ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

Ρύθμιση της έκφρασης και σχέσεις δομής-λειτουργίας μεταφορέων πουρινών

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΡΗΣΤΟΣ ΓΟΥΡΝΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

Εικόνα εξωφύλλου: Το φαινόμενο της *in trans* ενδοκύτωσης ανενεργού UapA-GFP μεταφορέα (πράσινο), δεν οδηγεί πλήρως σε στόχευση και αποικοδόμηση στο χυμοτόπιο, όπως φαίνεται με ταυτόχρονη χρώση των μεμβρανών με FM4-64 (κόκκινο) και των χυμοτοπίων με CMAC (μπλε). Επιπλέον δείχνεται η συγχώνευση των τριών φωτογραφιών (κάτω δεξιά), η οποία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ImageJ. Το πείραμα περιγράφεται στην παράγραφο 8.9 και αντιστοιχεί στην εικόνα 8.37.

NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
FACULTY OF BIOLOGY – DEPARTMENT OF BOTANY

Regulation of expression and structure-function relationships of purine transporters

Ph. D THESIS

CHRISTOS GOURNAS
BIOLOGIST

ATHENS 2011

Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Γ. Διαλλινάς, Αναπληρωτής Καθηγητής (επιβλέπων)
2. Α. Καραγκούνη, Καθηγήτρια
3. Α. Οικονόμου, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εξεταστική Επιτροπή:

1. Χ. Δελιδάκης, Καθηγητής Παν. Κρήτης
2. Α. Καραγκούνη, Καθηγήτρια
3. Β. Σοφιανοπούλου, Κύρια Ερευνήτρια Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος
4. Α. Οικονόμου, Καθηγητής Παν. Κρήτης
5. Γ. Διαλλινάς, Αναπληρωτής Καθηγητής
6. Σ. Ευθυμιόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής
7. Σ. Χριστοφορίδης, Επικ. Καθηγητής Παν. Ιωαννίνων

“Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα”

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Οφείλω να ομολογήσω πως τα όνειρα που είχα για επιστημονική καριέρα όταν βρέθηκα στο Βιολογικό της Αθήνας είχαν εξανεμισθεί φθάνοντας στον τέταρτο χρόνο της προπτυχιακής μου φοίτησης. Τι έγινε και σήμερα κρατάτε μια διατριβή με το όνομα μου; Γνώρισα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γιώργο Διαλλινά, στου οποίου το εργαστήριο εκπόνησα τη Διπλωματική μου Εργασία. Αυτός μου γνώρισε το συναρπαστικό κόσμο της βιολογικής έρευνας. Μου μετέδωσε τον ενθουσιασμό του και με την αμεσότητα με την οποία με αντιμετώπιζε, με έκανε πολύ σύντομα να νιώθω στο εργαστήριο και στην έρευνα τόσο άνετα όσο στο σπίτι μου. Ο ρομαντισμός με τον οποίο βλέπει και περιγράφει τη νέα γνώση είναι τεράστιο κίνητρο για να περιμένεις το αποτέλεσμα ενός πειράματος πάνω από τον μετρητή, απολαμβάνοντας τη στιγμή και την καθημερινότητα χωρίς το άγχος των απαιτήσεων. Ταυτόχρονα όμως, έχει την ικανότητα να αντιμετωπίζει με νοοτροπία αυστηρού επαγγελματία τα ερωτήματα που προκύπτουν, και είναι ικανός να σε καθοδηγεί εποικοδομητικά στον εκάστοτε στόχο. Η αλληλεπίδρασή μας δεν έμεινε μόνο στο επιστημονικό κομμάτι, και θεωρώ πως έγινα καλύτερος άνθρωπος μέσα αυτή τη γνωριμία και σχέση. Γιώργο, σε ευχαριστώ για αυτά τα πολύ όμορφα και ξέγνοιαστα στην πλειοψηφία τους χρόνια, σε ευχαριστώ που μου έδειξες έναν άλλο τρόπο σκέψης, νέα μέρη και κουλτούρες, που μου γνώρισες σημαντικούς ανθρώπους, που ασχολήθηκες, που νοιάστηκες και συνεχίζεις να νοιάζεσαι και σου εύχομαι ό,τι καλύτερο στην ζωή σου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου Συμβουλευτικής της Διδακτορικής Διατριβής Επιτροπής, την Καθηγήτρια κ. Αμαλία Καραγκούνη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αναστάσιο Οικονόμου για την στήριξή τους σε κάθε ζήτημα που προέκυπτε, το ενδιαφέρον και την κατανόησή τους. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την κυρία Καραγκούνη για την πολύ καλή συνύπαρξη και συνεργασία μας στο χώρο τον εργαστηρίων Μικροβιολογίας, του οποίου η τάξη και οργάνωση οφείλονται σε πολύ μεγάλο βαθμό σε δικές της προσπάθειες.

Επιπλέον ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της Διατριβής μου, τον Καθηγητή κ. Χ. Δελιδάκη, την Κύρια Ερευνήτρια κ Βίκυ Σοφιανοπούλου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σ. Ευθυμιόπουλο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σ. Χριστοφορίδη, που δέχθηκαν να κρίνουν τη διατριβή μου.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την Κύρια Ερευνήτρια του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος Δρ. Βίκυ Σοφιανοπούλου, για την άψογη φιλοξενία στο εργαστήριό της, την εποικοδομητική συνεργασία μας, την όμορφη εργαστηριακή ατμόσφαιρα και την εμπιστοσύνη της.

Επίσης ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτρη Χατζηνικολάου για τη βοήθειά του με τις μετρήσεις HPLC αλλά και σε πολλά επίπεδα, όπως και για την καθημερινή αλληλεπίδραση και κουβέντα.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω ανθρώπους με τους οποίους συνυπήρξαμε και συνεργαστήκαμε αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο. Πρώτα απ' όλα, τον, πανταχού παρόντα, Δρ. Σωτήρη Αμίλλη, ο οποίος είναι εκεί για όλους και για τα πάντα. Θέλω να τον ευχαριστήσω για την άψογη συνεργασία μας και τον ενθουσιασμό που μου μετέδιδε, κυρίως όμως για την παρέα του, την κουβέντα, την υποστήριξη του, το ενδιαφέρον, τις συμβουλές του, τη φιλία του. Σωτήρη, ευχαριστώ για όλα.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω επίσης την Δρ. Άννα Βλαντή, για την επίσης άψογη συνεργασία που είχαμε, για τον τρόπο που είχε να επαναφέρει στη λογική την επιστημονική μου φαντασία, για την υπομονή της στις «ατέρμονες συζητήσεις πάνω στα επιστημονικά πειράματα», την παρέα, τη φιλία της και την ψυχολογική της υποστήριξη. Άννα, το εργαστήριο δεν ήταν ποτέ το ίδιο από τότε που έφυγες.

Η άψογη συνεργασία που είχαμε με το Σωτήρη και την Άννα ήταν καθοριστικός παράγοντας για την πραγματοποίηση σημαντικού μέρους της δουλειάς που σχετίζεται με τη διατριβή αυτή, και των οποίων η συνεισφορά, αν και αναφέρεται μέσα στο κείμενο, σαφώς δεν περιορίζεται μόνο σε πειράματα.

Ένας ακόμη άνθρωπος που θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα είναι ο Δρ. Γιάννης Παπαγεωργίου, με τον οποίο συνεργασθήκαμε άψογα κατά το χρονικό διάστημα που δουλέψαμε μαζί. Γιάννη, σε ευχαριστώ για την παρέα, τη φιλία, τις συμβουλές, το γεγονός πως πολλές από τις ατελείωτες ώρες που δουλεύαμε μαζί στο εργαστήριο ήταν πολύ πιο ευχάριστες.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω νεότερα μέλη του εργαστηρίου, και συγκεκριμένα την υποψήφια διδάκτορα Βάσω Κωστή, για την πολύ καλή συνεργασία και παρέα που είχαμε στο εργαστήριο, και την υποψήφια διδάκτορα Μάγια Καραχάλιου για τη συνεργασία μας. Εύχομαι και στις δύο ό,τι καλύτερο στη συνέχιση της εκπόνησης της διδακτορικής τους διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Κατερίνα Ρουμελιώτη, για τη φιλοξενία της στο εργαστήριο της Δρ. Βίκυς Σοφιανοπούλου, την πάντα χαμογελαστή βοήθειά της και την φιλία που έχουμε από τα πρώτα προπτυχιακά μας χρόνια.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω για την καλή συνεργασία μας και τη συμβολή τους στο όμορφο εργαστηριακό, αλλά και εξωεργαστηριακό, κλίμα όλους τους διπλωματικούς φοιτητές που πέρασαν από το εργαστήριο αυτά τα χρόνια, τους Φοίβο Μπορμπόλη, Βάσω Ταρασλιά, Μαρία Γαληνού, Αντρέα Παυλίδη, Βασιλική Πανταζοπούλου, Αιμιλία Κρυπωτού και Βασίλη Γιαλελή. Ιδιαίτερα, τους Φοίβο και Αντρέα για την πολύ καλή συνεργασία και παρέα και την Αιμιλία για τον πολυδιάστατο ρόλο που έχει εδώ και λίγο καιρό αρχίσει να αναλαμβάνει στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ επίσης για τη συνεργασία και τις πολύ καλές σχέσεις τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας, και ιδιαίτερα τους Δρ. Ευστάθιο Κατσίφα, Δρ. Αλέξανδρο Σαββίδη, Δρ. Δέσποινα Λυμπεροπούλου, Δρ. Γιώργο Ανασοτζή, και τις υποψήφιες διδάκτορες Παναγιώτα Σταθοπούλου και Κική Κανινή, στις οποίες εύχομαι τα καλύτερα στη συνέχεια της εκπόνησης της διδακτορικής τους διατριβής.

Παράληψη θα ήταν να μην ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Αποστολάκο για την πολύ καλή συνεργασία στη λειτουργία και διαχείριση του μικροσκοπίου επιφθορισμού, καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου του, Δρ. Ελένη Γιαννούτσου και τον υποψήφιο διδάκτορα Παντελή Λιβανό, στον οποίο εύχομαι καλή συνέχεια στην εκπόνηση της διδακτορικής τους διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γιώργο Ζαχαριουδάκη, για τις διαφορετικές οπτικές γωνίες που μου έδειξε, τις συζητήσεις μας, την παρέα και την παρουσία του στο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Γιάννη Παπαϊωάννου για τη συνεργασία, την παρέα και το ενδιαφέρον του και να του ευχηθώ ότι καλύτερο στη συνέχιση της εκπόνησης της διδακτορικής του διατριβής.

Ήταν πολύ μεγάλη μου τιμή να γνωρίσω και να συνεργασθώ με τον καθηγητή Claudio Scazzocchio. Η αλληλεπίδραση με έναν τόσο μεγάλων διαστάσεων δάσκαλο γνώσεων, τρόπου σκέψης και αντίληψης, αλλά και ήθους και τρόπου ζωής ήταν για μένα ανεκτίμητη. Ο ενθουσιασμός, η ζωντάνια που μεταδίδει και η απίστευτη πνευματική του οξύτητα σε συνδυασμό με την απλότητα και την αμεσότητά του είναι μαθήματα όχι μόνο Βιολογίας αλλά ζωής. Νιώθω τυχερός που τον έχω γνωρίσει.

Πολύ σημαντική για την εκπόνηση αυτής της Διδακτορικής Διατριβής ήταν η Υποτροφία την οποία έλαβα από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) και το οποίο ευχαριστώ θερμά για τη συνέπεια και την υποστήριξή του.

Οι άνθρωποι που μας περιβάλλουν καθορίζουν και το ποίοι είμαστε τελικά, δεν θα μπορούσα λοιπόν να μην ευχαριστήσω τους αληθινούς, ανεκτίμητους, παιδικούς μου φίλους Βάσω Πλακιά, Σωτήρη Χριστοδούλου, Μάνο Καψούλιο και Κώστα Σχίζα, για την υπομονή τους όταν δεν είχα χρόνο για αυτούς, την παρουσία, τη στήριξη και τις συμβουλές τους σε εύκολες και δύσκολες συνθήκες.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη μητέρα μου Ευαγγελία και τον αδελφό μου Ευτύχιο για την στήριξη σε όλα τα επίπεδα και τις θυσίες τους. Το διδακτορικό είναι εν μέρει και δικό σας, σας ευχαριστώ.

Αφιερωμένο στη μνήμη του πατέρα μου….
και στη μικρή μου βαφτιστήρα.

Περίληψη της Διδακτορικής Διατριβής

Η παρούσα διατριβή είχε ως σκοπό τη διερεύνηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας και του μηχανισμού μετα-μεταφραστικής ρύθμισης της έκφρασης του UapA μεταφορέα ουρικού οξέος-ξανθίνης του *Aspergillus nidulans,* πρότυπου μέλους της οικογένειας μεταφορέων Νουκλεοτιδικών βάσεων-Ασκορβικού οξέος (Nucleobase-Ascorbate Transporters, NAT).

Για την περαιτέρω διερεύνηση και καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας του UapA, μελετήθηκε ο ρόλος τριών συντηρημένων πολικών αμινοξικών καταλοίπων, των Glu356, Gln382 και Lys439. Τα κατάλοιπα αυτά υποκαταστάθηκαν με *in vitro* στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση σε αμινοξικά κατάλοιπα με πλευρικές ομάδες α) παρόμοιου δομικού ή β) λειτουργικού χαρακτήρα, και γ) ουδέτερου χαρακτήρα ως προς το φορτίο ή την ικανότητα αλληλεπίδρασης. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν υποκαταστάσεις σε αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις συγκεκριμένες θέσεις των πρωτοταγών αλληλουχιών άλλων μεταφορέων της οικογένειας NAT με γνωστή λειτουργία. Τα μεταλλαγμένα αλλήλια μελετήθηκαν εκτεταμένα με δοκιμασίες ανάπτυξης, μικροσκοπία επιφθορισμού και μελέτες πρόσληψης ραδιοσημασμένου υποστρώματος για τον καθορισμό των αλλαγών της λειτουργίας και κινητικής τους συμπεριφοράς. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν υποδηλώνουν πως τα Gln382 και Lys439 δεν είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του μεταφορέα αφού δεν συμμετέχουν σημαντικά στον καθορισμό των κινητικών του χαρακτηριστικών. Το Glu356, απολύτως συντηρημένο στην οικογένεια, είναι απολύτως απαραίτητο για την ικανοποιητική ταχύτητα μεταφοράς των υποστρωμάτων, ενώ φαίνεται να συμμετέχει, άμεσα ή έμμεσα, στη δέσμευση των υποστρωμάτων και σε λειτουργικές αλληλεπιδράσεις κατά την ολοκλήρωση του κύκλου μεταφοράς.

Όσον αφορά τη μετα-μεταφραστική ρύθμιση του μεταφορέα, μελετήθηκαν το φαινόμενο της αρνητικής του ρύθμισης από τα υποστρώματά του και ο μηχανισμός ενδοκύτωσής του μέσω ουβικουιτινυλίωσης. Πιο συγκεκριμένα, δείχθηκε πως ο UapA, κατά την προσθήκη υποστρωμάτων του στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ενδοκυτώνεται από την πλασματική μεμβράνη του μύκητα μέσω διαλογής στα ενδοσώματα και τελικά οδηγείται στο χυμοτόπιο προς αποικοδόμηση. Χρήση αναλόγων υποστρώματος και μεταλλαγμένων αλληλίων πλήρους απώλειας

λειτουργίας έδειξαν πως η ενδοκύτωση είναι απολύτως εξαρτώμενη της λειτουργίας του μεταφορέα. Απαραίτητη είναι αυτή καθαυτή η μεταφορά του υποστρώματος δια μέσου αυτού και όχι απλώς η δέσμευση αναλόγων υποστρωμάτων που δεν μεταφέρονται. Η χρήση στελεχών που φέρουν μεταλλαγές που επηρεάζουν τη λειτουργία του θετικού μεταγραφικού ρυθμιστή του μονοπατιού καταβολισμού πουρινών, UaY, έδειξε πως η μεταγραφική αυτή επαγωγή δεν σχετίζεται με την ενδοκύτωση από υπόστρωμα. Χρήση στελέχους που φέρει μεταλλαγή πλήρους απώλειας λειτουργίας της ουρικάσης έδειξε πως υψηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις ουρικού οξέος δεν αποτελούν σήμα για την ενδοκύτωση του UapA. Η συγκέντρωση του ουρικού οξέος στο συγκεκριμένο στέλεχος μετρήθηκε με χρήση HPLC να είναι 10 περίπου φορές μεγαλύτερη από αυτή στελέχους φυσικού τύπου και 20 φορές από την ελάχιστη που είναι ικανή να προκαλέσει ενδοκύτωση όταν παρασχεθεί εξωκυτταρικά. Τέλος, η μελέτη της ενδοκύτωσης από υπόστρωμα μεταλλαγμένων μορφών του μεταφορέα με τροποποιημένη κινητική ή/και εξειδίκευση επιβεβαίωσε περαιτέρω την αναγκαιότητα μεταφοράς για την πρόκληση ενδοκύτωσης, ενώ έδωσε ενδείξεις πως το σήμα για την ενδοκύτωση προκαλείται από δυναμικές δομικές διαμορφώσεις του μεταφορέα κατά την ολοκλήρωση του κύκλου μεταφοράς.

Σχετικά με το μηχανισμό που πραγματοποιείται η ενδοκύτωση, μελετήθηκε η εμπλοκή της $HulA^{Rsp5}$ λιγάσης της ουβικουιτίνης. Πραγματοποιήθηκε απαλοιφή του γονιδίου της HulA, η οποία αποδείχθηκε θνησιγόνος, αλλά και αντικατάσταση του γονιδίου της από ένα που κωδικοποιεί για μια μορφή μειωμένης λειτουργίας της. Η μορφή αυτή (HulAΔC2) αφορά την απαλοιφή της C2 περιοχής της, η οποία έχει δειχθεί σε ομόλογά της σε άλλους οργανισμούς να απαραίτητη για την αλληλεπίδρασή της με φωσφολιπίδια της μεμβράνης και κατά συνέπεια για την ικανότητα ουβικουιτινυλίωσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Στο στέλεχος που φέρει την *hulaΔC2* μεταλλαγή ο UapA δείχθηκε να παραμένει στην πλασματική μεμβράνη, τόσο κατά την προσθήκη ουρικού οξέος, όσο και κατά την προσθήκη αμμωνιακών ιόντων, μια προτιμώμενη για το μύκητα πηγή αζώτου, προσθήκη της οποίας είχε δειχθεί παλαιότερα να οδηγεί το μεταφορέα προς αποικοδόμηση στο χυμοτόπιο. Η HulA δείχθηκε να ουβικουιτινυλιώνει το μεταφορέα στην Lys572, αφού κατέστη δυνατή η απομόνωση ζωνών μειωμένης κινητικότητας άμεσα εξαρτώμενων από την Lys572, οι οποίες απουσιάζουν επίσης σε στέλεχος HulAΔC2.

Η πρόκληση ενδοκύτωσης από υπόστρωμα δείχθηκε να είναι δυνατή και *in trans,* αφού ανενεργά μόρια UapA ενδοκυτώνονται από υπόστρωμα παρουσία ενός ενεργού, έστω με ανικανότητα ουβικουιτινυλίωσης μορίου. Η ενδοκύτωση αυτή δεν οδηγεί απαραίτητα σε αποικοδόμηση του μεταφορέα στο χυμοτόπιο και είναι επίσης εξαρτώμενη από ουβικουιτινυλίωση. Το φαινόμενο της *in trans* ενδοκύτωσης υποδεικνύει την εμπλοκή μιας διαδικασίας μεταγωγής σήματος κατά τη διαδικασία ενδοκύτωσης από υπόστρωμα, ή τη χωροθετική σύναξη των μορίων του UapA σε μεμβρανικές υποδομές, ή τον ομοδιμερισμό-ομοπολυμερισμό τους. Για τη μελέτη της πιθανότητας χωροθετικής σύναξης των μορίων του UapA σε δομές υποοργάνωσης της πλασματικής μεμβράνης, μελετήθηκε η πιθανότητα εντοπισμού του μεταφορέα σε γνωστές τέτοιες περιπτώσεις, όπως τα εισοσώματα, παρόλο που ο ομοιόμορφος εντοπισμός του μεταφορέα στην πλασματική μεμβράνη δεν υποστήριζε κάτι τέτοιο. Αντίστοιχα ομοιόμορφη όμως φάνηκε να είναι και η κατανομή της εργοστερόλης της πλασματικής μεμβράνης του μύκητα, μετά από χρώση με *filipin*. Έτσι, μελετήθηκε η ικανότητα εκχύλισης μορίων UapA από την πλασματική μεμβράνη παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων μη-ιονικών τασιενεργών και βρέθηκε πως ο UapA δε τοποθετείται σε περιοχές της μεμβράνης με ιδιαίτερη σύσταση ως προς τη συγκέντρωση εργοστερόλης.

Από στη συγκεκριμένη εργασία τέθηκαν οι βάσεις για την πληρέστερη κατανόηση της ρυθμιζόμενης διακίνησης του UapA. Η εμπλοκή της HulA υποδεικνύει πως το είδος και ο υποκυτταρικός τόπος της ουβικουιτινυλίωσης πιθανώς ρυθμίζουν τη στόχευση του μεταφορέα. Επιπλέον αναγκαία φαίνεται η ύπαρξη πρωτεϊνών προσαρμοστών μεταξύ του UapA και της HulA, μιας και ο UapA, όπως όλοι οι μέχρι στιγμής μελετημένοι μεταφορείς, δεν διαθέτει γνωστές αλληλουχίες αναγνώρισης από την HulA. Το γεγονός πως διακριτά σήματα ενδοκύτωσης συγκλίνουν σε ουβικουιτινυλίωση από την ίδια λιγάση προτείνει την εμπλοκή διαφορετικών προσαρμοστικών μορίων. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του μεταφορέα με τα μόρια-προσαρμοστές θα ήταν καινοτόμος. Τέλος, το φαινόμενο της *in trans* ενδοκύτωσης αφήνει ανοικτό το ενδεχόμενο πολυμερισμού του UapA και της πιθανής εμπλοκής της κατάστασης πολυμερισμού του στην υποκυτταρική του στόχευση.

Summary of Ph.D Thesis

The present Thesis's initiative was the investigation of structure-function relationships and the post-tranlational regulation of exression of the UapA uric acid-xanthine transporter of *Aspergillus nidulans*, the prototypic member of the NAT family of Nucleobase-Ascorbate Transporters.

In order to further investigate and better understand the translocation mechanism of UapA, the role of three conserved polar amino acid residues, Glu356, Gln382 and Lys439, was studied. These residues were substituted, using *in vitro* site-directed mutagenesis, by other residues of similar a) structural or b) functional character, and c) of non-polar nature. In addition, more substitutions were made having in mind amino acid residues of the same position on other NAT members of known function. Mutant proteins were extensively studied using physiological growth tests, epifluoresence microscopy and radiolabelled substrate uptake measurements, in order to evaluate changes in their kinetic profile. The results imply that Q382 and Lys439 are not important for the function of UapA, since they do not contribute consideralby in the determination of the transporter's kinetic characteristics. Glu356, absolutely conserved in the NAT family, is absolutely necessary for the translocation of the substrate and seems to contribute, directly or indirectly, to the binding of the substrate via functional interactions during the transport cycle.

On the post-transcriptional regulation of the transporter, the UapA downregulation phenomenon by its substrates and the mechanism of its endocytosis by ubiquitination were studied. In patricular, it was shown that UapA, in the presence of its substates, is endocytosed from the plasma membrane, sorted into endosomes and targered for degradation in the vacuole. The use of substrate analogues and loss of function UapA mutants showed that substrate-induced endocytosis is absolutely dependent on the functionality of the transporter. Substrate binding is not enough to cause endocytosis, as translocation through UapA is required. The use of mutant strains in the UaY purine pathway-specific positive transcriptional regulator showed that transcriptional induction is not connected with substrate-induced endocytosis. High cytoplasmic concentrations of uric acid do not consitute a signal for endocytosis as well, as UapA plasma membrane localisation is unaffected in a loss of function mutant of the uricase, thas has elevated uric acid concentration. Concetration of uric

acid in this strain, measured by HPLC, is 10-fold increased compared to the wild type and 20 fold the minimum required to elicit substrate-induced endocytosis. Finally, the use of UapA isoforms with altered kinetic and/or specificity further confirmed that substrate translocation is necessary for endocytosis, and provided evidence that the signal for endocytosis is generated by subtle structural conformations of the transporter during the completation of the transport cycle.

In regard to the mechanism that endocytosis is achieved, the contribution of the $HulA^{Rsp5}$ ubiquitin ligase was studied. Deletion of *hulA* was lethal, and its replacement by a mutant isoform was carried out. This isoform (HulAΔC2) lacks the C2 domain, responsible for the interaction with phospholipids, and has been shown in other organisms to be defficient for transporter endocytosis. In the *hulaΔC2* strain, UapA is stabilised at the plasma membrane during substrate or ammonium addition. Ammonium is a preferable nitrogen source and its addition was previouly shown to cause UapA downregulation and degradation in the vacuole. Moreover, HulA was shown to ubiquitinate UapA in Lys572, as seen in Western expreriments by lower mobility UapA bands, absolutely dependent on HulA and Lys572.

Substrate-induced endocytosis was also shown to occur *in trans*, as inactive UapA molecules can be endocytosed in the simultaneous presence of active UapA molecules, even if the latter cannot be endocytosed themselves. This *in trans* endocytosis does not necessarily lead to vacuolar degradation and is also dependent on ubiquitination. This phenomenon proposes the involvent of a signal transduction pathway or the organization of UapA molecules in plasma membrane microdomains, or even their homo-oligomerization. Filipin staining of ergosterol-rich membrane compartments and detergent-dependent extraction of UapA molecules, however, showed that UapA is not locasised in known plasma membrane microdomains, like MCC or eisosomes.

This work forms the basis for the further understanding of UapA regulated trafficking. The involvment of HulA suggests that the type and intracellular locus of ubiquitination possibly regulate the transporter's sorting. In addition, the involvement of ubiquitin ligase adaptors is evident, since UapA, like most transporters studied, does not possess any known motives for the direct interaction with HulA. The fact that distinct endocytic signals converge to the same ligase suggests the involvement of different adaptor molecules. Finally, the *in trans* endocytosis phenomenon means that

there is a possibility of UapA oligomerization. The state of this possible oligomerization could participate in the intracellular trafficking of the transporter.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή

1. Το πρότυπο σύστημα του *Aspergillus nidulans*....3
1.1. Συστηματική κατάταξη....3
1.2. Κύκλος ζωής του *A. nidulans*....5
1.2.1 Αγενής κύκλος....6
1.2.2 Εγγενής κύκλος....10
1.2.3 Παραφυλετικός κύκλος....11
1.3 Χαρακτηριστικά του *A.nidulans*....12
1.4. Η συνεισφορά του *A. nidulans* στη βιολογική έρευνα....14
1.4.1. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου....15
1.4.2. Εγκαθίδρυση και καθιέρωση πολικότητας στους νηματοειδείς μύκητες....17
1.4.3. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης....21
1.4.3.1. Ικανότητα καταβολισμού πηγών άνθρακα και αζώτου....21
1.4.3.2. Ρύθμιση της μεταγραφής ως απόκριση στο εξωτερικό pH....26
1.4.3.3. Ρύθμιση του δευτερογενούς μεταβολισμού....28

2. Πλασματική μεμβράνη-μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφορείς....33
2.1. Η δομή της πλασματικής μεμβράνης....33
2.2. Εκλεκτική διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης....36
2.2.1. Οι μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς....36
2.2.2. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφορείς....37
2.3. Η σημασία των μεταφορέων....40
2.4. Μεταφορείς πουρινών....41
2.4.1. Η οικογένεια NAT ή NCS2....42
2.4.2. Η οικογένεια που ορίζεται από τον AzgA....42
2.4.3. Η οικογένεια PRT ή NCS1....43
2.4.4. Η οικογένεια ENT....46
2.4.5. Η οικογένεια CNT....48
2.4.6. Η οικογένεια PUP....49
2.4.7. Η οικογένεια UPS....49

3. Η NAT/NCS2 οικογένεια μεταφορέων....51
3.1. Οι εξελικτικές σχέσεις των NAT....54
3.2. Ο ρόλος των NAT στη Φυσιολογία των οργανισμών....56
3.2.1. Οι NAT ως προμηθευτές πηγών αζώτου, στην πρόσληψη νουκλεοτιδικών βάσεων και στην αναδιανομή μεταβολιτών....56
3.2.2 Το μονοπάτι καταβολισμού πουρινών του *A. nidulans*....58
3.2.3 Πιθανός αντι-οξειδωτικός ρόλος του ουρικού οξέος....62
3.2.4 Οι NAT ως απαραίτητοι μεταφορείς ασκορβικού οξέος στην ανάπτυξη των θηλαστικών....64
3.3. Ρύθμιση της έκφρασης των NAT....65
3.3.1. Μεταγραφική ρύθμιση των *uapA* και *uapC*....65
3.3.2. Μετα-μεταφραστική ρύθμιση των NAT....68
3.3.2.1. Μετα-μεταφραστική ρύθμιση των SVCT....68
3.4. Σχέσεις δομή-λειτουργίας των NAT....70
3.4.1. Μικροβιακά πρότυπα συστήματα....70

3.4.2. Σχέσεις δομής-λειτουργίας στους SVCT.....77
3.5. Μοντέλα αλληπεπίδρασης των NAT με τα υποστρώματά τους.....79
3.5.1. NAT μεταφορείς πουρινών.....79
3.5.2. NAT μεταφορείς ασκορβικού οξέος.....82

4. Στόχευση και διακίνηση μεμβρανικών πρωτεϊνών.....83
4.1. Μεταφορά πρωτεϊνών από το Golgi σε άλλες μεμβράνες – το μονοπάτι κυστιδιακής μεταφοράς.....84
4.1.1. Τα δομικά μόρια σχηματισμού των κυστιδίων.....86
4.1.2. Εκβλάστηση των κυστιδίων.....90
4.1.3. Μεμβρανική ταυτότητα-σύντηξη κυστιδίων.....92
4.1.4. Σχηματισμός των MVBs.....97
4.2. Ο ρόλος της ενδοκύτωσης στην πολική αύξηση του *A. nidulans*.....99
4.3. Διαλογή, στόχευση και ελεγχόμενη διακίνηση μεταφορέων.....103
4.3.1 Υποκυτταρική έκφραση και μετα-μεταφραστική ρύθμιση μεταφορέων του *A. nidulans*.....104
4.3.2 Ουβικουιτινυλίωση.....106
4.3.2.1 Το μόριο της ουβικουιτίνης.....106
4.3.2.2 Η Rsp5p λιγάση της ουβικουιτίνης.....107
4.3.2.3 Είδη ουβικουιτινυλίωσης.....107
4.3.2.4. Η ουβικουιτινυλίωση ως σήμα διαλογής.....109
4.3.2.5. Οι πρωτεΐνες-προσαρμοστές της Rsp5p.....112
4.3.3. Μεμβρανικές μικροδομές ειδικής λιπιδικής σύστασης.....118

5. Οριοθέτηση στόχων της Διδακτορικής Διατριβής.....121
5.1. Μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας του UapA.....123
5.2. Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του UapA.....125
5.3. Τεχνικές και μέθοδοι.....128

6. Υλικά και Μεθοδολογία.....129
6.1. Στελέχη μυκήτων.....131
6.2. Ολιγονουκλεοτίδια- PCR Εκκινητές.....133
6.3. Θρεπτικά υποστρώματα μυκήτων.....135
6.4. Συντήρηση των στελεχών του *A. nidulans*.....137
6.5. Διασταυρώσεις στελεχών και ανάλυσή τους.....137
6.6. Θρεπτικά υποστρώματα βακτηρίων.....139
6.7. Βακτήρια δέκτες πλασμιδίων και η προετοιμασία τους.....140
6.8. Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*.....140
6.9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα.....141
6.10. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το μύκητα *Aspergillus nidulanς*.....142
6.11. Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες – Κλωνοποίηση.....142
6.11.1. Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....143
6.11.2. Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....143
6.11.3. Κατασκευή της αλληλουχίας ενσωμάτωσης του *uapA-gfp* ORF στο γονιδιακό τόπο του *uapA*.....144
6.11.4. Κατασκευή της αλληλουχίας απαλοιφής του *hulA*.....144
6.11.5. Κατασκευή της *hulAΔC2*.....144
6.11.6. Κατασκευή τω περικομμένων μορφών του καρβοξυτελικού άκρου του UapA.....145
6.11.7. Κατασκευή του πλασμιδίου έκφρασης του *uapA-gfp* υπό τον έλεγχο του $alcA_p$ υποκινητή.....145

6.11.8. Κατασκευή του pAN520exp-K572R....146
6.12. Κατευθυνόμενη *in vitro* PCR μεταλλαξιγένεση....146
6.12.1. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή στοχευόμενων μεταλλαγών....146
6.12.2. Σύσταση της αντίδρασης PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης....147
6.13. Γενετικός μετασχηματισμός στελεχών του *Aspergillus nidulans*....149
6.14. Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA του *Aspergillus nidulans*....150
6.14.1. Πέψη του γονιδιωματικού DNA και διαχωρισμός των ζωνών σε πήκτωμα αγαρόζης 151
6.14.2. Μεταφορά του DNA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης....151
6.14.3. Προϋβριδισμός - Κατασκευή ραδιοσημασμένου ανιχνευτή με ^{32}P-[^{a}dCTP]-Υβριδισμός....152
6.14.4. Εκπλύσεις της μεμβράνης-Εμφάνιση....154
6.15. Πρωτόκολλο απομόνωσης και ανάλυσης RNA....155
6.15.1. Απομόνωση Ολικού RNA από τον *A. nidulans*....155
6.15.2. Προσδιορισμός της Συγκέντρωσης του RNA....155
6.15.3. Ανάλυση Northern....155
6.16. Μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένων ουσιών και η κινητική τους....156
6.16.1. Προετοιμασία κονιδίων του *A. nidulans*....156
6.16.2. Προσθήκη της ραδιοσημασμένης ουσίας....157
6.17 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών....158
6.17.1 Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών....159
6.17.2 Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών για την ανίχνευση ουβικουιτινυλιωμένων μορφών του UapA....160
6.17.3 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών....161
6.17.4 Καθορισμός της ικανότητας εκχύλισης του UapA από τις λιπιδικές μεμβράνες με χρήση Triton-X-100....162
6.17.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο της Bradford....162
6.17.6 SDS-GAGE....163
6.17.7 Χρώση με διάλυμα χρωστικής coomasie....164
6.17.8 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF....164
6.17.9 Χρώση των δεσμευμένων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πρωτεϊνών με Ponceau S....165
6.17.10 Ανοσοαποτύπωμα και Χημειοφθορισμός....165
6.18 Μικροσκοπία επιφθορισμού....166
6.19 Προσδιορισμός της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ουρικού οξέος με χρήση HPLC....167

Αποτελέσματα και Συζήτηση

7. Μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας του UapA....171
7.1. Κατασκευή, μετασχηματισμός και ανάλυση του φαινοτύπου των νέων αλληλίων....171
7.2. Κινητική της πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης....174
7.3. Περαιτέρω ανάλυση του ρόλου του Glu356....178
8. Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του UapA....185
8.1. Το ουρικό οξύ προκαλεί αποικοδόμηση του UapA στο χυμοτόπιο μέσω απομάκρυνσης από την πλασματική μεμβράνη και διαλογής στα ενδοσώματα....185
8.2. Η ενσωμάτωση του *uapA-gfp* στο γονιδιωματικό τόπο του *uapA*....188
8.3. Η αποικοδόμηση του UapA προκαλείται ειδικά από τα υποστρώματά του ανεξάρτητα από τη μεταβολική τους πορεία....190
8.4. Η επαγόμενη από το υπόστρωμα αποικοδόμηση του μεταφορέα είναι ανεξάρτητη από τη μεταγραφή του....192

8.5. Η επαγόμενη από το υπόστρωμα αποικοδόμηση του UapA εξαρτάται από τη λειτουργία του.....194
8.6. Μεταλλαγές του UapA οι οποίες έχουν τροποποιημένη κινητική και εξειδίκευση δείχνουν διαφορετική ευαισθησία στην αποδόμηση από το υπόστρωμα.....196
8.7. Η Ενδοκύτωση και υποκυτταρική διαλογή του UapA εξαρτάται από την HulA^{Rsp5}, ένα κατάλοιπο λυσίνης στο καρβοξυτελικό άκρο του UapA και την ενεργό πρωτεϊνοσύνθεση.....199
8.7.1. Η HulA είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του *A. nidulans*, όχι όμως η C2 περιοχή της.....199
8.7.2. Η έκφραση των *hulA* και *hulAΔC2* είναι ισχυρή και ανεξάρτητη της χρησιμοποιούμενης πηγής αζώτου.....201
8.7.3. Η HulA είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωση του UapA.....202
8.7.4. Η Lys572 είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωση του UapA.....203
8.7.5. Η HulA ουβικουιτινυλιώνει τον UapA στην Lys572.....206
8.8. Η αποικοδόμηση του UapA πραγματοποιείται μέσω ενδοκύτωσης από την πλασματική μεμβράνη.....207
8.8.1. Η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου αναστέλλει την ενδοκύτωση του UapA.....208
8.8.2. Χρήση του *alcA$_p$* υποκινητή για την έκφραση του UapA.....210
8.9. Η ενδοκύτωση του UapA από το υπόστρωμά του μπορεί να πραγματοποιηθεί *in trans*.....213
8.10. Ο UapA δεν εντοπίζεται σε γνωστές δομές υποοργάνωσης της πλασματικής μεμβράνης.....217

9. Συμπεράσματα – Προοπτικές.....219
9.1. Σχέσεις δομής-λειτουργίας.....221
9.1.1. Η Gln382.....221
9.1.2. Η Lys439.....222
9.1.3. Το Glu356.....223
9.1.4. Η τρισδιάστατη δομή του UraA NAT μεταφορέα ουρακίλης.....228
9.1.5. Προοπτικές.....235
9.2. Ρύθμιση της έκφρασης.....236
9.2.1. Η ενδοκύτωση του UapA από υπόστρωμα εξαρτάται από την ενεργό μεταφορά του υποστρώματος.....236
9.2.2. Δυναμικές δομικές διαμορφώσεις του μεταφορέα κατά τη μεταφορά του υποστρώματος προωθούν την αποικοδόμησή του.....237
9.2.3. Η ενδοκύτωση του UapA πραγματοποιείται μέσω ουβιουιτινυλίωσης.....238
9.2.4. Η ενδοκύτωση από υπόστρωμα μπορεί να πραγματοποιηθεί και *in trans*.....239
9.2.5. Η HulA λιγάση της ουβικουιτίνης.....242
9.2.6. Προοπτικές.....243

10. Βιβλιογραφία

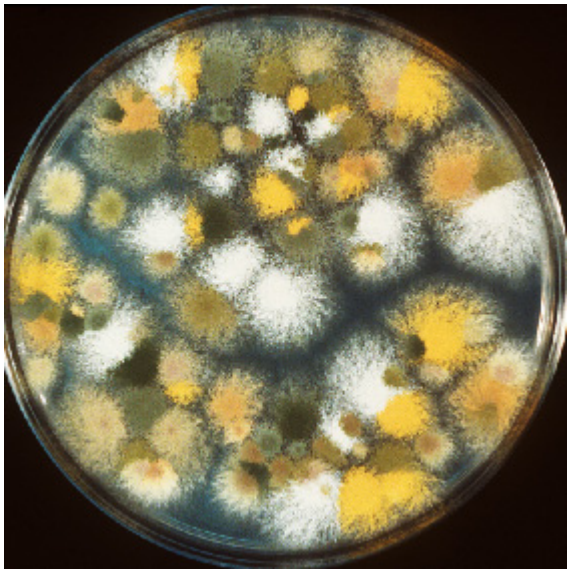
11. Παράρτημα Ι. Βιογραφικό σημείωμα του συγγραφέα

12. Παράρτημα ΙΙ. Δημοσιεύσεις σε διεθνή έγκριτα επιστημονικά περιοδικά

1-4. Εισαγωγή

1. Το πρότυπο σύστημα του *Aspergillus nidulans*

1.1. Συστηματική κατάταξη



Συστηματική κατάταξη

Βασίλειο: *Fungi*

Διαίρεση: *Ascomycota*

Υποδιαίρεση: *Pezizomycotina*

Κλάση: *Pezizomycetes*

Οικογένεια: *Trichocomaceae*

Γένος: *Emericella*

Εικόνα 1.1. Αποικίες στελεχών *A. nidulans* με διαφορετικά χρώματα κονιδιοσπορίων, σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, καθώς και η συστηματική του κατάταξη (http://www.fieldmuseum.org/myconet/outline.asp#classpeziz)

Ο *Aspergillus nidulans* αποτελεί χαρακτηριστικό νηματοειδή αντιπρόσωπο των ασκομυκήτων. Ταξινομικό χαρακτηριστικό τους αποτελεί η ύπαρξη του ασκού, ενός ειδικού τύπου σποριάγγειου που εσωκλείει τα προϊόντα της μείωσης. Με βάση τη μορφολογία του ασκού, η υποδιαίρεση περιλαμβάνει πέντε Κλάσεις (Ingold and Hudson, 1993). Στην Κλάση *Pezizomycetes* τα ασκοκάρπια είναι κλειστά και σχηματίζουν το κλειστοθήκιο, στον εγγενή κύκλο αναπαραγωγής τους.

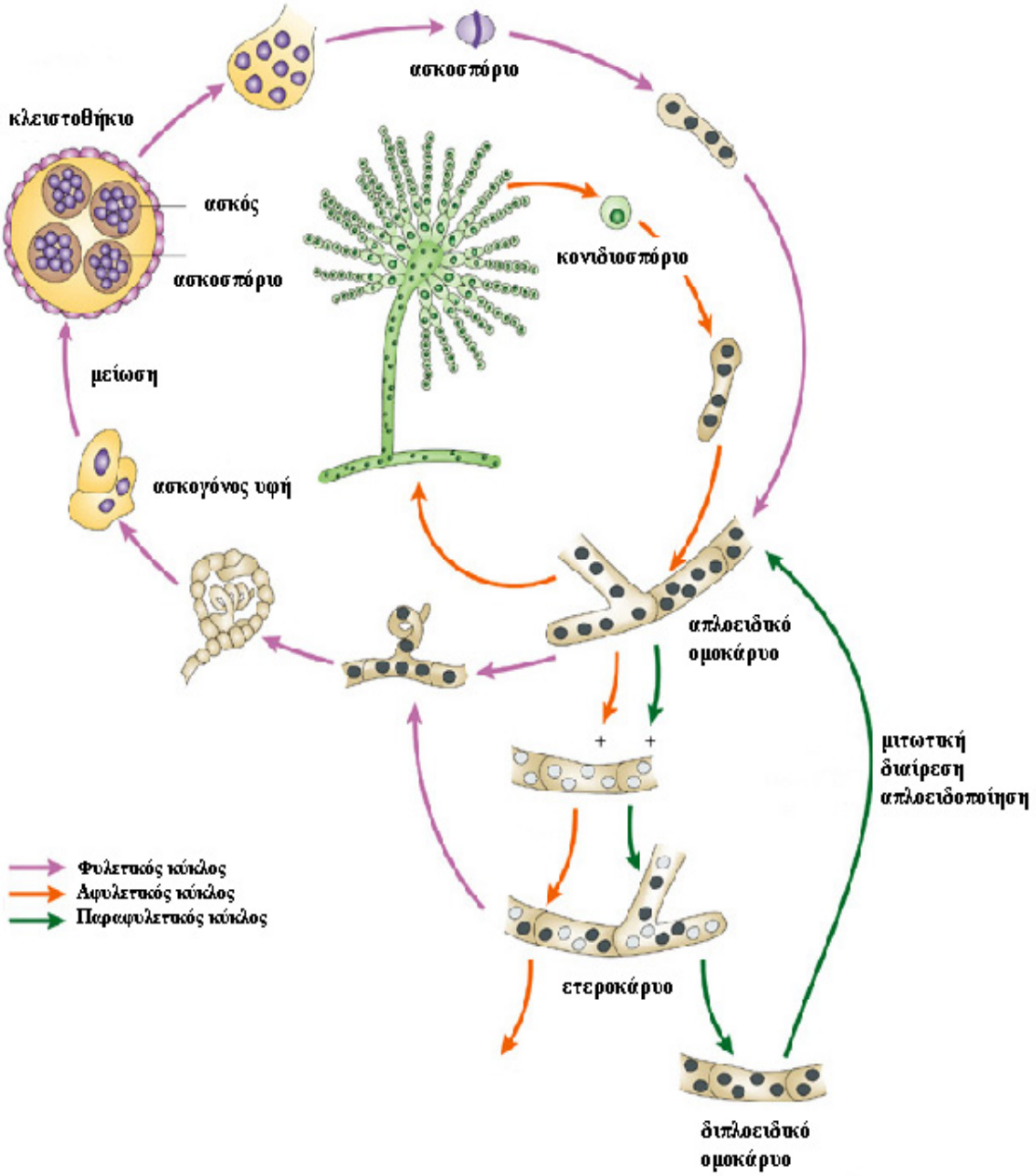
Στην υπόκλαση *Eurotiales* περιλαμβάνονται μύκητες με ευρύ ενζυμικό μεταβολικό ρεπερτόριο, συχνά πλούσιο και σε μεμονωμένα είδη. Από αυτούς, μέλη της οικογένειας *Trichocomaceae* παρουσιάζουν ευρεία εξάπλωση. Έτσι πολλοί έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή αντιβιοτικών (πενικιλίνη), στη βιομηχανία τροφίμων (*Penicillium roqueforti* και *P. camamberti* για την παραγωγή τυριών, προϊόντων σόγιας, το είδος *A. oryzae* για την παραγωγή του ποτού sake), όσο και στην παραγωγή οργανικών κιτρικών και γλουκονικών οξέων με παράδειγμα το είδος *A. niger* (Alexopoulos et al. 1996). Σημαντική είναι η χρήση πολλών ασκομυκήτων

στην έρευνα. Οι λόγοι της μελέτης τους ποικίλουν, αφού κάποιοι μελετώνται λόγω της σύνθεσης τοξινών (όπως των αφλατοξινών από τον *A. flavus* και των νευροτοξινών από τον *A. parasiticus*), άλλοι λόγω της μολυσματικής τους ικανότητας (όπως ασπεργίλλωση από τους *A. niger* και *A. fumigatus* σε άτομα με ανοσολογική καταστολή (Kirk et al. 2001)) ενώ άλλοι έχουν εγκαθιδρυθεί ως πρότυπα συστήματα-μοντέλα λόγω της ευκολίας χειρισμού τους (*A. nidulans , Neurospora crassa*).

Το όνομα του γένους *Aspergillus* προέρχεται από τον ιερέα και βοτανολόγο Pietro Antonio Micheli, οποίος το 1729 περιέγραψε τους κονιδιοφορείς πολλών κοινών μυκήτων (Scazzocchio 2009). Το σχήμα των αλυσίδων των κονιδιοσπορίων που εκτείνονται ακτινωτά από τον κονιδιοφορέα του θύμισε το *Aspergillum*, ένα ειδικό όργανο που χρησιμοποιείται στην Καθολική Εκκλησία για την ρίψη αγιασμού στα κεφάλια των πιστών. Η ταξινόμηση του *A. nidulans* στο φύλο των ασκομυκήτων έγινε με βάση το προϊόν της εγγενούς μειωτικής αναπαραγωγής, τον ασκό (παράγραφος 1.2.2). Ωστόσο, στα περισσότερα είδη Ασπέργιλλων δεν έχει παρατηρηθεί εγγενής αναπαραγωγή, γεγονός το οποίο δημιουργεί ένα σαφές ταξινομικό πρόβλημα. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος οι μυκητιολόγοι έχουν δημιουργήσει την ομάδα των Ατελών Μυκήτων ή Δευτερομυκήτων, όπου και τοποθετούνται όλοι οι μύκητες με άγνωστη εγγενή αναπαραγωγή. Το γεγονός αυτό προκαλεί την αλλαγή της συστηματικής κατάταξης οργανισμών των οποίων ευρίσκεται ο πλήρης κύκλος ζωής, με τη δημιουργία πολλές φορές νέων συστηματικών ταξινομήσεων. Έτσι, η ανακάλυψη του εγγενούς κύκλου αναπαραγωγής του *A. nidulans* οδήγησε στην τοποθέτησή του στο γένος *Emericella.* Το είδος *Emericella nidulans* αποτελεί το τελειομορφικό είδος του Ατελούς Μύκητα *Aspergillus nidulans* (αναμορφικού είδους). Η μέθοδος αυτή ταξινόμησης έχει τοποθετήσει σε ξεχωριστά γένη, είδη για τα οποία μοριακά και μορφολογικά δεδομένα υποστηρίζουν την στενή τους συγγένεια, όπως οι *Aspergillus nidulans* και *Aspergillus sydowii,* αλλά και γενικότερα τα είδη του γένους *Aspergillus* (Nierman et al. 2005, Scazzocchio 2006, Mabey Gilsenan et al. 2009). Για ιστορικούς λόγους, και επειδή στη βιβλιογραφία έχει επικρατήσει το όνομα *Aspergillus nidulans*, στη διατριβή αυτή θα χρησιμοποιηθεί αυτό, ως συνώνυμο του *Emericella nidulans*.

1.2. Κύκλος ζωής του *A. nidulans*

Ο *A. nidulans* διαθέτει πολύπλοκο κύκλο ζωής (Εικόνα 1.2), ο οποίος μπορεί να χωρισθεί σε τρεις επιμέρους κύκλους, τον φυλετικό ή εγγενή, τον αφυλετικό ή αγενή και τον παραφυλετικό κύκλο ζωής.

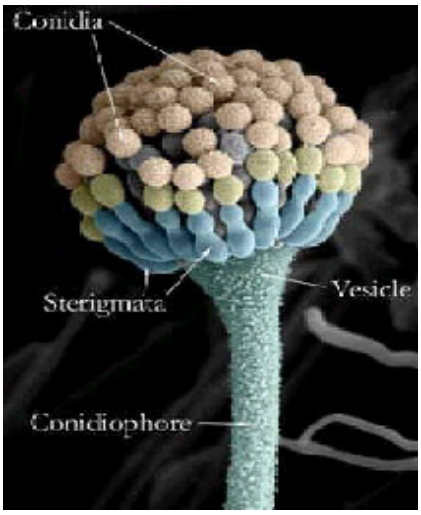


Εικόνα 1.2. Ο κύκλος ζωής του *Aspergillus nidulans*

Ως σημείο εκκίνησης των τριών κύκλων μπορεί να θεωρηθεί η εκβλάστηση αδρανών σπορίων, τα οποία μπορεί να έχουν προέλθει μιτωτικά (αγενή κονιδιοσπόρια) ή μειωτικά (εγγενή ασκοσπόρια). Τα σπόρια αυτά επάγονται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, εκβλαστάνουν, και μέσω επάκριας αύξησης επεκτείνονται σωληνοειδώς. Η αύξηση είναι επίσης διακλαδούμενη, δημιουργώντας ένα δίκτυο κυττάρων, που ονομάζεται μυκήλιο. Το μυκήλιο είναι ομοθαλλικό, αποτελείται δηλαδή από ισοδύναμα κύτταρα, τα οποία μακροσκοπικά μοιάζουν ως άμορφη μάζα. Σε υγρή καλλιέργεια, το μυκήλιο αυτό αυξάνεται έπ' αόριστον, ενώ σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα είναι δυνατή η ανάπτυξη διαφοροποιημένων εγγενών και αγενών αναπαραγωγικών δομών.

1.2.1. Αγενής κύκλος

Σε 16 ώρες από την εκβλάστηση, είναι ορατές μακροσκοπικά οι πρώτες διαφοροποιημένες υφές σε στερεό υπόστρωμα. Ο χρόνος εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης και την πυκνότητα των βιώσιμων μονάδων (Wu and Miller 1997). Στο κέντρο της αποικίας εμφανίζονται εναέριες υφές, οι οποίες διαθέτουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα και καλούνται μίσχοι. Το αρχικό σημείο διαφοροποίησης του μίσχου, το οποίο και τον στηρίζει, καλείται ποδικό κύτταρο. Οι μίσχοι δεν αυξάνουν πολύ σε μήκος (~100 μm) και δεν διακλαδίζονται, ενώ περιβάλλονται από διπλό κυτταρικό τοίχωμα. Αφού ολοκληρωθεί η αύξηση του μίσχου, το άκρο του διογκώνεται περίπου στο διπλάσιο (10 μm), σχηματίζοντας το κυστίδιο. Ποδικό κύτταρο, μίσχος και κυστίδιο δεν διαχωρίζονται με διαφράγματα και αποτελούν ένα μοναδικό κύτταρο με διπλό κυτταρικό τοίχωμα. Από την επιφάνεια του κυστιδίου εκβλαστάνει μια σειρά μονοπύρηνων κυττάρων, τα πρωτογενή στηρίγματα, ή απλώς στηρίγματα (μετούλες, metulae). Από αυτά εκβλαστάνει μια δεύτερη σειρά επίσης μονοπύρηνων κυττάρων, τα δευτερογενή στηρίγματα ή φιαλίδια. Κάθε κυστίδιο φέρει περίπου 60 στηρίγματα και κάθε στήριγμα 2-3 φιαλίδια. Από τα φιαλίδια, μιτωτικά παράγονται τα σφαιρικά μοποπύρηνα κονιδιοσπόρια. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα το σχηματισμό πανομοιότυπων σειρών κονιδιοσπορίων, με τέτοιο τρόπο ώστε το τελευταίο σχηματιζόμενο κονίδιο είναι αυτό που βρίσκεται προς το φιαλίδιο, ενώ το παλιότερο είναι το πιο απομακρυσμένο από αυτό (Εικόνα 1.3).

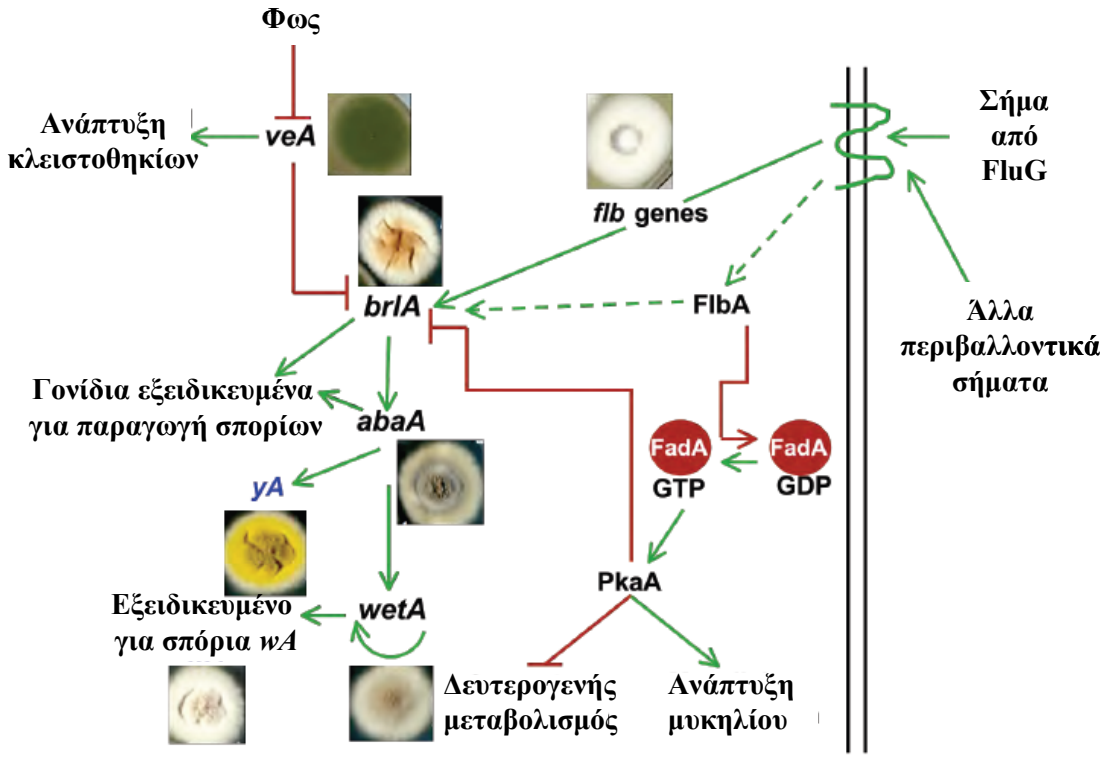


Εικόνα 1.3. Απεικόνιση κονιδιοφορέα του *A. nidulans* με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και ψευδοχρωματισμό.

Δεδομένου ότι κάθε φιαλίδιο μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μέχρι και 100 σπορίων, ο αριθμός των σπορίων του κάθε κονιδιοφορέα πιθανώς ξεπερνά τις 10.000. Μετά την αποκοπή τους, τα κονίδια ωριμάζουν περαιτέρω με την εναπόθεση δύο επιπλέον στρωμάτων κυτταρικού τοιχώματος.

Η ανάπτυξη του κονιδιοφορέα καθορίζεται από την αλληλεπίδραση προϊόντων συγκεκριμένων γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων. (Εικόνα 1.4) Κύριος ρυθμιστής της ανάπτυξης του κονιδιοφορέα φαίνεται να είναι ο μεταγραφικός παράγοντας BrlA (Griffith et al. 1999, Han and Adams 2001). Στελέχη που φέρουν μεταλλαγές του *brlA* εμφανίζουν μίσχους με ανικανότητα σχηματισμού κονιδιοφορέα. Ο BrlA είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με δομή δακτύλων ψευδαργύρου, ο οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή του *abaA* γονιδίου, το οποίο με τη σειρά του κωδικοποιεί για μεταγραφικό παράγοντα. Ο μεταγραφικός παράγοντας αυτός έχει ανάδρομη ρύθμιση πάνω στην έκφραση του *brlA* και καθορίζει την έκφραση του *wetA* (Sewall 1994). Μεταλλαγές του *abaA* (Sewall et al. 1990, Aramayo and Timberlake 1993, Andrianopoulos and Timberlake 1994) εμφανίζουν πολλαπλές διαδοχικές σειρές στηριγμάτων, οι οποίες δεν διαφοροποιούνται σε φιαλίδια ή κονιδιοσπόρια. Το προϊόν του *wetA* είναι πιθανώς κι αυτό μεταγραφικός παράγοντας, ενώ απώλεια λειτουργίας του προκαλεί αυτολυούμενα κονιδιοσπόρια . Η κατανομή των πρωτεϊνών BrlA και AbaA ρυθμίζεται, με άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο, από την StuA πρωτεΐνη (Miller et al. 1992). Μεταλλαγμένα αλλήλια της StuA δημιουργούν στελέχη με κοντούς κονιδιοφορείς στους οποίους τα κονίδια σχηματίζονται απευθείας από το κυστίδιο. Η χρονική έκφραση του *brlA* ρυθμίζεται από τον MedA μεταγραφικό παράγοντα (Clutterbuck 1990, Gems and Clutterbuck

1994). Μεταλλαγές σε αυτόν προκαλούν στελέχη στα οποία τα στηρίγματα δε διαφοροποιούνται άμεσα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλών σειρών στηριγμάτων πριν το σχηματισμό των φιαλιδίων. Καταρροϊκά των κύριων ρυθμιστών εντοπίζονται γονίδια στόχοι, τα οποία ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια και δομές, όπως της συνθετάσης πολυκετιδίων *wA* και της λακκάσης *yA*, που σχετίζονται με το χρώμα των κονιδιοσπορίων.



Εικόνα 1.4. Απλοποιημένο σχήμα της ανάπτυξης του κονιδιοφορέα. Απεικονίζεται το κεντρικό αναπτυξιακό μονοπάτι, που περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες BrlA, AbaA και WetA. Σε μπλε χρώμα είναι τα γονίδια-στόχοι. Το *rodA* κωδικοποιεί μια εξειδικευμένη για κονίδια υδροφοβίνη, τα *wA* και *yA* κωδικοποιούν το πρώτο και τελευταίο ένζυμο της σύνθεσης του πράσινου χρώματος των σπορίων, αντίστοιχα. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι φαινότυποι των μεταλλαγών *veA1*, *brlA*, *abaA*, *wetA*, *yA* και *wA*. Στα δεξιά, παρουσιάζεται μια απλοποιημένη εκδοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού των "fluffy" μεταλλαγών. Η ένθετη εικόνα δείχνει τη μορφολογία τέτοιων μεταλλαγμένων στελεχών. Ο διαμεμβρανικός υποδοχέας του σήματος του FluG δεν έχει ταυτοποιηθεί. Όλα τα σήματα απεικονίζονται να επηρεάζουν την έκφραση του *brlA*, για λόγους απλότητας, καθώς δεν είναι γνωστό αν οι επιδράσεις αυτές είναι άμεσες ή έμμεσες (Από Scazzocchio 2009 με τροποποιήσεις).

Η ρύθμιση της αγενούς και εγγενούς αναπαραγωγής βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *veA* γονιδίου (Kim et al. 2002). Ο VeA μεταγραφικός παράγοντας αναστέλλει την κονιδιοποίηση και επάγει την εγγενή αναπαραγωγή. Φαίνεται δηλαδή να λειτουργεί ανασταλτικά στην έκφραση ή λειτουργία της BrlA. Ο VeA ρυθμίζεται από το φως.

Παρουσία κυανού φωτός τον αποκλείει από τον πυρήνα, προωθώντας την αφυλετική αναπαραγωγή. Στο σκοτάδι καθίσταται ενεργός και επάγει τη φυλετική αναπαραγωγή. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως όλα τα στελέχη του *A. nidulans* που έχουν χρησιμοποιηθεί φέρουν μια μεταλλαγή μερικής απώλειας λειτουργίας, την *veA1*, και κατ' επέκταση κονιδιοποιούν κανονικά στο σκοτάδι. Η μεταλλαγή αυτή επιλέχθηκε από τον Pontecorvo, πιθανώς ακούσια, λόγω του πλεονεκτήματος που εμφάνιζε σε εργαστηριακές συνθήκες, μιας και δεν είχε ανάγκη την παρουσία φωτός.

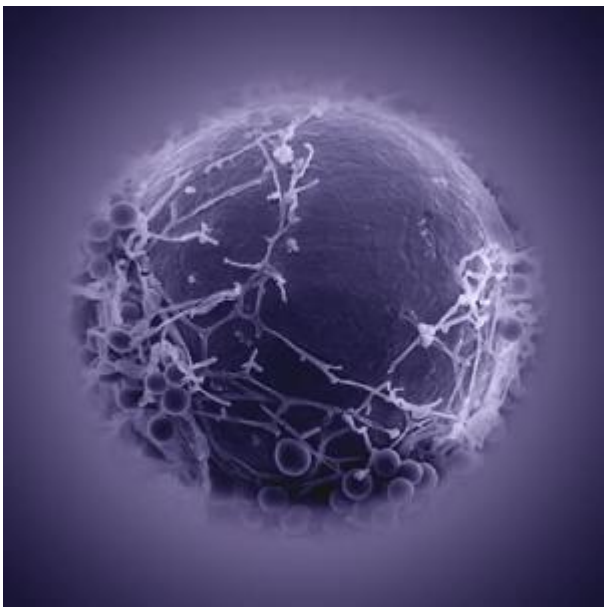
Η αγενής ή εγγενής αναπαραγωγή έχουν ανάγκη τη διαφοροποίηση των κυττάρων, αφού η αρχική φάση μυκηλιακής ανάπτυξης χαρακτηρίζεται από ομοιογένεια. Έχουν απομονωθεί μεταλλαγές που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση, οι αποικίες των οποίων χαρακτηρίζονται από ένα ομοιογενές-μη διαφοροποιημένο, άχρωμο μυκήλιο (fluffy μεταλλαγές). Τα fluA-G γονίδια σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την παραγωγή φερομονών και το δευτερογενή μεταβολισμό, ενώ φαίνεται να εμπλέκονται σε ένα πολύπλοκο σηματοδοτικό μονοπάτι που καταλήγει στην παραγωγή μιας, άγνωστης μέχρι στιγμής, ουσίας (Wieser et al. 1994). Η ουσία αυτή, μέσω των επίσης "fluffy" γονιδίων flb (Etxebeste et al. 2008), μάλλον προκαλεί ένα σηματοδοτικό καταρράκτη, με τελικό αποδέκτη την BrlA. Επικρατείς μεταλλαγές του *fadA* επίσης οδηγούν σε fluffy φαινότυπο (D'Souza et al. 2001). Η FadA αποτελεί υπομονάδα μιας τριμερούς G-πρωτεΐνης, η οποία στη δεσμευμένη με GTP μορφή ενεργοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση (PkaA) η οποία μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών στόχων, προωθεί την αύξηση και αναστέλλει την κονιδιοποίηση. Η πρωτεΐνη FlbA λειτουργεί καταρροϊκά της FluG, μετατρέποντας τη FadA στη GDP-δεσμευμένη ανενεργή μορφή (Yu et al. 1999). Στην Εικόνα 1.4 φαίνεται επίσης περιληπτικά το σηματοδοτικό μονοπάτι των "fluffy" γονιδίων και η πιθανή του σχέση με αναπτυξιακά μονοπάτια που οδηγούν σε κονιδιοποίηση. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα fluffy στελέχη δεν είναι απλώς στελέχη χωρίς κονίδια αλλά είναι κυρίως ταχέως αναπτυσσόμενα στελέχη, αφού αφορούν πολλές φορές μεταλλαγές σε γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Επομένως, μελετώντας μεταλλαγμένα στελέχη αυτού του τύπου, μελετώνται τα σήματα τα οποία ελέγχουν και περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό του μυκηλίου, και η απώλεια κονιδιοποίησης μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης αναπτυξιακής δραστηριότητας. Μάλιστα, αν επιβραδυνθεί η ανάπτυξη αυτών των μεταλλαγμένων στελεχών, χρησιμοποιώντας φτωχές πηγές άνθρακα, παρατηρείται κονιδιοποίηση.

1.2.2. Εγγενής κύκλος

Ο εγγενής ή φυλετικός κύκλος του *A. nidulans* εξαρτάται απόλυτα από τη θερμοκρασία, ενώ φαίνεται να εξαρτάται επίσης από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στο υπόστρωμα (Wu and Miller 1997). Επιπλέον έχουν χαρακτηρισθεί ουσίες που ομοιάζουν με ορμόνες, κυρίως τερπενοειδή και στεροειδή, και φαίνεται να ελέγχουν τον εγγενή κύκλο. Στον *A. nidulans* μέχρι στιγμής δεν έχουν περιγραφεί εξειδικευμένα φυλετικά όργανα, και το πρώτο ορατό στοιχείο του φυλετικού κύκλου είναι η ύπαρξη κλειστοθηκίων στο κέντρο μιας αποικίας. Το πρωταρχικό γεγονός της φυλετικής αναπαραγωγής είναι η αναστόμωση των μυκηλιακών υφών δύο στελεχών και η επακόλουθη ανάμιξη κυτταροπλασματικού υλικού και πυρήνων. Από τα ετεροκάρυα, μυκήλια τα οποία διαθέτουν διαφορετικών ειδών πυρήνες, ορισμένα τμήματα διαφοροποιούνται σε ασκογόνες υφές. Οι ασκογόνες υφές, οι οποίες θα δώσουν γένεση στους ασκούς, περικλείονται σε κλειστά καρποφόρα σωμάτια που ονομάζονται κλειστοθήκια, τα τοιχώματα των οποίων αποτελούνται από πολλά στρώματα παχιών διακλαδιζόμενων υφών, ενώ όταν ωριμάζουν περιβάλλονται από κύτταρα Hülle. Τα κλειστοθήκια σχηματίζονται στην περιφέρεια κυττάρου δικαρυωτικής υφής, όπου οι δύο πυρήνες συντήκονται με επακόλουθη μείωση δημιουργώντας τον ασκό, ο οποίος στη συνέχεια λόγω μίτωσης εμπεριέχει οκτώ απλοειδή ασκοσπόρια. Κάθε κλειστοθήκιο περιβάλλεται από κύτταρα *Hülle*, των οποίων ως πιθανός ρόλος θεωρείται η θρέψη των κλειστοθηκίων συνολικά (Swart et al. 2001, Bruggeman et al. 2003) (Εικόνα 1.5). Για το σχηματισμό των ασκοσπορίων, αρχικά το ακραίο κύτταρο κάθε υφής κυρτώνει και σχηματίζει ένα άγκιστρο. Οι δύο πυρήνες του ακραίου κυττάρου διαιρούνται ταυτόχρονα μιτωτικά ενώ σχηματίζονται διαφράγματα μεταξύ των θυγατρικών πυρήνων, τα οποία χωρίζουν το άγκιστρο σε τρία κύτταρα. Το υποκορυφαίο κύτταρο, που βρίσκεται στην καμπή του αγκίστρου, περιέχει δύο πυρήνες, ενώ τόσο το κορυφαίο κύτταρο όσο και το κύτταρο της βάσης περιέχουν από έναν θυγατρικό πυρήνα. Το υποκορυφαίο κύτταρο, που ονομάζεται μητρικό κύτταρο του ασκού, αρχίζει να διογκώνεται για το σχηματισμό του ασκού, ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα η σύντηξη των δύο πυρήνων του με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου διπλοειδούς κυττάρου το οποίο υπόκειται άμεσα σε μειωτική διαίρεση. Οι τέσσερις πυρήνες που προκύπτουν από τη μείωση διαιρούνται μιτωτικά δίνοντας γένεση σε οχτώ πυρήνες, καθένας από τους οποίους περικλείεται

σε ένα από τα οχτώ ασκοσπόρια του κάθε ασκού. Ο πυρήνας κάθε ασκοσπορίου διαιρείται μιτωτικά με αποτέλεσμα το σχηματισμό ώριμων διπλοειδών ασκοσπορίων. Το κορυφαίο και το βασικό κύτταρο συντήκονται σχηματίζοντας ένα διπλοειδές κύτταρο, το οποίο σχηματίζει ένα δεύτερο άγκιστρο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται (Todd et al. 2007).

Με τη διαδικασία αυτή τα κλειστοθήκια που παράγονται είναι τριών τύπων, αφού προέρχονται είτε από δύο όμοιους είτε δύο διαφορετικούς πατρικούς πυρήνες. Η διαδικασία που περιγράφηκε είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί από ένα μόνο στέλεχος, αφού ο *A. nidulans* είναι ομοθαλλικός μύκητας, με επακόλουθη αυτογονιμοποίηση.



Εικόνα 1.5. Φωτογραφία κλειστοθηκίου με συνεστιακό μικροσκόπιο laser και ψευδοχρωματισμό. Διακρίνονται τα σφαιρικά κύτταρα *Hülle* που δημιουργούν ένα εκτεταμένο νηματοειδές δίκτυο στην επιφάνεια (πιθανότατα και εσωτερικά) του κλειστοθήκιου (http://www.aspergillus.org.uk/pressimagesenlarge.htm, από R. Fischer)

1.2.3. Παραφυλετικός κύκλος

Ιδιομορφία στον κύκλο ζωής του *A. nidulans* παρουσιάζει το φαινόμενο του παραφυλετικού κύκλου ανάπτυξης. Σε αυτό, δύο ομοθαλλικές υφές από διαφορετικά στελέχη συντήκονται για να δημιουργήσουν ετεροκάρυο, παρόμοια με το φυλετικό κύκλο. Στο ετεροκάρυο, με πολύ χαμηλή συχνότητα, δύο πυρήνες είναι δυνατόν να

συντηχθούν για δημιουργία ενός διπλοειδούς πυρήνα. Ο πυρήνας αυτός είναι σταθερός και μπορεί να πολλαπλασιάζεται μιτωτικά μέσω του αγενούς κύκλου αναπαραγωγής. Σε κάποιο ποσοστό, πολύ μικρότερο του μειωτικού, εμφανίζεται μάλιστα και μιτωτικός ανασυνδυασμός μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Ο διπλοειδής πυρήνας είναι δυνατόν να αποσταθεροποιηθεί, φυσικά ή τεχνητά με χρήση χημικών, και να οδηγήσει μετά από μείωση σε κονιδιοσπόρια με 2ν+1 και 2ν-1 χρωμοσώματα. Από αυτή την ανευπλοειδική κατάσταση, στις επόμενες μιτώσεις, το πρώτο θα χάσει ένα χρωμόσωμα και θα επαναφερθεί στη διπλοειδική κατάσταση, ενώ το δεύτερο θα χάνει σταδιακά χρωμοσώματα μέχρι απλοειδίας. Η βιολογική σημασία του παραφυλετικού κύκλου παραμένει ασαφής δεδομένου ότι η συχνότητα του φαινομένου είναι πολύ χαμηλή. Θα μπορούσε να θεωρηθεί ως εναλλακτικό μονοπάτι για τη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας, καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς τις προϋποθέσεις που απαιτεί ο φυλετικός κύκλος, αλλά η μικρή συχνότητα εμφάνισής του δεν τον καθιστά ικανό να αντικαταστήσει το φυλετικό κύκλο στη λειτουργία αυτή (Schoustra et al. 2007).

1.3. Χαρακτηριστικά του *A. nidulans*

Ο *A. nidulans* είναι μη παθογόνος ομοθαλλικός νηματοειδής μύκητας. Όπως πολλοί μικροοργανισμοί, αναπτύσσεται με ευκολία σε φτηνά στερεά και υγρά θρεπτικά υποστρώματα, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (15-44 ^{o}C), επιτρέποντας την απομόνωση θερμοευαίσθητων και θερμοανθεκτικών μεταλλαγών. Διαθέτει ποικιλία μεταβολικών μονοπατιών, πολλά από αυτά τα οποία είναι χαρακτηρισμένα. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιεί μια πληθώρα διαφορετικών πηγών αζώτου και άνθρακα. Πλεονέκτημά του για αυτούς τους χαρακτηρισμούς, η φύση του αφυλετικού κύκλου αναπαραγωγής του, που δίνει τη δυνατότητα ύπαρξης μιας ποικιλίας φαινοτύπων, εν αντιθέσει με το αύξηση-μη αύξηση των βακτηρίων (Εικόνα 2.3). Η διάμετρος της αποικίας, η πυκνότητα και το ύψος των εναέριων υφών, η ύπαρξη ή μη και ο αριθμός των κονιδιοσπορίων επιτρέπουν τον απόλυτο διαχωρισμό μερικής ή ολικής απώλειας της λειτουργικότητας, ανθεκτικότητας, ευαισθησίας ή υπερευαισθησίας σε κάποια τοξική ουσία.

Ο φυλετικός του κύκλος είναι πολύ γρήγορος μιας και σε τρεις το πολύ εβδομάδες από την έναρξη μιας διασταύρωσης είναι δυνατή η ανάλυση των

απογόνων. Κάθε κλειστοθήκιο περιέχει έως και 100.000 ασκούς και κάθε ασκός μια οκτάδα ασκοσπορίων. Ο τόσο μεγάλος αριθμός απογόνων καθιστά εύκολη τη γενετική χαρτογράφιση και έχει παράγει έναν από τους πιο λεπτομερείς γενετικούς χάρτες οργανισμών που υπάρχει. Για το λόγο αυτό άλλωστε τον επέλεξε και ο Pontecorvo, με σκοπό τη διερεύνηση της δομής των γονιδίων, και συνέβαλε ουσιαστικά στην αποσύζευξη της ιδέας του αδιαίρετου γονιδίου με αυτών της μονάδας ανασυνδυασμού, μεταλλαγής και λειτουργικότητας. Είναι χαρακτηριστικό πως στον *A. nidulans* έχει γίνει διαχωρισμός ενδογονιδιακών μεταλλαγών που απέχουν μόλις 11 ζεύγη βάσεων μεταξύ τους, με χρήση μειωτικού ανασυνδυασμού (Scazzocchio, 2009). Το κατοπινό σύστημα βέβαια του Benzer με τον φάγο T4 αποδείχθηκε μεγαλύτερης αναλυτικής ικανότητας.

Επίσης η ομοθαλλική και απλοειδής φύση των μυκηλίων επιτρέπει τη σύντηξή τους και δημιουργία σταθερών ετεροκαρύων, ανάμεσα σε οποιαδήποτε σχεδόν στελέχη. Η δημιουργία σταθερών διπλοειδικών κονιδιοσπορίων μέσω του παραφυλετικού κύκλου καθιστά εύκολη τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων δύο ή περισσότερων μεταλλαγών καθώς και τον καθορισμό του μεταξύ τους γενετικού χαρακτήρα (π.χ, επικρατείς, υπολοιπόμενες μεταλλαγές, φαινόμενα επίστασης). Με τη διαδικασία της απλοειδοποίησης είναι δυνατή η χαρτογράφηση μεταλλαγών. Για το σκοπό αυτό, απομονώνεται στέλεχος με διπλοειδή πυρήνα, με χρήση παραφυλετικού κύκλου μεταξύ του επιθυμητού στελέχους και ενός με τουλάχιστον ένα φαινοτυπικά διακριτό γονιδιακό χαρακτήρα για κάθε χρωμόσωμα. Κατόπιν αποσταθεροποιείται το διπλοειδές, και είναι δυνατή η παρακολούθηση του χρωμοσώματος το οποίο ακολουθεί την επιθυμητή μεταλλαγή (Todd et al. 2007). Επίσης, με χρήση του μιτωτικού επιχιασμού είναι δυνατή η χαρτογράφηση μιας μεταλλαγής σε σχέση με το κεντρομερές.

Οι ανωτέρω λόγοι, αλλά και η ευρεία χρήση του *A. nidulans* είχαν δημιουργήσει μια μεγάλη γκάμα μεταλλαγών και αυξοτροφιών, οι οποίες με την ανακάλυψη της ικανότητας γενετικού μετασχηματισμού του *A. nidulans* (Tilburn et al. 1983) κατέστησαν δυνατή την εφαρμογή μεθόδων ανάστροφης γενετικής και την εύκολη κατασκευή διαειδικών πλασμιδίων με γονίδια επιλογής για την *E.coli* και τον *A. nidulans*. Η ικανοποιητική αποδοτικότητα μετασχηματισμού σε συνδυασμό με την ικανότητα «διάσωσής» των πλασμιδίων προσφέρουν την ευελιξία των μοριακών και γενετικών χειρισμών. Επιπλέον, η ανεύρεση αυτόνομα αντιγραφόμενων πλασμιδίων (Gems et al. 1991), που αυξάνουν κατά πολύ την αποτελεσματικότητα του

μετασχηματισμού, διευκόλυνε πολύ την κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών, ακόμη και χωρίς την ανάγκη κλωνοποίησης σε *E. coli*. Πολύ πρόσφατα, και μετά τη δημοσίευση της πλήρους αλληλουχίας του γονιδιώματος του *A. nidulans* (Galagan et al. 2005), έχει αναπτυχθεί μια σειρά από τεχνικές που επιτρέπει την εύκολη απαλοιφή και αντικατάσταση γονιδίων ή τη σήμανση των προϊόντων τους με μια ποικιλία επιτόπων. Πιο συγκεκριμένα, έχουν κατασκευασθεί στελέχη που φέρουν έλλειψη του γονιδίου της NkuA DNA ελικάσης (Nayak et al. 2006), υπεύθυνης για γεγονότα ετερόλογου ανασυνδυασμού. Στα στελέχη αυτά ο μετασχηματισμός δίνει γένεση σε απογόνους που έχουν προέλθει σχεδόν μόνο από γεγονότα ομόλογου ανασυνδυασμού. Έτσι καθίσταται ευκολότερη η στοχευόμενη ενσωμάτωση πλασμιδίων στο γονιδίωμα, και οι κάθε είδους γονιδιακές αντικαταστάσεις ή σημάνσεις πρωτεϊνών με επιτόπους στον γονιδιωματικό τους τόπο (Szewczyk et al. 2006). Μεγάλη συμβολή σε αυτό είχε η ανάπτυξη νέων PCR τεχνικών για τη σύζευξη διαφορετικών DNA τμημάτων χωρίς τη διαμεσολάβηση κυττάρων και την ανάγκη περιοριστικών ενδονουκλεασών (Yu et al. 2004), καθώς και η κατασκευή του συστήματος cre/lox (Forment et al. 2006), που επιτρέπει την ανακύκλωση του γονιδίου επιλογής του μετασχηματισμού. Με τη χρήση των ανωτέρω εργαλείων έγινε πολύ ευκολότερος ο χαρακτηρισμός απαραίτητων γονιδίων, μιας και απαλοιφή τους οδηγεί μόνο σε βιώσιμα ετεροκάρυα (Osmani et al. 2006). Αν προσθέσει κανείς τις σύγχρονες τεχνικές των μικροσυστοιχιών, βλέπει πως ο *A. nidulans* μοιάζει έτοιμος για την εποχή της Βιολογίας Συστημάτων και της Πρωτεομικής. Άλλωστε το γένος *Aspergillus* είναι ένα από τα λίγα με τόσα πολλά γονιδιώματα ειδών γνωστά (οκτώ μέχρι στιγμής), επιτρέποντας συγκριτικές γονιδιωματικές, πρωτεωμικές και μεταβολωμικές αναλύσεις, αλλά και την επέκταση της γνώσης που αποκτάται από το πρότυπο σύστημα του *A. nidulans* σε άλλους παθογόνους ή χρήσιμους συγγενείς του.

1.4. Η συνεισφορά του *A. nidulans* στη βιολογική έρευνα

Ο *A. nidulans* έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο-πρότυπο σύστημα σε τρία κυρίως επιστημονικά πεδία. Της ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και της μελέτη της ανάπτυξης του μύκητα. Ακολουθεί μια επισκόπηση μέρους αυτής της δουλειάς όπου τα σημαντικότερα και πιο πρόσφατα αποτελέσματα θα αναφερθούν εν συντομία.

1.4.1. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Η πολική ανάπτυξη των υφών και η εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων του *A. nidulans* έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των φαινομένων της εγκαθίδρυσης πολικότητας, της επάκριας αύξησης και της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (άρθρο ανασκόπισης: Scazzocchio 2009). Τα κονιδιοσπόρια μπορούν να παραμείνουν σε ληθαργική κατάσταση για χρόνια, με τον κυτταρικό τους κύκλο να έχει σταματήσει στην G1 φάση, μέχρι να βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες. Τότε αρχίζουν να αυξάνουν ισοτροπικά, δηλαδή να αυξάνουν σε μέγεθος και προετοιμάζονται για την πυρηνική διαίρεση. Η πρώτη πυρηνική διαίρεση συμβαίνει ταυτόχρονα ή λίγο μετά την καθιέρωση του άξονα πολικότητας. Έως και οκτώ πυρήνες είναι δυνατόν να βρίσκονται στο ίδιο κύτταρο πριν την εμφάνιση του πρώτου διαφράγματος. Η πολική αύξηση συνεχίζει και επιταχύνεται σημαντικά από την εμφάνιση του ακραίου σωματίου (ή Spitzenkörper) στο σημείο της επάκριας αύξησης, ενός σχηματισμού που δεν έχει καθοριστεί επαρκώς, αλλά φαίνεται να αποτελείται από πολυσωμάτια του συμπλέγματος Golgi και πολλά εκκριτικά κυστίδια. Κάθε 3-4 νέους πυρήνες, οι οποίοι προέρχονται από μιτωτικό διπλασιασμό αυτών που βρίσκονται μεταξύ του σημείου επάκριας αύξησης και του πρώτου διαφράγματος, εμφανίζεται ένα νέο διάφραγμα. Οι πυρηνικές διαιρέσεις είναι συγχρονισμένες, ενώ φαίνεται πως οι πυρήνες που βρίσκονται μεταξύ δύο διαφραγμάτων, δηλαδή σε κύτταρα πίσω του κορυφαίου, έχουν καταστεί ανενεργοί μιτωτικά. Η επεκτεινόμενη υφή διακλαδίζεται με την εμφάνιση υποακραίων βλαστητικών σωλήνων, ενώ είναι πιθανό να δημιουργηθεί αντιδιαμετρικός του πρώτου βλαστητικός σωλήνας. Οι διαδικασίες αυτές προφανώς αφορούν ενεργοποίηση ανενεργών μιτωτικά πυρήνων και εγκαθίδρυση νέων αξόνων πολικότητας. Αντίθετα με ότι συμβαίνει στον *S. serevisae* και άλλους πρότυπους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η μίτωση στις αυξανόμενες υφές του *A. nidulans* δεν ακολουθείται από κυτοκίνηση, ενώ η μιτωτική άτρακτος είναι ενδοπυρηνική. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία κοινοκυτίων (ή αλλιώς συγκυτίων). Το γεγονός αυτό επέτρεπε το διαχωρισμό των διαδικασιών αυτών και κατά συνέπεια την ξεχωριστή τους μελέτη.

Γονίδια τα οποία εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και την πολικότητα αναμενόταν να είναι θνησιγόνα. Για το λόγο αυτό, η μελέτη των παραπάνω

φαινομένων βασίσθηκε σε κάποια βασικά πλεονεκτήματα του *A. nidulans*. Η ικανότητά του να αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών επέτρεψε την απομόνωση θερμοευαίσθητων μεταλλαγών σε απαραίτητα γονίδια, ενώ κάποια άλλα μελετήθηκαν σε ετεροκάρυα, όταν δεν ήταν δυνατή η απομόνωση καθαρών στελεχών.

Έτσι, με την απομόνωση στελεχών ανθεκτικών στον αναστολέα της σωληνίνης, benomyl, χαρακτηρίσθηκαν τα γονίδια της σωληνίνης (tubulin) του *A. nidulans*. Η ανεύρεση μάλιστα του γονιδίου της γ-σωληνίνης, απαραίτητου για το σχηματισμό του κεντροσώματος των μικροσωληνίσκων του πυρήνα, ήταν η πρώτη σε ευκαρυωτικό οργανισμό.

Τέσσερις μεγάλες κατηγορίες θερμοευαίσθητων μεταλλαγών απομονώθηκαν από τους Morris και συνεργάτες (1982), οι οποίες αφορούν στον κυτταρικό κύκλο και στην αύξηση του *A. nidulans*. Αυτές ήταν οι nim (never in mitosis), bim (blocked in mitosis), nud (nuclear distribution) και sep (προβληματικές στη δημιουργία του διαφράγματος).

Οι nud μεταλλαγές αφορούν τα γονίδια της ελαφριάς και βαριάς αλυσίδας της δυνεΐνης, αλλά και πολλών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη λειτουργία της κατά την μίτωση και κυτοκίνηση. Μία από αυτές, η NudF, αποτελεί ομόλογο της ανθρώπινης πρωτεΐνης LIS1, η οποία είναι μεταλλαγμένη στο σύνδρομο λυσεγκεφαλίας Miller-Dicker. Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων και της λειτουργίας των nud γονιδίων βοήθησε στην κατανόηση της λειτουργίας του συμπλέγματος της δυνεΐνης στο νευρικό σύστημα.

Τα nim και bim γονίδια αφορούν μεταλλαγές όπου ο κυτταρικός κύκλος έχει διακοπεί στις φάσεις G2 και S. Κάποια από αυτά τα γονίδια κωδικεύουν για την κινεσίνη, την κυκλίνη B, τις σχετιζόμενες με αυτήν κινάσες, cdc2, cdc13 και άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν. Κάποια άλλα αφορούν το σύμπλεγμα προώθησης της ανάφασης (Anaphase Promoting Complex, APC), το οποίο έχει ενεργότητα λιγάσης της ουβικουιτίνης και στοχεύει πρωτεΐνες ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου στο πρωτεάσωμα. Από αυτή την ανάλυση ήταν η πρώτη φορά που υπήρξαν ενδείξεις πως η κινεσίνη εμπλέκεται στη μίτωση. Επίσης χαρακτηρίσθηκε για πρώτη φορά η πρωτεΐνη NimA, μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, συντηρημένη σε όλους τους ευκαρυωτικούς, η οποία λειτουργεί καταρροϊκά της cdc2. Με ανάλυση διπλού-υβριδίου χρησιμοποιώντας ως δόλωμα την ομόλογη της

NimA στο ποντίκι, βρέθηκε η Pin1, η οποία απενεργοποιεί την NimA και έχει δειχθεί να εμπλέκεται σε διαδικασίες καρκινογένεσης και στη νόσο του Alzheimer.

1.4.2. Εγκαθίδρυση και καθιέρωση πολικότητας στους νηματοειδείς μύκητες

Η εγκαθίδρυση και καθιέρωση της πολικότητας σε νηματοειδείς μύκητες έχει μελετηθεί εκτενώς, χαρακτηρίζοντας πολλές διαδικασίες και πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτές χωρίς ωστόσο ακόμη να έχει προκύψει ένα συνολικό μοντέλο. Από τις μελέτες αυτές έχει προκύψει πως πολλά σημεία είναι κοινά με την εκβλάστηση στις ζύμες. Όπως όμως ήταν αναμενόμενο, η κατασκευή, ταχεία αύξηση και υποστήριξη ενός δικτύου πολυκύτταρων ακραία αυξανόμενων και διακλαδιζόμενων υφών είναι πολυπλοκότερη και παρουσιάζει αρκετές διαφορές.

Το ακραίο σωμάτιο (Spitzenkorper) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πολική αύξηση των υφών. Είναι ένας σχηματισμός που φαίνεται να αποτελείται από πολυσωμάτα, δικτυοσωμάτια του συμπλεγματος Golgi και κυστίδια και απαντάται μόνο στις περιοχές πολικής αύξησης (π.χ. θέσεις εκβλάστησης, θέσεις διακλαδώσεων). Η θέση του σχετίζεται άμεσα με την κατεύθυνση της ανάπτυξης, καθώς αλλαγή της με χημικά ή γενετικά μέσα προκαλεί αλλαγές στο σχήμα των υφών (Riquelme et al. 1998, Riquelme et al. 2000). Τα κυστίδια τα οποία διαθέτει φαίνεται να είναι δύο ειδών και μεγεθών (Harris et al. 2005). Στο Spitzenkorper εντοπίζονται επιπλέον μικροσωληνίσκοι και ακτίνη (Bourett and Howard 1991, Grove and Bracker 1970, Hoch and Staples 1983). Οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζουν ένα πυκνό δίκτυο στον πυρήνα του αλλά επιπλέον παρατηρούνται προεκτάσεις προς το εσωτερικό και εξωτερικό του Spitzenkorper. Έχουν επίσης βρεθεί κι άλλες εξειδικευμένες πρωτεΐνες όπως μια ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης και φορμίνη, υποδηλώνοντας ότι το Spitzenkorper μπορεί να λειτουργεί ως κέντρο οργάνωσης μικροϊνιδίων (Crampin et al. 2005, Harris et al. 2005).

Το ακραίο σωμάτιο πιστεύεται ότι λειτουργεί ως κέντρο προμήθειας κυστιδίων (Vesicle Sypply Center, VSC), και πιο συγκεκριμένα ως σταθμός ανταλλαγής κυστιδίων, ο οποίος δέχεται εκκριτικά κυστίδια από το εσωτερικό της υφής μεταφερόμενα κατά μήκος μικροσωληνίσκων και τα στέλνει κατά μήκος μικροϊνιδίων ακτίνης σε περιοχές της κορυφής της αύξησης. Σημαντικό ρόλο στη

σωστή διευθέτηση του Spitzenkorper διαδραματίζουν οι κυτταροπλασματικοί μικροσωληνίσκοι και οι συνδεόμενες κινητικές πρωτεΐνες (π.χ. δυνεΐνη και κινεσίνη) (Riquelme et al. 2000). Εντός του Spitzenkorper, τα κυστίδια οργανώνονται γύρω από έναν πυρήνα ο οποίος επίσης φέρει πολυσώματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι βασικές μορφογενετικές πρωτεΐνες μπορεί να μεταφράζονται τοπικά (Jedd and Chua 2000). Στον *A. nidulans* και τον *U. maydis* έχει δειχθεί πως ο σχηματισμός σταθερού άξονα πολικότητας απαιτεί RNA-δεσμευόμενες πρωτεΐνες (Becht et al. 2005, Shaw and Upadhyay 2005), οι οποίες πιθανώς εμπλέκονται στην μεταφορά των RNA στο ακραίο σωμάτιο.

Ο ρόλος του κυτταροσκελετού έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει δειχθεί η παρουσία λειτουργικού κυτταροσκελετού ακτίνης να είναι απολύτως απαραίτητη για την κατευθυνόμενη επέκταση της κυτταροπλασματικής επιφάνειας και την κατευθυνόμενη εναπόθεση του κυτταρικού τοιχώματος στους νηματοειδείς μύκητες (Virag and Griffiths 2004). Παρακολουθώντας *in vivo* τη χιμαιρική ActA-GFP (Upadhyay and Shaw 2008) ή με ανοσοφθορισμό (Torralba et al. 1998, Harris et al. 1999) σε κύτταρα του *A. nidulans* παρατηρούνται υψηλής κινητικότητας κυτταροπλασματικές κηλίδες ακτίνης σε όλο το μήκος της υφής, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην κορυφή της υφής και περιστασιακά στο συσταλτό δακτύλιο κατά το σχηματισμό διαφραγμάτων. *Στη N. crassa* το στέλεχος *act1* που φέρει μεταλλαγή του γονιδίου της ακτίνης παρουσιάζει διαφορετική κατανομή ακτίνης στην κορυφή της αύξησης και σχηματίζει ανώμαλες διακλαδώσεις. Χημικός αποπολυμερισμός των μικροϊνιδίων της ακτίνης προκαλεί παντελή έλλειψη πολικής αύξησης και οδηγεί σε ισοτροπική ανάπτυξη. Το γεγονός ότι το κύτταρο εξακολουθεί να αναπτύσσεται και εναποτίθενται υλικά κυτταρικού τοιχώματος, έστω και με τυχαίο τρόπο, υποδηλώνει ότι παράγονται εκκριτικά κυστίδια τα οποία όμως δε στοχεύονται σε συγκεκριμένες θέσεις της κυτταρικής επιφάνειας. Επομένως, ο κύριος ρόλος των μικροϊνιδίων ακτίνης στην κορυφή της αύξησης είναι η εντοπισμένη μεταφορά κυστιδίων από το Spitzenkorper προς την κυτταρική επιφάνεια, ενώ η παρουσία κηλίδων ακτίνης είναι ενδεικτική γεγονότων ενδοκύτωσης στην κορυφή της αύξησης. Επιπλέον, στον *A. nidulans*, μεταλλαγές που επηρεάζουν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με ακτίνη όπως η φορμίνη SepA, η Bud6 και η MyoA (μυοσίνη I) προκαλούν ελλατωματική πολική αύξηση των υφών και του σχηματισμό διαφραγμάτων (Harris et al. 1997, Virag and Harris 2006). Ειδικότερα η SepA (Harris et al. 1997) εντοπίζεται στις κορυφές των υφών, όπου σχηματίζει ένα πεπλατυσμένο κυτταροπλασματικό ημικύκλιο με τη

μορφή μιας φωτεινής κηλίδας (Sharpless and Harris 2002), η οποία πιθανώς αντιστοιχεί στο Spitzenkorper (Harris et al. 2005). Μεταλλαγές της SepA αναστέλλουν το σχηματισμό σταθερού άξονα πολικότητας των υφών, χωρίς να αναστέλλουν την εγκαθίδρυση πολικότητας αυτή καθαυτή (Harris et al, 1999).

Σε αντίθεση με τα μικροϊνίδια της ακτίνης, οι μικροσωληνίσκοι δεν είναι απολύτως απαραίτητοι για την πολική αύξηση των υφών. Σε αποπολυμερισμό τους με χημικούς παράγοντες (π.χ. Benomyl) ή απενεργοποίηση των γονιδίων σωληνίνης πραγματοποιείται εγκαθίδρυση πολικότητας (Akashi et al. 1994, Doshi et al. 1991, Raudaskoski et al. 1994), αλλά επηρεάζεται η τοποθέτηση του Spitzenkorper με αποτέλεσμα ασταθείς άξονες πολικότητας και αδυναμία γραμμικής αύξησης της υφής (Riquelme et al. 1998). Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα καταδεικνύουν την αναγκαιότητα των μικροσωληνίσκων για την επίτευξη μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης των υφών, πιθανώς λόγω του ρόλου τους στη μεταφορά κυστιδίων προς την κορυφή της αύξησης (Horio and Oakley 2005, Mourino-Perez et al. 2006). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ακόμα και κατά τη διάρκεια της μίτωσης, υπάρχει ένας αριθμός κυτταροπλασματικών μικροσωληνίσκων στην κορυφαία περιοχή οι οποίοι δεν αποδιατάσσονται επιτρέποντας την ανεμπόδιστη αύξηση της κορυφής (Horio and Oakley, 2005). Γενικά, οι μικροσωληνίσκοι θεωρείται ότι υποστηρίζουν την πολική αύξηση συγκεντρώνοντας κυστίδια στο Spitzenkorper, απ' όπου μεταφέρονται μέσω μικροϊνιδίων ακτίνης προς την κορυφή της αύξησης. Στο Spitzenkorper έχει επίσης βρεθεί η πρωτεΐνη καλμοντουλίνη, μια σηματοδοτική πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου (Wang et al. 2006). Ο ρόλος του ασβεστίου στην εγκαθίδρυση και διατήρηση της πολικότητας υποστηρίζεται από το γεγονός πως στις υφές παρατηρείται διαβαθμισμένη, μειούμενη από την κορυφή, συγκέντρωση κυτταροπλασματικού και μεμβρανικού ασβεστίου (Silverman-Gavrila and Lew 2003) και ότι αλλοίωσή της προκαλεί πολλαπλές κορυφές αύξησης ή παντελή απώλεια πολικότητας. Παρόλα αυτά, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν η διαβάθμιση της συγκέντρωσης του ασβεστίου λειτουργεί ως σήμα στον καθορισμό πολικών περιοχών ή αν είναι δευτερογενές αποτέλεσμα άλλου σηματοδοτικού μονοπατιού το οποίο κατευθύνει την εγκαθίδρυση ορισμένου άξονα πολικότητας.

Η ρύθμιση του πολυμερισμού και της οργάνωσης της ακτίνης ελέγχεται από συγκεκριμένες GTPασες (Johnson 1999). Στη ζύμη χρησιμοποιείται η Rho GTPαση cdc42, η οποία ρυθμίζει τον πολυμερισμό της ακτίνης, αλλάζοντας τη δομή των πρωτεϊνών-ικριωμάτων για την οργάνωση των μικροινιδίων της, όπως η WASP και η

φορμίνη (Rohatgi et al. 2000, Palazzo et al. 2001). Η cdc42 φέρεται να ελέγχει τη μεταφορά κυστιδίων (Zhang et al. 2001), ενώ στρατολογεί τις σεπτίνες (Kadota et al. 2004), πρωτεΐνες υπεύθυνες για το σχηματισμό των διαφραγμάτων. Στον *A. nidulans*, η σεπτίνη AspB εντοπίζεται στα αρχικά σημεία διακλάδωσης και είναι απαραίτητη για το σωστό πρότυπο βασικών διακλαδώσεων (Westfall and Momany 2002). Η δράση της cdc42 (ModA) αλληλεπικαλύπτεται με αυτής της RacA, μιας GTPασης ομόλογης της Rac1 των θηλαστικών, με αντίστοιχο ρόλο (Arimura and Kaibuchi 2005). Τα υπάρχοντα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι οι Cdc42 και RacA συνεισφέρουν εξίσου στην εγκαθίδρυση του πρωτογενούς άξονα πολικότητας, αλλά στη συνέχεια η Cdc42 καθίσταται η κύρια GTPάση που ρυθμίζει όλα τα επακόλουθα γεγονότα τα οποία εμπεριέχουν καθιέρωση αξόνων πολικότητας (Virag et al. 2007). Η αρχική ισοτροπική αύξηση των σπορίων έχει επίσης δειχθεί να ελέγχεται από αναπτυξιακά σήματα που μεταδίδονται μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού Ras GTPάσης (Osherov and May 2000). Μετά την εγκαθίδρυση του άξονα πολικότητας, η μυοσίνη MyoA και η φορμίνη SepA ωθούν την τοπική οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στις θέσεις πολικής αύξησης (McGoldrick et al. 1995, Harris et al. 1999). Η πόλωση των κονιδιοσπορίων εξαρτάται επίσης από τη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων (Cheng et al. 2001) και προϋποθέτει λειτουργικό εκκριτικό μονοπάτι. Η πόλωση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με τη δημιουργία μικροδομών διαφορετικής σύστασης της επάκριας πλασματικής μεμβράνης, όπως λιπιδικών σχεδιών, αφού στο σημείο αυτό είναι εντονότερη η παρουσία εργοστερόλης, όπως φαίνεται μετά από ειδική χρώση με *filipin* (Takeshita et al. 2008). Επιπλέον, δύο συνθετάσες κεραμιδίων έχουν δειχθεί να σχετίζονται με την επάκρια αύξηση, υποστηρίζοντας το ρόλο των λιπιδικών σχεδιών σε αυτή (Li et al. 2006).

Σημαντικό ρόλο στην καθιέρωση πολικότητας των υφών του *A. nidulans* διαδραματίζουν ορισμένες πρωτεϊνικές τροποποιήσεις, όπως η O-γλυκοζυλίωση και η N-μυριστυλίωση. Πιο συγκεκριμένα, μια μαννοζυλοτρανσφεράση, η SwoA, και μια τρανσφεράση N-μυριστυλίωσης, η SwoF, δείχθηκαν να είναι απαραίτητες στο σχηματισμό και την εγκαθίδρυση σταθερού άξονα πολικότητας κατά την πόλωση των σπορίων (Shaw et al. 2002). Η N-μυριστυλίωση βοηθά στην πρόσδεση των πρωτεϊνών-στόχων σε μεμβράνες. Οι στόχοι της παραμένουν άγνωστοι, αν και πιθανοί υποψήφιοι είναι παράγοντες ADP-ριβοζυλίωσης (π.χ. ARFs), οι οποίοι

ρυθμίζουν τη μεταφορά κυστιδίων και την κυτταρική πολικότητα σε ζωικά και φυτικά κύτταρα (Donaldson and Honda 2005).

Η στοχευόμενη εξωκύτωση κυστιδίων στο σημείο επάκριας αύξησης φαίνεται να μην είναι αρκετή για την εγκαθίδρυση και διατήρηση της πολικότητας, αφού τελευταία έχει ενισχυθεί η πεποίθηση πως αναγκαία είναι και η λειτουργία της ενδοκύτωσης (Torralba and Heath 2002, Read and Kalkman 2003, επίσης παράγραφος 4.2). Η συνεχής αύξηση των υφών φαίνεται να προϋποθέτει την ανακύκλωση, μέσω ενδοκύτωσης, κάποιου, μέχρι στιγμής άγνωστου, παράγοντα στα σημεία επάκριας αύξησης (Harris and Momany 2004). Πράγματι, έχει δειχθεί πως η ανικανότητα σχηματισμού ενδοκυτωτικών κυστιδίων με κάλυμα κλαθρίνης, σε στέλεχος που φέρει έλλειψη του SlaB παράγοντα αλληλεπίδρασης του συστήματος κλαθρίνης με την ακτίνη, είναι θνησιγόνος για τον *A. nidulans* (Araujo-Bazan et al. 2008), ενώ επηρεάζει την καθιέρωση και όχι την εγκαθίδρυση της πολικότητας (Hervas-Aguilar and Penalva 2010). Ο ρόλος της ενδοκύτωσης στην πολική αύξηση του A. nidulans θα συζητηθεί εκτενώς στην παράγραφο 4.2.

1.4.3. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

1.4.3.1. Ικανότητα καταβολισμού πηγών άνθρακα και αζώτου

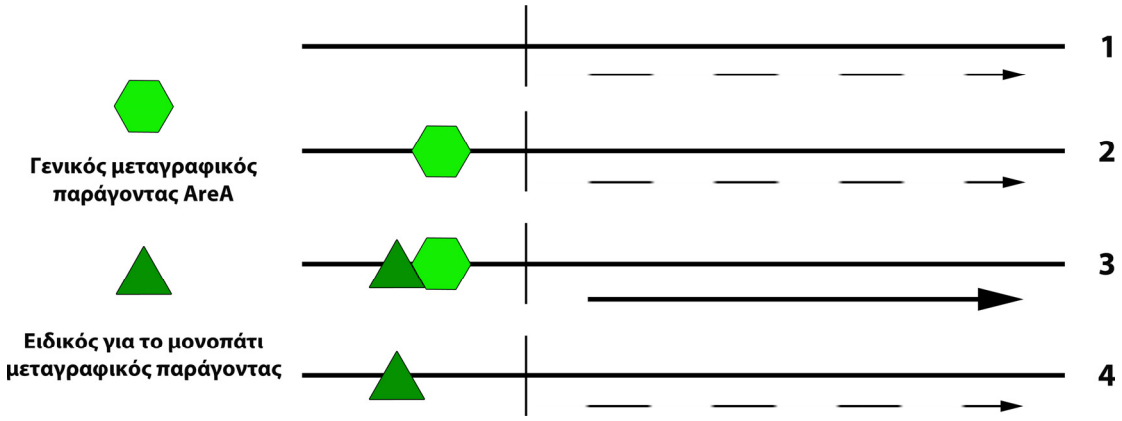
Τα είδη του γένους *Aspergillus*, και ο *A. nidulans* ειδικότερα, έχουν ικανότητα χρήσης μιας μεγάλης ποικιλίας ουσιών ως πηγών άνθρακα, αζώτου ή και τα δύο. Ο *A. nidulans* χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα-μοντέλο για το χαρακτηρισμό των γονιδίων των ενζύμων και μεταφορέων που εμπλέκονται στα αντίστοιχα καταβολικά μονοπάτια, καθώς και των ρυθμιστικών τους συστημάτων γονιδιακής έκφρασης. Το σύνολο αυτής της δουλειάς αποκάλυψε τη δεκαετία του ’60 τους πρώτους ειδικούς ευκαρυωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες συγκεκριμένων μεταβολικών μονοπατιών (UaY, NirA) καθώς και τους πρώτους ευκαρυωτικούς γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την αναστολή της έκφρασης παρουσία προτιμώμενης πηγής άνθρακα ή αζώτου (CreA, AreA).

Όπως είχε φανεί με εκλεπτυσμένα πειράματα γενετικής (Scazzocchio et al. 1982), και επιβεβαιώθηκε αργότερα με μοριακές αναλύσεις όταν οι αντίστοιχες τεχνολογίες έγιναν διαθέσιμες, τα γονίδια που εμπλέκονται στη χρήση ενός

συγκεκριμένου μεταβολίτη μεταγράφονται μόνο παρουσία ενός συγκεκριμένου μορίου-επαγωγέα. Τα μόρια-επαγωγείς δρουν ενεργοποιώντας συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων των ενζύμων και μεταφορέων που εμπλέκονται στο συγκεκριμένο καταβολικό μονοπάτι. Αναλυτικότερα, ο UaY (Suarez et al. 1995) μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιείται από το ουρικό οξύ και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη και τον μεταβολισμό των πουρινών. Τα νιτρικά ιόντα ενεργοποιούν τον NirA (Rand and Arst 1978, Burger et al. 1991), ο οποίος επάγει τη μεταγραφή των μεταφορέων νιτρικών και των αναγωγασών νιτρικών και νιτρώδων. Ο επαγωγέας του καταβολισμού της αιθανόλης AlcR (Lockington et al. 1987) επάγει τα αντίστοιχα γονίδια ύστερα από ενεργοποίηση από ακεταλδεΰδη, ενώ ο PrnA (Cazelle et al. 1998) επάγει τα ένζυμα και τους μεταφορείς που σχετίζονται με τη χρήση προλίνης μετά από ενεργοποίηση από την προλίνη. Τέλος, η β-αλανίνη ενεργοποιεί τον AmdR/IntA (Andrianopoulos and Hynes 1988) ο οποίος επάγει την έκφραση των γονιδίων της ακεταμιδάσης (*amdS*) και του μεταφορέα γ-αμινοβουτυρικού οξέος (*gabA*).

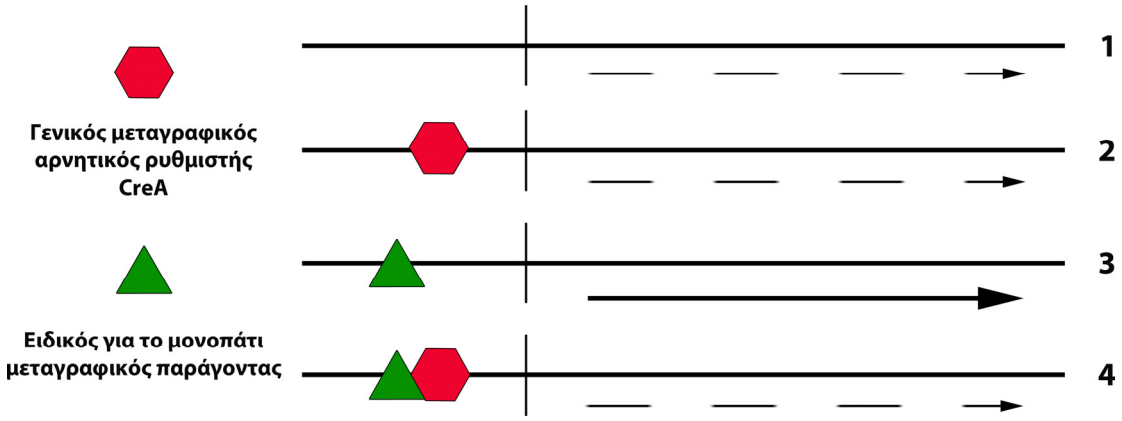
Όλοι οι παραπάνω θετικοί μεταγραφικοί ρυθμιστές ανήκουν σε μια κατηγορία πρωτεϊνών οι οποίες προσδένονται στο DNA μέσω μιας ειδικής μυκητιακής αλληλουχίας διπύρηνου ψευδαργύρου (Cys6Zn2). Οι περισσότεροι προσδένονται στο DNA ως διμερή, συμπεριλαμβανομένου του GAL4 του *S. serevisiae*. Η ενεργοποίηση των NirA και UaY επάγει την αλλαγή της τοπολογίας τους και τη στόχευσή τους στον πυρήνα (Bernreiter et al. 2007), ενώ οι PrnA και AlcR είναι μονίμως πυρηνικοί και χρειάζονται την ενεργοποίηση για να μπορέσουν να προσδεθούν στις αλληλουχίες στόχους. Η μεταγραφική όμως επαγωγή των γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο των συγκεκριμένων ρυθμιστών συμβαίνει μόνο όταν στο θρεπτικό μέσο δεν υπάρχουν προτιμώμενες πηγές αζώτου ή άνθρακα. Μάλιστα τα γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη και το μεταβολισμό δευτερευόντων πηγών αζώτου δεν μεταγράφονται καθόλου παρουσία αμμωνίας, ενώ παρουσία η γλυκόζης δεν αναστέλλει πλήρως τα γονίδια που εμπλέκονται στον καταβολισμό δευτερευόντων πηγών άνθρακα. Οι διαδικασίες αναστολής της έκφρασης γονιδίων λόγω ύπαρξης προτιμητέας πηγής άνθρακα ή αζώτου πραγματοποιούνται με τη συμβολή δύο ακόμη μεταγραφικών ρυθμιστών, των CreA (Dowzer and Kelly 1989) και AreA (Hynes 1975). Ο AreA είναι ένας τυπικός GATA θετικός μεταγραφικός παράγοντας (Kudla et al. 1990), οποίος δρα συνεργιστικά με

τους αντίστοιχους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι UaY και NirA (Narendja et al. 2002).



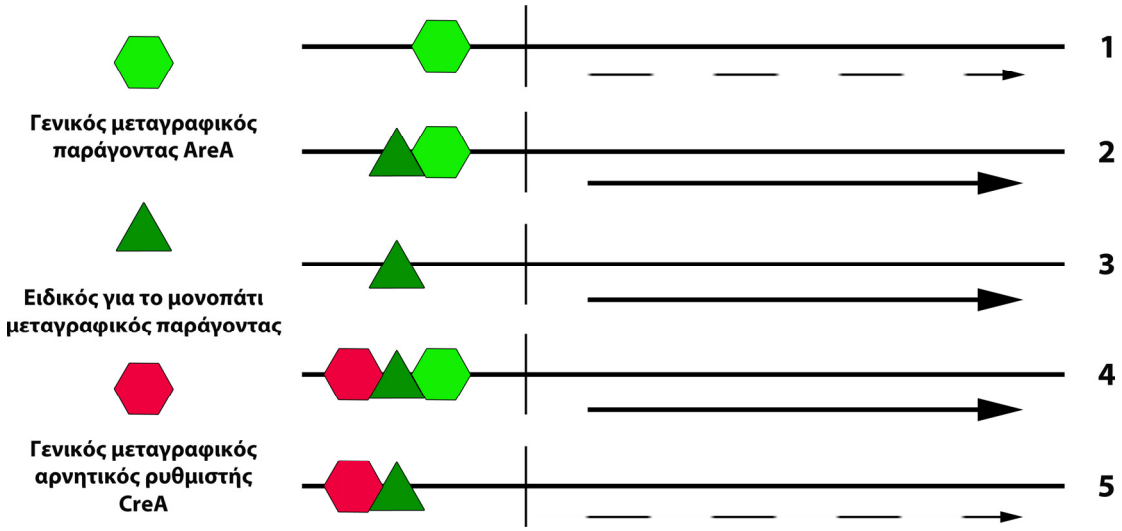
Εικόνα 1.6. Αναπαράσταση της ρύθμισης των γονιδίων που εμπλέκονται στη χρησιμοποίηση πηγών αζώτου. 1) Απουσία μορίου επαγωγέα (π.χ ουρικού) και παρουσία προτιμώμενης πηγής αζώτου (π.χ αμμωνιακών ιόντων) δεν προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων ούτε ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας-ρυθμιστής (π.χ UaY) ούτε ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας (AreA), και κατά συνέπεια τα γονίδια μεταγράφονται ελάχιστα ή καθόλου. 2) Απουσία μορίου επαγωγέα και προτιμώμενης πηγής αζώτου προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων μόνο ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας, και κατά συνέπεια τα γονίδια μεταγράφονται ελάχιστα ή καθόλου. 3) Παρουσία μορίου επαγωγέα και απουσία προτιμώμενης πηγής αζώτου προσδένονται στον υποκινητή των γονιδίων και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες και πραγματοποιείται μεταγραφή. 4) Παρουσία μορίου επαγωγέα και προτιμώμενης πηγής αζώτου μόνο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας-ρυθμιστής προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων και κατά συνέπεια τα γονίδια μεταγράφονται ελάχιστα ή καθόλου (βασισμένο σε αντίστοιχο του Scazzocchio 2009).

Τα ιόντα αμμωνίου και η γλουταμίνη απενεργοποιούν τον AreA σε πρωτεϊνικό επίπεδο, αλλά και σε μεταγραφικό, αποσταθεροποιώντας το mRNA του (Morozov et al. 2001). Δηλαδή ο AreA είναι θετικός μεταγραφικός παράγοντας που απενεργοποιείται από ιόντα αμμωνίου ή γλουταμίνη. Αντιθέτως, ο CreA είναι αρνητικός μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος προσδένεται στις αλληλουχίες στόχους μόνο παρουσία γλυκόζης (Panozzo et al. 1998). Ο CreA είναι μια τυπική πρωτεΐνη δακτύλων ψευδαργύρου και δρα είτε ακυρώνοντας τη μεταγραφή από τους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, είτε ανταγωνιζόμενος με αυτούς για τη δέσμευση στο DNA.



Εικόνα 1.7. Αναπαράσταση της ρύθμισης των γονιδίων που εμπλέκονται στη χρησιμοποίηση πηγών άνθρακα. 1) Παρουσία «ουδέτερης» πηγής άνθρακα (π.χ φρουκτόζης) και απουσία επαγωγικής δεν προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων ούτε ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας-ρυθμιστής (π.χ AlcR) ούτε ο γενικός μεταγραφικός αρνητικός ρυθμιστής (CreA), και κατά συνέπεια τα γονίδια μεταγράφονται ελάχιστα ή καθόλου. 2) Απουσία μορίου επαγωγέα και παρουσία προτιμώμενης πηγής άνθρακα (π.χ γλυκόζης) προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων μόνο ο γενικός μεταγραφικός αρνητικός ρυθμιστής, και κατά συνέπεια τα γονίδια μεταγράφονται ελάχιστα ή καθόλου. 3) Παρουσία μορίου επαγωγέα και απουσία προτιμώμενης πηγής άνθρακα προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων μόνο ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας και πραγματοποιείται μεταγραφή. 4) Παρουσία μορίου επαγωγέα και προτιμώμενης πηγής άνθρακα προσδένονται στον υποκινητή των γονιδίων και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες και κατά συνέπεια τα γονίδια μεταγράφονται ελάχιστα ή καθόλου (βασισμένο σε αντίστοιχο του Scazzocchio 2009).

Ο *A. nidulans* μπορεί να χρησιμοποιήσει μια ποικιλία ουσιών ως πηγές άνθρακα και αζώτου, όπως η προλίνη και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη και τον καταβολισμό των ουσιών αυτών δεν εκφράζονται μόνο όταν στο θρεπτικό υπόστρωμα υπάρχουν ταυτόχρονα γλυκόζη και αμμωνιακά ιόντα/γλουταμίνη (Gonzalez et al. 1997). Το σύστημα αυτό φαίνεται να έχει εξελιχθεί έτσι, ώστε όταν υπάρχει προτιμώμενη πηγή αζώτου η ουσία αυτή να χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα και αντίστροφα. Φυσικά, υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιείται ως πηγή αζώτου και άνθρακα ταυτόχρονα, όταν στο θρεπτικό μέσο απουσιάζουν οι προτιμώμενες.



Εικόνα 1.8. Αναπαράσταση της ρύθμισης των γονιδίων που εμπλέκονται στη χρησιμοποίηση ουσιών που μπορεί να είναι πηγές αζώτου και άνθρακα. 1) Απουσία μορίου επαγωγέα (π.χ. προλίνης) ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας (εν προκειμένω PrnA) δεν προσδένεται στον υποκινητή των γονίδιων και πραγματοποιείται ελάχιστη ή καθόλου μεταγραφή. Αυτό συμβαίνει ανεξάρτητα της παρουσίας προτιμώμενης πηγής αζώτου ή άνθρακα. Στο σχήμα φαίνεται μόνο η περιπτώση που απουσιάζει μια προτιμώμενη πηγή αζώτου. 2) Παρουσία επαγωγέα και απουσία προτιμώμενων πηγών αζώτου και άνθρακα προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας και ο AreA. Εμφανίζεται πλήρης μεταγραφική επαγωγή. 3) Παρουσία μορίου επαγωγέα και προτιμώμενης πηγής αζωτου με ταυτόχρονη απουσία προτιμώμενης πηγής άνθρακα προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων μόνο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας. Εμφανίζεται πλήρης ή σχεδόν πλήρης μεταγραφική επαγωγή. 4) Παρουσία μορίου επαγωγέα και προτιμώμενης πηγής άνθρακα, με ταυτόχρονη απουσία προτιμώμενης πηγής αζώτου, προσδένονται και οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες. Ο AreA ακυρώνει την αρνητική ρύθμιση του CreA και εμφανίζεται πλήρης ή σχεδόν πλήρης μεταγραφική επαγωγή. 5) Παρουσία μορίου επαγωγέα και προτιμώμενων πηγών αζώτου και άνθρακα προσδένονται μόνο ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας και ο CreA. Εμφανίζεται ελάχιστη ή καθόλου μεταγραφή (βασισμένο σε αντίστοιχο του Scazzocchio 2009).

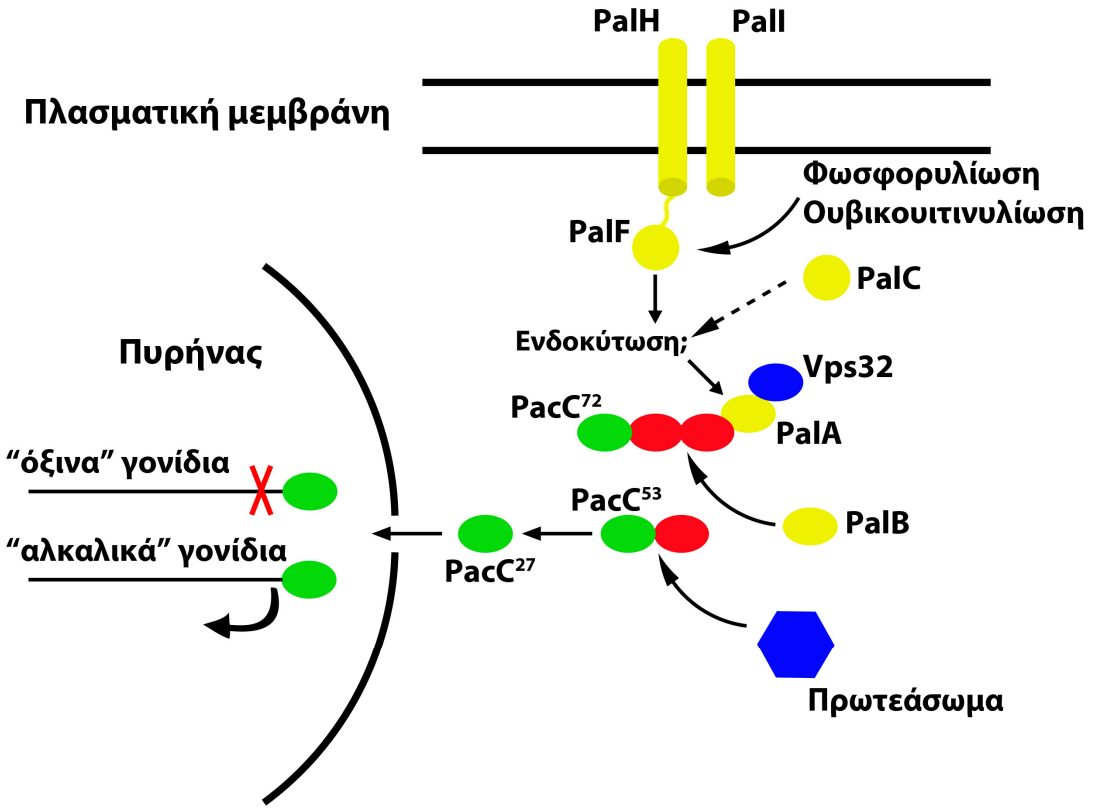
Η αναστολή από γλυκόζη απαιτεί τη συμμετοχή του CreA ενώ η αναστολή από προτιμώμενη πηγή αζώτου την απενεργοποίηση του AreA. Ενώ στα μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με δευτερεύουσες πηγές αζώτου ο AreA είναι πάντα απαραίτητος για τη μεταγραφή, στα αυτά τα μονοπάτια χρειάζεται μόνο όταν ο CreA έχει ενεργοποιηθεί από κάποια προτιμώμενη πηγή άνθρακα. Στις Εικόνες 1.6, 1.7 και

1.8 φαίνονται σχηματικά όσα περιγράφηκαν παραπάνω για τα μονοπάτια καταβολισμού πουρινών, αιθανόλης και προλίνης. Κάποιες επιπλέον λεπτομέρειες για τη ρύθμιση της μεταγραφής του μονοπατιού καταβολισμού πουρινών αναφέρονται στην παράγραφο 3.3.1

1.4.3.2. Ρύθμιση της μεταγραφής ως απόκριση στο εξωτερικό pH

Οι εδαφικοί οργανισμοί, όπως οι Ασπέργιλλοι, ανταποκρίνονται σε μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών. Μια από αυτές είναι το εξωτερικό pH, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση και έκκριση εξωκυτταρικών ενζύμων και εκκρινόμενων μεταβολιτών, καθώς και κάποιων μεταφορέων (Penalva et al. 2008). Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για τη μολυσματικότητα που εμφανίζει ο *A. nidulans* σε ποντίκια τεχνητά ανοσοκατεσταλμένα (Bignell et al. 2005). Άλλες διαδικασίες οι οποίες σχετίζονται με το εξωτερικό pH είναι η σύνθεση πενικιλίνης, η οποία σε κάποια είδη του γένους *Penicillium* συμβαίνει μόνο σε αλκαλικό pH (Brakhage et al. 2004), και η πρόσληψη σιδηροφόρων (Eisendle et al. 2004). Η μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης της έκφρασης από το εξωτερικό pH ήταν πρωτοπόρος στον *A. nidulans*. Ο κύριος ρυθμιστής αυτής της διαδικασίας είναι ο PacC, μεταγραφικός παράγοντας δακτύλων ψευδαργύρου, ενώ στη διαδικασία αντίληψης του pH και μεταγωγής του σήματος συμμετέχουν τα προϊόντα των γονιδίων *palA, palB, palC, palF, palH* και *palI* (Penalva et al. 2008). Ο PacC έχει, στην ενεργό του μορφή, θετική δράση για την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το αλκαλικό pH και αρνητική για αυτά του όξινου pH. Σε όξινο pH (συνήθως 4 χρησιμοποιείται πειραματικά) ο PacC είναι ανενεργός. Αυτό οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε τέτοια στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης που την αποκλείει από τον πυρήνα. Σε αλκαλικό pH (συνήθως 8 χρησιμοποιείται πειραματικά) η πρωτεΐνη ενεργοποιείται ύστερα από ρυθμιζόμενη μερική πρωτεόλυση, η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Η πρωτεόλυση αυτή πραγματοποιείται σε αλκαλικό pH, μετά την πρόσδεση του PalA στον PacC, σε ένα σημείο της πρωτεΐνης πολύ κοντά σε μια αλληλουχία ευαίσθητη σε πρωτεάσες, στο καρβοξυτελικό άκρο του PacC. Αυτή η πρόσδεση καθιστά τον PacC ευαίσθητο σε πρωτεόλυση από την PalB, μια πρωτεάση της οικογένειας των καλπαϊνών. Με την πρωτεόλυση αυτή παράγεται από την πλήρους μήκους 72 kDa PacC μια νέα μορφή

53 kDa. Η μορφή αυτή υπόκειται σε περαιτέρω πρωτεόλυση από το πρωτεάσωμα, από την οποία προκύπτει ο λειτουργικός PacC, μεγέθους 27 kDa.



Εικόνα 1.9 Απλοποιημένο σχήμα της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης από το εξωτερικό pH. Λεπτομέρειες στο κείμενο (βασισμένο σε αντίστοιχο του Scazzocchio 2009).

Το σήμα για την πρόσδεση του PalA στον PacC δεν είναι ακριβώς γνωστό πως προκύπτει. Η πρωτεΐνη ανιχνευτής του pH φαίνεται να είναι η PalH, πιθανώς υποβοηθούμενη από την PalI. Και οι δύο είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, και μάλιστα η καρβοξυτελική περιοχή της PalH αλληλεπιδρά άμεσα με την PalF. Η PalF ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών που ομοιάζουν σε αρρεστίνες (arrestin-like proteins, παράγραφος 4.2.1.5), οι οποίες έχουν πρόσφατα δειχθεί στον *S. serevisiae* να λειτουργούν ως προσαρμοστές μεταξύ μεταφορέων και της Rsp5p λιγάσης της ουβικουιτίνης. Για την PalF η κατάσταση φαίνεται να είναι λίγο διαφορετική, αφού, ενώ έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά σε αλκαλικές συνθήκες με το αμινοτελικό άκρο της PalH και να ουβικουιτινυλιώνεται, κάτι που φαίνεται να εξαρτάται από την φωσφορυλίωσή της, η PalF δεν μοιάζει να ενδοκυτώνεται μαζί με τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά, αλλά μόνη της. Από τη διαδικασία ενδοκύτωσης της PalF μέχρι την

ενεργοποίηση της PalA ώστε να προσδεθεί στον PacC, βρίσκεται ο χαμένος κρίκος στη μεταγωγή του σήματος από την αλλαγή του pH στον πυρήνα. Η ουβικουιτινυλίωση του PalF και η ενδοκύτωσή του με κάποιον τρόπο σχετίζονται με την μέχρι στιγμής ασύνδετη πρωτεΐνη PalC, μια πρωτεάση κυστεΐνης που διαθέτει μια επικράτεια Bro1. Οι επικράτειες αυτές έχουν δειχθεί να αλληλεπιδρούν με την Vps32 ενδοσωμική πρωτεΐνη. Η PalA διαθέτει επίσης μια τέτοια επικράτεια, συνεπώς όλα συνηγορούν πως η αλληλεπίδραση που λείπει συμβαίνει στα ενδοσώματα ή τα Πολυκιστιδιακά Σωμάτια (Multi-Vesicular Bodies, MVBs). Πράγματι, έχει δειχθεί πως η PalC όντως αλληλεπιδρά με την AnVps32, ενώ εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη σε αλκαλικό pH (Galindo et al. 2007). Στην Εικόνα 1.9 περιγράφονται περιληπτικά τα όσα έχουν αναφερθεί.

1.4.3.3. Ρύθμιση του δευτερογενούς μεταβολισμού

Οι μύκητες παράγουν μια πολύ μεγάλη ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τοξίνες, αντιβιοτικά της κατηγορίας της β-λακτάμης και λοβοστατίνη. Πολλά γονίδια ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών έχουν κλωνοποιηθεί. Από αυτό έχει φανεί πως τα γονίδια που εμπλέκονται σε ένα μονοπάτι σύνθεσης δευτερογενούς μεταβολίτη συνήθως οργανώνονται σε συστοιχίες (clusters). Τα μονοπάτια αυτά είναι συνήθως εύκολο να εντοπιστούν σε οργανισμούς με γνωστό γονιδίωμα, αφού φαίνεται σχεδόν πάντα να περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν για συνθετάσες πολυκετιδίων ή/και μη-ριβοσωμικών πεπτιδίων. Η οργάνωση σε συστοιχίες φαίνεται να προκαλεί αρκετά ερωτήματα σχετικά με την προέλευση των γονιδίων αυτών, μιας και τα περισσότερα γονίδια των μονοπατιών πρωτογενούς μεταβολισμού δεν έχουν τέτοια οργάνωση στους μύκητες. Μια εξήγηση που συνεχώς κερδίζει έδαφος είναι πως οι συστοιχίες αυτές γονιδίων μεταφέρθηκαν από άλλους οργανισμούς με οριζόντια μεταφορά. Πράγματι, υπάρχουν ενδείξεις πως τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της ισοπενικιλίνης-Ν μεταφέρθηκαν σε προγονικά είδη των γενών *Aspergillus* και *Penicillium* από κάποιο προγονικό είδος Στρεπτομύκητα (Buades and Moya 1996). Αντίστοιχες ενδείξεις προκύπτουν από συγκριτική ανάλυση γονιδιωμάτων. Πολύ πρόσφατα φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν πως η συστοιχία γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεση της στεριγματοκυστίνης πρέπει να έχει μεταφερερθεί οριζόντια από το γένος *Aspergillus*

στην *Podospora anserina* (Khaldi et al. 2008). Η συστοιχία είναι μήκους 54 kb και διατηρεί μεταξύ αυτών των πολύ απομακρυσμένων οργανισμών την γειτνίαση πολλών γονιδίων της συστοιχίας με άλλων του *A. nidulans*. Επιπροσθέτως, η συστοιχία της *Podospora anserina* εμφανίζει πολύ συντηρημένο περιεχόμενο, αλληλουχία και μικροσυνταίνια με αυτή του *A. nidulans*.

Όσον αφορά τη γονιδιωματική θέση των συστοιχιών, έχει παρατηρηθεί πως συνήθως εντοπίζονται σε υποτελομερικές χρωμοσωμικές περιοχές, οι οποίες εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ανασυνδυασμού και πολύ χαμηλή συνταίνια, ακόμη και μεταξύ πολύ συγγενικών οργανισμών (Scazzocchio 2006). Το γεγονός αυτό πιθανώς εξηγεί την μεγάλη ποικιλομορφία που εμφανίζεται όσον αφορά την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και ίσως σχετίζεται με τα γεγονότα οριζόντιας μεταφοράς.

Πολύ καλά μελετημένα μονοπάτια βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών είναι αυτό της σύνθεσης αφλατοξίνης από τον *A. flavus* (Georgianna and Payne 2009), καθώς και ισοπενικιλίνης (Perez-Esteban et al. 1993) και στεριγματοκυστίνης (Yu and Keller 2005, Cary and Ehrlich 2006), μιας πρόδρομης της αφλατοξίνης ουσίας, από τον *A. nidulans*. Η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών συμβαίνει κατά την προχωρημένη μυκηλιακή ανάπτυξη και φαίνεται να συνδέεται με την κονιδιοποίηση, αφού μοιράζεται ρυθμιστικούς μηχανισμούς με τη διαδικασία αυτή. Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης και στεριγματοκυστίνης έχει δειχθεί να ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη AflR, η οποία ανήκει στην οικογένεια των μυκητιακών μεταγραφικών ενεργοποιητών Cys6Zn2 (Fernandes et al. 1998). Δεν είναι γνωστό εάν η ενεργοποίηση του AflR πραγματοποιείται από κάποιον συγκεκριμένο μεταβολίτη, όπως συμβαίνει με τους άλλους Cys6Zn2 μεταγραφικούς ενεργοποιητές (π.χ AreA, NirA), ή ενεργοποιείται μόνο από το μονοπάτι που θα περιγραφεί παρακάτω. Δεν έχει βρεθεί κάποιος μεταγραφικός παράγοντας για το μονοπάτι βιοσύνθεσης ισοπενικιλίνης, το οποίο όμως ρυθμίζεται από διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως το εξωτερικό pH (Espeso and Penalva 1996).

Σημαντική συμβολή στην κατανόηση της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων του δευτερογενούς μεταβολισμού υπήρξε η κλωνοποίηση του γενικού ρυθμιστή LaeA (Bok and Keller 2004). Ο μεταγραφικός αυτός ρυθμιστής είναι συντηρημένος στους νηματοειδείς μύκητες αλλά όχι στις ζύμες, ενώ έχει δειχθεί να ενεργοποιεί τη σύνθεση ισοπενικιλίνης, στεριγματοκυστίνης, γλυοτοξίνης και

λοβοστατίνης. Από ανάλυση μεταγραφώματος του *A. fumigatus* φάνηκε πως απαλοιφή του γονιδίου του ομόλογου του LaeA προκαλεί αναστολή της έκφρασης των 13 από τις 22 συστοιχίες που έχουν βρεθεί στον οργανισμό αυτό (Perrin et al. 2007). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως ο LaeA έχει μεν μεγάλο εύρος δράσης, αλλά δεν αυτή δεν είναι καθολική. Ο LaeA διαθέτει μια μόνο μία από τις δύο τυπικές των μεθυλο-τρανσφερασών ιστονών αλληλουχίες, την SAM, ενώ δεν έχει την SET. Η αλληλουχία SAM είναι υπεύθυνη για την καταλυτική ενεργότητα των μεθυλοτρανσφερασών που τροποποιούν ειδικά την ιστόνη H3 (Min et al. 2003), οι οποίες δεν περιέχουν την αλληλουχία SET. Επίσης έχει δειχθεί πως τέτοιες μεθυλοτρανσφεράσες είναι πιθανό να έχουν ως υπόστρωμα RNA και όχι DNA (Sun et al. 2005). Πράγματι, πολύ πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως ο LaeA ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του δευτερογενούς μεταβολισμού μέσω αλλαγής της δομής της χρωματίνης, η οποία εξαρτάται από τη λειτουργία μορίων που σχετίζονται με την RNA-σίγηση. Απαλοιφή γονιδίων του *A. nidulans* που σχετίζονται με την RNA-σίγηση ετεροχρωματινικών περιοχών προκαλεί πρόωρη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Bok et al. 2009). Μάλιστα οι απαλοιφές αυτές μπορούν να καταστείλουν μερικώς το φαινότυπο που προκαλεί η απαλοιφή του LaeA, είναι δηλαδή επιστατικές, γεγονός που υποδηλώνει πως ο LaeA δρα αναρροϊκά των τροποποιήσεων που προκαλεί η RNA-σίγηση. Ακόμη πιο εντυπωσιακό ήταν το γεγονός πως η απαλοιφή του γονιδίου *cclA*, που κωδικοποιεί για μια μεθυλοτρανσφεράση της ιστόνης H3, ενεργοποιεί πολλά μονοπάτια παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών. Σε μετεγενέστερη εργασία (Reyes-Dominguez et al. 2010) δείχθηκε πως η ιστόνη H3 στη συστοιχία γονιδίων σύνθεσης στεριγματοκυστίνης είναι μεθυλιωμένη κατά την ενεργό μυκηλιακή αύξηση, ενώ η συστοιχία περιέχει υψηλά ποσοστά της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HepA. Κατά την αναστολή της αύξησης, και ενώ αρχίζει η παραγωγή στεριγματοκυστίνης, τα επίπεδα της μεθυλίωσης της H3 μειώνονται, όπως και το ποσοστό της HepA, ειδικά στη συγκεκριμένη συστοιχία και όχι σε παρακείμενες περιοχές του γονιδιώματος. Έτσι, φαίνεται πως η δράση του LaeA πρέπει να εντοπίζεται στην αντιστροφή της ανασταλτικής λειτουργίας της μεθυλίωσης της H3 και τις εγκαθίδρυσης ετεροχρωματικής δομής στις συστοιχίες τις οποίες επηρεάζει. Η πολύ ενδιαφέρουσα αυτή δουλειά είναι πιθανό να αποκαλύψει περισσότερα για το μηχανισμό ρύθμισης της σύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών, αλλά και να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση της γονιδιωματικής κατανομής της ετεροχρωματίνης στους νηματοειδείς

ασκομύκητες (Strauss and Reyes-Dominguez 2010). Τέλος, ο LaeA φαίνεται να είναι ο χαμένος κρίκος στη σύνδεση μεταξύ παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών και αγενούς αναπαραγωγής, της κονιδιοποίησης δηλαδή, που είχε παρατηρηθεί παλαιότερα. Δείχθηκε πως στελέχη που δεν εκφράζουν τον LaeA εμφανίζουν διαρκώς διαφοροποίηση προς φυλετική αναπαραγωγή (Bayram et al. 2008). Αυτό επιτυγχάνεται επειδή η αλληλεπίδραση του LaeA με τον VeA δείχθηκε να είναι απαραίτητη για την αναστολή της κονιδιοποίησης. Παρά τη συνεχή διαφοροποίηση προς φυλετική αναπαραγωγή, τα στελέχη εμφανίζουν πολύ μικρότερα κλειστοθήκια, λόγω έλλειψης των κυττάρων Hulle (Sarikaya Bayram et al. 2011). Αυτό δείχνει πως ο LaeA είναι απαραίτητος και για διαδικασίες διαφοροποίησης που σχετίζονται με τη φυλετική αναπαραγωγή.

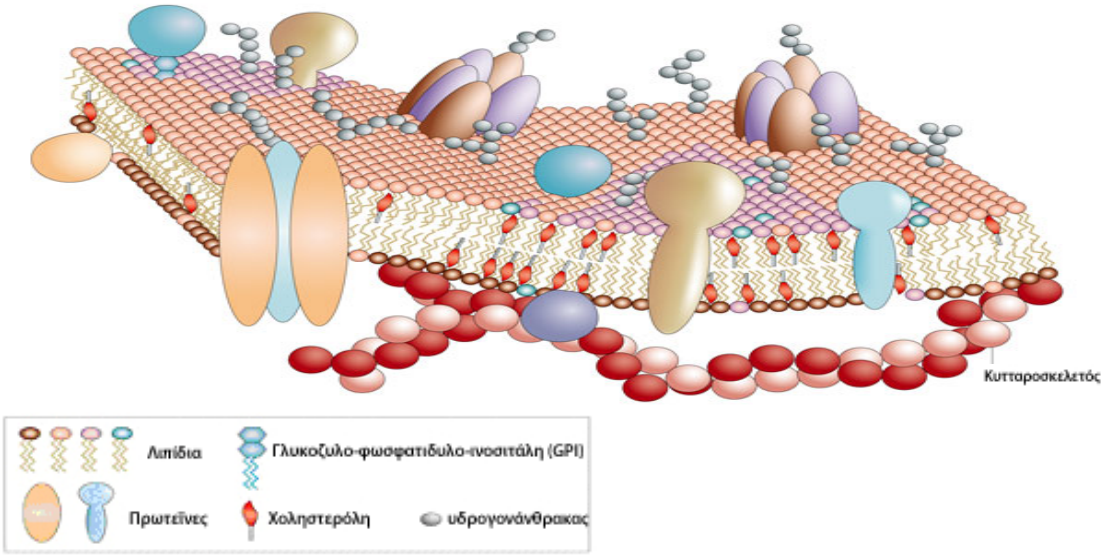
2. Πλασματική μεμβράνη - μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφορείς

2.1. Η δομή της πλασματικής μεμβράνης

Η πλασματική μεμβράνη αποτελεί το φυσικό σύνορο των κυττάρων, και ταυτόχρονα το πρώτο σημείο αλληλεπίδρασης με το περιβάλλον. Σήμερα πιστεύεται πως η βιολογική εξέλιξη στα πρώτα της βήματα διαδραματίστηκε μέσα σε κυστίδια λιπιδικών διπλοστοιβάδων. Πράγματι, η ικανότητα εκλεκτικής διαπερατότητας των μορίων κάθετα στη διπλοστοιβάδα και η οριοθέτηση ενός ασφαλούς και πλούσιου περιβάλλοντος στον ελλιπή πρωτόγονο μεταβολισμό πρέπει να αποδείχτηκε κρίσιμη για τη μετέπειτα εξέλιξη της ζωής. Με την πολυπλοκότητα και τον ανταγωνισμό να αυξάνονται, και τα χημικά θρεπτικά υποστρώματα να ελαττώνονται, η πλασματική μεμβράνη απέκτησε νέους ρόλους και έδωσε λύσεις. Αφενός, φιλοξένησε πρωτεΐνες που μετέφεραν νέες, πιο σύνθετες οργανικές ουσίες στο κύτταρο, οι οποίες δεν μπορούσαν να διασχίσουν τη μεμβράνη. Έτσι, νέες πηγές άνθρακα και αζώτου, ενεργειακά πλουσιότερες, άρχισαν να χρησιμοποιούνται. Αφετέρου, εξελίχθηκε στις επιφάνειες των μεμβρανών η φωτοσύνθεση, και κατόπιν η αναπνοή, και αποφεύχθηκε το διαφαινόμενο πρόωρο τέλος της ζωής. Με τη διαμερισματοποίηση του κυττάρου έγινε εφικτή η αύξηση του όγκου και της πολυπλοκότητάς του, ενώ το κύτταρο μπόρεσε να αντιλαμβάνεται περιβαλλοντικές αλλαγές, αλλά και μηνύματα από άλλους οργανισμούς. Μέσω της κυτταρικής σύνδεσης και προσκόλλησης, αλλά και της ανάπτυξης μηχανισμών για την κυτταρική επικοινωνία, έγινε δυνατό το πέρασμα από τους μονοκύτταρους στους πολυκύτταρους οργανισμούς.

Η πλασματική μεμβράνη αποτελείται από λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, σε αναλογίες που διαφέρουν μεταξύ οργανισμών, αλλά και κυττάρων του ίδιου οργανισμού, ακόμη και στο ίδιο το κύτταρο ανάλογα με τις συνθήκες. Οι διαφορές αυτές αντανακλούν λειτουργικές και περιβαλλοντικές εξειδικεύσεις. Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού (Singer and Nicolson 1972) (Εικόνα 2.1) καταφέρνει να εξηγήσει τις φυσικοχημικές διαφορές της μεμβράνης, όπως τη ρευστότητα, το σημείο τήξης και τη θερμοκρασία μετάπτωσης (Θμ). Διαφορές στη σύσταση σε λιπαρά οξέα, στο μήκος και τον αριθμό των ακόρεστων δεσμών των αλειφατικών αλυσίδων, αλλά και της περιεκτικότητας σε στερόλες, ρυθμίζουν τις ανωτέρω παραμέτρους. Σε φυσιολογικές συνθήκες η μεμβράνη διατηρείται σε κατάσταση

«υγρού κρυστάλλου». Η ρευστότητα αυτή, που είναι συνάρτηση της σύστασής της, αλλάζει με τη θερμοκρασία. Έτσι, όταν η μεμβράνη ψυχθεί και βρεθεί στο κάτω όριο του σημείου μετάπτωσής της, μετατρέπεται αντιστρεπτά σε πήκτωμα.



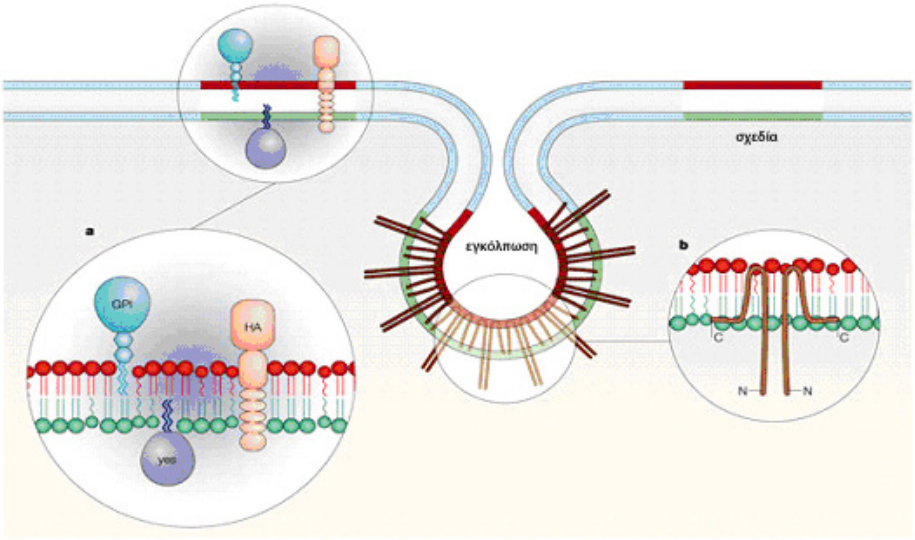
Εικόνα 2.1. Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού (από Alberts et al. 1994 με τροποποιήσεις)

Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού (Singer and Nicolson 1972) (Εικόνα 2.1) καταφέρνει να εξηγήσει τις φυσικοχημικές διαφορές της μεμβράνης, όπως τη ρευστότητα, το σημείο τήξης και τη θερμοκρασία μετάπτωσης (Θμ). Διαφορές στη σύσταση σε λιπαρά οξέα, στο μήκος και τον αριθμό των ακόρεστων δεσμών των αλειφατικών αλυσίδων, αλλά και της περιεκτικότητας σε στερόλες, ρυθμίζουν τις ανωτέρω παραμέτρους. Σε φυσιολογικές συνθήκες η μεμβράνη διατηρείται σε κατάσταση «υγρού κρυστάλλου». Η ρευστότητα αυτή, που είναι συνάρτηση της σύστασής της, αλλάζει με τη θερμοκρασία. Έτσι, όταν η μεμβράνη ψυχθεί και βρεθεί στο κάτω όριο του σημείου μετάπτωσής της, μετατρέπεται αντιστρεπτά σε πήκτωμα.

Σύνδεση της δομής-περιεκτικότητας της μεμβράνης με συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες έγινε με το μοντέλο των λιπιδικών σχεδίων (lipid rafts-Simons and Ikonen 1997, Brown and London 1998). Οι σχεδίες είναι μικρές λιπιδικές πλατφόρμες (Εικόνα 2.2) μεγέθους περίπου 50 nm και αποτελούν μια διαφοροποίηση της μεμβρανικής σύστασης. Στην κυτταροπλασματική τους πλευρά περιέχουν κυρίως φωσφολιπίδια και χοληστερόλη που συνδέονται με σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη της εξωκυτταρικής πλευράς της μεμβράνης. Η δομή αυτή είναι ρευστή, αλλά

λιγότερο από το περιβάλλον της. Έτσι μπορεί να διαχέεται πάνω σε μια δισδιάστατη θάλασσα λιπιδίων.

Περίπου 20 πρωτεΐνες υπολογίζεται ότι μπορούν να τοποθετηθούν σε μια σχεδία. Μάλιστα έχει βρεθεί πως συγκεκριμένα ήδη πρωτεϊνών, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους, έχουν μεγαλύτερη ή μικρότερη συγγένεια για τις σχεδίες (Simons and Ehehalt 2002). Οι σχεδίες, με άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο επάγονται και αυξάνουν σε μέγεθος, φέρνοντας κοντά πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν. Άλλες λειτουργίες στις οποίες φαίνεται να συμμετέχουν αυτές οι δομές είναι η μεταγωγή σήματος, η ανακύκλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω του συστήματος της ουβικιτινυλίωσης, η ανθεκτικότητα σε μη ιονικά τασιενεργά, ενώ έχουν συνδεθεί με την επάκρια αύξηση των υφών της *Candida albicans* (Martin and Konopka 2004), αλλά και του *A. nidulans* (παράγραφος 1.2.2).



Εικόνα 2.2. Το μοντέλο των λιπιδικών σχεδίων (από Simons and Ikonen 1997 με τροποποιήσεις)

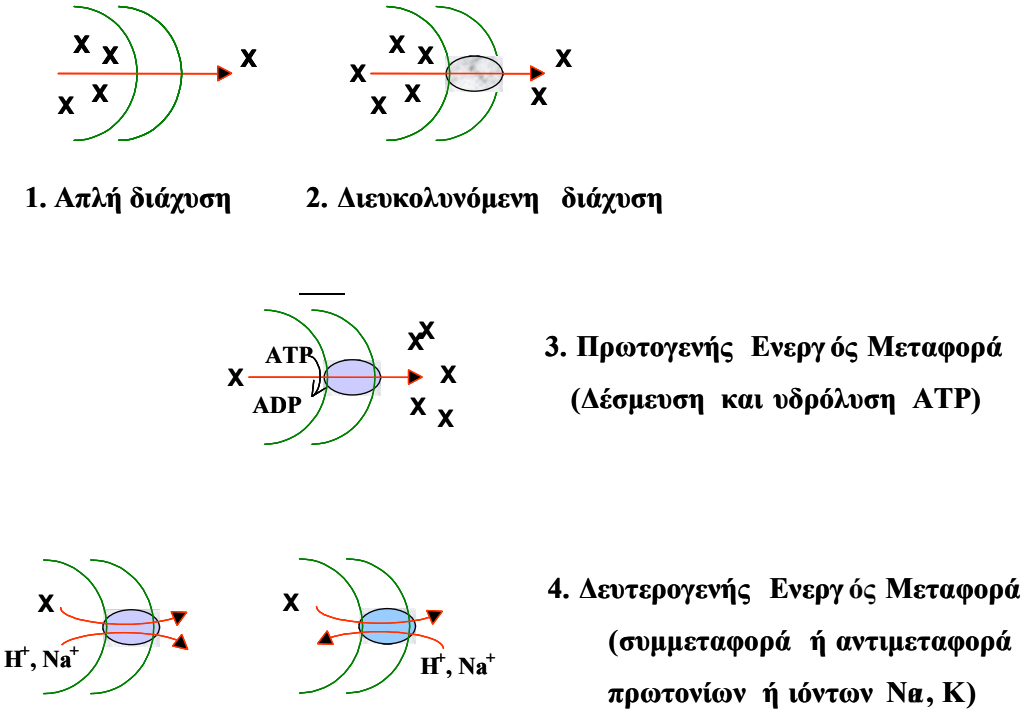
Οι λιπιδικές σχεδίες έχουν πρόσφατα ταυτισθεί με δομές της πλασματικής μεμβράνης (Membrane Compartments, MCs) που περιέχουν συγκεκριμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως οι μεταφορείς αργινίνης Can1p, τρυπτοφάνης Tat1p και ουρακίλης Fur4p του *S. serevisiae*. Τα μεμβρανικά αυτά τμήματα έχουν επίσης συσχετισθεί με μεγάλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα, τα εισοσώματα (Walther et al. 2006), τα οποία ευρίσκονται κυτταροπλασματικά σε επαφή με συγκεκριμένα MCs (παράγραφος 4.3.3). Οι απόψεις για τη λειτουργία τους διίστανται, αφού αρχικά είχαν

χαρακτηρισθεί ως σημεία έναρξης της ενδοκύτωσης (Walther et al. 2006), ενώ σε άλλες μελέτες φάνηκε να λειτουργούν ως σημεία προστασίας από ενδοκύτωση (Grossmann et al. 2008) και να είναι απαραίτητες για τη σωστή αναδίπλωση και κατά συνέπεια λειτουργία των πρωτεϊνών που περιέχουν (Umebayashi and Nakano 2003, Lauwers et al. 2007).

2.2. Εκλεκτική διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης

Η πλασματική μεμβράνη είναι διαπερατή για μικρά, μη πολικά μόρια, όπως η αιθανόλη. Το υδρόφοβο, όμως, περιβάλλον των αλειφατικών ουρών των λιπιδίων δημιουργεί ένα σχεδόν αδιαπέραστο φράγμα για μεγάλες ή πολικές ενώσεις. Για τις ενώσεις αυτές το κύτταρο διαθέτει μια ποικιλία μηχανισμών υπεύθυνων για τη μεταφορά και τη ρύθμιση της συγκέντρωσης τους. Είναι εντυπωσιακό ότι στην *E. coli* το 20% περίπου των γονιδίων σχετίζονται με τη μεταφορά ιόντων.

2.2.1. Οι μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς



Εικόνα 2.3. Μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς

Οι μηχανισμοί διαμεμβρανικής μεταφοράς μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες (Εικόνα 2.3). Κατά την απλή διάχυση, μικρά και μη πολικά μόρια κινούνται ελεύθερα αμφίδρομα κατά μήκος της μεμβράνης. Η υποβοηθούμενη διάχυση ή παθητική μεταφορά γίνεται μέσω μεμβρανικών πρωτεϊνών που διευκολύνουν τη μεταφορά συγκεκριμένων μορίων, όπως ιόντων, σύμφωνα με την ηλεκτροχημική τους κλίση. Μεγαλύτερα ή πιο πολικά μόρια, όπως σάκχαρα, αμινοξέα, νιτρικά άλατα, βιταμίνες, νουκλεοσίδια και νουκλεοτιδικές βάσεις μπορούν να διασχύσουν τη μεμβράνη με διευκολυνόμενη διάχυση μέσω μονομεταφορέων, πάλι κατά την ηλεκτροχημική τους κλίση. Τέλος με ενεργό μεταφορά, ουσίες σημαντικές για το κύτταρο, όπως πηγές άνθρακα ή αζώτου, δομικά συστατικά, ιόντα που συντηρούν την πόλωση της μεμβράνης και άχρηστες ή τοξικές ουσίες μεταφέρονται μέσα ή έξω από το κύτταρο ενάντια στην κλίση συγκέντρωσής τους. Η ενέργεια για αυτές τις διαδικασίες δίνεται από το ATP, την PMF (proton motive force, κλίση πρωτονίων) ή την περίσσεια ιόντων Na^+ εξωκυτταρικά, που διατηρείται από τις αντλίες καλίου/νατρίου.

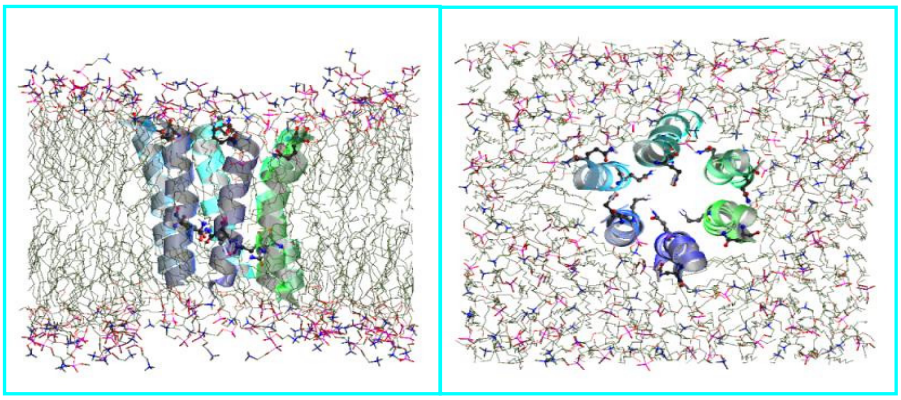
Η ενεργός μεταφορά διακρίνεται σε πρωτογενή και δευτερογενή, ανάλογα με την ενεργειακή πηγή που χρησιμοποιείται. Οι μεταφορείς πρωτογενούς ενεργότητας κάνουν χρήση χημικής ή ηλεκτρικής ενέργειας, προερχόμενης από αντιδράσεις, όπως την υδρόλυση ATP ή τις οξειδαναγωγικές αντιδράσεις καταβολισμού υποστρωμάτων. Οι μεταφορείς δευτερογενούς ενεργότητας χρησιμοποιούν τη διαφορά δυναμικού διαφόρων ιόντων (π.χ H^+, Na^+) για την παροχή ενέργειας, τα οποία μεταφέρουν ταυτόχρονα με τα υποστρώματα τους. Η μεταφορά του ιόντος μπορεί να γίνεται προς την ίδια ή την αντίθετη κατεύθυνση σε σχέση με την μεταφερόμενη ουσία, οπότε οι πρωτεΐνες ονομάζονται συμμεταφορείς ή αντιμεταφορείς, αντίστοιχα.

2.2.2. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφορείς

Δομικά και λειτουργικά, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά ουσιών διακρίνονται σε κανάλια ή διαύλους και σε μεταφορείς. Τα κανάλια μπορεί να αποτελούνται από διαμεμβρανικές β-πτυχωτές επιφάνειες, που σχηματίζουν ένα β-βαρέλι, και πολύ συχνότερα από α-έλικες. Έχουν στο κέντρο τους και κάθετα ή σχεδόν κάθετα στη μεμβράνη έναν υδάτινο πολικό πόρο κατάλληλου εύρους για να επιτρέπει το πέρασμα συγκεκριμένων μορίων σύμφωνα με την ηλεκτροχημική τους κλίση και χωρίς την ανάγκη ενέργειας (Saier 2000).

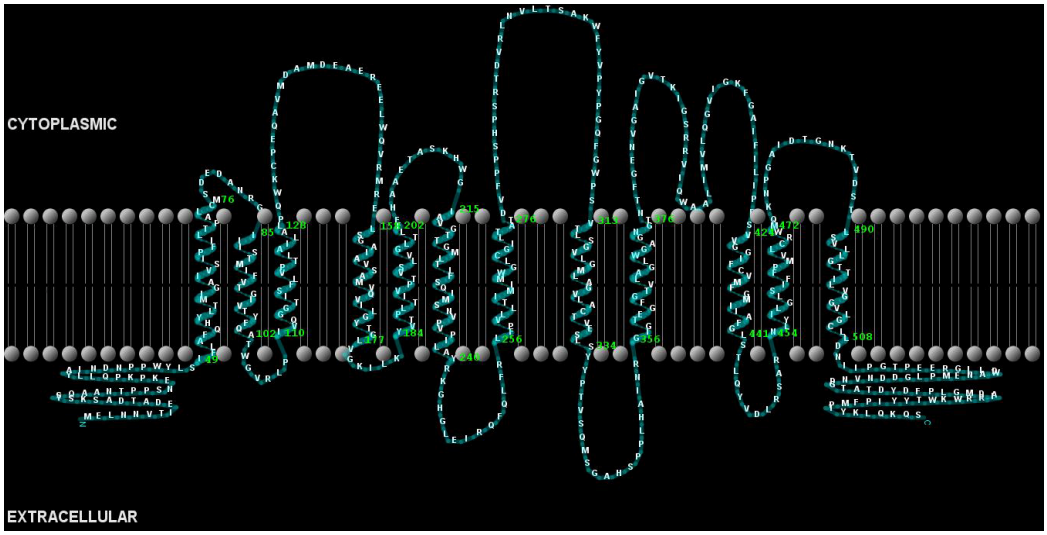
Οι μεταφορείς αποτελούνται από αρκετά διαμεμβρανικά τμήματα (TMS), τα οποία έχουν, σχεδόν αποκλειστικά, δομή α-έλικας. Οι α-έλικες σχηματίζονται κυρίως από μη πολικά υδρόφοβα αμινοξέα. Αυτό συντελεί στη σωστή τοπογένεσή τους κατά την πρωτεϊνοσύνθεση στις μεμβράνες του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), αλλά και στη σωστή διαμόρφωσή τους στο αλειφατικό περιβάλλον της μεμβράνης. Η α-έλικα έχει επικρατήσει στους μεταφορείς λόγω της ευκαμψίας της, που επιτρέπει τις κινήσεις, αλλά και της ποικιλότητας στον αριθμό αμινοξέων ενός TMS (15-25). Η ποικιλότητα αυτή των αμινοξέων έχει σχέση με τη λειτουργία, αλλά και με το γεγονός ότι η διαμόρφωση ενός TMS δεν είναι πάντα κάθετη στη μεμβράνη, ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις ακόμη και οριζόντια. Η δομή των μεταφορέων δεν σχηματίζει ανοικτό πόρο (Εικόνα 2.4), αλλά μοιάζει περισσότερο με ένζυμο που εκλεκτικά ανοίγει και μεταφέρει εξειδικευμένες ουσίες με αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής του. Η κινητική των μεταφορέων υπακούει στις κλασσικές θεωρίες που περιγράφονται για τα ένζυμα από τους Michaelis-Menten και χαρακτηρίζεται από τρεις ιδιότητες: την εξειδίκευση προς το υπόστρωμα, τη συγγένεια προς το υπόστρωμα (K_m) και την ταχύτητα μεταφοράς (V). Με βάση αυτές τις θεωρίες, όταν όλες οι θέσεις δέσμευσης υποστρώματος του μεταφορέα είναι κατειλημμένες τότε ο μεταφορέας έχει τη μέγιστη ταχύτητα μεταφοράς (V_{max}). Η σταθερά συγγένειας του μεταφορέα για την ουσία (K_m) ορίζεται ως ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος κατά την οποία η ταχύτητα μεταφοράς είναι το $V_{max}/2$.

Ο προσανατολισμός των μεταφορέων καθορίζεται από τον προσανατολισμό του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης στη μεμβράνη. Η πληροφορία υπάρχει στη αμινοξική της ακολουθία, η οποία καθορίζει την τοποθέτησή της στη μεμβράνη του ΕΔ κατά τη συμμεταφραστική τοπογένεση. Σημαντικό ρόλο παίζει η υδροφοβικότητα ενός TMS αλλά και η ύπαρξη πολικών, θετικά φορτισμένων αμινοξέων στις ενδοκυτταρικές θηλιές που συνδέουν δυο TMS ("*positive inside rule",* Andersson and von Heijne 1994). Η τελική δομή ενισχύεται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και σπανιότερα μέσω δεσμών υδρογόνου και ιοντικών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 2.4. Αριστερά απεικονίζονται οι υδρόφοβες διαμεμβρανικές α-έλικες μίας πολυτοπικής μεμβρανικής πρωτεΐνης ενσωματωμένες στη μεμβράνη. Δεξιά φαίνεται ο «εσωτερικός» υδρόφιλος πόρος που δημιουργείται από τις αμφιπαθικές α-έλικες (από σημειώσεις Μοριακής Μικροβιολογίας, Γ. Διαλλινάς) .

Η μεγάλη πλειοψηφία των μεταφορέων, αποτελείται από 10-14 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας, που ενώνονται μεταξύ τους με σχετικά μικρά, υδρόφιλα, εξωκυτταρικά ή κυτοπλασματικά τμήματα (Εικόνα 2.5), και λειτουργούν ως μονομερή. Η ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας των μεταφορέων είναι ανάλογη της εξειδίκευσής τους, ενώ αντίθετα οι ενεργειακές απαιτήσεις και τα κινητικά τους χαρακτηριστικά είναι ανεξάρτητα από την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμά τους και αντανακλούν την εξελικτική προσαρμογή τους στο περιβάλλον στο οποίο λειτουργούν (Alberts et al. 1994, Sadee et al. 1995, Griffith and Jarvis 1996).



Εικόνα 2.5. Τοπολογικό μοντέλο δευτεροταγούς δομής μεταφορέα. Διακρίνονται 12 TMS και 11 ενδιάμεσα υδρόφιλα τμήτατα. Επίσης διακρίνονται τα αμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα της πρωτεΐνης, που εν προκειμένω έχουν εξωκυτταρική τοποθέτηση (TMRPres2D tool, http://bioinformatics.biol.uoa.gr/).

2.3. Η σημασία των μεταφορέων

Η πολύ σημαντική για το κύτταρο ικανότητα εκλεκτικής διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη μεταφορικών πρωτεϊνών σε αυτήν. Οι πρωτεΐνες αυτές μεταφέρουν μια πολύ μεγάλη ποικιλία ουσιών, συμβάλλοντας σε πολλές διαδικασίες. Σε μια προσπάθεια περιληπτικής αναφοράς των ρόλων των πρωτεϊνών αυτών, πρέπει σίγουρα να αναφερθεί πως οι μεταφορείς:

- Είναι οι διαμεσολαβητές της ελεγχόμενης διακυτταρικής επικοινωνίας ή της επικοινωνίας του κυττάρου με το περιβάλλον του.
- Συμμετέχουν ενεργά στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από το περιβάλλον, από τους μονοκύτταρους οργανισμούς έως και τα ετερότροφα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών.
- Συμβάλλουν στην κατανομή των μεταβολιτών στα οργανίδια
- Απεκκρίνουν ταχέως τοξικές ουσίες
- Διατηρούν την πολικότητα της μεμβράνης (π.χ. Na^+/K^+-ATPάσες)

- Συμβάλουν καθοριστικά στη νευρική και μυϊκή λειτουργία μέσω της ταχείας μεταφοράς νευροδιαβιβαστών και ασβεστίου στους νευρώνες και τα μυϊκά κύτταρα.
- Μεταφέροντας ορμόνες και άλλες ουσίες του ενδοκρινικού και παρακρινικού συστήματος, συμμετέχουν στην άμεση προσαρμογή και συνεργασία των διαφόρων οργάνων
- Εξασφαλίζουν άμυνα και προστασία στους ιστούς με τη διανομή και ανακατανομή αντιβιοτικών και αντι-ιικών ουσιών, αλλά και αντιοξειδωτικών, όπως ουρικό ή ασκορβικό οξύ (Koronakis et al. 2000, Abramson et al. 2003, Murakami and Yamaguchi 2003).
- Διάφορα συστήματα μεταφοράς νουκλεϊκών οξέων προάγουν την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ διαφορετικών οργανισμών με συνέπεια την προώθηση της διαφοροποίησης των ειδών (Saier 2000).
- Αποτελούν ευκαιριακούς στόχους για την είσοδο ιών στο κύτταρο
- Μπορούν να αποτελέσουν μόρια στόχους για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών, μέσω της αναστολής της θρέψης τους, ή της καλύτερης πρόσληψης τοξικών για αυτούς ουσιών (de Koning and Diallinas 2000).

2.4. Μεταφορείς πουρινών

Δύο πουρίνες και τρεις πυριμιδίνες αποτελούν τον κορμό των πληροφοριακών μορίων της ζωής, του DNA και του RNA. Συνεπώς, μια έλλειψη σε αυτές θα είχε καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. Οι περισσότερες πουρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου σε πολλούς μικροοργανισμούς, αλλά και φυτά, μέσω ενός εκτεταμένου μεταβολικού μονοπατιού, το οποίο δεν υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς (de Koning and Diallinas 2000). Στο παραγόμενο ουρικό οξύ έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές ικανότητες, και κυκλοφορεί στο πλάσμα του αίματος του ανθρώπου λίγο κάτω από τη συγκέντρωση κορεσμού του (Faaland et al. 1998, Tsukaguchi et al. 1999, de Koning and Diallinas 2000). Ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών χρησιμοποιούνται ως αντιμεταβολίτες και αντικαρκινικά (de Koning and Diallinas 2000). Ωστόσο, η πλασματική μεμβράνη αποτελεί ένα φυσικό φράγμα για τις περισσότερες από αυτές, και μπορούν να την διασχίσουν μόνο με τη βοήθεια των αντίστοιχων μεταφορέων τους. Τέτοιοι μεταφορείς έχουν βρεθεί στα Αρχαία, τα

Βακτήρια, τους Μύκητες, τα Φυτά, τα Πρωτόζωα, τα Μετάζωα και στον Άνθρωπο. Ένας μικρός αριθμός τέτοιων μεταφορέων έχει χαρακτηρισθεί τα τελευταία χρόνια, ενώ η μεγάλη πλειοψηφία των ομολόγων τους παραμένουν άγνωστης λειτουργικότητας και ενδείξεις για τη λειτουργία τους βασίζονται στην ομοιότητα που παρουσιάζουν με μόρια γνωστής λειτουργίας (Gournas et al. 2008). Η μελέτη του τρόπου καθορισμού της εξειδίκευσης μεταφορέων-μοντέλων και η βελτίωση των οργανισμών-συστημάτων ετερόλογης έκφρασης θα βοηθήσουν καταλυτικά στο χαρακτηρισμό της λειτουργίας του μεγάλου όγκου αλληλουχιών που έχει προκύψει από τις αλληλουχίσεις γονιδιωμάτων.

Με τα υπάρχοντα δεδομένα, οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων ταξινομούνται σε έξι οικογένειες, και όλοι τους είναι δευτερογενούς ενεργότητας. Τα κριτήρια για την ταξινόμηση σε μία οικογένεια, είναι: 1) η ταυτότητα πάνω από 20%, 2) η ομοιότητα πάνω από 40%, 3) παρόμοια προφίλ υδροφοβικότητας, με 10-14 TMS και 4) η ύπαρξη συντηρημένων αλληλουχιών που να βρίσκονται σε παρόμοιες τοπολογικά περιοχές. Η αναγνώριση συγκεκριμένων αλληουχιών, που έχει αποδειχθεί πως έχουν λειτουργική σημασία, σε μερικώς δημοσιευμένες ή μη πληρούσες τα ανωτέρω κριτήρια πρωτεΐνες, έχει βοηθήσει στην ταξινόμησή τους (de Koning and Diallinas 2000, Hyde et al. 2001).

2.4.1. Η οικογένεια NAT ή NCS2

Η πρώτη και σημαντικότερη οικογένεια είναι αυτή των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού οξέος (**N**ucleobase **A**scorbate **T**ransporters, **NAT**/**N**ucleobase **C**ation **S**ymporters **2**, **NCS2**) και περιλαμβάνει μέλη από Αρχαία, Βακτήρια και Ευκαρυωτικά (Gorfinkiel et al, 1993, Ghim & Neuhard 1994, Turner et al, 1994, Andersen et al, 1995, Diallinas et al, 1995, Christiansen et al, 1997, Faaland et al, 1998, Daruwala et al, 1999, Rajan et al, 1999, Tsukaguchi et al, 1999, Argyrou et al, 2001, Karatza and Frilligos, 2005). Λεπτομέρειες για την οικογένεια αυτή θα αναφερθούν εκτεταμένα στο Κεφάλαιο 3.

2.4.2. Η οικογένεια που ορίζεται από τον AzgA

Μια δεύτερη, πρόσφατα χαρακτηρισμένη οικογένεια, αντιπροσωπεύεται από τον μεταφορέα AzgA (μεταφορέας αδενίνης-υποξανθίνης-γουανίνης) του *A. nidulans* και συμπεριλαμβάνει μεταφορείς άγνωστης λειτουργίας από αρχαία, βακτήρια, μύκητες και φυτά (Cecchetto et al. 2004, Maurino et al. 2006). Η πρωτεΐνη AzgA (580 αμινοξέα, 12 προβλεπόμενα TMS) του *A. nidulans* είναι ένας υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας μεταφορέας αδενίνης, υποξανθίνης, γουανίνης, 8-αζαξανθίνης και 2,6-διαμινοπουρίνης, η οποία μεταφέρει επίσης πουρίνη και το τοξικό ανάλογο 8-αζαγουανίνη (Cecchetto et al. 2004, Goudela et al. 2006). Στην ίδια οικογένεια ανήκει και ο μεταφορέας υποξανθίνης-γουανίνης PbuG του *Bacillus subtilis* (Johansen et al. 2003). Στο εργαστήριό μας κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε κινητικά, με ετερόλογη έκφραση στον *A. nidulans,* ο ομόλογος μεταφορέας του *Aspergillus fumigatus*, *Af*AzgA (Goudela et al. 2006), ο οποίος εμφανίζει παρόμοια κινητική και εξειδίκευση με τον AzgA. Επιπλέον πρόσφατα χαρακτηρίσθηκαν δύο ορθόλογα του AzgA της *Arabidopsis thaliana* ως μεταφορείς αδενίνης-γουανίνης (AtAzgA1 και AtAzgA2, (Mansfield et al. 2009).

2.4.3. Η οικογένεια PRT ή NCS1

Η τρίτη οικογένεια γνωστή ως **PRT (NCS1)** (**P**urine **R**elated **T**ransporters, **N**ucleobase **C**ation **S**ymporters **1**), αντιπροσωπεύεται από μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών που απαντώνται στα Βακτήρια, τους Μύκητες και τα Αρχαία (Jund et al. 1988, Weber et al. 1990, Danielsen et al. 1992, de Montigny et al. 1998). Χαρακτηριστικά μέλη της οικογένειας, πολύ μελετημένα σε επίπεδο σχέσεων δομής-λειτουργίας και ρύθμισης της έκφρασης, είναι οι μεταφορείς αδενίνης-γουανίνης-υποξανθίνης-κυτοσίνης Fcy2p (Weber et al. 1990) και ουρακίλης Fur4p (Jund et al. 1988). Από τους δύο αυτούς μεταφορείς προσλαμβάνονται τα ανάλογά τους 5-φθορο-κυτοσίνη και 5-φθόρο-ουρακίλη αντίστοιχα, τα οποία αποτελούν ισχυρά αντικαρκικά και εμφανίζουν σημαντική μυκοτοξικότητα. Πρόσφατα χαρακτηρίσθηκαν στο εργαστήριό μας τα δύο ομόλογά τους του *A. nidulans*, οι FcyB (Vlanti and Diallinas 2008) και FurD (Amillis et al. 2007) μεταφορείς. Η ενεργότητά τους είναι πολύ παρόμοια με αυτή των ομολόγων τους του *S. serevisiae*. Ο FcyB μεταφέρει με υψηλή

συγγένεια αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη, κυτοσίνη και 5-φθορο-κυτοσίνη, αλλά η μεταφορική του ικανότητα, τουλάχιστον όσον αφορά την υποξανθίνη και την αδενίνη, είναι χαμηλή. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με την ύπαρξη του AzgA στον *A. nidulans* ως κύριου μεταφορέα αυτών των ουσιών. Ο κύριος ρόλος του FcyB φαίνεται να είναι η πρόσληψη κυτοσίνης, αν και ρυθμίζεται μεταγραφικά όπως και οι άλλοι μεταφορείς πουρινών. Με εκτεταμένη κινητική ανάλυση της αναστολής της πρόσληψης ραδιοσημασμένης υποξανθίνης από μια ποικιλία υποστρωμάτων και αναλόγων τους προέκυψε ένα μοντέλο για τις αλληλεπιδράσεις του μεταφορέα με τα υποστρώματά του. Το μοντέλο αυτό θα συμβάλει σημαντικά στην περαιτέρω κατανόηση του τρόπου λειτουργίας του μεταφορέα, αλλά και στον πιθανό μελλοντικό σχεδιασμό ειδικών για το μεταφορέα μυκητιακών φαρμάκων. Πολύ ενδιαφέρουσα ήταν η παρατήρηση πως ο FcyB εκφράζεται σε δομές εγγενούς αναπαραγωγής του μύκητα, όπως τα κύτταρα Hulle και τους ανώριμους ασκούς, όπου όμως ο ρόλος του δεν είναι απαραίτητος για τη γονιμότητα ή τη βιωσιμότητα των ασκών. Με ετερόλογη έκφραση του ομόλογου του FcyB του *A. fumigatus* σε στέλεχος που έλλειπε ο ενδογενής FcyB, χαρακτηρίσθηκε ως παρόμοιας λειτουργίας μεταφορέας.

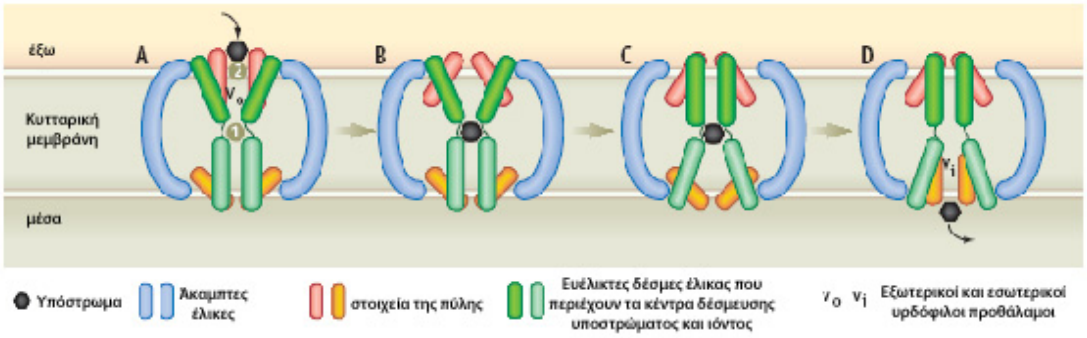
Ο FurD μεταφέρει με υψηλή συγγένεια ουρακίλη, θυμίνη καθώς και διάφορα ανάλογα ουρακίλης με υποκαταστάσεις στη θέση 5, ενώ με μέτρια συγγένεια ουρικό οξύ και ξανθίνη. Είναι επίσης, όπως και ο ομόλογός του Fur4p, ο κύριος μεταφορέας 5-φθορο-ουρακίλης. Για τον FurD, όπως και για τον FcyB, έχει προκύψει ένα μοντέλο για την αλληλεπίδραση με τα υποστρώματά του, με τις ανάλογες του FcyB προοπτικές. Η μεταγραφική ρύθμιση του FurD επίσης εξαρτάται από τα ρυθμιστικά στοιχεία του μονοπατιού καταβολισμού πουρινών. Ο Fur4p δεν αναγνωρίζει ούτε μεταφέρει πουρίνες, παρά το γεγονός πως ο πυριμιδινικός δακτύλιος του ουρικού οξέος είναι πολύ όμοιος με την ουρακίλης. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην εξειδίκευση και ρύθμιση μεταξύ των FcyB και FurD με τα ομόλογά τους του *S. serevisiae* πιθανώς σχετίζονται με την αδυναμία καταβολισμού των πουρινών από τον σακχαρομύκητα. Άλλωστε στον οργανισμό αυτό απουσιάζουν ομόλογα των μεταφορέων ουρικού οξέος-ξανθίνης της οικογένειας NAT.

Μέλος της οικογένειας είναι επίσης ο μεταφορέας αλλαντοΐνης Dal4 του *S. serevisiae*, του οποίου το ομόλογο στον *A. nidulans*, FurA, έχει επίσης χαρακτηρισθεί και έχει την ίδια εξειδίκευση (Hamari et al. 2009). Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε επίσης απαλοιφή των επτά παράλογων γονιδίων του μύκητα που

παρουσιάζουν ομοιότητα με τους Fur4p και Dal4p, που όμως δεν κατάφερε να αποδώσει λειτουργία σε άλλες πέραν των FurA και FurD πρωτεΐνες.

Πρόσφατα διευκρινίσθηκε η τρισδιάστατη δομή ενός μεταφορέα της NCS1 οικογένειας, αυτή του μεταφορέα βενζυλο-υδαντοΐνης Mhp1 από το *Microbacterium liqufaciens* (Shimamura et al. 2008). Ο Mhp1 αποτελείται από 12 TMS, τα οποία είναι διευθετημένα σε δύο επαναλαμβανόμενες μονάδες (TMS 1-5, αμινοξέα 20-190 και TMS 6-10, αμινοξέα 204-388) ενωμένα με μια θηλειά 29 αμινοξέων και ακολουθούμενα από δύο ακόμα διαμεμβρανικές α-έλικες. Ο Mhp1 απομονώθηκε σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις: σε εξωτερική ανοιχτή διαμόρφωση (outward-facing open) και σε εξωτερική δεσμευμένη με το υπόστρωμα κλειστή διαμόρφωση (outward-facing occluded). Η δομή αυτή είναι πολύ όμοια με αυτές που έχουν αποκτηθεί για μεταφορείς άλλων, πολύ απομακρυσμένων, οικογενειών, και συγκεκριμένα του μεταφορέα λευκίνης LeuT (Zhou et al. 2007, Singh et al. 2008), του μεταφορέα γαλακτόζης vSGLT (Faham et al. 2008) και του μεταφορέα γλουταμικού Glt_{ph} (Yernool et al. 2004). Συνολικά, αυτοί οι τέσσερις δομικά παρόμοιοι μεταφορείς έχουν απομονωθεί σε τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις: εξωτερικά ανοιχτή (LeuT, Mhp1), εξωτερικά κλειστή (Glt_{ph}, LeuT, Mhp1) και εσωτερικά κλειστή (inward-facing occluded) (vSGLT) (Εικόνα 2.6). Λόγω της κοινής τους τοπολογίας, καθένας από αυτούς μπορεί με *in silico* αναλύσεις να μετατραπεί και στις τρεις διαμορφώσεις, παρέχοντας πληροφορίες για τον πιθανό μηχανισμό της μεταφοράς. Μια τέταρτη εσωτερικά ανοιχτή (inward-facing open) διαμόρφωση είναι υποθετική. Με συνδυασμό τέτοιων *in silico* αναλύσεων, γενετικής και μεταλλαγών ταυτοποιήθηκε το ενεργό κέντρο του μεταφορέα προλίνης PrnB του *A. nidulans* (Vangelatos et al. 2009). Από τις δομές που αποκτήθηκαν προκύπτουν ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Πρώτον, τα αμινοξικά κατάλοιπα που πραγματοποιούν επαφές με το υπόστρωμα βρίσκονται σε συντηρημένες θέσεις της πρωτοταγούς αλληλουχίας των πρωτεϊνών. Δεύτερον, μόνο τα πρώτα δέκα διαμεμβρανικά τμήματα φαίνεται να συμμετέχουν στη λειτουργική δομή του μεταφορέα. Εάν αυτό δεν οφείλεται στη διαδικασία κρυστάλλωσης των συγκεκριμένων μεταφορέων, ο ρόλος των άλλων δύο διαμεμβρανικών τμημάτων στη ρύθμιση της έκφρασης και στόχευσής τους φαίνεται ιδιαίτερα ελκυστικός. Τρίτον, από τις διαφορετικές δομικές διαμορφώσεις που έχουν κρυσταλλωθεί φαίνεται πως υπάρχουν περιοχές της πρωτεΐνης που δυναμικά καλύπτουν τους πόρους της πρωτεΐνης και πιθανώς λειτουργούν ως φίλτρα, ή δευτερογενή κέντρα δέσμευσης υποστρωμάτων (Diallinas, 2008). Οι δομές αυτές

πιθανώς αυξάνουν την συγγένεια του μεταφορέα για τα υποστρώματά του και κάνουν την εξειδίκευση πιο αυστηρή.



Εικόνα 2.6. Στερεοδομικές αλλαγές μεταφορέων που επάγονται από το υπόστρωμα. (A) Η εξωτερική ανοιχτή διαμόρφωση είναι έτοιμη να δεχθεί το υπόστρωμα και το ιόν (δεν απεικονίζεται). Με 1 συμβολίζεται το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος μεταξύ δύο «σπασμένων» ελίκων. Με 2 απεικονίζεται ένα δευτερογενές κέντρο δέσμευσης όπως ταυτοποιήθηκε στην εξωτερική ανοιχτή διαμόρφωση του μεταφορέα LeuT (Singh *et al,*. 2008). (B) Στην εξωτερική κλειστή διαμόρφωση, το υπόστρωμα και το ιόν έχουν δεσμευθεί στο πρωτογενές κέντρο δέσμευσης και η εξωτερική «πύλη» κλείνει. (C) Το κλείσιμο της εξωτερικής πύλης προωθεί την εσωτερική κλειστή διαμόρφωση. (D) Η εσωτερική διαμόρφωση ανοίγει απελευθερώνοντας το υπόστρωμα και το ιόν. Η τελευταία αυτή διαμόρφωση είναι υποθετική (από Diallinas, 2008 με τροποποιήσεις).

2.4.4. Η οικογένεια ENT

Η τέταρτη οικογένεια (**ENT**, **E**quilibrative **N**ucleoside **T**ransporters) αφορά μεταφορείς κυρίως νουκλεοσιδίων, αλλά και νουκλεοτιδικών βάσεων και απαντάται μόνο σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Hyde et al. 2001). Πολύ καλά μελετημένοι είναι οι ENT μεταφορείς στον άνθρωπο, hENT1 και hENT2 (50% ταυτόσημες αλληλουχίες) και οι ομόλογοι τους στον αρουραίο (rENT1, rENT2). Πρόκειται για ευρείας εξειδίκευσης και κατανομής μεταφορείς πουρινικών/πυριμιδινικών νουκλεοσιδίων και αναλόγων τους. Οι hENT1 και rENT1 απαντώνται στην πλασματική μεμβράνη, στα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα (Lee et al. 2006). Ο hENT2 έχει μικρότερη συγγένεια για τα νουκλεοσίδια από τον hENT1, αλλά μεταφέρει και τις πουρίνες υποξανθίνη, αδενίνη, γουανίνη, καθώς και τις πυριμιδίνες θυμίνη και ουρακίλη, ενώ αποτελεί τον πρώτο αναγνωρισμένο μεταφορέα νουκλεοτιδικών βάσεων σε θηλαστικά (Ward et al. 2000, Hyde et al. 2001, Yao et al.

2002). Ο hENT1 μεταφορέας έχει δειχθεί πειραματικά να αποτελείται από 11 TMS, με κυτταροπλασματικό αμινοτελικό άκρο. Οι διαδοχικές α-έλικες συνδέονται μεταξύ τους με κοντές θηλιές, εκτός από τις θηλιές μεταξύ των TMS 1-2 και TMS 6-7, οι οποίες είναι ιδιαίτερα επιμηκυνσμένες.

Μέλη της οικογένειας εκτός των θηλαστικών διαθέτουν και τα πρωτόζωα καθώς επίσης και οι οργανισμοί *A. nidulans, S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *C. elegans* και *Drosophila melanogaster*. Έχουν χαρακτηρισθεί λειτουργικά δύο εκ των πέντε ENT του *C. elegans*, οι μεταφορείς αδενοσίνης-ουριδίνης CeENT1 και CeEnt2 (Appleford et al. 2004), ο μεταφορέας νουκλεοσιδίων πυριμιδινών Ent3 της *Arabidopsis thaliana* (Traub et al. 2007) και ο μεταφορέας Fun26p του *S. cerevisiae*, ο οποίος εντοπίζεται στα χυμοτόπια και μεταφέρει ουριδίνη, αδενοσίνη και κυτιδίνη (Vickers et al. 2000).

Ιδιαίτερα μελετημένοι και χαρακτηρισμένοι είναι και οι ENT μεταφορείς των πρωτοζώων *Plasmodium faliciparum* (PfNT1, μεταφορέας νουκλεοσιδίων/αναλόγων, αδενίνης, υποξανθίνης) (Carter et al. 2000, Parker et al. 2000)*, Toxoplasma gondii* (TgAT1 και TgAT2, μεταφορείς αδενοσίνης, ινοσίνης και άλλων πουρινικών και πυριμιδινικών νουκλεοσιδίων και αναλόγων τους) (Parker et al. 2000), *Leishmania donovani* (LdNT1.1 και LdNT1.2 μεταφορείς αδενοσίνης και πυριμιδινών και LdNT2 μεταφορέας ινοσίνης και γουανοσίνης) (Aronow et al. 1987, Vasudevan et al. 1998), *Leishmania major* (LmaNT3, υψηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης, υποξανθίνης, γουανίνης, αδενίνης, αλλοπουρινόλης και LmaNT4, χαμηλής συνάφειας μεταφορέας αδενίνης) (Ortiz et al. 1997, Sanchez et al. 2004) και *Trypanosoma brucei brucei* (TbNT2 μεταφορέας αδενοσίνης, ινοσίνης, γουανοσίνης και TbAT1 μεταφορέας αδενοσίνης και αδενίνης) (Carter and Fairlamb 1993, Maser et al. 1999, Sanchez et al. 1999). Επίσης χαρακτηρισμένος είναι ένας μεταφορέας εξειδικευμένος για τη μεταφορά νουκλεοτιδικών βάσεων (υποξανθίνη, αδενίνη, γουανίνη, ξανθίνη) από το *T. brucei brucei*, ο TbNBT1, ο πρώτος αναγνωρισμένος ENT μεταφορέας εξειδικευμένος μόνο για νουκλεοτιδικές βάσεις και όχι νουκλεοσίδια (Burchmore et al. 2003, Henriques et al. 2003), ο οποίος έχει επιπλέον μελετηθεί με τυχαία και κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και έχουν ταυτοποιηθεί περιοχές σημαντικές για τη λειτουργία και εξειδίκευσή του (Papageorgiou et al. 2008a). Στο *T. brucei brucei* έχουν εντοπιστεί συνολικά 16 μέλη της οικογένειας ENT, εκ των οποίων τα περισσότερα είναι χαρακτηρισμένα (Maser et al. 1999, Sanchez et al. 1999, Sanchez

et al. 2002, Burchmore et al. 2003, Henriques et al. 2003, Matovu et al. 2003, Landfear et al. 2004, Sanchez et al. 2004, Lanteri et al. 2006, Al-Salabi et al. 2007, Ortiz et al. 2009).

2.4.5. Η οικογένεια CNT

Η οικογένεια συγκεντρωτικών μεταφορέων νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων **CNT** (**C**oncentrative **N**ucleoside **T**ransporter) περιέχει μέλη σε θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια και μύκητες, όπου είναι συμμεταφορείς H^+, και σε θηλαστικά, όπου είναι συμμεταφορείς Na^+, αλλά όχι σε πρωτόζωα (Podgorska et al. 2005). Αποτελούνται από περίπου 400 αμινοξέα (βακτήρια) ή από 600-700 αμινοξέα (ευκαρυωτικά) διευθετημένα σε 10-14 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας (TMSs). Ο χαρακτηρισμένος μεταφορέας mCNT1 του ποντικού έχει δειχθεί ότι αποτελείται από 13 TMSs, με το αμινοτελικό άκρο να βρίσκεται προς το κυτταρόπλασμα, ενώ το καρβοξυτελικό προς την εξωκυτταρική πλευρά (Hamilton et al. 2001). Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί τρεις διαφορετικής εξειδίκευσης μεταφορείς της οικογένειας, οι hCNT1, hCNT2 και hCNT3. Ο hCNT1 μεταφέρει νουκλεοσίδια πυριμιδινών και αδενοσίνη, ο hCNT2 μεταφέρει αποκλειστικά νουκλεοσίδια πουρινών και ο hCNT3 είναι ευρείας εξειδίκευσης και μεταφέρει τόσο πουρινικά όσο και πυριμιδινικά νουκλεοσίδια. Για τον hCNT2 το ενεργό κέντρο φαίνεται να αποτελείται από τα TMS 7-8 (Ritzel et al. 2001). Στο μύκητα *C. albicans* ο ομόλογος μεταφορέας ονομάζεται CaCNT και πιθανολογείται ότι έχει την ίδια τοπολογία με τον μεταφορέα mCNT1 του ποντικού (Hamilton et al. 2001, Loewen et al. 2003). Οι NupC, NupG και XapB της E. coli μεταφέρουν μόνο ξανθίνη (Loewen et al. 2004). Οι τρεις μεταφορείς του *B. subtilis* πιστεύεται πως έχουν διακριτές ικανότητες, ο πρώτος μεταφέρει νουκλεοσίδια υποξανθίνης και γουανίνης, ο δεύτερος νουκλεοσίδια αδενίνης και ο τρίτος νουκλεοσίδια πυριμιδινών (κυτιδίνη, ουριδίνη και τα αντίστοιχα δεοξυριβονουκλεοσίδια). Τα πρώτα τρία TMSs του CNT1 των θηλαστικών δεν είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του και μάλιστα απουσιάζουν από τα βακτηριακά ομόλογα (Hamilton et al. 2001). Το μοναδικό μέλος της οικογένειας στον *A. nidulans*, CntA αποτελεί έναν ευρείας εξειδίκευσης, υψηλής συγγένειας μεταφορέα νουκλεοσιδίων, όπως ουριδίνη, κυτιδίνη, ινοσίνη, θυμιδίνη, αδενοσίνη και γουανοσίνη (Hamari et al. 2009). Επίσης αποτελεί το μοναδικό

μεταφορέα του τοξικού ανάλογου 5-φθόρο-ουριδίνη στον μύκητα. Αξίζει τέλος να αναφερθεί ότι η λειτουργία τέτοιων πρωτεϊνών συσχετίζεται στον άνθρωπο με περιπτώσεις χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Duflot et al. 2004, Larrayoz et al. 2004, Pastor-Anglada et al. 2004).

2.4.6. Η οικογένεια PUP

Η οικογένεια PUP περιλαμβάνει μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών που απαντώνται αποκλειστικά σε φυτά. Δομικά οι μεταφορείς της οικογένειας αποτελούνται από 9-10 TMSs. Ο μοναδικός χαρακτηρισμένος μεταφορέας της οικογένειας είναι ο AtPUP1 στο φλοίωμα και τους γυρεόκοκκους της *A. thaliana*, ο οποίος αναγνωρίζει και μεταφέρει με υψηλή συγγένεια αδενίνη και κυτοσίνη, πιθανώς με συμμεταφορά πρωτονίου. Άλλες πουρίνες όπως η υποξανθίνη, καθώς και φυτορμόνες (ζεατίνη, κυτοκινίνη) και αλκαλοειδή (καφφεΐνη) αποτελούν συναγωνιστικούς αναστολείς της πρόσληψης αδενίνης και πιθανώς συνιστούν υποστρώματα του μεταφορέα (Williams and Miller 2001). Στον ίδιο οργανισμό έχουν βρεθεί 15 παράλογα γονίδια (28-54% ταυτότητα σε συγκρίσεις ανά δύο), ενώ μη χαρακτηρισμένοι μεταφορείς φαίνεται να υπάρχουν σε πολλά φυτά (Gillissen et al. 2000, Burkle et al. 2003).

2.4.7. Η οικογένεια UPS

Η οικογένεια UPS (Ureide Permeases) ή NBUT (Nucleobase Uptake Transporter) της οποία μέλη προέρχονται επίσης κυρίως από φυτά, περιλαμβάνει μεταφορείς πουρινών, ουρεϊδών, κυτοκινών και αναλόγων τους. Χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας αποτελούν οι μεταφορείς AtUPS1 και 2 του *A. thaliana* και ο μεταφορέας αλλαντοΐνης του *Phaseolus vulgaris*, οι οποίοι μεταφέρουν αλλαντοΐνη, ουρακίλη και φθορο-ουρακίλη (Desimone et al. 2002, Schmidt et al. 2004), ενώ ο AtUPS1 μεταφέρει επίσης ουρικό οξύ και ξανθίνη (Desimone et al. 2002). Η UPS οικογένεια συμπεριλαμβάνει πέντε παράλογα της *A. thaliana*, τα οποία παρουσιάζουν ταυτότητα στην αμινοξική τους ακολουθία 64-82%, ενώ όμοιες αλληλουχίες έχουν εντοπιστεί σε αρκετά άλλα φυτά. Μακρινά ομόλογα συναντώνται στα *Bacteroides thetaiotamicron* και *Entamoeba histolyticia*. Ο AtUPS1 μεταφορέας πιθανώς

αποτελείται από δέκα διαμεμβρανικά τμήματα με μία μακριά κεντρική κυτταροπλασματική περιοχή, είναι συμμεταφορέας πρωτονίων και η έκφρασή του ρυθμίζεται από πηγές αζώτου (Desimone et al. 2002).

3. Η NAT/NCS2 οικογένεια μεταφορέων

Η οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων/ασκορβικού (Nucleobase Ascorbate Transporter, NAT) γνωστή και ως Οικογένεια συμμεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων κατιόντος 2 (Nucleobase Cation Symporter 2, NCS2) ορίζεται ιστορικά από την κλωνοποίηση και τον χαρακτηρισμό των μεταφορέων ουρικού οξέος/ξανθίνης UapA (Diallinas and Scazzocchio 1989, Gorfinkiel et al. 1993) και UapC (Diallinas et al. 1995) του *Aspergillus nidulans,* και των μεταφορέων ουρακίλης UraA και PyrP της *Escherichia coli* (Andersen et al. 1995) και του *Bacillus subtilis* (Turner et al. 1994). Σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί ως προς την εξειδίκευση και τη λειτουργία τους αρκετοί ακόμα μεταφορείς της οικογένειας NAT (Πίνακας 3.1). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι περισσότεροι χαρακτηρισμένοι NAT μεταφορείς των θηλαστικών (SVCT1 and SVCT2) αναγνωρίζουν με υψηλή εξειδίκευση L-ασκορβικό οξύ, και όχι πουρίνες ή πυριμιδίνες. Επομένως, η οικογένεια NAT μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τρεις υποοικογένειες με βάση την εξειδίκευση. Η πρώτη απαντάται σε βακτήρια, μύκητες και φυτά και περιλαμβάνει μεταφορείς ξανθίνης ή/και ουρικού οξέος, η δεύτερη απαντάται μόνο σε βακτήρια και είναι εξειδικευμένη για μεταφορά ουρακίλης, και η τρίτη απαντάται στα θηλαστικά και είναι εξειδικευμένη για ασκορβικό οξύ. Η συγγένεια δέσμευσης, K_m, ποικίλλει από 2-8 μM για την ξανθίνη, 7-130 μM για το ουρικό οξύ και 8-237 μM για το ασκορβικό οξύ. Η μεταφορική ικανότητα εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από ποικίλα αναπτυξιακά και φυσιολογικά σήματα, αλλά γενικά οι μεταφορείς NAT χαρακτηρίζονται από μέτρια ως υψηλή μεταφορική ικανότητα. Οι μεταφορείς ξανθίνης/ουρικού οξέος μεταφέρουν με χαμηλή απόδοση και ουρακίλη, ενώ επιπλέον αναγνωρίζουν, αλλά δεν μεταφέρουν L-ασκορβικό οξύ σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (> 35 mM). Αντίθετα, οι SVCT1 και SVCT2 μεταφορείς ασκορβικού οξέος δεν αναγνωρίζουν νουκλεοτιδικές βάσεις. Οι NAT μεταφορείς βακτηρίων, μυκήτων κα φυτών είναι συμμεταφορείς H^+, ενώ οι μεταφορείς των θηλαστικών είναι συμμεταφορείς Na^+.

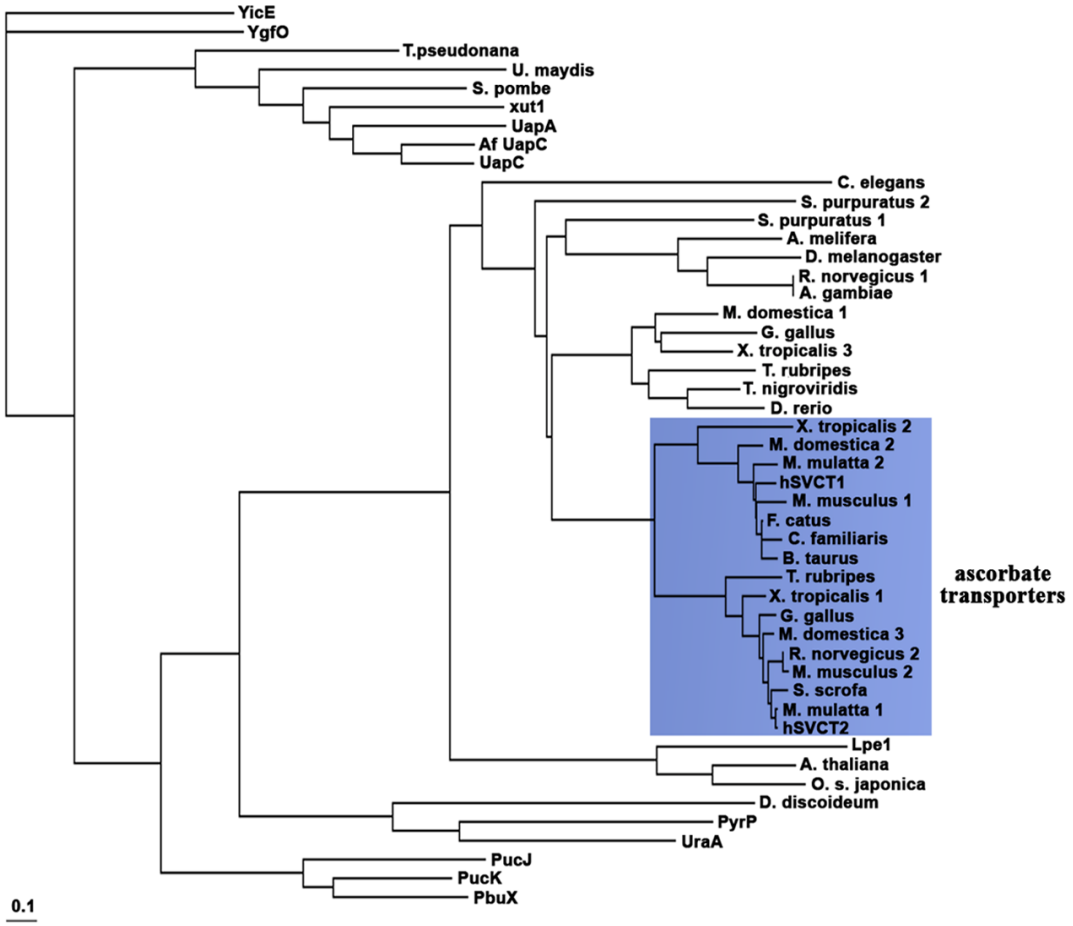
Πίνακας 3.1. NAT πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας (Από Gournas et al. 2008, με τροποποιήσεις)

Οργανισμός	Μεταφορέας	Φυσιολογικά υποστρώματα [$K_{m/i}$ (μM)]	Άλλοι προσδέτες [$K_{m/i}$ (μM)]	Μεταφορική ικανότητα
Aspergillus nidulans	UapA	X [7], UA [8]	2TX [63], 3MX [28], 8MX [100], OX [103], ALL	H
	UapC	X[4], UA[136]	1MX [<50], 2TX [<50], 3MX [~100], 8MX [~100], OX [38], ALL[a]	M
Aspergillus fumigatus	UapC	X [6], UA [171]	8MX [50], 1MX [60], 2TX [65], 3MX [100], OX [103]	H
Candida albicans	Xut1p	X [4], UA [50]	2TX [30], 2TUA [97], 3MX [22], 6TUA [84], 8MX [80], 8AZX [55], OX[4]	H
Escherichia coli	YgfO	X [4]	1MX [36], 2TX [91], 3MX [72], 6TX [41], 9MX [53]	H
	Yice	X [3]	-	L
	UraA	U	-	n.d.
Bacillus subtilis	PucJ	UA, X (?)	-	n.d.
	PucK	UA, X (?)	-	n.d.
	PbuX	X	-	n.d.
	PyrP	U	-	n.d.
Zea mays	Lpe1	X [30] , Ua [33]	-	H
Rattus norvegicus	SVCT1	AA [29]	DAA [~700]	H
	SVCT2	AA [10-100]	-	L
	SNBT1	U [21], X [83], HX [17], T [13], G [80]	5-FU [69], OX	H
Mus musculus	SVCT2	AA [20-115]	-	L
Homo sapiens	SVCT1	AA [65-237]	BrAA [33]	H
	SVCT2	AA [8-62]	DC [2,35], AA-DC [0,2], AA-NH-DC [24], BrAA [2,7], AA–KA [40], BrAA–KA [7,4], BrAA-DC [21]	L/H
Sus scrofa	SVCT2	AA [27]	-	n.d

X: ξανθίνη, UA: ουρικό οξύ, HX: υποξανθίνη, U: ουρακίλη, T: θυμίνη, G: γουανίνη, 1MX: 1-μεθυλο-ξανθίνη, 2TX: 2-θειο-ξανθίνη, 3MX: 3-μεθυλο-ξανθίνη, 6TX: 6-θειο-ξανθίνη, 8MX: 8-μεθυλο-ξανθίνη, 8AZX: 8-αζα-ξανθίνη, 9MX: 9-μεθυλο-ξανθίνη, OX: οξυπουρινόλη, ALL: αλλοπουρινόλη, 5-FU: 5-φθόρο-ουρακίλη, AA: L-ασκορβικό οξύ, DAA: D-ασκορβικό οξύ, BrAA: 6-βρώμο-6-δεόξυ-L- ασκορβικό οξύ, DC: διχλωφεραμικό οξύ, KA, κυνουρενικό οξύ, AA-DC: 6-διχλωφεραμικό-L- ασκορβικό οξύ, AA-KA: 6-κυνουρενικό-L-ασκορβικό οξύ, BrAA-KA: 6-βρώμο-6- κυνουρενικό-L-ασκορβικό οξύ, BrAA-DC: 6-βρώμο-6-διχλωφεραμικό-L-ασκορβικό οξύ, AA-NH-DC: 6-άμινο-6-διχλωφεραμικό-L-ασκορβικό οξύ. H: υψηλή, M: μέτρια, L: χαμηλή, n.d.: δεν έχει πραγματοποιηθεί.

Προκειμένου μια άγνωστη πρωτεΐνη να ταξινομηθεί στην οικογένεια NAT πρέπει να πληροί τρία κριτήρια: να έχει μήκος 400-650 αμινοξέα, να αποτελείται από 10-14 πιθανά TMS, και να φέρει σε κατάλληλες θέσεις δύο υψηλά συντηρημένες συναινετικές αλληλουχίες. Οι αλληλουχίες αυτές είναι δυό, η [Q/E/P]-**N**-X-**G**-X-X-X-X-**T**-[R/K/G] (όπου X υδρόφοβο αμινοξύ), η οποία συνιστά την αλληλουχία υπογραφή της οικογένειας NAT και εντοπίζεται σε μια αμφιπαθικής φύσεως περιοχή πριν το TMS9 (Diallinas et al. 1998, Koukaki et al. 2005), και το μοτίβο QH στην καρδιά του TMS1 (Pantazopoulou and Diallinas 2006). Οι δύο παραπάνω αλληλουχίες έχει δειχθεί ότι είναι ιδιαιτέρως σημαντικές για τη λειτουργία των μεταφορέων UapA, UapC και YgfO (παράγραφος 3.4). Επιπλέον κριτήριο συνιστά η παρουσία ορισμένων σχεδόν απόλυτα συντηρημένων πολικών ή φορτισμένων αμινοξέων. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια, εκατοντάδες πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας από κατά Gram-αρνητικά και θετικά Βακτήρια, Αρχαία, Μύκητες, Φυτά και Ζώα έχουν καταταχθεί στην οικογένεια NAT.

Η συνήθης προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή των NAT αποτελείται από 12 TMS με κυταροπλασματικά αμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα, δομή που μοιάζει με αυτήν των περισσότερων μεταφορέων δευτερογενούς ενεργότητας, συμπεριλαμβανομένων των μεταφορέων της Major Facilitator Superfamily (MFS). Αυτή η δομή των 12 διαμεμβρανικών α-ελίκων έχει επιβεβαιωθεί κρυσταλλογραφικά μόνο για μερικούς προκαρυωτικούς μεταφορείς (τον LacY μεταφορέα λακτόζης, τον GlpT μεταφορέα γλυκερόλη, τον EmrD μεταφορέα Πολυανθεκτικότητας (multidrug resistanse), τον LeuT μεταφορέα λευκίνη και τον Glt_{Ph} μεταφορέα γλουταμικού-ασπαρτικού). Για τους μεταφορείς αυτούς έχει δειχθεί πως τα σημεία δέσμευσης υποστρώματος ή πρωτονίου δομούνται από συγκεκριμένα αμινοξέα που βρίσκονται στην καρδιά TMS, αλλά έχει τονιστεί και ο σημαντικός ρόλος ευέλικτων αμφιπαθικών ελίκων και διαμεμβρανικών φουρκετών (Sobczak and Lolkema 2005). Στην οικογένεια NAT, η πρόβλεψη υψηλής περιεκτικότητας σε α-έλικες υποστηρίζεται από πρωταρχικά πειράματα κυκλικού διχρωισμού, που δείχνουν ότι τα δύο πρότυπα μέλη της (UapA και YgfO) αποτελούνται >80-90 % α-έλικες (Lemuh et al. 2009). Εν αντιθέσει με μέλη της MFS οικογένειας και παρόμοια με δύο μεταφορείς αμινοξέων γνωστής δομής (LeuT, Glt_{Ph}), δεν παρατηρείται καμία συμμετρία ή κάποια μεγάλη κυτταροπλασματική θηλειά να ενώνει τα δύο μισά της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.1. Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τις εξελικτικές σχέσεις επιλεγμένων NAT μεταφορέων. Σε κυανό φόντο βρίσκονται οι μεταφορείς ασκορβικού οξέος των μεταζώων. (Από Gournas et al. 2008)

3.1. Οι εξελικτικές σχέσεις των NAT

Οι εξελικτικές σχέσεις της NAT οικογένειας φαίνονται στην Εικόνα 3.1. Γενικά οι μεταφορείς των βακτηρίων και των μυκήτων (Pantazopoulou and Diallinas, 2007) εμφανίζουν μεγαλύτερη ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ τους (30-35%), από ότι με τους μεταφορείς των φυτών και των ζώων (22-24%). Αξιοσημείωτο είναι ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* δε διαθέτει κανένα μεταφορέα της οικογένειας NAT, γεγονός που αντανακλά την έλλειψη ενζύμων καταβολισμού ξανθίνης και ουρικού οξέος. Ελάχιστοι είναι οι οργανισμοί που δεν διαθέτουν NAT ομόλογα, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τα Πρωτόζωα. Οι UapA και UapC εμφανίζουν 65% ταυτότητα και 80% ομοιότητα. Οι υπόλοιποι Ασπέργιλλοι έχουν μόνο έναν NAT, ομόλογο του UapC, όπως δείχνει συνταινική ανάλυση (Pantazopoulou and Diallinas,

2007). Τα φυτά διαθέτουν πολλούς NAT μεταφορείς, εκ των οποίων ο μόνος λειτουργικά χαρακτηρισμένος είναι ο υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας συμμεταφορέας ουρικού οξέος-ξανθίνης/H^+ Lpe1, ο οποίος είναι απαραίτητος για το σχηματισμό των χλωροπλαστών στο καλαμπόκι (Argyrou et al. 2001). Η *Drosophila melanogaster* διαθέτει ένα NAT ομόλογο, ενώ ο *Caenorhabditis elegans* έξι. Οι NAT πρωτεΐνες των μεταζώων είναι 35-40% ταυτόσημες μεταξύ τους και 25% ταυτόσημες με τις πρωτεΐνες των φυτών. Τα θηλαστικά, εκτός από τους δύο χαρακτηρισμένους μεταφορείς ασκορβικού οξέος (SVCT1 και SVCT2), διαθέτουν και ομόλογα άγνωστης λειτουργίας τα οποία φέρουν συντηρημένες αλληλουχίες που μοιάζουν περισσότερο με αυτές των χαρακτηρισμένων μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων των βακτηρίων, μυκήτων και φυτών. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές είχε προταθεί πως οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να είναι υπεύθυνες για την εμφανιζόμενη ενεργότητα πρόσληψης νουκλεοτιδικών βάσεων που είχε ανιχνευθεί παλιότερα στα θηλαστικά (Gournas et al. 2008). Πράγματι, πρόσφατα χαρακτηρίσθηκε ένας από αυτούς τους μεταφορείς του *Rattus norvegicus,* ο rSNBT1, ως ο πρώτος μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων των θηλαστικών, με υποστρώματα τις ουρακίλη, θυμίνη, υποξανθίνη, γουανίνη και ξανθίνη (Yamamoto et al. 2010). Υποστρώματα του μεταφορέα αποτελούν επίσης τα τοξικά ανάλογα 5-φθόρο-ουρακίλη και οξυπουρινόλη. Η εξειδίκευση του συγκεκριμένου μεταφορέα είναι σαφώς πιο διευρυμένη από τα μυκητιακά ομόλογά του και μοιάζει αρκετά με μεταλλαγμένες μορφές του UapA (βλέπε παράγραφο 3.4.1). Όπως ήταν αναμενόμενο, ο rSNBT1 είναι δευτερογενούς ενεργότητας συμμεταφορέας κατιόντων νατρίου. Ομόλογά του δεν φαίνεται να υπάρχουν στον άνθρωπο, μιας και μόνο ένα ψευδογονίδιο έχει εντοπιστεί, το οποίο δεν εκφράζεται. Φαίνεται πως με την απώλεια ικανότητας καταβολισμού του ουρικού οξέος στα πρωτεύοντα δεν υπήρχε φυσική επιλογή για τη διατήρηση γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη και τον καταβολισμό πουρινών. Σε συμφωνία με αυτό, τα γονίδια της ουρικάσης, της HIU υδρολάσης και της OHCU αποκαρβοξυλάσης επίσης δεν υπάρχουν ή έχουν συσσωρεύσει μεταλλαγές. (βλέπε παράγραφο 3.2.2).

Οι πρωτεΐνες που ταξινομούνται με τους μεταφορείς ασκορβικού των θηλαστικών προέρχονται όλες από σπονδυλωτά και υποδιαιρούνται σε δύο εξελικτικούς κλάδους, το ένα παρόμοιο με τον SVCT1 και το άλλο με τον SVCT2 (Εικόνα 3.1). Τα περισσότερα σπονδυλωτά, εκτός από τα πρωτεύοντα, επίσης διαθέτουν NAT ομόλογα, τα οποία ταξινομούνται σε ξεχωριστό κλάδο, όπου και

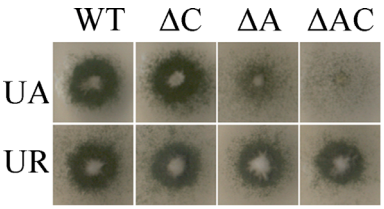
ανήκει ο πρόσφατα χαρακτηρισμένος μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων, rSNBT1. Τα ομόλογα αυτά όντως διαθέτουν συντηρημένες αλληλουχίες που μοιάζουν περισσότερο με τους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων βακτηρίων, μυκήτων και φυτών, παρά με τους μεταφορείς ασκορβικού των θηλαστικών και είναι πολύ πιθανό να εμφανίζουν παρόμοιες ενεργότητες. Τελευταία έχει αρχίσει να γίνεται αντιληπτό πως η συντήρηση συγκεκριμένων σημαντικών αμινοξικών καταλοίπων είναι πιο κρίσιμη για τον καθορισμό της εξειδίκευσης των μελών της οικογένειας NAT, παρά η πρωτοταγής αμινοξική ομοιότητα. Άλλωστε τα μέλη της οικογένειας NAT φαίνεται να έχουν αναπτύξει μια ιδιαίτερη πλαστικότητα ως προς την εξιδείκευση (Goudela et al. 2005, Koukaki et al. 2005).

3.2. Ο ρόλος των NAT στη Φυσιολογία των οργανισμών

3.2.1. Οι NAT ως προμηθευτές πηγών αζώτου, στην πρόσληψη νουκλεοτιδικών βάσεων και στην αναδιανομή μεταβολιτών

Στα Βακτήρια, τους Μύκητες και τα Φυτά οι NAT είναι υπεύθυνοι για την υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας πρόσληψη ουρικού οξέος και/ή ξανθίνης, ή ουρακίλης. Το ουρικό οξύ καταβολίζεται, μέσω συνεχόμενων οξειδώσεων, αρχικά σε ουρεΐδες και τελικά σε ουρία και αμμωνία, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μια σχετικά καλή πηγή αζώτου (Pantazopoulou and Diallinas, 2007) (Εικόνες 3.2, 3.3). Η ξανθίνη οξειδώνεται σε ουρικό οξύ, ακολουθώντας το ίδιο μεταβολικό μονοπάτι. Το ουρικό οξύ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή νουκλεοσιδίων και μόνο μερικά Βακτήρια και Φυτά μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ξανθίνη για αναβολικούς σκοπούς. Εν αντιθέσει, η ουρακίλη μπορεί άμεσα να κατευθυνθεί στη σύνθεση νουκλεοσιδίων και νουκλεϊκών οξέων, αλλά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πηγή αζώτου. Κάποια όμως Βακτήρια (π.χ των γενών *Pseudomonas* και *Rhizobium*) χρησιμοποιούν την ουρακίλη για τη βιοσύνθεση αλανίνης και ασπαρτικού οξέος. Τα Βακτήρια χρησιμοποιούν τους NAT για την πρόσληψη ουρικού οξέος και/ή ξανθίνης ή ουρακίλης (Turner et al. 1994, Andersen et al. 1995, de Koning and Diallinas, 2000, Karatza and Frillingos, 2005), ενώ οι μύκητες για την πρόληψη ουρικού οξέος και ξανθίνης. Παρά το γεγονός πως όλα τα βακτήρια έχουν NAT πρωτεΐνες, μόνο μερικά (π.χ *B. subtilis*) μπορούν να

χρησιμοποιήσουν το ουρικό ή την ξανθίνη σαν πηγές αζώτου, ενώ τα υπόλοιπα δεν μπορούν (π.χ *E. coli*), λόγω ανεπαρκούς καταβολισμού. Διακριτοί φαινότυποι σχετιζόμενοι με τη λειτουργία των NAT παρατηρούνται εύκολα στον *A. nidulans*, όπου μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας των UapA ή UapC μεταφορέων οδηγούν σε ανεπαρκή αύξηση στις πουρίνες αυτές (Darlington and Scazzocchio, 1967 Pantazopoulou and Diallinas, 2007) (Εικόνα 3.2).

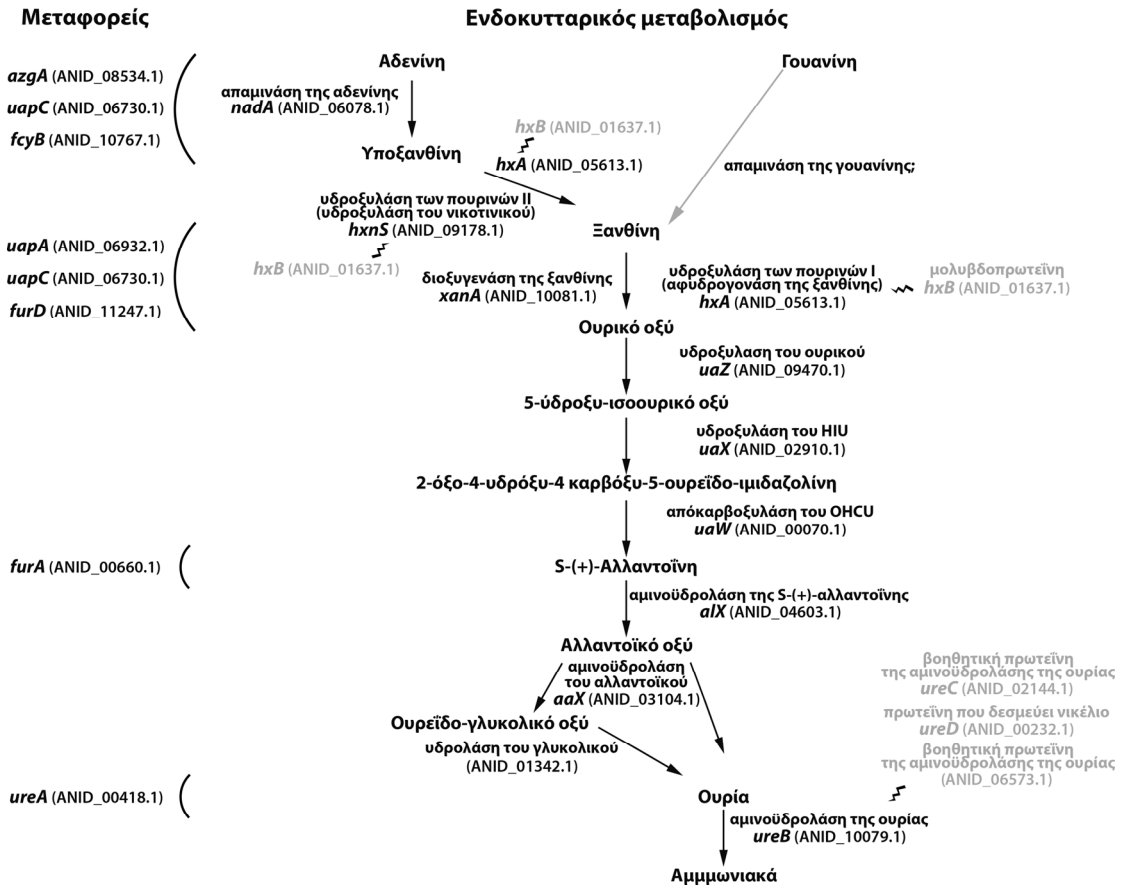


Εικόνα 3.2. Δοκιμασίες ανάπτυξης στελεχών φυσικού τύπου (WT), και στελεχών με απαλοιφή των *uapC* (ΔC), *uapA* (ΔA) ή και των δύο (ΔAC) NAT μεταφορέων, σε ουρία (UR) ή ουρικό οξύ (UA) ως μαναδικές πηγές αζώτου.

Στα φυτά μόνο μια NAT πρωτεΐνη, η ZmLpeI (leaf permease1) του *Zea mays* έχει χαρακτηρισθεί με λειτουργική συμπλήρωση ενός στελέχους του *A. nidulans* με έλλειψη στους ενδογενείς μεταφορείς πουρινών. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας υψηλής συγγένειας μεταφορέας ξανθίνης και ουρικού οξέος, πολύ όμοια με τις μυκητιακές UapA και UapC πρωτεΐνες (Argyrou et al. 2001). Ένα αλλήλιο απώλειας λειτουργίας του *lpe1* παρουσιάζει προβληματική χλωροπλαστική ανάπτυξη (Schultes et al. 1996), χωρίς όμως ο Lpe1 να είναι πλαστιδιακός μεταφορέας. Το *lpe1* γονίδιο εκφράζεται σε μη-φωτοσυνθετικούς ιστούς, κυρίως στις ρίζες, και φαίνεται να αναστέλλεται από φως. Η έκφρασή του προτείνει πως ο μεταφορέας αυτός μπορεί να μην είναι μόνο υπεύθυνος για την πρόσληψη ουρικού οξέος/ξανθίνης, αλλά να σχετίζεται με την πλαστιδιακή λειτουργία και/ή μεταβολικές διαδικασίες που επηρεάζονται από το φως. Αρκετοί NAT έχουν επίσης μελετηθεί στην *Arabidopsis thaliana* αλλά η λειτουργία τους παραμένει άγνωστη, αφού η ετερόλογή τους έκφραση δεν ήταν επιτυχής ή στελέχη με διαγραφή γονιδίων δεν είχαν διακριτό φαινότυπο. Είναι μόνο γνωστό πως μόνο πως οι περισσότεροι έχουν γενική έκφραση, με ιδιαίτερη παρουσία σε φλοιωματικούς ιστούς, μια ένδειξη πως ίσως λειτουργούν στη αναδιανομή μεταβολιτών σε μεγάλες αποστάσεις (Maurino et al. 2006).

3.2.2 Το μονοπάτι καταβολισμού πουρινών του *A. nidulans*

Οι περισσότεροι μύκητες είναι ικανοί να χρησιμοποιούν τις πουρίνες, αλλά όχι τις πυριμιδίνες, ως πηγές αζώτου (Scazzocchio, 1982), μέσω του ενζυμικού οξειδωτικού καταβολισμού τους σε ουρεΐδες (αλλαντοΐνη, αλλαντοϊκό οξύ) και τελικά σε ουρία και αμμωνιακά ιόντα. Ολόκληρο το μονοπάτι καταβολισμού πουρινών απαντάται στη συντριπτική πλειοψηφία των νηματοειδών μυκήτων, καθώς και σε ορισμένα βακτήρια και φυτά. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, ο *A. nidulans* αποτέλεσε πρότυπο σύστημα για τη μελέτη του καταβολικού μονοπατιού (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Το μονοπάτι καταβολισμού πουρινών του *A. nidulans* και οι γνωστοί μεταφορείς ουσιών του. Μαζί με τις εκάστοτε ενζυμικές ενεργότητες παρατίθενται τα αντίστοιχα γονίδια, καθώς και ο κωδικός τους αριθμός. Η τεθλασμένη γραμμή υποδεικνύει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν γκρι χρώμα, όπως και το βέλος που υποδεικνύει την πιθανολογούμενη διάσπαση της γουανίνης σε υποξανθίνη.

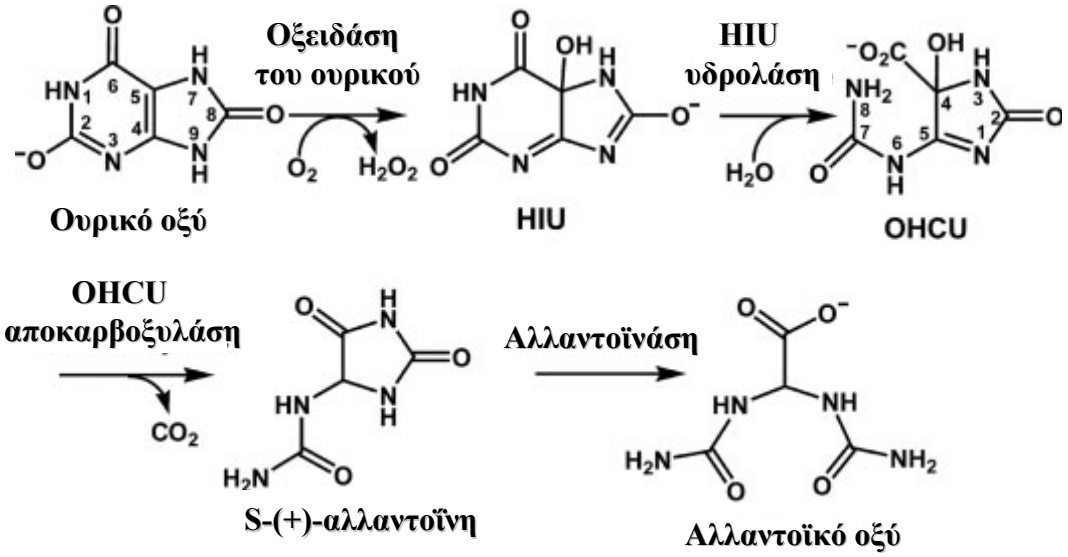
Κατά τον καταβολισμό, όλα τα άτομα αζώτου των πουρινικών δακτυλίων (πυριμιδινικός και ιμιδαζολικός) μετατρέπονται τελικά σε NH_4^+ και όλα τα άτομα άνθρακα σε 4 μόρια CO_2 και ένα μόριο γλυοξυλικού άλατος αντίστοιχα. Τα ιόντα NH_4^+ αφομοιώνονται στη συνέχεια αναβολικά σε αζωτούχα μόρια.

Το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού καταβολισμού πουρινών του *A. nidulans* είναι η απαμινάση της αδενίνης (NadA) (Oestreicher et al. 2008), η οποία αφαιρεί μια αμινομάδα από την αδενίνη, μετατρέποντάς τη σε υποξαθίνη. Ομόλογες πρωτεΐνες που επιτελούν την ίδια λειτουργία έχουν ταυτοποιηθεί και στους *S. cerevisiae* και *Schizosaccharomyces pombe* και αποτέλεσαν τις πρώτες χαρακτηρισμένες απαμινάσες αδενίνης ευκαρυωτικών κυττάρων (Ribard et al. 2003). Η γουανίνη είναι γνωστό πως χρησιμοποιείται από τον *A. nidulans* ως πηγή αζώτου. Έτσι, παρόλο που δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα για τον καταβολισμό της, το πιο πιθανό είναι να μετατρέπεται σε ξανθίνη από μια απαμινάση της γουανίνης. Η υποξανθίνη κατόπιν μετατρέπεται σε ξανθίνη, και αυτή σε ουρικό οξύ. Οι αντιδράσεις αυτές είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν από περισσότερα του ενός ενζύμων ανά αντίδραση. Τον κύριο μεταβολικό ρόλο έχει η αφυδρογονάση πουρινών I (HxA) (Sealy-Lewis et al. 1978, 1979, Marzluf, 1981), η οποία καταλύει και τα δύο βήματα, έχει δηλαδή ενεργότητα αφυδρογονάσης υποξανθίνης και ξανθίνης. Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη δράση της αφυδρογονάσης πουρινών II (HxnS), της οποία πρωταρχικό υπόστρωμα αποτελεί το νικοτινικό οξύ (Sealy-Lewis et al. 1979, Marzluf 1981). Τα ένζυμα της τάξης των υδροξυλασών, όπως οι HxA και HxnS, περιέχουν μολυβδαίνιο και απαιτούν ένα άτομο θείου προσδεδεμένο στο μολυβδαίνιο για να υδροξυλιώσουν τα υποστρώματά τους. Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση αυτή πραγματοποιείται από το προϊόν του γονιδίου *hxB* (Amrani et al. 1999), το οποίο κατά συνέπεια είναι απαραίτητο για τη λειτουργία των HxA και HxnS. Στελέχη που φέρουν μεταλλαγές απενεργοποίησης του *hxA*, διατηρούν την ικανότητα καταβολισμού της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Την ενεργότητα αυτή εμφανίζει το ένζυμο XanA (Sealy-Lewis et al. 1978). Το XanA είναι μια διοξυγενάση εξαρτώμενη από α-κετογλουταρικό οξύ και ιόντα Fe(II), της οποίας ομόλογα με δράση οξειδάσης της ξανθίνης απαντώνται μόνο στο βασίλειο των μυκήτων (Cultrone et al. 2005). Αντίθετα, η βασική αφυδρογονάση της ξανθίνης στον *A. nidulans*, HxA, ανήκει στην πολύ συντηρημένη σε όλα τα ζωικά βασίλεια οικογένεια αφυδρογονασών ξανθίνης, που περιέχουν τον συμπαράγοντα μολυβδοπτερίνης.

Η οξείδωση του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη για χρόνια ήταν αποδεκτό πως πραγματοποιείται από την οξειδάση του ουρικού οξέος, UaZ στον *A. nidulans*, η οποία παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με τις ουρικάσες άλλων οργανισμών, λειτουργεί με δέσμευση χαλκού και διαθέτει σήμα στόχευσης στο υπεροξύσωμα (Oestreicher and Scazzocchio, 1993). Ήταν από σχετικά νωρίς γνωστό (Bongaerts and Vogels 1979), και φάνηκε επίσης από την ανάλυση της δομής κρυσταλλωμένων μορίων ουρικάσης (Kahn et al. 1997), πως το ένζυμο υδροξυλιώνει το ουρικό σε 5-υδροξυ-ισοουρικό (HIU), ένα μεταβολικά ασταθές ενδιάμεσο με χρόνο ημιζωής περίπου μισή ώρα. Το HIU διασπάται αυθόρμητα σε 2-όξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεϊδοημιδαζολίνη (OHCU), ένα ακόμη ασταθές μεταβολικό ενδιάμεσο, το οποίο διασπάται σε αλλαντοΐνη. Για χρόνια ήταν αποδεκτό πως αυτή ήταν και η *in vivo* διαδικασία μετατροπής του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη, μέχρι την ανακάλυψη της ενζυμικής ενεργότητας της αποκαρβοξυλάσης της 2-όξο-4-υδροξυ-4-καρβοξυ-5-ουρεϊδοημιδαζολίνης (Sarma et al. 1999). Μάλιστα η μελέτη του επόμενου ενζύμου του μονοπατιού έδειξε πως η αλλαντοϊνάση μεταβολίζει ικανοποιητικά μόνο μία στερεομορφή της αλλαντοΐνης, την S-(+)-αλλαντοΐνη (Mulrooney and Hausinger 2003). Η χημική διάσπαση της OHCU παράγει και τα δύο στερεοϊσομερή σε ίδια αναλογία. Έτσι άρχισε να καλλιεργείται η ιδέα πως και τα τρία βήματα έπρεπε να πραγματοποιούνται ενζυμικά (Εικόνα 3.4). Στο συνεργίωμα καταβολισμού πουρινών του *Bacillus subtillis* υπάρχει το γονίδιο *pucM*, το οποίο είναι απαραίτητο για τη χρήση του ουρικού οξέος ως πηγής αζώτου. Το γονίδιο αυτό βρίσκεται δίπλα στο *pucL*, το οποίο κωδικοποιεί για την ουρικάση του βάκιλλου (Lee et al. 2005). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο γονιδιωματικής ανάλυσης συντηγμένων γονιδίων οι Ramazzina et al. 2006 βρήκαν γονίδια που στα γονιδιώματα των οργανισμών ακολουθούν την ύπαρξη του γονιδίου της ουρικάσης. Η ανάλυση αυτή αποτελεί βασική μέθοδο της Υπολογιστικής Βιολογίας και είναι ικανή να βρίσκει συντηρημένα γονίδια τα προϊόντα των οποίων αλληλεπιδρούν ή βρίσκονται στο ίδιο μεταβολικό μονοπάτι. Τα γονίδια που βρίσκονται με αυτή τη μέθοδο μπορεί επίσης να οργανώνονται σε βακτηριακά συνεργιώματα ή σε κάποιους οργανισμούς να έχουν συντηχθεί. Με την ανάλυση αυτή ταυτοποιήθηκαν δύο γονίδια να ακολουθούν την ύπαρξη ή μη του γονιδίου της ουρικάσης στα γονιδιώματα διαφόρων οργανισμών. Ένα από αυτά ήταν το *pucM*. Τα γονίδια αυτά δείχθηκαν να κωδικοποιούν τα ένζυμα που καταλύουν την δύο βημάτων μετατροπή του HIU σε αλλαντοΐνη (Ramazina et al. 2006). Το προϊόν του γονιδίου *pucM* κωδικοποιεί για μια υδροξυλάση του HIU, η

οποία εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με πρωτεΐνες μεταφοράς θυροξίνης των ανώτερων ευκαρυωτικών. Το δεύτερο ένζυμο είναι η αποκαρβοξυλάση του OHCU. Πολύ πρόσφατα χαρακτηρίσαμε τα ομόλογά τους στον *A. nidulans* (Gournas et al. 2011), τα οποία κωδικεύονται από τα *uaX* και *uaW* γονίδια αντίστοιχα. Η υδροξυλάση του HIU μάλιστα αντιστοιχεί στο *uaX* γονίδιο, μεταλλαγές του οποίου είχαν απομονωθεί από πολύ νωρίς αλλά δεν είχαν χαρακτηρισθει (Scazzocchio and Darlington, 1968)

Η παραγόμενη S-(+)-αλλαντοΐνη μετατρέπεται σε αλλαντοϊκό οξύ, το οποίο διασπάται σε ουρεϊδογλυκολικό και ουρία, με τη δράση των προϊόντων των γονιδίων *alX* και *aaX* (Scazzocchio and Darlington, 1968), που αντιστοιχούν στην αλλαντοϊνάση και αλλαντοϊκάση. Ο καταβολισμός της ουρίας σε αμμωνία έχει βρεθεί να ελέγχεται από τα προϊόντα των γονιδίων *ureB*, *ureC* και *ureD*, εκ των οποίων το πρώτο είναι η ουρεάση, ενώ το τελευταίο εμπλέκεται στη σύνθεση ή την ενσωμάτωση ενός συμπαράγοντα νικελίου, απαραίτητου για τη δράση της ουρεάσης (Mackay and Pateman, 1982).



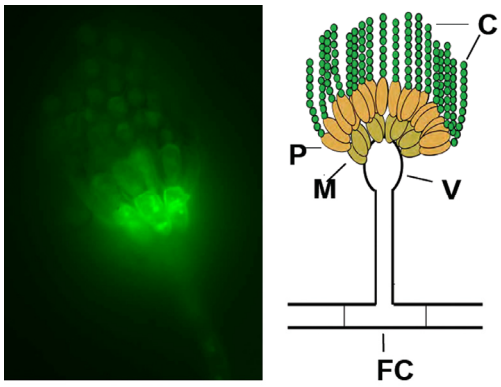
Εικόνα 3.4. Σχηματική αναπαράσταση της διάσπασης του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη και κατόπιν σε αλλαντοϊκό οξύ.

Τα *nadA*, *hxA* και η *uaZ* επάγονται από ουρικό οξύ μέσω του ειδικού μεταγραφικού παράγοντα UaY (βλ. παρακάτω). Το ίδιο ισχύει και για τα *uaX* και *uaW* (Gournas et al., 2011). Αξιοσημείωτο είναι ότι το *nadA* επάγεται επίσης από αδενοσίνη μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου του UaY, ενώ επιπλέον, σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα ένζυμα του καταβολισμού πουρινών δεν αναστέλλεται αλλά επάγεται από αμμωνία (Oestreicher et *al.,* 2008). Η αλλαντοϊνάση και η

αλλαντοϊκάση επάγονται τόσο από ουρικό οξύ, όσο και από αλλαντοΐνη, ενώ η ουρεϊδογλυκολάση και η ουρεάση είναι συστατικής έκφρασης (Marzluf, 1981).

3.2.3 Πιθανός αντι-οξειδωτικός ρόλος του ουρικού οξέος

Στελέχη που εκφράζουν λειτουργικές μορφές των UapA-GFP και UapC-GFP έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της έκφρασης των NAT σε αγενείς και εγγενείς δομές του *A. nidulans* (Valdez-Taubas et al. 2000, Valdez-Taubas et al. 2004, Pantazopoulou et al. 2007). Στην Εικόνα 3.5 φαίνεται πως ο UapA δεν εκφράζεται στο στέλεχος του κονιδιοφορέα, αλλά έχει αυξημένη έκφραση στην περιφέρεια των στηριγμάτων και φιαλιδίων. Ο UapC εκφράζεται στα στηρίγματα μόνο παρουσία ουρικού οξέος. Η έκφραση του UapA στις δομές αυτές είναι ανεξάρτητη των φυσιολογικών και γενετικών συνθηκών που αναστέλλουν την μεταγραφή του *uapA* στην βλαστητική αύξηση (π.χ η παρουσία ιόντων αμμωνίου ή η ανάγκη του μεταγραφικού παράγοντα UaY, παράγραφος 3.3.1), γεγονός που προτείνει ότι πραγματοποιείται *in situ*.



Εικόνα 3.5. Έκφραση του UapA κατά τη διάρκεια της αγενούς αναπαραγωγής του *A. nidulans*. Η απεικόνιση δείχνει τις διαφορετικές κυτταρικές δομές στον αγενή κύκλο ζωής του μύκητα. C: κονιδιοσπόρια, M: στηρίγματα, P: φιαλίδια, V: στέλεχος, FC: ποδικό κύτταρο.

Η έκφραση του UapA, ενός μεταφορέα που σχετίζεται με την πρόσληψη πουρινών ως πηγών αζώτου από το θρεπτικό υπόστρωμα, σε εναέρια τμήματα του μύκητα φαίνεται παράδοξη. Μια εικασία του ρόλου του εκεί μπορεί να είναι η ελεγχόμενη μεταφορά ουρικού οξέος από τα στηρίγματα και τα φιαλίδια στα κονιδιοσπόρια. Πρόσφατα στοιχεία από το εργαστήριό μας δείχνουν πως στελέχη που φέρουν την μεταλλαγή *uaZ*, τα οποία δεν έχουν την οξειδάση του ουρικού οξέος (UaZ), συσσωρεύουν 20 και 100 φορές περισσότερο ουρικό στο μηκύλιο και τους κονιδιοφορείς αντίστοιχα, σε σχέση με στέλεχος φυσικού τύπου (παράγραφος 7.5)

Αυτή η υπέρ-συσσώρευση ουρικού επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό αύξησης του μυκηλίου και μπλοκάρει ή μειώνει τη σπορίωση (Borbolis F., Diallinas G., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *ΔuapA uaZ*¯ δεν συσσωρεύουν ουρικό στους κονιδιοφορείς, ενώ έχουν αυξημένα ποσά ουρικού στο μυκήλιο. Αυτό επιβεβαιώνει πως ο UapA είναι απαραίτητος για τη μεταφορά του ουρικού οξέος από το μυκήλιο, μέσω των στηριγμάτων και των φιαλιδίων, στα σπόρια. Στελέχη που δεν έχουν τον UapA δείχνουν ήπια μειωμένη σπορίωση. Μια πιο σημαντική επίδραση στην σπορίωση φαίνεται σε στελέχη ανίκανα να βιοσυνθέσουν ουρικό οξύ (*hxA*$^{-}$ *xanA*$^{-}$) (Pantazopoulou and Diallinas 2007). Βάσει αυτών των παρατηρήσεων φαίνεται πως η παραγωγή, ο μεταβολισμός και η διακυτταρική μεταφορά ουρικού οξέος μπορεί να είναι κρίσιμοι παράγοντες τόσο για την ανάπτυξη του μυκηλίου, όσο και για την παραγωγή σπορίων. Πρέπει επίσης να σημειωθεί πως η ανάπτυξη των εργαστηριακών στελεχών του *A. nidulans* είναι ανεξάρτητη του φωτός, λόγω της *veA1* μεταλλαγής, και ο ρόλος του ουρικού οξέος στην επίδραση του φωτός στην ανάπτυξη του *A. nidulans* μπορεί να έχει υποεκτιμηθεί. Η κονιδιοποίηση στα στελέχη *veA*$^{+}$ πραγματοποιείται μόνο παρουσία φωτός, και το ουρικό οξύ θα μπορούσε να προστατεύει από την υπεριώδη ακτινοβολία, μιας και έχει μέγιστο απορρόφησης τα 292 nm. Αντίστοιχος ρόλος του ουρικού οξέος έχει προταθεί για τους οφθαλμούς των πτηνών (Ringvold et al. 2000).

Η έκφραση του UapA εξετάσθηκε επίσης σε δομές της εγγενούς αναπαραγωγής του *A. nidulans*, όπως κλειστοθήκια, ασκοσπόρια, ασκογόνες υφές και κύτταρα Hulle. Ο UapA βρέθηκε να εκφράζεται στις ασκογόνες υφές, τα κύτταρα hulle και τις διασυνδετικές υφές των τελευταίων, μα όχι στα κλειστοθήκια. Δεν είναι γνωστό εάν υπάρχει κάποιος ρόλος διαφορετικός από αυτόν της προμήθειας πουρινών ως πηγών αζώτου κατά τη διάρκεια της εγγενούς ανάπτυξης, αφού η διαγραφή του *uapA* δεν επηρεάζει το σχηματισμό κλειστοθηκίων ή την παραγωγή βιώσιμων ασκοσπορίων.

3.2.4 Οι NAT ως απαραίτητοι μεταφορείς ασκορβικού οξέος στην ανάπτυξη των θηλαστικών

Η βιταμίνη C είναι μια αποτελεσματική αντιοξειδωτική και UV-απορροφητική (Ringvold et al. 2000) ουσία, ενώ έχει σημαντικό ρόλο σε πολλές ενζυματικές αντιδράσεις ως συμπαράγοντας. Η ποικίλλουσα διασπορά της μεταξύ έξω- και ενδο-κυτταρικών υγρών, η παρουσία της σε μια πληθώρα οργάνων και ιστών, και το γεγονός πως οι άνθρωποι έχουν χάσει τη δυνατότητα να τη βιοσυνθέτουν, οδήγησαν σε πολλές προσπάθειες για τον χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων και μοριακών στοιχείων των μεταφορικών της συστημάτων. Προκαταρτικές μελέτες στα θηλαστικά αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο διακριτών συστημάτων, ένα για την χαμηλής συγγένειας μεταφορά της οξειδωμένης της μορφής, αφυδροασκορβικό οξύ, και άλλο ένα υπεύθυνο για την υψηλής συγγένειας και μεταφορικής ικανότητας πρόσληψη του L-ασκορβικού οξέος. Το πρώτο πραγματοποιείται από τους διευκολυνόμενης διάχυσης μεταφορείς εξοζών (GLUT1, GLUT3 και GLUT4) (Rumsey et al. 1997, Rumsey et al. 2000), οι οποίοι διαθέτουν τιμές συγγένειας δέσμευσης για το αφυδροασκορβικό της τάξης του 1 mM. Η φυσιολογική σημασία αυτού είναι υπό αμφισβήτηση, αφού η βιταμίνη C σπάνια βρίσκεται σε τέτοια μορφή *in vivo*, και η συγκέντρωση των εξοζών, που τυγχάνουν πολύ μεγαλύτερης συγγένειας για αυτούς τους μεταφορείς, είναι υψηλότερη. Το δεύτερο αποτελείται από δύο μέλη της οικογένειας NAT, τους SVCT1 και SVCT2 (Daruwala et al. 1999), που πραγματοποιούν ενεργό συμμεταφορά βιταμίνης C και ιόντων νατρίου. Τα ομόλογά τους στον αρουραίο ήταν αυτά που κλωνοποιήθηκαν πρώτα το 1999 (Tsukaguchi et al. 1999). Στους ανθρώπους, η NAT οικογένεια περιλαμβάνει τους hSVCT1 και hSVCT2, καθώς και δύο ορφανά μέλη, τους hSVCT3 και hSVCT4 (Daruwala et al. 1999).

Όπως υποδεικνύεται από τις λειτουργικές τους διαφορές, την κατανομή τους στους ιστούς και στην πολικότητα της μεμβράνης, οι δύο μεταφορείς έχουν διαφορετικούς φυσιολογικούς ρόλους. Ο SVCT1 είναι υπεύθυνος για την διατήρηση της σωματικής ομοιόστασης ασκορβικού οξέος, μέσω διαιτητικής απορρόφησης και νεφρικής επαναπρόσληψης. Ο SVCT2 έχει επιφορτισθεί με την πρόσληψη βιταμίνης C σε μεταβολικά ενεργές και εξειδικευμένες δομές, προστατεύοντάς τες από το οξειδωτικό στρες και την υπεριώδη ακτινοβολία. Ποντίκια ομόζυγα για διαγραφή του

slc23a2 πέθαναν αμέσως μετά τη γέννηση, παρά τη φυσιολογική ανάπτυξη που είχαν στη μήτρα (Sotiriou et al. 2002). Η αιτία θανάτου ήταν η αναπτνευστική ανεπάρκεια λόγω διάχυτης εγκεφαλικής αιμορραγίας, που υποδεικνύει προβληματικές λειτουργίες του νευρικού συστήματος. Τα ετερόζυγα επιβίωσαν ως την ενηλικίωση αλλά είχαν μειωμένα επίπεδα ασκορβικού οξέος στον εγκέφαλο και πολλούς άλλους ιστούς. Η μελέτη αυτή έδειξε την απόλυτη ανάγκη του SVCT2 κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ζωής, που επιβεβαιώνεται από το ρόλο του μεταφορέα στην πρόσληψη ασκορβικού οξέος στον πλακούντα (Biondi et al. 2007). Φαίνεται πως η μητρική παροχή βιταμίνης C είναι πολύ σημαντική στα θηλαστικά, αφού η βιοσύνθεση ασκορβικού αρχίζει αργά κατά την κύηση. Τα πρωτεύοντα δεν βιοσυνθέτουν καθόλου ασκορβικό, υποδεικνύοντας ένα πιο κρίσιμο ρόλο της μεταφοράς του. Κάποιες γενετικές ισομορφές των SVCT του ανθρώπου έχουν συσχετισθεί με πρόωρο τοκετό (Erichsen et al. 2006).

Οι δύο μεταφορείς έχουν δειχθεί να εκφράζονται σε μια πληθώρα ιστών. Ένας σημαντικός ρόλος του SVCT2 είναι η ανάπτυξη, ωρίμανση και οξειδωτική προστασία των νευρώνων του εγκεφάλου (Tsukaguchi et al. 1999, Qiu et al. 2007). Υψηλή έκφραση του SVCT2 έχει επίσης δειχθεί στους οφθαλμούς (Obrenovich et al. 2006) όπου το ασκορβικό πιστεύεται πως παίζει σημαντικό UV-απορροφητικό ρόλο, ανάλογο του ουρικού στα έντομα και τα πτηνά, και ίσως στους μύκητες. Είναι αξιοσημείωτο πως τα νυκτόβια θηλαστικά και πτηνά έχουν μειωμένα επίπεδα ασκορβικού και ουρικού οξέος στο μάτι αντίστοιχα, σε σχέση με τους ημερόβιους συγγενείς τους. Ο SVCT2 έχει επίσης δειχθεί να εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα επινεφρίδια (Bornstein et al. 2003, Patak et al. 2004) και το μυελό των οστών (Wu et al. 2004, McNulty et al. 2005), όπου το ασκορβικό έχει αντιοξειδωτικούς και ρυθμιστικούς ρόλους.

3.3. Ρύθμιση της έκφρασης των NAT

3.3.1. Μεταγραφική ρύθμιση των *uapA* και *uapC*

Η μεταγραφική ενεργοποίηση των *uapA* και *uapC* γονιδίων πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της ισοτροπικής φάσης ανάπτυξης των εκβλαστανόντων κονιδιοσπορίων, πριν από την πρώτη πυρηνική διαίρεση και την εγκαθίδρυση της

πολικότητας, και ακολουθείται από την εμφάνιση των αντίστοιχων μεταφορικών ενεργοτήτων (30-60 λεπτά αργότερα). Η μεταγραφική αυτή ενεργοποίηση είναι ανεξάρτητη των UaY και AreA, των δύο κύριων ρυθμιστών της μεταγραφής στο μυκήλιο. Η μόνη απαίτηση για την πρώιμη *de novo* μεταγραφική ενεργοποίηση των *uapA* και *uapC* κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης είναι η ενυδάτωση των αδρανών κονιδιοσπορίων (Amillis et al. 2004). Ενδιαφέρον είναι πως η έκφραση των γονιδίων που κωδικεύουν για τα ένζυμα του καταβολισμού πουρινών δεν ενεργοποιείται κατά την ισοτροπική φάση της εκβλάστησης αλλά αργότερα, κατά την αρχή της μυκηλιακής ανάπτυξης. Αυτός ο καινούριος μηχανισμός της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης των NAT ισχύει και για άλλους μυκητιακούς μεταφορείς. (Pendyala and Wellman 1977, Tazebay et al. 1997, Amillis et al. 2007, Vlanti and Diallinas, 2008). Άρα, αντίθετα από τον *S. cerevisiae* όπου πολύ ειδικές πρωτεΐνες ανιχνευτές ενεργοποιούν τους πραγματικούς μεταφορείς (Forsberg and Ljungdahl 2001), οι νηματοειδείς μύκητες φαίνεται να χρησιμοποιούν τους μεταφορείς τους τόσο για να αντιλαμβάνονται το περιβάλλον, όσο και για την ποσοτική πρόσληψη ουσιών. Οι μοριακοί πρωταγωνιστές που ελέγχουν αυτό το νέο σύστημα ρύθμισης παραμένουν άγνωστοι.

Μόλις ολοκληρωθεί η εκβλάστηση, η ρύθμιση της μεταγραφής των *uapA* και *uapC* γονιδίων ελέγχεται σε απόκριση επαγωγής από πουρίνες και καταβολικής αναστολής αζώτου (Scazzocchio et al. 1982, Scazzocchio 1994). Απουσία επαγωγέα (ουρικό οξύ), τα *uapA* και *uapC* μεταγράφονται σε χαμηλά βασικά επίπεδα όταν μια μη-ανασταλτική πηγή αζώτου βρίσκεται στο θρεπτικό (όπως στην Εικόνα 1.6). Επαγωγή από πουρίνες οδηγεί σε έως 8 φορές αύξηση του RNA μηνύματος (Amillis et al. 2004, Cecchetto et al. 2004). Η παρουσία ιόντων αμμωνίου ή γλουταμίνης (>5 mM) αναστέλλει δραστικά της μεταγραφή των *uapA* και *uapC*, ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη επαγωγέα (Amillis et al. 2004, Cecchetto et al. 2004). Μιας και ο φυσιολογικός επαγωγέας του μονοπατιού καταβολισμού πουρινών είναι το ουρικό οξύ, η λεπτομερής ρύθμιση της έκφρασης των *uapA* και *uapC* γονιδίων, που κωδικεύουν τις δύο μόνες διόδους του ουρικού οξέος στο κύτταρο, καταλήγει στον αποκλεισμό του επαγωγέα και συνιστά έναν διπλό μηχανισμό για την αναστολή της χρησιμοποίησης πουρινών.

Η επαγωγή της μεταγραφής των *uapA* και *uapC* πραγματοποιείται από τον θετικό ρυθμιστικό παράγοντα UaY (Scazzocchio, 1994). Ο UaY ανήκει στη μυκητιακή κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων Cys6Zn2 και περιέχει μια τυπική

δομή δακτύλων ψευδαργύρου, με την οποία προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του (Suarez et al., 1995). Η αλληλουχία που αναγνωρίζει, η οποία είναι παλίνδρομο μιας και προσδένεται στο DNA ως διμερές, είναι η 5΄-TCGG-6X-CCGA-3'. Η ταυτότητα του πρώτου νουκλεοτιδίου καθορίζει τη συγγένεια δέσμευσης του UaY σε αυτήν. Η αναστολή από αμμωνία πραγματοποιείται από την απενεργοποίηση του γενικού μεταγραφικού παράγοντα AreA, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη μεταγραφή περισσότερων από 100 γονιδίων που τα προϊόντα τους σχετίζονται με τη χρησιμοποίηση πηγών αζώτου του *A. nidulans* (Kudla et al. 1990). Η δομή του AreA και των ομόλογων μυκητιακών πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο DNA είναι ομόλογη αυτής των δακτύλων ψευδαργύρου και των βασικών περιοχών των GATA μεταγραφικών παραγόντων των μεταζώων (Kudla et al. 1990). Ο AreA πραγματοποιεί την καταβολική αναστολή αζώτου σε απόκριση στις συγκεντρώσεις γλουταμίνης ή αμμωνίας στο κύτταρο, ενώ η γλουταμίνη πιστεύεται πως αποσταθεροποιεί το *mRNA* του AreA (Platt et al. 1996, Morozov et al. 2001). Οι αλληλουχίες δέσμευσης στο DNA των UaY και AreA αποκαλύφθηκαν με πειράματα αλλαγής κινητικότητας σε πηκτώμα και αποτυπωμάτων DNAασης I (Suarez et al. 1995, Ravagnani et al. 1997, Muro-Pastor et al. 1999). Γενετικές, μοριακές και λειτουργικές αναλύσεις μια σειράς μεταλλαγών τροποποίησης της ειδικότητας δέσμευσης στο DNA του AreA και *cis*-δρώντων ρυθμιστικών στοιχείων των υποκινητών των *uapA* και *uapC* επιβεβαίωσαν πως αυτές οι *in vitro* ταυτοποιημένες αλληλουχίες είναι όντως οι φυσιολογικές αλληλουχίες δέσμευσης των UaY και AreA. Πιο συγκεκριμένα, η μεταλλαγή *areA102* (Arst and Scazzocchio 1975) προκαλεί αναστολή της έκφρασης των γονιδίων *uapA*, *uapC* και *azgA*. Η *areA102* είναι μια μη συντηρητική μεταλλαγή που προκαλεί υποκατάσταση της Leu683 σε Val (Kudla *et al.,* 1990). Εξωγονιδιακές κατασταλτικές μεταλλαγές εντοπίστηκαν στους υποκινητές των *uapA* και *uapC*. Οι μεταλλαγές αυτές αφορούσαν αντικαταστάσεις των θέσεων δέσμευσης του AreA, από CGATAR ή AGATAR σε TGATAR (Ravagnani *et al.,* 1997). Η μελέτη αυτών των μεταλλαγών οδήγησε στο συμπέρασμα πως οι αλληλεπιδράσεις της συντηρημένης λευκίνης της έβδομης θέσης του δακτυλίου Zn με την πρώτη βάση αναρροϊκά της αλληλουχίας πρόσδεσης GATA καθορίζουν την αποδοτικότητα της μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η μικρότερη από τη λευκίνη, βαλίνη στη θέση 683 του AreA δεν μπορεί να δημιουργήσει υδρόφοβες επαφές με την πρώτη βάση της θέσης HGATAR, όταν αυτή είναι αδενίνη ή κυτοσίνη, αλλά η ογκώδης μεθυλομάδα της θυμίνης αποκαθιστά το σχηματισμό του δεσμού αυτού

(Ravagnani *et al.* 1997). Μία από τις κατασταλτικές μεταλλαγές αφορούσε το διπλασιασμό αλληλουχίας του υποκινητή του *uapC*, η οποία δημιουργούσε μια δεύτερη αλληλουχία πρόσδεσης του UaY πολύ κοντά στην αρχική. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η πρόσδεση του UaY στην περιοχή του υποκινητή γονιδίων μεταφορέων πουρινών κατευθύνει την πρόσδεση του AreA, ώστε να πυροδοτήσει γεγονότα αναδιάταξης χρωματίνης και ενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης (N. Oestreicher, G. Diallinas, L. Gorginkiel, M. Vieira de Queiroz and C. Scazzocchio, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

3.3.2. Μετα-μεταφραστική ρύθμιση των NAT

Η μετα-μεταφραστική ρύθμιση των UapA και UapC αναφέρεται στην παράγραφο 4.2.1.

3.3.2.1. Μετα-μεταφραστική ρύθμιση των SVCT

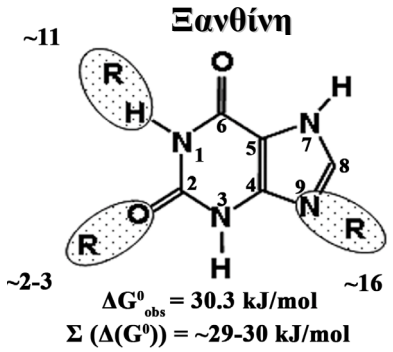
In silico ανάλυση αποκάλυψε ότι οι SVCT κατέχουν διάφορες συντηρημένες περιοχές φωσφορυλίωσης και γλυκοζυλίωσης (Wang et al. 2000). Επώαση ωοκυττάρων του *Xenopus laevis* που εκφράζουν hSVCT1 ή hSVCT2 με τον παράγοντα ενεργοποίησης της PKC, PMA, μειώνει εμφανώς την πρόσληψη L-ασκορβικού οξέος (Daruwala et al. 1999), χωρίς επιρροή στη συγγένεια του μεταφορέα (Liang et al. 2001). Αυτό ισχύει επίσης μετά από επίδραση PMA σε κύτταρα COS-1 που εκφράζουν hSVCT1, όπου παρατηρείται μια ανακατανομή της πρωτεΐνης από την κυτταρική επιφάνεια στα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Μείωση στην πρόσληψη L-ασκορβικού οξέος παρατηρείται επίσης για τον hSVCT2 χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα, αλλά η αποτυχία να συνδεθεί με μια ανάλογη αλλαγή στον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης εξηγήθηκε από μια αλλαγή στη διαμόρφωση του hSVCT2. Δύο πιθανές περιοχές N-γλυκοζυλίωσης βρίσκονται στην υποθετική εξωκυτταρική θηλιά μεταξύ TMS3 και 4 των SVCT1 και SVCT2. Ο SVCT1 επίσης κατέχει μια τρίτη μεταξύ των TMS5 και TMS6 (Wang et al. 2000). Ανάλυση Western για τον SVCT2 του αρουραίου αποκάλυψε την ύπαρξη δύο ζωνών, δείχνοντας πιθανώς τις διαφορετικές μορφές γλυκοζυλίωσης (Garcia Mde et al. 2005). Αυτό έχει δειχθεί και στην περίπτωση των ανθρώπινων SVCTs, όπου

τουλάχιστον δύο υποθετικές περιοχές μπορούν να γλυκοζυλιωθούν *in vitro,* όπως φαίνεται από την αλλαγή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας σε πήκτωμα των προϊόντων της μετάφρασης παρουσία ή απουσία μικροσωμάτων (Wang et al. 2000). Επίσης έχει αναφερθεί μια μη λειτουργική παραλλαγή του SVCT1, η οποία οφείλεται σε διαφορικό μάτισμα εσωνίων και περιέχει μια εισαγωγή τεσσάρων αμινοξέων (VGLH) μεταξύ των E155 και V156 (Wang et al. 1999). Η τοπολογία τους στην πιθανή θηλιά μεταξύ TMS3 και 4 υποδεικνύει πως είτε η περιοχή αυτή αποτελεί ένα κρίσιμο δομικό συστατικό για την αναδίπλωση του μεταφορέα είτε η εισαγωγή θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στην αποδοτικότητα της γλυκοζυλίωσης. Πράγματι έχει αποδειχθεί πως οι SVCTs γλυκοζυλιώνονται. Η γλυκοζυλίωση είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των μεταφορέων, ενώ είναι σημαντική για τη σωστή στόχευση του SVCT1 στην πλασματική μεμβράνη (Subramanian et al. 2008, Velho and Jarvis 2009). Μια μη λειτουργική ισομορφή του SVCT2, που στερείται τα TMS5 και TMS6 και μέρος του TMS4, αποδείχθηκε να έχει επικρατή αρνητικό φαινότυπο όσον αφορά την πρόσληψη L-ασκορβικού οξέος, όταν εκφράζεται ταυτόχρονα με τον φυσικού τύπου SVCT2 (Lutsenko et al. 2004). Αυτό προτείνει την ύπαρξη ρύθμισης με βάση περιοριστικές διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Στα κύτταρα MC3T3-E1, επίδραση με PGE2 μερικώς καταστέλλει αυτόν τον επικρατή αρνητικό φαινότυπο, με έναν PKA εξαρτώμενο τρόπο. Η κινάση αυτή έχει αποδειχθεί να αλληλεπιδρά με τον SVCT2, φωσφορυλιώνοντας τις σερίνες 402 και 639 (Wu et al. 2007). Χρησιμοποιώντας SVCT1 συζευγμένο με YFP και μια σειρά καρβοξυτελικών περικομμένων μεταλλάξεων, οι Subramanian et al. 2004 καθόρισαν μια καρβοξυτελική περιοχή δέκα αμινοξικών καταλοίπων που υπαγορεύουν την ακραία στόχευση του μεταφορέα στην πλασματική μεμβράνη πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων. Αυτή η περιοχή διαθέτει σημαντική ομοιότητα με γνωστές αλληλουχίες υπεύθυνες για την κορυφαία στόχευση που βρίσκονται σε άλλους συμμεταφορείς κατιόντων νατρίου.

3.4. Σχέσεις δομή-λειτουργίας των NAT

3.4.1. Μικροβιακά πρότυπα συστήματα

Οι σχέσεις δομής-λειτουργίας των NAT έχουν μελετηθεί κυρίως στον μεταφορέα ουρικού οξέος-ξανθίνης του *Aspergillus nidulan*s, UapA, αλλά και στον YgfO μεταφορέα ξανθίνης της *E. coli* (Diallinas and Gournas, 2008). Μια προσέγγιση με χιμαιρικούς UapA-UapC μεταφορείς προσδιόρισε αρχικά ένα σχετικά μικρό τμήμα (Diallinas et al. 1998), που περιλαμβάνει μια υποθετική διαμεμβρανική περιοχή (TMS9) και το τμήμα των προηγούμενων 61 αμινοξέων του, ως κρίσιμο για τη λειτουργία και την εξειδίκευση των μεταφορέων αυτών. Το τμήμα μεταξύ των TMS8 και TMS9, που είναι αμφιπαθικής φύσης, και κατά συνέπεια διφορούμενης τοπολογίας, αποδείχθηκε στη συνέχεια να περιλαμβάνει συγκεκριμένα, συντηρημένα μέσα στη NAT οικογένεια, αμινοξέα που έχουν σχέση με την πρόσδεση και τη μεταφορά υποστρωμάτων (Meintanis et al. 2000, Koukaki et al. 2005). Αυτά τα λειτουργικά αμινοξέα αποτελούν την αποκαλούμενη συναινετική αλληλουχία των NAT ([Q/E/P]^{408}-**N**- X**Γ**- **T**- [R/K/G]^{417}, οι αριθμοί αναφέρονται στην αναθεωρημένη ακολουθία του UapA, Koukaki et al. 2005). Η κινητική ανάλυση των στοχευόμενων μεταλλαγών του UapA χρησιμοποιώντας μια πληθώρα πιθανών πουρινικών υποστρωμάτων και αναλόγων τους έχει δείξει ότι αυτή η αλληλουχία αποτελεί μέρος του μονοπατιού διακίνησης υποστρωμάτων (Koukaki et al. 2005, Goudela et al. 2005). Πιο συγκεκριμένα, η Q408 προτάθηκε να είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με τη θέση N9 του ιμιδαζολικού δακτυλίου των πουρινών (Εικόνα 3.6, παράγραφος 3.5.1), η N409 αποδείχθηκε να είναι απολύτως απαραίτητη για την κατάλυση της μεταφοράς, ενώ η G411 επιδρά, πιθανώς έμμεσα, στη λειτουργία και την εξειδίκευση του μεταφορέα. *In silico* προβλέψεις, αναζήτηση στις δομικές βάσεις δεδομένων και πρόσφατα δεδομένα από NMR πρότειναν ότι αυτά τα λειτουργικά αμινοξικά κατάλοιπα (Q^{408}N^{409}XG^{411}) πρέπει να διαμορφώνουν μια θηλιά, πιθανώς συμπεριλαμβανομένης και μιας β-στροφής (Papachristodoulou et al. 2009)



Εικόνα 3.6. Μοντέλο αλληλεπίδρασης του UapA μεταφορέα με το υπόστρωμά του, ξανθίνη (Από Diallinas and Gournas, 2008). Φαίνεται η συμμετοχή συγκεκριμένων θέσεων του πουρινικού δακτυλίου στη δέσμευση, καθώς και η ενεργειακή τους συνεισφορά. Λεπτομέρειες στην παράγραφο 3.5.1.

Ο ρόλος της συναινετικής αλληλουχίας των NAT και των περιοχών που την πλαισιώνουν μελετήθηκε επίσης με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και κυστεϊνική σάρωση στον YgfO, δίνοντας εντυπωσιακά παρόμοια συμπεράσματα σχετικά με το λειτουργικό ρόλο των αμινοξικών καταλοίπων Q324, N325 και G327 του σε σχέση με τα ομόλογα κατάλοιπα (Q408, N409 και G411) του UapA. Ο ρόλος των άλλων δύο, συντηρημένων στη συναινετική αλληλουχία των NAT, καταλοίπων των UapA και YgfO (T416 και R417 ή T332 και G333, αντίστοιχα) ερευνήθηκε επίσης και αποδείχθηκαν να διαδραματίζουν βοηθητικό ρόλο στον καθορισμό της εξειδίκευσης της πρόσληψης, ειδικά όσον αφορά την αναγνώριση του ουρικού οξέος ή άλλων υποστρωμάτων τροποποιημένων στις θέσεις 7 και 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου (Karatza and Frillingos, 2005, Goudela et al. 2005).

Μελέτες της συγκεκριμένης περιοχής των NAT έχουν πραγματοποιηθεί για τον YgfO μεταφορέα ξανθίνης της *E. coli*, μέσω άλλης προσέγγισης. Χρησιμοποιώντας έναν λειτουργικό μεταφορέα YgfO απαλλαγμένο κυστεϊνικών καταλοίπων (ακυστεϊνικός), κάθε αμινοξικό κατάλοιπο της αλληλουχίας ^{315}GSLPITTFA**QN**N**Γ**VIQM**TG**VASRYVG^{340} αντικαταστάθηκε μεμονωμένα με Cys (ανάλυση μεταλλαξιγένεσης σε κυστεΐνες, cysteine scanning mutagenesis, (Frillingos et al. 1994). Η επίδραση του NEM (*N*- το ethylmaleimide), ένα αντιδραστήριο σουλφυδρυλίωσης με ικανότητα διάσχισης της πλασματικής μεμβράνης, στο αρχικό ποσοστό μεταφοράς ξανθίνης και η ανάλυση της αλκυλιοποίησης κάθε μονής cys-μεταλλαγής στην ακολουθία 315-340, έδειξαν ότι τα κατάλοιπα A323, N326, G327, V328, I329, T332, G333 και S336 μπορούν να αντικαταστασθούν με Cys χωρίς να επηρεασθεί η λειτουργικότητα του μεταφορέα, αλλά υποβάλλονται σε ισχυρή παρεμπόδιση κατά την περαιτέρω τροποποίηση από NEM. Η πιο εύλογη εξήγηση για αυτό είναι ότι αυτά τα κατάλοιπα σχετίζονται είτε με τις διαμορφωτικές αλλαγές που πραγματοποιούνται κατά την κατάλυση της μεταφοράς, είτε με τη σταθερότητα και το χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης. Το ίδιο έδειξε και τροποίηση των συγκεκριμένων

μεταλλαγών με 2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate {MTSES(-)} (Georgopoulou et al. 2010), έναν αλκυλιωτικό παράγοντα που όμως δεν μπορεί να διασχίσει την υδρόφοβη πλασματική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως η συναινετική αλληλουχία των NAT είναι προσβάσιμη εξωκυτταρικά, αν και έχει κυτταροπλασματική τοπολογία. Ενδιαφέρον επίσης παρουσίαζει το γεγονός πως η ικανότητα άμεσης αντίδρασης με το NEM της μεταλλαγής A323C ενισχύεται σημαντικά παρουσία ξανθίνης, γεγονός που προτείνει ότι αυτό το τμήμα των καταλοίπων έχει δυναμικά ενεργή διαμόρφωση και υποβάλλεται σε μετακινήσεις που συνδέονται με τον κύκλο μεταφοράς της πρωτεΐνης. Τέλος, η ανάλυση μεταλλαξιγένεσης σε κυστεΐνες παρείχε στοιχεία συμβατά με την θεώρηση πως τα κατάλοιπα 329-339, που βρίσκονται καταρροϊκά της συναινετικής αλληλουχίας των NAT, έχουν δομή τριών στροφών *α*-έλικας, με τα υπολείμματα I329, T332, G333, S336 και V339 να είναι σε μια περιοχή ευαίσθητη σε αλκυλίωση με τρόπο που είναι σημαντικό για τη μεταφορά (Karatza et al. 2006). Αυτά τα συμπεράσματα πρότειναν ότι η υποθετική διαμεμβρανική έλικα μετά από την συναινετική αλληλουχία των NAT (TMS9) πρέπει να επεκταθεί με δύο πρόσθετες ελικοειδείς στροφές μέσα στην προηγούμενη υδρόφιλη θηλιά (Εικόνα 3.7).

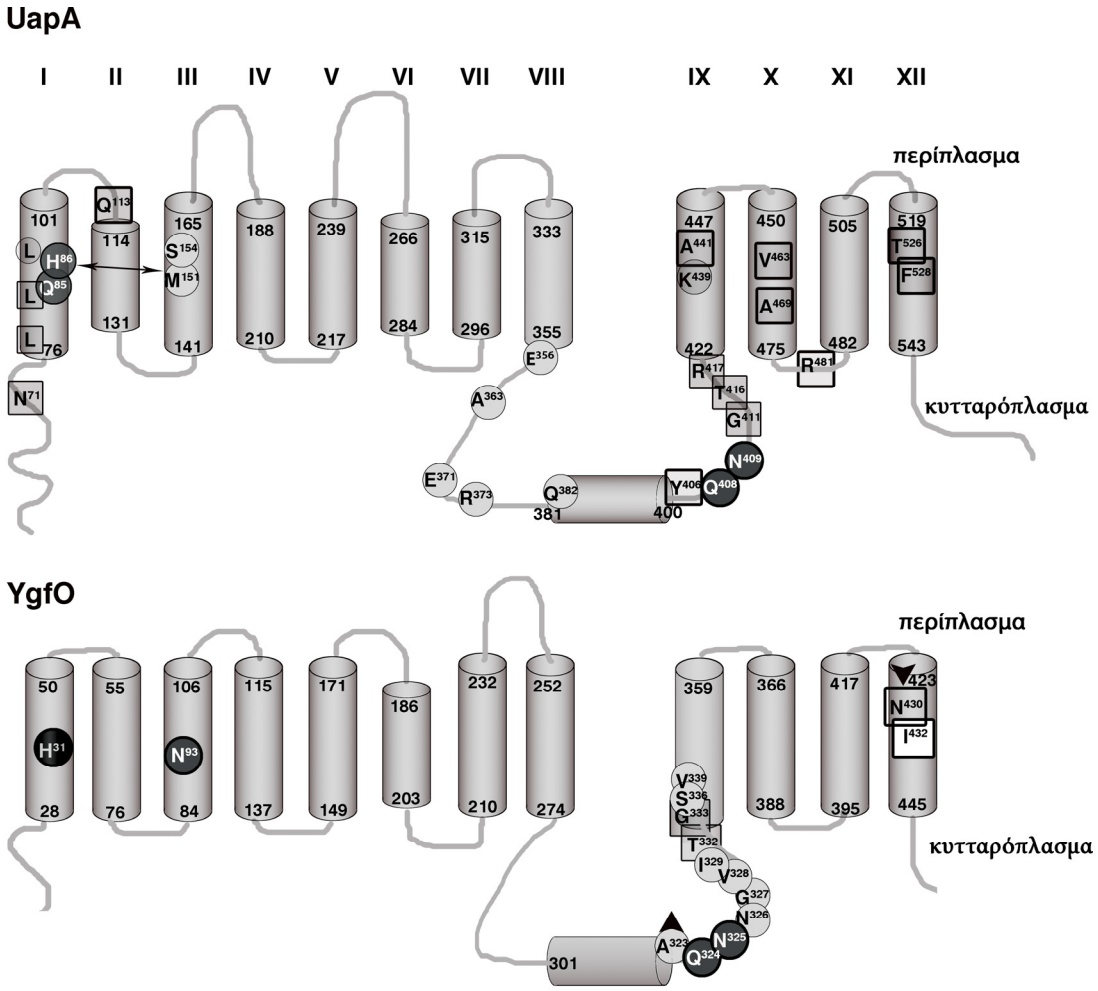
Κατασταλτικές μεταλλαγές δεύτερης θέσης της κρυοευαισθησίας της Q408E μεταλλαγής του UapA εντοπίζονται στο αμινοξικό κατάλοιπο F528 μέσα στο TMS12 (Amillis et al. 2001). Συστηματική στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση έδειξε πως όταν αυτό το αμινοξύ υποκαθίσταται με μικρά ή αλειφατικά αμινοξέα, ο UapA μετατρέπεται σε έναν χαμηλής-συγγένειας, μεγάλης χωρητικότητας μεταφορέα για όλα τα είδη των πουρινών, χωρίς επίπτωση στην υψηλή του συγγένεια για τα φυσιολογικά του υποστρώματα, ουρικά οξύ και ξανθίνη (Vlanti et al. 2006). Με άλλα λόγια, το F528 του TMS12 συμμετέχει σε ένα πολύ αποδοτικό φίλτρο επιλεκτικότητας, το οποίο αποκλείει πουρίνες εκτός από το ουρικό οξύ και την ξανθίνη από το κέντρο δέσμευσης του UapA. Μόλις «αφαιρεθεί» το φίλτρο, ο UapA μπορεί ακόμα να δεσμεύσει (σε 5-10 μM) και να μεταφέρει τα φυσιολογικά υποστρώματά του, τόσο αποτελεσματικά όσο και ο φυσικού τύπου μεταφορέας, αλλά μπορεί επίσης να δεσμεύσει και να μεταφέρει αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη και άλλα πουρινικά ανάλογα, όταν παρέχονται σε συγκεντρώσεις της τάξης του mM. Είναι ενδιαφέρον πως συγκεκριμένοι συνδυασμοί μεταλλαγών του F528 με υποκαταστάσεις του Q408 οδηγούν σε μια σειρά μορίων UapA με διαφορετικά χαρακτηριστικά κινητικής και εξειδίκευσης. Αυτό προτείνει μια μοριακή ‘‘συνομιλία’’

της περιοχής δέσμευσης των πουρινών, που καθορίζεται από τη συναινετική αλληλουχία των NAT, και το φίλτρο επιλεκτικότητας στο TMS12, η οποία καθορίζει τα κινητικά χαρακτηριστικά και την εξειδίκευση του UapA. Κατάλοιπα του TMS12 του YgfO, που αντιστοιχούν και με τα κατάλοιπα επιλεκτικότητας του UapA, έχουν βρεθεί να είναι απολύτως κρίσιμα για τη λειτουργία του μεταφορέα, αλλά όχι για την επιλεκτικότητα υποστρωμάτων (Papakostas et al., 2008). Πολύ πρόσφατα, οι ίδιοι συγγραφείς επίσης έχουν δείξει ότι τα αμινοξέα που συγκεντρώνονται σε μια πλευρά των ελίκων TMS9 και TMS12 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε στοχευμένη αλκυλιοποίηση, και ότι τα TMS8, TMS9 και TMS12 ίσως αλληλεπιδρούν λειτουργικά και πιθανώς φυσικά.

Με μεταλλαξιγένεση υπεριώδους και επιλογή σε αδενίνη ως μοναδική πηγή αζώτου απομονώθηκαν μεταλλαγμένες μορφές του UapA οι οποίες να μπορούν να μεταφέρουν πλέον την πουρίνη αυτή (Papageorgiou et al., 2008b). Οι μεταλλαγές αυτές χαρτογραφήθηκαν ως υποκαταστάσεις δύο αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης, της Thr526 σε Met και Leu και της Gln113 σε Leu. Επιπλέον, με στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση ενός συντηρημένου καταλοίπου ασπαρτικού (Asp71) σε αλανίνη δημιουργήθηκαν μεταφορείς με ικανότητα πρόσληψης υποξανθίνης. Η Thr526 βρίσκεται στο TMS12 του μεταφορέα, πολύ κοντά στην προαναφερόμενη Phe528. Σε σχέση όμως με την Phe528, η Thr 526 είναι πιο συντηρημένη, ιδίως σε μυκητιακούς NAT. Η Gln113 βρίσκεται στη μικρή υδρόφιλη εξωκυτταρική θηλειά μεταξύ των TMS1 και 2, ενώ η Asn71 στο κυτταροπλασματικό καρβοξυτερικό άκρο του UapA, πολύ κοντά στο TMS1. Παρόμοια με τις μεταλλαγές της θέσης 528, τα συγκεκριμένα αλλήλια έδειχναν ικανότητα μεταφοράς υποξανθίνης, αλλά και των φυσιολογικών υποστρωμάτων του UapA, ουρικό και ξανθίνη. Εκτεταμένη κινητική ανάλυση των συγκεκριμένων αλληλίων αλλά και νέων που έφεραν άλλες αμινοξικές υποκαταστάσεις των εν λόγω καταλοίπων έδειξε πως τα κινητικά χαρακτηριστικά τους για τα φυσιολογικά υποστρώματα παραμένουν ανεπηρέαστα, ενώ δεν εμφανίζουν ικανότητα υψηλής συγγένειας δέσμευσης των νέων υποστρωμάτων τους. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτών των μεταλλαγών, κυρίως αυτών που αφορούσαν την Thr526, ήταν πως μπορούσαν πλέον να δεσμεύσουν ανάλογα ξανθίνης που φέρουν ογκώδεις υποκαταστάσεις σε θέσεις του πουρινικού δακτυλίου που δεν σχετίζονται με τη δέσμευση της ξανθίνης, με συγγένεια δέσμευσης σχεδόν ταυτόσημη με την ξανθίνη. Βέβαια, η συγγένεια δέσμευσης αναλόγων με υποκαταστάσεις σε θέσεις του πουρινικού δακτυλίου που είναι απαραίτητες για τη δέσμευση στο μεταφορέα

παράμενε ανεπηρέαστη. Τα ανωτέρω σημαίνουν πως οι συγκεκριμένες μεταλλαγές έχουν προκαλέσει μια μικρή αλλαγή της δομής του UapA, η οποία διευρύνει το κέντρο δέσμευσης. Συνδυασμός αυτών των μεταλλαγών μεταξύ τους ή με άλλες υποκαταστάσεις καταλοίπων της NAT συναινετικής αλληλουχίας εμφάνισε συνέργια, δημιούργησε δηλαδή αλλήλια μεταφορέων με νέα κινητικά χαρακτηριστικά ή ακόμη και απώλειας λειτουργίας αλλήλια. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως οι τρεις περιοχές του UapA, τα TMS1 και 12 και η NAT αλληλουχία, αλληλεπιδρούν λειτουργικά για να καθορίσουν την αυστηρή εξειδίκευση του UapA προς ουρικό και ξανθίνη και την υψηλής συγγένειας δέσμευση του ουρικού οξέος. Πράγματι, υποκατάσταση των τριών αυτών περιοχών με αυτές του UapC, ο οποίος αποτελεί παράλογο του UapA με 65% ταυτότητα, παρόμοια λειτουργία αλλά διακριτά κινητικά χαρακτηριστικά, δημιούργησε μεταφορείς όμοιους με τον UapC. Αν επίσης ληφθεί υπόψιν πως ο UapA φαίνεται να έχει προκύψει από τον UapC (Pantazoloulou et al. 2007), η αυστηρή εξειδίκευση του UapA φαίνεται να είναι νέα ιδιότητα, η οποία προκύπτει από της ενδομοριακές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις τριών περιοχών του μεταφορέα. Η εξελικτική πίεση που οδήγησε στη δημιουργία ενός τόσο αυστηρής εξειδίκευσης και υψηλής συγγένειας μεταφορέα δεν είναι γνωστή ούτε προφανής.

Πρόσφατα δείχθηκε πως και άλλες περιοχές του UapA είναι σημαντικές για την εξειδίκευσή του (Kosti et al. 2010). Με μια προσέγγιση παρόμοια με αυτή για την απομόνωση των προηγούμενων, ξεκινώντας όμως από στέλεχος που φέρει το F528S αλλήλιο, απομονώθηκαν ενδογονιδιακές μεταλλαγές δεύτερης θέσης, οι οποίες εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική θηλιά μεταξύ των TMS10 και TMS11, στα TMS9, TMS10, στην Phe406 αλλά και η προαναφερόμενη Q113L μεταλλαγή. Η Phe406 βρίσκεται δίπλα στην NAT συναινετική αλληλουχία (Εικόνα 3.8). Τα νέα αλλήλια εμφάνισαν παρόμοια κινητικά χαρακτηριστικά με τις μεταλλαγές των TMS1 και TMS12. Η απομόνωση μεταλλαγών δεύτερης θέσεις σε περιοχές που είχαν προηγουμένως δειχθεί συνθετικά να αλληλεπιδρούν ήταν πολύ σημαντική για την εγκαθίδρυση της ιδέας της ενδομοριακής συνεργιστικής αλληλεπίδρασης περιοχών του UapA για τον καθορισμό της πρόσβασης των υποστρωμάτων στο κέντρο δέσμευσης. Η θέση και η τοπολογία πολλών περιοχών προτείνει πως ίσως αποτελούν δυναμικές πύλες αποκλεισμού μη φυσιολογικών υποστρωμάτων, μια λειτουργία που μέχρι στιγμής είχε δειχθεί μόνο σε κανάλια και όχι σε μεταφορείς.



Εικόνα 3.7. Περιληπτική απεικόνιση της τοπολογίας και των σχέσεων δομής-λειτουργίας των UapA και YgfO. Τα υποθετικά TMS με δομή α-έλικας δείχνονται ως κύλινδροι. Επισημαίνονται αμινοξικά κατάλοιπα σημαντικά για τη λειτουργία των μεταφορέων. Τα απολύτως απαραίτητα για τη λειτουργία κατάλοιπα βρίσκονται σε σκούρο γκρι υπόβαθρο (UapA: Q85, Q408, N409, YgfO: H31, N93, Q324, N325). Τα κατάλοιπα που επηρεάζουν την εξειδίκευση ή τη συγγένεια δέσμευσης περιβάλλονται σε τετράγωνα (UapA: N71, L77, L84, Q113, G411,T416, R417, T526, F528, YgfO: T332, G333, N430, I432). Φαίνεται επίσης η τοπολογία τριών καταλοίπων (E356, Q382, K439), ο ρόλος των οποίων μελετάται στη συγκεκριμένη διατριβή. Η H86 στο TMS1 του UapA επηρεάζει την τοπογένεση και έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με την M151 του TMS3. Στον YgfO τα αμινοξικά κατάλοιπα που φαίνονται σε γκρι και σκούρο γκρι υπόβαθρο είναι ευαίσθητα σε αλκυλίωση κατόπιν υποκατάστασής τους με Cys. Το N325C αλλήλιο προστατεύεται μερικώς από αλκυλίωση με προσθήκη υποστρώματος, ενώ το N430C προστατεύεται πλήρως με προσθήκη 2-θειο-ξανθίνης. Η αντίδραση του A323C ενισχύεται περαιτέρω παρουσία υποστρώματος.

Η συντηρημένη αλληλουχία [(**A**/**G**^{83})X**QH**], αλλά και το TMS1 του UapA έχουν επίσης μελετηθεί μέσω συστηματικής *in vitro* μεταλλαξιγένεσης, και έχει δειχθεί πως συγκεκριμένα κατάλοιπα, τα οποία όλα χαρτογραφούνται στην ίδια πλευρά της α-έλικας του TMS1, είναι κρίσιμα για τον αποκλεισμό πουρινών, άλλων από το ουρικό οξύ και την ξανθίνη, από την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος, και για την υψηλής-συγγένειας μεταφορά του ουρικού οξέος που παρατηρείται από τον UapA (Pantazopoulou and Diallinas, 2006) Η H86 δείχθηκε να είναι κρίσιμη για την υποκυτταρική στόχευση του UapA, αφού διαφορετικές αμινοξικές υποκαταστάσεις οδηγούν σε διαφορετικές τοπογενετικές ατέλειες (Pantazopoulou and Diallinas, 2006). Πιο συγκεκριμένα, ο UapA-H86D διατηρείται στο ER, ο UapA-H86A είναι εντοπισμένος σε ενδοκυτταρικά στικτά κοκκιώδη σημεία, αντί της πλασματικής μεμβράνης, ο UapA-H86K στοχεύεται κυρίως στο χυμοτόπιο, ενώ ο UapA-H86N έχει τοπολογία φυσικού τύπου. Η H86 είναι απολύτως συντηρημένη σε όλους τους NAT και χαρτογραφείται στην α-έλικα του TMS1 σε πλευρά αντίθετη από αυτή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα που έχουν επιπτώσεις στην αναγνώριση υποστρωμάτων. Η πλευρά του TMS1 που περιλαμβάνει την H86 δείχθηκε να αλληλεπιδρά με το TMS3, αφού η H86D μεταλλαγή καταστέλλεται από μεταλλαγές στο TMS3 (Pantazopoulou and Diallinas, 2006, S. Amillis, A. Pantazopoulou, V. Kosti and Diallinas, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Αντίστοιχες μελέτες στον YgfO έχουν δείξει πως το συγκεκριμένο κατάλοιπο ιστιδίνης είναι σημαντικό για την λειτουργία της πρωτεΐνης, όπως και ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στη θέση 93, στην καρδιά δηλαδή του τρίτου διαμεμβρανικού (Karena and Frillingos 2009). Υποκατάσταση της Asn93 από σερίνη, που υπάρχει στην αντίστοιχη θέση του UapA, καθιστά ικανό τον YgfO να αναγνωρίζει ουρικό οξύ, με χαμηλή όμως συγγένεια και χωρίς ικανότητα μεταφοράς. Τα αποτελέσματα αυτά συνολικά δείχνουν πως η αλληλεπίδραση των TMS1 και TMS3 είναι σημαντική για τη λειτουργικότητα των NAT και για τον καθορισμό της ικανότητας δέσμευσης υποστρωμάτων. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως το αντίστοιχο κατάλοιπο σερίνης στο TMS3 του UapA είναι σημαντικό για τη λειτουργία του, χωρίς όμως να επηρεάζει τη συγγένεια του μεταφορέα για τα υποστρώματά του (S. Amillis, A. Pantazopoulou, V. Kosti and Diallinas, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Τέλος, η παρουσία όλων των TMS φαίνεται να είναι απαραίτητη για το κατάλληλο δίπλωμα, καθώς περικομμένες εκδόσεις του UapA που στερούνται τα TMS1, TMS2 ή TMS12 διατηρούνται στο ER (Vlanti et al. 2006 και αδημοσίευτα), κάτι που ίσως απεικονίζει απλά μια γενική προβληματική

αναδίπλωση. Στην Εικόνα 3.8 φαίνονται περιληπτικά οι σχέσεις δομής-λειτουργίας των NAT.

Πολύ πρόσφατα, κατά τη διάρκεια συγγραφής αυτής της διατριβής, δημοσιεύθηκε η υψηλής ανάλυσης τρισδιάστατη δομή του UraA μεταφορέα ουρακίλης της *E. coli*, οποίος ανήκει στην οικογένεια NAT. Επειδή ο UapA με τον UraA μοιράζονται σημαντική ταυτότητα και ομοιότητα και οι δομές των μεταφορέων της ίδιας οικογένειας είναι γενικά συντηρημένες, η δομή αυτή είναι πολύ σημαντικό εργαλείο στην κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας των NAT και του UapA, στην καλύτερη ερμηνεία των δεδομένων που αναφέρθηκαν αλλά και των αποτελεσμάτων αυτής της διατριβής. Για το λόγο αυτό θα γίνει εκτενής αναφορά στο κεφάλαιο των Συμπερασμάτων-Συζήτησης-Προοπτικών.

3.4.2. Σχέσεις δομής-λειτουργίας στους SVCT

Παρά το μεγάλο όγκο δουλειάς στους SVCT, δεν υπάρχει ευρέως αποδεκτή άποψη για τα κινητικά τους χαρακτηριστικά, με τα αποτελέσματα να διαφέρουν μεταξύ κυτταρικών σειρών, ιστών, ή συστημάτων έκφρασης. Για τις ανθρώπινες ισομορφές, τιμές K_m από 65-237 μM για τον SVCT1 και από 8-62 μM για τον SVCT2 έχουν αναφερθεί (Savini et al. 2008). Πρόσφατα δείχθηκε πως η K_m του SVCT2 σε δέκα διαφορετικές αρχικές κυτταρικές σειρές είναι κοντά στα 20 μM (Godoy et al. 2007). Οι V_m τιμές επίσης διαφέρουν. Συγκεκριμένα, δεδομένα από ετερόλογη έκφραση των δύο μεταφορέων δείχνουν υψηλότερη μεταφορική ικανότητα για τον SVCT1, ενώ κάποιες ενδογενώς αποκτηθείσες τιμές δεν διαφέρουν σημαντικά. Και οι δύο μεταφορείς δείχνουν ευαισθησία στο pH, με τη μέγιστη μεταφορική ικανότητα να υπάρχει στο pH 7,5. Στο pH 5,5 η τιμή αυτή μειώνεται στο 50-60%, μια διαφορά που δεν μπορεί να εξηγηθεί από την ιονική κατάσταση του ασκορβικού οξέος, αφού η pK_a του στο 4,2 υποδεικνύει πως περισσότερο από 95% του L-ασκορβικού οξέος είναι στην αποπρωτονιομένη μορφή σε αυτό το pH.

Οι SVCTs έχουν απόλυτη ανάγκη για ιόντα νατρίου. Κινητικές μελέτες πρόσληψης με ποικίλες συγκεντρώσεις ιόντων νατρίου και σταθερή συγκέντρωση ασκορβικού έδειξαν σιγμοειδή καμπύλη και για τους δύο μεταφορείς. Μη γραμμική ανάλυση της απόκλισης έδωσε μια σταθερά Hill με τιμή 2, προτείνοντας πως τουλάχιστον 2 ιόντα νατρίου συμμεταφέρονται με κάθε μόριο ασκορβικού οξέος.

Αυτό δείχθηκε άμεσα στον SVCT1 με τη μέτρηση καθαρού θετικού φορτίου κατά την πρόσληψη ασκορβικού (Tsukaguchi et al. 1999). Δεν φάνηκε όμως να συμβαίνει το ίδιο και με τον SVCT2, ο οποίος δείχθηκε να μην είναι ηλεκτρογενής. Πολύ πρόσφατα μελετήθηκε λεπτομερώς ο μηχανισμός λειτουργίας του SVCT2 (Godoy et al. 2007). Ο μεταφορέας έχει απόλυτη ανάγκη ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, ενώ απουσία και των δύο οδηγεί σε μια ανενεργή μορφή του μεταφορέα, μειώνοντας δραματικά την V_m, χωρίς να επηρεάζει σημαντικά την $K_{m,}$. Η στοιχειομετρία 2:1 ιόντων νατρίου:ασκορβικού επιβεβαιώθηκε με τη σύγκριση πρόσληψης ραδιοσημασμένου νατρίου σε κορεσμό ασκορβικού, σε σχέση με την πρόσληψη ασκορβικού. Συγκεντρώσεις ιόντων νατρίου παραπάνω από 20 mM αλλάζουν την διαμόρφωση ενός χαμηλής συγγένειας (K_m > 0,5 mM) σε έναν υψηλής συγγένειας μεταφορέα. Είναι ενδιαφέρον η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος επηρεάζει συνεργατικά την αλλαγή αυτή υποδηλώνοντας μια αμοιβαία λειτουργική αλληλεπίδραση των δύο υποστρωμάτων. Η αλληλεπίδραση αυτή καθορίζει επίσης τη στοιχειομετρία τις αντίδρασης, καθώς και τη σειρά της δέσμευσης, η οποία προτείνεται πως είναι $Nα^+$:ασκορβικό οξύ:$Nα^+$. Παρόλα αυτά, και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο SVCT2 δείχθηκε και σε αυτή την εργασία να μην είναι ηλεκτρογενής. Οι συγγραφείς προσπάθησαν να εξηγήσουν το παράδοξο αυτό με τις παραδοχές πως είτε τα ρεύματα ήταν πολύ χαμηλά για να μετρηθούν, είτε ο SVCT2 λειτουργεί και ως αντιμεταφορέας, επιτρέποντας την εκροή ενός κατιόντος.

Ο ρόλος των δύο συνεχόμενων σχεδόν απόλυτα συντηρημένων στην NAT αλληλουχία αμινοξέων στη μέση του πρώτου διαμεμβρανικού τμήματος, QH, έχει μελετηθεί και στους SVCT. Ένας σημαντικός λόγος για τη μελέτη αυτή ήταν η pH-εξαρτώμενη λειτουργία τους, κάτι που θα μπορούσε να οφείλεται σε κατάλοιπα ιστιδίνης. Μεταλλαξιγένεση της ιστιδίνης του hSVCT1 (His51) σε αλανίνη οδήγησε σε μειωμένη πρόσληψη ραδιοσημασμένου ασκορβικού (Varma et al. 2008), λόγω μικρής μείωσης της συγγένειας δέσμευσης, χωρίς να επηρεάζεται το V_{m}. Ο SVCT1 έχει έτσι κι αλλιώς χαμηλή συγγένεια, και περαιτέρω μείωσή της πιθανόν να επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα αναγνώρισης πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων του ραδιοσημασμένου υποστρώματος. Οι μεταλλαγές H51N και H51Y έδειξαν μειωμένη λειτουργία, χωρίς ωστόσο μείωση της συγγένειας δέσμευσης, ενώ η H51Q φάνηκε να μπορεί να μεταφέρει, χωρίς ανάγκη συμμεταφοράς ιόντων νατρίου, αφυδρο-ασκορβικό οξύ. Αναγκαία δείχθηκε επίσης να είναι η γλουταμίνη του μοτίβου για τη λειτουργία του μεταφορέα.

Η αντίστοιχη μεταλλαγή της ιστιδίνης στον hSVST2 (H109A) αποδείχθηκε απώλειας λειτουργίας (Ormazabal et al. 2011). Μεταλλαξιγένεση όλων των καταλοίπων ιστιδίνης του hSVCT2 έδειξε πως σημαντική για την pH-εξαρτώμενη λειτουργία του είναι η His413, που βρίσκεται στην εξωκυτταρική θηλιά μεταξύ των TMS7 και TMS8. Ο μηχανισμός της εξάρτησης από το pH φαίνεται να προκαλείται από διακοπή της συνεργατικής δράσης ιόντων νατρίου-ασκορβικού οξέος στην αύξηση της συγγένειας του μεταφορέα. Οι συγγραφείς επίσης προτείνουν πως οι ιστιδίνες His(203), His(206), and His(413), όλες ευρισκόμενες εξωκυτταρικά, συμμετέχουν στη δομική συγκρότηση των διαμεμβρανικών τμημάτων του μεταφορέα, ενώ η απόλυτα συντηρημένη His109 ίσως συμμετέχει στη δέσμευση του ασκορβικού οξέος.

Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν περαιτέρω πως η αλληλουχία QH στο πρώτο διαμεμβρανικό τμήμα των NAT είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία τους και τα αμινοξικά αυτά κατάλοιπα συμμετέχουν στο μηχανισμό λειτουργίας του μεταφορέα.

3.5. Μοντέλα αλληπεπίδρασης των NAT με τα υποστρώματά τους

3.5.1. NAT μεταφορείς πουρινών

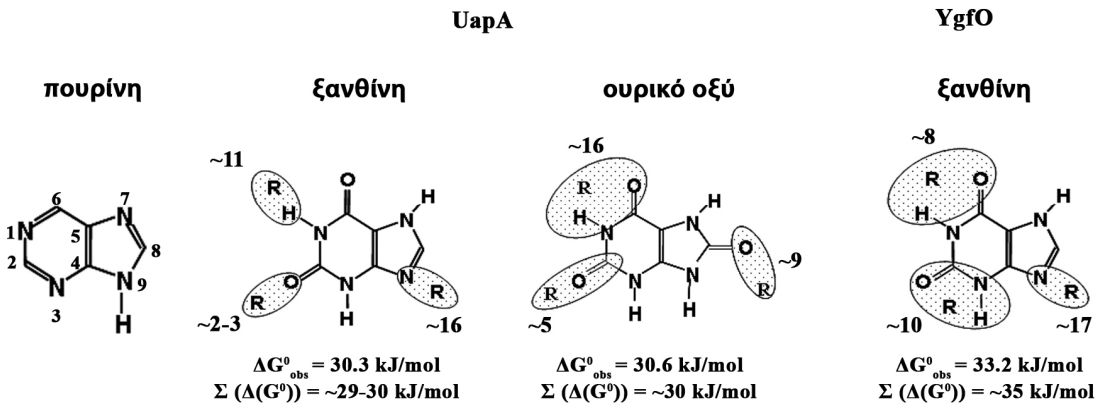
Τα ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών χρησιμοποιούνται ευρέως ως αντιμεταβολίτες ενάντια σε έναν πλήθος διαφορετικών παθογόνων μικροοργανισμών και ιών και στην χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου και της λευχαιμίας (5- φθόρο-ουρακίλη,, 5-μέρκαπτο-πουρίνη, 6-θείο-γουανίνη). Ανάλογα πουρινών χρησιμοιποιούνται επίσης ως αντι-ιικές ενώσεις (acyclovir, ganciclovir, carbovir), αντιβιοτικά και φάρμακα ενάντια σε παρασιτικές ασθένειες (π.χ. αλλοπουρινόλη, πυριμεθαμίνη), αλλά και για την πρόληψη της απόρριψης μεταμόσχευσης οργάνων (αζαθειοπουρίνη) και τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας (αλλοπουρινόλη) (Elion 1989). Οι κινητικές και γενετικές αναλύσεις των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων στα βακτηριακά και μυκητιακά πρότυπα συστήματα, όπου μια δεδομένη πρωτεΐνη μπορεί να μελετηθεί σε ένα γενετικό υπόβαθρο που στερείται όλους τους άλλους σχετικούς μεταφορείς, μπορούν να οδηγήσουν στη διαμόρφωση των αλληλεπιδράσεων μεταφορέα-υποστρωμάτος. Τέτοια μοντέλα μπορούν να εξεταστούν με τη χρήση αντίστροφης γενετικής και να χρησιμοποιηθούν για την

κατανόηση της λειτουργίας των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων παθογόνων μυκήτων και βακτηρίων. Αυτή η γνώση μπορεί, μακροπρόθεσμα, να αποτελέσει ένα ουσιαστικό βήμα στην πρόβλεψη της χρήσης ή/και του σχεδιασμού αντιμυκητιακών βασισμένων σε πουρίνες που δεν θα λαμβάνονται από τους ανάλογους μεταφορείς των μολυσμένων ιστών των ασθενών.

Στο εργαστήριό μας, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα γενετικά υπόβαθρα, έχουν πραγματοποιηθεί λεπτομερείς κινητικές αναλύσεις δέσμευσης υποστρωμάτων αρκετών μυκητιακών NAT, όπως ο UapA (Goudela et al. 2005) του *A. nidulans*, ο UapC (Goudela et al. 2008) του *A. fumigatus* και ο Xut1p (Goudela et al. 2006) της *C. albicans*. Η λογική αυτής της προσέγγισης έχει επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να καθορίσει τις αλληλεπιδράσεις μεταφορέα-υποστρωμάτων για μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων και νουκλεοσιδίων πρωτοζώων και θηλαστικών (de Koning and Diallinas 2000). Συνοπτικά, χρησιμοποιώντας μια ευρεία συλλογή πουρινών και πουρινικών ανάλογων, καθορίστηκαν τιμές $K_ι$ για ενώσεις που παρεμποδίζουν την πρόσληψη ραδιοσημασμένης ξανθίνης, από πλήρεις καμπύλες δόσης-αντίδρασης. Κατόπιν υπολογίστηκαν οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs ΔG^0 από τον τύπο $\Delta G^0 = -$ RTln ($K_ι$), όπου το R είναι η ιδανική σταθερά των αερίων και το T η απόλυτη θερμοκρασία (˚K). Συγκρίνοντας τη διαφορά σε ΔG^0 στην αλληλεπίδραση δύο υποθετικών υποστρωμάτων που διαφέρουν σε μια μόνο θέση κάθε φορά (π.χ. ξανθίνης με 2- ξανθίνης ή της αδενίνης με 3-δεάζα-αδενίνη), υπολογίστηκε η συμβολή αυτής της θέσης στη δέσμευση. Λαμβάνοντας υπόψη τις απώλειες λόγω πιθανών στερεοειδικών παρεμποδίσεων ή της αλλαγής της τρισδιάστατης δομής της πουρίνης, καθώς και τη δομή των προτιμώμενων ταυτομερών μορφών των υποστρωμάτων, αναπτύχθηκαν μοντέλα που περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις κάποιων μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων με τα πιθανά υποστρώματά τους (Εικόνα 3.8). Πολύ σημαντική για την ανάπτυξη του μοντέλου του UapA ήταν η συνεισφορά της μελέτης των αλληλίων που φέρουν μεταλλαγές στο TMS12, οι οποίες άρουν τις στερεοειδικές παρεμποδίσεις (Papageorgiou et al., 2008). Τα αλλήλια αυτά εξακολουθούν να αναγνωρίζουν με την ίδια συγγένεια την ξανθίνη και τα ανάλογά της με υποκαταστάσεις σε θέσεις σημαντικές για τη δέσμευση. Το γεγονός αυτό ενίσχυσε τις προηγούμενες παρατηρήσεις και λειτούργησε καταλυτικά για την μικρή τροποποίηση του μοντέλου με σκοπό τη βελτίωσή του. Φαίνεται πως σημαντικές θέσεις για τη δέσμευση είναι οι θέσεις 1 και 9, και σε μικρότερο βαθμό η 3. Για τις πρώτες δύο, η ενέργεια βρίσκεται στην τάξη ενός ισχυρού υδρογονοδεσμού.

Λόγω της πρωτονίωσης των θέσεων αυτών, το πιο πιθανό είναι να δεσμεύονται από κάποιο αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ, αν και έχουν δειχθεί περιπτώσεις που ένα μόριο ύδατος λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ δύο πρωτονιόφιλων ομάδων. Ανάλογα μοντέλα έχουν κατασκευαστεί σε συνεργασία με την ομάδα του Σ. Φριλίγγου για τον μεταφορέα YgfO της *E. coli* (Goudela et al. 2005). Με τη σύγκριση των κινητικών μοντέλων των διαφορετικών NAT μεταφορέων μερικές σημαντικές διαφορές έχουν καθιερωθεί. Παραδείγματος χάριν, οι περιοχές δέσμευσης υποστρωμάτων των YgfO και UapA, παρά τις ομοιότητες όσον αφορά τη γενική συμβολή του πυριμιδινικού δακτυλίου της ξανθίνης στη δέσμευση, έχουν σημαντική διαφορά στην ενέργεια δέσμευσης που αφορούν κάποιες άλλες θέσεις. Η πιο σημαντική διαφορά ωστόσο είναι η ανικανότητα του YgfO να δεσμεύσει ουρικό οξύ ή τα ανάλογα πουρινών που φέρουν υποκαταστάσεις στις θέσεις 7 ή 8, που επεξηγεί το βασικό ρόλο της θέσης 8 στους διαφορετικούς δεσμευτικούς προσανατολισμούς των υποστρωμάτων.

Από τέτοια μοντέλα κάποιες προβλέψεις μπορούν να εξαχθούν σχετικά με πιθανά ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη στόχευση των μυκήτων. Παραδείγματος χάριν, φαίνεται ότι μια σημαντική διαφορά μεταξύ των μυκητιακών μεταφορέων που έχουν αναλυθεί και των ανάλογων ανθρώπινων μεταφορέων είναι η συμμετοχή του N3 στη δέσμευση υποστρωμάτων (Kraupp and Marz 1995, Wallace et al. 2002). Μυκητιακά NATs δεν φαίνεται να χρησιμοποιούν το N3 για να δεσμεύσουν το ουρικό οξύ, την ξανθίνη και τα ανάλογά τους. Αυτό οδηγεί στην πρόβλεψη πως τα ανάλογα τις ξανθίνης με υποκαταστάσεις στη θέση N3 ίσως αποτελέσουν εξειδικευμένα υποστρώματα για τους μυκητιακούς NAT. Είναι γνωστό ότι τα N3-υποκαθιστέντα ανάλογα διοχετεύονται στη σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις ως ειδικοί αντι-ιικοί ανασταλτικοί παράγοντες (Shigeta et al. 1988, Andrei et al. 1990). Παρομοίως, 3-δεάζα-πουρίνες ή ανάλογά τους θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως αποδοτικά φάρμακα ενάντια στους παθογόνους μύκητες.



Εικόνα 3.8. Μοντέλα των αλληλεπιδράσεων των NAT με τα υποστρώματά τους. Οι ΔG0 υπολογίζονται από το αντίστοιχο K_i [όπου K_i=IC_{50}/[1+(L/K_m)], Παρ. 3.5.1]. Το R αντιπροσωπεύει ένα αμινοξύ στον μεταφορέα το οποίο αλληλεπιδρά, μέσω ενός δεσμού υδρογόνου, με μια συγκεκριμένη θέση της πουρίνης.

3.5.2. NAT μεταφορείς ασκορβικού οξέος

Οι κινητικές μελέτες στους μεταφορείς ασκορβικού οξέος είναι περιορισμένες, ενώ έχουν πραγματοποιηθεί σποραδικά. Λόγω της σημαντικότητας τους ακολουθεί μια περιληπτική επισήμανση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. Οι SVCT έχουν αυστηρή εξειδίκευση για L-ασκορβικό οξύ. Ακόμη και το στερεοϊσομερές του, D-ισοασκορβικό οξύ αναγνωρίζεται πολύ ασθενώς (K_i >700 μM) από τους δύο ανθρώπινους μεταφορείς (Tsukaguchi et al. 1999, Wang et al. 2000). Αφυδροασκορβικό οξύ, γλυκόζη, δεοξυ-γλυκόζη και μια σειρά από πουρίνες, πυριμιδίνες και βιταμίνες έδειξαν καθόλου ή ελάχιστη αναστολή στην πρόσληψη ραδιοσημανσμένου ασκορβικού οξέος (Rajan et al. 1999, Tsukaguchi et al. 1999, Wang et al. 2000). Επιπλέον, ανάλογα του ασκορβικού με υποκαταστάσεις στις θέσεις 2 και 3 επίσης φαίνεται να μην αναγνωρίζονται (Rumsey et al. 1999), εν αντιθέσει με ανάλογα που φέρουν υποκαταστάσεις στις θέσεις 5 και 6. Μάλιστα το 6-δεόξυ, 6-ίοδο-L-ασκορβικό οξύ έχει δειχθεί να μεταφέρεται. Τα παραπάνω υποδεικνύουν πως οι θέσεις 2 και 3 είναι σημαντικές για τις αλληλεπιδράσεις των SVCT με το ασκορβικό οξύ, ενώ οι θέσεις 5 και 6 όχι, ανοίγοντας τον δρόμο για πιθανούς φαρμακευτικούς σχεδιασμούς.

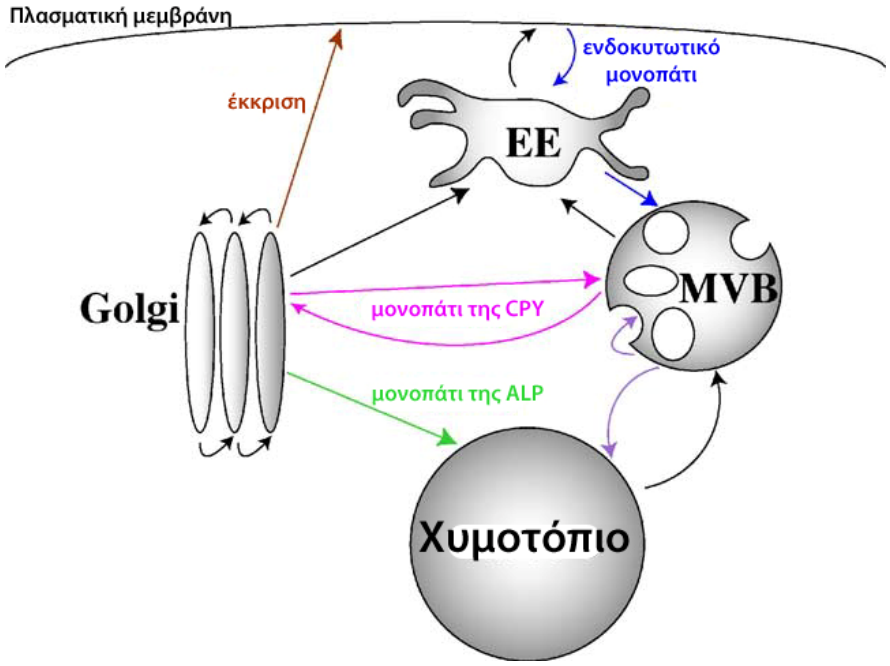
4. Στόχευση και διακίνηση μεμβρανικών πρωτεϊνών

Οι πολυτοπικές πρωτεΐνες-μεταφορείς των ευκαρυωτικών ενσωματώνονται στις μεμβράνες του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) κατά την πρωτεϊνοσύνθεσή τους. Το αρχικό νεοσυντιθέμενο πεπτίδιο περιέχει μια σηματοδοτική αλληλουχία (leader peptide ή Signal Sequence, SS), την οποία αναγνωρίζει το σωματίδιο αναγνώρισης του σήματος (SRP) (signal recognition particle), μια μοριακή συνοδός η οποία το οδηγεί στο σύμπλοκο της τρανσλοκάσης. Το σύμπλοκο της τρανσλοκάσης βοηθά την πρωτεΐνη να αποκτήσει τη σωστή τριτοταγή της δομή, κατά τη συμμεταφραστική της τοπογένεση στη μεμβράνη του ΕΔ. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία αυτή, μια σειρά από τροποποιήσεις είναι δυνατόν να λάβουν χώρα, όπως η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και η γλυκοζυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων που βρίσκονται στον αυλό του ΕΔ. Στο ΕΔ επιπλέον είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί η συγκρότηση των πολυμερών πρωτεϊνών από τα μονομερή τους. Οι διαδικασίες αυτές του πολυμερισμού και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων πολλές φορές είναι σημαντικές για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης, άμεσα ή με τη συμμετοχή εξειδικευμένων παραγόντων τοπογένεσης, με το μηχανισμό εξόδου από το ΕΔ. Η έξοδος από το ΕΔ πραγματοποιείται με κυστίδια που φέρουν COPII καλύμματα. Τα κυστίδια αφού εκβλαστήσουν από το ΕΔ συντήκονται μεταξύ τους δημιουργώντας το ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment), που αποτελεί ενδιάμεσο διαμέρισμα του ΕΔ και του Golgi, όπου και αποβάλλουν το κάλυμμα COPII. Από το ERGIC νέα κυστίδια με καλύμματα COPI εκβλαστάνουν και συντήκονται με τις μεμβράνες του cis-Golgi. Μικροσωληνίσκοι συμμετέχουν στην όλη διαδικασία μεταφοράς των κυστιδίων (Tomás et al. 2010). Στο Golgi είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν κάποιες πρωτεϊνικές τροποποιήσεις, όπως η περαιτέρω τροποποίηση των γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες μπορεί να συνδέονται με την μετέπειτα στόχευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη στόχο. Οι πρωτεΐνες διασχίζουν το Golgi και στο trans Golgi (TGN, Trans Golgi Network) πραγματοποιείται η διαλογή τους για τη στόχευση στην εκάστοτε μεμβράνη.

4.1. Μεταφορά πρωτεϊνών από το Golgi σε άλλες μεμβράνες – το μονοπάτι κυστιδιακής μεταφοράς

Για χρόνια επικρατούσε η άποψη πως η έξοδος από το Golgi δεν ήταν ρυθμιζόμενη. Η εντύπωση αυτή άρχισε να καταρρίπτεται με τη μελέτη πρωτεϊνών που στοχεύονται επιλεκτικά σε μεμβράνες πολικών κύτταρων. Από μελέτες κυρίως σε κύτταρα θηλαστικών αρχικά θεωρήθηκε πως η στόχευση στην κορυφαία πλευρά είναι ρυθμιζόμενη, ενώ στην βασοπλευρική αποτελούσε την δεδομένη πορεία (Rodriguez-Boulan and Musch 2005). Παράλληλα, απομόνωση στελεχών του *S. serevisiae* με ικανότητα εξωκυτταρικής έκκρισης χυμοτοπιακών πρωτεϊνών αποκάλυψε τα διαφορετικά μονοπάτια στόχευσης και τους μοριακούς τους πρωταγωνιστές (Bowers and Stevens 2005). Τελικά φαίνεται πως όλα τα βήματα είναι ρυθμιζόμενα και χρειάζονται αλληλεπίδραση με εξειδικευμένους παράγοντες, τόσο κατά το σχηματισμό των κυστιδίων στην αρχική μεμβράνη, όσο και κατά τη σύντηξή τους με τη μεμβράνη στόχο. Κύριο ρόλο στην μεταφορά των κυστιδίων έχουν οι μικροσωλινίσκοι, όπως φαίνεται από το συνεντοπισμό των κυστιδίων με τα αντίστοιχα ινίδια και τη συμμετοχή δυνεΐνης και κινεσίνης (Kreitzer et al. 2000). Οι μικροσωλινίσκοι πιστεύεται πως συμμετέχουν στην αποκοπή των κυστιδίων αλλά κυρίως στη μεταφορά τους στον εκάστοτε προορισμό τους. Τα πρώτα κυστίδια που χαρακτηρίσθηκαν ήταν αυτά που φέρουν κάλυμμα κλαθρίνης (CCVs, Clathrin-Coated Vesicles) (Kirchhausen 2000). Η κλαθρίνη περιέργως δεν είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωση όλων των υπό μελέτη φορτίων στον *S. serevisiae*. Ενώ μέχρι στιγμής η εξήγηση ήταν η ύπαρξη εναλλακτικών μονοπατιών, πρόσφατα δείχθηκε με μικροσκοπική βιντεοσκόπιση ζωντανών κυττάρων πως η κλαθρίνη συμμετέχει σε όλα τα αποκοπτόμενα από την πλασματική μεμβράνη κυστίδια και η απουσία της επηρεάζει το ποσοστό και την ταχύτητα της ενδοκύτωσης, αλλά και τον αριθμό των ενδοκυτωτικών γεγονότων (Kaksonen et al. 2005, Galletta et al. 2010).

Τα μονοπάτια στόχευσης που έχουν μέχρι στιγμής βρεθεί φαίνονται στην Εικόνα 4.1. Ένα είναι αυτό της απευθείας μεταφοράς από το TGN στην πλασματική μεμβράνη, το οποίο είναι και το λιγότερο μελετημένο ως προς τη ρύθμισή του. Εναλλακτικοί δρόμοι από το TGN για την πλασματική μεμβράνη είναι αυτοί της διαμεσολάβηση των ενδοσωμάτων ή/και των Πολυκυστιδιακών Σωματίων (MVBs, Multi-Vesicular Bodies), διαδρομές στην πλειοψηφία τους αμφότερης μεταφοράς.



Εικόνα 4.1. Τα μονοπάτια κυστιδιακής μεταφοράς του *S. serevisiae*. Οι πρωτεΐνες μπορούν να στοχευθούν από το Golgi κατευθείαν στην πλασματική μεμβράνη ή με τη μεσολάβηση των πρώιμων ενδοσωμάτων (EE). Από τη μεμβράνη μπορούν να οδηγηθούν στο χυμοτόπιο μέσω των ενδοσωμάτων και των MVBs. Πολλές πρωτεΐνες έχουν τη δυνατότητα να ακολουθήσουν το μονοπάτι της καρβοξυπεπτιδάσης Y (CPY), ενώ ενδογενείς κυρίως πρωτείνες της μεμβράνης του χυμοποπίου ακολουθούν το μονοπάτι της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) (από Bowers and Stevens, 2005 με τροποποιήσεις).

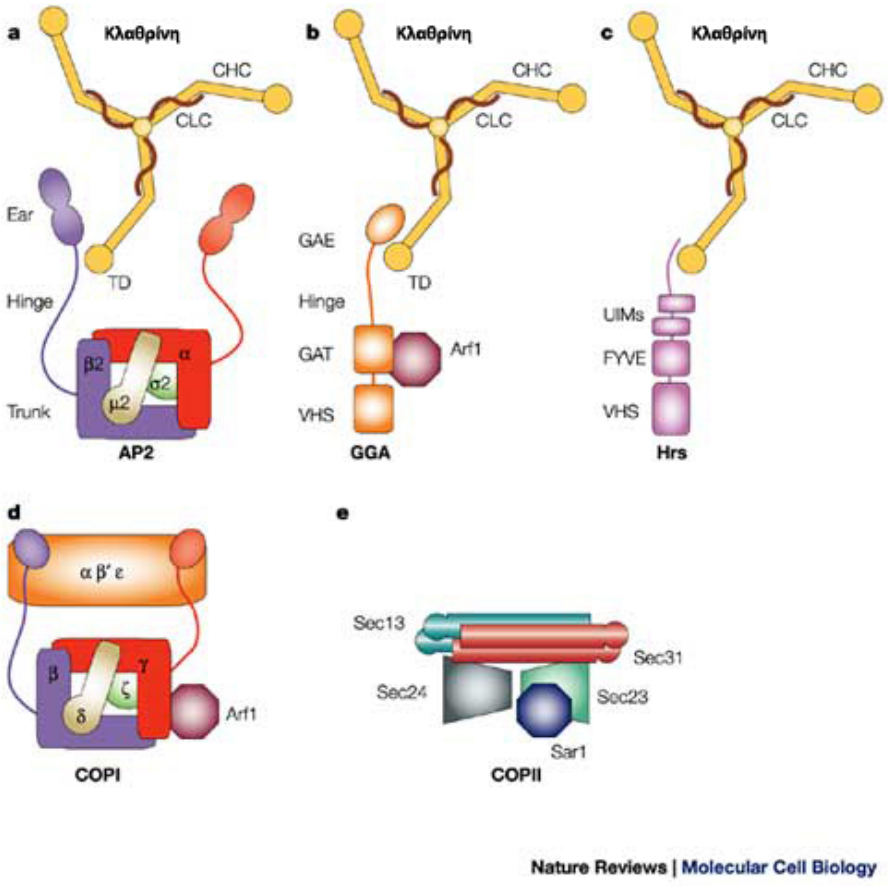
Τα MVBs αποτελούνται από μια εξωτερική περιοριστική μεμβράνη, ενώ στο εσωτερικό τους φέρουν πολλά κυστίδια. Στα MVBs πραγματοποιείται σύντηξη κυστιδίων και επαναδιαλογή τους για στόχευση στο χυμοτόπιο (Bowers and Stevens 2005). Από το TGN επίσης, ενδογενείς πρωτεΐνες του χυμοτοπίου είναι δυνατόν να καταλήξουν απευθείας στη μεμβράνη ή τον αυλό του οργανιδίου αυτού. Λόγω της πολυπλοκότητας του φαινομένου, ακολουθεί μια ανάλυση των διαδρομών αυτών βασισμένη περισσότερο στα μόρια που εμπλέκονται και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, παρά στην βήμα προς βήμα ανάλυση κάθε διαδρομής.

4.1.1. Τα δομικά μόρια σχηματισμού των κυστιδίων

Η προσέλκυση της κλαθρίνης στα κυστίδια που αποκόπτονται από μεμβράνες γίνεται μέσω ειδικών πρωτεϊνικών παράγοντων, χαρακτηριστικών για κάθε τύπο κυστιδίου. Οι πρώτοι τέτοιοι παράγοντες που χαρακτηρίσθηκαν ήταν τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα προσαρμοστών (APs, Adaptor Protein Complexes), ετεροτετραμερικά συμπλόκα με πολλούς ρόλους (Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003). Το AP1 χρειάζεται για την προσέλκυση της κλαθρίνης στις μεμβράνες του TGN και σχετίζεται με την κίνηση από το TGN στα πρώιμα ενδοσώματα και αντίστροφα, ενώ το AP2 στην προσέλκυση της κλαθρίνης στην πλασματική μεμβράνη και την ενδοκύτωση. Κάποιοι επιπλέον ρόλοι των APs είναι η διαλογή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που θα ενσωματωθούν στα CCVs μέσω αναγνώρισης ειδικών αλληλουχιών, η δέσμευση βοηθητικών παραγόντων πολυμερισμού και αποπολυμερισμού της κλαθρίνης, η αλληλεπίδραση με τους μικροσωλινίσκους και η συμμετοχή στην αναγνώριση των οργανιδίων-στόχων. Τα AP1 και AP2 έχουν ικανότητα άμεσης αλληλεπίδρασης με την κλαθρίνη, η οποία είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους. Μεταγενέστερα χαρακτηρίστηκαν και άλλοι τέτοιοι παράγοντες με παρόμοιες λειτουργίες, όπως το AP3, το οποίο μπορεί επίσης να αλληλεπιδρά με κλαθρίνη χωρίς όμως αυτή του η αλληλεπίδραση να είναι σημαντική για τη λειτουργία του, τα μονομερή GGAs (Golgi localized, γ-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins), τα οποία βρίσκονται επίσης σε CCVs από το TGN προς τα ώριμα ενδοσώματα (Boman 2001), οι επσίνες και ο Hrs (Hepatocycte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate), οι οποίοι συμμετέχουν στη διαλογή ουβικουιτινυλιωμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε CCVs της πλασματικής μεμβράνης και των πρώιμων ενδοσωμάτων, αντίστοιχα. (Polo et al. 2002, Raiborg et al. 2002). Τον ίδιο ρόλο φαίνεται να έχουν και τα Gga1p και Gga2p του *S. serevisiae*, τα οποία έχουν ικανότητα δέσμευσης της ουβικουιτίνης και οδηγούν ουβικουιτινυλιωμένες πρωτεΐνες (όπως την Gap1p) στο χυμοτόπιο από το TGN μέσω των ενδοσωμάτων και των MVBs με CCVs (Zhdankina et al. 2001). Ο ρόλος των Gga φαίνεται να είναι μη-επικαλυπτόμενος με αυτόν του AP1, αφού διπλά και τριπλά μεταλλαγμένα στελέχη της ζύμης εμφανίζουν προσθετικό φαινότυπο, γεγονός που υποστηρίζει πως ελέγχουν παράλληλα μονοπάτια εξόδου από το TGN στα ενδοσώματα (Costaguta et al. 2001, Hirst et al. 2001). Ο ρόλος του AP3 στα

μετάζωα δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, φαίνεται όμως να συμμετέχει στην βιογένεση των μελανοσωμάτων των επιδερμικών κυττάρων και των πυκνών σωματίων των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Bonifacino 2004). Πολύ πρόσφατα δείχθηκε πως το AP3 είναι απαραίτητο για τη στόχευση πρωτεϊνών των όξινων ασβεστιοσωμάτων (acidocalcisomes) του παρασιτικού πρωτοζώου *Leishmania major* και για τη μολυσματικότητά του (Besteiro et al. 2008). Τα οργανίδια αυτά, που υπάρχουν από τα βακτήρια μέχρι και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, είναι πλούσια σε πυροφωσφορικά και ασβέστιο, ενώ η μεμβράνη τους περιέχει αντλίες ασβεστίου, πρωτονίων, αντιμεταφορείς ιόντων και ακουαπορίνες. Ο ρόλος τους δεν είναι σαφής, ενώ πιστεύεται πως λειτουργούν ως αποθήκες ιόντων και δρουν ρυθμιστικά ως προς το εσωτερικό pH και την ωσμορύθμιση. Τα οργανίδια αυτά μοιάζουν με τα σχετιζόμενα με λυσοσώματα οργανίδια των θηλαστικών (LRO, Lysosome Related Organelles), όπως τα μελανοσώματα και τα πυκνά σωμάτια, ενώ φαίνεται να απουσιάζουν από μύκητες και φυτά, οργανισμούς δηλαδή που έχουν χυμοτόπιο. Πράγματι, στον *S. serevisiae* έχει δειχθεί πως το AP3 είναι απαραίτητο για τη διαλογή από το TGN κατευθείαν στο χυμοτόπιο, χωρίς τη διαμεσολάβηση ενδοσωμάτων, ενώ η διαλογή αυτή γίνεται με κυστίδια που δεν περιέχουν κλαθρίνη, αλλά την πρωτεΐνη Vps41p (Darsow et al. 2001).

Υπάρχουν όμως και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με κυστίδια που δεν περιέχουν κλαθρίνη, όπως τα COPI και COPII, που έχουν ήδη αναφερθεί, και το AP4, το οποίο έχει δειχθεί να σχετίζεται με κινήσεις από το TGN στα ενδοσώματα (Hirst et al. 1999). Η ρύθμιση της προσέλκυσης σε μεμβράνες των AP1, AP3, AP4 γίνεται μέσω των Arf1 και Arf3 (ADP ribosylation factors), παρόμοια με τον τρόπο ρύθμισης του COPI (Εικόνα 4.3). Μάλιστα οι τέσσερις υπομονάδες των APs είναι ομόλογες με τέσσερις από τις υπομονάδες του COPI, ενώ δεν σχετίζονται με το COPII (Εικόνα 4.2) (Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003). Διαφορετική σε σχέση με τα άλλα AP σύμπλοκα είναι η ρύθμιση του AP2, το οποίο προσελκύεται σε μεμβράνες με βάση την 4,5-διφωσφορική-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη {PtdIns(4,5)P2}, αλλά και του Hrs, με βάση την 3-φωσφορική-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη {PtdIns(3)P ή PI(3)P}. Τα GGAs ρυθμίζονται και αυτά μέσω των Arf. Για τη μεταφορά από το Golgi απευθείας στην πλασματική μεμβράνη δεν έχουν βρεθεί πρωτεΐνες προσαρμοστές, αλλά πρόσφατα έχει δειχθεί η συμμετοχή κλαθρίνης στο μονοπάτι αυτό (De Matteis and Luini 2008, Deborde et al. 2008).



Εικόνα 4.2. Σχηματική αναπαράσταση της δομής γνωστών πρωτεϊνικών κυστιδιακών καλυμμάτων. **a)** Ένα πολυμερές κλαθρίνης (CHC: Βαριά αλυσίδα κλαθρίνης, CLC: ελαφριά αλυσίδα κλαθρίνης) αλληλεπιδρά μέσω αμινοτελικής περιοχής (TD) της CHC με τη β2 υπομονάδα του AP2. Τα AP1, AP3 και AP4 έχουν παρόμοια οργάνωση. **b)** Η αλληλεπίδραση της κλαθρίνης με μια GGA και **c)** με τον Hrs. **d)** η προβλεπόμενη δομή του COPI, **e)** Σχηματική απεικόνιση του COPII (από Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003 με τροποποιήσεις).

Για όλους τους παραπάνω παράγοντες έχουν βρεθεί αλληλουχίες στις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν, οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1. Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και καθορίζουν την διαλογή τους στο TGN. Πολλές μεμβρανικές πρωτεΐνες δεν διαθέτουν τέτοιες αλληλουχίες και η αλληλεπίδρασή τους με τους παράγοντες προσέλκυσης της κλαθρίνης γίνεται μέσω υποδοχέων. Άλλοι καθοριστικοί παράγοντες είναι οι τροποποιήσεις N- και O-γλυκοζυλίωσης, η ουβικουιτινυλίωση, η φωσφορυλίωση, ο ομο- ή έτερο-ολιγομερισμός, καθώς και η συγγένεια για τον εντοπισμό σε λιπιδικές σχεδίες, οι οποίες σχηματίζονται στο Golgi.

Για τις τελευταίες, πιστεύεται πως, στα θηλαστικά, ο σχηματισμός τους σχετίζεται με τη διαλογή και κορυφαία στόχευση των GPI-AP πρωτεϊνών, οι οποίες ήταν οι πρώτες που βρέθηκαν να εντοπίζονται σε τέτοιες μεμβρανικές μικροδομές διαφορετικής λιπιδικής σύστασης (Paladino et al. 2004, Schuck and Simons 2004).

Πίνακας 4.1. Οι ιδιότητες των πρωτεϊνικών καλυμμάτων (από Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003 με τροποποιήσεις).

Κάλυμμα	**Ρυθμιστής της προσέλκυσης σε μεμβράνη**	**Αλληλουχίες διαλογής**	**Τοπολογία**	**Γνωστές λειτουργίες διαλογής**
Κλαθρίνη-AP1	Arf1, Arf3	YXXO, [D/E]XXXL[L/I]	TGN, ενδοσώματα	TGN σε ενδοσώματα
Κλαθρίνη-AP2	PtdIns(4,5)P2	YXXO, [D/E]XXXL[L/I], FXNPXY	Πλασματική μεμβράνη	ενδοκύτωση
Κλαθρίνη-GGA	Arf1, Arf3	DXXLL	TGN, ενδοσώματα	TGN σε ενδοσώματα και MVBs
Κλαθρίνη-Hrs	PtdIns(3)P	Ουβικουιτίνη	ενδοσώματα	Ενδοσώματα σε MVBs
Κλαθρίνη-Eps	PtdIns(4,5)P2	Ουβικουιτίνη	πλασματική μεμβράνη	Ενδοκύτωση
COPI	Arf1, Arf3	KKXX, KXKXX, FFXXRRXX	Golgi, ERGIC	Ομοιόσταση του Golgi, Golgi σε ΕΔ
COPII	Sar1	DXE	ERES	Έξοδος από το ΕΔ
AP3	Arf1, Arf3	YXXO, [D/E]XXXL[L/I]	TGN, ενδοσώματα	TGN σε χυμοτόπιο / ΟΣΛ
AP4	Arf1, Arf3	YXXO	TGN	TGN σε ενδοσώματα

Το "O" αναπαριστά L, I, F, M, ή V. Το "X" οποιοδήποτε αμινοξύ. ΟΣΛ: οργανίδια σχετιζόμενα με λυσοσώματα.

Τελευταία, δεδομένα δείχνουν πως συνθετάσες κεραμιδίων και ο σχηματισμός λιπιδικών σχεδιών σχετίζονται με την επάκρια αύξηση του *A. nidulans*, και συγκεκριμένα με την καθιέρωση και εγκαθίδρυση της πολικότητας (Παράγραφος 1.4.2), ενώ η στόχευση στην πλασματική μεμβράνη του Gap1p μεταφορέα του *S. serevisiae*, ο οποίος εντοπίζεται σε λιπιδικές σχεδίες, είναι ελαττωματική σε στελέχη που δεν βιοσυνθέτουν σφιγγολιπίδια (Lauwers and Andre 2006, Lauwers et al. 2007).

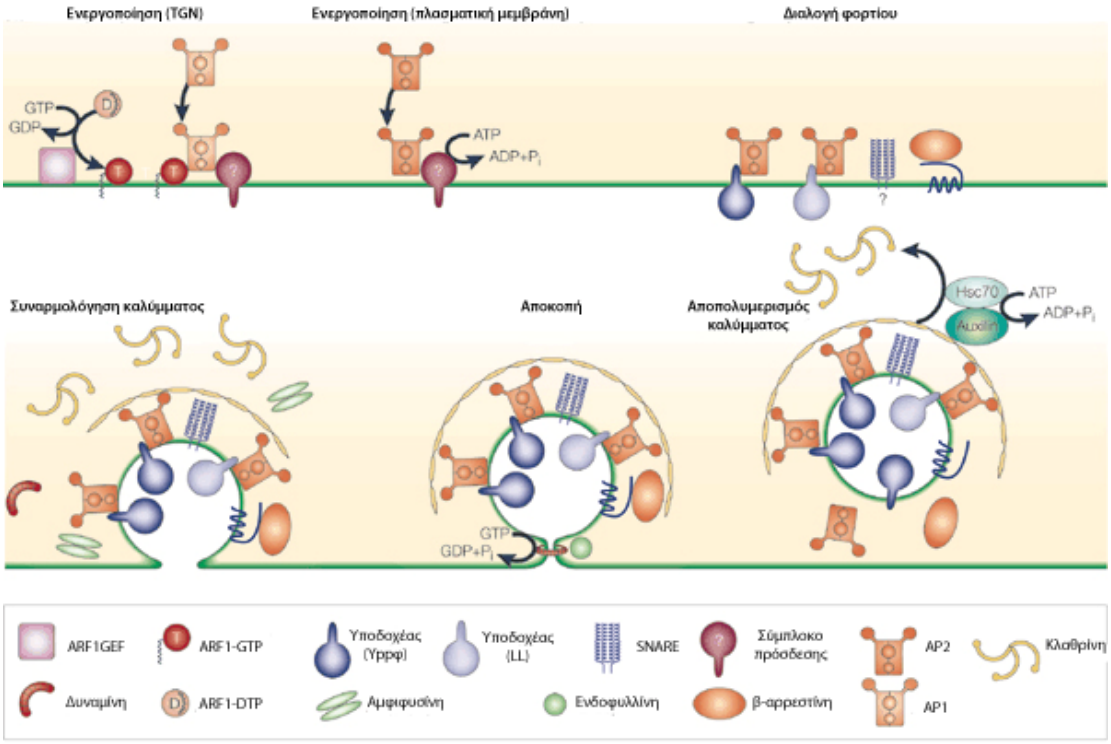
Οι αναλογίες των φαινομένων είναι πολύ εντυπωσιακές και προτείνουν πως πρότυπα μικροβιακά συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατανόηση πολύπλοκων φαινομένων των θηλαστικών.

4.1.2. Εκβλάστηση των κυστιδίων

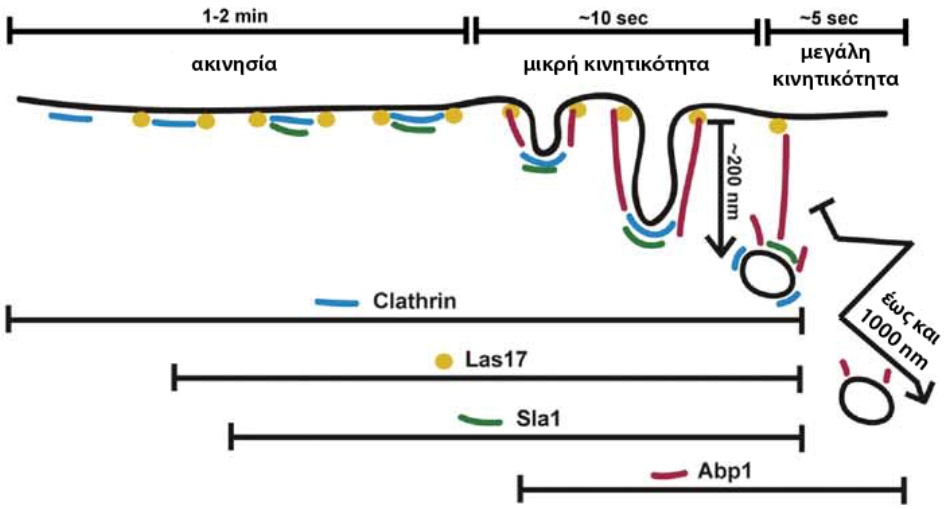
Μετά την προσέλκυση των δομικών παραγόντων των καλυμμάτων στις μεμβράνες πραγματοποιείται η εκβλάστηση και αποκοπή των κυστιδίων. Στην εκβλάστηση κυστιδίων από το TGN συμμετέχει η δυναμίνη (Galletta et al. 2010), το ομόλογο της οποίας στον *S. serevisiae* (Vps1p) έχει δειχθεί να μπορεί να πραγματοποιήσει *in vitro* αποκοπή λιποσωμάτων, ενώ αλληλεπιδρά με την Sla1p ρυθμιστική πρωτεΐνη της ακτίνης (Smaczynska-de et al. 2010). Η μελέτη της *in vivo* τοπολογίας της έδειξε πως βρίσκεται στο TGN αλλά και σε σημεία εκβλάστησης της πλασματικής μεμβράνης (Smaczynska-de et al. 2010). Σε *vps1Δ* στελέχη πραγματοποιείται η μεταφορά ενζύμων του χυμοτοπίου στο χυμοτόπιο μέσω της πλασματικής μεμβράνης, δείχνοντας πως η δυναμίνη είναι απαραίτητη για την εκβλάστηση κυστιδίων από το TGN για τα ενδοσώματα και τα MVBs, αλλά δεν παίζει τον κύριο ρόλο εκβλάστησης από το TGN για την πλασματική μεμβράνη ή για την ενδοκύτωση (Bowers and Stevens 2005). Στη μεμβράνη των θηλαστικών, όπου η δυναμίνη είναι απαραίτητη και για την ενδοκύτωση, ο σύνδεσμος μεταξύ δυναμίνης και κλαθρίνης είναι η αμφιφυσίνη (Kirchhausen 2000). Στο σύμπλοκο προσδένεται και η ενδοφιλίνη, οι παράγοντες τις ακτίνης και πραγματοποιείται η αποκοπή του κυστιδίου (Εικόνα 4.3).

Στους μύκητες έχουν εντοπισθεί κάποιες διαφορές. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η κλαθρίνη είναι απαραίτητη μόνο για την πολύ αποδοτική εκβλάστηση και αποκοπή των κυστιδίων, ενώ μια σειρά από παράγοντες προσέλκυσης και πολυμερισμού της ακτίνης έχουν χαρακτηρισθεί, όπως οι Arp2/3 (Actin regulatory protein), η CP (Coating Protein) και η κοφιλίνη (Galletta et al. 2010). Πρώτες στα σημεία όπου θα γίνει η εκβλάστηση του κυστιδίου διακρίνονται η κλαθρίνη και οι πρωτεΐνες-προσαρμοστές της ακτίνης, Sla1p, Sla2p και End3p. Κατόπιν προσδένονται πολλοί παράγοντες, μεταξύ αυτών οι Arp2/3p, Abp1p (Actin Binding Protein), CP, Sac6p (φιμπρίνη) και τελικά η ακτίνη. Τότε αρχίζει να πραγματοποιείται η εκβλάστηση του κυστιδίου. Μετά την αποκοπή του, οι

παράγοντες ενδοκύτωσης πλέον απομακρύνονται από το κυστίδιο, ενώ η ακτίνη και οι πρωτεΐνες που τη δεσμεύουν παραμένουν σε αυτό. Η όλη διαδικασία από την αρχή της εκβλάστησης μέχρι την αποκοπή του κυστιδίου φαίνεται να διαρκεί περίπου 15 sec, ενώ οι παράγοντες ενδοκύτωσης έχουν προσδεθεί στο σημείο περίπου 1-2 min νωρίτερα (Newpher et al. 2005) (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.3. Δομή και συγκρότηση του καλύμματος κλαθρίνης. Με την έλευση του ARF1 στη μεμβράνη του TGN αρχίζει η συγκρότηση του καλύμματος. Το ένα άκρο των υποδοχέων αλληλεπιδρά με την κλαθρίνη και το άλλο με τα φορτία τους. Η κλαθρίνη πολυμερίζεται και σχηματίζει ένα πλέγμα γύρω από το σχηματιζόμενο κυστίδιο. Η δυναμίνη αποκόπτει το κυστίδιο. Ο αποπολυμερισμός του καλύμματος χρειάζεται υδρόλυση ATP από την Hsc70 και την πρωτεΐνη auxilin. (AP: adaptor protein, ARF1: ADP-ribosylation factor 1, ARF1GEF: ADP-ribosylation factor 1 guanine exchange factor) (από Kirchhausen 2000 με τροποποιήσεις).



Εικόνα 4.4. Η αποκοπή ενός κυστιδίου κλαθρίνης από τη μεμβράνη του *S. serevisiae*. Διακρίνονται σχηματικά η κλαθρίνη καθώς και μερικές από τις πρωτεΐνες που χρειάζονται για τη δέσμευση της ακτίνης και εντοπίζονται νωρίς στα σημεία ενδοκύτωσης (από Newpher et al. 2005 με τροποποιήσεις).

4.1.3. Μεμβρανική ταυτότητα-σύντηξη κυστιδίων

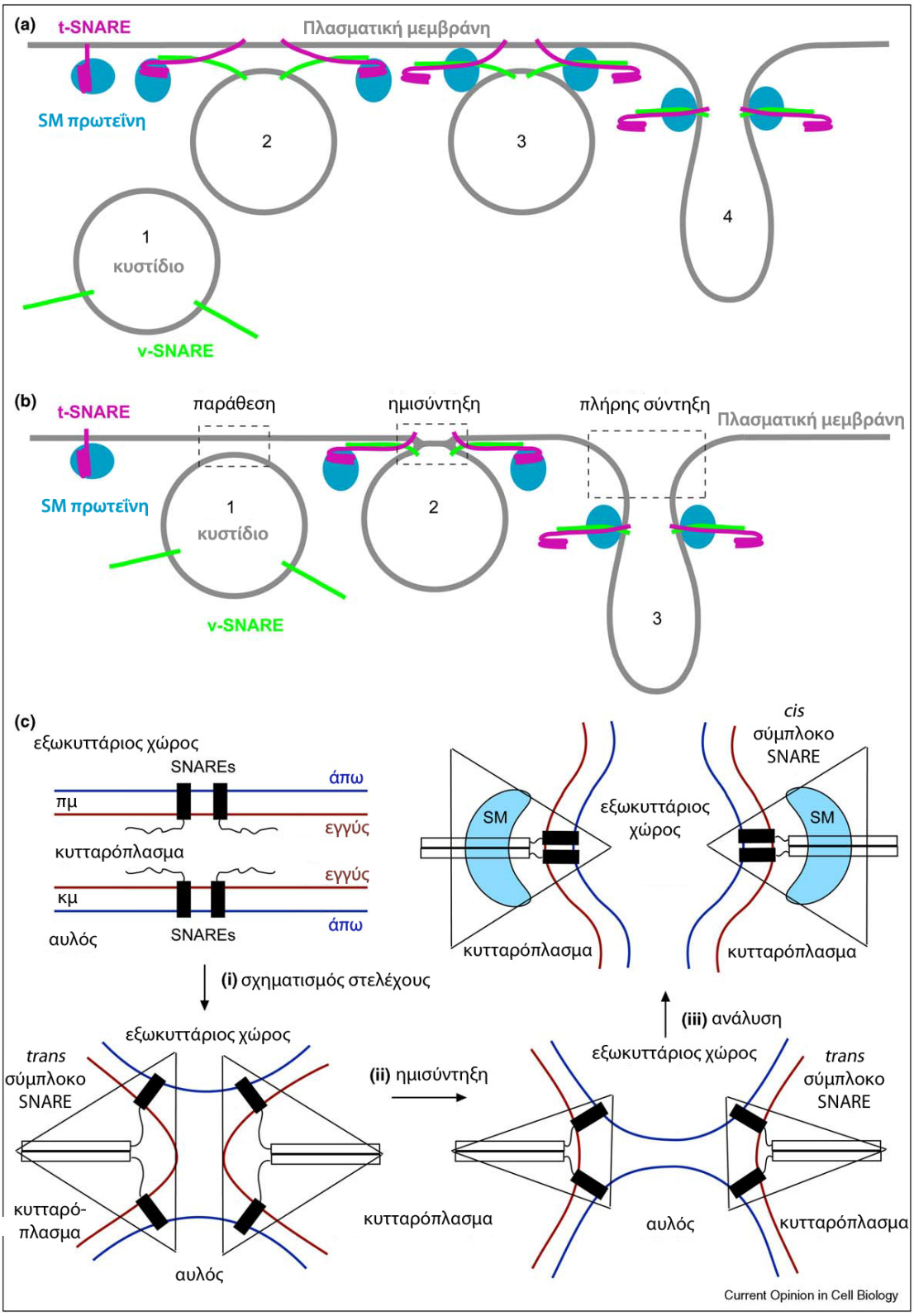
Μετά την αποκοπή τους, τα κυστίδια πλέον κινούνται σε δέσμες μικροσωλινίσκων προς τη μεμβράνη-στόχο τους, με τελικό σκοπό τη σύντηξη με αυτή. Στις διαδικασίες αυτές συμμετέχουν άλλοι παράγοντες, αφού τα σύμπλοκα πρωτεϊνών προσαρμοστών που αναφέρθηκαν έχουν ως ρόλο τη διαλογή των πρωτεϊνών από την αρχική μεμβράνη και την αποκοπή του κυστιδίου. Η θεωρία της κυστιδιακής μεταφοράς προέβλεπε πως τα παραγόμενα κυστίδια θα περιείχαν φορτίο που θα είχε τον ίδιο προορισμό, λόγο διαλογής στο οργανίδιο προέλευσης, ενώ θα έπρεπε με κάποιο τρόπο να αποκτήσουν ταυτότητα, ώστε να οδηγηθούν στο οργανίδιο-στόχο των φορτίων που περιέχουν και να συντηχθούν με αυτό.

Πράγματι, έχουν βρεθεί τέσσερις κατηγορίες πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόκτηση μεμβρανικής ταυτότητας, η οποία τελικά καθορίζει και την σύντηξή τους: 1) κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες υποδοχείς ευαίσθητες σε N-αιθυλ-μαλεϊμίδιο (NEM) SNAREs (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors), με ικανότητα αγκυροβόλησης σε κυστίδια (v, vesicles) ή σε μεμβράνες στόχους (t, target membrane), 2) παράγοντες αποδέσμευσης των SNAREs ,επίσης ευαίσθητοι σε NEM, NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) και SNAPs (NSF Attachment Proteins), 3) Rab GTPάσες και οι ρυθμιστές πρόσδεσης (tethering regulators) των κυστιδίων, και 4) οι SM (Sec1/Munc18) πρωτεΐνες. Οι SNAREs φέρνουν τις μεμβράνες σε επαφή

και καταλύουν τη σύντηξή τους με μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Για να συντηχθούν δύο μεμβράνες πρέπει η μία να διαθέτει μια R-SNARE και η άλλη μια QA-, QB-, ή QC-SNARE. QA-SNARE, ή αλλιώς συνταξίνη, του *S. serevisiae* είναι η Pep12p/Vps6p, η οποία είναι απαραίτητη για τη σύντηξη κυστιδίων που προέρχονται από το TGN, τα πρώιμα ενδοσώματα και το χυμοτόπιο με μεμβράνες των ώριμων ενδοσωμάτων και των MVBs. Η ευρεία της λειτουργία οφείλεται στην ικανότητά της να σχηματίζει σύμπλοκα με άλλες SNAREs, όπως τις Vti1p (QB-SNARE), Syn8p ή Tlg1p (QC-SNAREs), τις Snc1p, Snc2p, Ykt6p (R-SNAREs), αλλά και τον NSF της ζύμης, Sec18p. Ο παράγοντας NSF προκαλεί την αποδέσμευση των SNAREs ώστε να μπορέσουν να επαναλειτουργήσουν σε νέο κύκλο αλληλεπιδράσεων. Ενώ στα θηλαστικά ο NSF έχει δειχθεί να είναι απαραίτητος για τη μεμβρανική σύντηξη, ο Sec18p δεν είναι (άρθρα ανασκόπισης: Bowers and Stevens 2005, Carr and Rizo 2010).

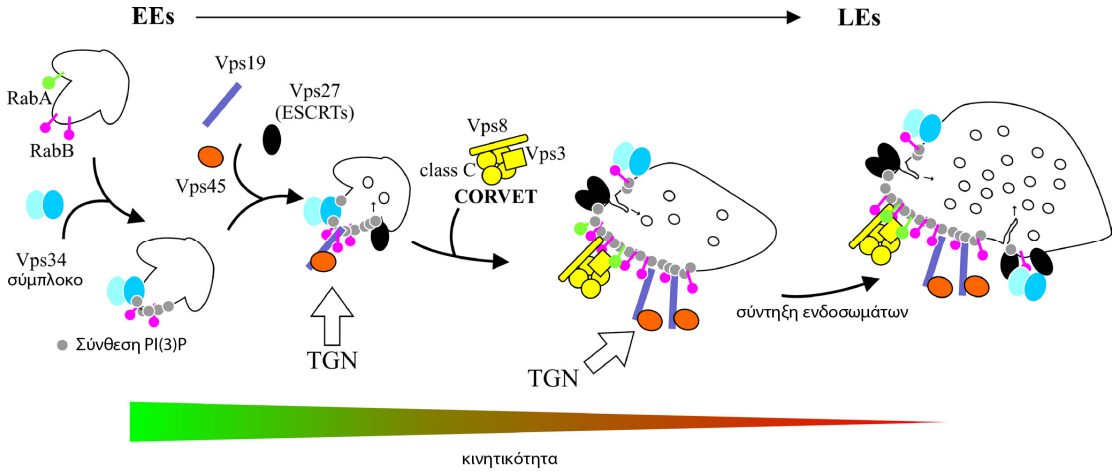
Η σύντηξη των κυστιδίων μέσω αναγνώρισης από ειδικές Q-SNAREs (Εικόνα 4.5) προϋποθέτει την προηγούμενη προσέγγιση των κυστιδίων μέσω των παραγόντων πρόσδεσης. Οι SM πρωτεΐνες δρουν συνεργιστικά με τους παράγοντες πρόσδεσης και κατευθύνουν την προσέγγιση των κυστιδίων. Στον *S. serevisiae* έχει δειχθεί πως οι SM πρωτεΐνες Vps33p και Vps45p είναι απαραίτητες για τη σύντηξη ενδοσωμάτων και κυστιδίων από το TGN με τα MVBs. Οι δύο αυτές SM πρωτεΐνες, Vps33p και Vps45p, συμμετέχουν στο σχηματισμό δύο συμπλόκων με παράγοντες πρόσδεσης, τα CORVET και HOPS αντίστοιχα (Markgraf et al. 2009).

Το σύμπλοκο CORVET ("class C" core vacuole/endosome tethering), στο οποίο συμμετέχουν οι Vps3p, Vps8p, Vps11p, Vps16p, Vps18p και Vps33p, είναι απαραίτητο για την ωρίμανση των πρώιμων ενδοσωμάτων και τη σύντηξή τους σε ώριμα. Η ρύθμιση της διαδικασίας αυτής πραγματοποιείται από την Rab5p/Vps21p Rab-GTPάση. Μια άλλη Rab GTPάση, η Ypt7p, ρυθμίζει το σύμπλοκο HOPS (Homotypic fusion and vacuole Protein Sorting), το οποίο περιέχει επίσης τις Vps11p, Vps16p, Vps18p και Vps33p, όπως το CORVET, αλλά και τις Vps39p και Vps41p. Το σύμπλοκο HOPS ρυθμίζει τη σύντηξη των ώριμων ενδοσωμάτων με τα MVBs και το χυμοτόπιο. Για τις διαδικασίες αυτές είναι απαραίτητη η SM πρωτεΐνη Vps45p. Σύμφωνα με το ισχύον μοντέλο, η πρόσδεση του CORVET προκαλεί τη σταδιακή ωρίμανση των πρώιμων ενδοσωμάτων σε ώριμα. Κατόπιν η Rab5p αντικαθίσταται από την Ytp7p και το CORVET από το HOPS, και τα ώριμα πλέον ενδοσώματα μπορούν να συντηχθούν με το χυμοτόπιο (Εικόνα 4.6) (Markgraf et al. 2009).



Εικόνα 4.5. Σύντηξη μεμβρανών από τις SNARE και SM πρωτεΐνες. (1) Πριν τη μεμβρανική σύντηξη μια t-SNARE (target-SNARE), ή συνταξίνη, απομονώνεται από μια SM πρωτεΐνη και αλλάζει δομή. Η αλλαγή αυτή καθιστά ικανή την αλληλεπίδραση της SM με την v-SNARE (vesicle SNARE) και οι δύο μεμβράνες πλησιάζουν. Η SM ενεργοποιεί τη

μεμβρανική σύντηξη με άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό. Η SM απομακρύνεται από το αμινοτελικό άκρο της συνταξίνης είτε πρίν [Μοντέλο A, (a)] είτε μετά [Μοντέλο B (b)] την αρχική σύντηξη των μεμβρανών. c) σχηματική απεικόνιση της πιθανής συμμετοχής των πρωτεϊνών στη μεμβρανική σύντηξη. Η δέσμευση των δύο SNARE σε *trans* κατάσταση προωθεί τη σύντηξη των εγγύτερων λιπιδικών στιβάδων των δύο μεμβρανών, δημιουργώντας ένα στέλεχος (i). Με περαιτέρω απομάκρυνση των ετεροδιμερών SNARE σταδιακά πλησιάζουν οι απομακρυσμένες λιπιδικές διπλοστιβάδες, δημιουργώντας μια ημισύντηξη (ii), η οποία τελικά καταλήγει σε πλήρη σύντηξη (iii). Η χαλάρωση της πλευρικής πίεσης που ασκούν τα ετεροδιμερή SNARE πραγματοποιείται με την αλλαγή της δομής της SM, η οποία καταλύει την αλλαγή του διμερισμού των SNARE από *trans* σε *cis*. πμ: πλασματική μεμβράνη, κμ: κυστιδιακή μεμβράνη (από Carr and Rizo 2010 με τροποποιήσεις).



Εικόνα 4.6. Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου σταδιακής ωρίμανσης των πρώιμων ενδοσωμάτων (EEs) του *A. nidulans* σε ώριμα (LEs), με ταυτόχρονη μείωση της κινητικότητάς τους. Η πρόσδεση στα EEs της ενεργοποιημένης RabB-GTP προσελκύει την Vps34p, η οποία συνθέτει PI(3)P (γκρι κύκλοι). Το PI(3)P προσελκύει την Vps19p, μέσω της FYVE αλληλουχίας της, και την SM πρωτεΐνη Vps45p, οι οποίες πραγματοποιούν σύντηξη με κυστίδια προερχόμενα από το TGN. Επίσης προσδένεται μέσω της FYVE αλληλουχίας της η Vps27p, ο καθοριστής των MVBs, και αρχίζει την προς τα έσω εκβλάστηση κυστιδίων μέσω των ESCRT-I–, -II–, και -III. Με το σχηματισμό του RabB συμπλόκου, τα ενδοσώματα μετακινούνται σε μεγάλη απόσταση πάνω σε δέσμες μικροσωληνίσκων. Σε επόμενο βήμα δεσμεύεται το σύμπλοκο CORVET, το οποίο προκαλεί Vps8p-εξαρτώμενη σύντηξη των ενδοσωμάτων, ενώ τα ενδοσώματα αυξάνουν σε μέγεθος και κατ' επέκταση χάνουν σε κινητικότητα. Μόλις τα ενδοσώματα φτάσουν σε κάποιο συγκεκριμένο βαθμό ωριμότητας, η Ypt7p αντικαθιστά την RabB (Vps21p), το σύμπλοκο HOPS το CORVET και τα LEs συντήκονται ομοτυπικά προς το σχηματισμό MVBs (Δεν παρουσιάζεται στην εικόνα) (από Abenza et al. 2010 με τροποποιήσεις).

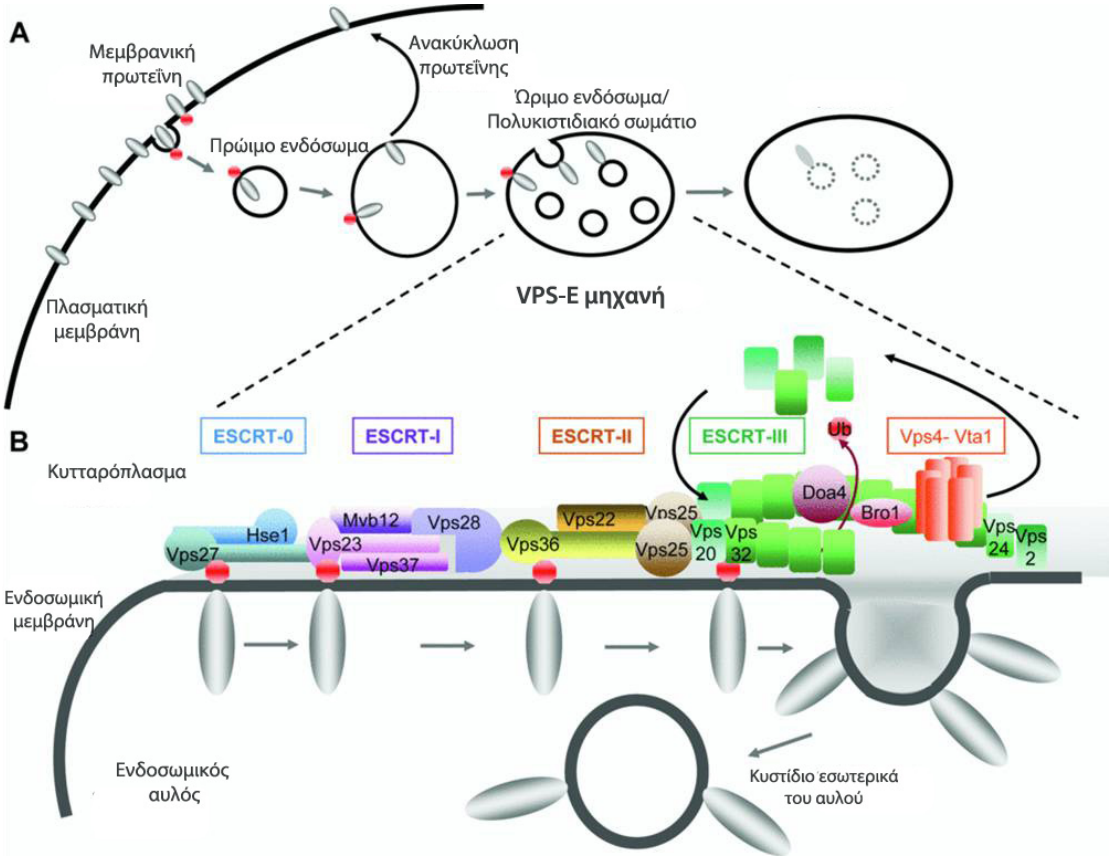
Πολύ πρόσφατα μελετήθηκε ο ρόλος του ορθόλογου της Rab5p του *A. nidulans*, RabB (Abenza et al. 2010). Η RabB εντοπίζεται στα υψηλής κινητικότητας πρώιμα ενδοσώματα του *A. nidulans*, και είναι απαραίτητη για την κινητικότητά τους αυτή, ενώ πρέπει να αλληλεπιδρά με τους παράγοντες πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων (όπως κινεσίνη), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την μεγάλης απόστασης μεταφορά των ενδοσωμάτων.

Τα μεγάλης κινητικότητας πρώιμα ενδοσώματα του *A. nidulans* είναι εύκολα διακριτά από τα σχετικά ακίνητα ώριμα (Abenza et al. 2009). Η RabB προσελκύει στα πρώιμα ενδοσώματα την κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης, η οποία συνθέτει PI(3)P, ουσία χαρακτηριστική των πρώιμων ενδοσωμάτων και απαραίτητη για την αναγνώριση τους από τα ESCRT (παράγραφος 4.4.4). Η διαδικασία δείχνει να είναι αντίστοιχη με αυτή που συμβαίνει σε ανθρώπινα κύτταρα, όπου κινάσες της PI(3), όπως η Vps34, είναι τελεστές της Rab5 (Christoforidis et al. 1999a). Η παραγόμενη PI(3)P συμβάλει στην προσέλκυση πρωτεϊνών με FYVE επικράτειες, όπως η rabenosyn-5 (Nielsen et al. 2000) και ο παράγοντας προσκόλλησης EEA1 (Christoforidis et al. 1999b). Η PI(3)P δρα μαζί με την Vps19p για την προσέλκυση της Vps45p (Abenza et al. 2010). Η προσέλκυση της AnVps45 δείχθηκε επίσης να είναι RabB εξαρτώμενη. Ωστόσο ο φαινότυπος της έλλειψης της AnVps45 είναι πιο σοβαρός από αυτόν της έλλειψης της RabB, δείχνοντας πως η AnVps45 έχει και άλλους ρόλους. Η Vps45p έχει συσχετισθεί με τη σύντηξη κυστιδίων που προέρχονται από το TGN με τις μεμβράνες των MVBs και του χυμοτοπίου. Η ομόλογή της του *A. nidulans* είναι πιθανό να επιτελεί ίδιους ρόλους κα για αυτό η έλλειψή της να προκαλεί τέτοιο φαινότυπο. Το παράλογο της RabB, RabA, δεν φαίνεται να έχει το ίδιο σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία, αν και ταυτόχρονη απαλοιφή και των δύο Rab είναι θνησιγόνος, δείχνοντας πως η εγκαθίδρυση της ταυτότητας των ενδοσωμάτων μέσω των RabA/RabB είναι απαραίτητη για το μύκητα. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται πως η RabB είναι ικανή και αναγκαία για τον καθορισμό της ταυτότητας των πρώιμων ενδοσωμάτων και την απόκτηση της "αποικοδομητικής ταυτότητας" (degrative identity) των ώριμων ενδοσωμάτων (Abenza et al. 2010) (Εικόνα 4.6).

4.1.4. Σχηματισμός των MVBs

Στον *S. serevisiae* αλλά και τα θηλαστικά έχουν χαρακτηρισθεί 4 ενδοσωμικά σύμπλοκα πρωτεϊνών που χρειάζονται για τη μεταφορά κυστιδίων (Bowers and Stevens 2005) (ESCRT, Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) τα ESCRT 0, I II και III. Το ESCRT 0 περιέχει τις Vps27p και Hes1p, οι οποίες περιέχουν αλληλουχίες αλληλεπίδρασης με ουβικουιτίνη (UIM, Ubiquitin Interacting Motives), και είναι απαραίτητο, μεταξύ άλλων, για τη διαλογή διάφορων ουβικουιτινυλιωμένων πρωτεϊνών από τα ενδοσώματα στα MVBs και προς αποικοδόμηση στο χυμοτόπιο (Bowers and Stevens, 2005). Η λειτουργία του αυτή ίσως σχετίζεται με την αλληλεπίδρασή του με τις Ent1 και Ent2 πρωτεΐνες της οικογένειας των επσινών, που έχουν δειχθεί να σχετίζονται με τη διαλογή ουβικουιτινυλιωμένων πρωτεϊνών από την πλασματική μεμβράνη (Sato et al. 2009). Το ESCRT 0 επίσης αλληλεπιδρά με PI(3)P και προσελκύει το ESCRT I. Με τη σειρά του το ESCRT I προσελκύει τα ESCRT II και ESCRT III, τα οποία με τη σειρά τους επίσης αλληλεπιδρούν, αυξάνοντας τη συγγένεια του ESCRT III για πρόσδεση στις μεμβράνες (Michelet et al. 2011).

Ο βασικός πυρήνας του ESCRT III είναι η Vps32p. Είναι πλέον καλά εδραιωμένο πως τα ESCRT χρειάζονται για την προς τα έσω εκβλάστηση κυστιδίων στα συντηγμένα ώριμα ενδοσώματα κατά το σχηματισμό των MVBs (Michelet et al. 2011) (Εικόνα 4.7). Η αναγνώριση των ενδοσωμάτων που περιέχουν ουβικουιτινυλιωμένες πρωτεΐνες γίνεται από το ESCRT 0. Η Vps27p προσδένει PI(3)P μέσω της FYVE επικράτειάς της, ενώ όλο το σύμπλοκο διαθέτει 5 UIMs. Με την προσέλκυση του ESCRT II ξεκινάει η προς τα μέσα εκβλάστηση, ενώ το ESCRT III χρειάζεται για την τελική αποκοπή του κυστιδίου. Η ενέργεια που χρειάζεται παρέχεται από τη δωδεκαμερή AAA ATPάση Vps4p, η οποία είναι επίσης απαραίτητη για την ανακύκλωση των ESCRT. Ο μη συνηθισμένος αυτός τρόπος εκβλάστησης, ο οποίος δεν χρειάζεται πρωτεΐνες καλύμματος, έχει το πλεονέκτημα της μη κατανάλωσης των πρωτεϊνών που τον προκαλούν. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να χρησιμοποιείται και για την επαγόμενη από λιπίδια εκβλάστηση σε σημεία μεμβρανών διαφορετικής λιπιδικής σύστασης, ενώ το ESCRT III σύμπλοκο υπάρχει στα Αρχαία, όπου πραγματοποιεί αποκοπή μεμβρανών, πιθανώς με τη συμβολή των ασυνήθιστων λιπιδίων των οργανισμών αυτών (Hurley et al. 2010).



Εικόνα 4.7. (Α) Σχηματική απεικόνιση του ενδοκυτωτικού μονοπατιού, με έμφαση στα MVBs. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ενδοκυτώνονται στα πρώιμα και περαιτέρω στα ώριμα ενδοσώματα με την προσθήκη ουβικουιτίνης (κόκκινος κύκλος). Στα MVBs τα κυστίδια εκβλαστάνουν προς τα έσω, δημιουργώντας χαρακτηριστικές δομές, και τελικά το MVB συντήκεται με το χυμοτόπιο. (Β) Τα σύμπλοκα ESCRT. Η επίτευξη της χαρακτηριστικής δομής των MVBs πραγματοποιείται από ένα πολύπλοκο πρωτεϊνικό σύμπλοκο στην κυτταροπλασματική πλευρά της εξωτερικής μεμβράνης των ώριμων ενδοσωμάτων. Τα ESCRT 0, I, II και III προσδένονται διαδοχικά μέσω εξειδικευμένων αλλεπιδράσεων πρωτεϊνών-λιπιδίων και πρωτεϊνών-πρωτεϊνών. Οι ουβικουιτινυλιωμένες πρωτεΐνες οδηγούνται σε ειδικές υπο-περιοχές όπου από-ουβικουιτινυλιώνονται από την Doa4p και συγκεντρώνονται σε εσωτερικά κυστίδια. Τα ESCRT ανακυκλώνονται με την δράση της Vps4p (από Michelet et al. 2011 με τροποποιήσεις)

Πρόσφατα μελετήθηκαν στοιχεία του ESCRT του *A. nidulans*, όπου και επιβεβαιώθηκε η παρουσία της Vps32p σε πρώιμα ενδοσώματα. Επιπλέον, μελετήθηκε ο ρόλος του DidB^{Did2p} ρυθμιστή της Vps4p (Hervas-Aguilar et al. 2010b). Απαλοιφή του προκαλεί μειωμένη αύξηση του μύκητα και σχετική ανθεκτικότητα

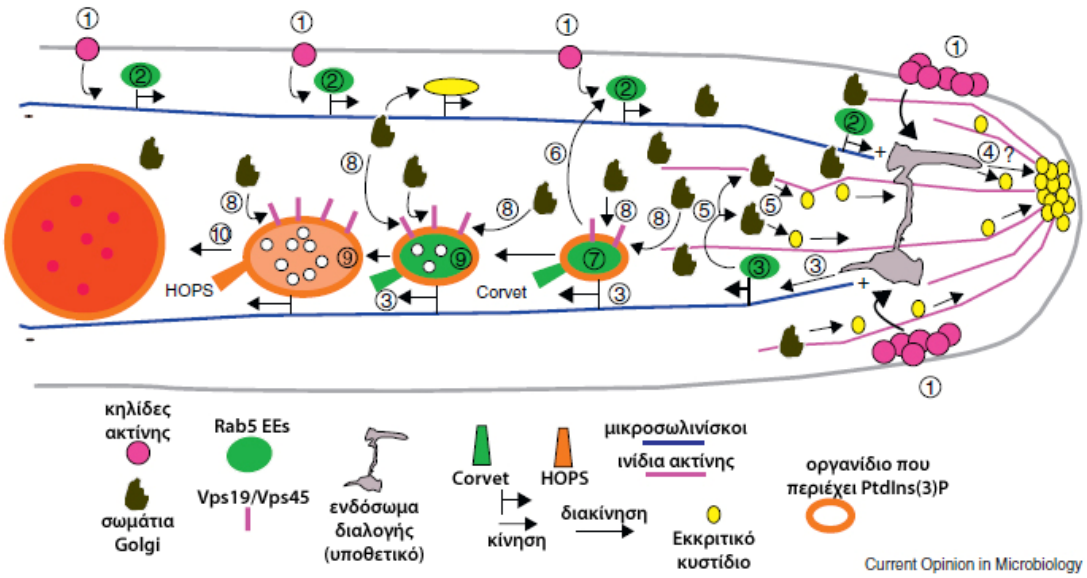
στην ενδοκύτωση από ιόντα αμμωνίου του μεταφορέα δικαρβοξυλικών αμινοξέων, AgtA. Το γεγονός αυτό προτείνει πως η ενδοκύτωση του AgtA από ιόντα αμμωνίου πραγματοποιείται μέσω ουβικουιτινυλίωσης και στόχευσης στα MVBs, αφού στον *S. serevisiae* έχει παρατηρηθεί ανακύκλωση ουβικουιτινυλιωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη μέσω των ενδοσωμάτων σε στελέχη με ελλατωματικό ESCRT.

4.2. Ο ρόλος της ενδοκύτωσης στην πολική αύξηση του *A. nidulans*

Όπως συζητήθηκε στην παράγραφο 1.4.2, η ανάπτυξη των υφών των νηματοειδών μυκήτων πραγματοποιείται με επάκρια αύξηση. Η επάκρια αυτή αύξηση σχετίζεται με την εντοπισμένη σύνθεση, στόχευση και εξωκύτωση μεμβρανών και πρωτεϊνών στο κορυφαίο σημείο (tip). Η εξωκύτωση όμως δεν είναι αρκετή για την επάκρια αύξηση των υφών, αφού η εγκαθίδρυση και καθιέρωση της πολικότητάς τους απαιτεί τις διαδικασίες ενδοκύτωσης. Η ενδοκύτωση συμβαίνει σε όλο το μήκος των υφών, αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό στην κορυφαία και υπο-κορυφαία περιοχή τους, όπως φαίνεται από την πολική τοπολογία της ακτίνης (Torralba et al. 1998, Harris et al. 1999, Upadhyay and Shaw 2008) και πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον πολυμερισμό της, όπως η φιμπρίνη FimA (Upadhyay and Shaw 2008) και οι AbpA και SlaB (Araujo-Bazan et al. 2008). Επιπλέον, συνεχής λειτουργία της μυοσίνης τύπου I, MyoA, επάγει συστατική αυξημένη ενδοκύτωση στην κορυφαία περιοχή αύξησης (Yamashita and May 1998).

Η ενδοκύτωση είναι απαραίτητη για την πολική αύξηση των υφών, αφού η απαλοιφή γονιδίων που σχετίζονται με αυτή είτε είναι θνησιγόνος, είτε οδηγεί σε σημαντικές μορφολογικές ανωμαλίες. Απαλοιφή του *slaB* είναι θνησιγόνος, αφού Δ*slaB* στελέχη εμφανίζουν ικανότητα εγκαθίδρυσης πολικότητας, την οποία όπως δεν μπορούν να διατηρήσουν (Araujo-Bazan et al. 2008). Η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την ArfB, ορθόλογη της Arf6 GTPάσης του ανθρώπου που ρυθμίζει την εκβλάστηση ενδοκυτωτικών κυστιδίων, προκαλεί αύξηση του χρόνου ισοτροπικής ανάπτυξης με επακόλουθη ελλατωματική καθιέρωση πολικότητας (Lee et al. 2008). Σημαντική αύξηση του χρόνου ισοτροπικής ανάπτυξης εμφανίζουν επίσης Δ*fimA* στελέχη, η οποία καταλήγει σε μεγάλα κύτταρα που τελικά αποκτούν πολλούς βλαστητικούς σωλήνες (Upadhyay and Shaw 2008).

Ο ρόλος της ενδοκύτωσης στην πολική αύξηση των υφών φαίνεται πως είναι η συνεχής ανακύκλωση σημαντικών παραγόντων καθιέρωσης της πολικότητας στο καρυφαίο σημείο (Penalva, 2010) (Εικόνα 4.8). Ένας τέτοιος παράγοντας του *S. serevisiae*, σημαντικός για την εκβλάστηση των κυττάρων, είναι η πρωτεΐνη συναπτομπρεβίνη (Snc1p), η οποία έχει δειχθεί να ανακυκλώνεται συνεχώς προς το σημείο εκβλάστησης μέσω ενδοκύτωσης (Valdez-Taubas and Pelham, 2003). Η Sns1p είναι μια v-SNARE πρωτεΐνη, δηλαδή χαρακτηριστική κυστιδίων μεταφοράς. Το γεγονός αυτό προτείνει πως η λειτουργία της πρέπει να σχετίζεται με την εγκαθίδρυση μεμβρανικής ταυτότητας κυστιδίων που προορίζονται για σύντηξη στην κορυφαία περιοχή, μέσω ειδικής αναγνώρισης από μια t-SNARE που βρίσκεται εκεί. Το ομόλογό της του *A. nidulans*, SynA, έχει δειχθεί να εντοπίζεται επίσης στην κορυφαία περιοχή (Taheri-Talesh et al. 2008), ενώ αποκλείεται από αυτή σε στελέχη που φέρουν ένα ελαττωματικό αλλήλιο της δυνεΐνης, *nudA1* (Abenza et al. 2009). Στα στελέχη αυτά η SynA συγκεντρώνεται σε μια περιοχή κοντά στο κορυφαίο σημείο που έχει ονομασθεί "ζώνη φόρτωσης δυνεΐνης" (dynein loading zone), όπου τα πρώιμα ενδοσώματα αλλάζουν πλευρά κίνησης πάνω στις δέσμες των μικροσωλινίσκων (Lenz et al. 2006). Σε *nudA1* στελέχη αυτό δεν είναι δυνατό, "παγιδεύοντας» τα πρώιμα ενδοσώματα. Από τη δουλεία αυτή προέκυψε η ιδέα πως τα πρώιμα ενδοσώματα των νηματοειδών μυκήτων εμφανίζουν μεγάλης κινητικότητας μετακίνηση από την βασιπλευρική προς την ακροπλευρική θέση της υφής και αντίστροφα, πάνω σε δέσμες μικροσωλινίσκων. Πράγματι, παρατήρηση των πρώιμων ενδοσωμάτων του *A. nidulans* μετά από κατάλληλη χρώση με FM4-64 (Penalva 2005) έδειξε πως εμφανίζουν τέτοια κινητικότητα, η οποία χάνεται μετά από χημικό αποπολυμερισμό των μικροσωλινίσκων ή σε στελέχη που εκφράζουν μεταλλαγμένα αλλήλια δυνεΐνης (Abenza et al. 2009). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από το θετικό άκρο των μικροσωλινίσκων, όπου η δυνεΐνη και τα ενδοσώματα αλληλεπιδρούν (Zhang et al. 2001). Φαίνεται λοιπόν πως η κίνηση αυτή των ενδοσωμάτων είναι υπεύθυνη για την ανακύκλωση του SynA στο κορυφαίο σημείο, γεγονός που συμφωνεί με τη θεωρία της συνεχούς ανακύκλωσης ενός μάρτυρα της πολικότητας (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.8. Υποθετικό μοντέλο της κίνησης των ενδοσωμάτων σε κορυφαία κύτταρα υφών. Η διακίνηση των ενδοσωμάτων δείχνεται να πραγματοποιείται πάνω σε δύο δέσμες μικροσωληνίσκων (MTs). Οι άνω και κάτω MTs χρησιμεύουν για την ακροπλευρική και βασιπλευρική κίνηση των ενδοσωμάτων, αντίστοιχα. Στις υφές, η ενδοκύτωση (μωβ κύκλοι) πραγματοποιείται κυρίως στην υποκορυφαία περιοχή (1). Η έκκριση επίσης είναι εντονότερη στην κορυφαία περιοχή (παράγραφος 1.4.2), και η δομή του ακραίου σωματίου (Spitzenkorper) αντιστοιχεί σε έναν ενδιάμεσο σταθμό συγκέτρωσης των εκκριτικών κυστιδίων, πριν από τη σύντηξή τους με την κορυφή. Η σύνδεση ενδοκύτωσης και εξωκύτωσης, γεγονότων που φαίνεται να είναι απαραίτητα για την εγκαθίδρυση και καθιέρωση της πολικότητας, πρέπει να συμβαίνει σε αυτή την περιοχή. Εκεί επίσης αλλάζει η κατεύθυνση κίνησης (3) των ενδοσωμάτων που έρχονται προς τη κορυφή (2). Η σύνδεση αυτή μπορεί να γίνεται με δύο τρόπους, είτε με την σύντηξη των ενδοσωμάτων στο Golgi (4), είτε απευθείας στην κορυφή της υφής (5), κάτι που δεν έχει διευκρινησθεί (ερωτηματικό στο σχήμα). Η βασιπλευρική κίνηση των ενδοσωμάτων, που πλεόν κινούνται συνδεδεμένα στη δυνεΐνη, μπορεί να αλλάξει σε απομακρυσμένες της κορυφής περιοχές περιοχές (6). Η σταδιακή ωρίμαση των ενδοσωμάτων ξεκινάει με την προσάρτηση PtdIns(3)P. Η σύνθεσή του πραγματοποιείται από την Vps34, την οποία ρυθμίζει η RabB/Rab5. Η PtdIns(3)P μαζί με την RabB προσελεύουν τις Vps19 και Vps45 (7). Με την προσάρτηση της Vps45 ξεκινάει η ωρίμανση, με τη σύντηξη κυστιδίων που προέρχονται από το Golgi (8) . Συγχρόνως,, η Vps27 δεσμεύεται στα ενδοσώματα, προσαρτώντας ουβικουιτινυλιωμένο φορτίο, και ξεκινάει το μονοπάτι των MVBs, με την χαρακτηριστική προς τα έσω εκβλάστηση κυστιδίων (9). Τα ενδοσώματα αυτού του σταδίου συντήκονται ομοτυπικά μεταξύ τους βάσει του συμπλόκου πρόσδεσης CORVET, ενώ η κινητικότητά τους μειώνεται. Μόλις τα ενδοσώματα φτάσουν κάποιο συγκεκριμένο βαθμό ωριμότητας, η RabB/Rab5 αντικαθίσταται από την Rab7 και το σύμπλοκο CORVET από το HOPS. Τα ενδοσώματα πλεόν μπορούν να συντηχθούν ομοτυπικά με τα χυμοτόπια (10) (από Penalva 2010 με τροποποιήσεις).

Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση, αλλά και να μελετηθεί καλύτερα ο ρόλος του *slaB,* κατασκευάσθηκε ένα στέλεχος που εκφράζει την GFP-SynA, ενώ έχει ρυθμιζόμενη έκφραση του *slaB*, μέσω του υποκινητή της νιτρικής αναγωγάσης *niiA* (Hervas-Aguilar and Penalva 2010). Ο υποκινητής αυτός είναι υπό τον έλεγχο των AreA και NirA μεταγραφικών παραγόντων (παράγραφος 1.4.3.1). Εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων σε συνθήκες αναστολής της έκφρασης του *slaB* οδηγεί σε φαινότυπο πανομοιότυπο με αυτόν του Δ*slaB*, δηλαδή η ανάπτυξη των σπορίων σταματά μετά την εγκαθίδρυση της πολικότητας. Με εκλεπτυσμένα πειράματα ρυθμιζόμενης σε διάφορα επίπεδα μεταγραφής του *slaB*, και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του μύκητα, οι συγγραφείς κατέληξαν σε μια σειρά από πολύ ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Ο ρόλος του SlaB, όπως και το ομόλογό του στον *S. serevisiae* Sla2p, σχετίζεται με την εκβλάστηση ενδοκυτωτικών κυστιδίων. Αναστολή της έκφρασης του *slaB* προκαλεί ομοιόμορφη κατανομή της GFP-SynA στην πλασματική μεμβράνη εκβλαστημένων σπορίων, δείχνοντας πως το SlaB είναι απαραίτητο για την ενδοκύτωση και ανακύκλωση του SynA μέσω ενδοσωμάτων στην κορυφαία περιοχή. Το γεγονός αυτό ενισχύει περαιτέρω την υπόθεση πως ο μηχανισμός διατήρησης της πολικότητας σχετίζεται με τη συνεχή ανακύκλωση ενός μάρτυρα. Η έλλειψη του SlaB όμως δεν επηρεάζει την εξωκύτωση της GFP-SynA, ή τη στόχευση της AnPep12 στη μεμβράνη του χυμοτοπίου, δείχνοντας πως δεν σχετίζεται με όλα τα κυστίδια μεμβρανικής μεταφοράς. Επιπλέον, ενισχύθηκε περαιτέρω ο ρόλος του SlaB στην εγκαθίδρυση της πολικότητας, αφού αναστολή της έκφρασης του *slaB* σε εκβλαστημένα σπόρια προκαλεί την εμφάνιση νέων, μη φυσιολογικών σημείων εκβλάστησης και ανακατανομή του κυτταροσκελετού ακτίνης, όπως φαίνεται από την τοπολογία της AbpA-mRFP. Ο μηχανισμός που το SlaB δρα φαίνεται να είναι ο περιορισμός του υπερβολικού πολυμερισμού των ινιδίων ακτίνης στα σημεία της εκβλάστησης των κυστιδίων, όπως έχει αντίστοιχα προταθεί και για το Sla2p.

4.3. Διαλογή, στόχευση και ελεγχόμενη διακίνηση μεταφορέων

Οι μεταφορείς αποτελούν πρωταρχικούς στόχους απόκρισης σε περιβαλλοντικά και αναπτυξιακά σήματα μέσω πολλαπλών μηχανισμών που λειτουργούν σε μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Ο μεταγραφικός έλεγχος είναι σχετικά "αργός" και δεν φαίνεται να εξυπηρετεί την άμεση προσαρμογή σε αλλαγές στο θρεπτκό μέσο. Αντίθετα, η άμεση και έγκαιρη ρύθμιση της βιογένεσης /τοπογένεσης και της ενεργότητας ενός μεταφορέα καθιστά δυνατό τον ταχύτατο έλεγχο της πρόσληψης ή μη ουσιών/υποστρωμάτων. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι α) τοξικές για το κύτταρο σε μεγάλες συγκεντρώσεις (όπως βαρέα μέταλλα, ουρακίλη, αμινοξέα), β) να συμμετέχουν σε μεταγραφικά / μετα-μεταφραστικά ρυθμιστικά κυκλώματα όπου ο αποκλεισμός ή η διαθεσιμότητα τους αλλάζει την ενεργότητα και έκφραση γονιδίων (π.χ. αμμωνιακά ιόντα, γλυκόζη, διάφορα στρες, αναπτυξιακές / περιβαλλοντικές συνθήκες) και γ) να συμμετέχουν σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ή μεταγωγή σήματος, όπου η ανάγκη αμεσότητας της απόκρισης είναι τάχιστη (όπως γλουταμικό οξύ στις νευρικές συνάψεις). Καλά μελετημένα παραδείγματα ρυθμιζόμενης διακίνησης και ενδοκύτωσης μεταφορέων στον *Saccharomyces cerevisiae* αποτελούν ο μεταφορέας ουρακίλης Fur4p και ο γενικός μεταφορέας αμινοξέων Gap1p (Dupre et al. 2001, André and Haguenauer-Tsapis 2004, Dupre et al. 2004). Οι μεταφορείς αυτοί έχουν δειχθεί να οδηγούνται προς αποικοδόμηση στο χυμοτόπιο παρουσία υψηλών κυτταροπλασματικών συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων τους, από διάφορα στρες (π.χ προσθήκη κυκλοεξιμιδίου), αλλά και από παρουσία αμμωνίας, μιας προτιμώμενης πηγής αζώτου (για τον Gap1p).

Η παρουσία ενδοκυτωτικών των σημάτων οδηγεί τους μεταφορείς του *S. serevisiae* στο χυμοτόπιο από την πλασματική μεμβράνη αλλά και το TGN, μέσω ενδοσωμάτων και MVBs. Άλλοι μεταφορείς που έχουν δειχθεί να ρυθμίζονται αρνητικά από το υπόστρωμά τους είναι μεταφορείς ειδικοί για μέταλλα, όπως σίδηρο και σιδηροφόρα (Liu and Culotta 1999, Gitan and Eide 2000, Felice et al. 2005, Stimpson et al. 2006, Kim et al. 2007, Erpapazoglou et al. 2008, Nikko et al. 2008), σάκχαρα (Medintz et al. 1998, Horak and Wolf 2001, Gadura et al. 2006), φωσφορικά (Estrella et al. 2008) και αμινοξέα (Beck et al. 1999, Umebayashi and Nakano 2003, Lin et al.,2008). Η επαγόμενη από το υπόστρωμα ρύθμιση της διακίνησης και

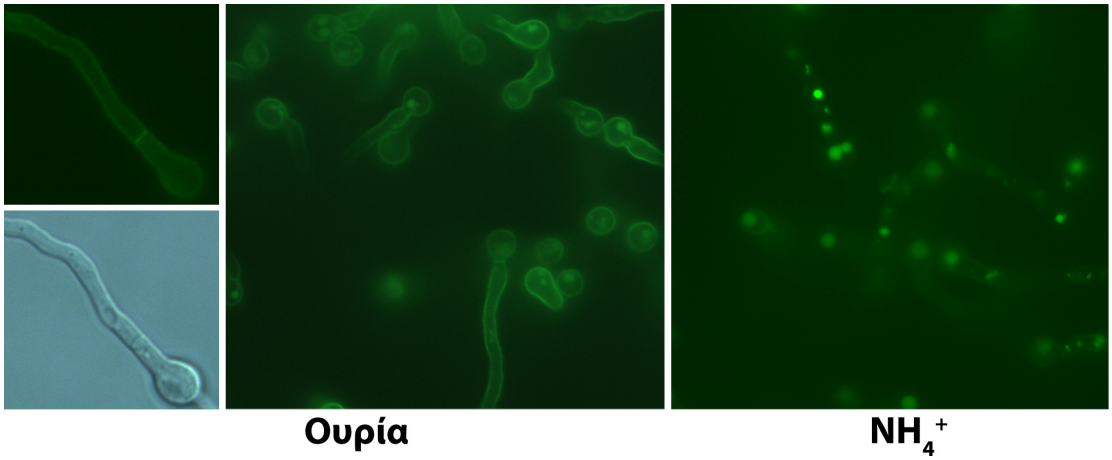
ενδοκύτωσης μεταφορέων είναι επίσης κοινή σε μεταφορείς θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων αυτών των μετάλλων και νευροδιαβιβαστών (Whitworth and Quick, 2001, Chi and Reith 2003, Miranda and Sorkin 2007).

4.3.1. Υποκυτταρική έκφραση και μετα-μεταφραστική ρύθμιση μεταφορέων του *A. nidulans*

Η υποκυτταρική έκφραση μιας σειράς μεταφορέων του *A. nidulans* έχει μελετηθεί χρησιμοποιώντας την GFP. Οι συζευγμένοι με GFP μεταφορείς εντοπίζονται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη και τα διαφράγματα του μύκητα, και λιγότερο στο χυμοτόπιο, μια ένδειξη της φυσιολογικής τους αποικοδόμησης με βάση το χρόνο ημιζωής. Η έκφραση του UapA έχει εξετασθεί επίσης κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων (Pantazopoulou et al. 2007). Αδρανή κονιδιοσπόρια δεν εκφράζουν UapA-GFP, αλλά η έκφρασή του γίνεται σταδιακά εμφανής κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης, σε συμφωνία με τη μεταγραφική του επαγωγή (παράγραφος 3.3.1). Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως στα αρχικά στάδια της εκβλάστησης ο UapA-GFP εντοπίζεται σε κυτταροπλασματικούς δακτυλίους που αντιστοιχούν στη μεμβράνη του ΕΔ (Vlanti et al. 2006). Στα μεταγενέστερα στάδια και στο μυκήλιο αυτοί οι δακτύλιοι του ΕΔ δεν είναι πλέον εμφανείς, προτείνοντας ότι η έξοδος του UapA από τη μεμβράνη του ΕΔ είναι αποδοτική μόνο μετά από την πρώτη πυρηνική διαίρεση και την καθιέρωση της πολικότητας. Ο PrnB-GFP μεταφορέας προλίνης φαίνεται να εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα αδρανή κονιδιοσπόρια, χωρίς όμως να εμφανίζεται αντίστοιχη μετρήσιμη ενεργότητα μεταφοράς. Η έκφρασή του εκεί έχει συσχετισθεί με τον ενυδατικό ρόλο της προλίνης (Tavoularis et al. 2001).

Σχεδόν όλοι οι μεταφορείς του *A. nidulans* που έχουν μελετηθεί ρυθμίζονται και μετα-μεταφραστικά. Οι μελέτες γίνονται κυρίως στη βλαστητική φάση ανάπτυξης του μύκητα. Οι UapA, UapC, PrnB, AgtA και FcyB μεταφορείς ρυθμίζονται αρνητικά από ιόντα αμμωνίου μέσω ενδοκύτωσης και αποικοδόμησης στο χυμοτόπιο (Valdez-Taubas et al. 2000, 2004, Tavoularis et al. 2001, Pantazopoulou et al. 2007, Vlanti and Diallinas 2008, Apostolaki et al. 2009). Ειδικότερα οι UapA (Εικόνα 4.9) και UapC, έχουν μελετηθεί εκφραζόμενοι από τον *alcA* υποκινητή, ο οποίος αναστέλλεται από γλυκόζη, επάγεται από αιθανόλη και δεν ρυθμίζεται μεταγραφικά

από ιόντα αμμωνίου. Στην περίπτωση του UapA, μελέτες με την τεχνική της ανάλυσης Western μεταφορέα συζευγμένου με GFP ή His επίτοπο έχουν επιβεβαιώσει την αρνητική επίπτωση του αμμωνίου στην έκφρασή του στην πλασματική μεμβράνη (Pantazopoulou et al. 2007). Αρνητική ρύθμιση από ιόντα αμμωνίου δείχνει και ο FurD μεταφορέας ουρακίλης (Φ. Μπορμπόλης, διπλωματική εργασία), αλλά και ο πρόσφατα χαρακτηρισμένος μεταφορέας ουρίας, UreA (Abreu et al. 2010). Ο μηχανισμός ενδοκύτωσης του AgtA μεταφορέα από ιόντα αμμωνίου πρέπει να σχετίζεται με ουβικουιτινυλίωση και στόχευση στα MVBs, αφού απαλοιφή της *didB* ATPάσης των ESCRT προκαλεί μερική ανθεκτικότητα στην ενδοκύτωση αυτή (Παράγραφος 4.1.4)



Εικόνα 4.9. Η έκφραση του UapA στην πλασματική μεμβράνη μυκηλίων του *A. nidulans* που έχουν μεγαλώσει απουσία προτιμώμενης πηγής αζώτου (Ουρία) σε σχέση με την ενδοκύτωση και αποικοδόμηση στο χυμοτόπιο που προκαλεί η παρουσία ιόντων αμμωνίου (NH_4^+).

Ένας ακόμη τρόπος ρύθμισης έχει βρεθεί για τον FcyB μεταφορέα, ο οποίος προωθείται στο χυμοτόπιο για αποικοδόμηση παρουσία των υποστρωμάτων του (Vlanti and Diallinas 2008). Αντίστοιχα δεδομένα υπάρχουν και για το άλλο χαρακτηρισμένο μέλος της NCS1 οικογένειας, FurD (Α. Παυλίδης, Διπλωματική Εργασία). Τέλος, η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου, ενός παράγοντα που προκαλεί ενδοκύτωση πολλών μεταφορέων του *S. serevisiae*, δείχθηκε να σταθεροποιεί τον AgtA στην πλασματική μεμβράνη του *A. nidulans* (Apostolaki et al. 2009).

Πολύ πρόσφατα, στο εργαστήριό μας βρέθηκαν προκαταρκτικά στοιχεία για την αδρανοποίηση του UapA μέσω ενδοκύτωσης από τα υποστρώματά του. Η

παρουσία ουρικού οξέος στο θρεπτικό μέσο επάγει την μεταγραφή του μεταφορέα, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην αύξηση της έντασης του φθορισμού της UapA-GFP πρωτεΐνης. Η αύξηση όμως αυτή δεν εντοπίζεται μόνο στην πλασματική μεμβράνη, αλλά και σε μικρά και μεγαλύτερα χυμοτόπια, όπως επίσης σε διάφορες κοκκιώδεις δομές, συχνά κοντά στην πλασματική μεμβράνη, οι οποίες θα μπορούσαν να είναι ενδοσώματα (Penalva 2005). Η εικόνα αυτή είναι συμβατή με προηγούμενες μελέτες πρόσληψης ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων σε μεταγραφική επαγωγή, που έδειχναν σαφώς μικρότερη ή καθόλου αύξηση της ενεργότητας, παρόλη την οκταπλάσια αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του *uapA* (Γ. Διαλλινάς, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η διερεύνηση του μηχανισμού αυτού του φαινομένου αποτελεί αντικείμενο της συγκεκριμένης διατριβής.

4.3.2. Ουβικουιτινυλίωση

4.3.2.1. Το μόριο της ουβικουιτίνης

Το πρωταρχικό σήμα για την ρυθμιζόμενη διακίνηση των μεταφορέων, και το μοναδικό που έχει μέχρι στιγμής βρεθεί στον *S.serevisiae*, είναι η ουβικουιτινυλίωσή τους (André and Haguenauer-Tsapis 2004, Dupre et al., 2004, Miranda and Sorkin 2007, Belgareh-Touze et al. 2008), η προσθήκη δηλαδή ενός ή περισσοτέρων μορίων ουβικουιτίνης. Η ουβικουιτίνη είναι ένα μικρό πολύ συντηρημένο πεπτίδιο 76 αμινοξέων, το οποίο συντήκεται στις πρωτεΐνες-στόχους μέσω ενός ισοπεπτιδικού δεσμού του ελεύθερου καρβοξυλίου του καρβοξυλικού άκρου της ουβικουιτίνης και της αμινομάδας της πλευρικής αλυσίδας ενός καταλοίπου λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου. Το μόριο της ουβικουιτίνης μεταφέρεται από ένα ενεργοποιητικό ένζυμο (E1) μέσω ενός ενζύμου σύνδεσης της ουβικουιτίνης (E2) στην λιγάση της ουβικουιτίνης (E3 HECT), η οποία καταλύει τον ισοπεπτιδικό δεσμό. Εναλλακτικά, η ουβικουιτίνη μπορεί να μεταφερθεί κατευθείαν στην πρωτεΐνη στόχο από την E2 μέσω αγκυροβόλησης μιας E3 RING, της οποίας ο ρόλος περιορίζεται στην αναγνώριση του υποστρώματος. Από τα παραπάνω είναι προφανές πως οι E3 προσδίδουν την απαραίτητη εξειδίκευση στη διαδικασία. Άλλωστε είναι χαρακτηριστικό πως το γονιδίωμα του *S. serevisiae* φαίνεται κωδικεύει 1 E1, 11 E2 και 54 E3 (Lauwers et al. 2010).

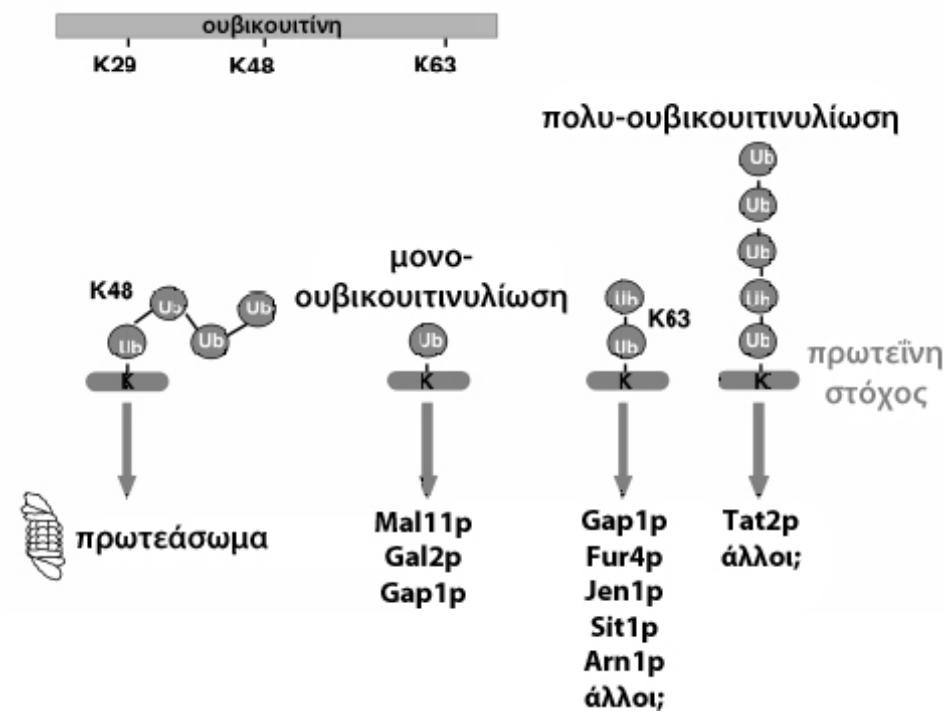
4.3.2.2. Η Rsp5p λιγάση της ουβικουιτίνης

Στον *S. cerevisiae* η ουβικουιτινυλίωση των μεταφορέων διενεργείται αποκλειστικά και μόνο από την Rsp5p, μια λιγάση της ουβικουιτίνης της κατηγορίας E3 HECT, η οποία περιέχει τρεις επικράτειες WW και μια C2 (André and Haguenauer-Tsapis, 2004, Dupre et al. 2004, Belgareh-Touze et al. 2008). Η επικράτεια HECT έχει την καταλυτική ενεργότητα, ενώ η C2 περιοχή είναι υπεύθυνη για την ασβεστιοεξαρτώμενη πρόσδεση της Rsp5p σε μεμβράνες (Plant et al. 1997, Springael et al. 1999). Απαλοιφή της C2 περιοχής έχει δειχθεί να σταθεροποιεί μεμβρανικές πρωτεΐνες στην πλασματική μεμβράνη (Wang et al. 2001, Dunn et al. 2004). Η *Drosophila melanogaster,* το ποντίκι και ο άνθρωπος διαθέτουν ένα μόνο ομόλογο της Rsp5p, την Nedd4 (Anan et al. 1998, Harvey and Kumar 1999, Rotin et al. 2000), η οποία έχει δειχθεί να έχει ανάλογο ρόλο, καταλύωντας την ουβικουιτινυλίωση μιας σειράς μεταφορέων, καναλιών και υποδοχέων (Rotin and Kumar 2009). Απαλοιφή της Rsp5p είναι θνησιγόνος και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται μια μεταλλαγή πολύ μειωμένης έκφρασής της (Hein et al. 1995). Η αλληλεπίδραση της Rsp5p με τις πρωτεΐνες-στόχους πραγματοποιείται μέσω των WW επικρατειών της, οι οποίες αναγνωρίζουν και δεσμεύουν PPXY αλληλουχίες (Belgareh-Touze et al. 2008). Η συντριπτική πλειοψηφία των μεταφορέων δεν έχουν τέτοιες PPXY αλληλουχίες και η αναγνώρισή τους από τη λιγάση της ουβικουιτίνης πραγματοποιείται μέσω πρωτεϊνών προσαρμοστών (παράγραφος 4.2.2.5).

4.3.2.3. Είδη ουβικουιτινυλίωσης

Σε κάθε πρωτεΐνη στόχο είναι δυνατό να προστεθεί ένα μόριο ουβικουιτίνης σε ένα (μόνο-ουβικουιτινυλίωση) ή περισσότερα (πολυ-μονο-ουβικουιτινυλίωση) κατάλοιπα λυσίνης (Εικόνα 4.10). Επίσης, είναι δυνατό να προστεθούν περισσότερα από ένα μόρια ουβικουιτίνης (πολύ-ουβικουιτινυλίωση) ανά κατάλοιπο λυσίνης, χρησιμοποιώντας τις λυσίνες τις ουβικουιτίνης ως γέφυρες (K6, K11, K27, K29, K33, K48, και K63) (André and Haguenauer-Tsapis 2004). Ανάλογα με τη λυσίνη η οποία χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό προκύπτουν διαφορετικές στερεοδομικές διαμορφώσεις της πολυ-ουβικουιτίνης, οι οποίες είναι διαφορετικά αναγνωρίσιμες από πρωτεΐνες που δεσμεύουν ουβικουιτίνη. Έτσι, πολυμερισμός της ουβικουιτίνης

με χρήση της K48 ως γέφυρας σχηματίζει μια πολύ σφιχτή δομή και οδηγεί τις πρωτεΐνες-στόχους για αποικοδόμηση στο 26s πρωτεάσωμα. Αντίθετα, η διακλάδωση των μορίων της ουβικουιτίνης με τη χρήση της K63 δημιουργεί αλυσίδες μορίων, και είναι σηματοδοτική για πολλές διαδικασίες, όπως η επιδιόρθωση του DNA, η προσαρμογή σε διάφορα στρες, η συμμετοχή σε διαδικασίες μεταγωγής σήματος και η αρνητική ρύθμιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Lauwers et al. 2010).



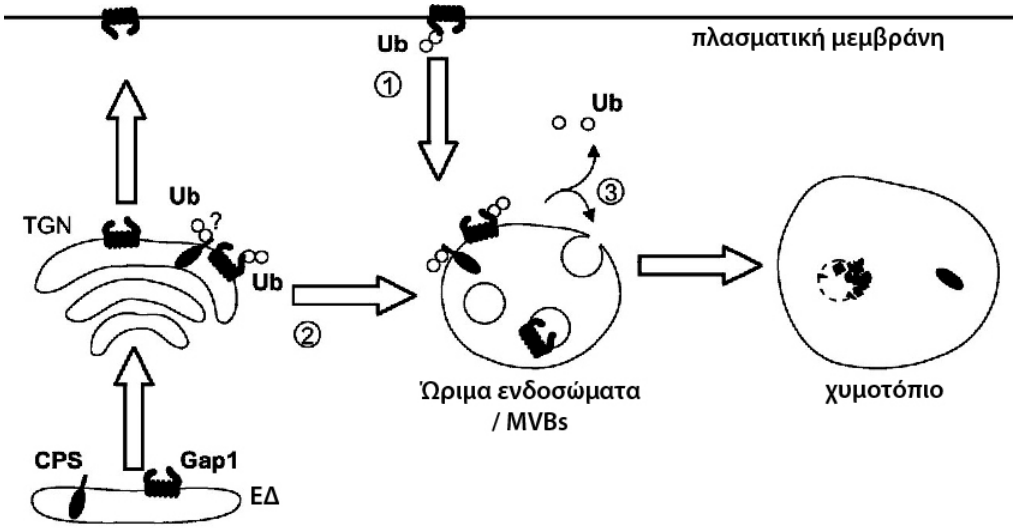
Εικόνα 4.10. Είδη ουβικουιτινυλίωσης στη ζύμη. Η ουβικουιτίνη (Ub) φέρει 11 κατάλοιπα λυσίνης, ορισμένα από τα οποία και κυρίως η K29, K48 και K63 λειτουργούν ως στόχοι για την πρόσδεση επιπλέον μορίων ουβικουιτίνης με ισοπεπτιδικό δεσμό. Τα κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών στόχων μπορούν να δεχθούν μόνο ένα μόριο ουβικουιτίνης (μονοουβικουιτινίωση) ή αλυσίδες μορίων ουβικουιτίνης που σχηματίζονται μέσω διακλάδωσης στην K48 ή την K63. Οι K48-διακλαδιζόμενες αλυσίδες ουβικουιτίνης, με μήκος τουλάχιστον τεσσάρων μορίων χρησιμοποιούνται για τη στόχευση πρωτεϊνών στο 26s πρωτεάσωμα. Ορισμένοι μεμβρανικοί μεταφορείς της ζύμης έχει δειχθεί ότι δέχονται ένα μόριο ουβικουιτίνης. Πολλοί μεταφορείς δέχονται στις λυσίνες στόχους τους 2-3 μόρια ουβικουιτίνης, συνδεόμενα με K63-διακλάδωση. Άλλοι μεταφορείς υπόκεινται σε πολυουβικουιτινίωση χωρίς να έχει προσδιοριστεί ο τύπος της σύνδεσης, και κυρίως κατά την στόχευση από το Golgi στο χυμοτόπιο (από André and Haguenauer-Tsapis 2004 με τροποποιήσεις).

Οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν τις δομές της ουβικουιτίνης φέρουν επικράτειες δέσμευσης της ουβικουιτίνης (UBDs, Ubiquitin Binding Domains). Περίπου 20 διαφορετικά UBDs έχουν χαρακτηρισθεί, συμπεριλαμβανομένων των UIMs των ESCRT. Όπως και η φωσφορυλίωση, η ουβικουιτινυλίωση είναι

αναστρέψιμη τροποποίηση. Την αποκοπή της ουβικουιτίνης πραγματοποιούν τα ένζυμα απο-ουβικουιτινυλίωσης (DUBs, De-ubiquitinylating Enzymes), τα οποία πιστεύεται πως θα μπορούσαν να έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο. Ένα από αυτά, η Doa4p, απο-ουβικουιτινυλιώνει μεμβρανικές πρωτεΐνες στα MVBs. *doa4*Δ στελέχη συσσωρεύουν ουβικουιτινυλιωμένο Fur4p στη μεμβράνη του χυμοτοπίου μετά από επαγωγή ενδοκύτωσή του, γεγονός που δείχνει πως η απο-ουβικουιτινυλίωση στα MVBs είναι σημαντική για τη διαλογή των προς αποικοδόμηση πρωτεϊνών στον αυλό του χυμοτοπίου (Dupre and Haguenauer-Tsapis 2001). Η CreB πρωτεΐνη του *A. nidulans* είναι επίσης ένζυμο απο-ουβικουιτινυλίωσης και εμπλέκεται στην αναστολή της μεταγραφής γονιδίων από προτιμώμενη πηγή άνθρακα (Lockington and Kelly 2002).

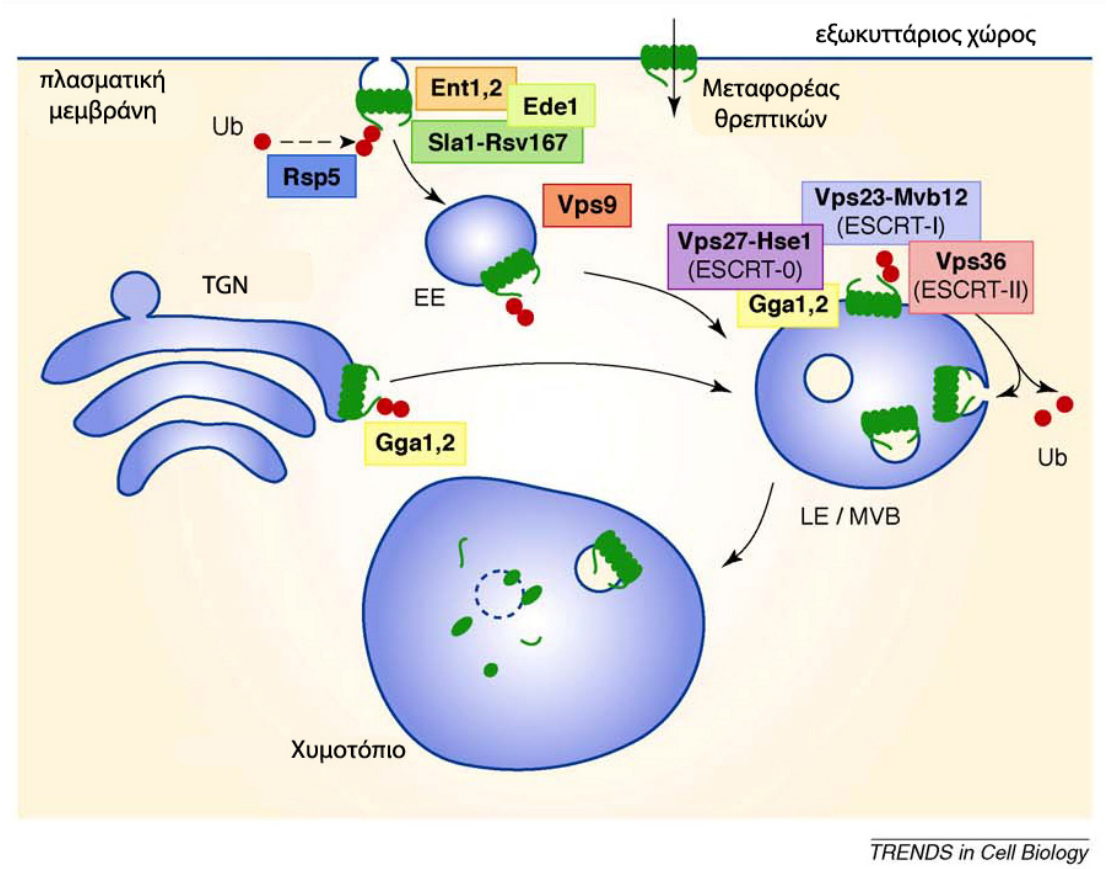
4.3.2.4. Η ουβικουιτινυλίωση ως σήμα διαλογής

Η ουβικουιτινυλίωση από την Rsp5p χρησιμεύει ως μήνυμα όχι μόνο για την εσωτερίκευση μεμβρανικών πρωτεϊνών από την πλασματική μεμβράνη, αλλά και για την ανακατεύθυνση των νεοσυντιθέμενων μορίων μεταφορέα από το TGN στα ενδοσώματα και τη διαλογή τους στα MVBs. (Katzmann et al. 2001, Soetens et al. 2001, Reggiori and Pelham 2002, André and Haguenauer-Tsapis 2004, Blondel et al. 2004, Erpapazoglou et al. 2008). Στον *S. serevisiae* έχει δειχθεί πως η πολύ-ουβικουιτινυλίωση με K63-διακλάδωση είναι απαραίτητη για την αποδοτική ενδοκύτωση των μεταφορέων Gap1p (Risinger and Kaiser 2008) και Fur4p (Blondel et al. 2004). Και οι δύο μεταφορείς ουβικουιτινυλιώνονται σε δύο κατάλοιπα λυσίνης του αμινοτελικού τους άκρου. Συγκεκριμένα για τον Gap1p, φαίνεται πως η μονο-ουβικουιτινυλίωση είναι ικανή να προκαλέσει την απομάκρυνσή του από την πλασματική μεμβράνη, αλλά στη συνέχεια ο μεταφορέας ανακυκλώνεται πίσω στη μεμβράνη. Φαίνεται λοιπόν πως ο μονο-ουβικουιτινυλιωμένος Gap1p δεν μπορεί να εισέλθει στα MVBs και ανακυκλώνεται μέσω ενδοσωμάτων (Εικόνα 4.11).



Εικόνα 4.11. Η στόχευση της Gap1p είναι εξαρτώμενη του είδους της ουβικουιτινυλίωσης. 1) Μονο-ουβικουιτινυλίωση της Gap1p προκαλεί την ενδοκύτωσή της, η οποία είναι ανεξάρτητη του Gga2. 2) Η διαλογή της Gap1p από το TGN στα ενδοσώματα εξαρτάται από τον Gga2 (αλλά όχι την GAT επικράτειά του) και την ουβικουιτινυλίωση. 3) Η διαλογή της Gap1p στα MVBs απαιτεί την πολυ-ουβικουιτινυλίωσή της με K63-διακλάδωση. Την πολύ-ουβικουιτίνη αναγνωρίζει η GAT επικράτεια του Gga2 (δεν δείχνεται) (από Lauwers et al. 2009 με τροποποιήσεις).

Πράγματι, έχει δειχθεί για την Gap1p, και την χυμοτοπιακή πρωτεΐνη CPS (καρβοξυπεπτιδάση S) πως η ουβικουιτινυλίωση με K63-διακλάδωση είναι απαραίτητη για την ποσοτική στόχευση στα MVBs (Lauwers et al. 2009) (Εικόνα 4.12). Επιπλέον, ουβιουιτινυλίωση με K63-διακλάδωση είναι απαραίτητη για τη στόχευση στο χυμοτόπιο των Jen1p (Paiva et al. 2009) και Sit1p (Erpapazoglou et al. 2008) μεταφορέων γαλακτικού και σιδηροφόρων, αντίστοιχα. Επίσης έχει δειχθεί πως τα UIMs του ESCRT 0 αναγνωρίζουν με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια πολυμερή ουβικουιτίνης με K63-διακλάδωση σε σχέση με τη μονομερή ουβικουιτίνη (Shields et al. 2009). Η ενδοκύτωση ουβικουιτινυλιωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών από την πλασματική μεμβράνη στον *S. servisiae* πιστεύεται πως πραγματοποιείται μέσω αναγνώρισης από τους προσαρμοστές που ομοιάζουν σε επσίνες (Eps15-like), όπως οι Ent1p, Ent2p και Ede1p (Dores et al. 2010), οι οποίοι τις αναγνωρίζουν μέσω UBDs και κατόπιν προσελκύουν την κλαθρίνη (Εικόνα 4.12). Μάλιστα η πολυμερής τους μορφή στα κυστίδια που συγκροτούνται θεωρείται πως έχει μεγαλύτερη συγγένεια για πολύ-ουβικουιτίνη με K63-διακλάδωση (Sato et al. 2009).



Εικόνα 4.12. Διαγραμματική απεικόνιση των παραγόντων που δεσμέυουν ουβικουιτίνη (Ub) και συμμετέχουν στη στόχευση στο χυμοτόπιο των μεταφορέων του *S. serevisiae*. Οι μεταφορείς ουβικουιτινυλιώντονται στην πλασματική μεμβράνη από την Rsp5p. Η ουβικουιτίνη αναγνωρίζεται από υποδοχείς που τη δεσμεύουν (Επσίνες: Ent1, Ent2, Ede1), οι οποίες προσελκύουν τους παράγοντες δέσμευσης της ακτίνης (Sla1-Rvs167) και αποκόπτουν κυστίδια προς τα πρώιμα ενδοσώματα (EE). Η ουβικουιτίνη εκεί αναγνωρίζεται από την Vps9p, η οποία στρατολογεί την Rab5/Vps21p και πρωωθείται η ωρίμανση των EE σε ώριμα ενδοσώματα (LE). Οι μεταφορείς είναι δυνατό να φτάσουν στα LE μετά από ουβικουιτινυλίωση από την Rsp5p στο TGN, μέσω κυστιδίων που περιέχουν καλύμματα Gga1/Gga2, οι οποίοι αναγνωρίζουν την ουβικουιτίνη. Στα LE τα σύμπλκοκα ESCRT αναγνωρίζουν (μέσω της Vps27p) αλυσίδες πολύ-ουβικουιτίνης με K63-διακλάδωση και προωθούν την προς τα έσω εκβλάστηση των LE σε υποδιαμερίσματα των MVBs, με ταυτόχρομη αφαίρεση της ουβικουιτίνης από την Doa4p (Δεν παρουσιάζεται στην Εικόνα) (από Lauwers et al. 2010 με τροποποιήσεις).

Η ουβικουιτινυλίωση με K63 διακλάδωση χρειάζεται και για τη στόχευση των Fur4p (Bilodeau et al. 2004), Sit1 (Erpapazoglou et al. 2008), Gap1p (Risinger and

Kaiser 2008) και Arn1p (Kim et al. 2007) στο χυμοτόπιο μέσω ενδοσωμάτων και MVBs από το TGN. Οι προσαρμοστές της κλαθρίνης σε αυτή την περίπτωση είναι οι Gga1p και Gga2p, οι οποίοι αναγνωρίζουν ουβικουιτινυλιωμένες πρωτεΐνες στο TGN και τα ενδοσώματα. Ενδιαφέρον είναι πως ο Gga2p φαίνεται να είναι απαραίτητος για την έξοδο από το TGN των Gap1p και Arn1p με τρόπο ανεξάρτητο της ουβικουιτίνης, ενώ εξαρτώμενη της ουβικουιτίνης είναι η διαλογή τους στα MVBs από τον Gga2p. Πράγματι, φαίνεται πως μόνο η GAT επικράτεια του Gga2p, η οποία δεσμεύει ουβικουιτίνη, είναι απαραίτητη για την στόχευση στα MVBs από τα ενδοσώματα (Risinger and Kaiser 2008). Η επικράτεια αυτή έχει δειχθεί να αναγνωρίζει με μεγαλύτερη συγγένεια K63-διακλαδώσεις πολυουβικουιτίνης (Deng et al. 2009). Από τα παραπάνω φαίνεται πως η εξοδος από το TGN προς τα ενδοσώματα και η στόχευση στα MVBs, παρόλο που πραγματοποιούνται με κυστίδια που φέρουν ίδιου τύπου καλύμματα, αποτελούν διακριτά στάδια στην στόχευση των μεταφορέων, με την ουβικουιτίνη να είναι η ειδοποιός διαφορά.

4.3.2.5. Οι πρωτεΐνες-προσαρμοστές της Rsp5p

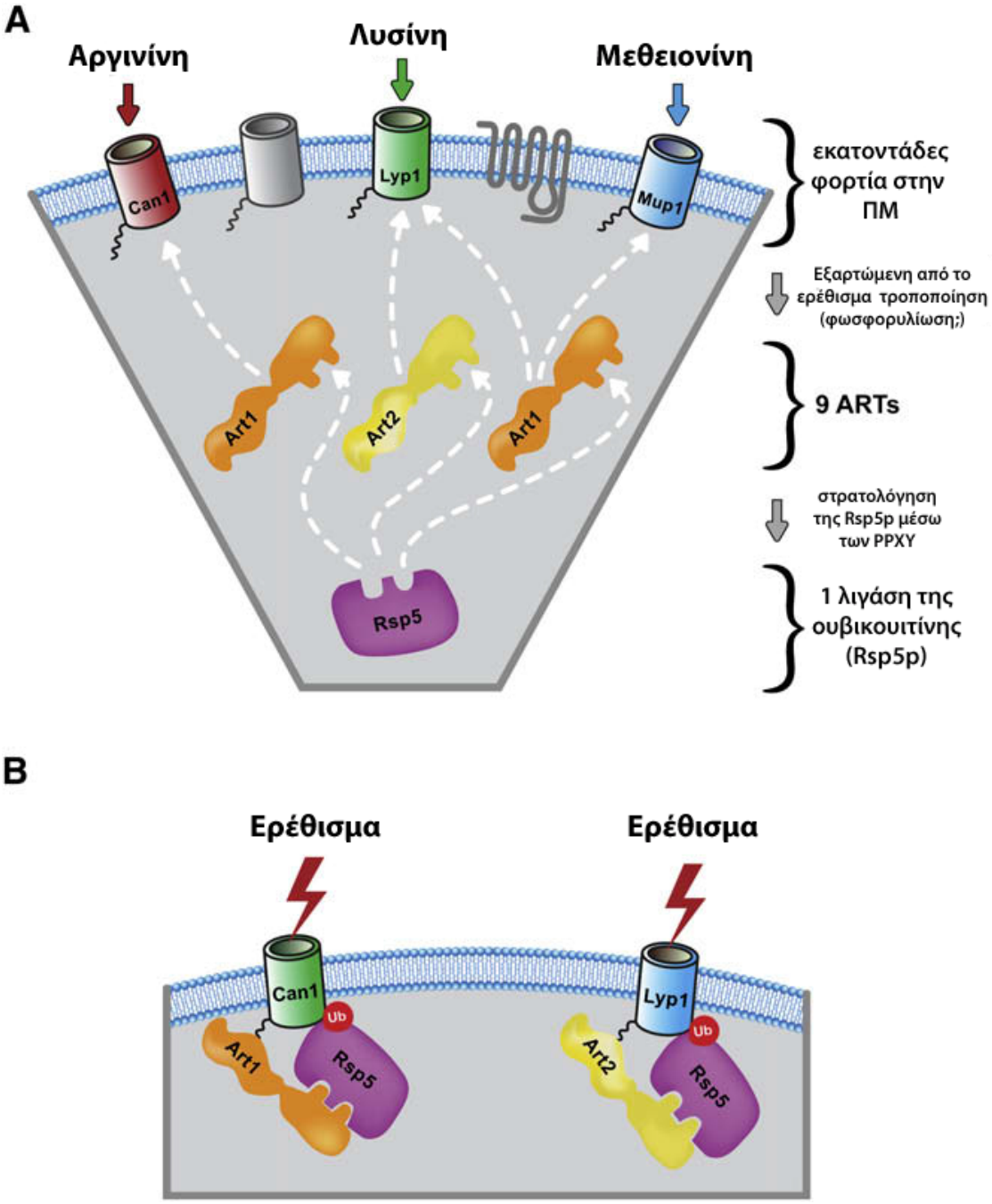
Οι πρωτεΐνες προσαρμοστές ανήκουν σε πολλές διαφορετικές οικογένειες και κύριο γνώρισμά τους είναι η ύπαρξη των PPXY αλληλουχιών με τις οποίες αναγνωρίζονται από την Rsp5p. Μέχρι πρόσφατα πολύ λίγοι προσαρμοστές ήταν χαρακτηρισμένοι, ενώ η δράση τους περιοριζόταν σε συγκεκριμένους μεταφορείς, ακόμη και για συγκεκριμένα μόνο μονοπάτια μεταφοράς (Πίνακας 4.2), κυρίως ενδοκυτταρικά. Ευρείας λειτουργικότητας προσαρμοστές με τόπο λειτουργίας την πλασμαστική μεμβράνη βρέθηκαν να είναι οι πρωτεΐνες-ομοιάζουσες σε αρρεστίνες (ARTs, Arrestin Related Trafficking adaptors) του *S. serevisiae* (Lin et al. 2008). 9 ARTs βρίσκονται στο γονιδίωμα του *S. serevisiae*, διαθέτουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο PPXY αλληλουχίες υπεύθυνες για την αλληλεπίδρασή τους με την Rsp5p και στο αμινοτελικό μια αλληλουχία που θα μπορούσε να έχει δομή αρρεστίνης, η οποία είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους. Η Art1p έχει δειχθεί να είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωση από υπόστρωμα των μεταφορέων αργινίνης Can1p και λυσίνης Lys1p (Lin et al. 2008). Η Art1p αλλάζει τοπολογία από το Golgi και το κυτταρόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη σε συνθήκες που επάγουν την ενδοκύτωση των ανωτέρω μεταφορέων, και η αλλαγή αυτή είναι εξαρτώμενη της

ουβικουιτινυλίωσής της από την Rsp5p. Για την ενδοκύτωση του Lys1p από στρες (κυκλοεξιμίδιο) είναι απαραίτητη η Art2p και όχι η Art1p. Η Art2 αλληλεπιδρά με στοιχεία στο αμινοτελικό άκρο της Lys1p και λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ της Lys1p και της Rsp5p (Εικόνα 4.13).

Πίνακας 4.2. Οι προσαρμοστές της ενδοκύτωσης μεταφορέων του *S. serevisiae* σε διάφορες συνθήκες (από Lauwers et al. 2010 με τροποποιήσεις).

Μεταφορέας (υπόστρωμα)	**Συνθήκες αποικοδόμησης**	**Προσαρμοστές**
Can1p (αργινίνη)	Κυκλοεξιμίδιο	Art1[a]
Ctr1p (χαλκός)	Περίσσεια υποστρώματος	Bul1[a], Bul2[a]
Fur4p (ουρακίλη)	Κυκλοεξιμίδιο	Bul1[a], Bul2[a], Art1[a], Art2[a], Art8[a], Bsd2[b], Ear1[b], Ssh4[b],
	Περίσσεια υποστρώματος	Bul1[a], Bul2[a], Art1[a], Art2[a], Art8[a], Bsd2[b]
Gap1p (αμινοξέα)	Αμμωνιακά ιόντα ή Περίσσεια υποστρώματος	Bul1[a,b], Bul2[a,b], Ear1[b], Ssh4[b], Art3[b], Art6[b]
Hxt6p (εξόζες)	Κυκλοεξιμίδιο	Art8[a]
	Περίσσεια υποστρώματος	Art4[a]
Itr1p (ινοσιτόλη)	Περίσσεια υποστρώματος	Art5[a], Bsd2[b]
Lyp1p (λυσίνη)	Κυκλοεξιμίδιο	Art2[a]
	Περίσσεια υποστρώματος	Art1[a]
Mup1p (μεθιονίνη)	Περίσσεια υποστρώματος	Art1[a]
Sit1p (φερροξιαμίνες)	Απουσία υποστρώματος	Ssh4[b], Ear1[b], Tre1[b], Tre2[b]
Smf1p (ιόντα μαγγανίου)	Περίσσεια υποστρώματος	Bsd2[b], Tre1[b], Tre2[b]
	Διάφορα στρες	Bsd2[b] Art2[a], Art8[a], Bsd2[b], Tre1[b], Tre2[b] Ear1[b], Ssh4[b]
Tat2p (τρυποτοφάνη)	Κυκλοεξιμίδιο	Bul1[a,b], Bul2[a,b], Art2[a], Art8[a], Bsd2[b]
	Περίσσεια υποστρώματος	Bul1[a,b], Bul2[a,b], Art1[a], Art2[a], Art8[a], Bsd2[b]
Dip5p (γλουταμικό/ασπαρτικό)	Περίσσεια υποστρώματος	Art3[a], Art6[a]

Ο προσαρμοστής μπορεί να δρα στην πλασματική μεμβράνη (a) ή το TGN και τα ενδοσώματα (b).



Εικόνα 4.13. Μοντέλο λειτουργίας των ART ως γενικών προσαρμοστών μεταξύ της Rsp5p και των μεταφορέων στόχων. Α) Πολλοί μεταφορείς ενδοκυτώνονται μέσω ουβικουιτινυλίωσης αλλά δεν διαθέτουν τα απαραίτητα PPXY στοιχεία για να αλληλεπιδράσουν άμεσα με την Rsp5p. Οι ARTs συμβάλλουν στην εξειδικευμένη αναγνώριση των μεταφορέων αυτών από την Rsp5p. Β) Μόλις υπάρξει ένα ειδικό για κάποιο μεταφορέα σήμα ενδοκύτωσης, συγκεκριμένη(ες) ART τον αναγνωρίζουν (π.χ η Art2p αναγνωρίζει τον Lys1p μέσω του αμινοτελικού του άκρου παρουσία περίσσειας υποστρώματος) και προσελκύουν την Rsp5p, η οποία τον ουβικουιτινυλιώνει (από Lin et al. 2008 με τροποποιήσεις).

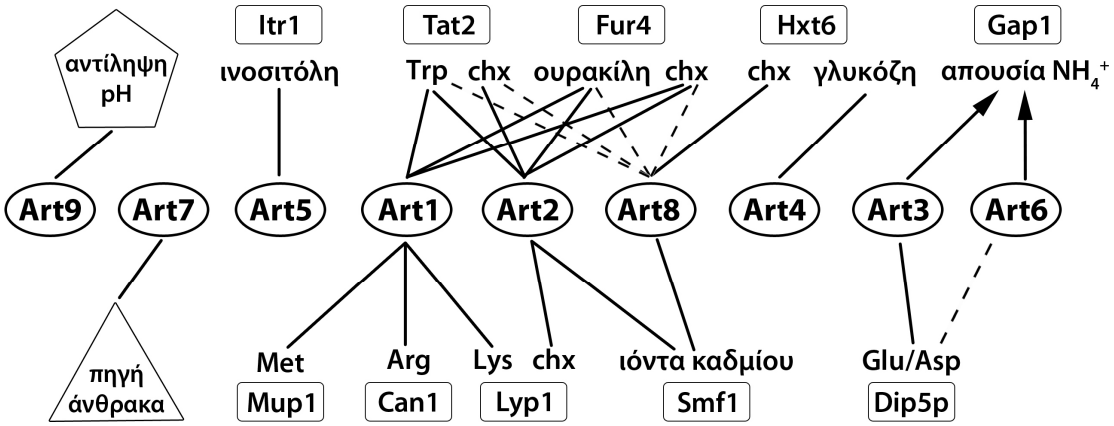
Ο ρόλος των υπόλοιπων ARTs διερευνήθηκε σε σχέση με την ενδοκύτωση των μεταφορέων ινοσιτόλης Itr1p, γλυκόζης Hxt6p, ουρακίλης Fur4p και τρυποτοφάνης Tat2p (Nikko and Pelham 2009), καθώς και για το μεταφορέα μετάλλων Smf1p (Nikko et al. 2008). Από την ανάλυση αυτή φάνηκε πως οι ARTs σχετίζονται περισσότερο με το είδος του σήματος ενδοκύτωσης (π.χ υπόστρωμα, στρες) και λιγότερο με συγκεκριμένους μεταφορείς (Εικόνα 4.14). Πολύ πρόσφατα δείχθηκε πως η Art3p/Aly2p και λιγότερο η Art6p/Aly1p είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωση του Dip5p μεταφορέα δικαρβοξυλικών αμινοξέων παρουσία υποστρώματος (Hatakeyama et al. 2010). Ο ρόλος των συγκεκριμένων ARTs μελετήθηκε και σε σχέση με τη στόχευση και διαλογή του Gap1p μεταφορέα (O'Donnell et al. 2010), όπου απρόσμενα φάνηκε πως δεν ελέγχουν την ενδοκύτωση του μεταφορέα, αλλά την ανακύκλωσή του από τα ενδοσώματα στην πλασματική μεμμβράνη, πιθανώς και μέσω του TGN. Πιο συγκεκριμένα, δείχθηκε πως σε συνθήκες έλλειψης προτιμώμενης πηγής αζώτου, οι δύο αυτές ARTs προωθούν την ανακύκλωση του μεταφορέα από τα ενδοσώματα προς την πλασματική μεβράνη, ενώ είναι πολύ πιθανό η αναδιανομή αυτή να γίνεται με ανακύκλωση μέσω του TGN. Ειδικά για την Art3p/Aly2p, η αναδιανομή είναι εξαρτώμενη της Npr1p (Nitrogen permease reactivator) κινάσης, η οποία ενεργοποιείται κατά την απουσία προτιμώμενης πηγής αζώτου, απενεργοποιείται παρουσία της μέσω του TORC μονοπατιού και ελέγχει την ενεργότητα πολλών μεταφορέων που σχετίζονται με πηγές αζώτου, με άγνωστο μέχρι πρότινος τρόπο (Schmidt et al. 1998). Η Art3/ Aly2 δείχθηκε να φωσφορυλιώνεται άμεσα από την Npr1p, ενώ σε ενίσχυση του ρόλου των δύο αυτών ARTs στην ανακύκλωση και όχι στην ενδοκύτωση της Gap1p, δείχθηκε πως αλληλεπιδρούν άμεσα με υπομονάδα του AP1 (O'Donnell et al. 2010).

Δύο ARTs έχουν χαρακτηρισθεί στον *A. nidulans*, οι PalF και CreD. Η CreD απομονώθηκε ως κατασταλτική μεταλλαγή της απώλειας λειτουργίας του CreB ενζύμου απο-ουβικουιτινυλίωσης, το οποίο σχετίζεται με τη μεταγραφική αναστολή από προτιμώμενη πηγή άνθρακα, και έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά φυσικά με την ομόλογη της Rsp5p του *A. nidulans*, HulA (Boase and Kelly 2004). Η όλη αλληλεπίδραση αυτή δείχνει πως η μεταγωγή σήματος της ύπαρξης προτιμώμενης πηγής άνθρακα πιθανώς σχετίζεται με την αποικοδόμηση μεμβρανικής πρωτεΐνης στο χυμοτόπιο μέσω των MVBs. Η PalF (παράγραφος 1.4.3.2, Εικόνα 1.9) έχει δειχθεί πως χρειάζεται να ουβικουιτινυλιωθεί για να λειτουργήσει, αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης ανιχνευτή του pH, palH, ενώ δεν ενδοκυτώνεται

μαζί με αυτή αλλά μόνη της, για να επιτελέσει τη μεταγωγή σήματος της αλλαγής του εξωτερικού pH (Hervas-Aguilar et al. 2010a). Αντιθέτως, η PalF δείχθηκε να προωθεί τη μεμβρανική τοπολογία της PalH, γεγονός που ομοιάζει με το ρόλο των Art6/Aly1 και Art3/Aly2 στη διακίνηση της Gap1p. Έκφραση της PalF συζευγμένης με ουβικουιτίνη (PalF-Ub) σε Δ*palH* γενετικό υπόβαθρο οδηγεί σε ικανοποιητική μεταγραφή των γονιδίων που σχετίζονται με το αλκαλικό pH. Το γεγονός αυτό δείχνει πως, απουσία του ανιχνευτή της αλλαγής του pH (PalH), η ουβικουιτινυλίωση της PalF είναι αρκετή για να λειτουργήσει το μονοπάτι μεταγωγής σήματος (Hervas-Aguilar et al. 2010a). Επιπλέον, η PalF-Ub είναι ικανή να επάγει την στόχευση της PalC σε στικτές πριοχές της πλασμαστικής μεμβράνης, ακόμη και σε όξινο pH (Hervas-Aguilar et al. 2010a). Η PalC πρωτεΐνη στοχεύεται σε τέτοιες στικτές δομές μόνο σε αλκαλικό pH, ενώ έχει δειχθεί να δεσμέυεται άμεσα στην AnVps32 πρωτεΐνη των ESCRT (Galindo et al. 2007). Η διαφαινόμενη ομοιότητα των δύο συστημάτων ρύθμισης είναι εντυπωσιακή, δείχνοντας πως η ουβικουιτινυλίωση και οι ARTs εμπλέκονται και σε άλλες διαδικασίες, πέραν της στόχευσης μεταφορέων. Άλλωστε η PalF μοιάζει περισσότερο με την Art9p του *S. serevisiae* (Nikko et al. 2008), ενώ η CreD με την Art7p/Rog3p, απαλοιφή της οποίας προκαλεί υπερευαισθησία σε διάφορους παράγοντες (Andoh et al. 2002), ARTs που δεν έχουν μέχρι στιγμής δειχθεί να σχετίζονται με τη στόχευση μεταφορέων.

Πολλοί μεταφορείς έχουν δειχθεί να ενδοκυτώνονται από περισσότερα του ενός σήματα και να ακολουθούν πολλά μονοπάτια διαλογής. Η παρουσία πρωτεϊνών-προσαρμοστών ειδικών για την αρνητική ρύθμιση υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να εξηγήσει τη ρύθμιση των φαινομένων αυτών. Για παράδειγμα, η ενδοκύτωση του μεταφορέα Fur4p από στρες προϋποθέτει την φωσφορυλίωσή του, ενώ από το υπόστρωμά του ουρακίλη φαίνεται να χρειάζεται και τη δέσμευση του υποστρώματος στον μεταφορέα (Blondel et al. 2004). Επειδή αυξημένες κυτταροπλασματικές συγκεντρώσεις ουρακίλης επίσης προκαλούν στόχευση του Fur4p στο χυμοτόπιο μέσω των MVBs, χωρίς δηλαδή ο μεταφορέας να φτάσει στην πλασματική μεμβράνη, προτάθηκε πως η ουρακίλη πρέπει να δεσμεύεται και ενδοκυτταρικά στο μεταφορέα (Blondel et al. 2004). Αντίστοιχα, ο μεταφορέας μετάλλων Smf1p στοχεύεται στο χυμοτόπιο προς αποικοδόμηση παρουσία των υποστρωμάτων του (Liu and Culotta 1999), μια διαδικασία που έχει δειχθεί να είναι εξαρτώμενη του Bsd2p προσαρμοστή και της λειτουργικότητας του Smf1p (Stimpson et al. 2006, Sullivan et al. 2007). Οι συγγραφείς πρότειναν πως η παρατηρούμενη

ανάγκη λειτουργικότητας του μεταφορέα πρέπει να σχετίζεται με κάποια δομική διαμόρφωση του λειτουργικού μεταφορέα η οποία αναγνωρίζεται από τον Bsd2.



Εικόνα 4.14. Οι ρόλοι των ARTs του *S. serevisiae*. Διακρίνονται οι συνθήκες με τις οποίες αλληλεπιδρούν με κάθες μεταφορέα. Οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν κύριο, ενώ οι διακεκομμένες δευτερεύοντα ρόλο στην αναγνώριση κάθε μεταφορέα. Τα βέλη υποδεικνύουν το θετικό ρυθμιστικό ρόλο των Art3 και Art6 στη στόχευση της Gap1p. Η Art9p δείχνεται να σχετίζεται με την αντίληψη του pH επειδή είναι η ομόλογη του PalF, ενώ η Art9p να εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση από προτιμώμενη πηγή άνθρακα επειδή είναι η πιο όμοια με την CreD. chx: κυκλοεξιμίδιο (από Nikko and Pelham 2009 με προσθήκες και τροποποιήσεις).

Για τις περιπτώσεις αυτές υπάρχει το εξής παράδοξο: οι μεταφορείς που βρίσκονται σε εσωτερικά σημεία του κυττάρου εξακολουθούν να έχουν εκτεθειμένη στο κυτταρόπλασμα την κυτταροπλασματική τους πλευρά, με την εξωκυτταρική να βρίσκεται στο εσωτερικό του εκάστοτε ενδομεμβρανικού διαμερίσματος. Η αναγνώριση του υποστρώματος από τους μεταφορείς γίνεται μόνο από την εξωκυτταρική πλευρά, λόγω της διαμόρφωσής τους, ή τουλάχιστον η αναγνώριση από την ενδοκυτταρική πλευρά γίνεται με πολύ χαμηλότερη συγγένεια. Το γεγονός αυτό προτείνει πως είτε αυτή η πιθανή χαμηλής συγγένειας αναγνώριση είναι αρκετή για τη στόχευση των μεταφορέων στο χυμοτόπιο χωρίς τη διαμεσολάβηση της πλασματικής μεμβράνης, είτε στη διαλογή αυτή εμπλέκεται κάποιας μορφής ρυθμιστικός μηχανισμός ο οποίος αντιλαμβάνεται το υπόστρωμα ανεξαρτήτως του μεταφορέα.

Ένας επιπλέον τρόπος ρύθμισης της διαθεσιμότητας των μεταφορέων στη λιγάση της ουβικουιτίνης είναι η κατάσταση φωσφορυλίωσής τους, που μπορεί να προστατεύει ή να αποσταθεροποιεί την πρωτεΐνη. Η φωσφορυλίωση αρκετών μεταφορέων έχει δειχθεί να προηγείται της ουβικουιτινυλίωσής τους και πιστεύεται πως αλλάζει τη δομή αλληλουχιών αναγνώρισης από μόρια-προσαρμοστές της λιγάσης της ουβικουιτίνης. Παράδειγμα οι μεταφορείς φωσφορίκων Pho84p και γαλακτικού Jen1p, των οποίων η ουβικουιτινυλίωση είναι εξαρτώμενη της φωσφορυλίωσής τους από τις κινάσες PKA (Protein Kinase A) και CKI (Casein Kinase I) αντίστοιχα (Lundh et al. 2009, Paiva et al. 2009).

Τα συνολικά δεδομένα που παρατέθηκαν υποστηρίζουν πως τελικά η ρύθμιση της ουβικουιτινυλίωσης των μεταφορέων πρέπει να γίνεται στο επίπεδο αναγνώρισης του μεταφορέα από την πρωτεΐνη-προσαρμοστή. Είναι, άλλωστε, χαρακτηριστικό πως μεταφορά των PPXY στοιχείων της Art1 στον Can1p μεταφορέα προκαλεί την συνεχόμενη στόχευση και αποικοδόμησή του στο χυμοτόπιο (Lin et al. 2008). Από όλα τα παραπάνω είναι προφανές πως την, για καιρό αινιγματική, αναγκαία εξειδίκευση για τη διαδικασία της, ρυθμιζόμενης από διάφορα σήματα, διακίνησης και ενδοκύτωσης μεταφορέων μέσω ουβικουιτινυλίωσης μπορούν να προσφέρουν η ποικιλία, η διαφαινόμενη οικουμενικότητα και ο πολλές φορές αλληλοεπικαλυπτόμενος ρόλος των ARTs. Λόγω των πολλών, πολλές φορές αλληλεπικαλυπτόμενων διαφαινόμενων ρόλων των ARTs είναι πολύ σημαντική η προεσεκτική και συστηματική τους μελέτη στη ρύθμιση της έκφρασης των μεμβρανικών πρωτεϊνών.

4.3.3. Μεμβρανικές μικροδομές ειδικής λιπιδικής σύστασης

Τελευταία έχουν δειχθεί περιπτώσεις μεμβρανικών πρωτεϊνών οι οποίες οργανώνονται σε μη επικαλυπτόμενα υποδιαμερίσματα της πλασματικής μεμβράνης (Membrane Compartments, MCs), τα οποία διαθέτουν διαφορετική λιπιδική σύσταση. Η κατανομή των πρωτεϊνών αυτών στα MCs φαίνεται να επηρεάζει τη διαθεσιμότητά τους στον ενδοκυτωτικό μηχανισμό (Grossmann et al. 2008). Στον *S. serevisiae* έχει δειχθεί πως στο πρώτο (MC of Can1p, MCC) βρίσκονται οι μεταφορείς αργινίνης Can1p, τρυπτοφάνης Tat1p και ουρακίλης Fur4p, ενώ στο δεύτερο (MC of Pma1p, MCP) η ATPάση της πλασματικής μεμβράνης Pma1p

(Malinska et al. 2004, Grossmann et al. 2006, Grossmann et al. 2007). Το MCC έχει δειχθεί να έχει διαφορετική λιπιδική σύσταση, πλούσια σε εργοστερόλη, όπως φαίνεται με μικροσκοπία επιφθορισμού και χρώση με *filipin*, μια φθορίζουσα ουσία που προσδένεται στην εργοστερόλη (Malinska et al. 2003, Grossmann et al. 2007), αλλά και με βιοχημικές διαδικασίες εκχύλισης των μεμβρανικών πρωτεϊνών του MCC από τα λιπίδια της μεμβράνης χρησιμοποιώντας μη-ιονικά τασιενεργά (απορρυπαντικά), κυρίως Triton-X-100 (Grossmann et al. 2007). Το MCC έχει συσχετισθεί με τις λιπιδικές σχεδίες των θηλαστικών, όπου η χοληστερόλη αντικαθιστά την εργοστερόλη, και διακρίνεται με μικροσκοπία επιφθορισμού των μεταφορέων που περιέχει ως κηλίδα περίπου 300 nm (Grossmann et al. 2007). Ο βιολογικός ρόλος που του έχει αποδοθεί είναι η προστασία των περιεχόμενων μεμβρανικών πρωτεϊνών από την ενδοκύτωση, αλλά και στη σωστή στόχευση πρωτεϊνών των θηλαστικών σε πολικές μεμβράνες. Άλλες μελέτες συσχετίζουν το MCC με μεγάλα μεμβρανικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα, τα εισοσώματα (Walther et al. 2006, Vangelatos et al. 2010). Οι απόψεις για τη λειτουργία των εισοσωμάτων διίστανται, αφού αρχικά είχαν χαρακτηρισθεί ως αρχικά σημεία ενδοκύτωσης πρωτεϊνών και λιπιδίων (Walther et al. 2006), ενώ αργότερα τους αποδόθηκε ρόλος ταυτόσημος με το MCC (Grossmann et al. 2008). Η διαφωνία αυτή πιθανώς εξηγείται από τη χρήση διαφορετικών μεμβρανικών πρωτεϊνών για τη μελέτη της λειτουργίας των MCC / εισοσωμάτων. Πιθανώς ο ρόλος τους να είναι διαφορετικός για κάθε πρωτεΐνη ανάλογα με τις αναπτυξιακές, περιβαλλοντικές και κυτταρικές συνθήκες. Τα δεδομένα από την μελέτη των εισοσωμικών πρωτεϊνών του *A. nidulans* (Vangelatos et al. 2010) δεν υποστηρίζουν τη δράση τους ως σημείων ενδοκύτωσης, μιας και απαλοιφή τους δεν επηρεάζει την ενδοκύτωση των μεμβρανών (όπως φαίνεται με τη χρήση της χρωστικής FM4-64) ή των AgtA και PrnB μεταφορέων. Επιπλέον, είναι γνωστό πως ενώ η ενδοκύτωση στον *A. nidulans* είναι σχεδόν απαραίτητη, αφού απαλοιφή γονιδίων που σχετίζονται με αυτή είναι σχεδόν θνησιγόνος (Rodriguez-Galan et al. 2009, Vangelatos et al. 2010), ενώ η απαλοιφή των εισοσωμικών πρωτεϊνών του *A. nidulans* δεν προκαλεί κάποιον ιδιαίτερο φαινότυπο (Vangelatos et al. 2010).

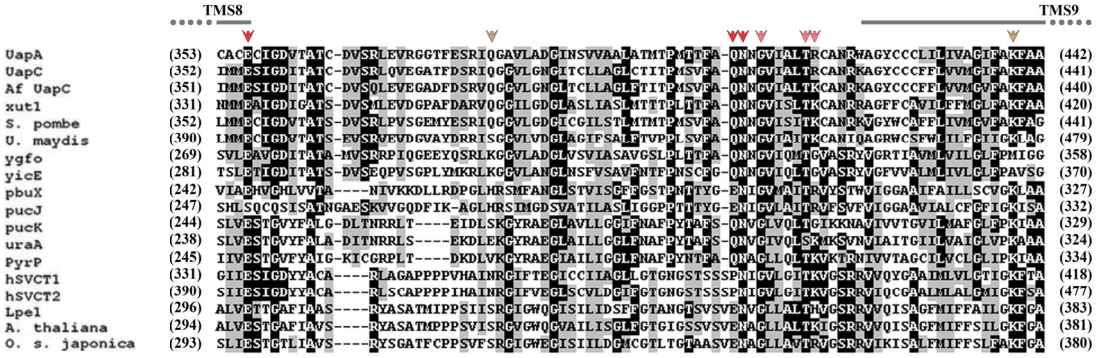
5. Οριοθέτηση στόχων της Διδακτορικής Διατριβής

5. Οριοθέτηση στόχων της Διδακτορικής Διατριβής

5.1. Μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας του UapA

Στα πλαίσια της περαιτέρω ανάλυσης των σχέσεων δομής-λειτουργίας των NAT μεταφορέων, έγινε προσπάθεια να μελετηθεί ο ρόλος τριών συντηρημένων πολικών αμινοξικών καταλοίπων του UapA. Η μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας των NAT σκόπευε στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας, του τρόπου δέσμευσης των υποστρωμάτων, και των αιτιών της πλαστικότητας εξειδίκευσης την οποία επιδεικνύουν τα μέλη της οικογένειας. Πολικά αμινοξικά κατάλοιπα έχουν δειχθεί να συμμετέχουν στη δέσμευση υποστρώματος ή/και κατιόντος αλλά και να σχετίζονται με κινήσεις του μορίου κατά τον μηχανισμό διακίνησης των υποστρωμάτων διάφορων μεταφορέων. Όπως έχει αναφερθεί, η αμφιπαθικής φύσεως θηλιά μεταξύ των TMS8 και 9 περιέχει σημαντικά στοιχεία για την εξειδίκευση, τη δέσμευση υποστρώματος αλλά και τον μηχανισμό λειτουργίας του μεταφορέα (Koukaki et al, 2005, Goudela et al, 2005). Μάλιστα η Gln408 κατά πάσα πιθανότητα συμμετέχει στη δέσμευση του υποστρώματος μέσω αλληλεπίδρασης με τη N9 θέση του πουρινικού δακτυλίου της ξανθίνης. Δύο επιπλέον δεσμοί υδρογόνου φαίνεται πως εμπλέκονται στον τρόπο αναγνώρισης και δέσμευσης της ξανθίνης, ένας ισχυρός μέσω της θέσης N1-H και ένας ασθενής μέσω της O2 (Εικόνα 3.8). Ένα αμινοξικό κατάλοιπο το οποίο θα έχει το ρόλο δέκτη πρωτονίου, όπως γλουταμικό ή ασπαρτικό, θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με τη θέση N1-H, ενώ ένα αμινοξύ-δότης πρωτονίου, όπως λυσίνη ή αργινίνη, θα μπορούσε να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το μόριο του οξυγόνου της θέσης 2 του πουρινικού δακτυλίου. Στην ευρύτερη περιοχή της θηλιάς μεταξύ TMS8 και 9, αλλά και στο TMS 9, και επιπλέον των ήδη μελετημένων αμινοξικών καταλοίπων, υπάρχει ένα απόλυτα συντηρημένο στην NAT οικογένεια γλουταμικό στη θέση 356 (Εικόνα 5.1) και μια απόλυτα συντηρημένη στα ευκαρυωτικά λυσίνη στη θέση 439 (Εικόνα 5.1). Επιπλέον, στη θέση 382 (Εικόνα 5.1) του UapA μεταφορέα υπάρχει μια γλουταμίνη με συντηρημένο πολικό χαρακτήρα στην οικογένεια, που όμως εμφανίζει ποικιλομορφία. Επειδή βρίσκεται στην περιοχή που έχει δειχθεί να είναι υπεύθυνη για τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ UapA και UapC (Diallinas et al, 1998), θα

μπορούσε να είναι ένα από τα αμινοξέα με ρόλο στον καθορισμό της εξειδίκευσης των NAT.



Εικόνα 5.1. Στοίχιση αλληλουχιών του UapA και ομόλογών του πρωτεϊνών. Επισημαίνονται τα μέχρις στιγμής μελετημένα αμινοξέα που αποτελούν τη συναινετική αλληλουχία των NAT, αλλά και τα προς μελέτη αμινοξέα.

Για τη διερεύνηση του ρόλου των παραπάνω αμινοξέων στη λειτουργία του μεταφορέα σχεδιάστηκε η κατασκευή των εξής στοχευμένων υποκαταστάσεων:

1. α) Glu356Asp, β) Glu356Gln
2. α) Lys439Arg β) Lys439Glu γ) Lys439Gln δ) Lys439Ala.
3. α) Gln382Glu β) Gln382Lys γ) Gln382Ser

Η λογική σχεδιασμού των συγκεκριμένων υποκαταστάσεων είναι η εξής:

Το Glu356 προβλέπεται να βρίσκεται αμέσως μετά το TMS8, και λόγω του αρνητικά φορτισμένου του χαρακτήρα και της πρωτονιόφιλής του φύσης σε ουδέτερες τιμές pH, θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με την N1-H θέση του πουρινικού δακτυλίου των υποστρωμάτων, ή να συμμετέχει στον μηχανισμό δέσμευσης και μεταφοράς του πρωτονίου που είναι απαραίτητο για την συμμεταφορά. Εναλλακτικά θα μπορούσε να σχηματίζει δεσμό ή γέφυρα άλατος με ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ της πρωτεΐνης. Η επαφή αυτή οφείλει να είναι πολύ σημαντική για την αρτιότητα ή/και τον μηχανισμό λειτουργίας του μεταφορέα, μιας και το αμινοξικό αυτό κατάλοιπο είναι απόλυτα συντηρημένο στην οικογένεια. Πραγματοποιήθηκαν δύο στοχευόμενες αμινοξικές υποκαταστάσεις στο ισο-λειτουργικό του αμινοξύ ασπαρτικό, το οποίο όμως έχει μικρότερου μήκους πλευρική ομάδα, και στο ισο-

δομικό του αμινοξύ γλουταμίνη, η οποία όμως έχει αμφιπαθικό χαρακτήρα. Αυτές οι αμινοξικές υποκαταστάσεις είναι οι πλέον συντηρητικές και σε περίπτωση που είναι λειτουργικές είναι πιθανόν να σχεδιαστούν επιπλέον άλλες.

Η Lys439 προβλέπεται να βρίσκεται στην καρδιά του TMS9, σε ένα πολύ υδρόφοβο περιβάλλον. Η πλευρική της αλυσίδα φέρει στο άκρο αμινομάδα και έχει πολύ υδρόφιλο, θετικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, χαρακτήρα, αλλά αποτελείται από μια εκτεταμένη γραμμική υδρόφοβη αλειφατική αλυσίδα. Αυτό σημαίνει πως μπορεί να τοποθετείται χωρίς πρόβλημα σε μια υδρόφοβη α-έλικα, αρκεί η αμινομάδα της άκρης της πλευρικής της αλυσίδας να βρίσκεται σε υδρόφιλο περιβάλλον, ή σε επαφή με πρωτονιόφιλο αμινοξικό κατάλοιπο. Έτσι η Lys439 θα μπορούσε να συμμετέχει στη δέσμευση του υποστρώματος μέσω αλληλεπίδρασης με την O2 θέση του πουρινικού δακτυλίου, να εξουδετερώνει ένα αρνητικό φορτίο, ή να εμπλέκεται στην διαδικασία ανακύκλωσης φορτίου πρωτονιόφιλου αμινοξέος κατά το μονοπάτι διακίνησης του πρωτονίου, όμοια με τον LacY μεταφορέα λακτόζης της *E. coli* (Smirnova et al., 2008). Πραγματοποιήθηκαν αμινοξικές υποκαταστάσεις στο ισο-λειτουργικό της αμινοξύ αργινίνη, στο αντίθετου φορτίου γλουταμικό, στην αμφιπαθικής φύσης γλουταμίνη και στο υδρόφοβο και σχετικά αδρανές αλανίνη.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η Gln382 βρίσκεται στην αμφιπαθικής φύσης θηλιά μεταξύ TMS8 και 9, και πιο συγκεκριμένα σε ένα τμήμα το οποίο πιθανώς σχηματίζει α-έλικα, η οποία θα μπορούσε να έχει δυναμική τοπολογία (reentrant loop) και να συμμετέχει στον μηχανισμό διακίνησης των υποστρωμάτων. Οι αμινοξικές υποκαταστάσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν σε αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία υπάρχουν σε άλλους μεταφορείς της οικογένειας, δηλαδή στο ισο-δομικό γλουταμικό, στην αντίθετου φορτίου λυσίνη και σε σερίνη η οποία υπάρχει σε άλλα μέλη της οικογένειας NAT.

5.2. Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του UapA

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.2.1, ο UapA έχει δειχθεί να ρυθμίζεται αρνητικά σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο από ιόντα αμμωνίου, μια προτιμώμενη πηγή αζώτου, μέσω ενδοκύτωσης και να οδηγείται στο χυμοτόπιο προς αποικοδόμηση (Pantazopoulou et al., 2007). Πρώιμα δεδομένα έδειξαν πως ο μεταφορέας πιθανός ρυθμίζεται παρόμοια και από το υπόστρωμά του, το ουρικό οξύ. Κοινό

χαρακτηριστικό όλων των περιπτώσεων μεταφορέων που ρυθμίζονται αρνητικά σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο αποτελεί το γεγονός πως η μεταφορά οφείλει να ρυθμίζεται στενά, είτε γιατί η υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση υποστρώματος μπορεί να είναι τοξική (π.χ. ουρακίλη, ψευδάργυρος, αμινοξέα κτλ), είτε γιατί η αυστηρή χρονική ρύθμιση της ενεργότητας του μεταφορέα είναι σημαντική για τη φυσιολογία του οργανισμού (π.χ. γλουταμικό στις νευρικές συνάψεις). Το ουρικό οξύ σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυσδιάλυτο και ίσως λειτουργεί και προ-οξειδωτικά, με συνέπεια η μεγάλη του συσσώρευση να γίνεται τοξική για το μύκητα. Αυτό φαίνεται και από μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του γονιδίου της ουρικάσης του *A. nidulans,* στις οποίες ο φαινότυπος αύξησης σε ουρικό οξύ είναι τοξικός και όχι αυτός της έλλειψης πηγής αζώτου (Oestreicher and Scazzocchio, 1993). Εάν όντως ο UapA ρυθμίζεται αρνητικά από το υπόστρωμά του, η πρωτοτυπία του συστήματος συνίσταται στην ταυτόχρονη επαγωγική μεταγραφική ρύθμιση και κατασταλτική μετα-μεταφραστική αποικοδόμηση του μεταφορέα από αυτό. Για τη μελέτη του φαινομένου υπάρχουν κάποια βασικά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν, και αποφασίστηκε να μελετηθούν στα πλαίσια αυτής της Διατριβής.

Αρχικά, το φαινόμενο έπρεπε να μελετηθεί χρονικά και αναπτυξιακά, δηλαδή σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής του μύκητα που είναι δυνατόν, να περιγραφεί όσο το δυνατόν καλύτερα, έτσι ώστε να μπορέσει να εκτιμηθεί ο πιθανός βιολογικός του ρόλος. Αυτό θα βοηθούσε στην αποκάλυψη του μηχανισμού λειτουργίας του φαινομένου. Κατά τα αρχικά στάδια της εκβλάστησης του μύκητα οι μεταφορείς πουρινών εκφράζονται ενώ τα ένζυμα καταβολισμού τους απουσιάζουν (Amillis et al., 2004). Θα μπορούσε το φαινόμενο της αποικοδόμησης από το υπόστρωμα να αντανακλά ένα μηχανισμό για τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ουρικού οξέος και την αποφυγή της υπερβολικής του συσσώρευσης. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης έπρεπε να ερευνηθεί εάν το ουρικό επάγει σε διάφορους χρόνους και αναπτυξιακά στάδια την αλλαγή στην τοπολογία του UapA. Εφόσον η υπόθεση αυτή ήταν σωστή, θα έπρεπε να δειχθεί εάν η υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση ουρικού οξέος είναι υπεύθυνη για την επαγωγή της αλλαγής της τοπολογίας του μεταφορέα, καθώς και να βρεθεί η ευαισθησία του φαινομένου, δηλαδή το εύρος συγκεντρώσεων που το προκαλούσαν. Για το σκοπό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στελέχη που φέρουν τη γονιδιακή μεταλλαγή *uaz14* (Oestreicher and Scazzocchio, 1993), τα οποία εμφανίζουν μηδενική ενεργότητα ουρικάσης και συσσωρεύουν ουρικό οξύ. Ένα άλλο ενδεχόμενο ήταν η ενδοκύτωση να οφείλεται

στην αύξηση της συγκέντρωσης του ουρικού κατά τη διάρκεια της πρόσληψής του. Η χρήση ξανθίνης, η οποία είναι υπόστρωμα του μεταφορέα αλλά και η άμεση πουρίνη αναροϊκά του μονοπατιού θα μπορούσε να δώσει απαντήσεις. Επιπλέον, η πρόδρομη ουσία της ξανθίνης, υποξανθίνη, μεταφέρεται από άλλον μεταφορέα (AzgA) και η επαγωγή ή μη ενδοκύτωσης του UapA θα ήταν ενδεικτική.

Ένα ενδεχόμενο που δεν μπορούσε να αποκλειστεί ήταν η ενδοκύτωση να οφείλεται στα παραγόμενα από τον καταβολισμό πουρινών ιόντα αμμωνίου. Η διερεύνηση της αποικοδόμησης ή μη του μεταφορέα σε στελέχη που δεν καταβολίζουν τις πουρίνες, έχουν δηλαδή μεταλλαγές σε κάποιο ένζυμο του μονοπατιού (π.χ. ουρικάση, αλλαντοϊνάση), αλλά και από ανάλογα πουρινών που αποτελούν υποστρώματα του μεταφορέα αλλά δεν χρησιμοποιούνται ως πηγές αζώτου (π.χ. 2-θειοξανθίνη, οξυπουρινόλη) θα ήταν καταλυτική για την επιβεβαίωση ή μη της παραπάνω υπόθεσης.

Σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό αποικοδόμησης του μεταφορέα, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.2.2.1, οι μεταφορείς του *S. cerevisiae* αποικοδομούνται μετά από την προσθήκη ενός ή περισσοτέρων μορίων ουβικουιτίνης σε κατάλοιπα λυσίνης, η οποία είναι και το πρωταρχικό σήμα για την ενδοκύτωσή τους. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την Npi1p/Rsp5p E3 HECT λιγάση ουβικουιτίνης (Dupre et al., 2004), ενώ τα ομόλογά της στα μετάζωα έχουν ανάλογο ρόλο (Anan et al., 1998, Harvey and Kumar, 1999, Rotin et al., 2000). Προκαταρτικά πειράματα είχαν δείξει πως απαλοιφή της καρβοξυτελικής κυτταροπλασματικής ουράς του UapA οδηγούσε σε απώλεια ικανότητας ενδοκύτωσης από ιόντα αμμωνίου (Α. Βλαντή, Σ. Αμίλλης και Γ. Διαλλινάς, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Στο τμήμα αυτό του μεταφορέα υπήρχε ένα κατάλοιπο λυσίνης, το οποίο πιθανώς αποτελούσε στόχο ουβικουιτινυλίωσης. Το κατάλοιπο αυτό μεταλλάχθηκε με *in vitro* στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση. Στον *A. nidulans* έχει ανιχνευθεί με μεθόδους Υπολογιστικής Βιολογίας μία μοναδική ομόλογη της Rsp5p, η οποία κωδικεύεται από την ANID_01339.1 αλληλουχία και έχει ονομασθεί HulA (**H**ect containing **U**biquitin **L**igase) (Boase and Kelly, 2004). Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της HulA στη διαδικασία ενδοκύτωσης του UapA, πραγματοποιήθηκε απαλοιφή του γονιδίου της. Όπως στον *S. serevisiae*, την *D. melanogaster* κ.ά., απαλοιφή του γονιδίου αναμενόταν να είναι θνησιγόνος. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης έγινε προσπάθεια να απομονωθούν βιώσιμα ετεροκάρυα. Εφόσον η απαλοιφή αποδείχθηκε θνησιγόνος, έγινε προσπάθεια να κατασκευασθεί μια βιώσιμη μορφή της πρωτεΐνης η

οποία θα ήταν ελαττωματική ως προς την ουβικουιτινυλίωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Τέτοιες περιπτώσεις στον *S. serevisiae* είχαν δειχθεί να είναι η μειωμένη της έκφραση (Hein et al., 1995) καθώς και η απαλοιφή της C2 περιοχής της που είναι υπεύθυνη για την ασβέστιο-εξαρτώμενη αλληλεπίδρασή της με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (Dunn et al., 2004, Springael et al., 1999).

Επιπλέον, διερευνήθηκε η πιθανότητα ο UapA να οργανώνεται στο MCC, αν και η ομοιόμορφη κατανομή του στην πλασματική μεμβράνη του μύκητα δεν υποστηρίζε κάτι τέτοιο.

5.3. Τεχνικές και μέθοδοι

Η μεθοδολογική προσέγγιση των παραπάνω μελετών απαιτούσε τις βασικές γενετικές, μοριακές και βιοχημικές τεχνικές χειρισμού του *A. nidulans,* του χειρισμού και της ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων, ενώ σημαντικές τεχνικές για την μελέτη της τοπογένεσης των μεταφορέων ήταν η χρήση της τεχνολογίας της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) με μικροσκοπία επιφθορισμού και αναλύσεις πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (SDS-PAGE, Western). Τέλος βασική για τη διαλεύκανση του ρόλου των υπό μελέτη αμινοξικών καταλοίπων ήταν η λεπτομερής κινητική ανάλυση των υποκατεστημένων τους αλληλίων με μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένου υποστρώματος, καθώς και ανταγωνισμού αυτής με μια ποικιλία υποστρωμάτων, προσδετών και αναλόγων τους. Οι τεχνικές παρουσιάζονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 6.

6. Υλικά και Μεθοδολογία

6. Υλικά και Μεθοδολογία

6.1. Στελέχη μυκήτων

Σε αυτή τη Διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω μυκητιακά στελέχη:

(**wt**): *pabaA1* Στέλεχος *A. nidulans* φυσικού τύπου αυξότροφο για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ.

(**wt pantoB100**): *pantoB100* Στέλεχος *A. nidulans* φυσικού τύπου αυξότροφο για παντοθενικό οξύ.

(**ΔACZ argB2 pabaA1**): *argB2 pabaA1* Δ*azgA* Δ*uapC* Δ*uapA* Μεταλλαγές έλλειψης των γονιδίων των τριών μεταφορέων πουρινών (*azgA, uapC, uapA*), αυξότροφο για αργινίνη και παρα -αμινο-βενζοϊκό οξύ.

(**ΔACZ**): το στέλεχος ΔACZ argB2 pabaA1 με ομόλογη μονή ενσωμάτωση στο *argB* του pBS argB πλασμιδίου (Diallinas et al. 1998).

(**ΔACZ pantoB100**): *pantoB100* Δ*azgA* Δ*uapC* Δ*uapA* Κατασκευάσθηκε σε αυτή τη διατριβή από διασταύρωση των ΔACZ και wt pantoB100 στελεχών.

(**pyrG89 ΔnkuA::argB pyroA4**): *pyrG89* Δ*nkuA::argB pyroA4* Στέλεχος που φέρει έλλειψη του γονιδίου της NkuA DNA ελικάσης, αυξότροφο για ουρακίλη-ουριδίνη και πυριδοξίνη (Nayak et al. 2006).

(**ΔuapA ΔuapC ΔnkuA::argB pabaA1**): Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*nkuA::argB pabaA1* Κατασκευάσθηκε σε αυτή τη διατριβή από διασταύρωση των ΔACZ και *pyrG89 ΔnkuA::argB pyroA4* στελεχών.

(**UapA-GFP**): το στέλεχος ΔACZ argB2 pabaA1 με ομόλογη μονή ενσωμάτωση στο *argB* του pAN510-GFP πλασμιδίου (Pantazopoulou et al. 2007).

(**Uaz14**): *uaz14 pantoB100* Στέλεχος που φέρει σημειακή μεταλλαγή πλήρους απώλειας λειτουργίας της ουρικάσης λόγω σχηματισμού πρόωρου κωδικονίου έναρξης, αυξότροφο για παντοθενικό οξύ (Oestreicher and Scazzocchio 1993).

(**UaY^{9}**): *uaY^{9} yA2 biA1* Στέλεχος που φέρει σημειακή μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του θετικού μεταγραφικού παράγοντα του μονοπατιού καταβολισμού πουρινών, UaY, χρώματος κίτρινου, αυξότροφο για βιοτίνη (Suarez et al. 1995).

(**UaY^{462}**): *uaY^{462} wA4 biA1* Στέλεχος που φέρει σημειακή μεταλλαγή συνεχούς λειτουργίας του θετικού μεταγραφικού παράγοντα του μονοπατιού καταβολισμού

πουρινών, UaY, χρώματος άσπρου, αυξότροφο για βιοτίνη (Oestreicher and Scazzocchio 1995).

Τα στελέχη που φέρουν μεταλλαγές απώλειας ή τροποποιημένης λειτουργίας του UapA έχουν κατασκευασθεί και περιγραφεί σε άλλες εργασίες οι οποίες αναφέρονται. Όλα είναι προϊόν του στελέχους ΔACZ argB2 pabaA1 το οποίο έχει μετασχηματισθεί με τα πλασμίδια που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλαγμένες μορφές του UapA συζευγμένες με GFP. Όλα τα υπόλοιπα στελέχη που αναφέρονται και χρησιμοποιούνται σε αυτή τη Διατριβή αποτελούν προϊόν μετασχηματισμού ή διασταύρωσης των ανωτέρω στελεχών, και λεπτομέρειες για αυτά αναφέρονται στα αποτελέσματα.

Η μεταλλαγή *pabaA1* προκαλεί αυξοτροφία για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας της συνθετάσης του παρα-αμινο-βενζοϊκού οξέος (Vlanti and Diallinas 2008).

Η μεταλλαγή *argB2* οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου της τρανσκαρβαμοϋλάσης της ορνιθίνης, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της αργινίνης (Buxton et al. 1985).

Η μεταλλαγή *pantoB100* προκαλεί αυξοτροφία για παντοθενικό οξύ και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας της συνθετάσης του παντοθενικού οξέος (Kurtov et al. 1999).

Η μεταλλαγή *pyrG89* προκαλεί αυξοτροφία για ουρακίλη-ουριδίνη και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας του ενζύμου της αποκαρβοξυλάσης της 5-φωσφορικής οροτιδίνης (Oakley et al. 1987).

Η μεταλλαγή *biA1* (ή *bioDA1)* προκαλεί αυξοτροφία για βιοτίνη και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας της συνθετάσης του 7,8-δι-άμινο-πελαργονικού οξέος (Magliano et al. 2011).

Η μεταλλαγή *yA2* αλλάζει το φυσικό πράσινο χρώμα του μύκητα σε κίτρινο και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του ενζύμου λακκάση (Aramayo and Timberlake 1990).

Η μεταλλαγή *wA4* αλλάζει το φυσικό πράσινο χρώμα του μύκητα σε άσπρο και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας μιας συνθετάσης πολυκετιδίων (Mayorga and Timberlake 1990).

Η μεταλλαγή *pyroA4* προκαλεί αυξοτροφία για πυριδοξίνη και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του ενζύμου *pyroA*, ενός SNZ ενζύμου που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση πυριδοξίνης (Osmani et al. 1999).

Καμία από τις ανωτέρω μεταλλαγές δεν εμπλέκεται ή επηρεάζει το μεταβολισμό και την πρόσληψη πουρινών.

6.2. Ολιγονουκλεοτίδια- PCR Εκκινητές

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της Διατριβής είναι οι εξής:

α/α	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
1	expBamHI f	5'- cgggatccctccatccattcaaccgac -3'
2	GFP XbaI f1	5'- cgtctagacatggtgagcaagggcgag -3'
3	GFP XbaI f2	5'- cgtctagaatggtgagcaagggcgag -3'
4	GFP XbaI r	5'- cgtctagattacttgtacagctcgtcc -3'
5	D564 XbaI r	5' cgtctagaccgattatcatgagcagag -3'
6	alcA BglII f	5′- cgagatctaagtcccttcgtatttctcc -3′
7	alcA BamHI r	5′- cgggatccattttgaggcgaggtgatag -3′
8	3'UTR BglII r	5'- gcagatctgcaataactcaaccgccttccc -3'
9	5'hulA KpnI f	5'- ccggtaccgcatcaatgcacccaagaaac -3'
10	5'hulA ClaI r	5'- gggcatcgatgattcatgagttccagaccag -3'
11	Prom hulA BglII f	5'- ccgagatctgagcactgcagtaatcgtc -3'
12	Prom hulA BamHI r	5'- ccggatcccatcctgcacaggttttcc -3'
13	C2less BamHI f	5'- ggggatccgtgcgcatcggagatgttattg -3'
14	C2less BamHI r	5'- ggggatcccagtccaccacatcctgg -3'
15	pyr4 ClaI f	5'- ccccatcgatgcttagacttcaacaacccc -3'
16	pyr4 ClaI r	5'- cgccatcgatggatcttcatcattcgtcgc -3'
17	K572R XbaI r	5'-catcagactaagcctgccggctctgatac-3'
18	K21/22R	5'-cccaactccaaccccaggaggaccgtccgacagagag -3'
19	K59/60R	5'- cgagctacccttcatgaggagggatccacgggcggcgcc -3'
20	K73R	5'- cctttttttggcctcaacgagagaattcccgtgctgttggcg -3'
21	K572R	5'- gaggcggagtatcagagccggcaggcttatgccatggtg - 3'

22	E543 XbaI	5’- catgcctgctgaagttctagagatcggtgccgtcac -3’
23	UapA4	5’-gattggcacctcggcctg-3’
24	UapA-UF	5’-atctgcgagatcctggggtct-3’
25	UapA 3’BglII rev	5’-gcagatctgcaataactcaaccgccttccc-3’
26	UapA4	5’-gattggcacctcggcctg-3’
27	UapA11	5’-aacgtcttcatcccgccc-3’
28	UapC16	5’-gatcccactggtcctcgc-3’
29	UapC 3’ rev	5’-gagatttgtcgcgcggtatg-3’
30	Af pyrG for	5’-ccaatacatatgccgtcag-3’
31	Af pyrG rev	5’-ccgctgtgcagcttcaac-3’
32	AzgA for	5′-accgagtaaagtcaaaccg-3′
33	AzgA rev	5′-aggtcttcggctggacag-3′
34	nkuA for	5’caggaattgaggcagagc-3’
35	nkuA rev	5’-cgcgtcctacatgtccac-3
36	UapA 5’upstream for	5’-cgggatccgcacaggatgtcaagcgc-3’
37	Oligo8	5’-ggtggacatgtcagtcg-3’
38	Oligo1	5’-gacccatcttccacca-3’
39	UapA 3’downstream rev	5’-ggaagcttctatcctctctgcctcgg-3’
40	Y569F	5’- cgggatggcgaggcggaattccagagcaagcaggcttatg-3’
41	Q383E NruI for	5’-gcacattcgagtcgcgaatcgagggcgccgtcctagc-3’
42	Q383K NruI for	5’-gcacattcgagtcgcgaatcaagggcgccgtcctagc-3’
43	Q383S NruI for	5’-ggcacattcgagtcgcgaatctcgggcgccgtcctagcag-3’
44	uapA E356Q F	5’-c atc atc tgc gcc tgc cag tgc atc ggt gat g-3’
45	uapA E356D F	5’-c atc tgc gcc tgc gac tgc atc ggt gat gta ac-3’
46	uapA K439R FOR	5’- gaggcggagtatcagagcccgcaggcttatgccatggtg- 3’
47	uapA K439E FOR	5’- gaggcggagtatcagagccggcaggcttatgccatggtg- 3’
48	uapA K439A FOR	5’- gaggcggagtatcagagcgggcaggcttatgccatggtg- 3’
49	uapA K439Q FOR	5’- gaggcggagtatcagagcccgcaggcttatgccatggtg- 3’
50	Q383E NruI for	5’-gcacattcgagtcgcgaatcgagggcgccgtcctagc-3’
51	Q383K NruI for	5’-gcacattcgagtcgcgaatcaagggcgccgtcctagc-3’
52	Q383S NruI for	5’-ggcacattcgagtcgcgaatctcgggcgccgtcctagcag-3’
53	uapA E356Q F	5’-c atc atc tgc gcc tgc cag tgc atc ggt gat g-3’

Σημείωση: Στις περιπτώσεις εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για *in vitro* στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση, μόνο ο ένας εκ των δύο εκκινητών έχει καταγραφεί, ο άλλος είναι ο αντίστροφος και συμπληρωματικός του και στο κείμενο αναφέρονται ως ζεύγη εκκινητών.

6.3. Θρεπτικά υποστρώματα μυκήτων

Οι καλλιέργειες των μυκήτων έγιναν σε Πλήρη και Ελάχιστα Υποστρώματα η σύσταση των οποίων αναγράφεται στους Πίνακες 6.1 και 6.2 (Cove, 1966, Scazzocchio et al. 1982).

Πίνακας 6.1. Η σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του *A. nidulans.*

	ΠΛΗΡΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (Complete Medium)	ΕΛΑΧΙΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (Minimal Medium)	ΙΣΟΟΣΜΩΤΙΚΟ ΕΛΑΧΙΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (Sucrose Minimal Medium)
H_2O dest	1 l	1 l	1 l
Δ/μα Αλάτων	20 ml	20 ml	20 ml
Δ/μα Βιταμινών	10 ml	-	-
D-Glucose	10 g	10 g	10 g
Casamino acids	1 g	-	-
Bacto peptone	2 g	-	-
Yeast extract	1 g	-	-
Σακχαρόζη	-	-	342,3 g

Η προσαρμογή του pH έγινε με τη χρήση διαλύματος NaOH (3 N) και HCl (1 N). Στα στερεά θρεπτικά μέσα, πλήρη και ελάχιστα, προστέθηκε 2% και 1% άγαρ αντίστοιχα. Στα εκλεκτικά υποστρώματα για δοκιμασίες ανάπτυξης, χρησιμοποιήθηκε μία ειδικά επεξεργασμένη άγαρ της εταιρείας Oxoid, η οποία περιέχει ελάχιστα ποσοστά πηγών αζώτου, και επέτρεψε τη διάκριση μικρών διαφορών στη μορφή της αποικίας (μέγεθος, πυκνότητα κονιδιοσπορίων) των προς μελέτη στελεχών. Στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκε επιπλέον μία πηγή αζώτου. Η πιο κοινή «ουδέτερη» πηγή αζώτου είναι η ουρία, η οποία προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Γλουταμίνη, προλίνη και

νιτρικά ιόντα χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 10 mM. Οι πουρίνες ως μοναδικές πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν συνήθως σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml (περίπου 500-600 μM). Σε καλλιέργειες για την απομόνωση RNA, ουρακίλη και κυτοσίνη προστέθηκαν σε συγκέντρωση 0,1 mg/ml επίσης. Η οξυπουρινόλη, τοξικό ανάλογο της ξανθίνης που μεταφέρεται από τον uapA, χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέτρωση 100 μM. Η 8-αζαγουανίνη και η 6-μεθοξυ-πουρίνη χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml. Όπου ήταν αναγκαία η προσθήκη αργινίνης ή ουρακίλης και ουριδίνης ως αυξοτροφιών, χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 5 mM, 2,5 mM και 5 mM αντίστοιχα. Η επαγωγή της έκφρασης του UapA από τον υποκινητή $alcA_p$ επιτεύχθηκε μετά από 2,5 ώρα ανάπτυξης σε MM με ουρία (5 mM), φρουκτόζη (0,1%) και αιθανόλη (3%). Η καταστολή επιτεύχθηκε σε MM με ουρία (5 mM) και γλυκόζη (1%). Σε υγρές καλλιέργειες για μικροσκοπία επιφθορισμού, απομόνωση πρωτεϊνών ή δοκιμασίες πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης, το κυκλοεξιμίδιο προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 20 μg/ml, 15 λεπτά πριν από την προσθήκη υποστρώματος ή ιόντων αμμωνίας. Οι υπόλοιπες αυξοτροφίες χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεντρώσεις, οι οποίες αναγράφονται στη σύσταση του διαλύματος βιταμινών στον Πίνακα 2.

Πίνακας 6.2. Σύσταση του διαλύματος ιχνοστοιχείων και συγκεντρώσεις χρησιμοποίησης αυξοτροφιών.

Διάλυμα Αλάτων		Διάλυμα Βιταμινών		Διάλυμα Ιχνοστοιχείων σε 1 l H_20 απεστ.	
H_2O απεστ.	1 l	H_2O απεστ.	1 l	$Nα_2B_4O_7$ x 10 H_20	40 mg
KCl	26 g	p-αμινοβενζοϊκό οξύ	20 mg	$CuSO_4$ x 5 H_20	400 mg
$MgSO_4$ 7H2O	26 g	βιοτίνη	1 mg	FeO_4P x 4 H_20	714 mg
KH_2PO_4	76 g	D-παντοθενικό ασβέστιο	50 mg	$MnSO_4$ x 1 H_20	728 mg
Χλωροφόρμιο	2 ml	Ριβοφλαβίνη	50 mg	Na_2MoO_4 x 2 H_20	800 mg
Δ/μα ιχνοστοιχείων	50 ml	Πυριδοξίνη	50 mg	$ZnSO_4$ x 7 H_20	8 mg

6.4. Συντήρηση των στελεχών του *A. nidulans*

Τα στελέχη του μύκητα μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον δύο χρόνια σε γλυκερόλη 50% στους -80 ^{o}C. Συγκεκριμένα, φρέσκα κονιδιοσπόρια περισυλλέγονται σε σωλήνα τύπου Eppendorf που περιέχει 0,7 ml αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (σύσταση στο λίτρο: NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na_2PO_4 1,44 g, KH_2PO4 0,24 g, pH 7,4 με 1 N HCl). Σε αυτό το διάλυμα κονιδιοσπορίων προστίθεται ίσος όγκος 100% γλυκερόλης. Κατόπιν καλής αναδεύσεως ακολουθεί αποθήκευση στους -80 ^{o}C.

6.5. Διασταυρώσεις στελεχών και ανάλυσή τους

Οι διασταυρώσεις στελεχών του *A. nidulans* πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται από το Pontecorvo et al. 1953. Πιο συγκεκριμένα τα επιθυμητά στελέχη, τα οποία έπρεπε να διαθέτουν τουλάχιστον μια διαφορετική αυξοτροφία έκαστο για τη σταθεροποίηση του ετεροκαρύου, εμβολιάσθηκαν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα και απόσταση μισού εκατοστού και κατόπιν επωάσθηκαν μέχρι το σχηματισμό μεταξύ τους αναστομώσεων των υφών. Ειδικά τα HulAΔC2 στελέχη, λόγω της πολύ καθυστερημένης τους ανάπτυξης, εμβολιάζονταν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα με 0,5 M δισόξινο φωσφορικό νάτριο, τουλάχιστον δύο μέρες πριν εμβολιασθεί το δεύτερο στέλεχος. Οι αναστομώσεις αποκόπηκαν και μεταφέρθηκαν σε στερεό ελάχιστο για το ετεροκάρυο θρεπτικό υπόστρωμα (που παρείχε δηλαδή μόνο τις κοινές των δύο στελεχών αυξοτροφίες) με νιτρικά ιόντα (τα νιτρικά μεταβολίζονται καλύτερα αναερόβια από τις άλλες πηγές αζώτου) ως πηγή αζώτου και επωάσθηκαν για 2-3 μέρες στους 37 ^{o}C. Ακολούθησε αποκλεισμός του αέρα και περαιτέρω καλλιέργεια για 2 τουλάχιστον εβδομάδες στους 37 ^{o}C. Τέσσερα τουλάχιστον σχηματισμένα κλειστοθήκια απομονώθηκαν και διαρρηγνύθηκαν σε σωλήνα τύπου eppendorf με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό, ώστε να απελευθερωθούν τα ασκοσπόρια. Δείγματα από αυτά επιστρώθηκαν σε στερεό ελάχιστο για το ετεροκάρυο θρεπτικό υπόστρωμα, για να διαπιστωθεί η προέλευση των δύο πυρήνων που έχουν συντηχθεί στο κάθε κλειστοθήκιο. Μόνο από κλειστοθήκιο το οποίο έχει προέλθει από τη σύντηξη πυρήνων των δύο μητρικών στελεχών μπορούν να προέλθουν ανασυνδυασμένοι απόγονοι οι οποίοι να

μεγαλώνουν στο θρεπτικό αυτό υπόστρωμα. Από τέτοια δείγματα επιστρώνονται αραιώσεις σε πλήρες στερεό θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη και απομόνωση των απογόνων. Οι απόγονοι αναλύθηκαν με δοκιμασίες ανάπτυξης κατάλληλες για τους εκάστοτε γονότυπους, όπως ουρικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου για τους *uapA* και *uapC* μεταφορείς, την ουρικάση *uaZ* και τον θετικό μεταγραφικό παράγοντα *uaY*, 8-αζαγουανίνη για τον *azgA* μεταφορέα (Cecchetto et al. 2004), 6-μεθοξυ-πουρίνη για την ύπαρξη του uaY^{462} και τις αντίστοιχες βιταμίνες για τις μεταλλαγές αυξοτροφιών. Η 8-αζαγουανίνη είναι ένα τοξικό ανάλογο το οποίο μεταφέρεται μόνο από τον AzgA μεταφορέα (Cecchetto et al. 2004), ενώ η 6-μεθοξυ-πουρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως πηγή αζώτου μόνο από τα στελέχη που φέρουν την uaY^{462} μεταλλαγή (Oestreicher and Scazzocchio 1995). Ο διαχωρισμός των *uapA* από Δ*uapA* και *uapA-gfp*, *uapC* από Δ *uapC::pyrG*^{af}, *azgA* από Δ*azgA* και *nkuA* από Δ*nkuA::argB* αλληλίων πραγματοποιήθηκε με PCR (HyTest DNA Taq polymerase, Takara) χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών και τις συνθήκες που φαίνονται στους πίνακες 6.3, 6.4, και 6.5.

Πίνακας 6.3. Οι εκκινητές και τα χαρακτηριστικά τους

Αλλήλιο	α/α εκκινητών	Αναμενόμενο μέγεθος PCR σε ύπαρξη του γονιδίου (bp)	Αναμενόμενο μέγεθος PCR σε έλλειψη του γονιδίου (bp)	T_m (^oC)
uapA	24,25	3500	800	60
uapA-gfp	24,25	4200	800	60
uapC	28,29	1700	-	59
pyrG^{af}	30,31	1500	-	58
azgA	32,33	2400	1500	58
nkuA	34,35	3000	2600	58

Πίνακας 6.4. Σύσταση των PCR Αντιδράσεων

Συστατικά της αντίδρασης PCR	Τελική Συγκέντρωση
DNA υπόστρωμα	10 μg
Εκκινητής 5΄- 3΄	135 ng
Εκκινητής 3΄- 5΄	135 ng
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	250 μM από το κάθε ένα
HyTest Taq polymerase	1 u
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης	1 x
$MgCl_2$	1 mM
H_2O_{dest}	μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 50 μl

Πίνακας 6.5. Συνθήκες των PCR αντιδράσεων

Βήματα	Θερμοκρασία (^{o} C)	Διάρκεια
1	94	300 sec
2	94	30 sec
3	Tm των εκκινητών	30 sec
4	72	1 min/kb
5	Επανάληψη 2-4	25 κύκλοι
6	72	10 min
7	12	∞

6.6. Θρεπτικά υποστρώματα βακτηρίων

Η καλλιέργεια των βακτηρίων του στελέχους DH5a έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani (LB) (Σύσταση στο λίτρο: Bacto Tryptone 10 g, NaCl 10 g, BactoYeast Extract 5 g, pH 7,0) (Sambrook et al. 1989). Η προσαρμογή του pH έγινε με διαλύματα ΝαΟΗ (1 Ν) και HCl (1 Ν). Σε περιπτώσεις παρασκευής στερεού θρεπτικού υποστρώματος, προστέθηκε επιπλέον 1,5% άγαρ μετά την προσαρμογή του pH. Στις περιπτώσεις τις οποίες χρειάστηκε η προσθήκη αμπικιλλίνης, σε υγρό ή στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml (Sambrook et al. 1989). Τα βακτηριακά στελέχη διατηρήθηκαν στους -80 ^{o}C σε 50% γλυκερόλη.

6.7. Βακτήρια δέκτες πλασμιδίων και η προετοιμασία τους

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δεκτικών κυττάρων της *E. coli* αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στα Κεφάλαια 1.82-1.84 στο Sambrook et al. (1989) και διαμορφώθηκε ως εξής: Μία απομονωμένη αποικία του βακτηρίου *E. coli* (DH5a) χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση 5 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος Luria Bertoni (LB) και η καλλιέργεια επωάστηκε για 16 ώρες στους 37 ^{o}C με ανάδευση στις 220 rpm. Από την πυκνή καλλιέργεια βακτηρίων που παράχθηκε, χρησιμοποιήθηκε 0,5 ml για την επιμόλυνση 400 ml υγρού LB σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 1 l, ώστε να εξασφαλιστεί καλός αερισμός και ανάδευση. Τα κύτταρα επωάστηκαν στους 37 ^{o}C με ανάδευση στις 260 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει το 0,45-0,55, σε μήκος κύματος 600 nm. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 λεπτά στις 4500 g και στους 4 ^{o}C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 160 ml ψυχρού διαλύματος TFB I (30 mM CH_3COOK, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$,100 mM $RbCl_2$, 15% γλυκερόλη, pH 5,8 με 1 M CH_3COOH), επωάστηκαν για 5 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκαν όπως προηγουμένως. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20 ml ψυχρού διαλύματος TFB II (10 mM MOPS pH 6,5, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM $RBCl_2$, 15% γλυκερόλη, pH 6,5 με 1 M KOH). Το εναιώρημα των κυττάρων επωάστηκε για 15-60 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα διαμοιράστηκαν σε Eppendorf και αποθηκεύτηκαν στους -80 ^{o}C, όπου μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον έξι μήνες χωρίς να χάσουν την δεκτικότητά τους (Sambrook et al. 1989).

6.8. Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων *E. coli* αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στο Κεφάλαια 1.74-1.81 του Sambrook et al. 1989 και διαμορφώθηκε ως εξής: Σε 200 μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 0,01-0,5 μg DNA. Το μίγμα επωάστηκε για 20 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε θερμικό σοκ των δεκτικών κυττάρων, με απότομη μεταφορά τους από τον πάγο στους 42 ^{o}C για 90 δευτερόλεπτα και απότομη επαναφορά στον πάγο, όπου και παρέμειναν για 2 λεπτά. Το θερμικό σοκ των

δεκτικών βακτηριακών κυττάρων χαλάρωσε την κυτταρική μεμβράνη και διευκόλυνε την εισαγωγή του πλασμιδίου. Τα κύτταρα στη συνέχεια επωάστηκαν για 45-60 λεπτά στους 37 ^{o}C σε 1 ml υγρού θρεπτικού LB προκειμένου να επανέλθουν στους φυσιολογικούς ρυθμούς ανάπτυξης και να εκφραστεί το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο εκάστοτε αντιβιοτικό (π.χ. το γονίδιο *bla* της β-λακταμάσης που θα εξασφαλίσει στα μετασχηματισμένα στελέχη ανθεκτικότητα σε αμπικιλλίνη). Ο χρόνος επώασης σε LB δεν πρέπει να ξεπερνάει τη μία ώρα, ώστε τα κύτταρα που θα επιλεχθούν να προέρχονται από μετασχηματισμένα κύτταρα και όχι από την διαίρεση αυτών. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB, που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό (συνήθως αμπικιλλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml). Ακολούθησε επώαση στους 37 ^{o}C για 16 ώρες (Sambrook et al. 1989).

6.9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *E. coli*, έγινε όπως περιγράφεται στο κιτ Nucleospin της εταιρείας Macherey-Nagel.

Για τη γρήγορη απομόνωση μικρής συγκέντρωσης και μέτριας καθαρότητας πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα, για διαγνωστικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω απλό και γρήγορο πρωτόκολλο που αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στα Κεφάλαια 1.34-1.37 στο Sambrook et al. 1989. Συγκεκριμένα 1,5 ml αναπτυγμένης καλλιέργειας βακτηρίων μετασχηματισμένων με πλασμίδιο, φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 12000 rpm. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200 μl διαλύματος 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μl διαλύματος 200 mM NaOH, 1% SDS και το μίγμα αναδεύτηκε καλά. Έπειτα, προστέθηκαν 200 μl διαλύματος 3 M CH_3COONa pH 5,5 και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 8 λεπτά στις 12000 rpm. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 500-600 μl διαλύματος ισοπροπανόλης και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 8 λεπτά στις 12000 rpm. Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με 140 μl αιθανόλης 70% και επαναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο νερού υψηλής καθαρότητας (δις-απεσταγμένο, HPLC, Milli-Q) (Sambrook et al. 1989).

6.10. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το μύκητα *Aspergillus nidulanς*

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση μικρής συγκέντρωσης γονιδιωματικού DNA αποτελεί παραλλαγή του αντίστοιχου πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους (Lockington et al. 1985). Για την απομόνωση μικρής συγκέντρωσης γονιδιωματικού DNA, 50-100 mg μυκηλίου θρυμματίστηκαν καλά με υγρό άζωτο και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Eppendorf χωρητικότητας 2,0 ml. Στο θρυμματισμένο μυκήλιο προστέθηκαν 0,8 ml διαλύματος 0,2 M Tris-HCl pH 8,0, 1% SDS, 1 mM EDTA pH 8,0, και ακολούθησε επώαση για 10-20 λεπτά στον πάγο. Το παρασκεύασμα στη συνέχεια καθαρίστηκε με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Πιο συγκεκριμένα, προστέθηκε ίσος όγκος (0,8 ml) ουδέτερης φαινόλης (pH 7-7,5), της εταιρίας Sigma, και ύστερα από καλή ανάδευση το παρασκεύασμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 12000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρηση δημιουργήθηκαν δύο φάσεις. Η ελαφρότερη φάση περιείχε το διάλυμα του DNA, ενώ η μεσόφαση περιείχε διάφορα ανεπιθύμητα συστατικά που είχαν απομείνει από το μυκήλιο. Ακολούθησε πολύ προσεκτικός διαχωρισμός της πάνω φάσης (DNA), αποφεύγοντας τη μεσόφαση, και μεταφορά σε ένα νέο σωλήνα Eppendorf. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφόρμιου και ακολούθησε καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως. Μετά τη φυγοκέντρηση δημιουργήθηκαν ξανά δύο φάσεις, όπου στην πάνω φάση βρισκόταν το DNA και στην κάτω φάση το χλωροφόρμιο. Περισυλλέχθηκε η «πάνω» φάση σε νέο Eppendorf αποφεύγοντας τη μεσόφαση. Ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκη είτε ίσου όγκου ισοπροπανόλης είτε 2,5 όγκων 99% αιθανόλης και 1/10 του όγκου οξικού νατρίου ή καλίου 3 M pH 5,2 με φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε 50 μl νερού υψηλής καθαρότητας.

6.11. Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες – Κλωνοποίηση

Οι πέψεις του DNA και οι κλωνοποιήσεις σε πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας τις οδηγίες που αναφέρονται στα Κεφάλαια 1.53-1.73 στο Sambrook et al. (1989).

6.11.1. Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε ένα μεγάλος αριθμός πέψεων σε πλασμιδιακό και γονιδιωματικό DNA ή σε προϊόντα PCR. Η ποσότητα του ενζύμου, που χρησιμοποιήθηκε για κάθε πέψη, εξαρτήθηκε από την συγκέντρωση του DNA υποστρώματος. Γενικότερα, οι ιδιότητες ενός περιοριστικού ενζύμου και οι συνθήκες, στις οποίες πραγματοποιείται η αντίδραση ορίζονται από τον κατασκευαστή (NEB, Fermentas, Takara).

6.11.2. Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Σε όλες τις κλωνοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν, τόσο το ένθεμα όσο και ο φορέας κλωνοποίησης ήταν υψηλής καθαρότητας. Το πλασμίδιο και το ένθεμα χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 1/3 (συνήθως σε συγκεντρώσεις 0,1 μg πλασμιδίου/ 0,3 μg ενθέματος). Στις περιπτώσεις, στις οποίες έγινε αποκυκλοποίηση του φορέα μετά από πέψη με ένα μοναδικό περιοριστικό ένζυμο, ακολούθησε αποφωσφορυλίωση των 5΄ άκρων του με την προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης αλκαλικής φωσφατάσης (Sambrook et al. 1989), προκειμένου να αποφευχθεί η κυκλοποίηση του φορέα χωρίς την επικόλληση του ενθέματος. Πριν την προσθήκη της λιγάσης, η οποία καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των άκρων του φορέα και του ενθέματος, ήταν απαραίτητη η απομάκρυνση ενζύμων και διαλυμάτων της πέψης, είτε μέσω διήθησης από ειδική κολώνα είτε, με κατακρήμνιση παρουσία αιθανόλης. Σε κάθε νέα κλωνοποίηση μαζί με το διάλυμα επικόλλησης συμπεριλήφθηκε και μία επιπλέον αντίδραση «μάρτυρας». Η αντίδραση αυτή, περιείχε τα ίδια συστατικά με την πραγματική αντίδραση επικόλλησης, αλλά δεν περιείχε ένθεμα και υποδείκνυε την περίπτωση ύπαρξης συμβατών άκρων στο φορέα, είτε λόγω ημιτελούς πέψης, είτε λόγω ατελούς δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης (Sambrook et al. 1989).

6.11.3. Κατασκευή της αλληλουχίας ενσωμάτωσης του *uapA-gfp* ORF στο γονιδιακό τόπο του *uapA*

Για την ενσωμάτωση του ORF του *uapA-gfp* στο γονιδιακό τόπο του *uapA*, κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pAN-uapA-GFP (Pantazopoulou et al. 2007) αναρροϊκές (5' UTR) και καταρροϊκές (3' UTR) του *uapA* αλληλουχίες μήκους 2000 bp έκαστη. Το 5' UTR ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 36 και 37 και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pAN-uapA-GFP με *BamHI*/*XhoI*. Το 3' UTR αντίστοιχα με τους 38 και 39 εκκινητές και με *SalI*/*HindIII* πέψεις, δημιουργώντας το πλασμίδιο pAN-UapA-GFP^{L} (Εικόνα 8.5). Η κασέτα κατέστη γραμμική με *BamHI*/*HindIII* πέψη και χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*nkuA::argB* στελέχους, με απευθείας επιλογή για αύξηση σε ουρικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου.

6.11.4. Κατασκευή της αλληλουχίας απαλοιφής του *hulA*

DNA τμήματα τα οποία αντιστοιχούσαν στα 5΄- και 3΄-UTR του hulA, καθώς και στο γονίδιο *pyr4* της *Neurospora crassa* πολλαπλασιάστηκαν με PCR από γονιδιωματικό DNA του *A. nidulans* ή το πλασμίδιο pGEM-pyr4 (Bouzarelou et al. 2008) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 9 και 10, 13 και 14 και 15 και 16 αντίστοιχα, και κλωνοποιήθηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα που φαίνονται στην εικόνα 9.16. Το σύνολο της κασέτας κατέστη γραμμικό με πέψη *KpnI/SpeI* και χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό στελέχους *pyrG89 ΔnkuA::argB,* με επιλογή πρωτότροφων για ουρακίλη και ουριδίνη στελεχών.

6.11.5. Κατασκευή της *hulAΔC2*

Τα DNA τμήματα που αντιστοιχούσαν στα 5΄-UTR, τον υποκινητή και το ORF του *hulA,* καθώς και στο *pyr4* πολλαπλασιάστηκαν με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 9 και 10, 11 και 12, 13 και 14, 15 και 16 αντίστοιχα και κλωνοποιήθηκαν με τα ένζυμα που φαίνονται στην εικόνα 9.17 στο πλασμίδιο pBS II SK (+), δημιουργώντας το πλασμίδιο pBS C2less HulA cassette. Το συνολικό DNA

τμήμα κατέστη γραμμικό με πέψη *KpnI/SpeI* και χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει στέλεχος *pyrG89 ΔnkuA::argB*.

6.11.6. Κατασκευή τω περικομμένων μορφών του καρβοξυτελικού άκρου του UapA (από τους Σ. Αμίλλη και Α. Βλαντή).

. Η περικομμένη μορφή ολόκληρου του καρβοξυτελικού άκρου του UapA κατασκευάστηκε εισάγοντας μια αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *XbaI* στη θέση 543 του γονιδίου του UapA, με *in vitro* στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση, χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών 22, στο πλασμίδιο pAN510exp και κατόπιν αποκοπή του καρβοξυτελικού άκρου με *XbaI* πέψη. Η μερική περικομμένη μορφή του καρβοξυτελικού άκρου του UapA κατασκευάστηκε με PCR ενίσχυση του αντίστοιχου ORF, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 1 και 5, και επακόλουθης κλωνοποίησης του PCR προϊόντος με *BamHI*/XbaI στον φορέα pAN510exp στην θέση του φυσικού τύπου ORF. Και στις δύο ανωτέρω περιπτώσεις ακολούθησε η κλωνοποίηση του *gfp* ORF με *XbaI*, με τους εκκινητές 2 ή 3 και τον 4, έτσι ώστε το ORF του *gfp* να είναι σε φάση με αυτό του *uapA*. Τα πλασμίδια ελέγχθηκαν με DNA αλληλούχιση και εισήχθησαν με μετασχηματισμό σε στέλεχος Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*azgA argB2*, και επιλογή πρωτότροφων για αργινίνη μετασχηματισμένων στελεχών.

6.11.7. Κατασκευή του πλασμιδίου έκφρασης του *uapA-gfp* υπό τον έλεγχο του *alcAp* υποκινητή (από τον Σ. Αμίλλη).

Ο $alcA_p$ ενισχύθηκε με PCR από γονιδιωματικό DNA, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 6 και 7, και κλωνοποιήθηκε με *BglII*/*BamHI* στην μοναδική θέση *BamHI* του πλασμιδίου pBS-argB (Diallinas et al. 1998). Από το πλασμίδιο pAN510-GFP πολλαπλασιάστηκε με PCR το ORF του *uapA-gfp* γονιδίου μαζί με το 3'UTR, με τους εκκινητές 1 και 8. Με πέψη *BamHI*/*BglII* κλωνοποιήθηκε στην *BamHI* θέση του προηγούμενου πλασμιδίου, σε φάση με το κωδικόνιο έναρξης του $alcA_p$. Έτσι προέκυψε το pBS-argB-$alcA_p$-uapA-GFP πλασμίδιο. Πραγματοποιώντας το τελευταίο PCR με τους ίδιους εκκινητές, αλλά έχοντας ως υπόστρωμα το πλασμίδιο pAN510-K572R-GFP, προέκυψε το pBS-argB-$alcA_p$-uapA-K572R-GFP πλασμίδιο. Τα

πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματίσουν στέλεχος Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*azgA* argB2, με επιλογή πρωτότροφων για αργινίνη μετασχηματισμένων στελεχών.

6.11.8. Κατασκευή του pAN520exp-K572R

Το ORF του uapA-K572R ενισχύθηκε με PCR από το πλασμίδιο pAN510-K572R-GFP με τους εκκινητές 1 και 17 και με διπλή πέψη *BamHI/XbaI* κλωνοποιήθηκε στη θέση του ORF του pAN520exp (Vlanti and Diallinas 2008). Η K572R μεταλλαγή δημιουργεί μια θέση του περιοριστικού ενζύμου *NaeI*, η οποία και χρησιμοποιήθηκε για να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο το αρχικό ORF να είχε παραμείνει στο πλασμίδιο φορέα. Το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των στελεχών N409D-GFP και E356Q-GFP. Το γονίδιο *pabaA* του πλασμιδίου συμπλήρωσε την *pabaA1* μεταλλαγή αυξοτροφίας για παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ.

6.12. Κατευθυνόμενη *in vitro* PCR μεταλλαξιγένεση

Για την δημιουργία στοχευόμενων μεταλλαγών στο γονίδιο *uapA*, και συγκεκριμένα στο πλασμίδιο pAN510-GFP (Pantazopoulou et al. 2007) εφαρμόσθηκε το πρωτόκολλο της PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, όπως περιγράφεται από την εταιρεία Stratagene (*quick change mutagenesis*), χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές.

6.12.1. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή στοχευόμενων μεταλλαγών

Η κάθε μεταλλαγή κατασκευάστηκε με τη χρήση ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδίων μεγέθους 30-40 νουκλεοτιδικών βάσεων το κάθε ένα, τα οποία ήταν μεταξύ τους συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πρωτόκολλο, ήταν αρκετά μεγάλοι ώστε να εξασφαλίζεται ένα μεγάλο τμήμα απόλυτης συμπληρωματικότητας, το οποίο θα αντισταθμίζει τη μειωμένη συμπληρωματικότητα στο σημείο όπου βρίσκονται οι τροποποιημένες νουκλεοτιδικές βάσεις. Η νουκλεοτιδική ακολουθία του 5΄ εκκινητή

ήταν πανομοιότυπη με την αλληλουχία περιοχής του γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, ενώ στο κέντρο περίπου έφερε τις νουκλεοτιδικές βάσεις προς αλλαγή. Ο 3΄ εκκινητής ήταν απόλυτα συμπληρωματικός και αντιπαράλληλος στην αλληλουχία του 5΄ εκκινητή. Λόγω του «εκφυλισμού» του γενετικού κώδικα, είναι γνωστό ότι παραπάνω από ένα κωδικόνια είναι δυνατόν να κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ. Το κωδικόνιο που θα αντικαθιστούσε αυτό του φυσικού τύπου γονιδίου, ώστε να προκαλέσει τη μεταλλαγή, έπρεπε να περιέχει το μικρότερο δυνατό αριθμό νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων (mismatch) και επιπλέον να εμφανιζόταν με υψηλή συχνότητα στο γονιδίωμα του οργανισμού, στον οποίο επρόκειτο να εκφραστεί το μεταλλαγμένο γονίδιο.

Η θερμοκρασία πρόσδεσης του εκκινητή στη DNA μήτρα (Tm), υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω εμπειρικό τύπο:

$$T_m = 69,3 + 0,41(GC\%) - 650/L$$

Όπου L είναι ο αριθμός νουκλεοτιδικών βάσεων του εκκινητή και GC% είναι το % ποσοστό περιεκτικότητας του εκκινητή σε γουανίνες (G) και κυτοσίνες (C). Τόσο το L όσο και το GC% αναφέρεται στο τμήμα του εκκινητή, ο οποίος παρουσιάζει συμπληρωματικότητα με τη DNA μήτρα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί με PCR. Στην περίπτωση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταλλαξιγένεση, από το T_m που προέκυψε εφαρμόζοντας τον παραπάνω τύπο αφαιρέθηκε το ποσοστό επί τοις εκατό των νουκλεοτιδικών βάσεων οι οποίες είχαν μεταβληθεί σε σύγκριση με το φυσικού τύπου γονιδίου (% mismatch) και από την θερμοκρασία που προέκυψε αφαιρέθηκαν επιπλέον 5 ^{o}C. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο μικρότερο από τα δύο Tm που υπολογίστηκε για κάθε ζεύγος εκκινητών.

6.12.2. Σύσταση της αντίδρασης PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης

Η αντίδραση PCR στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, περιλάμβανε μόνο 25 κύκλους προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία λαθών στη νουκλεοτιδική ακολουθία του προϊόντος της αντίδρασης. Οι πιθανότητες δημιουργίας λάθους ελαχιστοποιήθηκαν λόγω της χρήσης μίας ειδικής πολυμεράσης, της Pfx DNA πολυμεράσης (Invitrogen). Η πολυμεράση αυτή έχει τη δυνατότητα να διορθώνει πιθανά λάθη της (proof reading). Επιπλέον, είναι ανθεκτική στην παρατεταμένη σύνθεση, καθώς μπορεί να συνθέσει πλασμίδια μεγέθους μέχρι και 15 kb. Η διάρκεια

σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας από την DNA πολυμεράση διαφοροποιήθηκε ανάλογα με το μέγεθος του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, η διάρκεια σύνθεσης είναι 60 δευτερόλεπτα για κάθε kb του πλασμιδίου. Στα συγκεκριμένα πειράματα, το πλασμίδιο μήτρα pAN510-GFP έχει μέγεθος περίπου 9 kb και επομένως η σύνθεση έγινε για 9 λεπτά. Η σύσταση και το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης φαίνονται στους Πίνακες 6.6 και 6.7.

Πίνακας 6.6. Η σύσταση της αντίδρασης της PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης

Συστατικά της PCR	Συγκεντρώσεις
Πλασμίδιο (μήτρα)	10 ng
Εκκινητής 5΄- 3΄	135 ng
Εκκινητής 3΄- 5΄	135 ng
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	250 μM από το κάθε ένα
Pfx DNA polymerase	2,5 u
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (περιέχει $MgCl_2$)	1X (τελική συγκέντρωση $MgCl_2$ 1,5 mM)
H_2Odest	μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 50 μL

Πίνακας 6.7. Το πρόγραμμα PCR για την εφαρμογή της *in vitro* κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης

Βήματα	Θερμοκρασία (^oC)	Διάρκεια
1	94	5 min
2	94	15 sec
3	Tm των εκκινητών	30 sec
4	72	1 min/kb πλασμιδίου
5	Επανάληψη 2-4	25 κύκλοι
6	72	10 min
7	12	∞

Το πλασμίδιο που προέκυψε από την παραπάνω αντίδραση PCR, ελέγχθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε σύγκριση με την ποσότητα του αρχικού πλασμιδίου,

που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι ο πολλαπλασιασμός ήταν επιτυχής. Στη συνέχεια το πλασμίδιο υποβλήθηκε σε δίωρη πέψη στους 37 ^{o}C με το περιοριστικό ένζυμο *DpnI,* το οποίο αναγνωρίζει και καταστρέφει τις μεθυλιωμένες ή ημι-μεθυλιωμένες αλυσίδες DNA του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα στην παραπάνω αντίδραση PCR. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνθηκαν τα μόρια πλασμιδίου φυσικού τύπου που δεν περιείχαν την επιθυμητή μεταλλαγή. Μετά την ολοκλήρωση της πέψης, το πλασμίδιο εισήχθηκε σε δεκτικά κύτταρα DH5α και ακολούθησε απομόνωση καθαρού πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένες αποικίες που επιλέχθηκαν παρουσία αμπικιλλίνης. Στα πλασμίδια που παράχθηκαν, έγινε ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της επιθυμητής αντικατάστασης μέσω της επιβεβαίωσης της ύπαρξης της υπό δημιουργία θέσης περιορισμού με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1% αγαρόζης μετά από πέψη με το αντίστοιχα περιοριστικό ένζυμο. Όλες οι ταυτοποιήσεις νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγιναν στον αυτόματο *sequenator* που διαθέτει το Εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας στην Κρήτη.

6.13. Γενετικός μετασχηματισμός στελεχών του *Aspergillus nidulans*

Πίνακας 6.8. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά το μετασχηματισμό

Διάλυμα	Σύσταση
1	1,2 M $MgSO_4$ 10 mM Orthophosphate pH 5,8
2	1 M Σορβιτόλη 10 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM $CaCl_2$

Οι μετασχηματισμοί έγιναν όπως στο Koukaki et al. 2003. Αναλυτικότερα, 200 ml ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα με τις κατάλληλες ουσίες ως προς τις οποίες το στέλεχος είναι αυξότροφο και 5 mM ουρίας ως μοναδική πηγή αζώτου εμβολιάζονται με περίπου $3x10^{9}$ κονιδιοσπόρια σε 10 ml 0,04% αποδιατακτικό tween και επωάζονται στους 37 ^{o}C με 130 rpm ανάδευση για 3-4 ώρες. Η επώαση σταματάει

στη φάση όπου μικροσκοπική παρατήρηση δείχνει πως τα κονίδια μόλις αρχίζουν να εκβλαστάνουν.

Στη συνέχεια, τα κονίδια μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου falcon και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 4000 rpm. Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 20 ml Διαλύματος 1 (Πίνακας 6.8), 170 mg glucanex και μερικούς κόκκους BSA (αλβουμίνης ορού βοδιού, bovine serum albumin). Το εναιώρημα αυτό επωάζεται για 5 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια στους 30 ^{o}C με ανάδευση στις 130 rpm και για 75 λεπτά για τη δημιουργία πρωτοπλαστών.

Μετά το τέλος της επώασης οι πρωτοπλάστες διαμοιράζονται σε γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου corex όπου και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 4000 rpm. Το υπερκείμενο αφαιρείται και οι πρωτοπλάστες πλένονται με προσθήκη 10 ml Διαλύματος 2 και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε όγκο Διαλύματος 2 ανάλογα με τον αριθμό των μετασχηματισμών που πραγματοποιούνται, χρησιμοποιώντας 200 μl πρωτοπλαστών για κάθε μετασχηματισμό.

Τα 200 μl πρωτοπλαστών επωάζονται με 0,5-3 μg του εκάστοτε DNA παρουσία 50 μl διαλύματος 60% PEG 6.000 (polyethylene glycol) σε10 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM $CaCl_2$ για 15 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια στο μίγμα πρωτοπλαστών-DNA προστίθενται 500 μl διαλύματος PEG 60% και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6000 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα πλένεται προσθέτοντας 1 ml Διαλύματος 2 και φυγοκεντρώντας για 5 λεπτά στις 5000 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικά το ίζημα πρωτοπλαστών επαναδιαλύεται σε 200 μl του παραπάνω διαλύματος και απλώνεται ήπια σε ισοοσμωτικό επιλεκτικό στερεό μέσο καλλιέργειας. Τα τρυβλία επωάζονται για 4 μέρες στους 37 ^{o}C.

6.14. Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA του *Aspergillus nidulans*.

Η διαδικασία της ανάλυσης κατά Southern που περιγράφεται παρακάτω, αποτελεί τροποποίηση της αντίστοιχης μεθόδου που περιγράφεται στα Κεφάλαια 9.31-9.57 στο Sambrook et al. 1989.

Η ανάλυση κατά Southern έγινε σε όλα τα μετασχηματισμένα στελέχη του *A. nidulans,* προκειμένου να διαπιστωθεί τόσο το είδος της ενσωμάτωσης του πλασμιδίου στο γονιδίωμα του στελέχους δέκτη όσο και ο αριθμός των πλασμιδιακών αντιγράφων που ενσωματώθηκαν.

6.14.1. Πέψη του γονιδιωματικού DNA και διαχωρισμός των ζωνών σε πήκτωμα αγαρόζης.

3-5 μg γονιδιωματικού DNA που απομονώθηκε από τα μετασχηματισμένα στελέχη υποβλήθηκε σε πέψη με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο παρουσία ριβονουκλεάσης Α 1 μg/ml. Το εκάστοτε περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε, επιλέχθηκε με το κριτήριο της εμφανούς διαφοράς ομόλογων και ετερόλογων ενσωματώσεων στον εκάστοτε γονιδιακό τόπο. Προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης πέψη του γονιδιωματικού DNA, το περιοριστικό ένζυμο προστέθηκε σε δύο φάσεις ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα του περιοριστικού ενζύμου προστέθηκε από την αρχή στην τελική συγκέντρωση (1x). Στην πρώτη φάση προστέθηκε η μισή ποσότητα του ενζύμου και το ένζυμο αφέθηκε να δράσει για δύο ώρες στους 37 ^{o}C. Μετά την πάροδο των δύο ωρών προστέθηκε ίση ποσότητα περιοριστικού ενζύμου και το ένζυμο αφέθηκε να δράσει για άλλες 12 ώρες στους 37 ^{o}C.

6.14.2. Μεταφορά του DNA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Αφού έγινε καλός διαχωρισμός των προϊόντων της πέψης στο πήκτωμα αγαρόζης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε για 5 λεπτά στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, προκειμένου να διασπαστεί το DNA σε μικρότερα κομμάτια και να διευκολυνθεί η μεταφορά του σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιήθηκε με τη βύθιση του πηκτώματος σε διάλυμα μετουσίωσης (Πίνακας 6.9) για 30 λεπτά με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εξουδετερώθηκε σε διάλυμα εξουδετέρωσης (Πίνακας 6.9) για 30 λεπτά με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA στη συνέχεια μεταφέρθηκε μέσω της δράσης τριχοειδών φαινομένων σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Hybond-N^{+} (Amersham) με τη βοήθεια διαλύματος αλάτων 20x SSC (Πίνακας 6.9), χαρτιών Whatman και απορροφητικού χαρτιού (Sambrook et al. 1989). Μετά την

ολοκλήρωση της μεταφοράς του DNA στη μεμβράνη, η μεμβράνη τοποθετήθηκε πάνω στην τράπεζα UV για 5 λεπτά, προκειμένου να μονιμοποιηθεί η πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη μέσω της δημιουργίας ομοιοπολικών «σταυροδεσμών» (cross-linking) μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων νουκλεϊκών οξέων και της θετικά φορτισμένης μεμβράνης.

Πίνακας 6.9. Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανάλυσης κατά Southern

Διαλύματα	Σύσταση στο λίτρο
TAE (50x)	242 g Tris base, 57,1 ml κρυσταλλικό CH_3COOH, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
Διάλυμα Μετουσίωσης	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Διάλυμα Εξουδετέρωσης	1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 8,0
20X SSC	3 M NaCl, 0,3 M $Nα_3C_6H_5O_7$, pH 7,0 με NaOH
Ρυθμιστικό διάλυμα Church	0,5 M Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH 7,0, 1% BSA, 7% SDS, 1 mM EDTA

6.14.3. Προϋβριδισμός - Κατασκευή ραδιοσημασμένου ανιχνευτή με ^{32}P-[^{a}dCTP]-Υβριδισμός.

Η επιλογή της θερμοκρασίας στην οποία πραγματοποιείται ο προϋβριδισμός και ο υβριδισμός είναι καθοριστικής σημασίας. Όσο υψηλότερη είναι αυτή η θερμοκρασία τόσο πιο αυστηρές γίνονται οι συνθήκες πρόσδεσης του ιχνηθέτη στο DNA που είναι προσδεμένο στη μεμβράνη. Σε χαμηλές θερμοκρασίες ευνοείται η πρόσδεση του ιχνηθέτη με τμήματα του γονιδιωματικού DNA με τα οποία υπάρχει μικρή ομολογία στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. Στα συγκεκριμένα πειράματα ο υβριδισμός έγινε στους 65 ^{o}C. Ο προϋβριδισμός της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες επίσης στους 65 ^{o}C σε ρυθμιστικό διάλυμα Church (Πίνακας 9) με περιστροφή μέσα σε ειδικούς κυλίνδρους. Ο υβριδισμός έγινε για 15-18 ώρες στους 65 ^{o}C στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του κατάλληλου ραδιοσημασμένου ανιχνευτή.

Οι DNA ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις Southern και Northern ήταν: Για το ORF του *uapA* το τμήμα 860 bp που ενισχύθηκε με τους

εκκινητές 26 και 27, για το 3' του *uapA* το DNA τμήμα 990 bp που προκύπτει από την πέψη του πλασμιδίου pAN-UapA-GFP^{L} με τα περιοριστικά ένζυμα *SalI*/*ClaI*, για το *argB* το DNA τμήμα 800 bp που προκύπτει από την πέψη του pAN510exp πλασμιδίου με *SalI*, για το *pyr4* το DNA τμήμα το DNA τμήμα 1800 bp που προκύπτει από την πέψη του pGEMpyr4 πλασμιδίου με *EcoRI* και για το *hulA* το DNA τμήμα 1430 bp που προκύπτει από την πέψη του πλασμιδίου pBS C2less HulA cassette με *BamHI/EcoRI*. Από κάθε προϊόν, 250 ng χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ιχνηθέτη. Η σήμανση του ιχνηθέτη έγινε με «τυχαία πρόσδεση» (random priming) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της BRL Multiprime DNA labelling Kit. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν έχουν ως εξής: Τα 250 ng από του ιχνηθέτη προσαρμόστηκαν σε όγκο 21 μl με την προσθήκη απεσταγμένου νερού και αποδιατάχθηκαν με βρασμό για 2 λεπτά, προκειμένου να ανοίξουν οι αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA. Το βρασμένο δείγμα μεταφέρθηκε αμέσως στον πάγο, ώστε να μειωθεί η κινητικότητα των αλυσίδων και να αποφευχθεί η δημιουργία διπλής έλικας. Στο αποδιαταγμένο DNA προστέθηκε μίγμα όλων των πιθανών συνδυασμών τυχαίων εξανουκλεοτιδίων (random hexamers), τα τρία από τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP), το τέταρτο δεοξυνουκλεοτίδιο, dCTP, που ήταν ραδιοσημασμένο με ^{32}P (^{32}P-[$^{\alpha}$dCTP]), Klenow DNA πολυμεράση, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και ο όγκος της αντίδρασης προσαρμόστηκε με την προσθήκη νερού στα 50 μl. Η αντίδραση επωάστηκε για μία ώρα στους 37 ^{o}C. Η αναλυτική σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον Πίνακα 6.10. Τα τυχαία εξανουκλεοτίδια προσδέθηκαν σε τυχαίες θέσεις σε κάθε μονόκλωνη αλυσίδα DNA του ιχνηθέτη. Στα κενά που παρέμειναν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες, συντέθηκε το συμπληρωματικό κομμάτι DNA, μέσω της δράσης της Klenow πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί για αυτό το σκοπό τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια. Επειδή το dCTP δεοξυνουκλεοτίδιο είναι ραδιοσημασμένο με ^{32}P, η συμπληρωματική αλυσίδα που συντέθηκε περιείχε ^{32}P-[$^{\alpha}$dCTP] και επομένως ήταν ραδιοσημασμένη. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στους 37 ^{o}C, το παραπάνω μίγμα διηθήθηκε μέσα από ειδικό κολωνάκι χωρητικότητας 100 μl (Pharmacia), το οποίο συγκράτησε τα ελεύθερα νουκλεοτίδια που δεν κατάφεραν να ενσωματωθούν κατά τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του ιχνηθέτη και τα οποία δημιουργούν θόρυβο (μαύρες κουκίδες) στο φιλμ αυτοραδιογραφίας. Το μίγμα που διηθήθηκε από το κολωνάκι, αποδιατάχθηκε με βρασμό για 2 λεπτά και αμέσως προστέθηκε μέσα στο διάλυμα

προϋβριδισμού στον κύλινδρο που βρισκόταν η μεμβράνη, για να ξεκινήσει ο υβριδισμός. Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε για τουλάχιστον 12 ώρες στους 65 ^{o}C.

Πίνακας 6.10. Η σύσταση της αντίδρασης ραδιοσήμανσης του ιχνηθέτη με ^{32}P-[^{a}dCTP], μέσω της τυχαίας πρόσδεσης εξαμερών

Συστατικά της αντίδρασης	Συγκεντρώσεις
DNA ιχνηθέτης	250 ng
random hexamers (Sigma)	10 ng
dATP (BRL)	10 μM
dGTP (BRL)	10 μM
dTTP (BRL)	10 μM
^{32}P-[^{a}dCTP]	0,05 mCi
Klenow DNA πολυμεράση (Minotech)	5 u
10X ρυθμιστικό διάλυμα Klenow	5 μl
H_2O	μέχρι τα 50 μl

6.14.4. Εκπλύσεις της μεμβράνης-Εμφάνιση

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις εκπλύσεις της μεμβράνης και η κάθε έκπλυση διάρκεσε μισή ώρα. Οι τρεις πρώτες εκπλύσεις έγιναν μέσα στον κύλινδρο με περιστροφή και στους 65 ^{o}C με διάλυμα 2x SSC, 0,1% SDS. Η τελευταία έκπλυση έγινε με το διάλυμα 0,2x SSC, 0,1% SDS, μέσα σε λεκάνη με ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος των εκπλύσεων, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδική κασέτα αυτοραδιογραφίας μαζί με φιλμ (Kodak X-omat) και η κασέτα μεταφέρθηκε στους -80 ^{o}C. Η πρώτη εμφάνιση πραγματοποιήθηκε μετά από δύο ώρες έκθεσης, με κοινά φωτογραφικά διαλύματα ανάπτυξης και μονιμοποίησης της εταιρείας Kodak. Γενικά, η διάρκεια της έκθεσης καθορίζεται από την ποιότητα σήμανσης του ιχνηθέτη αλλά και από τη συγκέντρωση του DNA που έχει προσδεθεί στη μεμβράνη.

6.15. Πρωτόκολλο απομόνωσης και ανάλυσης RNA

6.15.1. Απομόνωση Ολικού RNA από τον *A. nidulans*

Υγρές καλλιέργειες κονιδιοσπορίων στις ανάλογες συνθήκες επωάστηκαν για 12-16 ώρες στους 25 ^{o}C και 130 rpm. Για την απομόνωση RNA, 50-100 mg μυκηλίου θρυμματίστηκαν καλά με υγρό άζωτο και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα τύπου Eppendorf χωρητικότητας 2,0 ml. Κατόπιν ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Trizol (Invitrogen).

6.15.2. Προσδιορισμός της Συγκέντρωσης του RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που περιγράφεται στο βιβλίο Molecular Cloning: A laboratory manual (Sambrook *et al.* 1989). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος μία μονάδα απορρόφησης αντιστοιχεί σε 40 μg/ml RNA, ενώ ο λόγος απορρόφησης 260/280 nm δίνει πληροφορία για την καθαρότητα του RNA και πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,6 και 2.

6.15.3. Ανάλυση Northern

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, για να απενεργοποιηθούν οι RNAάσες, χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό κατεργασμένο με DEPC (diethylpyrocarbonate) της εταιρίας Sigma. Το ολικό RNA που απομονώθηκε, κλασματώθηκε ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα 10 mM ορθοφωσφορικών και 1% (w/v) αγαρόζης, μετά από αποδιάταξη με τη μέθοδο της γλυοξάλης. Στη συνέχεια το RNA μεταφέρθηκε, μέσω της δράσης του τριχοειδών φαινομένων, σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη Hybond-N^{+} (Amersham) με τη βοήθεια διαλύματος αλάτων 20x SSC, χαρτιών Whattman και απορροφητικού χαρτιού (Sambrook *et al.* 1989). Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς του RNA, η μεμβράνη τοποθετήθηκε πάνω στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για 5 λεπτά, προκειμένου να μονιμοποιηθεί η πρόσδεση του αρνητικά φορτισμένου RNA στη μεμβράνη δημιουργώντας

ομοιοπολικούς δεσμούς με τη θετικά φορτισμένη μεμβράνη. Στη φάση αυτή ήταν δυνατή η χρώση της μεμβράνης με κατάλληλη χρωστική (0,03% μπλε του μεθυλενίου, 0,5 M οξικό νάτριο ρH 5,2). Μετά το ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό και την αποθήκευση της εικόνας της μεμβράνης, αποχρωματίζεται με SDS 1%, SSC 0,2X. Για την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν ραδιοσημασμένοι [^{32}P] ιχνηθέτες, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.14.3. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο υβριδισμός σε διάλυμα 0.5 M ορθοφωσφορικού νατρίου pH 7,0, 1 mM EDTA, 7 % (w/v) SDS και 1 % (w/v) BSA, μαζί με τον ανιχνευτή και σε θερμοκρασία 65 ^{o}C για 12-14 ώρες. Μετά τον υβριδισμό ακολούθησαν διαδοχικά πλυσίματα της μεμβράνης σε διάλυμα SSC, 0.1 % (w/v) SDS και τοποθέτησή της σε ειδική κασέτα αυτοραδιογραφίας μαζί με φιλμ (Kodak X-omat) στους -80 ^{o}C, ενώ η διάρκεια της έκθεσης καθορίστηκε από την ποιότητα σήμανσης του ιχνηθέτη και την επιτυχή μεταφορά του ολικού RNA στη μεμβράνη (Sambrook *et al.* 1989).

6.16. Μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένων ουσιών και η κινητική τους

6.16.1. Προετοιμασία κονιδίων του *A. nidulans*

Τα κινητικά πειράματα μέτρησης της πρόσληψης ραδιοσημασμένων πουρινών σε κονιδιοσπόρια και νεαρά μυκήλια στελεχών του *A. nidulans* έγιναν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Papageorgiou et al. 2008 και Tazebay et al. 1995, Tazebay et al. 1997.

Τα στελέχη του *A. nidulans* που χρησιμοποιήθηκαν, αναπτύχθηκαν επαρκώς μετά από επώασή τους σε στερεό, πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα στους 37 °C για 3-4 ημέρες. Τα κονιδιοσπόρια του μύκητα επαναδιαλύθηκαν στη συνέχεια σε διάλυμα Tween-80, συγκέντρωσης 0,01%, διηθήθηκαν μέσω φίλτρου blutex και χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 50 ml υγρής καλλιέργειας ελάχιστου θρεπτικού υποστρώματος που περιείχε τις κατάλληλες αυξοτροφίες, καθώς και τις αρμόζουσες κατά περίπτωση πηγές αζώτου και άνθρακα. Πριν από την επιμόλυνση υπολογίστηκε ο αριθμός των κονιδιοσπορίων και προσαρμόστηκε σε τελική συγκέντρωση 5 x 10^{6} κονιδιοσπόρια ανά ml καλλιέργειας. Η καλλιέργεια επωάστηκε

σε αναδευόμενο επωαστήρα σε συνθήκες 37 °C και 130 rpm, για τον απαιτούμενο χρόνο. Στις συνθήκες αυτές τα κονιδιοσπόρια χρειάζονται περίπου 4 ώρες για να φτάσουν στο τέλος της ισοτροπικής φάσης ανάπτυξης, ενώ νεαρά μυκήλια, παρόμοια με τις συνήθεις συνθήκες του μικροσκοπίου χρειάζονται περίπου 6 ώρες επώασης. Μετά το πέρας των 6 ωρών προστέθηκε στις καλλιέργειες η επιθυμητή ουσία (ουρικό οξύ 0,1 mg/ml, αμμωνιακά ιόντα 10 mM) και η καλλιέργεια συνεχίσθηκε για μία ακόμη ώρα. Στη συνέχεια τα δείγματα πλύθηκαν τρεις φορές με υγρό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα για την απομάκρυνση των προστιθέμενων ουσιών και συγκεντρώθηκαν με φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 5 λεπτά. Ακολούθησε επαναδιάλυση των δειγμάτων σε κατάλληλο όγκο ελάχιστου θρεπτικού υποστρώματος και σε τελική συγκέντρωση 2 x 10^8 αρχικών κονιδιοσπορίων ανά ml. Το κυκλοεξιμίδιο (20 μg/ml) προστέθηκε μετά από 6 ώρες καλλιέργειας στη φάση αυτή. Το εναιώρημα που προέκυψε, διαμοιράστηκε σε Eppendorfs (0,07 ml/ eppendorf) και εξισορροπήθηκε στους 37 °C για 10 λεπτά.

6.16.2. Προσθήκη της ραδιοσημασμένης ουσίας.

Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη της ραδιοσημασμένης ουσίας ([^{3}H]-ξανθίνη (21,1 Ci/mmol), Moravek Biochemicals, Brea, CA) σε συγκέντρωση 0,15 μM για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (συνήθως 1 λεπτό). Η πρόσληψη της ραδιοσημασμένης ουσίας τερματίστηκε με την προσθήκη περίσσειας (σε τελική συγκέντρωση 1 mM) μη σημασμένης ουσίας. Ακολούθησαν στάδια έκπλυσης της ραδιοσημασμένης ουσίας που δεν είχε προσληφθεί από τα κύτταρα. Η έκπλυση έγινε με φυγοκέντρηση του μίγματος στις 12000 rpm για 2 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου, επαναδιάλυση του μίγματος σε 1 ml ψυχρού υγρού διαλύματος και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα τελικά επαναδιαλύθηκε και ομογενοποιήθηκε με vortex σε 1 ml διαλύματος σπινθηρισμού, που περιείχε τον οργανικό διαλύτη τολουένιο, Triton-X-100 και μικροποσότητες των ενισχυτών σήματος PPO και POPOP (σύσταση στο λίτρο, 666 ml τολουένιο, 2,66 g PPO, 0,066 g POPOP, 333 ml Triton-X-100). Τέλος στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της πρόσληψης της ραδιοσημασμένης πουρίνης σε ειδικό φωτόμετρο σπινθηρισμού (Tazebay et al. 1995, Tazebay et al. 1997).

Στα πειράματα ανταγωνισμού προστέθηκαν ταυτόχρονα η ραδιοσημασμένη ουσία σε συγκέντρωση 0,5 ή 1 μM και δέκα διαφορετικές συγκεντρώσεις της μη ραδιοσημασμένης ουσίας (πουρίνες, ανάλογα πουρινών), η οποία έδρασε ως ανταγωνιστής. Από τα πειράματα ανταγωνισμού μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για την εξειδίκευση του μεταφορέα ως προς τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται ως ανταγωνιστές. Τα υποστρώματα που δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο του μεταφορέα είναι αυτά που ανταγωνίζονται τη δέσμευση της ραδιοσημασμένης ουσίας στο ίδιο ενεργό κέντρο. Η δέσμευση ενός υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του μεταφορέα δεν συνεπάγεται απαραιτήτως ότι ο μεταφορέας μεταφέρει το συγκεκριμένο υπόστρωμα κατά μήκος της μεμβράνης. Στα πειράματα κινητικής της πρόσληψης ραδιοσημασμένων ουσιών πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις για κάθε συνθήκη και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών που προέκυψαν. Ο αποδεσμευτής κλίσης πρωτονίων carbonylcyanide chlorophenylhydrazone (CCCP) και ο αναστολέας ATPασών *N*,*N*'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) προστέθηκαν 10 λεπτά πριν την προσθήκη ραδιοσημασμένου υποστρώματος σε συγκεντρώσεις 30 μM και 100 μM αντίστοιχα.

Η σταθερά συγγένειας K_m του μεταφορέα για το ραδιοσημασμένο υπόστρωμα μπορεί να υπολογισθεί εφαρμόζοντας τις εξισώσεις Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk, όπου γίνεται συσχέτιση της ταχύτητας της αντίδρασης (V) με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (S). Με τον τρόπο αυτό μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για τις σχέσεις συγγένειας του φυσικού τύπου όσο και των μεταλλαγμένων μεταφορέων με τα υποστρώματά τους, αλλά και ετερόλογων πρωτεϊνών κατάλληλα εκφρασμένων στον *A. nidulans*. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Prism3, με το οποίο και εξήχθησαν οι τιμές $k_{m/i.}$ Τα αποτελέσματα προέρχονται από τουλάχιστον 2 ανεξάρτητα πειράματα με τρεις επαναλήψεις έκαστο, των οποίων η τυπική απόκλιση των καθαρών τιμών είναι το πολύ 10%.

6.17 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών.

Για την απομόνωση πρωτεϊνών του *A. nidulans*, κονιδιοσπόρια από στελέχη του μύκητα αναπτυγμένα για 4 ημέρες σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα συλλέχθηκαν σε 0,01% (w/v) TWEEN-20 και, μέσω διήθησης με τη χρήση

αποστειρωμένου φίλτρου blutex, εμβολιάσθηκαν σε κωνική φιάλη με 100 ml του εκάστοτε αντίστοιχου ελάχιστου θρεπτικού υποστρώματος (ΜΜ), που περιείχε τις απαραίτητες πηγές αζώτου και αυξοτροφίες. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν για 12-16 ώρες στους 25 °C, με ανάδευση στις 130 rpm. Τα μυκήλια συλλέχθηκαν με τη χρήση φίλτρων blutex, θρυμματίστηκαν 4 φορές έκαστο παρουσία υγρού αζώτου και 400 mg θρυμματισμένου μυκηλίου συλλέχθηκαν σε σωλήνες 2 ml τύπου eppendorf. Κατόπιν ακολουθήθηκαν διαδικασίες ανάλογα με το είδος της επιθυμητής ανάλυσης, όπως αναφέρονται παρακάτω.

6.17.1 Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών (Pantazopoulou et al. 2007).

Το θρυμματισμένο μυκηλίο αναδιαλύθηκε μέχρι ομογενοποίησης σε παγωμένο διάλυμα απομόνωσης (μέχρι τα 2 ml) και επωάσθηκε 20-30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στους 4 °C, στα 3000 g προκειμένου να απομακρυνθούν αδιάσπαστα κύτταρα και κυτταρικά τοιχώματα. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα προπαγωμένα eppendorf 2 ml και οι ολικές μεμβρανικές πρωτεΐνες κατακρημνίσθηκαν με φυγοκέντρηση στα 13.000 g ,στους 4 °C για 1 ώρα. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα επαναδιάλυσης (80-100 μl) και φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 g για 3 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα σωματίδια. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα προπαγωμένα eppendorfs. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν μπορούν να διατηρηθούν στους -80 ^{o}C μέχρι τη χρήση τους. Η συγκέντρωσή τους μετρήθηκε με τη μέθοδο της Bradford. Πριν την ανάλυσή τους με SDS-PAGE προστέθηκε σε αυτά διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων (τελική συγκέντρωση 1x) και επωάσθηκαν 10-15 λεπτά στους 37 °C.

Πίνακας 6.11. Διαλύματα του πρωτοκόλλου της παραγράφου 6.17.1

Διάλυμα	**Σύσταση**
Διάλυμα απομόνωσης	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 0,3 M Σορβιτόλη, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), αναστολείς πρωτεασών (Sigma) (1:500)
Διάλυμα επαναδιάλυσης	10 mM HEPES, 250 mM Σακχαρόζη, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, αναστολείς πρωτεασών (Sigma) (1 :500).
1x διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2-3% SDS, 10 % Γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,005% μπλε της βρωμοφαινόλης

6.17.2 Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών για την ανίχνευση ουβικουιτινυλιωμένων μορφών του UapA (Galan et al. 1996)

Το θρυμματισμένο μυκηλίο αναδιαλύθηκε μέχρι ομογενοποίησης σε παγωμένο διάλυμα απομόνωσης με 25 mM N-ethyl-meilamide (NEM), 1 mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (Sigma) (1:500) (μέχρι τα 2 ml) και επωάσθηκε 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στους 4 °C, στα 3000 g προκειμένου να απομακρυνθούν αδιάσπαστα κύτταρα και κυτταρικά τοιχώματα. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα προπαγωμένα eppendorf 2 ml και οι ολικές μεμβρανικές πρωτεΐνες κατακρημνίσθηκαν με φυγοκέντρηση στα 13.000 g, στους 4 °C για 45 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 400 μl διάλυμα απομόνωσης που περιείχε 5 M ουρία και επωάσθηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Κατόπιν φυγοκεντρήθηκε στα 13.000 g για 45 λεπτά, στους 4 °C, και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 320 μL διαλύματος απομόνωσης, εμπλουτισμένο με 25 mM NEM, 1 mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (Sigma) (1:500). Για την κατακρίμηση των πρωτεϊνών προστέθηκαν 80 μL τριχλωρο-οξικού οξέος (TCA) 50%. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 30 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλύθηκε με προσθήκη και επαναρρόφηση 400 μl Tris Base 1 M, για την εξουδετέρωση του όξινου pH λόγω του TCA. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl 1x διάλυμα μετουσίωσης ουβικουιτινυλιωμένων πρωτεϊνικών δειγμάτων. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν μπορούν να διατηρηθούν στους -80 ^{o}C μέχρι τη χρήση τους. Με αυτό το πρωτόκολλο δεν είναι δυνατός ο ποσοτικός

προσδιορισμός των πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο της Bradford και ο καθορισμός της ισοποσοτικής τους φόρτωσης για την ανάλυση Western έγινε με προηγούμενη αναλυτική ηλεκτροφόρηση μέρους του δείγματος σε SDS-PAGE και χρώση με διάλυμα χρωστικής coomasie (παράγραφος 6.17.7). Πριν την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE επωάσθηκαν για 10-15 λεπτά στους 37 °C.

Πίνακας 6.12. Διαλύματα του πρωτοκόλλου της παραγράφου 6.17.2

Διάλυμα	**Σύσταση**
Διάλυμα απομόνωσης	100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8,0
1x διάλυμα μετουσίωσης ουβικουιτινυλιωμένων πρωτεϊνικών δειγμάτων	250 mM Tris, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% Γλυκερόλη, 2 mM EDTA, 2% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,005% μπλε της βρωμοφαινόλης

6.17.3 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών (Galan et al. 1994)

Τα θρυματισμένα μυκήλια αναδιαλύθηκαν μέχρι ομογενοποίησης σε παγωμένο διάλυμα απομόνωσης (μέχρι τα 2 ml) και επωάσθηκαν 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στους 4 °C, στα 3000 g προκειμένου να απομακρυνθούν αδιάσπαστα κύτταρα και κυτταρικά τοιχώματα. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα προπαγωμένα eppendorf 2 ml και οι ολικές πρωτεΐνες καθίζαναν με προσθήκη TCA σε τελική συγκέντρωση 5 %, κατόπιν ήπιας ανακίνησης. Μετά από 10 λεπτά επώασης στο πάγο, οι πρωτεΐνες κατακριμνήσθηκαν φυγοκεντρώντας το στα 13.000 g ,στους 4 °C για 5 λεπτά. Το ίζημα πλύθηκε με προσθήκη και επαναρρόφηση 400 μl Tris Base 1 M, για την εξουδετέρωση του όξινου pH λόγω του TCA και επαναιωρήθηκε σε διάλυμα απομόνωσης (80-100 μl). Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν μπορούν να διατηρηθούν στους -70^{o} C μέχρι τη χρήση τους. Η συγκέντρωσή τους μετρήθηκε με τη μέθοδο της Bradford. Πριν την ανάλυσή τους με SDS-PAGE προστέθηκε σε αυτά διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων (τελική συγκέντρωση 1x) και επωάσθηκαν 10-15 λεπτά στους 37 °C.

Πίνακας 6.13. Διαλύματα του πρωτοκόλλου της παραγράφου 6.17.3

Διάλυμα	**Σύσταση**
Διάλυμα απομόνωσης	50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών (Sigma) (1:500)
1x διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2-3% SDS, 10% Γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,005% μπλε της βρωμοφαινόλης.

6.17.4 Καθορισμός της ικανότητας εκχύλισης του UapA από τις λιπιδικές μεμβράνες με χρήση Triton-X-100

Το πρωτόκολλο που εφαρμόσθηκε ήταν αυτό των Grossmann et al. 2007. Δείγματα 50 μg απομονωμένων ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (6.17.3) επωάσθηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε 100 μl 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA και αυξανόμενες συγκεντρώσεις Triton-X-100 (0-0,8%). Το μη-διαλυτοποιημένο υλικό κατακριμνήσθηκε με φυγοκέντρηση στα 14.000 g για 30 λεπτά στους 4 ^{o}C και ξεπλύθηκε με 100 μl του αντίστοιχου διαλύματος. Τα ιζήματα επαναδιαλύθηκαν σε 30 μl 1x διαλύματος μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων, επωάσθηκαν για 15 λεπτά στους 37 ^{o}C και κατόπιν αναλύθηκαν σε SDS-PAGE και Western ανάλυση.

6.17.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο της Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Το σύμπλοκο πρωτεϊνών με τη χρωστική του αντιδραστηρίου Bradford (100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml αιθανόλη, 100 ml H_3PO_4, 850 ml H_2O) προκαλεί αλλαγή του μέγιστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Το ποσοστό απορρόφησης είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, 2-5 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος μεταφέρθηκαν σε 2 ml αντιδραστηρίου Bradford σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες, αναμείχθηκαν και η οπτική τους πυκνότητα προσδιορίστηκε στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 2 ml του αντιδραστηρίου. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών

καθορίζεται συγκρίνοντας τις τιμές οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων με την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της αλβουμίνης (BSA).

6.17.6 SDS-GAGE

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε όπως στο Pantazopoulou et al. 2007. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%, SDS 0,1%. Η σύσταση των πηκτωμάτων φαίνεται στον πίνακα 6.14.

Πίνακας 6.14. Σύσταση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης

Συστατικό	Πήκτωμα διαχωρισμού 10 % (10 ml)	Πήκτωμα συσσώρευσης 4 % (10 ml)
Acrylamide/Bisacrylamide 30 % 37,5/1	3,3 ml	1,3 ml
H_2O_{dest}	4,05 ml	6 ml
Lower Tris	2,5 ml	-
Upper Tris	-	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 μl	100 μl
10 % (w/v) APS	50 μl	50 μl
TEMED	10 μl	20 μl

Lower Tris: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Upper Tris: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
APS: Ammonium persulfate.

Τα δείγματα αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά στα 110 V, παρουσία διαλύματος ηλεκτροφόρησης σε συσκευή Mini PROTEAN^{TM} Tetra Cell (Bio-Rad) μέχρι η χρωστική τους (~15 kDa) να φτάσει στο κάτω μέρος του πηκτώματος (~ 1,5 ώρα). Η

ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για την ανίχνευση ουβικουιτινυλιωμένων μορφών του UapA πραγματοποιήθηκε στα 110 V μέχρι να φτάσει στο κάτω μέρος του πηκτώματος η ζώνη των 50 kDa του πρωτεϊνικού μάρτυρα (Fermentas) (~3 ώρες). Ο λόγος της εκτεταμένης ηλεκτροφορητικής ανάλυσης ήταν η ανάγκη διαχωρισμού των πιθανών ουβικουιτινυλιωμένων μορφών του UapA, αφού το μόριο της ουβικουιτίνης έχει μοριακό βάρος περίπου 5 kDa, όταν η UapA-GFP έχει περίπου 95 kDa, αλλά τρέχει στα 80 kDa. Ο λόγος για την αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτεΐνης αυτής είναι ο ίδιος με όλων των μεμβρανικών πρωτεϊνών, μιας και δεν προσδένουν το ίδιο ποσοστό SDS σε σχέση με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Ως γνωστόν, στην SDS-PAGE οι πρωτεΐνες αναλύονται ηλεκτροφορητικά με βάση το αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο που τους προσδίδει η προσάρτηση μορίων SDS σε υδρόφοβα αμινοξέα. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες διαθέτουν περισσότερα τέτοια, οπότε αποκτούν ισχυρότερο αρνητικό φορτίο και εμφανίζουν αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα στις συνθήκες αυτές. Μετά το πέραν της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα χρησιμοποιήθηκε για χρώση με διάλυμα χρωστικής coomasie ή μεταφέρθηκε σε μεμβράνη PVDF (Amersham) για την πραγματοποίηση Western ανάλυσης.

Πίνακας 6.15. Σύσταση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης

Διάλυμα	**Σύσταση**
Διάλυμα ηλεκτροφόρησης	25 mM Tris, 192 mM Γλυκίνη, 0,1 % (w/v) SDS

6.17.7 Χρώση με διάλυμα χρωστικής coomasie

Η χρώση των SDS-PAGE με διάλυμα χρωστικής coomasie πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα 0,25% coomasie brilliant blue, 45% μεθανόλη, 10% κρυσταλλικό οξικό οξύ για μία ώρα υπό ανάδευση. Ακολούθησε αποχρωματισμός του πηκτώματος με 2-3 πλυσίματα των 30 λεπτών σε 30% μεθανόλη, 10% κρυσταλλικό οξικό οξύ.

6.17.8 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα μεταφοράς για 30 λεπτά, ώστε να αποκτήσει οριστικό τελικό μέγεθος. Μετά το πέρας αυτών, η PVDF μεμβράνη ενεργοποιήθηκε για 30 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη και τοποθετήθηκε σε διάλυμα μεταφοράς για 5 λεπτά. Κατόπιν η μεμβράνη τοποθετήθηκε πάνω στο πήκτωμα και δύο χαρτιά Whatmann 4 mm προστέθηκαν εκατέρωθεν. Ο ανωτέρω σχηματισμός τοποθετήθηκε στη συσκευή μεταφοράς, με τη μεμβράνη προς το θετικό πόλο (οι πρωτεΐνες έχουν αποκτήσει αρνητικό φορτίο λόγω του SDS και θα κινηθούν προς αυτόν). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα στα 100 V σε διάλυμα μεταφοράς θερμοκρασίας 4 ^{o}C και χρήση παγοκύστης. Μετά το τέλος της μεταφοράς η μεμβράνη πλύθηκε σε διάλυμα TBS και τοποθετήθηκε σε διάλυμα TBS-Tween μέχρι την επώασή της με το επιθυμητό αντίσωμα.

Πίνακας 6.16. Διαλύματα του πρωτοκόλλου της παραγράφου 6.17.8

Διάλυμα	**Σύσταση**
Διάλυμα μεταφοράς	25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη
Διάλυμα TBS	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl
Διάλυμα TBS-Tween	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05-0,1% Tween 20

6.17.9 Χρώση των δεσμευμένων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πρωτεϊνών με Ponceau S.

Η αποδοτικότητα της μεταφοράς μπορεί να ελεγχθεί με χρώση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη με το αντιδραστήριο Ponceau S, το οποίο δεσμεύεται ειδικά στις πρωτεϊνικές ζώνες προσδίδοντάς τους χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα. Για τη χρώση, η μεμβράνη επωάστηκε με διάλυμα Ponceau S (AppliChem) για 2 λεπτά υπό ανάδευση, και στη συνέχεια εκπλύθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Ακολούθησε έκπλυση της μεμβράνης από τη χρωστική σε διάλυμα TBS-Tween υπό ανάδευση.

6.17.10 Ανοσοαποτύπωμα και Χημειοφθορισμός

Μετά τη μεταφορά τους στη μεμβράνη, οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν ειδικά, με τη βοήθεια αντισωμάτων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένους επιτόπους. Η αλληλεπίδραση επιτόπου-αντισώματος επιτρέπει την ειδική και υψηλής διακριτικότητας ανίχνευση μιας πρωτεΐνης που έχει ακινητοποιηθεί σε μια μεμβράνη, μέσω μιας διαδικασίας που καλείται ανοσοανίχνευση. Μετά τη μεταφορά ενός πηκτώματος SDS σε μεμβράνη, οι περιοχές της μεμβράνης που είναι ελεύθερες πρωτεϊνών πρέπει να αδρανοποιηθούν προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση του πρωτογενούς ή δευτερογενούς αντισώματος στη μεμβράνη. Για το σκοπό αυτό η μεμβράνη επωάστηκε για μια ώρα σε 2% διάλυμα σκόνης γάλακτος σε TBS-Tween (διάλυμα αδρανοποίησης), σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης για 2 ώρες με το πρωτογενές αντίσωμα (mouse anti-GFP μονοκλωνικό αντίσωμα, Roche, αραίωση 1:1000-2000 σε διάλυμα αδρανοποίησης) και έκπλυση με διάλυμα TBS-Tween 2 x 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα στο οποίο είναι χημικά συνδεδεμένο το μόριο αναφοράς Horse Radish Peroxidase (HRP) (rabbit anti-mouse IgG-HRP, Cell Signalling). Μετά την επώαση με τα αντισώματα η μεμβράνη εκπλύθηκε με διάλυμα TBS-Tween 2 x 10 λεπτά, στη συνέχεια για άλλα 10 λεπτά με διάλυμα TBS. Τέλος υποβλήθηκε σε αντίδραση χημειοφθορισμού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το Supersignal West Pico Chemiluminescent (Pierce) ως υπόστρωμα του ενζύμου HRP. Η μεμβράνη στεγνώθηκε μεταξύ διηθητικών χαρτιών, επικαλύφθηκε με 2 ml μίγματος του συγκεκριμένου υποστρώματος πάνω σε γυαλί για 90-240 δευτερόλεπτα, περιτυλίχθηκε σε διαφανή μεμβράνη και στη συνέχεια εκτέθηκε σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, όπως έχει περιγραφεί για τις διαδικασίες Southern και Northern.

6.18 Μικροσκοπία επιφθορισμού

Τα δείγματα για το μικροσκόπιο επιφθορισμού έχουν ετοιμαστεί σύμφωνα με τους Valdez-Taubas et al. 2004. Ειδικότερα, τα δείγματα επωάστηκαν σε τρυβλία Petri 3 cm με καλυπτρίδα, προστατευμένα από το φως, σε υγρό ΜΜ συμπληρωμένο με ουρία ως πηγή του αζώτου και τις κατάλληλες αυξοτροφίες στους 25 ºC για 12

ώρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε διάφορες συνθήκες για 2-4 ώρες. Το κυκλοεξιμίδιο προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 20 μg/ml, 15 λεπτά πριν τη μικροσκοπική παρατήρηση. Η χρώση με FM4-64 (Molecular Probes, Inc, USA) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το Penalva, 2005. Ειδικότερα, καλυπτρίδες με εκβλαστημένα κονίδια ή νεαρά μυκήλια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 3 cm, καλυμμένες με 0,1 ml 10 μM FM4-64, επωάστηκαν στον πάγο για 15 λεπτά, ξεπλύθηκαν με 5 ml MM, και μεταφέρθηκαν σε 3 ml νέου MM για 10 - 60 λεπτά. Η χρώση των χυμοτοπίων με CMAC (7-αμινο-4-χλωρομεθυλο κουμαρίνη) (Molecular Probes, Inc, USA) ήταν σύμφωνα με τους Pantazopoulou et al. 2007. Καλυπτρίδες με εκβλαστημένα κονίδια ή νεαρά μυκήλια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 3 cm, καλυμμένα με 0,1 ml αραίωση 1/1000 της CMAC (5 mg/ml διαλύματος), επωάστηκαν στους 25 ºC για 20 λεπτά, ξεπλύθηκαν με 3 ml MM, και μεταφέρθηκαν σε 3 ml νέο MM για 20 λεπτά. Η διπλή χρώση με CMAC και FM4-64 πραγματοποιήθηκε διαδοχικά. Ειδικότερα, τα δείγματα προετοιμάστηκαν για τη χρώση CMAC όπως παραπάνω, εκτός από το τελευταίο εικοσάλεπτο βήμα πλύσης και στη συνέχεια με FM4-64, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η χρώση με filipin (Sigma) πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 0,1 mL MM που περιείχε 25 μg/ml filipin σε καλυπτρίδες με εκβλαστημένα κονίδια ή νεαρά μυκήλια, τοποθετημένες σε τρυβλία 3 cm, 15 λεπτά πριν την μικροσκοπική παρατήρηση. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο επιφθορισμού αντίθεσης φάσεων Zeiss Axioplan με τα κατάλληλα φίλτρα και οι προκύπτουσες εικόνες αποκτήθηκαν με την Zeiss-MRC5 ψηφιακή φωτογραφική μηχανή με χρήση του λογισμικού V4.40.0 AxioVs40. Οι εικόνες στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Adobe Photoshop CS2 V9.0.2.

6.19 Προσδιορισμός της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ουρικού οξέος με χρήση HPLC

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος έγινε από εκχυλίσματα καλλιεργειών των στελεχών Uaz14 και wt, 12 ωρών σε MM στους 25 ºC με ουρία ως μοναδική πηγή αζώτου, τα οποία θρυμματίσθηκαν σε υγρό άζωτο και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα 10 mM KH_2PO4 (διάλυμα Α) και φιλτραρίστηκαν με φίλτρα διαμέτρου 0,22 μm. Τις μετρήσεις στο HPLC πραγματοποίησε ο Δ. Χατζηνικολάου. Στο HPLC χρησιμοποιήθηκε σύστημα αντλιών Hitachi LaChrom L-

7100 και HP 1046A ανιχνευτής υπεριώδους. Για καλύτερη ανάλυση του μέγιστου της οπτικής απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν δύο κολώνες Spherisob-ODS εν σειρά (5 μm, 150 and 250 x 4 mm, MZ-ANALYTICAL). Τα φιλτραρισμένα κυτταρικά εκχυλίσματα εισήχθησαν στο σύστημα με μικροένεση των 20 μl. Τα διαλύματα έκλουσης ήταν το διάλυμα Α (10 mM KH_2PO4) και το διάλυμα Α με 50% (v/v) μεθανόλη (διάλυμα Β). Και στα δύο το τελικό pH ρυθμίστηκε με πυκνό H_3PO_4 σε 4,5. Ο ρυθμός έκλουσης ήταν 0,8 ml/λεπτό και η έκλουση ξεκίνησε με ένα ισοκρατικό τμήμα 5 λεπτών με 5% του διαλύματος Β. Ακολούθησε γραμμική αυξανόμενη κλίση από 5 έως 55 % του διαλύματος Β για 55 λεπτά. Το μήκος κύματος της ανίχνευσης καθορίσθηκε στα 292 nm, το οποίο αποτελεί και μέγιστο του φάσματος απορρόφησης του ουρικού οξέος. Ο χρόνος έκλουσης του ουρικού οξέος και η συγκέντρωσή του καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα αναφοράς και καμπύλες εξισορρόπησης.

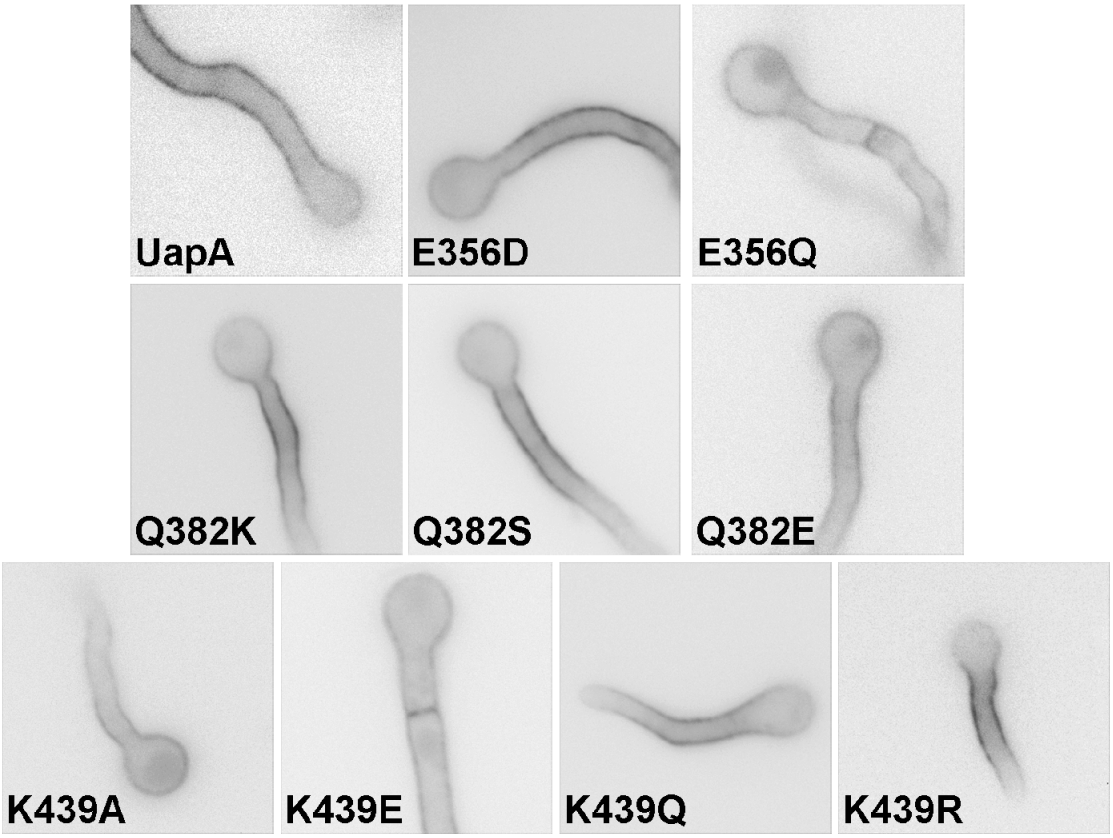
7-8. Αποτελέσματα και Συζήτηση

7. Μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας του UapA

7.1. Κατασκευή, μετασχηματισμός και ανάλυση του φαινοτύπου των νέων αλληλίων

Μετά το σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητικών DNA μορίων (παράγραφος 6.2) πραγματοποιήθηκε *in vitro* στοχευμένη PCR μεταλλαξιγένεση στο πλασμίδιο pAN510-GFP (Pantazopoulou and Diallinas, 2006) που φέρει γονιδιακή σύζευξη του *uapA* με την *sgfp* και όλα τα *cis* στοιχεία ικανά και αναγκαία για τη ρύθμιση της έκφρασης του μεταφορέα, καθώς και το γονίδιο επιλογής *argB*. Τα πλασμίδια που προέκυψαν ελέγχθηκαν με αλληλούχιση για την ύπαρξη των επιθυμητών μεταλλαγών. Κατόπιν εισήχθησαν με μετασχηματισμό πρωτοπλαστών σε στέλεχος Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*azgA argB2,* που φέρει ελλείψεις των γονιδίων των κυριότερων ενδογενών μεταφορέων πουρινών, *uapA, uapC* και *azgA,* ενώ είναι αυξότροφο για αργινίνη. Τουλάχιστον 10 μετασχηματισμένα, πρωτότροφα ως προς αργινίνη, στελέχη από κάθε μεταλλαγή απομονώθηκαν με την μέθοδο των παράλληλων γραμμών. Κατόπιν πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ανάπτυξης σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο με διαφορετικές πουρίνες ως μοναδική πηγή αζώτου, όπως ουρικό οξύ, αδενίνη, υποξανθίνη, σε τουλάχιστον δύο τιμές θερμοκρασίας και pH. Από όλους τους μετασχηματισμούς απομονώθηκαν στελέχη τα οποία εμφάνιζαν ικανότητα αύξησης σε ουρικό οξύ (το φυσιολογικό υπόστρωμα του UapA) ως μοναδική πηγή αζώτου, πλην αυτών που αφορούσαν τις μεταλλαγές του Glu356, όπου όλα τα μετασχηματισμένα εμφάνιζαν φαινότυπο ταυτόσημο με του στελέχους αρνητικού ελέγχου (Εικόνα 7.3). Εξαίρεση αποτελούσε το στέλεχος ED12, το οποίο αποτελούσε προϊόν μετασχηματισμού με το πλασμίδιο που έφερε τη μεταλλαγή Glu356Asp, το οποίο εμφάνιζε μερική ικανότητα αύξησης σε ουρικό. Λόγω του φαινομένου της γονιδιακής μετατροπής (gene conversion) σε κάποια στελέχη που απομονώθηκαν από το μετασχηματισμό το αλλήλιο *argB2* θα είχε διορθωθεί από το πλασμιδιακό αντίγραφο *argB*, χωρίς ωστόσο να έχει ενσωματωθεί το πλασμίδιο. Το γεγονός αυτό είναι πολύ συχνό στο μετασχηματισμό πρωτοπλαστών του *A. nidulans* και άλλων νηματοειδών μυκήτων. Για το λόγο αυτό, τα στελέχη τα οποία εμφάνιζαν ανικανότητα αύξησης σε ουρικό οξύ, έπρεπε να ελεγχθούν για το εάν ήταν όντως μετασχηματισμένα. Ένας αποτελεσματικός τρόπος για τον έλεγχο αυτό ήταν η

παρατήρηση των στελεχών αυτών σε μικροσκόπιο επιφθορισμού, μιας και ο πλασμιδιακής προέλευσης UapA μεταφορέας ήταν συζευγμένος με την GFP. Η ανάλυση αυτή έδειξε πως υπήρχε σύνδεση της ικανότητας αύξησης σε ουρικό οξύ με την ύπαρξη μεταφορέα συζευγμένου με GFP για στελέχη όλων των μεταλλαγών, πλην αυτών που αφορούσαν αντικαταστάσεις του Glu356. Μάλιστα, δεν υπήρχε κανένα στέλεχος το οποίο να είχε μετασχηματισθεί με το πλασμίδιο που έφερε τη μεταλλαγή Glu356Gln και να αναπτύσσεται σε ουρικό, ενώ αρκετά είχαν φθορισμό συμβατό με μεταφορέα UapA. Το ίδιο φαινόταν να ισχύει για τα στελέχη που πιθανώς έφεραν τη μεταλλαγή Glu356Asp, και μάλιστα το ED12 εμφάνιζε σημαντικά αυξημένο φθορισμό. Η τοπολογία της έκφρασης όλων των μεταλλαγμένων στελεχών ήταν παρόμοια με την φυσικού τύπου πρωτεΐνη, γεγονός που υποδηλώνει την δομική αρτιότητά τους (Εικόνα 7.1).



Εικόνα 7.1. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο επιφθορισμού επιλεγμένων στελεχών που φέρουν μεταλλαγμένες μορφές του UapA συζευγμένες με την GFP.

Τα παραπάνω υποδήλωναν πως η μεταλλαγή Glu356Gln οδηγεί σε πλήρη απώλεια λειτουργίας του μεταφορέα UapA, η μεταλλαγή Glu356Asp οδηγεί σε πολύ

μειωμένη λειτουργικότητα, και μόνο η ύπαρξη πολλαπλών γονιδιακών αντιγράφων είναι ικανή να προσδώσει μερική ικανότητα αύξησης σε ουρικό οξύ, ενώ οι υπόλοιπες μεταλλαγές δεν φαινόταν να είναι ικανές να προσδώσουν διακριτούς φαινοτύπους. Για την περαιτέρω ανάλυση του ρόλου κάθε μεταλλαγής ήταν απαραίτητη η λεπτομερής μελέτη των κινητικών χαρακτηριστικών κάθε μεταφορέα, αλλά και η πλήρης διαλεύκανση του αριθμού των πλασμιδιακών αντιγράφων κάθε στελέχους. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA επιλεγμένων μετασχηματισμένων στελεχών, ύστερα από πέψη με *EcoRI*. Χρησιμοποιήθηκαν ραδιενεργοί ιχνθέτες των γονιδιωματικών αλληλουχιών *uapA* και *argB,* με σκοπό την εύρεση του αριθμού των πλασμιδιακών αντιγράφων και του τύπου της ενσωμάτωσής τους (Εικόνα 7.2). Από την ανάλυση αυτή εξειχθησαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

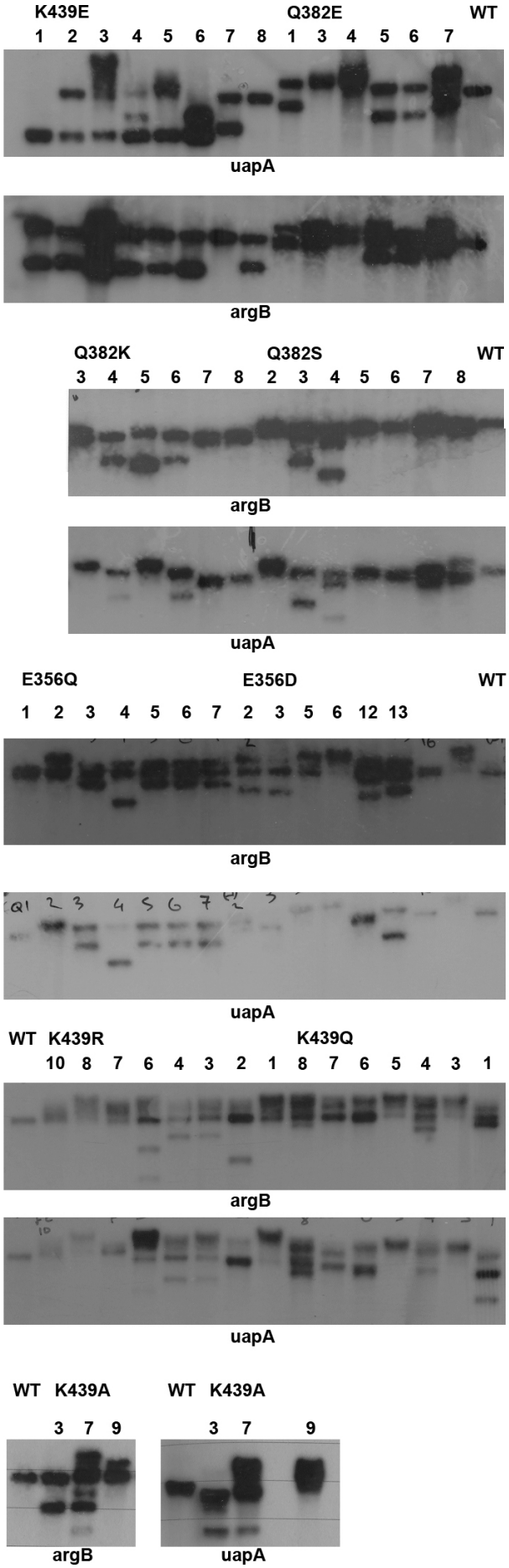
1) Τα στελέχη Q382E4, Q382K7, Q382S6, K439R7, E356D5, E356Q1 φέρουν απλή ενσωμάτωση, προερχόμενη από ετερόλογο ανασυνδυασμό, των αντίστοιχων πλασμιδίων pAN510-GFP.
2) Το στέλεχος K439E8 φέρει απλή, προερχόμενη από ομόλογο ανασυνδυασμό, ενσωμάτωση των αντίστοιχων πλασμιδίων pAN510-GFP.
3) Τα στελέχη K439Q7, K439A9 φέρουν διπλή ενσωμάτωση, προερχόμενη από ετερόλογο ανασυνδυασμό, των αντίστοιχων πλασμιδίων pAN510-GFP.
4) Το στέλεχος E356D12 φέρει πολλαπλές ενσωματώσεις του αντίστοιχου πλασμιδίου.

Συνεπώς, ένα μόνο αντίγραφο των περισσότερων μεταλλαγών είναι αρκετό για να προσδώσει φαινότυπο uapA^{+}. Η μεταλλαγή Glu356Asp φαίνεται να προκαλεί σημαντική μείωση της λειτουργίας της πρωτεΐνης, ενώ η μεταλλαγή Glu356Asn δείχνει να οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας του UapA. Στα επιλεγμένα στελέχη πραγματοποιήθηκε μια σειρά δοκιμασιών ανάπτυξης σε πουρίνες και τοξικά τους ανάλογα, σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH (Εικόνα 7.3). Από την παρατήρησή τους, ενισχύεται ο χαρακτήρας πλήρους απώλειας λειτουργίας του UapA-E356Q-GFP, ενώ φαίνεται πως καμία μεταλλαγή δεν οδηγεί σε αλλαγή της εξειδίκευσης του μεταφορέα, ή σε κάποιον άλλο διακριτό φαινότυπο ανάλογα με τις συνθήκες.

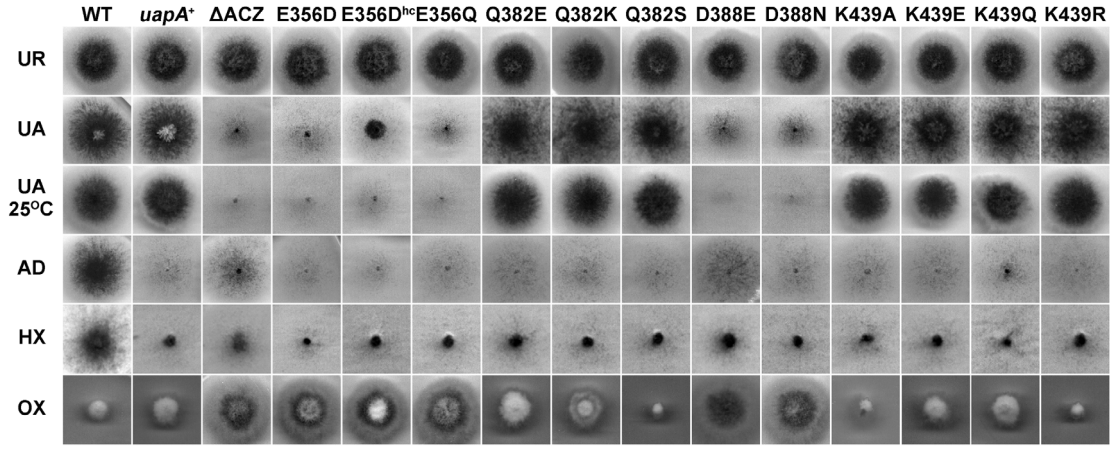
7.2. Κινητική της πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης

Στα επιλεγμένα στελέχη από κάθε μεταλλαγή πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης. Στην Εικόνα 7.4 φαίνεται πως η % πρόσληψη της ξανθίνης συμφωνεί με τις δοκιμασίες ανάπτυξης στην πουρίνη αυτή. Στο στέλεχος ED12, που φέρει πολλαπλά αντίγραφα του UapA-E356D-GFP μεταφορέα, η πρόσληψη ισούται περίπου με το 30% του φυσικού τύπου μεταφορέα.

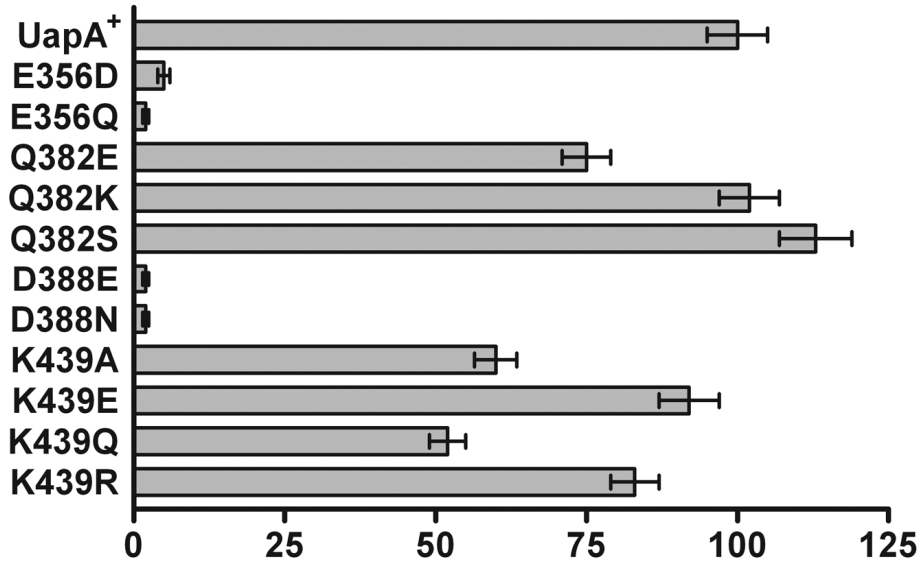
Το γεγονός πως ένα απόλυτα συντηρημένο στα ευκαρυωτικά αμινοξικό κατάλοιπο, όπως η Lys439, ήταν τόσο ανεκτικό σε αντικατάσταση από άλλα κατάλοιπα, διαφορετικού μεγέθους και φορτίου, ήταν αναπάντεχο. Με σκοπό την εύρεση των λεπτομερών κινητικών χαρακτηριστικών των μεταφορέων UapA που φέρουν μεταλλαγές σε αυτή τη θέση, αλλά και των μεταλλαγών στα υπόλοιπα αμινοξικά κατάλοιπα, πραγματοποιήθηκαν κινητικά πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης από μια ποικιλία πιθανών υποστρωμάτων/προσδετών. Η ανάλυση αυτή πιθανώς να αποκάλυπτε και τα αίτια της μειωμένης λειτουργικότητας της E356D μεταλλαγής. Τέτοια πειράματα δυστυχώς δεν ήταν δυνατά για τον UapA- E356Q-GFP, αφού εμφάνιζε μηδενική ενεργότητα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 7.1. Οι μεταλλαγές στο κατάλοιπο Q382 δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τα κινητικά χαρακτηριστικά του μεταφορέα, μειώνοντας λίγο τις συγγένειες δέσμευσης διάφορων αναλόγων. Μοναδική ίσως σημαντική αλλαγή είναι η μείωση της τιμής της συγγένειας δέσμευσης του ουρικού οξέος του μεταφορέα Q382S. Η κινητική ανάλυση των μεταλλαγών του K439 ήταν περισσότερο αποκαλυπτική σχετικά με το ρόλο του. Η συντηρητική του μεταλλαγή σε αργινίνη, αυξάνει σχετικά ομοιόμορφα τη συγγένεια δέσμευσης για τα περισσότερα υποστρώματα/προσδέτες. Αντίθετα αποτελέσματα δείχνουν να έχουν οι μεταλλαγές σε υδρόφοβα ή αντίθετα φορτισμένα αμινοξέα, μειώνοντας σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης για τα ανάλογα της ξανθίνης με ογκώδεις υποκαταστάσεις.



Εικόνα 7.2. Ανάλυση κατά Southern στελεχών μετασχηματισμένων με πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια των αντίστοιχα μεταλλαγμένων UapA πρωτεϊνών να αναφέρονται πάνω από το αυτοραδιογράφημα. Κάτω από αυτό αναφέρεται το γονίδιο- ιχνηθέτης. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ενδογενείς ζώνες των αντίστοιχων γονιδίων.



Εικόνα 7.3. Δοκιμασίες ανάπτυξης επιλεγμένων στελεχών σε ουρία (UR), ουρικό οξύ (UA), αδενίνη (AD), υποξανθίνη (HX), και ουρία με οξυπουρινόλη (OX), τοξικό ανάλογο της ξανθίνης που αποτελεί υπόστρωμα του UapA. WT: στέλεχος φυσικού τύπου, ΔACZ: στελεχος με έλλειψη των *uapA*, *uapC* και *azgA*



Εικόνα 7.4. Κανονικοποιημένη ανά γονιδιακό αντίγραφο % πρόσληψη ραδιοσημασμένης ξανθίνης.

Όσον αφορά το κατάλοιπο Glu356, η κινητική ανάλυση της μεταλλαγής του σε ασπαρτικό ήταν αποκαλυπτική σχετικά με τον πιθανό του ρόλο στην πρωτεΐνη. Τα αρχικά πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης από ξανθίνη έδιναν μια τιμή αναστολής κοντά στο 1 μM. Η συγκέντρωση αυτή είναι πολύ κοντά στην χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση της ραδιοσημασμένης ξανθίνης (0,15 μM).

Περιορισμός της μεθόδου προσδιορισμού σταθερών συγγένειας/αναστολής με τη μέθοδο αποτελεί η τουλάχιστον υποδεκαπλάσια συγκέντρωση του ραδιοσημασμένου υποστρώματος από την τιμή σταθερά συγγένειας/αναστολής, ωστέ η τιμή του να μπορεί να θεωρηθεί ως 100% στα πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψής της με αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος/προσδέτη. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε πείραμα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ραδιοσημασμένης ξανθίνης, και κατασκευή καμπύλης Michaelis-Menten. Από αυτήν (Πίνακας 7.1) φαίνεται πως το K_m της ξανθίνης στο E356D είναι 0,4 μM, δηλαδή βελτίωση της συγγένειας σχεδόν 17 φορές σε σχέση με το στέλεχος φυσικού τύπου. Αντίστοιχη είναι η βελτίωση της συγγένειας περισσότερα ανάλογα, με εξαίρεση την 9-μεθυλοξανθίνη, της οποίας μάλιστα το K_i έχει αυξηθεί σημαντικά, ενώ η βελτίωση της δέσμευσης του ουρικού δείχνει να είναι 8 φορές. Στην πραγματικότητα, η τιμή της συγγένειας αναστολής του ουρικού ίσως είναι χαμηλότερη, αλλά δεν μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια με αυτή τη μεθοδολογία. Στη διάθεσή μας όμως δεν υπήρχε ραδιοσημασμένο ουρικό οξύ, και η ακριβής γνώση της τιμής της συγγένειας δέσμευσης του ουρικού οξέος δεν θα προσέφερε περαιτέρω στην κατανόηση του ρόλου του Glu356.

Πίνακας 7.1. Τιμές σταθεράς συγγένειας/αναστολής για διάφορα υποστρώματα/προσδέτες.

	$K_{m/i}$ (μM)								
	UapA$^+$	**E356D**	**Q382E**	**Q382K**	**Q382S**	**K439E**	**K439R**	**K439A**	**K439Q**
Ξανθίνη	7	0,4	5	3	6	7	2	1,8	4
Ουρικό οξύ	8	1	8	6	141	43	7	5	84
Αδενίνη	μ.α.	~1000	μ.α.	μ.α.	μ.α.	μ.α.	>1000	>1000	μ.α.
Υποξανθίνη	μ.α.	>1000	μ.α.	μ.α.	μ.α.	μ.α.	>1000	>1000	μ.α.
Γουανίνη	μ.α.	>1000	δ.π.	δ.π.	μ.α.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
Ουρακίλη	μ.α.	~1000	~1000	~1000	n.d	δ.π.	δ.π.	δ.π.	>1000
1-μεθυλο-ξανθίνη	280	15	280	>1000	>1000	~1000	132	>1000	>1000
2-θειο-ξανθίνη	63	3	12	50	86	50	40	18	117
3-μεθυλο-ξανθίνη	28	24	19	44	400	28	20	20	373
6-θειο-ξανθίνη	346	2	63	90	730	321	180	616	>1000
7- μεθυλο-ξανθίνη	μ.α.	24	>1000	μ.α.	μ.α.	μ.α.	>1000	μ.α.	μ.α.
8 μεθυλο-ξανθίνη	100	80	16	39	240	~1000	70	>1000	476
9- μεθυλο-ξανθίνη	200	>1000	>1000	318	914	450	200	>1000	>1000
Οξυπουρινόλη	100	2,5	102	97	101	158	59	39	242

μ.α.: μη αναστολή, δ.π.: δεν πραγματοποιήθηκε

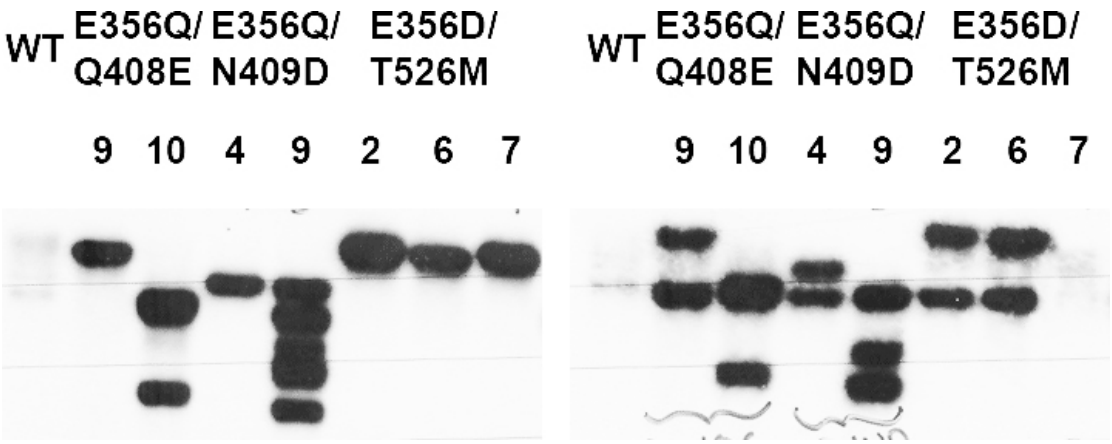
Λόγω της αρνητικά φορτισμένης φύσης του γλουταμικού οξέος σε ουδέτερα pH, το E356 είναι δυνατό να συμμετέχει στη δέσμευση ή/και μεταφορά του πρωτονίου το οποίο είναι απαραίτητο για την ενεργό συμμεταφορά από τον UapA. Η αντικατάστασή του με ασπαρτικό, το οποίο διαθέτει μικρότερη σε μήκος πλευρική αλυσίδα, πιθανώς να παρεμποδίζει την πλήρη λειτουργικότητα του μονοπατιού μεταφοράς του πρωτονίου. Η θεώρηση αυτή θα μπορούσε να εξηγήσει την πολύ μικρή ενεργότητα που εμφανίζει η E356D πρωτεΐνη. Για να ελεγχθεί αυτή η περίπτωση, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης παρουσία του αναστολέα ATPασών, CCCP, καθώς και του πρωτονοφόρου, DCCD. Το αποτέλεσμα της χρήσης και των δύο είναι η παρεμπόδιση της ενεργού συμμεταφοράς, δηλαδή η αποσύζευξη της μεταφοράς του υποστρώματος από την μεταφορά του πρωτονίου. Σε άλλους μεταφορείς (Herzlinger et al., 1985) έχει δειχθεί πως είναι δυνατόν έτσι ο μεταφορέας να πραγματοποιεί παθητική μεταφορά του υποστρώματος, ενώ μπορεί και να επηρεάζεται η συγγένεια δέσμευσης με την οποία το αναγνωρίζει (Godoy et al., 2007). Τα πειράματα έδειξαν πως η πρωτεΐνη E356D συμπεριφέρεται όπως ο φυσικού τύπου μεταφορέας στους δύο αναστολείς (τα δεδομένα δεν παρατίθενται), σε απόλυτες και σχετικές τιμές πρόσληψης.

7.3. Περαιτέρω ανάλυση του ρόλου του Glu356

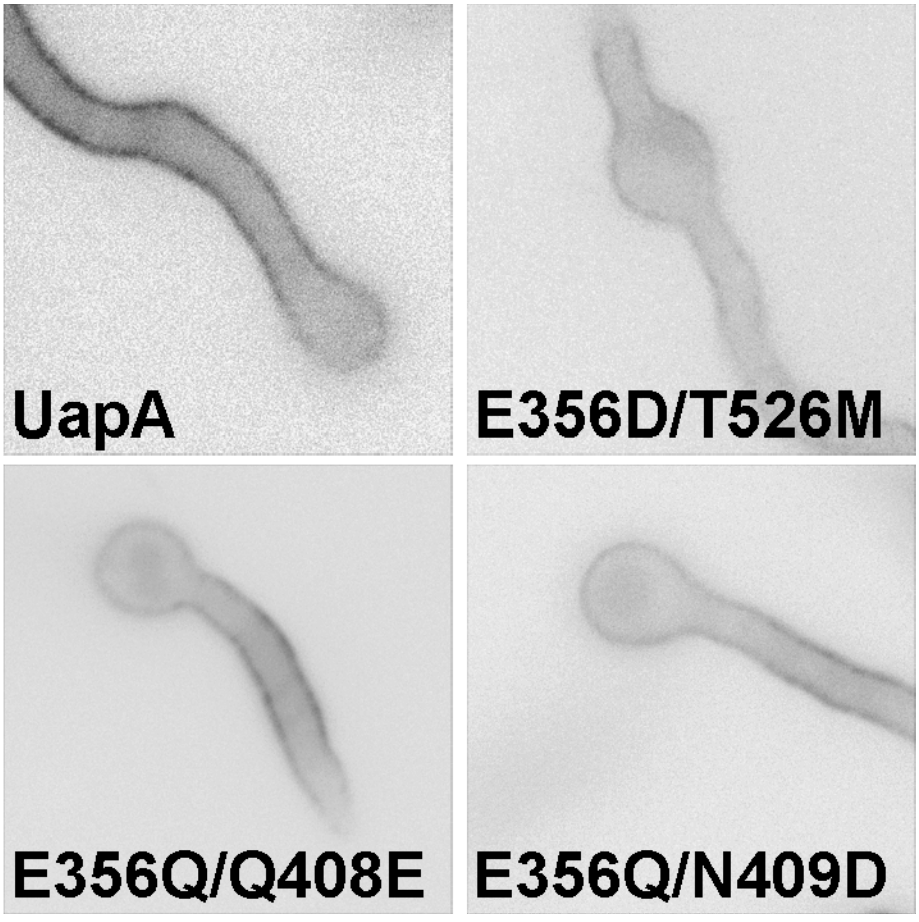
Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του Glu356, και δεδομένης της απόλυτης συντήρησής του στην οικογένεια NAT, αποφασίσθηκε ο συνδυασμός της μεταλλαγής απώλειας λειτουργίας E356Q με άλλες ήδη υπάρχουσες μεταλλαγές μερικής ή πλήρους απώλειας λειτουργίας σε συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα. Η πρώτη ήταν η μεταλλαγή N409D, πλήρους απώλειας λειτουργίας στην απόλυτα συντηρημένη ασπαραγίνη του NAT μοτίβου, η οποία πιθανώς σχετίζεται με κινήσεις κατά τη διαδικασία μεταφοράς του υποστρώματος (Goudela et al., 2005, Koukaki et al., 2005). Σε περίπτωση που το Glu356 αλληλεπιδρούσε με την Asn409, είναι πιθανό ο συνδυασμός Gln356 με Asp409 να είναι λειτουργικός. Αυτό γιατί οι δύο αμινοξικές υποκαταστάσεις αφορούν ισοδομικά σε κάθε θέση αμινοξέα, ενώ ο νέος συνδυασμός έχει ίδιο μήκος πλευρικών αλυσίδων και θα αποκαθιστούσε αντίστροφα τα πιθανά αλληλεπιδρώντα φορτία της φυσικού τύπου πρωτεΐνης. Ο δεύτερος συνδυασμός αφορούσε τις υποκαταστάσεις E356Q και Q408E. Σε αυτή την περίπτωση αλλάζει η

θέση δύο συντηρημένων αμινοξέων, και σε περίπτωση που αυτά βρίσκονταν κοντά στο χώρο στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, ίσως ήταν δυνατή η μερική λειτουργικότητά της. Ο τρίτος συνδυασμός είχε σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής λειτουργικής και δομικής αλληλεπίδρασης του Glu356 με περιοχές του μεταφορέα άλλες από το κέντρο δέσμευσης (NAT μοτίβο). Έχει δειχθεί σε παλιότερες εργασίες (Amillis et al., 2001, Koukaki et al., 2005, Vlanti et al., 2006) πως το NAT μοτίβο αλληλεπιδρά με το TMS12. Αντίστοιχα αποτελέσματα στον YgfO μεταφορέα υποδεικνύουν την εγγύτητα μέρους του TMS12 με το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος (Papakostas et al., 2008). Κατά τη διάρκεια εκπόνησης των ανωτέρω πειραμάτων είχαν απομονωθεί μεταλλαγές στη Thr528 του UapA, οι οποίες έδειχναν φαινότυπο παρόμοιο με αυτές της Phe526, καθώς και φαίνονταν να αλληλεπιδρούν με το NAT μοτίβο (Gournas et al., 2008, Papageorgiou et al., 2008). Η διπλή μεταλλαγή E356D/T526M σχεδιάστηκε με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής αυτής αλληλεπίδρασης, αλλά και ως πιθανή έμμεση ένδειξη της αλληλεπίδρασης του Glu356 με το NAT μοτίβο.

Οι παραπάνω διπλές μεταλλαγές κατασκευάσθηκαν με αντικατάσταση της αλληλουχίας η οποία περιέχεται μεταξύ των δύο μοναδικών *SacII* περιοριστικών θέσεων, των πλασμιδίων pAN510-GFP-E356Q και pAN510-GFP-E356D, με αυτές των πλασμιδίων pAN510-GFP-N409D, pAN510-GFP-Q408E και pAN510-GFP-T526M αντίστοιχα. Τα πλασμίδια μετασχηματίστηκαν σε στέλεχος Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*azgA argB2* με επιλογή για πρωτότροφα σε αργινίνη στελέχη. Στην Εικόνα 7.5 φαίνεται η ανάλυση κατά Southern επιλεγμένων μετασχηματισμένων στελεχών. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν από την ανάλυση αυτή παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο επιθφορισμού, όπου και διαπιστώθηκε η φυσικού τύπου τοπολογία και έκφραση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών (Εικόνα 7.6). Στα στελέχη αυτά πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ανάπτυξης σε διάφορες θερμοκρασίες, pH, πουρίνες και συγκεντρώσεις αυτών, καθώς και τοξικά ανάλογά τους (Εικόνα 7.7).

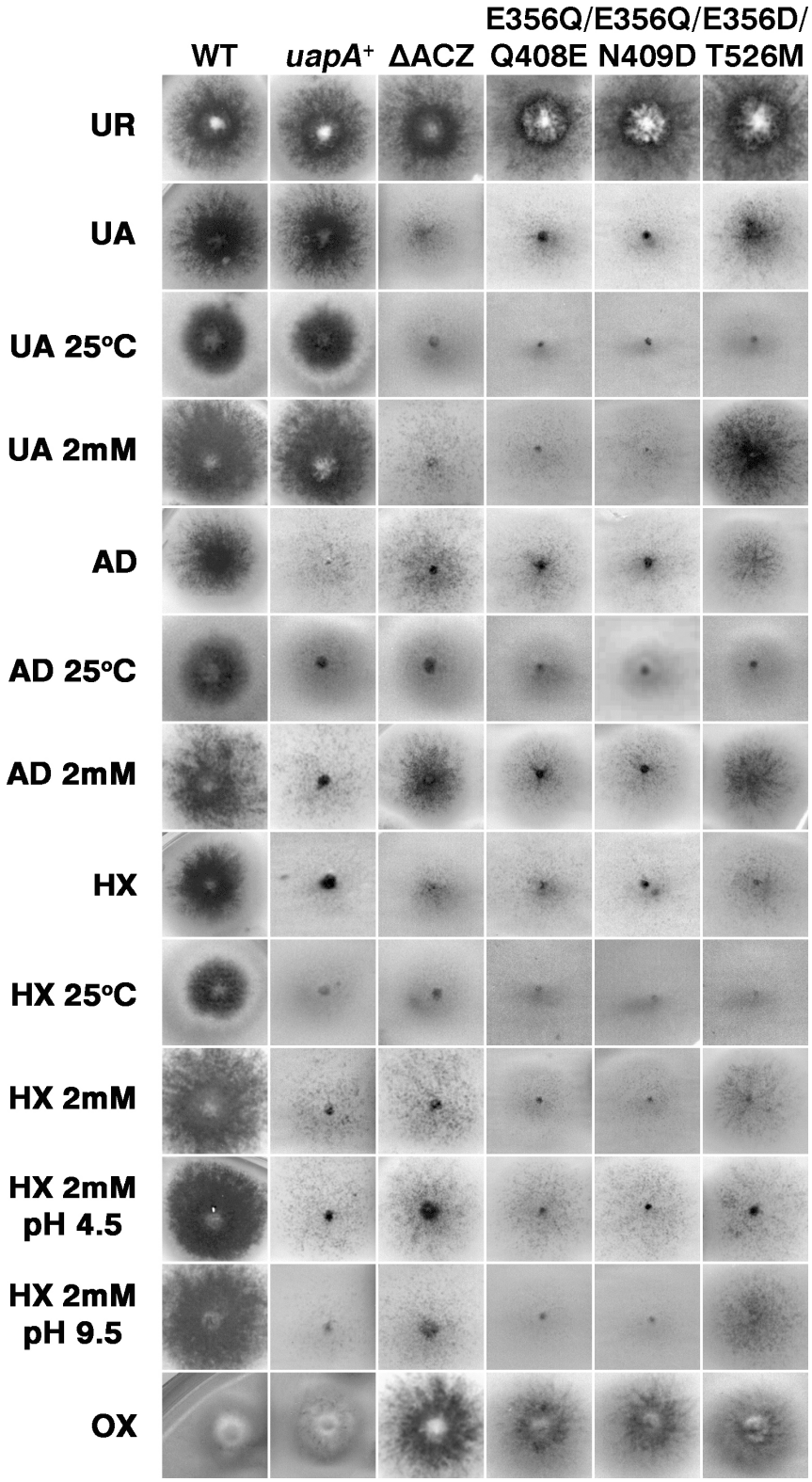


Εικόνα 7.5. Ανάλυση κατά Southern επιλεγμένων μετασμηματισμένων στελεχών με ιχνηθέτες για τα γονίδια *argB* (δεξιά) και *UapA* (αριστερά). Επιλέχθηκαν ως στελέχη απλής ετερόλογης ενσωμάτωσης τα EQ/QE9, EQ/ND4 και ED/TM2. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ενδογενείς ζώνες των αντίστοιχων γονιδίων.



Εικόνα 7.6. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο επιφθορισμού των αντίστοιχων επιλεγμένων μετασχηματισμένων στελεχών.

Από τις δοκιμασίες ανάπτυξης φαίνεται πως οι συνδυασμοί των μεταλλαγών E356Q/N409D και E356Q/Q408E είναι μη λειτουργικοί. Το γεγονός αυτό δεν είναι ασύμβατο με την λειτουργική και δομική αλληλεπίδραση των αμινοξικών αυτών καταλοίπων, αλλά δεν επιτρέπει την περαιτέρω διερεύνηση τους με τις κατασκευές αυτές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ο φαινότυπος του στελέχους που φέρει την E356D/T526M διπλή μεταλλαγή. Φαίνεται πως εξακολουθεί να υπάρχει η κρυοευαισθησία της E356D μεταλλαγής, αλλά στους 37 ^{o}C η διπλή μεταλλαγή είναι λειτουργική, η μεταφορική της ικανότητα δείχνει να αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος από 0,5 σε 2 mM, ενώ εμφανίζει μικρή ικανότητα πρόσληψης αδενίνης και λιγότερο υποξανθίνης. Η αύξηση της μεταφορικής ικανότητας ουρικού οξέος καθώς η συγκέντρωση αυξάνεται από 0,5 σε 2 mM υποδηλώνει πως ο μεταφορέας δεν είναι κορεσμένος στα 500 μM. Μοιάζει δηλαδή η τιμή της σταθεράς συγγένειας να είναι πολύ υψηλή. Κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώθηκε από τα πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης (Πίνακας 7.2), όπου δείχθηκε πως η E356D/T526M πρωτεΐνη έχει σταθερά αναστολής για ουρικό οξύ 30 μM. Η μεταφορική ικανότητα της πρωτεΐνης είναι χαμηλή, περίπου 10% αυτής του φυσικού τύπου, όπως φαίνεται από τον αρχικό ρυθμό πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης. Η κινητική της πρόσληψης για την ξανθίνη αλλά και για διάφορα άλλα υποστρώματα/προσδέτες παρουσίαζε διφασική καμπύλη, εικόνα συμβατή με την ύπαρξη δύο θέσεων δέσμευσής τους. Μάλιστα για την ξανθίνη, οι δύο αποκτηθείσες τιμές είναι πολύ κοντά σε αυτές των απλά μεταλλαγμένων μεταφορέων. Για την αδενίνη ο μεταφορέας δείχνει να έχει ένα υψηλής (14 μM) και ένα χαμηλής συγγένειας κέντρο δέσμευσης, Ο χαμηλός ρυθμός πρόσληψής της, όπως φαίνεται από τις δοκιμασίες ανάπτυξης, υποδηλώνει πως η αδενίνη πιθανώς μόνο προσδένεται στο υψηλής συγγένειας κέντρο δέσμευσης, ενώ μεταφέρεται αποδοτικά μόνο μέσω του δεύτερου χαμηλής συγγένειας κέντρου. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως υπάρχει λειτουργική αλληλεπίδραση των δύο αμινοξέων, κάτι που γίνεται ιδιαίτερα έκδηλο από την σημαντικά αυξημένη συγγένεια του διπλά μεταλλαγμένου μεταφορέα για αδενίνη και 9-μεθυλοξανθίνη σε σχέση με τις μονά μεταλλαγμένες πρωτεΐνες.



Εικόνα 7.7. Δοκιμασίες ανάπτυξης των επιλεγμένων μετασχηματισμένων στελεχών σε ουρία (UR), ουρικό οξύ (UA), αδενίνη (AD), υποξανθίνη (HX) και ουρία με οξυπουρινόλη (OX), σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και pH. WT: στέλεχος φυσικού τύπου, ΔACZ: στελεχος με έλλειψη των *uapA*, *uapC* και *azgA*.

Πίνακας 7.2. Τιμές σταθερών συγγένειας/αναστολής για διάφορα υποστρώματα/προσδέτες.

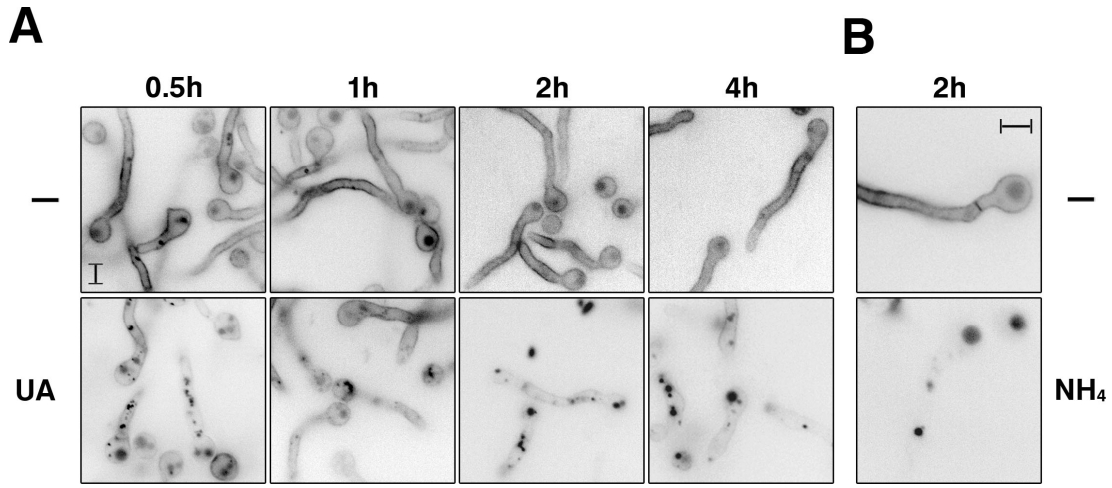
	$K_{m/i}$ (μM)			
	UapA$^+$	**T526M**	**E356D**	**E356D/ T526M**
Ξανθίνη	7	5	0,4	0,2/10
Ουρικό οξύ	8	12	1	30
Αδενίνη	μ.α.	>1000	~1000	14/732
Υποξανθίνη	μ.α.	>1000	>1000	38/>1000
Γουανίνη	μ.α.	>1000	>1000	117
Ουρακίλη	μ.α.	76/ >1000	~1000	90
1-μεθυλο-ξανθίνη	280	288	15	<2
2-θειο-ξανθίνη	63	8	3	<10
3-μεθυλο-ξανθίνη	28	11	24	<10
6-θειο-ξανθίνη	346	6	2	<10
7- μεθυλο-ξανθίνη	μ.α.	~1000	24	<20
8 μεθυλο-ξανθίνη	100	6	80	<10
9- μεθυλο-ξανθίνη	200	202	>1000	90
Οξυπουρινόλη	100	22	2,5	2,9

μ.α.: μη αναστολή

8. Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του UapA

8.1. Το ουρικό οξύ προκαλεί αποικοδόμηση του UapA στο χυμοτόπιο μέσω απομάκρυνσης από την πλασματική μεμβράνη και διαλογής στα ενδοσώματα

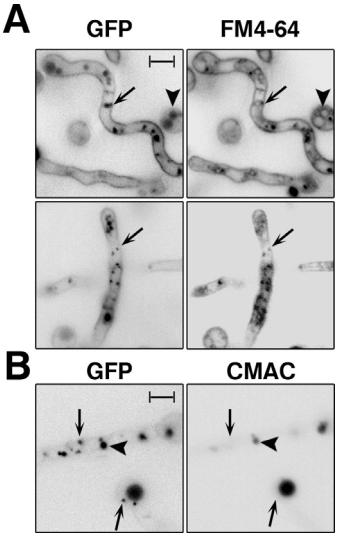
Σε πειράματα του εργαστηρίου μας (Pantazopoulou et al. 2007) είχε παρατηρηθεί πως η προσθήκη ουρικού οξέος στο θρεπτικό μέσο επάγει την αλλαγή της υποκυτταρικής κατανομής του σημασμένου με GFP UapA. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη του ουρικού φαίνεται να απομακρύνει σε κάποιο ποσοστό τον μεταφορέα από την φυσιολογική του κατανομή στην πλασματική μεμβράνη και τα διαφράγματα και να τον οδηγεί σε εσωτερικές στικτές υποκυτταρικές δομές και σε χυμοτόπια. Το φαινόμενο αυτό είχε παρατηρηθεί με την προσθήκη ουρικού οξέος για 2 ώρες σε καλλιέργειες που προηγουμένως είχαν φτάσει στο στάδιο της εκβλάστησης (>12 ώρες στους 25 ^{o}C) σε μια ουδέτερη για τον UapA πηγή αζώτου (ουρία). Για την πληρέστερη κατανόηση του φαινομένου πραγματοποιήθηκε πείραμα όπου δείγματα του στελέχους UapA-GFP είχαν επωαστεί σε διάφορους χρόνους με ουρικό οξύ στο θρεπτικό τους μέσο (Εικόνα 8.1A). Στο στέλεχος UapA-GFP (Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*azgA pabaA1 argB2*::pAN510-GFP), όπου απουσιάζουν οι κυριότεροι μεταφορείς πουρινών, UapA, UapC και AzgA, η UapA-GFP πρωτεΐνη εκφράζεται από το πλασμίδιο pAN510-GFP (Pantazopoulou et al. 2007), το οποίο έχει ενσωματωθεί στον γονιδιακό τόπο του *argB*. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1A, το φαινόμενο είναι διακριτό από τα πρώτα 30 λεπτά, ενώ η μέγιστη απομάκρυνση του μεταφορέα από την πλασματική μεμβράνη φαίνεται να επιτυγχάνεται σε 2 έως 4 ώρες μετά την προσθήκη του υποστρώματος. Παρόλα αυτά, ο μεταφορέας είναι ακόμη διακριτός στην πλασματική μεμβράνη του μύκητα, ενώ η εσωτερική του κατανομή είναι σαφώς διαφορετική από αυτή της περίπτωσης προσθήκης αμμωνιακών κατιόντων (Εικόνα 8.1B, Pantazopoulou et al. 2007).



Εικόνα 8.1. Α) Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού από τον Γ. Διαλλινά στο UapA-GFP στέλεχος με προσθήκη (UA) ή χωρίς (-) ουρικού οξέος για διάφορους χρόνους. Β) Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού στο UapA-GFP στέλεχος με προσθήκη (NH_4) ή χωρίς (-) αμμωνιακών ιόντων. Η μπάρα υποδεικνύει 5 μm, εδώ και σε όλη την έκθεση προόδου.

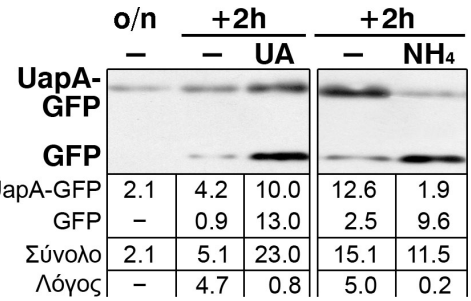
Η προσθήκη αμμωνιακών ιόντων, ως προτιμώμενη πηγή αζώτου, αναστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου του *uapA* και οδηγεί την πρωτεΐνη στο χυμοτόπιο προς αποικοδόμηση (Pantazopoulou et al. 2007). Σε μια προσπάθεια ταυτοποίησης των μικρών, στικτών υποκυτταρικών δομών που παρατηρήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν χρώσεις με FM4-64 και CMAC σε δείγματα που είχε προηγουμένως προστεθεί ουρικό οξύ. Η FM4-64 είναι μια αμφίφιλη ουσία η οποία εισχωρεί στην λιπιδική διπλοστιβάδα και πρακτικά βάφει όλες τις μεμβράνες του κυττάρου (Penalva, 2005). Στον *A. nidulans* η χρώση των υφών με FM4-64 στους 4 ^{o}C, όπου η ενδοκύτωση είναι ανενεργή, χρωματίζει αποκλειστικά την πλασματική μεμβρανη. Με μεταφορά του δείγματος στους 25 ^{o}C η ενδοκύτωση ενεργοποιείται και καθίσταται δυνατή η χρονική *in vivo* παρακολούθηση της διακίνησης των μεμβρανών της πλασματικής μεμβράνης και προδευτικά η χρώση διαφόρων μεμβρανικών οργανιδίων (Penalva, 2005). Με αυτή τη διαδικασία διαπιστώθηκε πως τα μικρά στικτά οργανίδια του UapA-GFP που φαίνονται κατά την προσθήκη ουρικού οξέος συνεντοπίζονται με αντίστοιχα της FM4-64 (Εικόνα 8.2Α). Πρέπει δε να σημειωθεί ότι τα μικρότερα στικτά σωματιδία στα οποία συνεντοπίζεται η FM4-64 και ο UapA-GFP χαρακτηρίζονται από έντονη κινητικότητα, χαρακτηριστική των πρώιμων ενδοσωμάτων (Penalva 2005, Abenza et al. 2009). Επισης, κάποια από τα μη κινητικά σωματίδια ίσως να είναι άλλα υποκυτταρικά οργανίδια του εκκριτικού ή ενδοκυτωτικού μονοπατιού, όπως πολυκυστιδιακά σωμάτια (MVBs) και πρώιμα

χυμοτόπια. Τα σωματίδια αυτά δεν συνεντοπίζονται με την CMAC (Εικόνα 2B), χρωστική των ώριμων κυρίως χυμοτοπίων (Pantazopoulou et al. 2007). Με συνδυασμό των αποτελεσμάτων των δύο χρωστικών παρατηρείται πως ο μεταφορέας UapA παρουσία ουρικού αποικοδομείται στα χυμοτόπια μεσω προηγούμενης απομάκρυνσης από την πλασματική μεμβράνη και διαλογής στα ενδοσώματα.



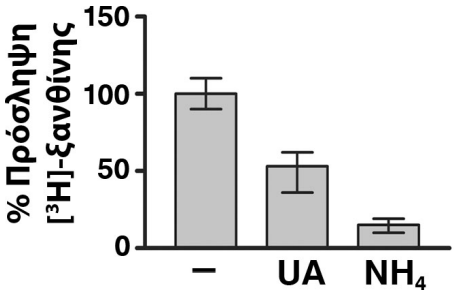
Εικόνα 8.2. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού στο UapA-GFP (GFP) στέλεχος με προσθήκη ουρικού οξέος για 2 ώρες και κατόπιν χρώση με A) FM4-64 και B) CMAC. Τα βέλη υποδεικνύουν ενδεικτικά μικρά στικτά σωματίδια που βάφονται με FM4-64 και όχι με CMAC. Οι κεφαλές των βελών υποδεικνύουν ενδεικτικά χυμοτόπια (Γ. Διαλλινάς).

Ανοσοαποτύπωμα Western (Εικόνα 8.3) με ειδικό μονοκλωνικό για την GFP αντίσωμα εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από όμοιες με τις ανωτέρω συνθήκες έδειξε 2 φορές αύξηση της ποσότητας της UapA-GFP και 14 περίπου φορές για την «ελευθερη» GFP. Κατά την είσοδο της UapA-GFP στον αυλό του χυμοτοπίου, πραγματοποιείται πρωτεόλυση από ειδικές πρωτεάσες. Η GFP είναι ανθεκτική στις πρωτεάσες αυτές, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στα χυμοτόπια. Το πείραμα αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη πως μεγάλο ποσοστό του μεταφορέα έχει οδηγηθεί στο χυμοτόπιο προς αποικοδόμηση, στην οποία η GFP είναι ανθεκτική. Το κλάσμα του άθικτου UapA-GFP μεταφορέα αντιπροσωπεύει μόρια από την πλασματική μεμβράνη, τα ενδοσώματα και τα MVBs. Συνθήκες όπου έχουν προστεθεί αμμωνιακά ιόντα έχουν συμπεριληφθεί ως πειράματα ελέγχου. Σε παρόμοια συμπεράσματα οδηγούν τα αποτελέσματα από την % πρόσληψη ραδιοσημασμένης ξανθίνης (Εικόνα 8.4). Η ενδοκύτωση του μεταφορέα αποτελεί μια πολύ καλή εξήγηση για την ασυμφωνία της παρατηρούμενης ενεργότητας του μεταφορέα στην πλασματική μεμβράνη (μέγιστη αύξηση 3 φορές) και της μεταγραφικής του επαγωγής (περίπου 8 φορές αύξηση) κατά την προσθήκη ουρικού οξέος σε παλαιότερα πειράματα (Γ. Διαλλινάς, αδημοσίευτα αποτελέσματα).



	o/n	+2h		+2h	
	–	–	UA	–	NH_4
UapA-GFP	2.1	4.2	10.0	12.6	1.9
GFP	–	0.9	13.0	2.5	9.6
Σύνολο	2.1	5.1	23.0	15.1	11.5
Λόγος	–	4.7	0.8	5.0	0.2

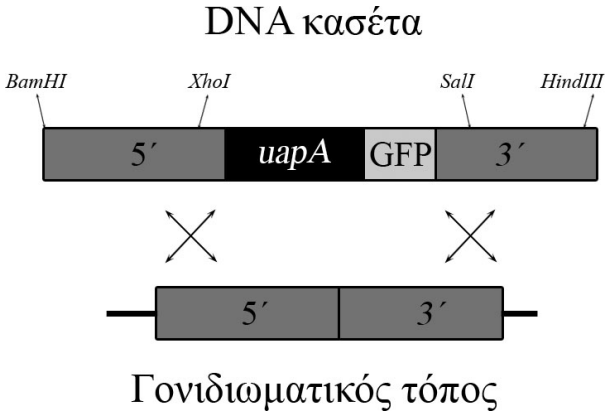
Εικόνα 8.3. Ανοσοστύπωμα Western πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από καλλιέργειες στελέχους UapA-GFP 12 ωρών (o/n) σε ουρία, στις οποίες προστέθηκε για 2 ώρες ουρικό οξύ (UA), αμμωνιακά ιόντα (NH_4) ή τίποτα (-). Στον πίνακα, εδώ και σε όλη την έκθεση προόδου, αναγράφονται οι σχετικές των εντάσεων τιμές που αποκτήθηκαν από την ημιποσοτική ανάλυση των ζωνών του ανοσοστυπώματος με το πρόγραμμα imageJ, καθώς και το σύνολο και ο λόγος των τιμών ακέραιης UapA-GFP και αποκομμένης GFP πρωτεΐνης (Πείραμα από Α. Βλαντή)



Εικόνα 8.4. Πείραμα πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης σε καλλιέργειες του στελέχους UapA-GFP με προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς για 2 ώρες (από τον Γ. Διαλλινά.)

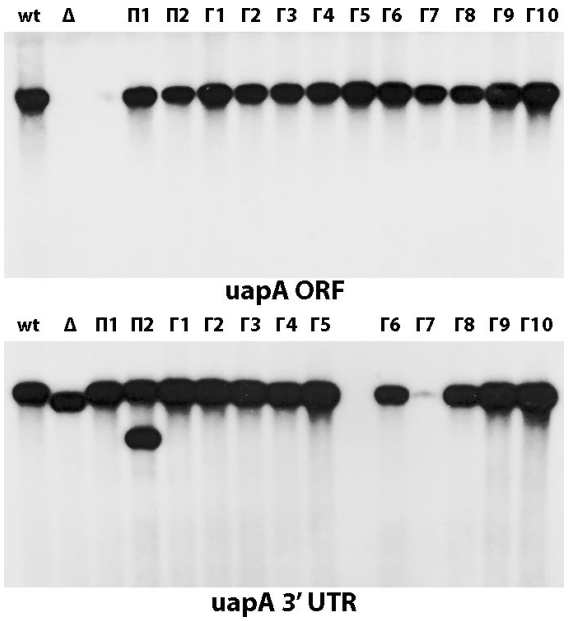
8.2. Η ενσωμάτωση του *uapA-gfp* στο γονιδιωματικό τόπο του *uapA*

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε και έχει μέχρι στιγμής χρησιμοποιηθεί σε όλα τα πειράματα μικροσκοπίας επιφθορισμού που αφορούν τον UapA, εκφράζει την UapA-GFP χιμαιρική πρωτεΐνη από τον φυσιολογικό υποκινητητή του αλλά από πλασμίδιο (pAN510-GFP) το οποίο έχει ενσωματωθεί στον γονιδιακό τόπο *argB*. Για να αποκλεισθεί το ακραίο ενδεχόμενο η ενσωμάτωση αυτή να επηρεάζει με οποιονδήποτε τρόπο το υπό μελέτη φαινόμενο, αποφασίστηκε η ενσωμάτωση του χιμαιρκού γονιδίου *uapA-gfp* στο γονιδιωματικό τόπο του *uapA*. Η ενσωμάτωση σχεδιάστηκε να γίνει με με διπλό ομόλογο ανασυνδυασμό με γραμμικό DNA τμήμα που φέρει το *uapA-gfp* (Εικόνα 8.5, Παράγραφος 6.11.3).

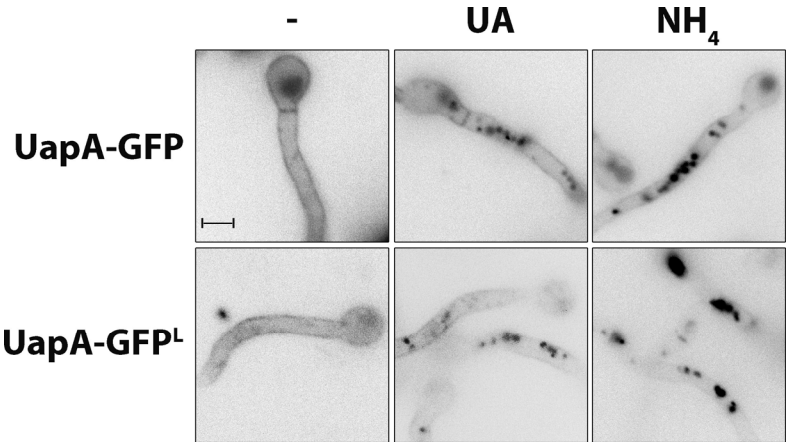


Εικόνα 8.5. Σχηματική απεικόνηση της κασέτας μετασχηματισμού που χρησιμοποιήθηκε για την ενσωμάτωση του *uapA-gfp* ORF στο γονιδιωματικό τόπο Δ*uapA*. Φαίνονται τα ενζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της κασέτας.

Λόγω της απαλοιφής του γονιδίου της NkuA DNA ελικάσης στο πατρικό στέλεχος (Nayak et al. 2006), η οποία είναι απαραίτητη για γεγονότα ετερόλογου DNA ανασυνδυασμού, μόνο στελέχη με αντικατάσταση του γονιδιωματικού τόπου Δ*uapA* με την ανωτέρω κασέτα μπορούσαν να επιλεχθούν. Ως πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο μετασχηματισμός με κυκλικό πλασμίδιο. Στην εικόνα 8.6 φαίνεται ανάλυση κατά Southern επιλεγμένων μετασχηματισμένων στελεχών. Όλα τα μετασχηματισμένα με την γραμμική κασέτα στελέχη (Γ) έδειξαν μοναδική ομόλογη ενσωμάτωση στον γονιδιωματικό τόπο που αρχικά έφερε ολοκληρωτική έλλειψη του ανοιχτού πλαισίου αναγνωσης του *uapA* (Δ*uapA*) και αντικατάστασή του με διπλό ομόλογο ανασυνδυασμό. Το στέλεχος Π2 που μετασχηματίστηκε με κυκλικό πλασμίδιο φέρει μοναδική ομόλογη ενσωμάτωση στον γονιδιωματικό τόπο του Δ*uapA* με απλό ομόλογο ανασυνδυασμό, και κατά συνέπεια τις *uapA-gfp* και Δ*uapA* αλληλουχίες εν σειρά. Όλα τα μετασχηματισμένα Γ στελέχη έδειξαν την ίδια εικόνα σε μικροσκόπιο επιφθορισμού και το στέλεχος Γ1 επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση. Το Γ1 διασταυρώθηκε με κατάλληλο στέλεχος για την απομάκρυνση της Δ*nkuA* μεταλλαγής, η οποία έχει δειχθεί να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των τελομερών του *A. nidulans* (Palmer et al. 2010). Από τη διασταύρωση αποκτήθηκε στέλεχος *uapA-GFP ΔuapC* (UapA-GFP^{L}), το οποίο και χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού, συγκριτικά με το UapA-GFP στέλεχος (Εικόνα 8.7). Το αποτέλεσμα ήταν ξεκάθαρο πως ο γονιδιωματικός τόπος έκφρασης του *uapA-gfp* δεν έχει σχέση με την αποικοδόμησή του από το υπόστρωμα ή τα αμμωνιακά ιόντα.



Εικόνα 8.6. Ανάλυση κατά Southern με ιχνηθέτες για το ORF και το 3΄ UTR του *uapA,* γονιδιωματικού DNA στελεχών μετασχηματισμένων με πλασμίδιο (Π) ή γραμμική κασέτα (Γ) του πλασμιδίου pAN-UapA-GFP^{L}, καθώς και στελεχών *uapA*$^{+}$ (wt) και Δ*uapA* (Δ).

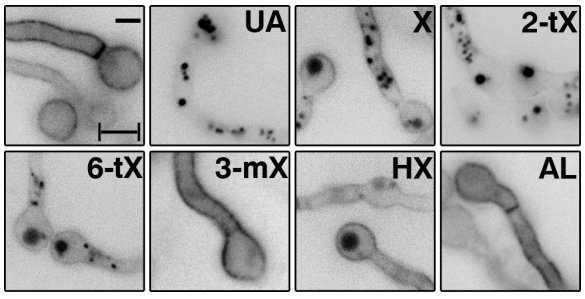


Εικόνα 8.7. Συγκριτικό πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού των στελεχών UapA-GFP και UapA-GFP^{L} με ή χωρίς (-) δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA) ή αμμωνίας (NH_4).

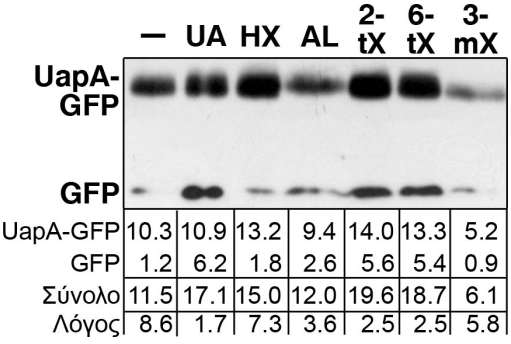
8.3. Η αποικοδόμηση του UapA προκαλείται ειδικά από τα υποστρώματά του ανεξάρτητα από τη μεταβολική τους πορεία

Ο UapA έχει ένα επιπλέον φυσιολογικό υπόστρωμα εκτός του ουρικού οξέος (με K_m 7 μM) , την ξανθίνη (με K_m 7 μM), καθώς και μια σειρά αναλόγων της, των οποίων η κινητική είναι μελετημένη και οι συγγένειες δέσμευσης γνωστές. Δοκιμάσθηκε κατά πόσον το φαινόμενο της εξαρτώμενης από το ουρικό διαλογής και αποικοδόμησης του μεταφορέα σε χυμοτόπια προκαλείται επίσης από τα υποστρώματα αυτά. Κάποια από τα ανάλογα αυτά, συγκεκριμένα η 2-θείο-ξανθίνη (με K_m 63 μM) και η 6-θείο-ξανθίνη (με K_m 346 μM) είναι γνωστό ότι μεταφέρονται

από τον UapA, ενώ η 3-μέθυλο-ξανθίνη όχι, παρόλο που προσδένεται ισχυρά σε αυτόν ως συναγωνιστικός αναστολέας (με K_i 28 μM) (Papageorgiou et al. 2008, Β. Κωστή, Γ. Παπαγεωργίου και Γ. Διαλλινάς, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επιπλέον, και για να ελεγχθεί η υπόθεση πως κάποια παραγόμενη μεταβολικά ουσία και όχι το ουρικό επάγει την αποικοδόμηση, δοκιμάσθηκαν και δύο ουσίες που βρίσκονται στο μονοπάτι καταβολισμού πουρινών. Από της ουσίες αυτές, η υποξανθίνη βρίσκεται αναρροϊκά του ουρικού και της ξανθίνης, ενώ η αλλαντοΐνη καταρροϊκά. Και οι δύο δεν αναγνωρίζονται από τον UapA και οι μεταφορείς τους, AzgA (Cecchetto et al. 2004) και FurA (Hamari et al. 2009) αντίστοιχα είναι γνωστό ότι εκφράζονται στις συγκεκριμένες συνθήκες. Πειράματα μικροσκοπικής παρατήρησης (Εικόνα 8.8) έδειξαν πως, όπως και το ουρικό, τα υποστρώματα του μεταφορέα που μεταφέρονται από αυτόν (ξανθίνη, 2-θείο-ξανθίνη και 6-θείο-ξανθίνη) είναι ικανά να προκαλέσουν την ενδοκύτωσή του. Η αποτελεσματικότητα της ενδοκύτωσης μοιάζει να ακολουθεί τη συγγένεια πρόσδεσης του UapA για τις ουσίες αυτές (με εξαίρεση την ξανθίνη). Το γεγονός ότι η 3-μέθυλο-ξανθίνη, ένας υψηλής συγγένειας προσδέτης του UapA, δεν προκάλεσε την αποικοδόμηση του μεταφορέα, ήταν κατά κάποιο τρόπο αναπάντεχο και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το σήμα για την ενδοκύτωση του UapA είναι η μεταφορά και όχι η δέσμευση του υποστρώματος. Αναμενόμενο λοιπόν ήταν η υποξανθίνη και η αλλαντοΐνη να μην προκαλούν την αποικοδόμηση του UapA. Τα παραπάνω αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με ανάλυση Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (Εικόνα 8.9).



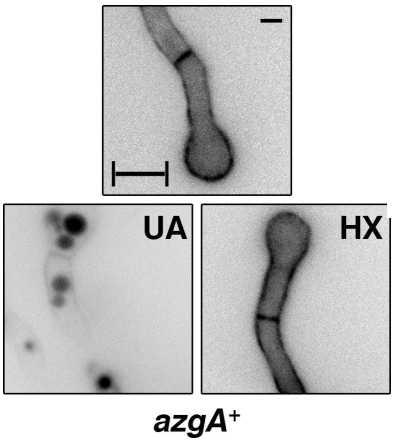
Εικόνα 8.8. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού από τους Α. Βλαντή και Γ. Διαλλινά στο UapA -GFP στέλεχος με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), ξανθίνης (X), 2-θειο-ξανθίνης (2-tX), 6-θείο-ξανθίνης (6-tX), 3-μεθυλο-ξανθίνης (3-mX), υποξανθίνης (HX), αλλαντοΐνης (AL) ή χωρίς (-).



	—	UA	HX	AL	2-tX	6-tX	3-mX
UapA-GFP	10.3	10.9	13.2	9.4	14.0	13.3	5.2
GFP	1.2	6.2	1.8	2.6	5.6	5.4	0.9
Σύνολο	11.5	17.1	15.0	12.0	19.6	18.7	6.1
Λόγος	8.6	1.7	7.3	3.6	2.5	2.5	5.8

Εικόνα 8.9. Ανοσοστύπωμα Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του UapA -GFP στελέχους με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), ξανθίνης (X), 2-θειο-ξανθίνης (2-tX), 6-θείο-ξανθίνης (6-tX), 3-μεθυλο-ξανθίνης (3-mX), υποξανθίνης (HX), αλλαντοΐνης (AL) ή χωρίς (-).

Επειδή στο συγκεκριμένο στέλεχος (UapA-GFP) ο κύριος μεταφορέας υποξανθίνης AzgA έχει απαλειφθεί, για να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο η σημαντικά μειωμένη ικανότητα πρόσληψης της πουρίνης αυτής να έχει επηρεάσει το ανωτέρω αποτέλεσμα, το πείραμα επαναλήφθηκε σε στέλεχος που κατασκευάσθηκε μέσω διασταύρωσης. Το στέλεχος αυτό εκφράζει τον UapA-GFP και τον AzgA. Όπως ήταν αναμενόμενο, και στο συγκεκριμένο στέλεχος το ουρικό οξύ και όχι η υποξανθίνη, επάγει την αποικοδόμηση του UapA (Εικόνα 8.10). Η υποξανθίνη μάλιστα, επειδή μεταβολικά μετατρέπεται σε ουρικό οξύ, επάγει τη μεταγραφή του UapA και ο φθορισμός είναι αρκετά πιο έντονος. Τα πειράματα αυτά αποτελούν ισχυρές ενδείξεις πως η παρατηρούμενη αποικοδόμηση του UapA δεν οφείλεται σε καταρροϊκά προϊόντα του καταβολισμού πουρινών ή στα παραγόμενα αμμωνιακά ιόντα δεδομένου ότι η υποξανθίνη και η αλλαντοΐνη επίσης τα παράγουν και επιπλέον η 2-θείο-ξανθίνη και η 6-θείο-ξανθίνη δεν μπορούν να μεταβολιστούν σε καμία πρωτογενή πηγή του αζώτου (Darlington and Scazzocchio 1967).

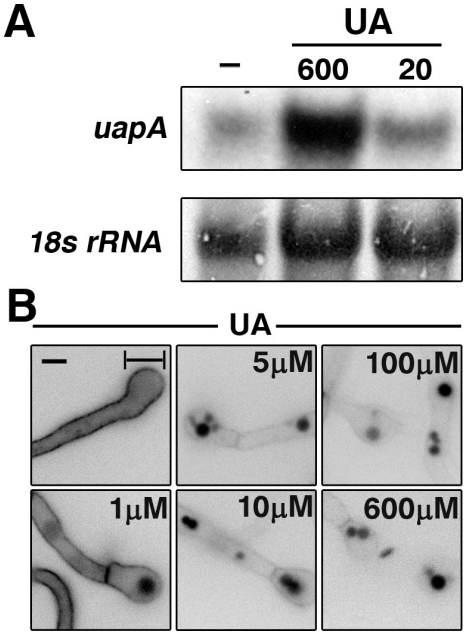


Εικόνα 8.10. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού στο UapA-GFP AzgA^{+} στέλεχος με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), υποξανθίνης (HX) ή χωρίς (-).

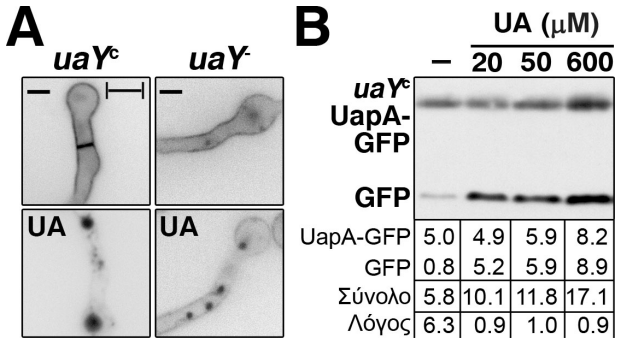
8.4. Η επαγόμενη από το υπόστρωμα αποικοδόμηση του μεταφορέα είναι ανεξάρτητη από τη μεταγραφή του

Δεδομένου ότι όλα τα υποστρώματα που προκαλούν την αποικοδόμηση του UapA είναι επίσης επαγωγείς της μεταγραφής του *uapA* γονιδίου (Α. Βλαντή, αδημοσίευτα αποτελέσματα), ένας πιθανός μηχανισμός για το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του ειδικού για το μονοπάτι καταβολισμού πουρινών θετικού μεταγραφικού ρυθμιστή, UaY (Oestreicher and Scazzocchio 1993). Ο UaY μάλιστα ενεργοποιείται από το ίδιο το ουρικό οξύ. Κατά

συνέπεια μελετήθηκε κατά πόσον χαμηλές συγκεντρώσεις ουρικού, η οποίες δεν επαρκούν για να προκαλέσουν μεταγραφική επαγωγή, μπορούν να προκαλέσουν τη διαλογή του UapA σε ενδοσώματα και χυμοτόπια. Με ανάλυση Northern βρέθηκε πως συγκέντρωση ουρικού 20 μM δεν προκαλεί επαγωγή της μεταγραφής του *uapA* (Εικόνα 8.11A). Ωστόσο συγκεντρώσεις ίσες και χαμηλότερες των 20 μM ήταν επαρκείς για να προκαλέσουν αποδόμηση του UapA (Εικόνα 8.11B). Επιπλέον κατασκευάσθηκαν με διασταύρωση στελέχη που εκφράζουν τον UapA-GFP και ταυτόχρονα φέρουν μια μεταλλαγή στον UaY θετικό μεταγραφικό ρυθμιστή. Οι μεταλλαγές αυτές είναι είτε απώλειας (UaY^-), είτε συνεχούς (UaY^c) λειτουργίας. Πειράματα μικροσκοπίας επιφθορισμού και ανάλυσης Western έδειξαν την μη εμπλοκή της πρωτεΐνης UaY στην ενδοκύτωση του UapA από τα υποστρώματά του (Εικόνα 8.12).

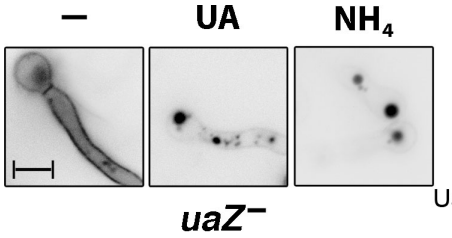


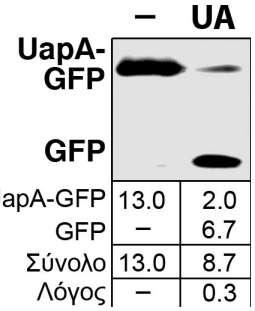
Εικόνα 8.11. A) Ανάλυση Northen με ιχνηθέτη για το *uapA,* ολικών RNA στελέχους φυσικού τύπου από καλλιέργειες 12 ωρών σε ουρία (-) και δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος σε τελική συγκεντρωση 600 ή 20 μM. Το *18s rRNA* αποικονίζεται όπως φαίνεται μετά από ειδική χρώση της μεμβράνης. B) Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού στο UapA-GFP στέλεχος με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA) σε διάφορες συγκεντρώσεις, ή χωρίς (-).



Εικόνα 8.12. A) Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού στα στελέχη UapA-GFP *uaY*$^-$ και UapA-GFP *uaY*^{c} με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), ή χωρίς (-). B) Ανοσοστύπωμα Western από τον Σ. Αμίλλη εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του UapA-GFP *uaY*^{c} στελέχους με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Ένα ακόμη πείραμα σχεδιάστηκε για τη διερεύνηση της εμπλοκής της μεταγραφικής επαγωγής στην αποικοδόμηση του UapA. Είναι γνωστό πως στέλεχος που φέρει μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του ενζύμου της ουρικάσης (*uaZ*⁻), συσσωρεύει ουρικό οξύ. Λόγω της συσσώρευσης αυτής, και του γεγονότος πως το ουρικό οξύ είναι ο φυσιολογικός επαγωγέας του μονοπατιού καταβολισμού πουρινών, έχει αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του *uapA*. Με διασταύρωση δημιουργήθηκε στέλεχος που φέρει τα *uapA-gfp* και *uaZ*⁻ αλλήλια. Σε αυτό μελετήθηκε η τοπολογία του UapA. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.13, σε πειράματα της Α. Βλαντή, απουσία ουρικού οξέος ή αμμωνιακών ιόντων, ο μεταφορέας βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη, ενώ κατά την προσθήκη ουρικού ή αμμωνίας, συμπεριφέρεται όπως και σε στέλεχος φυσικού τύπου. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαίωσαν πως η επίδραση των υποστρωμάτων επί της αποικοδόμησης του UapA είναι πλήρως ανεξάρτητα της μεταγραφικής του επαγωγής.





	–	UA
UapA-GFP	13.0	2.0
GFP	–	6.7
Σύνολο	13.0	8.7
Λόγος	–	0.3

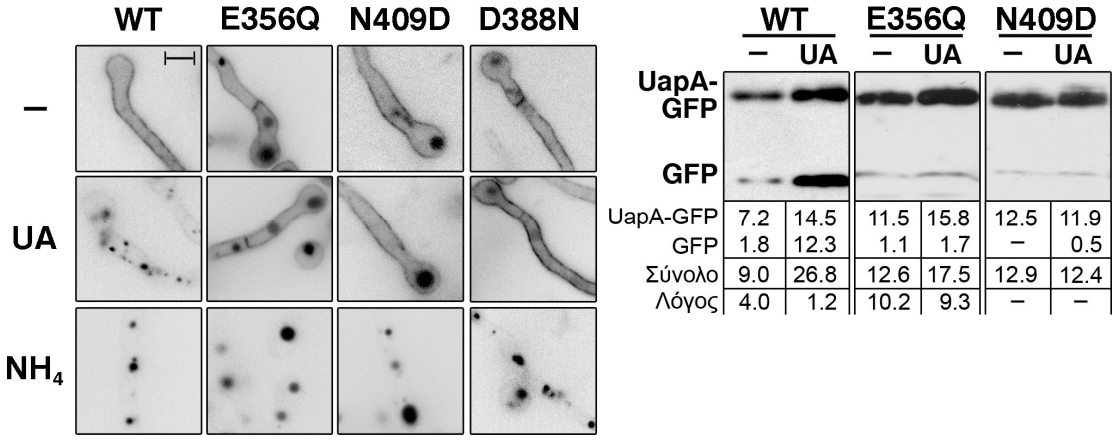
Εικόνα 8.13. Πειράματα μικροσκοπίας επιφθορισμού και ανοσοστυπώματος Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων της Α. Βλαντή στο στέλεχος UapA-GFP *uaZ*⁻ με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-).

8.5. Η επαγόμενη από το υπόστρωμα αποικοδόμηση του UapA εξαρτάται από τη λειτουργία του

Φαίνεται πως συγκεντρώσεις κοντά ή μεγαλύτερες από την $K_{m/i}$ του UapA για το ουρικό οξύ, αλλά και τα άλλα του υποστρώματα (Εικόνες 11 και 12), αρκούν για να προκαλέσουν ενδοκύτωση. Το συμπέρασμα αυτό, σε συνδυασμό με την απαίτηση για μεταφορά του υποστρώματος, συνάδει με την υπόθεση πως η μεταφορά του υποστρώματος διαμέσου του μεταφορέα είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμησή του. Ο μηχανισμός με τον οποίο θα μπορούσε να πραγματοποιείται η ενδοκύτωση θα μπορούσε να συνδέεται με την ολοκλήρωση ενός πλήρους κύκλου λειτουργίας του μεταφορέα και των δομικών αλλαγών που σχετίζονται με αυτόν ή με την δέσμευση

του υποστρώματος στην ενδοκυτταρική διαμόρφωση του μεταφορέα (Diallinas, 2008). Για τον έλεγχο της τελευταίας υπόθεσης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος UapA-GFP uaZ$^-$. Στο στέλεχος αυτό μετρήθηκε με χρήση HPLC η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ουρικού οξέος και βρέθηκε να είναι περίπου 100 μM, δέκα περίπου φορές μεγαλύτερη από αυτή που μετρήθηκε σε στέλεχος φυσικού τύπου. Η συγκέντρωση αυτή είναι μεγαλύτερη από την ελάχιστη (5 μM) που βρέθηκε να είναι ικανή να προκαλέσει ενδοκύτωση του UapA (Εικόνες 8.11 και 8.12). Στο στέλεχος uaZ$^-$ ο UapA-GFP δείχθηκε να έχει τοπολογία φυσικού τύπου (Εικόνα 8.13), υποδεικνύοντας πως η αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση ουρικού οξέος δεν αποτελεί σήμα για ενδοκύτωση, και πως το σενάριο της δέσμευσης του ουρικού οξέος σε μια ειδική ενδοκυτταρική τοπολογία του UapA είναι μάλλον απίθανο.

Άμεση απόδειξη ότι η αποικοδόμηση του UapA προκαλείται από την ενεργό μεταφορά υποστρώματος δια μέσου του μεταφορέα δώθηκε με τη χρήση μεταλλαγών απώλειας λειτουργίας του UapA. Τα E356Q, D388N και N409D αλλήλια έχουν φυσικού τύπου εντοπισμό στην πλασματική μεμβράνη και παρά την πλήρη έλλειψη μεταφορικής ικανότητας, αφορούν υποκαταστάσεις σε αμινοξικά κατάλοιπα που δεν επηρεάζουν την συγγένεια πρόσδεσης για υποστρώματα (Koukaki et al. 2005, Papageorgiou et al. 2008). Η προσθήκη ουρικού οξέος δεν είχε καμία επίδραση όσον αφορά τον εντοπισμό στην πλασματική μεμβράνη των εν λόγω μεταλλαγμένων UapA μορίων (Εικόνα 8.14).



	WT		E356Q		N409D	
	–	UA	–	UA	–	UA
UapA-GFP	7.2	14.5	11.5	15.8	12.5	11.9
GFP	1.8	12.3	1.1	1.7	–	0.5
Σύνολο	9.0	26.8	12.6	17.5	12.9	12.4
Λόγος	4.0	1.2	10.2	9.3	–	–

Εικόνα 8.14. Πειράματα μικροσκοπίας επιφθορισμού και ανοσοστυπώματος Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των στελεχών UapA-GFP (WT), E356Q, N409D και D388N με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-).

Αντίθετα, η προσθήκη αμμωνιακών ιόντων οδήγησε σε άμεση αποδόμηση των αλληλίων αυτών, παρόμοια με αυτή του φυσικού τύπου μεταφορέα. Η έκφραση του αλληλίου D388N ήταν πολύ χαμηλή και δεν μπόρεσε να ανιχνευθεί αποτελεσματικά με ανάλυση Western, παρά τις επαναλαμβανόμενες προσπάθειες για αυτό.

8.6. Μεταλλαγές του UapA οι οποίες έχουν τροποποιημένη κινητική και εξειδίκευση δείχνουν διαφορετική ευαισθησία στην αποδόμηση από το υπόστρωμα

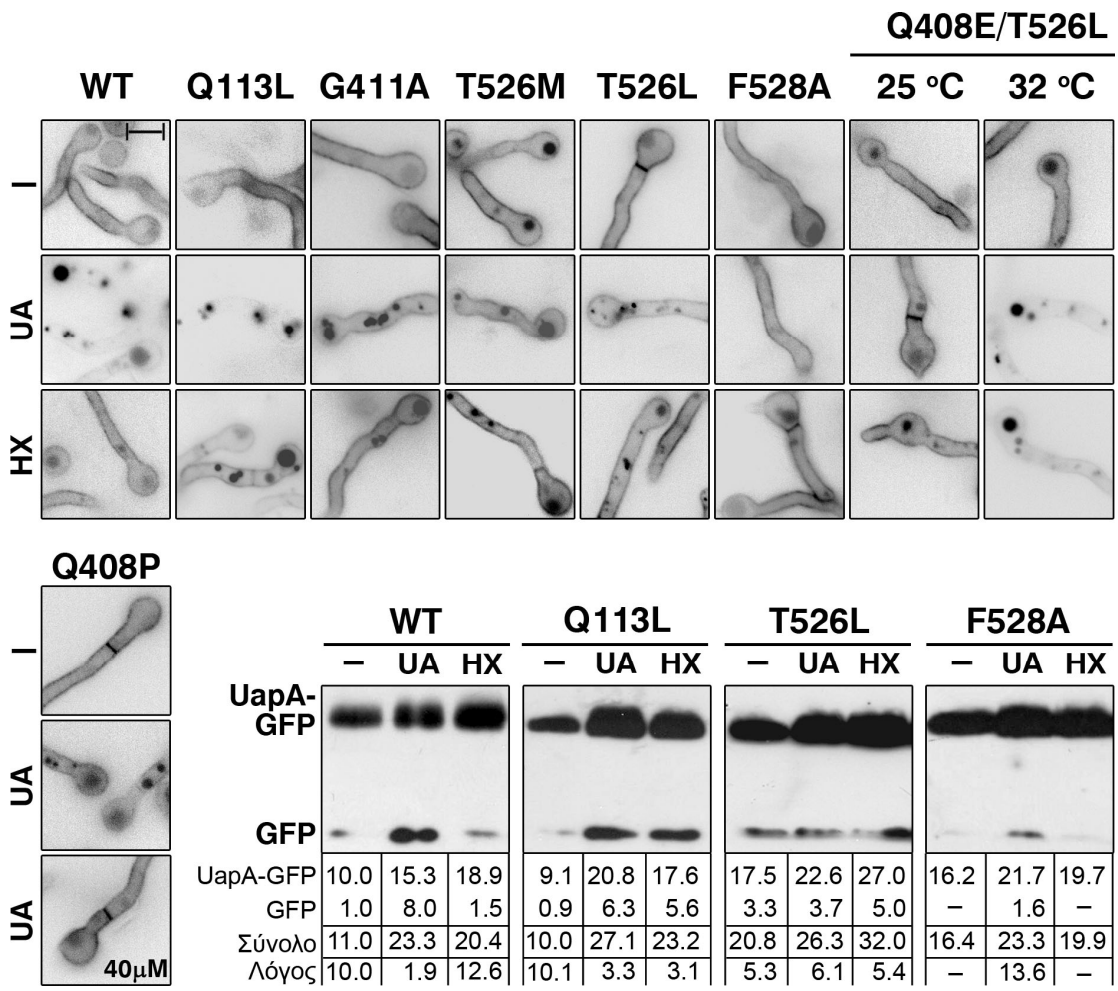
Επιπλέον διερεύνηση της εξαρτώμενης από το υπόστρωμα αποδόμησης έγινε με τη χρήση μεταλλαγμένων μεταφορών UapA που εμφανίζουν τροποποιημένη κινητική και εξειδίκευση (Πίνακας 8.1). Όλα τα επιλεγμένα μεταλλάγματα έχουν τον αναμενόμενο φυσικού τύπου εντοπισμό στην πλασματική μεμβράνη του μύκητα και κανονική εσωτερίκευση επαγόμενη από ιόντα αμμωνίου (Koukaki et al. 2005, Papageorgiou et al. 2008). Τα αλλήλια που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: μεταλλάγματα συγγένειας (Q408P, G411P), τα οποία εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα δέσμευσης για το ουρικό οξύ, και μεταλλάγματα ειδικότητας (Q113L, T526M, T526L, F528A, Q408E/T526M). Μεταξύ αυτών, το Q408P έχει πολύ χαμηλή μεταφορική ικανότητα λόγω πολύ χαμηλής συγγένειας για το υπόστρωμα, ενώ το Q408E/T526M είναι θερμοευαίσθητο. Ο πίνακας 8.1 και η εικόνα 8.15 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του ουρικού οξέος και της υποξανθίνης όσον αφορά τον εντοπισμό των συγκεκριμένων μεταλλαγμάτων στην πλασματική μεμβράνη. Το συμπέρασμα ήταν ότι η αποτελεσματική δέσμευση και μεταφορά των υποστρωμάτων είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την ενδοκυτταρική διαλογή (Πίνακας 8.1). Αυτό είναι εμφανές σε αρκετά αλλήλια. Για παράδειγμα, το κρυοευαίσθητο αλληλόμορφο UapA-Q408E/T526L^{cs}, το οποίο κατά την ανεκτική θερμοκρασία αναγνωρίζει και μεταφέρει τις δύο αυτές πουρίνες με μεγάλη συγγένεια, εσωτερικεύεται πολύ αποτελεσματικά και από τις δύο στη συνθήκη αυτή. Στη μη επιτρεπτή θερμοκρασία, όπου το αλλήλιο αυτό είναι ανενεργό, δεν ενδοκυτώνεται από κανένα υπόστρωμα. Ομοίως, το UapA-Q113L επίσης εσωτερικεύεται από ουρικό οξύ και υποξανθίνη, αλλά η ένταση του φαινομένου είναι αντίστοιχη της συγγένειας αυτού του αλληλίου για τις δύο πουρίνες

(Πίνακας 8.1). Οι μεταλλαγμένοι μεταφορείς G411A και Q408P που εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια για ουρικό οξύ, εσωτερικεύονται πολύ λίγο ή καθόλου, αντίστοιχα σε χαμηλή συγκέντρωση ουρικού οξέως. Το ενδιαφέρον ωστόσο είναι πως σε συγκέντρωση του ουρικού η οποία καλύπτει το K_m των συγκεκριμένων μεταλλαγμάτων για την πουρίνη αυτή, εμφανίζουν κάποιο βαθμό ενδοκύτωσης. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζουν μερικά πλήρως λειτουργικά μεταλλάγματα (T526M, T526L, F528A), τα οποία δείχνουν πολύ μέτρια ή καθόλου ευαισθησία σε εσωτερίκευση προκαλούμενη από τα υποστρώματά τους. Τα τρία αυτά αλλήλια, των οποίων οι μεταλλαγές χαρτογραφούνται στην εξωστρεφή πλευρά του δωδέκατου διαμεμβρανικού τμήματος του UapA, παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για ουρικό οξύ και διευρυμένη εξειδίκευση όσον αφορά τη μεταφορά άλλων πουρινών (Papageorgiou et al. 2008). Αυτό υποδηλώνει ότι η αποτελεσματική δέσμευση και μεταφορά των υποστρωμάτων δεν είναι επαρκείς για την ενδοκύτωση και διαλογή του UapA.

Πίνακας 8.1. Μεταλλαγμένα αλλήλια του UapA και η συμπεριφορά τους όσον αφορά την ενδοκύτωση από τα υποστρώματά τους.

Αλλήλιο	Μεταφορική ικανότητα (% V)	$K_{i\text{-}ua}$ (μM)	$K_{i\text{-}hx}$ (μM)	Ενδοκύτωση από ουρικό	Ενδοκύτωση από υποξανθίνη
Φυσικού τύπου	100	7	-	++	-
Q113L	135	10	260	++	+
Q408P	5	~2000	-	+	δ.π.
G411A	240	320	~2000	+	-
T526L	125	10	~2000	+	-
T526M	105	12	~2000	+	-
F528A	120	3	~2000	-	-
Q408/T526M^{cs}	20	7	35	++	++

δ.π.: δεν πραγματοποιήθηκε.

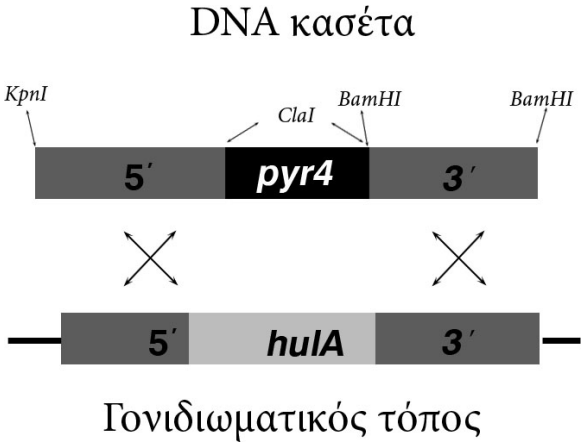


Εικόνα 8.15. Πειράματα μικροσκοπίας επιφθορισμού και ανοσοστυπώματος Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των στελεχών UapA-GFP (WT), Q113L, G411A, T526M, T526L, F528A, Q408E/T526L και Q408P με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), υποξανθίνης (HX), ή χωρίς (-).

8.7. Η Ενδοκύτωση και υποκυτταρική διαλογή του UapA εξαρτάται από την HulA^{Rsp5}, ένα κατάλοιπο λυσίνης στο καρβοξυτελικό άκρο του UapA και την ενεργό πρωτεϊνοσύνθεση

8.7.1. Η HulA είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του *A. nidulans*, όχι όμως η C2 περιοχή της

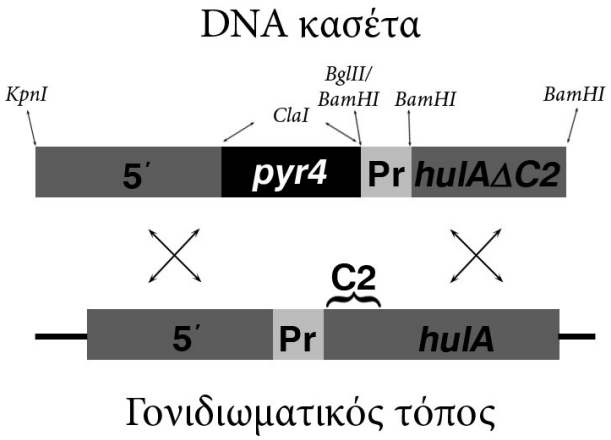
Σχεδόν όλοι οι μέχρι στιγμής μεταφορείς που ενδοκυτώνονται ρυθμιζόμενα, ουβικουιτινυλιώνονται από την Rsp5p λιγάση της ουβικουιτίνης και τα ομόλογά της. Όπως στους περισσότερους οργανισμούς, ένα μοναδικό ομόλογο της Rsp5p υπάρχει στον *A. nidulans*, ονομάζεται HulA και έχει ήδη εντοπιστεί με μεθόδους Υπολογιστικής Βιολογίας (Boase and Kelly 2004). Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της HulA στην ενδοκύτωση του UapA, πραγματοποιήθηκε απαλοιφή του γονιδίου της. Ο σχεδιασμός φαίνεται στην Εικόνα 8.16 (βλέπε και στην παράγραφο 6.11.4). Γονίδιο επιλογής του μετασχηματισμού ήταν το *pyr4* της *N. crassa,* το οποίο κωδικεύει για το ομόλογο ένζυμο του *pyrG* του *A. nidulans* και συμπληρώνει την *pyrG89* μεταλλαγή. Η DNA κασέτα χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει *pyrG89* Δ*nkuA::argB* στέλεχος.



Εικόνα 8.16. Σχηματική απεικόνηση της κασέτας μετασχηματισμού που χρησιμοποιήθηκε για την αντικατάσταση του *hulA* γονιδίου με το *pyr4*. Διακρίνονται τα ενζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της κασέτας.

Λόγω της απαλοιφής του γονιδίου της NkuA DNA ελικάσης σε αυτό το στέλεχος (Nayak et al. 2006), η οποία είναι απαραίτητη για γεγονότα ετερόλογου DNA ανασυνδυασμού, μόνο μετασχηματισμένα στελέχη με αντικατάσταση του γονιδίου της HulA με την ανωτέρω κασέτα μπορούσαν να επιλεχθούν. Από τα

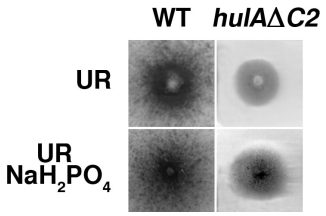
περίπου 50 μετασχηματισμένα ετεροκάρυα, κατόπιν απομόνωσης μοναδικής αποικίας από με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών, κανένα βιώσιμο στέλεχος δεν κατάφερε να απομονωθεί. Το γεγονός αυτό είναι χαρακτηριστικό θνησιγόνου απαλοιφής γονιδίου που είναι απαραίτητο για τη βιωσιμότητα του μύκητα (Osmani et al. 2006). Για το λόγο αυτό επιχειρήθηκε να κατασκευαστεί μια ελεγχόμενη μορφή μειωμένης λειτουργίας της HulA. Αυτή ήταν η απαλοιφή της C2 περιοχής της πρωτεΐνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τα φωσφολιπίδια. Η απαλοιφή αυτής της περιοχής έχει δειχθεί να αποτρέπει τα ομόλογα της HulA από την πλασματική μεμβράνη των *S. Serevisiae* (Dunn et al. 2004) και *M. musculus* (Plant et al. 1997) και να σταθεροποιεί μεμβρανικές πρωτεΐνες στην πλασματική μεμβράνη (Dunn et al. 2004, Springael et al. 1999). Ο σχεδιασμός φαίνεται στην Εικόνα 8.17 (βλέπε και στην παράγραφο 6.11.5).



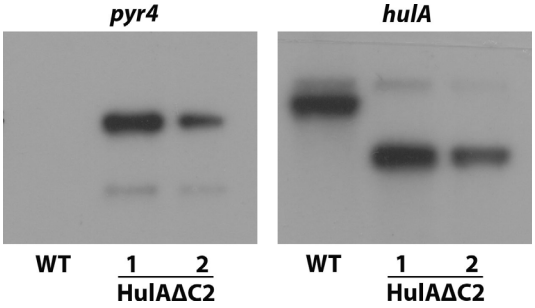
Εικόνα 8.17. Σχηματική απεικόνηση της κασέτας μετασχηματισμού που χρησιμοποιήθηκε για την απαλοιφή της C2 περιοχής του *hulA* γονιδίου. Διακρίνονται τα ενζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της κασέτας pBS-C2less-HulA-cassette.

Η αντικατάσταση πραγματοποιήθηκε πάλι σε στέλεχος *pyrG89 ΔnkuA::argB*. Ως πείραμα ελέγχου της απόδοσης του μετασχηματισμού και της ικανότητας συμπλήρωσης της *pyrG89* μεταλλαγής από το *pyr4* γονίδιο επιλογής στο συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό κυκλικό πλασμίδιο pBS-C2less-HulA-cassette. Μονή ομόλογη ενσωμάτωση του πλασμιδίου αυτού στο γονιδιακό τόπο του *hulA* δεν θα άλλαζε την ακεραιότητα του γονιδίου *hulA*, μιας και θα τοποθετούταν εν σειρά με αυτό. Από αυτό το μετασχηματισμό κατέστη δυνατή η απομόνωση μονοπυρηνικών κονιδιοσπορίων του μύκητα, υποδεικνύοντας πως η απαλοιφή της C2 περιοχής της HulA (*hulAΔC2*) είναι βιώσιμη. Τα απομονωμένα στελέχη είχαν πολύ μειωμένη σπορίωση και χαμηλό ποσοστό αύξησης (Εικόνα 8.18), ενώ αυτά που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο ως

πείραμα ελέγχου, φυσικού τύπου μορφολογία και αύξηση. Η σπορίωση βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη 0,5 M δισόξινου φωσφορικού νατρίου, όπως πολλές άλλες πλειοτροπικές μεταλλαγές μειωμένης σπορίωσης του *A. nidulans* (Α. Πανταζοπούλου, προσωπική επικοινωνία). Γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από δύο μετασχηματισμένα στελέχη και ανάλυση κατά Southern πραγματοποιήθηκε με ιχνηθέτες για το γονίδιο επιλογής, *pyr4*, και το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του *hulA* γονιδίου (Εικόνα 8.19). Όπως ήταν αναμενόμενο, λόγω της απαλοιφής του γονιδίου *nkuA* στο πατρικό στέλεχος, τα αποτελέσματα έδειξαν μοναδική ενσωμάτωση με διπλό ομόλογο ανασυνδυασμό της γραμμικής κασέτας μετασχηματισμού στον γονιδιακό τόπο του *hulA* και αντικατάσταση αυτού.



Εικόνα 8.18. Δοκιμασίες ανάπτυξης στελεχών φυσικού τύπου (WT) και HulAΔC2 σε MM με ουρία (UR) ως μοναδική πηγή αζώτου και προσθήκη ή μη 0,5 M NaH_2PO_4.

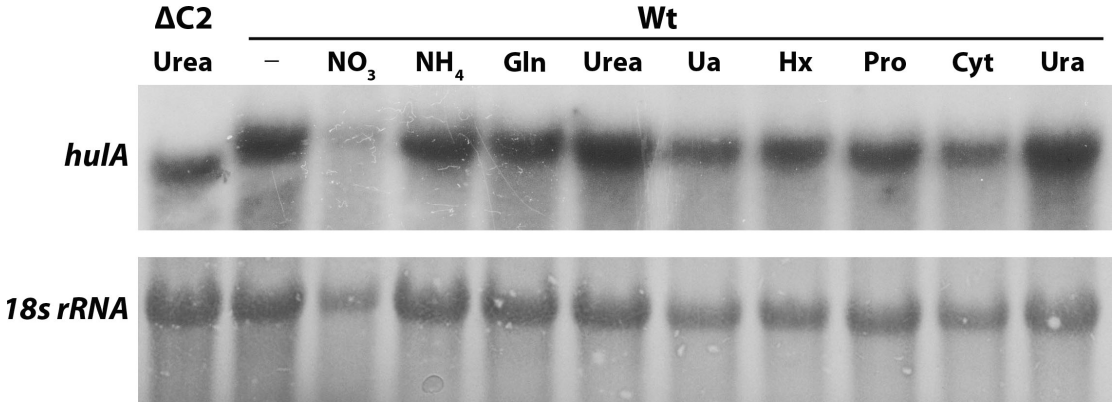


Εικόνα 8.19. Ανάλυση κατά Southern με ιχνηθέτες για τα *pyr4* και *hulA* γονίδια του *uapA,* γονιδιωματικού DNA στελεχών μετασχηματισμένων γραμμική κασέτα από το πλασμίδιο pBS-C2less-HulA-cassette (HulAΔC2) και φυσικού τύπου (WT).

8.7.2. Η έκφραση των *hulA* και *hulAΔC2* είναι ισχυρή και ανεξάρτητη της χρησιμοποιούμενης πηγής αζώτου.

Λόγω του πλειοτροπικού φαινοτύπου της HulAΔC2, κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της αποτελεσματικής της ή μη έκφρασης. Για το λόγο αυτό απομονώθηκε ολικό RNA από το στέλεχος αυτό και χρησιμοποιήθηκε σε ανάλυση Northern. Επιπλέον, πέραν του φυσικού τύπου μάρτυρα, και προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα αλλαγής της έκφρασης του *hulA* ανάλογα με την πηγή αζώτου που χρησιμοποιείται, απομονώθηκε RNA από καλλιέργειες στελέχους φυσικού τύπου στις οποίες είχε αλλάξει η πηγή αζώτου τις τελευταίες 2 ώρες της καλλιέργειας.

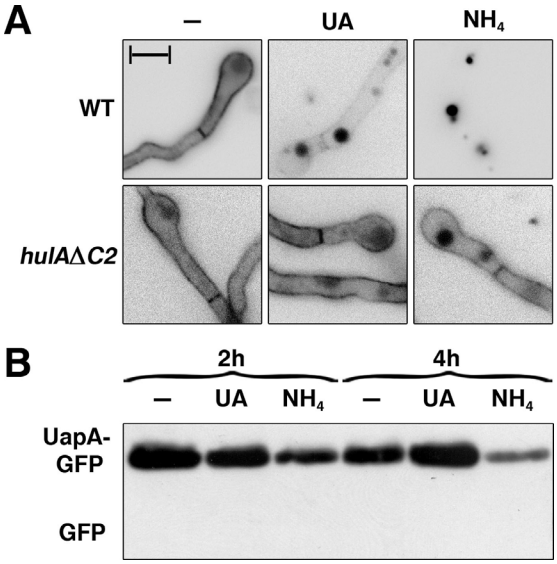
Αναλύσεις παρόμοιες με αυτή έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την διερεύνηση της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη και το μεταβολισμό δευτερευόντων πηγών αζώτου (Amillis et al. 2004, Amillis et al. 2007, Dzikowska et al. 1999, Gorfinkiel et al. 1993, Oestreicher and Scazzocchio 1993, Scazzocchio, 1994). Εκτός των συνθηκών αλλαγής πηγών αζώτου, προστέθηκαν υποστρώματα γνωστών μεταφορέων, σε συγκέντρωση 0,1 mg/ml. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.20, η έκφραση του *hulA* είναι συστατική σε όλες τις συνθήκες που διερευνήθηκαν και η *hulAΔC2* μεταλλαγή έχει φυσικού τύπου έκφραση και το αναμενόμενο μικρότερο κατά 550 bp μέγεθος. Τα αποτελέσματα αυτά επιτρέπουν την ασφαλέστερη διεξαγωγή συμπερασμάτων για την συμμετοχή της HulA στην μετα-μεταφραστική ρύθμιση του UapA ανάλογα με την πηγή αζώτου που χρησιμοποιείται.



Εικόνα 8.20. Ανάλυση Northern με ιχνηθέτη για το *hulA* ολικού RNA στελεχών φυσικού τύπου (WT) και HulAΔC2 από καλλιέργειες 12 ωρών στους 25 oC και ουρία (Urea) ως μοναδική πηγή αζώτου, και κατόπιν αλλαγή πηγής αζώτου ή προσθήκης ουσίας. NO_3: νιτρικά ιόντα, NH_4: αμμωνιακά ιόντα, Gln: γλουταμίνη Ua: ουρικό οξύ Hx: υποξανθίνη, Pro: προλίνη, Cyt: κυτοσίνη, Ura: ουρακίλη. Το *18s rRNA* αποικονίζεται όπως φαίνεται μετά από ειδική χρώση της μεμβράνης.

8.7.3. Η HulA είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωση του UapA

Το UapA-GFP στέλεχος διασταυρώθηκε με το HulAΔC2 και απομονώθηκε στέλεχος που φέρει τα *uapA-gfp* και *hulAΔC2* αλλήλια (UapA-GFP HulAΔC2). Αναλύσεις μικροσκοπίας επιφθορισμού και Western έδειξαν ότι ο UapA παραμένει σταθερός στην πλασματική μεμβράνη του μύκητα, τόσο κατά την προσθήκη ουρικού οξέος όσο και αμμωνίας, ακόμη και για πολύ παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Εικόνα 8.21).



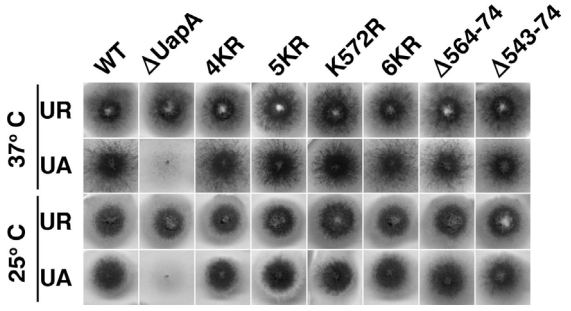
Εικόνα 8.21. Α) Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού των στελεχών UapA-GFP (WT) και UapA-GFP HulAΔC2 με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-). Β) Ανοσοστύπωμα Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του στελέχους UapA-GFP HulAΔC2 με δύωρη ή τετράωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-).

Είναι χαρακτηριστική η απουσία ελεύθερης GFP σε όλες τις συνθήκες του πειράματος στα δείγματα που προέρχονται από το UapA-GFP HulAΔC2 στέλεχος. Η μείωση της ποσότητας της UapA-GFP στις συνθήκες προσθήκης αμμωνίας οφείλεται στην μεταγραφική αναστολή της έκφρασης του *uapA-gfp* γονιδίου, που προκαλεί ποσοστιαία μείωση της πρωτεΐνης στο αυξανόμενο μυκήλιο.

8.7.4. Η Lys572 είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωση του UapA

Η εμπλοκή της HulA στην ενδοκύτωση του UapA υποδείκνυε την ύπαρξη μιας ή περισσοτέρων καταλοίπων λυσίνης, δεκτών της ουβικουιτίνης. Στους μεταφορείς που έχουν γίνει αντίστοιχες μελέτες, τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται σε κυτταροπλασματικά τμήματα, συνήθως στο αμινοτελικό (Kim et al. 2007, Miranda et al. 2007 Soetens et al. 2001) και σπανιότερα στο καρβοξυτελικό (Gonzalez-Gonzalez et al. 2008) άκρο της πρωτεΐνης ή σε ενδιάμεσα κυτταροπλασματικά τμήματα (Paiva et al. 2009). Για τον UapA τα Υπολογιστικά Μοντέλα προβλέπουν μια δευτεροταγή δομή με τα άμινο- και κάρβοξυ-τελικά άκρα να έχουν κυτταροπλασματική τοπολογία (βλ. 1^{η} Έκθεση Προόδου, Diallinas and Gournas 2008, Gournas et al. 2008). Στα τμήματα αυτά υπάρχουν έξι κατάλοιπα λυσίνης, πέντε στο αμινοτελικό (K21, K22, K59, K60, K73) και ένα στο καρβοξυτελικό (K572) άκρο της πρωτεΐνης. Προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός τους ρόλος ως αποδεκτών μορίων ουβικουιτίνης, έπρεπε να υποκατασταθούν με κατάλοιπα αργινίνης. Η αργινίνη είναι το ομοιότερο δομικά και λειτουργικά αμινοξύ, αφού πλευρική της αλυσίδα διαθέτει

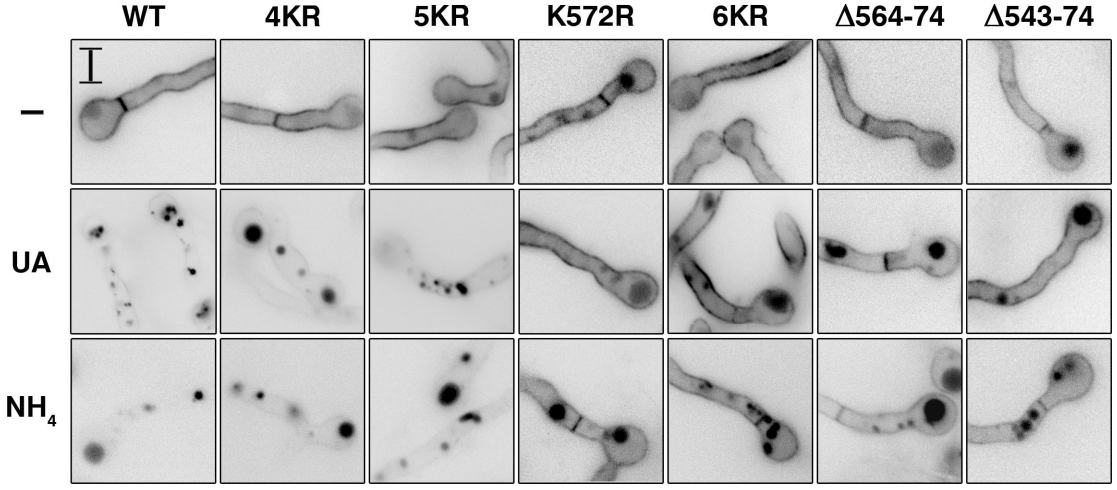
όμοια με τη λυσίνη θετικά φορτισμένη σε ουδέτερο pH αμινομάδα, με περίπου ίδια τιμή pK_a. Επιπλέον, στο καρβοξυτελικό άκρο, κοντά στην Lys572 υπάρχει μια υποθετική αλληλουχία φωσφορυλίωσης (Y569) από κινάση τυροσίνης. Σε κάποιους μεταφορείς έχει δειχθεί πως το σήμα για την ουβικουιτινυλίωσή τους είναι η φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης (Lundh et al. 2009, Nikko et al. 2008, Paiva et al. 2009). Για τη διερεύνηση αυτής της πιθανότητας, σε συνδυασμό με την Lys572, σχεδιάστηκαν δύο αλλήλια του *uapA-gfp* που φέρουν απαλοιφή ενός τμήματος (Δ564-574) ή ολόκληρου του καρβοξυτελικού άκρου (Δ543-574) του UapA. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση της Tyr569 με φαινυλαλανίνη. Τις κατασκευές αυτές (Παράγραφος 6.11.6) και τη μελέτη των στελεχών που θα προέκυπταν ανέλαβαν οι Σ. Αμίλλης και Α. Βλαντή, τα αποτελέσματα των οποίων θα αναφερθούν εν συντομία, λόγω της σημασίας τους και της άμεσής τους σχέσης με τη συγκεκριμένη μελέτη. Οι υποκαταστάσεις, μονές ή πολλαπλές, πραγματοποιήθηκαν με *in vitro* στοχευόμενη μεταλλαξιγένεση στο πλασμίδιο pAN510-GFP (Pantazopoulou et al. 2007) χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους PCR εκκινητές. Από ανάλυση κατά Southern των μετασχηματισμένων στελεχών επιλέχθηκαν στελέχη με μοναδική ενσωμάτωση του εκάστοτε πλασμιδίου στον γονιδιακό τόπο του *argB*. Στα στελέχη αυτά πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ανάπτυξης (Εικόνα 8.22) για τον έλεγχο της επίδρασης των μεταλλαγών στη λειτουργία της πρωτεΐνης UapA. Όπως φαίνεται, καμία από τις μεταλλαγές δεν επηρεάζει την κανονική λειτουργία του μεταφορέα.



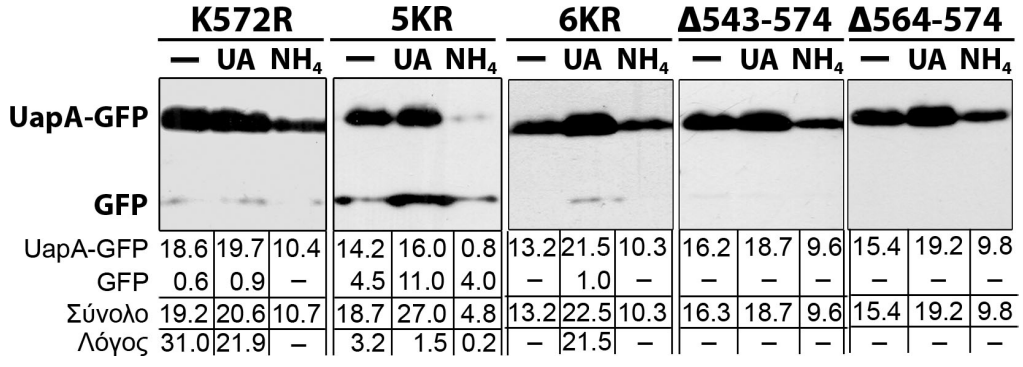
Εικόνα 8.22. Δοκιμασίες ανάπτυξης των στελεχών UapA-GFP (WT), Δ*uapA* και των μεταλλαγμένων αλληλίων που φέρουν υποκαταστάσεις σε αργινίνη των λυσινών 21,22,59,60 (4KR), 21,22,59,60,73 (5KR), 572 (K572R), όλων (6KR), καθως και ολόκληρης (Δ543-574) ή μερικής (Δ564-74) αποκοπής του καρβοξυτελικού άκρου του UapA, σε ουρία (UR) και ουρικό οξύ (UA), σε δύο θερμοκρασίες (από Σ. Αμίλλη και Α. Βλαντή).

Ανάλυση μικροσκοπίας επιφθορισμού (Εικόνα 8.23) έδειξε πως καμία από τις μεταλλαγές δεν επηρεάζει τη φυσιολογική έκφραση και στόχευση της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη. Επιπλέον, σε συνδυασμό με αναλύσεις Western (Εικόνα

8.24), κατέστη σαφές πως το μοναδικό κατάλοιπο λυσίνης που είναι απαραίτητο για την ενδοκύτωση του μεταφορέα UapA παρουσία υποστρώματος ή ιόντων αμμωνίου, είναι η Lys572. Παρόμοια συμπεριφορά δείχνουν και τα αλλήλια με περικομμένο καρβοξυτελικό άκρο, όπου το κατάλοιπο αυτό απουσιάζει. Η απουσία εντονότερου φαινοτύπου στις περικομμένες μορφές σε συνδυασμό με τη φυσικού τύπου συμπεριφορά στην ενδοκύτωση του αλληλίου που φέρει τη μεταλλαγή Y569F (δεν παρουσιάζεται) κατέδειξαν την Lys572 ως τη μοναδική λυσίνη του UapA που εμπλέκεται στην ενδοκύτωσή του.



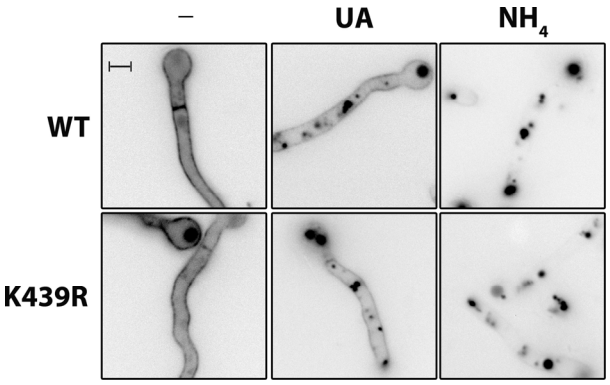
Εικόνα 8.23. Πειράματα μικροσκοπίας επιφθορισμού από τους Σ. Αμίλλη και Α. Βλαντή στελέχους UapA-GFP (WT) και των μεταλλαγμένων αλληλίων που φέρουν υποκαταστάσεις σε αργινίνη των λυσινών 21,22,59,60 (4KR), 21,22,59,60,73 (5KR), 572 (K572R), όλων (6KR), καθως και ολόκληρης (Δ543-574) ή μερικής (Δ564-74) αποκοπής του καρβοξυτελικού άκρου του UapA, με δύωρη προσθήκη ουρίας (UR), ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-).



	K572R			5KR			6KR			Δ543-574			Δ564-574		
	–	UA	NH_4	–	UA	NH_4	–	UA	NH_4	–	UA	NH_4	–	UA	NH_4
UapA-GFP	18.6	19.7	10.4	14.2	16.0	0.8	13.2	21.5	10.3	16.2	18.7	9.6	15.4	19.2	9.8
GFP	0.6	0.9	–	4.5	11.0	4.0	–	1.0	–	–	–	–	–	–	–
Σύνολο	19.2	20.6	10.7	18.7	27.0	4.8	13.2	22.5	10.3	16.3	18.7	9.6	15.4	19.2	9.8
Λόγος	31.0	21.9	–	3.2	1.5	0.2	–	21.5	–	–	–	–	–	–	–

Εικόνα 8.24. Ανοσοστυπώματα Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τον Σ. Αμίλλη των μεταλλαγμένων αλληλίων που φέρουν υποκαταστάσεις σε αργινίνη των λυσινών 21,22,59,60,73 (5KR), 572 (K572R), όλων (6KR), καθως και ολόκληρης (Δ543-574) ή μερικής (Δ564-74) αποκοπής του καρβοξυτελικού άκρου του UapA, με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-).

Ένα ακόμη μετάλλαγμα καταλοίπου λυσίνης που υπήρχε διαθέσιμο στο εργαστήριο ήταν αυτό της K439R, το οποίο κατασκευάσθηκε στα πλαίσια αυτής της διατριβής και αναφέρεται στη 2η Έκθεση Προόδου. Το κατάλοιπο αυτό, σύμφωνα με προγράμματα πρόβλεψης της δευτεροταγούς δομής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, προβλέπεται να βρίσκεται στο κέντρο του ένατου διαμεμβρανικού τμήματος του UapA. Μέχρι στιγμής δεν έχει δειχθεί λυσίνη η οποία να ευρίσκεται σε διαμεμβρανικό τμήμα να εμπλέκεται σε διαδικασία ουβικουιτινυλίωσης, αλλά λόγω της διαθεσιμότητας της μεταλλαγής, πραγματοποιήθηκε πείραμα για τον έλεγχο της περίπτωσης αυτής. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.25 η Lys439 δεν εμπλέκεται στην ενδοκύτωση του UapA.

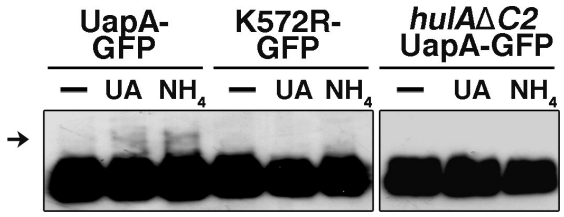


Εικόνα 8.25. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού των στελεχών UapA-GFP (WT) και K439R με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-).

8.7.5. Η HulA ουβικουιτινυλιώνει τον UapA στην Lys572

Άμεση απόδειξη των ισχυρών ενδείξεων πως η HulA ουβικουιτινυλιώνει τον UapA στην Lys572 θα ήταν μόνο η απομόνωση ουβικουιτινυλιωμένων μορφών του UapA. Για το σκοπό αυτό χρειάστηκε να δοκιμαστούν πρωτόκολλα απομόνωσης ολικών πρωτεϊνών (Galan et al. 1994) και εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών (Galan et al. 1996) που έχουν χρησιμοποιηθεί στον *S. serevisiae* για το λόγο αυτό και να προσαρμοστούν στις συνθήκες αύξησης του *A. nidulans* και τις ιδιαιτερότητες του UapA. Το NEM (N-ethyl-meilamide) χρησιμοποιήθηκε ως αναστολέας της απο-ουβικουιτινυλίωσης, αφού τροποποιεί ένα κατάλοιπο κυστεΐνης που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των αντίστοιχων ενζύμων, απενεργοποιώντας τα. Ουρικό οξύ και ιόντα αμμωνίου προστέθηκαν για χρονικό διάστημα 5 λεπτών (Erpapazoglou et al. 2008) και σε συγκέντρωση 5 φορές μεγαλύτερη του συνηθισμένου ώστε να προκαλέσουν εντονότερα το φαινόμενο (Risinger and Kaiser 2008). Σε μεγαλύτερους

χρόνους ή κανονικές συγκεντρώσεις ουρικού και αμμωνίου δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση ουβικουιτινυλιωμένων μορφών του μεταφορέα (δεν παρουσιάζονται). Στα πειράματα αυτά, που πραγματοποιήθηκαν στο UapA-GFP στέλεχος, χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου η μη προσθήκη ουσίας που επάγει ενδοκύτωση, καθώς και πανομοιότυπες συνθήκες καλλιέργειας και απομόνωσης στα στελέχη K572R-GFP και UapA-GFP HulAΔC2. Μόνο στο στέλεχος UapA-GFP και συγκεκριμένα στα δείγματα που προηγουμένως είχε προστεθεί ουρικό οξύ ή ιόντα αμμωνίου διακρίνονται ζώνες που εμφανίζουν μειωμένη κινητικότητα και μάλλον αντιστοιχούν σε μόρια UapA-GFP στα οποία έχουν προσδεθεί ένα ή περισσότερα μόρια ουβικουιτίνης (Εικόνα 8.26). Η διαφορά στην κινητικότητα είναι της τάξης των 15-20 kDa, οπότε φαίνεται να πρόκειται για 3-4 μόρια ουβικουιτίνης.



Εικόνα 8.26. Ανοσοστυπώματα Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών, που πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τον Σ. Αμίλλη, εκχυλισμάτων των στελεχών UapA-GFP, UapA-GFP HulAΔC2 και K572R-GFP με πεντάλεπτη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-). Το βέλος υποδεικνύει τη θέση ζωνών μειωμένης κινητικότητας που αντιστοιχούν σε μόρια UapA-GFP-ουβικουιτίνης.

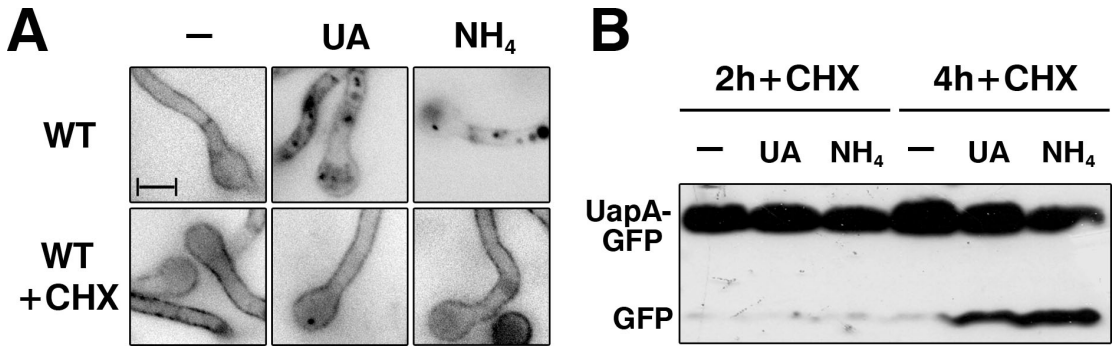
8.8. Η αποικοδόμηση του UapA πραγματοποιείται μέσω ενδοκύτωσης από την πλασματική μεμβράνη

Μέχρι στιγμής έχει δειχθεί πως παρουσία υποστρώματος το μεγαλύτερο ποσοστό του UapA οδεύει προς αποικοδόμηση στο χυμοτόπιο. Για να γίνει αυτό ο μεταφορέας πρέπει να είναι ενεργός, ενώ υψηλά κυτταροπλασματικά επίπεδα ουρικού οξέος δεν μπορούν να προκαλέσουν την αποικοδόμηση του μεταφορέα. Όλα αυτά είναι συμβατά με τη θεώρηση πως η αποικοδόμηση του μεταφορέα γίνεται κατά τη λειτουργία του και πραγματοποιείται μέσω ενδοκύτωσης από την πλασματική μεμβράνη. Παρόλα αυτά, στις συνθήκες που μέχρι στιγμής έχει μελετηθεί το φαινόμενο υπάρχει μεταγραφική επαγωγή του *uapA* από το ουρικό οξύ και ένα πολύ μεγάλο ποσοστό του μεταφορέα αφορά νέο-συντεθειμένη πρωτεΐνη. Το γεγονός αυτό

αφαιρεί από τα δεδομένα την ικανότητα απόδειξης της ενδοκύτωσης ως μοναδικού μηχανισμού αποικοδόμησης του UapA, καθώς ένα μέρος της αποικοδόμησης μπορεί να προέρχεται κατευθείαν από τη διαλογή μορίων UapA από το Golgi προς τα χυμοτόπια . Για το σκοπό αυτό κρίθηκε σκόπιμο να διαχωριστεί η πρωτεϊνοσύνθεση του μεταφορέα από τη διαδικασία της αποικοδόμησης.

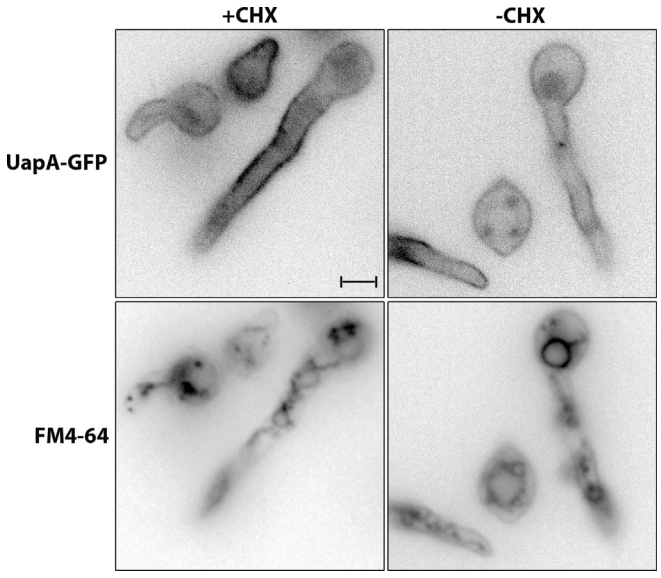
8.8.1. Η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου αναστέλλει την ενδοκύτωση του UapA

Στην προσπάθεια διαχωρισμού πρωτεϊνοσύνθεσης και ενδοκύτωσης πραγματοποιήθηκε πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού όπου 15 λεπτά πριν την προσθήκη ουρικού οξέος ή ιόντων αμμωνίου προστέθηκε κυκλοεξιμίδιο, ένας αναστολέας της ευκαρυωτικής πρωτεϊνοσύνθεσης. Το αποτέλεσμα ήταν αναπάντεχο (Εικόνα 8.27A), μιας και η προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου ανέστειλε πλήρως την ενδοκύτωση του UapA, είτε από υπόστρωμα είτε από ιόντα αμμωνίου. Το αποτέλεσμα είναι ταυτόσημο με την περίπτωση του AgtA μεταφορέα δικαρβοξυλικών αμινοξέων του *A. nidulans* (Apostolaki et al. 2009) και αντίστροφο πολλών περιπτώσεων μεταφορέων που ενδοκυτώνονται από το κυκλοεξιμίδιο στον *S. serevisiae* (André and Haguenauer-Tsapis 2004 Lin et al. 2008). Στην Εικόνα 8.27B επιβεβαιώνεται με ανάλυση Western η αναστολή της ενδοκύτωσης του UapA από την προσθήκη κυκλοεξιμιδίου. Είναι σαφής η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, μιας και στα δείγματα που έχει γίνει προσθήκη ουρικού οξέος ή αμμωνίας δεν διακρίνεται η μεταγραφική επαγωγή ή αναστολή, αντίστοιχα, σε σχέση με όλα τα προηγούμενα πειράματα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως η παρατεταμένη καλλιέργεια σε αυτές τις συνθήκες (4 ώρες) φαίνεται να επαναφέρει μερικώς την ενδοκύτωση. Ο *A. nidulans* είναι γνωστό πως είναι μερικώς ανθεκτικός στο κυκλοεξιμίδιο (de Souza et al. 1998) και το γεγονός αυτό πιθανώς εξηγεί την επαναφορά. Εναλλακτικά, το κυκλοεξιμίδιο ίσως απλά να καθυστερεί τις αποκρίσεις του οργανισμού συνολικά και την ενδοκύτωση, οπότε το φαινόμενο ίσως είναι έμμεσο. Επίσης, σε περίπτωση που ο UapA καθίσταται ανενεργός με την προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου, δεν θα μπορεί να ενδοκυτωθεί από την προσθήκη του υποστρώματός του.



Εικόνα 8.27. Α) Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού του στελέχους UapA-GFP (WT) με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-), με την προηγούμενη προσθήκη κυκλοεξιμιδίου (CHX). Β) Ανοσοστύπωμα Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του στελέχους UapA-GFP (WT) με δύωρη ή τετράωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH_4) ή χωρίς (-), με την προηγούμενη προσθήκη κυκλοεξιμιδίου (CHX).

Για να ελεγχθούν οι παραπάνω υποθέσεις πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα. Στο πρώτο, μετά την προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου πραγματοποιήθηκε χρώση με FM4-64 και επακόλουθη παρακολούθηση της ενδοκύτωσής της. Στην Εικόνα 8.28 φαίνεται πως η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου δεν επηρεάζει την συνεχή ενδοκύτωση μεμβρανών του μύκητα, αφού σε 45 λεπτά η FM4-64 είναι εμφανής στη μεμβράνη των χυμοτοπίων και στις δύο συνθήκες, όπως είναι φυσιολογικό (Penalva, 2005).



Εικόνα 8.28. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού από τον Γ. Διαλλινά του στελέχους UapA-GFP με δύωρη προσθήκη ουρικού οξέος (UA) και χρώση με FM4-64, με την προηγούμενη προσθήκη κυκλοεξιμιδίου (+CHX) ή χωρίς (-CHX).

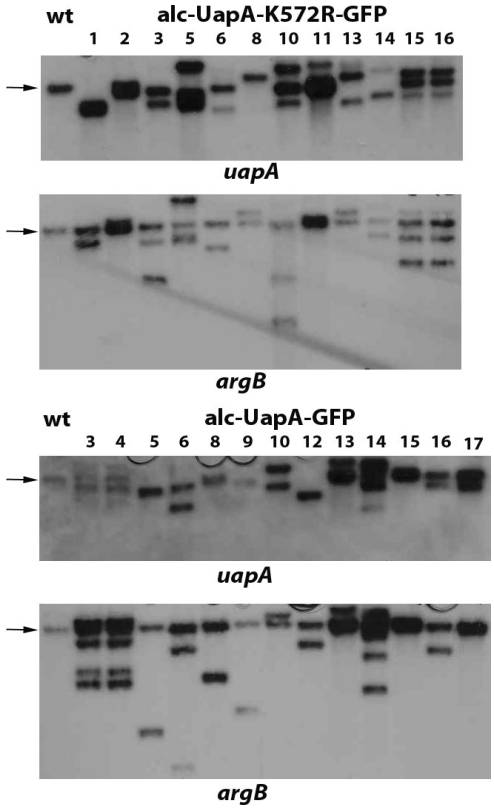
Στο δεύτερο πείραμα έγινε μελέτη της % πρόσληψης ραδιοσημασμένης ξανθίνης από τον UapA, παρουσία και απουσία κυκλοεξιμιδίου, όπου κατέστη σαφές πως η λειτουργία του μεταφορέα παραμένει ανεπηρέαστη (δεν παρουσιάζεται). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως η αναστολή της ενδοκύτωσης του UapA από

το κυκλοεξιμίδιο πραγματοποιείται μάλλον μέσω κάποιου ρυθμιστικού μηχανισμού, όπως η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης ενός απαιτούμενου παράγοντα ενδοκύτωσης η/και της δυναμικής του κυτταροσκλετού ακτίνης, και δεν είναι απόρροια μιας γενικευμένης επίπτωσης από τη χρήση του.

8.8.2. Χρήση του $alcA_p$ υποκινητή για την έκφραση του UapA

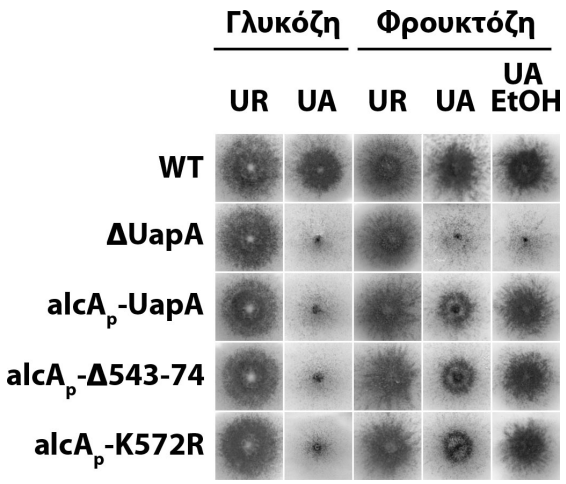
Αφού η χρήση του κυκλοεξιμιδίου δεν ήταν δυνατή για το διαχωρισμό πρωτεϊνοσύνθεσης και ενδοκύτωσης, επιλέχθηκε η αλλαγή του υποκινητή για την έκφραση του UapA, σε έναν ο οποίος να μην επηρεάζεται από τη χρησιμοποιούμενη πηγή αζώτου και να είναι ρυθμιζόμενος με τρόπο που δεν επηρεάζει τη λειτουργία και διακίνηση του UapA. Ο υποκινητής που επιλέχθηκε ήταν αυτός της αλκοολικής αφυδρογονάσης, $alcA_p$, του οποίου η ρύθμιση είναι καλά μελετημένη (Lockington et al. 1985) και έχει χρησιμοποιηθεί ξανά στο παρελθόν για την ελεγχόμενη έκφραση του UapA (Lemuh et al. 2009, Pantazopoulou et al. 2007). Ο $alcA_p$ επάγεται από αιθανόλη και αναστέλλεται από γλυκόζη. Με κλωνοποιήσεις (παράγραφος 6.11.7) δημιουργήθηκαν τα pBS-argB-$alcA_p$-uapA-GFP και pBS-argB-$alcA_p$-uapA-K572R-GFP πλασμίδια. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματίσουν στέλεχος Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*azgA argB2*, με επιλογή πρωτότροφων για αργινίνη στελεχών. DNA απομονώθηκε από επιλεγμένα μετασχηματισμένα στελέχη και χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση κατά Southern και ιχνηθέτες για τα γονίδια *uapA* και *argB,* το αποτέλεσμα της οποίας φαίνεται στην Εικόνα 8.29.

Από αυτά επιλέχθηκαν τα alc-UapA-GFP 5 και alc-UapA-K572GFP 8 ως στελέχη μοναδικής, ετερόλογης ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του πατρικού στελέχους. Στα στελέχη αυτά πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ανάπτυξης (Εικόνα 8.30) όπου φαίνεται πως συμπεριφέρονται όπως αναμενόταν και η λειτουργία δηλαδή του UapA που εκφράζουν είναι υπό τον έλεγχο του $alcA_p$. Τα δύο στελέχη χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού (Εικόνα 8.31), το οποίο έδειξε πως η αποικοδόμηση του UapA πραγματοποιείται μέσω ενδοκύτωσης.

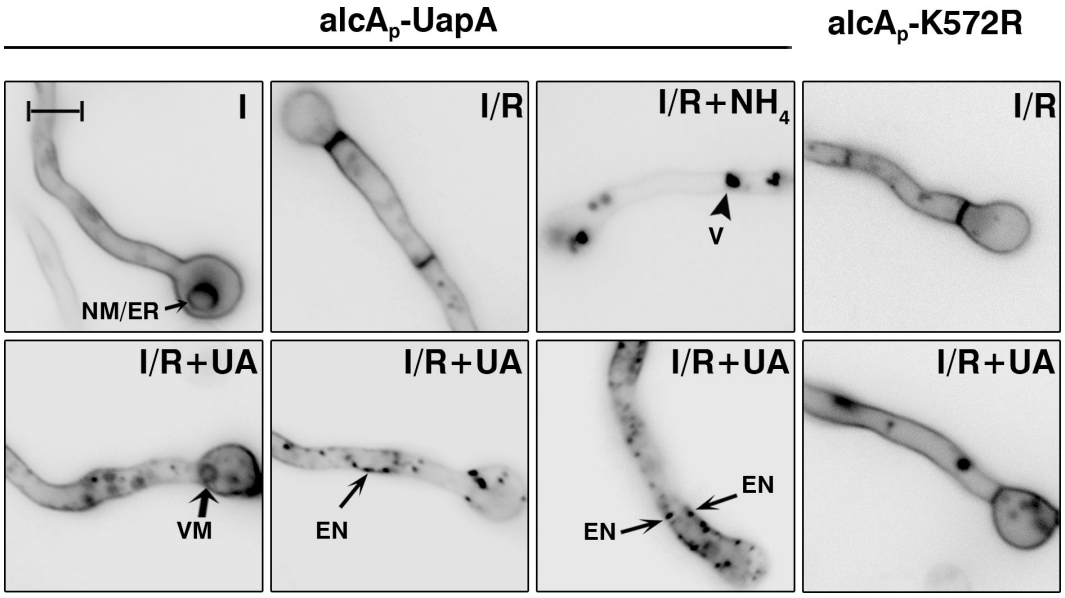


Εικόνα 8.29. Ανάλυση κατά Southern από τον Σ. Αμίλλη με ιχνηθέτες για τα *uapA* και argB γονίδια γονιδιωματικού DNA μετασχηματισμένων στελεχών με πλασμίδιο pBS-argB-$alcA_p$-uapA-GFP ή pBS-argB-$alcA_p$-uapA-K572R-GFP καθώς και στελέχους φυσικού τύπου (wt). Τα βέλη υποδεικνύουν τις ενδογενείς ζώνες των *uapA* και *argB* γονιδιακών τόπων.

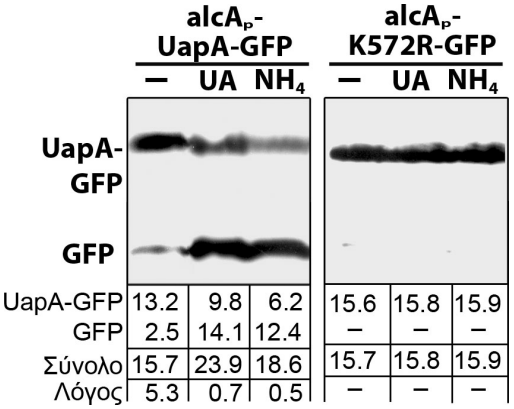
Συγκεκριμένα, τα στελέχη αναπτύχθηκαν ολονυχτίως σε θρεπτικό που περιείχε γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Κατά συνέπεια δεν εκφραζόταν καθόλου UapA-GFP. Κατόπιν, μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό που περιείχε φρουκτόζη και αιθανόλη, επάγοντας την έκφραση του μεταφορέα, για 2,5 ώρες. Παρατήρηση δειγμάτων σε αυτό το στάδιο κατέδειξε πως ο μεταφορέας βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη αλλά και εσωτερικούς περιπυρηνικούς δακτυλίους, οι οποίοι ταυτίζονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (Erpapazoglou et al. 2006, Vlanti et al. 2006). Αυτό μάλλον συμβαίνει λόγω υπερπαραγωγής της πρωτεΐνης. Προσθήκη γλυκόζης για μία ώρα και κατά συνέπεια αναστολή της έκφρασης του μεταφορέα εξαφάνισε τους δακτυλίους αυτούς, με την πλασματική μεμβράνη να αποτελεί το μοναδικό «ενδιαίτημα» του UapA. Περαιτέρω προσθήκη ουρικού οξέος ή ιόντων αμμωνίου κατέδειξε την εσωτερίκευση του μεταφορέα σε κινούμενα πρώιμα ενδοσώματα αλλά και στατικά σωματίδια καθώς και μικρά και μεγαλύτερα χυμοτόπια. Αυτό δεν συνέβη στο στέλεχος που εξέφραζε το K572R αλλήλιο. Στην Εικόνα 8.32 φαίνεται η επανάληψη του ίδιου πειράματος με Western ανάλυση. Και τα δύο πειράματα αποδεικνύουν πως κατά την προσθήκη υποστρώματος, ο UapA ενδοκυτώνεται και οδηγείται στο χυμοτόπιο προς αποικοδόμηση. Η προσθήκη ιόντων αμμωνίου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και συμπεριφέρθηκε ακριβώς όπως και παλαιότερα.



Εικόνα 8.30. Δοκιμασίες ανάπτυξη από τον Σ. Αμίλλη των στελεχών UapA-GFP (WT), ΔuapA, alcA-UapA-GFP και AlcA-UapA-K572R-GFP σε ουρία (UR) και ουρικό οξύ (UA) ως μοναδικές πηγές αζώτου, καθώς και σε συνθήκες αναστολής (Γλυκόζη), από-αναστολής (Φρουκτόζη) και επαγωγής (+αιθανόλη, EtOH) της έκφρασης του alcA υποκινητή.



Εικόνα 8.31. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού από τον Γ. Διαλλινά των στελεχών alcA-UapA-GFP και alcA-UapA-K572R-GFP σε ουρία, με διαδοχικές συνθήκες επαγωγής (Φρουκτόζη+αιθανόλη, I) και αναστολής (Γλυκόζη+Φρουκτόζη, I/R) της έκφρασης του alcA υποκινητή. Ακολούθησε προσθήκη ουρικού οξέος (UA) ή αμμωνιακών ιόντων (NH_4). Τα βέλη υποδεικνύουν ενδοσώματα (EN), μεβράνες χυμοτοπίων (VM) και περιπυρηνικό ενδοπλασματικό δίκτυο (NM/ER). Οι κεφαλές βελών επισημαίνουν χυμοτόπια (V).

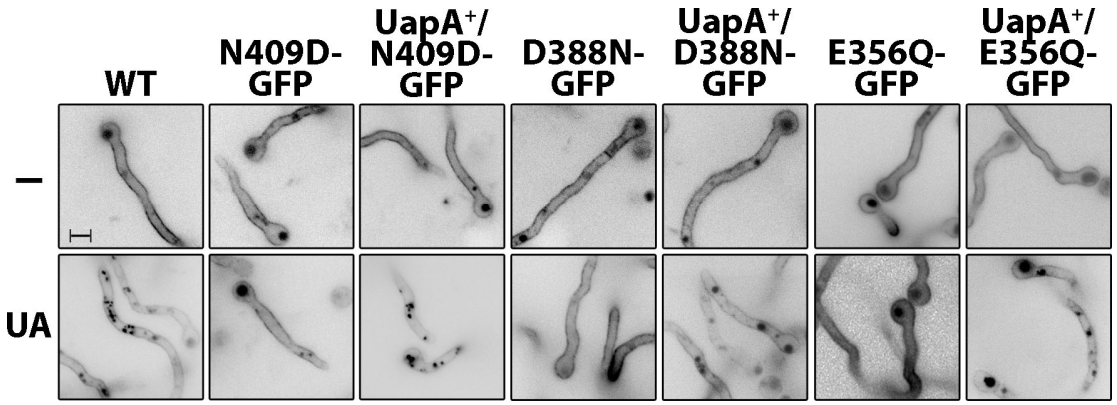


UapA-GFP	13.2	9.8	6.2	15.6	15.8	15.9
GFP	2.5	14.1	12.4	–	–	–
Σύνολο	15.7	23.9	18.6	15.7	15.8	15.9
Λόγος	5.3	0.7	0.5	–	–	–

Εικόνα 8.32. Ανοσοστύπωμα Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των στελεχών alcA-UapA-GFP και alcA-UapA-K572R-GFP σε ουρία με 1 ώρα γλυκόζη μετά από 2,5 ώρες επαγωγής, και κατόπιν προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων NH_4), ή χωρίς (-) (από Σ. Αμίλλη).

8.9. Η ενδοκύτωση του UapA από το υπόστρωμά του μπορεί να πραγματοποιηθεί *in trans*

Όπως αναφέρεται νωρίτερα, η λειτουργία του UapA είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωσή του από το υπόστρωμα. Συνεπώς και με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ, φαίνεται πως το σήμα για την ενδοκύτωση του μεταφορέα δημιουργείται κατά τη δυναμική λειτουργία του. Σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί εάν το σήμα αυτό αφορά το ίδιο μόνο μόριο ή μπορεί να μεταδοθεί, κατασκευάστηκαν με διασταύρωση στελέχη που εκφράζουν αλλήλια απώλειας λειτουργίας του UapA συζευγμένα με GFP ταυτόχρονα με ένα μη συζευγμένο φυσικού τύπου αλλήλιο. Τα αλλήλια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα N409D, E356Q και D388N. Στην Εικόνα 8.33 φαίνεται πως, παρουσία της φυσικού τύπου πρωτεΐνης, τα τρία αυτά ανενεργά μεταλλάγματα εμφανίζουν ενδοκύτωση όταν υπάρχει υπόστρωμα στο θρεπτικό υπόστρωμα.

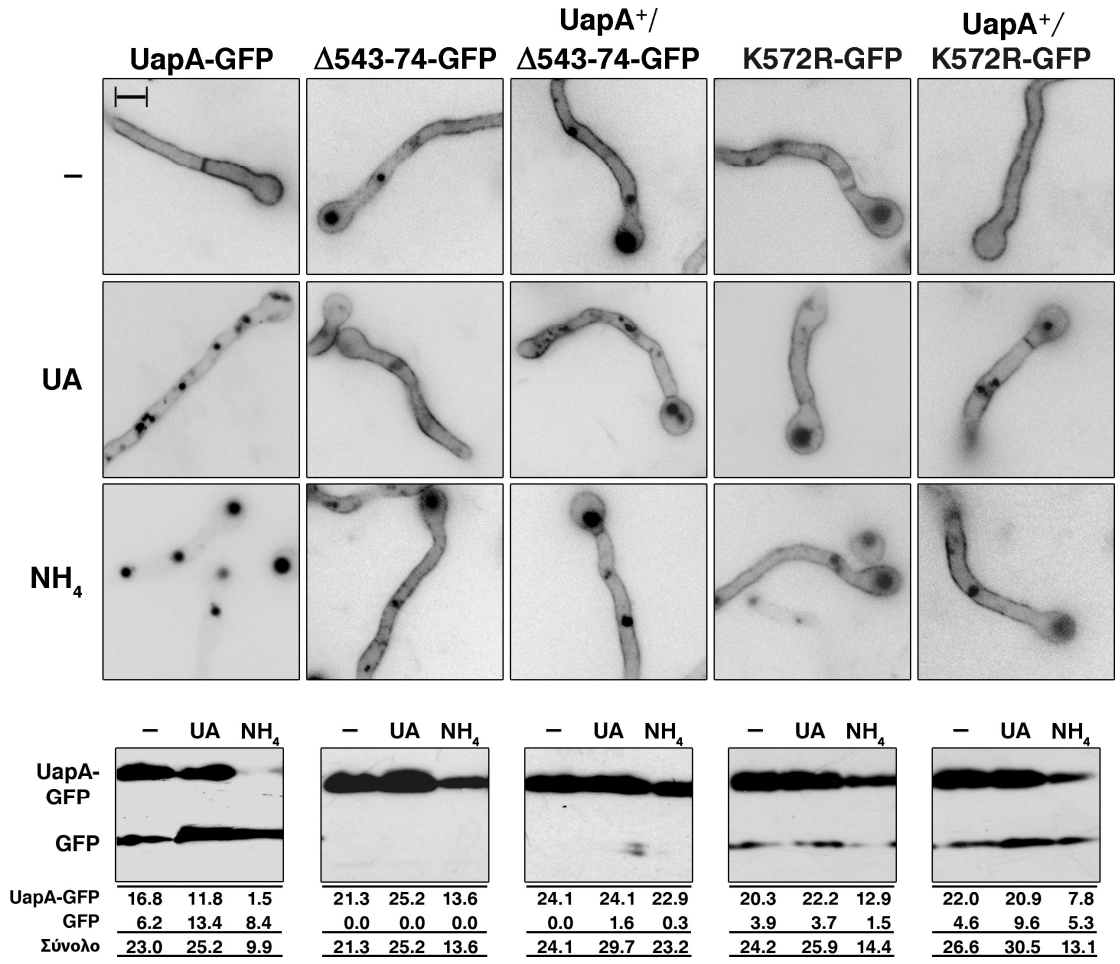


Εικόνα 8.33. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού των στελεχών UapA-GFP (WT), N409D-GFP, UapA+/N409D-GFP , D388N-GFP, UapA+/D388N-GFP, E356Q-GFP και UapA+/ E356Q-GFP με προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH4), ή χωρίς (-).

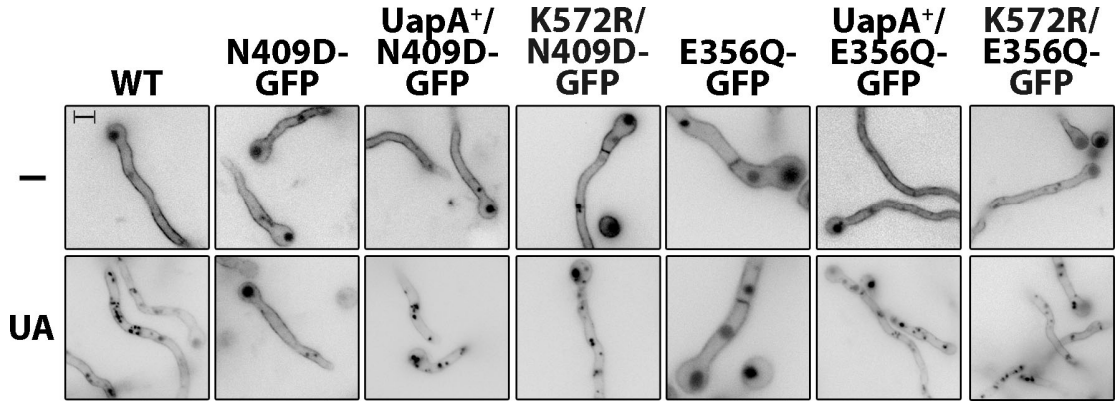
Το αποτέλεσμα αυτό ήταν πολύ ενδιαφέρον, αφού τα μέχρι στιγμής δεδομένα υποστήριζαν πως το υπόστρωμα πρέπει να μεταφερθεί δια μέσου του μεταφορέα ώστε να προκληθεί η ενδοκύτωση αυτού. Το ερώτημα που αμέσως διατυπώθηκε ήταν εάν τα μόρια αυτά τα οποία ενδοκυτώνονταν *in trans* χρειαζόταν να ουβικουιτινυλιωθούν. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκαν με διασταύρωση στελέχη που εκφράζουν τα αλλήλια K572R-GFP ή Δ543-574-GFP, τα οποία δεν ενδοκυτώνονται λόγω αδυναμίας ουβικουιτινυλίωσής τους, μαζί με το φυσικού τύπου μη-φθορίζων αλλήλιο. Τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα εμφανίζουν αδυναμία

ενδοκύτωσης από το υπόστρωμα αλλά και ιόντα αμμωνίου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8.34 με ανάλυση μικροσκοπίας επιφθορισμού αλλά και Western, η παρουσία του φυσικού τύπου μεταφορέα προκαλεί μια ελάχιστη αύξηση στην ενδοκύτωση των αλληλίων K572R-GFP και Δ543-574-GFP. Το αποτέλεσμα σίγουρα δεν είναι όμοιο με την ενδοκύτωση που παρατηρήθηκε στα ανενεργά μόρια (Εικόνα 8.33), αφού η ενδοκύτωση δεν είναι της ίδιας έντασης και αφήνει πολλά ανοικτά ενδεχόμενα. Η απάντηση στην ερώτηση που είχε τεθεί είναι πως σε κάποιο βαθμό η ουβικουιτινυλίωση χρειάζεται για την *in trans* ενδοκύτωση. Φαίνεται πως κάποια μόρια με αδυναμία ουβικουιτινυλίωσης, καταφέρνουν να ακολουθήσουν το δρόμο της ενδοκύτωσης. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο ήταν πως στα σημεία που γίνεται η ενδοκύτωση από το υπόστρωμα των φυσικού μορίων του μεταφορέα, συμπαρασύρονται μόρια των αλληλίων K572R-GFP και Δ543-574-GFP. Αυτό βέβαια προϋποθέτει τη σύναξη μορίων του UapA σε εξειδικευμένους μικροχώρους της πλασματικής μεμβράνης, αφού η ενδοκύτωση του AzgA μεταφορέα από το υπόστρωμά του υποξανθίνη (Α. Παυλίδης, Διπλωματική Εργασία) δεν συμπαρασύρει μόρια UapA (Εικόνα 10). Ο διμερισμός, ή γενικά πολυμερισμός του UapA ως πιθανή εξήγηση δεν μπορεί επισης να απορριφθεί (βλ. Συζήτηση).

Για να μελετηθεί παραιτέρω το φαινόμενο της *in trans* ενδοκύτωσης επιλέχθηκε ταυτόχρονη έκφραση δύο αλληλίων με αδυναμία ενδοκύτωσης από το υπόστρωμα, ένα ανενεργό και ένα με ανικανότητα ουβικουιτινυλίωσης. Έτσι, κατασκευάσθηκε πλασμίδιο που φέρει την K5272R μεταλλαγή χωρίς την GFP (παράγραφος 6.11.8), το οποίο μετασχηματίσθηκε στα στελέχη που φέρουν τα N409D-GFP και E356Q-GFP αλλήλια. Στην Εικόνα 8.35 φαίνεται ανάλυση μικροσκοπίας επιφθορισμού των συγκεκριμένων στελεχών, παρουσία ή μη ουρικού οξέος. Φαίνεται πως παρουσία του λειτουργικού, αλλά με ανικανότητα ουβικουιτινυλίωσης και ενδοκύτωσης, μη σημασμένου με GFP αλληλίου K572R, τα μη λειτουργικά αλλήλια N409D-GFP και E356Q-GFP ενδοκυτώνονται.



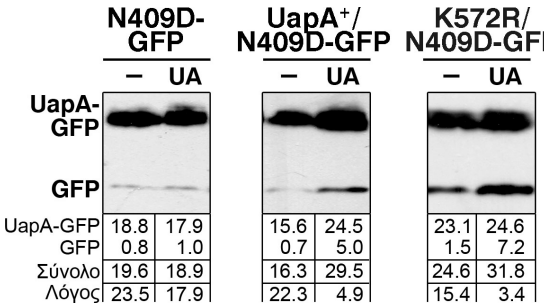
Εικόνα 8.34. Πειράματα μικροσκοπίας επιφθορισμού και Ανοσοστυπώματα Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των στελεχών UapA-GFP, Δ543-574-GFP, UapA+/ Δ543-574-GFP , K572R-GFP και UapA+/K572R-GFP με προσθήκη ουρικού οξέος (UA), αμμωνιακών ιόντων (NH4), ή χωρίς (-).



Εικόνα 8.35. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού των στελεχών UapA-GFP (WT), N409D-GFP, UapA+/ N409D-GFP , K572R/N409D-GFP, E356Q-GFP, UapA+/E356Q-GFP και K572R/E356Q-GFP με προσθήκη ουρικού οξέος (UA) ή χωρίς (-).

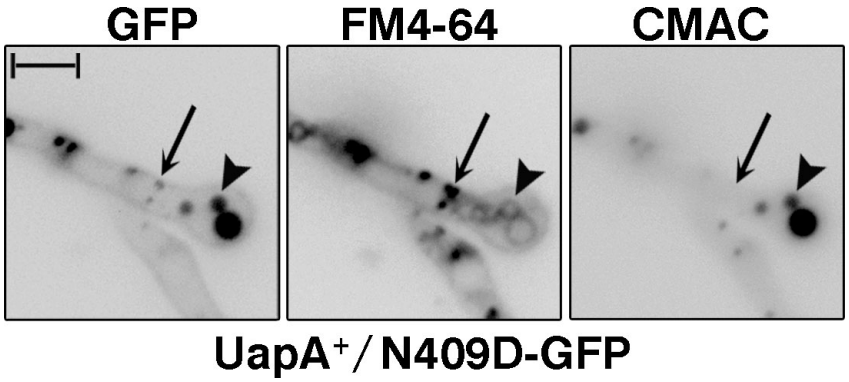
Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από ανάλυση Western (Εικόνα 8.36) όπου το αλλήλιο N409D-GFP εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό αποικοδόμησης όταν

συνεκφράζεται με ένα λειτουργικό αλλήλιο, είτε το αλλήλιο αυτό ενδοκυτώνεται (*uapA*$^{+}$) είτε όχι (K572R).



Εικόνα 8.36. Ανοσοστύπωμα Western εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα στελέχη), N409D-GFP, UapA+/ N409D-GFP και K572R/N409D-GFP με προσθήκη ουρικού οξέος (UA ή χωρίς (-).

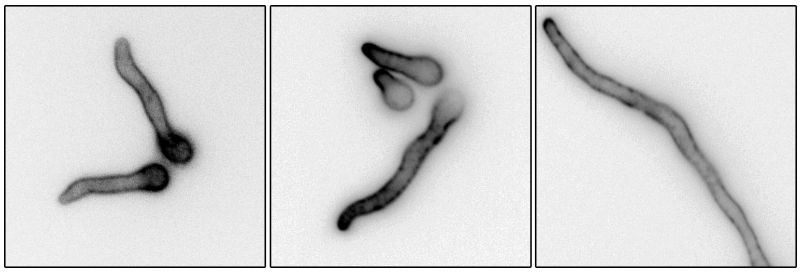
Η αποικοδόμηση αυτή δεν πραγματοποιείται σε μεγάλο ποσοστό, παρόμοιο με αυτό της ενδοκύτωσης που παρατηρείται στις συνθήκες αυτές στο μικροσκόπιο (Εικόνα 8.36), κάτι που όμως δικαιολογείται από την ύπαρξη πολλών εσωτερικών τμημάτων του N409D-GFP τα οποία συμπίπτουν με τη χρώση FM4-64, αλλά όχι με την CMAC, σε πείραμα διπλής ταυτόχρονης χρώσης παρουσία ουρικού οξέος στο συγκεκριμένο στέλεχος (Εικόνα 8.37). Αυτό σημαίνει πως η πρωτεΐνη N409D-GFP έχει ενδοκυτωθεί σε μεγάλο βαθμό, όπως φαίνεται από την εσωτερική κατανομή του GFP φθορισμού και την συμφωνία με την FM4-64, αλλά δεν έχει αποικοδομηθεί επειδή δεν έχει φτάσει σε χυμοτόπια, τα οποία υποδεικνύει η χρώση CMAC. Η σημασία αυτής της παρατήρησης αλλά και μια σύνοψη των συμπερασμάτων από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν αναλύεται στο κεφάλαιο των Συμπερασμάτων-Προοπτικών.



Εικόνα 8.37. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού του στελέχους UapA+/ N409D-GFP με προσθήκη ουρικού οξέος και ταυτόχρονη χρώση με FM4-64 και CMAC. Ο μεταφορέας διακρίνεται σε πολλά μικρά και μεγαλύτερα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Τα βέλη υποδεικνύουν μικρά, στικτά σωματίδια που δεν βάφονται με CMAC, ενώ οι κεφαλές βελών τονίζουν χυμοτόπια.

8.10 Ο UapA δεν εντοπίζεται σε γνωστές δομές υποοργάνωσης της πλασματικής μεμβράνης

Η πιθανότητα της χωροθετικής σύναξης μοριών UapA σε εξειδικευμένους μικροχώρους της πλασματικής μεμβράνης ως προϋπόθεση για την έναρξη ενδοκύτωσης είναι σχετική με γνωστές περιπτώσεις μεμβρανικής υποοργάνωσης πρωτεϊνών, όπως αυτή εντός λιπιδικών σχεδιών, των MCC (Membrane Comparment of Can1) και των εισοσωμάτων. Παρ' ότι ο UapA έχει ομοιόμορφη κατανομή στην πλασματική μεμβράνη, τουλάχιστον στα όρια ανάλυσης της οπτικής μικροσκοπίας, διερευνήθηκε η πιθανότητα να τοποθετείται σε μικροχώρους της πλασματικής μεμβράνης, είτε συστατικά, έιτε δυναμικά πριν την έναρξη ενδοκύτωσης. Οι λιπιδικές σχεδίες, τα MCC και τα εισοσώματα χαρακτηρίζονται από την πλούσια σε εργοστερόλη χημική τους σύσταση, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο κατόπιν χρώσης με *filipin* (Vangelatos et al. 2010). Σε εκβλαστάνοντα κονιδιοσπόρια έχει δειχθεί η *filipin* να χρωματίζει κηλίδες στην πλασματική μεμβράνη (Vangelatos et al. 2010), ενώ η κατανομή του UapA σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο είναι ομοιογενής (Pantazopoοulou et al. 2007). Δοκιμάσθηκε η χρώση με *filipin* σε νεαρά μυκήλια, όπου παρατηρήθηκε σχετικά ομοιογενής κατανομή της στην πλασματική μεμβράνη (Εικόνα 8.38), με αύξηση της έντασης στην κορυφαίο τμήμα (tip) οπου πραγματοποιείται η επάκρια αύξηση του μυκηλίου, όπως έχει παρατηρηθεί και από άλλους (Takeshita et al. 2008).

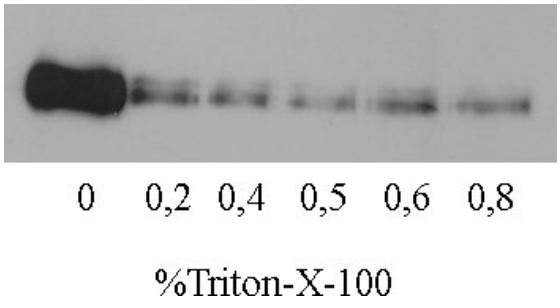


Εικόνα 8.38. Πείραμα μικροσκοπίας επιφθορισμού χρώσης με *filipin* της εργοστερόλης. Παρατηρείται σχετικά ομοιόμορφη κατανομή της, με αύξηση της έντασης στα σημεία επάκριας αύξησης.

Η κηλιδωτή χρώση της μεμβράνης που είχε παρατηρηθεί στα εκβλαστάνοντα κονιδιοσπόρια φαίνεται να χάνεται αργότερα κατά την ανάπτυξη, κάτι ανάλογο με την εικόνα που παρουσιάζουν οι PilB και SurG εισοσωμικές πρωτεΐνες (Vangelatos et

al. 2010). Έτσι φάνηκε ότι χρήση της *filipin* ως αυστηρού εργαλείου για τον εντοπισμό μικροχώρων της μεμβράνης πλούσιων σε εργοστερόλη δεν ήταν κατάλληλη στις συνθήκες αυτές.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες των μικροχώρων πλούσιων σε εργοστερόλη και σφιγγολιπίδια είναι ανθεκτικές στην εκχύλισή τους από τη μεμβράνη χρησιμοποιώντας μη-ιονικά τασιενεργά (Grossman et al. 2007). Με τη μέθοδο αυτή θα ήταν δυνατή η διερεύνηση της πιθανής τοποθέτησης του UapA σε μικροπεριοχές αντίστοιχης λιπιδικής σύστασης κάτι που πιθανώς να μην ήταν δυνατό με την μικροσκοπία επιφθορισμού, όπου η εργοστερόλη φαίνεται ως σχεδόν ομοιογενώς κατανεμημένη στην πλασματική μεμβράνη του *A. nidulans*. Ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών απομονώθηκαν από το στέλεχος UapA-GFP. 50 μg δείγματα από αυτό το εκχύλισμα επωάστηκαν για μισή ώρα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις Triton-X-100 (Grossmann et al. 2007). Το μη διαλυτοποιημένο από το απορρυπαντικό υλικό κατακρημνίσθηκε με φυγοκέντρηση στα 14.000 g για 30 λεπτά. Κατόπιν ακολούθησε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανάλυση Western. Στην Εικόνα 8.39 φαίνεται πως ο UapA είναι ευαίσθητος στην εκχύλιση από τα λιπίδια της μεμβράνης με Triton-X-100 από πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που υποδεικνύει τη μη εμπλοκή του σε λιπιδικές σχεδίες.



Εικόνα 8.39. Ανοσοστύπωμα Western ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από το στέλεχος UapA-GFP. Δείγματα 50 μg επωάστηκαν μισή ώρα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις Triton-X-100 και οι εκχυλισμένες από τα λιπίδια πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν.

9. Συμπεράσματα - Προοπτικές

9. Συμπεράσματα - Προοπτικές

9.1. Σχέσεις δομής-λειτουργίας του UapA

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο ρόλος τριών συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων της οικογένειας NAT, χρησιμοποιώντας ως εργαλείο τον εκτενέστερα μελετημένο αντιπρόσωπο της οικογένειας, UapA, στο πρότυπο μικροβιακό σύστημα, *A. nidulans*. Ο τρόπος μελέτης τους αφορούσε στοχευόμενες υποκαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων και διερεύνηση των επιπτώσεών τους στη λειτουργία της πρωτεΐνης βάσει:

Α) του φαινοτύπου που προκαλούν στην αύξηση του μύκητα σε πουρίνες ως πηγή αζώτου. Με τις δοκιμασίες ανάπτυξης μπορούσαν άμεσα να εξαχθούν συμπεράσματα για την λειτουργικότητα και εξειδίκευση της πρωτεΐνης.

Β) της τοπολογίας της πρωτεΐνης στο εκκριτικό μονοπάτι του μύκητα με χρήση της τεχνολογίας της GFP. Η δομική αρτιότητα του μεταφορέα καθώς και η ταξινόμηση του ρόλου ενός αμινοξικού καταλοίπου σε δομικό ή λειτουργικό ελέγχθηκαν με απλή παρατήρηση σε μικροσκόπιο επιφθορισμού.

Γ) της κινητικής της πρόσληψης ραδιοσημασμένου υποστρώματος, καθώς και ανταγωνισμού αυτής. Πληροφορίες για τη συγγένεια, την ταχύτητα πρόσληψης, την εξειδίκευση, τον τρόπο δέσμευσης και το μηχανισμό μεταφοράς μπορούν να εξαχθούν.

9.1.1. Η Gln382

Οι παραπάνω προσεγγίσεις έδωσαν πολλές πληροφορίες για το ρόλο των τριών υπό μελέτη αμινοξέων. Οι υποκαταστάσεις της Gln382 σε λυσίνη, γλουταμικό και σερίνη δεν έδωσαν ιδιαίτερους φαινοτύπους. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Q382K, Q382E, Q382S τοποθετούνται πλήρως στην πλασματική μεμβράνη του μύκητα και έχουν φυσιολογική έκφραση, δεν εμφανίζουν αλλαγή της εξειδίκευσης, διατηρούν περίπου την ίδια μεταφορική ικανότητα με τον φυσικού τύπου μεταφορέα, ενώ τα κινητικά τους χαρακτηριστικά διαφοροποιούνται λίγο, με την μεταλλαγή σε σερίνη να έχει τις μεγαλύτερες διαφορές (Πίνακας 7.1). Συνολικά, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες έχουν αυστηρότερη ειδικότητα για ξανθίνη, αφού οι μεταφορείς

παρουσιάζουν αυξημένες τιμές σταθερών αναστολής για διάφορα ανάλογά της. Η Q382S μάλιστα παρουσιάζει 20 φορές μειωμένη συγγένεια για ουρικό οξύ. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με μια κατάσταση όπου η Gln382 συμμετέχει, σε πολύ μικρό βαθμό, στην χαλάρωση της ειδικότητας του μεταφορέα UapA. Από τα δεδομένα που παρουσιάζονται, φαίνεται πως ο πολυμορφισμός της θέσης 382 στη NAT οικογένεια δεν μοιάζει να σχετίζεται με την εξειδίκευση των μελών της, αλλά μάλλον ακολουθεί την εξελικτική τους απόκλιση.

9.1.2. Η Lys439

Η Lys439 είναι απόλυτα συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς NAT μεταφορείς. Λόγω της απόλυτης συντήρησής της αναμενόταν να έχει σημαντικό ρόλο στην δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης. Επιπλέον, η πιθανή θέση της στην καρδιά του πολύ υδρόφοβου προβλεπόμενου TMS9 υποδείκνυε την εμπλοκή της στη λειτουργία της πρωτεΐνης, αφού ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ σε ένα πολύ υδρόφοβο περιβάλλον είτε θα έπρεπε να εξουδετερωθεί αλληλεπιδρώντας με ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ, είτε να βλέπει σε υδατικό πόρο. Παρόλα αυτά, οι υποκαταστάσεις της με την υδρόφοβη αλανίνη και το αντίθετου φορτίου γλουταμικό δεν είχαν καμία επίδραση στην τοπολογία και έκφραση της πρωτεΐνης, την συγγένεια δέσμευσης για την ξανθίνη και την ταχύτητα πρόσληψης. Η υποκατάσταση στην ισολειτουργική αργινίνη επηρέασε λιγότερο από τις άλλες υποκαταστάσεις της Lys439 τα κινητικά χαρακτηριστικά του μεταφορέα, ενώ η εισαγωγή της πολικής, αμφιπαθικής γλουταμίνης προκάλεσε τις πλέον διακριτές αλλαγές. Η συγγένεια δέσμευσης για την ξανθίνη γενικά δεν επηρεάζεται, κάτι που όμως δεν ισχύει για το ουρικό οξύ και ανάλογα ξανθίνης με ογκώδεις υποκαταστάσεις. Από αυτό φαίνεται πως η Lys439 χρειάζεται πιθανώς για να σταθεροποιεί μια πιο χαλαρή δομή στο ενεργό κέντρο, επιτρέποντας μεγαλύτερου μεγέθους μόρια να εισέρχονται. Ο ρόλος αυτός δεν είναι αυστηρός ούτε απαραίτητος, κάτι που μοιάζει ασύμβατο με την απόλυτη συντήρησή της. Δεν μπορεί να αποκλεισθεί το γεγονός το αμινοξικό αυτό κατάλοιπο να ήταν απαραίτητο σε προγονικές μορφές των NAT, αλλά πλέον η λειτουργία του να έχει εκφυλισθεί. Αυτό θα μπορούσε να έχει γίνει με τη συσσώρευση σιωπηλών μεταλλαγών που σταδιακά έκαναν τη λυσίνη αυτή μη απαραίτητη, τουλάχιστον για τον UapA . Ο UapA φαίνεται να έχει προέλθει από διπλασιασμό ενός προγονικού

uapC γονιδίου, το οποίο υπάρχει σε όλα τα είδη του γένους *Aspergillus* (Gournas et al. 2008). Σε σχέση με τους υπόλοιπους μέχρι στιγμής μελετημένους NAT, ο UapA εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια για ουρικό οξύ. Οι μεταλλαγές της Lys439 μοιάζουν να προκαλούν μερική αντιστροφή αυτής της διαδικασίας.

9.1.3. Το Glu356

Οι μεταλλαγές του Glu356 έδειξαν τον εξαιρετικά σημαντικό του ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η αντικατάστασή του με την ισοδομική γλουταμίνη καθιστά το μεταφορέα πλήρως μη λειτουργικό, ενώ στοχεύεται κανονικά στην πλασματική μεμβράνη και εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη E356D εκφράζεται και στοχεύεται επίσης κανονικά, αλλά εμφανίζει κρυοευαίσθητη ενεργότητα. Η αρχική ταχύτητα πρόσληψης υποστρωμάτων είναι στο 5% αυτής του μεταφορέα φυσικού τύπου, ενώ εμφανίζει αυξημένη συγγένεια, έως και 17 φορές, για όλα σχεδόν τα υποστρώματα/προσδέτες. Οι εξηγήσεις για αυτό μπορεί να είναι πολλές. Η σταθερά K_m των Michaelis-Menten καθορίζεται από τρεις σταθερές, αυτές τις δέσμευσης και αποδέσμευσης του υποστρώματος από την πρωτεΐνη, καθώς και αυτή της κατάλυσης της μεταφοράς. Στην περίπτωση που η μεταφορά είναι πολύ αποδοτικότερη από τη δέσμευση/αποδέσμευση του υποστρώματος, θεωρείται πως η τιμή της σταθεράς K_m αποτελεί μέτρο ένδειξης της συγγένειας του ενζύμου/μεταφορέα για τα υποστρώματά του. Η μεταλλαγή E356D προκαλεί τη δραματική μείωση της μεταφορικής ικανότητας της πρωτεΐνης, κάτι που θα μπορούσε να εξηγήσει και την πτώση της τιμής της K_m. Ενάντια σε αυτή την εξήγηση είναι το γεγονός πως υπάρχουν και άλλες μεταλλαγές του UapA οι οποίες παρουσιάζουν μειωμένη μεταφορική ικανότητα, αλλά διατηρούν τιμές K_m παρόμοιες με την πρωτεΐνη φυσικού τύπου. Οπότε φαίνεται πως η μείωση της τιμής της K_m στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη οφείλεται σε αποδοτικότερη δέσμευση ή μειωμένη απελευθέρωση του υποστρώματος. Σε κάθε περίπτωση αυτό σημαίνει πως τα υποστρώματα προσδένονται με ισχυρότερους δεσμούς στον μεταφορέα, και ίσως αυτός να είναι και ο λόγος της μειωμένης μεταφορικής του ικανότητας. Εάν υπολογίσουμε σε ελεύθερη ενέργεια τη δέσμευση της ξανθίνης στην E356D πρωτεΐνη, προκύπτουν επιπλέον 7,7 kJ/mole σε σχέση με τα ~30 της φυσικού τύπου πρωτεΐνης. Η ίδια περίπου βελτίωση παρατηρείται για όλα σχεδόν τα ανάλογα της ξανθίνης,

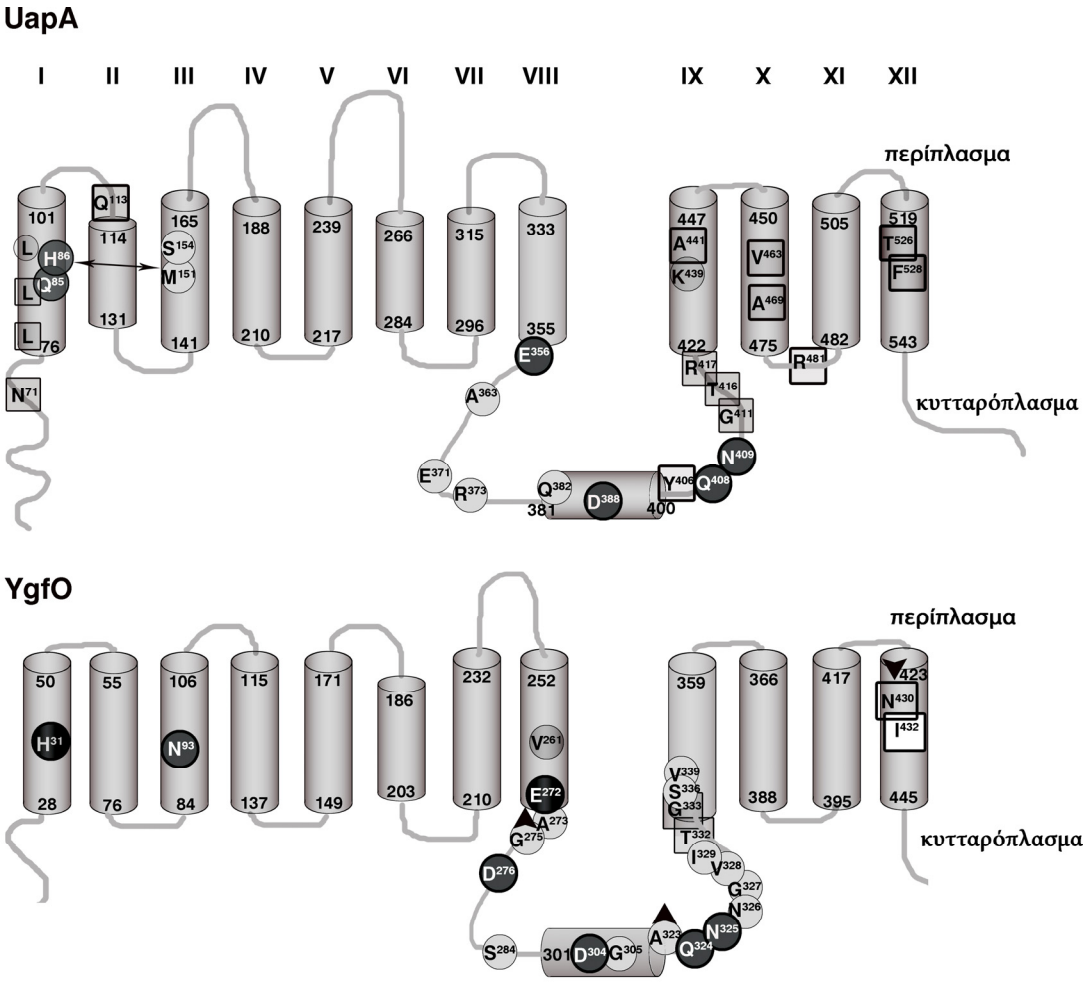
πλην της 3-μεθυλοξανθίνης, η οποία εμφανίζει περίπου ίδια την ίδια σταθερά αναστολής, και της 9-μεθυλοξανθίνης, η οποία πλέον δεν αναγνωρίζεται με υψηλή συγγένεια. Σύμφωνα με την κινητική ανάλυση, το Glu356 θα μπορούσε να δεσμεύει την ξανθίνη από τη θέση 3 του πουρινικού δακτυλίου. Κάτι τέτοιο όμως δεν είναι συμβατό με το μοντέλο δέσμευσης της ξανθίνης από τον UapA, οπότε μάλλον η ογκώδης μεθυλομάδα προκαλεί κάποια στερεοειδική παρεμπόδιση. Ως προς την 9-μεθυλοξανθίνη, η E356D μεταλλαγή μοιάζει με την Q408E, ενώ και οι δύο εμφανίζουν κρυοευαισθησία. Η Gln408 πιστεύεται να δεσμεύει άμεσα την ξανθίνη μέσω της N9 θέσης του πουρινικού δακτυλίου (Koukaki et al. 2005), και η ομοιότητα στην εξειδίκευση των δύο μεταλλαγών προτείνει πως βρίσκονται σχετικά κοντά στο χώρο. Ενισχυτική στις παραπάνω υποθέσεις είναι η κινητική ανάλυση της E356D/T526M πρωτεΐνης. Χαρακτηριστικό της μεταλλαγής T526M είναι πως διευρύνει την εξειδίκευση του UapA, χαλαρώνοντας τις στερεοειδικές παρεμποδίσεις που προκαλούνται από ογκώδεις υποκαστάσεις στον πουρινικό δακτύλιο (Papageorgiou et al. 2008). Από τον διπλά μεταλλαγμένο μεταφορέα είναι προφανές πως η χαμηλή συγγένεια της E356D μεταλλαγής για την 9-μεθυλοξανθίνη οφείλεται σε στερεοειδική παρεμπόδιση, την οποία άρει η T526M μεταλλαγή. Άρα φαίνεται η αύξηση της συγγένειας του μεταφορέα E356D να μην προκαλείται μέσω της ενίσχυσης του δεσμού της πρωτεΐνης με τη θέση 9 των πουρινών.

Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει η διφασική κινητική που εμφανίζει η E356D/T526M για διάφορα υποστρώματα/προσδέτες. Για το ουρικό οξύ δεν κατέστη δυνατό να υπολογισθεί κάτι τέτοιο, υπάρχουν όμως δύο πιθανά ενδεχόμενα. Αφενός, εάν υπάρχει ένα κέντρο δέσμευσης με πολύ υψηλή συγγένεια για το ουρικό, αντίστοιχο αυτού της ξανθίνης, είναι αδύνατο να υπολογισθεί με πειράματα ανταγωνισμού πρόσληψης της διαθέσιμης ραδιοσημασμένης ξανθίνης. Αυτό γιατί χρειάζεται μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση, δίνοντας μετρήσιμες τιμές πρόσληψης. Αφετέρου, όπως φαίνεται από τις δοκιμασίες ανάπτυξης, ο μεταφορέας E356D/T526M μοιάζει να μην είναι κορεσμένος σε συγκέντρωση 500 μM, κάτι που δεν ισχύει για τον E356D. Αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη ενός δεύτερου πολύ χαμηλής συγγένειας κέντρου δέσμευσης του ουρικού οξέος στην E356D/T526M πρωτεΐνη. Η μεταλλαγή T526M επιτρέπει σε διάφορα μη φυσιολογικά υποστρώματα του UapA να μεταφέρονται με πολύ χαμηλή συγγένεια, χωρίς να επηρεάζει την μετρήσιμη συγγένεια δέσμευσης των φυσιολογικών υποστρωμάτων του, ουρικό οξύ και ξανθίνη

(Papageorgiou et al. 2008). Αυτό έχει υποτεθεί πως πραγματοποιείται είτε μέσω της χαλάρωσης της δομής του μεταφορέα, μειώνοντας τις στερεοειδικές παρεμποδίσεις, είτε μέσω της αλλαγής της δομής ενός μέρους του μεταφορέα που θα μπορούσε να σχηματίζει μιας μορφής 'φίλτρου' (Papageorgiou et al. 2008, Kosti et al. 2010). Τελευταία έχει κρυσταλλωθεί μια σειρά μεταφορέων (Shimamura et al. 2008, Diallinas 2008) από διαφορετικές οικογένειες και με διαφορετική εξειδίκευση, οι οποίοι μοιράζονται παρόμοια δομή δύο αντιπαράλληλων V, καθένα αποτελούμενο από 5 διαμεμβρανικά τμήματα. Η ολίσθηση των δύο αυτών V επιτρέπει τις κινήσεις που είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση του κύκλου μεταφοράς, και επιπλέον, δείχνει πως υπάρχουν περιοχές που θα μπορούσαν να λειτουργούν ως πύλες για το υπόστρωμα, κατ' αναλογία με το μηχανισμό λειτουργίας των καναλιών (Diallinas 2008). Έχει επίσης δειχθεί πως υπάρχουν περιοχές στους μεταφορείς, άλλες του ενεργού κέντρου, οι οποίες εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια για τα υποστρώματα, ενώ έχουν προταθεί και μοντέλα λειτουργίας των μεταφορέων που περιλαμβάνουν περισσότερα του ενός κέντρα δέσμευσης με μικρότερες σε έκταση κινήσεις της πρωτεΐνης κατά τη μεταφορά του υποστρώματος (Naftalin et al. 2007). Με βάση αυτά, θα μπορούσε να υποτεθεί πως ο UapA διαθέτει ένα χαμηλής συγγένειας κέντρο δέσμευσης χωρίς αυστηρή εξειδίκευση, το οποίο αποκαλύπτεται από την T526M μεταλλαγή. Εναλλακτικά, η T526M μεταλλαγή ίσως δημιουργεί ένα τέτοιο κέντρο δέσμευσης, αν και αυτό δεν είναι τόσο πιθανό, αφού η ευκολία απόκτησης μεταλλαγών του ίδιου τύπου υποδεικνύει πως ο χαρακτήρας τους είναι απώλειας και όχι αλλαγής της λειτουργίας της πρωτεΐνης. Σε κάθε περίπτωση, το κέντρο αυτό δέσμευσης δεν είναι προφανές κινητικά στην φυσικού τύπου πρωτεΐνη, ούτε σε άλλα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα, αλλά φαίνεται να μπορεί εντοπισθεί όταν υπάρχει η E356D μεταλλαγή, λόγω της σημαντικής αύξησης της συγγένειας δέσμευσης. Η παραδοχή αυτή μπορεί να εξηγήσει τις διφασικές καμπύλες κινητικής του E356D/T526M και την αύξηση της μεταφορικής του ικανότητας για ουρικό οξύ από τα 0,5 στα 2 mM, ενώ παρέχει μια εναλλακτική εξήγηση για τις μεταλλαγές φίλτρου του UapA, συμβατή με όλα τα μέχρι στιγμής δεδομένα.

Πως όμως είναι δυνατόν μια μόνο μεταλλαγή να βελτιώνει την συγγένεια για δύο κέντρα δέσμευσης; Μια πιθανή εξήγηση, που αναφέρθηκε και νωρίτερα, θα ήταν πως τα υποστρώματα βρίσκονται περισσότερο χρόνο δεσμευμένα στο μεταφορέα, ο οποίος έχει μειωμένη ικανότητα ολοκλήρωσης του κύκλου μεταφοράς. Πως όμως μια τόσο συντηρητική μεταλλαγή μπορεί να το προκαλέσει αυτό; Η απάντηση που είναι

συμβατή με την βελτίωση της σταθεράς συγγένειας σε δύο κέντρα δέσμευσης είναι πως το αμινοξύ αυτό εμπλέκεται ενεργά στην ολοκλήρωση του κύκλου μεταφοράς της πρωτεΐνης είτε συμμετέχοντας ενεργά στη δέσμευση του υποστρώματος είτε στο μηχανισμό μεταφοράς του πρωτονίου. Μπορεί τα πειράματα με τις ουσίες που αποδεσμεύουν την μεταφορά υποστρώματος και πρωτονίου να ήταν αρνητικά, αλλά η μεταλλαγή E356D έχει διατηρήσει τον όξινο, αρνητικά φορτισμένο χαρακτήρα. Πιο συγκεκριμένα, δείχθηκε πως το μικρό ποσοστό μεταφοράς το οποίο πραγματοποιείται εξακολουθεί να οφείλεται σε ενεργό συμμεταφορά, αλλά αυτή θα μπορούσε να πραγματοποιείται και με το ασπαρτικό στη θέση του γλουταμικού. Το γεγονός πως το ασπαρτικό έχει μικρότερη πλευρική αλυσίδα ίσως είναι η εξήγηση για την μικρή αποδοτικότητα της ενεργού μεταφοράς. Στην περίπτωση που το Glu356 συμμετέχει άμεσα στη δέσμευση του υποστρώματος ή του πρωτονίου, η κοντύτερη πλευρική αλυσίδα του ασπαρτικού ίσως λειτουργεί ως παγίδα για το υπόστρωμα ή το πρωτόνιο, μη απελευθερώνοντάς τα το ίδιο αποδοτικά με το γλουταμικό. Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί στην LacY, την καλύτερα μελετημένη μεταφορική πρωτεΐνη. Σε αυτήν, η μεταλλαγή E269D, η οποία προκαλεί πολύ παρόμοιο φαινότυπο (Ujwal et al. 1994), έχει πολύ χαμηλή μεταφορική ικανότητα και αυξημένη συγγένεια δέσμευσης για το υπόστρωμα. Ο μεταφορέας αυτός έχει κρυσταλλωθεί, αλλά και μελετηθεί εκτενώς σε βιοχημικό επίπεδο (Kaback 2005). Από τις μελέτες αυτές έχει προκύψει η πεποίθηση πως το Glu269 είναι ο τελευταίος αποδέκτης του πρωτονίου, από το οποίο αποδεσμεύεται στο τελευταίο βήμα της ολοκλήρωσης του κύκλου μεταφοράς, με την βοήθεια της παρακείμενης στο χώρο Arg302 (He et al. 1997). Επειδή το ασπαρτικό έχει μικρότερη πλευρική αλυσίδα από το γλουταμικό, η αλληλεπίδραση δεν είναι αποτελεσματική, και ο μεταφορέας μένει «ακινητοποιημένος» σε αυτή την δομή. Το γεγονός αυτό μειώνει την ταχύτητα ολοκλήρωσης του κύκλου μεταφοράς και δίνει περισσότερο χρόνο στα υποστρώματα να προσδεθούν, οπότε και ο μεταφορέας εμφανίζει χαμηλή μεταφορική ικανότητα και αυξημένη συγγένεια δέσμευσης. Η εξήγηση αυτή μοιάζει πολύ ελκυστική και για την περίπτωση της E356D μεταλλαγής του UapA.



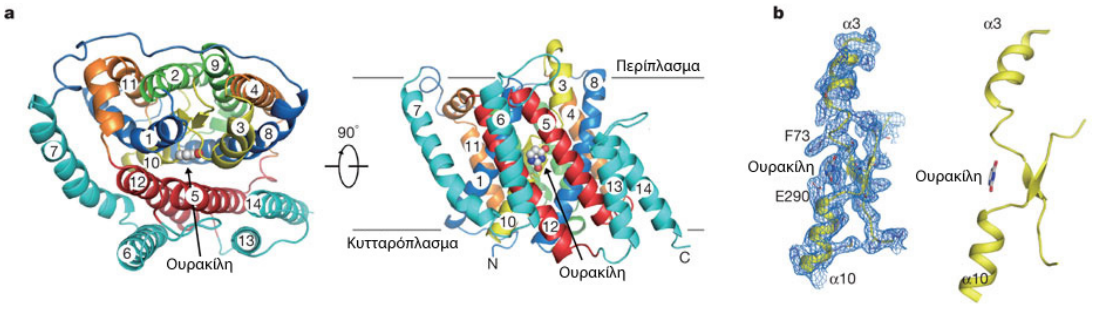
Εικόνα 9.1. Περιληπτική απεικόνιση της τοπολογίας και των σχέσεων δομής-λειτουργίας των UapA και YgfO. Τα υποθετικά TMS με δομή α-έλικας δείχνονται ως κύλινδροι. Επισημαίνονται αμινοξικά κατάλοιπα σημαντικά για τη λειτουργία των μεταφορέων. Τα απολύτως απαραίτητα για τη λειτουργία κατάλοιπα βρίσκονται σε σκούρο γκρι υπόβαθρο (UapA: Q85, E356, D388, Q408, N409, YgfO: H31, N93, E272, D276, Q324, N325). Τα κατάλοιπα που επηρεάζουν την εξειδίκευση ή τη συγγένεια δέσμευσης περιβάλλονται σε τετράγωνα (UapA: N71, L77, L84, Q113, G411,T416, R417, T526, F528; YgfO: T332, G333, N430, I432). Η H86 στο TMS1 του UapA επηρεάζει την τοπογένεση και έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με την M151 του TMS3. Στον YgfO τα αμινοξικά κατάλοιπα που φαίνονται σε γκρι και σκούρο γκρι υπόβαθρο είναι ευαίσθητα σε αλκυλίωση κατόπιν υποκατάστασής τους με Cys. Το N325C αλλήλιο προστατεύεται μερικώς από αλκυλίωση με προσθήκη υποστρώματος, ενώ το N430C προστατεύεται πλήρως με προσθήκη 2-θειο-ξανθίνης. Η αντίδραση των A323C και G275C ενισχύεται περαιτέρω παρουσία υποστρώματος.

Η σημαντική εμπλοκή του Glu356 στη διαδικασία μεταφοράς του υποστρώματος δείχθηκε πολύ πρόσφατα και στον YgfO μεταφορέα της *E.coli* (Karena and Frillingos 2009). Το αντίστοιχο αμινοξύ, Glu272 είναι αναντικατάστατο για τη λειτουργία του YgfO, αφού υποκατάστασή του ακόμη και με ασπαρτικό είναι πλήρους απώλειας λειτουργίας. Σημαντικό επίσης για τη λειτουργία του YgfO είναι το παρακείμενο Asp276, του οποίου υποκατάσταση αλλάζει την εξειδίκευσή του, επιτρέποντάς του να δεσμεύει 8-μεθυλο-ξανθίνη. Ένα ακόμη σημαντικό αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο στους UapA και YgfO είναι το Asp388 (Asp304 για τον YgfO), του οποίου ακόμη και συντηρητικές υποκαταστάσεις είναι πλήρους απώλειας λειτουργίας και για τους δύο μεταφορείς. Οι παρατηρήσεις αυτές αυξάνουν τα αμινοξέα που βρίσκονται στην θηλιά μεταξύ των TMS8 και 9 τα οποία είναι απαραίτητα για τη λειτουργία των NAT. Επιπλέον, η αλληλεπίδρασή του Glu356 με την Thr526 επιβεβαιώνει πως όλη αυτή η περιοχή έχει δυναμική διαμόρφωση η οποία αλλάζει σημαντικά κατά τον κύκλο λειτουργίας του μεταφορέα. (Karatza and Frillingos 2005, Koukaki et al. 2005, Papageorgiou et al. 2008, Papakostas et al. 2008). Στην Εικόνα 9.1 απεικονίζονται περιληπτικά τα μέχρι στιγμής δεδομένα για τις σχέσεις δομής-λειτουργίας των NAT.

9.1.4. Η τρισδιάστατη δομή του UraA NAT μεταφορέα ουρακίλης

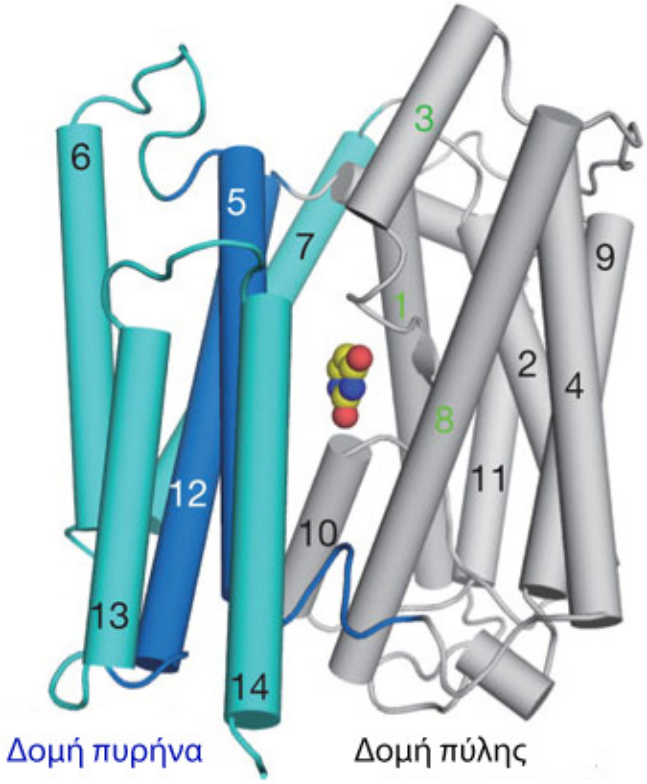
Κατά τη διάρκεια συγγραφής αυτής της διατριβής δημοσιεύθηκε η δομή του UraA μεταφορέα ουρακίλης της *E. coli*, μέλους της οικογένειας NAT (Lu et al. 2011). Ο μεταφορέας, όπως αναμενόταν για τους NAT (Diallinas and Gournas 2008), δεν έχει παρόμοια δομή με καμία από της μέχρι στιγμής κρυσταλλωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ εμφανίζει μερική συμμετρία. Συγκεκριμένα, ο μεταφορέας δείχθηκε να έχει 14 και όχι, όπως πιστευόταν για τους NAT, 12 διαμεμβρανικά τμήματα, τα οποία ταξινομούνται σε 2 σχεδόν αντιπαράλληλες διαμορφώσεις των TMS1-7 και TMS8-14 (Εικόνα 9.2a). Ιδιαιτερότητα στη δομή του UraA αποτελούν τα διαμεμβρανικά τμήματα 3 και 10, τα οποία δεν σχηματίζουν άρτιες α-έλικες. Το καθένα από τα TMS 3 και 10 σχηματίζει μια εκτεταμένη β-πτυχωτή επιφάνεια μέσα στη λιπιδική διπλοστιβάδα (Εικόνα 9.2b), η οποία ακολουθείται από μικρές α-έλικες, ενώ το προηγούμενο τμήμα δεν φαίνεται να έχει συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή. Οι δύο αυτές β-πτυχωτές επιφάνειες βρίσκονται στο κέντρο δέσμευσης του

υποστρώματος, ενώ σχηματίζονται πολλοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ καταλοίπων των TMS3 και 10.



Εικόνα 9.2. Η δομή του UraA. a) Δείχνονται δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες του μεταφορέα, μία από το κυτταρόπλασμα (αριστερά) και μία από πλάγια (δεξιά). Επισημαίνεται η δεσμευμένη ουρακίλη. b) Ένα ζεύγος μικρών β-πτυχωτών επιφανειών, σχηματιζόμενων από τα TMS3 και TMS10, βρίσκεται στο κέντρο δέσμευσης του μεταφορέα (από Lu et al. 2011 με τροποποιήσεις).

Ο μεταφορέας δομικά φαίνεται να χωρίζεται σε δύο μέρη, τον "πυρήνα", που αποτελείται από τα TMS1-4 και 8-11, και την "πύλη" που αποτελείται από τα υπόλοιπα. Οι περιοχές δηλαδή ανεστραμμένης συμμετρίας που εμφανίζει ο μεταφορέας (TMS1-7 και TMS8-14) δεν έχουν διακριτή λειτουργία, αλλά τα όμοια μεταξύ τους διαμεμβρανικά τμήματα αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν δύο διακριτές δομές. Ο πυρήνας του μεταφορέα βρίσκεται στο κέντρο της δομής και σχηματίζει το κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος, καθώς και το κύριο τμήμα του υδάτινου πόρου. Το τμήμα με λειτουργία πύλης, όπως ακριβώς είχε προταθεί να υπάρχει στον UapA (Papageorgiou et al. 2008, Kosti et al. 2010), βρίσκεται περιφερειακά της δομής του πυρήνα ελέγχοντας την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο. Αυτό δεν διακρίνεται καλά στην υπάρχουσα κρυσταλλωμένη δομή, μιας και ο UraA κρυσταλλώθηκε σε μια άκαμπτη εσωτερικώς τείνουσα ανοιχτή διαμόρφωση. Κάποια όμως από τα αμινοξικά κατάλοιπα της δομής της πύλης βρίσκονται αρκετά κοντά, και σε κάποια άλλη διαμόρφωση φαίνεται πως θα μπορούσαν να είναι ακόμη πιο κοντά στο κέντρο δέσμευσης του υποστρώματος.

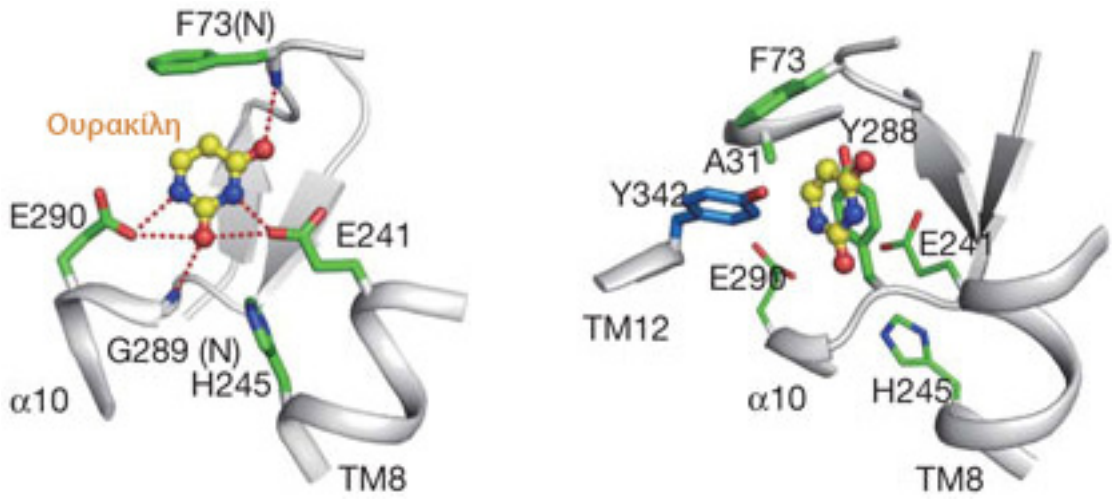


Εικόνα 9.3. Τα 14 TMS του UraA οργανώνονται σε δύο περιοχές, μία περιοχή πυρήνα (Core domain), η οποία σχηματίζει το κέντρο δέσμευσης, και μία περιοχής πύλης (Gate domain), η οποία ελέγχει την πρόσβαση στο κέντρο δέσμευσης (από Lu et al. in press με τροποποιήσεις).

Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκριτική ανάλυση των μέχρι στιγμής γνώσεων στις σχέσεις δομής-λειτουργίας των NAT (Παράγραφος 3.4, Κεφάλαιο 7, στην Εικόνα 9.1 περιληπτικά) με τη δομή του UraA. Τα επιπλέον TMS που φαίνεται να έχει ο UraA, και μάλλον όλοι οι NAT, οφείλονται σε δύο λόγους. Αφενός, η προηγουμένως θεωρούμενη αμφιπαθικής φύσεως α-έλικα μεταξύ των TMS8 και 9 (Εικόνα 9.1) που είχε προταθεί πως μπορεί να λειτουργεί ως έλικα εισόδου-εξόδου (reentrant loop) από την λιπιδική διπλοστιβάδα, είναι διαμεμβρανικό τμήμα, το ένατο του UraA (σύγκριση Εικόνων 9.1 και 9.5). Αφετέρου, η συναινετική αλληλουχία των NAT, για την οποία υπήρχαν δεδομένα από NMR πως σχηματίζει μια β-στροφή μεταξύ των N408 και Q409 (Ε. Μικρός και Γ. Διαλλινάς, αδημοσίευτα αποτελέσματα), φαίνεται στον UraA να είναι διαμεμβρανική α-έλικα (το TMS10 του UraA), αμέσως μετά την β-πτυχωτή επιφάνεια. Η παρουσία μιας γλυκίνης στη συγκεκριμένη περιοχή στον UraA είναι πιθανό να προκαλεί τη β-πτυχωτή επιφάνεια νωρίτερα. Άλλωστε, δεδομένα από ανάλυση μεταλλαξιγένεσης σε κυστεΐνες και μελέτες της προσβασιμότητάς τους στον YgfO έδειξαν πως προς το τέλος της συνεναιτικής NAT αλληλουχίας πρέπει να σχηματίζεται α-έλικα, ενώ στη δομή του UraA η περιοχή αυτή αποτελεί θηλιά μεταξύ των TMS10 και 11. Ίσως η διαφορά στην εξειδίκευση του UraA να σχετίζεται με αυτές τις μικρές διαφορές.

Το πλέον εντυπωσιακό συμπέρασμα είναι πως το Glu290 του UraA, που αποτελεί μέρος της συναινετικής αλληλουχίας NAT, δείχνεται να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το υπόστρωμα (Εικόνα 9.4). Το Glu290 είναι αντίστοιχο των Gln408 του UapA και Gln324 του YgfO που έχουν προταθεί να δεσμεύουν το υπόστρωμα των μεταφορέων αυτών. Μάλιστα η Gln408 του UapA έχει προταθεί να αλληλεπιδρά με τη θέση 9 του πουρινικού δακτυλίου της ξανθίνης. Υποκατάσταση του Glu290 του UraA με Ala οδηγεί επίσης σε απώλεια λειτουργίας. Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει είναι πως η απόλυτα συντηρημένη στους NAT Asn (409 στον UapA, 325 στον YgfO και 291 στον UraA) βρίσκεται πολύ κοντά στο κέντρο δέσμευσης και αλληλεπιδρά με την επίσης απόλυτα συντηρημένη ιστιδίνη του QH μοτίβου του TMS1. Η ασπαραγίνη αυτή είχε προταθεί να συμμετέχει σε δυναμικές αλληλεπιδράσεις κατά την ολοκλήρωση του κύκλου μεταφοράς των UapA και YgfO (Koukaki et al. 2005, Georgopoulou et al. 2010). Επίσης, πολλά αμινοξικά κατάλοιπα που είχαν δειχθεί να επηρεάζουν την πρόσβαση των υποστρωμάτων στο κέντρο δέσμευσης του UapA, όπως οι Thr526, Phe528 και Ala463 συμμετέχουν στη δομή της πύλης του UraA. Μάλιστα το αντίστοιχο της Thr526 (Asn430 του YgfO) θα μπορούσε να βρίσκεται πολύ κοντά στο κέντρο δέσμευσης σε μια άλλη διαμόρφωση του μεταφορέα, όπως ακριβώς είχε προταθεί για την N430 του YgfO. Επιπλέον, η Ala463 βρίσκεται δίπλα στο αντίστοιχο της Phe342 του UraA, η οποία αλληλεπιδρά με δυνάμεις Van der Waals με το υπόστρωμα. Τον ίδιο ρόλο έχει και η Y406, η οποία είχε απομονωθεί με την ίδια γενετική επιλογή (Kosti et al. 2010).

Το στοιχείο που προκύπτει όμως και αφορά περισσότερο από κάθε άλλο τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής, είναι πως το απόλυτα συντηρημένο γλουταμικό της θέσης 356 του UapA (241 του UraA, 272 του YgfO) είναι το δεύτερο κατάλοιπο που δεσμεύει το υπόστρωμα (Εικόνα 9.4), σχηματίζοντας άμεσα δεσμό υδρογόνου με αυτό. Μάλιστα στη δομή του UraA φαίνεται να βρίσκεται αντιδιαμετρικά του Glu290 (Q408 του UapA), γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την ανικανότητα αποδοτικής μεταφοράς που εμφανίζει το E356D αλληλίο, αφού η απόσταση μεταξύ των δύο καταλοίπων αυξάνεται. Οι συγγραφείς επίσης προτείνουν πως το συγκεκριμένο κατάλοιπο πιθανώς να συμμετέχει και στη δέσμευση και μεταφορά του πρωτονίου. Αν και δεν μπορεί να αποκλεισθεί, δεν έχει παρατηρηθεί κάτι τέτοιο σε άλλους μεταφορείς. Πάντως ένας πιθανός ρόλος του συγκεκριμένου καταλοίπου στη δέσμευση του πρωτονίου δεν είναι ασύμβατος με τα δεδομένα της συγκεκριμένης διατριβής και μένει να ερευνηθεί πειραματικά.

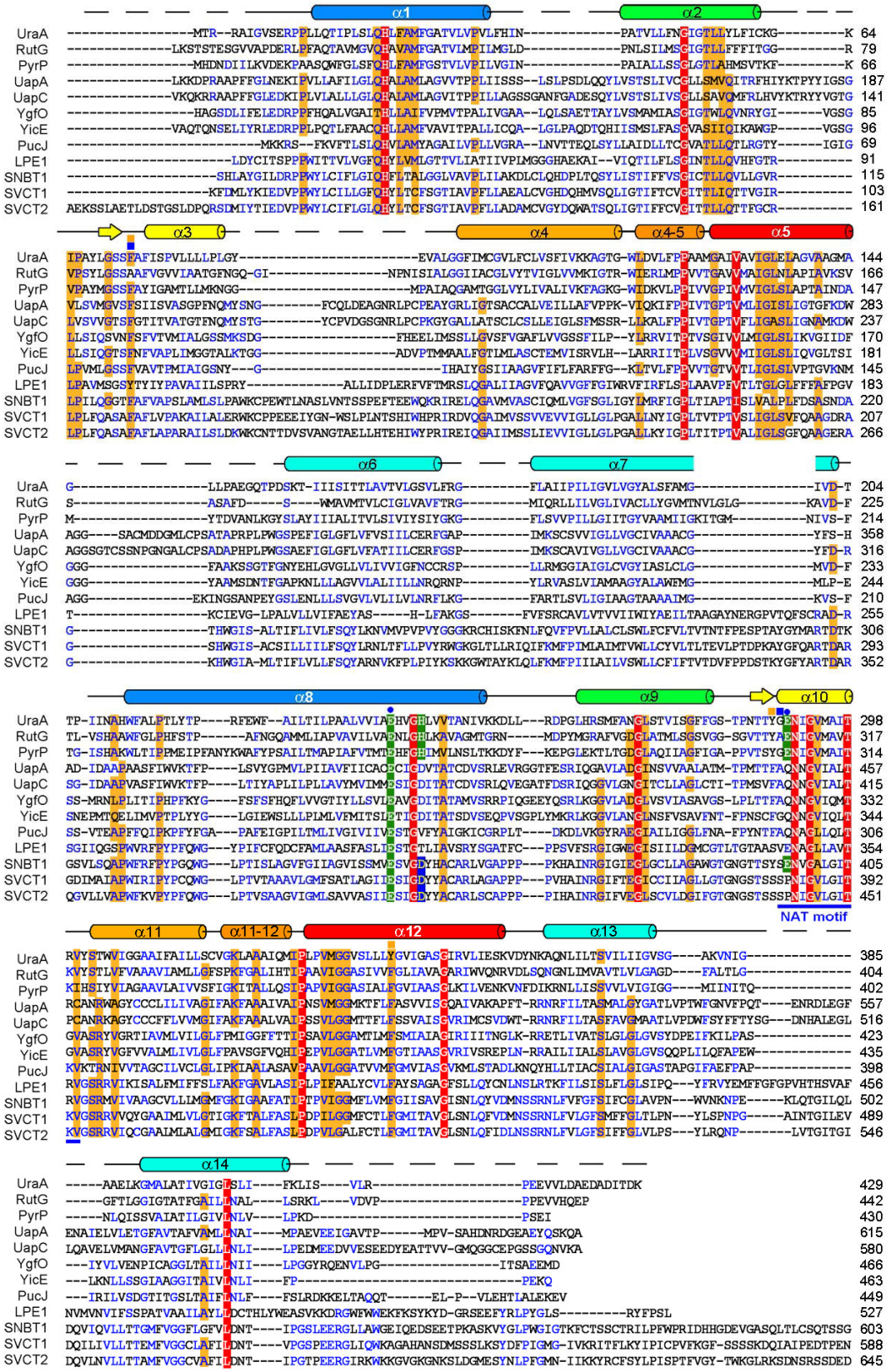


Εικόνα 9.4. Ο τρόπος δέσμευσης της ουρακίλης από τον UraA. Δύο οπτικές γωνίες παρατίθενται. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με κόκκινες διακεκομμένες γραμμές.

Ένα τρίτο κατάλοιπο φαίνεται να συμμετέχει στη δέσμευση του υποστρώματος του UraA, Η His245 (Glu276 του YgfO και Glu 360 του UapA), η οποία είναι σε κατάλληλη θέση και απόσταση για να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου (Εικόνα 9.4). Το αντίστοιχό της Glu276 του YgfO έχει δειχθεί να συμμετέχει στον καθορισμό της εξειδίκευσης του μεταφορέα (Karena and Frillingos 2009). Από τα παραπάνω φαίνεται πως δύο από τα τρία κατάλοιπα που δεσμεύουν το υπόστρωμα στον UraA φέρουν διαφορετικές υποκαταστάσεις στις αλληλουχίες των UapA και YgfO. Μάλιστα οι δύο αυτοί μεταφορείς ξανθίνης έχουν ακριβώς τα ίδια κατάλοιπα στις θέσεις αυτές. Η ουρακίλη και η ξανθίνη δεν διαφέρουν ιδιαίτερα σε δομή, όμως το ασκορβικό οξύ διαφέρει σημαντικά. Οι NAT μεταφορείς ασκορβικού οξέος των θηλαστικών έχουν προλίνη στη θέση της γλουταμίνης/γλουταμικού της NAT συναινετικής αλληλουχίας, ένα πολύ διαφορετικό αμινοξύ. Τα άλλα δύο όμως αμινοξέα που συμμετέχουν στη δέσμευση είναι ταυτόσημα με αυτά που φέρουν οι UapA και YgfO. Τα παραπάνω δείχνουν πως η αλλαγή της εξειδίκευσης των NAT δεν μπορεί να οφείλεται μόνο σε αλλαγές των αμινοξέων του κέντρου δέσμευσης, αλλά και σε αλληλεπιδράσεις με άλλες περιοχές της πρωτεΐνης, όπως τα TMS1 και TMS3 που φαίνονται να αλληλεπιδρούν με το TMS10 , αλλά και με την δομή της πύλης συνολικά. Άλλωστε είναι γνωστό πως μεταλλαγές στην αντίστοιχη περιοχή πύλης του UapA δημιουργούν αλλήλια που μπορούν να αναγνωρίσουν και να μεταφέρουν ουρακίλη, ενώ είχε ήδη προταθεί πως η εξειδίκευση των NAT

καθορίζεται από ενδομοριακές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις της NAT αλληλουχίας (TMS10 σύμφωνα με τη δομή του UraA) και των TMS1, TMS10 (TMS12 σύμφωνα με τη δομή του UraA) και TMS12 (TMS14 σύμφωνα με τη δομή του UraA) (Papageorgiou et al. 2008, Kosti et al. 2010).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η αλληλεπίδραση των TMS1 και TMS3 έχει δειχθεί γενετικά στον UapA (Pantazopoulou and Diallinas 2006, Σ. Αμίλλης, Β. Κωστή, Α. Πανταζοπούλου και Γ. Διαλλινάς, εργασία σε προετοιμασία), ενώ η στενή γειτνίαση του TMS3 με το ενεργό κέντρο φαινόταν από τις μεταλλαγές της Asn93 του YgfO. Παρόλα αυτά, η δομή του UraA δεν καταφέρνει να εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο μεταλλαγές στις θηλιές γύρω από το TMS1 ή στην κυτταροπλασματική θηλιά μεταξύ TMS10 και 11 επηρεάζουν την εξειδίκευση του UapA.



Εικόνα 9.5. Στοίχιση NAT γνωστής λειτουργίας. Πάνω από τις αλληλουχίες διακρίνεται η τοπολογία του UraA. Επισημαίνονται αμινοξέα απόλυτα συντηρημένα (Κόκκινο), συντηρημένα (Πορτοκαλί), που συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος με δεσμούς υδρογόνου μέσω της πλευρικής τους αλυσίδας (μπλε κύκλος πάνω από τη στοίχιση) ή της κύριας αλυσίδας (μπλε τετράγωνο πάνω από τη στοίχιση) ή με δυνάμεις Van der Waals (πορτοκαλί τετράγωνο πάνω από τη στοίχιση). Το πράσινο τονίζει απαραίτητα για τη λειτουργία του UraA αμινοξέα (από Lu et al. 2011).

9.1.5. Προοπτικές

Από τη στιγμή που υπάρχει η δομή του UraA θα είναι πολύ ενδιαφέρον να στοιχισθεί πάνω της η αλληλουχία των υπολοίπων NAT. Από την ανάλυση αυτή μπορούν να προκύψουν πολύ ενδιαφέροντα συμπεράσματα για τη λειτουργία και εξειδίκευση των NAT. Επίσης πολύ ενδιαφέρουσα θα ήταν η *in silico* μελέτη του τρόπου δέσμευσης των υποστρωμάτων τους, ειδικά για τον UapA, όπου υπάρχουν διαθέσιμες πολλές μεταλλαγές αλλαγής της εξειδίκευσης.

Πέρα από το θέμα της εξειδίκευσης, ανοιχτό επίσης παραμένει το πώς πραγματοποιείται η συμμεταφορά. Στον SVCT2 έχει δειχθεί μια αμοιβαία αλληλεπίδραση μεταξύ υποστρώματος και κατιόντων νατρίου, η οποία είναι απαραίτητη για την υψηλή συγγένεια του μεταφορέα για ασκορβικό οξύ (Godoy et al. 2007). Αυτό δείχνει πως είναι όντως πιθανό τα κατιόντα νατρίου και το ασκορβικό οξύ να αλληλεπιδρούν, ή η αλληλεπίδραση αυτή να γίνεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων που δεσμεύουν υπόστρωμα και κατιόν. Στον *A. nidulans* μπορούμε να εκμεταλλευτούμε τα πλεονεκτήματα της χρήσης πουρινών ως πηγών αζώτου και τη δυνατότητα άμεσης επιλογής κατασταλτικών μεταλλαγών υποκαταστάσεων του Glu356. Σε περίπτωση που το κατάλοιπο αυτό σχετίζεται όντως και με τη μεταφορά του πρωτονίου, οι κατασταλτικές αυτές μεταλλαγές θα μπορούσαν να αφορούν υποκαταστάσεις που προκαλούν αποδέσμευση της μεταφοράς υποστρώματος και πρωτονίου, πιθανώς σε κάποιο θετικά φορτισμένο αμινοξύ με ρόλο ανάλογο της Arg302 της LacY, ή ακόμη και μεταλλαγές που θα μετέτρεπαν το μεταφορέα σε διευκολυνόμενης διάχυσης πρωτεΐνη. Οι μεταλλαγές αυτές θα βοηθούσαν στην περαιτέρω κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας και του μηχανισμού μεταφοράς στη NAT οικογένεια. Επιπλέον, η E356D μεταλλαγή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με μεταλλαγές που χαλαρώνουν την εξειδίκευση του μεταφορέα, για να διερευνηθεί εάν αυτές επίσης εμφανίζουν κινητικά περισσότερα του ενός κέντρα δέσμευσης, παρόμοια με την E356D/T526M. Από την ανάλυση αυτή είναι δυνατόν να αποκαλυφθούν λειτουργικές αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με δυναμικές δομικές διαμορφώσεις κατά τη διάρκεια του κύκλου μεταφοράς οι οποίες είναι δύσκολο να προβλεφθούν σε μια στατική τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή.

9.2. Ρύθμιση της έκφρασης του UapA

Στη συγκεκριμένη διατριβή μελετήθηκε επίσης το φαινόμενο της ενδοκύτωσης του μεταφορέα UapA κατά την προσθήκη υποστρώματος στο μέσο ανάπτυξης, καθώς και ο μηχανισμός που πραγματοποιείται η ενδοκύτωση αυτή. Τα μόρια του UapA που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη εσωτερικεύονται γρήγορα (30 λεπτά), ταξινομούνται σε ενδοσώματα και κατευθύνονται στον αυλό του χυμοτοπίου, όπου τελικά αποικοδομούνται. Το φαινόμενο αυτό δείχθηκε να μην ενεργοποιείται από κάποιον μεταβολίτη που προέρχεται από τον καταβολισμό του υποστρώματος του μεταφορέα και να είναι ανεξάρτητο από τη μεταγραφική επαγωγή των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι πρόσληψης και καταβολισμού πουρινών. Αυτό είναι το πρώτο παράδειγμα μεταφορέα που ρυθμίζεται από τα υποστρώματά του με δύο ανταγωνιστικούς μηχανισμούς: Μεταγραφική επαγωγή και αυξημένο ρυθμό ενδοκύτωσης.

9.2.1. Η ενδοκύτωση του UapA από υπόστρωμα εξαρτάται από την ενεργό μεταφορά του υποστρώματος

Ένα πολύ σημαντικό εύρημα της συγκεκριμένης δουλειάς, το οποίο δεν έχει απαντηθεί επαρκώς για τους μεταφορείς του *S. serevisiae*, είναι πως η επαγομένη από το υπόστρωμα ενδοκύτωση του μεταφορέα UapA είναι απολύτως εξαρτώμενη από τη λειτουργία του, μιας και ανενεργά μόρια δεν είναι δυνατόν να ενδοκυτωθούν με τον τρόπο αυτό. Κάποια από αυτά τα ανενεργά μόρια που δοκιμάσθηκαν (N409D) είναι μάλιστα πολύ πιθανό να μπορούν να δεσμεύσουν κανονικά το ουρικό οξύ, μιας και τα σχετικά μεταλλαγμένα αμινοξέα δεν φαίνεται να εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις με το υποστρώμα, (Koukaki et al. 2005, Papageorgiou et al. 2008, παράγραφος 9.1.4). Επίσης, αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση ουρικού οξέος (~100 μM) ή δέσμευση στο ενεργό κέντρο του UapA προσδετών οι οποίοι δεν μεταφέρονται (*ligands*) δεν προκαλούν ενδοκύτωσή του. Αντιθέτως, η ενδοκύτωση του ενεργού μεταφορέα είναι δυνατόν να προκληθεί από πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ουρικού οξέος (5-10 μM), οι οποίες αντιστοιχούν στο K_m του UapA για το υπόστρωμα αυτό. Αυτό σημαίνει πως στις συνθήκες αυτές, πάνω από το 50% των μεταφορέων είναι κορεσμένοι και λειτουργούν συνεχώς. Τα ανωτέρω συμπεράσματα υποδεικνύουν την

αναγκαιότητα της ολοκλήρωσης του κύκλου μεταφοράς του υποστρώματος από τον μεταφορέα, προκειμένου να τεθεί στη διαθεσιμότητα του ενδοκυτωτικού μηχανισμού, γεγονός το οποίο αποτελεί σημαντικό νέο εύρημα αυτής της δουλειάς. Στον *S. serevisiae*, αλλά και στα θηλαστικά, έχει βρεθεί σημαντικός αριθμός μεταφορέων οι οποίοι ρυθμίζονται αρνητικά σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο από τα υποστρώματά τους. Σε αρκετές περιπτώσεις, όπως του μεταφορέα μετάλλων Smf1p (Liu and Culotta 1999, Stimpson et al. 2006), του Fur4p μεταφορέα ουρακίλης (Blondel et al. 2004) και μεταφορέων θηλαστικών (Whitworth and Quick 2001, Chi and Reith 2003, Felice et al. 2005, Kim et al. 2007, Miranda and Sorkin 2007), έχει δειχθεί επίσης πως ο μεταφορέας πρέπει να είναι ενεργός για να συμβεί αυτό. Σε κάποιες από αυτές τις περιπτώσεις έχει δειχθεί πως αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση υποστρώματος είναι αρκετή για να προκαλέσει την αποικοδόμηση του μεταφορέα, όπως η ουρακίλη για τον Fur4p (Blondel et al. 2004) και τα μέταλλα για τον Smf1p (Nikko et al. 2008). Επίσης έχει δειχθεί για τον Gap1p πως, σε κάποιες περιπτώσεις αναλόγων υποστρώματος τα οποία δεν μεταφέρονται, η δέσμευσή τους εξωκυτταρικά στον μεταφορέα είναι αρκετή για να επάγει ενδοκύτωση, δίνοντας στο μεταφορέα ρόλο *ανιχνευτή* (Thevelein et al. 2008). Κάτι τέτοιο, σύμφωνα με τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ, φαίνεται ξεκάθαρα να μην ισχύει για τον UapA. Μάλιστα για την περίπτωση του Gap1p υπάρχει και αντίλογος, προτείνοντας την αναγκαιότητα της μεταφοράς για την ενδοκύτωσή του (Risinger et al. 2006).

9.2.2. Δυναμικές δομικές διαμορφώσεις του μεταφορέα κατά τη μεταφορά του υποστρώματος προωθούν την αποικοδόμησή του

Όσον αφορά το πώς μηχανιστικά γίνεται αντιληπτή η μεταφορά του υποστρώματος, αυτή η εργασία προχώρησε ένα βήμα παραπέρα με τη μελέτη του φαινομένου σε στελέχη που εκφράζουν αλλήλια του UapA με τροποποιημένη συγγένεια ή/και εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα του φυσικού τύπου μεταφορέα. Είναι χαρακτηριστικό πως αλλήλια τα οποία αναγνωρίζουν και μεταφέρουν υποξανθίνη, ένα μη-φυσιολογικό υπόστρωμα του UapA, είναι δυνατόν να ενδοκυτωθούν παρουσια υποξανθίνης, αρκεί να τους προσφερθεί σε ικανή συγκέντρωση. Το γεγονός αυτό ενισχύει περαιτέρω την αναγκαιότητα της ολοκλήρωσης του κύκλου μεταφοράς. Ενδιαφέρουσα παρατήρηση από τη μελέτη των

συγκεκριμένων λειτουργικών αλληλίων του UapA ήταν επίσης ότι δεν δείχνουν όλα ευαισθησία στην ενδοκύτωση από το υπόστρωμα, προτείνοντας πως η ολοκλήρωση του κύκλου μεταφοράς είναι αναγκαία, αλλά όχι ικανή για την πρόκληση ενδοκύτωσης. Πως όμως αυτό είναι δυνατό; Είναι γνωστό πως κατά τη διάρκεια του κύκλου μεταφοράς οι μεταφορικές πρωτεΐνες πραγματοποιούν μια σειρά μοριακών κινήσεων που οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στη στερεοδιάταξή τους (Diallinas 2008). Η μελέτη της κινητικής συγκεκριμένων αλληλίων (T526L, F528A) του UapA έχει δείξει πως η δυνατότητα που έχουν αποκτήσει να μεταφέρουν υποξανθίνη δεν οφείλεται σε αλλαγή του τρόπου δέσμευσης των υποστρωμάτων, αλλά σε αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης η οποία την κάνει πιο «προσβάσιμη» και λιγότερο εκλεκτική σε πουρίνες και πυριμιδίνες (Papageorgiou et al. 2008, Vlanti et al. 2006). Αντίστοιχα συμπεράσματα έχουν εξαχθεί πρόσφατα και για άλλες μεταλλαγές του UapA (Kosti et al. 2010). Φαίνεται λοιπόν πως οι πρωτεΐνες αυτές έχουν τροποποιημένη δομή, τέτοια που δεν τις καθιστά διαθέσιμες στον ενδοκυτωτικό μηχανισμό που επάγεται από το υπόστρωμα, ενώ ενδοκυτώνονται κανονικά από ιόντα αμμωνίου. Οπότε, το σήμα για την ενδοκύτωση από τους δυο μηχανισμούς οφείλει να είναι διαφορετικό και στην περίπτωση ενδοκύτωσης από το υπόστρωμα φαίνεται να σχετίζεται άμεσα από δυναμικές αλλαγές στην διαμόρφωση του μεταφορέα κατά τη διάρκεια μεταφοράς του υποστρώματος.

9.2.3. Η ενδοκύτωση του UapA πραγματοποιείται μέσω ουβιουιτινυλίωσης

Μπορεί το αρχικό σήμα για την πρόκληση της ενδοκύτωσης να παραμένει αινιγματικό, αλλά ο τελικός αποδέκτης αυτού δείχθηκε σε αυτή την εργασία να είναι η ουβικουιτινυλίωση της Lys572 από την λιγάση της ουβικουιτίνης HulA. Μάλιστα από αυτήν εξαρτώνται τόσο η ενδοκύτωση από υπόστρωμα, όσο και από ιόντα αμμωνίου. Το γεγονός ότι και τα δύο σήματα ενδοκύτωσης καταλήγουν στον ίδιο αποδέκτη, προτείνει τη χρήση διαφορετικών καταρροϊκών ρυθμιστικών μηχανισμών από το κάθε σήμα, όπως την εμπλοκή διαφορετικών πρωτεϊνών-προσαρμοστών (*adaptors*). Οι πρωτεΐνες-προσαρμοστές χρειάζονται ως διαμεσολαβητές της πρωτεΐνης-στόχου και της λιγάσης της ουβικουιτίνης, μιας και σχεδόν όλοι οι μέχρι στιγμής μελετημένοι μεταφορείς δεν διαθέτουν τα απαραίτητα PPXY στοιχεία για να

αλληλεπιδράσουν με τις WW περιοχές της λιγάσης (Lin et al. 2008, Nikko et al. 2008 Leon and Haguenauer-Tsapis 2009). Από τους πρόσφατα χαρακτηρισμένους προσαρμοστές-πρωτεΐνες ομοιάζοντες σε αρρεστίνες, κάποιοι έχουν διακριτούς ρόλους, ενώ άλλοι αλληλεπικαλυπτόμενους. Το γεγονός αυτό περιπλέκει την κατάσταση, αλλά και δημιουργεί την απαραίτητη πολυπλοκότητα ώστε να μπορεί να ρυθμιστεί η ενδοκύτωση του συνόλου των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Στον *A. nidulans* έχουν εντοπιστεί 9 πρωτεΐνες-ομοιάζουσες με αρρεστίνες (Α. Παυλίδης, Σ. Αμίλλης και Γ. Διαλλινάς, αδημοσίευτα αποτελέσματα), ανοίγοντας το δρόμο για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού ενδοκύτωσης του UapA. Ανάμεσα στα ερωτήματα τα οποία ακόμη μένει να απαντηθούν είναι ο τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες-προσαρμοστές αναγνωρίζουν το υπόστρωμά τους και πως ρυθμίζεται η αναγνώριση αυτή. Πιθανώς εκεί να κρύβεται η απάντηση στην συσχέτιση της δομής της πρωτεΐνης που μεταφέρει ένα μόριο υποστρώματος και στην αναγνώρισή της από την ενδοκυτωτική μηχανή. Πιθανώς δηλαδή, κατά την κίνηση του μεταφορέα για την ολοκλήρωση ενός κύκλου μεταφοράς, να δημιουργείται μια δομή η οποία αναγνωρίζεται ευκολότερα ή να ενεργοποιεί ή να στρατολογεί μια πρωτεΐνη προσαρμοστή, ενώ στην ενδοκύτωση παρουσία ιόντων αμμωνίου να ενεργοποιείται αντίστοιχα ένας άλλος προσαρμοστής που δρα ανεξάρτητα της δομής του UapA, ή ακόμη να τροποποιείται μόνιμα ο UapA ούτως ώστε να αναγνωρίζεται ευκολότερα από την λιγάση της ουβικουιτίνης.

9.2.4. Η ενδοκύτωση από υπόστρωμα μπορεί να πραγματοποιηθεί και *in trans*

Στην παραπάνω σχέση πιθανώς εμπλέκεται και το φαινόμενο της *in trans* ενδοκύτωσης από υπόστρωμα ανενεργών μεταφορέων παρουσία ενεργών. Το φαινόμενο δεν έχει παρατηρηθεί αλλού, και όπως δείχθηκε σε αυτή την εργασία είναι σε ένα βαθμό εξαρτώμενο της ουβικουιτινυλίωσης, ενώ αποτελεί ισχυρή ένδειξη ενός μηχανισμού σύναξης μορίων του UapA σε εξειδικευμένους μικροχώρους της πλασματικής μεμβράνης, είτε συστατικά, είτε δυναμικά πριν την έναρξη ενδοκύτωσης. Εάν υπάρχει ένας τέτοιος χωροθετικός μηχανισμός, δεν φαίνεται να συμβαίνει λόγω της οργάνωσης του UapA σε μεμβρανικούς μικροχώρους εξειδικευμένης λιπιδικής σύστασης. Αποκαλυπτικό ήταν το πείραμα όπου ένα ενεργό

μόριο το οποίο δεν μπορεί να ουβικουιτινυλιωθεί και να ενδοκυτωθεί (K572R) είναι ικανό να προκαλέσει *in trans* ενδοκύτωση σε ένα μη ενεργό μόριο παρουσία υποστρώματος. Φαίνεται λοιπόν πως τα αρχικά στάδια της μετάδοσης του σήματος από τις κινήσεις του μεταφορέα που συνδέουν τη μεταφορά υποστρώματος με τον ενδοκυτωτικό μηχανισμό είναι ανεξάρτητα της ουβικουιτινυλίωσης. Επιπλέον, το σήμα αυτό μπορεί να μεταδοθεί και σε άλλα μόρια τα οποία δεν έχουν προκαλέσει το αρχικό ερέθισμα. Αυτό υποδεικνύει τη σύναξη μορίων του UapA σε εξειδικευμένους μικροχώρους ή/και την εμπλοκή μιας διαδικασίας μεταγωγής σήματος τουλάχιστον πριν την έναρξη της ενδοκύτωσης.

Η περίπτωση του ολιγομερισμού του UapA θα μπορούσε να αποτελεί την εξήγηση για την *in trans* ενδοκύτωση. Είναι γενικά γνωστό πως ο ολιγομερισμός μεμβρανικών πρωτεϊνών πολλές φορές είναι απαραίτητος για την έξοδο από το ER ή το Golgi. Πολλά κανάλια ολιγομερίζονται στο ER, κάτι που φαίνεται να είναι απαραίτητο για την έξοδό τους από το ER (Becker et al. 2008). Επίσης ο μεταφορέας γ-αμινο-βουτυρικού οξέος GAT1 χρειάζεται τον ολιγομερισμό του, κάτι που έχει αποδοθεί στην αποδοτική αναγνώριση από την Sec24D (Farhan et al. 2007). Η έξοδος από το Golgi σε ολιγομερή κατάσταση μπορεί να προκαλείται από την πρωτεΐνη φορτίο ή τον προσαρμοστή της και έχει σχετισθεί με το καλύτερο πακετάρισμα των πρωτεϊνών στα κυστίδια (Hannan et al. 1993, Borgonovo et al. 2006, Delacour et al. 2007). Ο ολιγομερισμός όμως έχει συσχετισθεί και με την ενδοκύτωση. Ιδιαίτερα για τους υποδοχείς, υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις που η κατάσταση ολιγομερισμού σχετίζεται με την ενδοκύτωσή τους. Αν και τις περισσότερες φορές εμπλέκονται γεγονότα ετερο-ολιγομερισμού, έχουν δειχθεί και περιπτώσεις ομο-ολιγομερισμού (Rios et al. 2001, Fiorentini et al. 2003, Stanasila et al. 2003, Balasubramanian et al. 2004, Cao et al. 2005, Genedani et al. 2005, Missale et al. 2006). Ιδιαίτερα για τον Ste2p έχει δειχθεί πως ο προσδέτης του επάγει τον πολυμερισμό και την ενδοκύτωσή του (Shi et al. 2009). Πρόσφατα έχει αρχίσει να φαίνεται πως η προσθήκη υποστρώματος ίσως επηρεάζει την κατάσταση ολιγομερισμού κάποιων μεταφορέων. Πιο συγκεκριμένα, για τον μεταφορέα ντοπαμίνης DAT έχει δειχθεί με ανάλυση FRET πως παρουσία υποστρώματός του ενδοκυτώνεται σε ολιγομερή κατάσταση (Sorkina et al. 2003). Μια μεταγενέστερη εργασία (Chen et al. 2008) δείχνει με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και διασύνδεσης πως η παρουσία των υποστρωμάτων του DAT αυξάνει το ποσοστό των μονομερών DAT στην πλασματική μεμβράνη. Τα δεδομένα αυτά με την πρώτη ματιά ίσως δείχνουν αντιφατικά, αλλά

υπάρχει η πιθανότητα μόνο τα ολιγομερή του DAT να ενδοκυτώνονται παρουσία υποστρώματος.

Εναλλακτικά, η *in trans* ενδοκύτωση θα μπορούσε να εξηγηθεί με κάποια μεταγωγή σήματος ή πιθανώς να σχετίζεται με την πιθανή αλληλεπίδραση με κάποια πρωτεΐνη-προσαρμοστή. Άλλωστε το φαινόμενο είναι εξαρτώμενο της ουβικουιτινυλίωσης. Έχει αρχίσει πλέον να επικρατεί η άποψη πως η ρύθμιση της ενεργότητας της λιγάσης της ουβικουιτίνης γίνεται με τη ρύθμιση της πρόσδεσης στην πρωτεΐνη-υπόστρωμα της πρωτεΐνης-προσαρμοστή (Leon and Haguenauer-Tsapis 2009). Το τελευταίο βήμα δεν είναι ξεκάθαρο πως πραγματοποιείται, πως δηλαδή η πρωτεΐνη που θα αποικοδομηθεί αναγνωρίζεται από τον προσαρμοστή. Η αναγνώριση του μεταφορέα Lys1p από την Art2 γίνεται μέσω του αμινοτελικού άκρου του μεταφορέα, η ρύθμιση όμως της αλληλεπίδρασης αυτή παραμένει άγνωστη. Οι πρωτεΐνες προσαρμοστές πάντως ουβικουιτινυλιώνονται και οι ίδιες κατά τη διαδικασία αυτή (Leon and Haguenauer-Tsapis 2009, Lin et al. 2008, Nikko et al. 2008). Σε αρκετές περιπτώσεις έχει δειχθεί πως απαιτείται φωσφορυλίωση του μεταφορέα πριν την ουβικουιτινυλίωσή του (Whitworth and Quick 2001, Springael et al. 2002, Perez-Valle et al. 2007, Nikko et al. 2008, Nikko and Pelham 2009, Lundh et al. 2009, Paiva et al. 2009). Δεν είναι ξεκάθαρο εάν η φωσφορυλίωση αυτή χρειάζεται για την αλληλεπίδραση-αναγνώριση του μεταφορέα από την πρωτεΐνη προσαρμοστή ή εάν χρειάζεται για την ουβικουιτινυλίωσή του από τη λιγάση της ουβικουιτίνης. Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση της ρύθμισης της στόχευσης της Gap1p από τις Aly1p και Aly2p ARTs (O'Donnell et al. 2010). Οι ARTs αυτές δεν συμμετέχουν στην ενδοκύτωση της Gap1p, αλλά στην ανακύκλωση και επαναστόχευσή της στην πλασματική μεμβράνη. Για την Aly2p μάλιστα δείχθηκε πως για τη διαδικασία αυτή ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης από την Npr1p κινάση. Αυτή είναι η πρώτη περίπτωση όπου η πρωτεΐνη-προσαρμοστής ρυθμίζεται μέσω φωφορυλίωσης. Τέτοια συστήματα μπορούν να εξηγήσουν πως αλλαγές στις κυτταροπλασματικές συγκεντρώσεις ουσιών μπορούν να επιδράσουν στην τοπολογία των μεταφορέων, κάτι που όμως φαίνεται να μην ισχύει για τον UapA. Μια άλλη ενδιαφέρουσα περίπτωση που έχει αναφερθεί στον *S. serevisiae* είναι πως μια μεταλλαγή στο ενεργό κέντρο της λιγάσης της ουβικουιτίνης Rsp5p προκαλεί την συνεχή ουβικουιτινυλίωση και αποικοδόμηση του Gap1p μεταφορέα (Haitani et al. 2009, Hoshikawa et al. 2003). Το γεγονός πως μια μεταλλαγή στο ενεργό κέντρο της Rsp5p είναι πάντα σε θέση να ουβικουιτινυλιώσει την Gap1p σημαίνει πως η λιγάση

έχει τη δυνατότητα να βρίσκεται πάντα σε στενή γειτονία με τον μεταφορέα, προφανώς μέσω των γνωστών της προσαρμοστών.

Μια αλλαγή στην κατάστασης φωσφορυλίωσης σε απόκριση είτε ενός σήματος που προκαλείται παρουσία ιόντων αμμωνίου, είτε παρουσία ενεργού μεταφοράς υποστρωμάτων, αποτελεί ένα νέο ερώτημα στην περίπτωση του UapA. Ιδιαίτερα ελκυστικό φαίνεται το ενδεχόμενο η φωσφορυλίωση του UapA να αλλάζει τη συγγένεια αλληλεπίδρασης με ένα προσαρμοστή της HulA. Ωστόσο δεν γνωρίζουμε αν ο UapA φωσφορυλιώνεται κάτι που οφείλει να διερευνηθεί άμεσα. Με την εμπλοκή ενός ελεγχόμενου μηχανισμού φωσφορυλίωσης είναι επίσης ευκολότερο να κατανοηθεί το φαινόμενο της *in trans* ενδοκύτωσης που μελετήθηκε στην εργασία αυτή.

9.2.5. Η HulA λιγάση της ουβικουιτίνης

Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα αυτής της εργασίας, στα πλαίσια της διερεύνησης του μηχανισμού ενδοκύτωσης του UapA, είναι η κατασκευή της HulAΔC2 μεταλλαγής. Απαλοιφή του γονιδίου της HulA είναι θνησιγόνος και σε αυτή την εργασία κατασκευάσθηκε βιώσιμη μεταλλαγή της HulA (HulAΔC2) η οποία φαίνεται να μην έχει ικανότητα ουβικουιτινυλίωσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν βρεθεί στον *S. serevisiae* (Dunn et al. 2004, Springael et al. 1999). Η κατασκευή της HulAΔC2 είναι η πρώτη βιώσιμη μεταλλαγή της αντίστοιχης λιγάσης της ουβικουιτίνης σε νηματοειδή μύκητα και αναμένεται να χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε άλλες μελέτες ενδοκύτωσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως τους υπόλοιπους μεταφορείς πουρινών και πηγών αζώτου που έχουν χαρακτηρισθεί και ρυθμίζονται μετα-μεταφραστικά (UapC, FurD, FcyB, UreA, PrnB, AgtA, CntA) (Tavoularis et al. 2001, Valdez-Taubas et al. 2004, Pantazopoulou et al. 2007, Vlanti and Diallinas 2008, Apostolaki et al. 2009, Hamari et al. 2009, Abreu et al. 2010,), την εισοσωμική πρωτεΐνη SurG (Vangelatos et al. 2010), το σύστημα ανίχνευσης αλλαγών στο pH (palF, palI, palH) (Herranz et al. 2005, Hervas-Aguilar et al. 2010, Penalva et al. 2008), τη μεμβρανική πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη σποριογένεση και την αντίληψη του φωτός (VeA) (Soid-Raggi et al. 2006), τον ρυθμιστή του συστήματος αναστολής μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με δευτερογενείς πηγές άνθρακα (CreD) (Boase and Kelly 2004) και αλλού.

9.2.6. Προοπτικές

Η εργασία αυτή θέτει τις βάσεις για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού ενδοκύτωσης του UapA. Τα ερωτήματα που μένουν να απαντηθούν είναι σημαντικά, όπως ποιές είναι οι πρωτεΐνες-προσαρμοστές, ποιο το είδος της ουβικουιτινυλίωσης που χρειάζεται για την ενδοκύτωση ή/και την αποικοδόμησή του, αν η ουβικουιτινυλίωση πραγματοποιείται μόνο στην πλασματική μεμβράνη ή και αλλού (όπως π.χ. στο TGN).

Μια κατηγορία μεταλλαγών του UapA είναι οι ενδογενώς ασταθείς πρωτεΐνες, όπως τα αλλήλια H86A, H86D (Pantazopoulou and Diallinas, 2006) και AG481R και Δ481R (Kosti et al. 2010). Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζουν διαφορετικό ποσοστό κατανομής στην πλασματική μεμβράνη και εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του ενδοκυτωτικού μονοπατιού. Η διερεύνηση της συμμετοχής της ουβικουιτινυλίωσης στη στόχευση αυτών των αλληλίων θα είναι πολύ ενδιαφέρουσα αφού το φαινόμενο της συστατική αποικοδόμησης μεταφορέων είναι ελλιπώς μελετημένο. Η αναζήτηση σχετικής βιβλιογραφίας έδειξε δύο περιπτώσεις μεταφορέων που φαίνεται να εμφανίζουν συστατική ενδοκύτωση, του GLYT1 μεταφορέα γλυκίνης (Fernandez-Sanchez et al. 2009) και του μεταφορέα ντοπαμίνης, DAT (Eriksen et al. 2010). Ο GLYT1 εμφανίζει επίσης ρυθμιζόμενη ενδοκύτωση μέσω φοσφωρυλίωσης, ενώ και τα δύο είδη ενδοκύτωσής του εξαρτώνται από την ουβικουιτινυλίωση. Εν αντιθέσει, η συστατική ενδοκύτωση του DAT φαίνεται να είναι ανεξάρτητη *cis* στοιχείων που είναι απαραίτητα για την ουβικουιτινυλίωσή του. Ο UapA και τα αλλήλιά του μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπο για τη μελέτη της συμμετοχής της ουβικουιτινυλίωσης στην περίπτωση αυτή, καθώς και στη διαλεύκανση μιας σειρά ερωτημάτων, όπως ποια είναι τα *cis* και *trans* στοιχεία που χρειάζονται για τη συστατική ενδοκύτωση, αν χρειάζονται πρωτεΐνες προσαρμοστές στις περιπτώσεις αυτές και, εάν ναι, αν είναι οι ίδιες με αυτές της επαγόμενης από ιόντα αμμωνίου και παρουσία υποστρώματος ενδοκύτωσης, και τέλος ποιο είναι το είδος και ο υποκυτταρικός τόπος της ουβικουιτινυλίωσης. Η μελέτη αυτών των ερωτημάτων μπορεί να δώσει απαντήσεις και σε κάποια επιπλέον ερωτήματα, όπως αν τα μόρια UapA που ενδοκυτώνονται έχουν τη δυνατότητα ανακύκλωσης στην πλασματική μεμβράνη σε κάποιες συνθήκες. Όσον αφορά την *in trans* ενδοκύτωση, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί εάν η λειτουργία του UapA μπορεί να επάγει ενδοκύτωση

ενός άλλου μεταφορέα, όπως του παράλογού του UapC. Όμως τα ουσιαστικότερα ερώτημα παραμένουν να διερευνηθεί περαιτέρω ο μοριακός μηχανισμός του αρχικού σήματος της ενδοκύτωσης του UapA παρουσία υποστρωμάτων και ποιος είναι ο διαφαινόμενος ρόλος της σύναξης μορίων του μεταφορέα πριν την ενδοκύτωσή τους.

Για την προσέγγιση των ερωτημάτων που αναφέρθηκαν υπάρχουν συγκεκριμένα βήματα τα οποία πρέπει να γίνουν, όπως η συστηματική απαλοιφή αλλά και η υπερέκφραση των γονιδίων των ARTs για την εύρεση αυτών που σχετίζονται με την ενδοκύτωση και στόχευση του UapA και η δημιουργία, αν είναι δυνατόν, μεταλλαγών απώλειας λειτουργίας ή ρυθμιζόμενης έκφρασης σε βασικές πρωτεΐνες των μοποπατιών εξωκύτωσης και ενδοκύτωσης. Στελέχη που φέρουν τέτοιες μεταλλαγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση των μονοπατιών που ακολουθεί ο UapA και των υποκυτταρικών τόπων που μπορεί να ουβικουιτινυλιωθεί. Για τα ερωτήματα αυτά υπάρχουν κάποιες απαντήσεις που μοιάζουν πιθανότερες από άλλες. Για παράδειγμα, η ενδοκύτωση ουβικουιτινυλιωμένων πρωτεϊνών στον *S. serevisiae* πραγματοποιείται με καλύμματα κλαθρίνης όπου ο προσαρμοστής είναι οι επσίνες Ent1, Ent2 ή Ede1, ενώ για τη στόχευσή τους στα MVBs και το χυμοτόπιο από το TGN χρειάζονται οι GGAs. Τα AP σύμπλοκα είναι επίσης πιθανό να συμμετέχουν σε κάποια βήματα της στόχευσης του UapA. Στις διαδικασίες ενδοκύτωσης του μεταφορέα από την πλασματική μεμβράνη οφείλει να συμμετέχει η SlaB, της οποίας όμως τα διαθέσιμα μεταλλαγμένα στελέχη δεν είναι συμβατά, αφού η απαλοιφή είναι θνησιγόνος και το ρυθμιζόμενης έκφρασης αλλήλιο επηρεάζεται από ιόντα αμμωνίου (Hervas-Aguilar and Penalva 2010). Τέλος, για τη διερεύνηση του είδους της ουβικουιτονυλίωσης του UapA είναι δυνατό να υπερεκφρασθούν μεταλλαγμένα αλληλία ουβικουιτίνης με υποκαταστάσεις συγκεκριμένων καταλοίπων λυσίνης. Τα αλλήλια αυτά λειτουργούν ανασταλτικά στην ειδική επέκταση συγκεκριμένων τύπων διακλάδωσης της πολυ-ουβικουιτίνης, ανταγωνιζόμενα το φυσικού τύπου μόριο (Galan and Haguenauer-Tsapis 1997). Πολλές από τις προσεγγίσεις που αναφέρθηκαν ερευνώνται ήδη στο εργαστήριο.

10. Βιβλιογραφία

1. Abenza, J.F., Galindo, A., Pantazopoulou, A., Gil, C., de los Rios, V., and Penalva, M.A. 2010. Aspergillus RabB Rab5 integrates acquisition of degradative identity with the long distance movement of early endosomes. Mol Biol Cell **21**(15): 2756-2769.
2. Abenza, J.F., Pantazopoulou, A., Rodriguez, J.M., Galindo, A., and Penalva, M.A. 2009. Long-distance movement of Aspergillus nidulans early endosomes on microtubule tracks. Traffic **10**(1): 57-75.
3. Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., and Iwata, S. 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli. Science **301**(5633): 610-615.
4. Abreu, C., Sanguinetti, M., Amillis, S., and Ramon, A. 2010. UreA, the major urea/H+ symporter in Aspergillus nidulans. *Fungal Genet Biol* **47**(12): 1023-1033.
5. Akashi, T., Kanbe, T., and Tanaka, K. 1994. The role of the cytoskeleton in the polarized growth of the germ tube in Candida albicans. *Microbiology* **140 (Pt 2)**: 271-280.
6. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. 1994. In: Molecular Biology of the Cell (Third Edition) Garland.
7. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. (eds). 1996. Introductory Mycology. Wiley Text Books.
8. Al-Salabi, M.I., Wallace, L.J., Luscher, A., Maser, P., Candlish, D., Rodenko, B., Gould, M.K., Jabeen, I., Ajith, S.N., and de Koning, H.P. 2007. Molecular interactions underlying the unusually high adenosine affinity of a novel Trypanosoma brucei nucleoside transporter. Mol Pharmacol **71**(3): 921-929.
9. Amillis, S., Koukaki, M., and Diallinas, G. 2001. Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *J Mol Biol* **313**(4): 765-774.
10. Amillis, S., Cecchetto, G., Sophianopoulou, V., Koukaki, M., Scazzocchio, C., and Diallinas, G. 2004. Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of Aspergillus nidulans conidia. Mol Microbiol **52**(1): 205-216.
11. Amillis, S., Hamari, Z., Roumelioti, K., Scazzocchio, C., and Diallinas, G. 2007. Regulation of expression and kinetic modeling of substrate interactions of a uracil transporter in Aspergillus nidulans. Mol Membr Biol **24**(3): 206-214.
12. Amrani, L., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., and Glatigny, A. 1999. The hxB gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in Aspergillus nidulans, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems. *Mol Microbiol* **31**(4): 1065-1073.
13. Anan, T., Nagata, Y., Koga, H., Honda, Y., Yabuki, N., Miyamoto, C., Kuwano, A., Matsuda, I., Endo, F., Saya, H., and Nakao, M. 1998. Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. Genes Cells **3**(11): 751-763.
14. Andersen, P.S., Frees, D., Fast, R., and Mygind, B. 1995. Uracil uptake in Escherichia coli K-12: isolation of uraA mutants and cloning of the gene. J Bacteriol **177**(8): 2008-2013.
15. Andersson, H. and von Heijne, G. 1994. Membrane protein topology: effects of delta mu H+ on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. EMBO J **13**(10): 2267-2272.
16. Andoh, T., Hirata, Y., and Kikuchi, A. 2002. PY motifs of Rod1 are required for binding to Rsp5 and for drug resistance. FEBS Lett **525**(1-3): 131-134.
17. André, B. and Haguenauer-Tsapis, R. 2004. Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation. Top Curr Genet(9): 273-323.
18. Andrei, G.M., Coulombie, F.C., Courreges, M.C., de Torres, R.A., and Coto, C.E. 1990. Meliacine, an antiviral compound from Melia azedarach L., inhibits interferon production. J Interferon Res **10**(5): 469-475.
19. Andrianopoulos, A. and Hynes, M.J. 1988. Cloning and analysis of the positively acting regulatory gene amdR from Aspergillus nidulans. Mol Cell Biol **8**(8): 3532-3541.
20. Andrianopoulos, A. and Timberlake, W.E. 1994. The Aspergillus nidulans abaA gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. Mol Cell Biol **14**(4): 2503-2515.
21. Apostolaki, A., Erpapazoglou, Z., Harispe, L., Billini, M., Kafasla, P., Kizis, D., Penalva, M.A., Scazzocchio, C., and Sophianopoulou, V. 2009. AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of Aspergillus nidulans, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. Eukaryot Cell **8**(3): 339-352.

22. Appleford, P.J., Griffiths, M., Yao, S.Y., Ng, A.M., Chomey, E.G., Isaac, R.E., Coates, D., Hope, I.A., Cass, C.E., Young, J.D., and Baldwin, S.A. 2004. Functional redundancy of two nucleoside transporters of the ENT family (CeENT1, CeENT2) required for development of Caenorhabditis elegans. Mol Membr Biol **21**(4): 247-259.
23. Aramayo, R. and Timberlake, W.E. 1990. Sequence and molecular structure of the Aspergillus nidulans yA (laccase I) gene. Nucleic Acids Res **18**(11): 3415.
24. Aramayo, R. and Timberlake, W.E. 1993. The Aspergillus nidulans yA gene is regulated by abaA. EMBO J **12**(5): 2039-2048.
25. Araujo-Bazan, L., Penalva, M.A., and Espeso, E.A. 2008. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol **67**(4): 891-905.
26. Argyrou, E., Sophianopoulou, V., Schultes, N., and Diallinas, G. 2001. Functional characterization of a maize purine transporter by expression in Aspergillus nidulans. Plant Cell **13**(4): 953-964.
27. Arimura, N. and Kaibuchi, K. 2005. Key regulators in neuronal polarity. Neuron **48**(6): 881-884.
28. Aronow, B., Kaur, K., McCartan, K., and Ullman, B. 1987. Two high affinity nucleoside transporters in Leishmania donovani. Mol Biochem Parasitol **22**(1): 29-37.
29. Arst, H.N., Jr. and Scazzocchio, C. 1975. Initiator constitutive mutation with an 'up-promoter' effect in Aspergillus nidulans. *Nature* **254**(5495): 31-34.
30. Balasubramanian, S., Teissere, J.A., Raju, D.V., and Hall, R.A. 2004. Hetero-oligomerization between GABAA and GABAB receptors regulates GABAB receptor trafficking. J Biol Chem **279**(18): 18840-18850.
31. Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.J., Keller, N.P., Yu, J.H., and Braus, G.H. 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. Science **320**(5882): 1504-1506.
32. Becht, P., Vollmeister, E., and Feldbrugge, M. 2005. Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of Ustilago maydis. Eukaryot Cell **4**(1): 121-133.
33. Beck, T., Schmidt, A., and Hall, M.N. 1999. Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. J Cell Biol **146**(6): 1227-1238.
34. Becker, D., Muller, M., Leuner, K., and Jendrach, M. 2008. The C-terminal domain of TRPV4 is essential for plasma membrane localization. Mol Membr Biol **25**(2): 139-151.
35. Belgareh-Touze, N., Leon, S., Erpapazoglou, Z., Stawiecka-Mirota, M., Urban-Grimal, D., and Haguenauer-Tsapis, R. 2008. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. Biochem Soc Trans **36**(Pt 5): 791-796.
36. Bernreiter, A., Ramon, A., Fernandez-Martinez, J., Berger, H., Araujo-Bazan, L., Espeso, E.A., Pachlinger, R., Gallmetzer, A., Anderl, I., Scazzocchio, C., and Strauss, J. 2007. Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in Aspergillus nidulans. Mol Cell Biol **27**(3): 791-802.
37. Besteiro, S., Tonn, D., Tetley, L., Coombs, G.H., and Mottram, J.C. 2008. The AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of Leishmania. J Cell Sci **121**(Pt 5): 561-570.
38. Bignell, E., Negrete-Urtasun, S., Calcagno, A.M., Haynes, K., Arst, H.N. Jr., and Rogers, T. 2005. The Aspergillus pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. Mol Microbiol **55**(4): 1072-1084.
39. Bilodeau, P.S., Winistorfer, S.C., Allaman, M.M., Surendhran, K., Kearney, W.R., Robertson, A.D., and Piper, R.C. 2004. The GAT domains of clathrin-associated GGA proteins have two ubiquitin binding motifs. J Biol Chem **279**(52): 54808-54816.
40. Biondi, C., Pavan, B., Dalpiaz, A., Medici, S., Lunghi, L., and Vesce, F. 2007. Expression and characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo: effect of steroids, flavonoids and NSAIDs. Mol Hum Reprod **13**(1): 77-83.
41. Blondel, M.O., Morvan, J., Dupre, S., Urban-Grimal, D., Haguenauer-Tsapis, R., and Volland, C. 2004. Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. Mol Biol Cell **15**(2): 883-895.
42. Boase, N.A. and Kelly, J.M. 2004. A role for creD, a carbon catabolite repression gene from Aspergillus nidulans, in ubiquitination. Mol Microbiol **53**(3): 929-940.
43. Bok, J.W., Chiang, Y.M., Szewczyk, E., Reyes-Dominguez, Y., Davidson, A.D., Sanchez, J.F., Lo, H.C., Watanabe, K., Strauss, J., Oakley, B.R., Wang, C.C., and Keller, N.P. 2009. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. Nat Chem Biol **5**(7): 462-464.

44. Boman, A.L. 2001. GGA proteins: new players in the sorting game. J Cell Sci **114**(Pt 19): 3413-3418.
45. Bongaerts, G.P. and Vogels, G.D. 1979. Mechanism of uricase action. Biochim Biophys Acta **567**(2): 295-308.
46. Bonifacino, J.S. 2004. Insights into the biogenesis of lysosome-related organelles from the study of the Hermansky-Pudlak syndrome. Ann N Y Acad Sci **1038**: 103-114.
47. Bonifacino, J.S. and Lippincott-Schwartz, J. 2003. Coat proteins: shaping membrane transport. Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 409-414.
48. Borgonovo, B., Ouwendijk, J., and Solimena, M. 2006. Biogenesis of secretory granules. Curr Opin Cell Biol **18**(4): 365-370.
49. Bornstein, S.R., Yoshida-Hiroi, M., Sotiriou, S., Levine, M., Hartwig, H.G., Nussbaum, R.L., and Eisenhofer, G. 2003. Impaired adrenal catecholamine system function in mice with deficiency of the ascorbic acid transporter (SVCT2). FASEB J **17**(13): 1928-1930.
50. Bouzarelou, D., Billini, M., Roumelioti, K., and Sophianopoulou, V. 2008. EglD, a putative endoglucanase, with an expansin like domain is localized in the conidial cell wall of Aspergillus nidulans. Fungal Genet Biol **45**(6): 839-850.
51. Bowers, K. and Stevens, T.H. 2005. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta **1744**(3): 438-454.
52. Brakhage, A.A., Sprote, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H., and Tuncher, A. 2004. Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. Adv Biochem Eng Biotechnol **88**: 45-90.
53. Brown, D.A. and London, E. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 111-136.
54. Bruggeman, J., Debets, A.J., Wijngaarden, P.J., deVisser, J.A., and Hoekstra, R.F. 2003. Sex slows down the accumulation of deleterious mutations in the homothallic fungus Aspergillus nidulans. Genetics **164**(2): 479-485.
55. Buades, C. and Moya, A. 1996. Phylogenetic analysis of the isopenicillin-N-synthetase horizontal gene transfer. J Mol Evol **42**(5): 537-542.
56. Burchmore, R.J., Wallace, L.J., Candlish, D., Al-Salabi, M.I., Beal, P.R., Barrett, M.P., Baldwin, S.A., and de Koning, H.P. 2003. Cloning, heterologous expression, and in situ characterization of the first high affinity nucleobase transporter from a protozoan. J Biol Chem **278**(26): 23502-23507.
57. Burger, G., Tilburn, J., and Scazzocchio, C. 1991. Molecular cloning and functional characterization of the pathway-specific regulatory gene nirA, which controls nitrate assimilation in Aspergillus nidulans. Mol Cell Biol **11**(2): 795-802.
58. Burkle, L., Cedzich, A., Dopke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kuhn, C., and Frommer, W.B. 2003. Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. Plant J **34**(1): 13-26.
59. Buxton, F.P., Gwynne, D.I., and Davies, R.W. 1985. Transformation of Aspergillus niger using the argB gene of Aspergillus nidulans. Gene **37**(1-3): 207-214.
60. Cao, T.T., Brelot, A., and von Zastrow, M. 2005. The composition of the beta-2 adrenergic receptor oligomer affects its membrane trafficking after ligand-induced endocytosis. Mol Pharmacol **67**(1): 288-297.
61. Carr, C.M. and Rizo, J. 2010. At the junction of SNARE and SM protein function. Curr Opin Cell Biol **22**(4): 488-495.
62. Carter, N.S., Ben Mamoun, C., Liu, W., Silva, E.O., Landfear, S.M., Goldberg, D.E., and Ullman, B. 2000. Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from Plasmodium falciparum. J Biol Chem **275**(14): 10683-10691.
63. Carter, N.S. and Fairlamb, A.H. 1993. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. Nature **361**(6408): 173-176.
64. Cary, J.W. and Ehrlich, K.C. 2006. Aflatoxigenicity in Aspergillus: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. Mycopathologia **162**(3): 167-177.
65. Cazelle, B., Pokorska, A., Hull, E., Green, P.M., Stanway, G., and Scazzocchio, C. 1998. Sequence, exon-intron organization, transcription and mutational analysis of prnA, the gene encoding the transcriptional activator of the prn gene cluster in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol **28**(2): 355-370.
66. Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., and Drevet, C. 2004. The AzgA purine transporter of Aspergillus nidulans. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. J Biol Chem **279**(5): 3132-3141.

67. Chen, N. and Reith, M.E. 2008. Substrates dissociate dopamine transporter oligomers. J Neurochem **105**(3): 910-920.
68. Cheng, J., Park, T.S., Fischl, A.S., and Ye, X.S. 2001. Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in Aspergillus nidulans. Mol Cell Biol **21**(18): 6198-6209.
69. Chi, L. and Reith, M.E. 2003. Substrate-induced trafficking of the dopamine transporter in heterologously expressing cells and in rat striatal synaptosomal preparations. J Pharmacol Exp Ther **307**(2): 729-736.
70. Christiansen, L.C., Schou, S., Nygaard, P., and Saxild, H.H. 1997. Xanthine metabolism in Bacillus subtilis: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J Bacteriol* **179**(8): 2540-2550.
71. Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D., and Zerial, M. 1999a. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. Nature *397*, 621–625.
72. Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S. C., Waterfield, M. D., Backer, J. M., and Zerial, M. 1999b. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. Nat. Cell Biol. *1*, 249–252.
73. Clutterbuck, A.J. 1990. The genetics of conidiophore pigmentation in Aspergillus nidulans. J Gen Microbiol **136**(9): 1731-1738.
74. Costaguta, G., Stefan, C.J., Bensen, E.S., Emr, S.D., and Payne, G.S. 2001. Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. Mol Biol Cell **12**(6): 1885-1896.
75. Cove, D.J. 1966. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus Aspergillus nidulans. *Biochim Biophys Acta* **113**(1): 51-56.
76. Crampin, H., Finley, K., Gerami-Nejad, M., Court, H., Gale, C., Berman, J., and Sudbery, P. 2005. Candida albicans hyphae have a Spitzenkorper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. J Cell Sci **118**(Pt 13): 2935-2947.
77. Cultrone, A., Scazzocchio, C., Rochet, M., Montero-Moran, G., Drevet, C., and Fernandez-Martin, R. 2005. Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Mol Microbiol* **57**(1): 276-290.
78. D'Souza, C.A., Lee, B.N., and Adams, T.H. 2001. Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of Aspergillus nidulans. Genetics **158**(3): 1027-1036.
79. Darlington, A.J. and Scazzocchio, C. 1967. Use of analogues and the substrate-sensitivity of mutants in analysis of purine uptake and breakdown in Aspergillus nidulans. J Bacteriol **93**(3): 937-940.
80. Darsow, T., Katzmann, D.J., Cowles, C.R., and Emr, S.D. 2001. Vps41p function in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains. Mol Biol Cell **12**(1): 37-51.
81. Daruwala, R., Song, J., Koh, W.S., Rumsey, S.C., and Levine, M. 1999. Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. FEBS Lett **460**(3): 480-484.
82. de Koning, H. and Diallinas, G. 2000. Nucleobase transporters (review). Mol Membr Biol **17**(2): 75-94.
83. De Matteis, M.A. and Luini, A. 2008. Exiting the Golgi complex. Nat Rev Mol Cell Biol **9**(4): 273-284.
84. de Montigny, J., Straub, M.L., Wagner, R., Bach, M.L., and Chevallier, M.R. 1998. The uracil permease of Schizosaccharomyces pombe: a representative of a family of 10 transmembrane helix transporter proteins of yeasts. Yeast **14**(11): 1051-1059.
85. Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R., and Rodriguez-Boulan, E. 2008. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. Nature **452**(7188): 719-723.
86. Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le Bivic, A., and Jacob, R. 2007. Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. Traffic **8**(4): 379-388.
87. Deng, Y., Guo, Y., Watson, H., Au, W.C., Shakoury-Elizeh, M., Basrai, M.A., Bonifacino, J.S., and Philpott, C.C. 2009. Gga2 mediates sequential ubiquitin-independent and ubiquitin-dependent steps in the trafficking of ARN1 from the trans-Golgi network to the vacuole. J Biol Chem **284**(35): 23830-23841.
88. Desimone, M., Catoni, E., Ludewig, U., Hilpert, M., Schneider, A., Kunze, R., Tegeder, M., Frommer, W.B., and Schumacher, K. 2002. A novel superfamily of transporters for allantoin

and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in Arabidopsis. Plant Cell **14**(4): 847-856.
89. de Souza, C.C., Pellizzon, C.H., Hiraishi, M., Goldman, M.H., and Goldman, G.H. 1998. Isolation and characterisation of cycloheximide-sensitive mutants of Aspergillus nidulans. *Curr Genet* **33**(1): 60-69.
90. Diallinas, G. 2008. Biochemistry. An almost-complete movie. Science **322**(5908): 1644-1645.
91. Diallinas, G., Gorfinkiel, L., Arst, H.N., Jr., Cecchetto, G., and Scazzocchio, C. 1995. Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of Aspergillus nidulans reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. J Biol Chem **270**(15): 8610-8622.
92. Diallinas, G. and Scazzocchio, C. 1989. A gene coding for the uric acid-xanthine permease of Aspergillus nidulans: inactivational cloning, characterization, and sequence of a cis-acting mutation. Genetics **122**(2): 341-350.
93. Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A., and Scazzocchio, C. 1998. Chimeric purine transporters of Aspergillus nidulans define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. EMBO J **17**(14): 3827-3837.
94. Diallinas, G. and Gournas, C. 2008. Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: Lessons from model microbial genetic systems. *Channels (Austin)* **2**(5).
95. Donaldson, J.G. and Honda, A. 2005. Localization and function of Arf family GTPases. Biochem Soc Trans **33**(Pt 4): 639-642.
96. Dores, M.R., Schnell, J.D., Maldonado-Baez, L., Wendland, B., and Hicke, L. 2010. The function of yeast epsin and Ede1 ubiquitin-binding domains during receptor internalization. Traffic **11**(1): 151-160.
97. Doshi, P., Bossie, C.A., Doonan, J.H., May, G.S., and Morris, N.R. 1991. Two alpha-tubulin genes of Aspergillus nidulans encode divergent proteins. Mol Gen Genet **225**(1): 129-141.
98. Dowzer, C.E. and Kelly, J.M. 1989. Cloning of the creA gene from Aspergillus nidulans: a gene involved in carbon catabolite repression. Curr Genet **15**(6): 457-459.
99. Duflot, S., Riera, B., Fernandez-Veledo, S., Casado, V., Norman, R.I., Casado, F.J., Lluis, C., Franco, R., and Pastor-Anglada, M. 2004. ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors. Mol Cell Biol **24**(7): 2710-2719.
100. Dunn, R., Klos, D.A., Adler, A.S., and Hicke, L. 2004. The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. J Cell Biol **165**(1): 135-144.
101. Dupre, S., Urban-Grimal, D., and Haguenauer-Tsapis, R. 2004. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. Biochim Biophys Acta **1695**(1-3): 89-111.
102. Dupre, S., Volland, C., and Haguenauer-Tsapis, R. 2001. Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting. Curr Biol **11**(22): R932-934.
103. Dzikowska, A., Swianiewicz, M., Talarczyk, A., Wisniewska, M., Goras, M., Scazzocchio, C., and Weglenski, P. 1999. Cloning, characterisation and regulation of the ornithine transaminase (otaA) gene of Aspergillus nidulans. Curr Genet **35**(2): 118-126.
104. Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P., and Haas, H. 2004. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH Regulatory system in Aspergillus nidulans. Eukaryot Cell **3**(2): 561-563.
105. Elion, G.B. 1989. Nobel Lecture. The purine path to chemotherapy. Biosci Rep **9**(5): 509-529.
106. Erichsen, H.C., Engel, S.A., Eck, P.K., Welch, R., Yeager, M., Levine, M., Siega-Riz, A.M., Olshan, A.F., and Chanock, S.J. 2006. Genetic variation in the sodium-dependent vitamin C transporters, SLC23A1, and SLC23A2 and risk for preterm delivery. Am J Epidemiol **163**(3): 245-254.
107. Eriksen, J., Jorgensen, T.N., and Gether, U. 2010. Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. J Neurochem **113**(1): 27-41.
108. Erpapazoglou, Z., Froissard, M., Nondier, I., Lesuisse, E., Haguenauer-Tsapis, R., and Belgareh-Touze, N. 2008. Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. Traffic **9**(8): 1372-1391.
109. Espeso, E.A. and Penalva, M.A. 1996. Three binding sites for the Aspergillus nidulans PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. J Biol Chem **271**(46): 28825-28830.

110. Estrella, L.A., Krishnamurthy, S., Timme, C.R., and Hampsey, M. 2008. The Rsp5 E3 ligase mediates turnover of low affinity phosphate transporters in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem **283**(9): 5327-5334.
111. Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N.J., Fischer, R., Yu, J.H., Espeso, E.A., and Ugalde, U. 2008. Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in Aspergillus nidulans. Eukaryot Cell **7**(1): 38-48.
112. Faaland, C.A., Race, J.E., Ricken, G., Warner, F.J., Williams, W.J., and Holtzman, E.J. 1998. Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and Aspergillus nucleobase transporters. *Biochim Biophys Acta* **1442**(2-3): 353-360.
113. Faham, S., Watanabe, A., Besserer, G.M., Cascio, D., Specht, A., Hirayama, B.A., Wright, E.M., and Abramson, J. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na+/sugar symport. Science **321**(5890): 810-814.
114. Farhan, H., Reiterer, V., Korkhov, V.M., Schmid, J.A., Freissmuth, M., and Sitte, H.H. 2007. Concentrative export from the endoplasmic reticulum of the gamma-aminobutyric acid transporter 1 requires binding to SEC24D. J Biol Chem **282**(10): 7679-7689.
115. Felice, M.R., De Domenico, I., Li, L., Ward, D.M., Bartok, B., Musci, G., and Kaplan, J. 2005. Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system. J Biol Chem **280**(23): 22181-22190.
116. Fernandes, M., Keller, N.P., and Adams, T.H. 1998. Sequence-specific binding by Aspergillus nidulans AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. Mol Microbiol **28**(6): 1355-1365.
117. Fernandez-Sanchez, E., Martinez-Villarreal, J., Gimenez, C., and Zafra, F. 2009. Constitutive and regulated endocytosis of the glycine transporter GLYT1b is controlled by ubiquitination. J Biol Chem **284**(29): 19482-19492.
118. Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M., and Missale, C. 2003. Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. J Biol Chem **278**(22): 20196-20202.
119. Forment, J.V., Ramon, D., and MacCabe, A.P. 2006. Consecutive gene deletions in Aspergillus nidulans: application of the Cre/loxP system. Curr Genet **50**(3): 217-224.
120. Forsberg, H. and Ljungdahl, P.O. 2001. Sensors of extracellular nutrients in Saccharomyces cerevisiae. *Curr Genet* **40**(2): 91-109.
121. Frillingos, S., Sahin-Toth, M., Persson, B., and Kaback, H.R. 1994. Cysteine-scanning mutagenesis of putative helix VII in the lactose permease of Escherichia coli. Biochemistry **33**(26): 8074-8081.
122. Gadura, N., Robinson, L.C., and Michels, C.A. 2006. Glc7-Reg1 phosphatase signals to Yck1,2 casein kinase 1 to regulate transport activity and glucose-induced inactivation of Saccharomyces maltose permease. Genetics **172**(3): 1427-1439.
123. Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Basturkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Penalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A., and Birren, B.W. 2005. Sequencing of Aspergillus nidulans and comparative analysis with A. fumigatus and A. oryzae. Nature **438**(7071): 1105-1115.
124. Galan, J.M. and Haguenauer-Tsapis, R. 1997. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. EMBO J **16**(19): 5847-5854.
125. Galan, J.M., Moreau, V., Andre, B., Volland, C., and Haguenauer-Tsapis, R. 1996. Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. J Biol Chem **271**(18): 10946-10952.
126. Galan, J.M., Volland, C., Urban-Grimal, D., and Haguenauer-Tsapis, R. 1994. The yeast plasma membrane uracil permease is stabilized against stress induced degradation by a point mutation in a cyclin-like "destruction box". Biochem Biophys Res Commun **201**(2): 769-775.
127. Galindo, A., Hervas-Aguilar, A., Rodriguez-Galan, O., Vincent, O., Arst, H.N., Jr., Tilburn, J., and Penalva, M.A. 2007. PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. Traffic **8**(10): 1346-1364.
128. Galletta, B.J., Mooren, O.L., and Cooper, J.A. 2010. Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. Curr Opin Biotechnol **21**(5): 604-610.

129. Garcia Mde, L., Salazar, K., Millan, C., Rodriguez, F., Montecinos, H., Caprile, T., Silva, C., Cortes, C., Reinicke, K., Vera, J.C., Aguayo, L.G., Olate, J., Molina, B., and Nualart, F. 2005. Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. Glia **50**(1): 32-47.
130. Gems, D., Johnstone, I.L., and Clutterbuck, A.J. 1991. An autonomously replicating plasmid transforms Aspergillus nidulans at high frequency. Gene **98**(1): 61-67.
131. Gems, D.H. and Clutterbuck, A.J. 1994. Enhancers of conidiation mutants in Aspergillus nidulans. Genetics **137**(1): 79-85.
132. Genedani, S., Guidolin, D., Leo, G., Filaferro, M., Torvinen, M., Woods, A.S., Fuxe, K., Ferre, S., and Agnati, L.F. 2005. Computer-assisted image analysis of caveolin-1 involvement in the internalization process of adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterodimers. J Mol Neurosci **26**(2-3): 177-184.
133. Georgianna, D.R. and Payne, G.A. 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. Fungal Genet Biol **46**(2): 113-125.
134. Georgopoulou, E., Mermelekas, G., Karena, E., and Frillingos, S. 2010. Purine substrate recognition by the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in the YgfO xanthine permease: ASN-325 binds and ALA-323 senses substrate. *J Biol Chem* **285**(25): 19422-19433.
135. Ghim, S.Y. and Neuhard, J. 1994. The pyrimidine biosynthesis operon of the thermophile Bacillus caldolyticus includes genes for uracil phosphoribosyltransferase and uracil permease. *J Bacteriol* **176**(12): 3698-3707.
136. Gillissen, B., Burkle, L., Andre, B., Kuhn, C., Rentsch, D., Brandl, B., and Frommer, W.B. 2000. A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in Arabidopsis. Plant Cell **12**(2): 291-300.
137. Gitan, R.S. and Eide, D.J. 2000. Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. Biochem J **346 Pt 2**: 329-336.
138. Godoy, A., Ormazabal, V., Moraga-Cid, G., Zuniga, F.A., Sotomayor, P., Barra, V., Vasquez, O., Montecinos, V., Mardones, L., Guzman, C., Villagran, M., Aguayo, L.G., Onate, S.A., Reyes, A.M., Carcamo, J.G., Rivas, C.I., and Vera, J.C. 2007. Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. J Biol Chem **282**(1): 615-624.
139. Gonzalez-Gonzalez, I.M., Garcia-Tardon, N., Gimenez, C., and Zafra, F. 2008. PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster. Glia **56**(9): 963-974.
140. Gonzalez, R., Gavrias, V., Gomez, D., Scazzocchio, C., and Cubero, B. 1997. The integration of nitrogen and carbon catabolite repression in Aspergillus nidulans requires the GATA factor AreA and an additional positive-acting element, ADA. EMBO J **16**(10): 2937-2944.
141. Gorfinkiel, L., Diallinas, G., and Scazzocchio, C. 1993. Sequence and regulation of the uapA gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus Aspergillus nidulans. J Biol Chem **268**(31): 23376-23381.
142. Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S., and Diallinas, G. 2005. Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. Mol Membr Biol **22**(3): 263-275.
143. Goudela, S., Reichard, U., Amillis, S., and Diallinas, G. 2008. Characterization and kinetics of the major purine transporters in Aspergillus fumigatus. Fungal Genet Biol **45**(4): 459-472.
144. Goudela, S., Tsilivi, H., and Diallinas, G. 2006. Comparative kinetic analysis of AzgA and Fcy21p, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families. Mol Membr Biol **23**(4): 291-303.
145. Gournas, C., Papageorgiou, I., and Diallinas, G. 2008. The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol Biosyst* **4**(5): 404-416.
146. Gournas, C., Oestreicher, N., Amillis, S., Diallinas, G., and Scazzocchio, C. 2011. Completing the purine utilization pathway of Aspergillus nidulans. Fungal Genet Biol.
147. Griffith, D.A. and Jarvis, S.M. 1996. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. Biochim Biophys Acta **1286**(3): 153-181.
148. Griffith, G.W., Stark, M.S., and Clutterbuck, A.J. 1999. Wild-type and mutant alleles of the Aspergillus nidulans developmental regulator gene brlA: correlation of variant sites with protein function. Mol Gen Genet **262**(4-5): 892-897.

149. Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W.B., Opekarova, M., and Tanner, W. 2008. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. J Cell Biol **183**(6): 1075-1088.
150. Grossmann, G., Opekarova, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I., and Tanner, W. 2007. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. EMBO J **26**(1): 1-8.
151. Grossmann, G., Opekarova, M., Novakova, L., Stolz, J., and Tanner, W. 2006. Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell **5**(6): 945-953.
152. Grove, S.N. and Bracker, C.E. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkorper. J Bacteriol **104**(2): 989-1009.
153. Haitani, Y., Nakata, M., Sasaki, T., Uchida, A., and Takagi, H. 2009. Engineering of the yeast ubiquitin ligase Rsp5: isolation of a new variant that induces constitutive inactivation of the general amino acid permease Gap1. *FEMS Yeast Res* **9**(1): 73-86.
154. Hamari, Z., Amillis, S., Drevet, C., Apostolaki, A., Vagvolgyi, C., Diallinas, G., and Scazzocchio, C. 2009. Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol **73**(1): 43-57.
155. Hamilton, S.R., Yao, S.Y., Ingram, J.C., Hadden, D.A., Ritzel, M.W., Gallagher, M.P., Henderson, P.J., Cass, C.E., Young, J.D., and Baldwin, S.A. 2001. Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na+-nucleoside cotransporter rCNT1. J Biol Chem **276**(30): 27981-27988.
156. Han, S. and Adams, T.H. 2001. Complex control of the developmental regulatory locus brlA in Aspergillus nidulans. Mol Genet Genomics **266**(2): 260-270.
157. Hannan, L.A., Lisanti, M.P., Rodriguez-Boulan, E., and Edidin, M. 1993. Correctly sorted molecules of a GPI-anchored protein are clustered and immobile when they arrive at the apical surface of MDCK cells. J Cell Biol **120**(2): 353-358.
158. Harris, S.D., Hamer, L., Sharpless, K.E., and Hamer, J.E. 1997. The Aspergillus nidulans sepA gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. EMBO J **16**(12): 3474-3483.
159. Harris, S.D., Hofmann, A.F., Tedford, H.W., and Lee, M.P. 1999. Identification and characterization of genes required for hyphal morphogenesis in the filamentous fungus Aspergillus nidulans. Genetics **151**(3): 1015-1025.
160. Harris, S.D. and Momany, M. 2004. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. Fungal Genet Biol **41**(4): 391-400.
161. Harris, S.D., Read, N.D., Roberson, R.W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M., and Momany, M. 2005. Polarisome meets spitzenkorper: microscopy, genetics, and genomics converge. Eukaryot Cell **4**(2): 225-229.
162. Harvey, K.F. and Kumar, S. 1999. Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. Trends Cell Biol **9**(5): 166-169.
163. Hatakeyama, R., Kamiya, M., Takahara, T., and Maeda, T. 2010. Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2. Mol Cell Biol **30**(24): 5598-5607.
164. He, M.M., Voss, J., Hubbell, W.L., and Kaback, H.R. 1997. Arginine 302 (helix IX) in the lactose permease of Escherichia coli is in close proximity to glutamate 269 (helix VIII) as well as glutamate 325. *Biochemistry* **36**(44): 13682-13687.
165. Hein, C., Springael, J.Y., Volland, C., Haguenauer-Tsapis, R., and Andre, B. 1995. NPl1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. Mol Microbiol **18**(1): 77-87.
166. Henriques, C., Sanchez, M.A., Tryon, R., and Landfear, S.M. 2003. Molecular and functional characterization of the first nucleobase transporter gene from African trypanosomes. Mol Biochem Parasitol **130**(2): 101-110.
167. Herranz, S., Rodriguez, J.M., Bussink, H.J., Sanchez-Ferrero, J.C., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A., and Vincent, O. 2005. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12141-12146.
168. Hervas-Aguilar, A., Galindo, A., and Penalva, M.A. 2010a. Receptor-independent Ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF. J Biol Chem **285**(23): 18095-18102.

169. Hervas-Aguilar, A. and Penalva, M.A. 2010. Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of Aspergillus nidulans. Eukaryot Cell **9**(10): 1504-1518.
170. Hervas-Aguilar, A., Rodriguez-Galan, O., Galindo, A., Abenza, J.F., Arst, H.N., Jr., and Penalva, M.A. 2010b. Characterization of Aspergillus nidulans DidB Did2, a non-essential component of the multivesicular body pathway. Fungal Genet Biol **47**(7): 636-646.
171. Herzlinger, D., Carrasco, N., and Kaback, H.R. 1985. Functional and immunochemical characterization of a mutant of Escherichia coli energy uncoupled for lactose transport. *Biochemistry* **24**(1): 221-229.
172. Hirst, J., Lindsay, M.R., and Robinson, M.S. 2001. GGAs: roles of the different domains and comparison with AP-1 and clathrin. Mol Biol Cell **12**(11): 3573-3588.
173. Hoch, H.C. and Staples, R.C. 1983. Visualization of actin in situ by rhodamine-conjugated phalloin in the fungus Uromyces phaseoli. Eur J Cell Biol **32**(1): 52-58.
174. Horak, J. and Wolf, D.H. 2001. Glucose-induced monoubiquitination of the Saccharomyces cerevisiae galactose transporter is sufficient to signal its internalization. J Bacteriol **183**(10): 3083-3088.
175. Horio, T. and Oakley, B.R. 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of Aspergillus nidulans. Mol Biol Cell **16**(2): 918-926.
176. Hoshikawa, C., Shichiri, M., Nakamori, S., and Takagi, H. 2003. A nonconserved Ala401 in the yeast Rsp5 ubiquitin ligase is involved in degradation of Gap1 permease and stress-induced abnormal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11505-11510.
177. Hurley, J.H., Boura, E., Carlson, L.A., and Rozycki, B. 2010. Membrane budding. Cell **143**(6): 875-887.
178. Hyde, R.J., Cass, C.E., Young, J.D., and Baldwin, S.A. 2001. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. Mol Membr Biol **18**(1): 53-63.
179. Hynes, M.J. 1975. Studies on the role of the areA gene in the regulation of nitrogen catabolism in Aspergillus nidulans. Aust J Biol Sci **28**(3): 301-313.
180. Ingold, C.T. and Hudson, H.J**.** 1993. Biology of Fungi. Edn 6. 224 pp. London etc.; Chapman & Hall.
181. Jedd, G. and Chua, N.H. 2000. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. Nat Cell Biol **2**(4): 226-231.
182. Johansen, L.E., Nygaard, P., Lassen, C., Agerso, Y., and Saxild, H.H. 2003. Definition of a second Bacillus subtilis pur regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus pbuG, nupG (yxjA), and pbuE (ydhL). J Bacteriol **185**(17): 5200-5209.
183. Johnson, D.I. 1999. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. Microbiol Mol Biol Rev **63**(1): 54-105.
184. Jund, R., Weber, E., and Chevallier, M.R. 1988. Primary structure of the uracil transport protein of Saccharomyces cerevisiae. Eur J Biochem **171**(1-2): 417-424.
185. Kaback, H.R. 2005. Structure and mechanism of the lactose permease. C R Biol **328**(6): 557-567.
186. Kadota, J., Yamamoto, T., Yoshiuchi, S., Bi, E., and Tanaka, K. 2004. Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell **15**(12): 5329-5345.
187. Kahn, K., Serfozo, P., and Tipton, P.A. 1997. Identification of the True Product of the Urate Oxidase Reaction. Journal of the American Chemical Society **119**(23): 5435-5442.
188. Kaksonen, M., Toret, C.P., and Drubin, D.G. 2005. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. Cell **123**(2): 305-320.
189. Karatza, P. and Frillingos, S. 2005. Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in Escherichia coli. *Mol Membr Biol* **22**(3): 251-261.
190. Karatza, P., Panos, P., Georgopoulou, E., and Frillingos, S. 2006. Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of Escherichia coli: Gln-324 and Asn-325 are essential, and Ile-329-Val-339 form an alpha-helix. *J Biol Chem* **281**(52): 39881-39890.
191. Karena, E. and Frillingos, S. 2009. Role of intramembrane polar residues in the YgfO xanthine permease: HIS-31 and ASN-93 are crucial for affinity and specificity, and ASP-304 and GLU-272 are irreplaceable. J Biol Chem **284**(36): 24257-24268.

192. Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. Cell **106**(2): 145-155.
193. Khaldi, N., Collemare, J., Lebrun, M.H., and Wolfe, K.H. 2008. Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. Genome Biol **9**(1): R18.
194. Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K., and Chae, K. 2002. The veA gene activates sexual development in Aspergillus nidulans. Fungal Genet Biol **37**(1): 72-80.
195. Kim, Y., Deng, Y., and Philpott, C.C. 2007. GGA2- and ubiquitin-dependent trafficking of Arn1, the ferrichrome transporter of Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell **18**(5): 1790-1802.
196. Kirchhausen, T. 2000. Clathrin. Annu Rev Biochem **69**: 699-727.
197. Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Stalpers, J.A. (eds). 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford. pp. 655.
198. Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature **405**(6789): 914-919.
199. Kosti, V., Papageorgiou, I., and Diallinas, G. 2010. Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation pathway. *J Mol Biol* **397**(5): 1132-1143.
200. Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S., and Diallinas, G. 2005. The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. J Mol Biol **350**(3): 499-513.
201. Kraupp, M. and Marz, R. 1995. Membrane transport of nucleobases: interaction with inhibitors. Gen Pharmacol **26**(6): 1185-1190.
202. Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., and Rodriguez-Boulan, E. 2000. Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. Nat Cell Biol **2**(2): 125-127.
203. Kudla, B., Caddick, M.X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N.M., Bennett, C.F., Sibley, S., Davies, R.W., and Arst, H.N., Jr. 1990. The regulatory gene areA mediating nitrogen metabolite repression in Aspergillus nidulans. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. EMBO J **9**(5): 1355-1364.
204. Kurtov, D., Kinghorn, J.R., and Unkles, S.E. 1999. The Aspergillus nidulans panB gene encodes ketopantoate hydroxymethyltransferase, required for biosynthesis of pantothenate and Coenzyme A. Mol Gen Genet **262**(1): 115-120.
205. Landfear, S.M., Ullman, B., Carter, N.S., and Sanchez, M.A. 2004. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. Eukaryot Cell **3**(2): 245-254.
206. Lanteri, C.A., Stewart, M.L., Brock, J.M., Alibu, V.P., Meshnick, S.R., Tidwell, R.R., and Barrett, M.P. 2006. Roles for the Trypanosoma brucei P2 transporter in DB75 uptake and resistance. Mol Pharmacol **70**(5): 1585-1592.
207. Larrayoz, I.M., Casado, F.J., Pastor-Anglada, M., and Lostao, M.P. 2004. Electrophysiological characterization of the human Na(+)/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. J Biol Chem **279**(10): 8999-9007.
208. Lauwers, E. and Andre, B. 2006. Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell-surface location. Traffic **7**(8): 1045-1059.
209. Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenauer-Tsapis, R., and Andre, B. 2010. The ubiquitin code of yeast permease trafficking. Trends Cell Biol **20**(4): 196-204.
210. Lauwers, E., Grossmann, G., and Andre, B. 2007. Evidence for coupled biogenesis of yeast Gap1 permease and sphingolipids: essential role in transport activity and normal control by ubiquitination. Mol Biol Cell **18**(8): 3068-3080.
211. Lauwers, E., Jacob, C., and Andre, B. 2009. K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. J Cell Biol **185**(3): 493-502.
212. Lee, Y., Lee, D.H., Kho, C.W., Lee, A.Y., Jang, M., Cho, S., Lee, C.H., Lee, J.S., Myung, P.K., Park, B.C., and Park, S.G. 2005. Transthyretin-related proteins function to facilitate the hydrolysis of 5-hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction. *FEBS Lett* **579**(21): 4769-4774.
213. Lee, E.W., Lai, Y., Zhang, H., and Unadkat, J.D. 2006. Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. J Biol Chem **281**(24): 16700-16706.

214. Lee, S.C., Schmidtke, S.N., Dangott, L.J., and Shaw, B.D. 2008. Aspergillus nidulans ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. Eukaryot Cell **7**(8): 1278-1288.
215. Lemuh, N.D., Diallinas, G., Frillingos, S., Mermelekas, G., Karagouni, A.D., and Hatzinikolaou, D.G. 2009. Purification and partial characterization of the xanthine-uric acid transporter (UapA) of Aspergillus nidulans. *Protein Expr Purif* **63**(1): 33-39.
216. Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A., and Steinberg, G. 2006. A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**(11): 2275-2286.
217. Leon, S. and Haguenauer-Tsapis, R. 2009. Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp Cell Res* **315**(9): 1574-1583.
218. Li, S., Du, L., Yuen, G., and Harris, S.D. 2006. Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus Aspergillus nidulans. Mol Biol Cell **17**(3): 1218-1227.
219. Liang, W.J., Johnson, D., and Jarvis, S.M. 2001. Vitamin C transport systems of mammalian cells. Mol Membr Biol **18**(1): 87-95.
220. Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., and Emr, S.D. 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. Cell **135**(4): 714-725.
221. Liu, X.F. and Culotta, V.C. 1999. Mutational analysis of Saccharomyces cerevisiae Smf1p, a member of the Nramp family of metal transporters. J Mol Biol **289**(4): 885-891.
222. Lockington, R.A., Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C., and Davies, R.W. 1985. Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in Aspergillus nidulans. *Gene* **33**(2): 137-149.
223. Lockington, R., Scazzocchio, C., Sequeval, D., Mathieu, M., and Felenbok, B. 1987. Regulation of alcR, the positive regulatory gene of the ethanol utilization regulon of Aspergillus nidulans. Mol Microbiol **1**(3): 275-281.
224. Lockington, R.A. and Kelly, J.M. 2002. The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB in vivo in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol **43**(5): 1173-1182.
225. Loewen, S.K., Ng, A.M., Mohabir, N.N., Baldwin, S.A., Cass, C.E., and Young, J.D. 2003. Functional characterization of a H+/nucleoside co-transporter (CaCNT) from Candida albicans, a fungal member of the concentrative nucleoside transporter (CNT) family of membrane proteins. Yeast **20**(8): 661-675.
226. Loewen, S.K., Yao, S.Y., Slugoski, M.D., Mohabir, N.N., Turner, R.J., Mackey, J.R., Weiner, J.H., Gallagher, M.P., Henderson, P.J., Baldwin, S.A., Cass, C.E., and Young, J.D. 2004. Transport of physiological nucleosides and anti-viral and anti-neoplastic nucleoside drugs by recombinant Escherichia coli nucleoside-H(+) cotransporter (NupC) produced in Xenopus laevis oocytes. Mol Membr Biol **21**(1): 1-10.
227. Lu, F., Li, S., Jiang, Y., Jiang, J., Fan, H., Lu, G., Deng, D., Dang, S., Zhang, X., Wang, J., and Yan, N. 2011. Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. Nature.
228. Lundh, F., Mouillon, J.M., Samyn, D., Stadler, K., Popova, Y., Lagerstedt, J.O., Thevelein, J.M., and Persson, B.L. 2009. Molecular mechanisms controlling phosphate-induced downregulation of the yeast Pho84 phosphate transporter. Biochemistry **48**(21): 4497-4505.
229. Lutsenko, E.A., Carcamo, J.M., and Golde, D.W. 2004. A human sodium-dependent vitamin C transporter 2 isoform acts as a dominant-negative inhibitor of ascorbic acid transport. Mol Cell Biol **24**(8): 3150-3156.
230. Mabey Gilsenan, J.E., Atherton, G., Bartholomew, J., Giles, P.F., Attwood, T.K., Denning, D.W., and Bowyer, P. 2009. Aspergillus genomes and the Aspergillus cloud. Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D509-514.
231. Mackay, E.M. and Pateman, J.A. 1982. The regulation of urease activity in Aspergillus nidulans. *Biochem Genet* **20**(7-8): 763-776.
232. Magliano, P., Flipphi, M., Sanglard, D., and Poirier, Y. 2011. Characterization of the Aspergillus nidulans biotin biosynthetic gene cluster and use of the bioDA gene as a new transformation marker. Fungal Genet Biol **48**(2): 208-215.
233. Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., and Tanner, W. 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. Mol Biol Cell **14**(11): 4427-4436.
234. Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., and Tanner, W. 2004. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living S. cerevisiae cells. J Cell Sci **117**(Pt 25): 6031-6041.

235. Mansfield, T.A., Schultes, N.P., and Mourad, G.S. 2009. AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in Arabidopsis. FEBS Lett **583**(2): 481-486.
236. Markgraf, D.F., Ahnert, F., Arlt, H., Mari, M., Peplowska, K., Epp, N., Griffith, J., Reggiori, F., and Ungermann, C. 2009. The CORVET subunit Vps8 cooperates with the Rab5 homolog Vps21 to induce clustering of late endosomal compartments. Mol Biol Cell **20**(24): 5276-5289.
237. Martin, S.W. and Konopka, J.B. 2004. Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in Candida albicans. Eukaryot Cell **3**(3): 675-684.
238. Marzluf, G.A. 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol Rev* **45**(3): 437-461.
239. Maser, P., Sutterlin, C., Kralli, A., and Kaminsky, R. 1999. A nucleoside transporter from Trypanosoma brucei involved in drug resistance. Science **285**(5425): 242-244.
240. Matovu, E., Stewart, M.L., Geiser, F., Brun, R., Maser, P., Wallace, L.J., Burchmore, R.J., Enyaru, J.C., Barrett, M.P., Kaminsky, R., Seebeck, T., and de Koning, H.P. 2003. Mechanisms of arsenical and diamidine uptake and resistance in Trypanosoma brucei. Eukaryot Cell **2**(5): 1003-1008.
241. Maurino, V.G., Grube, E., Zielinski, J., Schild, A., Fischer, K., and Flugge, U.I. 2006. Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol **47**(10): 1381-1393.
242. Mayorga, M.E. and Timberlake, W.E. 1990. Isolation and molecular characterization of the Aspergillus nidulans wA gene. Genetics **126**(1): 73-79.
243. McGoldrick, C.A., Gruver, C., and May, G.S. 1995. myoA of Aspergillus nidulans encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. J Cell Biol **128**(4): 577-587.
244. McNulty, A.L., Vail, T.P., and Kraus, V.B. 2005. Chondrocyte transport and concentration of ascorbic acid is mediated by SVCT2. Biochim Biophys Acta **1712**(2): 212-221.
245. Medintz, I., Jiang, H., and Michels, C.A. 1998. The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of Saccharomyces maltose permease. J Biol Chem **273**(51): 34454-34462.
246. Meintanis, C., Karagouni, A.D., and Diallinas, G. 2000. Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family. *Mol Membr Biol* **17**(1): 47-57.
247. Michelet, X., Djeddi, A., and Legouis, R. 2011. Developmental and cellular functions of the ESCRT machinery in pluricellular organisms. Biol Cell **102**(3): 191-202.
248. Miller, K.Y., Wu, J., and Miller, B.L. 1992. StuA is required for cell pattern formation in Aspergillus. Genes Dev **6**(9): 1770-1782.
249. Min, J., Zhang, Y., and Xu, R.M. 2003. Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. Genes Dev **17**(15): 1823-1828.
250. Miranda, M., Dionne, K.R., Sorkina, T., and Sorkin, A. 2007. Three ubiquitin conjugation sites in the amino terminus of the dopamine transporter mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. Mol Biol Cell **18**(1): 313-323.
251. Miranda, M. and Sorkin, A. 2007. Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. Mol Interv **7**(3): 157-167.
252. Missale, C., Fiorentini, C., Busi, C., Collo, G., and Spano, P.F. 2006. The NMDA/D1 receptor complex as a new target in drug development. Curr Top Med Chem **6**(8): 801-808.
253. Morozov, I.Y., Galbis-Martinez, M., Jones, M.G., and Caddick, M.X. 2001. Characterization of nitrogen metabolite signalling in Aspergillus via the regulated degradation of areA mRNA. Mol Microbiol **42**(1): 269-277.
254. Morris, N.R., Kirsch, D.R., and Oakley, B.R. 1982. Molecular and genetic methods for studying mitosis and spindle proteins in Aspergillus nidulans. Methods Cell Biol **25 Pt B**: 107-130.
255. Mourino-Perez, R.R., Roberson, R.W., and Bartnicki-Garcia, S. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in Neurospora crassa. Fungal Genet Biol **43**(6): 389-400.
256. Mulrooney, S.B. and Hausinger, R.P. 2003. Metal ion dependence of recombinant Escherichia coli allantoinase. J Bacteriol **185**(1): 126-134.
257. Murakami, S. and Yamaguchi, A. 2003. Multidrug-exporting secondary transporters. Curr Opin Struct Biol **13**(4): 443-452.
258. Muro-Pastor, M.I., Gonzalez, R., Strauss, J., Narendja, F., and Scazzocchio, C. 1999. The GATA factor AreA is essential for chromatin remodelling in a eukaryotic bidirectional promoter. *EMBO J* **18**(6): 1584-1597.

259. Naftalin, R.J., Green, N., and Cunningham, P. 2007. Lactose permease H+-lactose symporter: mechanical switch or Brownian ratchet? *Biophys J* **92**(10): 3474-3491.
260. Narendja, F., Goller, S.P., Wolschek, M., and Strauss, J. 2002. Nitrate and the GATA factor AreA are necessary for in vivo binding of NirA, the pathway-specific transcriptional activator of Aspergillus nidulans. Mol Microbiol **44**(2): 573-583.
261. Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A., and Oakley, B.R. 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for Aspergillus nidulans. Genetics **172**(3): 1557-1566.
262. Newpher, T.M., Smith, R.P., Lemmon, V., and Lemmon, S.K. 2005. In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. Dev Cell **9**(1): 87-98.
263. Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B., and Zerial, M. (2000). Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. J. Cell Biol. *151*, 601–612.
264. Nierman, W.C., May, G., Kim, H.S., Anderson, M.J., Chen, D., and Denning, D.W. 2005. What the Aspergillus genomes have told us. Med Mycol **43 Suppl 1**: S3-5.
265. Nikko, E. and Pelham, H.R. 2009. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. Traffic **10**(12): 1856-1867.
266. Nikko, E., Sullivan, J.A., and Pelham, H.R. 2008. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. EMBO Rep **9**(12): 1216-1221.
267. O'Donnell, A.F., Apffel, A., Gardner, R.G., and Cyert, M.S. 2010. Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. Mol Biol Cell **21**(20): 3552-3566.
268. Oakley, B.R., Rinehart, J.E., Mitchell, B.L., Oakley, C.E., Carmona, C., Gray, G.L., and May, G.S. 1987. Cloning, mapping and molecular analysis of the pyrG (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of Aspergillus nidulans. Gene **61**(3): 385-399.
269. Obrenovich, M.E., Fan, X., Satake, M., Jarvis, S.M., Reneker, L., Reddan, J.R., and Monnier, V.M. 2006. Relative suppression of the sodium-dependent Vitamin C transport in mouse versus human lens epithelial cells. Mol Cell Biochem **293**(1-2): 53-62.
270. Oestreicher, N., Ribard, C., and Scazzocchio, C. 2008. The nadA gene of Aspergillus nidulans, encoding adenine deaminase, is subject to a unique regulatory pattern. Fungal Genet Biol **45**(5): 760-775.
271. Oestreicher, N. and Scazzocchio, C. 1993. Sequence, regulation, and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in Aspergillus nidulans. J Biol Chem **268**(31): 23382-23389.
272. Oestreicher, N. and Scazzocchio, C. 1995. A single amino acid change in a pathway-specific transcription factor results in differing degrees of constitutivity, hyperinducibility and derepression of several structural genes. J Mol Biol **249**(4): 693-699.
273. Ormazabal, V., Zuniga, F.A., Escobar, E., Aylwin, C., Salas-Burgos, A., Godoy, A., Reyes, A.M., Vera, J.C., and Rivas, C.I. 2011. Histidine residues in the Na+-coupled ascorbic acid transporter-2 (SVCT2) are central regulators of SVCT2 function, modulating pH sensitivity, transporter kinetics, Na+ cooperativity, conformational stability, and subcellular localization. J Biol Chem **285**(47): 36471-36485.
274. Ortiz, D., Sanchez, M.A., Quecke, P., and Landfear, S.M. 2009. Two novel nucleobase/pentamidine transporters from Trypanosoma brucei. Mol Biochem Parasitol **163**(2): 67-76.
275. Ortiz, D.F., St Pierre, M.V., Abdulmessih, A., and Arias, I.M. 1997. A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. J Biol Chem **272**(24): 15358-15365.
276. Osherov, N. and May, G. 2000. Conidial germination in Aspergillus nidulans requires RAS signaling and protein synthesis. Genetics **155**(2): 647-656.
277. Osmani, A.H., May, G.S., and Osmani, S.A. 1999. The extremely conserved pyroA gene of Aspergillus nidulans is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. J Biol Chem **274**(33): 23565-23569.
278. Osmani, A.H., Oakley, B.R., and Osmani, S.A. 2006. Identification and analysis of essential Aspergillus nidulans genes using the heterokaryon rescue technique. Nat Protoc **1**(5): 2517-2526.

279. Paiva, S., Vieira, N., Nondier, I., Haguenauer-Tsapis, R., Casal, M., and Urban-Grimal, D. 2009. Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast Jen1 transporter: role of lysine 63-linked ubiquitin chains. J Biol Chem **284**(29): 19228-19236.
280. Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., and Zurzolo, C. 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. J Cell Biol **167**(4): 699-709.
281. Palazzo, A.F., Joseph, H.L., Chen, Y.J., Dujardin, D.L., Alberts, A.S., Pfister, K.K., Vallee, R.B., and Gundersen, G.G. 2001. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. Curr Biol **11**(19): 1536-1541.
282. Palmer, J.M., Mallaredy, S., Perry, D.W., Sanchez, J.F., Theisen, J.M., Szewczyk, E., Oakley, B.R., Wang, C.C., Keller, N.P., and Mirabito, P.M. Telomere position effect is regulated by heterochromatin-associated proteins and NkuA in Aspergillus nidulans. Microbiology **156**(Pt 12): 3522-3531.
283. Panozzo, C., Cornillot, E., and Felenbok, B. 1998. The CreA repressor is the sole DNA-binding protein responsible for carbon catabolite repression of the alcA gene in Aspergillus nidulans via its binding to a couple of specific sites. J Biol Chem **273**(11): 6367-6372.
284. Pantazopoulou, A. and Diallinas, G. 2006. The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. Mol Membr Biol **23**(4): 337-348.
285. Pantazopoulou, A. and Diallinas, G. 2007. Fungal nucleobase transporters. FEMS Microbiol Rev **31**(6): 657-675.
286. Pantazopoulou, A., Lemuh, N.D., Hatzinikolaou, D.G., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., and Diallinas, G. 2007. Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in Aspergillus nidulans. Fungal Genet Biol **44**(7): 627-640.
287. Papachristodoulou A., Kostidis S., Benaki D., Diallinas G., and Mikros E. 2009. Structure-activity studies in a purine transporter (UapA). Proceedings of the 31st Scientific Conference of Hellenic Association for Biological Sciences, Patra, May 14-16.
288. Papageorgiou, I., de Koning, H.P., Soteriadou, K., and Diallinas, G. 2008a. Kinetic and mutational analysis of the Trypanosoma brucei NBT1 nucleobase transporter expressed in Saccharomyces cerevisiae reveals structural similarities between ENT and MFS transporters. Int J Parasitol **38**(6): 641-653.
289. Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A., and Diallinas, G. 2008b. Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. J Mol Biol **382**(5): 1121-1135.
290. Papakostas, K., Georgopoulou, E., and Frillingos, S. 2008. Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgfO xanthine permease: ILE-432 and ASN-430 are important. J Biol Chem **283**(20): 13666-13678.
291. Parker, M.D., Hyde, R.J., Yao, S.Y., McRobert, L., Cass, C.E., Young, J.D., McConkey, G.A., and Baldwin, S.A. 2000. Identification of a nucleoside/nucleobase transporter from Plasmodium falciparum, a novel target for anti-malarial chemotherapy. Biochem J **349**(Pt 1): 67-75.
292. Pastor-Anglada, M., Molina-Arcas, M., Casado, F.J., Bellosillo, B., Colomer, D., and Gil, J. 2004. Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia **18**(3): 385-393.
293. Patak, P., Willenberg, H.S., and Bornstein, S.R. 2004. Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. Endocr Res **30**(4): 871-875.
294. Penalva, M.A. 2005. Tracing the endocytic pathway of Aspergillus nidulans with FM4-64. Fungal Genet Biol **42**(12): 963-975.
295. -. 2010. Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. Curr Opin Microbiol **13**(6): 684-692.
296. Penalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., and Arst, H.N., Jr. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. Trends Microbiol **16**(6): 291-300.
297. Pendyala, L. and Wellman, A.M. 1977. Developmental-stage-dependent adenine transport in Neurospora crassa. *J Bacteriol* **131**(2): 453-462.
298. Perez-Esteban, B., Orejas, M., Gomez-Pardo, E., and Penalva, M.A. 1993. Molecular characterization of a fungal secondary metabolism promoter: transcription of the Aspergillus nidulans isopenicillin N synthetase gene is modulated by upstream negative elements. Mol Microbiol **9**(4): 881-895.
299. Perez-Valle, J., Jenkins, H., Merchan, S., Montiel, V., Ramos, J., Sharma, S., Serrano, R., and Yenush, L. 2007. Key role for intracellular K+ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the

plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol Cell Biol* **27**(16): 5725-5736.
300. Perrin, R.M., Fedorova, N.D., Bok, J.W., Cramer, R.A., Wortman, J.R., Kim, H.S., Nierman, W.C., and Keller, N.P. 2007. Transcriptional regulation of chemical diversity in Aspergillus fumigatus by LaeA. PLoS Pathog **3**(4): e50.
301. Plant, P.J., Yeger, H., Staub, O., Howard, P., and Rotin, D. 1997. The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca2+-dependent plasma membrane localization. J Biol Chem **272**(51): 32329-32336.
302. Platt, A., Langdon, T., Arst, H.N., Jr., Kirk, D., Tollervey, D., Sanchez, J.M., and Caddick, M.X. 1996. Nitrogen metabolite signalling involves the C-terminus and the GATA domain of the Aspergillus transcription factor AREA and the 3' untranslated region of its mRNA. *EMBO J* **15**(11): 2791-2801.
303. Podgorska, M., Kocbuch, K., and Pawelczyk, T. 2005. Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. Acta Biochim Pol **52**(4): 749-758.
304. Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., and Di Fiore, P.P. 2002. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. Nature **416**(6879): 451-455.
305. Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D., and Bufton, A.W. 1953. The genetics of Aspergillus nidulans. Adv Genet **5**: 141-238.
306. Qiu, S., Li, L., Weeber, E.J., and May, J.M. 2007. Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. J Neurosci Res **85**(5): 1046-1056.
307. Raiborg, C., Bache, K.G., Gillooly, D.J., Madshus, I.H., Stang, E., and Stenmark, H. 2002. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. Nat Cell Biol **4**(5): 394-398.
308. Rajan, D.P., Huang, W., Dutta, B., Devoe, L.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., and Prasad, P.D. 1999. Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function. Biochem Biophys Res Commun **262**(3): 762-768.
309. Ramazzina, I., Folli, C., Secchi, A., Berni, R., and Percudani, R. 2006. Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nat Chem Biol* **2**(3): 144-148.
310. Rand, K.N. and Arst, H.N. Jr. 1978. Mutations in nirA gene of Aspergillus nidulans and nitrogen metabolism. Nature **272**(5655): 732-734.
311. Raudaskoski, M., Mao, W.Z., and Yli-Mattila, T. 1994. Microtubule cytoskeleton in hyphal growth. Response to nocodazole in a sensitive and a tolerant strain of the homobasidiomycete Schizophyllum commune. Eur J Cell Biol **64**(1): 131-141.
312. Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S., Gorton, D., Arst, H.N. Jr., and Scazzocchio, C. 1997. Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the Aspergillus nidulans GATA factor AreA. *EMBO J* **16**(13): 3974-3986.
313. Read, N.D. and Kalkman, E.R. 2003. Does endocytosis occur in fungal hyphae? Fungal Genet Biol **39**(3): 199-203.
314. Reggiori, F. and Pelham, H.R. 2002. A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. Nat Cell Biol **4**(2): 117-123.
315. Reyes-Dominguez, Y., Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N., and Strauss, J. 2010. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol **76**(6): 1376-1386.
316. Ribard, C., Rochet, M., Labedan, B., Daignan-Fornier, B., Alzari, P., Scazzocchio, C., and Oestreicher, N. 2003. Sub-families of alpha/beta barrel enzymes: a new adenine deaminase family. *J Mol Biol* **334**(5): 1117-1131.
317. Ringvold, A., Anderssen, E., and Kjonniksen, I. 2000. UV absorption by uric acid in diurnal bird aqueous humor. Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(8): 2067-2069.
318. Rios, C.D., Jordan, B.A., Gomes, I., and Devi, L.A. 2001. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. Pharmacol Ther **92**(2-3): 71-87.
319. Riquelme, M., Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. 2000. Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkorper and distort hyphal morphogenesis of Neurospora crassa. Microbiology **146 (Pt 7)**: 1743-1752.

320. Riquelme, M., Reynaga-Pena, C.G., Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. 1998. What determines growth direction in fungal hyphae? Fungal Genet Biol **24**(1-2): 101-109.
321. Risinger, A.L., Cain, N.E., Chen, E.J., and Kaiser, C.A. 2006. Activity-dependent reversible inactivation of the general amino acid permease. *Mol Biol Cell* **17**(10): 4411-4419.
322. Risinger, A.L. and Kaiser, C.A. 2008. Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. Mol Biol Cell **19**(7): 2962-2972.
323. Ritzel, M.W., Ng, A.M., Yao, S.Y., Graham, K., Loewen, S.K., Smith, K.M., Hyde, R.J., Karpinski, E., Cass, C.E., Baldwin, S.A., and Young, J.D. 2001. Recent molecular advances in studies of the concentrative Na+-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). Mol Membr Biol **18**(1): 65-72.
324. Rodriguez-Boulan, E. and Musch, A. 2005. Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. Biochim Biophys Acta **1744**(3): 455-464.
325. Rodriguez-Galan, O., Galindo, A., Hervas-Aguilar, A., Arst, H.N., Jr., and Penalva, M.A. 2009. Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of Aspergillus PalB cysteine protease to ESCRT-III. J Biol Chem **284**(7): 4404-4412.
326. Rohatgi, R., Ho, H.Y., and Kirschner, M.W. 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. J Cell Biol **150**(6): 1299-1310.
327. Rotin, D. and Kumar, S. 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. Nat Rev Mol Cell Biol **10**(6): 398-409.
328. Rotin, D., Staub, O., and Haguenauer-Tsapis, R. 2000. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. J Membr Biol **176**(1): 1-17.
329. Rumsey, S.C., Daruwala, R., Al-Hasani, H., Zarnowski, M.J., Simpson, I.A., and Levine, M. 2000. Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in Xenopus oocytes and isolated rat adipocytes. J Biol Chem **275**(36): 28246-28253.
330. Rumsey, S.C., Kwon, O., Xu, G.W., Burant, C.F., Simpson, I., and Levine, M. 1997. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. J Biol Chem **272**(30): 18982-18989.
331. Rumsey, S.C., Welch, R.W., Garraffo, H.M., Ge, P., Lu, S.F., Crossman, A.T., Kirk, K.L., and Levine, M. 1999. Specificity of ascorbate analogs for ascorbate transport. Synthesis and detection of [(125)I]6-deoxy-6-iodo-L-ascorbic acid and characterization of its ascorbate-specific transport properties. J Biol Chem **274**(33): 23215-23222.
332. Saier, M.H. Jr. 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 354-411.
333. Sadée, W., Drübbisch, V. and Amidon, G.L. (1995) Biology of Membrane Transport Proteins Pharm. Res.:12(12), 1823 – 1837.
334. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
335. Sanchez, M.A., Tryon, R., Pierce, S., Vasudevan, G., and Landfear, S.M. 2004. Functional expression and characterization of a purine nucleobase transporter gene from Leishmania major. Mol Membr Biol **21**(1): 11-18.
336. Sanchez, M.A., Ullman, B., Landfear, S.M., and Carter, N.S. 1999. Cloning and functional expression of a gene encoding a P1 type nucleoside transporter from Trypanosoma brucei. J Biol Chem **274**(42): 30244-30249.
337. Sarikaya Bayram, O., Bayram, O., Valerius, O., Park, H.S., Irniger, S., Gerke, J., Ni, M., Han, K.H., Yu, J.H., and Braus, G.H. 2011. LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. PLoS Genet **6**(12): e1001226.
338. Sarma, A.D., Serfozo, P., Kahn, K., and Tipton, P.A. 1999. Identification and purification of hydroxyisourate hydrolase, a novel ureide-metabolizing enzyme. J Biol Chem **274**(48): 33863-33865.
339. Sato, Y., Yoshikawa, A., Mimura, H., Yamashita, M., Yamagata, A., and Fukai, S. 2009. Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. EMBO J **28**(16): 2461-2468.
340. Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L., and Catani, M.V. 2008. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. Amino Acids **34**(3): 347-355.
341. Scazzocchio, C. 1994. The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation. Prog Ind Microbiol **29**: 221-257.

342. Scazzocchio, C. 2006. Aspergillus genomes: secret sex and the secrets of sex. Trends Genet **22**(10): 521-525.
343. Scazzocchio, C. 2009. Aspergillus: A Multifaceted Genus. Encyclopedia of Microbiology, p:401-421
344. Scazzocchio, C. and Darlington, A.J. 1968. The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in Aspergillus nidulans. Biochim Biophys Acta **166**(2): 557-568.
345. Scazzocchio, C., Sdrin, N., and Ong, G. 1982. Positive regulation in a eukaryote, a study of the uaY gene of Aspergillus nidulans: I. Characterization of alleles, dominance and complementation studies, and a fine structure map of the uaY--oxpA cluster. Genetics **100**(2): 185-208.
346. Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J., and Hall, M.N. 1998. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. EMBO J **17**(23): 6924-6931.
347. Schmidt, A., Su, Y.H., Kunze, R., Warner, S., Hewitt, M., Slocum, R.D., Ludewig, U., Frommer, W.B., and Desimone, M. 2004. UPS1 and UPS2 from Arabidopsis mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. J Biol Chem **279**(43): 44817-44824.
348. Schoustra, S.E., Debets, A.J., Slakhorst, M., and Hoekstra, R.F. 2007. Mitotic recombination accelerates adaptation in the fungus Aspergillus nidulans. PLoS Genet **3**(4): e68.
349. Schuck, S. and Simons, K. 2004. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. J Cell Sci **117**(Pt 25): 5955-5964.
350. Schultes, N.P., Brutnell, T.P., Allen, A., Dellaporta, S.L., Nelson, T., and Chen, J. 1996. Leaf permease1 gene of maize is required for chloroplast development. Plant Cell **8**(3): 463-475.
351. Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C., and Lee, S. 1978. A mutation defective in the xanthine alternative pathway of Aspergillus nidulans: its use to investigate the specificity of uaY mediated induction. *Mol Gen Genet* **164**(3): 303-308.
352. Sealy-Lewis, H.M., Lycan, D., and Scazzocchio, C. 1979. Product induction of purine hydroxylase II in Asperigillus nidulans. *Mol Gen Genet* **174**(1): 105-106.
353. Sewall, T.C. 1994. Cellular effects of misscheduled brlA, abaA, and wetA expression in Aspergillus nidulans. Can J Microbiol **40**(12): 1035-1042.
354. Sewall, T.C., Mims, C.W., and Timberlake, W.E. 1990. abaA controls phialide differentiation in Aspergillus nidulans. Plant Cell **2**(8): 731-739.
355. Sharpless, K.E. and Harris, S.D. 2002. Functional characterization and localization of the Aspergillus nidulans formin SEPA. Mol Biol Cell **13**(2): 469-479.
356. Shaw, B.D., Momany, C., and Momany, M. 2002. Aspergillus nidulans swoF encodes an N-myristoyl transferase. Eukaryot Cell **1**(2): 241-248.
357. Shaw, B.D. and Upadhyay, S. 2005. Aspergillus nidulans swoK encodes an RNA binding protein that is important for cell polarity. Fungal Genet Biol **42**(10): 862-872.
358. Shi, C., Paige, M.F., Maley, J., and Loewen, M.C. 2009. In vitro characterization of ligand-induced oligomerization of the S. cerevisiae G-protein coupled receptor, Ste2p. Biochim Biophys Acta **1790**(1): 1-7.
359. Shields, S.B., Oestreich, A.J., Winistorfer, S., Nguyen, D., Payne, J.A., Katzmann, D.J., and Piper, R. 2009. ESCRT ubiquitin-binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting. J Cell Biol **185**(2): 213-224.
360. Shigeta, S., Hosoya, M., Mochizuki, S., and Chiba, T. 1988. [Studies on antiviral agents. I. Antiviral activity of pyridobenzoazoles]. Yakugaku Zasshi **108**(9): 856-859.
361. Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Rutherford, N.G., O'Reilly, J., Henderson, P.J., and Iwata, S. 2008. Crystallization of the hydantoin transporter Mhp1 from Microbacterium liquefaciens. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **64**(Pt 12): 1172-1174.
362. Silverman-Gavrila, L.B. and Lew, R.R. 2003. Calcium gradient dependence of Neurospora crassa hyphal growth. Microbiology **149**(Pt 9): 2475-2485.
363. Simons, K. and Ehehalt, R. 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. J Clin Invest **110**(5): 597-603.
364. Simons, K. and Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature **387**(6633): 569-572.
365. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science **175**(23): 720-731.
366. Singh, S.K., Piscitelli, C.L., Yamashita, A., and Gouaux, E. 2008. A competitive inhibitor traps LeuT in an open-to-out conformation. Science **322**(5908): 1655-1661.

367. Smaczynska-de, R., II, Allwood, E.G., Aghamohammadzadeh, S., Hettema, E.H., Goldberg, M.W., and Ayscough, K.R. 2010. A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. J Cell Sci **123**(Pt 20): 3496-3506.
368. Smirnova, I.N., Kasho, V., and Kaback, H.R. 2008. Protonation and sugar binding to LacY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(26): 8896-8901.
369. Sobczak, I. and Lolkema, J.S. 2005. Loop VIII/IX of the Na+-citrate transporter CitS of Klebsiella pneumoniae folds into an amphipathic surface helix. Biochemistry **44**(14): 5461-5470.
370. Soetens, O., De Craene, J.O., and Andre, B. 2001. Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. J Biol Chem **276**(47): 43949-43957.
371. Soid-Raggi, G., Sanchez, O., and Aguirre, J. 2006. TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in Aspergillus nidulans. *Mol Microbiol* **59**(3): 854-869.
372. Sorkina, T., Doolen, S., Galperin, E., Zahniser, N.R., and Sorkin, A. 2003. Oligomerization of dopamine transporters visualized in living cells by fluorescence resonance energy transfer microscopy. J Biol Chem **278**(30): 28274-28283.
373. Sotiriou, S., Gispert, S., Cheng, J., Wang, Y., Chen, A., Hoogstraten-Miller, S., Miller, G.F., Kwon, O., Levine, M., Guttentag, S.H., and Nussbaum, R.L. 2002. Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. Nat Med **8**(5): 514-517.
374. Springael, J.Y., De Craene, J.O., and Andre, B. 1999. The yeast Npi1/Rsp5 ubiquitin ligase lacking its N-terminal C2 domain is competent for ubiquitination but not for subsequent endocytosis of the gap1 permease. Biochem Biophys Res Commun **257**(2): 561-566.
375. Springael, J.Y., Nikko, E., Andre, B., and Marini, A.M. 2002. Yeast Npi3/Bro1 is involved in ubiquitin-dependent control of permease trafficking. *FEBS Lett* **517**(1-3): 103-109.
376. Stanasila, L., Perez, J.B., Vogel, H., and Cotecchia, S. 2003. Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. J Biol Chem **278**(41): 40239-40251.
377. Stimpson, H.E., Lewis, M.J., and Pelham, H.R. 2006. Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. EMBO J **25**(4): 662-672.
378. Strauss, J. and Reyes-Dominguez, Y. 2010. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. Fungal Genet Biol **48**(1): 62-69.
379. Suarez, T., de Queiroz, M.V., Oestreicher, N., and Scazzocchio, C. 1995. The sequence and binding specificity of UaY, the specific regulator of the purine utilization pathway in Aspergillus nidulans, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of Saccharomyces cerevisiae. EMBO J **14**(7): 1453-1467.
380. Subramanian, V.S., Marchant, J.S., Boulware, M.J., and Said, H.M. 2004. A C-terminal region dictates the apical plasma membrane targeting of the human sodium-dependent vitamin C transporter-1 in polarized epithelia. J Biol Chem **279**(26): 27719-27728.
381. Subramanian, V.S., Marchant, J.S., Reidling, J.C., and Said, H.M. 2008. N-Glycosylation is required for Na+-dependent vitamin C transporter functionality. Biochem Biophys Res Commun **374**(1): 123-127.
382. Sullivan, J.A., Lewis, M.J., Nikko, E., and Pelham, H.R. 2007. Multiple interactions drive adaptor-mediated recruitment of the ubiquitin ligase rsp5 to membrane proteins in vivo and in vitro. Mol Biol Cell **18**(7): 2429-2440.
383. Sun, W., Xu, X., Pavlova, M., Edwards, A.M., Joachimiak, A., Savchenko, A., and Christendat, D. 2005. The crystal structure of a novel SAM-dependent methyltransferase PH1915 from Pyrococcus horikoshii. Protein Sci **14**(12): 3121-3128.
384. Swart, K., van Heemst, D., Slakhorst, M., Debets, F., and Heyting, C. 2001. Isolation and characterization of sexual sporulation mutants of Aspergillus nidulans. Fungal Genet Biol **33**(1): 25-35.
385. Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A., and Oakley, B.R. 2006. Fusion PCR and gene targeting in Aspergillus nidulans. Nat Protoc **1**(6): 3111-3120.
386. Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazan, L., Dou, X., Espeso, E.A., Penalva, M.A., Osmani, S.A., and Oakley, B.R. 2008. The tip growth apparatus of Aspergillus nidulans. *Mol Biol Cell* **19**(4): 1439-1449.
387. Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S., and Fischer, R. 2008. Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus Aspergillus nidulans. Mol Biol Cell **19**(1): 339-351.

388. Tavoularis, S., Scazzocchio, C., and Sophianopoulou, V. 2001. Functional expression and cellular localization of a green fluorescent protein-tagged proline transporter in Aspergillus nidulans. Fungal Genet Biol **33**(2): 115-125.
389. Tazebay, U.H., Sophianopoulou, V., Cubero, B., Scazzocchio, C., and Diallinas, G. 1995. Post-transcriptional control and kinetic characterization of proline transport in germinating conidiospores of Aspergillus nidulans. *FEMS Microbiol Lett* **132**(1-2): 27-37.
390. Tazebay, U.H., Sophianopoulou, V., Scazzocchio, C., and Diallinas, G. 1997. The gene encoding the major proline transporter of Aspergillus nidulans is upregulated during conidiospore germination and in response to proline induction and amino acid starvation. *Mol Microbiol* **24**(1): 105-117.
391. Thevelein, J.M., Bonini, B.M., Castermans, D., Haesendonckx, S., Kriel, J., Louwet, W., Thayumanavan, P., Popova, Y., Rubio-Texeira, M., Schepers, W., Vandormael, P., Van Zeebroeck, G., Verhaert, P., Versele, M., and Voordeckers, K. 2008. Novel mechanisms in nutrient activation of the yeast protein kinase A pathway. *Acta Microbiol Immunol Hung* **55**(2): 75-89.
392. Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A., and Davies, R.W. 1983. Transformation by integration in Aspergillus nidulans. Gene **26**(2-3): 205-221.
393. Todd, R.B., Davis, M.A., and Hynes, M.J. 2007. Genetic manipulation of Aspergillus nidulans: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. Nat Protoc **2**(4): 822-830.
394. Tomas, M., Martinez-Alonso, E., Ballesta, J., and Martinez-Menarguez, J.A. 2010. Regulation of ER-Golgi intermediate compartment tubulation and mobility by COPI coats, motor proteins and microtubules. Traffic **11**(5): 616-625.
395. Torralba, S. and Heath, I.B. 2002. Analysis of three separate probes suggests the absence of endocytosis in Neurospora crassa hyphae. Fungal Genet Biol **37**(3): 221-232.
396. Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A.M., and Laborda, F. 1998. Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in Aspergillus nidulans. Microbiology **144 (Pt 1)**: 45-53.
397. Traub, M., Florchinger, M., Piecuch, J., Kunz, H.H., Weise-Steinmetz, A., Deitmer, J.W., Ekkehard Neuhaus, H., and Mohlmann, T. 2007. The fluorouridine insensitive 1 (fur1) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in Arabidopsis thaliana. Plant J **49**(5): 855-864.
398. Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U.V., Chen, X.Z., Wang, Y., Brubaker, R.F., and Hediger, M.A. 1999. A family of mammalian Na+-dependent L-ascorbic acid transporters. Nature **399**(6731): 70-75.
399. Turner, R.J., Lu, Y., and Switzer, R.L. 1994. Regulation of the Bacillus subtilis pyrimidine biosynthetic (pyr) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism. J Bacteriol **176**(12): 3708-3722.
400. Ujwal, M.L., Sahin-Toth, M., Persson, B., and Kaback, H.R. 1994. Role of glutamate-269 in the lactose permease of Escherichia coli. *Mol Membr Biol* **11**(1): 9-16.
401. Umebayashi, K. and Nakano, A. 2003. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. J Cell Biol **161**(6): 1117-1131.
402. Upadhyay, S. and Shaw, B.D. 2008. The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol **68**(3): 690-705.
403. Valdez-Taubas, J., Diallinas, G., Scazzocchio, C., and Rosa, A.L. 2000. Protein expression and subcellular localization of the general purine transporter UapC from Aspergillus nidulans. Fungal Genet Biol **30**(2): 105-113.
404. Valdez-Taubas, J., Harispe, L., Scazzocchio, C., Gorfinkiel, L., and Rosa, A.L. 2004. Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from Aspergillus nidulans. Fungal Genet Biol **41**(1): 42-51.
405. Valdez-Taubas, J. and Pelham, H.R. 2003. Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. Curr Biol **13**(18): 1636-1640.
406. Vangelatos, I., Roumelioti, K., Gournas, C., Suarez, T., Scazzocchio, C., and Sophianopoulou, V. 2010. Eisosome organization in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell **9**(10): 1441-1454.
407. Vangelatos, I., Vlachakis, D., Sophianopoulou, V., and Diallinas, G. 2009. Modelling and mutational evidence identify the substrate binding site and functional elements in APC amino acid transporters. Mol Membr Biol **26**(5): 356-370.

408. Varma, S., Campbell, C.E., and Kuo, S.M. 2008. Functional role of conserved transmembrane segment 1 residues in human sodium-dependent vitamin C transporters. Biochemistry **47**(9): 2952-2960.
409. Vasudevan, G., Carter, N.S., Drew, M.E., Beverley, S.M., Sanchez, M.A., Seyfang, A., Ullman, B., and Landfear, S.M. 1998. Cloning of Leishmania nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 9873-9878.
410. Velho, A.M. and Jarvis, S.M. 2009. Topological studies of hSVCT1, the human sodium-dependent vitamin C transporter and the influence of N-glycosylation on its intracellular targeting. Exp Cell Res **315**(13): 2312-2321.
411. Vickers, M.F., Yao, S.Y., Baldwin, S.A., Young, J.D., and Cass, C.E. 2000. Nucleoside transporter proteins of Saccharomyces cerevisiae. Demonstration of a transporter (FUI1) with high uridine selectivity in plasma membranes and a transporter (FUN26) with broad nucleoside selectivity in intracellular membranes. J Biol Chem **275**(34): 25931-25938.
412. Virag, A. and Griffiths, A.J. 2004. A mutation in the Neurospora crassa actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. Fungal Genet Biol **41**(2): 213-225.
413. Virag, A. and Harris, S.D. 2006. The Spitzenkorper: a molecular perspective. Mycol Res **110**(Pt 1): 4-13.
414. Virag, A., Lee, M.P., Si, H., and Harris, S.D. 2007. Regulation of hyphal morphogenesis by cdc42 and rac1 homologues in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol **66**(6): 1579-1596.
415. Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M., and Diallinas, G. 2006. A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. J Mol Biol **357**(3): 808-819.
416. Vlanti, A. and Diallinas, G. 2008. The Aspergillus nidulans FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. Mol Microbiol **68**(4): 959-977.
417. Wallace, L.J., Candlish, D., and de Koning, H.P. 2002. Different substrate recognition motifs of human and trypanosome nucleobase transporters. Selective uptake of purine antimetabolites. J Biol Chem **277**(29): 26149-26156.
418. Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C., and Walter, P. 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. Nature **439**(7079): 998-1003.
419. Wang, G., Lu, L., Zhang, C.Y., Singapuri, A., and Yuan, S. 2006. Calmodulin concentrates at the apex of growing hyphae and localizes to the Spitzenkorper in Aspergillus nidulans. Protoplasma **228**(4): 159-166.
420. Wang, H., Dutta, B., Huang, W., Devoe, L.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., and Prasad, P.D. 1999. Human Na(+)-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant. Biochim Biophys Acta **1461**(1): 1-9.
421. Wang, Y., Mackenzie, B., Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C.C., and Hediger, M.A. 2000. Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. Biochem Biophys Res Commun **267**(2): 488-494.
422. Ward, J.L., Sherali, A., Mo, Z.P., and Tse, C.M. 2000. Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. J Biol Chem **275**(12): 8375-8381.
423. Weber, E., Rodriguez, C., Chevallier, M.R., and Jund, R. 1990. The purine-cytosine permease gene of Saccharomyces cerevisiae: primary structure and deduced protein sequence of the FCY2 gene product. Mol Microbiol **4**(4): 585-596.
424. Westfall, P.J. and Momany, M. 2002. Aspergillus nidulans septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. Mol Biol Cell **13**(1): 110-118.
425. Whitworth, T.L. and Quick, M.W. 2001. Substrate-induced regulation of gamma-aminobutyric acid transporter trafficking requires tyrosine phosphorylation. J Biol Chem **276**(46): 42932-42937.
426. Wieser, J., Lee, B.N., Fondon, J., 3rd, and Adams, T.H. 1994. Genetic requirements for initiating asexual development in Aspergillus nidulans. Curr Genet **27**(1): 62-69.
427. Williams, L. and Miller, A. 2001. Transporters Responsible for the Uptake and Partitioning of Nitrogenous Solutes. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **52**: 659-688.
428. Wu, J. and Miller, B.L. 1997. Aspergillus asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. Mol Cell Biol **17**(10): 6191-6201.

429. Wu, X., Itoh, N., Taniguchi, T., Hirano, J., Nakanishi, T., and Tanaka, K. 2004. Stimulation of differentiation in sodium-dependent vitamin C transporter 2 overexpressing MC3T3-E1 osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun **317**(4): 1159-1164.
430. Wu, X., Zeng, L.H., Taniguchi, T., and Xie, Q.M. 2007. Activation of PKA and phosphorylation of sodium-dependent vitamin C transporter 2 by prostaglandin E2 promote osteoblast-like differentiation in MC3T3-E1 cells. Cell Death Differ **14**(10): 1792-1801.
431. Yamashita, R.A. and May, G.S. 1998. Constitutive activation of endocytosis by mutation of myoA, the myosin I gene of Aspergillus nidulans. *J Biol Chem* **273**(23): 14644-14648.
432. Yamamoto, S., Inoue, K., Murata, T., Kamigaso, S., Yasujima, T., Maeda, J.Y., Yoshida, Y., Ohta, K.Y., and Yuasa, H. 2010. Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals: implication in the species difference in the intestinal absorption mechanism of nucleobases and their analogs between higher primates and other mammals. J Biol Chem **285**(9): 6522-6531.
433. Yao, S.Y., Ng, A.M., Vickers, M.F., Sundaram, M., Cass, C.E., Baldwin, S.A., and Young, J.D. 2002. Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation. J Biol Chem **277**(28): 24938-24948.
434. Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., and Gouaux, E. 2004. Structure of a glutamate transporter homologue from Pyrococcus horikoshii. Nature **431**(7010): 811-818.
435. Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Dominguez, Y., and Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. Fungal Genet Biol **41**(11): 973-981.
436. Yu, J.H. and Keller, N. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. Annu Rev Phytopathol **43**: 437-458.
437. Yu, J.H., Rosen, S., and Adams, T.H. 1999. Extragenic suppressors of loss-of-function mutations in the aspergillus FlbA regulator of G-protein signaling domain protein. Genetics **151**(1): 97-105.
438. Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K.G., Lipschutz, J.H., and Guo, W. 2001. Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. J Biol Chem **276**(50): 46745-46750.
439. Zhdankina, O., Strand, N.L., Redmond, J.M., and Boman, A.L. 2001. Yeast GGA proteins interact with GTP-bound Arf and facilitate transport through the Golgi. Yeast **18**(1): 1-18.
440. Zhou, Z., Zhen, J., Karpowich, N.K., Goetz, R.M., Law, C.J., Reith, M.E., and Wang, D.N. 2007. LeuT-desipramine structure reveals how antidepressants block neurotransmitter reuptake. Science **317**(5843): 1390-1393.

Παράρτημα Ι.

Βιογραφικό σημείωμα του συγγραφέα

Βιογραφικό σημείωμα του Χρήστου Γουρνά

Ο **Χρήστος Γουρνάς** γεννήθηκε στις **09/04/1982** στο Μαρούσι και μεγάλωσε στο Ίλιον. Από το 1999 είναι κάτοικος Καματερού Αττικής. Μιλάει και γράφει πολύ καλά Αγγλικά (F.C.E) και καλά Γαλλικά (D.E.L.F).

Αποφοίτησε από το 2^{ο} Ενιαίο Λύκειο Ιλίου το 2000 και το 2000-2001 ήταν φοιτητής του **Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης**. Με μετεγγραφή ήρθε στο **Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών**, όπου και φοίτησε από το 2001 έως το 2007.

Το 2005-2006 εκπόνησε τη **Διπλωματική του Εργασία** με τίτλο "**Λειτουργικός χαρακτηρισμός ενός ομόλογου μεταφορέα της οικογένειας NAT/NCS2 της *Drosophila melanogaster***" στο εργαστήριο **Μοριακής Μικροβιολογίας** της ομάδας Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, με επιβλέποντα τον Αναπληρωτή Καθηγητή **Γεώργιο Διαλλινά**.

Το 2008 ξεκίνησε την εκπόνηση της **Διδακτορικής του Διατριβής** με τίτλο "**Ρύθμιση της έκφρασης και σχέσεις δομής-λειτουργίας μεταφορέων πουρινών**" στο ίδιο εργαστήριο, με επιβλέποντα τον Αναπληρωτή Καθηγητή **Γεώργιο Διαλλινά**.

Το 2008, και για χρονικό διάστημα 6 μηνών, εργάσθηκε ημι-απασχολούμενος στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του ΕΚΠΑ ως αναλυτής ποιοτικού προσδιορισμού γενετικής τροποποίησης σε δείγματα (κατεργασμένων και μη) τροφίμων, φυτικών ιστών και σπόρων.

Για την εκπόνηση της Διδακτορικής του Διατριβής έλαβε **Υποτροφία από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών**, μετά από επιτυχία σε γραπτό διαγωνισμό.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

1. **C. Gournas**, A. Vlanti, H. Pitsouli, S. Amillis, C. Delidakis and G. Diallinas, 2006. Expression of a *Drosophila* NAT homologue in *A. nidulans.* 28th Panhellenic Conference of the Hellenic Society of Biological Sciences, Ioannina, Greece
2. G. Diallinas , S. Amillis, A. Vlanti, S. Goudela, N. Lemuh, **C. Gournas** and A. Pantazopoulou, 2006 Purine transporters: cellular expression and transporter-substrate interactions. Proceedings of the 24th International Meeting on Yeast Transport and Energetics (SMYTE), Prague, Czech Republic
3. I. Papageorgiou, **C. Gournas**, A. Pantazopoulou, S. Amillis, A. Vlanti and G. Diallinas**,** 2007. Towards the past through genetic disruption of intramolecular synergism in the nucleobase-ascorbate transporter family. Proceedings of the 59th Scientific Conference of the Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, Athens, Greece.
4. **C. Gournas**, I. Papageorgiou, S. Amillis, A. Vlanti , V. Kosti, A.Pantazopoulou and G. Diallinas, 2008. A two-step mechanism for substrate selection, binding and transport of uric acid by a highly

specific transporter. Channels and Transporters, Ettore Majorana Foundation and Center for Scientific Culture, Erice, Sicily, Italy.

5. G. Diallinas, I. Papageorgiou, **C. Gournas**, A. Vlanti , V. Kosti, A.Pantazopoulou and S. Amillis, 2008. Intramolecular synergy as the basis for the evolution of a highly specific uric acid transporter. 26th Smyte (Small Meeting on Yeast Transport and Energetics), Braga, Portugal.

6. **C. Gournas**, S. Amillis, A. Vlanti and G. Diallinas, 2008. Regulation of purine transporter by endocytosis: activity dependent and ammonium induced endocytic pathways converge at a c-tail Ub acceptor Lys. 26th Smyte (Small Meeting on Yeast Transport and Energetics), Braga, Portugal.

7. F. Borbolis**, C. Gournas**, M. Karachaliou, D. Hatzinicolaou, A. Pantazopoulou, and G. Diallinas, 2008. A cryptic role of uric acid metabolism and intercellular transport in fungal development reveals analogies with metazoa. 26th Smyte (Small Meeting on Yeast Transport and Energetics), Braga, Portugal.

8. S. Amillis, A. Vlanti, **C. Gournas** and G. Diallinas, 2008. Substrate- and ammonium induced endocytosis down-regulate the UapA purine transporter through ubiquitination. Final Eurofungbase Meeting, LSSG-CT-2005-018964, San Feliu de Guixols, Spain

9. F. Borbolis, M. Karachaliou**, C. Gournas**, D. Hatzinikolaou, A. Pantazopoulou, and G. Diallinas, 2008. A cryptic role of uric acid metabolism and intercellular redistribution in *Aspergillus nidulans* development. Final Eurofungbase Meeting, LSSG-CT-2005-018964, San Feliu de Guixols, Spain.

10. M.-E. Galinou, F. Borbolis, **C. Gournas** and G. Diallinas, 2009. *In vivo* subcellular localization of purine catabolic enzymes in a model eukaryote. 31th Panhellenic Conference of the Hellenic Society of Biological Sciences, Patra, Greece.

11. A. Pavlides, S. Amillis, V. Paspaliaris, G. Diallinas and **C. Gournas**, 2009. Mediators of transporter endocytosis in *A. nidulans:* the protagonist role of HulA ubiquitin ligase. 31th Panhellenic Conference of the Hellenic Society of Biological Sciences, Patra, Greece.

12. V. Bitsikas, M. Karachaliou, **C. Gournas**, A. Pavlides, G. Diallinas**,** 2010. Hypertonic conditions trigger transient plasmolyis, growth arrest and blocjkage of endocytosis in *Aspergillus nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*. 32th Panhellenic Conference of the Hellenic Society of Biological Sciences, Karpenisi, Greece

13. M. Karachaliou, V. Bitsikas, **C. Gournas**, A. Pavlides, G. Diallinas**,** 2010. Hypertonic conditions trigger transient plasmolyis, growth arrest and blockage of endocytosis in *Aspergillus nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae.* 9th International Mycological Congress (IMC9: *the Biology of Fungi*), Edinburgh*,* Scotland.

14. **C. Gournas**, S. Amillis, A. Vlanti , G. Diallinas, 2010. Dynamic structural conformations of the uric acid-xanthine transporter, UapA during its transport cycle direct its endocytosis and degradation. Proceedings of the 60th Scientific Conference of the Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, Athens, Greece

Δημοσιεύσεις σε διεθνή έγκριτα επιστημονικά περιοδικά

1. Gournas C, Papageorgiou I, Diallinas G. (2008) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol Biosyst.* **4**:404-16.

2. Papageorgiou I, Gournas C, Vlanti A, Amillis S, Pantazopoulou A, Diallinas G. (2008) Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J Mol Biol.* **382**:1121-35.

3. Diallinas G, Gournas C.(2008) Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: Lessons from model microbial genetic systems. *Channels (Austin).* **2**:363-372.

4. Gournas C, Amillis S, Vlanti A, Diallinas G. (2010) Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol Microbiol.* **75**:246-60.

5. Vangelatos I, Roumelioti K, Gournas C, Suarez T, Scazzocchio C, Sophianopoulou V. (2010) Eisosome organisation in the filamentous ascomycete Aspergillus nidulans. *Eukaryot Cell.* **9**(10):1441-1454.

6. Bitsikas V, Karachaliou M, Gournas C and Diallinas G (2011) Hypertonic conditions trigger transient plasmolysis, growth arrest and blockage of transporter endocytosis in *Aspergillus nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae. Mol Membr Biol.* **28**(1):54-68.

7. Gournas C, Oestreicher N, Amillis S, Diallinas G and Scazzocchio C (2011) Completing the purine utilization pathway of Aspergillus nidulans. *Fungal Genet Biol. In press.*

Παράρτημα ΙΙ.

Δημοσιεύσεις σε διεθνή έγκριτα επιστημονικά περιοδικά

Η οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων/ασκορβικού (NAT): γονιδιωματική, εξέλιξη, σχέσεις δομής-λειτουργίας και φυσιολογικός ρόλος

Χρήστος Γουρνάς, Ιωάννης Παπαγεωργίου και Γεώργιος Διαλλινάς

Αυτή η ανασκόπηση αποτελεί μια ανασκόπιση της υπάρχουσας γνώσης για μια διαδεδομένη οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών δευτερογενούς ενεργού μεταφοράς νουκλεοτιδικών βάσεων/ασκορβικού οξέος (NAT). Δείχνουμε πώς πρότυπα βακτηριακά και κυρίως μυκητιακά μέλη της οικογένειας έχουν γίνει μοναδικά συστήματα μοντέλα για μελέτες των σχέσεων δομής-λειτουργίας και της ρύθμισης της έκφρασης, με τη χρήση κλασσικής και αντίστροφης γενετικής καθώς και βιοχημικών προσεγγίσεων. Συζητούμε τη σημασία της μεταφοράς ασκορβικού οξέος μέσω των NAT μεταφορέων στα θηλαστικά και πως οι αλλαγές στην εξειδίκευση, από διάφορες νουκλεοτιδικές βάσεις σε ασκορβικό, μπορεί να έχουν εξελιχθεί σε μοριακό επίπεδο. Τέλος, συζητάμε επίσης πως οι μοντελοποίηση των αλληλεπιδράσεων των NAT με τις πουρίνες μπορεί να αποτελέσει ένα πρώτο βήμα προς τη χρήση των μεταφορέων αυτών σαν ειδικές διόδους για τη στόχευση παθογόνων μικροοργανισμών.

View Online

The nucleobase–ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure–function relationships and physiological role†

Christos Gournas, Ioannis Papageorgiou and George Diallinas*

Received 3rd January 2008, Accepted 28th February 2008
First published as an Advance Article on the web 11th March 2008
DOI: 10.1039/b719777b

This review summarizes knowledge concerning a ubiquitous plasma transmembrane protein family that mediates nucleobase or ascorbate secondary active transport (NAT). We show that prototype bacterial and mostly fungal members have become unique model systems to unravel structure–function relationships and regulation of expression, using classical and reverse genetics, as well as biochemical approaches. We discuss the importance of NAT-mediated ascorbate transport in mammals and how changes in substrate specificity, from different nucleobases to ascorbate, might have evolved at the molecular level. Finally, we also discuss how modelling NAT–purine interactions might constitute a step towards the use of NAT proteins as specific gateways for targeting pathogenic microbes.

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

1 Introduction to the NAT/NCS2 family

The nucleobase ascorbate transporter (NAT) family, also known as the nucleobase cation symport 2 (NCS2) family, was historically defined by the cloning and characterization of the UapA[1,2] and UapC[3] uric acid–xanthine permeases of the model ascomycete *Aspergillus nidulans*, and the UraA and PyrP uracil permeases of *Escherichia coli*[4] and *Bacillus subtilis*.[5] At present, the function and specificity of seven more NAT proteins are known[6] (Table 1). Surprisingly, the mammalian NATs (SVCT1 and SVCT2) recognise very specifically L-ascorbic acid, rather than purines or pyrimidines. Thus, it became clear that the NAT family can be subdivided into three sub-families in respect to substrate specificity; the first, present in bacteria, fungi and plants, is specific for the oxidised purines xanthine and/or uric acid, the second present only in bacteria is specific for uracil, and the third present in vertebrates is specific for L-ascorbic acid. K_m values range from 2–8 μM for xanthine, 7–130 μM for uric acid and 8–237 μM for ascorbic acid. Apparent V_m values depend on the expression levels of transporters, which in turn depend on various physiological or developmental signals, but in general NATs have a high/moderate capacity of transport. It is interesting to notice that no NAT member of known function is specific for the salvageable purines adenine, guanine or hypoxanthine. The xanthine/uric acid permeases can also transport uracil with low affinity and can recognise, but do not transport, L-ascorbic acid at very high concentrations (>35 mM). In contrast, the SVCT1 and SVCT2 L-ascorbic acid transporters do not recognise nucleobases. Bacterial, fungal and plant NATs have been shown to be H^+ symporters, while the mammalian SVCT L-ascorbic acid transporters use Na^+ symport for their function.

In order for an unknown protein to be classified in the NAT family, three criteria are considered. These include a size ranging from 400–650 amino acids, the prediction of 10–14 (usually 12) putative TMS, and the presence and the topology of two very highly conserved motives. These are the so called NAT signature motif, [Q/E/P]-**N**-X-**G**-X-X-X-X-**T**-[R/K/G] (where X is a hydrophobic amino acid) located in an amphipathic region just upstream from TMS9,[7,8] and the QH motif in the middle of TMS1[9] (Fig. 1). Both motives have been

Faculty of Biology, Department of Botany, University of Athens, Panepistimioupolis, Athens 15781, Greece. E-mail: diallina@biol.uoa.gr
† Electronic supplementary information (ESI) available: Protein accession numbers. See DOI: 10.1039/b719777b





G. D. is Assistant Professor in the Faculty of Biology of the University of Athens. His research project focuses on structure–function relationships in the uric acid permease UapA, and in unravelling the signals and mechanisms regulating the expression of purine transporters in the plasma membrane of eukaryotes. C. G. and I. P. are first and final year PhD students respectively in the lab of G. D.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2008

View Online

Table 1 NAT proteins of known function

Organism	Transporter	Physiological substrates [$K_{m/i}$/μM]	Other ligands [$K_{m/i}$/μM]	Transport capacity
Aspergillus nidulans	UapA	X [7], UA [8]	2TX [63], 3MX [28], 8MX [100], OX [103], ALL[1]	H
	UapC	X [4], UA [136]	1MX [<50], 2TX [<50], 3MX [~100], 8MX [~100], OX [38], ALL[a]	M
Aspergillus fumigatus	UapC	X [6], UA [171]	8MX [50], 1MX [60], 2TX [65], 3MX [100], OX [103]	H
Candida albicans	Xut1p	X [4], UA [50]	2TX [30], 2TUA [97], 3MX [22], 6TUA [84], 8MX [80], 8AZX [55], OX[4]	H
Escherichia coli	YgfO	X [4]	1MX [36], 2TX [91], 3MX [72], 6TX [41], 9MX [53]	H
	Yice	X [3]	—	L
	UraA	U	—	N.d.
Bacillus subtilis	PucJ	UA, X (?)	—	N.d.
	PucK	UA, X (?)	—	N.d.
	PbuX	X	—	N.d.
	PyrP	U	—	N.d.
Zea mays	Lpe1	X [30], Ua [33]	—	H
Rattus norvegicus	SVCT1	AA [29]	DAA [~700]	H
	SVCT2	AA [10–100]	—	L[b]
Mus musculus	SVCT2	AA [20–115]	—	L[b]
Homo sapiens	SVCT1	AA [65–237]	BrAA [33]	H
	SVCT2	AA [8–62]	DC [2,35], AA-DC [0,2], AA-NH-DC [24], BrAA [2,7], AA-KA [40], BrAA-KA [7,4], BrAA-DC [21]	L/H[b]
Sus scrofa	SVCT2	AA [27]	—	N.d

X, xanthine; UA, uric acid; 1MX, 1-methylxanthine; 2TX, 2-thioxanthine; 3MX, 3-methylxanthine; 6TX, 6-thioxanthine; 8MX, 8-methylxanthine; 8AZX, 8-azaxanthine; 9MX, 9-methylxanthine; OX, oxypurinol; ALL, allopurinol; U, Uracil; AA, L-ascorbic acid; DAA, D-ascorbic acid; BrAA, 6-bromo-6-deoxy-L-ascorbic acid; DC, diclophenamic acid; KA, kynurenic acid; AA-DC, 6-diclofenamic-L-ascorbic acid; AA-KA, 6-kynurenic-L-ascorbic acid; BrAA-KA, 6-bromo-6-kynurenic-L-ascorbic acid; BrAA-DC, 6-bromo-6-diclopheramic-L-ascorbic acid; AA-NH-DC, 6-amino-6-diclopheramic-L-ascorbic acid. The $K_{m/i}$ values concerning SVCT-mediated ascorbate transport derive from references 94–98.[a] Allopurinol affinity cannot be determined due to non-Michaelis–Menten kinetics (M. Koukaki, G. Diallinas, unpublished). Based on genetics and growth tests allopurinol is formally shown to be a substrate of UapA and UapC and that concentrations as low as 2 μM lead to allopurinol sensitivity. [b] The V_m values of SVCT2-mediated ascorbate transport in heterologous systems indicate a low capacity transporter. However data from endogenously expressed hSVCT1 and hSVCT2 propose similar V_m values.[44] H, high; M, moderate; L, low; N.d., not determined.

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

shown to be critical for the function of UapA, UapC or YgfO transporters (see later). An extra criterion is also the presence of some nearly absolutely conserved single polar/charged amino acids. Based on these, we have identified hundreds of currently sequenced proteins of unknown function derived from Gram-negative and Gram-positive bacteria, archaea, fungi, diatoms, plants and animals that belong to the NAT family. The commonest predicted structure of NATs is that of 12 TMS with cytoplasmic N- and C-termini, which resembles the predicted structures of most secondary active transporters, including the major facilitator superfamily (MFS). This 12 TMS α-helical structure has been confirmed by X-ray crystallography only for a few prokaryotic transporters (LacY lactose permease, GlpT glycerol permease, EmrD Multidrug Transporter, LeuT leucine transporter, Glt_{Ph} glutamate–aspartate transporter; http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html). It has been shown that substrate and H^+ binding sites are built-up of specific amino acids located deep in specific TMS, but a significant functional role of flexible re-entrant loops or helical hairpins, has also been suggested in a couple of cases.[10] In the NAT family, the prediction of high α-helicity has gained preliminary evidence from circular dichroism studies, showing that two prototype members of the family (UapA and YgfO) are rich in helical content (S. Frillingos, N. Lemuh, G. Diallinas, unpublished observations). Unlike members of the MFS family and similar to the two amino acid permeases of known structure (LeuT, Glt_{Ph}), no symmetry or a large cytoplasmic loop joining the two halves of the protein, are observed.

The evolutionary relationships of NAT homologues are shown in Fig. 1. In general, bacterial and fungal[6] transporters are more similar to each other in primary amino acid sequences (30–35%), than when compared to plants or animals (22–24%). Interestingly, *Saccharomyces cerevisiae* does not have any NAT/NCS2 protein, reflecting its lack of enzymes involved in xanthine or uric acid utilization. In fact, very few organisms lack NAT/NCS2 transporters, the most prominent examples being protozoa. Plants have numerous NAT/NCS2 transporters, the only one with known function being Lpe1, a high-affinity, high-capacity, uric acid–xanthine/H^+ symporter, necessary for chloroplast development in maize.[11] *Drosophila melanogaster* has a single NAT homologue and *Caenorhabditis elegans* six. The metazoan NAT proteins are 35–40% identical among themselves and 25% identical with plant members. Mammals, apart from the two known ascorbate transporters (SVCT1 and SVCT2), also possess homologues of unknown function which possess NAT signature motives more similar to the motif present in the characterised nucleobase transporters of bacteria, fungi and plants. These proteins might code for the specific nucleobase uptake activities previously detected in mammals.[12] The proteins clustered with the mammalian ascorbate transporters all come from vertebrates and are divided into two branches, one similar to SVCT1 and the other to SVCT2 (Fig. 1). Most vertebrates, except primates, also include NATs, which cluster together as a separate branch, possessing conserved motives that are more similar to the bacterial, fungal or plant nucleobase carriers, rather than to the mammalian vitamin C transporters.

View Online

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

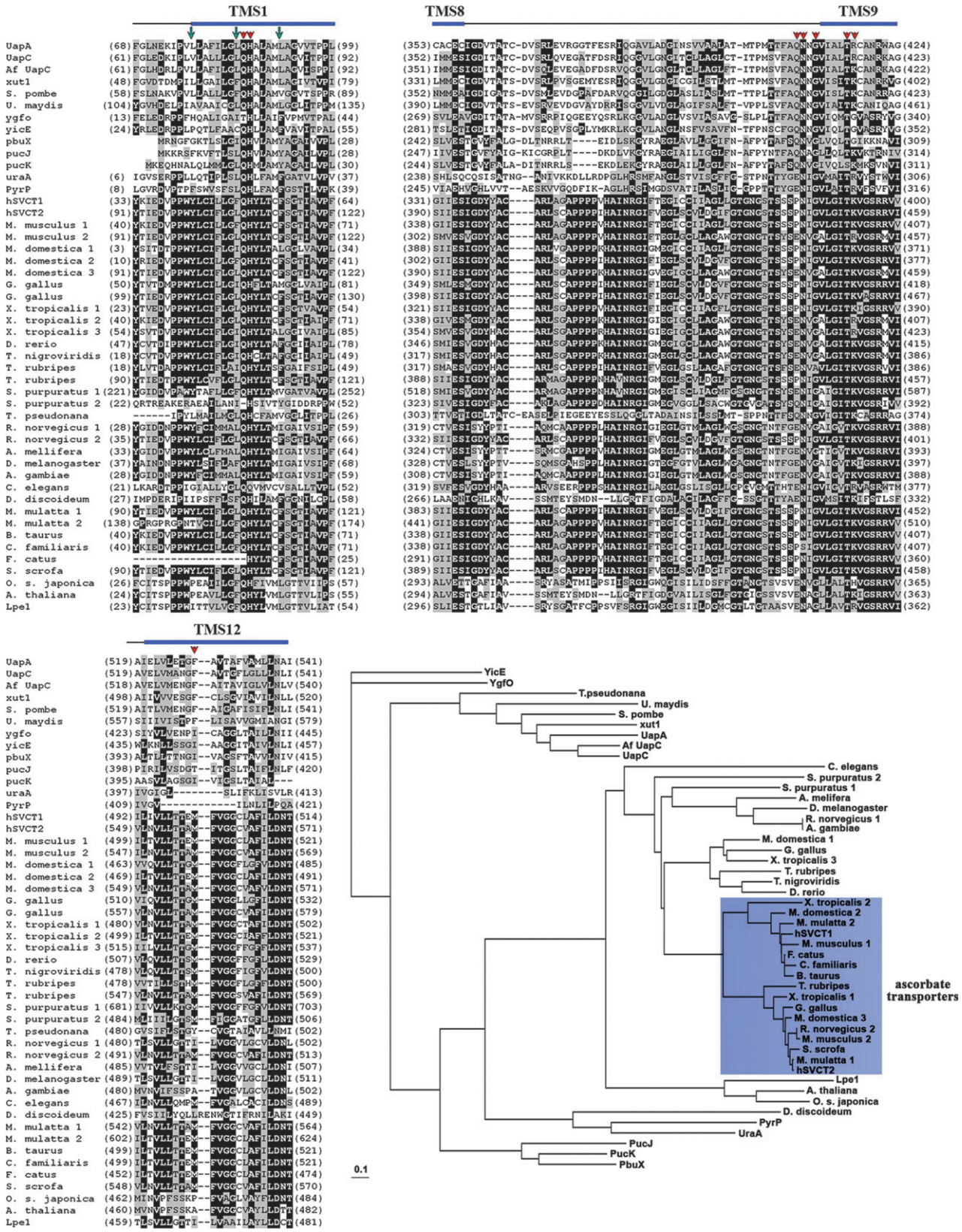


Fig. 1 Amino acid alignment in the three functional domains and evolutionary relationships of selected representative NAT proteins. TMS regions overlapping with the functional domains are shown above the alignment. Functional amino acids within TMS1, the NAT signature motif and TMS12 are indicated by red arrow heads. The UapA-specific Leu Repeat (LR) is also shown with green arrows. In the cladogram (PHYLIP) shown, ascorbate and ascorbate-like transporters are shaded blue. The protein accession numbers are given as supplementary material.†

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2008

View Online

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

Based on the above observations, and a thorough mutational analysis of UapA (see later), we believe that the specificity of NAT proteins towards nucleobase or ascorbic acid might be predicted based on amino acid variations in or close to the NAT signature motif [Q/E/P]-**N**-X-**G**-X-X-X-X-**T**-[R/K/G]. In particular, the first amino acid in the motif of known nucleobase transporters is always a Q/E, while in ascorbate transporters it is a P. The importance of this residue in the specificity of NATs is supported experimentally (see later). In addition, the segment before this residue in nucleobase transporters is of an amphipathic nature, while in ascorbate transporters, it is entirely polar (see Fig. 1). If so, NAT *nucleobase-specific* transporters seem to be ubiquitous from prokaryotes to fish, but are gradually "lost" within the mammalian kingdom, and entirely lost in primates. On the other hand, NAT *ascorbic acid-specific* transporters start appearing in fish and persist in amphibians, marsupials, mammals and primates. We find it very intriguing that the mammalian L-ascorbate transporters seem to have evolved from uric acid/xanthine transporters of lower eukaryotes, since uric acid and xanthine have entirely different formulas compared with ascorbic acid (discussed later).

2 On the physiological role of NATs

2.1 NATs as nitrogen source suppliers, in nucleobase salvage and metabolite redistribution

In bacteria, fungi and plants NATs are responsible for high-affinity, high-capacity transport of xanthine and/or uric acid, or uracil. What is the role of xanthine/uric acid or uracil transport in these organisms? Uric acid is catabolised, by sequential oxidations, first to ureides and eventually to urea and ammonium, and thus it can be used as a relatively good nitrogen source.[6] Xanthine is immediately oxidised to uric acid and thus follows the same catabolic pathway. Uric acid cannot be used to make nucleosides and only some bacteria and plants can utilize xanthine for anabolic purposes. In contrast, uracil can be directly channelled to nucleoside and nucleic acid synthesis, but it cannot be used directly as a nitrogen source. Some bacteria (*e.g. Pseudomonas* and *Rhizobium* sp.) however utilize uracil for alanine and aspartate biosynthesis. Bacteria use NATs for taking-up xanthine/uric acid or uracil,[4,5,12,13] while fungi employ NATs for xanthine and uric acid uptake.[14] Despite the fact that all bacteria have NAT proteins, only some (*e.g. B. subtilis*) can use uric acid or xanthine as nitrogen sources, while others (*e.g. E. coli*) cannot, due to inefficient catabolism. Discernable phenotypes related to NAT function are nicely observed in *A. nidulans*, where loss-of-function mutations in the UapA or UapC permeases lead to very inefficient growth on these purines[6,15] (Fig. 2). In plants, only one NAT protein, leaf permease1 from maize (ZmLPE1), has been characterized by functional complementation of a purine transport-deficient *A. nidulans* strain. This protein is a high-affinity transporter for xanthine and uric acid, very similar to the fungal UapA or UapC proteins.[11] A loss-of-function mutant (*lpe1*) displays a defective chloroplast phenotype;[16] however it is not a plastidic transporter. The *lpe1* gene is expressed in non-photosynthetic tissues, mostly in roots, and seems to be repressed by light. The expression of Lpe1 suggests

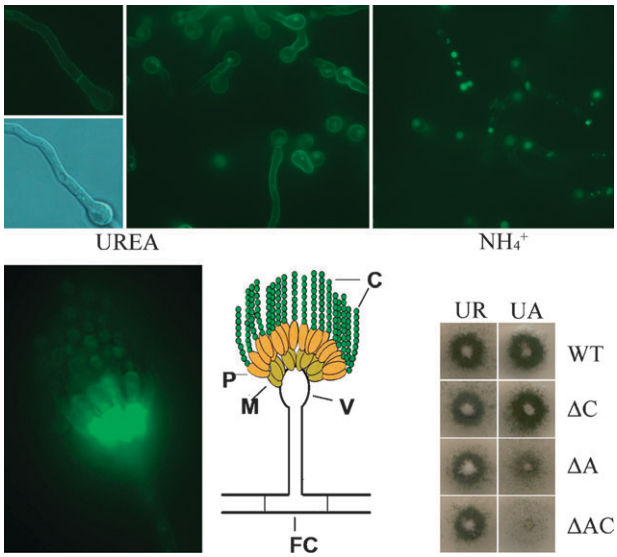


Fig. 2 *A. nidulans* growth phenotypes on urea (UR) or uric acid (UA) and expression of the major uric acid transporter UapA, as evidenced by GFP. Lower right panel: growth of isogenic wild type (WT), Δ*uapC* (Δ*C*), Δ*uapA* (Δ*A*), Δ*uapA* Δ*uapC* (Δ*AC*) strains. UapA and UapC are uric acid-specific NAT permeases of *A. nidulans*. Upper panel: UapA expression in the plasma membrane of mycelia grown in the absence of a favourable nitrogen source (UREA) compared to UapA endocytosis and degradation in the vacuoles in the presence of ammonium (NH_4^+). Lower left panel: developmental-specific expression of UapA during *A. nidulans* asexual reproduction. The cartoon in the middle shows the different cell structures in the asexual life of the fungus. C, conidiospores; M, metulae; P, phiallidiae; V, vesicle; FC, foot cell.[6]

that this permease might not only be responsible for uric acid/xanthine uptake, but also be involved in plastid function and/or metabolic processes affected by illumination. Several NATs have also been studied in *Arabidopsis thaliana* but their function remains unknown, since their heterologous expression was not successful or knock-out alleles had no detectable phenotypes. We only know that most of them are expressed ubiquitously, with a pronounced expression in vascular tissues, an indication that they function in long-distance metabolite redistribution.[17]

2.2 NATs in fungal sexual and asexual development: novel roles in ascomycete reproduction?

Strains expressing functional versions of UapA-GFP and UapC-GFP have been used for studying NAT expression in the asexual and sexual structures of *A. nidulans*.[14,18,19] Fig. 2 shows that UapA-GFP is not expressed in the conidiophore stalk and the vesicle, but is highly expressed in the periphery of the metulae, and at lower levels in phialidiae (for more details on *Aspergillus* asexual development see legend of Fig. 2). UapC is expressed in metulae only in the presence of uric acid. Metulae/phialidiae-specific expression is independent of physiological or genetic conditions that repress *uapA de novo* synthesis during vegetative growth (*e.g.* the presence of ammonium or the need of the UaY transcription factor), suggesting that it occurs *in situ*. The expression of UapA, a transporter known to be involved in the uptake of purines as nitrogen sources from the growth

View Online

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

medium, in the aerial parts of *Aspergillus* seems paradoxical. A speculation might be that UapA expression in metulae and phialidiae mediates controlled uric acid transport towards the conidiospores. Recent evidence from our lab shows that *uaZ*$^-$ mutations, which lack uric acid oxidase (UaZ), accumulate uric acid 20- and 100-fold in mycelia and conidiospores, respectively, compared to wild-type. This over-accumulation of uric acid affects significantly the mycelium rate of growth and arrests or reduces conidiation (F. Borbolis, D. Hatzinikolaou, G. Diallinas, unpublished). Most interestingly, Δ*uapA uaZ*$^-$ double mutants, while having increased uric acid in mycelia, do not accumulate uric acid in the conidiospores (F. Borbolis, D. Hatzinikolaou, G. Diallinas, unpublished). This confirms that UapA is necessary for the passage of uric acid from mycelia, through metulae and phialidiae, to conidiospores. Mutants lacking UapA show very moderately reduced conidiation. A more significant effect on conidiation can be seen in strains unable to synthesize uric acid (*hxA*$^-$ *xanA*$^-$).[6] These observations suggest that uric acid production, metabolism and intracellular transport can be a critical factor for both mycelium development and conidiospore production. It should also be noted that laboratory strains of *A. nidulans* are light-independent, due to the presence of a *veA*$^-$ mutation,[20] and thus the role of uric acid in respect to the effect of light on *Aspergillus* development might be underestimated.

UapA expression was also examined in sexual compartments of *A. nidulans*, such as cleistothecia, ascospores, ascogenous hyphae and hülle cells[14] (see legend of Fig. 2). UapA was found to be expressed in ascogenous hyphae, in hülle cells and interconnecting hyphae of the latter (Fig. 2), but not in the cleistothecia. Whether a role, other than the supply of purines as nitrogen sources during sexual development, exists is not known, since deletion of *uapA* does not affect the development of cleistothecia or the production of viable ascospores.

2.3 NATs as essential ascorbic acid carriers in mammalian development

Vitamin C is an effective antioxidant and UV absorbent[21] and plays a key role in many enzymatic reactions as a cofactor. Its varying distribution between extra- and intra-cellular fluids, its presence in a plethora of organs and tissues, and the fact that humans have lost the ability to synthesize it, have led to many attempts to characterize the properties and molecular determinants of its transport systems. Early work in mammals has revealed the existence of two distinct systems, one for the low affinity uptake of the oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, and another responsible for the high affinity and capacity uptake of L-ascorbic acid. The first is carried out by facilitative hexose transporters (GLUT1, GLUT3, and GLUT4),[22,23] which exhibit K_m values for dehydroascorbic acid in the range of 1 mM. The physiological significance of this function is in doubt, as vitamin C is rarely found in this form *in vivo* and the concentration of hexoses, which enjoy a much higher affinity for these transport systems, is higher. The latter consists of the two NAT members, SVCT1 and SVCT2,[24] which mediate active sodium dependent vitamin C transport. Their rat homologues were first cloned in 1999.[25] In humans, the NAT family includes hSVCT1 (previously identified as yolk-sac permease-like molecule 3, YSPL3), hSVCT2 (YSPL2 or KIAA0238) and two orphan members, hSVCT3 (YSPL1) and hSVCT4.[26]

hSVCT1 and hSVCT2 are encoded by the *SLC23A1* and *SLC23A2* genes, respectively. The *SLC23A1* maps to chromosome 5q31.2-31.3,[27] is 16 096 bp long and contains 15 exons.[28] Its transcript is about 2.4 kb, with an ORF of 1797 bp. The *SLC23A2* gene maps to chromosome 20p12.2-12.3, is 158 398 bp long and contains 17 exons,[28,29] comprising a transcript of about 7.5 kb, with a single ORF of 1953 bp. Despite the factor ten different genomic length, the position of the exon–intron borders is strikingly similar across the coding regions of both genes.[28] Synteny analysis of the neighboring regions of human and mouse SVCTs, and a phylogenetic analysis of several metazoan NAT sequences revealed a probable duplication of an ancestral gene 450 million years ago.[28] These results are in agreement with the cladogram in Fig. 1, indicating an earlier separation of the subfamily of SVCTs from another metazoan subfamily of NAT transporters, possibly specific for nucleobases. Promoter analysis of *SLC23A1* revealed the presence of classical CAAT and TATA 1 boxes, together with two AP-1 and one GATA1 binding sites.[30] The *SLC23A2* 5′ upstream region was shown to contain two promoter regions, P1 and P2, the latter being shown to be more efficient.[31] P1 contains single sites for XBP/USF, NFY, HIF, FAST-1 and SMAD3 transcription factors, while P2 contains 4 zinc finger transcription factor sites, 3 SP1 sites, 2 EGR1 sites, one AP2 site, a metal transcription factor site and a Myc-associated zinc finger protein site.[31]

The hSVCT1 and hSVCT2 proteins are 598 and 650 amino acids long, sharing 65% identity. The rat homologues have 604 and 592 amino acids, while mouse SVCTs are 605 and 647 amino acid polypeptides, respectively. SVCTs are highly conserved among mammals, with human, rat, mouse and rabbit homologues having 95–98% identity. Hydropathy profiles impose a 12 TMS SVCT model, with cytoplasmic amino- and carboxy-termini.[32]

As indicated by their functional properties (see also below), tissue distribution and membrane polarization, the two transporters have distinct physiological roles. SVCT1 is responsible for the maintenance of the whole body ascorbate homeostasis, through dietary absorption and renal reabsorption. SVCT2 is assessed with ascorbate uptake in metabolically active and specialized structures, thus protecting them from oxidative stress and UV radiation. Mice knocked out for *slc23a2* die immediately after birth, despite having a normal development in uterus.[33] These SVCT2 deficient mice fail to breath due to diffuse cerebral hemorrhage, indicating impaired nervous system functions. Heterozygous *slc23a2* mice survive to adulthood, but suffer reduced ascorbate levels in the brain and several other tissues. This study evidenced an absolute requirement of SVCT2 during prenatal life, further supported by the role of the transporter on placental ascorbate transport.[34] It seems that maternal vitamin C feeding is very important in mammals, as ascorbate biosynthesis begins late in gestation. Primates do not synthesize ascorbate at all, indicating a more crucial role of the vitamin's transport. This was highlighted by the fact that some human genetic variants of SVCTs have been related to preterm delivery.[35]

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2008

View Online

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

The two transporters have been shown to be expressed in a plethora of tissues. An important role of SVCT2 is the brain's neuronal development, maturation and oxidative protection.[25,36] High SVCT2 expression has been demonstrated in the eye,[37] where ascorbate is believed to have a major UV absorbent role, analogous to the uric acid role in insects and birds, and possibly fungi. It is noteworthy that nocturnal mammals and birds have reduced ascorbate and uric acid levels in the eye, respectively, compared to their diurnal relatives.[21,37] SVCT2 was also shown to be highly expressed in adrenal glands[38,39] and bone marrow,[40,41] where ascorbate fulfils antioxidant and regulatory roles. An important SVCT1 role, apart from dietary absorption and renal reabsorption, is the regulation of the vitamin C homeostasis in kidneys.[42]

Despite the large volume of work on SVCTs, there is no widespread agreement about their kinetic properties, with results varying between cell lines, tissues, or expression systems used. For the human isoforms, K_m values in the range of 65–237 μM for SVCT1 and 8–62 μM for SVCT2 have been reported.[43] Recently, it was shown that the K_m value of SVCT2 expressed in 10 different primary cells and cell lines is close to 20 μM.[44] The V_m values obtained also differ. In particular, data from heterologous expression of the two transporters indicate a higher capacity for SVCT1, while some endogenously acquired values do not differ significantly.[44] Both permeases show pH sensitivity, with maximum velocity obtained at an optimum pH of about 7.5. At pH 5.5 the maximum capacity is reduced to 50–60%, a difference that cannot be explained by the ionic state of ascorbic acid, since the pK_a of 4.2 indicates that more than 95% of the L-ascorbic acid is in the deprotonated form at this pH. This decrease in uptake could be due to reduced affinity of the transporters for their substrate at acidic pH.[45]

SVCTs have a strict specificity for L-ascorbic acid. Even its stereoisomer, D-isoascorbic acid is weakly recognized (K_i values >700 μM) by the two permeases.[25,27] Dehydroascorbic acid, glucose, deoxyglucose and a series of purines, pyrimidines and vitamins show little or no inhibition of radiolabelled ascorbic acid uptake.[25,27,46] In addition, ascorbate analogues with substitutions on carbons 2 and 3 fail to inhibit ascorbate uptake,[27,32,47] while analogues substituted on positions 5 and 6 show total inhibition.[47] Moreover, 6-deoxy-6-iodo-L-ascorbate was also proved to be transported,[47] suggesting that positions 2 and 3 are critical for the interaction of SVCTs with their substrate, while 5 and 6 are not, releasing the opportunity for potential drug design. SVCTs show an absolute requirement for Na^+ ions. Uptake measurements with varying Na^+ concentrations and a fixed concentration of ascorbic acid revealed a sigmoidal dependence for both transporters. Non-linear regression analysis yielded a Hill coefficient of around 2, suggesting that at least two Na^+ ions are co-transported per ascorbate molecule. This was further confirmed for SVCT1 by the measurement of net positive currents during ascorbate uptake.[25] Surprisingly, this was not the case for SVCT2, as it was shown not to be electrogenic. It was only very recently that the detailed functional mechanism of SVCT2 was studied.[44] SVCT2 shows absolute dependence on Ca^{2+} or Mg^{2+} ions, whereas depletion of both leads to an inactive form of the transporter, by dramatically decreasing the V_m, without significantly changing the K_m. The Na^+ : ascorbic acid stoichiometry of 2 : 1 was confirmed by comparing the net ^{22}Na uptake at saturating ascorbate concentrations with that for ascorbate. Concentrations of Na^+ above 20 mM change the conformation of a low affinity transporter ($K_m >$ 0.5 mM) into a high affinity one in an ascorbic acid cooperative manner. Interestingly, ascorbic acid affects the cooperativity in a bimodal and concentration dependent way, indicating a reciprocal functional interaction between the two substrates. This interaction defines the substrate stoichiometry and binding order, which Godoy *et al.*[44] proposed to be Na^+ : ascorbic acid : Na^+. However, and as mentioned above, SVCT2 was again shown not to be electrogenic. The authors' hypotheses compatible with current data were that either currents were too low to be detected or the transporter might function at the same time as an antiporter, permitting the efflux of a cation. Whether the efflux occurs simultaneously with the influx of 2 Na^+ and 1 ascorbic acid or during the last step of the transport cycle, is a question to be answered. An antiporter activity might be tested through kinetic assays performed with a reconstituted transporter in vesicles or inverted vesicles. Such systems allow the establishment of inward or outward gradients according to experimental needs.

2.4 NATs in metazoa: nucleobase or ascorbic acid carriers?

As shown here all metazoa have at least one putative NAT carrier. We propose that their specificity might be predicted *a priori*, based on variations in or close to the NAT signature motif. Based on that, we believe that metazoan NATs are nucleobase-specific rather than ascorbate-specific. If metazoan NATs are nucleobase-specific, the most probable prediction is that they will be specific for uric acid and/or xanthine. No NAT member characterised up to date can recognise other purines, while pyrimidine-specific NATs are known only in bacteria. Uric acid, unlike ascorbic acid which is only important in some domains of cellular life, is a universal key molecule of all multicellular organisms, providing both anti-oxidant and pro-oxidant roles. The anti-oxidant capacity of uric acid has been proven chemically and physiologically in insects and mammals. In humans, high metabolic uric acid levels in the blood, through production, excretion and re-absorption in the kidneys, has played a critical role in human evolution and might in fact have replaced or diminished the role of ascorbic acid.[48] However, the role of NATs in uric acid intercellular transport has not been shown. In *D. melanogaster* uric acid content decreases with aging and declining uric acid concentrations may represent a loss of antioxidant potential.[49] The extensively studied *rosy* (*ry*) mutants in *Drosophila*, which lack the enzyme xanthine dehydrogenase and thus are unable to produce any uric acid, are known to be hypersensitive to oxidative stress, caused by paraquat, ionizing radiation, hyperoxia or natural sunlight.[50] Furthermore, mutants doubly deficient for uric acid and Cu/Zn-containing superoxide dismutase are synthetic lethals, which are unable to complete metamorphosis under normal growth conditions. It was proposed that metamorphosis in *Drosophila* imposes a crisis of oxygen stress on the developing imago against which uric acid plays an important organ-specific defence role.[50] Lack of uric

View Online

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

acid is also connected with reduced life span (50%) and a characteristic brownish eye colour phenotype, reflecting a deficiency in the red eye pigment.[51] In fact, the *Drosophila* eye has the highest concentration of uric acid in the body of the insect, as well as a significant amount (30% of total adult activity) of xanthine dehydrogenase (XDH). These aspects lead to the hypothesis that uric acid production and transport in the eye might provide an efficient light-protective mechanism. This hypothesis finds an analogy in recent studies showing that uric acid is a significant UV-absorbing substance in the aqueous humor of diurnal birds. In the avian eyes, uric acid was proposed to fulfil the role that ascorbic acid does in mammals.[21] As discussed above, NAT-mediated uric acid transport and redistribution in fungal or plant compartments might be critical for proper fungal reproduction or plastid development, respectively, two processes that are affected by light and which could depend on the role of uric acid as an anti-oxidant molecule.

The possible role of NATs in the transport and redistribution of uric acid (or xanthine) in metazoa remains to be shown. We obtained very preliminary evidence that the single *D. melanogaster* NAT homologue, encoded by the CG6293 locus, expressed in oocytes and female adults, might be a uric acid/xanthine transporter (C. Gournas, C. Pitsouli, C. Delidakis and G. Diallinas, unpublished). We used a transposon knock-out allele and showed that CG6293 is essential for insect development. Homozygous knock-outs die during pupa metamorphosis, while heterozygous flies are sub-fertile and resistant to the toxic effects of allopurinol feeding. Allopurinol is a purine analogue, which in fungi is taken up by the NAT carriers UapA and UapC. Uptake studies in S2 cells, from which the CG6293 cDNA clone was obtained, showed that these cells possess a carrier-mediated xanthine/uric acid transport activity. Unfortunately, expression of the wild-type CG6293 and several chimeras of CG6293/UapA in *A. nidulans* was not successful. This was due to problematic trafficking and lack of expression in the plasma membrane. Replacing the N-terminal hydrophilic tail of CG6293 with that of UapA, which includes a fungal ER-exit motif, still did not allow expression in the plasma membrane (C. Gournas, S. Amillis, A. Vlanti, and G. Diallinas, unpublished).

3 Regulation of NAT expression

3.1 Regulation of transcription in fungi and mammals

3.1.1 Fungi. Transcriptional activation of the *uapA* and *uapC* genes occurs during the isotropic growth phase of conidiospore germination, prior to the first nuclear division and polarity establishment, and leads to the appearance of the corresponding purine transport activities within a short time delay (30–60 min). *UapA* and *uapC* transcriptional activation is independent of UaY and AreA, the two major *trans*-regulators affecting transcription in mycelia (see below). The only requirement for the early *de novo* transcriptional activation of *uapA* and *uapC* during germination is hydration of dormant conidiospores.[52] Interestingly, genes coding for enzymes necessary for purine catabolism are not transcriptionally activated during the isotropic growth phase of germination, but later, at the onset of mycelium development. This novel developmental mechanism of NAT regulation of expression is valid for several other fungal solute transporters.[53–56] Thus unlike *S. cerevisiae*, where highly specific sensor proteins can activate true transporters,[57] filamentous fungi seem to use their transporters *per se* for both *sensing* the environment and for the bulk transport of solutes. The molecular protagonists controlling this novel regulation system remain unknown.

Once germination is completed, regulation of *uapA* and *uapC* transcription is controlled in response to purine-induction and nitrogen metabolite repression.[58,59] In the absence of an inducer (uric acid), *uapA* and *uapC* are transcribed at low basal levels, when a non-repressing nitrogen source is present in the medium. Upon purine induction, *uapA* and *uapC* message accumulation increases up to 8-fold.[52,60] The presence of ammonium or glutamine (>5 mM) drastically represses the expression of both *uapA* and *uapC*, irrespective of the presence of an inducer.[52,60] As the physiological inducer of the purine catabolic pathway is uric acid, the tight repression of *uapA* and *uapC*, genes which encode for the two sole "gates" for uric acid uptake, results in inducer exclusion, and thus provides a "double-lock" mechanism for repression of purine utilization.

Uric acid induction of *uapA* and *uapC* transcription is mediated by the positive-acting regulatory protein UaY.[59] UaY contains a typical zinc binuclear cluster domain through which it binds to the promoter regions of *uapA* and *uapC*.[61] Ammonia repression is mediated by the inactivation of the general transcription factor AreA which is necessary for the transcription of more than 100 genes encoding products implicated in the utilization of nitrogen sources in *A. nidulans*.[62] The single DNA-binding domains of AreA and the homologous fungal proteins show striking similarities to the zinc fingers and adjacent basic regions of the metazoan GATA factors.[62] AreA mediates nitrogen metabolite repression by responding to the glutamine or ammonia concentration in the cell, while glutamine is thought to destabilize the *areA* mRNA.[63,64] Gel shifts, DNAse I footprinting and interference assays have shown that the binding sites of UaY and AreA correspond to the sequences 5′-TCGG-6X-CCGA and 5′-HGATAR, respectively.[61,65,66] The molecular and functional analysis of a number of *areA* DNA-binding specificity mutations and *cis*-acting regulatory mutations in the promoter regions of *uapA* and *uapC* have confirmed that the sites identified *in vitro* are indeed the physiological binding sites of UaY and AreA[65] (C. Scazzocchio, G. Diallinas, D. Gomez, N. Oestreicher, unpublished).

3.1.2 Mammals. *In vitro* and *in vivo* studies have revealed several transcriptional mechanisms regulating SVCT expression, involving hormones and intracellular signaling molecules. Glycocorticoids,[67] zinc[68] and calcium/phosphate ions in osteoblastic cells,[40] foetal bovine serum and epidermal growth factor in human trophoblast cell line[34] were shown to increase SVCT2 mRNA levels. Ischemic brain injury was shown to cause over-expression of SVCT2 mRNA *in vivo*. SVCT2 expression is down-regulated during differentiation of rat and mouse muscle cells,[69] while SVCT1 mRNA decreases in rat hepatocytes during aging.[70] Ascorbic acid, as in the case

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2008

View Online

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

of many other transporters where transcriptional regulation is greatly affected by their substrate, also plays a key role in SVCT expression. MacDonald *et al.*[71] have shown that elevated L-ascorbic acid levels in the intestinal lumen lead to a decrease in SVCT1 mRNA in enterocytes. Ascorbate supplementation or deprivation influences its own transport in osteoblasts.[72] Finally, a loss of intracellular ascorbate in human lung epithelial cells causes an increase in SVCT2 expression.[73]

3.2 Regulation at post-transcriptional level in fungi and mammals

3.2.1 Controlled UapA inactivation by endocytosis and degradation in *A. nidulans*. The subcellular expression of the UapA and UapC nucleobase transporters has been examined using GFP tags.[14,18,19] Similar to yeast, in vegetative *Aspergillus* mycelium functional GFP-tagged transporters appear in the plasma membrane and in the vacuoles (see Fig. 2). Expression of UapA was also examined during conidiospore germination.[14] Resting conidiospores do not express UapA-GFP, but its expression becomes progressively evident during germination. Interestingly, at early stages of germination UapA-GFP was localized in cytoplasmic rings corresponding to the ER membrane.[74] At later stages and in mycelia these ER rings are not apparent anymore, suggesting that the UapA exit from the ER membrane is efficient only after the first nuclear division and polarity establishment. In germinated conidiospores and mycelia UapA and UapC are down-regulated by ammonium through endocytosis and degradation in the vacuole.[14,18,19] This was clearly shown by fluorescent microscopy of GFP-tagged versions of UapA and UapC expressed from the *alcA* glucose-repressible, ethanol-inducible, promoter, which is not regulated by ammonium. In the case of UapA, western blotting of membrane-associated GFP- or His-tagged transporter has confirmed the negative effect of ammonium on plasma membrane expression.[14] UapA endocytosis by ammonium takes place through a mechanism possibly involving ubiquitination and is dependent on *cis*-acting elements in the UapA C-terminal cytoplasmic tail (see later; A. Vlanti, S. Amillis, G. Diallinas, unpublished).

Very recently, we also obtained preliminary evidence for substrate-induced UapA inactivation by endocytosis. Endocytosis of UapA-GFP becomes evident after 30 min but reaches its peak, where no or very little UapA was associated with the plasma membrane, after 2–3 h of continuous presence of uric acid, xanthine or 2-thioxanthine. At this point most fluorescence was associated with small and larger vacuoles, but also with several granular structures, often close to the plasma membrane, that could be endosomes.[75] Substrate-induced endocytosis is not simply due to elevated cytoplasmic accumulation of uric acid or xanthine, because in the *uaZ*$^-$ mutant that accumulates 20-fold more uric acid compared to an isogenic wild-type strain, UapA-GFP is very stably expressed in the plasma membrane (unpublished results). On the other hand, substrate-induced endocytosis is, similar to ammonium-induced endocytosis, dependent on the C-tail domain of UapA (A. Vlanti, S. Amillis, G. Diallinas, unpublished). Several questions concerning this mechanism are under investigation.

3.2.2 SVCT post-transcriptional regulation. *In silico* analysis revealed that SVCTs possess several conserved phosphorylation and glycosylation sites.[27] Incubation of *Xenopus laevis* oocytes expressing hSVCT1 or hSVCT2 with PKC activating agent phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) markedly decreases L-ascorbic acid uptake,[24] without affecting the affinity of the transporter.[76] This is also the case in PMA treated COS-1 cells expressing hSVCT1, where a redistribution of the protein from the cellular surface to intracellular compartments is observed.[76] A decrease in L-ascorbic acid uptake is also noticed for hSVCT2 using the same system, but the failure to associate it with an analogous change in the protein's subcellular localization was explained by a change in hSVCT2's conformation. Two potential N-linked glycosylation sites reside in the predicted extracellular loop between TMS3 and 4 of SVCT1 and SVCT2. SVCT1 also possesses a third one between TMS5 and TMS6.[27] Western analysis for rat SVCT2 revealed the existence of two bands, probably indicating different glycosylation states.[77] This has also been shown in the case of human SVCTs, where at least two putative sites are glycosylated *in vitro*, as shown from gel shifts of translation products in the presence or absence of microsomes.[27] A non-functional splice variant of SVCT1 is reported, that contains a four amino-acid insertion (VGLH) between E155 and V156.[32] Residing in the potential loop between TMS3 and 4, this region might be a critical structural component for the folding of the transporter, or the insertion could affect the efficiency of the potential glycosylation sites. A non functional splice variant of SVCT2, lacking TMS5 and TMS6 and part of TMS4, was shown to have a dominant negative phenotype regarding L-ascorbic acid uptake, when expressed simultaneously with the wild type SVCT2.[78] This might suggest regulation based on limiting protein–protein interactions. In MC3T3-E1 cells, PGE2 partially suppresses the dominant negative phenotype in a PKA dependent way. The latter was shown to physically interact with SVCT2, phosphorylating serines 402 and 639.[79] Using SVCT1-YFP fusions and a series of C-terminal truncated mutants, Subramanian *et al.*[80] defined a carboxy-terminal region of ten amino acid residues that dictates the apical plasma membrane targeting of the transporter in polarized epithelia. This region bears significant homology to known apical targeting motives found in other sodium dependent transporters. Finally, SVCT2 expression is stimulated in human platelets, in response to thrombin or phorbol esters, suggesting a translational control point for ascorbate uptake present in these unnucleated cells.[81]

4 Structure–function relationships

4.1 Substrate recognition and transport

Work from our laboratory has led to several conclusions concerning structure–function relationships in the UapA uric acid–xanthine transporter. An approach using chimeric

View Online

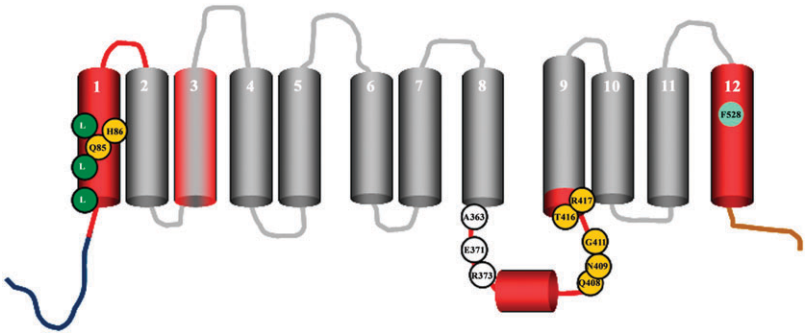


Fig. 3 Topology and structure–function relationships in a fungal NAT permease (UapA). Putative α-helical TMS are shown as cylinders. The three functional domains (TMS1 and its flanking loops, the long amphipathic segment between TMS8 and the beginning of TMS9, and TMS12) are shown in red, and correspond to the alignments shown in Fig. 1. Nearly absolutely conserved amino acids shown to affect the topogenesis (H86) or substrate recognition and transport (Q85, Q408, N409, G411, T416, R417) are shown as yellow circles. Residue F528 defining the selectivity-filter domain in TMS12 is shown as a turquoise circle. The LR affecting uric acid recognition is shown as green circles. Residues necessary for function are shown as colourless circles. TMS3, shown to interact genetically with TMS1, is also highlighted. The N- (in blue) and C- (ochre) tails, shown to be involved in ER-exit and post-translational inactivation and endocytosis, respectively, are predicted to be cytoplasmic.

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

UapA–UapC transporters has initially identified a relatively short segment,[7] including a putative transmembrane domain (TMS9) and its upstream segment of 61 amino acids, to be critical for the function and specificity of these purine transporters (see the revised topology model in Koukaki *et al.*[8] and Fig. 3). The segment between TMS8 and TMS9, which is of amphipathic nature, and thus of ambiguous topology, has subsequently been shown to include specific, conserved within the NAT family, amino acids that affect substrate binding and transport.[8,82] These functional amino acids constitute the so called NAT signature motif ([Q/E/P]^{408}-**N**-X-**G**-X-X-X-X-**T**-[R/K/G])^{417}, numbers refer to UapA in the revised sequence; Koukaki *et al.*, 2005[83]). Kinetic analysis of site-directed UapA mutants using a plethora of possible purine substrates has provided evidence that this motif is part of the substrate translocation pathway.[8,83] More specifically, Q408 was proposed to be able to interact with position N9 of the imidazol ring of purines, N409 was shown to be absolutely necessary for transport catalysis, while G411 affects the function and specificity of this motif probably indirectly. *In silico* predictions and a search in structural databases strongly suggested that these functional residues (Q^{408}N^{409}XG^{411}) should form a loop, probably including a β-turn.

The role of the NAT signature motif and its flanking regions was studied also by site-directed mutagenesis and cysteine-scanning in YgfO, the *E. coli*[13,83,84] functional homologue of UapA. The first approach showed that Q324 (equivalent to Q408 in UapA) replacements yielded normal permease expression levels, but very low (changes to E, N) or no detectable activity (A, P, or C). The detectably active mutants Q324N and Q324E had very low affinity for xanthine (15-fold higher K_m than wild type) and impaired binding affinity for any substrate analogue. These data suggested that high affinity binding of the purine substrate requires both the presence and correct geometry of a carbonyl group of Q324. Regarding N325 (N409 in UapA), all YgfO replacements (D, Q, S, T, C or A) had no activity, showing that this is a strictly irreplaceable residue with respect to active transport. Finally, substitutions of G327 (G411 in UapA) with A, P or C resulted in very high xanthine uptake, with a slightly lower K_m. It appears that this residue is not crucial for YgfO function, but is most important in determining its kinetics and specificity. Such conclusions on the functional role of the Q324, N325 and G327 residues in YgfO are impressively similar to the ones concerning the homologous residues (Q408, N409 and G411) of UapA. The role of the other two conserved residues in the NAT motif of UapA or YgfO (T416 and R417 or T332 and G333, respectively) was also investigated and shown to play an auxiliary role in uptake specificity, especially in respect to recognition of uric acid or other substrates modified at positions 7 and 8 of the imidazole ring.[13,83]

In the second approach, using a functional YgfO transporter devoid of cysteine residues (C-less), each amino acid residue in the sequence ^{315}GSLPITTFA**QNNG**VIQM**TG**-VASRYVG^{340}, including the NAT motif, had been replaced individually with Cys. Five of the 26 single Cys mutants (L317C, T320C, T321C, I329C and T332C) displayed low but significant uptake rates (10–25% of the Cys-less YgfO), while mutants P318C, F322C, Q324C, N325C, N3262C and G340C displayed no detectable xanthine uptake rates. Immunoblotting of tagged single-Cys YgfO showed that most mutants, except P318C and G340C, are normally expressed in the plasma membrane. The effect of NEM (*N*-ethylmaleimide), a membrane-permeable sulfhydryl reagent, on the initial rate of xanthine transport and alkylation analysis of each single Cys-mutant in the sequence 315–340, showed that residues A323, N326, G327, V328, I329, T332, G333 and S336 tolerate replacement with Cys but undergo strong inhibition upon further modification by NEM. The most plausible explanation for this is that these residues are involved in the conformational changes involved in transport catalysis or in permease stability and turnover. Interestingly, the NEM reactivity of mutant A323C is greatly enhanced in the presence of xanthine, which strongly suggested that this segment of residues is conformationally active and undergoes movements associated with the permease turnover. Finally, the Cys-scanning analysis provided evidence that residues 329–339 downstream of the NAT motif form three turns of an α-helix, with residues I329, T332, G333, S336 and V339 falling on an alkylation-sensitive face that is important for transport.[84] These findings suggested that the putative transmembrane

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2008

View Online

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

helix after the NAT motif should be extended by two additional helical turns within the preceding hydrophilic loop.

Taking advantage of the fact that *A. nidulans* uses purines as its sole nitrogen source, which in turn allows the direct genetic selection of mutants affecting purine transport, UapA-specific alleles affecting the specificity of UapA have also been isolated and subsequently further analysed by systematic targeted mutagenesis. This genetic approach led to the identification of two novel *domains* that, in collaboration with the NAT motif, define the function and specificity of this transporter. The first domain was originally defined by residue F528 within TMS12[85] and also by a second recently identified nearby amino acid (I. Papageorgiou, C. Gournas, A. Pantazopoulou, S. Amillis, A. Vlanti and G. Diallinas, in preparation). When these residues are replaced with small or aliphatic amino acids, UapA is converted into a low-affinity, high-capacity transporter for all kinds of purines, without affecting its high-affinity for the physiological substrates uric acid and xanthine[74] (I. Papageorgiou, C. Gournas, A. Pantazopoulou, S. Amillis, A. Vlanti and G. Diallinas, in preparation). In other words, TMS12 residues create a very efficient *selectivity filter*, which excludes purines other than uric acid and xanthine from the binding site of UapA. Once the filter is "removed", UapA can still bind (at 5–10 μM) and transport its physiological substrates as effectively as the wild-type, but can also bind and transport adenine, hypoxanthine guanine and other purine analogues, when these are supplied at mM concentrations. Interestingly, allele-specific combinations of mutations in TMS12 with substitutions of Q408 or N409[74] (I. Papageorgiou, C. Gournas, A. Pantazopoulou, S. Amillis, A. Vlanti and G. Diallinas, in preparation), two residues proposed to be involved in purine binding and transport, lead to an array of UapA molecules with different kinetic and specificity profiles, suggesting that a molecular cross-talk of the purine binding site defined by the NAT signature motif and the selectivity filter in TMS12 determines UapA kinetics and specificity. Interestingly, TMS12 residues in YgfO, corresponding to the *selectivity* residues in UapA, have been found to be absolutely critical for function, but not for substrate selectivity.[86] Very recently, the same authors have also shown that residues clustering in one side of helices TMS9 and TMS12 are highly sensitive to site-directed alkylation, and that TMS8, TMS9 and TMS12 might interact functionally and probably physically.

The second domain affecting UapA kinetics and specificity is the segment including TMS1 and its immediate flanking residues. Mutations selected randomly, but also through systematic *in vitro* mutagenesis, have shown that specific residues, all mapping at one side of the α-helical wheel projection of TMS1, are critical for the exclusion of purines, other than uric acid and xanthine, from the substrate binding site, and for the high-affinity for uric acid exhibited by UapA[9] (I. Papageorgiou, C. Gournas, A. Pantazopoulou, S. Amillis, A. Vlanti and G. Diallinas, in preparation). Interestingly, one of these residues (Q85) is part of the short absolutely conserved QH motif, used as a criterion for identifying NAT homologues (see earlier), while all others are not conserved in the NAT family.

In conclusion, two domains in NAT proteins from bacteria and fungi have been shown to include determinants affecting substrate binding and transport; the NAT motif and TMS12. The work on UapA has further revealed that a third domain, TMS1, can also affect substrate selection and transport. Mutations in any of the three functional domains in UapA not only modify its specificity and transport kinetics, but also show allele-specific interactions. Two aspects of this molecular cross-talk should be particularly noted. The first is that mutations in the NAT signature motif can severely modify or inactivate the function of UapA, while mutations in the other two domains can only modify UapA kinetics and specificity. This is compatible with the notion that the NAT signature motif domain is part of the *bona fide* substrate binding site, while the two other domains play a fine role in the regulation of substrate recognition and transport. The second aspect to be noted is that this intramolecular interaction is the basis for the build-up of a unique NAT member (UapA), which has an exceptionally high affinity for uric acid uptake, a feature not common in YgfO or other fungal or bacterial members. Several mutations, mapping in any of three domains identified, can lead to reduced affinity specifically for uric acid. In other words, such mutations can lead to UapA versions that have uric acid affinities similar to those of other fungal NATs. A series of UapA–UapC chimeric molecules further supports the uniqueness of interactions in the UapA molecule (manuscript in preparation). Finally, we cannot exclude that other domains might play a role in UapA function or selectivity. However, the fact that different genetic screens, based on the direct isolation of functional or selectivity mutants, led us, in some cases repeatedly, to amino acid residues mapping in the three domains described above, makes us believe that the domains identified include the basic elements for determining substrate UapA function.

4.2 *cis*-Acting elements affecting folding and topogenesis

All mutations concerning substrate recognition, discussed above, do not affect the folding and topology of UapA, as this is revealed by following the subcellular localisation of UapA using a GFP tag. Specific segments affecting the folding and topology of UapA have been identified in the N- and C-termini, within TMS1, TMS3, upstream from the NAT signature motif and in TMS12 (see Fig. 3). In the N-terminus and close to the NAT signature motif we have located determinants necessary for ER-exit and protein stability (S. Amillis, A. Vlanti, I. Papageorgiou, C. Gournas, A. Pantazopoulou and G. Diallinas, unpublished). The C-terminus was found to be necessary for ammonium-induced or substrate-induced endocytosis (S. Amillis, A. Vlanti and G. Diallinas, unpublished). Within TMS1, H86 is critical for the subcellular trafficking of UapA, as different amino acid substitutions lead to different topogenetic defects.[9] For example, UapA-H86D is retained in the ER, UapA-H86A is localised in punctuate granules instead of the plasma membrane, UapA-H86K is mostly found in vacuoles, while UapA-H86N has a wild-type plasma membrane topology. H86 is absolutely conserved in all NATs and maps in the α-helical side of TMS1 opposite from the side that includes amino acids affecting substrate recognition (see above and Fig. 3). The side of TMS1 including H86 should interact with TMS3, as H86D mutation is suppressed

View Online

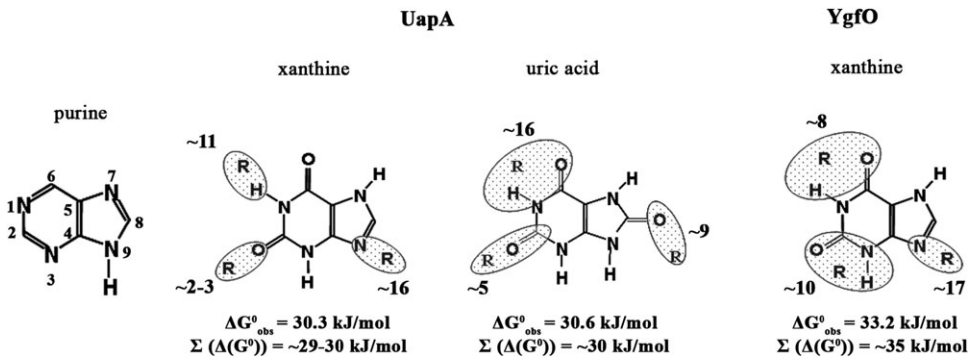


Fig. 4 NAT–substrate interactions modelled kinetically. ΔG^0 values are calculated from K_is [(K_i = IC_{50}/[1 + (L/K_m)], see text]. *R* stands for an amino acid in the transporter interacting, *via* a H-bond, with a specific purine position.

Downloaded by University of Washington on 07 April 2011
Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B

by mutations in TMS3[9] (I. Papageorgiou, C. Gournas, A. Pantazopoulou, S. Amillis, A. Vlanti and G. Diallinas, in preparation). Finally, the presence of all α-helical TMSs seems necessary for proper folding, as truncated versions of UapA lacking TMS1, TMS2 or TMS12 are ER-retained (ref. 74 and unpublished). While ER-retention in those cases might simply reflect a general misfolding of UapA, the phenotypes of missense mutations in H86 or of a couple of recently analysed residues, suggest that specific amino acids might act as *cis*-acting determinants controlling UapA topogenesis. The absolute conservation of these residues in all NATs further supports this idea.

5 Kinetic modelling of NAT–substrate interactions

Analogues of purine and pyrimidine nucleobases are being widely used as antimetabolites against a host of different diseases and infections, ranging from anti-tumour and leukaemia chemotherapy (5-fluorouracil, 6-mercaptopurine, thioguanine) and anti-viral compounds (acyclovir, ganciclovir, carbovir) to antibiotics and drugs against parasitic disease (*e.g.* allopurinol, pyrimethamine) and even for the prevention of organ transplant rejection (azathioprine) and the treatment of gout (allopurinol).[87] Kinetic and genetic analyses of nucleobase transporters in bacterial and fungal model systems, where a given protein can be studied in a genetic background lacking all other related transporters, can lead to modelling of transporter–substrate interactions. Such models can be tested by reverse genetics and be used to understand the functioning of nucleobase transporters of pathogenic fungi and bacteria. This knowledge can, in the long run, constitute an essential step in predicting the use or/and design of purine-based antifungals that will not be taken up by the analogous transporters of the infected host tissues.

In our lab, using appropriate genetic backgrounds, we have performed detailed kinetic analyses of substrate binding by several fungal NATs, such as the *A. nidulans* UapA,[83] the *A. fumigatus* UapC[88] and the *C. albicans* Xut1p.[89] The rationale of this approach has also been used successfully to define transporter–substrate interactions for protozoan and mammalian nucleobase and nucleoside transporters.[12,90] In brief, using a rich collection of purines and purine analogues, K_i values for compounds inhibiting the uptake of radiolabelled xanthine were determined from full dose–response curves. Gibbs free energies ΔG^0 were then calculated from $\Delta G^0 = -RT\ln(K_i)$, where R is the ideal gas constant and T is the absolute temperature (°K). By comparing the difference in ΔG^0s in the interaction of two putative substrates differing at a single position each time (*e.g.* xanthine *versus* 2-thioxanthine or adenine *versus* 3-deazadenine), the contribution of this position in binding was estimated. Taking into account losses due to possible steric hindrance or due to loss of planarity, and the structure of preferred tautomeric forms of substrates, we could develop models describing the interactions of nucleobase transporters with possible substrates. A summary of all these models is given in Fig. 4. Analogous models have been constructed in collaboration with Frillingos' group for the *E. coli* YgfO permease.[83] By comparing the kinetic models of the different NAT carriers some important differences have been established. For example, the substrate binding sites of YgfO and UapA, despite sharing similarities with respect to the overall contribution of the pyrimidine part of xanthine in binding, also display fine differences in the binding energies assigned to different positions of the pyrimidine ring. The most prominent difference however is the inability of YgfO to bind uric acid or purine analogues substituted at positions 7 or 8, illustrating the key role of position 8 in different substrate binding orientations.

From such models some predictions could be drawn in respect to possible nucleobase-related analogues that can be used to target fungi. For example, it seems that a major difference between fungal transporters analyzed and analogous human transporters is the involvement of N3 in substrate binding.[90,91] Fungal NATs do not seem to use N3 to bind uric acid, xanthine or their analogues. This leads to the prediction that xanthine analogues with N3 substitutions might be good substrates specifically for fungal NATs. It is known that N3-substituted analogues are channeled to nucleic acid synthesis and can be used at low concentrations as specific antiviral inhibitors.[92,93] Similarly, 3-deazapurines and their analogues might also be efficient drugs against pathogenic fungi.

6 Summary

The nucleobase–ascorbate transporters (NATs) constitute an ancient and ubiquitous family of high-affinity, high-capacity permeases, which in bacteria, fungi and plants, and possibly in metazoa, mediate H^+/uric acid/xanthine or H^+/uracil

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2008

View Online

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

transport, while in vertebrates can also transport Na^+/ascorbic acid. NAT-mediated purine or pyrimidine uptake in microorganisms and plants seems to serve both catabolic and anabolic needs, but recent evidence suggests that NAT-mediated uric acid redistribution in plant or fungal structures might play a critical role for development and reproduction. In mammals, NAT-mediated ascorbic acid transport is essential for brain development and life. Eukaryotic NATs are regulated both at a transcriptional level in response to physiological and developmental signals and at a post-translational level. In fungi, this latter control is mainly exerted by regulated endocytosis and probably recycling to the plasma membrane. Using bacterial and mostly fungal paradigms, structure–function relationships of NATs have been dissected by classical and reverse genetics, Cys-scanning mutagenesis and analysis of chimeric molecules. These studies have led to the idea that three distinct domains interact to define the function and specific features of NAT specificity. These are: (i) TMS1 and its flanking loops, (ii) the NAT signature motif domain including a long amphipathic segment and the following TMS9, and (iii) TMS12. Mutations in any of these domains modify NAT specificity and transport kinetics, while combinations of mutations show allele-specific interactions revealing an intramolecular cross-talk between the three domains. This intramolecular cross-talk is the basis for increased selectivity and for the unique high affinity for uric acid, which is observed in some fungal homologues. Finally, bacterial (*Escherichia coli*) and fungal (*Aspergillus nidulans*) model systems have allowed the rigorous kinetic study of NATs in genetic backgrounds lacking all other related transporters, and thus led to modeling of transporter–substrate interactions, which should constitute an essential step in predicting the use and/or design of purine-based antimicrobials.

Acronyms

NAT, nucleobase–ascorbate transporter; NCS2, nucleobase–cation symporter 2; MFS, major facilitator superfamily; GFP, green fluorescent protein; K_m, Michaelis affinity constant; K_i, Michaelis inhibiton constant; V_m, maximum uptake rate; TMS, transmembrane segment; UV, ultraviolet; NEM, *N*-ethylmaleimide; ΔG^0, Gibbs free energy.

Acknowledgements

We thank members of our lab and especially Sotiris Amillis, Foivos Borbolis, Sophia Goudela, Areti Pantazopoulou, Anna Vlanti and Dimitris Hatzinikolaou for sharing unpublished results and critically reading the manuscript. Work in the lab of G.D. was supported by grants PENED 2003 and Greece–German Bilateral Collaboration 2004, co-financed by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

References

1 G. Diallinas and C. Scazzocchio, *Genetics*, 1989, **122**, 341–350.
2 L. Gorfinkiel, G. Diallinas and C. Scazzocchio, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 23376–23381.
3 G. Diallinas, L. Gorfinkiel, H. N. Arst, Jr, G. Cecchetto and C. Scazzocchio, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 8610–8622.
4 P. S. Andersen, D. Frees, R. Fast and B. Mygind, *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 2008–2013.
5 R. J. Turner, Y. Lu and R. L. Switzer, *J. Bacteriol.*, 1994, **176**, 3708–3722.
6 A. Pantazopoulou and G. Diallinas, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2007, **31**, 657–675.
7 G. Diallinas, J. Valdez, V. Sophianopoulou, A. Rosa and C. Scazzocchio, *EMBO J.*, 1998, **17**, 3827–3837.
8 M. Koukaki, A. Vlanti, S. Goudela, A. Pantazopoulou, H. Gioule, S. Tournaviti and G. Diallinas, *J. Mol. Biol.*, 2005, **350**, 499–513.
9 A. Pantazopoulou and G. Diallinas, *Mol. Membr. Biol.*, 2006, **23**, 337–348.
10 I. Sobczak and J. S. Lolkema, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005, **8**, 161–167.
11 E. Argyrou, V. Sophianopoulou, N. Schultes and G. Diallinas, *Plant Cell*, 2001, **13**, 953–964.
12 H. de Koning and G. Diallinas, *Mol. Membr. Biol.*, 2000, **17**, 75–94.
13 P. Karatza and S. Frillingos, *Mol. Membr. Biol.*, 2005, **22**, 251–261.
14 A. Pantazopoulou, N. D. Lemuh, D. G. Hatzinikolaou, C. Drevet, G. Cecchetto, C. Scazzocchio and G. Diallinas, *Fungal Genet. Biol.*, 2007, **44**, 627–640.
15 A. J. Darlington and C. Scazzocchio, *J. Bacteriol.*, 1967, **93**, 937–940.
16 N. P. Schultes, T. P. Brutnell, A. Allen, S. L. Dellaporta, T. Nelson and J. Chen, *Plant Cell*, 1996, **8**, 463–475.
17 V. G. Maurino, E. Grube, J. Zielinski, A. Schild, K. Fischer and U.-I. Flugge, *Plant Cell Physiol.*, 2006, **47**, 1381–1393.
18 J. Valdez-Taubas, G. Diallinas, C. Scazzocchio and A. L. Rosa, *Fungal Genet. Biol.*, 2000, **30**, 105–113.
19 J. Valdez-Taubas, L. Harispe, C. Scazzocchio, L. Gorfinkiel and A. L. Rosa, *Fungal Genet. Biol.*, 2004, **41**, 42–51.
20 J. L. Mooney and L. N. Yager, *Genes Dev.*, 1990, **4**, 1473–1482.
21 A. Ringvold, E. Anderssen and I. Kjonniksen, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 2000, **41**, 2067–2069.
22 S. C. Rumsey, R. Daruwala, H. Al-Hasani, M. J. Zarnowski, I. A. Simpson and M. A. Levine, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 28246–28253.
23 S. C. Rumsey, O. Kwon, G. W. Xu, C. F. Burant, I. Simpson and M. Levine, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 18982–18989.
24 R. Daruwala, J. Song, W. S. Koh, S. C. Rumsey and M. Levine, *FEBS Lett.*, 1999, **460**, 480–484.
25 H. Tsukaguchi, T. Tokui, B. Mackenzie, U. V. Berger, X.-Z. Chen, Y. Wang, R. F. Brubaker and M. A. Hediger, *Nature*, 1999, **399**, 70–75.
26 H. Takanaga, B. Mackenzie and M. Hediger, *Pfluegers Arch.*, 2004, **447**, 677–682.
27 Y. Wang, B. Mackenzie, H. Tsukaguchi, S. Weremowicz, C. C. Morton and M. A. Hediger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, **267**, 488–494.
28 P. Eck, H. C. Erichsen, J. G. Taylor, M. Yeager, A. L. Hughes, M. Levine and S. J. Chanock, *Hum. Genet.*, 2004, **115**, 285–294.
29 C. A. Stratakis, S. E. Taymans, R. Daruwala, J. Song and M. Levine, *J. Med. Genet.*, 2000, **37**, e20.
30 H. C. Erichsen, P. Eck, M. Levine and S. Chanock, *J. Nutr.*, 2001, **131**, 2623–2627.
31 S. A. Rubin, S. Dey and J. C. Reidling, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1732**, 76–81.
32 H. Wang, B. Dutta, W. Huang, L. D. Devoe, F. H. Leibach, V. Ganapathy and P. D. Prasad, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1461**, 1–9.
33 S. Sotiriou, S. Gispert, J. Cheng, Y. Wang, A. Chen, S. Hoogstraten-Miller, G. F. Miller, O. Kwon, M. Levine, S. H. Guttentag and R. L. Nussbaum, *Nat. Med.*, 2002, **8**, 514–517.
34 C. Biondi, B. Pavan, A. Dalpiaz, S. Medici, L. Lunghi and F. Vesce, *Mol. Hum. Reprod.*, 2007, **13**, 77–83.
35 H. C. Erichsen, S. A. M. Engel, P. K. Eck, R. Welch, M. Yeager, M. Levine, A. M. Siega-Riz, A. F. Olshan and S. J. Chanock, *Am. J. Epidemiol.*, 2006, **163**, 245–254.
36 S. Qiu, L. L. Edwin, J. Weeber and J. M. May, *J. Neurosci. Res.*, 2007, **85**, 1046–1056.
37 M. Obrenovich, X. Fan, M. Satake, S. Jarvis, L. Reneker, J. Reddan and V. Monnier, *Mol. Cell. Biochem.*, 2006, **293**, 53–62.

View Online

38 S. R. Bornstein, M. Yoshida-Hiroi, S. Sotiriou, M. Levine, H.-G. Hartwig, R. L. Nussbaum and G. Eisenhofer, *FASEB J.*, 2003, **17**, 1928–1930.
39 P. Patak, H. S. Willenberg and S. R. Bornstein, *Endocr. Res.*, 2004, **30**, 871–875.
40 X. Wu, N. Itoh, T. Taniguchi, J. Hirano, T. Nakanishi and K. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, **317**, 1159–1164.
41 A. L. McNulty, T. P. Vail and V. B. Kraus, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1712**, 212–221.
42 J. Lee, C. Oh, G. Mun, J. Kim, Y. Chung, Y. Hwang, D. Shin and W. Lee, *Histochem. Cell Biol.*, 2006, **126**, 491–494.
43 I. Savini, A. Rossi, C. Pierro, L. Avigliano and M. V. Catani, *Amino Acids*, DOI: 10.1007/s00726-007-0555-7.
44 A. Godoy, V. Ormazabal, G. Moraga-Cid, F. A. Zuniga, P. Sotomayor, V. Barra, O. Vasquez, V. Montecinos, L. Mardones, C. Guzman, M. Villagran, L. G. Aguayo, S. A. Onate, A. M. Reyes, J. G. Carcamo, C. I. Rivas and J. C. Vera, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 615–624.
45 W. J. Liang, D. Johnson and S. M. Jarvis, *Mol. Membr. Biol.*, 2001, **18**, 87–95.
46 D. P. Rajan, W. Huang, B. Dutta, L. D. Devoe, F. H. Leibach, V. Ganapathy and P. D. Prasad, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, **262**, 762–768.
47 S. C. Rumsey, R. W. Welch, H. M. Garraffo, P. Ge, S.-F. Lu, A. T. Crossman, K. L. Kirk and M. Levine, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 23215–23222.
48 B. N. Ames, R. Cathcart, E. Schwiers and P. Hochstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, **78**, 6858–6862.
49 H. R. Massie, M. E. Shumway and S. J. Whitney, *Exp. Gerontol.*, 1991, **26**, 609–614.
50 A. J. Hilliker, B. Duyf, D. Evans and J. P. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992, **89**, 4343–4347.
51 A. G. Reaume, D. A. Knecht and A. Chovnick, *Genetics*, 1991, **129**, 1099–1109.
52 S. Amillis, G. Cecchetto, V. Sophianopoulou, M. Koukaki, C. Scazzocchio and G. Diallinas, *Mol. Microbiol.*, 2004, **52**, 205–216.
53 L. Pendyala and A. M. Wellman, *J. Bacteriol.*, 1977, **131**, 453–462.
54 U. H. Tazebay, V. Sophianopoulou, C. Scazzocchio and G. Diallinas, *Mol. Microbiol.*, 1997, **24**, 105–117.
55 S. Amillis, Z. Hamari, K. Roumelioti, C. Scazzocchio and G. Diallinas, *Mol. Membr. Biol.*, 2007, **24**, 206–214.
56 A. Vlanti and G. Diallinas, *Mol. Microbiol.*, in press.
57 H. Forsberg and P. O. Ljungdahl, *Mol. Cell. Biol.*, 2001, **21**, 814–826.
58 C. Scazzocchio, *Genetics*, 1982, **100**, 185–208.
59 C. Scazzocchio, *Prog. Ind. Microbiol.*, 1994, **29**, 221–257.
60 G. Cecchetto, S. Amillis, G. Diallinas, C. Scazzocchio and C. Drevet, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 3132–3141.
61 T. Suarez, M. V. de Queiroz, N. Oestreicher and C. Scazzocchio, *EMBO J.*, 1995, **14**, 1453–1467.
62 B. Kudla, M. X. Caddick, T. Langdon, N. M. Martinez-Rossi, C. F. Bennett, S. Sibley, R. W. Davies and H. N. Arst, *EMBO J.*, 1990, **9**, 1355–1364.
63 A. Platt, A. Ravagnani, H. Arst, D. Kirk, T. Langdon and M. X. Caddick, *Mol. Gen. Genet.*, 1996, **250**, 106–114.
64 I. Y. Morozov, M. Galbis-Martinez, M. G. Jones and M. X. Caddick, *Mol. Microbiol.*, 2001, **42**, 269–277.
65 A. Ravagnani, L. Gorfinkiel, T. Langdon, G. Diallinas, E. Adjadj, S. Demais, D. Gorton, H. N. Arst and C. Scazzocchio, *EMBO J.*, 1997, **16**, 3974–3986.
66 M. I. Muro-Pastor, R. Gonzalez, J. Strauss, F. Narendja and C. Scazzocchio, *EMBO J.*, 1999, **18**, 1584–1597.
67 I. Fujita, J. Hirano, N. Itoh, T. Nakanishi and K. Tanaka, *Br. J. Nutr.*, 2001, **86**, 145–149.
68 X. Wu, N. Itoh, T. Taniguchi, T. Nakanishi, Y. Tatsu, N. Yumoto and K. Tanaka, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **420**, 114–120.
69 I. Savini, M. Valeria Catani, G. Duranti, R. Ceci, S. Sabatini and L. Avigliano, *Free Radical Biol. Med.*, 2005, **38**, 898–907.
70 U. V. Berger, X. C. Lu, W. Liu, Z. Tang, B. S. Slusher and M. A. Hediger, *J. Neurochem.*, 2003, **86**, 896–906.
71 L. MacDonald, A. E. Thumser and P. Sharp, *Br. J. Nutr.*, 2002, **87**, 97–100.
72 S. J. Dixon and J. X. Wilson, *J. Bone Miner. Res.*, 1992, **7**, 675–681.
73 A. Karaczyn, S. Ivanov, M. Reynolds, A. Zhitkovich, K. S. Kasprzak and S. Konstantin, *J. Cell. Biochem.*, 2006, **97**, 1025–1035.
74 A. Vlanti, S. Amillis, M. Koukaki and G. Diallinas, *J. Mol. Biol.*, 2006, **357**, 808–819.
75 M. A. Penalva, *Fungal Genet. Biol.*, 2005, **42**, 963–975.
76 W.-J. Liang, D. Johnson, L.-S. Ma and S. M. Jarvis, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.*, 2002, **283**, C1696–1704.
77 M. D. L. A. Garcia, K. Salazar, C. Millan, F. Rodriguez, H. Montecinos, T. Caprile, C. Silva, C. Cortes, K. Reinicke, J. C. Vera, L. G. Aguayo, J. Olate, B. Molina and F. Nualart, *Glia*, 2005, **50**, 32–47.
78 E. A. Lutsenko, J. M. Carcamo and D. W. Golde, *Mol. Cell. Biol.*, 2004, **24**, 3150–3156.
79 X. Wu, L. H. Zeng, T. Taniguchi and Q. M. Xie, *Cell Death Differ.*, 2007, **14**, 1792–1801.
80 V. S. Subramanian, J. S. Marchant, M. J. Boulware and H. M. Said, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 27719–27728.
81 I. Savini, M. V. Catani, R. Arnone, A. Rossi, G. Frega, D. Del Principe and L. Avigliano, *Free Radical Biol. Med.*, 2007, **42**, 608–616.
82 C. Meintanis, A. D. Karagouni and G. Diallinas, *Mol. Membr. Biol.*, 2000, **17**, 47–57.
83 S. Goudela, P. Karatza, M. Koukaki, S. Frillingos and G. Diallinas, *Mol. Membr. Biol.*, 2005, **22**, 263–275.
84 P. Karatza, P. Panos, E. Georgopoulou and S. Frillingos, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 39881–39890.
85 S. Amillis, M. Koukaki and G. Diallinas, *J. Mol. Biol.*, 2001, **313**, 765–774.
86 E. Georgopoulou, G. Mermelekas, E. Karena, P. Karatza, P. Panos and S. Frillingos, *FEBS J.*, 2007, **274 Supplement 1**, 121.
87 G. B. Elion, *Science*, 1989, **244**, 41–47.
88 S. Goudela, U. Reichard, S. Amillis and G. Diallinas, *Fungal Genet. Biol.*, 2008, **45**, 459–472.
89 S. Goudela, H. Tsilivi and G. Diallinas, *Mol. Membr. Biol.*, 2006, **23**, 291–303.
90 L. J. M. Wallace, D. Candlish and H. P. De Koning, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 26149–26156.
91 M. Kraupp and R. Marz, *Gen. Pharmacol.*, 1995, **26**, 1185–1190.
92 S. Shigeta, K. Konno, T. Yokota, K. Nakamura and E. De Clercq, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, **32**, 906–911.
93 G. Andrei and E. De Clercq, *Antiviral Res.*, 1990, **14**, 287–299.
94 M. Momany, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2002, **5**, 580–585.
95 C. P. Corpe, J.-H. Lee, O. Kwon, P. Eck, J. Narayanan, K. L. Kirk and M. Levine, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 5211–5220.
96 A. Dalpiaz, B. Pavan, M. Scaglianti, F. Vitali, F. Bortolotti, C. Biondi, A. Scatturin and S. Manfredini, *Int. J. Pharm.*, 2005, **291**, 171–181.
97 A. Dalpiaz, B. Pavan, M. Scaglianti, F. Vitali, F. Bortolotti, C. Biondi, A. Scatturin, S. Tanganelli, L. Ferraro, P. Prasad and S. Manfredini, *J. Pharm. Sci.*, 2004, **93**, 78–85.
98 A. Dalpiaz, B. Pavan, S. Vertuani, F. Vitali, M. Scaglianti, F. Bortolotti, C. Biondi, A. Scatturin, S. Tanganelli, L. Ferraro, G. Marzola, P. Prasad and S. Manfredini, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005, **24**, 259–269.

Published on 11 March 2008 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B719777B
Downloaded by University of Washington on 07 April 2011

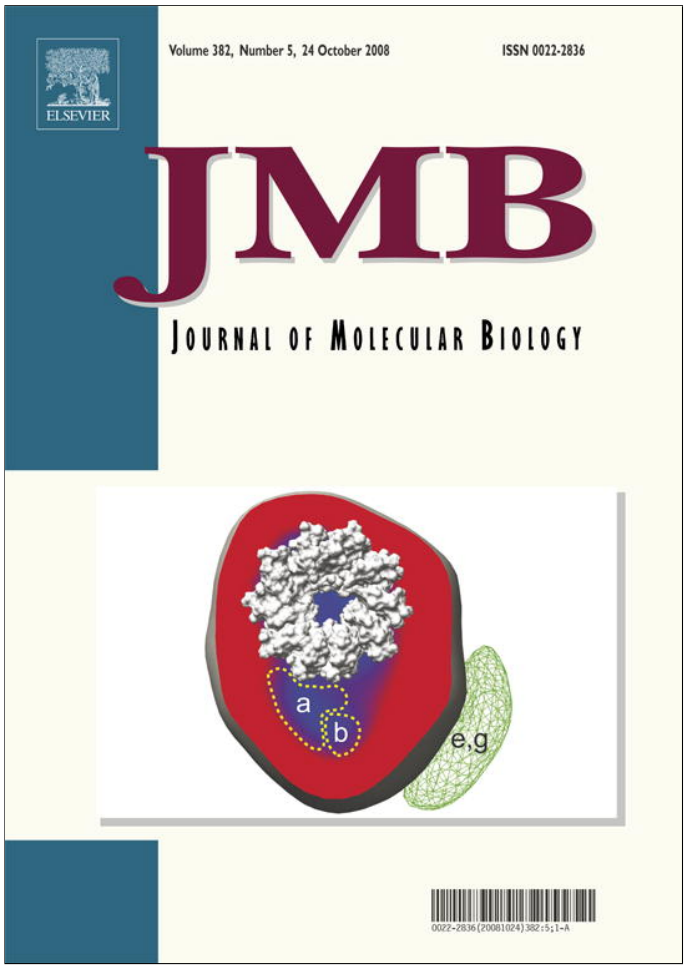
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2008

Εξειδικευμένες ενδομοριακές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις καθορίζουν την μοναδική για τους NAT μεταφορείς εξειδίκευση του UapA

Ιωάννης Παπαγεωργίου, **Χρήστος Γουρνάς, Άννα Βλαντή, Σωτήρης Αμίλλη και Γεώργιος Διαλλινάς**

Ο UapA μεταφορέας ουρικού οξέος-ξανθίνης του *Aspergillus nidulans* έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας της πανταχού παρούσας οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού οξέος (NAT). Με χρήση νέων γενετικών επιλεκτικών συνθηκών, ορθολογικού σχεδιασμού μεταλλαγμένων αλληλίων, χιμαιρικών NAT μορίων και εκτεταμένης ανάλυσης της κινητικής της πρόσληψης, δείχνουμε πως δυναμικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τριών διακριτών επικρατειών, του πρώτου (1) διαμεμβρανικού τμήματος (TMS), της θηλιάς μεταξύ των TMS8 και 9 και του TMS12, καθορίζουν την λειτουργία και εξειδίκευση του UapA. Η θηλιά μεταξύ των TMS8 και 9 περιλαμβάνει τέσσερα αμινοξικά κατάλοιπα απολύτως απαραίτητα για τη δέσμευση και μεταφορά του υποστρώματος (Glu356, Asp388, Gln408, and Asn409), ενώ τα TMS1 και TMS12 φαίνεται να ελέγχουν, μέσω στερεοειδικής παρεμπόδισης ή ηλεκτροστατικής απώθησης, τη διαφορική πρόσβαση των πουρινών στην επικράτεια της TMS8-9 θηλιάς. Άρα, η εξειδίκευση του UapA καθορίζεται άμεσα με εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος με την θηλιά TMS8-9 και έμμεσα με τις αλληλεπιδράσεις της θηλιάς με τα TMS1 και TMS12. Τέλος δείχνουμε πως η ενδομοριακή συνέργια μεταξύ των επικρατειών του UapA είναι πολύ εξειδικευμένη και προτείνουμε πως αποτελεί τη βάση για την εξέλιξη της μοναδικής μεταξύ των NAT υψηλής εξειδίκευσης του UapA για το ουρικό οξύ, μια ιδιότητα που δεν παρατηρείται στα υπόλοιπα μελετημένα μέλη της NAT.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Author's personal copy

doi:10.1016/j.jmb.2008.08.005 *J. Mol. Biol.* (2008) **382**, 1121–1135

JMB

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

ELSEVIER

Specific Interdomain Synergy in the UapA Transporter Determines Its Unique Specificity for Uric Acid among NAT Carriers

Ioannis Papageorgiou, Christos Gournas, Anna Vlanti, Sotiris Amillis, Areti Pantazopoulou and George Diallinas*

Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis 15781, Athens, Greece

Received 3 July 2008; received in revised form 4 August 2008; accepted 4 August 2008
Available online 7 August 2008

UapA, a uric acid–xanthine permease of *Aspergillus nidulans*, has been used as a prototype to study structure–function relationships in the ubiquitous nucleobase–ascorbate transporter (NAT) family. Using novel genetic screens, rational mutational design, chimeric NAT molecules, and extensive transport kinetic analyses, we show that dynamic synergy between three distinct domains, transmembrane segment (TMS)1, the TMS8–9 loop, and TMS12, defines the function and specificity of UapA. The TMS8–9 loop includes four residues absolutely essential for substrate binding and transport (Glu356, Asp388, Gln408, and Asn409), whereas TMS1 and TMS12 seem to control, through steric hindrance or electrostatic repulsion, the differential access of purines to the TMS8–9 domain. Thus, UapA specificity is determined directly by the specific interactions of a given substrate with the TMS8–9 loop and indirectly by interactions of this loop with TMS1 and TMS12. We finally show that intramolecular synergy among UapA domains is highly specific and propose that it forms the basis for the evolution of the unique specificity of UapA for uric acid, a property not present in other NAT members.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Edited by J. Karn

Keywords: chimeras; kinetics; mutations; permease; specificity

Introduction

The nucleobase–ascorbate transporters (NATs) constitute a ubiquitous family of carriers,[1] of which UapA, the uric acid–xanthine permease of the model fungus *Aspergillus nidulans*, is the prototype member.[2–4] UapA has become the major model towards understanding several aspects of the biology of this family of permeases. At present, the function and specificities of 17 more NAT proteins from bacteria, fungi, plants, and mammals are known. All non-mammalian members studied transport xanthine and/or uric acid (bacteria, fungi, and plants) or uracil (bacteria), through a H^+ symport mechanism. In contrast, the mammalian NATs (SVCT1 and SVCT2) transport very specifically L-ascorbate/Na^+, rather than nucleobases and H^+.[5] Interestingly, no NAT member of known function is specific for the salvageable purines adenine, guanine, or hypoxanthine. K_m values of NATs range from 2 to 8 μM for xanthine, from 7 to 130 μM for uric acid, and from 8 to 237 μM for ascorbate.[1,6]

NAT members, all of which are predicted to contain 12 α-helical transmembrane segments (TMSs) and cytoplasmically located N- and C-tails, are characterized by two highly conserved amino acid sequence motifs (Fig. 1). The first, [Q/E/P]-N-X-G-X_4-T-[R/K/G] (where X is a hydrophobic amino acid), is located in the long amphipathic loop between TMS8 and TMS9 (see Fig. 1). This consensus sequence, called the NAT signature motif, has been studied mostly in UapA as well as in the *Escherichia coli* YgfO xanthine permease.[8–12] Kinetic analyses of site-directed UapA and YgfO mutants using a number of possible purine substrates, as well as cysteine-scanning mutagenesis in YgfO,[7] have provided evi-

*Corresponding author. E-mail address: diallina@biol.uoa.gr.

Present address: A. Pantazopoulou, Centro de Investigaciones Biologicas, Madrid, Spain.

Abbreviations used: NAT, nucleobase–ascorbate transporter; TMS, transmembrane segment; GFP, green fluorescent protein; orf, open reading frame; ER, endoplasmic reticulum.

0022-2836/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Author's personal copy

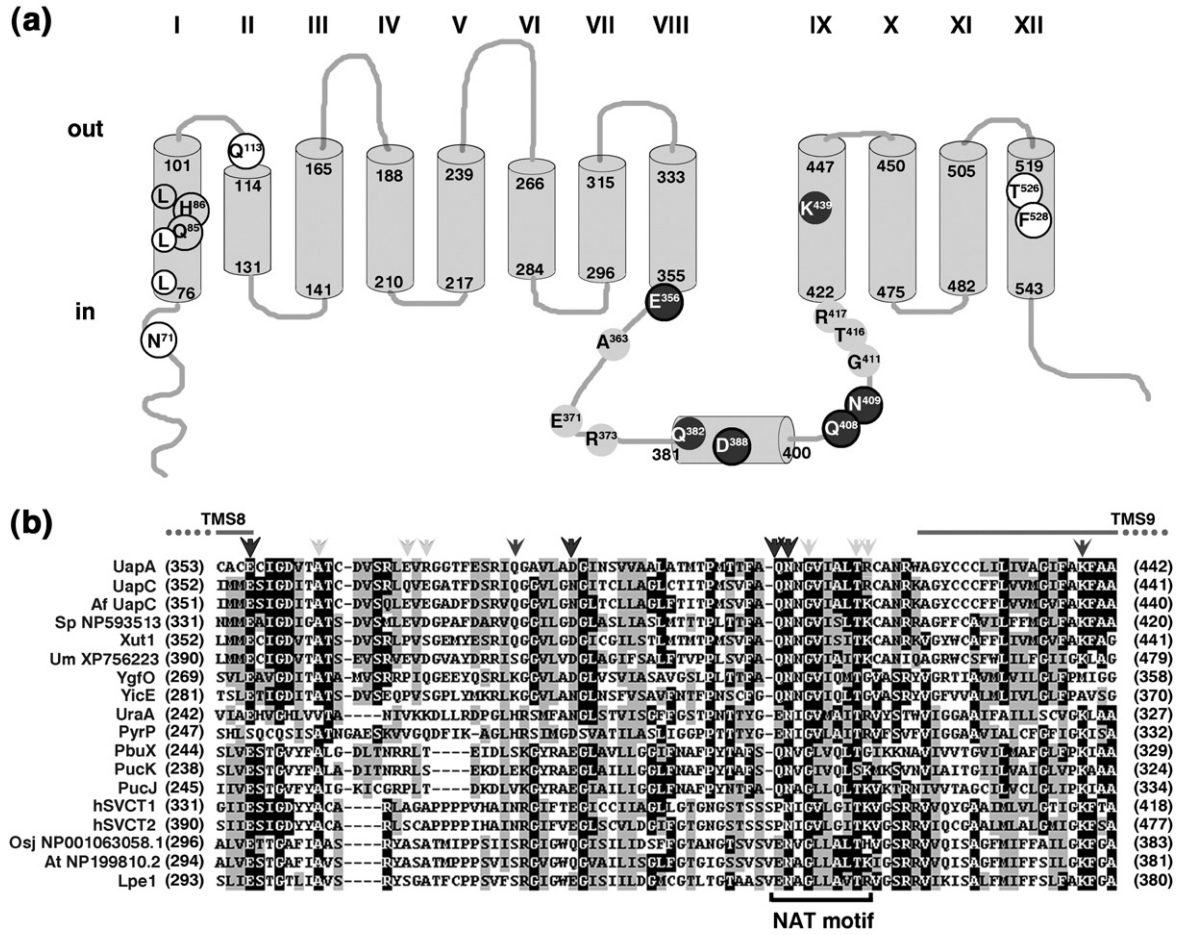


Fig. 1. UapA topology and sequence alignment of the TMS8–9 loop. (a) Speculative UapA topology based on several standard algorithms (PredictProtein, HHpred, TMHMM, SOSUI, TMAP, TopPred, etc.), the ConSeq program (http://conseq.tau.ac.il/), and minor manual modifications depending on the presence of Pro residues at the borders of putative helices. I–XII represent transmembrane domains (TMS). All algorithms predict as transmembrane domains the segments shown in the figure as TMS1–TMS9 and TMS12. An extension of TMS9 for two α-helical turns was based on the results from Cys-scanning mutagenesis of the YgfO transporter.[7] Most algorithms also predict the TMS10–TMS11 shown in the figure. Some algorithms predict an extra TMS (horizontal cylinder in the figure) in the loop between TMS8 and TMS9. In nearly all cases, TMSs are predicted to be mostly α-helical and 'buried'. The topology shown also obeys a 'positive-inside rule' with respect to the loops joining TMSs. Based on the above, we propose that the extra α-helix between TMS8 and TMS9 might be a flexible dynamic domain (reentrant loop) that acquires alternative topology during substrate binding and transport. The amino acid borders of TMSs are indicated. White or black stroked circles represent amino acids involved in altering UapA specificity or function, respectively. Other amino acids critical for function are also highlighted in gray circles. (b) Sequence alignment of the TMS8–9 loop from all NAT proteins with known function and from selected representative members of the family. The NAT signature motif (Q408–R417 in UapA) is indicated. Arrows indicate the amino acids depicted in the topology model. UapA (Q07307) and UapC (P48777), the *A. nidulans* xanthine–uric acid transporters (see the text); AfUapC (XP_748919.1), the xanthine–uric acid transporter of *A. fumigatus*; Sp, the *Schizosaccharomyces pombe* homologue (NP_593513); Xut1, the *C. albicans* xanthine–uric acid transporter (AAX22221); Um, the *Ustilago maydis* homologue (XP_756223); YgfO (NP417358) and YicE (NP418111), the *E. coli* xanthine transporters; UraA (D90878.1) and PyrP (Z99112.2), the uracil transporters from *E. coli* and *Bacillus subtilis*; PbuX (NP390088), PucK (NP_391124.1), and PucJ (Q32139), the *B. subtilis* transporters for xanthine and/or uric acid; hSVCT1 (AAF22490) and hSVCT2 (ABK34450), the human L-ascorbate transporters; Osj (NP_001063058.1) and At (NP_199810.2), close homologues from *Oryzae sativa japonica* and *Arabidopsis thaliana*, respectively; Lpe1, the maize xanthine–uric acid transporter (Q41760).

dence that the NAT motif is part of the substrate translocation pathway. In particular, the first residue of the motif (Gln in UapA and YgfO) might interact with position N9 of the imidazole ring of purines, whereas the neighboring invariable Asn residue is absolutely necessary for transport catalysis. Other residues in the NAT motif seem to play auxiliary roles in substrate specificity of UapA and YgfO, especially with respect to recognition of uric acid or other ligands.[11,12] A second NAT motif consists of two absolutely conserved neighboring Gln-His residues within TMS1 (Fig. 1). Systematic *in vitro* mutagenesis in UapA (Gln85-His86) has strongly suggested that His86 does not affect UapA transport function but is critical for proper folding and trafficking towards the plasma membrane, whereas Gln85 is necessary for transport catalysis *per se*.[13] The functional importance of other elements in

Author's personal copy

TMS1 was further suggested by mutational analysis of a Leu repeat motif, present only in UapA among the NAT proteins. Ala replacements of Leu77, Leu84, and Leu91 led to a UapA version that has a temperature-dependent, 55-fold reduced affinity for uric acid compared to xanthine.[13]

A third region of the NAT proteins has also been identified as important for function. In *A. nidulans*, genetic suppression of a cryosensitive Q408E missense mutation in the NAT motif has led to the identification of residue Phe528 in TMS12 (see Fig. 1), as a determinant of substrate specificity.[14] Phe528 replacements with small aliphatic amino acids converted UapA into a very low-affinity transporter for all kinds of purines, without affecting the high affinity for its physiological substrates, uric acid and xanthine,[15] suggesting that this residue is not part, *sensu stricto*, of the substrate-binding site. Further evidence for the functional importance of this region was provided by targeted and cysteine-scanning mutagenesis of the entire TMS12 in YgfO.[16] In particular, replacements of Ile432, which corresponds to Phe528 in UapA, abolish transport or affect the affinity of YgfO for specific xanthine analogues, whereas N430C is highly sensitive to *N*-ethylmaleimide, a sensitivity that is completely protected by 2-thioxanthine, a high-affinity substrate analogue. Thus, at least, Asn430 is at the vicinity of residues involved in substrate binding. An interaction of functional residues in TMS12 and substrate-binding residues in the

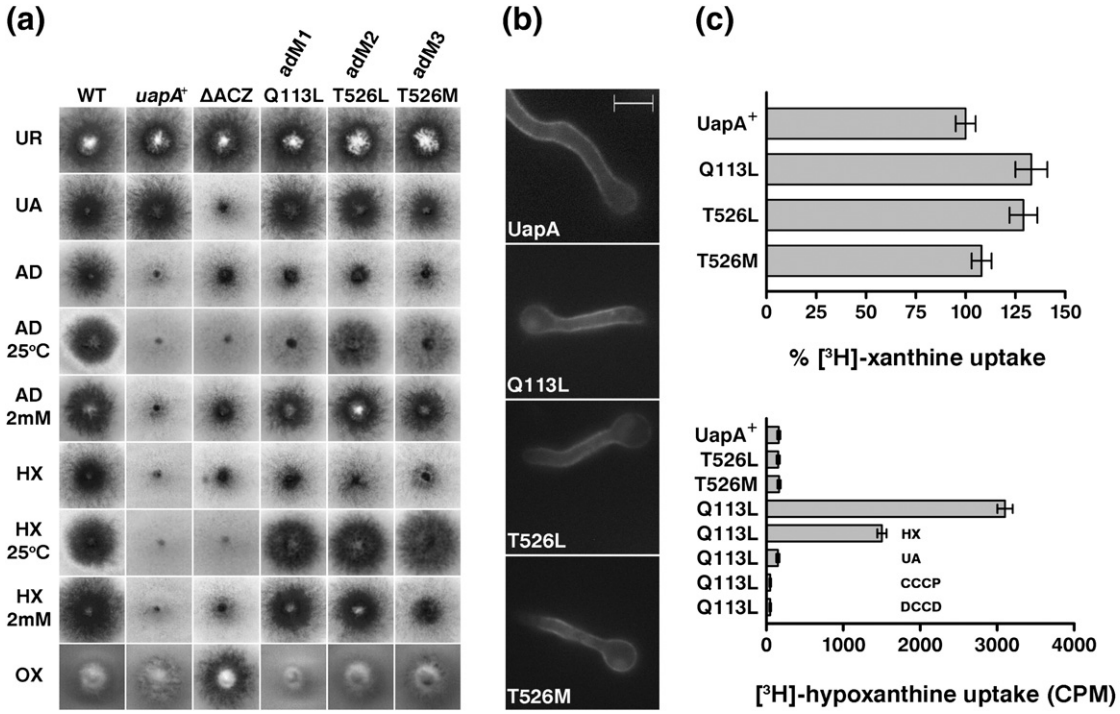


Fig. 2. Analysis of Q113L, T526M, and T526L specificity mutants. (a) Growth tests of Gln113 and Thr526 mutants on different purines as nitrogen sources. Control strains are a standard wild type expressing all major purine transporters (UapA, UapC, and AzgA), a strain with total deletions in all major purine transporters (Δ*ACZ*; negative control), and a ΔACZ transformant expressing *uapA–gfp* from a single-copy integration event in the *argB* gene (*uapA*$^+$; positive control). All mutant strains shown are isogenic to the negative and positive control strains, expressing single-copy *uapA* alleles tagged with *gfp*. Q113K^{hc} is a high-copy version of the corresponding allele. Unless otherwise stated, growth tests were performed at 37 °C, pH 6.8, which are the standard growth conditions of *A. nidulans* in the laboratory. Growth on urea (UR, 5 mM) as the sole nitrogen source is a control on which all mutants and control strains grow equally well. Unless otherwise stated, growth on uric acid (UA), adenine (AD), and hypoxanthine (HX) was tested at standard final concentrations of 0.5 mM. Growth on oxypurinol was tested at a final concentration of 100 μM at the simultaneous presence of nitrate (10 mM) as sole nitrogen source. Growth on xanthine was always similar to growth on uric acid and is thus not shown. Also, notice that the negative control strain Δ*ACZ* shows significant growth on adenine at 37 °C. This is due to FcyB, a cytosine transporter, which can also act as a minor purine transporter.[19] This leaky growth is significantly reduced at 25 °C or in the presence of *uapA* alleles encoding UapA molecules that can be localized in the plasma membrane (unpublished observations). At present, we ignore the mechanism of this apparent dominant-negative effect of UapA expression on FcyB function. (b) Epifluorescence microscopy of Gln113 and Thr526 mutants. Strains were grown as described in Koukaki *et al.*[11] In all cases, UapA was normally expressed in the plasma membrane. All images have the same magnification, and scale bars represent 5 μm. (c) Relative [^{3}H]xanthine (upper panel) or [^{3}H]hypoxanthine (lower panel) transport rates of single-copy mutants expressed as percentage of initial uptake rates (*V*) compared to the wild-type (UapA$^+$) rate (for [^{3}H]xanthine) or in counts per minute (CPM)/10^7 spores (for [^{3}H]hypoxanthine). [^{3}H]hypoxanthine uptake in mutant Q113L (lower panel) was also performed in the presence of excess nonradiolabeled hypoxanthine (HX) or uric acid (UA) or after prior incubation with H^+ gradient uncouplers (CCCP or DCCD). Results shown are means from four to five independent experiments, carried out in triplicate. Standard deviations in all experiments were always <20% of the mean values shown.

Author's personal copy

NAT motif was further strongly supported by allele-specific interactions of mutations in Phe528 and Gln408.[15]

A. nidulans utilizes purines as sole nitrogen sources, which, in turn, means that given a suitable genetic background, any mutation affecting a purine carrier is reflected in a discernable phenotype. UapA-specific mutants can be selected and characterized by simple growth tests on purines or purine toxic analogues in a genetic background lacking the major adenine–hypoxanthine–guanine transporter AzgA,[17] as well as the secondary uric acid–xanthine transporter UapC.[3] Subsequent uptake studies using radiolabeled xanthine and the use of green fluorescent protein (GFP) as a 'silent' fluorescent tag allow conclusions to be drawn on the nature of these mutations on UapA function or protein trafficking and localization into the plasma membrane.[10,11,13–15,18] Here, using a novel random genetic screen modifying the specificity of UapA and subsequent systematic mutational and protein chimeric analysis, we show that there is a highly specific functional synergy among TMS1, TMS8–9 loop, and TMS12 and provide evidence for the role of each of these regions in UapA function. We further show that the specificity of interactions among UapA domains is a critical determinant for the unique specificity of UapA towards uric acid, which, we speculate, is an evolutionary recent acquisition in the NAT family.

Results

Substitutions of Gln113 and Thr526 relax the specificity of UapA

A strain expressing UapA–GFP in a Δ*uapA* Δ*azgA* Δ*uapC* (Δ*ACZ*) genetic background, which can utilize xanthine and uric acid *via* the ectopic UapA–GFP copy but not adenine, hypoxanthine, or guanine as sole nitrogen sources, was UV mutagenized, and three mutants (adM1, adM2, and adM3) that could utilize adenine were selected and tested for their ability to utilize other purines under various conditions. A summary of this analysis is shown in Fig. 2a. All three mutants could grow on all purines tested. Growth on uric acid (Fig. 2) or xanthine (not shown) was similar to the originally mutagenized strain. This was reflected in normal expression of UapA in the plasma membrane and wild-type uptake rates of xanthine (Fig. 2b and c). Growth on adenine and hypoxanthine was most noticeable only at the highest concentration used (2 mM) and was stronger at 25 °C than at 37 °C. In uptake assays with

Table 1. Substrate-binding specificity profile of Gln113 and Thr526 mutants

	UapA$^+$		Q113L		T526M		T526L	
(a)	$K_{m/i}$ (μM)	ΔG^0 (kJ/mol)	$K_{m/i}$ (μM)	ΔG^0 (kJ/mol)	$K_{m/i}$ (μM)	ΔG^0 (kJ/mol)	$K_{m/i}$ (μM)	ΔG^0 (kJ/mol)
Xanthine	7	−30.6	4	−32.0	5	−31.5	5	−31.5
Uric acid	8	−30.3	10	−29.7	12	−29.2	10	−29.7
Adenine	n.i.	>−17.8	>1000	>−17.8	>1000	>−17.8	>1000	>−17.8
Hypoxanthine	n.i.	>−17.8	260	−21.3	>1000	>−17.8	>1000	>−17.8
Guanine	n.i.	>−17.8	~1000	~−17.8	>1000	>−17.8	>1000	>−17.8
Uracil	n.i.	>−17.8	413	−20.1	76/>1000	−24.5/>−17.8	>1000	>−17.8
1-Methyl-xanthine	280	−21.0	280	−21.0	288	−21.0	286	−21.0
2-Thio-xanthine	63	−25.0	10	−29.7	8	−30.3	59	−25.1
3-Methyl-xanthine	28	−27.0	9	−30.0	11	−29.5	17	−28.3
6-Thio-xanthine	346	−20.1	38	−26.3	6	−31.0	89	−24.0
7-Methyl-xanthine	n.i.	>−17.8	~1000	~−17.8	~1000	~−17.8	n.i.	>−17.8
8-Methyl-xanthine	100	−23.8	110	−23.5	6	−31.0	26	−27.2
9-Methyl-xanthine	200	−22.0	n.i.	>−17.8	202	−22.0	200	−22.0
Oxypurinol	100	−23.8	29	−27.0	22	−27.7	29	−27.0

	UapA$^+$	Q113E	T526A	T526N	T526S
(b)	$K_{m/i}$ (μM)				
Xanthine	7	8	2	2	3
Uric acid	8	48	3	10	6
Adenine	n.i.	n.i.	>1000	n.i.	>1000
Hypoxanthine	n.i.	n.i.	>1000	n.i.	>1000
Guanine	n.i.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Uracil	n.i.	n.i.	~1000	>1000	~1000
1-Methyl-xanthine	280	673	196	~1000	807
2-Thio-xanthine	63	60	20	15	15
3-Methyl-xanthine	28	30	15	6	12
6-Thio-xanthine	346	n.i.	120	8	160
7-Methyl-xanthine	n.i.	>1000	>1000	>1000	>1000
8-Methyl-xanthine	100	200	80	46	100
9-Methyl-xanthine	200	n.i.	210	>1000	600
Oxypurinol	100	500	37	20	24

$K_{m/i}$ and ΔG^0 values were determined as described in Materials and Methods. n.d., not determined. n.i., no inhibition (90–100% uptake). '>1000' stands for inhibition values close to 20–30% at 1 mM. Results are averages of at least three independent experiments in triplicate for each concentration point. Standard deviation was <20%.

Author's personal copy

radiolabeled hypoxanthine, only mutant adM1 showed UapA-mediated, H^+-coupled transport (Fig. 2c, lower panel). Finally, all mutants were hypersensitive to oxypurinol, a toxic xanthine analogue taken up by UapA.[12] No growth differences have been found with respect to the pH range where the wild-type UapA is fully functional (pH 5–8) (not shown). The *uapA* open reading frame (orf) from each of the three mutants was cloned in an appropriate vector and, upon reintroduction in the original Δ*ACZ* strain (see Materials and Methods), conferred growth patterns on purines, indistinguishable from the originally selected genetic mutants (not shown). Sequencing of the cloned alleles established their identity as follows: adM1 corresponds to Q113L, adM2 to T526L, and adM3 to T526M (see Fig. 1). Gln113 is a nonconserved amino acid in the putative extracellular loop linking TMS1 with TMS2. Thr526, which maps towards the extracellular part of TMS12, is a largely conserved residue in all eukaryotic NATs but not in bacteria. Interestingly, Thr526 is located very close to the previously characterized Phe528 specificity residue[15] and corresponds to Asn430 in YgfO, a functionally essential residue in the bacterial permease (see Introduction).

We carried out a detailed kinetic analysis of purine transport and/or binding in the Q113L, T526L, and T526M mutants (Table 1a). Similarly to mutations in Phe528,[15] none of the three novel alleles affected significantly the $K_{m/i}$ values for uric acid or xanthine, the physiological substrates of UapA. Also, similarly to Phe528 mutants, Thr526 alleles did not confer measurable affinities (measured as K_i values, e.g., <1 mM) for hypoxanthine, adenine, or guanine, showing that transport of these purines, observed in growth tests (adenine or hypoxanthine concentration >1 mM), should occur through very low binding affinities. These results agree with our inability to detect radiolabeled hypoxanthine uptake in these mutants (see Fig. 2c). In contrast to Thr526 UapA, the Q113L UapA mutant could bind hypoxanthine and uracil with detectable but low affinities (K_i values of 260 and 413 μM, respectively), a result agreeing with the low but detectable Q113L-mediated radiolabeled hypoxanthine uptake shown in Fig. 2c. Q113L, T526L, and T526M mutants could also bind xanthine analogues with bulky substitutions at positions 2, 3, 6, or 8 (2-thioxanthine, 3-methylxanthine, 6-thioxanthine, 8-methylxanthine, and oxypurinol) with significantly increased affinity, compared to the wild-type UapA (Table 1a). Mutation T526M had the most impressive effect, allowing xanthine-like binding affinities for all analogues with substitutions at positions 2, 3, 6, or 8. Interestingly, all mutants conserved wild-type affinities for 1-methylxanthine, 7-methylxanthine, or 9-methylxanthine, except a reduction in the affinity of Q113L for 9-methylxanthine.

To gain further insight on the role of residues Gln113 and Thr526 in UapA function, we also constructed (Materials and Methods) and analyzed mutants Q113K, Q113E, T526A, T526N, and T526S (Fig. 3). Mutation Q113K scored as a loss of function due to defective plasma membrane localization of the mutant UapA–GFP fusion protein (not shown). However, high expression of the corresponding allele in a transformant having five plasmid copies integrated in tandem conferred concentration-dependent growth on hypoxanthine and especially adenine, similar to mutation Q113L, and minimal growth on uric acid or xanthine. All other mutants were functional but only T526A conferred detectable,

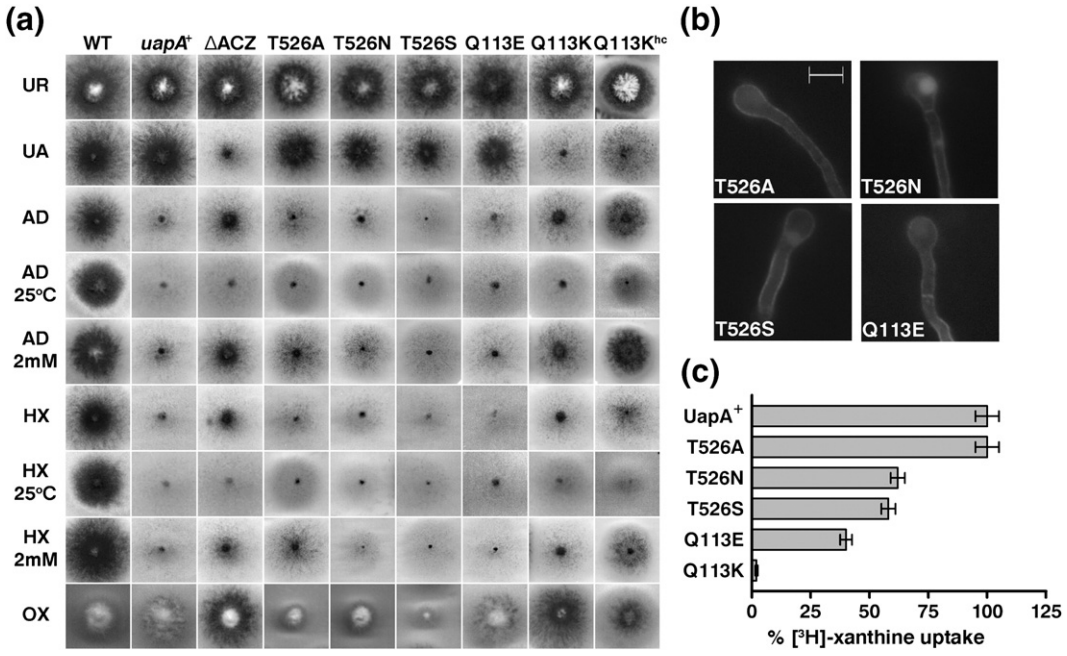


Fig. 3. Analysis of Q113E, Q113K, T526A, T526S, and T526N mutants. Growth tests (a), epifluorescence microscopy (b), and relative [^{3}H]xanthine uptake rates (c) of Q113E, Q113K, T526A, T526S, and T526N mutants. Details are as described in Fig. 2.

Author's personal copy

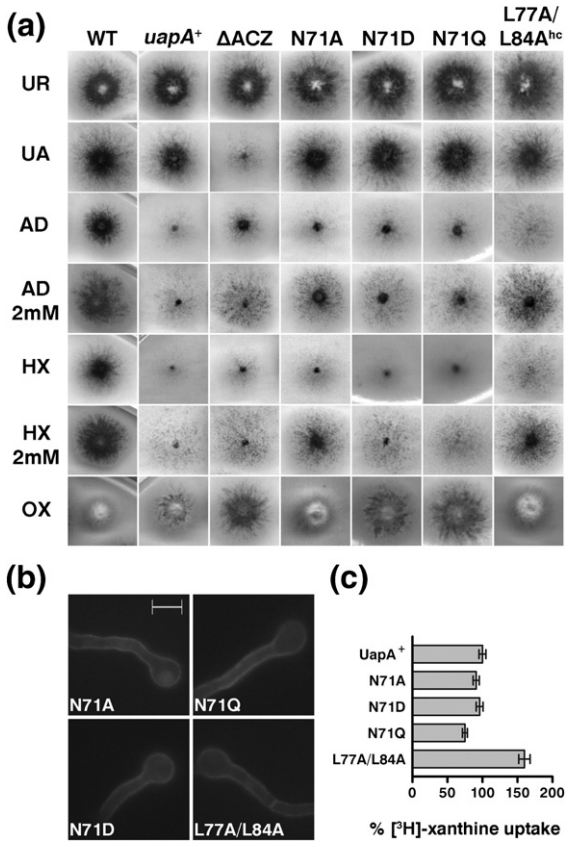


Fig. 4. Analysis of mutations in N71 and L74/L81 (TMS1). (a) Growth tests of transformants carrying single-copy site-directed mutations in N71 and L74/L81. The L74A/L81A allele shown is a high-copy transformant (five plasmid copies integrated in tandem). Details are as described in Fig. 2a. (b) Epifluorescence microscopy of strains shown in (a). In all cases, UapA was normally expressed in the plasma membrane. (c) Relative [^{3}H]xanthine transport rates of the same mutants. Details are as described in Fig. 2c.

but very low, UapA-mediated growth on both adenine and hypoxanthine. Kinetic analysis showed that T526A, T526N, and T526S have increased (2- to 40-fold) affinity values for analogues with substitutions at positions 2, 3, 6, or 8, whereas T526A and T526S also showed a very low ability to recognize hypoxanthine or adenine. In contrast, binding affinities for analogues with substitutions at positions 1, 7, or 9 were not affected significantly (Table 1b).

The TMS1 region is critical for UapA specificity

The fact that Gln113, a residue mapping in the short TMS1–TMS2 loop, affects UapA specificity suggested that either this particular segment has a direct role in substrate binding and transport or it affects the relative positioning of TMS1 and TMS2, which, in turn, affects UapA function. We obtained evidence favoring the second possibility. In particular, we showed that the two Leu residues (Leu77 and Leu84), mapping within TMS1 and proposed to be involved in tight α-helical packing,[13] as well as an Asn residue (N71) five amino acids upstream from TMS1, can also affect UapA specificity, in a manner very similar to that of Q113L.

The double L77A/L84A mutant, which is functional (Fig. 4a–c), has been shown not to utilize hypoxanthine or adenine as nitrogen sources at the standard concentrations,[13] but it was never tested on higher concentrations of these purines. Figure 4a shows that L77A/L84A, when overexpressed in a transformant with four to five plasmid copies integrated in tandem, could confer UapA-mediated growth on 2 mM adenine or hypoxanthine. Kinetic analysis showed no measurable affinities ($K_{m/i}$>1 mM) for hypoxanthine or adenine, strongly suggesting that L77A/L84A, similarly to Gln113, Thr526, or Phe528 alleles, confers growth on hypoxanthine or adenine, through very low-affinity transport (Table 2).

Mutants N71A, N71Q, and N71D, constructed herein, could grow on uric acid and xanthine (Fig. 4a) and had normal localization of UapA–GFP in the plasma membrane (Fig. 4b) and xanthine uptake rates similar to wild type (Fig. 4c). N71A, but not N71Q or N71D, could also grow weakly on 2 mM hypoxanthine (Fig. 4a). Kinetic analysis showed that all Asn71 mutants had affinities for uric acid

Table 2. Substrate-binding specificity profile of mutants in the TMS1 region

	$K_{m/i}$ (μM)				
	UapA$^+$	N71A	N71D	N71Q	L77A/L84A
Xanthine	7	12	3	2	36
Uric acid	8	9	21	4	32
Adenine	n.i.	>1000	n.i.	~1000	>1000
Hypoxanthine	n.i.	>1000	n.i.	~1000	>1000
Guanine	n.i.	>1000	>1000	>1000	>1000
Uracil	n.i.	~1000	~1000	650	>1000
1-Methyl-xanthine	280	~1000	700	590	840
2-Thio-xanthine	63	100	55	13	60
3-Methyl-xanthine	28	32	10	5	47
6-Thio-xanthine	346	290	215	67	340
7-Methyl-xanthine	n.i.	>1000	>1000	>1000	>1000
8-Methyl-xanthine	100	300	160	100	100
9-Methyl-xanthine	200	>1000	275	>1000	600
Oxypurinol	100	109	45	35	100

Details are as described in Table 1.

Author's personal copy

and xanthine similar or moderately different from that of the wild-type UapA and no measurable binding affinity (K_i>1 mM) for hypoxanthine, adenine, guanine, or uracil (Table 2). With respect to binding of xanthine analogues, UapA–N71A resembled more the wild-type protein, while N71D and N71Q had very moderately ameliorated binding affinities for analogues substituted with bulky groups at positions 2, 3, 6, and 8 but not with those substituted at positions 1, 7, or 9.

The TMS8–9 loop includes determinants other than the NAT motif that are absolutely essential for UapA function

We substituted four polar/charged residues, Glu356, Gln382, Asp388, and Lys439, mapping within the TMS8–9 region (see Fig. 1). Glu356 is one of the four nearly absolutely conserved polar/charged residues in the NAT family (the others being Gln85, His86, and Asn409). Gln382, Asp388, and Lys439 are also partially conserved in other NAT members. Figure 5 shows the analysis of the mutants constructed. In all Gln382 and Lys439 mutants, UapA was correctly expressed in the plasma membrane and conferred wild-type growth on purines, in agreement with nearly wild-type (50–115%) xanthine uptake rates (Fig. 5a–c). Detailed kinetic analysis (Table 3) showed that Gln382 and Lys439 mutations did not confer novel binding specificities but reduce the affinity of UapA for uric acid (e.g., up to 8- to 18-fold in K439Q and Q382S, respectively) or for several ligands with bulky substitutions (Lys439Gln, Lys439Ala, Lys439Glu, Gln382Ser, and Gln382Lys). The most conserved mutations (Q382E and K439R) result in very minor changes to the kinetic profile of UapA. These results suggested that residues Gln382 and Lys439 are not essential for UapA-mediated transport but might play a role in 'tightening up' the substrate-binding pocket, thus contributing to higher affinity for uric acid (see also discussion below).

In contrast to Gln382 and Lys439 mutations, even the most conservative substitutions of Glu356 and Asp388 led to loss of detectable UapA activity. Mutation E356D, E356Q, or D388N did not affect the plasma membrane localization of UapA. UapA–D388E was trapped in the endoplasmic reticulum (ER) (Fig. 5b). Only overexpression of UapA–E356D ($E356D^{hc}$), from five in-tandem integrated plasmid copies, led to very weak growth on uric acid at 37 °C. This transformant could not grow on any other

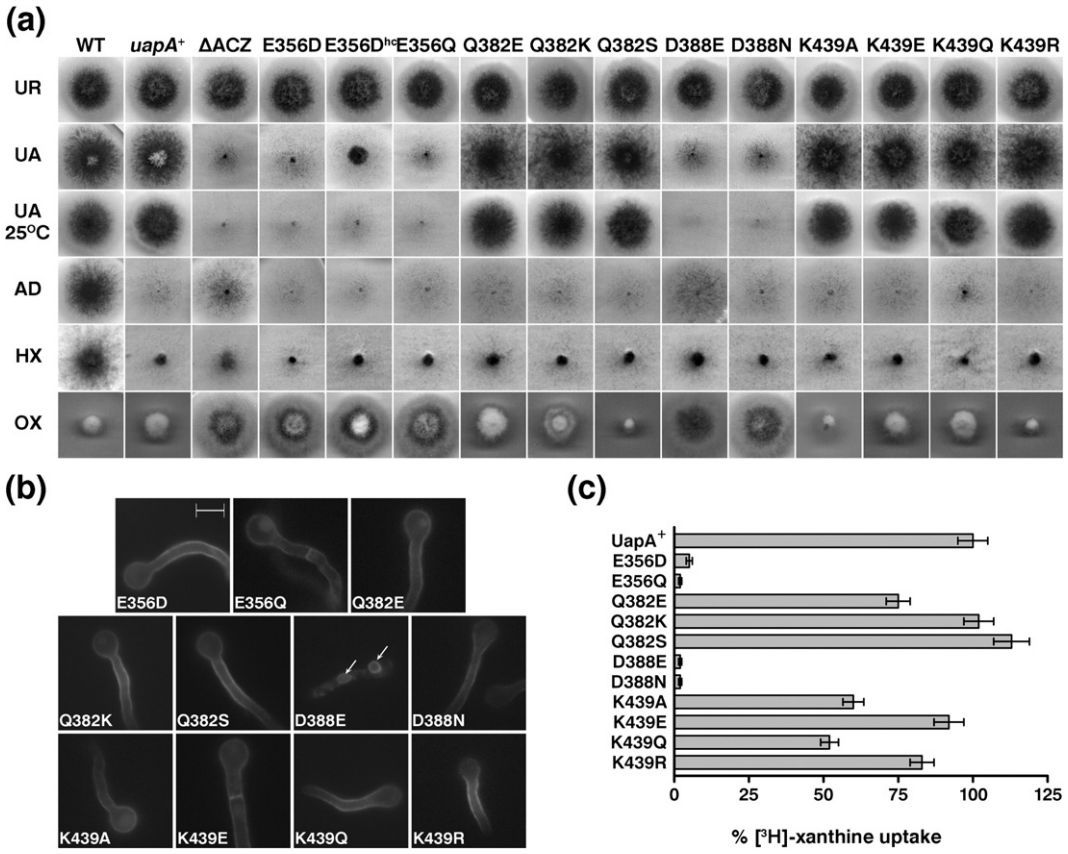


Fig. 5. Analysis of TMS8–9 mutants. (a) Growth tests of transformants carrying single-copy (E356D also in high-copy) mutations in Glu356, Gln382, Asp388, and Lys439. Details are as described in Fig. 2a. (b) Epifluorescence microscopy of strains shown in (a). In all cases, apart from D388E, UapA was normally expressed in the plasma membrane. In D388E, UapA was trapped in the ER, indicated with arrows. Mutant GFP fusion proteins stalled in the ER of hyphae, which are multinucleate, label the nuclear envelope (arrows), as previously shown.[15] (c) Relative [^{3}H]xanthine transport rates of the same mutants. Details are as described in Fig. 2c.

Author's personal copy

Table 3. Substrate-binding specificity profile of TMS8–9 mutants

	$K_{m/i}$ (μM)								
	UapA$^+$	E356D	Q382E	Q382K	Q382S	K439E	K439R	K439A	K439Q
Xanthine	7	0.4	5	3	6	7	2	1.8	4
Uric acid	8	1	8	6	141	43	7	5	84
Adenine	n.i.	~1000	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	>1000	>1000	n.i.
Hypoxanthine	n.i.	>1000	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	>1000	>1000	n.i.
Guanine	n.i.	>1000	n.d.	n.d.	n.i.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Uracil	n.i.	~1000	~1000	~1000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000
1-Methyl-xanthine	280	15	280	>1000	>1000	~1000	132	>1000	>1000
2-Thio-xanthine	63	3	12	50	86	50	40	18	117
3-Methyl-xanthine	28	24	19	44	400	28	20	20	373
6-Thio-xanthine	346	2	63	90	730	321	180	616	>1000
7-Methyl-xanthine	n.i.	24	>1000	n.i.	n.i.	n.i.	>1000	n.i.	n.i.
8-Methyl-xanthine	100	80	16	39	240	~1000	70	>1000	476
9-Methyl-xanthine	200	>1000	>1000	318	914	450	200	>1000	>1000
Oxypurinol	100	2.5	102	97	101	158	59	39	242

Details are as described in Table 1.

purines (Fig. 5a). Uptake measurements confirmed that mutant E356D^{hc} retains 30% of UapA-mediated xanthine uptake rate. E356D^{hc} provided a tool to analyze further the role of Glu356 in UapA function. Table 3 shows that E356D leads to (i) a significant increase in the affinity for the physiological substrates xanthine (17-fold) or uric acid (8-fold); (ii) an analogous significant and, in some cases, even greater increase in the binding affinities for analogues with bulky substitutions at positions 1, 2, 6, or 7; (iii) a small effect on 8-methylxanthine binding; (iv) loss of binding of 9-methylxanthine; and (v) low-affinity binding of hypoxanthine or uracil. The increased affinity for the xanthine ring is most probably responsible for the increase in binding affinities of most xanthine analogues. The absolute conservation of residue Glu356 among NATs, its charged nature, and the kinetic profile of E356D are compatible with the idea that this residue plays a key role in substrate-binding pocket responsible for UapA-mediated transport catalysis.

Allele-specific interactions of UapA mutations: Evidence for interdomain synergy

We showed that residues in TMS12 and TMS1 can affect UapA specificity, whereas residues absolutely essential for UapA function map in the TMS8–9 loop. We have previously shown that altered UapA specificity can also be achieved by mutations in the TMS8–9 loop and in particular within the NAT signature motif.[10,11] For example, mutant Q408E binds, but does not transport, hypoxanthine and guanine with moderate affinities, whereas G411P, G411A, and T416N can mediate low-affinity (>1 mM) hypoxanthine and adenine uptake.[10,11] Interestingly, specificity mutations concerning residues in the NAT signature motif also affect the kinetics of UapA towards its physiological substrates, while specificity mutations in TMS12 and TMS1 have no effect or have milder effects on uric acid and xanthine transport (this work and Refs. 10,11). We have previously obtained evidence for an interaction between residues Gln408 and Phe528.[14,15] To further understand how the TMS8–9 loop, TMS1, and TMS12 interact, we constructed and analyzed several novel double mutants described below (Fig. 6).

First, we studied double mutants combining specificity or nearly loss-of-function mutations in the NAT motif (Q408E and N409A or N409D, respectively) with the strongest specificity mutations in TMS12 (T526L, T526M, and F528A). None of the single mutations affect localization of UapA in the plasma membrane.[11] All double mutations, besides N409D/F528A, also do not affect UapA localization. N409D/F528A showed prominent amounts of UapA–GFP retained in the ER (Fig. 6b). Combining specificity mutations in the NAT motif and in TMS12 (Q408E/T526L and Q408E/T526M) led to additive, allele-specific phenotypes. Both mutants could grow on all purines in a way similar to, but not identical with, the single Thr526 mutations (Fig. 6a). Sensitivity to oxypurinol was intermediate of that of the single mutants. Xanthine uptake rates were also intermediate to that in the single mutants (see Figs. 2c and 6c), while, similarly to single mutants, no uptake of radiolabeled hypoxanthine was measurable (not shown). Finally, the double mutants had novel binding profiles towards purines and purine analogues (Table 4). The most noticeable change was the acquisition of high affinity (K_i = 10–34 μM) for hypoxanthine and guanine. In other words, by combining a mutation (Q408E) conferring to UapA the capacity of binding but not transporting novel substrates (hypoxanthine and guanine) with a mutation (T526L) permitting low-affinity transport of these substrates, we generated a UapA version exhibiting high-affinity transport for all oxopurines.

Combining nearly loss-of-function mutations in the NAT motif (N409A or N409D) with specificity mutations in TMS12 (T526L and F528A) could partially restore UapA function (Fig. 6a–c). The reduced function of UapA in the N409D/F528A mutant, which should be attributed to its partially defective localization in the plasma membrane, was ameliorated in a high-copy transformant. Kinetic analysis has confirmed that double mutants exhibit novel purine binding affinities (Table 4). The most significant

Author's personal copy

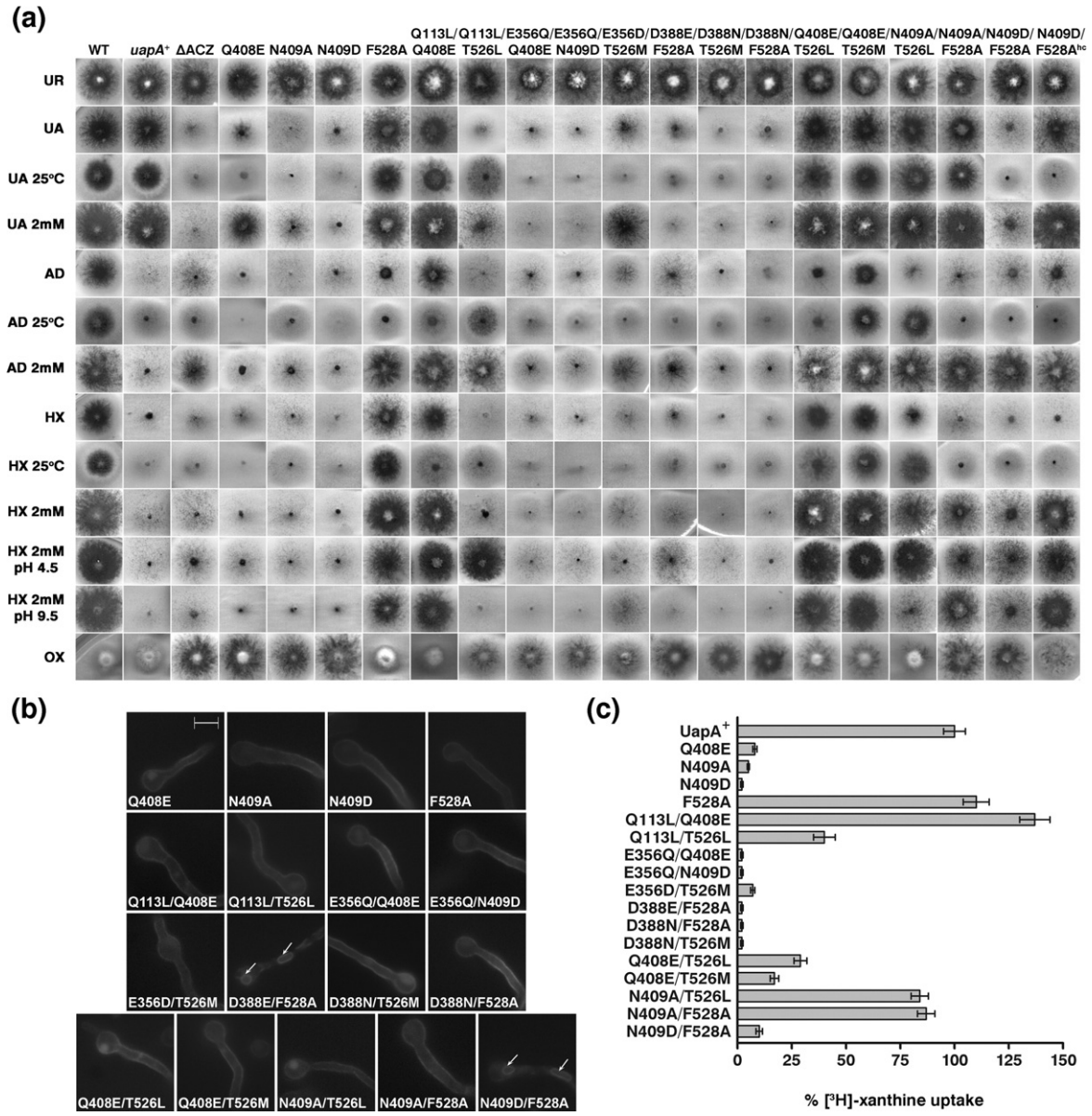


Fig. 6. Allele-specific interactions of UapA mutations. (a) Growth tests of control strains and transformants carrying single- or high-copy (hc) integrations of single and double mutations in Gln113, Glu356, Asp388, Gln408, Asn409, Thr526, and Phe528. Details are as described in Fig. 2a. (b) Epifluorescence microscopy of strains shown in (a). In all cases, apart from N409D/F528A and D388E/F528A, UapA was normally expressed in the plasma membrane. In D388E/F528A, similarly to the single mutant D388E (Fig. 5b), UapA was trapped in the ER (arrows). (c) Relative [^{3}H]xanthine transport rates of the same mutants. Details are as described in Fig. 2c.

change was the markedly increased affinities for all xanthine analogues with bulky substitutions at positions 2, 3, 6, and 8. N409A/F528A and N409D/F528A also showed increased affinity for 7-methylxanthine, while N409A/T526L and N409D/F528A showed increased affinity for oxypurinol. None of the double mutants, however, showed increased affinities for 1-methylxanthine or 9-methylxanthine. These results are in total agreement with the revised model (Fig. 8) proposed in Discussion.

We then looked for interactions among the strongest TMS1 specificity mutation (Q113L) with the strongest specificity mutations in the NAT motif (Q408E) and in TMS12 (T526L). In the two double mutants constructed (Q113L/Q408E and Q113L/T526L), UapA was normally localized in the plasma membrane (Fig. 6b). Q113L/Q408E had a phenotype that was obviously the result of an additive effect of the corresponding single mutations. It could grow well on uric acid, xanthine, hypoxanthine, or adenine even at standard purine concentrations and, independently of the temperature, showed practically wild-type xanthine uptake rates and had binding affinities of various substrates similar to those of the single mutant Q113L. Despite the fact that Q113L/Q408E had a fourfold higher K_i value for hypoxanthine compared to Q113L, it could grow better on this purine, suggesting that, in this mutant, K_i and K_m

Author's personal copy

Table 4. Substrate-binding specificity profile of double mutants

	$K_{m/i}$ (μM)										
	UapA$^+$	Q408E	N409A	F528A	Q113L/Q408E	Q113L/T526L	E356D/T526M	Q408E/T526L	Q408E/T526M	N409A/T526L	N409A/F528A	N409D/F528A
Xanthine	7	16	4	4	4	1.6	0.2/10	6	28	4	1.5	3
Uric acid	8	21	6	2	10	7	30	35	7	11	2	6
Adenine	n.i.	>1000	>1000	>1000	>1000	~1000	14/732	~1000	~1000	>1000	>1000	>1000
Hypoxanthine	n.i.	71	~1000	>1000	~1000	265	38/>1000	34	16	~1000	>1000	>1000
Guanine	n.i.	60	>1000	>1000	>1000	500	117	20	10	>1000	>1000	>1000
Uracil	n.i.	n.i.	~1000	>1000	~1000	19	90	612	>1000	~1000	~1000	~1000
1-Methyl-xanthine	280	420	250	350	280	32	<2	701	>1000	280	175	415
2-Thio-xanthine	63	149	65	63	23	8	<10	60	392	15	17	26
3-Methyl-xanthine	28	77	30	28	20	2	<10	50	230	4	7	7
6-Thio-xanthine	346	>1000	250	149	52	7	<10	350	>1000	5	42	15
7-Methyl-xanthine	n.i.	>1000	>1000	>1000	>1000	115	<20	>1000	>1000	n.i.	>1000	600
8-Methyl-xanthine	100	n.i.	102	80	100	4	<10	100	240	40	10	55
9-Methyl-xanthine	200	125	403	200	>1000	417	90	380	>1000	400	205	~1000
Oxypurinol	100	>1000	~1000	147	15	1.6	2.9	428	500	6	142	14

Details are as described in Table 1.

values might be different or that the limiting factor is the V_m. The double mutant Q113L/T526L had a conditional loss-of-function phenotype at 37 °C. However, at 25 °C, it could grow on uric acid, xanthine, adenine, and hypoxanthine and was sensitive to oxypurinol. The thermosensitive nature of Q113L/T526L was also confirmed in uptake assays. Kinetic analysis, performed at 25 °C, confirmed the novel substrate binding and transport capacity of Q113L/T526L. The most important change was the 4- to 80-fold increase in the affinities for xanthine analogues, including oxypurinol, compared to the single mutants and especially to the wild type. Q113L/T526L had affinities for hypoxanthine, adenine, and guanine identical with the single mutant Q113L, but interestingly, it also acquired the novel property of binding uracil with high affinity (K_i=19 μM). High-affinity binding of uracil could be confirmed in growth tests where uracil, which cannot be used as a nitrogen source, inhibited growth of Q113L/T526L on purines (not shown). Finally, high-affinity uracil transport in Q113L/T526L was also strongly suggested by the hypersensitivity of the mutant on 5-fluorouracil (not shown). This is the first time that the UapA substrate pocket has been converted to accommodate and transport efficiently a pyrimidine.

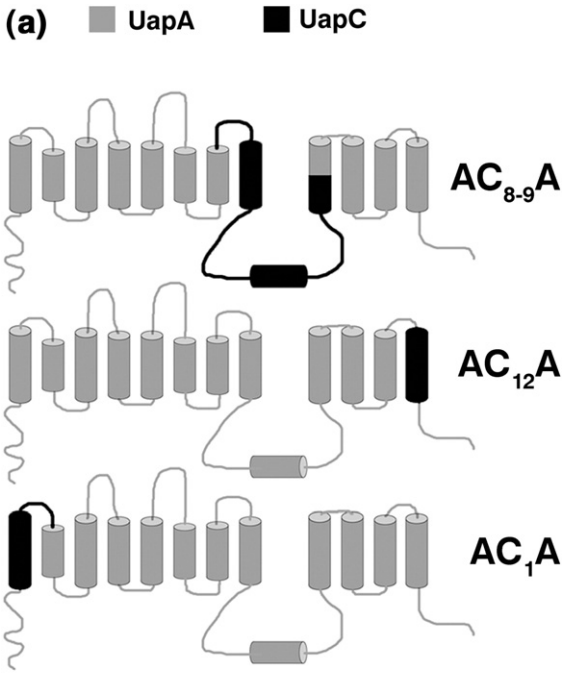
To further understand the role of the absolutely essential Glu356 and Asp388, we also constructed and analyzed the double mutants E356Q/N409D, E356Q/Q408E, E356D/T526M, D388E/F528A, D388N/F528A, and D388N/T526M (Fig. 6). All except E356D/T526M scored as total loss-of-function mutations. D388E/F528A was retained in the ER, similarly to the single mutant D388E, but all the others were normally localized in the plasma membrane. Mutant E356D/T526M could grow weakly on uric acid and xanthine and exhibited low (~10%) xanthine uptake rate, only at 37 °C. This enabled us to perform a minimal kinetic analysis and show that this mutant exhibits very high affinity for several substrates/ligands and a biphasic kinetic behavior compatible with the existence of two binding sites. The two K_m values for xanthine were 0.2 and 10 μM, similar to the individual K_m values obtained in the single mutants. Two K_i values were also obtained for hypoxanthine and adenine, further supporting the existence of a high- and a low-affinity binding site. These results further confirm that Glu356 is an absolutely essential key residue in the substrate translocation pathway of UapA.

UapA specificity depends on specific interdomain interactions absent in UapC

UapC is a moderate-capacity carrier, very similar in structure to UapA (58% amino acid identity), recognizing as its major substrates xanthine and uric acid, but is able to transport all other purines with very low capacity.[3] Figure 7b shows a comparison of the specificity profile of UapA and UapC, originating from a novel kinetic analysis of both proteins expressed in isogenic backgrounds (see Materials and Methods). The general conclusions from this

Author's personal copy

comparison are that (i) both proteins have similar affinities for xanthine or oxypurinol, but UapA has an ~20-fold higher affinity for uric acid, and (ii) only UapC recognizes other purines, albeit with very low affinity (~1–2 mM). We have previously constructed strains expressing functional chimeric UapA/UapC proteins.[9,15] Two of these chimeras, herein called $AC_{8–9}A$ and $AC_{12}A$, correspond, respectively, to UapA molecules in which either a segment of 116 amino acids from TMS8 to the boundary of TMS9 (residues 316–421) or the entire TMS12 (residues 520–541) has been replaced by the corresponding regions of UapC (shown in Fig. 7a). A third chimera, AC_1A, in which the TMS1 region including part of its flanking loops (residues 64–115) of UapA was replaced with that from UapC, was constructed herein (see also Fig. 7a). We made use of these three chimeras to address whether interdomain interactions in UapA can be replaced by the UapC domains. $AC_{8–9}A$ and $AC_{12}A$ were fully functional, whereas AC_1A was partially defective for plasma membrane localization, reflected in reduced apparent transport activity (not shown). Kinetic analysis showed that chimeras $AC_{8–9}A$ and $AC_{12}A$ have K_i values for uric acid and oxypurinol more similar to those of UapC than to those of UapA and could also recognize hypoxanthine, guanine, adenine, or uracil. Chimera AC_1A could also recognize hypoxanthine guanine, adenine, or uracil, but its $K_{m/i}$ values for xanthine, uric acid, and oxypurinol were closer to those of UapA. These results strongly support the idea that interdomain interactions in UapA are highly specific and constitute a major determinant for increasing the affinity for uric acid, as well as for excluding other purines from the translocation pathway.



(b)

	$K_{m/i}$ (μM)				
	UapA⁺	UapC⁺	$AC_{8-9}A$	AC_1A	$AC_{12}A$
Xanthine	7	4	8	2	13
Uric acid	8	132	130	4	79
Adenine	n.i.	>1000	~1000	~1000	n.i.
Hypoxanthine	n.i.	~1000	~1000	320	n.i.
Guanine	n.i.	~1000	~1000	380	n.i.
Uracil	n.i.	~1000	n.d.	270	>1000
Oxypurinol	100	155	311	48	213

Fig. 7. Analysis of UapA/UapC chimeras. (a) Topology of UapA/UapC functional chimeras. (b) Kinetics and specificity profile of UapA/UapC chimeras expressed from single-copy integration events in isogenic backgrounds. Details are as described in Table 1.

Discussion

The analysis of 37 novel single or double *uapA* missense mutations and chimeras and the reevaluation of previously made mutants presented herein reveal a specific intramolecular synergy among three discrete UapA regions (the TMS8–9 loop, TMS1, and TMS12). The unique ability of UapA to transport uric acid, while excluding other purines, finds its mechanistic basis in the interdomain functional interactions established in this work. The cryosensitive nature of several mutations in the TMS8–9 region strongly suggests that its role in interdomain synergy is dynamic and probably associated with conformational changes during substrate transport.[20] Furthermore, the amphipathicity of the TMS8–9 region is compatible with the latter being a reentrant loop, as those shown to play functional roles in other transporters.[21–23]

Figure 8 summarizes our findings in a speculative model on the role of specific domains and amino acid residues in UapA function. The TMS8–9 loop, which is the major domain in this synergy, was shown to include specific amino acid residues absolutely essential for substrate binding (Gln408 and Glu356) and transport (Glu356, Asp388, and Asn409), as well as residues affecting UapA specificity (Glu356, Gln408, G411, and R417; Refs. 10,11 and this work). Among the newly identified functional residues, Glu356 might have a direct role in both substrate and H^+ binding, thus becoming a key element in coupling. In the LacY permease, an irreplaceable Glu residue (E269) in the substrate-binding pocket was shown to have such a dual role.[24,25] Interestingly, analogously to Glu356Asp replacement in UapA, Glu269Asp in the LacY is the only substitution permitting limited uphill lactose/H^+ symport.[26] The two other domains involved in UapA specificity (TMS1 and TMS12) do not seem to include determinants for the *direct* binding of physiological substrates but rather determine the access and eventual binding of novel substrates to the binding pocket, through their interaction with the TMS8–9 loop. The indirect involvement of TMS1 and TMS12 in UapA specificity is based on the observation that, unlike mutations in the TMS8–9 loop, TMS1 and TMS12 specificity mutations are not associated with significant changes in the kinetics of

Author's personal copy

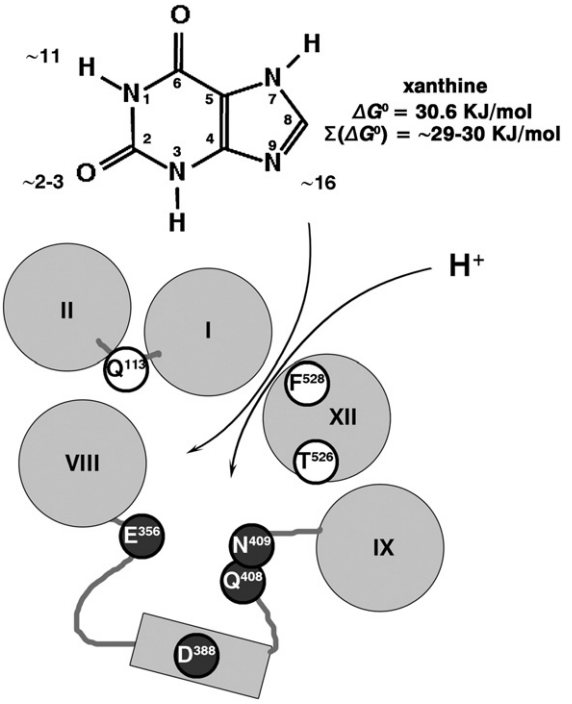


Fig. 8. UapA–xanthine interactions and a topological model on the different UapA domains involved. The rationale for identifying the positions of the xanthine ring that interact with UapA is explained in Goudela *et al.*[12] and in the text. In brief, by comparing differences in ΔG^0 values, calculated from K_i values (see Materials and Methods), in the interaction of two putative substrates differing at a single position each time (e.g., xanthine *versus* hypoxanthine or 2-thioxanthine), the contribution of this position (e.g., C2) in binding was estimated. In the case of analogues with bulky substitutions, the distinction between energetic losses due to modification of a position directly involved in binding from those due to steric hindrance was based on the kinetic behavior of specificity mutants (see the text). The topological model shown is relevant to that of Fig. 1 and highlights the roles of different UapA domains and specific amino acid residues in substrate binding and transport.

transport of physiological substrates. Evidence for the close proximity and a functional interaction between the TMS8–9 loop and TMS12 comes also from the observation that in the homologous YgfO permease of *E. coli*, the two residues corresponding to Thr526 and Phe528 of UapA, namely, Asn430 and Ile432, are critical for function, while one of these residues (Asn430) is also accessible to site-directed alkylation depending on the absence of substrate.[16] Finally, the close proximity of the periplasmic half of the TMS12 α-helix to the substrate-binding site in the TMS8–9 loop in YgfO has also been supported by cadmium sensitivity assays (S. Frillingos, personal communication). The fact that our present random mutagenesis approach was not saturating leaves open the question whether there are other UapA regions that can affect specificity. In fact, recently, we obtained evidence, through a different random mutation selection scheme, that mutations in the loop between TMS10 and TMS11 can also modify UapA specificity (V. Kosti, I. Papageorgiou, and G. Diallinas, unpublished observations).

How is UapA specificity achieved?

Based on the binding affinities of functional mutants towards a plethora of substrates, we propose that UapA specificity is mechanistically achieved by both size hindrance and electrostatic repulsion. The importance of size in substrate fitting is strongly suggested by the fact that specificity mutations in TMS1 and TMS12, which do not change the affinity for xanthine, allow increased binding affinity of xanthine analogues with bulky groups at positions C2═O, N3–H, C6═O, N7–H, or C8/C8═O. In fact, some mutant UapA proteins bind xanthine analogues with bulky substitutions at these positions as efficiently as xanthine or uric acid. Thus, these positions should not be involved or contribute little in substrate binding. In contrast, the same specificity mutations do not increase the affinities for xanthine analogues with modifications at positions N1–H and N9, strongly suggesting that N1–H and N9 are directly involved in binding. Compared to the previously proposed model describing UapA–xanthine interactions,[12] here, we propose a revised model where there is no energetic contribution from C6═O, while the weak contribution of C2═O (~5 kJ/mol) is reduced to ~2 kJ/mol (Fig. 8). Despite the fact that mutations described in this work cannot exclude the direct contribution of N7–H, competition assays with the wild-type UapA allele, using 7- or 9-deazaxanthine, have strongly suggested that this position does not contribute significantly to substrate binding.[12]

Steric effects could, in principle, partially account for the exclusion of adenine or guanine from the UapA binding pocket, due to the presence of amino groups at positions C6 and C2, respectively. Size effects cannot, however, explain how hypoxanthine is excluded from the UapA binding site. The preferred tautomers of hypoxanthine and xanthine have inversely protonated N atoms at positions 3, 7, and 9 (xanthine has N3–H, N7–H, and N9; hypoxanthine has N3, N7, and N9–H).[27] We speculate that the inverse protonation state of the N atoms in hypoxanthine, compared to xanthine, might repel the former from the substrate-binding pocket of the wild-type UapA. A similar mechanism might contribute to the 'filtering out' of adenine and guanine, which have N3, N7, and N9 protonation states identical with those of hypoxanthine. Repulsive forces might also explain the reduced binding of the wild-type UapA for oxypurinol, which, in its preferred tautomer, possesses a protonated N8–H. In the specificity mutants, loosening of the binding pocket might allow the accommodation of bulkier nonnatural substrates and could reduce any repulsive electrostatic forces that exclude totally or partially nonphysiological substrates. Once size or electrostatic restrictions are removed, different purines can be transported by UapA on the basis

Author's personal copy

of their ability to make specific H-bonds within the substrate-binding residues in the TMS8–9 region.

The observed low-affinity binding of hypoxanthine in the specificity mutants is in agreement with the idea that hypoxanthine interacts principally with UapA only through a strong interaction at N1–H, as it lacks a nonprotonated N9. This assumption predicts that, in the specificity mutants, guanine and uracil, which also have a protonated N1–H, might also be transported with affinities similar to that of hypoxanthine. This is indeed the case. The relatively lower affinity for adenine uptake in specificity mutants might be explained assuming that the H donor role of N1–H in the interaction with UapA might only partially be replaced by the neighboring C6–NH_2. Our assumptions are further supported by the results on the double mutants, where specificity mutations are combined with Q408E, a mutation that allows better binding of several nonnatural substrates that have a protonated N9–H (hypoxanthine, guanine, and 7-deazaxanthine).[11] According to our model, in these mutants, hypoxanthine (or guanine) can now make two H-bonds, one at N1–H simply due to loosening of the binding pocket and one with N9–H because of the presence of the Glu residue at position 408. In contrast, adenine, which lacks a protonated N1–H, seems to make only one strong H-bond at N9–H.

An evolutionary scenario for NAT specificity

Prokaryotic NAT members seem to be extremely specific permeases for either xanthine or uracil. Some homologues have also been reported to be specific for uric acid, but rigorous evidence in such cases is missing.[1] Fungal NATs have the ability to transport both xanthine and uric acid but not uracil. While all studied fungal members have nearly identical high affinities for xanthine, they differ significantly with respect to their ability for binding and transporting uric acid. Besides the UapA permease of *A. nidulans*, high-affinity uric acid transport was shown in *Neurospora crassa*, which possesses a single NAT homologue.[28] Low/moderate affinity for uric acid (K_m = 50–180 μM) was shown for the UapC protein of *A. nidulans* (this work) and the unique homologues of *Aspergillus fumigatus* (AfUapC) and *Candida albicans* (Xut1).[12,29] Interestingly, the UapC proteins of *A. nidulans* and *A. fumigatus*, unlike UapA, can also recognize, with very low affinities, other purines besides xanthine and uric acid. Fungal UapA-like and UapC-like proteins can be distinguished into two evolutionary groups.[1] Among the eight *Aspergillus* species whose genome is sequenced, only *A. nidulans* has both UapA and UapC. Synteny analysis provided strong evidence that in *A. nidulans*, *uapA* has evolved through duplication of an ancestral *uapC* gene†. These observations strongly suggest that the unique high affinity and high specificity of UapA-like transporters for uric acid are recent evolutionary acquisitions. Work presented herein suggest that highly specific interactions among a flexible substrate-binding pocket and two other domains determine NAT specificity. Fine modification of such interactions, through an accumulation of functional mutations, provides a possible mechanism for the evolution of NAT specificity. The fact that, in primates, NATs are specific for ascorbate, a metabolite with an entirely different chemical structure from that of nucleobases, reflects an uncommon and dramatic specificity change. Unfortunately, none of the specificity mutations characterized so far converts UapA into an ascorbate transporter, as indicated kinetically (not shown). Finally, it is noticeable that uric acid, the main physiological substrate of UapA-like transporters, and ascorbic acid serve similar physiological functions as powerful antioxidants in most organisms.[1] It is thus tempting to think that ascorbate transporters evolved from preexisting uric acid transporters as the antioxidant strategies of Metazoa adapted to novel lifestyles.

† www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/ and unpublished data.

Materials and Methods

Media, strains, growth conditions, and transformation genetics

Standard media for *A. nidulans* and *E. coli* were used.[30,31] A *pabaA1* strain was a standard wild-type control. The strain used to select the original mutants (adM1–3) was a Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*azgA argB2 pabaA1* (Δ*ACZ*) carrying a single-copy integration of the wild-type *uapA–gfp* allele in the *argB* locus.[18] *pabaA1* and *argB2* are genetic auxotrophies for *p*-aminobenzoic acid and arginine, respectively. UV mutagenesis was as described previously.[14] An isogenic Δ*uapA* Δ*uapC* Δ*azgA argB2 pabaA1* mutant was the recipient strain in transformations with *uapA* alleles cloned in vectors pAN510-GFP or pAN510exp (see below) or with an 'empty' vector (pBS-ArgB) as a negative control.[11,19] These vectors allow selection of tranformants based on arginine auxotrophy complementation. Transformation of *A. nidulans* was as described in Koukaki *et al.*[32] Transformants expressing intact *uapA* or *uapA–gfp* alleles or *uapA–uapC* chimeras (see below), through either single-copy or multicopy plasmid integration events, were identified by PCR and Southern analysis. In most cases, we selected transformants originating from homologous integration in the *argB* locus. In some cases, single-copy *uapA* alleles were integrated heterologously, but these transformants expressed UapA also at physiological levels (not shown). A vector encoding a functional UapC–GFP has been previously described.[33] This vector was used, in a cotransformation experiment with plasmid pBS-ArgB,[19] to obtain a Δ*ACZ* transformant expressing UapC–GFP from a single-copy integration event. Strains expressing chimeras $AC_{8–9}A$ and $AC_{12}A$ were previously described.[9,15] Growth tests were performed at 25 and 37 °C, at different pH values (4.5, 6.8, and 9.5), and at different purine concentrations (0.5 and 2 mM): 0.5 mM is the standard purine concentration used in all previous studies concerning purine metabolism in *A. nidulans*. Oxypurinol was used at 100 μM, with nitrate (10 mM) as a nitrogen source.

Author's personal copy

uapA alleles gave phenotypes that were independent of the presence or absence of the C-terminal *gfp* epitope. The only exceptions were the very low activity mutants E356D/T526M and N409D/F528A, which did not function when tagged with GFP.

uapA mutations and *uapA–uapC* chimeras

The *uapA* orf from original mutants was amplified by PCR using primers 1 and 2 or 4 (Supplementary Table 2), cloned in pAN510exp, and sequenced‡. Single mutations were constructed by site-directed mutagenesis (Stratagene) on vector pAN510-GFP,[18] using complementary oligonucleotides carrying the desired substitution (Supplementary Table 1) and confirmed by sequencing. Double mutations were constructed by standard PCR and cloning in pAN510exp and/or pAN510-GFP. Chimera AC_1A was constructed by the double-joint PCR method,[34] using chimeric primers 7 and 10 (Supplementary Table 2). The resulting chimeric PCR product was amplified using primers 1 and 4 and cloned into pAN510exp.

Plasmid constructions

pAN510 has been described in Diallinas *et al.*[9] It is a pBluescript vector carrying the *uapA* orf and its flanking sequences and the *argB* gene as a selection marker. pAN510-GFP is a similar vector carrying a *uapA–gfp* fusion.[18] pAN510exp and pAN510exp-GFP are modified versions of pAN510 and pAN510-GFP introducing a BamHI site at the translation start codon and knocking out an XbaI site in pBluescript multicloning region for cloning purposes.[19] pAN510exp-GFP was made by cloning the *gfp* orf, obtained by PCR using primers 3 and 5 (Supplementary Table 2), in the XbaI site of pAN510exp. Double mutations in the TMS8–9 loop and TMS1 or TMS12 were constructed by replacing the 460-bp PstI-PstI restriction fragment from pAN510exp vectors including a single mutation in TMS1 or TMS12 (Q113L, T526L, T526M, and F528A) with the same fragment from pAN510exp vectors including mutations in the TMS8–9 loop (Glu356, Asp388, Gln408, and Asn409). For the construction of the *gfp*-tagged versions of the double alleles, the *uapA* orf including the two mutations was recloned in vector pAN510exp-GFP using primers 1 and 6 (Supplementary Table 2). The double mutation Q113L/T526L was constructed by replacing a 1000-bp ClaI-XbaI restriction fragment from the pAN510exp-Q113L plasmid with the corresponding ClaI-XbaI restriction fragment from the pAN510exp-T526L plasmid. For the construction of the *gfp*-tagged version of Q113L/T526L, the *uapA* orf including the two mutations was recloned in vector pAN510exp-GFP as above. The E356Q/Q408E-GFP and E356Q/N409D-GFP double mutations were constructed by replacing a 1450-bp SacII-SacII restriction fragment from pAN510-GFP plasmid carrying mutation Q408E or N409D with the corresponding fragment from pAN510-GFP-E356Q. Strains expressing chimeras $AC_{8-9}A$ and $AC_{12}A$ were previously described.[9,15] Chimera AC_1A was constructed by the double-joint PCR method,[34] using chimeric primers 7 and 10 (Supplementary Table 2). The resulting chimeric PCR product was amplified using primers 1 and 4 and cloned into pAN510exp. This vector was used to isolate a strain expressing AC_1A-GFP, from a single-copy integration event in a Δ*ACZ* genetic background, as previously described for chimera $AC_{12}A$.[15]

‡ www.macrogen.com

Standard nucleic acid manipulations and fluorescence microscopy

Southern blot and PCR analyses were done as described in Sambrook *et al.*[31] [^{32}P]dCTP-labeled molecules used as *argB*- or *uapA*-specific probes were prepared using a random hexanucleotide primer kit following the supplier's instructions (Takara, Japan). Total genomic DNA isolation from *A. nidulans* strains and all other techniques involving DNA manipulations were according to Sambrook *et al.*[31] Samples for fluorescence microscopy were prepared as described previously.[33] In brief, the samples were incubated on coverslips in liquid MM supplemented with urea as nitrogen source at 25 °C for 12–14 h, observed on an Axioplan Zeiss phase-contrast epifluorescent microscope with appropriate filters, and the resulting images were acquired with a Zeiss MRC5 digital camera using the AxioVs40 V4.40.0 software. Images were then processed in the Adobe Photoshop CS2 V9.0.2 software.

Kinetic analysis and construction of substrate interaction models

[^{3}H]xanthine or [^{3}H]hypoxanthine uptake was assayed in conidiospores at 37 or 25 °C as described previously.[10] Radiolabeled purines (19.6–33.4 Ci/mmol) were from Moravek Biochemicals (Brea, CA). K_i values were calculated from the Cheng and Prusoff equation[35] $K_i = IC_{50}/[1/(L/K_m)]$, in which L is the permeant concentration. Free Gibbs energy (ΔG^0) was calculated from $\Delta G^0 = -RT\ln(K_i)$, where R is the ideal gas constant and T is the absolute temperature (in Kelvin).

Acknowledgements

We are grateful to C. Scazzocchio for critically reading the manuscript. We particularly thank V. Kosti for help in uptake studies and H. Tsilivi and V. Paspaliaris for technical assistance. A.V. and I.P. were supported by grants from the Ministry of Development (PENED 2003) and the Hellenic Pasteur Institute, respectively. Work in the laboratory of G.D. is part of a research project (PENED 2003) cofinanced by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jmb.2008.08.005

References

1. Gournas, C., Papageorgiou, I. & Diallinas, G. (2008). The nucleobase–ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure–function relationships and physiological role. *Mol. Biosyst.* **4**, 404–416.
2. Gorfinkiel, L., Diallinas, G. & Scazzocchio, C. (1993). Sequence and regulation of the uapA gene encoding a uric acid–xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 23376–23381.

Author's personal copy

3. Diallinas, G., Gorfinkiel, L., Arst, H. N., Jr, Cecchetto, G. & Scazzocchio, C. (1995). Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **270**, 8610–8622.
4. Diallinas, G. & Scazzocchio, C. (1989). A gene coding for the uric acid–xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a *cis*-acting mutation. *Genetics*, **122**, 341–350.
5. Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y. *et al.* (1999). A family of mammalian Na^+-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, **399**, 70–75.
6. Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2007). Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 657–675.
7. Karatza, P., Panos, P., Georgopoulou, E. & Frillingos, S. (2006). Cysteine-scanning analysis of the nucleobase–ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential, and Ile-329–Val-339 form an alpha-helix. *J. Biol. Chem.* **281**, 39881–39890.
8. Karatza, P. & Frillingos, S. (2005). Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 251–261.
9. Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A. & Scazzocchio, C. (1998). Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO J.* **17**, 3827–3837.
10. Meintanis, C., Karagouni, A. D. & Diallinas, G. (2000). Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase–ascorbate transporter family. *Mol. Membr. Biol.* **17**, 47–57.
11. Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S. & Diallinas, G. (2005). The nucleobase–ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J. Mol. Biol.* **350**, 499–513.
12. Goudela, S., Karatza, P., Koukaki, M., Frillingos, S. & Diallinas, G. (2005). Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 263–275.
13. Pantazopoulou, A. & Diallinas, G. (2006). The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 337–348.
14. Amillis, S., Koukaki, M. & Diallinas, G. (2001). Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid–xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. *J. Mol. Biol.* **313**, 765–774.
15. Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M. & Diallinas, G. (2006). A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *J. Mol. Biol.* **357**, 808–819.
16. Papakostas, K., Georgopoulou, E. & Frillingos, S. (2008). Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgfO xanthine permease: ILE-432 and ASN-430 are important. *J. Biol. Chem.* **283**, 13666–13678.
17. Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C. & Drevet, C. (2004). The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J. Biol. Chem.* **279**, 3132–3141.
18. Pantazopoulou, A., Lemuh, N. D., Hatzinikolaou, D. G., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C. & Diallinas, G. (2007). Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 627–640.
19. Vlanti, A. & Diallinas, G. (2008). The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine–purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Mol. Microbiol.* **68**, 959–977.
20. Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R. & Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, **301**, 610–615.
21. Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y. & Gouaux, E. (2005). Crystal structure of a bacterial homologue of Na^+/Cl^- dependent neurotransmitter transporters. *Nature*, **437**, 215–223.
22. Kanner, B. I. (2006). Structure and function of sodium-coupled GABA and glutamate transporters. *J. Membr. Biol.* **213**, 89–100.
23. Lolkema, J. S. (2006). Domain structure and pore loops in the 2-hydroxycarboxylate transporter family. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 318–325.
24. Vazquez-Ibar, J. L., Guan, L., Weinglass, A. B., Verner, G., Gordillo, R. & Kaback, H. R. (2004). Sugar recognition by the lactose permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 49214–49221.
25. Kaback, H. R. (2005). Structure and mechanism of the lactose permease. *C. R. Biol.* **328**, 557–567.
26. Johnson, J. L. & Brooker, R. J. (2004). Control of H^+/lactose coupling by ionic interactions in the lactose permease of *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* **198**, 135–146.
27. Hernandez, B., Orozco, M. & Luque, F. J. (1996). Tautomerism of xanthine and alloxanthine: a model for substrate recognition by xanthine oxidase. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **10**, 535–544.
28. Tsao, T. F. & Marzluf, G. A. (1976). Genetic and metabolic regulation of purine base transport in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* **149**, 347–355.
29. Goudela, S., Reichard, U., Amillis, S. & Diallinas, G. (2008). Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 459–472.
30. Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 51–56.
31. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
32. Koukaki, M., Giannoutsou, E., Karagouni, A. & Diallinas, G. (2003). A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J. Microbiol. Methods*, **55**, 687–695.
33. Valdez-Taubas, J., Diallinas, G., Scazzocchio, C. & Rosa, A. L. (2000). Protein expression and subcellular localization of the general purine transporter UapC from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **30**, 105–113.
34. Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y. & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 973–981.
35. Cheng, Y. & Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108.

Σχέσεις δομής-λειτουργίας στην Οικογένεια μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού οξέος (NAT): Μαθήματα από πρότυπα μικροβιακά γενετικά συστήματα.

Γεώργιος Διαλλινάς και Χρήστος Γουρνάς

Στο άρθρο αυτό αναλύουμε τις εργασίες μας που αφορούν τον μεταφορέα ουρικού-ξανθίνης UapA στον *A. nidulans*, καθώς και αυτές της ομάδας του Σ. Φριλλίγγου (Παν. Ιωαννίνων) που αφορούν στην ομόλογη πρωτεΐνη YgfO, εξειδικευμένη στη μεταφορά ξανθίνης στην *E. coli*, ως πρότυπα παραδείγματα μελέτης μιας από τις πιο σημαντικές οικογένειες μεταφορέων σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά. Δείχνουμε πως οι μικροοργανισμοί μοντέλα που χρησιμοποιούμε παρέχουν μοναδικά γενετικά, μοριακά, φυσιολογικά και βιοχημικά εργαλεία για την προσέγγιση ερωτημάτων που αφορούν τις σχέσεις δομής-λειτουργίας, έκφρασης και υποκυτταρικής διακίνησης των μεταφορέων αυτών. Τέλος, αναφερόμαστε στην δυνατότητα οι μελέτες μεταφορέων σε πρότυπους οργανισμούς να χρησιμοποιηθούν ως βάση για τον λογικό σχεδιασμό φαρμάκων με στοχευμένη πρόσβαση σε κύτταρα στόχους

[Channels 2:5, 1-10; September/October 2008]; ©2008 Landes Bioscience

Review

Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family

Lessons from model microbial genetic systems

George Diallinas* and Christos Gournas

Faculty of Biology; University of Athens; Athens Greece

Key words: *Aspergillus nidulans*, UapA, YgfO, purine, antifungals

This manuscript has been published online, prior to printing.Once the issue is complete and page numbers have been assigned, the citation will change accordingly.

©2008 LANDES BIOSCIENCE. DO NOT DISTRIBUTE.

Nucleobase Transporters

Highly specific nucleobase transport systems exist in all domains of life. A small number of genes encoding such purine and/or pyrimidine carriers have been cloned and studied in great detail, mostly in bacteria, fungi and protozoa,[1-5] but also in plants[6-8] and mammals.[2,4,9] The sequences of hundreds of other putative proteins extant in databases are homologous to the known nucleobase transporters, but in the majority of cases their physiological functions remain undetermined. *Sensu strictu* nucleobase-specific transporters belong to four evolutionary distinct proteins families (http://www.membranetransport.org).[2] These are the Nucleobase Cation Symporter family 1 (NCS1), also known as Purine-Related Transporter family (PRT),[2] the Nucleobase-Ascorbate Transporter family (NAT or NCS2), the AzgA-like family and the so called Equilibrative Nucleoside Transporter family (ENT). The NCS1 family includes nucleobase/H^+ symporters from prokaryotes, fungi and plants. Most known members are specific for purines or/and pyrimidines (adenine, hypoxanthine, guanine, uracil, cytosine), but some are also specific for other purine related compounds (allantoin, hydantoin, thiamine, pyridoxal-based compounds and nicotinamide riboside). The NAT/NCS2 family includes bacterial, fungal and plant uric acid/xanthine/uracil-H^+ symporters and, surprisingly, the mammalian L-ascorbate/Na^+ transporters.[10,11] The only members of known function of the AzgA-family, those of the ascomycetes *Aspergillus nidulans*[12] and *Aspergillus fumigatus,*[13] and the plant *Arabidopsis thaliana*,[14,15] are strictly specific for purine/H^+ symport (adenine, hypoxanthine, guanine). This family seems not to be present in metazoans. Finally, nucleobase-specific transporters of the ENT family are present in protozoa and mammals.[2,3,9,16] Most seem to be H^+ symporters and, as the name of the family indicates, some can also recognize nucleosides. In plants, two more families, PUP[7] and UPS,[6] include members, which transport purine-related metabolites (cytokinin, trans-zeatin, caffeine, ribosylated purine derivatives and allantoin, uric acid, xanthine, respectively), usually coupled with H^+ symport. In mammals multiple organic anion transporters, belonging to distinct evolutionary families, have been reported to contribute to net renal excretion of uric acid (URAT1, UAT, Oat1, Oat3, MRP2, MRP4 and Oatv1).[17-22] Finally, the SLC2A9 transporter gene, considered to encode a fructose transporter, was recently shown, by expression in *Xenopus laevis* oocytes, to be a uric acid facilitator[23] (an MFS member) with pronounced sex-specific effects related to serum uric acid concentrations, hyperuricemia, gout and possibly cardiovascular disease and diabetes.[24]

Given the metabolic importance of purine salvage and metabolism in all kinds of cells, the complex role of uric acid in mammals and allantoin in plants, but also the fact that purine and pyrimidine analogues are being widely used as antimetabolites against a host of different diseases and infections, ranging from anti-tumor and leukemia chemotherapy and anti-viral compounds to drugs against parasitic disease or for the prevention of organ transplant rejection and the treatment of gout,[25,26] knowledge on how nucleobase and related transporters work has an obvious scientific interest. However, nearly nothing is known on the structure of any transporter involved in nucleobase transport, a problem often associated with long hydrophobic transmembrane proteins. Only homology threading (Diallinas G, unpublished) shows some evidence that the NCS1 transporters might have structural similarity with the *Aquifex aeolicus* leucine (LeuT) and the *Vibrio parahaemolyticus* galactose (vSGLT) transporters, two bacterial carriers, belonging to distinct symporter families, whose structure has recently been solved. NCS1, NAT/NCS2 and AzgA transporters might also be very distantly related, but this is not supported by homology threading.[5] In contrast to the dearth of structural studies, a wealth of genetic and biochemical approaches carried out mostly in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* and in *Escherichia coli* have, in the recent years, contributed significantly to our knowledge of nucleobase transporters. In this review, we highlight results specifically concerning structure-function relationships of two prototype microbial NAT members and show how these findings are related to NAT function in general. We will not discuss the regulation of the expression of these microbial permeases, a subject recently reviewed elsewhere.[4,5]

*Correspondence to: George Diallinas; Faculty of Biology; University of Athens; Panepistimioupolis 15781; Athens, Greece; Tel.: +302107274649; Fax. +302107274702; Email: diallina@biol.uoa.gr

Submitted: 10/10/08; Accepted: 10/10/08

Previously published online as a *Channels* E-publication:
http://www.landesbioscience.com/journals/channels/article/6902

Table 1 **NAT proteins of known function**

Organism	Transporter	Physiological substrates [$K_{m/i}$ (μM)]	Other ligands [$K_{m/i}$ (μM)]	Transport capacity
Aspergillus nidulans	UapA	X [7], UA [8]	2TX [63], 3MX [28], 8MX [100], OX [103], ALL[a]	H
	UapC	X [4], UA [136]	1MX [<50], 2TX [<50], 3MX [~100], 8MX [~100], OX [38], ALL[a]	M
Aspergillus fumigatus	UapC	X [6], UA [171]	8MX [50], 1MX [60], 2TX [65], 3MX [100], OX [103]	H
Candida albicans	Xut1p	X [4], UA [50]	2TX [30], 2TUA [97], 3MX [22], 6TUA [84], 8MX [80], 8AZX [55], OX[4]	H
Escherichia coli	YgfO	X [4]	1MX [36], 2TX [91], 3MX [72], 6TX [41], 9MX [53]	H
	Yice	X [3]	-	L
	UraA	U	-	n.d.
Bacillus subtilis	PucJ	UA, X (?)	-	n.d.
	PucK	UA, X (?)	-	n.d.
	PbuX	X	-	n.d.
	PyrP	U	-	n.d.
Zea mays	Lpe1	X [30], Ua [33]	-	H
Rattus norvegicus	SVCT1	AA [29]	DAA [~700]	H
	SVCT2	AA [10–100]	-	L[b]
Mus musculus	SVCT2	AA [20–115]	-	L[b]
Homo sapiens	SVCT1	AA [65–237]	BrAA [33]	H
	SVCT2	AA [8–62]	DC [2,35], AA-DC [0,2], AA-NH-DC [24], BrAA [2,7], AA–KA [40], BrAA–KA [7,4], BrAA-DC [21]	L/H[b]
Sus scrofa	SVCT2	AA [27]	-	n.d

X, xanthine; UA, uric acid; 1MX, 1-methylxanthine; 2TX, 2-thioxanthine; 3MX, 3-methylxanthine; 6TX, 6-thioxanthine; 8MX, 8-methylxanthine; 8AZX, 8-azaxanthine; 9MX, 9-methylxanthine; OX, oxypurinol; ALL, allopurinol; U, Uracil; AA, L-ascorbic acid; DAA, D-ascorbic acid; BrAA, 6-Bromo-6-deoxy-L-ascorbic acid; DC, Diclophenamic acid; KA, kynurenic acid; AA-DC, 6-diclofenamic-L-ascorbic acid; AA-KA, 6-Kynurenic-L-ascorbic acid; BrAA-KA, 6-Bromo-6-kynurenic-L-ascorbic acid; BrAA-DC, 6-Bromo-6-diclopheramic-L-ascorbic acid; AA-NH-DC, AA-NH-DC, 6-amino-6-dicloropheramic-L-ascorbic acid. [a]Allopurinol affinity cannot be determined due to non-Michaelis-Menten kinetics (Koukaki M, Diallinas G, unpublished). Based on genetics and growth tests allopurinol is formally shown to be a substrate of UapA and UapC and that concentrations as low as 2 μM lead to allopurinol sensitivity. [b]The V_m values of SVCT2-mediated ascorbate transport in heterologous systems indicate a low capacity transporter. However data from endogenously expressed hSVCT1 and hSVCT2 propose similar V_m values.[11,60] H, high; M, moderate; L, low; n.d., not done.

The NAT Family and its Physiological Role

The NAT family was defined by the cloning and characterization of the UapA[27,28] and UapC[29] uric acid-xanthine permeases of the ascomycete *Aspergillus nidulans,* and the UraA[30] and PyrP[31] uracil permeases of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis,* respectively. At present, the function and specificity of fourteen more NAT proteins is known (Table 1). All six studied mammalian NATs (SVCT1 and SVCT2) transport L-ascorbic acid rather than purines or pyrimidines. Thus, the NAT family is subdivided into three sub-families in respect to substrate specificity; the first, present in bacteria, fungi and plants, is specific for the oxidized purines xanthine and/or uric acid, the second, present only in bacteria, is specific for uracil, and the third present in vertebrates is specific for L-ascorbic acid. No function is known for metazoan homologues outside the vertebrates. All known bacterial, fungal and plant NATs are high-affinity H^+ symporters, while the mammalian SVCTs use Na^+ for L-ascorbate symport.[4] Hundreds of NAT homologues are present in nearly all organisms, a prominent exception being *Saccharomyces cerevisiae* and several protozoa. All NATs are predicted to contain 12 putative transmembrane segments (TMS) and cytoplasmically located N- and C-tails, whereas no apparent symmetry or the presence of large cytoplasmic loops is evident.[4,32] The high α-helical content of NATs is suggested by Circular Dichroism studies, showing that two prototype members of the family (UapA and YgfO) are >80–90% helical (Frillingos S, Lemuh N, Diallinas G, unpublished observations). Most divergent members can be recognized by the presence of two highly conserved motifs. These are the so called NAT signature motif, [Q/E/P]-**N**-X-**G**-X-X-X-X-**T**-[R/K/G] located in an amphipathic region just upstream from TMS9,[32-34] and the QH motif in the middle of TMS1,[32,35] (see Fig. 1). Both motives have been shown to be critical for the function of fungal and bacterial NATs (see below). Microbial NATS, whether bacterial or fungal, show higher similarity among each other (30–35%) than to plant and metazoan homologues (22–24 %). Plants have numerous NAT/NCS2 transporters, the only one with known function being Lpe1, a high-affinity, high-capacity, uric acid-xanthine/H^+ symporter, necessary for chloroplast development in maize.[36] *Drosophila melanogaster* has a single NAT homologue, *Caenorhabditis elegans* six and *Arabidopsis thaliana* 12, whose function remains unknown.[8] The metazoan NAT proteins are 35–40% identical among themselves and 25% identical with plant members. Mammals, besides the two known ascorbate transporters (SVCT1 and SVCT2), also have homologues of unknown function which possess motives more similar to those present in the characterized nucleobase transporters of bacteria, fungi and plants.[4] These proteins might be related to nucleobase-related uptake activities. Most vertebrates, except primates, also include NATs possessing conserved motives that are more similar to the bacterial, fungal or plant nucleobase carriers, rather than to the mammalian vitamin C transporters.[4] As a general comment, it seems that *nucleobase-specific*

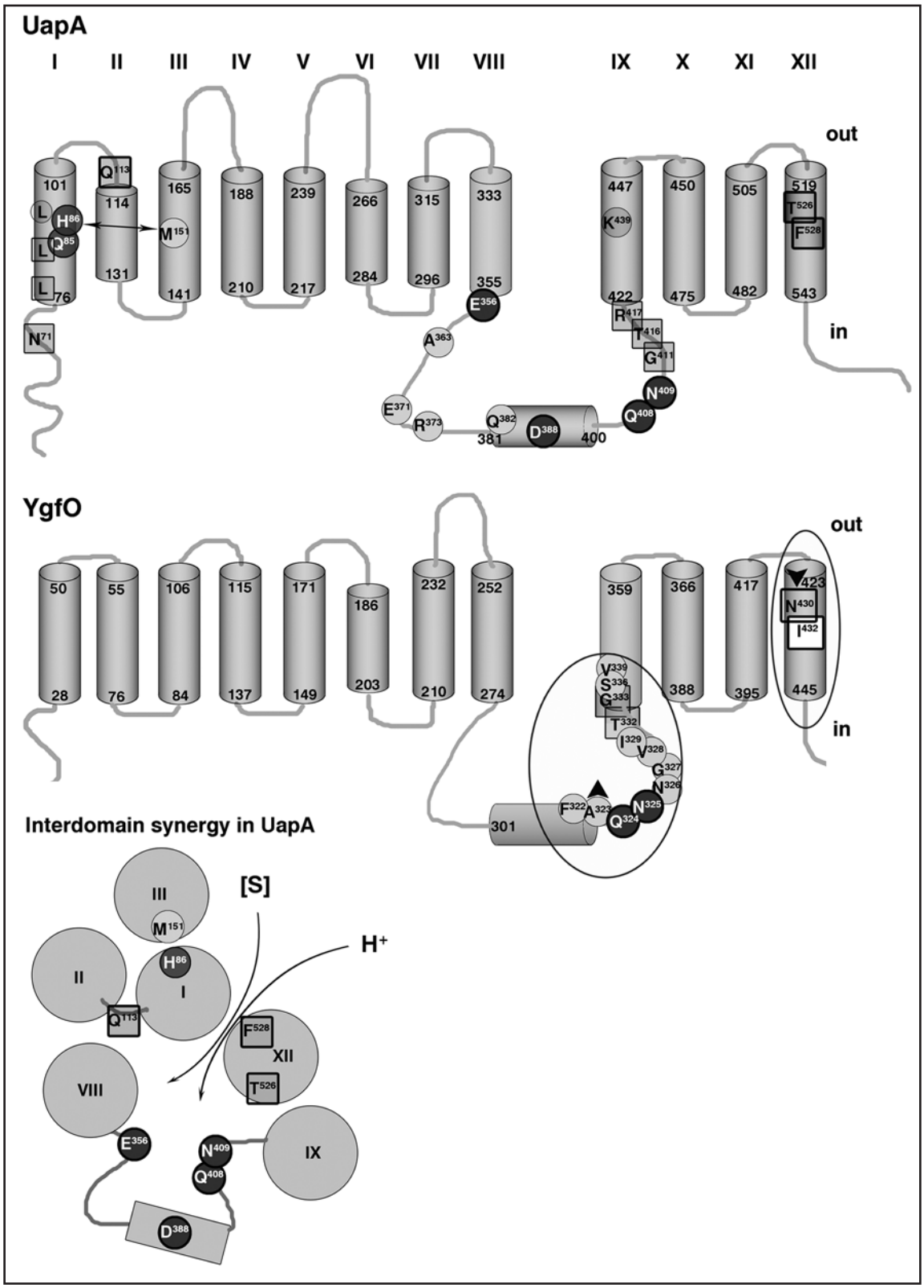


Figure 1. Topology and structure-function relationships in the two NAT prototypes, UapA and YgfO. Putative α-helical TMSs are displayed as cylinders. Residues important for function are shown. Residues absolutely necessary for function are highlighted in dark grey background (UapA: Q85, E356, D388, Q408, N409, YgfO: Q324, N325). Residues affecting specificity or/and affinity are highlighted within squares (UapA: N71, L77, L84, Q113, G411, T416, R417, T526, F528; YgfO: T332, G333, N430, I432). In UapA, H86 in TMS1 affects topogenesis and interacts genetically with M151 (TMS3). In YgfO encircled domains display regions where Cys-scanning mutagenesis has been performed. The residues shown, except I432, are sensitive to NEM alkylation when replaced by Cys. N325C is partially protected against NEM labeling upon substrate addition, while Q324C is highly reactive but not substrate protected, as expected due to impaired substrate binding.[61] N430C is completely protected from alkylation upon 2-thioxanthine addition, while A323C NEM reactivity is enhanced upon substrate addition. A speculative topology model summarizing interdomain synergy in UapA is also shown.

NATs seem to be ubiquitous from prokaryotes to fish, but are lost in several mammalian groups, and entirely lost in primates. On the other hand, *ascorbic acid-specific* NATs seem to appear in fish, amphibians, marsupials, mammals and primates. We find very intriguing that the mammalian L-ascorbate transporters seem to have evolved from uric acid/xanthine transporters of lower eukaryotes, since uric acid and xanthine are very different from ascorbic acid (discussed later). Table 1 summarizes characteristics of all known NAT proteins.

In bacteria, fungi and plants NATs are responsible for high-affinity, high-capacity uptake of xanthine and/or uric acid or uracil from the growth medium. Uracil can be directly channeled to nucleoside and nucleic acid synthesis, and this seems to serve a back-up scavenging role for pyrimidine salvage. On the other hand, xanthine and uric acid cannot be used to make other purines or nucleosides but can be utilized as nitrogen sources. In plants, inactivation of the uric acid-xanthine transporter ZmLPE1, the unique NAT protein of maize, leads to a defective chloroplast phenotype.[37] The *lpe1* gene is expressed in non-photosynthetic tissues, mostly in roots, and seems to be repressed by light. The expression of Lpe1 suggests that this permease might not only be responsible for uric acid/xanthine uptake, but also be involved in plastid function and/or metabolic processes affected by light. We recently obtained evidence for a cryptic role of NAT-mediated uric acid intercellular transport and catabolism in fungal development. In particular, in *A. nidulans* we showed that metabolically produced uric acid is transported, solely via the major uric acid transporter UapA, from the mycelium to asexually differentiated aerial cells, called metulae, where it is further oxidized to allantoin[38] (Borbolis F, Karachaliou M, Hatzinikolaou D, Pantazopoulou A and Diallinas G, unpublished). Metulae form the primary sterigmata from where secondary sterigmata (phialidiae) bud to eventually produce chains of external uninucleate conidiospores. Despite the fact that lack of the uric acid transporter (*uapA*Δ) does not lead to a major mutant phenotype, total lack of uric acid production in mutants genetically blocked in upstream steps of purine catabolism (e.g., *hxA*$^{-}$ *hxnS*$^{-}$), have increased sensitivity to oxidation and sporulate less. Furthermore, when uric acid is supplied externally *A. nidulans* sporulates more intensely, is more resistant to oxidation and conidiospores show increased survival to uv (Borbolis F, Karachaliou M, Hatzinikolaou D, Pantazopoulou A, Diallinas G, unpublished).

In metazoa, the only NAT members of known function are the mammalian ascorbate/Na^{+} transporters SVCT1 and SVCT2.[10,11,39] Ascorbate (vitamin C) is an effective antioxidant and UV absorbent[40] and plays a key role in many enzymatic reactions as a cofactor.[11] Its varying distribution between extra- and intra-cellular fluids, its presence in a plethora of organs and tissues, and the fact that humans have lost the ability to synthesize it, makes the study of its transport systems of primary importance.[4,11] SVCTs are highly conserved among mammals, with human, rat, mouse and rabbit homologues having 95–98% identity. The two transporters have distinct physiological roles. SVCT1 is responsible for the maintenance of the whole body ascorbate homeostasis, through dietary absorption and renal reabsorption. SVCT2 is involved in ascorbate uptake in metabolically active and specialized structures, seemingly protecting them from oxidative stress and UV radiation. Mice knocked-out for mSVCT2 (*slc23a2*) die immediately after birth, due to diffuse cerebral hemorrhage and impaired nervous system functions, despite having a normal development in uterus.[41] Heterozygous *slc23a2* mice survive to adulthood, but suffer reduced ascorbate levels in the brain and several other tissues. Primates do not synthesize ascorbate at all, indicating a more crucial role of the vitamin's transport.

Structure-Function Relationships: The Power of Model Microbial Systems

Despite the fact that high-resolution structures of membrane proteins are now emerging, the hydrophobic and metastable nature of transporters makes them difficult to study by traditional X-ray crystallography or NMR. In addition, even in cases of solved structures, the fact that transporters need to be removed from their natural membrane environment for their structure to be determined, may lead to artifacts, especially if complementary functional data from in vivo studies are missing. In addition, although solved structures provide fundamental molecular details on membrane protein function, alone they cannot give satisfying information on the dynamic mechanism of transport catalysis. Therefore, static structural data should, ideally, be integrated with genetic, biochemical, biophysical studies and other computational methods, to understand how transporters function at the molecular level. The most successful paradigm of integration of multidisciplinary approaches in studying a transporter is that of the lactose permease (LacY) of *E. coli*.[42,43] In the next sections of this review, we highlight how the ascomycete *A. nidulans* and *E. coli* have become unique complementary systems to study, using classical and reverse genetics and biochemical approaches, structure-function relationships of NATs.

A. nidulans or the Genetic Approach

A. nidulans is probably the organism where purine uptake and catabolism have been studied in most detail. All structural and regulatory genes involved, including five genes encoding purine permeases, have been identified and studied.[4] Most importantly, *A. nidulans*, unlike *S. cerevisiae,* utilizes purines as sole nitrogen sources, which in turn means that given a suitable genetic background, any mutation affecting a purine carrier is reflected in a discernable phenotype. Transporter-specific mutants can be selected and characterized by simple growth tests on purines or purine toxic analogues in a genetic background lacking all other purine transporters. Such single- or multiple transporter mutant strains are already available through targeted knockout approaches and genetic crossing. Thus, in principle, different genetic screens or selective approaches can be designed to obtain mutations, in any purine transporter. These mutations can then easily be distinguished into those affecting transporter topogenesis or those affecting several aspects of transporter function, such as transport capacity, substrate specificity, substrate affinity or ion selectivity. Detailed systematic mutational analysis can be employed in parallel to further characterize the role of specific amino acid residues. Subsequent, easily performed, transport kinetic analysis in germinated fungal conidiospores, using radiolabeled purines, and the use of GFP as a silent fluorescent tag allow rigorous conclusions to be drawn on the nature of these mutations (for a graphical summary of these tools see Fig. 2). Two of the five nucleobase permeases in *A. nidulans*, namely UapA and UapC, belong to the NAT family. One of these, UapA, has become the paradigm for structure-function analysis in the NAT family.

UapA is a high-affinity (*K*m 7–8 μM), high-capacity transporter specific for uric acid and xanthine, able to transport also the analogues 2-thiouric acid, 2-thioxanthine, 3-methylxanthine, and the drugs allopurinol and oxypurinol.[32,34,44,45] The first effort to identify regions critical for its function was the construction of chimeras consisting of UapA and UapC, the second NAT protein of *A. nidulans*.[33] UapC is a carrier with high-affinity (*K*m 5 μM) for xanthine, moderate affinity for uric acid (*K*m 130 μM) and very low affinity (*K*m >500 μM) and capacity for other purines, not recognized by UapA, such as adenine or hypoxanthine.[32] The approach of chimeric protein analysis revealed that the region between TMS8 and TMS9 is necessary and sufficient for determining the basic characteristics of the two permeases. In other words, chimeras including the TMS8-9 region from UapC had functional characteristics similar to UapC, rather than those of UapA. More specifically, they have reduced affinity for uric acid and acquired the capacity of very low binding of purines, other than uric acid and xanthine (see also later). This region included one of the two highly conserved motives of the NAT family, and in particular the NAT signature motif (^{408}[Q/E/P]-**N**-X-**G**-X-X-X-X-**T**-[R/K/G]^{417}, numbers refer to UapA). Extensive physiological, microscopic and kinetic analyses of systematic site-directed mutations have provided evidence that this motif is part of the substrate translocation pathway.[32,34,45] None of the several mutations made affected UapA translocation in the plasma membrane, as this was evidenced using GFP-tagged versions of mutant UapA molecules. In growth tests on purines, mutations in Q408 and N409 had the most pronounced effect, practically showing that these residues are irreplaceable for UapA function at 25°C. Some mutations in G411 and T416 (G411A, G411P, T416N) alter the specificity of UapA, so that in addition to uric acid and xanthine, the corresponding mutants could also grow on high concentrations (>0.5 mM) of hypoxanthine and adenine. Detailed uptake and competitive inhibition assays have confirmed that these mutations result in a protein able to transport adenine and hypoxanthine. Furthermore, the same analysis showed that Q408 is involved in substrate binding and substrate binding specificity, N409 is necessary for transport catalysis per se, while all other conserved residues of the motif (G411, T416, R417) contribute less, but considerably, to UapA specificity. Competition assays with a more than 30 different purine analogues, substituted each time at a single position in the purine ring, have shown that Q408 might directly be involved, as H^+ donor, in interactions with the unprotonated N9 of xanthine or the C8 = O of uric acid.[32,34,44,45] In line with this, mutant UapA-Q408E could bind purines with protonated N9-H, such as hypoxanthine, guanine or 7-deazaxanthine. This confirmed that Q408 is a basic element in substrate recognition and thus a critical residue determining the substrate affinity and specificity of UapA. A more recent mutational analysis[32] has further shown that the TMS8-9 loop includes two more amino acid residues, outside the NAT signature motif, absolutely essential for UapA function. These are the absolutely conserved Glu356 and the relatively conserved Asp388 (Fig. 1). Even the most conservative substitutions of these amino acids led to almost inactive UapA molecules. With the exception of mutant UapA-D388E, which was mostly retained in the Endoplasmic Reticulum (ER), the plasma membrane topology of all other mutants concerning E356 and D388 was unaffected. The residual transport activity of mutant E356D (5%) was exploited, through overexpression of the corresponding allele, to show that this substitution leads to a significant increase (8–17-fold) in the binding affinities of UapA for the physiological substrates and a similar or even greater increase for several xanthine analogues. Finally, in the same analysis it was shown that two more residues in the TMS8-9 segment, Q382 and K439, contribute moderately to the affinity of UapA for xanthine analogues with bulky substitutions.[32]

In an attempt to suppress the cryosensitivity of the Q408E mutant, a second-site suppressor, F528S, was identified within TMS12.[46] Subsequent kinetic analysis of systematic site-directed replacements of F528 revealed that substitution of Phe with small, aliphatic, amino acids led to transporter molecules that could catalyze the translocation of a series of purines, albeit with low affinity (>1 mM), without affecting the high-affinity (5–10 μM) for its physiological substrates, uric acid and xanthine.[47] This suggested that this residue is not part, *sensu strictu,* of the substrate binding site. Recently, a different genetic screen to obtain UapA mutants able to transport adenine revealed two more residues that could affect UapA specificity in a similar way. These residues were the partially conserved T526 and the variable Q113, the first lying within TMS12 and the second in the putative extracellular loop between TMS1 and TMS2.[32] Analysis of the kinetic profile of several site-directed mutants supports the idea that these mutations relax the specificity of UapA. Similarly to F528 mutation, T526 and Q113 substitutions should affect specificity indirectly, as they do not affect the high-affinity binding of UapA to its physiological substrates.[32]

The role of the TMS1 region on UapA function and specificity was further studied by systematic mutations of the second most conserved NAT motif ($Q^{85}H^{86}$) and of three Leu residues forming a Leu repeat (L77, L84, L91) within this α-helix, and finally, of an Asn residue (N71) located just upstream from the α-helix.[32,35] Leu residues in TMS might be involved in tight α-helical packing. Q85 mutations showed that this conserved residue is absolutely essential for function. Mutants conserving some transport activity (Q85E, Q85N, Q85L) have shown that the substrate affinity or specificity of UapA is not significantly altered in those strains, suggesting that the corresponding replacements affect transporter catalysis per se, rather than substrate binding.[35] Mutations in H86 affect UapA folding rather than function and are discussed later.[35] Ala substitutions of the Leu residues (L77, L84) of the Leu repeat and of Asn71 led to mutants that could grow on natural substrates, but also on high concentrations of hypoxanthine or adenine. Kinetic analysis showed that these novel substrates are transported through very low binding affinities, while the high affinities for physiological substrates were little or not affected.[32,35]

Further insight on the role of specific amino acids of the TMS8-TMS9 loop and the other two domains found to affect UapA specificity was gained by characterizing a series of double mutants. Physiological growth tests, GFP microscopy and detailed kinetic analyses showed a plethora of allele-specific phenotypes compatible with a functional, and probably physical, synergy between the TMS8-9 loop, TMS12 and TMS1 (see Fig. 1). Prominent examples from this analysis are the double mutants Q408E/F528S, Q408E/T526M, Q408E/T526L, which, besides from their normal kinetic profile towards their physiological substrates (uric acid and xanthine), also showed UapA mediated high affinity, and relatively high capacity, hypoxanthine transport. This distinguishes them

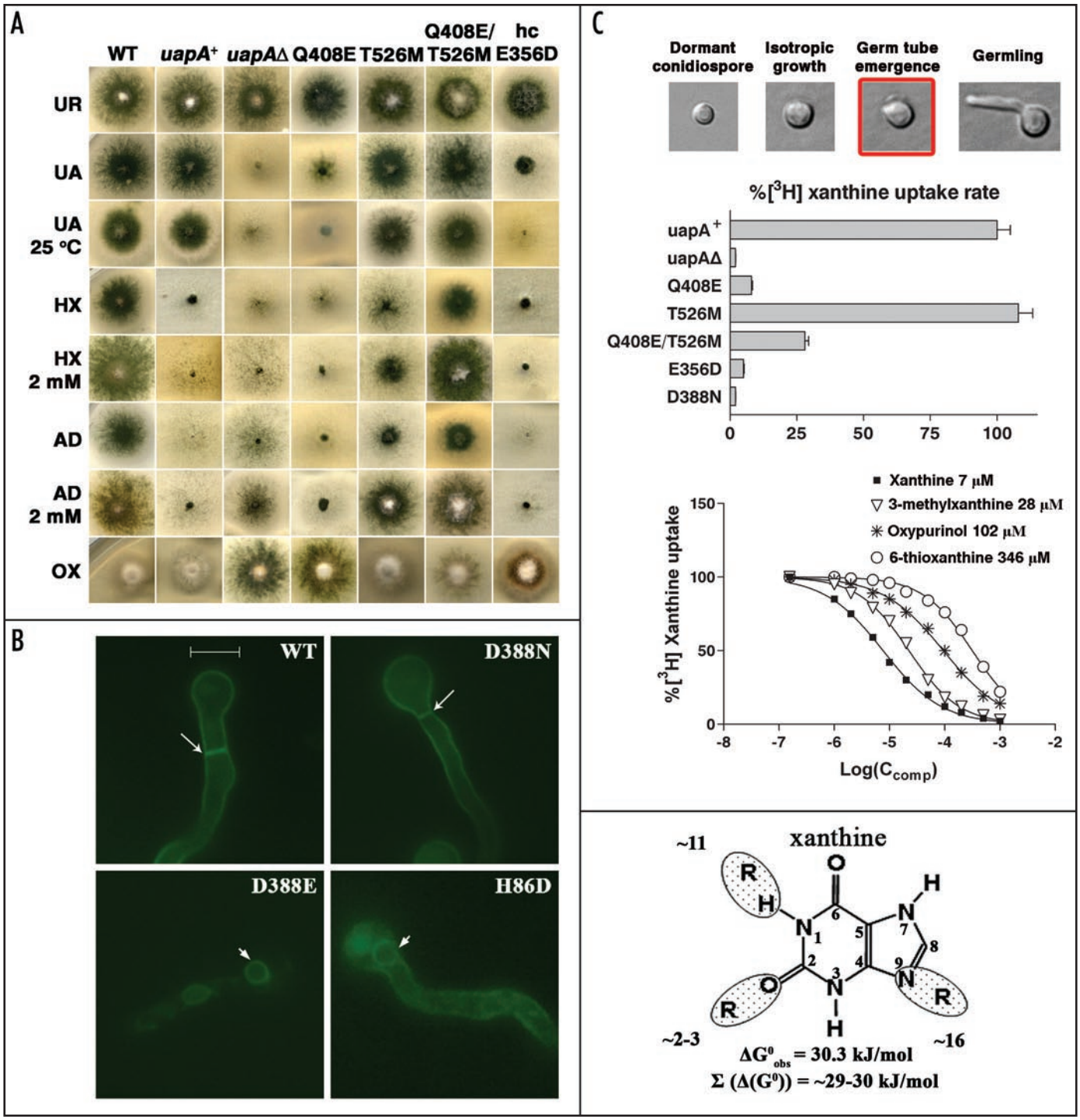


Figure 2. Summary of the tools used to study structure-function relationships in the UapA permease. (A) Growth phenotypes of a standard wild-type and isogenic strains carrying wild-type (*uapA*+) or mutant alleles of *uapA,* or lacking entirely *uapA* (*uapA*Δ). Besides the wild-type, all the other strains are knocked-out for all purine transporters except *uapA*. Growth tests shown are on urea (UR), uric acid (UA), hypoxanthine (HX) or adenine (AD), as sole nitrogen sources, as well as NO_3 plus oxypurinol (OX), a toxic xanthine analogue. Unless otherwise stated, purines were supplied at 0.5 mM final concentrations and growth tests were performed at 37°C Mutant E356D is a high-copy (hc) transformant, as the corresponding single-copy allele has no detectable UapA activity. Notice the cryosensitive nature and low transport rate of Q408E and E356D, the altered specificity of T526M, Q408E/T526M, or the additive nature of Q408E and T526M alleles in respect to adenine or hypoxanthine transport. (B) Epifluorescent microscopy of strains carrying wild-type (WT) and mutant UapA-GFP molecules. D388N is a loss of function mutant with wild-type topology, whereas D388E and H86D show problematic trafficking. Arrows highlight septa and arrowheads ring-like structures corresponding to the nuclear envelope associated Endoplasmic Reticulum.[47] (C) Upper: Different steps in the germination process of *A. nidulans*. The developmental stage prior germ tube emergence is established as ideal for direct uptake measurements.[62] Lower: % UapA-mediated uptake rate of radiolabeled xanthine in the mutants shown in (A) and an example of dose response curves obtained for four different substrates, from which K_i values are calculated using GraphPad Prism software. (D) UapA-xantine interactions modelled kinetically. The rationale for identifying positions of the xanthine ring that interact with UapA is explained in the text and in detail in Goudela et al.,[44] and Papageorgiou et al.[32] ΔG^0 values are calculated from K_is [($Ki = IC_{50}/[1 + (L/K_m)]$]. R stands for an amino acid in the transporter interacting, via an H-bond, with a specific purine position.

from the corresponding single mutants, which either bind with high affinity but cannot transport (Q408E) or transport with very low affinity (F528S, T526M and T526L) hypoxanthine.[32]

Besides from the role of TMS1 in the functional synergy between UapA domains, this α-helix contains elements affecting protein folding and topogenesis. Replacements of the nearly absolutely conserved residue H86 with different amino acid residues resulted in severely affected UapA-mediated transport, due to increased UapA turnover or/and problematic trafficking towards the plasma membrane.[35] Two extreme cases were mutations H86A and H86D, the first leading to rapid vacuolar degradation of UapA, while the second to significant ER-retention. All H86 mutants retained partial activity, which was used to show that the kinetic characteristics of UapA were not affected in these strains.[35] Mutant H86D was used in a genetic screen to get two second-site suppressors, both concerning the same residue (Met151) within TMS3 (Pantazopoulou A and Diallinas G, unpublished). Suppression was allele non-specific, as all M151 changes also suppressed other H86 mutations, while M151 mutations by themselves had nearly wild-type kinetic profiles (Pantazopoulou A, Taraslia V and Diallinas G, unpublished). This genetic analysis suggests the close physical proximity of TMS1 and TMS3.

Up to date, it has been possible to genetically convert UapA from a highly specific uric acid/xanthine transporter to various versions with enlarged or altered specificity. Combination of two mutations (Q408E in the NAT motif and T526L, or T526M in TMS12) was sufficient to make UapA able to bind with high affinity and transport efficiently hypoxanthine and guanine. However, all UapA adenine-transporting mutants recognized this aminopurine with very low affinity, showing that the presence of an amine group at C6 of the purine ring does not permit high-affinity binding. In our lab, we designed another genetic screen in order to get UapA specificity mutations that might be able to transport adenine with high affinity. In principle, this might have led as to UapA residues interacting with pyrimidine moiety of purines. We used the F528S (TMS12) specificity mutant which has normal kinetics for physiological substrates, but also low affinity (>1 mM) for binding and transporting adenine. This strain can grow on media containing 2 mM but not on 0.5 mM adenine as sole nitrogen source. After uv mutagenesis we obtained 55 *uapA*-specific mutations growing on 0.5 mM adenine. Preliminary analysis has shown that ~90% of them map in the loop between TMS10-TMS11 and the rest within TMS10 or in the NAT motif. This result shows that positioning of TMS10-TMS11 is critical for the function and specificity of UapA, and further confirms the functional synergy between the UapA domains (Papageorgiou I, Kosti V and Diallinas G, unpublished).

E. coli or Biochemistry Made Easy

NAT structure-function relationships have also been studied using the *E. coli* homologue YgfO, a high affinity and capacity xanthine/H^+ symporter.[48] Despite the lack of discernable YgfO-associated phenotypes and the use of classical genetic approaches, as a consequence of the fact that *E. coli* cannot use purines as sole nitrogen sources, *E. coli* provides some methodological advantages complementary to the Aspergillus system. The first arises from the fact that YgfO, unlike fungal NATs, has a minimum number of Cys residues, which has allowed the application of cysteine scanning mutagenesis and other methodologies related to the presence of single Cys at specific sites of a transporter.[49] Secondly, transmembrane protein purification in large amounts, necessary for downstream biochemical and biophysical methodologies, is much easier with bacterial than with fungal cells. Finally, the observation that UapA and YgfO differ significantly in their ability to recognize uric acid and purine analogues other than xanthine, makes the two systems ideal to address the molecular basis of substrate specificity within the NAT family.

Classical systematic mutational analysis of the NAT motif in YgfO, analogous to that performed in *A. nidulans*, has first showed that conserved residues Q324, N325 and G327, T332, G333 have an impressively analogous role to the corresponding to residues in UapA (Q408, N409, G411, T416 R417).[50] Explicitly, Q324 is absolutely required for transport catalysis due to its key role in binding of xanthine and other analogues, N325 is irreplaceable for transport catalysis, T332 and G333 have a fine role in determining YgfO kinetics and specificity, while G327 substitutions with Pro, Ala or Cys resulted in 2–5 fold increased V_{max}. Cys-scanning mutagenesis of a 25-amino acid region covering the NAT motif (see Fig. 1) and NEM alkylation analysis showed that most single Cys mutants in the sequence 323–336 undergo strong inhibition upon NEM modification. Interestingly, NEM reactivity is greatly enhanced upon xanthine addition for the A323C mutant. The most plausible explanation for these observations is that this region is part of a conformationally active substrate translocation pathway. The same Cys-scanning analysis showed that the region 329–339 had an alkylation pattern compatible with an α-helical 3 turn structure.

Site-directed and Cys-scanning mutagenesis was also employed in the sequence 419–450 (see Fig. 1), containing the TMS12 of YgfO.[51] Again, results obtained were in full agreement with those found in the Aspergillus system (UapA), regarding the role of two key residues. These residues in YgfO are Ile432 (equivalent to F528 in UapA) and Asn430 (equivalent to T526 in UapA). None of these residues is absolutely essential for function, but several specific mutations alter YgfO transport kinetics and specificity. More specifically, I432 substitutions with small or bulky amino acids display very low or no activity, whereas substitutions with intermediate amino acids have nearly wild-type transport activity, but altered substrate affinities. More importantly, mutant N430C was found to be highly sensitive to NEM alkylation, while 2-thioxanthine, a high affinity YgfO ligand, was able to completely protect it from NEM inactivation. These results support the idea that N430 is at the vicinity of the substrate binding site, probably posing steric constraints to substrate binding, while the role of I432 is indirect and probably transmitted to the binding pocket through N430 by unfavorable rearrangement of TMS12.[51] Thus, the picture we can draw on the role of TMS12 in YgfO is very similar to that obtained from the work in Aspergillus. The similarity in the role of the NAT motif and the TMS12 region for the function and specificity of YgfO and UapA is further supported by a series of double mutants strengthening the idea of a highly specific cross-talk between these domains (discussed in more detail in the next section).

How Specificity Is Determined in NATs

The most dramatic difference in the specificity of NATs was the 'shift' from nucleobase/H^+ to ascorbate/Na^+. The shift in ion selectivity is not a surprise, as it represents a common adaptive change

from microbial or plant transporters to mammalian carriers. The specificity difference however is extreme as nucleobase and ascorbate are structurally unrelated metabolites. Mutations replacing specific amino acids in the NAT motif of nucleobase transporters with residues found in the ascorbate transporters and vice versa, led to non-functional transporters (unpublished observations). In addition, none of the relaxed specificity mutants obtained with the fungal and bacterial NATs can transport or even bind ascorbate, even at very high concentrations.[32] In other words, the evolutionary change of NATs from nucleobase to ascorbate might be associated with a high mutational barrier. Thus, at present, we cannot draw conclusions on specific molecular elements that are critical for this substrate specificity difference. Below however, we are going to try to give some answers to the question of how NAT specificity towards different nucleobases is determined.

A very detailed specificity profile for nucleobase-specific NATs exists mostly for UapA, YgfO and several of their mutant versions. Analogous profiles exist for the wild-type versions of UapC-like transporters from *A. nidulans* (UapC) and *A. fumigatus* (AfUapC),[13] and for the *Candida albicans* Xut1 permease.[44] For several other NATs (see Table 1), we just know their basic physiological substrates. From these data it is obvious that bacterial nucleobase-selective NATs are all high-affinity (K_m < 5 μM) scavengers, extremely specific for either xanthine (YgfO, PbuX)[48,52] or uracil (PyrP, UraA).[30,31] Based on physiological tests or operon organization, some bacterial members have also been reported to be specific for uric acid (PucK, PucJ),[53] but in those cases rigorous evidence from transport studies is lacking. All known fungal NATs are high-affinity (K_m 4–8 μM) transporters for xanthine, but differ significantly in respect to their affinity for uric acid (K_m 8–130 μM) and in respect to their capacity to recognize other purines with very low affinity (>2 mM). UapA lies at one extreme, showing equally high affinities for xanthine and uric acid and totally excluding other purines (adenine, hypoxanthine or guanine) from its substrate binding site. In addition, in UapA, several xanthine analogues with bulky substitutions at positions seemingly not involved in direct interactions with the substrate binding residues are recognized with significantly reduced affinities. On the other end of the spectrum, UapC-like proteins and Xut1 have an affinity for uric acid that is 12–16 fold reduced compared to that for xanthine. In addition, these permeases recognize with very low affinity other purines (>2 mM).

Based on the binding affinities of functional mutants towards several possible substrates, we propose that UapA specificity is mechanistically achieved by both size hindrance and electrostatic repulsion.[32] The importance of size in substrate-fitting is strongly suggested by the fact that specificity mutations in TMS1 and TMS12, which do not change the affinity for xanthine, allow increased binding affinity of xanthine analogues with bulky groups at positions C2 = O, N3-H, C6 = O, N7-H or C8/C8 = O.[32] Some mutants in fact bind xanthine analogues with bulky substitutions at these positions equally well to xanthine or uric acid. Thus, these positions must not be involved or contribute little to substrate binding. In contrast, the same specificity mutations do not increase the affinities for xanthine analogues with modifications at positions N1-H and N9, strongly suggesting that N1-H and N9 are directly involved in binding. Based on the above, we recently proposed a revised kinetic model (Fig. 2D) where the interaction of xanthine with UapA occurs via H bonds with N1-H and N9, plus a weak bond with C2 = O (~2 kJ/mol), while there is no energetic contribution from N3-H, C6 = O, N7-H or C8. This model allows us to hypothesize that in the interaction of UapA with uric acid, the role of the non-protonated N9 as a proton acceptor is replaced by C8 = O.[32]

Steric effects could, in principle, partially account for the exclusion of adenine or guanine from the UapA binding pocket, due to the presence of amino groups at positions C6 and C2, respectively. Size effects cannot however explain how hypoxanthine is excluded from the UapA binding site. The preferred tautomers of hypoxanthine and xanthine have inversely protonated N atoms at positions 3, 7 and 9 (xanthine has N3-H, N7-H and N9; hypoxanthine has N3, N7 and N9-H).[54] We have proposed that the inverse protonation state of the N atoms in hypoxanthine, compared to xanthine, might repel the former from the substrate binding pocket of the wild-type UapA.[32] A similar mechanism might contribute to the 'filtering-out' of adenine and guanine, which have N3, N7 and N9 protonation states identical to those of hypoxanthine. Repulsive electrostatic forces might also explain the reduced binding of the wild-type UapA for oxypurinol, which in its preferred tautomer possess a protonated N8-H. In the specificity mutants, loosening of the binding pocket might allow the accommodation of not only bulkier non-natural substrates, but also would reduce any repulsive electrostatic forces that exclude totally or partially non-physiological substrates. Once size or electrostatic restrictions are removed, different purines can be transported by UapA on the basis of their ability to make specific H-bonds within the substrate binding residues in the TMS8-9 region.

The observed low affinity binding of hypoxanthine in the specificity mutants is in agreement with the idea that hypoxanthine interacts principally with UapA only through a strong interaction at N1-H, as it lacks a non-protonated N9. This assumption predicts that, in the specificity mutants, guanine and uracil, which also have a protonated N1-H, might also be transported with affinities similar to hypoxanthine. This is indeed the case. The relatively lower affinity for adenine uptake in specificity mutants might be explained assuming that the H donor role of N1-H in the interaction with UapA might only partially be replaced by the neighboring C6-NH_2. Our assumptions are further supported by double mutants, where specificity mutations are combined with Q408E, a mutation that allows better binding of several non-natural substrates which have a protonated N9-H (hypoxanthine, guanine, 7-deazaxanthine).[34] According to our model (see Fig. 2D), in these mutants, hypoxanthine (or guanine) can now make two H-bonds, one at N1-H simply due to loosening of the binding pocket, and one with N9-H because of the presence of the Glu residue at position 408. In contrast, adenine, which lacks a protonated N1-H, could make only one strong H-bond at N9-H.

We have shown that the unique UapA transporter kinetics and specificity profile necessitate a specific synergy between distant, in primary amino acid sequence, domains. Using UapA-UapC or UapA-YgfO chimeric molecules, the synergistic interactions of different NAT domains was further shown to be highly protein-specific.[32] In UapA-UapC chimeras, replacing, each time any of the three UapA domains involved in functional synergy (TMS8-9 loop, TMS12 or TMS1) with that of the UapC, led to chimeric transporters resembling either UapC, or having a new kinetic and specificity profile. The fact that several mutations in these three domains relax the

substrate binding site of UapA in a manner that allows the transport of all purines and some of them also lower the affinity UapA for uric acid, in other words making UapA behave like UapC transporters, is a strong indication that specific interdomain synergy in UapA forms the basis of the unique substrate binding characteristics of this carrier, and that this synergy has evolved through gain-of function interactions not present in other NATs. This idea is further supported by synteny (the physical co-localization of genetic loci on the same chromosome within an individual or species) analysis showing that the *uapA* gene has evolved from duplication of a *uapC*-like gene.[4] YgfO-UapA chimeras involving the TMS12 domain result in transporters with very low transport activity.[32,47] This is mainly due to increased protein turn-over, implying that synergy between NAT domains is highly protein-specific and necessary for normal transporter folding. Interestingly however, in the chimeric YgfO protein carrying the TMS12 domain from UapA, the mutation of the two specificity-important residues of the *A. nidulans* TMS12 (Thr, Phe) back to the original residues present in the YgfO TMS12 (Gln, Ile), not only reestablished protein stability and transport activity, but led to a transporter that has altered affinity for several xanthine analogues.[51] This observation shows that these two residues, T526 and F528 in UapA or N430 and I432 in YgfO, are key elements for the protein-specific synergy between the NAT motif and TMS12. Furthermore, this specific synergy determines which purines can have access to the substrate binding of UapA or YgfO.

Conclusions and Perspectives-NATs as Antifungal Drug Gateways?

Given that purine and pyrimidine analogues are widely used as antimetabolites against a host of diseases and infections,[25,26] work on NAT structure-function relationships can in the long run prove extremely useful in predicting and/or designing specific purine-based antifungals or antibacterials that will not be taken up by the host's analogous transport systems. The NAT homologues from the two most common pathogenic fungi, *Aspergillus fumigatus*[13] and *Candida albicans*,[44] have also been studied kinetically, and models on how they bind their substrates have been proposed. Such models can support the design of nucleobase-related analogues that can be used to target fungi. Comparison between fungal transporters analyzed and analogous human transporters[2,55] revealed major differences in involvement of N3 in substrate binding. Fungal NATs do not seem to use N3 to bind uric acid, xanthine or their analogues, leading to the prediction that xanthine analogues with N3 substitutions might be good substrates specifically for fungal NATs. N3-substituted purine analogues are channeled to nucleic acid synthesis and can be used at low concentrations as specific antiviral inhibitors.[56,57] Similarly, 3-deazapurines and their analogues might also be efficient drugs against pathogenic fungi.

A. nidulans is a candidate for the characterization, through heterologous expression, of novel eukaryotic NATs from more complex animal systems. Its ability to use purines as sole nitrogen sources gives the advantage of immediate discernable phenotypic observation, since all purine transporter genes are known, cloned and knocked out. A successful example is the only plant NAT of known function, the maize lpe1, which has been successfully expressed and characterized in *A. nidulans*.[36] However, heterologous expression of transmembrane proteins is most often problematic, resulting in defective topogenesis and trafficking. The only *D. melanogaster* NAT homologue, encoded by the *CG6293* locus, was expressed in *A. nidulans* but never reached the plasma membrane despite a series of overexpression strategies and the construction of several chimeric UapA-CG6293 molecules (Gournas C, Vlanti A, Amillis S and Diallinas G, unpublished). Work from *S. cerevisiae* proposes that the stabilization of transmembrane proteins through partial disruption of downregulation mechanisms, like the ubiquitin pathway, can have a positive impact on heterologous expression.[58,59] Similar genetic tools are at present being developed and tested in *A. nidulans.*

The strict high affinity of UapA for uric acid transport was proposed to be an evolutionary recent gain-of-function modification. Fine changes in interdomain interactions were shown to be responsible for the apparent flexibility of NAT specificity. However, the completely different chemical structure of ascorbic acid must have required more complex structural changes in the NATs of primates. The fact that uric acid and ascorbate serve similar and complementary antioxidant roles in many organisms raises intriguing thoughts about the possible evolution of ascorbate transporters from pre-existing uric acid permeases. This could have been an adaptation of antioxidant strategies of metazoa in response to novel life styles.

Acknowledgements

We thank previous and present members of our lab, especially Sotiris Amillis, Fivos Borbolis, Dimitris Hatzinikolaou, Mayia Karachaliou, Vasso Kosti, Areti Pantazopoulou, Ioannis Papageorgiou and Anna Vlanti, for sharing unbublished results and creative discussions. We particularly thank Claudio Scazzocchio for critically reading the manuscript.

References

1. Bellofatto V. Pyrimidine transport activities in trypanosomes. Trends Parasitol 2007; 23:187-9.
2. de Koning H, Diallinas G. Nucleobase transporters (review). Mol Membr Biol 2000; 17:75-94.
3. de Koning HP, Bridges DJ, Burchmore RJ. Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. FEMS Microbiol Rev 2005; 29:987-1020.
4. Gournas C, Papageorgiou I, Diallinas G. The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. Mol Biosyst 2008; 4:404-16.
5. Pantazopoulou A, Diallinas G. Fungal nucleobase transporters. FEMS Microbiol Rev 2007; 31:657-75.
6. Desimone M, Catoni E, Ludewig U, Hilpert M, Schneider A, Kunze R, Tegeder M, Frommer WB, Schumacher K. A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in Arabidopsis. Plant Cell 2002; 14:847-56.
7. Gillissen B, Burkle L, Andre B, Kuhn C, Rentsch D, Brandl B, Frommer WB. A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine and purine derivatives in Arabidopsis. Plant Cell 2000; 12:291-300.
8. Maurino VG, Grube E, Zielinski J, Schild A, Fischer K, Flugge UI. Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 2006; 47:1381-93.
9. Hyde RJ, Cass CE, Young JD, Baldwin SA. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. Mol Membr Biol 2001; 18:53-63.
10. Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Brubaker RF, Hediger MA. A family of mammalian Na^+-dependent L-ascorbic acid transporters. Nature 1999; 399:70-5.
11. Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. Amino Acids 2008; 34:347-55.
12. Cecchetto G, Amillis S, Diallinas G, Scazzocchio C, Drevet C. The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. J Biol Chem 2004; 279:3132-41.
13. Goudela S, Reichard U, Amillis S, Diallinas G. Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet Biol 2008; 45:459-72.
14. Mansfield TA, Schultes NP, Mourad GS. Identification and characterization of a two-member gene family encoding a novel purine transporter in Arabidopsis. 19th International Conference on Arabidopsis Research. Montreal, Canada: The North American Arabidopsis Steering Committee 2008; 211.

15. Winklbauer E, Maurino VG, Grube E, Schumacher BS, Nestorova A, Flügge U-I, Desimone M. Functional characterization of AtAzg2, a high affinity purine transporter in *Arabidopsis thaliana*. 19th International Conference on Arabidopsis Research. Montreal, Canada: The North American Arabidopsis Steering Committee 2008; 211.
16. Landfear SM, Ullman B, Carter NS, Sanchez MA. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. Eukaryot Cell 2004; 3:245-54.
17. Bakhiya A, Bahn A, Burckhardt G, Wolff N. Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux. Cell Physiol Biochem 2003; 13:249-56.
18. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. Nature 2002; 417:447-52.
19. Jutabha P, Kanai Y, Hosoyamada M, Chairoungdua A, Kim DK, Iribe Y, Babu E, Kim JY, Anzai N, Chatsudthipong V, Endou H. Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule. J Biol Chem 2003; 278:27930-8.
20. Leal-Pinto E, Tao W, Rappaport J, Richardson M, Knorr BA, Abramson RG. Molecular cloning and functional reconstitution of a urate transporter/channel. J Biol Chem 1997; 272:617-25.
21. Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. J Biol Chem 1997; 272:18526-9.
22. Van Aubel RAMH, Smeets PHE, van den Heuvel JJMW, Russel FGM. Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 288:327-33.
23. Vitart V, Rudan I, Hayward C, Gray NK, Floyd J, Palmer CN, Knott SA, Kolcic I, Polasek O, Graessler J, Wilson JF, Marinaki A, Riches PL, Shu X, Janicijevic B, Smolej-Narancic N, Gorgoni B, Morgan J, Campbell S, Biloglav Z, Barac-Lauc L, Pericic M, Klaric IM, Zgaga L, Skaric-Juric T, Wild SH, Richardson WA, Hohenstein P, Kimber CH, Tenesa A, Donnelly LA, Fairbanks LD, Aringer M, McKeigue PM, Ralston SH, Morris AD, Rudan P, Hastie ND, Campbell H, Wright AF. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. Nat Genet 2008; 40:437-42.
24. Doring A, Gieger C, Mehta D, Gohlke H, Prokisch H, Coassin S, Fischer G, Henke K, Klopp N, Kronenberg F, Paulweber B, Pfeufer A, Rosskopf D, Volzke H, Illig T, Meitinger T, Wichmann HE, Meisinger C. SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects. Nat Genet 2008; 40:430-6.
25. Elion GB. The purine path to chemotherapy. Science 1989; 244:41-7.
26. Kraupp M, Marz R. Membrane transport of nucleobases: interaction with inhibitors. Gen Pharmacol 1995; 26:1185-90.
27. Diallinas G, Scazzocchio C. A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization and sequence of a cis-acting mutation. Genetics 1989; 122:341-50.
28. Gorfinkiel L, Diallinas G, Scazzocchio C. Sequence and regulation of the uapA gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. J Biol Chem 1993; 268:23376-81.
29. Diallinas G, Gorfinkiel L, Arst HN Jr, Cecchetto G, Scazzocchio C. Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. J Biol Chem 1995; 270:8610-22.
30. Andersen PS, Frees D, Fast R, Mygind B. Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of uraA mutants and cloning of the gene. J Bacteriol 1995; 177:2008-13.
31. Turner RJ, Lu Y, Switzer RL. Regulation of the Bacillus subtilis pyrimidine biosynthetic (pyr) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism. J Bacteriol 1994; 176:3708-22.
32. Papageorgiou I, Gournas C, Vlanti A, Amillis S, Pantazopoulou A, Diallinas G. Specific Interdomain Synergy in the UapA Transporter Determines Its Unique Specificity for Uric Acid among NAT Carriers. J Mol Biol 2008; 382:1121-35.
33. Diallinas G, Valdez J, Sophianopoulou V, Rosa A, Scazzocchio C. Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. EMBO J 1998; 17:3827-37.
34. Koukaki M, Vlanti A, Goudela S, Pantazopoulou A, Gioule H, Tournaviti S, Diallinas G. The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. J Mol Biol 2005; 350:499-513.
35. Pantazopoulou A, Diallinas G. The first transmembrane segment (TMS1) of UapA contains determinants necessary for expression in the plasma membrane and purine transport. Mol Membr Biol 2006; 23:337-48.
36. Argyrou E, Sophianopoulou V, Schultes N, Diallinas G. Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. Plant Cell 2001; 13:953-64.
37. Schultes NP, Brutnell TP, Allen A, Dellaporta SL, Nelson T, Chen J. Leaf permease1 gene of maize is required for chloroplast development. Plant Cell 1996; 8:463-75.
38. Pantazopoulou A, Lemuh ND, Hatzinikolaou DG, Drevet C, Cecchetto G, Scazzocchio C, Diallinas G. Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 2007; 44:627-40.
39. Daruwala R, Song J, Koh WS, Rumsey SC, Levine M. Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. FEBS Lett 1999; 460:480-4.
40. Ringvold A, Anderssen E, Kjonniksen I. UV absorption by uric acid in diurnal bird aqueous humor. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41:2067-9.
41. Sotiriou S, Gispert S, Cheng J, Wang Y, Chen A, Hoogstraten-Miller S, Miller GF, Kwon O, Levine M, Guttentag SH, Nussbaum RL. Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. Nat Med 2002; 8:514-7.
42. Kaback HR. Structure and mechanism of the lactose permease. C R Biol 2005; 328:557-67.
43. Guan L, Kaback HR. Lessons from lactose permease. Annu Rev Biophys Biomol Struct 2006; 35:67-91.
44. Goudela S, Karatza P, Koukaki M, Frillingos S, Diallinas G. Comparative substrate recognition by bacterial and fungal purine transporters of the NAT/NCS2 family. Mol Membr Biol 2005; 22:263-75.
45. Meintanis C, Karagouni AD, Diallinas G. Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family. Mol Membr Biol 2000; 17:47-57.
46. Amillis S, Koukaki M, Diallinas G. Substitution F569S converts UapA, a specific uric acid-xanthine transporter, into a broad specificity transporter for purine-related solutes. J Mol Biol 2001; 313:765-74.
47. Vlanti A, Amillis S, Koukaki M, Diallinas G. A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. J Mol Biol 2006; 357:808-19.
48. Karatza P, Frillingos S. Cloning and functional characterization of two bacterial members of the NAT/NCS2 family in *Escherichia coli*. Mol Membr Biol 2005; 22:251-61.
49. Frillingos S, Sahin-Toth M, Wu J, Kaback HR. Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. FASEB J 1998; 12:1281-99.
50. Karatza P, Panos P, Georgopoulou E, Frillingos S. Cysteine-scanning analysis of the nucleobase-ascorbate transporter signature motif in YgfO permease of *Escherichia coli*: Gln-324 and Asn-325 are essential, and Ile-329-Val-339 form an alpha-helix. J Biol Chem 2006; 281:39881-90.
51. Papakostas K, Georgopoulou E, Frillingos S. Cysteine-scanning analysis of putative helix XII in the YgfO xanthine permease: ILE-432 and ASN-430 are important. J Biol Chem 2008; 283:13666-78.
52. Christiansen LC, Schou S, Nygaard P, Saxild HH. Xanthine metabolism in Bacillus subtilis: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. J Bacteriol 1997; 179:2540-50.
53. Schultz AC, Nygaard P, Saxild HH. Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in Bacillus subtilis and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. J Bacteriol 2001; 183:3293-302.
54. Hernandez B, Orozco M, Luque FJ. Tautomerism of xanthine and alloxanthine: a model for substrate recognition by xanthine oxidase. J Comput Aided Mol Des 1996; 10:535-44.
55. Wallace LJ, Candlish D, De Koning HP. Different substrate recognition motifs of human and trypanosome nucleobase transporters. Selective uptake of purine antimetabolites. J Biol Chem 2002; 277:26149-56.
56. Shigeta S, Konno K, Yokota T, Nakamura K, De Clercq E. Comparative activities of several nucleoside analogs against influenza A, B and C viruses in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:906-11.
57. Andrei G, De Clercq E. Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication in vitro. Antiviral Res 1990; 14:287-99.
58. Flegelova H, Haguenauer-Tsapis R, Sychrova H. Heterologous expression of mammalian Na/H antiporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta 2006; 1760:504-16.
59. Froissard M, Belgareh-Touze N, Buisson N, Desimone M, Frommer WB, Haguenauer-Tsapis R. Heterologous expression of a plant uracil transporter in yeast: improvement of plasma membrane targeting in mutants of the Rsp5p ubiquitin protein ligase. Biotechnol J 2006; 1:308-20.
60. Godoy A, Ormazabal V, Moraga-Cid G, Zuniga FA, Sotomayor P, Barra V, Vasquez O, Montecinos V, Mardones L, Guzman C, Villagran M, Aguayo LG, Onate SA, Reyes AM, Carcamo JG, Rivas CI, Vera JC. Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. J Biol Chem 2007; 282:615-24.
61. Mermelekas G, Georgopoulou E, Frillingos S. Site-directed alkylation and the nucleobase-ascorbate transporter signature motif. Febs Journal 2008; 275:218.
62. Amillis S, Cecchetto G, Sophianopoulou V, Koukaki M, Scazzocchio C, Diallinas G. Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. Mol Microbiol 2004; 52:205-16.

Εξαρτώμενη από τη μεταφορά ενδοκύτωση και αποικοδόμηση ενός μεταφορέα ουρικού οξέος-ξανθίνης

Χρήστος Γουρνάς*, Σωτήρης Αμίλλης*, Άννα Βλαντή* και Γεώργιος Διαλλινάς

*ισάξια συνεισφορά

Στη συγκεκριμένη εργασία αποκαλύπτουμε έναν καινούριο μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης του UapA μεταφορέα ουρικού οξέος/ξανθίνης, πρότυπου μέλους της πανταχού παρούσας οικογένειας Νουκλεοτιδικών Βάσεων-Ασκορβικού οξέος, άμεσα σχετιζόμενο με τη λειτουργία του. Παρουσία των υποστρωμάτων του, ο UapA ενδοκυτώνεται και εισέρχεται στο μονοπάτι των Πολυκυστιδιακών Σωματίων και αποικοδομείται στο χυμοτόπιο. Η επαγομένη από το υπόστρωμα ενδοκύτωση, αντίθετα με την ενδοκύτωση από αμμωνιακά ιόντα, είναι απολύτως εξαρτώμενη της λειτουργίας του UapA, κάτι που υποστηρίζεται από μια σειρά δεδομένων, τα οποία έδειξαν πως το σήμα για την ενδοκύτωση είναι η μεταφορά του υποστρώματος διαμέσου του UapA. Η χρήση αρκετών λειτουργικών μεταλλαγμένων UapA πρωτεϊνών με τροποποιημένη κινητική και εξειδίκευση έδειξε, επιπλέον, πως η εξαρτώμενη από τη μεταφορά ενδοκύτωση του UapA πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος αντιλαμβάνεται λεπτές αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με τον κύκλο μεταφοράς. Δείχνουμε επίσης πως οι δύο διακριτοί μηχανισμοί ενδοκύτωσης του UapA απαιτούν ουβικουιτινυλίωση σε ένα μόνο κατάλοιπο λυσίνης (K572) από την HulA(Rsp5) λιγάση της ουβικουιτίνης. Τέλος, δείχνουμε πως, παρουσία υποστρωμάτων, μη-λειτουργικές μορφές του UapA μπορούν να ενδοκυτωθούν *in trans* αν εκφράζονται με την ταυτόχρονη παρουσία ενεργών μορφών του UapA, ακόμη κι αν οι τελευταίες δεν μπορούν οι ίδιες να ενδοκυτωθούν.

Molecular Microbiology (2010) 75(1), 246–260 ■
doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06997.x
First published online 11 December 2009

Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease

Christos Gournas,† Sotiris Amillis,† Anna Vlanti† and George Diallinas*
Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis 15781, Athens, Greece.

Summary

In this work we unmask a novel downregulation mechanism of the uric acid/xanthine transporter UapA, the prototype member of the ubiquitous Nucleobase-Ascorbate Transporter family, directly related to its function. In the presence of substrates, UapA is endocytosed, sorted into the multivesicular body pathway and degraded in vacuoles. Substrate-induced endocytosis, unlike ammonium-induced turnover, is absolutely dependent on UapA activity and several lines of evidence showed that the signal for increased endocytosis is the actual translocation of substrates through the UapA protein. The use of several UapA functional mutants with altered kinetics and specificity has further shown that transport-dependent UapA endocytosis occurs through a mechanism, which senses subtle conformational changes associated with the transport cycle. We also show that distinct mechanisms of UapA endocytosis necessitate ubiquitination of a single Lys residue (K572) by HulA^{Rsp5}. Finally, we demonstrate that in the presence of substrates, non-functional UapA versions can be endocytosed *in trans* if expressed in the simultaneous presence of active UapA versions, even if the latter cannot be endocytosed themselves.

Introduction

Transporters respond to environmental and developmental signals as primary targets of multiple mechanisms operating at the transcriptional and post-translational levels. Post-translational control of yeast and animal transporters occurs at the level of protein trafficking, including secretion towards the plasma membrane, direct vacuolar sorting, endocytosis, endosomal recycling and turnover in the vacuole/lysosome (André and Haguenauer-Tsapis, 2004; Dupré *et al.*, 2004). Such mechanisms serve mostly the rapid downregulation of transporters in response to cellular adaptation to different nutrient needs or stress conditions, and/or protect cells from self-poisoning, a particular problem with compounds such as heavy metals, which are essential for cell physiology but toxic in excess. Well-studied examples of regulated trafficking and endocytosis of transporters in *Saccharomyces cerevisiae* include the uracil permease Fur4p and the general amino-acid transporter Gap1p (reviewed in Dupré *et al.*, 2001; 2004; André and Haguenauer-Tsapis, 2004), as well as transporters specific for metals, iron and siderophores (Liu and Culotta, 1999; Felice *et al.*, 2005; Stimpson *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Erpapazoglou *et al.*, 2008; Gitan and Eide, 2008; Nikko *et al.*, 2008), sugars (Medintz *et al.*, 1998; Horak and Wolf, 2001; Gadura *et al.*, 2006), phosphate (Estrella *et al.*, 2008) and several specific amino acids (Beck *et al.*, 1999; Umebayashi and Nakano, 2003; Lin *et al.*, 2008). Transporter downregulation and in particular substrate-induced internalization is also a common feature of several mammalian transporters, including metal or neurotransmitter transporters (Whitworth and Quick, 2001; Chi and Reith, 2003; Miranda and Sorkin, 2007).

The principal signal for transporter regulated trafficking, endocytosis and entry into multivesicular bodies (MVBs), which eventually fuse with the vacuole/lysosome and thus deliver the vesicles to degradative enzymes, is their ubiquitination (André and Haguenauer-Tsapis, 2004; Dupré *et al.*, 2004; Miranda and Sorkin, 2007; Belgareh-Touzé *et al.*, 2008). Ubiquitination serves as a signal not only for internalization from the plasma membrane, but also to redirect newly synthesized transporter molecules from the Golgi to endosomes and for MVB sorting (Soetens *et al.*, 2001; Katzmann *et al.*, 2002; Reggiori and Pelham, 2002; André and Haguenauer-Tsapis, 2004; Blondel *et al.*, 2004; Erpapazoglou *et al.*, 2008). In *S. cerevisiae* the ubiquitination of transporters is exclusively carried out by Rsp5p, an E3 HECT ubiquitin ligase containing three WW domains and a calcium/phospholipid binding C2 domain (André and Haguenauer-Tsapis, 2004; Dupré *et al.*, 2004; Belgareh-Touzé *et al.*, 2008). The WW domains recognize PPXY or PY motifs present in the cargoes or in adaptors (Sullivan *et al.*, 2007 and references therein). This makes necessary the existence of specific adaptors which

Accepted 23 November, 2009. *For correspondence. E-mail diallina@biol.uoa.gr; Tel. (+30) 2107274649; Fax (+30) 2107274702.
†Equal contribution.

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd

recognize the substrate and also bind, through PY motifs, to the Rsp5 ligase (Léon and Haguenauer-Tsapis, 2009).

Aspergillus nidulans, which grows exclusively by apical extension, provides an excellent system to study transporter endocytosis and trafficking in polarized cells, which face challenges related to movement of molecules within long and fast growing hyphae (Peñalva, 2005; Abenza *et al*., 2008; Taheri-Talesh *et al*., 2008). A number of *A. nidulans* (PrnB, UapA, UapC, AgtA) and *A. oryzae* (AoUapC) transporters involved in the uptake of amino acids and purines are downregulated by ammonium (NH_4) (Diallinas, 2008a; Apostolaki *et al*., 2009; Higuchi *et al*., 2009). Among those, UapA, a high-affinity, high-capacity, uric acid-xanthine/H^+ permease, is one of the most studied transporters in respect to regulation of expression and structure-function relationships (reviewed in Diallinas and Gournas, 2008; Gournas *et al*., 2008). UapA *de novo* synthesis takes place during conidiospore germination and, in the absence of purines, remains at basal levels during vegetative growth. Purines, through their oxidation to uric acid (UA), induce *uapA* transcription several fold, through the action of the pathway-specific transcriptional regulator UaY. However, *uapA* transcription is only possible in the absence of NH_4 or glutamine which represses UapA synthesis through inactivation of the general transcription factor AreA.

Here, we describe a novel downregulation mechanism of UapA by endocytosis which is directly related to its function and we further show that inactive UapA forms can be endocytosed *in trans* in the presence of active UapA molecules.

Results

Uric acid elicits UapA sorting into endosome-like structures and degradation in vacuoles

In the course of previous epifluorescence microscopic analyses, using a strain expressing a fully functional UapA-GFP, we noticed that the amount of plasma membrane-located UapA-GFP was similar in the presence or absence of substrates (UA), but the amount of GFP-labelled cytoplasmic granules and vacuoles increased significantly in the presence of substrates (Pantazopoulou *et al*., 2007; and G. Diallinas, unpubl. data). This result suggested that in the presence of substrates a significant fraction of UapA is turned over, either by enhanced endocytosis or direct sorting from the secretory compartments or both.

Figure 1A shows a time-course of this phenomenon. Increased turnover of UapA-GFP was obtained 30 min after the addition of UA, whereas maximum removal from the plasma membrane was after 2–4 h. A fraction of UapA-GFP was localized in cytoplasmic punctuate particles stainable with FM4-64, seemingly endosomes (Fig. 1C). Other GFP-labelled organelles, especially after longer exposure to UA, were CMAC- and FM4-64 stained (see *Experimental procedures*) vacuoles or mature endosomes (Fig. 1C and D). The endosomal nature of UapA-GFP labelled particles was supported by their similarity and frequent superimposition to mobile FM4-64-labelled endosomes (Peñalva, 2005; Abenza *et al*., 2008). Compared with an analogous time-course of NH_4 induced endocytosis, the UA effect is somehow slower and less dramatic (Pantazopoulou *et al*., 2007, and Fig. 1B).

Western analysis of membrane protein fractions using an anti-GFP antibody showed that addition of UA for 2–4 h leads to a ~twofold increase in UapA-GFP levels and to a prominent increase (14-fold) of the band corresponding to free GFP (Fig. 1E). Free GFP, liberated from membrane protein chimeras in the lumen of vacuoles, is generally stable and therefore could serve as a measure of UapA degradation. This is better seen by comparing the relative amounts of intact UapA-GFP and free GFP in the presence and absence of UA for 2 h. NH_4-induced turnover of UapA was more drastic than that caused by UA. Figure 1E also confirmed that UA leads to significant *de novo* synthesis of UapA, but more than half of the induced UapA population is destroyed in the vacuole.

The effect of NH_4 on UapA internalization is directly reflected in uptake assays. One hour preloading of strains with NH_4, at a concentration not causing transcriptional repression (e.g. 0.1 mM), led to a drop in UapA activity to 16% of the control (Fig. 1F), in agreement with the amount of intact UapA-GFP estimated in westerns (Fig. 1E). On the other hand, preloading germlings with UA had a more complex effect on UapA. More specifically, xanthine uptake assays (Fig. 1F), suggest that the amount of UapA present in the plasma membrane is ~twofold reduced after preloading with UA. This is in line with epifluorescence microscopic analysis (Fig. 1A), but Western blots showed that the amount of intact UapA-GFP is in fact increased by twofold in the presence of UA. This strongly suggests that a significant portion of the intact UapA-GFP band detected in westerns corresponds to molecules present in internal membranes, rather than the plasma membrane.

UapA turnover is elicited specifically by substrates independently of their metabolic fate

We tested whether the phenomenon of UA-elicited sorting of UapA into the multivesicular pathway and its degradation in vacuoles is also triggered by other substrates, ligands, or purines and purine degradation products not recognized by UapA (Fig. 2A). Xanthine (X) is a physiological substrate of UapA with a binding affinity identical to that of UA ($K_{m/i}$s 7–10 μM), 2-thioxanthine (2tX) and 6-thioxanthine (6tX) are also *bona fidae* substrates of

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

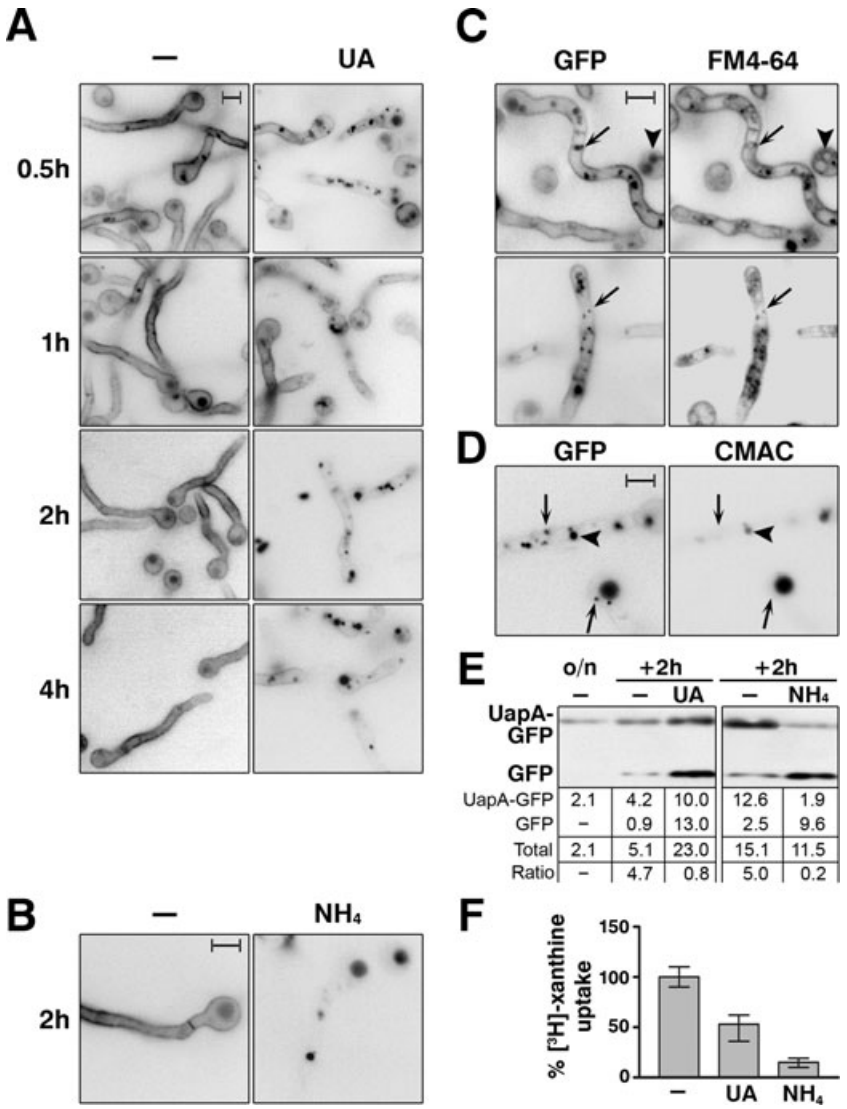


Fig. 1. Uric acid (UA) elicits UapA sorting into endosome-like structures and vacuolar degradation.
A and B. Effect of UA or NH_4 on UapA-GFP cellular expression. In this and all subsequent experiments germlings were grown for 12 h (o/n) in urea-glucose MM, which allows constitutive expression of UapA-GFP (for details see text and *Experimental procedures*). Subsequently, different conditions were imposed by adding for 2 h UA (A) or NH_4 (B). Control samples were allowed to grow for the same extra 2 h (–). These conditions were imposed for all experiments shown herein, unless otherwise stated. Scale bars, here and all other figures, represent 5 μm.
C and D. UapA-GFP after 2 h UA addition, simultaneously stained with FM4-64 or CMAC. Different arrows highlight cytoplasmic granular bodies or vacuoles labelled with both GFP and FM4-64 or CMAC. At the condition used FM4-64 labels plasma membrane but mostly endosomes and vacuolar membranes, whereas CMAC labels vacuolar lumens.
E. Western blot analysis of membrane protein fractions corresponding to 2 h addition of UA or NH_4 and controls (–), probed with anti-GFP. Conditions of growth were identical to those described for the microscopic analysis. 50 μg of protein extract was loaded in all cases. The low mobility band corresponds to intact UapA-GFP and the high mobility band to free GFP produced through vacuolar degradation of UapA (see text). Relative semi-quantitative amounts of UapA-GFP and free GFP are estimated with ImageJ. Ratios of UapA-GFP/GFP are also shown, except from cases where the free GFP amount is too low.
F. UapA-GFP-mediated [^{3}H]-xanthine uptake measured in the absence of UA or NH_4, or after preloading for 1 h and washing of samples with UA or NH_4.

UapA (K_is 63 and 346 μM respectively), 3-methylxanthine (3mX) is a non-transportable competitive inhibitor, whereas hypoxanthine (HX) and allantoin (AL) are not recognized by UapA (Papageorgiou *et al*., 2008; G. Diallinas, unpubl. data). X, 2tX and 6tX elicited UapA internalization and vacuolar degradation, whereas 3mX, HX and AL did not. The efficiency of UapA internalization follows the order: UA, 2tX > X > 6tX, which, with exception of X, is also the order of binding affinity of UapA for these purines. The fact that 3mX, a high-affinity ligand of UapA, failed to provoke UapA endocytosis was somehow unexpected and led us to conclude that the signal for UapA turnover is substrate *transport* rather than substrate or ligand *binding*. Western blot analysis (Fig. 2B) confirmed that substrates lead to increased UapA-GFP vacuolar degradation. Furthermore, these results show that substrate-elicited UapA endosomal sorting and vacuolar degradation cannot be attributable to the catabolism of purines to NH_4, since 2tX and 6tX cannot be metabolized to any primary nitrogen source (Darlington and Scazzocchio, 1967).

Substrate-induced turnover is independent of transcriptional induction

Given that all substrates resulting in UapA turnover are also inducers of *uapA* transcription, a possible mechanism for this phenomenon would be that activation of the pathway specific regulator UaY induces a physiological response leading to increased UapA turnover. We thus tested whether low amounts of UA, which are not sufficient to induce, could trigger UapA sorting in endosomes and vacuoles. We found that concentrations of UA in the range of 5–20 μM did not induce *uapA* transcription (Fig. S1A), but were sufficient to elicit UapA turnover (Fig. 2C). Thus, concentrations close to or greater than the $K_{m/i}$ of UapA for UA (7 μM) are sufficient to elicit its turnover. We

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

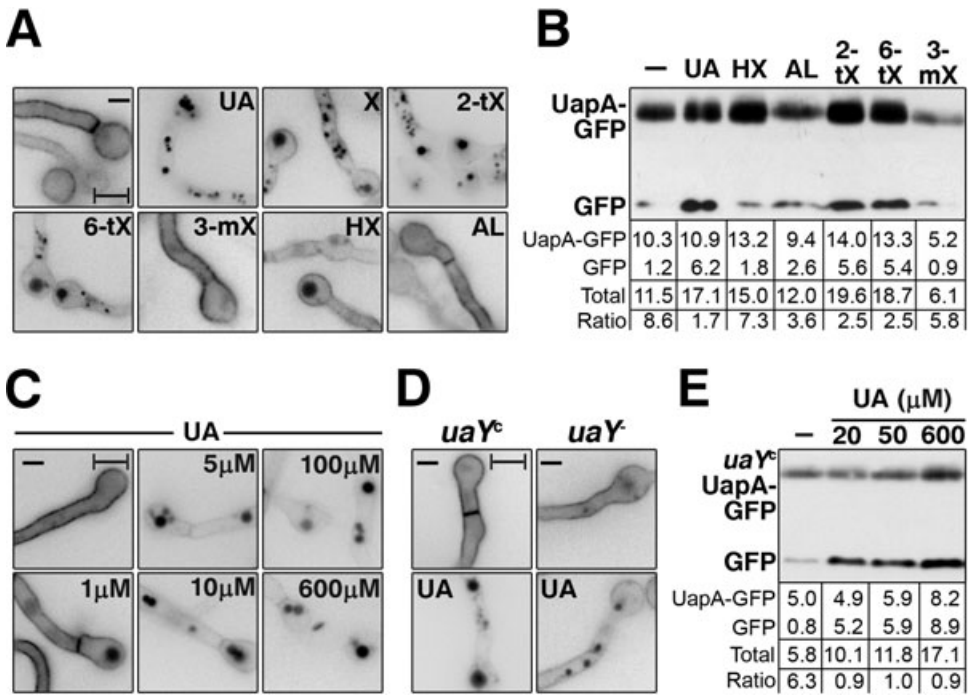


Fig. 2. A. Epifluorescence.
B. Western blot analyses of UapA turnover in response to addition of substrates, ligands or other purine-related metabolites.
C. UapA-GFP cellular distribution at various concentrations of UA added for 2 h.
D. UapA-GFP cellular distribution in the genetic background of *uaY*$^{-}$ or *uaY*^{c}.
E. Western blot analysis of UapA-GFP expression in *uaY*^{c}.

also showed that substrate-induced UapA turnover is independent of UaY activity. We used two strains expressing UapA-GFP in the presence of either a non-functional UaY protein (*uaY*$^{-}$), or of a constitutive UaY protein (*uaY*^{c}). Figure 2D shows that in both mutants UapA-GFP is stable in the absence of substrates, but addition of UA provokes enhanced turnover. Western blot analysis of UapA-GFP in the *uaY*^{c} mutant confirmed that increased levels of UapA do not constitute a signal for its turnover, whereas addition of external UA, even at low concentrations (20 μM), dramatically increases UapA turnover (Fig. 2E). Finally, we used a strain that, besides UapA-GFP, also possesses an active AzgA transporter, capable of taking-up HX or adenine. These purines are enzymatically oxidized to UA, which in turn activates UaY leading to full induction of *uapA* and other genes involved in purine catabolism. In this strain addition of UA elicited, as expected, UapA-GFP turnover, but addition of HX did not (Fig. S1B). The above results confirm that the effect of substrates on UapA turnover is fully independent of transcriptional induction.

Substrate-induced UapA turnover is activity dependent

We showed that substrates, but not ligands, at concentrations close to their corresponding $K_{m/I}$ values, elicit UapA turnover, suggesting the existence of a mechanism directly dependent on completion of substrate transport or elicited by substrate binding to the inward-facing conformation of the transporter (Diallinas, 2008b). To test the latter possibility, we used a strain that overproduces UA metabolically due to a block in uric acid oxidase (*uaZ*$^{-}$). It should be noted that this strain, similarly to the wild-type, does not efflux UA. We determined using HPLC that the *uaZ* mutant has an intracellular UA concentration of ~100 μM, which corresponds to a 10-fold increase compared with the wild-type, in the absence of exogenous purines (see *Experimental procedures*). Using this genetic background we examined the cellular localization of UapA-GFP as described earlier. Figure 3A shows that in the absence of substrates, UapA-GFP is highly localized in the plasma membrane, and there was no sorting to endosomes or vacuolar degradation. Thus, neither increased UA levels in the cytoplasm nor increased amounts of UapA constitute a signal for UapA turnover. In contrast, upon addition of external UA, even at very low concentrations (5 μM), UapA was significantly internalized and degraded. This strongly suggested that UA binding to an inward-facing conformation of UapA is not a signal of turnover.

Direct evidence that substrate-induced UapA turnover is indeed activity dependent was obtained by using loss-of-function mutants of UapA. E356Q and N409D show normal plasma membrane localization and despite their

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

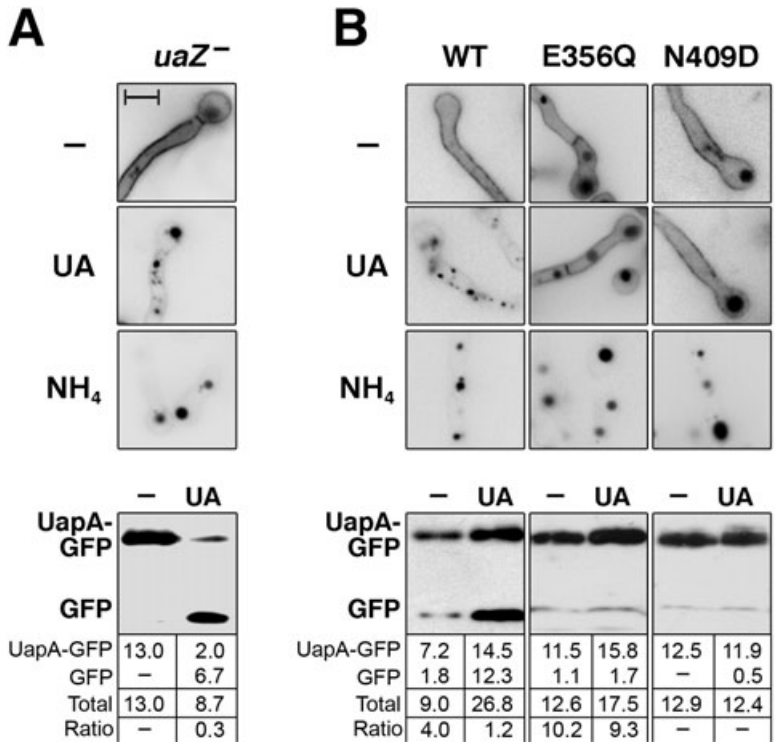


Fig. 3. Substrate-induced UapA turnover is activity dependent.
A. Epifluorescence and Western blot analysis of UapA-GFP expressed in *uaZ*⁻, with or without addition of 5 μM UA for 2 h.
B. Epifluorescence and Western blot analysis of loss-of-function mutants of UapA-GFP (E356Q, N409D). Differences in the total amount of UapA-GFP and free GFP reflect the fact that in the mutants induction of *uapA* transcription does not occur. This does not challenge the conclusions of the paper regarding UapA endocytic turnover.

total incapacity for transport activity they concern substitutions in residues that do not affect the binding affinity for substrates (Koukaki *et al*., 2005; Papageorgiou *et al*., 2008). UA had no effect on the plasma membrane localization of these UapA mutants (Fig. 3B). In contrast, addition of NH_4 led to drastic turnover of UapA-E356Q or UapA-N409D, indistinguishable from the wild-type.

UapA mutants with modified kinetics and specificity have different sensitivities towards substrate-induced turnover

We further investigated transport-dependent UapA turnover by making use of functional versions with modified kinetics and specificity (Table 1). All selected mutants show the expected plasma membrane localization and normal NH_4-induced internalization of UapA-GFP (Koukaki *et al*., 2005; Papageorgiou *et al*., 2008). The mutants used can be classified in two categories: affinity mutants (Q408P, G411P) exhibiting reduced binding ability for uric acid, and specificity mutants (Q113L, T526M, T526L, F528A, Q408E/T526L). Among these, Q408P has very low capacity of transport due to very low substrate binding affinity, whereas Q408E/T526L has a cryosensitive activity. Table 1 and Fig. 4 show representative results concerning the effect of UA or HX on the localization of UapA-GFP in these mutants. An immediate conclusion was that efficient binding *and* transport of sub-

Table 1. UapA mutants and substrate-induced endocytosis.

Allele	Transport activity (% V)	Uric acid binding, $K_{i\text{-}ua}$ (μM)	Hypoxanthine binding, $K_{i\text{-}hx}$ (μM)	Uric acid induced endocytosis	Hypoxanthine induced endocytosis
Wild-type	100	7	No affinity	++	–
Q113L	135	10	260	++	+
Q408P	5	~2000	No affinity	+[a]	n.d.
G411A	240	320	~2000	+	–
T526L	125	10	~2000	+	–
T526M	105	12	~2000	+	–
F528A	120	3	~2000	–	–
Q408E/T526L[cs]	20	7	35	++[b]	++[b]

a. Denotes that endocytosis is observed at 1 mM but not at 40 μM.
b. Denotes that endocytosis is observed only at the permissive T (30°C).
The effect of UA (20–600 μM) or HX (2 mM) on UapA turnover in the mutants at 25°C is denoted as ++ (significant endocytosis), + (moderate endocytosis) or – (no endocytosis). The superscript 'cs' stands for cryosensitive UapA activity (non-permissive T is 25°C, permissive T is > 30°C).

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

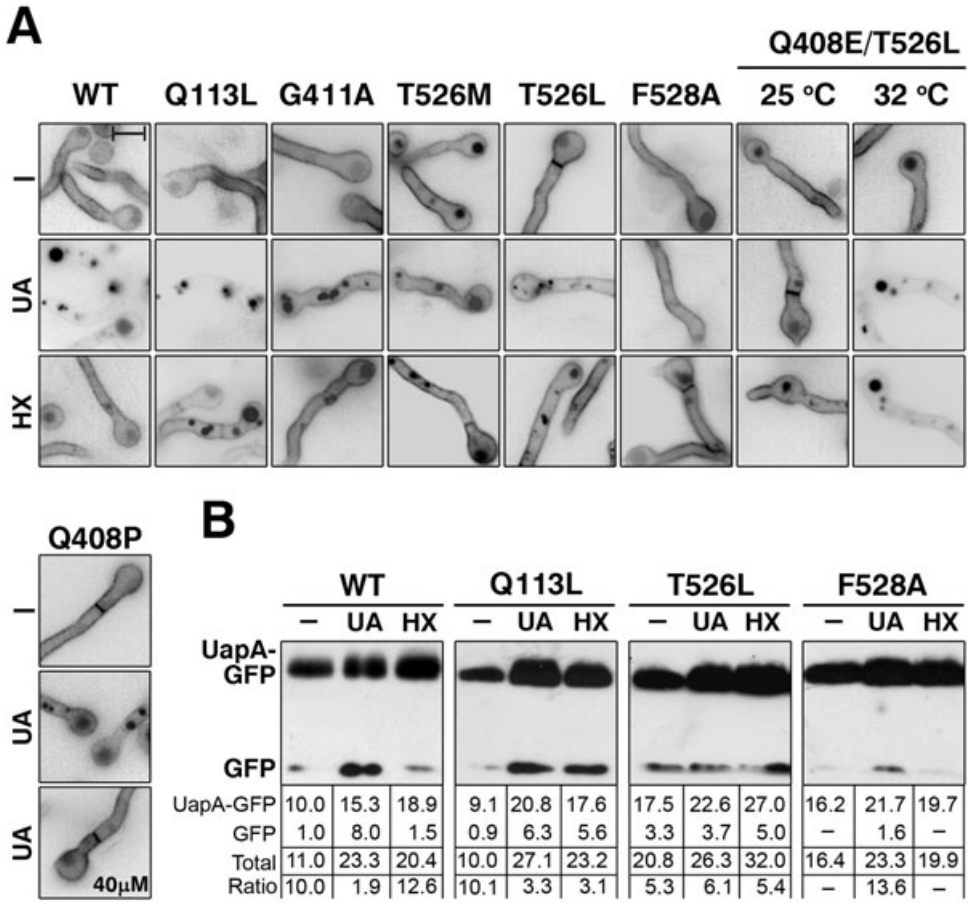


Fig. 4. UapA mutants with modified function have different sensitivities towards substrate-induced turnover.
A. UapA-GFP variants upon addition of UA (600 μM) or HX (2 mM), or without any purine addition, at 25°C, unless indicated differently. For the Q408P mutant, UA was also used at 40 μM. Details on the various UapA alleles are given in the text and Table 1.
B. Western blot analysis of selected strains. Notice the lack of UapA-GFP turnover in F528A, the moderate turnover by both UA and HX in T526L, and the more significant turnover by both purines in Q113L, a result in close agreement with that shown in (A).

strates are prerequisites for endosomal sorting (Table 1). This is highlighted in several mutants. For example, the cryosensitive allele UapA-Q408E/T526L^{cs}, which at the permissive temperature recognizes and transports both these purines with high affinity, is very efficiently internalized by both UA and HX. Similarly, UapA-Q113L is also internalized by both by both UA and HX, but in the latter case internalization is moderate, in line with the lower affinity of this mutant for HX compared with UA (Table 1). In mutants Q408P and G411A, which exhibit low affinities for UA, UapA is either not or very little internalized respectively. Interestingly however, several fully functional mutants (T526M, T526L, F528A) show very moderate or no sensitivity to substrate induced internalization. These three mutants, which concern substitutions in residues predicted to be located in the outward-face of TMS12, show high-affinity for UA and enlarged specificity for other purines (Papageorgiou *et al.*, 2008). This suggests that efficient substrate binding and transport are necessary but not sufficient for MVB sorting of UapA. Finally, although the experiment shown in Fig. 4 was performed at concentrations of UA (600 μM) and HX (2 mM) exceeding the corresponding affinity constants of UapA in the wild-type and in most mutants, we have noticed that the minimum substrate concentrations triggering internalization correlate with the K_m values for UA or HX of each strain. The significance of these observations is central to the interpretation of our result (discussed later).

Sorting of UapA into the MVB pathway depends on HulA^{Rsp5}, a C-terminal Lys and protein synthesis

A single Rsp5p homologue of *A. nidulans*, called HulA, has been previously identified by *in silico* analysis (Boase and Kelly, 2004). We deleted the C2 domain of HulA, the single *Aspergillus* orthologue of Rsp5, and found that the *hulAΔC2* strain is viable, grows and conidiates poorly unless sodium phosphate is added in the medium, has

© 2009 The Authors

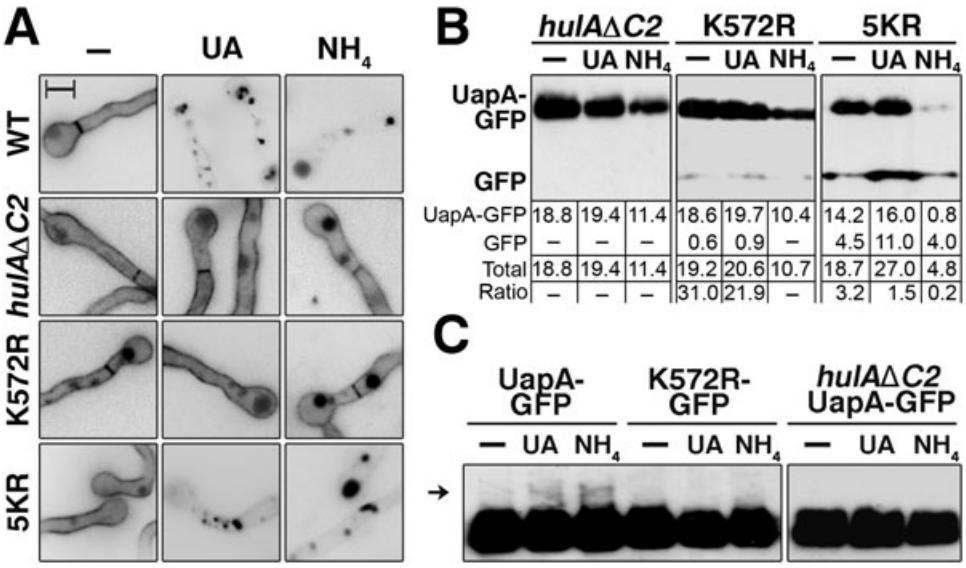


Fig. 5. Substrate-induced UapA turnover depends on HulA^{Rsp5} ubiquitin ligase and Lys572.
A. Epifluorescence.
B. Western blot analysis of the cellular expression of UapA-GFP in *hulA*$^{+}$ (WT) and *hulAΔC2* genetic backgrounds, or K572R and 5KR UapA-GFP mutants.
C. Western blot analysis of *alcA*$_p$-driven UapA-GFP (expressed in HulA^{+} or HulAΔC2 backgrounds) or K572R under conditions inhibiting de-ubiquitination. Samples were collected under control conditions (–) or after addition (5 min) of UA and NH_4. Arrow indicates minor heavier band corresponding to putative ubiquitin-UapA-GFP conjugates, as judged by their disappearance in the K572R mutant and the HulAΔC2 background respectively.

reduced growth rate and exhibits low fertility (Fig. S2). The equivalent deletion in Rsp5p has been shown to result in impaired internalization and/or sorting into MVB vesicles of several transporters in response to NH_4 or substrates (Springael *et al.*, 1999). UapA-GFP was found to be stabilized in the plasma membrane of the *hulAΔC2* strain, as both NH_4- and substrate-induced turnover were drastically impaired (Fig. 5A and B).

We analysed the role of six Lys residues located in cytosolic N-terminal (K21, K22, K59, K60, K73) and C-terminal (K572) regions of UapA, as possible ubiquitin acceptor sites. Substitution of any of these lysines with an arginine residue had no effect on UapA activity (Fig. S3B and results not shown). Among these substitutions, only K572R was found to stabilize UapA-GFP in the plasma membrane (Fig. 5A and B) in both UA and NH4 conditions. The mutant with all N-terminal Lys replaced by Arg (5KR) behaved like wild-type, while the mutant with all six Lys replaced by Arg (6KR) behaved like the single K572R mutant (Fig. 5A and B and Fig. S3). The crucial role of K572 in substrate- or NH_4-elicited endocytosis was further confirmed by two C-terminal deletions, UapA-Δ543-74 or UapA-Δ564-74 (Fig. S3).

We performed experiments to detect ubiquitinated forms of UapA in several nutritional conditions and mutant strains. Figure 5C shows that under conditions of protein extraction inhibiting de-ubiquitination, heavier forms of UapA, probably UapA-ubiquitin conjugates, appear predominantly in the presence of substrate or NH_4. More importantly, under the same physiological conditions, these putative UapA-ubiquitin conjugates are Lys572 and HulA dependent.

Figure 6 shows that the addition of cycloheximide also blocked sorting in cytoplasmic compartments and vacuolar degradation leading to very stable plasma membrane localization of UapA, at least for 2 h after the addition of

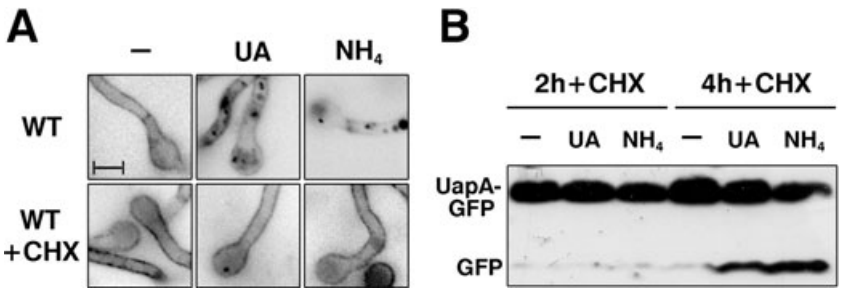


Fig. 6. A. Epifluorescence.
B. Western blot analyses of UapA-GFP cellular expression in urea (–) and after addition of cycloheximide (CHX) 15 min prior to uric acid (UA) or ammonium (NH_4) addition for a period of 2 h (A and B) or 4 h (B).

© 2009 The Authors

uric acid or ammonium. Reduced internalization compared with samples grown in the absence of cycloheximide was only seen after 4 h of substrate or ammonium addition. Treatment with cycloheximide did not impair endocytosis of FM4-64 and has no effect on UapA activity (not shown). These results imply that either UapA sorting in cytoplasmic compartments and vacuolar degradation requires *de novo* synthesis of unknown factor(s) or that this drug affects directly an essential step in protein endocytosis or/and trafficking in *A. nidulans*. A similar effect has been reported for amino acid transporters of *A. nidulans* (Apostolaki *et al*., 2009). This contrasts the effects of cycloheximide in *S. cerevisiae*, where it does not block plasma membrane protein endocytosis but in fact triggers the internalization of several permeases (André and Haguenauer-Tsapis, 2004; Lin *et al*., 2008).

Substrate-induced UapA turnover occurs through endocytosis

In all experiments described so far, UapA-GFP expression was driven by the endogenous *uapA* promoter, which allows a low level, but continuous UapA synthesis. Thus, UapA-GFP labelling of endosome/MVB-like particles and vacuoles upon substrate addition might also reflect the sorting of UapA at the Golgi into carriers that reach endosomes directly without passing through the plasma membrane. In principle, there are two possible approaches to distinguish whether the sorting effect of UA takes place on plasma membrane or newly made UapA. One is blocking UapA synthesis before adding the substrate; the other is using mutants preventing endocytosis. However, as described above, cycloheximide itself blocks endocytosis and thus cannot be used as an inhibitor of *de novo* made UapA, whereas endocytic internalization is essential for *Aspergillus* (Araujo-Bazán *et al*., 2008), and no conditional mutants are available. Thus, in order to investigate whether UapA is indeed endocytosed from the plasma membrane or directly sorted into the MVB pathway for degradation, we used a regulatable promoter in 'pulse-and-chase' experiments. More specifically, we examined the cellular localization of UapA-GFP expressed from $alcA_p$, a promoter that is repressed by glucose and induced by ethanol. A strain expressing UapA-GFP from $alcA_p$ grows fully on UA as a sole nitrogen source in fructose/ethanol media, but not on glucose media (Fig. S4). Upon a 2.5 h induction with ethanol, germlings showed UapA-GFP labelling of the plasma membrane, the ER and the vacuoles (Fig. 7A, [a]). Subsequent blocking of UapA synthesis by adding glucose for 1 h led to significant disappearance of the labelling of ER and of most internal structures, but allowed a strong UapA-GFP labelling of the plasma membrane and the septa (Fig. 7A, [b]). This shows that nearly all detectable UapA-GFP molecules have reached the plasma membrane. Subsequent addition of NH_4 (7A [c]) or UA (7A [d,e,f]) for 2–4 h led to the disappearance of UapA-GFP from the plasma membrane, sorting into the endosome/MVB-like granular particles and degradation in vacuolar lumens. The majority of the cytoplasmic granular particles were not stained by CMAC and, in some samples, showed rapid bidirectional movement, compatible with UapA localization to early endosomes (not shown). In many samples we could also detect labelling of the vacuolar membrane, often embedding strongly fluorescent spots and thread-like extensions. The results shown in Fig. 7A were in agreement with Western blot analysis showing that UA results in enhanced vacuolar degradation of plasma membrane UapA-GFP (Fig. 7B). We repeated the same experiment using the UapA-K572R mutation expressed from the $alcA_p$ promoter and confirmed that Lys572 is a critical residue for both substrate- and ammonium-elicited UapA endocytosis, very probably by being the site of ubiquitin addition by HulA (Fig. 7A and B).

The above experiments strongly suggest that the presence of UA elicits UapA endocytosis but still does not exclude that it might also lead to re-routing of *de novo* made permease for vacuolar degradation. To address this question we induced the *de novo* production of UapA-GFP from the *alcA* promoter ($alcA_p$) after having established conditions eliciting endocytosis by NH_4 or UA. To achieve the steady-state accumulation of UA prior to $alcA_p$-*uapA-gfp* expression, we used a strain that simultaneously expresses a genomic copy of *uapA*, the expression of which is known to occur constitutively during germination and germling development (Amillis *et al*., 2004). Figure 7C shows that in the presence of UA UapA-GFP was present in small vacuoles and endosome-like particles, but mostly in the plasma membrane and especially in the tip of germlings. This result shows that *de novo* produced UapA-GFP predominantly reaches the plasma membrane, which strongly suggests that UA-triggered internalization acts exclusively on plasma membrane-bound UapA. On the other hand, in the presence of NH4, UapA-GFP was mostly in vacuoles and endosome-like particles, suggesting that a significant fraction of UapA might be directly sorted into the MVB pathway.

Substrate-induced endocytosis of inactive UapA molecules can be elicited in trans

As shown in Fig. 3, loss-of-function versions of UapA are not endocytosed in the presence of UA. We tested whether inactive UapA molecules are internalized from the plasma membrane when expressed in a strain simultaneously expressing a wild-type allele of UapA. To that

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

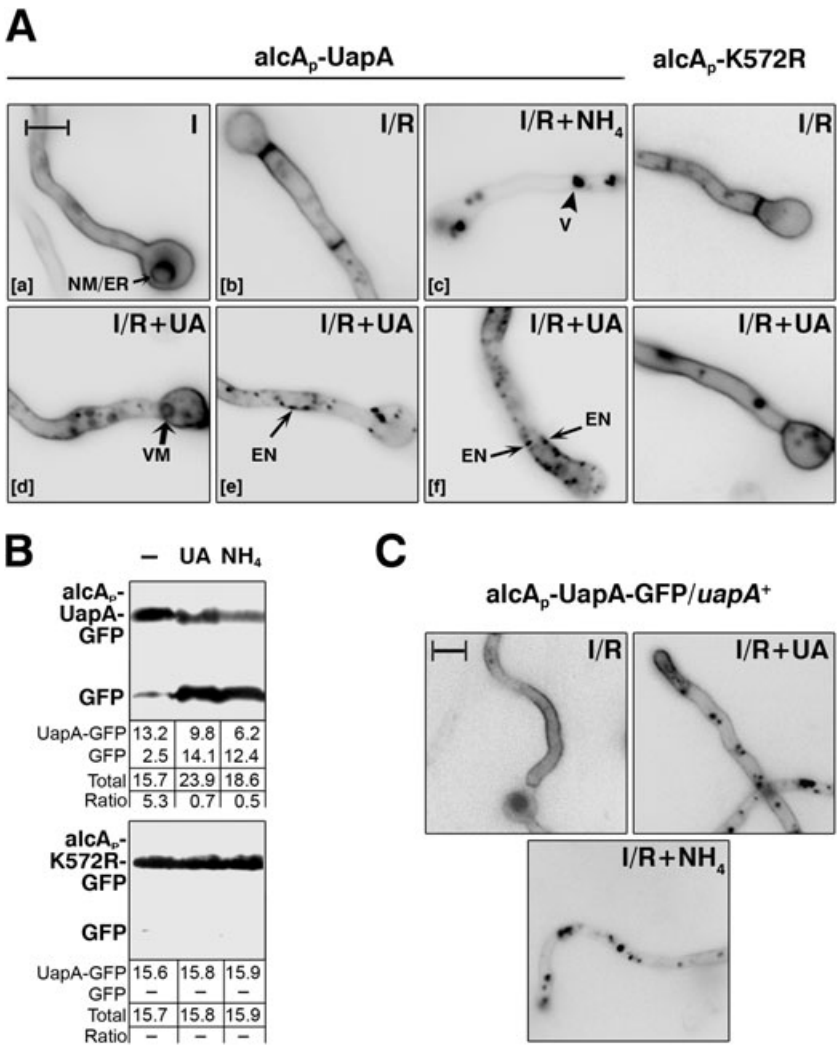


Fig. 7. Transport-dependent UapA turnover through endocytosis.
A. UapA-GFP or K572R expressed from the *alcA$_p$* promoter. Germlings were grown for 12 h in urea plus glucose media (no UapA-GFP expression) and then the following conditions were imposed: I (induced: fructose, ethanol 2.5 h), I/R (induced-repressed: fructose, ethanol 2.5 h, glucose 30 min), I/R+NH$_4$ (I/R plus 2 h addition of NH4), I/R+UA (I//R plus 2 h addition of UA). Different arrows indicate nuclear membrane/ER (NM/ER), vacuolar lumen (V), vacuolar membranes (VM) or endosome/MVB-like particles (EN).
B. Western blot analysis of UapA-GFP and K572R.
C. Localization of *de novo* synthesized *alcA$_p$*-UapA-GFP expressed in a *uapA*$^+$ strain. Conditions for *alcA$_p$*-UapA-GFP expression were as in (A). Native UapA is constitutively expressed (see text).

end, we used the loss-of-function alleles (N409D, D388N or E356Q) shown not to be endocytosed by UA (Fig. 3B). Figure 8A shows the results with N409D, but all three loss-of-function UapA alleles behaved equally. Upon UA addition, when functional UapA molecules are expressed, the inactive UapA version was endocytosed and degraded in the vacuole. Despite prominent UapA-GFP internalization in all mutants in the presence of UA, labelling of the plasma membrane was also still evident, and Western blot analysis showed that a significant amount of UapA-GFP remains intact, despite a relative increase in free GFP (Fig. 8B). These observations suggest that a fraction of UapA-GFP might be present in an endosomal compartment, rather than in vacuoles. This was confirmed with CMAC and FM4-64 double staining (Fig. 8C).

To further analyse this phenomenon of *trans*-endocytosis, we also tested if inactive versions of UapA-GFP are internalized by UA in the presence of an active untagged UapA molecule, such as UapA-K572R, which itself cannot be endocytosed. We tested the N409D and E356Q mutants and the results with the former allele are shown also in Fig. 8A and B. In both cases, UA elicited the endocytosis and significant turnover of the inactive UapA-GFP molecules.

Discussion

We showed that upon addition of substrates to the growth medium, UapA molecules present in the plasma membrane are rapidly (30 min) internalized and sorted into the MVB/endosomal pathway *en route* to the vacuolar lumen, where they are eventually degraded. This phenomenon is not triggered by a metabolite derived from substrates and is independent of transcriptional induction by purines. Results presented herein also strongly suggest that *de novo* made UapA is not sensitive to enhanced turnover by substrates prior to its translocation in the plasma membrane. We provided strong evidence that substrate-

© 2009 The Authors

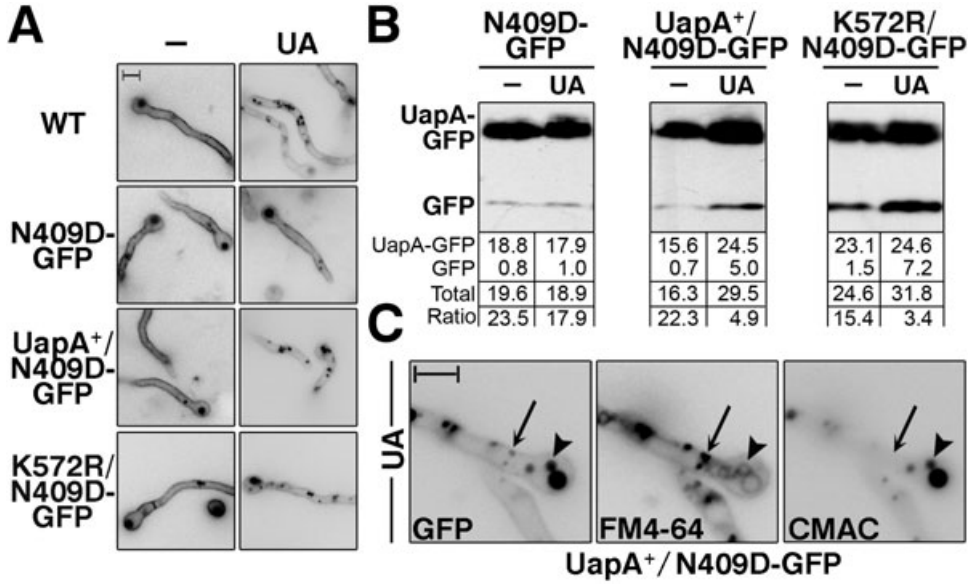


Fig. 8. Substrate-induced endocytosis of inactive UapA molecules is triggered in *in trans*.
A. Epifluorescence.
B. Western blot analyses of a loss-of-function version of UapA-GFP (N409D) expressed alone or in the simultaneous expression of a non-tagged wild-type UapA (UapA^{+}/N409D), or mutant K572R (N409D/K572R). The standard wild-type UapA-GFP is used as a control (WT). UA was added for 2 h.
C. Double stain with CMAC and FM4-64 of UapA^{+}/N409D in the presence of UA. Arrows and arrow heads indicate vacuoles and endosome-like particles respectively.

elicited sorting of plasma membrane UapA into the endosomal degradative pathway is absolutely dependent on transport activity and that conformational changes associated with the transport cycle underlie UapA endocytosis. Interestingly however, specific functional mutants of UapA (F528A) are insensitive to substrate-elicited endosomal sorting and degradation, implying that a transport cycle is necessary but not sufficient for turnover to occur.

The transport-dependence of substrate-elicited UapA endocytosis clearly distinguishes this phenomenon from ammonium-induced endocytosis. However, we showed that in both phenomena UapA endocytosis is dependent on ubiquitination of the transporter itself by the same ubiqutin ligase (HulA^{Rsp5}), which acts on the same residue (K572). The convergence of both endocytic signals to a common ubiquitination mechanism suggests the recruitment of different adaptors or different UapA modifications operating specifically and, respectively, when ammonium cellular levels increase or when UapA is actively transporting its substrates. Several cargo-specific Rsp5p adaptors, often with overlapping specificities and responding to different stimuli, have been characterized in yeast and shown, in some cases, to cooperate to mark an Rsp5p substrate (Lin *et al*., 2008; Nikko *et al*., 2008; Léon and Haguenauer-Tsapis, 2009).

Our results could be accounted for by a mechanism where a high local concentration of substrates on the inner side of the plasma membrane stimulates endocytosis, perhaps by binding to a static site on the inner face of the transporter. We do not, however, favour this hypothesis for the following reasons. First, the lowest substrate concentrations and the profile of substrates, which trigger endocytosis of UapA, correlate with the $K_{m/I}$ values and the substrate specificity of not only the wild-type, but also of all mutants with differentially affected binding affinities and specificities (see Fig. 4 and Table 1). The simplest explanation of this result is that the binding site involved in transport and the one involved in triggering endocytosis might be one and the same. In that case however, the latter site would correspond to the substrate binding site in its inward facing conformation, which necessarily has a much lower substrate affinity than in its outward-facing conformation, in order for UapA to function as an uphill transporter. Such a low-affinity, inward-facing, site could not have responded to the concentrations of substrates which trigger endocytosis, as judged from our results.

Second, metabolically over-produced uric acid does not trigger UapA endocytosis. One can speculate that, uric acid produced metabolically could not come in contact with UapA but no data support this speculation. Third, if an internal site for turnover existed it would trigger direct MVB sorting and degradation of newly synthesized UapA molecules, similar to the case of the Fur4p permease in *S. cerevisiae* (Blondel *et al*., 2004), but unlike what we observed herein.

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

A novel finding of this work is related to the fact that substrate-induced endocytosis of inactive UapA versions can occur *in trans*, that is, in the simultaneous presence of functional UapA molecules, even when these active molecules cannot by themselves be endocytosed, like the K572R or the Δ543-574 mutant. This provides strong evidence that functional UapA molecules activate or recruit a mechanism that leads to the ubiquitination-dependent endocytosis of all UapA molecules, including non-functional versions. The above conclusions are more easily rationalized if UapA molecules are closely organized in plasma membrane microdomains. A *trans*-effect on transport activity, but not on turnover, has been reported for the *Arabidopsis thaliana* ammonium permeases (Loqué *et al.*, 2007). In that case, the wild-type transporter is inactivated by mutant forms expressed simultaneously, but coexpression of two inactive transporters, one with a defective pore, the other with an ablated C-terminus, reconstituted activity. The crystal structure of the homologous *Archaeoglobus fulgidus* ammonium transporter suggested that the C-terminus interacts physically with cytosolic loops of the neighbouring subunit. Conformational coupling and allostery between monomers in an oligomeric complex was proposed as the cognate control mechanism. In addition, oligomerization of neurotransmitter mammalian transporters has been shown to be necessary for ER-exit and localization in the plasma membrane. Interestingly, in that case, addition of substrates elicits the dissociation of transporter oligomers, which in turn leads to enhanced endocytosis (Sorkina *et al.*, 2003; 2009; Sitte *et al.*, 2004; Chen and Reith, 2008).

UapA is the first example of a transporter regulated by its substrates by two antagonistic mechanisms; transcriptional induction and enhanced endocytosis. However, substrate-mediated downregulation of plasma membrane transporter by endosomal sorting appears to be a common process in *S. cerevisiae*. In several instances it has been shown that only transporters that are actually active are subject to endocytosis. This is the case in the manganese permease Smf1 (Liu and Culotta, 1999; Stimpson *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2009), the uracil permease Fur4p (Blondel *et al.*, 2004), Arn1p (Kim *et al.*, 2007), the complex Fet3p-Ftr1p-mediating iron transport (Felice *et al.*, 2005) or the general amino acid permease Gap1p (Risinger *et al.*, 2006). In the case of the Smf1 permease, toxic manganese triggers its vacuolar degradation by sorting of cell surface and intracellular molecules into the multivesicular body, but interestingly, this does not require transport activity of Smf1p and is independent of adaptors necessary for downregulation by manganese starvation (Jensen *et al.*, 2009). A number of mammalian transporters behave analogously (Whitworth and Quick, 2001; Chi and Reith, 2003; Miranda and Sorkin, 2007). Thus, substrate-induced turnover of transporters is generally believed to have evolved as a negative feedback control for avoiding excess uptake of potentially toxic metabolites (Hicke and Dunn, 2003). However, mutants insensitive to substrate-induced turnover of UapA (e.g. F528A, UapA-K572R or HulAΔC2) do not have a detectable phenotype and are not oversensitive to toxic xanthine analogues. This implies that the physiological consequences of this phenomenon, besides its mechanistic role, might vary depending on downstream metabolic pathways related to the fate of the imported metabolite.

Experimental procedures

Media, growth conditions, strains and transformation

Chemicals were from Sigma (St Louis, MO, USA) and AppliChem GmbH. Standard complete (CM) and minimal media (MM) for *A. nidulans* were used (http://www.fgsc.net). Nitrogen sources or purine analogues were used, unless otherwise stated, at the following concentrations: urea 5 mM, $NaNO_3$ 10 mM, NH_4Cl 10 mM, purines, purine analogues and allantoin 0.1 mg ml^{-1}. CM and MM media were supplemented with 0.5 M NaH_2PO_4 when necessary. Induction of UapA expression from the *alcA* promoter was achieved after 2.5 h of growth in MM supplemented with urea (5 mM), fructose (0.1%) and ethanol (3%). Repression of UapA expressed from the *alcA* promoter ($alcA_p$) was achieved in MM supplemented with urea (5 mM) and glucose (1%). In liquid cultures used for microscopy, westerns or uptake assays, cycloheximide was added, at a final concentration of 20 μg ml^{-1}, 15 min prior to substrate/ammonium addition. Growth tests were carried out at 25°C or 37°C, at pH 6.8. Supplements were added when appropriate. The *A. nidulans* strains used are shown on Table S1. Transformation of *A. nidulans* was as in Koukaki *et al.* (2003).

Molecular techniques and plasmids

Southern blots were according to Sambrook *et al.* (1989). In most cases single-copy transformants in the *argB* locus were selected. Northern blot analysis was performed using the glyoxal method. In northerns, equal RNA loading (~5–10 μg) was estimated by optical density measurements (260/280 nm) and controlled by estimating the amount of rRNA, as described in Sambrook *et al.* (1989). [^{32}P]-dCTP labelled DNA molecules were prepared by a random hexanucleotide-primer kit following the supplier's instructions (New England Biolabs). Total RNA isolation from *A. nidulans* was with Trizol reagent according to Invitrogen. Estimation of specific mRNA steady-state levels after autoradiography was carried out by standard semi-quantitative densitometry (ImageJ, http://rsbweb.nih.gov/ij/). Labelled [^{32}P]-dCTP (3000 Ci $mmol^{-1}$) was purchased from Institute of Isotops.

Plasmids pAN510, pAN510exp and pAN510-GFP are described in Diallinas *et al.* (1998), Vlanti and Diallinas (2008) and Pantazopoulou *et al.* (2007) respectively. In pAN520exp, the *argB* sequence has been replaced by *pabaA*

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

from pBS-pabaA (Vlanti and Diallinas, 2008). The *alcA*$_p$ 480 bp sequence was acquired by PCR using primers 6 and 7 (Table S2), digested with BamHI/BglII and introduced in the unique BamHI sequence of pBS-argB (Diallinas *et al*., 1998), resulting in plasmid pBS-argB-alcA$_p$. The sequences of wild-type *uapA-gfp* and mutants K572R and Δ543-574 (see below) were obtained by PCR using primers 1 and 8 (Table S2), using as template the respective pAN510-GFP plasmids, digested with BamHI/BglII and subsequently cloned in the unique BamHI site of pBS-argB-alcA$_p$. Single mutations were constructed by site-directed mutagenesis (*Stratagene*), using proof-read polymerase Pfx50 (Invitrogen) on vector pAN510-GFP, using complementary oligonucleotides carrying the desired substitution (Table S2) and confirmed by sequencing (Macrogen). C-terminal truncation of UapA (Δ543-574) was constructed using vector pAN510exp by introducing an XbaI site at position E543 (Primer 22, Table S2). Truncation Δ564-574 was amplified from vector pAN510exp using primers 1 and 5 (Table S2), subsequently re-cloned into pAN510exp. At positions E543 and D564 the *gfp* orf was cloned using primers 2 or 3 and 4 (Table S2). pAN520exp-K572R was made by PCR amplification of the *uapA* sequence from pAN510-GFP-K572R using primers 1 and 17 (Table S2) and subsequent cloning of the resulting fragment into the unique BamHI, XbaI sites of pAN520exp. Restriction enzymes and T4-ligases used were purchased from Takara Bio Inc.

Truncation of the HulA C2 domain

Truncation of amino acids 4–93 that correspond to the C2 domain of HulA (AN1339.3) and specifically the 104 926–104 363 bp sequence of contig 18, chromosome VIII, was achieved by replacement of the genomic sequence by a linear DNA cassette containing a 1992 bp 5′ flanking sequence, the *Neurospora crassa pyr4* gene, a 826 bp sequence containing the *hulA* promoter and the truncated *hulA* (*hulAΔC2*). The promoter region was amplified with primers 11 and 12 (Table S2), digested with BglII/BamHI and introduced in the unique BamHI site of pBluescript II KS- (Stratagene). In the resulting plasmid the *hulAΔC2* was cloned into the BamHI site using primers 13 and 14 (Table S2). The 5′ flanking sequence was subsequently amplified using primers 9 and 10 and inserted in the KpnI/ClaI sites. Finally, *pyr4*, amplified from plasmid pGEM *pyr4* (Bouzarelou *et al*., 2008) using primers 15 and 16 (Table S2), was inserted in the unique ClaI site of the above vector. The entire cassette was sequenced (Macrogen), linearized by a KpnI/SpeI double digest, and used to transform the Δ*nkuA pyrG89 pyroA4* strain, selecting uracil/uridine prototrophs. Confirmation of single homologous recombination events was achieved by PCR using primers 11 and 14 (Table S2) and by Southern analysis using specific probes (BamHI/EcoRI 1418 bp fragment as a probe for *hulA*, EcoRI/EcoRI 1859 bp fragment for *pyr4*).

Epifluorescence microscopy

Samples for fluorescence microscopy were prepared as in Valdez-Taubas *et al.* (2004). In particular, the samples were incubated in 3 cm Petri dishes on coverslips protected from light in liquid MM supplemented with urea as nitrogen source and appropriate auxotrophies at 25°C for 12 h and then shifted to various conditions for 2–4 h. Staining with FM4-64 (Molecular Probes, USA) was according to Peñalva (2005). In particular, coverslips with germinated conidia were placed on top of plastic covers, covered with 0.1 ml of 10 μM FM4-64, incubated on ice for 15 min, washed in 5 ml MM, and transferred to fresh 3 ml medium for 10–60 min chase time. Vacuole staining with CMAC (7-amino-4-chloromethyl coumarin) (Molecular Probes) was according to Pantazopoulou *et al.* (2007). Coverslips with germinated conidia were placed on top of plastic covers, covered with 0.1 ml of 1/1000 dilution of CMAC (5 mg ml^{-1} stock solution), incubated at 25°C for 20 min, washed in 3 ml MM, and transferred to fresh 3 ml medium for 20 min. Double staining with CMAC and FM4-64 was performed sequentially. In particular, samples were stained with CMAC as above, except for the 20 min washing step, and then with FM4-64 as already described. Samples were observed on an Axioplan Zeiss phase-contrast epifluorescent microscope with appropriate filters and the resulting images were acquired with a Zeiss-MRC5 digital camera using the AxioVs40 V4.40.0 software. Images were then processed in the Adobe Photoshop CS2 V9.0.2 software.

Membrane protein extraction and Western blot analysis

Protein extracts were prepared as in Pantazopoulou *et al*., (2007) (18). In particular, liquid cultures were incubated for 12 h at 25°C before the addition of substrates or ammonium, or induction for the *alcA*-driven UapA expression. Protein concentrations were determined by the method of Bradford. In each case 50 μg of protein was loaded for SDS-PAGE. Detection of ubiquitinated UapA-GFP was achieved in membrane-enriched protein fractions (Galan *et al*., 1996). Mycelia from cultures were harvested, frozen and broken with liquid nitrogen. All subsequent steps were carried at 4°C. Cell extracts were resuspended in extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 5 mM EDTA pH 8.0) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma), 0.2 mM phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) and 25 mM freshly prepared N-ethyl maleimide (NEM). Unbroken cells and debris were removed by a 3 min centrifugation at 1000 *g*. The crude extracts were centrifuged for 45 min at 19 000 *g*. The pellets (membrane-enriched fractions) were resuspended in extraction buffer containing 5 M Urea and incubated on ice for 30 min. Membrane enriched fractions were recovered as pellets after 45 min of centrifugation at 19 000 *g*, were resuspended in extraction buffer (supplemented with NEM, Protease inhibitors, PMSF) and precipitated by addition of 10% TCA, followed by a 30 min incubation on ice and a 30 min centrifugation at 19 000 *g*. The pellet was neutralized and resuspended in sample buffer (250 mM Tris base, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 2% β-mercaptoethanol) and heated at 37°C for 15 min.

Samples were fractionated on a 10% SDS-PAGE gel and electroblotted (Mini PROTEAN™ Tetra Cell, Bio-Rad) onto a PVDF membrane (Macherey-Nagel) for immunodetection. The membrane was treated with 2% non-fat dry milk or according to the manufacturer's instructions and immunodetection was performed using a primary mouse anti-GFP

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

monoclonal antibody (Roche) and a secondary goat anti-mouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling). Blots were developed by the chemiluminescent method using the West Pico SuperSignal reagent (Pierce). Estimation of specific protein levels after chemiluminescence was carried out by standard semi-quantitative densitometry (ImageJ, http://rsbweb.nih.gov/ij/).

HPLC analysis

Uric acid concentration in mycelium extracts, grown in liquid MM for 12 h at 25°C, using urea as sole nitrogen source, was determined through HPLC, using a Hitachi LaChrom L-7100 pump system and an HP 1046A UV detector. For maximum peak resolution we used two Spherisob-ODS-2 columns in series (5 μm, 150 and 250 × 4 mm, MZ-ANALYTICAL). Filtered extracts (0.22 μm) were introduced into the system using a 20 μl injection loop. The elution buffers were 10 mM KH_2PO4 (buffer A) and 50% v/v methanol in buffer A (buffer B), both adjusted to pH 4.5 with H_3PO_4. The flow rate was 0.8 ml min^{-1} and elution initiated with a 5 min isocratic section of 5% B, followed by a 55 min linear gradient from 5% to 50% B. A detection wavelength of 292 nm was employed that corresponds to a maximum in uric acid absorption spectra. Uric acid elution time and concentration were determined using appropriate standards and calibration curves.

Uptake assays

Kinetic analysis of UapA activity was as measured by estimating uptake rates of [^{3}H]-xanthine uptake as described in Amillis *et al.* (2004); Cecchetto *et al.* (2004) and Vlanti *et al.* (2006); Papageorgiou *et al.* (2008). More specifically, [^{3}H]-xanthine uptake in MM was assayed in germinating conidiospores of *A. nidulans*, concentrated at 10^7 conidiospores 100 μl^{-1}, at 37°C just prior of germ tube emergence (4 h), and in germlings (6 h). Initial velocities were measured at 1 min of incubation with 0.2–1 μM radioactive substrate. Reactions were terminated with addition of equal volumes of ice-cold MM containing 1000-fold excess of non-radiolabelled substrate. Background uptake values were corrected by subtracting either values measured in the deleted mutants or values obtained in the simultaneous presence of 1000-fold excess of non-radiolabelled substrate. Both approaches led to the same background uptake level, not exceeding 10–15% of the total counts obtained in wild-type strains. $K_{m/l}$ values were obtained directly by performing and analysing (Prism3) uptakes at various concentrations as described previously (Papageorgiou *et al.*, 2008). All transport assays were carried out in at least three independent experiments, with three replicates for each concentration or time point. Standard deviation was < 20%. Radiolabelled [^{3}H]-xanthine (21.1 Ci $mmol^{-1}$) was purchased from Moravek Biochemicals, Brea, CA, USA.

Acknowledgements

We thank C. Scazzocchio for critically reading the manuscript and D. Hatzinikolaou for the HPLC analysis. C.G. was supported by IKY. A.V. was supported by PENED 2003. Work in the laboratory of G.D. was supported by PENED 2003 co-financed by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

References

Abenza, J.F., Pantazopoulou, A., Rodríguez, J.M., Galindo, A., and Peñalva, M.A. (2008) Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* **10:** 57–75.

Amillis, S., Cecchetto, G., Sophianopoulou, V., Koukaki, M., Scazzocchio, C., and Diallinas, G. (2004) Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. *Mol Microbiol* **52:** 205–216.

André, B., and Haguenauer-Tsapis, R. (2004) Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation. *Top Curr Genet* **9:** 273–323.

Apostolaki, A., Erpapazoglou, Z., Harispe, L., Billini, M., Kafasla, P., Kizis, D., *et al.* (2009) AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. *Eukaryot Cell* **8:** 339–352.

Araujo-Bazán, L., Peñalva, M.A., and Espeso, E.A. (2008) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in Aspergillus nidulans. *Mol Microbiol* **67:** 891–905.

Beck, T., Schmidt, A., and Hall, M.N. (1999) Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J Cell Biol* **146:** 1227–1238.

Belgareh-Touzé, N., Léon, S., Erpapazoglou, Z., Stawiecka-Mirota, M., Urban-Grimal, D., and Haguenauer-Tsapis, R. (2008) Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem Soc Trans* **36:** 791–796.

Blondel, M.O., Morvan, J., Dupré, S., Urban-Grimal, D., Haguenauer-Tsapis, R., and Volland, C. (2004) Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. *Mol Biol Cell* **15:** 883–895.

Boase, N.A., and Kelly, J.M. (2004) A role for *creD*, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Mol Microbiol* **53:** 929–940.

Bouzarelou, D., Billini, M., Roumelioti, K., and Sophianopoulou, V. (2008) EglD, a putative endoglucanase, with an expansin like domain is localized in the conidial cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **45:** 839–850.

Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., and Drevet, C. (2004) The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J Biol Chem* **279:** 3132–3141.

Chen, N., and Reith, M.E. (2008) Substrates dissociate dopamine transporter oligomers. *J Neurochem* **105:** 910–920.

Chi, L., and Reith, M.E. (2003) Substrate-induced trafficking of the dopamine transporter in heterologously expressing cells and in rat striatal synaptosomal preparations. *J Pharmacol Exp Ther* **307:** 729–736.

Darlington, A.J., and Scazzocchio, C. (1967) Use of analogues and the substrate-sensitivity of mutants in analysis

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **93:** 937–940.
Diallinas, G. (2008a) Aspergillus transporters. In *The Aspergilli. Genomics, Medical Applications, Biotechnology, and Research Methods*. Osmani, A., and Gustavo Goldman, H. (eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 297–316.
Diallinas, G. (2008b) Biochemistry. An almost-complete movie. *Science* **322:** 1644–1645.
Diallinas, G., and Gournas, C. (2008) Structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: Lessons from model microbial genetic systems. *Channels (Austin)* **2:** 363–372.
Diallinas, G., Valdez, J., Sophianopoulou, V., Rosa, A., and Scazzocchio, C. (1998) Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO J* **17:** 3827–3837.
Dupré, S., Volland, C., and Haguenauer-Tsapis, R. (2001) Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting. *Curr Biol* **11:** 932–934.
Dupré, S., Urban-Grimal, D., and Haguenauer-Tsapis, R. (2004) Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* **1695:** 89–111.
Erpapazoglou, Z., Froissard, M., Nondier, I., Lesuisse, E., Haguenauer-Tsapis, R., and Belgareh-Touzé, N. (2008) Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. *Traffic* **9:** 1372–1391.
Estrella, L.A., Krishnamurthy, S., Timme, C.R., and Hampsey, M. (2008) The Rsp5 E3 ligase mediates turnover of low affinity phosphate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **283:** 5327–5334.
Felice, M.R., De Domenico, I., Li, L., Ward, D.M., Bartok, B., Musci, G., and Kaplan, J. (2005) Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system. *J Biol Chem* **280:** 22181–22190.
Gadura, N., Robinson, L.C., and Michels, C.A. (2006) Glc7-Reg1 phosphatase signals to Yck1,2 casein kinase 1 to regulate transport activity and glucose-induced inactivation of *Saccharomyces* maltose permease. *Genet* **172:** 1427–1439.
Galan, J.M., Moreau, V., Andre, B., Volland, C., and Haguenauer-Tsapis, R. (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem* **271:** 10946–10952.
Gitan, R.S., and Eide, D.J. (2008) Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochem J* **346:** 329–336.
Gournas, C., Papageorgiou, I., and Diallinas, G. (2008) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol Biosyst* **4:** 404–416.
Hicke, L., and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19:** 141–172.
Higuchi, Y., Shoji, J.Y., Arioka, M., and Kitamoto, K. (2009) Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell* **8:** 37–46.
Horak, J., and Wolf, D.H. (2001) Glucose-induced monoubiquitination of the *Saccharomyces cerevisiae* galactose transporter is sufficient to signal its internalization. *J Bacteriol* **183:** 3083–3088.
Jensen, L.T., Carroll, M.C., Hall, M.D., Harvey, C.J., Beese, S.E., and Culotta, V.C. (2009) Down-regulation of a manganese transporter in the face of metal toxicity. *Mol Biol Cell* **20:** 2810–2819.
Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D. (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12:** 893–905.
Kim, Y., Deng, Y., and Philpott, C.C. (2007) GGA2- and ubiquitin-dependent trafficking of Arn1, the ferrichrome transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **18:** 1790–1802.
Koukaki, M., Giannoutsou, E., Karagouni, A., and Diallinas, G. (2003) A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J Microbiol Methods* **55:** 687–695.
Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S., and Diallinas, G. (2005) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *J Mol Biol* **350:** 499–513.
Léon, S., and Haguenauer-Tsapis, R. (2009) Ubiquitin ligase adaptors: Regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp Cell Res* **315:** 1574–1583.
Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., and Emr, S.D. (2008) Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* **135:** 714–725.
Liu, X.F., and Culotta, V.C. (1999) Post-translation control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the *BSD2* gene. *J Biol Chem* **274:** 4863–4868.
Loqué, D., Lalonde, S., Looger, L.L., von Wirén, N., and Frommer, W.B. (2007) A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature* **446:** 195–198.
Medintz, I., Jiang, H., and Michels, C.A. (1998) The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of *Saccharomyces* maltose permease. *J Biol Chem* **273:** 34454–34462.
Miranda, M., and Sorkin, A. (2007) Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* **7:** 157–167.
Nikko, E., Sullivan, J.A., and Pelham, H.R. (2008) Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep* **9:** 1216–1221.
Pantazopoulou, A., Lemuh, N.D., Hatzinikolaou, D.G., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., and Diallinas, G. (2007) Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **44:** 627–640.
Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A., and Diallinas, G. (2008) Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *J Mol Biol* **382:** 1121–1135.
Peñalva, M.A. (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* **42:** 963–975.
Reggiori, F., and Pelham, H.R. (2002) A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat Cell Biol* **4:** 117–423.

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

Risinger, A.L., Cain, N.E., Chen, E.J., and Kaiser, C.A. (2006) Activity-dependent reversible inactivation of the general amino acid permease. *Mol Biol Cell* **17:** 4411–4419.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Press.

Sitte, H.H., Farhan, H., and Javitch, J.A. (2004) Sodium-dependent neurotransmitter transporters: oligomerization as a determinant of transporter function and trafficking. *Mol Interv* **4:** 38–47.

Soetens, O., De Craene, J.O., and André, B. (2001) Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J Biol Chem* **276:** 43949–43957.

Sorkina, T., Doolen, S., Galperin, E., Zahniser, N.R., and Sorkin, A. (2003) Oligomerization of dopamine transporters visualized in living cells by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J Biol Chem* **278:** 28274–28283.

Sorkina, T., Richards, T.L., Rao, A., Zahniser, N.R., and Sorkin, A. (2009) Negative regulation of dopamine transporter endocytosis by membrane-proximalN-terminal residues. *J Neurosci* **29:** 1361–1374.

Springael, J.Y., De Craene, J.O., and André, B. (1999) The yeast Npi1/Rsp5 ubiquitin ligase lacking its N-terminal C2 domain is competent for ubiquitination but not for subsequent endocytosis of the gap1 permease. *Biochem Biophys Res Commun* **257:** 561–566.

Stimpson, H.E., Lewis, M.J., and Pelham, H.R. (2006) Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *EMBO J* **25:** 662–672.

Sullivan, J.A., Lewis, M.J., Nikko, E., and Pelham, H.R. (2007) Multiple interactions drive adaptor-mediated recruitment of the ubiquitin ligase rsp5 to membrane proteins in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* **18:** 2429–2440.

Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E.A., Peñalva, M.A., *et al.* (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19:** 1439–1449.

Umebayashi, K., and Nakano, A. (2003) Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J Cell Biol* **161:** 1117–1131.

Valdez-Taubas, J., Harispe, L., Scazzocchio, C., Gorfinkiel, L., and Rosa, A.L. (2004) Ammonium-induced internalisation *of UapC, the general purine permease from Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **41:** 42–51.

Vlanti, A., and Diallinas, G. (2008) The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. *Mol Microbiol* **68:** 959–977.

Vlanti, A., Amillis, S., Koukaki, M., and Diallinas, G. (2006) A novel-type substrate-selectivity filter and ER-exit determinants in the UapA purine transporter. *J Mol Biol* **357:** 808–819.

Whitworth, T.L., and Quick, M.W. (2001) Substrate-induced regulation of gamma-aminobutyric acid transporter trafficking requires tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **276:** 42932–42937.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

Η οργάνωση των εισοσωμάτων του νηματοειδούς ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*

Ιωάννης Βαγγελάτος, Κατερίνα Ρουμελιώτη, Χρήστος Γουρνάς, Tereza Suarez, Claudio Scazzocchio και Βίκυ Σοφιανοπούλου

Τα εισοσώματα είναι υποφλοιώδη οργανίδια που πιθανώς εμπλέκονται στην ενδοκύτωση και έχουν μέχρι σήμερα περιγραφεί μόνο στον *S. serevisiae*. Απαρτίζονται από δύο ομόλογες πρωτεΐνες, τις Pil1 και Lsp1, οι οποίες συνεντοπίζονται με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη Sur7. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι εξολοκλήρου συντηρημένες στους Ασκομύκητες. Σε αυτή την εργασία ταυτοποιούμε στον *Aspergillus nidulans* (και σε όλα τα μέλη του υποφύλου *Pezizomycotina*) δύο ομόλογα των Pil1/Lsp1, τα PilA και PilB, τα οποία έχουν προέλθει από ένα γονιδιακό διπλασιασμό ανεξάρτητο αυτού που υπάρχει στο υποφύλο *Saccharomycotina.* Στους Ασπέργιλλους υπάρχουν αρκετές πρωτεΐνες που ομοιάζουν στη Sur7, συμπεριλαμβανομένης μιας αυστηρής Sur7 ορθόλογης (η SurG για τον *Aspergillus nidulans*). Στα κονιδιοσπόρια του *A. nidulans*, αλλά όχι στις υφές, οι τρεις πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στην περιφέρεια του κυττάρου και σχηματίζουν στενά δομημένες στικτές δομές, οι οποίες φαίνονται διαφορετικές από τις ξεκάθαρα διακριτές εισοσωμικές κηλίδες που παρατηρούνται στον *S. serevisiae*. Οι δομές αυτές συναρμολογούνται αργά κατά την ωρίμανση των κονιδιοσπορίων. Στα μυκήλια, οι στικτές δομές είναι παρούσες, αλλά αποτελούνται μόνο από την PilA, ενώ η PilB είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και η SurG εντοπίζεται σε χυμοτόπια και ενδοσώματα. Απαλοιφή καθενός από τα τρία γονίδια δεν οδηγεί σε εμφανή φαινότυπο αύξησης, εκτός από μέτρια ανθεκτικότητα στην ιντρακοναζόλη. Δεν μπορέσαμε να βρούμε καμία προφανή συσχέτιση μεταξύ των μυκηλιακών (PilA) δομών που ομοιάζουν σε εισοσώματα και σε ενδοκύτωση. Η PilA και η SurG είναι απαραίτητες για την εισοσωμική οργάνωση με διαφορετικούς τρόπους από αυτούς των ομολόγων τους του *S. serevisiae*. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν πως η συντήρηση των εισοσωμικών πρωτεϊνών στους ασκομύκητες συνοδεύεται με εντυπωσιακή λειτουργική απόκλιση.

EUKARYOTIC CELL, Oct. 2010, p. 1441–1454 Vol. 9, No. 10
1535-9778/10/$12.00 doi:10.1128/EC.00087-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Eisosome Organization in the Filamentous Ascomycete *Aspergillus nidulans*▽†

Ioannis Vangelatos,[1] Katerina Roumelioti,[1] Christos Gournas,[1] Teresa Suarez,[2] Claudio Scazzocchio,[3,4] and Vicky Sophianopoulou[1]*

Institute of Biology, National Center for Scientific Research, Demokritos (NCSRD), Athens, Greece[1]; Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biologicas (CSIC), 9, 28040 Madrid, Spain[2]; Department of Microbiology, Imperial College, London, United Kingdom[3]; and Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, UMR8621 Orsay, France[4]

Received 13 April 2010/Accepted 27 July 2010

Eisosomes are subcortical organelles implicated in endocytosis and have hitherto been described only in *Saccharomyces cerevisiae*. They comprise two homologue proteins, Pil1 and Lsp1, which colocalize with the transmembrane protein Sur7. These proteins are universally conserved in the ascomycetes. We identify in *Aspergillus nidulans* (and in all members of the subphylum Pezizomycotina) two homologues of Pil1/Lsp1, PilA and PilB, originating from a duplication independent from that extant in the subphylum Saccharomycotina. In the aspergilli there are several Sur7-like proteins in each species, including one strict Sur7 orthologue (SurG in *A. nidulans*). In *A. nidulans* conidiospores, but not in hyphae, the three proteins colocalize at the cell cortex and form tightly packed punctate structures that appear different from the clearly distinct eisosome patches observed in *S. cerevisiae*. These structures are assembled late during the maturation of conidia. In mycelia, punctate structures are present, but they are composed only of PilA, while PilB is diffused in the cytoplasm and SurG is located in vacuoles and endosomes. Deletion of each of the genes does not lead to any obvious growth phenotype, except for moderate resistance to itraconazole. We could not find any obvious association between mycelial (PilA) eisosome-like structures and endocytosis. PilA and SurG are necessary for conidial eisosome organization in ways that differ from those for their *S. cerevisiae* homologues. These data illustrate that conservation of eisosomal proteins within the ascomycetes is accompanied by a striking functional divergence.

In mammalian cells and in *Saccharomyces cerevisiae* there is cogent evidence that membrane proteins are organized in discrete domains. In the latter organism, some transporters, such as Can1p, Tat2p, and Fur1p, are organized in discrete domains on the plasma membrane. This specific domain has been named MCC, for membrane compartment occupied by Can1p (17, 26, 27). As many as 21 proteins share the MCC localization pattern. These include MCC integral components, such as the membrane protein Sur7 and the MCC-associated cytosolic proteins Pil1 and Lsp1 (see below) (18). Sur7 is a transmembrane protein consisting of four putative transmembrane domains and remains associated with the MCC compartments even under physiological conditions in which all other MCC components are dispersed (17). The pair of homologous proteins, Pil1 and Lsp1, are components of subcortical punctate assemblies named "eisosomes" (52) which show localization identical to that of MCC proteins. Both MCC and eisosome components were shown to localize to furrow-like invaginations of the plasma membrane (43). The biological functions of MCC and eisosomes are quite elusive. They were initially characterized to be sites of lipid and protein endocytosis (53), but this function is by no means certain (18). In *Candida albicans*, Sur7 (CaSur7) has additional roles in cell wall synthesis, actin cytoskeleton organization, and septin localization (3, 4), while in *S. cerevisiae*, *sur7* mutants show a diminished efficiency of sporulation (54). Eisosomes are synthesized *de novo* in the bud during cell division (28). The Pil1/Lsp1 cytoplasmic components of the eisosome, together with the membrane protein Sur7, are conserved throughout the ascomycetes (3) (see below).

Recent work on eisosomal proteins has mainly dealt with two issues. First, both Pil1 and Lsp1 are phosphorylated. Phosphorylation is mediated by a pair of redundant kinases, Pkh1p and Pkh2p. The evidence linking phosphorylation with eisosome assembly and disassembly is, however, contradictory (25, 53). The Pkh1/2 kinases are conserved throughout the eukaryotes and strictly conserved in the ascomycetes, with one putative orthologue of the Pkh1/2 pair being present in all *Aspergillus* genomes sequenced. The second avenue of research is the identification of eisosome-associated proteins, including those necessary for eisosome assembly. Two recent reports have characterized a second conserved protein with four transmembrane domains, Nce102p, to be essential for eisosome assembly (15, 43). The striking conservation in all available ascomycete genomes of proteins involved in eisosome structure or assembly posits an interesting paradox. No obvious macroscopic growth phenotype is seen in *S. cerevisiae* cells from which *PIL1*, *LSP1*, or *SUR7* is deleted in mutants with single, double, or triple mutations (52). The only report dealing with eisosomal proteins in an organism other than *S. cerevisiae* concerns the Sur7 homologue of *Candida albicans*. CaSur7 is organized in punctate eisosome-like structures. At

* Corresponding author. Mailing address: Institute of Biology, National Center for Scientific Research, Demokritos, Aghia Paraskevi 153 10, Athens, Greece. Phone: 30 2106503602. Fax: 30 2106511767. E-mail: vicky@bio.demokritos.gr.

† Supplemental material for this article may be found at http://ec.asm.org/.

▽ Published ahead of print on 6 August 2010.

variance with *S. cerevisiae*, a deletion of the cognate gene results in a clear growth phenotype (see above) which resembles that resulting from the inhibition of β-glucan synthesis (2).

Model filamentous ascomycetes, such as *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Sordaria macrospora*, and *Podospora anserina*, together with a host of plant and animal pathogens and an increasing number of opportunistic human pathogens, belong to the subphylum Pezizomycotina, which may have diverged from the subphylum Saccharomycotina (such as *S. cerevisiae* and *C. albicans*) between 650 million and more than 1,000 million years ago (34). All these organisms are characterized by a highly polarized growth pattern and developmental processes which include the alternation of asexual and sexual cycles involving two different types of spores: conidiospores and ascospores. Differently from the Saccharomycotina (see below), the sexual cycle involves a dikaryotic stage and a transient diploid, which never divides as such but which enters meiosis as soon as it is formed (see reference 55 and references therein).

A. nidulans is arguably, among the Pezizomycotina, the organism where membrane proteins and endocytosis have been better studied. In this organism, a number of transporters driven by their physiological promoters have been visualized in the cell membrane (UapC [48], PrnB [45], UapA and AzgA [35], AgtA [5], MstE [14], FcyB [51], UreA [M. Sanguinetti and A. Ramón, personal communication], and FurD [G. Diallinas and F. Borbolis, personal communication]). Load-and-chase experiments have shown that when the dye FM4-64 is endocytosed, it first appears in cortical punctate structures (36). Active research concerning membrane proteins (see reference 12 for a review), determination and maintenance of polarity during development (including the possible involvement of sphingolipids [23], which may be involved in signaling eisosomal protein phosphorylation in *S. cerevisiae*), and ongoing recent work on endocytosis (1, 5, 6, 16, 36, 40) make *A. nidulans* an obvious model within the Pezizomycotina with which to study eisosomal presence, structure, and function. A description of the presence and fate of these organelles during asexual development is presented below.

(The work of I. Vangelatos was in partial fulfillment of Ph.D. thesis requirements at NCSRD.)

MATERIALS AND METHODS

Media and growth conditions. Minimal medium (MM) and complete medium (CM) as well as the growth conditions for *A. nidulans* were described by Cove (10). pH 5.5 and 8.2 MM were made using MM without salt solution and with the addition of 25 mM NaH_2PO_4 and 25 mM Na_2HPO_4, respectively. When necessary, supplements were added at the adequate concentrations (http://www.gla.ac.uk/acad/ibls/molgen/aspergillus/supplement.html). Glucose (1%) was used throughout as a carbon source. Urea (5 mM) or ammonium L-(+)-tartrate (10 mM) was used as the nitrogen source. The antifungal drugs caspofungin (MSD, Merck & Co Inc., Whitehouse Station, NJ) and itraconazole (Sigma) were used at final concentrations of 10 μg/ml and 15 μM, respectively, in CM. Caffeine, calcofluor white, SDS, Congo red, and $CaCl_2$ were purchased from Sigma and used at final concentrations of 10 mM, 100 μg/ml, 50 μg/ml, 50 μg/ml, and 100 mM, respectively, in CM (20). Staining with the dye FM4-64 (Molecular Probes, Inc.) was as described by Peñalva (36). In particular, coverslips with germinated conidia (12 h of growth at 25°C) adhering to the glass surface were placed on top of plastic covers, covered with 0.1 ml of 10 μM FM4-64, incubated on ice for 15 min, washed in 5 ml MM, and immediately observed. Vacuole staining with 7-amino-4-chloromethyl coumarin (CMAC; Molecular Probes, Inc.) was as described by Tavoularis at al. (45). Coverslips with germinated conidia were placed on top of plastic covers, covered with 0.1 ml of 1/1,000 dilution of CMAC (5-mg/ml stock solution), incubated at 25°C for 30 min, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and observed under a phase-contrast fluorescent microscope with a 4′,6-diamidino-2-phenylindole filter (excitation, 365/10 nm; UV-1A filter; model DM 400 digital microscope and model BA 400 light microscope [Leica]).

Crosses between *A. nidulans* strains were carried out as described by Pontecorvo et al. (37). For growth tests, conidiospores were inoculated on solid CM or MM supplemented with the appropriate substrates and incubated at 25°C, 37°C, or 42°C for 2 to 4 days. To monitor *PilA*, *PilB*, and *SurG* mRNA steady-state levels in different developmental stages from ungerminated conidia to young mycelia, strains were grown on liquid MM containing 1% (wt/vol) glucose and 5 mM urea as the sole carbon and nitrogen sources, respectively, for 0, 4, 8, 12, 16, and 20 h at 25°C.

Fungal and bacterial strains. (i) *A. nidulans* strains. The different auxotrophic mutations of *A. nidulans* strains are compiled by A. J. Clutterbuck (http://www.gla.ac.uk/acad/ibls/molgen/aspergillus/index.html). In particular, *pantoB100*, *pabaA1*, *pabaB22*, *riboB2*, *pyroA4*, *pyrG89*, and *argB2* indicate auxotrophies for D-pantothenic acid, *p*-aminobenzoic acid, riboflavin, pyridoxine hydrochloride, uracil/uridine, and L-arginine, respectively. The *nkuA*Δ mutation results in a dramatically decreased frequency of heterologous integration events into the *A. nidulans* genome. The LO1516 (Table 1) strain expresses functional chimeric histone H1 molecules fused with the monomeric red fluorescent protein (mRFP). The VS125 (*agtA*::*sgfp*) strain expresses functional chimeric AgtA molecules fused with the green fluorescent protein (sGFP). These markers do not affect the localization of eisosomal proteins. All strains used in this work are listed in Table 1. In every case, MM indicates minimal medium supplemented with the requirements relevant to the strains used in the experiment. *pabaA1* was used as the wild-type (wt) strain. The VS79 to VS81 and VS83 strains (*pilA*::*sgfp pilB*::*sgfp* and *surG*::*sgfp pilA*::*mrfp*, respectively; for complete genotypes, see Table 1) were isolated after transformation of protoplasts of the *nkuA*Δ *pyrG89 pyroA4* or *nkuA*Δ *pyrG89 riboB2* strain with the *pilA*::*sgfp*::*AfpyrG*$^+$ (*pyrG* gene of *A. fumigatus*), *pilB*::*sgfp*::*AfpyrG*$^+$, *surG*::*sgfp*::*AfpyrG*$^+$, or *pilA*::*mrfp*::*AfpyrG*$^+$ translational fusion cassettes (see below). The VS84 to VS86 (*surG*Δ::*Afpyro*$^+$ [*pyro* gene of *A. fumigatus*], *pilB*Δ::*AfpyrG*$^+$, and *pilA*Δ::*Afribo*$^+$ [*ribo* gene of *A. fumigatus*], respectively) strains were isolated after transformation of protoplasts of the *nkuA*Δ *pyrG89 pyroA4* or *nkuA*Δ *pyrG89 riboB2* recipient strain with the *surG*Δ, *pilB*Δ, and *pilA*Δ deletion cassettes (see deletion of the *pilA*, *pilB*, and *surG* genes). The VS87 (*pilA*Δ::*Afribo*$^+$ *pilB*Δ::*AfpyrG*$^+$) strain was isolated by crossing the VS85 and VS86 strains. The VS91 (*pilA*::*mrfp pilB*::*sgfp*) and VS94 (*pilA*::*mrfp surG*::*sgfp*) strains were isolated by crossing the VS83 strain with the VS80 and VS81 strains, respectively. The VS128 (*pilB*::*sgfp pilA*Δ::*Afribo*$^+$) and VS129 (*surG*::*sgfp pilA*Δ::*Afribo*$^+$) strains were isolated by crossing the VS84 strain with the VS80 and VS81 strains, respectively. The VS118 (*pilA*::*mrfp surG*Δ::*Afpyro*$^+$) and VS132 (*pilB*::*sgfp surG*Δ::*Afpyro*$^+$) strains were isolated by crossing the VS84 strain with the VS79 and VS80 strains, respectively. The VS145 (*surG*::*sgfp hhoA*::*mrfp*) and VS153 (*pilB*::*sgfp hhoA*::*mrfp*) strains were isolated by crossing the LO1516 strain with the VS80 and VS81 strains, respectively. The VS172 (*agtA*::*sgfp pilA*Δ::*Afribo*$^+$) strain was isolated by crossing the VS86 and VS125 strains. The VS186 strain was isolated by crossing the VS83 strain with the TpA4 strain (45). The *nkuA*Δ *pyrG89 riboB2* and *nkuA pyrG89 pyroA4* strains were kindly provided by M. Peñalva and were used for the deletion and the in-locus fusions of the *pilA*, *pilB*, and *surG* genes. For plasmid details, see below and Table 2.

(ii) *Escherichia coli* strains. The *Escherichia coli* strain used was DH5α.

Transformation methods. Transformation of *E. coli* was carried out as described by Sambrook and Russell (39). Transformation of *A. nidulans* is described by Tilburn et al. (47).

Plasmids. The pRG3 plasmid carries the radish 18S rRNA gene (11).The p1548 plasmid contains the *riboB* gene of *Aspergillus fumigatus* (44), which complements the *riboB2* mutation of *A. nidulans* (kindly provided by M. Peñalva). The p1547 plasmid contains the *pyroA* gene of *A. fumigatus* (44), which complements the *pyroA4* mutation of *A. nidulans* (kindly provided by M. Peñalva). The p1439 and p1491 plasmids contain a 5 Gly-Ala (5GA) linker fused in frame with the sGFP and with mRFP, respectively, followed by the *A. fumigatus pyrG* gene (kindly provided by M. Peñalva) (44).

DNA manipulations. Plasmid preparation from *E. coli* strains was carried out as described by Sambrook and Russell (39). DNA digestion was carried out as described by Sambrook and Russell (39). Total DNA extraction from *A. nidulans* is described by Lockington et al. (24). Southern blot analysis was carried out as described by Sambrook and Russell (39). The restriction enzymes used to monitor the deletion of *surG*, *pilB*, and *pilA* from the genomes of the VS84, VS85, and VS86 strains, respectively, were HindIII (*pilA*Δ::*Afribo*$^+$*surG*Δ::*Afpyro*$^+$) and PstI (*pilB*Δ::*AfpyrG*$^+$). *AfriboB*, *AfpyrG*, and *AfpyroA* probes corresponding to

TABLE 1. *Aspergillus nidulans* strains used in this study

Strain	Genotype	Source
wt	*pabaA1*	CS2498 (Fungal Genetics Stock Center)
nkuAΔ pyrG89 riboB2	*pyrG89 argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 riboB2*	M. Peñalva
nkuAΔ pyrG89 pyroA4	*pyrG89 argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pyroA4*	M. Peñalva
LO1516	*pyrG89 argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pyroA4 hhoA::mrfp::Afribo riboB2*	C. Scazzocchio
VS79	*pyrG89 argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 pilA::sgfp::AfpyrG*$^+$ *riboB2*	This study
VS80	*pyrG89 pilB::sgfp::AfpyrG*$^+$ *argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 riboB2*	This study
VS81	*pyrG89 surG::sgfp::AfpyrG*$^+$*argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 riboB2*	This study
VS83	*pyrG89 argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pyroA4 pilA::mrfp::AfpyrG*$^+$	This study
VS84	*pyrG89 argB2 surGΔ::Afpyro*$^+$ *nkuAΔ::argB*$^+$ *pyroA4*	This study
VS85	*pyrG89 pilBΔ::AfpyrG*$^+$ *argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 riboB2*	This study
VS86	*pyrG89 argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 pilAΔ::Afribo*$^+$ *riboB2*	This study
VS87	*pyrG89 pilBΔ::AfpyrG*$^+$ *argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 pilAΔ::Afribo*$^+$ *riboB2*	This study
VS91	*pyrG89 argB2 surG::sgfp::AfpyrG*$^+$ *nkuAΔ::argB*$^+$ *pilA::mrfp::AfpyrG*$^+$ *riboB2*	This study
VS94	*pyrG89 pilB::sgfp::AfpyrG*$^+$ *argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pilA::mrfp::AfpyrG*$^+$ *riboB2*	This study
VS118	*pyrG89 argB2 surGΔ::Afpyro*$^+$ *nkuAΔ::argB*$^+$ *pyroA4 pilA::mrfp::AfpyrG*$^+$	This study
VS125	*agtA::sgfp::AfpyrG*$^+$ *argB2 riboB2*	This study
VS128	*pyrG89 pilB::sgfp::AfpyrG*$^+$ *argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 pilAΔ::Afribo*$^+$ *riboB2*	This study
VS129	*pyrG89 surG::sgfp::AfpyrG*$^+$*argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 pilAΔ::Afribo*$^+$ *riboB2*	This study
VS132	*pyrG89 pilB::sgfp::AfpyrG*$^+$ *argB2 surGΔ::Afpyro*$^+$ *nkuAΔ::argB*$^+$ *pyroA4*	This study
VS145	*pyrG89 surG::sgfp::AfpyrG*$^+$*argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pabaB22 hhoA::mrfp::Afribo*$^+$ *riboB2*	This study
VS153	*pyrG89 pilB::sgfp::AfpyrG*$^+$ *argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pyroA4 hhoA::mrfp::Afribo*$^+$ *riboB2*	This study
VS172	*pyrG89 agtA::sgfp::AfpyrG*$^+$ *argB2 nkuAΔ::argB*$^+$ *pilAΔ::Afribo*$^+$ *riboB2*	This study
VS186	*yA2 pantoB100*, *prnB::sgfp::trpC* 3′ terminator sequence *pyrG89 argB2 nkuAΔ::pilA::mrfp::AfpyrG*$^+$	This study

the purified ~1-kb PCR fragments were obtained using as template DNA the p1548, p1439, and p1547 plasmids, respectively, and the PilAΔ-Ribo F and PilAΔ-Ribo R, PilBΔ-PyrG F and PilBΔ-PyrG R, and SurGΔ-Pyro F and SurGΔ-Pyro R primer pairs, respectively (Table 3).

High-fidelity and long-fragment PCRs were carried out using an LA *Taq* kit (Takara). High-fidelity and small-fragment PCRs were carried out using platinum *Pfx* polymerase (Invitrogen), while conventional PCRs were carried out using *Taq* polymerase (NEB). DNA bands were purified from agarose gels using a Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega). The [^{32}P]dCTP-labeled DNA molecules, which were used as gene-specific probes, were prepared using a Megaprime DNA labeling system kit (Amersham Life Sciences).

Deletion of *pilA*, *pilB*, and *surG* genes. The entire *pilA*, *pilB*, and *surG* open reading frames (ORFs) (1,044 bp [ANID_05217.1], 1,200 bp [ANID_3931.1], and 735 bp [ANID_4615.1], respectively) were replaced in an *nkuAΔ pyrG89 riboB2* (*pilA* and *pilB*) or *nkuAΔ pyroA4* (*surG*) strain by the *riboB*, *pyrG*, or *pyroA* (*pilA*, *pilB*, and *surG*, respectively) gene after a double crossing-over event, using the fusion PCR gene replacement method (44). The primers used are listed in Table 3. In the *pilA* deletion cassette, the fragment corresponding to the central part contains the *riboB* gene of *A. fumigatus* amplified from the p1548 plasmid using primers PilAΔ-Ribo F and PilAΔ-Ribo R. In the *pilB* deletion cassette, the fragment corresponding to the central part contains the *pyrG* gene of *A. fumigatus* amplified from the p1439 plasmid using primers PilBΔ-PyrG F and PilBΔ-PyrG R. For the *surG* deletion cassette, the fragment corresponding to the central part contains the *pyroA* gene of *A. fumigatus* amplified from the p1547 plasmid using primers SurGΔ-Pyro F and SurGΔ-Pyro R. The sequences 1,115 bp upstream and 1,014 bp downstream of the *pilA* ORF were amplified from genomic DNA of a wild-type strain (*pabaA1*) using the P1 PilAΔ-P3 PilAΔ and P4 PilAΔ-P6 PilAΔ primer pairs, respectively. The sequences 1,126 bp upstream and 1,112 bp downstream of the *pilB* ORF were amplified from genomic DNA of a wild-type strain (*pabaA1*) using the P1 PilBΔ-P3 PilBΔ and P4 PilBΔ-P6 PilBΔ primer pairs, respectively. The sequences 973 bp upstream and 1,073 bp downstream of the *surG* ORF were amplified from genomic DNA of a wild-type strain (*pabaA1*) using the P1 SurGΔ-P3 SurGΔ and P4 SurGΔ-P6 SurGΔ primer pairs, respectively. The whole *pilA*, *pilB*, and *surG* deletion cassettes used to transform the *nkuAΔ pyrG89 riboB2* and *nkuAΔ pyroA4* strains were amplified using the P2 PilAΔ-P5 PilAΔ, P2 PilBΔ-P5 PilBΔ, and P2 SurGΔ-P5 SurGΔ primer pairs, respectively (Table 3). Selection of transformants was carried out on urea-containing minimal medium lacking riboflavin, uracil/uridine, or pyridoxine, as required for each replacement. The in-locus replacement of *pilA*, *pilB*, and *surG* with *riboB*, *pyrG*, and *pyroA*, respectively, was confirmed by Southern blot analysis (data not shown). The deleted outcrossed strains were checked by PCR using specific primer pairs P2 PilAΔ-P5 PilA for the *pilA*Δ strain, P2 PilBΔ-P6 PilB for the *pilB*Δ strain, and P2 SurGΔ-P5 SurG for the *surG*Δ strain, respectively (Table 3).

TABLE 2. Plasmids used in this work[a]

Cloning vector	Description	Source, yr (reference)
pRG3	pGEM with 18S rRNA gene	Delcasso-Tremousaygue et al., 1988 (11)
p1548	*AfriboB*	Szewczyk et al., 2006 (provided by M. Peñalva) (44)
p1547	*AfpyroA*	Szewczyk et al., 2006 (provided by M. Peñalva) (44)
p1439	5GA-*sgfp-AfpyrG*	Szewczyk et al., 2006 (provided by M. Peñalva) (44)
p1491	5GA-*mrfp-AfpyrG*	Szewczyk et al., 2006 (provided by M. Peñalva) (44)

[a] See also Materials and Methods.

Construction of *pilA*, *pilB*, and *surG* in-locus fusions. Cassettes containing the *pilA*::*sgfp*, *pilB*::*sgfp*, *surG*::*sgfp*, *pilA*::*mrfp*, and *pilB*::*mrfp* sequences were constructed by joining three different PCR fragments, as described by Szewczyk et al. (44), using the PilA, PilB, and SurG pairs of primers (Table 3). To construct the *pilA*::*sgfp*, *pilB*::*sgfp*, *surG*::*sgfp*, *pilA*::*mrfp*, and *pilB*::*mrfp* translational fusions, DNA fragments corresponding to the central part of the construction were amplified from the p1439 and p1491 plasmids. These fragments contain a 5GA linker fused in frame with the sGFP and the mRFP proteins, followed by the *pyrG* gene of *A. fumigatus.* The upstream flanking sequence of the *sgfp* and *mrfp* ORFs is a 1,128-bp fragment containing a part of the *pilA* ORF followed by the 5GA linker, while the downstream flanking sequence is a fragment containing a 1,014-bp fragment corresponding to the 3′ end of the *pilA* gene, just after the chain termination codon. The upstream flanking sequence of the *sgfp* ORF is a fragment containing 1,105 bp of the *pilB* ORF, followed by the 5GA linker, while the downstream flanking sequence is a fragment containing a 1,112-bp fragment corresponding to the 3′ downstream region of the *pilB* gene, just after the chain termination codon. The upstream flanking sequence of the *sgfp* ORF is a 1,157-bp fragment of the *surG* ORF, followed by the 5GA linker, while the downstream flanking sequence is a fragment containing a 1,073-bp fragment corresponding to the 3′ end of the *surG* gene, just following the chain termina-

TABLE 3. Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence (5′–3′)
PilAΔ-Ribo F	GCA GAA TAT CGG CTG GTC TC CGC TCT AGA ACT AGT GGA TCC
PilAΔ-Ribo R	GCT CAT TCA GTG AGT GCT CG CCT CGA GGT CGA CGG TAT CG
PilBΔ-PyrG F	CAC CTG TCT AGC CTC AGC AA GTC GCC TCA AAC AAT GCT CTT C
PilBΔ-PyrG R	CAC AAA GCA CTA ATC ACC CCT T CTG AGA GGA GGC ACT GAT GC
SurGΔ-Pyro F	GTC TAC TCG TCT CTC ATC AGA CGC TCT AGA ACT AGT GGA TCC
SurGΔ-Pyro R	GTG TAT AGC CGA CAG CAG CA CCT CGA GGT CGA CGG TAT CG
P1 PilAΔ	CGA TCC TAG CTC TCA GGA TC
P3 PilAΔ	GGA TCC ACT AGT TCT AGA GCG GAG ACC AGC CGA TAT TCT GC
P4 PilAΔ	CGA TAC CGT CGA CCT CGA GG CGA GCA CTC ACT GAA TGA GC
P6 PilAΔ	ACC AAC CTA GTC GAC GTG AC
P1 PilBΔ	CTC AGC TGA GAG ACT GTC AG
P3 PilBΔ	GAA GAG CAT TGT TTG AGG CGA C TTG CTG AGG CTA GAC AGG TG
P4 PilBΔ	GCA TCA GTG CCT CCT CTC AG AAG GGG TGA TTA GTG CTT TGT G
P6 PilBΔ	TCG GAG TCA ATG TAG TAC AGC
P1 SurGΔ	GCT CAC ATC CAC AAT GTC TAG
P3 SurGΔ	GGA TCC ACT AGT TCT AGA GCG TCT GAT GAG AGA CGA GTA GAC
P4 SurGΔ	CGA TAC CGT CGA CCT CGA GG TGC TGC TGT CGG CTA TAC AC
P6 SurGΔ	GAC TGC CAC ACC TCA CCT C
P2 PilAΔ	GCT GAA CCA GAA GAG GCT GC
P5 PilAΔ	GCA TCC ATG ATG TCA GCA TAC
P2 PilBΔ	TCA TCA CCA GGC AAG ATC ATC
P5 PilBΔ	CAT CGT TCC CAT GCT CAG AC
P2 SurGΔ	TCT TGT GCT GAG GGA ACT AAG
P5 SurGΔ	CGT CCT CAT CCG TGT CTG C
PilA F	CGG GAG CCT GTC CCT GTC GGA GCT GGT GCA GGC GCT G
PilA R	GCT CAT TCA GTG AGT GCT CG CTG AGA GGA GGC ACT GAT GC
PilA P1	GCA TCG TAC ATA CTC TAT GCG
PilA P2	CAC CAC TCT CCT CGA CCA AG
PilA P3	CAG CGC CTG CAC CAG CTC C GAC AGG GAC AGG CTC CCG
PilA P4	GCA TCA GTG CCT CCT CTC AG CGA GCA CTC ACT GAA TGA GC
PilA P5	GCA TCC ATG ATG TCA GCA TAC
PilA P6	ACC AAC CTA GTC GAC GTG AC
PilB F	AGC GAG TTG CAG TGC CCA TT GGA GCT GGT GCA GGC GCT G
PilB R	CAC AAA GCA CTA ATC ACC CCT T CTG AGA GGA GGC ACT GAT GC
PilB P1	GCA GAA GAA GGA GCT CTG TC
PilB P2	CGT GCT GAT GGC AGA AAT GG
PilB P3	CAG CGC CTG CAC CAG CTC C AAT GGG CAC TGC AAC TCG CT
PilB P4	GCA TCA GTG CCT CCT CTC AG AAG GGG TGA TTA GTG CTT TGT G
PilB P5	CAT CGT TCC CAT GCT CAG AC
PilB P6	TCG GAG TCA ATG TAG TAC AGC
SurG F	GCA ACA AGG AAA TCG CTC CCG GAG CTG GTGCAG GCG CTG GAG
SurG R	GTG TAT AGC CGA CAG CAG CAC TGA GAG GAG GCA CTG ATG CGT G
SurG P1	CTT CAT CGT TCA AGC TTC AGG
SurG P2	TCT ACT CGT CTC TCA TCA GAG
SurG P3	C TCC AGC GCC TGC ACC AGC TCC GGG AGC GAT TTC CTT GTT GC
SurG P4	CAC GCA TCA GTG CCT CCT CTC AG TGC TGC TGT CGG CTA TAC AC
SurG P5	TGT CGA GTT TCT GCC TCT CC
SurG P6	GAC TGC CAC ACC TCA CCT C

tion codon. All fragments were amplified from genomic DNA of a wild-type strain (*pabaA1*) using the P1-P3 (PilA, PilB, or SurG) and P1-P4 (PilA, PilB, or SurG) primer pairs. The whole fusion cassettes were amplified using the P2-P5 (PilA, PilB, or SurG) pair of primers and were used to transform *nkuA*Δ *pyrG89 riboB2* (*pilA*::*sgfp*, *pilB*::*sgfp*, *surG*::*sgfp*, and *pilB*::*mrfp*) or *nkuA*Δ *pyroA4* (*pilA*::*mrfp*) strains. Transformants were selected on MM with urea as the sole nitrogen source and without uracil/uridine. The in-locus replacement of *pilA*, *pilB*, and *surG* with *pilA*::*sgfp*, *pilB*::*sgfp*, *surG*::*sgfp*, or *pilA*::*mrfp* was confirmed by Southern blot analysis. Genomic DNA was restricted with EcoRV (*pilA*::*sgfp*, *pilA*::*mrfp*), NcoI (*pilB*::*sgfp*), or PstI (*surG*::*sgfp*) and hybridized with the *AfriboB*, *AfpyrG*, and *AfpyroA* sequence fragments, respectively. These fragments were amplified from plasmids p1439, p1548, and p1547 using the primer pairs Ribo F-Ribo R with "PilAΔ-Ribo F with PilAΔ-Ribo R," PyrG F-PyrG R with "PilBΔ-PyrG F with PilBΔ-PyrG R," and Pyro F-Pyro R with "SurGΔ-Pyro F with SurGΔ-Pyro R," respectively (Tables 2 and 3). All transformants checked by Southern blot analysis contained single-copy sequence integrations at the *pilA*, *pilB*, and *surG* loci; and their sequences did not show any differences from those of the wild-type controls under any of the conditions tested (see Results).

RNA manipulations. Total RNA extraction from *A. nidulans* was carried out using the TRIzol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. RNA was separated on glyoxal agarose gels, as described by Sambrook and Russell (39). The hybridization technique is described by Church and Gilbert (9). To monitor RNA loading, the radish 18S rRNA gene was used as the probe (11). This corresponds to the ~1.5-kb EcoRI-EcoRI fragment purified from plasmid pRG3. *pilA*, *pilB*, and *surG* mRNA steady-state levels were monitored by hybridization with probes corresponding to the purified ~1-kb PCR fragments obtained using as the template DNA from a wild-type (*pabaA1*) strain and the P1-P3 (PilA, PilB, and SurG, respectively) primer pairs.

Membrane protein extraction and Western blot analysis. Protein extracts were prepared as described by Kafasla et al. (21). In particular, mycelia grown for 16 h in MM containing 5 mM urea as the sole nitrogen source and supplemented with the appropriate auxotrophs and conidiospores (0 h of growth) were harvested, frozen, and ground in liquid nitrogen. All subsequent steps were carried out at 4°C. Conidia and mycelial powder was resuspended in 1.5 ml ice-cold extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma) and 0.2 mM phenylmethylsul-

fonyl fluoride (PMSF). A volume of ~200 μl sterile glass beads (diameter, 0.1 mm) in conidia extraction buffer was added, and the suspension was vortexed for about 2 min. After 10 min incubation on ice, unbroken cells and larger cell debris were removed by a short low-speed centrifugation (3,000 × *g* for 3 min). Trichloroacetic acid was added to a final volume of 5%, followed by 10 min incubation on ice. Total proteins were precipitated by a 5-min centrifugation at 13,000 × *g*, washed with 500 μl Tris base, and resuspended in extraction buffer. The sample protein concentration was measured by the method of Bradford (7a). Protein samples (20 μg) were fractionated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and electroblotted (Mini Protean Tetra cell; Bio-Rad) onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Macherey-Nagel) for immunodetection. The membrane was treated with 2% nonfat dry milk, and immunodetection was performed using a primary mouse anti-GFP monoclonal antibody (Roche) and a secondary goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody (Cell Signaling). Blots were developed by the chemiluminescent method using an enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Bioscience).

FM and LSCM. Ten milliliters of a suspension of 5×10^5 or 5×10^7 conidia/ml was inoculated onto sterile coverslips embedded into appropriate liquid culture media, incubated for 4 h or 16 h at 25°C, and observed by fluorescence microscopy (FM) and laser scanning confocal microscopy (CSLM), as described previously (45, 46). Two hundred microliters of a suspension of 5×10^7 conidia/ml was inoculated into sterile Eppendorf tubes and observed by FM and CSLM, as described previously (45, 46). To elicit AgtA-GFP endocytosis, ammonium L-(+)-tartrate was added to a final concentration of 10 mM at 30, 60, and 120 min before observation. Filipin was used at a concentration of 25 μg/ml at 37°C for 15 min before the observation. Samples were observed on an Axioplan Zeiss phase-contrast epifluorescent microscope with appropriate filters, and the resulting images were acquired with a Zeiss MRC5 digital camera using AxioVs40 (version 4.40.0) software. Images were then processed with Adobe Photoshop CS2 (version 9.0.2) software. Confocal scanning laser microscopy to examine PilA-sGFP, PilB-sGFP, SurG-sGFP, PilA-mRFP, PilB-mRFP, and HhoA-mRFP localization was carried out on an MRC 1024 confocal system (Laser Sharp, version 3.2 software [Bio-Rad]; zoom, ×2 to ×5; excitation, 488 nm/blue and 568 nm/yellow for sGFP and mRFP, respectively; samples at laser power 3 [PilA, SurG, and HhoA] and 30% [PilB]; Kalman filter; $n = 5$ to 6; 0.3-μm cut; iris, 7 to 8; krypton/argon laser; Nikon Diaphot 300 microscope with a ×60 [oil immersion] lens; emission filter, 522/DF35; lens reference, Plan Apo 60/1.40 oil immersion DM 160175, 60 DM/Ph4, 160/0.17 [Nikon, Japan]).

Bioinformatic tools and databases. The databases consulted were http://www.fgsc.net/, through which most fungal genomes are accessible. Specifically, *Aspergillus* sequences were obtained through http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html. The yeast databases consulted were http://www.genolevures.org/yeastgenomes.html, http://www.yeastgenome.org/, http://www.genedb.org/genedb/pombe/, and http://www.candidagenome.org/. The *Pneumocystis carinii* database is http://pgp.cchmc.org/. Phylogenetic trees were constructed online using the different programs contained in http://www.phylogeny.fr/. Muscle alignments were carried out with http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html. T-Coffee alignments were carried out at http://www.phylogeny.fr/. Alignments were carried out with the Boxshade program (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Transmembrane protein topologies were predicted with the HMMTOP (http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html), PRED-TMR (http://athina.biol.uoa.gr/PRED-TMR2/input.html), TopPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), and SPLIT4 (http://split.pmfst.hr/split/4/) programs. Coiled coils were predicted at http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils and http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_lupas.html.

RESULTS

Eisosomal core components in *Aspergillus*. A search of the available fungal databases reveals that homologues of Pil1 and Lsp1 are present in all the ascomycetes (properly, phylum Ascomycota). In the available genomes of all the Pezizomycotina, including the aspergilli, we found proteins belonging to two clades, which we call the PilA and the PilB clades. Very stringent conservation is seen within the PilA clade, while the proteins of the PilB clade show a higher rate of divergence. Proteins of the PilA clade show a central coiled-coil domain (residues 166 to 198 for PilA), similarly to Pil1 (52) and Lsp1, while all proteins of the PilB clade show the presence of an additional carboxy-terminal coiled-coil domain (residues 147 to 178 and 225 to 244 for PilB; data not shown). The PilA and PilB clades are represented in *A. nidulans* by the sequences with the designations ANID_05217.1 and ANID_03931.1, respectively. The duplication which generated PilA and PilB is possibly ancestral to the Pezizomycotina, as orthologues of ANID_05217.1 (73% identity) and ANID_03931.1 (56% identity) are present in *Tuber melanosporum* (R. Percudani, personal communication), a member of the Pezizales, which is a basal branch of the Pezizomycotina (42). The PilA clade clusters with the Pil1-like and Lsp1-like proteins of the subphylum Saccharomycotina, with the latter arising from an independent duplication event at the root of the Saccharomycotina. For clarity, the results for proteins from only two genomes (*S. cerevisiae* and *Kluveromyces lactis*) of the latter subphylum, together with the results for proteins from some representative genomes of the Pezizomycotina, are shown in Fig. 1. A third duplication independent of those of the Saccharomycotina and Pezizomycotina is present in all the available genomes of the genus *Schizosaccharomyces*, represented in Fig. 1 by *S. pombe.* Two close homologues showing 64% to 42% identities with the two *S. pombe* proteins, respectively, are also present in *Pneumocystis carinii*, another member of the Taphrinomycotina (data not shown). The homologues present in the Taphrinomycotina are quite divergent from Pil1/PilA, but their position in the tree is consistent with the proposal that the ancestral Pil protein could have been Pil1/PilA-like. This topology, indicating the occurrence of three independent duplications, one for each subphylum, is maintained when all available genomes are included in trees constructed with a variety of algorithms (32; our unpublished data; A. Olivera-Couto and P. Aguilar, personal communication). The Meu14 protein of *S. pombe*, necessary for the second division of meiosis and the accurate formation of the forespore membrane (30), is clearly related to Pil1/Pil1A/Lsp1 (22% identity with both Pil1 and PilA, 24% identity with PilB) (31). When it is included in trees similar to that shown in Fig. 1, it appears as an outgroup to both the Pil1/Lsp1/PilA clade (including the *S. pombe* putative eisosomal proteins) and the PilB clade (data not shown) (32).

The Sur7 transmembrane protein has been characterized as a component of eisosomes in both *S. cerevisiae* and *C. albicans* (see Introduction). Three putative members of the Sur7 family of proteins are present in *A. nidulans*, ANID_04615.1, ANID_01331.1, and ANID_05213.1. These proteins represent each of the three clades of Sur7-like proteins present in the aspergilli (see Fig. S1 in the supplemental material). ANID_04615.1 (to be called SurG, whose cognate gene is *surG*) is clearly the orthologue Sur7 protein of *S. cerevisiae* and *C. albicans* (showing 21% and 27% identities, respectively). The positions of the four transmembrane domains, typical of Sur7, are conserved in the three homologues, together with the sequence showing similarities with the Claudin-like domain (3).

The subcellular localization of eisosomal proteins is developmentally regulated. To determine the subcellular localization of PilA, PilB, and SurG, we used strains carrying the *pilA-gfp* and *pilA-mrfp*, *pilB-gfp*, and *surG-gfp* alleles replacing the corresponding resident genes, respectively. The GFP fusion strains behave like the wild type in relation to growth on complete medium in the presence or absence of itraconazole

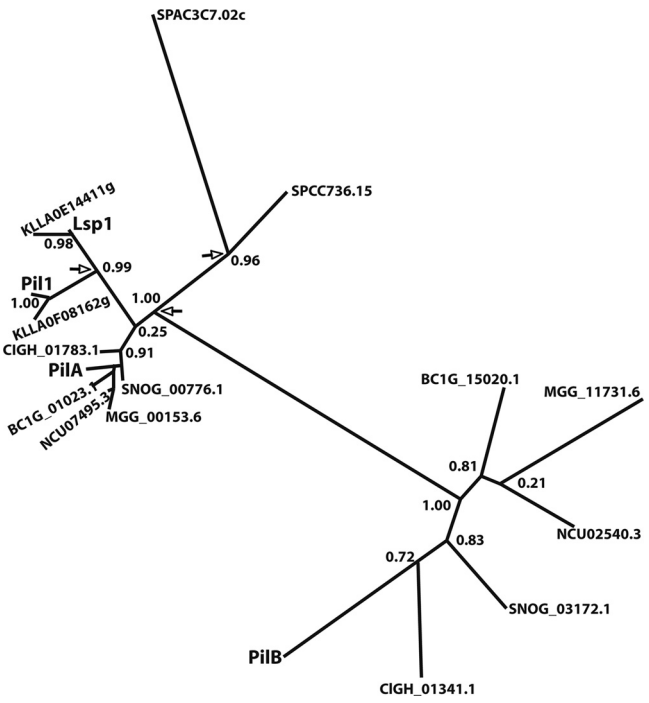


FIG. 1. Eisosomal proteins in the subphylum Pezizomycotina. Phylogenetic unrooted tree, including the Pil1 (YGR086C) and Lsp1 (YPL004C) proteins of *S. cerevisiae*; the two putative eisosomal proteins of the second member of the Saccharomycotina, *Kluvermyces lactis* (KLLA); a member of the Taphrinomycotina, *S. pombe* (SPAC3C7.02c, SPCC736.15); and the PilA and PilB homologues (see text) of a number of representative fungi of the Pezizomycotina. The proteins of *A. nidulans* (Euriotiomycetes) referred to are PilA (ANID_05217.1) and PilB (ANID_03931.1) Other species referred to are *Botritis cynerea* (BC) (Leotiomycetes), *Coccidioides immitis* (CIGH; Euriotiomycetes), *Magnaporthe grisae* (MGG), *Neurospora crassa* (NCU; Sordariomycetes), and *Stegonospora nodorum* (SNOG; Dothideomycetes), followed by their systematic numbers in the relevant databases. Alignments were carried out with T-Coffee, curated with the Phylogeny site internal curation program (see Materials and Methods), and the tree was obtained with the maximum-likelihood program alLRT-PhyML (4a; http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/alacarte.cgi) and redrawn after a Drawtree image. The digits at the nodes represent the results of the approximate likelihood ratio test and are nonparametric branch support values (http://atgc.lirmm.fr/alrt/). The PilA clade is clustered with all the homologues of the Saccharomycotina (approximate likelihood ratio test value = 1), but note the weak support (approximate likelihood ratio test value = 0.25) of the node where the PilA clade branches out from the homologues in the Saccharomycotina; in trees (data not shown) where many more species of Saccharomycotina and Pezizomycotina are included, the topology is maintained and the approximate likelihood ratio test value increases to >0. 80. For reasons of space, we do not show the branch support approximate likelihood ratio test values within the PilA clade; all nodes with the exception of the node where PilA branches out have strong support (approximate likelihood ratio test value > 0.80); the node where PilA branches out has an approximate likelihood ratio test value of 0.43. While we show only representative species in this tree, the topology of a tight cluster of PilA homologues and a looser cluster of PilB homologues is maintained in a tree that was constructed with the same or other algorithms and that includes at least one species of every genus of the Pezizomycotina for which there is an available sequence. Arrows show the nodes corresponding to the three independent duplications that gave origin to the PilA and PilB clades of the Pezizomycotina, the Pil1 and Lsp1 clades of the Saccharomycotina, and the two clades of the Taphrinomycotina.

(see below). It was also checked that the temporal pattern of expression of the mRNAs corresponding to each of the *gfp* fusion proteins is identical to that seen for the wild-type genes (data not shown; see below).

Epifluorescence microscopy of ungerminated conidia (Fig. 2) showed PilA-GFP, PilB-GFP, and SurG-GFP localized as patches in the periphery of the spores. SurG-GFP is additionally localized perinuclearly. The perinuclear location of SurG is more clearly shown by confocal microscopy in a strain carrying both SurG-GFP and the H1 histone gene fused to mRFP, suggesting localization of SurG to the endoplasmic reticulum, similar to that shown by the endoplasmic reticulum chaperone ShrA (Fig. 2B) (13). Polar and equatorial sections of confocal microscopic images of ungerminated conidia showed that the PilA-GFP patches are not as clearly separated in *A. nidulans* as they are in *S. cerevisiae* (see Fig. S2 in the supplemental material).

No change in the localization of PilA or PilB is seen during the period of isotropic growth. The same stands for the peripheral localization of SurG; nevertheless, the perinuclear ring disappears before the emergence of the germination tube (this is better seen in Fig. 9 [see below]). All three proteins are restricted to the periphery of the conidial head opposite the emergent germ tube, while they have different destinations in young and older mycelia. PilA is present in discrete patches in young mycelia (16 h; Fig. 2) but also older and branching mycelia (20 and 24 h; data not shown). PilA spots in hyphae are not uniform in size and are not restricted to the periphery as they are in conidiospores. This is shown in Fig. 3, where the brightest PilA spots are localized at the periphery of the hyphae, while smaller ones are present both at the interior of the hyphae and at its periphery. Furthermore, double labeling of PrnB (the major proline transporter) (41, 45) and PilA indicates that hyphal membrane-bound PilA punctate structures (which we can equate to eisosomes) are localized to the internal face of the membrane (Fig. 3E). In hyphae, PilB-GFP is seen as very low intensity, diffused fluorescence in the cytoplasm (Fig. 3A), the settings of the microscope being such that the difference in fluorescence between the ungerminated conidia and the germlings is faithfully reflected. This suggests that the protein is downregulated after germination. PilB-GFP is excluded from the nuclei, as shown in a strain carrying both PilB-GFP and the gene encoding the H1 histone fused to mRFP (Fig. 3B). Finally, in hyphae SurG-GFP is confined to the vacuole and endosomes (Fig. 3A, black arrows) (some residual signal can be seen in the membrane of the conidial head), and this is confirmed by CMAC staining (data not shown).

Expression of *pilA*, *pilB*, and *surG* genes. The accumulation of the three eisosomal proteins in conidia led us to investigate whether this is correlated with transcription of the cognate genes, from resting conidia through young mycelia. The results presented in Fig. 4A show that both *pilA* and *surG* mRNAs accumulate more in resting conidia that at any other time point of germination tested. At variance with this, *pilB* mRNA is abundant in resting conidia and is not detectable within the sensitivity of the Northern blot at 4 h, 8 h, 12 h, and 16 h after the onset of germination. The transcription of the *pilB* homologue of *A. fumigatus*, Afu6g08320, is also clearly detected in

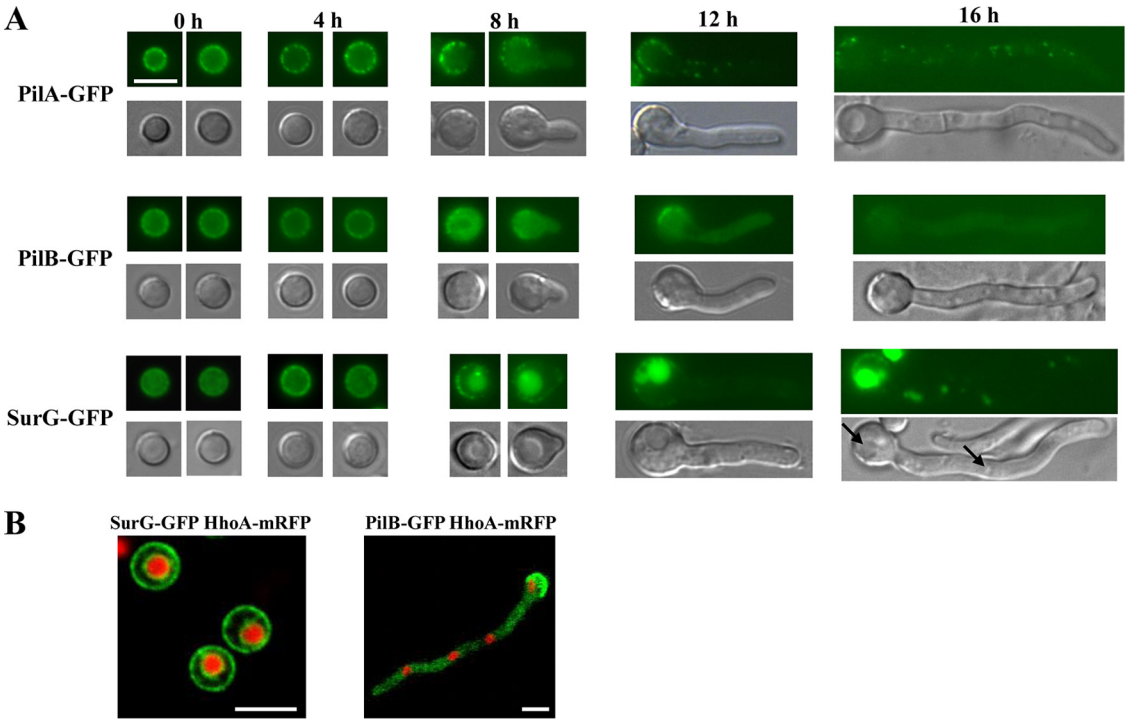


FIG. 2. Subcellular localization of PilA, PilB, and SurG proteins at various asexual developmental stages of the *A. nidulans* life cycle. (A) Representative pictures from epifluorescence microscopy of strains expressing chimeric PilA-GFP, PilB-GFP, and SurG-GFP molecules in ungerminated (0 h), swollen (4 h), and germinated (8 h) conidia and young mycelia (12 h, 16 h). Strains were grown in the presence of 5 mM urea and 1% (wt/vol) glucose as the sole nitrogen and carbon sources, respectively, at 25°C. GFP fluorescence is shown in the upper panels of each row, while Nomarski pictures of the same samples are shown in the lower panels. Black arrows indicate the central vacuole and endosomes. Bar, 5 μm. (B) Representative pictures from laser scanning confocal microscopy of strains expressing both SurG-GFP and HhoA-mRFP (histone1-RFP) molecules in ungerminated wild-type conidia (left panel) and both PilB-GFP and HhoA-mRFP molecules in young mycelia (16 h) (right panel). The strains were grown as described for panel A. Bars, 5 μm.

dormant conidia and is barely detectable at the onset of germination (22).

The fluorescence signal (Fig. 2) seen in germlings and mycelia for PilB (cytosolic) and SurG (vacuolar) could be due either to the presence of the intact fusion proteins, to degradation products conserving the proteins' C termini, or simply to degradation-resistant GFP accumulating in the cytosol and vacuoles, respectively. Western blots (Fig. 4B) carried out with protein extracts of ungerminated conidia (0 h) or young mycelia (16 h) grown under the same conditions used to investigate intracellular localization show that bands corresponding to full-length PilA-GFP and PilB-GFP are present in both conidia and mycelia, while bands corresponding to full-length SurG-GFP are present in conidia and are faintly observed in mycelia. Molecular masses are indicated in kDa. The slower-migrating bands of PilA-GFP and PilB-GFP have approximate apparent molecular masses of 70 kDa and 80 kDa, respectively (calculated molecular masses, 67 kDa and 71.5 kDa, respectively). The PilA and PilB bands running just below them have apparent molecular masses of 62 and 72 kDa, respectively. We cannot conclude from these data if N-terminal proteolysis and/or other posttranslational modifications are responsible for the presence of these additional electrophoretic species, together with those seen between 48 and 27 kDa of the protein marker. The apparent molecular mass of SurG-GFP is about 48 kDa (calculated molecular mass, 54 kDa), a difference which is not surprising for a protein comprising a highly hydrophobic moiety. A band with an apparent molecular mass of 27 kDa corresponding to free GFP is seen only in strains carrying the SurG-GFP fusion. This, together with the down-regulation of the full-length SurG-GFP observed after 16 h of growth, demonstrates that the vacuolar fluorescence detected in the mycelia of SurG-GFP strains (Fig. 2A) mostly derives from free GFP and degradation intermediates.

Eisosomal proteins assemble during conidiogenesis. The presence and colocalization (see below) of the three eisosomal proteins in ungerminated conidia led us to investigate their appearance during conidial development. Figure 5 shows that during conidiogenesis the three proteins are present in late, mature conidia (Fig. 5B and 5C for PilA-GFP, Fig. 5G for PilB-GFP, and Fig. 5H for SurG-GFP). PilA spots can be detected in the stalk of the conidiophore, the vesicle, metulae, and phialides (Fig. 5A). Differently from PilB and SurG, which are seen only in mature, older conidia on the conidiophore, the appearance of PilA in conidia budding from the phialides is quite variable from one conidiophore to the other and even within the same conidiophore. Figure 5D and F shows two extremes in which none and almost all of the emerging conidia express PilA-GFP, respectively, while the micrograph in Fig. 5E shows an intermediate situation, with only some of the budding conidia expressing PilA-GFP. Control strains which did not include any GFP fusion protein do not show any con-

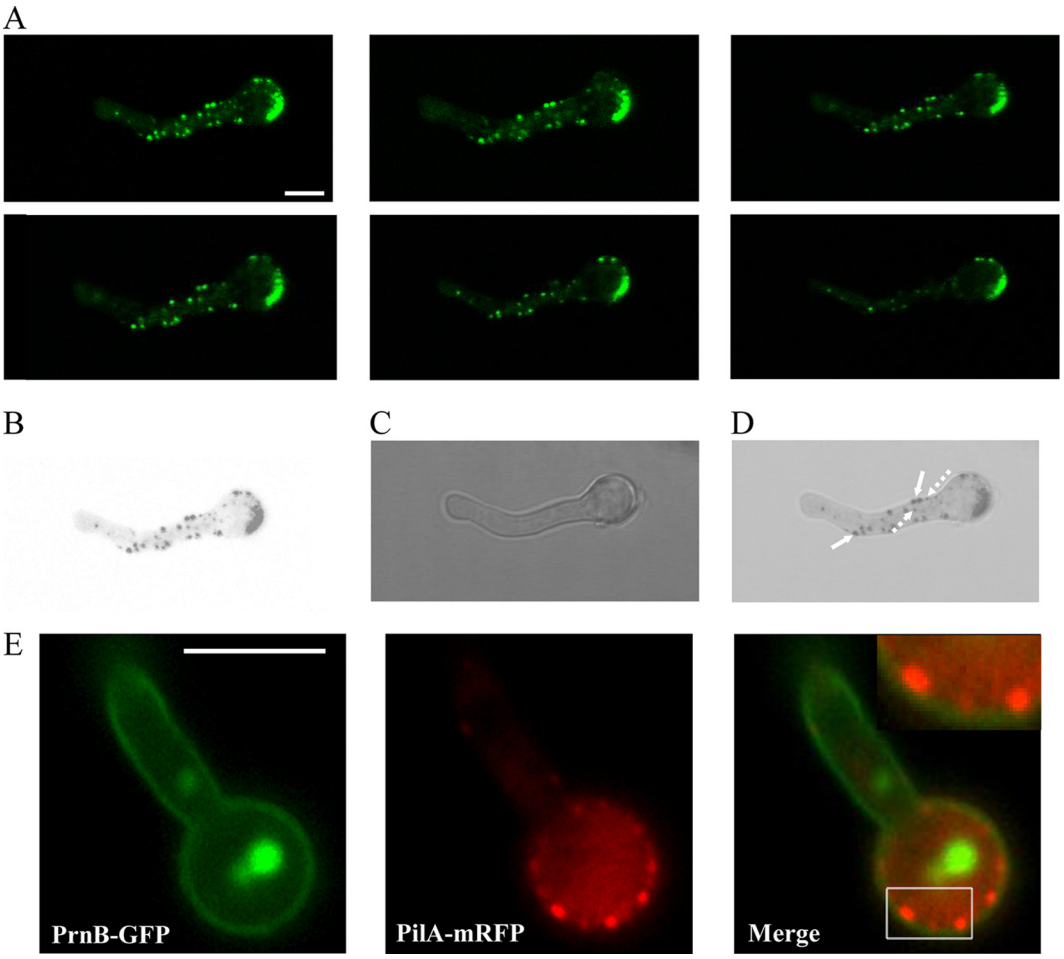


FIG. 3. (A) Confocal *z*-stack sections showing PilA-GFP in a wild-type strain. The strain was grown in the presence of 5 mM urea and 1% (wt/vol) glucose as the sole nitrogen and carbon sources, respectively, for 16 h at 25°C. (B to D) Inverted black and white fluorescence of the first *z*-stack section merged to the corresponding DIC. Bar, 5 μm (A to D). Note that PilA spots are not uniform in size and are not restricted at the periphery of mycelia. The largest PilA eisosomes (filled arrows in panel D) are localized at the periphery, while the smaller ones are at both the interior and the periphery (dashed arrows). (E) Subcellular localization of PilA and PrnB proteins in mycelia. Representative pictures from laser scanning confocal microscopy of strains expressing both PilA-mGFP and PrnB-GFP molecules in young mycelia (12 h) are shown. The upper right inset in the Merge panel shows a magnification of the boxed region. Strains were grown in the presence of 5 mM urea and 1% (wt/vol) glucose as the sole nitrogen and carbon sources, respectively, at 25°C. To induce *prnB* gene expression, 20 mM L-proline was added during the last 2 h of growth (45). Bar, 5 μm.

idiophore or conidiospore fluorescence under the same observation conditions (data not shown).

Colocalization of PilA, PilB, and SurG in quiescent conidia. PilA, PilB, and SurG are localized at the periphery of resting conidia. We thus investigated their colocalization. To this aim we constructed strains carrying PilA-mRFP and PilB-GFP or SurG-GFP. Figure 6 shows colocalization of PilA with PilB and colocalization of PilA with SurG in the periphery of the conidia; there is obviously no colocalization of PilA with the perinuclear fraction of SurG. The PilB fluorescence intensity more consistently follows the peaks of PilA fluorescence than those of SurG. It can be seen from both Fig. 2 and Fig. 6 that the localization pattern of SurG is less discontinuous and punctate than that of PilA and PilB.

Phenotypic characterization of mutants with deletions. (i) Growth phenotypes. We have constructed strains with *pilA*, *pilB*, and *surG* deletions (see Materials and Methods). A strain with both *pilA* and *pilB* deletions was also constructed. No growth phenotype at 25°C, 37°C, and 42°C was seen for any of the strains with deletions on either complete or minimal medium supplemented with urea, ammonium, or nitrate as the sole nitrogen source (data not shown). Moreover, conidia from strains with a *pilA*, *pilB*, or *surG* deletion exhibited swelling and polarity establishment (time of germination tube appearance) indistinguishable from that of a wild-type strain at 25°C, 37°C, and 42°C. This was seen after incubation of conidia in minimal medium supplemented with urea as the sole nitrogen source for 2 h, 4 h, and 6 h under the conditions described above and observation of differential interference contrast (DIC) images using a phase-contrast fluorescent microscope (data not shown). As eisosomal proteins are localized in quiescent conidia, we investigated whether they are important for conidial survival. The conidial survival for strains with a *pilA*, *pilB*, or *surG* deletion was not significantly different from that for the

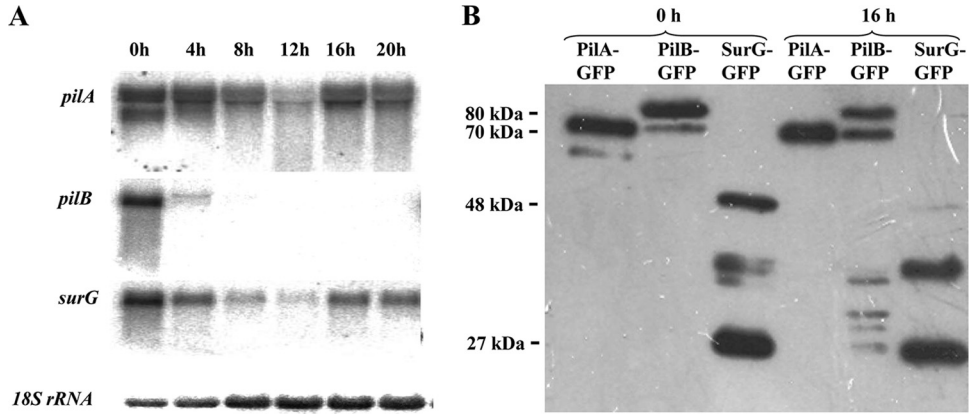


FIG. 4. (A) Expression of the *pilA*, *pilB*, and *surG* genes in a wild-type strain. *pilA*, *pilB*, and *surG* transcript levels in ungerminated (0 h), swollen (4 h), and germinated (8 h) conidia and in young (12 h, 16 h) and older (20 h) mycelia are shown. Strains were grown in the presence of 5 mM urea and 1% (wt/vol) glucose as sole nitrogen and carbon sources, respectively, at 25°C. Steady-state 18S rRNA levels were used to monitor the amount of RNA loading in each lane. (B) Western blot analysis of the PilA, PilB, and SurG tagged proteins. Approximately 20 μg of total protein fractions of conidia (0 h) and young mycelia (16 h) derived from strains expressing PilA, PilB, or SurG tagged with GFP proteins was fractionated on a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a PVDF membrane, and probed with a primary mouse anti-GFP monoclonal antibody and a secondary goat anti-mouse IgG HRP-linked antibody. Protein markers are indicated in kDa on the left. Equal loading was checked by Coomassie blue staining.

wild-type conidia after incubation of freshly harvested conidia for 4 h at 4°C (<100%), 25°C (<60 to 70%), and 45°C (<60 to 75%). Strains with deletions were checked for sensitivity to caffeine, ethanol, SDS, Congo red, $CaCl_2$, and the antifungal drugs caspofungin and itraconazole. Figure 7 shows that *pilA*Δ mutants, *pilA*Δ *pilB*Δ double mutants, and *surG*Δ mutants but not *pilB*Δ strains show moderate resistance to 15 μM itraconazole. The itraconazole resistance phenotype cosegregates in crosses with the genetic markers *riboB* and *pyroA*, used to interrupt the *pilA* and *surG* genes, respectively (see Materials and Methods; data not shown). No other phenotype of resistance or hypersensitivity was observed.

(ii) Cell localization patterns and processes. PilA (but not PilB or SurG) is present in punctate structures in mycelia. The presence of ammonium results in endocytosis in the germlings and mycelia of a number of transporters involved in the utilization of nitrogen sources (5, 35, 49). We have investigated whether the ammonium-elicited endocytosis of the dicarboxylic amino acid transporter AgtA (5) was affected in a strain with the *pilA* deletion. The expression of AgtA is identical in *pilA*$^+$ and *pilA*Δ strains (data not shown). The endocytosis of AgtA-GFP, checked at time intervals of 30, 60, and 120 min after addition of ammonium, is identical in *pilA*$^+$ and *pilA*Δ strains, within the limits of the confocal microscopic observation, being completed at 120 min in both strains (results not shown). Similarly, the rate of endocytosis of the lipophilic fluorochrome FM4-64 is no different between a *pilA*$^+$ strain and a *pilA*Δ strain, within the limits of the epifluorescence microscopic observation (data not shown). Moreover, deletion of PilA does decrease either the uptake of FM4-64 or its early internalization pattern. As reported by Peñalva (36), the earliest FM4-64 internalization intermediates are cortical punctate structures. Figure 8 shows that these structures do not usually colocalize with PilA in germlings. Such colocalization that could be seen may well be coincidental. Thus, PilA foci are not obligatory endocytic portals for this lipid marker, as has been proposed for eisosomes in *S. cerevisiae* (52).

We have checked if any of the strains with a deletion is affected by the distribution of filipin, a polyene antibiotic which selectively stains ergosterol and which can be detected by its blue fluorescence under UV light. No changes in filipin binding were seen in young mycelia of strains with the *pilA* and *surG* deletions (data not shown). In these strains, the strong filipin staining at the tip of the hyphae is not altered. However, preliminary results strongly suggest that the distribution of filipin staining is affected in ungerminated conidia by the deletion of either *pilA* or *surG* but not by the deletion of *pilB* (not shown).

(iii) Effects on eisosome assembly. We have checked the distribution of SurG-GFP and PilB-GFP in strains with the *pilA* deletion and PilA-GFP and PilB-GFP in strains with the *surG* deletion. Figure 9A shows that in *pilA*Δ ungerminated conidia (0 h), PilB-GFP patches become larger and more distinctly separated from each other. After 5 h of isotropic growth, PilB is distributed in the cytoplasm as it is in the wild type, with fewer patches persisting at the conidial periphery. In a *pilA*Δ background, ungerminated conidia (0 h) show a significant decrease of SurG-GFP peripheral patches, while the inner perinuclear ring remains intact, indicating that PilA is required for proper localization of SurG at the conidial periphery. In the absence of SurG (Fig. 9B), the peripheral targeting and distribution of PilB-GFP are drastically affected, with the protein being localized to a few bright clusters at the periphery of ungerminated conidia, which project into the cytoplasm, and to a diffuse cytoplasmic pool, which becomes more evident after 5 h of isotropic growth. At this time point, PilB-GFP clusters not only are peripheral but also appear in the cytoplasm. On the other hand, deletion of SurG does not affect the localization of PilA-mRFP.

DISCUSSION

Our own data (see the data in the supplemental material) and those of others (32; A. Olivera-Couto and P. Aguilar,

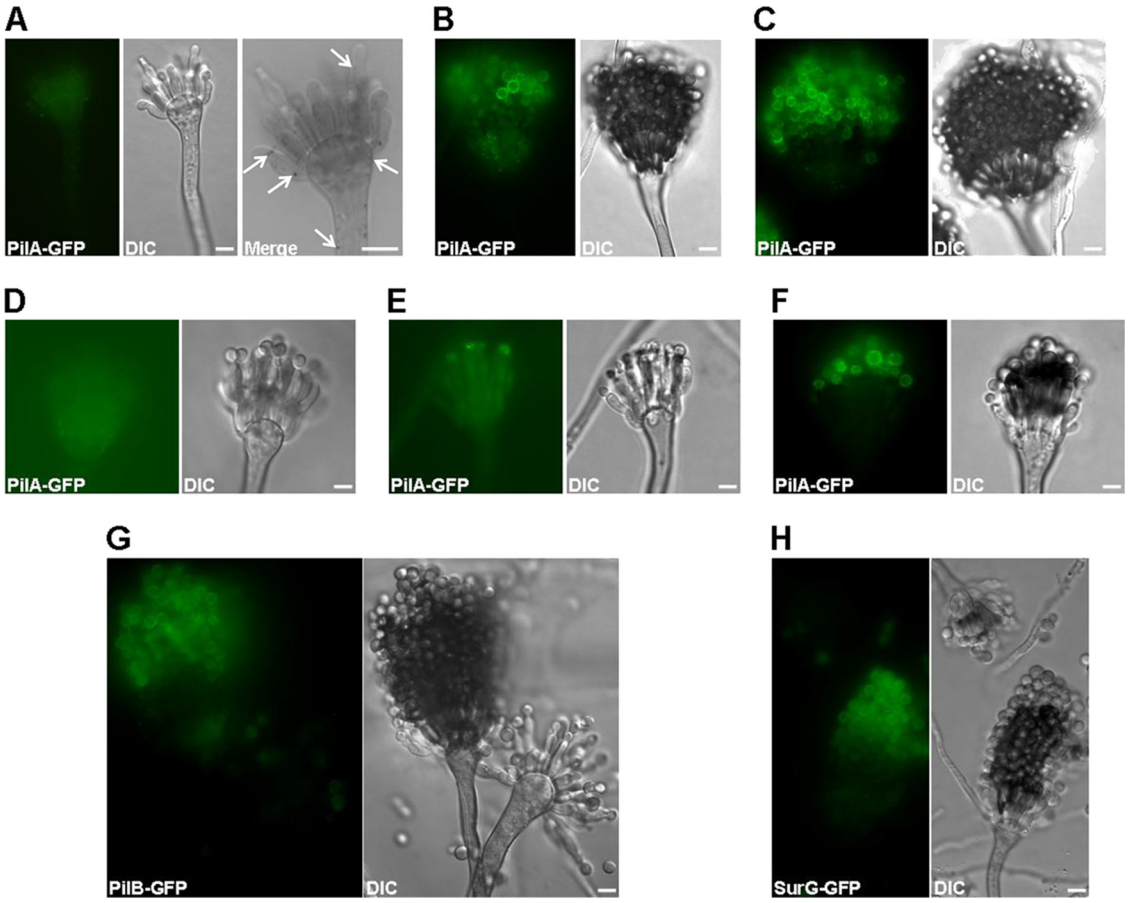


FIG. 5. Localization of PilA, PilB, and SurG proteins during conidial development. Representative wide-field fluorescence and DIC pictures of wild-type conidiophores expressing chimeric PilA-GFP (A to F), PilB-GFP (G), and SurG-GFP (H) proteins are shown. The Merge section of panel A shows in inverted black and white an enlarged portion of the same conidial head shown in the PilA-GFP and DIC panels in order to highlight the PilA-GFP spots present in metulae and a budding phialide. Expression of PilB-GFP (G) and SurG-GFP (H) during conidial development is also presented. Young PilA-GFP-expressing conidiophores are shown in panels A and D to F, and mature PilA-GFP-expressing conidiophores are shown in panels B and C. All strains were inoculated on microscope slides covered with MM containing 2% glycerol and 0.8% agarose and grown at 37°C for 2 days. Bars, 5 μm.

unpublished data) establish the universal presence of homologues of Pil1 and Lsp1 in the ascomycetes. The sequence divergence between the PilA and PilB clades of the Pezizomycotina, including differences in the conservation of putative phosphorylation sites (data not shown), and the presence of a second coiled-coil domain in PilB are associated with a different fate in the course of development in *A. nidulans*. While Pil1 and Lsp1 are integral components of eisosomes in all stages of the *S. cerevisiae* cell cycle, in *A. nidulans*, PilB shows colocalization with PilA only in conidia. The eisosomes of the *A. nidulans* conidiospore can be considered equivalent to those of *S. cerevisiae*, as they contain both Pil paralogues and SurG, the orthologue of Sur7 (see below). However, there are some intriguing differences between the *S. cerevisiae* cellular eisosomes and those of the conidiospores of *A. nidulans*. In *S. cerevisiae* there is about 1 eisosome/3 μm^2 of surface area, and they are well separated from each other at a distance of >0.5 μm (28). In the *A. nidulans* conidiospore, eisosomes are more tightly packed and seem to touch each other; thus, they cannot be easily counted (see Fig. S2 in the supplemental material). The peripheral localization of SurG does not match exactly the localization of PilA in conidia but shows a more continuous distribution (Fig. 6). The perinuclear ring of SurG has not been reported for either *S. cerevisiae* or *C. albicans*.

In *S. cerevisiae*, Pil1 but not Lsp1 is essential for proper eisosome assembly (28, 53). In contrast to *S. cerevisiae*, in *A. nidulans* the absence of PilA does not markedly affect the localization of its paralogue, PilB, in conidia. In the absence of PilA, PilB patches are still uniformly distributed at the conidial periphery, but they are larger and more widely spaced than in the wild type. In *S. cerevisiae*, Sur7 and Lsp1 are similarly affected by a *pil1* deletion. In *A. nidulans*, the distribution of SurG in a *pilA*Δ background (see Fig. 9 and Results section) is drastically altered, but the scanty SurG patches are very different from the large peripheral Sur7 clusters seen in *pil1* strains. A deletion of *SUR7* in *S. cerevisiae* has no effect on the localization of Pil1 and Lsp1. This also applies to strains with additional deletions from the two paralogues, which cluster with Sur7 in the phylogenetic tree (see Fig. S1 in the supplemental material). Similar results were obtained for the deletion of Sur7 in *C. albicans* (3). The situation is quite different in *A. nidulans*. While the distribution of PilA is not affected in

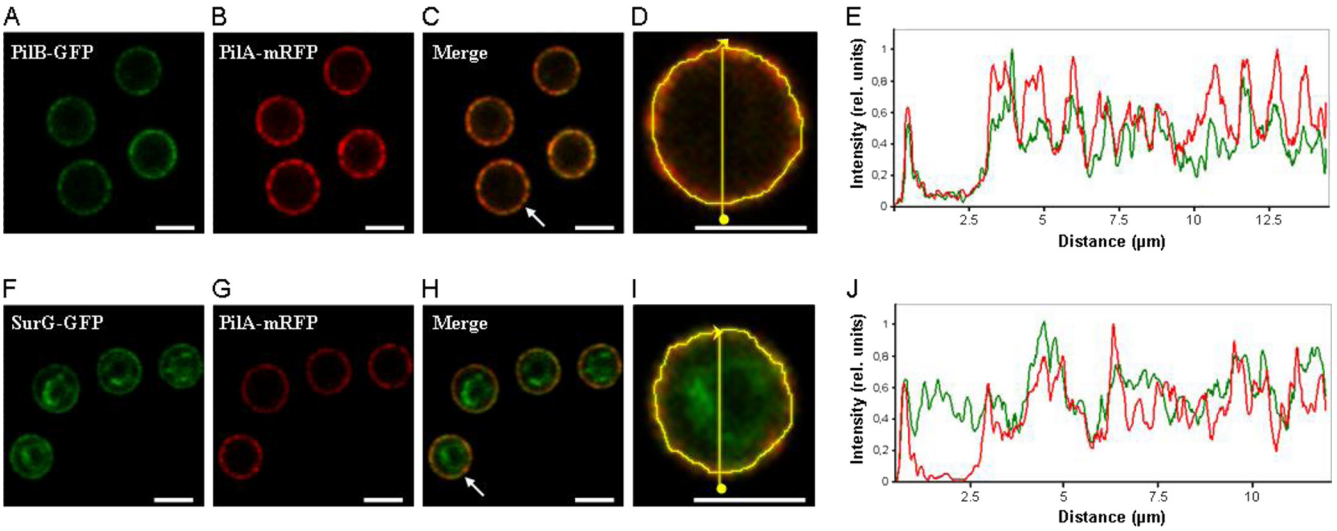


FIG. 6. Colocalization of PilB with PilA and SurG with PilA in resting conidiospores. Representative confocal fluorescence micrographs (A to C and F to H) and fluorescence intensity profiles of PilA (red curves in panels E and J), PilB (green curve in panel E), and SurG (green curve in panel J) are shown. The fluorescence intensity, plotted along the yellow line in panel D (a magnification of panel C) and panel I (a magnification of panel H) that runs through both the inside and the periphery of the arrowed cell in panels C and H, respectively, was calculated using ImageJ software and normalized to the maximum value. Bars, 5 μm.

*surG*Δ strains, that of PilB is drastically affected. The distribution of PilB in *surG*Δ strains is partly reminiscent, in quiescent conidia, of the distribution of Lsp1 in *pil1*Δ strains. That SurG is necessary for PilB localization is also consistent with the localization of PilB to the cytoplasm of wild-type hyphae, where SurG is sequestered in the vacuole and endosomes and, consequently, may not be available to interact with PilB. Thus, the strong similarity of eisosomal components in *S. cerevisiae* cells and *A. nidulans* conidiospores is not correlated with the identical interactions leading to their assembly.

Eisosomes have been defined as portals of endocytosis (52). However, the data presented in this article imply that if they play a role in endocytosis in *A. nidulans*, this role is minor or limited to specific cargos, which remain unidentified. Neither the endocytosis of FM4-64 nor the ammonium-elicited endocytosis of the AgtA (dicarboxylic amino acid transporter [5]; data not shown) or PrnB (the major proline transporter [41]; data not shown) are visibly affected in mycelia by a deletion of *pilA*, encoding the only eisosomal protein present in discrete foci in hyphae. It should be noted that although the AgtA and PrnB proteins of *A. nidulans* and the Hxt2 protein of *S. cerevisiae* are transporters with a homogeneous distribution in the plasma membrane, upon endocytosis Hxt2 accumulates in discrete plasma membrane-associated foci (52), while the two *A. nidulans* proteins do not (5).

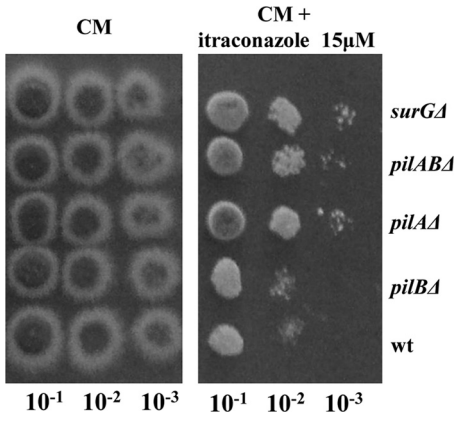


FIG. 7. Itraconazole resistance of *pilA*Δ, *pilAB*Δ, and *surG*Δ strains. Cotton-filtered *pilA*Δ, *pilB*Δ, *pilAB*Δ, *surG*Δ, and wild-type conidiospore suspensions were prepared in PBS; counted using a Neubauer counting chamber and found to have a concentration of $\sim 10^6$ conidia/ml; and then plated (5 μl) as 10^{-1}, 10^{-2}, and 10^{-3} serial dilutions on CM in the absence or the presence of 15 μM itraconazole. The plates were incubated at 37°C for 3 days.

Endocytosis in *A. nidulans* has been investigated in mycelia (36), where it is involved in the cycling of transporters (5, 16, 35, 49) and in sensing the external pH (19, 38, 50), but has not been investigated in the process of conidial germination; and the possibility remains open that the yeast-like eisosomes of conidiospores have a role in early, germination-related endocytosis events. The endocytic pathway is nearly essential in *A. nidulans*. Deletion of components of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRT-III; Vps24 [38] and Vps20, Vps32, and Vsp36 [A. M. Calcagno-Pizzarelli and H. N. Arst, personal communication) results in a drastic impairment of growth. This contrasts with the absence of any obvious growth phenotype in *surG*Δ, *pilA*Δ, and *pilB*Δ strains. A possible explanation for this apparent paradox is that, as proposed for *S. cerevisiae*, endocytosis could proceed by two independent pathways, one of which would not involve eisosomes (18).

A vexing result, common to *S. cerevisiae* and *A. nidulans*, is the absence of any drastic phenotype in deletion mutants of the eisosomal soluble proteins (Pil1/Lsp1/PilA/PilB) or membrane proteins (Sur7/SurG). We did not observe any growth phenotype in any media or at any temperature tested for strains with *pilA*, *pilB*, *pilA pilB*, or *surG* deletions. Nevertheless it was

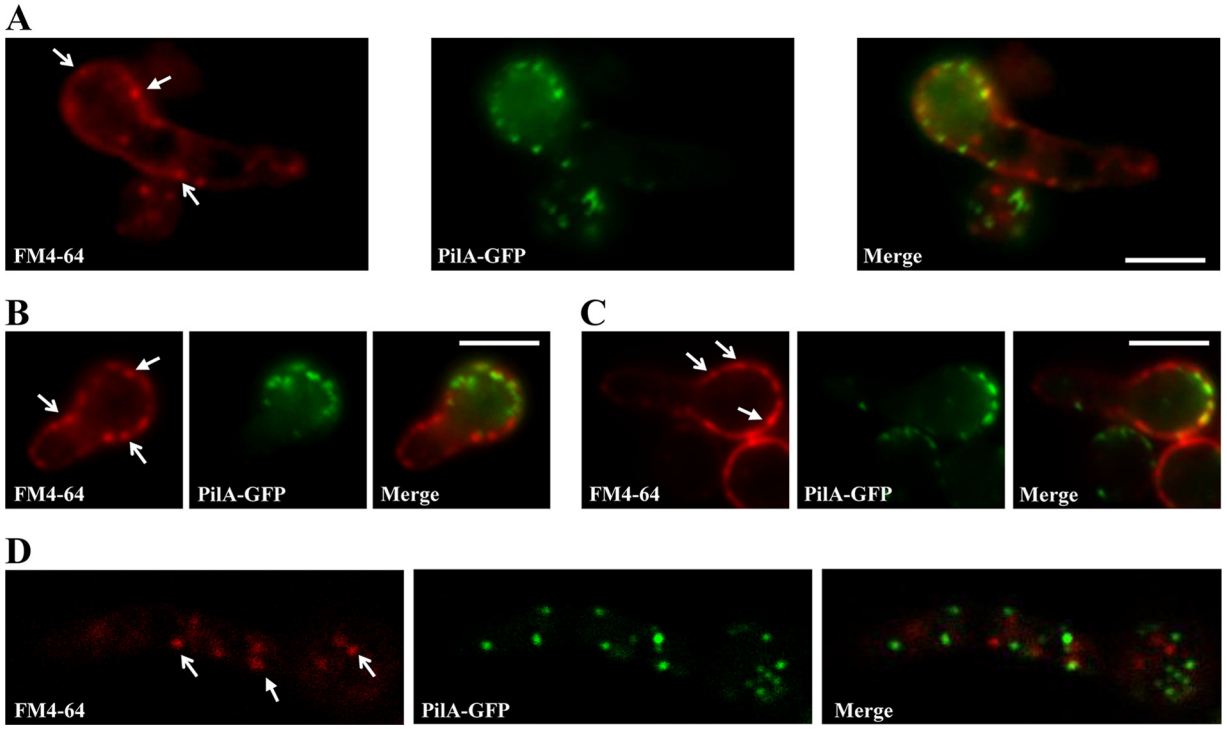


FIG. 8. Representative epifluorescence (A to C) and confocal (D) images of a PilA-GFP strain labeled with FM4-64. Samples were taken after the dye was loaded and the samples were placed on ice for 5 min (A). Note the cortical punctate structures indicated by arrows: forked headed arrows indicate FM4-64 internalization sites free of PilA, while triangular headed arrows indicate FM4-64 internalization sites colocalizing with PilA.

reported at a recent meeting that a deletion of ANID_04615.1 (*surG*) results in growth impairment on minimal medium with nitrate as the nitrogen source at 37°C and 42°C, an impairment that is seen only on complete medium at 42°C (8a; D. Chung and B. Shaw, personal communication). We did not observe this phenotype on minimal medium using a variety of nitrogen sources, including nitrate, or on complete medium at any temperature. The phenotype did not appear after outcrossing our strain with the deletion, which eliminates the possibility that our strain could carry a suppressor of the growth phenotype. We do not know the reason for this difference, which merits investigation. However, a growth phenotype was observed for strains with the *surG* deletion and the *pilA* deletion. This is the mild but clear resistance to itraconazole which cosegregates in crosses with each deletion. This is surprising, as deletions of *SUR7* in *Candida albicans* result in marked hypersensitivity to fluconazole (3), another triazole antifungal agent to which *Aspergillus* species are tolerant (33). This resistance probably operates at the level of conidial survival or germination, and it may be in some way related to the mislocalization of filipin staining in conidia but not in mycelia both in strains with the *surG* deletion and in strains with the *pilA* deletion. Triazole drugs act by inhibiting the cytochrome P450-dependent conversion of lanosterol to ergosterol. Filipin is a polyene macrolide antifungal agent that selectively binds and stains ergosterol at the plasma membrane.

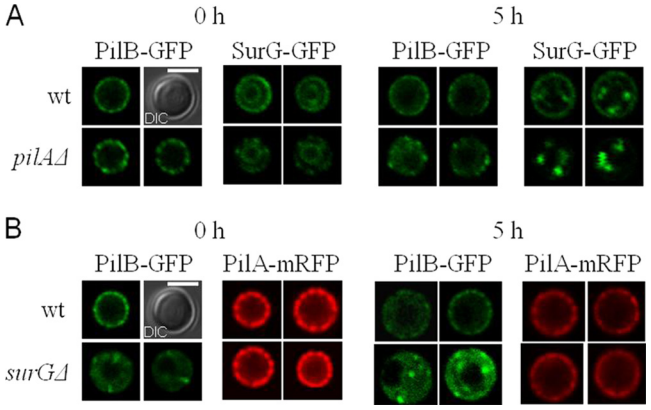


FIG. 9. Subcellular localization of PilB-GFP and SurG-GFP proteins expressed in conidia of a *pilA*Δ strain and of PilA-mRFP and PilB-GFP proteins expressed in conidia of a *surG*Δ strain. (A) Pictures of representative equatorial sections from laser scanning confocal microscopy of strains expressing chimeric PilB-GFP and SurG-GFP molecules in ungerminated (0 h) and swollen (5 h) conidia of a wild-type and a *pilA*Δ strain. (B) Representative pictures from laser scanning confocal microscopy of strains expressing chimeric PilA-mGFP and PilB-GFP molecules in ungerminated (0 h) and swollen (5 h) conidia of a wild-type and a *surG*Δ strain. In both panels A and B, Nomarski pictures (DIC) of wild-type conidia 0 h are shown. Bars, 5 μM. For the PilA-GFP and PilB-GFP strains, two independent conidia are shown.

One of the surprising results from this work is that in *A. nidulans*, *S. cerevisiae*-like eisosomes assemble during conidial formation and disassemble during germination, resulting in germlings and mycelia in eisosome-like punctate structures comprising PilA and a novel cellular distribution (cytosolic and vacuolar, respectively) for PilB and SurG. As no specific conidial survival phenotype was found in strains with eisosomal component deletions, this developmentally regulated distribu-

tion remains baffling. EglD, a putative endoglucanase comprising an expansin-like domain, also localizes at the periphery of ungerminated conidia (7). It would be of interest to study whether this localization implies a topological or functional association with eisosomes. In mycelia, PalI and PalH, involved in pH sensing, have been reported to form membrane-associated punctate structures (8). The connection between PilA and these proteins is under investigation.

The work presented above is a first study of eisosomal structure and function in a model filamentous ascomycete. The universal presence of eisosomal proteins in the ascomycetes and probably in other fungal phyla (3, 32; Olivera-Couto and Aguilar, unpublished; C. Scazzocchio, unpublished data), coupled with the paucity and diversity of the phenotypes of the deletion mutants observed in three different fungal species (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, and *A. nidulans*) and the striking developmental pattern of eisosomal protein distribution seen in *A. nidulans*, continues to be an unsolved paradox. The role of the Meu14 protein, a relative of the Pil1/PilA proteins in the meiosis of *S. pombe*, suggests that eisosomal proteins may have acquired entirely new functions in different ascomycete phylogenetic groups. Eisosomes, as defined in *S. cerevisiae*, are present within the asexual cycle only in the conidia of *A. nidulans* (see also reference 29), positing the question of their functional significance in this developmental stage. The punctate structures seen in mycelia can be considered to define a new class of assemblies comprising only one Pil paralogue. Thus, it would be of interest to explore in this filamentous ascomycete the developmental fate of other conserved proteins known to share the *S. cerevisiae* MCC localization pattern.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dawoon Chung and Brian Shaw for open discussion relating to the phenotype found in their laboratory for an isolate with a *surG* deletion, Pablo Aguilar and Agustina Olivera-Couto for sharing unpublished data, and G. Diallinas for laboratory facilities. Specifically, C.S. thanks Agustina Olivera-Couto for very helpful insights concerning the phylogeny of the Pil-like proteins and Andrés Iriarte for help with interpretation of phylogenies. T.S. thanks Miguel Peñalva for laboratory facilities, helpful discussions, and encouragement at the onset of this work.

This work was supported by research grants from the NCSR Demokritos to I.V. and IKY to C.G.

REFERENCES

1. **Abenza, J. F., A. Pantazopoulou, J. M. Rodríguez, A. Galindo, and M. A. Peñalva.** 2009. Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. Traffic **10:**57–75.
2. **Alvarez, F. J., and J. B. Konopka.** 2007. Identification of an N-acetylglucosamine transporter that mediates hyphal induction in. Candida albicans. Mol. Biol. Cell **18:**965–975.
3. **Alvarez, F. J., L. M. Douglas, A. Rosebrock, and J. B. Konopka.** 2008. The Sur7 protein regulates plasma membrane organization and prevents intracellular cell wall growth in *Candida albicans*. Mol. Biol. Cell **19:**5214–5225.
4. **Alvarez, F. J., L. M. Douglas, and J. B. Konopka.** 2009. The Sur7 protein resides in punctate membrane subdomains and mediates spatial regulation of cell wall synthesis in Candida albicans. Commun. Integr. Biol. **2:**76–77.

4a. **Anisimova, M., and O. Gascuel.** 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. Syst. Biol. **55:**539–552.

5. **Apostolaki, A., Z. Erpapazoglou, L. Harispe, M. Billini, P. Kafasla, D. Kizis, M. A. Peñalva, C. Scazzocchio, and V. Sophianopoulou.** 2009. AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. Eukaryot. Cell **8:**339–352.
6. **Araujo-Bazán, L., M. A. Peñalva, and E. A. Espeso.** 2008. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. **67:**891–905.
7. **Bouzarelou, D., M. Billini, K. Roumelioti, and V. Sophianopoulou.** 2008. EglD, a putative endoglucanase, with an expansin like domain is localized in the conidial cell wall of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. **45:**839–850.

7a. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72:**248–254.

8. **Calcagno-Pizarelli, A. M., S. Negrete-Urtasun, S. H. Denison, J. D. Rudnicka, H. J. Bussink, T. Múnera-Huertas, L. Stanton, A. Hervás-Aguilar, E. A. Espeso, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva.** 2007. Establishment of the ambient pH signaling complex in Aspergillus nidulans: PalI assists plasma membrane localization of PalH. Eukaryot. Cell **6:**2365–2375.

8a. **Chung, D., and B. Shaw.** 2009. Abstr. 25th Fungal Genet. Meet., abstr. 322.

9. **Church, G. M., and W. Gilbert.** 1984. Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **81:**1991–1995.
10. **Cove, D. J.** 1966. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. Biochim. Biophys. Acta **113:**51–56.
11. **Delcasso-Tremousaygue, D., F. Grellet, F. Panabieres, E. D. Ananiev, and M. Delseny.** 1988. Structural and transcriptional characterization of the external spacer of a ribosomal RNA nuclear gene from a higher plant. Eur. J. Biochem. **172:**767–776.
12. **Diallinas, G.** 2007. Aspergillus transporters, p. 301–310. *In* G. Goldman and S. Osmani (ed.), The aspergilli: genomics, medicine, biotechnology and research methods. CRC Press, Boca Raton, FL.
13. **Erpapazoglou, Z., P. Kafasla, and V. Sophianopoulou.** 2006. The product of the SHR3 orthologue of *Aspergillus nidulans* has restricted range of amino acid transporter targets. Fungal Genet. Biol. **43:**222–233.
14. **Forment, J. V., M. Flipphi, D. Ramon, L. Ventura, and A. P. Maccabe.** 2006. Identification of the *mstE* gene encoding a glucose-inducible, low affinity glucose transporter in *Aspergillus nidulans*. J. Biol. Chem. **281:**8339–8346.
15. **Fröhlich, F., K. Moreira, P. S. Aguilar, N. C. Hubner, M. Mann, P. Walter, and T. C. Walther.** 2009. A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. J. Cell Biol. **185:**1227–1242.
16. **Gournas, C., S. Amillis, A. Vlanti, and G. Diallinas.** 2010. Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. Mol. Microbiol. **75:**246–260.
17. **Grossmann, G., M. Opekarová, J. Malinsky, I. Weig-Meckl, and W. Tanner.** 2007. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. EMBO J. **26:**1–8.
18. **Grossmann, G., J. Malinsky, W. Stahlschmidt, M. Loibl, I. Weig-Meckl, W. B. Frommer, M. Opekarová, and W. Tanner.** 2008. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. J. Cell Biol. **183:**1075–1088.
19. **Herranz, S., J. M. Rodríguez, H. J. Bussink, J. C. Sánchez-Ferrero, H. N. Arst, Jr., M. A. Peñalva, and O. Vincent.** 2005. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102:**12141–12146.
20. **Hill, T. W., D. M. Loprete, M. Momany, Y. Ha, L. M. Harsch, J. A. Livesay, A. Mirchandani, J. J. Murdock, M. J. Vaughan, and M. B. Watt.** 2006. Isolation of cell wall mutants in Aspergillus nidulans by screening for hypersensitivity to calcofluor white. Mycologia **98:**399–409.
21. **Kafasla, P., S. Frillingos, and V. Sophianopoulou.** 2007. The proline permease of *Aspergillus nidulans*: functional replacement of the native cysteine residues and properties of a cysteine-less-transporter. Fungal Genet. Biol. **44:**615–626.
22. **Lamarre, C., S. Sokol, J. P. Debeaupuis, C. Henry, C. Lacroix, P. Glaser, J. Y. Coppée, J. M. François, and J. P. Latgé.** 2008. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. BMC Genomics **16:**417.
23. **Li, X. M., M. M. Momsen, H. L. Brockman, and R. E. Brown.** 2003. Sterol structure and sphingomyelin acyl chain length modulate lateral packing elasticity and detergent solubility in model membranes. Biophys. J. **85:**3788–3801.
24. **Lockington, R. A., H. M. Sealy-Lewis, C. Scazzocchio, and R. W. Davies.** 1985. Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. Gene **33:**137–149.
25. **Luo, G., A. Gruhler, Y. Liu, O. N. Jensen, and R. C. Dickson.** 2008. The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. J. Biol. Chem. **283:**10433–10444.
26. **Malínská, K., J. Malínský, M. Opekarová, and W. Tanner.** 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. Mol. Biol. Cell **14:**4427–4436.
27. **Malínská, K., J. Malínský, M. Opekarová, and W. Tanner.** 2004. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living S. cerevisiae cells. J. Cell Sci. **117**(Pt. 25)**:**6031–6041.
28. **Moreira, K. E., T. C. Walther, P. S. Aguilar, and P. Walter.** 2009. Pil1 controls eisosome biogenesis. Mol. Biol. Cell **20:**809–818.
29. **Oh, Y. T., C. S. Ahn, J. G. Kim, Ro, H. S., C. W. Lee, and J. W. Kim.** 2010.

Proteomic analysis of early phase of conidia germination in Aspergillus nidulans. Fungal Genet. Biol. **47:**246–253.
30. **Ohtaka, A., D. Okuzaki, T. T. Saito, and H. Nojima.** 2007. cp4, a meiotic coiled-coil protein, plays a role in F-actin positioning during Schizosaccharomyces pombe meiosis. Eukaryot. Cell **6:**971–983.
31. **Okuzaki, D., W. Satake, A. Hirata, and H. Nojima.** 2003. Fission yeast meu14+ is required for proper nuclear division and accurate forespore membrane formation during meiosis II. J. Cell Sci. **116:**2721–2735.
32. **Olivera-Couto, A.** 2009. Búsqueda de estructuras homólogas a los eisosomas de *Saccharomyces cerevisiae* en eucariotas superiores. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
33. **Osherov, N., D. P. Kontoyiannis, A. Romans, and G. S. May.** 2001. Resistance to itraconazole in Aspergillus nidulans and Aspergillus fumigatus is conferred by extra copies of the A. nidulans P-450 14alpha-demethylase gene, pdmA. J. Antimicrob. Chemother. **48:**75–81.
34. **Padovan, A. C., G. F. Sanson, A. Brunstein, and M. R. Briones.** 2005. Fungi evolution revisited: application of the penalized likelihood method to a Bayesian fungal phylogeny provides a new perspective on phylogenetic relationships and divergence dates of Ascomycota groups. J. Mol. Evol. **60:** 726–735.
35. **Pantazopoulou, A., N. D. Lemuh, D. G. Hatzinikolaou, C. Drevet, G. Cecchetto, C. Scazzocchio, and G. Diallinas.** 2007. Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in Aspergillus nidulans. Fungal Genet. Biol. **44:**627–640.
36. **Peñalva, M. A.** 2005. Tracing the endocytic pathway of Aspergillus nidulans with FM4-64. Fungal Genet. Biol. **42:**963–975.
37. **Pontecorvo, G., J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. MacDonald, and A. W. Bufton.** 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. **5:**141–238.
38. **Rodríguez-Galán, O., A. Galindo, A. Hervás-Aguilar, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva.** 2009. Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. J. Biol. Chem. **284:**4404–4412.
39. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY.
40. **Sanchez-Ferrero, J. C., and M. A. Peñalva.** 2007. Endocytosis. *In* S. Osmani and G. Goldman (ed.), The aspergilli: genomics, medical applications, biotechnology, and research methods. CRC Press, Boca Raton, FL.
41. **Sophianopoulou, V., and C. Scazzocchio.** 1989. The proline transport protein of *Aspergillus nidulans* is very similar to amino-acid transporters of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Microbiol. **3:**705–714.
42. **Spatafora, J. W., G. H. Sung, D. Johnson, C. Hesse, B. O'Rourke,M. Serdani, R. Spotts, F. Lutzoni, V. Hofstetter, J. Miadlikowska, V. Reeb, C. Gueidan, E. Fraker, T. Lumbsch, R. Lücking, I. Schmitt, K. Hosaka, A. Aptroot, C. Roux, A. N. Miller, D. M. Geiser, J. Hafellner, G. Hestmark, A. E. Arnold, B. Büdel, A. Rauhut, D. Hewitt, W. A. Untereiner, M. S. Cole, C. Scheidegger, M. Schultz, H. Sipman, and C. L. Schoch.** 2006. A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. Mycologia **98:**1018–1028.
43. **Strádalová, V., W. Stahlschmidt, G. Grossmann, M. Blazíková, R. Rachel, W. Tanner, and J. Malinsky.** 2009. Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. J. Cell Sci. **122:**2887–2894.
44. **Szewczyk, E., T. Nayak, C. E. Oakley, H. Edgerton, Y. Xiong, N. Taheri-Talesh, S. A. Osmani, and B. R. Oakley.** 2006. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. Nat. Protoc. **1:**3111–3120.
45. **Tavoularis, S., C. Scazzocchio, and V. Sophianopoulou.** 2001. Functional expression and cellular localization of a green fluorescent protein-tagged proline transporter in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. **33:**115–125.
46. **Tavoularis, S. N., U. H. Tazebay, G. Diallinas, M. Sideridou, A. Rosa, C. Scazzocchio, and V. Sophianopoulou.** 2003. Mutational analysis of the major proline transporter (PrnB) of *Aspergillus nidulans*. Mol. Membr. Biol. **20:** 285–297.
47. **Tilburn, J., C. Scazzocchio, G. G. Taylor, J. H. Zabicky-Zissman, R. A. Lockington, and R. W. Davies.** 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene **26:**205–221.
48. **Valdez-Taubas, J., G. Diallinas, C. Scazzocchio, and A. L. Rosa.** 2000. Protein expression and subcellular localization of the general purine transporter UapC from Aspergillus nidulans. Fungal Genet. Biol. **30:**105–113.
49. **Valdez-Taubas, J., L. Harispe, C. Scazzocchio, L. Gorfinkiel, and A. L. Rosa.** 2004. Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from Aspergillus nidulans. Fungal Genet. Biol. **41:**42–51.
50. **Vincent, O., L. Rainbow, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva.** 2003. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by Aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. Mol. Cell. Biol. **23:**1647–1655.
51. **Vlanti, A., and G. Diallinas.** 2008. The Aspergillus nidulans FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. Mol. Microbiol. **68:**959–977.
52. **Walther, T. C., J. H. Brickner, P. S. Aguilar, S. Bernales, C. Pantoja, and P. Walter.** 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. Nature **439:**998–1003.
53. **Walther, T. C., P. S. Aguilar, F. Fröhlich, F. Chu, K. Moreira, A. L. Burlingame, and P. Walter.** 2007. Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. EMBO J. **26:**4946–4955.
54. **Young, M. E., T. S. Karpova, B. Brügger, D. M. Moschenross, G. K. Wang, R. Schneiter, et al.** 2002. The Sur7 family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. Mol. Cell. Biol. **22:**927–934.
55. **Zickler, D.** 2006. Meiosis in mycelial fungi. *In* U. Kües and R. Fischer (ed.), The mycota. I. Growth, differentiation and sexuality. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Υπερτονικές συνθήκες προκαλούν παροδική πλασμόλυση, αναστολή της αύξησης και της ενδοκύτωσης μεταφορέων στους *Aspergillus nidulans* και *Saccharomyces cerevisiae*

Βασίλειος Μπίτσικας*, Μάγια Καραχάλιου*, Χρήστος Γουρνάς και Γεώργιος Διαλλινάς

*ισάξια συνεισφορά

Χρησιμοποιώντας στελέχη του *Aspergillus nidulans* που εκφράζουν λειτουργικούς μεταφορείς, συζευγμένους με τον GFP επίτοπο, σε υπερτονικές συνθήκες, παρατηρήσαμε την ταχεία εμφάνιση μεμβρανικών, σχετικά στατικών, φθορίζοντων κηλίδων (0,5-2,3 μm). Οι κηλίδες αυτές δεν αντιστοιχούν σε μικροπεριοχές ειδικές για τους μεταφορείς, αφού συνεντοπίζονται με άλλα σχετιζόμενα με την πλασματική μεμβράνη μόρια, όπως η ομόλογη της πλεκστρίνης (PH) επικράτεια και η SsoA t-SNARE, ή με τους αναφορείς λιπιδίων FM4-64 και *filipin*. Επιπλέον, οι μικροπεριοχές δεν δείχνουν χαρακτηριστικά λιπιδικών σχεδιών, MCCs ή άλλων μεμβρανικών μικροπεριοχών. Αποσυνελιγμένες φωτογραφίες μικροσκοπίας επιφθορισμού έδειξαν πως οι φθορίζουσες κηλίδες αντιστοιχούν σε εγκολπώσεις της πλασματικής μεμβράνης. Οι μεταφορείς παραμένουν πλήρως ενεργοί κατά τη διάρκεια του φαινομένου αυτού της εντοπισμένης πλασμόλυσης. Η πλασμόλυση όμως συσχετίσθηκε με μειωμένο ρυθμό αύξησης και δραματική αναστολή της ενδοκύτωσης των μεταφορέων και της FM4-64. Τα φαινόμενα αυτά είναι παροδικά και άμεσα αναστρέψιμα μετά από έκπλυση του υπερτονικού μέσου. Βασισμένοι στην παρατήρηση πως η αναστολή της ενδοκύτωσης από υπερτονικές συνθήκες αλλάζει δραματικά τον κυτταρικό εντοπισμό της τροπομυοσίνης (GFP-tmpA), αλλά δεν επηρεάζει τη μεμβρανική εμφάνιση αναρροϊκών (SlaB-GFP) ή καταρροϊκών (AbpA-mRFP) ενδοκυτωτικών συστατικών, συμπεραίνουμε πως η υπερτονικότητα τροποποιεί τη δυναμική των ινιδίων ακτίνης, και κατά συνέπεια δρα έμμεσα στην ενδοκύτωση. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται επιπλέον από την επίπτωση της επίδρασης με Latrunculin B, έναν παράγοντα αποπολυμερισμού της ακτίνης, στην ενδοκύτωση. Δείχνουμε πως τα φαινόμενα αυτά που παρατηρούνται στον *A. nidulans* συμβαίνουν επίσης και στον *S. serevisiae*, προτείνοντας πως αποτελούν βασικές ομοιοστατικές αποκρίσεις των ασκομυκήτων σε υπερτονικό σοκ. Τέλος, η δουλειά

μας δείχνει πως υπερτονικές συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσιολογικά εργαλεία για τη μελέτη της αρνητικής ρύθμισης μεταφορέων μέσω ενδοκύτωσης στον *A. nidulans*, αφού μη-ρυθμιζόμενη γενετική αναστολή παραγόντων που επηρεάζουν την ενδοκύτωση είναι πλήρως ή σχεδόν θνησιγόνος.

Molecular Membrane Biology, 2010; Early Online, 1–15

informa
healthcare

Hypertonic conditions trigger transient plasmolysis, growth arrest and blockage of transporter endocytosis in *Aspergillus nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*

VASSILIS BITSIKAS*, MAYIA KARACHALIOU*, CHRISTOS GOURNAS & GEORGE DIALLINAS

Faculty of Biology, Department of Botany, University of Athens, Panepistimioupolis, Athens, Greece

(Received 4 June 2010; and in revised form 5 July 2010)

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

Abstract

By using *Aspergillus nidulans* strains expressing functional GFP-tagged transporters under hypertonic conditions, we noticed the rapid appearance of cortical, relatively static, fluorescent patches (0.5–2.3 μm). These patches do not correspond to transporter microdomains as they co-localize with other plasma membrane-associated molecules, such as the pleckstrin homology (PH) domain and the SsoA t-Snare, or the lipophilic markers FM4-64 and filipin. In addition, they do not show characteristics of lipid rafts, MCCs or other membrane microdomains. Deconvoluted microscopic images showed that fluorescent patches correspond to plasma membrane invaginations. Transporters remain fully active during this phenomenon of localized plasmolysis. Plasmolysis was however associated with reduced growth rate and a dramatic blockage in transporter and FM4-64 endocytosis. These phenomena are transient and rapidly reversible upon wash-out of hypertonic media. Based on the observation that block in endocytosis by hypertonic treatment altered dramatically the cellular localization of tropomyosin (GFP-TpmA), although it did not affect the cortical appearance of upstream (SlaB-GFP) or downstream (AbpA-mRFP) endocytic components, we conclude that hypertonicity modifies actin dynamics and thus acts indirectly on endocytosis. This was further supported by the effect of latrunculin B, an actin depolymerization agent, on endocytosis. We show that the phenomena observed in *A. nidulans* also occur in *Saccharomyces cerevisiae*, suggesting that they constitute basic homeostatic responses of ascomycetes to hypertonic shock. Finally, our work shows that hypertonic treatments can be used as physiological tools to study the endocytic down-regulation of transporters in *A. nidulans*, as non-conditional genetic blocks affecting endocytic internalization are lethal or severely debilitating.

Keywords: *Fungi, patches, plasma membrane invaginations, microdomain/actin dynamics*

Copyright © 2010 Informa Healthcare
Not for Sale or Distribution
Unauthorised use prohibited
display, view and print for personal use only

Introduction

Eukaryotic transporters respond to environmental and developmental signals at both the transcriptional and post-translational levels. Their tight control includes mostly rapid *de novo* synthesis and even more rapid down-regulation through endocytosis and vacuolar degradation (André and Haguenauer-Tsapis 2004, Dupré et al. 2004). The molecular mechanisms underlying endocytosis and vacuolar degradation are best understood in *Saccharomyces cerevisiae*. It has been shown that the principal signal for transporter endocytosis and entry into multivesicular bodies (MVBs), which eventually fuse with the vacuole/lysosome and thus deliver the vesicles to degradative enzymes, is their ubiquitination (André and Haguenauer-Tsapis 2004, Dupré et al. 2004, Belgareh-Touze et al. 2008). Ubiquitination serves as a signal not only for transporter internalization from the plasma membrane, but also to redirect newly synthesized transporter molecules from the Golgi to endosomes (Soetens et al. 2001, Umebayashi and Nakano 2003) and for MVB sorting (Helliwell et al. 2001, Soetens et al. 2001, Reggiori and Pelham 2002, André and Haguenauer-Tsapis 2004, Blondel et al. 2004, Erpapazoglou et al. 2008).

Correspondence: Prof. George Diallinas, Faculty of Biology, Department of Botany, University of Athens, Panepistimioupolis, Athens 15781, Greece. Tel: +30 210 7274649. Fax: +30 210 7274702. E-mail: diallina@biol.uoa.gr

*These authors contributed equally to the paper.

ISSN 0968-7688 print/ISSN 1464-5203 online © 2010 Informa UK, Ltd.
DOI: 10.3109/09687688.2010.510484

RIGHTSLINK

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

The trafficking, function and turnover of *S. cerevisiae* transporters is also known to depend on their partitioning in lipid-rafts or plasma membrane compartments (MCs) with distinct lipid composition. Two such non-overlapping membrane compartments (MCs) have been distinguished, using GFP-tagged transporters as markers, as evenly distributed ~300 nm isolated patches (Grossmann et al. 2007). The first, MCC, contains permeases specific for arginine (Can1p), tryptophan (Tat2p) and uracil (Fur4p), whereas the second, MCP, contains the proton ATPase Pma1p (Malinska et al. 2004, Grossmann et al. 2006, 2007). MCCs contain a distinct lipid composition enriched in ergosterol, as visualized by staining with filipin, a fluorescent marker binding this lipid (Malinska et al. 2003, Grossmann et al. 2007), but also as supported by biochemical assays relating transporter extractability from membranes using Triton-X 100 (Grossmann et al. 2007). The compartmentation of the plasma membrane into MCC and MCP is highly stable (Malinska et al. 2004), but transporters dock within MCC patches in a reversible, membrane potential-dependent manner (Grossmann et al. 2007). Based on a number of observations relating to the rate of transporter endocytosis with localization in MCCs, it has been proposed that the biological function of MCCs is to protect therein embedded transporters and other proteins from internalization and turnover (Grossmann et al. 2008). This view is somehow contradicted by other studies showing that MCC organization is, at least in part, mediated by large protein complexes, termed eisosomes, which were proposed to mark static sites of endocytosis (Walther et al. 2006). One possible function of MCCs and eisosomes is to regulate protein and lipid abundance by sorting them into distinct, spatially separated pools where they are stabilized or from which they can be either endocytosed, or protected from internalization, selectively. Electron microscopy analysis suggested that MCC patches correspond to furrow-like invaginations in the plasma membrane of yeast (Strádalová et al. 2009).

Several transporters of the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans* have been studied (for reviews see Pantazopoulou and Diallinas 2007, Diallinas 2008). In most cases, transporters tagged with GFP remain fully functional, although in some cases the GFP tag led to increased instability and vacuolar turnover (Tavoularis et al. 2001, Pantazopoulou et al. 2007, Vlanti and Diallinas 2008). After transcriptional activation of the corresponding genes during conidiospore germination (Amillis et al. 2004), transporter proteins show a uniform distribution along the plasma membrane of germlings and developing mycelia. Often, GFP-tagged transporters also label the vacuoles, which is the site of their constitutive turnover (see Figure 1).

Transporter turnover is dramatically enhanced upon various physiological signals or stress conditions. For example, several transporters of purines (UapA, UapC), pyrimidines (FcyB, FurD) and amino acids (PrnB, AgtA) are rapidly turned-over in the presence of ammonium ions (Tavoularis et al. 2001, Valdez-Taubas et al. 2004, Pantazopoulou et al. 2007, Vlanti and Diallinas 2008, Apostolaki et al. 2009, Borbolis and Diallinas, unpublished). This is a typical example of down-regulation of transporters specific for nitrogenous compounds when a primary nitrogen source such as ammonium or glutamine is added in the media, a phenomenon very well studied in *S. cerevisiae*. Several *A. nidulans* transporters are also down-regulated by endocytosis and vacuolar degradation in the presence of their substrates (Vlanti and Diallinas 2008, Gournas et al. 2010, Borbolis, Pavlides and Diallinas, unpublished). An interesting aspect concerning the turnover of the UapA permease by its substrates is that endocytosis of inactive UapA molecules has been shown to occur *in trans* when co-expressed with active UapA versions, even if the latter cannot be endocytosed (Gournas et al. 2010). This last observation strongly suggested that UapA molecules might be organized in specific plasma membrane microdomains, either constitutively or prior to endocytosis.

In the course of previous work, we noticed that some *A. nidulans* transporters tagged with GFP form fluorescent cortical patches, when the samples were washed in buffers containing relatively high salt concentrations (Pavlides and Diallinas, unpublished). In the present work, we investigated the conditions eliciting the appearance of transporters as cortical patches, whether this phenomenon is specific to transporters and their turnover, and whether patches correspond to transporter-specific microdomains or membrane compartments similar to MCCs. We show that patches originally observed with transporters correspond to membrane invaginations rather than specific membrane microdomains, transiently elicited by hypertonic conditions. We further show that this phenomenon is associated with transient growth arrest and a total block of endocytic mechanisms in *A. nidulans*. Similar conclusions were reached in *S. cerevisiae*. We finally investigate aspects concerning the mechanism blocking endocytosis and discuss how conditions established herein can be used as physiological tools to study transporter trafficking and sorting in the MVB pathway in *A. nidulans*, where genetic blocks in relevant genes are usually lethal or debilitating

RIGHTSLINK

(Araujo-Bazán et al. 2008, Rodríguez-Galán et al. 2009, Abenza et al. 2010).

Methods

Strains, genetics, media and growth conditions

A. nidulans and *S. cerevisiae* strains used are listed in Table I. Newly-made *A. nidulans* strains were constructed with standard genetic crossing using auxotrophic markers for heterokaryon establishment. Standard complete (CM) and minimal media (MM) for *A. nidulans* were used (www.fgsc.net). Nitrogen sources were used at the following concentrations: urea 5 mM, $NaNO_3$ 10 mM, NH_4Cl 10 mM, uric acid 0.1 mg/ml. Induction of UapA expression from the *alcA* promoter was achieved after 14 h of growth in MM supplemented with urea (5 mM) and fructose (0.1%). Repression of UapA expressed from the *alcA* promoter ($alcA_p$) was achieved in MM supplemented with urea (5 mM) and glucose (1%). Growth tests were carried out at 25°C, at pH 6.8. Supplements were added when appropriate. In yeast, Jen1p-GFP expression was induced by 4 h growth in MM supplemented with 0.5% lactate (Paiva et al. 2009) and Fur4p-GFP by 16 h growth in MM with 2% galactose (Leung et al. 2010).

Epifluorescence and confocal microscopy

Samples for fluorescence microscopy were prepared as in Valdez-Taubas et al. (2004). In particular, the samples were incubated in 3 cm Petri dishes on cover slips, protected from light, in liquid MM supplemented with urea as nitrogen source and appropriate auxotrophies, at 25°C for 12–17 h and then shifted to various conditions for 2–4 h. Staining with FM4-64 (Molecular Probes, Inc, USA) was according to Penalva (2005). In particular, cover slips with germinated conidia were placed on top of plastic covers, covered with 0.1 ml of 10 μM FM4-64 in MM, incubated on ice for 15 min, washed in 5 ml MM, and transferred to fresh 3 ml medium for 0–30 min chase time. Staining with filipin (Sigma) was performed by addition of 0.1 ml MM supplemented with 25 μg/ml filipin on cover slips with germinated conidia, on top of plastic covers, 15 min prior to observation. Calcofluor white (Sigma) staining, used for detecting the presence and deposition of polysaccharides (chitin and b-1,3-glucan) in the cell walls of yeast and mycelial fungi, was performed according to Slaninová et al. (2000). Cells were stained for 5 min on coverslips with a solution of Calcofluor (0.001%w/v in relevant growth medium), washed and immediately observed in the fluorescence microscope. Lat-B was used as described (Taheri-Talesh et al. 2008), at a final concentration of 20–40 μg/ml (50–100 μM). The drug was added from a 10 mM stock in DMSO. For endocytosis, uric acid (0.1 mg/ml) or NH_4Cl (10–50 mM) was added for 1 h before observation. For hypertonic treatment, sucrose, NaCl or other agents were added as indicated in the relevant Figures. Samples were observed on an Axioplan Zeiss phase-contrast epifluorescent microscope with appropriate filters and the resulting images were acquired with a Zeiss-MRC5 digital camera using the AxioVs40 V4.40.0 software. Image

Table I. Strains used in this study.

Strains	Genotype	Origin
Aspergillus nidulans		
UapA-GFP	*pabaA1 ΔuapA ΔuapC ΔazgA argB2::argB uapA-gfp*	(Pantazopoulou et al. 2007)
$alcA_p$-UapA-GFP	*pabaA1 ΔuapA ΔuapC ΔazgA argB2::argB* $alcA_p$*-uapA-gfp*	(Gournas et al. 2010)
UapA-mRFP AzgA-GFP	*pabaA1 ΔuapA ΔuapC ΔazgA argB2* $[uapA\text{-}mrfp]^{argB}$ $[azgA\text{-}gfp]^{argB}$	This study
AzgA-GFP	*pabaA1 ΔuapA ΔuapC ΔazgA argB2::argB azgA-gfp*	(Pantazopoulou et al. 2007)
PrnB-GFP	*yA2 pabaA1 argB2 prn397::prnB-gfp-trpC*$_{C\text{-}term}$ *prnC*	(Tavoularis et al. 2001)
FurD-GFP	*ΔuapA ΔuapC ΔazgA ΔfurD::riboB ΔcntA::riboB ΔnkuA::argB pantoB100* $[furD\text{-}GFP]^{pantoB}$	(Borbolis and Diallinas unpublished)
GFP-PH domain	*yA2 pabaA1 argB2::argB*^{BglII} $gpdA_p$*-gfp-(PHdomainPLCΔ*$_1$*)*$_2$	(Pantazopoulou and Penalva 2009)
GFP-SsoA	*pyrG89 pyroA4 ΔnkuA::bar ssoA::*$[ssoA_p\text{-}gfp\text{-}ssoA]^{AfpyrG}$	(Taheri-Talesh et al. 2008)
SlaB-GFP	*pyrG89 pyroA4 argB2 ΔnkuA::argB slaB-gfp-AfpyrG*	(Araujo-Bazán et al. 2008)
SlaB-GFP UapA-mRFP	*pabaA1 ΔnkuA::argB slaB-gfp-AfpyrG argB2*$[uapA\text{-}mrfp]^{argB}$	This study
AbpA-GFP	*yA2 pabaA1 pyrG89[abpA-mrfp-AfpyrG]*	(Araujo-Bazán et al. 2008)
UapA-K572R-GFP	*pabaA1 ΔuapA ΔuapC ΔazgA argB2::argB* $alcA_p$*-K572R-gfp*	(Gournas et al. 2010)
GFP-TpmA	*fwA1 pyrG89 pyroA4 nicA2 ΔnkuA::argBAfpyG-mcherry-synA yA::AfpyroA* $tpmA_p$*-gfp-tpmA*	(Taheri-Talesh et al. 2008)
Saccharomyces cerevisiae		
Fur4p-GFP	*BY4742 MATa his3Δ1 leu2Δ0 lysΔ0 ura3Δ0/URA3 GAL-FUR4-GFP*	(Dupré and Haguenauer-Tsapis 2003)
Jen1p-GFP	*MATa ura3-52 JEN1-GFP*	(Paiva et al. 2009)

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

processing, contrast adjustment and color combining were made using Adobe Photoshop CS2 V9.0.2. Images were converted to 8-bit greyscale or RGB and annotated using Photoshop CS2 before being saved to TIFF. At CIB-CSIC (Madrid), an inverted Leica DMI6000B microscope with motorized z-focus and a Leica EL6000 external light source was used for epifluorescence excitation. The microscope was driven by Metamorph (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) software using a DMI6000-specific driver. Images were acquired using HCX ×63 1.4 numerical aperture (NA) or ×100 1.4 NA objectives and a Hamamatsu ORCA ER-II cooled-charge coupled device camera (Hamamatsu Photonics, Massy, France). The microscope was equipped with Semrock Brightline GFP-3035B and TXRED-4040B filter sets (Semrock, Rochester, NY, USA). Maximal intensity projections were obtained from z-stacks using the Metamorph 3D plugin. Images were converted to 8-bit greyscale or RGB and annotated using Photoshop CS2 before being saved to TIFF. When indicated (Figure 4), images were deconvoluted using the blind deconvolution algorithms of ImageJ 1.37 http://rsb.info.nih.gov/ij. For Laser Confocal Microscopy at the Medical School of Universidade do Minho, we used an inverted FLUOVIEW confocal laser scanning microscope, version FV1000 Viewer (Ver.2.0b) as described by the manufacturer (http://www.olympusfluoview.com/).

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

Transport assays

Radiolabelled xanthine (33.4 Ci/mmol) was from Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA). [^{3}H]-xanthine uptake was assayed in conidiospores at 37°C as described previously (Koukaki et al. 2005, Papageorgiou et al. 2008). All experiments were carried out in triplicate. Initial velocities were corrected by subtracting background uptake values, measured in the *uapA*$^-$*uapC*$^-$ mutant (Koukaki et al. 2005). The K_m (concentration for obtaining $V_m/2$) of UapA for xanthine was determined from full dose-response curves with a minimum of eight points spread over the relevant range. In all cases, the Hill coefficients were close to −1, consistent with competitive inhibition.

Western blot analysis

Protein extracts were prepared as in Pantazopoulou et al. (2007). In particular, liquid cultures were incubated for 12 h at 25°C before the addition of substrates or ammonium, or induction for the *alcA*$_p$-driven UapA expression. Protein concentrations were determined by the method of Bradford. In each case, 50 μg of protein were loaded for SDS PAGE. Samples were fractionated on a 10% SDS-page gel and electroblotted (Mini PROTEAN^{TM} Tetra Cell, BIO-RAD) onto a PVDF membrane (Macherey-Nagel) for immunodetection. The membrane was treated with 2% non-fat dry milk or according to the manufacturer instructions and immunodetection was performed using a primary mouse anti-GFP monoclonal antibody (Roche) and a secondary goat anti-mouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling). Blots were developed by the chemiluminescent method using the West Pico SuperSignal reagent (Pierce).

Determination of detergent resistance

This is basically as described in Grossmann et al. (2007). In brief, aliquots corresponding to 50 μg of membrane protein in 100 μl 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, were treated with increasing concentrations of Triton X-100 (0–0.8%) at room temperature for 30 min. Non-solubilized material was pelleted by centrifugation (14,000 rpm at 4°C for 30 min) and washed by 100 μl of the corresponding buffers under the same conditions. The pellets were resuspended in 30 μl of sample buffer, dissociated at 37°C for 15 min and then resolved by SDS-PAGE, and UapA-GFP was detected by a specific anti-GFP antibody on a Western blot.

Results

Hypertonic media elicit a cortical patchy appearance of A. nidulans transporters

Using functional GFP-tagged versions of seven permeases belonging to four evolutionary distinct protein families (NAT/NCS2, NCS1, AzgA-like, APC; http://www.membranetransport.org/), we have found that after transcriptional activation of the corresponding genes during conidiospore germination, transporter polypeptides show a rather uniform distribution along the plasma membrane of germlings and developing mycelia. A similar picture of uniform plasma membrane partitioning was also observed in other *Aspergillus* transporters studied using GFP (Forment et al. 2006, Apostolaki et al. 2009, Ramon and Scazzocchio, personal communication). This contrasts the case of several *S. cerevisiae* transporters that appear to form discrete cortical foci, corresponding to MCCs or MCPs (see *Introduction*). A representative picture of transporter cellular expression in *A. nidulans* is shown in the upper panel of Figure 1a.

RIGHTSLINK

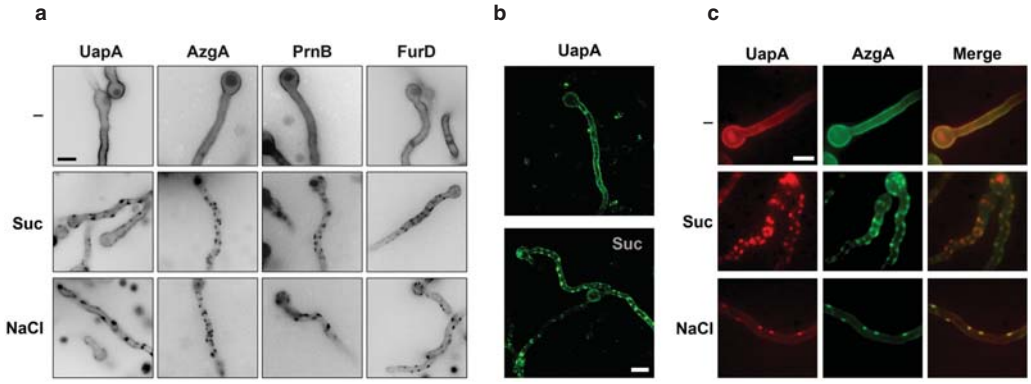


Figure 1. (a) Hypertonic media elicit a cortical patchy appearance of *A. nidulans* GFP-tagged transporters observed by epifluorescence microscopy. Upper panel: Control samples (–) were grown for 13 h in MM (urea 5 mM, glucose 1%) at 25°C, which permit the induction of transporters during conidiospore germination (Pantazopoulou and Diallinas 2007). Lower panels: Samples grown similarly as control samples, but then transferred to the same media containing 0.8 M Sucrose (Suc) or 0.5 M NaCl. Here and in several subsequent Figures, images were converted to 8-bit inverted grayscale. (b) Confocal laser scanning microscopy of UapA-GFP cellular expression in control media (–) or after 1 min exposure to 0.8 M Sucrose (Suc). (c) Epifluorescence microscopy of a strain expressing simultaneously UapA-mRFP and AzgA-GFP in control (–) or hypertonic (Suc, NaCl) media. Notice the overlap of red and green fluorescence (merge). Scale bars shown here and in subsequent figures correspond to 5 μm unless otherwise stated. This Figure is reproduced in colour in the online version of *Molecular Membrane Biology*.

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

In this Figure, UapA is a carrier specific for uric acid-xanthine (Gorfinkiel et al. 1993) (NAT family), AzgA (Cecchetto et al. 2004) is a carrier specific for adenine-guanine-hypoxanthine (AzgA-like family), PrnB (Tazebay et al. 1997) is a proline permease (APC family) and FurD (Amillis et al. 2007) is a uracil permease (NCS1 family).

The cellular expression of the *A. nidulans* GFP-tagged transporters was also examined in samples treated for 1–5 min with NaCl or sucrose. Under these conditions, we observed the rapid appearance of cortical fluorescent patches, as those shown in the lower panels of Figure 1a and 1b. By using a strain simultaneously expressing two of these transporters, UapA and AzgA, tagged with mRFP and GFP respectively, we showed that at least these permeases co-localize in the same patches (Figure 1c).

The kinetics of appearance of patches and most subsequent work were performed using a fully functional UapA-GFP transporter expressed from a strong controllable promoter ($alcA_p$) (Gournas et al. 2010). Patch appearance depended on the concentration of NaCl or sucrose (Figure 2a). The minimum concentrations of sucrose or NaCl eliciting the appearance of patches were determined to be >400 mM and > 200 mM, respectively, in agreement with the relative hypertonic strength of these two solutes. Patches formed by the two solutes looked identical

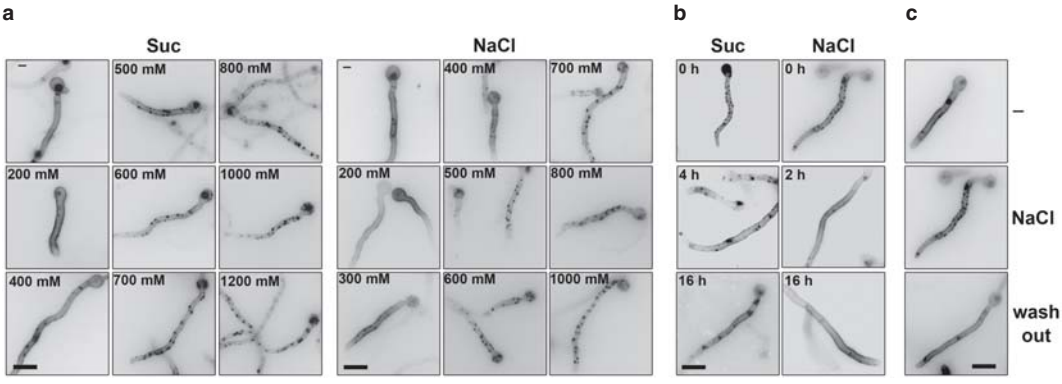


Figure 2. (a) Kinetics of appearance of cortical patches in a strain expressing UapA-GFP from the *alcA* promoter ($alcA_p$-UapA-GFP) in hypertonic media (1 min) in response to tonicity strength. Samples were grown for 14–15 h in mM (urea 5 mM, fructose 0.1%), at 25°C, which permits the induction of UapA-GFP from $alcA_p$ (Gournas et al. 2010). (b) Disassembly of $alcA_p$-UapA-GFP fluorescent patches after prolonged growth (2, 4 or 16 h) in hypertonic media (Suc or NaCl). (c) Wash-out of $alcA_p$-UapA-GFP fluorescent patches (NaCl) after 10 min transfer to control (–) media. The figure shows epifluorescence microscopy images. Scale bars shown are 10 μM.

RIGHTSLINK

and their number and size depended on tonicity strength. The hypertonic effect imposed on mycelia was more evident at higher concentrations where hyphae became thinner, apparently due to water loss. The size of patches ranged from 0.5 through 2.3 μm. Patches were shown to appear transiently, as they disappeared in overnight cultures in hypertonic media (see Figure 2b). We estimated this recovery from the patchy appearance to take place after 4–8 h in sucrose (800 mM) or 2–4 h in NaCl (500 mM) (Figure 2b and not shown). Finally, patches disappeared rapidly (15 min) when sucrose or NaCl was washed-out (Figure 2c).

Several other hypertonic media (LiCl, KCl, Na_2PO_4, NH_4Cl, sorbitol or mannitol) led to patchy distribution of UapA, whereas other stress conditions such as the presence of most divalent ions or heavy metals, protein synthesis blockage (cycloheximide), proton gradient uncouplers or extreme pH, had no effect (Figure 3).

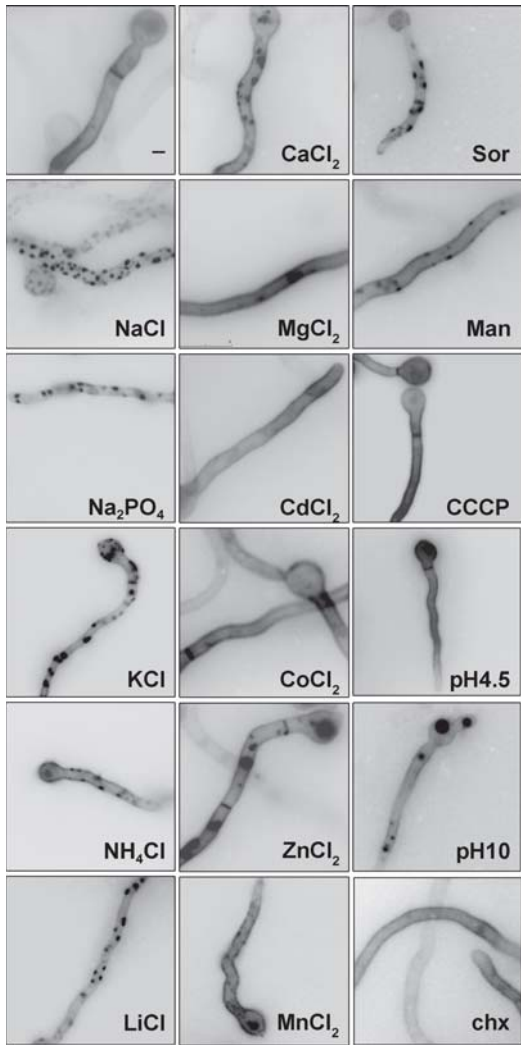


Figure 3. Examination by epifluorescence microscopy of UapA-specific fluorescent cortical patches after treatment with various salts (0.5 M), sugars (0.8 M), cycloheximide (chx, 20 μg/ml, 15 min prior to examination), different pH or the proton gradient uncoupler CCCP (30 μM, 15 min prior to examination). UapA-GFP is expressed from the the *alcA* promoter (*alcA*$_p$-UapA-GFP) as described in Figure 3. Sor and Man stand for Sorbitol and Mannitol, respectively. Notice that only monovalent ions and sugars (mostly Sor), which are known to produce hypertonic stress, lead to fluorescent patches.

Patches correspond to plasma membrane invaginations rather than lipid raft-like microdomains specific for transporters

Some patches, especially those produced under stronger tonicity, although clearly plasma membrane-associated, seem to extend beyond the membrane towards the cytoplasm. This was more clearly seen in deconvoluted Z-stack images, which strongly supported that patches correspond to membrane invaginations (Figure 4). This observation is in full agreement with two reports in *S. cerevisiae* (Slaninová et al. 2000) and *Aspergillus repens* (Kelavkar et al. 1993) directly showing, using TEM, that hypertonic media lead to plasma membrane invaginations, that can be extended deeply in the cytoplasm (see also later).

We obtained independent evidence that fluorescent patches, initially observed using GFP-tagged transporters, are plasma membrane invaginations rather than specific transporter microdomains. This evidence is based on the following observations. Firstly, similar patches were observed using two other GFP-tagged plasma membrane associated polypeptides (Figure 5a). These are the pleckstrin homology (PH) domain of PLC-δ1, specifically recognizing the plasma membrane PI(4,5)P_2 lipids (Pantazopoulou and Penalva 2009) and the SsoA t-Snare, a protein that serves as a membrane-specific tag in the docking of transport vesicles to the plasma membrane (Taheri-Talesh et al. 2008). Secondly, similar patches were also observed in hypertonic conditions, using the lipophilic markers FM4-64 (Penalva 2005) or Filipin (Takeshita et al. 2008) (also Figure 5a). Importantly, FM4-64 patches co-localized with transporter (UapA) patches (see later in Figure 6f). Thirdly, as known plasma membrane microdomains have a distinct raft-like lipid composition, we tested the extractability of UapA by Triton X-100 from membranes. This biochemical approach is a standard assay used to detect partitioning of transporters in detergent resistant membranes (DRMs), which seems to be the biochemical equivalent of lipid-raft microdomains (Grossmann et al. 2007). Figure 5b shows that UapA extractability was identical in standard and hypertonic media. Fourthly,

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

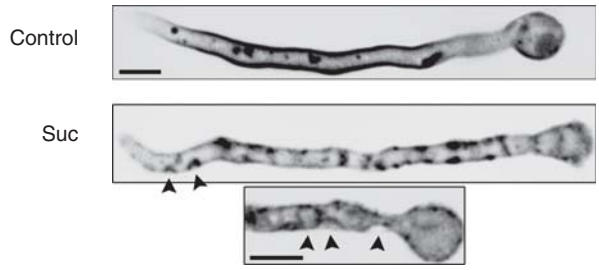


Figure 4. Fluorescent, UapA-GFP specific (*alcA*$_p$-UapA-GFP), patches correspond to plasma membrane invaginations visible (highlighted with arrow heads) in deconvoluted images obtained with an inverted Leica microscope with motorized z-focus. Maximal intensity projections obtained from z-stacks using the Metamorph 3D are shown (see *Experimental* section). Two samples treated with sucrose (0.8 M) are shown compared with an untreated control.

direct transport measurements of radiolabeled ^{3}H-xanthine performed under hypertonic conditions (0.8 M sucrose or 0.5 NaCl) showed that UapA-GFP remains fully functional, showing a K_m value (8 μM) and transport capacity nearly identical to the one obtained in standard media (Figure 5c). Finally, using Calcofluor white staining, a marker of cell wall material such as chitin or b-1,3-glucan (see *Material and methods*), we showed that control samples exhibited a uniform blue fluorescence on their surfaces, whereas cells shifted to hyperosmotic medium (0.8 M sucrose) showed cortical fluorescent patches (Figure 5a, right panel). Several Calcofluor patches overlapped with UapA-GFP patches (highlighted with arrows). These results strongly suggest that invaginated areas of the plasma membrane are rapidly filled with cell wall material, either through *de novo* synthesis or reorganization of pre-existing periplasmic material. Similar observations were reported in yeast (Slaninová et al. 2000) and plants (Komis et al. 2002). The simplest explanation of all the above results is that fluorescent patches obtained with different markers represent plasma membrane invaginations, rather than specific microdomains with distinct lipid composition.

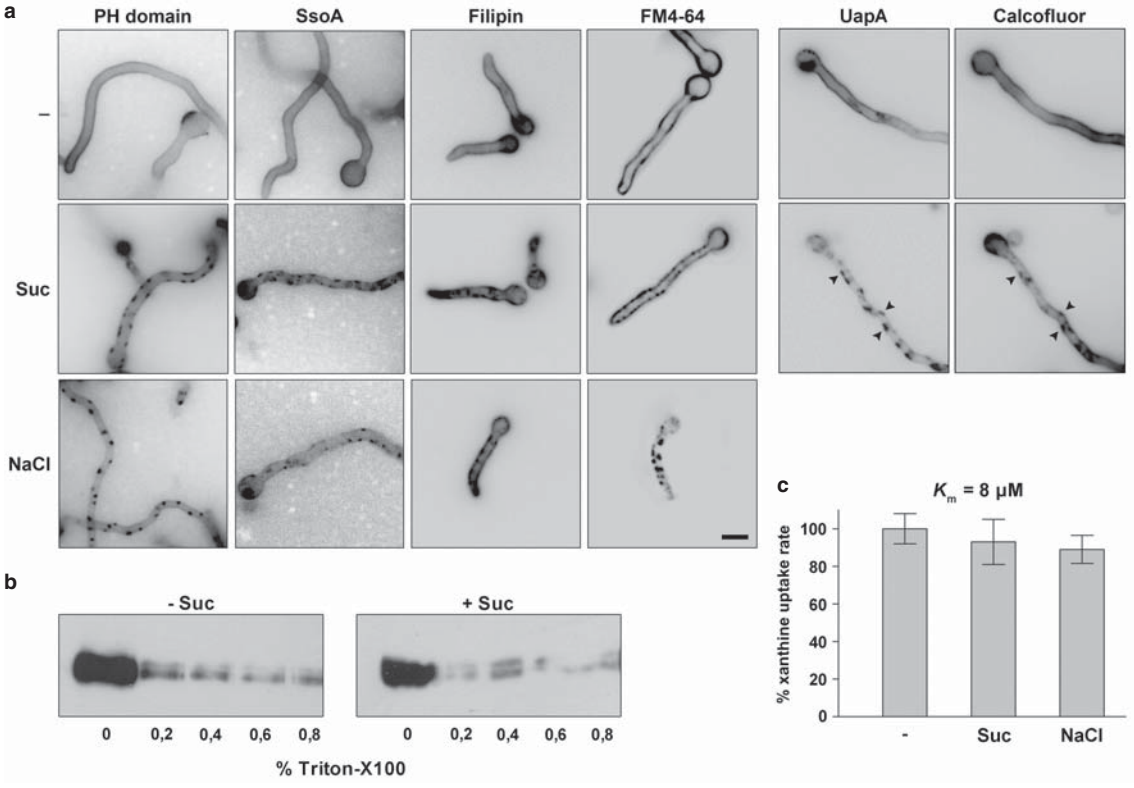


Figure 5. (a) Fluorescent patches detected with membrane-associated molecular markers other than transporters in hypertonic conditions. 'PH domain' is a GFP-tagged duplication of the PLC-δ1 PH domain which acts as an exclusive marker for the plasma membrane through its high affinity binding of PI(4,5)P_2 lipids. SsoA is a GFP-tagged t-Snare exocytic protein that attaches to the inner leaflet of the plasma membrane. Filipin and FM4-64 are fluorescent lipophilic markers labeling the plasma membrane under specific conditions (see *Experimental* section). Calcofluor white staining (see *Materials and methods*) showing overlap of UapA-GFP patches with deposition of cell wall material (highlighted with arrows). (b) Extractability of UapA-GFP by Triton X-100 from plasma membranes is identical in standard media and after exposure to hypertonic treatment (0.8 M sucrose, 10 min). (c) UapA-mediated (*alcA*$_p$-UapA-GFP) ^{3}H-xanthine transport capacity in standard media and after exposure to hypertonic treatment (0.8 M sucrose, 10 min). The K_m value of UapA-GFP (*alcA*$_p$-UapA-GFP) for xanthine, established in hypertonic media, is also shown (8 μM). For details of uptake studies, see *Experimental* section.

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

Hypertonic media elicit transient blockage of endocytosis and growth arrest

Sucrose has been reported to be a specific clathrin-dependent inhibitor of receptor and transporter endocytosis in mammalian cells (Heuser and Anderson 1989). We tested whether sucrose or other hypertonic media have an effect on endocytosis of UapA-GFP. We have recently showed the existence of two distinct, but converging endocytic pathways concerning the turnover of UapA in response to the presence of NH_4^+ ions or substrates (uric acid or xanthine). The process of endocytosis can be easily monitored by epifluorescence or confocal microscopy and Western blot analysis using an anti-GFP antibody.

We observed that the addition of sucrose (0.8 M) or NaCl (0.5 M) prior to ammonium or uric acid abolished the endocytosis and turnover of UapA-GFP (Figure 6a, 6b). As expected, we also observed that in the presence of sucrose or NaCl, UapA-GFP molecules appeared in plasma membrane patches described earlier. The block in transporter endocytosis and turnover was confirmed by Western blot analysis, which showed the absence of free GFP in samples grown for the last hour in the presence of ammonium ions (NH_4) or uric acid (UA) under

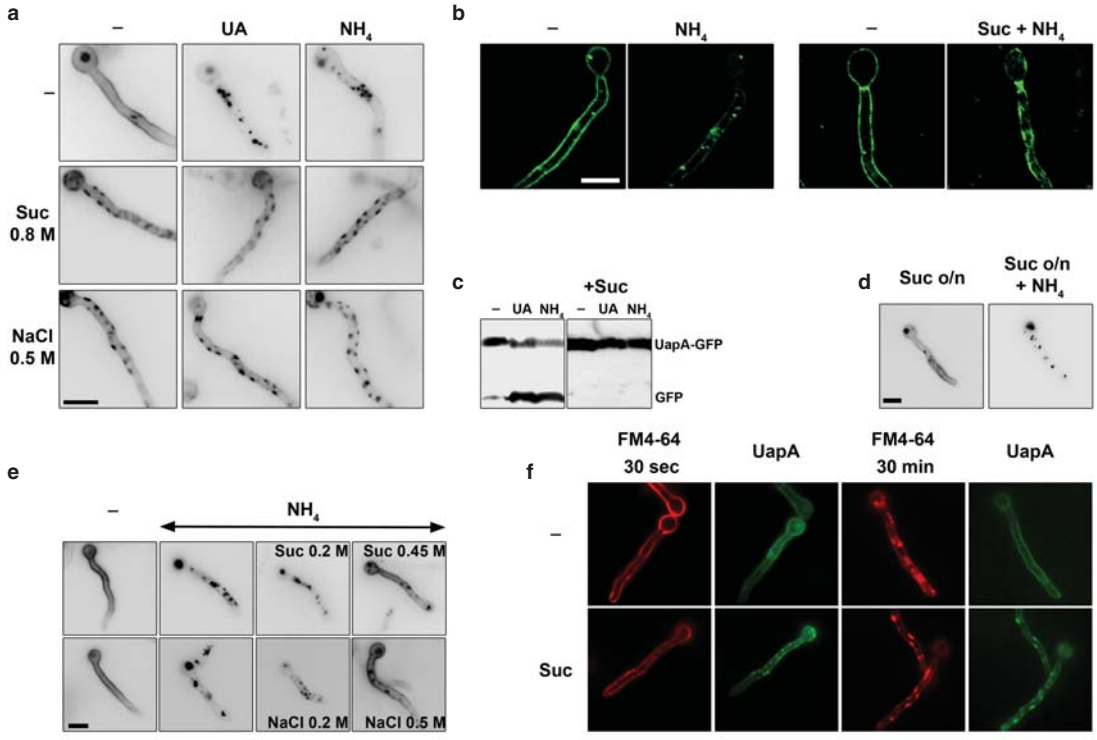


Figure 6. (a) Hypertonic media elicit a blockage of UapA-GFP endocytosis. In control samples UapA-GFP (*alcA*$_p$-UapA-GFP) endocytosis is elicited upon transfer for 1h to standard media with either 1 mM uric acid (UA) or 20 mM ammonium ions (NH_4) (Gournas et al. 2010). Under these conditions, UapA-GFP is internalized and degraded in the vacuoles (appearing as prominent fluorescent granules in the cytoplasm) through sorting in the MBV pathway. Here and in all subsequent Figures, unless otherwise stated, hypertonic conditions are imposed by transfer to standard media with 0.8 M sucrose or 0.5 M NaCl. Notice that after hypertonic treatment there are UapA-GFP cortical fluorescent patches but no vacuoles visible in conditions that normally lead to UapA-GFP turnover. (b) UapA-GFP (*alcA*$_p$-UapA-GFP) endocytosis by ammonium in a control sample and blockage of UapA-GFP endocytosis by ammonium after hypertonic treatment, as seen with inverted confocal laser microscopy in a single hypha. (c) Western blot analysis of membrane protein fractions corresponding to 2 h addition of UA or NH_4 and controls (–), probed with anti-GFP. The low mobility band corresponds to intact UapA-GFP (*alcA*$_p$-UapA-GFP) and the high mobility band to free GFP produced through vacuolar degradation of UapA (see text). (d) Recovery of NH_4-elicited endocytosis of UapA-GFP (*alcA*$_p$-UapA-GFP) after prolonged growth (16 h) in hypertonic media. (e) Minimal concentrations of sucrose or NaCl blocking endocytosis. (f) Effect of hypertonic treatment on FM4-64 internalization. The strain used is *alcA*$_p$-UapA-GFP. Control and hypertonic samples were treated as previously. Upon 15 min of staining on ice and 30 sec transfer to 25°C, FM4-64 labels only the plasma membrane, which appears uniform in control media but patchy after sucrose treatment. A practically identical labeling was obtained with UapA-GFP (left panels). After 30 min of incubation at 25° in untreated samples, FM4-64 still labeled the plasma membrane but was mostly localized in endosomal compartments. In sharp contrast, in sucrose treated samples, FM4-64 still labeled cortical patches associated with plasma membrane and no sign of internalization was evident. The cortical fluorescent patches labeled with FM4-64 are identical with those labeled with UapA-GFP (right panels). This Figure is reproduced in colour in the online version of *Molecular Membrane Biology*.

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

hypertonic treatment (Figure 6c). The appearance of free GFP is a well-established marker of endocytosis and vacuolar turnover of UapA-GFP and other GFP-tagged transporters (Gournas et al. 2010). The blockage in UapA-GFP endocytosis is transient, as its internalization recovers with kinetics practically identical to those of patch disassembly after longer exposures to hypertonic media (Figure 6d). In addition, the minimal concentration of hypertonic solutes blocking UapA-GFP endocytosis was practically identical to that leading to plasmolysis (~0.45 sucrose, ≥0.2 M NaCl) (Figure 6e).

Interestingly, Figure 6f shows that sucrose also blocked the constitutive internalization of the lipophilic marker FM4-64, strongly suggesting that tonicity has a global negative effect on both clathrin-mediated and fluid-phase endocytosis (discussed later).

In the course of the experiments described above, we noticed a significant delay in growth rate in samples exposed to hypertonicity. Figure 7a shows that this delay is maximal in media containing a non-catabolic carbon source such as fructose (0.1%) (40% reduction in colony radius), while it is more moderate in carbon catabolite repressing (1% glucose) media (20% reduction). Figure 7b shows a quantification of this growth arrest expressed as reduction in average hyphal length after hypertonic treatment (20–40% reduction in germ tube length). The delay in growth recovered after longer exposures to hypertonic media, as did the appearance of fluorescent patches and the block in endocytosis (not shown).

Hypertonicity affects actin dynamics and thus blocks endocytosis

A block in endocytosis can occur at several steps concerning the formation and internalization of the endocytic vesicle. To address this question we examined how basic elements of this process are affected by tonicity. In particular, we examined the cellular organization of well-characterized upstream (SlaB) and downstream (AbpA) endocytic factors, as well as that of tropomyosin (TpmA), tagged with either GFP or mRFP, under standard or hypertonic growth conditions. SlaB (Araujo-Bazán et al. 2008) is a Sla2p *S. cerevisiae* orthologue (Wesp et al. 1997), which acts as a well-characterized endocytosis regulator involved in the formation of early actin patch components (Newpher et al. 2005). In particular, Sla2p regulates the association of the clathrin endocytic machinery with actin polymerization (Newpher and Lemmon 2006). AbpA (Araujo-Bazán et al. 2008) is true homologue of Abp1p in *S. cerevisiae*, which is a late endocytic vesicle formation component. It appears near the end of Sla2p lifetime, is localized exclusively at cortical endocytic actin filaments/patches (Huckaba et al. 2004, Quintero-Monzon et al. 2005) and does not associate with actin cables (Huckaba et al. 2004). In *A. nidulans*, AbpA and SlaB are strongly polarized in hyphae, forming a ring that embraces the hyphal tip, leaving an area of exclusion at the apex (Araujo-Bazán et al. 2008). AbpA localizes at highly motile and transient peripheral foci overlapping with actin patches, which predominate in the tip (Taheri-Talesh et al. 2008). SlaB also localizes at peripheral foci, but these are markedly more abundant and cortical than those of AbpA (Araujo-Bazán et al. 2008). Based on SlaB and AbpA cellular dynamics, it has been proposed that spatial association of exocytosis with endocytosis at the fungal tip underlies hyphal growth. Interestingly and unlike the case in *S. cerevisiae*, SlaB is an essential gene revealing a major role of endocytosis in filamentous fungal growth. Tropomyosin (TpmA) is a major actin-binding protein that regulates actin mechanics (Stewart 2001). A GFP-TpmA fusion has been used to image actin cables, which was not feasible with

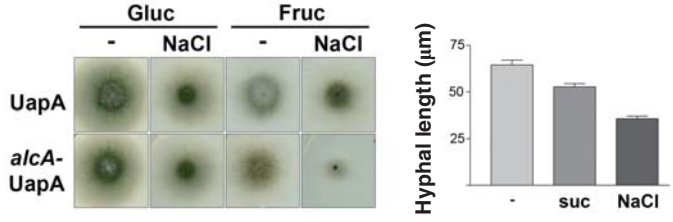


Figure 7. Hypertonic media elicit growth arrest of *A. nidulans.* (a) Growth tests of two isogenic strains expressing UapA-GFP from either its native promoter (used for Figure 1) or from the *alcA* promoter (used for all other Figures). 0.5 NaCl was used for hypertonic treatment and tests were carried out in MM with fructose (0.1%) or glucose (1%), as carbon sources. NaCl led to a reduction of both the diameter of colonies and conidiospore production. The reduction of growth was stronger in fructose media. (b) Reduction of hyphal length upon addition of either 0.8 M sucrose or 0.5 M NaCl for 4 h in the strain expressing $alcA_p$-UapA-GFP grown in fructose media. This Figure is reproduced in colour in the online version of *Molecular Membrane Biology.*

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

GFP-actin fusions, in *A. nidulans* (Pearson et al. 2004, Taheri-Talesh et al. 2008). GFP-TpmA is concentrated near the apex and at forming septa (Pearson et al. 2004, Taheri-Talesh et al. 2008), labels actin cables along the hyphae, but does not seem to co-localize with endocytic actin patches.

Figure 8a (upper panels) shows that, as expected, SlaB and AbpA form cortical foci which are mostly concentrated at the tip of hyphae, whereas TpmA has a rather diffuse localization in the cytosol, but also clearly labels actin cables along the hyphal axis and the tip region. The lower panels in Figure 8a show that neither sucrose nor NaCl affected the cortical and polar appearance of SlaB-GFP or AbpA-mRFP foci, whereas hypertonic media dramatically modified the cellular localization of GFP-TpmA. More specifically, fluorescence is not any longer associated with actin cables and the tips of hyphae, but is now apparent as diffuse cytosolic fluorescence and in scattered cortical foci along the axis of hyphae. This picture constitutes strong evidence that hypertonic media modify actin dynamics, rather than the formation of cortical endocytic complexes *per se*, probably through immediate actin depolymerization followed by rapid localized re-polymerization. A similar conclusion has been proposed for the effect of tonicity in plants (Komis et al. 2002).

We also tested how actin depolymerization triggered by Latrunculin B (Lat-B) (Taheri-Talesh et al. 2008) affects plasmolysis and transporter

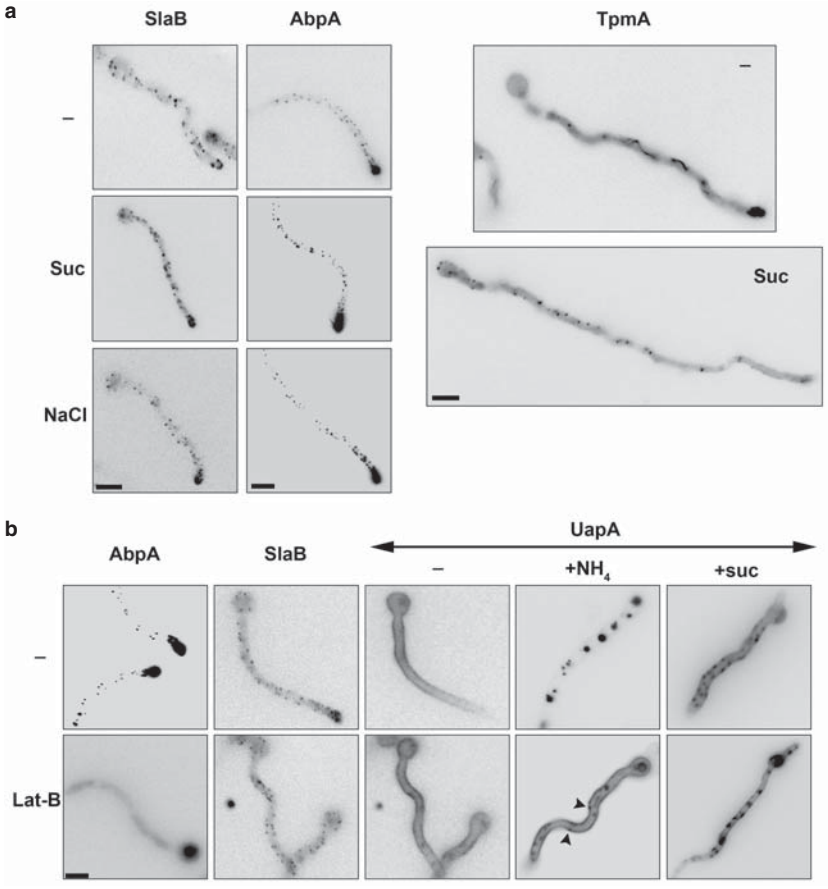


Figure 8. Hypertonicity and Lat-B effects on actin dynamics and the endocytic machinery. (a) Cellular localization of SlaB, AbpA and of TpmA, tagged with either GFP or mRFP, under standard or hypertonic growth conditions. Samples were treated as previously described. SlaB-GFP and AbpA-mRFP form cortical foci which predominate at the tip of hyphae under all conditions. GFP-TpmA in standard conditions (–) labels diffusely the cytocol and more strongly actin-like cables along the hyphal length and the tip. In hypertonic conditions (Suc) labeling of the actin cables and the tip disappears and scattered cortical patches appear along the hyphal length. (b) Effect of Lat-B (50 μM) on the cellular localization of UapA (-GFP or -mRFP tagged) in standard (–), endocytic (NH_4) or hypertonic (Suc) conditions. The effect of Lat-B on AbpA-GFP and SlaB-GFP was also examined as a control. Lat-B leads to the disassembly of all AbpA patches as expected (Araujo-Bazán et al. 2008), but has a minor effect on SlaB, as only the patches at the tip seem to disassemble. Lat-B has no effect on either the normal uniform localization of UapA in the plasma membrane in standard media (–) or on the appearance of UapA-specific fluorescent patches (plasmolysis) in hypertonic media (Lat-B + Suc and Lat-B + NaCl). In contrast, Lat-B blocked the internalization of UapA by NH_4. Note that in the latter case, UapA cortical foci are also visible (highlighted with arrows).

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

endocytosis. As a control of Lat-B action, we followed its effect on AbpA, but also on SlaB. Figure 8b shows that Lat-B led to complete disassembly of AbpA patches, as expected (Pantazopoulou and Penalva 2009), but had a moderate apparent effect on SlaB patches, more evident at the tip. This might be due to the fact that, unlike AbpA, SlaB regulates F-actin polymerization but contains a $PI(4,5)P_2$ binding domain that contributes to its plasma membrane localization. Lat-B had no effect on either the localization of UapA-GFP in the plasma membrane, or on the appearance of UapA-GFP cortical patches (plasmolysis), but blocked UapA-GFP endocytosis by ammonium (Figure 8b). Therefore, both hypertonicity and Lat-B blocked endocytosis, suggesting that hypertonicity, similarly to Lat-B, might act through an effect on actin dynamics.

Hypertonic conditions elicit similar phenomena in S. cerevisiae as in A. nidulans

We tried the effect of similar conditions and studied the response of *S. cerevisiae* to hypertonicity. In these studies, we used a strain expressing a functional GFP-tagged version of the lactate (Jen1p) permease, a transporter that in standard media labels uniformly the plasma membrane. Jen1p is endocytosed and degraded through the MVB pathway in response to the presence of a preferred carbon source such as glucose.

Figure 9 shows that both sucrose and NaCl lead to the appearance of prominent Jen1p-specific fluorescent patches. These patches are clearly distinguishable from the Fur4p-specific MCC foci observed in the standard media (see Introduction), the former being larger and extended towards the cytoplasm as expected for plasma membrane invaginations. In addition, Figure 9 also shows that under hypertonic conditions, the endocytosis of Jen1p by glucose is totally blocked. As in *A. nidulans*, patch appearance and blockage of endocytosis show similar kinetics and both phenomena recover after 10–14 h in hypertonic media (not shown). Finally, similarly to *A. nidulans*, hypertonic media elicited a growth arrest, which has also been observed by others (Slaninová et al. 2000, Hohmann et al. 2007). A notable difference between the response of the two fungi to hypertonicity was that *S. cerevisiae* proved more resistant than *A. nidulans* to tonicity, that is, two-fold higher concentrations of sucrose (1.6 M) or NaCl (1 M) were needed to elicit plasmolysis, blockage of endocytosis and growth arrest. Similar results were also obtained with a second *S. cerevisiae* transporter (Fur4p) (results not shown).

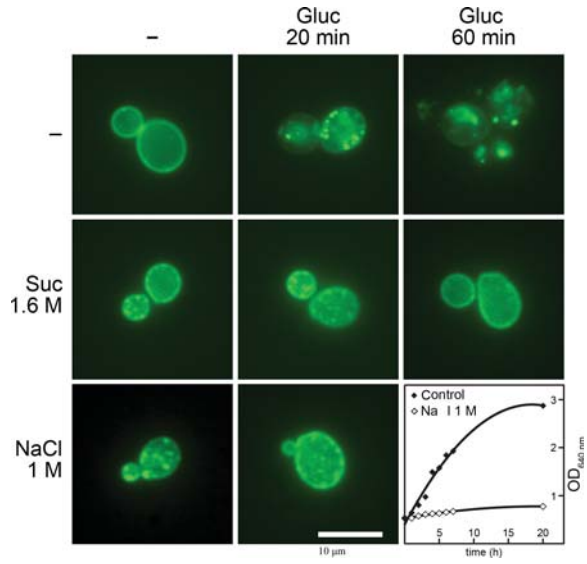


Figure 9. Hypertonic conditions elicit similar phenomena in *S. cerevisiae* as in *A. nidulans*. Epifluorescence microscopy images of a *S. cerevisiae* strain expressing a functional Jen1p-GFP chimeric transporter are shown. Jen1p-GFP is expressed uniformly in the plasma membrane under standard conditions of induction (–) but is rapidly internalized (20 min) and eventually degraded in the vacuole (60 min) upon addition of 1% glucose (Paiva et al. 2009). Hypertonic treatment (1.6 M sucrose or 1 M NaCl) for 1 min leads to the appearance of mostly cortical fluorescent patches and shows no evidence of internalization or degradation of Jen1p-GFP by glucose. The last panel shows the growth arrest elicited by addition of 1 M NaCl in the Jen1p-GFP strain at an $OD_{640\ nm}$ of 0.5. For more technical details, see the *Experimental* section. This Figure is reproduced in colour in the online version of *Molecular Membrane Biology*.

Discussion

Using several transporters and other membrane-associated markers tagged with GFP or mRFP, but also fluorescent lipophilic probes, we directly showed that various moderate (within the osmoregulatory range) hypertonic media lead to rapid localized plasmolysis, growth arrest and blockage of endocytosis in *A. nidulans* and *S. cerevisiae*. These phenomena are reversed within minutes when the hypertonic media are washed-out. If the hypertonic media persist, deplasmolysis and recovery of endocytosis initiate after 2–8 h, depending on tonicity strength, although full reversal might take up to 14 h. Recovery to normal growth rate is slower, but this depends on the fungus and the agent used to elicit hypertonicity (not shown).

The effects of hypertonic treatment on fungi have been extensively studied before. Yeast cells respond to increased tonicity by water loss, cell shrinkage, cessation of growth associated with diminished translational capacity, rapid closure of the glycerol export channel Fps1, remodeling of the actin cytoskeleton

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

and a loss of cell polarity (for review, see Hohmann et al. 2007). The phenomena are transient and recover through gradual accumulation of solutes, mostly glycerol, as a consequence of the activation of genes of the so-called high-osmolarity glycerol (HOG) pathway. Similar responses have been observed in filamentous fungi, mostly *Neurosporra crassa* (Lew and Nasserifar 2009), but also in plants (Komis et al. 2002). A recent publication has shown that under extreme and persisting osmotic conditions (out of the osmoregulatory range) the plasma membrane of *S. cerevisiae* is functionally and structurally reorganized irreversibly, which in turn leads to cell death (Dupont et al. 2010). This work and two other publications in fungi (Kelavkar et al. 1993, Slaninová et al. 2000) have shown that responses to different degrees of hypertonic treatment include the rapid formation of deep plasma membrane invaginations or localized plasmolysis.

Our work strongly supports, by *in vivo* direct approaches, the previous findings concerning two major responses of fungi to moderate hypertonic media: first, the partial or localized plasmolysis and shrinkage of cells due to water loss, and second, growth arrest. It further investigates the specificity and kinetics of these effects, showing that plasmolysis is practically immediate (<1 min), tonicity-dependent rather than solute-dependent, never complete, reversible and transient, whereas growth arrest is also transient, but slower to recover than plasmolysis. Furthermore, we show for the first time, that the invaginated part of the membrane does not seem to have a distinct lipid composition, and that transporters embedded in it are fully functional. The first conclusion arises from *in vivo* microscopic evidence using specific lipophilic markers (Filipin, FM4-64 and the $PI(4,5)P_2$-binding marker (a duplication of the PH domain of PLC-δ1) and biochemical evidence showing that transporter membrane-extractability is not affected by hypertonic treatment. The second conclusion came from direct transport kinetics measurements using radiolabelled substrates. Furthermore, transporter-mediated uptake assays showed that there is no diffusion of radiolabelled substrates within the cells, a strong indication that the *A. nidulans* plasma membrane and lipid composition remain intact under the hypertonic treatment used. Thus, although the originally observed patches using GFP-tagged transporters resembled specific plasma membrane microdomains, such as the yeast MCC or MCP compartments, which all host transporters, they proved not to be so. The simplest explanation of the apparent fluorescence accumulation detected by using FM4-64, filipin, SsoA or the PH domain markers is an increase in plasma membrane surface due to infoldings.

We also directly showed that hypertonicity totally but transiently blocks the endocytosis of transporters. Several lines of evidence strongly support that this is due to a rapid effect of hypertonicity on actin dynamics, rather than due to the direct abolishment of clustering of cargoes in coated pits or the initial formation of membrane-associated endocytic complexes. Firstly, hypertonicity altered dramatically and rapidly the cellular localization of tropomyosin (GFP-TpmA), but not that of the endocytic cortical markers SlaB and AbpA, which act upstream from the pinching-off of endocytic vesicles. Using the GFP-TpmA marker, we detect the rapid disassembly of actin cables, which constitute the major machinery for the internalization of endocytic vesicles. Secondly, hypertonicity blocked the endocytosis of FM4-64, a marker of bulk fluid-phase endocytosis which, to our knowledge, operates by an actin-dependent but also a coated pit-independent mechanism (Vida and Emr 1995). In line with this observation, Dupont et al. (2010) have shown a similar block of FM4-64 endocytosis in yeast cells exposed to moderate hypertonic media. Thirdly, the abolishment of ammonium-elicited UapA-GFP endocytosis by Lat-B is also in line with an effect on actin dynamics. Despite the fact that this drug has a global effect on actin filament polymerization and thus the endocytic machinery, we noticed that in Lat-B treated cells exposed to ammonium ions, UapA-GFP, in addition to a uniform labeling of the plasma membrane, also appears in cortical foci. This observation suggests that UapA-GFP might well be clustered in upstream endocytic complexes/pre-vesicles, but these cannot be internalized. Thus, the simplest interpretation of our results is that hypertonicity elicits the modification of actin mechanics, rather than interfering with cargo clustering in cortical endocytic complexes. The observation that upon hypertonic treatment cables disappear and the actin patches redistribute over the cortex of hyphae has also been observed in *S. cerevisiae* (Slaninová et al. 2000) and plants (Komis et al. 2002). Evidently, the blockage of Jen1p endocytosis by hypertonic treatment in yeast, shown in Figure 9, should also take place through modification of actin dynamics.

Previous reports in vertebrate cells have shown that hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis (Daukas et al. 1983, Larkin et al. 1986, Heuser and Anderson 1989). In polymorphonuclear leukocytes, hypertonic media inhibited receptor-mediated uptake of the chemotactic peptide N-formylnorleucylleucylphenylalanine. Furthermore, it was shown that hypertonic medium prevented the clustering of surface molecules as indicated by the inhibition of capping of fluorescent concanavalin A

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

(Daukas et al. 1983). In human and chicken fibroblasts, TEM analysis has shown that hypertonic cells display empty clathrin 'microcages' rather than normal coated pit lattices, with concomitant loss of normally clustered low density lipoprotein (LDL) receptors observed in untreated cells. Upon return to normal medium, these changes reverse. The authors propose that hypertonic treatment causes coated pits to disintegrate, while clathrin becomes unavailable and endocytosis is blocked (Heuser and Anderson 1989). Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of SlaB/Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast (Newpher and Lemmon 2006). Thus, we cannot formally exclude that hypertonic media also have a negative effect on clathrin function in fungi. However, unlike vertebrate cells where fluid-phase endocytosis and endosome turnover, detected by FM4-64, is not blocked by hypertonicity, in *A. nidulans* FM4-64 internalization is totally blocked by both sucrose and NaCl, a result incompatible with a sole effect on clathrin. Of course, our results might also reflect differences in the molecular mechanisms employed by fungal (or plant) cells, compared to animal cells, to respond to hypertonicity.

Last but not least, this work establishes that moderate hypertonic treatment (within the osmoregulatory range) constitutes a transient and reversible physiological inhibitor of fungal endocytosis. A similar block in endocytosis seems to occur in vertebrates and we predict that a similar situation might take place in plants. This is of primary importance for research in systems, such as *A. nidulans* and other filamentous fungi or even more complex cells, where genetic blocks in endocytosis and in cargo trafficking are usually lethal. Blocking endocytosis by sucrose or NaCl will permit us to ask novel questions on transporter trafficking, recycling and turnover through alternative pathways. We are currently using this approach for studying the direct sorting of transporters from the Golgi to the vacuole and how this is affected by lipid composition.

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

Acknowledgements

We are extremely grateful to Dr Areti Pantazopoulou for critical discussions, her help in microscopy and for performing the deconvolution analysis of images at CSIC/CIB (Madrid), and to Dr Miguel Angel Peñalva (CSIC/CIB) for critical discussions and sharing molecular markers and strains. We thank the students Andreas Pavlides and Fivos Borbolis (Faculty of Biology, University of Athens) for preliminary experiments in initial stages of this work. We thank Prof. Margarida Casal for her generous hospitality at her lab in Universidade do Minho (Braga, Portugal), where part of this work was carried out during a sabbatical of GD and *Erasmus* visits of MK and VB. We also thank Mrs Goretti for her technical help with the confocal microscope at the Medical School of Universidade do Minho and Dr Berl Oakley (Ohio State University) for the GFP-TpmA strain, Prof. R. Haguenauer-Tsapis (Institut Jacques Monod, Paris VII) and Assoc. Prof. S. Paiva (Universidade do Minho) for the Fur4p-GFP and Jen1p-GFP strains, respectively. We also thank Dr Sotiris Amillis for help in making the Figures and Dr Herlander Azevedo (Universidade do Minho), Prof. Basil Galatis and Ass. Prof. Panagiotis Apostolakos (Faculty of Biology, University of Athens) for helpful discussions. Finally, we thank Prof. Claudio Scazzocchio (Imperial College) for comments on the manuscript and the unknown referee who suggested to us an important recent publication relevant to this work. C.G was supported by I.K.Y.

Declaration of interest: This work was carried out through a minimal support from Athens University and the *Erasmus* program.

References

Abenza JF, Galindo A, Pantazopoulou A, Gil C, De Los Ríos V, Peñalva MA. 2010. *Aspergillus* RabBRab5 integrates acquisition of degradative identity with the long distance movement of early endosomes. Mol Biol Cell 21:2756–2769. PMID: 20534811.

Amillis S, Cecchetto G, Sophianopoulou V, Koukaki M, Scazzocchio C, Diallinas G. 2004. Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. Mol Microbiol 52:205–216.

Amillis S, Hamari Z, Roumelioti K, Scazzocchio C, Diallinas G. 2007. Regulation of expression and kinetic modeling of substrate interactions of a uracil transporter in *Aspergillus nidulans*. Mol Membr Biol 24:206–214.

André B, Haguenauer-Tsapis R. 2004. Membrane trafficking of yeast transporters: Mechanisms and physiological control of downregulation. Top Curr Genet 273–323.

Apostolaki A, Erpapazoglou Z, Harispe L, Billini M, Kafasla P, Kizis D, Penalva MA, Scazzocchio C, Sophianopoulou V. 2009. AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. Eukaryot Cell 8:339–352.

Araujo-Bazán L, Penalva MA, Espeso EA. 2008. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol 67:891–905.

Belgareh-Touze N, Leon S, Erpapazoglou Z, Stawiecka-Mirota M, Urban-Grimal D, Haguenauer-Tsapis R. 2008. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. Biochem Soc Trans 36:791–796.

RIGHTSLINK

Blondel MO, Morvan J, Dupré S, Urban-Grimal D, Haguenauer-Tsapis R, Volland C. 2004. Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. Mol Biol Cell 15:883–895.

Cecchetto G, Amillis S, Diallinas G, Scazzocchio C, Drevet C. 2004. The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. J Biol Chem 279:3132–3141.

Daukas G, Lauffenburger DA, Zigmond S. 1983. Reversible pinocytosis in polymorphonuclear leukocytes. J Cell Biol 96: 1642–1650.

Diallinas G. 2008. Biochemistry. An almost-complete movie. Science 322:1644–1645.

Dupont S, Beney L, Ritt JF, Lherminier J, Gervais P. 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. Biochim Biophys Acta 1798:975–985.

Dupré S, Haguenauer-Tsapis R. 2003. Raft partitioning of the yeast uracil permease during trafficking along the endocytic pathway. Traffic 4:83–96.

Dupré S, Urban-Grimal D, Haguenauer-Tsapis R. 2004. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. Biochim Biophys Acta 1695:89–111.

Erpapazoglou Z, Froissard M, Nondier I, Lesuisse E, Haguenauer-Tsapis R, Belgareh-Touze N. 2008. Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. Traffic 9:1372–1391.

Forment JV, Flipphi M, Ramon D, Ventura L, Maccabe AP. 2006. Identification of the mstE gene encoding a glucose-inducible, low affinity glucose transporter in *Aspergillus nidulans*. J Biol Chem 281:8339–8346.

Gorfinkiel L, Diallinas G, Scazzocchio C. 1993. Sequence and regulation of the uapA gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. J Biol Chem 268:23376–2381.

Gournas C, Amillis S, Vlanti A, Diallinas G. 2010. Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. Mol Microbiol 75:246–260.

Grossmann G, Opekarova M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W. 2007. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. EMBO J 26:1–8.

Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, Opekarová M, Tanner W. 2008. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. J Cell Biol 183:1075–1088.

Grossmann G, Opekarova M, Novakova L, Stolz J, Tanner W. 2006. Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell 5:945–953.

Helliwell SB, Losko S, Kaiser CA. 2001. Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. J Cell Biol 153:649–662.

Heuser JE, Anderson RG. 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. J Cell Biol 108:389–400.

Hohmann S, Krantz M, Nordlander B. 2007. Yeast osmoregulation. Methods Enzymol 428:29–45.

Huckaba TM, Gay AC, Pantalena LF, Yang HC, Pon LA. 2004. Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol 167:519–530.

Kelavkar U, Rao KS, Ghhatpar HS. 1993. Sodium chloride stress induced morphological and ultrastructural changes in *Aspergillus* repens. Indian J Exp Biol 31:511–515.

Komis G, Apostolakos P, Galatis B. 2002. Hyperosmotic stress-induced actin filament reorganization in leaf cells of *Chlorophyton comosum*. J Exp Bot 53:1699–1710.

Koukaki M, Vlanti A, Goudela S, Pantazopoulou A, Gioule H, Tournaviti S, Diallinas G. 2005. The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. J Mol Biol 350:499–513.

Larkin JM, Donzell WC, Anderson RG. 1986. Potassium-dependent assembly of coated pits: New coated pits form as planar clathrin lattices. J Cell Biol 103:2619–2627.

Leung J, Karachaliou M, Alves C, Diallinas G, Byrne B. 2010. Expression and purification of a functional uric acid-xanthine transporter (UapA). Protein Expr Purif 72:139–146.

Lew RR, Nasserifar S. 2009. Transient responses during hyperosmotic shock in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Microbiology 155:903–911.

Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W. 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. Mol Biol Cell 14:4427–4436.

Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W. 2004. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. J Cell Sci 117:6031–6041.

Newpher TM, Lemmon SK. 2006. Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast. Traffic 7:574–588.

Newpher TM, Smith RP, Lemmon V, Lemmon SK. 2005. In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. Dev Cell 9:87–98.

Paiva S, Vieira N, Nondier I, Haguenauer-Tsapis R, Casal M, Urban-Grimal D. 2009. Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast Jen1 transporter: Role of lysine 63-linked ubiquitin chains. J Biol Chem 284:19228–19236.

Pantazopoulou A, Diallinas G. 2007. Fungal nucleobase transporters. FEMS Microbiol Rev 31:657–675.

Pantazopoulou A, Lemuh ND, Hatzinikolaou DG, Drevet C, Cecchetto G, Scazzocchio C, Diallinas G. 2007. Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 44:627–640.

Pantazopoulou A. Penalva MA. 2009. Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. Mol Biol Cell 20:4335–4347.

Papageorgiou I, Gournas C, Vlanti A, Amillis S, Pantazopoulou A, Diallinas G. 2008. Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. J Mol Biol 382:1121–1135.

Pearson CL, Xu K, Sharpless KE, Harris SD. 2004. MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. Mol Biol Cell 15:3658–3672.

Penalva MA. 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. Fungal Genet Biol 42:963–975.

Quintero-Monzon O, Rodal AA, Strokopytov B, Almo SC, Goode BL. 2005. Structural and functional dissection of the Abp1 ADFH actin-binding domain reveals versatile in vivo adapter functions. Mol Biol Cell 16:3128–3139.

Reggiori F, Pelham HR. 2002. A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. Nat Cell Biol 4:117–123.

Rodríguez-Galán O, Galindo A, Hervás-Aguilar A, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2009. Physiological involvement in pH signaling of

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

Vps24-mediated recruitment of Aspergillus PalB cysteine protease to ESCRT-III. J Biol Chem 284:4404–4412.

Slaninová I, Sestak S, Svoboda A, Farkas V. 2000. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol 173:245–252.

Soetens O, De Craene JO, Andre B. 2001. Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. J Biol Chem 276:43949–43957.

Stewart M. 2001. Structural basis for bending tropomyosin around actin in muscle thin filaments. Proc Natl Acad Sci USA 98:8165–8166.

Strádalová V, Stahlschmidt W, Grossmann G, Blazikova M, Rachel R, Tanner W, Malinsky J. 2009. Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. J Cell Sci 122:2887–2894.

Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazán L, Dou X, Espeso EA, Penalva MA, Osmani SA, Oakley BR. 2008. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. Mol Biol Cell 19:1439–1449.

Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R. 2008. Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Mol Biol Cell 19:339–351.

Tavoularis S, Scazzocchio C, Sophianopoulou V. 2001. Functional expression and cellular localization of a green fluorescent protein-tagged proline transporter in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 33:115–125.

Tazebay UH, Sophianopoulou V, Scazzocchio C, Diallinas G. 1997. The gene encoding the major proline transporter of *Aspergillus nidulans* is upregulated during conidiospore germination and in response to proline induction and amino acid starvation. Mol Microbiol 24:105–117.

Umebayashi K, Nakano A. 2003. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. J Cell Biol 161:1117–1131.

Valdez-Taubas J, Harispe L, Scazzocchio C, Gorfinkiel L, Rosa AL. 2004. Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 41:42–51.

Vida TA, Emr SD. 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. J Cell Biol 128:779–792.

Vlanti A, Diallinas G. 2008. The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. Mol Microbiol 68:959–977.

Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P. 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. Nature 439:998–1003.

Wesp A, Hicke L, Palecek J, Lombardi R, Aust T, Munn AL, Riezman H. 1997. End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 8:2291–2306.

Mol Membr Biol Downloaded from informahealthcare.com by Dr George Diallinas on 11/26/10
For personal use only.

RIGHTSLINK

Ολοκληρώνοντας το μονοπάτι καταβολισμού πουρινών του *Aspergillus nidulans*

Χρήστος Γουρνάς, Natalie Oestreicher, Σωτήρης Αμίλλης, Γεώργιος Διαλλινάς και Claudio Scazzocchio

Είχαμε προηγουμένως ταυτοποιήσει με μεθόδους κλασσικής γενετικής και βιοχημείας όλα τα γονίδια του *Aspergillus nidulans* που προβλεπόταν να εμπλέκονται στον καταβολισμό πουρινών, μαζί με τα αντίστοιχά τους ρυθμιστικά γονίδια, καθώς και ένα γονίδιο που κωδικοποιούσε για μια καινούρια ενεργότητα υδροξυλίωσης της ξανθίνης. Σε αυτό το άρθρο ολοκληρώνουμε την περιγραφή του μονοπατιού καταβολισμού πουρινών με την ταυτοποίηση των δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για τα ένζυμα τα οποία καταλύουν την μετατροπή του προϊόντος οξείδωσης του ουρικού οξέος, από την οξειδάση του ουρικού, 5-υδροξυ-ισοουρικού οξέος, σε οπτικά ενεργό αλλαντοΐνη. Η ταυτοποίηση αυτών των επιπλέον γονιδίων επιβεβαιώνει την παντελή έλλειψη συστοίχισης των γονιδίων του *A. nidulans* που εμπλέκονται στον καταβολισμό πουρινών.

Fungal Genetics and Biology xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi

Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*

Christos Gournas [a], Nathalie Oestreicher [b,c], Sotiris Amillis [a], George Diallinas [a], Claudio Scazzocchio [d,e,*]

[a] *Faculty of Biology, Panepistemioupolis 15781, Athens, Greece*
[b] *Université Paris-Sud (XI), Bâtiment 360, 91450 Orsay, France*
[c] *Pôles Risques MSH-CNRS, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France*
[d] *Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud (XI), 91450 Orsay, France*
[e] *Department of Microbiology, Imperial College London, South Kensington Campus, Flowers Building, Armstrong Road, London SW7 2AZ, UK*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 February 2011
Accepted 7 March 2011
Available online xxxx

Keywords:
Purine utilisation
Urate oxidation
Aspergillus
Transcriptional regulation

ABSTRACT

We have previously identified by classical genetics and biochemistry, all the genes of *Aspergillus nidulans* predicted to be involved in purine utilisation, together with cognate regulatory genes and one gene encoding a novel xanthine hydroxylation activity. In this article we complete the description of the purine utilisation pathway with the identification of the two genes (*uaX* and *uaW*) encoding the enzymes catalysing the conversion of the product of urate oxidation by urate oxidase, 5-hydroxyisourate, to optically active allantoin. The identification of these additional genes confirms the complete absence of clustering of the genes involved in purine utilisation in *A. nidulans*.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans* was established by conventional mutant isolation and enzyme assays in the sixties (Darlington et al., 1965; Scazzocchio and Darlington, 1968; review in Scazzocchio, 1994). More recent work established the identity of the xanthine alternative utilisation mechanism (Cultrone et al., 2005, 2007; Montero-Morán et al., 2007), a step predicted on the basis of early genetic data (Darlington and Scazzocchio, 1968) and that of the enzyme catalysing the deamination of adenine to hypoxanthine (Ribard et al., 2003; Oestreicher et al., 2008). The mutations isolated in the first screen (Darlington et al., 1965) comprised mutations in all the predicted structural genes of the pathway (Scazzocchio and Darlington, 1968), in a post-translational modification of xanthine dehydrogenase (Amrani et al., 1999, 2000), in the specific transcriptional regulatory gene of the pathway, *uaY* (Scazzocchio et al., 1982; Suárez et al., 1995) and in urease co-factor synthesis (Mackay and Pateman, 1980, 1982; C. Scazzocchio, unpublished observations). These genes, have, with one exception, either been cloned by transformation of suitable mutants (Suárez et al., 1991; Oestreicher et al., 1993; Glatigny and Scazzocchio, 1995; Amrani et al., 1999) or could be easily identified in the genome of the organism, an identification facilitated by the correlation between the physical and genetic maps. Fig. 1 shows all experimentally determined and predicted gene/enzyme relationships in the purine utilisation pathway, including the genes described in this article. In particular, the gene encoding urate oxidase, *uaZ*, corresponds to ANID_09470.1, and it has been thoroughly characterised (Oestreicher et al., 1993; Oestreicher and Scazzocchio, 1993). The exception to this identification process is the *uaX* gene, where the mutations called UA1, UA3 and UA10 in Darlington et al. (1965), and *uaX1*, *uaX3*, and *uaX10* in subsequent work (Scazzocchio and Darlington, 1968; Scazzocchio and Gorton, 1977; Bailey et al., 1979) were mapped. These mutations were shown to be allelic, to map in chromosome VI and clearly impair, but not prevent completely, growth on uric acid (and its precursors) as sole nitrogen source, while not affecting growth on the product of uric acid oxidation, allantoin (Darlington et al., 1965; Scazzocchio and Darlington, 1968; Scazzocchio and Gorton, 1977). Paradoxically, strains carrying any of the *uaX* alleles maintain inducible urate oxidase activity albeit at somewhat lower values than wild type (Darlington et al., 1965; Scazzocchio, 1966; Scazzocchio and Darlington, 1968; Scazzocchio and Gorton, 1977). Recent work has shown that *uaX10* neither affects the transport activity and membrane localisation of the specific urate-xanthine transporter UapA, nor the peroxisomal localisation of urate oxidase (C. Gournas, G. Diallinas, unpublished observations).

The genes encoding the purine degradation pathway of *Bacillus subtilis* are clustered. A gene, *pucM*, necessary for uric acid

Abbreviations: HIU, 5-hydroxyisourate; OHCU, 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline.

* Corresponding author at: Department of Microbiology, Imperial College London, South Kensington Campus, Flowers Building, Armstrong Road, London SW7 2AZ, UK. Fax: +44 20 7594 3095.
E-mail address: c.scazzocchio@imperial.ac.uk (C. Scazzocchio).

1087-1845/$ - see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.fgb.2011.03.004

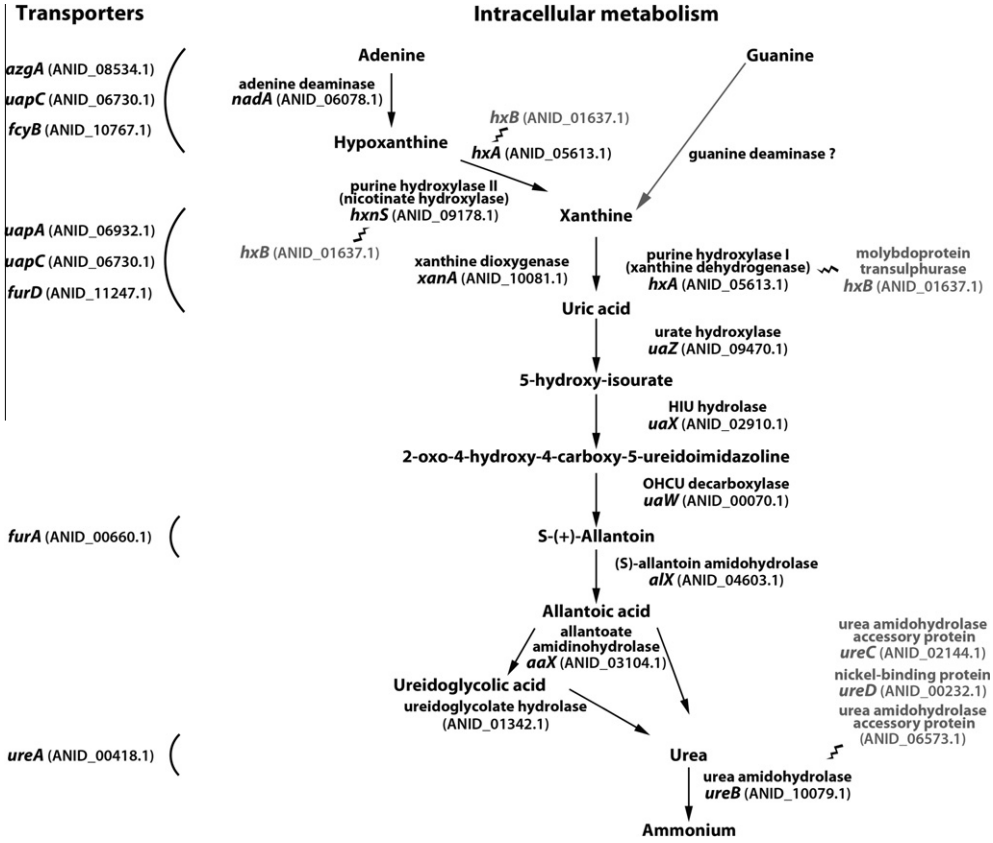


Fig. 1. Gene-enzyme relationships in the purine utilisation pathway of *A. nidulans*. The complete pathway of purine degradation to ammonium in *Aspergillus nidulans* is shown. Arrows connect the metabolic intermediates. Adjacent to each arrow the corresponding enzymatic reaction is shown, together with the name and identifier of the cognate gene. To the left of the figure, and opposite to their substrates, the transporters involved in the uptake of different metabolites are shown. The FcyB and FurD transporters play a minor role in the transport of purines, but are included for the sake of completion. In grey type we show genes and their cognate proteins involved in co-factor synthesis or modification. They are connected by a squiggly line to the relevant enzymes. When one gene is involved in more than one step, the complete entry is shown once and only the gene symbol and database entry is shown opposite additional steps. Experimental identification of each gene is described in: *nadA* (Ribard et al., 2003); *hxA* (Glatigny and Scazzocchio, 1995); *hxB* (Amrani et al., 1999, 2000); *xanA* (Cultrone et al., 2005); *uaZ* (Oestreicher and Scazzocchio, 1993); *azgA* (Cecchetto et al., 2004); *uapA* (Gorfinkiel et al., 1993); *uapC* (Diallinas et al., 1995); *fcyB* (Vlanti and Diallinas, 2008); *furD* (Amillis et al., 2007; Hamari et al., 2009); *furA* (Hamari et al., 2009); *ureA* (Abreu et al., 2010); *uaX* and *uaW* are described in this article. *alX* (Hamari et al., 2009) *aaX* and the putative ureidoglycolase gene were identified by similarity with the cognate genes of *S. cerevisiæ*, confirmed for *alX* and *aaX* by their known chromosomal locations. Experimental identification of *alX* will be published separately (S. Amillis and C. Scazzocchio, unpublished). Mutants in *ureB*, *ureC* and *ureD* were isolated in the early screen (Darlington et al., 1965; Mackay and Pateman, 1980, 1982) The genes were identified by similarity with their characterised counterparts of *Klebsiella ærogenes* (Lee et al., 1992) together with their chromosomal location. ANID_06573 was not identified in the genetic screen but is most probably the orthologue of the *K. ærogenes ureF* gene (Lee et al., 1992). *hxnS* encodes a nicotinate hydroxylase which accepts hypoxanthine but not xanthine as substrate (Lewis et al., 1978; Mehra and Coughlan, 1984). Its transcription is induced by nicotinate, but also by nitrogen starvation (Scazzocchio, 1973), thus it may play a physiological role in purine utilisation and/or recycling under these conditions. The gene has been identified by its strong similarity with *hxA* and its chromosomal location. Experimental identification of *hxnS* will be published elsewhere (R. Fernández-Martín., Z. Hamari, and C. Scazzocchio unpublished.). The unlinked *cnxABC*, *cnxE*, *cnxF*, *cnxG*, *cnxH* (Pateman et al., 1964; Unkles et al., 1999) and *cnxJ* genes (Arst et al., 1982) encode different steps in the biosynthesis of the molybdopterin co-factor which is essential of the activity of both HxA and HxnS (together with that of nitrate reductase) and are thus also integral part of the purine utilisation pathway, but are not shown in this scheme for the sake of clarity. Guanine is a nitrogen source for *A. nidulans* and thus it must be metabolised through this pathway. However, as no experimental work on the conversion of guanine, presumably to xanthine, is extant, nor has a guanine deaminase activity been characterised, a grey arrow indicates this predicted step.

utilisation, is adjacent to *pucL* encoding a bifunctional protein, which comprises a classical urate oxidase (Lee et al., 2005). Recently, based on chemical considerations and utilising an astute genomic approach, Ramazzina et al. (2006), demonstrated that, contrary to what was accepted for a long time, the oxidation of uric acid to allantoin involves not one, but three enzymatic steps. The first step, catalysed by the classical urate oxidase yields 5-hydroxy-isourate (HIU). HIU hydrolase converts HIU to 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline (OHCU). PucM of *B. subtilis* catalyses precisely this step. OHCU is in turn converted to dextrorotatory S-(+)-allantoin by OHCU decarboxylase. Interestingly HIU hydrolase shows clear sequence and structural similarities with vertebrate transthyretins, transport proteins of the thyroid hormone, which have probably originated from a duplication of an ancestral HIU hydrolase gene (Zanotti et al., 2006). HIU can convert slowly and non-enzymatically to allantoin, but these non-catalysed conversion yields racemic allantoin rather than the S-(+)-form (Ramazzina et al., 2006). In this work we show that in *A. nidulans* HIU hydrolase and OHCU decarboxylase activities are encoded by *uaX* and the hereby identified *uaW* genes respectively.

2. Materials and methods

2.1. Strains

All the *A. nidulans* strains used in this work are listed in Table 1. Standard genetic markers are described in http://www.gla.ac.uk/ibls/molgen/aspergillus/index.html. Gene disruptions were carried out in the TNO2A7 strain (Nayak et al., 2006). The *areA600* mutation introduces a stop codon at position 489 of the AreA protein (the wild-type protein being 719 residues long, Kudla et al., 1990) and corresponds to a null mutation. The *areA102* mutation,

Please cite this article in press as: Gournas, C., et al. Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. (2011), doi:10.1016/j.fgb.2011.03.004

Table 1
A. nidulans strains used in this study.

Strains	Genotype	Reference
CS2498	*pabaA1*	FGSC
CS1094	*fwA1 pyroA4 areA102*	Kudla et al. (1990) and Ravagnani et al. (1997)
CS3095	*biA1 sB43 areA600*	Kudla et al. (1990)
CS2459	*wA3 pantoB100 uaY^{C}462*	Oestreicher and Scazzocchio (1995)
CS836	*yA2 pantoB100 uaY2 fpaD43*	Suárez et al. (1995)
TNO2A7	*pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuAΔ::argB*	Nayak et al. (2006)
alX4	*biA1 alX4*	Scazzocchio and Darlington (1968) and Roberts et al. (1979)
uaZ14	*uaZ14 pabaA1*	Oestreicher and Scazzocchio (1993)
hxA18	*hxA18 pabaA1*	Glatigny and Scazzocchio (1995)
uaX10	*uaX10 pantoB100*	Darlington et al. (1965), Scazzocchio and Darlington (1968), Bailey et al. (1979)
uaXΔ	*pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuAΔ::argB uaXΔ::pyr4*	This study
uaWΔ	*pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuAΔ::argB uaWΔ::pyr4*	This study

a Leu to Val change in residue 526, is an altered specificity mutation (Kudla et al., 1990; Ravagnani et al., 1997). The null mutation *uaY2* is a C to T transition at position +1173, which results in the introduction of an amber codon at position 392 of the UaY protein (the wild-type protein being 1060 residues long, Suárez et al., 1995). The *uaY^{C}462* mutation, a Ser to Leu change in residue 222, is a gain of function mutation, which affects differentially the expression of different genes under UaY control, resulting in various degrees of constitutive, hyperinducible and derepressed expression (Oestreicher and Scazzocchio, 1995; Cecchetto et al., 2004; Cultrone et al., 2007; Oestreicher et al., 2008). *hxA18* is a chain termination mutation at codon 148 of the *hxA* gene encoding purine hydroxylase I (Glatigny and Scazzocchio, 1995). *uaZ14* is a chain termination mutation after residue 131 in exon 2 of *uaZ*, leading to extremely low mRNA levels and absence of UaZ CRM (Oestreicher and Scazzocchio, 1993; Oestreicher et al., 1993). *alX4* a putative chain termination mutation (Roberts et al., 1979) results in complete absence of allantoinase activity even under fully inducing conditions (Scazzocchio and Darlington, 1968) and in toxicity when grown in the presence of allantoin or its precursors (Darlington and Scazzocchio, 1967). The *Escherichia coli* K-12 strain used in standard protocols was DH5α.

2.2. Media and growth conditions

The media and growth conditions for *A. nidulans* were according to Scazzocchio et al. (1982). *A. nidulans* transformation was carried out according to Koukaki et al. (2003). Growth tests were carried out in minimal media (MM) at 37 °C. Ammonium L (+) tartrate (5 mM), urea (5 mM), purines (0.1 mg/ml) or allantoin (1 mM) were used as sole N sources. Mycelia used for DNA preparation were grown as described in Oestreicher and Scazzocchio (1993). When not stated differently in the figure legend, the mycelia for RNA preparation were grown with shaking at 150 rpm for 10 h at 37 °C in suitably supplemented MM, in the presence of 5 mM urea as sole nitrogen source (non-inducing, non-repressing conditions, noted N). Induction was carried out by addition of 600 μM uric acid (condition I) and repression by addition of 5 mM final concentration of ammonium L (+) tartrate (condition R) for the last hour of growth. In the non-induced culture, urea was added again for the last hour. In condition RI, both uric acid and ammonium were added at the same time. Chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

2.3. DNA manipulations

To complement and sequence the *uaX10* mutation a 2149 bp PCR fragment, starting at position 273171 of chromosome VI contig 51, containing the putative ANID_02910.1 ORF, was amplified using wild-type total genomic DNA as template (Primer pairs 13, 14 see Table 2) and subsequently cloned at the *Sal*I restriction site of pGEM-*panB* (Cultrone et al., 2007). The resulting plasmid (p2910) was used to complement a *uaX10 pantoB100* strain. The same fragment was amplified from total genomic *uaX10* DNA, and sequenced to detect the respective mutation. The construction of gene deletion cassettes was based on the complementation of the *pyrG89* auxotrophic mutation by the orthologous *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. The *uaX* knockout cassette was constructed by sequential cloning of a 1042 bp fragment, starting at position 272781, and another 1051 bp fragment, starting at position 274867 of the chromosome VI contig 51, upstream and downstream of the putative *uaX* ORF, using restriction enzymes *Xba*I/*Spe*I and *Cla*I/*Kpn*I respectively (Primer pairs 1, 2 and 3, 4; Table 2). The *pyr4* selection marker, deriving from the plasmid pBS-*hulAΔ*C2 (Gournas et al., 2010) was then inserted using *Cla*I. Similarly, the construction of the *uaW* knockout cassette was achieved by sequential cloning of a 1031 bp fragment, starting at position 49417, and another 1021 bp fragment, starting at position 51194 of the chromosome VIII contig 3, upstream and downstream of the putative *uaW* ORF, using restriction enzymes *Kpn*I/*Cla*I and *Cla*I/*Spe*I respectively (Primer pairs 5, 6 and 7, 8; Table 2). The *pyr4* selection marker was again inserted using *Cla*I. Southern blot analyses of several *uaXΔ* transformants was carried out using a 1273 bp fragment, starting at position 272550, and a 936 bp fragment, starting at position 273925 of the chromosome VI contig 51, as probes for the upstream and ORF regions respectively (primer pairs 1, 2 and 9, 10; Table 2). To detect *uaW*, a 1272 bp fragment, starting at position 49177, and a 713 bp fragment, starting at position 50449 of the chromosome VIII contig 3 were used as probes for the upstream and ORF regions respectively (primer pairs 5, 6 and 11, 12; Table 2). Surprisingly the deletion of *uaW* resulted in defective growth in all media tested. This defective growth is an artefact of the inactivation marker used, *pyr4* of *N. crassa* and it disappears when the media is supplemented with uracil and uridine. This artefact illustrates both the position effects (no general impairment of growth is seen when the same marker is used to inactivate *uaX*) and the pitfalls that could be encountered when complementing the *pyrG89* mutation of *A. nidulans*, as recently described by Robellet et al. (2010). Once supplemented with uridine

Table 2
Oligonucleotides used in this study.

	Name	Sequence
1.	*uaX* 5′UTR *Xba*I F	5′-CCTCTAGACTAGATCCTGCATCATATTCCC-3′
2.	*uaX* 5′UTR *Spe*I R	5′-CGACTAGTGAAGACGAGGTGAATTGGAG-3′
3.	*uaX* 3′UTR *Cla*I F	5′-CGCGATCGATCGGAAAACGACGTTAGCTGC-3′
4.	*uaX* 3′UTR *Kpn*I R	5′-CGGGTACCCGTGATGACGCAACTTTGAG-3′
5.	*uaW* 5′UTR *Kpn*I F	5′-GTGGTACCGACCCCAACCTTGGAATGTG-3′
6.	*uaW* 5′UTR *Cla*I R	5′-CGACATCGATGTAGTTCGTCGTAATCTGAGC-3′
7.	*uaW* 3′UTR *Spe*I F	5′-GGACTAGTGGCTGTCAAGATAATGCAAGG-3′
8.	*uaW* 3′UTR *Xba*I R	5′-CATCTAGAGCTCACATACTGCAGAAGAC-3′
9.	*uaX* Probe ORF F	5′-CTCCTTCCAGCTGGAGTCTC-3′
10.	*uaX* Probe ORF R	5′-GACAAATGCGGCCATTTGCGC-3′
11.	*uaW* Probe ORF F	5′-ATGCCGTCTCTTCCCCAGCC-3′
12.	*uaW* Probe ORF R	5′-CCTCCAATCGAGACTGTACTC-3′
13.	ANID_02910.1 *Sal*I F	5′-GCGGTCGACGGGGTTATCGGAAATTCGCG-3′
14.	ANID_02910.1 *Sal*I R	5′-CAGGTCGACCGTTGGCGGCAGTTATCAG-3′

Please cite this article in press as: Gournas, C., et al. Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. (2011), doi:10.1016/j.fgb.2011.03.004

and uracil, the *uaW* deleted strains only showed the specific phenotype discussed in Section 3.

Plasmid extraction from *E. coli* and other DNA manipulations were as described by Sambrook et al. (1989). Routine PCR amplifications were carried out using GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega). Cloning and amplification of the gene deletion cassettes were carried out using Phusion® Flash High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). DNA fragments were purified from agarose gels using the Wizard PCR preps DNA purification system (Promega) or MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). DNA molecules used as gene-specific probes were labelled with [α-^{32}P] dCTP using the Random Hexanucleotide Primer kit and purified on MicroSpin™ S-200 HR columns, following the supplier's instructions (Roche Applied Science).

2.4. RNA manipulations

Total RNA was isolated from *A. nidulans* as described by Lockington et al. (1985), and northern-blots were carried out as described in Oestreicher and Scazzocchio (1993), modified as in Oestreicher et al. (2008). To monitor the RNA loading, an actin-specific probe was used. The actin (*acnA*) probe corresponds to the purified 2.5 kbp *Kpn*I-*Bam*HI fragment of pSF5 (Fidel et al., 1988). The *uaZ* probe was a 949 bp PCR fragment, starting at the position +40 (after the ATG) (Oestreicher and Scazzocchio, 1993). A 2.7 kbp *Xba*I fragment from pAN503 (Gorfinkiel et al., 1993) was used to detect the *uapA* messenger. The *uaX* probe was a 450 bp PCR fragment, starting at position 273994 of the chromosome VI contig 51 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html), ORF ANID_02910.1. The *uaW* probe was a 522 bp PCR fragment, starting at position 51107 of the chromosome VIII contig 3, which corresponds to the G of the putative ATG of ORF ANID_00070.1. The intensities of radioactive signal were quantified with a 400A Phosphoimager (Amersham Biosciences). Data were analysed with ImageQuant software (Molecular Dynamics). All northern-blot experiments were carried out (with one exception, see legend to Fig. 5A) in triplicate.

2.5. Bioinformatics and databases

Alignments were carried out with T-Coffee (Poirot et al., 2003; Notredame et al., 2000) in http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi and visualised with Boxshade http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html. *Aspergillus* sequences and their synteny were checked on http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html and (http://www.aspgd.org/). Other sequences were downloaded from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein. Putative peroxisomal localisation signals were identified using Target Signal Predictor Tool, http://www.peroxisomedb.org/Target_signal.php.

3. Results and discussion

3.1. The uaX gene encodes HIU hydrolase

The *uaX* mutations result in quite severely impaired growth on uric acid as nitrogen source, growth however, which catches up on further incubation (Scazzocchio, 1966, Fig. 2). Only one *uaX* allele is still available (*uaX10*), and it happens to be the less extreme mutation among those originally isolated. The *uaX10* allele has been precisely mapped in chromosome VI at 0.1 cM from *agaA*, the gene encoding arginase (ANID_02901.1, Bailey et al., 1979). A putative HIU hydrolase (showing 23% and 32% identities with the characterised HIU hydrolases from *Bacillus subtilis* and *Mus musculus* respectively) is ANID_02910.1, mapping at about 24 kb from *agaA* (ANID_02901.1), a larger distance than what was expected from the low recombination frequency. ANID_02910.1 shows complete conservation of all residues involved in the binding of the substrate (Fig. 3A) in the characterised HIU hydrolases (see below). The gene is conserved and located in a region of high synteny in all the available genomes of the Aspergilli (not recorded for *Aspergillus flavus* in databases, but revealed in a syntenic position with tblastn). Urate oxidase is a typical peroxisomal enzyme, and this also applies to *A. nidulans* (G. Langousis and G. Diallinas G. unpublished). It would be expected HIU hydrolase and OHCU decarboxylase also to be localised in the peroxisome. The extended N-tail of UaX contains the sequence ^{20}RLNLYQNHL, conserved in the *Danio rerio* sequence (Fig. 3A) and all other Aspergilli, which is a canonical PTS2 peroxisomal localization sequence [(R/K)(L/V/I/Q)XXXXX(H/Q)(L/A/F/I), Petriv et al., 2004, Target Signal Predictor Tool]. PST2 peroxisomal targeting is operational in *A. nidulans* (Hynes et al., 2008).

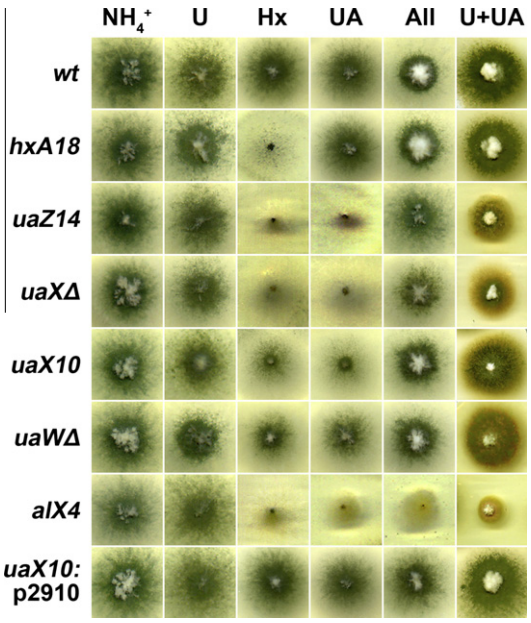


Fig. 2. Growth tests illustrating the impairment of uric acid utilisation of *uaX* and *uaW* mutations. *hxA18*, *uaZ14* and *alX4* are null mutations which result in complete absence of xanthine dehydrogenase, urate oxidase and allantoinase activities respectively. *uaX10*, *uaXΔ*, *uaWΔ* and *uaX10*:p2910 are described in this article (see Table 1 and Section 2). The wt control is CS 2498. Growth was tested on minimal medium containing, ammonium L (+) tartrate (NH_4^+), urea (U), hypoxanthine (Hx), uric acid (UA) or allantoin (All) as nitrogen sources. Inhibition by uric acid was tested in media containing urea as nitrogen source and saturated with uric acid (Darlington and Scazzocchio, 1967). Growth was tested at 37 °C, pH 6.8 for 48 h.

The identity of ANID_02910.1 with *uaX* was established by three independent experiments. Firstly, a plasmid (p2910) containing ANID_02910.1 complements *uaX10* (Fig. 2). Secondly, the *uaX10* mutation was identified as a C to T transition at position 274393 of contig 51, resulting in a P140S missense mutation. The P140 residue is located in a loop between the two carboxy-terminal β-sheets in the solved structures of HIU hydrolases, where two of the crucial active site residues lay. However, this residue is not strictly conserved, its place being occupied by an R in the zebrafish enzyme (Zanotti et al., 2006) and by a Q in the characterised proteins from *Salmonella dublin* (Hennebry et al., 2006) and *E. coli* (Lundberg et al., 2006). A proline residue at this position is however present in the *B. subtilis* PucM enzyme, and very highly conserved in the vertebrate transthyretins (Lundberg et al., 2006). Thirdly ANID_02910.1 was deleted (see Section 2). The resulting phenotype is similar to, but more extreme than, that of *uaX10* (Fig. 2).

Please cite this article in press as: Gournas, C., et al. Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. (2011), doi:10.1016/j.fgb.2011.03.004

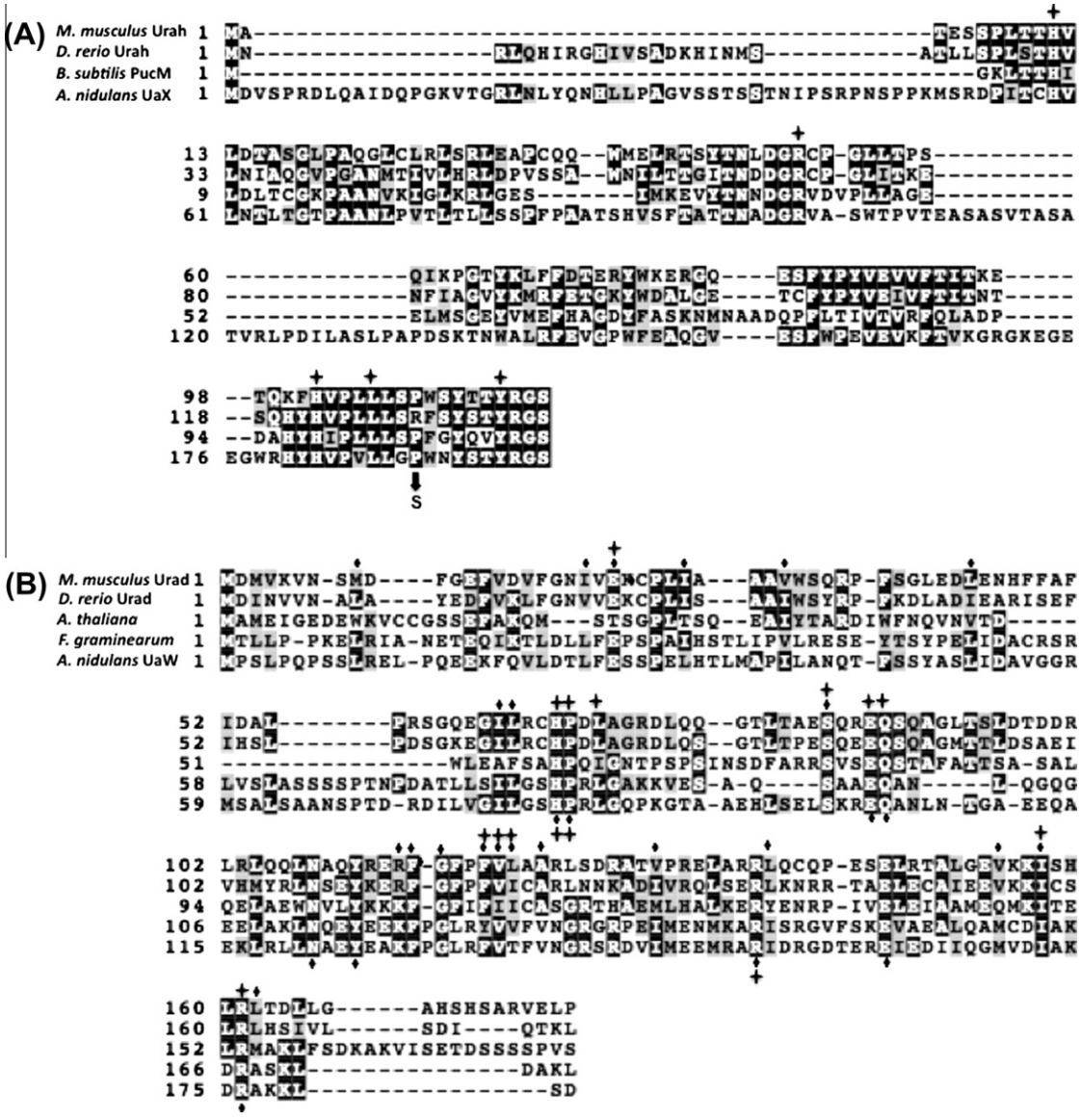
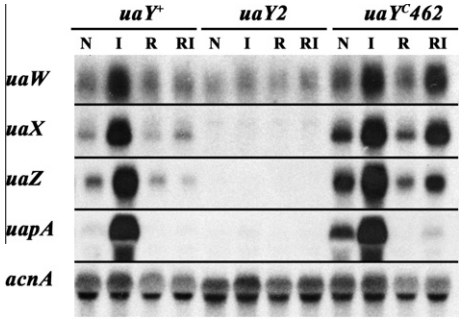


Fig. 3. Sequence comparisons of the UaX and UaW proteins. (A) T-Coffee alignment (see Section 2) of UaX and its biochemically (Ramazzina et al., 2006) and/or structurally (see below) characterised homologues. In the annotated sequence (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html) the *A. nidulans* protein starts with the methionine that is at position 51 in the sequence of this figure. We have chosen the upstream methionine as a putative translation start, as it is in phase with Met51, the intervening peptidic sequence is highly conserved among all the Aspergilli, and even partially with other distant eukaryotes (*D. rerio* in Fig. 3A). The residues indicated with a cross are conserved active site residues, as determined in the structures of the enzymes from *Salmonella dublin* (Hennebry et al., 2006) *Danio rerio* (Zanotti et al., 2006) and *Bacillus subtilis* (Jung et al., 2006). The *uaX10* mutation (P140S) is indicated by an arrow below the alignment. (B) T-Coffee alignment, visualised with Boxshade of UaW and its biochemically (Ramazzina et al., 2006) or structurally (see below) characterised homologues. The putative orthologue from *F. graminearum* is also included. Lozenges below the sequence indicate "absolutely conserved" residues in an alignment of 60 known or putative OHCU decarboxylases. Lozenges above the alignment indicate residues that in the same data set are conserved or substituted by isofunctional amino acids (Cendron et al., 2007). Crosses below the alignment indicate residues involved in catalysis in the enzyme from *A. thaliana* (Kim et al., 2007) Crosses above the alignment indicate the residues composing the substrate binding site of the *Danio rerio* enzyme (Cendron et al., 2007).

3.2. Identification of uaW, the gene encoding OHCU decarboxylase

One single *A. nidulans* sequence, ANID_00070.1, showing a 48% identity with a *Fusarium graminearum* ORF (FFSG_02706.3), previously reported as a putative OHCU decarboxylase (Ramazzina et al., 2006) was detected in Contig 3, Linkage group VIII. This ORF and its syntenic position are conserved among all the Aspergilli, with the apparent exceptions of *Aspergillus oryzæ* and *Aspergillus fumigatus Af293*. However, a tblastn search revealed orthologues also in these two organisms, in syntenic positions with the *A. nidulans* gene. The peptidic sequence shows a complete conservation of all residues reported by Cendron et al. (2007) as invariant in OHCU decarboxylases and excellent conservation of the substrate binding site, as determined for both the *Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2007) and *D. rerio* (Cendron et al., 2007) enzymes (Fig. 3B). Both hydrophobic residues lining the substrate pocket and polar and hydrophilic residues making contact with the substrate molecule are strictly conserved. In addition, the transcript of this gene, to be called *uaW*, is co-induced with *uaZ* and *uaX* (see below), thus ANID_00070.1 is a very good candidate to encode an OHCU decarboxylase. UaW does not seem to posses any known peroxisomal targeting sequence (using Target Signal Predictor). However, in *A. thaliana* the UaX and UaW homologues are fused, the peroxisomal PST2 sequence laying in the amino terminal of the UaX-like moiety (Reumann et al., 2007) which suggests that hetero-oligomerization of UaX and UaW may be



	uaY+				uaY2				uaYc462			
	N	I	R	RI	N	I	R	RI	N	I	R	RI
uaW	40	**100**	40	50	25	20	30	25	60	115	60	115
uaX	20	**100**	15	20	4	3	1	1	45	120	35	80
uaZ	15	**100**	15	5	1	1	1	1	35	110	15	35
uapA	5	**100**	2	2	1	1	1	1	25	105	2	5

Fig. 4. Expression of *uaX and uaW* is inducible, repressible by ammonium and dependent on UaY. The relevant *uaY* allele of each strain is shown above the panel. See Section 2 for growth conditions, strains and probe description. All cultures were grown on urea as nitrogen source for a total of 10 h, after 9 h the following metabolites were added at the concentrations indicated in Section 2: urea (N), uric acid (I), ammonium (R), and uric acid + ammonium (RI). The previously characterised regulation profile of *uaZ* and *uapA* (see text) was also tested in parallel in the same experiment. Below: Quantification of *uaW, uaX, uaZ* and *uapA* transcripts. The Phosphoimager readings were corrected using the corresponding *acnA* transcript signal intensity as a measure of RNA loading. All values are expressed in relation to the wild type mycelia induced by uric acid and correspond to the average values of three independent northern-blots. The maximal standard deviation (SD) values found are 19% for *uaW*, 12% for *uaX*, 15% for *uaZ* and 10% for *uapA*. The reference values (corresponding to the arbitrary value of 100) are shown in bold.

responsible for the localisation in the peroxisome of the latter protein. Alternatively, if UaW, is, as expected, peroxisomal, its localisation could rely on another yet unidentified peroxisomal targeting signal, similarly to the *A. nidulans* glyoxylate cycle enzyme isocytrate lyase (AcuD), which was shown to be peroxisomal (Hynes et al., 2008) without relying on any obvious PTS1 or PTS2 sequences.

The *uaW* gene was deleted (see Section 2). The inactivated strains show a minor defective growth on uric acid (and its precursors) while growing as the wild type on allantoin (Fig. 2). A moderate uric acid toxicity as described for *uaZ* mutations (Darlington and Scazzocchio, 1967) is also visible (Fig. 2), characterised by a typical accumulation of brown pigment in the mycelia when uric acid is present in excess (Fig. 2). The inactivation of *uaW* results in a less extreme phenotype than that of *uaX*. No candidate paralogue of *uaW* is present in the genome of *A. nidulans,* thus, the minor effect of the *uaW* deletion is more readily explained by the relatively efficient non-enzymatic conversion of OHCU to allantoin (Ramazzina et al., 2006). This mild phenotype co-segregates in crosses with the introduced *pyr4* marker.

3.3. uaX and uaW are co-regulated with uaZ (urate oxidase) and uapA (specific urate-xanthine transporter)

Fig. 4 shows that *uaX* and *uaW* are, as the other genes involved in purine utilisation, inducible by uric acid and repressible by ammonium. *uaX* and *uaW* are under the control of the UaY protein, a Zn-cluster protein showed to be the specific transcription factor responding to uric acid induction (Scazzocchio et al., 1982; Suárez et al., 1995). No induction is seen in the null *uaY2* mutant (Suárez et al., 1995) while partially constitutive and partially ammonium derepressed expression is seen in strains carrying the *uaY^{c}462* mutation in line with what has been described previously for other genes of the pathway (Oestreicher and Scazzocchio, 1995; Cecchetto et al., 2004; Cultrone et al., 2007; Oestreicher et al., 2008; *uapA* and *uaZ* controls shown in Fig. 4).

The expression of *uapA,* encoding the high capacity urate-xanthine transporter, depends absolutely on the GATA factor AreA (Ravagnani et al., 1997), which is inactivated by ammonium and glutamine by a variety of mechanisms (Kudla et al., 1990; Morozov et al., 2001; Todd et al., 2005). Genes encoding the enzymes of the purine degradation pathway show a less stringent requirement for AreA (Glatigny and Scazzocchio, 1995; Cultrone et al., 2007; Oestreicher et al., 2008; see Fig. 5 for *uaZ*) than those encoding the purine transporters *uapA* and *azgA* (Ravagnani et al., 1997; Cecchetto et al., 2004). The null mutation *areA600* does result in null expression of *uapA*, but not of *uaZ*, *uaX* and *uaW* (Fig. 5). The pattern of expression of these genes in an *areA600* background confirms that the uric acid taken up *via* the UapC and/or the FurD transporter (see Fig. 5) is sufficient to afford induction. The expression of *uapC* is neither completely sensitive to ammonium repression, nor is completely dependent on AreA (Cecchetto et al., 2004). Fig. 6 shows the 5′ upstream sequences of *uaX* and *uaW* together with those of *uaZ* and *uapA*. Both *uaX* and *uaW* show UaY canonical binding sites and upstream non-canonical sites of the type CGG-6X-GCG, which occur in *hxA*, and have been shown to bind UaY (Suárez et al., 1995), together with a number of canonical AreA binding sites. The specificity mutation *areA102* (a L526V mutation in the DNA binding domain; Ravagnani et al., 1997) impairs the expression of *uaZ, uaX* and *uaW* to a greater extent than the *areA600* null mutation (Fig. 5). This surprising effect could be indirect, resulting, among other possibilities, from inducer exclusion. Both *areA600* and *areA102* result in nil expression of *uapA,* while the paralogue transporter gene *uapC* is clearly less transcribed in *areA102* than in *areA600* strains, leading possibly to diminished incorporation of inducer (Cecchetto et al., 2004). Both *uaZ* and *uaW* genes have GATA sites of the type TGATAR and C/AGATAR. AreA102 binds preferentially to TGATAR sites and shows decreased (but not nil) binding to C/AGATAR sites (Ravagnani et al., 1997). A configuration of AreA molecules in the promoter sequence, different from the one extant on the wild type, could result in direct repression. The *uaX*, promoter has a CGATA site (starting at −665 in the opposite strand) and an AGATAA site. An overlap of a non-canonical UaY site and a CGATAG site is extant in this promoter. The *areA600* null mutation may allow the non-canonical UaY binding site to function, thus affording a higher mRNA steady state rate, while even the weak binding of AreA102 to the CGATAG site may prevent this. Direct repression by AreA by direct competition with UaY has been shown for the *nadA* gene (Oestreicher et al., 2008), while a paradoxical phenotype resulting from the *areA102* mutation was reported previously for the *fcyB* gene encoding a cytosine-purine transporter (Vlanti and Diallinas, 2008).

4. Concluding remarks

We have identified *uaX* and *uaW*, the two missing genes in the purine degradation pathway of *A. nidulans*, encoding the enzymes which convert the product of urate oxidase catalytic activity to (presumably) optically active allantoin. The expression of these genes, as for all other genes upstream of *alX* encoding allantoinase (Scazzocchio and Darlington, 1968) is strictly dependent on the binuclear Zn-cluster protein UaY and the presence of uric acid. Allantoinase and allantoicase are regulated by UaY-mediated uric acid induction but also by another uncharacterised system responding to allantoin as inducer, while the expression of ureidoglycolase and urease is constitutive, albeit repressible by ammonium (Scazzocchio and Darlington, 1968). *uaX* and *uaW* show exactly the same pattern of UaY-dependent induction found for all other genes upstream of *alX*. The identification of

Please cite this article in press as: Gournas, C., et al. Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. (2011), doi:10.1016/j.fgb.2011.03.004

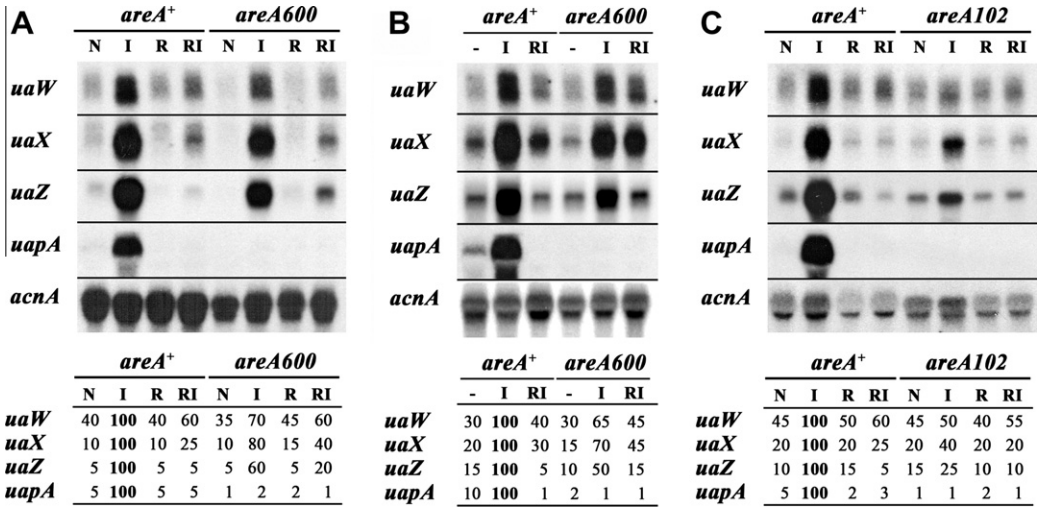


Fig. 5. Expression of *uaX* and *uaW* is only partially dependent on AreA. The relevant *areA* allele of each strain is shown above the panel. The previously characterised regulation profile of *uaZ* and *uapA* (see text) was also tested in parallel in the same experiment. (A) Growth conditions as in Fig. 4. Below: quantification of *uaW, uaX, uaZ* and *uapA* transcripts, corresponding to the average values of two independent northern-blots. The maximal SD values found are 18% for *uaW*, 19% for *uaX*, 15% for *uaZ* and 2% for *uapA*. (B) As the growth of strains carrying *areA600* is limited on urea as sole nitrogen source, a different growth protocol was used in order to test in parallel the effect of nitrogen starved conditions. The strains were grown at 37 °C in presence of ammonium as sole nitrogen source. After 9 h of growth, the mycelia were harvested, washed with sterile water and transferred to fresh medium, without nitrogen source (indicated by -, above the panel) or with uric acid (I) or with uric acid + ammonium (RI), and the culture were grown at 37 °C for 90 additional minutes. Below, quantification of *uaW, uaX, uaZ* and *uapA* transcripts. The values shown correspond to the average values of three independent northern-blots. The maximal SD values found are 22% for *uaW*, 13% for *uaX*, 7% for *uaZ* and 1% for *uapA*. (C) Compares expression of *areA*$^{+}$ and *areA102* strains. Growth condition as in Fig. 4 Below, Quantification of *uaW, uaX, uaZ* and *uapA* transcripts. The values shown correspond to the average values of three independent northern-blots. The maximal SD values found are 20% for *uaW*, 9% for *uaX*, 18% for *uaZ* and 8% for *uapA*.

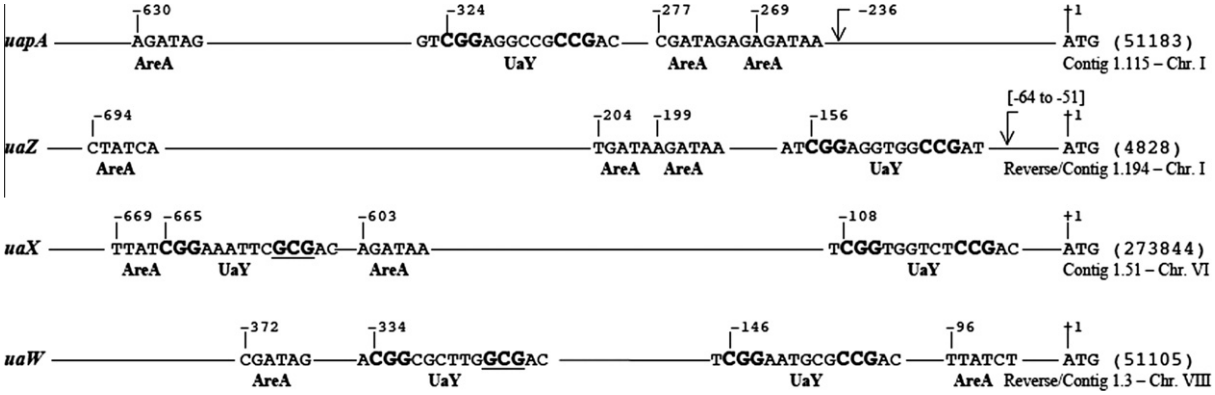


Fig. 6. Upstream sequences of *uapA, uaZ, uaX* and *uaW* showing putative or actual UaY and AreA binding sites. Only canonical AreA 5′ HGATAR sites (H stands for A or T or G, R for A of G) are shown. Canonical sites in the opposite strand are of the form 5′YTATCD, where Y is C or T and D is T, G or A. The AreA sites in the *uapA* promoter have been determined experimentally (Ravagnani et al., 1997) while the UaY binding sites have been determined experimentally for the *uapA* and *uaZ* promoters (Suárez et al., 1995). The transcription initiation sites of the *uapA* (Gorfinkiel et al., 1995) and the *uaZ* genes (Oestreicher and Scazzocchio, 1993) are indicated by vertical arrows.

uaX and *uaW* confirms the complete absence of clustering in *A. nidulans* for genes involved in this pathway. In fact, no two genes of this pathway are closely linked to each other. A reported exception, the apparent clustering of the *ureA* and *ureB* genes encoding the specific urea transporter and the urease apo-enzyme respectively (Mackay and Pateman, 1982), is spurious, as these genes do not constitute a cluster. They are separated by more than 30 kb and 14 putative ORFs, including well characterised genes such as the developmental regulator *abaA* (Abreu et al., 2010, our unpublished observations). This scattering of genes contrasts not only with the situation seen in many bacteria, where the clustering of the enzymes involved in purine degradation has been a precious help in identifying new activities, including HIU hydrolase and OHCU decarboxylase (Ramazzina et al., 2006, 2010), but also with the conserved clustering in the Aspergilli of genes involved in other primary metabolism pathways, such as in nitrate (Tomsett and Cove, 1979; Punt et al., 1995) and proline (Sharma and Arst, 1985; Hull et al., 1989) utilisation.

Acknowledgments

We thank Prof. H.N. Arst, Jr., Prof. J. Strauss, T. Schinko and Dr. C. Velot for helpful discussion and/or laboratory facilities and two anonymous referees for helpful suggestions. C. Gourmas was supported by IKY, the Foundation of National Scholarships (Greece).

References

Abreu, C., Sanguinetti, M., Amillis, S., Ramon, A., 2010. UreA, the major urea/H+symporter in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. 47, 1023–1033.

Amillis, S., Hamari, Z., Roumelioti, K., Scazzocchio, C., Diallinas, G., 2007. Regulation of expression and kinetic modeling of substrate interactions of a uracil transporter in *Aspergillus nidulans*. Mol. Membr. Biol. 24 (3), 206–214.

Amrani, L., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., Glatigny, A., 1999. The *hxB* gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in *Aspergillus nidulans*, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems. Mol. Microbiol. 31, 1065–1073.

Amrani, L., Primus, J., Glatigny, A., Arcangeli, L., Scazzocchio, C., Finnerty, V., 2000. Comparison of the sequences of the A*spergillus nidulans hxB* and *Drosophila melanogaster* ma-l genes with nifS from *Azotobacter vinelandii* suggests a mechanism for the insertion of the terminal sulphur atom in the molybdopterin cofactor. Mol. Microbiol. 38, 114–125.

Arst Jr., H.N., Tollervey, D.W., Sealy-Lewis, H.M., 1982. A possible regulatory gene for the molybdenum-containing cofactor in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 128 (5), 1083–1093.

Bailey, C.R., Penfold, H.A., Arst Jr., H.N., 1979. Cis-dominant regulatory mutations affecting the expression of GABA permease in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 169, 79–83.

Cendron, L., Berni, R., Folli, C., Ramazzina, I., Percudani, R., Zanotti, G., 2007. The structure of 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline decarboxylase provides insights into the mechanism of uric acid degradation. J. Biol. Chem. 282, 18182–18189.

Cecchetto, G., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C., Drevet, C., 2004. The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. J. Biol. Chem. 279, 3132–3141.

Cultrone, A., Scazzocchio, C., Rochet, M., Montero-Morán, G., Drevet, C., Fernández-Martín, R., 2005. Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. Mol. Microbiol. 57, 276–290.

Cultrone, A., Domínguez, Y.R., Drevet, C., Scazzocchio, C., Fernández-Martín, R., 2007. The tightly regulated promoter of the *xanA* gene of *Aspergillus nidulans* is included in a helitron. Mol. Microbiol. 63, 1577–1587.

Darlington, A.J., Scazzocchio, C., Pateman, J.A., 1965. Biochemical and genetical studies of purine breakdown in *Aspergillus*. Nature 206, 599–600.

Darlington, A.J., Scazzocchio, C., 1967. Use of analogues and the substrate-sensitivity of mutants in analysis of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. 93, 937–940.

Darlington, A.J., Scazzocchio, C., 1968. Evidence for an alternative pathway of xanthine oxidation in *Aspergillus nidulans*. Biochim. Biophys. Acta 166, 569–571.

Diallinas, G., Gorfinfiel, L., Arst Jr., H.N., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., 1995. Genetic and molecular characterisation of a gene encoding a wide-specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in procaryotes and in eucaryotes. J. Biol. Chem. 270, 8610–8622.

Fidel, S., Doonan, J.H., Morris, N.R., 1988. *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a α-actin. Gene 70, 283–293.

Glatigny, A., Scazzocchio, C., 1995. Cloning and molecular characterization of *hxA*, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*. J. Biol. Chem. 270, 3534–3550.

Gorfinkiel, L., Diallinas, G., Scazzocchio, C., 1993. Sequence and regulation of the *uapA* gene, encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. J. Biol. Chem. 268, 23376–23381.

Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A., Diallinas, G., 2010. Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. Mol. Microbiol. 75, 246–260.

Hamari, Z., Amillis, S., Drevet, C., Apostolaki, A., Vágvölgyi, C., Diallinas, G., Scazzocchio, C., 2009. Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. 73, 43–57.

Hennebry, S.C., Law, R.H., Richardson, S.J., Buckle, A.M., Whisstock, J.C., 2006. The crystal structure of the transthyretin-like protein from *Salmonella dublin*, a prokaryote 5-hydroxyisourate hydrolase. J. Mol. Biol. 359, 1389–1399.

Hull, E.P., Green, P.M., Arst Jr., H.N., Scazzocchio, C., 1989. Cloning and physical characterisation of the L-proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. 3, 553–559.

Hynes, M.J., Murray, S.L., Khew, G.S., Davis, M.A., 2008. Genetic analysis of the role of peroxisomes in the utilization of acetate and fatty acids in *Aspergillus nidulans*. Genetics 178, 1355–1369.

Jung, D.K., Lee, Y., Park, S.G., Park, B.C., Kim, G.H., Rhee, S., 2006. Structural and functional analysis of PucM, a hydrolase in the ureide pathway and a member of the transthyretin-related protein family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 9790–9795.

Kim, K., Park, J., Rhee, S., 2007. Structural and functional basis for (S)-allantoin formation in the ureide pathway. J. Biol. Chem. 282, 23457–23464.

Koukaki, M., Giannoutsou, E., Karagouni, A., Diallinas, G., 2003. A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. J. Microbiol. Methods 55, 687–695.

Kudla, B., Caddick, M.X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N., Bennett, C.F., Sibley, S., Davies, R.W., Arst Jr., H.N., 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. EMBO J. 9, 1355–1364.

Lee, M.H., Mulrooney, S.B., Renner, M.J., Markowicz, Y., Hausinger, R.P., 1992. *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster: sequence of *ureD* and demonstration that four accessory genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, and *ureG*) are involved in nickel metallocenter biosynthesis. J. Bacteriol. 174, 4324–4330.

Lee, Y., Lee, D.H., Kho, C.W., Lee, A.Y., Jang, M., Cho, S., Lee, C.H., Lee, J.S., Myung, P.K., Park, B.C., Park, S.G., 2005. Transthyretin-related proteins function to facilitate the hydrolysis of 5-hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction. FEBS Lett. 579, 4769–4774.

Lewis, N.J., Hurt, P., Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C., 1978. The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. IV. A comparison between purine hydroxylase I and II. Eur. J. Biochem. 91, 311–316.

Lockington, R.A., Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C., Davies, R.W., 1985. Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. Gene 33, 137–149.

Lundberg, E., Bäckström, S., Sauer, U.H., Sauer-Eriksson, A.E., 2006. The transthyretin-related protein: structural investigation of a novel protein family. J. Struct. Biol. 155, 445–457.

Mackay, E.M., Pateman, J.A., 1980. Nickel requirement of a urease-deficient mutant in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 116, 249–251.

Mackay, E.M., Pateman, J.A., 1982. The regulation of urease activity in *Aspergillus nidulans*. Biochem. Genet. 20, 763–776.

Mehra, R.K., Coughlan, M.P., 1984. Purification and properties of purine hydroxylase II from *Aspergillus nidulans*. Arch. Biochem. Biophys. 229, 585–595.

Montero-Morán, G.M., Li, M., Rendòn-Huerta, E., Jourdan, F., Lowe, D.J., Stumpff-Kane, A.W., Feig, M., Scazzocchio, C., Hausinger, R.P., 2007. Purification and characterization of the FeII- and alpha-ketoglutarate-dependent xanthine hydroxylase from *Aspergillus nidulans*. Biochemistry 46, 5293–5304.

Morozov, I.Y., Galbis-Martinez, M., Jones, M.G., Caddix, M.X., 2001. Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *area* mRNA. Mol. Microbiol. 42, 269–277.

Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A., Oakley, B.R., 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. Genetics 172, 1557–1566.

Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J. Mol. Biol. 302, 205–217.

Oestreicher, N., Scazzocchio, C., 1993. Sequence, regulation and mutational analysis of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. J. Biol. Chem. 268, 23382–23389.

Oestreicher, N., Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C., 1993. Characterisation, cloning and integrative properties of the gene encoding urate oxidase in *Aspergillus nidulans*. Gene 132, 185–192.

Oestreicher, N., Scazzocchio, C., 1995. A single amino acid change in a pathway-specific transcription factor results in different degrees of constitutivity, hyperinducibility and derepression of several structural genes. J. Mol. Biol. 249, 693–699.

Oestreicher, N., Ribard, C., Scazzocchio, C., 2008. The *nadA* gene of *Aspergillus nidulans*, encoding adenine deaminase, is subject to a unique regulatory pattern. Fungal Genet. Biol. 45, 760–775.

Pateman, J.A., Cove, D.J., Rever, B.M., Roberts, D.B., 1964. A common co-factor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. Nature 201, 58–60.

Petriv, O.I., Tang, L., Titorenko, V.I., Rachubinski, R.A., 2004. A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. J. Mol. Biol. 341, 119–134.

Poirot, O., O'Toole, E., Notredame, C., 2003. Tcoffee@igs: a web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. Nucleic Acids Res. 31, 3503–3506.

Punt, P.J., Strauss, J., Smit, R., Kinghorn, J.R., van den Hondel, C.A., 1995. The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niaD* genes of *Aspergilus nidulans* contains multiple NirA bind sites which act bidirectionally. Mol. Cell. Biol. 15, 5688–5699.

Ramazzina, I., Folli, C., Secchi, A., Berni, R., Percudani, R., 2006. Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. Nat. Chem. Biol. 2, 144–148.

Ramazzina, I., Costa, R., Cendron, L., Berni, R., Peracchi, A., Zanotti, G., Percudani, R., 2010. An aminotransferase branch point connects purine catabolism to amino acid recycling. Nat. Chem. Biol. 6, 801–806.

Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S., Gorton, D., Arst Jr., H.N., Scazzocchio, C., 1997. Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. EMBO J. 16, 3974–3986.

Reumann, S., Babujee, L., Ma, C., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G.E., Rasche, N., Lüder, F., Weckwerth, W., Jahn, O., 2007. Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. Plant Cell 10, 3170–3193.

Ribard, C., Rochet, M., Labedan, B., Daignan-Fornier, B., Alzari, P., Scazzocchio, C., Oestreicher, N., 2003. Sub-families of alpha/beta barrel enzymes: a new adenine deaminase family. J. Mol. Biol. 334, 1117–1131.

Robellet, X., Oestreicher, N., Guitton, A., Vélot, C., 2010. Gene silencing of transgenes inserted in the *Aspergillus nidulans* alcM and/or alcS loci. Curr. Genet. 56, 341–348.

Roberts, T., Martinelli, S., Scazzocchio, C., 1979. Allele specific, gene unspecific suppressors in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 177, 57–64.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Scazzocchio, C., 1966, Studies on the genetic control of purine oxidation in *Aspergillus nidulans*. Ph. D. Thesis, University of Cambridge, UK.

Scazzocchio, C., Darlington, A.J., 1968. The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. Biochim. Biophys. Acta 166, 557–568.

Please cite this article in press as: Gournas, C., et al. Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. (2011), doi:10.1016/j.fgb.2011.03.004

Scazzocchio, C., 1973. The genetic control of molyboflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. Allopurinol resistant mutants constitutive for xanthine dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 36, 428–445 (Appendix: The induction of xanthine dehydrogenase II, *in* Scazzocchio, C., Holl, F. B. and Foguelman A).

Scazzocchio, C., Gorton, D., 1977. The regulation of purine breakdown. In: Smith, J.E., Pateman, J.A. (Eds.), Genetics and physiology of *Aspergillus nidulans*. Academic Press, London, New York, San Francisco, pp. 255–265.

Scazzocchio, C., Sdrin, N., Ong, G., 1982. Positive regulation in a eukaryote, a study of the uaY gene of Aspergillus nidulans: I. Characterization of alleles, dominance and complementation studies, and a fine structure map of the uaY–oxpA cluster. Genetics 100, 185–208.

Scazzocchio, C., 1994. The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation. In: *Aspergillus*: 50 years on (Prog. Ind. Microbiol.), Martinelli, S., Kinghorn, J.R. (Eds.), vol. 29. Elsevier Scientific, Amsterdam, London, New York, Tokio, pp. 221–257.

Sharma, K.K., Arst Jr., H.N., 1985. The product of the regulatory catabolism gene cluster of *Aspergilus nidulans* is a positive-active protein. Curr. Genet. 9, 299–304.

Suárez, T., Oestreicher, N., Kelly, J., Ong, G., Sankarsingh, T., Scazzocchio, C., 1991. The uaY positive control gene of *Aspergillus nidulans*: fine structure, isolation of constitutive mutants and reversion patterns. Mol. Gen. Genet. 230, 359–368.

Suárez, T., Vieira de Queiroz, M., Oestreicher, N., Scazzocchio, C., 1995. The sequence and binding specificity of UaY, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of Saccharomyces cerevisiæ. EMBO J. 14, 1453–1467.

Todd, R.B., Fraser, J.A., Wong, K.H., Davis, M.A., Hynes, M.J., 2005. Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. Eukaryot. Cell 4, 1646–1653.

Tomsett, A.G., Cove, D.J., 1979. Deletion mapping of the *niiA-niaD* gene region of *Aspergillus nidulans*. Genet. Res. 34, 19–32.

Unkles, S.E., Heck, I.S., Appleyard, M.V., Kinghorn, J.R., 1999. Eukaryotic molybdopterin synthase. Biochemical and molecular studies of *Aspergillus nidulans cnxG* and *cnxH* mutants. J. Biol. Chem. 274 (27), 19286–19293.

Vlanti, A., Diallinas, G., 2008. The *Aspergillus nidulans* FcyB cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive compartments and is downregulated by endocytosis. Mol. Microbiol. 68 (4), 959–977.

Zanotti, G., Cendron, L., Ramazzina, I., Folli, C., Percudani, R., Berni, R., 2006. Structure of zebra fish HIUase: insights into evolution of an enzyme to a hormone transporter. J. Mol. Biol. 363, 1–9.

Please cite this article in press as: Gournas, C., et al. Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. (2011), doi:10.1016/j.fgb.2011.03.004