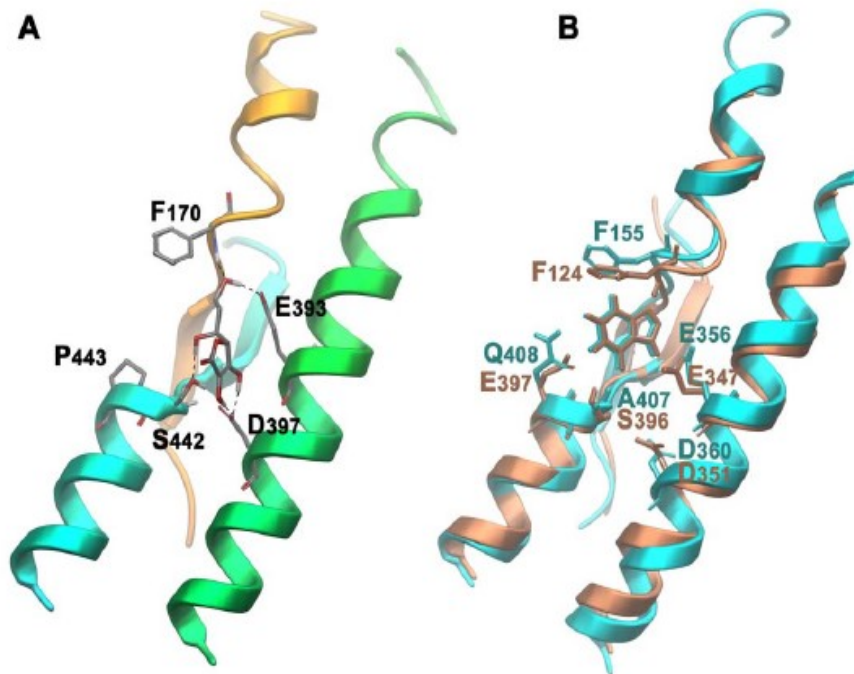


## Αναζητώντας τη μοριακή βάση της εξέλιξης της εξειδίκευσης των μεταφορέων της οικογένειας NAT



**Figure 8. Interactions of NAT proteins with specific substrates.** (A) Docking pose of L-ascorbate in SVCT-2 and (B) xanthine on superimposed rSNBT1 (in pink) and UapA (in blue).  
doi:10.1371/journal.pone.0041939.g008

**Αθανασία Βασιλική Κούρκουλου**

Πτυχιακή Εργασία

Τμήμα Βιολογίας

ΕΚΠΑ

Επιβλέπων: Καθ. Γιώργος Διαλλινάς

## Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	5
1.1 Γενικές πληροφορίες για τον μύκητα <i>Aspergillus nidulans</i> .....	5
1.2 Οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2.....	6
1.3 Μεταφορέας ουρικού οξέος και ξανθίνης (UapA) .....	7
1.4 L-ασκορβικό οξύ και D-ερυθρο ασκορβικό οξύ.....	8
1.5 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας .....	11
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	12
2.1 Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη του <i>A. nidulans</i> .....	12
2.2 Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη <i>E. coli</i> .....	13
2.3 Συνθήκες επώασης και εμβολιασμοί .....	13
2.4 Απομόνωση γενωμικού DNA από τον <i>A. nidulans</i> .....	13
2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από την <i>E. coli</i> .....	14
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	14
2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	15
2.8 Κλωνοποίηση (Molecular cloning).....	16
2.9 Μετασχηματισμός <i>A. nidulans</i> .....	18
2.10 Διασταυρώσεις στελεχών .....	19
2.11 In vitro site-directed PCR mutagenesis.....	20
2.12 Διαδικασία πρόσληψης ραδιενεργού υποστρώματος.....	21
2.13 Μικροσκοπία φθορισμού .....	22
3. Αποτελέσματα .....	22
Μέρος α: Μελέτη SVCT-like μεταλλαγμένων μορφών του UapA .....	22
Μέρος β: Ρόλος του D-έρυθρο ασκορβικού οξέος στον <i>A. nidulans</i> .....	28
4. Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	31
4.1 Οι τροποποίηση του TFAQ απενεργοποιεί τον UapA.....	31
4.2 Ενδείξεις για βελτιωμένη αναγνώριση ασκορβικού οξέος από τις μεταλλαγμένες μορφές του UapA.....	31
4.3 Αλληλουχίες NAT με μοτίβα δέσμευσης ασκορβικού εμφανίζονται στα ψάρια.....	32
4.4 Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με κωδικό AN0836 (aloA) κωδικοποιεί πιθανότατα μια οξειδάση της D-arabinono-1.4-lactone .....	32

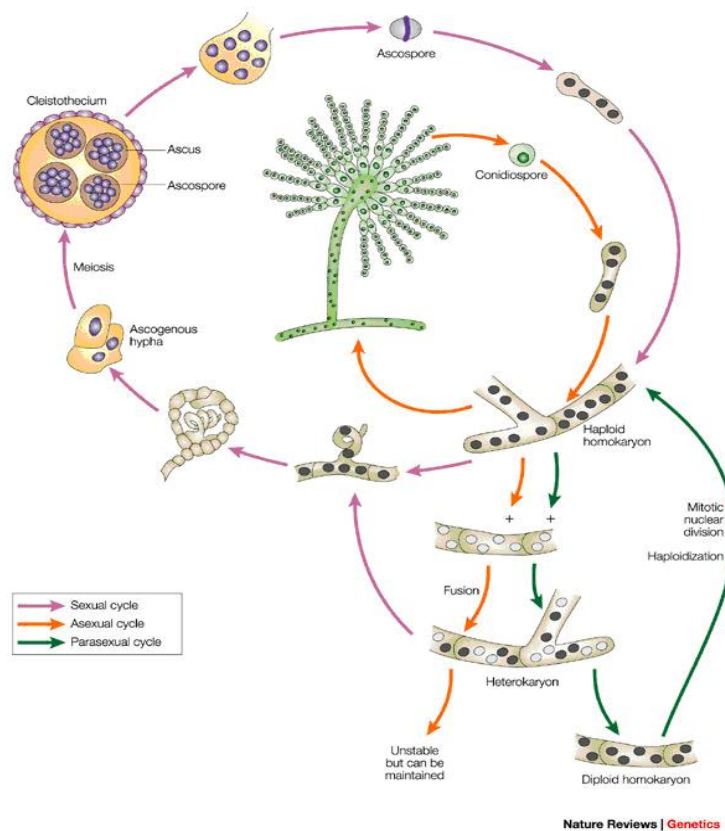
4.5 Χρήση του <i>aldAΔ</i> ως εργαλείο για την αναγνώριση των μεταλλαγμένων μορφών του <i>UarA</i> που μεταφέρουν ασκορβικό.....	32
<i>Βιβλιογραφία</i> .....	33



## 1.Εισαγωγή

### 1.1 Γενικές πληροφορίες για τον μύκητα *Aspergillus nidulans*

Ο *A. nidulans* είναι ένας νηματοειδής μύκητας που ανήκει στους Ασκομύκητες. Είναι ένας αερόβιος μικροοργανισμός που συναντάται σχεδόν σε όλα σχεδόν τα αερόβια περιβάλλοντα, όπου αναπτύσσεται ως μούχλα στην επιφάνεια διαφόρων υποστρωμάτων παράγοντας κονιδιοσπόρια (προϊόντα του ασεξουαλικού κύκλου), ενώ είναι ένα από τα λίγα είδη του γένους που μπορούν να σχηματίσουν επίσης ασκοσπόρια με μείωση (σεξουαλικός κύκλος), επιτρέποντας έτσι την πραγματοποίηση διασταυρώσεων μεταξύ στελεχών<sup>1</sup>. Από ένα κονιδιοσπόριο ή ένα ασκοσπόριο εκβλαστώνει και αναπτύσσεται με πολική αύξηση μια πολυπύρνηνη υφή με διαφράγματα, ενώ στη συνέχεια δημιουργούνται διακλαδώσεις. Σε στερεά θρεπτικά κάποια κύτταρα των υφών διαφοροποιούνται και σχηματίζουν κονιδιοφορείς που θα φέρουν νέα κονιδιοσπόρια. Οι υφές μπορούν να αναστομωθούν μεταξύ τους (ομοθαλικός μύκητας) ή με υφές διαφορετικών στελεχών και να σχηματίσουν ετεροκάρυα, τα οποία κάτω από συγκεκριμένες στρεσογόνες συνθήκες σχηματίζουν κλειστοθήκια με ασκούς που φέρουν τα ασκοσπόρια που δημιουργήθηκαν με μείωση (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Ο κύκλος ζωής του *A. nidulans*<sup>2</sup>

Αποτελεί ένα πολύ σημαντικό οργανισμό-μοντέλο για τη μελέτη της κυτταρικής βιολογίας των ευκαρυωτικών κυττάρων καθώς: α) μπορεί να πραγματοποιηθεί εξαιρετική κλασική γενετική ανάλυση εφόσον είναι απλοειδής οργανισμός (μπορεί να υπάρξει και σε διπλοειδή κατάσταση, Εικόνα 1.1), β) μπορεί να πραγματοποιηθεί αντίστροφη γενετική (εύκολος μετασχηματισμός) και αντικατάσταση ή τροποποίηση γονιδίων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, γ) έχει ταχεία αύξηση (2-3 ώρες χρόνος διπλασιασμού), δ) έχει μικρό και καθορισμένο γονιδίωμα ( $2.7 \times 10^7$  bp).

## 1.2 Οικογένεια μεταφορέων NAT/NCS2

Η οικογένεια μεταφορέων NAT (nucleobase ascorbate transporters) είναι μια εκτενώς χαρακτηρισμένη οικογένεια μεταφορέων που αποτελείται από μέλη που συναντώνται από το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) μέχρι και τον άνθρωπο. Μπορεί να χωριστεί με βάση την εξειδίκευση σε υποστρώματα σε 3 υποοικογένειες: την πρώτη που έχει μέλη που απαντώνται στα βακτήρια, τους μύκητες και τα φυτά και έχει εξειδίκευση για την μεταφορά ξανθίνης και/ή ουρικού οξέος, την δεύτερη με μέλη που απαντώνται στα βακτήρια και μεταφέρουν ουρακίλη και την τρίτη με μέλη που απαντώνται στα σπονδυλωτά και έχει εξειδίκευση για τη μεταφορά L-ασκορβικού οξέος. Οι μεταφορείς ξανθίνης και ουρικού οξέος μεταφέρουν με μικρή συγγένεια ουρακίλη και αναγνωρίζουν, αλλά δεν μεταφέρουν, L-ασκορβικό οξύ σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (>35mM). Οι μεταφορείς ασκορβικού αντίστοιχα δεν αναγνωρίζουν βάσεις. Επιπλέον οι μεταφορείς των βακτηρίων, των μυκήτων και των φυτών συμμεταφέρουν, μαζί με τις βάσεις,  $H^+$  ενώ οι μεταφορείς ασκορβικού  $Na^{+3}$ .

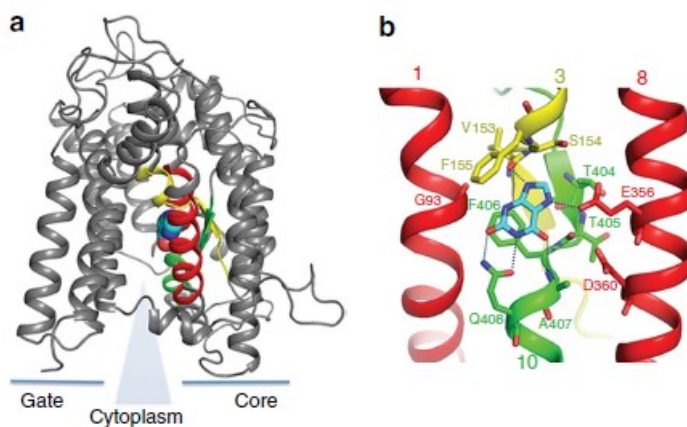
Όσον αφορά τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των μελών της οικογένειας NAT φαίνεται πως οι μεταφορείς ασκορβικού των θηλαστικών έχουν εξελιχθεί από τους μεταφορείς ουρικού οξέος και ξανθίνης των κατώτερων ευκαρυωτικών. Η σχέση αυτή είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα καθώς η δομή των υποστρωμάτων τους είναι εντελώς διαφορετική. Οι μεταφορείς ουρικού οξέος-ξανθίνης φαίνεται να απαντώνται από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς μέχρι τα ψάρια και στη συνέχεια χάνονται σταδιακά μέσα στα θηλαστικά. Αντίθετα οι μεταφορείς ασκορβικού ξεκινούν να εμφανίζονται στα ψάρια και παραμένουν μέχρι και τα Πρωτεύοντα<sup>3</sup>. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως και η έλλειψη της ικανότητας σύνθεσης L-ασκορβικού οξέος φαίνεται να χάνεται για πρώτη φορά, εξελικτικά, στα ψάρια, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Μέσα από συγκρίσεις των αλληλουχιών των διαφόρων μεταφορέων και μελέτη μεταλλαγμένων μορφών του μεταφορέα ουρικού οξέος και ξανθίνης του *A. nidulans*, UarA, φαίνεται πως η ειδικότητα των μεταφορέων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μοτίβο [Q/E/P]-N-X-G-X-X-X-T-[R/K/G]. Στους μεταφορείς ουρικού οξέος-ξανθίνης το πρώτο κατάλοιπο είναι Gln ή Glu ενώ στους μεταφορείς ασκορβικού είναι Pro. Επιπλέον η αλληλουχία πριν από αυτό το μοτίβο, που μελετάται και στην παρούσα διπλωματική, είναι

αρκετά σημαντική. Συγκεκριμένα, στους μεταφορείς ουρικού οξέος-ξανθίνης η αλληλουχία πριν το μοτίβο έχει αμφιπαθική φύση ενώ στους μεταφορείς ασκορβικού είναι πλήρως πολική.<sup>3</sup>

### 1.3 Μεταφορέας ουρικού οξέος και ξανθίνης (UarA)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο UarA είναι ένας μεταφορέας ουρικού οξέος και ξανθίνης του πρότυπου μύκητα *A. nidulans* και μέλος της οικογένειας NAT. Ο μεταφορέας αυτός έχει μελετηθεί εκτενώς σε επίπεδο ρύθμισης της έκφρασης, υποκυτταρικής μεταφοράς, αποδόμησης και σχέσεων δομής λειτουργίας. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε η δομή του μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, με τη δημιουργία κρυστάλλου του UarA μαζί με το υπόστρωμα ξανθίνη, η οποία αποκάλυψε και τις θέσεις πρόσδεσης της ξανθίνης στον uarA. Ο UarA αποτελείται από 14 διαμεμβρανικές περιοχές (TMs) οι οποίες οργανώνονται σε μια τοπολογική δομή 7+7 διαμεμβρανικών περιοχών (TMS or TMD) η οποία χωρίζεται στο *core* (πυρήνα) (TMS 1-4 και 8-11) και στο *gate* (πύλη) (TMS 5-7 και 12-14). Αυτή η δομή έχει βρεθεί και στο προκαρυωτικό ομόλογο του μεταφορέα ουρακίλης της *E. coli*, UraA (Εικόνα 1.2). Τα δυο αμινοξέα που βρίσκονται σε κατάλληλη απόσταση από το υπόστρωμα για να συμμετάσχουν σε δεσμούς υδρογόνου μέσω των πλευρικών αλυσίδων τους είναι η Gln408 και το Glu356, ενώ επιπλέον πολικές αλληλεπιδράσεις με το υπόστρωμα κάνουν η Ala407, η Val153 και η Phe155. Τέλος, οι φαινυλικόι δακτύλιοι της Phe155 και της Phe406 ενισχύουν την δέσμευση της ξανθίνης μέσω δεσμών π-π<sup>4</sup> (Εικόνα 1.2).



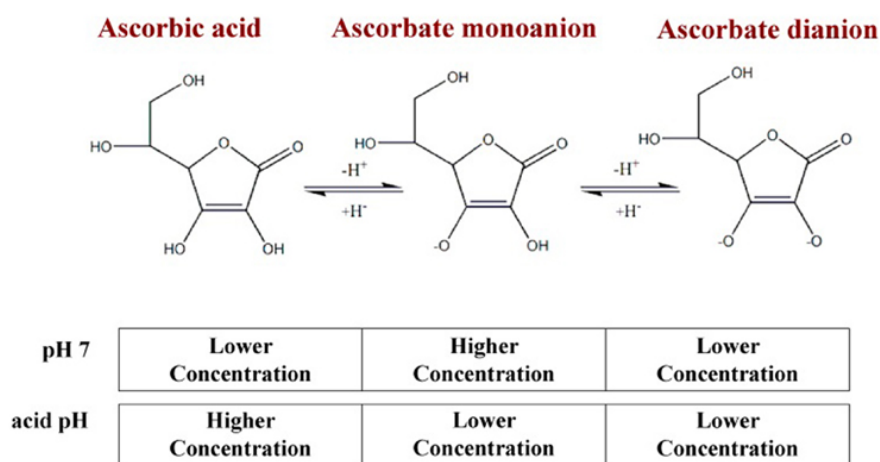
Εικόνα 1.2. α) Δομή του UarA β) Περιοχή πρόσδεσης ξανθίνης του UarA<sup>4</sup>

Ο φυσικός UarA δεν προσδένει υποξανθίνη ή αδερίνη όμως έχουν απομονωθεί μεταλλαγμένες μορφές του που επιτρέπουν την μεταφορά αυτών των υποστρωμάτων. Στις μεταλλαγμένες αυτές μορφές έχουν βρεθεί μεταλλαγές σε 3 διαφορετικές περιοχές του μεταφορέα. Μια μεταλλαγή έχει βρεθεί στην περιοχή πρόσδεσης (Phe406), μια σειρά

μεταλλαγών στην διαεπιφάνεια ανάμεσα στην πύλη και στον πυρήνα του μεταφορέα δίπλα στην περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος (Val463, Ala469, Thr526 και Phe528), και τέλος 2 μεταλλαγές σε περιοχές απομακρυσμένες από την περιοχή πρόσδεσης (Gln113 και Ala441). Επιπλέον, μεταλλαγές στην Arg481 δεν επηρεάζουν την μεταφορά των φυσιολογικών υποστρωμάτων αλλά επιτρέπουν την μεταφορά υποξανθίνης και αδενίνης, έστω και με μικρή συγγένεια. Το αμινοξύ αυτό βρίσκεται αρκετά μακριά από την περιοχή πρόσδεσης όμως εξαιτίας του λειτουργικού διμερισμού του UapA έρχεται πολύ κοντά στην περιοχή πρόσδεσης του άλλου «απέναντι» μεταφορέα στο διμερές. Συνδυασμοί των παραπάνω μεταλλαγών μεταξύ τους αλλά και με μεταλλαγές στο κέντρο δέσμευσης υποστρωμάτων βελτιώνουν (π.χ. Q113L/F528S, A441V/F528S, V463I/F528S, A469E/F528S, R481G/F528S, R481G/T526M, Q408E/R481G/F528S και Q408E/R481G/T526M) την μεταφορά υποξανθίνης και αδενίνης από τον UapA<sup>4</sup>.

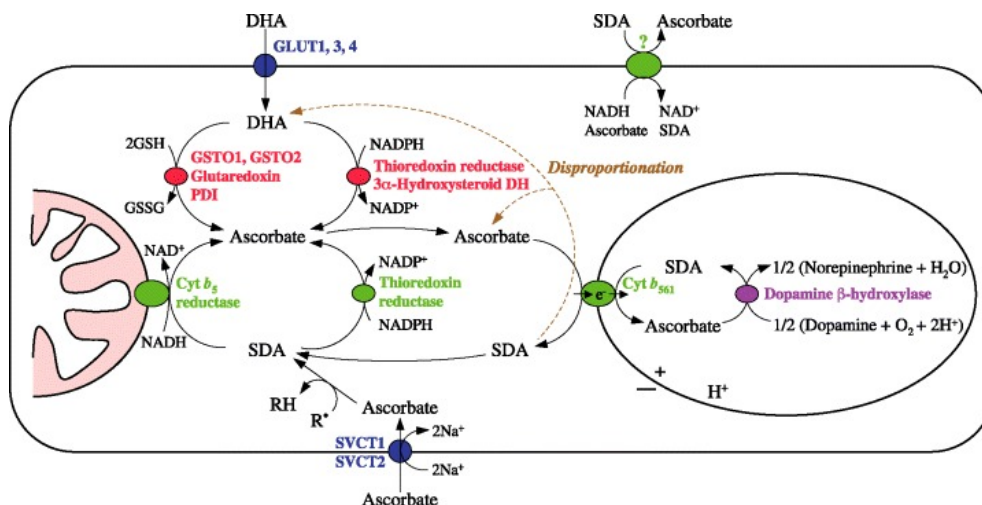
#### 1.4 L-ασκορβικό οξύ και D-ερυθρο ασκορβικό οξύ

Το L-ασκορβικό οξύ ή βιταμίνη C είναι απαραίτητος μεταβολίτης στα φυτικά και ζωικά κύτταρα εξαιτίας του ρόλου του ως συμπαραγοντας ενζύμων (π.χ. σε αντιδράσεις σύνθεσης κολλαγόνου) και της αντιοξειδωτικής του δράσης. Σε όξινο pH, έχει όλα του τα πρωτόνια και ως αποτέλεσμα δεν έχει φορτίο. Αντίθετα σε pH=7 χάνει ένα πρωτόνιο και αποκτά αρνητικό φορτίο (Εικόνα 1.3)<sup>5</sup>. Η αντιοξειδωτική του δράση οφείλεται στην ικανότητα του να δρα ως αναγωγικός παράγοντας (δότης e<sup>-</sup>). Παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων ROS οξειδώνεται σε δευδροασκορβικό οξύ (DHA), το οποίο ανάγεται άμεσα από την γλουταθειόνη (GSH) και άλλες θειολικές ενώσεις (Εικόνα 1.4)<sup>6</sup>. Το δευδροασκορβικό οξύ διατηρεί τις βιοχημικές ιδιότητες της βιταμίνης C, εκτός βέβαια από την αντιοξειδωτική της δράση.



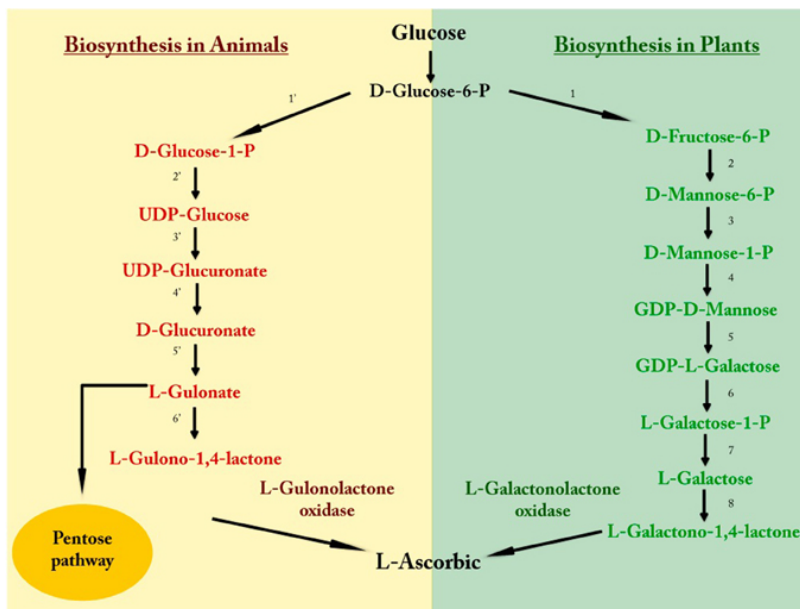
**Εικόνα 1.3.** pH-εξαρτώμενες μορφές της βιταμίνης C. Σε pH 7, κοντά στο pH του αίματος, η επικρατέστερη μορφή ασκορβικού είναι το μονοφορτισμένο ανιόν, ενώ το ασκορβικό οξύ βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση και το διφορτισμένο ανιόν σε ακόμα μικρότερη. Αντίθετα σε όξινο pH η επικρατέστερη μορφή είναι το ασκορβικό οξύ.<sup>5</sup>





**Εικόνα 1.4.** Ανακύκλωση της Βιταμίνης C. Το SDA είναι η ρίζα ημιδευδροασκορβικού οξέος. Η χρήση του ασκορβικού ως αντιοξειδωτικό παράγοντα ή συμπράγοντα ενζύμων οδηγεί στον σχηματισμό της στο κυτταρόπλασμα, στα νευροενδοκρινικά εκκριτικά κυστίδια και στον εξωκυτταρικό χώρο. Διάφορα ενζυματικά συστήματα (απεικονίζονται με πράσινο χρώμα) μετατρέπουν το SDA πάλι σε ασκορβικό. Το DHA που σχηματίζεται από το SDA ή μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα μετατρέπεται σε ασκορβικό από διάφορα ένζυμα (απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα) ή με αυθόρμητη αντίδραση με την GSH (δεν απεικονίζεται)<sup>6</sup>.

Τα φυτά και τα περισσότερα ζώα έχουν την ικανότητα σύνθεσης L-ασκορβικού οξέος μέσω μια σειράς ενζυμικών αντιδράσεων από μονοσακχαρίτες (Εικόνα1.5). Όμως οι τελεόστοι ιχθύες, κάποια πουλιά Passeriformes, οι χοίροι guinea και κάποια Πρωτεύοντα συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου έχουν χάσει την ικανότητα αυτή. Η έλλειψη αυτή οφείλεται στην συσσώρευση μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο L-gulonolactoneoxidase, το οποίο έχει μετατραπεί σε ψευδογονίδιο. Για αυτό το λόγο τα είδη αυτά παίρνουν τις απαραίτητες ποσότητες βιταμίνης C από την διατροφή τους, μέσω των μεταφορέων ασκορβικού SVCT1 και SVCT2 και των μεταφορέων γλυκόζης GLUT1, GLUT3 και GLUT4 που μεταφέρουν το DHA<sup>6</sup>. Παρόλο που το DHA προσλαμβάνεται με μεγαλύτερο ρυθμό από το ασκορβικό η συγκέντρωση του στο πλάσμα και στους ιστούς είναι χαμηλή κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καθώς τα κύτταρα το μετατρέπουν αμέσως σε ασκορβικό. Οι μεταφορείς του ασκορβικού είναι απαραίτητοι για την επιβίωση του κυττάρου καθώς ζώα τα οποία δεν έχουν λειτουργικό μεταφορέα SVCT2 πεθαίνουν λίγο μετά τη γέννηση. Ο SVCT1 φαίνεται να είναι υπεύθυνος για την διατήρηση της ομοιόστασης του ασκορβικού σε όλο το σώμα ενώ ο SVCT2 έχει συσχετιστεί με την πρόσληψη ασκορβικού στους μεταβολικά ενεργούς ιστούς ώστε να προστατευτούν από το οξειδωτικό stress και την UV<sup>3</sup>.



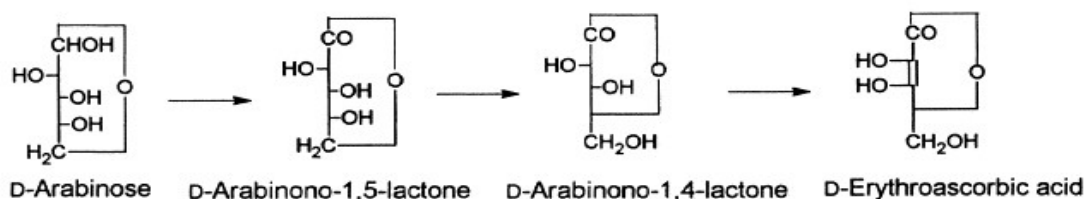
**Εικόνα 1.5.** Μονοπάτι βιοσύνθεσης L-ασκορβικού οξέος στα ζώα και στα φυτά. Ο αρχικός μεταβολίτης και στα δυο μονοπάτια είναι η γλυκόζη. 1, Glucose-6-phosphateisomerase; 2, Mannose-6-phosphateisomerase; 3, Phospho-mannomutase; 4, GDPD-mannosepyrophosphorylase; 5, GDP-D-mannose-3,5-epimerase; 6, Phosphodiesterase; 7, Sugarphosphatase; 8, L-galactosedehydrogenase; 1' , Phosphoglucomutase; 2' , UDP-glucosepyrophosphorylase; 3' , UDP-glucosedehydrogenase;<sup>5</sup>

Παρόλα αυτά στους μύκητες δεν φαίνεται να υπάρχει ασκορβικό αλλά έχει βρεθεί ένα ανάλογο του, το D-έρυθρο-ασκορβικό οξύ. Η ύπαρξη του έχει ανιχνευτεί σε διάφορα είδη μυκήτων όπως ο *S.cerevisiae* και η *C.albicans*. Το D-έρυθρο-ασκορβικό οξύ συντίθενται από D-αραβινόζη μέσα από το μονοπάτι που απεικονίζεται στην Εικόνα 1.6. Το πρώτο στάδιο είναι η οξείδωση της D-αραβινόζης από μια  $NADP^+$  ειδική αφυδρογονάση της D-αραβινόζης. Το τελευταίο στάδιο είναι η οξείδωση της D-arabinono-1,4-lactone από ένα ένζυμο που περιέχει φλαβίνη και απομονώθηκε από το μιτοχονδριακό κλάσμα της *C.albicans* και του *S. cerevisiae* το οποίο ονομάζεται οξειδάση της D-arabinono-1.4-lactone<sup>7</sup>.

Η οξειδάση της D-arabinono-1,4-lactone κωδικοποιείται στον *S.cerevisiae* από το γονίδιο *ALO1*. Στελέχη με μεταλλαγμένο το γονίδιο αυτό αναπτύσσονται κανονικά σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο, ενώ στελέχη με πολλαπλά αντίγραφα του *ALO1* παρουσιάζουν διαφορές στο ρυθμό αύξησης και στον φαινότυπο από τα φυσικού τύπου στελέχη. Επιπλέον υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες με τη μορφή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και μεναδιόνης το στέλεχος με το μεταλλαγμένο *ALO1* παρουσίαζε ευαισθησία σε σχέση με το στέλεχος φυσικού τύπου. Όμως φαίνεται πως το D-έρυθρο-ασκορβικό δεν έχει σημαντικό ρόλο στην ανταπόκριση σε οξειδωτικό stress καθώς κύτταρα φυσικού τύπου και *alo1* τα οποία έχουν προεπωαστεί με οξειδωτικά μέσα είχαν αυξημένη αντίσταση σε θνησιγόνες δόσεις των

οξειδωτικών παραγόντων παρόμοια με αυτή των στελεχών φυσικού τύπου και τα επίπεδα έκφρασης του *ALO1* δεν μεταβλήθηκαν παρουσία οξειδωτικών παραγόντων<sup>8</sup>.

Όπως στον *S.cerevisiae* και στην *C.albicans*, στελέχη *alo1/alo1* είναι πιο ευαίσθητα στους οξειδωτικούς παράγοντες  $H_2O_2$  και μεναδιόνη, ενώ στελέχη που μεγάλη συγκέντρωση έρυθρο ασκορβικού εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με αυτά φυσικού τύπου. Επιπλέον κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες η έλλειψη του έρυθρο ασκορβικού επηρεάζει την ανάπτυξη των υφών και της μολυσματικότητας της *C.albicans*<sup>9</sup>.



Εικόνα 1.6. Βιοσύνθεση του D-έρυθρο ασκορβικού οξέος στους μύκητες<sup>7</sup>

Το D-έρυθρο ασκορβικό φαίνεται να έχει ίδιες βιολογικές ιδιότητες με το L-ασκορβικό οξύ. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην κάμπια *Manduca sexta* το D-έρυθρο ασκορβικό υποστήριξε την ανάπτυξη της λάρβας όπως και το L-ασκορβικό.<sup>10</sup> Συμπερασματικά, σε συνδυασμό με την έλλειψη ασκορβικού σε πολλούς μικροοργανισμούς και την σημασία του έρυθρο-ασκορβικού στον *S.cerevisiae* όπως και του ασκορβικού στα ζώα και στα φυτά, πιστεύεται ότι το D-έρυθρο ασκορβικό έχει αντικαταστήσει το ασκορβικό σε αυτούς τους οργανισμούς.<sup>9</sup>

### 1.5 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής είναι η αναζήτηση της μοριακής βάσης της εξέλιξης της εξειδίκευσης των μεταφορέων της οικογένειας NAT. Για τον σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν μεταλλαγμένες μορφές του *UapA* με βάση τους SVCTs και κατασκευάστηκε στέλεχος στο οποίο δεν γίνεται βιοσύνθεση D-έρυθρο-ασκορβικού. Το στέλεχος αυτό θα χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ανίχνευση μεταφοράς ασκορβικού.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη του *A. nidulans*

Χρησιμοποιήθηκαν δυο τύποι θρεπτικών μέσων, το πλήρες και το ελάχιστο θρεπτικό. Το πλήρες αποτελείται από όλα τα συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μυκήτων με τέτοια σύσταση ώστε να αναπτύσσονται όλα τα στελέχη το ίδιο ανεξάρτητα από τις αυξοτροφίες τους. Το ελάχιστο αποτελείται από τα ελάχιστα συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μυκήτων, δηλαδή πηγή άνθρακα (C), πηγή αζώτου (N), τις αυξοτροφίες που χρειάζεται το εκάστοτε στέλεχος και διάλυμα αλάτων (salt solution). Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη ενώ ως πηγή αζώτου αμμωνιακά ιόντα ( $\text{NH}_4^+$ ) ή νιτρικά ιόντα ( $\text{NO}_3^-$ ) με τελική συγκέντρωση 10 mM. Το pH των θρεπτικών ήταν 6.8 ή 8.0 (στην περίπτωση που προστέθηκε ασκορβικό οξύ το οποίο κατεβάζει το pH, ως οξύ, σε μεγάλες συγκεντρώσεις) και ρυθμίστηκε με τη χρήση NaOH 3N. Τα θρεπτικά αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε υγρή ή στερεά μορφή ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων και αποστειρώθηκαν με τη χρήση αυτόκαυστου. Οι επιμέρους συγκεντρώσεις των συστατικών φαίνονται στον Πίνακα 1 και στον Πίνακα 2.

	Πλήρες θρεπτικό (CM)	Ελάχιστο θρεπτικό (MM)
D-glucose	10 g	10 g
Salt solution	20 mL	20mL
Vitamine solution	10 mL	-
Bactopeptone	2 g	-
Casamino acids	1 g	-
Yeast extract	1 g	-
H <sub>2</sub> O	1 L	1 L

Salt solution		Vitamine solution		Trace elements	
KCl	26 g	D-pantothenic acid	50 mg	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10H <sub>2</sub> O	40 mg
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	26 g	p-aminobenzoid acid	20 mg	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	400 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	76 g	Rivoflavin	50 mg	FeO <sub>4</sub> P x 4H <sub>2</sub> O	714 mg
Chloroform	2 mL	Pyridoxin	50 mg	MnSO <sub>4</sub> x 1H <sub>2</sub> O	728 mg
Trace elements	50 mL	Biotin	1 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	800 mg
H <sub>2</sub> O	1 L	H <sub>2</sub> O	1 L	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8 mg

## 2.2 Θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη *E.coli*

Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό Luria-Bertani (LB Lennox: Bactotryptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, BactoYeast Extract 5 g/L) με pH 7.0 είτε σε υγρή μορφή είτε σε στερεή με την προσθήκη άγαρ (1% w/v) και προσθήκη αμπικιλίνης σε συγκέντρωση 100μg/ml για την επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών.

## 2.3 Συνθήκες επώασης και εμβολιασμοί

Οι στερεές καλλιέργειες *A.nidulans* (τρυβλία) επώαστηκαν σε επωαστήρα με θερμοκρασία 37°C (συνήθως) ή 25°C ή 42°C ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων για 2-4 μέρες. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C ή 25°C στις 140 grm για περίπου 18 ώρες.

Οι στερεές καλλιέργειες *E.coli* επώαστηκαν στους 37°C για περίπου 18 ώρες. Οι υγρές επώαστηκαν στην ίδια θερμοκρασία στις 200 grm.

Οι εμβολιασμοί του *A.nidulans* έγιναν με απομόνωση σπορίων με τη χρήση οδοντογλυφίδας ή λούπας εμβολιασμού από καλλιέργειες ή από αποθηκευμένα σε γλυκερόλη (-80°C) σπόρια στελεχών. Οι εμβολιασμοί του *E. coli* έγιναν με οδοντογλυφίδα απομονώνοντας τμήμα της αποικίας.

## 2.4 Απομόνωση γενωμικού DNA από τον *A. nidulans*

Εμβολιάζονται τρυβλία με πλήρες θρεπτικό μέσο και επωάζονται για 4 μέρες στους 37°C. Απομονώνονται σπόρια από το ¼ των τρυβλίων και εμβολιάζεται με αυτά υγρό ελάχιστο θρεπτικό μέσο με  $\text{NH}_4^+$  ως πηγή αζώτου και τις απαραίτητες αυξοτροφίες. Τα θρεπτικά αυτά επωάζονται για περίπου 16 ώρες στους 37°C στις 140 grm ώστε να δημιουργηθεί μυκήλιο. Το μυκήλιο συλλέγεται με κατάλληλο ηθμό και αφού απομακρυνθεί όσο τον δυνατόν περισσότερο νερό τοποθετείται σε υγρό άζωτο ώστε να παγώσει. Στη συνέχεια τοποθετείται σε γουδί με υγρό άζωτο και θρυμματίζεται ώστε να μετατραπεί σε σκόνη. Συλλέγονται 100-200 mg σκόνης σε σωλήνα τύπου erpendorf, σε αυτό προστίθενται 800 μL DNA extraction buffer (0.2M Tris-HCl pH 8.0, 1% SDS, 1 mM EDTA pH 8.0) και το περιεχόμενο αναδεύεται μέχρι να ομογενοποιηθεί και επωάζεται για 20 λεπτά σε πάγο. Μετά την επώαση προστίθενται 800 μL φαινόλης, το περιεχόμενο αναδεύεται καλά για περίπου 1 λεπτό και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12000 grm. Μετά την φυγοκέντρηση η πάνω φάση (υδατική) που περιέχει το DNA μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf, όπου προστίθενται ίσος όγκος χλωροφορμίου, το περιεχόμενο ανακατεύεται καλά για 1 περίπου λεπτό και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12000 grm. Μεταφέρεται ξανά η πάνω φάση σε νέο σωλήνα όπου προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και 1/10 του όγκου  $\text{CH}_3\text{COONa}$  3 M pH 5.3, αναδεύεται γυρνώντας ομαλά το σωλήνα 4-5 φορές (μέχρι την εμφάνιση κλωστών/DNA) και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12000 grm. Το υπερκείμενο αφαιρείται, στο ίζημα προστίθενται 200 μL αιθανόλης 70% χωρίς αναδιάλυση και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 12000 grm. Ακολούθως αφαιρείται πλήρως το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να

στεγνώσει για 10 λεπτά (maximum) στους 50°C. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 50-100 µL απιονισμένο H<sub>2</sub>O και προστίθεται RNAάση σε συγκέντρωση 100 µg/ml. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37°C. Μετά την απομόνωση χρησιμοποιούνται 2 µL του DNA για ηλεκτροφόρηση ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα και η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε.

## 2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από την *E. coli*

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν δυο μέθοδοι ανάλογα με την επιθυμητή ποιότητα του DNA.

- Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA με υψηλή ποιότητα χρησιμοποιήθηκε το (Macherey-Nagei) Nucleospin Plasmid kit.
- Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χαμηλή σχετικά ποιότητα (όπου δεν ήταν αναγκαία η υψηλή) χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη μέθοδος:

Εμβολιάζεται υγρό θρεπτικό μέσο LB με αποικία *E.coli*, προστίθεται αμπικιλίνη και επώαζεται για περίπου 18 ώρες στους 37°C. Γίνεται φυγοκέντρηση 1 ml της καλλιέργειας για λεπτό στις 12000 rpm και αφαιρείται το υπερκείμενο. Στο ίζημα προστίθενται 200 µL διαλύματος P1 (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) και αναδιαλύεται. Στην συνέχεια προστίθενται 200 µL διαλύματος P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) και το περιεχόμενο αναδεύεται ομαλά (ώστε μην απομονωθεί και γενωμικό DNA) γυρνώντας το σωλήνα 10 φορές. Ακολούθως προστίθενται 200 µL διαλύματος P3 (3 M Sodium-acetate pH 5.2), το περιεχόμενο αναδεύεται ομαλά όπως προηγουμένως (ώστε να μην απομονωθούν πρωτεΐνες και μεμβράνες) και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12000 rpm. Μετά την φυγοκέντρηση μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα και προστίθενται 550 µL 2-προπανόλης. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12000 rpm, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 200 µL αιθανόλης 70%. Το περιεχόμενο φυγοκεντρείται χωρίς να γίνει αναδιάλυση για 5 λεπτά στις 12000 rpm και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 5 λεπτά στους 50°C, αναδιαλύεται σε 100 µL απιονισμένο νερό με RNAάση 0.2 mg/ml και επώαζεται για 30 λεπτά στους 37°C. Τέλος χρησιμοποιούνται 15 µL για ηλεκτροφόρηση ώστε να προσδιοριστεί η επιτυχία της απομόνωσης και το βάρος του πλασμιδίου.

## 2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μετά την απομόνωση γενωμικού DNA από τον *A.nidulans* αλλά και πλασμιδιακού DNA από το *E.coli* ακολούθησε ηλεκτροφόρηση ώστε να διαπιστωθεί η επιτυχία της απομόνωσης, η σχετική ποσότητα του αλλά και το βάρος των πλασμιδίων. Σε αυτές και σε άλλες περιπτώσεις (Κεφάλαια 2.7 PCR και 2.8 Κλωνοποίηση) πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Για την παρασκευή του πήκτωμα διαλύονται 1.5 gr αγαρόζης σε 150 mL 1x TAE buffer (242 gr Tris-Base, 57.1 mL glacial CH<sub>3</sub>COOH, 100 mL 0.5 M EDTA pH 8.0 για 1 L 50x buffer) και το μίγμα θερμαίνεται ώστε να

διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Στην συνέχεια αφού το μίγμα κρυώσει (περίπου στους 70°C) προστίθενται 3.5 mL βρωμιούχο αιθίδιο (τελική συγκέντρωση 0.5 mg/mL) και τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο όπου έχουν ήδη προστεθεί εξαρτήματα που μοιάζουν με χτένες για τη δημιουργία θέσεων υποδοχής του DNA (πηγαδάκια) όπου αφήνεται να κρυώσει μέχρι να πήξει και να δημιουργηθεί πήκτωμα. Μόλις κρυώσει το πήκτωμα, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης κι αφού προστεθεί διάλυμα φόρτωσης στα δείγματα του DNA, τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής μαζί με δείκτη μοριακής μάζας. Τέλος εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 100 V και μετά από κατάλληλο χρόνο το πήκτωμα εκτίθεται σε UV και παρατηρούνται οι ζώνες του DNA.

Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, εξαιτίας της ύπαρξης φωσφορικών ομάδων, και για αυτό τοποθετείται στην απέναντι πλευρά από το θετικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος) ώστε να μετακινηθεί προς αυτή. Ο διαχωρισμός των διαφόρων μορίων DNA που υπάρχουν στο δείγμα γίνεται με βάση το μέγεθος και έτσι τα μικρότερα μόρια κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα προς την κάθοδο από ότι τα μεγαλύτερα.

Διάλυμα φόρτωσης: Περιέχει ουσία υψηλής πυκνότητας (συνήθως γλυκερόλη) που προσδίδει στα μίγματα/δείγματα μεγαλύτερη πυκνότητα από αυτή του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (TAE) ώστε τα δείγματα να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής καθώς προστίθενται στο πήκτωμα. Επιπλέον έχουν μια ή δυο χρωστικές οι οποίες κινούνται με ταχύτητα ίδια με μικρά μόρια DNA, ώστε να διευκολύνεται η διαδικασία της προσθήκης των δειγμάτων και να γίνεται μια εκτίμηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.

## **2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε είτε για την απομόνωση συγκεκριμένων περιοχών γενωμικού ή πλασμιδιακού DNA είτε για διαγνωστικούς λόγους. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η KAPA Taq DNA πολυμεράση (KapaBiosystems) και οι συνθήκες της αντίδρασης και οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών περιγράφονται στον Πίνακα 3 και 4 αντίστοιχα. Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η KAPA HiFi Hotstart Ready mix πολυμεράση (KapaBiosystems) η οποία προσφέρει υψηλής πιστότητας αντιγραφή, στοιχείο που χρειάζεται για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων καθώς αυτά θα χρησιμοποιηθούν για κλωνοποίηση και θα εισαχθούν στον *A.nidulans*. Οι συνθήκες και συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών περιγράφονται στον Πίνακα 3 και 4 αντίστοιχα.

Βήμα	ΚΑΡΑ Ταq		ΚΑΡΑ HiFi	
	°C	Διάρκεια	°C	Διάρκεια
1	95	5 min	95	3 min
2	95	30 s	98	20 sec
3	T <sub>m</sub> *-5	30 s	60-75	15 sec
4	72	1 min/kb	72	15-16 sec/kb
5	Βήματα 2-4	x25 κύκλοι	Βήματα 2-4	x30κύκλοι
6	72	10 min	72	10 min
7	12		12	

	ΚΑΡΑ Ταq	ΚΑΡΑ HiFi
10x polymerase buffer	1x	-
2x polymerase ready mix	-	1x
dNTPs	200 μM το καθένα	-
Αναρροικός primer	0.4 μM	0.4 μM
Καταρροικός primer	0.4 μM	0.4 μM
DNA πολυμεράση	1 μL	-
DNA	10-20 ng	10 ng
H <sub>2</sub> O	Μέχρι τα 25 μL	Μέχρι τα 25 μL

## 2.8 Κλωνοποίηση (Molecular cloning)

Περιλαμβάνει μια σειρά από μεθόδους μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA και την εισαγωγή του σε έναν οργανισμό ώστε να πολλαπλασιαστεί. Για την δημιουργία του ανασυνδυασμένου DNA γίνεται πέψη πλασμιδίων (φορείς) και των τμημάτων που θέλουμε εισάγουμε σε αυτά με ένζυμα περιορισμού, in vitro σύνδεση τους και μετασχηματισμό *E.coli*.

### 2.8.1 Απομόνωση μορίων DNA και πέψη με ένζυμα περιορισμού

Τα επιθυμητά τμήματα DNA που θα κλωνοποιηθούν στα πλασμίδια απομονώνονται με PCR. Τα τμήματα αυτά καθώς και τα πλασμίδια κόβονται με ένζυμα περιορισμού ώστε να δημιουργηθούν συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα (κολλώδη άκρα) και να ενωθούν με την επίδραση λιγάσης. Τα ένζυμα περιορισμού είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλίνδρομες αλληλουχίες και τις διασπών πάντα στο ίδιο σημείο. Τέτοιες αλληλουχίες μπορούν να “εισαχθούν” στα άκρα των αλληλουχιών σχεδιάζοντας κατάλληλους εκκινητές. Στην περίπτωση που τα πλασμίδια έχουν κοπεί με ένα ένζυμο και τα κολλώδη άκρα είναι ίδια, στο τέλος της πέψης γίνεται επίδραση αλκαλικής φωσφατάσης CIAP (TaKaRa) για ακριβώς 15



λεπτά στους 37°C, η οποία αφαιρεί την 5' φωσφορική ομάδα από το πλασμίδιο ώστε να μειωθούν κατά πολύ τα πλασμίδια στα οποία θα ενωθούν τα άκρα τους και θα κυκλοποιηθούν χωρίς να εισαχθεί το επιθυμητό τμήμα DNA. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και τα μόρια DNA απομονώνονται από το πήκτωμα, χρησιμοποιώντας το Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel). Συγκεκριμένα τα τμήματα του πηκτώματος που περιέχουν το πλασμίδιο και την επιθυμητή αλληλουχία κόβονται με την χρήση νυστεριού κάτω από UV μικρής έντασης ώστε να μην δημιουργηθούν βλάβες στο DNA και τοποθετούνται σε σωλήνα τύπου erpendorfόπου προστίθενται τα διάφορα διαλύματα σύμφωνα με το kit.

### 2.8.2 Σύνδεση με λιγάση

Τα μόρια που απομονώθηκαν προηγουμένως συνδέονται με την επίδραση DNA λιγάσης για 1.5-2 ώρες στους 25°C. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μL, όπου προστίθεται πλασμίδιο και τμήμα DNA σε αναλογία 1:3. 1 μL DNA λιγάσης και 1 μL buffer DNA λιγάσης (από 10x).

### 2.8.3 Μετασχηματισμός *E.coli*

Το μίγμα αυτό μετά το πέρας 1.5-2 ωρών χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E.coli*.

- Παρασκευή δεκτικών κυττάρων: Απομονώνεται ένας αριθμός κυττάρων DH5a *E.coli*, εμβολιάζεται με αυτό ένα τρυβλίο με θρεπτικό LB και άγαρ και το τρυβλίο αφήνεται για 16-18 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, απομονώνεται μια αποικία από το τρυβλίο, εμβολιάζεται με αυτήν δοκιμαστικός σωλήνας με 5ml υγρού θρεπτικού LB και ακολουθεί ξανά επώαση για 16 ώρες στους 37°C, στις 200 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή απομονώνεται 0.5 mL το οποίο χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό κωνικής φιάλης 1L με 400 mL υγρού θρεπτικού LB, η οποία επωάζεται στους 37°C και στις 260 rpm μέχρι η OD<sub>600</sub> του διαλύματος να γίνει 0.45-0.55. Η καλλιέργεια στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 4500 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0.4x παγωμένου transformation buffer I (30 mM CH<sub>3</sub>COOK, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, pH 5.8 με 1M CH<sub>3</sub>COOH) και επωάζεται για επιπλέον 5 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στις 4500 g για 5 λεπτά στους 4°C και το ίζημα αναδιαλύεται σε 1/25 του όγκου παγωμένου transformation buffer II (10 mM MOPS pH 6.5, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, pH 6.5 με 1 M KOH). Τα κύτταρα επωάζονται ξανά στον πάγο για 15-60 λεπτά και χωρίζεται σε επιμέρους δείγματα των 200 μL σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου erpendorf. Οι σωλήνες τοποθετούνται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C.
- Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων: Ένα δείγμα δεκτικών κυττάρων αφήνεται να ξεπαγώσει, προστίθεται σε αυτό το μίγμα από το στάδιο 2.8.2 και αφήνεται στον πάγο

για 20 λεπτά. Ακολουθεί heat shock για ακριβώς 90 δευτερόλεπτα στους 42°C και επώαση για 2 λεπτά στον πάγο. Στην συνέχεια προστίθεται σε αυτό 1 mL αποστειρωμένο υγρό LB, αφήνεται για 1 ώρα στους 37°C και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 12000 rpm. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 µL LB και απλώνεται σε τρυβλία με στερεό LB και αμπικιλίνη με τελική συγκέντρωση 100 µg/mL (επιλογή μετασηματισμένων κυττάρων, καθώς το πλασμίδιο έχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη).

## **2.9 Μετασηματισμός *A. nidulans***

Η παραπάνω διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί αν πρόκειται να εισαχθούν στο πλασμίδιο και άλλα τμήματα DNA και το τελικό πλασμίδιο εισάγεται στον *A.nidulans*. Η διαδικασία μετασηματισμού του *A. nidulans* περιλαμβάνει τη δημιουργία πρωτοπλαστών, δηλαδή τη δημιουργία κυττάρων χωρίς το κυτταρικό τοίχωμα. Για τον σκοπό αυτό εμβολιάζονται με οδοντογλυφίδα 2 τρυβλία με CM από το στέλεχος *A.nidulans* που θέλουμε να μετασηματίσουμε και επωάζονται για 4 μέρες στους 37°C. Με τη χρήση σπάτουλας απομονώνονται τα κονίδια, τοποθετούνται σε 5mL θρεπτικού διαλύματος, φιλτράρονται μέσα από κατάλληλο ηθμό και εμβολιάζουν ελάχιστο υγρό θρεπτικό διάλυμα, με πηγή αζώτου και τις απαραίτητες αυξοτροφίες, που βρίσκεται σε κωνική φιάλη. Η καλλιέργεια αφήνεται για 4 ώρες στους 37°C στις 130 rpm και στο τέλος αυτής της περιόδου ελέγχεται αν βρίσκονται σε ιστροπική φάση(έχουν αρχίσει να εκβλαστάνουν αλλά βρίσκονται 100% σε μονοκύτταρη μορφή) σε οπτικό μικροσκόπιο. Τα κονίδια χρησιμοποιούνται σε αυτή τη φάση καθώς το κυτταρικό τοίχωμα στο σημείο της εκβλάστησης είναι αρκετά χαλαρό και διασπάται εύκολα. Όταν βρίσκονται στη φάση αυτή τοποθετούνται σε αποστειρωμένο falcon των 50 mL και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 4000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20 mL Διαλύματος 1 (1.2 M MgSO<sub>4</sub>, 10 mM Orthophosphate pH 5.8). Το περιεχόμενο τοποθετείται σε αποστειρωμένη κωνική όπου έχουν τοποθετηθεί 200 mg ενζύμων διάσπασης του τοιχώματος και η κωνική επωάζεται για 1.5-2 ώρες στους 30°C στις 60 rpm. Το περιεχόμενο αδειάζεται σε αποστειρωμένο falcon των 50 mL και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 4000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα αναδιαλύεται σε 10 mL Διάλυμα 2 (1 M Sorbitol, 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 4000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 2 mL Διαλύματος 2, PEG και DMSO και οι πρωτοπλάστες διαμοιράζονται σε σωλήνα τύπου erpendorf των 2 µL. Αυτά μπορούν να αποθηκευτούν στους -80°C ή να χρησιμοποιηθούν απευθείας για μετασηματισμό. Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιούνται 2 τέτοιοι σωλήνες στο ένα προστίθεται το μόριο DNA που θέλουμε να εισάγουμε και στο άλλο νερό (control) και αφού αναδευθούν ήπια τοποθετούνται σε πάγο για 15 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθενται 500 µL PEG και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 6000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και

προστίθεται 1 mL Διαλύματος 2 χωρίς αναδιάλυση σε κάθε ένα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 5000 rpm, απομάκρυνση του υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 200 μL Διαλύματος 2. Τα περιεχόμενα μεταφέρονται σε falcon με 4-5 mL θρεπτικού Top SM και αυτά χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό στερεών θρεπτικών SM με πηγή αζώτου  $\text{NH}_4$  και τις αυξοτροφίες του στελέχους εκτός από αυτήν που περιέχει το πλασμίδιο με το οποίο το μετασηματίστηκε. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 37°C για 4 μέρες όπου αναπτύσσονται μόνο οι μετασηματισμένοι πρωτοπλάστες στο ένα και κανένας στο control εφόσον τα διαλύματα και οι πρωτοπλάστες δεν είχαν κάποια μόλυνση. Από το τρυβλίο με τους μετασηματισμένους πρωτοπλάστες απομονώνονται σπόρια για τον εμβολιασμό τρυβλίου με ελάχιστο θρεπτικό, με τις ανάλογες αυξοτροφίες το οποίο επωάζεται για 2-3 μέρες στους 37°C και απομονώνονται μεμονωμένες αποικίες για δοκιμασίες αύξησης.

Όλα τα αντικείμενα και τα διαλύματα που αναφέρθηκαν παραπάνω πρέπει να είναι αποστειρωμένα πριν την χρήση και οι διαδικασίες μεταφοράς των διαλυμάτων να γίνονται υπό στείρες συνθήκες.

## 2.10 Διασταυρώσεις στελεχών

Ένας τρόπος δημιουργίας καινούριων στελεχών είναι η διασταύρωση υπαρχόντων στελεχών.<sup>11</sup> Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, ο *A. nidulans* είναι ένας ομοθαλικός μύκητας όμως υφές από διαφορετικά στελέχη μπορούν να αναστομωθούν και να δημιουργήσουν ετεροκάρυα με διαφορετικούς πυρήνες. Χρησιμοποιώντας στελέχη με συμπληρωματικές αυξοτροφίες, και τοποθετώντας τα ετεροκάρυα σε θρεπτικό μέσο χωρίς τις αυξοτροφίες των γονέων (προστίθενται μόνο οι κοινές αυξοτροφίες), εξαναγκάζονται να διατηρήσουν μια αναλογία πυρήνων<sup>2</sup>. Από τα ετεροκάρυα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες δημιουργούνται κλειστοθήκια με ασκούς που περιέχουν ασκοσπόρια.

Αρχικά τα δυο στελέχη, των οποίων τους γονοτύπους θέλουμε να συνδυάσουμε, εμβολιάζονται σε στερεό θρεπτικό εναλλάξ σε απόσταση 1-2 cm. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 2 μέρες στους 37°C και από αυτές απομονώνονται τμήματα του θρεπτικού όπου έχουν ενωθεί τα δυο στελέχη. Από αυτά απομακρύνεται η περίσσεια του θρεπτικού, τοποθετούνται ανάποδα σε στερεό θρεπτικό μέσο χωρίς τις αυξοτροφίες των γονέων (μόνο τις κοινές) και επωάζονται για 2 μέρες στους 37°C. Μετά από 2 μέρες θα είναι εμφανής η ανάπτυξη του ετεροκαρύου. Σε αυτή τη φάση κλείνεται εντελώς η παροχή αέρα στα θρεπτικά και οι καλλιέργειες επωάζονται για 2-3 εβδομάδες στους 37°C. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα θα έχουν δημιουργηθεί κλειστοθήκια τα οποία θα είναι εμφανή είτε με γυμνό μάτι είτε κάτω από στερεοσκόπιο. Απομονώνονται συνήθως 8 κλειστοθήκια, τα οποία αφού καθαριστούν πάνω σε νέο θρεπτικό μέσο τοποθετούνται σε σωλήνα τύπου errendorf με 500 μL αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό, όπου διανοίγονται με τη χρήση οδοντογλυφίδας

πιέζοντας τα πάνω στα τοιχώματα του σωλήνα. Στην συνέχεια χρησιμοποιούνται 10 μL από κάθε κλειστοθήκιο για να ανιχνευτεί αν είναι αποτέλεσμα διασταύρωσης μεταξύ των δυο διαφορετικών στελεχών ή ενός στελέχους με τον εαυτό του. Αυτό επιτυγχάνεται με τον εμβολιασμό θρεπτικού χωρίς τις αυξοτροφίες των γονέων (ή μόνο τις κοινές αν υπάρχουν) όπου θα αναπτυχθούν μόνο τα πρωτότροφα στελέχη. Το θρεπτικό μέσο επωάζεται για 2-3 μέρες στους 37°C και από τα κλειστοθήκια που είναι αποτέλεσμα διασταύρωσης των δυο στελεχών, απλώνονται 2-10 μL σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Η καλλιέργεια αφήνεται για 2 μέρες στους 37°C και απομονώνονται σπόρια από μεμονωμένες αποικίες ώστε να πραγματοποιηθούν δοκιμασίες αύξησης για να εξακριβωθεί ο γονότυπος των απογόνων. Από τους απογόνους διαλέγουμε τα επιθυμητά στελέχη και ελέγχουμε τον γονότυπο τους και με PCR.

### 2.11 In vitro site-directed PCR mutagenesis

Για κάθε μεταλλαγή που θα δημιουργηθεί σχεδιάζεται ένα ζευγάρι εκκινητών 35-40 ζευγών βάσεων με >50% περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη. Η μεταλλαγή πρέπει να βρίσκεται περίπου στο κέντρο του εκκινητή ώστε να μην επηρεάζεται η σύνδεση με το DNA από την αναντιστοιχία στο σημείο της μεταλλαγής. Οι αλλαγές των κωδικονίων σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχουν οι ελάχιστες δυνατές αναντιστοιχίες κάτι που επιτυγχάνεται εξαιτίας του εκφυλισμένου γενετικού κώδικα. Επιπλέον αν είναι δυνατό σχεδιάζονται μεταλλαγές που να δημιουργούν ή να εξαλείφουν θέσεις περιορισμού ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση της επιτυχίας της μεταλλαξιγένεσης. Για τις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιείται η πολυμεράση KAPA HiFi HotStart Ready Mix (KAPA Biosystems), η οποία όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως προσφέρει υψηλής πιστότητας αντιγραφή. Οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών καθώς και η διάρκεια και η θερμοκρασία των βημάτων απεικονίζονται στον Πίνακα 5.

Μετά την ενίσχυση με PCR, το προϊόν επωάζεται για 2 ώρες στους 37°C με 1 μL ενζύμου Dpn I (TaKaRa), το οποίο πέπτει το μεθυλιωμένο (GA<sup>m</sup>|TC) DNA, ώστε να διασπαστεί το μη μεταλλαγμένο πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση. Το τελικό διάλυμα χρησιμοποιείται για τον μετασηματισμό δεκτικών κυττάρων *E.coli*. Από τις αποικίες που προκύπτουν, απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA και αφού γίνει πέψη με το κατάλληλο ένζυμο και διαπιστωθεί η επιτυχία της μεταλλαξιγένεσης, χρησιμοποιείται ένας μέρος του για αλληλούχιση. Τέλος τα πλασμίδια με την επιθυμητή μετάλλαξη μετασηματίζουν πρωτοπλάστες *A.nidulans*.

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις συστατικών και βήματα αντίδρασης για την In vitro site-directed PCR mutagenesis					
Συστατικά	Συγκέντρωση		Βήματα	Θερμοκρασία °C	Διάρκεια
2x Polymerase Ready mix	1x		1	95	3 λεπτά
Αναρροικός εκκινητής	0.4 μM		2	98	30 δευτ.
Καταρροικός εκκινητής	0.4 μM		3	60-75	1 λεπτό
Πλασμιδιακό DNA	10 ng		4	72	5 λεπτά
H <sub>2</sub> O	Μέχρι τα 25 μL		5	Βήματα 2-4	x18 κύκλοι
			6	72	10 λεπτά
			7	12	

### 2.12 Διαδικασία πρόσληψης ραδιενεργού υποστρώματος

Με αυτές τις διαδικασίες μπορεί να γίνει κινητική ανάλυση ενός μεταφορέα μετρώντας το Km και το Vmax καθώς και προσδιορισμός της ειδικότητας υποστρωμάτων μέσω δοκιμασιών ανταγωνισμού.

Εμβολιάζονται τρυβλία με πλήρες θρεπτικό μέσο με τα στελέχη που θα χρησιμοποιήσουμε χρησιμοποιώντας οδοντογλυφίδα και επωάζονται για 4 μέρες στους 37°C. Με τη χρήση αποστειρωμένης σπάτουλας απομονώνεται το ¼ του τρυβλίου (μια αποικία) και προστίθεται σε falcon των 50 mL που περιέχει 2 mL Tween. Το εναιώρημα ανακατεύεται αρκετά καλά, φιλτράρεται από αποστειρωμένο ηθμό, τοποθετείται σε κωνική με 25 mL ελάχιστο θρεπτικό μέσο με πηγή αζώτου και τις απαραίτητες αυξοτροφίες για την ανάπτυξη του και επωάζεται για 4-4.5 ώρες (σε αυτό το χρονικό διάστημα οι μεταφορείς έχουν την μέγιστη έκφραση) στους 37°C στις 140 rpm. Κατά τη διάρκεια αυτών των ωρών ετοιμάζονται τα stock των αντιδράσεων με τα ραδιοσημασμένα υποστρώματα (π.χ. ραδιοσημασμένη ξανθίνη) σε νερό με τελικό όγκο τέτοιο ώστε να προστίθενται 25 μL από το stock σε κάθε erpendorf αντίδρασης. Μετά το πέρας 4-4.5 ωρών, το εναιώρημα τοποθετείται σε falcon των 50 mL και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 3000 rpm. Το υπερκείμενο αφαιρείται, το ίζημα επαναδιαλύεται σε όγκο κρύου θρεπτικού ανάλογο της ποσότητας που θα χρησιμοποιήσουμε και ανακατεύεται αρκετά καλά με vortex. Από το εναιώρημα μεταφέρονται 75 μL σε κάθε σωλήνα αντίδρασης (3 για κάθε συνθήκη) και επωάζονται για 5 λεπτά στους 37°C. Σε κάθε σωλήνα αντίδρασης προστίθενται 25 μL από το stock με το ραδιοσημασμένο υπόστρωμα για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη περίσσειας μη ραδιοσημασμένου υποστρώματος και την τοποθέτηση των σωλήνων στον πάγο. Στο τέλος όλων των αντιδράσεων φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 12000 rpm, το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 mL κρύο θρεπτικό. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13000 rpm, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 mL τολουένιο. Οι

σωλήνες τοποθετούνται σε κατάλληλα δοχεία για μέτρηση ραδιενέργειας και η ραδιενέργεια μετράται σε κατάλληλο μετρητή.

### 2.13 Μικροσκοπία φθορισμού

Η υποκυτταρική θέση των μεταφορέων μπορεί να παρατηρηθεί σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά την σύντηξη σε επίπεδο DNA του μεταφορέα με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) με τη χρήση των τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Για την παρατήρηση χρησιμοποιούνται υφές *A. nidulans* 16-18 ωρών σε ειδικά τρυβλία με γυάλινη βάση. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάζεται ελάχιστο θρεπτικό μέσο με 0.1% γλυκόζη και pH 5.2-5.5 και από αυτό τοποθετούνται 2 mL σε κάθε τρυβλίο. Επιπλέον προστίθεται πηγή αζώτου, οι απαραίτητες αυξοτροφίες και μερικά  $\mu\text{L}$  (8-12 ανάλογα με την πυκνότητα) εναιωρήματος σπορίων του επιθυμητού στελέχους. Τα τρυβλία επωάζονται για 16-18 ώρες στους 25°C και υφές παρατηρούνται στο μικροσκόπιο επιφθορισμού AxioPlan Zeiss phase contrast με τη χρήση UV. Για τις φωτογραφίες των υφών (Κεφάλαιο 3) χρησιμοποιήθηκε η Zeiss-MRC5 digital camera και το AxioVs40 V4.40.0 software ενώ η επεξεργασία των εικόνων έγινε χρησιμοποιώντας το Adobe Photoshop CS3.

## 3. Αποτελέσματα

### Μέρος α: Μελέτη SVCT-like μεταλλαγμένων μορφών του UapA

Με βάση τους ανθρώπινους SVCTs δημιουργήθηκαν μεταλλαγμένες μορφές του UapA με *in vitro* site-directed PCR mutagenesis (πρωτόκολλο στο Κεφ 2.11). Συγκεκριμένα μεταλλάχθηκε μια περιοχή του ενεργού κέντρου του UapA (θέσεις 405-408, Εικόνα 3.1). Επιπλέον μεταλλάχθηκαν δυο σημεία στις πύλες εισόδου των υποστρωμάτων (θέσεις 481, 526) με στόχο την διευκόλυνση της εισόδου του ασκορβικού στο ενεργό κέντρο. Τα στελέχη που δημιουργήθηκαν είχαν τις ακόλουθες μεταλλάξεις: Q408P, A407S/Q408P, F406S/A407S/Q408P, T405S/F406S/A407S, R481G/T526M, R481G/T526M/A407S/Q408P, R481G/T526M/F406S/A407S/Q408P.

**A. Κούρκουλου- Αναζητώντας τη μοριακή βάση της εξέλιξης της εξειδίκευσης των μεταφορέων της οικογένειας NAT**

```
sp|Q07307|UAPA_EMENI  ---SVYGPMLP IIAVFIICACIECTIGDVTATCDVSRLEVRGGTFESRIQ
sp|Q9UGH3|S23A2_HUMAN WGLPTVSAAGVIGMLS AVVASITIESTIGDYYAC--ARLSCAPPPPITHAIN
sp|Q9UHI7|S23A1_HUMAN WGLPTVTA AAVLGMFSATLAGITIESTIGDYYAC--ARLAGAPPPPVHAIN
      *  ..  * :  ::  :  *  **  *  : **  ..  * :

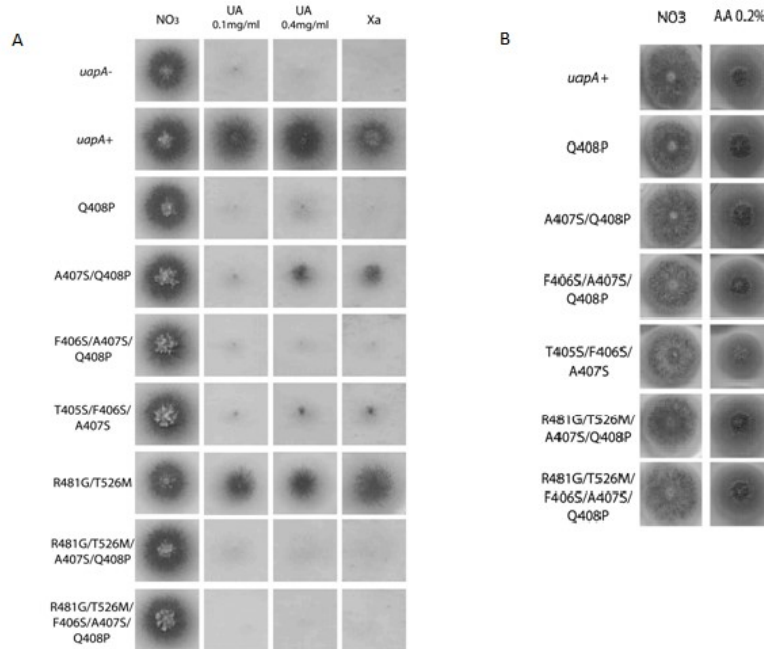
sp|Q07307|UAPA_EMENI  GAVLADGINSVVAAL-ATMTF TTF AQN G VIALTRCANRHAGYCCCLIL
sp|Q9UGH3|S23A2_HUMAN RGI FVEGLSCVLDGIFGTGNG TSSSPN GVLGITKVGSRRVIQCGAALM
sp|Q9UHI7|S23A1_HUMAN RGI FTEGICCI IAGLLGTGNG TSSSPN GVLGITKVGSRRVWQYGAATM
      . : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : :

sp|Q07307|UAPA_EMENI  IVAGIFAKFAAAI VAI P NSVYGGMKTFLFA SVV I SQQAIVAKAP-FTRRN
sp|Q9UGH3|S23A2_HUMAN LALGHIGKFSALFASLPDPV LGALFCTLFGMITAVGLSNLQFVDMSSRN
sp|Q9UHI7|S23A1_HUMAN LVLGTIGKFTALFSSLDPD I LGGMFCTLFGMITAVGLSNLQFVDMSSRN
      :  *  :  **  * :  : : : : * :  **  :  *  :  :  :  **
```

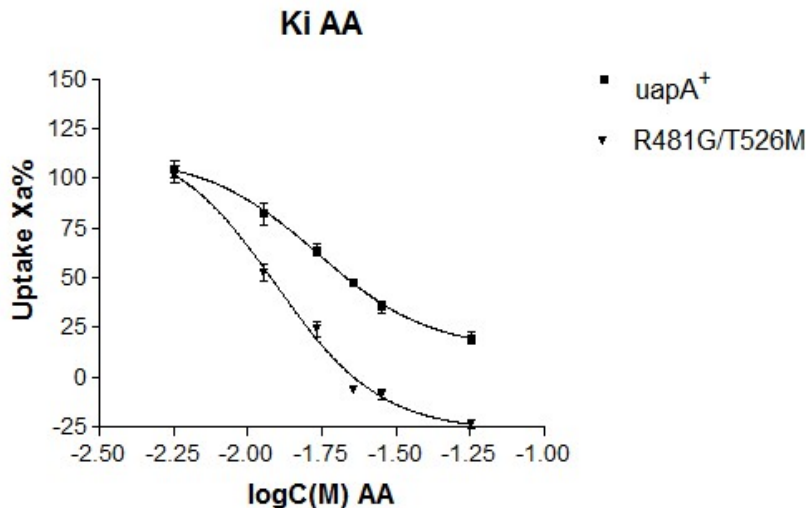
**Εικόνα 3.1.** Στοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών του UapA, SVCT2 και SVCT1. Μέσα σε κόκκινο πλαίσιο φαίνεται η περιοχή του ενεργού κέντρου που μεταλλάχθηκε στον UapA καθώς και οι αλληλουχίες των SVCTs στην περιοχή αυτή.

Για τα στελέχη που δημιουργήθηκαν, αρχικά έγιναν δοκιμασίες αύξησης χρησιμοποιώντας ως πηγή αζώτου NO<sub>3</sub>, ουρικό οξύ και ξανθίνη. Τα αποτελέσματα αυτών βρίσκονται στην Εικόνα 3.2.A. Ανάμεσα στα μεταλλαγμένα στελέχη μόνο το R481G/T526M αναπτύχθηκε σχεδόν σαν το στέλεχος φυσικού τύπου ενώ το A407S/Q408P αναπτύχθηκε ελάχιστα παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης ουρικού (0.4 mg/mL) και ξανθίνης. Ακολούθως έγιναν δοκιμασίες αύξησης των στελεχών αυτών και παρουσία ασκορβικού, τα αποτελέσματα των οποίων βρίσκονται στην Εικόνα 3.2.B. Όλα τα στελέχη εκτός του T405S/F406S/A407S εμφανίζουν φυσιολογική ανάπτυξη.

Τα στελέχη με τον φυσικό UapA και την μεταλλαγμένη μορφή R481G/T526M που μεταφέρουν ξανθίνη χρησιμοποιήθηκαν για διαδικασίες πρόσληψης ραδιενεργής ξανθίνης (πρωτόκολλο στο Κεφ. 2.12). Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε πρόσληψη ραδιενεργής ξανθίνης παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ασκορβικού και προσδιορίστηκε το K<sub>i</sub> για τα δύο στελέχη. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 3.3 όπου φαίνεται πως το στέλεχος R481G/T526M (K<sub>i</sub>=12,45mM) αναγνωρίζει καλύτερα το ασκορβικό από το στέλεχος με τον φυσικό UapA (K<sub>i</sub>=17,14 mM). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το στέλεχος A407S/Q408P, όμως δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός K<sub>i</sub> εξαιτίας της πρόσληψης μικρής ποσότητας ξανθίνης



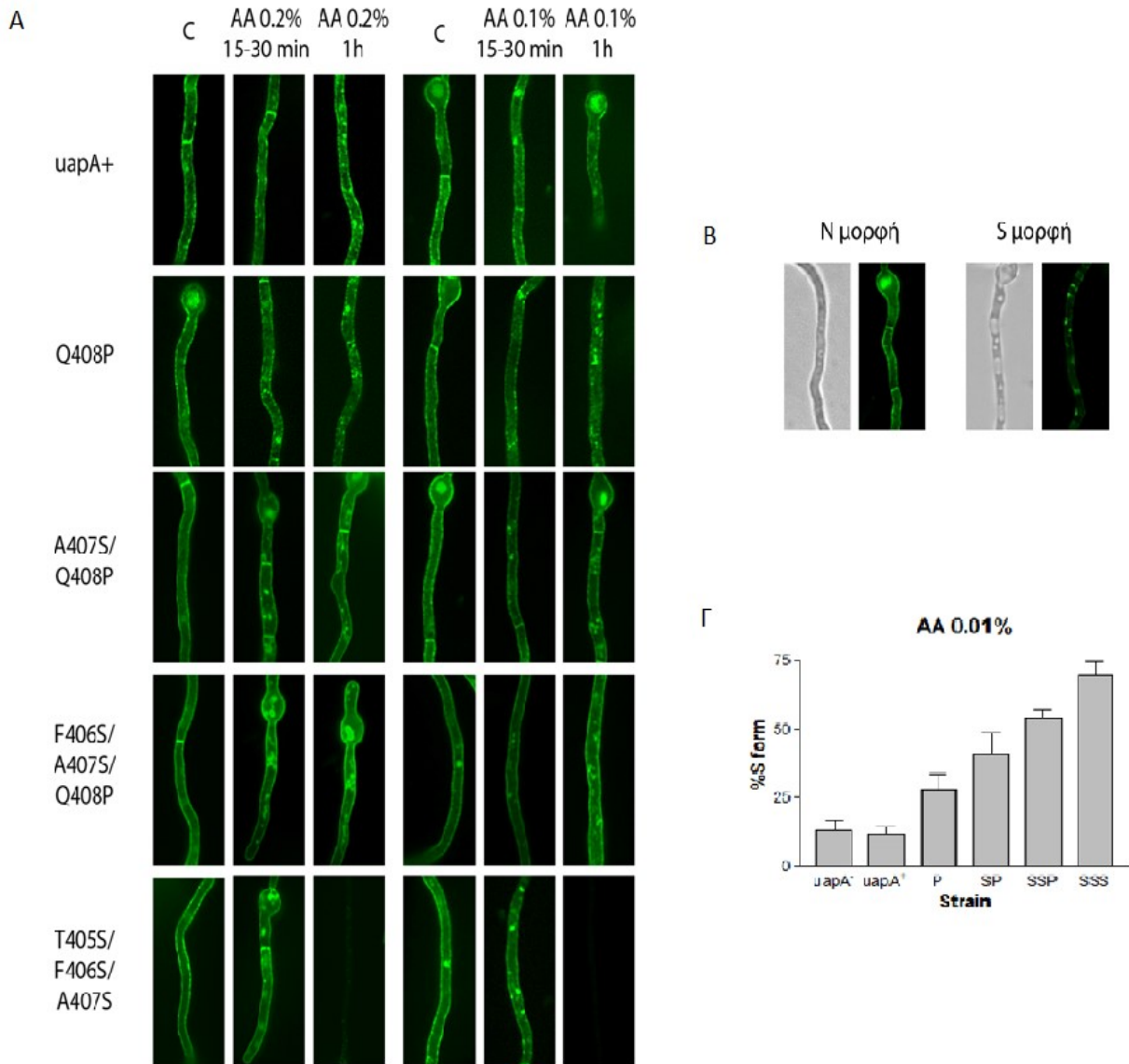
**Εικόνα 3.2.** Δοκιμασίες αύξησης των στελεχών *uapA*<sup>-</sup>, *uapA*<sup>+</sup> και στελεχών με τις μεταλλαγμένες μορφές του *UapA*. Α) Χρησιμοποιήθηκε ελάχιστο θρεπτικό μέσο με 1% γλυκόζη και  $\text{NO}_3^-$ , ουρικό οξύ 0.1 mg/mL και 0.4 mg/mL και ξανθίνη 0.1 mg/mL, αντίστοιχα, ως πηγή αζώτου. Β) Χρησιμοποιήθηκε ελάχιστο θρεπτικό μέσο με pH 8.0, γλυκόζη 1% και  $\text{NO}_3^-$  ως πηγή αζώτου παρουσία ή μη ασκορβικού οξέος 0.2%. Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο με pH 8.0 καθώς το ασκορβικό οξύ στην συγκεκριμένη συγκέντρωση κατεβάζει το pH σε 7.0 όπου είναι το φυσιολογικό pH για την ανάπτυξη των στελεχών.



**Εικόνα 3.3.** Διαδικασίες πρόσληψης ραδιενεργής ξανθίνης παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος για τα στελέχη με τον φυσικό *UapA* και την μεταλλαγμένη μορφή R481G/T526M. Για τον φυσικό *UapA* το  $K_i$  υπολογίστηκε με 95% πιθανότητα 14,57-20,17 και  $R^2=0.9790$  ενώ για τη μεταλλαγμένη μορφή R481G/T526M 10,35-14,87 και  $R^2=0.9878$

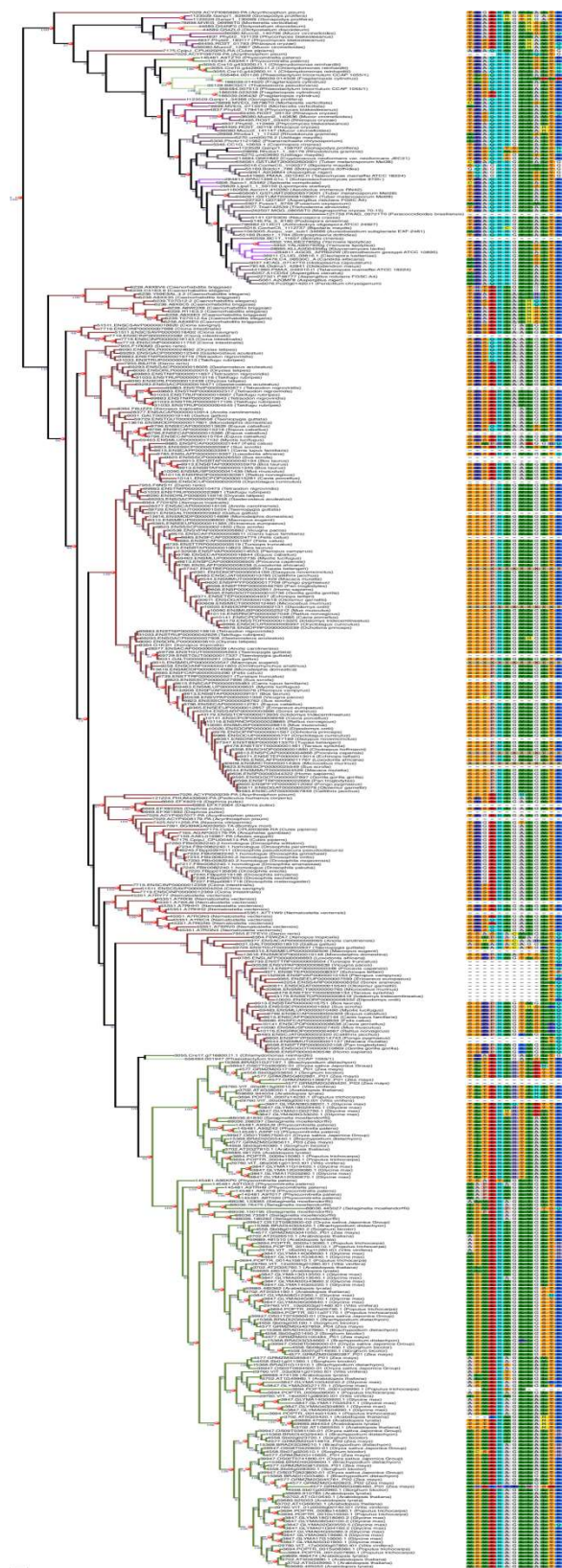


Ο φυσικός UapA παρουσία των υποστρωμάτων του ενδοκυττώνεται και αποικοδομείται στο χυμοτόπιο, ένα μονοπάτι που πιθανότατα ενεργοποιείται από δομικές αλλαγές των μορίων του UapA κατά την διάρκεια της μεταφοράς.<sup>12</sup> Η εμφάνιση του ίδιου φαινομένου ελέγχθηκε και παρουσία ασκορβικού οξέος τόσο για τον φυσικό UapA όσο και για τις μεταλλαγμένες του μορφές με τη χρήση μικροσκοπίας επιφθορισμού. Για τον σκοπό αυτό, τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταλλαξιγένεση είχαν ενσωματωμένο το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) στο τέλος του γονιδίου του UapA. Παρουσία 0.2% και 0.1% ασκορβικού οξέος οι μεταλλαγμένες μορφές παρουσιάζουν έντονη ενδοκύτωση μετά από 15 λεπτά επώασης με ασκορβικό. Η ένταση μάλιστα αυξάνεται όσο αυξάνονται και οι μεταλλαγές στο ενεργό κέντρο. Στον φυσικό UapA το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται μετά από μια ώρα επώασης με ασκορβικό και σε μικρότερη ένταση. Τα στελέχη με την μεταλλαγμένη μορφή T405S/F406S/A407S μετά από 15 λεπτά επώασης με ασκορβικό παρουσιάζουν, όπως τα στελέχη με τις υπόλοιπες μεταλλαγμένες μορφές, έντονη ενδοκύτωση όμως μετά από 1 ώρα επώασης οι υφές φαίνεται να έχουν οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον παρουσία μικρότερης συγκέντρωσης ασκορβικού (0.01%) ένα ποσοστό υφών παρουσιάζουν εικόνα συμβατή με αυτή που παρατηρείται σε υπερτονικό διάλυμα (S μορφή). Το ποσοστό των υφών που παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο αυξάνεται όσο αυξάνονται οι μεταλλαγές στο ενεργό κέντρο και κορυφώνεται στο στέλεχος T405S/F406S/A407S. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 3.4.



**Εικόνα 3.4.** Μικροσκοπία επιφθορισμού για τον φυσικό UapA και τις μεταλλαγμένες του μορφές. A. Μικροσκοπία επιφθορισμού παρουσία ασκορβικού οξέος (AA) 0.2% και 0.1% για 15-30 λεπτά και 1 ώρα. B. Μορφές υφών που παρατηρούνται μετά από 20 λεπτά επώασης με 0.01% ασκορβικό οξύ. Γ. Ποσοστό S μορφής των διαφόρων στελεχών μετά από 20 λεπτά επώασης με 0.01% ασκορβικό οξύ.

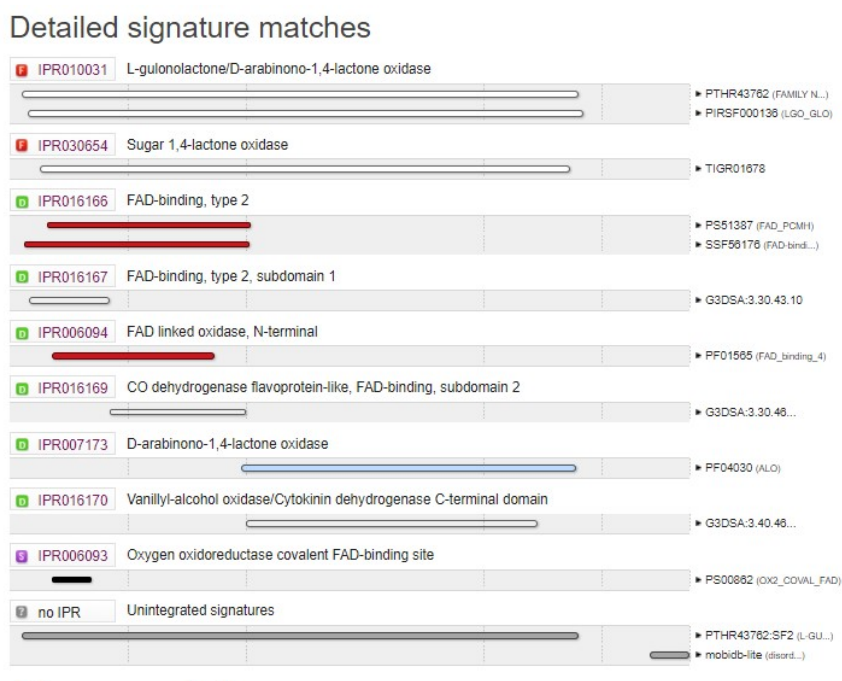
Τέλος πραγματοποιήθηκαν *in silico* από τον αναλύσεις για τον εντοπισμό αλληλουχιών NAT σε όλους τους οργανισμούς και κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 3.5), όπου απεικονίζεται και η αλληλουχία του ενεργού κέντρου της κάθε αλληλουχίας



Εικόνα 3.5 Φυλογενετικό δέντρο των αλληλουχιών NAT (A. Pittis, G. Diallinas, αδημοσίευτες αναλύσεις).

## Μέρος β: Ρόλος του D-έρυθρο ασκορβικού οξέος στον *A. nidulans*

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση BLAST με την αλληλουχία της πρωτεΐνης του γονιδίου *alo1* του *S.cerevisiae* για τον έλεγχο ύπαρξης ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στον *A.nidulans* από το οποίο θα εκφράζεται πρωτεΐνη με πιθανή ενεργότητα οξειδάσης της D-arabinono-1,4-lactone, του τελευταίου ενζύμου της βιοσύνθεσης του D-έρυθρο-ασκορβικού. Από την ανάλυση αυτή ανιχνεύτηκε η ύπαρξη ενός ORF (AN0836) με 35.3% ταυτότητα και 54.3% ομοιότητα με την πρωτεΐνη Alo1. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για την αλληλουχία του αντίστοιχου γονιδίου στην *Candida albicans*, όπου το ίδιο ORF είχε 35.8% ταυτότητα και 53.8% ομοιότητα με την πρωτεΐνη Alo1 της *C.albicans*. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια ακόμη ανάλυση Blast για τον έλεγχο της συντηρητικότητας της ύπαρξης αυτού του ORF στο γένος *Aspergillus* όπου ανιχνεύτηκε πως υπάρχει σε τουλάχιστον 20 άλλα είδη του γένους με ταυτότητα μεγαλύτερη από 70%. Ακόμα έγινε χρήση του εργαλείου Interpro, το οποίο προέβλεψε την ύπαρξη domain D-arabinono-1,4-lactone oxidase, domain πρόσδεσης FAD τύπου 2 κ.α.(Εικόνα 3.6)



Εικόνα 3.6. Αποτελέσματα χρήσης του εργαλείου Interpro για το AN0836

Για την μελέτη του ρόλου του D-έρυθρο ασκορβικού, έγινε knockout του AN0836. Για τον σκοπό αυτό απομονώθηκε αλληλουχία μήκους περίπου 1500 βάσεων από το 5' και 3' άκρο του γονιδίου. Για την απομόνωση σχεδιάστηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές:

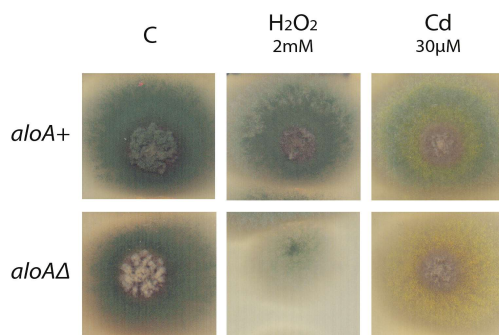
5' Forward(F): CGCGCCATGGGTGATATCAGCCATGTTTGGCAAGG

5' Reverse(R):CGCGACTAGTCTGGCTGCTTTTGTGTGTATCGATG

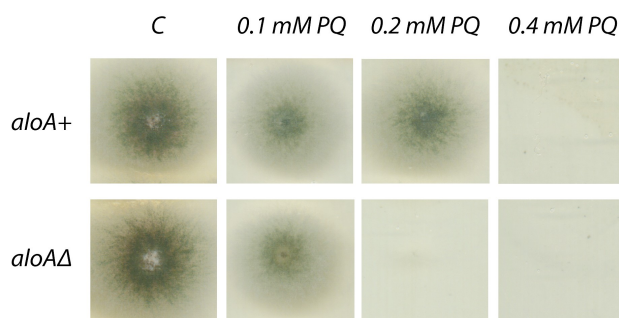
3'F: CGCGACTAGTGAAAGGTACGGTTACAGCTAGCAAAC

3'R:CGCGGCGGCCCGCCAACCGCTGATTCCCGATTTGTCTC

Τα τμήματα αυτά κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδιο pGEM-TEasy και ανάμεσα τους κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *ryrG*. Μόλις ολοκληρώθηκε η κατασκευή έγινε απομόνωση από το πλασμίδιο της γραμμικής κασέτας 5'-*ryrG*-3' και με αυτή μετασηματίστηκε ο *A. nidulans*. Η επιτυχία του μετασηματισμού ελέγχθηκε με PCR. Τα μεταλλαγμένα στελέχη χωρίς το AN0836 (*aloAΔ*), αναπτύσσονται κανονικά σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο, όμως παρουσιάζουν ευαισθησία παρουσία  $H_2O_2$  και paraquat (PQ) ενώ δημιουργούν κίτρινα σπόρια παρουσία καδμίου (Cd) με συγκέντρωση 30  $\mu$ M (Εικόνα 3.7 και 3.8).



Εικόνα 3.7. Δοκιμασία αύξησης (growth test) παρουσία  $H_2O_2$  2mM και Cd 30 $\mu$ M όπου είναι η εμφανής η μειωμένη ανάπτυξη του *aloAΔ* παρουσία  $H_2O_2$  και η παρουσία κίτρινων σπορίων παρουσία Cd



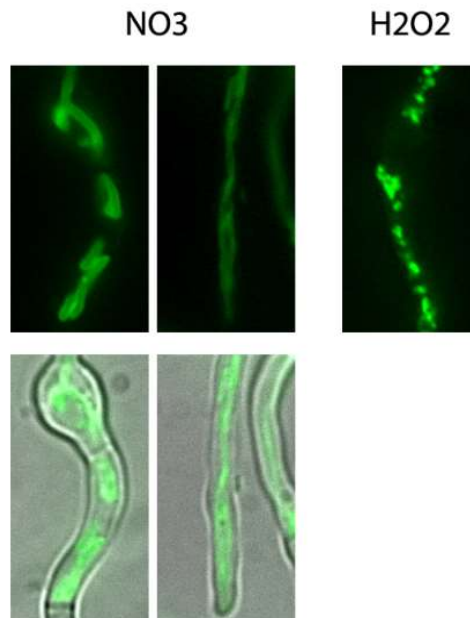
Εικόνα 3.8. Growth test παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων PQ. Το *aloAΔ* δεν αναπτύσσεται σε συγκέντρωση PQ 0.2 mM αντίθετα με το *aloA+* που αναπτύσσεται σχεδόν κανονικά.

Επιπλέον έγινε σύντηξη σε επίπεδο DNA του *aloA* με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP ώστε να προσδιοριστεί η υποκυτταρική τοπολογία του προϊόντος του *aloA*. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν οι ακόλουθοι primers:

F:GGGCCCGCCTCCGATCTCACATGTTCTTC

R:ACTAGTCGGTTCAGGGATGAGAACACTAG

Ο αναρροϊκος εκκινητής υβριδίζεται στη αρχή του *aloA* ενώ ο καταρροϊκός στο τέλος του *aloA* ακριβώς πριν το κωδικόνιο λήξης. Με αυτό τον τρόπο το κωδικόνιο λήξης αφαιρείται και η μετάφραση συνεχίζεται μέχρι το κωδικόνιο λήξης της GFP. Η αλληλουχία που απομονώνεται με αυτούς τους primer κλωνοποιείται σε πλασμίδιο μαζί με το γονίδιο της GFP, το *ryrG* και την 3' αλληλουχία που κλωνοποιήθηκε προηγουμένως για το knock-out ώστε να δημιουργηθεί μια γραμμική κασέτα της μορφής *aloA-gfp-ryrG-3'*. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα παρατηρήθηκαν με μικροσκοπία επιφθορισμού όπου φάνηκε πως το προϊόν του *aloA* είναι μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη (Εικόνα 3.9).



**Εικόνα 3.9.** Μικροσκοπία επιφθορισμού για το στέλεχος *aloAΔ*. Παρουσία  $H_2O_2$ , το οποίο διαταράσσει την μεμβράνη των μιτοχονδρίων, βλέπουμε αλλαγή του προτύπου του φθορισμού που επιβεβαιώνει την ύπαρξη της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια.

## 4. Συζήτηση αποτελεσμάτων

### 4.1 Οι τροποποίηση του TFAQ απενεργοποιεί τον UapA

Η τροποποίηση της αλληλουχίας TFAQ ελαττώνει δραματικά την μεταφορά των υποστρωμάτων του UapA. Συγκριτικά, μόνο η μεταλλαγμένη μορφή A407S/Q408P μεταφέρει με μικρή απόδοση ξανθίνη, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από διαδικασίες πρόσληψης ραδιενεργής ξανθίνης. Οι μεταλλαγμένες μορφές A407S/Q408P και η Q408P και T405S/F406S/A407S, σε μικρότερο βαθμό, φαίνεται να αναγνωρίζουν σχετικά καλύτερα το ουρικό οξύ όταν τετραπλασιάζεται η συγκέντρωση του γεγονός που δείχνει πως πρόκειται για μεταλλαγές που επηρεάζουν την συγγένεια του μεταφορέα για τα υποστρώματα του. Επιπλέον η παρουσία των μεταλλαγών R481G/T526M στις πύλες εισόδου του μεταφορέα δεν επαναφέρει τη λειτουργία του UapA όταν το TFAQ είναι τροποποιημένο. (Εικόνα 3.2)

### 4.2 Ενδείξεις για βελτιωμένη αναγνώριση ασκορβικού οξέος από τις μεταλλαγμένες μορφές του UapA

Τα στελέχη που εκφράζουν τον φυσικό UapA ή τις περισσότερες από τις μεταλλαγμένες μορφές δεν παρουσιάζουν κάποιο φαινότυπο παρουσία ασκορβικού οξέος στο τρυβλίο. Όμως η μεταλλαγμένη μορφή T405S/F406S/A407S παρουσιάζει μικρότερη διάμετρο αποικίας γεγονός που σημαίνει ότι το ασκορβικό για το στέλεχος αυτό είναι τοξικό (Εικόνα 3.2). Ακόμα, οι μεταλλαγές στις πύλες εισόδου οδηγούν σε αποδοτικότερη αναγνώριση του ασκορβικού σε σχέση με τον φυσικό UapA, αφού ελαττώνουν το  $K_i$  από 17,14 σε 12,45 (Εικόνα 3.3).

Παρουσία ασκορβικού οξέος οι μεταλλαγμένες μορφές ενδοκυττώνονται σημαντικά ταχύτερα από τον φυσικό UapA και η ένταση της ενδοκύττωσης είναι ανάλογη του αριθμού των μεταλλαγών στο ενεργό κέντρο. Εφόσον ο φυσικός UapA παρουσιάζει το ίδιο φαινόμενο παρουσία των υποστρωμάτων του, οι μεταλλαγμένες μορφές αναγνωρίζουν καλύτερα το ασκορβικό, χωρίς να είναι γνωστό αν το μεταφέρουν. Επιπλέον η μεταλλαγμένη μορφή T405S/F406S/A407S μετά από μια ώρα παρουσίας ασκορβικού οξέος οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο γεγονός που επιβεβαιώνει την τοξικότητα του ασκορβικού που υπάρχει και στις δοκιμασίες αύξησης. Τέλος παρουσία μικρότερης συγκέντρωσης ασκορβικού (0.01%), παρατηρείται εικόνα συμβατή με αυτή που παρατηρείται σε υπερτονικό διάλυμα. Ο αριθμός των υφών με αυτή την εικόνα στο ίδιο χρονικό διάστημα αυξάνεται όσο αυξάνονται οι μεταλλαγές στο ενεργό κέντρο και κορυφώνεται στην μεταλλαγμένη μορφή T405S/F406S/A407S (Εικόνα 3.4).

Συμπερασματικά η μετατροπή του μοτίβου TFAQ σε SSSP (SVCTs), το οποίο βρίσκεται εντός της περιοχής δέσμευσης των υποστρωμάτων του UapA, φαίνεται να σχετίζεται με την διαφοροποίηση της ικανότητας μεταφοράς βάσεων και ασκορβικού.

#### 4.3 Αλληλουχίες NAT με μοτίβα δέσμευσης ασκορβικού εμφανίζονται στα ψάρια

Οι φυλογενετικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν επιβεβαιώνουν την πρόταση πως η εξέλιξη των μεταφορέων ασκορβικού έγινε στα ψάρια. Εντοπίστηκαν αλληλουχίες NAT με μοτίβα δέσμευσης υποστρωμάτων είτε ειδικά για νουκλεοτιδικές βάσεις (T/S-F/Y-A/S-Q/E), είτε ειδικά για ασκορβικό (S-S-S-P), αλλά και ενδιάμεσες μορφές όπως: S-S-A-S (*Daniorerio*), S-S-M-S (*Anoliscarolinensis*), T-S-A-E (*Physcomitrella patens*), I-S-V-E (*Selaginella moellendorffii*), A-S-V-E (*Arabidopsis thaliana*), V-S-V-E (*Glycine max*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa* κ.α.). Η εξέλιξη των μεταφορέων ασκορβικού στα ψάρια θα ήταν χρήσιμο να συσχετιστεί και με την εμφάνιση για πρώτη φορά ,εξειδικευμένα, στα ψάρια της έλλειψης βιοσύνθεσης του ασκορβικού (Κεφ. 1.4). Καθώς το ασκορβικό είναι ένας πολύ σημαντικός μεταβολίτης για τους οργανισμούς η παντελής έλλειψη του θα οδηγούσε σε θάνατο. Όμως με την δημιουργία μεταφορέων ασκορβικού, η έλλειψη βιοσύνθεσης μπορεί να αντισταθμιστεί με μεταφορά ασκορβικού από την διατροφή.

#### 4.4 Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με κωδικό AN0836 (aloA) κωδικοποιεί πιθανότατα μια οξειδάση της D-arabinono-1.4-lactone

Απαλοιφή του *aloA* οδήγησε σε ευαισθησία των στελεχών (*aloAD*) σε οξειδωτικούς παράγοντες, όπως συνέβη και με την απαλοιφή του *ALO1* στον *S.cerevisiae* και την *C.albicans* (Εικόνα 3.7, 3.8). Άρα πιθανότατα τα στελέχη αυτά δεν βιοσυνθέτουν D-έρυθρο-ασκορβικό οξύ. Επιπλέον το προϊόν του *aloA* είναι μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη (Εικόνα 3.9) όπως τα προϊόντα του *ALO1*. Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τη φυσιολογικής λειτουργίας της πρωτεΐνης *AloA*, θα πραγματοποιηθεί μελλοντικά υπερέκφραση και ο έλεγχος συνεντοπισμού της.

#### 4.5 Χρήση του *aloAD* ως εργαλείο για την αναγνώριση των μεταλλαγμένων μορφών του UapA που μεταφέρουν ασκορβικό

Μελλοντικά θα κατασκευαστεί στέλεχος χωρίς την ικανότητα βιοσύνθεσης D-έρυθρο ασκορβικού και χωρίς τους 3 μεταφορείς του *A. nidulans*, UapA, UapC και AzgA, ώστε να εισαχθούν σε αυτό οι μεταλλαγμένες μορφές του UapA και να ελεγχθεί αν τα στελέχη αυτά είναι ανθεκτικά σε οξειδωτικούς παράγοντες παρουσία ασκορβικού οξέος. Η διαδικασία αυτή είναι μια έμμεση απόδειξη της μεταφοράς ασκορβικού από τις μεταλλαγμένες μορφές του UapA.



## Βιβλιογραφία

1. Pontecorvo, G., Roper, J. A., Chemmons, L. M., Macdonald, K. D. & Bufton, A. W. J. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**, 141–238 (1953).
2. Casselton, L. & Zolan, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 683–697 (2002).
3. Gournas, C., Papageorgiou, I. & Diallinas, G. The nucleobase–ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure–function relationships and physiological role. *Mol. Biosyst.* **4**, 404 (2008).
4. Alguel, Y. *et al.* Structure of eukaryotic purine/H<sup>+</sup> symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nat. Commun.* **7**, 11336 (2016).
5. Figueroa-Méndez, R. & Rivas-Arancibia, S. Vitamin C in health and disease: Its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Front. Physiol.* **6**, 1–11 (2015).
6. Linster, C. L. & Van Schaftingen, E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.* **274**, 1–22 (2007).
7. A, F., Wagner, G. & Yang, J. C. Biosynthesis and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **258**, 7–23 (1975).
8. Huh, W. K. *et al.* D-erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **30**, 895–903 (1998).
9. Huh, W., Kim, S., Kim, H. & Jeong, G. Deficiency of D -Erythroascorbic Acid Attenuates Hyphal Growth and Virulence of *Candida albicans*. *Society* **69**, 3939–3946 (2001).
10. Shao, Y., Seib, P. a, Kramer, K. J. & Galen, D. a Van. Synthesis and Properties of D-Erythroascorbic Acid and Its Vitamin C Activity in the Tobacco Hornworm ( *Manduca sexta* ). *J. Agric. Food Chem.* 1391–1396 (1993). doi:10.1021/jf00033a009
11. Todd, R. B., Davis, M. A. & Hynes, M. J. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat. Protoc.* **2**, 811–821 (2007).
12. Gournas, C., Amillis, S., Vlanti, A. & Diallinas, G. Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol. Microbiol.* **75**, 246–260 (2010).