

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MULTIDISCIPLINARNE DOKTORSKE STUDIJE

Katarina S. Stevanović

**Dominantne struje ćelijske membrane hifa i  
membrane citoplazmatskih kapi poreklom iz  
sporangiofora gljive *Phycomyces blakesleeanus*.  
Karakterizacija izlazno-ispravljačke  
inaktivirajuće struje citoplazmatskih kapi**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
MULTIDISCIPLINARY DOCTORAL STUDIES

Katarina S. Stevanović

**Dominant currents of cell membrane of hyphae and cytoplasmic droplets from sporangiophore of *Phycomyces blakesleeanus*. Characterisation of outwardly-rectified inactivated current of cytoplasmic droplets**

PhD thesis

Belgrade, 2023.

Mentori:

Dr Miroslav Živić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Nataša Todorović, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije :

Dr Aleksandar Krmpot, naučni savetnik, Institut za Fiziku, Univerzitet u Beogradu

Dr Ljiljana Nikolić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Dr Danijela Bataveljić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Kristina Atlagić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Biološki Fakultet

Datum odbrane \_\_\_\_\_

Eksperimentalni deo doktorske disertacije izveden je na Odseku za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, Laboratoriji za Biofiziku Instituta za Fiziku u Beogradu i Institutu za Fiziologiju i Biohemiju „Ivan Đaja“ Biološkog fakuleta u Beogradu.

Želim da se zahvalim svojim mentorima:

dr Miroslavu Živiću, na inicijalnoj inspiraciji i ohrabrenju da se upustim u istraživačke vode u ovoj oblasti, svim savetima tokom ovih godina i održavanju zdrave, optimistične radne atmosfere;

dr Nataši Todorović, koja me je oblikovala kao istraživača i podstakla na razvijanje kritičkog mišljenja, samostalnosti i radne etike, veliko hvala i na požrtvovanosti i istrajnosti koja svakoga motiviše da ne odustaje kada je najteže.

Tanji Pajić, mojoj najbližoj saradnici i „mentorki“ prvih dana rada u laboratoriji 13 – zahvalna sam za sve što smo zajednički postigle, prebrodivši sve prepreke i međusobne različitosti koje su nas obogatile. Ostatku grupe laboratorije 13, prvenstveno dr Ljilji Nikolić, dr Marini Stanić, Jovani Lukičić i dr Kristini Atlagić – zahvaljujem se na nesebičnoj pomoći i sjajnoj komunikaciji tokom čitave izrade ove disertacije - iako formalno nismo bili isti tim, u 13ici je sve počelo i uvek će za mene biti „prva kuća“.

Duboko sam zahvalna dr Aleksandru Krmpotu sa Insituta za fiziku, na njegovoj bezuslovnoj volji za prenošenjem znanja, na pruženim prilikama, kao i impresivnom nivou energije kojom je održavao moral u teškim periodima.

Dr Danijeli Bataveljić iskreno zahvaljujem na brojnim konstruktivnim savetima tokom mog rada na Biološkom fakultetu, pružanju sveže perspektive i diskusijama koje će svima na „galeriji“ nedostajati po njenom odlasku. Dr Mini Perić i dr Dunji Bijelić takođe zahvaljujem na dobrodošlici pred ubrzo opraštanje, žao mi je što ova insitucija gubi najbolje istraživače.

Dr Mileni Milošević dugujem zahvalnost na nesebičnj pomoći i savetima od perioda izrade mog master rada sve do danas.

Bogdani – mom omiljenom „patch clamper“-u i neiscrpnom izvoru inspiracije, ali i Tamari, Anđeli i Milanu zahvaljujem na (nažalost kratkim) saradnjama i nadam se njihovom obnavljanju u budućnosti.

Roditeljima, bliskim prijateljima (prvenstveno Tamari, Vileni i Tamari), a posebno Milošu - dugujem neizmernu zahvalnost za strpljenje, razumevanje, bezuslovnu podršku i ljubav bez koje nikada ne bih uspela da ostvarim svoje ciljeve.

Srećku, Luni i Gabi – za veliki doprinos emotivnom miru tokom procesa pisanja disertacije.

# **Dominantne struje ćelijske membrane hifa i membrane citoplazmatskih kapi poreklom iz sporangiofora gljive *Phycomyces blakesleeanus*. Karakterizacija izlazno-ispravljačke inaktivirajuće struje citoplazmatskih kapi**

## **Sažetak**

Jonski kanali končastih gljiva su oblast istraživanja koja je jako slabo izučena, iako od ključne važnosti za razumevanje njihove fiziologije. Citoplazmatske kapi (CK) sporangiofora gljive *Phycomyces blakesleeanus* prethodno su uvedene kao model sistem za ispitivanje jonskih struja ćelijske membrane sporangiofora. Dominantna struja citoplazmatskih kapi u hiposmotskim uslovima je izlazno-ispravljačka (rektifikujuća) inaktivirajuća struja – IRIS, koja nalikuje zapreminski regulisanoj anjonskoj struji kičmenjaka po biofizičkim osobinama među kojima je sekvenca selektivnosti, izlazno ispravljanje i specifičan obrazac inaktivacije na depolarizujućim potencijalima. Drugi novorazvijeni model sistem za izučavanje jonskih kanala končastih gljiva su protoplasti dobijeni preciznim uklanjanjem ćelijskog zida hifa *Phycomyces blakesleeanus* femtosekundnim laserskim sistemom.

U okviru ove disertacije okarakterisan je modulatorni efekat ATP-a na IRIS i prvi put su registrovane aktivnosti pojedinačnih kanala u osnovi IRIS u konfiguraciji „spolja spolja“. Pokazano je da CK produkuju ATP i funkcionalno odgovaraju plazmamembrani sporangiofora. ATP stabilise otvoreno stanje kanala IRIS alosteričkom modulacijom, a najverovatnije ne utiče na aktivaciju IRIS, već samo umanjuje nivo inaktivacije. U prisustvu ATP IRIS se oporavlja od depolarizacijom-indukovane inaktivacije na naponski i vremenski zavisani način. Ispitan je farmakološki profil IRIS sa akcentom na molekulske vrste koje deluju na zapreminski-regulisan kanal kičmenjaka: flavonoide, vanćelijski ATP i karbenoksolon. Od jona sa fiziološkim značajem za gljivu, IRIS provodi nitrate, dok nije propustljiva za fosfate. Registrovan je obrazac inaktivacije IRIS na nivou pojedinačnih kanala, što je potvrđeno blokom vanćelijskim ATP-om i registracijom obrasca oporavka od inaktivacije. Provodljivost kanala u osnovi IRIS je 14 pS na 50-90 mV i primećeno je blago izlazno ispravljanje na nivou pore.

Ispitana je efikasnost ostvarivanja prisnog kontakta mikropipete sa membranom protoplasta dobijenih ćelijskom hirurģijom i upoređena sa efikasnošću registracije sa citoplazmatskih kapi. Napravljen je preliminarni pregled aktivnosti jonskih struja u membrani protoplasta dobijenih hirurģijom. Dominantna jonska struja registrovana sa cele membrane protoplasta je ulazna inaktivirajuća struja, koja je najverovatnije nošena anjonima. Na nivou pojedinačnih kanala registrovane su aktivnosti kanala različitih provodljivosti, selektivnih za hlor, glutamat, više anjona, kalijum i kalcijum, sa dominantno prisutnim anjonskim strujama. Rezultati postavljaju osnov za ispitivanje sličnosti registrovanih struja sa već opisanim jonskim strujama u drugim gljivama i pronalaženje novih kanala specifičnih za gljive iz grupe kojoj *P. blakesleeanus* pripada.

**Ključne reči:** končaste gljive, jonski kanali, ATP, elektrofiziologija, ćelijska hirurģija, *Phycomyces blakesleeanus*

**Naučna oblast:** Biološke nauke

**Uža naučna oblast:** Biofizika

# **Dominant currents of cell membrane of hyphae and cytoplasmic droplets from sporangiophore of *Phycomyces blakesleeanus*. Characterisation of outwardly-rectified inactivated current of cytoplasmic droplets**

## **Abstract**

Ion channels of filamentous fungi are an area of research that is very poorly studied, although it is of key importance for understanding their physiology. Cytoplasmic droplets derived from the sporangiophore of the fungus *Phycomyces blakesleeanus* were previously introduced as a model system for investigating ionic currents of the sporangiophore cell membrane. The dominant current recorded from cytoplasmic droplets in hypoosmotic conditions is the outwardly-rectifying inactivating current - IRIS, which resembles the volume-regulated anionic current of vertebrates in several biophysical properties, among which are the sequence of selectivity, outward rectification and a specific pattern of inactivation at depolarizing potentials. Another newly developed model system for studying ion channels of filamentous fungi are protoplasts obtained by precise removal of the hyphal cell wall of *Phycomyces blakesleeanus* by femtosecond laser system.

Within this dissertation, the modulatory effect of ATP on IRIS was characterized and for the first time the single channel activities of IRIS in the "outside-out" configuration were registered. It was shown that CKs produce ATP and functionally correspond to the plasma membrane of the sporangiophore. ATP stabilizes the open state of the IRIS channel by allosteric modulation, and most likely does not affect the activation of IRIS, but only reduces the level of inactivation. In the presence of ATP, IRIS recovers from depolarization-induced inactivation in a voltage and time-dependent manner. The pharmacological profile of IRIS was examined with an emphasis on molecular species that act on the volume-regulated channel of vertebrates: flavonoids, extracellular ATP and carbenoxolone. Of the ions with physiological importance for the fungus, IRIS conducts nitrates, while it is not permeable to phosphates. The pattern of IRIS inactivation at the level of individual channels was registered, which was confirmed by the block with extracellular ATP and by recording the pattern of recovery from inactivation. The conductance of IRIS at the single channel level is 14 pS at 50-90 mV and a slight outward rectification is observed at the pore level.

The efficiency of making a tight seal of the micropipette with the membrane of protoplasts obtained by cell surgery was tested and compared with the efficiency of registration from cytoplasmic droplets. A preliminary review of the activity of ion currents in the membrane of protoplasts obtained by cell surgery was made. The dominant ionic current registered from the entire protoplast membrane is the inward inactivating current, which is most likely carried by anions. At the level of individual channels, the activities of channels of different conductances, selective for chlorine, glutamate, several anions, potassium and calcium, with dominantly present anion currents, were registered. The results set the basis for examining the similarity of registered currents with already described ion currents in other fungi and finding new channels specific to fungi from the group to which *P. blakesleeanus* belongs.

**Keywords:** filamentous fungi, ion channels, ATP, electrophysiology, cell surgery, *Phycomyces blakesleeanus*

**Scientific field:** Biology

**Narrow scientific field:** Biophysics

## Lista skraćenica

AMP PCP - Adenylylmethylenediphosphate

ATP - adenzin trifosfat

CK - citoplazmatske kapi

conA - konkanavalin A

DFSM - dvofotonska mikroskopija

DIDS - 4,4'-diizotiocijanostilben-2,2'-disulfonska kiselina - natrijum hidratna so

DCPIB - 4-(2-butyl-6,7-dihloro-2-ciklopentil-indan-1-on-5-il) oksibuterna kiselina

GTP - guanozin trifosfat

IP3 - inozitol trifosfat

IRIS - izlazno-rektifikovana inaktivirajuća struja

ORIC - outwardly rectified inactivating current

Rh123 - rhodamine 123

SOI - stepeničasti obrazac inaktivacije

TEA - tetraetil amonijum

TNVnDM - tehnika nametnute voltaže na deliću membrane

TOK - „tandem pore outward rectifying K<sup>+</sup>“ kanal

VRAC - “volume regulated anion channel” - zapreminski regulisan anjonski kanal

# Sadržaj

1.	Uvod .....	1
1.1	Jonski kanali i ćelijske funkcije.....	1
1.2	Fiziologija končastih gljiva i uloga ćelijske membrane .....	2
1.3	Jonski kanali končastih gljiva i izazovi njihove registracije .....	5
1.4	Citoplazmatske kapi sporangiofora i protoplasti hifa <i>P. blakesleeanus</i> .....	9
1.5	Osmotske promene i jonski kanali.....	10
1.5.1	Zapreminski regulisan kanal kičmenjaka .....	11
1.5.2	Reakcija gljiva na osmotske promene .....	13
1.5.3	ORIC – IRIS .....	13
1.6	Jonski kanali i metabolizam .....	14
1.7	Farmakologija osmotski aktiviranih anjonskih kanala .....	15
2.	Ciljevi .....	17
3.	Materijal i metode .....	19
3.1	Gajenje model organizma.....	19
3.2	Dobijanje protoplasta ćelijskom hirurgijom .....	20
3.3	Priprema preparata citoplazmatskih kapi .....	21
3.4	Rastvori.....	22
3.5	Hemikalije .....	24
3.6	Oslikavanje citoplazmatskih kapi.....	25
3.7	Eksperimenti namentanja voltaže na deliću membrane – instrumentalna postavka.....	25
3.8	Pipete.....	26
3.9	Eksperimentalni protokoli .....	27
3.10	Analiza rezultata .....	28
4.	REZULTATI.....	31
4.1	Citoplazmatske kapi sporangiofora su metabolički aktivne .....	31
4.2	Inhibitor plazmamembranske protonske pumpe izaziva depolarizaciju membrane CK.....	32
4.3	Efekat unutarćelijskog ATP-a na voltažno-zavisne osobine IRIS.....	33
4.3.1	<i>ATP menja potencijal poluinaktivacije IRIS</i> .....	34
4.3.2	<i>FIS i konstanta inaktivacije IRIS se menjaju sa dijalizom ATP-a</i> .....	35
4.3.3	Respiratorni inhibitor ostvaruje efekat na brzinu inaktivacije IRIS .....	36
4.4	Održavanje aktivnosti IRIS ne zahteva hidrolizu ATP-a .....	37
4.5	IRIS je osetljiva na flavonoide .....	39
4.6	IRIS se u prisustvu ATP oporavlja od inaktivacije na voltažno-zavisan način .....	44



4.7	Vanćelijski ATP blokira IRIS.....	47
4.8	Karbenoksolon blokira IRIS.....	49
4.9	IRIS je osmotski osetljiva struja koja se može detektovati i bez razlike u osmolarnosti.....	49
4.10	Provodljivost IRIS za nitrate i fosfate.....	51
4.11	Moguće je registrovati IRIS u istrgnutom deliću membrane.....	52
4.12	Identifikacija IRIS u istrgnutoj konfiguraciji.....	53
4.13	Registracija jonskih struja sa membrane protoplasta micelijuma.....	55
4.13.1	Karakterizacija protoplasta micelijuma kao model sistema i poređenje sa modelom CK.....	55
4.13.2	Dominantne struje protoplasta micelijuma snimane sa celog protoplasta.....	57
4.13.3	Struje pojedinačnih kanala sa protoplasta dobijenih mikrohirurgijom.....	58
4.14	IRIS je aktivna u citoplazmatskim kapima u uslovima snimanja protoplasta hifa.....	61
4.15	Ulazna inaktivirajuća struja u membrani citoplazmatskih kapi.....	62
5.	Diskusija.....	64
6.	Zaključci.....	71

# 1. Uvod

## 1.1 Jonski kanali i ćelijske funkcije

Jonski kanali su integralni membranski proteini koji predstavljaju esencijalne komponente bioloških membrana u svakom tipu ćelije, u svim do danas poznatim domenima živog sveta. Poseduju hidrofилnu poru kojom omogućavaju regulisani transport jona, time što je za njeno otvaranje i održavanje aktivnosti potreban specifičan signal. Regulacija jonskog transporta ima ključnu ulogu u mnogim ćelijskim procesima, među kojima je i prva linija odgovora ćelije na spoljašnje promene. Jonski kanali mogu biti ujedno i senzori i glavni efektori, kao i prva reakcija kojom se promena signalizira ili privremeno amortizuje, dajući ćeliji vreme za pokretanje sporijih mehanizama koji dovode do dugoročne adaptacije.

Prisustvo proteina koji omogućavaju komunikaciju unutrašnjosti ćelije sa okruženjem je bio preduslov za nastanak prvih protoćelija okruženih lipidnom membranom (Morris 2002), te je evoluciju živog sveta pratila evolucija membranskih proteina. Ovo je rezultovalo time da danas postoje konzervirani jonski kanali čiji su homolozi rasprostranjeni u velikom broju grupa organizama kao i oni koji su usko specifični za određeni domen živog sveta pa čak i užu grupu organizama. Najveći broj strukturnih studija prvih decenija po otkrivanju postojanja jonskih kanala obavljeno je upravo na strukturnim homolozima prokariota (Booth, Edwards, and Miller 2003; Martinac, Saimi, and Kung 2008). Za sve jonske kanale je zajedničko da poseduju transmembranske domene koji obrazuju poru za provođenje jona, dok terminusi mogu biti locirani sa unutrašnje ili spoljašnje strane ćelije. Struktura pore i termina određuje selektivnost za jonske vrste, nivo provodljivosti kanala, osetljivost na brojne modulatorne faktore, dok su često razvijeni i posebni domeni u okviru subjedinica koji imaju funkciju senzora za specifičan stimulus.

Primer izuzetno konzerviranih jonskih kanala su mehanosenzitivni receptori, pronađeni kod eukariota, prokariota (Koprowski and Kubalski 2001) a zatim i archaea (Kloda and Martinac 2001), koji su divergirali u klase različitih provodljivosti, selektivnosti i voltažne zavisnosti, dok je mehanizam recepcije zadržan u sva tri domena (Martinac and Kloda 2003). Bakterijski i mehanosenzitivni kanali archaea reaguju na istezanje lipidnog dvosloja, dok su eukariotski kanali evoluirali u smeru uspostavljanja složenih interakcija sa citoskeletom (Martinac and Kloda 2003).

Familija voltažno-zavisnih kanala, koji su prvi funkcionalno okarakterisani tehnikom nametanja voltaže na deliću membrane (TNVnDM) kao kanali u osnovi električnih svojstava nadražljivih ćelija životinja (Neher and Sakmann 1976), nastala je evolutivnom divergencijom od prvih kanala sa voltažnim senzorom koji se nalaze i kod današnjih prokariota, tokom više miliona godina (Anderson and Greenberg 2001). Tako voltažno-zavisni kanali za kalcijum, natrijum i kalijum predstavljaju strukturne homologe (Catterall 1988).

Nasuprot evolutivnoj divergenciji, primeri konvergencije na molekulskom nivou su znatno ređi i često kontroverzni (Wood and Hollomon 2003). Kanali koji formiraju pukotinaste veze kod kičmenjaka – koneksini, nisu evolutivno srodni kanalima beskičmenjaka koji formiraju isti tip veze – ineksinima, te ove dve grupe predstavljaju primer funkcionalne konvergencije. Ineksinima beskičmenjaka su, sa druge strane, homolozi kičmenjačkim paneksinima – kanalima koji imaju ulogu u parakrinoj signalizaciji eksportujući ATP u brojnim tipovima ćelija

kičmenjaka (Beyer and Berthoud 2018). Slične funkcije membranskih proteina mogu da nastanu i rekombinantnim transferom između različitih kodirajućih sekvenci, kao što je pokazano u slučaju domena odgovornog za vezivanje liganda koji dele jonotropni i metabotropni glutamatni receptori, za koje se inicijalno smatralo da predstavljaju produkt evolitivne konvergencije (Wood and Hollomon 2003).

Jonski kanali mogu biti aktivirani na brojne načine pored direktne detekcije promene voltažnim ili mehanosenzorom, kao što su: aktivacija posredstvom vanćelijskih liganda, citoplazmatskih sekundarnih glasnika, lipida u sastavu ćelijske membrane, promena pH vrednosti, jonske jačine i koncentracije kalcijuma.

U slučaju familije jonskih kanala kao što su  $K_v$  i  $Na_v$ , promena membranskog potencijala dovodi do izmeštanja voltažnog senzora u sklopu proteina koji dovodi do aktivacije, dok aktivnost može biti modulirana faktorima kao što su interakcije sa lipidnim molekulima (Kasimova et al. 2014) i alosteričko vezivanje određenih molekula (Y. Zhang, Wang, and Yu 2020). Održavanje homeostaze ćelije je u tesnoj vezi sa membranskim potencijalom koji omogućava jonski transport time što je rad velikog broja jonskih kanala modulisan njegovim promenama. Čest primer su jonski kanali čija se provodljivost drastično menja sa promenom membranskog potencijala - pretežno provode jone u jednom smeru, te su po analogiji sa diodama u elektronici nazvani ulazni/izlazni ispravljači. Druga česta pojava je stabilizacija/destabilizacija otvorenog stanja sa porastom promene membranskog potencijala i promena verovatnoće prelaska u inaktivirano stanje. Ovo se manifestuje kao eksponencijalni porast/pad amplitude, sa često specifičnim konstantama aktivacije/inaktivacije, koje zavise od strukture proteina i brojnih faktora iz njegovog okruženja.

Nezaisno od mehanizma aktivacije, mnogi jonski kanali su višestruko regulisani vezivanjem alosteričkih modulatora koji dovode do stabilizacije različitih konformacija (Zemkova et al. 2014; Latimer et al. 2021; Y. Zhang, Wang, and Yu 2020). Sa usložnjavanjem višćelijskih organizama, razvile su se i specifične funkcije ćelija i sve složeniji mehanizmi odgovora na spoljašnje promene, pa su tako i jonski kanali, koji su primarno posedovali glavnu efektorsku funkciju, postali jedan od faktora mreže odgovora ćelije na stimulus kao i učesnici u mehanizmima rasta, deobe, diferencijacije i apoptotske ćelijske smrti (Blackiston, McLaughlin, and Levin 2009). Povezanost rada jonskog kanala sa ćelijskim procesima je nastala usled njegove osetljivosti na različite glasnike i parametre koji prate promene fizioloških procesa, kao što je koncentracija ATP i drugih produkata metabolizma (Serysheva et al. 1999; Sikimic et al. 2019b; Jackson, Morrison, and Strange 1994; Bertl et al. 1998). Jonski kanali mogu biti modulirani fosforilacijom od strane proteinskih kinaza i predstavljati rezultat balansa kinazne i fosfatazne aktivnosti. Neprovođene funkcije jonskih kanala su nova oblast istraživanja koja se bavi ulogom domena ovih proteina u različitim signalnim aktivnostima koje ne zavise od prolaska jona, najčešće kroz interakciju sa integrinima ćelijske membrane (Forzisi and Sesti 2022). Poseban istraživački izazov predstavlja otkrivanje novih tipova jonskih kanala i shvatanje značaja njihove aktivnosti u fiziološkom kontekstu ćelije.

## 1.2 Fiziologija končastih gljiva i uloga ćelijske membrane

Končaste gljive su organizmi sveprisutni u prirodi. Od nastanka prvih gljiva odvajanjem od zajedničkog pretka sa životinjama pre 1.2 – 1.5 milijardi godina do danas je opisano 150 000 različitih vrsta gljiva (Bhunjun et al. 2022). Ovaj broj je dupliran u poslednje dve decenije sa razvojem molekularno-bioloških tehnika koje su omogućile pregled genoma koji je zamenio prethodno razvrstavanje na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika. Procene

ukupnog diverziteta su veoma neusaglašene i kreću se od oko 1.5 do oko 12 miliona vrsta (Bhunjun et al. 2022). Gljive su razvile sposobnost da nasele gotovo sve kopnene ekološke niše, dok je otkrivanje morskih vrsta još uvek u povoju (sa tek preko 1000 opisanih vrsta)(Pang and Jones 2017). Gljive su isprepletane sa svim sferama ljudskih delatnosti – od vrsta koje proizvode jestiva i lekovita plodna tela, preko vrsta od biotehnološkog značaja (Hyde et al. 2019) – do parazita ljudi i organizama od privrednog značaja (Savary et al. 2019)(Seyedmousavi et al. 2018).

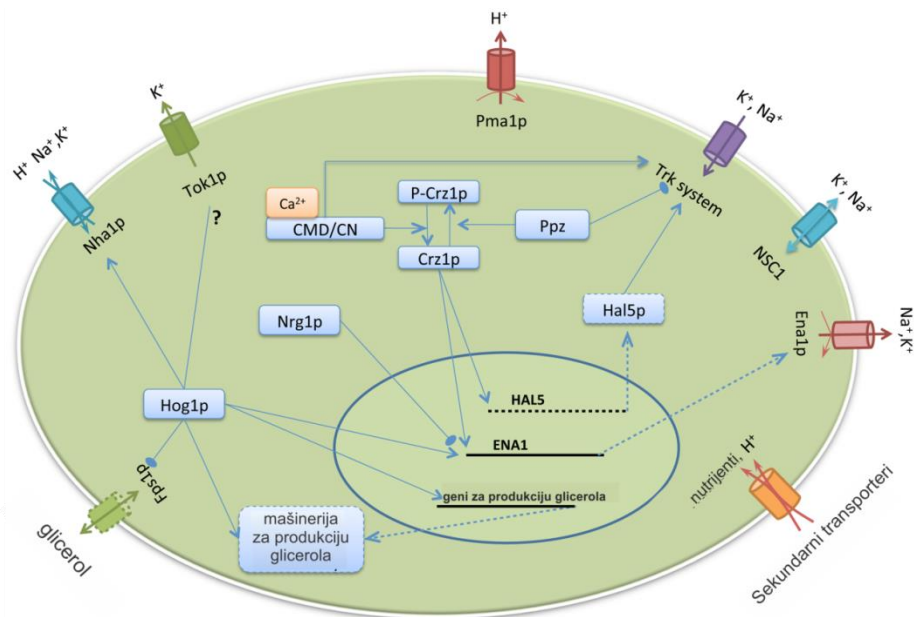
Micelijum saprotrofnih gljiva se razvija u zemljištu, ili na biljnim i životinjskim ostacima, dok parazitske gljive naseljavaju žive domaćine. Nevezano od životnog stila, sve končaste gljive, pored hifa koje obrazuju micelijum formiraju i specijalizovane hife koje imaju ulogu u reprodukciji, u vidu jednostavnih sporonosnih vazdušnih hifa za aseksualnu reprodukciju ili složenih plodonosnih tela. Iako filogenetski značajno srodnije životinjama nego biljkama, zbog sedentarnog životnog stila, obrazac ekspresije genetičkog materijala gljiva više podseća na „improvizaciju“ programa razvića sličnu biljkama, pa time njihova fiziologija predstavlja veliki istraživački izazov. Razmnožavanje sporama koje se raznose na velike udaljenosti dovodi do mogućnosti da svaka sledeća generacija iste vrste bude suočena sa potpuno drugačijim spoljašnjim faktorima. Uz to, ista jedinka često mora da se aklimatizuje na drastične fluktuacije faktora sredine u svom staništu. Većina saprotrofnih gljiva se razvija u umereno kiseloj sredini, rastući na fermentisanom supstratu, dok patogene vrste preživljavaju opsege od 2-8 pH jedinica (Davis 2009). Poznate su vrste koje su razvile toleranciju na visok salinitet kao i visok nivo teških metala (Śliżewska, Struszczyk-Świta, and Marchut-Mikołajczyk 2022)(Zafar, Aqil, and Ahmad 2007). Odgovor na promene spoljašnjih uslova kod gljiva u mnogim pogledima se značajno razlikuje od životinjskih ćelija. Dok višecelijske životinje održavaju usko određene parametre homeostaze unutrašnjih odeljaka koje formiraju, svaka ćelija micelijarne mreže gljiva je u kontaktu sa spoljašnjom sredinom i na njih reaguje daleko plastičnije. Tako je u slučaju septiranih gljiva pokazano da ćelije na različitim krajevima micelijuma mogu da promene program razvića u odgovoru na promenu uslova, potpuno nezavisno od ostatka micelijarne mreže (Levin et al. 2007).

Saprotrofne gljive su glavni razlagači u kopnenim ekosistemima, pri čemu posebno mesto imaju simbiotske gljive u tesnoj vezi sa korenskim sistemom biljaka, kojima omogućavaju efikasniju absorpciju minerala, fosfata, amonijuma i nitrata (S. Wang et al. 2020). Parazitske gljive, upravo zbog kapaciteta za adaptaciju, predstavljaju ozbiljnu opasnost kako za zdravlje ljudi tako i za privredu. Potrebno je istaći da se vremenom otkriva da sve veći broj vrsta, koje su poznate kao saprotrofne gljive, imaju sposobnost oportunističke patogenosti. Tako se za sve veći broj vrsta gljiva iz grupe Mucoromycota otkriva da po dospevanju u krv imunokompromitovanih osoba postaju paraziti sa letalnim ishodom (Walther, Wagner, and Kurzai 2020; Pasrija and Naime 2022). Među vrstama koje predstavljaju obligatne ili oportunističke patogene, zabelžen je alarmantan porast razvijanja rezistencije na poznate antimikotike (Fisher et al. 2022). Poseban problem predstavlja široka upotreba različitih fungicida za tretiranje useva, što dovodi do razvijanja rezistencije gljiva koje nastanjuju zemljište, a ujedno mogu biti patogeni ljudi, kao što su gljive iz roda *Aspergillus* (Fraaije et al. 2020). Sa druge strane, evolucija prilagođavanja na promene uslova spoljašnje sredine, kompeticije za resurse i odbrane od parazita gljiva razvila je kod njih sposobnost da sintetišu spektar supstanci sa antioksidativnim, antikancerogenim, antibiotskim pa i antimikotičkim dejstvom. Gljive roda *Trichoderma* mogu se primenjivati kao biopesticidi, zbog razvijenih mehanizama dejstva na mnoge fitopatogene gljive - izlučuju enzime za razgradnju ćelijskog zida i molekule peptaibola koji se u ciljnim hifama ugrađuju u ćeljsku membranu kao jonski kanali i dovode do letalnog nivoa propustljivosti (Degenkolb et al. 2008; Tyśkiewicz et al. 2022).

Svi do sada poznati receptori gljiva spregnuti sa G proteinom su specifični za gljive i stoga se ispituju kao meta farmakoloških supstanci radi suzbijanja patogeneze parazitskih vrsta (Brown et al. 2018).

Gljive održavaju membranski potencijal radom protonske pumpe ( $H^+$ ATP-aze), koja pripada klasi P ATP-aza zajedno sa  $Na^+/K^+$  ATP-azom ćelijske membrane životinja.  $H^+$  ATP-aza ispumpava protone u vanćelijski matriks i time održava hiperpolarišući potencijal koji daje osnovu za funkcionisanje membranskog transporta. Fiziološke vrednosti membranskog potencijala gljiva kreću se od ekstremno negativnih u slučaju morskih vrsta (do -250 mV) preko proseka od -120 do -150 mV (Slayman and Slayman 1962), do vrednosti merenih na kvascima koje su bliže potencijalu mirovanja u ćelijama životinja (-35 mV kod *Endomyces magnusii*, -50 mV do -70 mV kod *Saccharomyces cerevisiae*) (Bakker, Dobbelmann, and Borst-Pauwels 1986; Vacata, Kotyk, and Sigler 1981). Membranski potencijal je najčešće meren oštrim intracelularnim elektrodama, dok je u povelju i merenje fluorescentnim indikatorima (Limapichat et al. 2020). Za razliku od ćelija životinja, sa izuzetkom nadražljivih ćelija, micelijum gljiva ima kapacitet da ugađa vrednost membranskog potencijala kao odgovor na promene, nasuprot striktnoj potrebi održavanja stabilne vrednosti kod životinja. Slično biljkama, postoji mogućnost da su i gljive razvile sposobnost brze komunikacije, sprovođenjem promena potencijala duž svoje mreže, na šta ukazuje nekoliko istraživanja (Dehshibi and Adamatzky 2021)(Adamatzky et al. 2022). Ovo nije nimalo neočekivano, kada se uzme u obzir da se prosečna površina micelijuma saprofitnih vrsta meri kvadratnim metrima, dok micelijum jednog primerka gljive *Armillaria ostoyae* predstavlja najveći živi organizam – prostirući se ispod zemlje površinom od 965 hektara (Fricker et al. 2017). Električna signalizacija je primer konvergentne evolucije između carstava eukariota – električne promene slične akcionim potencijalima biljaka nisu rezultat katjonskih flukseva već pretežno eksporta anjona, sa doprinosom kalcijuma i kalijuma (J Fromm, Hajirezaei, and Wilke 1995; Sukhova, Akinchits, and Sukhov 2017; Jörg Fromm and Lautner 2007). Objašnjenje ovog fenomena leži u tome da su prvi organizmi koji su razvili voltažno-zavisne natrijumske kanale živeli okruženi slanom vodom – koja se u carstvu životinja zadržala kao unutrašnja sredina sa kojom ćelije komuniciraju. Drugi kopneni organizmi su izgubili potrebu za dominantno natrijumskim strujama, ali je potreba za brzom električnom komunikacijom dovela do razvijanja sličnog fenomena. Još uvek nije utvrđeno koji jonski kanali gljiva leže u osnovi ove sposobnosti.

Jonski fluksevi micelijuma gljiva detektovani su primenom elektroda osetljivih na odedene jone i pH (Lew 2007; Živanović 2005) i intracelularnim merenjem makroskopskih struja (Hamam, 2012). Tehnikom nametanja voltaže na deliću membrane do sada je na nativnim membranama okarakterisan jako mali broj jonskih kanala. Jedina ćelijska membrana gljive čiji su jonski kanali temeljno okarakterisani je membrana kvasca i, kao što je šematski prikazano (Slika 1.1), kod nje jonsku ravnotežu održavaju dominantno katjonski kanali (Ke, Ingram, and Haynes 2013). Ukratko, Tok1p kanal je zadužen za efluks kalijuma, dok se  $K^+$  usvaja radom Trk  $Na^+/K^+$  transportera.  $Na^+$  u slučaju povećanog saliniteta u okruženju prekomereno ulazi u ćeliju i postaje toksičan, pa se u slučaju povećane intracelularne koncentracije izbacuje preko Tok1p kanala, protonske pumpe Enap1 i Nhap1 antiportera, koji na osnovu protonskog gradijenta koji Enap1 stvara, izbacuje natrijum i kalijum u zamenu za proton.



Slika 1.1 Integrativni model regulacije jonske ravnoteže u ćeliji kvasca. Ena1p protonska pumpa održava membranski potencijal, NSC1 antiporter doprinosi oporavku membranskog potencijala u uslovima stresa, Tok1p kanal vrši efluks kalijuma i natrijuma pri njegovoj toksičnoj koncentraciji u citoplazmi. Fps1p akvagliceroporin eksportuje glicerol i vodu u hipoosmotskim uslovima. Sekundarni transporteri usvajaju nutrijente na račun protonskog gradijenta. Nisu prikazani transporteri koji dovode do povećanja kalcijuma u citoplazmi, samo posledična aktivacija kalcineurinskog signalnog puta. Preuzeto i modifikovano iz Ke *et al* 2013.

Protonska pumpa i Nhap1 antiporter kvasca su zaduženi i za održavanje membranskog potencijala nakon stresom-izazvanih promena. U uslovima smanjene osmolarnosti, glavni efektor je Fps1p akvagliceroporin koji eksportuje glicerol zajedno sa vodom. Dugoročna adaptacija u kvascu se odigrava post-translacionim modifikacijama membranskih proteina, modulacijom radom kinaza i transkripcionom regulacijom koju pokreću signalne kaskade.

U končastim gljivama opisani su brojni transporteri, među kojima je homolog kvaščevog Trk Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transportera (Corratgé et al. 2007), kao Nhap1 antiporter, koji je konzerviran i javlja se i u bakterijama (Quinn et al. 2012). Pokazano je da ABC transporteri, prisutni kod kvasaca i končastih gljiva, imaju ulogu u izbacivanju stranih supstanci uključujući antimikotike, zbog čega postaju fokus istraživanja mehanizma rezistencije (Víglaš and Olejníková 2021).

### 1.3 Jonski kanali končastih gljiva i izazovi njihove registracije

Jonski kanali končastih gljiva su slabo ispitani prvenstveno zbog problema pristupa ćeljskoj membrani pipetom kada se primenjuje TNVnDM. Za razliku od gljiva, ćeljski zid biljaka se rutinski razgrađuje primenom enzima za razgradnju celuloze sa visokim prinosom protoplasta (Wagner et al, 1978) pogodnih za elektrofiziološka merenja TNVnDM (Hryvusevich et al. 2021). Ćeljski zid gljiva je značajno kompleksniji od biljnog i sadrži kombinaciju različitih polimera, koji jako variraju između vrsta, iako formiraju sličnu arhitekturu u vidu mreže čvrstih vlakana okruženih matriksom. Procenat hitina u sastavu ćeljskog zida gljiva varira od 1-2 % hitina kod kvasca do 45 % hitina kod končastih gljiva (Arroyo et al. 2016), dok su u ćeljskom zidu kvasca dominantno zastupljeni ugljeni hidrati beta-glukan i manan (Lipke and Ovalle 1998). U ćeljskom zidu gljiva iz razdela *Mucoromycetes* dominira hitozan u koncentracijama do 40 %, a prati ga hitin sa

zastupljenošću do 20 % (Svensson et al. 2022). U slučaju kvasaca, kao jednoćelijskih gljiva, moguće je izvesti delimičnu enzimsku razgradnju kombinacijom enzima  $\alpha$ -mannanaze, hitinaze i endo-laminarinaze, pri čemu se ćelije spontano deformišu i oslobađaju od ostatka zida formirajući sferoplaste (Mann, Heintz, and Macmillan 1972). Ovaj metod je korišćen u različite svrhe i pre razvitka tehnike nametanja voltaže na deliću membrane. Već decenijama se razvijaju različiti kokteli enzima za razgradnju ćelijskog zida končastih gljiva, u svrhu genetičke manipulacije protoplastima. Na končastoj gljivi iz razdela Ascomycota, *Eutypella sp.* D-1, razvijen je protokol za dobijanje regenerativnih protoplasta kombinacijom litičkih enzima, i koktela enzima za razgradnju ćelijskog zida biljaka, u prisustvu visoke koncentracije NaCl za koju je zaključeno da je ključna za stabilizaciju protoplasta (Ning et al. 2022). Na bazidiomiceti *Trametes hirsuta*, visok prinos protoplasta dobijen je serijom homogenizacije i primene litičkih enzima iz micelijuma u eksponencijalnoj fazi rasta (Mosunova et al. 2016), pri čemu je prinos i stepen regeneracije bio povećan u prisustvu antioksidanasa  $\beta$  karotena i kvercetina (Mosunova et al. 2016). Kombinacija hitinaze i hitozanaze na *P. blakesleeanus* dovodi do produkcije protoplasta iz tek iskljajalih spora (Fukui et al. 2001). Međutim, postoji samo jedna studija o uspešnoj registraciji jonskih struja končaste gljive, sa protoplasta dobijenog enzimskom razgradnjom - na bazidiomiceti *Uromyces appendiculatus*. U još jednoj objavljenoj studiji TNVnDM je uspešno izvedena na protoplastima dobijenim enzimskom razgradnjom oomicete *Saprolegnia ferax* (Garrill, Lew, and Heath 1992), međutim oomicete po savremenoj klasifikaciji ne pripadaju carstvu gljiva, dok su fenotipske sličnosti rezultat horizontalnog genskog transfera (Richards and Talbot 2007), a njihov ćelijski zid po sastavu više nalikuje biljnom. TNVnDM zahteva električnu izolovanost dela membrane ispod mikropipete i okolnog medijuma, kako bi se pouzdano registrovao protok jona samo kroz jonske kanale membrane. Za uspešno uspostavljanje prisnog, „gigaomskog“ kontakta između staklene pipete i lipida membrane, neophodno je da ćelijska membrana bude potpuno „čista“, bez rezidua matriksa zida, što još uvek nije dovoljno uspešno izvedeno enzimskom razgradnjom. Primena laserske ablacije ćelijskog zida, poslednji put je sprovedena azotnim laserom koji operiše na talasnoj dužini UV spektra na gljivi pre više od dve decenije (Roberts et al. 1997; Véry and Davies 1998). Iako je registracija kanala na nativnoj membrani od velikog značaja za ispitivanje njegove fiziološke funkcije, ovaj metodski pristup nikada nije ustaljen kao rutinski. Moguć razlog za to je niska efikasnost dobijanja gigaomskih kontakata kao i nivo toksičnosti laserskog impulsa visoke energije koja je potrebna za razaranje ćelijskog zida. Zanimljivo je da je lasersko uklanjanje ćelijskog zida isprobavano i na biljnoj ćeliji u cilju lokalizovane registracije jonskih kanala (Gordon H. Henriksen et al. 1996) uprkos razrađenom protokolu za enzimsko dobijanje protoplasta. Pojedine studije su takođe ukazale na nepovoljan efekat proteaza iz koktela za razgradnju ćelijskog zida na proteine ćelijske membrane (G H Henriksen et al. 1996).

Jedan specifičan model sistem za registraciju sa nativne membrane gljive predstavlja sluzavi mutant gljive *Neurospora crassa*, koji odlikuje odsustvo ćelijskog zida. Na ovom modelu opisane su samo ukupne jonske struje kalijumskih kanala osetljivih na TEA-Cl i hlornih kanala osetljivih na DIDS, kombinacijom TNVnDM i jonosenzitivnih elektroda, bez temeljne karakterizacije kanala u osnovi ovih struja (Levina et al. 2002).

Laserskim uklanjanjem ćelijskog zida ustanovljen je anjonski kanal konduktivnosti 43pS u *Aspergillus niger* (Roberts et al. 1997). Registrovani kanal odlikuje blago izlazno ispravljanje na nivou struja pojedinačnih otvaranja, a provodljivost je izvedena linearnim fitovanjem u opsegu napona oko potencijala reverzije. Kako je značajno aktivniji u opsegu negativnih potencijala, pretpostavljena uloga ovog kanala je izbacivanje anjona iz citosola. Kanal dominantno provodi hlor, ali je pretpostavljeno da je delimično propustljiv i za glukonat, kako mu je potencijal reverzije blago izmešten od  $E_{rev}$  za hlor ka  $E_{rev}$  za glukonat. Druga

studija koja se bavila uspostavljanjem kontakta na protoplastu dobijenom ćelijskom hirurģijom u *N. crassa* je rezultovala registracijom 2 kanala, za koje je pretpostavljeno da provode anjone (kanal provodljivosti 17pS) i kalijum (kanal provodljivosti 9pS) (Véry and Davies 1998).

Na protoplastu dobijenom enzimskom razgradnjom u vršnom regionu fitopatogene gljive *Uromyces appendiculatus* registrovan je kanal stimulisan istezanjem, neobično velike konduktivnosti od čak 600 pS, selektivan za katjone. Protoplasti su dobijeni razgradnjom vrha tubule koja klija iz uospora i smatra se da registrovana struja ima ulogu u aktiviranju diferencijacije hife u apresoriju tako što detektuje istezanje membrane u regionu kontakta sa stominim ćelijama lista domaćina (Zhou et al. 1991). Okarakterisana je struja cele membrane i pojedinačnih kanala, i pokazano da se verovatnoća otvorenog stanja pri manjim nametnutim pritiscima povećava sa promenom membranskog potencijala i ustanovljena slaba diferencijacija između katjona sa sekvencom selektivnosti.  $K^+ > Cs^+ > Rb^+ > Na^+$  (Zhou et al. 1991).

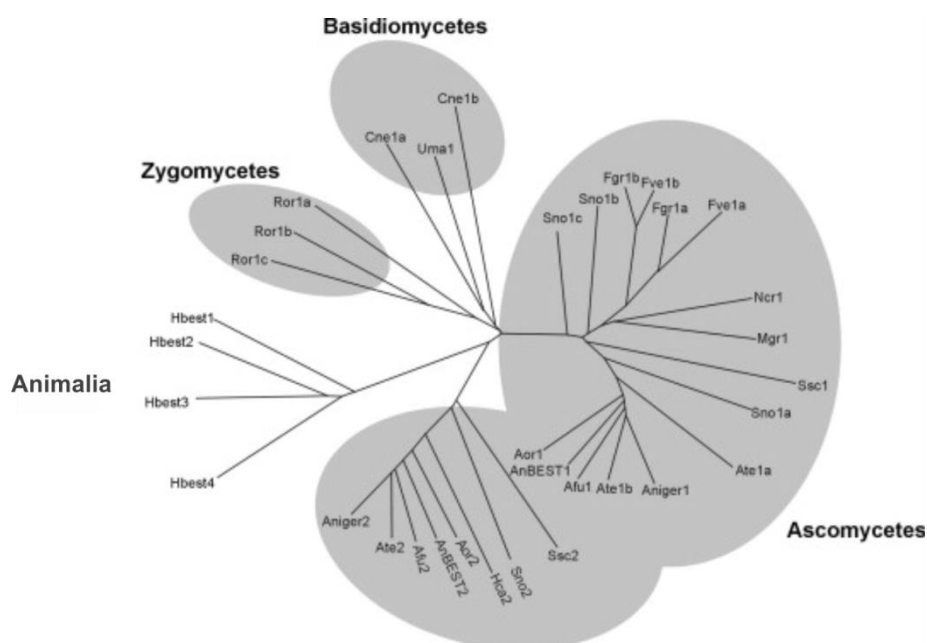
Razvitkom tehnika za analizu genetičkog materijala, kod gljiva je pronađeno nekoliko homologa poznatih sisarskih gena za jonske kanale, čija je funkcionalnost utvrđena kloniranjem sekvence i heterolognom ekspresijom u model sistemima pogodnim za elektrofiziološka merenja.

Često korišćen sistem za heterolognu ekspresiju su jajne ćelije *Xenopus laevis*, pogodne zbog niske ekspresije plazmamembranskih jonskih kanala i jednostavne manipulacije, kao i sferoplasti kvasca dobijeni enzimskom razgradnjom. U slučaju oocita *X.laevis* moguće je ispitivanje struja pojedinačnih kanala primenom TNVnDM u istrgnutim konfiguracijama, dok je za ukupne struje ćelije, zbog njihove veličine, neophodna primena nametanja napona uz pomoć dve elektrode (Baumgartner, Islas, and Sigworth 1999). Problem ekspresije jonskih kanala gljiva u membrani životinjskih ćelija je njihovo smeštanje u okruženje koje je značajno drugačije od prirodnog, počevši od lipidnog sastava membrane, membranskog potencijala i jonske homeostaze. Stoga najpogodniji ekspresioni sistem za elektrofiziološka merenja kanala gljiva predstavlja kvasac. Membrana kvasca je ujedno i jedina nativna membrana gljive koja je temeljno elektrofiziološki okarakterisana. Za potrebe heterologne ekspresije u kvascu, generišu se mutanti bez TOK katjonskih struja koje su dominantne, čime se visokom ekspresijom željenog kanala postiže njegova jednostavna registracija (Roberts, Milnes, and Caddick 2011).

Jedan od najbolje okarakterisanih anjonskih kanala končastih gljiva je AnBest. Bestrofini su familija hlornih jonskih kanala koji su duboko konzervirani u živom svetu. Prvi okarakterisan je humani bestrofin1, hBest1, kalcijumski aktiviran kanal selektivn za hlor u epitelijumu mrežnjače, čije mutacije dovode do urođenog tipa viteliformne distrofije žute mrlje ili Bestove bolesti. Njegov homolog pronađen je i u bakterijskoj ćeliji – KpBest u *Klebsiella pneumoniae*, i strukturno okarakterisan kao pentamer, sa konzerviranim hidrofobnim regionom koji oivičava transmembransku poru (Yang et al. 2014). Postojanje homologa kod končastih gljiva otkriveno je u genomu *A. nidulans*. AnBest je funkcionalno okarakterisan ekspresijom u kvascu, a njegovo prisustvo u ćelijskoj membrani pokazano je ekspimiranjem kanala koji je na C-terminusu fuzionisan sa fluorescentnim zelenim proteinom (Roberts, Milnes, and Caddick 2011). U prisustvu 10  $\mu$ M kalcijuma AnBest se registruje kao trenutno aktivirajuća ulazna struja, sa blagom inaktivacijom na jako hiperpolarišućim potencijalima, a konduktivnosti pojedinačnih kanala procenjene su na 16 pS. AnBest se aktivira povećanim nivoom unutarćelijskog kalcijuma. Svaki tip bestrofinskog proteina ima specifičnu fiziološku ulogu, do sada je, u različitim tipovima tkiva životinja, potvrđeno učešće u odbrani od oksidativnog stresa (Johnson et al. 2017), stresa endoplazmatičnog retikuluma (Lee et al.



2012) i inflamacije (Song, Yang, and He 2014), kao i eksportu bikarbonata (Bakall et al. 2008). Mnoštvo homologa, za sada funkcionalno neokarakterisanih, pronađeno je u genomima različitih razdela gljiva. U genomu *Rhizopus oryzae*, predstavniku klase Mucoromycetes, kojoj *P.blakesleanus* pripada, pronađeni su homolozi označeni kao Ror1a, Ror1b i Ror1c (Slika1.2) (Roberts, Milnes, and Caddick 2011).



Slika 1.2. Homolozi bestrofina u carstvu životinja i gljiva. Preuzeto iz Roberts et al, 2018.

Hlorni kanal iz CIC familije pronađen je u genomu *A. nidulans* i nazvan AnCICA (Oddon, Diatloff, and Roberts 2007b). Konstruisanjem mutiranih jedinki „knock-out“ tehnikom pokazano je da kanal ima ulogu u homeostazi bakra. Međutim, još uvek nije utvrđeno da li se ovaj jonski kanal nalazi na ćelijskoj membrani, dok većina studija sugerije da je lociran u endomembranama (Roberts, Milnes, and Caddick 2011). Ovaj kanal aktivira povećani nivo kalcijuma u citosolu, dok konduktivnost nije poznata kako nije registrovan primenom TNVnDM. Konduktivnosti poznatih kanala CIC familije iznose: 1 pS za CIC1, 3 pS, za CIC2 i velike konduktivnosti (oko 40 pS) u slučaju humanih CIC-K kanala u kompleksu sa batrinom (Poroca, Pelis, and Chappe 2017).

Nedavno su okarakterisani voltažno-zavisni protonski kanali kod končastih gljiva, homologni Hv kanalima životinja (C. Zhao and Tombola 2021). Svi homolozi međusobno dele strukturnu organizaciju i visok nivo selektivnosti za protone, dok su Hv kanali gljiva specifično osetljivi na različite opsege membranskog potencijala i pH vrednosti. Ispitani kanali su SIHv1 kanal, izolovan iz *Suillus luteus*, gljive iz razdela Basidiomycota, i AoHv1 iz *Aspergillus oryzae*, predstavnice razdela Ascomycota. Oba kanala su eskprimirana u oocitama *X. laevis*, i funkcionalno okarakterisana u istrgnutoj membrani. Ustavnovljeno je da, iako imaju voltažni senzor u sklopu konzerviranih S1-S4 transmembranskih domena koji formiraju poru kao i svi proteini ove familije, razlike u perifernim domenima proteina ostvaruju efekat na potencijal poluaktivacije.

Msc-slični kanali su pretpostavljeni mehanosenzitivni jonski kanali u končastim gljivama, na osnovu pronađenih kodirajućih sekvenci. Novija istraživanja pokazuju funkcionalnost dva tipa kanala, koji se nalaze u membrani endoplazmatskog retikuluma (MscA) i u plazmamembrani (MscB), u *A. niger* (Dionysopoulou et al. 2022). Pokazano je da provode kalcijum. Još jedna

ranija studija je pokazala postojanje 2 tipa kalcijumskog kanala koje aktivira IP3 u vršnom delu hife gljive *Neurospora crassa*, konduktivnosti 13, koji je lokalizovan u membrani endoplazmatičnog retikuluma i 77pS, koji se nalazi u membrani vakuole (Silverman-Gavrila and Lew 2002).

TOK kanal, pronađen je u kvascu i končastim gljivama, provodi kalijum i inhibira se povećanim vanćelijskim kalijumom, pa se pretpostavlja da učestvuje u održavanju njegove ravnoteže izbacivanjem iz ćelije. Ovaj kanal poseduje 8 transmembranskih domena po subjednici i obrazuje dve pore. Moguće je i da ima ulogu u usvajanju kalijuma kako je u mutantima bez poznatih transportera kalijuma sa visoko eksprimiranim nCTOC premošćena auksotrofija u kvascu (Houdinet et al. 2023). Inhibira ga i visoka koncentracija spoljašnjeg kalcijuma i TEA.

U končastim gljivama pronađen je homolog anoktamina TMEM16 i ispitana njegova uloga u izmeštanju lipida, ali nije biofizički okarakterisan (Malvezzi et al. 2013), kao ni mnogi članovi porodice anoktamina, izuzev kanala za koje je utvrđeno da provode hlor (Picollo, Malvezzi, and Accardi 2015).

#### 1.4 Citoplazmatske kapi sporangiofora i protoplasti hifa *P. blakesleeanus*

*P. blakesleeanus* (carstvo Fungi, razdeo Mucoromycota, podrazdeo Mucoromycotina, klasa Mucoromycetes, red Mucorales, familija Phycomycetaceae, rod *Phycomyces*) je saprotrofna končasta gljiva, iz reda Mucorales, do nedavno svrstavanog u polifiletsku klasu Zygomycetes. Nakon molekularno-filogenetske metaanalize, klasa Zygomycetes je rasformirana, a rod Mucorales je ostao u novodefinisanoj klasi Mucoromycetes, kao jednoj od najstarijih klasa gljiva. Gljivama iz reda Mucorales pripadaju brojni obligatni i oportunistički patogeni, dok se neke vrste koriste kao proizvođači nanočestica (Aziz et al. 2016) i kao materijal za proizvodnju biogoriva (Carvalho et al. 2017). Ovu grupu gljiva odlikuje dominantno prisustvo hitozana u ćelijskom zidu i hife bez septi, koje predstavljaju ogromne višejedarne ćelije, dok vrste roda *Phycomyces* obrazuju najbujniju miceliju od svih gljiva reda Mucorales. Polno razmnožavanje obavlja se zigosporama, koje se razvijaju iz hifa nastalih nakon fuzije jedinki dva „pola“, po kojima je polifiletska klasa inicijalno imenovana. Bespolno razmnožavanje je učestalije, i odvija se tako što se iz micelijuma razvijaju specijalizovane cenocitične vazdušne hife- sporangiofori. Sporangiofori na svom vrhu nose sporangije sa sporama, a u zavisnosti od uslova, razvijaju se dva tipa – mikro i megasporangiofori.

Megasporangiofori *P.blakesleeanus* korišćeni su kao model sistem u brojnim istraživanjima zbog izražene anti-gravitropske (Galland 2014) i fototropske (Wels and Weisenseel 1990) reakcije. Poseduju senzore za široki opseg elektromagnetnog spektra (Cerdá-Olmedo 2001) (UV, plavi, zeleni, crveni i daleko-crveni), silu gravitacije (statolitni kristali u vakuoli, zaslužni za antigravitropski rast), kao i jedinstveni sistem detekcije objekata u okruženju, koji zajedno doprinose složenom mehanizmu rasta (Ortega et al. 2021). Kao i hife micelijuma, odlikuje ih odsustvo septi, pa je svaki sporangiofor zapravo jedna ćelija dužine do preko 20 centimetara. Odlikuje ih izuzeno brz vršni rast, pri čemu su u zoni rasta primećen komponente koje nalikuju vršnim telima opisanim kod viših gljiva (*Spitzenkorper*) (Zivanović 2013), – grupi vezikula, koje nose komponente za sintezu ćelijskog zida i stapaju sa membranom u zoni izduzivanja u procesu egzocitoze i time ujedno doprinose uvećanju ćelijske membrane (Bueno and Silva 2014).

Ovaj model organizam zauzima posebno mesto i u elektrofiziologiji gljiva, zbog, još uvek slabo istražene, mogućnosti formiranja citoplazmatskih kapi. Citoplazmatske kapi (CK) *P. blakesleeanus* su strukture koje se spontano formiraju od ćelijskog materijala iz zone rasta sporangiofora, pri oslobađanju sadržaja u odgovarajući rastvor. Sporangiofori se isecaju u IVb fazi rasta koju odlikuje povećan udeo zone rasta (Galland 2014). Citoplazmatske kapi su prvi put opisane od strane Zaichkin-a (Zaichkin, Orlova, and Fikhte 1975), kao regenerativne strukture koje, nalik pluripotentnim protoplastima biljaka (Jeong et al. 2021), i protoplasta dobijenih enzimskom razgradnjom micelijuma, imaju sposobnost obnavljanja ćelijskog zida i rediferencijaciju u hifu. U našoj istraživačkoj grupi, CK su implementirane kao model sistem za registraciju jonskih struja primenom TNVnDM. Za njihovo formiranje neophodno je prisustvo divalentnih katjona u rastvoru, a optimalna osmolarnost za formiranje je 500 mOsm. Potvrđeno je da udeo formiranih citoplazmatskih kapi ima sposobnost regeneracije ćelijskog zida (Križak et al. 2015), primenom bojenja metilen-plavim, čime se CK ubijaju a samo formirani zidovi ostaju vidljivi kao okrugle strukture. Resinteza ćelijskog zida ubeležena je tek minimalno 2 sata nakon oslobađanja CK u rastvor, tako da je njihova membrana „čista“ i dostupna za formiranje gigaomskog kontakta staklenom mikropipetom.

Heterogenost citoplazmatskih kapi ogleda se u vidljivim citološkim karakteristikama - većina je ispunjena gustom zrnastom strukturom, dok mali deo predstavlja „duhove“- naizgled prazne sfere, a njihove dimenzije variraju od krupnih struktura (preko 100 mikrometara u dijametru) do onih u opsegu veličine sporangiospore (2 mikrometra). Strujna aktivnost koja je okarakterisana na CK u istrgnutoj membrani je izlazno-ispravljena anjonska struja osetljiva na malat, čija je konduktivnost procenjena na 10 pS – ORAC (Zivić et al. 2009). ORAC odlikuje povećanje verovatnoće otvorenog stanja sa povećanjem depolarišućeg stimulusa. U istrgnutoj membrani CK opisana su i dva kanala konduktivnosti od 43 i 74 pS (Zivić et al. 2005). U konfiguraciji „cela ćelija“, prva i najdetaljnije okarakterisana struja je izlazno ispravljena inaktivirajuća struja - IRIS - anjonska struja koja je u fokusu ove disertacije, kao i ulazna anjonska struja sa većom selektivnošću za glutamat, koju odlikuje specifična odložena aktivacija na potencijalu od -50 mV.

Razvoj sistema nelinearne mikroskopije omogućio je sprovođenje precizne ćelijske hirurgije na brojnim biološkim uzorcima (Marshall et al. 2022)(Mizuta 2021), sa već velikim brojem istraživačkih (X. Wang et al. 2014) i kliničkih primena (König 2023). Višefotonska apsorpcija u tački fokusa primenom femtosekundnih laserskih sistema omogućava visoku preciznost i prodiranje dubko u preparat sa minimalnim oštećenjem van fokalne zapremine. To je navelo na ideju razvijanja protokola za primenu precizne laserske hirurgije ćelijskog zida u svrhu dobijanja protoplasta pogodnih za registraciju jonskih struja gljiva. Uspostavljanje nove tehnike (optimizacija je van opsega ove disertacije) omogućilo je formiranje protoplasta sa različitih delova hifa uz minimalno oštećenje preparata i lokalizovanu primenu TNVnDM, pri čemu je jedan od ciljeva ove disertacije određivanje efikasnosti registracije jonskih struja sa ovako dobijenih protoplasta.

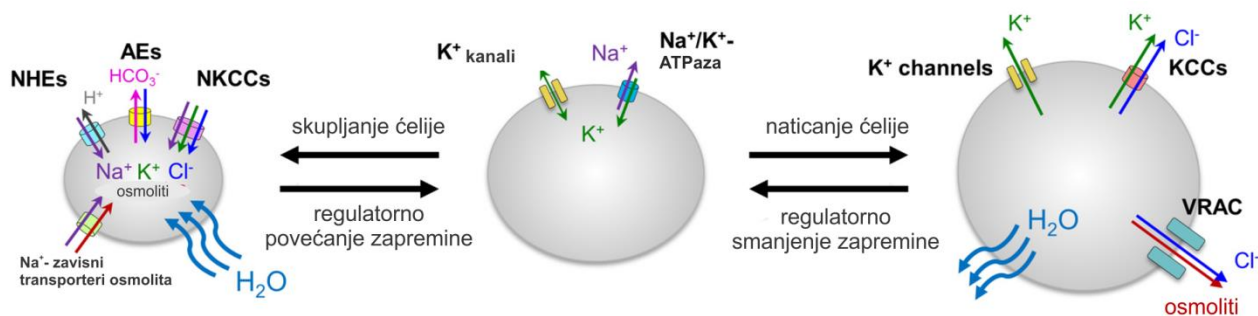
## 1.5 Osmotske promene i jonski kanali

Regulacija osmotskog pritiska je jedan od prvih izazova pionirskih ćelijskih struktura, pa su glavni adaptivni mehanizmi duboko ukorenjeni u živom svetu (Zonia and Munnik 2007). Esencijalne ćelijske funkcije su zavisne od koncentracije sekundarnih glasnika, šećera, enzima i kofaktora, te je razblaživanje sastava citoplazme stres na koji ćelija mora da odgovori velikom brzinom. Najdirektniji i najbrži odgovor ostvaruje se detekcijom promene

tangencijalnog napona ćelijske membrane usled prodora vode od strane senzora u sklopu jonskih kanala koji su ujedno i efektori. Mehanorecepcija jonskih kanala je pretpostavljena osnova razvijanja prvih signalnih puteva zbog čega je rasprostranjena u svim domenima živih bića (Kung 2005). Novija istraživanja pokazuju da i suptilnije reakcije na promene u membrani kao što je nivo fluidnosti mogu biti detektovane od strane mehanosenzitivnih jonskih kanala koji su pozicionirani na obodima lipidnih ostrvaca (W. Li et al. 2018), čija dinamika asembliranja i internalizacije/razdvajanja zavisi od, između ostalog, temperature i osmotskog potencijala. Biosenzorima vezanim za ćelijsku membranu pokazano je da je signal koji se javlja pri stresu istezanja pojačan u uslovima povećane fluidnosti membrane i remećenja aktinskog citoskeleta (W. Li et al. 2018). Poznato je da lipidna ostrvca asocirana sa kaveolinom deluju kao centri za prenos mehanotransdukcije (Trouet et al. 2001). Svi organizmi koji su izloženi osmotskom stresu (osim halobakterija) na njega dugoročno reaguju promenom koncentracije organskih osmolita. Najčešće u pitanju su polihidroksilni alkoholi, slobodne aminokiseline i njihovi derivati i kombinacije uree i metilamina. Evolutivna prednost korišćenja malih organskih molekula ogleda se u njihovom neutralnom efektu na makromolekule koji zahtevaju stabilan sastav neorganskih jona za svoje funkcionisanje (Pasantes-Morales 2016).

### 1.5.1 Zapreminski regulisan kanal kičmenjaka

Regulatorno smanjenje zapremine kod kičmenjaka uključuje aktivnost većeg broja jonskih kanala i transportera. Za prenos jona hlora, odgovorne su samo izoforme VRAC kanala (Pasantes-Morales 2016) kod svih tipova ćelija kičmenjaka. Pored hlora VRAC u manjoj meri provodi i organske anjone, glutamat, inozitol, taurin kao i ATP (Medina et al. 1997). U endotelu životinja, povećanje citoplazmatske koncentracije kalcijuma igra značajnu ulogu u prvoj liniji regulacije zapremine, aktivacijom kalcijum-zavisnog kanala za kalijum, koji dovodi do efluksa kalijuma. VRAC tako igra ulogu u anuliranju hiperpolarizacije koju izaziva efluks katjona, uz izbacivanje organskih osmolita (Slika 1.3). U nervnom sistemu pri ishemijskom šoku, umerena aktivacija VRAC-a dovodi do oporavka od hipoosmotskog stimulusa, dok preterana aktivnost izaziva apoptotsku ćelijsku smrt (H. Zhang et al. 2011). Kako je utvrđeno da VRAC provodi krupne organske anjone uključujući i neurotransmiter glutamat, intenzivno se ispituje njegova uloga u patološkim disbalansima neuronske signalizacije. Takođe se intenzivno ispituju izoforme u svim tkivima koja su izložena osmotskim fluktuacijama, kao što je endotel. Propustljivost VRAC za ATP daje mu novu ulogu u autokrinom i parakrinom regulaciji, što je pokazano u endotelu (Hisadome et al. 2002).



Slika 1.3. Sprega aktivnosti VRAC-a i kalijumovog kanala u regulatornom smanjenju zapremine životinja. Preuzeto i modifikovano iz Florian et al 2016.

Zapreminski regulisan anjonski kanal „fascinira i frustrira istraživače otkako je prvi put okarakterisan 1988. godine“ (Strange, Yamada, and Denton 2019). Decenijama je tragano za molekularnim kandidatom nakon funkcionalne karakterizacije struje specifičnog profila u hipoosmotskim uslovima u različitim tkivima. Strukturne studije su napokon rasvetlile molekularni identitet ovog kanala - VRAC je heteroheksamer čije su subjedinice varijacije LRRC8 proteina, koje odlikuju ponovci sekcenci bogatih leucinom („leucine rich repeat containing proteine“)(Qiu et al. 2014). Subjedinica esencijalna za rad kanala nazvana SWELL 1 protein, ili LRRC 8A. Kombinacije drugih subjedinica sa LRRC8A određuju osobine specifične za svaku izoformu nađenu u različitim tkivima. Pokazano je da kombinacija LRRC8A i LRRC8E subjedinica daje kanal koji odlikuje brža inaktivacija na pozitivnim potencijalima. Kombinacije subjedinica utiču i na provodljivost za specifične osmolite poput taurina. Brzina inaktivacije kanala zavisi i od pH, spoljne koncentracije magnezijuma i amplitude izlazne struje.

Detekcija VRAC-a u istrgnutim konfiguracijama je predstavljala izazov zbog njegove jako brze inaktivacije. Umesto klasičnog kontinualnog protokola primenjen je depolarišući pravougaoni stimulus kako bi bila registrovana trenutna aktivacija sa inaktivirajućom komponentom (Nilius et al. 1997). Provodljivost VRAC kanala dobijena registracijom pojedinačnih kanala je između 50 i 80 pS na pozitivnim, i 10 do 20 pS na negativnim potencijalima, dijametar pore procenjuje se na 11-17 Å na osnovu sekvence selektivnosti (Nilius and Droogmans 2003). Izlazno ispravljanje u slučaju VRAC kanala je posledica povećanja provodljivosti pojedinačnih kanala, tj definiše se kao ispravljanje na nivou pore (Nilius and Droogmans 2003), dok se inaktivacija na depolarišućim potencijalima javlja usled inaktivacijom izazvanog smanjenja udela otvorenih kanala koji se menja sa vremenom izloženosti depolarizaciji.

I pored ekstenzivnih istraživanja, tačan mehanizam aktivacije VRAC još uvek nije razjašnjen. Najjednostavnija hipoteza je da je kanal u osnovi VRAC mehanosenzitivnan. Ova hipoteza je poljuljana činjenicom da je u nekoliko prvih studija isti strujni obrazac registrovan i u izoosmotskim uslovima ukoliko je sa unutarćelijske strane prisutan GTP ili njegov nehidrolizabilni analog. GTP je poznati aktivator Rho kinaze zbog čega je otvorena mogućnost kompleksnijeg mehanizma aktivacije koja uključuje enzimsku kaskadu. Međutim, jedna od meta Rho kinaze je i fosfataza lakog lanca miozina, zbog čega je predložena mogućnost da GTP ostvaruje efekat posredno kroz dejstvo na citoskelet (Carton et al. 2002). Aktivacija smanjenom intracelularnom jonskom jačinom je još jedan fenomen koji je potencijalno isključio aktivaciju mehanorecepcijom, međutim i ovaj slučaj je od strane dela autora interpretiran kao faktor koji zapravo smanjuje prag osetljivosti na mehaničku stimulaciju (Strange, Yamada, and Denton 2019). Smatra se da intracelularni kalcijum ne aktivira kanal, kako povećanje njegove koncentracije ne utiče na nivo aktivacije, dok je predložena neophodnost prisustva minimalne koncentracije kalcijuma (>50nM) za uspešnu aktivaciju (Nilius et al. 1997). Novije studije ukazuju i na ulogu reaktivnih kiseoničnih vrsta u aktivaciji određenih izoformi VRAC. Heteromeri LRRC8A-LRRC8E se aktiviraju oksidacijom dve rezidue cisteina u prva dva leucinska ponovka na subjedinici LRRC8E, što dovodi do formiranja disulfidnog mosta i rezultujuće konformacione promene koja aktivira kanal (Bertelli et al. 2022). Oksidacija inhibira izoformu LRRC8A-LRRC8C modifikujući prvi metionin na LRRC8C subjedinici (Bertelli et al. 2022). Ova istraživanja su utvrdila ulogu izoformi VRAC-a u mehanizmima oksidativnog stresa, pored uloge u održavanju osmotske homeostaze. VRAC je osetljiv i na promene pH vrednosti pri čemu ga umereni pad pH aktivira, dok pad ispod pH 6 dovodi do inhibicije (R. Wang et al. 2017).

## 1.5.2 Reakcija gljiva na osmotske promene

Odgovor na hipoosmotski stres temeljno je ispitivan na kvascu *S.cerevisiae* i predstavlja prvi opisani model mehanizma adaptacije eukariotske ćelije. Povećanje zapremine ćelije do kojeg dolazi usled ulaska vode pokreće mehanizam regulatornog smanjenja zapremine koji podrazumeva izbacivanje osmolita iz ćelije, u prvoj liniji glicerola. Inicijalni, brzi odgovor podrazumeva promenu koncentracije neorganskih jona posredstvom membranskih kanala. Porast koncentracije kalcijuma dovodi do otvaranja akvagliceroporina Fps1. Osmosenzori ćelijske membrane dovode do inhibicije HOG (eng. *high osmotic glicerol*) MAPK signalnog puta koji, kada je aktivan dovodi do ekspresije enzima koji učestvuju u sintezi glicerola od glikolitičkog intermedijera dihidroksiaceton fosfata, pa gašenje ovog puta predstavlja sporiji odgovor i trajno prilagođavanje na smanjenu osmotsku koncentraciju spoljašnjosti..

Končaste gljive reaguju na nagle promene osmolarnosti zastojem u vršnom rastu, koji nastavlja da se odvija posle pauze tokom koje gljiva podleže adaptaciji. U slučaju hiperosmotskog šoka, oporavak je moguć ukoliko razlika ne prelazi 10 MPa, kako je ispitano na *Penicillium chrysogenum* i *Chrysosporium fastidium* (Luard 1982).

Odgovor na osmotske promene i njegova uloga u regulaciji metabolizma i detekciji nutrijenata je kod končastih gljiva opisan na gljivi iz roda *Neurospora* (Huberman, Coradetti, and Glass 2017). Gljive razvijaju kompleksnu signalizaciju za registrovanje dostupnih tipova i količine nutrijenata kako bi reorganizovale metaboličke puteve za njihovu razgradnju i održale pravilnu dinamiku rasta. Pretpostavljeno je da končaste gljive koriste promene osmolarnosti kao signal za nivo dostupnih rastvorljivih ugljenih hidrata (Huberman, Coradetti, and Glass 2017).

Končaste gljive iz roda *Aspergillus* intenzivno su proučavane u uslovima različitih abiotičkih stresora. Nađeni su ortolozi gena koji kodiraju učesnike HOG puta kod kvasca. Senzorni molekul ove gljive (SskA protein, homolog Ssk1p proteina kvasca) reaguje i na oksidativni stres. *Knock-out* mutant za protein SskA međutim, pokazuje smanjenu osetljivost, ali ne i potpuno odsustvo reakcije na osmotski stres, što ukazuje na postojanje složenije regulatorne mreže kod končastih gljiva (Duran, Cary, and Calvo 2010). Ovaj zaključak je u skladu sa činjenicom da kvasce odlikuje regresivna evolucija genoma koja se javila pri sekundarnom prelasku na jednoćeličnost (Braun et al. 2000). Integrativni model koji opisuje odgovor većeg broja signalnih puteva kvasca ne podrazumeva transport anjona (Ke et al, 2013). Zbog regresivne evolucije kvasaca koja ih čini funkcionalno zasebnom grupom, između kvasaca i končastih gljiva uporedivi su samo fiziološki mehanizmi koji su duboko ukorenjeni u živom svetu.

## 1.5.3 ORIC – IRIS

Izlazno ispravljena (rektifikovana) brzoinaktivirajuća trenutna struja - IRIS (eng. *outwardly rectifying fast inactivating instantaneous current*, ORIC) je dominantna anjonska struja registrovana u hipoosmotskim uslovima u membrani citoplazmatskih kapi *P.blakesleanus* (Križak et al. 2015). Karakteristike IRIS se značajno razlikuju od svih do sada opisanih jonskih kanala na gljivama, dok je odlikuje veliki broj sličnosti sa zapreminski regulisanom anjonskom strujom kičmenjaka (VRAC).

Prvo, IRIS je dozno-zavisno aktivirana razlikom u osmolarnosti između pipetnog i vanćelijskog rastvora, dok nije bila registrovana u snimanjima dominantnih struja CK u

izoosmotskim uslovima. Jedno odstupanje u ponašanju CK u odnosu na ćelije u kojima je registrovan VRAC je odsustvo pojave regulatornog smanjenja zapremine nakon hipoosmotske stimulacije, već je izmereno samo blago bubrenje koje dostiže plato nakon 10 minuta (Križak et al. 2015). Slično VRAC-u, IRIS je bilo moguće aktivirati u izoosmotskim uslovima u prisustvu unutarćelijskog analoga GTP-a.

IRIS odlikuje blago povećanje provodljivosti sa porastom depolarišućeg potencijala, tj izlazno ispravljanje, sa izračunatim naelektrisanjem vratnica približnom jedinici. Ona je dominantna izlazna struja u membrani CK na depolarišućim potencijalima, dok to nije slučaj na hiperpolarišućim potencijalima, na kojima često prevladavaju drugi tipovi struja, kao što je ulazna struja za čiji kanal se pretpostavlja da je provodljiviji za organske anjone. Depolarišući potencijali dovode do vrlo konzistentnog obrasca brze inaktivacije, koji nalikuje aktivnosti određenih izoformi VRAC kanala (Ullrich et al. 2016b).

IRIS je anjonska struja sa sekvencom provodljivosti koja odgovara Eisenman I seriji. Ispitana je selektivnost za sledeće anjone i utvrđen redosled provodljivosti,  $I^- : Cl^- : HCO_3^- : \text{glutamat} : \text{glukonat} = 1.4 : 1 : 0.25 : 0.01 : 0.088$ . Provodeći jon utiče na brzinu inaktivacije IRIS na depolarišućim potencijalima, pri čemu više provodljivi joni ubrzavaju inaktivaciju.

Odstupanje od sličnosti sa VRAC kanalom ogleda se i u odsustvu bloka struje poznatim klasičnim blokatorima anjonskih kanala – DIDS-om i DCPIB-om. DIDS je nespecifični blokator koji deluje kao čep na velikom broju anjonskih kanala, te je jako neobično da IRIS njime nije blokirana. Odsustvo osetljivosti IRIS na ove blokatore ukazuje na strukturne razlike u vanćelijskoj strani pore u poređenju sa VRAC. IRIS je, sa druge strane osetljiva na druge blokatore anjonskih kanala, antracen (A9C) i niflumičnu kiselinu (NA), za koje je pokazano da ujedno inhibiraju respiraciju i usporavaju rast *P. blakesleeanus*, (Stanić et al. 2017), kao i *N. crassa* (Hanke et al. 2001) i *C. albicans* (Baker et al. 2002). Pokazano je da prisustvo unutarćelijskog ATP-a pri registraciji IRIS u CK potpuno uklanja efekat antracena, dok blok niflumičnom kiselinom postoji, ali je momenat njenog efekta odložen za nekoliko minuta. Ovi podaci sugeršu spregnutost aktivnosti IRIS i metaboličkog statusa gljive.

## 1.6 Jonski kanali i metabolizam

Povezanost rada membranskih proteina sa metabolizmom ćelije često je regulisana alosteričkim efektom unutarćelijskog ATP-a i ili modulacijom fosforilacijom, za šta je ATP neophodan kao supstrat za kinaze. Jedan od najtemeljnije ispitivanih primera je modulacija kalijumskog ATP-zavisnog kanala ( $K_{ATP}$ ), koji predstavlja kompleks sačinjen od kalijumskog izlaznog ispravljača -  $K_iR$  kanala i sulfonilurea receptora (SUR). Smatra se da se ovaj kanal aktivira prilikom smanjenja unutarćelijskog ATP i predstavlja vezu između ćelijskog metabolizma i ekscitabilnosti u nervnom i mišićnom tkivu (Teramoto 2006) i  $\beta$ -ćelijama pankreasa (Ortiz et al. 2013). ATP se direktno vezuje za obe komponente  $K_{ATP}$  kanala, pri čemu alosterički izaziva suprotne efekte – vezivanje za SUR dovodi do konformacije koja aktivira kanal dok, u kompleksu sa Mg, vezivanjem za  $K_iR$  ostvaruje inhibitorni efekat (Sikimic et al. 2019a). Modulacija  $K_{ATP}$  je stoga jako kompleksna i predstavlja balans između aktivnosti ove dve komponente.

Inhibicija IRIS blokatorima ajonskh kanala (A9C i NA) koji ujedno utiču na respiraciju končastih gljiva ukazuje na moguću povezanost mehanizma reakcije na osmotski stres sa metaboličkim statusom gljive. ATP, kao supstrat za kinaze bi mogao da ostvaruje efekat posredno, ukoliko se otvoreno stanje kanala stabilizuje fosforilacijom. U slučaju kičmenjačkog

zapreminski regulisanog kanala nehidrolizabilni analog ATP-a u nekoj meri održava amplitudu VRAC-a pa se smatralo da je uloga koju ATP ostvaruje dvojaka (Bryan-Sisneros et al. 2000).

Metabolički status *P. blakesleeanus* je ispitivan u različitim uslovima (Stanić et al. 2017). Odnos slobodnih polifosfata je pokazan kao dobar indikator statusa disanja, a natrijum-azid kao pouzdan metabolički inhibitor. Azid se ruitnski primenjuje kao blokator citohrom-c oksidaze. Većina gljiva, među kojima je i *P. blakesleeanus* poseduju i alternativnu oksidazu AOX (M Zivić et al. 2009), koja omogućava prenos elektrona sa ubikvina mimo kompleksa III i kod nekih vrsta se eksprimira konstitutivno, dok se njena ekspresija češće aktivira prilikom inhibicije kompleksa III ili IV respiratornog lanca, tako da gljive nastavljaju sa aerobnim metabolizmom nakon kraćeg zastoja. Tretman azidom se pokazao kao efikasan i za sprečavanje resinteze ćelijskog zida micelijuma u uslovima ćelijske hirurgije (Pajić et al., n.d.), koji se neizbežno odigravao u kontrolnim uslovima, te je ovo još jedan pokazatelj njegove efikasnosti u usporavanju ćelijskih funkcija *P.blakesleeanus*.

Familija TOK kanala, ispitivan u *S.cerevisiae* (DUK1), a zatim i u končastim gljivama (nTOK) takođe je modulisan ATP-om tako da ATP sprečava njegovu inaktivaciju (Bertl et al. 1998).

## 1.7 Farmakologija osmotski aktiviranih anjonskih kanala

Poslednjih decenija vrši se intenzivna farmakološka karakterizacija zapreminski regulisanog kanala životinja, međutim još uvek nije pronađen blokator koji deluje na sve izoforme i visoko je specifičan samo za VRAC (Strange, Yamada, and Denton 2019). VRAC blokiraju brojni nespecifični blokatori: SITS (4-acetamido-4'-isothio-cyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid), DIDS (4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid), NFA (niflumic acid), FFA (fluflemic acid), NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid), DPC (diphenylamine-2-carboxylate), 9-AC (9-Anthracenecarboxylic acid), NPA (N-phenylanthracilic acid), sa EC<sub>50</sub> najčešće u opsegu od 1 do 100 μM (Figueroa and Denton 2022). DCPIB koji je nekada smatran specifičnim blokatorom VRAC-a takođe blokira mnoge druge anjonske kanale u sličnom opsegu koncentracija (Figueroa and Denton 2022). Kao što je pomenuto, IRIS nije osetljiva na DIDS i DCPIB, dok je inhibiraju antracen i niflumična kiselina.

**Karbenoksolon** (eng *carbenoxolone, cbx*), blokira zapreminski regulisan kanal kičmenjaka, ali ujedno i kanale koji formiraju pukotinaste veze – koneksine i kanale sa ulogom u regulaciji inflamacije - paneksine. Zanimljiva činjenica je postojanje strukturne sličnosti N-terminusa VRAC-a i paneksina, koja je navela na jednu od hipoteza o evolutivnom nastanku VRAC kanala prilikom razvajanja linije hordata (Abascal and Zardoya 2012). Pokazano je da karbenoksolon deluje i na votlažno - zavisani kalcijumski kanal u retini (Vessey et al. 2004) i GABA receptor (Connors 2012). Kao polaran molekul koji ne prolazi slobodno kroz ćelijsku membranu, karbenoksolon verovatno ostvaruje dejstvo na sve ciljane proteine sa vanćelijske strane, kako je pokazano u slučaju paneksina (Michalski and Kawate 2016).

Flavonoidi predstavljaju grupu polifenolnih sekundarnih metabolita biljaka, sa poznatim antioksidativnim dejstvom, i dejstvom koje ostvaruju vezivanjem za kinaze (Gamet-Payrastre et al. 1999), kao i brojne druge tipove proteina (Gao and Tang, n.d.). **Genistein** je fitoestrogen izolovan iz biljke *Genisteia tinctoria* (4,5,7 trihidroksi-izoflavon). Inicijalno je primenjivan kao nespecifični blokator tirozin-kinaza, i stimulator apoptoze. Utvrđen je njegov inhibitorski efekat na VRAC endotelnih ćelija (Voets et al. 1998). Ispitivanje efekta na ćelijama miocita sa druge strane, dalo je rezultate stimulatornog dejstva, kao i primenom specifičnog blokatora Src



kinaze, dok drugi blokator širokog spektra - tyrphostin A23 deluje inhibitorno (*Xin-Ling Du et al. 2004*). Struja potencirana genisteinom, blokirana je DIDS-om i tamokscifenom. To ukazuje na mogućnost postojanja složene regulatorne mreže koja zavisi od tipa ispitivane ćelije. **Kvercetin** je prirodni flavon biljaka i gljiva. Pokazano je njegovo učešće u regulaciji proliferacije i programirane ćelijske smrti ćelija (Kumar and Pandey 2013). Ispitivano je i njegovo antifungalno dejstvo, kao i efekat povećane senzitivnosti gljiva na antimikotike u prisustvu kvercetina (Nguyen and Bhattacharya 2022). Polifenolna jedinjenja su poznata i po svom izraženom antioksidativnom i potencijalnom antikancerogenom dejstvu. Kvercetin je kao antioksidans korišćen i za stabilizaciju protoplasta končastih gljiva, dobijenih enzimskom razgradnjom (Mosunova et al. 2016).

Sve veći broj istraživanja poslednjih godina ističe širinu spektra meta flavonoida. Proteini sa kojima interaguju ne razlikuju se samo na osnovu svoje sekvence već i po tipu konformacije džepova sa kojima flavonoidi interaguju, pri čemu je do sada samo za kvercetin ustanovljeno 8 različitih tipova. Ovo se objašnjava fleksibilnošću rotacije trećeg prstena oko jednostruke veze sa ostatkom molekula koji čini rigidna struktura preostala dva prstena, kao i brojnim polarnim bočnim grupama koje mogu ostvariti ceo spektar interakcija. Zapreminski regulisani kanal kičmenjaka osetljiv je na ukupno 34 molekula iz ove grupe, pri čemu su genstein i kvercetin među najpotentnijima (Xue et al. 2018b).

## 2. Ciljevi

U ovoj doktorskoj disertaciji su postavljena dva osnovna cilja koji su dalje razrađeni kroz potciljeve od kojih je svaki konkretizovan kroz neposredne istraživačke zadatke:

### 1. Bliža biofizička karakterizacija izlazno-ispravljačke brzoinaktivirajuće trenutne struje (IRIS) u modelu citoplazmatskih kapi. Ovaj cilj je razrađen kroz tri potcilja:

#### 1.1 Karakterizacija IRIS u konfiguraciji „cela ćelija“. U cilju detaljnog ispitivanja osobina IRIS, planirano je pet istraživačkih zadataka:

- 1.1.1 Analiza efekta ATP na voltažno-zavisnu inaktivaciju IRIS.
- 1.1.2 Utvrđivanje da li je za efekat ATP na IRIS neophodna hidroliza ATP-a.
- 1.1.3 Ispitivanje vremenske i voltažne zavisnosti oporavka IRIS od inaktivacije u prisustvu ATP.
- 1.1.4 Ispitivanje osjetljivost IRIS na različite farmakološke inhibitore i modulatore (flavonoide, ATP, CBX, azid).
- 1.1.5 Ispitivanje provodljivost za anjone koji su fiziološki značajni za končaste gljive (nitrati i fosfati).

#### 1.2 Registracija i identifikacija struja pojedinačnih kanala u osnovi IRIS, u istrgnutoj membrani. Ovaj potcilj je konkretizovan kroz tri istraživačka zadatka:

- 1.2.1 Registrovanje brzoinaktivirajuće struje na nivou pojedinačnih kanala.
- 1.2.2 Identifikacija struje pojedinačnih jonskih kanala koji nose IRIS u istrgnutoj membrani, na osnovu bloka vanćelijskim ATP i merenja oporavka od inaktivacije.
- 1.2.3 Merenje amplitude struje pojedinačnih kanala i utvrđivanje strujno-naponske zavisnosti pojedinačnih kanala u osnovi IRIS.

#### 1.3 Karakterizacija eksperimentalnog modela citoplazmatskih kapi. Radi ostvarivanja navedenog cilja planirani su sledeći istraživački zadaci:

- 1.3.1 Potvrđivanje plazmamebranske prirode membrane citoplazmatskih kapi elektrofiziološkim pristupom.
- 1.3.2 Utvrđivanje da li CK sadrže aktivne mitohondrije.

### 2. Elektrofiziološka registracija i tipizacija membranskih struja protoplasta hifa, oslobođenih ćelijskom mikrohirurgijom primenom TNVnDM. Ovaj cilj je razrađen kroz dva potcilja:

#### 2.1 Karakterizacija protoplasta dobijenih ćelijskom hirurgijom hifa kao model sistema za elektrofiziološka merenja sa ćelijske membrane končastih gljiva i poređenje efikasnosti ostvarivanja gigaomskog kontakta sa efikasnošću postignutom kod citoplazmatskih kapi. Radi ostvarenja navedenog cilja planirana su tri istraživačka zadatka:

- 2.1.1 Ostvarivanje gigaomskog kontakta sa ćelijskom membranom protoplasta oslobođenih mikrohirurgijom korišćenjem TNVnDM.
- 2.1.2 Utvrđivanje osobina protoplasta koje utiču na uspešnost ostvarivanja gigaomskog kontakta sa pipetom.
- 2.1.3 Upoređivanje otpora dobijenih kontakata sa pipetom korišćenjem TNVnDM i verovatnoće dobijanja gigaomskog kontakta na dobijenim protoplastima sa vrednostima dobijenim na CK.

- 2.2** Registracija dominantnih jonskih struja ćelijske membrane protoplasta iz hife *P. blakesleeanus* pomoću različitih konfiguracija TNVnDM. Ovaj potcilj će biti realizovan kroz pet istraživačkih zadataka:
- 2.2.1 Registrovanje i analiza osobina dominantnih jonskih struja ćelijske membrane celih protoplasta iz micelijuma *P. blakesleeanus* primenom konfiguracije TNVnDM cela ćelija.
  - 2.2.2 Registrovanje i analiza jonskih struja pojedinačnih kanala prisutnih na ćelijskoj membrani istrgnutoj sa protoplasta iz micelijuma *P. blakesleeanus* primenom istrgnutih konfiguracija TNVnDM „unutra – spolja“ i „spolja – spolja“.
  - 2.2.3 Klasifikacija jonskih struja sa protoplasta iz micelijuma *P. blakesleeanus*.
  - 2.2.4 Utvrđivanje postojanja obrasca prostorne distribucije jonskih struja protoplasta duž hifa *P. blakesleeanus*.
  - 2.2.5 Utvrđivanje aktivnosti IRIS u ćelijskoj membrani protoplasta iz micelijuma *P. blakesleeanus*

### 3. Materijal i metode

#### 3.1 Gajenje model organizma

Model organizam *Phycomyces blakesleeanus*, „wildtype“ soj NRRL1555(-) (Burgeff), korišćen je za dobijanje oba tipa model sistema – citoplazmatskih kapi (CK) sporangiofora i protoplasta hifa. Gljiva se gaji korišćenjem spora za vegetativno razmnožavanje - sporangiospora (kasnije u tekstu - spore), na čvrstom bogatom krompirovom medijumu i u tečnom minimalnom medijumu.

Čvrsti medijum priprema se (za zapreminu od 1 l) ekstrakovanjem šećera iz 200 g krompira kuvanjem (do sat vremena) i filtriranjem kroz dvoslojnu sterilnu gazu. U filtrat se zatim dodaje 20 g glukoze i 15 g agra. U slučaju primene 40 g/l PDA (potato-dextrose-agar) praha, u smesu je bilo neophodno dodati još 5 g čistog agra radi optimalnog stezanja. Za rast *P. blakesleeanus* neophodni sastojci u oba slučaja pripreme medijuma su i 1.5 g ekstrakta kvasca i 1 mg tiamina kao esencijalnog vitamina koji gljiva apsorbuje iz okruženja. Posude u kojima se medijum skladišti sterilišu se na 120°C pod pritiskom.

Za potrebe dobijanja hifa za ćelijsku hirurgiju, micelijum se gaji u tečnom minimalnom medijumu koji sadrži (za 1 l): 10 g glukoze, 2 g L-asparagin monohidrata, 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 500 mg  $\text{MgSO}_4(\times 7 \text{H}_2\text{O})$  i 10 ml unapred pripremljenog 100x koncentrovanog štoka mikroelemenata. Štok mikroelemenata sadrži: 100 mg/ml tiamina, 100 mg/ml limunske kiseline, 75 mg/ml  $\text{Fe}_2\text{NO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/ml  $\text{ZnSO}_4$ , 30 mg/ml  $\text{MnSO}_4$ , 5 mg/ml  $\text{CuSO}_4$  i 50 mg/ml  $\text{NaMoO}_4$ .

Spore se dugoročno (do 2 godine) skladište u koncentrovanim master štokovima, na -20°C. Za potrebe održavanja genetičke uniformnosti gljive, prilikom pravljenja novog master štoka spora, koriste se spore poreklom iz iste sporangije, tako što se sadržaj jedne sporangije oslobadja u 1 ml sterilne destilovane vode, čime se dobija rastvor koncentracije 50 000 spora/ml. Ovaj rastvor se razblažuje do koncentracije od 100 spora/ml za zasejavanje na čvrstom medijumu. Pred sejanje u oba tipa medijuma, neophodna je aktivacija spora, koja se izvodi inkubacijom u vodenom kupatilu na 49.5°C, minimalno 15 minuta. Medijum se razliva u petri kutije prethodno sterilisane UV lampom. Na ohlađen medijum razliva se 100 µl rastvora spora po petri kutiji. Petri kutije se drže u sterilisanim i navlaženim plastičnim prozirnim kutijama sa poklopcem radi održavanja vlažnosti vazduha, ispod fluorescentne lampe. Nakon 96 sati rasta, izrasli sporangiofori se uranjaju u sterilnu destilovanu vodu (1-1,5 ml / petri kutiji, u zavisnosti od gustine izrastanja). Gustina ovako pripremljenog koncentrovanog master štoka iznosi  $10^7$  spora/ml. Pre alikvotiranja štoka, razblaženje (10 000 spora/ml) se nanosi na hemocitometar radi provere koncentracije. Ovim se održava uniformnost u okviru rada sa istim štokom, ali se izdvajanjem nove sporangije za svaku sledeću generaciju i rizikuju potencijalni efekti veštačke selekcije. U toku izrade ove teze, novi master štok je pravljen 4 puta.

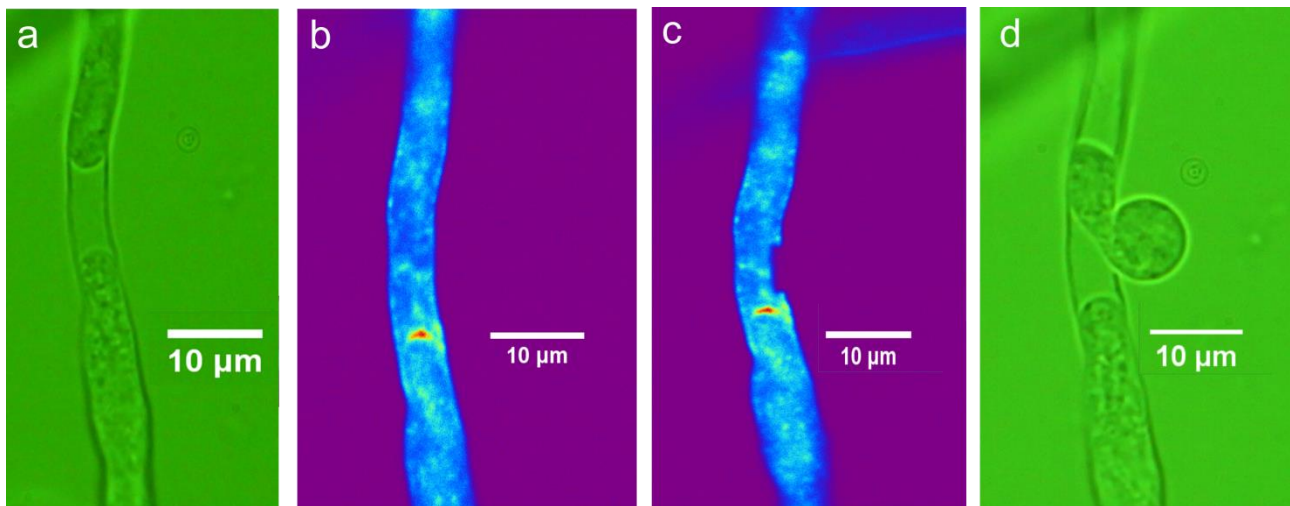
Za gajenje micelijuma u tečnom medijumu, pri zasejavanju koristi se koncentrovani štok, dok se za potrebe gajenja sporangiofora na čvrstom medijumu štok alikvotira i skladišti u koncentraciji  $10^4$  i razblažuje sterilnom destilovanom vodom neposredno pre sejanja do rastvora od 100 spora/ml. Za potrebe dobijanja sporangiofora koristi se isti alikvot spora do pripreme sledećeg master štoka. Za potrebe gajenja micelijuma u tečnom minimalnom medijumu, kako se za sejanje primenjuje koncentracija spora od  $10^7$  spora/ml, neophodno je periodično obnavljanje štoka gajenjem u petri kutijama po istom principu kao za pripremu master štoka, sa tim da se za zasejavanje polazi od alikvota iz postojećeg master štoka.

## 3.2 Dobijanje protoplasta ćelijskom hirurgijom

Za potrebe dobijanja micelijuma za ćelijsku hirurgiju, spore se zasejavaju u bunarićima, na pokrovnom staklu tretiranom tankim slojem 50 % kolagena. Radni rastvor kolagena pripreman je (za 1 ml) mešanjem 500  $\mu$ l gotovog rastvora nepolimerisanog kolagena (tip I, *Corning*) sa 100  $\mu$ l PBS-a, 2  $\mu$ l NaOH i 398  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Radi što boljeg lepljenja za podlogu procedura se sastoji iz prvobitnog nanošenja direktno na tretiranu pločicu oko 100  $\mu$ l štoka aktiviranih spora ( $10^7$ ), razblaženog 3-5 puta minimalnim medijumom, a tek nakon sat vremena u bunarić se dodaje još 1 ml medijuma kako bi se obezbedilo da spore kličaju na kolagenu i izbeglo sušenje pločice.

Za ćelijsku hirurgiju koriste se hife stare do 24 sata. Usled neuniformne aktivacije spora, u istom preparatu mogu se naći i hife stare tek nekoliko sati. Na micelijum zasejan na pločicama sa kolagenom nanosi se Calcofluor white fluorescentni indikator koji se vezuje za komponente ćelijskog zida (100x razblaženje u rastvoru od 495 mOsm), pokriva neprozirnom folijom i inkubira 20 minuta. Nakon toga boja se ispira i pločica smešta u mikroskopsku komoricu ispunjenu hiperosmotskim rastvorom (tabela 2) za plazmolizu.

Ćelijska hirurgija se obavlja Ti:Sapphire femtosekundnim laserom (*MIRA 900-F, Coherent Inc. CA, USA*), na aparaturi za dvofotonsku lasersku skenirajuću mikroskopiju (DFSM). Ultrakratki laserski pulsevi (160 fs, u razmacima od 13 ns) fokusiraju se na ćelijski zid hife u regionu sa kojeg se membrana povukla u procesu plazmolize. Laserski snop je imao talasnu dužinu podešenu za optimalnu apsorpciju korišćene boje (730 nm). Visok intenzitet u fokalnoj zapremini laserskog snopa postignut je fiziološkim objektivom visoke numeričke aperture (*Carl Zeiss W Plan-Apochromat 40X, NA 1.0*) i primenom ultra kratkih pulseva koji omogućavaju visoku vršnu snagu. Ovi uslovi omogućavaju dvofotonsku apsorpciju kojom se postiže efekat ekvivalentan ozračivanju fotonima u UV-opsegu talasne dužine u tački fokusa, dok sa udaljavanjem od tačke fokusa snaga nelinearno opada, čime se verovatnoća za dvofotonsku apsorpciju drastično smanjuje. Opseg primenjene snage za hirurgiju ćelijskog zida kretao se između 4 i 14 mW na uzorku. Preparat se prethodno dvofotonski oslikava, snagom oko 1-2 mW na uzorku. Snaga lasera primenjena za oslikavanje i lasersku ablaciju prvenstveno zavisi od efikasnosti bojenja Calcofluor indikatorom i debljine ćeliskog zida hife. Optimizacija protokola ćelijske hirurgije je van opsega ove disertacije. Po uklanjanju ćelijskog zida, deo hiperosmotskog rastvora (610-670 mOsm) se izmenjuje rastvorom od 520 mOsm, kako bi se se stimulisao izlazak protoplasta. U oko 50 % slučajeva protoplasti se izdvajaju iz hife i odmah po uklanjanju zida (Slika 3.1).



Slika 3.1. Hifa *P. blakesleeanus* tokom izvođenja ćelijske hirurgije. a: plazmolizovana hifa snimljena oslikavanjem svetlim poljem; b: hifa obojena Calcofluor indikatorom i oslikana dvofotonskom mikroskopijom; c: ista hifa nakon mikrohirurškog uklanjanja dela ćelijskog zida; d: spontani izlazak protoplasta nakon ćelijske hirurgije.

### 3.3 Priprema preparata citoplazmatskih kapi

Za potrebe dobijanja citoplazmatskih kapi iz sporangiofora, gljiva se gaji čvrstom medijumu, koji se razliva u staklene violice sterilisane visokom temperaturom, do 2/3 njihove zapremine. Na ohlađeni čvrsti medijum razliva se rastvor aktiviranih spora (20 µl po violici) koncentracije 100 spora/ml. Violice u stalcima se gaje po istom principu, u plastičnim kutijama pod fluorescentom lampom. Micelijum postaje vidljiv nakon 48 h kada počinje da formira sporangiofore, a već nakon 72 h prvi sporangiofori dostižu IVb fazu rasta, koju odlikuje zrela sporangiujna i zona rasta koja zauzima dominantan deo zapremine.

Sporangiofori optimalni za pripremu preparata su velikog promera za pojedinačnu ćeliju, vidljivi golim okom i rastu bez krivljenja, pošto ih karakteriše maksimalna krutost koja olakšava sečenje i mase citoplazmatskog materijala koji izbacuju. Kako njihov prečnik zavisi od gustine sejanja, optimalna gustina je ta koja daje 3-5 sporangiofora iz iste faze rasta po violici (brzina aktivacije spora nije uniformna, pa se u svakoj violici nalaze sporangiofori u različitim fazama rasta). Sa uklanjanjem sporangiofora, naredna generacija je manje brojna pa samim tim većeg prečnika. Negativan efekat na prinos CK predstavlja i diskontinuirano izlaganje svetlosti i oscilacije u temperaturi u fazi rasta sporangiofora (u slučaju transporta zasejane kulture na drugu lokaciju), dok transport u fazi micelije ne utiče na osobine izraslih sporangiofora.

Preparat se priprema uranjanjem sporangiofora u mikroskopsku komoricu ispunjenu vanćelijskim rastvorom. Vrh se seče 2 milimetra ispod sporangije (radi pouzdanog obuhvatanja zone rasta). Sporangija se pažljivo vadi iz rastvora odmah po isecanju, kako bi se sprečilo oslobađanje prevelikog broja spora u preparat. Prisustvo spora u preparatu je neizbežno, jer opna sporangije puca ubrzo po kontaktu sa tečnošću. U proseku, po preparatu, utroši se 15 do 20 sporangiofora. Preparat se ostavlja najmanje 20 minuta kako bi se citoplazmatske kapi slegle, stabilisale i zalepile za podlogu.

Isprobano je nekoliko podloga za imobilizaciju CK, radi mogućnosti korišćenja perfuzije kao i istrzanja membrane za potrebe registracije aktivnosti pojedinačnih kanala. Testirani su konkanavalin A (conA, Sigma Aldrich), kolagen (tip I, Corning) i laminin u kombinaciji sa poly lizinom (Sigma Aldrich), pri čemu je preparat posmatran pod jakom perfuzijom (tabela 1).

Tabela 1. Efikasnost 3 tipa podloge u vezivanju membrane CK nasuprot vezivanju ćelijskog zida spora. CK označene kao „manje“, su dijametra  $<30\mu\text{m}$ , a „veće“  $>30\mu\text{m}$ . Raspon efikasnosti od jednog do 4 znaka „+“ označava potpuno odsustvo željenog efekta (1) do potpunog efekta (ni jedna CK odlepljena perfuzijom, i sve spore uklonjene perfuzijom).

	odsustvo zadržavanja spora	održavanje manjih CK	održavanje većih CK
PLL + laminin	+++	++++	+++
kolagen	++	+++	+
Con-A	+++	++++	++++

Primenom perfuzije, ili izmenom rastvora pipetom, moguće je eliminisati većinu spora i ostataka kolumele sporangije, kao i ostatke neformirane citoplazme, koja u najvećoj meri ugrožava čistoću pipete od koje zavisi uspešnost ostvarivanja gigaomskog kontakta. Parametri koji su pracen su broj i veličina preživelih citoplazmatskih kapi po prosečnom vidnom polju, naspram ispiranja spora i ostataka opne sporangije, čiji je grub proporcionalni odnos prikazan brojem „+“ simbola u tabeli 1. Utvrđeno je da se CK najefikasnije imobilizuju na konkanavalinu A, dok se spore slabo zadržavaju, te je nadalje korišćen kao podloga za sve eksperimente rađene na CK.

Konkanavalin A se skladišti u vodenom rastvoru na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Radna koncentracija od  $100\mu\text{g/ml}$  se razliva na pokrovna stakla koja odgovaraju dnu mikroskopske komorice i ostavlja da polimeriše na sobnoj temperaturi, minimum 12 sati. Stakla se prethodno sterilizuju držanjem u etanolu 20 minuta, nakon čega se ispiraju destilovanom vodom i ostavljaju pod UV lampom da se osuše i dodatno sterilizuju još pola sata.

### 3.4 Rastvori

Za formiranje citoplazmatskih kapi neophodno je prisustvo divalentnih katjona, kao i osmolarnost preko  $450\text{mOsm}$ , dok se ostale komponente rastvora variraju prema potrebama eksperimenta.

Standardni vanćelijski rastvor (S-V) za formiranje i registraciju sa citoplazmatskih kapi sadrži (u mM): 65 KCl, 60 K-glutamat, 10 HEPES, 2  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 263 saharoza, pH podešen do 7-7.1 kalijum-hidroksidom. Standardni pipetni rastvor (SP) za hipoosmotsku aktivaciju sadrži (u mM): 65 KCl, 60 K-glutamat, 10 HEPES, 2 EGTA, 2  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , i podešen je saharozom do  $550\text{mOsm}$ , pH 7-7.1. Za testiranje efekta nehidrolizabilnog analoga ATP, primenjuje se  $2\text{mM}$  AMP PCP (adenylyl-( $\beta,\gamma$ -methylene)-diphosphonate, tetralithium salt, *Sigma Aldrich*). Pipetni rastvor za testiranje spontanog pada amplitude struje u vremenu ima isti sastav, bez ATP-a. Za registraciju IRIS sa CK u istrgnutim konfiguracijama, korišćeni su SE i SP rastvori, kao i rastvori u kojima je sav glutamat zamenjen kalijum-hloridom. U rastvorima za testiranje provodljivosti nitrata i fosfata, KCl i K-glutamat su zamenjeni K-nitratom, odnosno kalijum dihidrogen-fosfatom. Hloridi su u vanćelijskom rastvoru dodati u vidu  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{MgCl}_2$ , dok je u pipetni rastvor dodato  $2\text{mM}$  KCl-a, kako bi srebro-hloridne elektrode funkcionisale.

Za aktivaciju IRIS u izoosmotskim uslovima korišćen je SV i nekoliko varijacija pipetnog rastvora:

- Izoosmotski SP rastvor, sa sniženom koncentracijom saharoze, tako da odgovara osmolarnosti SE rastvora;
- Pipetni rastvor identičnog sastava kao SE, sa izuzetim  $\text{CaCl}_2$ ;
- Izoosmotski pipetni rastvor smanjene jonske jačine, u kojem je 100mOsm KCl-a zamenjeno saharozom u odnosu na izoosmotski SI;
- Izoosmotski pipetni rastvor povećane jonske jačine u kojem je 200mOsm saharoze zamenjeno KCl-om u odnosu na SP rastvor.

Za proveru dozne osetljivosti IRIS na hipoosmotsku stimulaciju, korišćen je SP podešen saharozom do 630 mOsm.

Za registraciju struja sa protoplasta micelijuma korišćeno je nekoliko varijacija rastvora, pri čemu svaka kombinacija pipetnog i vanćelijskog rastvora omogućava asimetrične koncentracije jona kako bi se ispitala provodljivost registrovanih struja na osnovu potencijala reverzije za svaki jon. Svi rastvori sadrže 10 mM HEPES i podešeni su na neutralnu pH vrednost, a svi ekstracelularni rastvori sadrže 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Svi vanćelijski rastvori podešeni su sorbitolom do ciljane osmolarnosti, dok su pipetni rastvori podešeni saharozom. Prema sastavu ostalih komponentni, rastvori su podeljeni prema tabelama 2-4. Primenjivane su kombinacije, pri čemu su hiperosmotski vanćelijski rastvori za plazmolizu i ablaciju zida označeni velikim slovima, vanćelijski rastvori niže osmolarnosti koji se dodaju u preparat pred NVnDM malim slovima, a pipetni rastvori brojevima, u tabelama su naznačene komponente čije se koncentracije razlikuju između rastvora.

Tabela 2. Sastav pipetnih rastvora korišćenih za ćelijsku hirurgiju označeni brojevma 1-5.

1	2	3	4	5
570 mOsm 5 $\text{CaCl}_2$ 125 KCl	618 mOsm 1 $\text{CaCl}_2$ 125 KCl 5 K-glu	650 mOsm 1 $\text{CaCl}_2$ 50 KCl 1 K-glu	570 mOsm 1 $\text{CaCl}_2$ 125 TEA-Cl	640 mOsm 1 $\text{CaCl}_2$ 80 KCl

Tabela 3. Sastav vanćelijskih hiperosmotskih rastvora za za plazmolizu i ćelijsku mikrohirurgiju označeni slovima A-D.

A	B	C	D
620m Osm 30 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 60 KCl 65 K-glut	620 mOsm 30 $\text{CaCl}_2$ 100 K-glut 25 KCl	636 mOsm 30 $\text{CaCl}_2$ 125 TEA-Cl	680 mOsm 30 $\text{CaCl}_2$ 125 KCl

Tabela 4. Rastvori za dodavanje u komoricu pred TNVnDM označeni slovima a-c.

a	b	c
520mOsm 5 $\text{CaCl}_2$ , 125 KCl	520 mOsm 5 $\text{CaCl}_2$ , 125 K-glu	510 mOsm 5 $\text{CaCl}_2$

Kombinacije navedenih rastvora daju različite vrednosti Nernstvorih potencijala za svaki jon, koje su prikazane u tabeli 5.



Tabela 5. Nernstovi potencijali za svaki jon (redovi) pri različitim kombinacijama rastvora iz tabele 2 (kolone). Sve vrednosti potencijala reverzije (u mV) se odnose na konfiguraciju spolja-spolja, kada su pipetni rastvori sa unutarćelijske strane.

	A+a+1	A+a+3	B+b+2	C+c+4	D+a+5
Cl <sup>-</sup>	13	-10	16	-1	20
K <sup>+</sup>	0	21	0		-11
glutamat	-567	-58	-119	20	
Ca <sup>++</sup>	20	40	40		40
Mg <sup>++</sup>	0	0	0		
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<<0				

Snimanje membranskog poencijala u režimu nametanja struje izvedeno je primenom izoosmotskog SP rastvora sa glutamatom izmenjenim hlorom, dok je pored SE rastvora korišćen i rastvor sličan APW (artificial pond water) rastvoru, koji odlikuje nizak jonski sastav: 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, podešen saharozom do 495 mOsm, i pH vrednosti 6, bez tretiranja puferom.

Svi rastvori su filtrirani (i time i sterilisani) korišćenjem 22 µm filtera, alikvotirani i skladišteni na -20°C. Pipetni rastvori koji su sadržali ATP/ AMP PCP su tokom eksperimenata držani na u špricu za punjenje na rashladnom stalku.

### 3.5 Hemikalije

Flavonol kvercetin (*Sigma Aldrich*) i izoflavon genistein (*Tokyo chemical industry*), korišćeni za ispitivanje inhibicije IRIS skladišteni su u koncentrovanim štokovima (30 mM) u DMSO i razblaženi do finalne koncentracije u komorici tokom eksperimenta. Sintetički analog kvercetina LY294002 (*Sigma Aldrich*), koji je nepemeabilan za ćelijsku membranu, pripreman je u DMSO štoku i zatim razblaživan u pipetnom rastvoru do finalne koncentracije od 1 0µM neposredno pred eksperiment. Koncentrovani štok natrijum-vanadata od 200 mM pravljen je u PBS-u, prema protokolu opisanom od strane Gordon *et al* (Gordon 1991). Pred eksperiment, štok vanadata je razblažen u dva koraka, prvo 10 puta u SE, a zatim do finalne koncentracije dodavanjem u mikroskopsku komoricu tokom eksperimenta. Natrijum-azid rastvaran je u vodi u koncentraciji od 500 mM i razblaživan u komorici tokom pripreme preparata radi inkubacije. ATP i AMP PCP (*Sigma Aldrich*) rastvarani su direktno u SP rastvorima prilikom njihove pripreme. ATP za potrebe ekstracelularnog apliciranja rastvaran je u vodi u koncentraciji od 50 mM. Svi agensi su u štokovima čuvani na -20°C, alikvotirani u malim zapreminama u ependorf tubicama, koje su jednokratno odmrzavane pred svaki eksperiment. Radni rastvori su pred apliciranje držani na rashladnim ulošcima, i razblaženi su dodavanjem male zapremine koncentrovanog štoka direktno u komoricu za registraciju.

### 3.6 Oslikavanje citoplazmatskih kapi

Autofluorescentni signal CK, kao i emisija fluorescentnih indikatora su snimani dvofotonskim pobuđivanjem, na istom sistemu na kojem je izvođena i ćelijska hirurgija. Citoplazmatske kapi formirane su u standardnom ekstracelularnom rastvoru, nalivenom na pločicu sa konkanavalinom A (60  $\mu$ l). Pločica je postavljena na mikroskopsko staklo sa dve strane ovičeno fiksiranim pokrovnim stakalcima debljine 300  $\mu$ m. Preko preparata je nanošeno novo pokrovno staklo posle čega je postavljan pod uljano-imerzioni objektiv (*Carl Zeiss, EC Plan-Neofluar* 40X, NA 1.3). Autofluorescentni signal sniman je skeniranjem snagom od 3.8 mW na talasnoj dužini od 730 nm. Signal je filtriran interferencionim filterom na 479 nm sa opsegom  $\pm 20$  nm i detektovan fotomultiplikatorom. CK bojene fluorescentnim indikatorom Rh123 (2-(6-amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl) benzoic acid methyl ester, Sigma-Aldrich), su bile inkubirane u boji finalne koncentracije 5  $\mu$ M 30 minuta i snimane bez prethodnog ispiranja. Rh123 je skladišten u koncentrovanom štoku od 1.8 mM, a pred eksperiment prvo razblažen 72 puta i finalno još 5 puta mešanjem sa SV pred nalivanje na pločicu sa podlogom, koja se dalje tretirala na isti način. Signal Rh123 indikatora dobijen je pobuđivanjem snagom od 3.5 mW, na 800 nm a detektovan kroz filter MF 530  $\pm$  21.5 nm. CK bojene DAPI indikatorom, inkubirane su 10 minuta u 0.4  $\mu$ M boje, snimane na 730 nm snagom od 5 mW, a signal je detektovan kroz filter 479  $\pm$  20 nm.

### 3.7 Eksperimenti nametanja voltaže na deliću membrane – instrumentalna postavka

Aktivnost IRIS u CK i dominantnih struja protoplasta micelijuma registrovana je u dve konfiguracije tehnike nametanja voltaže na deliću membrane:

Konfiguracija „cela ćelija“, za registraciju ukupnih struja citoplazmatičnih kapi, koja se postiže ostvarivanjem gigaomskog kontakta, nakon čega dodatni kratki pulsevi negativnog pritiska špricom u oba smera dovode do prekida membrane pod pipetom i otvaranja unutrašnjosti kapi ka mikropipeti. Radi utvrđivanja veličine pritiska namenutog na membranu prilikom ostvarivanja gigaomskog kontakta i ulaska u konfiguraciju cela ćelija, na sistem za sukciju u jednom setu merenja bio je povezan manometar, koji je merio nivo pozitivnog pritiska koji se dovodi na membranu za date nepromenjive uslove (zapremina šprica, promer i dužina creva za sukciju koje dovodi vazduh do nosača pipete). Za ostvarivanje gigaomskog kontakta prethodno nametnutii pozitivan pritisak pred uranjanje pipete iznosio je  $60 \pm 10$  mbar, pri čemu se kontakt pipete i CK najčešće ostvarivao trenutno po otpuštanju pritiska. Vrednost negativnog pritiska grubo je procenjena na osnovu promene zapremine šprica pri pomeranju klipa za određeni broj podeoka, pri čemu se uzima da je promena ista u oba smera, te je procenjeno da se za ulazak u konfiguraciju „cela ćelija“ membrana izlaže negativnoj promeni pritiska od  $20 \pm 5$  mbar, u vidu naglog povlačenja klipa šprica, pri čemu je često potrebno 2-3 puta ponoviti postupak.

Konfiguracija „spolja-spolja“, je uspostavljena nakon što se IRIS registruje po ulasku u konfiguraciju „cela-ćelija“, primenom standardne serije pravougaonih protokola. Praćen je udeo uspešno istrgnutih membrana sa porastom otpora kontakta u odnosu na ukupan broj pokušaja, kao i amplitude dobijenih struja iz fragmenta membrane u odnosu na veličinu primenjene pipete.

Instrumentalna postavka se u određenom periodu razlikovala u zavisnosti od primenjene konfiguracije. Pri registraciji ukupnih struja, radi preciznog praćenja parametara konfiguracije „cela ćelija“, prvobitno je korišćen *Clampex7* softver, pretpojačavač AM Systems 2400 (*AM systems, USA*) i analogno-digitalni pretvarač *Digidata 1200* (*Molecular Devices, USA*). Odnos serijskog otpora („access resistance“,  $R_a$ ) i otpora membrane ( $R_m$ ) je ključan za procenu validnosti voltažne kontrole, jer i usled same aktivnosti IRIS-a membranski otpor po ulasku u konfiguraciju „cela ćelija“ pada na oko 100 do 200 M $\Omega$ . Zbog varijabilnosti u veličini citoplazmatskih kapi, neophodno je merenje kapacitivnosti membrane ( $C_m$ ), koja je proporcionalna njenoj površini, da bi se iz količnika amplitude struje i kapacitivnosti izvela gustina struje, koja onda omogućava validnije poređenje između grupa podataka.

Struje pojedinačnih kanala prvobitno su snimane u *Pulse* softveru koristeći EPC8 pretpojačavač i ITC16 analogno-digitalni pretvarač (*HEKA Electronics, Nemačka*). Isti sistem, izuzev softvera, korišćen je i za snimanje ukupnih struja sa membrane u određenim eksperimentima, kada se *Digidata* pretvarač iz tehničkih razloga nije mogao koristiti. U tom slučaju, korišćen je *WinWCP* softver u kojem je moguće pratiti stabilnost ulaznog otpora u „membrane test“ odeljku, koji ne postoji u *Pulse* softveru, s tim da se vrednost kapacitivnosti membrane izvodi na drugačiji način u odnosu na *Clampfit* softver, pa su stoga podaci o gustinama neuporedivi. Po unapređenju sistema sve konfiguracije snimane su u *PClamp11* programu (*Molecular Devices, SAD*), *Axopatch 200B* pretpojačavačem i *Digidata 1550* pretvaračem. Svi rezultati analizirani su u *Clampex* softveru.

Za potrebe merenja membranskog potencijala CK *P.blakesleanus*, primenjen je režim nametanja struje na *Axopatch 200B* pretpojačavaču, u konfiguraciji „cela ćelija“. Protokol je podrazumevao pasivno praćenje membranskog potencijala bez stimulacije, te kompenzacija serijskih otpora nije bila neophodna.

Struje pojedinačnih kanala protoplasta micelijuma snimane su u navedenim konfiguracijama, kao i konfiguraciji „unutra-spolja“, dobijenoj istrzanjem membrane neposredno nakon uspostavljanja gigaomskog kontakta.

Tokom trajanja merenja sa jednog preparata, nije bio korišćen sistem za perfuziju. Tipično trajanje merenja u CK preparatu je sat vremena, dok je sa protoplasta dobijenih mikrohirurgijom često snimano i duže od dva sata. Oba tipa preparata su pripremana u mikroskopskim komoricama zapremina 600  $\mu$ l i 330  $\mu$ l. Pri merenjima dužim od sat vremena, zbog neizbežnog isparavanja vode iz rastvora, posebno u slučaju zapremine manje komorice, u prepat je ili dodavana voda (oko 10 % početne zapremine) ili je u više navrata po polovina zapremine iz komorice pipetom izmenjena svežim vanćelijskim rastvorom.

### 3.8 Pipete

Za dobijanje mikropipeta korišćeno je debelozidno borosilikatno staklo sa filamentom, proizvođača *Sutter* i *Science products*, u oba slučaja model GB150F 0.86 x 1.50x100 mm. Mikropipete su zvlačene na horizontalnom automatskom instrumentu za izvlačenje P97, *Sutter Instruments*. Pipete su polirane na *Microforge* sistemu (L/MCPZ 101, *List Medical-Elektronik*), zagrevanjem žice protokom struje do 2500 mA. Pipete korišćene na protoplastima dobijenim ćelijskom hirurgijom su dvostruko polirane – po izvlačenju i pred sam eksperiment.

Pipete koje su najčešće korišćene za konfiguraciju cela ćelija bile su otpora od 5-7 M $\Omega$  što je omogućilo uspostavljanje gigaomskog otpora uz primenu lagane sukucije i nije dovelo do degradacije ili usisavanja citoplazmatičnih kapi pri ulasku u konfiguraciju „cela ćelija“. Za potrebe snimanja grupe pojedinačnih kanala u osnovi ORIC-a u konfiguraciji „spolja spolja“, korišćene su pipete otpora 8-10 M $\Omega$ .

Za snimanje pojedinačnih kanala u konfiguracijama „unutra-spolja“ i „spolja-spolja“ sa citoplazmatskih kapi i protoplasta hifa primenjene su oštrije pipete, otpora od 12 do 19 M $\Omega$ .

### 3.9 Eksperimentalni protokoli

Nakon ulaska u konfiguraciju „cela ćelija“, praćeni su parametri (otpor membrane, serijski otpor i kapacitivnost membrane) u odgovoru na test stimulus od 5 mV u „membrane test“ odeljku Clampfit softvera. Snimci su smatrani stabilnim ukoliko parametri nisu oscilirali više od 20 % i voltažna kontrola pouzdana ukoliko je otpor membrane višestruko (minimalno 4x) prevazilazio ulazni otpor.

Standardni protokol za snimanje u konfiguraciji „cela ćelija“ sastoji se iz serije pravougaonih stimulusa istog trajanja i početnih potencijala (-50 mV), sa rastućim amplitudama koje kreću od -130 mV do +90 mV u koracima od 20 mV. Serijski otpori nisu kompenzovani u modu nametanja napona. Trajanje svakog pravougaonog stimulusa je 500 ms, sa vremenom odmora od 500-1000 ms. Standardni protokol je korišćen za utvrđivanje voltažno-zavisnih osobina registrovanih struja u konfiguraciji „cela ćelija“, snimanih u različitim uslovima, pri čemu se izmerene vrednosti amplituda prikazuju u funkciji napona (I-V dijagram). Za potrebe snimanja kontrolnih zapisa i efekta blokatora, standardni protokol je korišćen u razmacima od jednog minuta u trajanju do 20 min.

Protokol za testiranje oporavka od inaktivacije izazvane depolarišućim potencijalom (P1P2 protokol), sastoji se od dva uzastopna pravougaona stimulusa od +70 mV, pri čemu prvi polazi od potencijala od -130 mV, dok je potencijal i trajanje perioda između dva pulsa variran. Amplituda inaktivirajuće komponente struje ( $I_p$ ) pri odgovoru na drugi voltažni stimulus (P2) normalizovana je vrednošću odgovora na prvi stimulus (P1). Radi registracije aktivnosti pojedinačnih kanala u osnovi IRIS, nakon stimulacije u konfiguraciji „cela ćelija“ snimana je struja sa istrgnute membrane u konfiguraciji „spolja-spolja“. Neposredno po uspostavljanju druge konfiguracije, sniman je standardni protokol ili serija pravougaonih stimulusa na +70 mV nakon početnog hiperpolarišućeg potencijala. Primenom pipete sa dovoljno velikim otvorom, u optimalnom slučaju može se registrovati dovoljan broj kanala koji će obrazovati stepeničasti obrazac inaktivacije (SOI) na +70 mV koji odražava karakterističnu inaktivaciju makroskopske struje. Za identifikaciju registrovanog kanala dodatno je korišćen i protokol za merenje oporavka od inaktivacije.

Za merenje struja protoplasta dobijenih mikrohirurgijom, pored standardnog protokola, primenjivan je i rampa stimulus, sa rasponom od -110 do +110 mV, u trajanju od 100 ms, kao i rampa protokol produžen u početnom delu za 20 ms tokom kojih se održava početni potencijal od -110 mV, čime se dozvoljava pražnjenje kapacitivnog tranzijenta bez kontaminacije odgovora na nagib potencijala. Za analizu dinamike otvaranja pojedinačnih kanala primenjeni su i kontinualni protokoli od po 30s, na različitim potencijalima membrane.

### 3.10 Analiza rezultata

Analiza rezultata obavljena je u Clampfit (*Molecular Devices USA*), Grafpad Prism (*San Diego USA*) i MS Excel softweru.

Za analizu profila voltažne i vremenske zavisnosti IRIS, uzimane su dve vrednosti : vršna (peak) struja ( $I_p$ ), koja se meri sa početnog dela strujnog zapisa odmah iza kapacitativnog tranzijenta, i stacionarna ( $I_s$ ) struja, koja se meri na kraju strujnog odgovora. U oba slučaja oduziman je odgovor na početni nametnuti potencijal.

Frakcija inaktivirajuće struje (FIS), je veličina definisana kao odnos  $(I_p - I_s)/I_p$ , koja je korišćena kao pokazatelj nivoa inaktivacije IRIS u različitim uslovima snimanja. Kriva zavisnosti FIS od nametnutog potencijala membrane ugađana je Bolcmanovom funkcijom:

$$FIS(V) = FIS_{min} + \frac{FIS_{max} - FIS_{min}}{1 + e^{zDF(V_{0.5} - V)/RT}} \quad (1)$$

Gde je  $z$  vratničko naelektrisanje,  $F$  Faradejeva konstanta (96,485 C/mol),  $V_{0.5}$  potencijal poluinaktivacije,  $V$ - nametnuti potencijal membrane,  $R$  univerzalna gasna konstanta (8.314 J / mol) i  $T$  apsolutna temperatura izražena u Kelvinima.

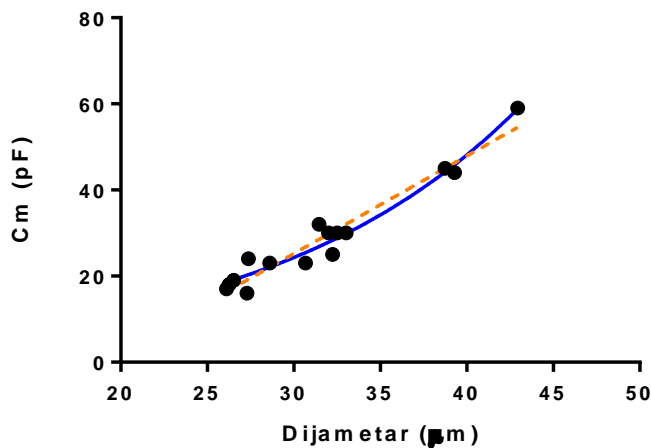
Vremenska dinamika inaktivacije IRIS i ukupnih struja sa protoplata micelije analizira se fitovanjem strujnog zapisa jednodimenzionalnom eksponencijalnom funkcijom, prema formuli:

$$Y(t) = Y_0 e^{t/\tau} + C \quad (2)$$

Gde je  $Y(t)$  vrednost amplitude struje u vremenu,  $Y_0$  početna amplituda, a  $C$  stacionarna amplituda struje nakon završenog procesa inaktivacije. Iz ovog obrasca izvodi se vrednost  $\tau_{in}$  - vremenska konstanta inaktivacije, koja je dalje analizirana u funkciji vremena i napona.

Za ispitivanje vremenskog profila IRIS u kontrolnim zapisima i pod uticajem inhibirajućih supstanci, najčešće je korišćena vrednost  $I_p$ , normalizovana na vrednost na početku snimanja, ili vrednost pred dodavanje blokatora. Srednji procenat bloka je određivan poređenjem kontrolne i vrednosti merene u određenoj vremenskoj tački (2. minut za vanćelijski blok, 3. minut za blok sa unutarćelijske strane). Za poređenje efekata na voltažno-zavisne osobine u različitim tretmanima u pipetnom rastvoru, uzete su vremenske tačke nakon utvrđenog perioda tokom kojeg se odigrava dijaliza CK pipetnim rastvorom.

Za poređenje efekta različitih parametara na aktivaciju struje, neophodno je izvođenje gustine struje, kojom se uniformiše odgovor CK različitih veličina. Na osnovu merenja vrednosti  $C_m$  u eksperimentima izvedenim u Clampex softweru, u okviru kojih su CK slikane digitalnom kamerom (DCC1545M, Torcam), konstruisana je kriva zavisnosti  $C_m$  od dijametra CK (grafik 1), nakon utvrđivanja dijametra i površine membrane CK na osnovu dobijenih slika u TorCam softveru.



Slika 3.2. Zavisnost  $C_m$  vrednosti izmerene u Clampex softveru od dijametra.  $n=16$ , prikazane su sve tačke sa fitovanjem eksponencijalnom funkcijom (plava kriva) i linearnom regresijom (narandžasta isprekidana linija), kako su u ovom opsegu merenja zavisnosti približne, za aproksimaciju  $C_m$  je korišćena linearna zavisnost od dijametra ( $R^2=0.89$ ).

Ova aproksimacija na osnovu poznatog dijametra korišćena je u nekoliko eksperimenata u kojima je  $C_m$  određivan na osnovu softverskog fita koji se razlikuje od Clampex softvera radi provere uporedivosti, i retkim slučajevima kada je šum bazne linije dovodio do fluktuacije svih vrednosti fita radi dodatne potvrde koja vrednost je realna.

Pri ispitivanju efekta ekstracelularnog ATP, kada je primenjena serija koncentracija, procenat bloka je prikazan u funkciji koncentracije, a zavisnost ugađan Hilovom funkcijom za dozno-zavisan odgovor sa varijabilnim nagibom u Graphpad softveru.

$$\left(1 - \frac{I_p}{I_{pcontrol}}\right) * 100\% = \frac{[ATP]^n}{EC50^n + [ATP]^n} \quad (3)$$

Gde  $n$  označava Hilov koeficijent koji ukazuje na prisustvo kooperativnog efekta kada je veći od jedinice, a  $EC50$  koncentraciju na kojoj je blokirano 50 % struje.

Pri ispitivanju efekta vanćelijskog ATP na strujni odgovor u istrgnutoj konfiguraciji, analizirana je promena površine ispod dela strujnog zapisa u kojem je inaktivirajuća struja aktivna, a iza pražnjenja kapacitativnog tranzijenta, sa oduzetom baznom linijom, u Clampfit softveru (za baznu liniju uzet je odgovor u delu strujnog zapisa po završetku inaktivirajuće struje).

Oporavak od inaktivacije IRIS prikazan je kao količnik amplitude oporavljene struje (P1) i amplitude odgovora na prvi depolarišući pravougaoni stimulus (P2), u funkciji vremena između dva depolarišuća stimulusa, dok su varirani nametnuti potencijali membrane za vreme oporavka prikazani kao zasebne serije. Rezultati su ugađani eksponencijalnim funkcijama, pri čemu su određene vremenske konstante oporavka za svaki nametnuti potencijal.

Amplitude pojedinačnih kanala merene su u Clampfit softveru. U slučaju IRIS, amplitude „stepenika“ inaktivirajuće struje su procenjene na osnovu ugađanja rastojanja između horizontalnih kursora, tako da njihovo identično rastojanje obeležava svaki prelaz. Amplitude otvaranja pojedinačnih kanala snimanih sa membrane protoplasta merene su iz kontinualnih zapisa. Na osnovu kontinualnih zapisa snimanih na različitim potencijalima membrane, konstruisane su strujno-naponske krive iz kojih je izvođen ravnotežni potencijal za provodeći jon. Kako su zapisi snimani u asimetričnim jonskim uslovima, prema Nernstovoj jednakosti za ravnotežni potencijal, može se izvesti zaključak o selektivnosti snimljenog kanala (jednačina 4).

$$V_{eq} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{X_e}{X_{in}} \right) \quad (4)$$

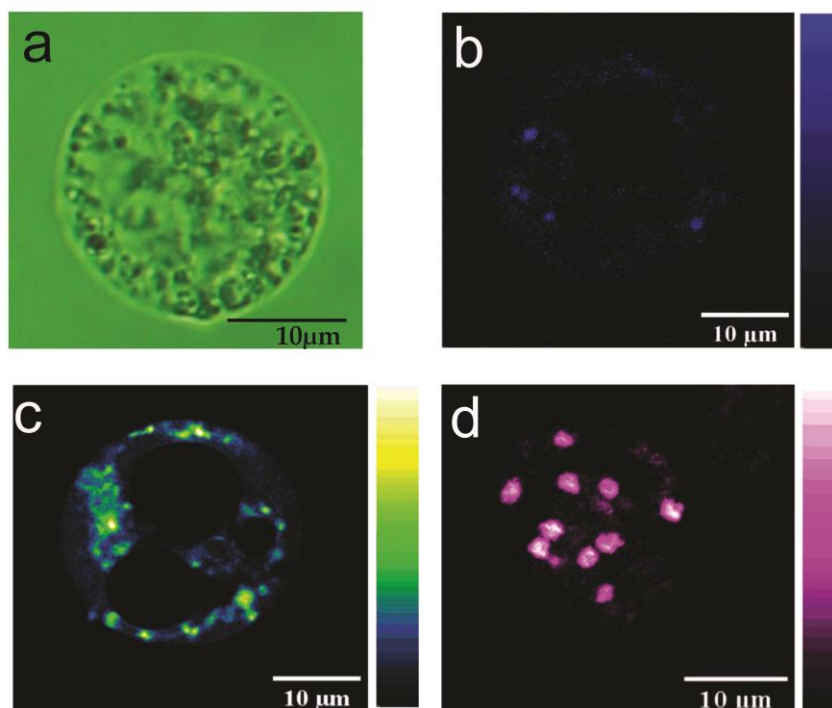
Gde je:  $V_{eq}$  – ravnotežni potencijal za dati jon,  $R$  – univerzalna gasna konstanta  $T$  – temperatura izražena u K,  $z$  – naelektrisanje jona,  $F$  – Faradejeva konstanta,  $X_e$ - ekstraćelijska koncentracija jona,  $X_{in}$  - intracelularna koncentracija jona.

Statistička analiza rađena je u GraphPad softveru. Za testiranje statističke značajnosti između dve grupe podataka, korišćen je Studentov t-test u slučaju normalne raspodele u uzorku: t-test za zavisne uzorke, u slučaju poređenja kontrola i tretmana ili t-test za nezavisne uzorke u slučaju poređenja podataka snimanih u različitim uslovima, sa Velšovom korekcijom. Man-Vitni test korišćen je u slučaju odsustva normalne raspodele u uzorku. Za poređenje osobina IRIS na različitim membranskim potencijalima ili različitim uslovima snimanja, koja daju više od 2 grupe podataka, korišćena je jednosmerna ili dvosmerna ANOVA analiza, sa Holm-Sidak korekcijom, kako bi se testirale i statističke značajnosti međusobnih razlika između svih grupa. Prilikom fitovanja merenih podataka funkcijama primenjivan je princip najmanjih kvadrata i fit smatran validnim za  $R^2$  vrednost iznad 0.5.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Citoplazmatske kapi sporangiofora su metabolički aktivne

Citoplazmatske kapi su u mikroskopskom prepatatu vidljive kao granulirane strukture okružene membranom, sa ili bez praznih regiona koji verovatno odgovaraju vakuolama (Slika 4.1a) i izraženim kretanjem unutarćelijskih struktura. Postavljena je hipoteza da su CK dinamične, metabolički aktivne strukture, okružene ćelijskom membranom. Na prirodu membrane kojom su CK okružene ukazuje činjenica da imaju sposobnost regeneracije ćelijskog zida (Križak et al. 2015). Prisustvo komponenti energetskog metabolizma u CK je ispitana fluorescentnim dvofotonskim oslikavanjem. Kao što je prikazano na Slici 4.1b, sa nebojenih CK, autofluorescentni signal dobijen dvofotonskom ekscitacijom, primenom snage od 3.8 mW na 730 nm, pokazuje obrise regiona koji emituju u poznatom opsegu emisije NAD(P)H (420-480 nm). Ovi obrisi vrlo verovatno odgovaraju pozicijama mitohondrija. Kako bi se ovo dodatno potvrdilo, primenjen je Rh123 fluorescentni indikator, koji daje signal samo pri vezivanju za membrane funkcionalnih mitohondrija. Rh123, takođe dvofotonski pobuđen sličnom snagom (3.5 mW) na 800nm, produkovao je signal sa struktura dimenzija između 0.5 i 1  $\mu\text{m}$  (slika 4.1c), značajno intenzivniji od pozadinskog šuma u odnosu na autofluorescentni signal, u 25 snimanih CK. Dvofotonskim pobuđivanjem CK obojenih DAPI indikatorom, ispitano je prisustvo struktura koje sadrže nukleinske kiseline. Kao što je prikazano na slici 4.1d, ekscitacijom DAPI indikatora na 730 nm (5.6 mW) pokazano je prisustvo velikog broja struktura dijametra oko 2  $\mu\text{m}$ , čime je potvrđeno prisustvo većeg broja nukleusa.



Slika 4.1. Mikrografije citoplazmatskih kapi. a: CK snimane svetlim poljem; b: autofluorescentni signal nebojene CK propušten kroz VIS filter (400-700 nm) + filter na  $479 \pm 20$  nm, nakon dvofotonskog pobuđivanja na 730 nm snagom od 3.8mW; c: fluorescentni signal CK obojene Rh123 indikatorom, propušten kroz VIS + filter na  $530 \pm 43$  nm, pri dvofotonskom pobuđivanju na 800 nm snagom od 3.5 mW; d: signal CK obojene DAPI indikatorom, propusten kroz VIS + filter na  $479 \pm 20$  nm, nakon



pobuđivanja na 730 nm snagom od 5.6 mW. Skale sa desne strane slika fluorescentnog signala označavaju kom delu ukupnog opsega intenziteta odgovara koja boja u „pseudocolor“ režimu.

Citoplazmatske kapi bile su imobilisane podlogom koja se primenjuje i pri TNVnDM eksperimentima, što je omogućilo oslikavanje skenirajućom metodom kao što je DFSM. Primećeno je izraženo kružno kretanje oslikavanih subćelijskih struktura i čitave unutrašnjosti CK tokom snimanja. Strujanje protoplazme, prisustvo aktivnih mitohondrija i nukleusa zajedno ukazuju da unutrašnjost CK citološki odgovara citoplazmi cenocitičnih sporangiofora iz zone rasta. Prisustvo aktivnih mitohondrija ukazuje i da CK aktivno proizvode ATP.

#### 4.2 Inhibitor plazmamembranske protonske pumpe izaziva depolarizaciju membrane CK

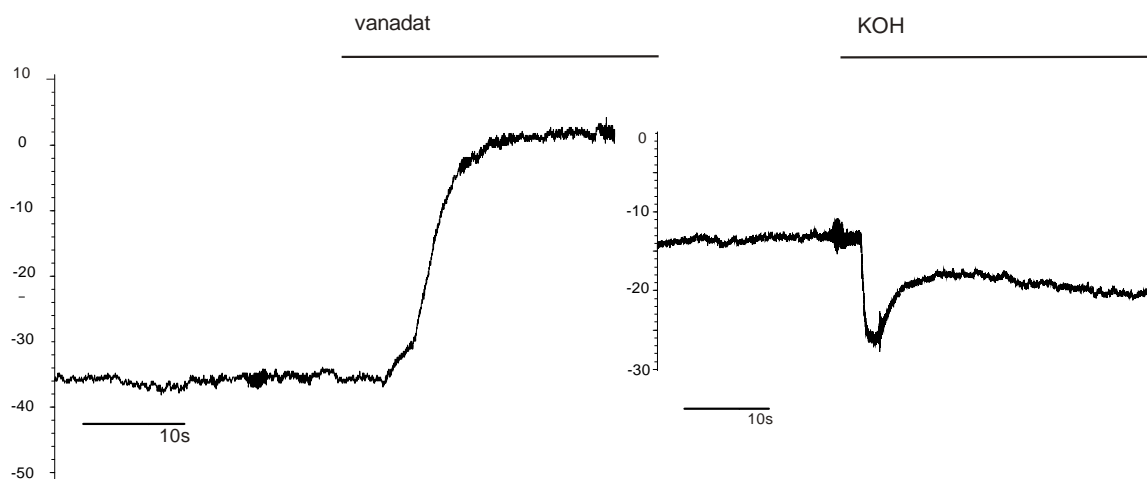
Tehnikom NVnDM u režimu nametanja struje, izmeren je membranski potencijal citoplazmatskih kapi. Približne vrednosti dobijene su snimanjem u standardnim uslovima za registraciju IRIS -  $68 \pm 10$  mV (n=8), kao i u prilagođenom vanćelijskom rastvoru koji je sastavom sličan APW (*artificial pond water*), ranije primenjivanom za snimanje potencijala sporangiofora oštrim elektrodama (Živanovic et al. 2001),  $-64 \pm 28$  mV (n=10). Neposredno po ulasku u konfiguraciju „cela ćelija“ a pre prelaska u režim nametanja struje, kao i nakon registracije membranskog potencijala, CK su uvek držane u režimu nametanja napona kako bi se izmerili parametri konfiguracije „cela ćelija“. U 5 od 10 eksperimenata sa APW-sličnim rastvorom kao i prilikom 3 od 8 ponavljanja snimanih u standardnim rasvorima, u režimu nametanja napona snimljen je i strujni zapis (protokolom prikazanim na slici 4.3a) pred prelazak u režim nametanja struje. Zapisi koji su odabrani za analizu su oni kod kojih je izmerena stabilna vrednost ulaznog otpora (Ra) pre i nakon snimanja u režimu nametanja struje i u kojima se tokom snimanja održavala stabilna vrednost membranskog potencijala. Natrijum-vanadat, inhibitor plazmamembranskih HATP-aza, primenjen je sa vanćelijske strane u APW-sličnom rastvoru u finalnoj koncentraciji od 100  $\mu$ M. Aplikiranje vanadata je izazvalo depolarizaciju membrane od  $43 \pm 10$  mV (n=3, p<0.001) (tabela 6).

Tabela 6. Srednje vrednosti membranskog potencijala u kontrolnim snimanjima i depolarizacije membranskog potencijala izazvane tretmanom različitim koncentracijama vanadata. Sd – standardna devijacija, n – broj merenja.

	kontrola[mV]	$\Delta V_m$ [mV]	
[Na-vanadat]		100 $\mu$ M	$\geq 200\mu$ M
Srednja vrednost	-63.9	42.7	59.5
sd	28.33	10.32	0.71
n	10	3	2

Nepotpuna depolarizacija pod dejstvom vanadata u delu eksperimenata može biti posledica nedovoljnog prolaska vanadata kroz ćelijsku membranu. Sa druge strane, brzina reakcije (promena u toku 10 s) je neočekivano velika, te je urađeno kontrolno snimanje kako bi se utvrdilo da registrovani efekat nije posledica promene pH vrednosti po uticajem vanadata.

Izmereno je da 100  $\mu\text{M}$  vanadata dovodi do alkalizacije rastvora za jednu pH jedinicu (od početnog pH 6). Dodavanje rastvora KOH u meri koja dovodi do ekvivalentne ili veće promene pH izazvalo je blagu i tranzijentnu hiperpolarizaciju (slika 4.2). To je isključilo mogućnost artefakta izazvanog promenom pH prilikom snimanja efekta natrijum-vanadata.



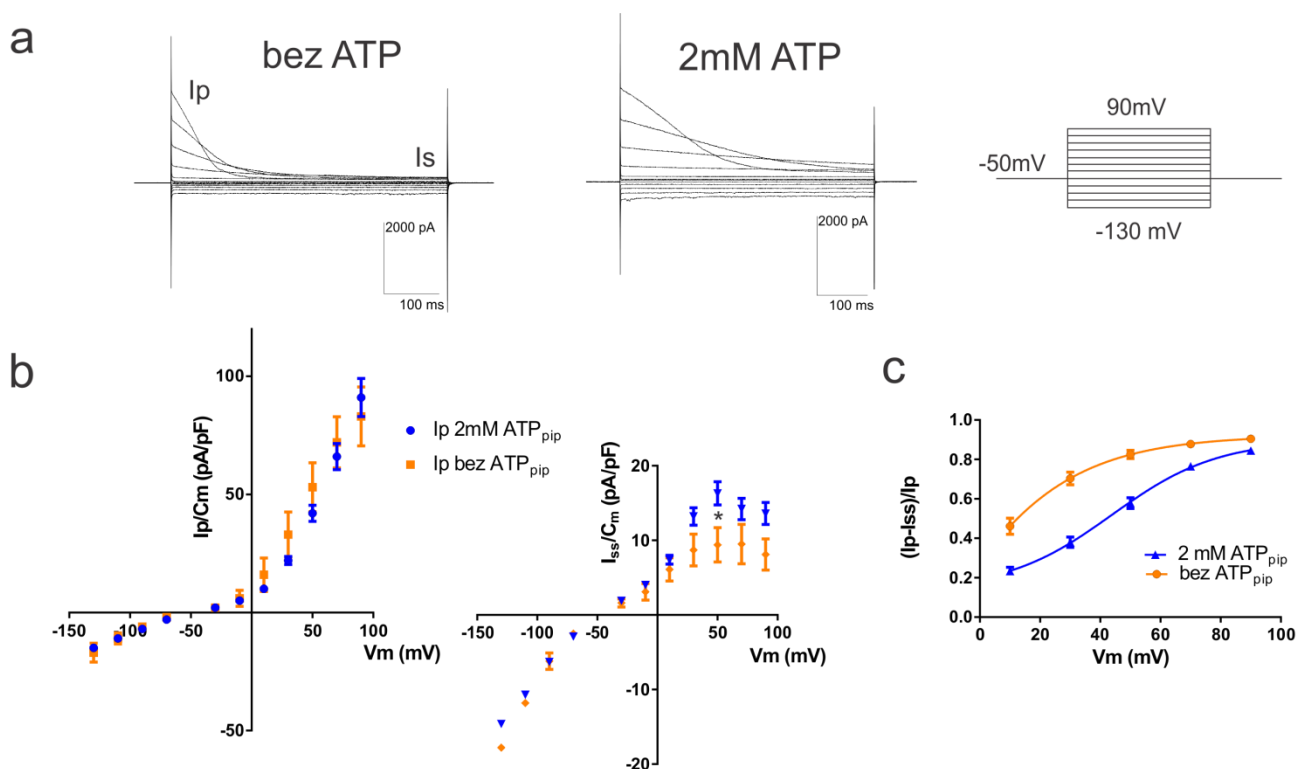
Slika 4.2. Zapisi membranskog potencijala u režimu nametanja struje. Levo: efekat ekstracelularno primenjenog vanadata; horizontalna linija iznad strujnog zapisa prikazuje vreme dodavanja vanadata. Desno: efekat ekstracelularno primenjenog KOH u dozi koja izaziva pomeranje pH vrednosti za više od jedne pH jedinice; horizontalna linija iznad zapisa prikazuje vreme dodavanja KOH.

### 4.3 Efekat unutarćelijskog ATP-a na voltažno-zavisne osobine IRIS

IRIS se registruje kao dominantna struja na CK u konfiguraciji cela ćelija u hipoosmotskim uslovima. Najčešće korišćen protokol je standardnim voltažnim protokol (SVP), koji se sastoji iz serije pravougaonih stimulusa od -130 mV do 90 mV u koracima od +20 mV, sa negativnim potencijalom od -50 mV između pravougaonih stimulusa. Vrednost koja se meri na početku strujnog odgovora na stimulus definiše se kao vršna struja (*I<sub>peak</sub>*, dalje u tekstu *I<sub>p</sub>*, Slika 4.3a). Kao što je prethodno opisano (Križak et al. 2015), neposredno po aktivaciji, vršna struja IRIS podleže inaktivaciji na nametnutim pozitivnim potencijalima od +10 mV i naviše, pa se označava i kao inaktivirajuća komponenta struje, a brzina inaktivacije, definisana vremenskom konstantom  $\tau_{in}$  ima voltažno-zavisni pad, tj struja se sve brže inaktivira sa porastom depolarizacije (Križak et al. 2015). Amplituda struje koja se meri na kraju odgovora na voltažni protokol, nakon završetka inaktivirajuće komponente definiše se kao stacionarna struja (*I<sub>s</sub>*, Slika 4.3a). Vremenski profil IRIS u odsustvu ATP odlikuje dramatičan pad amplitude *I<sub>p</sub>* praćen smanjenjem  $\tau_{in}$ , pri čemu su oba procesa statistički značajno odložena uvođenjem 2 mM ATP-a u pipetni rastvor. Karakterizacija IRIS u okviru ove disertacije u fokusu ima bolje razumevanje mehanizma dejstva ATP-a na aktivnost IRIS.

### 4.3.1 ATP menja potencijal poluinaktivacije IRIS

Poređene su strujno-naponske osobine IRIS snimane u uslovima sa i bez ATP-a u pipetnom rastvoru (Slika 4.3). Amplitude struje u odgovoru na SVP merene su iz zapisa registrovanih minimalno 2 minuta od ulaska u konfiguraciju cela ćelija, kako bi se utvrdilo da je uspostavljena dijaliza CK pipetnim rastvorom. Kao što je prikazano na slici 4.3, ne postoji statistički značajna razlika u gustinama struja ni na jednom depolarišućem potencijalu između grupa snimanih sa i bez dodatog unutarćelijskog ATP-a. Strujno-naponska zavisnost je takođe nepromenjena, što je kvantifikovano poređenjem napona polukativacije ( $V_{mid}$ ) dobijenih fitovanjem srednjih strujno-naponskih krivih Bolcmanovom funkcijom (jednačina 1). Vrednosti  $V_{mid}$  iznose  $67 \pm 4.9$  mV u kontrolnoj grupi snimanoj bez pipetnog ATP-a ponovljenoj u toku ove disertacije ( $n=6$ ) i  $68 \pm 21$  u ponovljenoj kontrolnoj ATP grupi ( $n=26$ ). Vrednost vratničkog naelektrisanja je takođe nepromenjena u prisustvu ATP i iznosi približno 1. Jedina statistički značajna razlika je u gustini stacionarne struje na potencijalu od +50 mV ( $p < 0.5$ , Slika 4.3). Ono što se značajno razlikuje u ove dve grupe je odnos inaktivirajuće i stacionarne komponente struje usled usporene inaktivacije IRIS, što je definisano frakcijom inaktivirajuće struje (FIS)(slika 4.3c).

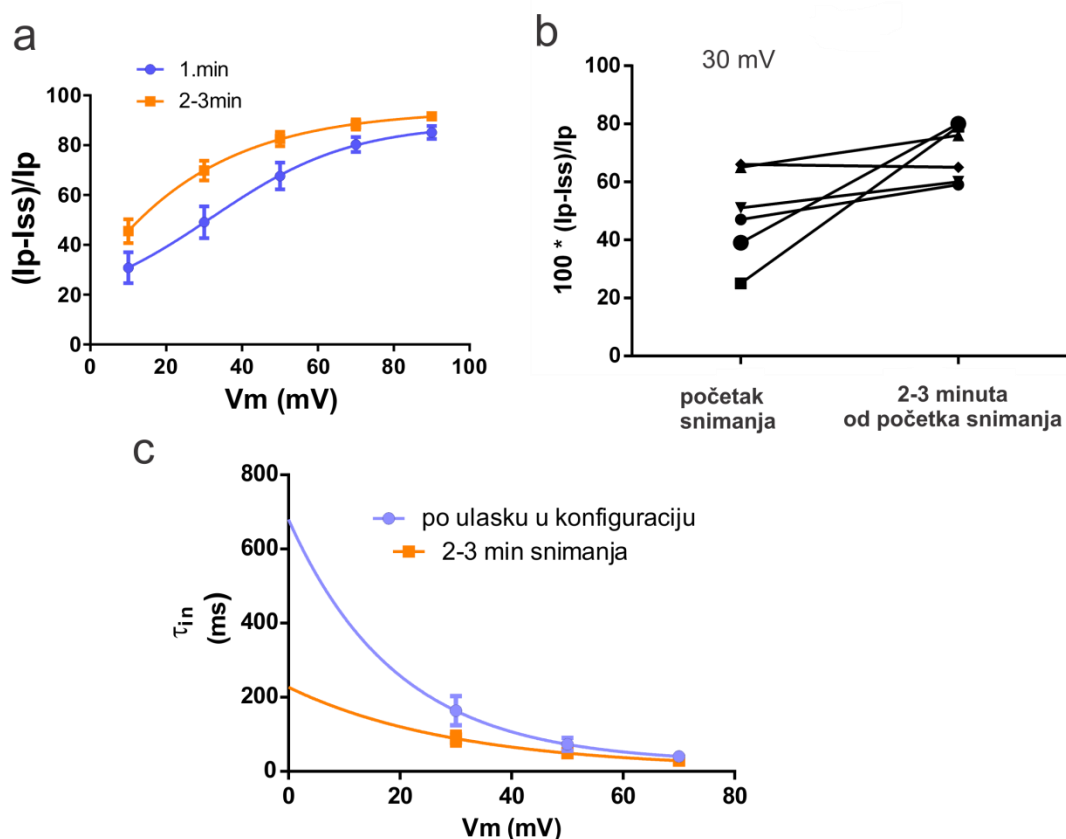


Slika 4.3. Efekat ATP-a na strujno-naponske osobine IRIS, a: reprezentativni originalni zapisi struja registrovanih u uslovima bez i sa 2 mM ATP u pipeti za registraciju, desno: šematski prikaz ekspeimentalnog protokola; b: preklapljeni I-V dijagrami inaktivirajuće komponente struje (levo) i stacionarne struje (desno) u oba uslova merenja, statistička značajnost razlike između grupa proverena je t-testom za vezane uzorke sa Holm-Sidak korekcijom za višestruka poređenja i pronađena je samo za odgovoru na stimulus od +50 mV ( $p=0.042$ ); c: dijagram zavisnosti frakcije inaktivirane struje (FIS) od napona u uslovima snimanja sa i bez pipetnog ATP, sa fitovanjem Bolcmanovom funkcijom koje daje  $V_{50}$  od  $4.8 \pm 2.0$  mV u grupi bez ATP<sub>pip</sub> i  $35 \pm 4$  mV u grupi sa ATP<sub>pip</sub>.

Vrednost potencijala poluinaktivacije dobijenog iz fita srednje FIS-naponske krive u grupi bez ATP-a iznosi  $4.8 \pm 2.0$  mV ( $n=6$ ). U grupi sa dodatim intracelularnim ATP-om vrednost potencijala poluinaktivacije iznosi čak  $35 \pm 4$  mV ( $p<0.001$ ).

### 4.3.2 FIS i konstanta inaktivacije IRIS se menjaju sa dijalizom ATP-a

Ispitan je uticaj dijalize pipetnim rastvorom bez ATP na strujno-naponske osobine IRIS koje se razlikuju u uslovima snimanja sa i bez ATP-a, kako bi se ispratio efekat smanjenja inicijalne koncentracije ATP u CK. Strujni zapisi snimljeni neposredno po uspostavljanju konfiguracije cela ćelija u uslovima bez primenjenog ATP-a u pipeti međusobno se razlikuju u frakciji inaktivirajuće struje, pri čemu neke od zapisa odlikuje napon poluinaktivacije koji teži vrednostima dobijenim analizom zapisa snimanih sa prisutnim unutarćelijskim ATP-om, pa je tako izmereni potencijal poluinaktivacije na početku snimanja  $19 \pm 8$  mV ( $n=6$ ), a nakon 2-3 minuta dijalize  $5 \pm 6$  mV ( $n=6$ ). Varijansa udela inaktivirajuće struje na nižim depolarišućim potencijalima je takođe veća na početku snimanja i opada nakon istog vremena dijalize ( $p = 0.0189$ ), kako je prikazano na slici 4.4b za potencijal od 30 mV ( $n=6$ ). Ovaj rezultat sugerise da se citoplazmatske kapi razlikuju u inicijalnoj koncentraciji ATP-a.



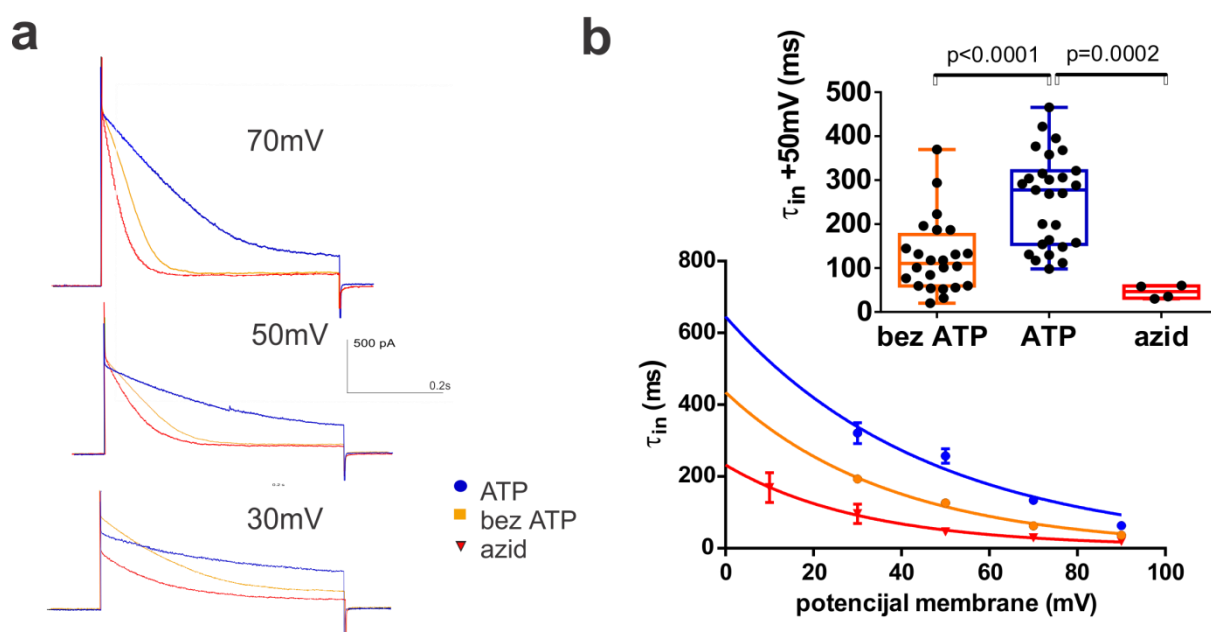
Slika 4.4. Efekat dijalize pipetnim rastvorom na inaktivaciju IRIS, a: FIS-naponski dijagram IRIS snimane u uslovima bez pipetnog ATP neposredno po uspostavljanju konfiguracije i 2-3 minuta nakon dijalize pipetnim rastvorom; b: sve vrednosti FIS na +30 mV na početku i nakon 2-3 minuta eksperimenta, statistička značajnost razlike u varijansi potvrđena je t-testom za vezane uzorke, sa  $p=0.0189$ . c: vrednosti konstante inaktivacije u funkciji napona snimane u uslovima bez ATPpip, neposredno po

ulasku u konfiguraciju „cela ćelija“ (ljubičasto) i nakon 2-3 minuta dijalize pipetnim rastvorom (narandžasto).

Očekivano, i srednje vrednosti vremenske konstante inaktivacije IRIS,  $\tau_{in}$  na svim potencijalima, bliže su većim vrednostima izvedenim iz zapisa u grupi sa intracelularnim ATP-om, dok se nakon 3 minuta dijalize smanjuju (n=6) (slika 4.4c).

### 4.3.3 Respiratorni inhibitor ostvaruje efekat na brzinu inaktivacije IRIS

Natrijum-azid je inhibitor citohrom c oksidaze, sa utvrđenim dejstvom na respiraciju *P.blakesleeanus* (Stanić et al. 2014). IRIS je registrovana nakon preinkubacije citoplazmatskih kapi (40-60 min) u 2 mM natrijum-azidu, kako bi se analizirao efekat redukovano nivoa ATP-a prilikom hipoosmotske stimulacije. Srednje gustine struja registrovanih u ovim uslovima su nepromenjene u odnosu na podatke dobijene u kontrolnim uslovima (sa i bez dodatog ATP u pipeti) i na 70 mV iznose  $74 \pm 8.3$  pA/pF. Ono što se razlikuje je brzina inaktivacije,  $\tau_{in}$ , na pozitivnim membranskim potencijalima. Neposredno po ulasku u konfiguraciju cela ćelija (kada je dijaliza pipetnim rastvorom tek u začetku), vrednosti  $\tau_{in}$  u grupi pretretiranoj azidom su vidno manje, na svim depolarizujućim potencijalima (slika 4.5).



Slika 4.5. Efekat preinkubacije respiratornim inhibitorom, natrijum-azidom, na brzinu inaktivacije IRIS. a: reprezentativni originalni zapisi na 3 različita potencijala pri čemu su 3 grupe podataka preklopljene za svaki potencijal – kontrolni zapis sniman sa prisutnim ATP-om u pipetnom rastvoru (plavo), zapis sniman bez pipetnog ATP-a, u 2. minutu od uspostavljanja konfiguracije „cela ćelija“ (narandžasto) i zapis snimljen neposredno po uspostavljanju konfiguracije, nakon preinkubacije CK 40 minuta u 2 mM natrijum-azidu; b: vremenske konstante inaktivacije dobijene fitovanjem zapisa eksponencijalnim funkcijama prikazane u odnosu na zadati potencijal membrane; zavisnosti od napona su ugađane eksponencijalnom funkcijom u svakoj grupi; umetnuti grafik sa desne strane – statistički značajna razlika u konstanti inaktivacije IRIS na +50 mV, ispitana t-testom za nezavisne uzorke, prikazane su sve tačke uokvirene u oblasti 25-75 % oko medijane dok se nastavci protežu do minimalnih i maksimalnih vrednosti.

Na potencijalu od +50 mV razlika u  $\tau_{in}$  se statistički značajno razlikuje od  $ATP_{pip}$  grupe i iznosi  $46 \pm 15$  ms (n = 4, p=0.002). Iako manja od proseka za kontrolnu grupu bez ATP, srednja

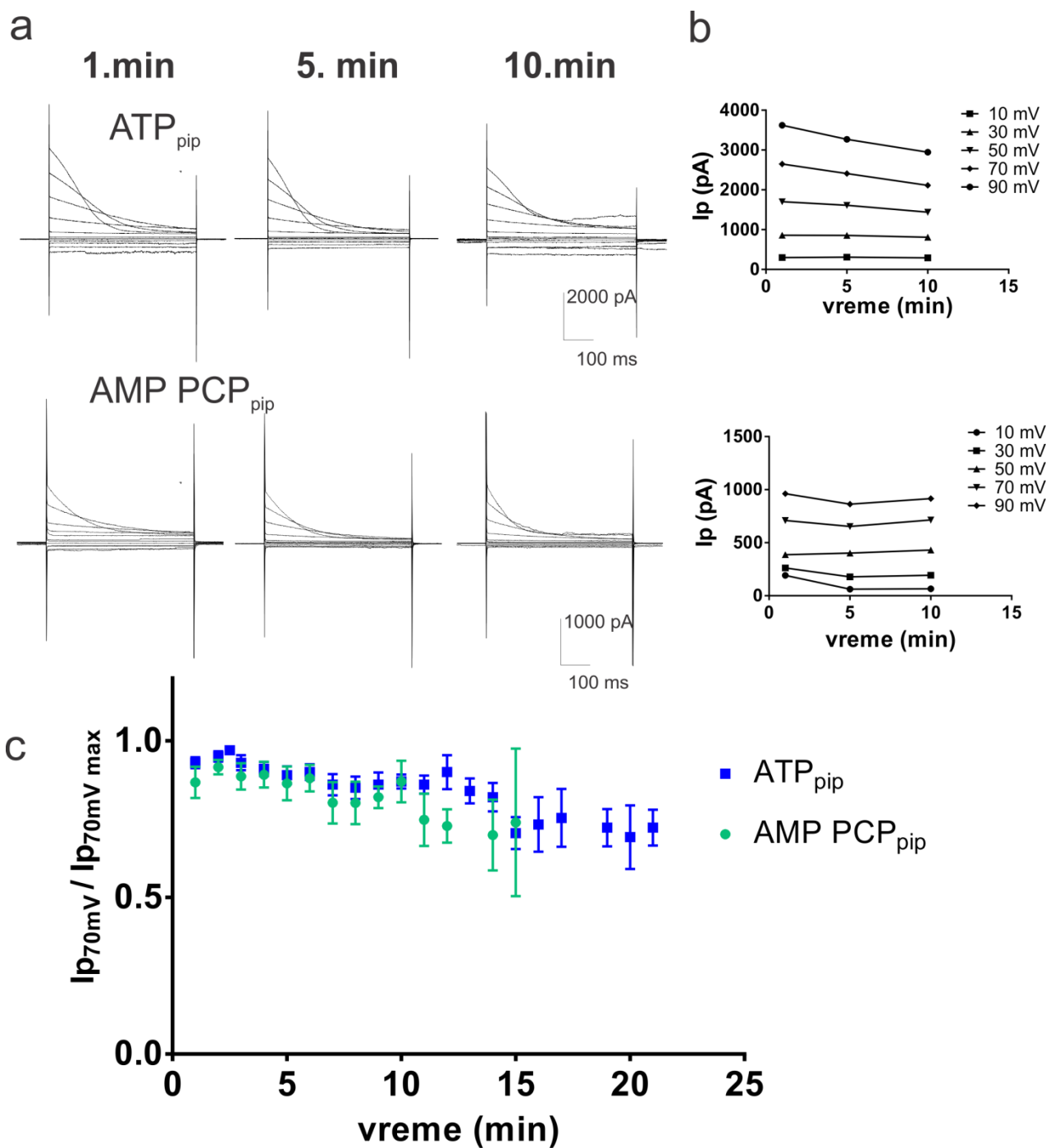
vrednost konstante inaktivacije u grupi tretiranoj azidom se statistički značajno ne razlikuje od ove grupe, što se može objasniti malim uzorkom i činjenicom da se ove vrednosti javljaju u onim citoplazmatskim kapima koje su od početka stimulacije siromašne ATP-om. Sa druge strane, stopa promene  $\tau_{in}$  sa promenom potencijala membrane je bez statističke značajnosti između grupa, i iznosi oko 0.26 s sa promenom od 10 mV, što ukazuje na to da ATP ne utiče na voltažnu osetljivost inaktivacije.

#### 4.4 Održavanje aktivnosti IRIS ne zahteva hidrolizu ATP-a

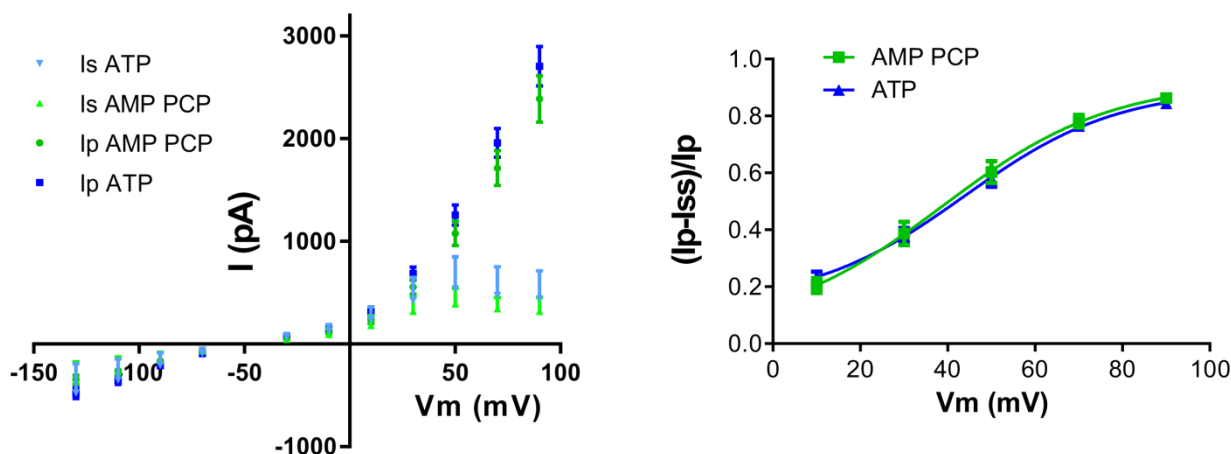
Kako je prethodno utvrđeno da prisustvo unutarćelijskog ATP-a stabilise IRIS odgađanjem inaktivacije, testirano je da li je ovaj efekat posledica dejstva kinaza koje modulišu kanal fosforilacijom ili ATP ostvaruje direktan alosterički efekat. To je sprovedeno zamenom ATP-a u intracelularnom rastvoru istom koncentracijom njegovog nehidrolizabilnog analoga AMP PCP. AMP PCP ne može biti supstrat za kinaze, a ako se veže za ATP-vezivno mesto na enzimu sprečava vezivanje ATP koji postoji u CK pre potpune dijalize. Dobijeni rezultati (n=11) daju vremenski profil amplitude IRIS, koji je na svim depolarizujućim potencijalima istovetan onom u kontrolnim zapisima sa 2 mM unutarćelijskim ATP snimanim za potrebe ove disertacije (n=25) (slika 4.3b i 4.3c), dok se statistički značajno razlikuje (p=0.0445) od vremenskog profila amplitude IRIS uslovima snimanja bez unutarćelijskog ATP (n=32). Plato vrednosti  $I_p$ , sa fluktuacijama od 10 % u uslovima snimanja sa AMP PCP u pipeti, održava se 10 minuta, dok u 12. minutu  $I_p$  pada na 73 % (Slika 4.6).

Očekivano, strujno-naponski dijagrami i zavisnost frakcije inaktivirajuće struje (FIS) od napona, takođe se ne razlikuju između kontrolnih eksperimenata i snimanja sa pipetnim AMP PCP (slika 4.7).

Voltažna zavisnost inaktivirajuće komponente ( $I_p$ ) IRIS u prisustvu 2 mM AMP PCP je nepromenjena u odnosu na ATP grupu, kako potencijal poluaktivacije iznosi  $69 \pm 18$  mV. Fitovanje FIS- $V_m$  krive Boltzmanovom funkcijom pokazalo je da se ni napon poluinaktivacije u uslovima snimanja sa intracelularnim AMP PCP ( $36 \pm 3$  mV) ne razlikuje od vrednosti u ATP grupi ( $35 \pm 4$  mV) (legenda slike 4.7). Rezultati ukazuju na to da AMP PCP ostvaruje istovetan efekat na IRIS te da je povećana stabilnost IRIS na depolarizujućim potencijalima u prisustvu ATP-a i odlaganje njene nepovratne inaktivacije rezultat alosteričkog efekta ATP.



Slika 4.6. Efekat nehirdolizabilnog analoga ATP-a, AMP PCP na vremenski profil amplitude IRIS, a: reprezentativni originalni zapisi u 1., 5. i 10. minutu snimanja u kontrolnim (2mM ATP, prvi red) i uslovima snimanja sa AMP PCP u pipeti (drugi red); b: vrednosti amplitude inaktivirajuće struje na depolarizujućim potencijalima u iste 3 vremenske tačke za kontrolnu (prvi red) i AMP PCP grupu (drugi red); c: vremenski tok srednje vrednosti amplitude inaktivirajuće struje na 70 mV, normalizovane na maksimalnu vrednost, za ATP i AMP PCP grupe, prikazane kao zasebne serije u funkciji vremena.

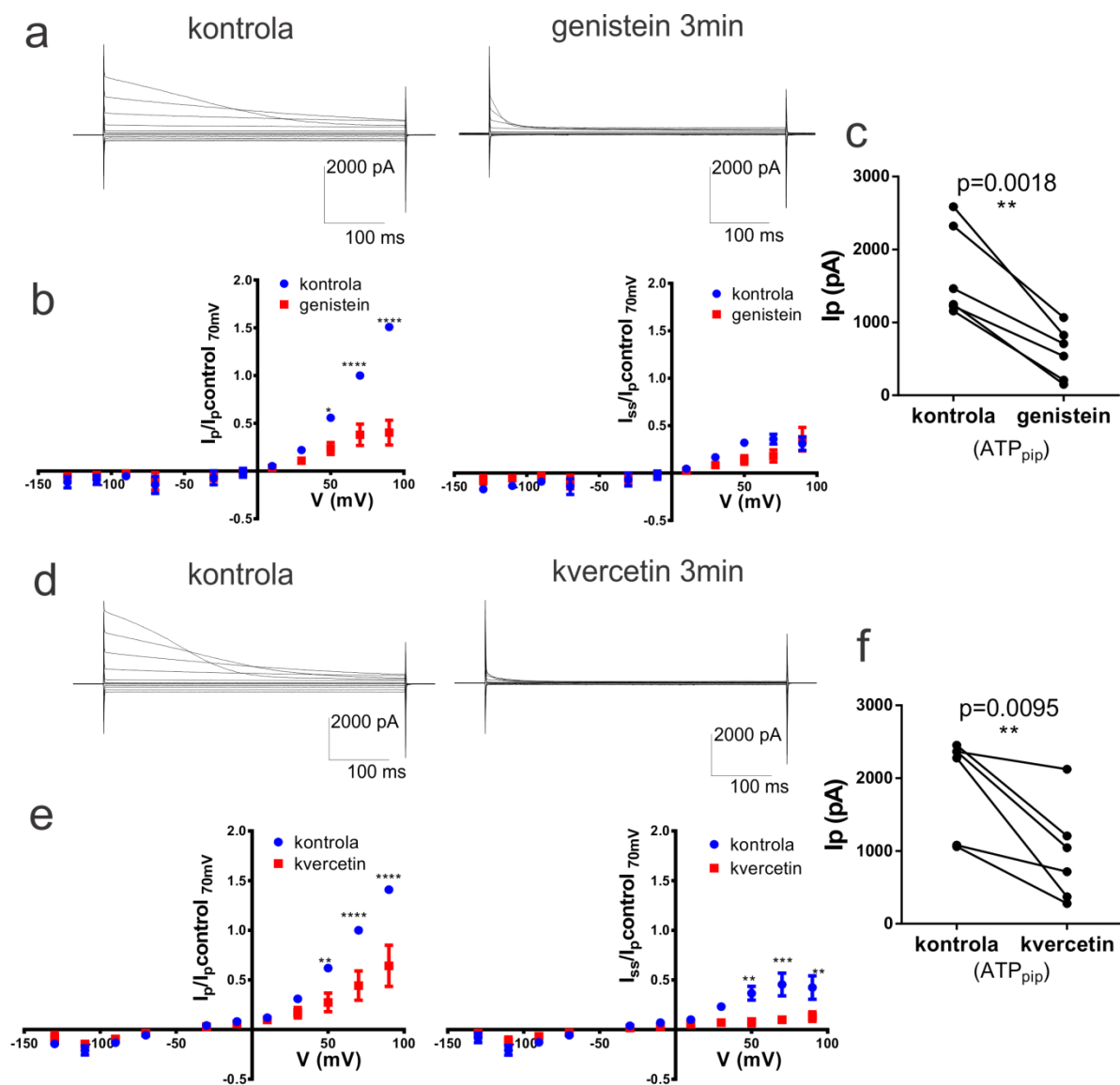


Slika 4.7. Efekat AMP PCP na strujno-naponske osobine IRIS, levo: srednje strujno-naponske krive inaktivirajuće ( $I_p$ ) i stacionarne ( $I_s$ ) komponente IRIS u uslovima snimanja sa pipetnim ATP (plavo) i AMP PCP (zeleno), prikazane sa standardnim greškama; desno: FIS-naponski dijagram ugađan Bolcmanovim funkcijama za grupu sa ATP (plavo) i AMP PCP (zeleno).  $V_{50}$  vrednost dobijena iz fita FIS-V za uslove snimanja sa AMP PCP je  $36 \pm 3$  mV.

#### 4.5 IRIS je osetljiva na flavonoide

Ispitan je efekat tri tipa flavonoida na IRIS – izoflavona genisteina, flavonola kvercetina i sintetičkog analoga kvercetina LY294002. U svim eksperimentima unutarćelijski rastvor sadržao je 2mM ATP, kako bi se onemogućilo spontano gašenje IRIS. Na osnovu snimljenih kontrolnih zapisa procenjeno je da je do desetog minuta od ulaska u konfiguraciju „cela ćelija“ amplituda struje stabilna i održava se iznad 80 % početne vrednosti (slika 4.6c), te se efekat bloka pratio do ovog momenta. Genistein i kvercetin su liposolubilni te su aplicirani sa vanćelijske strane u konačnoj koncentraciji od 100  $\mu$ M, dok je sintetički analog kao nepermeabilan za ćelijsku membranu dodavan u pipetu za registraciju u koncentraciji od 10  $\mu$ M. Sva tri flavonoida pokazuju izražen efekat na IRIS (slike 4.8 i 4.9). Merena je amplituda  $I_p$  u odgovoru na voltažni stimulus od +70 mV, 3 minuta nakon vanćelijskog dodavanja (3 minuta od početka stimulacije u slučaju LY294002) i poređena sa amplitudom kontrolnog zapisa, snimljenog neposredno pre dodavanja blokatora (po uspostavljanju konfiguracije cela ćelija u slučaju LY294002). Efekat je definisan kao procenat struje koja je blokirana tretmanom, čije srednje vrednosti sa standardnim devijacijama iznose :  $67 \pm 15$  % ( $p=0.0018$ ,  $n=6$ ) za blok genisteinom,  $51 \pm 27$  % za blok kvercetinom ( $p=0.0095$ ,  $n=6$ ), i  $37 \pm 20$  % ( $p<0.001$ ,  $n=5$ ), za blok Ly294002.

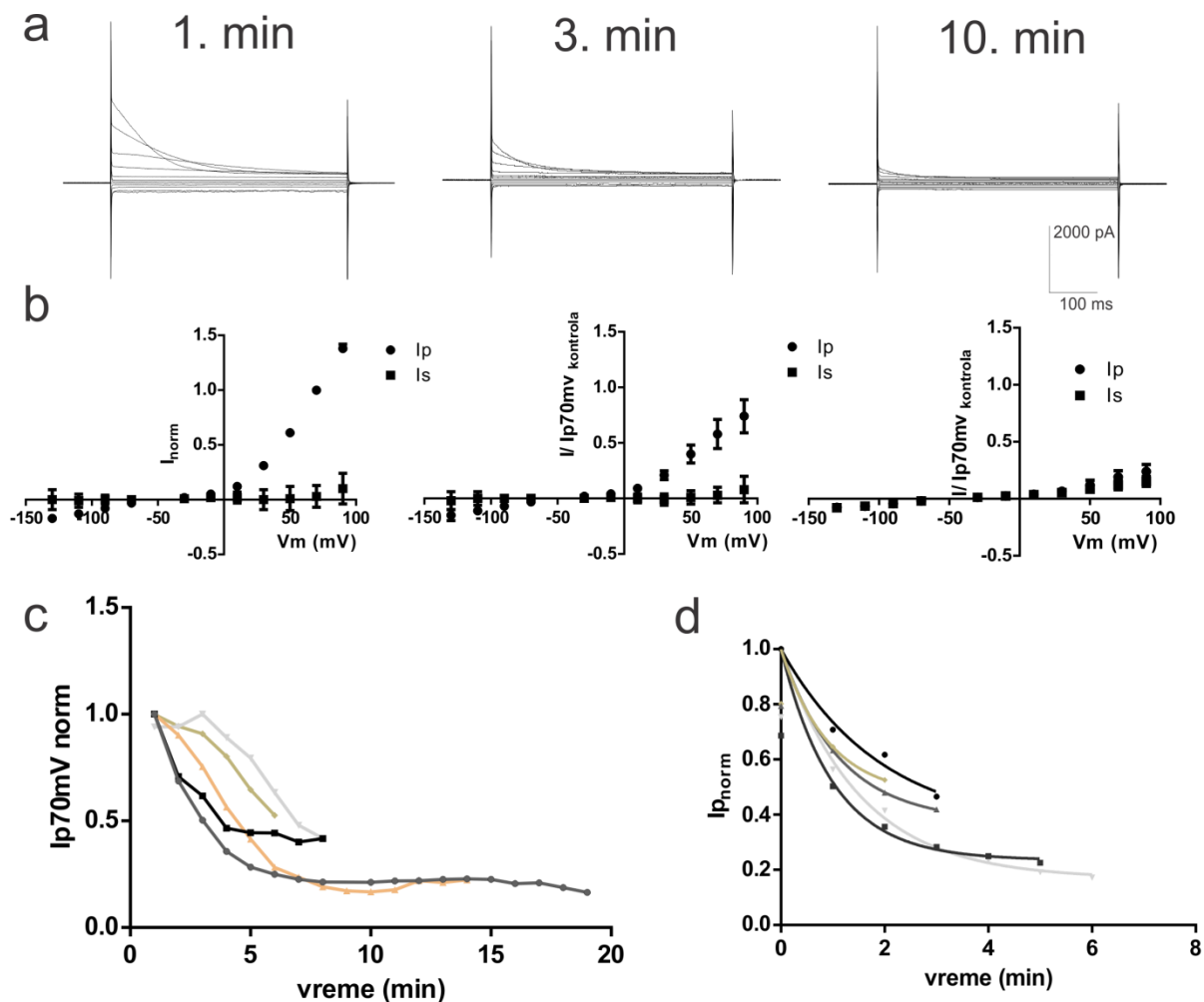




Slika 4.8. Efekat vanćelijski primenjenih flavonoida na IRIS. a: reprezentativni originalni zapisi IRIS u odgovoru na standardni protokol pre dodavanja i u 3. minutu od dodavanja genisteina; b: srednje strujno-naponske krive izvedene iz svih kontrolnih (plavo) i zapisa u 3. minutu tretmana geinsteinom (crveno) sa prikazanim standardnim greškama; statističke značajnosti razlika za svaki potencijal prikazane su brojem zvezdica; levo- poređenje srednjih I-V kriva inaktivirajuće komponente struje ( $I_p$ ), desno - poređenje srednjih I-V kriva stacionarne struje ( $I_{ss}$ ); c:  $I_{p70\text{ mV}}$ , vrednosti pre i posle tretmana genisteinom za sva ponavljanja, t- test za vezane uzorke daje p vrednost za razliku srednjih vrednosti od 0.0018; d: originalni zapisi IRIS u odgovoru na standardni protokol pre dodavanja i u 3. minutu od dodavanja kvercetina; e: srednje I-V krive iz svih kontrolnih zapisa (plavo) i tretmana kvercetinom (crveno); f:  $I_{p70\text{ mV}}$  vrednosti pre i posle tretmana kvercetinom za sva ponavljanja, t-test za vezane uzorke daje p vrednost od 0.0095. Sva prikazana merenja su izvedena uz prisustvo ATP-a u pipeti.

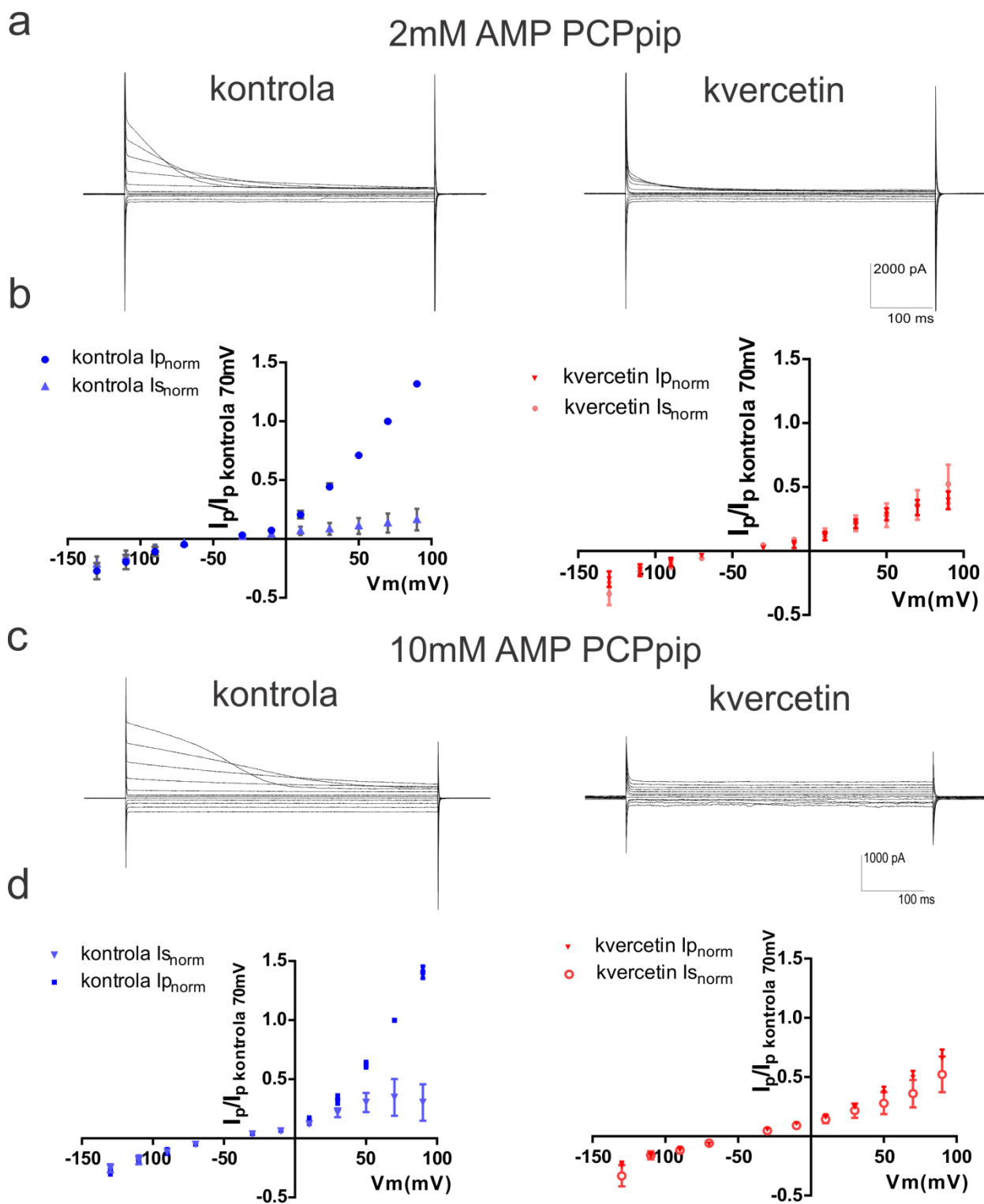
Kako je prikazano na Slici 4.9c, trenutak dejstva LY294002 na IRIS se razlikuje između eksperimenata, što se može pripisati različitoj brzini dijalize pipetnim rastvorom i utiče na procenat bloka u odabranoj vremenskoj tački, dok je pri merenju od momenta početka eksponencijalnog pada, vremenska konstanta pada amplitude u vremenu slična između eksperimenata i iznosi  $1.3 \pm 0.22$  minuta (slika 4.9d). U eksperimentima u kojima je snimanje

trajalo dovoljno dugo (ali ne duže od 10 minuta od ulaska u konfiguraciju cela ćelija), izmeren je konačan blok (smanjenje  $I_{p70\text{ mV}}$  u odnosu na početnu izmerenu vrednost) koji iznosi  $79 \pm 11\%$  za genistein ( $n=4$ ),  $61 \pm 20\%$  za kvercetin ( $n=5$ ) i  $81 \pm 3\%$  za LY29004 ( $n=2$ ). Kako je uočljivo na strujno-naponskim dijagramima (Slika 4.8b, 4.8e i 4.9b), blok flavonoidima je izražen na svim potencijalima.



Slika 4.9. Efekat unutarćelijski primenjenog flavonoida LY294002. a: reprezentivni originalni zapisi struja snimanih u prvom minutu (levo), trećem minutu (sredina) i desetom minutu (desno) od ulaska u konfiguraciju cela ćelija sa flavonoidom u pipetnom rastvoru; b: srednje strujno naponske krive koje odgovaraju inaktivirajućoj i stacionarnoj struji za iste vremenske tačke,  $n=6$  za prvi i treći minut,  $n=2$  za deseti minut, prikazane sa standardnim greškama. c: vremenski tok  $I_{p70\text{ mV}}$  za svaki eksperimentalni ponovak, normalizovane na početnu vrednost. d: izolovani segmenti eksponencijalnog pada amplitude u svakom eksperimentalnom ponovku, prikazani sa fitovanjem jednodimenzionalnim eksponencijalnim funkcijama. Sva merenja su izvedena u prisustvu ATP-a u pipeti.

Ispitan je efekat iste koncentracije kvercetina na IRIS sa unutarćelijskim ATP zamenjenim nehidrolizabilnim analogom u istoj (2 mM) i 5 puta većoj koncentraciji, kako bi se uočila potencijalna razlika u efektu kvercetina na IRIS (slika 4.10). U oba slučaja, razlika između kontrole i tretmana kvercetinom je statistički značajna i iznosi  $53 \pm 6\%$  ( $p = 0.0007$ ) za 2 mM AMP PCP<sub>pip</sub> i  $50 \pm 10\%$  za 10 mM AMP PCP<sub>pip</sub>, ( $p=0.019$ ),  $n=3$  za obe grupe.

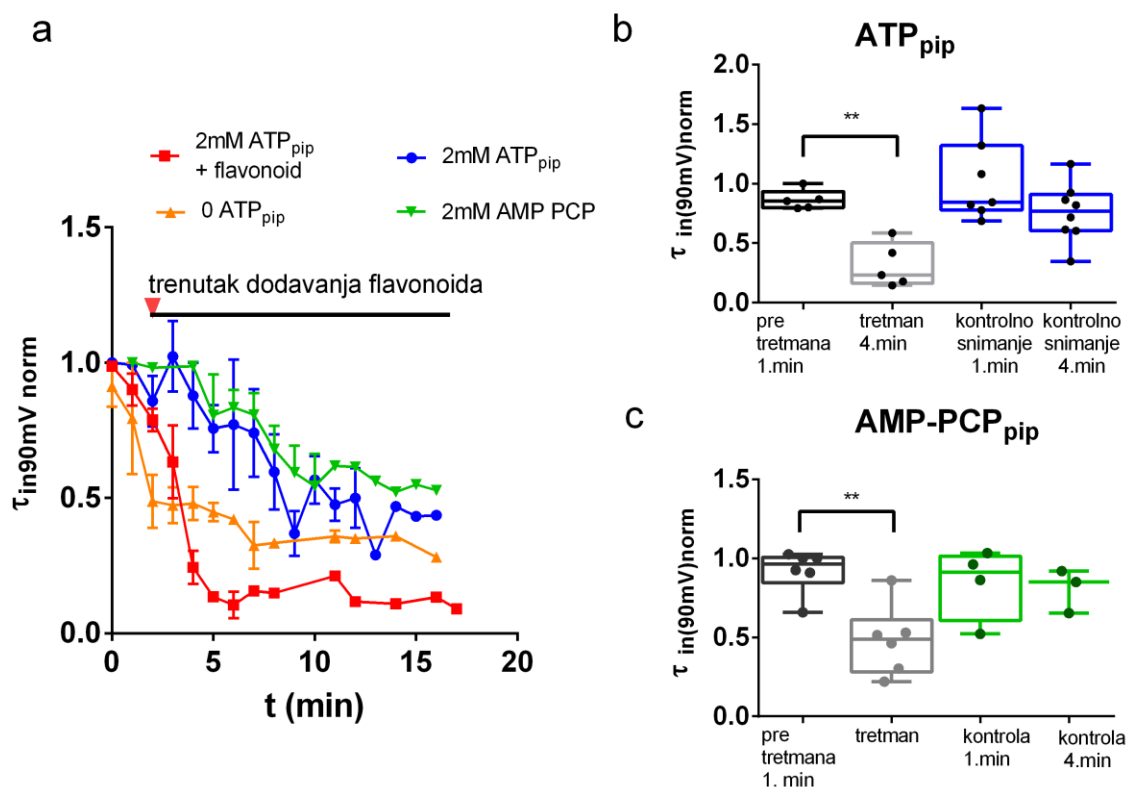


Slika 4.10. Efekat kvercetina na IRIS snimanu sa prisutnim unutarćelijskim AMP PCP. a) reprezentativni originalni zapisi snimljeni pre i 1.5 - 3 minuta od dodavanja 100  $\mu$ M kvercetina sa 2mM AMP PCP-a u pipetnom rastvoru; b) srednje I-V krive izvedene iz kontrolnih i zapisa 1.5 - 3 minuta posle tretmana, prikazane sa standardnim greškama; c) reprezentativni originalni zapisi snimljeni pre i 1.5-3 minuta od dodavanja 100  $\mu$ M kvercetina sa 10mM AMP PCP<sub>pip</sub>; d) srednje I-V krive snimane u uslovima pod c), prikazane sa standardnim greškama. n=3 u obe grupe merenja.

Izraženiji blok u uslovima snimanja sa 2 mM AMP PCP<sub>pip</sub> u odnosu na blok sa prisutnim ATP bi potencijalno ukazao na dodatnu funkciju ATP-a u modulaciji IRIS pored alosteričkog efekta, međutim, između ove dve grupe nema statistički značajne razlike. Takođe, povećanje koncentracije analoga od 5 puta nije rezultovalo statistički značajno manjim procentom bloka kvercetinom (p=0.07).

Efekat nehidrolizabilnog analoga na održavanje amplitude IRIS i istovetno dejstvo flavonoida u uslovima snijmanja sa unutarćelijskim ATP i AMP PCP ukazuje na zaključak da održavanje amplitude IRIS nije rezultat fosforilacije kinazama, te da efekat koji flavonoidi ostvaruju verovatno nije posledica njihovog dejstva na kinaze u CK.

Ispitan je vremenski tok promena  $\tau_{in}$  tokom snimanja u prisustvu/odsustvu dodatog ATP-a i poredjen sa promenama  $\tau_{in}$  koje se dešavaju tokom bloka flavonoidima. Na slici 4.11, prikazani su rezultati analize eksperimenata sa primenom kvercetina i genisteina, spojeni u jednu grupu koja je nazvana flavonoidi. Kao što se vidi na slici 4.11a, smanjenje konstante inaktivacije u tretmanu flavonodima (crveno) nalikuje promeni u vremenu u snimanjima bez unutarćelijskog ATP. U četvrtom minutu snimanja, razlika između vrednosti u kontrolnim snimanjima i tretmanu flavonodima je statistički značajnai iznosi 0.006 sa unutarćelijskim ATP (slika 4.11b) i 0.012 sa unutarćelijskim AMP PCP (slika 4.11c).

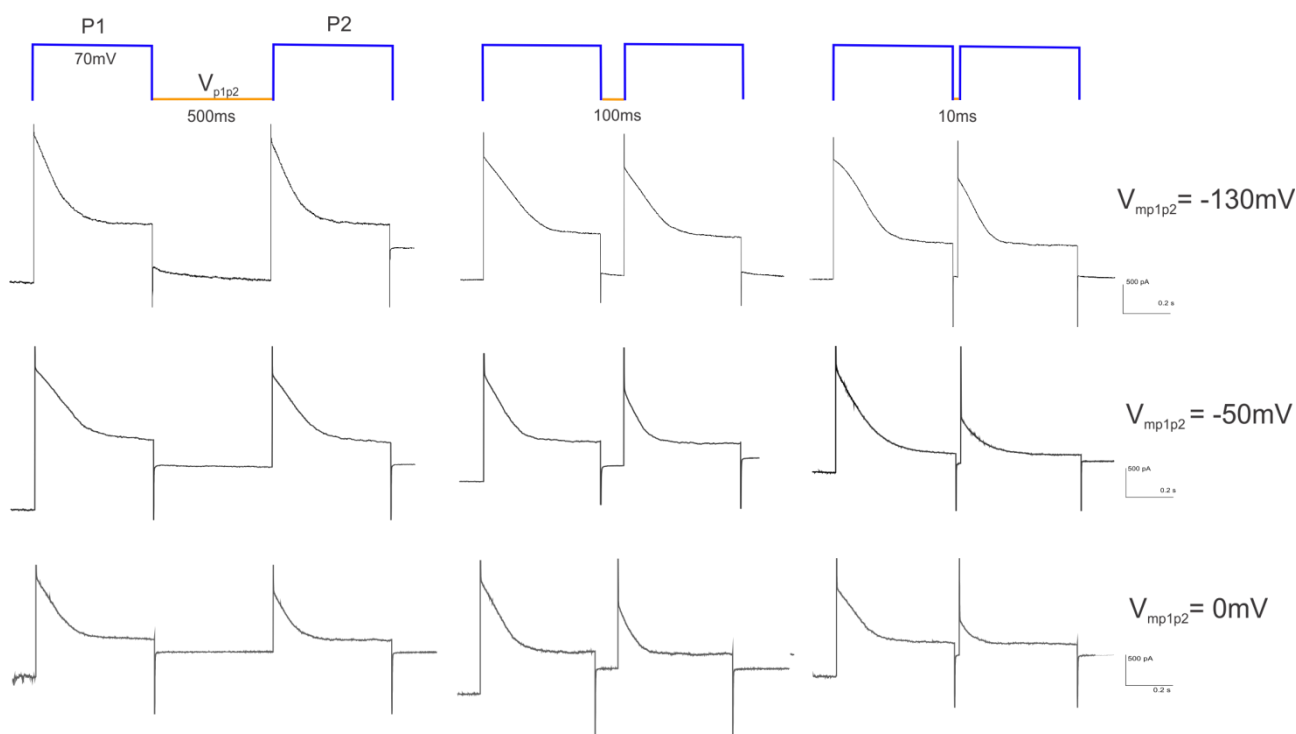


Slika 4.11. Uticaj flavonoida na vremensku konstantu inaktivacije IRIS. a: vremenski profil vrednosti konstante inaktivacije IRIS na 90 mV u uslovima bez unutarćelijskog ATP (narandžasto), sa unutarćelijskim ATP i AMP PCP (plavo i zeleno) i sa unutarćelijskim ATP/AMP PCP i ekstralcelularno dodatim flavonoidima (crveno), prikazane sa standardnim greškama. Linija sa crvenim startnim simbolom označava prisustvo flavonoida u poslednjoj grupi. b-c: statističko poređenje promene vrednosti  $\tau_{90mV}$  u zapisima dobijenim na početku stimulacije IRIS i 4 minuta od dejstva flavonoida, s prisutnim unutarćelijskim ATP (b) i AMP PCP (c), sa promenom  $\tau_{90mV}$  između zapisa sa istim vremenskim razmakom, dobijenih iz kontrolnih snimanja u ATP (b, plavo) i AMP PCP (c,zeleno).

Prikazane su sve tačke uokvirene opsegom verovatnoće između 25 i 75 %, sa nastavcima koji se pružaju do minimalnih i maksimalnih vrednosti.

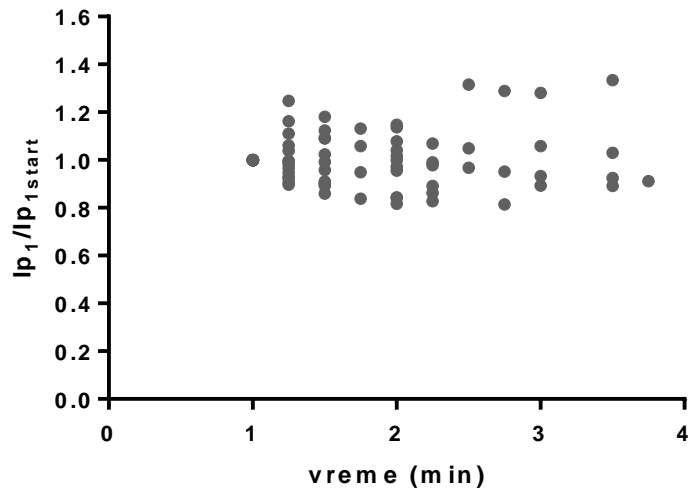
#### 4.6 IRIS se u prisustvu ATP oporavlja od inaktivacije na voltažno-zavisan način

Odlaganje inaktivacije u prisustvu unutarćelijskog ATP omogućilo je analizu reverzibilne voltažno-zavisne inaktivacije na depolarizujućim potencijalima. Ispitana je vremenska i voltažna zavisnost oporavka IRIS od inaktivacije koju izaziva depolarizujući stimulus. Primenjeni protokol sastoji se od dva uzastopna depolarizujuća pravougaona stimulusa (+70 mV) između kojih se membranski potencijal drži u određenom vremenskom periodu na hiperpolarizujućem potencijalu čija vrednost i trajanje su varirani (Slika 4.12) i ispitan je njihov uticaj na udeo oporavljene struje koja se aktivira na drugom depolarizujućem pravougaonom stimulusu.



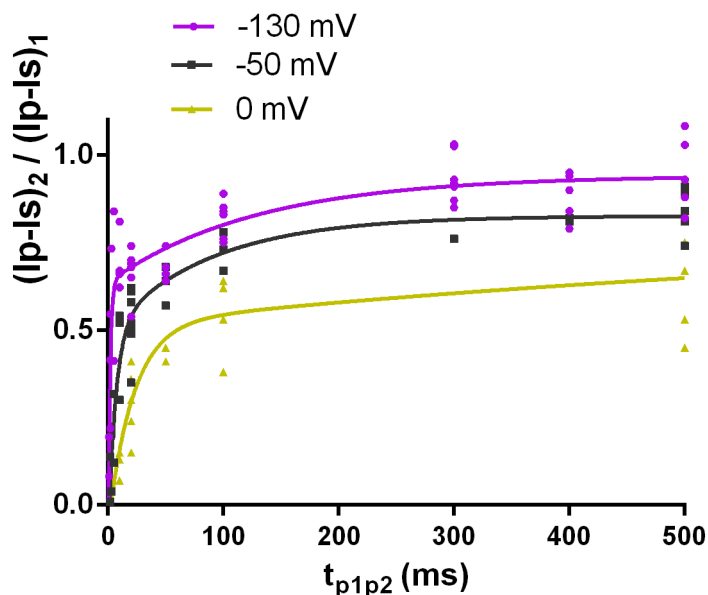
Slika 4.12. Prikaz eksperimentalnog protokola i strujnog odgovora pri merenju voltažno i vremenski zavisnog oporavka od inaktivacije IRIS. Prvi red: šema protokola koji se sastoji iz dva pravougaona depolarizujuća stimulusa sa primerom 3 različita vremena oporavka između stepenika. Redovi 2-5 : strujni zapisi u odgovoru na prikazane protokole, pri čemu svaki red odgovara membranskom potencijalu koji je održavan za vreme oporavka (obeleženo sa desne strane).

Za analizu su odabrani oni eksperimenti u kojima amplituda odgovora na prvi pravougaoni stimulus P1P2 protokola, definisan kao „kontrolni“ nije opadala više od 20% od vrednosti na početku snimanja, što odgovara i vremenskom toku održavanja amplitude u kontrolnim snimanjima (slika 4.6). Time se izbegava artefakt izazvan udelom ireverzibilno inaktivirane struje u vremenu i testira samo vremenska i naponska zavisnost reverzibilnog oporavka od inaktivacije. Na slici 4.13 prikazane su normalizovane vrednosti amplituda odgovora na P1 stimulus iz svih eksperimentalnih ponavljanja, kako bi se istaklo da ni u jednom eksperimentu nije došlo do ireverzibilnog pada amplitude ispod 20 % početne vrednosti.



Slika 4.13.  $I_p$  odgovora na kontrolni (P1) pravougaoni stimulus prikazana u svakoj vremenskoj tački tokom eksperimenata i normalizovana na vrednost na početku eksperimenta; prikazane su vrednosti svih eksperimentalnih ponavljanja.

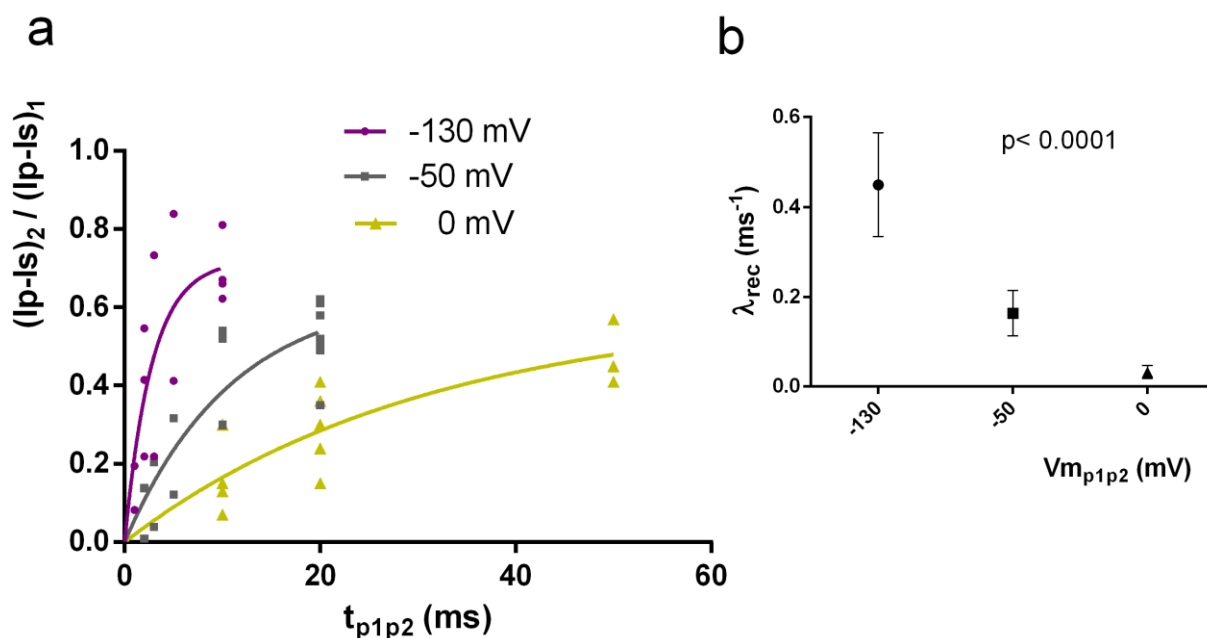
Amplitude inaktivirajuće komponente struje u odgovoru na drugi depolarizujući stimulus (P2) normalizovane su na odgovor na prvi stimulus (P1) i prikazane su u funkciji vremena između dva stimulusa ( $t_{p1p2}$ ) (slika 4.14). Upoređivane su izmerene vrednosti  $I_p-I_s$ , kako bi se pratila inaktivirajuća komponenta struje, jer se za hipotetičko nulto vreme oporavka, IRIS zapravo zadržava na  $I_s$  vrednosti. Rezultati jasno pokazuju da IRIS može da oporavi preko 90% amplitude inaktivirajuće komponente ukoliko se izloži hiperpolarišućim potencijalima (-130 mV i -50 mV).



Slika 4.14. Oporavak IRIS od depolarizacijom izazvane inaktivacije. Oporavak predstavljen odnosom amplituda inaktivirajuće struje tokom dva uzastopna depolarizujuća pravougaona stimulusa prikazan je u funkciji vremena. Oporavak je prikazan u vidu zasebnih serija za svaki od 3 potencijala membrane koji je nametnut tokom hiperpolarišućeg stimulusa između dva stepenika. Prikazani su svi eksperimentalni ponovci i fit dvokomponentnim eksponencijalnim funkcijama.

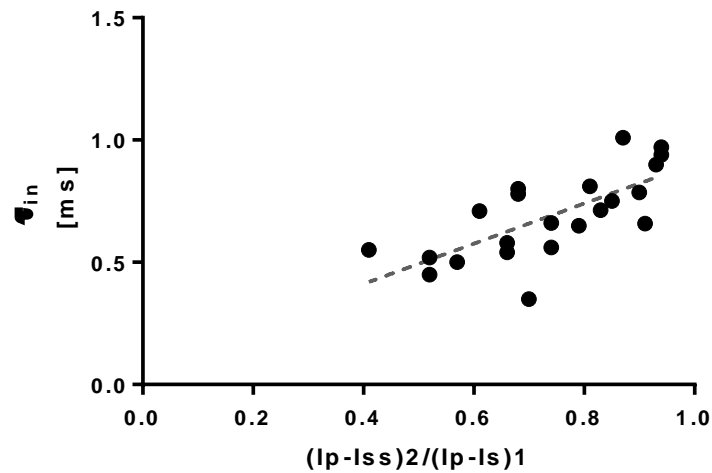
Održavanje membranskog potencijala na 0 mV između pravougaonih stimulusa dovodi do nepotpunog oporavka i sa produženim vremenom trajanja pauze (Slika 4.14). Oporavak preko 80 % amplitude IRIS nakon pauze na 0mV nije moguć ni sa trajanjem pauze od 1000 ms (n=3). Kao što se vidi na slici 4.14, krive vremenske zavisnosti oporavka  $I_p-I_s$ , ugađane su eksponencijalnim funkcijama sa uvedenim ograničenjem na  $I_p-I_s = 0$ , za nulto vreme oporavka. Rezultati fita pokazuju dvofaznu dinamiku oporavka, pri čemu se brza komponenta oporavka na -130 mV odigrava već na trajanjima pauze kraćim od 10 ms. Udeo oporavljene struje tokom pauze od 10 ms tako iznosi  $0.67 \pm 0.008$  na -130 mV,  $0.41 \pm 0.13$  na -50 mV, i  $0.16 \pm 0.09$  na 0 mV.

Brže komponente oporavka prikazane su na slici 4.15a, sa fitom jednodokomponentnim eksponencijalnim funkcijama. F test najmanjih kvadrata pokazao je da svakoj grupi podataka odgovara zasebna eksponencijalna funkcija ( $p < 0.0001$ ). Stope oporavka izvedene iz fita eksponencijalnim funkcijama jasno pokazuju ubrzavanje oporavka sa povećanjem nametnutog negativnog potencijala između depolarizujućih stimulusa (slika 4.15b). Sa slike 4.15a je takođe očigledno da se brža komponenta oporavka na potencijalu od -130 mV odvija u prvih 10 ms, na potencijalu od -50 mV u opsegu od 20 ms, a na 0 mV do 50 ms.



Slika 4.15. Zavisnost brzine oporavka IRIS od napona nakon depolarizujućeg stimulusa. a): izdvojene frakcije brže komponente oporavka sa slike 4.14, koje se uspešno ugađaju jednodokomponentnom eksponencijalom za sva tri potencijala; b): srednje stope oporavka dobijene iz fita bržih komponenti oporavka za 3 membranska potencijala, prikazane sa standardnim greškama fita.

Trend pada amplitude sa skraćanjem vremena oporavka prati i smanjenje vremenske konstante inaktivacije, sa statistički značajnom korelacijom ( $p < 0.01$ ), kako je prikazano na slici 4.16.

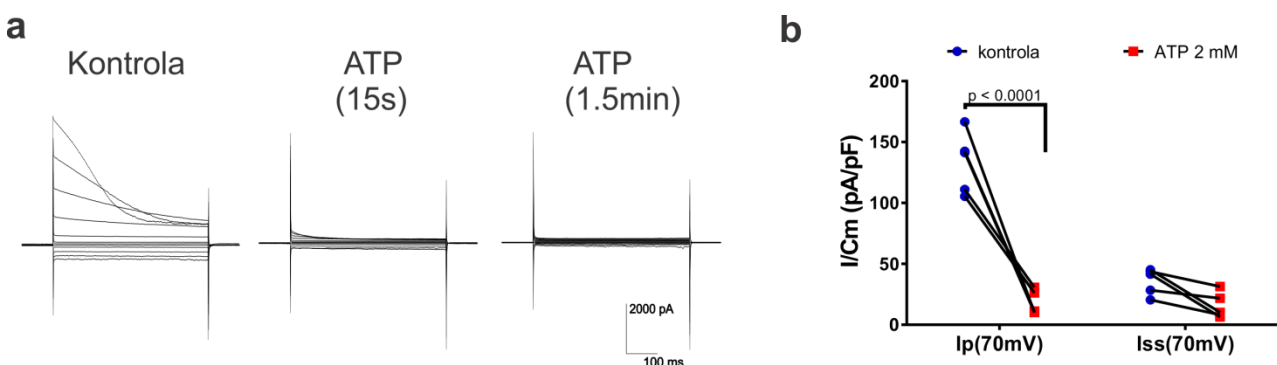


Slika 4.16. Korelacija promene udela oporavljene IRIS i promene konstante inaktivacije dobijenih primenom P1P2 protokola.  $R^2$  vrednost iznosi 0.51,  $p < 0.01$ ,  $n = 22$ .

Ovaj rezultat, kao i efekat koji ostvaruju flavonoidi/odsustvo ATP-a, zajedno ukazuju na tesnu povezanost fenomena dinamike inaktivacije IRIS i njene amplitude, te se može zaključiti da odsustvo ATP-a dovodi do smanjene mogućnosti kanala da se vrati u otvoreno stanje iz inaktiviranog.

#### 4.7 Vanćelijski ATP blokira IRIS

Nakon utvrđivanja efekta 2 mM unutarćelijskog ATP na IRIS, ispitan je efekat iste ove koncentracije primenjene sa spoljašnje strane membrane. Registrovan je izuzetno brz i dramatičan blokirajući efekat ( $n = 4$ ), već u prvom minutu po dodavanju 2 mM ATP u komoricu za registraciju tokom snimanja IRIS (slika 4.17).

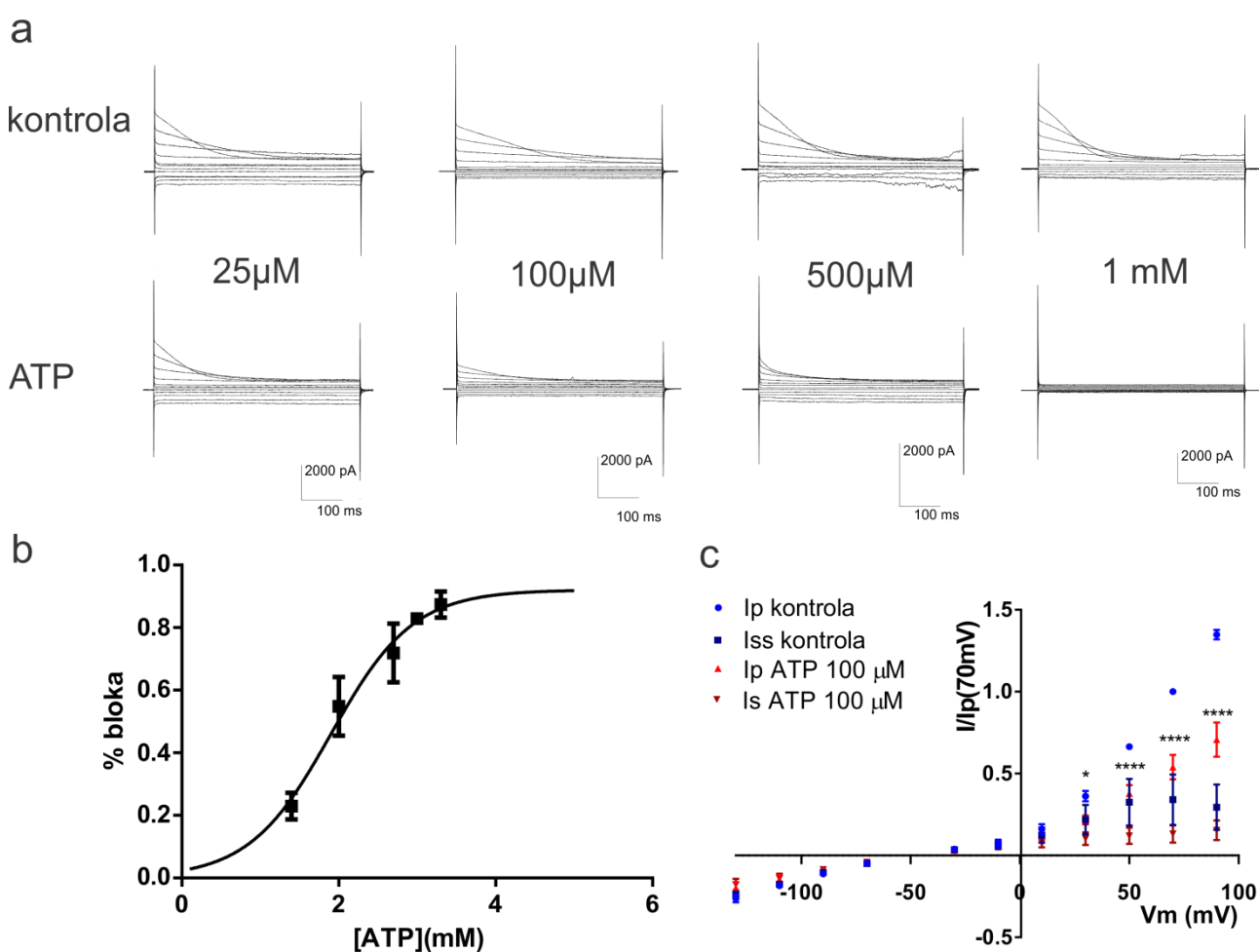


Slika 4.17. Efekat vanćelijskog ATP na IRIS. A: reprezentativni zapisi efekta 2 mM vanćelijskog ATP na IRIS, levo – kontrolni zapis, sredina – efekat nakon 15 s, desno – pun efekat nakon 1-2 min; b: gustine  $I_p$  i  $I_{ss}$  na +70mV u kontrolnim zapisima i tretmanima nakon punog bloka (do 2min), prikazane su izmerene vrednosti kontrole i tretmana iz svih eksperimentalnih ponavljanja, povezane linijama,  $p$  vrednost t-testa za vezane uzorke vrednosti za  $I_p$  je  $< 0.0001$ ;



Zatim je ispitan efekat ATP-a u rasponu koncentracija od 25  $\mu\text{M}$  do 1 mM (slika 4.18). Blok je u slučaju svake primenjene koncentracije primetan već u drugom minutu, pri čemu je preko 90% IRIS blokirano na koncentracijama od 1mM (n=3), te je iza vrednosti od 1 mM dostignut gornji plato efekta ATP-a. Najmanja primenjena koncentracija blokira 25 % IRIS. Kako je maksimalan pad amplitude IRIS u pojedinim kontrolnim snimanjima bio do 20 % početne amplitude, efekat manjih koncentracija od 25  $\mu\text{M}$  ne bi bio pouzdano merljiv.

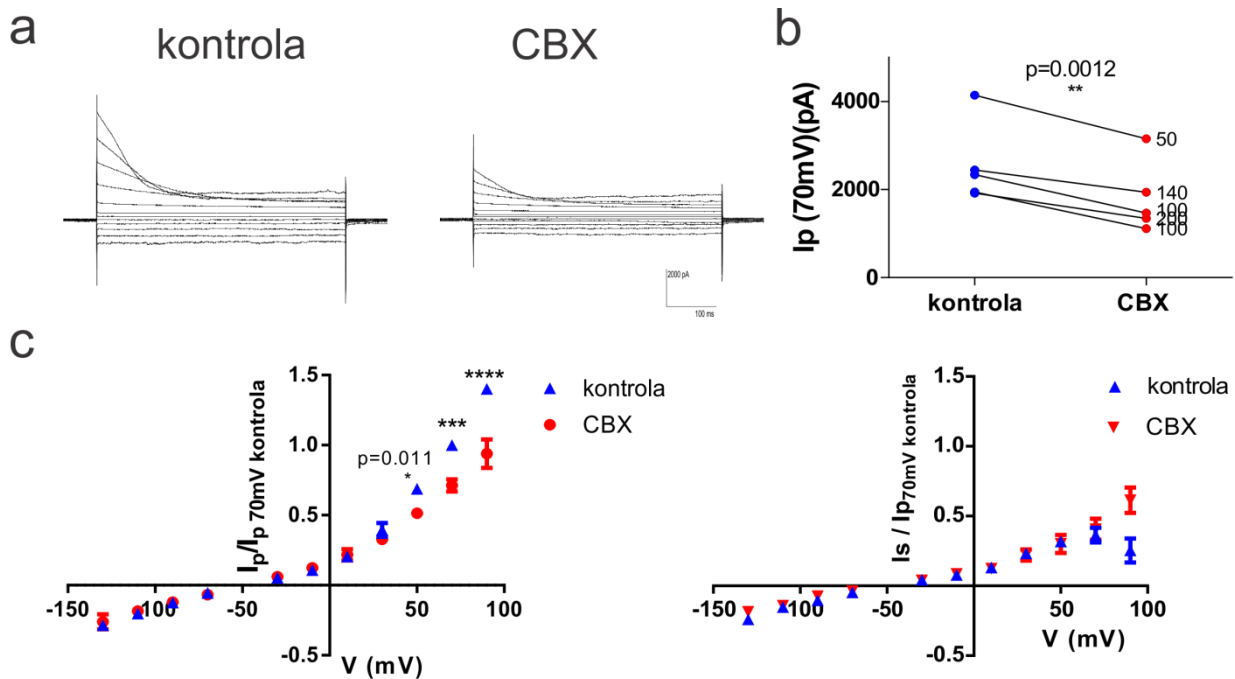
Iz krive zavisnosti procenta bloka od koncentracije (slika 4.18b), fitovane Hilovom funkcijom za dozno-zavisan odgovor, izvedena je koncentracija na kojoj je inhibirano 50 % struje ( $\text{EC}_{50}$ ) koja iznosi 60  $\mu\text{M}$ . Hilov koeficijent izveden fitovanjem podataka istom funkcijom je blizu jedinice ( $0.91 \pm 0.3$ ), iz čega se zaključuje da ATP ne ostvaruje blokirajući efekat kroz kooperativno vezivanje više molekula. Na slici 4.18c prikazan je efekat ATP na svim potencijalima, u koncentraciji najbližjoj izračunatoj  $\text{EC}_{50}$  vrednosti (100  $\mu\text{M}$ ).



Slika 4.18. Dozna zavisnost bloka vančelijskim ATP. a: reprezentativni originalni zapisi IRIS u kontrolnim snimanjima (prvi red) i tretmanima vančelijskim ATP-om u rastućim koncentracijama (drugi red). b: dozno-zavisna kriva procenta bloka vančelijskim ATP-om, prikazane su srednje vrednosti bloka u funkciji logaritma koncentracije primenjenog ATP, sa fitovanjem Hilovom funkcijom; c: srednje strujno-naponske krive za kontrolne (plavo) i zapise u vančelijskom 100  $\mu\text{M}$  ATP (crveno), prikazane sa standardnim greškama i p vrednostima za razlike srednjih vrednosti u vidu zvezdica.

## 4.8 Karbenoksolon blokira IRIS

Karbenoksolon (CBX), blokator jonskih kanala među kojima je i zapreminski regulisani kanal kičmenjaka ostvaruje blag inhibitorni efekat na IRIS, koji je merljiv u izlaznoj komponenti struje (slika 4.19). Blok u opsegu primenjenih koncentracija od 50-150  $\mu\text{M}$  iznosi  $27 \pm 8 \%$ , ( $p=0.0012$ ,  $n= 5$ ) za vrednosti  $I_p$  na 70 mV. Razlika je statistički značajna na 90 mV ( $p< 0.001$ ), 70mV ( $p=0.0012$ ) i 50 mV ( $p<0.05$ ), dok statistička značajnost odsustvuje na potencijalima ispod 50 mV.

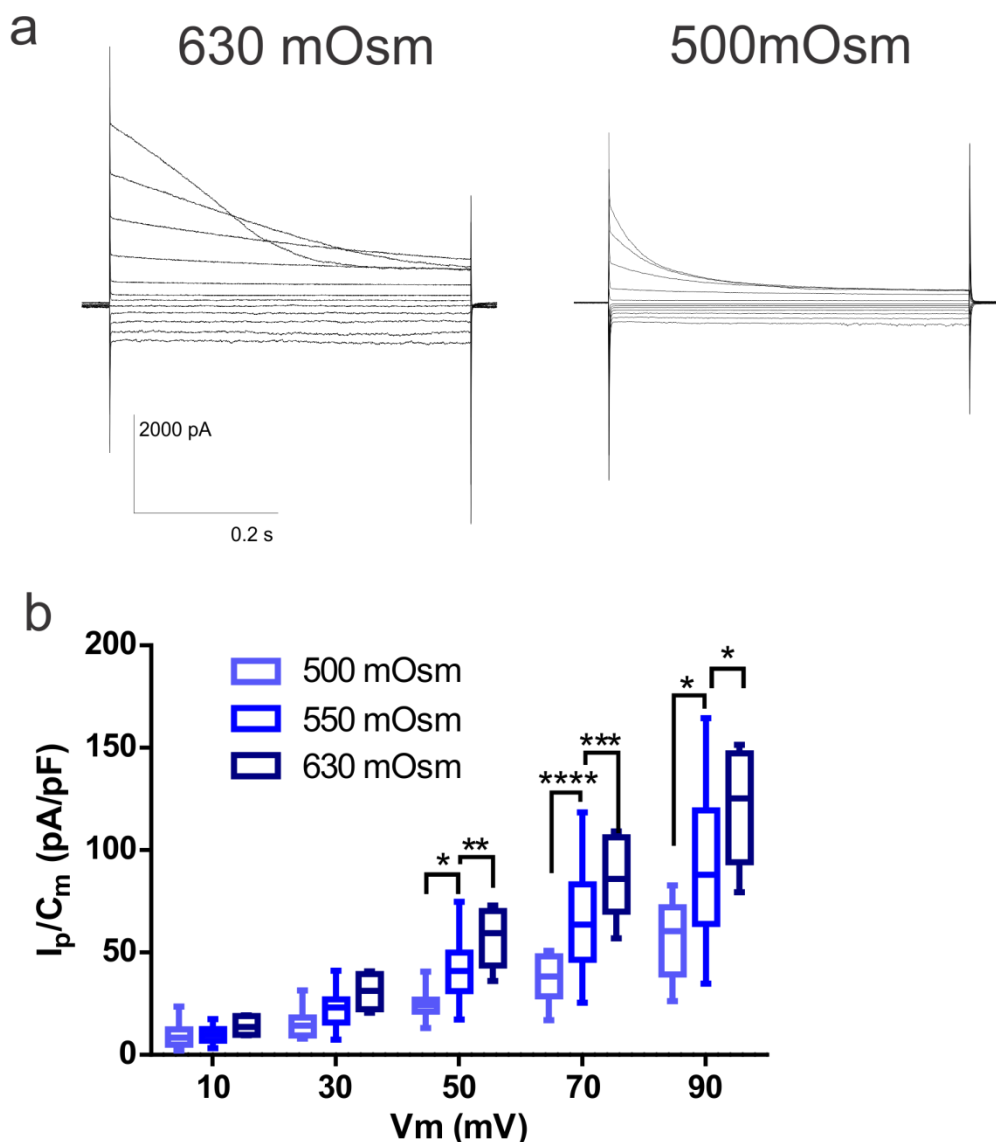


Slika 4.19. Efekat karbenoksolona (CBX) na IRIS. a: reprezentativni zapisi snimljeni pre i u 3. minutu tretmana CBX-om; b: amplitude  $I_p$  struje na 70 mV u svim eksperimentima, u uslovima pre i u 3. minutu od dodavanja CBX, prikazane kao zasebne tačke spojene linijama; c: srednje strujno-naponske krive inaktivirjuće ( $I_p$ , levo) i stacionarne ( $I_s$ , desno) struje u kontrolnim zapisima (plavo) i tretmanu CBX-om nakon 3 minuta od dodavanja (crveno); prikazane su statsističke značajnosti razlika između  $I_p$  amplituda za svaki potencijal membrane, utvrđenje t-testom za vezane uzorke.

## 4.9 IRIS je osmotski osetljiva struja koja se može detektovati i bez razlike u osmolarnosti

Za razliku od prethodnih rezultata (Križak et al. 2015), tokom izrade ove disertacije IRIS je bila detektovana i u odsustvu osmotske stimulacije. Iako aktivna, srednja gustina IRIS na svim depolarišućim potencijalima je statistički značajno manja pri snimanju u izoosmotskim uslovima ( $n=8$ ) u odnosu na IRIS aktiviranu standardnim rastvorom sa razlikom od 550 mOsm (slika 4.20). Ponovljeno je i snimanje struja u uslovima povećane osmotske razlike (hiperosmotskim pipetnim rastvrom od 630 mOsm), sa standardnim izoosmotskim rastvorom u komorici. Srednje gustine struja u ovoj grupi se takođe statistički značajno razlikuju od IRIS u standardnim uslovima snimanja, na svim depolarišućim potencijalima (slika 4.20,  $n=8$ ). Rezultati potvrđuju da je IRIS dozno-zavisno stimulisana osmotskom

razlikom. Varijacije sastava rastvora nisu dovele do zaključka čime je IRIS stimulirana u odsustvu osmotske razlike.

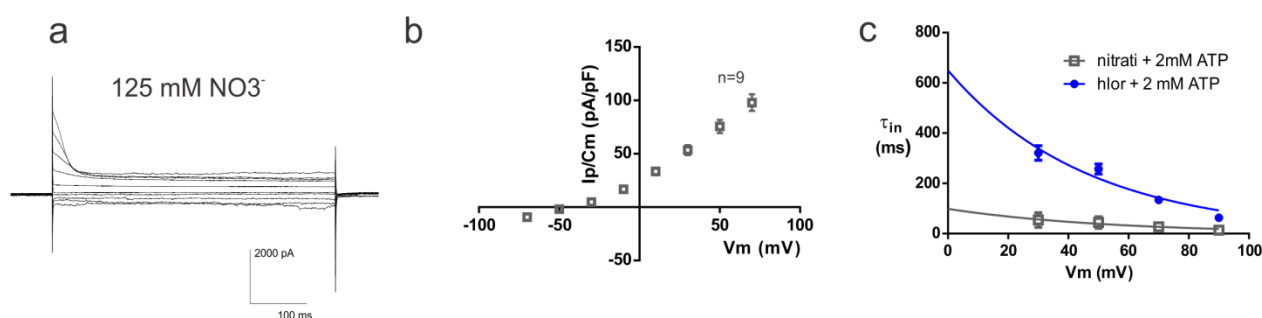


Slika 4.20. Osmotska osetljivost IRIS. a: reprezentativni originalni zapisi IRIS snimane sa pipetnim rastvorom osmolarnosti 630 mOsm (levo) i u izoosmotskim uslovima (desno). b: srednje gustine IRIS za svaki nametnuti potencijal membrane, u 3 grupe osmotske razlike –izoosmotski uslovi (500 mOsm u pipeti), standardni pipetni hiperosmotski rastvor (550 mOsm) i pipetni rastvor povećane osmolarnosti (630 mOsm). Prikazane su srednje vrednosti ograđene opsegom verovatnoće od 25-75 % dok se nastavci pružaju do maksimalnih i minimalnih vrednosti. Statističko poređenje rađeno je ANOVA testom sa dodatnim međusobnim poređenjem srednjih vrednosti grupa sa grupom od 550 kao kontrolnom (Holm-Sidak korekcija),  $p=0.0006$ .

Izmeren je prosečan pritisak sukucije primenjen za ostvarivanje gigaomskog kontakta i ulazak u konfiguraciju „cela-ćelija“ – opseg negativnog pritiska je 20-40 mbar za razaranje membrane pri ulasku u konfiguraciju. Međutim variranje pritiska van ovog opsega koje bi pokazalo da nivo mehaničkog pritiska utiče na stimulaciju IRIS, dovodi do neuspeha ostvarivanja konfiguracije cela ćelija na CK. Ovi podaci sugerišu da osmotski stres nije jedini stresor koji dovodi do reakcije CK aktivacijom IRIS.

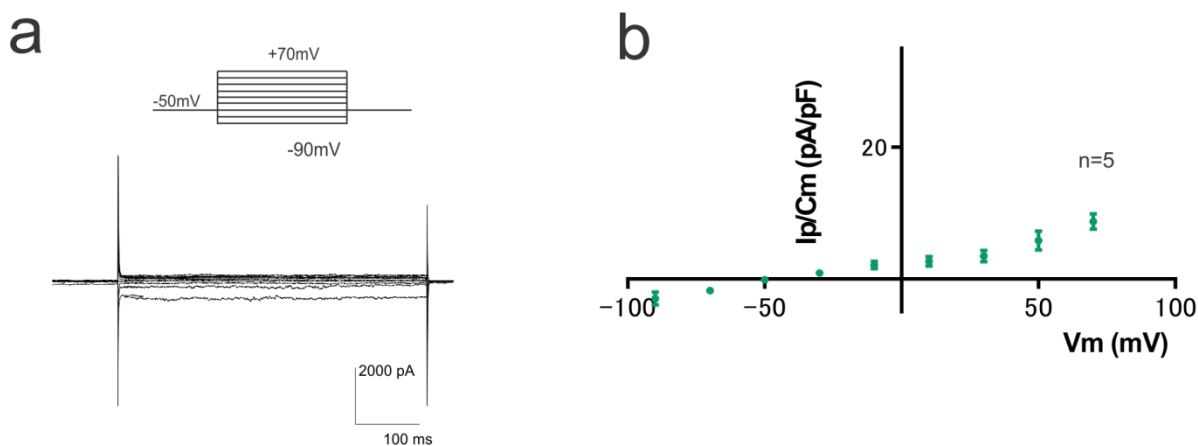
#### 4.10 Provodljivost IRIS za nitrate i fosfate

Ispitana je provodljivost IRIS za nitratne i fosfatne jone. Slično zapreminski-regulisanom kanalu kičmenjaka, IRIS provodi nitrate (slika 4.21), dok fosfati nisu permeabilni (slika 4.22). Srednje gustine struja snimanih u rastvorima u kojima je hlor zamenjen nitratima blago su veće u odnosu na grupu snimanu u hloru, ali bez statističke značajnosti ni na jednoj vrednosti depolarišućeg membranskog potencijala. Fitovanje strujno naponske krive Bolcmanovom funkcijom pokazuje prisustvo umerenog izlaznog ispravljanja (nešto slabijeg, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na IRIS nošenu hlorom), što pokazuje da provodeći jon, kako je i očekivano, ne utiče na na zavisnost provodljivosti IRIS od napona. Sa druge strane, srednja brzina inaktivacije IRIS, izvedena iz vremenske konstante dobijene fitovanjem strujnih zapisa jednodimenzionalnom eksponencijalom, značajno je veća (konstanta inaktivacije je manja) pri snimanju IRIS u nitratima u odnosu na snimanje u hloru, što je u skladu sa već pokazanim trendom ubrzavanja inaktivacije sa većim provođenjem datog anjona. IRIS je snimana u uslovima sa i bez prisutnog unutarćelijskog ATP-a, te su grupe vremenskih konstanti upoređivane sa odgovarajućim grupama snimanim u rastvorima sa 125 Cl<sup>-</sup>, a poređenje između grupa sa prisutnim unutarćelijskim ATP-om je prikazano na slici 4.20c.



Slika 4.21 Provodljivost IRIS za nitratne anjone. a: reprezentativni zapis IRIS registrovane u rastvorima sa <math>< 6 \text{ mM}</math> hlora i 125 mM nitratnog anjona; b: srednja kriva zavisnosti gustine IRIS od napona ( $n=9$ ), prikazana sa standardnim greškama; c: srednje vrednosti konstanti inaktivacije na depolarišućim potencialima za IRIS nošenu hlornim i nitratnim anjonima sa, u oba slučaja pristutnim 2mM ATP.

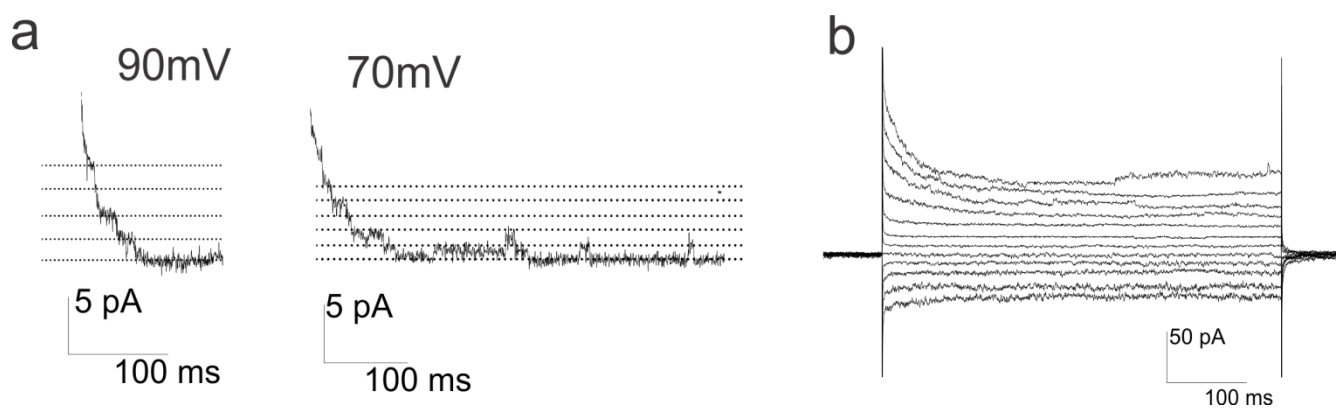
Kao i u slučaju kičmenjačke VRAC, IRIS ne provodi fosfate (slika 4.22). Iako snimana u uslovima standardne razlike u osmolarnosti od 55 mOsm, u 4 od 5 zapisa IRIS odsustvuje u potpunosti, dok se u jednom zapisu javlja sa amplitudom od 20 % srednje amplitude nošene hlorom pri istoj razlici u osmolarnosti.



Slika 4.22. IRIS ne može biti nošena fosfatnim jonima. a: reprezentivni originalni zapis odgovora CK na opseg potencijala membrane između -90 i +70 mV u uslovima snimanja sa 125 mM fosfatnog jona; b: srednja strujno-naponska kriva izvedena iz svih eksperimenata (n=5) prikazana sa standardnim greškama.

#### 4.11 Moguće je registrovati IRIS u istrgnutom deliću membrane

IRIS je registrovana u konfiguraciji „spolja-spolja“, nakon registracije ukupne struje u konfiguraciji „cela ćelija“. Imobilizacija CK vezujućom podlogom (conA) je bio prvi neophodan korak za optimizaciju izvođenja snimanja u konfiguraciji „spolja spolja“ na CK, kako su do sada obavljena snimanja samo u konfiguraciji „unutra-spolja“ (Zivić et al. 2005) pri kojem istrzanje dela membrane nakon ostvarivanja prisnog kontakta bilo moguće bez imobilizacije. U svim eksperimentima pipetni rastvor sadržao je 2 mM ATP. Uspešnost dobijanja gigaomskog kontakta nakon istrzanja membrane iznosi 50 %. U 78 % snimanja istrgnute membrane nakon aktivacije IRIS u konfiguraciji „cela ćelija“, registrovana je aktivnost označena kao stepeničasti obrazac inaktivacije (SOI) (Slika 4.23a). Kako je IRIS dominantna struja citoplazmatskih kapi, što je jasno vidljivo u konfiguraciji cela ćelija, očekivano je da je struja koja se u istrgnutim membranama registruje u ovako visokom procentu zapravo aktivnost kanala u osnovi IRIS. Usledila je detaljnija analiza karakteristika SOI kako bi se ova hipoteza potvrdila. Prilikom upotrebe pipeta za registraciju od 7-9 M $\Omega$ , koje omogućavaju lakši ulazak u konfiguraciju „cela ćelija“, istrgnuti membranski segmenti su često pak bili toliko veliki i sadržali toliko kanala da su ukupne amplitude SOI iznosile više desetina pA (Slika 4.23b) i samim tim nužno snimane na manjim pojačanjima. Stoga su se nakon perioda optimizacije za dalje istrzanje koristile samo pipete otpora preko 9 M $\Omega$ .

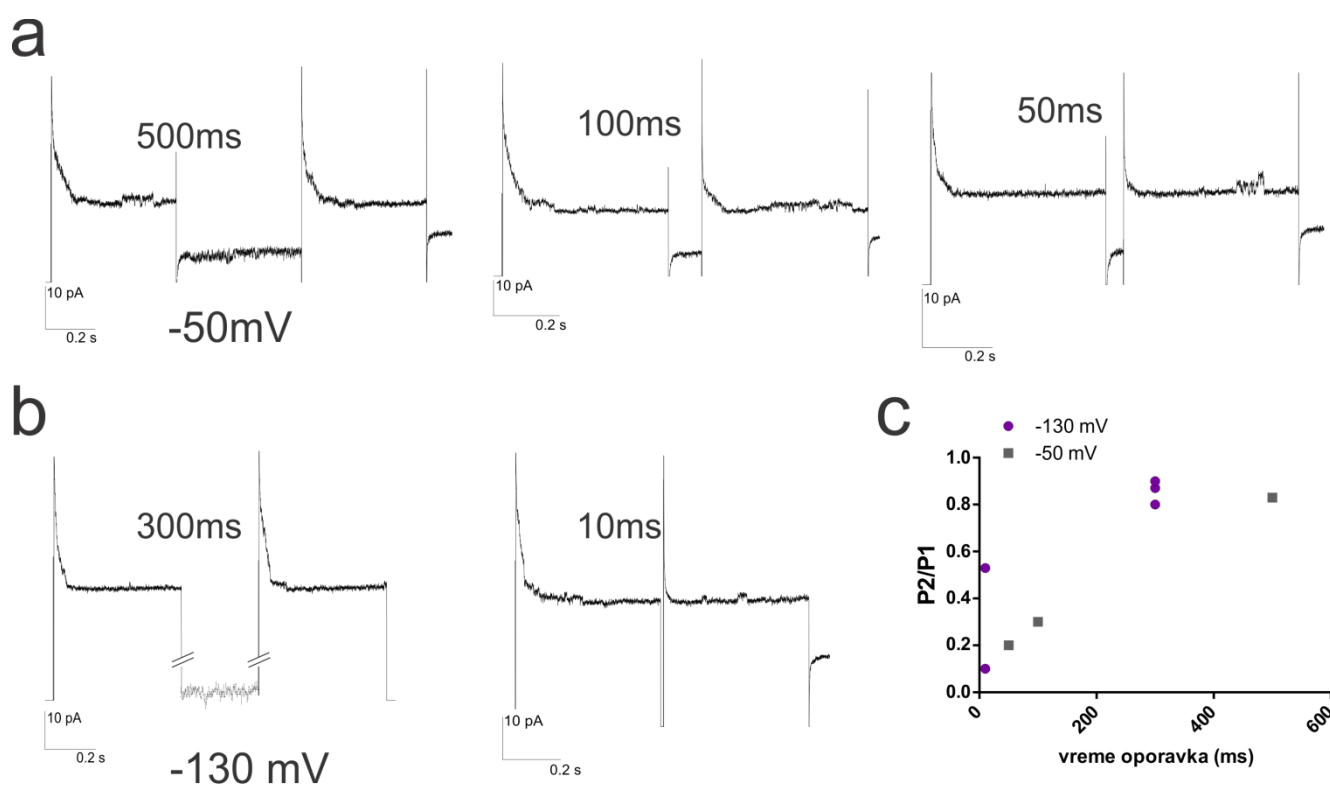


Slika 4.23. Registracija IRIS u istrgnutoj membrani u konfiguraciji „spolja-spolja“. a: registracija dela membrane istrgnutog pipetom od 10 M $\Omega$ , sa pojačanjem od 500 mV/pA; b: strujni odgovor snimljen upotrebom mikropipete otpora 7M $\Omega$ , pri pojačanju od 20 mV/pA;

## 4.12 Identifikacija IRIS u istrgnutoj konfiguraciji

### 4.12.1 Identifikacija testiranjem oporavka od inaktivacije

P1P2 protokol korišćen za test oporavka od inaktivacije ukupne IRIS (slika 4.12), primenjen je i za analizu SOI.



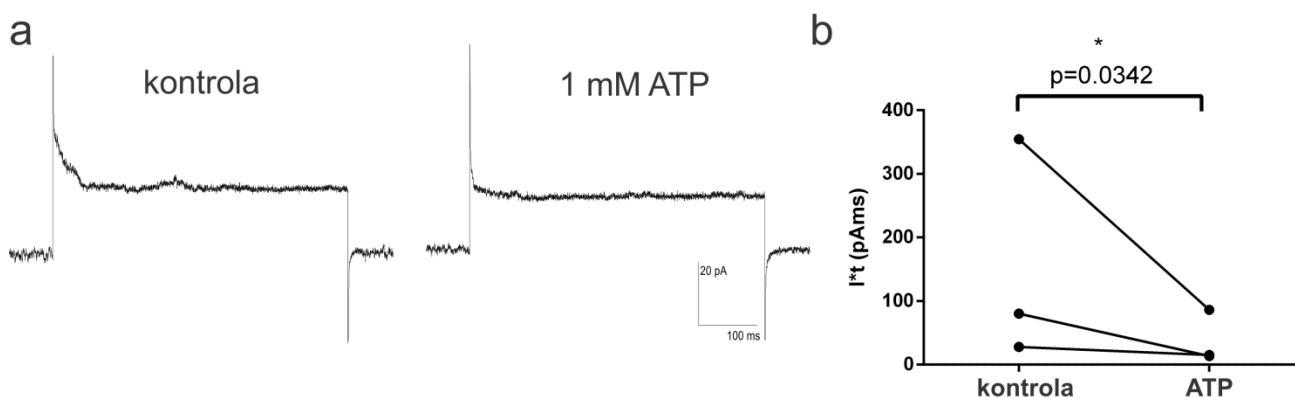
Slika 4.24. P1P2 protokol primenjen na membrani istrgnutoj nakon stimulacije IRIS. a: originalni zapisi oporavka od inaktivacije na nivou pojedinačnih otvaranja na hiperpolarisućem potencijalu od -50 mV u 3 različita vremena; b: originalni zapisi oporavka od inaktivacije na hiperpolarisućem potencijalu od

-130 mV u 2 različita vremena; c: amplitude oporavljene struje normalizovane na prvi depolarišući stimulus svih ponovaka snimanja na istrgnutoj membrani.

Rezultati su izvedeni iz ukupno 5 snimanja istrgnute membrane u kojima je SOI predstavljao dominantnu aktivnost na depolarišućim potencijalima. Oporavak od inaktivacije prati trend smanjenja odgovora na P2 sa skraćanjem vremena oporavka od P1 na hiperpolarišućim potencijalima, kao što je prikazano na slici 4.24.

#### 4.12.2 Identifikacija blokom vanćelijskim ATP-om

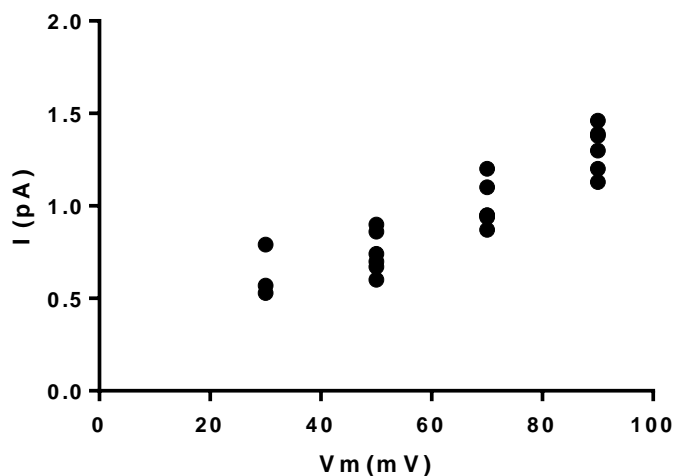
Ispitana je osetljivost SOI registrovane u istrgnutoj membrani na vanćelijski ATP. Primenjena je koncentracija od 1 mM, koja izaziva dramatičan blok ukupnih struja membrane CK (slika 18). Za analizu su odabrani zapisi sa minimalnim registrovanim šumom i stabilnim kontaktom i merena je površina ispod zapisa u regionu SOI. Za određivanje regiona u kojem je pouzdano izmeriti površinu, prvo je na nekoliko zapisa bez aktivnosti mereno do koje se tačke u zapisu prostiru kapacitativni tranzijenti, koji su prisutni usled nepotpune kompenzacije tranzijenta pipete i samog tranzijenta većih zatvorenih fragmenata membrane. ATP primenjen sa spoljašnje strane membrane izazvao je gašenje SOI u toku 2 minuta od dodavanja ( $p=0.0342$ ,  $n=3$ )(slika 4.25).



Slika 4.25. Efekat ekstracelularnog ATP-a na IRIS registrovanu u istrgnutoj membrani u konfiguraciji „spolja spolja“, a: odabrani originalni zapisi struja istrgnute membrane u kontroli i 2 min nakon tretmana ATP-om; b: vrednosti površine inaktivirajuće komponente struje ispod zapisa struja istrgnute membrane pre i nakon dodavanja 1mM ekstracelularnog ATP u svakom od ponovaka. P vrednost t-testa za vezane uzorke iznosi 0.0342,  $n=3$ .

Iz zapisa sa jasno razlučivim stepenicima na potencijalu od +70 mV izmerena je amplituda pojedinačnog otvaranja od  $1.04 \pm 0.13$  pA ( $n=22$  snimanja različitih delića membrane). Kada je ustanovljeno da SOI predstavlja aktivnost kanala u osnovi IRIS, izdvojeno je 6 zapisa snimljenih na više depolarišućih potencijala na osnovu kojih je konstruisana strujno-naponska kriva za aktivnost pojedinačnih kanala. Na slici 4.26, prikazane su sve izmerene amplitude koje su grupno fitovane Bolcmanovom funkcijom. Iako trenutni obim podataka ne daje statistički značajnu razliku fita linearnom i nelinearnom funkcijom, strujno-naponski dijagram sugerše da na nivou pojedinačnih otvaranja postoji blago povećanje provodljivosti IRIS sa porastom depolarizacije. Stoga postoji verovatnoća da porast amplitude snimljene sa

cele membrane nije rezultat (samo) povećanja verovatnoće otvorenog stanja. Provodljivost na višim depolarizacijama (50-90 mV) koje se dobro ugađaju pravom iznosi  $14 \pm 1.5$  pS.



Slika 4.26. Strujno-naponska zavisnost aktivnosti pojedinačnih kanala u osnovi IRIS. Prikazana su sva merenja amplitude struje.

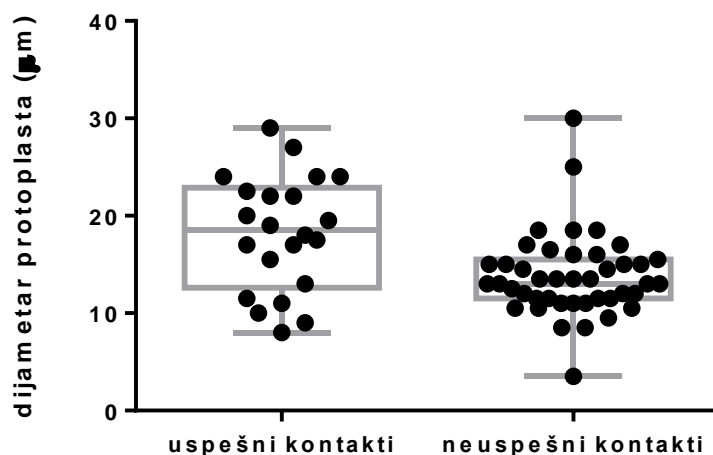
### 4.13 Registracija jonskih struja sa membrane protoplasta micelijuma

#### 4.13.1 Karakterizacija protoplasta micelijuma kao model sistema i poređenje sa modelom CK

Jonske struje ćelijske membrane micelijuma snimane su na protoplastima dobijenim ćelijskom hirurģijom, optimizovanim protokolom (rezultat u procesu objave). Broj pokušaja uspostavljanja kontakta pipete i protoplasta nakon optimizacije protokola iznosio je 235, na 78 protoplasta. Na 28 % protoplasta (ukupno 22), bilo je moguće uspostaviti gigaomski kontakt, pri čemu je na nekima bilo moguće višestruko istrzanje membrane i ponovni kontakt, što je rezultovalo u ukupno 36 grupa strujnih zapisa sa jedinstvenih delova membrane. Po uspešnom dobijanju gigaomskog kontakta, pipete su istrzane, i snimano je u konfiguraciji „unutra-spolja“. U nekoliko slučajeva kada je maksimalan otpor kontakta dostizao do 700 M $\Omega$ , snimani su zapisi u konfiguraciji „na ćeliji“, jer istrzanje pri ovako niskom kontaktu nije rezultovalo održavanjem kontakta sa istrgnutom membranom. U 20 slučajeva, tokom porasta otpora kontakta pri sukuciji membrana se spontano otvarala, pri čemu je samo u 2 slučajaja pre otvaranja registrovan G $\Omega$  kontakt. Za analizu su prihvaćeni svi zapisi celih protoplasta sa otporom preko 100 M $\Omega$ , kod kojih je kontakt bio dovoljno stabilan da opstane nakon istrzanja i omogući snimanje u konfiguraciji „spolja spolja“.

Jedan od glavnih faktora za uspešno ostvarivanje kontakta predstavljala je veličina protoplasta i adekvatano fitovanje geometrije vrha pipete i njegove veličine. Prečnici dobijenih protoplasta kreću se od < 10  $\mu$ m do 30  $\mu$ m. Prosečan prečnik protoplasta na kojima je ostvaren gigaomski kontakt iznosi  $18.2 \pm 6$   $\mu$ m, dok u grupi ubeleženih neuspelih pokušaja sa izmerenim dijametrom (n=43), prosečan dijametar iznosi  $13.6 \pm 4.2$   $\mu$ m. Ova razlika, prikazana na slici 4.27 je statistički značajno različita, sa p vrednošću od 0.0006.





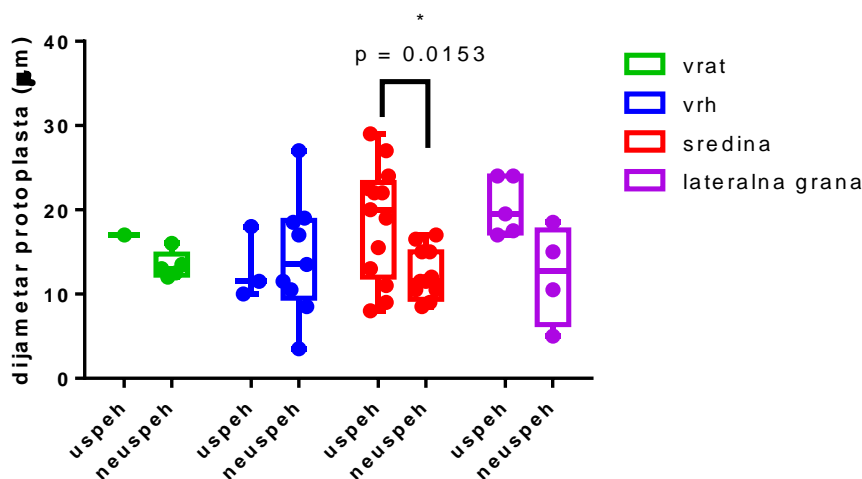
Slika 4.27. Raspodela dijametara protoplasta u grupi uspešnih i neuspešnih ostvarivanja gigaomskog kontakta. Prikazane su sve tačke uokvirene opsegom verovatnoće između 25 i 75 %, sa nastavcima koji se pružaju do minimalnih i maksimalnih vrednosti. T-test za nezavisne uzorke sa Velšovom korekcijom za nejednake SD ( $p=0.0006$ ).  $n$  (uspešni)=22,  $n$ (neuspešni)=43.

U određenom broju slučajeva (koji nije precizno kvantifikovan), protoplasti su bili prenapregnuti te se deo membrane nije mogao uvući u pipetu blagom sukciom, dok je prejaka sukucija usisavala/degradirala protoplast, što je ukazalo na to da protoplastima dobijenim hirurijom za stabilnost odgovara rastvor značajno veće osmolarnosti od rastvora u kojima se registruju CK. Međutim beleženi su i slučajevi pri kojima je deo protoplasta ulazio u pipetu bez dostizanja tesnog kontakta sa staklom, koji nisu do kraja razjašnjeni. U tabeli 5 prikazano je poređenje uspešnosti rada na protoplastima hifa i citoplazmatskim kapima sprangiofora za približan broj uzoraka. Uspešnost registracije struja na CK aproksimirana je na osnovu uzorka od 200 pokušaja iz različitih perioda eksperimentalnog rada. Izračunata uspešnost dobijanja gigaomskog kontakta na CK iznosi oko 55 % (u 60 analiziranih pokušaja) uspešnost snimanja istrgnute membrane sa otporom kontakta preko 1 G $\Omega$  48 % (30 analiziranih pokušaja), dok je poređenje uspešnosti dobijanja konfiguracije cela ćelija teško uporedivo, kako je na protoplastima hifa retko primenjivana dodatna sukucija nakon uspostavljanja kontakta, već je preferirano istrzanje membrane. Na CK, uspešnost snimanja stabilnih konfiguracija „cela ćelija“ iznosi 15-20 % ( $n=150$  pokušaja).

Tabela 5. Poređenje uspešnosti registracije jonskih struja sa CK i protoplasta micelijuma.

	Citoplazmatske kapi sporangiofora	Protoplasti micelijuma
Prosečan dijametar pri uspešnom kontaktu ( $\mu\text{m}$ )	$33 \pm 6$	$18.2 \pm 6$
Procenat ostvarenih G $\Omega$ kontakata	55 %	28 %
Procenat uspešnih zapisa u konfiguraciji „cela ćelija“	15 %	Nije primenljivo
Procenat G $\Omega$ kontakata nakon istrzanja u konfiguraciji „spolja spolja“	50 %	50 %

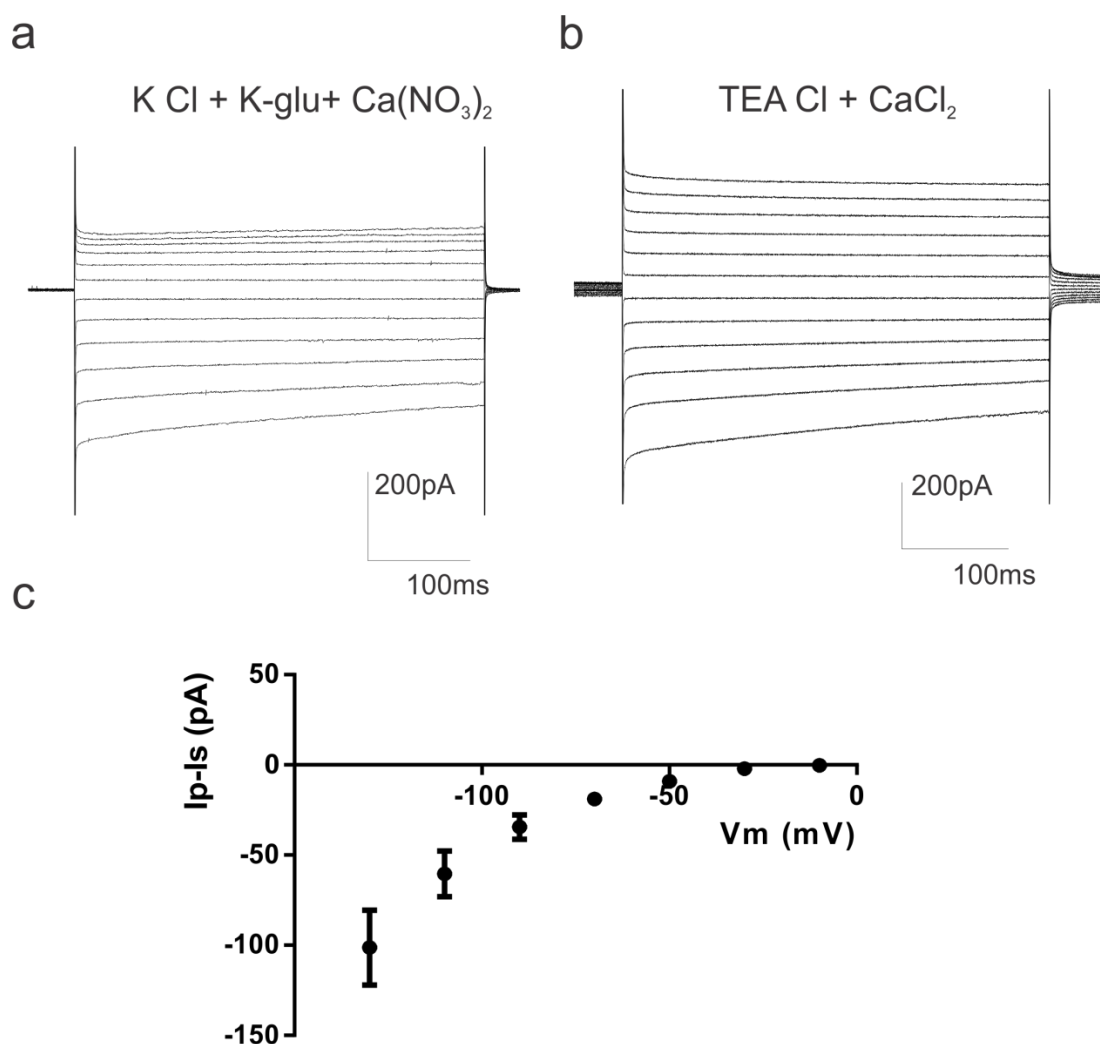
Protoplasti su dobijeni mikrohirurškim eliminisanjem zida sa različitih delova hife – isecanjem u vršnom delu, središnjem delu, na mestu grananja, i na bočnim granama. Raspodela veličina protoplasta i uspešnost ostvarivanja kontakta u zavisnosti od mesta izvora prikazana je na Slici 4.28. Najveći broj protoplasta dobijen je oslobađanjem od zida u središnjem delu hife, pri čemu se dijometri protoplasta na kojima je kontakt ostvaren statistički značajno razlikuju od grupe na kojoj kontakt nije ostvaren.



Slika 4.28. Raspodela dijametara protoplasta dobijenih sa različitih delova hife i uspešnost ostvarivanja kontakta.

#### 4.13.2 Dominantne struje protoplasta micelijuma snimane sa celog protoplasta

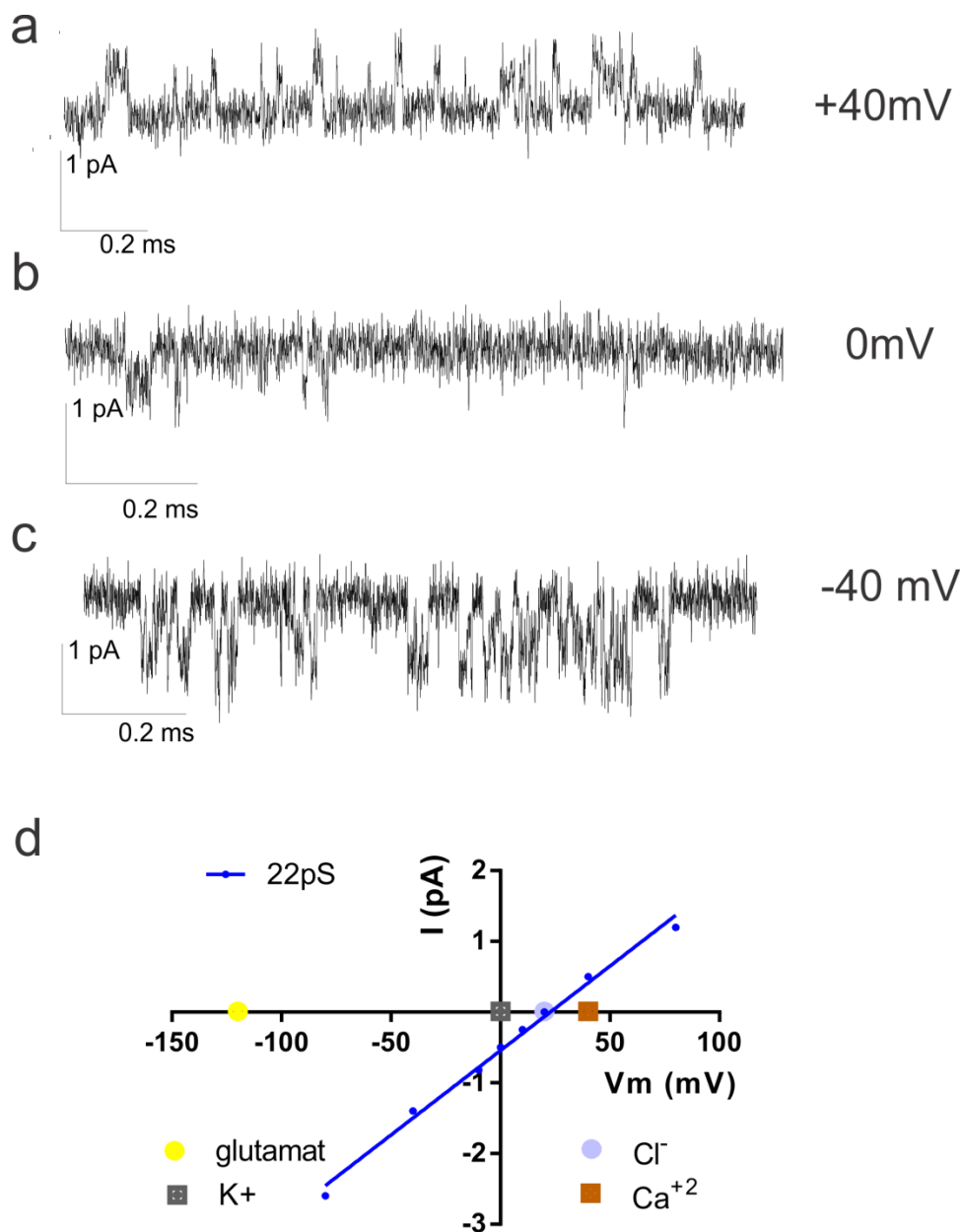
U konfiguraciji cela ćelija, dominantna struja koja se javlja u svakom protoplastu je ulazna struja sa specifičnom inaktivacijom na hiperplarišućim potencijalima (Slika 4.29a), koje odlikuje vremenska konstanta inaktivacije od  $528 \pm 145$  ms na  $-130$  mV ( $n=8$ ). Kako je registrovana i u rastvorima u kojima je kalijum zamenjen tetraetilamonijumom (Slika 4.29b), može se pouzdano zaključiti da struja nije nošena kalijumom. Po oduzimanju stacionarne vrednosti na hiperpolarišućim potencijalima, kako bi se izgubio doprinos pasivnih struja, strujno naponski dijagram pokazuje jasno ulazno ispravljanje (Slika 4.29c). Još uvek nije razlučeno da li je registrovana struja odraz izlaska anjona ili ulaska kalcijuma u protoplast. Usled kratkog trajanja stabilnog kontakta, snimanje odgovora na rampa stimulus nije bilo izvodljivo.



Slika 4.29. Ukupne struje protoplasta micelijuma snimane u konfiguraciji „cela ćelija“. a: reprezentativni originalni zapis ukupnih struja snimanih u uslovima sa prisutnim hloridnim, glutamatnim, nitratnim anjonima, kao i K i Ca (rastvori A+1, tabele 2-4) b: reprezentativni originalni zapis snimljen u uslovima sa kalijumom zamenjenim TEA-Cl-om. c: srednja strujno.naponska kriva ulazne komponente ukupne vršne struje, od koje je oduzeta vrednost stacionarne struje iz ukupno 9 zapisa, prikazana sa standardnim greškama i fitovanjem Bolcmanovom funkcijom.

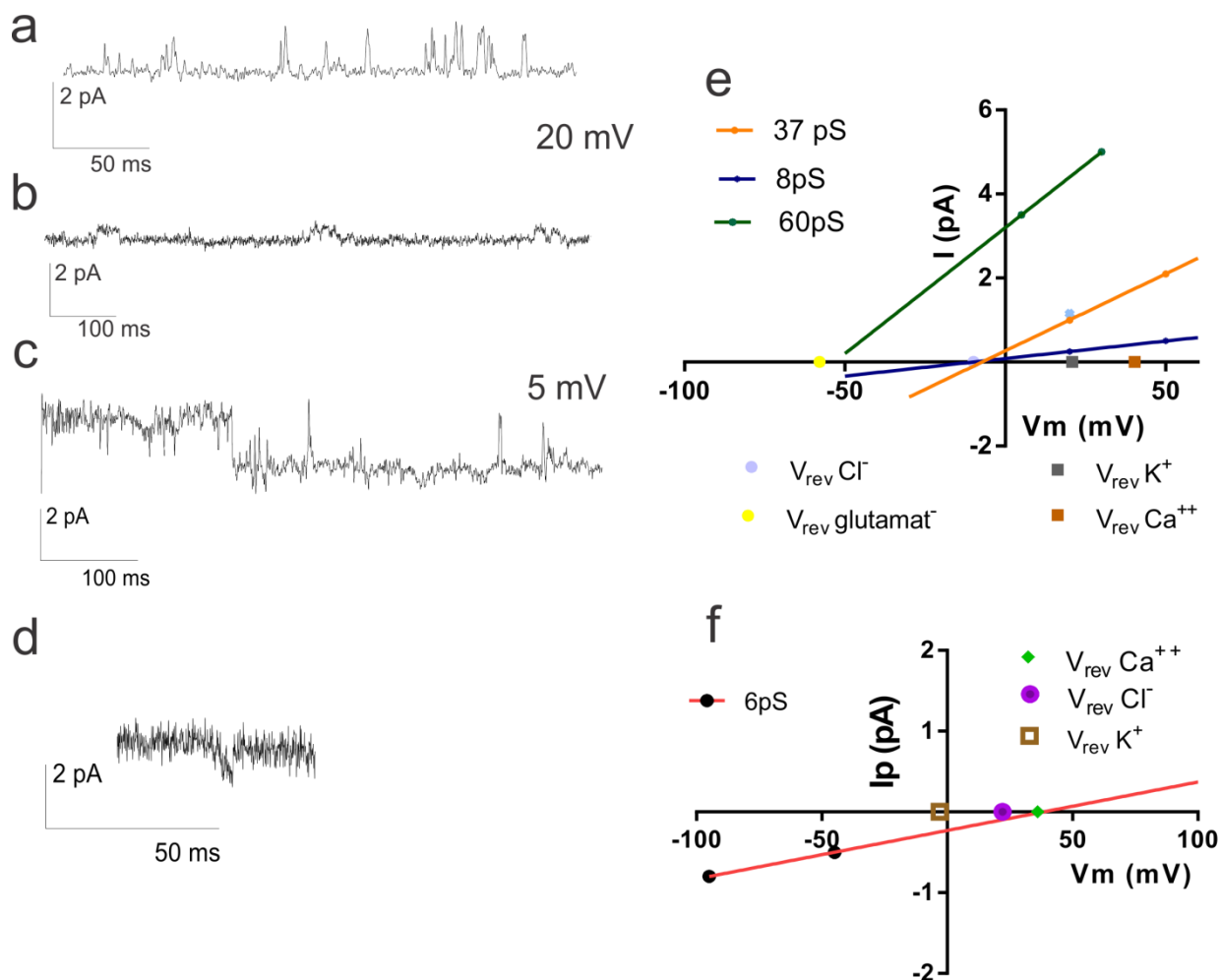
#### 4.13.3 Struje pojedinačnih kanala sa protoplasta dobijenih mikrohirurgijom

Zapisi dobijeni u odgovoru na kontinualne protokole, pravougaone i rampa-stimuluse, korišćeni su za merenje amplituda pojedinačnih otvaranja na različitim vrednostima membranskog potencijala. Na osnovu konstruisanih strujno-naponskih dijagrama za grupe pojedinačnih otvaranja određivana je provodljivost snimljenih kanala iz nagiba kriva. Takođe, na osnovu izračunatih potencijala reverzije za svaki jon u datim uslovima snimanja, određivan je provodeći jon za svaku grupu jonskih kanala, kao onaj čije je potencijal reverzije najbliži potencijalu reverzije strujno naponske krive registrovane struje. Na osnovu provodljivosti i selektivnosti, aktivnosti su podeljene u 10 kategorija, pri čemu su najčešće registrovane struje bile anjonske.



Slika 4.30. Aktivnost struja selektivnih za hlor provodljivosti 20 pS. a-c: originalni zapisi odgovora na kontinualni stimulus na potencijalima od +40 mV, 0 mV i -40 mV; b: strujno-naponski dijagram aktivnosti sa ugođenom pravom.

Za deo izmerenih anjonskih struja bilo je moguće precizno odrediti provodeći jon jer je strujno-naponska kriva jasno sekla vrednosti ravnotežnog potencijala za određeni anjon. Najčešće registrovana aktivnost je kanal provodljivosti 20 pS selektivan za hlor (Slika 4.30). Još 3 grupe aktivnosti ukazuju na kanale selektivne za jedan anjon : kanali selektivni za hlor provodljivosti 10 pS i 37 pS i kanal provodljivosti 60 pS, za koji je utvrđena selektivnost za glutamat (Slika 4.31).



Slika 4.31. Aktivnosti kanala selektivnih za jedan jon. a-b: originalni zapisi pojedinačnih otvaranja u odgovoru na kontinualni stimulus od +20 mV kanala selektivnih za hlor provodljivosti 37 pS (a) i provodljivosti 10 pS (b); c: zapis pojedinačnih otvaranja kanala selektivnog za glutamat u odgovoru na kontinualni stimulus na potencijalu 5 mV; d: strujno-naponski dijagrami pojedinačnih otvaranja kanala prikazanih u odeljcima a-c: glutamat selektivan kanal (tamno-zeleno), hlor-selektivan kanal od 37 pS (narandžasto), hlor-selektivan kanal od 8 pS (plavo). e: originlni zapis aktivnosti kanala selektivnog za kalcijum u odgovoru na -100 mV; f: strujno-naponski djagram kanala selektivnog za kalcijum.

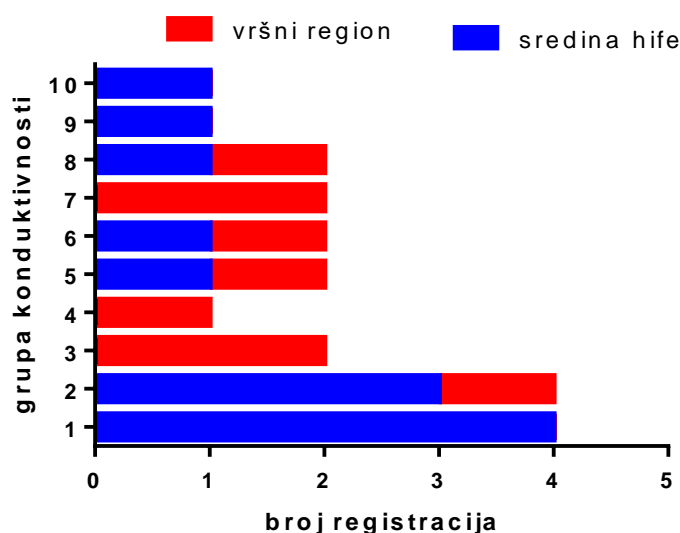
Sve prikazane izmerene jonske struje pokazuju linearnu strujno-naponsku zavisnost, dok je samo u jednom eksperimentu registrovan kanal sa izraženim ulaznim ispravljanjem za koji je pretpostavljeno da provodi hlor.

Kalijum je jedini jon koji je u većini eksperimentalnih postavki simetrične koncentracije sa obe strane membrane. Tako se može pretpostaviti da I-V krive koje seku x-osu u nuli odgovaraju kalijumskoj aktivnosti. Međutim, vrednosti koje se nalaze u blizini nule, mogu da se tumače na više načina : kao kalijumska aktivnost u slučaju disbalansa jonske koncentracije (na primer, usled isparavanja vode iz komorice za registraciju čime se vanćelijski ratvor blago koncentruje) ili kao aktivnost kanala koji je delimično selektivan, pa se tako potencijal reverzije njegove aktivnosti nalazi negde između izračunatih vrednosti za svaki jon, u zavisnosti od odnosa provodljivosti za svaki jon. Izmereno je nekoliko aktivnosti za koje nije moguće sa sigurnošću odrediti selektivnost, koje su razvrstane prema provodljivosti i prikazane u tabeli 6, zajedno sa već opisanim aktivnostima.

Tabela 6. Podela registrovanih aktivnosti u protoplastima dobijenim ćelijskom hirurģijom prema selektivnosi i provodljivosti.

grupa	selektivnost	provodljivost
I	Hlor-selektivan kanal	20 pS
II	Selektivan za više anjona/K kanali	13-26 pS
III	Kanal selektivan za kalijum	110 pS
IV	Selektivan za više anjona	48 pS
V	Kanal selektivan za glutamat	60 pS
VI	Kanal selektivan za hlor	10pS
VII	Kanal selektivan za hlor	37 pS
VIII	Anjonski kanal selektivniji za glutamat	10 pS
IX	(anjonski) kanal sa ulaznim ispravljanjem	6 i 22 pS
X	Kanal selektivan za kalcijum	6 pS

Jonske struje iz prethodno opisanih 10 grupa registrovane su sa vršnog i središnjeg regiona hife, a njihova raspodela prikazana je histogramom na slici 32. Protoplasti dobijeni sa vrhova lateralnih grana na kojima je uspostavljen kontakt svrstani su u grupu „vršni region“.

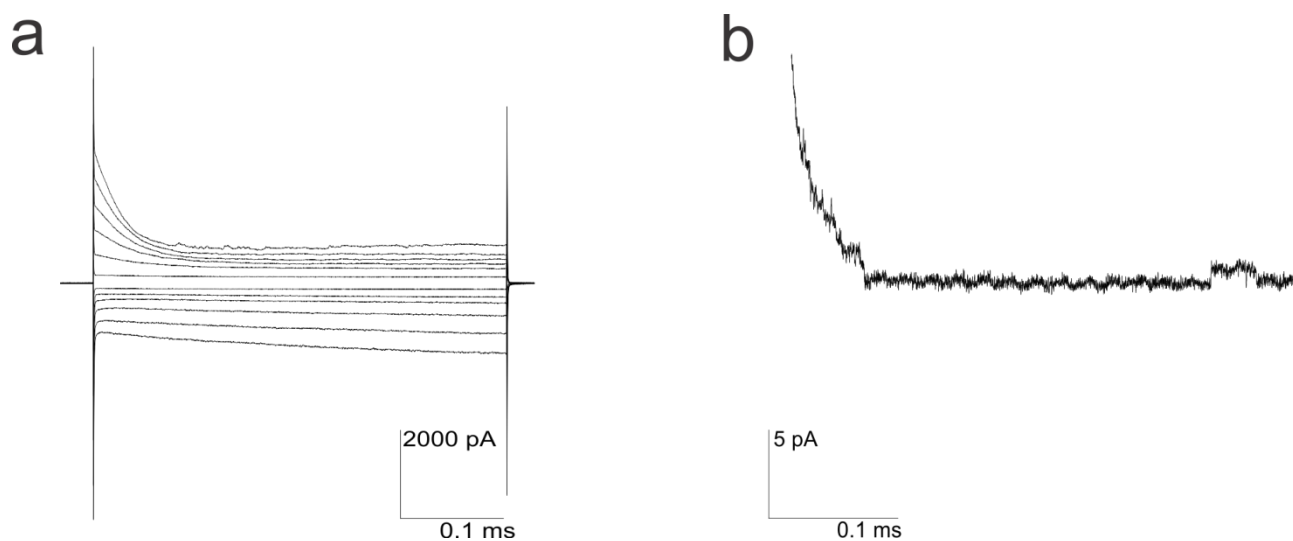


Slika 4.32. Raspodela pojedinih tipova struja prema mestu oslobadjanja protoplasta sa kojih su registrovane. Na x osi je označen ukupan broj merenja aktivnosti struja sa zasebnih delića membrane koji pripadaju svakoj od kategorija struja.

#### 4.14 IRIS je aktivna u citoplazmatskim kapima u uslovima snimanja protoplasta hifa

Struje membrane CK su registrovane u rastvorima primenjenim za ćelijsku hirurģiju (tablela br 2 u odeljku materijal i metode), kako bi se utvrdilo da li je odsustvo registracije IRIS u membrani protoplasta micelijuma potencijalno posledica uslova snimanja. IRIS je registrovana u svakoj snimljenoj CK (n= 7) (slika 4.33). Kako rastvori za ćelijsku hirurģiju sadrže 2 mM azid, čija je funkcija usporavanje metabolizma u cilju odlaganja formiranja

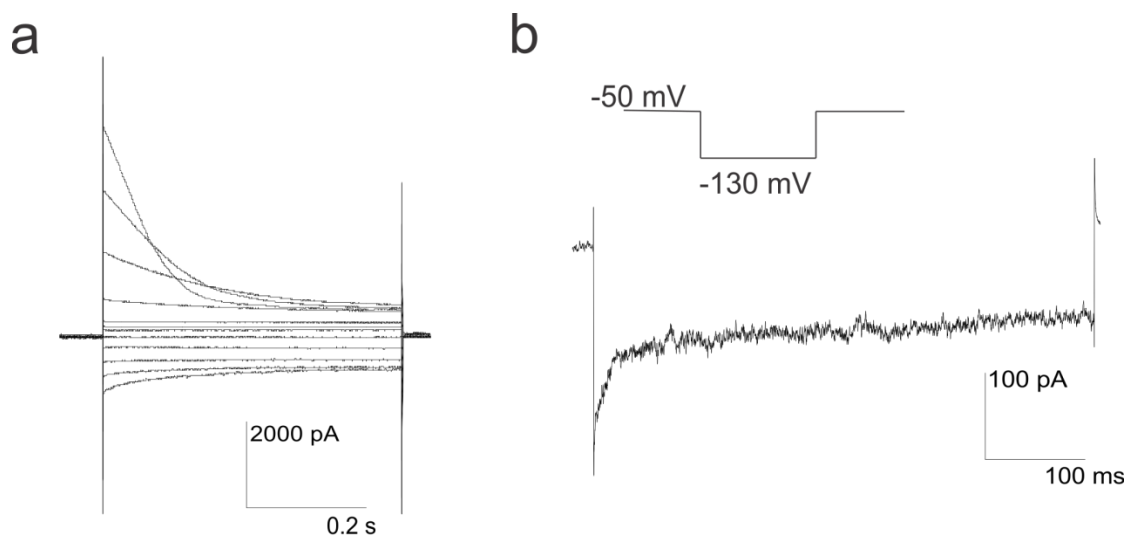
ćelijskog zida na plazmolizovanoj membrani unutar hife, registrovanu IRIS na CK odlikuje ubrzana inaktivacija, nezavisno od prisustva nitrata. IRIS je registrovana i u istrgnutoj konfiguraciji u ovim uslovima (slika 4.33b).



Slika 4.33. IRIS registrovana u jonskim uslovima korišćenim za snimanje protoplasta dobijenih mikrohirurgijom. Levo : strujni zapis u odgovoru na SVP u konfiguraciji „cela ćelija“; desno: strujni zapis SOI snimljen sa istrgnute membrane nakon aktivacije u konfiguraciji „cela ćelija“.

#### 4.15 Ulazna inaktivirajuća struja u membrani citoplazmatskih kapi

U standardnim rastvorima sa 1 mM kalcijumom na CK blago ulazno ispravljanje je registrovano izuzetno retko (7 % izabranih reprezentativnih zapisa, n=70), dok je u samo jednom zapisu registrovana inaktivacija ulazne struje koja je prikazana na slici 4.34a.



Slika 4.34. Registracija ulazno-isprvljene inaktivirajuće struje u membrani citoplazatskih kapi. a: ukupne struje snimljene sa membrane cele CK; b: struje registrovane u krupnom fragmentu istrgnute membrane u konfiguraciji „spolja spolja“.

U uslovima snimanja sa visokim vanćelijskim kalcijumom, sa membrane CK ovaj sličan obrazac ulaznog ispravljanja je detektovno u 2 od 7 zapisa u konfiguraciji „cela ćelija“, i u 3 od 6 zapisa sa istrgnute membrane u konfiguraciji spolja-spolja registrovana je inaktivacija ulazno-ispravljenе struje, prikazana na slici 4.34b. Iz trenutnih rezultata može se zaključiti da postoji mogućnost da se slična struja javlja u membrani spofangiogora i hifa, ali ne predstavlja dominantnu struju sporangiofora, i da je ili nošena kalcijumom, ili anjonima, pri čemu zahteva povišenu koncentraciju kalcijuma za aktivaciju.



## 5. Diskusija

Citoplazmatske kapi predstavljaju pogodan model ćelijske membrane sporangiofora za ispitivanje jonskih kanala. Prisustvo P-tipa protonske pumpe, koje je dokazano depolarizacijom membranskog potencijala po dodatku vanadata predstavlja dodatnu potvrdu ispravnosti modela elektrofiziološkim pristupom. Ovaj rezultat je bio očekivan kako je već ustanovljeno da frakcija (20 %) citoplazmatskih kapi nakon inkubacije u vanćelijskom rastvoru duže od sat vremena spontano formira ćelijski zid (Križak et al. 2015). Dodatna potvrda je bila potrebna zbog činjenice da vakuola zauzima veliku zapreminu zone rasta iz koje se CK formiraju (Ortega et al. 2021), a poznat je fenomen stvaranja vakuolarnih vezikula prilikom oslobađanja ćelijskog sadržaja koji je ustanovljen kod algi iz porodice Characeae (Berecki et al. 2001). U tom slučaju, fragmenti po oslobađanju obuhvataju i deo citoplazme pri spontanom zatvaranju u sfere čija je membrana „izvrnuta“. Stoga je postojala mogućnost da je samo frakcija CK koja je resintetisala ćelijski zid posedovala membranu poreklom od sporangiofora. Reakcija na vanadat kao i uniforman profil IRIS pri registraciji na CK velikog opsega veličina (15 - 50  $\mu\text{m}$ ) idu u prilog hipotezi da sve CK u preparatu imaju membranu istovetne strukture. Uz obuhvaćenost ćelijskom membranom, prisustvo aktivnih mitohondrija i nukleusa u CK opravdava njihovo korišćenje kao modela bliskog fiziološkim uslovima unutar sporangiofora.

Vrednosti membranskog potencijala CK izmerene u režimu nametanja struje TNVnDM, odstupaju od ranije pokazanih vrednosti izmerenih oštrim elektrodama koje su se kretale oko -100 mV u 5 snimanja (neobjavljeni podaci). Ukoliko su podaci snimanja oštrim elektrodama bili ispravni, otvara se mogućnost da je sam pristup merenju pipetom za TNVnDM invazivan za CK, te da na stres razaranja dela membrane reaguju depolarizacijom, međutim još uvek nije dovoljno ispitan uticaj mehaničkog stresa na membranski potencijal gljive. Još jedan mogući uzrok odstupanja vrednosti između dve tehnike merenja na CK je nužna dijaliza rastvorom u pipeti koja je zanemarljiva prilikom snimanja oštrim elektrodama. Ipak metod je pouzdan za praćenje potencijalnog efekta supstanci na potencijal membrane, jer se merena vrednost, bilo da predstavlja stvarni potencijal mirovanja ili novouspostavljenu vrednost, tokom eksperimenta održava dovoljno dugo. Skorija merenja membranskog potencijala na *Candida albicans* korišćenjem neinvazivnih fluorescentnih voltažno-zavisnih indikatora pokazala su da ova gljiva menja membranski potencijal pri različitim faktorima sredine, između ostalog i u zavisnosti od faze rasta, pri čemu je u eksponencijalnoj fazi protonska pumpa manje aktivna i membrana depolarisanija (Suchodolski and Krasowska 2019). Merenje membranskog potencijala CK primenom fluorescentnih indikatora i praćenje potencijalne promene pri ulasku u konfiguraciju cela ćelija bi bilo korisno za razrešavanje ove problematike.

Dominantna struja membrane CK, IRIS, je osmotski osetljiva struja čiji faktor aktivacije bez razlike u osmolarnosti još uvek nije utvrđen. Kako i u slučaju zapreminski regulisanog anjonskog kanala kičmenjaka još uvek postoji više hipoteza o tačnom mehanizmu aktivacije, jasno je da aktivacija kanala izazvana osmotskim promenama može biti izuzetno kompleksna. Naizgled najjednostavniji mehanizam aktivacije osmotski osetljivog kanala je prisustvo mehanoreceptora, međutim brojni faktori mogu uticati na prag osetljivosti mehanosenzora, ili više faktora uticati na aktivaciju (Strange, Yamada, and Denton 2019).

Za razliku od biljnih ćelija, čiji je celulozni ćelijski zid rigidan i vakuola preuzima glavnu ulogu u regulaciji promena osmolarnosti ćelijski zid gljiva i bakterija je zapravo elastičan i dinamičan (Casadevall and Gow 2022). Klasu Mucoromycetes, kojoj *P. blakesleeanus* pripada, odlikuje zid izgrađen pretežno od hitozana, koji je po hemijskoj strukturi još elastičniji od hitina (Yeul and Rayalu 2013), koji dominira u sastavu kod većine drugih grupa. Kako ćelije

gljiva rastu konstantnim izduživanjem, njihov zid prolazi kroz stalne reverzibilne i ireverzibilne procese istezanja, za koje je u slučaju *P. blakesleeanus* pokazano da predstavljaju rezultat rada različitih membranskih proteina (Ortega et al. 2015), koji su praćeni promenama aksijalnih i transcelularnih jonskih flukseva (Ruiz-Herrera et al. 2003). Stoga je bilo opravdano pretpostaviti da u hipoosmotskim uslovima, slično životinjama, u ćelijama gljiva dolazi i do istezanja ćelijske membrane. Prilikom testiranja efekata plazmolize i deplazmolize micelijuma bez sprečavanja resinteze ćelijskog zida, primećeno je da kada membrana oko plazmolizovane citoplazme regeneriše ćelijski zid i time onemogućuje vraćanje citoplazme u prvobitnu zapreminu u hifi, pri izlaganju hipoosmotskom rastvoru dolazi do bubrenja ograničenog odeljka (neobjavljeno opažanje). Takođe je pokazano da hipoosmotski uslovi dovode do blagog bubrenja CK (Križak et al. 2015). Promene pritiska kod gljiva su usko povezane sa rastom (Lew 2011), te je logično pretpostaviti da kanal registrovan iz membrane dobijene iz vršne zone sporangiofora ima ulogu u detekciji promena pritiska u procesu rasta.

Nije isključeno da IRIS reaguje na istezanje pri čemu osmotska razlika amplifikuje ovaj signal tako da se dozno-zavisno aktivira sve veći broj kanala, dok dodatni faktori među kojima mogu biti i ROS ili promena jonske jačine/povećanje unutarćelijskog kalcijuma modulišu osetljivost na istezanje, kao što se pretpostavlja u slučaju VRAC (Akita and Okada 2014). Zanimljivo je da VRAC u nekim studijama nije uspešno aktiviran istezanjem (Okada 1997), kao i da u mnogim tipovima kičmenjačkih ćelija porast amplitude VRAC, tj povećanje verovatnoće otvorenosti u slučaju merenja aktivnosti pojedinačnih kanala ne prati pravilno povećanje osmolarnosti. Jedno predloženo objašnjenje je da u istom tipu ćelije postoje različiti heteromeri LRRC8 subjedinicama sa različitim pragom aktivacije istezanjem, dok je druga hipoteza da ćelijska membrana ne „oseća“ razliku osmolarnosti jednako celom svojom površinom, usled prisustva brojnih invaginacija u okviru kojih kanali neće detektovati istezanje pre pojačanja stimulusa (Strange, Yamada, and Denton 2019).

Najneobičniji podatak koji je dobijen je registracija IRIS u membrani CK u uslovima snimanja nakon ćelijske hirurgije, sa vanćelijskim rastvorom koji je čak blago hiperosmotski u odnosu na pipetni. Amplitude IRIS registrovanih u rastvorima za ćelijsku hirurgiju su u opsegu amplituda dobijenih primenom standardne osmotske razlike, dok su gustine registrovane IRIS u standardnim rastvorima niže sa manjim stepenom osmotske razlike. Sve ovo sugerira da u aktivaciji IRIS učestvuju dodatni faktori koji su prisutni u uslovima snimanja nakon ćelijske hirurgije, koje tek treba ispitati. U ovim snimanjima, unutarćelijski rastvor je uvek sadržao 1mM kalcijuma, dok vanćelijski rastvor sadrži čak 30mM kalcijum-hlorida/kalcijum-nitrata, radi stabilizacije protoplazma, što ujedno čini da vanćelijski rastvor ima veću jonsku jačinu od unutarćelijskog. Uticaj razlike u jonskoj jačini je faktor koji bi trebalo bliže ispitati, pošto je pokazano da utiče i na smanjenje praga osetljivosti na stimulaciju kanala u osnovi VRAC (Friard et al. 2017). Bilo bi interesantno ispitati da li povećanje jonske jačine vanćelijskog rastvora jonom koji nije kalcijum ostvaruje isti efekat na aktivaciju IRIS. Dva poznata kanala kod gljiva su aktivirana povećanom koncentracijom unutarćelijskog kalcijuma – AnBEST i CIC (Roberts, Milnes, and Caddick 2011; Odden, Diatloff, and Roberts 2007a). U standardnim uslovima snimanja IRIS, pri hipoosmotskoj razlici i simetričnoj jonskoj jačini sa dve strane membrane, njena aktivacija ne zahteva prisustvo kalcijuma u pipetnom rastvoru, koji čak sadrži i helator EGTA. Ipak IRIS je aktivna trenutno po ulasku u konfiguraciju cela ćelija, dok je za dijalizu pipetnim rastvorom potrebno određeno vreme. U ćelijama životinja, mehaničko oštećenje membrane dovodi do porasta unutarćelijskog kalcijuma koji je ključan za mehanizme reparacije membrane, ali zahteva prodor vanćelijskog kalcijuma u ćeliju (Z. Li and Shaw 2023). Ipak treba napomenuti da su prva merenja IRIS rađena u uslovima simetričnih jonskih rastvora pri čemu je pipetni rastvor sadržao 1mM CaCl<sub>2</sub>, a IRIS se nije aktivirala bez osmotske razlike.

Kako dodavanje 2mM unutarćelijskog ATP-a nije dovelo do povećanja srednje gustine IRIS, a snimanje u uslovima redukovano ATP izazvanog preinkubacijom CK azidom nije dovelo do njenog smanjenja, može se zaključiti da ATP vrlo verovatno nema ulogu u aktivaciji IRIS. Prve hipoteze o zapreminski regulisanom kanalu kičmenjaka podazumevale su neophodnost prisustva ATP-a za aktivaciju VRAC, nakon čega je utvrđeno da pri osmotskoj razlici od preko 100 - 150 mOsm prisustvo ATP nije nužno (Volk et al. 1996)(Strange, Yamada, and Denton 2019). Sve opisane osobine IRIS u prisustvu unutarćelijskog ATP – odlaganje pada amplitude i vremenske konstante inaktivacije i povećanje udela stacionarne struje, ukazuju na njegov stabilizujući modulatorni efekat koji se ostvaruje nakon što je kanal otvoren. Efekat nehidrolizabilnog analoga ATP nedvosmisleno pokazuje da fosforilacija kinazama ne posreduje u modulatornom efektu ATP na IRIS. Među brojnim jonskim kanalima čija je aktivnost modulirana ATP-om je i TOK kanal gljiva, kod kojeg ATP takođe odlaže pad amplitude (Bertl et al. 1998).

Vremenski i voltažno-zavisan oporavak od inaktivacije IRIS u prisustvu ATP koji je prikazan u odeljku 6 ukazuje na jako preciznu regulaciju stabilnosti otvorenog stanja membranskim potencijalom. Može se zaključiti da je u prisustvu unutarćelijskog ATP inaktivacija IRIS koju stimuliše depolarizacija reverzibilan proces koji zahteva vraćanje membrane u opseg fizioloških vrednosti membranskog potencijala, dok se sa smanjenjem koncentracije ATP kanal vremenom destabilizuje, što dovodi do nepovratnog pada amplitude usled povećanog stepena inaktivacije.

Modulacija IRIS unutarćelijskim ATP-om odražava povezanost aktivnosti IRIS i metaboličkog statusa ćelije. Kako je IRIS blokirana vanćelijskim ATP-om, a smanjenje koncentracije unutarćelijskog ATP dovodi do intenziviranja njene inaktivacije, moguće je da je kanal u osnovi IRIS u izvesnoj meri propustan za ATP, kao u slučaju VRAC-a (Chu et al. 2023). U tom slučaju, njegova prolongirana aktivnost može dovesti do gubitka ATP-a iz ćelije, što uočene mehanizme čini vidom negativne povratne sprege. Činjenica da se IRIS gasi u energetski nepovoljnom stanju za ćeliju ukazuje na to da njegova fiziološka uloga nije u vezi sa preživljavanjem. Efekat vanćelijskog ATP je ispitan kao faktor prenosa signala mehaničkog stresa na končastoj gljivi iz roda *Trichoderma* (Medina-Castellanos et al. 2014). Primenjena koncentracija od 100-500  $\mu\text{M}$  izazvala je konidijaciju, tj pokretanje aseksualne reprodukcije koja je poznati mehanizam reakcije ove grupe končastih gljiva na mehanički stres. Dodatno, izazivanje mehaničkog stresa micelijuma u prisustvu apiraze sa vanćelijske strane redukovalo je pokretanje konidijacije u odnosu na kontrolne grupe. Receptorni molekuli za ATP i signalni putevi koje bi vanćelijski ATP mogao da pokrene još uvek su slabo ispitani kod gljiva, te je ideja da gljive i biljke signaliziraju mehanička oštećenja slično životinjama još uvek na nivou hipoteze (Hernández-Oñate and Herrera-Estrella 2015).

Efekat flavonoida na jonske kanale dugo je interpretiran kao dokaz učešća različitih kinaza u njihovoj aktivaciji / modulaciji. Tako je efekat nehidrolizabilnog analoga ATP pored efekta genisteina tumačen kao postojanje dvojne uloge ATP-a, koji ujedno ostvaruje dejstvo kao supstrat za kinaze i alosterički modulator (Bryan-Sisneros et al. 2000). Međutim, kako je u međuvremenu ustanovljen veliki broj proteina koji predstavljaju metu flavonoida, isključeno je da je njihov efekat specifično vezan za inhibiciju kinaza. Postoji mogućnost da flavonoidi ostvaruju alosteričko dejstvo na jonske kanale, kao što je pokazano u slučaju kardiovaskularnog voltažno-zavisnog kanala za kalcijum (Fusi et al. 2017; Medina et al. 1997). Promene IRIS koje su registrovane u prisustvu flavonoida potencijalno odražavaju efekat gubitka pozitivne modulacije ATP-om, jer dovode do slične dinamike pada amplitude i vremenske konstante inaktivacije. Ispitivanjima efekta flavonoida na VRAC pokazano da su  $EC_{50}$  za genistein i kvercetin jako niske : od oko 8.5  $\mu\text{M}$  za genistein i 7  $\mu\text{M}$  za kvercetin (Xue

et al. 2018a). Procenat bloka IRIS od 50-60 % sa primenom 100  $\mu\text{M}$  genisteina i kvercetina sugerise manje izrazen efekat u odnosu na VRAC. Ipak, treba imati u vidu da je efektivna unutarcelijska koncentracija koja deluje na IRIS možda i niza jer zavisi od nivoa prolaska flavonoida kroz celijsku membranu, na šta ukazuje efikasnost značajno manje koncentracije analoga kvercetina (10  $\mu\text{M}$ ), primenjenog sa unutarcelijske strane. Odsustvo promene u procentu bloka sa 5 puta povećanom dozom AMP PCP ukazuje na veći afinitet flavonoida za hipotetičko vezivno mesto preko kojeg bi ATP ostvario alosteričku modulaciju, za čak više od 2 reda veličine.

Još jedan potencijalni posredni efekat koji bi flavonoidi mogli da ostvaruju je uklanjanje reaktivnih kiseoničnih vrsta koje takođe mogu biti modulatori rada jonskih kanala. Još uvek nerazjašnjen mehanizam kojim se IRIS aktivira u izosmotskim uslovima bi mogao da uključuje i ROS, pri čemu bi ROS mogle da ostvaruju i modulatorni efekat na verovatnoću prelaska kanala iz zatvorenog u otvoreno stanje. Dva zapažanja potencijalno ukazuju na efekat flavonoida koji se ostvaruje i van konteksta poništavanja efekta ATP. Prvo, vrednost konstante inaktivacije koja se dostiže u prisustvu flavonoida je niza od vrednosti snimljene u odsustvu pipetnog ATP nakon više minuta dijalize pipetnim rastvorom. Drugo zapažanje se odnosi na tri slučaja registracije IRIS na novostimulisanoj CK nakon detekcije efekta genisteina u istom preparatu (pre ispiranja genisteina). Preinkubacija genisteinom, za razliku od preinkubacije azidom, smanjila je amplitudu IRIS uprkos jakoj stimulaciji osmotskom razlikom (ali nije bilo moguće izvesti gustine struje radi statističkog poređenja). Antioksidativno dejstvo flavonoida izolovanih iz biljaka ispitivano je na većem broju sisarskih ćelija (Kumar and Pandey 2013). Rezultati koji ukazuju na značajno antioksidativno dejstvo flavonoida izolovanih iz gljiva (Kozarski et al. 2015; S. Zhao et al. 2021) otvaraju pitanje njihove produkcije u funkciji regulacije oksidativnog stresa i jonskih kanala u končastim gljivama. Poznat efekat flavonoida u suzbijanju proliferacije (Levina et al. 2002) bi mogao da se poveže sa potencijalnom ulogom IRIS u rastu, čija bi aktivnost bila regulisana metaboličkim statusom ćelije i flavonoidima.

Provodljivost IRIS za nitrate koja se statistički ne razlikuje od provodljivosti za hlor na osnovu postojećih rezultata, predstavlja odstupanje od do sada konzistentnog poklapanja sekvence provodljivosti IRIS sa Eisenman 1 serijom, prema kojoj bi nitrati trebalo da budu provodljiviji (Ullrich et al. 2016a). Međutim, dramatično ubrzavanje inaktivacije u nitratima prati trend koji kod IRIS izaziva provodljiviji jon. Veći stepen inaktivacije IRIS nošene nitratima, potencijalno bi mogao da dovede do nepotpunog oporavka amplitude tokom 500 ms pauze između depolarišućih stepenika u standardnom voltažnom protokolu i time do potencijalnog artefakta izmerenih gustina, te je potrebno povećati uzorak podataka sa produženim vremenom oporavka i manjim brojem uzastopnih depolarišućih stimulusa. IRIS nije nošena fosfatima, ali bilo bi interesantno ispitati da li fosfati ujedno i blokiraju struju, što se može ispitati različitim kombinacijama odnosa fosfata i hlora.

Prvodoljivost IRIS od 14 pS na depolarišućim potencijalima je drastično manja od izlazne provodljivosti VRAC kanala (50-80 pS) i zapravo odgovara opsegu provodljivosti koju VRAC ima u ulaznom smeru (Osei-Owusu et al. 2018), dok su velike amplitde na depolarišućim potencijalima u konfiguraciji „cela ćelija“ rezultat aktivnosti jako velikog broja kanala u membrani CK. Promena provodljivosti pojedinačnih kanala sa depolarizacijom membrane međutim, nije tako česta pojava, kako je kod većine jonskih kanala povećanje amplitude snimljene sa cele membrane rezultat povećane verovatnoće otvorenog stanja sa promenom membranskog potencijala, te je interesantno da IRIS i VRAC potencijalno dele ovu osobinu. Ispitivanje verovatnoće otvorenog stanja stacionarne komponente IRIS sa membrane CK je teško izvodljivo jer CK poseduju različite aktivnosti većih provodljivositi koje dominiraju u zapisima odgovora na depolarišući stimulus, te se odustalo od identifikacije IRIS u kontinualnim zapisima (od više desetina merenja odgovora na pravougaoni stimulus u svega

6 je bilo moguće pouzdano izmeriti IRIS na više depolarišućih potencijala, bez kontaminirajućih aktivnosti). Verovatnoća otvorenog stanja za VRAC kanal, najuspešnije je izmerena „double patch“ tehnikom koja podrazumeva ulazak u konfiguraciju „cela ćelija“ jednom mikropipetom, čime se ćelija stimuliše i održava konstantan membanski potencijal, dok se drugom elektrodom registruju pojedinačne aktivnosti u konfiguraciji „na ćeliji“. VRAC se jako brzo gasi u istrgnutim membranama, te je u konfiguraciji „spolja spolja“ takođe ispitan samo u vidu odgovora na pravougaone stimuluse. Ne može se sa sigurnošću utvrditi koliko se dugo IRIS održava u istrgnutoj membrani, kako je samo održavanje stabilnog kontakta velikog fragmenta membrane u konfiguraciji „spolja spolja“ retko, međutim u 2 slučaja je primećeno gašenje posle 4-5 minuta uprkos prisustvu unutarćelijskog ATP.

Kada se sagledaju svi dosadašnji rezultati, može se zaključiti da IRIS vrlo verovatno nije strukturni homolog zapreminski regulisanog kanala kičmenjaka, već pre funkcionalni analog. Genom *P.blakesleeanus* je sekvenciran 2016. godine, dok se baza kodirajućih sekvenci kontinualno dopunjuje i trenutno broji 16528 gena (“Phycomyces Blakesleeanus NRRL 1555(-) - NCBI - NLM”). Do sada još uvek nema značajnog poklapanja kodirajućih sekvenci ove gljive sa LRRC8 proteinima. Ovo nije iznenađujuće jer VRAC kanal nije pronađen ni u carstvu životinja van grupe kičmenjaka. Blagi blok IRIS karbenoksolonom je zanimljiv jer je njegov pretpostavljeni mehanizam dejstva vanćelijski blok kanala slične strukture, ali ne nužno i homologne sekvence. Ukoliko se pretpostavi da je deo strukture VRAC kanala koji je sličan paneksinima odgovoran za osetljivost na CBX, otvara se pitanje strukturne sličnosti IRIS i paneksina.

Činjenica da IRIS nije registrovana u membrani protoplasta micelijuma, iako je neočekivano aktivna u membrani CK snimanoj u sličnim uslovima sugerše da je njena dominantna aktivnost specijalizovana za sam sporangiofor. Azid, koji je inicijalno primenjen radi usporavanja regeneracije ćelijskog zida pri mikrohirurgiji, utiče na IRIS samo kroz ubrzavanje depolarizacijom-indukovane inaktivacije, u svim varijacijama jonskih sastava primenjivanih u uslovima snimanja protoplasta micelijuma. Deo zapisa ukupnih struja protoplasta sniman je i sa protoplasta dobijenih sa vršnog regiona hife, gde je bilo očekivano da se nađu kanali sa potencialnim učešćem u rastu. Ovo sugerše da zonu rasta hife i sporangiofora odlikuju drugačiji mehanizmi koji uključuju rad jonskih kanala.

Dominantna ulazna struja registrovana u svim eksperimentima u konfiguraciji „cela ćelija“ na protoplastima micelijuma, pokazuje strujno-voltažne osobine potencijalno slične AnBest homologu izolovanom u *A. nidulans*, čiji je homolog pronađen i u genomu iz gljive blisko srodne *P.blakesleeanus* (Roberts, Milnes, and Caddick 2011). U prilog ovoj ideji ide i činjenica da je u svim eksperimentima u kojima je registrovana struja sa protoplasta micelijuma u pipetnom rastvoru sadržan i minimalno 1 mM kalcijum, što je u opsegu koncentracija koje značajno stimulišu aktivaciju ovog kanala. Prisustvo sličnog profila jonske struje, sa manjom učestalošću u membrani CK može se objasniti odsustvom kalcijuma u pipetnom rastvoru. Još uvek nije isključeno da je ulazna struja registrovana na protoplastu hife ipak nošena kalcijumom, čemu ide u prilog postojanje velikog kalcijumskog gradijenta u uslovima snimanja koji bi favorizovao ulazak  $Ca^{2+}$ , ali se može pretpostaviti da je malo verovatno da se dominantna struja cele membrane protoplasta izuzetno retko detektuje u istrgnutoj konfiguraciji (svega 1 zapis je posedovao aktivnosti koje odgovaraju struji kalcijuma). Ipak ne sme se zanemariti mogućnost jako brzog gašenja struje u istrgnutim konformacijama, a protokol u vidu pravougaonog hiperpolarišućeg stimulusa kojim je ulazna inaktivirajuća struja registrovana u membrani CK, nažalost nije primenjen na protoplastima micelijuma.

Činjenica da u protoplastima dobijenim iz vršnog regiona hifa nisu identifikovane kalcijumske struje je interesantna, kako brojne studije vezuju kalcijumske transmembranske flukseve za

vršni rast hifa (Lew 2011). Ipak, u slučaju *N. crassa*, za struje identifikovane u protoplastima nakon laserske ablacije u vršnom regionu pretpostavljeno je da provode anjone (kanal provodljivosti 17 pS) i kalijum (kanal provodljivosti 9 pS) (Véry and Davies 1998). U *N. crassa* je utvrđeno da uklanjanje unutarćelijskog kalcijuma nepovoljno utiče na vršni rast, ali su pronađeni kalcijumski kanali locirani u endomembranama za koje se pretpostavlja su odgovorni za povećanje koncentracije kalcijuma u citosolu prilikom rasta (Silverman-Gavrila and Lew 2002). U protoplastima *P. blakesleeanus* dobijenim ćelijskom hirurģijom registrovan je hlor-selektivni kanal od 17-20 pS, ali u svim regionima sem u vršnom.

Prisustvo nekoliko tipova aktivnosti registrovanih na protoplastima micelijuma čiji potencijal reverzije ukazuje na provodljivost za više jonskih vrsta, nije nimalo neobičan podatak, kako i samu IRIS odlikuje kompleksna sekvenca provodljivosti za anjone. Još jedan, ranije opisan anjonski kanal u membrani CK – ORAC (Zivić et al. 2009), odlikuje izlazno ispravljanje, provodljivost od oko 10 pS i jaka selektivnost za anjone naspram katjona, ali slaba selektivnost između anjona. U membrani protoplasta micelijuma u dva slučaja registrovane su aktivnosti čija je provodljivost procenjena na 10 i 13 pS. U slučaju provodljivosti od 10 pS, kanal je registrovan u prisustvu TEA-Cl, što ukazuje da je struja nošena anjonima. Amplitude imaju linearan strujno-naponski odnos, a količina podataka je zasada nedovoljna za utvrđivanje verovatnoće otvorenog stanja kako bi se ustanovilo da li je u pitanju ORAC. Aktivnost još jedne jonske struje registrovane u membrani protoplasta *P. blakesleeanus*, relativno nalikuje na već okarakterisanu u literaturi – jonska struja koja ne pokazuje selektivnost za jedan jon, provodljivosti od 48 pS – što je relativno blizu izmerenoj provodljivosti od 43 pS anjonske delimično selektivne jonske struje u *A. niger*, registrovane laserskom ablacijom. Međutim struja u *A. Niger* je snimana u drugačijim jonskim uslovima te bi bilo zanimljivo dalje ih varirati pri snimanju protoplasta *P. blakesleeanus*.

Kako je karakterizacija jonskih struja sa protoplasta hifa tek u prvim fazama, otvara se mnogo mogućnosti za njihovu dalju identifikaciju. Dodatne eksperimentalne manipulacije u vidu redukcije broja provodećih jona u rastvorima, primene helatora kalcijuma i blokatora katjonskih i anjonskih kanala će razjasniti brojne nedoumice u tumačenju dobijenih podataka.

Otkrivanje u genomu gljiva sekvenci homolognih poznatim genima koji kodiraju jonske kanale životinja i biljaka je dobar princip koji omogućava izolaciju i manipulaciju ekspresije jonskih kanala čime se lakše utvrđuje njihova fiziološka uloga u samoj gljivi. Uz to, elektrofiziološka karakterizacija se može vršiti u heterolognim sistemima koji su tehnički manje zahtevni za prikupljanje podataka i daju mogućnost redukcije primesa kontaminirajućih jonskih struja, koje nije moguće u nativnoj membrani. Sa druge strane, otkrivanje potpuno novih jonskih kanala, specifičnih samo za gljive ili određenu grupu gljiva, nemoguće je bez direktnog merenja struja nativne membrane. Do sada, ni jedna jonska struja slična VRAC-u nije pokazana ni kod jedne grupe gljiva, te je karakterizacija IRIS bila moguća samo na CK kao model sistemu. Takođe, brojne studije ukazuju na razlike u posttranskripcionoj obradi proteina između udaljenih grupa organizama, pa je tako poznato da proteini homologne kodirajuće sekvence mogu jako da se razlikuju u sastavu introna (Frey and Pucker 2020), kao i da se između evoluitivno udaljenih grupa razlikuje spektar regularnih RNK molekula koji učestvuju u brojnim procesima obrade transkripta kao što je alternativno splajsovanje, koje je široko zastupljeno među gljivama (Fang et al. 2020). Jedan od drastičnih primera za fenomen varijacije osobina kanala u živom svetu, je efekat alternativnog splajsovanja na selektivnost voltažno-zavisnog kanala za kalcijum-natrijum u mekušcu *Lymnaea stagnalis* (Hsu and Ben-Johny 2023).

Ograničenje ekstrapolacije rezultata dobijenih merenjem CK na prirodne uslove u sporangioforu je činjenica da su sporangiofori vazdušne hife, u tesnoj vezi sa ćelijskim zidom,

dok se citoplazmatske kapi formiraju u vodenom rastvoru, oslobođene turgorovog pritiska. Snimanje jonskih struja direktno sa membrane protoplasta hifa dobijenih mikrohirurgijom daje fiziološki kontekst bliži samoj hifi nego što je to slučaj sa CK-sporangiofor paralelom. Na kraju, *P.blakesleeanus* može biti predstavnik razdela Mucoromycota ali ne i svih končastih gljiva, kada se uzme u obzir raznolikost fiziologije i evolutivna udaljenost između grupa. Dalje unapređenje postupka dobijanja protoplasta mikrohirurgijom, ili efikasna enzimaska razgradnja ćelijskog zida predstavljaju način da se jonske struje u prirodnom okruženju ispituju na velikom broju vrsta končastih gljiva.

Kako je prikazano, sam metod mikrohirurškog dobijanja protoplasta još uvek zaostaje u efikasnosti dobijanja podataka koje omogućava snimanje na CK, pa je zaključak da je u slučaju *P. blakesleeanus* model membrane sporangiofora još uvek efikasniji za ispitivanje jonskih kanala. Ipak, uspešnost ostvarivanja gigaomskog kontakta od 28 % na protoplastima hifa *P. blakesleeanus* je veća od ranije objavljene u slučaju ablacije UV laserom na *A. niger* (Roberts et al. 1997), koja je iznosila svega 10 %, što je verovatno bio razlog odsustva dalje primene tog pristupa. Dalja optimizacija laserske hirurgije za dobijanje protoplasta pogodnih za registraciju jonskih struja je neophodna. Prednost primene femtosekundnih lasera u odnosu na klasične laserske sisteme koji su primenjeni u nekoliko studija od strane različitih grupa, leži u nekoliko činjenica: primena fs lasera u omogućava dvofotonsku apsorpciju samo u uskoj fokalnoj zapremini laserskog snopa (omogućenoj i primenom objektiva visoke numeričke aperture), što omogućava visoku prostornu preciznost prilikom stvaranja reza, koji je „čist“, kako je pokazano elektronskom mikroskopijom (rezultat u procesu objave). Druga, još bitnija posledica je potpuno odsustvo ozračavanja ostatka preparata visokom snagom u UV spektru koji izaziva visok nivo stresa, prvenstveno oštećujući nukleinske kiseline stvaranjem dimera timina. Primena fluorescentne boje koja vezuje ćelijski zid i pospešuje apsorpciju je dodatno smanjila snagu neophodnu kako za hirurgiju tako i za oslikavanje preparata, koje se vrši brzim skeniranjem. Zasada najveće ograničenje primene laserske hirurgije, kao i bilo kog načina oslobađanja protoplasta končastih gljiva je veličina protoplasta koji je moguće dobiti iz hife. *P. blakesleeanus* je cenocitična – neseptirana gljiva, prečnika hife od 10-20  $\mu\text{m}$ , što je svrstava u vrste sa krupnim hifama. Uobičajeni dijometri hifa končastih gljiva su 7-10  $\mu\text{m}$ , a kreću se u opsegu 1-30  $\mu\text{m}$  (Islam et al. 2017). Dodatnu poteškoću predstavlja činjenica da gljive iz grupa askomiceta i bazidiomiceta formiraju septe duž hifa koje se često granaju na sve tanje ogranke, što ograničava zapreminu koja bi mogla da formira oslobođeni protoplast.

Saznanja do kojih dovodi optimizacija registracije jonskih struja na nativnim membranama gljiva su od izuzetnog, u prvoj liniji fundamentalnog značaja za shvatanje kompleksne fiziologije končastih gljiva. Tek uz značajnu akumulaciju mehanističkog uvida u njihovo funkcionisanje, mogu se razviti preko potrebna primenjena istraživanja u cilju suzbijanja patogenih vrsta, efikasnije eksploatacije komercijalno značajnih vrsta i primene gljiva u zaštiti životne sredine. Optimalni pristup budućim studijama jonskih kanala gljiva je zapravo kombinacija registracije struja na nativnim membranama gljiva na kojima je to moguće i paralelnog traganja za kodirajućim genima i njihovim homolozima u okviru fascinantno raznolikog carstva gljiva.

## 6. Zaključci

Citoplazmatske kapi su metabolički aktivne strukture, čija membrana kojom su obuhvaćene odgovara ćelijskoj membrani sporangiofora.

ATP moduliše IRIS sledećim mehanizmima:

ATP ostvaruje efekat na brzinu inaktivacije IRIS, stabilišući otvoreno stanje u odnosu na inaktivirano.

Mehanizam delovanja ATP-a ne zahteva njegovu hidrolizu i verovatno ne deluje na deo kanala koji određuje strujno-voltažnu zavisnost. Rezultati sugerišu mogućnost postojanja ATP-vezivnog mesta na samom kanalu ili hipotetičkom elementu pridruženom kanalu.

ATP ne igra ulogu u aktivaciji IRIS, jer smanjen nivo ATP-a u CK ne dovodi do pada amplitude IRIS, već samo do ubrzavanja inaktivacije,

Depolarizacijom-izazvana inaktivacija u prisustvu unutarćelijskog ATP je reverzibilna, pri čemu je oporavak voltažno i vremenski zavisna, a brzina oporavka raste sa povećanjem hiperpolarizacije tokom oporavka. Ubrzavanje inaktivacije prati pad amplitude IRIS.

Svi poznati blokatori zapreminski-regulisanog kanala kičmenjaka koji su ispitani ostvarili su efekat na IRIS:

Flavonoidi ostvaruju inhibitorno dejstvo na kanal u osnovi IRIS. Utvrđeno je da se dejstvo ostvaruje sa citoplazmatske strane, najverovatnije antagonizujući stabilišući efekat ATP-a. U slučaju postojanja kompeticije za vezivno mesto, flavonoidi imaju značajno veći afinitet vezivanja od ATP.

IRIS je blokirana vanćelijskim ATP. Dinamika dozne zavisnosti ukazuje da ne dolazi do kooperativnog vezivanja molekula ATP.

IRIS je osetljiva na karbenoksolon, što ukazuje na potencijalno postojanje domena koji je u određenom nivou strukturne organizacije sličan domenima paneksina ili VRAC kanala, uprkos odsustvu homologije primarne strukture.

IRIS je osmotski-osetljiva struja koja se može aktivirati i u odsustvu osmotske razlike, još uvek nerazjašnjenim mehanizmom.

IRIS provodi nitratne ali ne i fosfatne jone. Provodljivost za nitrate se ne razlikuje od provodljivosti za hlor, dok je inaktivacija na depolarišućim potencijalima značajno ubrzana.

IRIS je moguće registrovati u istrgnutoj membrani u vidu stepeničastog obrasca inaktivacije (SOI).

SOI predstavlja aktivnost kanala u osnovi IRIS, na šta ukazuje blok vanćelijskim ATP-om i oporavak od inaktivacije koji je vremenski i voltažno-zavisan.

Kanali u osnovi IRIS zastupljeni su u velikom broju u membrani CK, dok je konduktivnost kanala relativno mala i na potencijalima od 50 – 90 mV iznosi oko 14 pS. Strujno-naponski dijagram amplitude pojedinačnih kanala sugeriše postojanje ispravljanja na nivou pore.



Protoplasti dobijeni mikrohirurgijom hifa micelijuma *P. blakesleeanus* predstavljaju model sistem pogodan za registraciju jonskih struja native membrane hife.

Trenutni nivo optimizacije dobijanja protoplasta omogućava uspešnost registracije jonskih struja manju od uspešnosti koja se ostvaruje na CK, čineći citoplazmatske kapi još uvek najoptimalnijim model sistemom za registraciju jonskih struja direktno sa ćelijske membrane gljive.

Ukupne struje snimljene sa protoplasta hifa dobijenih ćelijskom hirurgijom se razlikuju od dominantnih struja sa citoplazmatskih kapi dobijenih iz sporangiofora.

Dominantna struja u uslovima snimanja u protoplastima hifa nakon ćelijske hirurgije je ulazno-ispravljena inaktivirajuća struja, koja je nošena anjonima ili kalcijumom. Slična struja je prisutna u membrani CK u uslovima povećane koncentracije kalcijuma.

Struje pojedinačnih kanala sa protoplasta dobijenih ćelijskom hirurgijom su dominantno anjonske. Među njima je najčešće registrovana struja kroz hlor-selektivan kanal provodljivosti oko 20 pS, koja je bila prisutna u svim regionima hife izuzev vršnom.

IRIS je aktivna u membrani CK snimanim u rastvorima korišćenim za registraciju struja protoplasta nakon mikrohirurgije, dok pri istim uslovima odsustvuje u membrani protoplasta micelijuma. Zaključeno je da je u svim primenjenim uslovima snimanja IRIS struja specifična za membranu sporangiofora kod *P. blakesleeanus*.

# Literatura

- Abascal, Federico, and Rafael Zardoya. 2012. "LRRC8 Proteins Share a Common Ancestor with Pannexins, and May Form Hexameric Channels Involved in Cell-Cell Communication." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 34 (7): 551–60. <https://doi.org/10.1002/bies.201100173>.
- Adamatzky, Andrew, Jordi Valverde, Antoni Gandia, Alessandro Chiolerio, Oscar Castro, and Gordana Dodig-Crnkovic. 2022. "Fungal States of Minds." *BioRxiv*, 2022.04.03.486900. <http://biorxiv.org/content/early/2022/04/03/2022.04.03.486900.abstract>.
- Akita, T, and Y Okada. 2014. "Characteristics and Roles of the Volume-Sensitive Outwardly Rectifying (VSOR) Anion Channel in the Central Nervous System." *Neuroscience* 275 (September): 211–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.015>.
- Anderson, Peter A.V., and Robert M. Greenberg. 2001. "Phylogeny of Ion Channels: Clues to Structure and Function." *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 129 (1): 17–28. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00376-1](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00376-1).
- Arroyo, Javier, Vladimír Farkaš, Ana Belén Sanz, and Enrico Cabib. 2016. "Strengthening the Fungal Cell Wall through Chitin–Glucan Cross-Links: Effects on Morphogenesis and Cell Integrity." *Cellular Microbiology* 18 (9): 1239–50. <https://doi.org/10.1111/cmi.12615>.
- Aziz, Nafe, Rishikesh Pandey, Ishan Barman, and Ram Prasad. 2016. "Leveraging the Attributes of *Mucor Hiemalis*-Derived Silver Nanoparticles for a Synergistic Broad-Spectrum Antimicrobial Platform." *Frontiers in Microbiology* 7 (DEC): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01984>.
- Bakall, Benjamin, Precious McLaughlin, J Brett Stanton, Youwen Zhang, H Criss Hartzell, Lihua Y Marmorstein, and Alan D Marmorstein. 2008. "Bestrophin-2 Is Involved in the Generation of Intraocular Pressure." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (4): 1563–70. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1338>.
- Baker, Andrew, Frederick D Northrop, Hendrik Miedema, Gary R Devine, and Julia M Davies. 2002. "The Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Niflumic Acid Inhibits *Candida Albicans* Growth." *Mycopathologia* 153 (1): 25–28. <https://doi.org/10.1023/a:1015248027394>.
- Bakker, Roel, Jan Dobbelmann, and George W.F.H. Borst-Pauwels. 1986. "Membrane Potential in the Yeast *Endomyces Magnusii* Measured by Microelectrodes and TPP+ Distribution." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 861 (C): 205–9. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90421-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90421-9).
- Baumgartner, W., L. Islas, and F. J. Sigworth. 1999. "Two-Microelectrode Voltage Clamp of *Xenopus* Oocytes: Voltage Errors and Compensation for Local Current Flow." *Biophysical Journal* 77 (4): 1980–91. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77039-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77039-6).
- Berecki, Géza, Marco Eijken, Frank Van Iren, and Bert Van Duijn. 2001. "Membrane Orientation of Droplets Prepared from *Chara Corallina* Internodal Cells." *Protoplasma* 218 (1–2): 76–82. <https://doi.org/10.1007/BF01288363>.

- Bertelli, Sara, Paolo Zuccolini, Paola Gavazzo, and Michael Pusch. 2022. "Molecular Determinants Underlying Volume-Regulated Anion Channel Subunit-Dependent Oxidation Sensitivity." *The Journal of Physiology* 600 (17): 3965–82. <https://doi.org/10.1113/JP283321>.
- Bertl, A., H. Bihler, J. D. Reid, C. Kettner, and C. L. Slayman. 1998. "Physiological Characterization of the Yeast Plasma Membrane Outward Rectifying K<sup>+</sup> Channel, DUK1 (TOK1), in Situ." *The Journal of Membrane Biology* 162 (1): 67–80. <https://doi.org/10.1007/S002329900343>.
- Beyer, Eric C, and Viviana M Berthoud. 2018. "Gap Junction Gene and Protein Families: Connexins, Innexins, and Pannexins." *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes* 1860 (1): 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.016>.
- Bhunjun, Chitrabhanu S., Tuula Niskanen, Nakarin Suwannarach, Nopparat Wannathes, Yi Jyun Chen, Eric H.C. McKenzie, Sajeewa S.N. Maharachchikumbura, et al. 2022. "The Numbers of Fungi: Are the Most Speciose Genera Truly Diverse?" *Fungal Diversity* 2022 114:1 114 (1): 387–462. <https://doi.org/10.1007/S13225-022-00501-4>.
- Blackiston, Douglas J, Kelly A McLaughlin, and Michael Levin. 2009. "Bioelectric Controls of Cell Proliferation: Ion Channels, Membrane Voltage and the Cell Cycle." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (21): 3527–36. <https://doi.org/10.4161/cc.8.21.9888>.
- Booth, Ian R., Michelle D. Edwards, and Samantha Miller. 2003. "Bacterial Ion Channels." *Biochemistry* 42 (34): 10045–53. [https://doi.org/10.1021/BI034953W/ASSET/BI034953W.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/BI034953W/ASSET/BI034953W.FP.PNG_V03).
- Braun, E L, A L Halpern, M A Nelson, and D O Natvig. 2000. "Large-Scale Comparison of Fungal Sequence Information: Mechanisms of Innovation in Neurospora Crassa and Gene Loss in Saccharomyces Cerevisiae." *Genome Research* 10 (4): 416–30. <https://doi.org/10.1101/gr.10.4.416>.
- Brown, Neil Andrew, Sanne Schrevens, Patrick Van Dijck, and Gustavo Henrique Goldman. 2018. "Fungal G-Protein-Coupled Receptors: Mediators of Pathogenesis and Targets for Disease Control." *Nature Microbiology* 2018 3:4 3 (4): 402–14. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0127-5>.
- Bryan-Sisneros, A., V. Sabanov, S. M. Thoroed, and P. Doroshenko. 2000. "Dual Role of ATP in Supporting Volume-Regulated Chloride Channels in Mouse Fibroblasts." *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes* 1468 (1–2): 63–72. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00243-1).
- Bueno, D. J., and J. O. Silva. 2014. "FUNGI | The Fungal Hypha." *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, January, 11–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00132-4>.
- Carton, Iris, Dominique Trouet, Diane Hermans, Holger Barth, Klaus Aktories, Guy Droogmans, Nanna K Jorgensen, Else K Hoffmann, Bernd Nilius, and Jan Eggermont. 2002. "RhoA Exerts a Permissive Effect on Volume-Regulated Anion Channels in Vascular Endothelial Cells." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 283 (1): C115–25. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00038.2001>.
- Carvalho, Ana Karine F., Leyvison Rafael V. da Conceição, João Paulo V. Silva, Victor H. Perez, and Heizir F. de Castro. 2017. "Biodiesel Production from Mucor Circinelloides Using

Ethanol and Heteropolyacid in One and Two-Step Transesterification." *Fuel* 202 (August): 503–11. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2017.04.063>.

Casadevall, Arturo, and Neil A R Gow. 2022. "Ending the (Cell) Wall Metaphor in Microbiology." *Cell Surface (Amsterdam, Netherlands)* 8 (December): 100087. <https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2022.100087>.

Catterall, W A. 1988. "Structure and Function of Voltage-Sensitive Ion Channels." *Science (New York, N.Y.)* 242 (4875): 50–61. <https://doi.org/10.1126/science.2459775>.

Cerdá-Olmedo, Enrique. 2001. "Phycomyces and the Biology of Light and Color." *FEMS Microbiology Reviews* 25 (5): 503–12. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00588.x>.

Chu, Jiachen, Junhua Yang, Yuan Zhou, Jianan Chen, Kevin Hong Chen, Chi Zhang, Henry Yi Cheng, et al. 2023. "ATP-Releasing SWELL1 Channel in Spinal Microglia Contributes to Neuropathic Pain." *Science Advances* 9 (13): eade9931. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADE9931>.

Connors, Barry W. 2012. "Tales of a Dirty Drug: Carbenoxolone, Gap Junctions, and Seizures." *Epilepsy Currents* 12 (2): 66–68. <https://doi.org/10.5698/1535-7511-12.2.66>.

Corratgé, Claire, Sabine Zimmermann, Raphaël Lambilliotte, Claude Plassard, Roland Marmeisse, Jean-Baptiste Thibaud, Benoît Lacombe, and Hervé Sentenac. 2007. "Molecular and Functional Characterization of a Na(+)-K(+) Transporter from the Trk Family in the Ectomycorrhizal Fungus Hebeloma Cylindrosporum." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (36): 26057–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611613200>.

Davis, Dana A. 2009. "How Human Pathogenic Fungi Sense and Adapt to PH: The Link to Virulence." *Current Opinion in Microbiology* 12 (4): 365–70. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.006>.

Degenkolb, Thomas, Hans von Döhren, Kristian Fog Nielsen, Gary J. Samuels, and Hans Brückner. 2008. "Recent Advances and Future Prospects in Peptaibiotics, Hydrophobin, and Mycotoxin Research, and Their Importance for Chemotaxonomy of Trichoderma and Hypocrea." *Chemistry & Biodiversity* 5 (5): 671–80. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200890064>.

Dehshibi, Mohammad Mahdi, and Andrew Adamatzky. 2021. "Electrical Activity of Fungi: Spikes Detection and Complexity Analysis." *Bio Systems* 203 (May): 104373. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2021.104373>.

Dionysopoulou, Mariangela, Nana Yan, Bolin Wang, Christos Pliotas, and George Diallinas. 2022. "Genetic and Cellular Characterization of MscS-like Putative Channels in the Filamentous Fungus Aspergillus Nidulans." *Channels (Austin, Tex.)* 16 (1): 148–58. <https://doi.org/10.1080/19336950.2022.2098661>.

Duran, Rocio, Jeffrey W. Cary, and Ana M. Calvo. 2010. "Role of the Osmotic Stress Regulatory Pathway in Morphogenesis and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi." *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins2040367>.

Fang, Shumei, Xue Hou, Kaihua Qiu, Rui He, Xiaoshuo Feng, and Xilong Liang. 2020. "The Occurrence and Function of Alternative Splicing in Fungi." *Fungal Biology Reviews* 34 (4): 178–88. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2020.10.001>.

- Figuroa, Eric E., and Jerod S. Denton. 2022. "A SWELL Time to Develop the Molecular Pharmacology of the Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)." *Channels* 16 (1): 27–36. <https://doi.org/10.1080/19336950.2022.2033511>.
- Fisher, Matthew C., Ana Alastruey-Izquierdo, Judith Berman, Tihana Bicanic, Elaine M. Bignell, Paul Bowyer, Michael Bromley, et al. 2022. "Tackling the Emerging Threat of Antifungal Resistance to Human Health." *Nature Reviews Microbiology* 20 (9): 557–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>.
- Forzisi, Elena, and Federico Sesti. 2022. "Non-Conducting Functions of Ion Channels: The Case of Integrin-Ion Channel Complexes." <https://doi.org/10.1080/19336950.2022.2108565> 16 (1): 185–97. <https://doi.org/10.1080/19336950.2022.2108565>.
- Fraaije, Bart, Sarah Atkins, Steve Hanley, Andy Macdonald, and John Lucas. 2020. "The Multi-Fungicide Resistance Status of *Aspergillus Fumigatus* Populations in Arable Soils and the Wider European Environment." *Frontiers in Microbiology* 11 (December): 599233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.599233/BIBTEX>.
- Frey, Katharina, and Boas Pucker. 2020. "Animal, Fungi, and Plant Genome Sequences Harbor Different Non-Canonical Splice Sites." *Cells* 9 (2). <https://doi.org/10.3390/cells9020458>.
- Friard, Jonas, Michel Tauc, Marc Cougnon, Vincent Compan, Christophe Duranton, and Isabelle Rubera. 2017. "Comparative Effects of Chloride Channel Inhibitors on LRRC8/VRAC-Mediated Chloride Conductance." *Frontiers in Pharmacology* 8 (MAY): 328. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00328>.
- Fricker, Mark D., Luke L. M. Heaton, Nick S. Jones, and Lynne Boddy. 2017. "The Mycelium as a Network." *Microbiology Spectrum* 5 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0033-2017>.
- Fromm, J, M Hajirezaei, and I Wilke. 1995. "The Biochemical Response of Electrical Signaling in the Reproductive System of Hibiscus Plants." *Plant Physiology* 109 (2): 375–84. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.375>.
- Fromm, Jörg, and Silke Lautner. 2007. "Electrical Signals and Their Physiological Significance in Plants." *Plant, Cell and Environment* 30 (3): 249–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01614.x>.
- Fukui, J., K. S. Choi, A. Miyazaki, T. Ootaki, and T. Oikawa. 2001. "Analysis of the Formation of Protoplasts and Regeneration of Cells in *Phycomyces Blakesleeana*." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2001. <https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?spage=72&volume=11&number=1>.
- Fusi, Fabio, Ottavia Spiga, Alfonso Trezza, Giampietro Sgaragli, and Simona Saponara. 2017. "The Surge of Flavonoids as Novel, Fine Regulators of Cardiovascular Cav Channels." *European Journal of Pharmacology* 796 (February): 158–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.12.033>.
- Galland, P. 2014. "The Sporangiochore of *Phycomyces Blakesleeana*: A Tool to Investigate Fungal Gravireception and Graviresponses." *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 16 Suppl 1 (SUPPL.1): 58–68. <https://doi.org/10.1111/PLB.12108>.
- Gamet-Payraastre, Laurence, Stéphane Manenti, Marie Pierre Gratacap, Jacques Tulliez, Hugues Chap, and Bernard Payraastre. 1999. "Flavonoids and the Inhibition of PKC and PI 3-Kinase." *General Pharmacology* 32 (3): 279–86. <https://doi.org/10.1016/S0306->

3623(98)00220-1.

- Gao, Min, and Guang-Yan Tang. n.d. "Structural Basis for Great Protein-Binding Potential of Flavonoids: A Case Study of Quercetin."
- Garrill, A., R. R. Lew, and B. Heath. 1992. "Stretch-Activated Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in the Hyphal Tip Plasma Membrane of the Oomycete *Saprolegnia Ferax*." *Journal of Cell Science* 101 (3): 721–30. <https://doi.org/10.1242/JCS.101.3.721>.
- Gordon, J A. 1991. "Use of Vanadate as Protein-Phosphotyrosine Phosphatase Inhibitor." *Methods in Enzymology* 201: 477–82. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)01043-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)01043-2).
- Hanke, G T, F D Northrop, G R Devine, J H Bothwell, and J M Davies. 2001. "Chloride Channel Antagonists Perturb Growth and Morphology of *Neurospora Crassa*." *FEMS Microbiology Letters* 201 (2): 243–47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10763.x>.
- Henriksen, G H, A R Taylor, C Brownlee, and S M Assmann. 1996. "Laser Microsurgery of Higher Plant Cell Walls Permits Patch-Clamp Access." *Plant Physiology* 110 (4): 1063–68. <https://doi.org/10.1104/pp.110.4.1063>.
- Henriksen, Gordon H., Alison R. Taylor, Colin Brownlee, and Sarah M. Assmann. 1996. "Laser Microsurgery of Higher Plant Cell Walls Permits Patch-Clamp Access." *Plant Physiology* 110 (4): 1063–68. <https://doi.org/10.1104/pp.110.4.1063>.
- Hernández-Oñate, M. A., and A. Herrera-Estrella. 2015. "Damage Response Involves Mechanisms Conserved across Plants, Animals and Fungi." *Current Genetics* 61 (3): 359–72. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0467-5>.
- Hisadome, Kazunari, Tetsuya Koyama, Chiwaka Kimura, Guy Droogmans, Yushi Ito, and Masahiro Oike. 2002. "Volume-Regulated Anion Channels Serve as an Auto/Paracrine Nucleotide Release Pathway in Aortic Endothelial Cells." *The Journal of General Physiology* 119 (6): 511–20. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028540>.
- Houdinet, Gabriella, Carmen Guerrero-Galán, Benjamin D Rose, Kevin Garcia, and Sabine D Zimmermann. 2023. "Secrets of the Fungus-Specific Potassium Channel TOK Family." *Trends in Microbiology* 31 (5): 511–20. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.11.007>.
- Hsu, Allen L, and Manu Ben-Johny. 2023. "Ion Channel Chameleons: Switching Ion Selectivity by Alternative Splicing." *The Journal of Biological Chemistry* 299 (3): 102946. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102946>.
- Huberman, Lori B., Samuel T. Coradetti, and N. Louise Glass. 2017. "Network of Nutrient-Sensing Pathways and a Conserved Kinase Cascade Integrate Osmolarity and Carbon Sensing in *Neurospora Crassa*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (41): E8665–74. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1707713114/-/DCSUPPLEMENTAL>.
- Hyde, Kevin D., Jianchu Xu, Sylvie Rapior, Rajesh Jeewon, Saisamorn Lumyong, Allen Grace T. Niego, Pranami D. Abeywickrama, et al. 2019. "The Amazing Potential of Fungi: 50 Ways We Can Exploit Fungi Industrially." *Fungal Diversity* 2019 97:1 97 (1): 1–136. <https://doi.org/10.1007/S13225-019-00430-9>.
- Islam, M R, G Tudryn, R Bucinell, L Schadler, and R C Picu. 2017. "Morphology and Mechanics of Fungal Mycelium." *Scientific Reports* 7 (1): 13070. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13295-2>.

- Jackson, P. S., R. Morrison, and K. Strange. 1994. "The Volume-Sensitive Organic Osmolyte-Anion Channel VSOAC Is Regulated by Nonhydrolytic ATP Binding." *https://doi.org/10.1152/Ajpcell.1994.267.5.C1203* 267 (5 36-5). <https://doi.org/10.1152/AJPCCELL.1994.267.5.C1203>.
- Jeong, Yeong Yeop, Hun Young Lee, Suk Weon Kim, Yoo Sun Noh, and Pil Joon Seo. 2021. "Optimization of Protoplast Regeneration in the Model Plant *Arabidopsis Thaliana*." *Plant Methods* 17 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13007-021-00720-X/FIGURES/6>.
- Johnson, Adiv A, Karina E Guziewicz, C Justin Lee, Ravi C Kalathur, Jose S Pulido, Lihua Y Marmorstein, and Alan D Marmorstein. 2017. "Bestrophin 1 and Retinal Disease." *Progress in Retinal and Eye Research* 58 (May): 45–69. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.01.006>.
- Kasimova, Marina A., Mounir Tarek, Alexey K. Shaytan, Konstantin V. Shaitan, and Lucie Delemotte. 2014. "Voltage-Gated Ion Channel Modulation by Lipids: Insights from Molecular Dynamics Simulations." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838 (5): 1322–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.024>.
- Ke, Ruian, Piers J. Ingram, and Ken Haynes. 2013. "An Integrative Model of Ion Regulation in Yeast." *PLoS Computational Biology* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002879>.
- Kloda, A., and B. Martinac. 2001. "Molecular Identification of a Mechanosensitive Channel in Archaea." *Biophysical Journal* 80 (1): 229–40. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76009-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76009-2).
- König, Karsten. 2023. "Medical Femtosecond Laser." *Journal of the European Optical Society- Rapid Publications* 19 (2): 36. <https://doi.org/10.1051/JEOS/2023032>.
- Koprowski, Piotr, and Andrzej Kubalski. 2001. "Bacterial Ion Channels and Their Eukaryotic Homologues." *BioEssays* 23 (12): 1148–58. <https://doi.org/10.1002/BIES.10017>.
- Kozarski, Maja, Anita Klaus, Dragica Jakovljevic, Nina Todorovic, Jovana Vunduk, Predrag Petrović, Miomir Niksic, Miroslav M Vrvic, and Leo van Griensven. 2015. "Antioxidants of Edible Mushrooms." *Molecules (Basel, Switzerland)* 20 (10): 19489–525. <https://doi.org/10.3390/molecules201019489>.
- Križak, Strahinja, Ljiljana Nikolić, Marina Stanić, Milan Žižić, Joanna Zakrzewska, Miroslav Živić, and Nataša Todorović. 2015. "Osmotic Swelling Activates a Novel Anionic Current with VRAC-like Properties in a Cytoplasmic Droplet Membrane from *Phycomyces Blakesleeanus* Sporangioophores." *Research in Microbiology* 166 (3): 162–73. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.02.004>.
- Kumar, Shashank, and Abhay K. Pandey. 2013. "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview." *The Scientific World Journal*. ScientificWorld Ltd. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.
- Kung, Ching. 2005. "A Possible Unifying Principle for Mechanosensation." *Nature* 2005 436:7051 436 (7051): 647–54. <https://doi.org/10.1038/nature03896>.
- Latimer, Dustin R., Amber N. Edinoff, Rachel D. Ruff, Kelsey C. Rooney, Kayla M. Penny, Shaan B. Patel, Suresh Sabbenahalli, et al. 2021. "Cenobamate, a Sodium Channel Inhibitor and Positive Allosteric Modulator of GABAA Ion Channels, for Partial Onset Seizures in Adults: A Comprehensive Review and Clinical Implications." *Neurology International* 2021, Vol. 13, Pages 252-265 13 (2): 252–65. <https://doi.org/10.3390/NEUROLINT13020026>.

- Lee, Wing-Kee, Prabir K Chakraborty, Eleni Roussa, Natascha A Wolff, and Frank Thévenod. 2012. "ERK1/2-Dependent Bestrophin-3 Expression Prevents ER-Stress-Induced Cell Death in Renal Epithelial Cells by Reducing CHOP." *Biochimica et Biophysica Acta* 1823 (10): 1864–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.003>.
- Levin, Ana M., Ronald P. De Vries, Ana Conesa, Charissa De Bekker, Manuel Talon, Hildegard H. Menke, Noel N.M.E. Van Peij, and Han A.B. Wösten. 2007. "Spatial Differentiation in the Vegetative Mycelium of *Aspergillus Niger*." *Eukaryotic Cell* 6 (12): 2311–22. <https://doi.org/10.1128/EC.00244-07>.
- Levina, N N, A Y Dunina-Barkovskaya, S Shabala, and R R Lew. 2002. "Blue Light Modulation of Ion Transport in the Slime Mutant of *Neurospora Crassa*." *The Journal of Membrane Biology* 188 (3): 213–26. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0185-z>.
- Lew, Roger R. 2007. "Ionic Currents and Ion Fluxes in *Neurospora Crassa* Hyphae." *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3475–81. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm204>.
- Lew RR.. 2011. "How Does a Hypha Grow? The Biophysics of Pressurized Growth in Fungi." *Nature Reviews. Microbiology* 9 (7): 509–18. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2591>.
- Li, Wang, Xinlei Yu, Fei Xie, Aziz Ur, Rehman Aziz, Xiaoling Liao, and Bo Liu. 2018. "A Membrane-Bound Biosensor Visualizes Shear Stress-Induced Inhomogeneous Alteration of Cell Membrane Tension." <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.09.002>.
- Li, ZiWei, and Gary S Shaw. 2023. "Role of Calcium-Sensor Proteins in Cell Membrane Repair." *Bioscience Reports* 43 (2). <https://doi.org/10.1042/BSR20220765>.
- Limapichat, Walrati, Wichai Pornthanakasem, Chatchaya Satitthammachart, Penchit Chitnumsub, and Ubolsree Leartsakulpanich. 2020. "Real-Time Detection of Changes in Yeast Plasma Membrane Potential Using Genetically Encoded Voltage Indicator Proteins." *FEMS Yeast Research* 20 (5): 41. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOAA041>.
- Lipke, P N, and R Ovalle. 1998. "Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges." *Journal of Bacteriology* 180 (15): 3735–40. <https://doi.org/10.1128/JB.180.15.3735-3740.1998>.
- Luard, E. J. 1982. "Effect of Osmotic Shock on Some Intracellular Solutes in Two Filamentous Fungi." *Journal of General Microbiology* 128 (11): 2575–81. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-11-2575>.
- Malvezzi, Mattia, Madhavan Chalal, Radmila Janjusevic, Alessandra Picollo, Hiroyuki Terashima, Anant K. Menon, and Alessio Accardi. 2013. "Ca<sup>2+</sup>-Dependent Phospholipid Scrambling by a Reconstituted TMEM16 Ion Channel." *Nature Communications* 4. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS3367>.
- Mann, J. W., C. E. Heintz, and J. D. Macmillan. 1972. "Yeast Spheroplasts Formed by Cell Wall-Degrading Enzymes from *Oerskovia* Sp." *Journal of Bacteriology* 111 (3): 821. <https://doi.org/10.1128/JB.111.3.821-824.1972>.
- Marshall, Abigail R, Eirini Maniou, Dale Moulding, Nicholas D E Greene, Andrew J Copp, and Gabriel L Galea. 2022. "Two-Photon Cell and Tissue Level Laser Ablation Methods to Study Morphogenetic Biomechanics." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2438: 217–30. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2035-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2035-9_14).
- Martinac, Boris, and Anna Kloda. 2003. "Evolutionary Origins of Mechanosensitive Ion



Channels." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 82 (1–3): 11–24.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(03\)00002-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(03)00002-6).

- Martinac, Boris, Yoshiro Saimi, and Ching Kung. 2008. "Ion Channels in Microbes." *Physiological Reviews* 88 (4): 1449–90.  
<https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00005.2008/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0040824900006.JPEG>.
- Medina-Castellanos, Elizabeth, Edgardo U. Esquivel-Naranjo, Martin Heil, and Alfredo Herrera-Estrella. 2014. "Extracellular ATP Activates MAPK and ROS Signaling during Injury Response in the Fungus *Trichoderma Atroviride*." *Frontiers in Plant Science* 5 (NOV): 659.  
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00659/BIBTEX>.
- Medina, Jorge H., Haydee Viola, Claudia Wolfman, Mariel Marder, Cristina Wasowski, Daniel Calvo, and Alejandro C. Paladini. 1997. "Overview--Flavonoids: A New Family of Benzodiazepine Receptor Ligands." *Neurochemical Research* 22 (4): 419–25.  
<https://doi.org/10.1023/A:1027303609517>.
- Michalski, Kevin, and Toshimitsu Kawate. 2016. "Carbenoxolone Inhibits Pannexin1 Channels through Interactions in the First Extracellular Loop." *The Journal of General Physiology* 147 (2): 165–74. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511505>.
- Mizuta, Yoko. 2021. "Advances in Two-Photon Imaging in Plants." *Plant & Cell Physiology* 62 (8): 1224–30. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab062>.
- Morris, Catherine E. 2002. "How Did Cells Get Their Size?" *The Anatomical Record* 268 (3): 239–51. <https://doi.org/10.1002/AR.10158>.
- Mosunova, O V, D V Vasina, T V Tyazhelova, E O Landesman, and O V Koroleva. 2016. "[Preparation of protoplasts of the fungus *Trametes hirsuta* 072 and study of the effect of antioxidants on their formation and regeneration]." *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* 52 (3): 318–23.
- Neher, Erwin, and Bert Sakmann. 1976. "Single-Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres." *Nature* 260 (5554): 799–802.  
<https://doi.org/10.1038/260799a0>.
- Nguyen, Thi Lan Anh, and Debanjana Bhattacharya. 2022. "Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle." *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (8). <https://doi.org/10.3390/molecules27082494>.
- Nilius, Bernd, and G. Droogmans. 2003. "Amazing Chloride Channels: An Overview." *Acta Physiologica Scandinavica* 177 (2): 119–47. <https://doi.org/10.1046/J.1365-201X.2003.01060.X>.
- Nilius, Bernd, Jan Eggermont, Thomas Voets, Gunnar Buyse, Vangelis Manolopoulos, and Guy Droogmans. 1997. "Properties of Volume-Regulated Anion Channels in Mammalian Cells." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 68 (1): 69–119.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(97\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(97)00021-7).
- Ning, Yaodong, Bo Hu, Haobing Yu, Xiaoyu Liu, Binghua Jiao, and Xiaoling Lu. 2022. "Optimization of Protoplast Preparation and Establishment of Genetic Transformation System of an Arctic-Derived Fungus *Eutypella* Sp." *Frontiers in Microbiology* 13 (April): 769008. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.769008/BIBTEX>.

- Oddon, Delphine M., Eugene Diatloff, and Stephen K. Roberts. 2007a. "A CLC Chloride Channel Plays an Essential Role in Copper Homeostasis in *Aspergillus Nidulans* at Increased Extracellular Copper Concentrations." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768 (10): 2466–77. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2007.05.022>.
- Oddon, Delphine M, Eugene Diatloff, and Stephen K Roberts. 2007b. "A CLC Chloride Channel Plays an Essential Role in Copper Homeostasis in *Aspergillus Nidulans* at Increased Extracellular Copper Concentrations." <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.022>.
- Ortega, Joseph K.E., Revathi P. Mohan, Cindy M. Munoz, Shankar Lalitha Sridhar, and Franck J. Vernerey. 2021. "Helical Growth during the Phototropic Response, Avoidance Response, and in Stiff Mutants of *Phycomyces Blakesleeanus*." *Scientific Reports* 2021 11:1 11 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83254-5>.
- Ortega, Joseph K E, Jason T Truong, Cindy M Munoz, and David G Ramirez. 2015. "Cell Wall Loosening in the Fungus, *Phycomyces Blakesleeanus*." *Plants (Basel, Switzerland)* 4 (1): 63–84. <https://doi.org/10.3390/plants4010063>.
- Ortiz, David, Lindsay Gossack, Ulrich Quasts, and Joseph Bryan. 2013. "Reinterpreting the Action of ATP Analogs on KATP Channels." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (26): 18894. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.476887>.
- Osei-Owusu, James, Junhua Yang, Maria del Carmen Vitery, and Zhaozhu Qiu. 2018. "Molecular Biology and Physiology of Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)." *Current Topics in Membranes* 81 (January): 177–203. <https://doi.org/10.1016/BS.CTM.2018.07.005>.
- Pajić, Tanja, Katarina Stevanović, Nataša V Todorović, Aleksandar J Krmpot, and Steva Lević. n.d. "In Vivo Femtosecond Laser Nanosurgery of Fungal Cell Wall to Enable Patch-Clamp Electrophysiology Femtosecond Laser Nanosurgery of Cell Wall ( for ) to Enable Patch-Clamp on Filamentous Fungi Femtosecond Laser Nanosurgery of Cell Wall Clears the Way For (."
- Pang, Ka Lai, and E. B.Gareth Jones. 2017. "Recent Advances in Marine Mycology." *Botanica Marina* 60 (4): 361–62. <https://doi.org/10.1515/BOT-2017-0048/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- Pasantes-Morales, Herminia. 2016. "Channels and Volume Changes in the Life and Death of the Cell." *Molecular Pharmacology*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104158>.
- Pasrija, Ritu, and Mohammad Naime. 2022. "Resolving the Equation between Mucormycosis and COVID-19 Disease." *Molecular Biology Reports* 1 (January): 1–8. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-07085-3/FIGURES/4>.
- "*Phycomyces Blakesleeanus* NRRL 1555(-) - NCBI - NLM." n.d. Accessed August 17, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/763407/>.
- Piccolo, Alessandra, Mattia Malvezzi, and Alessio Accardi. 2015. "TMEM16 Proteins: Unknown Structure and Confusing Functions." *Journal of Molecular Biology* 427 (1): 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.028>.
- Poroca, Diogo R, Ryan M Pelis, and Valérie M Chappe. 2017. "ClC Channels and Transporters : Structure , Physiological Functions , and Implications in Human Chloride Channelopathies" 8 (March): 1–25. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00151>.

- Qiu, Zhaozhu, Adrienne E. Dubin, Jayanti Mathur, Buu Tu, Kritika Reddy, Loren J. Miraglia, Jürgen Reinhardt, Anthony P. Orth, and Ardem Patapoutian. 2014. "SWELL1, a Plasma Membrane Protein, Is an Essential Component of Volume-Regulated Anion Channel." *Cell* 157 (2): 447–58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.024>.
- Quinn, Matthew J, Craig T Resch, Jonathan Sun, Erin J Lind, Pavel Dibrov, and Claudia C Häse. 2012. "NhaP1 Is a K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> Antiporter Required for Growth and Internal PH Homeostasis of *Vibrio Cholerae* at Low Extracellular PH." *Microbiology (Reading, England)* 158 (Pt 4): 1094–1105. <https://doi.org/10.1099/mic.0.056119-0>.
- Richards, Thomas A, and Nicholas J Talbot. 2007. "Plant Parasitic Oomycetes Such as *Phytophthora* Species Contain Genes Derived from Three Eukaryotic Lineages." *Plant Signaling & Behavior* 2 (2): 112–14. <https://doi.org/10.4161/psb.2.2.3640>.
- Roberts, Stephen K., Graham K. Dixon, Stuart J. Dunbar, and Dale Sanders. 1997. "Laser Ablation of the Cell Wall and Localized Patch Clamping of the Plasma Membrane in the Filamentous Fungus *Aspergillus*: Characterization of an Anion-Selective Efflux Channel." *The New Phytologist* 137 (4): 579–85. <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.1997.00862.X>.
- Roberts, Stephen K., James Milnes, and Mark Caddick. 2011. "Characterisation of AnBEST1, a Functional Anion Channel in the Plasma Membrane of the Filamentous Fungus, *Aspergillus Nidulans*." *Fungal Genetics and Biology* 48 (9): 928–38. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2011.05.004>.
- Ruiz-Herrera, José, Guadalupe Martínez-Cadena, Flavia Loarca, and Rubén Salcedo-Hernández. 2003. "Analysis of Phenomena Involved in the Apical Growth of *Phycomyces Blakesleeanus*." *Archives of Microbiology* 180 (6): 427–33. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0609-5>.
- Savary, Serge, Laetitia Willocquet, Sarah Jane Pethybridge, Paul Esker, Neil McRoberts, and Andy Nelson. 2019. "The Global Burden of Pathogens and Pests on Major Food Crops." *Nature Ecology & Evolution* 2019 3:3 3 (3): 430–39. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>.
- Serysheva, I. I., M. Schatz, M. Van Heel, W. Chiu, and Susan L. Hamilton. 1999. "Structure of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel Activated with Ca<sup>2+</sup> and AMP-PCP." *Biophysical Journal* 77 (4): 1936. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77035-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77035-9).
- Seyedmousavi, Seyedmojtaba, Sandra de M G Bosco, Sybren de Hoog, Frank Ebel, Daniel Elad, Renata R Gomes, Ilse D Jacobsen, et al. 2018. "Fungal Infections in Animals: A Patchwork of Different Situations." *Medical Mycology* 56 (suppl\_1): 165–87. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx104>.
- Sikimic, Jelena, Timothy S. McMillen, Cita Bleile, Frank Dastvan, Ulrich Quast, Peter Krippeit-Drews, Gisela Drews, and Joseph Bryan. 2019a. "ATP Binding without Hydrolysis Switches Sulfonylurea Receptor 1 (SUR1) to Outward-Facing Conformations That Activate KATP Channels." *The Journal of Biological Chemistry* 294 (10): 3707. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA118.005236>.
- Sikimic J, McMillen TS, Bleile C, Dastvan F, Quast U, Krippeit-Drews P, Drews G, Bryan J. 2019b. "ATP Binding without Hydrolysis Switches Sulfonylurea Receptor 1 (SUR1) to Outward-Facing Conformations That Activate KATP Channels." *Journal of Biological Chemistry* 294 (10): 3707–19. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA118.005236>.

- Silverman-Gavrila, Lorelei B., and Roger R. Lew. 2002. "An IP<sub>3</sub>-Activated Ca<sup>2+</sup> Channel Regulates Fungal Tip Growth." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 24): 5013–25. <https://doi.org/10.1242/JCS.00180>.
- Slayman, Clifford L., and Carolyn W. Slayman. 1962. "Measurement of Membrane Potentials in Neurospora." *Science* 136 (3519): 876–77. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.136.3519.876>.
- Śliżewska, Weronika, Katarzyna Struszczyk-Świta, and Olga Marchut-Mikołajczyk. 2022. "Metabolic Potential of Halophilic Filamentous Fungi-Current Perspective." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms23084189>.
- Song, Wei, Zhen Yang, and Ben He. 2014. "Bestrophin 3 Ameliorates TNF $\alpha$ -Induced Inflammation by Inhibiting NF-KB Activation in Endothelial Cells." *PloS One* 9 (10): e111093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111093>.
- Stanić, Marina, Strahinja Križak, Mirna Jovanović, Tanja Pajić, Ana Ćirić, Milan Žižić, Joanna Zakrzewska, Tijana Cvetić Antić, Nataša Todorović, and Miroslav Živić. 2017. "Growth Inhibition of Fungus *Phycomyces Blakesleeanus* by Anion Channel Inhibitors Anthracene-9-Carboxylic and Niflumic Acid Attained through Decrease in Cellular Respiration and Energy Metabolites." *Microbiology (United Kingdom)* 163 (3): 364–72. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000429>.
- Stanić, Marina, M. Živić, Mirzeta Hadžibrahimović, Aleksandra Pajdić, S. Križak, M. Žižić, and Joanna Zakrzewska. 2014. "Effect of Long-Term Cyanide Exposure on Cyanide-Sensitive Respiration and Phosphate Metabolism in the Fungus *Phycomyces Blakesleeanus*." *Archives of Biological Sciences* 66 (2): 847–57. <https://doi.org/10.2298/ABS1402847S>.
- Strange, Kevin, Toshiki Yamada, and Jerod S. Denton. 2019. "A 30-Year Journey from Volume-Regulated Anion Currents to Molecular Structure of the LRRC8 Channel." *Journal of General Physiology*. Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812138>.
- Suchodolski, Jakub, and Anna Krasowska. 2019. "Plasma Membrane Potential of *Candida Albicans* Measured by Di-4-ANEPPS Fluorescence Depends on Growth Phase and Regulatory Factors." *Microorganisms* 7 (4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7040110>.
- Sukhova, Ekaterina, Elena Akinchits, and Vladimir Sukhov. 2017. "Mathematical Models of Electrical Activity in Plants." *The Journal of Membrane Biology* 250 (5): 407–23. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9969-7>.
- Svensson, Sofie E., Ana Osório Oliveira, Karin H. Adolfsson, Ivo Heinmaa, Andrew Root, Nahid Kondori, Jorge A. Ferreira, Minna Hakkarainen, and Akram Zamani. 2022. "Turning Food Waste to Antibacterial and Biocompatible Fungal Chitin/Chitosan Monofilaments." *International Journal of Biological Macromolecules* 209 (January): 618–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.031>.
- Teramoto, Noriyoshi. 2006. "Physiological Roles of ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels in Smooth Muscle." *The Journal of Physiology* 572 (Pt 3): 617. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2006.105973>.
- Trouet, Dominique, Diane Hermans, Guy Droogmans, Bernd Nilius, and Jan Eggermont. 2001. "Inhibition of Volume-Regulated Anion Channels by Dominant-Negative Caveolin-1."

*Biochemical and Biophysical Research Communications* 284 (2): 461–65.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4995>.

- Tyśkiewicz, Renata, Artur Nowak, Ewa Ozimek, and Jolanta Jaroszuk-ściseł. 2022. "Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth." *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 2329 23 (4): 2329.  
<https://doi.org/10.3390/IJMS23042329>.
- Ullrich, Florian, S. Momsen Reincke, Felizia K. Voss, Tobias Stauber, and Thomas J. Jentsch. 2016a. "Inactivation and Anion Selectivity of Volume-Regulated Anion Channels (VRACs) Depend on C-Terminal Residues of the First Extracellular Loop." *The Journal of Biological Chemistry* 291 (33): 17040. <https://doi.org/10.1074/JBC.M116.739342>.
- Ullrich F, Reincke SM, Voss FK, Stauber T, Jentsch TJ. 2016b. "Inactivation and Anion Selectivity of Volume-Regulated Anion Channels (VRACs) Depend on c-Terminal Residues of the First Extracellular Loop." *Journal of Biological Chemistry* 291 (33): 17040–48.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.739342>.
- Vacata, Vladimir, Arnošt Kotyk, and Karel Sigler. 1981. "Membrane Potentials in Yeast Cells Measured by Direct and Indirect Methods." *Biochimica et Biophysica Acta* 643 (1): 265–68. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90241-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90241-8).
- Véry, Anne Aliénor, and Julia M. Davies. 1998. "Laser Microsurgery Permits Fungal Plasma Membrane Single-Ion-Channel Resolution at the Hyphal Tip." *Applied and Environmental Microbiology* 64 (4): 1569. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.4.1569-1572.1998>.
- Vessey, John P, Melanie R Lalonde, Hossein A Mizan, Nicole C Welch, Melanie E M Kelly, and Steven Barnes. 2004. "Carbenoxolone Inhibition of Voltage-Gated Ca Channels and Synaptic Transmission in the Retina." *Journal of Neurophysiology* 92 (2): 1252–56.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00148.2004>.
- Vígláš, Ján, and Petra Olejníková. 2021. "An Update on ABC Transporters of Filamentous Fungi - from Physiological Substrates to Xenobiotics." *Microbiological Research* 246 (May): 126684. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126684>.
- Voets, T, V Manolopoulos, J Eggermont, C Ellory, G Droogmans, and B Nilius. 1998. "Regulation of a Swelling-Activated Chloride Current in Bovine Endothelium by Protein Tyrosine Phosphorylation and G Proteins." *The Journal of Physiology* 506 ( Pt 2) (January): 341–52.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.341bw.x>.
- Volk, K A, C Zhang, R F Husted, and J B Stokes. 1996. "Cl<sup>-</sup> Current in IMCD Cells Activated by Hypotonicity: Time Course, ATP Dependence, and Inhibitors." *The American Journal of Physiology* 271 (3 Pt 2): F552-9. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.271.3.F552>.
- Walther, Grit, Lysett Wagner, and Oliver Kurzai. 2020. "Outbreaks of Mucorales and the Species Involved." *Mycopathologia* 185 (5): 765–81. <https://doi.org/10.1007/S11046-019-00403-1>.
- Wang, Runping, Yongjun Lu, Susheel Gunasekar, Yanhui Zhang, Christopher J Benson, Mark W Chapleau, Rajan Sah, and François M Abboud. 2017. "The Volume-Regulated Anion Channel (LRRC8) in Nodose Neurons Is Sensitive to Acidic PH." *JCI Insight* 2 (5): e90632.  
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.90632>.
- Wang, Shuangshuang, Aiqun Chen, Kun Xie, Xiaofeng Yang, Zhenzhen Luo, Jiadong Chen,

- Dechao Zeng, et al. 2020. "Functional Analysis of the OsNPF4.5 Nitrate Transporter Reveals a Conserved Mycorrhizal Pathway of Nitrogen Acquisition in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (28): 16649–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000926117>.
- Wang, Xueying, John A Hayes, Ann L Revill, Hanbing Song, Andrew Kottick, Nikolas C Vann, M Drew LaMar, et al. 2014. "Laser Ablation of Dbx1 Neurons in the Pre-Bötzinger Complex Stops Inspiratory Rhythm and Impairs Output in Neonatal Mice." *ELife* 3 (July): e03427. <https://doi.org/10.7554/eLife.03427>.
- Weiss, J., and M. H. Weisenseel. 1990. "Blue Light-Induced Changes in Membrane Potential and Intracellular PH of Phycomyces Hyphae." *Journal of Plant Physiology* 136 (1): 78–85. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81619-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81619-6).
- Wood, Paul M, and Derek W Hollomon. 2003. "A Critical Evaluation of the Role of Alternative Oxidase in the Performance of Strobilurin and Related Fungicides Acting at the Qo Site of Complex III." *Pest Management Science* 59 (5): 499–511. <https://doi.org/10.1002/ps.655>.
- Xue, Yucong, Honglin Li, Yuanyuan Zhang, Xue Han, Gaohua Zhang, Wenya Li, Huiran Zhang, et al. 2018a. "Natural and Synthetic Flavonoids, Novel Blockers of the Volume-Regulated Anion Channels, Inhibit Endothelial Cell Proliferation." *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 470 (10): 1473–83. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2170-8>.
- Xue Y, Li H, Zhang Y, Han X, Zhang G, Li W, Zhang H, Lin Y, Chen P, Sun X, Liu Y, Chu L, Zhang J, Zhang M, Zhang X. 2018b. "Natural and Synthetic Flavonoids, Novel Blockers of the Volume-Regulated Anion Channels, Inhibit Endothelial Cell Proliferation." *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 470 (10): 1473–83. <https://doi.org/10.1007/S00424-018-2170-8>.
- Yang, Tingting, Qun Liu, Brian Kloss, Renato Bruni, Ravi C. Kalathur, Youzhong Guo, Edda Kloppmann, Burkhard Rost, Henry M. Colecraft, and Wayne A. Hendrickson. 2014. "Structure and Selectivity in Bestrophin Ion Channels." *Science* 346 (6207): 355–59. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1259723/SUPPL\\_FILE/YANG\\_SM\\_REV.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1259723/SUPPL_FILE/YANG_SM_REV.PDF).
- Yeul, Vijay S., and Sadhana S. Rayalu. 2013. "Unprecedented Chitin and Chitosan: A Chemical Overview." *Journal of Polymers and the Environment* 21 (2): 606–14. <https://doi.org/10.1007/S10924-012-0458-X/METRICS>.
- Zafar, Shaheen, Farrukh Aqil, and Iqbal Ahmad. 2007. "Metal Tolerance and Biosorption Potential of Filamentous Fungi Isolated from Metal Contaminated Agricultural Soil." *Bioresource Technology* 98 (13): 2557–61. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.09.051>.
- Zaichkin, E I, S A Orlova, and B A Fikhte. 1975. "[Dynamics of Formation of the Surface Membrane in Isolated Microdroplets of Phycomyces Blakesleeanus Cytoplasm]." *Doklady Akademii Nauk SSSR* 225 (5): 1187–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1212911>.
- Zemkova, H, V Tvrdonova, A Bhattacharya, and M Jindrichova. 2014. "Allosteric Modulation of Ligand Gated Ion Channels by Ivermectin." *Physiol. Res* 63: 215–24. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932711>.
- Zhang, Huaqiu, H. James Cao, Harold K. Kimelberg, and Min Zhou. 2011. "Volume Regulated Anion Channel Currents of Rat Hippocampal Neurons and Their Contribution to Oxygen- and-Glucose Deprivation Induced Neuronal Death." *PLOS ONE* 6 (2): e16803.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0016803>.

- Zhang, Yanyun, Ke Wang, and Zhiyi Yu. 2020. "Drug Development in Channelopathies: Allosteric Modulation of Ligand-Gated and Voltage-Gated Ion Channels." *Journal of Medicinal Chemistry* 63 (24): 15258–78.  
[https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C01304/SUPPL\\_FILE/JMOC01304\\_SI\\_001.CS](https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C01304/SUPPL_FILE/JMOC01304_SI_001.CS) V.
- Zhao, Chang, and Francesco Tombola. 2021. "Voltage-Gated Proton Channels from Fungi Highlight Role of Peripheral Regions in Channel Activation." *Communications Biology* 2021 4:1 4 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01792-0>.
- Zhao, Shuheng, Xulong Wu, Xiaoyu Duan, Caixia Zhou, Zhiqiao Zhao, Hui Chen, Zizhong Tang, Yujun Wan, Yirong Xiao, and Hong Chen. 2021. "Optimal Extraction, Purification and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from Endophytic Fungi of *Conyza Blinii* H. Lév." *PeerJ* 9: e11223. <https://doi.org/10.7717/peerj.11223>.
- Zhou, X L, M A Stumpf, H C Hoch, and C Kung. 1991. "A Mechanosensitive Channel in Whole Cells and in Membrane Patches of the Fungus *Uromyces*." *Science (New York, N.Y.)* 253 (5026): 1415–17. <https://doi.org/10.1126/science.1716786>.
- Živanović, Branka. 2005. "Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> Ion Fluxes near the Surface of Gravitropically Stimulated *Phycomyces* Sporangiphore." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1048: 487–90. <https://doi.org/10.1196/annals.1342.074>.
- Zivanović, Branka D. 2013. "Intracellular Reorganization and Ionic Signaling of the *Phycomyces* Stage I Sporangiphore in Response to Gravity and Touch." *Communicative & Integrative Biology* 6 (1): e22291. <https://doi.org/10.4161/cib.22291>.
- Živanovic, Branka, Kurt Köhler, Paul Galland, and Manfred Weisenseel. 2001. "Membrane Potential and Endogenous Ion Current of *Phycomyces* Sporangiphores." *Electromagnetic Biology and Medicine* 20 (3): 343–62. <https://doi.org/10.1081/JBC-100108575>.
- Zivić, M, J Zakrzewska, M Stanić, T Cvetić, and B Zivanović. 2009. "Alternative Respiration of Fungus *Phycomyces* Blakesleeanus." *Antonie van Leeuwenhoek* 95 (3): 207–17. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9304-5>.
- Zivić, Miroslav, Marko Popović, Natasa Todorović, and Zeljko Vucinić. 2009. "Outwardly Rectifying Anionic Channel from the Plasma Membrane of the Fungus *Phycomyces* Blakesleeanus." *Eukaryotic Cell* 8 (9): 1439–48. <https://doi.org/10.1128/EC.00059-09>.
- Zivić, Miroslav, Marko Popović, Branka Zivanović, and Zeljko Vucinić. 2005. "A New Model System for Investigation of Ionic Channels in Filamentous Fungi: Evidence for Existence of Two K<sup>+</sup>-Permeable Ionic Channels in *Phycomyces* Blakesleeanus." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1048 (June): 491–95. <https://doi.org/10.1196/annals.1342.075>.
- Zonia, Laura, and Teun Munnik. 2007. "Life under Pressure: Hydrostatic Pressure in Cell Growth and Function." *Trends in Plant Science* 12 (3): 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.006>.

## Biografija kandidata

Katarina S. Stevanović rođena je 4. juna 1992. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Godine 2011. upisala je osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Molekularna biologija i fiziologija gde je diplomirala 2015. godine. Prva eksperimentalna iskustva stekla je volonterskim radom u laboratoriji za fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine. Masterirala je na Biološkom fakultetu 2016. godine na modulu Biofizika, na temi „Promene unutarćelijske koncentracije kalcijuma u odgovoru na hipoosmotski stimulus kod citoplazmatskih kapi izolovanih iz gljive *Phycomyces blakesleeanus*“. Iste godine upisala je Multidisciplinarne doktorske studije pri Univerzitetu u Beogradu, modul Biofizika.

Tokom izrade disertacije, kandidatkinja se bavila pretežno tehnikom nametanja voltaže na deliću membrane. Obučavala je nekoliko mlađih studenata i učestvovala u nastavi u okviru metodskih predmeta Biološkog fakulteta. Pohađala je nekoliko internacionalnih kurseva na temu mikroskopije i elektrofiziologije. Učestvovala je u Erasmus+ razmeni studenata u okviru koje je 3 meseca boravila u Centru za molekularnu medicinu Karolinska Instituta u Stokholmu, gde se bavila fluorescentnom korelacionom spektroskopijom. Nastavne obaveze u okviru studijskog modula završila je sa prosečnom ocenom 10. Učestvovala je u brojnim konferencijama na kojima je prezentovala rezultate svog rada, a iz disertacije su do sada proizašle dve publikacije u međunarodnim časopisima kategorije M21:

Stevanović KS, Čepkenović B, Križak S, Pajić T, Todorović NV, Živić MŽ. ATP modulation of osmotically activated anionic current in the membrane of *Phycomyces blakesleeanus* sporangiophore. *Sci Rep.* 2023 Jul 24;13(1):11897. doi: 10.1038/s41598-023-39021-9.

Stevanović KS, Čepkenović B, Križak S, Živić MŽ, Todorović NV. Osmotically Activated Anion Current of *Phycomyces blakesleeanus*-Filamentous Fungi Counterpart to Vertebrate Volume Regulated Anion Current. *J Fungi (Basel).* 2023 May 31;9(6):637. doi: 10.3390/jof9060637.



# Изјава о ауторству

Име и презиме аутора : Катарина С. Стевновић

Број индекса: 51/2016

## Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Доминантне струје ћелијске мембране хифа и мембране цитоплазматских капи пореклом из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus*. Карактеризација излазно-исправљачке инактивирајуће струје цитоплазматских капи

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Катарина С. Стевановић

Број индекса: 51/2016

Студијски програм: Биофизика

Наслов рада Доминантне струје ћелијске мембране хифа и мембране цитоплазматских капи пореклом из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus*. Карактеризација излазно-исправљачке инактивирајуће струје цитоплазматских капи

Ментори Др Наташа Тодоровић

Др Мирослав Живић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Доминантне струје ћелијске мембране хифа и мембране цитоплазматских капи пореклом из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus*. Карактеризација излазно-исправљачке инактивирајуће струје цитоплазматских капи

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство** – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство** – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство** – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство** – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство** – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.