



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Εισοσωμικές πρωτεΐνες: μελέτη των σχέσεων
δομής – λειτουργίας στον υφομύκητα *Aspergillus
nidulans***

Παύλος Γεράνιος

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τριμελής Επιβλέπουσα Επιτροπή
Καθηγητής Μιλτιάδης Α. Τύπας
Καθηγήτρια Αμαλία Καραγκούνη – Κύρτσου
Καθηγητής Γεώργιος Διαλλινάς

Επιστημονική Εποπτεία
Δρ. Βίκυ Σοφianoπούλου, Διευθύντρια Ερευνών

Τόπος Διεξαγωγής
Εργαστήριο Γενετικής Μικροοργανισμών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

Αθήνα, 2014

Ευχαριστίες

Τολμώ να πω ότι η παρούσα Διπλωματική Εργασία καθώς η επιλογή μου να παρακολουθήσω το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών της «Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας» αποτέλεσε το σημαντικότερο και καθοριστικό παράγοντα για την μετέπειτα πορεία μου ως βιολόγο ερευνητή. Καθώς, αυτή η εργασία είναι προϊόν συνεργασίας πολλών ατόμων που επένδυσαν χρόνο, χρήμα και πνευματικούς πόρους στο πρόσωπό μου οι ευχαριστίες πέραν ότι είναι απαραίτητες είναι και ολότελα επιθυμητές.

Αρχικώς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Βίκυ Σοφianoπούλου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και δέχτηκε να εκπονήσω την Εργασία στο εργαστήριο της Μοριακής Γενετικής Μικροοργανισμών στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ». Θεωρώ ότι η καθημερινή αλληλεπίδρασή μας με βελτίωσε σημαντικά ως νέο επιστήμονα αλλά και το προσωπικό παράδειγμά της με βοήθησε να βελτιώσω στοιχεία της προσωπικότητάς μου, γενικότερα. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω για την αμέριστη κατανόηση και υπομονή που έδειξε σε δύσκολες περιόδους που υπήρξαν, λόγω προσωπικών λόγων, κατά τη διάρκεια αυτής της Διπλωματικής Εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μιλτιάδη Τύπα, για τη συνεχή υποστήριξή του, τις οξυδερκείς και εύστοχες συμβουλές του που δε σταμάτησε να τις δίνει από τον προπτυχιακό κύκλο σπουδών μου, ακόμη, και το κυριότερο για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή του οποιαδήποτε στιγμή και αν τη χρειάστηκα. Τέλος, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω γιατί είναι πάντα πρόθυμος να μου υπενθυμίζει ότι το πόσο σημαντική είναι η λακωνικότητα του «όσο λιγότερα, τόσο το καλύτερο».

Φυσικά, αυτή η Εργασία θα ήταν αδύνατον να πραγματοποιηθεί αν δεν είχα γίνει δεκτός στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών της «Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας», Διευθύντρια του οποίου είναι η Καθηγήτρια Αμαλία Καραγκούνη- Κύρτσου. Για αυτό το λόγο θα ήθελα να την ευχαριστήσω τόσο για την αποδοχή μου όσο και για τις πολύ σημαντικές διδαχές της κατά τη διάρκεια του Προγράμματος.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γεώργιο Διαλλινά για τη βοήθεια που δεν αρνήθηκε ποτέ τόσο για αυτήν την Εργασία όσο και για προσωπικούς λόγους. Η προσέγγισή του γύρω από τα θέματα της Μοριακής Μικροβιολογίας στο Προπτυχιακό Κύκλο Σπουδών, ήταν ένας από τους λόγους που αποφάσισα να συνεχίσω την ειδίκευσή μου σε αυτό το αντικείμενο της Βιολογίας μέσω του Π.Μ.Σ.

Μαζί και ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Χρήστο Γουρνά, μεταδιδακτορικό ερευνητή, και Αλέξανδρο Αθανασόπουλο, υποψήφιο διδάκτορα, οι οποίοι ήταν συγκλονιστικά βοηθητικοί σε κάθε πρόβλημα που συναντούσα κατά τη διάρκεια αυτής της Εργασίας, χωρίς να

σταματάνε ούτε λεπτό να μου δίνουν κίνητρα να ερευνήσω κάθε τι που πιθανώς να είχε ενδιαφέρον. Το Χρήστο για τα τεράστια αποθέματα υπομονής που έδειξε ανά περιόδους, τις συμβουλές του τόσο εντός όσο και εκτός εργαστηρίου αλλά και την τρομερή του επιμονή να μου μεταβιβάσει όσο μπορούσε τη δίψα του για μάθηση και τη φυσική του περιέργεια για κάθε τι που έχει σχέση με τη Βιολογία. Τον Αλέξανδρο, γιατί από την αρχή με βοήθησε να εγκλιματιστώ στο εργαστήριο και διότι, με τον πάντα διακριτικό τρόπο, ήταν εκεί για να μου δείξει στα σφάλματά μου. Τέλος, γιατί με βοήθησε με τρομερή όρεξη να μάθω όλα τα σημαντικά προγράμματα ανάλυσης εικόνας και τεχνικές γύρω από το μικροσκόπιο, γνώσεις οι οποίες είναι εξαιρετικά σημαντικά προαπαιτούμενα για τη συνέχεια της επιστημονικής μου πορείας. Είμαι ευγνώμων που αυτή η Διπλωματική Εργασία υπήρξε αιτία ώστε να γνωρίσω όχι απλώς δύο καινούργιους συνεργάτες, αλλά να αποκτήσω δύο εξαιρετικούς φίλους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, την Ηλιάννα Ζώη, πτυχιούχο πλέον βιολόγο, η οποία στα πλαίσια της Προπτυχιακής Διπλωματικής της Εργασίας μου τόνιζε πάντα με τις ερωτήσεις της τα δικά μου κενά και με ωθούσε κατά αυτόν τον τρόπο στην κάλυψή τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Σωτήρη Αμίλλη, για τις συζητήσεις που είχαμε και τις συμβουλές του καθώς και για την κατασκευή εντός στελέχους του *A.nidulans* που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της Εργασίας, και Δρ. Στάθη Κατσίφα για όλη τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια του Π.Μ.Σ.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου καθώς και την Παναγιώτα Σταθοπούλου για τη συνεχή υποστήριξή τους σε όλους τους τομείς, χωρίς την οποία δε θα μπορούσε αυτή η Εργασία να ολοκληρωθεί.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ο υφομόκητας <i>Aspergillus nidulans</i>	2
1.1.1 Ταξινόμηση του γένους <i>Aspergillus</i>	2
1.1.2 Βιολογικός κύκλος του <i>Aspergillus nidulans</i>	4
1.1.2.1 Αφυλετικός κύκλος.....	5
1.1.2.2 Φυλετικός κύκλος.....	7
1.1.2.3 Παραφυλετικός.....	9
1.1.3 Ο <i>Aspergillus nidulans</i> ως εργαλείο στη βιολογική έρευνα.....	10
1.2 Η σύσταση της πλασματικής μεμβράνης.....	13
1.2.1 Το ρευστό μωσαϊκό.....	13
1.2.2 Λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης.....	15
1.2.2.1 Φωσφογλυκερίδια.....	16
1.2.2.2 Σφιγγολιπίδια.....	18
1.2.2.3 Στερόλες.....	20
1.2.3 Πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης.....	20
1.3 Οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης.....	21
1.3.1 Λιπιδικές σχεδίες.....	22
1.3.2 Λειτουργικές μικροπεριοχές της μεμβράνης.....	23
1.3.3 Καθορισμός σχήματος της μεμβράνης από πρωτεΐνες.....	25
1.3.4 Παραμόρφωση της μεμβράνης από πρωτεΐνες που περιέχουν τη δομή BAR.....	26
1.4 Οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
1.4.1 Εισοσώματα στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
1.4.1.1 Ο βιολογικός ρόλος των εισοσωμάτων στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
1.4.2 Εισοσώματα στον <i>Aspergillus nidulans</i>	38
Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας.....	42
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	43
2.1 Στελέχη μυκήτων.....	44
2.2 Θρεπτικά υποστρώματα μυκήτων.....	45
2.3 Συντήρηση των στελεχών του <i>A. nidulans</i>	47
2.4 Διασταυρώσεις στελεχών και ανάλυσή τους.....	47
2.5 Θρεπτικά υποστρώματα βακτηρίων.....	48
2.6 Προετοιμασία δεκτικών βακτηρίων για μετασχηματισμό.....	48
2.7 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i>	49
2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα.....	49
2.9 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το μύκητα <i>A. nidulans</i>	50
2.10 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες - Κλωνοποίηση.....	51
2.11 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	52
2.11.1 Εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	52
2.11.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του τμήματος DNA που αντιστοιχεί στον υποκινητή <i>alcA^P</i>	53
2.11.3 Κατευθυνόμενη <i>in vitro</i> PCR μεταλλαξιγένεση.....	53
2.11.3.1 Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή στοχευμένων μεταλλαγών.....	54
2.11.3.2 Σύσταση της αντίδρασης PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης.....	55
2.12 Γενετικός μετασχηματισμός στελεχών του <i>A. nidulans</i>	56
2.13 Ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA του <i>A. nidulans</i>	58
2.13.1 Πέψη του γονιδιωματικού DNA και διαχωρισμός των ζωνών σε πήκτωμα αгарόζης.....	58
2.13.2 Μεταφορά του DNA σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη nylon.....	59
2.13.3 Προϋβριδισμός - Κατασκευή ραδιοσημασμένου ανιχνευτή με 32P-[adCTP]-Υβριδισμός.....	60
2.13.4 Εκπλύσεις της μεμβράνης - Εμφάνιση.....	61
2.14 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών.....	62
2.14.1 Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών (Pantazopoulou <i>et al.</i> , 2007).....	62
2.14.2 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών (Galan <i>et al.</i> , 1996).....	63
2.14.3 Απομόνωση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Mingot <i>et al.</i> , 2000).....	64
2.14.4 Καθορισμός της ικανότητας εκχύλισης της PilA από τις λιπιδικές μεμβράνες με χρήση Triton-X100.....	64

2.14.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford	65
2.14.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με SDS (SDS-PAGE)	65
2.14.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (native-PAGE)	66
2.14.8 Χρώση με διάλυμα χρωστικής Coomassie-blue.....	67
2.14.9 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF	67
2.14.10 Χρώση των δεσμευμένων σε μεμβράνη PVDF πρωτεϊνών με Ponceau S.	67
2.14.11 Ανοσοαποτύπωμα και Χημειοφθορισμός	68
2.15 Μικροσκοπία επιφθορισμού και συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM).....	69
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
3.1 Βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεΐνης Pila.....	71
3.1.1. Η Pila είναι πρωτεΐνη με μοτίβο BAR	71
3.1.2 Διερεύνηση αμινοξικών καταλοίπων που σταθεροποιούν το διμερές της Pila	72
3.1.3 Στην κυρτή επιφάνεια της Pila εντοπίζονται θετικά φορτισμένα αμινοξέα	74
3.2 Κλωνοποίηση της κασέτας <i>pilA::gfp::AfpYrG</i> σε πλασμιδιακό φορέα	75
3.3 Κλωνοποίηση του υποκινητή <i>alca^P</i> ανωφερικά της κασέτας <i>pilA::gfp::AfpYrG</i>	76
3.4 Επιλογή μετασχηματισμένων στελεχών του <i>A. nidulans</i> που φέρουν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της πρωτεΐνης Pila	77
3.5 Υποκαταστάσεις της Leu87 επηρεάζουν την κατανομή της Pila	80
3.5.2 Η Leu87 – Διμερισμός της Pila	82
3.6 Οι υποκαταστάσεις K147N K149E, K149E, K156E, K160E, R166E οδηγούν σε μη φυσιολογική στικτή κατανομή της Pila.....	83
3.7 Απαλοιφή του γονιδίου <i>Annce102</i> επηρεάζει τον αριθμό των στικτών σχηματισμών των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της Pila.....	87
3.8 Επίδραση των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της Pila στην τοπολογία της PilB.....	88
3.9 Η μυρισίνη δεν επηρεάζει την κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της Pila	90
3.10 Η μεταγραφική υπερέκφραση του γονιδίου <i>pilA</i> οδηγεί στη συγκρότηση μεγάλων, πολυάριθμων κηλίδων Pila στη μεμβράνη.....	91
3.11 Η αλληλεπίδραση της Pila με τη μεμβράνη	94
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	95
4.1 Η σημασία της Leu87 στον διμερισμό της Pila.....	96
4.2 Τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys147, Lys 149, Lys 156, Lys 160 και Arg166 είναι σημαντικά για την αλληλεπίδραση της Pila με τη μεμβράνη	97
4.3 Η απώλεια λειτουργίας της <i>AnNce102</i> δεν οδηγεί σε απώλεια της τοπολογίας της Pila αλλά μειώνει τον αριθμό των στικτών σχηματισμών της σε νεαρές υφές	98
4.4 Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της Pila επηρεάζουν την τοπολογία της PilB.....	99
4.5 Χρήση του υποκινητή <i>alca^P</i> ως εργαλείο για τη μελέτη του βιολογικού ρόλου της Pila	100
4.6 Η συσχέτιση των εισοσωμικών πρωτεϊνών με τη μεμβράνη	102
4.7 Γενικές μελλοντικές προοπτικές.....	103
4.8 Γενικά Συμπεράσματα.....	105
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	119

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα συστατικά της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων δεν είναι τυχαία κατανεμημένα σε αυτήν, αντιθέτως διαμερισματοποιούνται σε συγκεκριμένες περιοχές της. Τα τρία κυρίως μελετημένα μεμβρανικά διαμερίσματα στο ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* είναι: το μεμβρανικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει τη Can1 (Membrane Compartment of Can1, MCC), το μεμβρανικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει την Pma1 (Membrane Compartment of Pma1, MCC) και το μεμβρανικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα TORC2 (Membrane Compartment of TORC2, MCT). Η σωστή διαμερισματοποίηση των συστατικών πρωτεϊνών του MCC εξαρτάται από την ύπαρξη ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος, του εισοσώματος. Κύρια πρωτεΐνη οργανωτής των εισοσωμάτων στο *S. cerevisiae* είναι η πρωτεΐνη Pil1, η οποία αποτελείται από την αυτόνομη δομική περιοχή ημισεληνοειδούς σχήματος BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs). Οι πρωτεΐνες με την περιοχή BAR είναι ομοδιμερή και σημαντικές για τη σταθεροποίηση και διατήρηση της κάμψης της μεμβράνης, και σχετίζονται με διάφορες λειτουργίες του κυττάρου όπως η διαδικασία ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης.

Ομόλογη πρωτεΐνη της εισοσωμικής Pil1 στον υφομύκητα *Aspergillus nidulans*, είναι η PilA. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις συγκεκριμένων αμινοξικών υποκαταστάσεων στη δομική περιοχή BAR στη λειτουργικότητα του μορίου της PilA σε στελέχη του *A. nidulans*. Ως δείκτες για τη φυσιολογική λειτουργικότητα της PilA χρησιμοποιήθηκαν οι εισοσωμικές πρωτεΐνες AnNce102 και PilB. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής BAR είναι σημαντικά για το φυσιολογικό διμερισμό του μορίου, και για την αλληλεπίδρασή του με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου.

SUMMARY

The plasma membrane components are not randomly distributed across the membrane, however they are compartmentalized in specific domains. The three better studied membrane compartment in the yeast fungus *Saccharomyces cerevisiae* are: the Membrane Compartment of Can1 (MCC), the Membrane Compartment of Pma1 (MCP) and the Membrane Compartment of TORC2 (MCT). The normal compartmentalization of the consisting proteins of MCC is dependent on the presence of a multi-protein complex, the eisosome. The main organizer of eisosomes in *S. cerevisiae* is the Pil1 protein, which consists of the semi-crescent BAR domain (Bin/Ampiphyphin/Rvs). BAR domain proteins are homodimers and are important for the stabilization and maintenance of membrane curvature, while they are related to several cell functions such as clathrin-mediated endocytosis.

The homologue protein to Pil1 in the hyphomycete *Aspergillus nidulans* is PilA. In this study, the impact of specific amino-acid residue substitutions in the BAR domain on the protein's functionality were examined. The protein markers used to determine the functionality of PilA were the eisosomal proteins *AnNce102* and PilB. Our results show that specific amino-acid residues of the BAR domain are important for the normal dimerization of the protein, and for its interaction with the plasma membrane of the cell.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο υφομόκητας *Aspergillus nidulans*

1.1.1. Ταξινόμική του γένους *Aspergillus*

Το γένος *Aspergillus* αποτελείται από περίπου 250 είδη, τα οποία έχει επικρατήσει να αποκαλούνται Ασπερίλλοι. Ο παραπάνω αριθμός πιθανώς είναι μικρότερος από την πραγματικότητα, λόγω αντικρουόμενων αναφορών πάνω στον πραγματικό αριθμό των αποδεχόμενων ειδών, γεγονός που οφείλεται στην περίπλοκη κατανομή του γένους (Peterson, 2008).

Πίνακας 1.1 Συστηματική κατάταξη του *Aspergillus nidulans*

Συστηματική κατάταξη	
Βασίλειο	Fungi
Διαίρεση	Ascomycota
Υποδιαίρεση	Pezizomycotina
Κλάση	Pezizomycetes
Οικογένεια	Trichocomaceae
Γένος	<i>Emericella</i>

Το γένος *Aspergillus* κατατάσσεται φυλογενετικά στην Τάξη των Eurotiales (Eurotiomycetidae/ Eurotiomycetes/ Pezizomycotina/ Ascomycetes) που περιέχει μύκητες με ευρύ ενζυμικό μεταβολικό ρεπερτόριο, συχνά πλούσιο και σε μεμονωμένα είδη. Από αυτούς, μέλη της οικογένειας *Trichocomaceae* παρουσιάζουν ευρεία εξάπλωση. Έτσι πολλοί έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή αντιβιοτικών (*Penicillium chrysogenum* για την παρασκευή πενικιλίνης), στη βιομηχανία τροφίμων (*Penicillium roqueforti* και *P. camamberti* για την παραγωγή τυριών, *Aspergillus oryzae* για την παραγωγή του ποτού sake και προϊόντων σόγιας), και στην παραγωγή οργανικών κιτρικών και γλουκονικών οξέων με παράδειγμα το είδος *A. niger* (Alexopoulos *et al.*, 1996). Σημαντική είναι η χρήση πολλών ασκομυκήτων στην έρευνα. Οι λόγοι της μελέτης τους ποικίλουν, αφού κάποιοι μελετώνται λόγω της σύνθεσης τοξινών (όπως των αφλατοξινών από τον *A. flavus* και των νευροτοξινών από τον *A. parasiticus*), άλλοι λόγω της μολυσματικής τους ικανότητας (όπως της ασπερίλλωσης από τους *A. niger* και *A. fumigatus* σε άτομα με ανοσολογική καταστολή (Kirk *et al.*, 2001), ενώ άλλοι έχουν εγκαθιδρυθεί ως πρότυπα συστήματα-μοντέλα καθώς διαθέτουν καλά-χαρακτηρισμένα συμβατικά γενετικά συστήματα και ευκολία εργαστηριακού χειρισμού (*A. nidulans*, *Neurospora crassa*)

Η υποδιαίρεση Pezizomycotina περιέχει τους ασκομύκητες που αυξάνονται μέσω παραγωγής υφών. Ταξινόμικό χαρακτηριστικό τους αποτελεί η ύπαρξη των σπορίων του φυλετικού κύκλου (ασκοσπόρια) τα οποία εντοπίζονται σε ένα εκ των τεσσάρων ειδικών δομών (ασκοκάρπια): κλειστοθήκια, περιθήκια, αποθήκια και

ψευδοθήκια. Αυτές οι δομές διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος, σχήμα, τον τύπο και την οργάνωση των ασκών (το σποριάγγειο που εσωκλείει τα προϊόντα της μείωσης, Rögeller *et al.*, 2006). Το ασκοκάρπιο των μελών του γένους *Aspergillus*, κατά το φυλετικό κύκλο αναπαραγωγής είναι το κλειστοθήκιο, ο μόνος τύπος ασκοκάρπιου που περικλείει πλήρως τους ασκούς και τα ασκοσπόρια.

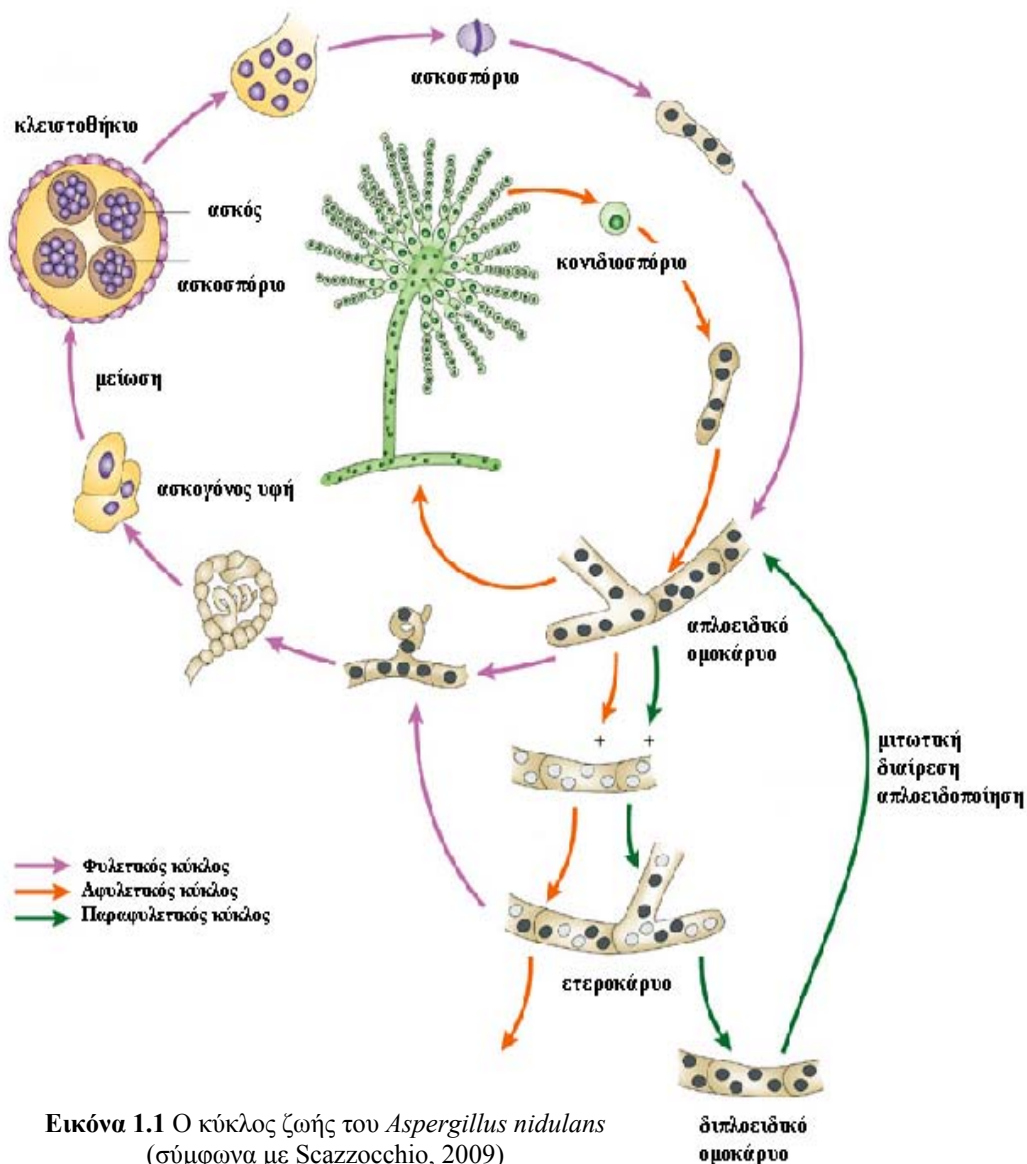
Τα είδη του γένους *Aspergillus* αναγνωρίζονται από την ύπαρξη ενός κοινού μορφολογικού χαρακτηριστικού, της αναπαραγωγικής δομής του αφυλετικού κύκλου. Αυτή απαρτίζεται από τον κονιδιοφορέα, ο οποίος καταλήγει σε μία βολβοειδή περιοχή πάνω στην οποία προσφύονται εξειδικευμένα κύτταρα, τα πρωτογενή στηρίγματα (*metulae*) και τα δευτερογενή στηρίγματα (*phialides*) από τα οποία δημιουργούνται μέσω μίτωσης αλυσίδες κονιδιοσπορίων (κονίδια). Το όνομα του γένους *Aspergillus* προέρχεται από τον ιερέα και βοτανολόγο Pietro Antonio Micheli που το 1729 περιέγραψε τους κονιδιοφορείς πολλών κοινών μυκήτων (Scazzocchio, 2009). Το σχήμα των αλυσίδων των κονιδιοσπορίων που εκτείνονται ακτινωτά από τον κονιδιοφορέα του θύμισε το *aspergillum*, ένα ειδικό όργανο που χρησιμοποιείται στην Καθολική Εκκλησία για την ρίψη αγιασμού στα κεφάλια των πιστών.

Παρότι ο *A. nidulans* ταξινομείται στο φύλο των Ascomycota με βάση τα προϊόντα της εγγενούς αναπαραγωγής, για τα περισσότερα είδη του γένους *Aspergillus* δεν είναι γνωστός ο φυλετικός κύκλος. Στην πραγματικότητα, το γένος *Aspergillus* περιέχει αναμορφές μυκητών που πλέον είναι συνδεδεμένες με δώδεκα διαφορετικά τελεομορφικά είδη, στα οποία παρατηρείται παραγωγή ασκοσπορίων μέσω της μείωσης (Dyer & O’Gorman, 2011). Για την επίλυση αυτού του προβλήματος, έχει δημιουργηθεί η ομάδα των ατελών μυκήτων (*fungi imperfecti*) ή δευτερομυκήτων, ομάδα χωρίς σαφή φυλογενετικό προσδιορισμό, όπου εντοπίζονται όλοι οι μύκητες για τους οποίους δεν έχει περιγραφεί μέχρι στιγμής εγγενής αναπαραγωγή (Taylor *et al.*, 1999). Κατά την εύρεση του φυλετικού κύκλου μυκήτων που βρίσκονται στην ομάδα των δευτερομυκήτων, αυτοί αποκτούν διαφορετική συστηματική κατάταξη, αλλάζοντας ορισμένες φορές γένος ή ακόμη και φύλο. Κατά αυτόν τον τρόπο, η περιγραφή του εγγενούς κύκλου αναπαραγωγής του *A. nidulans* (αναμορφή, ατελής μορφή) οδήγησε στην κατάταξή του ως *Emericella nidulans* (τελεομορφή). Η μέθοδος αυτή ταξινόμησης έχει τοποθετήσει σε ξεχωριστά γένη, είδη για τα οποία μοριακά και μορφολογικά δεδομένα υποστηρίζουν την στενή τους συγγένεια, όπως οι *A. nidulans* και *A. sydowii*, αλλά και γενικότερα τα είδη του γένους *Aspergillus* (Nierman *et al.*, 2005; Scazzocchio, 2006; Mabey Gilseman *et al.*,

2009). Συνολικά, ο συνδυασμός τελομορφής και αναμορφής είναι γνωστός ως ολομορφή, όπου το τελομορφικό στάδιο προηγείται ταξινομικά, δηλαδή κατά την αναφορά ενός μύκητα οι επιστήμονες είναι υποχρεωμένοι να χρησιμοποιούν τα ονόματα των τελομορφών, εάν αυτές έχουν περιγραφεί. Για το γένος *Aspergillus* κατά τους Raper και Fennell (1965), αυτός ο κανόνας δεν λαμβάνεται υπ' όψιν, επομένως εφεξής σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιείται το όνομα *Aspergillus nidulans*.

1.1.2 Βιολογικός κύκλος του *Aspergillus nidulans*

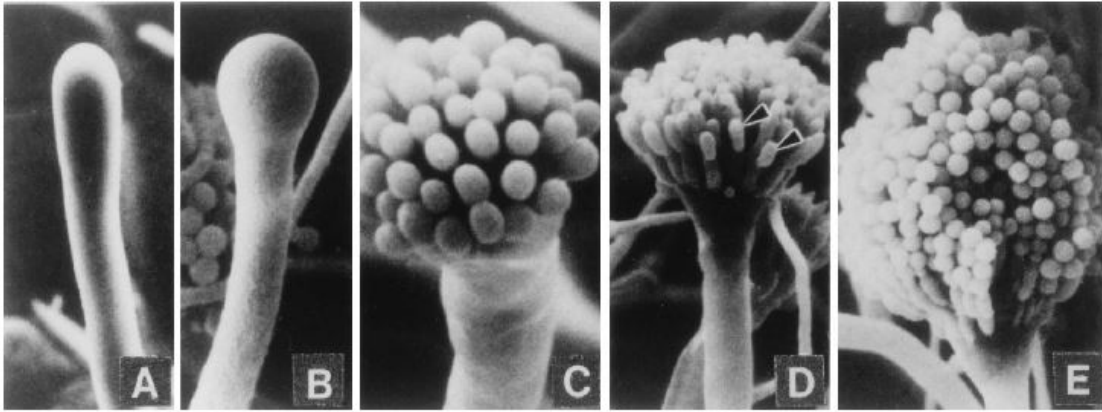
Ο κύκλος ζωής του *A. nidulans* μπορεί να χωριστεί σε τρεις επιμέρους κύκλους: το φυλετικό (εγγενή αναπαραγωγή), τον αφυλετικό (αγενής αναπαραγωγή) και τον παραφυλετικό κύκλο ζωής (Εικόνα 1.1).



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). Έπειτα από επαγωγή από κατάλληλο περιβαλλοντικό ερέθισμα, τα σπόρια εκβλαστάνουν και επεκτείνονται σωληνοειδώς μέσω επάκριας αύξησης. Υπάρχει επίσης διακλαδούμενη αύξηση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πλέγματος πολυκυτταρικών υφών, του μυκηλίου. Στον *A.nidulans*, όπως και στα περισσότερα είδη *Aspergillus* με γνωστές τελεομορφές, το μυκήλιο είναι ομοθαλλικό, δηλαδή αποτελείται από ισοδύναμα κύτταρα. 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 0.5 mm/h στους 37° C (Lee & Adams, 1994), ενώ είναι δυνατή η ανάπτυξη διαφοροποιημένων εγγενών και αγενών αναπαραγωγικών δομών.

1.1.2.1 Αφυλετικός κύκλος

Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, οι πρώτες διαφοροποιημένες υφές είναι ορατές 16 ώρες μετά την εκβλάστηση (Champe & Simon, 1992; Lee & Adams, 1994). Ο χρόνος αυτός δεν είναι σταθερός και εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης και την πυκνότητα βιώσιμων μονάδων (Wu & Miller, 1997). Στο κέντρο της αποικίας εντοπίζονται εναέριες υφές. Χρειάζονται περίπου 6 με 8 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 μετά από 24 ώρες από την εκβλάστηση του αρχικού σπορίου (Champe & Simon, 1992). Η δημιουργία κονιδιοφορέων σε μία αποικία είναι μια σύνθετη διαδικασία η οποία μπορεί να διαχωριστεί σε αρκετά μορφολογικά διακριτά στάδια (Εικόνα 1.2) (Timberlake, 1990). Η διαδικασία ξεκινά 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 τρία βασικά χαρακτηριστικά (Mims *et al.*, 1988; Timberlake, 1990). Αρχικά, ο μίσχος εκφύεται από ένα εξειδικευμένο κύτταρο με παχύ κυτταρικό τοίχωμα το οποίο ονομάζεται ποοδίσκος. Τόσο ο ποοδίσκος 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



Εικόνα 1.2 Μορφολογικά στάδια κατά το σχηματισμό κονιδιοφορέα στον *Aspergillus nidulans*, σε εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (A) Πρώιμος μίσχος κονιδιοφορέα, (B) Σχηματισμός κυστιδίου στην κορυφή του μίσχου, (C) Αναπτυσσόμενες μετούλες, (D) Αναπτυσσόμενες φυαλίδες, (E) Ωριμος κονιδιοφορέας με αλυσίδες κονιδίων (σύμφωνα με Timberlake, 1990)

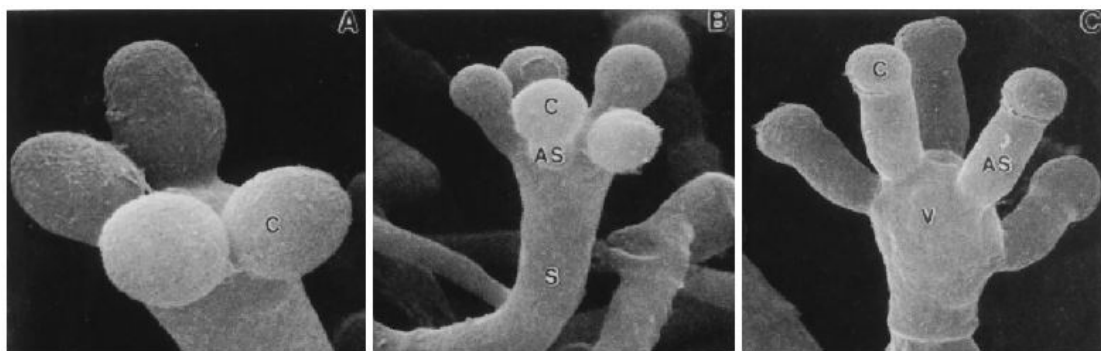
κύτταρα του μυκηλίου, ενώ η εσωτερική στρώση εντοπίζεται αποκλειστικά στο ποδικό κύτταρο και το μίσχο. Επιπρόσθετα, ο μίσχος του κονιδιοφορέα έχει διάμετρο περίπου 4-5 μm σε αντίθεση με τις βλαστικές υφές που έχουν διάμετρο περίπου 2-3 μm . Τέλος σε αντίθεση με τις υφές ο μίσχος σπάνια διακλαδίζεται, ενώ έχει και καθορισμένο ύψος (~100 μm).

Μετά την επάκρια αύξηση του μίσχου, η κορυφή του αρχίζει και διογκώνεται σχηματίζοντας το κυστίδιο του κονιδιοφορέα, διαμέτρου ~10 μm . Τόσο το κυστίδιο με το μίσχο, όσο και ο μίσχος με τον ποδίσκο δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους με κάθετα τοιχώματα (septae, 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 φυαλίδια (phialides). Η εκβλάστηση πραγματοποιείται αντιδιαμετρικά του κυστιδίου. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις έχουν δείξει πως κάθε κυστίδιο φέρει περίπου 60 μετούλες και κάθε μετούλα φέρει 2-3 φυαλίδια. Τα φυαλίδια διαιρούνται μιτωτικά και από αυτά παράγονται αλυσίδες μονοπύρηνων, σφαιρικών κυττάρων, τα κονιδιοσπόρια ή κονίδια. Η διαδικασία της μίτωσης των φυαλιδίων είναι συνεχής με αποτέλεσμα το πιο προσφάτως σχηματιζόμενο κονίδιο να εντοπίζεται δίπλα στο φυαλίδιο ενώ το παλαιότερο να είναι το πιο απομακρυσμένο από αυτό (Εικόνα 1.2). Επειδή κάθε φυαλίδιο μπορεί να δημιουργήσει έως και περίπου 100 κονίδια, υπολογίζεται πώς ο αριθμός των σπορίων που παράγονται από έναν κονιδιοφορέα ξεπερνάει τις 100.000.

Τόσο η αγενής όσο και η εγγενής αναπαραγωγή ρυθμίζονται από το προϊόν του γονιδίου *veA* (Kim *et al.*, 2002). Ο μεταγραφικός παράγοντας VeA αναστέλλει την κονιδιοποίηση και επάγει την εγγενή αναπαραγωγή, λειτουργεί ανασταλτικά, δηλαδή, στην έκφραση ή λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα BrlA, ο οποίος έχει ως στόχους εξειδικευμένα γονίδια σχετιζόμενα για την παραγωγή σπορίων, ενώ ρυθμίζεται από το φως. Η παρουσία κυανού φωτός αποκλείει τον παράγοντα αυτόν από τον πυρήνα, προωθώντας την αφυλετική αναπαραγωγή. Στο σκοτάδι καθίσταται ενεργός και επάγει τη φυλετική αναπαραγωγή. Όλα στελέχη του *A. nidulans* που έχουν χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια αυτής της εργασίας φέρουν μια μεταλλαγή μερικής απώλειας λειτουργίας, την *veA1*, και κατ' επέκταση κονιδιοποιούν στο σκοτάδι. Η μεταλλαγή αυτή έχει το πλεονέκτημα της ταχείας αγενούς αναπαραγωγής σε εργαστηριακές συνθήκες, διότι δεν υπάρχει ανάγκη παρουσίας φωτός.

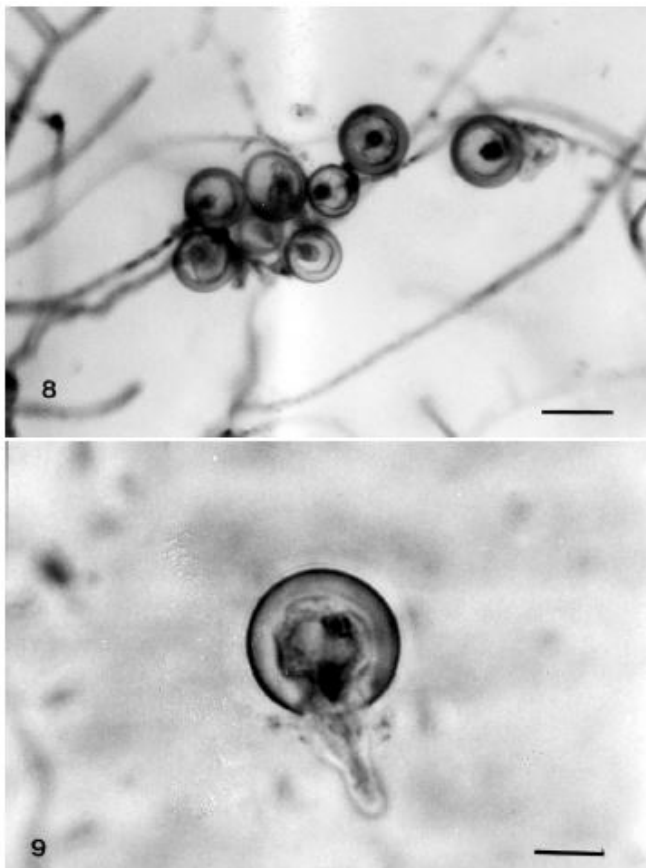
1.1.2.2 Φυλετικός κύκλος

Ο εγγενής ή φυλετικός κύκλος του *A. nidulans* εξαρτάται απόλυτα από τη θερμοκρασία, ενώ φαίνεται να εξαρτάται και από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών στο υπόστρωμα (Wu & Miller, 1997). Επιπλέον έχουν χαρακτηριστεί ουσίες που επιτελούν ρόλο όμοιο με αυτόν των ορμονών στα θηλαστικά, και φαίνεται να ελέγχουν τον εγγενή κύκλο. Στον *A. nidulans* μέχρι στιγμής δεν έχουν περιγραφεί εξειδικευμένα φυλετικά όργανα, και το πρώτο ορατό στοιχείο του φυλετικού κύκλου είναι η ύπαρξη κλειστοθηκίων στο κέντρο μιας αποικίας. Το πρωταρχικό γεγονός της φυλετικής αναπαραγωγής είναι η αναστόμωση των μυκηλιακών υφών δύο στελεχών και η επακόλουθη ανάμιξη κυτταροπλασματικού υλικού και πυρήνων. Από τα



Εικόνα 1.3 Κονιδιοφορείς στελεχών με μεταλλαγή στο γονίδιο *stuA*. (A) Κονίδια [C] τα οποία εκβλαστάνουν από το κυστίδιο [V] του μίσχου ή (B)+(C) από μη φυσιολογικά στηρίγματα [AS] (σύμφωνα με Aguirre, 1993)

ετεροκάρυα, μυκήλια τα οποία διαθέτουν διαφορετικών ειδών πυρήνες, ορισμένα τμήματα διαφοροποιούνται σε ασκογόνες υφές. Οι ασκογόνες υφές, οι οποίες θα δώσουν γένεση στους ασκούς, περικλείονται σε κλειστά καρποφόρα σωματίδια που ονομάζονται κλειστοθήκια, τα τοιχώματα των οποίων αποτελούνται από πολλά στρώματα παχιών διακλαδιζόμενων υφών. Τα κλειστοθήκια σχηματίζονται στην περιφέρεια κυττάρου δικαρυωτικής υφής, όπου οι δύο πυρήνες συντήκονται με επακόλουθη μείωση δημιουργώντας τον ασκό, ο οποίος στη συνέχεια λόγω μίτωσης εμπεριέχει οκτώ απλοειδή ασκοσπόρια. Κάθε ώριμο κλειστοθήκιο περιβάλλεται από τα κύτταρα Hülle, των οποίων ως πιθανός ρόλος θεωρείται η θρέψη των κλειστοθηκίων συνολικά (nursing cells) (Swart *et al.*, 2001; Bruggeman *et al.*, 2003) (Εικόνα 1.4). 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



Εικόνα 1.4 Ομάδα ώριμων κυττάρων Hülle, στα οποία διακρίνεται ο μακροπυρήνας. Στην κάτω εικόνα παρατηρείται κύτταρο Hülle κατά την εκβλάστηση όπου διακρίνεται τόσο ο απλός πυρήνας όσο και ο μακροπυρήνας. Μέγεθος κλίμακας = 10 μm (σύμφωνα με Carvalho *et al.*, 2002)

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 ένα 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 οκτώ πυρήνες, καθένας από τους οποίους περικλείεται σε ένα από τα οκτώ 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).

1.1.2.3 Παραφυλετικός κύκλος

Όπως αρκετοί υφομύκητες (ανεξαρτήτως ύπαρξης φυλετικού κύκλου) έτσι και ο *A. nidulans* παρουσιάζει το φαινόμενο του παραφυλετικού κύκλου ανάπτυξης. Σε αυτό, δύο ομοθαλικές υφές από διαφορετικά στελέχη συντήκονται για να δημιουργήσουν ετεροκάρυο, παρόμοια με το φυλετικό κύκλο. Στο ετεροκάρυο, με πολύ χαμηλή συχνότητα, δύο πυρήνες είναι δυνατόν να συντηχθούν για δημιουργία ενός διπλοειδούς πυρήνα. Ο πυρήνας αυτός είναι σταθερός και μπορεί να πολλαπλασιάζεται μιτωτικά μέσω του αγενούς κύκλου αναπαραγωγής. Σε κάποιο ποσοστό, πολύ μικρότερο του μειωτικού, εμφανίζεται μάλιστα και μιτωτικός ανασυνδυασμός μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Ο διπλοειδής πυρήνας είναι δυνατόν να αποσταθεροποιηθεί, φυσικά ή τεχνητά με χρήση χημικών, και να οδηγήσει μετά από μείωση σε κονιδιοσπόρια με $2n+1$ 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).

1.1.3 Ο *Aspergillus nidulans* ως εργαλείο στη βιολογική έρευνα

Ο *A. nidulans* είναι μη παθογόνος ομοθαλλικός υφομύκητας. Αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (15-44 °C), τόσο σε υγρά όσο και στερεά θρεπτικά υποστρώματα. Το μεγάλο εύρος θερμοκρασιών επιτρέπει την απομόνωση θερμοευαίσθητων και θερμοανθεκτικών μεταλλαγών. Η ταχεία ανάπτυξη του μύκητα, όπως επίσης και ο γρήγορος φυλετικός του κύκλος επιτρέπει την ταχεία ανάλυση των απογόνων. Δεδομένου ότι κάθε κλειστοθήκιο περιέχει έως και 100.000 ασκούς, με κάθε ασκό να έχει 8 ασκοσπόρια, η γενετική χαρτογράφηση του οργανισμού είναι εξαιρετικά εύκολη και έχει αποδώσει έναν από τους πιο λεπτομερείς γενετικούς χάρτες οργανισμών. Είναι χαρακτηριστικό πως ο *A. nidulans* χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός ενδογονιδιακών μεταλλαγών που απέχουν μόλις 11 ζεύγη βάσεων μεταξύ τους, με χρήση μειωτικού ανασυνδυασμού και την «ανάλυση τετράδων» (Scazzocchio, 2009). Το σύστημα του Benzer με τον φάγο T4 έχει αποδειχθεί μεγαλύτερης αναλυτικής ικανότητας.

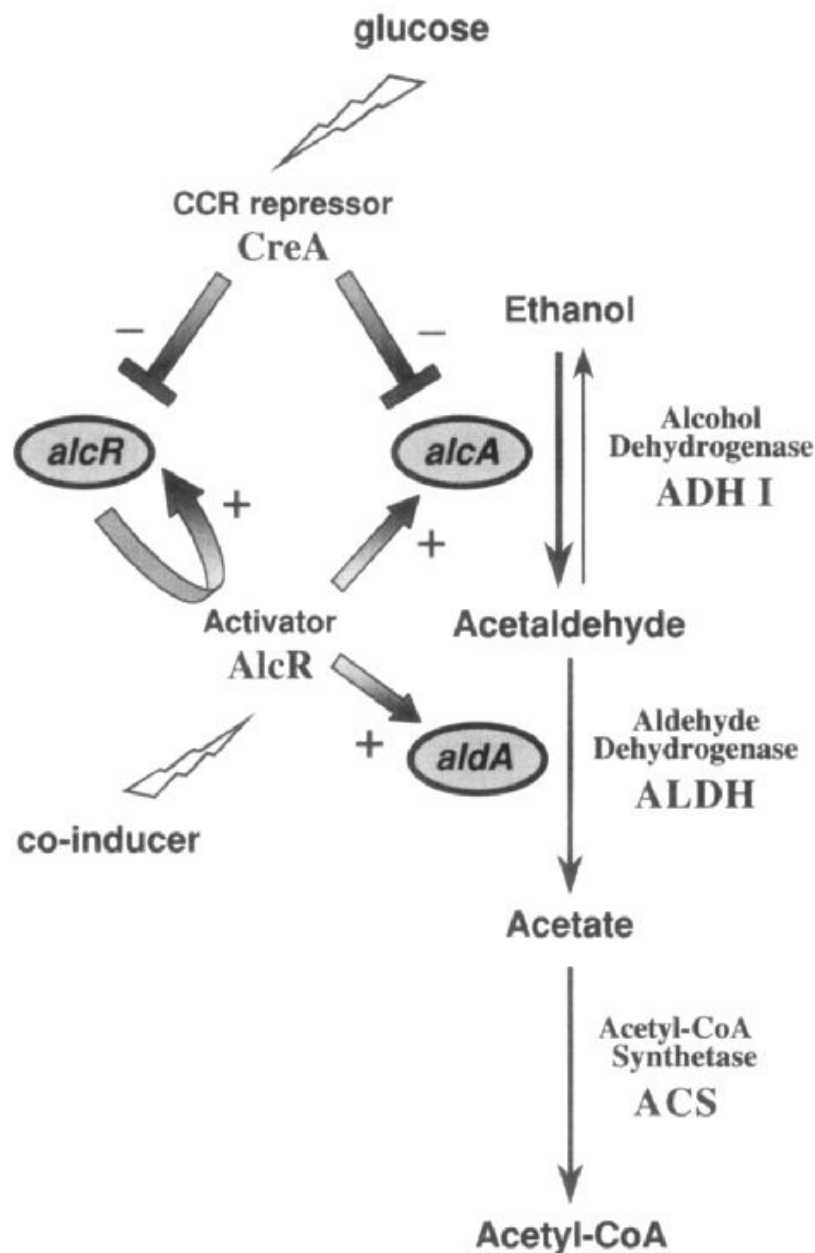
Επίσης η ομοθαλλική και απλοειδής φύση των μυκηλίων επιτρέπει τη σύντηξή τους και δημιουργία σταθερών ετεροκαρύων, ανάμεσα σε οποιαδήποτε σχεδόν στελέχη. Η δημιουργία σταθερών διπλοειδικών κονιδιοσπορίων μέσω του παραφυλετικού κύκλου καθιστά εύκολη τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων δύο ή περισσότερων μεταλλαγών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

Οι παραπάνω λόγοι, αλλά και η ευρεία χρήση του *A. nidulans* είχαν δημιουργήσει μια μεγάλη ποικιλία μεταλλαγών και αυξοτροφιών, οι οποίες με την ανακάλυψη της ικανότητας γενετικού μετασχηματισμού του *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1983) κατέστησαν δυνατή την εφαρμογή μεθόδων αναστροφής γενετικής και την εύκολη κατασκευή δια-ειδικών πλασμιδίων με γονίδια επιλογής για το βακτήριο *Escherichia*

coli και τον *A. nidulans*. Η ικανοποιητική αποδοτικότητα μετασχηματισμού σε συνδυασμό με την ικανότητα «διάσωσης» των πλασμιδίων προσφέρουν την ευελιξία των μοριακών και γενετικών χειρισμών. Επιπλέον, η ανεύρεση αυτόνομα αντιγραφόμενων πλασμιδίων (Gems *et al.*, 1991), που αυξάνουν κατά πολύ την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού, διευκόλυνε πολύ την κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών, ακόμη και χωρίς την ανάγκη κλωνοποίησης σε *E. coli*. Πολύ πρόσφατα, και μετά τη δημοσίευση της πλήρους αλληλουχίας του γονιδιώματος του *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005), έχει αναπτυχθεί μια σειρά από τεχνικές που επιτρέπει την εύκολη απαλοιφή και αντικατάσταση γονιδίων ή τη σήμανση των προϊόντων τους με μια ποικιλία επιτόπων. Πιο συγκεκριμένα, έχουν κατασκευασθεί στελέχη που φέρουν έλλειψη του γονιδίου της NkuA DNA ελικάσης (Nayak *et al.*, 2006), υπεύθυνης για γεγονότα ετερόλογου ανασυνδυασμού. Στα στελέχη με απαλοιφή του γονιδίου *nkuA*, ο μετασχηματισμός με DNA δίνει γένεση σε απογόνους που έχουν προέλθει σχεδόν αποκλειστικά από γεγονότα ομόλογου ανασυνδυασμού. Κατά αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η στοχευόμενη ενσωμάτωση πλασμιδιακού DNA στο γονιδίωμα του μύκητα, και οι κάθε είδους γονδιακές αντικαταστάσεις ή σημάνσεις πρωτεϊνών με επιτόπους στο γονιδιωματικό τους τόπο (Szewczyk *et al.*, 2006). Μεγάλη συμβολή σε αυτό είχε η ανάπτυξη νέων PCR τεχνικών για τη σύζευξη διαφορετικών DNA τμημάτων χωρίς τη διαμεσολάβηση κυττάρων (fusion-PCR) και την ανάγκη περιοριστικών ενδονουκλεασών (Yu *et al.*, 2004), καθώς και η κατασκευή του συστήματος *cre/lox* (Forment *et al.*, 2006), η οποία επιτρέπει την ανακύκλωση του γονιδίου επιλογής του μετασχηματισμού. Με τη χρήση των ανωτέρω εργαλείων έγινε πολύ ευκολότερος ο χαρακτηρισμός απαραίτητων γονιδίων, μιας και απαλοιφή τους οδηγεί μόνο σε βιώσιμα ετεροκάρυα (Osmani *et al.*, 2006).

Επιπρόσθετα, η πολική ανάπτυξη των υφών και η εκβλάστηση των κονιδιοσπορίων του *A. nidulans* έχουν συμβάλει στην εκτενή μελέτη των φαινομένων της εγκαθίδρυσης πολικότητας, της επάκριας αύξησης και της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (Scazzocchio, 2009). Ο *A. nidulans*, λόγω της ικανότητας χρήσης πολλών διαφορετικών ουσιών ως μοναδικών πηγών άνθρακα ή/και αζώτου, έχει χρησιμοποιηθεί ως σύστημα-μοντέλο για το χαρακτηρισμό ενζύμων και μεταφορέων που εμπλέκονται σε αντίστοιχα μεταβολικά μονοπάτια, όπως επίσης και για τη μελέτη των ρυθμιστικών συστημάτων γονδιακής έκφρασης.

Ένα εκτενώς μελετημένο ρυθμιστικό σύστημα γονιδιακής έκφρασης, το οποίο εξαρτάται από την πηγή άνθρακα του θρεπτικού μέσου είναι αυτό του καταβολισμού της αιθανόλης. Κύριος μεταγραφικός επαγωγέας του μονοπατιού είναι ο παράγοντας AlcR (Lockington *et al.*, 1987), ο οποίος επάγει τα αντίστοιχα γονίδια έπειτα από ενεργοποίηση από ακεταλδεύδη. Ο AlcR, παρουσία γλυκόζης (προτιμώμενης πλούσιας πηγής άνθρακα) στο θρεπτικό μέσο, βρίσκεται σε αναστολή από το γενικό μεταγραφικό αρνητικό ρυθμιστή CreA (Dowzer & Kelly, 1989), ο οποίος προσδένεται στις αλληλουχίες στόχους (Panozzo *et al.*, 1998) των γονιδίων *alcR* και *alcA* (γονίδιο της αλκοολικής αφυδρογονάσης, ADH I) και δεν επιτρέπει τη



Εικόνα 1.5 Η ρύθμιση του μονοπατιού καταβολισμού αιθανόλης στον *A. nidulans*. Λεπτομέρειες στο κείμενο (σύμφωνα με Felenbok *et al.*, 2001)

μεταγραφή τους, επομένως τα γονίδια-στόχοι του AlcR, δεν μεταγράφονται. Παρουσία «ουδέτερης» πηγής άνθρακα, όπως η φρουκτόζη, και παρουσία του συνεπαγωγέα (ακεταλδεϋδης) ο CreA δεν δεσμεύεται στις αλληλουχίες στόχους, ενώ το γονίδιο του *alcR* μεταγράφεται κανονικά και επάγει τόσο τη μεταγραφή των *alcA* και *aldA* (γονίδιο της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης), όσο και τη δική του (θετική αυτορρύθμιση) (Εικόνα 1.5). Η υψηλή επαγωγιμότητα του παραπάνω μονοπατιού έχει οδηγήσει στην αξιοποίησή του ως εργαλείο ρυθμιζόμενης έκφρασης γονιδίων στη μοριακή βιολογία.

1.2 Η σύσταση της πλασματικής μεμβράνης

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελεί το φυσικό όριο του κυττάρου με το περιβάλλον του, επιτελώντας ένα εύρος λειτουργιών, όπως η εγκαθίδρυση πολικότητας του κυττάρου, η κινητικότητα του κυττάρου και η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Επομένως, η ύπαρξη της πλασματικής μεμβράνης είναι ακρογωνιαίος λίθος για την ύπαρξη της ζωής. Για την επίτευξη όλων των λειτουργιών της η μεμβράνη είναι εξαιρετικά δυναμική με τη σύσταση της να ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Η ύπαρξη υποδοχέων, μεταφορέων ή σηματοδοτικών μορίων οφείλει να ρυθμίζεται με αυστηρό τρόπο, μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών και λιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη.

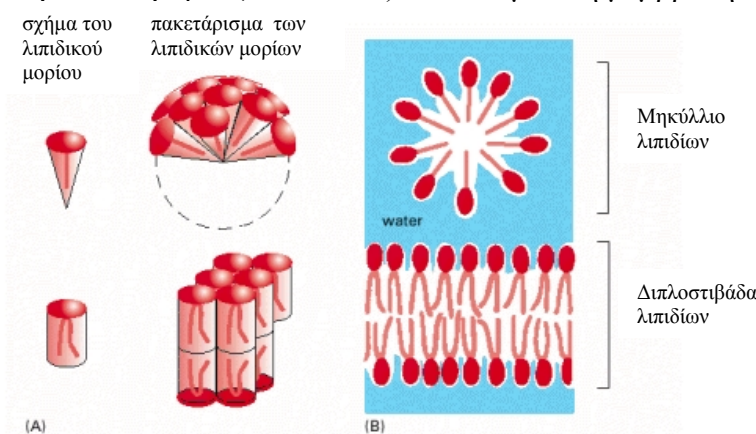
1.2.1 Το ρευστό μωσαϊκό

Το 1972 προτάθηκε από τους Singer και Nicolson το μοντέλο του «ρευστού μωσαϊκού» για να εξηγήσει την οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης. Το μοντέλο αυτό ενοποίησε τα μέχρι τότε πειραματικά δεδομένα και θεωρήσεις για την πλασματική μεμβράνη και περιγράφει τις βιολογικές μεμβράνες ως διαστάτα διαλύματα τα οποία αποτελούνται από σφαιρικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι ελεύθερα διάχυτες σε μία διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων (Singer & Nicolson, 1972). Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού 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.

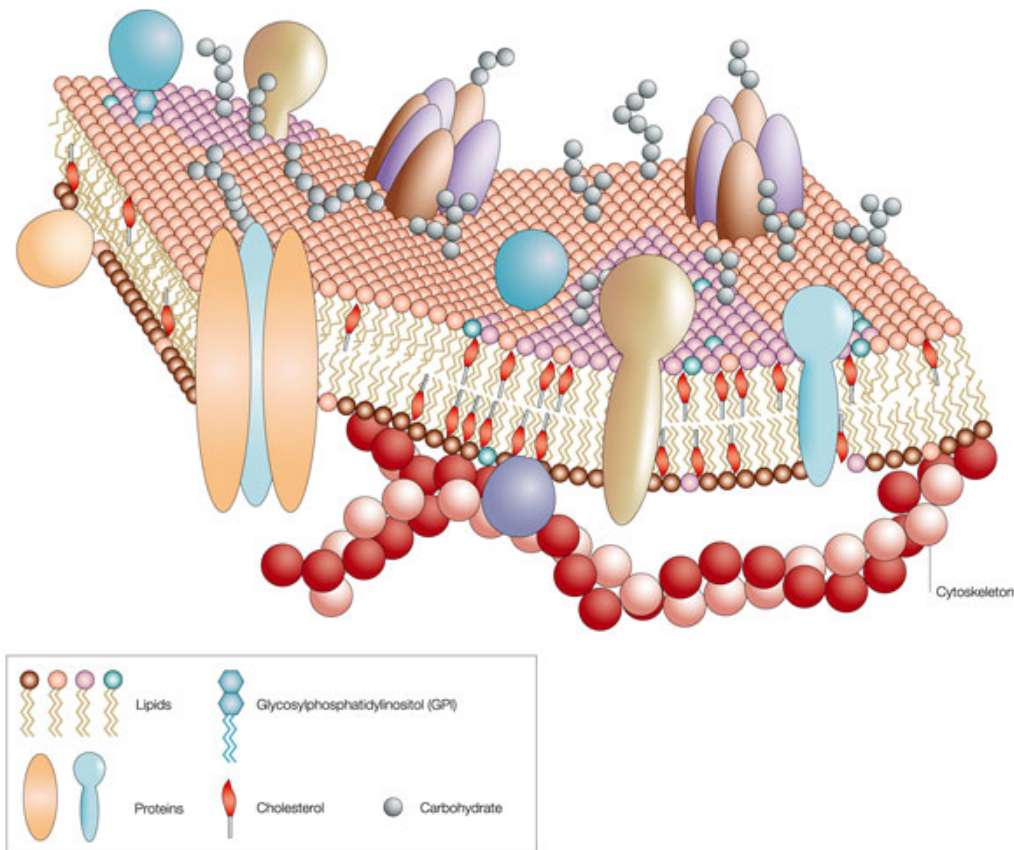
Οι κυτταρικές μεμβράνες απαρτίζονται κυρίως από αμφιπαθικά φωσφολιπίδια, λιπίδια που αποτελούνται από αλυσίδες λιπαρών οξέων (μη πολική ομάδα) και μία φορτισμένη υδρόφιλη ομάδα στην κεφαλή. Με βάση τη θερμοδυναμική, η ύλη τείνει να σχηματίζει δομές χαμηλής ενεργειακής κατάστασης, κατά επέκταση οι υδρόφιλες 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 (Εικόνα 1.6). Το αποτέλεσμα είναι η σταθεροποίηση της λιπιδικής διπλοστιβάδας από μη ομοιοπολικούς δεσμούς χωρίς την απαίτηση ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των συστατικών μορίων. Η λιπιδική διπλοστιβάδα 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). Τα λιπίδια έχουν δυνατότητα κίνησης κατά μήκος του οριζόντιου άξονα του επιπέδου της μεμβράνης, ενώ εξαιρετικά σπάνιες είναι οι αλλαγές πλευράς ενός λιπιδίου (κίνηση flip-flop).

Πρωτεΐνες που εντοπίζονται στη μεμβράνη μπορούν είτε να διαπερνούν κάθετα το επίπεδο της, με ένα υδρόφοβο τμήμα τους να αλληλεπιδρά με το υδρόφοβο εσωτερικό της διπλοστιβάδας, είτε να αγκιστρώνονται πάνω σε αυτήν με τις πολικές ομάδες τους να είναι εκτεθειμένες στο υδάτινο περιβάλλον, όπου μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα μόρια (Εικόνα 1.7). Η πλασματική μεμβράνη δεν αποτελεί



Εικόνα 1.6 Συμπεριφορά των λιπιδίων σε υδάτινο περιβάλλον αναλόγως τη δομή τους ως αποτέλεσμα της ελαχιστοποίησης της εντροπίας. Λιπίδια με μία αλυσίδα λιπαρού οξέος τείνουν να σχηματίζουν μηκύλλια σε υδάτινο περιβάλλον. Λιπίδια, με δύο αλυσίδες λιπαρών οξέων (πχ. φωσφολιπίδια) σχηματίζουν διπλοστιβάδες (σύμφωνα με Alberts *et al.*, 2002)

μία τυχαία αυτοσυγκρότηση αμφιπαθικών πρωτεϊνών και λιπιδίων. Τα συστατικά της παρουσιάζουν ανομοιογενή κατανομή, ενώ βρίσκονται σε δυναμική κατάσταση με μία σχετική κινητικότητα. Επομένως ο όρος «ρευστότητα» περιγράφει την κινητικότητα των μορίων της πλασματικής μεμβράνης και ο όρος «μωσαϊκότητα» την ανομοιόμορφη κατανομή τους.



Εικόνα 1.7 Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού (σύμφωνα με Pietzsch, 2004)

1.2.2 Λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης

Τα λιπίδια και οι μεταβολίτες τους παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο και τη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών. Λόγω των δομικών ιδιοτήτων και των σηματοδοτικών λειτουργιών των λιπιδίων η πλασματική μεμβράνη έχει τη δυνατότητα πολλαπλών λειτουργιών. Για αυτό το λόγω η μεμβράνη απαρτίζεται από ένα σύνθετο μίγμα διαφορετικών τύπων λιπιδίων. Οι τρεις βασικοί τύποι λιπιδίων διαφέρουν ως προς τη χημική τους σύσταση, με αποτέλεσμα διαφορετικές συστάσεις των μεμβρανών σε αυτά να προσδίδουν και διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες.

Τα λιπίδια που εντοπίζονται στα κύτταρα είναι: στερόλες, σφιγγολιπίδια και γλυκερολιπίδια, με τους δύο τελευταίους τύπους να απαρτίζουν το σύνολο των φωσφολιπιδίων (van der Rest *et al.*, 1995).

1.2.2.1 Φωσφογλυκερίδια

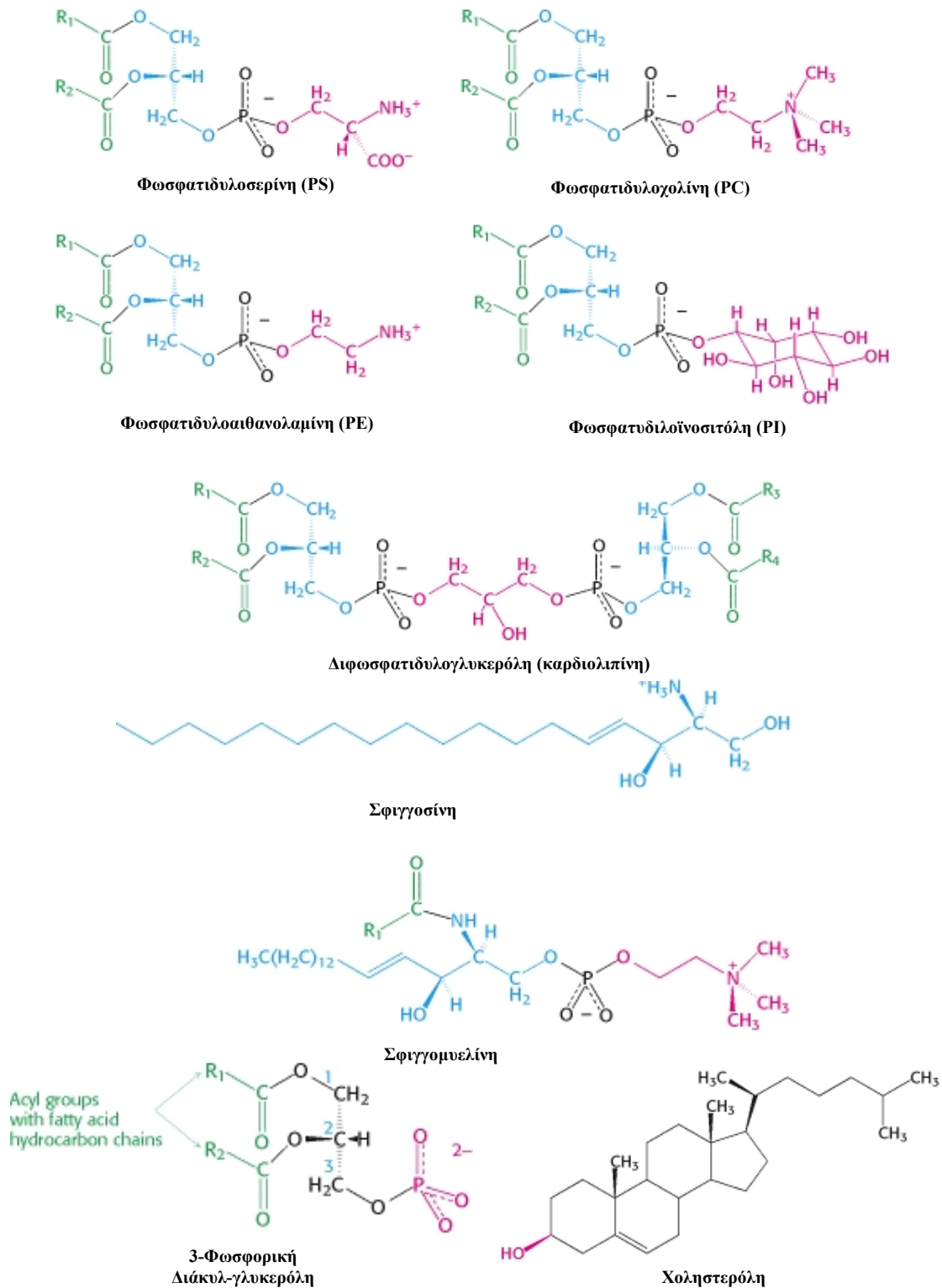
Η μεγαλύτερη ομάδα λιπιδίων που απαρτίζουν τη μεμβράνη είναι αυτή των φωσφογλυκεριδίων. Τα φωσφογλυκερίδια είναι φωσφολιπίδια τα οποία έχουν ως εξέδρα πρόσδεσης των

Πίνακας 1.2 Οι πιο κοινές αλκοόλες που ενώνονται με τη γλυκερόλη του φωσφολιπιδίου και τα προκύπτοντα φωσφογλυκερίδια

Αλκοόλη	Φωσφογλυκερίδιο
-	Φωσφατιδικό οξύ (PA)
Χολίνη	Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)
Αιθανολαμίνη	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE)
Σερίνη	Φωσφατιδυλοσερίνη (PS)
Ινοσιτόλη	Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI)

λιπαρών οξέων ένα μόριο γλυκερόλης. Η γλυκερόλη είναι μία αλκοόλη τριών ανθράκων, η οποία συνδέεται με δύο αλυσίδες λιπαρών οξέων μέσω εστερικών δεσμών και μία φωσφορική ομάδα. Η φωσφορική ομάδα μπορεί να εστεροποιηθεί περαιτέρω με την υδροξυλομάδα ενός μεγάλου εύρους αλκοολών καθορίζοντας τον τελικό τύπο του φωσφογλυκερίδιου. Οι πιο κοινές αλκοόλες με τις οποίες είναι δυνατή η σύνδεση της γλυκερόλης καθώς και τα προκύπτοντα φωσφογλυκερίδια συνοψίζονται στον Πίνακα 1.2, ενώ η χημική δομή τους απεικονίζεται στην Εικόνα 1.8. 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.

Ο δακτύλιος της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI) μπορεί να τροποποιηθεί περαιτέρω μέσω κινάσων και φωσφατασών της PI, προσδένοντας ή αφαιρώντας ομοιοπολικώς φωσφορικές ομάδες. Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη και τα φωσφορυλιωμένα παράγωγα της είναι βασικοί ρυθμιστές της αύξησης και επιβίωσης του κυττάρου, της διαεπικοινωνίας της μεμβράνης καθώς και της κίνησης του κυτταροσκελετού (Di Paolo & De Camilli, 2006; Hurley, 2006, Lemmon, 2008; Roth, 2004).



Εικόνα 1.8 Οι διαφορετικοί τύποι λιπιδίων που απαντώνται στην πλασματική μεμβράνη. Με πράσινο απεικονίζονται οι αλυσίδες των λιπαρών οξέων, με μπλε η πλατφόρμα στην οποία προσδένονται (με εξαίρεση το φωσφατιδικό οξύ). Απεικονίζονται επίσης ένα μόριο χοληστερόλης και η σφιγγομυελίνη (κεραμίδιο της φωσφοχολίνης, σύμφωνα με Berg *et al.*, 2002)

Συγκεκριμένα παράγωγα φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης σχετίζονται με συγκεκριμένα υποκυτταρικά οργανίδια, λειτουργώντας ως δείκτες, αφού αναλόγως τη διάταξη των φωσφορικών ομάδων γύρω από το δακτύλιο της ινοσιτόλης στοχεύονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα: η πλασματική μεμβράνη είναι πλούσια σε 4,5-διφωσφορική φωσφοϊνοσιτόλη [PI(4,5)P₂], ενώ το σύμπλεγμα Golgi και τα πρώιμα ενδοσώματα είναι πλούσια σε 4-φωσφορική φωσφοϊνοσιτόλη [PI(4)P] και 3-φωσφορική φωσφοϊνοσιτόλη [PI(3)P] αντίστοιχα (Kutateladze, 2010).

1.2.2.2 Σφιγγολιπίδια

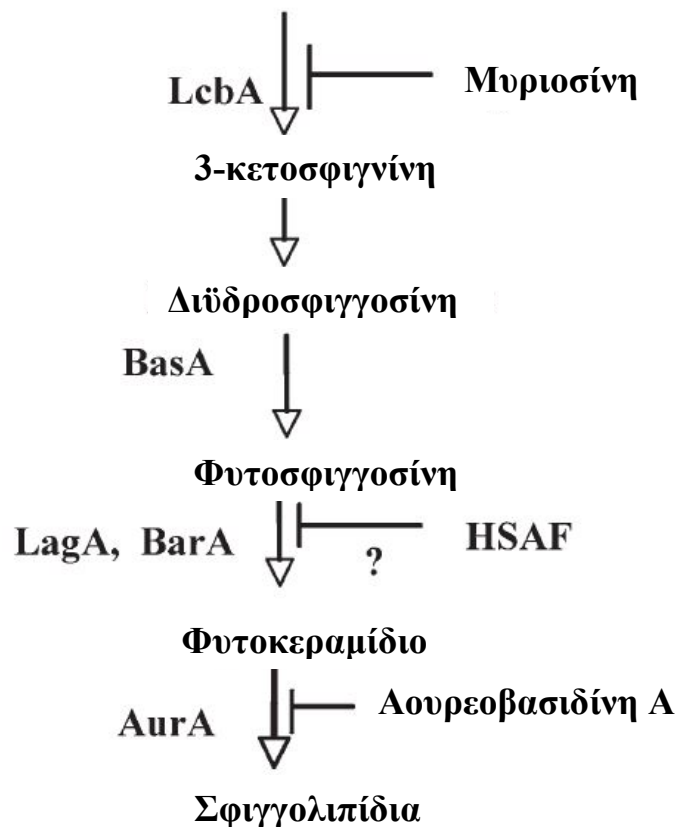
Ο δεύτερος τύπος λιπιδίων που βρίσκεται πάντα στην κυτταρική μεμβράνη είναι τα σφιγγολιπίδια, ένας τύπος φωσφολιπιδίων που ως πολική κεφαλή φέρουν τη σφιγγοσίνη, μία αμινοαλκοόλη που περιέχει μία επιμήκη ακόρεστη υδρογονανθρακική αλυσίδα (Sphingolipid Long-Chain Base, LCB). Το λιπαρό οξύ συνδέεται στη σφιγγοσίνη με αμιδικό δεσμό και το προκύπτον μόριο, ονομάζεται κεραμίδιο (Εικόνα 1.9). Τέλος η πρωτοταγής υδροξυλομάδα της σφιγγοσίνης εστεροποιείται με διαφορετικές ομάδες για να προκύψουν τελικώς τα σύνθετα σφιγγολιπίδια: κεραμίδιο της φωσφοϊνοσιτόλης (IPC), κεραμίδιο της μαννοσυλ-φωσφοϊνοσιτόλης (MIPC) και κεραμίδιο της μαννοσυλ-διφωσφορικής ινοσιτόλης [M(IP₂)C] (van der Rest *et al.*, 1995).

Τόσο ο *Saccharomyces cerevisiae*, στον οποίο το μονοπάτι βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων είναι εκτενώς μελετημένο, όσο και ο *A. nidulans* χρησιμοποιούν έναν ειδικό τύπο κεραμιδίου, τη φυτοσφιγγοσίνη ως βάση για τη σύνθεση των σύνθετων σφιγγολιπιδίων. Η αρχή της *de novo* σύνθεσης των σφιγγολιπιδίων και στους δύο οργανισμούς γίνεται με τη συμπύκνωση μιας σερίνης με το παλμιτοϋλιωμένο συνένζυμο A για την απόδοση της 3-κετοσφιγγανίνης. Η αντίδραση καταλύεται από την παλμιτοϋλτρανσφεράση της σερίνης ένα ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο *lcbA* στον *A. nidulans* (Cheng *et al.*, 2001). Η 3-κετοσφιγγανίνη ανάγεται και προκύπτει η διϋδροσφιγγοσίνη (DHS). Υδροξυλίωση της DHS στον τέταρτο άνθρακα σχηματίζει τη φυτοσφιγγοσίνη (PHS) η οποία τροποποιείται περαιτέρω σε φυτοκεραμίδιο έπειτα από συμπύκνωση με ακυλ-συνένζυμο A (Merrill, 2002). Τα φυτοκεραμίδια τροποποιούνται σε IPC με την προσθήκη φωσφορικής μυο-ινοσιτόλης (Merrill & Wang, 1986). Ένα συνοπτικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων στον *A. nidulans* απεικονίζεται στην Εικόνα 1.9. Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί

αρκετοί αναστολείς της βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων, όπως η μυριοσίνη και η αουρεοβασιδίνη A (aureobasidin A, AbA) οι οποίες αναστέλλουν την παλμιτοϋλτρανσφεράση της σερίνης (Ikushiro *et al.*, 2004) και τη συνθετάση του IPC (Zhong *et al.*, 2000) αντίστοιχα. Αυτοί οι αναστολείς χρησιμοποιούνται εκτενώς για τη διερεύνηση των λειτουργιών φυσιολογίας της σύνθεσης σφιγγολιπιδίων (Cheng *et al.*, 2001).

Τα σφιγγολιπίδια μπορούν να αποτελούν μέχρι και το 30% των φωσφολιπιδίων στη μεμβράνη. Επιπρόσθετα, διαδραματίζουν ρόλο δευτερογενών σηματοδοτών της ρύθμισης μεταγωγής σήματος που σχετίζεται με τον έλεγχο της αύξησης και πολικότητας του κυττάρου, την ενδοκύττωση, τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού ακτίνης και τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος (Cheng *et al.*, 2001, Dickson *et al.*, 2006, van der Rest *et al.*, 1995).

Παλμιτοϋλ-Συνένζυμο A + Σερίνη



Εικόνα 1.9 Συνοπτικό μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων στον *A. nidulans*. Στα αριστερά απεικονίζονται τα ένζυμα, ενώ στα δεξιά οι αναστολείς του μονοπατιού (σύμφωνα με Li *et al.*, 2007)

1.2.2.3 Στερόλες

Κύριος εκπρόσωπος των στερολών στα ζωικά και φυτικά κύτταρα είναι η χοληστερόλη. Η χοληστερόλη έχει συμπαγή, υδρόφοβη δομή αποτελούμενη από 4 συνδεδεμένους δακτυλίους υδρογονανθράκων και αποτελεί την τρίτη κύρια κατηγορία λιπιδίου που εντοπίζεται στη μεμβράνη. Μια υδρογονανθρακική ουρά συνδέεται με το στεροειδές στο ένα άκρο, ενώ υπάρχει μία υδροξυλική ομάδα στο άλλο άκρο (πολική ομάδα) (Εικόνα 1.9). Η παρουσία της χοληστερόλης στη μεμβράνη οδηγεί σε στενότερο πακετάρισμα των γειτονικών λιπιδίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης όπως επίσης και τη διαπερατότητα της από πολικές ενώσεις. Λόγω της επίδρασής τους στη ρευστότητα της μεμβράνης, η χοληστερόλη είναι σημαντικός ρυθμιστής της πλευρικής διάχυσης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη (Daum *et al.*, 1998). Στην πλασματική μεμβράνη των μυκήτων απαντάται και επιτελεί το ρόλο της χοληστερόλης, η εργοστερόλη. Η δομή της είναι παρόμοια με αυτή της χοληστερόλης, με τη διαφορά πως έχει περισσότερο κινητή πολική ομάδα λόγω ύπαρξης διπλού δεσμού άνθρακα.

1.2.3 Πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης

Οι πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες αναλόγως την αλληλεπίδραση τους με τη μεμβράνη: τις διαμεμβρανικές, τις μερικά εισερχόμενες στη μεμβράνη, τις περιφερειακές και τις περιφερειακές πρωτεΐνες συνδεδεμένες με λιπίδια.

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 είτε στο κυτταρόπλασμα είτε 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 δεν διαπερνούν κάθετα όλο το επίπεδο της μεμβράνης αλλά αλληλεπιδρούν με μέρος του υδρόφοβου τμήματός της.

Οι περιφερειακές πρωτεΐνες δεν έρχονται σε αλληλεπίδραση με το εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστιβάδας, 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 σύνδεση 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 παλμιτοϋλίωσης (Levental *et al.*, 2010). 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 η περιοχή ομολογίας με την πλεξτρίνη (pleckstrin homology domain, PH), η πρώτη περιοχή που βρέθηκε ότι συνδέεται ειδικά με τα PI(4,5)P₂ (Harlan *et al.*, 1994; Mayer *et al.*, 1993). Μέχρι στιγμής, περιοχές PH έχουν εντοπιστεί σε πληθώρα πρωτεϊνών, όπως στις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (δυναμίνη) ή ρυθμιστές μικρών G-πρωτεϊνών, όπως η Cdc24 στο *S. cerevisiae* (Toenjes *et al.*, 1999). Άλλο παράδειγμα περιοχών στόχευσης μεμβρανών είναι το μοτίβο PX, το οποίο συνδέεται κυρίως με μεμβράνες πλούσιες σε PI(3)P, όπως είναι τα ενδοσώματα και τα χυμοτόπια (Seet & Hong, 2006; Yu & Lemmon, 2001).

1.3 Οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης

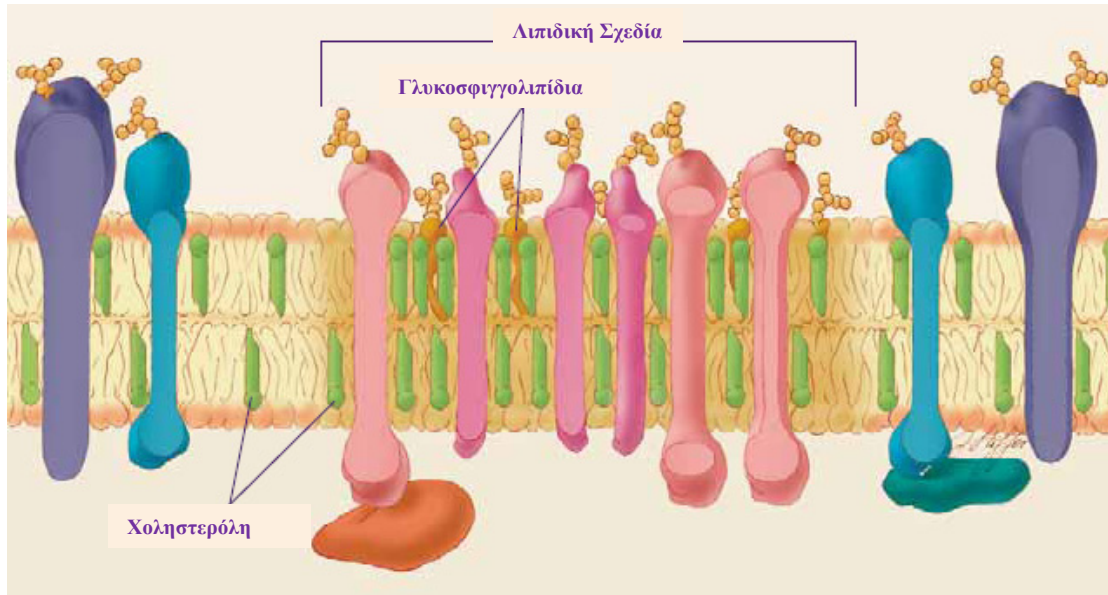
Οι κυτταρικές μεμβράνες παρουσιάζουν πολυπλοκότητα ως προς τη σύνθεση και τα ποσοστά λιπιδίων και πρωτεϊνών με σκοπό την επίτευξη των λειτουργιών τους. Για την επίτευξη του συντονισμού αυτών των λειτουργιών, τα κύτταρα έχουν υιοθετήσει την ικανότητα διαχωρισμού των βιοχημικών αντιδράσεων με αποτέλεσμα την εξειδικευμένη τοπική αύξηση των μοριακών συστατικών τους. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης των λειτουργιών τους (Lajoie *et al.*, 2009, Lingwood & Simons, 2010). Αυτή η διαμερισματοποίηση πραγματοποιείται σε πολλά κυτταρικά επίπεδα.

1.3.1 Λιπιδικές σχεδίες

Οι λιπιδικές σχεδίες θεωρούνται πώς είναι οι μικρότερες μονάδες οργάνωσης της πλασματικής μεμβράνης (Lingwood & Simons, 2010; Munro, 2003; Simons & Vaz, 2004). 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 νανοσυγκροτήσεις ή πλατφόρμες, εμπλουτισμένες σε στερόλες και σφιγγολιπίδια (Simons & Ikonen, 1997; Simons & Vaz, 2004). Αυτά τα δύο είδη λιπιδίων σχηματίζουν μαζί μια 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. Ο μηχανισμός για τη συγκρότηση των λιπιδικών σχεδίων βασίζεται στη διαδικασία του διαχωρισμού φάσης στη ρευστή λιπιδική διπλοστιβάδα, και πιο συγκεκριμένα μεταξύ των διαφορετικών ειδών λιπιδίων αναλόγως τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Λόγω της δύσκαμπτης δομής των στερολών, υπάρχει προτίμηση να αλληλεπιδρά με κορεσμένες αλυσίδες λιπαρών οξέων, όπως αυτές που εντοπίζονται στα σφιγγολιπίδια, παρά με τις πιο ογκώδεις ακόρεστες αλυσίδες (Simons & Vaz, 2004). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί πως οι μικρές πολικές ομάδες των στερολών είναι ανεπαρκείς για να αλληλεπιδράσουν σωστά με τα μόρια του νερού στο περιβάλλον ώστε να δημιουργηθεί το κατάλληλο υδάτινο κάλυμμα. Με την κατανομή των σφιγγολιπιδίων στην ίδια περιοχή, αυτά μπορούν να παράσχουν επαρκή κάλυψη λόγω της μεγαλύτερης πολικής ομάδας τους, επομένως τα μόρια των στερολών πακετάρονται ανάμεσά τους καλύπτοντας τα κενά που προκύπτουν μεταξύ των σφιγγολιπιδίων (Εικόνα 1.10). Αυτή η κατανομή περιγράφεται ως «μοντέλο ομπρέλα» ή «μοντέλο συμπυκνωμένου συμπλέγματος» (Ikonen, 2008).

Η κατανομή των λιπιδίων στη μεμβράνη με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες, οδηγεί στη διαφοροποίηση σε υγρές φάσεις που είναι σε τάξη (I_o) ή αταξία (I_d) και είναι εξαρτώμενες από χοληστερόλη (Simons & Ikonen, 1997). Λόγω του μήκους των αλυσίδων των συστατικών τους, οι I_o φάσεις θεωρούνται πως είναι παχύτερες των I_d φάσεων (Harder & Simons, 1997). Η διαφορά μορφολογίας μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό εξειδικευμένων περιοχών στην πλασματική μεμβράνη, όπου πχ. πρωτεΐνες με μεγάλα διαμεμβρανικά τμήματα ενσωματώνονται κατά προτίμηση και συσσωρεύονται μαζί. Λόγω της δυνατότητας ένταξης συγκεκριμένων ειδών λιπιδίων

και πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης σε λειτουργικές νανοπεριοχές το μοντέλο των λιπιδικών σχεδίων συνδέει τις φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών της μεμβράνης με επιμέρους λειτουργίες της, όπως η πολική κατανομή των πρωτεϊνών (Bagnat *et al.*, 2000).



Εικόνα 1.10 Οι λιπιδικές σχεδίες είναι περιοχές πλουσιότερες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια από ότι η υπόλοιπη μεμβράνη. Τα μόρια χοληστερόλης πακετάρονται ανάμεσα στα σφιγγολιπίδια, δημιουργώντας την φάση L_0 . Παράλληλα παρατηρείται σε αυτές ύπαρξη συγκεκριμένων πρωτεϊνών (σύμφωνα με American National Institute of General Medical Sciences)

1.3.2 Λειτουργικές μικροπεριοχές της μεμβράνης

Σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει *in vivo* όπου παρατηρούνται μικρές και διάχυτες περιοχές σχεδίων, σε συστήματα *in vitro* ο διαχωρισμός φάσεων οδηγεί στο σχηματισμό πολύ μεγάλων λιπιδικών φάσεων. Ο λόγος δεν έχει πιστοποιηθεί ακόμη, αλλά θεωρείται πώς βασίζεται στο γεγονός ότι η πλασματική μεμβράνη βρίσκεται σε ένα κρίσιμο σημείο πριν τη μετάβαση σε άλλη φάση. Επομένως, οι μικρές σχεδίες είναι διάχυτες *in vivo*, αλλά είναι σε θέση να σχηματίζουν συσσωματώματα κατά την αλληλεπίδραση τους με το κυτταροσκελετό ή άλλες πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης (Honerkamp-Smith *et al.*, 2008; Honerkamp-Smith *et al.*, 2009; Veatch *et al.*, 2008). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδίων είναι αρκετά αδύναμες και παροδικές, αλλά αυτές οι μικροπεριοχές μπορούν να σταθεροποιηθούν περαιτέρω μέσω αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών και λιπιδίων.

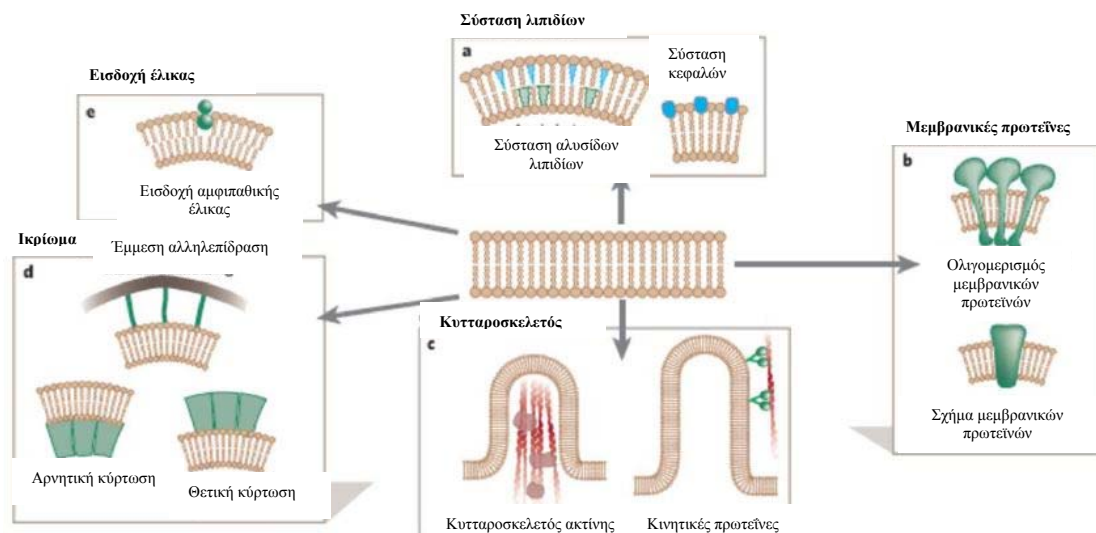
Ένα παράδειγμα τέτοιας οργάνωσης λειτουργικής μικροπεριοχής *in vivo* είναι τα μικροσπήλαια των μεμβρανών (caveolae). Τα μικροσπήλαια είναι εγκοιλώσεις της μεμβράνης μεγέθους 60-80 nm, τα οποία είναι εξειδικευμένες και μορφολογικές διακριτές δομές από αυτές των λιπιδικών σχεδίων (Rajendran & Simons, 2005; Simons & Toomre, 2000).

Παρότι η λειτουργία των μικροσπηλαίων δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, φαίνεται να εμπλέκονται σε αρκετές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η πρόσληψη και ρύθμιση λιπιδίων, η ενδοκύττωση, η μεταγωγή σήματος ενώ μπορούν να λειτουργήσουν και ως πύλες εισόδου για ιούς (Simons & Toomre, 2000). Επιπρόσθετα σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες λειτουργίες, τα μικροσπήλαια έχουν συνδεθεί με ασθένειες: μεταλλάξεις στα μοριακά συστατικά τους οδηγούν σε καρκίνο του μαστού καθώς και σε διάφορους τύπους μυϊκής δυστροφίας (Schwencke *et al.*, 2006). Το κύριο συστατικό τους είναι μία πρωτεΐνη που εισέρχεται μερικώς στη μεμβράνη η καβεολίνη-1 (caveolin-1, Rothberg *et al.*, 1992). Περίπου 145 μόρια καβεολίνης-1 απαρτίζουν ένα μικροσπήλαιο (Pelkmans & Zerial, 2005) ενώ η αποκλειστική ύπαρξη της είναι ικανή συνθήκη για το σχηματισμό του μικροσπηλαίου (Fra *et al.*, 1995). Η καβεολίνη-1 εισέρχεται στη διπλοστιβάδα με το θεωρητικώς προβλεπόμενο υδρόφιλο τμήμα της και έχει υψηλή συγγένεια με τη χοληστερόλη (Murata *et al.*, 1995), η οποία απαντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε λιπιδικές σχεδίες. Πειράματα κατακρήμνισης έχουν δείξει πως η διαλυμένη με απορρυπαντικά καβεολίνη-1 σχηματίζει ολιγομερείς δομές μεγέθους 340 kDa, ίσες με περίπου 10-15 μόρια της πρωτεΐνης. Επομένως, η αλληλεπίδραση της καβεολίνης-1 με τη χοληστερόλη ενεργοποιεί τον ολιγομερισμό της, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω στρατολόγηση καβεολίνης-1 στις σχεδίες. Λόγω της τοπικής αύξησης των διαθέσιμων για πρόσδεση μορίων χοληστερόλης, αυτές οι ολιγομερείς δομές συντήκονται μεταξύ τους οδηγώντας το σχηματισμό και σταθεροποίηση μεγάλων δομικών περιοχών από τις αρχικές νανοπεριοχές. Παρότι η επικρατούσα θεώρηση προβλέπει πως οι σχεδίες είναι δυναμικές και παροδικές δομές οι οποίες αλλάζουν σε μέγεθος και σύσταση ως απόκριση σε ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά ερεθίσματα (Hancock, 2006; Sargiacomo *et al.*, 1995; Simons & Toomre, 2000), το παράδειγμα των μικροσπηλαίων δείχνει πως οι σχεδίες μπορούν να είναι και στατικές μικροπεριοχές στη μεμβράνη.

1.3.3 Καθορισμός σχήματος της μεμβράνης από πρωτεΐνες

Το παράδειγμα των μικροσπηλαίων είναι μία μόνο περίπτωση κατά την οποία πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την πλασματική μεμβράνη και οδηγούν στην παραμόρφωσή της. Οι δύο τρόποι με τους οποίους οι πρωτεΐνες μπορούν να παραμορφώσουν τη μεμβράνη είναι μέσω έλξης ή κάμψης (Zimmerberg & Kozlov, 2006). Καθίζηση λιπιδικών κυστιδίων τα οποία είναι επικαλυμμένα με κινεσίνες, σε ένα δίκτυο σταθεροποιημένων μικροσωληνίσκων, οδηγεί στην αύξηση μεμβρανικών σωληνώσεων κατά μήκος του συστήματος μικροσωληνίσκων (Koster *et al.*, 2003; Roux *et al.*, 2002). Το παραπάνω δεδομένο σε συνδυασμό με μελέτες *in vivo*, έχουν οδηγήσει στην πρόταση πως η μεμβρανική καμπυλότητα μπορεί να επαχθεί από κινητικές πρωτεΐνες, οι οποίες εφαρμόζουν απευθείας δυνάμεις έλξης πάνω στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Επιπρόσθετα, δυνάμεις πολυμερισμού που επάγονται από τον κυτταροσκελετό έχουν αποδειχθεί πως επάγουν εξειδικευμένες σωληνοειδείς δομές της μεμβράνης, ανεξάρτητα από το μηχανισμό των κινητικών πρωτεϊνών (Waterman-Storer & Salmon, 1998, Εικόνα 1.11).

Η κάμψη της μεμβράνης μπορεί να επαχθεί από δύο μηχανισμούς, οι οποίοι δεν είναι αλληλοαποκλειόμενοι: μέσω σχηματισμού ικρίωματος-σκαλωσιάς των



Εικόνα 1.11 Μηχανισμοί παραμόρφωσης της μεμβράνης. Η φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα μπορεί να παραμορφωθεί με αρνητική ή με θετική κάμψη της μεμβράνης. Αυτό μπορεί να συμβεί με **(a)** αλλαγές στη σύσταση των λιπιδίων, **(b)** επιρροή από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν σφηνοειδή μορφή ή λόγω ολιγομερισμού τους, **(c)** αλλαγές στον πολυμερισμό του κυτταροσκελετού και έλξη των σωληνώσεων από κινητικές πρωτεΐνες, **(d)** πρωτεΐνες που λειτουργούν είτε άμεσα είτε έμμεσα ως ικρίωμα για τη διπλοστιβάδα, **(e)** εισδοχή μίας αμφιπαθικής έλικας στη μία στιβάδα της μεμβράνης (σύμφωνα με McMahon & Gallop, 2005)

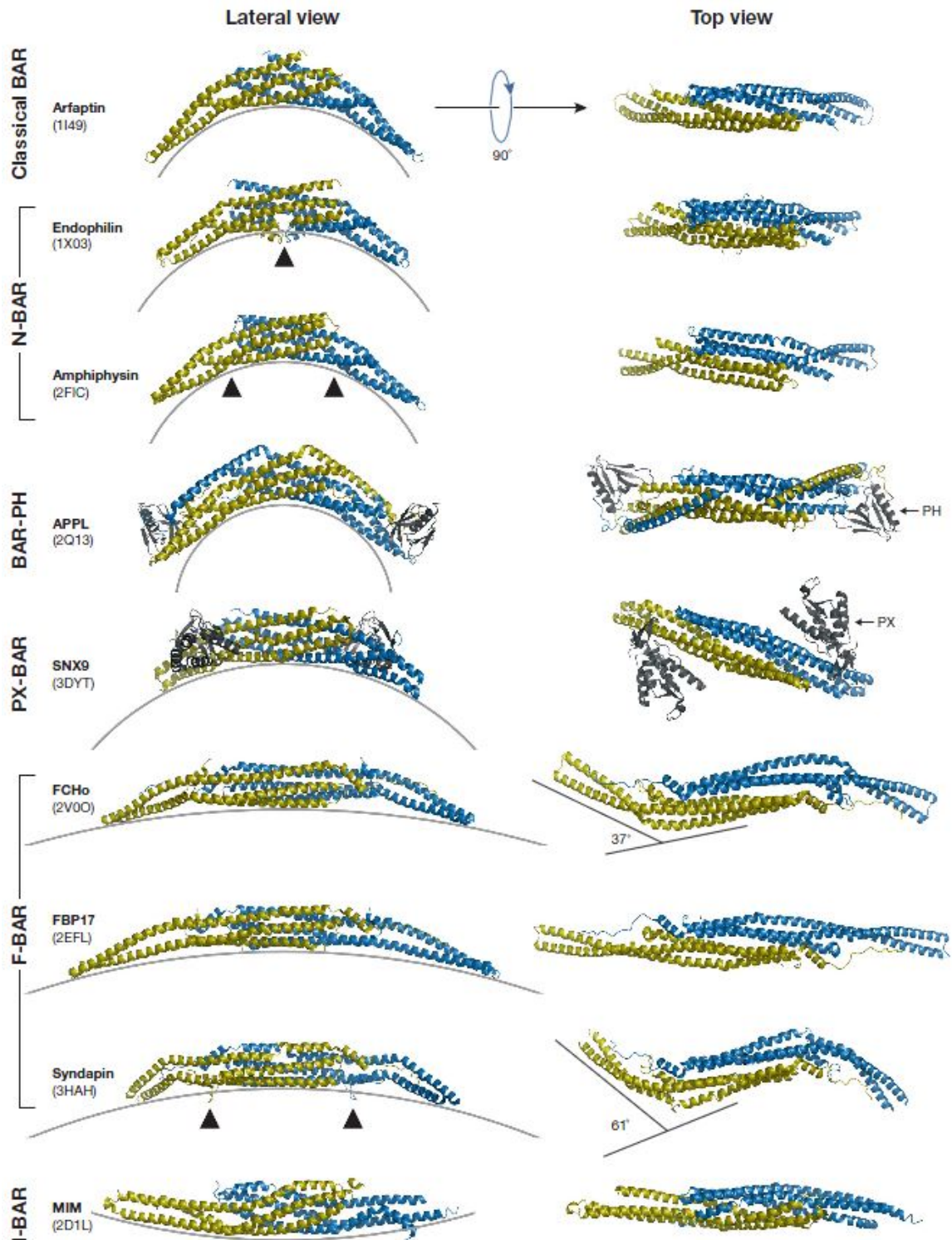
πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη λιπιδική διπλοστιβάδα ή μέσω εισδοχής μέρους πρωτεϊνών εντός της στιβάδας, πχ. μίας αμφιπαθικής έλικας. Η διατάραξη του πακεταρίσματος των πολικών κεφαλών των λιπιδίων στο σημείο γύρω από την εισδοχή οδηγεί σε κάμψη της μεμβράνης. Αντιθέτως, ο μηχανισμός του σχηματισμού ικρίωματος προβλέπει πως οι πρωτεΐνες επιδρούν στη μεμβράνη και την οδηγούν σε κάμψη με βάση την τριτοταγή ή τεταρτοταγή δομή που έχουν. Κατά αυτόν τον τρόπο η μεμβράνη παίρνει το σχήμα του ικρίωματος (Peter *et al.*, 2004). Η αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών και λιπιδικής διπλοστιβάδας πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων (Wang *et al.*, 2009). Ο μηχανισμός του ικρίωματος βασίζεται στο συμπέρασμα πως το ικρίωμα των πρωτεϊνών είναι πολύ πιο άκαμπτο από ότι η μεμβράνη, μια ιδιότητα που χαρακτηρίζει την υπεροικογένεια πρωτεϊνών που φέρουν το δομικό μοτίβο BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs161/167).

1.3.4 Παραμόρφωση της μεμβράνης από πρωτεΐνες που περιέχουν τη δομή BAR

Μέλη της υπεροικογένειας πρωτεϊνών που περιέχουν την αυτόνομη δομική περιοχή BAR έχουν περιγραφεί ως θεμελιώδεις ρυθμιστές των διαδικασιών της παραμόρφωσης της μεμβράνης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στρατολογούνται από το κυτταρόπλασμα και συμμετέχουν σε κυτταρικές αλλαγές, όπως ο σχηματισμός προεκτάσεων ή εγκολπώσεων της πλασματικής μεμβράνης, σε σχηματισμό ενδιάμεσων δομών μεταφοράς, όπως τα ενδοκυτταρικά κυστίδια, στην ανάπτυξη σωληνοειδών δομών της μεμβράνης (Itoh *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2004; Tsujita *et al.*, 2006), ενώ έχουν συσχετισθεί επίσης με τη διήθηση καρκινικών κυττάρων σε καρκίνο του μαστού και της ουροδόχου κύστεως (Chen *et al.*, 2012). Η μοριακή βάση για την κατανόηση των πρωτεϊνών που περιέχουν την περιοχή BAR προέρχεται από κρυσταλλογραφικά και βιοχημικά δεδομένα (Gallop *et al.*, 2006; Peter *et al.*, 2004).

Όλα τα μέλη της υπεροικογένειας έχουν δομή διμερούς με σχήμα ημισελήνου, η οποία προκύπτει από αντιπαράλληλη διάταξη των δύο μονομερών (Casal *et al.*, 2006; Masuda & Mochizuki, 2010; Shimada *et al.*, 2007; Tarricone *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2007, Εικόνα 1.12). Ανάλογα με 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 υποκατηγορίες ως εξής: πρωτεΐνες με το κλασσικό

μοτίβο BAR, αυτές που φέρουν το πιο επίμηκες F-BAR (FES-CIP4 homology BAR, FCH-BAR), πρωτεΐνες με την περιοχή N-BAR που φέρει αμφιπαθικές έλικες που

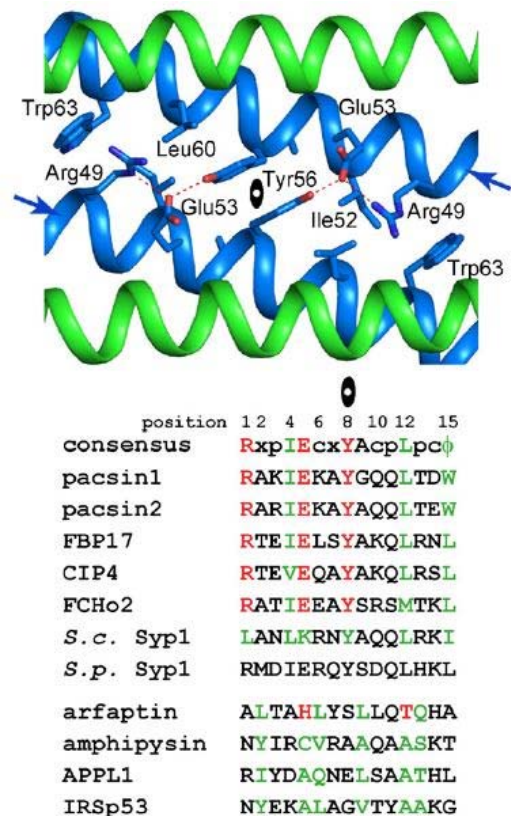


Εικόνα 1.12 Συγκριτική απεικόνιση των κύριων αντιπροσώπων της υπερικογένειας μοτίβου BAR. Κάθε μονάδα αποτελείται από δύο μονομερή (κίτρινο και κυανό). Παρουσιάζονται και οι αυτόνομες δομικές περιοχές PH και PX. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τα αμφιπαθικά αμινοτελικά άκρα στις πρωτεΐνες της ενδοφιλίνης, αμφιφυσίνης και συνδαπίνης (σύμφωνα με Qualmann *et al.*, 2011).

εισβάλουν στη λιπιδική διπλοστιβάδα και πρωτεΐνες με το I-BAR (inverse-BAR) που προκαλούν κύλωση και όχι κύρτωση στις μεμβράνες. Το διμερές σταθεροποιείται από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εσωτερικών επιφανειών του, με την τελική μορφή του να είναι μία συμμετρική επιμήκης δομή με έναν κεντρικό πυρήνα έξι πακεταρισμένων α -ελίκων (τρεις από κάθε μονομερές) και 2 άκρα (Gallor *et al.*, 2006; Henne *et al.*, 2007; Masuda & Mochizuki, 2010; Zhu *et al.*, 2007). Στην πρώτη α -έλικα των πρωτεϊνών F-BAR έχει παρατηρηθεί το χαρακτηριστικό μοτίβο που εντοπίζεται στις δομικές περιοχές FCH, R-x-p-[I/L/V]-E-c-x-Y-A-c-p-L-p-c-φ (p: πολικό αμινοξικό κατάλοιπο, c: φορτισμένο, φ: υδρόφοβο).

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 τη σταθεροποίηση του διμερούς (Masuda & Mochizuki, 2010, Εικόνα 1.13). Η διατάραξη του υδρόφοβου προφίλ που υπάρχει εντός του πυρήνα του διμερούς είναι ικανή να οδηγήσει σε αποδιοργάνωση του μοτίβου BAR, όπως έχει δειχθεί με αντικατάσταση της λευκίνης στη θέση 215 σε ασπαρτικό οξύ στην ενδοφιλίνη (Gortat *et al.*, 2011).

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 καμπυλότητα του στη μεμβράνη και τη σταθεροποιεί μέσω του μηχανισμού ικριώματος (Zimmerberg & Kozlov, 2006). Αυτό επιβεβαιώνεται



Εικόνα 1.13 Το συντηρημένο χαρακτηριστικό μοτίβο που απαντάται στις πρωτεΐνες F-BAR. Για σύγκριση παραθέτονται και πρωτεΐνες N-BAR, οι οποίες διατηρούν συντηρημένες θέσεις για ορισμένα αμινοξικά κατάλοιπα (σύμφωνα με Masuda & Mochizuki, 2010)

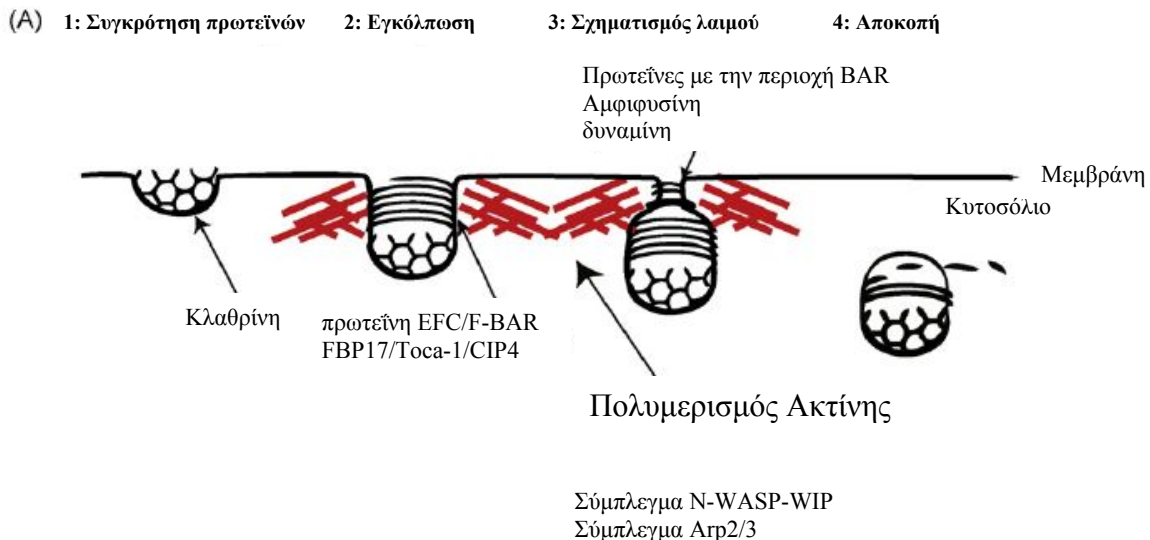
περαιτέρω με *in vitro* πειράματα επώασης BAR πρωτεϊνών με λιποσώματα όπου τα τελευταία οδηγούνται σε σωληνοειδείς έκαμπτες δομές, των οποίων η διάμετρος αντιστοιχεί με το βαθμό κυρτότητας της συγκεκριμένης δομής BAR (Shimada *et al.*, 2007). Εκτός από το μηχανισμό του ικριώματος, οι πρωτεΐνες τύπου N-BAR χρησιμοποιούν και το μηχανισμό σφήνας για να σταθεροποιήσουν την κύρτωση της μεμβράνης, με τη εισδοχή των αμφιπαθικών τους αμινοτελικών ελίκων στη μεμβρανική διπλοστιβάδα. Χαρακτηριστικά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών N-BAR είναι η ενδοφιλίνη και η αμφιφυσίνη (Gallor *et al.*, 2006; Masuda & Mochizuki, 2010), οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν πως η μεμβράνη πρέπει να έρθει πρώτα σε ελαφρά παραμορφωμένη κατάσταση, μέσω κινητικών πρωτεϊνών ή με τη βοήθεια του κυτταροσκελετού, προτού στρατολογηθούν και τη σταθεροποιήσουν οι πρωτεΐνες με δομή BAR (Bhatia *et al.*, 2009; Galic *et al.*, 2012). Επομένως, τα μέλη της υπεροικογένειας πρωτεϊνών που φέρουν τη δομή BAR μπορούν να παραμορφώσουν τη μεμβράνη ανεξάρτητα είτε μέσω του μηχανισμού ικριώματος, είτε μέσω του μηχανισμού σφήνας, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις που υιοθετούνται ταυτόχρονα και οι δύο μηχανισμοί για την αποδοτική επαγωγή και σταθεροποίηση της κύρτωσης της μεμβράνης (Masuda & Mochizuki, 2010).

Οι πρωτεΐνες με δομή BAR έχουν συσχετισθεί με πολλές λειτουργίες σε δυναμικές περιοχές της μεμβράνης, όπως οι περιοχές ενδοκύτωσης (Salazar *et al.*, 2003, Soulet *et al.*, 2005). Ανάμεσα στις διαφορετικές οδούς ενδοκύτωσης που έχουν περιγραφεί σε ευκαρυωτικά κύτταρα, μία εκτενώς μελετημένη είναι αυτή της ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης. Αυτό το μονοπάτι απαιτεί ένα συνδυασμό πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μεμβράνη για να οδηγήσουν στην καμπυλότητα της. Ο σχηματισμός κυστιδίων επικαλυπτόμενων με κλαθρίνη (clathrin-coated vesicles, CCVs) μπορεί να περιγραφεί σε τέσσερα διακριτά στάδια (Kaksonen *et al.*, 2005, Merrifield *et al.*, 2005) (Εικόνα 1.14):

- i. συγκρότηση του καλύμματος κλαθρίνης και επιλογή του φορτίου για το σχηματισμό ενός κοιλώματος επικαλυμμένου με κλαθρίνη (clathrin coated pit, CCP)
- ii. εγκόλπωση του CCP μέσω στρατολόγηση του μηχανισμού πολυμερισμού της ακτίνης
- iii. σχηματισμός σωληνοειδούς λαιμού πάνω από το CCP
- iv. αποκοπή του κυστιδίου.

Για παράδειγμα, η FBP17 είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών με δομή F-BAR, η οποία στρατολογείται παροδικά στα CCP στα τελικά στάδια της ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης (Giuliani *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2005; Suetsugu *et al.*, 2010; Tsujita *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Qualmann *et al.*, 2011). Η συγκρότηση του καλύμματος κλαθρίνης οδηγεί πιθανώς στη συσσώρευση του CCP στην έδρα του ημισφαιρικού κοιλώματος, δεδομένο που συμφωνεί με την προτίμηση αυτής της δομής για μεμβράνες με χαμηλό βαθμό κύρτωσης (Shimada *et al.*, 2007).

Ο επακόλουθος ολιγομερισμός της FBP17 οδηγεί στην εγκόλπωση του CCP λόγω στένωσης του σωλήνα ώστε να σχηματιστεί ένας λαιμός. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του πολυμερισμού της ακτίνης στην περιοχή και η στρατολόγηση μορίων δυναμίνης οδηγεί σε περαιτέρω στένωση του λαιμού ώστε να αποκοπεί πλήρως το κυστίδιο. Σε αυτό το σημείο, πρωτεΐνες με την κλασσική δομή BAR οι οποίες έχουν μικρότερη γωνία κύρτωσης, όπως η αμφιφυσίνη (Takei *et al.*, 1999) ή η ενδοφιλίνη (Farsad *et al.*, 2001; Ferguson *et al.*, 2009), έχουν προταθεί πως συμμετέχουν στη ρύθμιση του τελικού σταδίου απόσχισης του κυστιδίου (Shimada *et al.*, 2007). Επομένως, στη διαδικασία ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης, ένας συνδυασμός πολλών πρωτεϊνών που περιέχουν τη δομή BAR συμμετέχει στη δημιουργία αλλά και στην πρόσδεση διαφορετικών βαθμών κάμψης της πλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14 Η σχέση των πρωτεϊνών με δομή BAR στα διαφορετικά στάδια την ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης. Η εγκοιλώσεις που δημιουργούνται από την κλαθρίνη αναγνωρίζονται από τις F-BAR πρωτεΐνες. Η πρόσδεση των F-BAR πρωτεϊνών επάγει μεγαλύτερη εγκόλπωση με τον πολυμερισμό των ινιδίων ακτίνης, μέσω των περιοχών SH3 (Src homology 3 domain) που στρατολογούν τις δυναμίνες. Το αποτέλεσμα είναι η τελική αποκοπή του κυστιδίου (σύμφωνα με Suetsugu *et al.*, 2010)

Ένας οργανισμός στον οποίο έχει μελετηθεί η ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης είναι ο *S. cerevisiae*, όπου η διαδικασία CME (clathrin-mediated endocytosis) αποτελεί ένα πολυσύνθετο μηχανισμό, με τη συμμετοχή περίπου 60 διαφορετικών τύπων πρωτεϊνών (Weinberg & Drubin, 2012). Η συγκεκριμένη διαδικασία περιορίζεται σε εξειδικευμένες περιοχές όπου η πυκνότητα ακτίνης στην πλασματική μεμβράνη είναι υψηλή. Επομένως, η πλασματική μεμβράνη του *S. cerevisiae* μπορεί να διαχωρίσει σύνθετες διαδικασίες σε ξεχωριστά μεμβρανικά διαμερίσματα υψηλής οργάνωσης.

1.4 Οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης στο *Saccharomyces cerevisiae*

Παρότι, οι δομικές περιοχές της πλασματικής μεμβράνης εντοπίζονται σε όλους τους τύπους των κυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο σε διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες, οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στο σχηματισμό τους είναι στις περισσότερες περιπτώσεις ελάχιστα μελετημένοι. Ο *S. cerevisiae* αποτελεί οργανισμό μοντέλο για τη μελέτη τέτοιων φαινομένων, ακριβώς διότι η πλασματική του μεμβράνη χαρακτηρίζεται από υψηλή οργάνωση σε διακριτά διαμερίσματα, και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση πρωτεϊνών *in vivo*.

Η πλασματική μεμβράνη του ζυμομύκητα αποτελείται από μη επικαλυπτόμενες περιοχές (Grossmann *et al.*, 2007; Malínská *et al.*, 2003; Opekarova *et al.*, 2005), οι οποίες καλύπτουν το μεγαλύτερο ποσοστό της μεμβράνης. Μέχρι στιγμής τρία μη επικαλυπτόμενα μεμβρανικά διαμερίσματα έχουν μελετηθεί εκτενώς στο ζυμομύκητα, τα οποία παίρνουν την ονομασία τους από την πρωτεΐνη δείκτη που τα χαρακτηρίζει:

- I. το μεμβρανικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει το μεταφορέα αργινίνης Can1 (membrane compartment occupied by Can1, MCC)
- II. το μεμβρανικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει το δεύτερο σύμπλεγμα στόχο της ραπαμυκίνης (Target of Rapamycin complex 2, TORC2) (MCT)
- III. το μεμβρανικό διαμέρισμα που περιλαμβάνει την H⁺/ATPάση Pma1 (membrane compartment occupied by Pma1, MCP)

Πέραν των εξειδικευμένων πρωτεϊνών που εντοπίζονται τα διαμερίσματα αυτά διαφέρουν και στη σύσταση των λιπιδίων τους. Πιο συγκεκριμένα, το MCC

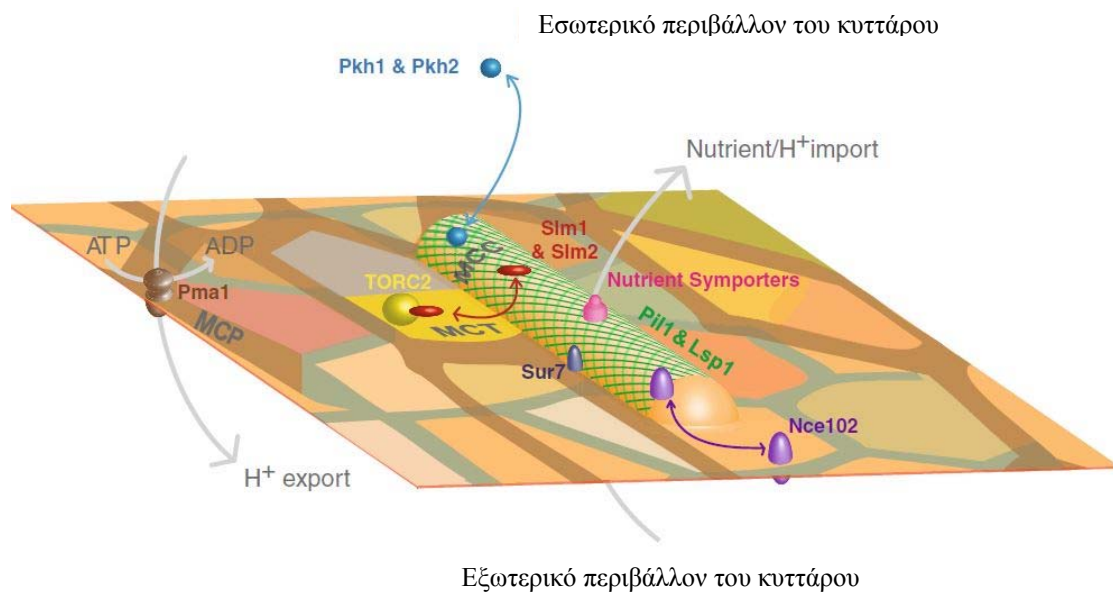
θεωρείται πως είναι πλούσιο σε εργοστερόλη, που είναι η κυριότερη στερόλη του ζυμομύκητα (Grossmann *et al.*, 2007).

Η διαμερισματοποίηση της πλασματικής μεμβράνης σε περιοχές με συγκεκριμένη σύσταση λιπιδίων και πρωτεϊνών θεωρείται πως συμμετέχει στο χωρικό έλεγχο της κυτταρικής σήμανσης (Fröhlich *et al.*, 2009). Επίσης, η πλευρική οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης απαιτείται για τη φυσιολογική ενδοκύτωση πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές (Grossmann *et al.*, 2008).

Πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας laser σε στελέχη του ζυμομύκητα που έχουν σημασμένες τις πρωτεΐνες-δείκτες έχουν δείξει πως τα συγκεκριμένα μεμβρανικά διαμερίσματα δε συνεντοπίζονται. Συγκεκριμένα, τα MCP και MCT έχουν στικτή κατανομή, ενώ το MCP εκτείνεται ως δίκτυο ανάμεσα στα MCC και MCT σε όλη τη μεμβράνη (Malínská *et al.*, 2003; Berchtold & Walther, 2009; Grossmann *et al.*, 2007) (Εικόνα 1.15).

1.4.1 Εισοσώματα στο *Saccharomyces cerevisiae*

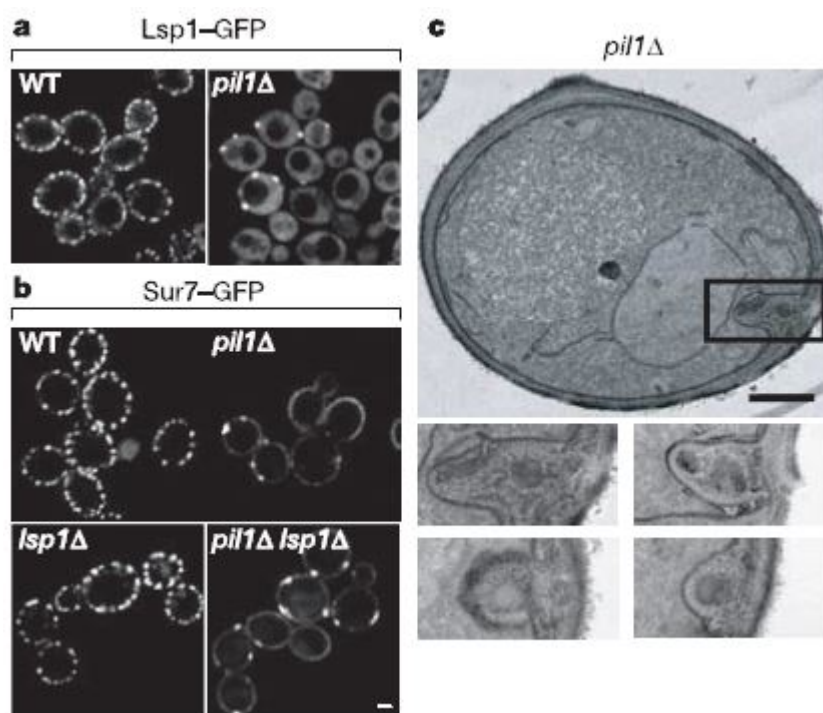
Μέρος της διαμερισματοποίησης της πλασματικής μεμβράνης του *S. cerevisiae* οφείλεται στα εισοσώματα. Τα εισοσώματα είναι μεγάλα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα σταθερά στο χώρο και στο χρόνο, τα οποία προσδένονται στη μεμβράνη από την κυτταροπλασματική της μεριά στο φλοιό του κυττάρου. Η παρουσία τους είναι



Εικόνα 1.15 Σχηματική απεικόνιση των MCC, MCT και MCP από την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης στο *S. cerevisiae*. (σύμφωνα με Olivera-Couto and Aguilar, 2012)

απαραίτητη για τη σωστή οργάνωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη. Είναι δομές με μεγάλο ενδιαφέρον καθώς η παρουσία τους εντοπίζεται αποκλειστικά στο Βασίλειο των Μυκήτων και φαίνεται να επιδρούν σε μία σειρά κυτταρικών λειτουργιών.

Τα εισοσώματα δεν μοιάζουν με άλλες γνωστές υποκυτταρικές δομές λόγω της χαρακτηριστικής στικτής κατανομής που έχουν στο κύτταρο, καθώς και λόγω του σταθερού τους σχήματος. Κατά μέσο όρο, ένα φυσικού τύπου κύτταρο του *S. cerevisiae* περιέχει 30 περίπου εισοσώματα, τα οποία είναι ομοιόμορφα καταναμημένα στην πλασματική μεμβράνη με μια ελάχιστη δυνατή απόσταση μεταξύ τους (Moreira *et al.*, 2009, Εικόνα 1.16). Αυτό το μοτίβο παραμένει σταθερό, δηλαδή τα εισοσώματα δεν κινούνται (Walther *et al.*, 2006). Τα εισοσώματα απαρτίζονται ως επί το πλείστον από δύο πρωτεΐνες, την Pil1 (phosphorylation inhibited by long-chainbases) και την Lsp1 (long-chain bases stimulate phosphorylation) (Zhang *et al.*, 2004). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες συνεντοπίζονται τόσο μεταξύ τους όσο και με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη Sur7 (Walther *et al.*, 2006). Η Sur7 χρησιμοποιείται ως



Εικόνα 1.16 Τα εισοσώματα είναι στικτές δομές και εντοπίζονται υπομεμβρανικά στο κυτταρόπλασμα στο *S. cerevisiae*. Ισημερινές τομές συνεστιακής μικροσκοπίας όπου φαίνονται α) η κατανομή της Lsp1 σε κύτταρα φυσικού τύπου και σε κύτταρα που φέρει έλλειψη του γονιδίου *pil1*, b) η Pil1 είναι ο κύριος οργανωτής των εισοσωμάτων, αφού σε κύτταρα *pil1Δ* τα εισοσώματα χάνουν τη στικτή κατανομή τους, σε αντίθεση με τα κύτταρα *lsp1Δ* όπου την διατηρούν. Ως μάρτυρας των εισοσωμάτων χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη Sur7. c) Σε εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας φαίνεται πώς τα εισοσωμικά απομεινάρια είναι ακανόνιστες, ευμεγέθεις δομές της μεμβράνης. (σύμφωνα με Walther *et al.*, 2006)

δείκτης των MCC λόγω συνεντοπισμού της με την Can1 (Malínská *et al.*, 2004) και κατ' επέκταση τα εισοσώματα συνεντοπίζονται με το MCC. Ο προβλεπόμενος αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο είναι ~115.000 για την Pil1 και ~104.000 για την Lsp1 (de Godoy *et al.*, 2008; Ghaemmaghami *et al.*, 2003), με περίπου 3000 μονάδες κάθε πρωτεΐνης ανά εισόσωμα.

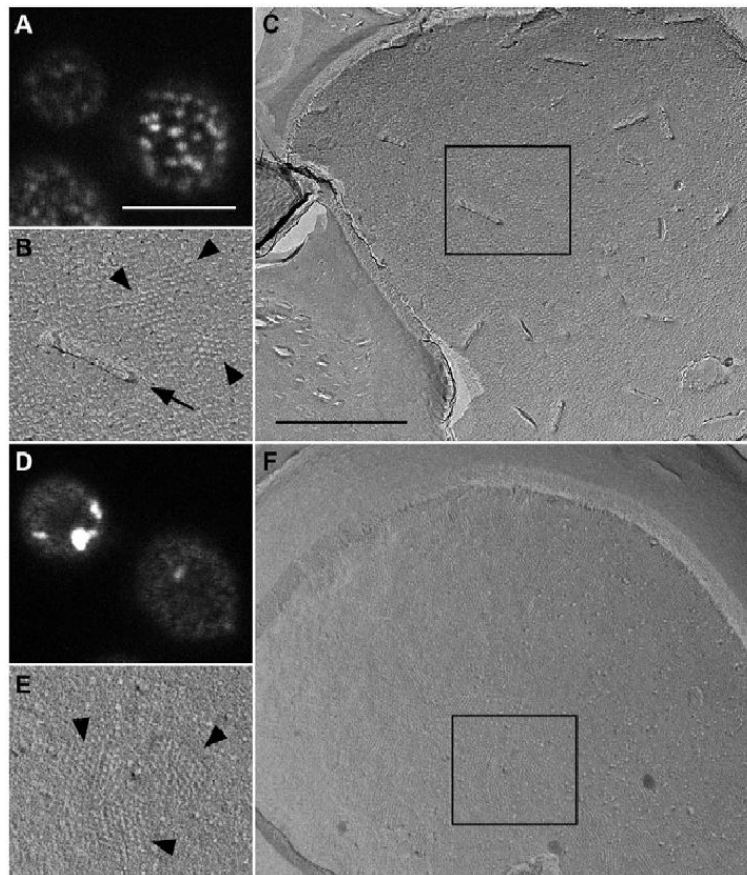
Η Pil1 (YGR086C, 339 aa) και η Lsp1 (YPL004C, 441 aa) παρουσιάζουν 72% ταυτότητα στην αμινοξική τους ακολουθία, με τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις να εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Η δομή της Lsp1 έχει λυθεί κρυσταλλογραφικά για τα αμινοξικά κατάλοιπα 36-267, δείχνοντας πως η Lsp1 είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη που περιέχει τη δομική περιοχή BAR και εντάσσεται φυλογενετικά κοντύτερα στις N-BAR πρωτεΐνες (Ziółkowska *et al.*, 2011). Σε πειράματα καθαρισμού των πρωτεϊνών Pil1 ή Lsp1 από εκχυλίσματα κυττάρων *S. cerevisiae*, συγκατακρυσμνίζονται ισομοριακές ποσότητες τους αντίστοιχα (Walther *et al.*, 2006). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τους υπολογισμούς για τον ίσο αριθμό αντιγράφων της κάθε πρωτεΐνης που εντοπίζονται ανά εισόσωμα, ενώ υποδεικνύουν πως οι δύο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν στοιχειομετρικά ώστε να δημιουργήσουν ένα ικρίωμα για να καμφθεί η μεμβράνη. Απαραίτητη για τη σωστή αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τη μεμβράνη είναι η ύπαρξη της 4,5-διφωσφορικής φωσφο-ινοσιτόλης (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 *Δpil1* δεν παρατηρείται στικτή κατανομή των εισοσωμάτων αλλά κάποια «εισοσωμικά απομεινάρια» που παραμένουν στη μεμβράνη. Αντίθετα, απουσία της Lsp1 τα εισοσώματα διατηρούν τη στικτή κατανομή τους στο κύτταρο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η Pil1 είναι ο κύριος οργανωτής των εισοσωμάτων (Walther *et al.*, 2006, Εικόνα 1.17).

1.4.1.1 Ο βιολογικός ρόλος των εισοσωμάτων στο *Saccharomyces cerevisiae*

Αρχικά με την περιγραφή των εισοσωμάτων προτάθηκε από τον Walther και τους συνεργάτες του ότι τα εισοσώματα λειτουργούν ως πύλες ενδοκύτωσης στο κύτταρο, βασιζόμενοι σε πειράματα μικροσκοπικής παρατήρησης με χρήση της φθορίζουσας βαφής λιπιδίων FM-464. Σε αυτά τα πειράματα παρατηρήθηκε πως

υπήρχε συσσώρευση του δείκτη ενδοκύτωσης σε διακριτές περιοχές, 20 δευτερόλεπτα μετά την επώαση, οι οποίες και συνεντοπίζονταν με τα εισοσώματα (Walther *et al.*, 2006). Όμως μετέπειτα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν πως ο κύριος ρόλος των εισοσωμάτων δεν είναι η διαδικασία της ενδοκύτωσης, την οποία επηρεάζουν μόνο έμμεσα (Grossmann *et al.*, 2008; Vangelatos *et al.*, 2010; Stradalova *et al.*, 2012).

Τα εισοσώματα είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των διαμερισμάτων MCC, τα οποία σε πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης παρατηρούνται ως αυλακώσεις στην πλασματική μεμβράνη του ζυμοκύτητα (Stradalova *et al.*, 2009; Karotki *et al.*, 2011, Εικόνα 1.17). Σε κύτταρα με απαλοιφή του γονιδίου *pill* οι αυλακώσεις αυτές δεν παρατηρούνται και η Can1 αποκτά ομοιόμορφη κατανομή σε όλη τη μεμβράνη. Αυτό συμβαίνει και για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο MCC, οι οποίες είτε εντοπίζονται στα εισοσωμικά απομεινάρια είτε κατανέμονται ομοιόμορφα στη μεμβράνη έπειτα από απαλοιφή του γονιδίου *pill* (Fröhlich *et al.*, 2009; Grossmann *et al.*, 2007; Walther *et al.*, 2006). Επιπρόσθετα, η

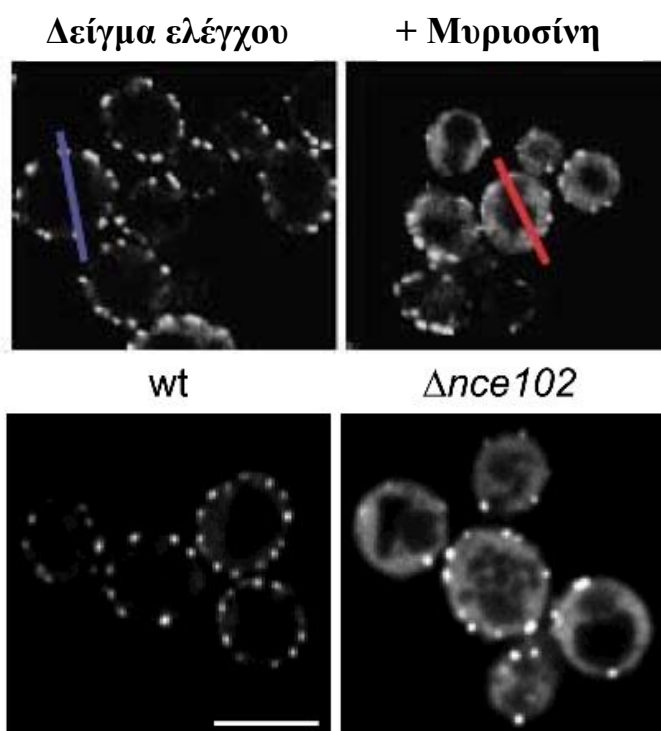


Εικόνα 1.17 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης όπου φαίνονται τα MCC ως αυλακοειδείς εγκοιλώσεις της πλασματικής μεμβράνης. (A-C) σε κύτταρα φυσικού τύπου, (D-F) η απουσία τους σε κύτταρα *Δpill1*. (σύμφωνα με Stradalova *et al.*, 2009).

εργοστερόλη χάνει το στικτό της μοτίβο και αποκτά περισσότερο ομοιόμορφη κατανομή στην πλασματική μεμβράνη ενώ εντοπίζεται και στα εισοσωμικά απομεινάρια (Grossmann *et al.*, 2007).

Περαιτέρω πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η κατανομή της Pil1 στο κύτταρο επηρεάζεται άμεσα από τη διαθεσιμότητα σφιγγολιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα η Pil1 γίνεται κυτταροπλασματική έπειτα από επώαση των κυττάρων με μυριοσίνη, ειδικό αναστολέα της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων (βλ. 1.2.2.2). Ο ίδιος φαινότυπος κατανομής της Pil1 παρατηρείται και σε κύτταρα που υπάρχει απαλοιφή του γονιδίου *nce102* (Εικόνα 1.18). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 173 αμινοξικών καταλοίπων με τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα.

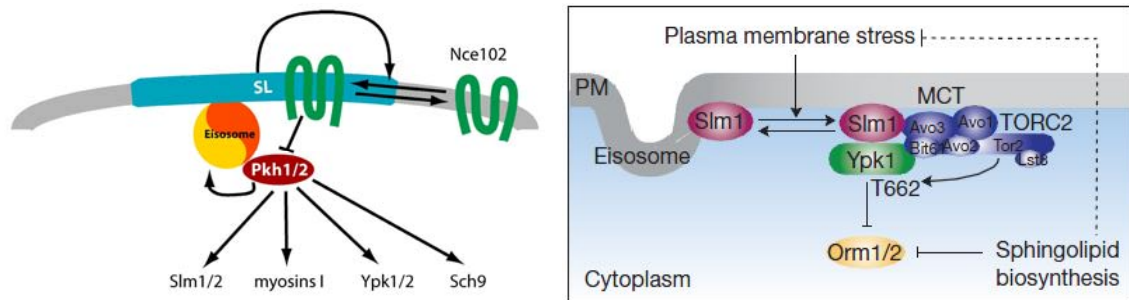
Η πρωτεΐνη Nce102 σχετίζεται με τη μη τυπική έκκριση (non-classical export) λοιμογόνων παραγόντων στην κυτταρική επιφάνεια του *S. cerevisiae*. Παρουσιάζει στικτή κατανομή και συνεντοπίζεται, με τις κύριες πρωτεΐνες των εισοσωμάτων Pil1, Lsp1, Sur7, ενώ φαίνεται να αλληλεπιδρά και με τις κινάσες Pkh. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η Nce102 έχει οργανωτικό ρόλο στη συγκρότηση των εισοσωμάτων καθώς υπερέκφραση της οδηγεί σε διάσωση του φαινοτύπου της Pil1 σε κύτταρα που έχουν επωαστεί σε μυριοσίνη (Fröhlich *et al.*, 2009). Η ομόλογη της Nce102 πρωτεΐνης στον *A. fumigatus* σχετίζεται με τη σποριογένεση, χωρίς να είναι απαραίτητη για την αύξηση των υφών ή την παθογένεια του οργανισμού (Khalaj *et al.*, 2012). Επίσης στην *C. albicans* έχει πρόσφατα δειχθεί ότι ο πολυμερισμός της ακτίνης ρυθμίζεται από την Nce102 (Douglas *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.18 Ισημερινές τομές συνεστιακής μικροσκοπίας laser, όπου παρατηρείται η κατανομή της Pil1 σε κύτταρα φυσικού τύπου και σε κύτταρα που έχουν υποστεί επώαση με μυριοσίνη. Ο τελευταίος φαινότυπος είναι ίδιος με αυτόν σε κύτταρα *Δnce102* (σύμφωνα με Walther *et al.*, 2007 και Fröhlich *et al.*, 2009)

Τα τελευταία πειραματικά δεδομένα συνδυασμένα, οδηγούν σε ένα ενοποιημένο μοντέλο σύμφωνα με το οποίο ο κύριος ρόλος των εισοσωμάτων είναι η ρύθμιση της βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων στο ζυμομύκητα (Zhang *et al.*, 2004; Fröhlich *et al.*, 2009; Niles *et al.*, 2012; Berchtold *et al.*, 2012). Σε αυτό το μοντέλο η πρωτεΐνη Nce102 συνεντοπίζεται με τα εισοσώματα και δρα ως αρνητικός ρυθμιστής των κινασών Pkh1 και Pkh2. Οι κινάσες αυτές έχουν ως υποστρώματα μια πληθώρα πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων οι Slm 1 και Slm 2, οι κινάσες της οικογένειας AGC, Yrk 1 και Yrk 2 καθώς και η Pil1. Ο βαθμός φωσφορυλίωσης της Pil1 έχει δειχθεί πως οδηγεί είτε σε απενεργοποίηση είτε σε ενεργοποίηση της (Walther *et al.*, 2007 και Luo *et al.*, 2008 αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η Pil1 απαιτεί συγκεκριμένο πρότυπο φωσφορυλίωσης ώστε να παραμείνει ενεργή. Σε κάθε περίπτωση αδυναμία της Pil1 για αυτοσυγκρότηση, οδηγεί σε αποδιοργάνωση των εισοσωμάτων.

Σε περίπτωση που υπάρχει μειωμένη συγκέντρωση σφιγγολιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, η Nce102 απομακρύνεται από τις λιπιδικές σχεδίες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποαναστολή των κινασών Pkh1/2 και φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων τους. Τα εισοσώματα αποδιοργανώνονται, λόγω της φωσφορυλιωμένης Pil1, και κατ' επέκταση οι κινάσες Slm1/2 μετακινούνται από τα αποδιοργανωμένα εισοσώματα στο TORC2. Εκεί στρατολογούν την κινάση Yrk1, η οποία έχει ήδη μερικώς φωσφορυλιωθεί από τις Pkh1/2. Η κινάση Yrk1



Εικόνα 1.19 Ο βιολογικός ρόλος των εισοσωμάτων στο *S. cerevisiae* (A) η Nce102 δρα ως αναστολέας των κινασών Pkh1/2 (προσαρμογή από Fröhlich *et al.*, 2009), (B) η Slm1 στρατολογεί την Yrk1 στο TORC2 (προσαρμογή από Berchtold *et al.*, 2012), (C) ο καταρράκτης φωσφορυλίσεων έχει ως αποτέλεσμα την αποαναστολή του μονοπατιού βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων (σύμφωνα με Niles *et al.*, 2012). Λεπτομέρειες στο κείμενο.

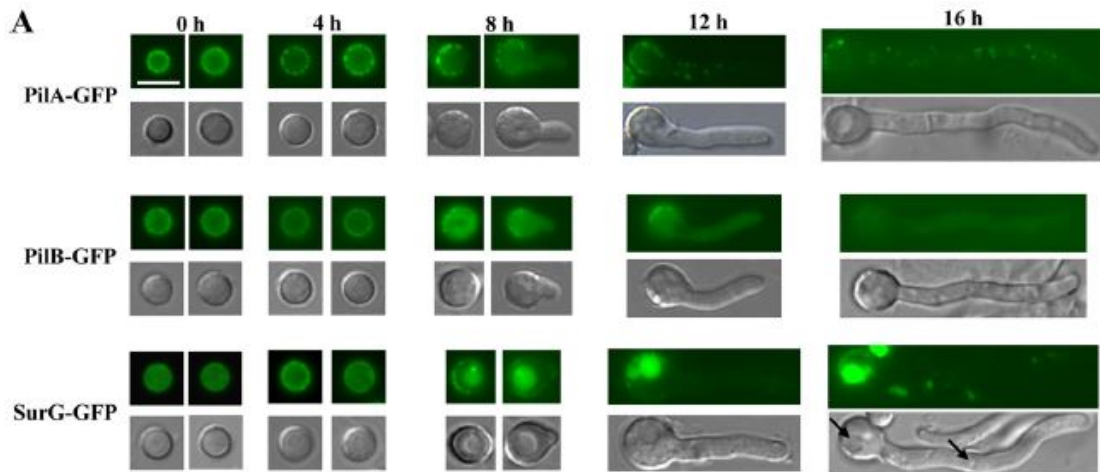
φωσφορυλιώνεται περαιτέρω στο TORC2 και καθίσταται πλήρως λειτουργική. Υπόστρωμα της Yrk1 είναι και οι κινάσες Opm1/2, οι οποίες όταν είναι ενεργές (μη φωσφορυλιωμένες) αναστέλουν την παλμιτοϋλτρανσφεράση της σερίνης του μονοπατιού βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων. Φωσφορυλίωση και επομένως ανενεργοποίηση των Opm1/2 από την Yrk1 οδηγεί σε αποαναστολή του μονοπατιού και βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων ώστε να αναπληρωθούν τα σφιγγολιπίδια στο κύτταρο. Τα παραπάνω συνοψίζονται στην Εικόνα 1.20.

1.4.2 Εισοσώματα στο *Aspergillus nidulans*

Η μελέτη των εισοσωμάτων στον υφομύκητα *A. nidulans* παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω των ευδιάκριτων διαφορετικών δομών που έχει ο μύκητας κατά τη διάρκεια του αφυλετικού και φυλετικού κύκλου ζωής. Μέχρι στιγμής, στον οργανισμό έχουν ταυτοποιηθεί οι ομόλογες πρωτεΐνες των εισοσωμικών Pil1/Lsp1 και της πρωτεΐνης-δείκτη των MCC Sur7, PilA και SurG αντίστοιχα. Παράλληλα, εντοπίστηκε η εισοσωμική πρωτεΐνη PilB, η οποία έχει διαχωριστεί εξελικτικά από τις ομόλογες Pil1/PilA πολύ νωρίτερα στην εξέλιξη των Pezizomycotina (Vangelatos *et al.*, 2010). Έχει επίσης πραγματοποιηθεί λειτουργικός χαρακτηρισμός της YrkA, ομόλογης της πρωτεΐνης Yrk1 καθώς και της PkhA, ομόλογης των Pkh1/2 (Colabardini *et al.*, 2013).

Παρά την εξελικτική συντήρηση των εισοσωμικών πρωτεϊνών, μέχρι στιγμής δεν έχει υπάρξει κάποιος διακριτός μακροσκοπικός ή μικροσκοπικός φαινότυπος στην ανάπτυξη του υφομύκητα απουσία της PilA ή της PilB (Vangelatos *et al.*, 2010).

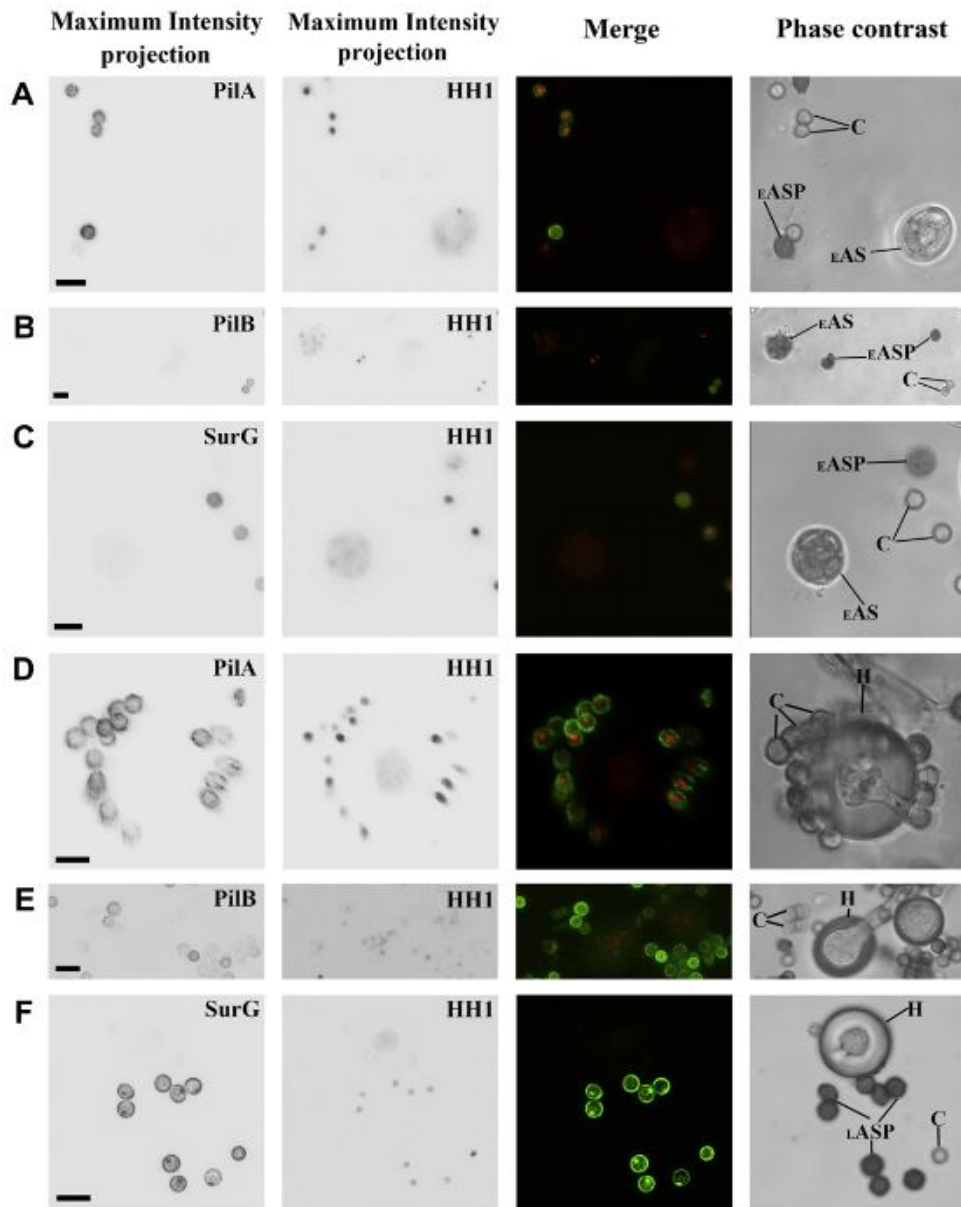
Στον αφυλετικό κύκλο ζωής του μύκητα η PilA και η PilB έχουν στικτή κατανομή στη μεμβράνη του κονιδιοσπορίου. Αυτή η κατανομή δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ισοτροπικής φάσης ανάπτυξης του μύκητα. Η SurG πέραν του εντοπισμού της στην περιφέρεια των κονιδιοσπορίων παρατηρείται και περιπυρηνικά. Κατά την εκβλάστηση και στις νεαρές υφές μόνο η PilA διατηρεί τη στικτή κατανομή της, η PilB γίνεται κυτταροπλασματική, χωρίς όμως να εντοπίζεται στους πυρήνες, ενώ η SurG εντοπίζεται κυρίως στα χυμοτόπια και τα ενδοσώματα (Vangelatos *et al.*, 2010, Εικόνα 1.20).



Εικόνα 1.20 Η κυτταροπλασματική κατανομή των εισοσωμικών πρωτεϊνών PilA, PilB και SurG. Η PilA διατηρεί τη στικτή της κατανομή καθόλη την ανάπτυξη της υφής, η PilB γίνεται σταδιακά κυτταροπλασματική υποδεικνύοντας μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε νεαρές υφές ενώ η SurG εντοπίζεται στα χυμοτόπια μετά την εκβλάστηση (προσαρμογή από Vangelatos *et al.*, 2010).

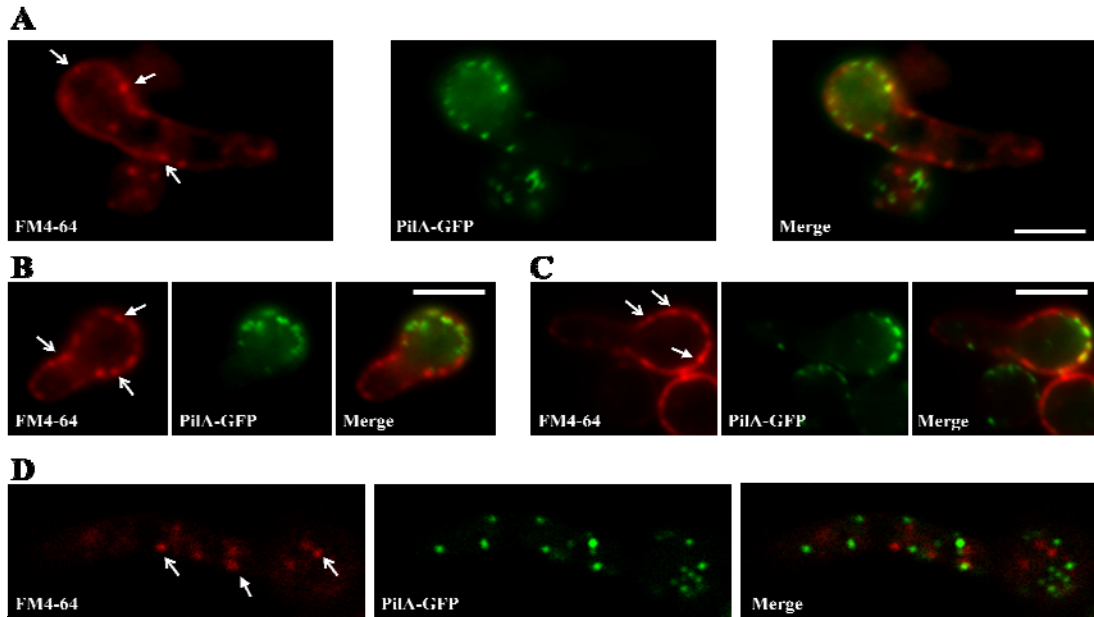
Πρόσφατα εξετάστηκε η κατανομή των κύριων εισοσωμικών πρωτεϊνών PilA, PilB και SurG στα ασκοσπόρια (Athanasopoulos *et al.*, 2013). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές δεν εκφράζονται στα πρώιμα ασκοσπόρια ούτε στα κύτταρα Hülle, ενώ εκφράζονται στα ώριμα ασκοσπόρια (εικόνα 1.21). Η PilA έχει στικτή κατανομή στο ώριμο ασκοσπόριο, ενώ κατά τη διαδικασία της εκβλάστησης συγκεντρώνεται στην περιοχή του σπορίου αντίθετα από το σωλήνα εκβλάστησης. Η PilB σε ληθαργικά ασκοσπόρια εντοπίζεται στην περιφέρεια των κυττάρων ενώ κατά την ισοτροπική φάση και την εκβλάστηση η κατανομή της γίνεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, η SurG εντοπίζεται στην περιφέρεια των ασκοσπορίων και περιπυρηνικά. Κατά τη διάρκεια της ισοτροπικής φάσης ο περιπυρηνικός φθορισμός της SurG μειώνεται και εξαφανίζεται πλήρως κατά την εκβλάστηση της υφής. Στα εκβλαστημένα ασκοσπόρια η SurG περιορίζεται στα ενδοσώματα και το χυμοτόπιο.

Με πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας όπου παρατηρήθηκε απουσία συντενοπισμού της PilA με τον AbrA, το δείκτη σημείων ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης, έχουν δείξει πώς τα εισοσώματα δεν εμπλέκονται με την ενδοκύτωση (Athanasopoulos *et al.*, 2013). Επιπρόσθετα, ο ρυθμός ενδοκύτωσης της χρώσης λιπιδίων FM4-64, δε διαφοροποιείται σημαντικά σε κύτταρα *pilA*⁺ και *pilAΔ* (εικ. 1.23), παρότι υπάρχει μία μικρή μείωση στην πρόσληψη της FM4-64 σε κύτταρα *pilAΔ*. Τέλος, η απαλοιφή του γονιδίου *pilA* δεν έχει καμία επίπτωση στην επαγόμενη από αμμωνιακά ιόντα ενδοκύτωση του AgtA (μεταφορέας δικαρβοξυλικών αμινοξέων), ή στην ενδοκύτωση του κύριου μεταφορέα της προλίνης Prib (Vangelatos *et al.*, 2010). Όλα αυτά τα αποτελέσματα συνηγορούν πως τα



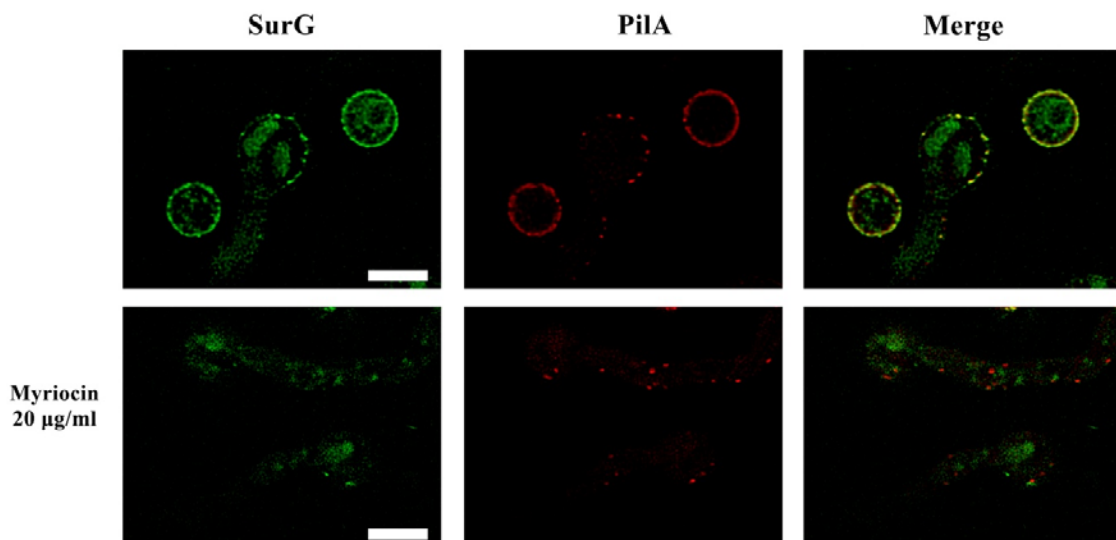
Εικόνα 1.21 Η έκφραση και ο υποκυτταρικός εντοπισμός των εισσωμικών πρωτεϊνών PilA, PilB και SurG, όπως παρατηρούνται σε πρώιμες (A-C) και ώριμες (D-F) μορφές των προϊόντων του φυλετικού και του αφυλετικού κύκλου. Οι πρωτεΐνες δεν εκφράζονται στα πρώιμα στάδια του φυλετικού κύκλου ή στα κύτταρα Hülle, ενώ εντοπίζονται στα ώριμα ασκοσπόρια. Μέγεθος κλίμακας = 5 μm . C: κονίδια, EASP: πρώιμο ασκοσπόριο, EAS: πρώιμος ασκός, H: κύτταρο Hülle, LASP: ώριμο ασκοσπόριο (προσαρμογή από Athanasopoulos *et al.*, 2013).

εισοσώματα δεν λειτουργούν ως πύλες ενδοκύττωσης στον *A. nidulans*. Η συσχέτιση των εισσωμάτων με την AnNce102 μελετάται αυτή τη στιγμή (Athanasopoulos and Sophianopoulou, αδημοσίευτα αποτελέσματα).



Εικόνα 1.22 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser όπου φαίνεται πώς δεν υπάρχει απόλυτος συνεντοπισμός της PilA με τη χρώση FM4-64, επομένως η PilA δεν είναι πύλη ενδοκύτωσης των λιπιδίων στον *A. nidulans*. Τα συμπαγή βέλη δείχνουν τα σημεία συνεντοπισμού (Vangelatos *et al.*, 2010).

Τέλος, μελέτη της επίδρασης της μυριοσίνης στην κατανομή των εισοσωμάτων και την ανάπτυξη του μύκητα έχει δείξει πώς η μυριοσίνη σε συγκεντρώση 20 $\mu\text{g/ml}$, οδηγεί σε αποδιοργάνωση των εισοσωμάτων (εικόνα 1.23). Σε τέτοια συνθήκη η SurG δεν συνεντοπίζεται με την PilA (Athanasopoulos and Sophianopoulou, αδημοσίευτα αποτελέσματα), ενώ έχει ήδη αποδειχθεί πώς οι στικτοί σχηματισμοί της PilA-GFP σε αυτές τις συνθήκες μειώνονται με ταυτόχρονη αύξηση του κυτταροπλασματικού φθορισμού (Athanasopoulos *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.23 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας laser όπου φαίνεται η επίδραση της μυριοσίνης στα εισοσώματα. Παρουσία μυριοσίνης η τοπολογία της SurG αλλάζει. Η απουσία συνεντοπισμού SurG και PilA σε αυτή τη συνθήκη υποδεικνύει πώς οι στικτοί σχηματισμοί της PilA που παραμένουν στη μεμβράνη δεν είναι λειτουργικά εισοσώματα (Athanasopoulos and Sophianopoulou, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της συσχέτισης της δομής με τη λειτουργία της εισοσωμικής πρωτεΐνης PilA στον *A. nidulans*. Πιο συγκεκριμένα:

1. με βάση προηγούμενα πειραματικά δεδομένα μελέτη *in silico* της δομής της PilA
2. Σχεδιασμός και εισαγωγή συγκεκριμένων υποκαταστάσεων αμινοξικών καταλοίπων στο λειτουργικό μόριο της PilA.
3. Μελέτη της κυτταρικής κατανομής των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της PilA και των πιθανών επιπτώσεων τους στην κατανομή των PilB και AnNce102 εισοσωμικών πρωτεϊνών.

2. Υλικά και Μεθοδολογία

2.1. Στελέχη μυκήτων

Οι γονότυποι των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Τα στελέχη του *A. nidulans* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

α/α	Γονότυπος στελέχους	Κατασκευή
1	wt <i>riboB2</i>	
2	<i>PilAΔ::[Afribo] nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Vangelatos I.
3	<i>nce102::mrfp::AfpyrG pyroA4 nkuA::argB+ pyrG89</i>	Athanasopoulos A.*
4	<i>nce102Δ::Afribo pyrG89 riboB2 pyroA4 nkuA::argB+</i>	Amillis S.*
5	<i>pilB::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22</i>	Vangelatos I. (2010)
6	<i>pilA::gfp::AfpyrG nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Vangelatos I. (2010)
7	<i>pilA(L87D multicopy)::gfp::AfpyrG nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Παρούσα εργασία
8	<i>pilA(L87R)::gfp::AfpyrG nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Παρούσα εργασία
9	<i>pilA(K149E)::gfp::AfpyrG nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Παρούσα εργασία
10	<i>pilA(K147N K149E)::gfp::AfpyrG nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Παρούσα εργασία
11	<i>pilA(K156E)::gfp::AfpyrG nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Παρούσα εργασία
12	<i>pilA(K160E)::gfp::AfpyrG nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Παρούσα εργασία
13	<i>pilA(R166E)::gfp::AfpyrG nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Παρούσα εργασία
14	<i>alcA^p::pilA::gfp::AfpyrG nkuAΔ(argB+) pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2</i>	Παρούσα εργασία
15	<i>pilA::gfp::AfpyrG nce102::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyroA4 pyrG89 argB2</i>	Παρούσα εργασία
16	<i>pilA(L87D)::gfp::AfpyrG nce102::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyroA4 pyrG89 argB2</i>	Παρούσα εργασία
17	<i>pilA(L87R)::gfp::AfpyrG nce102::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyroA4 pyrG89 argB2</i>	Παρούσα εργασία
18	<i>pilA(K149E)::gfp::AfpyrG nce102::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyroA4 pyrG89 argB2</i>	Παρούσα εργασία
19	<i>pilA(K147N K149E)::gfp::AfpyrG nce102::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyroA4 pyrG89 argB2</i>	Παρούσα εργασία
20	<i>pilA(K156E)::gfp::AfpyrG nce102::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyroA4 pyrG89 argB2</i>	Παρούσα εργασία
21	<i>pilA(K160E)::gfp::AfpyrG nce102::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyroA4 pyrG89 argB2</i>	Παρούσα εργασία
22	<i>pilA(R166E)::gfp::AfpyrG nce102::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyroA4 pyrG89 argB2</i>	Παρούσα εργασία
23	<i>alcA^p::pilA::gfp::AfpyrG nce102::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyroA4 pyrG89 argB2</i>	Παρούσα εργασία
24	<i>pilA::gfp::AfpyrG pilB::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22</i>	Παρούσα εργασία
25	<i>pilA(L87D)::gfp::AfpyrG pilB::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22</i>	Παρούσα εργασία
26	<i>pilA(L87R)::gfp::AfpyrG pilB::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22</i>	Παρούσα εργασία
27	<i>pilA(K149E)::gfp::AfpyrG pilB::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22</i>	Παρούσα εργασία
28	<i>pilA(K147N K149E)::gfp::AfpyrG pilB::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22</i>	Παρούσα εργασία
29	<i>pilA(K156E)::gfp::AfpyrG pilB::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22</i>	Παρούσα εργασία
30	<i>pilA(K160E)::gfp::AfpyrG pilB::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22</i>	Παρούσα εργασία
31	<i>pilA(R166E)::gfp::AfpyrG pilB::mrfp::AfpyrG nkuAΔ::argB+ pyrG89 argB2 pabaB22</i>	Παρούσα εργασία
32	<i>pilA::gfp::AfpyrG nce102Δ::Afribo nkuAΔ::argB+ pyrG89 pyroA4 riboB2 argB2</i>	Παρούσα εργασία
33	<i>pilA(L87D)::gfp::AfpyrG nce102Δ::Afribo nkuAΔ::argB+ pyrG89 pyroA4 riboB2 argB2</i>	Παρούσα εργασία
34	<i>pilA(L87R)::gfp::AfpyrG nce102Δ::Afribo nkuAΔ::argB+ pyrG89 pyroA4 riboB2 argB2</i>	Παρούσα εργασία
35	<i>pilA(K149E)::gfp::AfpyrG nce102Δ::Afribo nkuAΔ::argB+ pyrG89 pyroA4 riboB2 argB2</i>	Παρούσα εργασία

36	<i>pilA(K147N K149E)::gfp::Afp_{pyrG} nce102Δ::Afr_{ibo} nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 pyroA4 riboB2 argB2</i>	Παρούσα εργασία
37	<i>pilA(K156E)::gfp::Afp_{pyrG} nce102Δ::Afr_{ibo} nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 pyroA4 riboB2 argB2</i>	Παρούσα εργασία
38	<i>pilA(K160E)::gfp::Afp_{pyrG} nce102Δ::Afr_{ibo} nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 pyroA4 riboB2 argB2</i>	Παρούσα εργασία
39	<i>pilA(R166E)::gfp::Afp_{pyrG} nce102Δ::Afr_{ibo} nkuAΔ::argB⁺ pyrG89 pyroA4 riboB2 argB2</i>	Παρούσα εργασία

Τα στελέχη που σημειώνονται με αστερίσκο (*) έχουν κατασκευαστεί από τους αντίστοιχους ερευνητές αλλά δεν έχουν προς το παρόν ανακοινωθεί σε επιστημονική δημοσίευση.

Η κατασκευή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της PilA περιγράφεται στα αποτελέσματα. Τα στελέχη με αύξοντα αριθμό 15-23 στον πίνακα 2.1 προέκυψαν έπειτα από διασταύρωση του στελέχους *nce102::mr_{gfp}::Afp_{pyrG} pyroA4 nkuA::argB⁺ pyrG89* με τα αντίστοιχα στελέχη αύξοντα αριθμού 6-14. Ομοίως τα στελέχη 24-31 προέκυψαν από διασταύρωση των στελεχών 6-13 με το στέλεχος 5, και τα στελέχη 32-39 από διασταύρωση των 6-13 με το στέλεχος 4. Οι μεταλλαγές που χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλεία αυξοτροφίων των στελεχών είναι οι εξής:

Η μεταλλαγή *rabaB22* προκαλεί αυξοτροφία για παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ.

Η μεταλλαγή *riboB2* προκαλεί αυξοτροφία για ριβοφλαβίνη και το αντίστοιχο γονίδιο έχει κλωνοποιηθεί επιτυχώς από τους Oakley *et al.*, 1987a.

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

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

2.2. Θρεπτικά υποστρώματα μυκήτων

Οι καλλιέργειες των μυκήτων έγιναν σε Πλήρη και Ελάχιστα Υποστρώματα η σύσταση των οποίων αναγράφεται στους Πίνακες 2.2 και 2.3 (Cove, 1966; Scazzocchio *et al.*, 1982).

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 αναλόγως τη χρήση για την οποία προορίζονταν. Στα εκλεκτικά υποστρώματα για δοκιμασίες ανάπτυξης, χρησιμοποιήθηκε μία ειδικά επεξεργασμένη άγαρ της

εταιρείας Oxoid, η οποία περιέχει ελάχιστα ποσοστά πηγών αζώτου, και επέτρεψε τη διάκριση μικρών διαφορών στη μορφή της αποικίας (μέγεθος, πυκνότητα κονιδιοσπορίων) των προς μελέτη στελεχών. Στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκε επιπλέον μία πηγή αζώτου. Η πιο κοινή «ουδέτερη» πηγή αζώτου είναι η ουρία, η οποία προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα σε τελική συγκέντρωση. Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκαν νιτρικά ιόντα σε τελική συγκέντρωση 10 mM. Όπου ήταν αναγκαία η προσθήκη ουρακίλης και ουριδίνης ως αυξοτροφιών, χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 2,5 mM και 5 mM αντίστοιχα. Η επαγωγή της έκφρασης της PilA από τον υποκινητή *alcA^P* επιτεύχθηκε μετά από 2 ώρα ανάπτυξης σε MM με ουρία (5 mM), πηγή άνθρακα γλυκερόλη (0,1%) και θρεονίνη (100 mM). Η αναστολή επιτεύχθηκε σε MM με ουρία (5 mM) και γλυκόζη (1%). Οι υπόλοιπες αυξοτροφίες χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεντρώσεις, οι οποίες αναγράφονται στη σύσταση του διαλύματος βιταμινών στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.2 Η σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του *A. nidulans*.

	Πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα (Complete Medium)	Ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα (Minimal Medium)	Ισοοσμωτικό Ελάχιστο Υπόστρωμα (Sucrose Minimal Medium)
dH ₂ O	μέχρι 1 l	μέχρι 1 l	μέχρι 1 l
Διάλυμα Αλάτων	20 ml	20 ml	20 ml
Διάλυμα 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

Πίνακας 2.3 Σύσταση του διαλύματος ιχνοστοιχείων και συγκεντρώσεις χρησιμοποίησης αυξοτροφιών.

Διάλυμα Αλάτων		Διάλυμα Βιταμινών		Διάλυμα Ιχνοστοιχείων σε 1l dH ₂ O	
dH ₂ O	1 l	dH ₂ O	1 l	Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	40 mg
KCl	26 g	p-αμινοβενζοϊκό οξύ	200 mg	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	400 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	26 g	βιοτίνη	1 mg	FeO ₄ P x 4 H ₂ O	714 mg
KH ₂ PO ₄	76 g	D-παντοθενικό ασβέστιο	50 mg	MnSO ₄ x 1 H ₂ O	728 mg
Χλωροφόρμιο	2 ml	Ριβοφλαβίνη	50 mg	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	800 mg
Δ/μα ιχνοστοιχείων	50 ml	Πυριδοξίνη	50 mg	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8 mg

2.3. Συντήρηση των στελεχών του *A. nidulans*

Τα στελέχη του μύκητα μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον δύο χρόνια σε γλυκερόλη 50% στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Συγκεκριμένα, φρέσκα κονιδιοσπόρια περισυλλέγονται σε σωλήνα τύπου Eppendorf που περιέχει 0,7 ml αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (σύσταση στο λίτρο: NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na_2PO_4 1,44 g, KH_2PO_4 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Διασταυρώσεις στελεχών και ανάλυσή τους

Οι διασταυρώσεις στελεχών του *A. nidulans* πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται από τους 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 αναστομάσεων των υφών. Επιφάνειες διαστάσεων $0.5 \times 0.5\text{ cm}^2$, που περιέχει σημεία επαφής των υφών των δύο μυκήτων άρα και τις μεταξύ τους αναστομάσεις, αποκόπηκαν και μεταφέρθηκαν σε στερεό ελάχιστο για το ετεροκάριο 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ακολούθησε αποκλεισμός του αέρα και περαιτέρω καλλιέργεια για 2 τουλάχιστον εβδομάδες στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 ετεροκάριο θρεπτικό υπόστρωμα, για να διαπιστωθεί η προέλευση των δύο πυρήνων που έχουν συντηχθεί στο κάθε κλειστοθήκιο. Μόνον 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, και σε περιπτώσεις που οι συγκεκριμένες δοκιμασίες δεν ήταν αρκετές για διάγνωση των επιθυμητών απογόνων πραγματοποιήθηκε παρατήρηση κονιδιοσπορίων με χρήση μικροσκοπίας επιφθορισμού.

2.5 Θρεπτικά υποστρώματα βακτηρίων

Η καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους DH5a του *E. coli* έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani (LB) (Σύσταση στο λίτρο: Bacto Tryptone 10 g, NaCl 10 g, BactoYeast Extract 5 g, pH 7,0) (Sambrook et al. 1989). Η προσαρμογή του pH έγινε με διαλύματα 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 για τις οποίες χρειάστηκε η προσθήκη αμπικιλίνης, σε υγρό ή στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Τα βακτηριακά στελέχη διατηρήθηκαν στους -80 °C σε 50% γλυκερόλη.

2.6 Προετοιμασία δεκτικών βακτηρίων για μετασηματισμό

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δεκτικών κυττάρων της *E. coli* αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στα Κεφάλαια 1.82-1.84 στο Sambrook et al. (1989) και διαμορφώθηκε ως εξής: Μία απομονωμένη αποικία του βακτηρίου *E. coli* (DH5a) χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση 5 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος Luria Bertoni (LB) και η καλλιέργεια επώαστηκε για 16 ώρες στους 37 °C με ανάδευση στις 220 rpm. Από την πυκνή καλλιέργεια βακτηρίων που παράχθηκε, χρησιμοποιήθηκε 0,5 ml για την επιμόλυνση 400 ml υγρού LB σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 1 l, ώστε να εξασφαλιστεί καλός αερισμός και ανάδευση. Τα κύτταρα 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 φυγοκέντρωση 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 σωληνάρια Eppendorf και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, όπου μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον έξι μήνες χωρίς να χάσουν τη δεκτικότητα τους (Sambrook et al. 1989).

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 Κεφάλαιο 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 (π.χ. το γονίδιο *bla* της β-λακταμάσης που θα εξασφαλίσει στα μετασηματισμένα στελέχη ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη). 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 τη διαίρεση αυτών. Τα μετασηματισμένα κύτταρα στη συνέχεια επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB, που περιείχε αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 16 ώρες (Sambrook et al. 1989).

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 στα Κεφάλαια 1.34-1.37 στο Sambrook et al. 1989. Συγκεκριμένα 1,5 ml αναπτυγμένης καλλιέργειας βακτηρίων μετασηματισμένων 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 et al. 1989).

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 φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως. Μετά τη φυγοκέντρηση δημιουργήθηκαν ξανά δύο φάσεις, όπου στην πάνω φάση βρισκόταν το DNA και στην κάτω φάση το χλωροφόρμιο. Περισυλλέχθηκε η «πάνω» φάση σε νέο Eppendorf αποφεύγοντας τη μεσόφαση. Ακολούθησε κατακρήμιση του DNA με την προσθήκη είτε ίσου όγκου ισοπροπανόλης είτε 2,5 όγκων 99% αιθανόλης και 1/10 του όγκου οξικού νατρίου ή καλίου 3 M pH 5,2 με φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα εκκλύθηκε με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε 50 μl νερού υψηλής καθαρότητας.

2.10 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες – Κλωνοποίηση

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

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκαν πέψεις 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, Takara).

Σε όλες τις κλωνοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν, τόσο το ένθεμα όσο και ο φορέας κλωνοποίησης ήταν υψηλής καθαρότητας. Το πλασμίδιο και το ένθεμα χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 1/3 (συνήθως σε συγκεντρώσεις 0,1 μg πλασμιδίου/0,3 μg ενθέματος). Στις περιπτώσεις, στις οποίες έγινε αποκυκλοποίηση του φορέα μετά από πέψη με ένα μοναδικό περιοριστικό ένζυμο, ακολούθησε αποφωσφορυλίωση των 5' άκρων του με την προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης αλκαλικής φωσφατάσης (Sambrook et al. 1989), προκειμένου να αποφευχθεί η κυκλοποίηση του φορέα χωρίς την επικόλληση του ενθέματος. Πριν την προσθήκη της λιγάσης, η οποία καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των άκρων του φορέα και του ενθέματος, ήταν απαραίτητη η απομάκρυνση ενζύμων και

διαλυμάτων της πέψης, είτε μέσω διήθησης από ειδική κολώνα είτε, με κατακρήμνιση παρουσία αιθανόλης. Σε κάθε νέα κλωνοποίηση μαζί με το διάλυμα επικόλλησης συμπεριλήφθηκε και μία επιπλέον αντίδραση «μάρτυρας». Η αντίδραση αυτή, περιείχε τα ίδια συστατικά με την πραγματική αντίδραση επικόλλησης, αλλά δεν περιείχε ένθεμα και υποδείκνυε την περίπτωση ύπαρξης συμβατών άκρων στο φορέα, είτε λόγω ημιτελούς πέψης, είτε λόγω ατελούς δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης (Sambrook et al. 1989).

2.11 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.11.1 Εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Τα εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2

Πίνακας 2.4 Πίνακας των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

α/α	Όνομα	Αλληλουχία	Tm (°C)
1	PilA P2	5' - GCT GAA CCA GAA GAG GCT GC - 3'	61.4
2	PilA P5	5' - GCA TCC ATG ATG TCA GCA TAC - 3'	57.9
3	PilA-L87R F	5' - TGA CCC GAC TAG CAA CAA GAC TCC ATC TGG GGT GAG AAC - 3'	64.6
4	PilA-L87R R	5' - GTT CTC ACC CCA GAT GGA GTC TTG TTG CTA GTC GGG TCA - 3'	64.6
5	PilA-L87D F	5' - GAC CCG ACT AGC AAC AAC GGT CCA TCT GGG GTG AGA A - 3'	67.9
6	PilA-L87D R	5' - TTC TCA CCC CAG ATG GAC CGT TGT TGC TAG TCG GGT C - 3'	67.9
7	PilA-K149E F	5' - CAT GTC CTA GGC AAG CAG GAG ATC ACC GAT GAG ATT G - 3'	65.7
8	PilA-K149E R	5' - CAA TCT CAT CGG TGA TCT CCT GGT TGC CTA GGA CAT G - 3'	65.7
9	PilA-K156E F	5' - ATC ACC GAT GAG ATT GCC GAG TTG AAG TAC AAG GAC C - 3'	64.6
10	PilA-K156E R	5' - GGT CCT TGT ACT TCA ACT CGG CAA TCT CAT CGG TGA T - 3'	64.6
11	PilA-K160E F	5' - ATT GCC AAG TTG AAG TAC GAG GAC CCC AAC TCC CCA C - 3'	66.8
12	PilA-K160E R	5' - GTG GGG AGT TGG GGT CCT CGT ACT TCA ACT TGG CAA T - 3'	66.8
13	PilA-R166E F	5' - AAG GAC CCC AAC TCC CCA GAG ATT GTC GTT CTC GAG CAA - 3'	64.6
14	PilA-R166E R	5' - TTG CTC GAG AAC GAC AAT CTC TGG GGA GTT GGG GTC CTT - 3'	64.6
15	AlcA-PstI F	5' - ACC TGC AGT AAG TCC CTT CGT ATT TCT CCG - 3'	55.9
16	AlcA-NsiI R	5' - ACG ATG CAT TTT GAG GCG AGG TGA TAG - 3'	57.9

2.11.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του τμήματος DNA που αντιστοιχεί στον υποκινητή *alcA^P*

Για την απομόνωση της αλληλουχίας του υποκινητή *alcA^P* πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη χρήση των υποκινητών AlcA-PstI F και AlcA-NsiI R. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η υψηλής πιστότητας DNA πολυμεράση HiFi (KAPA). Η σύσταση της αντίδρασης PCR παρουσιάζεται στον πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5 Σύσταση της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας DNA του υποκινητή *alcA^P*

Συστατικά της PCR	Ποσότητα/ Συγκέντρωση
Γονιδιωματικό DNA	50 ng
Primer AlcA-PstI F	0.3 μ M
Primer AlcA-NsiI R	0.3 μ M
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	250 μ M από το κάθε ένα
KAPA HiFi DNA polymerase	1 u
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (περιέχει MgCl ₂)	1X (τελική συγκέντρωση MgCl ₂ 2 mM)
dH ₂ O	μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 50 μ L

Πίνακας 2.6 Πρωτόκολλο κύκλων της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας DNA του υποκινητή *alcA^P*

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
1	95	3 min
2	95	20 sec
3	61	15 sec
4	72	15 sec
5	Επανάληψη 2-4	25 κύκλοι
6	72	5 min
7	4	∞

2.11.3 Κατευθυνόμενη *in vitro* PCR μεταλλαξιγένεση

Για τη δημιουργία στοχευόμενων μεταλλαγών στο γονίδιο *pilA*, και συγκεκριμένα στο πλασμίδιο pPG2 (ενότητα 3.2) εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της

PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, όπως περιγράφεται από την εταιρεία Stratagene (*quick change mutagenesis*), χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές.

2.11.3.1 Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή στοχευόμενων μεταλλαγών

Η κάθε μεταλλαγή κατασκευάστηκε με τη χρήση ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδίων μεγέθους 30-40 νουκλεοτιδικών βάσεων το κάθε ένα, τα οποία ήταν μεταξύ τους συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πρωτόκολλο, είχαν μέγεθος 35-39 βάσεις ώστε να εξασφαλίζεται ένα μεγάλο τμήμα απόλυτης συμπληρωματικότητας, το οποίο θα αντισταθμίζει τη μειωμένη συμπληρωματικότητα στο σημείο όπου βρίσκονται οι τροποποιημένες νουκλεοτιδικές βάσεις. Η νουκλεοτιδική ακολουθία του 5' εκκινητή ήταν πανομοιότυπη με την αλληλουχία περιοχής του γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, ενώ στο κέντρο περίπου έφερε τις νουκλεοτιδικές βάσεις προς αλλαγή. Ο 3' εκκινητής ήταν απόλυτα συμπληρωματικός και αντιπαράλληλος στην αλληλουχία του 5' εκκινητή. Λόγω του «εκφυλισμού» του γενετικού κώδικα, είναι γνωστό ότι παραπάνω από ένα κωδικόνια είναι δυνατόν να κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ. Το κωδικόνιο που θα αντικαθιστούσε αυτό του φυσικού τύπου γονιδίου, ώστε να προκαλέσει τη μεταλλαγή, έπρεπε να περιέχει το μικρότερο δυνατό αριθμό νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων (mismatch) και επιπλέον να εμφανιζόταν με υψηλή συχνότητα στο γονιδίωμα του οργανισμού, στον οποίο επρόκειτο να εκφραστεί το μεταλλαγμένο γονίδιο.

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

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

Όπου L είναι ο αριθμός νουκλεοτιδικών βάσεων του εκκινητή και GC% είναι το % ποσοστό περιεκτικότητας του εκκινητή σε γουανίνες (G) και κυτοσίνες (C). Τόσο το L όσο και το GC% αναφέρεται στο τμήμα του εκκινητή, ο οποίος παρουσιάζει συμπληρωματικότητα με τη DNA μήτρα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί με PCR. Στην περίπτωση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταλλαξιγένεση, από το T_m που προέκυψε εφαρμόζοντας τον παραπάνω τύπο αφαιρέθηκε το ποσοστό επί

τοίς εκατό των νουκλεοτιδικών βάσεων οι οποίες είχαν μεταβληθεί σε σύγκριση με το φυσικού τύπου γονιδίου (% mismatch) και από την θερμοκρασία που προέκυψε αφαιρέθηκαν επιπλέον 5 °C. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο μικρότερο από τα δύο Tm που υπολογίστηκε για κάθε ζεύγος εκκινητών.

2.11.3.2 Σύσταση της αντίδρασης PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης

Η αντίδραση PCR στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, περιλάμβανε μόνο 25 κύκλους προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία λαθών στη νουκλεοτιδική ακολουθία του προϊόντος της αντίδρασης. Οι πιθανότητες δημιουργίας λάθους ελαχιστοποιήθηκαν λόγω της χρήσης μίας ειδικής πολυμεράσης, της HiFi DNA πολυμεράσης (KAPA). Η πολυμεράση αυτή έχει τη δυνατότητα να διορθώνει πιθανά λάθη της (proof reading). Επιπλέον, είναι ανθεκτική στην παρατεταμένη σύνθεση, καθώς μπορεί να συνθέσει πλασμίδια μεγέθους μέχρι και 15 kb. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, η διάρκεια σύνθεσης είναι το μέγιστο 60 δευτερόλεπτα για κάθε kb του πλασμιδίου. Στα συγκεκριμένα πειράματα, το πλασμίδιο μήτρα pPG2 έχει μέγεθος περίπου 8 kb και επομένως η σύνθεση έγινε για 8 λεπτά. Η σύσταση και το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης φαίνονται στους Πίνακες 2.7 και 2.8.

Πίνακας 2.7 Η σύσταση της αντίδρασης της PCR κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης

Συστατικά της PCR	Συγκεντρώσεις
Πλασμίδιο (μήτρα)	<1 ng
Εκκινητής 5' - 3'	135 ng
Εκκινητής 3' - 5'	135 ng
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 μM από το κάθε ένα
KAPA HiFi DNA polymerase	1 u
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (περιέχει MgCl ₂)	1X (τελική συγκέντρωση MgCl ₂ 2 mM)
dH ₂ O	μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 50 μL

Τα πλασμίδια που προέκυψαν από την παραπάνω αντίδραση PCR, ελέγχθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε σύγκριση με την ποσότητα του αρχικού πλασμιδίου, που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι ο πολλαπλασιασμός ήταν επιτυχής.

Πίνακας 2.8 Το πρόγραμμα PCR για την εφαρμογή της *in vitro* κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
1	95	5 min
2	95	15 sec
3	67	15 sec
4	72	8 min
5	Επανάληψη 2-4	25 κύκλοι
6	72	10 min
7	4	∞

Στη συνέχεια τα πλασμίδια υποβλήθηκαν σε δίωρη πέψη στους 37 °C με το περιοριστικό ένζυμο *DpnI*, το οποίο αναγνωρίζει και καταστρέφει τις μεθυλιωμένες ή ημι-μεθυλιωμένες αλυσίδες DNA του πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα στην παραπάνω αντίδραση PCR. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνθηκαν τα μόρια πλασμιδίου φυσικού τύπου που δεν περιείχαν την επιθυμητή μεταλλαγή. Μετά την ολοκλήρωση της πέψης, τα πλασμίδια εισήχθηκαν σε δεκτικά κύτταρα DH5α και ακολούθησε απομόνωση καθαρού πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένες αποικίες που επιλέχθηκαν παρουσία αμικικιλίνης. Στα πλασμίδια που παράχθηκαν, έγινε ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της επιθυμητής αντικατάστασης μέσω της επιβεβαίωσης της ύπαρξης της υπό δημιουργία θέσης περιορισμού με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1% αγαρόζης μετά από πέψη με το αντίστοιχα περιοριστικό ένζυμο. Όλες οι ταυτοποιήσεις νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκαν με διαδικασία sequencing από την εταιρεία VBC Biotech στη Βιέννη.

2.12 Γενετικός μετασχηματισμός στελεχών του *Aspergillus nidulans*

Πίνακας 2.9 Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά το μετασχηματισμό

Διάλυμα	Σύσταση
A	0.6 M MgSO ₄ 10 mM Orthophosphate pH 5.8
B	1.2 M MgSO ₄ 10 mM Orthophosphate pH 5.8
C	0.6M Sorbitol 100 mM TrisHCl pH 7.5

D	1M Sorbitol 10 mM TrisHCl pH 7.5
E	1M Sorbitol 10 mM TrisHCl pH 7.5 10 mM CaCl ₂
F	40% PEG 6000 10 mM TrisHCl pH 7.5 10 mM CaCl ₂

Για το μετασχηματισμό στελεχών του *A. nidulans*, 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 ολονύκτια (~14h) στους 37 °C με 130 rpm ανάδευση.

Το μυκήλιο διηθείται μέσα από αποστειρωμένο ύφασμα τύπου blutex, ξεπλένεται με 200 ml Διαλύματος Α, στεγνώνεται με αποστειρωμένο χαρτί και ζυγίζεται. Έπειτα τοποθετείται σε σωλήνα τύπου falcon (50 ml) ο οποίος περιέχει Διάλυμα Β (~ 10 ml/g μυκηλίου). Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση για να σπάσει το μυκήλιο σε μικρότερα κομμάτια και μεταφορά το εναιωρήματος σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη χωρητικότητας 250 ml, και προσθήκη λυτικών ενζύμων (υδρόλυση του 1-3 γλυκοζιδικού δεσμού της γλυκάνης των τοιχωμάτων του μύκητα) απομονωμένα από τον οργανισμό *Trichoderma harzianum* [Glucanex (100 mg/g μυκηλίου)]. Η κωνική τοποθετείται στο πάγο για 5 λεπτά.

Με το πέρας των 5 λεπτών προστίθενται 5-6 κόκκοι αλβουμίνης ορού βοδιού (bovine serum albumin, BSA) και η κωνική φιάλη τοποθετείται στους 30 °C για 90 λεπτά σε ήπια ανάδευση (100 rpm). Έπειτα το εναιώρημα ισοκατανέμεται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου COREX και προστίθεται πολύ αργά το Διάλυμα C, έτσι ώστε να σχηματιστούν δύο διακριτές φάσεις. Μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6000 rpm, οι πρωτοπλάστες εντοπίζονται στη μέση των δύο φάσεων και συλλέγονται με αποστειρωμένη πιπέττα Pasteur της οποίας η άκρη έχει κυρτωθεί με φλόγα. Οι πρωτοπλάστες μεταφέρονται σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα τύπου COREX, και πραγματοποιείται καθαρισμός τους με ίσο όγκο Διαλύματος D (φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000 rpm). Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος με Διάλυμα E, μισού όγκου από τον όγκο Διαλύματος D που προστέθηκε πριν τη φυγοκέντρηση, και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000 rpm.

Ακολουθεί αναδιάλυση των πρωτοπλαστών σε 1 ml Διαλύματος E, και παρατήρηση δείγματος στο μικροσκόπιο με τη χρήση αντικειμενοφόρου Neubauer. Για τον επιτυχή μετασχηματισμό απαιτούνται 10^7 - 10^8 πρωτοπλάστες ανά 200 μl δείγματος. Τα 200 μl τοποθετούνται σε σωλήνα Eppendorf και προστίθενται 5 μg γραμμικού τμήματος DNA. Ακολουθεί ήπια ανακίνηση και προσθήκη 50 μl Διαλύματος F. Έπειτα από ομαλή ανάδευση τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 500 μl Διαλύματος F, ανάμιξη και περαιτέρω επώαση στον πάγο για 20 λεπτά.

Μετά από φυγοκέντρηση (5 λεπτά στις 6000 rpm) το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται 1 ml Διαλύματος E. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 5000 rpm, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 200 μl Διαλύματος E. Το παραπάνω διάλυμα 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 στα Κεφάλαια 9.31-9.57 στο Sambrook *et al.*, 1989.

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

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

Πραγματοποιήθηκε πέψη 3-5 μg γονιδιωματικού DNA, που απομονώθηκε από τα μετασχηματισμένα στελέχη, με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο παρουσία ριβονουκλεάσης A, τελικής συγκέντρωσης 1 μg/ml. 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 αφήθηκε να δράσει για δύο ώρες στους 37 °C. Μετά την πάροδο των δύο ωρών προστέθηκε ίση ποσότητα περιοριστικού ενζύμου και το ένζυμο αφήθηκε να δράσει για άλλες 12 ώρες στους 37 °C.

2.13.2 Μεταφορά του DNA σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη nylon

Αφού έγινε καλός διαχωρισμός των προϊόντων της πέψης στο πήκτωμα αγαρόζης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε για 5 λεπτά στην τράπεζα υπερϊώδους ακτινοβολίας, προκειμένου να διασπαστεί το DNA σε μικρότερα κομμάτια και να διευκολυνθεί η μεταφορά του σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη nylon (Hybond⁺). Η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιήθηκε με τη βύθιση του πηκτώματος σε διάλυμα μετουσίωσης (Πίνακας 2.10) για 30 λεπτά με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εξουδετερώθηκε σε διάλυμα εξουδετέρωσης (Πίνακας 2.10) για 30 λεπτά με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA στη συνέχεια μεταφέρθηκε μέσω της δράσης τριχοειδών φαινομένων σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη nylon Hybond-N⁺ (Amersham) με τη βοήθεια διαλύματος αλάτων 20x SSC (Πίνακας 2.10), 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 2.10 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 - $[\alpha\text{dCTP}]$ -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 9) 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.

Για την παρασκευή ιχνηθέτη χρησιμοποιήθηκαν 250 ng γραμμικού DNA. Η σήμανση του ιχνηθέτη έγινε με «τυχαία πρόσδεση» (random priming) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της BRL Multiprime DNA labelling Kit. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν έχουν ως εξής: Τα 250 ng από του ιχνηθέτη προσαρμόστηκαν σε όγκο 21 μl με την προσθήκη απεσταγμένου νερού και αποδιατάχθηκαν με βρασμό για 2 λεπτά, προκειμένου να ανοίξουν οι αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA. Το βρασμένο δείγμα μεταφέρθηκε αμέσως στον πάγο, ώστε να μειωθεί η κινητικότητα των αλυσίδων και να αποφευχθεί η δημιουργία διπλής έλικας. Στο αποδιαταγμένο DNA προστέθηκε μίγμα όλων των πιθανών συνδυασμών τυχαίων εξανουκλεοτιδίων (random hexamers), τα τρία από τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP), το τέταρτο δεοξυνουκλεοτίδιο, dCTP, που ήταν ραδιοσημασμένο με ^{32}P (^{32}P - $[\alpha\text{dCTP}]$), Klenow DNA πολυμεράση, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και ο όγκος της αντίδρασης προσαρμόστηκε με την προσθήκη νερού στα 50 μl. Η αντίδραση επωάστηκε για μία ώρα στους 37 °C. Η αναλυτική σύσταση της αντίδρασης φαίνεται στον Πίνακα 2.11. Τα τυχαία εξανουκλεοτίδια προσδέθηκαν σε τυχαίες θέσεις σε κάθε μονόκλωνη αλυσίδα DNA του ιχνηθέτη. Στα κενά που παρέμειναν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες, συντέθηκε το συμπληρωματικό κομμάτι DNA, μέσω της δράσης της Klenow πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί για αυτό το σκοπό τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια. Επειδή το dCTP δεοξυνουκλεοτίδιο είναι ραδιοσημασμένο με ^{32}P , η συμπληρωματική αλυσίδα που συντέθηκε περιείχε ^{32}P -

[^adCTP] και επομένως ήταν ραδιοσημασμένη. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στους 37 °C, το παραπάνω μίγμα διηθήθηκε μέσα από ειδικό κολωνάκι χωρητικότητας 100 μl (Pharmacia), το οποίο συγκράτησε τα ελεύθερα νουκλεοτίδια που δεν κατάφεραν να ενσωματωθούν κατά τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του ιχνηθέτη και τα οποία δημιουργούν θόρυβο (μαύρες κουκίδες) στο φιλμ αυτοραδιογραφίας. Το μίγμα που διηθήθηκε από το κολωνάκι, αποδιατάχθηκε με βρασμό για 2 λεπτά και αμέσως προστέθηκε μέσα στο διάλυμα προϋβριδισμού στον κύλινδρο που βρισκόταν η μεμβράνη, για να ξεκινήσει ο υβριδισμός. Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε για τουλάχιστον 12 ώρες στους 65 °C.

Πίνακας 2.11 Η σύσταση της αντίδρασης ραδιοσημάνσης του ιχνηθέτη με ³²P-[^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-[^a dCTP]	0,05 mCi
Klenow DNA πολυμεράση (Minotech)	5 u
10X ρυθμιστικό διάλυμα Klenow	5 μl
dH ₂ O	μέχρι τα 50 μl

2.13.4. Εκπλύσεις της μεμβράνης-Εμφάνιση

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις εκπλύσεις της μεμβράνης και η κάθε έκπλυση διάρκεσε μισή ώρα. Οι τρεις πρώτες εκπλύσεις έγιναν μέσα στον κύλινδρο με περιστροφή και στους 65 °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 φωτοευαίσθητη επιφάνεια και η κασέτα τοποθετήθηκε σε συνθήκες σκότους σε θερμοκρασία δωματίου. Η πρώτη εμφάνιση της φωτοευαίσθητης επιφάνειας πραγματοποιήθηκε μετά από δύο ώρες έκθεσης, με χρήση μηχανήματος σάρωσης Fujifilm FLA-7000, στο πρόγραμμα ποσοτικοποίησης

απεικόνισης ραδιενεργού φωσφόρου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. 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 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών.

Για την απομόνωση πρωτεϊνών του *A. nidulans*, κονιδιοσπόρια από στελέχη του μύκητα αναπτυγμένα για 4 ημέρες σε στερεό πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα συλλέχθηκαν σε 0,01% (w/v) TWEEN-20 και, μέσω διήθησης με τη χρήση αποστειρωμένου φίλτρου blutex, εμβολιάστηκαν σε κωνική φιάλη με 100 ml του εκάστοτε αντίστοιχου ελάχιστου θρεπτικού υποστρώματος (MM), που περιείχε τις απαραίτητες πηγές αζώτου και συμπλήρωσης των αυξοτροφιών. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 12-16 ώρες στους 25 °C, με ανάδευση στις 130 rpm. Τα μυκήλια συλλέχθηκαν με τη χρήση φίλτρων blutex, θρυμματίστηκαν 4 φορές έκαστο παρουσία υγρού αζώτου και 400 mg θρυμματισμένου μυκηλίου συλλέχθηκαν σε σωλήνες 2 ml τύπου erpendorf. Κατόπιν ακολουθήθηκαν διαδικασίες ανάλογα με το είδος της επιθυμητής ανάλυσης, όπως αναφέρονται παρακάτω.

2.14.1 Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών (Pantazopoulou *et al.*, 2007).

Το θρυμματισμένο μυκήλιο αναδιαλύθηκε μέχρι ομογενοποίησης σε παγωμένο διάλυμα απομόνωσης (μέχρι τα 2 ml) και επώασθηκε 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 σωληνάρια Eppendorf 2 ml και οι ολικές μεμβρανικές πρωτεΐνες κατακρημνίστηκαν 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 σωληνάρια erpendorf. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν μπορούν να διατηρηθούν στους -80 °C μέχρι τη χρήση τους. Η συγκέντρωσή τους μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Πριν την ανάλυσή τους με SDS-PAGE προστέθηκε σε αυτά διάλυμα μετουσίωσης

πρωτεϊνικών δειγμάτων (τελική συγκέντρωση 1x) και επώασθηκαν 10-15 λεπτά στους 37 °C.

Πίνακας 2.12 Διαλύματα του πρωτοκόλλου της παραγράφου 2.14.1

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

*Η σύσταση του μείγματος των αναστολέων πρωτεασών όπως δίνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία είναι η εξής: AEBSF (2 mM), Aprotinin (0.3 μM), Bestatin (130 μM), EDTA (1 mM), E-64 (14 μM), Leupeptin (1 μM)

2.14.2 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών (Galan *et al.*, 1994)

Τα θρυματισμένα μυκήλια αναδιαλύθηκαν μέχρι ομογενοποίησης σε παγωμένο διάλυμα απομόνωσης (μέχρι τα 2 ml) 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 νέα προπαγωμένα σωληνάρια erpendorf 2 ml και οι ολικές πρωτεΐνες καθίζαναν με προσθήκη TCA σε τελική συγκέντρωση 5 %, κατόπιν ήπιας ανακίνησης. Μετά από 10 λεπτά επώασης στον πάγο, οι πρωτεΐνες κατακρυσνώθηκαν φυγοκεντρώντας το στα 13.000 g ,στους 4 °C για 5 λεπτά. Το ίζημα πλύθηκε με προσθήκη και επαναρρόφηση 400 μl Tris Base 1 M, για την εξουδετέρωση του όξινου pH λόγω του TCA και επαναιωρήθηκε σε διάλυμα απομόνωσης (80-100 μl). Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν μπορούν να διατηρηθούν στους -70° C μέχρι τη χρήση τους. Η συγκέντρωσή τους μετρήθηκε με τη μέθοδο της Bradford. Πριν την ανάλυσή τους με SDS-PAGE προστέθηκε σε αυτά διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων όπως προηγουμένως (Πίνακας 2.12).

Πίνακας 2.13 Διαλύματα του πρωτοκόλλου της παραγράφου 2.14.2

Διάλυμα	Σύσταση
Διάλυμα απομόνωσης	50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών (Sigma) (1:500)

2.14.3 Απομόνωση πρωτεΐνων σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Mingot *et al.*, 2000)

Πίνακας 2.13 Η σύσταση του διαλύματος A₅₀

Αντιδραστήριο	Τελική Συγκέντρωση
HEPES-KOH pH 7.5	25 mM
Glycerol	10%
MgCl ₂	5 mM
EDTA	0.1 mM
DTT	0.5 mM
KCL	50 mM
Protease Inhibitors	1:250
PMSF	2 mM

Τα θρυματισμένα μυκήλια αναδιαλύθηκαν μέχρι ομογενοποίησης σε παγωμένο διάλυμα απομόνωσης A₅₀ (Πίνακας 2.13) μέχρι τα 1.5 ml και επώασθηκαν για 1.5 ώρα υπό συνεχή ήπια ανάδευση στους 4 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 3000 rpm (4 °C) και μεταφορά του υπερκειμένου σε προπαγωμένο σωλήνα Eppendorf. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Για την ανάλυσή τους σε native-PAGE προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων όμοιο με αυτό του Πίνακα 2.13, στο οποίο δεν υπήρχε μερκαπτοαιθανόλη.

2.14.4 Καθορισμός της ικανότητας εκχύλισης της P1A από τις λιπιδικές μεμβράνες με χρήση Triton-X-100

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν αυτό των Grossmann *et al.*, 2007. Δείγματα 50 µg απομονωμένων ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (6.17.3) επώασθηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε 100 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA και αυξανόμενες συγκεντρώσεις Triton-X-100 (0-0,8%). Το μη-διαλυτοποιημένο υλικό κατακρίμνησθηκε με φυγοκέντρηση στα 14.000 g για 30 λεπτά στους 4 °C και ξεπλύθηκε με 100 µl του αντίστοιχου διαλύματος. Τα

ιζήματα επαναδιαλύθηκαν σε 30 μl διαλύματος μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων 1x, επωάσθηκαν για 15 λεπτά στους 37 °C και κατόπιν αναλύθηκαν σε SDS-PAGE και Western ανάλυση.

2.14.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford

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

2.14.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με SDS (SDS-PAGE)

Πίνακας 2.14 Σύσταση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης

Συστατικό	Πήκτωμα διαχωρισμού 10 % (10 ml)	Πήκτωμα συσσώρευσης 4 % (10 ml)
Acrylamide/Bisacrylamide 40 % 37,5/1	2,475 ml	0,975 ml
dH ₂ O	4,925 ml	6 ml
Lower Tris (1.5M, pH 8.8)	2,5 ml	-
Upper Tris (1M, pH 6.8)	-	1,25 ml
20 % (w/v) SDS	50 μl	50 μl
10 % (w/v) APS (Ammonium Persulfate)	50 μl	50 μl
TEMED	10 μl	20 μl

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τους Pantazopoulou *et al.*, 2007. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%, SDS 0,1%. Η σύσταση των πηκτωμάτων φαίνεται στον πίνακα 2.14.

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). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα χρησιμοποιήθηκε για χρώση με διάλυμα χρωστικής coomasie ή μεταφέρθηκε σε μεμβράνη πολυβινυλιδενοφθορίου (PVDF, Amersham) για την πραγματοποίηση ανάλυσης κατά Western.

Πίνακας 2.15 Σύσταση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης

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

2.14.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (native-PAGE)

Τα δείγματα διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 7.5%. Η σύσταση των πηκτωμάτων φαίνεται στον πίνακα 2.16.

Πίνακας 2.16 Σύσταση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης native

Συστατικό	Πήκτωμα διαχωρισμού 7.5 % (10 ml)	Πήκτωμα συσσώρευσης 4 % (10 ml)
Acrylamide/Bisacrylamide 40 % 37,5/1	1,875 ml	0,975 ml
dH ₂ O	5,525 ml	6 ml
Lower Tris (1.5M, pH 8.8)	2,5 ml	-
Upper Tris (1M, pH 6.8)	-	1,25 ml
10 % (w/v) APS	50 μl	50 μl
TEMED	10 μl	20 μl

Τα δείγματα αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά στα 95 V, παρουσία διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Πίνακας 2.15) σε συσκευή Mini PROTEAN™ Tetra Cell (Bio-Rad) μέχρι η χρωστική τους (~15 kDa) να φτάσει στο κάτω μέρος του πηκτώματος. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα χρησιμοποιήθηκε για χρώση με διάλυμα χρωστικής coomasie ή μεταφέρθηκε σε μεμβράνη PVDF (Amersham) για την πραγματοποίηση ανάλυσης κατά Western.

2.14.8 Χρώση με διάλυμα χρωστικής Coomassie-blue

Η χρώση των SDS-PAGE με διάλυμα χρωστικής coomassie πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα 0,25% coomassie 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.

2.14.9 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα μεταφοράς για 30 λεπτά, ώστε να αποκτήσει οριστικό τελικό μέγεθος. Μετά το πέρας αυτών, η PVDF μεμβράνη ενεργοποιήθηκε για 30 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη και τοποθετήθηκε σε διάλυμα μεταφοράς για 5 λεπτά. Κατόπιν η μεμβράνη τοποθετήθηκε πάνω στο πήκτωμα και δύο χαρτιά Whatmann 4 mm προστέθηκαν εκατέρωθεν. Ο ανωτέρω σχηματισμός τοποθετήθηκε στη συσκευή μεταφοράς, με τη μεμβράνη προς το θετικό πόλο (οι πρωτεΐνες έχουν αποκτήσει αρνητικό φορτίο λόγω του SDS και θα κινηθούν προς αυτόν). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα στα 100 V σε διάλυμα μεταφοράς θερμοκρασίας 4 °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 2.17 Διαλύματα του πρωτοκόλλου της παραγράφου 2.14.9

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

2.14.10 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.

2.14.11 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 τοποθετήθηκε σε μηχανήμα ImageQuantant LAS-4000 για ανίχνευση και ψηφιακή απεικόνιση του σήματος της αντίδρασης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.15 Μικροσκοπία επιφθορισμού και συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM)

Τα δείγματα για το μικροσκόπιο επιφθορισμού έχουν ετοιμαστεί σύμφωνα με τους Valdez-Taubas *et al.* 2004. Ειδικότερα, τα δείγματα επώαστηκαν σε τρυβλία Petri διαμέτρου 3 cm στα οποία είχε ήδη τοποθετηθεί τετράγωνη καλυπτρίδα πριν την προσθήκη θρεπτικού υλικού, προστατευμένα από το φως, σε υγρό MM συμπληρωμένο με ουρία ως πηγή του αζώτου και τις κατάλληλες αυξοτροφίες στους 25 °C για 12 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε διάφορες συνθήκες για 2-4 ώρες. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο επιφθορισμού αντίθεσης φάσεων Zeiss AxioPlan με τα κατάλληλα φίλτρα ενώ οι εικόνες αποκτήθηκαν με την ψηφιακή φωτογραφική μηχανή ProgRes CF Scan και χρήση του λογισμικού ProgRes Capture Pro 2.5 (JENOPTIK AG). Οι εικόνες στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Adobe Photoshop CS5 V12.0.

Αντιστοίχως, τα δείγματα συνεστιακής μικροσκοπίας laser επώαστηκαν σε ειδικά τρυβλία 35 mm (ibidi) σχεδιασμένα για παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο, προστατευμένα από το φως, σε υγρό MM συμπληρωμένο με ουρία ως πηγή του αζώτου και τις κατάλληλες αυξοτροφίες στους 25 °C για 12 ώρες, με προσθήκη μυρισίνης (τελική συγκέντρωση 20 µg/ml) 6 ώρες πριν την παρατήρηση (όπως Athanasopoulos *et al.*, 2013) και προσθήκη θρεονίνης (100 mM) 2 ώρες πριν την παρατήρηση, αναλόγως τις εξεταζόμενες συνθήκες. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης laser Leica-SP5. Οι εικόνες αποκτήθηκαν με το πρόγραμμα LAS AF – Lite και αναλύθηκαν με χρήση του προγράμματος Bitplane Imaris (v. 7.4.2), ενώ η αποσυνέλιξη (deconvolution) των εικόνων για μείωση του θορύβου λόγω υποβάθρου πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SVI Huygens Professional.

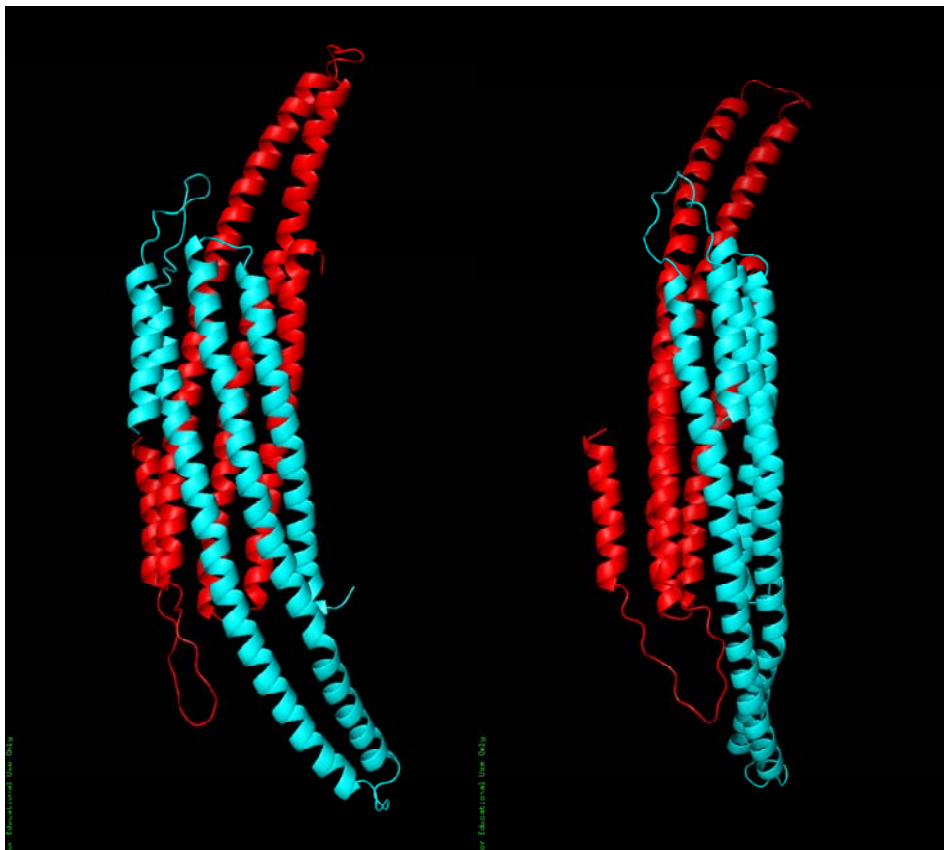
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτεΐνης PilA

3.1.1 Η PilA είναι πρωτεΐνη με μοτίβο BAR

Η κατασκευή του τρισδιάστατου μοντέλου της πρωτεΐνης PilA (347 aa) του *A. nidulans* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SWISS-MODEL (www.expasy.org). Το πρόγραμμα χρησιμοποίησε αυτόματα τις συντεταγμένες της κρυσταλλογραφικά λυμένης ομόλογης πρωτεΐνης N-BAR Lsp1 του *S. cerevisiae*, ως μήτρα για την πρόβλεψη της δομής της PilA.

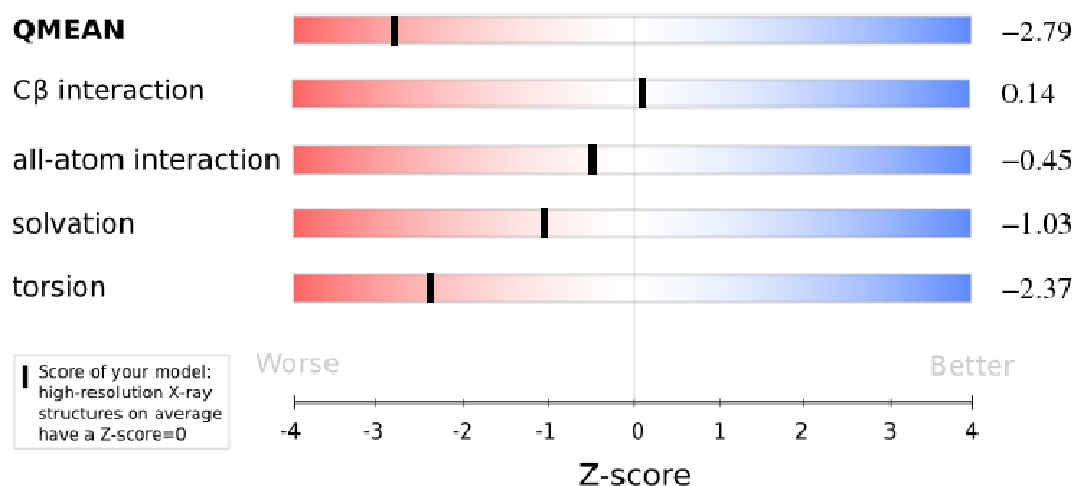
Το προβλεπόμενο μοντέλο της PilA έχει τη δομή ομοδιμερούς, το οποίο αποτελεί τον πυρήνα της πρωτεΐνης PilA (αμινοξικά κατάλοιπα 52-262), με τη χαρακτηριστική ημισελινοειδή δομή της αυτόνομης δομικής περιοχής BAR (Εικόνα 3.1), που ανήκει στην οικογένεια N-BAR. Η περιοχή BAR της PilA αποτελείται από τέσσερις α -έλικες διατεταγμένες με τη μορφή έλικα-λούπα-έλικα (μορφή coiled-coil). Αδυναμία πρόβλεψης της δομής του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου της



Εικόνα 3.1 Η δομή της PilA περιέχει BAR domain. Το μόριο είναι ομοδιμερές ημισελινοειδούς μορφής. Αριστερά φαίνεται η πλευρική απεικόνιση της πρωτεΐνης, ενώ δεξιά η πρωτεΐνη σε κάτοψη.

PilA, οφείλεται στην έλλειψη πληροφορίας του κρυστάλλου για τις αντίστοιχες περιοχές της Lsp1. Η στατιστική ανάλυση που παρείχαν τα αποτελέσματα από το SWISS-Model έδειξε πως το προβλεπόμενο μοντέλο της PilA έχει ένα Z-score που ισούται με -2.74. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.2, το Z-score αποτελεί μέσο όρο τιμών και είναι ένα μέτρο της σταθερότητας του πρωτεϊνικού μορίου, όπως αυτό κατασκευάστηκε από τον αλγόριθμο του προγράμματος.

Η βιοπληροφορική μελέτη της δομής της PilA, έδειξε ότι η πρωτεΐνη παρουσιάζει όμοια δομή με την ομόλογη Pil1. Το προβλεπόμενο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε ως βάση για τη δομική ανάλυση της PilA με το πρόγραμμα PyMOL, με σκοπό την εύρεση αμινοξικών καταλοίπων που είναι σημαντικά για τη δομή και τη λειτουργία του μορίου.



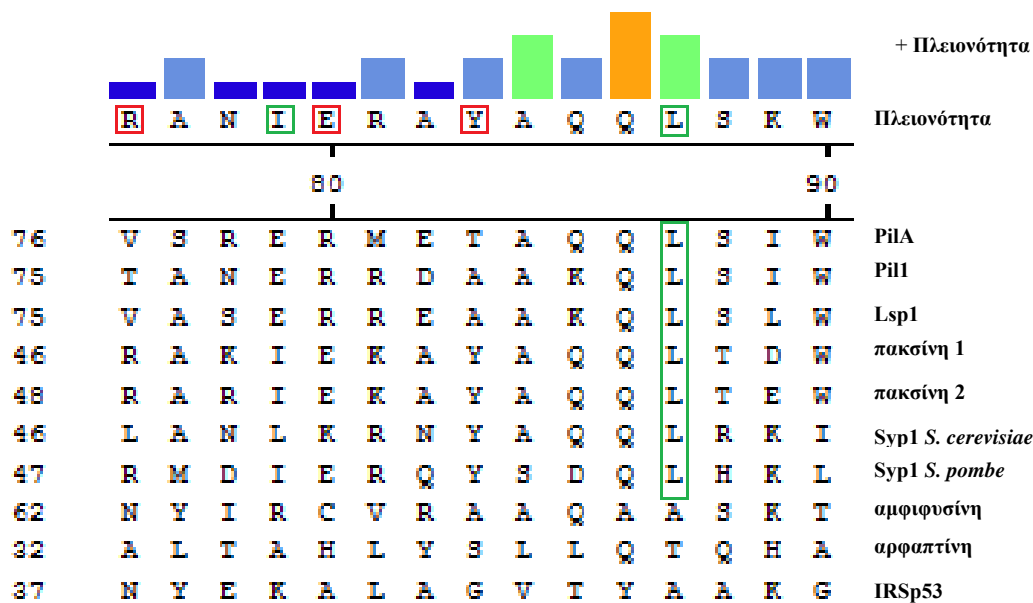
Εικόνα 3.2 Η εκτίμηση της σταθερότητας του προβλεπόμενου μοντέλου της PilA, με βάση τον υπολογισμό της αλληλεπίδρασης των δευτεροταγών δομών, την αλληλεπίδραση των ατόμων, τη δυνατότητα συστρόφησης (torsion) και τη επαναδιαλυτοποίηση (salvation) των συστατικών της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη έχει μέση τιμή Z ίση με -2.74, ενώ η υψηλής ανάλυσης κρυσταλλογραφικές δομές ακτίνων-X έχουν τιμή Z=0.

3.1.2 Διερεύνηση αμινοξικών κατάλοιπων που σταθεροποιούν το διμερές της PilA

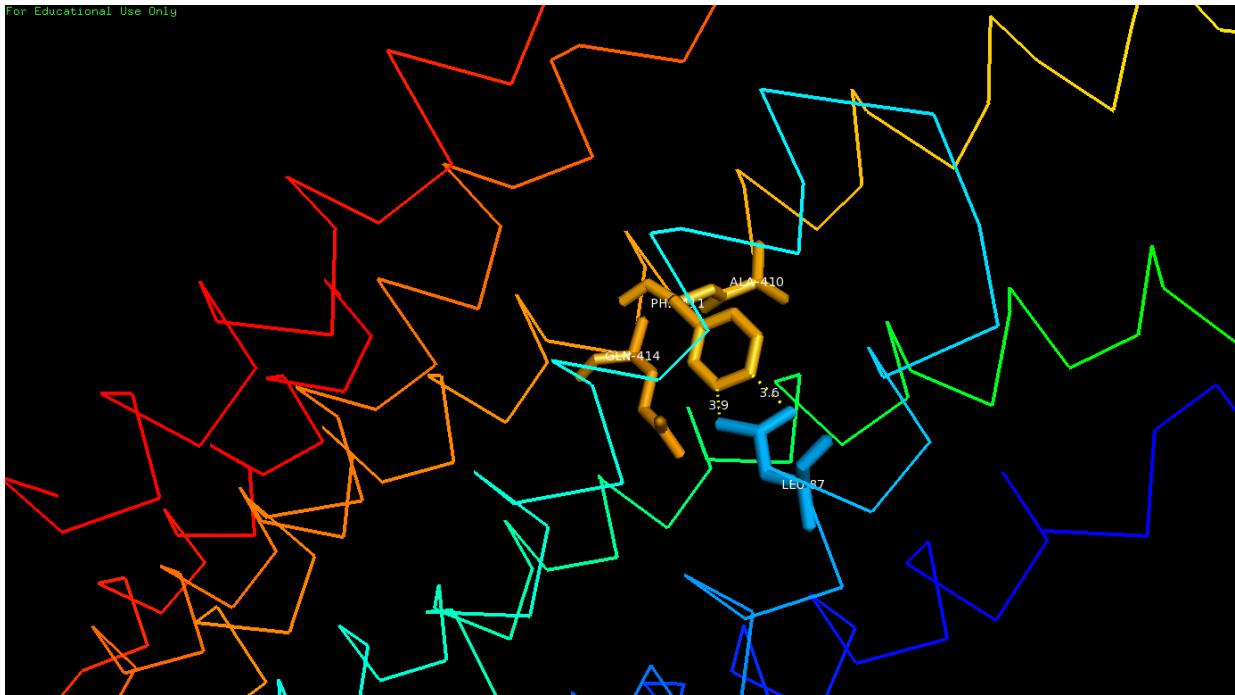
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης των Masuda & Mochizuki (2010), στις F-BAR πρωτεΐνες εντοπίζεται ένα μοτίβο (FCH) το οποίο θεωρείται σημαντικό για τη σταθεροποίηση του διμερούς της δομικής περιοχής BAR. Με σκοπό τη διαπίστωση της ύπαρξης αντίστοιχου μοτίβου στην PilA, πραγματοποιήθηκε στοίχιση της ακολουθίας της PilA με γνωστές BAR πρωτεΐνες

που περιέχουν αυτό το μοτίβο. Συγκεκριμένα, ως πρωτεΐνες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι ομόλογες της PilA στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* Pil1 και Lsp1, οι πρωτεϊνικές κινάσες C 1 και 2 του *Mus musculus* (πακσίνας), η Syp1 των *S. cerevisiae* και *S. pombe* (πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού), η υπεύθυνη για τη ριβοζυλίωση του ADP στον άνθρωπο (*Homo sapiens*) αρφαπτίνη και η IRSp53, και η αμφιφυσίνη (πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο μονοπάτι ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης) της *Drosophila melanogaster*. Στοίχιση των ακολουθιών αυτών των πρωτεϊνών αποκάλυψε την ύπαρξη του μοτίβου FCH μήκους 15 αμινοξικών καταλοίπων στην PilA. Στο μοτίβο αυτό, εντοπίστηκαν συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα μεταξύ των οποίων είναι και η Leu87 της μονομερούς αλυσίδας της PilA (Εικόνα 3.3).

Δομική ανάλυση του μοντέλου της PilA αποκάλυψε πως η Leu87 βρίσκεται στο τέλος της πρώτης α -έλικας του μονομερούς της πρωτεΐνης, λίγο πριν την πρώτη λούπα και είναι προσανατολισμένη προς το υδρόφοβο εσωτερικό πυρήνα του λειτουργικού διμερούς μορίου (Εικόνα 3.4). Η Leu87 εντοπίζεται στο εσωτερικό της PilA και πιθανώς αλληλεπιδρά με υδροφοβικές δυνάμεις με την Phe200 του δεύτερου μονομερούς, η οποία εντοπίζεται στην τρίτη α -έλικα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η κοντινότερη απόσταση μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων αυτών των αμινοξικών καταλοίπων είναι 3.6 Å. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα σχεδιάστηκαν υποκαταστάσεις της ουδέτερης, μη πολικής Leu87 με φορτισμένα αμινοξικά



Εικόνα 3.3 Στοίχιση BAR πρωτεϊνών που περιέχουν το μοτίβο FCH.

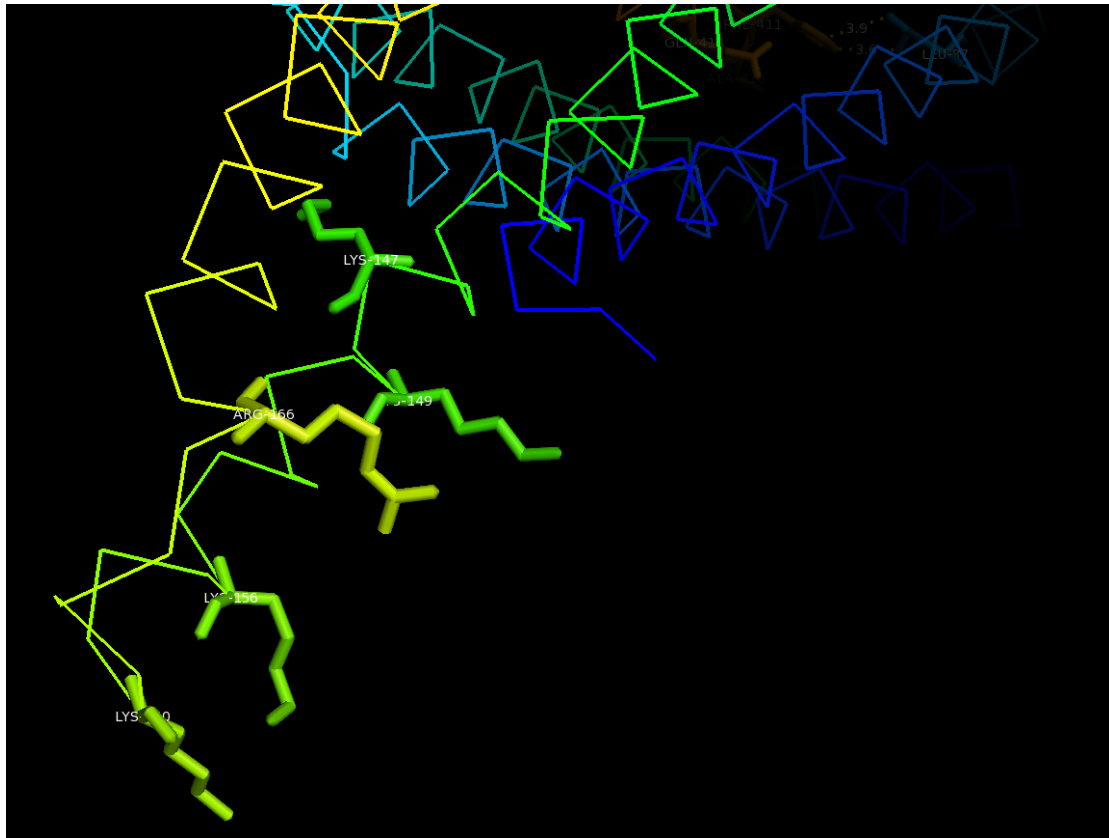


Εικόνα 3.4 Η Leu87 εντοπίζεται στο τέλος της α-έλικας και αλληλεπιδρά με την Phe200 του αντίθετου μονομερούς

κατάλοιπα ασπαρτικό οξύ (D) και αργινίνη (R), οι L87D και L87R, αντίστοιχα. Στην περίπτωση που η υδρόφοβη Leu87, είναι σημαντική για τη σταθεροποίηση του διμερούς, η τοπολογία της P1A θα μεταβάλλεται στα μεταλλαγμένα στελέχη.

3.1.3 Στην κυρτή επιφάνεια της P1A εντοπίζονται θετικά φορτισμένα αμινοξέα

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η κυρτή επιφάνεια των πρωτεϊνών που περιέχουν τη δομική περιοχή BAR καταλαμβάνεται από αμινοξέα με θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, ώστε να αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες κεφαλές των λιπιδίων στην επιφάνεια της μεμβράνης (Olivera-Couto *et al.*, 2011). Για τον εντοπισμό τέτοιων θετικά φορτισμένων αμινοξέων στην P1A, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των άκρων της ημισεληνοειδούς δομής της περιοχής BAR της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έδειξαν ότι στο τέλος της δεύτερης α-έλικας, με προσανατολισμό προς την κυρτή επιφάνεια του μορίου, εντοπίζονται πέντε θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα (Lys147, Lys149, Lys156, Lys160 και Arg166) (Εικόνα 3.5). Σχεδιάστηκαν συγκεκριμένες υποκαταστάσεις των καταλοίπων αυτών (K149E, K156E, K160E, R166E και η διπλή

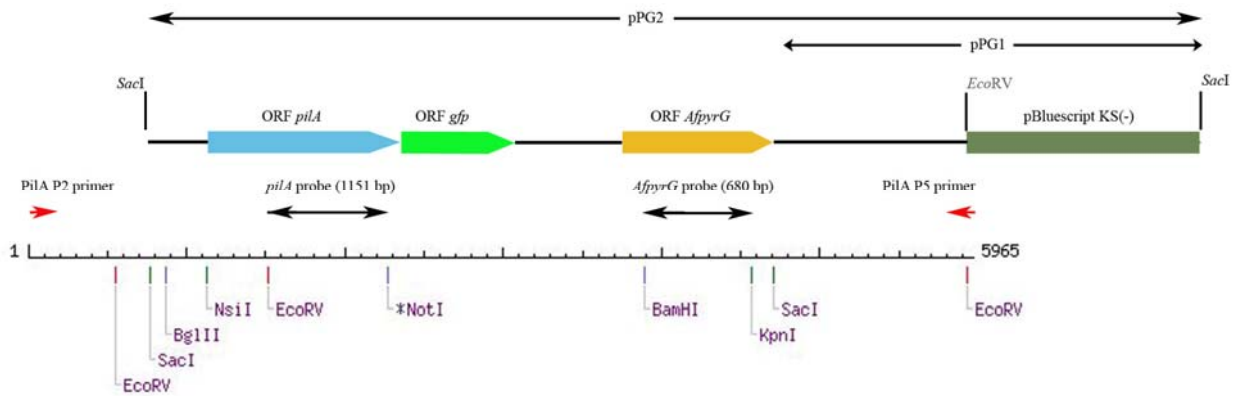


Εικόνα 3.5 Τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys147, Lys149, Lys156, Lys160 εντοπίζονται στο τέλος της δεύτερης α -έλικας του μονομερούς της PilA με τις πλευρικές τους ομάδες προσανατολισμένες στην κυρτή επιφάνεια του μορίου. Η Arg166 (κίτρινο χρώμα) εντοπίζεται αμέσως μετά τη στροφή μεταξύ δεύτερης και τρίτης έλικας και έχει κατεύθυνση προς την κυρτή επιφάνεια του μορίου.

μεταλλαγή K147N K149E) για να ελεγχτεί ο ρόλος τους στην πρόσδεση της PilA στη μεμβράνη και κατά συνέπεια στη λειτουργία της. Παρατήρηση αλλαγής της τοπολογίας των μεταλλαγμένων μορίων PilA θα σήμαινε ότι τα μεταλλαγμένα αμινοξικά κατάλοιπα έχουν ρόλο στη σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πρωτεΐνης και της μεμβράνης και είναι απαραίτητα για τη σωστή τοπολογία της πρωτεΐνης και την κύρτωση της μεμβράνης από αυτήν, όπως έχει δειχθεί για ομόλογα αμινοξικά κατάλοιπα της Pil1 στο *S. cerevisiae* (Olivera-Couto *et al.*, 2011).

3.2 Κλωνοποίηση της κασέτας *pilA::gfp::AfpyrG* σε πλασμιδιακό φορέα

Με στόχο την *in vitro* κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των παραπάνω αμινοξικών καταλοίπων που είναι ενδεχομένως σημαντικά για τη φυσιολογική τοπολογία και λειτουργία της PilA, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση της κασέτας *pilA::gfp::AfpyrG* σε φορέα pBluescript KS(-). Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε σε 2 στάδια. Αρχικώς το κομμάτι ενισχύθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης



Εικόνα 3.6 Κλωνοποίηση της κασέτας *pilA::gfp::AfpvrG* σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης

πολυμεράσης από γονιδιωματικό DNA στελέχους του *A. nidulans* με γονότυπο *pilA::gfp::AfpvrG nkuAA:[argB⁺] pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2*, με τη χρήση των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων PilA P2 F και PilA P5 R. Το πρότυπο πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα τα *SacI* και *EcoRV* του ενισχυμένου τμήματος DNA που προέκυψε από την αντίδραση PCR (μήκους 5965 bp) φαίνονται στην Εικόνα 3.6.

Αναλυτικότερα, στο πρώτο στάδιο της κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη του τμήματος του προϊόντος PCR με τα περιοριστικά ένζυμα *SacI* και *EcoRV*. Από τα αναμενόμενα τμήματα της πέψης κλωνοποιήθηκε σε φορέα pBluescript KS(-) το τμήμα μεγέθους 1221 bp (θέσεις πέψεων 4710 για τη *SacI* και 5930 για την *EcoRV*). Το τμήμα αυτό αντιστοιχεί στις 3' UTR των γονιδίων *AfpvrG* (*pyrG* του *Aspergillus fumigatus*) και *pilA*. Ο κλώνος που προέκυψε, μεγέθους 4182 bp, ονομάστηκε pPG1. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη του αρχικού προϊόντος PCR μόνο με *SacI*. Από τα αναμενόμενα προϊόντα της πέψης απομονώθηκε από πήκτωμα αгарόζης το τμήμα μεγέθους 3935 bp που προέκυψε από την πέψη του αρχικού τμήματος DNA με το περιοριστικό ένζυμο *SacI* στις θέσεις 775 και 4709. Το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pPG1 μετά από πέψη του με *SacI*. Ο τελικός κλώνος, μεγέθους 8152 bp, ονομάστηκε pPG2 (Εικόνα 3.6).

3.3 Κλωνοποίηση του υποκινητή *alcA^P* ανορροϊκά της κασέτας *pilA::gfp::AfpvrG*

Για τη μελέτη των επιπτώσεων της υπερέκφρασης της PilA στον *A. nidulans*, κλωνοποιήθηκε ο υποκινητής *alcA^P* ανορροϊκά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου *pilA* στο πλασμίδιο pPG2. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση της αλληλουχίας του *alcA^P*, μήκους 468 bp με αντίδραση PCR και τη

χρήση των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων AlcANsiI F και AlcAPstI R. Το προϊόν της PCR περιέχει στο 5' άκρο αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο *NsiI* (5'-ATGCA[^]T - 3'), και στο 3' άκρο αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο *PstI* (5'-CTGCA[^]G - 3'). Τα κολλώδη άκρα που προκύπτουν από την πέψη είναι όμοια. Τέλος στην αλληλουχία του υποκινητή *alcA^P* εντοπίζεται μία επιπλέον θέση αναγνώρισης από το ένζυμο *NsiI*, στο ζεύγος βάσεων 140.

Η κλωνοποίηση του υποκινητή *alcA^P* πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια ως εξής. Διπλή πέψη του προϊόντος PCR με *NsiI* - *PstI* οδηγεί σε δύο προϊόντα: το 5' τμήμα μήκους 144 bp και το 3' τμήμα 332 bp. Το δεύτερο τμήμα κλωνοποιήθηκε στο φορέα pPG2, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με *NsiI*. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6 η *NsiI*, έχει μοναδική θέση περιορισμού στο πλασμίδιο pPG2, ακριβώς πάνω στο κωδικόνιο έναρξης του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *pilA*. Κλωνοποίηση με τη σωστή φορά του 3' τμήματος του υποκινητή *alcA^P* οδηγεί σε απώλεια της θέσης αναγνώρισης *NsiI* στο κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *pilA*, και τη δημιουργία θέσης αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο *PstI*. Στο 5' άκρο εξακολουθεί να υπάρχει η θέση *NsiI*. Στη συνέχεια, στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα κλωνοποιήθηκε το 5' τμήμα του DNA του υποκινητή *alcA^P* που προέκυψε μετά από πέψη *NsiI*. Ο τελικός πλασμιδιακός φορέας που φέρει την κασέτα *alcA^P::pilA::gfp::AfpyrG* ονομάστηκε pPG3.

3.4 Επιλογή μετασηματισμένων στελεχών του *A. nidulans* που φέρουν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της πρωτεΐνης PilA

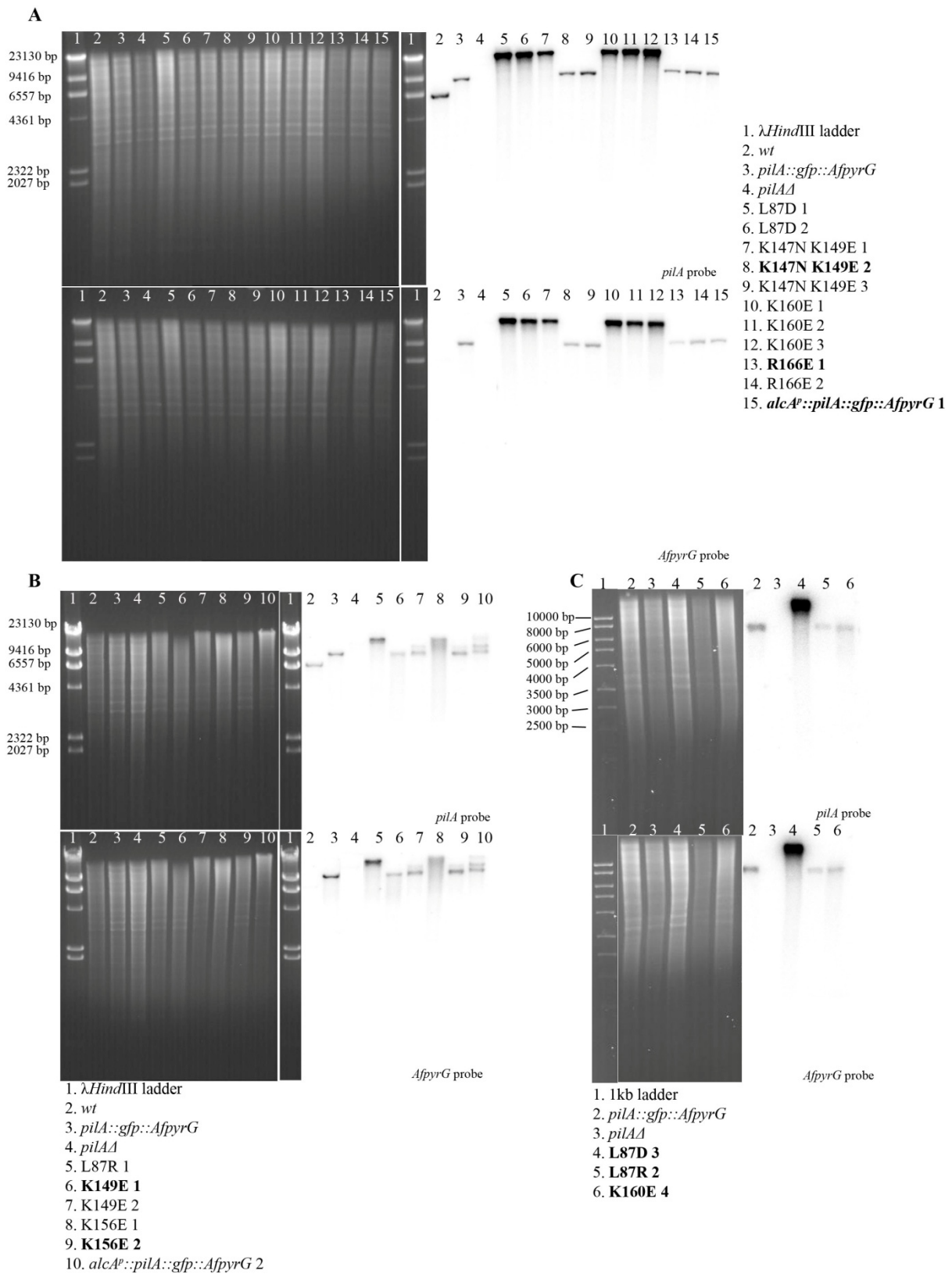
Ο πλασμιδιακός φορέας pPG2 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την *in vitro* κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των επιλεγμένων αμιξονικών καταλοίπων. Οι υποκαταστάσεις που πραγματοποιήθηκαν είναι οι εξής: L87D, L87R, K147N K149E, K149E, K156E, K160E, R166E. Τα αποτελέσματα της μεταλλαξιγένεσης επαληθεύθηκαν με αλληλούχιση (VBC Biotech Service GmbH) (βλ. Παράρτημα). Τα πλασμίδια που φέρουν τις επιθυμητές αμινοξικές υποκαταστάσεις καθώς και ο φορέας pPG3, χρησιμοποιήθηκαν για το μετασηματισμό στελέχους *pilAΔ::[Afrifo⁺]* *nkuAΔ::[argB⁺]* *pyrG89 argB2 pabaB22 riboB2* του *A. nidulans*.

Ο μετασηματισμός του παραπάνω στελέχους πραγματοποιήθηκε με ~ 3 μg γραμμικού DNA, μετά από πέψη των αντίστοιχων πλασμιδίων με το ένζυμο *BglII*, το

οποίο έχει μοναδική θέση αναγνώρισης σε αυτά (Εικόνα 3.6). Ως γονίδιο επιλογής χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *AfpyrG*, το οποίο προσδίδει πρωτοτροφία σε ουρακίλη-ουριδίνη. Στελέχη που έχουν προκύψει από ομόλογο ανασυνδυασμό, θα είναι πρωτότροφα για ουρακίλη – ουριδίνη, και αυξότροφα για ριβοφλαβίνη (λόγω απώλειας του γονιδίου *Afribo*⁺ που χρησιμοποιήθηκε για την απαλοιφή του γονιδίου *pilA* στο στέλεχος-δέκτη).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενσωμάτωση των αλληλουχιών μετασχηματισμού στη γενετική θέση του γονιδίου *pilA*, έγινε ανάλυση κατά Southern γονιδιωματικού DNA που απομονώθηκε από τα επιλεγμένα στελέχη. Μετά από ολική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI* ~5 μg γονιδιωματικού DNA, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη nylon. Αυτή η μεμβράνη υβριδοποιήθηκε με ειδικούς ραδιοσημασμένους ανιχνευτές που φέρουν τις αλληλουχίες *pilA* και *AfpyrG*. Οι ραδιενεργοί ιχνηθέτες κατασκευάστηκαν έπειτα από πέψη του πλασμιδίου pPG2 (εικ. 3.6) και σήμανση με ³²P-cytidine (dCTP). Ο ραδιενεργός ιχνηθέτης που είναι ειδικός για το γονίδιο *pilA*, προέκυψε μετά από διπλή πέψη του πλασμιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRV-NotI* (τελικό μέγεθος 1151 bp), ενώ ο ιχνηθέτης για το γονίδιο *AfpyrG* (680 bp) μετά από διπλή πέψη με *BamHI-KpnI*. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά Southern (Εικόνα 3.7), επιλέχθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη που έφεραν την κασέτα *pilA::gfp::AfpyrG* ενσωματωμένη στο γενετικό τόπο του γονιδίου *PilA* (αναμενόμενο μέγεθος ζώνης υβριδισμού 9146 bp). Το αναμενόμενο μέγεθος που αντιστοιχεί σε ζώνη όπου εντοπίζεται το φυσικού τύπου γονίδιο *pilA* είναι 6505 bp.

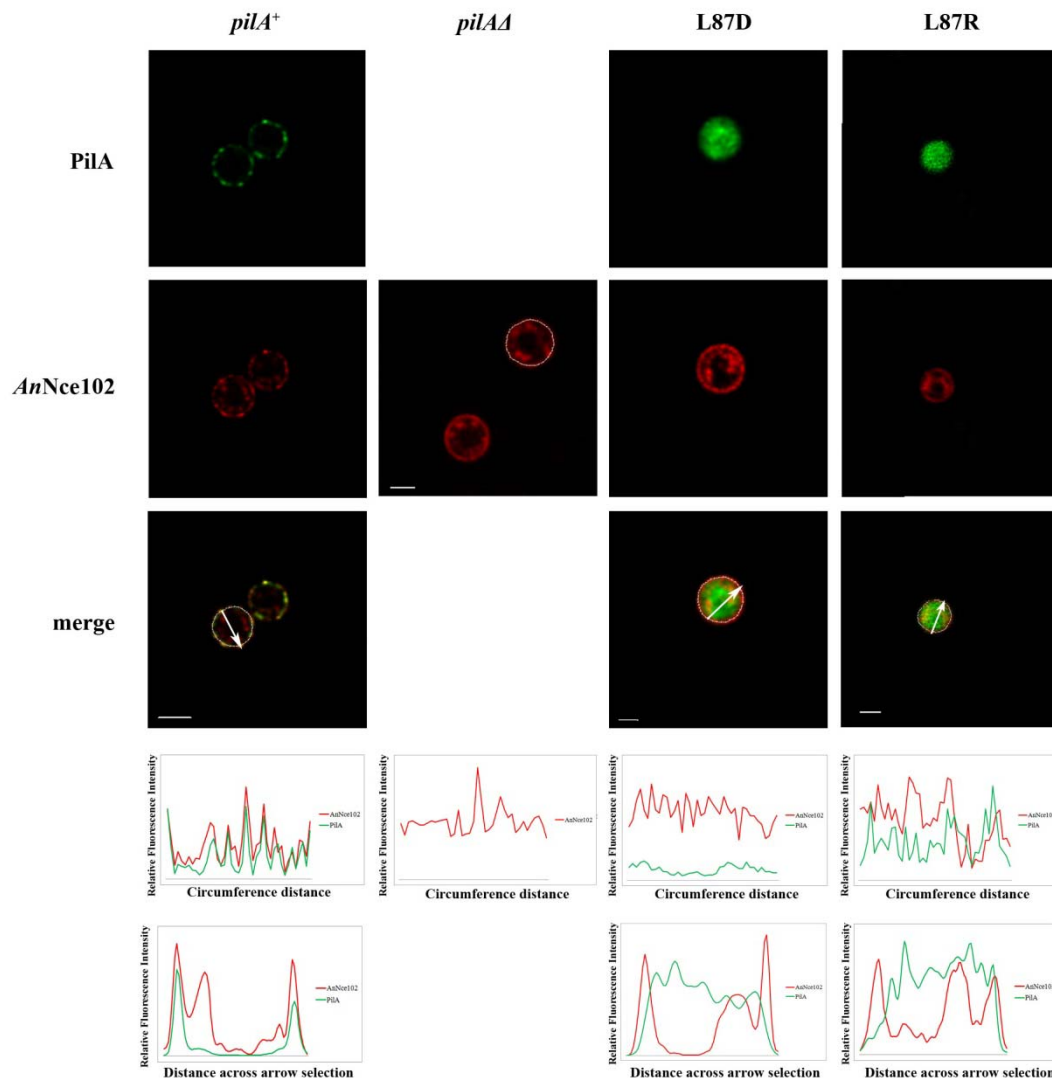
Τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 3.7 δείχνουν ότι τα επιλεγμένα μετασχηματισμένα στελέχη φέρουν ένα αντίγραφο της εκάστοτε κασέτας μετασχηματισμού (*pilA::gfp::AfpyrG* ή *alcA^P::pilA::gfp::AfpyrG*) στο γενετικό τόπο του γονιδίου *pilA* εκτός από το μεταλλαγμένο στέλεχος L87D, το οποίο φέρει πολλαπλά αντίγραφα του μεταλλαγμένου γονιδίου.



Εικόνα 3.7 Ανάλυση κατά Southern των PilA μεταλλαγμένων στελεχών του *A. nidulans*. Με έντονη γραμματοσειρά επισημαίνονται τα στελέχη που επιλέγηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Το αναμενόμενο μέγεθος για τη σωστά ενσωματωμένη κασέτα *pilA::gfp::AfpyrG* είναι 9146 bp (για το στέλεχος φυσικού τύπου 6505 bp). Οι πέψεις DNA πραγματοποιήθηκαν με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI*.

3.5 Υποκαταστάσεις της Leu87 επηρεάζουν την κατανομή της PilA

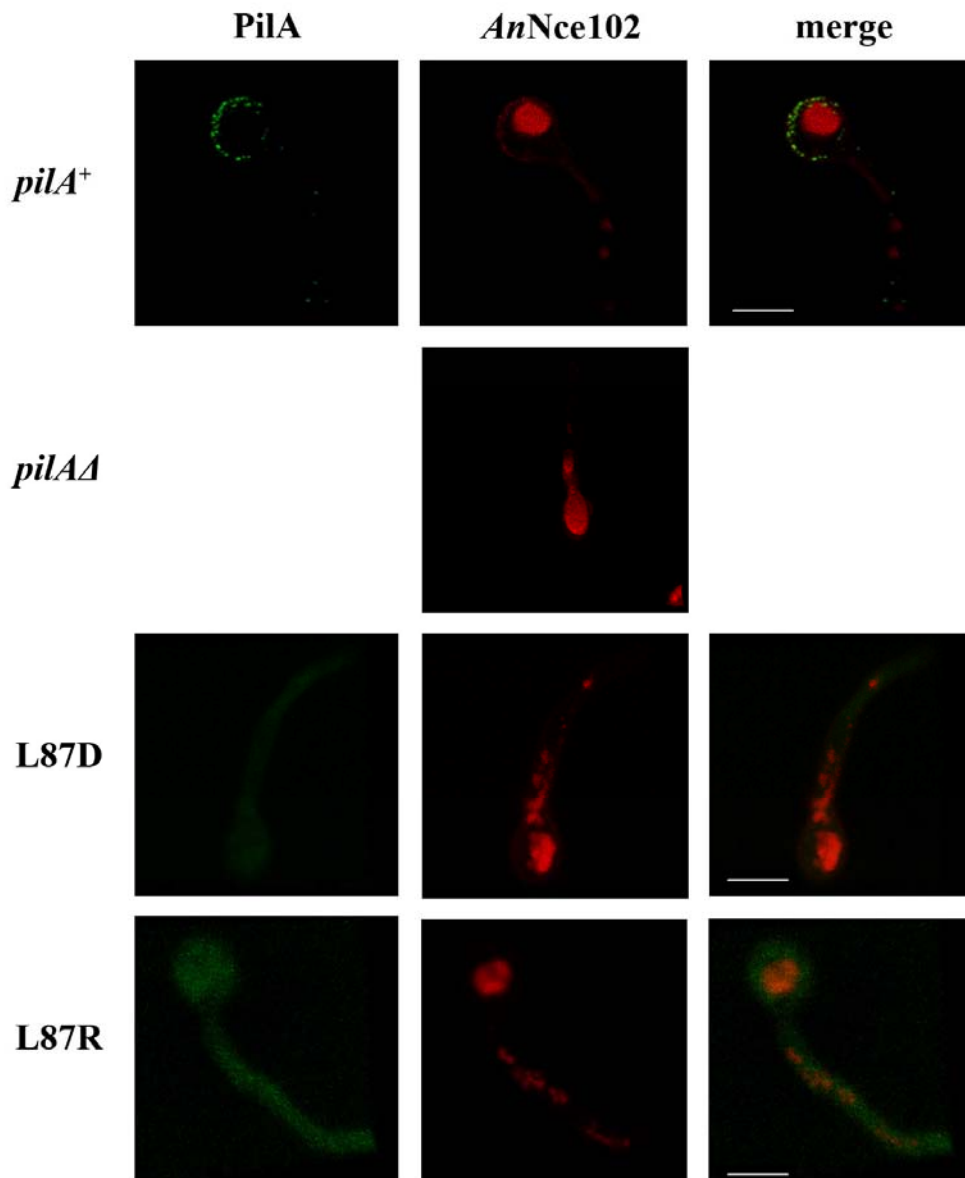
Για τη διερεύνηση του ρόλου της Leu87 στο διμερισμό και τη λειτουργία της PilA πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης laser (CLSM) στελεχών του *A. nidulans* που φέρουν τις υποκαταστάσεις L87D, L87R στην PilA-GFP. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στις Εικόνες 3.8-3.9 δείχνουν ότι στα μεταλλαγμένα στελέχη η κατανομή της PilA είναι κυτταροπλασματική σε αντίθεση με τη στική κατανομή της στη μεμβράνη σε στέλεχος φυσικού τύπου. Η κατανομή αυτή παρατηρείται σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια και σε νεαρές υφές που προκύπτουν από την εκβλάστησή τους. Τα



Εικόνα 3.8 Υποκαταστάσεις της Leu87 από φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα οδηγούν σε κυτταροπλασματική κατανομή της PilA σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια. Η πρωτεΐνη AnNce102 σε αυτά τα στελέχη αποκτά ομοιόμορφη κατανομή στη μεμβράνη, ομοίως με ένα στέλεχος *pilA*Δ. (Μέγεθος κλίμακας = 2 μm)

επίπεδα φθορισμού των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων είναι αισθητώς χαμηλότερα στις νεαρές υφές. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η υποκατάσταση της Leu87 με θετικά ή αρνητικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα, οδηγεί σε μη αλληλεπίδραση της PilA με τη μεμβράνη.

Για τον έλεγχο της λειτουργικότητας των μεταλλαγμένων αλληλίων της PilA χρησιμοποιήθηκε η εισοσωμική πρωτεΐνη *AnNce102*, ομόλογη της Nce102 του *S. cerevisiae*. Δεδομένου ότι η PilA είναι ο βασικός οργανωτής των εισοσωμάτων στον *A. nidulans*, επηρεάζει την τοπολογία πρωτεϊνών που απαρτίζουν το εισοσωμικό



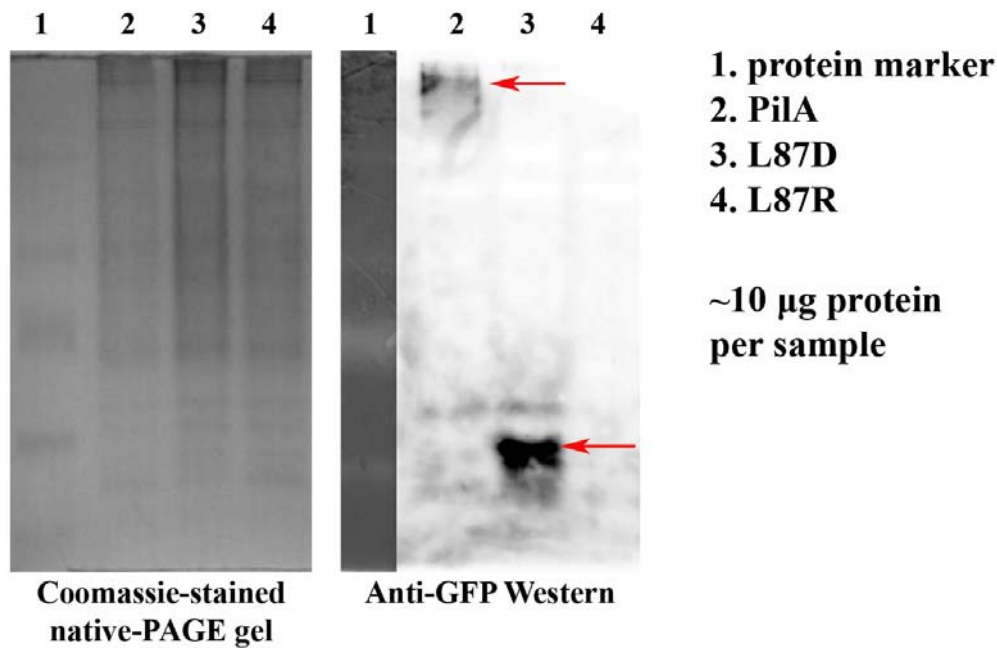
Εικόνα 3.9 Υποκαταστάσεις της Leu87 από φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα οδηγούν σε κυτταροπλασματική κατανομή της PilA σε νεαρές υφές. Η πρωτεΐνη *AnNce102* σε αυτά τα στελέχη εντοπίζεται στο χυμοτόπιο, όπως σε στέλεχος *pilAΔ*. (Μέγεθος κλίμακας = 5 μm)

σύμπλοκο. Αυτή η υπόθεση έχει επιβεβαιωθεί για την *AnNce102* από πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια στελέχους φυσικού τύπου η *AnNce102* συνεντοπίζεται με την PilA, ενώ σε στέλεχος *pilAΔ* εντοπίζεται ομοιόμορφα στη μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε νεαρές υφές στελέχους *pilAΔ* η *AnNce102* αποικοδομείται στα χυμοτόπια (Athanasopoulos and Sophianopoulou, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η *AnNce102* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τη λειτουργικότητα των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της PilA. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 3.8-3.9, σε στέλεχη PilA (L87D) και PilA(L87R), η *AnNce102* παρουσιάζει παρόμοια κατανομή με αυτήν που απαντάται σε στέλεχος *pilAΔ*, υποδεικνύοντας ότι τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα είναι μη λειτουργικά.

Για τη μέτρηση των επιπέδων σχετικού φθορισμού κάθε μεταλλαγμένου μορίου PilA έγινε επιλογή 40-45 σημείων της μεμβράνης των κονιδιοσπορίων (πρόγραμμα Bitplane Imaris) ανά 0.2 μm απόσταση μεταξύ τους. Τα αντίστοιχα διαγράμματα (Εικόνα 3.8) επιβεβαιώνουν το συνεντοπισμό των *AnNce102* και PilA σε ένα στέλεχος φυσικού τύπου κατά μήκος της περιφέρειας της μεμβράνης των κονιδιοσπορίων και την περισσότερο ομοιόμορφη κατανομή της *AnNce102* στα PilA μεταλλαγμένα στέλεχη, λόγω της μικρότερης διακύμανσης των κορυφών του σχετικού φθορισμού.

3.5.2 Η Leu87 - Διμερισμός της PilA

Για να διαπιστωθεί αν οι συγκεκριμένες υποκαταστάσεις της Leu87 έχουν ρόλο στη σταθεροποίηση του διμερούς της PilA, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από νεαρά μυκήλια σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και ηλεκτροφόρισή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (native-PAGE). Η απομόνωση πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε από στέλεχος φυσικού τύπου PilA-GFP και από τα στέλεχη PilA(L87D) και PilA(L87R). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.10 η ηλεκτροφορητική ικανότητα της PilA(L87D) διαφέρει από αυτήν της φυσικού τύπου PilA-GFP, υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη μεταλλαγή οδηγεί σε μη δυνατότητα συγκρότησης λειτουργικού διμερούς της PilA.

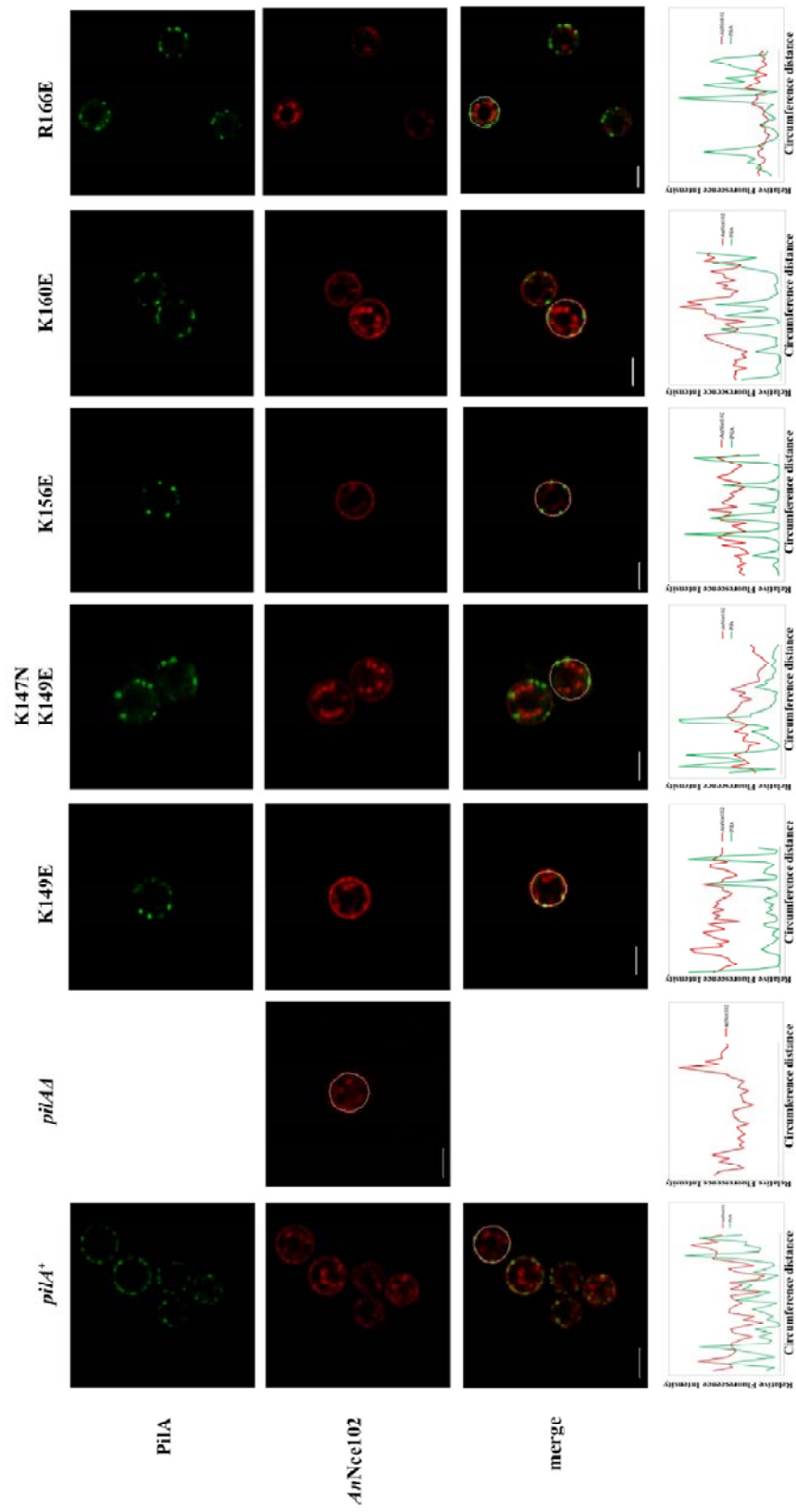


Εικόνα 3.10 Native-PAGE της PilA, PilA(L87D) και PilA(L87R). Η PilA(L87D) κωδικοποιείται από πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου PilA.

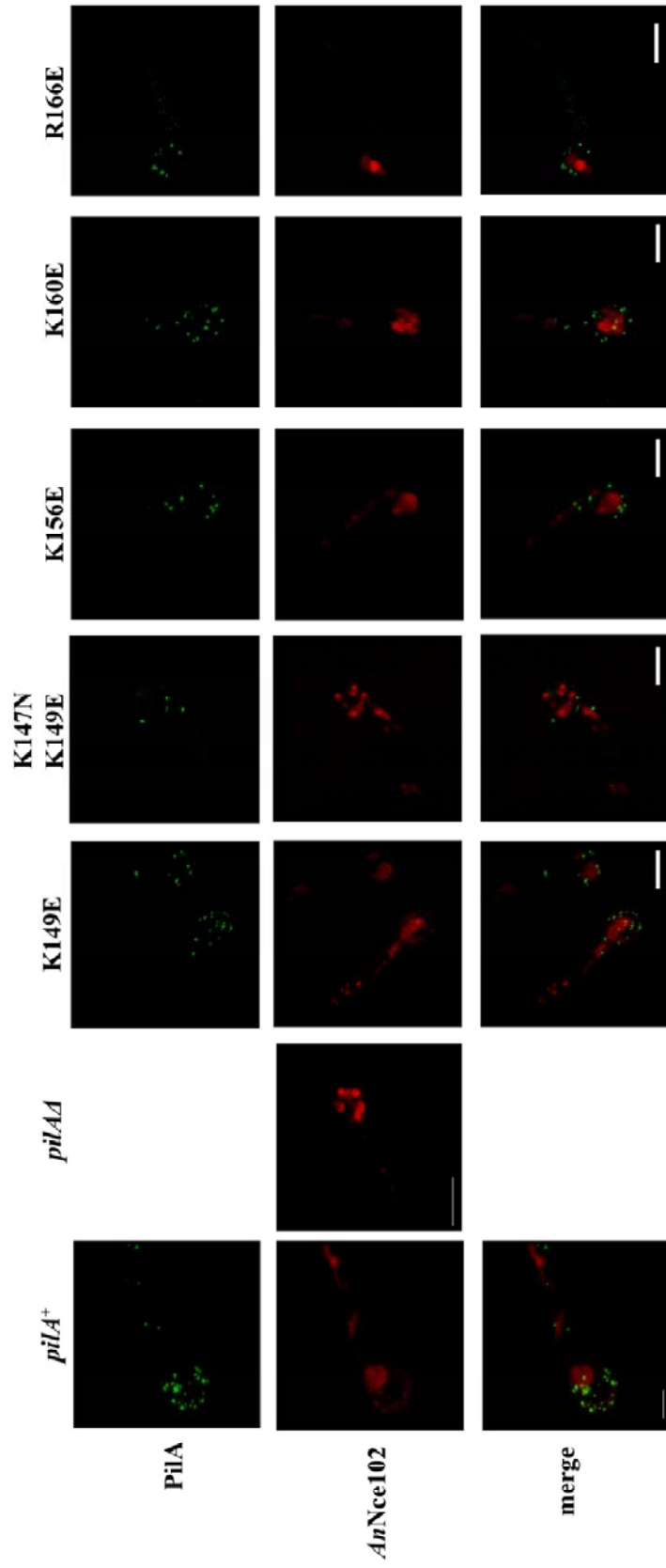
3.6 Οι υποκαταστάσεις K147N K149E, K149E, K156E, K160E, R166E οδηγούν σε μη φυσιολογική στικτή κατανομή της PilA

Για τη διερεύνηση του ρόλου των αμινοξικών καταλοίπων Lys147, Lys149, Lys156, Lys160 και Arg166 στην αλληλεπίδραση της PilA με τη κυτταροπλασματική μεμβράνη πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης laser (CLSM) στελεχών του *A. nidulans* που φέρουν στην PilA-GFP τις υποκαταστάσεις K147N K149E, K149E, K156E, K160E, R166E και ταυτόχρονα εκφράζουν την *AnNce102-mRFP*.

Τα αποτελέσματα της Εικόνας 3.11 δείχνουν ότι η υποκυτταρική κατανομή όλων των μεταλλαγμένων αλληλίων PilA σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια διαφέρει από αυτήν της πρωτεΐνης φυσικού τύπου. Συγκεκριμένα, τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα εντοπίζονται σε μεγαλύτερου μεγέθους και μειωμένες σε αριθμό κηλίδες στη μεμβράνη των κυττάρων από ότι η πρωτεΐνη φυσικού τύπου. Η *AnNce102* σε όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσιάζει παρόμοια κατανομή με αυτή του στελέχους *pilAΔ*, όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα σχετικής έντασης φθορισμού κατά μήκος της μεμβράνης των κονιδιοσπορίων. Εξαίρεση αποτελεί η υποκατάσταση K160E η οποία, σύμφωνα με τα διαγράμματα σχετικής έντασης φθορισμού της μεμβράνης (Εικόνα 3.11) που προέκυψαν από επιλογή 45 σημείων, φαίνεται να συνεντοπίζεται μερικώς,



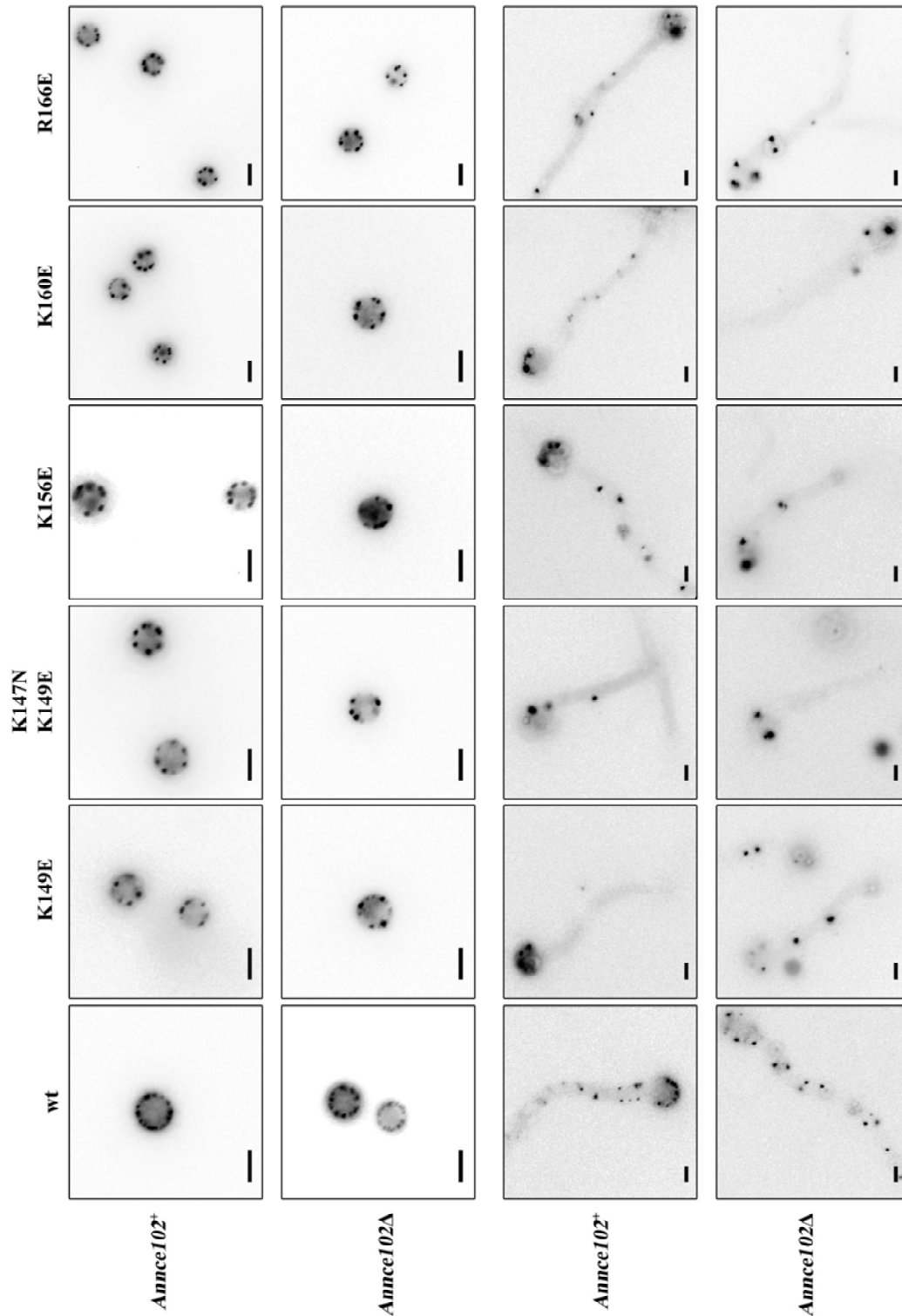
Εικόνα 3.11 Κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της PiliA στη μεμβράνη των κονιδιοσπορίων. Μέγεθος κλίμακας = 2 μ m



Εικόνα 3.12 Κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων της *PilA* στη μεμβράνη των νεαρών υφών. Μέγεθος κλίμακας = 5 μ m

3.7 Απαλοιφή του γονιδίου *Annce102* επηρεάζει τον αριθμό των στικτών σχηματισμών των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της Pila

Προηγούμενα πειραματικά δεδομένα σε στέλεχος *Annce102Δ* έδειξαν ότι στικτοί σχηματισμοί της φυσικού τύπου Pila εντοπίζονται σε μη εκβλαστημένα



Εικόνα 3.14 Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού των μεταλλαγμένων αλληλίων Pila σε *Annce102Δ* γενετικό υπόβαθρο. Μέγεθος κλίμακας = 2 μm

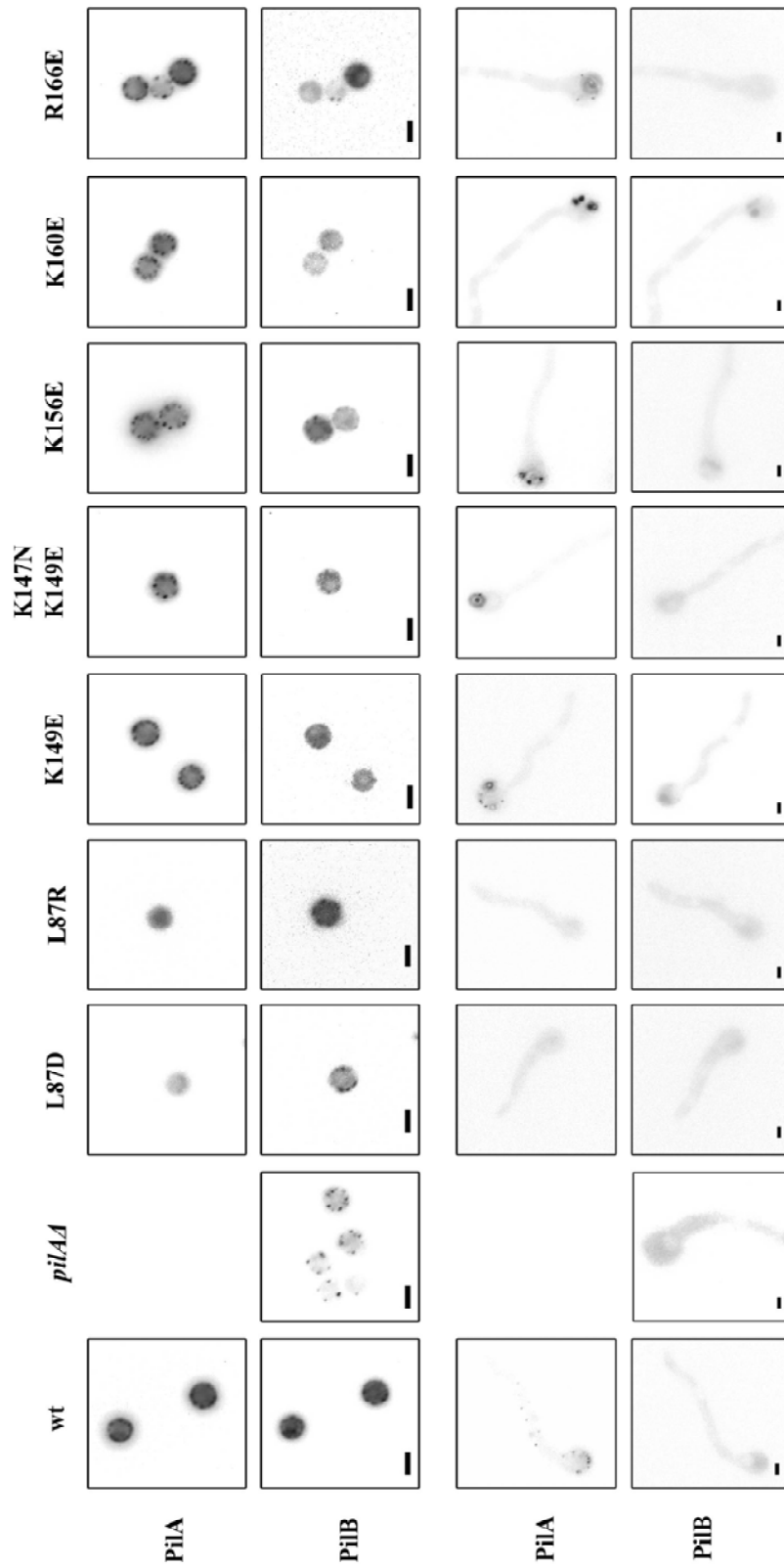
κονιδιοσπóρια και σε νεαρές υφές. Ο αριθμός αυτών των σχηματισμών στην κεφαλή των νεαρών υφών είναι μειωμένος σε σχέση με το στέλεχος φυσικού τύπου (Athanasopoulos and Sophianopoulou, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Σε νεαρές υφές στελεχών του *A. nidulans* που εκφράζουν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της PilA που είναι σημαντικά για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τη μεμβράνη, παρατηρείται μείωση του αριθμού των στικτών σχηματισμών PilA σε *Annce102Δ* γενετικό υπόβαθρο σε σχέση με το στέλεχος *Annce102⁺* (Εικόνα 3.14). Αντίθετα το πρότυπο κατανομής και ο αριθμός κηλίδων της PilA δεν διαφοροποιείται αισθητά σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπóρια.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η απαλοιφή του γονιδίου *AnNce102* έχει επίπτωση στη δυνατότητα συγκρότησης των στικτών σχηματισμών μεταλλαγμένων αλληλομόρφων PilA στην αναπτυσσόμενη υφή.

3.8 Επίδραση των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της PilA στην τοπολογία της PilB

Για τη μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της PilA στην κατανομή της εισοσωμικής πρωτεΐνης PilB κατασκευάστηκαν, με γενετικές διασταυρώσεις, στελέχη τα οποία εκφράζουν την PilB-mRFP και ένα από τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα PilA-GFP κάθε φορά. Τα στελέχη αυτά μελετήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 3.15, δείχνουν ότι τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (L87D, L87R, K147N K149E, K149E, K156E, K160E, R166E) αλλάζουν την τοπολογία της PilB σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπóρια. Η PilB εντοπίζεται σε μεγάλους και διακριτούς στικτούς σχηματισμούς, παρόμοια με την κατανομή της σε στέλεχος *pilAΔ*, ενώ παράλληλα υπάρχει αυξημένος κυτταροπλασματικός φθορισμός της. Το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο στα αλλήλια L87D και L87R της PilA. Σε νεαρές υφές το πρότυπο κατανομής της PilB παραμένει το ίδιο ανεξαρτήτως της παρουσίας ή όχι λειτουργικής PilA.

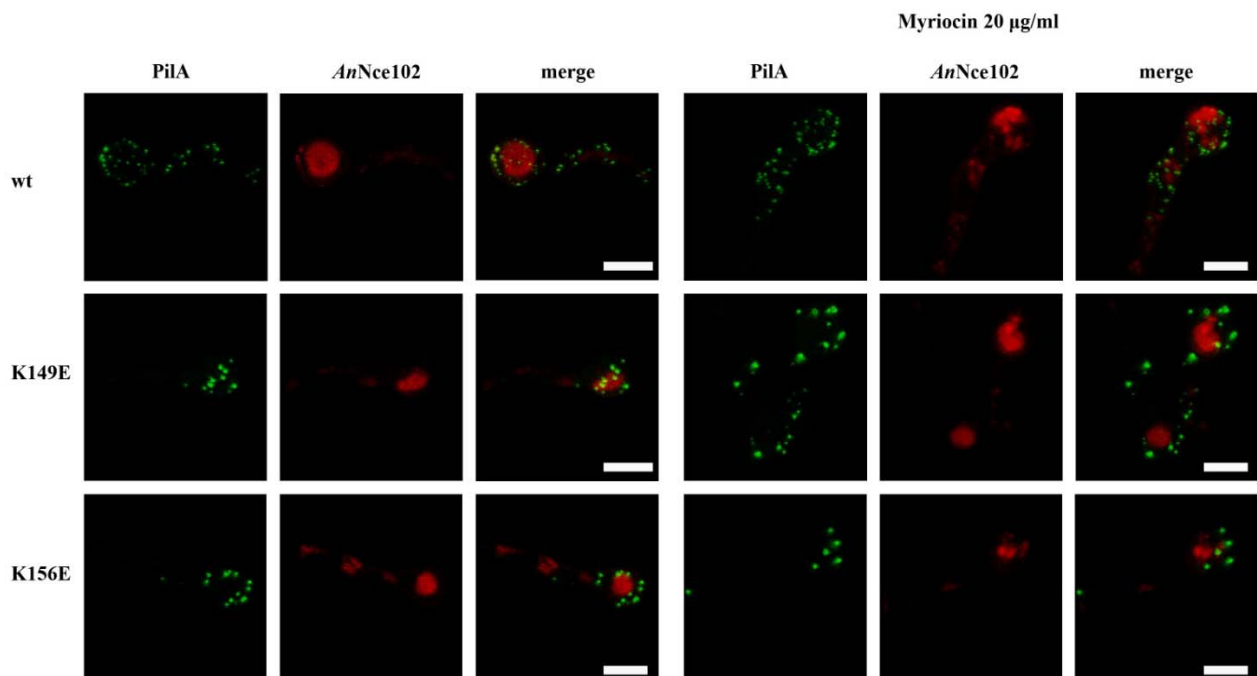


Εικόνα 3.15 Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού όπου φαίνεται ότι η τοπολογία της PilB παρουσία μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της PilA. Μέγεθος κλίμακας = 2.5 μm

3.9 Η μυριοσίνη δεν επηρεάζει την κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της PilA

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η παρουσία μυριοσίνης, ειδικού αναστολέα της βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων, οδηγεί σε μερικώς κυτταροπλασματική κατανομή της PilA, με ταυτόχρονη μείωση των στικτών σχηματισμών της στη μεμβράνη (Athanasopoulos *et al.*, 2013) και επιπλέον στον εντοπισμό της AnNce102 στα χυμοτόπια (Athanasopoulos and Sophianopoulou, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επομένως, μείωση των επιπέδων σφιγγολιπιδίων στο κύτταρο οδηγεί σε αποσυγκρότηση των εισοσωμάτων. Για την περαιτέρω μελέτη της λειτουργικότητας των μεταλλαγμένων αλληλίων της PilA, παρατηρήθηκαν τα στελέχη με τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (K149E), (K156E) με συνεστιακή μικροσκοπία laser παρουσία μυριοσίνης (20 $\mu\text{g/ml}$).

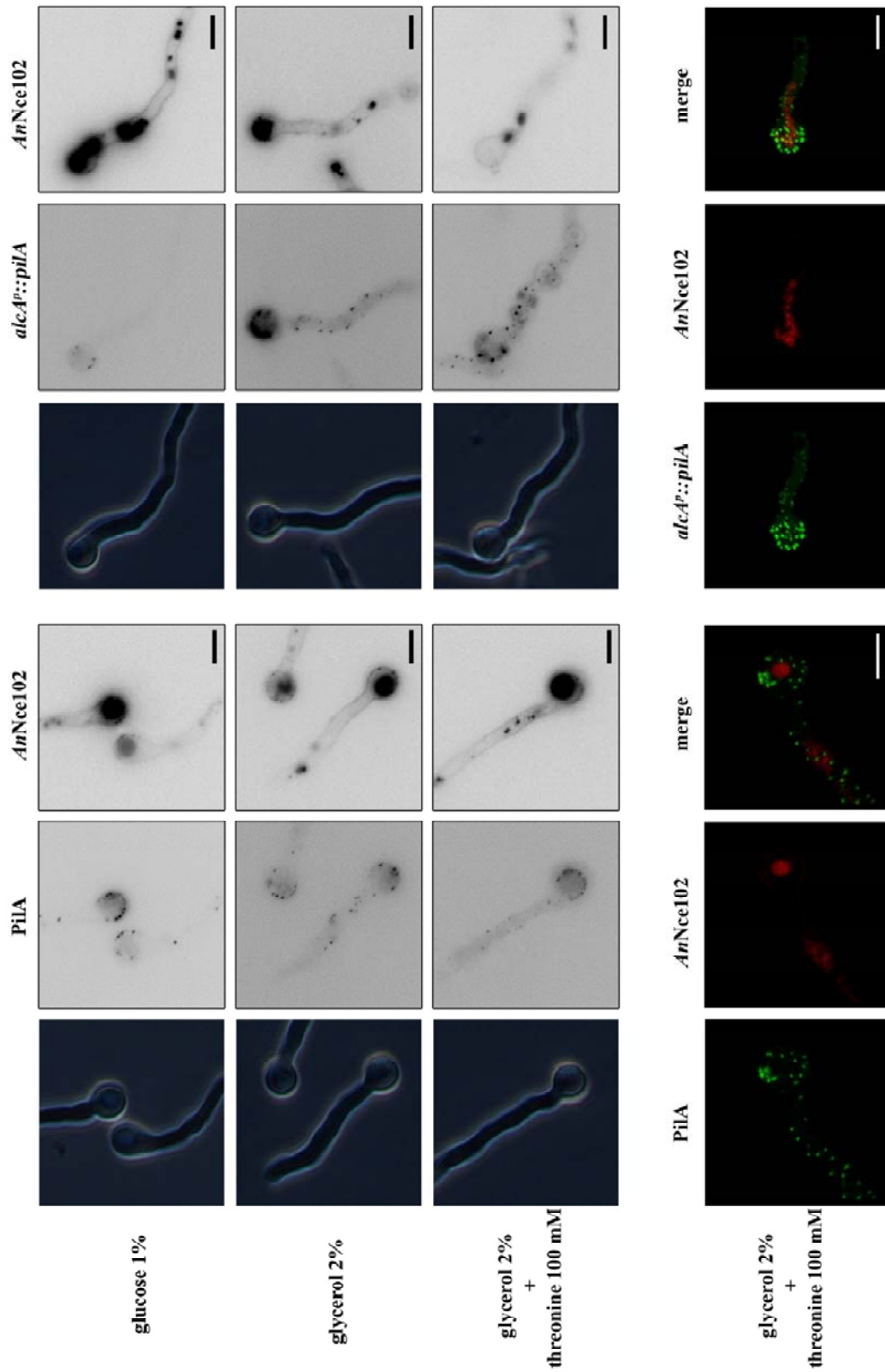
Τα αποτελέσματα, που φαίνονται στην Εικόνα 3.16, δείχνουν ότι η κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων δεν μεταβάλλεται παρουσία μυριοσίνης, υποδηλώνοντας ότι οι στικτοί σχηματισμοί που παρατηρούνται δεν είναι λειτουργικά εισοσώματα, αφού δεν επηρεάζονται από την ποσότητα σφιγγολιπιδίων στο κύτταρο.



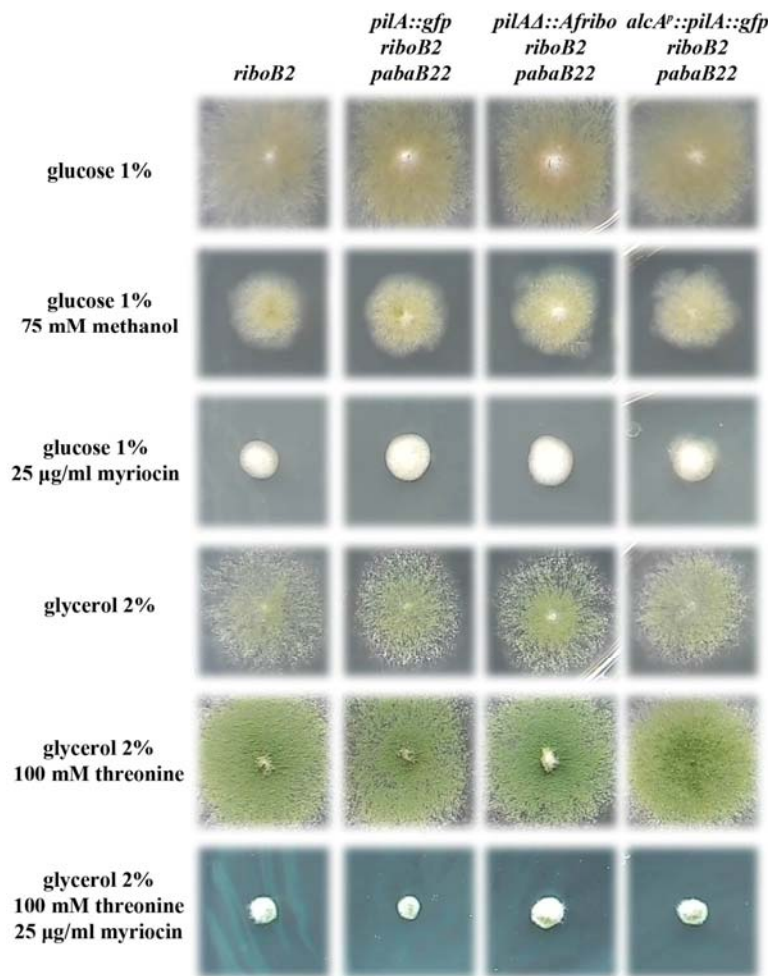
Εικόνα 3.16 Επίδραση της μυριοσίνης στην κατανομή της PilA και AnNce102 σε κύτταρα φυσικού τύπου και σε κύτταρα PilA μεταλλαγμένων αλληλίων. Η κατανομή των μεταλλαγμένων PilA αλληλίων παραμένει ανεπηρέαστη από τη μυριοσίνη. Μέγεθος κλίμακας = 5 μm .

3.10 Η μεταγραφική υπερέκφραση του γονιδίου *pilA* οδηγεί στη συγκρότηση μεγάλων, πολυάριθμων κηλίδων PilA στη μεμβράνη

Στην προσπάθεια εύρεσης λειτουργικού ρόλου της PilA, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης της πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μεταγραφική υπερέκφραση του γονιδίου *pilA* με τη χρήση του ρυθμιζόμενου υποκινητή *alcA^P* που κλωνοποιήθηκε ανορροϊκά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της κασέτας *pilA::gfp:Afp_{pyrG}*. Το μονοπάτι καταβολισμού της αιθανόλης στο μύκητα *A. nidulans* (μονοπάτι *alc*) είναι ισχυρά επαγόμενο γενετικό σύστημα υπεύθυνο για τη χρήση της αιθανόλης ως μοναδική πηγή άνθρακα και είναι πολύ καλά μελετημένο σε φυσιολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο (Felenbok *et al.*, 1991; Felenbok *et al.*, 1994; Felenbok *et al.*, 2001). Πέραν της αιθανόλης, το μονοπάτι *alc* επάγεται και από άλλες πρωτοταγείς αλκοόλες, πρωτοταγείς αμίνες, το αμινοξύ 1-θρεονίνη και τις κετόνες (2-βουτανόνη) (Lockington *et al.*, 1985). Σε συνθήκες αναστολής του υποκινητή *alcA^P* (γλυκόζη 1%), η πρωτεΐνη PilA εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα και η AnNce102 εντοπίζεται ομοιόμορφα κατανεμημένη στη μεμβράνη του κυττάρου, και στα χυμοτόπια. Σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα γλυκερόλη 2%, ο υποκινητής είναι αποκατεσταλμένος και η PilA παρουσιάζει όμοια κατανομή με το στέλεχος φυσικού τύπου, με την AnNce102 να συνεντοπίζεται σε αρκετά σημεία με την PilA. Σε συνθήκες επαγωγής του υποκινητή *alcA^P* (γλυκερόλη 2% με προσθήκη 100 mM θρεονίνης δύο ώρες πριν την παρατήρηση), παρατηρήθηκε αύξηση των σχηματισμών της PilA σε μέγεθος και αριθμό, όπως επαληθεύτηκε και με πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας laser (Εικόνα 3.17), υποδηλώνοντας ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *pilA* οδηγεί σε υπερέκφραση της PilA. Σε συνθήκες γονιδιακής υπερέκφρασης της PilA, η AnNce102 φαίνεται να αποκτά κατανομή όμοια με αυτή που παρατηρείται όταν υπάρχει έλλειψη της πρωτεΐνης PilA. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην ανάπτυξη του μύκητα, όπως επιβεβαιώθηκε και με αντίστοιχες δοκιμασίες ελέγχου ανάπτυξης στελεχών του μύκητα παρουσία διαφορετικών ουσιών ως μοναδικές πηγές άνθρακα (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.17 Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας laser νεαρών υφών σε διαφορετικές συνθήκες έκφρασης της *PilA*. Μέγεθος κλίμακας = 5 μm



Εικόνα 3.18 Δοκιμασία ελέγχου της επίδρασης υπερέκφρασης της PilA στην αύξηση του μύκητα σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης

μεγαλύτερο βαθμό σπορίωσης, από ότι σε γλυκερόλη 2% απουσία θρεονίνης.

Σύμφωνα με τη θεώρηση που προβλέπει ότι τα εισοσώματα εμπλέκονται στη ρύθμιση βιοσύνθεσης των σφιγγολιπιδίων (βλ. ενότητα 1.4.1.1), εξετάστηκε κατά πόσο η υπερέκφραση της PilA οδηγεί σε αυξημένη αναστολή του συγκεκριμένου μονοπατιού. Ανικανότητα βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων έχει δειχθεί ότι επηρεάζει την ανάπτυξη του μύκητα (Cheng *et al.*, 2001). Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε αν η ανάπτυξη στελέχους του μύκητα που υπερεκφράζει την PilA διαφοροποιείται σε σχέση με στέλεχος φυσικού τύπου και στέλεχος *pilAD*, παρουσία μυριοσίνης (ειδικού αναστολέα της βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων). Τα αποτελέσματα της Εικόνας 3.18 δείχνουν ότι η αύξηση του μύκητα παρουσία μυριοσίνης δεν παρουσιάζει διαφορές ανεξαρτήτως των επιπέδων έκφρασης της PilA ή απουσίας αυτής. Ο φαινότυπος μειωμένης ανάπτυξης του μύκητα παρουσία μυριοσίνης δεν οφείλεται στην παρουσία μεθανόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης της μυριοσίνης. Παρόλα αυτά η

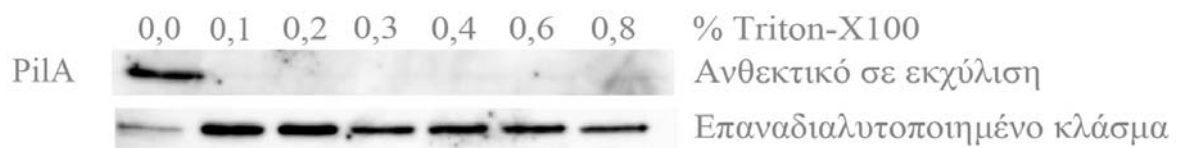
Συγκεκριμένα ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν η γλυκόζη (1%) και η γλυκερόλη (2%) και ως μοναδική πηγή αζώτου νιτρικά ιόντα.

Τα αποτελέσματα της εικόνας 3.18 δείχνουν ότι η αύξηση του μύκητα (έπειτα από 60 ώρες ανάπτυξης) είναι παρόμοια παρουσία γλυκερόλης 2% και γλυκόζης 1%, ως μοναδική πηγή άνθρακα. Παρουσία 100 mM θρεονίνης σε γλυκερόλη 2%, ο μύκητας εμφανίζει

μεθανόλη οδηγεί σε μικρή μείωση της ανάπτυξης του μύκητα. Για κάθε εξεταζόμενη συνθήκη η αύξηση του μύκητα ήταν ανεξάρτητη της έκφρασης της PilA.

3.11 Η αλληλεπίδραση της PilA με τη μεμβράνη

Καθώς η PilA ανήκει στις N-BAR πρωτεΐνες, εξετάστηκε το κατά πόσον το αμινοτελικό της άκρο, για το οποίο δεν υπάρχει πληροφορία δομής από κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (βλ. ενότητα 3.1.1), παρουσιάζει συγκεκριμένη δομή (πχ. αμφιπαθικής έλικας), η οποία «βυθίζεται» στη μεμβράνη και σταθεροποιεί περαιτέρω την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με αυτήν. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι ανθεκτικές στην εκχύλισή τους από τη μεμβράνη χρησιμοποιώντας μη-ιονικά τασιενεργά (Grossmann et al., 2007). Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκε απομόνωση εμπλουτισμένων σε μεμβρανικές πρωτεΐνες εκχυλισμάτων από στέλεχος του *A. nidulans* που εκφράζει την PilA-GFP και μελετήθηκε η ανθεκτικότητα εκχύλιση της από τη μεμβράνη χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις του μη-ιονικού τασιενεργού Triton-X100. Τα αποτελέσματα στην εικόνα 3.19 δείχνουν ότι η PilA είναι ευαίσθητη στην εκχύλισή της από τα λιπίδια της μεμβράνης, υποδηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τη μεμβράνη πραγματοποιείται κυρίως με ασθενείς δυνάμεις.



Εικόνα 3.19 Η PilA δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε εκχύλισή της από τη μεμβράνη με χρήση Triton-X100. Ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις % Triton-X100, η PilA εντοπίζεται στο διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Η σημασία της Leu87 στο διμερισμό της PilA

Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής στοίχισης της PilA με άλλες γνωστές πρωτεΐνες που περιέχουν τη δομική περιοχή BAR έδειξαν ότι η πρωτεΐνη PilA, περιέχει το μοτίβο FCH (βλ. ενότητα 1.3.4). Το μοτίβο αυτό σύμφωνα με τους Masuda και Mochizuki (2010), είναι θεωρητικώς υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση του διμερούς BAR των πρωτεϊνών της υποκατηγορίας F-BAR, και για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με δομές του κυτταροσκελετού. Παρόλα αυτά μέχρι πρόσφατα δεν είχε επιβεβαιωθεί πειραματικά η σημασία του εν λόγω μοτίβου στο διμερισμό των πρωτεϊνών με την περιοχή BAR. Για πρώτη φορά, σε αυτήν την εργασία, αποδείχτηκε ότι η Leu87, συντηρημένο αμινοξικό κατάλοιπο του μοτίβου FCH, είναι σημαντική για τη σωστή συγκρότηση του διμερούς της πρωτεΐνης PilA σε πρωτεΐνες που περιέχουν τη δομική περιοχή N-BAR, και επιβεβαιώνεται πειραματικά ότι αποτελεί απαραίτητο αμινοξικό κατάλοιπο για τη λειτουργία του μοτίβου FCH.

Παρότι τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχουν και άλλα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα στο μοτίβο FCH, η Leu87 επιλέχθηκε με βάση προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν ότι τα υδρόφοβα κατάλοιπα που βρίσκονται στον «πυρήνα» του μορίου είναι τα κατ' εξοχήν σημαντικά για το διμερισμό των πρωτεϊνών με δομική περιοχή BAR. Συγκεκριμένα, έχει ήδη αποδειχτεί ότι η υποκατάσταση της Leu215 της ενδοφιλίνης από ασπαρτικό οξύ (L215D), οδηγεί σε μη δυνατότητα διμερισμού των μονομερών της πρωτεΐνης (Gortat *et al.*, 2011).

Οι υποκαταστάσεις L87D, L87R οδηγούν σε παρόμοιο φαινότυπο δηλαδή κυτταροπλασματικό εντοπισμό της πρωτεΐνης, όπως παρατηρήθηκε με χρήση μεθόδων μικροσκοπίας (φθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης laser). Επιπλέον το πρότυπο κατανομής της *AnNce102* σε αυτά τα στελέχη υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη είναι μη λειτουργική. Επομένως, αντικατάσταση της Leu87 με φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας της PilA.

Η χαμηλή ηλεκτροφορητική ικανότητα της πρωτεΐνης PilA(L87D) στελέχους που φέρει πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου που την κωδικοποιεί, με την παράλληλη συσσώρευση της πρωτεΐνης φυσικού τύπου σε native-PAGE συνάδει με τα αποτελέσματα της εργασίας των Quinones *et al.* (2010). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως για να εισέλθει πρωτεΐνη με περιοχή BAR σε native gel, πρέπει να έχει επωασθεί μαζί με λιποσώματα κατάλληλης λιπιδικής σύστασης. Τα

αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η φυσικού τύπου PilA πιθανώς δημιουργεί συσσωματώματα και δεν μπορεί να ηλεκτροφορηθεί πλήρως σε μη αποδιατακτικές συνθήκες σε αντίθεση με την PilA(L87D) η οποία πιθανώς λόγω της μη συγκρότηση του διμερούς ηλεκτροφορείται κανονικά. Επομένως, η ζώνη που εμφανίζεται στο δείγμα των ολικών απομονωμένων πρωτεϊνών του στελέχους με τη μεταλλαγμένη PilA(L87D) αποτελεί ένδειξη ότι η πρωτεΐνη δεν βρίσκεται στη φυσιολογική της κατάσταση, δηλαδή αυτή του διμερούς. Η απουσία παρόμοιας ζώνης στο δείγμα πρωτεΐνης από το στέλεχος που εκφράζει PilA (L87R) πιθανώς οφείλεται στη χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης.

4.2 Τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys147, Lys149, Lys156, Lys160 και Arg166 είναι σημαντικά για την αλληλεπίδραση της PilA με τη μεμβράνη

Η μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας της πρωτεΐνης PilA παρουσιάζει δυσκολία καθώς η απουσία λειτουργικής PilA δεν προσδίδει διακριτό φαινότυπο αύξησης σε στελέχη του *A. nidulans*. Όμως, με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα (βλ. ενότητα 1.4.1.1), είναι δυνατή η εκτίμηση της λειτουργικότητας ή μη της PilA με μικροσκοπική παρατήρηση. Σε στελέχη με απώλεια λειτουργίας της PilA, τα μεμβρανικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα MCC, τα οποία συνεντοπίζονται με τα εισοσώματα, δεν μπορούν να οργανωθούν φυσιολογικά με αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική μεμβρανική διαμερισματοποίηση των πρωτεϊνών που τα απαρτίζουν (Stradalova *et al.*, 2009). Παραδείγματα τέτοιων συστατικών πρωτεϊνών είναι η Sur7 και Nce102 στο *S. cerevisiae*, με τη δεύτερη να έχει καθοριστικό ρυθμιστικό ρόλο στη συγκρότηση των εισοσωμάτων του μύκητα (Fröhlich *et al.*, 2009). Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε η ομόλογη πρωτεΐνη AnNce102, ως δείκτης λειτουργικότητας της PilA.

Οι υποκαταστάσεις K147N K149E, K149E, K156E, K160E και R166E δείχνουν ότι η PilA δεν είναι λειτουργική σε κύτταρα που εκφράζουν τα αντίστοιχα αλληλόμορφα. Συμπερασματικά, αυτές οι υποκαταστάσεις είναι σημαντικές για τη σωστή αλληλεπίδραση της PilA με τη μεμβράνη. Δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Jao *et al.*, 2010) έχουν επισημάνει τη σημασία των αμφιπαθικών ελίκων, δηλαδή α-ελίκων με συγκεκριμένο προφίλ υδροφοβικότητας ανά πλευρά, πρωτεϊνών που φέρουν την αυτόνομη δομική περιοχή BAR στην αλληλεπίδρασή τους με τη μεμβράνη. Το μοντέλο από την προαναφερθείσα εργασία προτείνει ότι η θετικώς

φορτισμένη κυρτή επιφάνεια του μορίου της ενδοφιλίνης «βυθίζεται» κατά κάποιο τρόπο στις αρνητικώς φορτισμένες κεφαλές των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Οποιαδήποτε αλλαγή στο προφίλ φορτίου του πρωτεϊνικού μορίου, επιφέρει μεγάλες αλλαγές στην αλληλεπίδρασή του με τη μεμβράνη λόγω της ελεύθερης ενέργειας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συνάδουν με τα αποτελέσματα αντίστοιχης μελέτης σε ομόλογα αμινοξικά κατάλοιπα της ομόλογης της PilA, Pil1 στο *S. cerevisiae* (Olivera-Couto *et al.*, 2011). Υποκαταστάσεις στα αμινοξικά αυτά κατάλοιπα οδηγούν σε μικρότερο αριθμό στικτών σχηματισμών και αύξηση του κυτταροπλασματικού εντοπισμού της Pil1 στο ζυμομύκητα. Τα διπλά μεταλλαγμένα αλληλόμορφα καθώς και το αλληλόμορφο που φέρει ταυτόχρονα όλες τις υποκαταστάσεις, εντείνουν αυτόν το φαινότυπο. Αντίστοιχος φαινότυπος παρατηρήθηκε στο διπλά μεταλλαγμένο αλληλόμορφο K147N K149E στον *A. nidulans*.

Παράλληλα, το ανοσοαποτύπωμα κατά Western δείχνει ότι η συνολική ποσότητα της PilA παραμένει σταθερή. Επομένως, οι μεγάλοι στικτοί σχηματισμοί που απομένουν είναι αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής συγκρότησης της PilA που εκφράζεται, λόγω της μη φυσιολογικής αλληλεπίδρασής της με τη μεμβράνη ή και λόγω της μη φυσιολογικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των ίδιων των μορίων της PilA.

Σε κάθε περίπτωση αυτές οι συσσωματώσεις της PilA δεν είναι λειτουργικές, αφού μένουν ανεπηρέαστες έπειτα από επώαση με μυριοσίνη, σε αντίθεση με τη φυσικού τύπου PilA. Παρά την εμφανή επίδραση της μυριοσίνης στην ανάπτυξη του μύκητα (καθυστερημένη αύξηση των υφών), δεν παρατηρήθηκε αποδιοργάνωση των στικτών σχηματισμών της PilA. Η αποδιοργάνωση αυτή θα οφειλόταν στην έλλειψη σφιγγολιπιδίων, η οποία έχει δειχτεί ότι οδηγεί σε αποσυγκρότηση των εισοσωμάτων (Athanasopoulos *et al.*, 2013). Συμπερασματικά, οι δομές που μένουν ανεπηρέαστες από την επίδραση της μυριοσίνης στο κύτταρο δεν εξαρτώνται από τα επίπεδα των σφιγγολιπιδίων στο κύτταρο. Επιπλέον αυτά τα συσσωματώματα της PilA δεν συνεντοπίζονται με την AnNce102 (βλ. ενότητα 3.9).

4.3 Η απώλεια λειτουργίας της AnNce102 δεν οδηγεί σε απώλεια της τοπολογίας της PilA αλλά μειώνει τον αριθμό των στικτών σχηματισμών της σε νεαρές υφές

Προηγούμενα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας laser δείχνουν ότι η PilA απουσία λειτουργικής AnNce102 παρουσιάζει αλλαγμένο πρότυπο κατανομής σε

κονιδιοσπόρια και σε αναπτυσσόμενες υφές. Συγκεκριμένα, υπάρχει μείωση του αριθμού των εισοσωμάτων σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια. Αντιστοίχως, ο αριθμός των εισοσωμάτων που εντοπίζεται στην κεφαλή της αναπτυσσόμενης υφής είναι 3 φορές μειωμένος σε κύτταρα *Annce102Δ* από ότι σε κύτταρα φυσικού τύπου, ενώ ο αριθμός τους στην κυρίως υφή παραμένει ανεπηρέαστος.

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις με τα πειραματικά δεδομένα που έχουν προηγουμένως δημοσιευτεί για το *S. cerevisiae*, όπου σε κύτταρα *ncc102Δ* η Pil1 αποκτά κυτταροπλασματική κατανομή με ταυτόχρονη παραμονή μειωμένου αριθμού εισοσωμικών καταλοίπων στη μεμβράνη (Fröhlich *et al.*, 2009). Παρότι το φαινόμενο που παρατηρείται στους δύο οργανισμούς είναι παρόμοιο, δηλαδή μείωση των κηλίδων PilA/Pil1 στη μεμβράνη απουσία *AnNce102/Nce102* αντίστοιχα, η μείωση του αριθμού των εισοσωμάτων στο *S. cerevisiae* είναι διακριτά μεγαλύτερη σε σχέση με ότι έχει παρατηρηθεί στον *A. nidulans*. Αυτή η διαφορά ενδεχομένως να υποδηλώνει την υπάρξη επιπρόσθετων πρωτεϊνικών μορίων που συμπληρώνουν μερικώς την απώλεια λειτουργίας της *AnNce102* στον *A. nidulans*.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων της PilA απουσία του γονιδίου *Annce102*. Τα αποτελέσματα από πειράματα μικροσκοπίας επιφθορισμού δείχνουν ότι η απώλεια λειτουργίας της *AnNce102*, η ομόλογη της οποίας έχει ήδη διαπιστωθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκρότησης των εισοσωμάτων (Fröhlich *et al.*, 2009), οδηγεί σε μείωση των στικτών σχηματισμών των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων PilA στα αντίστοιχα στελέχη του μύκητα.

Για την περαιτέρω εξέταση αυτού του φαινομένου στα συγκεκριμένα στελέχη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν τεχνικές αυξημένης διακριτικής ικανότητας (συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης laser) και στατιστική ανάλυση του αριθμού των κηλίδων των μεταλλαγμένων αλληλίων της PilA, καθώς και μέτρηση της σχετικής έντασης φθορισμού στο κυτταρόπλασμα.

4.4 Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της PilA επηρεάζουν την τοπολογία της PilB

Τα πειράματα που έγιναν για τη μελέτη της τοπολογίας της PilB παρουσία λειτουργικής PilA, έδειξαν ότι η κατανομή της PilB, σε μεγάλους στικτούς σχηματισμούς, είναι παρόμοια σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια μεταξύ κυττάρων

pilAΔ και κύτταρων που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες PilA. Το παραπάνω φαινόμενο επιβεβαιώνει το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες αμινοξικές υποκαταστάσεις οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας της PilA.

Ένα ερώτημα το οποίο προκύπτει, είναι γιατί η PilB παρότι έχει όμοια τοπολογία με την PilA σε μη εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια, διαχέεται στο κυτταρόπλασμα σε νεαρές υφές. Αυτό πιθανώς να σχετίζεται με το γεγονός ότι η PilB είναι φυλογενετικά απομακρυσμένη από την PilA (Vangelatos *et al.*, 2010), δηλαδή δεν μοιράζεται τον ίδιο βαθμό συγγένειας που μοιράζεται η ομόλογη της PilA, Pil1 με την Lsp1 στο *S. cerevisiae*. Αυτή η εξελικτική απόσταση, πιθανώς να έχει οδηγήσει σε διαφορετική λειτουργία της PilB, η οποία όμως δεν έχει προσδιοριστεί μέχρι στιγμής.

Μία προοπτική για την περαιτέρω διερεύνηση προς αυτήν την κατεύθυνση είναι η δημιουργία σταθερού ετεροκαρύου που να εκφράζει ταυτόχρονα την PilA-GFP (φυσικού τύπου αλλά και τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της) και την PilB-mRFP. Χρησιμοποιώντας τέτοια στελέχη, είναι δυνατόν να γίνει έλεγχος του πιθανού ετεροδιμερισμού των δύο πρωτεϊνών, ειδικά με τη χρήση των αλληλόμορφων L87D και L87R.

4.5 Χρήση του υποκινητή *alcA^P* ως εργαλείο για τη μελέτη του βιολογικού ρόλου της PilA

Παρότι ο υποκινητής *alcA^P* είναι ένα εξαιρετικό εργαλείο για τη ρυθμιζόμενη έκφραση γονιδίων στον *A. nidulans*, δεν είναι επαρκής για τη μελέτη των εισοσωμικών πρωτεϊνών στο στάδιο των κονιδιοσπορίων, καθώς δεν είναι επαρκώς λειτουργικός σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο. Για αυτό το λόγο, μελετήθηκε η υπερέκφραση της PilA αποκελειστικά σε νεαρές υφές. Τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης της PilA με τη βοήθεια του ρυθμιζόμενου υποκινητή *alcA^P* έδειξαν ότι σε συνθήκες όπου η PilA υπερεκφράζεται δημιουργούνται πολυάριθμοι, μεγάλοι στικτοί σχηματισμοί της στις νεαρές υφές.

Δοκιμασίες ελέγχου αύξησης στελεχών του *A. nidulans* που εκφράζουν σε διαφορετικά επίπεδα την PilA, με χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα, παρουσία ή απουσία μυρισίνης, έδειξαν ότι αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου της *pilA* δεν επιδρούν στην ανάπτυξη του μύκητα. Η βελτίωση της σπορίωσης όλων των στελεχών σε γλυκερόλη 2% ως πηγή άνθρακα παρουσία θρεονίνης σε σχέση με τη συνθήκη

όπου υπάρχει μόνο γλυκερόλη 2%, μπορεί να οφείλεται στο ότι η θρεονίνη χρησιμοποιείται και ως πηγή αζώτου από το μύκητα. Λόγω του ρυθμιστικού μονοπατιού βιοσύνθεσης σφιγγολιπιδίων, υπερέκφραση της *PilA* θα αναμενόταν να οδηγήσει σε στρατολόγηση της *Nce102* που δρα ανασταλτικά σε όλο το μονοπάτι (βλ. ενότητα 1.4.1.1). Επομένως, επώαση με μυριοσίνη θα οδηγούσε σε αυξημένη αναστολή του μονοπατιού, και άρα αυξημένη ευαισθησία του μύκητα σε αυτή τη συνθήκη. Το γεγονός ότι η υπερέκφραση της *PilA* δεν παρουσιάζει φαινότυπο υπερευαισθησίας από τη μυριοσίνη οδηγεί στο συμπέρασμα πώς το μονοπάτι ρύθμισης σφιγγολιπιδίων δεν ρυθμίζεται αυστηρά με τον τρόπο που προτείνεται στο *S. cerevisiae*, αλλά πιθανώς εμπλέκονται και άλλα μόρια-ρυθμιστές σε αυτό.

Η παρατήρηση ότι η υπερέκφραση της *PilA* οδηγεί σε όμοια κατανομή της *AnNce102* με αυτήν που παρατηρείται σε κύτταρα *pilAΔ*, αποτελεί ένδειξη πως η ποσοτική ισορροπία (equilibrium) της *PilA* είναι αυτή που καθορίζει τη λειτουργική και τη φυσιολογική κατανομή των εισοσωμάτων στη μεμβράνη του κυττάρου. Εναλλακτικά, η αποικοδόμηση της *Nce102* μπορεί να έχει ήδη προηγηθεί της προσθήκης του επαγωγέα του υποκινητή *alcA^P* (L-θρεονίνη) και η μετέπειτα επαγωγή του *alcA^P* δεν είναι ικανή να αναστρέψει αυτό το φαινόμενο. Για την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, χρειάζεται να κατασκευαστεί στέλεχος το οποίο θα φέρει σε πολλαπλά αντίγραφα το γονίδιο *pilA* με τον ενδογενή υποκινητή. Σε ένα τέτοιο στέλεχος η *PilA* θα υπερεκφράζεται συνεχώς, και θα είναι δυνατόν να παρατηρηθεί η επίδραση αυτής της μόνιμης επαγωγής πάνω στην τοπολογία της *AnNce102*.

Ο υποκινητής *alcA^P* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την εύρεση γονιδίων που αλληλεπιδρούν με την *PilA* και εμφανίζουν συνθετικό θνησιγόνο φαινότυπο. Για να πραγματοποιηθεί μία τέτοια σάρωση πρέπει να κατασκευαστεί ένα στέλεχος *alcA^P::pilA::gfp biA1*, που θα είναι δηλαδή αυξότροφο για βιοτίνη. Σε ένα τέτοιο στέλεχος μπορούν να απομονωθούν υπό συνθήκη θνησιγόνες μεταλλαγές, έπειτα από τυχαία μεταλλαξιγένεση κονιδιοσπορίων με υπεριώδη ακτινοβολία. Εμβολιασμός ελάχιστου υγρού θρεπτικού υλικού απουσία βιοτίνης με πηγή άνθρακα γλυκόζη, οδηγεί τα κονιδιοσπόρια που είναι βιώσιμα, λόγω έλλειψης βιοτίνης, σε εκβλάστηση και σε θάνατο. Παράλληλα σε τέτοια συνθήκη η *PilA* δεν εκφράζεται λόγω της προτιμώμενης πηγής άνθρακα. Όσα κονιδιοσπόρια δεν εκβλαστήσουν, θα φέρουν ήδη θνησιγόνες μεταλλαγές. Μεταφορά των κονιδιοσπορίων σε θρεπτικό μέσο με προσθήκη βιοτίνης, και ταυτόχρονη αλλαγή της πηγής άνθρακα σε γλυκερόλη ώστε να εκφραστεί η *PilA*, είναι πιθανό να δώσει τη δυνατότητα σε

στελέχη που φέρουν μεταλλαγές συνθετικά θνησιγόνες με την έλλειψη της PilA. Με ένα τέτοιο σύστημα μπορούν να ταυτοποιηθούν γονίδια τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται σε ρυθμιστικό μονοπάτι στο οποίο μετέχει η PilA.

4.6 Η συσγέτιση των εισοσωμικών πρωτεϊνών με τη μεμβράνη

Στην παρούσα εργασία για πρώτη φορά, μελετάται η ανθεκτικότητα της PilA σε εκχύλισή της από τη μεμβράνη με τη χρήση μη ιονικών τασιενεργών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η PilA αλληλεπιδρά με τη μεμβράνη με ασθενείς δυνάμεις καθώς δεν παρουσιάζει αντίσταση στην εκχύλισή της από αυτήν με χρήση Triton-X100, ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η παρατήρηση αυτή οφείλεται, κατά πάσα πιθανότητα, στο γεγονός ότι η PilA δεν είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη και δεν περιέχει τμήματα που εισέρχονται στη λιπιδική διπλοστιβάδα.

Μελέτες στην ομόλογη της PilA στο *S. cerevisiae*, Pil1, αλλά και σε άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν τη δομική περιοχή BAR και αλληλεπιδρούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, έδειξαν ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη του φωσφολιπιδίου της 4,5-διφωσφορικής φωσφοϊνσιτόλης (Karotki *et al.*, 2011; Gortat *et al.*, 2011). Η Pil1 έχει επίσης δειχθεί ότι μετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων του συγκεκριμένου φωσφολιπιδίου στο κύτταρο (Kabeche *et al.*, 2014). Ειδικά στην περίπτωση της μελέτης των Karotki *et al.*, παρατηρήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης δημιουργία μακρών σωληνοειδών μορφών των λιποσωμάτων που φέρουν την PI(4,5)P₂ όταν αυτά επώασθηκαν με καθαρή Pil1.

Με βάση τα παραπάνω, μελλοντική προοπτική για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της PilA με τη μεμβράνη, είναι η κατασκευή λιποσωμάτων που έχουν σε συγκεκριμένο ποσοστό διαφορετικούς τύπους σύνθετων φωσφολιπιδίων και επώασή τους τόσο με τη φυσικού τύπου PilA όσο και με τα μεταλλαγμένα αλληλία της που κατασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία. Κατά αυτόν τον τρόπο θα διερευνηθεί η απαίτηση συγκεκριμένου τύπου φωσφολιπιδίων για τη σωστή στρατολόγηση της PilA στη μεμβράνη και θα μελετηθεί η ικανότητα πρόσδεσης των μεταλλαγμένων αλληλίων της PilA σε συγκεκριμένα λιπιδικά υποστρώματα. Τέτοιου είδους πιθανές αλληλεπιδράσεις μπορούν να διαπιστωθούν με τη βοήθεια native-PAGE, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Gortat *et al.*, 2011), ή με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης.

Η ανθεκτικότητα εκχύλισης πρωτεϊνών του MCC από τη μεμβράνη με χρήση Triton-X100 έχει ήδη μελετηθεί στο *S. cerevisiae* (Grossmann *et al.*, 2008). Σε αυτή τη δημοσίευση αναφέρεται ότι η περμεάση αργινίνης Can1, η οποία απουσία λειτουργικής Pil1 αποκτά ομοιόμορφη κατανομή στη μεμβράνη, γίνεται λιγότερο ανθεκτική σε εκχύλισή της από Triton-X100, σε κύτταρα *pill1Δ*. Παρότι αντίστοιχη μελέτη θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί στον *A. nidulans* για τις εισοσωμικές πρωτεΐνες SurG και AnNce102, αυτό καθίσταται δύσκολο λόγω της τοπολογίας των δύο αυτών πρωτεϊνών σε στελέχη *pilAΔ*, στα οποία οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες δεν εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη αλλά στα χυμοτόπια του μύκητα όπου πιθανώς αποικοδομούνται. Εξάιρεση αποτελεί η AnNce102 που διατηρεί σε πολύ μικρό ποσοστό μία ομοιόμορφη κατανομή στη μεμβράνη.

4.7 Γενικές μελλοντικές προοπτικές

Η περαιτέρω μελέτη των εισοσωμάτων παρουσιάζει ενδιαφέρον διότι φαίνεται να εμπλέκονται σε αρκετές λειτουργίες του κυττάρου των μυκήτων. Η επικρατούσα θεώρηση είναι ότι τα εισοσώματα κατά κύριο λόγο ρυθμίζουν τα επίπεδα σφιγγολιπιδίων και συγκεκριμένου τύπου φωσφολιπιδίων στο κύτταρο μέσα από ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο μονοπάτι στο οποίο κύριο ρυθμιστικό ρόλο στο *S. cerevisiae* έχουν οι πρωτεΐνες Nce102 και Pil1, με τη δεύτερη να έχει και καθοριστικό ρόλο στη δομική οργάνωση των εισοσωμάτων (Stradalova *et al.*, 2009; Fröhlich *et al.*, 2009; Roelants *et al.*, 2011; Berchtold *et al.*, 2012; Niles and Powers, 2012; Kabeche *et al.*, 2014). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε αυτό το μονοπάτι εμπλέκονται οι κινάσες Pkh1 και Pkh2, οι οποίες έχουν ένα εύρος υποστρωμάτων και ρυθμίζονται αρνητικά από την Nce102 (Fröhlich *et al.*, 2009). Πρόσφατη εργασία έχει αποκαλύψει ότι η πρωτεΐνη Nce102 στην *Candida albicans* περιέχει μία δομική περιοχή MARVEL, η οποία είναι υπεύθυνη για την οργάνωση της μεμβράνης και ρυθμίζει την οργάνωση της ακτίνης στο κύτταρο. Επίσης εμπλέκεται στη ρύθμιση της αύξησης του μύκητα κατά τη επιμόλυνσή του στο κύτταρο-ξενιστή (Douglas *et al.*, 2013).

Επιπρόσθετα, η μελέτη των ομόλογων των κινασών Ypk1 και Pkh 1/2 στον *A. nidulans* παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς οι ομόλογές τους σε θηλαστικά συμμετέχουν στη μετάδοση σήματος σε κύτταρα υπό την ορμονική ρύθμιση γλυκοκοτρικοειδών (Webster *et al.*, 1993). Τέλος, το σύμπλεγμα TORC2 στο οποίο

φοσφορυλιώνονται οι Yrk, Slm1 και Slm2 εμπλέκεται και σε άλλες διεργασίες του κυττάρου εκτός από τη ρύθμιση των σφιγγολιπιδίων, όπως η οργάνωση του κυτταροσκελετού (Schmidt *et al.*, 1996) και η ενδοκύτωση (deHart *et al.*, 2002, 2003; Bultynck *et al.*, 2006). Κύρια πρωτεΐνη του συμπλέγματος TORC2 είναι η κινάση Tor2, η οποία εντοπίζεται και στο TORC1 (Loewith *et al.*, 2002). Κύρια πρωτεΐνη του συμπλέγματος TORC1 είναι η Tor1, ενώ το σύμπλεγμα εμπλέκεται σε πληθώρα σημαντικών λειτουργιών του κυττάρου μεταξύ των οποίων είναι η επαγωγή της κυτταρικής αύξησης και ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης, η βιογένεση των ριβοσωμάτων και η συμμετοχή στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών (επισκόπηση Loewith and Hall, 2011).

Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με τις διακριτά διαφοροποιημένες δομές που παρουσιάζει ο *A. nidulans* στον κύκλο ζωής του σε σχέση με το ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, όπως επίσης και οι διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες που αποδίδονται στο βιολογικό ρόλο των εισοσωμάτων σε διαφορετικά είδη μυκήτων παρά τη φυλογενετική τους συγγένεια, υποδηλώνουν την αναγκαιότητα μελέτης των εισοσωμάτων στο συγκεκριμένο υφομύκητα.

Οι ομόλογες πρωτεΐνες των Yrk1 και Pkh1 στον *A. nidulans* έχουν ταυτοποιηθεί ως YrkA (AN5973) και PkhA (AN3110) αντίστοιχα (Colabardini *et al.*, 2013). Η AnNce102 (AN7683) έχει κλωνοποιηθεί (Athanasopoulos and Sophianopoulou, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και έχει χρησιμοποιηθεί για μελέτες της παρούσας εργασίας. Σημαντική είναι η διερεύνηση της σχέσης αυτών των πρωτεϊνών στη βιοσύνθεση των σφιγγολιπιδίων στον *A. nidulans*, με τη χρήση υπό συνθήκη επαγόμενων υποκινητών που έχουν κλωνοποιηθεί ανορροϊκά στα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των αντίστοιχων γονιδίων. Η επίδραση της AnNce102 στην κατανομή της PilA, με απαλοιφή του γονιδίου της, έχει ήδη πραγματοποιηθεί και έχει συζητηθεί στην ενότητα 4.3 (Athanasopoulos and Sophianopoulou, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επιπρόσθετα, στον *A. nidulans* υπάρχει μία μόνον ομόλογη κινάση των Tor1 και Tor2, η TorA (Fitzgibbon *et al.*, 2005), ενώ δεν έχουν αναγνωρισθεί τα TORC συμπλέγματα του μύκητα. Η περαιτέρω μελέτη της κινάσης TorA στον *A. nidulans* μπορεί να αποτελέσει πρότυπο σύστημα για τις ομόλογες κινάσες που απαντώνται στα θηλαστικά και τα φυτά καθώς και σε αυτά τα συστήματα υπάρχει μόνο μία ομόλογη κινάση Tor.

Τέλος, έχουν ήδη ταυτοποιηθεί 88 γονίδια τα οποία επιδρούν στην οργάνωση της Pil1 στο *S. cerevisiae*, τα οποία εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών

(Fröhlich *et al.*, 2009). Δεδομένου ότι δεν υπάρχει βιβλιοθήκη με απαλοιφή όλων των γονιδίων στον *A. nidulans*, ένα αντίστοιχο εργαλείο για αυτό το σκοπό είναι η χρήση του υποκινητή *alcA^p* στη σάρωση και ανίχνευση πιθανών υπό συνθήκη θνησιγόνων μεταλλαγών που εξαρτώνται από την έκφραση της PilA, η οποία έχει αναλυθεί στην ενότητα 4.5.

4.8 Γενικά Συμπεράσματα

Πίνακας 4.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας	
Αποτέλεσμα	Συμπέρασμα
1 Οι υποκαταστάσεις της Leu87 με φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα οδηγεί σε κυτταροπλασματική τοπολογία της PilA	Η Leu87 είναι ενδεχομένως σημαντική για το φυσιολογικό διμερισμό της περιοχής BAR της PilA
2 Η PilA (L87D) έχει διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα σε native-PAGE από τη φυσικού τύπου PilA	
3 Υποκαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων στη θετικά φορτισμένη κυρτή επιφάνεια της PilA (Lys147, Lys149, Lys156, Lys160 και Arg166) οδηγεί σε αλλαγή της κατανομής της	Αυτοί οι σχηματισμοί είναι πιθανώς μη φυσιολογικά συσσωματώματα, λόγω μη φυσιολογικής αλληλεπίδρασης των μορίων PilA με τη μεμβράνη
4 Δεν υπάρχει αλλαγή της έκφρασης της PilA μεταξύ των διαφορετικών αλληλίων της	
5 Οι PilA υποκαταστάσεις οδηγούν σε κατανομή της AnNce102 όμοια με αυτή σε κύτταρα <i>pilAΔ</i>	Οι συγκεκριμένες υποκαταστάσεις οδηγούν σε μη λειτουργικά εισοσώματα
6 Η κατανομή της PilB σε κονίδια στελεχών που φέρουν τα μεταλλαγμένα αλληλία της PilA, είναι η ίδια με αυτή στελεχών <i>pilAΔ</i>	
7 Η κατανομή αλληλόμορφων της PilA μένει ανεπηρέαστη έπειτα από επίδραση μυρισίνης	
8 Ο αριθμός των δομών που συγκροτούν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της PilA σε μεταλλαγμένες υφές είναι αισθητά μειωμένος απουσία λειτουργικής AnNce102	Το φαινόμενο ενδεχομένως οφείλεται σε συνεργιστικό φαινότυπο απώλειας λειτουργίας των PilA/AnNce102
9 Υπερέκφραση της PilA οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των στικτών σχηματισμών στο κύτταρο	Απαιτείται ισορροπία στο αριθμό της PilA για τη σωστή συγκρότηση και λειτουργία των εισοσωμάτων
10 Δοκιμασίες ανάπτυξης έδειξαν ότι υπερέκφραση της PilA δεν οδηγεί σε φαινότυπο υπερευαισθησίας σε μυρισίνη	Το μονοπάτι ρύθμισης σφιγγολιπιδίων πιθανώς ρυθμίζεται από επιπρόσθετα μόρια
11 Η PilA δεν εμφανίζει αντίσταση σε εκχύλιση της από μεμβράνη με Triton-X100	Η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη PilA αλληλεπιδρά με ασθενείς δυνάμεις με τη μεμβράνη

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguirre, J. (1993). Spatial and temporal controls of the *Aspergillus* brlA developmental regulatory gene. *Mol Microbiol*, **8**(2): 211-218
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1994). In: *Molecular Biology of the Cell* (Fourth Edition) Garland.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. (eds). (1996). *Introductory Mycology*. Wiley Text Books.
- 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
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A., & Simons, K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(7), 3254-3259. doi: 10.1073/pnas.060034697
- 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**(5), 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**(5), 1565-1575. doi: 10.1091/mbc.E08-10-1001
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. & Clarke, N.D. (2002). *Biochemistry* (Fifth Edition). Freeman and Company, New York
- Bhatia, V. K., Madsen, K. L., Bolinger, P. Y., Kunding, A., Hedegard, P., Gether, U., & Stamou, D. (2009). Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing. *EMBO J*, **28**(21), 3303-3314. doi: 10.1038/emboj.2009.261
- Bultynck, G., Heath, V. L., Majeed, A. P., Galan, J. M., Haguenaer-Tsapis, R., & Cyert, M. S. (2006). Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Mol Cell Biol*, **26**(12), 4729-4745. doi: 10.1128/MCB.01973-05
- Bruggeman, J., Debets, A.J., Wijngaarden, P.J., deVisser, J.A. & Hoekstra, R.F. (2003). Sex slows down the accumulation of deleterious mutations in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **164**(2): 479-485.
- Carvalho M. D.F., Marta S. B. & Ivanhoe R. B (2002). *Genetics and Molecular Biology*, **25**, 4:485-488
- Casal, E., Federici, L., Zhang, W., Fernandez-Recio, J., Priego, E. M., Miguel, R. N., DuHadaway, J.B., Prendergast, G.C., Luisi, B.F. & Laue, E. D. (2006). The crystal structure of the BAR domain from human Bin1/amphiphysin II and its implications for molecular recognition. *Biochemistry*, **45**(43), 12917-12928. doi: 10.1021/bi060717k
- Champe S. P. & Simon L. D. (1992). *Cellular Differentiation and Tissue Formation in the Fungus Aspergillus nidulans*. Morphogenesis - An Analysis of the Development of Biological Form (Chapter 3), Marcel Dekker Inc.
- Chen, Y., Aardema, J., Misra, A., & Corey, S. J. (2012). BAR proteins in cancer and blood disorders. *Int J Biochem Mol Biol*, **3**(2), 198-208.
- 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**(18), 6198-6209.

- Colabardini, A. C., Brown, N. A., Savoldi, M., Goldman, M. H., & Goldman, G. H. (2013). Functional characterization of *Aspergillus nidulans* ypkA, a homologue of the mammalian kinase SGK. *PLoS One*, *8*(3), e57630. doi: 10.1371/journal.pone.0057630
- Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta*, *113*(1), 51-56.
- Daum, G., Lees, N. D., Bard, M., & Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *14*(16), 1471-1510. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y
- de Godoy, L. M., Olsen, J. V., Cox, J., Nielsen, M. L., Hubner, N. C., Frohlich, F., Walther, T. C. & Mann, M. (2008). Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature*, *455*(7217), 1251-1254. doi: 10.1038/nature07341
- deHart, A. K., Schnell, J. D., Allen, D. A., & Hicke, L. (2002). The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, *156*(2), 241-248. doi: 10.1083/jcb.200107135
- deHart, A. K., Schnell, J. D., Allen, D. A., Tsai, J. Y., & Hicke, L. (2003). Receptor internalization in yeast requires the Tor2-Rho1 signaling pathway. *Mol Biol Cell*, *14*(11), 4676-4684. doi: 10.1091/mbc.E03-05-0323
- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, *443*(7112), 651-657. doi: 10.1038/nature05185
- Dickson, R. C., Sumanasekera, C., & Lester, R. L. (2006). Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res*, *45*(6), 447-465. doi: 10.1016/j.plipres.2006.03.004
- 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*(6), e00723-00713. doi: 10.1128/mBio.00723-13
- Dowzer, C. E., & Kelly, J. M. (1989). Cloning of the creA gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr Genet*, *15*(6), 457-459.
- Dyer, P. S., & O'Gorman, C. M. (2011). A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Curr Opin Microbiol*, *14*(6), 649-654. doi: 10.1016/j.mib.2011.10.001
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., & De Camilli, P. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol*, *155*(2), 193-200. doi: 10.1083/jcb.200107075
- Felenbok, B. (1991). The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA-alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins. *J Biotechnol*, *17*(1), 11-17.
- 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.
- Felenbok, B., & Sealy-Lewis, H. M. (1994). Alcohol metabolism. *Prog Ind Microbiol*, *29*, 141-179.
- Ferguson, S. M., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., Cremona, O., O'Toole, E. & De Camilli, P. (2009). Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell*, *17*(6), 811-822. doi: 10.1016/j.devcel.2009.11.005

- Fitzgibbon, G. J., Morozov, I. Y., Jones, M. G., & Caddick, M. X. (2005). Genetic analysis of the TOR pathway in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, **4**(9), 1595-1598. doi: 10.1128/EC.4.9.1595-1598.2005
- Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K., & Parton, R. G. (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(19), 8655-8659.
- 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**(7), 1227-1242. doi: 10.1083/jcb.200811081
- 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**(7071), 1105-1115. doi: 10.1038/nature04341
- Galan, J.M., Moreau, V., Andre, B., Volland, C., and Haguenaer-Tsapis, R. (1996). Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem* **271**(18): 10946-10952.
- Galic, M., Jeong, S., Tsai, F. C., Joubert, L. M., Wu, Y. I., Hahn, K. M., Cui, Y. & Meyer, T. (2012). External push and internal pull forces recruit curvature-sensing N-BAR domain proteins to the plasma membrane. *Nat Cell Biol*, **14**(8), 874-881. doi: 10.1038/ncb2533
- Gallop, J. L., Jao, C. C., Kent, H. M., Butler, P. J., Evans, P. R., Langen, R., & McMahon, H. T. (2006). Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J*, **25**(12), 2898-2910. doi: 10.1038/sj.emboj.7601174
- Gems, D., Johnstone, I. L., & Clutterbuck, A. J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene*, **98**(1), 61-67.
- 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**(6959), 737-741. doi: 10.1038/nature02046
- Giuliani, C., Troglio, F., Bai, Z., Patel, F. B., Zucconi, A., Malabarba, M. G., Disanza, A., Stradal, T. B., Cassata, G., Confalonieri, S., Hardin, J. D., Soto, M.C., Grant, B.D. & Scita, G. (2009). Requirements for F-BAR proteins TOCA-1 and TOCA-2 in actin dynamics and membrane trafficking during *Caenorhabditis elegans* oocyte growth and embryonic epidermal morphogenesis. *PLoS Genet*, **5**(10), e1000675. doi: 10.1371/journal.pgen.1000675
- Gortat, A., San-Roman, M. J., Vannier, C., & Schmidt, A. A. (2012). Single point mutation in Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) sequence of endophilin impairs

- dimerization, membrane shaping, and Src homology 3 domain-mediated partnership. *J Biol Chem*, **287**(6), 4232-4247. doi: 10.1074/jbc.M111.325837
- Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W. B., Opekarova, M. & Tanner, W. (2008). Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol*, **183**(6), 1075-1088. doi: 10.1083/jcb.200806035
- Grossmann, G., Opekarova, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I., & Tanner, W. (2007). Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J*, **26**(1), 1-8. doi: 10.1038/sj.emboj.7601466
- Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**(6), 456-462. doi: 10.1038/nrm1925
- Harder, T., & Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, **9**(4), 534-542.
- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S., & Fesik, S. W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*, **371**(6493), 168-170. doi: 10.1038/371168a0
- Henne, W. M., Kent, H. M., Ford, M. G., Hegde, B. G., Daumke, O., Butler, P. J., Mittal, R., Langen, R., Evans, P.R. & McMahon, H. T. (2007). Structure and analysis of FCHo2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. *Structure*, **15**(7), 839-852. doi: 10.1016/j.str.2007.05.002
- Honerkamp-Smith, A. R., Cicuta, P., Collins, M. D., Veatch, S. L., den Nijs, M., Schick, M., & Keller, S. L. (2008). Line tensions, correlation lengths, and critical exponents in lipid membranes near critical points. *Biophys J*, **95**(1), 236-246. doi: 10.1529/biophysj.107.128421
- Honerkamp-Smith, A. R., Veatch, S. L., & Keller, S. L. (2009). An introduction to critical points for biophysicists; observations of compositional heterogeneity in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1788**(1), 53-63. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.09.010
- Hurley, J. H. (2006). Membrane binding domains. *Biochim Biophys Acta*, **1761**(8), 805-811. doi: 10.1016/j.bbalip.2006.02.020
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(2), 125-138. doi: 10.1038/nrm2336
- Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2004). Reactions of serine palmitoyltransferase with serine and molecular mechanisms of the actions of serine derivatives as inhibitors. *Biochemistry*, **43**(4), 1082-1092. doi: 10.1021/bi035706v
- Itoh, S., Lemay, S., Osawa, M., Che, W., Duan, Y., Tompkins, A., Brookes, P.S., Sheu, S.S. & Abe, J. (2005). Mitochondrial Dok-4 recruits Src kinase and regulates NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Biol Chem*, **280**(28), 26383-26396. doi: 10.1074/jbc.M410262200
- Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., & De Camilli, P. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell*, **9**(6), 791-804. doi: 10.1016/j.devcel.2005.11.005
- 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*. doi: 10.1242/jcs.143545

- Kaksonen, M., Toret, C. P., & Drubin, D. G. (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, **123**(2), 305-320. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.024
- Karotki, L., Huiskonen, J. T., Stefan, C. J., Ziolkowska, 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**(5), 889-902. doi: 10.1083/jcb.201104040
- 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**(2), 138-145. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02513.x
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K., & Chae, K. (2002). The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, **37**(1), 72-80.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Stalpers, J.A. (eds). 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford. pp. 655.
- Koster, G., VanDuijn, M., Hofs, B., & Dogterom, M. (2003). Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(26), 15583-15588. doi: 10.1073/pnas.2531786100
- Kutateladze, T. G. (2010). Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol*, **6**(7), 507-513. doi: 10.1038/nchembio.390
- Lajoie, P., Goetz, J. G., Dennis, J. W., & Nabi, I. R. (2009). Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol*, **185**(3), 381-385. doi: 10.1083/jcb.200811059
- le Roux, C. W., Murphy, E., & Seed, M. (2002). A retrospective assessment of the effectiveness of fenofibrate 267 mg on high-density lipoprotein cholesterol levels in patients attending a lipid clinic. *Clin Ther*, **24**(7), 1154-1160.
- Lee, A. G. (2003). Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta*, **1612**(1), 1-40.
- Lee, B. N., & Adams, T. H. (1994). Overexpression of flbA, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of brlA and premature initiation of development. *Mol Microbiol*, **14**(2), 323-334.
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(2), 99-111. doi: 10.1038/nrm2328
- Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, U., & Simons, K. (2010). Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(51), 22050-22054. doi: 10.1073/pnas.1016184107
- 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**(1), 243-253. doi: 10.1534/genetics.106.068239
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, **327**(5961), 46-50. doi: 10.1126/science.1174621
- Lockington, R., Scazzocchio, C., Sequeval, D., Mathieu, M., & Felenbok, B. (1987). Regulation of alcR, the positive regulatory gene of the ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, **1**(3), 275-281.
- Lockington, R. A., Sealy-Lewis, H. M., Scazzocchio, C., & Davies, R. W. (1985). Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, **33**(2), 137-149.

- Loewith, R., & Hall, M. N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, **189**(4), 1177-1201. doi: 10.1534/genetics.111.133363
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. & Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, **10**(3), 457-468.
- 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**(16), 10433-10444. doi: 10.1074/jbc.M709972200
- Mabey Gilsean, J. E., Atherton, G., Bartholomew, J., Giles, P. F., Attwood, T. K., Denning, D. W., & Bowyer, P. (2009). Aspergillus genomes and the Aspergillus cloud. *Nucleic Acids Res*, **37**(Database issue), D509-514. doi: 10.1093/nar/gkn876
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., & Tanner, W. (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell*, **14**(11), 4427-4436. doi: 10.1091/mbc.E03-04-0221
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., & Tanner, W. (2004). Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J Cell Sci*, **117**(Pt 25), 6031-6041. doi: 10.1242/jcs.01493
- Masuda, M., & Mochizuki, N. (2010). Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. *Semin Cell Dev Biol*, **21**(4), 391-398. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.01.010
- Mayer, B. J., & Baltimore, D. (1993). Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol*, **3**(1), 8-13.
- McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, **438**(7068), 590-596. doi: 10.1038/nature04396
- Merrifield, C. J., Perais, D., & Zenisek, D. (2005). Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell*, **121**(4), 593-606. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.015
- Merrill, A. H., Jr. (2002). De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem*, **277**(29), 25843-25846. doi: 10.1074/jbc.R200009200
- Merrill, A. H., Jr., & Wang, E. (1986). Biosynthesis of long-chain (sphingoid) bases from serine by LM cells. Evidence for introduction of the 4-trans-double bond after de novo biosynthesis of N-acylsphinganine(s). *J Biol Chem*, **261**(8), 3764-3769.
- Mims C. W., Richardson E. A. & Timberlake W. E. (1998). Ultrastructural Analysis of Conidiophore Development in the Fungus *Aspergillus nidulans* Using Freeze-Substitution. *Protoplasma* **144**: 132-141
- Mingot J. M., Espeso E. A., Diez E. & Penalva M.A. (2001). Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell Biol*. **21**: 1688-1699.
- Moreira, K. E., Walther, T. C., Aguilar, P. S., & Walter, P. (2009). Pil1 controls eisosome biogenesis. *Mol Biol Cell*, **20**(3), 809-818. doi: 10.1091/mbc.E08-03-0313
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**(4), 377-388.

- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V., & Simons, K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(22), 10339-10343.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., . . . Oakley, B. R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, **172**(3), 1557-1566. doi: 10.1534/genetics.105.052563
- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R., Kim, H. S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P.S., Farman, M., Fedorova, N., Fedorova, N., Feldblyum, T.V., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., García, J.L., García, M.J., Goble, A., Goldman, G.H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jiménez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafon, A., Latgé, J.P., Li, W., Lord, A., Lu, C., Majoros, W.H., May, G.S., Miller, B.L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Peñalva, M.A., Perteua, M., Price, C., Pritchard, B.L., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M.A., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G.D., Rodríguez de Córdoba, S., Rodríguez-Peña, J.M., Ronning, C.M., Rutter, S., Salzberg, S.L., Sanchez, M., Sánchez-Ferrero, J.C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekaia, F., Turner, G., Vazquez de Aldana, C.R., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J.H., Fraser, C., Galagan, J.E., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B. & Denning, D. W. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, **438**(7071), 1151-1156. doi: 10.1038/nature04332
- 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 U S A*, **109**(5), 1536-1541. doi: 10.1073/pnas.1117563109
- 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**(20), 3745-3749. doi: 10.4161/cc.21752
- 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**(3), 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**(2-3), 293-298.
- Olivera-Couto, A., & Aguilar, P. S. (2012). Eisosomes and plasma membrane organization. *Mol Genet Genomics*, **287**(8), 607-620. doi: 10.1007/s00438-012-0706-8
- Olivera-Couto, A., Grana, M., Harispe, L., & Aguilar, P. S. (2011). The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Mol Biol Cell*, **22**(13), 2360-2372. doi: 10.1091/mbc.E10-12-1021
- Opekarova, M., Malinska, K., Novakova, L., & Tanner, W. (2005). Differential effect of phosphatidylethanolamine depletion on raft proteins: further evidence for diversity of rafts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1711**(1), 87-95. doi: 10.1016/j.bbamem.2005.02.015

- 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**(33), 23565-23569.
- Osmani, A. H., Oakley, B. R., & Osmani, S. A. (2006). Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nat Protoc*, **1**(5), 2517-2526. doi: 10.1038/nprot.2006.406
- Panozzo, C., Cornillot, E., & Felenbok, B. (1998). The CreA repressor is the sole DNA-binding protein responsible for carbon catabolite repression of the *alcA* gene in *Aspergillus nidulans* via its binding to a couple of specific sites. *J Biol Chem*, **273**(11), 6367-6372.
- Pantazopoulou, A., Lemuh, N. D., Hatzinikolaou, D. G., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., & Diallinas, G. (2007). Differential physiological and developmental expression of the *UapA* and *AzgA* purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, **44**(7), 627-640. doi: 10.1016/j.fgb.2006.10.003
- Pelkmans, L., & Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*, **436**(7047), 128-133. doi: 10.1038/nature03866
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, **303**(5657), 495-499. doi: 10.1126/science.1092586
- Peterson, S. W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, **100**(2), 205-226.
- Pietzsch J. (2004) Background: Mind the membrane. *Nature* 1-4
- Pöggeler S, Nowrousian M, Ringelberg C, Loros JJ, Dunlap JC and Kück U (2006) Microarray and real time PCR analysis reveal mating type-dependent gene expression in a homothallic fungus. *Mol Genet Genomics* **275**:492-503.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., Macdonald, K. D., & Bufton, A. W. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet*, **5**, 141-238.
- Qualmann, B., Koch, D., & Kessels, M. M. (2011). Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO J*, **30**(17), 3501-3515. doi: 10.1038/emboj.2011.266
- Quinones, G. A., Jin, J., & Oro, A. E. (2010). I-BAR protein antagonism of endocytosis mediates directional sensing during guided cell migration. *J Cell Biol*, **189**(2), 353-367. doi: 10.1083/jcb.200910136
- Rajendran, L., & Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci*, **118**(Pt 6), 1099-1102. doi: 10.1242/jcs.01681
- Raper, K. B. & Fennell D. I. (1965). The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- 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 U S A*, **108**(48), 19222-19227. doi: 10.1073/pnas.1116948108
- Roth, M. G. (2004). Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev*, **84**(3), 699-730. doi: 10.1152/physrev.00033.2003
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., & Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, **68**(4), 673-682.

- Salazar, M. A., Kwiatkowski, A. V., Pellegrini, L., Cestra, G., Butler, M. H., Rossman, K. L., . . . De Camilli, P. (2003). Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **278**(49), 49031-49043. doi: 10.1074/jbc.M308104200
- Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K. S., Sanders, M. C., & Lisanti, M. P. (1995). Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(20), 9407-9411.
- Scazzocchio, C. (2006). Aspergillus genomes: secret sex and the secrets of sex. *Trends Genet*, **22**(10), 521-525. doi: 10.1016/j.tig.2006.08.004
- Scazzocchio, C., Sdrin, N., & Ong, G. (1982). Positive regulation in a eukaryote, a study of the uaY gene of Aspergillus nidulans: I. Characterization of alleles, dominance and complementation studies, and a fine structure map of the uaY--oxpA cluster. *Genetics*, **100**(2), 185-208.
- Schmidt, A., Kunz, J., & Hall, M. N. (1996). TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(24), 13780-13785.
- Schoustra, S. E., Debets, A. J., Slakhorst, M., & Hoekstra, R. F. (2007). Mitotic recombination accelerates adaptation in the fungus Aspergillus nidulans. *PLoS Genet*, **3**(4), e68. doi: 10.1371/journal.pgen.0030068
- Schwencke, C., Braun-Dullaeus, R. C., Wunderlich, C., & Strasser, R. H. (2006). Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: Implications for human disease. *Cardiovasc Res*, **70**(1), 42-49. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.11.029
- Seet, L. F., & Hong, W. (2006). The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*, **1761**(8), 878-896. doi: 10.1016/j.bbaliip.2006.04.011
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scazzocchio, C. (2009). Aspergillus: A Multifaceted Genus. *Encyclopaedia of Microbiology*, p:401-421
- Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., Liu, Z.J., Wang, B.C., Yamamoto, M., Terada, T., Miyazawa, A., Tanaka, A., Sugano, S., Shirouzu, M., Nagayama, K., Takenawa, T. & Yokoyama, S. (2007). Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell*, **129**(4), 761-772. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.040
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**(6633), 569-572. doi: 10.1038/42408
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**(1), 31-39. doi: 10.1038/35036052
- Simons, K., & Vaz, W. L. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 269-295. doi: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**(4023), 720-731.
- Soulet, F., Yarar, D., Leonard, M., & Schmid, S. L. (2005). SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*, **16**(4), 2058-2067. doi: 10.1091/mbc.E04-11-1016

- Stradalova, V., Blazikova, M., Grossmann, G., Opekarova, M., Tanner, W., & Malinsky, J. (2012). Distribution of cortical endoplasmic reticulum determines positioning of endocytic events in yeast plasma membrane. *PLoS One*, *7*(4), e35132. doi: 10.1371/journal.pone.0035132
- Stradalova, V., Stahlschmidt, W., Grossmann, G., Blazikova, M., Rachel, R., Tanner, W., & Malinsky, J. (2009). Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J Cell Sci*, *122*(Pt 16), 2887-2894. doi: 10.1242/jcs.051227
- Suetsugu, S., Toyooka, K., & Senju, Y. (2010). Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin Cell Dev Biol*, *21*(4), 340-349. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.12.002
- Swart, K., Debets, A. J., Bos, C. J., Slakhorst, M., Holub, E. F., & Hoekstra, R. F. (2001). Genetic analysis in the asexual fungus *Aspergillus niger*. *Acta Biol Hung*, *52*(2-3), 335-343. doi: 10.1556/ABiol.52.2001.2-3.18
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A. & Oakley, B. R. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc*, *1*(6), 3111-3120. doi: 10.1038/nprot.2006.405
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V., & De Camilli, P. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*, *1*(1), 33-39. doi: 10.1038/9004
- Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. A., Rittinger, K., Gamblin, S. J., & Smerdon, S. J. (2001). The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature*, *411*(6834), 215-219. doi: 10.1038/35075620
- Taylor, J., Jacobson, D., & Fisher, M. (1999). THE EVOLUTION OF ASEXUAL FUNGI: Reproduction, Speciation and Classification. *Annu Rev Phytopathol*, *37*, 197-246. doi: 10.1146/annurev.phyto.37.1.197
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., & Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, *26*(2-3), 205-221.
- Timberlake, W. E. (1990). Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu Rev Genet*, *24*, 5-36. doi: 10.1146/annurev.ge.24.120190.000253
- 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*(4), 811-821. doi: 10.1038/nprot.2007.112
- Toenjes, K. A., Sawyer, M. M., & Johnson, D. I. (1999). The guanine-nucleotide-exchange factor Cdc24p is targeted to the nucleus and polarized growth sites. *Curr Biol*, *9*(20), 1183-1186. doi: 10.1016/S0960-9822(00)80022-6
- Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., & Takenawa, T. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol*, *172*(2), 269-279. doi: 10.1083/jcb.200508091
- Valdez-Taubas, J., Diallinas, G., Scazzocchio, C., & Rosa, A. L. (2000). Protein expression and subcellular localization of the general purine transporter UapC from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, *30*(2), 105-113. doi: 10.1006/fgbi.2000.1197

- van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., & Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev*, **59**(2), 304-322.
- Vangelatos, I., Roumelioti, K., Gournas, C., Suarez, T., Scazzocchio, C., & Sophianopoulou, V. (2010). Eisosome organization in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, **9**(10), 1441-1454. doi: 10.1128/EC.00087-10
- Veatch, S. L., Cicuta, P., Sengupta, P., Honerkamp-Smith, A., Holowka, D., & Baird, B. (2008). Critical fluctuations in plasma membrane vesicles. *ACS Chem Biol*, **3**(5), 287-293. doi: 10.1021/cb800012x
- Walther, T. C., Aguilar, P. S., Frohlich, F., Chu, F., Moreira, K., Burlingame, A. L., & Walter, P. (2007). Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *EMBO J*, **26**(24), 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**(7079), 998-1003. doi: 10.1038/nature04472
- Wang, Q., Navarro, M. V., Peng, G., Molinelli, E., Goh, S. L., Judson, B. L., Rajashankar, K.R. & Sondermann, H. (2009). Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pascin/Syndapin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(31), 12700-12705. doi: 10.1073/pnas.0902974106
- Waterman-Storer, C. M., & Salmon, E. D. (1998). Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr Biol*, **8**(14), 798-806.
- Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C., & Firestone, G. L. (1993). Characterization of *sgk*, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol*, **13**(4), 2031-2040.
- Weinberg, J., & Drubin, D. G. (2012). Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol*, **22**(1), 1-13. doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.001
- Wu, J., & Miller, B. L. (1997). *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. *Mol Cell Biol*, **17**(10), 6191-6201.
- Wu, M., Huang, B., Graham, M., Raimondi, A., Heuser, J. E., Zhuang, X., & De Camilli, P. (2010). Coupling between clathrin-dependent endocytic budding and F-BAR-dependent tubulation in a cell-free system. *Nat Cell Biol*, **12**(9), 902-908. doi: 10.1038/ncb2094
- Yu, J., Whitelaw, C. A., Nierman, W. C., Bhatnagar, D., & Cleveland, T. E. (2004). *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiol Lett*, **237**(2), 333-340. doi: 10.1016/j.femsle.2004.06.054
- Yu, J. W., & Lemmon, M. A. (2001). All phox homology (PX) domains from *Saccharomyces cerevisiae* specifically recognize phosphatidylinositol 3-phosphate. *J Biol Chem*, **276**(47), 44179-44184. doi: 10.1074/jbc.M108811200
- Zhang, X., Lester, R. L., & Dickson, R. C. (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**(21), 22030-22038. doi: 10.1074/jbc.M400299200

- Zhong, W., Jeffries, M. W., & Georgopapadakou, N. H. (2000). Inhibition of inositol phosphorylceramide synthase by aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**(3), 651-653.
- Zhu, G., Chen, J., Liu, J., Brunzelle, J. S., Huang, B., Wakeham, N., Terzyan, S., Li, X., Rao, Z., Li, G. & Zhang, X. C. (2007). Structure of the APPL1 BAR-PH domain and characterization of its interaction with Rab5. *EMBO J*, **26**(14), 3484-3493. doi: 10.1038/sj.emboj.7601771
- Zimmerberg, J., & Kozlov, M. M. (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**(1), 9-19. doi: 10.1038/nrm1784
- Ziolkowska, N. E., Karotki, L., Rehman, M., Huiskonen, J. T., & Walther, T. C. (2011). Eisosome-driven plasma membrane organization is mediated by BAR domains. *Nat Struct Mol Biol*, **18**(7), 854-856. doi: 10.1038/nsmb.2080

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρατίθεται η στοίχιση των μεταλλαγμένων αλληλουχιών DNA της PιIA, όπως προέκυψαν από κατευθυνόμενη *in vitro* μεταλλαξιγένεση (ενότητα 2.11.3) και αλληλούχισή τους (VBC Biotech, Βιέννη).

