

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διερεύνηση του γενετικού-βιολογικού ρόλου των
εισοσωμικών πρωτεϊνών του μύκητα *Aspergillus*
nidulans

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΣ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2015

Η εικόνα στο εξώφυλλο είναι αποτέλεσμα πειραμάτων συνεστιακής μικροσκοπίας στελεχών που εκφράζουν την εισοσωμική πρωτεΐνη PilA σημασμένη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και στα οποία στελέχη ο υποκινητής του γονιδίου *annce102*, αντικαταστάθηκε από το ρυθμιζόμενο υποκινητή της αλκοολικής αφυδρογονάσης (*alcA^P*). Στην υπερέκφραση της AnNce102, η εισοσωμική πρωτεΐνη PilA, εντοπίζεται “άτυπα” και στα διαφράγματα όπως επιβεβαιώνεται από τον συνεντοπισμό της με τη χρωστική calcofluor η οποία βαφεί τα διαφράγματα.

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Μιλτιάδης Τύπας Επιβλέπων	Καθηγητής Γενετικής - Μικροβιακής Γενετικής
Βασιλική Σοφianoπούλου	Διευθύντρια Ερευνών (Ερευνήτρια Α'), Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
Αικατερίνη – Μαρία Παππά	Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής - Μοριακής Μικροβιακής Γενετικής

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Μιλτιάδης Τύπας Επιβλέπων	Καθηγητής Γενετικής - Μικροβιακής Γενετικής
Βασιλική Σοφianoπούλου	Διευθύντρια Ερευνών (Ερευνήτρια Α'), Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
Αικατερίνη – Μαρία Παππά	Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής - Μοριακής Μικροβιακής Γενετικής
Γεώργιος Διαλλινάς	Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)
Ευστάθιος Φριλίγγος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)
Επαμεινώνδας Παπλωματάς	Καθηγητής, Αντιπρύτανης, Φυτοπαθολογίας (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών)
Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη	Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»
(Ν.5343/1932, άρθρο 202).

Στους Γιάννηδες της ζωής
μου, που με καθόρισαν και
πάντα θα με καθορίζουν...

Πρόλογος και Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Μικροοργανισμών του Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη της Δρος Β. Σοφianoπούλου. Από τη θέση αυτή θέλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Καταρχήν αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω την Ερευνήτρια Α΄, Β. Σοφianoπούλου, αφενός, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, αφετέρου, για τη συνεχή παρακολούθηση αλλά και την αμεσότητα στην επικοινωνία όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή Μιλτιάδη Τύπα και την Επίκουρη Καθηγήτρια Αικατερίνη – Μαρία Παππά όχι μόνο για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση της παρούσας διατριβής, αλλά και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις τους. Θα πρέπει να ευχαριστήσω παράλληλα τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή Γεώργιο Διαλλινά, τον Καθηγητή Επαμεινώνδας Παπλωματάς, την Καθηγήτρια Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη και τον Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο, για το χρόνο που αφιέρωσαν για τη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή και τη συμβολή τους στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου κάποιους σημαντικούς φίλους, κάποιους ιδιαίτερος προσφιλείς μου ανθρώπους, τη Βασιλικούλα (Βασιλική Πανταζοπούλου, μεταπτυχιακή φοιτήτρια), τότε διπλωματική φοιτήτρια, με την οποία ξεκίνησα αυτό το όμορφο ταξίδι στο κόσμο του *A. nidulans*. Το Σωτήρη (Δρ. Σωτήρη Αμίλλη), άνθρωπο προικισμένο με υπομονή και φαντασία, ο οποίος με βοήθησε στα πρώτα ερευνητικά μου βήματα. Το Παβλίτο (Παύλο Γεράνιο, Υποψήφιο Διδάκτορα), τότε μεταπτυχιακό φοιτητή, ο οποίος αποτελούσε πάντα πηγή γέλιου και ξεγνοιασιάς, ακόμη και σε πολύ δύσκολες περιόδους της ερευνητικής μας ζωής. Το chris (Δρ. Γουρνά Χρήστο), τον πιο στενό συνεργάτη που είχα κατά τη διάρκεια αυτής της πορείας, πάντα διαθέσιμος να μοιραστεί πολύτιμες γνώσεις και ιδέες. Την Ηλιάνα Ζώη, τότε διπλωματική φοιτήτρια, για όλες τις ευχάριστες και διασκεδαστικές στιγμές που μας χάρισε. Την Άντα (Άντα Μπιράτση, Υποψήφια Διδάκτορα), νεότερο μέλος του εργαστηρίου, με την οποία πέρασα ευχάριστα και δημιουργικά την τελευταία περίοδο, μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω, ολόψυχα, τη Μουμτζή Άγγελική, η οποία μου παρείχε τη δυνατότητα να έχω πρόσβαση σε όλη την επιστημονική πληροφορία (άρθρα, μονογραφίες, ερευνητικά δεδομένα) κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας. Τον καθηγητή Claudio Scazzocchio και την Ερευνήτρια Β, Χαραλαμπία Μπολέτη, οι οποίοι με τίμησαν με τη συνεργασία τους.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ, ωστόσο, το οφείλω στη σύντροφο μου, Φάνια, χωρίς την οποία η ζωή μου όπως και αυτή η διαδρομή θα ήταν μοναχική, δυσκολοδιάβατη, ακανθώδης και εξαιρετικά ανιαρή.

Αθανασόπουλος Αλέξανδρος

Αθηνά, 2015

Περίληψη

Η πλασματική μεμβράνη εμπλέκεται σε διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, ο συντονισμός των οποίων απαιτεί τη δυναμική οργάνωση των συστατικών της, σε μεμβρανικές περιοχές διαφορετικής λιπιδικής και πρωτεϊνικής σύστασης. Τα στικτά πρωτεϊνικά συμπλέγματα που ονομάζονται εισοσώματα, τουλάχιστον εν μέρει, συμβάλλουν στη διαμερισματοποίηση της πλασματικής μεμβράνης των μυκήτων. Στο νηματοειδή μύκητα *Aspergillus (Emericella) nidulans*, οι εισοσωμικές πρωτεΐνες PilA και PilB, ομόλογες των Pil1/Lsp1 του *Saccharomyces cerevisiae*, και η SurG, ομόλογη της Sur7, συναρμολογούνται και σχηματίζουν πυκνές στικτές κοκκιώδεις δομές στα προϊόντα του αφυλετικού κύκλου ζωής του μύκητα, τα κονιδιοσπόρια

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήθηκε η κατανομή και η έκφραση των εισοσωμικών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του φυλετικού κύκλου ζωής του *A.nidulans*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι κύριες εισοσωμικές πρωτεΐνες, PilA, PilB και SurG δεν εκφράζονται στα κύτταρα hülle ή τα πρώιμα ασκοσπόρια αλλά αντίθετα εκφράζονται στα ώριμα ασκοσπόρια. Σε αδρανή ώριμα ασκοσπόρια, η πρωτεΐνη PilA σχηματίζει στατικές στικτές δομές στην πλασματική μεμβράνη των ασκοσπορίων. Παρόμοια, η PilB εντοπίζεται στην περιφέρεια των ασκοσπορίων αλλά συγκεντρώνεται κυρίως στις περιοχές όπου τα δύο μισά ενός ασκοσπορίου ενώνονται. Τέλος, η SurG εντοπίζεται τόσο στη μεμβράνη των ασκοσπορίων όσο και περιπυρηνικά - ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε εκβλαστημένα ασκοσπόρια, οι στικτές δομές κατά μήκος της υφής αποτελούνται αποκλειστικά από την πρωτεΐνη PilA. Η PilB εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και η SurG στοχεύεται στα χυμοτόπια, τα ενδοσώματα αλλά εντοπίζεται και σε στικτούς κοκκιώδεις σχηματισμούς στην κεφαλή των υφών. Η κατανομή αυτών των πρωτεϊνών είναι πανομοιότυπη με αυτή που βρέθηκε σε νεαρές υφές προερχόμενες από κονιδιοσπόρια. Επιπλέον, σε εκβλαστημένα ασκοσπόρια οι PilA στικτοί σχηματισμοί δεν συνεντοπίζονται με τις ιδιαίτερα κινητικές στικτές δομές της AbpA, ενός μάρτυρα ενδοκύττωσης κυστιδίων καλυμμένων με πλέγμα κλαθρίνης. Παρουσία μυριοσίνης – ειδικού αναστολέα της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων – τα PilA κοκκία των νεαρών υφών που προέρχονται από ασκοσπόρια, είναι λιγότερα σε αριθμό και η τοπολογία τους έχει σημαντικά αλλοιωθεί, υποδηλώνοντας συσχέτιση μεταξύ της εισοσωμικής PilA και της βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων.

Επιπρόσθετα, καθώς η πρωτεΐνη Nce102 του *S. cerevisiae* έχει προταθεί ότι αποτελεί μέρος ενός αισθητήρα των επίπεδων των σφιγγολιπιδίων, διερευνήθηκε ο ρόλος της AnNce102 στον *A. nidulans*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η AnNce102 σχηματίζει σταθερές δομές με χαμηλή κινητικότητα που συνεντοπίζονται με τα εισοσώματα και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην πυκνότητα/αριθμό των PilA/SurG κοκκίων στην κεφαλή νεαρών υφών. Επιπλέον, δείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες AnNce102 και PilA ρυθμίζουν αρνητικά τη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων, καθώς απαλοιφές των γονιδίων τους καταστέλλουν μερικώς τη θερμοευαισθησία του στελέχους *basA1*, το οποίο κωδικοποιεί για την C4-υδροξυλάση, υπεύθυνη για τη μετατροπή της διϋδροσφιγγοσίνης σε φυτοσφιγγοσίνη. Επιπλέον, απαλοιφές των γονιδίων *annce102* και *pilA* καταστέλλουν μερικώς τη μη φυσιολογική ανάπτυξη που παρατηρείται μετά από επώαση των κυττάρων με τους αναστολείς της βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων, μυριοσίνη και ουρεοβασιδίνη A. Ταυτόχρονα, δείχθηκε ότι απενεργοποίηση της κινάσης YrkA μιμείται τη γενετική ή τη φαρμακολογική μείωση των σφιγγολιπιδίων, γεγονός, το οποίο υποδεικνύει την άμεση σχέση της κινάσης με τη ρύθμιση του μονοπατιού της βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων. Στις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση δραστικών μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ- ROS), η οποία μπορούσε εν μέρει να ξεπεραστεί με την απαλοιφή των γονιδίων *pilA* και *annce102*. Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, παρατηρήθηκε ευαισθησία ή ανθεκτικότητα των *annce102Δ* ή/και *pilAΔ* στελεχών σε διαφορετικούς οξειδωτικούς παράγοντες, ενώ η υπερέκφραση της AnNce102 αποκαθιστά τον αριθμό και την οργάνωση των PilA/SurG κοκκίων σε κύτταρα με διαταραγμένα επίπεδα σφιγγολιπιδίων και επιπρόσθετα οδηγεί στον «άτυπο» εντοπισμό των PilA κοκκίων στα διαφράγματα.

Abstract

The plasma membrane is implicated in a variety of functions, whose coordination necessitates highly dynamic organization of its constituents into domains of distinct protein and lipid composition. Eisosomes, at least partially, mediate this lateral plasma membrane compartmentalization. In the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, PilA and PilB, two homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* eisosome proteins Pil1/Lsp1, and SurG, a strict orthologue of Sur7, are assembled and form tightly packed structures in conidiospores, products of the asexual cycle.

Our results show that core eisosome proteins PilA, PilB and SurG are not expressed in hülle cells or early ascospores, but are expressed in mature ascospores. In mature but quiescent ascospores, PilA forms static punctate structures (foci) at the plasma membrane. PilB also was observed at the ascospore membrane as well, with higher concentration at the areas where the two halves of ascospores are joined together. Finally, SurG was localized both at the membrane of ascospores and perinuclearly. In germlings originating from ascospores the punctate structures along the hypha were shown to be composed only of PilA. PilB is diffused in the cytoplasm and SurG was located in vacuoles, endosomes and in foci in the hyphal head. This localization is identical to that found in germlings originated from conidiospores. In germinated ascospores PilA foci did not colocalise with the highly mobile and transient peripheral punctate structures of AbpA, a marker for sites of clathrin-mediated endocytosis. Deletions of each one or all the three core eisosomal genes do not affect viability or germination of ascospores. In the presence of myriocin – a specific inhibitor of sphingolipid biosynthesis – PilA-GFP foci of ascospore germlings were less numerous and their distribution was significantly altered, suggesting a correlation between PilA foci and sphingolipid biosynthesis.

Moreover due to the fact that the tetraspan protein Nce102 has been implicated as part of a sensor for sphingolipid homeostasis, the role of Nce102 homologue (AnNce102) in *A.nidulans* was investigated. We showed that AnNce102 forms stable structures with low mobility that colocalizes with eisosomes and plays a crucial role in density/number of PilA/SurG foci in the head of germlings. In addition we demonstrate that AnNce102 and PilA negatively regulate sphingolipid biosynthesis,

since their deletions partially suppress the thermosensitivity of *basA* mutant encoding sphingolipid C4-hydroxylase and the growth defects observed upon treatment with inhibitors of sphingolipid biosynthesis, myriocin and Aureobasidin A. Moreover, we show that YpkA repression mimics genetic or pharmacological depletion of sphingolipids, conditions that induce the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and can be partially overcome by deletion of *pilA* and/or *annce102*. Consistent with these findings, *pilA* Δ and *annce102* Δ also show differential sensitivity to various oxidative agents, while AnNce102 overexpression can bypass sphingolipid depletion regarding the PilA/SurG foci number and organization, also leading to the mislocalization of PilA to septa.

Συντμήσεις - Abbreviations

PK	Πολυκετίδια - Polyketides
NRPs	Μη ριβοσωμικά πεπτίδια - nonribosomal peptides
RGS	Ρυθμιστές της σηματοδότησης μέσω πρωτεϊνών G - Regulators of G protein Signaling
ΔMO - ROS	Δραστικές μορφές οξυγόνου - Reactive oxygen species
GFP	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη - Green fluorescent protein
mRFP	Μονομερής κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη - monomeric red fluorescent protein
GPI	Γλυκοσυλ-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη - glycosyl-phosphatidylinositol
PAGE	Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου - polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - Polymerase chain reaction
PH domain	Περιοχή ομολογίας με την πλεξτρίνη - pleckstrin homology domain
ER	Ενδοπλασματικό δίκτυο - endoplasmic reticulum
SPT	Παλμιτοϋλτρανσφεράση της σερίνης - serine palmitoyltransferase
LCB	Βάσεις μακράς αλυσίδας - Long-Chain Bases
3-KDS	3-κετοδιϋδροσφιγγοσίνη - 3-ketodihydrosphingosine
DHS	Διϋδροσφιγγοσίνη - Dihydrosphingosine
PHS	Φυτοσφιγγοσίνη - Phytosphingosine
IPC	Φωσφοκεραμίδια ινοσιτόλης - Inositol phosphorylceramide
MIPC	Μαννοζυλ ινοσιτόλ-P-κεραμίδια - Mannosyl inositol-P-ceramide
MCC	Μεμβρανικές περιοχές πλούσιες στο μεταφορέα αργινίνης Can1 - Membrane Compartment of Can1
MCT	Μεμβρανικές περιοχές οι οποίες περιέχουν το σύμπλοκο στόχο της ραπαμυκίνης 2, TORC2 - Membrane Compartment containing TORC2
MCP	Μεμβρανικές περιοχές πλούσιες στην αντλία πρωτονίων Pma1 - Membrane Compartment of Pma1
DPI	Χλωριούχο δυμεθυλαμόνιο - Diphenyliodonium chloride
HM	Ηλεκτρονική μικροσκοπία - Electron microscopy

PtdCho	Φωσφατιδυλοχολίνη - Phosphatidylcholine
PtdEtn	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη - Phosphatidylethanolamine
AbA	Αουρεοβασιδίνη Α - Aureobasidin A
TIRFM	Μικροσκοπία ολικής εσωτερικής ανάκλασης - Total Internal Reflection Microscopy-TIRFM)
VSC	Κέντρο Προμήθειας Κυστιδίων - Vesicle Supply Center
CaM	Καλμοδουλίνη - Calmodulin
SPK	Ακραίο σωματίο - Spitzenkorper
CN	Καλσινευρίνη - Calcineurin
PIPs	Φωσφοϊνοσιτίδια - Phosphoinositides
LB	Υπόστρωμα Luria-Bertani
FRAP	Ανάκτηση φθορισμού μετά από φωτολεύκανση - Fluorescence recovery after photobleaching

Περιεχόμενα:

Πρόλογος και Ευχαριστίες.....	i
Περίληψη	iii
Abstract.....	v
Συντμήσεις - Abbreviations	vii
1. Εισαγωγή	1
1.1 Το γένος <i>Aspergillus</i>	1
1.1.1 Ιστορική Αναδρομή	1
1.1.2 Ταξινόμηση του γένους <i>Aspergillus</i>	2
1.1.3 Οι <i>Ασπέργιλλοι</i> στη βιολογία, την ιατρική και τη βιοτεχνολογία	4
1.2 Η συνεισφορά του <i>A. nidulans</i> στη βιολογία.....	6
1.2.1 Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	6
1.2.1.1 Ρύθμιση του μεταβολισμού του αζώτου.....	8
1.2.1.2 Ρύθμιση του μεταβολισμού του άνθρακα.....	10
1.3 Βιολογικός κύκλος ζωής του <i>Aspergillus nidulans</i>	13
1.3.1 Αφυλετικός κύκλος.....	16
1.3.1.1 Η ρύθμιση του αφυλετικού κύκλου.....	18
1.3.2 Φυλετικός κύκλος	23
1.3.2.1 Η ρύθμιση του φυλετικού κύκλου.....	25
1.3.3 Παραφυλετικός κύκλος.....	31
1.4 Οι δραστικές μορφές οξυγόνου - Reactive oxygen species (ΔΜΟ-ROS) στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.....	32
1.4.1 Ο ρόλος των ROS στη κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση	34
1.5 Σύσταση και οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης.....	40
1.5.1 Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού.....	43
1.5.2 Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης.....	45

1.5.2.1	Πρωτεΐνες	45
1.5.2.2	Τα λιπίδια	48
1.5.2.2.1	Στερόλες.....	49
1.4.2.2.2	Φωσφογλυκερίδια.....	50
1.5.2.2.3	Γλυκολιπίδια.....	54
1.5.2.2.4	Τα σφιγγολιπίδια και ο μεταβολισμός τους	54
1.5.3	Λιπιδικές σχεδίες	60
1.6	Οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης στο <i>S. cerevisiae</i>	66
1.6.1	Τα εισοσώματα και η πρωτεΐνη Nce102 στο <i>S. cerevisiae</i>	70
1.6.2	Τα MCC/εισοσώματα σχηματίζουν αυλακώσεις στην πλασματική μεμβράνη.....	73
1.6.3	Ρύθμιση της συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης των εισοσωμάτων.....	75
1.6.4	Ο βιολογικός ρόλος των εισοσωμάτων στο <i>S. cerevisiae</i>	78
1.6.5	Τα εισοσώματα στο μύκητα <i>Candida albicans</i>	82
1.6.6	Τα εισοσώματα στο μύκητα <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	84
1.6.7	Τα εισοσώματα στο μύκητα <i>Ashbya gossypii</i>	86
1.6.8	Τα εισοσώματα στο μύκητα <i>Aspergillus fumigatus</i>	86
1.6.9	Τα εισοσώματα στο μύκητα <i>Aspergillus nidulans</i>	86
1.7	Στόχοι της διδακτορικής διατριβής.....	89
2.	Υλικά και Μεθοδολογία	91
2.1	Στελέχη μυκήτων	91
2.2	Θρεπτικά υποστρώματα μυκήτων.....	94
2.3	Συντήρηση των στελεχών του <i>A. nidulans</i>	96
2.4	Διασταυρώσεις στελεχών και ανάλυση των απογόνων.....	96
2.5	Θρεπτικά υποστρώματα βακτηρίων	97
2.6	Βακτήρια δέκτες πλασμιδίων και η προετοιμασία τους	97
2.7	Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. Coli</i>	98

2.8	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα.....	99
2.9	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το μύκητα <i>A. nidulans</i>	99
2.10	Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες – Κλωνοποίηση	101
2.11	Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα	101
2.12	Γενετικός μετασχηματισμός στελεχών του <i>A. nidulans</i>	102
2.13	Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA του <i>A. nidulans</i>	103
2.13.1	Πέψη του γονιδιωματικού DNA και διαχωρισμός των ζωνών σε πήκτωμα αγαρόζης.	103
2.13.2	Μεταφορά του DNA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	104
2.13.3	Προϋβριδισμός - Κατασκευή ραδιοσημασμένου ανιχνευτή με ³² P-[^α dCTP]-Υβριδισμός.	105
2.13.4	Εκπλύσεις της μεμβράνης-Εμφάνιση	106
2.14	Πρωτόκολλο απομόνωσης και ανάλυσης RNA.....	106
2.14.1	Απομόνωση Ολικού RNA από τον <i>A. nidulans</i>	106
2.14.2	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA.....	107
2.14.3	Καθαρισμός του RNA από DNA.....	108
2.14.4	RT-PCR.....	108
2.15	Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών	110
2.15.1	Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	111
2.15.2	Απομόνωση εισοσωμικών πρωτεϊνών από ασκοσπόρια του <i>A. nidulans</i>	112
2.15.3	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο της Bradford.....	113
2.15.4	SDS-GAGE.....	113
2.15.5	Χρώση με διάλυμα χρωστικής coomasie.....	115
2.15.6	Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.....	115
2.15.7	Χρώση των δεσμευμένων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πρωτεϊνών με Ponceau S.....	116

2.15.8	Ανοσοαποτύπωμα και χημειοφθορισμός.....	116
2.16	Έλεγχος παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου – ROS.....	117
2.17	Μικροσκοπία.....	118
2.17.1	Μικροσκοπία επιφθορισμού	118
2.17.2	Συνεστιακή μικροσκοπία	119
2.17.3	Η σημασία της Αποσυσχέτησης-Deconvolution	119
2.17.4	Ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού φθοριοχρωμάτων	120
2.17.4	Τεχνικές μικροσκοπίας διακεκομμένης μαγνητοσκόπησης (time-lapse) και ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP).....	121
3.	Αποτελέσματα.....	123
3.1	Υποκυτταρικός εντοπισμός των εισοσωμικών πρωτεϊνών στα κύτταρα Hülle και τους ασκούς	123
3.2	Υποκυτταρικός εντοπισμός των εισοσωμικών πρωτεϊνών κατά το φυλετικό κύκλο ζωής του <i>A. nidulans</i>	126
3.3	Τα εισοσωμικά γονίδια εκφράζονται κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης των ασκοσπορίων.....	131
3.3	Οι εισοσωμικές πρωτεΐνες συνεντοπίζονται κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης των ασκοσπορίων	132
3.4	Οι PilA σχηματισμοί δεν αποτελούν πύλες/σημεία ενδοκύττωσης.....	134
3.5	Η PilA σχηματίζει στατικές δομές στη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων του <i>A. nidulans</i>	135
3.6	Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων στελεχών	138
3.7	Η κυτταρική κατανομή της PilA εξαρτάται από τα επίπεδα των σφιγγολιπιδίων.....	139
3.8	Η πρωτεΐνη AnNce102 του <i>A. nidulans</i> συνεντοπίζεται με τα εισοσώματα	141
3.9	Η AnNce102 σχηματίζει στατικές δομές.....	146
3.10	Η PilA είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα των πρωτεϊνών AnNce102 και SurG	147

3.11	Απαλοιφή του γονιδίου <i>annce102</i> οδηγεί σε μείωση του αριθμού των εισοσωμάτων στην κεφαλή των νεαρών υφών.....	151
3.12	Η υπερέκφραση της <i>AnNce102</i> αποκαθιστά τον αριθμό των εισοσωμικών σχηματισμών παρουσία μυριοσίνης και οδηγεί σε «άτυπο» εντοπισμό των P1A κοκκίων στα διαφράγματα.....	158
3.13	Μείωση των σφιγγολιπιδίων και αναστολή της έκφρασης της ΥrkA κινάσης προκαλεί αύξηση των επιπέδων των ROS.....	160
3.14	Οι πρωτεΐνες <i>AnNce102</i> και P1A εμπλέκονται στη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων.....	165
4.	Συζήτηση και προοπτικές.....	169
5.	Βιβλιογραφία.....	175
	Παράρτημα I. Βιογραφικό σημείωμα του συγγραφέα.....	192
	Παράρτημα II. Δημοσιεύσεις σε διεθνή έγκριτα επιστημονικά περιοδικά.....	196

1. Εισαγωγή

1.1 Το γένος *Aspergillus*

1.1.1 Ιστορική Αναδρομή

Οι άνθρωποι γνωρίζουν για την ύπαρξη των μανιταριών/μυκήτων από την αρχή της καταγεγραμμένης ιστορίας. Μικροσκοπικοί μύκητες όπως οι *Ασπέργιλλοι* αναφέρονταν συνήθως έμμεσα ως παράγοντες σήψης και αποδόμησης. Καταγεγραμμένες αναφορές υπάρχουν από την αρχαία Ελλάδα (Νίκανδρος ο Κολοφώνιος, 185 π.χ.) μέχρι και στην Εβραϊκή Βίβλο (Λευιτικό, Κεφ.13-14). Η πρώτη γνωστή αξιοποίηση των *Ασπέργιλλων* για ωφελιμιστικούς σκοπούς ήταν στην Κίνα πριν από περίπου 2000 χρόνια, όπου *Ασπέργιλλοι* χρησιμοποιούνταν για την ενίσχυση της γεύσης του ρυζιού, της σόγιας και άλλων φυτικών προϊόντων (Goldman and Osmani, 2007). Στην Ιαπωνία, οι ζυμώσεις των σιτηρών και της σόγιας από κάποια είδη *Ασπέργιλλων* είναι γνωστές με το όνομα Koji και εμφανίστηκαν αιώνες πριν αναπτυχθεί η επιστήμη της μικροβιολογίας.

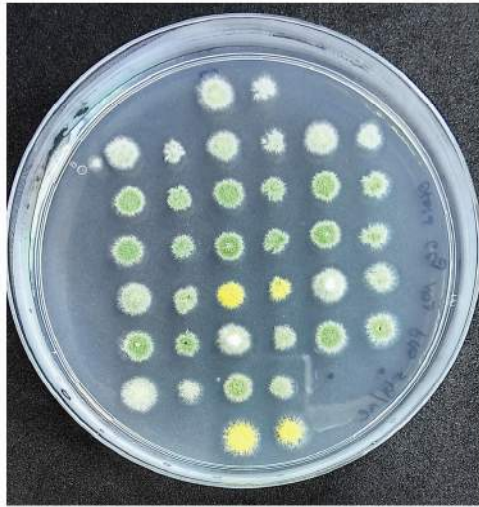
Η επιστημονική έρευνα των *Ασπέργιλλων* αλλά και άλλων μυκήτων ξεκίνησε με την ανακάλυψη του μικροσκοπίου. Το όνομα του γένους *Aspergillus* προέρχεται από τον ιερέα και βοτανολόγο Pietro Antonio Micheli, ο οποίος το 1729 περιέγραψε τους κονιδιοφορείς πολλών κοινών μυκήτων. Η μικροσκοπική ανάλυση των αλυσίδων των κονιδιοσπορίων που εκτείνονται ακτινωτά από τον κονιδιοφορέα του θύμισε το *aspergillum*, λειτουργικό όργανο που χρησιμοποιείται στη Ρωμαιοκαθολική Εκκλησία για την ρίψη αγιασμού στα κεφάλια των πιστών (Machida and Gomi, 2010). Η πρώτη μεγάλη μονογραφία για το γένος *Aspergillus* δημοσιεύτηκε το 1926 από τους μυκητολόγους Charles Thom και Margaret Church, καθιστώντας αυτούς τους μικροοργανισμούς ως την καλύτερα μελετημένη ομάδα μυκήτων (Thom and

Church, 1926). Κατά τη διάρκεια του εικοστού αιώνα, οι Thom και Raper (Thom and Raper, 1945) και οι συνεργάτες τους (Raper et al., 1965) διαίρεσαν το γένος *Aspergillus* σε 18 ομάδες : *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ornatus*, *Aspergillus cervinus*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus cremeus*, *Aspergillus sparsus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavipes* και *Aspergillus terreus* (Afzal et al., 2013). Η εξάπλωση τους στο φυσικό περιβάλλον, η ευκολία καλλιέργειας τους στο εργαστήριο αλλά και η οικονομική σπουδαιότητα των διαφόρων ειδών εξασφάλισε ότι πολλοί μυκητολόγοι και μικροβιολόγοι θα ασχολούνταν με τη μελέτη τους.

1.1.2 Ταξινόμηση του γένους *Aspergillus*

Το γένος *Aspergillus* αποτελείται από περίπου 250 είδη (Geiser, 2009), τα οποία έχει επικρατήσει να αποκαλούνται *Ασπέργιλλοι*. Ο αριθμός αυτός είναι πιθανό να αυξηθεί σημαντικά στο εγγύς μέλλον, λόγω αντικρουόμενων αναφορών πάνω στον πραγματικό αριθμό των αποδεχόμενων ειδών, γεγονός που οφείλεται στην περίπλοκη κατανομή του γένους αλλά και στην ανάπτυξη νέων τεχνικών φυλογενετικής ταξινόμησης, βασιζόμενες κυρίως σε βιολογικά χαρακτηριστικά των οργανισμών, εξετάζοντας κοινά κυτταρικά γνωρίσματα όπως την ακολουθία δομικών μονάδων (πρωτεϊνών, νουκλεοτιδικών αλληλουχιών κ.λπ.).

Το γένος *Aspergillus* κατατάσσεται φυλογενετικά στην Τάξη των Eurotiales (Eurotiomycetidae / Eurotiomycetes / Pezizomycotina / Ascomycetes), όπου περιλαμβάνονται μύκητες με ευρύ ενζυμικό μεταβολικό ρεπερτόριο. Τα είδη του γένους *Aspergillus* αναγνωρίζονται από την ύπαρξη ενός κοινού μορφολογικού χαρακτηριστικού, της αναπαραγωγικής δομής του αφυλετικού κύκλου, τον κονιδιοφορέα. Οι κονιδιοφορείς εκφύονται απευθείας από πλευρικές, μακριές διακλαδώσεις των ποδικών κυττάρων (foot cells) και καταλήγουν στην κύστη. Από την ώριμη κύστη εκφύονται φιαλοειδή κύτταρα, τα πρωτογενή στηρίγματα (metulae) και τα δευτερογενή στηρίγματα (phialides), τα οποία δημιουργούν μέσω μίτωσης, αλυσίδες κονιδιοσπορίων (κονίδια). Το μέγεθος, η διάταξη, καθώς και το χρώμα των κονιδιοσπορίων αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά ταξινόμησης.



Συστηματική ταξινόμηση

Βασίλειο: *Fungi*

Διαίρεση: *Ascomycota*

Υποδιαίρεση: *Pezizomycotina*

Κλάση: *Pezizomycetes*

Οικογένεια: *Trichocomaceae*

Γένος: *Aspergillus*

Είδος: *A.nidulans*

Εικόνα 1-1 Δοκιμασία ανάπτυξης στελεχών *Aspergillus nidulans* με διαφορετικά χρώματα κονιδιοσπορίων, σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Δεξιά της εικόνας παρουσιάζεται η συστηματική ταξινόμηση του είδους *A. nidulans*.

Η ταξινόμηση του *Aspergillus nidulans* στο φύλο των ασκομυκήτων (**Εικόνα 1-1**) έγινε με βάση το προϊόν της εγγενούς μειωτικής αναπαραγωγής, τον ασκό. 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 μυκητολόγοι 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 ταξινόμησης οργανισμών των οποίων είναι γνωστός 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) (Kendrick, 1979). 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* (*Encyclopedia of Microbiology*, 2009).

1.1.3 Οι *Aspέργιλλοι* στη βιολογία, την ιατρική και τη βιοτεχνολογία

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ειδών του γένους *Aspergillus* είναι η ικανότητά τους να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες σε απόκριση σε περιβαλλοντικές παραμέτρους, επιτρέποντάς τους να προσαρμόζονται σε πολύπλοκες και συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων επιτρέπουν είτε την αύξηση των πιθανοτήτων επιβίωσης των ίδιων είτε την μείωση των πιθανοτήτων επιβίωσης των άλλων οργανισμών που βρίσκονται στην περιοχή, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την επιβίωση και την αναπαραγωγή τους. Παρά τη σημαντική μελέτη που περιβάλλει το γένος *Aspergillus*, η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών παραμένει ένας σχετικά ανεξερεύνητος τομέας. Τα μεταβολικά και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των *Aspέργιλλων*, καθιστούν αυτό το γένος σημαντικό στη μικροβιακή έρευνα, τη γενετική, την οικολογία, τη βιοτεχνολογία, τη φαρμακοβιομηχανία, την ενζυμική βιομηχανία και τη βιοχημεία. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι μικρά μόρια, χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία δεν είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την επιβίωση του οργανισμού που τα παράγει. Οι κυριότερες ομάδες των δευτερογενών μεταβολιτών των *Aspέργιλλων* περιλαμβάνουν πολυκετίδια (PK- polyketides), ριβοσωμικά και μη πεπτίδια (NRPs - ribosomal and nonribosomal peptides) και τερπενοειδή (terpenoids) (Brakhage, 2012). Η διαφορετική φύση των δευτερογενών μεταβολιτών είναι αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης γενετικής ρύθμισης, όπου μια τεραστία ποικιλία ενζύμων τροποποιούν, με διαφορετικό τρόπο, δομικά πολυμερή.

Πολλά είδη του γένους *Aspergillus* έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς από τον άνθρωπο, όπως το είδος *Aspergillus niger* για την παραγωγή κιτρικού οξέος στη βιομηχανία τροφίμων, το είδος *Aspergillus oryzae* για την παραγωγή του ποτού sake, αλλά και το είδος *Aspergillus sojae* για την παραγωγή της σάλτσας σόγιας (Sato et al., 2011). Αρκετοί δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους έχουν μεγάλη οικονομική σημασία για τον άνθρωπο, εκ των οποίων μεγαλύτερο οικονομικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον έχουν οι στατίνες¹ και τα παράγωγά τους. Η πρώτη στατίνη, μεβαστατίνη

¹ Οι στατίνες είναι φάρμακα που μειώνουν τη χοληστερόλη.

(mevastatin), απομονώθηκε από το είδος *Penicillium citrinum*, από τον Akira Endo και τους συνεργάτες του στην Ιαπωνία. Για την ανακάλυψη αυτή ο Endo κέρδισε το Βραβείο Lasker το 2008. Κλινικές μελέτες για τη μεβαστατίνη πραγματοποιήθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1970, ωστόσο δεν κυκλοφόρησε ποτέ στην αγορά. Η πρώτη διαθέσιμη στο ευρύ κοινό στατίνη ήταν η λοβαστατίνη, φυσικό προϊόν που απομονώθηκε από το μύκητα *Aspergillus terreus* (Tobert, 2003).

Πολλά είδη του γένους *Aspergillus* είναι σημαντικά για την ιατρική και τη βιοτεχνολογία (Gibbons and Rokas, 2013). Ορισμένα είδη μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις σε ανθρώπους, ζώα και φυτά, όπως ο *Aspergillus fumigatus*, παθογόνος μικροοργανισμός, υπεύθυνος για το μεγαλύτερο αριθμό θανάτων από μύκητες (Pfaller et al., 2006). Ο *Aspergillus flavus*, σαπροφυτικός-παθογόνος μύκητας, καταστροφικώς για τις γεωργικές καλλιέργειες, αφού με την ισχυρή καρκινογόνο αφλατοξίνη, μπορεί να προκαλέσει σημαντικές απώλειες στην απόδοση των καλλιεργειών και δεκάδες θανάτους ετησίως (Amaiike and Keller, 2011). Επίσης ο *Aspergillus sydowii*, ευκαιριακά παθογόνος των γοργόνιων κοραλλιών της Καραϊβικής, των οποίων πρόσφατη μόλυνση απειλείσαι με τη κατάρρευση αυτού του ευαίσθητου οικοσυστήματος (Ryrien et al., 2008).

Άλλοι *Ασπέργιλλοι* έχουν καθιερωθεί ως πρότυπα συστήματα-μοντέλα λόγω της ευκολίας χειρισμού τους (*Aspergillus nidulans*) και έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση πολλών φαινομένων της κυτταρικής βιολογίας και της γονιδιακής ρύθμισης, όπως η λειτουργία του κυτταροσκελετού, η ρύθμιση του μεταβολισμού, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η ανάπτυξη και η μορφογένεση (Galagan et al., 2005).

1.2 Η συνεισφορά του *A. nidulans* στη βιολογία

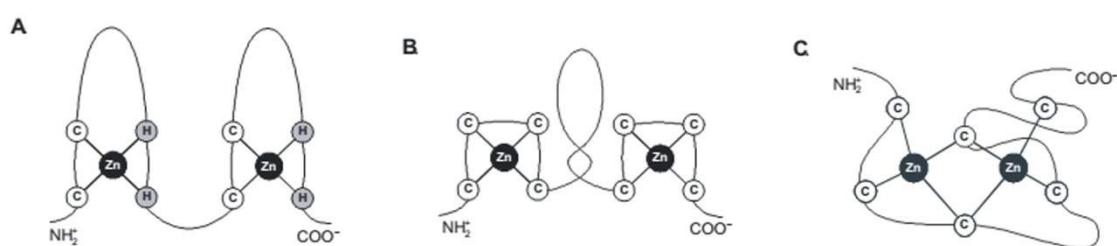
Ο *A. nidulans* έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο σύστημα σε πολλά επιστημονικά πεδία, όπως τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

1.2.1 Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Εξελιγμένα γενετικά ρυθμιστικά συστήματα επιτρέπουν στους μύκητες να χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων ως πηγές σημαντικών μεταβολιτών. Ο *A. nidulans* ειδικότερα, έχει ικανότητα χρήσης μιας μεγάλης ποικιλίας ουσιών ως πηγών άνθρακα, αζώτου ή και τα δύο. Ο μύκητας αυτός χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα-μοντέλο για το χαρακτηρισμό ενζύμων και μεταφορέων που εμπλέκονται σε πλήθος από τα μεταβολικά μονοπάτια του υφομύκητα αλλά και για τη διερεύνηση των μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής τους έκφρασης. Ήδη τη δεκαετία του '60 ανακαλύφθηκαν οι πρώτοι ειδικοί ευκαρυωτικοί μεταγραφικοί παράγοντες συγκεκριμένων μεταβολικών μονοπατιών, καθώς και οι πρώτοι ευκαρυωτικοί γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με την αναστολή της έκφρασης παρουσία προτιμώμενης πηγής άνθρακα ή αζώτου. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη χρήση μιας συγκεκριμένης ουσίας ως μοναδική πηγή αζώτου ή/και άνθρακα μεταγράφονται μόνο παρουσία ενός συγκεκριμένου μορίου επαγωγέα (*Encyclopedia of Microbiology*, 2009). 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.

Οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες ανήκουν στην κατηγορία πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA μέσω μιας ειδικής μυκητιακής δομικής ενότητας/μοτίβο δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger motif) (Pan and Coleman, 1990). Το ιόν ψευδαργύρου είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθερότητα αυτού του μοτίβου, καθώς απουσία του οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να αναδιπλωθούν σωστά. Το μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αυτών των μοτίβων/δομικών ενοτήτων που περιέχουν τον ψευδάργυρο, είναι περίπου 30-50 αμινοξικά κατάλοιπα, με κανονική επανάληψη κυστεϊνών και/ή ιστιδινών κατά μήκος της αλυσίδας. Αυτά τα αμινοξέα

συνδέονται ομοιοπολικά με τον ψευδάργυρο, δημιουργώντας μία συμπαγή δομή που ονομάζεται δακτύλιος ψευδαργύρου (zinc finger). Τα μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου κατατάσσονται σε διαφορετικούς τύπους βάσει του αριθμού και της απόστασης των ιόντων ψευδαργύρου μεταξύ τους. Για παράδειγμα, οι τύποι C2H2, C2C2 και C3H αλληλεπιδρούν με ένα ιόν ψευδαργύρου, ενώ οι τύποι C3H4, PHD και LIM συντονίζουν δύο ιόντα ψευδαργύρου (**Εικόνα 1-2**). Δομικά, το μοτίβο δακτύλων ψευδαργύρου τύπου C2H2, περιλαμβάνει μια β-στροφή ακολουθούμενη από μια α-έλικα η οποία αναδιπλώνεται γύρω από ένα μοναδικό ιόν ψευδαργύρου. Η αναγνώριση συγκεκριμένης αλληλουχίας στο DNA πραγματοποιείται, πρωταρχικά, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ ποικίλων αμινοξέων στην εσωτερική και την εξωτερική πλευρά της α-έλικας και νουκλεοτιδίων της μεγάλης (major) αύλακας του DNA. Σε αντίθεση με τους δακτύλους με ένα άτομο ψευδαργύρου, υπάρχει, όπως προαναφέρθηκε, μία οικογένεια παραγόντων μεταγραφής, των οποίων η περιοχή αλληλεπίδρασης με το DNA περιέχει 2 άτομα ψευδαργύρου είναι συναρμοσμένα με κατάλοιπα κυστείνης. Το ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι δύο από τις κυστείνες συνδέονται και με τα δύο άτομα ψευδαργύρου ταυτόχρονα, σχηματίζοντας δύο γέφυρες μεταξύ τους. Σκοπός της ύπαρξης των δύο ιόντων ψευδαργύρου, είναι η δημιουργία της σωστής στερεοδομής της περιοχής επαφής του μεταγραφικού παράγοντα με το DNA (Vallee et al., 1991).



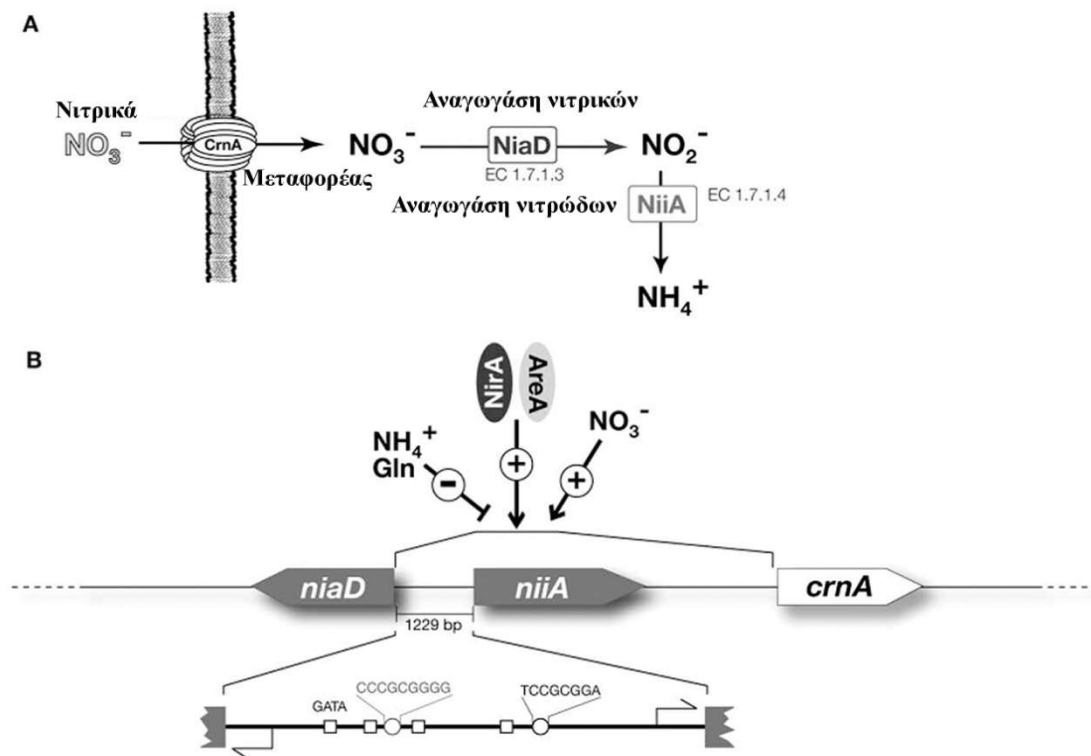
Εικόνα 1-2 Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικώς τύπων δακτύλων ψευδαργύρου. (A) Το μοτίβο δακτύλων ψευδαργύρου C2H2. (B) Cys4 μοτίβο (C) C, Zn(II)2Cys6 μοτίβο. Προσαρμογή από Vallee et al., 1991.

1.2.1.1

Ρύθμιση του μεταβολισμού του αζώτου

Οι *Aspérgιλλοι* μπορούν να χρησιμοποιούν ένα ευρύ φάσμα πηγών αζώτου, μεταξύ των οποίων η αμμωνία, τα νιτρικά, τα αμινοξέα (όπως ιστιδίνη ή προλίνη), ή σύνθετα υποστρώματα όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το μονοπάτι αφομοίωσης των νιτρικών, μια βασική διαδικασία στο παγκόσμιο κύκλο του αζώτου με τεράστια οικολογική και γεωργική σημασία. Η πλήρης αναγωγή των νιτρικών από το μύκητα αποδίδει αμμωνία, η οποία μπορεί να ενσωματωθεί στα αμινοξέα, γλουταμικό και γλουταμίνη που δρουν ως δότες αζώτου (Wilson and Arst, 1998). Το μονοπάτι αφομοίωσης/καταβολισμού των νιτρικών ουσιαστικά αποτελείται από τρία στοιχεία (Εικόνα 1-3):

- τον ειδικό μεταφορέα νιτρικών (CrnA)
- τα δύο ένζυμα που καταλύουν τη βαθμιαία μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη (NiaD) και αμμωνία (NiiA) (Burger et al., 1991).



Εικόνα 1-3 Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού αφομοίωσης/καταβολισμού των νιτρικών στον *A. nidulans*. (A) Η πρόσληψη των εξωκυττάριων νιτρικών πραγματοποιείται από τη δράση του μεταφορέα νιτρικών, CrnA. Ακολουθεί η αναγωγή των νιτρικών σε

αμμωνία από τα ενζύμα NiaD και NiiA, αναγωγή νιτρικών και αναγωγή νιτρώδων, αντίστοιχα. Τα προκύπτοντα ιόντα αμμωνίου ενσωματώνονται στα αμινοξέα, γλουταμικό και γλουταμίνη. **(B)** Γενετική οργάνωση και ρύθμιση του συσσωματώματος –cluster - αφομοίωσης νιτρικών. Τα γονίδια *niiA*, *niaD*, και *crnA* εντοπίζονται στο γονιδίωμα ως ένα συνεργείομα. Η μεταγραφική επαγωγή οδηγείται από τους θετικούς μεταγραφικούς παράγοντες (ή μεταγραφικούς ενεργοποιητές) *AreA* και *NirA*, οι συντηρημένες αλληλουχίες νουκλεοτιδικών βάσεων στις αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές των υποκινητών *niiA/niaD*, οι οποίες δεσμεύονται από τους ενεργοποιητές δείχνεται, με τα μοτίβα GATA να απεικονίζονται ως κουτιά. Όπως απεικονίζεται, η μεταγραφική ενεργοποίηση του μονοπατιού απαιτεί την παρουσία νιτρικών (μόρια- επαγωγή) και την απουσία αμμωνίας ή η γλουταμίνης. Προσαρμογή από Krappmann and Braus, 2005.

Επιπρόσθετα, στους *Aspéριλλους* υπάρχει ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας, *AreA*, ένας τυπικός GATA μεταγραφικός ενεργοποιητής της έκφρασης των γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη χρησιμοποίηση δευτερευόντων πηγών αζώτου (όπως νιτρικά, αμινοξέα και πουρίνες). Καθοριστικό ρόλο σε αυτό το μονοπάτι διαδραματίζει το προϊόν του γονιδίου *nirA*, ένας ειδικός μεταγραφικός παράγοντας που επάγει τα γονίδια που απαιτούνται για την πρόσληψη και τον καταβολισμό των νιτρικών. Τα ιόντα αμμωνίου και η γλουταμίνη απενεργοποιούν τον *AreA* σε πρωτεϊνικό επίπεδο, αλλά και σε μεταγραφικό, αποσταθεροποιώντας το mRNA του (Krappmann and Braus, 2005). Τα νιτρικά ιόντα ενεργοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα *NirA*, ο οποίος επάγει τη μεταγραφή των μεταφορέων νιτρικών και των αναγωγασών νιτρικών και νιτρώδων (**Εικόνα 1-3**). Στη ρύθμιση του μονοπατιού καταβολισμού των νιτρικών μπορούν να διακριθούν οι εξής περιπτώσεις:

1. **Απουσία** του επαγωγέα (νιτρικών ιόντων) και **παρουσία** προτιμώμενης πηγής αζώτου (π.χ. αμμωνιακών ιόντων) δεν προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων ούτε ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας-ρυθμιστής (*NirA*) ούτε ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας (*AreA*), και κατά συνέπεια τα γονίδια δεν εκφράζονται ή εκφράζονται σε βασικά επίπεδα (basal levels).
2. **Απουσία** μορίου επαγωγέα και προτιμώμενης πηγής αζώτου προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων μόνο ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας, και κατά συνέπεια τα γονίδια δεν εκφράζονται ή εκφράζονται σε βασικά επίπεδα (basal levels).
3. **Παρουσία** μορίου επαγωγέα και **απουσία** προτιμώμενης πηγής αζώτου προσδένονται στον υποκινητή των γονιδίων και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες (*AreA* και *NirA*) και πραγματοποιείται μεταγραφή.

4. **Παρουσία** μορίου επαγωγέα και προτιμώμενης πηγής αζώτου μόνο ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας (NirA) προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων και κατά συνέπεια τα γονίδια δεν εκφράζονται ή εκφράζονται σε βασικά επίπεδα (basal levels).

1.2.1.2 Ρύθμιση του μεταβολισμού του άνθρακα

Οι νηματώδεις μύκητες χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να μεταβολίζουν μία μεγάλη ποικιλία πηγών άνθρακα, όπως αμινοξέα (προλίνη), πηκτίνες και πολυσακχαρίτες (άμυλο και φρουκτάνη). Τα περισσότερα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση αυτών των πολυσακχαριτών καταστέλλονται από τη γλυκόζη, μία προτιμώμενη πηγή άνθρακα (Bailey and ARST, 1975). Η καταστολή επιτυγχάνεται μέσω της πρωτεΐνης CreA. Αντίθετα με το γενικό μεταγραφικό ενεργοποιητή AreA, ο CreA είναι ένας γενικός μεταγραφικός καταστολέας (carbon catabolite repressor), ο οποίος προσδένεται στις αλληλουχίες στόχους μόνο παρουσία γλυκόζης. Ο CreA είναι μια τυπική πρωτεΐνη δακτύλων ψευδαργύρου (τύπου C₂H₂) και δρα είτε απενεργοποιώντας τους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, είτε ανταγωνιζόμενος με αυτούς για τη δέσμευση στο DNA (Cubero and Scazzocchio, 1994).

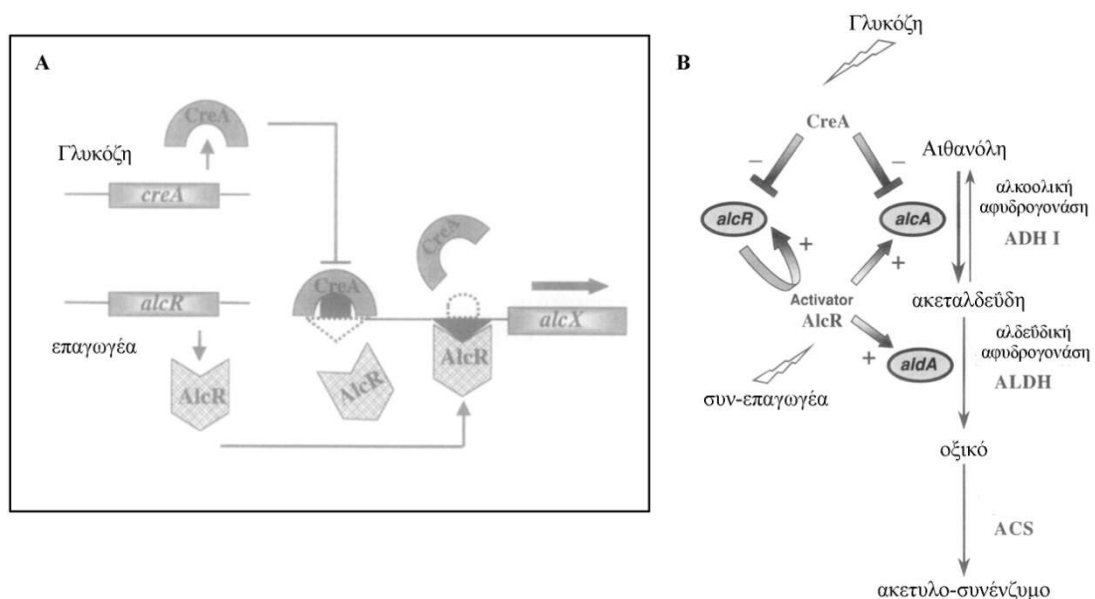
Ένα εκτενώς μελετημένο ρυθμιστικό σύστημα γονιδιακής έκφρασης, το οποίο εξαρτάται από την πηγή άνθρακα του θρεπτικού μέσου είναι αυτό του καταβολισμού της αιθανόλης. Ειδικός μεταγραφικός ενεργοποιητής του μονοπατιού είναι ο AlcR (Lockington et al., 1985), ο οποίος επάγει την έκφραση των γονιδίων *alcA* και *aldA*, της αλκοολικής αφυδρογονάσης και της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης, αντίστοιχα (Felenbok et al., 2001). Στη ρύθμιση του μονοπατιού της αιθανόλης μπορούν να διακριθούν οι εξής περιπτώσεις:

- 1 **Παρουσία** «ουδέτερης» πηγής άνθρακα (π.χ. φρουκτόζης) και **απουσία** του συν-επαγωγέα (ακεταλδεϋδης) δεν προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων ούτε ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας-ρυθμιστής (π.χ. AlcR) ούτε ο γενικός μεταγραφικός αρνητικός ρυθμιστής/καταστολέας (CreA), και κατά

συνέπεια τα γονίδια δεν εκφράζονται ή εκφράζονται σε βασικά επίπεδα (basal levels).

- 2 **Απουσία** μορίου συν-επαγωγέα και **παρουσία** προτιμώμενης πηγής άνθρακα (π.χ γλυκόζης) τα γονίδια δεν εκφράζονται ή εκφράζονται σε βασικά επίπεδα (basal levels). Ο AlcR, **παρουσία** γλυκόζης (προτιμώμενης άνθρακα) στο θρεπτικό μέσο, βρίσκεται σε καταστολή από το γενικό μεταγραφικό αρνητικό παράγοντα CreA, ο οποίος προσδένεται στις αλληλουχίες στόχους των γονιδίων *aldA* και *alcA* και δεν επιτρέπει την έκφρασή τους.
- 3 **Παρουσία** «ουδέτερης» πηγής άνθρακα, όπως η φρουκτόζη, και **παρουσία** του συν-επαγωγέα (ακεταλδεΐδης) ο CreA δεν δεσμεύεται στις αλληλουχίες στόχους του, ενώ το γονίδιο του *alcR* εκφράζεται κανονικά και επάγει τόσο τη μεταγραφή των *alcA* και *aldA*, όσο και τη δική του (θετική αυτορρύθμιση) (Εικόνα 1-4).
- 4 Παρουσία του συν-επαγωγέα και προτιμώμενης πηγής άνθρακα προσδένονται στον υποκινητή των γονιδίων και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες και κατά συνέπεια τα γονίδια δεν εκφράζονται ή εκφράζονται σε βασικά επίπεδα (basal levels).

Η υψηλή επαγωγιμότητα του παραπάνω μονοπατιού έχει οδηγήσει στην αξιοποίησή του ως εργαλείο ρυθμιζόμενης έκφρασης γονιδίων στη μοριακή βιολογία.



Εικόνα 1-4 (Α) Μοντέλο ανταγωνισμού μεταξύ AlcR και CreA για την πρόσδεση στη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *alc*. Η πρωτεΐνη CreA απεικονίζεται ως μισό στέμμα και ο στόχος της ως κύκλος. Ο στόχος της πρωτεΐνης AlcR απεικονίζεται ως ένα μαύρο τρίγωνο. Κάτω από επαγωγικές συνθήκες ανάπτυξης, ο μεταγραφικός παράγοντας AlcR είναι ενεργός και προσδένεται στο στόχο του, εμποδίζοντας την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα CreA. Σε συνθήκες ανάπτυξης όπου στο θρεπτικό μέσο υπάρχει γλυκόζη, συμβαίνει το αντίθετο. **(Β) Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης των γονιδίων *alc*, που εμπλέκονται στην αξιοποίηση της αιθανόλης στον *A. nidulans*.** Παρουσία του συν-επαγωγέα (ακεταλδεύδης), ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας AlcR αυτορυθμίζεται θετικά και ταυτόχρονα ρυθμίζει θετικά τα δύο δομικά γονίδια *alcA* και *Alda*, τα οποία κωδικοποιούν για την αλκοολική αφυδρογονάση και την αλδεϋδική αφυδρογονάση, αντίστοιχα. Αυτά τα ένζυμα οξειδώνουν την αιθανόλη σε ακεταλδεύδη και την ακεταλδεύδη σε οξικό, αντίστοιχα. Το οξικό μετατρέπεται σε ακετυλο-συνένζυμο Α (από την ACS) και στη συνέχεια εισέρχεται στον κυτταρικό μεταβολισμό. Προσαρμογή από Felenbok et al., 2001.

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 αυτών των ουσιών δεν εκφράζονται όταν στο θρεπτικό υπόστρωμα υπάρχουν ταυτόχρονα γλυκόζη και αμμωνιακά ιόντα/γλουταμίνη. 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, η προλίνη να χρησιμοποιείται ως πηγή αζώτου και άνθρακα ταυτόχρονα, όταν στο θρεπτικό μέσο απουσιάζουν οι προτιμώμενες.

Ο κύριος μεταφορέας προλίνης του *A. nidulans* κωδικοποιείται από το γονίδιο *prnB*, το οποίο ανήκει στο συνεργείο γονιδίων (gene cluster) *prn* του χρωμοσώματος VII. Στο συνεργείο αυτό ανήκουν εκτός από το γονίδιο του μεταφορέα της προλίνης, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα καταβολισμού της προλίνης σε γλουταμικό οξύ (*prnC* και *prnD*), ένα γονίδιο άγνωστης λειτουργίας (*prnX*) και το ρυθμιστικό γονίδιο *prnA*. Η πρωτεΐνη PrnA είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί την έκφραση των δομικών γονιδίων *prnB*, *prnC* και *prnD* παρουσία προλίνης (Sharma and Jr, 1985). Ο μεταφορέας προλίνης PrnB ανήκει στην οικογένεια YAT της υπεροικογένειας APC. Σε αντίθεση με τον ομόλογο μεταφορέα Put4 του *S. cerevisiae*, χαρακτηρίζεται από απόλυτη εξειδίκευση στην πρόσληψη της προλίνης (Gournas et al., 2015). Η έκφραση του γονιδίου *prnB* βρίσκεται υπό αυστηρό έλεγχο τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταμεταφραστικό επίπεδο (Sophianopoulou and Scazzocchio, 1989). Στη ρύθμιση των γονιδίων που

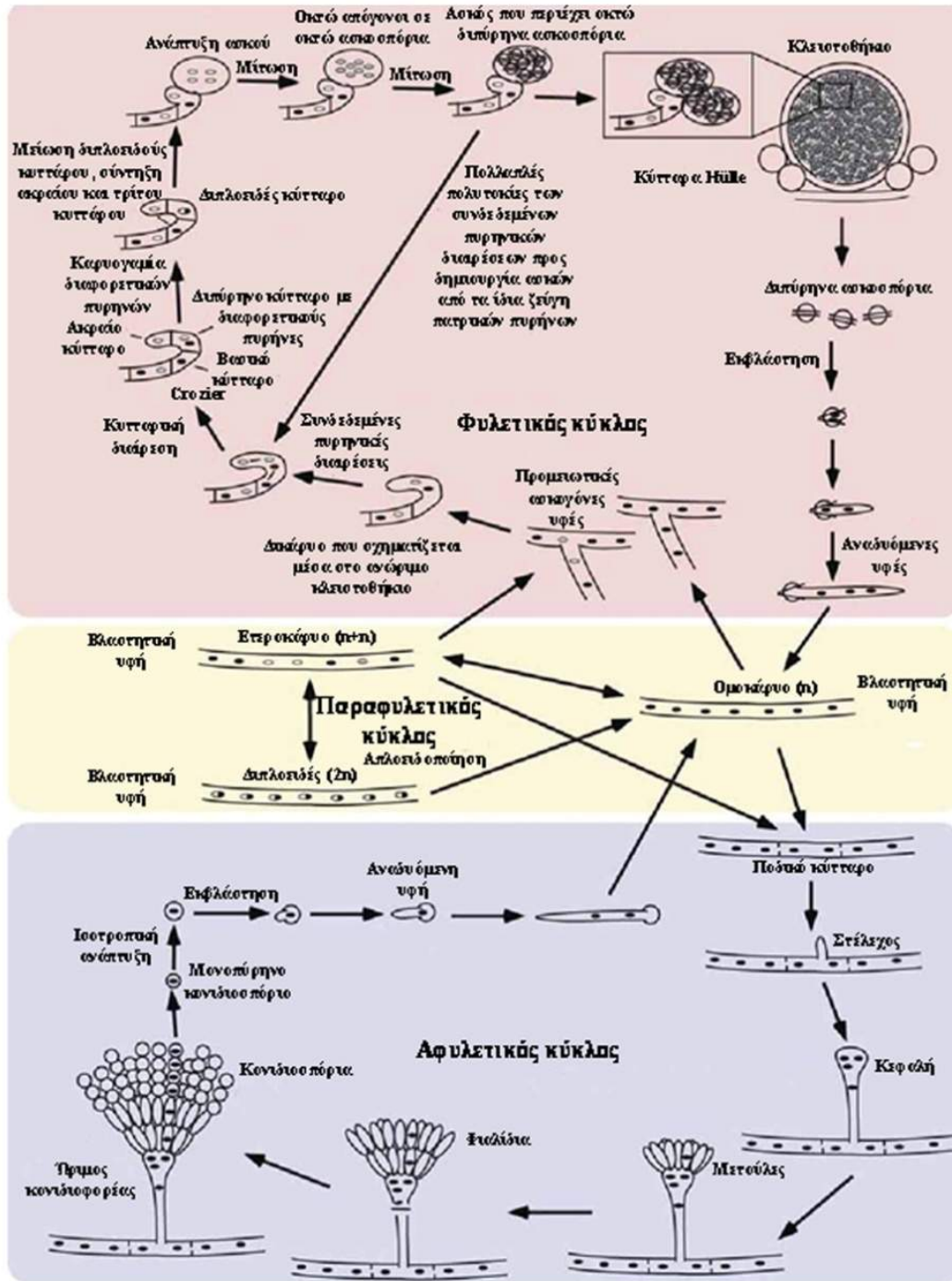
εμπλέκονται στη χρησιμοποίηση ουσιών που μπορεί να είναι πηγές αζώτου και άνθρακα μπορούν να διακριθούν οι εξής περιπτώσεις:

1. **Απουσία** του επαγωγέα (προλίνης) ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας (εν προκειμένω ο P_{trnA}) δεν προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων και κατά συνέπεια τα γονίδια δεν εκφράζονται ή εκφράζονται σε βασικά επίπεδα (basal levels). Η έκφραση αυτή είναι ανεξάρτητη της παρουσίας προτιμώμενης πηγής αζώτου ή άνθρακα.
2. **Παρουσία** του επαγωγέα και **απουσία** προτιμώμενων πηγών αζώτου και άνθρακα προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας (P_{trnA}) και ο AreA. Εμφανίζεται συνεπώς πλήρης επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων.
3. **Παρουσία** του επαγωγέα και προτιμώμενης πηγής αζώτου με ταυτόχρονη απουσία προτιμώμενης πηγής άνθρακα προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων μόνο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας (P_{trnA}). Εμφανίζεται συνεπώς πλήρης ή σχεδόν πλήρης μεταγραφική επαγωγή.
4. **Παρουσία** του επαγωγέα (προλίνης) 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 μεταγραφικός αρνητικός ρυθμιστής CreA. Εμφανίζεται ελάχιστη ή καθόλου μεταγραφή.

1.3 Βιολογικός κύκλος ζωής του *Aspergillus nidulans*

Ο κύκλος ζωής του *A. nidulans* μπορεί να χωριστεί σε τρεις επιμέρους κύκλους (**Εικόνα 1-5**): το φυλετικό (εγγενή αναπαραγωγή), τον αφυλετικό (αγενής αναπαραγωγή) και τον παραφυλετικό κύκλο ζωής. Εναρκτήριο σημείο των τριών κύκλων αποτελεί η εκβλάστηση των αδρανών σπορίων του μύκητα. Αυτά τα σπόρια μπορεί να είναι προϊόντα μίτωσης (αγενή κονιδιοσπόρια) ή μείωσης (εγγενή

ασκοσπόρια). Στην ύπαρξη κατάλληλου περιβαλλοντικού ερεθίσματος, τα σπόρια εκβλαστάνουν και επεκτείνονται σωληνοειδώς μέσω επάκριας αύξησης. Ταυτόχρονα υπάρχει διακλαδούμενη αύξηση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πλέγματος πολυκυτταρικών υφών, το μυκήλιο. Σε ανοιχτή υγρή καλλιέργεια με περίσσεια θρεπτικών συστατικών το μυκήλιο έχει δυνατότητα αύξησης επ' αόριστον, ενώ σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σχηματίζει μία ακτινωτής συμμετρίας αποικία, η οποία επεκτείνεται μέχρι τον περιορισμό χώρου σε ρυθμό της τάξης των 0.25 mm/h στους 37 °C, ενώ είναι δυνατή η ανάπτυξη διαφοροποιημένων εγγενών και αγενών αναπαραγωγικών δομών.



Εικόνα 1-5 Σχηματική αναπαράσταση του βιολογικού κύκλου του *A. nidulans*. Με ροζ πλαίσιο σημειώνονται τα στάδια του φυλετικού κύκλου, με γαλάζιο του αφυλετικού και με κίτρινο του παραφυλετικού κύκλου. Οι τρεις κύκλοι μπορούν να εξελίσσονται ταυτόχρονα από μία αποικία του μύκητα, εξυπηρετώντας την εξάπλωσή της (αφυλετικός), την επιβίωση της υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (φυλετικός) και τη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας (φυλετικός και παραφυλετικός). Προσαρμογή από Todd et al., 2007.

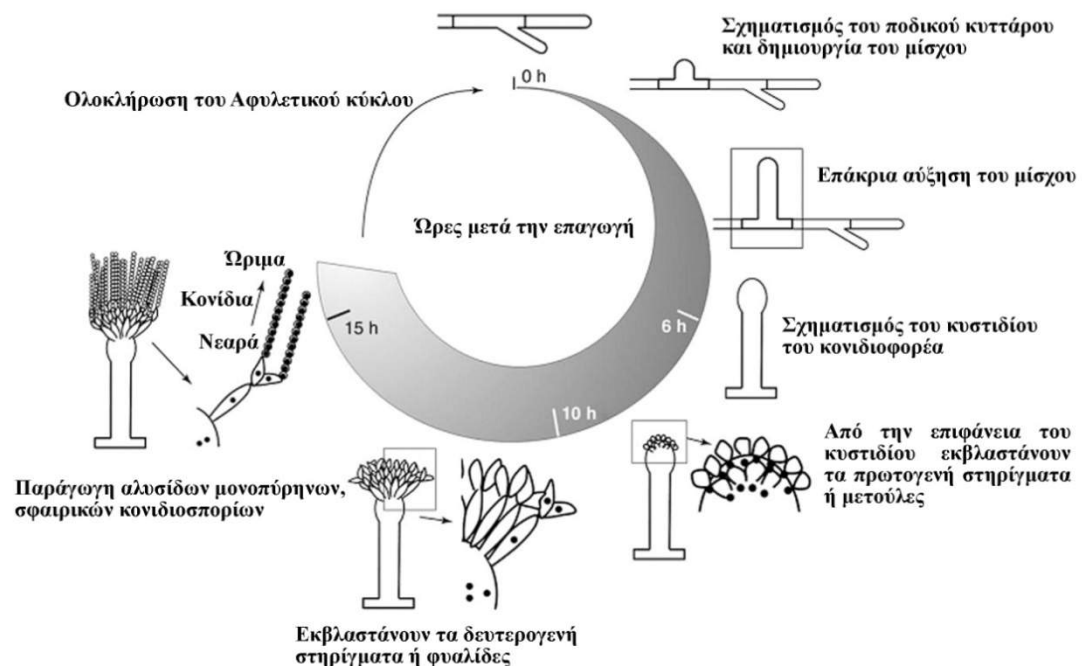
1.3.1 Αφυλετικός κύκλος

Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, οι πρώτες διαφοροποιημένες υφές είναι ορατές 16 ώρες μετά την εκβλάστηση. Ο χρόνος αυτός δεν είναι σταθερός και εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης, την πυκνότητα βιώσιμων κυττάρων, τη σύσταση του υποστρώματος καλλιέργειας, την παρουσία οξυγόνου και τις συνθήκες έκθεσης στο φως (Bayram et al., 2010). Στο κέντρο της αποικίας εντοπίζονται εναέριες υφές. Χρειάζονται περίπου 6 με 12 ώρες από την έναρξη της εναέριας αύξησης μέχρι τη δημιουργία του πρώτου κονιδίου (κονιδιοσπορίου), επομένως καινούργια κονίδια δημιουργούνται με την έναρξη του καινούργιου αγενούς κύκλου, περίπου 24-28 ώρες μετά από την εκβλάστηση του αρχικού σπορίου (Rossomando and Alexander, 1992).

Η δημιουργία κονιδιοφορέων σε μία αποικία είναι σύνθετη διαδικασία, η οποία μπορεί να διαχωρισθεί σε αρκετά μορφολογικώς διακριτά στάδια (**Εικόνα 1-6**). Η διαδικασία ξεκινάει με την αύξηση του μίσχου του κονιδιοφορέα, ο οποίος επιμηκύνεται μέσω επάκριας αύξησης από μία εναέρια υφή. Ο μίσχος του κονιδιοφορέα διαφέρει από μία βλαστική υφή σε τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά (Etchebeste et al., 2010):

1. Ο μίσχος εκφύεται από ένα εξειδικευμένο κύτταρο με παχύ κυτταρικό τοίχωμα το οποίο ονομάζεται ποδικό.
2. Τόσο το ποδικό κύτταρο όσο και ο μίσχος διαφέρουν από τα υπόλοιπα κύτταρα του μυκηλίου, λόγω της ύπαρξης διπλού κυτταρικού τοιχώματος. Η πρώτη στρώση του κυτταρικού τοιχώματος είναι συνεχής και κοινή με τα υπόλοιπα κύτταρα του μυκηλίου, ενώ η εσωτερική στρώση εντοπίζεται αποκλειστικά στο ποδικό κύτταρο και το μίσχο.
3. Επιπροσθέτως, ο μίσχος του κονιδιοφορέα έχει διάμετρο περίπου 4-5 μm σε αντίθεση με τις βλαστικές υφές που έχουν διάμετρο περίπου 2-3 μm .
4. Τέλος, σε αντίθεση με τις υφές ο μίσχος σπάνια διακλαδίζεται ενώ έχει και καθορισμένο ύψος (~100 μm).

Μετά την επάκρια αύξηση του μίσχου, η κορυφή του αρχίζει και διογκώνεται σχηματίζοντας το κυστιδίο του κονιδιοφορέα, διαμέτρου ~10 μm. Τόσο το κυστιδίο με το μίσχο, όσο και ο μίσχος με το ποδικό κύτταρο δε διαχωρίζονται μεταξύ τους με σέπτα, επομένως όλες αυτές οι δομές αποτελούν μία ενιαία μονάδα με διπλό κυτταρικό τοίχωμα. Από την επιφάνεια του κυστιδίου εκβλαστάνει μία σειρά μονοπύρηνων κυττάρων, τα πρωτογενή στηρίγματα ή μετούλες (metulae). Από τις μετούλες εκβλαστάνουν μονοπύρηννα κύτταρα, τα δευτερογενή στηρίγματα ή φυαλίδες (phialides). Η εκβλάστηση πραγματοποιείται αντιδιαμετρικά του κυστιδίου. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι κάθε κυστιδίο φέρει περίπου 60 μετούλες και κάθε μετούλα φέρει 2-3 φυαλίδες. Οι φυαλίδες διαιρούνται μιτωτικά και από αυτές παράγονται αλυσίδες μονοπύρηνων, σφαιρικών κυττάρων, τα κονιδιοσπόρια ή κονίδια. Η διαδικασία της μίτωσης των φυαλίδων είναι συνεχής με αποτέλεσμα το πιο προσφάτως σχηματιζόμενο κονίδιο να εντοπίζεται δίπλα στη φυαλίδα ενώ το παλαιότερο να είναι το πιο απομακρυσμένο από αυτήν. Επειδή κάθε φυαλίδα μπορεί να δημιουργήσει έως και 100 κονίδια υπολογίζεται πώς ο αριθμός των σπορίων που παράγονται από έναν κονιδιοφορέα ξεπερνάει τις 100.000.



Εικόνα 1-6 Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων σταδίων κατά το σχηματισμό κονιδιοφορέων στον *A. nidulans*. Προσαρμογή από Etxebeste et al., 2010.

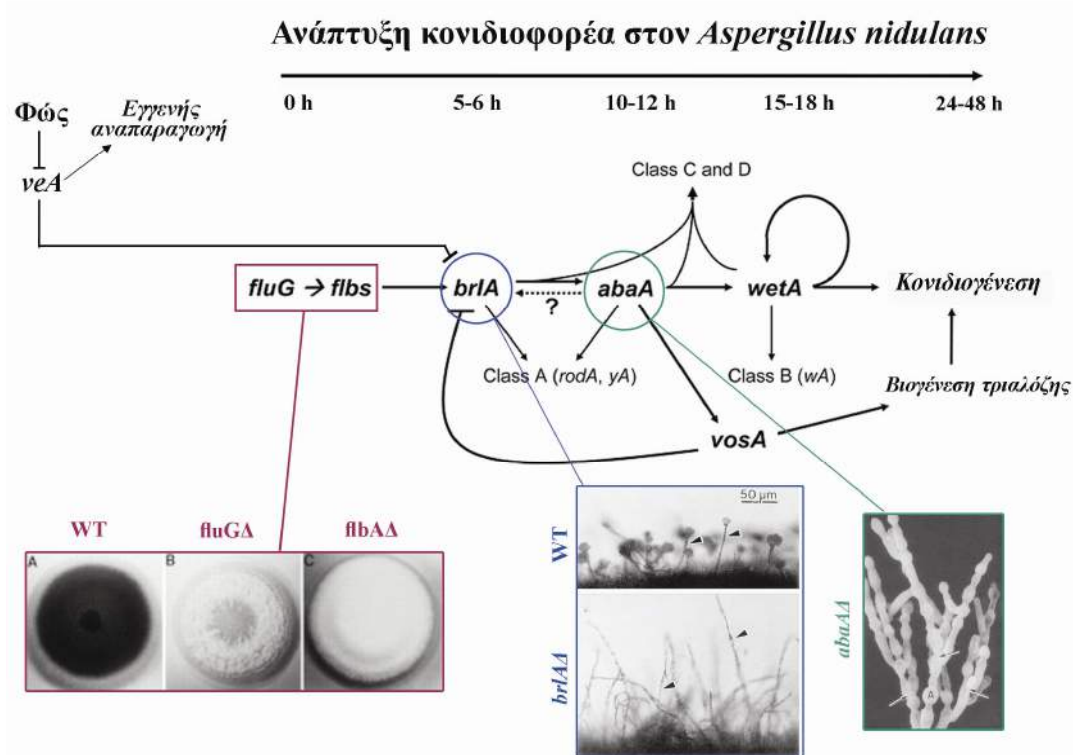
1.3.1.1 Η ρύθμιση του αφυλετικού κύκλου

Η ανάπτυξη του κονιδιοφορέα καθορίζεται τόσο από το χωρικό όσο και χρονικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, αλλά και την ενδοκυτταρική επικοινωνία (Yu, 2010). Η πρωτεΐνη FluG θεωρείται ότι βρίσκεται στην έναρξη του αγενή κύκλου, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο κατά την κονιδιογένεση. Πράγματι, η υπερέκφραση του γονιδίου *fluG* σε υφές, είναι αρκετή για να οδηγήσει στο σχηματισμό κονιδιοφορέων και την παραγωγή κονιδιοσπορίων, ακόμα και σε συνθήκες που δεν ευνοούν τη δημιουργία τους (Lee and Adams, 1996). Επόμενο βασικό βήμα για την κονιδιογένεση είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα BrlA. Στελέχη που φέρουν μεταλλάγες του γονιδίου *brlA* εμφανίζουν μίσχους με ανικανότητα σχηματισμού κονιδιοφορέα (επ'αόριστον επιμήκυνση του μίσχου, χωρίς τον σχηματισμό πρωτογενών και δευτερογενών στηριγμάτων) (**Εικόνα 1-7**). Ο BrlA φέρει δομή δακτυλίων ψευδαργύρου και ρυθμίζει τη μεταγραφή του γονιδίου *abaA*, το προϊόν του οποίου με τη σειρά του, ρυθμίζει θετικά το μεταγραφικό παράγοντα BrlA. Μορφολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι μεταλλάγες του γονιδίου *abaA*, εμφανίζουν πολλαπλές διαδοχικές σειρές στηριγμάτων, τα οποία δεν διαφοροποιούνται σε φιαλίδια ή κονιδιοσπόρια (Sewall et al., 1990). Η πρωτεΐνη AbaA περιλαμβάνει ένα μοτίβο σύνδεσης με το DNA του τύπου ATTS/TEA, όπως και ένα μοτίβο φερμουάρ/αυτόκλειστο λευκίνης (leucine zipper), το οποίο ενδεχομένως χρησιμεύει για διμερισμό της πρωτεΐνης. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη AbaA προσδένεται σε *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία αναρροικά των γονιδίων *yA*² και *rodA*³ και ελέγχει την έκφραση τους. Κατά το τελευταίο στάδιο της κονιδιογένεσης, η πρωτεΐνη AbaA ρυθμίζει θετικά την έκφραση του γονιδίου *wetA*, το προϊόν του οποίου είναι μεταγραφικός παράγοντας σχετιζόμενος με τη σύνθεση σημαντικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Απώλεια λειτουργίας του *wetA* προκαλεί φαινότυπο αυτολυόμενων κονιδιοσπορίων. Η πρωτεΐνη WetA φαίνεται ότι ενεργοποιεί μια σειρά από γονίδια που απαιτούνται για το σχηματισμό και την ωρίμανση των σπορίων. Η αλληλεπίδραση των γονιδίων *brlA*, *abaA* και *wetA* έχει προταθεί ότι αποτελεί ένα κεντρικό ρυθμιστικό μονοπάτι

² Το γονίδιο *yA* κωδικοποιεί για την οξειδάση της p-διφαινολής και σχετίζεται με το χρώμα των κονιδιοσπορίων.

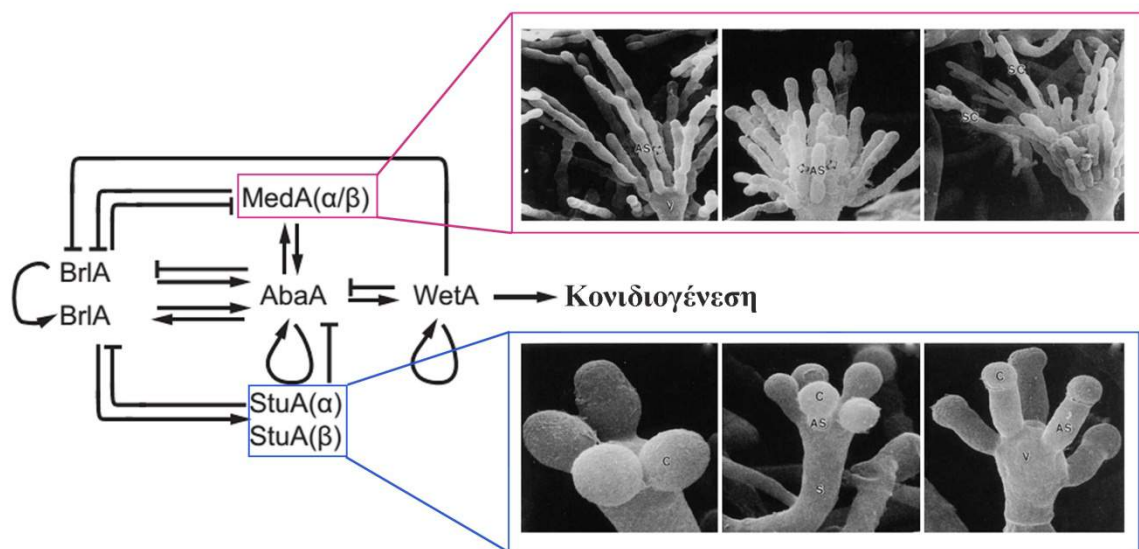
³ Το γονίδιο *rodA* (hydrophobin gene) του *A. nidulans* εκφράζεται κατά τα τελικά στάδια του σχηματισμού κονιδιοφορέα και δεν εκφράζεται σε υφές και κονιδιοσπόρια.

που ελέγχει χρονικά και χωρικά την έκφραση γονιδίων κατά τη δημιουργία και ανάπτυξη των κονιδιοφορέων αλλά και την ωρίμανση των σπορίων (Εικόνα 1-7). Πρόσφατα, ο νέος μεταγραφικός παράγοντας VosA (**v**iability **o**f **s**pore) εντοπίστηκε σε μια γενετική ανάλυση, στην οποία απαλοιφή του *vosA* είχε ως αποτέλεσμα την έλλειψη τρεαλόζης και στους δυο τύπους σπορίων (κονιδιοσπόρια και ασκοσπόρια) του *A. nidulans*, με αποτέλεσμα την ταχεία εξαφάνιση του κυτταροπλάσματος, την αποσύνθεση των κυτταρικών οργανιδίων και τη μακροπρόθεσμη απώλεια βιωσιμότητας. Ο μεταγραφικός παράγοντας αυτός έχει αρνητική ανάδρομη ρύθμιση (negative feedback regulation) πάνω στην έκφραση του *brlA* και σε συνεργασία με τα κεντρικά ρυθμιστικά γονίδια του μονοπατιού, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη βιογένεση τρεαλόζης και την ωρίμανση των κονιδίων (Ni and Yu, 2007).



Εικόνα 1-7 Σχηματική αναπαράσταση ανάπτυξης κονιδιοφορέα. Απεικονίζεται το κεντρικό αναπτυξιακό μονοπάτι. Το *rodA* κωδικοποιεί μια εξειδικευμένη για κονίδια υδροφοβίνη. Στις ένθετες εικόνες παρουσιάζονται οι φαινότυποι των μεταλλαγών, *brlA*, *abaA*, *fluG* και *flbA*. Τα περισσότερα σήματα απεικονίζονται να επηρεάζουν την έκφραση του *brlA*, για λόγους απλότητας, καθώς δεν είναι γνωστό αν οι επιδράσεις αυτές είναι άμεσες ή έμμεσες. Προσαρμογή και τροποποίηση από Adams et al., 1998; Araújo-Bazán et al., 2009; Ni and Yu, 2007; Sewall et al., 1990.

Η κατανομή και η χρονική έκφραση των πρωτεϊνών BrlA και AbaA ρυθμίζεται από τους αναπτυξιακούς τροποποιητές (developmental modifiers) StuA και MedA. Ο μεταγραφικός παράγοντας StuA παρουσιάζει 2 θέσεις έναρξης μεταγραφής, με αποτέλεσμα την παραγωγή των μεταγράφων *stuAα* και *stuAβ*, εκ των οποίων το *stuAα*, φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην κονιδιογένεση. Η έκφραση του *stuAα* εξαρτάται από την πρωτεΐνη BrlA, τα επίπεδα δυναμικής ισορροπίας του *stuAα* αυξάνονται έως 20 φορές κατά την κονιδιογένεση. Με τη σειρά του, ο StuA αναστέλλει και περιορίζει χωρικά την έκφραση των *brlAα* και *abaA* (Εικόνα 1-8) (Miller et al., 1992). Μεταλλαγμένα αλληλία της StuA δημιουργούν στελέχη με κοντούς κονιδιοφορείς, στους οποίους τα κονίδια σχηματίζονται απευθείας από το κυστίδιο (Adams et al., 1998).



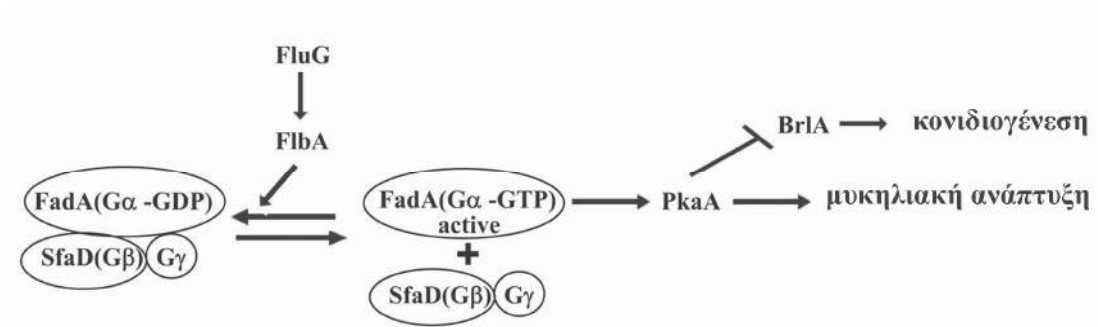
Εικόνα 1-8 Σχηματική αναπαράσταση του κεντρικού μονοπατιού ανάπτυξης του κονιδιοφορέα, στο οποίο απεικονίζονται οι αναπτυξιακοί τροποποιητές StuA και MedA. Στα ροζ και μπλε πλαίσια, απεικονίζονται ηλεκτρονικές μικρογραφίες μεταλλαγμένων στελεχών *medA* και *stuA*, αντίστοιχα. Μεταλλαγμένα αλληλία της StuA δημιουργούν στελέχη με κοντούς κονιδιοφορείς στους οποίους τα κονίδια σχηματίζονται απευθείας από το κυστίδιο, ενώ μεταλλαγές στην πρωτεΐνη MedA έχουν ως αποτέλεσμα τα στηρίγματα να μην διαφοροποιούνται άμεσα, και τον επακόλουθο σχηματισμό πολλών σειρών πρωτογενών στηριγμάτων (μετούλες) πριν το σχηματισμό των φιαλίδων. Προσαρμογή και τροποποίηση από (Adams et al., 1998; Krijgheld et al., 2013)

Η χρονική έκφραση του *brlA* ρυθμίζεται επίσης από το μεταγραφικό παράγοντα MedA, ο οποίος δρα ως αναστολέας της έκφρασης του γονιδίου *brlA* και

ενεργοποιητής της έκφρασης του *abaA*, συμπεράσμα το οποίο πρόεκυψε από την παρατήρηση ότι τα επίπεδα των μετάγραφων *abaA* μειώνονται σημαντικά ή απουσιάζουν σε στελέχη *medAΔ*. Μεταλλαγές στο μεταγραφικό παράγοντα MedA φέρουν στελέχη στα οποία τα στηρίγματα δε διαφοροποιούνται άμεσα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλών σειρών πρωτογενών στηριγμάτων (μετούλες) πριν το σχηματισμό των φιαλιδίων (**Εικόνα 1-8**) (Krijgsheld et al., 2013).

Σημαντικό παράγοντα στην απόφαση ανάμεσα στη μυκηλιακή ανάπτυξη και την εγγενή ή αγενή αναπαραγωγή διαδραματίζει η σηματοδότηση μέσω πρωτεϊνών G. Το γονίδιο *flbA* (fluffy low *briA* expression) κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη RGS⁴ που ρυθμίζει αρνητικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη, μετατρέποντας τη FadA (fluffy autolytic dominant), υπομονάδα μιας τριμερούς G-πρωτεΐνης, στη GDP-δεσμευμένη ανενεργή μορφή (D'Souza et al., 2001). Στη μορφή αυτή, η πρωτεΐνη FadA σχηματίζει την πρωτεΐνη G με τις -β και γ-υπομονάδες, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *sfaD* και *grgA*, αντίστοιχα (**Εικόνα 1-9**). Όταν η FadA είναι ενεργή (GTP-δεσμευμένη), διαχωρίζεται από τις SfaD και GrgA, και προάγει τη μυκηλιακή ανάπτυξη, αναστέλλοντας την εγγενή και αγενή αναπαραγωγή ενεργοποιώντας ένα cAMP-PKA καταρράκτη σηματοδότησης (Shimizu and Keller, 2001). Υπερέκφραση του γονιδίου *flbA* αναστέλλει τη μυκηλιακή ανάπτυξη και διεγείρει την ανάπτυξη κονιδιοφορέων ακόμη και υπό συνθήκες που συνήθως εμποδίζουν την κονιδιογένεση. Από την άλλη πλευρά, μεταλλαγές του *flbA* οδηγούν σε μειωμένη έκφραση του γονιδίου *briA* και ένα φαινότυπο fluffy. Τα στελέχη *flbAΔ* δεν σχηματίζουν κονιδιοφορείς, αντίθετα, το μυκήλιο πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα σχηματίζοντας μάζες αδιαφοροποίητων εναέριων υφών (Lee and Adams, 1996).

⁴ RGS (Regulators of G protein Signaling) είναι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ένταση και τη δραστηριότητα των G πρωτεϊνών μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων, δρώντας ως σημαντικοί ρυθμιστές στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Ο πρωταρχικός τους ρόλος είναι η αλληλεπίδραση τους με τις Gα υπομονάδες των G πρωτεϊνών και η επιτάχυνση της υδρόλυσης του GTP από τις τελευταίες οδηγώντας στη μείωση της σηματοδότησης των GPCR.



Εικόνα 1-9 Προτεινόμενο μοντέλο για το ρόλο των γονιδίων *flbA* και *fadA* στην κονιδιογένεση και μυκηλιακή ανάπτυξη στον *A. nidulans*. Η πρωτεΐνη FluG εμπλέκεται στη σύνθεση ενός μικρού σηματοδοτικού μορίου σήματος, το οποίο συμμετέχει στη θετική ρύθμιση της F1bA, μιας RGS πρωτεΐνης που ρυθμίζει αρνητικά την FadA (υπομονάδα μιας τριμερούς G-πρωτεΐνης). Η ενεργή FadA, διαχωρίζεται από τις Gβ-Gγ υπομονάδες, ρυθμίζει θετικά ένα cAMP-PKA καταρράκτη σηματοδότησης προωθώντας τη μυκηλιακή ανάπτυξη και αναστέλλοντας την κονιδιογένεση. Προσαρμογή και τροποποίηση από (Kato et al., 2003)

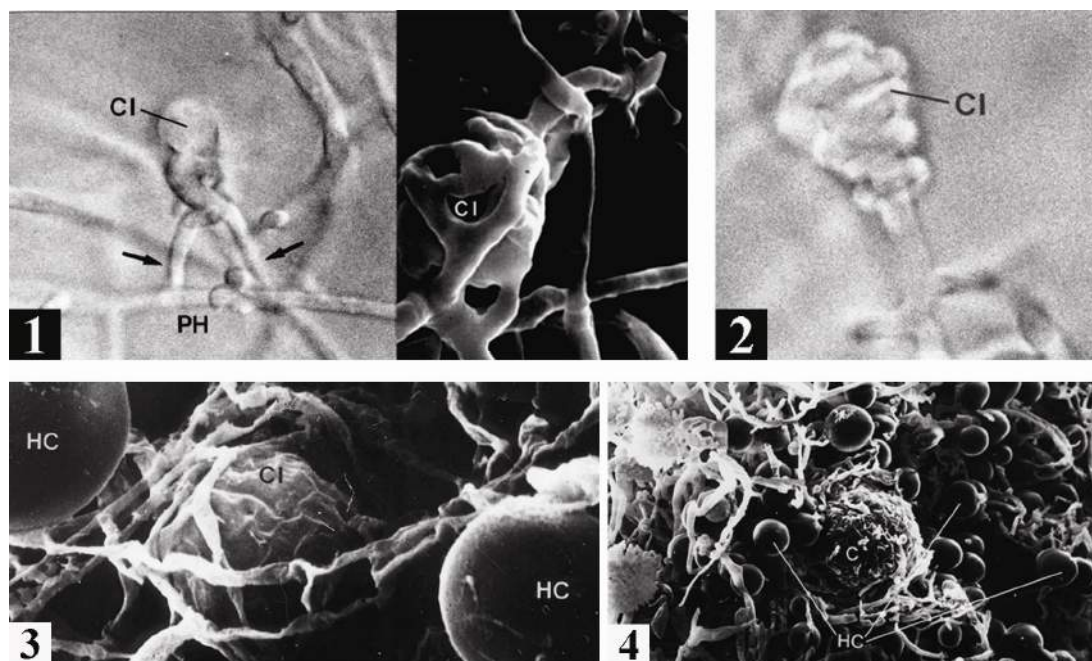
1.3.2 Φυλετικός κύκλος

Υπάρχουν πολλοί πιθανοί λόγοι για τους οποίους ένας αριθμός από *Aspέργιλλους*, και ειδικά ο *A. nidulans*, έχουν διατηρήσει την ικανότητα να αναπαράγονται φυλετικά, παρά το αυξημένο μεταβολικό κόστος σε σύγκριση με την καθαρά αφυλετική αναπαραγωγή. Κάποιοι από τους λόγους αυτούς αναφέρονται παρακάτω:

- Η εγγενής αναπαραγωγή που περιλαμβάνει την επικοινωνία (η οποία είναι δυνατή ακόμα και σε ομοθαλλικά είδη όπως ο *A. nidulans*) μπορεί να παράξει μεγάλη γενετική ποικιλότητα και νέους γονότυπους πολύ ταχύτερα από ότι η αφυλετική αναπαραγωγή (Schoustra et al., 2007).
- Παράλληλα, η εγγενής αναπαραγωγή, οδηγεί στη συσσώρευση χρήσιμων μεταλλαγών και την απομάκρυνση επιβλαβών που θα μπορούσαν να παραμένουν και να συσσωρεύονται κατά την αγενή αναπαραγωγή
- Επιπλέον, οι μειωτικοί απόγονοι (ασκοσπόρια), σε σύγκριση με τα κονίδια έχουν πολύ μεγαλύτερη ικανότητα να επιβιώνουν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η έλλειψη νερού και οι υψηλές θερμοκρασίες (Schoustra et al., 2007).

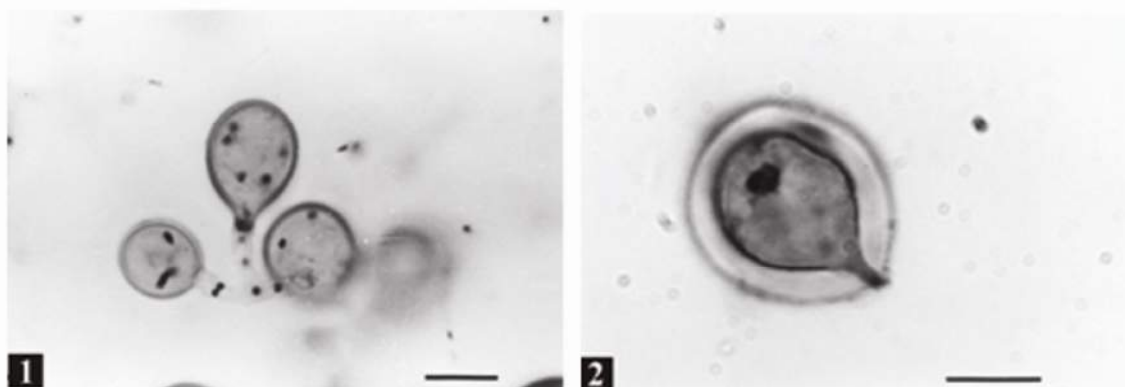
Το πρωταρχικό γεγονός της φυλετικής αναπαραγωγής είναι η αναστόμωση των μυκηλιακών υφών δύο στελεχών και η επακόλουθη ανάμειξη κυτταροπλασματικού υλικού και πυρήνων. Από τα ετεροκάρυα, τα μυκήλια που διαθέτουν διαφορετικών ειδών πυρήνες, το ένα είδος πυρήνων θα συμβάλει εξ' ολοκλήρου στο σχηματισμό του μητρικού ιστού, δημιουργώντας το τοίχωμα του κλειστοθηκίου (**Εικόνα 1-10**), αποτελούμενο από πολλά στρώματα παχιών διακλαδιζόμενων υφών, ενώ ο δεύτερος τύπος πυρήνων θα συμβάλει στη δημιουργία των ασκογόνων υφών, οι οποίες θα δώσουν γένεση στους ασκούς. Για το σχηματισμό των ασκοσπορίων, αρχικά το ακραίο κύτταρο κάθε υφής κυρτώνει και σχηματίζει ένα άγκιστρο. Ακολουθεί ταυτόχρονη μιτωτική διαίρεση των δύο πυρήνων του ακραίου κυττάρου, και σχηματισμός διαφραγμάτων 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. Το αποτέλεσμα αυτής της σύντηξης είναι ο σχηματισμός 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 διπύρηνων 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).



Εικόνα 1-10 Στάδια ανάπτυξης ενός κλειστοθηκίου. (1-2) Η πρώτη μορφολογική εκδήλωση του σχηματισμού ενός κλειστοθηκίου είναι η εμφάνιση δυο ξεχωριστών υφών που περιτυλίγονται, σχηματίζοντας μια δομή, στην οποία είναι ευδιάκριτη η κεφαλή και η ουρά του αρχικού κλειστοθηκίου. (3) Νεαρό κλειστοθήκιο με μερικά κύτταρα Hülle. (4) Ωριμο κλειστοθήκιο περιτριγυρισμένο από μεγάλο αριθμό κυττάρων Hülle. CI= αρχικό κλειστοθήκιο, HC= κύτταρα Hülle, C= ώριμο κλειστοθήκιο. Προσαρμογή από Sohn and Yoon 2002.

Η *Emericella* είναι το μονό γνωστό τελειομορφικό είδος το οποίο παράγει κύτταρα Hülle (Εικόνα 1-11). Αυτά είναι μεγάλα, σφαιρικά κύτταρα (10-15μm διάμετρος), με παχύ κυτταρικό τοίχωμα, τα οποία περιβάλλουν τα κλειστοθήκια κατά τη διάρκεια ανάπτυξης τους. Είναι πολυπύρρηνα κύτταρα, ωστόσο όταν φτάνουν το στάδιο της ωρίμανσης παρουσιάζουν κυρίως ένα μακροπυρήνα (εικοσαπλάσιου μεγέθους σε σχέση με ένα φυσιολογικό) από τη συνένωση πολλών μικρότερων πυρήνων (Carvalho et al., 2002). Αυτά τα κύτταρα θεωρείται ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στη θρέψη των κλειστοθηκίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους, κυρίως μέσω της παραγωγής α-1,3 γλυκανασών για την αποικοδόμηση ουσιών και τη χρήση τους ως πηγών άνθρακα.



Εικόνα 1-11 Διαφορετικά στάδια ανάπτυξης κύτταρων Hülle. (1) Ανώριμα πολυπύρρηνα κύτταρα Hülle. **(2)** Ωριμο κύτταρο Hülle, με εμφανή μακροπυρήνα. Κλίμακα μεγέθυνσης 10 μm. Προσαρμογή από Carvalho et al. 2002.

1.3.2.1 Η ρύθμιση του φυλετικού κύκλου

Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον 78 γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί να σχετίζονται με την εγγενή αναπαραγωγή στον *A. nidulans* (Dyer and O’Gorman, 2012). Μερικά από αυτά τα γονίδια είναι απαραίτητα για την έναρξη και την ολοκλήρωση του φυλετικού κύκλου ζωής, ενώ άλλα εμφανίζονται να εμπλέκονται με τον αριθμό ή το βαθμό ωρίμανσης των μειωτικών απογόνων. Ο ρυθμός ανάπτυξης αλλά και η επιλογή ανάμεσα στην αγενή και εγγενή αναπαραγωγή, εξαρτάται άμεσα από τις

περιβαλλοντικές συνθήκες, τη σύνθεση του μέσου ανάπτυξης και την κυτταρική σηματοδότηση (Krijgsheld et al., 2013).

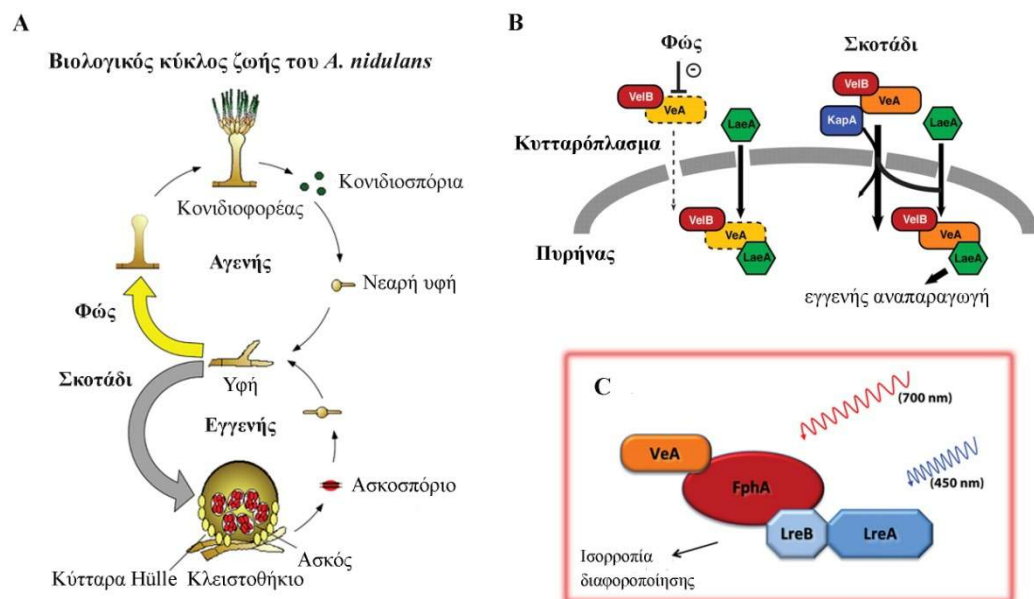
Σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την αναπτυξιακή διαφοροποίηση στους μύκητες είναι η σύνθεση του μέσου ανάπτυξης (θρεπτικά συστατικά και pH). Στην περίπτωση του *A. nidulans* ο σχηματισμός άφθονων μειωτικών απογόνων απαιτεί στερεά υποστρώματα «πλούσια» σε θρεπτικά συστατικά, σε αντίθεση με τα «φτωχά» θρεπτικά υποστρώματα που επάγουν το φυλετικό κύκλο σε άλλους μύκητες (Dyer et al., 1992). Μειωμένα επίπεδα πηγών άνθρακα ή αζώτου αναστέλλουν την εγγενή αναπαραγωγή, αναστέλλοντας το σχηματισμό των κλειστοθηκίων, πιθανώς λόγω έλλειψης α-1,3-γλυκάνων⁵, που αποτελούν απαραίτητα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των κλειστοθηκίων και μόρια αποθήκευσης ενέργειας. Η διαθεσιμότητα πηγών αζώτου όπως το αμμώνιο, τα νιτρικά, τα αμινοξέα και τα πεπτίδια, επηρεάζει καθοριστικά το αναπτυξιακό προγράμματα του *A. nidulans*. Μειωμένα επίπεδα πηγών αζώτου, έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή μικρότερων σε αριθμό και μέγεθος κλειστοθηκίων.

Εξίσου σημαντικός παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την εγγενή αναπαραγωγή είναι η παρουσία ατμοσφαιρικών αερίων. Η ανάπτυξη κλειστοθηκίων στον *A. nidulans* πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μέσο, όπου έρχονται σε επαφή με τον αέρα (π.χ. σε μια επιφάνεια από άγαρ και όχι σε υγρή καλλιέργεια, όπου το μυκήλιο παραμένει συνήθως εξ ολοκλήρου αδιαφοροποίητο). Σε στερεά υποστρώματα, ο σχηματισμός μειωτικών απογόνων ενισχύεται σημαντικά όταν τα επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα είναι αυξημένα. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται στο εργαστήριο με τη σφράγιση των τρυβλίων, τη μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου, προκαλώντας μη αναστρέψιμη είσοδο στο φυλετικό κύκλο (Han et al., 2003). Ο τελευταίος περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει την εγγενή αναπαραγωγή είναι η θερμοκρασία. Παραδοσιακά ο *A. nidulans* επώαζεται στους 37 °C για την επαγωγή του φυλετικού κύκλου (G. Pontecorvo et al., 1953) , ενώ σχεδόν διπλάσια αύξηση του αριθμού των κλειστοθηκίων μπορεί να επιτευχθεί με επώαση στους 32 °C (Heitman, 2007).

Το φως αποτελεί καθοριστικό περιβαλλοντικό ερέθισμα, το οποίο καθορίζει τόσο το ρυθμό ανάπτυξης του μύκητα όσο και τον τρόπο αναπαραγωγής του. Ο εγγενής κύκλος μπορεί να λάβει χώρα τόσο στο φως όσο και στο σκοτάδι, ωστόσο το

⁵ Οι γλυκάνες είναι πολυμερή της γλυκόζης, ενωμένα με γλυκοζιδικούς δεσμούς.

σκοτάδι είναι προτιμητέο, καθώς το φως καθυστερεί την έναρξη του μονοπατιού για περίπου 15 ώρες (Yager, 1992) ενώ το έντονο φως αναστέλλει πλήρως το σχηματισμό των μειωτικών απογόνων (Han et al., 2003) (Εικόνα 1-12A). Μεταξύ των γονιδίων που απαιτούνται για το σχηματισμό των κλειστοθηκίων είναι οι πρωτεΐνες velvet. Η πρωτεΐνη VeA φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της μορφογένεσης και δρα ως ένας κεντρικός μεταβολικός ρυθμιστής στη βιοσύνθεση φυσικών προϊόντων (δευτερογενείς μεταβολίτες), όπως οι καρκινογόνες μυκοτοξίνες. Ο μηχανισμός δράσης των οποίων δεν είναι απόλυτα κατανοητός μέχρι και σήμερα. Ο VeA⁶ μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζεται από το φως, η παρουσία κυανού φωτός τον αποκλείει από τον πυρήνα, προωθώντας την αφυλετική αναπαραγωγή (Bayram and Braus, 2012). Στο σκοτάδι, ο VeA, μετατοπίζεται στον πυρήνα μέσω του μεταφορέα KapA όπου καθίσταται ενεργός και επάγει τη εγγενή αναπαραγωγή και διαφοροποίηση (Εικόνα 1-12B).



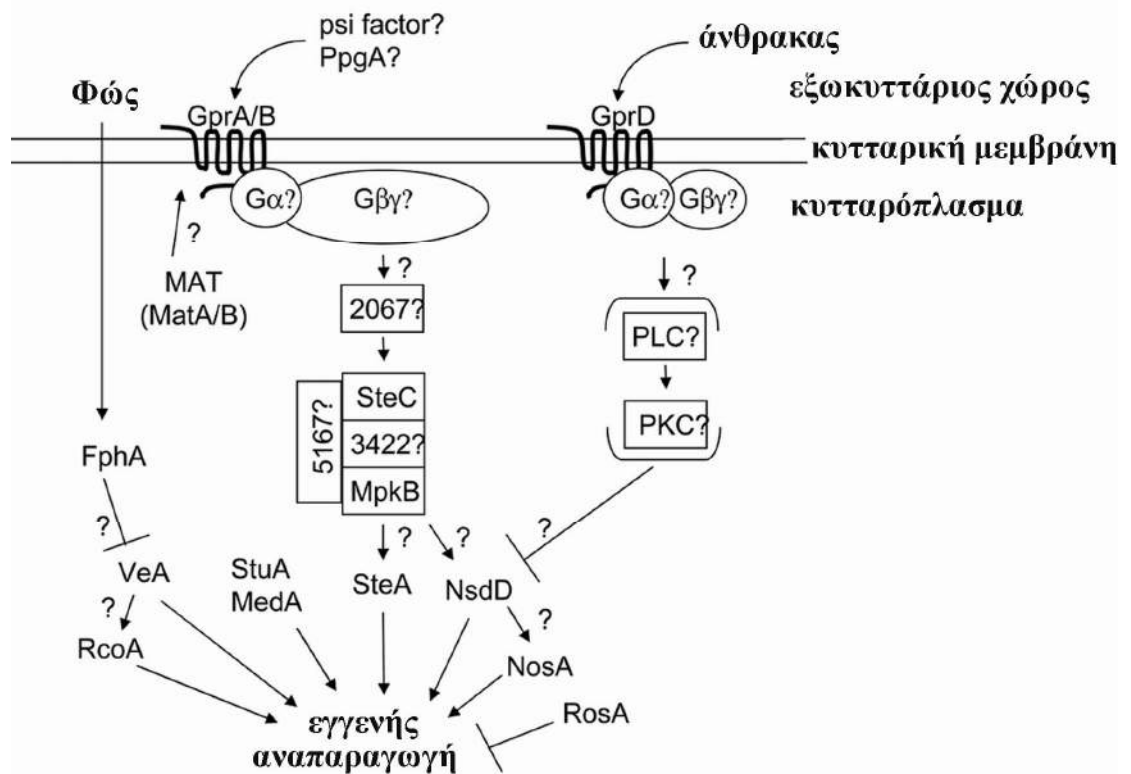
Εικόνα 1-12 (A) Ο κύκλος ζωής του *A. nidulans* και επίδραση του φωτός στην ανάπτυξη του μύκητα. Στον *A. nidulans* η ισορροπία μεταξύ αγενούς και εγγενούς αναπαραγωγής είναι εξαρτωμένη από το φως. Προσαρμογή από Bayram et al., 2008. (B) Σχηματική αναπαράσταση της δράσης της VeA. Παρουσία φωτός η VeA διατηρείται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και η VeIB υποστηρίζει την αφυλετική δημιουργία σπορίων. Στο σκοτάδι η VeA μεταφέρεται στον πυρήνα (οπού καθίσταται ενεργή) μέσω του KapA και επάγει τη εγγενή αναπαραγωγή. ADDIN ZOTERO_ITEM CSL_CITATION

⁶ Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως όλα τα στελέχη του *A. nidulans* που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα εργασία, φέρουν την *veA1* μεταλλαγή μερικής απώλειας λειτουργίας του VeA, και κατά συνέπεια κονιδιοποιούν κανονικά στο σκοτάδι. Η μεταλλαγή αυτή επιλέχθηκε από τον Pontecorvo (G. Pontecorvo et al., 1953), πιθανώς ακούσια, λόγω του πλεονεκτήματος που εμφάνιζε το στέλεχος που τη φέρει σε εργαστηριακές συνθήκες, μιας και δεν είχε ανάγκη την παρουσία φωτός.

{"citationID":"aoe85757d","properties":{"formattedCitation":"(Bayram et al., 2010)","plainCitation":"(Bayram et al., 2010)"}, "citationItems":[{"id":1678,"uris":["http://zotero.org/users/1097545/items/XDMNJCKU"],"uri":["http://zotero.org/users/1097545/items/XDMNJCKU"],"itemData":{"id":1678,"type":"article-journal","title":"Spotlight on Aspergillus nidulans photosensory systems","container-title":"Fungal Genetics and Biology","page":"900-908","volume":"47","issue":"11","source":"CrossRef","DOI":"10.1016/j.fgb.2010.05.008","ISSN":"10871845","language":"en","author":[{"family":"Bayram","given":"Özgür"}, {"family":"Braus","given":"Gerhard H."}, {"family":"Fischer","given":"Reinhard"}, {"family":"Rodriguez-Romero","given":"Julio"}]}, "issued":{"date-parts":[["2010",11]]}}}], "schema":"https://github.com/citation-style-language/schema/raw/master/csl-citation.json"} (Bayram et al., 2010)(**Bayram et al., 2008**) (C) Το σύμπλοκο του Φώτος στον *A. nidulans*. Προσαρμογή από Bayram et al., 2008.

Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν, ότι η μεταφορά της πρωτεΐνης VeA σχετίζεται με ένα μηχανισμό “αίσθησης του φωτός”, εφόσον η VeA αποτελεί τμήμα ενός πυρηνικού πρωτεϊνικού συμπλόκου στο οποίο περιλαμβάνονται η πρωτεΐνη του κόκκινου φυτοχρώματος⁷, FphA (Blumenstein et al., 2005) (υποδοχέας του κόκκινου φωτός), και οι πρωτεΐνες LreA και LreB (πρωτεΐνες απόκρισης στο μπλε φως) (Calvo, 2008) (**Εικόνα 1-12C**). Επιπλέον, η VeA αλληλεπιδρά με την LaeA (loss of aflR expression), μια μεθυλ-τρανσφεράση που απαιτείται για τη φυσιολογική ενεργοποίηση του δευτερογενούς μεταβολισμού και τη βιοσύνθεση πενικιλίνης και λοβαστατίνης στον *A. nidulans*. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης VeA και LaeA αλλά και της VeA με την πρωτεΐνη VelB με τέτοιο τρόπο ώστε οι VelB και LaeA να μην αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (**Εικόνα 1-12C**). Η VeA αλληλεπιδρά επίσης με άλλες velvet-like πρωτεΐνες αλλά και με τις πρωτεΐνες VirA, VirB, και VirC. Είναι πιθανόν η VeA να δρα ως πρωτεΐνη ικρίωμα για την επιτυχή ολοκλήρωση εξωτερικών ερεθισμάτων (π.χ. το φως), τα οποία εμπλέκονται με μεταβολικές αλλαγές αλλά και την ισορροπία μεταξύ αγενούς και εγγενούς αναπαραγωγής (Bayram et al., 2008).

⁷ Τα φυτοχρώματα είναι χρωμοπρωτεΐνες αντίχενωσης του φωτός με δραστηριότητα κινάσης.



Εικόνα 1-13 Απλουστευμένη σχηματική αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών της εγγενούς αναπαραγωγής του *A. nidulans*. Προσαρμογή από Han, 2009.

Σε πειράματα UV μεταλλαξιγένεσης στις αρχές της δεκαετίας του 1990, απομονώθηκε ένας μεγάλος αριθμός μεταλλαγών που χαρακτηρίστηκαν ως μεταλλαγές *nsd* (**n**ever in **s**exual **d**evelopment) παρουσίαζαν μεγάλα προβλήματα κατά την εγγενή ανάπτυξη (Han, 2009; Han et al., 2003). Μεταξύ των *nsd* μεταλλαγών, το γονίδιο *nsdD* κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ελέγχει το σχηματισμό κλειστοθηκίων. Απαλοιφή του *nsdD* προκαλεί απώλεια σχηματισμού κλειστοθηκίων, ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης NsdD προωθεί το σχηματισμό κυττάρων Hülle ακόμη και κάτω από συνθήκες (π.χ. υγρή καλλιέργεια) που αναστέλλεται κάθε είδους διαφοροποίησης (**Εικόνα 1-13**). Πολλοί ακόμα μεταγραφικοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί και έχουν προταθεί ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρολό στην εγγενή αναπαραγωγή. Μερικοί από τους καλύτερα μελετημένους είναι ο SteA, θετικός ρυθμιστής της εγγενούς ανάπτυξης, απαλοιφή του όποιου δεν επηρεάζει τη μυκηλιακή ανάπτυξη και την κονιδιογένεση. Ωστόσο, τα *steAD* στελέχη δεν αναπτύσσουν κλειστοθήκια και ασκοσπόρια ακόμη

και υπό συνθήκες που ευνοούν την εγγενή αναπαραγωγή. Ο μεταγραφικός παράγοντας RosA (αναστολέας της εγγενή ανάπτυξη A - repressor of sexual development A), αναστέλλει την εγγενή αναπαραγωγή κάτω από ακατάλληλες συνθήκες (χαμηλές συγκεντρώσεις άνθρακα). Απαλοιφή του γονιδίου *rosA* προάγει το σχηματισμό των κυττάρων Hülle, ωστόσο η εγγενής ανάπτυξη δεν ξεπερνά ποτέ αυτό το στάδιο, δηλαδή δεν φθάνει στο σχηματισμό κλειστοθηκίων. Ένα άλλο γονίδιο, *nosA* (αριθμός των μειωτικών σπόριων -number of sexual spores A) κωδικοποιεί για έναν πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα που σχετίζεται και αυτός με την εγγενή ανάπτυξη. Επειδή ο RosA αναστέλλει την έκφραση του *nosA*, δείχνει ότι η ισορροπία αυτών των δύο μεταγραφικών παραγόντων καθορίζει την μοίρα των υφών που εισέρθουν στην εγγενή αναπαραγωγή (Sarıkaya Bayram et al., 2010).

Σε αντίθεση με την αγενή αναπαραγωγή, οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την εγγενή αναπαραγωγή στον *A. nidulans* είναι ελάχιστα μελετημένοι. Με δεδομένη τη μεγάλη πολυπλοκότητα της αναπτυξιακής διαδικασίας, είναι σχεδόν σίγουρο ότι ο αριθμός των γονιδίων που διαδραματίζει καθοριστικό θα είναι σημαντικά αυξημένος. Ένας κύριος λόγος για τον οποίο μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με την εγγενή διαδικασία αναπαραγωγής είναι δύσκολο να απομονωθούν είναι, γιατί το αρχικό εργαστηριακό στέλεχος έφερε την *veA1* μεταλλαγή. Και ο δεύτερος λόγος είναι ότι η κονιδιογένεση λαμβάνει χώρα πριν την εγγενή αναπαραγωγή, έτσι καθίσταται δύσκολη η παρακολούθηση της εγγενούς διαδικασίας (σύντηξη υφών, σχηματισμός κλειστοθηκίων, δημιουργία ασκοσπορίων).

1.3.3 Παραφυλετικός κύκλος

Όπως αρκετοί υφομύκητες (ανεξαρτήτως τεκμηριωμένης ύπαρξης φυλετικού κύκλου) έτσι και ο *A. nidulans* παρουσιάζει το φαινόμενο του παραφυλετικού κύκλου ανάπτυξης. Σε αυτόν, δύο ομοθαλλικές υφές από διαφορετικά στελέχη συντήκονται για να δημιουργήσουν ετεροκάρυο, παρόμοια με το σχηματισμό τους στο φυλετικό κύκλο. Στο ετεροκάρυο, με πολύ χαμηλή συχνότητα, δύο πυρήνες είναι δυνατόν να συντηχθούν για τη 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 $2n+1$ και $2n-1$ 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).

1.4 Οι δραστικές μορφές οξυγόνου - Reactive oxygen species (ΔΜΟ-ROS) στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

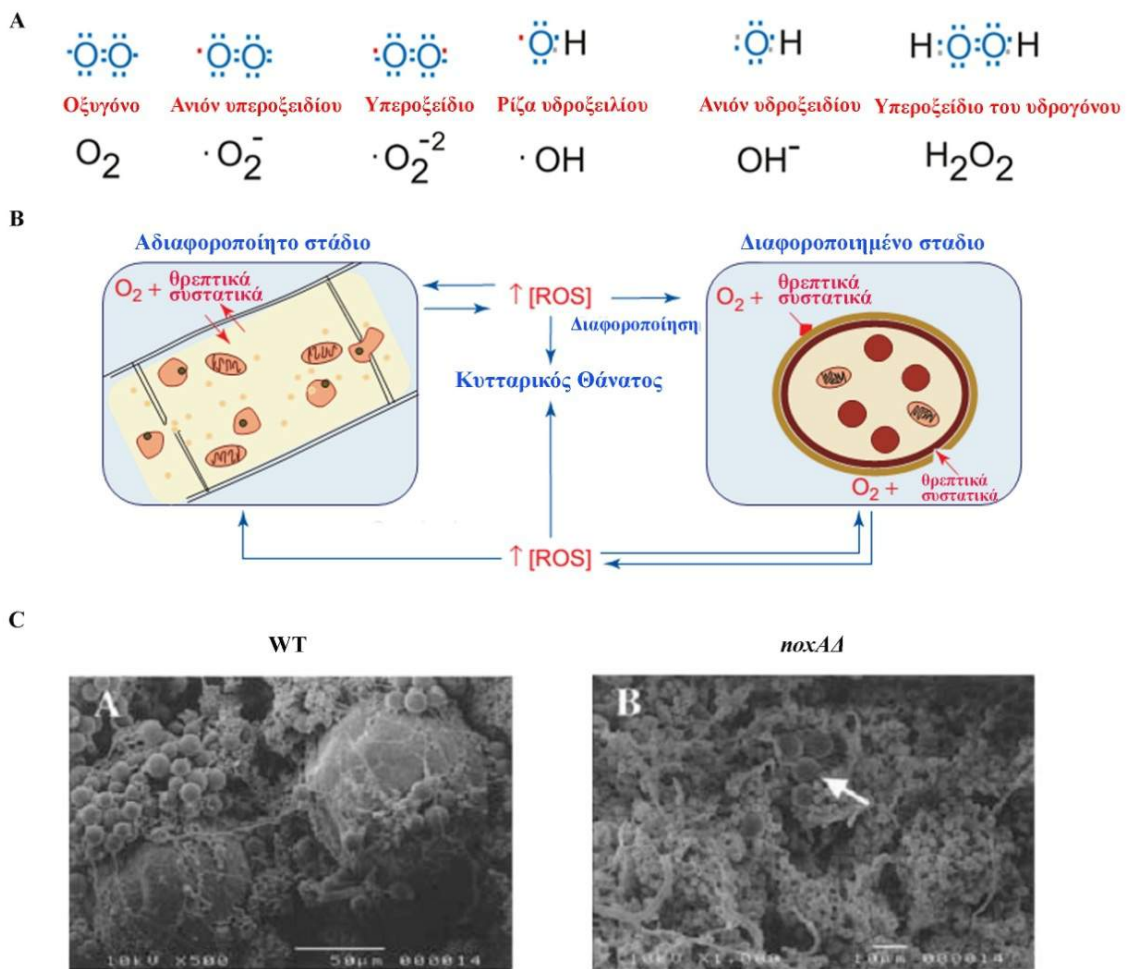
Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ, ROS), στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και τα ανιόντα σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$), σχηματίζονται αναπόφευκτα κατά τον αερόβιο μεταβολισμό (Εικόνα 1-14Α) και είναι η κύρια αιτία εκδήλωσης του φαινομένου της οξειδωτικής πίεσης στα κύτταρα. Τα ROS περιλαμβάνουν τα πρωτογενή δραστικά παράγωγα του οξυγόνου αλλά και όλα εκείνα (ρίζες ή μη), τα οποία προκύπτουν δευτερογενώς κατά τις διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις με τα στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος (π.χ. ελεύθερες υπεροξυλ-ρίζες $\text{R-C-O-O}\cdot$ και αλκοξυλ-ρίζες $\text{R-C-O}\cdot$, ενδιάμεσα προϊόντα της υπεροξειδωσίας λιπιδίων) (Held, 2010).

Οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει αμυντικούς μηχανισμούς ώστε να μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες. Είναι σημαντικό ότι κατορθώνουν όχι μόνο να διατηρούν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του O_2 σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά της ατμόσφαιρας (21%), αλλά διατηρούν και την ικανότητα αποτελεσματικής λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας σε αυτές τις συνθήκες. Το οξειδωτικό φορτίο (ROS και προϊόντα δράσης τους) που δημιουργείται σε συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες αντιμετωπίζεται από την αντιοξειδωτική άμυνα των οργανισμών, η οποία εκδηλώνεται σε τρία βασικά επίπεδα (Gessler et al., 2007):

- στον περιορισμό της διαθεσιμότητας των μετάλλων μετάπτωσης και άλλων ουσιών με προ-οξειδωτική δράση (προάγουν την οξειδωτική καταστροφή των βιομορίων από ROS ή άλλα προϊόντα του οξειδωτικού στρες). Εδώ συμμετέχουν πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης (μεταλλοπρωτεΐνες) και συνεπώς μειώνουν τη διαθεσιμότητά τους (τρανσφερρίνη, φερριτίνη και σερουλοπλασμίνη κ.λπ.).
- στην εκκαθάριση των ROS και άλλων δραστικών μορίων πριν πλήξουν τα βιομόρια, που επιτυγχάνεται με ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση όπως οι δισμουτάσες (εξωκυττάρια, κυτταροπλασματική, μιτοχονδριακή) της ρίζας υπεροξειδίου (SuperOxide Dismutases, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT), οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidases, GPx), και οι γενικές υπεροξειδάσες (Peroxidases). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται και

οργανικές ενώσεις, μικρού συνήθως μοριακού βάρους, που δρουν ως αντιοξειδωτικοί εκκαθαριστές ελεύθερων ριζών (free radical scavengers) και δραστικών μορίων, όπως η γλουταθειόνη, χολερυθρίνη, λιποϊκό οξύ, ουρικό οξύ, μελανίνες, ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες και καροτενοειδή.

- στην επιδιόρθωση των πληγέντων μορίων και αποκατάσταση των βλαβών τους, που αφορά μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (DNA γλυκοζυλάσες), αναγωγής οξειδωμένων σουλφυδρυλομάδων των πρωτεϊνών και την επιδιόρθωση των λιπιδικών υπεροξειδίων.



Εικόνα 1-14 (A) Ηλεκτρονική δομή των πιο συνηθισμένων δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS (ΔΜΟ). Η ύπαρξη ενός τουλάχιστον ασύζευκτου ηλεκτρονίου συμβολίζεται συνήθως με μια τελεία ως εκθέτη στη αριστερή πλευρά του χημικού τύπου της ένωσης. (B) Προτεινόμενο μοντέλο για τη ρύθμιση της διαφοροποίησης των κυττάρων από τα ROS. Μια κατάσταση έντονης οξειδωτικής πίεσης είναι μια παροδική και ασταθής κατάσταση στην οποία η παραγωγή ROS ξεπερνά την αντιοξειδωτική ικανότητα του

κυττάρου, και φαίνεται να ρυθμίζει τη μετάβαση μεταξύ αδιαφοροποίητων και διαφοροποιημένων καταστάσεων. Η έντονη οξειδωτική πίεση έχει τρία πιθανά αποτελέσματα: (i) την αντιστάθμιση της οξειδωτικής πίεσης και την επιστροφή στην προηγούμενη σταθερή κατάσταση (ii) τη διαφοροποίηση του κύτταρου ή (iii) τον κυτταρικό θάνατο. Ο κυτταρικός θάνατος επιτρέπει σε άλλα κύτταρα είτε να προσαρμοστούν ή να διαφοροποιηθούν. Προσαρμογή από Aguirre et al., 2005. (C) Το γονίδιο *noxA* είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των κλειστοθηκίων. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας με σκοπό την εύρεση κυττάρων Hülle (λευκό βέλος) και κλειστοθηκίων σε στελέχη φυσικού τύπου και στελέχη *noxΔΔ*. Προσαρμογή από Lara-Ortíz et al., 2003.

Χωρίς αυτούς τους μηχανισμούς οι οργανισμοί θα συσσωρευαν οξειδωτικές βλάβες σε βαθμό τέτοιο που δε θα επέτρεπε την επιβίωσή τους (Held, 2010). Οι βλαβερές συνέπειες των ROS στο DNA, στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια αλλά και ο ρόλος τους σε παθολογικές καταστάσεις και τη γήρανση είναι καλά μελετημένες (Aguirre et al., 2005). Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία έχουν συσσωρευτεί πολλά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν μια εναλλακτική άποψη, σύμφωνα με την οποία ειδικά ένζυμα, όπως οι οξειδάσες της NADPH (Φωσφορική οξειδάση του νικοτιναμιδο αδενοδινουκλεοτιδίου - NOX), παράγουν ROS με σκοπό τη ρύθμιση διαφορετικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως την κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μεταγωγή σήματος και τη μεταφορά ιόντων. Τόσο ο επιβλαβής όσο και ο λειτουργικός ρόλος των ROS έχουν προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον στον καθορισμό των μηχανισμών με τους οποίους τα ROS παράγονται, ανιχνεύονται και αντιμετωπίζονται, καθώς και το βαθμός συντήρησης αυτών των μηχανισμών μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών.

1.4.1 Ο ρόλος των ROS στη κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση

Πριν από είκοσι πέντε χρόνια, οι Hansberg and Aguirre πρότειναν ένα μοντέλο στο οποίο η διαφοροποίηση των κυττάρων βασιζόταν στα επίπεδα των ROS (Hansberg and Aguirre, 1990). Αρχικά, η υπόθεση αυτή βασίστηκε στην ανίχνευση οξειδωμένων μορφών της συνθετάσης της γλουταμίνης, της γλουταμικής αφυδρογονάσης, καθώς και στην οξείδωση της NADPH και της γλουταθειόνης κατά την αγενή διαφοροποίηση του μύκητα *Neurospora crassa*. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, η ανάπτυξη και οι διαφοροποιημένες καταστάσεις των κυττάρων είναι

σταθερές συνθήκες στις οποίες τα ROS διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα από μια ισορροπία μεταξύ παραγωγής ROS (π.χ. από τα μιτοχόνδρια και τις πρωτεΐνες NOX) και την απομάκρυνση αυτών (π.χ., με αντιοξειδωτικά ένζυμα). Η παροδική αύξηση των ROS, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αντιστάθμιση της οξειδωτικής πίεσης και την επιστροφή στην προηγούμενη σταθερή κατάσταση, την κυτταρική διαφοροποίηση ή τον κυτταρικό θάνατο, όταν η προσαρμογή ή η διαφοροποίηση των κυττάρων δεν μπορεί να λάβει χώρα (**Εικόνα 1-14B**).

Αρκετές αναφορές σε διαφορετικούς ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των αναπτυξιακών διαδικασιών και την αύξηση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως δισμουτάσες και καταλάσες (Aguirre et al., 2005). Αρκετά γονίδια καταλάσων του *A. nidulans* (CATA-D) και της *N. crassa* (cat-1-3) έχουν βρεθεί να εκφράζονται σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, κυτταρικά διαμερίσματα ή τύπους κυττάρων (Kawasaki and Aguirre, 2001; Michán et al., 2002). Τα γονίδια *catB* και *cat-3*, των οποίων η έκφραση επάγεται από οξειδωτικό στρες, κωδικοποιούν ομόλογες καταλάσες που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την έναρξη της κονιδιογένεσης. Ομοίως, τα γονίδια *catA* και *cat-1* κωδικοποιούν ομόλογες καταλάσες που εντοπίζονται στα κονιδιοσπόρια (Kawasaki and Aguirre, 2001).

Εκτός από τις αλλαγές στη δραστηριότητα/έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, άλλα δεδομένα συσχετίζουν την παρουσία των ROS με την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Μελέτες έχουν δείξει ότι δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται κατά τη διαφοροποίηση και το σχηματισμό κλειστοθηκίων στον *A. nidulans*. Απαλοιφή του γονιδίου *noxA* (οξειδάση της NADPH) δεν έχει καμιά επίπτωση στη μυκηλιακή ανάπτυξη ή την αγενή αναπαραγωγή. Ωστόσο, τα μεταλλαγμένα *noxAD* στελέχη αναπτύσσουν ανώριμα κύτταρα Hülle και κλειστοθήκια, δηλαδή τα κύτταρα μπορούν να εισέρθουν στην εγγενή αναπαραγωγή, χωρίς ωστόσο να είναι σε θέση να την ολοκληρώσουν. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την σπουδαιότητα των ROS στην επιτυχή ωρίμανση των εγγενών δομών του *A. nidulans* (**Εικόνα 1-14C**) (Lara-Ortiz et al., 2003).

Η εγκαθίδρυση πολικής αύξησης (βλέπε παραπάνω) για την ανάπτυξη των υφών στους νηματοειδείς μύκητες απαιτεί την εξειδικευμένη εκβλάστηση μέσω επάκριας αύξησης, ενώ η ταυτόχρονη απουσία πλευρικών διακλαδώσεων στην επάκρια περιοχή των υφών υποδηλώνει ότι ο σχηματισμός τους καταστέλλεται ενεργά (Επάκρια Κυριαρχία) (Rossomando and Alexander, 1992). Αυτό

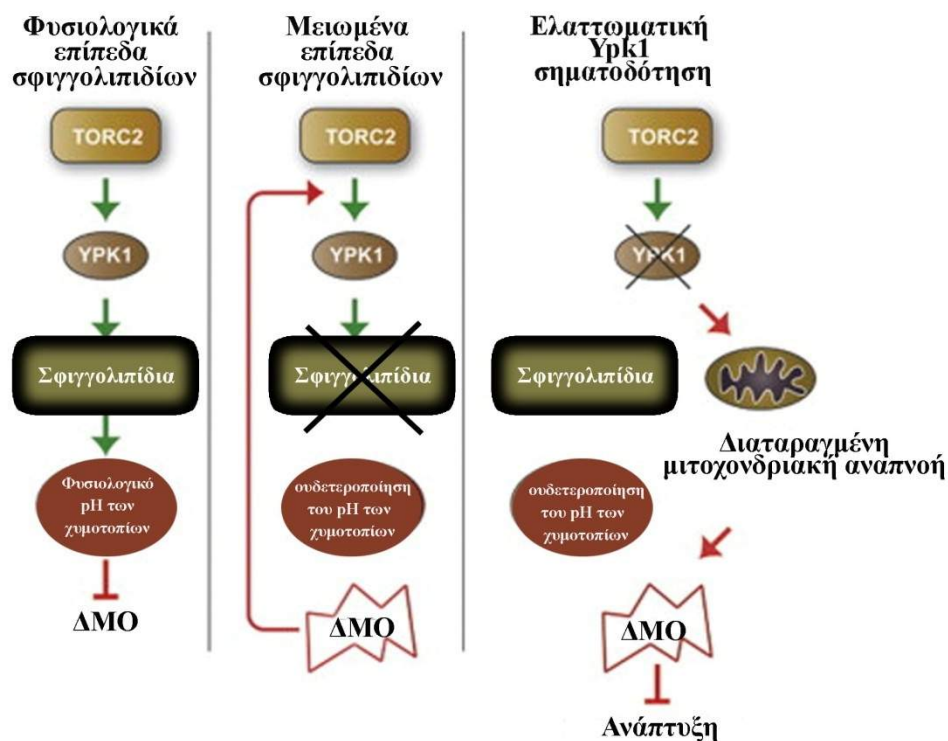
επιτυγχάνεται μέσω ενός μηχανισμού, κεντρικό ρόλο στον οποίο διαδραματίζουν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Semighini and Harris, 2008). Η δημιουργία μιας κλίσης συγκέντρωσης ROS στο εγγύς άκρο των υφών φαίνεται να είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της πολικής αύξησης. Μετρήσεις της παράγωγης ROS κατά τη διάρκεια εκβλάστησης των κυττάρων του *A. nidulan*, έδειξαν ότι η συσσώρευση των ROS στην επάκρια περιοχή των υφών συσχετίζεται με την Επάκρια Κυριαρχία των υφών (Apical Dominance) αλλά και την δημιουργία ενός πολικού άξονα εκβλάστησης. Η διακοπή της παραγωγής ROS είτε με χορήγηση DPI (χλωριούχο δυμεθυλαμμώνιο), αναστολέα των οξειδασών Nox είτε με επώαση των κυττάρων με τον εκκαθαριστή ελεύθερων ριζών, ασκορβικό οξύ, είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού του βλαστικού σωλήνα. Απαλοιφή του γονιδίου *noxR* οδηγεί σε διπολική εκβλάστηση και διχοτομική διακλάδωση, υποδεικνύοντας ότι η NoxR⁸ (Lambeth, 2004) έχει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της χωρικής παραγωγής ROS (Semighini and Harris, 2008).

Η παράγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στους μύκητες πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια του βιολογικού κύκλου ζωής τους. Δεδομένου ότι αλλαγές στα επίπεδα των ROS εμπλέκονται στις αναπτυξιακές αποφάσεις πολλών οργανισμών, δεν προκαλεί έκπληξη η ύπαρξη συσχέτισης των ROS με την παράγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στους μύκητες. Έχει παρατηρηθεί ότι αυξημένα επίπεδα ROS συσχετίζονται με αυξημένη παράγωγή αφλατοξινών στον *Aspergillus parasiticus* και *Aspergillus flavus* (Reverberi et al., 2008). Στελέχη τα οποία δεν μπορούσαν να βιοσυνθέσουν αφλατοξίνες παρουσίαζαν μειωμένα επίπεδα ROS σε σύγκριση με τα στελέχη φυσικού τύπου (τα οποία παρήγαγαν αφλατοξίνες), αποτέλεσμα, το οποίο υποδηλώνει ότι η σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών μπορεί να συμβαίνει ως αντισταθμιστική απάντηση στη συσσώρευση ROS. Η διατήρηση μιας ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών ριζών/μορίων και αντιοξειδωτικών μηχανισμών είναι επίσης σημαντική για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Απαλοιφή του γονιδίου *yap1*⁹ το οποίο κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα που ανταποκρίνεται στο οξειδωτικό στρες, οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία σε

⁸ Η πρωτεΐνη NoxR κωδικοποιεί για τη ρυθμιστική υπομονάδα p47phox της οξειδάσης Nox. Στον *A. nidulan* η NoxR πρωτεΐνη λειτουργεί σε ένα παράλληλο μονοπάτι (με εκείνο της πρωτεΐνης NoxA) και ρυθμίζει τον εντοπισμό της πρωτεΐνης Nox (Semighini and Harris, 2008).

⁹ Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες, ο μεταγραφικός παράγοντας Yap1, μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, ενεργοποιώντας την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική προστασία των κυττάρων (Ikner and Shiozaki, 2005).

οξειδωτικές ουσίες καθώς και την πρόωρη παραγωγή ROS και αφλατοξινών. Η ανάγκη για επίτευξη οξειδοαναγωγής ισορροπίας υποστηρίζεται περαιτέρω από την παρατήρηση ότι η προσθήκη καφεϊκού οξέος (ισχυρό αντιοξειδωτικό) οδηγεί σε δραματική μείωση της βιοσύνθεσης αφλατοξινών. Αναλύσεις μικροσυστοιχιών, στις ίδιες συνθήκες, έδειξαν ότι μειώνεται σημαντικά η έκφραση σχεδόν όλων των γονιδίων, που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αφλατοξινών. Μεταξύ των γονιδίων που υπερεκφράζονται είναι αυτά που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που αποτοξινώνουν τα κύτταρα από ROS (όπως τα γονίδια υπεροξειδασών).



Εικόνα 1-15 Προτεινόμενο μοντέλο της TORC2-Ypk1 σηματοδότησης για τη διατήρηση της ομοιόστασης των σφινγγολιπιδίων και τη ρύθμιση των ROS. Προσαρμογή από Niles et al., 2014

ROS παράγονται από πολλές πηγές, τόσο στα κύτταρα θηλαστικών όσο και στους μύκητες. Η σημαντικότερη πηγή ROS είναι η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. ROS παράγονται επίσης από μη μιτοχονδριακές πηγές, όπως μετά από στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, έκθεση των κυττάρων σε βαρέα μέταλλα (Haynes et al., 2004), καθώς και μετά από τη μείωση των επιπέδων των

σφιγγολιπιδίων (Kajiwara et al., 2012). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η TORC2/Ypk1 σηματοδότηση (βλέπε παρακάτω) διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο τόσο στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών ROS επίπεδων όσο και στην απόκριση των κυττάρων σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η κινάση Ypk1 καταστέλλει τη συσσώρευση ROS, τα όποια παράγονται από δυο διακριτές πηγές (Niles et al., 2014). Η πρώτη και σημαντικότερη πηγή ROS αποτελεί η διαταραγμένη μιτοχονδριακή αναπνοή ενώ δεύτερη σημαντική πηγή είναι η ουδετεροποίηση του pH του χυμοτοπίου (Brett et al., 2011) και η επακόλουθη οξίνιση του κυτταροπλάσματος. Ταυτόχρονα διαπιστώθηκε ότι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του σφιγγολιπιδίων συμβάλλουν τόσο στη διατήρηση του φυσιολογικού pH των χυμοτοπίων όπως και στην καταστολή παράγωγης ROS. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα ROS που παράγονται από την αναστολή της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων οδηγούν στην φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού TORC2/Ypk1 (**Εικόνα 1-15**). Η ενεργοποιημένη Ypk1 με τη σειρά της είναι σε θέση να δράσει ως θετικός ρυθμιστής της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων για την αποκατάσταση της ομοιόστασης. Η ίδια ερευνητική ομάδα παρουσίασε πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία οι ROS αποτελούν σημαντικούς διαμεσολαβητές στη ρύθμιση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού ακτίνης μέσω του μονοπατιού TORC2/Ypk1. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ένα μοντέλο στο οποίο η ρύθμιση της Fpk1¹⁰, της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων αλλά και της μιτοχονδριακής αναπνοής από τη Ypk1 αποτρέπει την οξείδωση κρίσιμων κυστεϊνών της ακτίνης από τα ROS και την επακόλουθη αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (Niles and Powers, 2014).

Ο ρόλος των ROS ως μόρια σηματοδότησης έχει αμφισβητηθεί, κυρίως λόγω της εμφανούς απουσίας συγκεκριμένων στόχων αυτών των ριζών/μορίων αλλά και της απουσίας μηχανισμών αναστρεψιμότητας αντιδράσεων οξείδωσης. Το πώς επιτυγχάνεται η σηματοδότηση μέσω των ROS παραμένει ένα βασικό ερώτημα. Κατάλοιπα κυστεϊνών σε φωσφατάσες τυροσίνης και σε μεταγραφικούς παράγοντες αποτελούν σημαντικούς στόχους οξείδωσης από τα ROS, ιδιαίτερα από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂). Ίσως το καλύτερο παράδειγμα αποτελεί αυτό της βακτηριακής OxyR, όπου οξείδωση της από ROS έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης και την επακόλουθη μετάβασή της από ανενεργό σε

¹⁰ Η Fpk1 είναι κινάση σερίνης-θρεονίνης, η οποία φωσφορυλιώνει πολλά μέλη της οικογένειας αμινοφωσφολιπιδικών τρανσλοκασών, ρυθμίζοντας έτσι τη μετατόπιση των φωσφολιπιδίων και την ασυμμετρία της μεμβράνης. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, στα ενδοσώματα και στην πλασματική μεμβράνη (Yamane-Sando et al., 2014).

ενεργό μορφή (Winterbourn and Hampton, 2008). Ωστόσο, η οξειδωση πρωτεϊνών από τα ROS μπορεί να μην είναι άμεση, αλλά μπορεί να περιλαμβάνει μία πρωτεΐνη προσαρμογέα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού του μηχανισμού «προσαρμογέα» είναι αυτό του μεταγραφικού παράγοντα Yap1, του οποίου η οξειδωση προκαλείται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης Gpx3 (Ikner and Shiozaki, 2005). Οι περισσότερες μέχρι σήμερα μελέτες καταδεικνύουν ότι η χωρική και χρονική οργάνωση της παράγωγης ROS παίζει ένα βασικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη (Scott and Eaton, 2008). Ωστόσο ποιοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ROS είναι βασικό ερώτημα για μελλοντικές μελέτες για την αποσαφήνιση και κατανόηση των σηματοδοτικών μηχανισμών στους οποίους οι δραστικές μορφές οξυγόνου εμπλέκονται.

1.5 Σύσταση και οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης

Από ένα οσμωτικό φράγμα στις λιπιδικές σχεδίες. Μια σύντομη ιστορία των μοντέλων της πλασματικής μεμβράνης

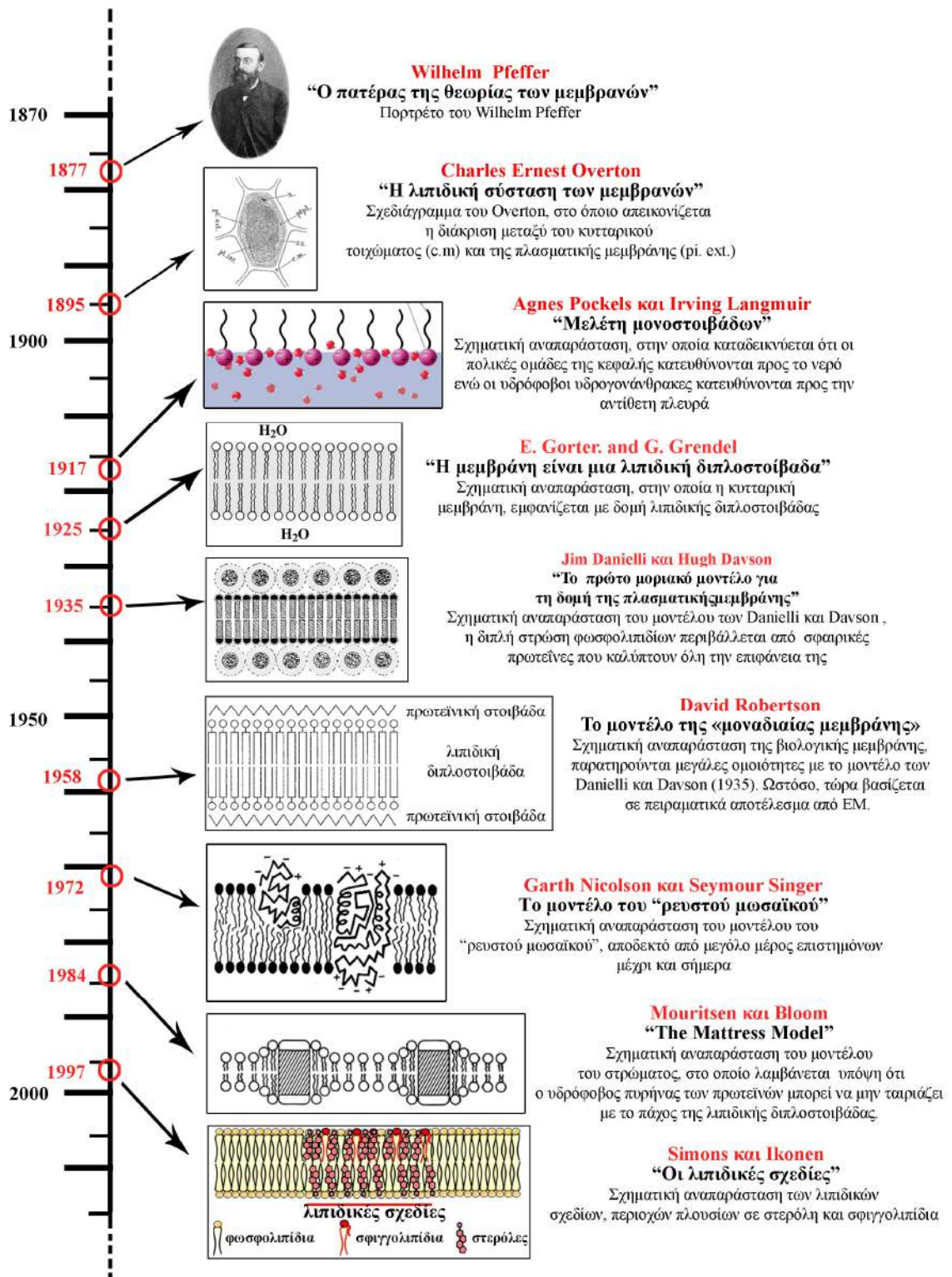
Η πλασματική μεμβράνη αποτελεί ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά του βιολογικού κόσμου, με την εξαίρεση κάποιων ιών, όλα τα έμβια όντα εξαρτώνται από την ύπαρξη της, καθώς χωρίς αυτήν, η ζωή όπως την ξέρουμε δεν θα ήταν δυνατόν να υπάρξει. Η πλασματική μεμβράνη καθορίζει τα όρια του κυττάρου και το διαχωρίζει από το περιβάλλον του. Περιβάλλει όλα τα κύτταρα και είναι ημιδιαπερατή, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο την κίνηση των μικρών υδατοδιαλυτών μορίων μέσα και έξω από το κύτταρο. Σήμερα γνωρίζουμε πολλά για τις μεμβράνες, ωστόσο δεν ήταν πάντα έτσι. Η ιστορία για το πώς φτάσαμε σήμερα να κατανοούμε τη σύσταση και τη δομή των μεμβρανών, δεν αρχίζει με τη βιολογία, αλλά με τη χημεία, τη μελέτη των λιπιδίων (π.χ. έλαια) και με το πως αυτά αλληλεπιδρούν με το νερό (Mouritsen, 2011).

Ήδη από το δεύτερο μισό του 19ου αιώνα, έγινε προφανές ότι ένα οσμωτικό φράγμα διαχωρίζει το εσωτερικό και το εξωτερικό των κυττάρων. Πρωτοπλάστες φυτικών κυττάρων ήταν διαπερατοί από το νερό, αλλά όχι από μεγαλύτερα μακρομόρια όπως η σουκρόζη. Ο Pfeffer ήταν ο πρώτος που μελέτησε την οσμωτική πίεση στο εσωτερικό των κυττάρων και διατύπωσε την ιδέα ότι το πρωτόπλασμα των κυττάρων περιβάλλεται από ένα λεπτό στρώμα, το οποίο και ονόμασε **πλασματική μεμβράνη**. Στην πραγματικότητα, ο Pfeffer πρότεινε ότι αυτή η μεμβράνη δεν καλύπτει μόνο την εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων, αλλά επίσης διαχωρίζει όλα τα υδατικά περιβάλλοντα στο εσωτερικό των κυττάρων, και για αυτό το λόγο, μπορεί να θεωρηθεί ως ο πατέρας της θεωρίας των μεμβρανών. Ο Charles Ernest Overton (1895), πρώτος ερεύνησε τις οσμωτικές ιδιότητες των κυττάρων και παρατήρησε στα τέλη του 19ου αιώνα, ότι η διείσδυση των μορίων μέσω των μεμβρανών σχετίζεται με το συντελεστή κατανομής νερού και λαδιού, εφόσον μη πολικά/λιπόφιλα μόρια ήταν σε θέση να διαπεράσουν τα κύτταρα πολύ πιο εύκολα από ότι πολικά μόρια ίδιου μεγέθους. Τα ευρήματα του Overton οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι λεπτές μεμβράνες που περιβάλλουν τα κύτταρα έχουν τις ιδιότητες του λαδιού (Heimburg, 2007). Στο βιβλίο του για την αναισθησία, αποκάλυψε τα στρώματα που περιβάλλουν τα κύτταρα «Λιποειδή» και ανέφερε ότι αποτελούνται από λιπίδια και χοληστερόλη (Baker, 1952).

Έχοντας ως δεδομένο ότι η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από λιπίδια, πρόεκυψε το ερώτημα, πώς οργανώνονται αυτά στο χώρο ώστε να σχηματίσουν τις λεπτές μεμβράνες. Το 1890, ο Rayleigh, που εργαζόταν με απλά έλαια, έδειξε ότι αυτά (τα λιπίδια) έχουν την τάση να εξαπλώνονται πάνω από την επιφάνεια του νερού. Μετρώντας τον αρχικό όγκο του ελαίου και το εμβαδόν της περιοχής που κάλυπτε, ήταν σε θέση να υπολογίσει το πάχος του φιλμ που σχηματιζόταν. Αυτή η αρχική παρατήρηση, βελτιώθηκε από την Agnes Pockels, η οποία εργαζομένη στην κουζίνα της, και χωρίς επίσημη εκπαίδευση, επινόησε μια απλή συσκευή για να ποσοτικοποιεί την περιοχή που κάλυπτε το λιπιδικό φιλμ. Η συσκευή τελειοποιήθηκε από τον Langmuir (1917), με την όποια ήταν σε θέση να μελετήσει στοιβάδες λιπιδίων, διαπιστώνοντας ότι σε αυτές τις μονές στοιβάδες, οι πολικές ομάδες της κεφαλής κατευθύνονταν προς το νερό ενώ οι υδρόφοβοι υδρογονάνθρακες κατευθύνονταν προς την αντίθετη πλευρά. Το 1925, οι E. Gorter και G. Grendel, μέτρησαν την ποσότητα των φωσφολιπιδίων που πήραν από συγκεκριμένο αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων και υπολόγισαν ότι δυο στρώσεις φωσφολιπιδίων περιέβαλαν κάθε ερυθρό αιμοσφαίριο. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές, πρότειναν επίσης ότι οι μη πολικές (υδρόφοβες) ουρές των λιπιδίων εκτείνονται προς τα μέσα και οι πολικές (υδρόφιλες) κεφαλές βρίσκονται προς το εξωτερικό των κυττάρων (**Εικόνα 1-16**).

Ωστόσο τα λιπίδια από μόνα τους δεν ήταν σε θέση να αιτιολογήσουν /εξηγήσουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες και λειτουργίες των μεμβρανών. Στην προσπάθεια ερμηνείας της εκλεκτικής διαπερατότητας της μεμβράνης από μη λιπιδικά μόρια, οι Danielli και Davson πρότειναν το - πρώτο μοριακό - μοντέλο για τη δομή των βιομεμβρανών. Στο μοντέλο αυτό των Danielli και Davson, η διπλή στρώση φωσφολιπιδίων περιβάλλεται από σφαιρικές πρωτεΐνες που καλύπτουν όλη την επιφάνεια της. Ωστόσο οι Danielli και Davson δεν απέκλεισαν το ενδεχόμενο ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να διαπερνούν τη μεμβράνη έτσι ώστε να σχηματίζεται ένα «μωσαϊκό»¹¹ πλούσιο σε πρωτεΐνες και λιπίδια.

¹¹ Ο όρος «μωσαϊκό» χρησιμοποιήθηκε αργότερα πάλι από τους Singer και Nicolson (1972).



Εικόνα 1-16 Σχηματική αναπαράσταση των θεωριών για τη σύσταση και οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης.

Μέχρι τότε οι περισσότερες ενδείξεις σχετικά με τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών ήταν έμμεσες. Η διακριτική ικανότητα του οπτικού μικροσκοπίου περιορίζεται στα 200 nm, και είναι συνεπώς ανεπαρκής για την αποκάλυψη της δομής της βιολογικής μεμβράνης που έχει πάχος μεταξύ 5-10 nm. Αυτό άλλαξε με την πρόοδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (HM). Τη δεκαετία του 1950 η HM χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στη μελέτη της λεπτής δομής των μεμβρανικών συστημάτων. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο η πλασματική μεμβράνη εμφανίζεται ως μια τρίστρωμη δομή, όπου δύο ακραίες σκοτεινές ζώνες περιβάλλουν μια φωτεινή κεντρική ζώνη. Ο Robertson (1958) θεώρησε ότι οι δύο σκοτεινές ζώνες αντιστοιχούν στα πρωτεϊνικά μόρια και η ανοιχτόχρωμη στη λιπιδική στοιβάδα. Στο μοντέλο το οποίο προτάθηκε από τον Robertson, οι πρωτεΐνες δεν θεωρούνται πλέον σφαιρικές αλλά εκτιμάται ότι σχηματίζουν επίπεδες επιφάνειες στα δύο άκρα της μεμβράνης. Το μοντέλο της «μοναδιαίας μεμβράνης» στηρίζεται στο μοντέλο των Danielli και Davson αλλά προσθέτει ένα νέο στοιχείο:

- αποδεικνύει την «παγκοσμιότητα» της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (τη δομή αυτή παρουσιάζουν όχι μόνο οι πλασματικές μεμβράνες αλλά και όλες οι υπόλοιπες βιολογικές μεμβράνες).

1.5.1 Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού

Στη δεκαετία του 1960, οι δομές σχετικά μεγάλου αριθμού διαλυτών πρωτεϊνών, προσδιορίστηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Οι Lenard και Singer διαπίστωσαν ότι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες στο μεγαλύτερο μέρος τους σχηματίζουν α-έλικες (Lenard and Singer, 1966). Επίσης, ηλεκτρονιογραφίες αποκάλυψαν ότι οι σημασμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν απομονωμένα σημεία σε ορισμένες μεμβράνες. Έτσι, οι Singer και Nicolson κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες μπορεί επίσης να εκτείνονται διαμέσου των μεμβρανών, γεγονός που οδήγησε στη διατύπωση του μοντέλου του ρευστού μωσαϊκού (Singer and Nicolson, 1972). Τα βασικά σημεία του μοντέλου αυτού, το οποίο διατηρεί το κύριο στοιχείο της λιπιδικής διπλοστοιβάδας είναι:

- οι πρωτεΐνες δεν βρίσκονται στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας αλλά σχηματίζουν ένα είδος μωσαϊκού καθώς βρίσκονται περιφερικά ή παρεμβάλλονται ανάμεσα στα λιπίδια.
- οι βιολογικές μεμβράνες είναι ημίρευστες δομές στις οποίες τόσο τα λιπίδια όσο και οι πρωτεΐνες μπορούν να μετατοπίζονται πλευρικά μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα.

Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού (**Εικόνα 1-17**) εξηγεί πλήρως τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των μεμβρανών (σημείο τήξης, ρευστότητα) ενώ περιγράφει και τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των συστατικών τους (υδρόφοβες και υδρόφιλες). Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ωθούν στην απομάκρυνση των μη πολικών ομάδων μακριά από το νερό, ενώ οι υδρόφιλες οδηγούν σε κατανομή των ιονικών και πολικών ομάδων προς ένα υδάτινο περιβάλλον. Οι κυτταρικές μεμβράνες απαρτίζονται κυρίως από αμφιπατικά φωσφολιπίδια, λιπίδια που αποτελούνται από αλυσίδες λιπαρών οξέων (μη πολική ομάδα) και μία φορτισμένη υδρόφιλη ομάδα στην κεφαλή. Με βάση τη θερμοδυναμική, η ύλη τείνει να σχηματίζει δομές χαμηλής ενεργειακής κατάστασης, κατά επέκταση οι υδρόφιλες και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις πρέπει να βελτιστοποιηθούν. Σε ένα υδατικό διάλυμα οι αλειφατικές αλυσίδες των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων τείνουν να έρθουν κοντά με αποτέλεσμα τη μικρότερη δυνατή έκθεσή τους στο νερό. Αντιθέτως, οι υδρόφιλες κεφαλές έρχονται σε πλήρη επαφή με το υδάτινο περιβάλλον. Το αποτέλεσμα είναι η σταθεροποίηση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας από μη ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των συστατικών μορίων. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα έχει πάχος της τάξης των $\sim 50 \text{ \AA}$, μέγεθος το οποίο εξαρτάται από τη χημική σύσταση και τα επίπεδα ενυδάτωσης της μεμβράνης (Lee, 2003).

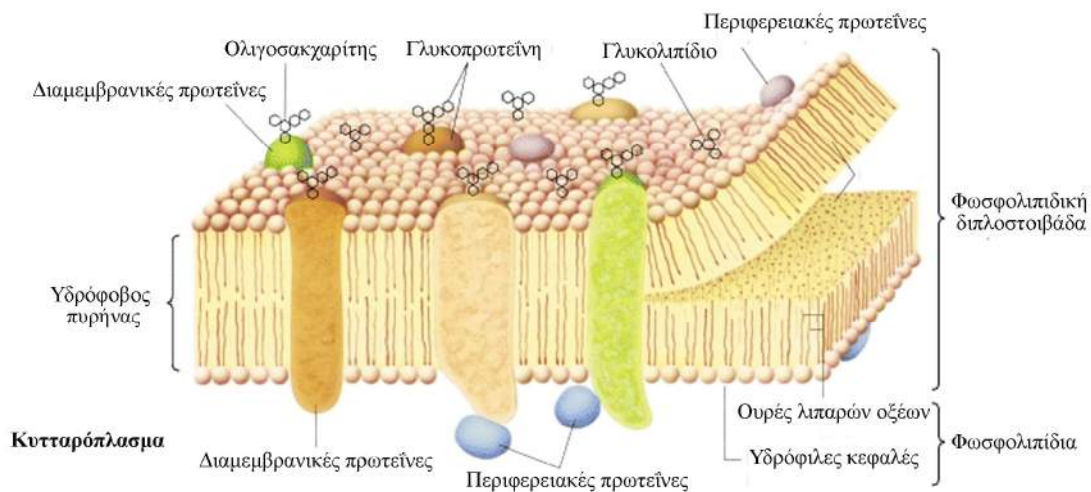
1.5.2 Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης

1.5.2.1 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης μπορούν να διακριθούν σε διαφορετικές κατηγορίες αναλόγως την αλληλεπίδρασή τους με τη μεμβράνη: τις διαμεμβρανικές, τις μερικά εισερχόμενες στη μεμβράνη, τις περιφερειακές και τις συνδεδεμένες πρωτεΐνες με λιπίδια (Εικόνα 1-17).

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες περιέχουν ένα ή περισσότερα υδρόφοβα τμήματα τα οποία διαπερνούν το μη πολικό τμήμα της μεμβράνης. Η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης και των λιπαρών οξέων που εντοπίζονται στο εσωτερικό της μεμβράνης. Τα υδρόφιλα τμήματα αυτών των πρωτεϊνών βρίσκονται εκτεθειμένα στο κυτταρόπλασμα, στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου, είτε και στους δύο αυτούς χώρους. Ο ρόλος αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να είναι η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες του εξωτερικού χώρου ή του κυττάρου, η μεταγωγή σήματος είτε η διευκολυνόμενη ή ενεργός μεταφορά ιόντων και αμινοξέων. Οι μερικά εισερχόμενες πρωτεΐνες της μεμβράνης δε διαπερνούν κάθετα όλο το επίπεδο της μεμβράνης, αλλά αλληλεπιδρούν με μέρος του υδρόφοβου τμήματός της (Lodish et al., 2000). Οι περιφερειακές πρωτεΐνες δεν έρχονται σε αλληλεπίδραση με το εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, αλλά προσκολλώνται στη μεμβράνη με ένα συνδυασμό υδρόφοβων, ηλεκτροστατικών ή άλλων μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν την πρόσδεση σε πρωτεΐνες που έχουν εισέρθει στη μεμβράνη ή την ηλεκτροστατική σύνδεσή τους με τις πολικές κεφαλές των μεμβρανικών λιπιδίων. Επιπρόσθετα, ακυλιωμένες αλυσίδες λιπαρών οξέων, όπως η γλυκοσυλοφωσφατιδύλοϊνοσιτόλη (GPI) μπορούν να λειτουργήσουν ως άγκυρες στην πλασματική μεμβράνη, και να προσδέσουν ομοιοπολικά πρωτεΐνες μέσω παλμιτουλίωσης (είτε μέσω μυριστοϋλίωσης, ή πρενυλίωσης). Τέτοιες τροποποιήσεις λιπιδίων ρυθμίζουν τη λειτουργία και την τοπολογία των G-πρωτεϊνών στο κύτταρο. Μία εναλλακτική αλληλεπίδραση από αυτές των αγκύρων GPI είναι η ύπαρξη συγκεκριμένων αυτόνομων λειτουργικών περιοχών στις πρωτεΐνες που στοχεύουν

συγκεκριμένα λιπίδια στη μεμβράνη. Ένα παράδειγμα, είναι οι περιοχές ομολογίας με την πλεξτρίνη (pleckstrin homology domain, PH), γνώστες για την ικανότητά τους να δεσμεύουν φωσφοϊνοσιτίδια PI(4,5)P2 με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα και αντιπροσωπεύουν την 11^η πιο κοινή περιοχή στο ανθρώπινο πρωτέωμα (Lemmon, 2007). Μέχρι στιγμής, περιοχές PH έχουν εντοπιστεί σε πληθώρα πρωτεϊνών, όπως τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (δυναμίνη) ή ρυθμιστές μικρών G-πρωτεϊνών, όπως η Cdc24 αλλά και οι πρωτεΐνες Slm1/2, απαραίτητες για τη στρατολόγηση της κυτταροπλασματικής κινάσης Yrk1 (βλέπε παρακάτω) στη πλασματική μεμβράνη του *S. cerevisiae* (Niles and Powers, 2012, p. 2).

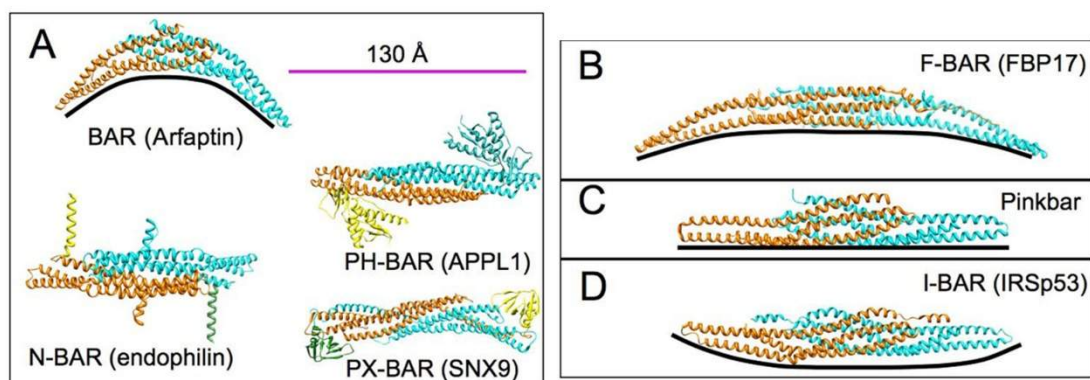


Εικόνα 1-17 Σχηματική απεικόνιση της πλασματικής μεμβράνης ως λιπιδική διπλοστοιβάδα. Διακρίνονται οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι μερικά εισερχόμενες στη μεμβράνη, και οι περιφερειακές πρωτεΐνες συνδεδεμένες με λιπίδια. Προσαρμογή από Lodish et al., 2000.

Κυτταρικές διαδικασίες, όπως η ενδοκύττωση, η κυτταρική μετανάστευση, και η μορφογένεση, απαιτούν ακριβή ρύθμιση του σχήματος και της δυναμικότητας της πλασματικής μεμβράνης. Επιπρόσθετα του πολυμερισμού της ακτίνης, όπου παράγονται οι δυνάμεις για τη δημιουργία προεξοχών και εγκολπώσεων της μεμβράνης, αυτές οι διεργασίες βασίζονται σε πρωτεΐνες που δεσμεύονται απ'ευθείας στις μεμβράνες για να ανιχνεύσουν την καμπυλότητα της και να τη διαμορφώσουν αναλόγως. Μέλη της υπεροικογένειας πρωτεϊνών που περιέχουν την αυτόνομη δομική περιοχή BAR έχουν περιγραφεί ως θεμελιώδεις ρυθμιστές των διαδικασιών παραμόρφωσης της μεμβράνης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Daumke et al., 2014). Στρατολογούνται από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη και συμμετέχουν σε

κυτταρικές διαδικασίες όπως ο σχηματισμός εγκολπώσεων της πλασματικής μεμβράνης, σχηματισμούς ενδιάμεσων δομών μεταφοράς όπως τα ενδοκυτταρικά κυστίδια και την ανάπτυξη σωληνοειδών δομών της μεμβράνης (Suetsugu et al., 2014). Όλα τα μέλη της υπεροικογένειας έχουν δομή διμερούς με σχήμα ημισελήνου, η οποία προκύπτει από αντιπαράλληλη διάταξη των δύο μονομερών. Αναλόγως το μέγεθος της γωνίας μεταξύ των μονομερών, και επομένως της κάμψης που εμφανίζεται στην πρωτεΐνη, οι πρωτεΐνες με το μοτίβο BAR μπορούν να χωριστούν σε υποοικογένειες ως εξής (**Εικόνα 1-18**):

- πρωτεΐνες με το κλασσικό μοτίβο BAR
- πρωτεΐνες που φέρουν το πιο επίμηκες F-BAR μοτίβο (FES-CIP4 homology BAR, FCH-BAR)
- πρωτεΐνες με το μοτίβο N-BAR το οποίο φέρει αμφιπαθικές έλικες που εισβάλλουν στη λιπιδική διπλοστοιβάδα
- πρωτεΐνες με το I-BAR (inverse-BAR) που προκαλούν κύλωση και όχι κύρτωση στις μεμβράνες



Εικόνα 1-18 Διαφορετικές υποοικογένειες BAR αυτόνομων περιοχών. Όλες οι δομές απεικονίζονται ως διμερή (κυανό και πορτοκαλί). Η μαύρη γραμμή κάτω από κάθε δομή εισήχθη για να δείξει την εγγενή καμπυλότητα της κάθε BAR πρωτεΐνης. **(A)** Πάνω αριστερά, πρωτεΐνες με το κλασσικό μοτίβο BAR. N-BAR αυτόνομης περιοχής της ενδοφιλίνης (endophilin), η οποία περιέχει μια N- τελική έλικα (κίτρινο και πράσινο χρώμα) και ένα δεύτερο σετ αμφιπαθικών ελικών γνωστές ως «ένθετες έλικες (πορτοκαλί και κυανό χρώμα). Δεξιά επάνω (APPL1), ένα παράδειγμα μιας αυτόνομης περιοχής PH-BAR, που περιέχει επιπλέον μια περιοχή ομολογίας με την πλεξτρίνη (PH). Δεξιά κάτω, πρωτεΐνες PX-BAR (SNX9) που περιλαμβάνουν μια περιοχή ομολογίας με την rhoX. **(B)** Πλάγια κάτοψη των πρωτεϊνών F-BAR (FBP). **(C)** Πρωτεΐνη με BAR δομική περιοχή, η οποία δεν παρουσιάζει εγγενή καμπυλότητα. **(D)** Πρωτεΐνες με το I-BAR (inverse-BAR) που

προκαλούν κύλωση και όχι κύρτωση στις μεμβράνες. Προσαρμογή από (Mim and Unger, 2012)

Το διμερές των BAR πρωτεϊνών σταθεροποιείται από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εσωτερικών επιφανειών του, με την τελική μορφή του να είναι μία συμμετρική επιμήκη δομή με έναν κεντρικό πυρήνα έξι πακεταρισμένων α-ελίκων (τρεις από κάθε μονομερές) και 2 άκρα . Κατά την αντιπαράλληλη διάταξη των μονομερών, τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα του μοτίβου αλληλεπιδρούν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται το απαραίτητο υδρόφοβο προφίλ, και οι φορτισμένες αμινοξικές πλευρικές ομάδες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με ηλεκτροστατικούς δεσμούς και πιθανώς είναι σημαντικές για την σταθεροποίηση του διμερούς (Masuda and Mochizuki, 2010). Η διατάραξη του υδρόφοβου προφίλ που υπάρχει εντός του πυρήνα του διμερούς είναι ικανή να οδηγήσει σε αποδιοργάνωση του μοτίβου BAR. Η πρόσδεση και η παραμόρφωση των μεμβρανών από τις περιοχές BAR προκύπτουν από την αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων που είναι εκτεθειμένα στην κοίλη πλευρά του διμερούς με τις αρνητικά φορτισμένες κεφαλές των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Κατά αυτόν τον τρόπο, το μοτίβο BAR επιβάλλει την καμπυλότητά του στη μεμβράνη και τη σταθεροποιεί μέσω του μηχανισμού ικριώματος (Zimmerberg and Kozlov, 2006).

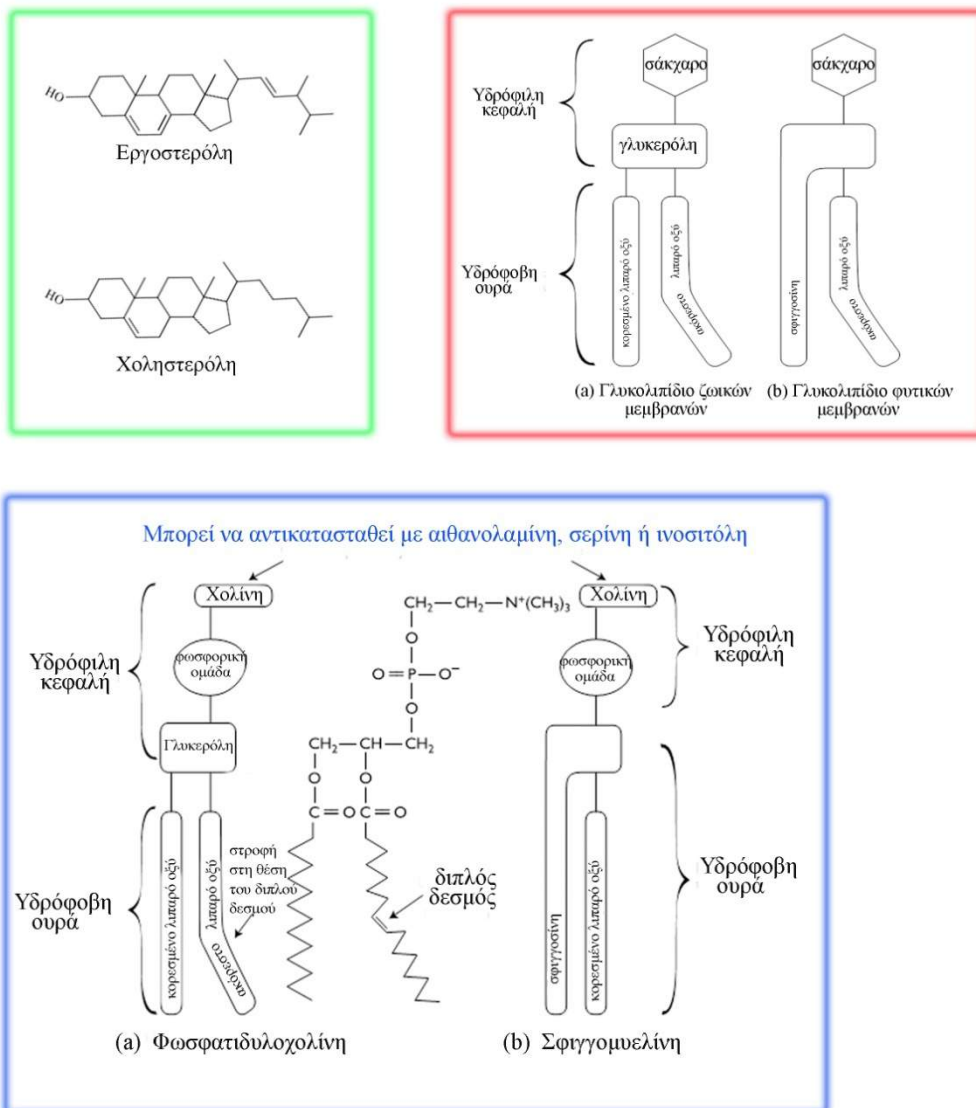
1.5.2.2 Τα λιπίδια

Τα λιπίδια και οι μεταβολίτες τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης όσο και στον έλεγχο και τη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών (Pomorski et al., 2001). Η πλασματική μεμβράνη απαρτίζεται από ένα σύνθετο μίγμα διαφορετικών τύπων λιπιδίων. Οι βασικοί τύποι λιπιδίων διαφέρουν ως προς τη χημική τους σύσταση, με αποτέλεσμα διαφορετικές συστάσεις των μεμβρανών να έχουν και διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Τα κύρια λιπίδια που εντοπίζονται στα κύτταρα είναι: στερόλες, φωσφογλυκερίδια, γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια.

1.5.2.2.1 Στερόλες

Τα στεροειδή έχουν διαφορετική δομή από τα υπόλοιπα λιπίδια. Σε αυτά ανήκουν οι στερόλες, τα χολικά οξέα, τα κορτικοειδή, τα οιστρογόνα κ.λ.π. Το κύριο μέρος της χημικής δομής των στεροειδών σχηματίζεται από τέσσερις δακτυλίους που ονομάζονται στεροειδής δακτύλιος. Ενώ η χοληστερόλη είναι η κύρια στερόλη των μεμβρανών των ανώτερων ευκαρυωτικών, η εργοστερόλη¹² είναι η κύρια στερόλη στα κατώτερα ευκαρυωτικά όπως ορισμένα πρωτόζωα, ζύμες και μύκητες (**Εικόνα 1-19**). Η βιοσύνθεση των στερολών και των φωσφολιπιδίων πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, απ' όπου μεταφέρονται με κυστίδια στη πλασματική μεμβράνη (Blom et al., 2011). Η παρουσία στερολών στη μεμβράνη οδηγεί σε στενότερο «πακετάρισμα» (βλέπε παρακάτω) των γειτονικών λιπιδίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης όπως επίσης και τη μείωση της διαπερατότητά της από πολικές ενώσεις. Λόγω της επίδρασής τους στη ρευστότητα της μεμβράνης, οι στερόλες αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της πλευρικής διάχυσης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη (Arora et al., 2004).

¹² Η δομή της εργοστερόλης είναι παρόμοια με αυτήν της χοληστερόλης, τη διαφορά ότι έχει περισσότερο κινητή πολική ομάδα λόγω της ύπαρξης διπλού δεσμού άνθρακα.

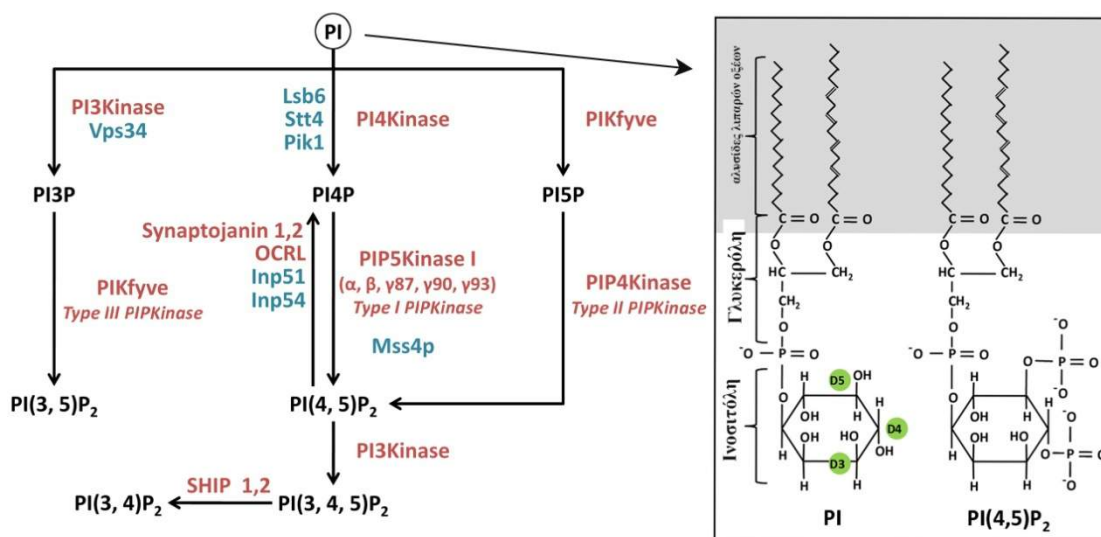


Εικόνα 1-19 Οι χημικές δομές της χοληστερόλη και της εργοστερόλη (πράσινο πλαίσιο). **(α)** Τυπικό γλυκολιπίδιο ζωικών μεμβρανών (πάνω δεξιά). **(β)** Τυπικό γλυκολιπίδιο φυτικών μεμβρανών (κόκκινο πλαίσιο) (πάνω δεξιά). **(α)** Η φωσφατιδυλοχολίνη είναι ένα φωσφογλυκερίδιο. **(β)** Η σφινγομυελίνη είναι ένα σφινγολιπίδιο. Τα σφινγολιπίδια διαφέρουν από τα περισσότερα φωσφολιπίδια στο ότι έχουν μακρές, κυρίως κορεσμένες αλυσίδες, οι οποίες τους επιτρέπουν να «πακετάρνονται» σφιχτά στη διπλοστοιβάδα, σχηματίζοντας μια φάση πηκτώματος στο οποίο υπάρχει πολύ μικρή πλευρική κίνηση ή διάχυση (μπλε πλαίσιο).

1.4.2.2 Φωσφογλυκερίδια

Η μεγαλύτερη ομάδα λιπιδίων που απαρτίζουν τη μεμβράνη είναι αυτή των φωσφογλυκεριδίων. Τα φωσφογλυκερίδια είναι φωσφολιπίδια τα οποία έχουν ως εξέδρα πρόσδεσης των λιπαρών οξέων ένα μόριο γλυκερόλης. Η γλυκερόλη είναι μία αλκοόλη τριών ανθράκων, η οποία συνδέεται με μία φωσφορική ομάδα και δύο

αλυσίδες λιπαρών οξέων μέσω εστερικών δεσμών (**Εικόνα 1-19**). Η φωσφορική ομάδα μπορεί να εστεροποιηθεί περαιτέρω με την υδροξυλομάδα ενός μεγάλου εύρους ενώσεων που περιέχουν μια ομάδα υδροξυλίου και άζωτο (χολίνη, αιθανολαμίνη, ινοσιτόλη) καθορίζοντας τον τελικό τύπο του φωσφογλυκεριδίου (Strahl and Thorner, 2007). Το πιο σπουδαίο χαρακτηριστικό των φωσφογλυκεριδίων από την άποψη της μεμβρανικής δομής, είναι ο αμφίτροπος χαρακτήρας τους. Οι αλειφατικές αλυσίδες των λιπαρών οξέων είναι μη πολικές και υδρόφοβες, ενώ το φωσφορικό άκρο είναι πολικό και υδρόφιλο. Η χημική σύσταση των αλυσίδων των λιπαρών οξέων των φωσφογλυκεριδίων και πιο συγκεκριμένα η ύπαρξη ή όχι διπλών δεσμών άνθρακα στην αλυσίδα επηρεάζει άμεσα το πακετάρισμα των λιπιδίων και κατά επέκταση τη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης. Αύξηση της ποσότητας των κορεσμένων φωσφολιπιδίων οδηγεί σε περισσότερη συμπαγή, και επομένως ανθεκτική σε χαμηλές θερμοκρασίες, μεμβράνη. Οι περισσότερες φωσφατιδυλοχολίνες (PtdCho) περιέχουν μια *cis*- ακόρεστη αλυσίδα υδρογονανθράκων, η οποία τις καθιστά ρευστές σε θερμοκρασία δωματίου. Οι φωσφατιδυλαιθανολαμίνες (PtdEtn) υιοθετούν κωνική μοριακή γεωμετρία, λόγω του σχετικά μικρού μεγέθους της πολικής ομάδας της κεφαλής. Περιοχές της διπλοστοιβάδας πλούσιες σε PtdEtn και PtdCho αποκτούν κυρτή επιφάνεια (van Meer et al., 2008).

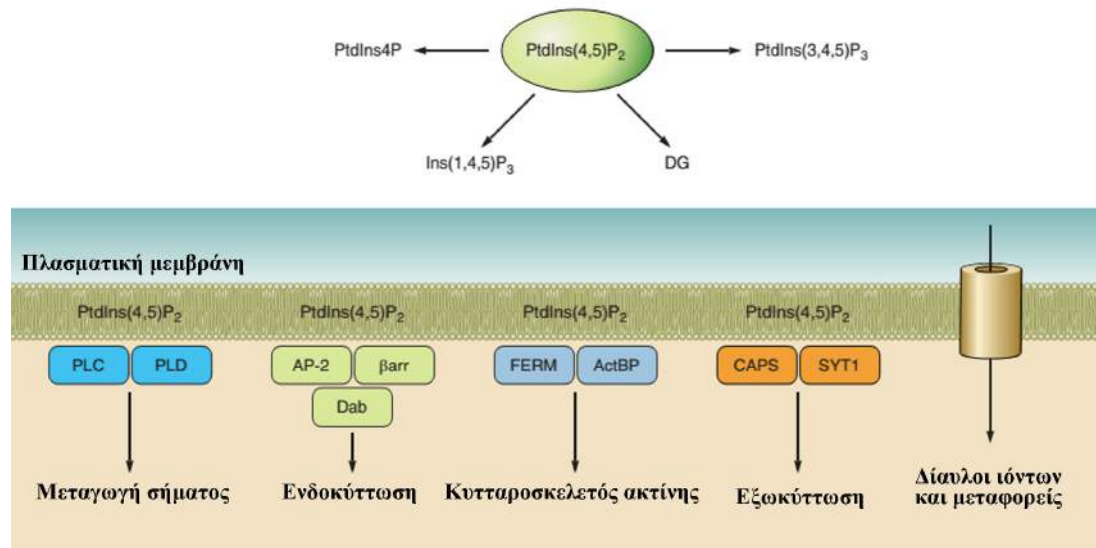


Εικόνα 1-20 Τα ενζυμα στο μεταβολισμό των φωσφοϊνοσιτιδίων. Παρατίθενται τα σημαντικότερα ενζυμα των λιπιδικών κινάσων στα θηλαστικά (κόκκινο χρώμα) και στο ζυμομύκητα (μπλε χρώμα) και η δομή της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI) και της 4,5 διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI(4,5)P₂).

Η ομάδα της κεφαλής της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PtdIns) είναι μοναδική ανάμεσα στα φωσφογλυκερίδια με την έννοια ότι τρεις (θέσεις D3, D4 και D5) από τις ομάδες υδροξυλίου του εξαμελούς δακτύλου ινοσιτόλης υπόκεινται σε αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση μέσω φωσφορυλίωση. Έτσι τα μόρια φωσφατιδυλινοσιτόλης αποτελούν υπόστρωμα για έναν αριθμό διαφορετικών λιπιδικών κινασών και μπορεί να αποδώσει ένα σύνολο διαφορετικών, δραστικών παράγωγων, που συλλογικά ονομάζονται φωσφοϊνοσιτίδια (PIPs) (**Εικόνα 1-20**) (Strahl and Thorner, 2007). Οι λιπιδικές κινάσες αρχικά είχαν ταξινομηθεί σύμφωνα με τις διακριτές βιοχημικές τους ιδιότητες, όπως κατά πόσο αυτές διεγείρονταν από την παρουσία απορρυπαντικών ή κατά πόσο αναστέλλονται από την αδενοσίνη, με αποτέλεσμα κατηγοριοποίηση των PtdIns κινασών στις ομάδες I, II, και III. Αργότερα, οι κινάσες ταξινομήθηκαν περαιτέρω σε τρεις υποομάδες ανάλογα με τα προϊόντα που παράγουν ή την ειδικότητα τους για κάποιο υπόστρωμα στις: PtdIns 3-κινάσες, PtdIns 4-κινάσες, και PtdInsP-(PIP) 5-κινάσες (Loijens et al., 1996). Οι φωσφατάσες στο *S. cerevisiae* ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: οι φωσφατάσες της I κατηγορίας περιέχουν sac (sac domain), οι φωσφατάσες της II κατηγορίας περιέχουν τη δομική περιοχή ινοσιτόλ πολυφωσφορική 5-φωσφατάση (inositol polyphosphate 5-phosphatase domain), ενώ οι φωσφατάσες της III κατηγορίας είναι ομόλογες της μυοτουμπουλαρίνης (myotubularins) των θηλαστικών (Balla, 2013). Γονιδιακά προϊόντα της οικογένειας ινοσιτόλ πολυφωσφορικές 5 φωσφατάση περιλαμβάνουν τις Inp51, Inp52, Inp53 and Inp54 (**IN**ositol polyphosphate **5-Phosphatase**). Όλες εκτός από την Inp54 περιέχουν μια sac δομική περιοχή και μια δομική περιοχή φωσφατάσης και είναι ορθόλογα των synaptojanin στα θηλαστικά. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η Inp53 εμπλέκεται με τη λειτουργία των εισοσωμάτων (βλέπε παρακράτω) . Ενώ η Inp51 και η Inp52 εντοπίζονται στη πλασματική μεμβράνη, με την Inp52 να είναι συστατικό των κοκκίων ακτίνης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκύττωση, ο οποίος είναι παρόμοιος με εκείνον που έχει προταθεί για την synaptojanin στην ενδοκύττωση μέσω κυστιδίων με κάλυμμα κλαθρίνης σε κύτταρα θηλαστικών (Fröhlich et al., 2014).

Επιπλέον, αρκετά φωσφοϊνοσιτίδια αποτελούν υποστρώματα φωσφολιπασών καθώς και φωσφατασών, δημιουργώντας έτσι μια σειρά προϊόντων που λειτουργούν ως δευτεροί αγγελιοφόροι. Τα PIPs χρησιμεύουν ως «άγκυρες» για στρατολόγηση

ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα λιπίδια μέσω συντηρημένων μοτίβων πρόσδεσης. Ως εκ τούτου, τα PIPs είναι ως βασικοί ρυθμιστές πολλών βιολογικών διεργασιών σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα.



Εικόνα 1-21 Οι πολλαπλές λειτουργίες της PI(4,5)P2 στη πλασματική μεμβράνη. Αυτό το λιπίδιο χρησιμεύει ως πρόδρομο μόριο των δεύτερων αγγελιοφόρων, Ins(1,4,5)P3 και DG ή PtdIns (3,4,5) P3. Μπορεί επίσης να αποφωσφορυλιωθεί από τις 5- φωσφατάσες σε PtdIns4P. Εκτός από τη δημιουργία δεύτερων αγγελιοφόρων η PI(4,5)P2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξωκύττωση, στη ρύθμιση της δραστηριότητας ενζύμων, όπως PLCδ1 και PLD, συμβάλλει στη στρατολόγηση πρωτεϊνών στη πλασματική μεμβράνη που εμπλέκονται με την ενδοκύττωση, την αγκυροβόληση του κυτταροσκελετού ακτίνης στην πλασματική μεμβράνη, στη διατήρηση και ρύθμιση της δομής μιας ποικιλίας διαύλων ιόντων και μεταφορέων. Προσαρμογή από (Balla, 2013).

Τα διαφορετικά PIPs εντοπίζονται σε διακριτά κυτταρικά διαμερίσματα. Για παράδειγμα, η PI(4,5)P2 εντοπίζονται στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, η φωσφατιδυλνισοιτόλη (PI) και η 4-φωσφορική φωσφατιδυλνισοιτόλη (PI4P) εντοπίζονται στο σύμπλεγμα Golgi και η 3-φωσφορική φωσφατιδυλνισοιτόλη (PI3P) αποτελεί δείκτη των ενδοσωμάτων. Η PI(4,5)P2 παράγεται στη πλασματική μεμβράνη από τη διαδοχική φωσφορυλίωση της φωσφατιδυλνισοιτόλης στις ομάδες υδροξυλίου D4 και D5 από τις PtdIns 4-κινάσες, PtdIns 5-κινάσες και αντιπροσωπεύει περίπου το 0,5-1% των συνολικών φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Η PI(4,5)P2 έχει συγκεντρώσει τεραστία προσοχή από την επιστημονική κοινότητα κατά την τελευταία δεκαετία λόγω της ικανότητάς της να ρυθμίζει μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών γεγονότων. Η PI(4,5)P2 εμπλέκεται στη διακίνηση κυστιδίων,

στη φαγοκυττάρωση, την κυτταρική κίνηση και πρόσφυση, τη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων, και πιο πρόσφατα στη ρύθμιση της δράσης καναλιών ιόντων (Coppolino et al., 2002; Honda et al., 1999; Loijens et al., 1996). Επιπλέον, η PI(4,5)P2 αποτελεί υπόστρωμα για την παραγωγή της IP3, DAG και PI(3,4,5)P3 και λειτουργεί επίσης ως πλατφόρμα σηματοδότησης για τη στρατολόγηση πρωτεϊνών στη πλασματική μεμβράνη. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η PI(4,5)P2 στην ενδοκύττωση, όπου δεσμεύει και στρατολογεί πρωτεΐνες του καλύμματος, όπως η AP-2. Ταυτόχρονα φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της καμπυλότητα μεμβρανών αλλά και στον πολυμερισμό της ακτίνης, αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την ακτίνη, όπως τις Arp1 και Arp2 (Εικόνα 1-21) (Janmey and Lindberg, 2004).

1.5.2.2.3 Γλυκολιπίδια

Ομοίως με τα φωσφολιπίδια, τα γλυκολιπίδια περιέχουν μόρια γλυκερόλης ή σφιγγοσίνης συνδεδεμένα με αλυσίδες λιπαρών οξέων. Διαφέρουν από τα φωσφολιπίδια στο ότι τα γλυκολιπίδια έχουν ένα σάκχαρο, όπως τη γλυκόζη ή τη γαλακτόζη, αντί της κεφαλής που περιέχει τη φωσφορική ομάδα (Εικόνα 1-19). Τα γλυκολιπίδια στις μεμβράνες των ανωτέρων ευκαρυωτικών περιέχουν σχεδόν πάντα σφιγγοσίνη, ενώ εκείνα που εντοπίζονται σε βακτηριακά ή φυτικά κύτταρα περιέχουν κυρίως γλυκερόλη. Τα γλυκολιπίδια εντοπίζονται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (Blom et al., 2011).

1.5.2.2.4 Τα σφιγγολιπίδια και ο μεταβολισμός τους

Το 1884 ο J. L. W. Thudichum μελετώντας τη χημική σύνθεση του εγκεφάλου ανακάλυψε μια νέα κατηγορία λιπιδίων. Τα ονόμασε σφιγγολιπίδια (από την λέξη Σφίγξ¹³), λόγω των αιγυπτιακών τους ιδιοτήτων (Merrill et al., 1997). Τα σφιγγολιπίδια, είναι ένας τύπος φωσφολιπιδίων που φέρουν ως πολική κεφαλή τη

¹³ Η Σφίγγα αποτελεί φανταστικό πλάσμα της ελληνικής μυθολογίας, Στις αναπαραστάσεις η Σφίγγα απεικονίζεται ως φτερωτό λιοντάρι με κεφάλι γυναίκας (εν αντιθέσει με τη Σφίγγα της Αιγύπτου, που δεν έχει φτερά) ή ως γυναίκα με πέλματα και στήθη λιονταριού, ουρά ερπετού και φτερά πτηνού (“Σφίγγα (μυθολογία),” 2014).

σφιγγοσίνη, μία αμινοαλκοόλη που περιέχει μία επιμήκη ακόρεστη υδρογονανθρακική αλυσίδα (Long-Chain Base, LCB). Το λιπαρό οξύ συνδέεται στη σφιγγοσίνη με αμιδικό δεσμό και το προκύπτον μόριο, ονομάζεται κεραμίδιο. Επιπλέον, η πρωτοταγής υδροξυλομάδα της σφιγγοσίνης εστεροποιείται με διαφορετικές ομάδες για να προκύψουν τελικώς τα σύνθετα σφιγγολιπίδια, στον *S. cerevisiae*, τρεις μόνο τύποι σύνθετων σφιγγολιπιδίων υπάρχουν: φωσφοκεραμίδιο της ινοσιτόλης (IPC), Μαννοζυλ ινοσιτόλ-φωσφο-κεραμίδιο (MIPC) και Μαννοζυλ ινοσιτόλ-διφωσφο-κεραμίδιο[M(IP₂)C]. Οι αντιδράσεις για την βιοσύνθεση των σφιγγολιπιδίων εκτείνονται σε δύο οργανίδια και περιλαμβάνουν τουλάχιστον 11 ένζυμα. Οκτώ εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και 3 στο σύμπλεγμα Golgi, με τις ενεργές θέσεις των ενζύμων να βρίσκονται στη κυτταροπλασματική πλευρά ή τον αυλό των οργανιδίων (Gault et al., 2010).

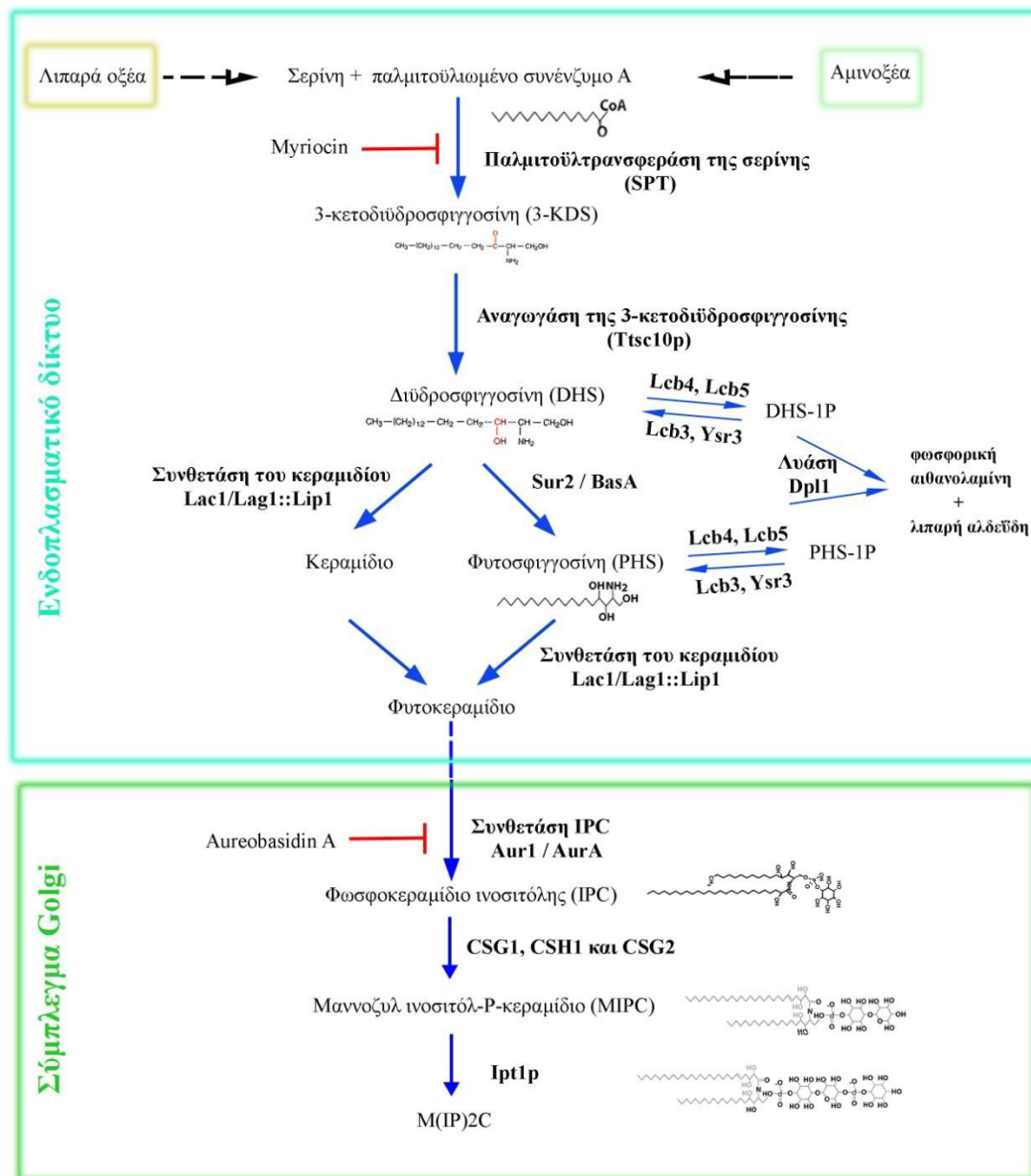
Το πρώτο και καθοριστικό βήμα στη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων είναι συντηρημένο από τον άνθρωπο έως τους μύκητες (Gulati et al., 2010) και πραγματοποιείται από την παλμιτοϋλτρανσφεράση της σερίνης (SPT) στη κυτταροπλασματική πλευρά του ενδοπλασματικού δικτύου και περιλαμβάνει τη συμπύκνωση μίας σερίνης με το παλμιτοϋλιωμένο συνένζυμο A για την παραγωγή της 3-κετοδιϋδροσφιγγοσίνης (3-KDS) (**Εικόνα 1-22**). Τουλάχιστον τα προϊόντα δύο γονιδίων, LCB1 και LCB2, είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα της SPT στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, απαλοιφή των οποίων οδηγεί σε θνησιγόνο φαινότυπο, ο οποίος μπορεί να διασωθεί με εξωγενή χορήγηση βάσεων μακράς αλυσίδας (LCBs) (Montefusco et al., 2014).

Η 3-KDS ανάγεται σε διϋδροσφιγγοσίνη (DHS) που ονομάζεται επίσης σφινγγανίνη. Αυτή η αντίδραση επιτελείται από το ένζυμο Tsc10p και απαιτεί NADPH. Όπως και για την παλμιτοϋλτρανσφεράση της σερίνης, η Tsc10p είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη. Σε όλους τους οργανισμούς που μελετήθηκε μέχρι σήμερα, η DHS μεταβολίζεται ταχύτατα (Dickson, 2008), στους μύκητες η DHS μπορεί να τροποποιηθεί μέσω υδροξυλίωσης, φωσφορυλίωσης ή συμπύκνωσης με μακρές αλυσίδες λιπαρών οξέων λιπαρό για το σχηματισμό κεραμιδίων. Υδροξυλίωση της διϋδροσφιγγοσίνης στη θέση 4 αποδίδει την κύρια σφιγγοειδή βάση, τη φυτοσφιγγοσίνη (PHS). Στον *S. cerevisiae* η αντίδραση καταλύεται από την πρωτεΐνη Sur2p, χωρίς ωστόσο να είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη του μύκητα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, το γεγονός ότι η ομόλογη πρωτεΐνη στον *A. nidulans*, BasA, είναι επίσης αναγκαία για τη βιοσύνθεση φυτοσφιγγοσίνης αλλά σε

αντίθεση με ότι συμβαίνει στο σακχαρομύκητα είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Li et al., 2007).

Τόσο η DHS όσο και η PHS μπορούν να φωσφορυλιωθούν από τις κινάσες Lcb4p και Lcb5p για το σχηματισμό DHS-1P και PHS-1P, αντίστοιχα. Παρά το γεγονός ότι καμία από αυτές τις κινάσες δεν περιλαμβάνει ένα μεμβρανικό σήμα εντοπισμού στην αμινοξική αλληλουχία, η Lcb4p εντοπίζεται στο ER, ενώ η Lcb5p έχει βρεθεί να συ-κλασμάτωναται με τις μεμβράνες Golgi (Funato et al., 2002). Οι σφιγγοειδείς βάσεις μπορούν να αποφωσφορυλιωθούν ή διασπαστούν. Η αποφωσφορυλίωση επιτυγχάνεται μέσω των πρωτεϊνών Lcb3p ή Ysr3p στο ζυμομύκητα. Αυτές οι φωσφατάσες είναι ειδικές για τις σφιγγοειδείς βάσεις, δεδομένου ότι δεν μπορούν να αποφωσφορυλιώσουν κεραμίδια ή φωσφολιπίδια (Aguilera-Romero et al., 2014). Τα γονίδια *Lcb3* και *Ysr3* κωδικοποιούν για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου και απαλοιφή αυτών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν έχει επίπτωση στην επιβίωση και μορφολογία των κυττάρων.

Η διάσπαση των σφιγγοειδών φωσφορικών βάσεων επιτυγχάνεται μέσω της λύασης που κωδικοποιείται από το γονίδιο Dpl1 (Εικόνα 1-22). Η διάσπαση οδηγεί στο σχηματισμό φωσφορικής αιθανολαμίνης και λιπαρής αλδεύδης. Η Dpl1p εντοπίζεται στο ER και απαλοιφή του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία στελεχών υπερευαίσθητων σε σφιγγοειδής βάσεις. Η βιωσιμότητα των κυττάρων αποκαθίσταται με την επιπλέον απαλοιφή της κύρια LCB κινάσης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *lcb4*. Παρατηρήσεις ου οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η υπερ-συσσώρευση LCBPs (φωσφορυλιωμένων LCBs) και όχι των LCBs είναι τοξική για τα κύτταρα (Muir et al., 2014).



Εικόνα 1-22 Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων. Με έντονα γράμματα αναγράφονται τα κυριότερα ενζύμα του μονοπατιού. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι ειδικοί αναστολείς του μονοπατιού. Προσαρμογή από (Aguilera-Romero et al., 2014; Gault et al., 2010; Hallstrom et al., 2001; Hannun et al., 2001; Thevissen et al., 2000; Vecer et al., 2014)

Η συμπύκνωση των DHS και PHS με μακρές αλυσίδες λιπαρών ακυλο- CoA οδηγεί στη παραγωγή κεραμιδίων, όπως το φυτοκεραμίδιο. Η παραγωγή κεραμιδίων καταλύεται από το σύμπλοκο της συνθετάση του κεραμιδιού, το οποίο αποτελείται από τρεις υπομονάδες, Lac1p, Lag1p και Lip1p (Εικόνα 1-22 και Εικόνα 1-23). Οι Lac1p και Lag1p είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του ER. Η μικρή υπομονάδα Lip1p

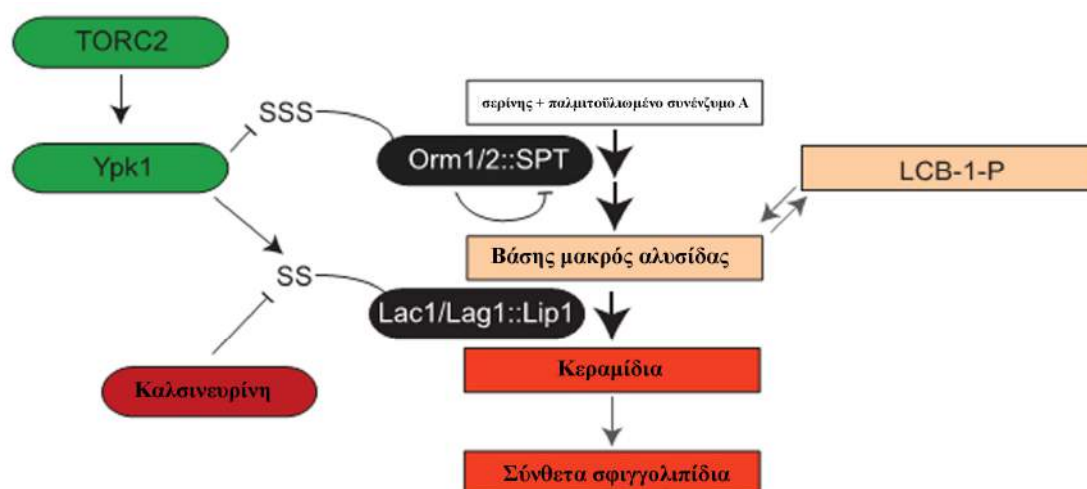
εντοπίζεται επίσης στο ER και διασχίζει τη μεμβράνη μία φορά, με μια μικρή N-κυτταροπλασματική ουρά (Muir et al., 2014, p. 1).

Μετά τη σύνθεση τους, τα κεραμίδια πρέπει να μεταφερθούν από το ER στο σύμπλεγμα Golgi, όπου είναι η θέση σύνθεσης της IPC. Αυτή η μεταφορά έχει αναφερθεί να συμβαίνει μέσω κυστιδίων ή σε μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από κυστίδια (αλλά μέσω αμέσων επαφών των μεμβρανών του ER και του συμπλέγματος Golgi). Στο σύμπλεγμα Golgi τα κεραμίδια μετατρέπονται περαιτέρω σε φωσφοκεραμίδια ινοσιτόλης (IPCs). Τα IPCs ανήκουν στην κατηγορία των σύνθετων σφιγγολιπιδίων και περιέχουν μια φωσφορική ινοσιτόλη συνδεδεμένη με την C1-OH ομάδα του κεραμιδιού. Αυτή η αντίδραση επιτελείται από τη συνθετάση IPC, Aur1p/AurA, ενζυμο συνδεδεμένο με τη μεμβράνη του συμπλέγματος Golgi. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *csg1*, *cgh1* και *csg2* συμμετέχουν στη μετατροπή των IPCs μέσω μαννοζυλίωσης σε μαννοζυλ ινοσιτόλ-P-κεραμίδια (MIPC). Απαλοιφή του ενός είτε όλων αυτών των γονιδίων δεν εμποδίζει τη ανάπτυξη των κυττάρων. Ενώ η πρωτεΐνη Csg1p αλληλεπιδρά με την Csg2p για την παράγωγή MIPC τύπου A, B, C και B', η Csh1p αλληλεπιδρά με την Csg2p για τη δημιουργία MIPC τύπου C. Με βάση την ομολογία αλληλουχίας με άλλες πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες Csg1p και Csh1p είναι πιθανό να έχουν καταλυτική λειτουργία μαννοζυλοτρανσφεράσης και εντοπίζονται στο σύμπλεγμα Golgi. Ο ρόλος της Csg2p είναι πολύ λιγότερο κατανοητός. Με τη μεταφορά μιας άλλης ομάδας φωσφορικής ινοσιτόλης στο MIPC, σχηματίζεται M(IP)2C. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την πρωτεΐνη Ipt1. Η θέση δράσης του ενζύμου Ipt1p υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι ο αυλός του συμπλέγματος Golgi (Dickson et al., 1997). Απαλοιφή του γονιδίου *ipt1* οδηγεί σε πλήρη έλλειψη M(IP)2C και συσσώρευση MIPC. Τα M(IP)2C είναι τα πιο άφθονα σφιγγολιπίδια στα κύτταρα της ζύμης. Αποτελούν το 75% της συνολικής μάζας των συνθετών σφιγγολιπιδίων στον *S. cerevisiae*, με το υπόλοιπο 25% κατανέμεται μεταξύ IPC και MIPC. Φαίνεται ότι τα κύτταρα ζύμης είναι σε θέση να ανιχνεύουν τα επίπεδα των σφιγγολιπιδίων και να προσαρμόζουν τα σχετικά επίπεδα των MIPC για να αντισταθμίσουν την απουσία των M(IP)2C (Daum et al., 1998).

Τα σφιγγολιπίδια μπορούν επίσης να αποικοδομηθούν. Η αποικοδόμηση των σύνθετων σφιγγολιπιδίων σε κεραμίδια καταλύεται από την Isc1p. Η Isc1p περιέχει δύο διαμεμβρανικές α έλικες και φαίνεται να εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Swinnen et al., 2014). Απαλοιφή του Isc1 οδηγεί σε δραματική μείωση της δραστηριότητας

σφιγγολιπάσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι Isc1p είναι η μόνη σφιγγολιπάση στους ζυμομύκητες (Sawai et al., 2000, p. 1).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα σύνθετα σφιγγολιπίδια μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη και στα χυμοτόπια. Αυτό συμβαίνει μέσω κυστιδικής μεταφοράς, διότι όλοι οι τύποι σύνθετων σφιγγολιπιδίων βρέθηκαν σε εκκριτικά κυστίδια και διαπιστώθηκε ότι μεταλλαγές που επηρεάζουν το μονοπάτι έκκρισης έχουν έως αποτέλεσμα την απουσία σύνθετων σφιγγολιπιδίων από τη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (Klemm et al., 2009).



Εικόνα 1-23 Το μονοπάτι σηματοδότησης TORC2-Ypk1 ρυθμίζει θετικά τη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων. Απλοποιημένο διάγραμμα της de novo σύνθεσης σφιγγολιπιδίων, οι μεταβολίτες είναι σε κουτιά και τα ένζυμα σε οβάλ σχήματα. Απεικονίζεται η αρνητική ρύθμιση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης μέσω της καλσινευρίνη, αποφωσφορυλιώνοντας τις πρωτεΐνες Lac1 και Lag1. Προσαρμογή από Muir et al., 2014.

Σημαντικά γενετικά στοιχεία της τελευταίας πενταετίας υποδεικνύουν ισχυρή σύνδεση μεταξύ της σηματοδότησης μέσω ιόντων Ca^{2+} και τη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων (Aronova et al., 2008). Όπως θα συζητηθεί εκτενώς παρακάτω η κίνηση Ypk1 δρα ως θετικός ρυθμιστής αυτού του μονόπατου, φωσφορυλιώνοντας και ανακουφίζοντας από την αρνητική ρύθμιση των πρωτεϊνών Orm1/2 του ενδοπλασματικού δικτύου (Liu, 2005; Muir et al., 2014; Niles et al., 2012; Niles and Powers, 2012; Roelants et al., 2011; Sun et al., 2000). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι Ypk1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί επίσης τις πρωτεΐνες του συμπλόκου της συνθάσης του κεραμιδίου (Muir et al., 2014). Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές

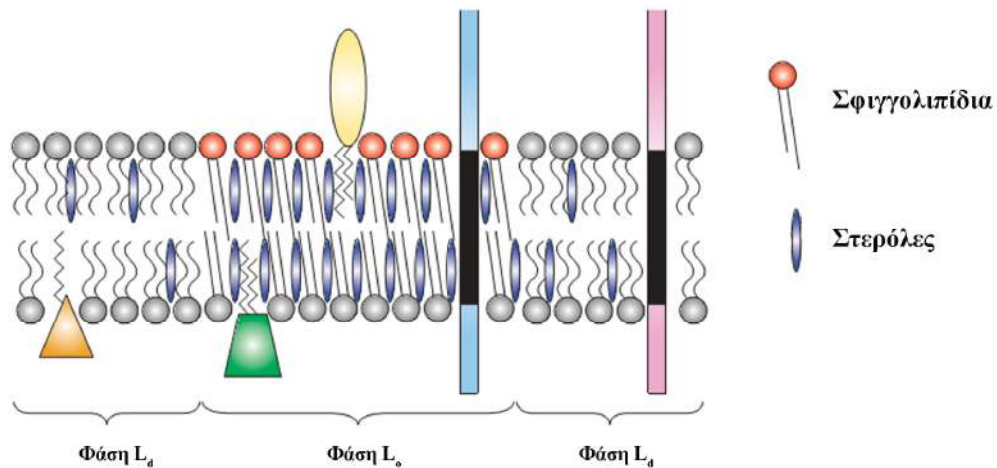
διαπίστωσαν ότι η καλσινευρίνη ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι, τουλάχιστον σε μεγάλο βαθμό, με την άμεση αποφωσφορλίωση των προτεΐνων Lac1 και Lag1 (Εικόνα 1-23) (Muir et al., 2014). Επιπλέον, χορήγηση αναστολέων της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων σε κύτταρα της ζύμης όπως μυρισίνη και ουρεοβασιδίνη A (*aureobasidin A*, AbA) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων κυτταροπλασματικού Ca^{2+} και η απώλεια βιωσιμότητας αυτών των κυττάρων είναι άμεσα εξαρτώμενη από το ασβέστιο. Εφόσον η απαλοιφή των γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν για τα κανάλια ιόντων ασβεστίου *mid1* και *cchl* είναι σε θέση να διασώσουν τα κύτταρα (Kajiwara et al., 2012).

1.5.3 Λιπιδικές σχεδίες

Το μοντέλο του “ρευστού μωσαϊκού” των Singer and Nicolson, σήμερα έχει υποστεί βελτιώσεις. Πλέον είναι κοινά αποδεκτό ότι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες κατανέμονται ανομοιογενώς, σχηματίζοντας εξειδικευμένες περιοχές κατά μήκος της μεμβράνης. Χωρίς να αναφέρεται ξεκάθαρα στη δημοσίευση των Singer and Nicolson, η μεμβράνη αντιμετωπίζεται ως ένα ομογενές ρευστό στο οποίο οι πρωτεΐνες διαχέονται σε δύο διαστάσεις. Το 1984, οι Mouritsen και Bloom πρότειναν το μοντέλο του στρώματος (mattress model), στο οποίο πρωτεΐνες και λιπίδια αλληλεπιδρούν (Mouritsen and Bloom, 1984). Το μοντέλο του στρώματος δηλώνει ότι το ταίριασμα των διαστάσεων των λιπιδίων και των πρωτεϊνών επηρεάζουν τη συσσώρευση λιπιδίων γύρω από μια πρωτεΐνη και την πλευρική διευθέτηση της πρωτεΐνης λόγω ελκτικών δυνάμεων που προκύπτουν από τα τριχοειδή φαινόμενα. Η πλασματική μεμβράνη όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων, όπως όλες οι βιολογικές μεμβράνες, περιέχουν περισσότερα είδη λιπιδίων (π.χ. τα φωσφολιπίδια έχουν μια τρομακτική ποικιλία ομάδων κεφαλής και ακυλικές αλυσίδες διαφορετικής δομής και μήκους) από όσα χρειάζονται για τη δημιουργία μιας απλής λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Munro, 2003). Ωστόσο βιοφυσικές και μικροσκοπικές μελέτες έδειξαν την ύπαρξη εξειδικευμένων μικρο/νάνο περιοχών, τις οποίες πρώτοι οι Simons και Ikonen, το 1997, ονόμασαν λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts) (Simons and Ikonen, 1997).

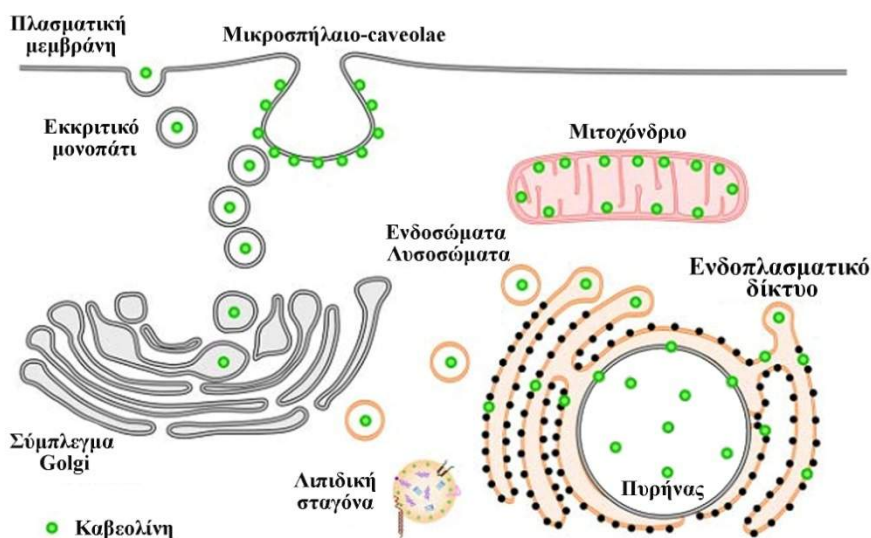
Οι λιπιδικές σχεδίες θεωρούνται οι μικρότερες μονάδες οργάνωσης της πλασματικής μεμβράνης, και αποτελούν διακριτές περιοχές, αδιάλυτες σε μη ιονικά

τασιενεργά απορρυπαντικά. Οι λιπιδικές σχεδίες είναι νάνο/μίκρο περιοχές της πλασματικής μεμβράνης που εκτείνονται σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών χωρικών και χρονικών κλιμάκων, οι οποίες κυμαίνονται από μερικές δεκάδες έως εκατοντάδες νανόμετρα και από χιλιοστά του δευτερολέπτου σε εξαιρετικά σταθερές ακόμη και αμετάβλητες δομές (Olivera-Couto and Aguilar, 2012). Θεωρείται ότι διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στην κίνηση του κυττάρου, στην ενδοκύττωση και στην κυτταρική σηματοδότηση (Simons and Ikonen, 1997). Παρότι, η βιολογική ύπαρξη των λιπιδικών σχεδίων έχει αμφισβητηθεί κατά τη διάρκεια των ετών (Munro, 2003), η τεχνολογική ανάπτυξη έχει αποδώσει αποτελέσματα που περιγράφουν τις λιπιδικές σχεδίες ως δυναμικές νάνο/μίκρο συγκροτήσεις ή πλατφόρμες, εμπλουτισμένες σε στερόλες και σφιγγολιπίδια. Αυτά τα δύο είδη λιπιδίων σχηματίζουν μαζί μία μονάδα, η οποία φαίνεται να επιπλέει στη μεμβράνη, ενώ στην πραγματικότητα είναι μέρος της με τη διαφορά ότι είναι πιο συγκροτημένη και πιο σφιχτά πακεταρισμένη από ότι το περιβάλλον στρώμα φωσφολιπιδίων (van Meer and Lisman, 2002). Ο μηχανισμός για τη συγκρότηση των λιπιδικών σχεδίων βασίζεται στη διαδικασία διαχωρισμού φάσεων της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, βάσει των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των λιπιδίων. Λόγω της δύσκαμπτης δομής των στερολών, υπάρχει προτίμηση να αλληλεπιδρούν με κορεσμένες αλυσίδες λιπαρών οξέων, όπως αυτές που εντοπίζονται στα σφιγγολιπίδια, παρά με τις πιο ογκώδεις ακόρεστες αλυσίδες των φωσφολιπιδίων (Opekarová et al., 2010). Η κατανομή των λιπιδίων στη μεμβράνη με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες, οδηγεί στη διαφοροποίηση σε υγρές φάσεις που είναι σε τάξη (L_o) ή αταξία (L_d) (Εικόνα 1-24) (Martin et al., 2005).



Εικόνα 1-24 Σχηματική αναπαράσταση των λιπιδικών σχεδίων (lipid rafts) της πλασματικής μεμβράνης. Πλευρική σύνδεση των σφιγγολιπιδίων (πορτοκαλί σφαίρες) στην εξωτερική πλευρά και των στερολών (μπλε ελλείψεις) στην εξωτερική και εσωτερική πλευρά της διπλοστοιβάδας, οδηγούν στο σχηματισμό υγρών φάσεων, που βρίσκονται σε τάξη (Lo) και είναι διακριτές από τις περιβάλλουσες υγρές φάσεις που βρίσκονται σε αταξία (Ld). Προσαρμογή από Martin et al., 2005.

Λόγω του μήκους των αλυσίδων των συστατικών τους, οι Lo φάσεις θεωρούνται πως είναι παχύτερες των Ld φάσεων. Η διαφορά στο πάχος της διπλοστοιβάδας μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό εξειδικευμένων περιοχών στην πλασματική μεμβράνη, όπου πχ. πρωτεΐνες με μεγάλα διαμεμβρανικά τμήματα ενσωματώνονται και συσσωρεύονται μαζί. Λόγω της δυνατότητας ένταξης συγκεκριμένων λιπιδίων και πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης σε λειτουργικές μικρο/νάνο περιοχές το μοντέλο των λιπιδικών σχεδίων συνδέει τις φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών της μεμβράνης με επιμέρους λειτουργίες της (Bagnat and Simons, 2002).

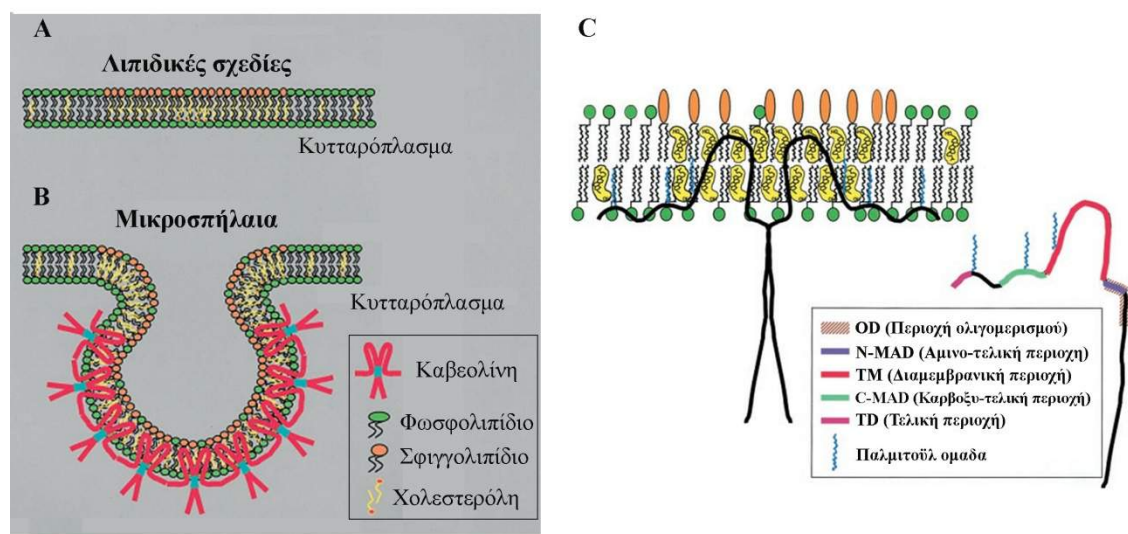


Εικόνα 1-25 Η καβεολίνη εντοπίζεται σε πολλαπλά κυτταρικά διαμερίσματα όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), το σύμπλεγμα Golgi, τα μιτοχόνδρια, ο πυρήνας, τα ενδοσώματα, τα λυσοσώματα και τα λιπιδικά σταγονίδια. Προσαρμογή από Fridolfsson et al., 2014.

Ένα παράδειγμα οργάνωσης λειτουργικής μικρο περιοχής *in vivo* είναι τα μικροσπήλαια των μεμβρανών (caveolae) στα κύτταρα θηλαστικών. Τα μικροσπήλαια είναι εγκολπώσεις της μεμβράνης μεγέθους 50 –100 nm, τα οποία ανακαλύφθηκαν σχεδόν πριν 60 χρόνια (Parton and del Pozo, 2013). Η καβεολίνη, η δομική πρωτεΐνη απαραίτητη για το σχηματισμό των μικροσπηλαίων, είναι παρούσα στα κύτταρα σε τρεις ισομορφές. Στοιχεία των τελευταίων χρόνων καταδεικνύουν ότι αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να έχουν ρόλους ανεξάρτητα από αυτόν της συγκρότησης των μικροσπηλαίων, στη μεταφορά λιπιδίων, στη μεταγωγή σήματος, στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, και στη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Fridolfsson et al., 2014). Αυτές οι ανεξάρτητες δράσεις των καβεολινών μπορούν να διευκολύνονται από το γεγονός ότι αυτές οι πρωτεΐνες εντοπίζονται σε πολλά κυτταρικά διαμερίσματα όπως: στις κυτταρικές μεμβράνες, στα ενδοκυτταρικά κυστίδια, στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια, στα λυσοσώματα/ενδοσώματα και στο σύμπλεγμα Golgi (**Εικόνα 1-25**).

Το κύριο συστατικό των μικροσπηλαίων είναι η καβεολίνη (caveolin), μία πρωτεΐνη 20 kDa που εισέρχεται μερικώς στη μεμβράνη και συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στο ER, οι νεοσυντιθέμενες καβεολίνες υφίστανται το πρώτο

στάδιο ολιγομερισμού τους, ενώ τα ολιγομερή αυτά σταθεροποιούνται μέσω της σύνδεσής τους με μόρια χοληστερόλης (Fridolfsson et al., 2014). Οι καβεολίνες στη συνέχεια μεταφέρονται στο σύμπλεγμα Golgi και εντός του Golgi σχηματίζουν ολιγομερή υψηλού μοριακού βάρους (~ 400 kDa) απαραίτητα για την ενσωμάτωση τους στις λιπιδικές σχεδίες (Εικόνα 1-26). Τα ολιγομερή καβεολίνης συνεχίζουν μέσω της εκκριτικής οδού για την ενσωμάτωση τους στη πλασματική μεμβράνη, όπου εκεί άλλες πρωτεΐνες όπως οι καβίνες σταθεροποιούν το σχηματισμό των μικροσπηλαίων (Kovtun et al., 2015).



Εικόνα 1-26 (A-B) Οργάνωση των λιπιδικών σχεδίων και των μικροσπηλαίων. (A) Στις λιπιδικές σχεδίες η υγρή φάση σε τάξη (L_o) είναι εμπλουτισμένη σε χοληστερόλη (κίτρινο χρώμα) και σφιγγολιπίδια στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης (πορτοκαλί χρώμα). Σε αντίθεση η υγρή φάση σε αταξία (L_d) αποτελείται ουσιαστικά από φωσφολιπίδια, όπως φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, και φωσφατιδυλοσερίνη (πράσινο χρώμα). (B) Μετά την ενσωμάτωση της πρωτεΐνης καβεολίνης, οι περιοχές της μεμβράνης σε L_o σχηματίζουν εγκολλώσεις που ονομάζονται μικροσπήλαια. Ομο-ολιγομερή της καβεολίνης (παρουσιάζονται ως διμερή για απλότητα) συναθροίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές της πλασματικής μεμβράνης. (C) Η τοπολογία της καβεολίνης στη πλασματική μεμβράνη. Η καβεολίνη σχηματίζει ομο-ολιγομερή ή έτερο-ολιγομερή. Μέσω της υδρόφοβης διαμεμβρανικής περιοχής (κόκκινο χρώμα) η καβεολίνη πιστεύεται ότι διεισδύσει στη μεμβράνη. Η πρωτεΐνη είναι επίσης συνδεδεμένη με τη μεμβράνη μέσω των περιοχών N-MAD και C-MAD (πράσινο χρώμα). Προσαρμογή από Razani et al., 2002.

Τα μικροσπήλαια πιθανότατα αποτελούν κέντρα οργάνωσης για την κυτταρική μεταγωγή σήματος. Ένα μοντέλο για το λειτουργικό ρόλο των μικροσπηλαίων, προτείνει ότι αυτά φέρουν τελεστές κοντά σε υποδοχείς μέσω της σύνδεσής τους με μόρια σηματοδότησης. Αυτή η υπόθεση επιπλέον προτείνει ότι η

καβεολίνη διατηρεί τις πρωτεΐνες σηματοδότησης σε μια ανενεργή μορφή μέχρι την άφιξη του καταλλήλου ερεθίσματος (Razani et al., 2002). Οι καβεολίνες αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία μορίων σηματοδότησης, τα οποία περιλαμβάνουν υποδοχείς που συζεύγνυνται με G (GPCRs), κανάλια ιόντων, αδενυλική κυκλάση, ενδοθηλιακή συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (eNOS) αλλά και κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPs) (Parton and del Pozo, 2013). Τα μικροσπύλαια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκύττωση, την πρόσληψη παθογόνων βακτηρίων και ιών, στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος αλλά και στην ογκογένεση. Ταυτόχρονα μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις καβεολίνες έχουν συσχετιστεί με ασθενείς, όπως τον καρκίνο του μαστού καθώς και σε διάφορους τύπους μυϊκής δυστροφίας (Razani et al., 2002).

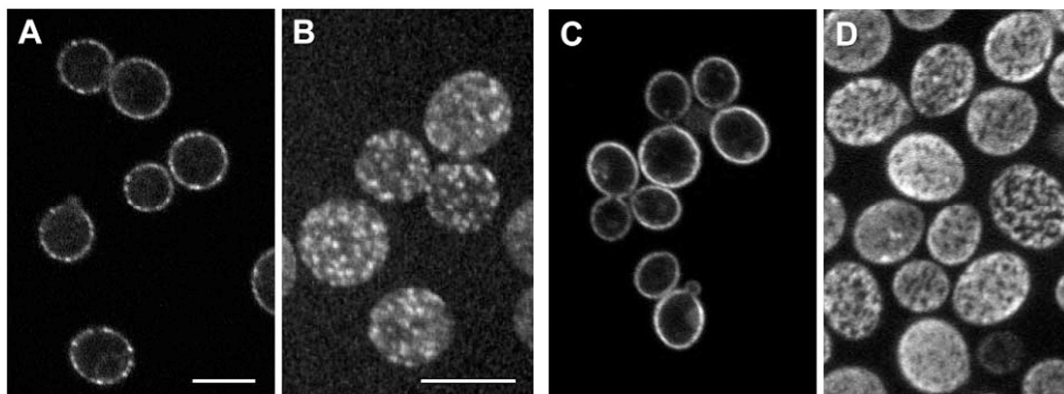
1.6 Οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης στο *S. cerevisiae*

Η πλασματική μεμβράνη (PM) είναι απαραίτητη για τη ζωή και συμμετέχει σε μια πληθώρα λειτουργιών, όπως η κυτταρική προσκόλληση, η ενδοκύττωση και η εξωκύττωση, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί πλατφόρμα για πολλά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης (νευροδιαβίβασης, διαφοροποίησης, απόπτωσης, κ.λπ.). Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει όλο και πιο προφανές ότι η πλασματική μεμβράνη είναι σε μεγάλο βαθμό διαμερισματοποιημένη για την επίτευξη των διαφορετικών της λειτουργιών (Bagnat and Simons, 2002; Lingwood and Simons, 2010). Μελέτες κυρίως στο ζυμομύκητα, *S. cerevisiae* αλλά και σε άλλους ασκομύκητες όσον αφορά την πλευρική οργάνωση (lateral organization) των βιολογικών μεμβρανών, έδειξαν ότι η PM είναι οργανωμένη σε πολυάριθμες μερικώς επικαλυπτόμενες περιοχές που είναι αρκετά μεγάλες ώστε να μελετηθούν με μικροσκοπία φθορισμού (Spira et al., 2012). Ωστόσο το πώς αυτές οι μεμβρανικές περιοχές προκύπτουν είναι ελάχιστα κατανοητό, κυρίως λόγω των τεχνικών δυσκολιών μελέτης τους που οφείλονται κυρίως στην υψηλή υδροφοβικότητα των μεμβρανών (Douglas and Konopka, 2014).

Μια πρόσφατη έρευνα όσο αναφορά την οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης του ζυμομύκητα χρησιμοποιώντας μικροσκοπία ολικής εσωτερικής ανάκλασης (Total Internal Reflection Microscopy-TIRFM) με μεθόδους αποσυσχέτισης αποκάλυψε την ύπαρξη πάνω από δώδεκα μικρο περιοχών διαφορετικής δυναμικότητας και μορφών που κυμαίνονται από διακριτά κοκκία σε συνεχή δίκτυα (Spira et al., 2012). Ωστόσο, τρεις τύποι τόσο δυναμικών όσο και στατικών διακριτών περιοχών με διαφορετική σύνθεση λιπιδίων και πρωτεϊνών είναι καλά χαρακτηρισμένες στην πλασματική μεμβράνη του *S. cerevisiae*:

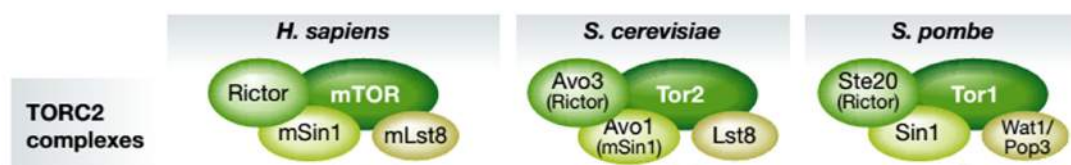
- οι περιοχές **MCC** (μεμβρανικές περιοχές πλούσιες στο μεταφορέα αργινίνης Can1 - Membrane Compartment of Can1)
- οι περιοχές **MCT** (μεμβρανικές περιοχές οι οποίες περιέχουν το σύμπλοκο στόχο της ραπαμυκίνης 2, TORC2 - Membrane Compartment containing TORC2)
- οι περιοχές **MCP** (μεμβρανικές περιοχές πλούσιες στην αντλία πρωτονίων Pma1 - Membrane Compartment of Pma1)

Η περιοχή **MCP**, αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα στατικής μικρο-περιοχής, περιλαμβάνει την αντλία πρωτονίων Pma1, η οποία δημιουργεί την ηλεκτροχημική κλίση που χρησιμεύει στην ενεργό μεταφορά θρεπτικών ουσιών. Οι περιοχές MCP σχηματίζουν ένα συνεχές δίκτυο που συνεντοπίζεται εν μέρει με άλλες νάνο-περιοχές της πλασματικής μεμβράνης αλλά όχι με τα MCC (βλέπε παρακράτω) (**Εικόνα 1-27**) (Spira et al., 2012). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, ο σημασμένος με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη μεταφορέας αργινίνης, Can1, δημιουργεί 50-80 κοκκιδείς-στικτούς/κύτταρο σχηματισμούς με διάμετρο 300 nm περίπου. Αυτό το πρότυπο κατανομής της Can1 έχει δηχθεί ότι παραμένει σταθερό για περισσότερο από 90 λεπτά (Malinska, 2004; Malínská et al., 2003). Οι περιοχές της μεμβράνης που καταλαμβάνει η Can1 είναι πλούσιες σε εργοστερόλη (Grossmann et al., 2006a) και αντανakλούν μια στατική δομή, η οποία ονομάζεται **MCC** (**Εικόνα 1-27**). Στις περιοχές **MCC** εντοπίζονται πολλές πρωτεΐνες όπως οι μεταφορείς ουρακίλης και τρυπτοφάνης (Grossmann et al., 2006b), μέλη της οικογένειας Sur7/PalI (Strádalová et al., 2009, p. 1), οι κινάσες Pkh1 και Pkh2 και οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες Lsp1 and Pil1 (εισοσωμικές πρωτεΐνες) (Walther et al., 2006) (βλέπε παρακράτω).



Εικόνα 1-27 Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Can1 και Pma1 στην πλασματική μεμβράνη του *S. cerevisiae*. Πρότυπα φθορισμού των (A και B) Can1-GFP (εγκάρσια και πολική τομή, αντίστοιχα) και (C και D) Pma1-GFP (εγκάρσια και πολική τομή, αντίστοιχα) σε ζωντανά κύτταρα ζύμης. Κλίμακα μεγέθυνσης 5 μ m. Προσαρμογή από Malínská et al., 2003.

Οι πρωτεΐνες TOR (στόχος της ραπαμυκίνης) είναι άτυπες κινάσες σερίνης/θρεονίνης που ανήκουν στη οικογένεια των φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινασών (PI3K-like kinases or PIKKs). Οι πρωτεΐνες TOR είναι καλύτερα γνωστές για τους ρόλους τους στα μονοπάτια σηματοδότησης που αφορούν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Επανάσταση στην κατανόηση των εμπλεκόμενων TOR-εξαρτώμενων σηματοδοτικών μονοπατιών ήταν η ανακάλυψη 2 ξεχωριστών συμπλόκων, τα οποία και ονομαστήκαν TORC1 (σύμπλοκο στόχο της ραπαμυκίνης 1) και TORC2 (σύμπλοκο στόχο της ραπαμυκίνης 2). Και τα δυο σύμπλοκα είναι συντηρημένα από τις ζύμες μέχρι τον άνθρωπο (Loewith and Hall, 2011).

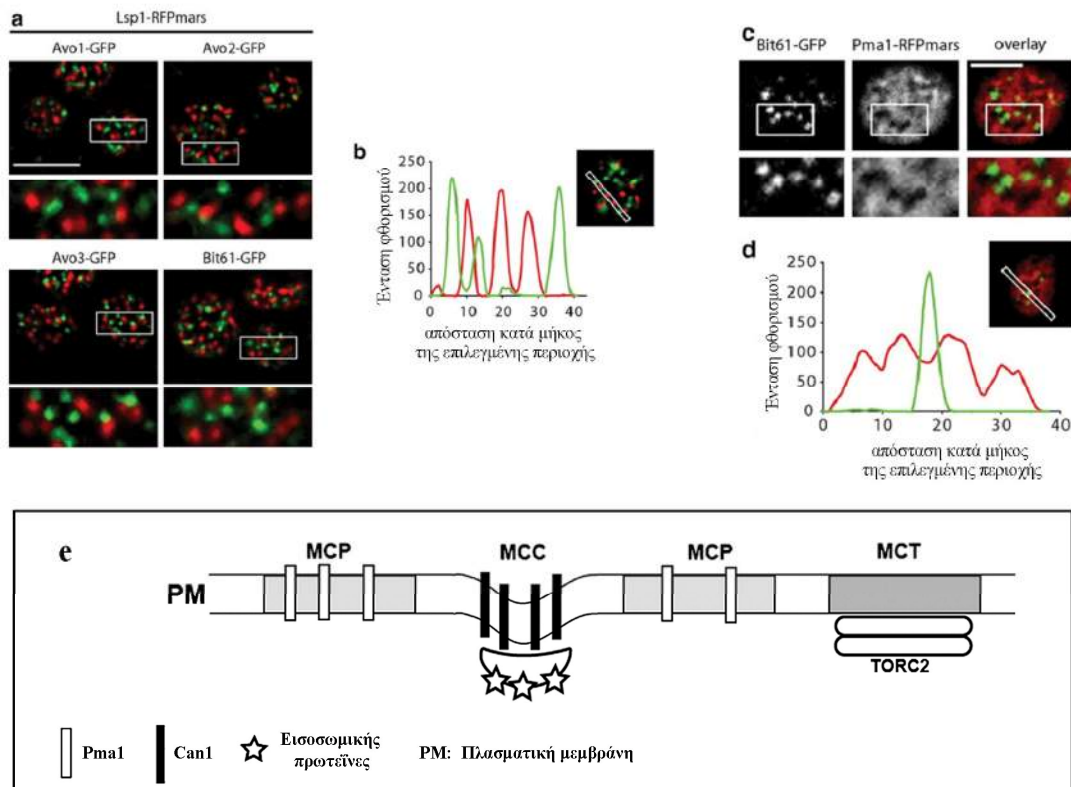


Εικόνα 1-28 Σχηματική αναπαράσταση των TORC2 στον άνθρωπο, το *S. cerevisiae* και το *S. pombe*. Οι ανθρώπινες πρωτεΐνες Rictor και Sin1 είναι συντηρημένες από τους μύκητες έως τον άνθρωπο. Οι ομόλογες στο *S. cerevisiae* είναι η Avo3 (Rictor) και η Avo1 (Sin1) και οι Ste20 (Rictor) και Sin1 στο *S. pombe*. Προσαρμογή από Weisman et al., 2014.

Το TORC1, πρωτίστως διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και ρυθμίζει την πρωτεϊνική σύνθεση, τη βιογένεση των ριβοσωμάτων, και την αυτοφαγία (Jacinto and Lorberg, 2008). Οι κυτταρικές λειτουργίες του TORC2 είναι λιγότερο κατανοητές, γιατί σε αντίθεση με το TORC1, δεν έχουν βρεθεί ειδικοί αναστολείς για το TORC2. Η ραπαμυκίνη¹⁴ και τα παράλογα της αναστέλλουν μόνο το TORC1 και η χρήση τους επέτρεψε την σε βάθος ανάλυση των λειτουργιών αυτού του συμπλόκου (Loewith and Hall, 2011). Η ραπαμυκίνη έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη θεραπεία νευρολογικών και μεταβολικών διαταραχών, καθώς και σε ορισμένες μορφές καρκίνου, όπως ο καρκίνος των νεφρικών κυττάρων και ο

¹⁴ Η ραπαμυκίνη (επίσης γνωστή ως σιρόλιμους) είναι χημική ουσία η οποία ανακαλύφθηκε από τον Suren Sehgal ως προϊόν των βακτηρίων στο Νησί του Πάσχα. Εγκρίθηκε από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration) το Σεπτέμβριο του 1999 και διατίθεται στην αγορά με την εμπορική ονομασία Rapamune by Pfizer. Η ραπαμυκίνη αναπτύχθηκε αρχικά ως αντιμυκητιασικός παράγοντας, ωστόσο, η χρήση αυτή εγκαταλείφθηκε όταν διαπιστώθηκε ότι η ουσία αυτή έχει ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση και αντικαρκινικές ιδιότητες (Gao et al., 2011).

καρκίνος του μαστού (Dienstmann et al., 2014). Τα κύτταρα των θηλαστικών περιέχουν ένα μόνο γονίδιο *tor* (mTOR) που κωδικοποιεί για την καταλυτική υπομονάδα είτε του TORC1 ή του TORC2. Ο *S. cerevisiae* έχει δύο γονίδια *tor* (*tor1* και *tor2*). Η κινάση Tor1 βρίσκεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο TORC1, ενώ η Tor2 μπορεί να χρησιμεύσει ως καταλυτική υπομονάδα και των δυο συμπλόκων (De Virgilio and Loewith, 2006). Ο *S. pombe* με τη σειρά του φέρει δύο γονίδια *tor*, η Tor1 βρίσκεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο TORC2, ενώ η Tor2 βρίσκεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο TORC1 (τα γονίδια ονομάστηκαν κατά σειρά ανακάλυψης και όχι με βάση τη λειτουργία τους) (Ikai et al., 2011, p. 2). Σε όλα τα είδη, τα δύο σύμπλοκα διακρίνονται από συντηρημένες υπομονάδες. Ειδικότερα, οι ανθρώπινες υπομονάδες Rictor και Sin1 είναι TORC2-ειδικές πρωτεΐνες συντηρημένες τόσο στον *S. pombe* όσο και στον *S. cerevisiae*, αν και με διαφορετικά ονόματα (**Εικόνα 1-28**) (Weisman et al., 2014). Ενώ το TORC1 εντοπίζεται στα χυμοτόπια (Loewith and Hall, 2011), το TORC2 εντοπίζεται στη πλασματική μεμβράνη του *S. cerevisiae*, σχηματίζοντας δυναμικές νάνο-περιοχές, οι οποίες δεν συνεντοπίζονται με τις περιοχές MCC και MCP (**Εικόνα 1-29**) (Berchtold et al., 2012). Κάθε σύμπλοκο TORC2 αποτελείται τουλάχιστον από δέκα μικρότερα σύμπλοκα που συναρμολογούνται, κινούνται και αποσυναρμολογούνται στην πλασματική μεμβράνη μέσα σε ένα χρονικό διάστημα μερικών λεπτών (Berchtold and Walther, 2009).



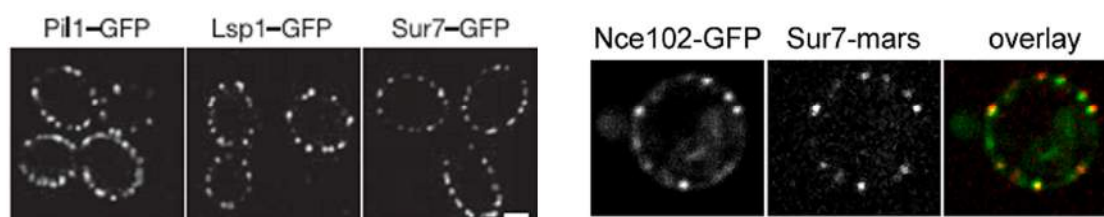
Εικόνα 1-29 Τα διαμερίσματα TORC2 εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές της μεμβράνης (a) Τα TORC2 εντοπίζονται σε διακριτές περιοχές της πλασματικής μεμβράνης από τα MCC/εισοσώματα. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας όπου οι πρωτεΐνες του TORC2, Avo1 και Avo2 έχουν σημειωθεί με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) και ο μάρτυρας των MCC, Lsp1 με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (RFPmars). Τα ένθετα δείχνουν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση τις επιλεγμένες περιοχές. Κλίμακα μεγέθυνσης 5 μm . **(b)** Διάγραμμα συνεντοπισμού των πρωτεϊνών Avo1 και Avo2 -GFP/Lsp1-RFPmars. **(c)** Τα TORC2 εντοπίζονται σε διακριτές περιοχές της πλασματικής μεμβράνης από τα MCP. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας όπου η πρωτεΐνη του TORC2, Bit61 έχει σημειωθεί με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) και ο μάρτυρας των MCP, Pma1 με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (RFPmars). Τα ένθετα δείχνουν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση τις επιλεγμένες περιοχές. Κλίμακα μεγέθυνσης 2,5 μm . **(d)** Διάγραμμα συνεντοπισμού των πρωτεϊνών Bit61-GFP / Pma1-RFPmars. Προσαρμογή από Berchtold and Walther, 2009. **(e)** Σχηματική απεικόνιση και των τριών καλύτερα μελετημένων μεμβρανικών περιοχών στο *S. cerevisiae*. Προσαρμογή από Bartlett and Kim, 2014.

1.6.1 Τα εισοσώματα και η πρωτεΐνη Nce102 στο *S. cerevisiae*

Η ιδέα των εισοσωμάτων γεννήθηκε για πρώτη φορά, όταν παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο επιφθορισμού η στικτή και στατική κατανομή της πρωτεΐνης Sur7 (σημασμένη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) στη πλασματική μεμβράνη του *S. cerevisiae* (Young et al., 2002). Απροσδόκητα, αν και η Sur7 είχε χαρακτηριστεί ως

καταστολέας πολλών αντιγράφων (high-copy suppressor) των μεταλλαγμένων προβληματικών σε ενδοκύττωση στελεχών *rns167*¹⁵ (Sivadon et al., 1997), τα Sur7-GFP κοκκία δεν συνεντοπίζονται με τα κοκκία ακτίνης στις περιοχές ενδοκύττωσης. Στην κυτταροπλασματική πλευρά κάθε MCC, εντοπίζονται χιλιάδες μόρια των παράλογων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών Pil1 (phosphorylation inhibited by long-chain bases) και Lsp1 (long-chain bases stimulate phosphorylation), οι οποίες μαζί με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη Sur7 σχηματίζουν το υπερμοριακό σύμπλεγμα που ονομάζεται εισόσωμα (Walther et al., 2006; Zhang, 2004). Μέρος της διαμερισματοποίησης της πλασματικής μεμβράνης του *S. cerevisiae* οφείλεται στα εισοσώματα. Τα εισοσώματα είναι μεγάλα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα σταθερά στο χώρο και στο χρόνο, τα οποία προσδένονται στη μεμβράνη από την κυτταροπλασματική της μεριά στο φλοιό του κυττάρου (**Εικόνα 1-30**). Η Pil1 και η Lsp1 έχουν 72% ταυτότητα στην αμινοξική τους ακολουθία, με τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις να εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Η δομή της Lsp1 έχει λυθεί κρυσταλλογραφικά για τα αμινοξικά κατάλοιπα 36-267, δείχνοντας πως η Lsp1 είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη που περιέχει τη δομική περιοχή BAR (βλέπε παράγραφο 1.5.2.1) και εντάσσεται φυλογενετικά κοντύτερα στις N-BAR πρωτεΐνες (Karotki et al., 2011).

Είναι δομές με εξαιρετικά μεγάλο ενδιαφέρον διότι η παρουσία τους εντοπίζεται στους μύκητες (Scazzocchio et al., 2011; Vangelatos et al., 2010) και στα μικροφύκη (GM microalgae) (Lee et al., 2015) και φαίνεται να επιδρούν σε μία σειρά κυτταρικών λειτουργιών.



Εικόνα 1-30 (Α) Οι εισοσωμικές πρωτεΐνες συνεντοπίζονται κάτω από την πλασματική μεμβράνη. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, στις οποίες οι Pil1, Lsp1 και Sur7 έχουν σημειωθεί με την GFP. Κλίμακα μεγέθυνσης 1 μm. Προσαρμογή από (Walther et al., 2006)

¹⁵ Τα μεταλλαγμένα στελέχη *rns167* (μειωμένη βιωσιμότητα μετά από έλλειψη θρεπτικών - reduced viability upon starvation) (Bauer et al., 1993), παρουσιάζουν προβλήματα στην οργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης. Η επιλογή των γονιδίων που όταν υπερεκφράζονται, είναι σε θέση να καταστείλουν την μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από έλλειψη πηγή άνθρακα, επέτρεψε την κλωνοποίηση του γονιδίου *sur7* (Sivadon et al., 1997).

(B) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας στελεχών, στα οποία η πρωτεΐνη Nce102 έχει σημανθεί με την GFP και η πρωτεΐνη Sur7 με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (mars). Κλίμακα μεγέθυνσης 5 μm. Προσαρμογή από (Frohlich et al., 2009)

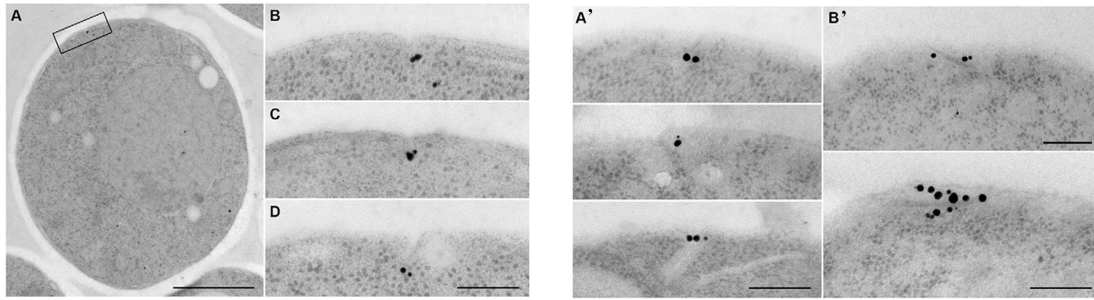
Τα εισοσώματα συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη Nce102 (Εικόνα 1-30), η οποία επίσης είναι συντηρημένη στο Βασίλειο των Μυκήτων (Khalaj et al., 2012). Στο *S. cerevisiae* το γονίδιο *nce102* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 173 αμινοξέων με τέσσερις διαμεμβρανικές α-έλικες, που σχηματίζουν μια πρωτεϊνική περιοχή, η οποία ονομάζεται MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link). Στα ζωικά κύτταρα, η οικογένεια των MARVEL πρωτεϊνών περιλαμβάνει τη μυελίνη, φυσίνες (physins), γυρίνες (gyrins) και οκλουντίνες (occludins). Οι MARVEL πρωτεΐνες έχουν προταθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη δημιουργία κυστιδίων μεταφοράς και στενοσυνδέσμων. Παρόλο που η ακριβής λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι γνωστή, φαίνεται να παίζουν σημαντικούς ρόλους, εφόσον μεταλλαγές στα γονίδια που τις κωδικοποιούν έχουν συσχετιστεί με σοβαρές ασθένειες. Η συναπτοφυσίνη και συναπτογυρίνη στον άνθρωπο, οι οποίες εντοπίζονται σε νευρωνικά κυστίδια έχουν συνδεθεί με τη σχιζοφρένεια. Μεταλλαγές που επηρεάζουν τη δημιουργία στενοσυνδέσμων έχουν συσχετιστεί με τη νεφρική δυσλειτουργία και την ασβεστοποίηση του εγκεφάλου (Douglas et al., 2013, p. 102)

Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *nce102* μπορεί να βοηθήσει την έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης, galectin-1 (Cleves et al., 1996). Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη Nce102 σχετίζεται με τη μη κλασική έκκριση (nonclassical export) λοιμογόνων/τοξικών παραγόντων στην κυτταρική επιφάνεια των παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι τα στελέχη στα οποία είχε γίνει απαλοιφή του γονιδίου *nce102* ήταν πιο ευαίσθητα στο διαιθυλμαλέικο οξύ (diethylmaleate), υποδηλώνοντας ως πιθανό ρόλο για την Nce102, την προστασία του κυττάρου από το οξειδωτικό στρες (Desmyter et al., 2007).

1.6.2 Τα MCC/εισοσώματα σχηματίζουν αυλακώσεις στην πλασματική μεμβράνη

Στον οργανισμό μοντέλο *S. cerevisiae*, οι πρώτες περιγραφές των νάνο-περιοχών της πλασματικής μεμβράνης χρονολογούνται από το 1963 όταν, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Moog and Mühlethaler, 1963), διαπιστώθηκε η ύπαρξη εγκολπώσεων, διαμέτρου 300 nm και βάθους 50 nm. Ωστόσο η σημασία τους δεν ήταν γνωστή, περάν του γεγονότος ότι ήταν διαφορετικές από τις στενόμακρες προβολές που εμφάνιζαν οι περιοχές ενδοκύττωσης. Πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης έδειξαν ότι αυτές οι αυλακώσεις στην πλασματική μεμβράνη αντιστοιχούν στις MCC/εισοσώματα¹⁶ περιοχές (Strádalová et al., 2009). Περαιτέρω μελέτες ανέφεραν την ύπαρξη παρόμοιων νάνο-περιοχών και στο *S. pombe*, ωστόσο και στα 2 είδη μυκήτων οι εγκολπώσεις είναι παρούσες σε αδρανή περιοχές της πλασματικής μεμβράνης και απουσιάζουν από τις περιοχές ενεργούς ανάπτυξης/αύξησης (Takeo, 1984). Αν και η διαμεμβρανική πρωτεΐνη Sur7 και η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Pil1 εμφανίζονται να συνεντοπίζονται με μικροσκοπία επιφθορισμού, η ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία (immunoelectron microscopy) έδειξε ότι η Sur7 εντοπίζεται στα ανώτερα άκρα των εγκολπώσεων, ενώ η Pil1 στο χαμηλότερο ύψος τους (**Εικόνα 1-31**) (Strádalová et al., 2009). Με βάση την εκτιμώμενη αφθονία της Sur7 στα κύτταρα (Ghaemmaghani et al., 2003), φαίνεται να υπάρχει αρκετή πρωτεΐνη για το σχηματισμό ενός δακτυλιδιού γύρω από την περίμετρο της κάθε εγκόλπωσης σε ένα τυπικό κύτταρο. Ομοίως, η εκτιμώμενη ποσότητα των Pil1 και Lsp1, θα επαρκούσε για την κάλυψη του μεγαλύτερου μέρους της επιφάνειας των εγκολπώσεων. Τα αλλά συστατικά των MCC/εισοσωμάτων είναι λιγότερο άφθονα και δεν θα καταλαμβάνουν πολύ χώρο.

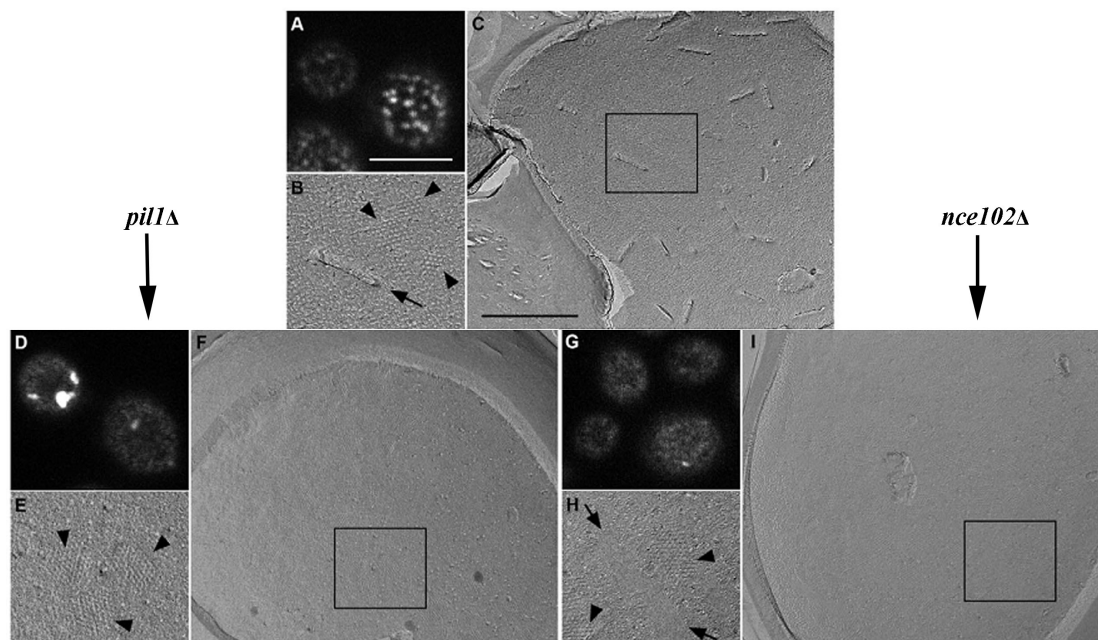
¹⁶ Τα εισοσώματα και οι περιοχές MCCs συνιστούν την ίδια υποκυτταρική δομή: αυλακώσεις της πλασματικής μεμβράνης. Για λόγους απλότητας, θα χρησιμοποιηθεί ο όρος εισοσώματα για να περιγράψει τις αυλακώσεις της πλασματικής μεμβράνης αλλά και τις πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές αυτές.



Εικόνα 1-31 Εντοπισμός της Pil1 μετά την ενσωμάτωση ανοσο-χρυσού. Ο εισοσωμικός δείκτης Pil1-GFP εντοπίστηκε σε υπέρλεπτες τομές, στα βαθύτερα τμήματα των εγκολπώσεων. (A) Διατήρηση όλων των κυτταρικών δομών του κυττάρου. (B- D) Ακριβής εντοπισμός της Pil1 στην εγκόλπωση. Η περιοχή B- D αποτελεί μεγέθυνση της επιλεγμένης περιοχής στην εικόνα A. Κλίμακα μεγέθυνσης A= 1 μ m, B- D =200 nm. Εντοπισμός της Sur7 μετά την ενσωμάτωση ανοσο-χρυσού. Ο MCC δείκτης Sur7-GFP εντοπίστηκε σε υπέρλεπτες τομές, στα επιφανειακά τμήματα των εγκολπώσεων. (A') Τρεις τομές. (B') Και δύο σχεδόν εφαπτόμενες τομές. Κλίμακα μεγέθυνσης 200 nm. Προσαρμογή από Strádalová et al., 2009.

Οι πρωτεΐνες **Pil1** και **Nce102** είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό των διαμερισμάτων MCC, τα οποία όπως προαναφέρθηκε, σε πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης φαίνονται ως αυλακώσεις στην πλασματική μεμβράνη (Stradalova et al., 2009, Karotki et al., 2011). Παρά τη μεγάλη αμινοξική τους ταυτότητα και τεταρτοταγή δομική ομοιότητα, οι πρωτεΐνες Pil1 και Lsp1 έχουν διαφορετική επίπτωση στην αρχιτεκτονική των εισοσωμάτων. Η παρουσία της Pil1 είναι σημαντική για τη συγκρότηση των εισοσωμάτων και γενικώς την οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης καθώς σε κύτταρα *pil1Δ* η στικτή κατανομή των εισοσωμάτων (Lsp1 και Sur7) χάνεται με μερικά «εισοσωμικά απομεινάρια» να παραμένουν στη μεμβράνη (Walther et al., 2006). Ταυτόχρονα δεν παρατηρούνται οι αυλακώσεις της πλασματικής μεμβράνης (Strádalová et al., 2009) και Can1 και Nce102 αποκτούν ομοιόμορφη κατανομή σε όλη τη μεμβράνη (**Εικόνα 1-32**) (Grossmann et al., 2006a). Αυτό συμβαίνει και στις υπόλοιπες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο MCC, οι οποίες είτε εντοπίζονται στα εισοσωμικά απομεινάρια είτε κατανέμονται ομοιόμορφα στη μεμβράνη έπειτα από απαλοιφή του γονιδίου *pil1* (Frohlich et al., 2009, p. 102). Το ίδιο συμβαίνει και για την εργοστερόλη η οποία χάνει το στικτό της μοτίβο/πρότυπο και αποκτά περισσότερο ομοιόμορφη κατανομή στην πλασματική μεμβράνη ενώ εντοπίζεται και στα εισοσωμικά απομεινάρια (Grossman et al., 2007). Σε έλλειψη της Lsp1 τα εισοσώματα διατηρούν τη στικτή κατανομή τους στο κύτταρο και οι αυλακώσεις της πλασματικής μεμβράνης

φαίνονται να σχηματίζονται όπως σε στελέχη φυσικού τύπου. Απαλοιφή του γονιδίου *nce102* έχει ως αποτέλεσμα την ομοιόμορφη κατανομή της Sur7 σε όλη τη μεμβράνη, τον εντοπισμό της Pil1 στα «εισοσωμικά απομεινάρια» και την έλλειψη αυλακώσεων της πλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 1-32) (Strádalová et al., 2009).



Εικόνα 1-32 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης όπου φαίνονται τα MCC ως αυλακοειδείς εγκολλώσεις της πλασματικής μεμβράνης και η στικτή κατανομή της Can1-GFP. (A-C) σε κύτταρα φυσικού τύπου, (D-F) η απουσία τους σε κύτταρα *pil1Δ*. (G-I) η απουσία τους σε κύτταρα *nce102Δ*. Προσαρμογή από Stradalova *et al.*, 2009.

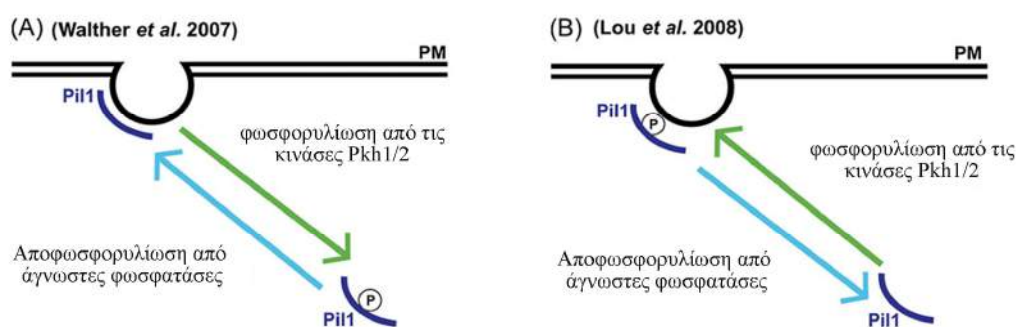
1.6.3 Ρύθμιση της συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης των εισοσωμάτων

Η πρωτεΐνη Pil1 (μαζί με την πρωτεΐνη Nce102) φαίνεται να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για το σχηματισμό των εισοσωμάτων. Μεταλλαγές των βασικών αμινοξικών καταλοίπων που αλληλεπιδρούν με τα όξινα PI(4,5)P2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) στη πλασματική μεμβράνη μειώνει την ικανότητα της Pil1 να δεσμεύει μεμβράνες και ελαττώνεται ο αριθμός των εισοσωμάτων που σχηματίζεται (Olivera-Couto et al., 2011). Η αλληλεπίδραση της Pil1 με την πλασματική μεμβράνη αλλά και ο σχηματισμός αυλακώσεων στην

πλασματική μεμβράνη διευκολύνεται από την πρωτεΐνη Seg1 (Moreira et al., 2012). Η πρωτεΐνη Seg1 προηγείται της Pil1 κατά τη διάρκεια σχηματισμού του εισοσώματος και φαίνεται να συμμετέχει στη δημιουργία μιας πλατφόρμας για τη συναρμολόγηση των άλλων εισοσωμικών συστατικών. Αυτή η πλατφόρμα σταθεροποιείται περαιτέρω με την άφιξη των Pil1 και LSP1. Επιπλέον, η ποσότητα της Seg1 καθορίζει το σχήμα του εισοσώματος, αφού υπερέκφραση της οδηγεί στο σχηματισμό μακρύτερων εισοσωμάτων, ενώ η απαλοιφή του γονιδίου *seg1* οδηγεί στο σχηματισμό λιγότερων και μικρότερων εισοσωμάτων (Moreira et al., 2012).

Οι εισοσωμικός πρωτεΐνες Pil1 και LSP1 ρυθμίζονται από φωσφορυλίωση (Murphy and Kim, 2012). Ωστόσο, είναι αμφιλεγόμενη εάν αυτή προωθεί τη συναρμολόγηση ή την αποσυναρμολόγηση του εισοσώματος (Deng et al., 2009; Walther et al., 2007). Υπάρχει συμφωνία ότι Pil1 και LSP1 φωσφορυλιώνονται από τις πρωτεΐνες Pkh1 και Pkh2 (Zhang, 2004), ένα ζευγάρι κινασών σερίνης-θρεονίνης, το οποίο εντοπίζεται στα εισοσώματα (Frohlich et al., 2009; Luo et al., 2008). Ωστόσο, η διαμάχη έγκειται στον ακριβή ρόλο που έχει η Pkh1/2 εξαρτωμένη φωσφορυλίωση της Pil1 στη συναρμολόγηση του εισοσώματος. Ο Walther και οι συνεργάτες του αρχικά έδειξαν ότι η υπερφωσφορυλίωση της Pil1 από αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών Pkh1/2 οδηγούσε σε αποσυναρμολόγηση του εισοσώματος (Walther et al., 2007). Ταυτόχρονα οι ερευνητές παρατήρησαν ότι φαρμακολογική ή γενετική αναστολή της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων (συνθήκη στην οποία αυξάνεται η ενεργότητα των κινασών Pkh1/2), προκαλεί επίσης την αποσυναρμολόγηση του εισοσώματος (Walther et al., 2007). Σε υποστήριξη αυτού του μοντέλου, παρατηρήθηκε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *pil1 (4D)* στα οποία οι σερίνες 45, 59 και 230, και η θρεονίνη 233 είχαν αντικατασταθεί από ασπαρτικό οξύ (D) (μιμούμενη υπερφωσφορυλίωση), η Pil1 εντοπιζόταν διάχυτη στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα η μείωση των επιπέδων των κινασών Pkh1/2, η προσθήκη LCBs στο θρεπτικό μέσο και η αντικατάσταση των αμινοξικών καταλοίπων (σερίνες 45, 59 και 230, και η θρεονίνη 233) σε αλανίνες (μιμούμενη υποφωσφορυλίωση) οδηγούσε στην συναρμολόγηση και το σχηματισμό των εισοσωμάτων. Συμπεραίνοντας, ότι η Pil1 αποφωσφορυλιώνεται για να συγκροτηθεί το εισόσωμα και απελευθερώνεται κατά τη φωσφορυλίωση της στο κυτόπλασμα (**Εικόνα 1-33**). Σε συμφωνία, ο Deng και οι συνεργάτες του, ανέφεραν ότι μειωμένα επίπεδα κυτταροπλασματικού Pil1-GFP φθορισμού συσχετίζονται με την αποφωσφορυλίωση της Pil1, κυρίως στις θέσεις της σερίνης 230 και της θρεονίνης 233 (Deng et al., 2009). Ωστόσο, δύο σειρές ενδείξεων

υποστηρίζουν ότι η αποφωσφορυλίωση της Pil1 οδηγεί στη συναρμολόγηση του εισοσώματος. Αρχικά ο Luo και οι συνεργάτες του, έδειξαν ότι το αλλήλιο της Pil1, στο οποίο πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης (έως έξι) είχαν αντικατασταθεί από αλανίνες, εντοπιζόταν στο κυτταρόπλασμα υποδεικνύοντας ότι ο σχηματισμός του εισοσώματος απαιτεί τη φωσφορυλίωση της Pil1 (**Εικόνα 1-33**) (Luo et al., 2008). Συνεπώς με αυτή τη παρατήρηση, προσθήκη της ουσίας KP-372-1, η οποία αναστέλλει τις κινάσες Pkh1/2, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αποφωσφορυλιωμένου Pil1 πληθυσμού ο οποίος εντοπιζόταν στο κυτταρόπλασμα υποστηρίζοντας την άποψη ότι η φωσφορυλίωση της Pil1 απαιτείται για το σχηματισμό του εισοσώματος. Δεν είναι σαφές πώς διαφορετικές ομάδες ερευνητών καταλήγουν σε αντίθετα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας παρόμοιες μεταλλάξεις.



Εικόνα 1-33 Η διαμάχη του ρόλου της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Pil1 στην οργάνωση του εισοσώματος. (A) Το μοντέλο προτείνει ότι η αποφωσφορυλίωση της Pil1 προωθεί την ενσωμάτωση της στο εισόσωμα. (B) Το άλλο μοντέλο προτείνει ότι η αποφωσφορυλίωση της Pil1 είναι απαραίτητη για την αποσυναρμολόγηση του εισοσώματος. Προσαρμογή από Murphy and Kim, 2012.

Η χωρική οργάνωση του εισοσώματος διατηρείται σε βάθος χρόνου και δεν διαχέεται στη πλασματική μεμβράνη του *S. cerevisiae*. Αυτή η σταθερότητα δεν φαίνεται να οφείλεται σε μια άμεση αλληλεπίδραση με το κυτταρικό τοίχωμα, τα νημάτια ακτίνης, ή τους μικροσωληνίσκους (Malinska, 2004). Ίσως η ακινησία του εισοσώματος οφείλεται στο σχηματισμό αυλακώσεων σε αυτές τις περιοχές σε συνδυασμό με τη σύνδεση με την πλασματική μεμβράνη σταθερών νημάτων αποτελούμενα από χιλιάδες μόρια Pil1 και LSP1. Οι BAR πρωτεΐνες πρόσφατα βρέθηκε ότι προάγουν το σχηματισμό σταθερών λιπιδικών περιοχών (Zhao et al., 2013). Άλλες πρωτεΐνες του εισοσώματος δεν παρουσιάζουν τέτοια υψηλή

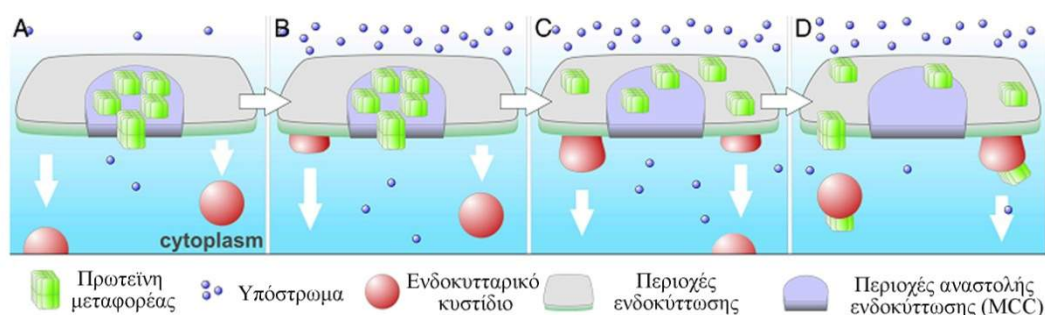
σταθερότητα, η πρωτεΐνη Nce102 και οι πρωτεΐνες Slm1/2 που κινούνται μεταξύ των περιοχών του εισοσώματος και άλλων μεμβρανικών περιοχών της πλασματικής μεμβράνης του *S. cerevisiae* ως απόκριση στα διαφορετικά επίπεδα σφιγγολιπιδίων (Frohlich et al., 2009). Ο μεταφορέας Can1 αλλά και άλλοι μεταφορείς θρεπτικών συστατικών δεν είναι επίσης τόσο σταθεροί στο χρόνο, δεδομένου ότι εντοπισμός τους σε αυτές τις περιοχές μπορεί να διαταραχτεί ευκολότερα από μεταλλαγές ή απώλεια του δυναμικού της μεμβράνης (Brach et al., 2011; Frohlich et al., 2009; Grossmann et al., 2006a).

1.6.4 Ο βιολογικός ρόλος των εισοσωμάτων στο *S. cerevisiae*

Η αρχική περιγραφή των εισοσωμάτων από τους Walther και συνεργάτες, πρότεινε πώς τα εισοσώματα λειτουργούν ως πύλες ενδοκύττωσης στο κύτταρο βασιζόμενοι σε πειράματα μικροσκοπικής παρατήρησης με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής λιπιδίων, FM4-64. Σε αυτά τα πειράματα παρατηρήθηκε πώς υπήρχε συσσώρευση του δείκτη ενδοκύττωσης, FM4-64, σε διακριτές περιοχές, 20 δευτερόλεπτα μετά την επώαση, οι οποίες και συνεντοπίζονταν με τα εισοσώματα (Walther et al., 2006). Άλλες μελέτες απέτυχαν να βρουν κάποια συσχέτιση των εισοσωμάτων με τις περιοχές ενδοκύττωσης-εξαρτώμενης από την ακτίνη (Kabeche et al., 2011; Reijntj et al., 2011; Seger et al., 2011; Vangelatos et al., 2010). Πρόσφατα προτάθηκε ότι η Pil1 παίζει έμμεσο ρόλο στην ενδοκύττωση, επειδή χρειάζεται για τη στρατολόγηση συστατικών του μηχανισμού ενδοκύττωσης (Murphy et al., 2011). Παρόλα αυτά, είναι ενδιαφέρον ότι οι κινάσες Pkh1/2 είναι επίσης απαραίτητες για την ενδοκύττωση (deHart, 2002; Luo et al., 2008; Walther et al., 2006).

Με βάση την υψηλή σταθερότητα τους προτάθηκε ότι τα εισοσώματα αποτελούν περιοχές της πλασματικής μεμβράνης που προστατεύουν διάφορες πρωτεΐνες από την ενδοκύττωση (Grossmann et al., 2008). Πρωταρχικές μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Can1 είναι περισσότερο σταθερή στις περιοχές MCC/εισοσώμα από άλλες περιοχές της μεμβράνης που εντοπίζονταν μετά την προσθήκη του υποστρώματος της, αργινίνης. Μεταγενέστερες μελέτες, αντίθετα,

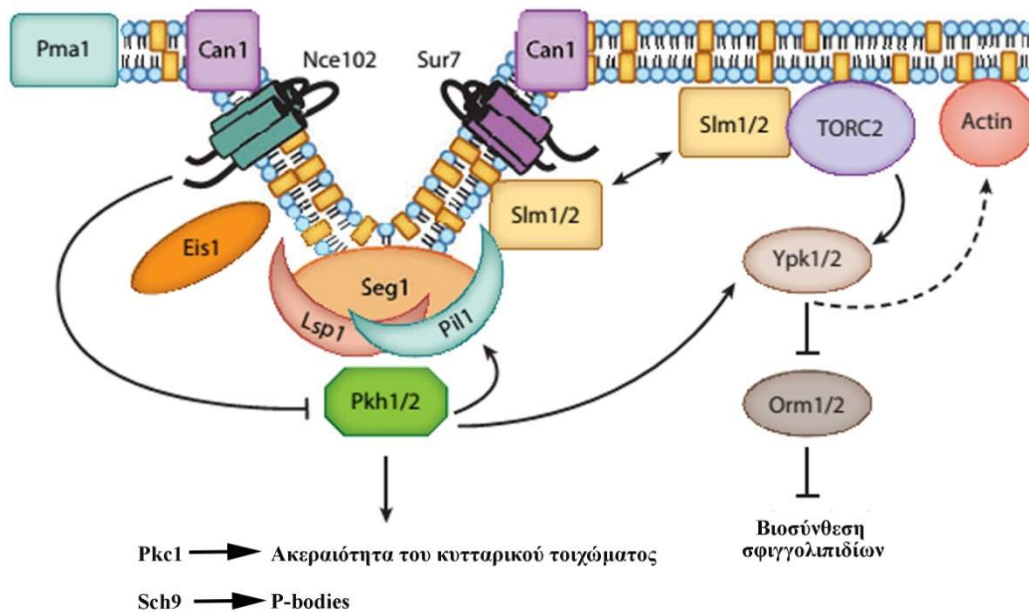
έδειξαν ότι η Can1 κινείται ταχύτατα μεταξύ των περιοχών MCC και MCP, έτσι ώστε να μην επηρεάζεται το συνολικό ποσοστό της Can1 που ενδοκυττώνεται (Εικόνας 1-34) (Brach et al., 2011). Ωστόσο, είναι περισσότερο πιθανό οι πρωτεΐνες που συνδέονται σταθερά με τις περιοχές MCC/εισόσωμα να προστατεύονται από ενδοκύττωση.



Εικόνα 1-34 Προτεινόμενο μοντέλο για την προστασία από ενδοκύττωση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στις περιοχές MCC/εισόσωμα. (A) Παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων υποστρώματος, οι μεταφορείς εντοπίζονται στις περιοχές MCC και προστατεύονται από την ενδοκύττωση. (B) Αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος (C) οδηγεί στην απελευθέρωση των μεταφορέων από τις περιοχές MCC/εισόσωμα στην περιβάλλουσα μεμβράνη (D) και σε ενδοκύττωση τους. Προσαρμογή από (Grossmann et al., 2008).

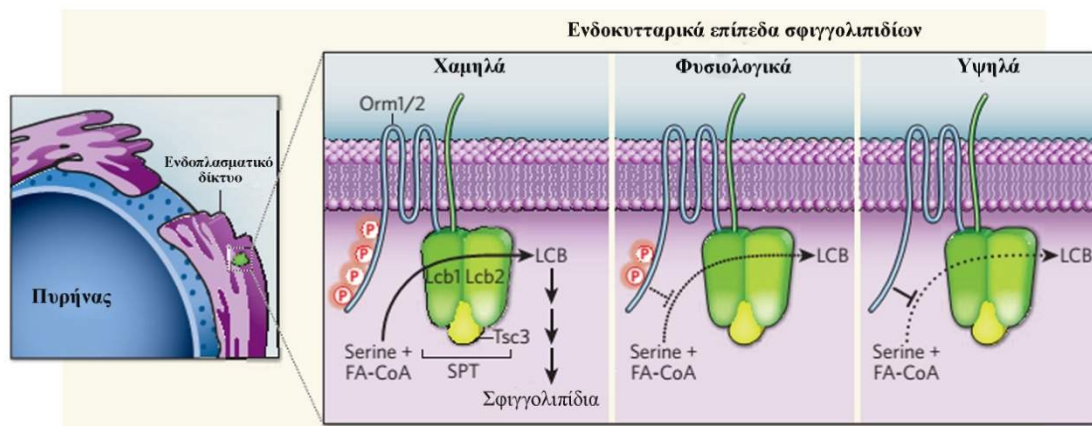
Βασιζόμενοι κυρίως σε βιοχημικά πειράματα και μελέτες μικροσκοπίας ο Fröhlich και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η πρωτεΐνη Nce102 λειτουργεί ως τμήμα ενός αισθητήρα, ο οποίος ελέγχει τα επίπεδα των σφιγγολιπιδίων (Frohlich et al., 2009). Σε αυτό το μοντέλο, όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη Nce102 συνεντοπίζεται με τα εισοσώματα και δρα ως αρνητικός ρυθμιστής των κινάσων Pkh1 και Pkh2. Οι κινάσες Pkh1 και Pkh2 έχουν ως υποστρώματα μία πληθώρα πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων τις Slm 1 και Slm 2, τις κινάσες της οικογένειας AGC, τις κινάσες Yrk 1 και Yrk 2 καθώς και την εισοσωμική πρωτεΐνη Pil1. Όταν τα ενδοκυττάρια επίπεδα των σφιγγολιπιδίων μειώνονται, η Nce102 απομακρύνεται από τις μεμβρανικές περιοχές MCC. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποαναστολή των κινάσων Pkh1/2 και την επακόλουθη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων τους. Τα εισοσώματα αποδιοργανώνονται, λόγω της φωσφορυλιωμένης Pil1, και κατ' επέκταση οι πρωτεΐνες Slm1/2 μετακινούνται

από τα αποδιοργανωμένα εισοσώματα στο TORC2 (Εικόνα 1-35) (Douglas and Konopka, 2014).



Εικόνα 1-35 Μοντέλο για το βιολογικό ρόλο των εισοσωμάτων στο *S. cerevisiae*. Η Nce102 δρα ως αναστολέας των κινασών Pkh1/2, η Slm1 στρατολογεί την Ypk1 στο TORC2, ο καταρράκτης φωσφορυλιώσεων έχει ως αποτέλεσμα την αποαναστολή του μονοπατιού βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων. Προσαρμογή από Douglas and Konopka, 2014.

Εκεί (TORC2) στρατολογούν την κινάση Ypk1 στη πλασματική μεμβράνη, η οποία έχει ήδη μερικώς φωσφορυλιωθεί από τις Pkh1/2. Η κινάση Ypk1 φωσφορυλιώνεται περαιτέρω στο TORC2 και καθίσταται πλήρως λειτουργική. Υποστρώματα της Ypk1 είναι και οι πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου Orm1/2, οι οποίες όταν είναι ενεργές, μη φωσφορυλιωμένες, δημιουργούν σύμπλοκο με το πρώτο και καθοριστικό ενζυμο στη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων, την παλμιτοϋλτρανσφεράση της σερίνης, αναστέλλοντας τη δράση της (Εικόνα 1-35 και Εικόνα 1-36). Φωσφορυλίωση και επομένως ανενεργοποίηση των Orm1/2 από την Ypk1 έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της παλμιτοϋλτρανσφεράση της σερίνης από το σύμπλοκο, η οποία οδηγεί σε αποαναστολή του μονοπατιού και βιοσύνθεση καινούργιων σφιγγολιπιδίων (Tafesse and Holthuis, 2010).



Εικόνα 1-36 Η βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων αρχίζει με τον σχηματισμό βάσεων μακράς αλυσίδας (LCBs), από τη σερίνη και ακυλο-CoA, σε μία αντίδραση που καταλύεται από την παλμιτοϋλτρανσφεράση της σερίνης (SPT) στην κυτταροπλασματική πλευρά του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι υπομονάδες της SPT, Lcb1, Lcb2 και Tsc3 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες Orm1 και Orm2. Όταν τα κυτταρικά επίπεδα των σφιγγολιπιδίων είναι άφθονα, οι πρωτεΐνες Orm δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της σύνθεσης LCB. Ωστόσο όταν τα κυτταρικά επίπεδα των σφιγγολιπιδίων είναι χαμηλά, η φωσφορυλίωση των Orm πρωτεϊνών από την κινάση Yrk1 σταδιακά ανακουφίζει από την ανασταλτική δράση των Orm πρωτεϊνών, αποκαθιστώντας έτσι τα επίπεδα σφιγγολιπιδίων. Προσαρμογή από Tafesse and Holthuis, 2010.

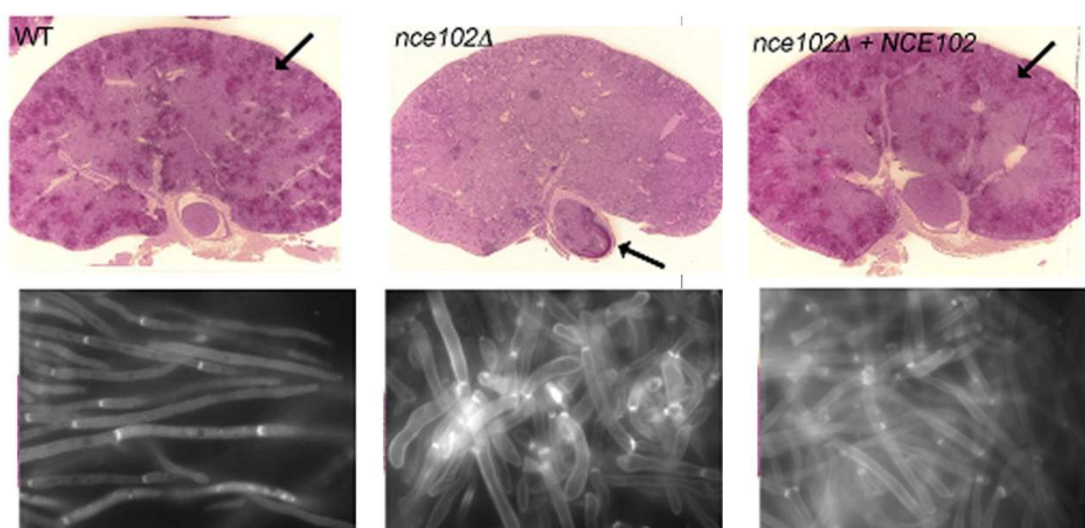
Οι περιοχές MCC/εισόσωμα περιέχουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση και την απόκριση στο στρες, υποδηλώνοντας ότι λειτουργούν ως κριώματα για την οργάνωση πολλών μονοπατιών σηματοδότησης. Για παράδειγμα, οι Pkh1 /2 κινάσες ρυθμίζουν τις σημαντικές Pkc1 και Sch9 πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες επηρεάζουν την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος, τον εντοπισμό της ακτίνης, την απόκριση στο θερμικό σοκ και τη συναρμολόγηση των κυτταροπλασματικών συμπλόκων P-body που ρυθμίζουν τη σταθερότητα των mRNAs (Dickson et al., 2006; Luo et al., 2011, 2008; Walther et al., 2007). Ωστόσο, η λειτουργία ως κριώμα του εισοσώματος δεν είναι πλήρως κατανοητή, εν μέρει επειδή ο εντοπισμός των Pkh1 / 2 στο εισόσωμα δεν είναι απαραίτητος για τη λειτουργία των Pkh1 / 2 κινασών. Παρόλα αυτά, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι μεταλλάξεις γονιδίων άλλων συστατικών του εισοσώματος επηρεάζουν την απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες. Για παράδειγμα η απαλοιφή του γονιδίου *sur7* έχει ως αποτέλεσμα την προβληματική σπορίωση και την ελαττωματική βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων (Yoshikawa et al., 2009; Young et al., 2002). Επιπλέον, οι απαλοιφές των παραλόγων της Sur7 (FMP45, PUN1, και

YNL194C) επηρεάζουν την απόκριση στο στρες, την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος, και την επιβίωση των κυττάρων (Hosiner et al., 2011; Martinez et al., 2004; Xu et al., 2010).

1.6.5 Τα εισοσώματα στο μύκητα *Candida albicans*

Ο μύκητας *C. albicans* αναπτύσσεται ως αβλαβής συμβιωτικός οργανισμός στο δέρμα και στο βλεννογόνο της γαστρεντερικής οδού του ανθρώπου (Brandt, 2002). Ωστόσο, ο μύκητας μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρες μολύνσεις όταν εισέρθει στην κυκλοφορία του αίματος, συνήθως μέσω χειρουργικών επεμβάσεων ή καθετήρων, όπως αποδεικνύεται από τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Μέχρι στιγμής, οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ένα υψηλό βαθμό ομοιότητας των εισοσωμάτων στους μύκητες *S. cerevisiae* και *C. albicans*. Οι εισοσωμικές πρωτεΐνες (Sur7, Fmp45, LSP1, Pil1, Slm1, και Seg1) εντοπίζονται ως στατικά κοκκία στη πλασματική μεμβράνη του *C. albicans* (Alvarez et al., 2008; Reijnst et al., 2011; Wang et al., 2011). Ωστόσο, υπάρχουν ενδιαφέρουσες διαφορές στους δύο μύκητες. Για παράδειγμα, η Sur7 είναι περισσότερο σημαντική στο *C. albicans* από ότι στο *S. cerevisiae*, καθώς απαλοιφή του γονιδίου *sur7* οδηγεί σε έντονα προβλήματα μορφογένεσης, στη δημιουργία ακανόνιστου σχήματος εκβλαστημάτων, σε ελαττωματική διαφραγματοποίηση και στη δημιουργία ασθενέστερων κυτταρικών τοιχωμάτων (Wang et al., 2011). Χημική ανάλυση της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος έδειξε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *sur7Δ*, παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα β-γλυκάνης, που αποτελεί το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος. Σε συνέπεια με αυτό, τα *sur7Δ* στελέχη που αναπτύσσονται υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση μιας ποικιλίας γονιδίων που σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα, παρόμοια με εκείνη των κυττάρων φυσικού τύπου στα οποία έχει χορηγηθεί κασποφουνγκίνη (caspofungin), αντιμυκητιασικό φάρμακο που αναστέλλει το σχηματισμό της β-1,3-γλυκάνης (Alvarez et al., 2008). Παρά τα σημαντικά προβλήματα των στελεχών *sur7Δ*, η πρωτεΐνη LSP1 εντοπίζεται σε στικτή κατανομή, υποδεικνύοντας ότι τα εισοσώματα σε αυτά τα στελέχη μπορούν να σχηματιστούν κανονικά. Ωστόσο, η τοπολογία σημαντικών πρωτεϊνών, οι όποιες δεν εντοπίζονται στις περιοχές των εισοσωμάτων φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά. Για παράδειγμα οι σεπτίνες στα *sur7Δ* στελέχη δεν εντοπίζεται στο λαιμό των

εκβλαστημάτων αλλά σε έκτοπες θέσεις (Oh and Bi, 2011). Το ασύνηθες δαχτυλίδι σεπτινών θα μπορούσε να συμβάλει στον εσφαλμένο εντοπισμό της ακτίνης στα *sur7Δ* στελέχη, αφού κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οι σεπτίνες σχηματίζουν ένα δαχτυλίδι στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης στο λαιμό των εκβλαστημάτων που δρα ως φράγμα, το οποίο περιορίζει τα κοκκία ακτίνης στα εκβλαστήματα. Επιπλέον τα *sur7Δ* παρουσίασαν μειωμένη μολυσματικότητα σε ποντίκια (Douglas et al., 2012). Ένας βασικός λόγος είναι ότι τα *sur7Δ* στελέχη έχουν έντονο πρόβλημα στο να σχηματίζουν νημάτια υφών, απαραίτητα για την μόλυνση των ιστών. Τα *sur7Δ* στελέχη είναι επίσης πιο ευαίσθητα σε μία ποικιλία στρεσογόνων συνθηκών, όπως η υψηλή θερμοκρασία και η έκθεση αυτών των κυττάρων σε χαλκό.



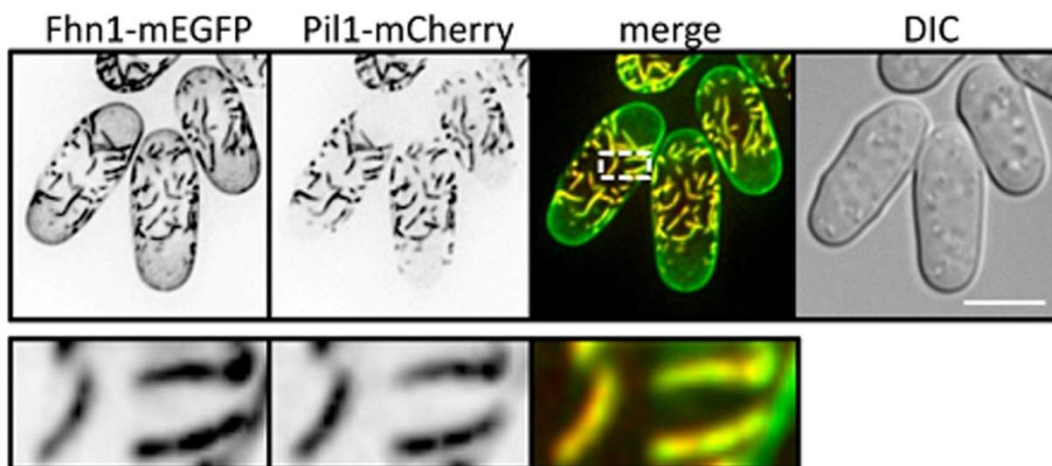
Εικόνα 1-37 Μειωμένη μολυσματικότητα των στελεχών *nce102Δ*. Νεφροί αποκόπηκαν από ποντικούς που είχαν μολυνθεί με φυσικού τύπου στελέχη *C. albicans* και στελέχη *nce102Δ* για 2 ημέρες. Τομές νεφρών χρωματίστηκαν με την χρώση PAS (periodic acid-Schiff staining) στην οποία τα στελέχη *C. albicans* αποκτούν ένα σκούρο πορφυρό χρώμα (μαύρα βέλη). Προσαρμογή από Douglas et al., 2013.

Σε αντίθεση με το *S. cerevisiae*, η Nce102 πρωτεΐνη στο *C. albicans* εντοπίζεται στα εισοσώματα όταν τα κύτταρο βρίσκονται σε στατική φάση ανάπτυξης (Douglas et al., 2013). Απαλοιφή του γονιδίου *nce102* οδηγεί σε μικρή μείωση του αριθμού των εισοσωμάτων. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν έντονο πρόβλημα ανάπτυξης σε χαμηλές συγκεντρώσεις άγαρος. Το πρόβλημα αυτό,

φαίνεται να οφείλεται σε ελαττωματική οργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης, με αποτέλεσμα τα *nce102Δ* στελέχη να είναι λιγότερο λοιμογόνα σε ποντίκια (Εικόνα 1-37). (Douglas et al., 2013).

1.6.6 Τα εισοσώματα στο μύκητα *Schizosaccharomyces pombe*

Τα εισοσώματα στο *S. pombe* παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με αυτά του *S. cerevisiae* (Kabeche et al., 2014). Ωστόσο, έχουν δύο μοναδικές ιδιαιτερότητες: είναι πέντε φορές περισσότερα και η πρωτεΐνη Pil1 εντοπίζεται σε σχήμα ράβδου, με μήκος 1 μm (Kabeche et al., 2011). Το μήκος των εισοσωμάτων φαίνεται να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην ρυθμιστική πρωτεΐνη Seg1, και δεν αποτελεί εγγενής ιδιότητα της Pil1 του *S. pombe*. Ετερόλογη έκφραση της Pil1 του *S. cerevisiae* στον *S. pombe* έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό «μεγάλων» εισοσωμάτων, ενώ η ετερόλογη έκφραση της Pil1 του *S. pombe* στο *S. cerevisiae* προωθεί τον σχηματισμό τυπικών εισοσωμάτων, με μέγεθος 200-300 nm (Kabeche et al., 2011). Η δεύτερη χαρακτηριστική ιδιότητα έγκειται στο γεγονός ότι τα εισοσώματα στο *S. pombe* απομακρύνονται από τις μελλοντικές περιοχές κυτταρικής διαίρεσης και εντοπίζονται στο μέσο του κυττάρου. Κατά την έναρξη του κυτταρικού κύκλου, τα εισοσώματα ανιχνεύονται στη μεσαία περιοχή του κυττάρου, και όχι στις αυξανόμενες άκρες. Στη συνέχεια, τα εισοσώματα εξαφανίζονται από τη μεσαία περιοχή, καθώς τα κύτταρα προετοιμάζουν τις θέσεις της μελλοντικής κυτταροκίνησης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι, είτε υπάρχουν ειδικοί μηχανισμοί στο *S. pombe* που προωθούν την κίνηση των εισοσωμάτων, είτε ότι είναι λιγότερο αποδοτικοί οι μηχανισμοί που εμποδίζουν τη μετακίνησή τους κατά τη διάρκεια της κυτταροκίνησης.



Εικόνα 1-38 Συνεντοπισμός των πρωτεϊνών Pil1 και Fhn1 του *S. pombe*. Προσαρμογή από Kabeche et al., 2011

Παραδόξως, όλα τα ορθόλογα των εισοσωμικών πρωτεϊνών στο *S. pombe* δεν συνεντοπίζονται με την Pil1. Η μοναδική ορθόλογη της Nce102 πρωτεΐνης, η Fhn1 συνεντοπίζεται με την Pil1 και είναι σημαντική για την οργάνωση του εισοσώματος στο μύκητα (**Εικόνα 1-38**). Σε αντίθεση, η Sur7 και η Slm1 εντοπίζονται σε περιοχές ενεργούς αύξησης του κυττάρου και όχι στην κεντρική περιοχή του κυττάρου με τη Pil1 (Kabeche et al., 2011). Μερικές πρωτεΐνες του εισοσώματος φαίνεται να έχουν αποκτήσει νέες λειτουργίες στον *S. pombe*. Το γονιδίωμα του *S. pombe* κωδικοποιεί δύο ακόμα πρωτεΐνες που σχετίζονται με την Pil1, μια που ονομάζεται Pil2 και μια με χαμηλότερη αμινοξική ταυτότητα (με την Pil1), η οποία ονομάζεται Meu14. Παρά το γεγονός ότι Pil1 και Pil2 είναι 46% ταυτόσημες, εμφανίζουν διακριτά πρότυπα έκφρασης και υποκυτταρικής τοπολογίας. Απαλοιφή του γονιδίου *pil1* δεν οδηγεί σε κάποιο προφανή μορφολογικό φαινότυπο, ωστόσο η υπερέκφραση της, προκαλεί στα κύτταρα σημαντικά προβλήματα όσο αφορά τη μορφογένεση και κυτοκίνηση. Σε αντίθεση η Pil2 ανιχνεύεται μόνο στην πλασματική μεμβράνη μειωτικών σπόριων. Η τρίτη πρωτεΐνη, η οποία σχετίζεται με την Pil1, η Meu14, εκφράζεται κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαδικασίας σε δομές δακτυλίου στη μεμβράνη των σποριών και δεν συνεντοπίζεται με τα εισοσώματα. Τα στελέχη *meu14Δ* παρουσιάζουν έντονα προβλήματα στο σχηματισμό της ατράκτου και την επιμήκυνση των μικροσωληνίσκων κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαδικασίας. Κατά συνέπεια, τα

meu14Δ στελέχη παράγουν τετραπύρρηνα κύτταρα, τα οποία αποτυγχάνουν να σχηματίσουν ασκούς (Okuzaki, 2003).

1.6.7 Τα εισοσώματα στο μύκητα *Ashbya gossypii*

Ο μύκητας *A. gossypii* αναπτύσσεται ως νηματοειδής μύκητας, ωστόσο φυλογενετικά βρίσκεται πιο κοντά με τον *S. cerevisiae* παρά με τους άλλους νηματοειδείς μύκητες. Όπως είναι αναμενόμενο, ορθόλογα των Pil1 και LSP1 υπάρχουν και σε αυτό το μύκητα (Seger et al., 2011). Τα εισοσώματα εντοπίζονται στην υποκορυφαία περιοχή των υφών και δεν συνεντοπίζονται με περιοχές ενεργούς ενδοκύττωσης. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι η απαλοιφή του γονιδίου *pil1* του *A. gossypii* προκαλεί έντονο πρόβλημα στην πολική αύξηση των υφών. Παραδόξως, η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την Nce102 πρωτεΐνη δεν επηρεάζει το σχηματισμό του εισοσώματος. Η σταθερότητα του εισοσώματος μειώνεται με την απαλοιφή του γονιδίου *seg1* και σε αντίθεση με το *S. pombe* και το *S. cerevisiae*, η Seg1 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα και όχι στο σχηματισμό του εισοσώματος (Seger et al., 2011).

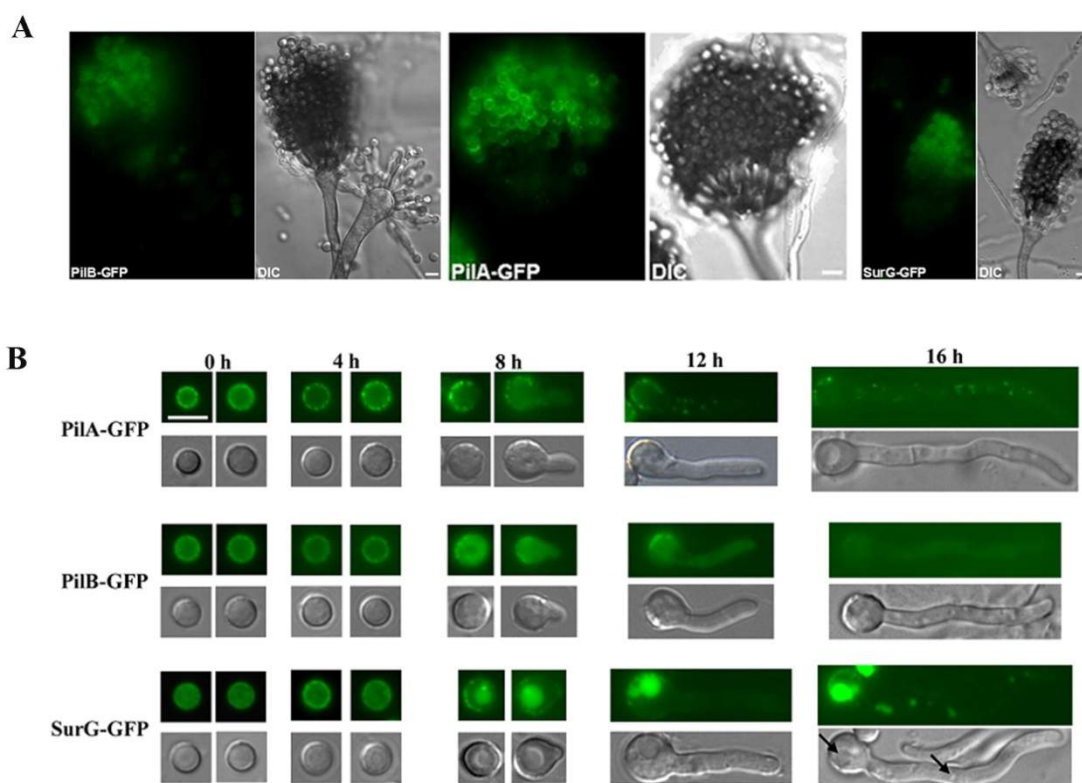
1.6.8 Τα εισοσώματα στο μύκητα *Aspergillus fumigatus*

Η μοναδική εισοσωμική πρωτεΐνη που έχει μελετηθεί στον παθογόνο υφομύκητα *A. fumigatus* είναι η ομόλογη της Nce102 (Khalaj et al., 2012), η οποία εκφράζεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μύκητα. Μικροσκοπική εξέταση της AfuNce102-GFP, έδειξε ότι εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ απαλοιφή του γονιδίου της είχε ως αποτέλεσμα καθυστέρηση στο σχηματισμό κωνidioφορέων στον *A. fumigatus* (Khalaj et al., 2012).

1.6.9 Τα εισοσώματα στο μύκητα *Aspergillus nidulans*

Το γονιδίωμα του *A. nidulans* κωδικοποιεί για 3 ομόλογες εισοσωμικές πρωτεΐνες (Vangelatos et al., 2010), τη διαμεμβρανική SurG και τις κυτταροπλασματικές

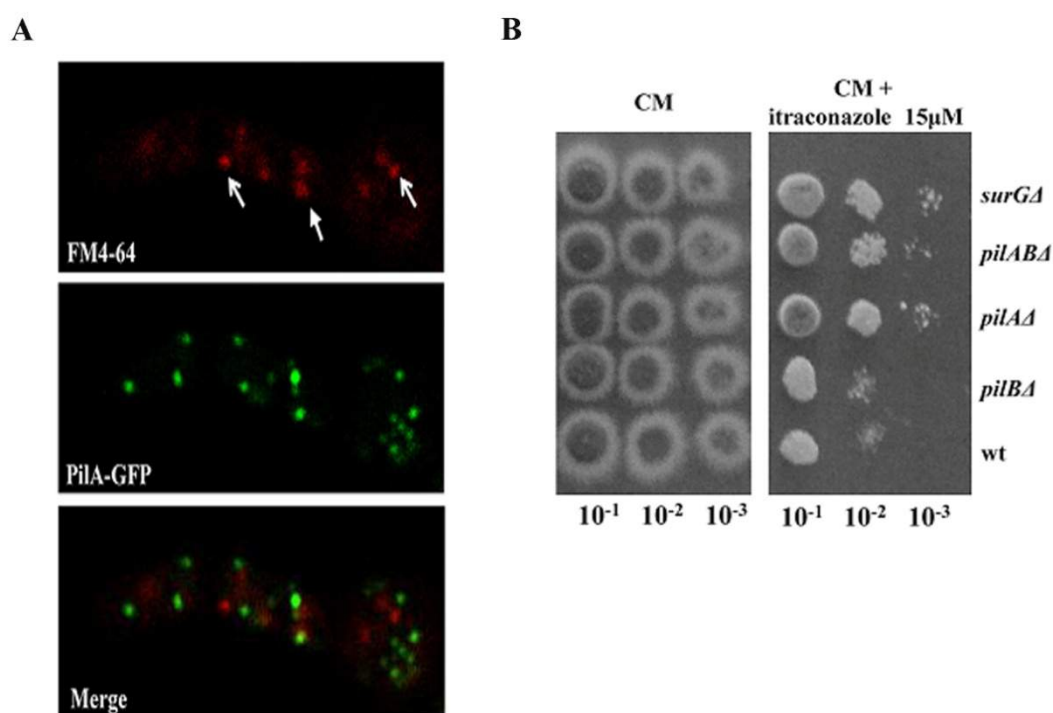
πρωτεΐνες PilA/PilB. Και οι 3 πρωτεΐνες φαίνεται να εκφράζονται αργά κατά την κονιδιογένεση, μόνο σε ώριμα κονίδια (**Εικόνα 1-39**). Η PilA σχηματίζει στικτές δομές στην πλασματική μεμβράνη των κονιδιοσπορίων. Παρόμοια, η PilB εντοπίζεται στην περιφέρεια των κονιδιοσπορίων και η SurG εντοπίζεται τόσο στη μεμβράνη των κονιδιοσπορίων όσο και περιτυρηγικά. Σε νεαρές υφές η PilA είναι η μόνη που διατηρεί στικτό πρότυπο κατανομής κατά μήκος των υφών, αντίθετα με την PilB που εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και τη SurG που εντοπίζεται τόσο στην κεφαλή εκβλαστημένων κονιδιοσπορίων όσο στα κενοτόπια και τα ενδοσώματα (**Εικόνα 1-39**) (Vangelatos et al., 2010).



Εικόνα 1-39 (A) Οι 3 εισσωμικές πρωτεΐνες του *A. nidulans*, PilA, PilB και SurG φαίνεται να εκφράζονται αργά κατά την κονιδιογένεση, μόνο σε ώριμα κονίδια. (B) Υποκυτταρικός εντοπισμός των 3 εισσωμικών πρωτεϊνών σε αδρανή κονιδιοσπόρια (0 ωρών), σε κονιδιοσπόρια που βρίσκονται στην ιστροπική φάση ανάπτυξης (4 ωρών, 8 ωρών) και σε νεαρές υφές (12 ωρών). Προσαρμογή από Vangelatos et al., 2010.

Επιπρόσθετα έχει δειχθεί ότι οι στικτοί σχηματισμοί της PilA στις υφές των εκβλαστημένων κονιδιοσπορίων δεν συνεντοπίζονται με την ουσία FM4-64, ένα

τεχνητό μαρτύρα ενδοκύττωσης λιπιδίων (Vangelatos et al., 2010). Ταυτόχρονα μελετήθηκε η κατανομή και ο ρυθμός ενδοκύττωσης, παρουσία ιόντων αμμωνίου, του μεταφορέα δικαρβοξυλικών αμινοξέων AgtA (Apostolaki et al., 2009) του *A. nidulans*, σε στελέχη με απαλοιφή του γονιδίου *pilA*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει κάποια σημαντική μεταβολή στην κατανομή ή την ενδοκύττωση του μεταφορέα AgtA, υποδεικνύοντας ότι η PilA δεν εμπλέκεται με τις διαδικασίες ενδοκύττωσης πρωτεϊνών στον *A. nidulans* (**Εικόνα 1-40**). Η απαλοιφή καθενός ξεχωριστά ή σε συνδυασμό των γονιδίων των εισοσωμικών πρωτεϊνών, δεν οδηγεί σε προφανή αναπτυξιακό φαινότυπο, εκτός από μια μέτρια αλλά επαναλαμβανόμενη ανθεκτικότητα των στελεχών *pilAΔ* και *surGΔ* στην ιτρακοναζόλη, ουσία που αναστέλλει τη σύνθεση της εργοστερόλης από τη λανοστερόλη. Η ανθεκτικότητα αυτή, που είναι άγνωστο με ποιό τρόπο επιτυγχάνεται, μπορεί να συνδέεται με τη μη φυσιολογική χρώση της φιλιπίνης (filipin) -χρωστική που εξειδικευμένα προσδένεται στην εργοστερόλη-, στα κονίδια αλλά όχι στα μυκήλια των στελεχών *pilAΔ* και *surGΔ* (Vangelatos et al., 2010).



Εικόνα 1-40 (A) Έλλειψη συνεντοπισμού της PilA και της FM4-64 (τεχνητό μαρτύρα ενδοκύττωσης λιπιδίων). (B) Ανθεκτικότητα των στελεχών που φέρουν απαλοιφές των γονιδίων *pilA* και *surG* στην ιτρακοναζόλη. Προσαρμογή από Vangelatos et al., 2010.

1.7 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ξεκίνησε το 2010 με στόχο τη διερεύνηση του βιολογικού ρόλου των εισοσωμικών πρωτεϊνών στο σύστημα του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*. Όπως προαναφέρθηκε τα εισοσώματα που βρέθηκαν αρχικά στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* (Walther *et al.*, 2006), αποτελούν σταθερά πρωτεϊνικά συμπλέγματα που δημιουργούν στικτούς σχηματισμούς και εντοπίζονται κάτω από την περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης. Ενώ αρχικά τα εισοσώματα του ζυμομύκητα χαρακτηρίστηκαν ως στατικές πύλες ενδοκύττωσης (Walther *et al.*, 2006), απαραίτητες για την ομαλή εσωτερίκευση μεμβρανών και μεμβρανικών πρωτεϊνών, μετέπειτα δημοσιεύσεις σε άλλους μύκητες (τόσο στον *A. nidulans* όσο και στην *C. albicans*) έδειξαν ότι οι εισοσωμικές πρωτεΐνες δε συμμετέχουν τουλάχιστον άμεσα, στη διαδικασία της ενδοκύττωσης (Grossmann *et al.*, 2008; Vangelatos *et al.*, 2010; Reijntjens *et al.*, 2011). Ο μοναδικός βιολογικός ρόλος που έχει διατυπωθεί μέχρι σήμερα για τις εισοσωμικές πρωτεΐνες και συγκεκριμένα για την Pil1 στον *S. cerevisiae*, είναι ότι αποτελεί μαζί με την πρωτεΐνη Nce102 τους κύριους οργανωτές των περιοχών MCC (Grossmann *et al.*, 2008). Η πρωτεΐνη Nce102 είναι διαμεμβρανική και εμπλέκεται σε μη κλασικά μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών. Ενώ αρχικά χαρακτηρίστηκε σαν προστατευτικός παράγοντας έναντι του οξειδωτικού στρες (Desmyter *et al.*, 2007), σήμερα γνωρίζουμε ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την οργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης και των εισοσωμάτων. Μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες Pil1 και Nce102 αλλάζουν τη στικτή κατανομή πολλών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την ομοιογενή κατανομή τους στην κυτταρική μεμβράνη του *S. cerevisiae*. Επιπλέον βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη Meu14 του *Schizosaccharomyces pombe*, η οποία παρουσιάζει 22% ταυτότητα με τις εισοσωμικές πρωτεΐνες Pil1/PilA/Lsp1 (Okuzaki, 2003) είναι απαραίτητη για τη δεύτερη μειωτική διαίρεση και το σχηματισμό της μεμβράνης του σπορίου. Με έναυσμα αυτές τις αρχικές βιβλιογραφικές παρατηρήσεις, οι στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι:

- Η διερεύνηση του ρόλου των εισοσωμικών πρωτεϊνών στη μετάβαση από τον αφυλετικό στο φυλετικό κύκλο ζωής του μύκητα *A. nidulans*

- Η διερεύνηση της υποκυτταρικής κατανομής των πρωτεϊνών PilA, PilB και SurG στα διαφορετικά στάδια του εγγενή κύκλου ζωής του *A. nidulans*
- Η διερεύνηση του ρολού των εισοσωμικών πρωτεϊνών στην ανάπτυξη των μειωτικών απογόνων του *A. nidulans*.
- Η μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής της ομόλογης πρωτεΐνης Nce102 στο μύκητα και ο ρόλος της στην οργάνωση των εισοσωμάτων.
- Η διερεύνηση της σχέσης των εισοσωμικών/Nce102 πρωτεϊνών με τη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων και την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου.

2. Υλικά και Μεθοδολογία

2.1 Στελέχη μυκήτων

Στη παρούσα Διατριβή τα μυκητιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον **πίνακα 2-1**. Η μεταλλαγή *rabaA1* προκαλεί αυξοτροφία για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας της συνθετάσης του παρα-αμινο-βενζοϊκού οξέος. Η μεταλλαγή *argB2* οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου της τρανσκαρβαμοϋλάσης της ορνιθίνης, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της αργινίνης (Urshall et al., 1986). 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 (B. R. 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* οδηγεί σε κίτρινο χρώμα σπορίων του μύκητα και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του ενζύμου λακκάση. Η λακκάση YA (p-διφαινύλο-οξειδοορεδουκτάση) ανήκει στις πολύ-χαλκούχες πολυφαινολικές οξειδάσες και παράγονται κυρίως από βασιδιομύκητες αλλά και από μερικά στελέχη ασκομυκήτων και είναι απαραίτητη για τη μετατροπή της κιτρίνης χρωστικής σε πράσινη (O'Hara and Timberlake, 1989). Η μεταλλαγή *pyrA4* προκαλεί αυξοτροφία για πυριδοξίνη και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του ενζύμου *pyrA*, ενός SNZ ενζύμου που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση πυριδοξίνης (Osmani et al., 1999). Η σημειακή μεταλλαγή *basA1* (TGG→TGC; τρυπτοφάνη W44→C κυστεΐνη), έχει ως αποτέλεσμα την παράγωγη μη λειτουργικής C4-υδροξυλάσης στους 42 °C, η δεν είναι σε θέση να καταλύσει τη μετατροπή της διϋδροσφιγγοσίνης σε φυτοσφιγγοσίνη (Li et al., 2007). Η μεταλλαγή *riboB2* προκαλεί αυξοτροφία για ριβοφλαβίνη και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του ενζύμου GTP κυκλουδρολάση (C. E. Oakley et al., 1987). Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν

στελέχη στα οποία ο υποκινητής του γονιδίου *ypkA* (Colabardini et al., 2013) είχε αντικατασταθεί από το ρυθμιζόμενο υποκινητή *niiA* (nitrate reductase gene). Η έκφραση του γονιδίου *ypkA* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *niiA* (*niiA::ypkA*) ρυθμίζεται από την πηγή αζώτου στο μέσο ανάπτυξης του μύκητα. Αναστολή της έκφρασης του γονιδίου *ypkA* πραγματοποιείται παρουσία 50 mM τρυγικού αμμωνίου, ενώ η υπερέκφραση του γονιδίου *ypkA* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *niiA* εργαστηριακά επιτυγχάνεται με τη χρήση 10 mM νιτρικού νατρίου ως μοναδική πηγή αζώτου (Arst Jr and Cove, 1973). Επιπλέον, σε πολλά πειράματα στη παρούσα μελέτη η έκφραση του γονιδίου *annce102* βρισκόταν υπό τον έλεγχο του ρυθμιζόμενου υποκινητή *alcA*. Η έκφραση του γονιδίου *annce102* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *alcA*, ρυθμίζεται από την πηγή άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης του μύκητα. Αναστολή της έκφρασης πραγματοποιείται παρουσία 4% w/v γλυκόζης ως μοναδικής πηγής άνθρακα, ενώ η επαγωγή της έκφρασης παρουσία 1% v/v αιθανόλη ή 100 mM θρεονίνης ως μοναδικής πηγής άνθρακα (Lockington et al., 1985).

Πίνακας 2-1 Τα μυκητιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Διατριβή.

Όνομασία στελέχους	Γονότυπος
WT	<i>pabaA1</i>
WT	<i>pyroA4</i>
<i>niiA::ypkA</i>	<i>pyroA4; chaA1; argB2; Δnku::argB; niiA::ypkA::pyrG</i>
8-145	<i>PabaA1; biA; basA1</i>
<i>nkuAΔ pyrG89 riboB2</i>	<i>pyrG89; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pabaB22; riboB2</i>
<i>nkuAΔ pyrG89 pyroA4</i>	<i>pyrG89; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
VS79	<i>pyrG89; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pabaB22; pilA::sgfp::AfpyrG⁺; riboB2</i>
VS80	<i>pyrG89; pilB::sgfp::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pabaB22; riboB2</i>
VS81	<i>pyrG89; surG::sgfp::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pabaB22; riboB2</i>
VS83	<i>pyrG89; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; pilA::mrfp::AfpyrG⁺</i>
VS91	<i>pyrG89; argB2; surG::sgfp::AfpyrG⁺; nkuAΔ::argB⁺; pilA::mrfp::AfpyrG⁺; riboB2</i>
VS94	<i>pyrG89; pilB::sgfp::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pilA::mrfp::AfpyrG⁺; riboB2</i>
VS200	<i>pilBΔ::AfpyrG⁺; surGΔ::Afpyro⁺; pyroA4; pilAΔ::Afribo⁺; pantoB100</i>

VS202	<i>pilBΔ::AfpyrG⁺; surGΔ::Afpyro⁺; yA2</i>
AGAV1	<i>annce102::sgfp::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV2	<i>annce102::mrfp::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV3	<i>annce102Δ::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV4	<i>annce102Δ::Afribo⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; riboB2</i>
AGAV5	<i>AN8278D marv1Δ::Afribo⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; riboB2</i>
AGAV6	<i>AN8422D marv2Δ::Afpyro⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV7	<i>pilAΔ::Afribo⁺; annce102::mrfp::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV8	<i>pilAΔ::Afribo⁺; annce102::gfp::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV9	<i>pilAΔ::Afribo⁺; annce102Δ::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV10	<i>pilAΔ::Afribo⁺; annce102::mrfp::AfpyrG⁺; surG::sgfp::AfpyrG⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV11	<i>alcA::annce102::mrfp::AfpyrG⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV12	<i>alcA::annce102::mrfp::AfpyrG⁺; pilA::sgfp::AfpyrG⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV13	<i>alcA::annce102::mrfp::AfpyrG⁺; surG::sgfp::AfpyrG⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV14	<i>annce102Δ::AfpyrG⁺; surG::sgfp::AfpyrG⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV15	<i>annce102Δ::AfpyrG⁺; pilA::sgfp::AfpyrG⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV16	<i>annce102Δ::AfpyrG⁺; surG::sgfp::AfpyrG⁺; pilA::mrfp::AfpyrG⁺; pyroA4; pyrG89</i>
AGAV17	<i>pilAΔ::Afribo⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV18	<i>annce102Δ::AfpyrG⁺; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV19	<i>annce102Δ::AfpyrG⁺; pilAΔ::Afribo⁺; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV20	<i>niiA::ypkA::pyrG; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV21	<i>niiA::ypkA::pyrG; pilAΔ::Afribo⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV22	<i>niiA::ypkA::pyrG; annce102Δ::AfpyrG⁺; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV23	<i>niiA::ypkA::pyrG; annce102Δ::AfpyrG⁺; pilAΔ::Afribo⁺; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV24	<i>basA1; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV25	<i>basA1; pilAΔ::Afribo⁺; argB2; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV26	<i>basA1; annce102Δ::AfpyrG⁺; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>

AGAV27	<i>basA1; annce102Δ::AfpYrG⁺; pilAΔ::Afribo⁺; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV28	<i>basA1; niiA::ypkA::pyrG; nkuAΔ::argB⁺; pyroA4</i>
AGAV29	<i>basA1; niiA::ypkA::pyrG; nkuAΔ::argB⁺; annce102Δ::AfpYrG⁺; pyroA4</i>
AGAV30	<i>basA1; niiA::ypkA::pyrG; nkuAΔ::argB⁺; pilA::Afribo⁺; pyroA4</i>
AGAV31	<i>basA1; niiA::ypkA::pyrG; nkuAΔ::argB⁺; pilA::Afribo⁺; annce102Δ::AfpYrG⁺; pyroA4</i>

2.2 Θρεπτικά υποστρώματα μυκήτων

Οι καλλιέργειες των μυκήτων έγιναν σε Πλήρη (Complete Medium - CM) και Ελάχιστα Υποστρώματα (Minimal Medium - MM) η σύσταση των οποίων αναγράφεται στους Πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2-2 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 ₂ O 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 συνεπώς επιτρέπει 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. Στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα προστέθηκε επιπλέον μία πηγή άνθρακα, όπως 1% w/v γλυκόζη ή 2% w/v γλυκερόλη. Οι αυξοτροφίες χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεντρώσεις, οι οποίες αναγράφονται στη σύσταση του διαλύματος βιταμινών στον **Πίνακα 2-2**. Μυριοσίνη-myriocin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), αουρεοβασιδίνη A - Aureobasidin A (Clontech), φυτοσφιγγοσίνη-Phytosphingosine (Avanti Polar Lipids, Inc), 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου - Hydrogen Peroxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Paraquat dichloride hydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), μεναδιόνη - menadione sodium bisulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and N-Acetyl-L-cysteine- NAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) προστέθηκαν σε συγκεντρώσεις όπως υποδεικνύεται στο παρακάτω πινάκα (**Πινάκα 2-3**).

Πίνακας 2-3 Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
Μυριοσίνη - Myriocin	20 - 40 µg/ml
Αουρεοβασιδίνη A - Aureobasidin A	0.25 - 1 µg/ml
Φυτοσφιγγοσίνη - Phytosphingosine	2 µg/ml
Υπεροξείδιο του υδρογόνου - Hydrogen Peroxide	0.1 – 0.15 mM
Παράκουατ - Paraquat	15 - 20 µM
Μεναδιόνη - Menadione	150 -250 µM
N-ακετυλο-παράγωγο της κυστεΐνης - N-Acetyl-L-cysteine	20 mM

2.3 Συντήρηση των στελεχών του *A. nidulans*

Τα στελέχη του μύκητα μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον πέντε χρόνια σε γλυκερόλη 50% στους -80 °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, Na₂PO₄ 1,44 g, KH₂PO₄ 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 °C.

2.4 Διασταυρώσεις στελεχών και ανάλυση των απογόνων

Οι διασταυρώσεις στελεχών του *A. nidulans* πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται από τον Pontecorvo (G Pontecorvo et al., 1953). Πιο συγκεκριμένα τα επιθυμητά στελέχη, τα οποία έπρεπε να διαθέτουν τουλάχιστον μια διαφορετική αυξοτροφία έκαστο για τη σταθεροποίηση του ετεροκαρύου, εμβολιάστηκαν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα και απόσταση μισού εκατοστού και κατόπιν επώασθηκαν μέχρι το σχηματισμό μεταξύ τους αναστομώνσεων των υφών. Οι αναστομές 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 επώασθηκαν για 2-3 μέρες στους 37 °C. Ειδικά τα *niiA::ypkA* στελέχη, λόγω του ρυθμιζόμενου υποκινητή *niiA* εμβολιάστηκαν σε στερεό ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη νιτρικών ιόντων σαν μοναδική πηγή αζώτου. Τα *basA1* στελέχη, λόγω της ευαισθησίας τους σε υψηλές θερμοκρασίες, εμβολιάστηκαν σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα και επώασθηκαν για 5 μέρες στους 25 °C. Ακολούθησε αποκλεισμός του αέρα και περαιτέρω καλλιέργεια για 2 τουλάχιστον εβδομάδες στους 37 °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.

2.5 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 and Russell, 2001). Η προσαρμογή του pH έγινε με διαλύματα NaOH (1 N) και HCl (1 N). Σε περιπτώσεις παρασκευής στερεού θρεπτικού υποστρώματος, προστέθηκε επιπλέον 1,5% άγαρ μετά την προσαρμογή του pH. Στις περιπτώσεις στις οποίες χρειάστηκε η προσθήκη αμπικιλίνης ¹⁷, σε υγρό ή στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Τα βακτηριακά στελέχη διατηρήθηκαν στους -80 °C σε 50% γλυκερόλη.

2.6 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 στο Sambrook and Russell, 2001 et al. 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 επώαστηκε για 16 ώρες στους 37 °C με ανάδευση στις 220 rpm. Από την πυκνή καλλιέργεια βακτηρίων

¹⁷ Πλασμίδιο είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA που φέρει γονίδια για ορισμένες εξειδικευμένες λειτουργίες του βακτηρίου. Ένα βακτήριο μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα πλασμίδια, τα οποία αντιγράφονται ανεξάρτητα από το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου. Μεταξύ των γονιδίων που περιέχονται στα πλασμίδια είναι αυτά που προσδίδουν ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και αυτά που σχετίζονται με τη μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο σε ένα άλλο. Τα πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό τόσο μεταξύ τους όσο και με το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου. Τα πλασμίδια αποτελούν πολύτιμο εργαλείο των τεχνικών της Γενετικής Μηχανικής, όπου αποτελούν μέσο που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή ξένων γονιδίων σε ένα κύτταρο. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην κλωνοποίηση γονιδίων για την παραγωγή σημαντικών πρωτεϊνών. Μερικά πλασμίδια έχουν το γονίδιο *ampR*, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Κύτταρα *E. coli* που περιέχουν αυτό το πλασμίδιο, χαρακτηρίζονται ως θετικά "+ *ampR*" κύτταρα και μπορεί να επιβιώσουν σχηματίζοντας αποικίες σε καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό άγαρ LB που έχει συμπληρωθεί με αμπικιλίνη.

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 επώαστηκαν στους 37 °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 °C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 160 ml ψυχρού διαλύματος TFB I (30 mM CH₃COOK, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 5,8 με 1 M CH₃COOH), επώαστηκαν 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 CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 6,5 με 1 M KOH). Το εναιώρημα των κυττάρων επώαστηκε για 15-60 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα διαμοιράστηκαν σε Eppendorf και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, όπου μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον έξι μήνες χωρίς να χάσουν την δεκτικότητά τους (Sambrook and Russell, 2001).

2.7 Μετασηματισμός κυττάρων *E. Coli*

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για το μετασηματισμό 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 επώαστηκε για 20 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε θερμικό σοκ των δεκτικών κυττάρων, με απότομη μεταφορά τους από τον πάγο στους 42 °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 επώαστηκαν για 45-60 λεπτά στους 37 °C σε 1 ml υγρού θρεπτικού LB προκειμένου να επανέλθουν στους φυσιολογικούς ρυθμούς ανάπτυξης και να εκφραστεί το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο εκάστοτε αντιβιοτικό. Ο χρόνος επώασης σε LB δεν πρέπει να ξεπερνάει τη μία ώρα, ώστε τα κύτταρα που θα επιλεγθούν να προέρχονται από μετασηματισμένα κύτταρα και όχι από την διαίρεση αυτών. Τα μετασηματισμένα κύτταρα στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB, που περιείχε το

κατάλληλο αντιβιοτικό (συνήθως αμικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml). Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 16 ώρες (Sambrook and Russell, 2001).

2.8 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 kit 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 στο Sambrook and Russell, 2001. 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 CH₃COONa 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 and Russell, 2001).

2.9 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το μύκητα *A. nidulans*

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 φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρωση όπως προηγουμένως. Μετά τη φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε 50 μl νερού υψηλής καθαρότητας.

Εναλλακτικά για την γρήγορη απομόνωση γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Calcagno-Pizarelli et al., 2007 με σημαντικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 10^5 κονιδιοσπόρια τοποθετήθηκαν σε 0.2 ml διαλύματος 2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8, 150-200mg 0.01mm glass beads, αναδεύτηκαν για 30 δευτερόλεπτα και επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 60 °C (αναδεύονταν τα παρασκευάσματα κάθε 10 λεπτά για 30 δευτερόλεπτα). Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 0.2 ml από phenol-SEVAG (phenol/chloroform/isoamyl alcohol, 25:24:1). Μετά απ μια σύντομη ανάδευση και φυγοκέντρωση (12000 rpm, 5 λεπτά, 4° C), περισυλλέχθηκε η «πάνω» φάση σε νέο Eppendorf. Ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκη είτε ίσου όγκου ισοπροπανόλης είτε 2,5 όγκων 100% αιθανόλης με φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε 50 μl νερού υψηλής καθαρότητας.

2.10 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες – Κλωνοποίηση

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

2.11 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 and Russell, 2001), 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 and Russell, 2001).

2.12 Γενετικός μετασχηματισμός στελεχών του *A. nidulans*

Πίνακας 2-4 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 (Amillis et al., 2004). 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 3×10^9 κονιδιοσπόρια σε 10 ml 0,04% αποδιατακτικό tween και επωάζονται στους 37 °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 φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά στις 4000 rpm. Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 20 ml Διαλύματος 1 (Πίνακας 2-4), 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 °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 φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά στις 4000 rpm. Το υπερκείμενο αφαιρείται και οι πρωτοπλάστες καθαρίζονται με προσθήκη 10 ml Διαλύματος 2 και φυγοκέντρωση 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) σε 10 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM CaCl₂ 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 καθαρίζοντας 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 °C.

2.13 Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA του *A. nidulans*.

Η διαδικασία της ανάλυσης κατά Southern που περιγράφεται παρακάτω, αποτελεί τροποποίηση της αντίστοιχης μεθόδου που περιγράφεται στο Sambrook and Russell, 2001. Η ανάλυση κατά Southern έγινε σε όλα τα μετασηματισμένα 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.

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

3-5 μg γονιδιωματικού DNA που απομονώθηκε από τα μετασηματισμένα στελέχη υποβλήθηκε σε πέψη με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο παρουσία ριβονουκλεάσης A 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 °C. Μετά την

πάροδο των δύο ωρών προστέθηκε ίση ποσότητα περιοριστικού ενζύμου και το ένζυμο αφέθηκε να δράσει για άλλες 12 ώρες στους 37 °C.

2.13.2 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 2-5) 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 2-5), 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 2-5 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 ₃ COOH, 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 Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , pH 7,0 με NaOH
Ρυθμιστικό διάλυμα Church	0,5 M Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ pH 7,0, 1% BSA, 7% SDS, 1 mM EDTA

2.13.3 Προϋβριδισμός - Κατασκευή ραδιοσημασμένου ανιχνευτή με ^{32}P -[$^{\text{a}}$ 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 °C. Ο προϋβριδισμός της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες επίσης στους 65 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα Church (Πίνακας 2-6) με περιστροφή μέσα σε ειδικούς κυλίνδρους. Ο υβριδισμός έγινε για 15-18 ώρες στους 65 °C στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του κατάλληλου ραδιοσημασμένου ανιχνευτή.

Πίνακας 2-6 Η σύσταση της αντίδρασης ραδιοσήμανσης του ιχνηθέτη με ^{32}P -[adCTP], 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 -[$^{\text{a}}$ dCTP]	0,05 mCi
Klenow DNA πολυμεράση (Minotech)	5 u
10X ρυθμιστικό διάλυμα Klenow	5 μl
H ₂ O	μέχρι τα 50 μl

2.13.4 Εκπλύσεις της μεμβράνης-Εμφάνιση

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις εκπλύσεις της μεμβράνης και η κάθε έκπλυση διήρκησε μισή ώρα. Οι τρεις πρώτες εκπλύσεις έγιναν μέσα στον κύλινδρο με περιστροφή και στους 65 °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 °C. Η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του cyclon phosphorimager (Perkin Elmer). Γενικά, η διάρκεια της έκθεσης καθορίζεται από την ποιότητα σήμανσης του ιχνηθέτη αλλά και από τη συγκέντρωση του DNA που έχει προσδεθεί στη μεμβράνη.

2.14 Πρωτόκολλο απομόνωσης και ανάλυσης RNA

2.14.1 Απομόνωση Ολικού RNA από τον *A. nidulans*

Η καθαρότητα και ακεραιότητα του RNA που απομονώνεται από τα κύτταρα είναι σημαντικοί παράγοντες για τη χρήση του σε διάφορες τεχνικές, μια από τις οποίες είναι και η ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR). Η επιτυχής απομόνωση ακέραιου RNA απαιτεί την πραγματοποίηση τεσσάρων βημάτων:

- i) Επιτυχή διάσπαση των κυττάρων
- ii) Μετουσίωση των συμπλόκων νουκλεοπρωτεϊνών
- iii) Απενεργοποίηση της δράσης των ενδογενών ριβονουκλεασών (RNase), και
- iv) Καθαρισμό του RNA από DNA και πρωτεΐνες.

Το σημαντικότερο βήμα είναι η απενεργοποίηση της δράσης των ενδογενών ριβονουκλεασών, που απελευθερώνονται από οργανίδια της κυτταρικής μεμβράνης κατά τη διάσπαση των κυττάρων.

Το RNA βρίσκεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το κυτταροπλασματικό RNA αποτελείται από

ριβοσωμικό RNA (rRNA), μεταφορικό RNA (tRNA), αγγελιοφόρο RNA (mRNA) και άλλα μικρά τμήματα RNA. Στον πυρήνα βρίσκεται το ετεροπυρηνικό RNA (hnRNA), πρόδρομος του RNA. Μόνο το 1-2% του ολικού RNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι mRNA. Η πλειοψηφία του ολικού RNA είναι rRNA. Η απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών (RNases) είναι εξαιρετικά δύσκολη. Μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στη μη επιθυμητή εισαγωγή ριβονουκλεασών στο RNA που απομονώνεται, κατά τη διάρκεια της απομόνωσης, ή και μετά από αυτήν, από εξωγενείς παράγοντες. Οι πιο κοινές πηγές μόλυνσης είναι τα χέρια του ερευνητή και τα βακτήρια που βρίσκονται στη σκόνη και στα γυαλικά του εργαστηρίου. Για την αποφυγή τέτοιου είδους μόλυνσης πρέπει να υπάρχουν στείρες συνθήκες, να γίνεται χρήση αποστειρωμένων εξαρτημάτων και ο ερευνητής να φοράει συνέχεια γάντια. Η αποστείρωση των γυαλικών πραγματοποιείται με θέρμανση στους 200 °C για 18 ώρες, ενώ των πλαστικών είτε με ξέπλυμα με 0.1 N NaOH / 1mM EDTA και στη συνέχεια με νερό που δεν περιέχει ριβονουκλεάσες (κατεργασμένο με DEPC, diethyl pyrocarbonate). Η κατεργασία με DEPC γίνεται ως εξής: υδατικό διάλυμα DEPC 0.1% (v/v) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες και κατόπιν αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο για την απομάκρυνση τυχόν εναπομένουστος ίχνους DEPC (Huang et al., 1995).

Υγρές καλλιέργειες κονιδιοσποριών στις ανάλογες συνθήκες επώαστηκαν για 0-14 ώρες στους 25 °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).

2.14.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Η απόδοση της απομόνωσης RNA προσδιορίζεται φωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm, όπου μια μονάδα απορρόφησης (A_{260}) ισοδυναμεί με 40 μg μονόκλωνου RNA/mL (1 A_{260} unit = 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA). Το RNA για να θεωρηθεί καθαρό δεν πρέπει να περιέχει προσμίξεις DNA ή πρωτεϊνών. Το καθαρό RNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} = 2$. Όταν ο λόγος αυτός είναι μεταξύ 1.7-2.0 τότε το RNA θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας. Αν ο παραπάνω λόγος είναι πολύ διαφορετικός

συνίσταται επανεκχύλιση του RNA με συνέπεια χαμηλή απόδοση στην απομόνωση. Η τυχόν επιμόλυνση του RNA από DNA ελέγχεται με αντίδραση PCR και ηλεκτροφόρηση αγαρόζης 2% (w/v) παρουσία βαφής Gelstar stain (BioWhittaker, Rockland, ME USA) και UV. Αν το RNA δεν έχει επιμολυνθεί, η PCR δε θα δώσει κανένα αποτέλεσμα.

2.14.3 Καθαρισμός του RNA από DNA

Σε περίπτωση που το παρασκεύασμα του RNA περιέχει γονιδιακό DNA, αντί για επανεκχύλιση που θα είχε ως αποτέλεσμα απώλεια ~40% του RNA που απομονώθηκε, μπορεί να γίνει κατεργασία με δεοξυριβονουκλεάση (DNase).

Για το σκοπό αυτό, γίνεται προσθήκη του ενζύμου σε αναλογία 0.2 units ανά 2 μg συνολικού RNA και κατεργασία για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου σε συνολικό όγκο 10 μL, χρησιμοποιώντας 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, το οποίο περιέχει 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl και 40 units αναστολέα των ριβονουκλεασών (RNase inhibitor). Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 1 μL διαλύματος 25 mM Na₂EDTA και επώαση στους 65°C για 15 min για την αδρανοποίηση του ενζύμου και την αποδιάταξη του RNA, εάν αυτό απαιτείται για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA).

2.14.4 RT-PCR

Η τεχνική PCR¹⁸ μπορεί να εφαρμοστεί και για τη γονιδιακή ενίσχυση RNA. Επειδή όμως, οι θερμοανθεκτικές πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της βασικής PCR απαιτούν ένα εκμαγείο DNA, πρέπει πρώτα το RNA μετατραπεί σε συμπληρωματικό του DNA (cDNA). Αυτό γίνεται με τη δράση του ενζύμου

¹⁸ Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια επαναστατική τεχνική *in vitro* σύνθεσης πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA (DNA στόχος) με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων. Η τεχνική αυτή μιμείται το φυσιολογικό μηχανισμό του κυττάρου για τον πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων DNA με τρόπο γρήγορο και αξιόπιστο. Η μεγάλη της αξία στηρίζεται στο ότι είναι μέθοδος γρήγορη, απλή, μικρού κόστους, αυτοματοποιημένη και απαιτεί μόνο ελάχιστες ποσότητες δείγματος. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία της. Η τεχνική αναπτύχθηκε το 1984 από τον Dr. Kary Banks Mullis, ερευνητή της εταιρείας Cetus Corporation, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1993 για τη συνεισφορά του αυτή. Με την τεχνική PCR επιτυγχάνεται η ενίσχυση *in vitro* ενός τμήματος DNA. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών το DNA στόχος πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κλώνων της αντίδρασης (Lorenz, 2012).

ανάστροφης μεταγραφάσης. Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ανάστροφη μεταγραφάση (RT-PCR) είναι δυνατή η γονιδιακή ενίσχυση RNA ιών. Υπάρχουν δυο ευρέως χρησιμοποιούμενα είδη ανάστροφης μεταγραφάσης, η μια προέρχεται από ιό μυελοβλάστωσης πτηνών (AMV) και η άλλη από ιό της λευχαιμίας Moloney και ποντικών (M-MLV). Άλλα είδη αντίστροφης μεταγραφάσης είναι η Taq DNA πολυμεράση, η οποία είναι μια τροποποιημένη 94 kDa DNA πολυμεράση, και κάποια ανασυνδυασμένα ετεροδιμερή ένζυμα. Η Taq DNA πολυμεράση απομονώνεται από το γένος *Thermus aquaticus*, το οποίο εκφράζεται σε *E.coli* και προσφέρει υψηλά εξειδικευμένη ενίσχυση κατά τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων του cDNA, έχοντας αντοχή σε μεγάλες θερμοκρασίες. Τα ανασυνδυασμένα ετεροδιμερή ένζυμα εκφράζονται και αυτά σε *E.coli* και προσφέρουν υψηλή αποτελεσματικότητα και εξειδίκευση στην αντίστροφη μεταγραφή. Η πορεία της PCR, για την παραλαβή cDNA από RNA, έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον προμηθευτή των αντιδραστηρίων (Invitrogen). Για την δημιουργία του cDNA χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα 2-3 μg RNA ενώ οι συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν 1 μM. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε Tris-HCl, KCl, DTT, MgCl₂ και ποσότητα από τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP).

Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται πιο πάνω για την PCR αφού ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμιστεί για 2 λεπτά στους 42 °C και 50 λεπτά στους 42 °C για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής με ενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και στη συνέχεια 15 λεπτά στους 95°C για την ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης και απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης, 30 δευτερόλεπτα στους 94°C για τη μετουσίωση των κλώνων του σχηματιζόμενου cDNA, 30 δευτερόλεπτα στη θερμοκρασία υβριδοποίησης ανάλογα με τον κάθε εκκινητή και 1 min στους 72°C για την επέκταση των κλώνων. Το τελικό βήμα ήταν η τελική επέκταση η οποία έγινε για 10 λεπτά στους 72°C. Ο αριθμός των κύκλων που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση κυμαινόταν ανάλογα με τις απαιτήσεις των εκκινητών. Οι αλληλουχίες των cDNA αναλύθηκαν ημιποσοτικά έχοντας ως γονίδιο αναφοράς το 18S rRNA, το οποίο είναι ένα μόριο που εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα και τους ιστούς (housekeeping gene). Στις ίδιες συνθήκες με την εκτέλεση της RT-PCR αντίδρασης

για τις εισοσωμικές πρωτεΐνες γινόταν RT-PCR αντίδραση και με τους εκκινητές για το cDNA του γονιδίου 18S rRNA.

Ο έλεγχος των προϊόντων της RT-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris - Acetate - EDTA, pH 8.3 (TAE), που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Τα δείγματα αναμειχθηκαν με ποσότητα βαφής φόρτωσης των δειγμάτων, το προϊόν της RT-PCR ανάλυσης για το 18S rRNA και TAE. Η βαφή φόρτωσης των δειγμάτων (loading dye), περιέχει 15% (v/v) Ficoll[®] 400, 0.03% (w/v) bromophenol blue, 0.03% (w/v) xylene cyanol FF, 0.4% (w/v) orange G, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) και 50 mM EDTA, ενώ η συνιστώμενη ποσότητα ενδείκνυται σε ένα μέρος βαφής για κάθε πέντε μέρη διαλύματος DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο 60 V για 3 h, ενώ τόσο η άνοδος όσο και η κάθοδος ήταν βυθισμένες σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M TAE. Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR αντίδρασης έγινε με τοποθέτηση των ηλεκτροφόρων πάνω σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η φωτογράφιση των ηλεκτροφόρων έγινε με CCD κάμερα ενώ η ανάλυση, η επεξεργασία και η ποσοτικοποίηση των ζωνών στα ηλεκτροφόρα αγαρόζης έγιναν βάση του προγράμματος ανάλυσης εικόνας Fiji/imagej software (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) έπειτα από μέτρηση και ολοκλήρωση του εκπεμπόμενου φθορισμού των ζωνών. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λόγος του φθορισμού του κάθε μορίου που αναλύθηκε με διαίρεση της τιμής του φθορισμού του με την τιμή του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε.

2.15 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών

Για την απομόνωση πρωτεϊνών του *A. nidulans*, κονιδιοσπόρια/ασκοσπόρια 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, εμβολιάστηκαν σε κωνική φιάλη με 100 ml του εκάστοτε αντίστοιχου ελάχιστου θρεπτικού υποστρώματος (MM), που περιείχε τις απαραίτητες πηγές αζώτου και αυξοτροφίες. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 0-16 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.

2.15.1 Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών

Το θρυμματισμένο μυκηλίο αναδιαλύθηκε μέχρι ομογενοποίησης σε παγωμένο διάλυμα απομόνωσης (μέχρι τα 2 ml, βλέπε πίνακα 7) και επωάστηκε 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 erpendorf 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 erpendorfs. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν μπορούν να διατηρηθούν στους -80 °C μέχρι τη χρήση τους. Η συγκέντρωσή τους μετρήθηκε με τη μέθοδο της Bradford (Bradford, 1976). Πριν την ανάλυσή τους με SDS-PAGE προστέθηκε σε αυτά διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων (τελική συγκέντρωση 1x) και επωάστηκαν 10-15 λεπτά στους 37 °C.

Πίνακας 2-7 Διαλύματα απομόνωσης, επαναδιάλυσης και μετουσίωσης

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 μετουσίωσης πρωτεϊνικών	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2-3% SDS, 10 % Γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,005% μπλε της βρωμοφαινόλης

2.15.2 Απομόνωση εισοσωμικών πρωτεϊνών από ασκοσπόρια του *A. nidulans*

Για την απομόνωση πρωτεϊνών του *A. nidulans*, κλειστοθήκια απομονώθηκαν με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. ~ 200 mg κλειστοθηκίων, θρυμματίστηκαν πλήρως παρουσία υγρού αζώτου και συλλέχθηκαν σε σωλήνες τύπου Eppendorf 2 ml. Τα θρυμματισμένα κλειστοθήκια αναδιαλύθηκαν μέχρι ομογενοποίησης σε παγωμένο διάλυμα απομόνωσης {(50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών (Sigma) (1:500)} και επώασθηκαν 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 νέους προπαγωμένους σωλήνες τύπου 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 κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση στα 13.000 g ,στους 4 °C για 5 λεπτά. Το ίζημα εξισορροπήθηκε 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 -80° C μέχρι τη χρήση τους. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976), προστέθηκε σε κάθε ένα από αυτά διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνών (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2-3% SDS, 10% Γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,005% μπλε της βρωμοφαινόλης) και επώασθηκαν 10-15 λεπτά στους 37 °C.

Πίνακας 2-8 Διαλύματα απομόνωσης και μετουσίωσης

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.

2.15.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο της Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ηλεκτροστατικής φύσης αντίδραση των πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Coomassie Brilliant Blue G-250, που ενισχύεται από την υδροφοβικότητα, η οποία αυξάνει τον αριθμό των μορίων της χρωστικής που προσδέονται ανά μόριο πρωτεΐνης. Το σύμπλοκο πρωτεϊνών με τη χρωστική του αντιδραστηρίου Bradford (100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml αιθανόλη, 100 ml H₃PO₄, 850 ml H₂O) 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).

2.15.4 SDS-GAGE

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε όπως στο (Kafasla et al., 2007). Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα

πολυακρυλαμίδης 10%, SDS 0,1%. Η σύσταση των πηκτωμάτων φαίνεται στον **πίνακα 2-9**.

Πίνακας 2-9 Σύσταση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης

	Πήκτωμα διαχωρισμού	Πήκτωμα συσσώρευσης
Συστατικό	10 % (10 ml)	4 % (10 ml)
Acrylamide/Bisacrylamide 30 % 37,5/1	3,3 ml	1,3 ml
H ₂ O _{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™ Tetra Cell (Bio-Rad) μέχρι η χρωστική τους (~15 kDa) να φτάσει στο κάτω μέρος του πηκτώματος (~ 1,5 ώρα. Όπως είναι γνωστό, 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, και κατά συνέπεια αποκτούν ισχυρότερο αρνητικό φορτίο και εμφανίζουν αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα. 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 2-10 Σύσταση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης

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

2.15.5 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.

2.15.6 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. Παράλληλα, 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 °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 2-11 Διαλύματα του πρωτοκόλλου της παραγράφου 2.15.6

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

2.15.7 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 επώαστηκε 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.

2.15.8 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 επώαστηκε 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, αραιώση 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 στο LAS-4000 Luminescent Image Analyzer (Fuji-Film).

2.16 Έλεγχος παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου – ROS

Για τον έλεγχο παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου διαφορετικών στελεχών του *A. nidulans* χρησιμοποιήθηκε ο φθορίζων ανιχνευτής 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Sigma) (Mao et al., 2012). Η χρώση DCF-DA, η οποία αποτελεί έναν κοινό δείκτη ελέγχου οξειδωτικών παραγόντων και μάλιστα με αυξημένη ευαισθησία για το H₂O₂. Η DCF-DA μετά την είσοδό της στα κύτταρα από-ακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε ένα μη φθορίζον προϊόν το οποίο οξειδώνεται από δραστικές μορφές οξυγόνου στη φθορίζουσα ένωση, 2,7-dichlorofluorescein (DCF). Ειδικότερα, τα δείγματα επώαστηκαν σε τρυβλία Petri 3 cm με καλυπτρίδα, προστατευμένα από το φως, σε υγρό MM και τις κατάλληλες αυξοτροφίες στους 25, 37 και 42 °C. Στα δείγματα προστέθηκαν 10 μM DCF-DA, και

παρέμειναν στο σκοτάδι για τουλάχιστον 45 λεπτά. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με απεσταγμένο νερό. Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων έγινε σε αντικειμενοφόρους πλάκες σε μικροσκόπιο AxioPlan 2 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Inc.) με το φακό Plan-Apochromat 100× 1.40.

2.17 Μικροσκοπία

2.17.1 Μικροσκοπία επιφθορισμού

Τα δείγματα για το μικροσκόπιο επιφθορισμού έχουν ετοιμαστεί όπως περιγράφεται στο (Athanasopoulos et al., 2013). Ειδικότερα, τα δείγματα επώαστηκαν σε τρυβλία Petri 3 cm με καλυπτρίδα, προστατευμένα από το φως, σε υγρό MM συμπληρωμένο με ουρία ως μοναδική πηγή του αζώτου και τις κατάλληλες αυξοτροφίες στους 25 °C για 0-16 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε διάφορες συνθήκες για 2-4 ώρες. 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, επώαστηκαν 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 Vangelatos et al., 2010. Καλυπτρίδες με εκβλαστημένα κονίδια ή νεαρά μυκήλια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 3 cm, καλυμμένα με 0,1 ml αραιώση 1/1000 της CMAC (5 mg/ml διαλύματος), επώαστηκαν στους 25 °C 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. 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 CS6.

2.17.2 Συνεστιακή μικροσκοπία

Φθορίζοντα παρασκευάσματα με σημαντικό πάχος όπως στρογγυλά κύτταρα ή τομές ιστών δεν απεικονίζονται καλά με μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου διότι φθορίζοντα σήματα από μόρια που ευρίσκονται εκτός αλλά κοντά στο επίπεδο εστίασης ανιχνεύονται αυξάνουν το background και δίνουν εικόνες με χαμηλή αντίθεση (contrast). Η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος, με τοποθέτηση διαφραγμάτων (pinhole) στους οπτικούς άξονες του συγκεντρωτή και του αντικειμενικού φακού. Με τον τρόπο αυτό, δεν ανιχνεύεται το φως που προέρχεται έξω από την περιοχή εστίασης (Dobrucki, 2004). Το φως που εκπέμπεται από το επίπεδο εστίασης στο δείγμα περνά μέσα από την οπή του διαφράγματος του ανιχνευτή για να δημιουργήσει μια σημειακή εικόνα στον φωτοπολλαπλασιαστή (PMT, photon multiplier tube). Ο φωτοπολλαπλασιαστής μετατρέπει τα φωτόνια σε ηλεκτρόνια. Στη συνέχεια το σήμα ψηφιοποιείται και αποστέλλεται στον ψηφιακό αναλυτή εικόνας.

Τα κύτταρα στην παρούσα διατριβή απεικονίστηκαν με τη χρήση ενός Leica TCS SP συνεστιακού μικροσκοπίου (PL APO 63x / 1.2 NA) ή με τη χρήση ενός Leica TCS SP5 (PL APO 63x / 1.4 NA, εξοπλισμένου με 2 laser, θάλαμο παρατήρησης ζωντανών κυττάρων). Εικόνες αποκτήθηκαν διαδοχικά ως Z-stack και επεξεργαστήκαν/αναλύθηκαν με τη χρήση εξειδικευμένου λογισμικού, Fiji/imagej software (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) ή Imaris (Bitplane AG, Zurich, Switzerland).

2.17.3 Η σημασία της Αποσυσχέτισης-Deconvolution

Το πρόβλημα κατά τη λήψη μιας εικόνας είναι ότι συχνά μπορεί να υπάρχει υψηλός θόρυβος (background), που να φτάνει έως και το 30% της μέγιστης έντασης

φθορισμού. Για το λόγο αυτό, πριν γίνουν οι μετρήσεις για τον συνεντοπισμό ή/μη των υπό μελέτη φθοριζόντων μακρομορίων πρέπει να διορθωθεί ο θόρυβος των εικόνων. Εξειδικευμένα προγράμματα όπως το Huygens Professional (Scientific Volume Imaging B.V.) and Autoquant (MediaCybernetics, Autoquant X2 software) παρέχουν τη δυνατότητα αφαίρεσης/διόρθωσης (αποσυσχέτιση) του background. Το βήμα αυτό είναι πολύ σημαντικό και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό το αποτέλεσμα του υπολογισμού των συντελεστών συνεντόπισης (βλέπε παρακάτω). Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος αποσυσχέτισης 3-D BLIND DECONVOLUTION (των λογισμικών Huygens Professional και Autoquant X2).

2.17.4 Ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού φθοριοχρωμάτων

Η ανάλυση συνεντοπισμού σε πολυχρωματικές εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού βασίζεται στη μελέτη παρουσίας σήματος/φθορισμού στο ίδιο pixel της ψηφιακής εικόνας. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η επιβεβαίωση συνεντόπισης των φθοριοχρωμάτων δεν αποτελεί απόδειξη της λειτουργικής τους συσχέτισης (αλλά ενδεχομένως αποτελεί μόνο μια ένδειξη) (Adler and Parmryd, 2010). Πρέπει να δίνεται σημαντική προσοχή ώστε τα επιλεγμένα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται να έχουν καλά διαχωρισμένα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης και να καθορίζεται το ποσοστό αυτοφθορισμού, με χρήση μη σημασμένων δειγμάτων ως μάρτυρες. Η συνεντόπιση 2 φθοριοχρωμάτων μπορεί να αξιολογηθεί ποσοτικά χρησιμοποιώντας αλγορίθμους, που υπολογίζουν τους εξής συνετέλεσες:

1. Pearson's correlation
2. Οι συντελεστές συνεντόπισης m_1 και m_2

Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson's correlation) είναι ένας από τους πλέον συχνά χρησιμοποιούμενους αλγόριθμους για να περιγράψει τη συσχέτιση κατανομής της έντασης φθορισμού σε διαφορετικά κανάλια (channels). Οι τιμές που παίρνουμε για τον συντελεστή αυτό κυμαίνονται μεταξύ -1.0 και 1.0 , όπου το 0 δεν δείχνει σημαντική συσχέτιση, και το -1 δείχνει πλήρως αρνητική συσχέτιση.

Εντούτοις, οι αρνητικές τιμές στο Pearson's correlation coefficient, θα πρέπει να ερμηνεύονται πολύ προσεκτικά. Εάν η τιμή στο Pearson's correlation coefficient είναι >0 , επιπρόσθετα θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί το Manders' overlap coefficient για την πληρέστερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Οι συντελεστές συνεντόπισης m_1 και m_2 περιγράφουν τη συνεισφορά καθενός από τα δύο επιλεγμένα φθοριοχρώματα (channels) στα pixels που μας ενδιαφέρουν. Για παράδειγμα, εάν το κόκκινο-πράσινο ζεύγος καναλιών είναι επιλεγμένο και τα m_1 και m_2 είναι 1.0 και 0.2, αντίστοιχα, αυτό σημαίνει ότι όλα τα κόκκινα pixels συνεντοπίζονται με τα πράσινα pixels, αλλά μόνο το 20% των πράσινων pixels συνεντοπίζονται με τα κόκκινα. Η τιμή 1.0 και για τα δύο κανάλια υποδηλώνει πλήρη συνεντοπισμό (Bolte and Cordelieres, 2006). Για την ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού φθοριοχρωμάτων στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Imaris software package (Bitplane, Zurich, Switzerland), imageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) και το Image-Pro Plus 6.

2.17.4 Τεχνικές μικροσκοπίας διακεκομμένης μαγνητοσκόπησης (time-lapse) και ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP)

Με την ανάπτυξη των κατάλληλων βιολογικών εργαλείων για την παρατήρηση βιολογικών δομών και λειτουργιών στο χρόνο σε ζωντανά κύτταρα αναπτύχθηκε ο κλάδος της λειτουργικής μικροσκοπίας. Στις τεχνικές λειτουργικής μικροσκοπίας κατατάσσονται τεχνικές όπως της παρατήρησης στην πάροδο του χρόνου (time-lapse) Η ένταση της εκπομπής φθορισμού μπορεί να μειωθεί από συνθήκες που την επηρεάζουν. Ορισμένα φαινόμενα που οδηγούν σε μείωση της εκπομπής φθορισμού είναι η φωτολεύκανση (photobleaching), η απόσβεση (quenching), ο κορεσμός διέγερσης (excitation saturation), και η μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Η φωτολεύκανση είναι η μη αναστρέψιμη αποσύνθεση των φθορίζοντων μορίων στη διεγερμένη κατάσταση εξαιτίας της αλληλεπίδρασής τους με μοριακό οξυγόνο πριν από την εκπομπή φθορισμού. Το φαινόμενο της φωτολεύκανσης αξιοποιείται σε μία

τεχνική που ονομάζεται ανάκτηση φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) (Zheng et al., 2011), η οποία αποτελεί έναν πολύ χρήσιμο μηχανισμό για τη διερεύνηση της διάχυσης και της κίνησης των βιολογικών μακρομορίων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη φωτολεύκανση μίας συγκεκριμένης περιοχής του δείγματος μέσω laser, ακολουθούμενη από την παρατήρηση της ανάκτησης φθορισμού στην περιοχή που υπέστη φωτολεύκανση. Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος FRAP λαμβάνονται απεικονίσεις πριν τη φωτολεύκανση (pre-bleach images), ακολουθεί αυτή καθ'εαυτή η φωτολεύκανση (bleaching), και συνεχίζεται η καταγραφή μετά από αυτή (post bleach images). Η περιοχή της φωτολεύκανσης αποτελεί και την περιοχή ενδιαφέροντος No1 (Region of Interest 1). Στις απεικονίσεις ορίζονται δύο ακόμα περιοχές (ROIs): το σύνολο της περιοχής όπου κατανέμεται η προς μελέτη πρωτεΐνη(ROI2), καθώς και μια περιοχή εκτός κυττάρου στην οποία δεν εντοπίζεται η πρωτεΐνη (ROI3), ώστε να καταγραφεί ο θόρυβος(background) και να χρησιμοποιηθεί αυτή η μέτρηση για διόρθωση.

3. Αποτελέσματα

3.1 Υποκυτταρικός εντοπισμός των εισοσωμικών πρωτεϊνών στα κύτταρα Hülle και τους ασκούς

Η χρήση της τεχνολογίας της Πράσινης και της μονομερούς Κόκκινης Φθορίζουσας Πρωτεΐνης (Green Fluorescent Protein, GFP/ monomeric Red Fluorescent Protein, mRFP) έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στον υποκυτταρικό εντοπισμό διαμεμβρανικών και εκκρινόμενων πρωτεϊνών στους διαφορετικούς οργανισμούς (Apostolaki et al., 2009; Tavoularis et al., 2001). Η παραγωγή αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών, γενικά, είναι μία διαδικασία περισσότερο χρονοβόρα και δαπανηρή σε σύγκριση με τη συγκεκριμένη μέθοδο και ειδικά στην περίπτωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών παρουσιάζει πολλές τεχνικές δυσκολίες, λόγω των χαμηλών επιπέδων έκφρασης τους στις μεμβράνες του κυττάρου, αλλά και της υψηλής υδροφοβικότητας τους. Η *in vivo* παρατήρηση της υποκυτταρικής κατανομής πρωτεϊνικών μορίων με τους επίτοπους GFP και mRFP, καθιστά δυνατή τη μελέτη του υποκυτταρικού συνεντοπισμού τους που μπορεί να υποδηλώνει πιθανή λειτουργική αλληλεπίδραση τους (Hitchcock et al., 2005; Lukyanov et al., 2005; Matz et al., 2005; Valdivia et al., 2005).

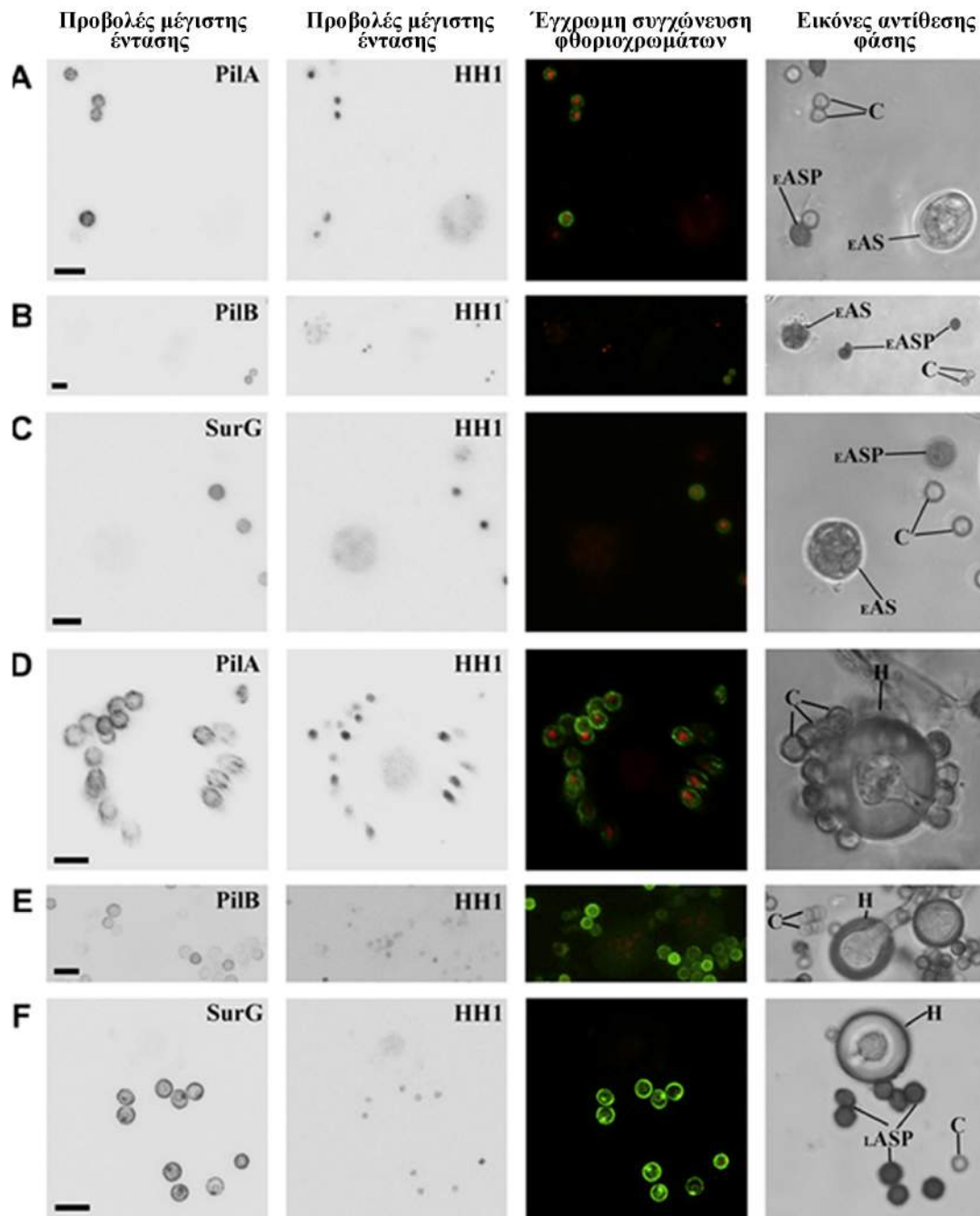
Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής, το πρωταρχικό γεγονός της φυλετικής αναπαραγωγής είναι η αναστόμωση των μυκηλιακών υφών δύο στελεχών και η επακόλουθη ανάμιξη κυτταροπλασματικού υλικού και πυρήνων. Από τα ετεροκάρυα (μυκήλια τα οποία διαθέτουν διαφορετικών ειδών πυρήνες) ή ομοκάρυα (μυκήλια τα οποία διαθέτουν ένα είδος πυρήνων), ο ένας πυρήνας θα συμβάλει εξ' ολοκλήρου στο σχηματισμό του μητρικού ιστού, δημιουργώντας το τοίχωμα του κλειστοθηκίου ενώ ο άλλος θα συμβάλει στη δημιουργία των ασκογόνων υφών, οι οποίες θα δώσουν γένεση στους ασκούς (Heitman, 2007). Στο τέλος της φυλετικής αναπαραγωγής, κάθε κλειστοθήκιο περιλαμβάνει χιλιάδες ασκούς, και κάθε ασκός περιλαμβάνει οκτώ διπύρηνια ασκοσπόρια (Elliott, 1960).

Χρησιμοποιώντας στελέχη που εκφράζουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις κύριες εισοσωμικές πρωτεΐνες PilA, PilB και SurG σημασμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) (Vangelatos et al., 2010), αλλά και στελέχη που έφεραν απαλοιφή των γονιδίων αυτών, εξετάστηκε η έκφραση των κύριων εισοσωμικών πρωτεϊνών αλλά και ο ρόλος αυτών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ασκών και των κυττάρων Hülle, χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία. Αυτά τα στελέχη εξέφραζαν επίσης την ιστόνη H1 σημασμένη με τη μονομερή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (mRFP). Ο φυλετικός κύκλος ζωής επάγεται σε εργαστηριακά στελέχη *A. nidulans* αναπτύσσοντας το σχετικό στέλεχος ή ετεροκάρυο (κατά τη διασταύρωση δύο διαφορετικών στελεχών) για 48 ώρες πριν τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών με τη σφράγιση των τρυβλίων ανάπτυξης. Ασκοσπόρια/ασκοί παρατηρήθηκαν 5-7 ημέρες μετά τη σφράγιση των τρυβλίων (πρώιμοι, μη χρωματισμένοι ασκοί, ασκοσπόρια) και 14 ημέρες μετά από το σφράγισμα των τρυβλίων (ώριμοι ασκοί / ασκοσπόρια, οι οποίοι ήταν πλήρως χρωματισμένοι). Τα αποτελέσματά παρουσιάζονται στην **εικόνα 3-41** και δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες PilA, PilB και SurG δεν εκφράζονται κατά τη διάρκεια της αρχικής ανάπτυξης των ασκών (δεν ανιχνεύτηκε φθορισμός σε πρώιμους ασκούς/ασκοσπόρια) και ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε ότι τα βοηθητικά κύτταρα Hülle δεν εκφράζουν τις εισοσωμικές πρωτεΐνες σε κανένα στάδιο της ανάπτυξης τους. Ενώ οι εισοσωμικές πρωτεΐνες PilA, PilB και SurG εκφράζονται και σχηματίζουν δομές όπως υποδεικνύεται από τον παρατηρούμενο φθορισμό, στους ώριμους ασκούς/ασκοσπόρια (**Εικόνα 3-41 και παράγραφος 3.2**).

Για να διερευνηθεί αν η έκφραση αυτών των πρωτεϊνών είναι αυτόνομη, στελέχη που εξέφραζαν την PilA-GFP, την PilB-GFP και την SurG-GFP διασταυρώθηκαν με ένα στέλεχος φυσικού τύπου, *pabaA1*¹⁹. Τα ασκοσπόρια των διασταυρωμένων κλειστοθηκίων παρατηρήθηκαν με μικροσκοπία επιφθορισμού. Κάθε *gfp* σημασμένο γονίδιο διαχωρίζονταν με αναλογία 1:1 με το αντίστοιχο μη σημασμένο γονίδιο φυσικού τύπου, δεδομένου ότι περίπου το ήμισυ των ασκοσπορίων φθόριζε (τουλάχιστον 10^3 ασκοσπόρια προερχόμενα από ένα μόνο

¹⁹ Η μεταλλαγή *pabaA1* προκαλεί αυξοτροφία για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ και οφείλεται σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας της συνθετάσης του παρα-αμινο-βενζοϊκού οξέος.

κλειστοθήκιο μετρήθηκαν κάθε φορά σε τρία ανεξάρτητα πειράματα) (Athanasopoulos et al., 2013).



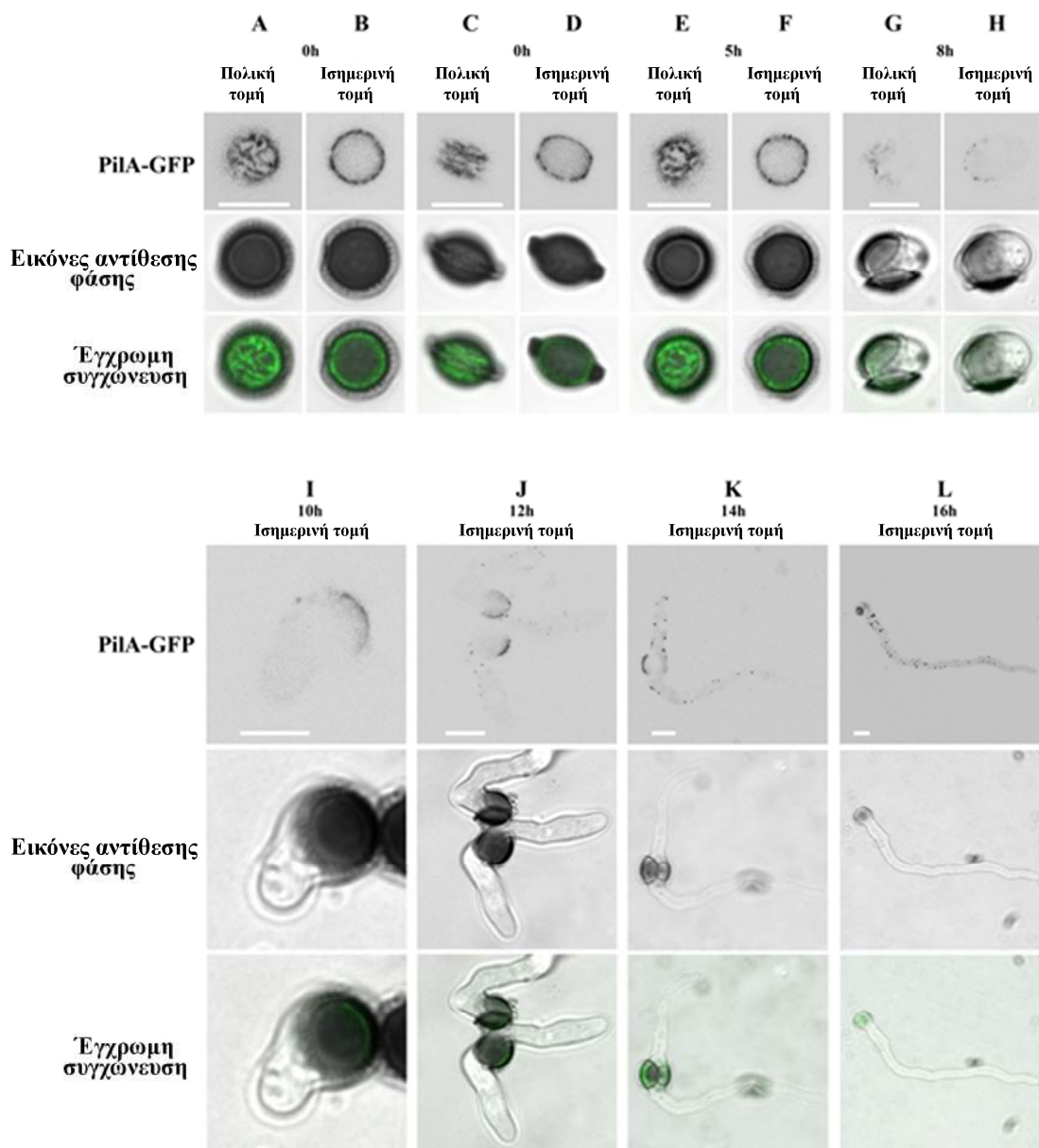
Εικόνα 3-41 Έκφραση και υποκυτταρική κατανομή των εισοσωμικών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων του φυλετικού κύκλου ζωής του *A. nidulans*. Προβολές μέγιστης έντασης εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας σε κονίδια, πρώιμα ασκοσπόρια και πρώιμους ασκούς των πρωτεϊνών: (A) PilA-GFP και ιστόνη HH1-mRFP (HH1), (B) PilB-GFP και HH1-mRFP, και (C) SurG-GFP και HH1-mRFP. Προβολές μέγιστης έντασης εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων hülle στελεχών που εκφράζουν τις PilA-GFP, PilB-GFP και SurG-GFP πρωτεΐνες αντίστοιχα (D-F). C: κονίδιο; EASP: πρώιμο ασκοσπόριο (αχνό κόκκινο χρώμα); EAS: πρώιμος ασκός (διαφανείς ασκοί σε εικόνες αντίθεσης φάσης); LASP: όψιμα/ώριμα ασκοσπόρια (Σκούρο κόκκινο χρώμα) H:

κύτταρα hülle. Ο φθορισμός παρουσιάζεται σε αντεστραμμένη κλίμακα του γκρι, οι συγχωνευμένες εικόνες (merge) του φθορισμού και της αντίθεσης φάσης δείχνονται ως χρωματιστές εικόνες. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μm. Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013.

3.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός των εισοσωμικών πρωτεϊνών κατά το φυλετικό κύκλο ζωής του *A. nidulans*

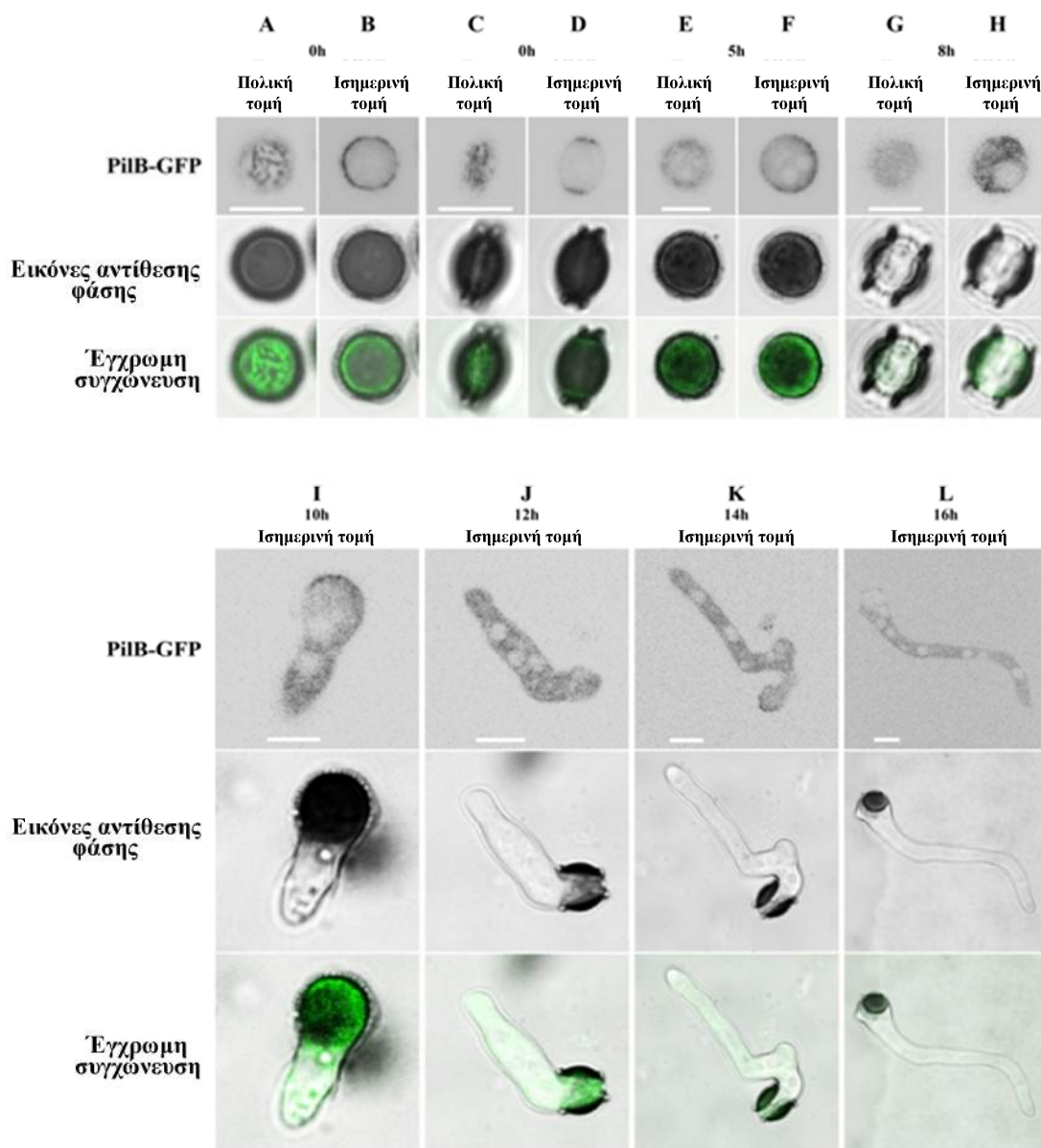
Πολικές και ισημερινές τομές εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η PilA-GFP εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των μη εκβλαστημένων ασκοσπορίων (Εικόνα 3-42). Καμία αλλαγή στην κατανομή της PilA δεν παρατηρήθηκε κατά την περίοδο της ισοτροπικής φάσης ανάπτυξης του μύκητα. Κατά το χρονικό σημείο εμφάνισης του βλαστικού σωλήνα, η PilA-GFP συγκεντρώνεται στην περιφέρεια της κεφαλής του ασκοσπορίου απέναντι από το βλαστικό σωλήνα. Σε νεαρές και ώριμες υφές παραμένει κυρίως στην κεφαλή των ασκοσπορίων ενώ κάποια κοκκία PilA ανιχνεύονται τόσο στο εσωτερικό των υφών όσο και στην περιφέρειά τους. Παρόμοια, σε αδρανή ασκοσπόρια η PilB-GFP εντοπίζεται στην περιφέρεια αλλά φαίνεται να συγκεντρώνεται περισσότερο στις περιοχές όπου τα δύο μισά του ασκοσπορίου ενώνονται (Εικόνα 3-43). Κατά την περίοδο της ισοτροπικής αύξησης καθώς και μετά την εμφάνιση του βλαστικού σωλήνα -σε νεαρές υφές ασκοσπορίων-, η PilB-GFP εντοπίζεται ως διάχυτος φθορισμός στο κυτταρόπλασμα εκτός των περιοχών των πυρήνων, όπως δείχθηκε χρησιμοποιώντας το στέλεχος (VS153 - *pilB::sgfp::AfpypG+ argB2 nkuAΔ::argB+ pyroA4 hhoA::mrfp*) που εκφράζει τόσο την PilB-GFP όσο και την ιστόνη H1 σημασμένη με την μονομερή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP (Εικόνα 3-44). Τέλος, η SurG-GFP εντοπίζεται τόσο στην περιφέρεια του ασκοσπορίου όσο και περιπυρηνικά. Αυτή η περιπυρηνική τοπολογία της SurG δείχθηκε χρησιμοποιώντας το στέλεχος - *surG::sgfp::AfpypG+ argB2 nkuAΔ::argB+ pyroA4 hhoA::mrfp* - που εκφράζει τόσο την πρωτεΐνη SurG σημασμένη με GFP όσο και την ιστόνη H1 σημασμένη με mRFP (Εικόνα 3-44 B). Κατά την περίοδο της ισοτροπικής αύξησης ο περιπυρηνικός φθορισμός της SurG-GFP αρχίζει να ελαττώνεται (Εικόνα 3-45) και

εξαφανίζεται λίγο πριν την εμφάνιση του βλαστικού σωλήνα. Στις υφές η SurG περιορίζεται στα χυμοτόπια και τα ενδοσώματα αλλά ταυτόχρονα σήμα μπορεί να ανιχνευθεί στη μεμβράνη της κεφαλής του ασκοσπορίου (Athanasopoulos et al., 2013).



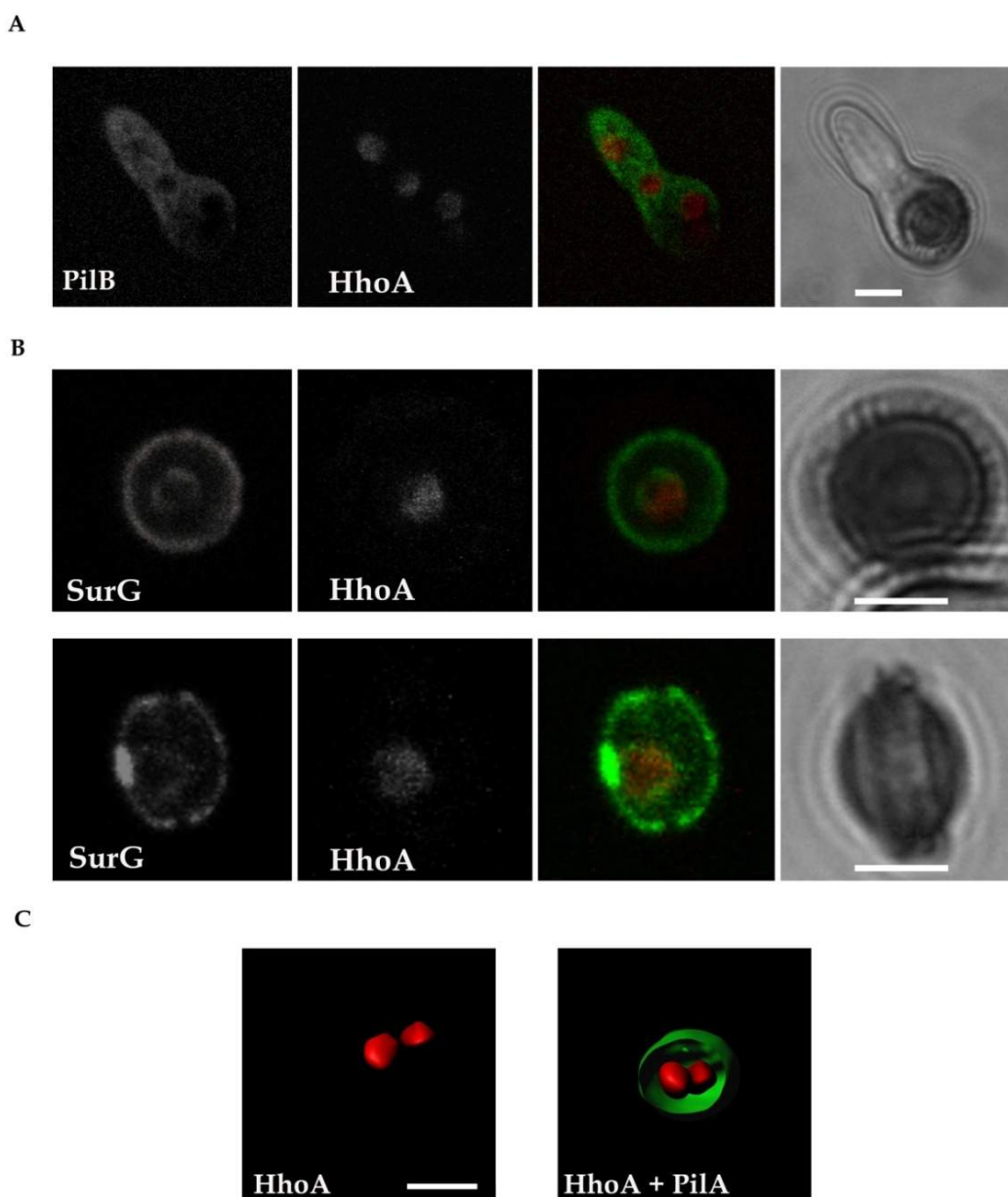
Εικόνα 3-42 Εντοπισμός της PiiA-GFP σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του φυλετικού κύκλου του *A. nidulans*. Τομές συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης Laser (0.5 μm). Όλες οι εικόνες φθορισμού αποκτήθηκαν με την ίδια ένταση και τις ίδιες ρυθμίσεις λέιζερ και ανιχνευτή. (A-D) Πολικές και ισημερινές τομές αδρανών ασκοσπορίων που εκφράζουν την PiiA-GFP (0h) προσανατολισμένα παράλληλα με το ισημερινό επίπεδο (A-B) ή κάθετα (C-D) προς το επίπεδο xy, (E-F). Πολικές και ισημερινές τομές ασκοσπορίων που

βρίσκονται στην ισοτροπική φάση ανάπτυξης (5h) (G-H) και ασκοσπορίων που έχουν μόλις εκβλαστήσει. Ισημερινές τομές νεαρών υφών 10 ωρών, 12 ωρών, 14 και 16 ωρών ανάπτυξης (I-L), αντίστοιχα). Τα στελέχη αναπτύχθηκαν παρουσία 5 mM ουρίας και 1% w/v γλυκόζη σαν μοναδικές πηγές αζώτου και άνθρακα αντίστοιχα, στους 25 °C. Ο φθορισμός GFP παρουσιάζεται σε αντεστραμμένη κλίμακα του γκρι, οι συγχωνευμένες εικόνες του φθορισμού και της αντίθεσης φάσης παρουσιάζονται ως χρωματιστές εικόνες. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μm. Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013.



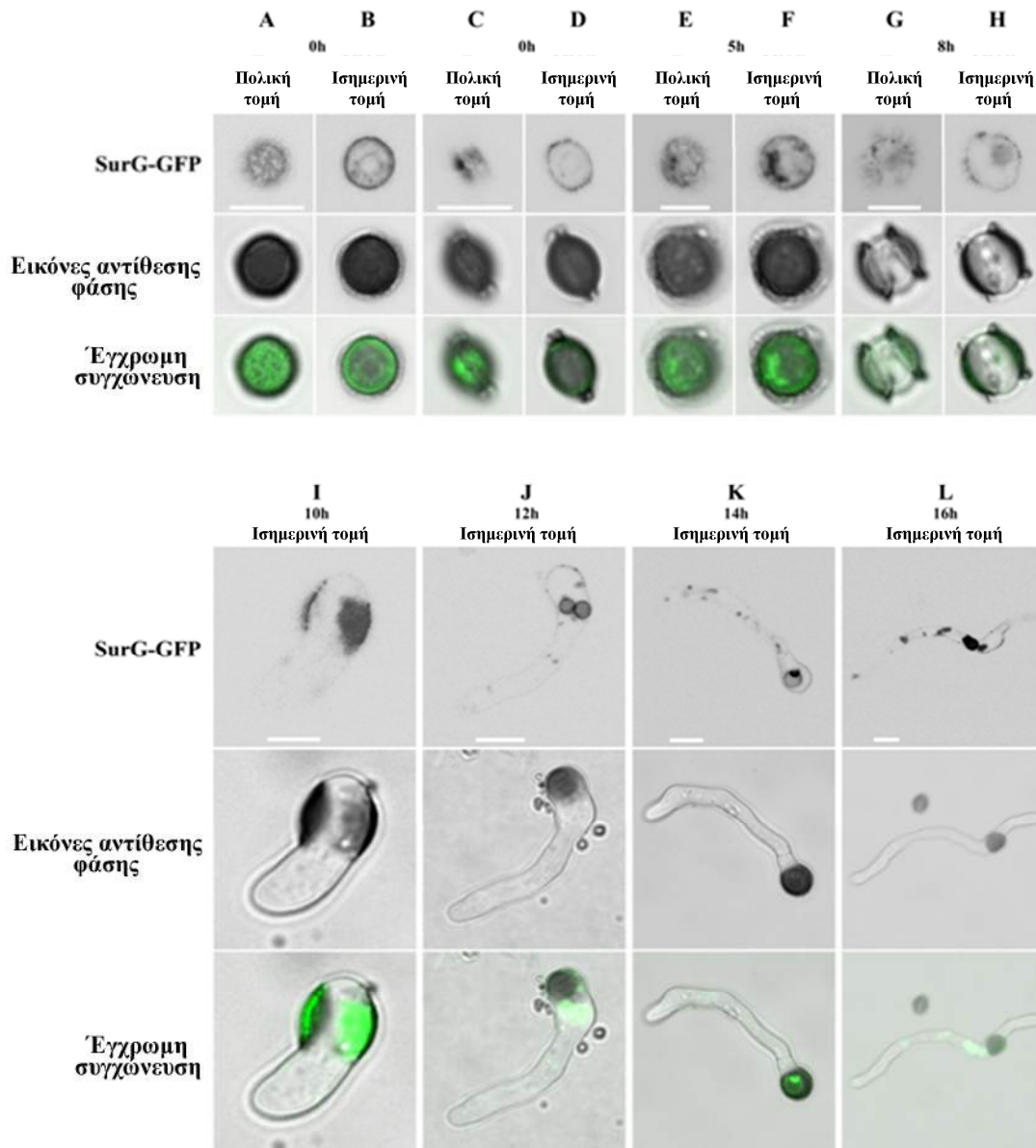
Εικόνα 3-43 Εντοπισμός της PilB-GFP σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του φυλετικού κύκλου του *A. nidulans*. Τομές συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης Laser (0.5 μm). Όλες εικόνες φθορισμού αποκτήθηκαν με την ίδια ένταση και τις ίδιες ρυθμίσεις λείζερ και ανιχνευτή. (A-D) Πολικές και ισημερινές τομές αδρανών ασκοσπορίων που εκφράζουν την PilB -GFP (0h) προσανατολισμένα παράλληλα με το ισημερινό επίπεδο (A-B) ή κάθετα

(C-D) προς το επίπεδο xy, (E-F). Πολικές και ισημερινές τομές ασκοσπορίων που βρίσκονται στην ισοτροπική φάση ανάπτυξης (5h) (G-H) και ασκοσπορίων που έχουν μόλις εκβλαστήσει. βρίσκονται στην ισοτροπική φάση ανάπτυξης (5h) (G-H) και ασκοσπορίων που έχουν μόλις εκβλαστήσει. Ισημερινές τομές νεαρών υφών 10 ωρών, 12 ωρών, 14 και 16 ωρών ανάπτυξης (I-L), αντίστοιχα. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν παρουσία 5 mM ουρίας και 1% w/v γλυκόζη σαν μοναδικές πηγές αζώτου και άνθρακα αντίστοιχα, στους 25 °C. Ο φθορισμός GFP παρουσιάζεται σε αντεστραμμένη κλίμακα του γκρι, οι συγχωνευμένες εικόνες του φθορισμού και της αντίθεσης φάσης παρουσιάζονται ως χρωματιστές εικόνες. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μ m. Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013.



Εικόνα 3-44 (A-B) Ισημερινές τομές συνεστιακής μικροσκοπίας εκβλαστημένων και μη εκβλαστημένων ασκοσπορίων που εκφράζουν ταυτόχρονα τη SurG-GFP και την ιστόνη H1 (HhoA) σημασμένη με mRFP. (C) 3-D άποψη με τη χρήση του 3-D λογισμικού απεικόνισης

Imaris 7. 2.3. Εσωτερική άποψη ασκοσπορίου που δείχνει τους 2 πυρήνες των ασκοσπορίων. Πράσινο και κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στις PilA και HhoA πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Κλίμακα μεγέθυνσης : 3 μm.. Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013.

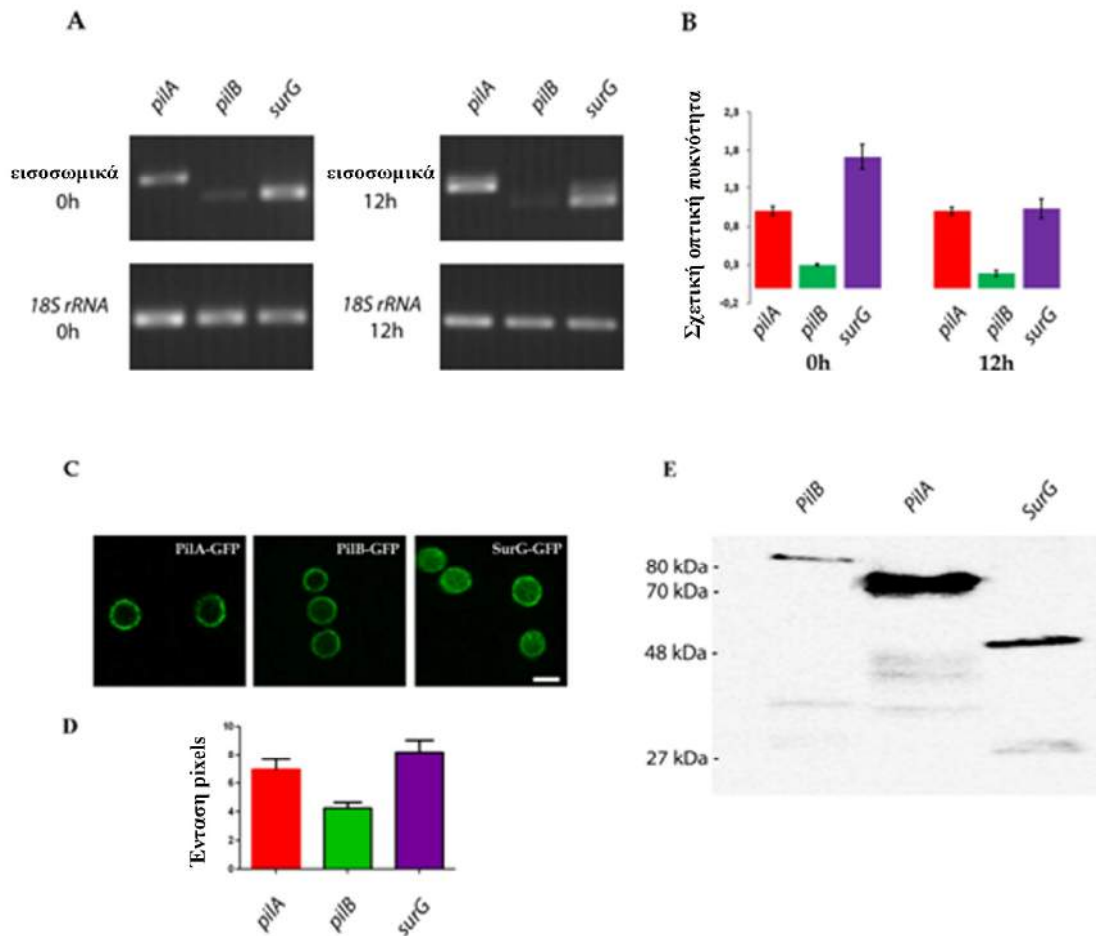


Εικόνα 3-45 Ο εντοπισμός της SurG-GFP σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του φυλετικού κύκλου του *A. nidulans*. Τομές συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης Laser (0.5 μm). Όλες εικόνες φθορισμού αποκτήθηκαν με την ίδια ένταση και τις ίδιες ρυθμίσεις λείζερ και ανιχνευτή. (A-D) Πολικές και ισημερινές τομές αδρανών ασκοσπορίων που εκφράζουν την SurG-GFP (0h) προσανατολισμένα παράλληλα με το ισημερινό επίπεδο (A-B) ή κάθετα (C-D) προς το επίπεδο xy, (E-F). Πολικές και ισημερινές τομές ασκοσπορίων που βρίσκονται στην ιστροπική φάση ανάπτυξης (5h) (G-H) και ασκοσπορίων που έχουν μόλις εκβλαστανεί. Ισημερινές τομές νεαρών υφών σε 10 ώρες, 12 ώρες, 14 ώρες και 16 ώρες (I-L, αντίστοιχα). Τα στελέχη αναπτύχθηκαν παρουσία 5 mM ουρίας και 1% w/v γλυκόζη σαν μοναδικές πηγές αζώτου και άνθρακα αντίστοιχα, στους 25 °C. Ο φθορισμός GFP παρουσιάζεται σε αντεστραμμένη κλίμακα του γκρι, οι συγχωνευμένες εικόνες του

φθορισμού και της αντίθεσης φάσης παρουσιάζονται ως χρωματιστές εικόνες. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μm . Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013.

3.3 Τα εισοσωμικά γονίδια εκφράζονται κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης των ασκοσπορίων

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των εισοσωμικών γονιδίων κατά την εκβλάστηση των ασκοσπορίων πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT-PCRs (συνδυασμός αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης) σε ολικό RNA από μη εκβλαστημένα ασκοσπόρια (0 ώρες) και νεαρές υφές εκβλαστημένων ασκοσπορίων (12 ώρες) του στελέχους φυσικού τύπου (**Εικόνα 3-53**). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα γονίδια *pilA* και *surG* εκφράζονται παρόμοια τόσο σε μη εκβλαστημένα ασκοσπόρια όσο και νεαρά μυκήλια ασκοσπορίων 12 ωρών. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *pilB* είναι ελαττωμένα σε σύγκριση με αυτά των γονιδίων *pilA* και *surG* στις αντίστοιχες συνθήκες ανάπτυξης. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις RT-PCRs αντιδράσεις ήταν αναμενόμενο να παράγουν προϊόντα από 376 bp (*pilA* cDNA), 286 bp (*pilB* cDNA), 272 bp (*surG* cDNA) και 280 bp (*18S rRNA* cDNA). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα ποσοτικοποίησης του φθορισμού των αντίστοιχων πρωτεϊνών, τα οποία προκύπτουν από τη ψηφιακή επεξεργασία των εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης Laser και την ανάλυση τους μέσω εξειδικευμένου λογισμικού (Image-Pro® Plus software) (**Εικόνα 3-46 C-D**). Η ανάλυση κατά Western ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (**Εικόνα 3-46 E**) μη εκβλαστημένων ασκοσπορίων (0 ώρες), χρησιμοποιώντας ένα αντι-GFP αντίσωμα (mouse anti-GFP μονοκλωνικό αντίσωμα, Roche), έδειξε ότι οι ζώνες που αντιστοιχούν σε πλήρους μήκους πρωτεΐνες PilA-GFP, PilB-GFP και SurG-GFP είναι παρούσες σε ασκοσπόρια με κατά προσέγγιση μοριακά βάρη 70 kDa, 80 kDa και 48 kDa αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο παρατηρούμενος φθορισμός αντιστοιχεί σε πλήρους μεγέθους PilA, PilB και SurG πρωτεϊνών. Μία ζώνη με μία φαινομενική μοριακή μάζα των 27 kDa που αντιστοιχεί στην πρωτεολυτική διάσπαση της ελεύθερης GFP στο κενोटόπιο, παρατηρείται μόνο σε στελέχη που εκφράζουν την πρωτεΐνη SurG-GFP (Athanasopoulos et al., 2013).

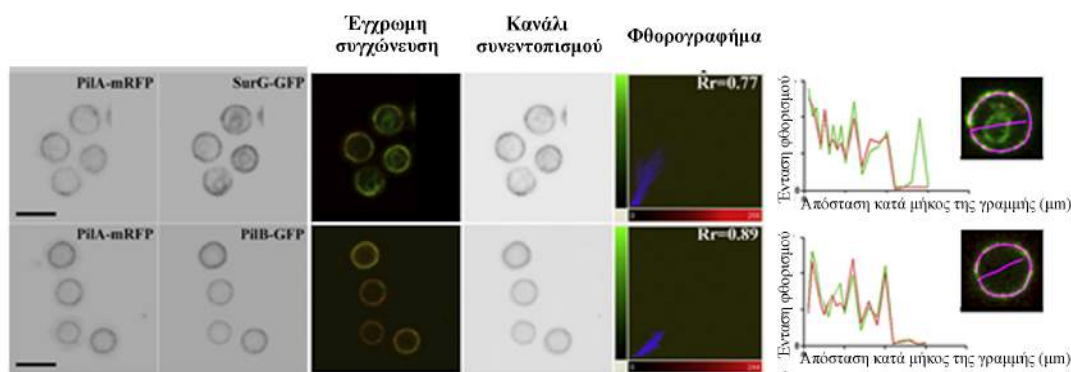


Εικόνα 3-46 Έκφραση των εισοσωμικών γονιδίων (*pilA*, *pilB* και *surG*) σε μη εκβλαστημένα ασκοσπόρια (0 ωρών) και νεαρές υφές εκβλαστημένων ασκοσπορίων (12 ωρών) με τη χρήση της ημι-ποσοτικής μεθόδου RT-PCR (A). Η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ. Όλες οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου *18S rRNA* (B). Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού σε μη εκβλαστημένα ασκοσπόρια (n = 10) που εκφράζουν τις εισοσωμικές πρωτεΐνες σημασμένες με GFP πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του εξειδικευμένου λογισμικού Image-Pro Plus (C-D), Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μm. Ανάλυση κατά Western σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (E) από μη εκβλαστημένα ασκοσπόρια (0 ωρών), χρησιμοποιώντας αντι-GFP μονοκλωνικό αντίσωμα (Roche). Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013.

3.3 Οι εισοσωμικές πρωτεΐνες συνεντοπίζονται κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης των ασκοσπορίων

Όπως προαναφέρθηκε οι εισοσωμικές πρωτεΐνες PilA, PilB και SurG, εντοπίζονται στην περιφέρεια των μη εκβλαστημένων ασκοσπορίων. Διερευνήθηκε

λοιπόν η πιθανότητα συνεντοπισμού τους κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν στελέχη που εκφράζουν τις εισοσωμικές πρωτεΐνες σημασμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP και παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **εικόνα 3-47** δείχνουν ότι η PilA συνεντοπίζεται τόσο με την PilB (συντελεστής Pearson ²⁰= 0,77) όσο και με τη SurG (συντελεστής Pearson = 0,89) στην περιφέρεια των ασκοσπορίων (βλέπε υλικά και μεθόδους). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε συνεντοπισμός της PilA με την περιπυρηνική περιοχή της SurG. Ο συνεντοπισμός των πρωτεϊνών επιβεβαιώνεται από το κανάλι συνεντοπισμού (**Εικόνα 3-47**), το οποίο προκύπτει από την ανάλυση και επεξεργασία των εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας με εξειδικευμένο λογισμικό και στο οποίο το σήμα που απεικονίζεται αντιστοιχεί μόνο στις περιοχές του κυττάρου όπου ο φθορισμός των πρωτεϊνών συνυπάρχει. Επίσης ο συνεντοπισμός των πρωτεϊνών επιβεβαιώνεται και από το γράφημα της ανάλυσης της έντασης φθορισμού των πρωτεϊνών κατά μήκος της άσπρης γραμμής.



Εικόνα 3-47 Συνεντοπισμός της PilA με την PilB και της PilA με τη SurG σε εκβλαστημένα ασκοσπόρια. Μετά την επεξεργασία των εικόνων με ένα διάμεσο φίλτρο, αναλύθηκε και προσδιορίστηκε ο βαθμός συνεντοπισμού των πρωτεϊνών με τη βοήθεια του εξειδικευμένου λογισμικού Imaris (Bitplane, Ζυρίχη, Ελβετία). Αντίστοιχες εικόνες συγχωνεύθηκαν (τρίτη στήλη), τα συνεντοπισμένα pixels εκπροσωπήθηκαν με γκρι χρώμα (τέταρτη στήλη) και τα scatterplots ²¹(φθορογραφήματα) της έντασης των εικονοστοιχείων

²⁰ Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson's correlation) είναι ένας από τους πλέον συχνά χρησιμοποιούμενους αλγόριθμους για να περιγράψει τη συσχέτιση κατανομής της έντασης φθορισμού σε διαφορετικά κανάλια (channels). Οι τιμές που παίρνουμε για τον συντελεστή αυτό κυμαίνονται μεταξύ -1.0 και 1.0, όπου το 0 δεν δείχνει σημαντική συσχέτιση, και το -1 δείχνει πλήρως αρνητική συσχέτιση

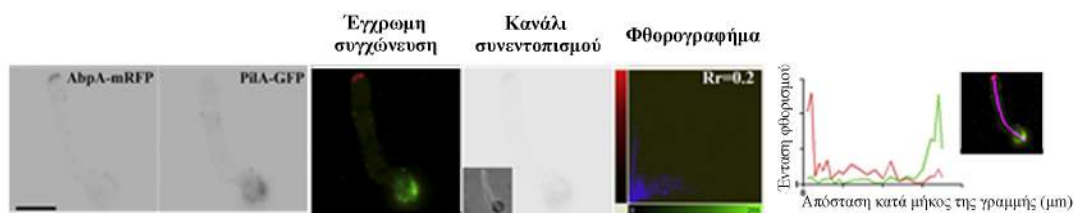
²¹ Τα αποτελέσματα μελετών συνεντοπισμού (colocalization) μπορούν επίσης να παρασταθούν γραφικά με φθορογραφήματα (scatterplots), όπου η ένταση ενός χρώματος παρίσταται γραφικά έναντι της έντασης του δεύτερου χρώματος για κάθε εικονοστοιχείο (pixel) της εικόνας. Η ύπαρξη

εκπροσωπήθηκαν από τους αντίστοιχους συντελεστές Pearson (Rr) (πέμπτη στήλη). Τέλος παρουσιάζεται η ανάλυση της έντασης φθορισμού κατά μήκος της γραμμής στα ενθέματα. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μm . Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013.

3.4 Οι PilA σχηματισμοί δεν αποτελούν πύλες/σημεία ενδοκύττωσης

Όπως έχει δειχθεί πρόσφατα από το εργαστήριό μας, οι στικτοί σχηματισμοί της PilA στις υφές των εκβλαστημένων κονιδιοσπορίων δεν συνεντοπίζονται με την χρωστική FM4-64 (Fischer-Parton et al., 2001; Peñalva, 2005), μάρτυρα για τη μελέτη της ενδοκύττωσης και τη διακίνηση κυστιδίων (Vangelatos et al., 2010). Ωστόσο, ένας αριθμός από πρόσφατες δημοσιεύσεις υποδεικνύουν ότι η χρήση της FM4-64 παρουσιάζει πολλές τεχνικές αλλοιώσεις. Για παράδειγμα, Ο Tanner και οι συνεργάτες παρατήρησαν ότι η προσθήκη FM4-64 σε κύτταρα που εκφράζουν την Can1-GFP (περμεάση της αργινίνης) στο *S. cerevisiae* προκαλεί ταχεία απώλεια της κατανομής άλλων περμεασών (Alvarez et al., 2008; Grossmann et al., 2008). Για το λόγο αυτό μελετήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία η κατανομή της πρωτεΐνης AbpA (Araujo-Bazán et al., 2008), ενός μάρτυρα ενδοκύττωσης μέσω κυστιδίων με κάλυμμα κλαθρίνης, σε σχέση με την κατανομή της PilA. Η πρωτεΐνη αυτή περιέχει τη χαρακτηριστική N-τελική περιοχή ADFH (actin-depolymerizing factor homology), με την οποία προσδένεται ειδικά στην ακτίνη και πιο συγκεκριμένα συνεντοπίζεται με κοκκία ακτίνης, αλλά όχι με τα ινίδια ακτίνης που διατρέχουν όλη την υφή (Araujo-Bazán et al., 2008). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **(Εικόνα 3-48)** δείχνουν ότι οι στικτοί σχηματισμοί της PilA δεν συνεντοπίζονται με τις εξαιρετικά κινητικές και στικτές δομές της AbpA (συντελεστής Pearson = 0.2), υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της PilA και της διαδικασίας ενδοκύττωσης μέσω κυστιδίων καλυμμένων με πλέγμα κλαθρίνης.

συνεντοπισμού (colocalization) βεβαιώνεται όταν τα εικονοστοιχεία εντοπίζονται γύρω/κοντά από μια ευθεία διαγώνιο γραμμή. Η έλλειψη συνεντοπισμού (colocalization) βεβαιώνεται όταν τα εικονοστοιχεία εντοπίζονται σε δύο χωριστές ομάδες, παράλληλα των αξόνων x και y (Dunn et al., 2011).

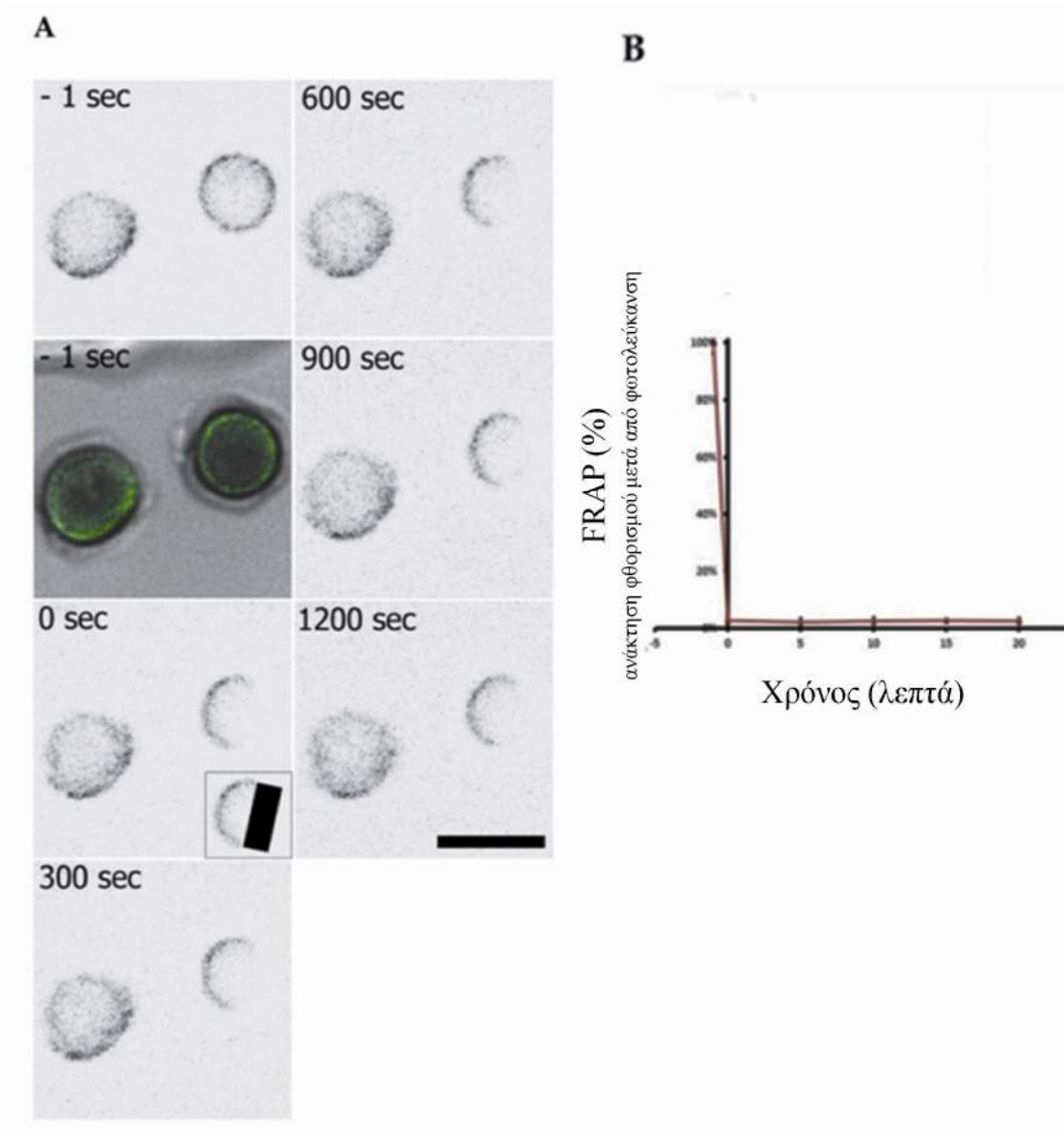


Εικόνα 3-48 Μελέτη του συνεντοπισμού της πρωτεΐνης AbpA με την εισωσωμική πρωτεΐνη PilA σε νεαρά μυκήλια. Μετά την επεξεργασία των εικόνων με ένα διάμεσο φίλτρο, αναλύθηκε και προσδιορίστηκε ο βαθμός συνεντοπισμού των πρωτεϊνών με τη βοήθεια του εξειδικευμένου λογισμικού Imaris (Bitplane, Ζυρίχη, Ελβετία). Αντίστοιχες εικόνες συγχωνεύθηκαν (τρίτη στήλη), τα συνεντοπισμένα pixels εκπροσωπήθηκαν με γκρι χρώμα (τέταρτη στήλη) και τα scatterplots (φθορογραφήματα) της έντασης των εικονοστοιχείων εκπροσωπήθηκαν από τους αντίστοιχους συντελεστές Pearson (Rr) (πέμπτη στήλη). Τέλος παρουσιάζεται η ανάλυση της έντασης φθορισμού κατά μήκος της γραμμής στα ενθέματα. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μm. Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013

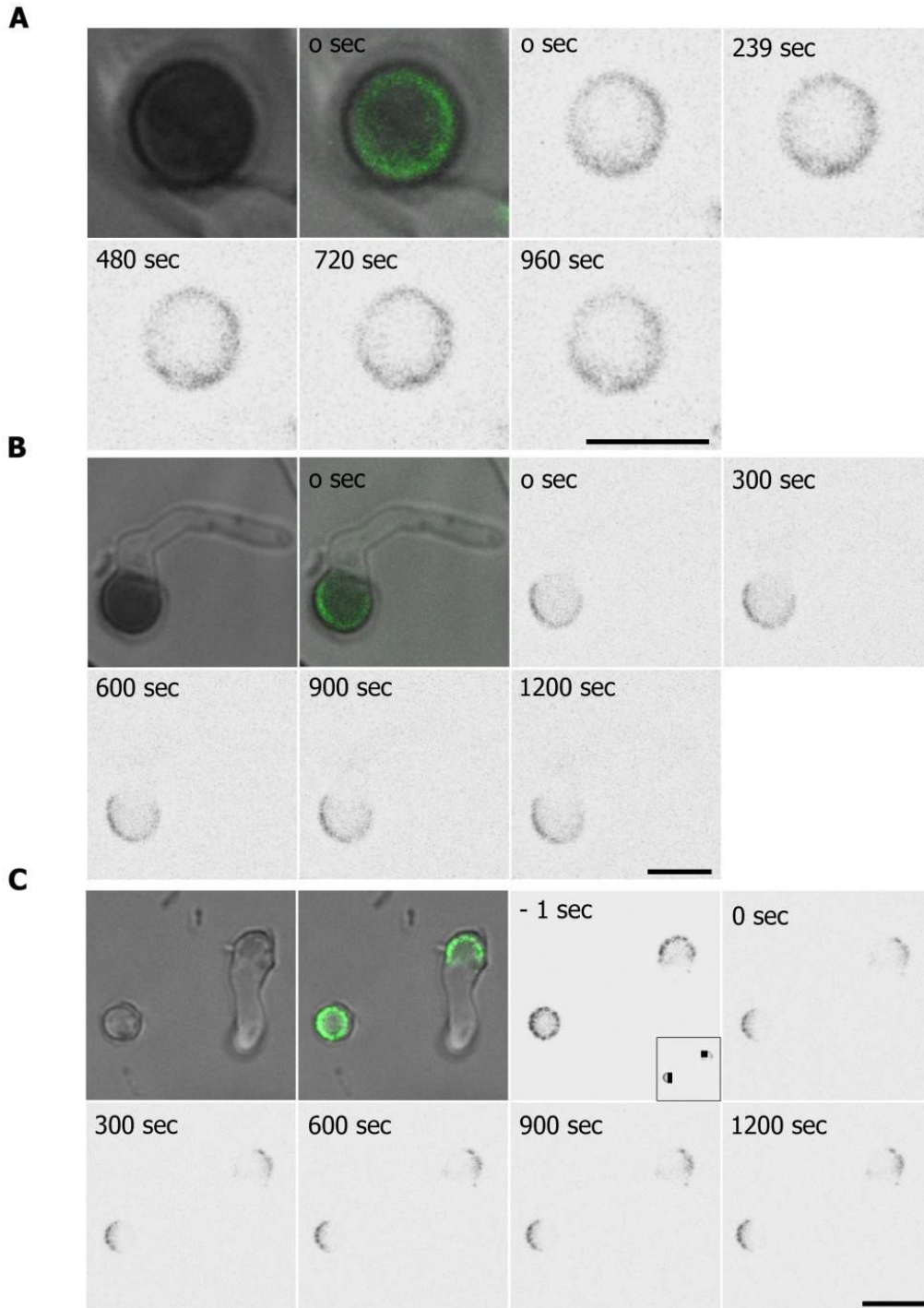
3.5 Η PilA σχηματίζει στατικές δομές στη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων του *A. nidulans*

Η πρωτεΐνη Pil1 στο *S. pombe* και η ομόλογη της στο *S. cerevisiae* έχει δειχθεί ότι σχηματίζουν στατικές δομές με εξαιρετικά χαμηλή κινητικότητα (Kabeche et al., 2011). Χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μικροσκοπίας διακεκομμένης μαγνητοσκόπησης (time-lapse) και ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτολευκανση²² (FRAP) σε μη εκβλαστημένα ασκοσπόρια (0 ωρών) και σε νεαρές υφές εκβλαστημένων ασκοσπορίων (12 ωρών), με σκοπό τη μελέτη των κινητικών ιδιοτήτων της σημασμένης με GFP εισωσωμικής πρωτεΐνης PilA. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 3-49 και 3-50 δείχνουν, ότι τα μόρια της PilA-GFP στην περιφέρεια των εκβλαστημένων και μη ασκοσπορίων/κονιδίων δεν ανταλλάσσονται με τον κυτταροπλασματικό πληθυσμό, σχηματίζοντας συνεπώς στατικές δομές με εξαιρετικά χαμηλή κινητικότητα. Τα πειράματα επαναληφθήκαν τρεις φορές και δεν παρατηρήθηκε φθορισμός στη φωτολευκανθείσα περιοχή στο διάστημα των 20 λεπτών αξιολόγησης (Athanasopoulos et al., 2013).

²² Όλες οι βιολογικές φθορίζουσες χρωστικές (fluorescence dyes) εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από υπεριώδη ακτινοβολία. Αν η διέγερση πραγματοποιηθεί με χρήση φωτός υψηλής έντασης, τότε εμφανίζεται το φαινόμενο της λεγόμενης 'φωτολευκανσης' (photobleaching), της αναστολής δηλαδή της φθορίζουσας ιδιότητας των χρωστικών.



Εικόνα 3-49 Η Pi1A-GFP σχηματίζει στατικές δομές στην περιφέρεια των ασκοσπορίων
(A) Μη εκβλαστημένα ασκοσπόρια που εκφράζουν την πρωτεΐνη Pi1A-GFP διεγέρθηκαν με χρήση φωτός υψηλής εντάσεως (488 nm). Ο φθορισμός δεν ανακτήθηκε κατά τη διάρκεια των 20 λεπτών του πειράματος **(B)** Ποσοτικοποίηση της ανάκτησης φθορισμού. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μ m. Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013.



Εικόνα 3-50 (Α-Β) Μικροσκοπία διακεκομμένης μαγνητοσκόπησης (time-lapse) σε εκβλαστημένα και αδρανή ασκοσπόρια που εκφράζουν την πρωτεΐνη Pi1A-GFP για 1200 και 960 δευτερόλεπτα αντίστοιχα. (C) Τεχνική ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP) σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια (0 ωρών) και σε νεαρές υφές εκβλαστημένων κονιδιοσπορίων (12 ωρών) που εκφράζουν την πρωτεΐνη Pi1A-GFP για 1200 δευτερόλεπτα. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μm . Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2013.

3.6 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων στελεχών

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός γονιδίων στον οργανισμό που τα εκφράζει, μπορεί να προσεγγιστεί μέσω δύο διαφορετικών κατευθύνσεων: της ανενεργοποίησης/απαλοιφής ή της υπερέκφρασης του προς μελέτη γονιδίου (Yu *et al.*, 2004). Σε κάθε περίπτωση, αναζητούνται οι συνθήκες, εφόσον υπάρχουν, στις οποίες ο φαινότυπος του μεταλλαγμένου στελέχους διαφοροποιείται από αυτόν του στελέχους φυσικού τύπου. Οι συνθήκες αυτές μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για τη ή τις λειτουργίες που επιτελεί το προϊόν του προς μελέτη γονιδίου στο κύτταρο. Στην προσπάθεια διερεύνησης του βιολογικού ρόλου των εισοσωμικών πρωτεϊνών μελετήθηκε ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός στελεχών με *pilA*, *pilB*, και *surG* μονές ή συνδυασμένες απαλοιφές, και του στελέχους στο οποίο έχει γίνει ταυτόχρονη απαλοιφή και των τριών εισοσωμικών γονιδίων (*pilAΔpilBΔsurGΔ*) (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Δεν παρατηρήθηκε αναπτυξιακός φαινότυπος σε κάποιο από τα στελέχη στις παρακάτω συνθήκες: 25, 37 ή 42 °C σε πλήρες ή ελάχιστο θρεπτικό μέσο, υπερωσμωτικές, όξινες ή βασικές συνθήκες pH. Επιπλέον, το τριπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *pilAΔpilBΔsurGΔ* δε φάνηκε να διαφοροποιείται όσον αφορά την εγκαθίδρυση της πολικότητας από ένα στέλεχος φυσικού τύπου στους 25, 37 ή 42 °C. Η πιθανή συμμετοχή των εισοσωμικών πρωτεϊνών στο φυλετικό κύκλο (διαδικασία της μείωσης) του *A. nidulans*, μελετήθηκε με γενετικές διασταυρώσεις του στελέχους *pilAΔpilBΔsurG*. Διαπιστώθηκε, ότι ο αριθμός και το μέγεθος των παραγόμενων κλειστοθηκίων ήταν φυσιολογικός, ότι τα διασταυρωμένα κλειστοθήκια περιείχαν βιώσιμα ασκοσπόρια και τα εισοσωμικά αλληλόμορφα διαχωρίζονται στους απογόνους, σύμφωνα με τους νόμους του Μέντελ. Το στέλεχος *pilAΔpilBΔsurGΔ* ελέγχθηκε επιπλέον για ευαισθησία σε ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα με την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (Binder *et al.*, 2010) όπως καφεΐνη, Congo red (CR) και Calcofluor white (CFW), συνθήκες ανάπτυξης στις οποίες δεν εντοπίστηκαν ευδιάκριτες διαφορές σε σχέση με ένα στέλεχος φυσικού τύπου.

Είναι γνωστό ότι η παρουσία αμμωνιακών έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκύττωση ενός μεγάλου αριθμού μεταφορέων που εμπλέκονται στην πρόσληψη διαφορετικών πηγών αζώτου. Γι αυτό το λόγο ελέγχθηκε η κατανομή και πρότυπο

ενδοκύττωσης από ιόντα αμμωνίου του μεταφορέα AgtA (μεταφορέας δικαρβοξυλικών αμινοξέων) (Apostolaki et al., 2009) και του κυρίου μεταφορέα προλίνης PrnB σε στελέχη φυσικού τύπου και στο τριπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *pilAΔpilBΔsurGΔ*.

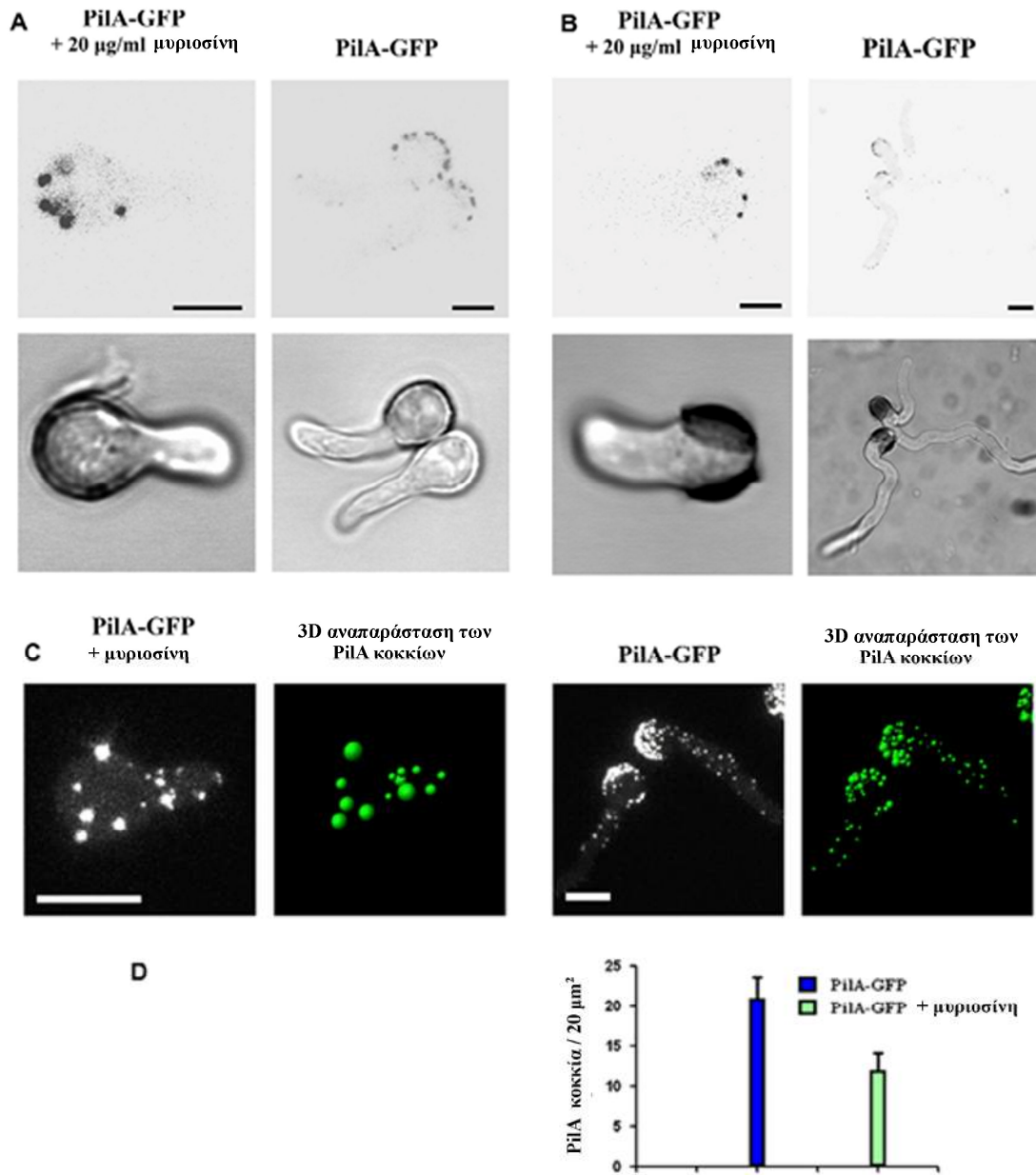
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πρότυπο ενδοκύττωσης των μεταφορέων αμινοξέων είναι παρόμοιο σε όλα τα στελέχη, φυσικού τύπου η μεταλλαγμένα. Υποδεικνύοντας ότι οι εισοσωμικές πρωτεΐνες δεν εμπλέκονται στην NH₄⁺-εξαρτώμενη ενδοκύττωση των μεταφορέων αμινοξέων AgtA και PrnB.

3.7 Η κυτταρική κατανομή της PilA εξαρτάται από τα επίπεδα των σφιγγολιπιδίων

Δεδομένου ότι τα *pilAΔ* στελέχη παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ιτρακοναζόλη²³ (Vangelatos et al., 2010), δεδομένου ότι η PilA πρωτεΐνη δεν εμπλεκείται με την ενδοκύττωση, βασιζόμενοι σε βιβλιογραφικές αναφορές (Grossmann et al., 2008, 2006a; Malínská et al., 2003) αλλά και στο γεγονός οι εισοσωμικοί σχηματισμοί ενδεχομένως αποτελούν λιπιδικές σχεδίες (περιοχές της πλασματικής μεμβράνης πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και εργοστερόλη), μελετήθηκε η κατανομή της πρωτεΐνης PilA σε στελέχη τα οποία είχαν πρόβλημα στο να βιοσυνθέτουν σφιγγολιπίδια. Δείχθηκε ότι η μυριοσίνη (Meyer et al., 2012) (myriocin - Sigma), ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος αναστολέας της βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων (αναστολέας της σερίνη-παλμιτοϋλοτρανσφεράσης, του ενζύμου που καταλύει το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση των σφιγγολιπιδίων) προκαλεί σημαντική αλλαγή στο πρότυπο κατανομής της PilA στην περιφέρεια μη εκβλαστημένων ασκοσπορίων/κονιδίων καθώς και στα PilA κοκκία των νεαρών υφών εκβλαστημένων ασκοσπορίων/κονιδίων (12 ωρών). Πιο συγκεκριμένα, η PilA κατανέμεται υπό μορφή πυκνών στικτών σχηματισμών στην περιφέρεια των μη

²³ Η ιτρακοναζόλη (itraconazole) είναι ένα τριαζολικό παράγωγο που αναστέλλει τη σύνθεση της εργοστερόλης στα κύτταρα των μυκήτων. Η εργοστερόλη είναι ένα θεμελιώδες συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων. Η παρεμπόδιση της σύνθεσης της εργοστερόλης τελικά καταλήγει σε αντιμυκητιασική δράση.

εκβλαστημένων ασκοσπορίων/κονιδίων και στη κεφαλή αλλά και κατά μήκος της υφής σε νεαρά μυκήλια, παρουσία μυρισίνης ο αριθμός των PilA-GFP κηλίδων ελαττώνεται σημαντικά στην κεφαλή νεαρών υφών ενώ παρατηρείται ταυτόχρονη μικρή αύξηση του κυτταροπλασματικού φθορισμού (Εικόνα 3-51).

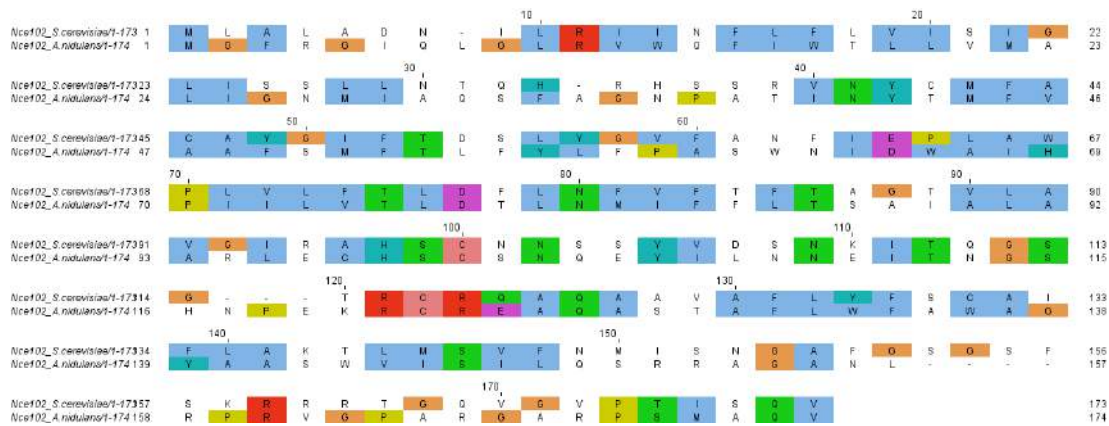


Εικόνα 3-51 Παρουσία μυρισίνης ο αριθμός των PilA-GFP κοκκίων ελαττώνεται σημαντικά ενώ παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση του κυτταροπλασματικού φθορισμού σε εκβλαστημένα ασκοσπόρια/κονίδια (A-B). Τα κοκκία PilA ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Imaris (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) (C). Στο γράφημα παρουσιάζεται η πυκνότητα των PilA κοκκίων ανά 20 μm² (D). Κλίμακα μεγέθυνσης: 5 μm Προσαρμογή από Athanassopoulos et al., 2013.

3.8 Η πρωτεΐνη AnNce102 του *A. nidulans* συνεντοπίζεται με τα εισοσώματα

In silico ανάλυση στο γονιδίωμα του *A. nidulans*, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνη Nce102 του *S. cerevisiae*, οδήγησε στην ταυτοποίηση μιας πολύ υψηλά συντηρημένης αμινοξικής αλληλουχίας που ονομάστηκε AnNce102. Το γονίδιο *annce102* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα IV του μύκητα. Περιλαμβάνει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μήκους 633 ζευγών βάσεων που κωδικοποιεί μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 174 αμινοξικών καταλοίπων, την πρωτεΐνη Nce102. Το γονίδιο *nce102* έχει 2 εσώνια μήκους 54 και 52 ζευγών βάσεων (μεταξύ των νουκλεοτιδικών θέσεων +43-+97 και +365-+417, αντίστοιχα, ως προς το νουκλεοτίδιο αδερίνης στη θέση +1 του κωδικονίου έναρξης ATG). Η AnNce102 εμφανίζει 33% αμινοξική ταυτότητα και 53% ομοιότητα με την πρωτεΐνη Nce102 του *S. cerevisiae* και προβλεπόμενη μοριακή μάζα 19.4 kDa (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) (Εικόνα 3-52). Η AnNce102 έχει τέσσερις διαμεμβρανικές α-έλικες, που σχηματίζουν μια πρωτεϊνική περιοχή, η οποία ονομάζεται MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link) (PFAM domain PF01284; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>).

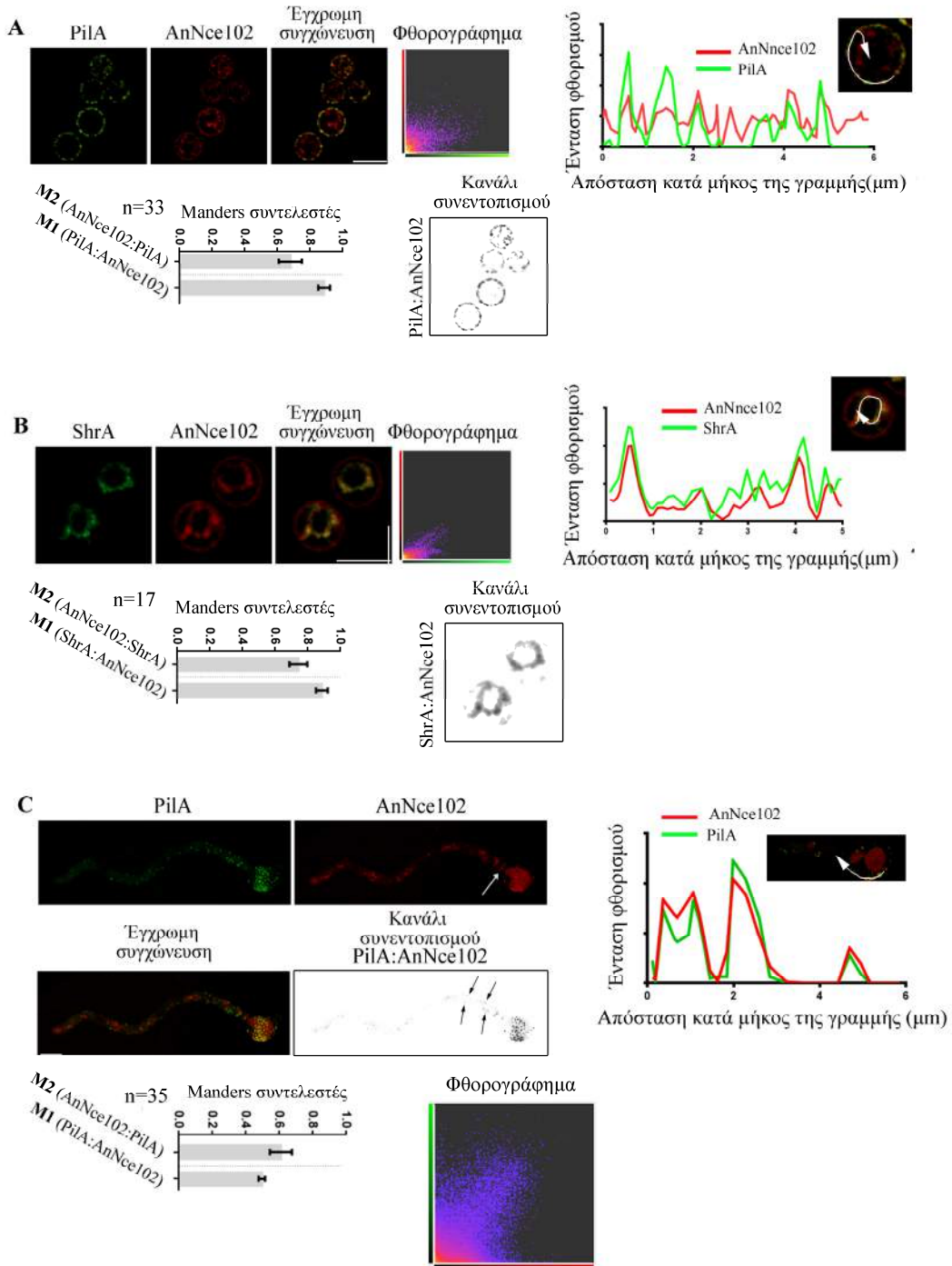
Στα ζωικά κύτταρα, η οικογένεια των MARVEL πρωτεϊνών περιλαμβάνει τη μυελίνη, φυσίνες (physins), γυρίνες (gyrins) και οκλουντίνες (occludins). Οι πρωτεΐνες MARVEL, έχει προταθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη δημιουργία κυστιδίων μεταφοράς και στενοσυνδέσμων. Παρόλο που η ακριβής λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι γνωστή, φαίνεται να παίζουν σημαντικούς ρόλους, εφόσον μεταλλαγές στα γονίδια που τις κωδικοποιούν έχουν συσχετιστεί με σοβαρές ασθένειες (Douglas et al., 2013, p. 102).

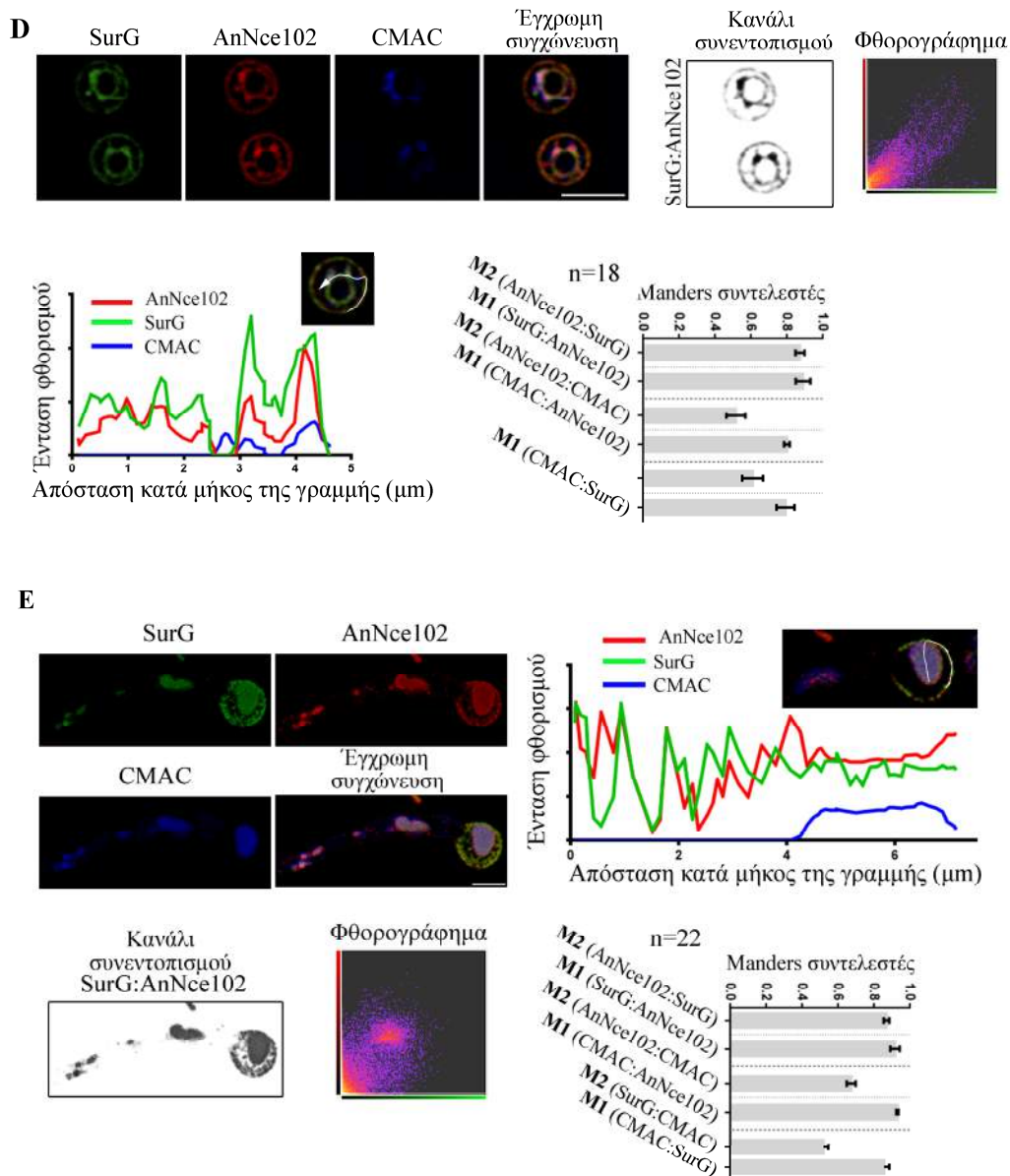


Εικόνα 3-52 Στοιχισμός της αλληλουχίας Nce102 του *S. cerevisiae* με την ομόλογη πρωτεΐνη του *A. nidulans*, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα T-coffee.

Η σύζευξη γονιδίων του *A. nidulans* με γονίδια που κωδικοποιούν για φθορίζουσες πρωτεΐνες καθώς και η γονιδιακή ανενεργοποίηση βασίζονται στη γονιδιακή αντικατάσταση των υπό μελέτη γονιδίων με κασέτες σήμανσης που είναι κατά προτίμηση γραμμικές μοριακές κατασκευές (Nayak, 2005). Στην παρούσα εργασία, οι κασέτες σήμανσης *annce102::sgfp* (πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη - **Green fluorescent protein**) και *annce102::mrfp* (μονομερής κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη - **monomeric red fluorescent protein**) κατασκευάστηκαν με Double-Joint PCR (D-J PCR), μια μέθοδο *in vitro* ανασυνδυασμού τριών μορίων DNA. Αρχικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι η πρωτεΐνη AnNce102 σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια του *A. nidulans* εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη. Καθώς οι κύριες εισοσωμικές πρωτεΐνες PilA, PilB και SurG, εντοπίζονται και αυτές στην περιφέρεια των μη εκβλαστημένων κονιδιοσπορίων, διερευνήθηκε ο συνεντοπισμός τους με την AnNce102. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν στελέχη που εκφράζουν ταυτόχρονα είτε τις PilA-mRFP και AnNce102-GFP είτε τις SurG-GFP και AnNce102-mRFP, και μελετήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία laser. Η πρωτεΐνη AnNce102 σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη όπου συνεντοπίζεται με την PilA και εν μέρει εντοπίζεται επιπλέον και στο υπόλοιπο της μεμβράνης (**Εικόνα 3-59A**). Επιπρόσθετα, η AnNce102 εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικές δομές που μοιάζουν με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), όπως φαίνεται από το συνεντοπισμό της με την πρωτεΐνη ShrA, η οποία αποτελεί μάρτυρα του ενδοπλασματικού δικτύου (Erparazoglou et al., 2006) (**Εικόνα 3-59B**). Κατά την περίοδο της ιστροπικής αύξησης ο περιπυρηνικός φθορισμός της AnNce102 αρχίζει

να ελαττώνεται και εξαφανίζεται λίγο πριν την εμφάνιση του σωλήνα εκβλάστησης. Σε νεαρές υφές, η πρωτεΐνη περιορίζεται στα εισοσώματα της κεφαλής και τα χυμοτόπια (συνεντοπισμός με τη χρωστική CMAC {7-amino-4-chloromethylcoumarin} που βάφει επιλεκτικά τα όξινα χυμοτόπια). Επιπλέον, η AnNce102 σαφώς ανιχνεύεται στα διαφράγματα (**Εικόνα 3-53C**, μαύρο βέλος) και συνεντοπίζεται με την PilA σε μερικά κοκκία κατά μήκος της υφής (**Εικόνα 3-53C**, άσπρα βέλη). Αυτή η χρονική και χωρική κατανομή της AnNce102 είναι παρόμοια με εκείνη της εισοσωμικής πρωτεΐνης SurG, όπως εξάλλου επιβεβαιώνεται από τους υψηλούς συντελεστές συνεντοπισμού Manders (βλέπε παράγραφο 2.17.4).





Εικόνα 3-53 Η πρωτεΐνη AnNce102 συνεντοπίζεται με την PiiA και τη SurG. Εικόνες συνεκτικής μικροσκοπίας και μελέτη συνεντοπισμού (βλέπε υλικά και μεθόδους) της (A) AnNce102/PiiA σε αδρανή κονιδιοσπóρια, (B) AnNce102/ShrA σε αδρανή κονιδιοσπóρια, (C) AnNce102/PiiA σε νεαρές υφές 14 ωρών (D) AnNce102/SurG σε αδρανή κονιδιοσπóρια και (E) και AnNce102/SurG σε νεαρές υφές 14 ωρών. Κάθε σύνολο δεδομένων (A, B, C, D και E) περιέχει ένα φθορογράφημα²⁴ (2D ιστογράμμο/scatterplot - για τη συσχέτιση των 2 καναλιών/φθοριοχρωμάτων). Ο συνεντοπισμός δείχνεται ως νέο κανάλι (το οποίο αντιστοιχεί μόνο στα voxels²⁵ που συνεντοπίζονται). Τα ιστογράμματα δείχνουν τους συντελεστές Manders (M1 και M2) (βλέπε υλικά και μεθόδους). Το n παριστά τον αριθμό των κυττάρων

²⁴ Τα αποτελέσματα μελετών συνεντοπισμού (colocalization) μπορούν επίσης να παρασταθούν γραφικά με φθορογραφήματα (scatterplots), όπου η ένταση ενός χρώματος παρίσταται γραφικά έναντι της έντασης του δεύτερου χρώματος για κάθε εικονοστοιχείο (pixel) της εικόνας. Η ύπαρξη συνεντοπισμού (colocalization) βεβαιώνεται όταν τα εικονοστοιχεία εντοπίζονται γύρω/κοντά από μια ευθεία διαγώνιο γραμμή. Η έλλειψη συνεντοπισμού (colocalization) βεβαιώνεται όταν τα εικονοστοιχεία εντοπίζονται σε δύο χωριστές ομάδες, παράλληλα των αξόνων x και y (Dunn et al., 2011).

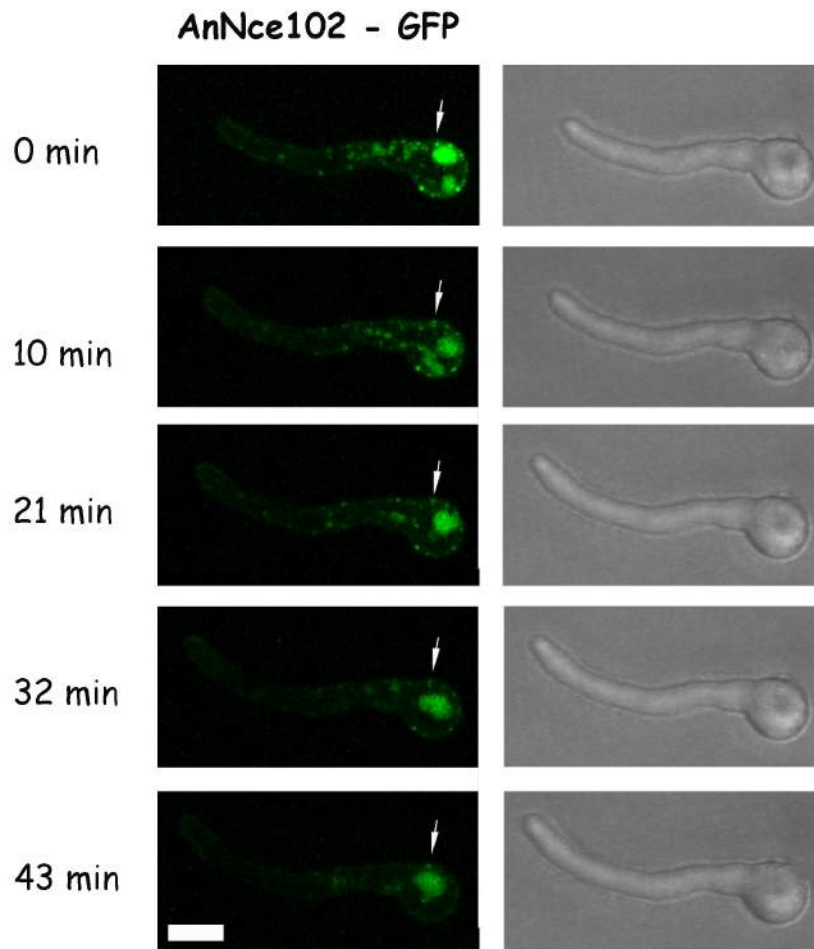
²⁵ Τα voxels, ορίζονται ως η τρισδιάστατη παράταξη δεδομένων των στοιχείων-όγκου.

που εξετάστηκαν σε τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. Τέλος παρουσιάζεται η ανάλυση της έντασης φθορισμού κατά μήκος της άσπρης γραμμής για κάθε σύνολο δεδομένων. Κλίμακα μεγέθυνσης: 5 μm . Προσαρμογή από Athanasopoulos et al., 2015.

3.9 Η AnNce102 σχηματίζει στατικές δομές

Όπως προαναφέρθηκε τα εισοσώματα αποτελούν στατικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, με σχετικά ομοιόμορφο μέγεθος, που περιλαμβάνουν χιλιάδες αντίγραφα των κύριων εισοσωμικών πρωτεϊνών Pil1 και Lsp1 (ή των ομολόγων τους πρωτεϊνών στους ασκομύκητες).

Χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μικροσκοπίας διακεκομμένης μαγνητοσκόπησης (time-lapse) σε νεαρές υφές εκβλαστημένων κονιδιοσπόριων (12-14 ωρών), με σκοπό τη μελέτη των κινητικών ιδιοτήτων της σημασμένης με GFP πρωτεΐνης AnNce102. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **εικόνα 3-54** δείχνουν, ότι τα μόρια της AnNce102-GFP στην περιφέρεια των εκβλαστημένων σχηματίζουν στατικές δομές στη πλασματική μεμβράνη νεαρών υφών. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνεντοπισμού και κινητικών ιδιοτήτων, υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη AnNce102 αποτελεί μέρος του εισοσωμικού συμπλόκου στον *A. nidulans*.

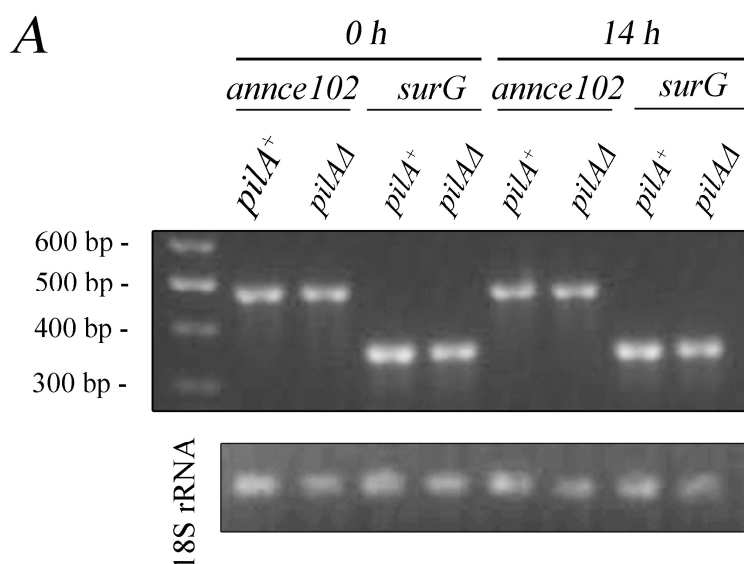


Εικόνα 3-54 Μικροσκοπία διακεκομμένης μαγνητοσκόπησης (time-lapse) σε νεαρές υφές 14 ωρών που εκφράζουν την πρωτεΐνη AnNce102-GFP για 44 λεπτά. Το άσπρο βέλος δείχνει ένα AnNce102 κοκκίο στη κεφαλή της υφής το οποίο, παραμένει σταθερό για περισσότερο από 44 λεπτά. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μm . Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

3.10 Η PilA είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα των πρωτεϊνών AnNce102 και SurG

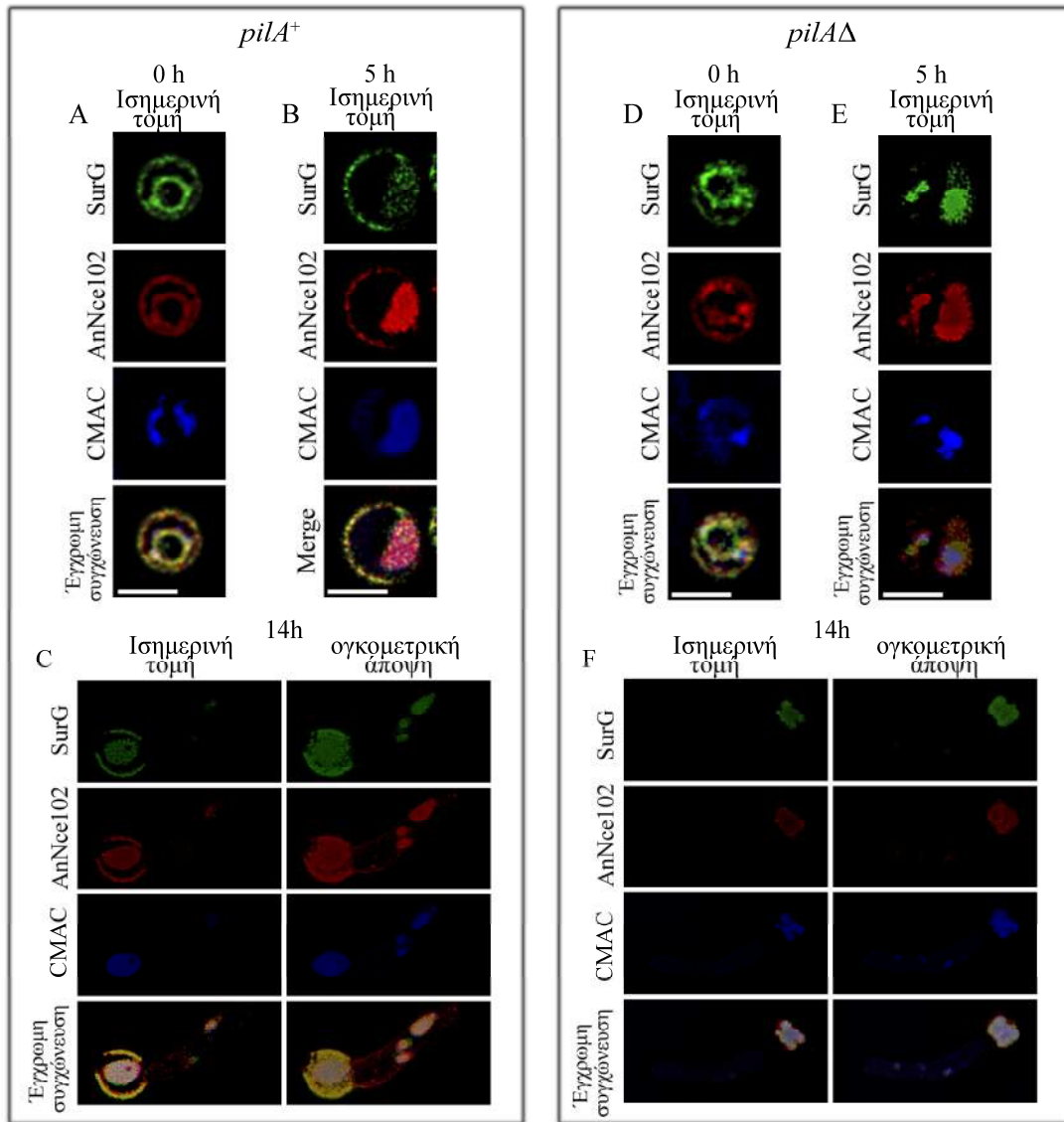
Στο ζυμομύκητα η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την εισοσωμική πρωτεΐνη Pil1 διαταράσσει την κυτταρική κατανομή των περιοχών MCCs και των υπολοίπων εισοσωμικών πρωτεϊνών που έχουν διερευνηθεί μέχρι σήμερα. Στα *pil1Δ* στελέχη οι MCC στικτοί σχηματισμοί συνενώνονται σε έναν ή περισσότερους κοκκιώδεις σχηματισμούς που αναφέρονται ως εισοσωμικά

υπολείμματα/απομεινάρια (eisosome remnants) (Grossmann et al., 2006a; Walther et al., 2006), ενώ οι πρωτεΐνες Sur7 και Nce102 κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλη την πλασματική μεμβράνη (Frohlich et al., 2009; Walther et al., 2006).



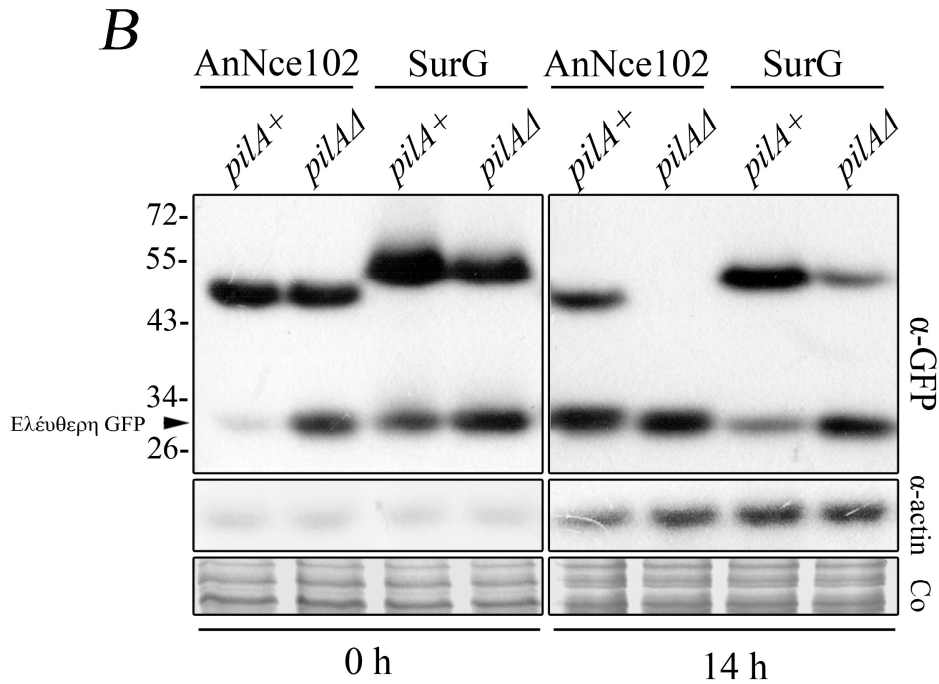
Εικόνα 3-55 (A) Έκφραση των εισοσωμικών γονιδίων (*annce102* και *surG*) σε αδρανή κονιδιοσπόρια (0 ωρών) και νεαρές υφές (14 ωρών) από *pilA*⁺ και *pilA*Δ στελέχη (με τη χρήση της ημι-ποσοτικής μεθόδου RT-PCR). Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με τη μέθοδο της RT-PCR (συνδυασμός αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης) των γονιδίων *annce102* και *surG* σε φυσικού τύπου και *pilA*Δ στελέχη σε αδρανή κονιδιοσπόρια 0 ωρών και νεαρές υφές 14 ωρών έδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα των μεταγράφων των γονιδίων αυτών (Εικόνα 3-55). Πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η απαλοιφή του γονιδίου *pilA* οδηγεί σε μικρή μείωση του φθορισμού της σημασμένης με GFP SurG εισοσωμικής πρωτεΐνης και της σημασμένη με mRFP AnNce102 πρωτεΐνης από την πλασματική μεμβράνη αδρανών κονιδιοσπορίων (0 ωρών) και σε πλήρη απουσία φθορισμού αυτών των πρωτεϊνών από την πλασματική μεμβράνη των νεαρών υφών (Εικόνα 3-56). Με τις πρωτεΐνες AnNce102 και SurG εντοπίζονται αποκλειστικά στα χυμοτόπια (συνεντοπισμός με τη χρωστική CMAC {7-amino-4 chloromethylcoumarin} που βάφει επιλεκτικά τα όξινα χυμοτόπια).



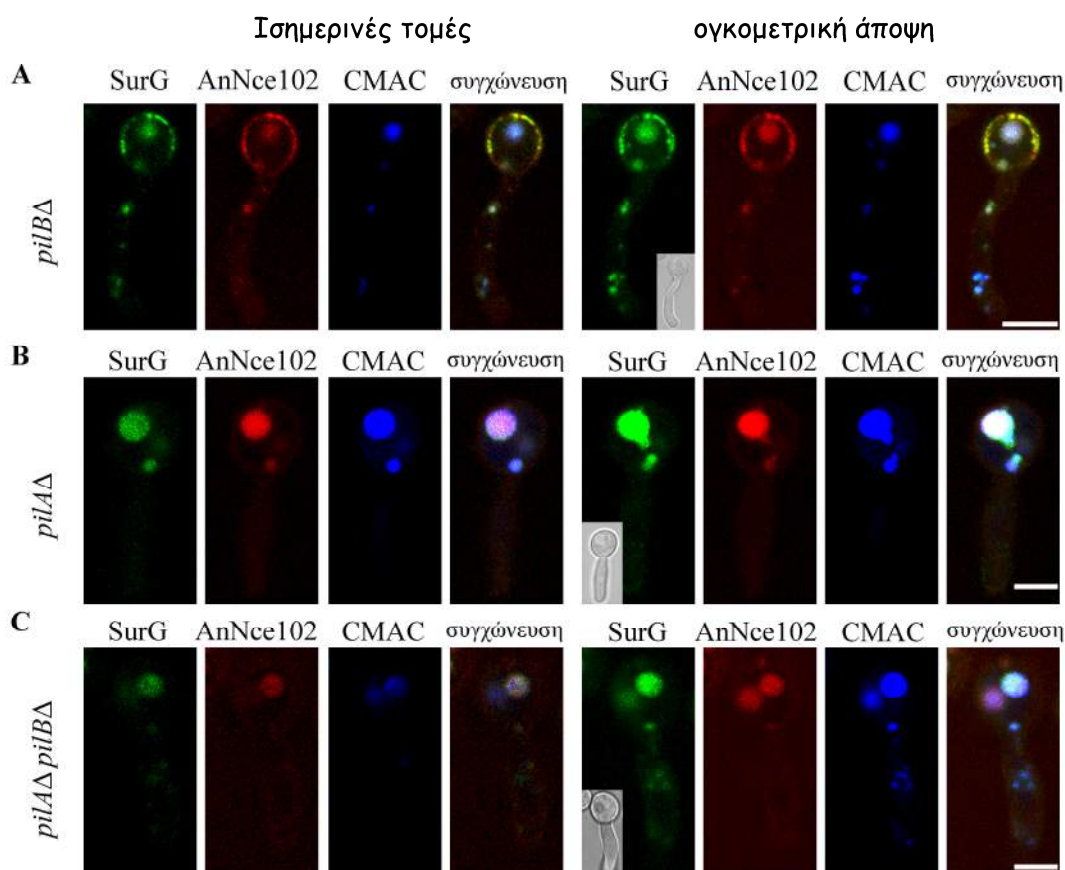
Εικόνα 3-56 Η πρωτεΐνη PilA είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα των πρωτεϊνών AnNce102 και SurG. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser των SurG-GFP και AnNce102-mRFP σε αδρανή κονίδια (0 ωρών), κονίδια στην ισοτροπική φάση ανάπτυξης (5 ωρών) και νεαρές υφές (14 ωρών) σε *pilA*⁺ (A-C) και *pilAΔ* (D-F) στελέχη.). Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μm. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μελέτες ανοσοαποτύπωσης των AnNce102-GFP και SurG-GFP πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αδρανών κονιδίων (0 ώρες ανάπτυξης) και νεαρών μυκηλίων (14 ώρες ανάπτυξης). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε στελέχη *pilAΔ* το σήμα από ζώνες που αντιστοιχούν σε πλήρους μήκους AnNce102-GFP και SurG-GFP είναι μειωμένο σε αδρανή κονίδια και σχεδόν εξαφανίζεται σε νεαρά μυκήλια (Εικόνα 3.57).



Εικόνα 3-57 (B) Ανοσοαποτύπωση των SurG και AnNce102 που απομονώθηκαν από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αδρανών κονιδίων (0 ωρών) και νεαρών υφών (14 ωρών) από *pilA+* και *pilAΔ* στελέχη. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

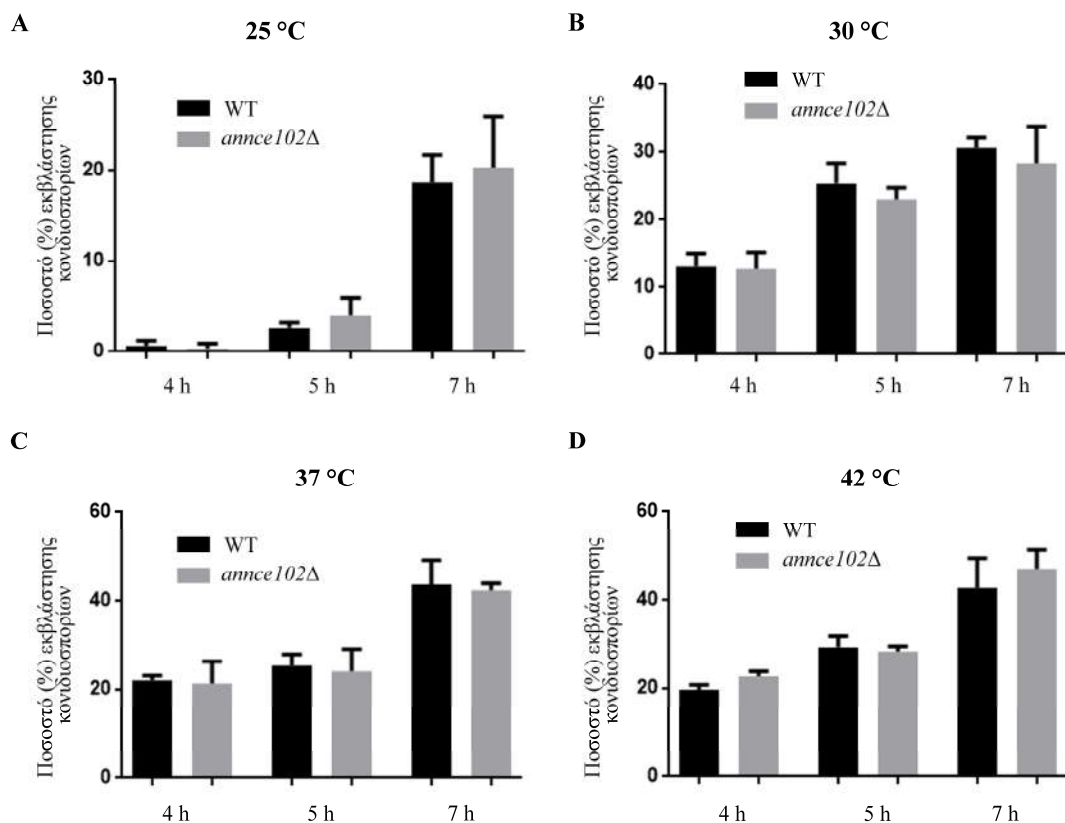
Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η απαλοιφή του γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί για τη εισσωμική πρωτεΐνη PilB δεν επηρεάζει τον εντοπισμό στη μεμβράνη των πρωτεϊνών AnNce102 και SurG σε νεαρές υφές, ενώ τα διπλά μεταλλαγμένα *pilAΔpilBΔ* δεν έδειξαν καμία διαφορά από *pilAΔ* στέλεχος όσον αναφορά την τοπολογία των AnNce102 και SurG πρωτεϊνών (**Εικόνα 3-60**). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η PilA διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη σταθερότητα των AnNce102 και SurG πρωτεϊνών καθώς και ότι η οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης απαιτεί την εισσωμική πρωτεΐνη PilA.



Εικόνα 3-58 Η απαλοιφή του γονιδίου της PilB εισοσωμικής πρωτεΐνης δεν επηρεάζει τον εντοπισμό των πρωτεϊνών AnNce102 και SurG σε νεαρές υφές. Εικόνες συνενστίωσης μικροσκοπίας στελεχών (14 ωρών) που εκφράζουν την AnNce102-mRFP και την SurG-GFP σε (A) *pilBΔ*, (B) *pilAΔ* και (C) *pilBΔ pilAΔ*, γενετικό υπόβαθρο. Κλίμακα μεγέθυνσης : 5 μ m. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

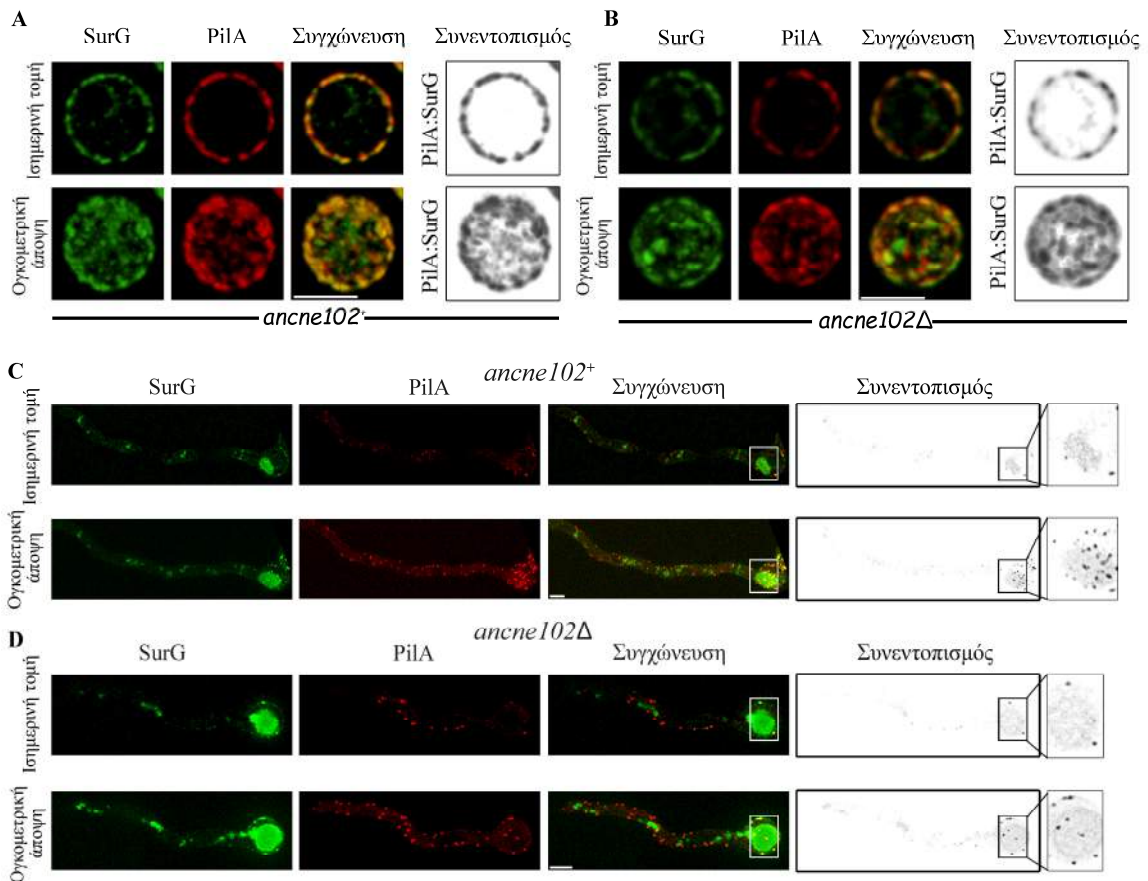
3.11 Απαλοιφή του γονιδίου *annce102* οδηγεί σε μείωση του αριθμού των εισοσωμάτων στην κεφαλή των νεαρών υφών

Δοκιμασίες ανάπτυξης στελεχών του *A. nidulans* με απαλοιφή του γονιδίου *annce102Δ* δείχνουν ότι τα στελέχη αυτά αναπτύσσονται παρόμοια με στελέχη φυσικού τύπου στους 25, 30, 37 και 42 °C. Επιπλέον, κονίδια του στελέχους *annce102Δ* παρουσιάζουν εγκαθίδρυση πολικότητας - χρόνο εμφάνισης του βλαστικού σωλήνα - παρόμοιο με εκείνον στελεχών φυσικού τύπου (Εικόνα 3-59).



Εικόνα 3-59 Ποσοστό εκβλάστησης κονιδίων στελεχών φυσικού τύπου και *annce102Δ* στελεχών σε διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης. Περίπου 10^3 κονίδια στελεχών φυσικού τύπου και *annce102Δ* στελεχών εμβολιάστηκαν πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες με την παρουσία 5 mM ουρίας και 1% (w / v) γλυκόζης σαν μοναδική πηγή αζώτου και άνθρακα, αντίστοιχα και επώαστηκαν στους 25 °C, 30°C, 37°C και 42°C (A, B, C και D, αντίστοιχα). Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε διάφορα χρονικά διαστήματα (4, 5 και 7 ώρες) και παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα Axioptan 2 μικροσκόπιο (Carl Zeiss, Inc.). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των εικόνων με το λογισμικό ImageJ (NIH). Η ποσοτικοποίηση πρόεκυψε εξετάζοντας 200-300 κύτταρα, σε κάθε συνθήκη. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

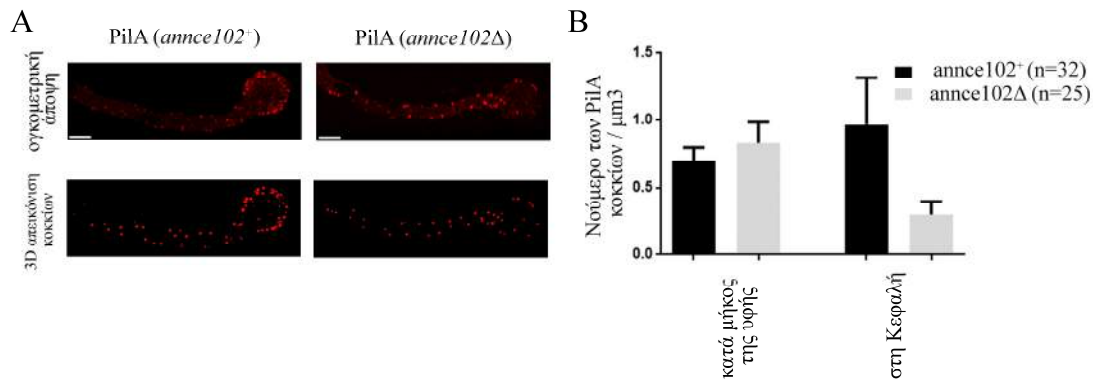
Στο *S. cerevisiae*, στελέχη *nce102Δ* εμφανίζουν αλλοιωμένη κατανομή των εισοσωμικών πρωτεϊνών Sur7-GFP, Pil1-GFP, της Can1-GFP καθώς και της εργοστερόλης (Frohlich et al., 2009; Grossmann et al., 2008). Αντίθετα, η απαλοιφή του γονιδίου *annce102* σε αδρανή κονίδια του *A. nidulans* δεν οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στην κατανομή, το μέγεθος ή τον αριθμό των κοκκίων που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες PilA-mRFP και SurG-GFP (Εικόνα 3-60). Ωστόσο, σε νεαρά *annce102Δ* υφές οι 2 πρωτεΐνες συνεντοπίζονται σε εισοσωμικούς σχηματισμούς που είναι έως και τρεις φορές λιγότεροι στη κεφαλή των υφών σε σύγκριση με αυτούς του στελέχους φυσικού τύπου (Εικόνα 3-60 C-D).



Εικόνα 3-60 Η πρωτεΐνη AnNce102 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη σταθερότητα των PilA και SurG εισοσωμικών κοκκίων στην κεφαλή των νεαρών υφών. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser των PilA-mRFP και SurG-GFP σε αδρανή κονίδια (0 ώρες ανάπτυξης) (A) *annc102*⁺ (B) *annc102Δ* και σε νεαρές υφές (14 ώρες ανάπτυξης) σε (C) *annc102*⁺ (D) *annc102Δ* στελέχη. Ο συνεντοπισμός δείχνεται ως νέο κανάλι (συνεντοπισμός), το οποίο αντιστοιχεί μόνο στα voxels που συνεντοπίζονται. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

Επιπλέον, η απαλοιφή του γονιδίου *annc102* σε νεαρές υφές, δεν φαίνεται να έχει επίπτωση στους PilA²⁶ στικτούς σχηματισμούς που εντοπίζονται κατά μήκος των υφών (Εικόνα 3-61). Υποδεικνύοντας ενδεχομένως την ύπαρξη 2 PilA πληθυσμών. Έναν στην κεφαλή ο οποίος επηρεάζεται από τη λειτουργία της AnNce102 πρωτεΐνης και ένας πληθυσμός κατά μήκος των υφών ο οποίος φαίνεται να παραμένει ανεπηρέαστος.

²⁶ Η εισοσωμική πρωτεΐνη PilA είναι η μοναδική πρωτεΐνη του εισοσώματος, η οποία διατηρεί ένα στικτό πρότυπο κατανομής σε νεαρές υφές, τόσο στη κεφαλή όσο και κατά μήκος των υφών.

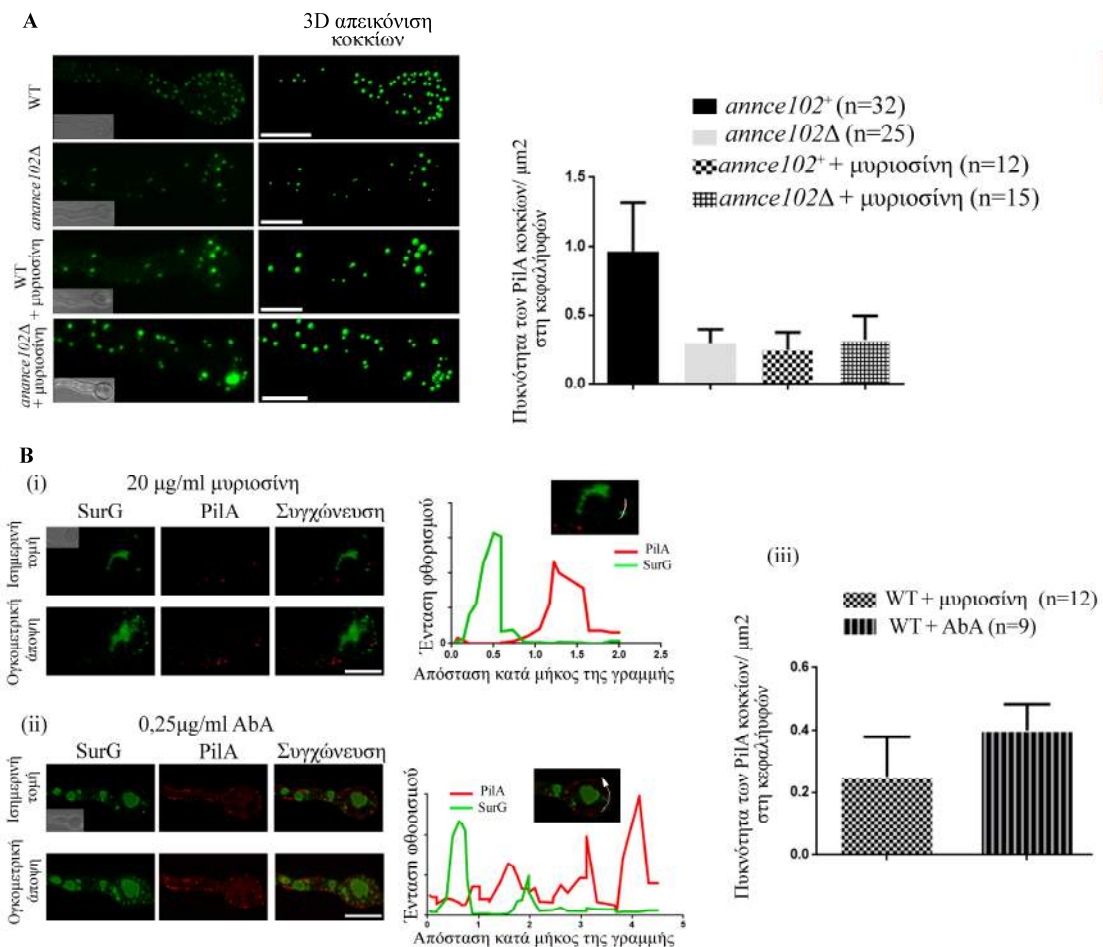


Εικόνα 3-61 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser των PilA-mRFP σε νεαρές *annce102*⁺ *annce102Δ* υφές (14 ώρες ανάπτυξης) (A). Γράφημα των PilA εισοσωμικών κοκκίων τα οποία μετρήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Imaris (bitplane) σε *annce102*⁺ και *annce102Δ* νεαρές υφές. Το n παριστά τον αριθμό των κυττάρων που εξετάστηκαν σε τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα (B). Κλίμακα μεγέθυνσης: 3 μm. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρόμοιος μικροσκοπικός φαινότυπος παρατηρείται παρουσία του φαρμάκου μυριοσίνη (myriocin). Σε αντίθεση όμως με τα *annce102Δ* στελέχη, η παρουσία μυριοσίνης οδηγεί σε μη συνεντοπισμό των εισοσωμικών PilA-mRFP και SurG-GFP πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη (Εικόνα 3-62). Επιπλέον, όταν κύτταρα *annce102Δ* επωάστηκαν με μυριοσίνη, δεν παρουσίασαν προσθετικό φαινότυπο (πέραν από το “φαινότυπο μυριοσίνης”), υποδεικνύοντας ότι η σηματοδότηση που οδηγεί στη βιοσύνθεση των σφιγγολιπιδίων και η πρωτεΐνη AnNce102 δρουν στο ίδιο μεταβολικό μονοπάτι. Με βάση το μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων (Εικόνα 3-62), η επίδραση της μυριοσίνης στον αριθμό και τον εντοπισμό των PilA και SurG εισοσωμικών κοκκίων, μπορεί να οφείλεται είτε γενικά στα επίπεδα των σφιγγολιπιδίων είτε πιο συγκεκριμένα στη διαθεσιμότητα των σύνθετων σφιγγολιπιδίων.

Για να γίνει διάκριση μεταξύ των 2 αυτών πιθανών περιπτώσεων, εξετάσαμε την επίδραση της Αουρεοβασιδίνης Α (Kuroda et al., 1999) (aureobasidin A - AbA), ειδικού αναστολέα βιοσύνθεσης σύνθετων σφιγγολιπιδίων (Heidler and Radding, 1995). Πιο συγκεκριμένα, στελέχη που εκφράζουν τις πρωτεΐνες PilA-mRFP και SurG-GFP αναπτύχθηκαν παρουσία AbA και παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία laser. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 3-62B δείχνουν ότι η παρουσία AbA δεν οδηγεί σε σημαντική μείωση των PilA και SurG εισοσωμικών

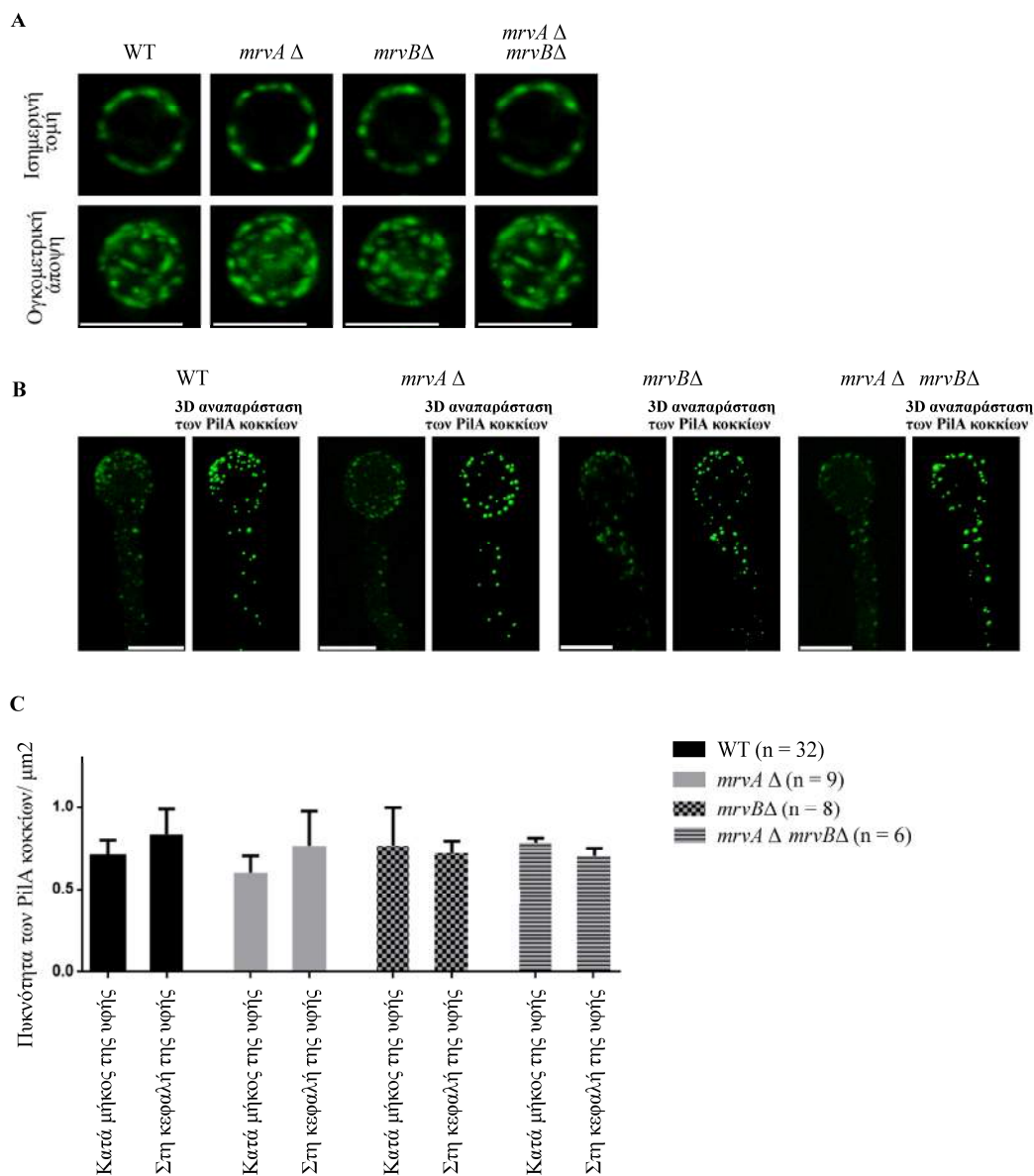
σχηματισμών στην κεφαλή των νεαρών υφών των παραπάνω στελεχών, αλλά αντίθετα οδηγεί αφ' ενός σε αυξημένη αποικοδόμηση της SurG και αφ' ετέρου σε αυξημένο κυτταροπλασματικό φθορισμό και σε σχηματισμό μεγάλων κοκκίων της PilA κατά μήκος της υφής. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο αριθμός αλλά και η κυτταρική κατανομή των εισοσωμικών πρωτεϊνών εξαρτάται από τα γενικά επίπεδα των σφιγγολιπιδίων και όχι από τη διαθεσιμότητα των σύνθετων σφιγγολιπιδίων.



Εικόνα 3-62 (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser νεαρών υφών στελεχών φυσικού τύπου ή *annce102*Δ μετά από επώαση τους με 20 μg/ml μυρισίνη για 5 ώρες. Ο αριθμός των PilA κοκκίων μετρήθηκε όπως αναφέρεται σε προηγούμενα πειράματα και εμφανίζεται ως γράφημα **(B)** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser στελεχών που εκφράζουν την PilA-mRFP και SurG-GFP που επώαστηκαν για 5 ώρες με **(i)** 20 μg/ml μυρισίνη και **(ii)** 0,25 μg/ml AbA. **(iii)** Ο αριθμός των PilA κοκκίων μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το spot tool του λογισμικού Imaris και εμφανίζεται ως γράφημα. Το n παριστά τον αριθμό των κυττάρων που εξετάστηκαν σε τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. Κλίμακα μεγέθυνσης: 5 μm. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

Έχοντας δείξει ότι η πρωτεΐνη AnNce102 επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των εισοσωμάτων στην κεφαλή των νεαρών υφών του *A. nidulans* και γνωρίζοντας ότι η PilA είναι η μοναδική εισοσωμική πρωτεΐνη που παρουσιάζει στικτό πρότυπο κατανομής κατά μήκος της υφής (Vangelatos et al., 2010), προχωρήσαμε στην προσπάθεια ταυτοποίησης άλλων πρωτεϊνών που θα επηρεάζουν την κατανομή/αριθμό των PilA εισοσωμικών κοκκίων κατά μήκος της μυκητιακής υφής. Επιλέξαμε να μελετήσουμε πρωτεΐνες οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη αμινοξική ταυτότητα με την AnNce102 και περιέχουν μια MARVEL²⁷ δομική περιοχή. Με *in silico* ανάλυση στο γονιδίωμα του *A. nidulans* πρόεκυψαν οι αλληλουχίες AN8278 (26.9% ταυτότητα) και AN8422 (23.9% ταυτότητα), οι οποίες και ονομαστήκαν *mrnA* και *mrnB*, αντίστοιχα. Στελέχη με απαλοιφή του ενός ή και των δύο γονιδίων ταυτόχρονα εμφάνισαν φυσιολογική ανάπτυξη σε όλες τις συνθήκες και δεν επηρέασαν την τοπολογία/αριθμό της PilA τόσο σε αδρανή κονίδια όσο και σε νεαρές υφές του μύκητα (Εικόνα 3-63).

²⁷ Η MARVEL, είναι μια πρωτεϊνική περιοχή που ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Αποτελείται από 4 διαμεμβρανικές α έλικες και για πρώτη φορά εντοπίστηκε σε πρωτεΐνες της μυελίνης και των λεμφοκυττάρων (Myelin And Lymphocyte, MAL). Πολλές βιβλιογραφικές αναφορές συνδέουν την ύπαρξη των πρωτεϊνών αυτών με την οργάνωση και τη λειτουργία εξειδικευμένων μεμβρανικών περιοχών. Πολλές πρωτεΐνες που περιέχουν τη MARVEL περιοχή (MARVEL domain-containing proteins) σχετίζονται με πολύπλοκες ασθένειες του ανθρώπου, όπως η σχιζοφρένεια (Hamacher et al., 2001).

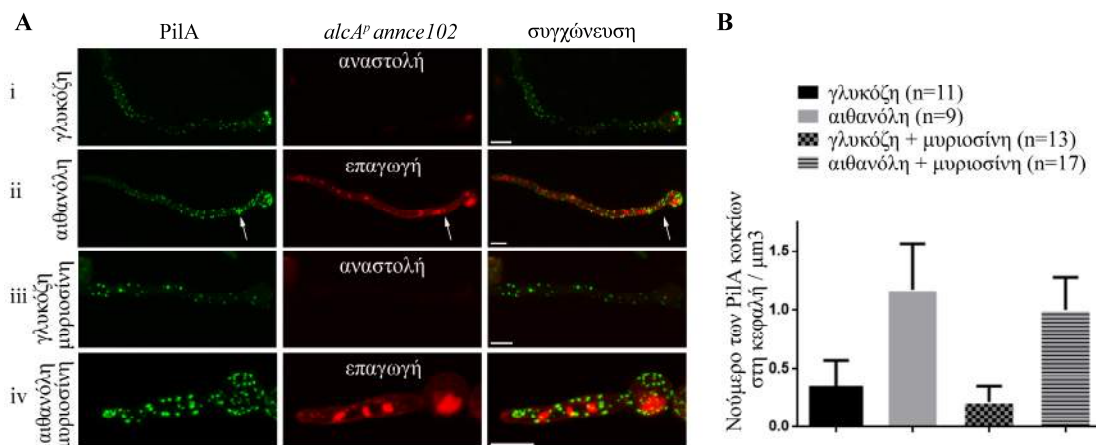


Εικόνα 3-63 Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser στελεχών WT, *mrnA*Δ, *mrnB*Δ και *mrnA*Δ *mrnB*Δ που εκφράζουν την εισοσωμική πρωτεΐνη PiIa-GFP σε (A) αδρανή κονίδια (0 ώρες ανάπτυξης) και (B) νεαρές υφές (14 ώρες ανάπτυξης). Ο αριθμός των PiIa κοκκίων μετρήθηκε όπως στην εικόνα 3-67 και φαίνεται στο (C) ως γράφημα. Το n παριστά τον αριθμό των κυττάρων που εξετάστηκαν σε τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. Κλίμακα μεγέθυνσης: 5 μm. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

3.12 Η υπερέκφραση της AnNce102 αποκαθιστά τον αριθμό των εισοσωμικών σχηματισμών παρουσία μυριοσίνης και οδηγεί σε «άτυπο» εντοπισμό των PīA κοκκίων στα διαφράγματα

Στο *S. cerevisiae*, η υπερέκφραση της Nce102 διασώζει από την αποσυγκρότηση των εισοσωμάτων σε συνθήκες που η βιοσύνθεση των σφιγγολιπιδίων έχει ανασταλεί από τη χορήγηση μυριοσίνης (Frohlich et al., 2009). Εξετάσαμε λοιπόν εάν η υπερέκφραση της AnNce102 στον *A. nidulans* οδηγεί στο ίδιο αποτέλεσμα. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν στελέχη (*alcA::annce102::mRFP*) στα οποία ο υποκινητής του γονιδίου *annce102*, αντικαταστάθηκε με αυτόν της αλκοολικής αφυδρογονάσης²⁸ (*alcA*), η έκφραση του οποίου αναστέλλεται από τη γλυκόζη και επάγεται από την αιθανόλη (Felenbok et al., 2001). Παρουσία γλυκόζης όπου αναστέλλεται η έκφραση του γονιδίου *annce102*, η PīA παρουσιάζει μικρό αριθμό από κοκκιώδεις σχηματισμούς στην κεφαλή των νεαρών υφών, παρουσιάζει δηλαδή φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν των *annce102Δ* στελεχών. Παρουσία αιθανόλης όπου επάγεται η έκφραση του γονιδίου *annce102*, η AnNce102 εντοπίζεται κυρίως διάχυτη στην περιφέρεια των κυττάρων. Ωστόσο, στην κεφαλή των νεαρών υφών μπορούν να διακριθούν κοκκιώδεις σχηματισμοί που συνεντοπίζονται με τα PīA κοκκία (**Εικόνα 3-64A**). Η υπερέκφραση της Annce102 παρουσία αιθανόλης, αποκαθιστά το φαινότυπο στελεχών φυσικού τύπου, με τον αριθμό των PīA κοκκίων στην κεφαλή των νεαρών υφών να είναι σχεδόν ταυτόσημος με αυτόν των αντίστοιχων κοκκίων που παρατηρείται σε κύτταρα στα οποία δεν έχει χορηγηθεί μυριοσίνη (κύτταρα φυσικού τύπου) (**Εικόνα 3-64Aiv**).

²⁸ Το γονίδιο της αλκοολικής αφυδρογονάσης (alcohol dehydrogenase, ADH) κωδικοποιεί για το ενζυμο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την οξειδωση της αλκοόλης σε ακεταλδεΐδη (βλέπε παράγραφο 1.2.1.2).

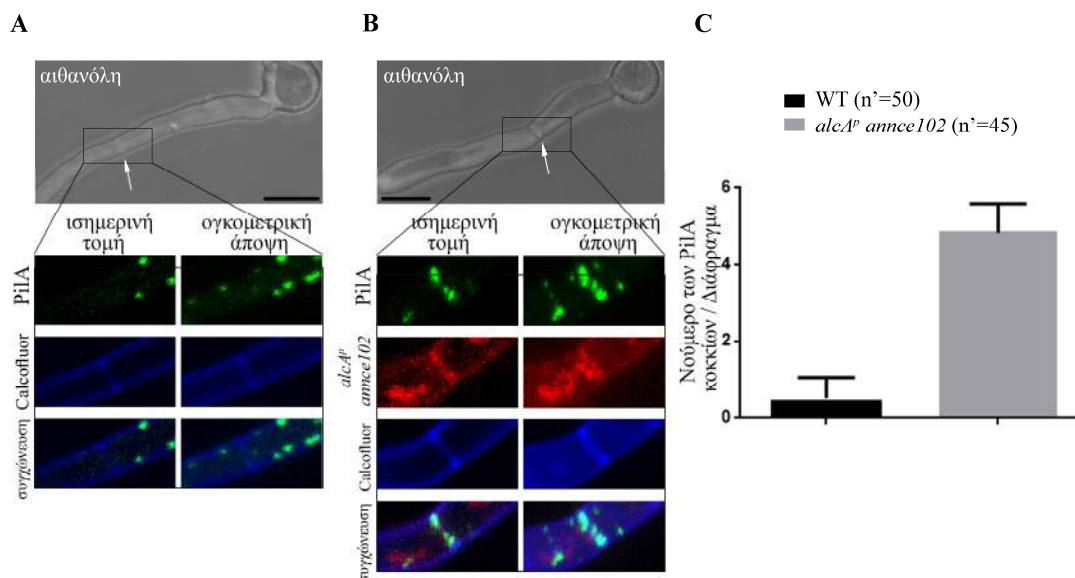


Εικόνα 3-64 Η υπερέκφραση της AnNce102 καταστέλλει το φαινότυπο της μυριοσίνης. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser νεαρών υφών (14 ωρών) που εκφράζουν (A*i*) την PilA-GFP και την AnNce102::mRFP κάτω από τον έλεγχο του ρυθμιζόμενου υποκινητή *alcA* (*alcA*:: AnNce102::mRFP) παρουσία γλυκόζης, (A*ii*) παρουσία αιθανόλης, (A*iii*) παρουσία γλυκόζης και 25 μg/ml μυριοσίνης και (A*iv*) παρουσία αιθανόλης και 25 μg/ml μυριοσίνης. Ο αριθμός των PilA κοκκίων μετρήθηκε όπως στην εικόνα 3-67 και φαίνεται στο (B) ως γράφημα. Το n παριστά τον αριθμό των κυττάρων τα οποία εξετάστηκαν σε τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα Κλίμακα μεγέθυνσης: 5 μm. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

Στον *A. nidulans*, η PilA δεν εντοπίζεται συχνά στα διαφράγματα²⁹, των οποίων η χρώση με το φθοριόχρωμα Calcofluor-white έδειξε ότι μόλις το 18% από αυτά περιέχει ένα ή δύο PilA κοκκία (Εικόνα 3-65, λεύκα βέλη). Όταν υπερεκφράζεται η AnNce102, το 100% των διαφραγμάτων περιέχουν περισσότερα από 5 PilA κοκκία, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η μορφολογία και ο αριθμός των διαφραγμάτων. Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή της AnNce102 στο μονοπάτι σηματοδότησης των σφιγγολιπιδίων και υποδεικνύουν τον καθοριστικό

²⁹ Τα διαφράγματα στις πολυκύτταρες υφές δεν είναι στην πραγματικότητα πλήρη αλλά στο κέντρο τους φέρουν πολύ μικρή οπή (δεν φαίνεται στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο). Οι υφές αυτές λοιπόν δεν αποτελούνται στην πραγματικότητα από ξεχωριστά κύτταρα αφού μέσα από τα μικροσκοπικά αυτά ανοίγματα το πρωτόπλασμα μπορεί να ρέει ελεύθερα κατά μήκος των υφών. Τα κυτταρικά οργανίδια, συμπεριλαμβανομένων των πυρήνων μπορούν να μεταναστεύουν από διαμέρισμα σε διάμερισμα. Συνεπώς το μυκήλιο τόσο ενός πολυκύτταρου όσο και ενός κοινοκύτταρου (υφές με ενιαίο εσωτερικό χώρο, χωρίς διαφράγματα κατά μήκος τους) μύκητα περιέχει ένα ενιαίο πολυπύρηνο πρωτόπλασμα. Πλήρη εγκάρσια διαφράγματα σχηματίζονται τόσο στους πολυκύτταρους όσο και στους κοινοκύτταρους μύκητες σε δύο ειδικές περιπτώσεις: α) για να απομονωθούν τραυματισμένα ή γερασμένα τμήματα υφών, β) όταν σχηματίζονται οποιασδήποτε μορφής αναπαραγωγικά όργανα (Harris, 2001). Στον *A. nidulans*, ο σχηματισμός διαφραγμάτων απαιτεί τη συναρμολόγηση μιας διαφραγματικής ζώνης μετά την ολοκλήρωση της μίτωσης. Πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι αυτή η ζώνη μια δυναμική δομή που αποτελείται από ακτίνη, σηπτίνη και φορμίνη. Επιπλέον, η συναρμολόγηση/σχηματισμός του διαφράγματος εξαρτάται από έναν καταρράκτη σηματοδότησης κινασών, ο οποίος ρυθμίζει μιτωτική έξοδο και τη διαφραγματοποίηση στους μύκητες (Harris, 2001).

ρόλο που αυτή διαδραματίζει όσον αφορά τον αριθμό και την τοπολογία της κυρίας εισοσωμικής πρωτεΐνης PilA.



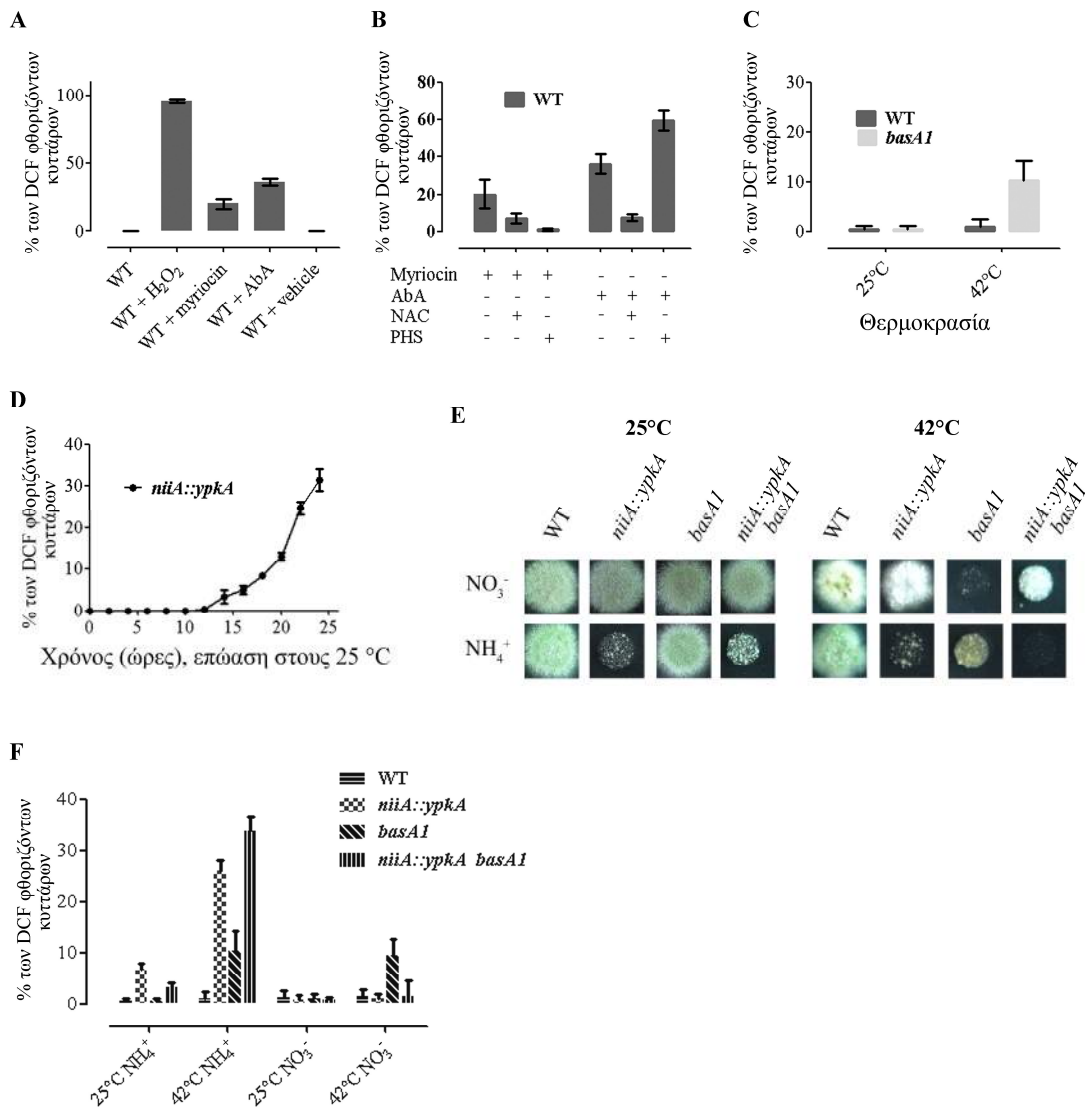
Εικόνα 3-65 Η υπερέκφραση της AnNce102 οδηγεί σε άτυπο εντοπισμό των PilA κοκκίων στα διαφράγματα. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser νεαρών υφών που εκφράζουν την (A) PilA-GFP (B) και την PilA-GFP, *alcA::AnNce102::mRFP* παρουσία αιθανόλης. Ο αριθμός των PilA κοκκίων στα διαφράγματα μετρήθηκε όπως στην εικόνα 3-67 και φαίνεται στο (C) ως γράφημα. Τα διαφράγματα σημειώνονται με λευκά βέλη. Το n' τον αριθμό των διαφραγμάτων τα οποία εξετάστηκαν σε τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. Κλίμακα μεγέθυνσης: 5 μ m. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

3.13 Μείωση των σφιγγολιπιδίων και αναστολή της έκφρασης της YrkA κινάσης προκαλεί αύξηση των επιπέδων των ROS

Στο μύκητα *S. cerevisiae* πρόσφατα δείχθηκε ότι η διατάραξη του μεταβολισμού των σφιγγολιπιδίων οδηγεί σε απώλεια της βιωσιμότητας των κυττάρων και συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου - ROS (Kajiwara et al., 2012). Αρχικά επιδιώξαμε να μελετήσουμε εάν η μείωση των επιπέδων των σφιγγολιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ROS και στο νηματοειδή μύκητα

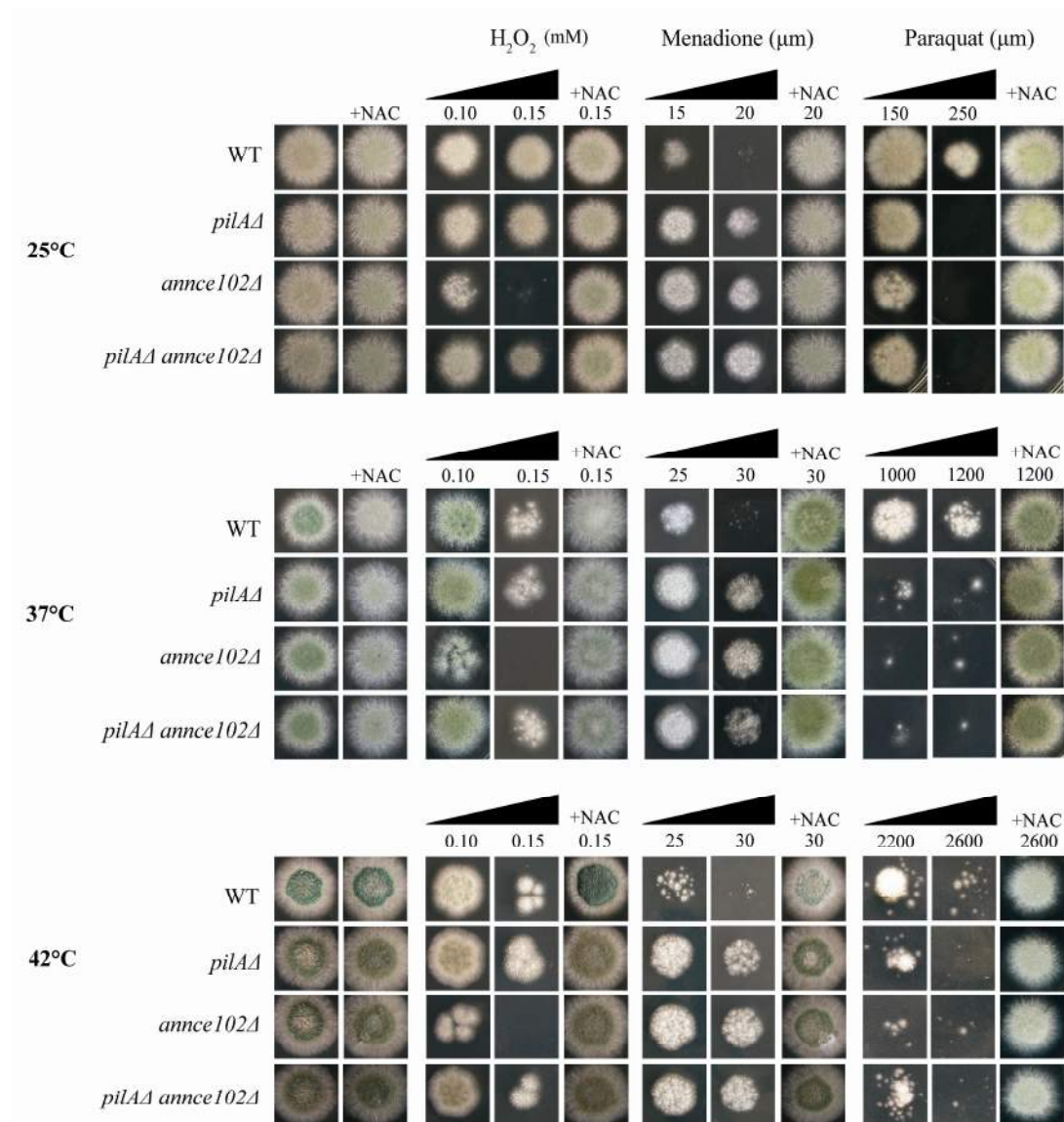
A. nidulans. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί αναστολείς της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων, μυριοσίνη και ουρεοβασιδίνη A (Cheng et al., 2001; Heidler and Radding, 1995) αλλά και τα μεταλλαγμένα στελέχη *basA1* (πρόσφορα από το εργαστήριο του Καθηγητή Γ. Διαλλίνα), τα οποία φέρουν μια σημειακή μεταλλαγή, που έχει σαν αποτέλεσμα την παράγωγή μιας μη λειτουργικής C4-υδροξυλάσης, η οποία δεν είναι σε θέση να καταλύσει τη μετατροπή της διϋδροσφιγγοσίνης σε φυτοσφιγγοσίνη σε υψηλές θερμοκρασίες. Η παρουσία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά με τη χρήση της χρωστικής 2',7' dichlorofluorescein diacetate ³⁰(DCF) (Eruslanov and Kusmartsev, 2010). Επώαση κυττάρων με μυριοσίνη έχει ως αποτέλεσμα μικρή αύξηση των επιπέδων των ROS στο ~ 20 % (**Εικόνα 3-66**), ενώ η παρουσία του ειδικού αναστολέα συνθέτων σφιγγολιπιδίων ουρεοβασιδίνη A (AbA) οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ROS στο ~ 35%. Επιπρόσθετα η επώαση των θερμοευαίσθητων στελεχών *basA1* στη μη επιτρεπτή θερμοκρασία (42 °C) είχε επίσης ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ROS στο ~ 9%. Επιπλέον, η επώαση κυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία μυριοσίνης, ουρεοβασιδίνης A ή στους 42 °C (στελέχη *basA1*) με έναν αλιευτή/εκκαθαριστή (scavenger) ελεύθερων ριζών, όπως η N-ακετυλοκυστεΐνη (N-acetylcysteine-NAC), οδηγεί σε μείωση των ROS και στις 3 περιπτώσεις (**Εικόνα 3-66**). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα φυσικού τύπου στα οποία δεν είχε χορηγηθεί αναστολέας της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων (και δεν φέρουν την μεταλλαγή *basA1*) παρουσίαζαν μηδενικά επίπεδα ROS. Συνεπώς με την ιδέα ότι εξάντληση σφιγγολιπιδίων οδηγεί σε συσσώρευση ROS, προσθήκη φυτοσφιγγοσίνης (PHS - σφιγγολιπίδιο) οδηγεί σε σημαντική μείωση των επιπέδων ROS μόνο στα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί μυριοσίνη και όχι ουρεοβασιδίνη A. Προσθήκη φυτοσφιγγοσίνης σε κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με την ουρεοβασιδίνη A, είχε ως αποτέλεσμα την περεταίρω αύξηση των ROS, υποδεικνύοντας ότι η συσσώρευση ROS δεν οφείλεται μόνο στην αναστολή των συνθέτων σφιγγολιπιδίων αλλά και στη συσσώρευση LCBs (**Long-Chain Bases**) (Cheng et al., 2003; Nagiec, 1997).

³⁰ Η DCF μετά την είσοδό της στα κύτταρα από-ακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε ένα μη φθορίζον (excitation 495nm, emission 529nm) προϊόν το οποίο οξειδώνεται από τις ΔMO/ROS σε 2,7-dichlorofluorescein (DCF).



Εικόνα 3-66 Συσσώρευση ROS μετά από αναστολή της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων και καταστολή της *ypkA*. (A) Στελέχη φυσικού τύπου που αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο για 12 ώρες στους 25°C και στη συνέχεια για 7 ώρες παρουσία 0,5 mM H₂O₂, 40 μg/ml μυριοσίνης, 2 μg/ml AbA και μεθανόλης (vehicle). Όλα τα στελέχη επώαστηκαν με 10 μM 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF) για τα τελευταία 45 λεπτά πριν την απεικόνισή τους με μικροσκοπία επιφθορισμού. Η ποσοτικοποίηση αντιπροσωπεύει ποσοστό 200 - 500 κυττάρων τα οποία εξέπεμπαν φθορισμό από τουλάχιστον τρία αντιπροσωπευτικά ανεξάρτητα πειράματα. (B) Στελέχη φυσικού τύπου αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο για 12 ώρες στους 25°C, και στη συνέχεια για 7 ώρες παρουσία 40 μg/ml μυριοσίνης, 2 μg/ml AbA 20 mM NAC και 2 μg/ml PHS. Τα ROS προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν όπως στο (A). (C) *basA1* και στελέχη φυσικού τύπου αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο για 12 ώρες στους 25°C και μεταφερθήκαν στους 42 °C για επιπλέον 7 ώρες. τα ROS προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν όπως στο (A). (D) Στέλεχος *niiA::ypkA* αναπτύχθηκε σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο για 0 - 24 ώρες στους 25°C υπό συνθήκες καταστολής (NH₄⁺). Τα ROS προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν κάθε 2 ώρες όπως στο (A). (E) 5 μl of 10⁷/ml κονίδια στελεχών WT, *niiA::ypkA*, *basA1* και *niiA::ypkA basA1* τοποθετήθηκαν σε στερεό ελάχιστο θρεπτικό μέσο στους 25 °C ή 42 °C κάτω από κατασταλτικές ή συνθήκες επαγωγής και αναπτύχθηκαν για 48 ώρες. (F) Στελέχη WT, *niiA::ypkA*, *basA1* και *niiA::ypkA basA1* αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο για 12 ώρες στους 25 °C κάτω από κατασταλτικές ή συνθήκες επαγωγής. Τα στελέχη παρέμειναν

στους 25 °C ή μεταφερθήκαν στους 42 ° C για επιπλέον 7 ώρες. Τα ROS προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν όπως στο (A). Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)



Εικόνα 3-67 Ανάπτυξη των *pilAΔ* και/ή *annce102Δ* στελεχών παρουσία οξειδωτικών παραγόντων. 5 μ l of 10^7 /ml κωνίδια στελεχών WT, *pilAΔ*, *annce102Δ* και *pilAΔ annce102Δ* αναπτύχθηκαν σε στερεό ελάχιστο θρεπτικό μέσο στους 25, 37 και 42 °C για 36-48 ώρες παρουσία H_2O_2 , paraquat και μεναδιόνης, σε συγκεντρώσεις όπως υποδεικνύεται και με την ουρία ως τη μοναδική πηγή αζώτου. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

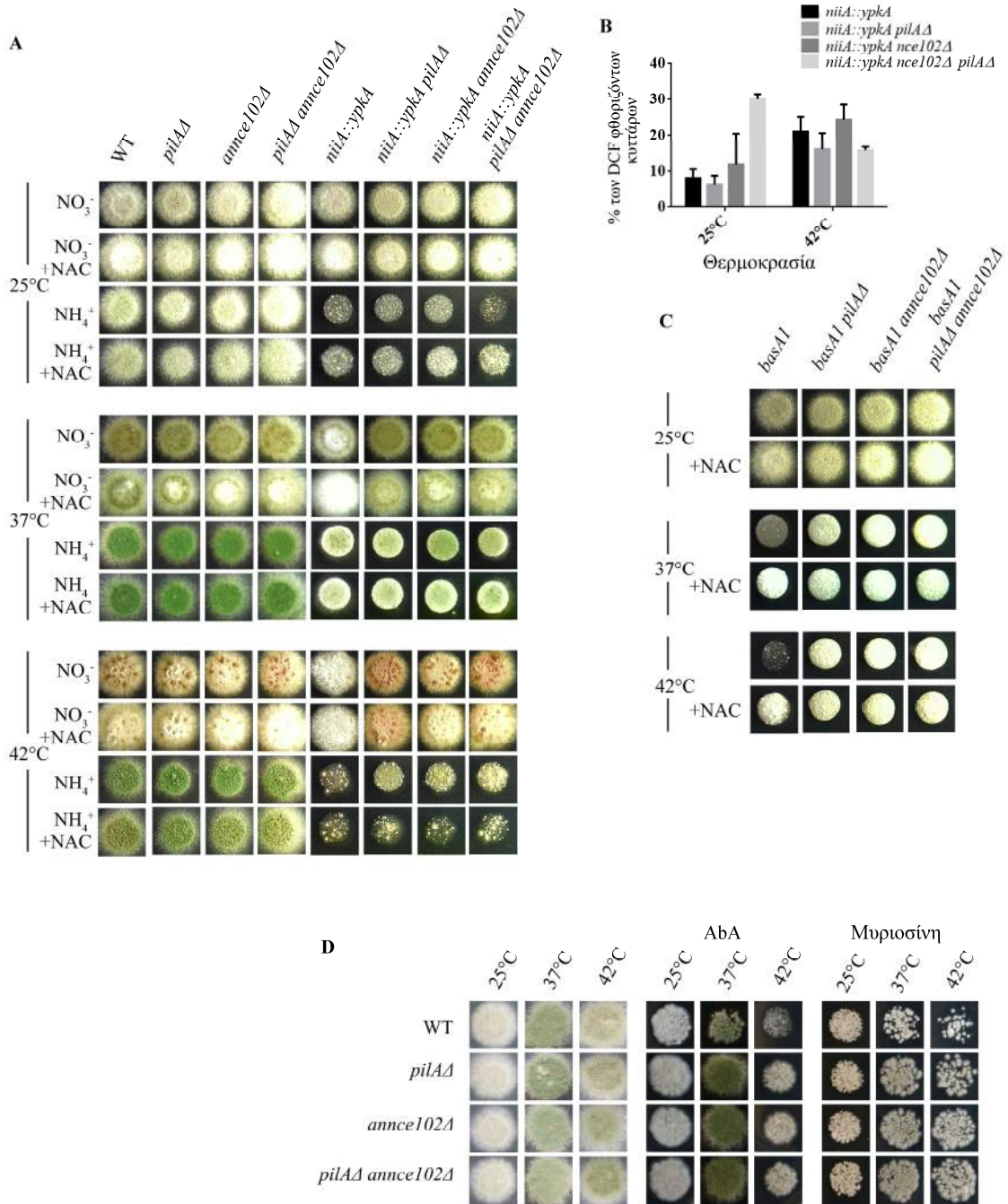
Η βιοσύνθεση σφινγολιπιδίων στο ζυμομύκητα ρυθμίζεται από την κινάση Ypk1 (Liu, 2005; Muir et al., 2014; Niles et al., 2012; Niles and Powers, 2012; Roelants et al., 2011; Sun et al., 2000) (Βλέπε εισαγωγή). Ενδιαφέρον αποτελεί το

γεγονός, ότι η καταστολή της έκφρασης της ομόλογης κινάσης στον *A. nidulans*, χρησιμοποιώντας το ρυθμιζόμενο υποκινητή *niiA* (*niiA::yrcA* στέλεχος) οδηγεί σε σημαντική αύξηση των ROS επιπέδων, εμφανής μετά από 12 ώρες ανάπτυξης παρουσία ιόντων αμμωνίου ως μοναδική πηγή αζώτου στους 25 ° C. Για να διερευνηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση της YrcA με τη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων και της παραγωγής ROS, κατασκευάστηκαν διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *niiA ::yrcA basA1*. Αυτά τα στελέχη εμφάνιζαν έναν συνθετικό θνησιγόνο φαινότυπο όταν αναπτύσσονταν υπό συνθήκες αναστολής στη μη-επιτρεπτική θερμοκρασία (42 ° C), αν και κάτω από συνθήκες επαγωγής στους 42 ° C τα επίπεδα ROS στο διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος, *niiA ::yrcA basA1*, ήταν χαμηλότερα σε σύγκριση με το μονά μεταλλαγμένο στέλεχος, *basA1* και στις ίδιες συνθήκες η επαγωγή της έκφρασης της YrcA, ήταν σε θέση να διασώσει μερικώς τη θνησιμότητα των *basA1* στελεχών (Εικόνα 3-66 E). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν περαιτέρω τη γενετική αλληλεπίδραση μεταξύ YrcA της βιοσύνθεσης σφιγγοειδών.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν οι πρωτεΐνες AnNce102 και PilA εμπλέκονται άμεσα με το οξειδωτικό στρες. Αναλύθηκε η βιωσιμότητα μεταλλαγμένων και φυσικού τύπου στελεχών του *A. nidulans* παρουσία H₂O₂, μεναδιόνης (menadione) και paraquat (Εικόνα 3-67). Και τα δύο φάρμακα, μεναδιόνη και paraquat, αποτελούν ουσίες, οι οποίες δημιουργούν ανιόντα σουπεροξειδίου (Lamarre et al., 2001). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι συγκριτικά τα στελέχη *annce102Δ* είναι περισσότερο ευαίσθητα στο υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα *pilAΔ*, *annce102Δ* περισσότερο ανθεκτικά στην παρουσία μεναδιόνης. Αντίθετα, τα στελέχη *pilAΔ* ή/και *annce102Δ* βρέθηκαν να είναι υπερευαίσθητα στο paraquat (Εικόνα 3-67). Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι ANnce102 ή/και PilA διαδραματίζουν ένα ρόλο στην προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες που δημιουργείται από το paraquat και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Επίσης, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο της YrcA κινάσης στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων και συνολικά επιβεβαιώνουν το σημαντικό ρόλο τόσο της YrcA όσο και των σφιγγολιπιδίων στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση.

3.14 Οι πρωτεΐνες AnNce102 και PilA εμπλέκονται στη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων

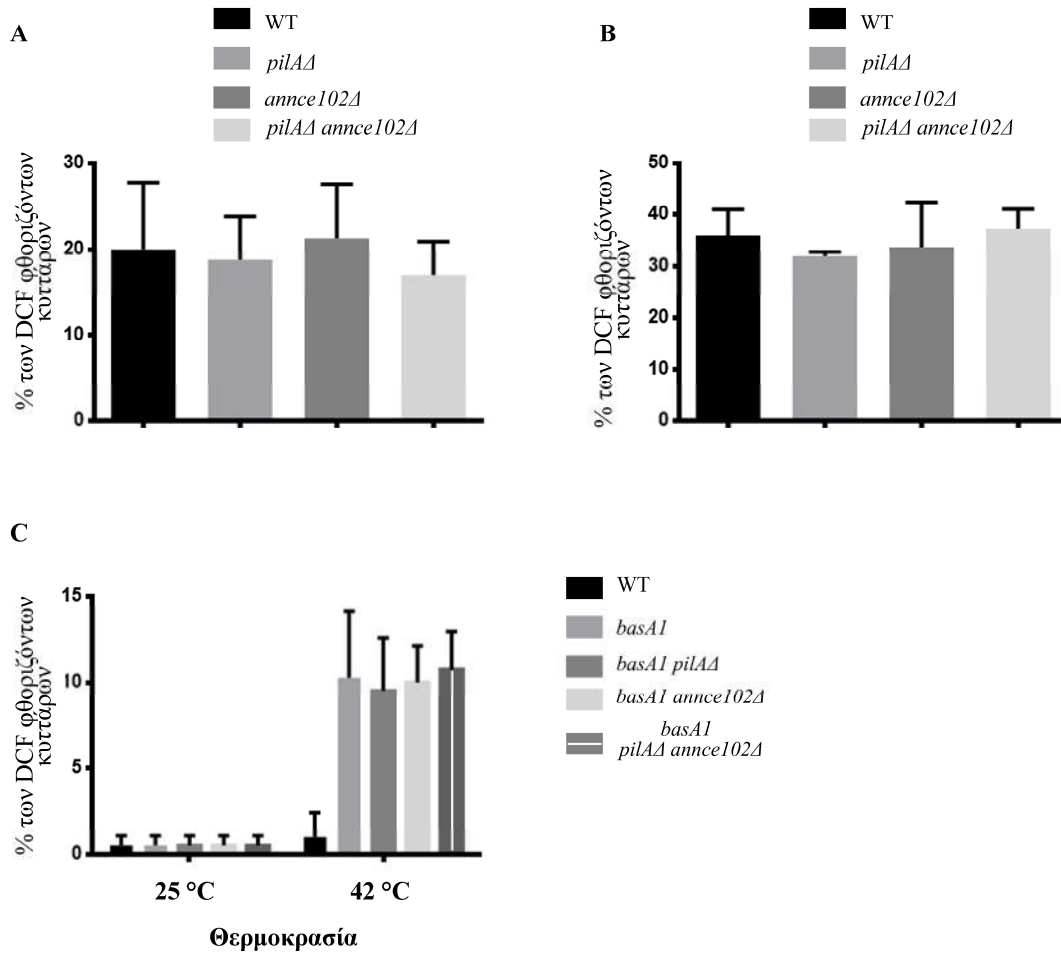
Προκειμένου να ελεγχτεί εάν η απαλοιφή των *pilA* και *annce102* γονιδίων επηρεάζει τα επίπεδα των ROS μέσω της ρύθμιση της δραστηριότητας της YrkA κινάσης, κατασκευάστηκαν διπλές και τριπλές μεταλλαγές των *pilAΔ* ή/και *annce102Δ* σε στελέχη *niiA::yrkA*. Η ταυτόχρονη απαλοιφή των *pilAΔ* και *annce102Δ* έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ανάπτυξη του *niiA::yrkAannce102Δ pilAΔ* στελέχους παρουσία ιόντων αμμωνίου στους 25 °C (**Εικόνα 3-68A**) και πιο σημαντικά φαίνεται ότι η απαλοιφή του *pilAΔ* ή/και *annce102Δ* μπορεί να καταστείλει μερικώς την προβληματική ανάπτυξη του στελέχους *niiA::yrkA* στους 42 °C (παρουσία ιόντων αμμωνίου). Η ανάπτυξη όλων των μεταλλαγμένων στελεχών συσχετίζεται καλά με τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS στους 25 °C, με το τριπλά μεταλλαγμένο στέλεχος (*niiA::yrkA annce102Δ pilAΔ*) να εμφανίζει 3 φορές υψηλότερα επίπεδα ROS (**Εικόνα 3-68B**). Ωστόσο στους 42 °C ανιχνευτήκαν μη στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS μεταξύ των μονά, διπλά και του τριπλά μεταλλαγμένου στελέχους. Προκειμένου να ελεγχθεί εάν οι παραπάνω διαφορές στην ανάπτυξη και τη συσσώρευση ROS είναι αποτέλεσμα της αποδιοργάνωσης του μονοπατιού βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων κατασκευαστήκαν στελέχη *basA1* που έφεραν μονές ή συνδυασμένες απαλοιφές των *pilA* και *annce102* γονιδίων. Όπως φαίνεται από την εικόνα **Εικόνα 3-68C** τα *basA1* στελέχη εμφανίζουν ελαφρώς μειωμένη ανάπτυξη στους 37 °C, η οποία επιδεινώνεται στην μη επιτρεπτή θερμοκρασία ανάπτυξης (42 °C). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα διπλά (*annce102ΔbasA1* και *pilAΔbasA1*) και το τριπλά (*annce102ΔpilAΔbasA1*) μεταλλαγμένα στελέχη αναπτύσσονται καλύτερα από ότι τα στελέχη *basA1*



Εικόνα 3-68 Οι AnNce102 και PilA πρωτεΐνες ρυθμίζουν αρνητικά τη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων. (A) 5 μ l of 10^7 /ml κονίδια στελεχών WT, *pilAΔ*, *annce102Δ*, *pilAΔ annce102Δ*, *niiA::yprkA*, *niiA::yprkA pilAΔ*, *niiA::yprkA annce102Δ* και *niiA::yprkA pilAΔ annce102Δ* αναπτύχθηκαν σε στερεό ελάχιστο θρεπτικό μέσο στους 25, 37 και 42 °C για 36-48 ώρες υπό συνθήκες καταστολής ή επαγωγής. (B) WT, *niiA::yprkA*, *niiA::yprkA pilAΔ*, *niiA::yprkA annce102Δ* και *niiA::yprkA pilAΔ annce102Δ* αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο για 12 ώρες στους 25 °C κάτω από κατασταλτικές ή συνθήκες επαγωγής. Τα στελέχη παρέμειναν στους 25 °C ή μεταφέρθηκαν στους 42 °C για επιπλέον 7 ώρες. Τα ROS προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν όπως στην εικόνα 3-66. (C) 5 μ l of 10^7 /ml κονίδια στελεχών WT, *basA1*, *basA1pilAΔ*, *basA1annce102Δ* και *basA1pilAΔ annce102Δ* τοποθετήθηκαν σε στερεό ελάχιστο θρεπτικό μέσο στους 25 και 42 °C για 48 ώρες. (D) 5 μ l of 10^7 /ml κονίδια στελεχών WT, *pilAΔ*, *annce102Δ* και *pilAΔ annce102Δ*, αναπτύχθηκαν σε

στερεό ελάχιστο θρεπτικό μέσο παρουσία 40 $\mu\text{g/ml}$ μυριοσίνης και 1 $\mu\text{g/ml}$ AbA στους 25, 37 και 42 °C για 36-48 ώρες. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, τα στελέχη *annce102* Δ ή/και *pilA* Δ βρέθηκαν να είναι εν μέρει ανθεκτικά παρουσία των ειδικών αναστολέων της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων, της μυριοσίνης και της αουρεοβασιδίνης A σε υψηλές θερμοκρασίες (Εικόνα 3-68D). Μη αναμενόμενα, η προσθήκη του αλιευτή/εκκαθαριστή (scavenger) ελεύθερων ριζών, N-ακετυλοκυστεΐνη (N-acetylcysteine-NAC) στο θρεπτικό μέσο, οδήγησε στην αποτελεσματική απόκρυψη των όποιων διαφορών ανάπτυξης μεταξύ των στελεχών *basA1*, *niiA::yprkA*, *annce102* Δ και *pilA* Δ (Εικόνα 3-68), αν και αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 3-69). Τα παραπάνω δεδομένα σαφώς υποδεικνύουν ένα αρνητικό ρόλο των AnNce102 και PilA πρωτεϊνών στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων σε υψηλές θερμοκρασίες. Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, έχει ήδη δειχθεί ότι το θερμικό σοκ οδηγεί σε μια παροδική αύξηση σφιγγολιπιδίων, η οποία είναι σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων σε αυτές τις συνθήκες (Coward, 2003; Jenkins et al., 1997).



Εικόνα 3-69 WT, *pilAΔ*, *annce102Δ* και *pilAΔ annce102Δ* στελέχη αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο για 12 ώρες στους 25 °C και στη συνέχεια επώστηκαν για επιπλέον 7 ώρες με (A) 40 μg/ml μυρισίνης και (B) 2 μg/ml AbA. (C) WT, *basA1*, *basA1 pilAΔ*, *basA1 annce102Δ* και *basA1 pilAΔ annce102Δ* στελέχη αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο για 12 ώρες στους 25 °C και στη συνέχεια είτε παρέμειναν στους 25 °C είτε μεταφέρθηκαν στους 42 °C για επιπλέον 7 ώρες. Τα ROS προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν όπως στην εικόνα 3-66. Προσαρμογή από (Athanasopoulos et al., 2015)

4. Συζήτηση και προοπτικές

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν γενετικές, βιοχημικές, μοριακές μέθοδοι και τεχνικές συνεστιακής μικροσκοπίας laser για τη μελέτη των εισοσωμικών πρωτεϊνών PilA, PilB, SurG στους απογόνους του φυλετικού κύκλου του *A. nidulans* (Athanasopoulos et al., 2013). Επιπλέον, διερευνήθηκε ο ρόλος της πρωτεΐνης AnNce102 στην οργάνωση των εισοσωμάτων στη διαμερισματοποίηση της πλασματικής μεμβράνης του μύκητα αλλά και στη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων.

Με τεχνικές μικροσκοπίας διακεκομμένης μαγνητοσκόπησης (time-lapse) και ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP) δείχθηκε ότι η PilA εισοσωμική πρωτεΐνη σχηματίζει στατικές δομές κάτω από την πλασματική μεμβράνη του υφομύκητα. Τα μέχρι πρότινος δεδομένα υποδείκνυαν ότι το πρότυπο κατανομής των τριών κύριων εισοσωμικών πρωτεϊνών (PilA, PilB και SurG) είναι παρόμοιο σε ώριμα ασκοσπόρια και κονιδιοσπόρια (απογόνους του φυλετικού και αφυλετικού κύκλου ζωής, αντίστοιχα). Ωστόσο διαπιστώθηκε ότι οι κύριες εισοσωμικές πρωτεΐνες δεν ανιχνεύονται σε πρώιμους ασκούς/ασκοσπόρια και βοηθητικά κύτταρα Hülle (Athanasopoulos et al., 2013). Τα πειραματικά δεδομένα από την παρούσα διατριβή υποδηλώνουν ότι οι εισοσωμικές πρωτεΐνες δεν εμπλέκονται άμεσα στην εγκαθίδρυση του φυλετικού κύκλου του *A. nidulans*. Δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς αναπτυξιακές αλλαγές στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα. Η έλλειψη συνεντοπισμού των πρωτεϊνών PilA και AbrA υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ των εισοσωμάτων και της ενδοκύττωσης μέσω κυστιδίων καλυμμένων με πλέγμα κλαθρίνης. Επιπλέον η διατάραξη της ομοιόστασης των σφιγγολιπιδίων από τη μυριοσίνη έδειξε σημαντική μεταβολή τόσο στον αριθμό όσο και στην κατανομή των στικτών σχηματισμών της PilA (Athanasopoulos et al., 2013).

Αρκετές μελέτες μέχρι σήμερα έχουν τεκμηριώσει το ρόλο των Nce102 πρωτεϊνών και παρά την αυξημένη συντήρησή τους στους Ασκομύκητες (Douglas et al., 2013; Khalaj et al., 2012), ο λειτουργικός ρόλος αυτών των πρωτεϊνών φαίνεται να αποκλίνει. Για παράδειγμα, στην *Ashbya gossypii*, το ορθόλογο του Nce102 παρά

το γεγονός ότι συνεντοπίζεται με τα εισοσώματα, φαίνεται να μην είναι απαραίτητο για τη σταθερότητα τους και την πολική αύξηση (Seger et al., 2011). Στον *Aspergillus fumigatus*, η απαλοιφή του *AfuNce102* είχε ως αποτέλεσμα καθυστέρηση στο σχηματισμό κονιδιοφορέων και σημαντική μείωση στον αριθμό των παραχθέντων κονιδιοσπορίων, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η μολυσματικότητα του μύκητα (Khalaj et al., 2012). Απαλοιφή του γονιδίου *nce102* στη *Candida albicans* είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των εισοσωμικών κοκκίων. Ωστόσο, τα κύτταρα εμφάνιζαν φυσιολογικό πρότυπο κατανομής των Lsp1-GFP και Sur7-GFP πρωτεϊνών αλλά και σημαντική μείωση στη μολυσματικότητα του μύκητα (Douglas et al., 2013).

Στον *A. nidulans* οι πρωτεΐνες PilA και AnNce102 φαίνεται να είναι οι κύριοι οργανωτές των εισοσωμάτων. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι η AnNce102 συνεντοπίζεται με την PilA στην πλασματική μεμβράνη και η χρονική και χωρική κατανομή της (AnNce102) είναι παρόμοια με εκείνη της SurG εισοσωμικής πρωτεΐνης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η απαλοιφή του γονιδίου *pilA* έχει τεράστιες επιπτώσεις στη τη σταθερότητα των AnNce102 και SurG πρωτεϊνών σε νεαρές υφές, όπου και οι δύο πρωτεΐνες εντοπίζονται αποκλειστικά στα χυμοτόπια και τα ενδοσώματα. Παρά το γεγονός ότι η αυξημένη ενδοκύττωση και ο εντοπισμός των AnNce102 και SurG στα χυμοτόπια, ευνοούν την υπόθεση ότι η PilA (οποία ως επί το πλείστον εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη) αποσταθεροποιεί τους στατικούς/σταθερούς AnNce102/SurG σχηματισμούς αντί να επηρεάζει την ενδοκυτταρική τους διακίνηση/στόχευση. Η υπόθεση αυτή είναι σύμφωνη με τον προτεινόμενο ρόλο των εισοσωμικών πρωτεϊνών στην προστασία από ενδοκύττωση του μεταφορέα αργινίνης Can1 στο ζυμομύκητα (Grossmann et al., 2008), θεώρηση η οποία επί του παρόντος βρίσκεται υπό συζήτηση (Brach et al., 2011).

Από την άλλη πλευρά, στον *A. nidulans*, η απαλοιφή του γονιδίου *annce102* επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό/πυκνότητα των PilA/SurG κοκκίων, με αποτέλεσμα να εντοπίζονται λιγότεροι κοκκιώδεις σχηματισμοί στην κεφαλή των νεαρών υφών, χωρίς ωστόσο να επηρεάζονται τα εισοσώματα κατά μήκος των υφών. Αυτός ο φαινότυπος είναι παρόμοιος με αυτόν που προκύπτει μετά από τη χορήγηση μυριοσίνης στα κύτταρα και μπορεί να ξεπεραστεί με την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης AnNce102. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι δύο διαφορετικοί PilA κοκκιώδεις πληθυσμοί υπάρχουν στον *A. nidulans*. Ένας πληθυσμός στη κεφαλή νεαρών υφών, για την οργάνωση του οποίου είναι

απαραίτητη η πρωτεΐνη AnNce102 και είναι ευαίσθητος σε διακυμάνσεις των επίπεδων των σφιγγολιπιδίων. Και ένας δεύτερος πληθυσμός PilA κοκκίων κατά μήκος της υψής, ο οποίος δεν εξαρτάται από τα επίπεδα σφιγγολιπιδίων ή την πρωτεΐνη AnNce102. Ενδιαφέρον, αποτελεί το γεγονός ότι απαλοιφή του *pilA* γονιδίου επηρεάζει τον αριθμό/τοπολογία των AnNce102 κοκκίων (όπως και απαλοιφή του *annce102* γονιδίου επηρεάζει τον αριθμό/τοπολογία των PilA κοκκίων) κυρίως σε νεαρές υφές (και όχι κονιδιοσπόρια). Αυτή η χρονική ρύθμιση θα μπορούσε να σχετίζεται με το δυνητικό ρόλο των εισοσωμικών πρωτεϊνών στη ρύθμιση των σφιγγολιπιδίων, ή/και PI (4,5) P2 (Aguilar et al., 2010; Frohlich et al., 2009; Kabeche et al., 2014; Young et al., 2002) στη στρατολογήση σηματοδοτικών μορίων και στην αυξημένη ανάγκη για βιογένεση μεμβρανών (Olivera-Couto and Aguilar, 2012) και διαμερισματοποίηση της πλασματικής μεμβράνης σε ενεργά αυξανόμενα και όχι αδρανή κύτταρα. Αυτά τα δεδομένα είναι συνεπή με εκείνα προηγούμενων μελετών στο ζυμομύκητα, που δείχνουν ότι η υπερέκφραση της Nce102 διασώζει από την αποσυναρμολόγηση του εισοσώματος μετά την αναστολή της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων με μυριοσίνη (Frohlich et al., 2009). Επιπλέον, η υπερέκφραση της AnNce102 στον *A. nidulans* οδηγεί σε εκτοπικό εντοπισμό των PilA κοκκίων στα διαφράγματα, ένα αποτέλεσμα που επιβεβαιώνει περαιτέρω τον κρίσιμο ρόλο της AnNce102 στην οργάνωση του εισοσώματος, επίσης, προτείνοντας επιπλέον έναν λειτουργικό ρόλο της AnNce102 που αφορά τη διαφραγματοποίηση στους μύκητες. Σε συμφωνία με αυτόν τον προτεινόμενο ρόλο, η απαλοιφή του Sur7 στη *C. albicans* οδηγεί σε εκτοπικό εντοπισμό της σεπτίνης *cdc12* (Alvarez et al., 2008).

Στον *S. cerevisiae* η Pil1 ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι σηματοδότησης Ypk1 (Zhang, 2004) ενώ η Nce102 έχει προταθεί ότι αποτελεί αισθητήρα της αφθονίας των σφιγγολιπιδίων και αρνητικό ρυθμιστή των κινασών Pkh (Frohlich et al., 2009). Τα δεδομένα από την παρούσα διατριβή υποστηρίζουν ένα σημαντικό, αν και μερικό, ρόλο των πρωτεϊνών AnNce102 και PilA στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων στον *A. nidulans*. Πράγματι, η απαλοιφή των γονιδίων *annce102* και *pilA* μπορεί να καταστείλει εν μέρει τη γενετική (*basA1* και *niiA::ypkA*) ή φαρμακολογική (μυριοσίνη και AbA) αναστολή της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων σε υψηλές θερμοκρασίες. Σύμφωνα με αυτό το αποτέλεσμα, έχει δειχθεί προηγουμένως ότι το θερμικό σοκ οδηγεί σε μια παροδική αύξηση της παραγωγής σφιγγολιπιδίων, η

οποία είναι σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων σε αυτές τις συνθήκες (Cowart, 2003; Jenkins et al., 1997).

Μια άλλη σημαντική πτυχή σχετιζόμενη με την πρωτεΐνη Nce102 είναι η εμπλοκή της με το οξειδωτικό στρες (Desmyter et al., 2007). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ - ROS) είναι μόρια, τα οποία εντοπίζονται στο επίκεντρο ενός προηγμένου δικτύου κυτταρικής σηματοδότησης, με σημαντικούς ρόλους στην κυτταρική φυσιολογία και τις κυτταρικές αποκρίσεις προς το περιβάλλον (Bhattacharjee, 2012). Τα ROS έχουν δειχθεί ότι συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες που κυμαίνονται από τη διαφοροποίηση των κυττάρων (Maryanovich and Gross, 2013) μέχρι την απόπτωση (Hideg et al., 2002), και από τη ρύθμιση της κυριαρχίας της κορυφής (Apical Dominance) (Semighini and Harris, 2008) μέχρι την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Niles and Powers, 2014), υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός «ΔΜΟ- ROS ροοστάτη» στα κύτταρα. Είναι επίσης γνωστό ότι τα ROS μπορούν να επηρεάζουν ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού των σφιγγολιπιδίων και χρησιμεύουν ως αγγελιοφόροι στο μονοπάτι σηματοδότησης των σφιγγολιπιδίων (οξειδοαναγωγική σηματοδότηση) (Castillo et al., 2007; Nikolova-Karakashian and Reid, 2011; Niles et al., 2014). Στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε ότι η απαλοιφή του γονιδίου *annce102* οδηγεί σε υπερευαισθησία στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Ωστόσο, η χορήγηση σε *pilAΔ* ή / και *annce102Δ* στελέχη με 2 ουσίες που οδηγούν στη παράγωγή ανιόντων σουπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$) είχε αντίθετα αποτελέσματα στην ανάπτυξη των στελεχών. Πιο συγκεκριμένα, τα *pilAΔ*, *annce102Δ* και *pilAΔannce102Δ* στελέχη βρέθηκε να είναι περισσότερο ανθεκτικά στην παρουσία μεναδιόνης και λιγότερο ανθεκτικά στο paraquat. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ένα μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν που οδηγεί στο σχηματισμό ανιόντων σουπεροξειδίου υπεύθυνο για αυτή τη διαφορά. Επιπλέον, δόθηκε ότι η φαρμακολογική (χορήγηση μυριοσίνης και AbA) ή γενετική (χρήση του στελέχους *basA1*) αναστολή της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση των επιπέδων ROS. Είναι ενδιαφέρον ότι, καταστολή της έκφρασης της κινάσης YpkA (ομόλογο της YPK1 του ζυμομύκητα) οδήγησε επίσης σε αύξηση των ROS, η οποία είναι εμφανής 12 ώρες μετά την έναρξη της καταστολής. Η κινητική αυτής της αύξησης συσχετίζεται με τη μειωμένη ανάπτυξη του μύκητα, τη καθυστερημένη εκβλάστηση των κονιδίων και την ανικανότητα εγκαθίδρυσης πολικού άξονα που παρατηρείται σε στελέχη *niiA::ypkA*, τα οποία έχουν αναπτυχτεί

για περισσότερο από 12 ώρες υπό κατασταλτικές συνθήκες (Colabardini et al., 2013). Ταυτόχρονα, δόθηκε ότι το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *niiA::yprkA basA1* εμφανίζουν συνθετικό θνησιγόνο φαινότυπο όταν αναπτύσσονται υπό κατασταλτικές συνθήκες στη μην επιτρεπτή θερμοκρασία (42 °C), παρόμοιο με συνθετικό θνησιγόνο φαινότυπο των στελεχών *niiA::yprkAbarA1* όταν αναπτύσσονται παρουσία αμμωνιακών στους 37 °C (Colabardini et al., 2013). Επιπλέον, το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος, *niiA::yprkA basA1*, παρουσίασε αυξημένα επίπεδα ROS από τα μονά μεταλλαγμένα στελέχη, υπό τις ίδιες συνθήκες, επιβεβαιώνοντας τον προτεινόμενο ρόλο της κινάσης YrkA στο μονοπάτι βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων (Colabardini et al., 2013) και προτείνοντας ένα σημαντικό ρόλο της YrkA τόσο στη σφιγγολιπιδική όσο και την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση.

Όσον αφορά το ρόλο των εισοσωμάτων/AnNce102 στη YrkA/ σφιγγολιπιδική σηματοδότηση, δείχθηκε ότι τα *pilAΔ* ή/και *annce102Δ* στελέχη είναι μερικώς ανθεκτικά στη φαρμακολογική ή γενετική μείωση των επιπέδων των σφιγγολιπιδίων σε υψηλές θερμοκρασίες. Υπό αυτές τις συνθήκες, η προσθήκη του αλιευτή/εκκαθαριστή (scavenger) ελεύθερων ριζών, N-ακετυλοκυστεΐνη (N-acetylcysteine-NAC), απέκρυψε αποτελεσματικά τις όποιες διαφορές ανάπτυξης μεταξύ των στελεχών αν και στατιστικά μη σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ROS ήταν ανιχνευτήκαν μεταξύ των μεταλλαγμένων στελεχών. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι τα ROS που παράγονται σε αυτές τις συνθήκες δεν μπορούν ανιχνευτούν με τη χρήση της χρωστικής 2',7' dichlorofluorescein diacetate (DCF) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το τριπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *niiA::yprkA annce102Δ pilAΔ* παρουσιάζει ευαισθησία στους 25 °C κάτω από συνθήκες καταστολής και αποτελεί το μόνο στέλεχος που εμφανίζει 3 φορές περισσότερα ROS από τα μονά ή τα διπλά μεταλλάγματα. Στο πλαίσιο αυτό, τα *nce102Δ* στελέχη του μύκητα *C. albicans* παρουσιάζουν έντονο πρόβλημα στο να εισβάλλουν χαμηλές συγκεντρώσεις άγαρ, πιθανότατα λόγω προβληματικής οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης, ενώ η κινάση Yrk1 στο ζυμομύκητα έχει προταθεί ότι ρυθμίζει την πόλωση της ακτίνης ελέγχοντας τη συσσώρευση των ROS (Niles and Powers, 2014). Εφόσον, λόγω της καταστολής της YrkA προκαλείται η ανεπάρκεια στη δημιουργία πολικού άξονα αλλά και έντονη διακλάδωση των υφών (Colabardini et al., 2013). Μια ενδιαφέρουσα εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι, εκτός από το ρόλο των PilA/ AnNce102 στη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων, οι πρωτεΐνες αυτές είναι πιθανό να εμπλέκονται στη ρύθμιση του

κυτταροσκελετού ακτίνης μέσω της YrkA και ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει ROS.

Είναι γνωστό πάνω από μια δεκαετία ότι η φαρμακολογική (χρήση της φουμονισίνης³¹ B1) ή γενετική (χρήση του μεταλλαγμένου στελέχους *ipt1Δ*) αναστολή της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων οδηγεί σε υπερευαισθησία των φυσικού τύπου κυττάρων της *C. albicans* σε πολλά φάρμακα, μεταξύ των οποίων είναι και τα αντιμυκητιακά φάρμακα, αζόλες (κετοκοναζόλη, ιτρακοναζόλη, φλουκοναζόλη) (Mukhopadhyay et al., 2004; Prasad et al., 2005). Τα αποτελέσματα αυτά, αλλά και αυτά της παρούσας διατριβής, είναι σε θέση να εξηγήσουν παρατηρήσεις του εργαστηρίου μας (Vangelatos et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα έχει δείχθει ότι τα *pilAΔ* και *surGΔ* στελέχη εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο αντιμυκητιακό φάρμακο, ιτρακοναζόλη (Vangelatos et al., 2010). Επιπλέον, πρόσφατα δείχθηκε ότι η εξωγενής προσθήκη ή / και η μη φυσιολογική συσσώρευση LCBs, οδηγεί σε αλλαγή της ευαισθησίας διαφορετικών μυκήτων στις εχινοκανδίνες, αναστολέων της β-1,3-συνθάσης της γλυκάνης (Douglas, 2001). Συνοπτικά, τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ένα ρόλο των PilA/ AnNce102 πρωτεϊνών στη βιοσύνθεση των σφιγγολιπιδίων και όχι στη ρύθμιση του τρόπου δράσης των αντιμυκητιακών φαρμάκων όπως είχε προταθεί από τους Edlind και Katiyar (Edlind and Katiyar, 2004). Συνεπώς οι πρωτεΐνες PilA/ AnNce102 αποτελούν ιδανικά εργαλεία μελέτης της σηματοδότησης του μονοπατιού βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων, της αντιμυκητιασιακής αντίστασης και των μηχανισμών που τις διέπουν.

³¹ Η φουμονισίνη B1 (Fumonisin B1- παράγεται από διάφορα είδη του γένους *Fusarium*) είναι μία τοξίνη που αναστέλλει τη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων (επιδρώντας στη συνθάση του κεραμιδίου). Η φουμονισίνη B1 μιμείται τις βάσεις μακράς αλυσίδας (LCBs). Επώαση φυτικών κυττάρων παρουσία φουμονισίνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση δύο LCBs, της διϋδροσφιγγοσίνης (D18: 0, DHS) και της φυτοσφιγγοσίνης (T18: 0 PHS). Αυτή η συσσώρευση LCBs οδηγεί σε απόπτωση των εν λόγω κυττάρων (Berkey et al., 2012; Merrill et al., 2001).

5. Βιβλιογραφία

- Adams, T.H., Wieser, J.K., Yu, J.-H., 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 35–54.
- Adler, J., Parmryd, I., 2010. Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 77, 733–742. doi:10.1002/cyto.a.20896
- Afzal, H., Shazad, S., Qamar Un Nisa, S., 2013. Morphological identification of *Aspergillus* species from soil of larkana district (Sindh, Pakistan). *Asian J Agri Biol* 1, 105–117.
- Aguilar, P.S., Fröhlich, F., Rehman, M., Shales, M., Ulitsky, I., Olivera-Couto, A., Braberg, H., Shamir, R., Walter, P., Mann, M., Ejsing, C.S., Krogan, N.J., Walther, T.C., 2010. A plasma-membrane E-MAP reveals links of the eisosome with sphingolipid metabolism and endosomal trafficking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 901–908. doi:10.1038/nsmb.1829
- Aguilera-Romero, A., Gehin, C., Riezman, H., 2014. Sphingolipid homeostasis in the web of metabolic routes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841, 647–656. doi:10.1016/j.bbalip.2013.10.014
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, W., 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13, 111–118. doi:10.1016/j.tim.2005.01.007
- Alvarez, F.J., Douglas, L.M., Rosebrock, A., Konopka, J.B., 2008. The Sur7 protein regulates plasma membrane organization and prevents intracellular cell wall growth in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 19, 5214–5225.
- Amaike, S., Keller, N.P., 2011. *Aspergillus flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 107–133. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095221
- 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. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03956.x
- Apostolaki, A., Erpapazoglou, Z., Harispe, L., Billini, M., Kafasla, P., Kizis, D., Penalva, M.A., 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. doi:10.1128/EC.00270-08
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M.A., 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. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06102.x
- Aronova, S., Wedaman, K., Aronov, P.A., Fontes, K., Ramos, K., Hammock, B.D., Powers, T., 2008. Regulation of Ceramide Biosynthesis by TOR Complex 2. *Cell Metab.* 7, 148–158. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.015

- Arora, A., Raghuraman, H., Chattopadhyay, A., 2004. Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 920–926. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.118
- Arst Jr, H.N., Cove, D.J., 1973. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 126, 111–141.
- Athanasopoulos, A., Boleti, H., Scazzocchio, C., Sophianopoulou, V., 2013. Eisosome distribution and localization in the meiotic progeny of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 53, 84–96. doi:10.1016/j.fgb.2013.01.002
- Athanasopoulos, A., Gournas, C., Amillis, S., Sophianopoulou, V., 2015. Characterization of AnNce102 and its role in eisosome stability and sphingolipid biosynthesis. *Sci. Rep.* 5, 15200.
- Bagnat, M., Simons, K., 2002. Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.* 383, 1475–1480. doi:10.1515/BC.2002.169
- Bailey, C., ARST, H.N., 1975. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* 51, 573–577.
- Baker, J.R., 1952. The Cell-Theory: A Restatement, History, and Critique Part III. The Cell as a Morphological Unit. *Q. J. Microsc. Sci.* 3, 157–190.
- Balla, T., 2013. Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation. *Physiol. Rev.* 93, 1019–1137. doi:10.1152/physrev.00028.2012
- Bauer, F., Urdaci, M., Aigle, M., Crouzet, M., 1993. Alteration of a yeast SH3 protein leads to conditional viability with defects in cytoskeletal and budding patterns. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5070–5084.
- Bayram, Ö., Braus, G.H., 2012. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 1–24. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x
- Bayram, Ö., Braus, G.H., Fischer, R., Rodriguez-Romero, J., 2010. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet. Biol.* 47, 900–908. doi:10.1016/j.fgb.2010.05.008
- Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.-J., Keller, N.P., Yu, J.-H., Braus, G.H., 2008. VelB/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science* 320, 1504–1506. doi:10.1126/science.1155888
- Berchtold, D., Piccolis, M., Chiaruttini, N., Riezman, I., Riezman, H., Roux, A., Walther, T.C., Loewith, R., 2012. Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nat. Cell Biol.* 14, 542–547. doi:10.1038/ncb2480
- Berchtold, D., Walther, T.C., 2009. TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol. Biol. Cell* 20, 1565–1575.
- Berkey, R., Bendigeri, D., Xiao, S., 2012. Sphingolipids and Plant Defense/Disease: The “Death” Connection and Beyond. *Front. Plant Sci.* 3. doi:10.3389/fpls.2012.00068
- Bhattacharjee, S., 2012. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *J. Bot.* 2012, e985298. doi:10.1155/2012/985298
- Binder, U., Oberparleiter, C., Meyer, V., Marx, F., 2010. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 75, 294–307. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06936.x

- Blom, T., Somerharju, P., Ikonen, E., 2011. Synthesis and Biosynthetic Trafficking of Membrane Lipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004713–a004713. doi:10.1101/cshperspect.a004713
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., Fischer, R., 2005. The *Aspergillus nidulans* Phytochrome FphA Represses Sexual Development in Red Light. *Curr. Biol.* 15, 1833–1838. doi:10.1016/j.cub.2005.08.061
- Bolte, S., Cordelieres, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
- Brach, T., Specht, T., Kaksonen, M., 2011. Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J. Cell Sci.* 124, 328–337. doi:10.1242/jcs.078519
- 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.
- Brakhage, A.A., 2012. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 21–32. doi:10.1038/nrmicro2916
- Brandt, M.E., 2002. *Candida* and Candidiasis. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 876. doi:10.3201/eid0808.020059
- Brett, C.L., Kallay, L., Hua, Z., Green, R., Chyou, A., Zhang, Y., Graham, T.R., Donowitz, M., Rao, R., 2011. Genome-Wide Analysis Reveals the Vacuolar pH-Stat of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 6, e17619. doi:10.1371/journal.pone.0017619
- Burger, G., Strauss, J., Scazzocchio, C., Lang, B.F., 1991. *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5746–5755.
- Calvo, A.M., 2008. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1053–1061. doi:10.1016/j.fgb.2008.03.014
- Carvalho, M.D.F., Baracho, M.S., Baracho, I.R., 2002. An investigation of the nuclei of hülle cells of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Mol. Biol.* 25, 485–488. doi:10.1590/S1415-47572002000400019
- Castillo, S.S., Levy, M., Thaikootathil, J.V., Goldkorn, T., 2007. Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 313, 2680–2686. doi:10.1016/j.yexcr.2007.04.002
- Cheng, J., Park, T.S., Chio, L.C., Fischl, A.S., Xiang, S.Y., 2003. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 163–177.
- Cheng, J., Park, T.-S., Fischl, A.S., Ye, X.S., 2001. Cell Cycle Progression and Cell Polarity Require Sphingolipid Biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6198–6209. doi:10.1128/MCB.21.18.6198-6209.2001
- Cleves, A.E., Cooper, D.N., Barondes, S.H., Kelly, R.B., 1996. A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 133, 1017–1026. doi:10.1083/jcb.133.5.1017
- Colabardini, A.C., Brown, N.A., Savoldi, M., Goldman, M.H.S., Goldman, G.H., 2013. Functional Characterization of *Aspergillus nidulans* *ypkA*, a Homologue of the Mammalian Kinase SGK. *PLoS ONE* 8, e57630. doi:10.1371/journal.pone.0057630

- Coppolino, M.G., Dierckman, R., Loijens, J., Collins, R.F., Pouladi, M., Jongstra-Bilen, J., Schreiber, A.D., Trimble, W.S., Anderson, R., Grinstein, S., 2002. Inhibition of Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase I α Impairs Localized Actin Remodeling and Suppresses Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 277, 43849–43857. doi:10.1074/jbc.M209046200
- Cowart, L.A., 2003. Roles for Sphingolipid Biosynthesis in Mediation of Specific Programs of the Heat Stress Response Determined through Gene Expression Profiling. *J. Biol. Chem.* 278, 30328–30338. doi:10.1074/jbc.M300656200
- Cubero, B., Scazzocchio, C., 1994. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 13, 407–415.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., Dickson, R., 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* Chichester Engl. 14, 1471–1510. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y
- Daumke, O., Roux, A., Haucke, V., 2014. BAR Domain Scaffolds in Dynamin-Mediated Membrane Fission. *Cell* 156, 882–892. doi:10.1016/j.cell.2014.02.017
- deHart, A.K.A., 2002. The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* 156, 241–248. doi:10.1083/jcb.200107135
- Deng, C., Xiong, X., Krutchinsky, A.N., 2009. Unifying fluorescence microscopy and mass spectrometry for studying protein complexes in cells. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 1413–1423.
- Desmyter, L., Verstraelen, J., Dewaele, S., Libert, C., Contreras, R., Chen, C., 2007. Nonclassical export pathway: overexpression of NCE102 reduces protein and DNA damage and prolongs lifespan in an SGS1 deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology* 8, 527–535. doi:10.1007/s10522-007-9095-5
- De Virgilio, C., Loewith, R., 2006. Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 25, 6392–6415. doi:10.1038/sj.onc.1209884
- Dickson, R.C., 2008. Thematic Review Series: Sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J. Lipid Res.* 49, 909–921. doi:10.1194/jlr.R800003-JLR200
- Dickson, R.C., Nagiec, E.E., Wells, G.B., Nagiec, M.M., Lester, R.L., 1997. Synthesis of mannose-(inositol-P) 2-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the IPT1 (YDR072c) gene. *J. Biol. Chem.* 272, 29620–29625.
- Dickson, R., Sumanasekera, C., Lester, R., 2006. Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Lipid Res.* 45, 447–465. doi:10.1016/j.plipres.2006.03.004
- Dienstmann, R., Rodon, J., Serra, V., Tabernero, J., 2014. Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1021–1031. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0639
- Dobrucki, J.W., 2004. Confocal microscopy: quantitative analytical capabilities. *Methods Cell Biol.* 75, 41–72.
- Douglas, C.M., 2001. Fungal $\beta(1,3)$ -d-glucan synthesis. *Med. Mycol.* 39, 55–66. doi:10.1080/mmy.39.1.55.66
- Douglas, L.M., Konopka, J.B., 2014. Fungal Membrane Organization: The Eisosome Concept. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 140626173329002. doi:10.1146/annurev-micro-091313-103507

- Douglas, L.M., Wang, H.X., Keppler-Ross, S., Dean, N., Konopka, J.B., 2012. Sur7 promotes plasma membrane organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence of *Candida albicans*. *mBio* 3. doi:10.1128/mBio.00254-11
- Douglas, L.M., Wang, H.X., Konopka, J.B., 2013. The MARVEL Domain Protein Nce102 Regulates Actin Organization and Invasive Growth of *Candida albicans*. *mBio* 4, e00723–13–e00723–13. doi:10.1128/mBio.00723-13
- D'Souza, C.A., Lee, B.N., Adams, T.H., 2001. Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 158, 1027–1036.
- Dunn, K.W., Kamocka, M.M., McDonald, J.H., 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 300, C723–C742. doi:10.1152/ajpcell.00462.2010
- Dyer, P.S., Ingram, D.S., Johnstone, K., 1992. The Control of Sexual Morphogenesis in the Ascomycotina. *Biol. Rev.* 67, 421–458. doi:10.1111/j.1469-185X.1992.tb01189.x
- Dyer, P.S., O’Gorman, C.M., 2012. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 165–192. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00308.x
- Edlind, T.D., Katiyar, S.K., 2004. The echinocandin “target” identified by cross-linking is a homolog of Pil1 and Lsp1, sphingolipid-dependent regulators of cell wall integrity signaling. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4491. doi:10.1128/AAC.48.11.4491.2004
- Elliott, C.G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* 1, 462–476. doi:10.1017/S0016672300000434
- Encyclopedia of Microbiology, 2009. . Academic Press.
- Erapapazoglou, Z., Kafasla, P., Sophianopoulou, V., 2006. The product of the SHR3 orthologue of *Aspergillus nidulans* has restricted range of amino acid transporter targets. *Fungal Genet. Biol.* 43, 222–233. doi:10.1016/j.fgb.2005.11.006
- Eruslanov, E., Kusmartsev, S., 2010. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 594, 57–72. doi:10.1007/978-1-60761-411-1_4
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U., 2010. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol.* 18, 569–576. doi:10.1016/j.tim.2010.09.007
- Felenbok, B., Flipphi, M., Nikolaev, I., 2001. Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: A model system for studying gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 69, 149–204.
- Fischer-Parton, S., Parton, R.M., Hickey, P.C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H.A., Read, N.D., 2001. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J. Microsc.* 198, 246–259.
- Fridolfsson, H.N., Roth, D.M., Insel, P.A., Patel, H.H., 2014. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* doi:10.1096/fj.14-252320
- Fröhlich, F., Christiano, R., Olson, D.K., Alcazar-Roman, A., DeCamilli, P., Walther, T.C., 2014. A Role for Eisosomes in Maintenance of Plasma Membrane Phosphoinositide Levels. *Mol. Biol. Cell* mbc–E13.

- Frohlich, F., Moreira, K., Aguilar, P.S., Hubner, N.C., Mann, M., Walter, P., Walther, T.C., 2009. A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *J. Cell Biol.* 185, 1227–1242. doi:10.1083/jcb.200811081
- Funato, K., Vallée, B., Riezman, H., 2002. Biosynthesis and Trafficking of Sphingolipids in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*[†]. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 15105–15114. doi:10.1021/bi026616d
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.-I., Baştürkmen, 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., Peñalva, 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., Birren, B.W., 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438, 1105–1115. doi:10.1038/nature04341
- Gao, G., Li, J.-J., Li, Y., Li, D., Wang, Y., Wang, L., Tang, X.D., Walsh, M.P., Gui, Y., Zheng, X.-L., 2011. Rapamycin inhibits hydrogen peroxide-induced loss of vascular contractility. *AJP Heart Circ. Physiol.* 300, H1583–H1594. doi:10.1152/ajpheart.01084.2010
- Gault, C.R., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Sphingolipids Signal. Regul. Mol.* 1–23.
- Geiser, D.M., 2009. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Med. Mycol.* 47 Suppl 1, S21–26. doi:10.1080/13693780802139859
- Gessler, N.N., Aver’yanov, A.A., Belozerskaya, T.A., 2007. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochem. Mosc.* 72, 1091–1109. doi:10.1134/S0006297907100070
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E.K., Weissman, J.S., 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741. doi:10.1038/nature02046
- Gibbons, J.G., Rokas, A., 2013. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends Microbiol.* 21, 14–22. doi:10.1016/j.tim.2012.09.005
- Goldman, G., Osmani, S. (Eds.), 2007. *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods, Mycology*. CRC Press.
- Gournas, C., Evangelidis, T., Athanasopoulos, A., Mikros, E., Sophianopoulou, V., 2015. The *Aspergillus nidulans* proline permease as a model for understanding the factors determining substrate binding and specificity of fungal amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* jbc.M114.612069. doi:10.1074/jbc.M114.612069
- Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W.B., Opekarová, M., Tanner, W., 2008. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* 183, 1075–1088. doi:10.1083/jcb.200806035
- Grossmann, G., Opekarová, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I., Tanner, W., 2006a. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J.* 26, 1–8.

- Grossmann, G., Opekarova, M., Novakova, L., Stolz, J., Tanner, W., 2006b. Lipid Raft-Based Membrane Compartmentation of a Plant Transport Protein Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5, 945–953. doi:10.1128/EC.00206-05
- Gulati, S., Liu, Y., Munkacsi, A.B., Wilcox, L., Sturley, S.L., 2010. Sterols and sphingolipids: Dynamic duo or partners in crime? *Prog. Lipid Res.* 49, 353–365. doi:10.1016/j.plipres.2010.03.003
- Hallstrom, T.C., Lambert, L., Schorling, S., Balzi, E., Goffeau, A., Moye-Rowley, W.S., 2001. Coordinate Control of Sphingolipid Biosynthesis and Multidrug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 23674–23680. doi:10.1074/jbc.M101568200
- Hamacher, M., Pippirs, U., Köhler, A., Müller, H.W., Bosse, F., 2001. Plasmolipin: genomic structure, chromosomal localization, protein expression pattern, and putative association with Bardet-Biedl syndrome. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 12, 933–937.
- Han, K.-H., 2009. Molecular Genetics of *Emericella nidulans* Sexual Development. *Mycobiology* 37, 171–182. doi:10.4489/MYCO.2009.37.3.171
- Han, K.H., Lee, D.B., Kim, J.H., Kim, M.S., Han, K.Y., Kim, W.S., Park, Y.S., Kim, H.B., Han, D.M., 2003. Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.-SEOUL-* 41, 34–40.
- Hannun, Y.A., Luberto, C., Argraves, K.M., 2001. Enzymes of Sphingolipid Metabolism: From Modular to Integrative Signaling †. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 4893–4903. doi:10.1021/bi002836k
- Hansberg, W., Aguirre, J., 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* 142, 201–221. doi:10.1016/S0022-5193(05)80222-X
- Harris, S.D., 2001. Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 736–739.
- Haynes, C.M., Titus, E.A., Cooper, A.A., 2004. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol. Cell* 15, 767–776. doi:10.1016/j.molcel.2004.08.025
- Heidler, S.A., Radding, J.A., 1995. The AUR1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* encodes dominant resistance to the antifungal agent aureobasidin A (LY295337). *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2765–2769.
- Heimburg, T., 2007. Thermal biophysics of membranes, *Tutorials in biophysics*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Heitman, J., 2007. Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications. ASM Press, Washington, D.C.
- Held, P., 2010. An Introduction to Reactive Oxygen Species. BioTek White Pap.
- Hideg, E., Barta, C., Kálai, T., Vass, I., Hideg, K., Asada, K., 2002. Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol.* 43, 1154–1164.
- Hitchcock, A.L., Kahana, J.A., Silver, P.A., 2005. The Uses of Green Fluorescent Protein in Yeasts, in: Chalfie, rtin, Kain, S.R. (Eds.), *Green Fluorescent Protein*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 179–201.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A., Kanaho, Y., 1999. Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase α Is a Downstream Effector of the Small G Protein ARF6 in Membrane Ruffle Formation. *Cell* 99, 521–532. doi:10.1016/S0092-8674(00)81540-8

- Hosiner, D., Sponder, G., Grascopf, A., Reipert, S., Schweyen, R.J., Schüller, C., Aleschko, M., 2011. Pun1p is a metal ion-inducible, calcineurin/Crz1p-regulated plasma membrane protein required for cell wall integrity. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1108–1119. doi:10.1016/j.bbamem.2011.01.002
- Huang, Y.H., Leblanc, P., Apostolou, V., Stewart, B., Moreland, R.B., 1995. Comparison of Milli-Q PF plus water with DEPC-treated water in the preparation and analysis of RNA. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 129–133.
- Ikai, N., Nakazawa, N., Hayashi, T., Yanagida, M., 2011. The reverse, but coordinated, roles of Tor2 (TORC1) and Tor1 (TORC2) kinases for growth, cell cycle and separase-mediated mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Open Biol.* 1. doi:10.1098/rsob.110007
- Ikner, A., Shiozaki, K., 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 569, 13–27. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.09.006
- Jacinto, E., Lorberg, A., 2008. TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem. J.* 410, 19. doi:10.1042/BJ20071518
- Janmey, P.A., Lindberg, U., 2004. Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 658–666. doi:10.1038/nrm1434
- Jenkins, G.M., Richards, A., Wahl, T., Mao, C., Obeid, L., Hannun, Y., 1997. Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 32566–32572.
- Kabeche, R., Baldissard, S., Hammond, J., Howard, L., Moseley, J.B., 2011. The filament-forming protein Pil1 assembles linear eisosomes in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 22, 4059–4067. doi:10.1091/mbc.E11-07-0605
- Kabeche, R., Roguev, A., Krogan, N.J., Moseley, J.B., 2014. A Pil1-Sle1-Syj1-Tax4 functional pathway links eisosomes with PI(4,5)P2 regulation. *J. Cell Sci.* 127, 1318–1326. doi:10.1242/jcs.143545
- Kafasla, P., Bouzarelou, D., Frillingos, S., Sophianopoulou, V., 2007. The proline permease of *Aspergillus nidulans*: functional replacement of the native cysteine residues and properties of a cysteine-less transporter. *Fungal Genet. Biol. FG B* 44, 615–626. doi:10.1016/j.fgb.2007.01.011
- Kajiwara, K., Muneoka, T., Watanabe, Y., Karashima, T., Kitagaki, H., Funato, K., 2012. Perturbation of sphingolipid metabolism induces endoplasmic reticulum stress-mediated mitochondrial apoptosis in budding yeast: Sphingolipids regulate ER stress-mediated yeast apoptosis. *Mol. Microbiol.* 86, 1246–1261. doi:10.1111/mmi.12056
- Karotki, L., Huiskonen, J.T., Stefan, C.J., Ziółkowska, N.E., Roth, R., Surma, M.A., Krogan, N.J., Emr, S.D., Heuser, J., Grünwald, K., Walther, T.C., 2011. Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *J. Cell Biol.* 195, 889–902. doi:10.1083/jcb.201104040
- Kato, N., Brooks, W., Calvo, A.M., 2003. The Expression of Sterigmatocystin and Penicillin Genes in *Aspergillus nidulans* Is Controlled by veA, a Gene Required for Sexual Development. *Eukaryot. Cell* 2, 1178–1186. doi:10.1128/EC.2.6.1178-1186.2003
- Kawasaki, L., Aguirre, J., 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 183, 1434–1440. doi:10.1128/JB.183.4.1434-1440.2001
- Kendrick, B., 1979. The Whole Fungus: The Sexual-asexual Synthesis : Proceedings of the Second International Mycological Conference, Held at the Environmental Sciences Centre of the University of Calgary, Kananaskis,

- Alberta, Canada. National Museum of Natural Sciences, National Museums of Canada and the Kananakis Foundation.
- Khalaj, V., Azizi, M., Enayati, S., Khorasanizadeh, D., Ardakani, E.M., 2012. NCE102 homologue in *Aspergillus fumigatus* is required for normal sporulation, not hyphal growth or pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 329, 138–145. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02513.x
- Klemm, R.W., Ejsing, C.S., Surma, M.A., Kaiser, H.-J., Gerl, M.J., Sampaio, J.L., de Robillard, Q., Ferguson, C., Proszynski, T.J., Shevchenko, A., Simons, K., 2009. Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* 185, 601–612. doi:10.1083/jcb.200901145
- Kovtun, O., Tillu, V.A., Ariotti, N., Parton, R.G., Collins, B.M., 2015. Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *J. Cell Sci.* 128, 1269–1278. doi:10.1242/jcs.167866
- Krappmann, S., Braus, G.H., 2005. Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. *Med. Mycol.* 43 Suppl 1, S31–40.
- Krijgheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G.J., Wang, F., Müller, W.H., Dijksterhuis, J., Wösten, H.A.B., 2013. Development in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 74, 1–29. doi:10.3114/sim0006
- Kuroda, M., Hashida-Okado, T., Yasumoto, R., Gomi, K., Kato, I., Takesako, K., 1999. An aureobasidin A resistance gene isolated from *Aspergillus* is a homolog of yeast AUR1, a gene responsible for inositol phosphorylceramide (IPC) synthase activity. *Mol. Gen. Genet.* MGG 261, 290–296.
- Kurtov, D., Kinghorn, J.R., Unkles, S.E., 1999. The *Aspergillus nidulans* panB gene encodes ketopantoate hydroxymethyltransferase, required for biosynthesis of pantothenate and Coenzyme A. *Mol. Gen. Genet.* MGG 262, 115–120.
- Lamarre, C., LeMay, J.-D., Deslauriers, N., Bourbonnais, Y., 2001. *Candida albicans* Expresses an Unusual Cytoplasmic Manganese-containing Superoxide Dismutase (SOD3 Gene Product) upon the Entry and during the Stationary Phase. *J. Biol. Chem.* 276, 43784–43791. doi:10.1074/jbc.M108095200
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189. doi:10.1038/nri1312
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., Aguirre, J., 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 50, 1241–1255. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03800.x
- Lee, B.N., Adams, T.H., 1996. FluG and flbA function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through brlA beta activation. *EMBO J.* 15, 299.
- Lee, J.-H., Heuser, J.E., Roth, R., Goodenough, U., 2015. EISOSOME ULTRASTRUCTURE AND EVOLUTION IN FUNGI, MICROALGAE AND LICHENS. *Eukaryot. Cell* EC.00106–15. doi:10.1128/EC.00106-15
- Lemmon, M.A., 2007. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem. Soc. Symp.* 81–93. doi:10.1042/BSS0740081
- Lenard, J., Singer, S.J., 1966. Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 56, 1828.
- Lingwood, D., Simons, K., 2010. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Sci.* January 1 2010 327, 46–50. doi:10.1126/science.1174621

- Li, S., Bao, D., Yuen, G., Harris, S.D., Calvo, A.M., 2007. *basA* Regulates Cell Wall Organization and Asexual/Sexual Sporulation Ratio in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 176, 243–253. doi:10.1534/genetics.106.068239
- Liu, K., 2005. The Sphingoid Long Chain Base Phytosphingosine Activates AGC-type Protein Kinases in *Saccharomyces cerevisiae* Including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *J. Biol. Chem.* 280, 22679–22687. doi:10.1074/jbc.M502972200
- Lockington, R.A., Scaly-Lewis, H.M., Scazzocchio, C., Davies, R.W., 1985. Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 33, 137–149. doi:10.1016/0378-1119(85)90088-5
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000. *Membrane Proteins*.
- Loewith, R., Hall, M.N., 2011. Target of Rapamycin (TOR) in Nutrient Signaling and Growth Control. *Genetics* 189, 1177–1201. doi:10.1534/genetics.111.133363
- Loijens, J.C., Boronenkov, I.V., Parker, G.J., Anderson, R.A., 1996. The phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase family. *Adv. Enzyme Regul.* 36, 115–140.
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Vis. Exp. JoVE* e3998. doi:10.3791/3998
- Lukyanov, K.A., Chudakov, D.M., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Matz, M.V., Lukyanov, S., 2005. Discovery and Properties of GFP-Like Proteins from Nonbioluminescent Anthozoa, in: Chalfie, rtin, Kain, S.R. (Eds.), *Green Fluorescent Protein*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 121–138.
- Luo, G., Costanzo, M., Boone, C., Dickson, R.C., 2011. Nutrients and the Pkh1/2 and Pkc1 Protein Kinases Control mRNA Decay and P-body Assembly in Yeast. *J. Biol. Chem.* 286, 8759–8770. doi:10.1074/jbc.M110.196030
- Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O.N., Dickson, R.C., 2008. The Sphingolipid Long-chain Base-Pkh1/2-Ypk1/2 Signaling Pathway Regulates Eisosome Assembly and Turnover. *J. Biol. Chem.* 283, 10433–10444. doi:10.1074/jbc.M709972200
- Machida, M., Gomi, K., 2010. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Horizon Scientific Press.
- Magliano, P., Flipphi, M., Sanglard, D., 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, 208–215. doi:10.1016/j.fgb.2010.08.004
- Malinska, K., 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. doi:10.1242/jcs.01493
- Malínská, K., Malínský, J., Opekarová, M., Tanner, W., 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 4427–4436.
- Mao, W., Chen, X., Yang, T., Yin, Y., Ge, M., Luo, M., Chen, D., Qian, X., 2012. A rapid fluorescent screening method for cellular sensitivity to anti-cancer compound. *Cytotechnology* 64, 451–457. doi:10.1007/s10616-011-9423-0
- Martinez, M.J., Roy, S., Archuletta, A.B., Wentzell, P.D., Anna-Arriola, S.S., Rodriguez, A.L., Aragon, A.D., Quiñones, G.A., Allen, C., Werner-Washburne, M., 2004. Genomic Analysis of Stationary-Phase and Exit in *Saccharomyces cerevisiae*: Gene Expression and Identification of Novel Essential Genes. *Mol. Biol. Cell* 15, 5295–5305. doi:10.1091/mbc.E03-11-0856

- Martin, S.W., Glover, B.J., Davies, J.M., 2005. Lipid microdomains – plant membranes get organized. *Trends Plant Sci.* 10, 263–265. doi:10.1016/j.tplants.2005.04.004
- Maryanovich, M., Gross, A., 2013. A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol.* 23, 129–134. doi:10.1016/j.tcb.2012.09.007
- Masuda, M., Mochizuki, N., 2010. Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 391–398. doi:10.1016/j.semcdb.2010.01.010
- Matz, M.V., Labas, Y.A., Ugalde, J., 2005. Evolution of Function and Color in GFP-Like Proteins, in: Chalfie, rtin, Kain, S.R. (Eds.), *Green Fluorescent Protein*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 139–161.
- Merrill, A.H., Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A., Wang, E., 1997. Sphingolipids—the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 208–225.
- Merrill, A.H., Sullards, M.C., Wang, E., Voss, K.A., Riley, R.T., 2001. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* 109, 283–289.
- Meyer, S.G.E., Wendt, A.E., Scherer, M., Liebisch, G., Kerkweg, U., Schmitz, G., de Groot, H., 2012. Myriocin, an inhibitor of serine palmitoyl transferase, impairs the uptake of transferrin and low-density lipoprotein in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 526, 60–68. doi:10.1016/j.abb.2012.07.006
- Michán, S., Lledías, F., Baldwin, J.D., Natvig, D.O., Hansberg, W., 2002. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 521–532.
- Miller, K.Y., Wu, J., Miller, B.L., 1992. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev.* 6, 1770–1782.
- Mim, C., Unger, V.M., 2012. Membrane curvature and its generation by BAR proteins. *Trends Biochem. Sci.* 37, 526–533. doi:10.1016/j.tibs.2012.09.001
- Montefusco, D.J., Matmati, N., Hannun, Y.A., 2014. The yeast sphingolipid signaling landscape. *Chem. Phys. Lipids* 177, 26–40. doi:10.1016/j.chemphyslip.2013.10.006
- Moor, H., Mühlethaler, K., 1963. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.* 17, 609–628.
- Moreira, K.E., Schuck, S., Schrul, B., Fröhlich, F., Moseley, J.B., Walther, T.C., Walter, P., 2012. Seg1 controls eisosome assembly and shape. *J. Cell Biol.* 198, 405–420. doi:10.1083/jcb.201202097
- Mouritsen, O.G., 2011. Model Answers to Lipid Membrane Questions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004622–a004622. doi:10.1101/cshperspect.a004622
- Mouritsen, O.G., Bloom, M., 1984. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys. J.* 46, 141–153.
- Muir, A., Ramachandran, S., Roelants, F.M., Timmons, G., Thorner, J., 2014. TORC2-dependent protein kinase Ypk1 phosphorylates ceramide synthase to stimulate synthesis of complex sphingolipids. *eLife* 3. doi:10.7554/eLife.03779
- Mukhopadhyay, K., Prasad, T., Saini, P., Pucadyil, T.J., Chattopadhyay, A., Prasad, R., 2004. Membrane Sphingolipid-Ergosterol Interactions Are Important Determinants of Multidrug Resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1778–1787. doi:10.1128/AAC.48.5.1778-1787.2004
- Munro, S., 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377–388.

- Murphy, E.R., Boxberger, J., Colvin, R., Lee, S.J., Zahn, G., Loor, F., Kim, K., 2011. Pil1, an eisosome organizer, plays an important role in the recruitment of synaptojanins and amphiphysins to facilitate receptor-mediated endocytosis in yeast. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 825–833. doi:10.1016/j.ejcb.2011.06.006
- Murphy, E.R., Kim, K.T., 2012. Insights into eisosome assembly and organization. *J. Biosci.* 37, 295–300. doi:10.1007/s12038-012-9206-6
- Nagiec, E.E., 1997. Sphingolipid Synthesis as a Target for Antifungal Drugs. COMPLEMENTATION OF THE INOSITOL PHOSPHORYLCERAMIDE SYNTHASE DEFECT IN A MUTANT STRAIN OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE BY THE AUR1 GENE. *J. Biol. Chem.* 272, 9809–9817. doi:10.1074/jbc.272.15.9809
- Nikolova-Karakashian, M.N., Reid, M.B., 2011. Sphingolipid Metabolism, Oxidant Signaling, and Contractile Function of Skeletal Muscle. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2501–2517. doi:10.1089/ars.2011.3940
- Niles, B.J., Joslin, A.C., Fresques, T., Powers, T., 2014. TOR Complex 2-Ypk1 Signaling Maintains Sphingolipid Homeostasis by Sensing and Regulating ROS Accumulation. *Cell Rep.* doi:10.1016/j.celrep.2013.12.040
- Niles, B.J., Mogri, H., Hill, A., Vlahakis, A., Powers, T., 2012. Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1536–1541. doi:10.1073/pnas.1117563109
- Niles, B.J., Powers, T., 2014. TOR complex 2–Ypk1 signaling regulates actin polarization via reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 25, 3962–3972.
- Niles, B.J., Powers, T., 2012. Plasma membrane proteins Slm1 and Slm2 mediate activation of the AGC kinase Ypk1 by TORC2 and sphingolipids in *S. cerevisiae*. *Cell Cycle* 11, 3745–3749. doi:10.4161/cc.21752
- Ni, M., Yu, J.-H., 2007. A Novel Regulator Couples Sporogenesis and Trehalose Biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 2, e970. doi:10.1371/journal.pone.0000970
- Oakley, B.R., Rinehart, J.E., Mitchell, B.L., Oakley, C.E., Carmona, C., Gray, G.L., May, G.S., 1987. Cloning, mapping and molecular analysis of the pyrG (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 61, 385–399.
- Oakley, C.E., Weil, C.F., Kretz, P.L., Oakley, B.R., 1987. Cloning of the riboB locus of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 53, 293–298.
- O'Hara, E.B., Timberlake, W.E., 1989. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* yA locus. *Genetics* 121, 249–254.
- Oh, Y., Bi, E., 2011. Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol.* 21, 141–148. doi:10.1016/j.tcb.2010.11.006
- Okuzaki, D., 2003. Fission yeast *meu14+* is required for proper nuclear division and accurate forespore membrane formation during meiosis II. *J. Cell Sci.* 116, 2721–2735. doi:10.1242/jcs.00496
- Olivera-Couto, A., Aguilar, P.S., 2012. Eisosomes and plasma membrane organization. *Mol. Genet. Genomics* MGG 287, 607–620. doi:10.1007/s00438-012-0706-8
- Olivera-Couto, A., Graña, M., Harispe, L., Aguilar, P.S., 2011. The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Mol. Biol. Cell* 22, 2360–2372.
- Opekarová, M., Malinsky, J., Tanner, W., 2010. Plants and fungi in the era of heterogeneous plasma membranes*. *Plant Biol.* 12, 94–98. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00356.x

- Osmani, A.H., May, G.S., 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, 23565–23569.
- Pan, T., Coleman, J.E., 1990. GAL4 transcription factor is not a “zinc finger” but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2077–2081.
- Parton, R.G., del Pozo, M.A., 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 98–112. doi:10.1038/nrm3512
- Peñalva, M.A., 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* 42, 963–975. doi:10.1016/j.fgb.2005.09.004
- Pfaller, M.A., Pappas, P.G., Wingard, J.R., 2006. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. *Clin. Infect. Dis.* 43, S3–S14. doi:10.1086/504490
- Pomorski, T., Hrafnisdóttir, S., Devaux, P.F., Meer, G. van, 2001. Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 139–148. doi:10.1006/scdb.2000.0231
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Chemmons, L.M., Macdonald, K.D., Bufton, A.W.J., 1953. The Genetics of *Aspergillus nidulans*, in: *Advances in Genetics*. Elsevier, pp. 141–238.
- Pontecorvo, G., ROPER, J.A., HEMMONS, L.M., MACDONALD, K.D., BUFTON, A.W.J., 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141–238.
- Prasad, T., Saini, P., Gaur, N.A., Vishwakarma, R.A., Khan, L.A., Haq, Q.M.R., Prasad, R., 2005. Functional Analysis of CaIPT1, a Sphingolipid Biosynthetic Gene Involved in Multidrug Resistance and Morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3442–3452. doi:10.1128/AAC.49.8.3442-3452.2005
- Raper, K.B., Fennell, D.I., Austwick, P.K.C., 1965. *The Genus Aspergillus: With a Chapter on Pathogenicity by Peter K.C. Austwick*. Williams & Wilkins Company.
- Razani, B., Woodman, S.E., Lisanti, M.P., 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* 54, 431–467.
- Reijntj, P., Walther, A., Wendland, J., 2011. Dual-colour fluorescence microscopy using yEmCherry-/GFP-tagging of eisosome components Pil1 and Lsp1 in *Candida albicans*. *Yeast Chichester Engl.* 28, 331–338. doi:10.1002/yea.1841
- Reverberi, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camera, E., Fabbri, C., Picardo, M., Fanelli, C., Fabbri, A.A., 2008. Modulation of Antioxidant Defense in *Aspergillus parasiticus* Is Involved in Aflatoxin Biosynthesis: a Role for the ApyapA Gene. *Eukaryot. Cell* 7, 988–1000. doi:10.1128/EC.00228-07
- Roelants, F.M., Breslow, D.K., Muir, A., Weissman, J.S., Thorner, J., 2011. Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 19222–19227. doi:10.1073/pnas.1116948108
- Rossomando, E.F., Alexander, S., 1992. *Morphogenesis: An Analysis of the Development of Biological Form: An Analysis of the Development of Biological Form*. CRC Press.
- Rypien, K.L., Andras, J.P., Harvell, C.D., 2008. Globally panmictic population structure in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus sydowii*. *Mol. Ecol.* 17, 4068–4078. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03894.x
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sarikaya Bayram, Ö., Bayram, Ö., Valerius, O., Park, H.S., Irniger, S., Gerke, J., Ni, M., Han, K.-H., Yu, J.-H., Braus, G.H., 2010. LaeA Control of Velvet Family Regulatory Proteins for Light-Dependent Development and Fungal Cell-Type Specificity. *PLoS Genet.* 6, e1001226. doi:10.1371/journal.pgen.1001226
- Sato, A., Oshima, K., Noguchi, H., Ogawa, M., Takahashi, T., Oguma, T., Koyama, Y., Itoh, T., Hattori, M., Hanya, Y., 2011. Draft genome sequencing and comparative analysis of *Aspergillus sojae* NBRC4239. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 18, 165–176. doi:10.1093/dnares/dsr009
- Sawai, H., Okamoto, Y., Luberto, C., Mao, C., Bielawska, A., Domae, N., Hannun, Y.A., 2000. Identification of ISC1 (YER019w) as Inositol Phosphosphingolipid Phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 39793–39798. doi:10.1074/jbc.M007721200
- Scazzocchio, C., Vangelatos, I., Sophianopoulou, V., 2011. Eisosomes and membrane compartments in the ascomycetes: A view from *Aspergillus nidulans*. *Commun. Integr. Biol.* 4, 64.
- Schoustra, S.E., Debets, A.J.M., Slakhorst, M., Hoekstra, R.F., 2007. Mitotic Recombination Accelerates Adaptation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet.* 3, e68. doi:10.1371/journal.pgen.0030068
- Scott, B., Eaton, C.J., 2008. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 488–493. doi:10.1016/j.mib.2008.10.008
- Seger, S., Rischatsch, R., Philippsen, P., 2011. Formation and stability of eisosomes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *J. Cell Sci.* 124, 1629–1634. doi:10.1242/jcs.082487
- Semighini, C.P., Harris, S.D., 2008. Regulation of Apical Dominance in *Aspergillus nidulans* Hyphae by Reactive Oxygen Species. *Genetics* 179, 1919–1932. doi:10.1534/genetics.108.089318
- Sewall, T.C., Mims, C.W., Timberlake, W.E., 1990. *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell Online* 2, 731–739.
- Sharma, K.K., Jr, H.N.A., 1985. The product of the regulatory gene of the proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans* is a positive-acting protein. *Curr. Genet.* 9, 299–304. doi:10.1007/BF00419959
- Shimizu, K., Keller, N.P., 2001. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 157, 591–600.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572. doi:10.1038/42408
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175, 720–731. doi:10.1126/science.175.4023.720
- Sivadon, P., Peypouquet, M.-F., Doignon, F., Aigle, M., Crouzet, M., 1997. Cloning of the Multicopy Suppressor Gene SUR7: Evidence for a Functional Relationship between the Yeast Actin-binding Protein Rvs167 and a Putative Membranous Protein. *Yeast* 13, 747–761. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19970630)13:8<747::AID-YEA137>3.0.CO;2-L
- Sophianopoulou, V., Scazzocchio, C., 1989. The proline transport protein of *Aspergillus nidulans* is very similar to amino acid transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 3, 705–714.
- Spira, F., Mueller, N.S., Beck, G., von Olshausen, P., Beig, J., Wedlich-Söldner, R., 2012. Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat. Cell Biol.* 14, 640–648.

- Strádalová, V., Stahlschmidt, W., Grossmann, G., Blazíková, 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. doi:10.1242/jcs.051227
- Strahl, T., Thorner, J., 2007. Synthesis and Function of Membrane Phosphoinositides in Budding Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 353–404. doi:10.1016/j.bbaliip.2007.01.015
- Suetsugu, S., Kurisu, S., Takenawa, T., 2014. Dynamic Shaping of Cellular Membranes by Phospholipids and Membrane-Deforming Proteins. *Physiol. Rev.* 94, 1219–1248. doi:10.1152/physrev.00040.2013
- Sun, Y., Taniguchi, R., Tanoue, D., Yamaji, T., Takematsu, H., Mori, K., Fujita, T., Kawasaki, T., Kozutsumi, Y., 2000. Sli2 (Ypk1), a homologue of mammalian protein kinase SGK, is a downstream kinase in the sphingolipid-mediated signaling pathway of yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4411–4419.
- Swinnen, E., Wilms, T., Idkowiak-Baldys, J., Smets, B., De Snijder, P., Accardo, S., Ghillebert, R., Thevissen, K., Cammue, B., De Vos, D., others, 2014. The protein kinase Sch9 is a key regulator of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 25, 196–211.
- Tafesse, F.G., Holthuis, J.C.M., 2010. Cell biology: A brake on lipid synthesis. *Nature* 463, 1028–1029. doi:10.1038/4631028a
- Takeo, K., 1984. Lack of invaginations of the plasma membrane during budding and cell division of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22, 97–100.
- Tavoularis, S., Ouellet, S., Stephens, S., 2001. Identification of three new DRB3* (DRB3*0106, DRB3*0107 and DRB3*02022) alleles. *Tissue Antigens* 57, 390–393.
- Thevissen, K., Cammue, B.P.A., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R.C., Lester, R.L., Ferket, K.K.A., Van Even, F., Parret, A.H.A., Broekaert, W.F., 2000. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9531–9536.
- Thom, C., Church, M.B., 1926. *The Aspergilli*. The Williams & Wilkins company, Baltimore.
- Thom, C., Raper, K.B. (Kenneth B., 1945. *A manual of the Aspergilli*. Baltimore, The Williams & Wilkins Company.
- Tobert, J.A., 2003. Case history: Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 517–526. doi:10.1038/nrd1112
- Todd, R.B., Davis, M.A., Hynes, M.J., 2007. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat. Protoc.* 2, 811–821. doi:10.1038/nprot.2007.112
- Upshall, A., Gilbert, T., Saari, G., O'Hara, P.J., Weglenski, P., Berse, B., Miller, K., Timberlake, W.E., 1986. Molecular analysis of the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 204, 349–354.
- Valdivia, R.H., Cormack, B.P., Falkow, S., 2005. The Uses of Green Fluorescent Protein in Prokaryotes, in: Chalfie, rtin, Kain, S.R. (Eds.), *Green Fluorescent Protein*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 163–178.
- Vallee, B.L., Coleman, J.E., Auld, D.S., 1991. Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 999–1003.

- Vangelatos, I., Roumelioti, K., Gournas, C., Suarez, T., Scazzocchio, C., Sophianopoulou, V., 2010. Eisosome Organization in the Filamentous Ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 9, 1441–1454. doi:10.1128/EC.00087-10
- van Meer, G., Lisman, Q., 2002. Sphingolipid Transport: Rafts and Translocators. *J. Biol. Chem.* 277, 25855–25858. doi:10.1074/jbc.R200010200
- van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–124. doi:10.1038/nrm2330
- Vecer, J., Vesela, P., Malinsky, J., Herman, P., 2014. Sphingolipid levels crucially modulate lateral microdomain organization of plasma membrane in living yeast. *FEBS Lett.* 588, 443–449. doi:10.1016/j.febslet.2013.11.038
- Walther, T.C., Aguilar, P.S., Fröhlich, F., Chu, F., Moreira, K., Burlingame, A.L., Walter, P., 2007. Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *EMBO J.* 26, 4946–4955. doi:10.1038/sj.emboj.7601933
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C., Walter, P., 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998–1003. doi:10.1038/nature04472
- Wang, H.X., Douglas, L.M., Amanianda, V., Latgé, J.-P., Konopka, J.B., 2011. The *Candida albicans* Sur7 protein is needed for proper synthesis of the fibrillar component of the cell wall that confers strength. *Eukaryot. Cell* 10, 72–80. doi:10.1128/EC.00167-10
- Weisman, R., Cohen, A., Gasser, S.M., 2014. TORC2--a new player in genome stability. *EMBO Mol. Med.* 6, 995–1002. doi:10.15252/emmm.201403959
- Wilson, R.A., Arst, H.N., 1998. Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the “streetwise” GATA family of transcription factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 586–596.
- Winterbourn, C.C., Hampton, M.B., 2008. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 549–561. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004
- Xu, T., Shively, C.A., Jin, R., Eckwahl, M.J., Dobry, C.J., Song, Q., Kumar, A., 2010. A Profile of Differentially Abundant Proteins at the Yeast Cell Periphery during Pseudohyphal Growth. *J. Biol. Chem.* 285, 15476–15488. doi:10.1074/jbc.M110.114926
- Yager, L.N., 1992. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. Read. Mass* 23, 19–41.
- Yamane-Sando, Y., Shimobayashi, E., Shimobayashi, M., Kozutsumi, Y., Oka, S., Takematsu, H., 2014. Fpk1/2 kinases regulate cellular sphingoid long-chain base abundance and alter cellular resistance to LCB elevation or depletion. *MicrobiologyOpen* 3, 196–212. doi:10.1002/mbo3.160
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Shimizu, H., 2009. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 9, 32–44. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00456.x
- Young, M.E., Karpova, T.S., Brügger, B., Moschenross, D.M., Wang, G.K., Schneiter, R., Wieland, F.T., Cooper, J.A., 2002. The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 927–934.

- Yu, J.-H., 2010. Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* 38, 229. doi:10.4489/MYCO.2010.38.4.229
- Zhang, X., 2004. Pil1p and Lsp1p Negatively Regulate the 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-like Kinase Pkh1p and Downstream Signaling Pathways Pkc1p and Ypk1p. *J. Biol. Chem.* 279, 22030–22038. doi:10.1074/jbc.M400299200
- Zhao, H., Michelot, A., Koskela, E.V., Tkach, V., Stamou, D., Drubin, D.G., Lappalainen, P., 2013. Membrane-Sculpting BAR Domains Generate Stable Lipid Microdomains. *Cell Rep.* 4, 1213–1223. doi:10.1016/j.celrep.2013.08.024
- Zheng, C.-Y., Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Kachar, B., 2011. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) of Fluorescence Tagged Proteins in Dendritic Spines of Cultured Hippocampal Neurons. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/2568
- Zimmerberg, J., Kozlov, M.M., 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 9–19. doi:10.1038/nrm1784
- Σφίγγα (μυθολογία), 2014. . Βικιπαίδεια.

Παράρτημα Ι. Βιογραφικό σημείωμα του συγγραφέα

Βιογραφικό σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



Αθανασόπουλος Αλέξανδρος

- 📍 Κομοτηνής 56, 18541 Πειραιάς (Ελλάδα)
☎️ (+30) 2110103147 📠 (+30) 6995095264
✉️ alexandr@bio.demokritos.gr
✉️ alexandrosathanasopoulos@yahoo.it
💬 Skype alexandrosathanasopoulos
🌐 https://www.researchgate.net/profile/Alexandros_Athanasopoulos

Φύλο Άρρεν | Ημερομηνία γέννησης 25 Ιουλ 81 | Εθνικότητα Ελληνική

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

27 Μαΐ 10–Σήμερα

Υποψήφιος διδάκτορας

Δρ. Βίκυ Σοφιανοπούλου, Ερευνήτρια Α'
Οδός Πατριάρχου Γρηγορίου Ε και Νεαπολεως 27, 15310 Αθήνα (Ελλάδα)
http://bio.demokritos.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=35&Itemid=46&lang=el

Επιχείρηση ή κλάδος Επαγγελματικές, επιστημονικές και τεχνικές δραστηριότητες

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

01–05

Πτυχίο στις Βιολογικές Επιστήμες

Πανεπιστήμιο της Σιένα, Σιένα (Ιταλία)
Τίτλος διπλωματικής εργασίας: Χρήση τεχνικών ανοσοϊστοχημείας για τον εντοπισμό των υποδοχέων οιστρογόνων άλφα (ERα).
Τελικός Βαθμός: 96/110

05–08

Μεταπτυχιακό στη Μοριακή Βιολογία

Πανεπιστήμιο της Σιένα, Σιένα (Ιταλία)
Τίτλος διπλωματικής εργασίας: Δομικός χαρακτηρισμός ενός αντιμικροβιακού δεκαπεπτιδίου σε γραμμική και δενδριμερική μορφή.
Τελικός Βαθμός: 110/110 cum laude.

10–Σήμερα

Υποψήφιος διδάκτορας

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Μικροοργανισμών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», Αθήνα (Ελλάδα)
Τίτλος Διατριβής: Μελέτες για τη διερεύνηση του βιολογικού ρόλου των εισσωμικών πρωτεϊνών στο μύκητα *Aspergillus nidulans*.

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική(ές) γλώσσα(ες) Ελληνικά

Λοιπές γλώσσες

	ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		ΟΜΙΛΙΑ		ΓΡΑΦΗ
	Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση	
Ιταλικά	C1	C1	C1	C1	C1
Αγγλικά	B2	C1	B2	B2	B2

Cambridge English: First (FCE)

Επίπεδα: A1 και A2: Βασικός χρήστης - B1 και B2: Ανεξάρτητος χρήστης - C1 και C2: Εμπειρος χρήστης
Κοινό Ευρωπαϊκό Πλαίσιο Αναφοράς για Γλώσσες

Επικοινωνιακές δεξιότητες

Είμαι σε θέση να επικοινωνώ με αυτοπεποίθηση με ανθρώπους σε όλα τα επίπεδα. Έχω αναπτύξει καλές γραπτές δεξιότητες επικοινωνίας, ως αποτέλεσμα της προετοιμασίας μιας λεπτομερούς διδακτορικής διατριβής και δημοσιεύσεων σε διεθνή περιοδικά.

Οργανωτικές / διαχειριστικές δεξιότητες

Κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής μου, έχω μάθει να σχεδιάζω να εκτελώ ανεξάρτητα τα πειράματα μου και να αναλύω τα δεδομένα. Ξέρω πώς να θέτω στόχους και να τους επιτυγχάνω. Προσπαθώ πάντα για το βέλτιστο αποτέλεσμα, ενώ κάθε καλοπροαίρετη και εποικοδομητική κριτική είναι καλοδεχούμενη. Επίσης κατανοώ την ανάγκη της ομαδικότητας, του καλού κλίματος και του σεβασμού ανάμεσα στους συναδέλφους αλλά και απέναντι στους προϊστάμενους.

Επαγγελματικές δεξιότητες

- Μικροβιολογικές-μοριακές τεχνικές
- Απομόνωση DNA, RNA και πρωτεϊνών
- Southern, Northern και Western blotting
- PCR, RT-PCR
- 2D/3D/4D απεικόνιση ζωντανών κυτάρων με συνεσιακή μικροσκοπία. Επεξεργασία και ανάλυση εικόνων συνεσιακής μικροσκοπίας με τη χρήση εξειδικευμένου λογισμικού: Imaris (Bitplane), ImageJ (NIH), Image-Pro plus 6.0, Autoquant software (AutoQuant Imaging, Waterviet, NY), SVI Huygens Professional.

Ψηφιακή δεξιότητα

ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ				
Επεξεργασία δεδομένων	Επικοινωνία	Δημιουργία Περιεχομένου	Ασφάλεια	Επίλυση προβλημάτων
Έμπειρος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης	Ανεξάρτητος χρήστης

Ψηφιακές δεξιότητες - Πίνακας αυτοαξιολόγησης

- Άριστη γνώση ηλεκτρονικών υπολογιστών: Windows και MacOS λειτουργικά συστήματα. Βασικές γνώσεις λειτουργικών συστημάτων Linux
- Άριστη γνώση του MS-Office
- Καλή γνώση διαφόρων εργαλείων βιοπληροφορικής (jalview, BLAST, MultAlin,

ClustalW), προγραμμάτων επεξεργασίας εικόνας (Adobe Photoshop, κλπ). Καλή γνώση χρήσης προγραμμάτων για αναζήτηση πληροφοριών σε επιστημονικές τράπεζες δεδομένων.

Λοιπές δεξιότητες - ενδιαφέροντα	Είμαι παθιασμένος με την τεχνολογία. Έχω βασικές γνώσεις στη χρήση μικροελεγκτών, όπως Arduino και Raspberry Pi.
Δίπλωμα οδήγησης	B
Στρατιωτικές υποχρεώσεις	Εκπληρωμένες (2009 - 2010)

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Βραβεία και Υποτροφίες	2010 - 2014 Υποτροφία (μέσω εξετάσεων) για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».
Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Επιστημονικά Περιοδικά	<p>Ø Athanasopoulos, A., Boleti, H., Scazzocchio, C., Sophianopoulou, V., 2013. Eisosome distribution and localization in the meiotic progeny of <i>Aspergillus nidulans</i>. Fungal Genet. Biol. 53, 84–96.</p> <p>Ø Gourmas, C., Evangelidis, T., Athanasopoulos, A., Mikros, E., Sophianopoulou, V., 2015. The <i>Aspergillus nidulans</i> proline permease as a model for understanding the factors determining substrate binding and specificity of fungal amino acid transporters. J. Biol. Chem. jbc.M114.612069. doi:10.1074/jbc.M114.612069</p> <p>Ø Athanasopoulos, A., Gourmas, C., Amillis, S., Sophianopoulou, V., 2015. Characterization of AnNce102 and its role in eisosome stability and sphingolipid biosynthesis. Sci. Rep. 5, 15200.</p>
Ανακινώσεις σε συνέδρια	<p>Προφορικές Ανακινώσεις:</p> <p>Ø <u>Athanasopoulos A.</u>, Boleti H., Sophianopoulou V. "Molecular organization of plasma membrane in fungi: subcellular distribution of eisosomal proteins in the ascomycetes <i>Aspergillus nidulans</i>". 62th Scientific conference of Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB). 15-17 November, 2011.</p> <p>Αναρτημένες ανακινώσεις:</p> <p>Ø <u>A. Athanasopoulos</u>, C. Gourmas and V. Sophianopoulou. "Characterization of AnNce102 and its role in eisosome assembly and YpkA Signaling". 6st Annual Conference of the Greek National Initiative "Μικροβίοςμος", 3-5 April 2015 in the National Research Institute, Athens</p> <p>Ø <u>A. Athanasopoulos</u>, C. Gourmas and V. Sophianopoulou. "Characterization of AnNce102 and its role in eisosome assembly and YpkA Signaling". 65th Scientific conference of</p>

Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB). 28-30 November 2014.

Ø **A.Athanasopoulos**, P.Geranos and V. Sophianopoulou. "Fungal plasma membrane organization eisosomal proteins". 64th Scientific conference of Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB). 6 -8 December 2013.

Ø **A.Athanasopoulos**, H. Boleti, C. Scazzocchio, V. Sophianopoulou. "Eisosome distribution and localization in the plasma membrane of *Aspergillus nidulans*". The 27th *Fungal Genetics Conference* at Asilomar, March 12-17, 2013.

Ø **A.Athanasopoulos**, P.Geranos, C.Gourmas, H.Boleti and V.Sophianopoulou. "Eisosomes in the sexual cycle of *Aspergillus nidulans*". International Conference on Membrane *Domains*, November 27-30, 2012.

Ø Neri Nicolai, Chiara Falciani, Alessandro Pini, Luisa Bracci, **Alexandros Athanasopoulos**, Vincenzo Venditti, Ottavia Spiga and Andrea Bernini. "The NMR structure of an antimicrobial decapeptide". 11th Naples Workshop on Bioactive Peptides, May 24-27, 2008.

**Παράρτημα II. Δημοσιεύσεις σε διεθνή έγκριτα
επιστημονικά περιοδικά**



Eisosome distribution and localization in the meiotic progeny of *Aspergillus nidulans*

Alexandros Athanasopoulos^a, Haralabia Boleti^b, Claudio Scazzocchio^{c,d}, Vicky Sophianopoulou^{a,*}

^a Institute of Biosciences and Applications, Microbial Molecular Genetics Laboratory, National Center for Scientific Research, Demokritos (NCSR), Athens, Greece

^b Intracellular Parasitism Group, Molecular Parasitology Laboratory, Department of Microbiology and Light Microscopy Unit, Institute Pasteur Hellenique, Athens, Greece

^c Department of Microbiology, Imperial College, London, United Kingdom

^d Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, UMR8621 Orsay, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2012

Accepted 10 January 2013

Available online 6 February 2013

Keywords:

Emericella
Eisosomes
Ascospore
Cleistothecium
Ascus
Sexual cycle

ABSTRACT

In the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, PilA and PilB, two homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* eisosome proteins Pil1/Lsp1, and SurG, a strict orthologue of Sur7, are assembled and form tightly packed structures in conidiospores. As *A. nidulans* differs in its reproduction pattern from the Saccharomycotina in that it has the ability to reproduce through two different types of spores, conidiospores and ascospores, the products of the asexual and the sexual cycle respectively, we investigated the eisosome distribution and localization during the sexual cycle. Our results show that core eisosome proteins PilA, PilB and SurG are not expressed in hülle cells or early ascospores, but are expressed in mature ascospores. All eisosomal proteins form punctate structures at the membrane of late ascospores. In mature but quiescent ascospores, PilA forms static punctate structures at the plasma membrane. PilB also was observed at the ascospore membrane as well, with higher concentration at the areas where the two halves of ascospores are joined together. Finally, SurG was localized both at the membrane of ascospores and perinuclearly. In germlings originating from ascospores the punctate structures were shown to be composed only of PilA. PilB is diffused in the cytoplasm and SurG was located in vacuoles and endosomes. This altered localization is identical to that found in germlings originated from conidiospores. In germinated ascospores PilA foci did not colocalise with the highly mobile and transient peripheral punctate structures of AbpA, a marker for sites of clathrin-mediated endocytosis. Deletions of each one or all the three core eisosomal genes do not affect viability or germination of ascospores. In the presence of myriocin – a specific inhibitor of sphingolipid biosynthesis – PilA-GFP foci of ascospore germlings were less numerous and their distribution was significantly altered, suggesting a correlation between PilA foci and sphingolipid biosynthesis.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Biological membranes are essential to life and are highly compartmentalized for accomplishing a variety of functions (Simons and Ikonen, 1997). The last decade many studies have focused on the organization of the plasma membrane into space and time. In *Saccharomyces cerevisiae* the plasma membrane contains three types of distinct spatial domains with different lipid and protein composition. W. Tanner and co-workers described MCC (Membrane Compartment of Can1), which harbors at least 19 integral proteins (Young et al., 2002; Malinská et al., 2003), when they observed a “patchy” appearance of the arginine transporter Can1 in the plasma membrane of yeast under normal growth conditions. Another domain formed by the network-like membrane area occupied by Pma1 is called MCP (Membrane Compartment of Pma1)

* Corresponding author Address: Institute of Biology, National Center for Scientific Research, Demokritos, Aghia Paraskevi 153 10, Athens, Greece. Fax: +30 2106511767.

E-mail address: vicky@bio.demokritos.gr (V. Sophianopoulou).

and a third domain contains the target of rapamycin complex 2 (TORC2) called MCT (Malinská et al., 2003; Malinska, 2004; Berchtold and Walther, 2009; Malinsky et al., 2010). MCC organization of the plasma membrane is at least in part mediated by a cellular stable structure termed eisosome, lying underneath MCC patches (Walther et al., 2006). Each eisosome includes three proteins in thousands of copies, the cytoplasmic Pil1 and Lsp1 (Ziółkowska et al., 2012) and the transmembrane protein Sur7. Homologues of Pil1-like proteins are found to be conserved throughout the ascomycetes (Vangelatos et al., 2010). In *S. cerevisiae* eisosomes are organized/regulated by the phosphorylation of Pil1 and Lsp1 by the Pkh1/2 kinase and the levels of sphingolipid long-chain bases (LCBs) (Walther et al., 2007; Luo et al., 2008). Pil1 and the tetra-spanning plasma membrane protein Nce102, which is involved in sensing sphingolipids, are the main organizers of MCC (Frohlich et al., 2009) in *S. cerevisiae*. In their absence, all MCC markers lose their punctate pattern and cells show altered organization of their plasma membrane (Grossmann et al., 2006; Desmyter et al., 2007; Loibl et al., 2010). Both MCC and eisosome components were shown to localize to furrow-like invaginations

of the plasma membrane (Strádlová et al., 2009). Recently a comprehensive bioinformatics analysis and structural studies of eisosome proteins in *S. cerevisiae* succeeded in identifying unreported functional domains as well as to demonstrate that eisosome core components Pil1 and Lsp1 belong to the BAR membrane-sculpting superfamily of proteins (Olivera-Couto et al., 2011; Ziółkowska et al., 2012). The type of BAR domains found in Pil1 and Lsp1 were BAR/N-BAR, which act as molecular scaffolds that self-assemble into higher order structures and bind preferentially to PI(4,5)P2 phosphoinositides (Karotki et al., 2011). Overall the available data suggest that eisosome BAR domain components interact with the plasma membrane to generate a specific membrane environment that selects for specific proteins and lipids.

Homologues of Pil1, Lsp1 and Sur7 have been studied in the ascomycetes *Aspergillus nidulans* (Vangelatos et al., 2010), *Candida albicans* (Reijnst et al., 2011), *Ashbya gossypii* (Seger et al., 2011) and *Schizosaccharomyces pombe* (Kabeche et al., 2011). The eisosomal proteins are universally and quite strictly conserved in the subphyla Pezizomycotina and Saccharomycotina, however, this evolutionary conservation is in apparent contradiction with an elusive functional significance (Scazzocchio et al., 2011). Eisosomes were initially proposed to be sites of lipid and protein endocytosis (Walther et al., 2006, 2007), but this function is by no means certain (Alvarez et al., 2008; Grossmann et al., 2008; Brach et al., 2011; Vangelatos et al., 2010). In *Candida albicans*, Sur7 (CaSur7) has additional roles in cell wall synthesis, actin cytoskeleton organization, and septin localization (Alvarez et al., 2008, 2009), while in *S. cerevisiae*, *sur7* mutants show a diminished efficiency of sporulation during cell division (Young et al., 2002; Moreira et al., 2009). In *A. gossypii*, the homologue of Pil1, is very important for polar growth, whereas the homologue of Nce102, which colocalizes with eisosomes is not required for eisosome stability (Seger et al., 2011). In a recent study, fission yeast eisosome protein Pil1 forms filaments that underlie plasma membrane invaginations and generate spatial domains within the cell cortex (Kabeche et al., 2011). Comparative analysis of eisosomes in *S. cerevisiae* and *A. nidulans* reveals striking differences in their assembly and developmental fate (Scazzocchio et al., 2011).

The homothallic fungus *Aspergillus (Emericella) nidulans* is arguably, among the Pezizomycotina, the organism where membrane proteins have been better studied and is a genetic model system having the ability to reproduce through two different types of spores, conidiospores and ascospores, the products of the asexual and the sexual cycle respectively (Pontecorvo et al., 1953b; Han et al., 2001; Todd et al., 2007). Conidiospores and ascospores are very different cells, which have a radically different morphology and are formed through completely different developmental pathways. Ascospores are formed only after the completion of meiosis inside asci, conidiospores arise from mitotic budding of specialized cells (phialides).

The development of fruiting bodies accompanied by the generation of ascospores is being actively investigated. Ascogenous hyphae fuse to give eventually rise to a large and complex structure, termed the cleistothecium. The cleistothecial wall ('peridium') (Dyer and O'Gorman, 2012) is composed of two layers of dark-purple flattened cells, which at least in *A. nidulans* are glued together with an uncharacterized electron-dense substance ('cleistin') (Champe and Simon, 1992) that fills the intercellular spaces. Large, thick-walled globose cells named hülle cells surround the cleistothecia of *Aspergillus* during development (Carvalho et al., 2002). Hülle cells have a specialized physiology, exhibiting laccase and chitin synthase activity (Hermann et al., 1983), and have been proposed to 'nurse' the cleistothecia during development through the production of α -1,3 glucanase which mobilizes carbon resources required for fruiting body development (Wei et al., 2001). Indeed, it was recently shown that a reduction in the num-

ber of hülle cells surrounding ascomata of *A. nidulans* resulted in significantly smaller cleistothecia. In *A. nidulans* an average cleistothecium is the result of a single fertilization event and may contain thousands of asci with eight bi-nucleate, haploid ascospores each arranged in unordered asci (Pontecorvo et al., 1953b; Sohn and Yoon, 2002). Ascospores are released in the environment following the natural breakdown of the ascus wall and the outer wall of the cleistothecium.

We have recently described *A. nidulans* eisosomes (tagging the core proteins PilA, PilB and SurG) during asexual development (asexual spores, conidiophores) and conidial germination (Vangelatos et al., 2010). Moreover, we showed that the Meu14 protein of *Schizosaccharomyces pombe*, necessary for the second division of meiosis and the accurate formation of the forespore membrane (Okuzaki, 2003), is phylogenetically related to Pil1/Pil1A/Lsp1/PilB (22% identity with both Pil1 and PilA, 24% identity with PilB). This work describes the presence and fate of core eisosomal proteins (PilA, PilB and SurG) during ascus development and ascospore germination and also addresses whether the core eisosomal proteins PilA and PilB are necessary for *A. nidulans* sexual cycle progression.

2. Materials and methods

2.1. Media and growth conditions

Minimal (MM) and complete media (CM) as well as the growth conditions for *A. nidulans* were performed as described by Cove (Cove, 1966). When necessary, supplements were added at the adequate concentrations (http://www.fgsc.net/aspergillus/gene_list/supplement.html). Glucose (1%) was used throughout as a carbon source. Urea (5 mM) or ammonium ι -(+)-tartrate (10 mM) was used as sole nitrogen source. Myriocin (Sigma–Aldrich) was added in concentrations as indicated and incubated for 3 h or 5 h. Crosses between *A. nidulans* strains were carried out as described by Pontecorvo et al. (1953a) and Todd et al. (2007). Selfing of strains carrying tagged eisosomal proteins was carried out analogously but transferring individual strains to appropriately supplemented minimal or to complete media.

Dehydration experiments were performed as described by Dupont et al., 2010. The solute used in all experiments to perform hyperosmotic treatments was glycerol (Sigma Aldrich). Four conditions were chosen: 1.4 MPa ($a_w = 0.99$), 30 MPa ($a_w = 0.8$), 110 MPa ($a_w = 0.45$) and 166 MPa ($a_w = 0.3$). More particular, selfed cleistothecia of a wild type and the *pilA Δ pilB Δ surG Δ* triple mutant strains were isolated and cleaned by rolling across a 2% agar surface plates. Once clean, cleistotheciae were transferred to an Eppendorf tube containing 30 μ L water or 1.4 MPa water–glycerol solution, ruptured, and vortexed to release the ascospores. Ascospores were counted with Haemocytometer, and an equal number of ascospores was placed to 1 mL of different binary water–glycerol solutions (final osmotic pressure of 1.4, 30, 110, or 166 MPa) for rapid perturbations (shock). The cells were maintained for various periods (15 min, 30 min and 1 h at 25 °C) under hyperosmotic conditions before rehydration. Rehydration was rapid, the hyperosmotic solution was removed from the Eppendorf tube after centrifugation (10 min, 5100g) and 1 mL of the binary water–glycerol solution (1.4 MPa) was added to the cell pellet. Ascospores' viability was estimated in triplicate by the CFU method. After osmotic treatment, fully rehydrated cells were diluted serially and the appropriate dilutions were plated in MM or CM media. CFUs were counted after 3–5 days of incubation at 25 °C.

2.2. *Aspergillus 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 *nkuA1* mutation results in a dramatically decreased frequency of heterologous recombination events into the *A. nidulans* genome (Nayak, 2006). The LO1516 strain expresses functional chimeric histone H1 molecules fused with the monomeric red fluorescent protein (mRFP) (Ramón et al., 2000). These markers do not affect the localization of eisosomal proteins. The VS185 strain was isolated by crossing the MAD1417 with the VS79. The VS151 strain was isolated by crossing the LO1516 with the VS79. The VS199 strain was isolated by crossing the VS48.5 with the VS84. The VS200 strain was isolated by crossing the VS87 with the VS84. VS201 strain was isolated by crossing the VS200 with the VS48.5. All strains used in this work are listed in Table S1. In every case, MM indicates minimal medium supplemented with the requirements relevant to the strains used in the experiment. *pabaA1* was used as a wild-type (wt) strain.

2.3. Reverse transcriptase-PCR

RNA samples were prepared from freshly harvested *A. nidulans* strains. Selfed- cleistothecia were scraped gently from Petri dishes, vortexed gently and vacuum filtered several times using 0.5 mm diameter filters (Durapore®). Cleistothecia were placed on a 3% w/v agar plate and intact cleistothecia were selected microscopically. ~50 mg of cleistothecia were added to a 2.0 mL screw cap Eppendorf tube containing distilled water and crushed using a toothpick to release the ascospores. Ascospores were homogenized in each Eppendorf tube containing 50 mg of glass beads (0.10 mm diameter (Sigma) using the Mini-Beadbeater (BioSpec, Oklahoma, USA) according to the instructions of the manufacturer. RNA was isolated from ungerminated (0 h) and germinated ascospores (12 h) using the TRI Reagent (GIBCO-BRL) kit according to the instructions of the manufacturer. RNA samples were further purified according to the RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup, in the RNeasy Mini Kit (Qiagen) (Bouzarelou et al., 2008). To avoid contamination with genomic DNA, ~10 µg of each RNA sample were treated and cleaned up with TURBO DNA-free™ kit (Ambion). The absence of DNA contamination was verified with conventional PCRs in which using specific *-pilA*, *pilB*, *surG* and 18S rRNA set of primers, at least 2 µg of each RNA sample as template were amplified for 40 cycles (the absence of products indicates the absence of a detectable DNA contamination under the experimental conditions used). The quality of RNA was confirmed in a conventional 2% w/v agarose gel stained with ethidium bromide (Et-Br) (10 µg/mL). The concentration of each RNA sample was calculated using the nanodrop apparatus (ND-1000 Spectrophotometer) according to the instructions of the manufacturer. Approximately 2 µg of each RNA sample were used for reverse transcription using the SuperScript™ II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen) according to the instructions of the manufacturer. For semi-quantitative analysis of transcript levels, cDNA was diluted 10-, 100-, 1000-fold. The number of cycles required to produce detectable difference in band intensity between dilutions (to avoid saturation) was determined with Et-Br staining. Densitometry measurements of band intensity, was performed using imageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Experiments were repeated at least three times.

2.4. Total protein extraction and Western blot analysis

For each sample, cleistothecia from 20 Petri dishes were scraped gently, vortexed and vacuum filtered several times using 0.5 mm diameter filters (Durapore®). Approximately 500 mg of

ungerminated ascospores (0 h) were frozen and ground in liquid nitrogen. Ascospore powder was resuspended in 1.5 mL ice-cold precipitation buffer (50 mM Tris-HCl pH 7, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). TCA (Trichloroacetic acid) was added (1/8th of the volume) and the suspension was vortexed. After 10 min incubation on ice the suspension was centrifuged for 10 min at 4 °C (15,000g). The pellet was washed twice with ice cold acetone, heat-dried and dissolved in 500 µL extraction buffer (150 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1% w/v SDS, 1 mM EDTA and protease inhibitor cocktail (Sigma)). Unbroken cells and larger cell debris were removed by a short, low-speed centrifugation (2000g for 2 min). The supernatant was transferred into a new eppendorf and precipitated with TCA as before in 25 µL extraction buffer. Protein samples (25 µL each) were analyzed on a 10% w/v 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% w/v nonfat dry milk, and immunodetection was performed using a primary mouse anti-GFP monoclonal antibody (Roche) and a secondary rabbit anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody (Cell Signaling). Blots were developed by the chemiluminescent method using an enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Bioscience) and visualized with LAS 4000 (Fuji).

2.5. Microscopy

For analysis of ascospores by laser scanning confocal microscopy (CSLM), the layer of light yellow hülle cells were removed from the black peridium of mature *A. nidulans* cleistothecia (<http://www.fgsc.net/fgn48/Kaminskyj.htm>) by rolling them on a plate covered with 4% w/v agar. Once clean, the cleistothecium was transferred to an Eppendorf tube containing 20 µL water, crushed and vortexed to release the ascospores. A quantity of 20 µL from a suspension containing 10⁵–10⁶ ascospores was transferred onto sterile coverslips embedded into appropriate liquid culture media or the suspension was transferred onto sterile microscope slides previously covered with a thin layer of agar medium containing the appropriate nutrient supplements. All samples were incubated for 0–16 h at 25 °C, covered with an oblong large coverglass (22 × 50 size, 13–17 thickness) and subjected to observation by laser scanning confocal microscopy as previously described (Tavoularis et al., 2001, 2003). Cells were imaged by the use of a Leica TCS SP confocal microscope with a Leica PL APO 63x/1.2 NA oil immersion lens. GFP and mRFP were excited with 488 nm and 543 nm laser lines, respectively. Images were acquired sequentially as Z-series (step size 0.5 µm) and processed/analyzed using the Fiji/imageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) or the Imaris (Bitplane AG, Zurich, Switzerland). Three dimensional (3D) reconstructions of the ascospores (Fig. S1C) were obtained after isosurface extraction, which converts volume images into geometric surfaces using the 3D visualization software of Imaris.

2.5.1. Quantification of fluorescence signal in captured images

Background noise produced by scatter from out of focus light and by noise inherent to the imaging system was subtracted from cell fluorescence measurements in every experiment using the Image-Pro Plus 6 software, which was also used to quantify fluorescence in the images. Intensity units represent averages of fluorescence signal.

2.5.2. Colocalization analysis

For colocalization assessment images were processed with a median filter to suppress background, and the degree of colocalization is measured by comparing the equivalent pixel positions in

each of the acquired images with the colocalization module of the Imaris software package (Bitplane, Zurich, Switzerland). The colocalization channel – that contains only pixels that represent the co-localization result – was built using Imaris (Bitplane). The Pearson correlation coefficient of channels A (green) and B (red) was used as a measure of the degree of colocalization. Pearson's Correlation is a well defined and commonly accepted means for describing the extent of overlap between image pairs. It is a value computed to be between -1 and 1 , with -1 being no overlap and 1 being perfect image colocalization (French et al., 2008). Scatter plots (plotted pixels of a two-channel image) were obtained. In the absence of/low colocalization the scatter plot is bi-lobed as shown in Fig 6, bottom panels, while colocalised pixels are distributed closer to the diagonal of the scatter-plot (upper panels). Additionally the intensities of fluorescent signal in the green and red channels were quantified separately using Imaris (Bitplane) along a line crossing the entire ascospores and their cell cortex and were plotted together (Fig 6 far right panels).

2.5.3. Time-lapse and FRAP experiments

Experiments were conducted at $\sim 26^\circ\text{C}$. Cells were imaged by the use of a Leica TCS SP5 confocal microscope with a Leica HXC PL APO CS 63 \times /1.2 NA water immersion lens. FRAP assays, performed at zoom 3, consisted of three pre-bleach images and four rapid bleach scans at full laser power. Fluorescence loss during the assay due to photobleaching was measured in unbleached regions, averaged and added back to the mean recovery data to correct for photobleaching. The images were analyzed with the Imaris software package (Bitplane, Zurich, Switzerland).

3. Results

3.1. Expression and subcellular localization of eisosomal proteins in hülle cells and asci

During early stages of *A. nidulans* sexual cycle, some hyphae form highly branched structures that become asci and the hülle cells appear (Elliott, 1960). We examined the expression of core eisosomal proteins in strains carrying *pilA-gfp*, *pilB-gfp* and *surG-gfp* alleles and/or single deletions of these alleles during ascus and hülle cells development, using confocal microscopy. These strains also expressed HhoA-mRFP (histone H1-mRFP) protein that labels the nuclei. *A. nidulans* is homothallic. The sexual cycle is induced in laboratory strains of *A. nidulans* by growing the relevant strain or heterokaryon (when crossing two different strains) for 48 h before sealing the plates to lead to conditions of near anaerobiosis. Ascospores/asci were observed 5–7 days after sealing the crossing plates (early, non-pigmented asci, ascospores) and at 14 days after sealing the crossing plates (late, mature asci/ascospores, which were fully pigmented). Our results presented in Fig. 1A–C show that PilA, PilB or SurG are not expressed during the early stages of ascus/ascospore development. No GFP fluorescence was detected in any of the asci/ascospore imaged. PilA, PilB and SurG are expressed and form punctate structures as indicated by the observed fluorescence, in late red-pigmented asci/ascospores (Fig. 1, Fig. S1). To investigate whether the expression of the PilA, PilB and SurG proteins is autonomous, strains expressing PilA-GFP, PilB-GFP and SurG-GFP molecules were crossed with a wild type (*paba1*) strain. Ascospores of crossed cleistothecia were observed under an epifluorescence microscope. Each GFP-tagged eisosomal gene segregates 1:1 to the corresponding not labeled wild type gene since approximately half of the ascospores were labeled and half were not (at least 10^3 ascospores derived from a single cleistothecium were counted each time in three independent

experiments). Neither PilA, PilB nor SurG are expressed in hülle cells (Fig. 1D–F).

Finally, we detected significant lower expression of histone H1 in early as compared with late ascospores. Whether this represents a genuine difference in the expression or localization of this chromatin protein during the sexual cycle, will be reported separately.

3.2. Subcellular localization of eisosomal proteins during ascospore germination

Polar and equatorial sections of confocal microscopy images of PilA-GFP localization in ungerminated mature ascospores showed a plasma membrane-like punctated staining pattern (Fig. 2). No change in the localization of PilA was seen during the period of ascospore isotropic growth. At the time point of the germ tube emergence and during early polar growth, PilA-GFP is concentrated at the periphery of the ascospore head opposite to the emergent germ tube. In young and mature ascospore-derived germlings, PilA remains mostly restricted to the ascospore head while some PilA spots were detected both at the interior of the hyphae and at its periphery. Similarly, in quiescent ascospores PilB-GFP was also observed to localize at the cell periphery, but it was found to concentrate more at the areas where the two halves of ascospores are joined together (Fig. 3C and D). During the period of isotropic growth as well as after the emergence of the germ tube in young and mature ascospore-derived germlings, PilB-GFP was observed as diffuse fluorescence in the cytoplasm while it was excluded from the nuclei, as shown in a strain carrying both PilB-GFP and the gene encoding histone H1 fused to mRFP (kindly provided by Oakley; Nayak et al., 2006) (Fig. S2A).

Finally, SurG-GFP was localized at both the periphery of ascospores and perinuclearly. This perinuclear location of SurG is seen clearly in a strain carrying both SurG-GFP and the histone H1 gene (HhoA) fused to mRFP (Fig. S2B). During the period of isotropic growth the SurG-GFP perinuclear fluorescence signal diminishes (Fig. 4E and F) and it disappears before the emergence of the germ tube. In ascospore-derived germlings, SurG is confined to the vacuole and endosomes (confirmed by CMAC staining, data not shown) but some residual signal can be detected in the periphery of the ascospore head.

3.3. Core eisosomal genes are expressed during ascospore germination

RT-PCRs in total RNA extracted from ungerminated ascospores (0 h) and ascospore-derived germlings (12 h) of a wild-type strain revealed that mRNAs of both *pilA* and *surG* are abundant throughout the time-interval tested. By contrast *pilB* mRNA is less abundant throughout. The primers used for RT-PCR were expected to produce amplicons of 376 bp (*pilA* cDNA), 286 bp (*pilB* cDNA), 272 bp (*surG* cDNA) and 280 bp (*18S* ribosomal RNA gene) (Fig. 5A). Captured images (Fig. 5D) of ungerminated ascospores (0 h) expressing PilA-, PilB- and SurG- tagged proteins, acquired with the same laser intensity and detector settings, were segmented and fluorescence emission was quantified as mean fluorescence intensity (MFI) with the Image-Pro[®] Plus software (Fig. 5E). Western blots (Fig. 5C) carried out with protein extracts of ungerminated ascospores (0 h), using an anti-GFP monoclonal antibody, showed that bands corresponding to full-length PilA-GFP, PilB-GFP and SurG-GFP proteins are present in ascospores with approximate apparent molecular masses of 70 kDa, 80 kDa and 48 kDa, respectively (calculated molecular mass, 67 kDa 71.5 kDa and 54 kDa respectively). These results indicate that the observed fluorescence corresponds to full-length eisosomal proteins. A band with an apparent molecular mass of 27 kDa corresponding to the proteolytic cleavage of free GFP in the vacuole is seen only in strains carrying the SurG-GFP fusion. These data are consistent with our

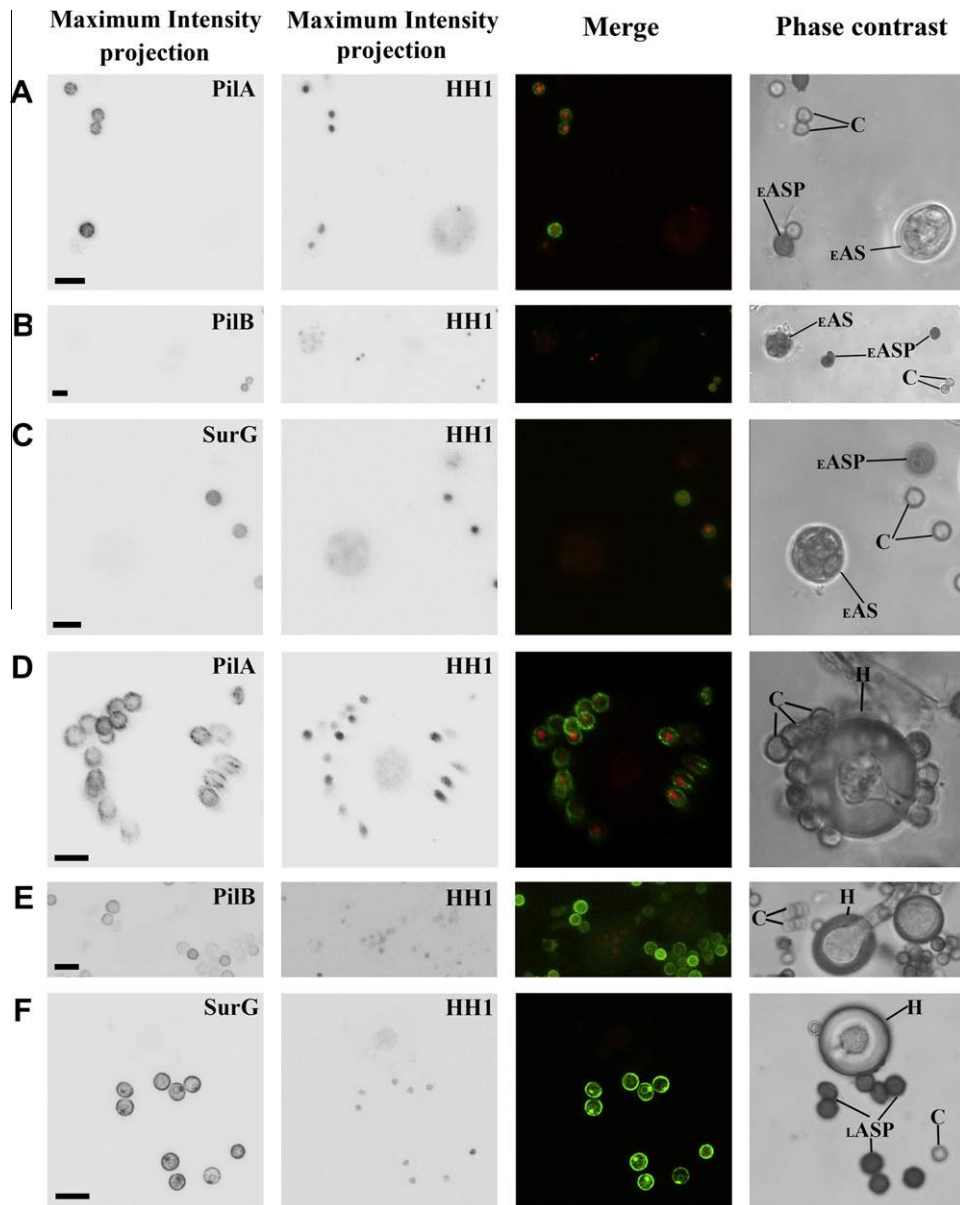


Fig. 1. Expression and subcellular localization of eisosomal proteins during early stages of *A. nidulans* sexual cycle. Maximum-intensity confocal microscopy projections (from optical sections acquired at 0.5 μm intervals) in conidia, early ascospores and early asci of: (A) PilA-GFP and histone H1-mRFP (HH1), (B) PilB-GFP and HH1-mRFP, and (C) SurG-GFP and HH1-mRFP fluorescence. (D–F). The ascospores were obtained by selfing strains VS145, VS151 and VS153 (see Table S1): Maximum-intensity confocal microscopy projections from optical sections acquired at 0.5 μm intervals in hülle cells derived from strains carrying *pilA-gfp*, *pilB-gfp* and *surG-gfp* alleles, respectively. C: conidium; EASP: early ascospore (faint red colored ascospores of 5–7 days cleistothecia); EAS: early ascus (transparent asci in phase contrast images); LASP: late ascospore (dark red pigmented ascospores of 14 days cleistothecia); H: hülle cells. GFP and mRFP fluorescence is shown as inverted gray scale in black and white images. Merged images of fluorescence are shown as colored images. Phase contrast images are shown on the far right column as black and white images. Size bar = 5 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

previous findings regarding eisosomal proteins in conidia and conidia-derived germlings (Vangelatos et al., 2010).

3.4. Colocalization of PilA, PilB, and SurG in quiescent ascospores. PilA does not colocalise with endocytic patches

All core eisosomal proteins PilA, PilB and SurG were localized at the periphery of quiescent ascospores. We thus investigated their colocalization. To this aim we used strains carrying PilA-mRFP and PilB-GFP or SurG-GFP molecules. Fig. 6 shows colocalization of PilA with PilB (Pearson's correlation coefficient = 0.77) and colocalisation of PilA with SurG (Pearson's correlation coefficient = 0.89) at the periphery of the ascospores. No colocalization of PilA with the perinuclear fraction of SurG was observed. As we

have previously shown by pulse-chase time course experiments using FM4-64, a lipophilic marker of the endocytic pathway (Peñalva, 2005), PilA foci in hyphae do not colocalise with sites of endocytosis (Vangelatos et al., 2010). In this work we reexamined the possible involvement of eisosomes with endocytosis using the AbpA protein (Araujo-Bazán et al., 2008), as a marker for sites of clathrin-mediated endocytosis. AbpA is known to localize predominantly at the hyphal tip and colocalise with actin patches but not with actin cables (Araujo-Bazán et al., 2008). Our results showed that PilA foci do not colocalise with the highly motile and transient peripheral punctate structures of AbpA (Pearson's correlation coefficient = 0.2) (Fig. 6). These results suggest that there is no direct relation between eisosomes and clathrin-mediated endocytosis.

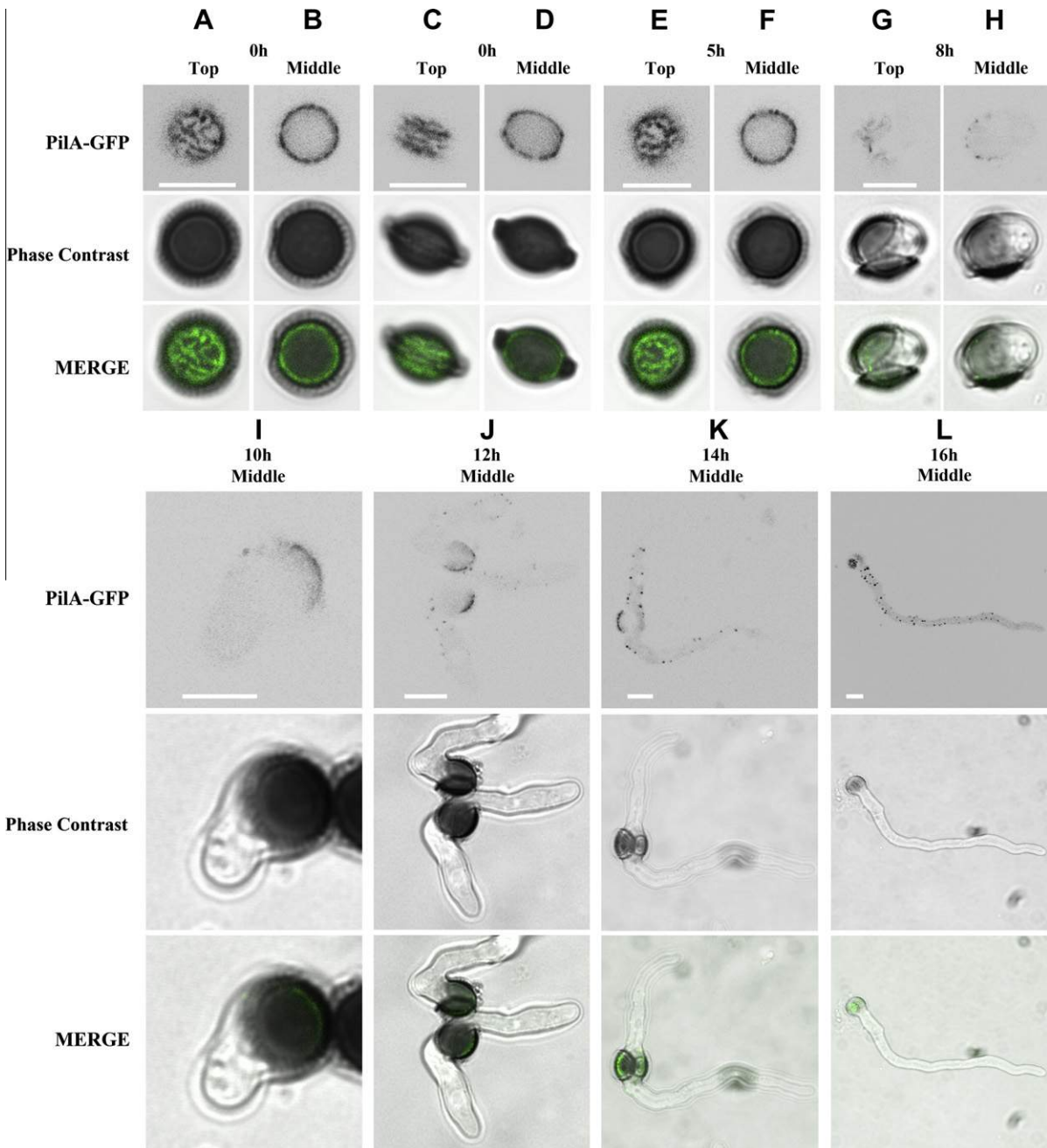


Fig. 2. PiIA-GFP localization in ascospores Polar and equatorial sections of ascospores expressing PiIA-GFP in (A–D) quiescent ascospores (0 h) oriented parallel to the equatorial plane (A and B) or perpendicular (C and D) to the xy plane; (E and F) swollen ascospores (5 h), (G and H) germinated ascospores (8 h), (I–L) equatorial sections of ascospore germlings after 10 h, 12 h, 14 h and 16 h of growth (I–L, respectively). Optical sectioning (step size = 0.5 μm) was performed by confocal microscopy imaging. All fluorescence images were acquired at the same laser intensity and detector settings. Strains were grown in the presence of 5 mM urea and 1% w/v glucose as the sole nitrogen and carbon sources respectively plus supplemented for the relevant auxotrophies, at 25 °C. The ascospores were obtained by selfing strain VS139 (see Table S1). GFP fluorescence is shown as inverted gray scale in black and white images. Phase contrast is shown as black and white images and merged images of fluorescence and phase contrast are shown in color. Size bar = 5 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.5. PiIA forms stable, non mobile structures

We used time-lapse video microscopy and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) techniques to study whether PiIA forms static or dynamic structures in ungerminated (0 h) and germinated (12 h) ascospores, quiescent conidia and conidia derived germlings (Fig. 7, Fig. S3). Like Pil1 of fission yeast (Kabeche et al., 2011) and budding yeast (Walther et al., 2006; Alvarez et al., 2008), the PiIA-GFP molecules at the membrane of the filamentous *A. nidulans* do not exchange with a cytoplasmic pool fraction, forming stable structures with extremely low mobility (if

any), since fluorescence in the bleached area did not recover to any measurable extent over a time period of 20 min.

3.6. Phenotypic characterization of deleted strains

We analyzed the growth characteristics of strains with *pilA*, *pilB*, and *surG* single deletions and a strain carrying a triple deletion of all three core eisosomal genes that we generated in this study (see Section 2). No growth phenotype was seen at 25 °C, 37 °C or 42 °C on either complete or minimal media supplemented with urea, in colonies and germlings derived from ascospores, as

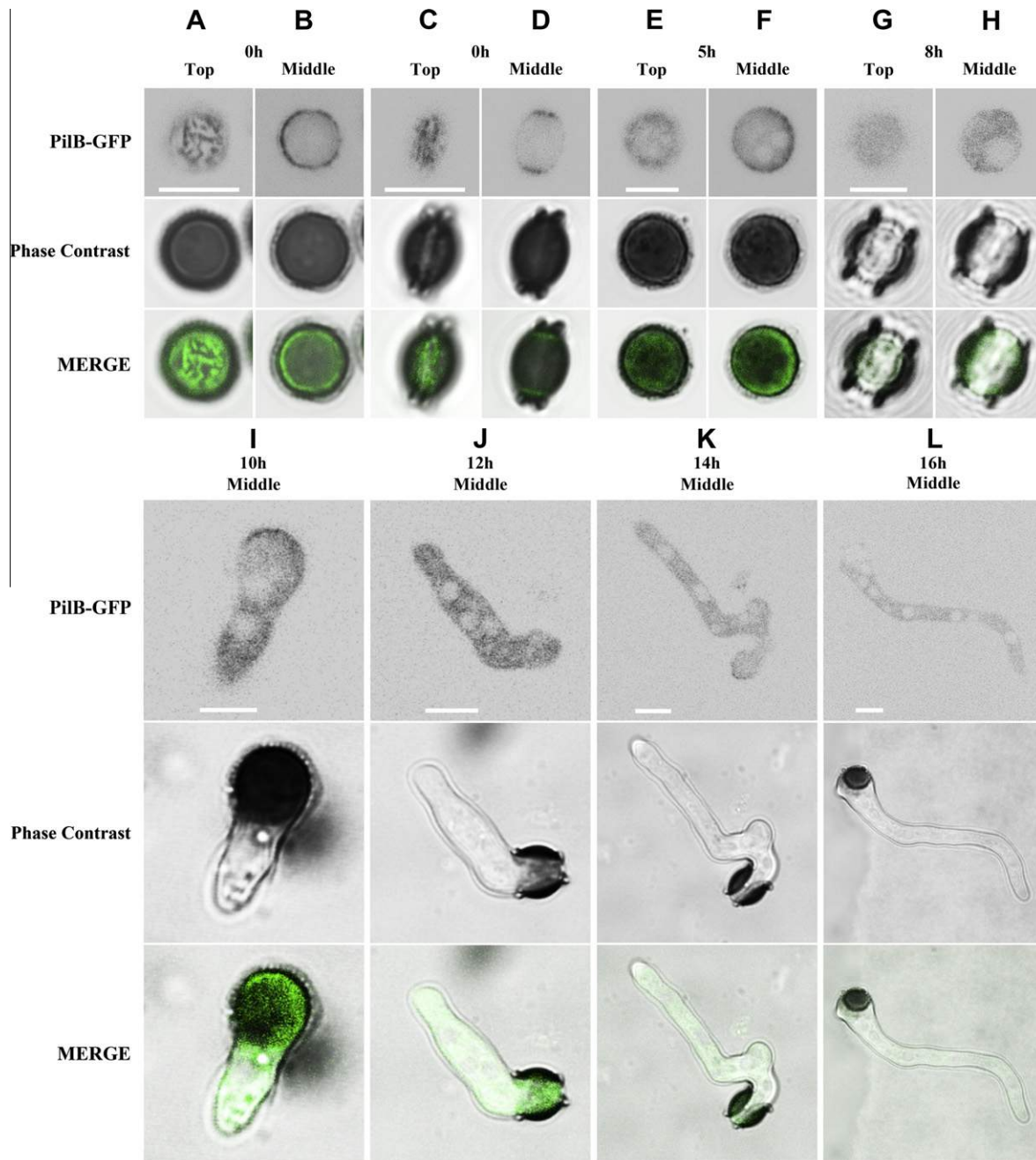


Fig. 3. PiIB-GFP localization in ascospores. Polar and equatorial sections of ascospores expressing PiIB-GFP in (A–D) quiescent ascospores (0 h) oriented parallel with the equatorial plane (A and B) or perpendicular (C and D) to the *xy* plane; (E and F) swollen ascospores (5 h), (G and H) germinated ascospores (8 h), (I–L) equatorial sections of ascospore germlings after 10 h, 12 h, 14 h and 16 h of growth (I–L, respectively). The ascospores were obtained by selfing strain VS138 (see Table S1). Optical sectioning (step size = 0.5 μm) was performed by confocal microscopy imaging. All fluorescence images were acquired at the same laser intensity and detector settings. Strains were grown in the presence of 5 mM urea and 1% w/v glucose as the sole nitrogen and carbon sources respectively, at 25 °C. GFP fluorescence is shown as inverted gray scale in black and white images. Phase contrast in black and white and merged images of fluorescence and phase contrast are shown in color. Size bar = 5 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

reported before for colonies derived from asexual spores (Vangelatos et al., 2010). The triple deleted strain was also checked for sensitivity to caffeine, ethanol, SDS, Congo red, osmotic stresses and was found to be indistinguishable from a wild-type strain (data not shown). The ascospores of the triple deleted mutant strain (*piIA Δ pilB Δ surG Δ*) exhibited swelling and polarity establishment (time of germ tube emergence) indistinguishable from that of a wild-type strain at 25 °C, 37 °C or 42 °C (data not shown). We have also examined the viability of the ascospores of the triple mutant strain under rapid dehydration stress conditions, using different binary water-glycerol solutions of final osmotic pressures of 1.4,

30, 110, or 166 MPa, for 15 min, ½ h or 1 h at 25 °C, as described by Dupont et al., 2010. No statistically significant differences of the viability of *piIA Δ pilB Δ surG Δ* and wild-type ascospores was observed under the examined conditions (data not shown).

To investigate whether eisosomes have a role in the sexual cycle of *A. nidulans*, the behavior of single and triple deleted strains was examined in crosses. Our results show that hybrid cleistothecia derived from crosses among strains carrying single *piIA*, *piIB*, and *surG* or double deletions of the eisosome genes contain viable ascospores in which each deleted eisosomal gene segregates 1:1 to the corresponding wild-type gene.

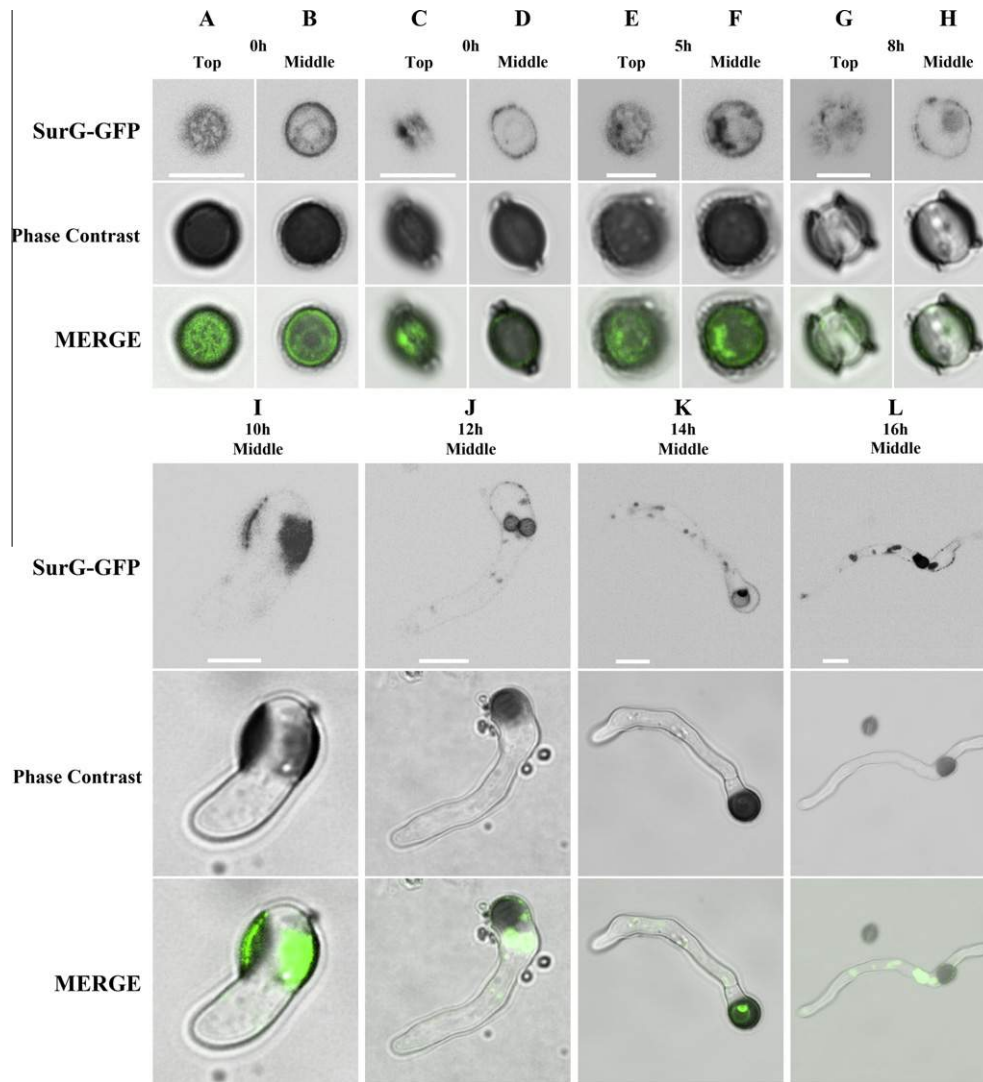


Fig. 4. SurG-GFP localization in ascospores Polar and equatorial sections of ascospores expressing SurG-GFP in (A–D) quiescent ascospores (0 h) oriented parallel with the equatorial plane (A and B) or perpendicular (C and D) to the xy plane; (E and F) swollen ascospores (5 h), (G and H) germinated ascospores (8 h). (I–L) equatorial sections of ascospore germlings after 10 h, 12 h, 14 h and 16 h of growth (I–L, respectively). Optical sectioning (step size = 0.5 μm) was performed by confocal microscopy imaging. The ascospores were obtained by selfing strain VS140 (see Table S1). All fluorescence images were acquired at the same laser intensity and detector settings. Strains were grown in the presence of 5 mM urea and 1% w/v glucose as the sole nitrogen and carbon sources respectively, at 25 °C. GFP fluorescence is shown as inverted gray scale in black and white images. Phase contrast in black and white and merged images of fluorescence and phase contrast are shown in color. Size bar = 5 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Moreover, selfed cleistothecia of triple deleted *piA1 pilB1 surG1* strain or strains carrying single *piA*, *piB*, and *surG* deletions contain viable ascospores (~90% viability in respect to the wild-type strain).

Finally, we have checked whether the distribution and the rate of ammonium-elicited endocytosis of the dicarboxylic amino acid transporter AgtA are affected in the triple deleted strain in germinated ascospores. Our results, in agreement with our previous findings concerning the involvement of PilA in ammonium-elicited endocytosis of AgtA in germinated mycelia (Vangelatos et al., 2010), showed no significant alteration of AgtA endocytosis (data not shown).

3.7. PilA localization depends on sphingolipid levels

Experimental observations reported by Fröhlich and coworkers in yeast (Fröhlich et al., 2009) showed that an MCC protein, Nce102, regulates eisosome biogenesis in response to sphingolipid availability. Myriocin, a widely used specific inhibitor of

sphingolipid biosynthesis was chosen to be used in our experiments to create sphingolipid-deficiency (Miyake et al., 1995). After testing various concentrations of myriocin, ranging from 5 μM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (as used in *S. cerevisiae* by Fröhlich et al.) to 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which is known to affect polarity in *A. nidulans* (Cheng et al., 2001), we chose 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which is not lethal, as used also by Li et al., 2007. In the presence of this concentration of myriocin we observed delayed growth of *A. nidulans* strains and altered patterns of PilA-GFP distribution. Using the spot detection tool of the Imaris (Bitplane) software we calculated the mean value area of PilA-GFP foci and the number of patches per 20 μm^2 in the presence or absence of myriocin (Fig. C and D). While PilA-GFP is organized in distinct domains distributed all around the surface of ungerminated (0 h) and germinated (12 h) ascospores, in the presence of myriocin, PilA-GFP staining in germinated ascospores was observed in fewer and larger foci (Fig. 8). PilA-GFP had a similar distribution pattern in ungerminated conidia (0 h) (data not shown) and conidia derived germlings (12 h) in the presence of myriocin.

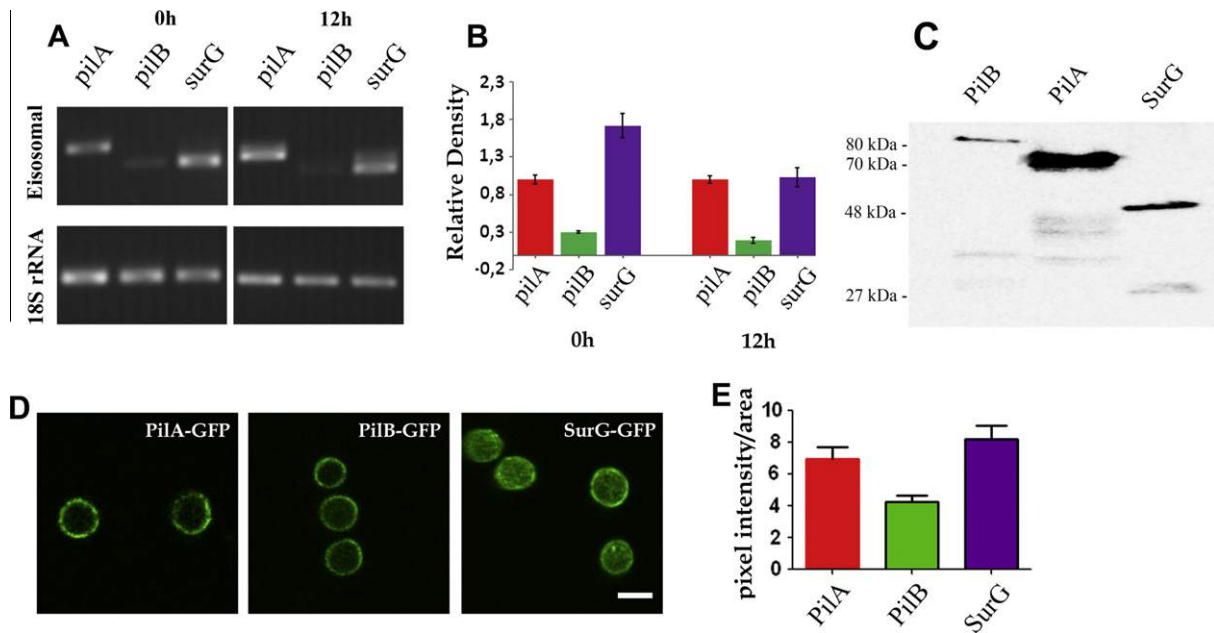


Fig. 5. Expression of core eisosomal genes in ascospores. (A) Expression of *pilA*, *pilB* and *surG* in ungerminated ascospores (0 h) and ascospore germlings (12 h) using semi-quantitative RT-PCRs. (B) Graph presenting the optical density of each amplified band shown in (A) calculated by ImageJ. All values were normalized to the expression of the housekeeping 18S rRNA gene. (C) Western blot analysis of PilA-, PilB- and SurG-GFP proteins. Approximately 200 μ g of total protein fractions of ungerminated ascospores (0 h) from strains expressing PilA, PilB, or SurG proteins tagged with GFP, were separated on a 10% w/v SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and probed with a primary mouse anti-GFP monoclonal antibody and a secondary rabbit anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody. Protein markers are indicated in kDa on the left. (D) Maximum intensity projections of z-stacks from confocal microscopy images of ungerminated ascospores expressing core eisosomal GFP-tagged proteins used for the quantification of the levels of expression of each protein. (E) Graph comparing the levels of expression of the core eisosomal GFP-tagged proteins in ungerminated ascospores based on quantification of the GFP fluorescence in images ($n = 20$) like the ones presented in (D). Pixel values/area were calculated with Image-Pro[®] Plus software. Size bar = 5 μ m. The ascospores were obtained by selfing strains VS138, VS139 and VS140 respectively (see Table S1).

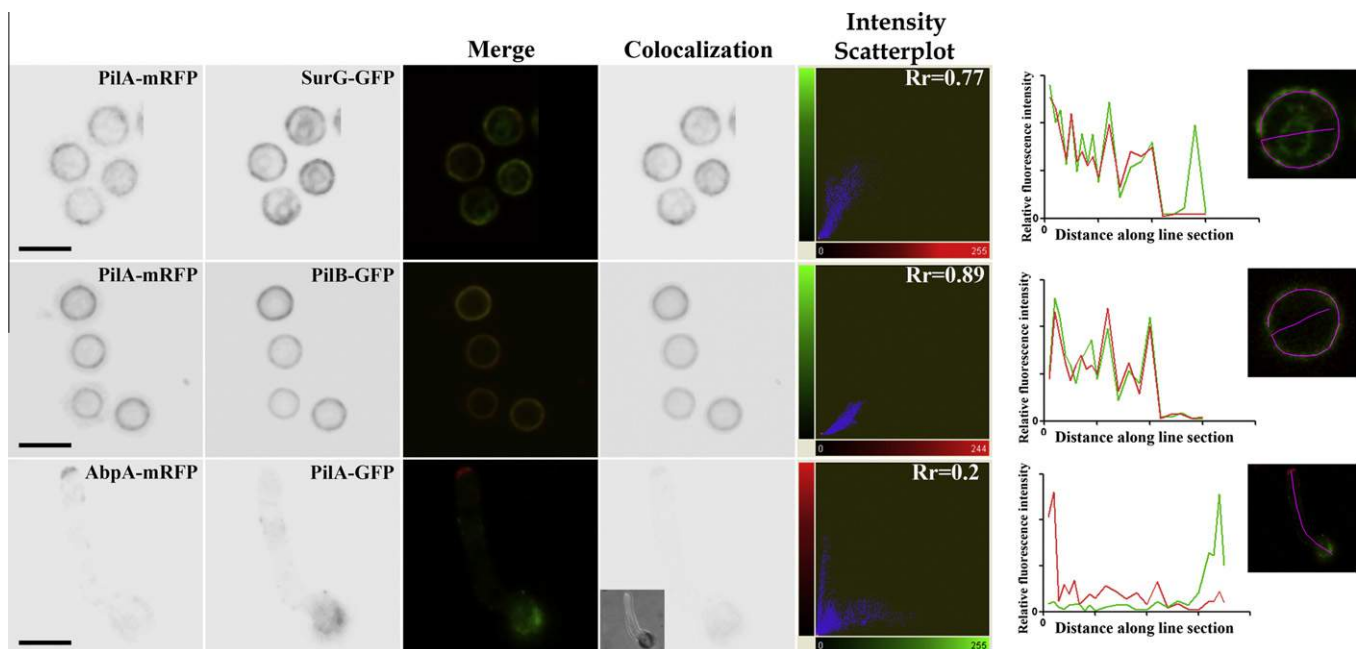


Fig. 6. Colocalization of PilA with PilB and SurG in ungerminated ascospores and PilA with AbpA in ascospore derived hyphae. Representative confocal fluorescence images were analyzed after processing with a median filter to suppress background. Corresponding pictures were merged. All pixels colocalised are represented as inverted gray scale images in black and white and scatterplots (fluorogram) pixel intensities are represented with the respective Pearson's correlation coefficients (R_r). The degree of colocalization was determined with the colocalization module of the Imaris software package (Bitplane, Zurich, Switzerland). Analysis of fluorescent intensities along line section is shown in far right panels (see Section 2). The inset in the colocalization image shows a phase contrast image of an optical section. Size bar = 5 μ m. The ascospores were obtained by selfing strains VS91, VS94 and VS185 (see Table S1).

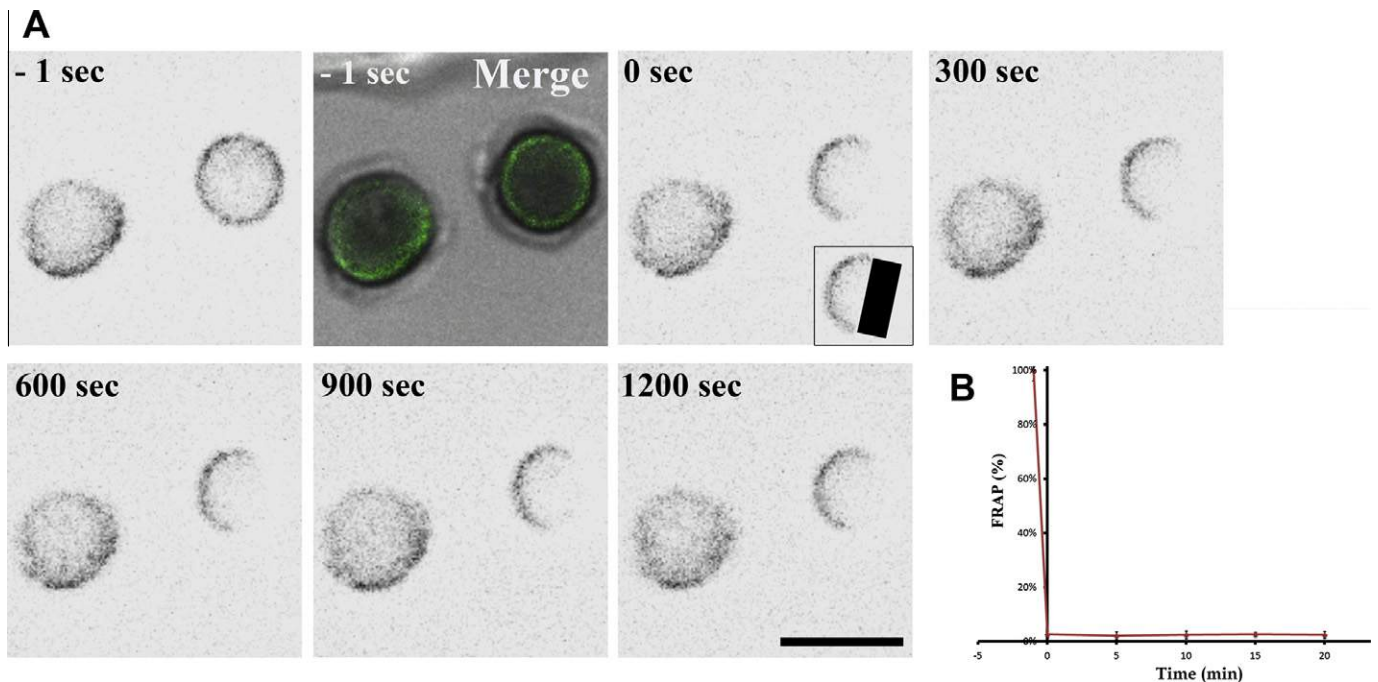


Fig. 7. PiA-GFP molecules form stable structures (A) A representative image of ungerminated ascospores, expressing PiA-GFP, photobleached with a 488 nm laser beam. GFP fluorescence is shown as inverted gray scale in black and white. Merged image of fluorescence and phase contrast is shown in color. The time stated in each panel refers to the time of bleach (0 s). The inset shows the bleached region. (B) Graph showing the fluorescence recovery (%FRAP) in the bleached region over the course of 1200 s (20 min). Size bar = 5 μ m. The ascospores were obtained by selfing strain VS139 (see Table S1). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Discussion

A. nidulans has a complex sexual cycle that has been studied using morphological, cellular and genetic approaches (Machida and Gomi, 2010 and references therein). One of these approaches is the use of GFP-protein fusions that allow visualization of protein expression during development by fluorescence microscopy. For example, GFP has been used as a tool to monitor the expression of the FcyB cytosine permease in asci of *A. nidulans* (Vlanti and Djalilinas, 2008). In the present work we have used biochemical and live cell imaging approaches to study the expression and distribution of the core eisosomal proteins PiA, PiB and SurG in different structures of *A. nidulans* sexual cycle. Our results demonstrate that the three core eisosomal proteins are not expressed either in early and late stages of hülle cells development or during the early stages of ascospore development. They appear as punctate foci at the plasma membrane of quiescent, germinating and germinated ascospores, where their distribution resembles that of conidia (Vangelatos et al., 2010). In contrast to PiA and SurG, we have found that PiB in quiescent ascospores is concentrated where the two halves of the ascospores are joined together. In *S. pombe*, there are two PiA/Pil1-like proteins, Pil1 and Pil2, which are the product of a gene duplication independent to the one which originated PiA and PiB in the Pezizomycotina (Vangelatos et al., 2010). Their distribution in asci is very different from what has been found in either *S. cerevisiae* or *A. nidulans*, Pil1 being restricted to the periphery of the ascus, and Pil2 to the ascospore membrane (Kabeche et al., 2011).

Given that PiA, PiB and SurG are expressed in the sexual cycle of *A. nidulans*, we have examined whether they affect cleistothecium and/or ascospore development. Deletions of each one or all three core eisosomal genes do not affect either ascospore viability or cleistothecium and ascospore morphology. This is in accordance with the fact that *pilA*, *pilB*, and *surG* are expressed late in

ascospore development, suggesting that they are not involved in sexual cycle progression. Notwithstanding the presence of eisosomal proteins in mature ascospores their corresponding gene deletions have no obvious effect on ascospore germination in different growth media and temperatures tested.

We have previously reported (Vangelatos et al., 2010) that neither FM4-64 nor the ammonium-elicited endocytosis of the AgtA (dicarboxylic amino acid transporter) are visibly affected in conidia derived germlings of the deleted strains. To further investigate possible involvement of eisosomal proteins in endocytosis, we have tested the possible colocalization of sites of endocytosis and PiA, using the clathrin-mediated endocytosis marker, AbpA (Araujo-Bazán et al., 2008). Our results showed no colocalization of PiA and AbpA. Overall, our data indicate that there is no direct relationship between eisosomes and endocytosis, as also previously reported (Grossmann et al., 2008; Brach et al., 2011).

Time-lapse microscopy and FRAP analysis showed that eisosomes in *A. nidulans* are static as reported previously for eisosomes in *Ashbya gossypii* (Seger et al., 2011) budding yeast (Walther et al., 2006, 2007) and fission yeast (Kabeche et al., 2011). Disruption of sphingolipid biosynthesis by myriocin (an inhibitor of serine palmitoyl transferase) resulted in reduced number of PiA spots and increased cytoplasmic fluorescence compared to myriocin untreated cells. These results are in agreement with experimental observations reported by Fröhlich and coworkers in *S. cerevisiae* (Fröhlich et al., 2009), who showed that an MCC protein, Nce102, regulates eisosome biogenesis in response to sphingolipid availability. Nce102 regulates kinases pkh1/2, in *S. cerevisiae*, which control eisosome biogenesis through phosphorylation of Pil1 (Fröhlich et al., 2009). The orthologues of Nce102 in *A. gossypii* and *Aspergillus fumigatus*, AgNce102 and AfNce102 are functionally divergent, since the AgNce102 is not necessary for eisosome formation while the AfNce102 is required for efficient conidiation and localizes mostly at the ER and the tip of hyphae (Seger et al.,

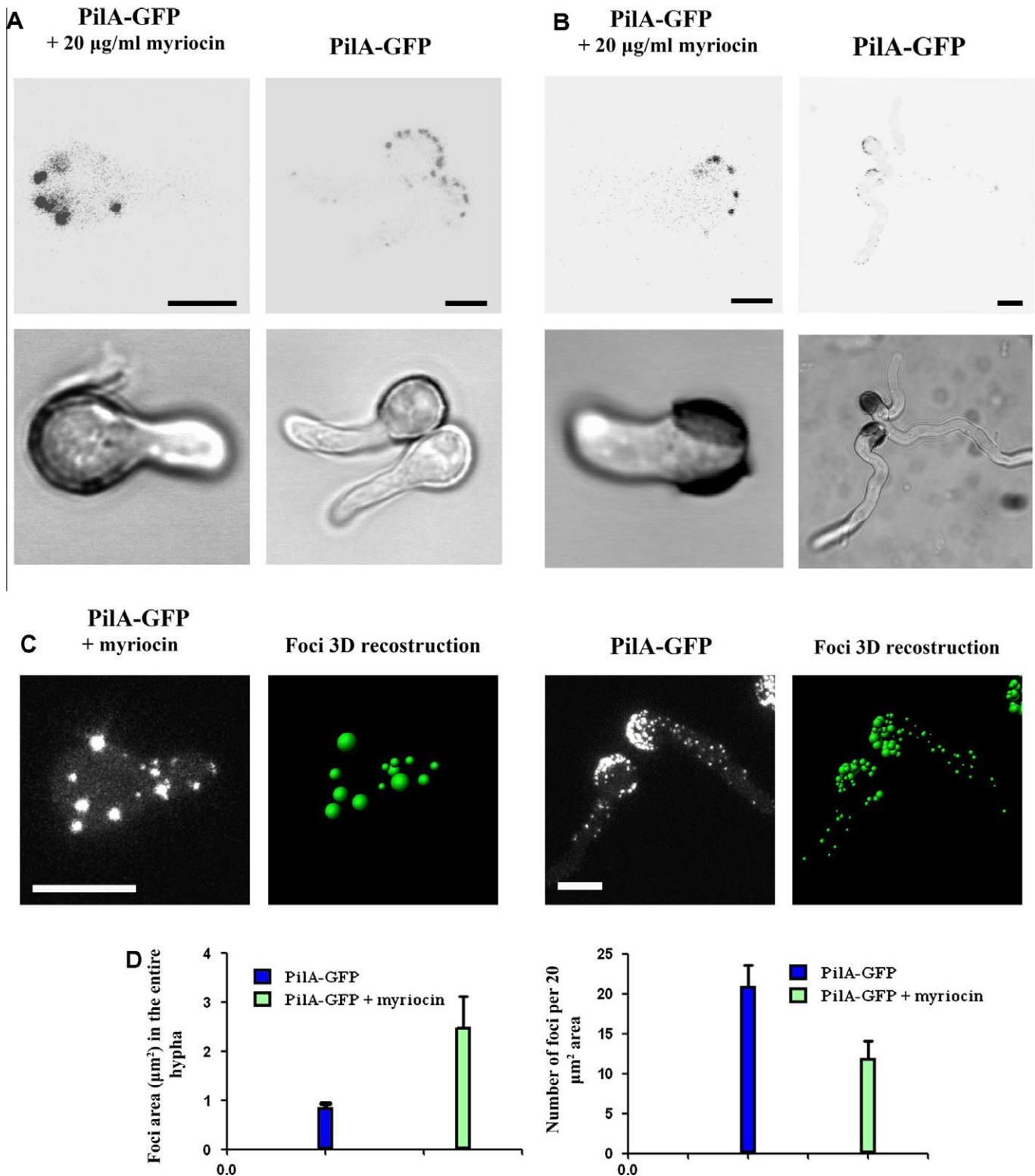


Fig. 8. Effect of myriocin in PilA distribution. Equatorial sections of confocal images of a strain expressing PilA-GFP in (A) young mycelia and (B) germinated ascospores (12 h), in the presence of 20 $\mu\text{g/ml}$ myriocin. (C) Images correspond to maximal intensity projections of z-stacks and 3D reconstruction of the same images using spot detection tool of Imaris (Bitplane) of a strain expressing PilA-GFP, in the absence and the presence of 20 $\mu\text{g/ml}$ myriocin. (D) Quantification of PilA foci (mean value area (μm^2) and number of foci per 20 μm^2 area in non-treated and myriocin treated cells. Error bars indicate standard deviations. GFP fluorescence is shown as inverted gray scale in black and white. Corresponding phase contrast images are also shown in black and white at the bottom panels. Size bar = 5 μm . The ascospores were obtained by selfing strain VS139 (see Table S1).

2011; Khalaj et al., 2012). *A. nidulans* also has an orthologue of Nce102 and its role is currently being studied in our laboratory. These results further confirm that the evolutionary conservation

of eisosomal proteins in the Ascomycetes is inconsistent with their functional significance. However, a conclusion that can be drawn from the study of core eisosomal proteins in various fungal species

is that eisosome foci are excluded from membrane regions of cell growth (Douglas et al., 2011 and references therein).

Recently, FloA, a protein which localizes at the plasma membrane and is excluded from regions of cell growth, was reported to be implicated in membrane compartmentalization and to play an indirect role in apical sterol-rich plasma membrane domains (SRDs) maintenance (Takeshita et al., 2012). However, FloA is not colocalised with PilA (Athanopoulos, Gournas and Sophianopoulou unpublished data).

The Sur7 protein of the pathogen *C. albicans* plays a role in morphogenesis, cell wall synthesis and maintenance (Wang et al., 2011 and references therein). Deletion of *SUR7* in *S. cerevisiae* causes defects in sporulation and osmotic stress (Young et al., 2002; Dupont et al., 2010). In contrast, *pilAΔ*, *pilBΔ* and *surGΔ* strains (or triple deleted mutant strain) have not shown any abnormalities in morphogenesis, sporulation, hyphal growth and polarity establishment or any resistance/sensitivity to factors that induce cell wall defects, such as detergents (SDS) and chitin-binding agents (Congo red), suggesting that core eisosomal proteins of *A. nidulans* are not playing any indirect/direct role in cell wall synthesis/maintenance. Moreover, deletion of *sur7* in *C. albicans* results in marked hypersensitivity to fluconazoles (Alvarez et al., 2008), a triazole antifungal agent which is an inhibitor of ergosterol biosynthesis, to which *A. nidulans* is tolerant (Edlind and Katiyar, 2004). Interestingly, deletion of either or both *surG* and *pilA* genes lead to moderate resistance to another antifungal triazole agent, itraconazole (Vangelatos et al., 2010). Overall, despite differences in temporal expression and membrane distribution of core eisosome proteins in different fungi, the types of different structures – puncta or filaments (Kabeche et al., 2011) – eisosomes form, all available data implicate eisosomal proteins in plasma membrane (PM) organization. The importance of plasma membrane organization is highlighted by the fact that the most effective antifungal drugs, target lipids and proteins in this essential barrier. Future studies will contribute to elucidate the mechanisms involved in eisosomes assembly/disassembly, understanding their function in different fungal species and hopefully comprehend the relationship between PM organization and pathogenicity. Notwithstanding the elusive function of eisosomal proteins, it is noteworthy that the distribution in ascospores and conidiospores, quiescent, long-term survival cells, that have a quite different developmental origin, is almost identical, and quite different from that in growing germlings and mycelia.

Acknowledgments

We thank I. Vangelatos who obtained preliminary data on the presence of eisosomes in ascospores. Most of the Imaging work was performed at the Light microscopy unit of the Hellenic Pasteur Institute (LMU-HPI). The FRAP and Time-lapse experiments were performed at the Biological Imaging Unit of the Biomedical Research Foundation (BIU-BRF) in Athens Greece. The authors acknowledge the technical assistance of Dr. Evagelia Xingi (LMU-HPI) and Dr. Eleni Rigana (BIU-BRF) in the imaging experiments. We thank Prof. B.R. Oakley for the mRFP-H1 containing strain and Dr. M. Peñalva for the AbpA-mRFP containing strain. We also thank Dr. G. Diallinas and Dr. C. Gournas for critical reading of the manuscript. This work was supported by research grant from the NCSR Demokritos to A. A.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.01.002>.

References

- Alvarez, F.J., Douglas, L.M., Konopka, J.B., 2009. The Sur7 protein resides in punctate membrane subdomains and mediates spatial regulation of cell wall synthesis in *Candida albicans*. *Communicative & Integrative Biology* 2, 76–77.
- Alvarez, F.J., Douglas, L.M., Rosebrock, A., Konopka, J.B., 2008. The Sur7 protein regulates plasma membrane organization and prevents intracellular cell wall growth in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell* 19, 5214–5225.
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M.A., Espeso, E.A., 2008. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 67, 891–905.
- Berchtold, D., Walther, T.C., 2009. TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Molecular Biology of the Cell* 20, 1565–1575.
- Bouzarelou, D., Billini, M., Roumelioti, K., Sophianopoulou, V., 2008. EglD, a putative endoglucanase, with an expansin like domain is localized in the conidial cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*: FG & B 45, 839–850.
- Brach, T., Specht, T., Kaksonen, M., 2011. Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *Journal of Cell Science* 124, 328–337.
- Carvalho, M.D.F., Baracho, M.S., Baracho, I.R., 2002. An investigation of the nuclei of hülle cells of *Aspergillus nidulans*. *Genetics and Molecular Biology* 25, 485–488.
- Champe, S.P., Simon, L.D., 1992. Cellular differentiation and tissue formation in the fungus *Aspergillus nidulans*. In: Rossomando, E.F., Alexander, S. (Eds.), *Morphogenesis: an analysis of the development of biological form*. Dekker, New York, NY, pp. 63–91.
- Cheng, J., Park, T.-S., Fischl, A.S., Ye, X.S., 2001. Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology* 21, 6198–6209.
- Cove, D.J., 1966. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 113, 51–56.
- Desmyter, L., Verstraelen, J., Dewaele, S., Libert, C., Contreras, R., Chen, C., 2007. Nonclassical export pathway: overexpression of NCE102 reduces protein and DNA damage and prolongs lifespan in an SGS1 deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology* 8, 527–535.
- Douglas, L.M., Wang, H.X., Li, L., Konopka, J.B., 2011. Membrane compartment occupied by Can1 (MCC) and eisosome subdomains of the fungal plasma membrane. *Membranes* 1, 394–411.
- Dupont, S., Beney, L., Ritt, J.-F., Lherminier, J., Gervais, P., 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1798, 975–985.
- Dyer, P.S., O'Gorman, C.M., 2012. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 165–192.
- Edlind, T.D., Katiyar, S.K., 2004. The echinocandin 'target' identified by cross-linking is a homolog of Pil1 and Lsp1, sphingolipid-dependent regulators of cell wall integrity signaling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 4491.
- Elliott, C.G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetics Research* 1, 462–476.
- French, A.P., Mills, S., Swarup, R., Bennett, M.J., Pridmore, T.P., 2008. Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nature Protocols* 3, 619–628.
- Frohlich, F., Moreira, K., Aguilar, P.S., Hubner, N.C., Mann, M., Walther, P., Walther, T.C., 2009. A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *The Journal of Cell Biology* 185, 1227–1242.
- Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W.B., Opekarová, M., Tanner, W., 2008. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *The Journal of Cell Biology* 183, 1075–1088.
- Grossmann, G., Opekarová, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I., Tanner, W., 2006. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *The EMBO Journal* 26, 1–8.
- Han, K.H., Han, K.Y., Yu, J.H., Chae, K.S., Jahng, K.Y., Han, D.M., 2001. The nsdD gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* 41, 299–309.
- Hermann, T.E., Kurtz, M.B., Champe, S.P., 1983. Laccase localized in hülle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 154, 955–964.
- Kabeche, R., Baldissard, S., Hammond, J., Howard, L., Moseley, J.B., 2011. The filament-forming protein Pil1 assembles linear eisosomes in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* 22, 4059–4067.
- Karotki, L., Huisken, J.T., Stefan, C.J., Ziólkowska, N.E., Roth, R., Surma, M.A., Krogan, N.J., Emr, S.D., Heuser, J., Grünwald, K., Walther, T.C., 2011. Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *The Journal of Cell Biology* 195, 889–902.
- Khalaj, V., Azizi, M., Enayati, S., Khorasanizadeh, D., Ardakani, E.M., 2012. NCE102 homologue in *Aspergillus fumigatus* is required for normal sporulation, not hyphal growth or pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* 329, 138–145.
- Li, S., Bao, D., Yuen, G., Harris, S.D., Calvo, A.M., 2007. BasA Regulates Cell Wall Organization and Asexual/Sexual Sporulation Ratio in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 176, 243–253.
- Loibl, M., Grossmann, G., Stradalova, V., Klingl, A., Rachel, R., Tanner, W., Malinsky, J., Opekarova, M., 2010. C terminus of Nce102 determines the structure and function of microdomains in the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane. *Eukaryotic Cell* 9, 1184–1192.

- Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O.N., Dickson, R.C., 2008. The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *Journal of Biological Chemistry* 283, 10433–10444.
- Machida, M., Gomi, K., 2010. *Molecular Biology and Genomics*. Horizon Scientific Press, Aspergillus.
- Malinska, K., 2004. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *Journal of Cell Science* 117, 6031–6041.
- Malinská, K., Malinský, J., Opekarová, M., Tanner, W., 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Molecular Biology of the Cell* 14, 4427–4436.
- Malinsky, J., Opekarová, M., Tanner, W., 2010. The lateral compartmentation of the yeast plasma membrane. *Yeast* 27, 473–478.
- Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T., Kawasaki, T., 1995. Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 211, 396–403.
- Moreira, K.E., Walther, T.C., Aguilar, P.S., Walter, P., 2009. Pil1 controls eisosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 20, 809–818.
- Nayak, T., 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172, 1557–1566.
- Okuzaki, D., 2003. Fission yeast *meu14+* is required for proper nuclear division and accurate forespore membrane formation during meiosis II. *Journal of Cell Science* 116, 2721–2735.
- Olivera-Couto, A., Graña, M., Harispe, L., Aguilar, P.S., 2011. The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Molecular Biology of the Cell* 22, 2360–2372.
- Peñalva, M.A., 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genetics and Biology* 42, 963–975.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Chemmons, L.M., Macdonald, K.D., Bufton, A.W.J., 1953a. The genetics of *Aspergillus nidulans*. In: *Advances in Genetics*. Elsevier. pp. 141–238.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D., Bufton, A.W.J., 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5, 141–238.
- Ramón, A., Muro-Pastor, M.I., Scazzocchio, C., Gonzalez, R., 2000. Deletion of the unique gene encoding a typical histone H1 has no apparent phenotype in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 35, 223–233.
- Reijntjens, P., Walther, A., Wendland, J., 2011. Dual-colour fluorescence microscopy using yEmCherry-/GFP-tagging of eisosome components Pil1 and Lsp1 in *Candida albicans*. *Yeast (Chichester, England)* 28, 331–338.
- Scazzocchio, C., Vangelatos, I., Sophianopoulou, V., 2011. Eisosomes and membrane compartments in the ascomycetes: a view from *Aspergillus nidulans*. *Communicative & Integrative Biology* 4, 64.
- Seger, S., Rischatsch, R., Philippson, P., 2011. Formation and stability of eisosomes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Journal of Cell Science* 124, 1629–1634.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.
- Sohn, K.T., Yoon, K.S., 2002. Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* 30, 117–127.
- Strádalová, V., Stahlschmidt, W., Grossmann, G., Blazíková, M., Rachel, R., Tanner, W., Malinsky, J., 2009. Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *Journal of Cell Science* 122, 2887–2894.
- Takehita, N., Diallinas, G., Fischer, R., 2012. The role of flotillin FloA and stomatin StoA in the maintenance of apical sterol-rich membrane domains and polarity in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 83, 1136–1152.
- Tavoularis, S., Scazzocchio, C., Sophianopoulou, V., 2001. Functional expression and cellular localization of a green fluorescent protein-tagged proline transporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 33, 115–125.
- Tavoularis, S.N., Tazebay, U.H., Diallinas, G., Sideridou, M., Rosa, A., Scazzocchio, C., Sophianopoulou, V., 2003. Mutational analysis of the major proline transporter (PtnB) of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Membrane Biology* 20, 285–297.
- Todd, R.B., Davis, M.A., Hynes, M.J., 2007. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nature Protocols* 2, 811–821.
- Vangelatos, I., Roumelioti, K., Gournas, C., Suarez, T., Scazzocchio, C., Sophianopoulou, V., 2010. Eisosome organization in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 9, 1441–1454.
- 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. *Molecular Microbiology* 68, 959–977.
- Walther, T.C., Aguilar, P.S., Fröhlich, F., Chu, F., Moreira, K., Burlingame, A.L., Walter, P., 2007. Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *The EMBO Journal* 26, 4946–4955.
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C., Walter, P., 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998–1003.
- Wang, H.X., Douglas, L.M., Aimanianda, V., Latgé, J.-P., Konopka, J.B., 2011. The *Candida albicans* Sur7 protein is needed for proper synthesis of the fibrillar component of the cell wall that confers strength. *Eukaryotic Cell* 10, 72–80.
- Wei, H., Scherer, M., Singh, A., Liese, R., Fischer, R., 2001. *Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (mutanase), *mutA*, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 34, 217–227.
- Young, M.E., Karpova, T.S., Brügger, B., Moschenross, D.M., Wang, G.K., Schneider, R., Wieland, F.T., Cooper, J.A., 2002. The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Molecular and cellular biology* 22, 927–934.
- Ziółkowska, N.E., Christiano, R., Walther, T.C., 2012. Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends in Cell Biology* 22, 151–158.

The *Aspergillus nidulans* Proline Permease as a Model for Understanding the Factors Determining Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters*

Received for publication, September 15, 2014, and in revised form, January 8, 2015. Published, JBC Papers in Press, January 8, 2015, DOI 10.1074/jbc.M114.612069

Christos Gournas^{†1}, Thomas Evangelidis^{§2}, Alexandros Athanasiopoulos^{‡3}, Emmanuel Mikros[§], and Vicky Sophianopoulou^{‡4}

From the [‡]Microbial Molecular Genetics Laboratory, Institute of Biosciences and Applications, NCSR "Demokritos," Agia Paraskevi, 15310 Athens and the [§]School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15771, Greece

Background: PrnB, different from Put4p, its *Saccharomyces cerevisiae* orthologue, is a highly specific L-proline transporter of *Aspergillus nidulans*.

Results: Identification of 12 residues important for PrnB activity and/or specificity. Put4p-mimicking mutants of PrnB recognize other Put4p substrates.

Conclusion: Residues variable in the yeast amino acid transporter (YAT) family determine transporter specificity.

Significance: Understanding the molecular mechanisms underlying amino acid recognition and translocation through YATs.

Amino acid uptake in fungi is mediated by general and specialized members of the yeast amino acid transporter (YAT) family, a branch of the amino acid polyamine organocation (APC) transporter superfamily. PrnB, a highly specific L-proline transporter, only weakly recognizes other Put4p substrates, its *Saccharomyces cerevisiae* orthologue. Taking advantage of the high sequence similarity between the two transporters, we combined molecular modeling, induced fit docking, genetic, and biochemical approaches to investigate the molecular basis of this difference and identify residues governing substrate binding and specificity. We demonstrate that L-proline is recognized by PrnB via interactions with residues within TMS1 (Gly⁵⁶, Thr⁵⁷), TMS3 (Glu¹³⁸), and TMS6 (Phe²⁴⁸), which are evolutionary conserved in YATs, whereas specificity is achieved by subtle amino acid substitutions in variable residues. Put4p-mimicking substitutions in TMS3 (S130C), TMS6 (F252L, S253G), TMS8 (W351F), and TMS10 (T414S) broadened the specificity of PrnB, enabling it to recognize more efficiently L-alanine, L-azetidine-2-carboxylic acid, and glycine without significantly affecting the apparent K_m for L-proline. S253G and W351F could transport L-alanine, whereas T414S, despite displaying reduced proline uptake, could transport L-alanine and glycine, a phenotype suppressed by the S130C mutation. A combination of all five Put4p-resembling substitutions resulted in a functional allele that could also transport L-alanine and glycine, displaying a specificity profile impressively similar to that of Put4p. Our results support a model where residues in these positions

determine specificity by interacting with the substrates, acting as gating elements, altering the flexibility of the substrate binding core, or affecting conformational changes of the transport cycle.

Amino acid supply in cells depends on specialized transmembrane transporter proteins. The majority of these proteins belong to the ubiquitous amino acid polyamine organocation (APC)⁵ superfamily, one of the largest families of secondary transporters (1, 2). The APC includes members that function as solute/cation symporters and solute/solute antiporters and are found in bacteria, archaea, fungi, protists, plants and animals (1, 3). Fungal APC members belong to the yeast amino acid transporter (YAT) family (4). Numerous YAT transporters can be identified in all sequenced genomes of fungi. Characterized members include 15 of the 16 characterized amino acid transporters of *Saccharomyces cerevisiae* (5, 6), two proteins of *Aspergillus nidulans*, PrnB and AgtA (7, 8), as well as transporters from *Candida glabrata*, *Neurospora crassa*, and *Penicillium chrysogenum* (9–11). These proteins display different specificities and are subject to tight transcriptional and post-translational regulation (12–14).

The *prnB* gene encoding the main proline transporter of *A. nidulans* is part of the *prn* gene cluster mediating transport and utilization of proline as a sole carbon and/or nitrogen source (7, 15, 16). The *prnB* gene has been extensively used as a model for transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression (15–20).

The PrnB transporter has been used as a model to address structure-function relationships in YATs, by mutational analysis and cysteine scanning mutagenesis (21–23). Earlier computational studies suggested that APC members possess the so called "5 + 5"-fold (24), commonly found in the crystal struc-

* This work was supported in part by the European Union (European Social Fund, ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF), Research Funding Program: THALES, Investing in knowledge society through the European Social Fund (to V. S. and E. M.).

¹ To whom correspondence may be addressed. E-mail: cgournas@bio.demokritos.gr.

² Supported by the Bodossaki Foundation.

³ Supported by an NCSR "Demokritos" Ph.D scholarship.

⁴ To whom correspondence may be addressed. E-mail: vicky@bio.demokritos.gr.

⁵ The abbreviations used are: APC, amino acid polyamine organocation; YAT, yeast amino acid transporter; AZC, L-azetidine-2-carboxylic acid; TMS, transmembrane segment; MM, minimal media; r.m.s., root mean square.

Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters

tures of several prokaryotic transporters belonging to evolutionary distinct protein families with different substrate specificities (25–28). By using a sensitive homology threading approach, a three-dimensional model of PrnB was previously generated, using as template the crystal structure of the LeuT transporter of *Aquifex aeolicus* (23). This model predicted that PrnB, as well as other members of the APC superfamily and the YAT family, share a common structural core (23). This core consists of two intertwined, antiparallel V-shaped repeating units of five transmembrane segments each (TMS1–5 and TMS6–10) connected by a relatively long loop and is followed by two additional helices (TMS11 and -12). Along with mutational evidence, the model suggested that the substrate binding pocket of APCs would be located in the vicinity of the unwound part of two kinked helices (TMS1 and TMS6) of each V-shaped repeated unit of the transporter. These predictions were confirmed by the subsequent crystal structures of three bacterial APC members: the arginine/agmatine (AdiC) and glutamate/ γ -aminobutyric acid (GadC) antiporters and the ApcT, a broad specificity proton/amino acid symporter (29–31).

In this study, using the PrnB transporter, we combine molecular modeling and induced fit docking along with comparative sequence analyses, genetic and biochemical approaches in an attempt to identify substrate binding residues and specificity determinants of YATs. More precisely, we provide further evidence that residues Gly⁵⁶ and Thr⁵⁷ of TMS1 contribute to substrate binding and also identify new substrate interacting residues in TMS3 (Glu¹³⁸), TMS6 (Phe²⁴⁸), TMS8 (Trp³⁵¹), and TMS10 (Thr⁴¹⁴). Moreover, we show that PrnB is a highly specific L-proline transporter compared with Put4p, which is also known to transport L-alanine, glycine, GABA, and the toxic proline analog L-azetidine-2-carboxylic acid (AZC) (32–37). Taking advantage of the high primary sequence similarity and the specificity differences of PrnB and Put4p, we identify residues in TMSs 3 (Ser¹³⁰), 6 (Phe²⁵² and Ser²⁵³), 8 (Trp³⁵¹), and 10 (Thr⁴¹⁴) that contribute to the determination of the specificity profile of proline transporters. Based on these results, we discuss the potential mechanisms governing specificity determination in fungal amino acid transporters.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Multiple alignments—Accession numbers of the proteins: AdiC, C8U042; PrnB, P18696; Put4p, P15380; AgtA, B2M1L6; Dip5, P53388; PcDip5, Q6SKV7; Can1, P04817; Lyp1, P32487; Alp1, P38971; Gap1, P19145; NcPMG, P87251; Agp1, P25376; Gnp1, P48813; Bap2, P38084; Bap3, P41815; Tat1, P38085; Tat2, P38967; Tat3, A4UZ28; CgCyn1, Q6FK93; Hip1, P06775; Sam3, Q08986; Mmp1, Q12372.

Homology Modeling—Multiple threading alignments were created with LOMETS metaserver (38) using the full-length sequence of PrnB from *A. nidulans* or Put4p from *S. cerevisiae* (UniProt accession codes P18696 and P15380, respectively). Fig. 1 shows a multiple alignment of YAT sequences. The alignments of the PrnB and Put4p sequences with that of AdiC (PDB code 3L1L), shown in Fig. 2, were obtained by TM-Coffee (39) and modified manually on the basis of this multiple alignment. The full-length sequences of PrnB and Put4p were submitted to the TOPCONS meta-server (40) for consensus membrane pro-

tein topology prediction. 2000 models of PrnB residues 38–515 and 2000 models of Put4p residues 107–590 were constructed in total using the Rosetta threading protocol with the membrane specific scoring function terms (41–43). The secondary structure of the protein, as predicted by SAM server (44), as well as the consensus membrane protein topology prediction made by TOPCONS meta-server, were also taken into account in the form of restraints during model construction. 3-mer and 9-mer peptide fragments for modeling were created locally using the SAM-predicted secondary structure of PrnB and Put4p. Unfolded and broken structures were excluded by retaining only the 90% top scores models. A random model among them was superimposed on the crystal structure of AdiC using the combinatorial extension algorithm (45), and the putative substrate binding cavities of PrnB and Put4p were determined by selecting every residue that was poised within 8 Å from the arginine ligand. Trajectories were assembled from the remained low-energy models and were clustered with GROMACS Tools version 4.6.1 (46) using the backbone heavy atoms and C β carbon of the putative substrate binding pocket. The algorithm used for clustering was “gromos” with cutoff at 1.5 Å. Root mean square (r.m.s.) fluctuation of the backbone atoms was calculated with g_rmsf module of GROMACS Tools.

Induced Fit Docking—Protein preparation using OPLS2005 force field (47) and molecular docking was performed with the Schrödinger Suite 2014, as described in our previous study (48). Substrates were docked on the most dominant cluster representative receptor structures, using the induced fit docking protocol (Schrödinger Suite 2014 Induced Fit Docking protocol), which is intended to circumvent the inflexible binding site and accounts for the side chain and backbone movements upon ligand binding (49).

Strains, Media, and Growth Conditions—Strains used in this study are summarized in Table 1. All carry the *veA1* mutation. Chemicals were from Sigma and AppliChem GmbH. Standard, previously described MM and complete media for *A. nidulans*, as well as medium supplements, were used (described in the Fungal Genetics Stock Centre). Assessment of the functionality of PrnB alleles was performed in MM using 1% glucose or 1% glycerol as carbon sources. Urea, amino acids, and GABA have been supplemented at a final concentration of 5 or 10 mM, unless otherwise indicated. D-Serine was used at a final concentration of 0.1 mg/ml, using urea as the sole nitrogen source. For membrane-enriched protein extracts, strains were incubated 3–4 days at 37 °C in solid complete medium. Conidiospores were harvested, filtered through miracloth, and used to inoculate flasks containing 200 ml of liquid MM, appropriately supplemented, using 0.1% fructose and 10 mM NaNO₃ as carbon and nitrogen sources, respectively. Cultures were incubated 18 h at 25 °C and *prnB* induction was achieved by the addition of 20 mM L-proline for the last 4 h of growth.

Molecular Manipulations and Transformation—*prnB* alleles have been generated by *in vitro* site-directed mutagenesis of plasmid pA4 (50), using Kapa-HiFi (Kapa Biosystems) DNA polymerase and primers 11–32 of Table 2. The alleles were confirmed by sequencing (VBC Genomics, Austria). Linearized sequences of these plasmids were used to transform, as previously described (51), strain *prn397*. Transformants were iso-

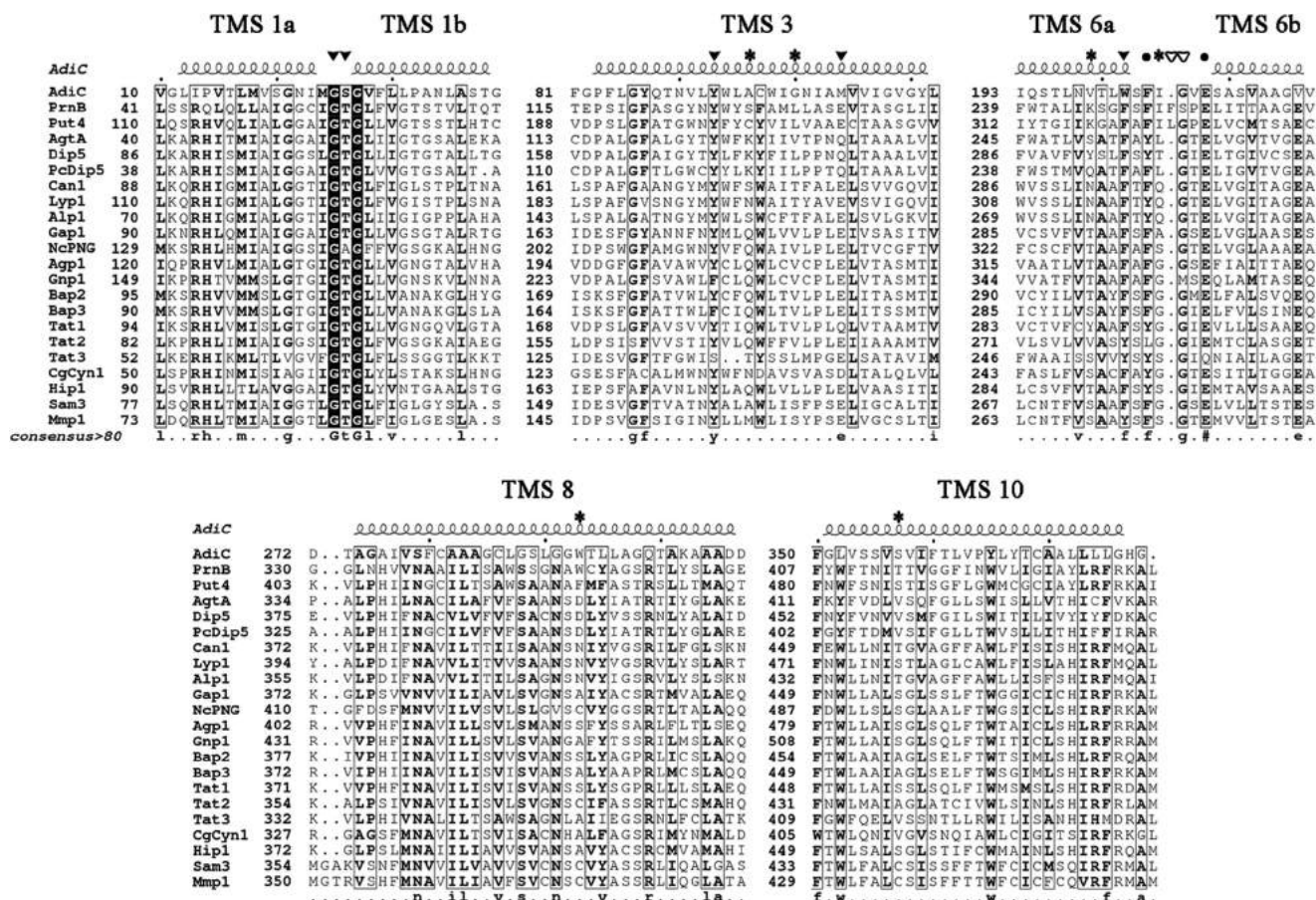


FIGURE 1. Sequence alignment of TMS 1, 3, 6, 8, and 10 of YATs of known function. Black arrowheads indicate residues conserved in the family, which in PrnB (Gly⁵⁶, Thr⁵⁷, Glu¹³⁸, and Phe²⁴⁸) and Can1 (Gly¹⁰³, Thr¹⁰⁴, and Phe²⁹⁵) appear to interact with the invariant part of amino acid substrates. Tyr¹⁸¹ of Bap2, necessary for transport activity, is also highlighted. Black asterisks indicate residues non-conserved in the family, which in PrnB (Trp³⁵¹ and Thr⁴¹⁴) and Can1 (Ser¹⁷⁶, Thr¹⁸⁰, Gln²⁹⁸, and Thr⁴⁵⁶) appear to participate in substrate binding, as well as specificity determination residues of PrnB (Ser¹³⁰, Lys²⁴⁵, Trp³⁵¹, and Thr⁴¹⁴). Empty arrowheads indicate residues that are close to the binding site and, directly or indirectly, affect the specificity of PrnB (Phe²⁵² and Ser²⁵³). Black circles indicate residues important for PrnB function, which are conserved in the family and do not appear to directly participate in substrate binding (Phe²⁵⁰ and Glu²⁵⁵). Visualization was done using ESPrnt 3.0 (78), following annotation using Photoshop CS5 (Adobe).

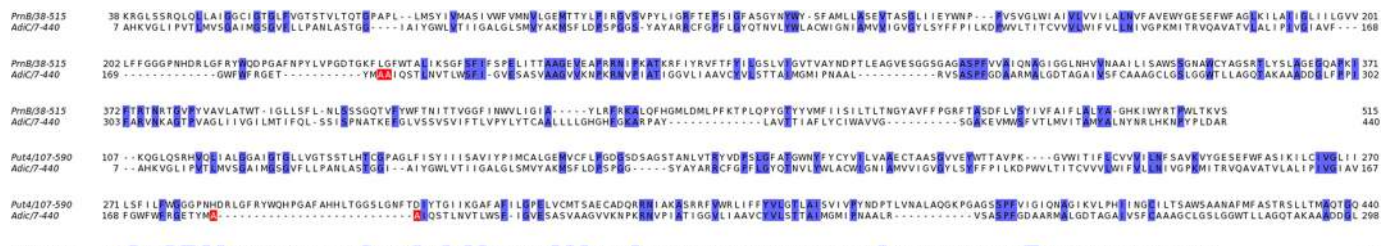


FIGURE 2. The pairwise alignments between PrnB and Adic as well as Put4p and Adic, which were used for homology modeling. The two terminal amino acids of the gap in Adic (residues 181-191) structure are marked in red.

lated and analyzed by Southern blotting for the sequence of the *prnB* gene, ensuring that all strains used in this study carry single copy *in-locus prnB* alleles derived from homologous integration events. A ~1100-bp SmaI fragment, including part of the promoter and ORF of *prnB*, from plasmid pA4 was used as a *prnB*-specific probe. The ~1500 bp 5' and 3' flanking sequences of *gabA* were PCR amplified using primers 1-8 of Table 2 digested with KpnI/XbaI and XbaI/NotI and subsequently cloned into a KpnI/NotI linearized pBlueScript II SK(+)vector. In the unique XbaI site of the resulting plasmid, the *AfpyrG* gene, PCR amplified using primers 9 and 10 from plasmid p1439 (52, 53) and XbaI digested was cloned. The

resulting cassette was PCR amplified using primer pairs 1 and 4 and ~2 μg of the products were used to transform strain *nkuΔΔ*, selecting for uracil/uridine prototrophy. Single copy *gabAΔ::AfpyrG* strains were checked by Southern analysis, using as probes the sequences of *AfpyrG* and the 5' flanking sequence of *gabA*. Plasmid preparation from *Escherichia coli* strains and DNA bands purified from agarose gels were performed with the Nucleospin Plasmid kit and the Nucleospin ExtractII kit, respectively, according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, Lab Supplies Scientific SA, Hellas, Greece). DNA probes for Southern analysis (54) were labeled with [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, Institute of Isotopes

Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters

TABLE 1

A. nidulans strains used and constructed in this study

Strain	Genotype	Description/Refs.
Wt1	<i>pantoB100</i> ; <i>yA2</i>	Wild-type reference strain
CAM45	<i>prn377</i> ; <i>pabaA1</i> ; <i>yA2</i>	<i>prnBΔ</i> , Ref. 50
<i>prn397</i>	<i>prn397</i> ; <i>pantoB100</i> ; <i>yA2</i>	<i>prnBCΔ</i> , Ref. 12
TpA4 ^a	<i>prnB-gfp</i> ; <i>pantoB100</i> ; <i>yA2</i>	Ref. 50
VIE180	<i>ckiA1919</i> ; <i>pabaA1</i> ; <i>pantoB100</i> ; <i>yA2</i>	Ref. 60
VIE181	<i>ckiA1919</i> ; <i>prnB377</i> ; <i>pabaA1</i> ; <i>riboB2</i> ; <i>yA2</i>	Ref. 60
<i>nkuAΔ</i>	<i>nkuAΔ::argB</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>pyroA4</i>	Ref. 52
CG1	<i>gabAΔ::AfpyrG</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>nkuAΔ::argB</i>	This study
CG2	<i>ngn2Δ::AfpyrG</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>nkuAΔ::argB</i>	This study
CG3 ^b	<i>prnB-gfp</i> ; <i>ckiA1919</i> ; <i>pantoB100</i> ; <i>yA2</i>	This study
CG4 ^b	<i>prnB-gfp</i> ; <i>gabAΔ::AfpyrG</i> ; <i>pantoB100</i> ; <i>yA2</i>	This study
CG5	<i>prn377</i> ; <i>gabAΔ::AfpyrG</i> ; <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>yA2</i>	This study

^a Strains isogenic to TpA4, carrying *prnB-gfp* alleles with substitutions G56P, T57N, S130C, E138D, E138Q, G247A, F248Y, F248W, F250Y, F248W/F250W, I251Δ, F252Δ, F252L, S253G, E255D, E255Q, W351F, W351E, W351A, T414S, T414A, S130C/T414S, and S130C/F252L/S253G/W351F/T414S were constructed in this study.

^b Strains isogenic to CG3 and CG4, carrying *prnB-gfp* alleles with substitutions S130C, G247A, F252L, S253G, W351F, W351E, W351A, T414S, T414A, S130C/T414S, and S130C/F252L/S253G/W351F/T414S were constructed in this study.

TABLE 2

Primers used in this study

Primers 7–28 have been used for *in vitro* site-directed mutagenesis along with a, herein not shown, reverse complement primer.

Name	5'-3' sequence
1 5' <i>gabA</i> KpnI F	aatcggtagccgcttcacgctgcaggac
2 5' <i>gabA</i> XbaI R	aagcttagagcttctcgcgtgccagataaac
3 3' <i>gabA</i> XbaI F	aagcttagagccggatccaacactcgag
4 3' <i>gabA</i> NotI R	aatcggccggcgggtctcgcggtggaatggtcg
5 <i>AlpyrG</i> XbaI F	cgcgcttagagccctcaaaacatgctctccaccctc
6 <i>AlpyrG</i> XbaI R	cgcgcttagagctgctcgaagaggagcaactgatgcg
7 G56P F	ctcgccatcggaggatgatacccactggtctctcgcggtac
8 T57N F	ccatcggaggatgattggcaatggtctctcgcggtacttc
9 S130C F	ggctataactactggatattgctttgctatgctgctgacctc
10 E138D F	ctatgctgctggcctcggatgtgagtaacaatggctttatt
11 E138Q F	ctatgctgctggcctcgaagtgtgagtaacaatggctttatt
12 G247A F	ggactgcccgtgatacaagtcocgctttttcgttcaattttctcgc
13 F248Y F	gccctgatacaagtcocggttattcgttcaattttctcgcgccaattg
14 F248W F	gccctgatacaagtcocggttggctcgttcaattttctcgcgccaattg
15 F250Y F	ctgatacaagtcocggtttttcgttcaattttctcgcgccaattg
16 F248W/F250W F	gccctgatacaagtcocggttggctcgtgattttctcgcgccaattg
17 I251Δ F	caagtcocggtttttcgttctctcgcgccaattg
18 F252Δ F	caagtcocggtttttcgttctctcgcgccaattg
19 F252L F	gtccgggtttttcgttcaattctcgcgccaattg
20 S253G F	ccgggtttttcgttcaattttcgggcccgaattgatacaccag
21 F252L/S553G F	gtccgggtttttcgttcaattctcgggcccgaattgatacaccag
22 E255D F	gttcaattttctcgcgccaattgatacaccagcagcct
23 E255Q F	ttcgttcaattttctcgcgccaattgatacaccagcagcct
24 W351F F	ggctcatccggtaaacgcaattctgttacgctggatcgag
25 W351E F	tggtcatccggtaaacgcaagttggttacgctggatcgag
26 W351A F	tggtcatccggtaaacgcaagttggttacgctggatcgag
27 T414S F	ctactgggtcaccacaattttctaccgctggcgggttcac
28 T414A F	ctactgggtcaccacaattttctaccgctggcgggttcac

Co. Ltd., Miskolc, Hungary) using a random hexanucleotide primer kit following the supplier's instructions (Takara Bio, Lab Supplies Scientific SA) and purified on MicroSpinTM S-200 HR columns following the supplier's instructions (Roche Diagnostics). Restriction enzymes used were from Takara Bio.

Epifluorescence Microscopy—Samples were prepared as previously described (55, 56). 20 mM L-proline was used for induction of *prnB* expression, at 25 °C for 12–14 h. Samples were observed using a Plan-Apochromat ×100 1.40 NA oil immersion objective lens on an Axioplan 2 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Inc.) with appropriate filters and the resulting images were acquired with a Zeiss-MRC5 digital camera using AxioVs40 V4.40.0 software. Images were then processed with ImageJ (NIH) and annotated with Photoshop CS5 software (Adobe).

Radiolabeled Uptake Measurements and Kinetic Analyses—Activity of PrnB mutants was measured by estimating rates of L-[³H]proline (60.0 Ci mmol⁻¹, Moravik Biochemicals, Brea,

CA) uptake as previously described (21–23, 57). L-[³H]Proline uptake in MM, pH 6.8, at 25 °C was assayed in germinating conidiospores of *A. nidulans* derived from 8 to 9-h cultures at 25 °C, induced with 20 mM L-proline and washed 3 times with 50 ml of MM, finally concentrated at 10⁷ conidiospores/100 μl. Initial velocities were measured at 1–5 min of incubation with 0.25–20 μM radioactive substrate because uptake was linear for at least 30 min (21). K_m/K_i values were obtained directly by performing and analyzing (Prism3) L-[³H]proline uptake in the presence of at least 10 different concentrations of competitor. In all cases background uptake values were corrected by subtracting values measured in a *prnBΔ* strain. K_i values calculated satisfy the criteria for use of the Cheng and Prusoff equation $K_i = IC_{50}/[1 + (L/K_m)]$, in which L is the permeant concentration. IC_{50} values were determined from full dose-response curves, and in all cases the Hill coefficient was close to -1, consistent with the presence of one uptake system.

Protein Extraction and In-gel Fluorescence—Membrane-enriched protein extracts were prepared as previously described (22, 55), with the following modifications (58). Following membrane protein precipitation by centrifugation (1 h, 18,000 × *g*, 4 °C), the extraction buffer was removed and the pellet was resuspended in ice-cold In-gel Fluorescence Resuspension Buffer (IFRB: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 10% glycerol) freshly supplemented with protease inhibitor mixture (Sigma, P8215, 1:500) and 1 mM PMSF. Cell debris was pelleted by centrifugation at 500 × *g* for 3 min at 4 °C and the supernatant was transferred to a new pre-cooled Eppendorf tube. Protein concentration was measured by the method of Bradford. 30–50 μg of protein samples were mixed with one-third volume of 4× SB for In-gel Fluorescence (4× IFSB: 70 mM Tris-HCl, pH 7.5, 7% glycerol, 7 mM EDTA, pH 8.0, 8% SDS, 100 mM DTT, 0.02% bromophenol blue) and immediately used to load a standard 10% SDS-polyacrylamide gel. Following SDS-PAGE at 110 V, the gel was rinsed with dH₂O and the fluorescent bands were detected with a CCD camera system (ImageQuantTM LAS 4000, GE Healthcare) by exposure to blue light (EPI source) set at 460 nm, using a cut-off filter of 515 nm, by increasing the exposure time until fluorescent bands were clearly visible (10–60 s). The gel was subsequently stained with Coomassie staining solution. Images were processed with ImageJ (NIH) and annotated with the Adobe Photoshop CS5 software.

RESULTS

To identify the topology of PrnB and Put4p residues that are essential or crucial for proline binding and transport, we constructed the three-dimensional structural models of the transporters, using a robust comparative modeling approach (Fig. 3). The models were based on the outward-facing occluded structure of AdiC (PDB code 3L1L). In that structure, AdiC was crystallized with its substrate, arginine, in an intermediate conformation, which enables the identification of most of the amino acid residues involved in substrate binding (29).

Two thousand structural models of PrnB and Put4p were built and divided into clusters, based on the structural similarity of their substrate binding sites. The three largest clusters of each protein were used for docking. These clusters represent 28, 17.5, and 6.7% of the total model population in PrnB and 28,

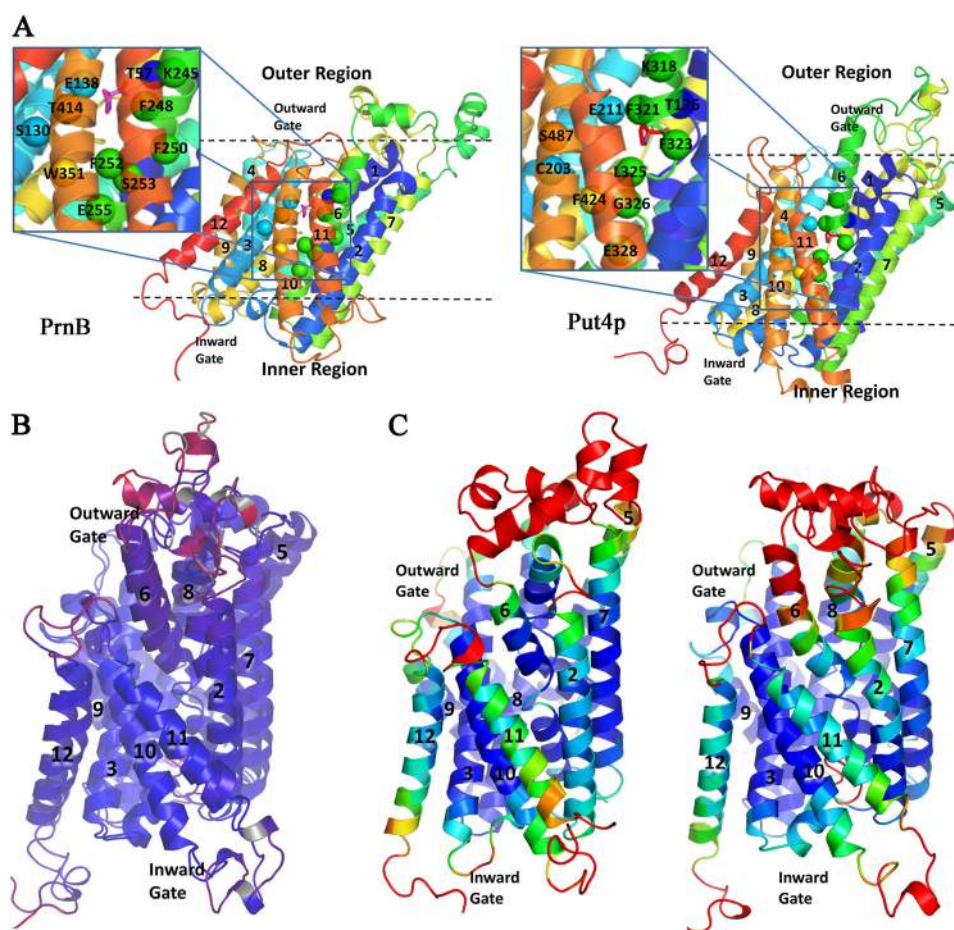


FIGURE 3. *A*, the orientation of theoretical models of PrnB and Put4p with respect to the membrane, as predicted by the OPM server (79), along with the position of selected residues important for the function and specificity profile of PrnB marked with spheres. *Insets* in the figure show a higher magnification of the boxed area. *B*, superimposition of the PrnB and Put4p models colored by r.m.s. deviation. Low r.m.s. deviation regions are colored in dark blue, moderate r.m.s. deviation in magenta, and high r.m.s. deviation in red. Unaligned regions are gray. *C*, the structural models of PrnB (left) and Put4p (right) were color-coded in rainbow scale according to r.m.s. fluctuation (RMSF) measurements. Dark blue indicates low r.m.s. fluctuation, whereas red indicates very high r.m.s. fluctuation.

26.4, and 12.4% of that in Put4p, respectively. Fig. 3*A* shows a representative structure of the largest cluster of each of the two transporters. The overall models of the two permeases are, as expected, very similar (Fig. 3*B*). A notable difference was observed in the positioning of TMS6a and TMS11, which are closer to the pore of the transporter in Put4p. The observed differential positioning of TMS6a could be partially explained by the differential flexibility of the nearby unwound segment of TMS6. Indeed, r.m.s. fluorescence measurements showed that the positioning of TMS6a is substantially more variable in Put4p than in PrnB (Fig. 3*C*). Our mutational analysis suggests that this could be related to the broader specificity of Put4p (see below). In contrast to TMS6a, the r.m.s. fluctuation of TMS11 between PrnB and Put4p is quite similar.

Identifying Substrate Binding Residues—We performed induced fit docking of L-proline in PrnB as well as L-proline, L-alanine, and L-azetidine-2-carboxylic acid in Put4p (Fig. 4 and data not shown). Docking of these substrates was performed to the representative structures of at least the three largest clusters of the homology models, which altogether represent more than 50% of the structures created for each transporter. With this strategy we allowed implicitly larger structural movements to occur in the substrate binding regions, than those introduced

by the induced fit docking protocol alone. This way we accounted for transporter flexibility, which was necessary (as discussed below) to obtain docking poses that are in agreement with previous studies (23, 29, 59).

Our docking studies suggested that proline binds almost identically in PrnB and Put4p (Fig. 4, *A–D*), whereas L-alanine and AZC are bound to Put4 in a way very similar to that of proline (data not shown). More specifically, in the first two clusters, which represent the most abundant populations of the structures generated (45.5% in PrnB and 54.4% in Put4p), proline seems to bind to two distinct sites. In the first site, which is located closer to the extracellular region of the transporters, proline interacts with the side chains of two amino acid residues, which are highly conserved in the YAT family (Fig. 4, *A* and *B*). The first, Thr⁵⁷ of PrnB (Thr¹²⁶ of Put4p), is located in the unwound segment of TMS1 and is part of the characteristic “G(T/S)G” motif of YATs (Fig. 1). This residue, previously suggested to be part of the proline binding site (23), is found to interact with proline via a hydrogen bond. The second residue, Glu¹³⁸ of PrnB (Glu²¹¹ of Put4p), located in TMS3 and also highly conserved in the family, interacts with proline via a salt bridge. The interactions of these two residues with proline via the invariant part of amino acid substrates (the α -carboxyl and

Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters

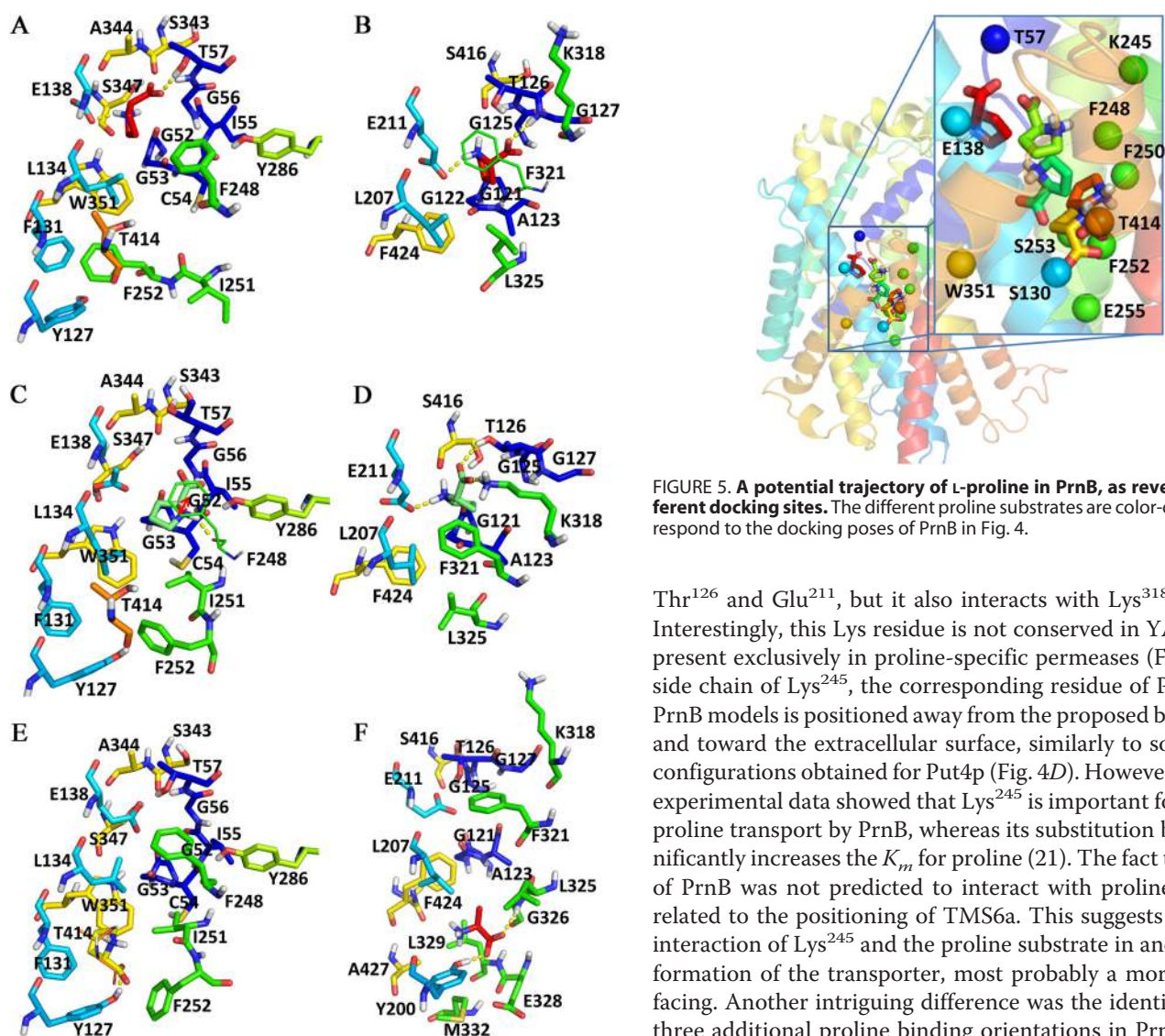


FIGURE 4. The substrate binding sites of PrnB and Put4p, as revealed by induced fit docking of L-proline in the models of PrnB (A and C) and Put4p (B and D). Hydrogen bonds are marked with dashed yellow lines. Two headed red arrows indicate the π -cation interaction. Putative secondary binding sites in PrnB and Put4p as revealed by the docking of L-proline in PrnB (E) and L-alanine in Put4p (F). All L-proline poses of PrnB and Put4p have the same colors as in Fig. 5, to mark the position of the ligand in the trajectory.

the imino group) are compatible with their high conservation in several YATs of different specificities (Fig. 1). In addition, the docked substrate forms H-bonds with the backbone of the highly conserved PrnB^{G56} and PrnB^{G58} (Fig. 4, C, Put4p^{G125}, and Put4p^{G127} in B, respectively). This configuration seems to be stabilized by hydrophobic or π -cation interactions with the side chains of PrnB^{F248} and PrnB^{W351} (Fig. 4, A and C, Put4p^{F321}, and Put4p^{F424} in B and D, respectively). PrnB^{F248} (Put4p^{F321}), located at the vicinity of the unwound part of TMS6, is highly conserved in the family. On the contrary, an aromatic residue in position 351 of PrnB is found only in proline-specific YATs (Fig. 1).

An interesting difference in proline binding was acquired by a significant percentage of the second cluster of Put4p structures (26.4% of the population). In these structures it was found that proline still interacts with the side chains of residues

FIGURE 5. A potential trajectory of L-proline in PrnB, as revealed by different docking sites. The different proline substrates are color-coded to correspond to the docking poses of PrnB in Fig. 4.

Thr¹²⁶ and Glu²¹¹, but it also interacts with Lys³¹⁸ (Fig. 4B). Interestingly, this Lys residue is not conserved in YATs and is present exclusively in proline-specific permeases (Fig. 1). The side chain of Lys²⁴⁵, the corresponding residue of PrnB, in all PrnB models is positioned away from the proposed binding site and toward the extracellular surface, similarly to some of the configurations obtained for Put4p (Fig. 4D). However, previous experimental data showed that Lys²⁴⁵ is important for efficient proline transport by PrnB, whereas its substitution by Leu significantly increases the K_m for proline (21). The fact that Lys²⁴⁵ of PrnB was not predicted to interact with proline could be related to the positioning of TMS6a. This suggests a possible interaction of Lys²⁴⁵ and the proline substrate in another conformation of the transporter, most probably a more outward facing. Another intriguing difference was the identification of three additional proline binding orientations in PrnB (Fig. 5), which could reflect intermediate positions of the substrate between the two substrate binding sites found in both PrnB and Put4p.

The second binding site, found only by the docking of L-proline in PrnB (Fig. 4E) and L-alanine in Put4p (Fig. 4F), is located deeper into the substrate binding core. Proline, at this site, is found to interact with PrnB via H-bonding with the side chains of Thr⁴¹⁴ and Tyr¹²⁷ (Fig. 4E). Similarly, L-alanine in Put4p forms H-bonds with the side chain of Tyr²⁰⁰ (Tyr¹²⁷ of PrnB) and the backbone of Gly³²⁶ and Glu³²⁸ (Ser²⁵³ and Glu²⁵⁵ of PrnB, respectively) (Fig. 4F). Interestingly, in this configuration, L-alanine, a substrate of Put4p but not PrnB, seems to be close to Leu³²⁵, which along with Gly³²⁶ differ in the two transporters (Phe²⁵² and Ser²⁵³ in PrnB, respectively). Thr⁴¹⁴, part of TMS10, is also different between the two transporters (Ser⁴⁸⁷ of Put4p) and other YATs (Fig. 1). Most interestingly, it corresponds to Thr⁴⁵⁶ of Can1, a substrate interacting residue of the arginine permease of *S. cerevisiae* that has been very recently shown to determine the specificity of the basic amino acid transporters of yeast (59). The above residues, along with PrnB^{W351}, constitute the main differences in the predicted substrate binding pockets of PrnB and Put4p (Fig. 9) and could,

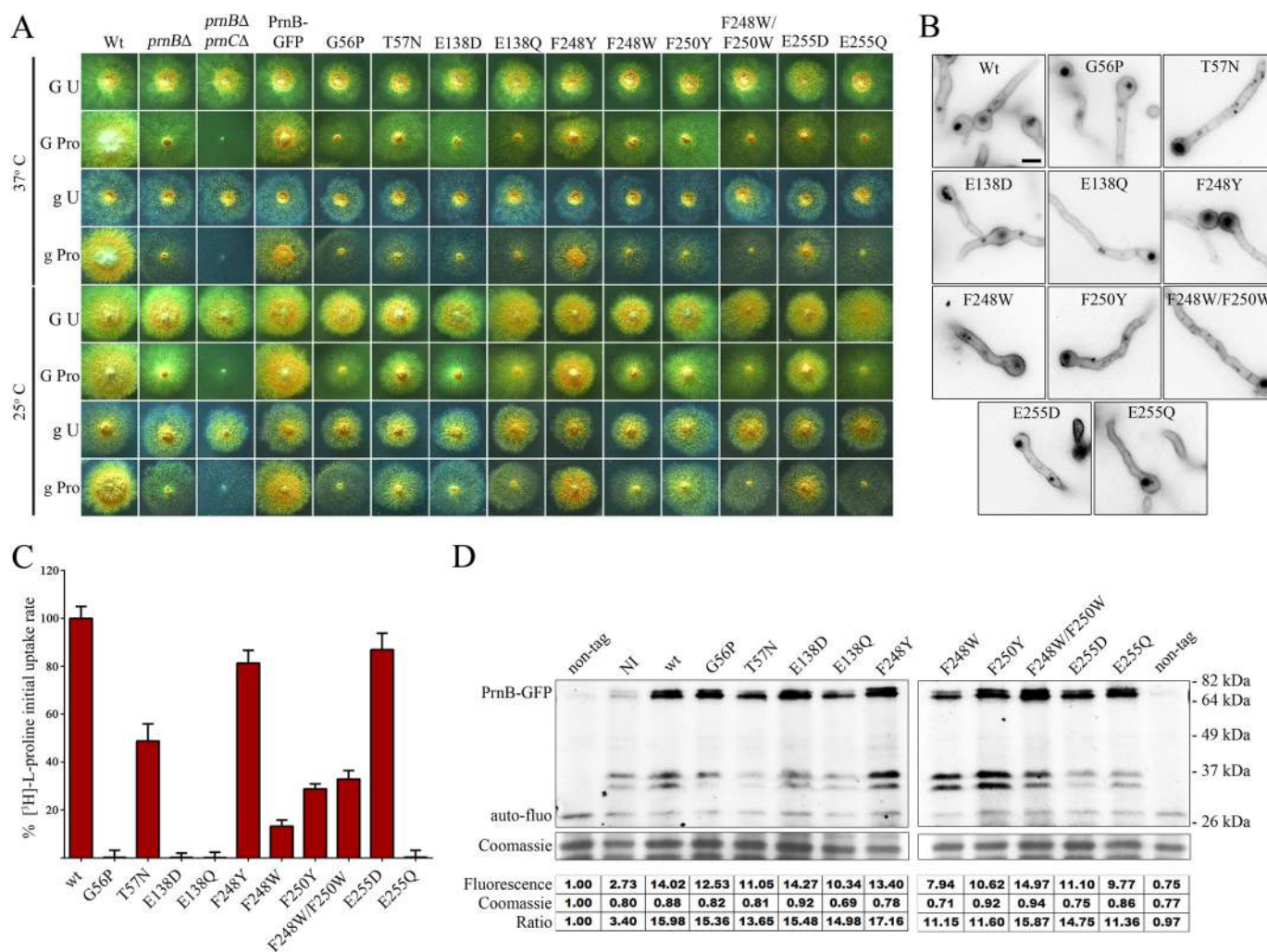


FIGURE 6. Study of PrnB alleles substituted in amino acid residues highly conserved in YAT members. *A*, growth tests at 37 and 25 °C of strains expressing the indicated PrnB alleles using proline (*Pro*) or urea (*U*) as sole nitrogen sources, and 1% glucose (*G*) or glycerol (*g*) as sole carbon sources. *B*, inverted, grayscale epifluorescence microscopy images of strains expressing the corresponding GFP-tagged PrnB alleles. Scale bar represents 5 μ m. *C*, graph showing the % initial uptake of L-[³H]proline, at a concentration of 0.350 μ M, of the examined PrnB alleles. *D*, analysis of in-gel fluorescence of membrane-enriched protein extracts from strains expressing the corresponding PrnB-GFP alleles. *Non-tag*, sample from a strain not expressing GFP. *NI* (non-induced), sample from a strain expressing the wild-type PrnB-GFP transporter grown under non-inducing, non-repressing conditions of *prnB* expression. Quantification was performed with the program ImageJ (NIH). For relative quantification of fluorescence (*Fluorescence*), the intensity of the endogenous autofluorescent faint band of the *left panel*, appearing at ~70 kDa of the non-tag sample, was considered as equal to 1. For normalization in relationship to the total protein amount, the intensity of a chosen band was measured after staining with the Coomassie solution. Value 1 was set as the intensity of the band from the non-tag sample of the *left panel*. The ratio (*Ratio*) of the fluorescence intensity to the intensity of the corresponding band in Coomassie represents, the relative amount of each intact PrnB-GFP allele (~72 kDa), normalized to the total protein loaded.

thus, be related to the different specificity profiles of the two orthologues.

Rationale of the Mutational Analysis—The comparative analysis of structural alignments of YAT members of Fig. 1 showed that the substrate interacting residues of PrnB and Put4p fall into two categories. The first includes residues showing high to absolute evolutionary conservation in YATs (Gly⁵⁶, Thr⁵⁷, Glu¹³⁸, and Phe²⁴⁸ of PrnB). Consistent with their conserved nature, our docking analysis showed that the above PrnB residues interact with proline through the invariable part of amino acid substrates (Fig. 4).

The second category includes residues (Ser¹³⁰, Gly²⁴⁷, Phe²⁵², Ser²⁵³, Trp³⁵¹, and Thr⁴¹⁴ of PrnB) predicted to be in the substrate binding pocket of PrnB and Put4p but are variable between the two permeases (Fig. 9) and other YATs (Fig. 1). Among these residues, Trp³⁵¹ and Thr⁴¹⁴ are found to interact

directly with proline (Fig. 4), whereas Ser¹³⁰ is close to Thr⁴¹⁴ (Fig. 3). Finally, Gly²⁴⁷, Phe²⁵², and Ser²⁵³, parts of the unwound segment of TMS6, are close to the substrate binding core of PrnB.

Consequently, conservative substitutions of the conserved proline binding residues of the first category and Put4p-mimicking substitutions of the variable proline binding residues of the second category were carried out (S130C, G247A, F252L, S253G, W351F, and T414S). Moreover, the unwound segments of TMS6 of the proline-specific YATs are uniquely longer by one amino acid (Fig. 1). To investigate the importance of this variation, we constructed PrnB mutants shorter by one amino acid residue lacking either Ile²⁵¹ (I251 Δ) or Phe²⁵² (F252 Δ).

Study of Conserved Residues—Results concerning the conserved amino acid residues of the binding site in YATs are shown in Fig. 6 and Table 3. As shown in Figs. 6*B* and 7*B*, all

Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters

TABLE 3

Specificity profile of functional PrnB mutants carrying substitutions in residues conserved in YATs

The abbreviations used in the table are: GABA, γ -aminobutyric acid; L-AZC, L-azetidine-2-carboxylic acid; L-P-NH₃, L-prolinamide; 3,4-D-Pro, 3,4-dehydro-L-proline; L-PCA, L-pipecolic acid; NI, no inhibition (90–100% uptake); >2000, slight inhibition at 2 mM (65–90% uptake); ~2000, inhibition at 2 mM (~50–65% uptake). Results are averages of at least three independent experiments in triplicate for each concentration point. Standard deviation was below 20%.

PrnB allele	K_m/K_i								
	L-Proline	GABA	L-AZC	L-Ala	Gly	L-P-NH ₃	3,4-D-Pro	L-PCA	
WT	38 ± 3	NI	1129 ± 86	>2000	>2000	983 ± 67	52 ± 5	1089 ± 115	
T57N	6 ± 1.9	NI	610 ± 44	541 ± 53	>2000	534 ± 45	77 ± 6	>2000	
F248Y	33 ± 2.6	>2000	1350 ± 142	>2000	NI	947 ± 92	175 ± 16	683 ± 49	
F248W	21 ± 1.8	>2000	750 ± 67	1013 ± 115	>2000	508 ± 41	145 ± 12	177 ± 14	
F250Y	13 ± 1.6	NI	441 ± 47	563 ± 52	>2000	455 ± 39	114 ± 9	~2000	
F248W/F250W	1.9 ± 0.2	>2000	172 ± 14	219 ± 23	>2000	650 ± 33	62 ± 6	107 ± 9	
E255D	2 ± 0.8	NI	84 ± 6	553 ± 44	>2000	408 ± 42	24 ± 2	422 ± 19	

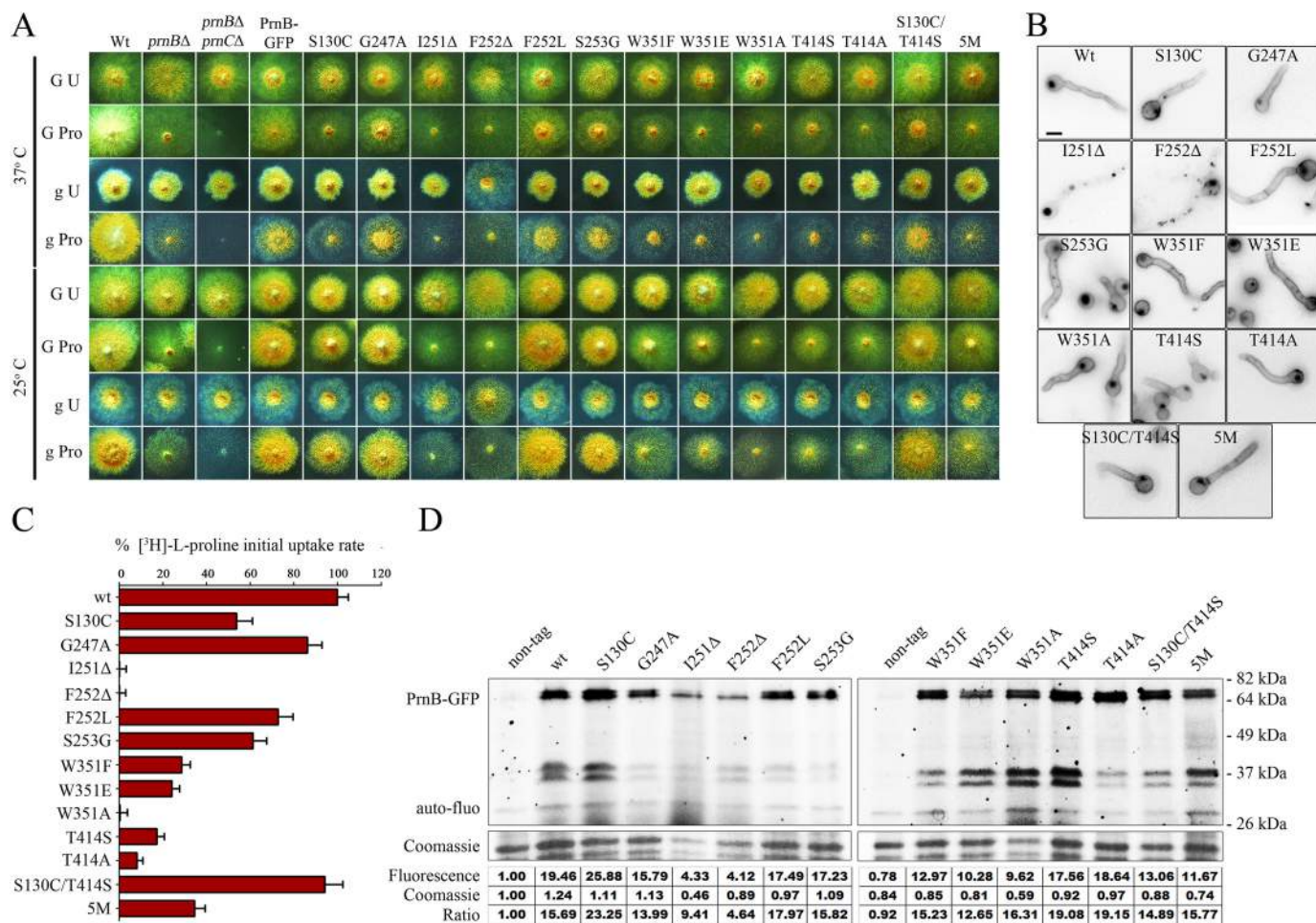


FIGURE 7. Study of PrnB alleles carrying substitutions in amino acid residues not conserved in YAT members. A–D are as indicated in the legend of Fig. 6. 5M, PrnB allele carrying the following five substitutions: S130C/F252L/S253G/W351F/T414S.

alleles, except I251Δ and F252Δ, are normally targeted to the plasma membrane. Consistently with previous Western blots (22), all PrnB-GFP alleles detected by in-gel fluorescence appear as doublets. Moreover, the lower molecular weight fast migrating bands that were also detected most probably correspond to N-terminal degradation products, as it has been observed for AgtA, another YAT of *A. nidulans* (60). In-gel fluorescence analysis (Figs. 6D and 7D) showed that all mutant proteins, except I251Δ and F252Δ, are expressed at levels comparable with the wild-type PrnB-GFP, displaying a 2-fold maximal variation. The above results strongly indicate that the dif-

ferences in growth tests (Figs. 6A and 7A) as well as in L-[³H]proline initial uptake rates (Figs. 6C and 7C) are truly indicative of the functionality of the PrnB mutant proteins. In addition, L-[³H]proline initial uptake rates are well correlated with the growth of strains carrying the corresponding *prnB* mutants on proline as sole nitrogen source at 25 °C. This is in agreement with previous studies on *A. nidulans* transporters, where only mutations that reduce the uptake rate <50% of the wild-type lead to a defect reflected by relevant growth tests, whereas mutations retaining <20% uptake rate are difficult to distinguish from a strain carrying deletion of the transporter

TABLE 4

Specificity profile of functional PrnB mutants carrying substitutions in residues not conserved in YATs

The abbreviations used in the table are: GABA, γ -aminobutyric acid; L-AZC, L-azetidine-2-carboxylic acid; L-P-NH₃, L-prolinamide; 3,4-D-Pro, 3,4-dehydro-L-proline; L-PCA, L-pipecolic acid; NI, no inhibition (90–100% uptake); >2000, slight inhibition at 2 mM (65–90% uptake); ~2000, inhibition at 2 mM (~50–65% uptake); NK, not known. Results are averages of at least three independent experiments in triplicate for each concentration point. Standard deviation was below 20%.

PrnB allele	K_m/K_i								
	L-Proline	GABA	L-AZC	L-Ala	Gly	L-P-NH ₃	3,4-D-Pro	L-PCA	
WT	38 ± 3	NI	1129 ± 86	>2000	μM >2000	983 ± 67	52 ± 5	1089 ± 115	
S130C	20 ± 2.2	>2000	253 ± 18	245 ± 16	>2000	502 ± 38	34 ± 2.8	>2000	
G247A	65 ± 4	>2000	895 ± 79	>2000	NI	1450 ± 112	50 ± 4	>2000	
F252L	44 ± 3	>2000	150 ± 16	~2000	>2000	1033 ± 84	156 ± 12	>2000	
S253G	39 ± 3	>2000	245 ± 19	158 ± 12	~2000	~2000	96 ± 6	>2000	
W351F	26 ± 3.3	>2000	178 ± 18	403 ± 44	NI	>2000	71 ± 8	>2000	
W351E	27 ± 3	NI	463 ± 52	>2000	NI	824 ± 92	48 ± 5	>2000	
T414S	31 ± 2.6	>2000	257 ± 28	475 ± 51	529 ± 56	1120 ± 120	75 ± 9	1054 ± 111	
T414A	27 ± 2.9	NI	461 ± 51	~2000	>2000	618 ± 60	88 ± 10	>2000	
S130C/T414S	44 ± 4	>2000	576 ± 54	176 ± 18	125 ± 11	>2000	137 ± 14	>2000	
5M	29 ± 2.6	338 ± 31	129 ± 14	52 ± 5	106 ± 10	1522 ± 183	56 ± 6	817 ± 76	
Put4 ^a	31	110	120	72.5	NK	NK	71	NK	

^a The K_m/K_i values for Put4 were obtained from Refs. 32–37.

(48, 57, 61). Notable exceptions are strains expressing T57N, F248W/F250W, and E255D. T57N and E255D, despite retaining high initial uptake rates (Fig. 6C), show less pronounced growth on proline than expected. This is also the case for F248W/F250W, which despite retaining 33% of the wild type uptake rate, is indistinguishable from a *prnB* Δ strain on proline. This apparent inconsistency can be well rationalized by reduced transport capacity, consistent with the 6–20-fold decreased apparent half-saturation constant (K_m) for proline that these three mutants exhibit (Table 3). Interestingly, conservative substitutions G56P, E138D, and E138Q lead to total loss of PrnB function, as indicated by the lack of detectable levels of PrnB-dependent L-proline uptake, either by physiological growth tests at 25 or 37 °C or by L-[³H]proline uptake measurements. The above data are in agreement with results from docking analysis indicating that the side chain of Glu¹³⁸ and the backbone of Gly⁵⁶ directly interact with the proline substrate (Fig. 4A). T57N, although partially functional, displays up to 6-fold decreased K_m/K_i values for most substrates/ligands, whereas T57A was previously shown to be completely non-functional (23). These results are consistent with the direct interaction of Thr⁵⁷ with the α -carboxyl group of proline (Fig. 4A). Supportive of a predicted hydrophobic/ π -cation interaction of Phe²⁴⁸ with the substrate are also the results from the presence of a tyrosine (F248Y) at position 248, which does not lead to significant changes in proline uptake and the kinetic characteristics of the transporter. However, the bulkier tryptophan (F248W) significantly reduced the functionality of PrnB, simultaneously reducing the K_m/K_i values for many ligands, especially for L-pipecolic acid, whereas previous data from our laboratory had shown that the presence of Leu at position 248 of PrnB results in 3-fold increased K_m for proline and significantly reduces transport capacity (21). The important role of conserved Phe²⁵⁰ and Glu²⁵⁵ was reflected by the dramatic reduction of the K_m/K_i values of the transporter caused even by the very conservative substitutions F250Y and E255D. F250Y is significantly impaired for proline transport at 37 °C, whereas it displays 3-fold decreased K_m/K_i values for many substrates. Most importantly, the combination of F248W with F250W resulted in up to 20-fold lower K_m/K_i values for most ligands. An analogous reduction was also acquired by the E255D sub-

stitution, whereas E255Q was completely non-functional, indicating that a negative charge at this position is necessary for proline transport. These two residues (Phe²⁵⁰, Glu²⁵⁵) are not predicted to directly interact with the substrate and could possibly be involved in conformational changes of the transporter during the transport cycle (see “Discussion”).

Study of Variable Residues—Substitutions of the variable amino acid residues of the proline binding site are shown in Fig. 7 and Table 4. Epifluorescence microscopy suggests that a substantial proportion of I251 Δ and F252 Δ is driven to the vacuole for degradation. In line with this, reduced amounts of intact GFP-tagged molecules in in-gel fluorescence are observed, suggesting that the structure of the unwound part of TMS6 in proline transporters is different from other YATs and appears to be important for their stability. Most alleles carrying Put4p-mimicking substitutions exhibit broadened specificity profiles, displaying significantly reduced K_i values for some of the Put4p substrates not recognized by PrnB without displaying significant differences in their apparent K_m values for L-proline. More specifically, Put4p-resembling substitutions of residues predicted to directly interact with the substrate (W351F, T414S), although significantly reducing the functionality of PrnB (Fig. 7, A and C), did not affect the K_m for proline and displayed significantly lower K_i values specifically for L-alanine, AZC, and glycine (Table 4). Contrary, the residually functional T414A, and the partially functional W351E do not show a significant decrease in the K_i values of any Put4p substrate, whereas W351A leads to complete loss of PrnB transport activity. Similarly, substitutions F252L and S253G, resembling Put4p in residues close to the substrate binding pore, are largely functional and only decrease K_i values for AZC and L-alanine, respectively. Contrary, G247A, another Put4p mimicking substitution of the unwound part of TMS6a, only had a minor effect on the kinetics, specificity profile, and function of PrnB. Finally, substitution of Ser¹³⁰ by the corresponding residue of Put4p (S130C) created a thermosensitive allele that exhibited decreased K_i values specifically for L-alanine and AZC. Most interestingly, the S130C/T414S double mutant was fully functional, suppressing the thermosensitivity of S130C and the low functionality of T414S (Fig. 7). It possessed K_m for proline similar to that of wild-type PrnB, and, most importantly, significantly reduced K_i

Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters

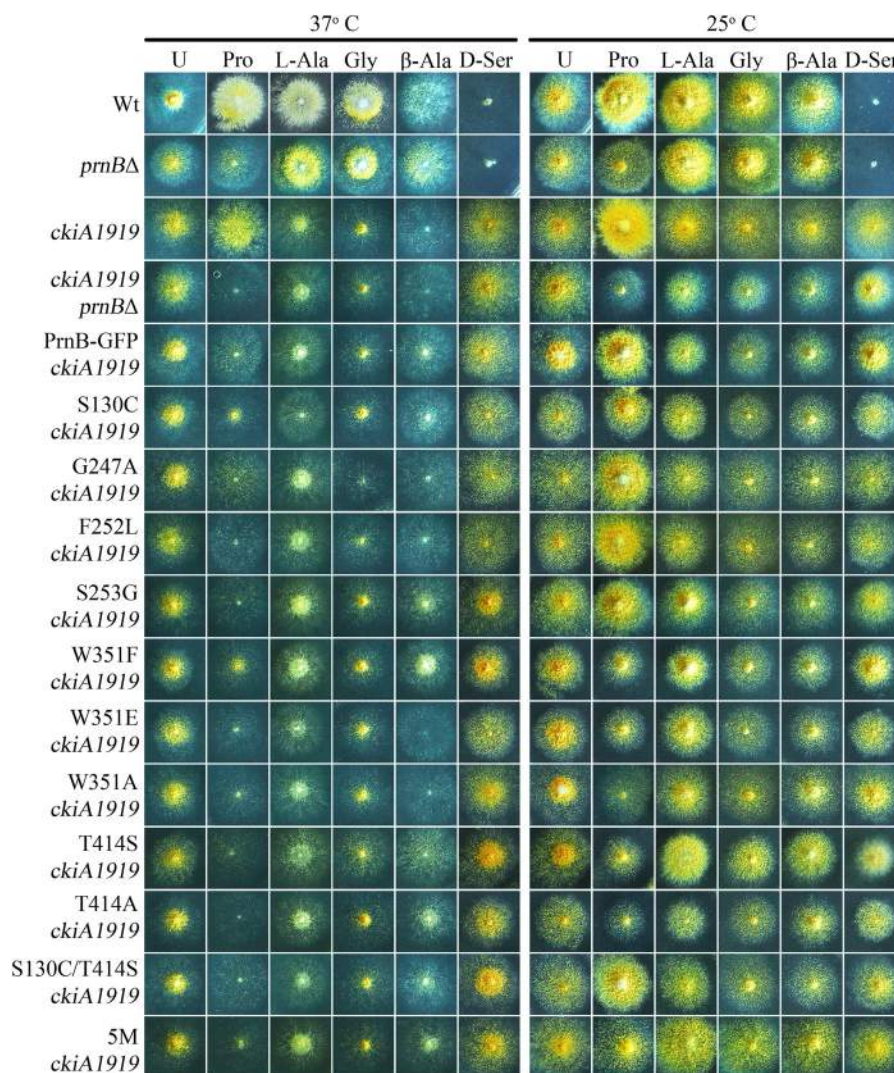


FIGURE 8. Growth tests of *ckiA1919* strains expressing the corresponding PrnB-GFP alleles in 5 mM urea (U), 5 mM L-proline (Pro), 5 mM L-alanine, 10 mM glycine (Gly), or 5 mM β -alanine (*b-Ala*) as sole nitrogen sources, as well as urea and the toxic analog D-serine (D-Ser), with 1% glycerol as sole carbon source. 5M, allele of PrnB carrying the following five substitutions: S130C/F252L/S253G/W351F/T414S.

values for L-alanine and glycine as well as a slight decrease for AZC (Table 4).

Despite the clearly broadened specificity present in the above Put4p-resembling PrnB alleles none showed significantly decreased K_i for GABA, another substrate of Put4p. Thus, a strain expressing a PrnB allele combining all five Put4p-mimicking substitutions (S130C/F252L/S253G/W351F/T414S) (5M) was constructed and studied. Our results showed that this allele is partially functional and displays a specificity profile impressively similar to that of Put4p, exhibiting K_i values for all Put4p substrates (L-proline, AZC, and L-alanine) very similar to the latter. Notably, this is the only PrnB allele where GABA significantly competes the uptake of L-[3 H]proline (Table 4).

To examine whether AZC, Ala, Gly, and GABA, apart from inhibiting L-[3 H]proline transport, could also be transported by the PrnB mutants, we made use of the genetic tractability of *A. nidulans*, which can utilize L-alanine, glycine, and GABA as sole nitrogen and/or carbon sources. Given that the permease(s) of *A. nidulans* involved in L-alanine and glycine transport are not known, we made use of a CkiA (casein kinase I) allele, which has

been previously shown to be necessary for the plasma membrane targeting of amino acid transporters (60). The *ckiA1919* mutation does not significantly affect *prnB*-dependent growth on L-proline, but confers severely impaired growth on many other amino acids, including glycine and L-alanine (Fig. 8). The PrnB mutants of Fig. 7 were introduced into the *ckiA1919* background by standard genetic crosses, and were found to be targeted at the plasma membrane, as expected (data not shown). Growth tests showed that alleles T414S, the quintuple mutant 5M and, to a lesser extent, S253G, W351F, and W351E can improve the growth of a *ckiA1919* strain in L-alanine as the sole nitrogen source (Fig. 8). Additionally, T414S and 5M were also able to improve the growth of *ckiA1919* on glycine and β -alanine as the sole nitrogen sources. These phenotypes were more prominent at 25 °C (Fig. 8), consistent with the partial thermosensitivity of PrnB-GFP (50). Altogether (Fig. 9, Table 5), the above data strongly suggest that these Put4p-mimicking PrnB mutants are indeed able to transport these Put4p substrates.

Contrary, none of the *prnB* alleles shown in Fig. 7 was able to improve the growth on GABA as the sole nitrogen source (data

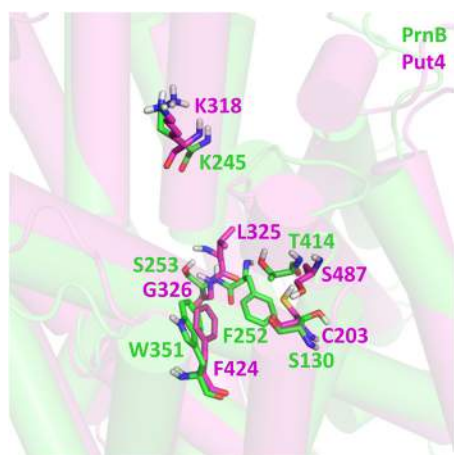


FIGURE 9. Superimposition of the substrate binding sites of PrnB (green) and Put4p (magenta). The residues that differ between the two permeases and determine specificity are displayed with sticks.

not shown) of a herein constructed (see “Experimental Procedures”) strain carrying deletion of the main GABA transporter of *A. nidulans*, GabA (62). At this point it is worth mentioning that the expression of *prnB* alleles under these conditions is low but significant, because all are under the control of the native *prnB* promoter, which is significantly induced only in the presence of proline (7, 20). In fact, as observed by epifluorescence microscopy (data not shown) and in-gel fluorescence analysis, the protein levels of intact PrnB-GFP are about 5-fold lower at derepressed than at induced conditions (Fig. 6D). Consequently, it cannot be ruled out that other alleles could also possess low efficiency in transporting L-alanine, glycine, and GABA, which, however, cannot become apparent in the absence of induction.

Finally, we tried to explore the possibility of AZC transport by the PrnB mutants. In *S. cerevisiae*, AZC is toxic and four permeases have been shown to be involved in its uptake, Put4p, Gap1, Agp1, and Gnp1 (33). Consistent with previous reports (63), we observed that AZC is not toxic in *A. nidulans*. AZC resistance in certain yeast strains is conferred by the product of the MPR1 gene, coding for an L-azetidine-2-carboxylic acid N-acetyltransferase (64–66). However, deletion of AN2102, an orthologue of MPR1, did not render *A. nidulans* sensitive to AZC (data not shown). Most interestingly, we found that, rather than being toxic, AZC can be used as a poor nitrogen source by *A. nidulans*. This growth is independent of PrnB, GabA, and PrnC,⁶ whereas no differences in growth on AZC as a sole nitrogen source could be observed in strains carrying any PrnB mutant allele described herein (data not shown).

The Specificity Profile of PrnB Mutants—To further confirm the docking results and gain further insight into the specificity profile of PrnB, apart from Put4p substrates, we calculated the K_i values of all the functional PrnB mutants for other proline-related compounds (Fig. 10, Tables 3 and 4). The kinetic data obtained were consistent with our induced fit docking calculations. The kinetics of L-prolinamide, a proline analog possessing an amide in place of the α -carboxyl group of proline (Fig. 10), supports an interaction of the α -carboxyl group with the

transporter. More specifically, L-prolinamide shows weak inhibition of L-[³H]proline uptake. In addition, mutants that exhibit significantly improved K_m/K_i values for many substrates (e.g. E255D, F248W/F250W) do not exhibit an analogous improvement for L-prolinamide, suggesting that this substance is unable to efficiently interact with PrnB in a manner similar to L-proline. Surprisingly, the K_i values of another proline analog, 3,4-dehydro-L-proline, despite being a very good agonist in the wild-type ($K_i = 52 \pm 5 \mu\text{M}$) and most mutants, showed no correlation with the observed differences in the K_m for proline of most mutants. This suggested that 3,4-dehydro-L-proline also binds differentially to L-proline in PrnB.

Regarding the other substrates/ligands, mutants in residues not involved in specificity (Thr⁵⁷, Gly²⁴⁷, Phe²⁴⁸, Phe²⁵⁰, and Glu²⁵⁵) display similar correlative differences of the K_m/K_i values for L-proline, L-alanine, and AZC (Table 3), suggesting that these substances are recognized by the transporter in a similar way. However, this is not the case for glycine and GABA, which possess different positioning of the amino group (Fig. 10), whose inhibition constants did not correlate with the variations in the K_m for proline in the above mutants. These data suggest that glycine and GABA are not recognized by PrnB in a manner similar to L-proline. Curiously, the K_i values for L-pipecolic acid, a proline analog with a side chain ring by one methyl group longer (Fig. 10), did not relate to the K_m for proline. In fact, whereas the wild-type PrnB displays almost equal K_i values for L-pipecolic acid and AZC, a proline analog with a smaller side chain ring, most mutants preferentially recognized only one of these two analogs (Table 3). This suggests that the size of the side chain is very critical for substrate recognition by PrnB. Consistently, Put4p-mimicking mutants that better recognize the smaller AZC, exhibit improved recognition for the also smaller L-alanine. Thus, it seems very likely that the substrate binding core of, the highly selective, PrnB is finely adapted to the size of proline, whereas the one of Put4p can also accept smaller molecules. It is not known whether Put4p recognizes L-pipecolic acid; however, our data suggest that it does not.

DISCUSSION

Transmembrane proteins are notoriously difficult to crystallize. As a result, homology modeling has been used as a reasonable alternative in cases where no x-ray structure is available (23, 48, 59, 61, 67–73). Using this approach, combined with induced fit docking and a detailed characterization of the specificity profile, we identified 9 residues that are important for PrnB function, Gly⁵⁶, Thr⁵⁷, Ser¹³⁰, Glu¹³⁸, Phe²⁴⁸, Phe²⁵⁰, Glu²⁵⁵, Trp³⁵¹, and Thr⁴¹⁴ (summary in Table 5). These residues, with the exception of Phe²⁵⁰, are located within the pore of the transporter and seem to affect different aspects of substrate translocation.

The Proline Binding Pocket of PrnB—Our results support the previously proposed model (23) predicting that the main substrate binding core of fungal amino acid transporters is formed by the unwound segments of TMS1 and TMS6. In addition we show that important substrate interacting residues are also found in TMSs 3, 8, and 10. Residues from TMS1 (Gly⁵⁶, Thr⁵⁷), TMS3 (Glu¹³⁸), and TMS6 (Phe²⁴⁸), highly conserved in fungal amino acid transporters, seem to directly interact with the

⁶ A. Biratsi, C. Gournas, and V. Sophianopoulou, unpublished data.

Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters

TABLE 5
Summary of PrnB mutants functional analysis and specificity determination

PrnB allele	TMS	Binding site	Put4/AdiC residue	K_m/K_i^a					Transport based on growth tests			
				L-Proline	GABA	L-AZC	L-Ala	Gly	V	L-Proline	L-Ala ^b	Gly ^b
WT				38 ± 3	NI ^c	1129 ± 86	>2000 ^d	>2000	100	+++		–
G56P	1	Upper	Gly ¹²⁵ /Gly ²⁵	NF ^e	NF	NF	NF	NF	NF	–	ND ^f	ND
T57N	1	Upper	Thr ¹²⁶ /Ser ²⁶	6 ± 1.9	NI	610 ± 44	541 ± 53	>2000	48.8	++	ND	ND
S130C	3	Lower	Cys ²⁰³ /Ala ⁹⁶	20 ± 2.2	>2000	253 ± 18	245 ± 16	>2000	53.8	++		–
E138D	3	Upper	Glu ²¹¹ /Met ¹⁰⁴	NF	NF	NF	NF	NF	NF	–	ND	ND
E138Q	3	Upper	Glu ²¹¹ /Met ¹⁰⁴	NF	NF	NF	NF	NF	NF	–	ND	ND
G247A	6		Ala ³²⁰ /Leu ²⁰¹	65 ± 4	>2000	895 ± 79	>2000	NI	86.3	+++	–	–
F248W	6	Upper, proximal gate	Phe ³²¹ /Trp ²⁰²	21 ± 1.8	>2000	750 ± 67	1013 ± 115	>2000	13.2	++	ND	ND
F248Y	6	Upper, proximal gate	Phe ³²¹ /Trp ²⁰²	33 ± 2.6	>2000	1350 ± 142	>2000	NI	81.3	+++	ND	ND
F250Y	6		Phe ³²³ /Phe ²⁰⁴	13 ± 1.6	NI	441 ± 47	563 ± 52	>2000	28.8	++	ND	ND
F248W/F250W	6	Upper		1.9 ± 0.2	>2000	172 ± 14	219 ± 23	>2000	32.9	–	ND	ND
F252L	6	Indirect	Leu ³²⁵ /–	44 ± 3	>2000	150 ± 16	~2000 ^g	>2000	72.9	+++	–	–
S253G	6	Indirect	Gly ³²⁶ /Gly ²⁰⁶	39 ± 3	>2000	245 ± 19	158 ± 12	~2000	61.3	+++	+	–
E255D	6	Lower, distal gate	Glu ³²⁸ /Glu ²⁰⁸	2 ± 0.8	NI	84 ± 6	553 ± 44	>2000	86.9	++	ND	ND
E255Q	6	Lower, distal gate	Glu ³²⁸ /Glu ²⁰⁸	NF	NF	NF	NF	NF	NF	–	ND	ND
W351F	8	Both, middle gate	Phe ⁴²⁴ /Trp ²⁹³	26 ± 3.3	>2000	178 ± 18	403 ± 44	NI	28.7	+	+	–
W351E	8	Both, middle gate	Phe ⁴²⁴ /Trp ²⁹³	27 ± 3	NI	463 ± 52	>2000	NI	24.2	+	+	–
W351A	8	Both, middle gate	Phe ⁴²⁴ /Trp ²⁹³	NF	NF	NF	NF	NF	NF	–	–	–
T414A	10	Lower	Ser ⁴⁸⁷ /Ser ³⁵⁷	27 ± 2.9	NI	461 ± 51	~2000	>2000	8.2	+	–	–
T414S	10	Lower	Ser ⁴⁸⁷ /Ser ³⁵⁷	31 ± 2.6	>2000	257 ± 28	475 ± 51	529 ± 56	17.3	+	++	++
S130C/T414S				44 ± 4	>2000	576 ± 54	176 ± 18	125 ± 11	94.3	+++	–	–
5 M				29 ± 2.6		338 ± 31	129 ± 14	52 ± 5	106 ± 10	34.6	++	++
Put4				31	110	120	72.5	NK ^h				

^a The K_m/K_i values for Put4 were obtained from Refs. 32–37.

^b Transport based on the growth tests of Fig. 9.

^c NI, no inhibition (90–100% uptake).

^d >2000, slight inhibition at 2 mM (65–90% uptake).

^e NF, not functional.

^f ND, not done.

^g ~2000, inhibition at 2 mM was about 50–65%.

^h NK, not known. Results are averages of at least three independent experiments in triplicate for each concentration point. Standard deviation was below 20%.

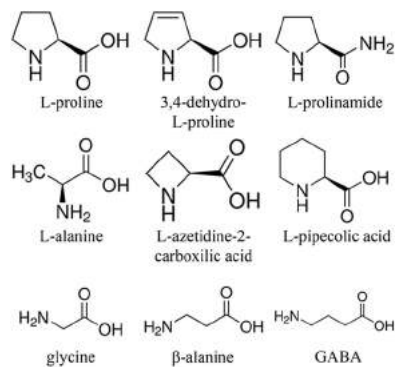


FIGURE 10. The structures of L-proline and related compounds used in this study.

invariant part of amino acid substrates, creating the scaffold for amino acid recognition. More specifically, the α -carboxyl and amino groups of amino acid substrates seem to be recognized by the side chains of the highly conserved Thr⁵⁷ and Glu¹³⁸. This module, impressively similar to the way that amino acids bind to the bacterial transporters AdiC and LeuT (29, 74), is also supported by recent studies of induced fit docking and mutational analysis of the arginine permease (59), as well as mutants of the leucine and tryptophan permeases of *S. cerevisiae* (67, 69). Glu¹³⁸ was shown to be essential for PrnB transport activity, because even its most conservative substitutions by Asn or Asp were completely nonfunctional. These data suggest that not only a negatively charged residue is needed at this position, but also the length of its side chain is also important. Consistently, E184Q and E184A variants of Can1 are also nonfunctional (59). This glutamate, highly conserved in the YAT family, is not present in AdiC (Fig. 1). AdiC functions as an

antiporter, whereas most fungal transporters are proton symporters (3). Interestingly, Ghaddar *et al.* (59) showed that the orientation of the side chain of the substrate could be influenced by the protonation state of the corresponding Glu¹⁸⁴ of Can1. Thus, it could be possible that this glutamate residue could also be associated with the commitment of the symported proton.

Insights into the Translocation Mechanism—Substitutions of Glu²⁵⁵, the other highly conserved in the YAT family glutamate, display a pattern different from that of Glu¹³⁸; E255Q is totally inactive, whereas E255D retains significant activity, displaying up to 19-fold improved apparent inhibition constants for many substrates/ligands. This situation resembles that of mutants in the Nucleobase Ascorbate Transporter family (48, 57) and could be explained by a substrate trapping condition, where the substrate remains more time at the binding core of the transporter. This could be caused by either more efficient binding to a specific position of the translocation pathway or by partially defective transition from one conformational state of the transport cycle to another. Our data are supportive of the second scenario. First, analogous improvement of the K_m is obtained for mutants in Phe²⁵⁰, which is orientated away from the substrate binding pocket and could not directly contribute to substrate binding. Second, Glu²⁵⁵ also seems not to directly interact with proline, at least in this conformation of the transporter, whereas the corresponding residue of AdiC, Glu²⁰⁸, part of the distal gate, was suggested to control substrate translocation (29). This distal gate seems conserved in YATs, as, the highly conserved in YATs, Glu²⁵⁵ and Tyr¹²⁷ of PrnB correspond to Glu²⁰⁸ and Tyr⁹³ of AdiC (Fig. 1, Table 5), whereas the corresponding residues of the Bap2 leucine permease of *S. cerevisiae*, Glu³⁰⁵ and Tyr¹⁸¹, were recently shown to be important for its

function (67). In fact, in PrnB and Put4p, all three gates of AdiC seem to be conserved. In AdiC, the proximal gate consists of Trp²⁰², the middle of Trp³⁹³, and the distal of Glu²⁰⁸, Tyr⁹³, and Tyr³⁶⁵. The corresponding residues of PrnB are Phe²⁴⁸, Trp³⁵¹, Glu²⁵⁵, Tyr¹²⁷, and Trp⁴²² (Fig. 1, Table 5). Like in AdiC, the main substrate binding site of PrnB and Put4p is found between the proximal and middle gates (Figs. 3 and 4A). Interestingly, our predicted second binding site of proline in PrnB and L-alanine in Put4p lies between the middle and distal gates, just upstream of the distal gate (Fig. 4, E and F). A second binding site, between the middle and distal gates, has also been proposed for AdiC (29), whereas disruption of the distal gate formation was suggested to lead to potential major conformational changes of AdiC allowing it to adopt an inward-open conformation (29). It is noteworthy that in both our models, the substrate did not directly interact with the nearby PrnB^{S130} or Put4p^{C203}. However our data clearly suggest an interaction between Thr⁴¹⁴ and Ser¹³⁰. Substitutions of these two residues, which are very close at the structural model of PrnB, show allele-specific phenotypes, as the single Put4p-mimicking mutants T414S and S130C, but not the double S130C/T414S, are impaired in proline transport activity. Moreover, only T414S but not S130C or the double mutant could transport L-alanine, glycine, or β-alanine (Fig. 8). Despite this interaction that seems to determine both proline transport and specificity, neither mutant displayed significantly affected apparent K_m for proline. The above data clearly suggest a physical or functional interaction between Ser¹³⁰ and Thr⁴¹⁴. An intriguing explanation would be that a transient interaction of the substrate with this position would be related to major structural rearrangements of the transporter, thereby promoting substrate translocation. Consistently, Ser³⁵⁷, the corresponding residue of Thr⁴¹⁴ in AdiC, undergoes significant displacement upon occlusion of the transporter (29). In addition, our data are compatible with the suggestion that lysine transport by the T456S mutant of Can1, rather than being due to more efficient substrate binding, could result by facilitated structural transitions (59). The above statements are in line with the induced fit transition mechanism, proposed for the function of LeuT (74–77), suggesting that successful interactions of the substrate in more than one site of the transporter promote the conformational changes of the transport cycle. Interestingly, our docking analysis in PrnB revealed a potential trajectory for proline (Fig. 5) showing putative intermediate interactions of the substrate during transition from one gate to another. Molecular dynamics simulations, along with mutational analysis, could verify the above.

On the Specificity Determination of YATs—Our current study of PrnB mutants substituted in residues not conserved in the YAT family, along with the detailed kinetic analysis of their specificity profile, provides important insight on the specificity determinants of this family (Table 5). Apart from the Ser¹³⁰ and Thr⁴¹⁴ residues discussed above, the variable in YATs Trp³⁵¹ of TMS8 was also shown to be a potential substrate binding residue, important for PrnB specificity and proline transport activity. Trp³⁵¹ seems to have a role analogous to Trp²⁰² in AdiC, which forms the middle gate (29). Interestingly, the Put4p resembling W351F mutant displayed enlarged specificity (Table 4) and could also transport L-alanine (Fig. 8). Analogous

phenotypes were also obtained by Put4p-mimicking mutants in residues close to the potential distal gate (S130C, T414S, as discussed above) and the unwound part of TMS6 (F252L, S253G). The latter could determine specificity directly or indirectly. L-Alanine, docked at the putative second binding site of Put4p, appears to be very close to Leu³²⁵ and Gly³²⁶, interacting via H-bond with Gly³²⁶ (Fig. 4F). PrnB, that only weakly recognizes and does not transport L-alanine, possesses more bulky (Phe instead of Leu) and hydrophilic (Ser instead of Gly) residues at these positions (Fig. 9), which would pose steric effects and disturb L-alanine binding. Consistently, a S253G mutant displayed an impressive improvement of the K_t for L-alanine and could also transport it (Table 5). Alternatively, the bulkier side chains of these residues could affect the local flexibility of the unwound part of TMS6, leading to decreased flexibility of the TMS6a of the highly selective PrnB (Fig. 3C). TMS6a includes important binding residues of the putative proximal gate (Phe²⁴⁸), as well as residues important for the kinetic characteristics of PrnB (Lys²⁴⁵). Interestingly, the corresponding TMS6a of AdiC was shown to undergo the most pronounced structural shift during the formation of the occluded conformation and was suggested to be involved in the closure of the proximal gate (29).

In summary (Table 5), our data show that the specificity of PrnB and Put4p, and by extension of other YATs, is determined by at least three ways. 1) Residues forming the middle gate (Trp³⁵¹); 2) residues between the middle and distal gates (Ser¹³⁰ and Thr⁴¹⁴); and 3) residues of TMS6 (Lys²⁴⁵) and the unwound part of TMS6 (Phe²⁵² and Ser²⁵³). These residues (Fig. 9) appear to determine specificity by directly interacting with the substrate, imposing steric constraints, and/or affecting local flexibility. In YATs of known function, even from different fungal species, residues in corresponding positions display interesting patterns (Fig. 1). For example, in TMS6, an Asn residue is present in the corresponding position of Lys²⁴⁵ in all three basic amino acid permeases, accompanied by a Gln residue in place of Ile²⁵¹. In TMS3, in position of Ser¹³⁰, three fungal bicarboxylic acid permeases from different species possess Lys, whereas in TMS8, in position of Trp³⁵¹, an aromatic residue present in both L-proline permeases is substituted by Asp in bicarboxylic acid permeases and Asn in Can1, Lyp1, and Alp1. The above observations suggest that our results could be directly applicable to other members of the YAT family, whereas our approach of comparing two orthologues from different organisms shows that interspecies comparisons can yield significant results concerning specificity determination.

Acknowledgments—We are grateful to Prof. Claudio Scazzocchio and Dr. Sotiris Amillis for useful discussions and for critically reading the manuscript and Dr. Efstratios Stratikos for critically reading the manuscript. We also acknowledge financial support from the European Commission under the Seventh Framework Program by means of the grant agreement for the Integrated Infrastructure Initiative No. 262348 European Soft Matter Infrastructure (ESMI).

Note Added in Proof—Tables 3a and 3b were incomplete in the version of this article that was published as a Paper in Press on January 8, 2015. The tables now shown as Tables 3 and 4 are correct.

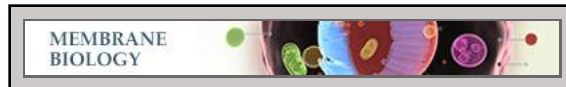
REFERENCES

- Vastermark, A., Wollwage, S., Houle, M. E., Rio, R., and Saier, M. H. (2014) Expansion of the APC superfamily of secondary carriers. *Proteins* **82**, 2797–2811
- Jeschke, G. (2013) A comparative study of structures and structural transitions of secondary transporters with the LeuT fold. *Eur. Biophys. J.* **42**, 181–197
- Wong, F. H., Chen, J. S., Reddy, V., Day, J. L., Shlykov, M. A., Wakabayashi, S. T., and Saier, M. H. (2012) The amino acid-polyamine-organocation superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 105–113
- Sophianopoulou, V., and Diallinas, G. (1995) Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 53–75
- André, B. (1995) An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1575–1611
- Van Belle, D., and André, B. (2001) A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 389–398
- Sophianopoulou, V., and Scazzocchio, C. (1989) The proline transport protein of *Aspergillus nidulans* is very similar to amino acid transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **3**, 705–714
- Apostolaki, A., Erpapazoglou, Z., Harispe, L., Billini, M., Kafasla, P., Kizis, D., Peñalva, 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**, 339–352
- Yadav, A. K., and Bachhawat, A. K. (2011) CgCYN1, a plasma membrane cystine-specific transporter of *Candida glabrata* with orthologues prevalent among pathogenic yeast and fungi. *J. Biol. Chem.* **286**, 19714–19723
- Trip, H., Evers, M. E., Kiel, J. A., and Driessen, A. J. (2004) Uptake of the β -lactam precursor α -amino adipic acid in *Penicillium chrysogenum* is mediated by the acidic and the general amino acid permease. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4775–4783
- Dieterle, M. G., Wiest, A. E., Plamann, M., and McCluskey, K. (2010) Characterization of the temperature-sensitive mutations un-7 and png-1 in *Neurospora crassa*. *PLoS One* **5**, e10703
- Tazebay, U. H., Sophianopoulou, V., Scazzocchio, C., and Diallinas, G. (1997) The gene encoding the major proline transporter of *Aspergillus nidulans* is up-regulated during conidiospore germination and in response to proline induction and amino acid starvation. *Mol. Microbiol.* **24**, 105–117
- Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R., and André, B. (2010) The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol.* **20**, 196–204
- 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**, 27–37
- Cubero, B., and Scazzocchio, C. (1994) Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **13**, 407–415
- Cubero, B., Gómez, D., and Scazzocchio, C. (2000) Metabolite repression and inducer exclusion in the proline utilization gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **182**, 233–235
- García, I., Gonzalez, R., Gómez, D., and Scazzocchio, C. (2004) Chromatin rearrangements in the prnD-prnB bidirectional promoter: dependence on transcription factors. *Eukaryot. Cell* **3**, 144–156
- Gómez, D., García, I., Scazzocchio, C., and Cubero, B. (2003) Multiple GATA sites: protein binding and physiological relevance for the regulation of the proline transporter gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **50**, 277–289
- 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**, 2937–2944
- Sophianopoulou, V., Suárez, T., Diallinas, G., and Scazzocchio, C. (1993) Operator derepressed mutations in the proline utilisation gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 209–213
- Tavoularis, S. N., Tazebay, U. H., Diallinas, G., Sideridou, M., Rosa, A., Scazzocchio, C., and Sophianopoulou, V. (2003) Mutational analysis of the major proline transporter (PrnB) of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Membr. Biol.* **20**, 285–297
- Kafasla, P., Bouzarelou, D., Frilingos, S., and Sophianopoulou, V. (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
- 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**, 356–370
- Lolkema, J. S., and Slotboom, D.-J. (2008) The major amino acid transporter superfamily has a similar core structure as Na⁺-galactose and Na⁺-leucine transporters. *Mol. Membr. Biol.* **25**, 567–580
- 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**, 810–814
- 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**, 1390–1393
- Weyand, S., Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Mirza, O., Krusong, K., Carpenter, E. P., Rutherford, N. G., Hadden, J. M., O'Reilly, J., Ma, P., Saidijam, M., Patching, S. G., Hope, R. J., Norbertczak, H. T., Roach, P. C., Iwata, S., Henderson, P. J., and Cameron, A. D. (2008) Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science* **322**, 709–713
- Schulze, S., Köster, S., Geldmacher, U., Terwisscha van Scheltinga, A. C., and Kühlbrandt, W. (2010) Structural basis of Na⁺-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT. *Nature* **467**, 233–236
- Gao, X., Zhou, L., Jiao, X., Lu, F., Yan, C., Zeng, X., Wang, J., and Shi, Y. (2010) Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. *Nature* **463**, 828–832
- Ma, D., Lu, P., Yan, C., Fan, C., Yin, P., Wang, J., and Shi, Y. (2012) Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature* **483**, 632–636
- Shaffer, P. L., Goehring, A., Shankaranarayanan, A., and Gouaux, E. (2009) Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science* **325**, 1010–1014
- Horák, J., and Rihová, L. (1982) L-Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **691**, 144–150
- Andréasson, C., Neve, E. P., and Ljungdahl, P. O. (2004) Four permeases import proline and the toxic proline analogue azetidine-2-carboxylate into yeast. *Yeast* **21**, 193–199
- Omura, F., Fujita, A., Miyajima, K., and Fukui, N. (2005) Engineering of yeast Put4 permease and its application to lager yeast for efficient proline assimilation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1162–1171
- Regenberg, B., Düring-Olsen, L., Kielland-Brandt, M. C., and Holmberg, S. (1999) Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **36**, 317–328
- Bermúdez Moretti, M., Correa García, S., and Batlle, A. (1998) UGA4 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* depends on cell growth conditions. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **44**, 585–590
- André, B., Hein, C., Grenson, M., and Jauniaux, J. C. (1993) Cloning and expression of the UGA4 gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 17–25
- Wu, S., and Zhang, Y. (2007) LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **35**, 3375–3382
- Chang, J.-M., Di Tommaso, P., Taly, J.-F., and Notredame, C. (2012) Accurate multiple sequence alignment of transmembrane proteins with PSI-Coffee. *BMC Bioinformatics* **13**, S1
- Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A., and Elofsson, A. (2009) TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Res.* **37**, W465–W468

41. Yarov-Yarovoy, V., Schonbrun, J., and Baker, D. (2006) Multipass membrane protein structure prediction using Rosetta. *Proteins* **62**, 1010–1025
42. Barth, P., Schonbrun, J., and Baker, D. (2007) Toward high-resolution prediction and design of transmembrane helical protein structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 15682–15687
43. Barth, P., Wallner, B., and Baker, D. (2009) Prediction of membrane protein structures with complex topologies using limited constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 1409–1414
44. Karplus, K. (2009) SAM-T08, HMM-based protein structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **37**, W492–497
45. Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (1998) Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng.* **11**, 739–747
46. Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B., and Lindahl, E. (2013) GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **29**, 845–854
47. Banks, J. L., Beard, H. S., Cao, Y., Cho, A. E., Damm, W., Farid, R., Felts, A. K., Halgren, T. A., Mainz, D. T., Maple, J. R., Murphy, R., Philipp, D. M., Repasky, M. P., Zhang, L. Y., Berne, B. J., Friesner, R. A., Gallicchio, E., and Levy, R. M. (2005) Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). *J. Comput. Chem.* **26**, 1752–1780
48. Kryptou, E., Lambrinidis, G., Evangelidis, T., Mikros, E., and Diallinas, G. (2014) Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA: Structure-function relationships in AzgA. *Mol. Microbiol.* **93**, 129–145
49. Sherman, W., Day, T., Jacobson, M. P., Friesner, R. A., and Farid, R. (2006) Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *J. Med. Chem.* **49**, 534–553
50. 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**, 115–125
51. 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**, 205–221
52. 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**, 3111–3120
53. 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**, 1441–1454
54. Roumelioti, K., Vangelatos, I., and Sophianopoulou, V. (2010) A cryptic role of a glycolytic-gluconeogenic enzyme (aldolase) in amino acid transporter turnover in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 254–267
55. Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A., and Diallinas, G. (2010) Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol. Microbiol.* **75**, 246–260
56. Athanasopoulos, A., Boleti, H., Scazzocchio, C., and Sophianopoulou, V. (2013) Eisosome distribution and localization in the meiotic progeny of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **53**, 84–96
57. 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
58. Drew, D., Newstead, S., Sonoda, Y., Kim, H., von Heijne, G., and Iwata, S. (2008) GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Protoc.* **3**, 784–798
59. Ghaddar, K., Krammer, E.-M., Mihajlovic, N., Brohé, S., André, B., and Prévost, M. (2014) Converting the yeast arginine Can1 permease to a lysine permease. *J. Biol. Chem.* **289**, 7232–7246
60. Apostolaki, A., Harispe, L., Calcagno-Pizarelli, A. M., Vangelatos, I., Sophianopoulou, V., Arst, H. N., Jr., Peñalva, M. A., Amillis, S., and Scazzocchio, C. (2012) *Aspergillus nidulans* CkiA is an essential casein kinase I required for delivery of amino acid transporters to the plasma membrane. *Mol. Microbiol.* **84**, 530–549
61. Kryptou, E., Kosti, V., Amillis, S., Myriantopoulos, V., Mikros, E., and Diallinas, G. (2012) Modeling, substrate docking, and mutational analysis identify residues essential for the function and specificity of a eukaryotic purine-cytosine NCS1 transporter. *J. Biol. Chem.* **287**, 36792–36803
62. Hutchings, H., Stahmann, K. P., Roels, S., Espeso, E. A., Timberlake, W. E., Arst, H. N., Jr., and Tilburn, J. (1999) The multiply-regulated *gabA* gene encoding the GABA permease of *Aspergillus nidulans*: a score of exons. *Mol. Microbiol.* **32**, 557–568
63. Kinghorn, J. R., and Pateman, J. A. (1975) Mutations which affect amino acid transport in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **86**, 174–184
64. Nasuno, R., Hirano, Y., Itoh, T., Hakoshima, T., Hibi, T., and Takagi, H. (2013) Structural and functional analysis of the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1 involved in oxidative stress tolerance via proline metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 11821–11826
65. Nomura, M., Nakamori, S., and Takagi, H. (2003) Characterization of novel acetyltransferases found in budding and fission yeasts that detoxify a proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid. *J. Biochem.* **133**, 67–74
66. Ogawa-Mitsuhashi, K., Sagane, K., Kuromitsu, J., Takagi, H., and Tsukahara, K. (2009) MPR1 as a novel selection marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **26**, 587–593
67. Usami, Y., Uemura, S., Mochizuki, T., Morita, A., Shishido, F., Inokuchi, J., and Abe, F. (2014) Functional mapping and implications of substrate specificity of the yeast high-affinity leucine permease Bap2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838**, 1719–1729
68. Sanguinetti, M., Amillis, S., Pantano, S., Scazzocchio, C., and Ramón, A. (2014) Modelling and mutational analysis of *Aspergillus nidulans* UreA, a member of the subfamily of urea/H⁺ transporters in fungi and plants. *Open Biol.* **4**, 140070
69. Kanda, N., and Abe, F. (2013) Structural and functional implications of the yeast high-affinity tryptophan permease Tat2. *Biochemistry* **52**, 4296–4307
70. Amillis, S., Kosti, V., Pantazopoulou, A., Mikros, E., and Diallinas, G. (2011) Mutational analysis and modeling reveal functionally critical residues in transmembrane segments 1 and 3 of the UapA transporter. *J. Mol. Biol.* **411**, 567–580
71. Papakostas, K., Botou, M., and Frillingos, S. (2013) Functional identification of the hypoxanthine/guanine transporters YjcD and YgfQ and the adenine transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **288**, 36827–36840
72. Papakostas, K., and Frillingos, S. (2012) Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **287**, 15684–15695
73. Karena, E., and Frillingos, S. (2011) The role of transmembrane segment TM3 in the xanthine permease XanQ of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **286**, 39595–39605
74. Piscitelli, C. L., and Gouaux, E. (2012) Insights into transport mechanism from LeuT engineered to transport tryptophan. *EMBO J.* **31**, 228–235
75. 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**, 1655–1661
76. Singh, S. K., Yamashita, A., and Gouaux, E. (2007) Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature* **448**, 952–956
77. Kowalczyk, L., Ratera, M., Paladino, A., Bartocconi, P., Errasti-Murugarren, E., Valencia, E., Portella, G., Bial, S., Zorzano, A., Fita, I., Orozco, M., Carpena, X., Vázquez-Ibar, J. L., and Palacín, M. (2011) Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 3935–3940
78. Robert, X., and Guet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**, W320–W324
79. Lomize, M. A., Lomize, A. L., Pogozheva, I. D., and Mosberg, H. I. (2006) OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* **22**, 623–625

Membrane Biology:

**The *Aspergillus nidulans* Proline Permease
as a Model for Understanding the Factors
Determining Substrate Binding and
Specificity of Fungal Amino Acid
Transporters**



Christos Gournas, Thomas Evangelidis,
Alexandros Athanasopoulos, Emmanuel
Mikros and Vicky Sophianopoulou
J. Biol. Chem. 2015, 290:6141-6155.

doi: 10.1074/jbc.M114.612069 originally published online January 8, 2015

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.612069](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612069)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](https://www.jbc.org/).


Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 79 references, 33 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/290/10/6141.full.html#ref-list-1>

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Characterization of AnNce102 and its role in eisosome stability and sphingolipid biosynthesis

Alexandros Athanasopoulos¹, Christos Gournas^{2,†}, Sotiris Amillis² & Vicky Sophianopoulou¹

Received: 23 April 2015

Accepted: 21 September 2015

Published: 15 October 2015

The plasma membrane is implicated in a variety of functions, whose coordination necessitates highly dynamic organization of its constituents into domains of distinct protein and lipid composition. Eisosomes, at least partially, mediate this lateral plasma membrane compartmentalization. In this work, we show that the Nce102 homologue of *Aspergillus nidulans* colocalizes with eisosomes and plays a crucial role in density/number of PilA/SurG foci in the head of germlings. In addition we demonstrate that AnNce102 and PilA negatively regulate sphingolipid biosynthesis, since their deletions partially suppress the thermosensitivity of *basA* mutant encoding sphingolipid C₄-hydroxylase and the growth defects observed upon treatment with inhibitors of sphingolipid biosynthesis, myriocin and Aureobasidin A. Moreover, we show that YpkA repression mimics genetic or pharmacological depletion of sphingolipids, conditions that induce the production of Reactive Oxygen Species (ROS), and can be partially overcome by deletion of *pilA* and/or *annce102* at high temperatures. Consistent with these findings, *pilA*Δ and *annce102*Δ also show differential sensitivity to various oxidative agents, while AnNce102 overexpression can bypass sphingolipid depletion regarding the PilA/SurG foci number and organization, also leading to the mislocalization of PilA to septa.

The plasma membrane (PM) is involved in a variety of functions such as cell adhesion, endocytosis, exocytosis, while serving as a platform for various signalling complexes. In the last years, it has increasingly become evident that the PM is highly compartmentalized for accomplishing these roles^{1,2}. Studies mainly with *Saccharomyces cerevisiae* and other ascomycetes focused on the lateral organization of biological membranes, have shown that PM is organized into numerous partially overlapping domains³, some of which are protein organized and large enough to be monitored by fluorescence microscopy. But how these domains arise is poorly understood, largely due to the technical difficulties in studying hydrophobic membranes⁴.

In the PM of yeast, three types of distinct spatial domains with different lipid and protein composition are well characterized: MCP, MCC and MCT. The first identified domain (Membrane Compartment of Pma1p, MCP) was found to contain the highly expressed plasma membrane H⁺-ATPase - Pma1p, which forms a network-like pattern⁵. In contrast to MCP, MCC (Membrane Compartment of Can1p, arginine permease) appears as large immobile patches of roughly 300 nm diameter forming long furrow-like invaginations that contain several transmembrane proteins^{6,7} and members of the Sur7 and Nce102 families of tetraspan proteins^{8,9}. MCC organization is at least in part mediated by the Nce102 protein¹⁰ and by a cellular stable structure termed eisosome, lying underneath MCC. Each eisosome is composed of three proteins in thousands of copies, the phylogenetically related cytoplasmic Pil1 and Lsp1 and the transmembrane Sur7 protein¹¹. Eisosomes in *S. cerevisiae* are organized/regulated by the phosphorylation of

¹Institute of Biosciences and Applications, Microbial Molecular Genetics Laboratory, National Center for Scientific Research, Demokritos (NCSR), Athens, Greece. ²Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis 15781, Athens, Greece. [†]Present address: Molecular Physiology of the Cell, Université Libre de Bruxelles, IBMM, 6041 Gosselies, Belgium. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.S. (email: vicky@bio.demokritos.gr)

Pil1 and Lsp1 by the Pkh1/2 kinase (homologues of mammalian 3-phosphoinositide-dependent kinase) and the levels of sphingolipid Long-Chain Bases (LCBs)^{12–14}. Sphingolipids, especially abundant complex sphingolipids, are important structural components of eukaryotic cell membranes. In addition to their structural roles, sphingolipid metabolites such as ceramides and LCBs can act as signaling molecules in many cellular processes, including cell migration, stress response, survival, apoptosis, senescence, differentiation and endocytosis^{15,16}. The tetraspan protein Nce102 has been implicated as part of a sensor for sphingolipid homeostasis¹⁰. Membrane stress, including sphingolipid depletion, triggers eisosome proteins Slm1/2, to move out of MCC and associate with the third well characterized PM domain, MCT, Membrane Compartment of TORC2 (target of rapamycin kinase complex 2)^{10,17}. The Slm1/2 proteins then recruit Ypk1 to the PM, where it is phosphorylated by Tor2 and Pkh1/2, in order to be fully activated^{17,18}. Once fully activated, Ypk1 phosphorylates and consequently inactivates the endoplasmic reticulum (ER)-localized proteins, Orm1 and Orm2^{17,19,20}. Furthermore, it stimulates the function of the ceramide synthase complex, by increasing the rate of the formation of ceramides and preventing hyper-accumulation of LCBs/LCBPs, thus avoiding inadvertent induction of autophagy under sufficient conditions²¹.

In the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, PilA, PilB and SurG, homologues of the *S. cerevisiae* eisosome proteins Pil1/Lsp1 and Sur7, are assembled and form tightly packed structures²². In conidiospores and ascospores, the three proteins colocalize at the cell cortex forming stable structures that differ from the clearly distinct eisosome patches observed in *S. cerevisiae*^{22,23}. The aim of the present study was to use the genetically tractable filamentous fungus *Aspergillus nidulans* for a detailed live-cell imaging and characterization of AnNce102 at different developmental stages of fungus asexual life cycle. We examined the contribution of AnNce102 to the organization/stability of eisosome foci and its possible role in sphingolipid biosynthesis and YpkA (YPK1 homologue) signaling. Our results indicate that AnNce102 colocalizes with eisosomes and affects the density/number of PilA/SurG foci in the head of germlings. Myriocin treatment, similar to *annce102Δ*, results in PilA foci disassembly, a phenotype that can be overcome by overexpression of AnNce102. In addition we show that the main organizers of eisosomes, the PilA and AnNce102 proteins, negatively regulate sphingolipid biosynthesis.

Results

Nce102 of *A. nidulans* is an eisosomal protein. The *S. cerevisiae* Nce102 sequence (YPR149W) was used as template to identify homologues in the *A. nidulans* genome using BlastP. The top-scoring match corresponds to AN7683 Open Reading Frame (NCBI-GeneID:2869016) of 633 bp encoding an 174 amino acid protein, characterized by the presence of a MARVEL (Myelin And Lymphocyte and Related Proteins for Vesicle Trafficking and Membrane Link) domain (PFAM domain PF01284; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>). To investigate the intracellular localization of AnNce102, C-terminal fusions of *annce102* open reading frame with GFP and mRFP fluorophores were constructed, expressing *annce102* from its endogenous promoter. Deconvoluted Z stacks of AnNce102 in quiescent conidia showed a plasma membrane staining pattern that colocalizes with PilA and partially localizes in the remainder of the membrane (Fig. 1A). AnNce102 localizes additionally in intracellular structures resembling the Endoplasmic Reticulum (ER), as shown by its colocalization with the ER chaperone, ShrA²⁴ (Fig. 1B). During isotropic growth, the AnNce102 ER fluorescence signal diminishes and it disappears before the emergence of the germination tube (Fig. 1C and below). In germlings, AnNce102 foci are mostly confined to eisosomes of the hyphal head and to vacuoles, as stainable with the vacuolar tracer, CMAC. Additionally, AnNce102 is clearly detected in septa of germlings (Fig. 1C, white arrow) and colocalizes with some PilA foci along the hyphal plasma membrane (Fig. 1C, black arrows). This temporal and spatial AnNce102 distribution resembles that of the SurG tetraspan eisosomal protein (Fig. 1D,E)²². Moreover using time-lapse live-cell imaging, we show that AnNce102 forms stable structures with low mobility at fungal plasma membrane (Fig. 2).

Deletion of *pilA* leads to low levels of AnNce102 and SurG in growing germlings. In yeast cells, deletion of *PIL1* disrupts MCCs and all remaining eisosome proteins investigated so far coalesce into one or a few punctate foci at the cell periphery, referred to as eisosome remnants^{7,13}. In addition, Sur7 and Nce102 localize to a few bright clusters and a pool diffusely distributed over the plasma membrane^{10,13}. On the contrary, deletion of *pilA* in quiescent conidia of *A. nidulans* has a minor effect on AnNce102 and SurG distribution. Both proteins appear to be localized less on the membrane and more in vacuoles compared to wild type cells (Fig. 3A,D). Similarly, almost no fluorescence is detected on the membrane during isotropic growth (Fig. 3E), while in germlings both proteins are localized exclusively in vacuoles and endosomes (Fig. 2F). RT-PCRs in total RNA extracted from quiescent conidia (0 h) and germlings (14 h) of a wild type strain and *pilAΔ* revealed that mRNAs of both *annce102* and *surG* are abundant throughout the time-interval tested without significant differences (Fig. 3G). In contrast, western blot, using protein extracts from quiescent conidia (0 h) and germlings (14 h) confirmed microscopic observations. More specifically, deletion of *pilA* causes enhanced degradation of AnNce102-GFP and SurG-GFP in the vacuoles, as evidenced by the diminished signal of intact GFP-tagged proteins and the increased quantity of free GFP, even in quiescent conidia (Fig. 3H). We should also mention that deletion of *pilB* did not affect the membrane localization of AnNce102 and SurG of young germlings, while *pilAΔ*

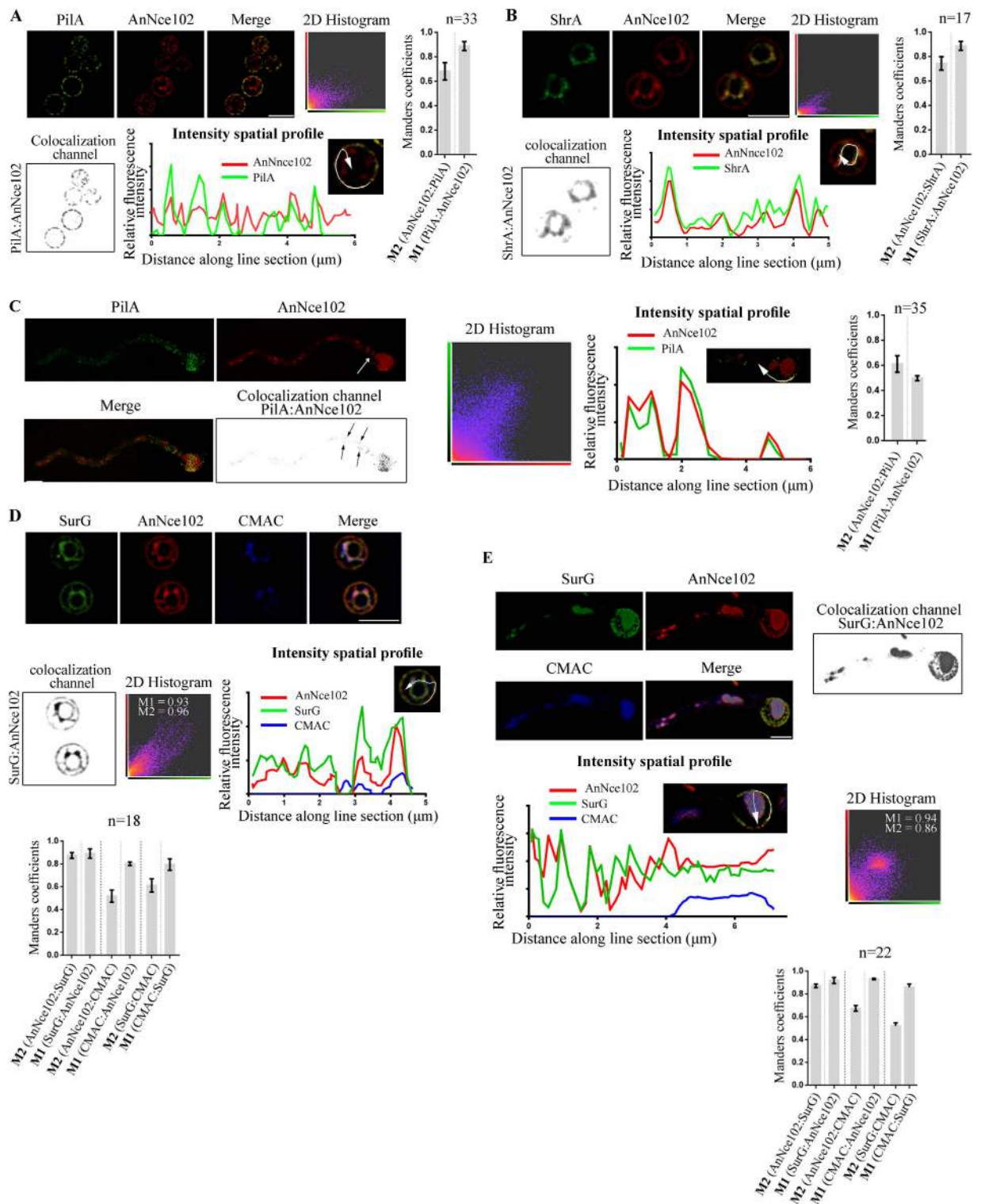


Figure 1. AnNce102 colocalizes with PilA and SurG eisosomal proteins. Deconvoluted confocal images and colocalization analysis (see materials and methods) of AnNce102/PilA (A) and AnNce102/ShrA (B) in quiescent conidia, AnNce102/PilA in germlings (C) and AnNce102/SurG in quiescent conidia (D) and germlings (E). Every dataset (A,B,C,D,E) contains a 2D histogram obtained using Imaris. Colocalization was represented as new channel (colocalization channel as inverted gray scale images in black and white) corresponding to the colocalized voxels. Histograms show Manders colocalization coefficients (M1 and M2), with averages presented as mean \pm SEM, where n represents the number of cells examined from at least three independent experiments. Analysis of fluorescent intensities (intensity spatial profile) along line section is shown for every dataset. A, B and D represent equatorial sections of confocal stacks and C and E represent volumetric views of confocal stacks generated by Imaris. Scale Bars 5 μm .



Figure 2. AnNce102 forms stable structures with low mobility. Images were acquired every 150 seconds. White arrow indicates representative AnNce102 spot that remains stable more than 39 minutes. Scale Bars 5 μ m.

pilB Δ double mutants did not show any difference from *pilA* Δ single mutants (Supplementary Fig. S1). Together, these data suggest that normal eisosomal organization requires PilA.

Deletion of *annce102* leads to fewer PilA and SurG foci in the head of germlings. *annce102* deletion mutants displayed normal growth at 25, 30, 37, and 42 $^{\circ}$ C (see Materials and Methods), while conidia exhibited properties of swelling and polarity establishment (time of germination tube appearance) indistinguishable from that of a wild type strain at all temperatures tested (Supplementary Fig. S2). Contrary to *S. cerevisiae*, where *nce102* Δ mutants displayed altered localization of Sur7-GFP, Pil1-GFP, Can1-GFP, and ergosterol^{18,10}, deletion of the *annce102* gene has no significant effect on PilA-mRFP and SurG-GFP distribution in quiescent conidia of *A. nidulans*, with both proteins colocalizing on the membrane (Fig. 4A,B). In *annce102* Δ germlings however, PilA and SurG displayed an uneven distribution compared to wild type (Fig. 4C,D). Using the spot tool of the Imaris software, we found that PilA forms 3-fold fewer foci in the head of *annce102* Δ germlings (Fig. 4E). Interestingly, a similar effect is observed in the presence of sub-lethal doses of myriocin (Fig. 5A) (inhibitor of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the first step in sphingolipid biosynthesis), where in addition no colocalization of PilA-mRFP and SurG-GFP foci is observed (Fig. 5Bi). The similarity of the phenotypes suggests that, like in yeast¹⁰, myriocin could affect the organization of eisosomes through AnNce102. To add to the significance of the above, the effects of myriocin addition and *annce102* deletion on the number of PilA foci were not additive (Fig. 5C), while overexpression of *annce102* can protect from myriocin-induced eisosome disassembly (see below).

The myriocin effect on eisosome localization may be due to the lack of LCBs, complex sphingolipids or a more general response to sphingolipids overall. To distinguish between these possibilities, we tested the effect of Aureobasidin A (AbA), a specific inhibitor of complex sphingolipids²⁵ (Fig. 5A). In PilA-mRFP/SurG-GFP cells treated with AbA, although we observed less pronounced reduction of PilA foci in the head of conidia-derived germlings, the treated cells displayed enhanced degradation of SurG (Fig. 5 Bii and Biii, compare with 4E), suggesting that proper eisosomal organization depends on the overall level of sphingolipids. Together, the above data show that normal eisosomal organization requires AnNce102 and suggests that this protein is involved in sphingolipid biosynthesis.

Having shown that the AnNce102 protein affects eisosomal foci number in the head of germlings, and given that PilA is the only eisosomal protein displaying a punctate distribution pattern along the hypha²², we attempted to identify other proteins that could potentially affect the distribution/number of PilA foci along hypha. We chose to study proteins that exhibit high identity to the amino acid sequence of AnNce102 MARVEL-containing protein. *In silico* analysis of the genome of *A. nidulans* revealed 2 sequences, AN8278 and AN8422, designated *mrvA* and *mrvB*, showing 26.9% and 23.9% identity to AnNce102 and displaying 9.0e-07 and 6.0e-03 E values to AnNce102, respectively. However, strains with deletions in one or both genes exhibited normal growth in all conditions tested and no changes in the topology of PilA in both conidia and germlings were observed (Supplementary Fig. S3). These results suggest that *mrvA* and *mrvB* do not participate in eisosome stability/organization.

Overexpression of AnNce102 restores PilA foci number in the presence of myriocin and leads to ectopic localization of PilA foci into septa. In order to test the effect of *annce102* overexpression on PilA foci number in myriocin-treated cells, a conditional *annce102* mutant strain was constructed, *alcA::annce102::mRFP*, expressing *annce102* under the control of the alcohol dehydrogenase (*alcA*) promoter, which is repressed by glucose and induced by ethanol²⁶. Under repressing conditions the number of PilA foci in the head of germlings is similar to that of *annce102* Δ cells (Fig. 6Ai). Under inducing conditions, AnNce102 is diffusely distributed to the periphery of cells, although some colocalization with PilA foci can be detected in the head of germlings. Most importantly, overexpression of AnNce102 in the presence of myriocin results in normal PilA foci number in the head of germlings (Fig. 6B).

Interestingly, under conditions of induced expression of AnNce102, PilA foci are also clearly localized to septa (Fig. 6, white arrows). As shown in Fig. 6C (white arrows), PilA foci do not localize to calcofluor white-stained septa of *A. nidulans*. However, overexpression of AnNce102 causes mislocalization

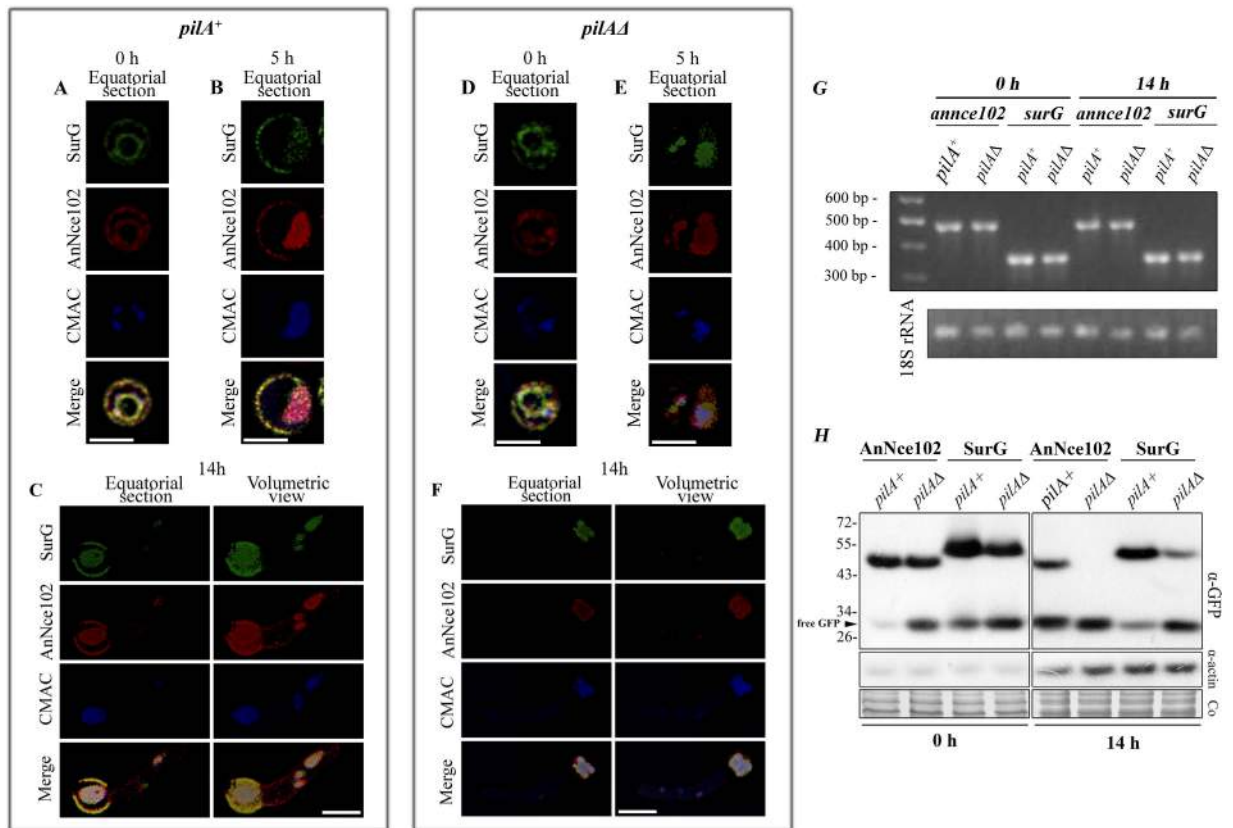


Figure 3. Deletion of *pilA* leads to enhanced degradation of AnNce102 and SurG. Deconvoluted confocal images of AnNce102-mRFP and SurG-GFP in quiescent (0 h) and swollen (5 h) conidia and germlings (14 h) of (A–C) *pilA*⁺ and (D–F) *pilA*Δ strains, respectively, stained with the vacuolar tracer, CMAC. Scale Bars 5 μm. (G) Expression of *annce102* and *surG* genes in quiescent conidia (0 h) and germlings (14 h) of *pilA*⁺ and *pilA*Δ strains using semi-quantitative RT-PCRs. (H) Western blot analysis of AnNce102-GFP and SurG-GFP proteins derived from quiescent conidia (0 h) and young hyphae (14 h) of *pilA*⁺ and *pilA*Δ strains. Detection of actin and Coomassie staining (Co) are also shown as loading controls. Notice the lower signal of actin in the samples from quiescent conidia, which is due to the developmental expression of actin (*acnA*) during conidiospore germination⁵⁹.

of PilA foci to septa without however, affecting their morphology. These data confirm the involvement of AnNce102 in sphingolipid sensing and demonstrate the crucial role of AnNce102 regarding PilA foci number and topology.

Sphingolipid depletion and *ypkA* repression increase ROS levels. In *S. cerevisiae* it has been shown that perturbation of sphingolipid metabolism leads to loss of cell viability and Reactive Oxygen Species (ROS) accumulation¹⁶. In addition, deletion of *nce102* confers higher sensitivity to oxidative stress²⁷. Thus, we have investigated whether sphingolipid depletion regulates ROS accumulation in *A. nidulans* as well. Toward this end, we studied cells treated with myriocin and Aureobasidin A, specific inhibitors of sphingolipid biosynthesis^{25,28}, as well as cells genetically blocked for sphingolipid biosynthesis. 20% of myriocin and 36% of AbA treated cells displayed increased ROS levels, visualized by the ROS indicator dye 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF) (Fig. 7A). In addition, 10% of germlings from *basA1* cells possessed elevated ROS levels at 42 °C (Fig. 7C). These cells carry a point missense mutation in *basA*, the *A. nidulans* *SUR2* homologue of *S. cerevisiae*, which results in thermosensitivity of C4-hydroxylase, the enzyme catalyzing the conversion of dihydrosphingosine to phytosphingosine²⁹. This increase in ROS levels was relieved by incubated *basA1* cells in the presence of the ROS scavenger N-acetyl cysteine (NAC) (Fig. 7B). It is worth mentioning that in untreated wild type cells grown under these conditions, the percentage of ROS was extremely low. Consistent with the idea that sphingolipid depletion causes ROS accumulation, addition of phytosphingosine (PHS), a 4-hydroxylated LCB, only reduced ROS production in myriocin and not AbA treated cells. Notably, PHS administration in AbA-treated cells resulted in augmented ROS levels, suggesting that not only depletion of complex sphingolipids but also accumulation of LCBs can result to further production of ROS³⁰ (Fig. 7B).

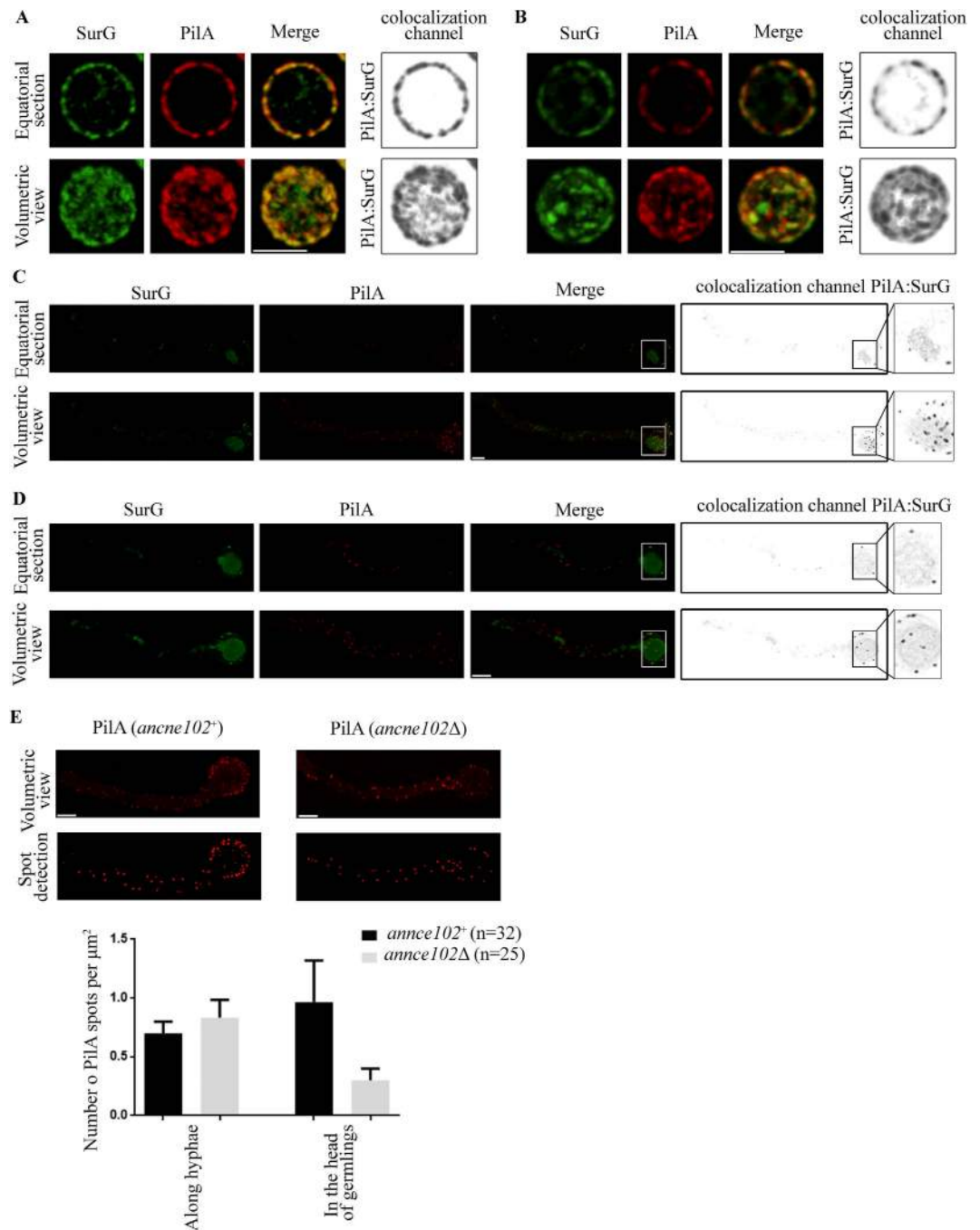


Figure 4. Deletion of *annce102* leads to fewer PilA and SurG foci in the head of germlings.

Deconvoluted confocal images of PilA-mRFP and SurG-GFP in quiescent conidia (0h) and germlings (14h) of *annce102*⁺ (A,C) and *annce102* Δ (B,D) strains, respectively. (E) The number of PilA foci in *annce102*⁺ and *annce102* Δ cells was counted using the spot tool of the Imaris software and is shown below the images, as a graph with averages presented as mean \pm SEM, where n represents the number of cells examined from at least three experiments. Scale Bars 3 μm .

Sphingolipid biosynthesis in yeast is regulated by the Ypk1 kinase^{18,19,21,31–33}. Interestingly, repression of YPK1 homologue in *A. nidulans*, using the regulatable promoter *niiA* (*niiA::ypkA* strain kindly provided by Dr. Goldman³⁴) by ammonium resulted in a significant increase in ROS levels, evident after 12 h of growth in presence of ammonium as sole nitrogen source at 25°C (Fig. 7D).

To further investigate the interrelationship of *ypkA* with sphingolipid biosynthesis and ROS production, double *niiA::ypkA basA1* mutant strains were constructed. These double mutants displayed a synthetic lethal phenotype when grown under repressing conditions at the non-permissive temperature (42°C), although under inducing conditions at 42°C *niiA::ypkA* partially suppressed *basA1* lethality

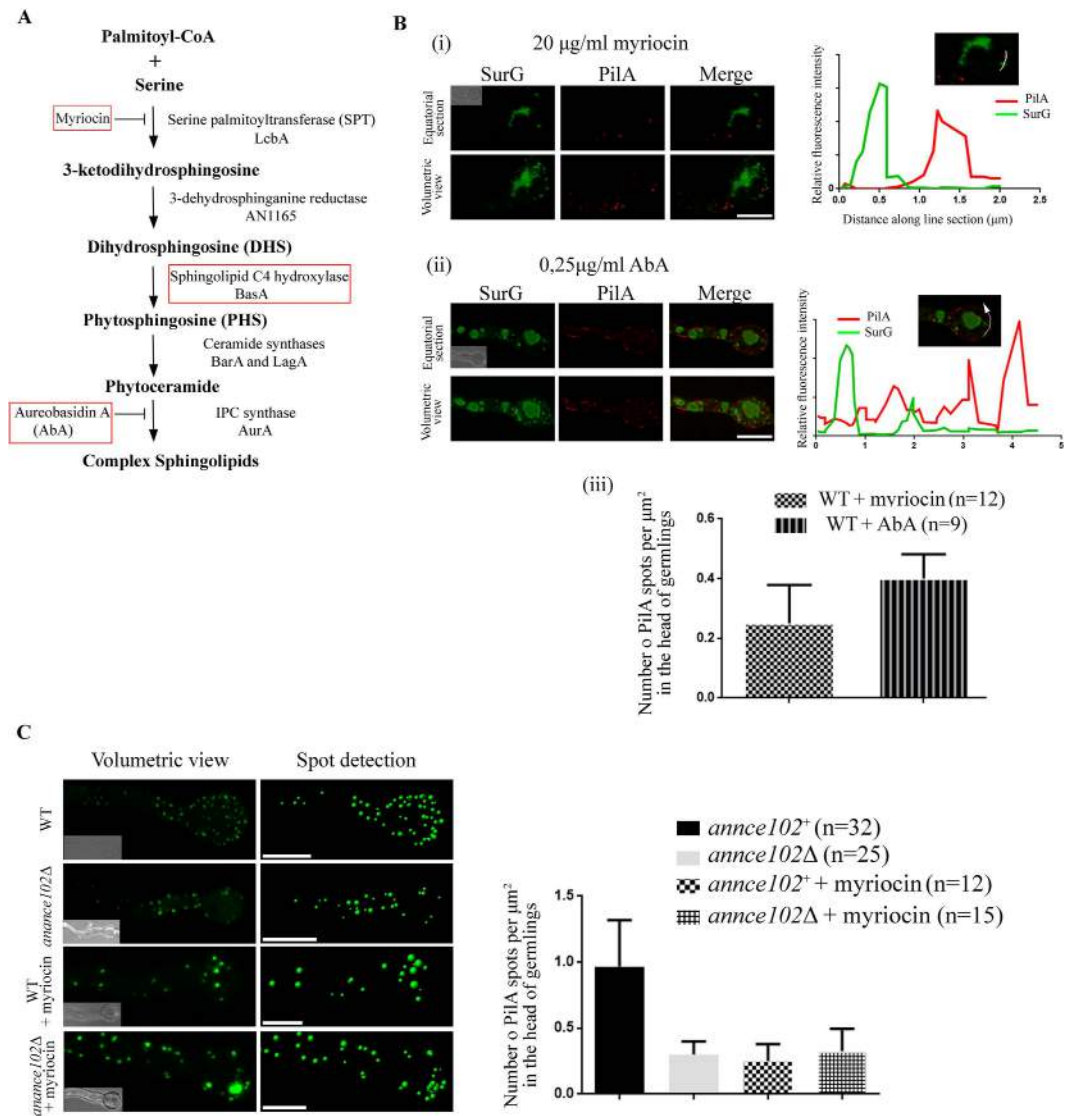


Figure 5. (A) A simplified scheme of the sphingolipid synthesis pathway of *A. nidulans*²⁹. Genes and inhibitors used in this study are shown in red boxes. (B) Deconvoluted confocal images of PiA-mRFP and SurG-GFP, shown as equatorial sections and volumetric view of confocal stacks, treated for 5 h with 20 $\mu\text{g/ml}$ myriocin (i) and 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Aureobasidin A (AbA) (ii). The number of PiA foci was counted using the spot tool of the Imaris software and is shown as a graph with averages presented as mean \pm SEM, where n represents the number of cells examined from at least three independent experiments (iii) (C) Representative deconvoluted confocal images of wild type and *annce102Δ* cells expressing PiA-GFP, treated for 5 h with 20 $\mu\text{g/ml}$ myriocin. The number of PiA foci was counted as above and is shown as a graph with averages presented as mean \pm SEM, where n represents the number of cells examined from at least three independent experiments. Scale Bars 5 μm .

(Fig. 7E). The above results confirm a genetic interaction between YpkA and the sphingolipid-mediated signaling pathway. In addition, ~35% of *niaA::ypkA basA1* double mutant germlings displayed elevated ROS under repressing conditions at 42 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 7F).

Having established the conditions and tools, we sought to examine whether AnNce102 and PiA are directly involved in oxidative damage. In our analysis we also compared the use of two different selection markers to create the deletion of *annce102* in order to exclude possible marker effects (see Materials and Methods). In all cases, mutants lacking *annce102* showed similar growth, regardless of selection marker used. Cell viability of *A. nidulans* mutants growing in the presence of H_2O_2 , menadione or paraquat was assayed (Fig. 8). Both drugs, menadione and paraquat are cycling agents that generate superoxide ions³⁵. Interestingly, cells with deletion of *annce102* were more sensitive to H_2O_2 stress and *pilAΔ* and/or *annce102Δ* mutants were more resistant in the presence of menadione (Fig. 8). On the other hand, all mutant strains were found to be hypersensitive to paraquat (Fig. 8).

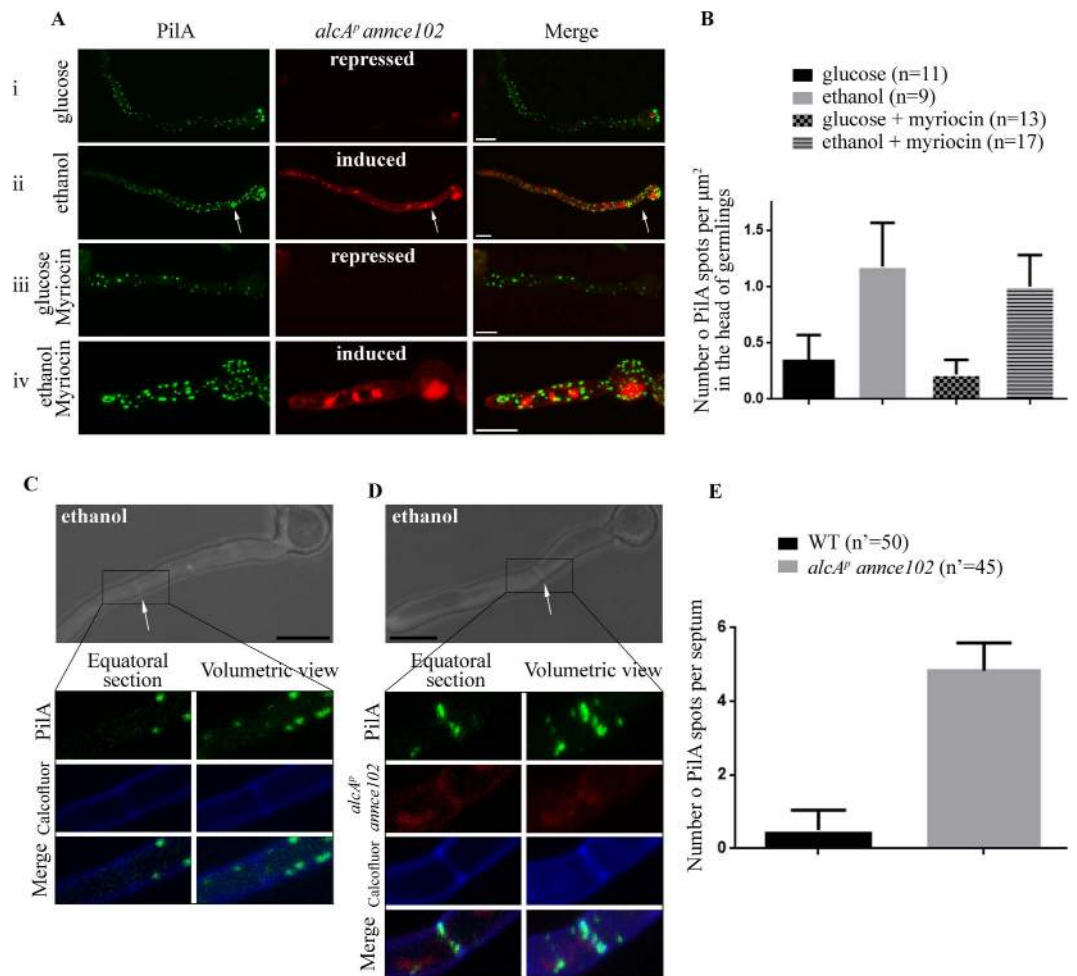


Figure 6. Overexpression of AnNce102 suppresses myriocin-induced eisosome disassembly and causes mislocalization of PilA foci to septa. Deconvoluted confocal images of WT (PilA-GFP) and *alcA^P annce102* (*alcA^P* AnNce102-mRFP) strains grown in the presence of (Ai) glucose, (Aii) ethanol, (Aiii) glucose and 20 $\mu\text{g/ml}$ myriocin and (Aiv) ethanol and 20 $\mu\text{g/ml}$ myriocin. (B) The number of PilA foci every case was counted using the spot tool of the Imaris software and is shown as a graph. Representative confocal images of (C) PilA-GFP and (D) PilA-GFP *alcA^P*-AnNce102-mRFP strains, in the presence of ethanol as sole carbon source. Septa are visualized by calcofluor white staining and marked with white arrows. Insets show a higher magnification of the boxed area. (E) The number of PilA foci per septum was counted and is shown as a graph with averages presented as mean \pm SEM, where n represents the number of cells examined from at least three independent experiments. Bars 5 μm .

The above data show that AnNce102 or/and PilA play a role in protection against oxidative stress generated by paraquat and H_2O_2 , also suggesting a role of the YpkA kinase in sphingolipid biosynthesis pathway and confirming the important role of YpkA and sphingolipids in redox homeostasis.

AnNce102 and PilA genetically interact with YpkA and BasA, key players in sphingolipid metabolism. In order to test whether deletion of PilA and AnNce102 affects ROS levels through regulation of YpkA activity, we created double and triple mutants of *pilA* Δ and/or *annce102* Δ with *niiA::ypkA*. Simultaneous deletion of both *pilA* and *annce102* results in impaired growth of a *niiA::ypkA* in ammonium at 25 $^\circ\text{C}$, and, most importantly, seems to partially suppress the defects of *ypkA* downregulation at 42 $^\circ\text{C}$ (Fig. 9A). The growth of all mutants is well correlated with their intracellular ROS levels detected by DCF at 25 $^\circ\text{C}$ (Fig. 9B), where *niiA::ypkA annce102* Δ *pilA* Δ triple mutants display 3 fold more ROS at 25 $^\circ\text{C}$. At 42 $^\circ\text{C}$ no statistically significant differences in ROS levels were detected. In order to test whether the above differences in growth and ROS accumulation are caused by the regulation of sphingolipid biosynthesis, we introduced the *pilA* Δ and/or *annce102* Δ mutations in a *basA1* strain. As shown in Fig. 9C, *basA1* mutants display slightly impaired growth at the semi-permissive temperature (37 $^\circ\text{C}$), which is furthermore enhanced at non-permissive temperature (42 $^\circ\text{C}$). Most remarkably, the double and triple mutants grow significantly better than the single *basA1*. Consistent with the above,

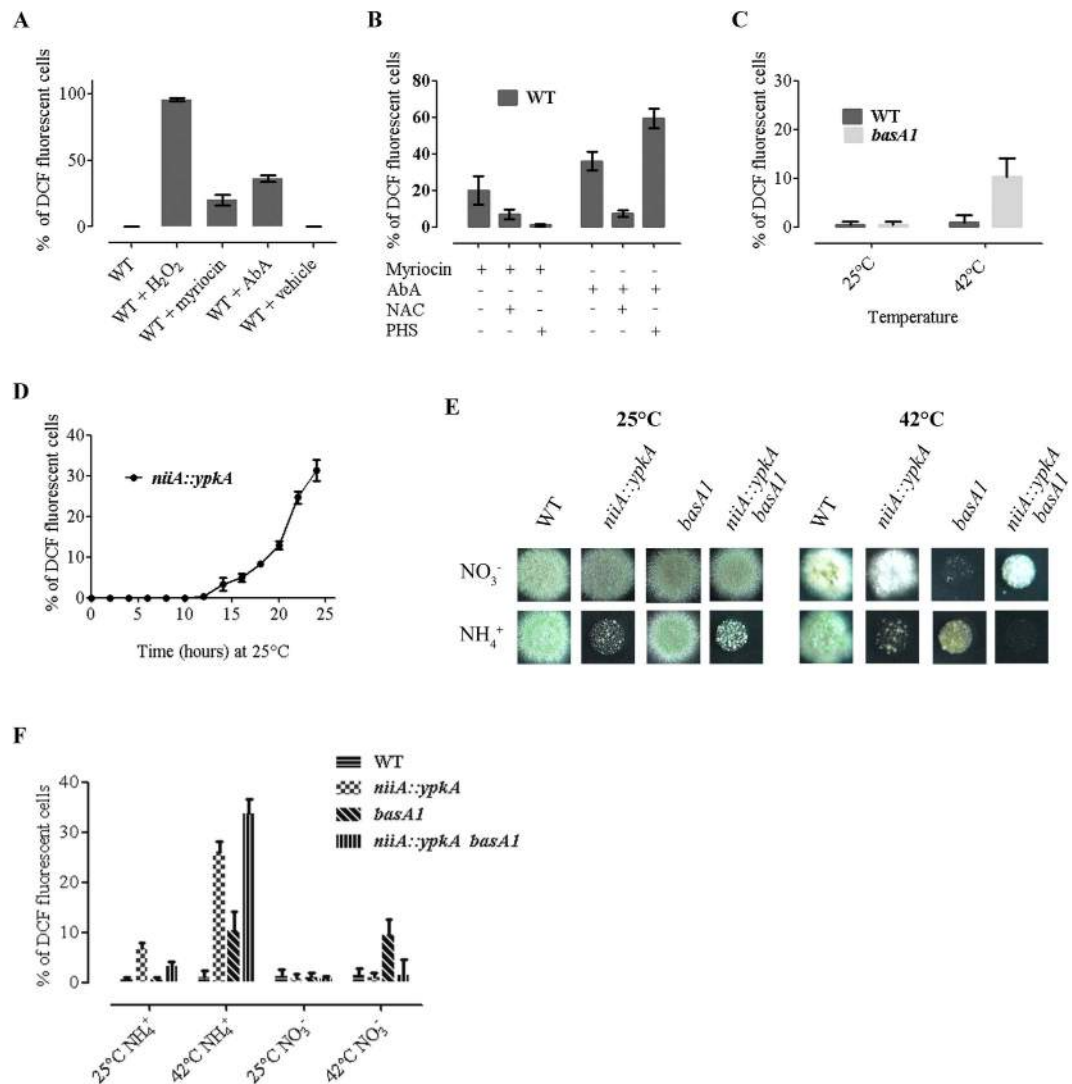


Figure 7. ROS accumulation by sphingolipid depletion and *ypkA* repression. (A) WT cells grown in MM for 12 h at 25 °C and then treated for 7 h with 0,5 mM H₂O₂, 40 μg/ml myriocin, 2 μg/ml AbA and methanol (vehicle). All strains were incubated with 10 mM 2, 7 -dichlorofluorescein diacetate (DCF) for the last 45 min prior to imaging by fluorescence microscopy. Quantification represents percentage of 200–500 cells labeled with DCF, from at least three representative independent experiments, with averages presented as mean ± SEM. (B) WT cells grown in MM for 12 h at 25 °C, and then treated for 7 h with 40 μg/ml myriocin, 2 μg/ml AbA, 20 mM NAC and 2 μg/ml PHS. ROS were determined and quantified as in (A). (C) WT and *basA1* cells grown in MM for 12 h at 25 °C and shifted at 42 °C for additional 7 h. ROS were determined and quantified as in (A). (D) *niiA::ypkA* cells grown in MM for 0–24 h at 25 °C under repressing (NH₄⁺) conditions. ROS were determined and quantified every 2 h intervals as in (A). (E) 5 μl of 10⁷/ml conidia of WT, *niiA::ypkA*, *basA1* and *niiA::ypkA basA1* cells spotted on MM and grown for 48 h at 25 °C or 42 °C, under repressing or inducing conditions. (F) WT, *niiA::ypkA*, *basA1* and *niiA::ypkA basA1* cells grown in MM for 12 h at 25 °C, under repressing or inducing conditions. Strains remain at 25 °C or shifted at 42 °C for additional 7 h, as indicated. ROS were determined and quantified as in (A).

annce102Δ and/or *pilAΔ* were found to be partially resistant to myriocin and AbA treatment at high temperatures (Fig. 9D). Curiously, addition of the ROS scavenger N-acetyl cysteine (NAC) effectively concealed any growth differences among *basA1*, *niiA::ypkA*, *annce102Δ* and *pilA* mutants observed above (Figs 9A,C), although no statistically significant differences in ROS levels were detected among mutants. Moreover, we quantitatively determine the inhibitory effects of the inhibitors of sphingolipid metabolism, myriocin and AbA, in WT, *pilAΔ*, *annce102Δ*, *pilAΔ annce102Δ* and *alcA::annce102* cells at 37 °C, in the presence of MM+2% glucose or MM+2% glycerol+ethanol. Myriocin was the least active against *A. nidulans* with a minimal inhibitory concentration (MIC) of 80 μg/ml in the presence of glucose and 60 μg/ml in the presence of glycerol+ethanol. The MIC of AbA was 4 μg/ml in the presence of glucose

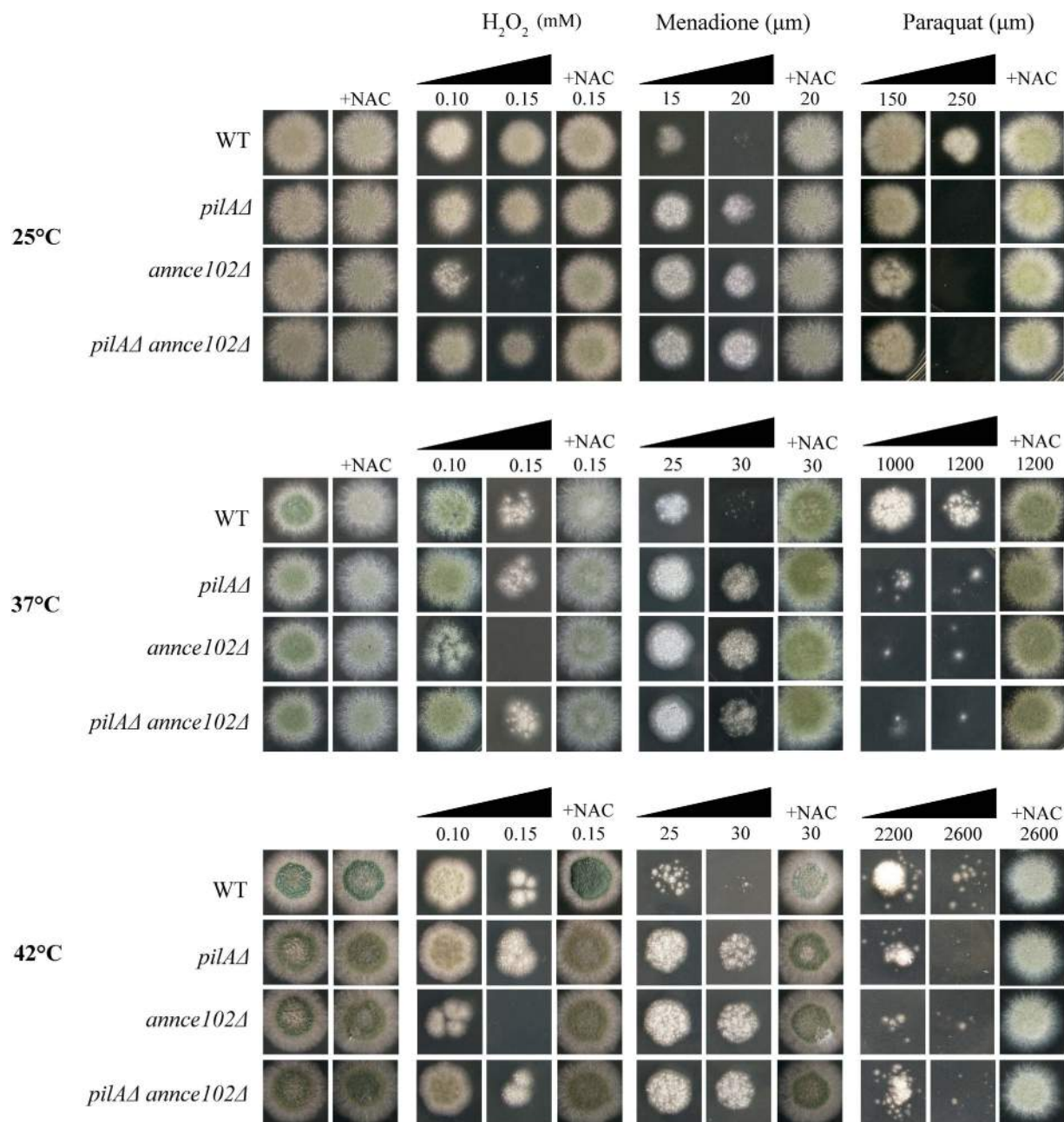


Figure 8. Growth of *pilA*Δ and/or *annce102*Δ mutants in the presence of oxidative agents. 5 μl of 10^7 /ml conidia of WT, *pilA*Δ, *annce102*Δ and *pilA*Δ *annce102*Δ cells spotted on MM and grown for 36–48 h in the presence of H_2O_2 , paraquat and menadione, at concentrations as indicated, at 25, 37 or 42°, in the presence of urea as the sole nitrogen source.

and 2 μg/ml in the presence of glycerol+ethanol. In these conditions we were not able to detect significant differences in the resistance or sensitivity of mutants compared to wild-type (Supplementary Fig. S4).

Discussion

Several studies so far have documented the role of Nce102 proteins and despite their conservation among the ascomycetes^{36,37}, the functional role of these proteins may diverge. For instance, in *Ashbya gossypii*, the orthologue of Nce102 despite colocalizing with eisosomes is not needed for eisosome stability and polar growth³⁸. In *Aspergillus fumigatus* AfuNce102 deletion mutants showed a clear delay in conidiophore formation and severely affected sporulation, without affecting the virulence of the fungus³⁷. Deletion of Nce102 from *Candida albicans* caused a 2-fold decrease in MCC/eisosomes. However, the

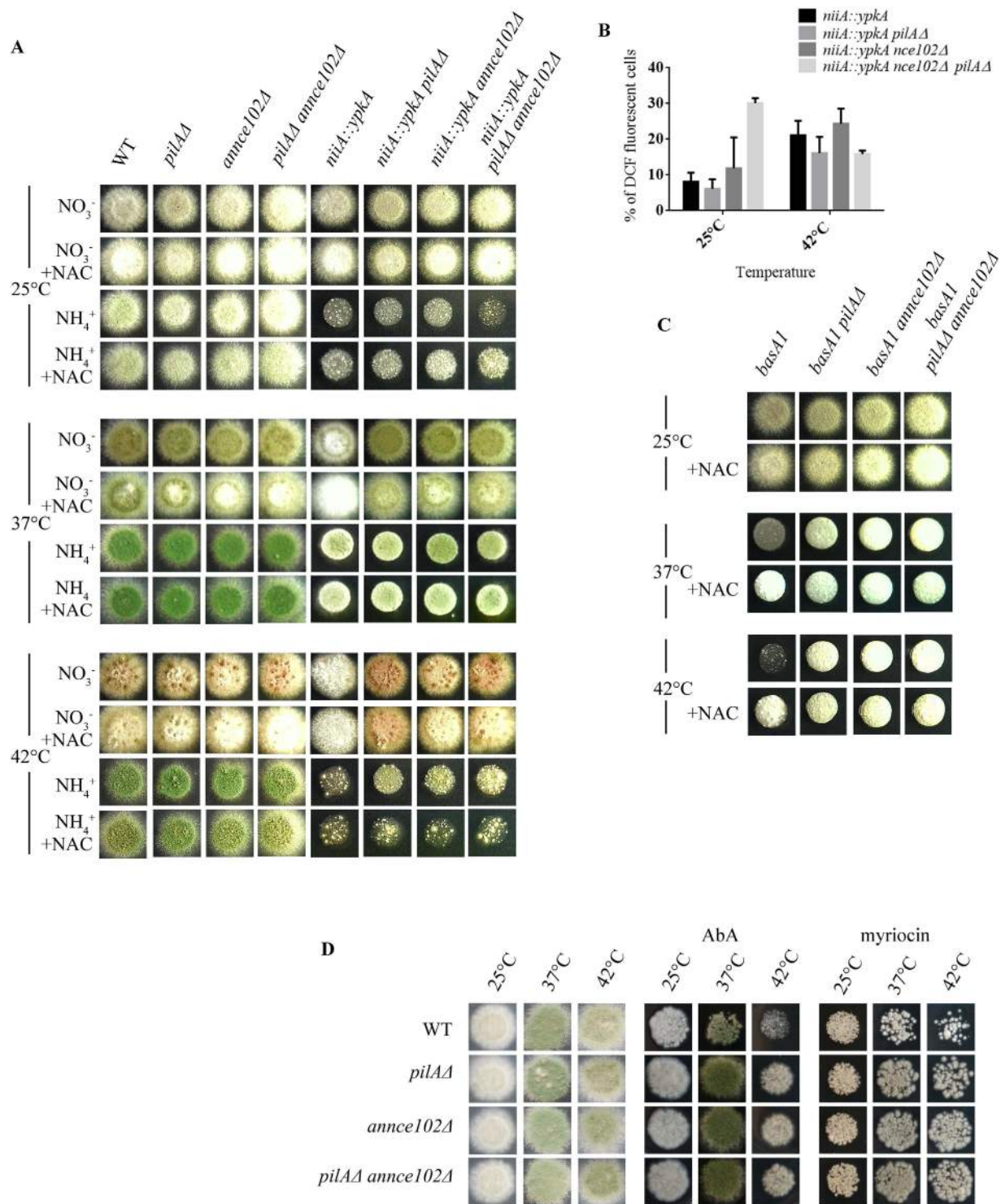


Figure 9. AnNce102 and PilA genetically interact with YpkA and sphingolipid biosynthesis pathway.

(A) 5 μ l of 10^5 conidia of WT, *pilA* Δ , *annce102* Δ , *pilA* Δ *annce102* Δ , *niiA::ypkA*, *niiA::ypkA pilA* Δ , *niiA::ypkA annce102* Δ and *niiA::ypkA pilA* Δ *annce102* Δ cells spotted on MM and grown for 36–48 h at 25, 37 and 42 $^{\circ}$ C, under repressing or inducing conditions. (B) WT, *niiA::ypkA*, *niiA::ypkA pilA* Δ , *niiA::ypkA annce102* Δ and *niiA::ypkA pilA* Δ *annce102* Δ cells grown in MM for 12 h at 25 $^{\circ}$ C, under repressing or inducing conditions. Strains remain at 25 $^{\circ}$ C or shifted at 42 $^{\circ}$ C for additional 7 h, as indicated. ROS were determined and quantified as in Fig. 7A. (C) 5 μ l of 10^5 conidia of WT, *basA1*, *basA1 pilA* Δ , *basA1 annce102* Δ , *basA1 pilA* Δ *annce102* Δ cells spotted on MM and grown for 48 h at 25 or 42 $^{\circ}$ C, (D) 5 μ l of 10^7 /ml conidia of WT, *pilA* Δ , *annce102* Δ and *pilA* Δ *annce102* Δ cells spotted on MM and grown for 36–48 h in the presence of 40 μ g/ml myriocin or 1 μ g/ml of AbA at 25, 37 and 42 $^{\circ}$ C.

cells displayed normal punctate localization of Lsp1-GFP and Sur7-GFP and showed decreased virulence by forming abnormal hyphae in mice³⁶.

In this study, we present evidence that PilA and Nce102 are the main eisosomal organizers of *A. nidulans*. In particular, we showed that AnNce102 colocalizes with PilA at the PM and its temporal and spatial distribution resembles that of the SurG eisosomal protein. In addition, we observed that deletion of *pilA* has enormous impact on the stability of AnNce102 and SurG in germlings, where both proteins localized exclusively in vacuoles and endosomes. Despite the fact that increased endocytosis and enhanced direct vacuolar sorting of SurG and AnNce102 could both rationalize the data presented herein, we favor the hypothesis that the absence of PilA, which is mostly found at the plasma membrane, most probably destabilizes the otherwise stable foci of AnNce102 (and SurG) rather than it affects their intracellular trafficking. This is consistent with the proposed role of eisosomes in protecting Can1 from endocytosis in yeast⁸, which is however currently under debate⁶.

On the other hand, deletion of AnNce102 affects the older PilA/SurG eisosomal pool, resulting in fewer foci only in the head of germlings and without affecting eisosomes along hyphae. This phenotype resembles myriocin treatment and, similarly to *S. cerevisiae*¹⁰, can be overcome by overexpression of AnNce102. The above results suggest that two different populations of PilA foci exist in *A. nidulans* germlings; one at the head of the germlings that requires AnNce102 for proper organization and is sensitive to sphingolipid levels and another in the hyphae that does not respond to the above and possibly has different function and composition. Interestingly, deletion of *annce102* or *pilA* affects each other topology/foci number mostly in growing germlings. This temporal regulation could be related to the potential role(s) of eisosomes in sphingolipid and/or PI(4,5)P₂ regulation^{1–4} and present study, recruitment of signaling molecules⁵ and the greater need of membrane biogenesis and compartmentalization in actively growing and not quiescent cells. Furthermore, overexpression of AnNce102 in *A. nidulans* led to ectopic localization of PilA foci into septa, a result that further confirms the crucial role of AnNce102 concerning eisosome organization, also suggesting a functional role of eisosomes related to septation. Consistent with this, deletion of *sur7* in *C. albicans* resulted in ectopic localization of the cdc12 septin from the bud neck³⁹.

In *S. cerevisiae* Pil1 down-regulates the Ypk1 pathway¹⁴ and Nce102 has been implicated as a sensor for sphingolipid abundance and a negative regulator of pkh1 activity¹⁰. Our data support a subtle role for AnNce102 and PilA in the regulation of sphingolipid biosynthesis in *A. nidulans*. Indeed, we herein show that deletion of either *pilA* or *annce102* can partially suppress genetic (*basA1* and *niiA::ypkA*) or pharmacological (myriocin and AbA) inhibition of sphingolipid biosynthesis at high temperatures (Fig. 9). Consistent with this, it has been shown previously that heat shock leads to a transient increase in sphingolipid production and that sphingolipid production is important for heat shock survival^{40,41}. The fact that MIC measurements did not display significant differences, suggests a minor role of PilA and AnNce102 proteins in the regulation of sphingolipid metabolism (Fig. S4). An intriguing alternative explanation is that the difference observed in agar plates, in which *A. nidulans* colonies differentiate by asexual sporulation, cannot be observed by MIC measurements, which have been done in liquid media only allowing the growth of mycelia. Consistent with the above, the expression of *basA* was shown to increase upon begin of sexual and asexual development and the *basA1*, *barA* and *lagA* mutants have been shown to negatively affect the asexual/sexual ratio of sporulation in *A. nidulans*²⁹, strongly indicating that asexual sporulation requires increased levels of sphingolipid biosynthesis. In light of the above, our results presented in Fig. 9 can be rationalized by developmental stage-specific genetic interaction of eisosomes and the sphingolipid biosynthesis pathway. In support of this, deletion of *ypkA* is known to result in very slow-growing, non-sporulating cells, while the defective growth of a *niiA::ypkA* strain in repressing conditions can be overcome by PHS supply³⁴ suggesting that YpkA, possible through the regulation of sphingolipid metabolism, indeed participates in asexual sporulation.

Another important aspect related to Nce102 is its implication with oxidative stress²⁷. Reactive oxygen species (ROS) are versatile molecular species and radicals that are poised at the core of a sophisticated network of signaling pathways and act as core regulators of cell physiology and cellular responses to environment⁴². ROS also help to monitor/modulate cellular processes that range from different cell fates⁴³ to apoptosis⁴⁴, from regulation of Apical Dominance⁴⁵ to actin polarization⁴⁶, suggesting that a kind of ‘ROS rheostat’ exists in cells. It is also known that oxidants can influence regulatory proteins to modulate sphingolipid metabolism and also appear to serve as upstream/downstream messengers for sphingolipid signaling^{47–49}. In this study, we observed that, deletion of AnNce102 results in hypersensitivity to H₂O₂. However, treatment of *pilAΔ* and/or *annce102Δ* strains with 2 superoxide generators, had opposing effects on growth, where *pilAΔ*, *annce102Δ* and *pilAΔ annce102Δ* strains were more resistant in the presence of menadione and less resistant to paraquat. These results suggest a mechanism other than superoxide formation being responsible for this discrepancy. Moreover, we demonstrated that pharmacological (using myriocin and AbA) or genetic (using *basA1* mutant) inhibition of sphingolipid synthesis resulted in a significant increase in ROS levels. Interestingly, repression of YpkA (YPK1 homologue) expression resulted also in an increase in ROS, evident after 12 h of repression. The kinetics of this increases correlate well with the decreased radial growth, the delayed conidial germination, a deficiency in polar axis establishment and the intense branching observed after the germination of conidia of the *niiA::ypkA* strain grown under repressing conditions³⁴. Furthermore, we showed that *niiA::ypkA basA1* double mutant strain displayed a synthetic lethal phenotype when grown under

repressing conditions at the non-permissive temperature (42 °C), similar to synthetic lethality phenotype of *barA1 niiA::ypkA* mutants grown in the presence of ammonium at 37 °C³⁴. In addition double mutants show higher ROS levels than single mutants at the same conditions, confirming a previous suggested role of YpkA kinase in sphingolipid biosynthesis pathway³⁴ and suggesting an important role of YpkA and sphingolipids in redox homeostasis. Concerning the role of eisosomes/AnNce102 in YpkA/sphingolipid signaling we showed that *pilAΔ* and/or *annce102Δ* strains were partially resistant to pharmacological or genetic reduction of sphingolipid synthesis at high temperatures. Under these conditions, addition of the ROS scavenger N-acetyl cysteine (NAC) effectively concealed any growth differences among mutants, although no statistically significant differences in ROS levels were detected (Supplementary Fig. S5). A possible explanation could be that the ROS produced in these conditions cannot be detected by DCF, used in the present study. Interestingly we found *niiA::ypkA annce102Δ pilAΔ* triple mutant to be more sensitive at 25 °C under repressing conditions, and the only strain that displayed 3 fold more ROS than single or double mutants. Within this context, *nce102Δ* mutants of *C. albicans* were defective in forming hyphae and invading low concentrations of agar, likely due to a defect in actin organization, whereas Ypk1 has been proposed to regulate actin polarization by controlling ROS accumulation⁴⁶. Since repression of YpkA mainly causes deficient polar axis establishment and intense branching³⁴, an intriguing explanation could be that besides the role of PilA/AnNce102 in sphingolipid signaling, these proteins are likely to be involved in the regulation of cytoskeleton polarization through YpkA and a mechanism that involves ROS.

Previously we have shown that *pilAΔ* mutants, *pilAΔ pilBΔ* double mutants and *surGΔ* mutants displayed resistance to inhibitor of ergosterol synthesis, itraconazole²². In addition, it was recently shown that exogenous addition and/or improper accumulation of LCBs resulted in altered susceptibility to inhibitors of β -1,3-glucan synthesis⁵⁰, echinocandins, in various fungi⁵¹. All these data support the possibility that eisosomal proteins modulate the mode of action of these groups of antifungal drugs by regulating sphingolipid biosynthesis rather than directly regulating β -1,3-glucan synthase as was hypothesized by Edlind and Katiyar⁵², making these proteins ideal candidates for studying sphingolipid signaling, antifungal resistance/susceptibility and their underlying mechanisms.

Methods

The entire *annce102*, *mrvA*, and *mrvB* open reading frames (ORFs) (627 bp [AN7683], 570 bp [AN8278], and 747 bp [AN8422], respectively) were replaced in appropriate strains (see Supplementary Table S1) by the *A. fumigatus*, *riboB* (*Afribo*), *pyrG* (*AfpYrG*) or *pyroA* (*AfpYro*) genes, using the fusion PCR gene replacement method⁵³ and standard molecular cloning techniques. Recipient strains also carried a *nkuAΔ* mutation that results in a dramatically decreased frequency of heterologous integration events into the *A. nidulans* genome⁵⁴. Cassettes containing the *annce102::sgfp* and *annce102::mrfp* fusions, expressed under the control of the endogenous promoter or under the *alcA* (alcohol dehydrogenase gene) promoter, were constructed by joining three different PCR fragments, as previously described⁵³. For the AnNce102-GFP and AnNce102-mRFP fusions, the GFP and mRFP were separated from the ORFs by a quintuple Gly-Ala di-peptide repeat (5GA linker). Cassettes for gene replacement were constructed and amplified using Kapa-HiFi (Kapa Biosystems) DNA polymerase and the primers of Supplementary Table S2. In-locus integration events in all transformants used in this study were confirmed by Southern analysis and PCR (see below).

Conventional PCR screen of the transformants was performed as previously described⁵⁵, with the following modifications. Approximately 10⁵ conidiospores were suspended in 0.2 ml of extraction buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8, 150–200 mg 0.01 mm glass beads), vortexed for 30 sec and incubated for 30 min at 60 °C, with vortexing every 10 min for 30 sec, prior to purification using 0.2 ml of phenol-SEVAG (phenol/chloroform/isoamyl alcohol, 25:24:1). After brief vortexing and centrifugation (12000 rpm, 5 min, 4 °C), the nucleic acids contained in 0.15 ml of supernatant were precipitated by adding equal volume of isopropanol, followed by centrifugation (12000 rpm, 15 min, RT), washed with 70% ethanol and resuspended in 50 ml RNase dH₂O. 1 μ l of each sample was used in 25 μ l PCR reaction using KAPA Taq EXtra HotStart (Nippon Genetics Co., Ltd., Tokyo, Japan).

RNA samples were prepared as previously described²³ RNA was isolated from quiescent conidia (0 h) and germlings (14 h), using the TRI Reagent (GIBCO-BRL) kit according to the instructions of the manufacturer. RNA samples were further purified according to the RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup, in the RNeasy Mini Kit (Qiagen). To avoid contamination with genomic DNA, 10 μ g of each RNA sample were treated and cleaned up with TURBO DNA-freeTM kit (Ambion). The absence of DNA contamination was verified with conventional PCRs using specific-, *surG*, *annce102* and 18S rRNA set of primers and at least 3 μ g of each RNA sample as template, which were amplified for 40 cycles. Primers were designed to cross at least an intron and expected to produce amplicons of 355 bp (*surG* cDNA), 478 bp (*annce102* cDNA), and 280 bp (18S ribosomal RNA gene). The quality of RNA was confirmed in a conventional 2% w/v agarose gel stained with ethidium bromide (Et-Br) (10 μ g/ml). The concentration of each RNA sample was calculated using the nanodrop apparatus (ND-1000 Spectrophotometer) according to the instructions of the manufacturer. Approximately 3 μ g of each RNA sample were used for reverse transcription using the SuperScriptTM II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen), according to the instructions of the manufacturer. For semi-quantitative analysis of transcript levels, cDNA was diluted

10-, 100-, 1000-fold. The number of cycles required to produce detectable difference in band intensity between dilutions (to avoid saturation) was determined with Et-Br staining.

A. nidulans cells were cultured in appropriately supplemented minimal medium (MM) at 25 °C, using 35 mm μ -Slides (Ibidi GmbH, Germany). Cells were imaged by the use of a Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Ltd., Milton Keynes, UK) confocal microscope, with a Leica HCX PL APO CS 63x/1.4 NA oil immersion len. GFP and mRFP were excited with 488 and 531 nm laser lines, respectively. Mature endosomes/vacuoles were stained and visualized with CMAC (7-amino-4-chloromethyl-coumarin) (Molecular Probes) as previously described (Gournas *et al.*, 2010). Septa were stained with calcofluor white (CFW) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as described by (McIntyre *et al.*, 2001).

For most figures, representative images of the equatorial sections and/or volumetric views of confocal stacks are shown. Images were acquired sequentially as Z-series (step size 0.2 μ m) and processed/analyzed using the Fiji/imagej software (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) or the Imaris 7.2.4 (Bitplane AG, Zurich, Switzerland). For colocalization assessment z-stacks were deconvolved using a three-dimensional (3D) blind algorithm [Autoquant X (Media Cybernetics, Silver Spring, MD)]. Colocalization was measured using Imaris software package (Bitplane, Zurich, Switzerland). The threshold of each channel used to quantify colocalization was determined automatically, according to the method of Costes⁵⁶. Colocalization was defined as the overlap of two channels in three dimensions and was calculated by the program automatically. Colocalization was analyzed by using Manders colocalization coefficients (M1 and M2) that describe the colocalization of molecules with respect to an individual channel, and increase from 0 to 1 with rising colocalization and visual inspection of the spatial relations (intensity spatial profile). 2D histograms (plotted pixels of a two-channel image) were obtained using Imaris (Bitplane). Colocalization was represented as new channel (colocalization channel) corresponding to the colocalized voxels. PilA foci in germlings were counted using spot detection tool of the Imaris (Bitplane) software. A minimum diameter of 0.3 μ m and an automatic threshold detection of the software were used, adjusted manually to identify all visible PilA foci.

Time-lapse experiments were conducted at 26 °C. Cells were imaged by the use of Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Ltd., Milton Keynes, UK) confocal microscope with a Leica HCX PL APO CS 63x/1.4 NA oil immersion lens. The images were analyzed with the Imaris software package (Bitplane, Zurich, Switzerland).

Total protein extracts were prepared as previously described^{23,57}, with the following modifications. Approximately 500 mg of liquid N-grounded conidiospores or young mycelia (14 h, 25 °C) were resuspended in 1.5 ml ice-cold precipitation buffer (50 mM Tris-HCl pH 7, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA), supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). TCA was added (1/8 of total V), the suspension was briefly vortexed, followed by centrifugation (15000 g, 10 min, 4 °C). The pellet was washed twice with ice cold acetone, heat-dried and dissolved in 0.5 ml extraction buffer (150 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1% w/v SDS, 1mM EDTA and protease inhibitor cocktail). Protein concentrations were determined by the method of Bradford. In each case 30–50 μ g protein were fractionated on a 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel and electroblotted (Mini Protean Tetra cell, Bio-Rad) onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Macherey-Nagel, Lab Supplies Scientific SA, Hellas) for immunodetection. The membrane was treated with 2% (w/v) non-fat dry milk, and immunodetection was performed using a primary mouse anti-GFP monoclonal antibody (Roche), a mouse anti-actin monoclonal (C4) antibody (MP Biomedicals Europe, Lab Supplies Scientific SA, Hellas) and a secondary rabbit anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody (Cell Signaling). Blots were developed by the chemiluminescent method using the LumiSensor Chemiluminescent HRP Substrate kit (GenScript USA Inc, Lab Supplies Scientific SA), an enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Bioscience) and SuperRX Fuji medical X-Ray films (FujiFILM Europe, Lab Supplies Scientific SA, Hellas).

Myriocin and Aureobasidin A susceptibility assays. The susceptibility assays were performed by measuring the MIC of each molecule in 96-well flat bottom plates, using a slightly modified protocol previously described⁵⁸. Briefly, the assay mixture was prepared by adding 1 volume of conidial suspension (10^5 conidia ml^{-1} in 0.05% Tween 20) to 12 volumes of assay medium (MM+2% glucose or MM+2% glycerol+ethanol). Two-fold dilutions of each drug were prepared with this assay mixture. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, the culture medium was removed from each well and the biofilms were washed three times with Milli-Q water. 130 ml of 0.01% (w/v) crystal violet solution (Sigma Aldrich) was added to each well for 20 min at room temperature. The solution was then removed and the biofilms were washed until the supernatant was clear. The plates were air-dried and the absorbance at 560 nm was measured in a Tecan Infinite M-1000 PRO plate reader (Tecan Systems Inc., San Jose, CA).

References

- Bagnat, M. & Simons, K. Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.* **383**, 1475–1480 (2002).
- Lingwood, D. & Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Sci. January 1 2010* **327**, 46–50 (2010).
- Spira, F. *et al.* Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat. Cell Biol.* **14**, 640–648 (2012).
- Douglas, L. M. & Konopka, J. B. Fungal Membrane Organization: The Eisosome Concept. *Annu. Rev. Microbiol.* **68**, 140626173329002 (2014).

5. Malínská, K., Malínský, J., Opekarová, M. & Tanner, W. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4427–4436 (2003).
6. Brach, T., Specht, T. & Kaksonen, M. Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J. Cell Sci.* **124**, 328–337 (2011).
7. Grossmann, G., Opekarová, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I. & Tanner, W. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J.* **26**, 1–8 (2006).
8. Grossmann, G. *et al.* Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* **183**, 1075–1088 (2008).
9. Young, M. E. *et al.* The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol. Cell Biol.* **22**, 927–934 (2002).
10. Frohlich, F. *et al.* A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *J. Cell Biol.* **185**, 1227–1242 (2009).
11. Ziólkowska, N. E., Christiano, R. & Walther, T. C. Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol.* **22**, 151–158 (2012).
12. Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O. N. & Dickson, R. C. The Sphingolipid Long-chain Base-Pkh1/2-Ypk1/2 Signaling Pathway Regulates Eisosome Assembly and Turnover. *J. Biol. Chem.* **283**, 10433–10444 (2008).
13. Walther, T. C. *et al.* Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**, 998–1003 (2006).
14. Zhang, X. Pil1p and Lsp1p Negatively Regulate the 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-like Kinase Pkh1p and Downstream Signaling Pathways Pkc1p and Ypk1p. *J. Biol. Chem.* **279**, 22030–22038 (2004).
15. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139–150 (2008).
16. Kajiwar, K. *et al.* Perturbation of sphingolipid metabolism induces endoplasmic reticulum stress-mediated mitochondrial apoptosis in budding yeast: Sphingolipids regulate ER stress-mediated yeast apoptosis. *Mol. Microbiol.* **86**, 1246–1261 (2012).
17. Berchtold, D. *et al.* Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nat. Cell Biol.* **14**, 542–547 (2012).
18. Niles, B. J. & Powers, T. Plasma membrane proteins Slm1 and Slm2 mediate activation of the AGC kinase Ypk1 by TORC2 and sphingolipids in *S. cerevisiae*. *Cell Cycle* **11**, 3745–3749 (2012).
19. Roelants, F. M., Breslow, D. K., Muir, A., Weissman, J. S. & Thorner, J. Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19222–19227 (2011).
20. Sun, Y. *et al.* Orm protein phosphoregulation mediates transient sphingolipid biosynthesis response to heat stress via the Pkh-Ypk and Cdc55-PP2A pathways. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2388–2398 (2012).
21. Muir, A., Ramachandran, S., Roelants, F. M., Timmons, G. & Thorner, J. TORC2-dependent protein kinase Ypk1 phosphorylates ceramide synthase to stimulate synthesis of complex sphingolipids. *eLife* **3**, e03779 (2014).
22. Vangelatos, I. *et al.* Eisosome Organization in the Filamentous Ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **9**, 1441–1454 (2010).
23. Athanasopoulos, A., Boleti, H., Scazzocchio, C. & Sophianopoulou, V. Eisosome distribution and localization in the meiotic progeny of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **53**, 84–96 (2013).
24. Erpapazoglou, Z., Kafasla, P. & Sophianopoulou, V. The product of the SHR3 orthologue of *Aspergillus nidulans* has restricted range of amino acid transporter targets. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 222–233 (2006).
25. Heidler, S. A. & Radding, J. A. The AUR1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* encodes dominant resistance to the antifungal agent aureobasidin A (LY295337). *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2765–2769 (1995).
26. Felenbok, B., Flippi, M. & Nikolaev, I. Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: A model system for studying gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **69**, 149–204 (2001).
27. Desmyter, L. *et al.* Nonclassical export pathway: overexpression of NCE102 reduces protein and DNA damage and prolongs lifespan in an SGS1 deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology* **8**, 527–535 (2007).
28. Cheng, J., Park, T.-S., Fischl, A. S. & Ye, X. S. Cell Cycle Progression and Cell Polarity Require Sphingolipid Biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6198–6209 (2001).
29. Li, S., Bao, D., Yuen, G., Harris, S. D. & Calvo, A. M. basA Regulates Cell Wall Organization and Asexual/Sexual Sporulation Ratio in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **176**, 243–253 (2007).
30. Cheng, J., Park, T. S., Chio, L. C., Fischl, A. S. & Xiang, S. Y. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* **23**, 163–177 (2003).
31. Liu, K. The Sphingoid Long Chain Base Phytosphingosine Activates AGC-type Protein Kinases in *Saccharomyces cerevisiae* Including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *J. Biol. Chem.* **280**, 22679–22687 (2005).
32. Niles, B. J., Mogri, H., Hill, A., Vlahakis, A. & Powers, T. Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 1536–1541 (2012).
33. Sun, Y. *et al.* Sli2 (Ypk1), a homologue of mammalian protein kinase SGK, is a downstream kinase in the sphingolipid-mediated signaling pathway of yeast. *Mol. Cell Biol.* **20**, 4411–4419 (2000).
34. Colabardini, A. C., Brown, N. A., Savoldi, M., Goldman, M. H. S. & Goldman, G. H. Functional Characterization of *Aspergillus nidulans* ypkA, a Homologue of the Mammalian Kinase SGK. *PLoS ONE* **8**, e57630 (2013).
35. Lamarre, C., LeMay, J.-D., Deslauriers, N. & Bourbonnais, Y. *Candida albicans* Expresses an Unusual Cytoplasmic Manganese-containing Superoxide Dismutase (SOD3 Gene Product) upon the Entry and during the Stationary Phase. *J. Biol. Chem.* **276**, 43784–43791 (2001).
36. Douglas, L. M., Wang, H. X. & Konopka, J. B. The MARVEL Domain Protein Nce102 Regulates Actin Organization and Invasive Growth of *Candida albicans*. *mBio* **4**, e00723–13–e00723–13 (2013).
37. Khalaj, V., Azizi, M., Enayati, S., Khorasanizadeh, D. & Ardakani, E. M. NCE102 homologue in *Aspergillus fumigatus* is required for normal sporulation, not hyphal growth or pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **329**, 138–145 (2012).
38. Seger, S., Rischatsch, R. & Philippssen, P. Formation and stability of eisosomes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *J. Cell Sci.* **124**, 1629–1634 (2011).
39. Alvarez, F. J., Douglas, L. M., Rosebrock, A. & Konopka, J. B. The Sur7 protein regulates plasma membrane organization and prevents intracellular cell wall growth in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5214–5225 (2008).
40. Cowart, L. A. Roles for Sphingolipid Biosynthesis in Mediation of Specific Programs of the Heat Stress Response Determined through Gene Expression Profiling. *J. Biol. Chem.* **278**, 30328–30338 (2003).
41. Jenkins, G. M. *et al.* Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 32566–32572 (1997).
42. Bhattacharjee, S. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *J. Bot.* **2012**, e985298 (2012).
43. Maryanovich, M. & Gross, A. A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol.* **23**, 129–134 (2013).

44. Hideg, E. *et al.* Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1154–1164 (2002).
45. Semighini, C. P. & Harris, S. D. Regulation of Apical Dominance in *Aspergillus nidulans* Hyphae by Reactive Oxygen Species. *Genetics* **179**, 1919–1932 (2008).
46. Niles, B. J. & Powers, T. TOR complex 2–Ypk1 signaling regulates actin polarization via reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3962–3972 (2014).
47. Castillo, S. S., Levy, M., Thaikoottathil, J. V. & Goldkorn, T. Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 2680–2686 (2007).
48. Nikolova-Karakashian, M. N. & Reid, M. B. Sphingolipid Metabolism, Oxidant Signaling, and Contractile Function of Skeletal Muscle. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 2501–2517 (2011).
49. Niles, B. J., Joslin, A. C., Fresques, T. & Powers, T. TOR Complex 2–Ypk1 Signaling Maintains Sphingolipid Homeostasis by Sensing and Regulating ROS Accumulation. *Cell Rep.* (2014). doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.040
50. Douglas, C. M. Fungal $\beta(1,3)$ -d-glucan synthesis. *Med. Mycol.* **39**, 55–66 (2001).
51. Healey, K. R., Challa, K. K., Edlind, T. D. & Katiyar, S. K. Sphingolipids mediate differential echinocandin susceptibility in *Candida albicans* and *Aspergillus nidulans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* AAC. 04667–14 (2015). doi: 10.1128/AAC.04667-14
52. Edlind, T. D. & Katiyar, S. K. The echinocandin ‘target’ identified by cross-linking is a homolog of Pil1 and Lsp1, sphingolipid-dependent regulators of cell wall integrity signaling. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4491 (2004).
53. Szewczyk, E. *et al.* Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* **1**, 3111–3120 (2007).
54. Nayak, T. A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557–1566 (2005).
55. Hervas-Aguilar, A., Rodriguez, J. M., Tilburn, J., Arst, H. N. & Penalva, M. A. Evidence for the Direct Involvement of the Proteasome in the Proteolytic Processing of the *Aspergillus nidulans* Zinc Finger Transcription Factor PacC. *J. Biol. Chem.* **282**, 34735–34747 (2007).
56. Costes, S. V. *et al.* Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophys. J.* **86**, 3993–4003 (2004).
57. Gournas, C., Evangelidis, T., Athanasopoulos, A., Mikros, E. & Sophianopoulou, V. The *Aspergillus nidulans* proline permease as a model for understanding the factors determining substrate binding and specificity of fungal amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* jbc. M114.612069 (2015). doi: 10.1074/jbc.M114.612069
58. Briard, B. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Sci. Rep.* (2015) Feb 10;5:8220. doi: 10.1038/srep08220.
59. Amillis, S. *et al.* Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. *Mol. Microbiol.* **52**, 205–216 (2004).

Acknowledgements

We are grateful to Prof. Claudio Scazzocchio for useful discussions. We would like to thank Dr. Dimitris Kletsas and Dr. Joseph Strauss for providing materials.

Author Contributions

A.A. designed, performed the experiments, analyzed and interpreted the data. C.G. and S.A. discussed the results and performed some experiments. V.S. supervised experimental design and data discussions and interpretation. The manuscript was written by A.A. and extensively edited by C.G., S.A. and V.S.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Athanasopoulos, A. *et al.* Characterization of AnNce102 and its role in eisosome stability and sphingolipid biosynthesis. *Sci. Rep.* **5**, 15200; doi: 10.1038/srep15200 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>