***ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ 2021-2022***

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ - ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΑΡΘΡΩΝ**

1. **Άσκηση 1**
	1. **Μεταλλαγές -Φαινότυποι** **στον *Aspergillus nidulans* : ένα εξαιρετικό γενετικό εργαλείο βασικής έρευνας**
	2. **Γενετική διασταύρωση στον *A. nidulans* - Βασικές αρχές ανάλυσης φαινοτύπων σε πρότυπους ασκομύκητες**

**(*Βήμα Ι: δημιουργία ετεροκάρυου*)**

* 1. **Καλλιέργεια στελέχους για πείραμα γενετικής επιλογή (*genetic screening*) κατασταλτικών μεταλλαγών** **στον *A. nidulans***
1. **Άσκηση 2**
	1. **Ανάλυση γενετικής διασταύρωσης**

**(*Βήμα ΙΙ: απομόνωση κλειστοθηκίων και καλλιέργεια ασκοσπορίων*)**

* 1. **Σχεδιασμός και εκτέλεση πειράματος για την γενετική επιλογή κατασταλτικών μεταλλαγών στον *A. nidulans.***
1. **Άσκηση 3**

**3.1` Ανάλυση γενετικής διασταύρωσης**

 **(*Βήμα ΙΙΙ: Φαινοτυπική ανάλυση απογόνων*)**

**3.2 Καθαρισμός και φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων στελεχών**

1. **Άσκηση 4**

**4.1 Κυτταρική Μικροβιολογία-Μελέτη πρωτεϊνικής δυναμικής διακίνησης μέσω Μικροσκοπίας φθορισμού σε ζωντανά κύτταρα (*in vivo*)**

 **(*Παρακολούθηση της υποκυτταρικής τοπολογίας του μεταφορέα UapA****-****φυσιολογικού και μεταλλαγμένων μορφών*)**

**4.2 Καταγραφή της ανάλυση γενετικής διασταύρωσης**

**(Ασκήσεις 1-4: 30% στην τελική βαθμολογία)**

1. **Άσκηση 5 (εργασία από το σπίτι)**

**Αποκωδικοποίηση αλληλουχιών πρωτεϊνών & και δομικες αναλυσεις *in silico***

**(10% στην τελική βαθμολογία)**

1. **Άσκηση 6 (εργασία από το σπίτι)**

**Ανάλυση-παρουσίαση επιλεγμένων επιστημονικών άρθρων (20 min)-προαιρετικό –εναλλακτικά προφορική εξέταση (10 min)**

**(50% στην τελική βαθμολογία)**

**Υπόλοιπο βαθμολογίας 10% από την ενεργή συμμετοχή στις διαλέξεις μου Βασικές αρχές ανάλυσης φαινοτύπων σε πρότυπους μύκητες**

**Εισαγωγή: Ο *Aspergillus nidulans* ως πρότυπο γενετικό ευκαρυωτικό σύστημα**

Ο *A. nidulans* είναι ένας απλός ευκαρυωτικός οργανισμός. Είναι μη-παθογόνος νηματοειδής μύκητας, εύκολος στη χρήση γενετικών, βιοχημικών και μοριακών τεχνικών. Ουσιώδεις γενετικές αναλύσεις (φυλετικές και μη φυλετικές) έχουν αναπτυχθεί από το 1950. Γενετικός μετασχηματισμός, εξειδικευμένη αντικατάσταση γονιδίων, πλασμίδια ενσωμάτωσης και αναδιπλασιασμού, και μελέτες κινητικής της διαμεμβρανικής μεταφοράς ουσιών αναπτύχθηκαν στις δεκαετίες του 80 και 90. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδιώματος του *A. nidulans* (2,7x107 bp, περίπου 9.500 γονίδια) έχει ολοκληρωθεί από το 2006 γεγονός που επιτρέπει την ταυτοποίηση ομόλογων γονιδίων με γνωστή λειτουργία που παρουσιάζουν επιστημονικό ενδιαφέρον. Όπως όλοι οι μύκητες του εδάφους, ο *A. nidulans* διαθέτει ένα εξαιρετικό μεταβολικό ρεπερτόριο.Αναπτύσσεται παρουσία μεγάλης ποικιλίας θρεπτικών ουσιών τις οποίες μπορεί να τις χρησιμοποιήσει ως πηγές αζώτου και/ή άνθρακα.

Εξαιρετικές δυνατότητες γενετικής και αναπτυξιακής ανάλυσης προσφέρει ο κύκλος ζωής του, ο οποίος μπορεί να είναι φυλετικός, αφυλετικός, ή παραφυλετικός (**Εικόνα 1**). Στον αφυλετικό κύκλο του *A. nidulans* ένα απλοειδές κονιδιοσπόριο διογκώνεται και εκβλαστάνει, ο βλαστικός σωλήνας επιμηκύνεται για να δημιουργήσει το πρώτο τμήμα του μυκηλίου, μέσα στο οποίο ο πυρήνας του κονιδιοσπορίου κινείται και διαιρείται μιτωτικά, για να δημιουργήσει τελικά το πολυπύρηνο μυκήλιο. Το μυκήλιο είναι ένα δίκτυο συνδεόμενων τμημάτων (*υφές*), όπου το κάθε τμήμα περιέχει πολλούς πυρήνες. Το μυκήλιο με τη σειρά του, διαφοροποιείται σε αέριες υφές και κονιδιοφορείς, όπου αναπτύσσονται οι αλυσίδες κονιδιοσπορίων (βλ. ένθεση δεξιά).. Τα κονιδιοσπόρια χαρακτηρίζονται ως αδρανή και παρουσιάζουν πολύ χαμηλά επίπεδα μεταβολισμού.



***Εικόνα 1: Εγγενής και αγενής κύκλος ζωής Aspergillus nidulan***

Η αδρανής φάση των κονιδιοσπορίων διακόπτεται, όταν το περιβάλλον του μύκητα είναι ενυδατωμένο και αποκτά ιδιότητες ιδανικές για περαιτέρω ανάπτυξη όταν υπάρχει πηγή αζώτου και άνθρακα, με αποτέλεσμα τη γρήγορη διόγκωσή τους, τον επαναπροσδιορισμό της οργάνωσης του πυρήνα, την εμφάνιση της πρώιμης βλαστητικής υφής και τελικά το σχηματισμό της ώριμης υφής (*μυκήλιο*). Η διαδικασία αυτή της εκβλάστησης των κονιδιοσπορίων μπορεί να διαιρεθεί σε τρία στάδια: την ισοτροπική φάση ανάπτυξης (*Isotropic growth phase*) όπου αρκεί η ενυδάτωση των σποριών, τη φάση καθιέρωσης της πολικότητας του κυττάρου (*Polarity establishment*) και τη φάση διατήρησης της πολικότητας (*Polarity maintenance*).

Η ισοτροπική φάση ανάπτυξης περιλαμβάνει τη διόγκωση των σπορίων, την αποσυσπείρωση της χρωματίνης του πυρήνα, καθώς και μια σειρά αλλαγών στις επιφανειοδραστικές ιδιότητες στην περιφέρεια του κυττάρου, που αντικατοπτρίζονται με αυξημένη τάση προσκόλλησης των σπορίων σε υγρή καλλιέργεια. Στα πρωταρχικά στάδια αυτής της φάσης (20 min), με την παρουσία και μόνο νερού, ενεργοποιείται αναπτυξιακά μια σειρά μεταβολικών μονοπατιών, όπως η αναπνοή, και αρκετά αργότερα (2-4 ώρες) θα ακολουθήσει η βασική βιοσύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων και η παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων. Η υδρόλυση τρεχαλόζης παίζει κομβικό ρόλο στη ενεργοποίηση των κονιδιοσπορίων μέσω του οσμορυθμιστικού ρόλου της. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι κατά ισοτροπική φάση ανάπτυξης του *A. nidulans,* ανεξαρτήτως τι εμπεριέχει το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, ενεργοποιείται η έκφραση διαμεμβρανικών ***μεταφορέων*** (***transporters***) της πλασματικής μεμβράνης για την άμεση πρόσληψη ουσιών/μεταβολιτών/θρεπτικών, όπως οι νουκλεοτιδικές βάσεις, τα αμινοξέα, τα νιτρικά και αμμωνιακά ιόντα, κτλ. Η έκφραση των μεταφορέων αυτών είναι μηδενική στην αδρανή φάση των σπορίων, ενώ στη φάση του πλήρως αναπτυγμένου μυκηλίου διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα, εκτός εάν στο θρεπτικό υπάρχουν υποστρώματα του μεταφορά (φαινόμενο ***επαγωγή****ς*). Μετά την έκφραση των μεταφορέων ακολουθεί η έκφραση των σχετικών ενζύμων για τις ουσίες που προσλαμβάνονται.

Κατά το φυλετικό κύκλο του *A. nidulans*, ο οποίος συνήθως γίνεται σε συνθήκες στρες, ένα ζεύγος πυρήνων διαιρείται μειωτικά και σε συγχρονισμό. Αρχικά δύο απλοειδείς πυρήνες του μυκηλίου έρχονται σε σύντηξη και ο διπλοειδής πυρήνας που παράγεται υπόκειται σε μείωση και επακολουθούν δυο μιτώσεις, που οδηγούν στη δημιουργία οχτώ απλοειδών *ασκοσπορίων* (*ascospores*) εντός ενός ασκού (ascus). Στη διαδικασία της μείωσης μπορεί να γίνει εκτεταμένος γονιδιωματικός ανασυνδυασμός. Η δημιουργία ασκών πραγματοποιείται κλωνικά ώστε να δημιουργηθεί τελικά ένα καρποφόρο σώμα, το κλειστοθήκιο, μέσα στο οποίο εμπερικλείονται εκατοντάδες *ασκοί* (~104 ασκοσπόρια). Τα ασκοσπόρια απελευθερώνονται με τη ρήξη του κλειστοθηκείου. Ο φυλετικός κύκλος σε ένα στέλεχος θεωρείται ως φαινόμενο ***αυτογονιμοποίησης*** (***selfing***).

Όταν δυο διαφορετικά στελέχη έρθουν σε επαφή, οι υφές που συντήκονται (*αναστόμωση*) δημιουργούν ένα ***ετεροκάρυο***. Το ετεροκάρυο δεν είναι σταθερό, αλλά σε συνθήκες πίεσης, π.χ. όταν έχουμε διαφορετικές αυξοτροφίες για κάθε στέλεχος, η ισορροπημένη αναλογία των δύο διαφορετικών πυρήνων και η διατήρηση του ετεροκάρυου είναι δυνατή. Αν ακολουθήσει ένας φυλετικός κύκλος στο ετεροκάρυο, θα προκύψουν νέα στελέχη λόγω γενετικών ανασυνδυασμών. Ο φυλετικός κύκλος που πραγματοποιείται σε ετεροκάρυο μέσω σύντηξης διαφορετικών γονικών πυρήνων θεωρείται φαινόμενο ***ετερογονιμοποίησης*** η απλώς ***διασταύρωσης*** (***crossing***).

Στον *A. nidulans* υπάρχουν εκατοντάδες διαθέσιμα στελέχη με μεταλλαγές σε γονίδια, τα οποία εμπλέκονται σε βιοσυνθετικά και καταβολικά μονοπάτια. Τα στελέχη που αδυνατούν να βιοσυνθέσουν συγκεκριμένους μεταβολίτες, όπως οι βιταμίνες, τα αμινοξέα και οι νουκλεοτιδικές βάσεις (***αυξότροφα***), χρησιμεύουν ως στελέχη «υποδοχής» πλασμιδίων σε πειράματα γενετικού μετασχηματισμού. Σε αυτά τα πειράματα πλασμίδια φέρουν ως *γονιδιακό μάρτυρα επιλογής* μετασχηματισμένων στελεχών τα γονίδια τα οποία στα «απουσιάζουν» στα αυξότροφα στελέχη (π.χ. στέλεχος  *argB-* μετασχηματίζεται με πλασμίδια που φέρει το *argB+* ώστε να επιλεχθούν μόνο τα μετασχηματισμένα στελέχη απουσία *αργινίνης* στο θρεπτικό-βλέπε σημειώσεις μαθήματος). Τα περισσότερα πλασμίδια μετασχηματισμού στον *A. nidulans* είναι πλασμίδια ενσωμάτωσης (*ομόλογης* ή *ετερόλογης*, *απλής η πολλαπλής*- βλέπε σημειώσεις μαθήματος). Τα ενσωματωμένα στο γονιδίωμα του *A. nidulans* πλασμίδια μπορούν επίσης να «διασωθούν» είτε μέσω PCR είτε μέσω μετασχηματισμού στην *E. coli.* Στην δεύτερη περίπτωση η διαδικασία διάσωσης βασίζεται στην ιδιότητα του *A. nidulans* να *αποβάλλει* πλασμίδια ενσωματωμένα στο γονιδίωμα του κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Η αποβολή του πλασμίδιο είναι αποτέλεσμα του ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ δυο διαδοχικών αντιγράφων του προς μελέτη γονιδίου, που βρίσκονται ενσωματωμένα διαδοχικά στο γονιδίωμα του μύκητα και οδηγεί στην αποβολή του ενός από τα δύο αντίγραφα φερόμενο στο πλασμίδιο.

**Για περισσότερα για τον *A. nidulans* δείτε στο e-class articles 1-5**

**Πειραματικό μέρος Άσκησης 1**

* 1. **Μεταλλαγές--Φαινότυποι στον *Aspergillus nidulans*:**

**Ένα εξαιρετικό γενετικό εργαλείο βασικής έρευνας**

**Σκοπός της άσκησης**. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα του *Α.nidulans* (και άλλων ασκομυκήτων) είναι ότι μεταλλαγές αντανακλώνται σε πολλούς και διαφορετικούς φαινοτύπους αποικιών που αναπτύσσονται σε διαφορετικά θρεπτικά. Με την άσκηση θα δούμε φαινοτύπους μεταλλαγών ***καταβολισμού, αναβολισμού, ανάπτυξης, αύξησης*** ή σχετική με την ***δράση φαρμάκων*** και θα συζητήσουμε αν μια μεταλλαγή φαίνεται να είναι ***ολικής η μερικής απώλειας λειτουργίας η τροποποίησης υπάρχουσας*** λειτουργίας (οι έννοιες αυτές θα συζητηθούν και στο μάθημα).

***Φαινότυποι A. nidulans σχετικοί με:***

**Χρήση πηγών C & N**

**Θρεπτικά**: α) ΜΜ+ αμμωνιακά, β) ΜΜ+νιτρικά, γ) ΜΜ+ ουρικό οξύ, δ) ΜΜF +αμμωνιακά

**Στελέχη *Α. nidulans*:** *pabαA1, Δ3 pabaA1, Δ7 pabaA1*

Κάθε ομάδα εμβολιάζει 4 τρυβλία από τα α-δ, και με τα τρία στελέχη

**13 MM/NH4+, 13 MM/NO3-, 13 MM/UA, 13 MMF/ NH4+**

ΜΜ =ελάχιστο θρεπτικό με γλυκόζη, CM=πλήρες θρεπτικό, UA: ουρικό οξύ, ΜΜF: ελάχιστο θρεπτικό με φρουκτόζη

Δ3 & Δ7 = στελέχη με 3 ή 7 απενεργοποιημένους μεταφορείς πουρινών και σχετικών μεταβολιτών\* (*θα συζητηθεί στην άσκηση*)

**Αυξοτροφίες**

**Θρεπτικά**: α) MM/ΝΗ4+ + riboflavin, paba, β) MM/ΝΗ4+ + riboflavin, pantothenate, γ) MM/ΝΗ4+ + pantothenate, paba, δ) MM/ΝΗ4+ + riboflavin, pantothenate, paba

**Στελέχη *Α. nidulans*:** *pabaA1, riboB2, pantoB100*

Κάθε ομάδα εμβολιάζει 4 τρυβλία από τα α-δ, και με τα τρία στελέχη

13 MM/NH4+paba/ribo, 13 MM/NH4+paba/panto,

13 MM/NH4+panto/ribo, 13 MM/NH4+paba/ribo/panto

**Τοξικά ανάλογα μεταβολιτών-αντιμυκητιακά**

**Θρεπτικά**: MM/ΝO3- + 5-FC

**Στελέχη *Α. nidulans*:** *pabA1, Δ7 pabaA1*

Κάθε ομάδα εμβολιάζει 1 τρυβλίο και με τα δυο στελέχη

13 τρυβλία: ΜΜ/ΝO3/5-FC

 5-FC : φθορο-κυτοσίνη

**Μορφολογικές μεταλλαγές & Επιρροή θερμοκρασίας**

**Θρεπτικά: CM (**πλήρες θρεπτικό)

**Μεταλλαγμένα στελέχη *Α. nidulans*: *Δap2, hulAΔC2, Δerg5, sedVts, pabA1 \****

Κάθε ομάδα εμβολιάζει 1 τρυβλίο CM με τα 5 στελέχη.

13 τρυβλία CM

Ανά 4 ομάδες επωάζουν σε: 18, 25, 37 ή 42 oC

*\*Θα συζητήσουμε τι είναι οι σχετικές μεταλλαγές*

**1.2 Γενετική διασταύρωση στον *A. nidulans* - Βασικές αρχές ανάλυσης φαινοτύπων σε πρότυπους μύκητες**

**(Βήμα Ι: δημιουργία ετεροκάρυου)**

Θα διασταυρώσουμε στελέχη *A. nidulans* με εμβολιασμό σε CM, σε απόσταση 1 cm, των δυο γονικών στελεχών με ***συμπληρωματικές αυξοτροφίες*** (απαραίτητο για την επιλογή αργότερα διασταυρωμένων κλειστοθήκιων). Την επόμενη Δεύτερα θα περάσετε από το εργαστήριο να μεταφέρετε το σημείο όπου έχουν δημιουργηθεί ετεροκαρυωτικές υφές σε νέο τρυβλίο χωρίς καμιά από τις αυξοτροφίες απαραίτητες για την επιβίωση των γονέων. Έτσι θα *επιλέξετε/εμπλουτίσετε* το ***ετεροκάρυο.*** Σε αυτό, μετά από 3 μέρες, θα του «στερήσουμε» τον αέρα (κάλυψη με διάφανη μεμβράνη) ώστε να του δημιουργήσουμε στρες, το οποίο επάγει την ***σεξουαλική διαφοροποίηση,*** ***σύντηξη 2 πυρήνων***, και την ανάπτυξη 8 ***ασκοσπορίων*** μέσω **μείωσης** και 2 *μιτώσεων* σε ***ασκούς,*** οι όποιοι εσωκλείονται σε ***κλειστοθήκια*** (ορατές μαύρες σφαίρες πάνω στο μυκήλιο) . Αυτό χρειάζεται 10-14 ημέρες.

**Θρεπτικά: CM & ΝΟ3**

**Στελέχη *Α. nidulans*:**

*yA2 riboB2 x wA pantoB10 uaY462C*

*Δ3 pabaA1 x pantoB100 yA2*

Κάθε ομάδα εμβολιάζει μια από τις 2 διασταυρώσεις

13 CM τρυβλία

13 ΜΜ/ΝO3 (για το ετεροκάρυο)

**1.3 Καλλιέργεια στελέχους για το πείραμα γενετική επιλογή (*genetic screening*) κατασταλτικών μεταλλαγών στον *A. nidulans***

Εμβολιάζουμε ένα τρυβλίο CM (πλήρες θρεπτικό) ανά ομάδα με **ένα** από τα στελέχη σε 4 συμμετρικά σημεία:

1. *Δ7::gpdp-FurE-W473Α-GFP pabaA1* ομάδες 1-6
2. *Δ7::UapA-GLI-GFP pabaA1* ομάδες 7-13

Δ7: στέλεχος με ολική γενετική διαγραφή 7 γονίδιων που κωδικοποιούν τους βασικούς μεταφορείς σχετικών με πρόσληψη νουκλεοτιδικών βάσεων, παραγόντων τους και χημικών ανάλογων τους

***gpdp-*FurE-W473Α**: Υπερεκφρασμένη αλλά ανενεργή λόγω εγκλωβισμού στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ), μορφή του μεταφορέα πρόσληψής *αλλαντοΐνης-ουρικού-ουρακίλης* FurE. Η μεταλλαγή βρίσκεται στο διαμεμβρανικό τμήμα TMS12 (προς την εξωκυτταρικό μέρος) του μεταφορέα.

**UapA-GLI**: Μεταλλαγμένη, μερικώς ανενεργή λόγω σημαντικού εγκλωβισμού στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ), μορφή του κύριου μεταφορέα πρόσληψής *ουρικού-ξανθίνης* UapA. Η μεταλλαγή βρίσκεται στο αμινοτελικό κυτταροπλασματικό άκρο του μεταφορέα.

**UapA-GFP**: Σημασμένος με GFP μεταφορέας UapA

**Πειραματικό μέρος Άσκησης 2**

**2.1 Ανάλυση γενετικής διασταύρωσης**

**(Βήμα ΙΙ: απομόνωση κλειστοθηκίων και καλλιέργεια ασκοσπορίων)**

* 13 τρυβλία ΜΜS για καθαρισμό κλειστοθηκίων
* 13 τρυβλία ΜΜ/NH4 για εύρεση *διασταυρωμένων* κλειστοθηκίων

Θα σημειώσετε την διαδικασία μετά που θα την κάνετε παρουσία μου και των βοηθών της άσκησης

**2.2 Σχεδιασμός και εκτέλεση πειράματος για την γενετική επιλογή (*genetic screening*) κατασταλτικών μεταλλαγών στον *A. nidulans*.**

Σκοπός μας είναι η απομόνωση κατασταλτικών μεταλλαγών που

1. Αναπτύσσονται σε αλλαντοΐνη, για το *Δ7::gpd-FurE-* *W473Α-GFP* ομάδες 1-6

2. Αναπτύσσονται σε ουρικό, για το *Δ7::UapA-GLI-GFP* ομάδες 7-13

Θα συλλέξετε και θα χειριστείτε τα σπόρια των στελέχους που έχετε εμβολιάσει όπως θα σας δείξουμε.

θα προβείτε σε U.V. μεταλλαξιγένεση 4 min και επιλογή στελεχών σε ΜΜ θρεπτικό με αλλαντοΐνη (Δ7::gpd-FurE-Y484S ) ή ουρικό (Δ7::UapA-Y47S) ως πηγή αζώτου.

**Τμήμα Γ**: θα προβείτε σε άμεσο εμβολιασμό θρεπτικού που επιτρέπει την επιλογή συμβάντων μετάθεσης του *Minos\** *και* πρόσδωσης ανθεκτικότητας σε ουρικό οξύ ( MM/ΝO3- + 4xUA)\*\*.

Όλα τα τρυβλία επωάζονται 7 μέρες σε 37 o C.

Uέλουμε να απομονώσουμε μεταλλαγές που ***απεγκλωβίζουν*** τους μεταλλαγμένους μεταφορείς FurE-W473Α-GFP ή UapA-GLI-GFP από το Ε.Δ. Με βάση αυτά που θα ειπωθούν στην άσκηση και στο μάθημα εσείς πρέπει να αναπτύξετε υποθέσεις ως προς την φύση των πιθανών μεταλλαγών που ίσως απομονωθούν.

Θα σημειώσετε την διαδικασία μετά που θα την κάνετε παρουσία μου και των βοηθών της άσκησης. Με βάση τα αποτελέσματα σας και αυτά που θα ειπωθούν στην άσκηση και στο μάθημα θα αναπτύξετε συζήτηση, υποθέσεις και συμπεράσματα ως προς την φύση των πιθανών μεταλλαγών που ίσως προκύψουν (βλ. μάθημα – κατασταλτικές μεταλλαγές).

**Πειραματικό μέρος Άσκησης 3**

**3.1` Ανάλυση γενετικής διασταύρωσης**

 **(Βήμα ΙΙΙ: Φαινοτυπική ανάλυση απογόνων)**

Θα σημειώσετε την διαδικασία μετά που θα την κάνετε παρουσία μου και των βοηθών της άσκησης. Σχολιάστε το αποτέλεσμα σας.

* 1. **Καθαρισμός και φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων στελεχών**

Θα προβείτε σε καθαρισμό πιθανών μεταλλαγμένων στελεχών μέσω αντιαλλεργικές στο επιλεκτικό θρεπτικό που έχετε χρησιμοποιήσει και αρχικά.

Θα σημειώσετε την διαδικασία μετά που θα την κάνετε παρουσία μου και των βοηθών της άσκησης. Σχολιάστε το αποτέλεσμα σας.

**Πειραματικό μέρος Άσκησης 4**

**Κυτταρική Μικροβιολογία-Μελέτη πρωτεϊνικής δυναμικής διακίνησης μέσω Μικροσκοπίας φθορισμού *In vivo***

**Παρακολούθηση της υποκυτταρικής τοπολογίας του μεταφορέα UapA (φυσιολογικού και μεταλλαγμένων μορφών)**

**Εισαγωγή**

Πολύ λίγα είναι γνωστά για την κυτταρική βιολογία και κυρίως την βιογένεση και αποδόμηση των μεταφορικών πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα όπου υφίσταται η πρόκληση της πρωτεϊνικής μεμβρανικής διακίνησης και στόχευσης (*cargo membrane traffic* and *targeting*). Αυτό οφείλεται κυρίως στη δυσκολία εντοπισμού και απομόνωσής τους, λόγω της υδρόφοβης φύσης των μεταφορέων και της θέσης τους στη μεμβράνη. Επιπλέον, τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών, σε συνδυασμό με τη μικρή σχετικά αφθονία τους στη μεμβράνη (δεν πρέπει να ξεπερνάει το 0.01%), καθιστά δύσκολη την εφαρμογή κλασσικών μεθόδων ανοσοφθορισμού και ανοσοκατακρήμνισης. Οι περισσότερες μελέτες ανοσολογικού εντοπισμού έχουν περιγραφεί σε μεμβρανικές πρωτεΐνες της ζύμης και βασίζονται στην υπερέκφραση του προς μελέτη μεμβρανικού μεταφορέα.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (*GFP*) (αλλά και άλλων φθοριζουσών πρωτεϊνών, RFP, YFP, BFP, κτλ) αποδείχθηκε εξαιρετικά επωφελής για τη μελέτη της κυτταρικής έκφρασης πρωτεϊνών, και για τον προσδιορισμό *cis* και *trans* στοιχείων που εμπλέκονται σε διαδικασίες, όπως η μεταφορά και η τοπογένεση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Εκτός από τη μεγαλύτερη ευαισθησία που συχνά έχει, συγκρινόμενη με τον ανοσοεντοπισμό, η τεχνολογία της GFP έχει το εξαιρετικό πλεονέκτημα του *in vivo* εντοπισμού.

Η GFP έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μελέτη της έκφρασης, υποκυτταρικής διακίνησης, τοπογένεσης και ρυθμιζόμενής αποδόμησης διαμεμβρανικών μεταφορέων του *A. nidulans*. Ως γονίδιο αναφοράς για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των διαμεμβρανικών μεταφορέων σε ζωντανά κύτταρα μυκήτων *in vivo*,χρησιμοποιούμε μία ενεργοποιημένη εκδοχή του γονιδίου *gfp* (*sgfp*), η οποία είχε δειχθεί ότι είναι ιδιαιτέρως λειτουργική στον *A. nidulans.* Σε όλες τις περιπτώσεις δημιουργούνται χιμαιρικές πρωτεΐνες ***μεταφορέας-GFP,*** οι οποίες εκφράζονται μέσω του *ενδογενούς* ή ενός *ισχυρού και ρυθμιζόμενου* υποκινητή. Για να γίνει αυτό πρώτα κατασκευάζονται, μέσω γενετικής μηχανικής, τα αντίστοιχα χιμαιρικά γονίδια. Η ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της GFP συγχωνεύεται, σχεδόν πάντα, στο καρβοξυτελικό άκρο του γονίδιου κάθε μεταφορέα με τέτοιο τρόπο ώστε *μεταφράζεται* ενιαία η χιμαιρική πρωτεΐνη μεταφορέας-GFP (απουσία κωδικόνιου stop). Έχει διαπιστωθεί ότι το μήκος των συνδετικών αμινοξέων μεταφορέας-GFP στην χιμαιρική πρωτεΐνη είναι συχνά σημαντικό για την λειτουργική έκφραση και τοπογένεση των χιμαιρικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη, αλλά και για τον φθορισμό της GFP. Τα χιμαιρικά μόρια με 0, 2 ή 4 συνδετικά αμινοξέα είναι συχνά λειτουργικά. Το χιμαιρικό γονίδιο *μεταφορέας-gfp* ενσωματώνεται στο φυσιολογικό γενετικό τόπο με αμοιβαία αντικατάσταση, κατόπιν γενετικού μετασχηματισμού του *A. nidulans* με γραμμικές DNA “κασέτες”, ή μέσω εκτοπικά ενσωματωμένων στο γονιδίωμα πλασμιδίων που φέρουν το χιμαιρικό γονίδιο (βλ. μάθημα), πάντα σε στέλεχος του οποίου «σχετικοί» ενδογενείς μεταφορείς είναι απενεργοποιημένοι. (*γιατί;)*

Η έκφραση χιμαιρικών μεταφορέων-GFP επιτρέπει τη μελέτη όχι μόνο των μεταφορέων «φυσικού τύπου», αλλά και μιας πληθώρας διαθέσιμων μεταλλαγμένων μορφών τους, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των μεταλλαγών που επηρεάζουν την υποκυτταρική διακίνηση, σταθερότητα, στόχευση και αποδόμηση των μεταφορέων, από αυτές που επηρεάζουν αποκλειστικά την ενεργότατα και την κινητική των μεταφορέων αυτή καθαυτή.

Παρακαλώ να μελετηθούν τα άρθρα από το e-class (articles 8-12):

* Dimou S, Diallinas G. Life and Death of Fungal Transporters under the Challenge of Polarity. Int J Mol Sci. 2020 Jul 29;21(15):5376. :
* Diallinas G, Martzoukou O. Transporter membrane traffic and function: lessons from a mould. FEBS J. 2019 Dec;286(24):4861-4875.
* Dimou S, Martzoukou O, Dionysopoulou M, Bouris V, Amillis S, Diallinas G. Translocation of nutrient transporters to cell membrane via Golgi bypass in Aspergillus nidulans. EMBO Rep. 2020 Jul 3;21(7):e49929.
* Martzoukou O, Karachaliou M, Yalelis V, Leung J, Byrne B, Amillis S, Diallinas G. Oligomerization of the UapA Purine Transporter Is Critical for ER- Exit, Plasma Membrane Localization and Turnover. J Mol Biol. 2015 Aug 14;427(16):2679-96.
* Martzoukou O, Diallinas G, Amillis S. Secretory Vesicle Polar Sorting, Endosome Recycling and Cytoskeleton Organization Require the AP-1 Complex in Aspergillus nidulans. Genetics. 2018 Aug;209(4):1121-1138.

**Εισαγωγή στην Άσκηση**

Θα μελετήσουμε σε μικροσκόπιο φθορισμού φυσικού τύπου στελέχη & και μεταλλαγμένα στελέχη που εκφράζουν τον μεταφορέα UapA (πρόσληψη ουρικού και ξανθίνης) του *A. nidulans*. Θα πάρετε καλλιέργειες σε τρυβλία κατάλληλα για παρατήρηση σε αντεστραμμένο μικροσκοπίου επιφθορισμού, από:

**Ομάδες 1-6 UapA-GFP** σε νιτρικά, αμμωνιακά ή ουρικό

**Ομάδες 7-11 UapA-GLI-GFP & FurE-W473A-GFP** σε νιτρικά

**Ομαδες 12-13 UapA-GFP σε στελέχη *thiAp-sedV* or *thiAp-GeaA*** σε νιτρικά

**Η μικροσκοπία θα γίνει στο μικροσκόπιο που βρίσκεται στον Τομέα Φυσιολογίας σε ομάδες των 6 ατόμων.**

Σχολιάστε την υποκυτταρική θέση του UapA που παρατηρήσατε (κρατάτε εικόνες από όλα τα αποτελέσματα σας) σε κάθε περίπτωση, και με βάση αυτά που θα ειπωθούν στην άσκηση και στις διαλέξεις θα δώσετε γραπτή αναφορά σε μορφή επιστημονικής έκθεσης με εικόνες και σχόλασμα (1 σελίδα) .

**Πειραματικό μέρος Άσκησης 5**

**Αποκωδικοποίηση αλληλουχιών πρωτεϊνών in silico**

**Θα εξοικειωθούμε με:**

• ΑνάλυσηDNA: εύρεση orfs, εξωνίων, εσωνίων, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

• Ανάλυση Πρωτεϊνών: Πρωτοταγής δομή πρωτεΐνης-ανάλυση, λειτουργικά μοτίβα, μοτίβα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, κτλ. Δευτεροταγής δομή πρωτεΐνης-ανάλυση (α-έλικες, β-πτυχώσεις, κλπ), διαμεμβρανικές περιοχές, δομικά μοτίβα. Τριτοταγής δομή πρωτεΐνης-*homology threading*

• Σύγκριση με άλλες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων (blastp), *multiple sequence alignments*, φυλογενετικές αναλύσεις, κτλ

* Genome annotation

***Σημαντικές ιστοσελίδες για αναλύσεις in silico***

• http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/

• http://www.expasy.ch/

• http://web.expasy.org/translate

• https://www.predictprotein.org/

• http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html

• http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\_form.html

• http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

• http://www.psort.org/psortb/index.html

• https://toolkit.tuebingen.mpg.de/

• <http://www.phylogeny.fr/>

* <http://tcdb.org/>
* http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/

***Genome annotations link***

* http://www.yeastgenome.org/
* http://www.aspgd.org/
* http://www.fgsc.net/
* http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf
* http://fungidb.org/fungidb/
* <https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>

**Άσκηση 2021**

• Τι ενδιαφέρουσες πληροφορίες μπορείτε αν βρείτε *in silico* από τον σχολιασμό της πρωτεΐνης Ykt6 απo την βάση δεδομένων του γονιδιώματος του *S. cerevisiae (Yeast DB);*

•Βρείτε τις πιθανές διαμεμβρανικές περιοχές της πρωτεΐνης AN1154 (*Fungi DB*) του *A. nidulans*. Ποιες από αυτές είναι αμφιφιλικές (α-helical wheel projection);

• Βρείτε 20 πρωτεΐνες ιχθύων που παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα με την πρωτεΐνη UapA του *A. nidulans*. Συγκρίνατε τις αλληλουχίες (*multilalign & esprit*). Παρατηρείτε συντηρημένα μοτίβα; Σχολιάστε.

• Δημιουργήστε ένα φυλογενετικό δέντρο (*phylogeny.fr* η άλλο πρόγραμμα) με τα ομόλογα του Sec31 με αντιπροσώπους από όλα τα βασικά γκρουπ των μεταζώων και δικάρυων. Bρείτε συντηρημένα μοτίβα και σχολιάστε.