

ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ 2025

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ

50% τελικής βαθμολογίας

Άσκηση 1

1.1 Μεταλλαγές - Φαινότυποι στον *Aspergillus nidulans* : ένα εξαιρετικό γενετικό εργαλείο βασικής έρευνας

Άσκηση 2

2.1 Γενετική διασταύρωση στελεχών *Aspergillus nidulans*-

Βήμα I: δημιουργία σταθερού ετεροκάρυου

2.2 Καταγραφή αποτελεσμάτων της άσκησης 1

2.3 Μεταλλαξιγένεση στον *Aspergillus nidulans* μέσω του μεταθετού στοιχείου *Minos*

Άσκηση 3

3.1 Ανάλυση γενετικής διασταύρωσης – Βήμα II: Απομόνωση κλειστοθηκίων και επώαση ασκοσπορίων

3.2 Καταγραφή αποτελεσμάτων της άσκησης 2 και ανακαλλιέργειες μεταλλαγμένων στελεχών

Άσκηση 4

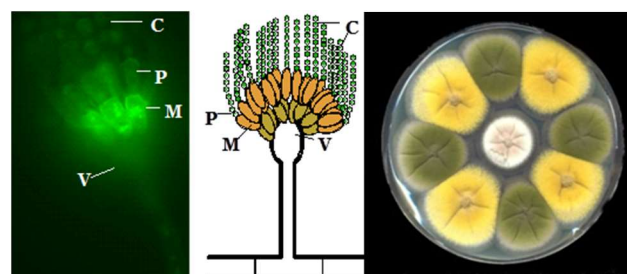
4.1 Κυτταρική Μικροβιολογία-Μελέτη πρωτεϊνικής δυναμικής διακίνησης μέσω Μικροσκοπίας φθορισμού σε ζωντανά κύτταρα (*in vivo*)

4.2 Καταγραφή της ανάλυσης της γενετικής διασταύρωσης-φαινότυποι απογόνων

4.3 Καταγραφή των αποτελεσμάτων ανακαλλιέργειας στελεχών *Minos*

Άσκηση 5 (εργασία από το σπίτι)

Αποκωδικοποίηση αλληλουχιών πρωτεϊνών & και δομικές αναλύσεις *in silico*

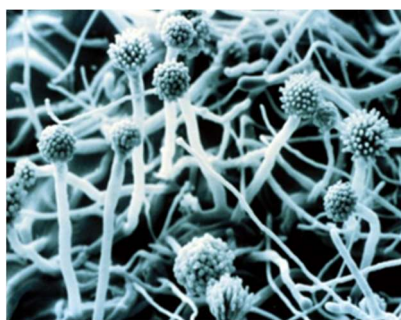


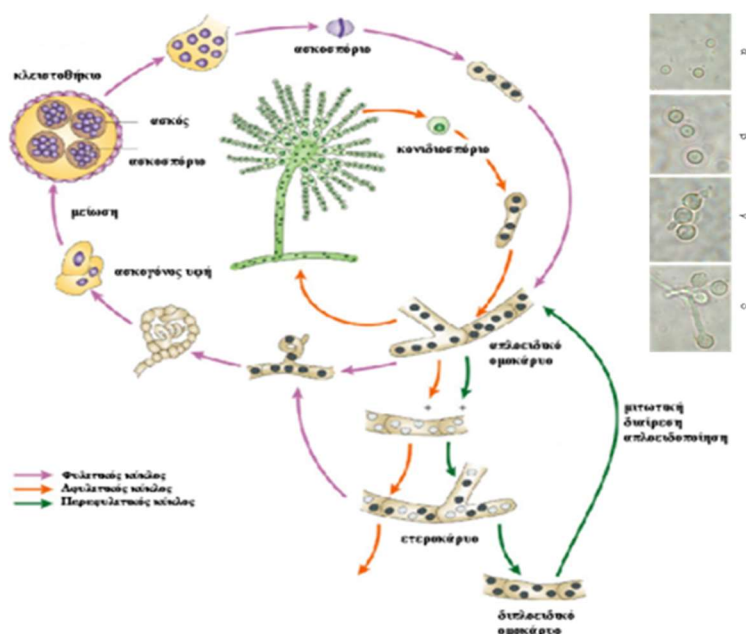
Βασικές αρχές ανάλυσης φαινοτύπων σε πρότυπους μύκητες

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* ($2,7 \times 10^7$ 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 μυκήλιου, μέσα στο οποίο ο πυρήνας του κονιδιοσπορίου κινείται και διαιρείται μιτωτικά, για να δημιουργήσει τελικά το πολυπύρρηνο 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 nidulans*
(Casselton, L., Zolan, M. *Nat Rev Genet* 3, 683–697 (2002). <https://doi.org/10.1038/nrg889>)

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 ιστροπική φάση ανάπτυξης (*Isotropic growth phase*) όπου αρκεί η ενυδάτωση των σπορίων, τη φάση καθιέρωσης της πολικότητας του κυττάρου (*Polarity establishment*) και τη φάση διατήρησης της πολικότητας (*Polarity maintenance*).

Η ιστροπική 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 ιστροπική 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 **επαγωγής**). 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 ($\sim 10^4$ 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 ετεροκαρύου 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**, ή 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* ή *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 πλασμιδίου 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.

Πειραματικό μέρος Άσκησης 1

1.1 Μεταλλαγές--Φαινότυποι στον *Aspergillus nidulans*:

Σκοπός της άσκησης. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα του *A.nidulans* (και άλλων ασκομυκήτων) είναι ότι μεταλλαγές αντανakλώνται 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.

Φαινότυποι *A. nidulans* σχετικοί με:

Χρήση πηγών C & N και pH

Θρεπτικά:

MMG/ NH_4^+ pH 5.0

MMG/ NH_4^+ pH 6.8

MMG/ NH_4^+ pH 8.0

MMG/UA (ουρικό οξύ) pH 6.8

MMF/ NH_4^+ pH 6.8

MMG/ NO_3^- + 5-FUd (τοξικό ανάλογο ουριδίνης) pH 6.8

Στελέχη *A. nidulans*:

(wt) *pabaA1*

$\Delta 1$ *pabaA1* (*uarAΔ*)

$\Delta 2$ *pabaA1* (*uarAΔ*, *azgAΔ*)

$\Delta 3$ *pabaA1* (*uarAΔ*, *uarCΔ*, *azgAΔ*)

$\Delta 6$ *pabaA1* (*uarAΔ*, *uarCΔ*, *azgAΔ*, *fcyBΔ*, *furAΔ*, *furDΔ*)

$\Delta 7$ *pabaA1* (*uarAΔ*, *uarCΔ*, *azgAΔ*, *fcyBΔ*, *furAΔ*, *furDΔ*, *cntAΔ*)

alcA_p-dnfA

palFΔ

MMG: Minimal media + Glucose

MMF: Minimal media + Fructose

uarA, *uarC*: Μεταφορείς ουρικού οξέος/ξανθίνης

azgA, *fcyB*: Μεταφορείς αδενίνης/γουανίνης/υποξανθίνης

furA: Μεταφορέας αλλαντοίνης

furD: Μεταφορέας ουρακίλης/ουριδίνης/ουρικού οξέος

cntA: Μεταφορέας νουκλεοσιδίων/ουριδίνης

palFΔ: α -arrestin

dnfA: φλιπάση φωσφολιπιδίων

alcA_p: (υποκινητής αλκαλικής αφυδρογονάσης, ο οποίος επάγει την έκφραση παρουσία φρουκτόζης και αναστέλεται παρουσία γλυκόζης)

Επώαση MMG και MMF στους 37°C για 72h

Αυξοτροφίες

Θρεπτικά:

MMG/NH₄⁺ + riboflavin (ribo), p-amino-benzoic acid (paba), pH 6.8

MMG/NH₄⁺ + riboflavin (ribo), pantothenic acid (panto), pH 6.8

MMG/NH₄⁺ + pantothenic acid (panto), p-amino-benzoic acid (paba), pH 6.8

Στελέχη *A. nidulans*:

pabaA1

riboB2

pantoB100

Επώαση MMG στους 37°C για 72h

Μορφολογικές μεταλλαγές & Επιρροή θερμοκρασίας

Θρεπτικά:

CM (πλήρες θρεπτικό), pH 6.8

Στελέχη *A. nidulans*:

ar2Δ: Μεταλλαγή ολικής απώλειας της λειτουργίας της σ-υπομονάδας του ar2 adaptor complex

hulAΔC2: Μεταλλαγή μερικής απώλειας λειτουργίας της HECT λιγάσης ουβικουιτίνης *hulA*

sedV^{ts}: Θερμοευαίσθητη μεταλλαγή του t-SNARE *sedV*

Επώαση CM σε θερμοκρασίες 25°C, 37°C και 42°C για 72h

Πειραματικό μέρος Άσκησης 2

2.1 Γενετική διασταύρωση στελεχών *Aspergillus nidulans*-

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.

Θα λάβετε τις εξής διασταυρώσεις *A. nidulans*:

Στελέχη *A. nidulans*:

pabaA1 x *pantoB100* *yA2*

yA: γονίδιο της *p*-diphenol oxidase απαραίτητο για τη σύνθεση πράσινου χρώματος στα κονιδιοσπόρια του *A. nidulans*

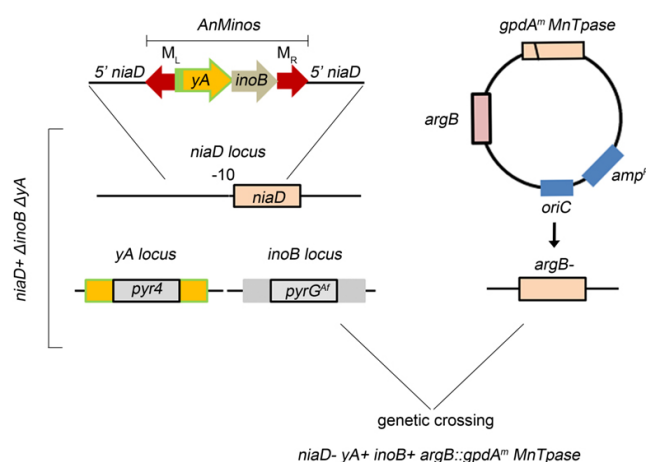
Θρεπτικά:

MMG/NO₃⁻ χωρίς τις αυξοτροφίες pantothenic acid (*panto*), *p*-amino-benzoic acid (*paba*)

2.2 Καταγραφή–ανάλυση των αποτελεσμάτων της άσκησης 1

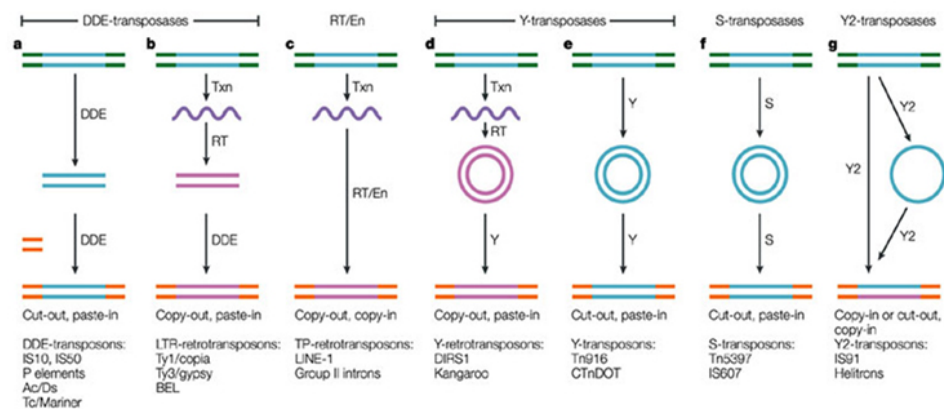
2.3 Μεταλαξιγένεση στον *Aspergillus nidulans* μέσω του μεταθετού στοιχείου *Minos*

- Θα λάβετε ανά ομάδα 1 τρυβλίο του στελέχους *Minos/Trpase yA2*
- Θα απομονώσετε τα κονιδιοσπόρια με σπάτουλα και θα δημιουργήσετε εναιώρημα τους σε στείρες συνθήκες.
- Θα εμβολιάσετε τρυβλία μέσω θρεπτικού tor-agar με σκοπό την επιλογή μεταλλαγών ανθεκτικότητας:
MMG/NO₃⁻ + D-serine (τοξικό ανάλογο σερίνης)
MMG/NO₃⁻ + D-serine + FPA (τοξικό ανάλογο φαινυλαλανίνης)
MMG/NO₃⁻ + D-Serine + FPA + FUd (τοξικό ανάλογο ουριδίνης)
Επώαση MMG για 7 μέρες στους 37°C.
- Ο μηχανισμός του μεταθετού *Minos/Trpase* θα έχει περιγραφεί στο μάθημα (δείτε και παρακάτω)



Transposable elements

a | Most DDE-transposons excise from the flanking DNA to generate an excised linear transposon, which is the substrate for integration into a target (orange). b | Retrotransposons copy-out by reverse-transcribing (RT) a full-length copy of their RNA (purple) that is generated by transcription (Txn). Long-terminal repeat (LTR)-retrotransposons make a full-length cDNA copy (pink represents newly replicated DNA) from their RNA and integrate this into a target using a DDE-transposase. c | TP-retrotransposons use reverse transcriptase (RT) to copy their RNA directly into a target that has been nicked by a transposon-encoded nuclease (En). d | Y-retrotransposons are thought to generate a circular cDNA intermediate by reverse transcription. A Y-transposase integrates the element into the target. e | and f | Y- and S-transposons encode either a tyrosine or serine transposase, which mediates excision of the transposon to form a circular intermediate. A reversal of the catalytic steps results in transposon insertion. g | Y2-transposons 'paste' one strand of the transposon into a target and use it as a template for DNA replication. Two models have been proposed for Y2-transposition. Representatives of each type of transposon are listed below each pathway.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Curcio, M., Derbyshire, K. The outs and ins of transposition: from Mu to Kangaroo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 865–877 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrm1241>

Πειραματικό μέρος Άσκησης 3

3.1 Ανάλυση γενετικής διασταύρωσης – Βήμα II: Απομόνωση κλειστοθηκίων και επώαση ασκοσπορίων

Βήμα II: απομόνωση κλειστοθηκίων και καλλιέργεια ασκοσπορίων

Κάθε ομάδα (2 άτομα) απομονώνει 8 κλειστοθήκια και αναλύει τους απόγονους της διασταύρωσης με εμβολιασμό διασποράς εναιωρήματος ασκοσπορίων σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα.

Θρεπτικά:

MMG/NO₃⁻ χωρίς τις αυξοτροφίες pantothenic acid (panto), p-amino-benzoic acid (paba)

3.2 Καταγραφή των αποτελεσμάτων της μεταλλαξιγένεσης μέσω του μεταθετού στοιχείου *Minos*

Σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταλλαξιγένεσης με το αρχικό στέλεχος σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και σε συνθήκες «επαγωγής» της μετάθεσης του *Minos*. Ανακαλλιέργεια μεταλλαγών που ενδεχομένως να προκύψουν:

Θρεπτικά:

MMG/NO₃⁻

MMG/NO₃⁻ + D-Serine + FPA + FUD

Άσκηση 4 - Εισαγωγή

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

Λίγα είναι γνωστά για την κυτταρική βιολογία και κυρίως την βιογένεση και αποδόμηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα όπου υφίσταται μεμβρανική διακίνηση και στόχευση (*cargo membrane traffic and targeting*). Αυτό οφείλεται κυρίως στη δυσκολία εντοπισμού και απομόνωσής τους, λόγω της υδρόφοβης φύσης 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 κλασικών μεθόδων ανοσοφθορισμού και ανοσοκατακρήμνισης. Οι περισσότερες μελέτες ανοσολογικού εντοπισμού έχουν περιγραφεί σε μεμβρανικές πρωτεΐνες της ζύμης και βασίζονται συχνά στην υπερέκφραση του προς μελέτη μεμβρανικού μεταφορέα, ή άλλης μεμβρανικής πρωτεΐνης.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (*GFP*) (αλλά και άλλων φθορίζουσών 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 ρυθμιζόμενης 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 δείχθει ότι είναι ιδιαιτέρως λειτουργική στον *A. nidulans*. Σε όλες τις περιπτώσεις δημιουργούνται χιμαιρικές πρωτεΐνες μεταφορέα-*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. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της *GFP* συγχωνεύεται, σχεδόν πάντα, στο καρβοξυτελικό ή αμινοτελικό άκρο του γονιδίου με τέτοιο τρόπο ώστε μεταφράζεται ενιαία η χιμαιρική πρωτεΐνη μεταφορέας-*GFP*. 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 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, πάντα σε στέλεχος του οποίου «σχετικοί» ενδογενείς μεταφορείς, ή ένζυμα, 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 ενεργότητα και την κινητική των μεταφορέων αυτή καθαυτή.

Εισαγωγή στο πειραματικό μέρος της Άσκησης

Θα μελετήσουμε σε μικροσκόπιο φθορισμού στελέχη που εκφράζουν τον μεταφορέα UapA του *A. nidulans* σε φυσιολογικές συνθήκες, σε συνθήκες πρόκλησης ενδοκύτωσης και σε συνθήκες πρόκλησης ενδοκύτωσης με ταυτόχρονο απενεργοποίηση της μικρής υπομονάδας της κλαθρίνης, ClaL, μέσω της χρήσης ρυθμιζόμενου υποκινητή (*thiA_p*), αποκρινόμενου στην παρουσία θειαμίνης. Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί υποκυτταρικός εντοπισμός της φλιπάσης φωσφολιπιδίων DnfA και της GTPase RabB^{RAB5} σε φυσιολογικές συνθήκες, καθώς και σε συνθήκες όπου η AP-1^o υπομονάδα (και κατά συνέπεια ολόκληρο το σύμπλοκο AP-1) θα είναι απενεργοποιημένη (*thiA_p*). Θα παραλάβετε καλλιέργειες σε τρυβλία κατάλληλα για παρατήρηση σε ανεστραμμένο μικροσκοπίου επιφθορισμού, από τα:

UapA-GFP σε MMG/NO₃⁻

UapA-GFP σε στέλεχος *thiA_p-claL* σε MMG/NH₄⁺

UapA-GFP σε στέλεχος *thiA_p-claL* σε MMG/NH₄⁺ + θειαμίνη

DnfA-GFP σε στέλεχος *RabB^{RAB5}-mRFP, thiA_p-ap1* σε MMG/NH₄⁺

DnfA-GFP σε στέλεχος *RabB^{RAB5}-mRFP, thiA_p-ap1* σε MMG/NH₄⁺ + θειαμίνη

Καταγραφή και αναλυτικός σχολιασμός των αποτελεσμάτων με βάση τις ψηφιακές φωτογραφίες που θα αποθηκεύσετε και θα βρήτε αναρτημένες στο e-class.

4.2 Καταγραφή της ανάλυση γενετικής διασταύρωσης-φαινότυποι απογόνων

Σχολιάσμός των αποτελεσμάτων.

4.3 Καταγραφή των αποτελεσμάτων ανακαλλιέργειας στελεχών που προέκυψαν από τη μεταλλαξιγένεση μέσω του μεταθετού στοιχείου *Minos*

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων ως προς την πιθανή φύση των μεταλλαγών που ίσως προκύψουν.

Πειραματικό μέρος Άσκησης 5

Αποκωδικοποίηση αλληλουχιών πρωτεϊνών *in silico*

- Ανάλυση DNA: 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

Χρήσιμες ιστοσελίδες για αναλύσεις *in silico*

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <https://www.expasy.org/>
- <https://web.expasy.org/translate/>
- <https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>
- <https://psort.org/>
- <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/>
- <https://www.phylogeny.fr/>
- <https://tcdb.org/>
- <https://www.rcsb.org/>
- <https://www.uniprot.org/>
- <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>
- <https://prosite.expasy.org/scanprosite/>
- <https://www.ebi.ac.uk/>
- <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>
- <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
- <https://www.uniprot.org/align>
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>
- <https://alphafold.ebi.ac.uk/>

Fungal genome annotations links

- <https://www.yeastgenome.org/>
- <https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>
- <https://fungidb.org/fungidb/app>

Άσκηση 2025

- Αναζήτηση με BlastP (πχ. blast.ncbi) στους οργανισμούς *Aspergillus nidulans*, *Fusarium oxysporum*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Ustilago maydis* και σε επιπλέον 10 μύκητες της αρεσκέας σας (mycocosm), καθώς και στον *Homo sapiens*, ομόλογες πρωτεΐνες των κινασών φωσφοινοσιτιδίων **LSB6** και **MSS4** του *Saccharomyces cerevisiae* (yeastgenome.org). Προχωρήστε σε στοίχιση και σύγκριση αλληλουχιών (πχ. multialign, ή άλλο πρόγραμμα). Παρατηρείτε συντηρημένα μοτίβα, ή άλλες διαφορές; Προχωρήστε σε εντοπισμό (πχ scanprosite, alphafold, uniprot, pdb, psort κλπ) συγκεκριμένων domains, ή άλλων χαρακτηριστικών, σε πρόβλεψη υποκυτταρικού εντοπισμού και σε πρόβλεψη δευτεροταγούς/τριτοταγούς δομής και σχολιασμό. Τι επιπλέον πληροφορίες μπορείτε να βρείτε για τις δύο αυτές κινάσες σχετικά με γενετικές και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις απο την βάση δεδομένων του γονιδιώματος του *Saccharomyces cerevisiae*;
- Δημιουργία ενός φυλογενετικού δέντρου (*phylogeny.fr*, ή άλλο πρόγραμμα) με ομόλογα της φωσφατάσης φωσφοινοσιτιδίων **TEP1** του *Saccharomyces cerevisiae* (yeastgenome.org) από αντιπροσώπους της αρεσκέας σας από όλες τις βασικές οικογένειες μυκήτων (mycocosm). Ως outgroup μπορείτε να χρησιμοποιήσετε την ομόλογη πρωτεΐνη στον *Homo sapiens*. Αναζήτηση διαφορών στις αλληλουχίες και σχολιασμός.