

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Strahinja V. Križak

**Karakterizacija osmotski aktiviranih jonskih
struja u membrani citoplazmatskih kapi
izolovanih iz sporangiofora gljive *Phycomyces
blakesleanus* Burgeff**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Strahinja V. Križak

**Characterization of osmotically activated ion
currents in the membrane of cytoplasmic
droplets from *Phycomyces blakesleeanus*
Burgeff sporangiophores**

PhD thesis

Belgrade, 2018.

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",

Članovi komisije:

Dr Marina Stanić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za multidisciplinarna istraživanja,

Dr Ljiljana Nikolić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Dr Tijana Cvetić Antić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

Eksperimentalna istraživanja ovog rada izvedena su na Odseku za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu i u laboratoriji za NMR Instituta za opštu i fizičku hemiju

Veliku zahvalnost dugujem mentorima, pre svih dr Miroslavu Živiću, koji me je od prvog do poslednjeg dana izrade disertacije podsticao, ohrabrivao i aktivno učestvovao u svim fazama izrade rada i bez čije pomoći ova disertacija ne bi ugledala svetlost dana i dr Nataši Todorović, na svim savetima i pomoći u eksperimentalnom radu ali i nepokolebljivoj rešenosti da rezultati sprovedenih istraživanja nađu svoje mesto u naučnoj javnosti

Posebnu zahvalnost dugujem dr Ljiljani Nikolić koja je bila tu da me uvede u prve korake eksperimentalnog rada i nesebično pomogne u savladavanju svih prepreka sa kojima sam se suočavao kao početnik u istraživanjima

Zahvaljujem se dr Marini Stanić, na saradnji, pomoći u izvođenju eksperimenata, savetima i podršci koju mi je pružala kada god mi je to bilo neophodno

Veliki doprinos ovoj disertaciji dali su i dr Milan Žižić i dr Joanna Zakrzewska, zahvaljujući čijem angažovanju su obavljene NMR eksperimenti predstavljeni u ovoj disertaciji

Hvala dr Željku Vučiniću, rukovodiocu projekta u okviru kojeg su sva istraživanja obavljena, što mi je ukazao poverenje i pružio priliku da se ovaj rad dovede do kraja

Na kraju, hvala Andreju i Kosti, koji su razumeli da mi je potrebno malo samoće i tišine da završim posao započet pre njihovog rođenja i najveće hvala Magdaleni na beskrajnom strpljenju, razumevanju i moralnoj podršci koju mi je pružila tokom svih ovih godina

Karakterizacija osmotski aktiviranih jonskih struja u membrani citoplazmatskih kapi izolovanih iz sporangiofora gljive *Phycomyces blakesleanus* Burgeff

Rezime

Membrana citoplazmatskih kapi dobijenih iz rastućih sporangiofora gljive *Phycomyces blakesleanus* Burgeff je jedan od samo dva za sada poznata model sistema u kojima se mogu ispitivati elektrofiziološka svojstva plazma membrane filamentoznih gljiva (drugi model sistem je sluzavi mutant gljive *Neurospora crassa*). Pokazano je da bar 20% citoplazmatskih kapi nakon 2 h formira ćelijski zid što ukazuje da njihova membrana odgovara plazma membrani hife. Eksperimentima prikazanim u disertaciji je po prvi put izvršeno registrovanje struja metodom nametnute voltaže u konfiguraciji *cela ćelija* na model sistem membrane citoplazmatskih kapi. Ovaj način snimanja jonskih struja daje uvid u tipove i osobine dominantnih ukupnih struja prisutnih u ispitivanoj membrani. Okarakterisan je odgovor membrane na hipoosmotske uslove sredine, izazvane dijalizom čitave kapi hiperosmotskim rastvorom. Za razliku od familije struja u izoosmotskim uslovima, kojima dominiraju pasivna svojstva membrane, male konduktivnosti, u hipoosmotskim uslovima je karakteristično dominantno prisustvo izlazno ispravljene brzoinaktivirajuće trenutne struje (IRIS), aktivirane na depolarišućim potencijalima. Pored IRIS, prisutne u svakoj ispitivanoj membrani citoplazmatskih kapi čija je maksimalna gustina struje na +70 mV iznosila 129 ± 14 pA/pF (n=30), u 73% registrovanih odgovora je bila primetna i sporoaktivirajuća ulazna struja, gustine 99 ± 11 pA/pF na -150 mV (n=22) koja nije dalje ispitivana.

IRIS je prava osmotski aktivirana struja jer: 1. ima dozno zavisnu osetljivost na osmotski stimulus; 2. promena sredine iz hipoosmotskih u hiperosmotske trenutno gasi IRIS. Prema svojim osobinama IRIS se jasno razlikuje od svih do sada opisanih jonskih struja kod gljiva, ali pokazuje brojne sličnosti sa zapreminom regulisanom anjonskom strujom (VRAC-volume regulated anionic channel) kod kičmenjaka. Ove sličnosti su sledeće: 1. aktivacija u uslovima osmotski izazvanog povećanja zapremine; 2. umereno izlazno ispravljanje, sa naelektrisanjem vratnica od $z_g = 0,82 \pm 0,1$; 3. voltažno i vremenski zavisna inaktivacija na pozitivnim potencijalima i oporavak od inaktivacije na negativnim potencijalima; 4. izražena selektivnost za anjone u odnosu na katjone sa karakterističnom sekvencom provodljivosti koja odgovara Ajsmanovoj seriji I ($I: Cl^- : HCO_3^- : glukonat^- : glutamat^- = 1,4: 1: 0,25: 0,01: 0,088$); 5. progresivno smanjenje amplitude struje u vremenu, koje usporava unutarćelijski

ATP; 6. aktivacija nehidrolizujućim analogom GTP u izoosmotskim uslovima, kao i kod VRAC, ukazujući da se IRIS aktivira putem nekog GTP-zavisnog signalnog puta. 7. smanjenje struje u prisustvu jona magnezijuma sa unutarćelijske strane.

Farmakološka karakterizacija IRIS je pokazala da DIDS, poznati blokator anjonskih kanala, nema efekta na IRIS. IRIS inhibiraju niflumična kiselina (NFK) (koncentracija 0,5 mM izaziva blok maksimalne struje od $79 \pm 5\%$ (n=4)) i antracen-9-karboksilna kiselina (A9C) (koncentracija 1 mM blokira $68 \pm 5\%$ maksimalne struje (n=5)).

Praćenjem promena veličine citoplazmatskih kapi pri hipoosmotskom stimulusu od 45 mOsm pokazano je da dolazi do povećanja prečnika kapi za $8 \pm 4\%$ (n = 4), ali nije primećeno merljivo regulisano opadanje zapremine koje bi bilo očekivano da sledi, kao način adaptacije, nakon povećanja zapremine u hipoosmotskim uslovima, moguće usled nedovoljno intenzivnog stimulusa.

S obzirom da su citoplazmatske kapi na čijoj membrani je prisutan IRIS poreklom od rastućih sporangiofora, ispitan je efekat blokatora IRIS na rast micelijuma *P. blakesleeanus* i utvrđeno je da ga blokatori IRIS usporavaju ili zaustavljaju. Niflumična kiselina je efikasniji inhibitor sa vrednostima IC_{50} za rast od 23 μ M dok je IC_{50} za A9C 130 μ M. Merenje respiracije u prisustvu NFK i A9C je pokazalo da oba blokatora snažno inhibiraju disanje micelijuma ($IC_{50(NFK)} = 50 \mu$ M a $IC_{50(A9C)} = 142 \mu$ M). Oba blokatora dovode do značajnog smanjenja koncentracije ATP, koja u slučaju dodavanja 2 mM A9C pada za čak 91%. A9C, ali ne i NFK, dovodi do zakišeljavanja kako citoplazme, tako i vakuole za oko 0,3 pH jedinice. Mehanizmi ovih procesa nisu sa sigurnošću utvrđeni, ali je pokazano da postoji čvrsta veza između energetskog metabolizma ćelije i regulacije aktivnosti IRIS. Dalja ispitivanja mehanizama aktivacije i regulacije IRIS, kao i njihovo poredjenje sa procesima aktivacije VRAC kod kičmenjaka, trebalo bi da omogućе bolje razumevanje uloge IRIS u fiziologiji filamentoznih gljiva.

Ključne reči: *Phycomyces blakesleeanus*, elektrofiziologija, anjonska struja, hipoosmotska sredina, rast, disanje.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biofizika

UDK broj: 577.352.5: [582.281] (043.3)

Characterization of osmotically activated ion currents in the membrane of cytoplasmic droplets from *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff sporangiophores

Summary

Cytoplasmic droplet membrane obtained from growing sporangiophore of fungus *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff is one out of two known experimental models for electrophysiological exploration of plasma membrane properties of filamentous fungi (the other being *Neurospora crassa* slime mutant). At least 20 % of cytoplasmic droplets forms cell wall after 2 h, confirming that their membrane corresponds functionally to hyphal plasma membrane. This is the first patch-clamp registration in *whole cell* configuration obtained on cytoplasmic droplet membrane model system. This configuration gives insight into types and properties of dominant ion currents present on membrane under investigation. The membrane response to hypoosmotic stimuli, performed by whole droplet dialysis by hyperosmotic solution, is characterised in detail. In contrast to family of currents under isoosmotic conditions, that are dominated by passive membrane properties and small conductances, under hypoosmotic conditions there is prominent outwardly rectified fast-inactivating instantaneous current (ORIC) that is activated at depolarised potentials. In addition to ORIC that was present in every droplet examined (with average maximal current density at +70 mV = 129 ± 14 pA/pF (n=30)), in 73% of obtained responses there was noticeable an additional current, slowly activating inward current, current density at -150 mV = 99 ± 11 pA/pF (n=22). The inward current was not examined in more detail.

IRIS is true osmotically activated current according to following properties: 1. Its osmotic sensitivity is dose-dependent; 2. It shuts down immediately upon change from hypoosmotic to hyperosmotic environment. IRIS is clearly different from other known fungal ion channels, but shares a number of features with vertebrate VRAC (volume regulated anionic channel): 1. activation under conditions of osmotically induced volume increase; 2. moderate outward rectification with gate charge $z_g = 0.82 \pm 0.1$; 3. time- and voltage-dependent inactivation at positive potentials and recovery from inactivation at negative potentials; 4. distinct selectivity for anions over cations, with characteristic permeability sequence corresponding to Aismann series I ($\Gamma: \text{Cl}^- : \text{HCO}_3^- : \text{glukonat}^- : \text{glutamat}^- = 1.4: 1: 0.25: 0.01: 0.088$); 5. time dependent current shut down that is slowed down by intracellular ATP; 6. activation by unhydrolyzable

GTP analogs under isoosmotic conditions, pointing to ORIC being activated through GTP-dependent cascade; 7. decrease of current in the presence of intracellular magnesium ions.

Pharmacological characterization shows that DIDS, known anion channel blocker, is not effective on ORIC. ORIC is inhibited by niflumic acid (0.5 mM concentration induces $79 \pm 5\%$ block of maximal current (n=4)) and by A9C (1 mM A9C blocks $68 \pm 5\%$ maximal current (n=5)).

We have recorded changes of cytoplasmic droplet diameter under 45 mOsm hypoosmotic challenge and found that droplets diameter increased by $8 \pm 4\%$ (n = 4). No measurable regulatory volume decrease has been found, probably due to ineffective hypoosmotic stimulation.

Taking into consideration that ORIC is present on the membrane of cytoplasmic droplets obtained from growing sporangiophores, the effect of ORIC blockers on micelia growth was tested. It was found that blockers inhibit growth: niflumic acid was more efficient inhibitor ($IC_{50} = 23 \mu\text{M}$) than A9C ($IC_{50} = 130 \mu\text{M}$). Respiration measurements have shown that both blockers have strong inhibitory effect on micelia respiration (niflumic acid $IC_{50} = 50 \mu\text{M}$; A9C $IC_{50} = 142 \mu\text{M}$). Both blockers induced a decrease in ATP concentration (with 2 mM A9C, there was 91% decrease). Additionally, A9C induced a pH shift (in cytosol and in vacuole as well), and that was not observed with niflumic acid application. Mechanisms of these processes have not been elucidated yet, but it seems that there is a clear connection between energetic metabolism and ORIC activity. Further studies of ORIC activation and regulation mechanisms, as well as their comparison with VRAC regulation, should be enabling for better understanding of ORIC role in filamentous fungus physiology.

Keywords: *Phycomyces blakesleeanus*, electrophysiology, anionic current, hypoosmotic condition, growth, respiration.

Scientific field: Biology

Narrow scientific field: Biophysics

UDK number: 577.352.5: [582.281] (043.3)

SKRAĆENICE

ATP – adenozin trifosfat

GTP – guanozin trifosfat

DIDS – 4,4'-diizotiocijanatosilben-2,2'-disulfonska kiselina – natrijum hidratna so

NFK – niflumična kiselina

A9C – antracen-9-karboksilna kiselina

RSZ – regulatorno smanjenje zapremine

RPZ – regulatorno povećanje zapremine

VRAC (*volume regulated anion channel/current*) – anjonski/a kanal/struja regulisan/a zapreminom ćelije

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

NPPB – 5-nitro-2-(3-fenilpropil-amino) benziočna kiselina

GTP γ S-Li₄ - guanozin 5'-(γ -tio)-trifosfat tetralitijumska so

SVP – standardni voltažni protokol

IP- inaktivacioni protokol

SVR – standardni vanćelijski rastvor

SUR – standardni unutarćelijski rastvor

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Jonski kanali i njihova uloga u ćeliji.....	1
1.2. Omoregulacija – ćelijski nivo.....	2
1.3. Mehanosenzitivni jonski kanali.....	5
1.4. Anjonski kanal regulisan zapreminom ćelije (VRAC) – karakteristike i fiziološka uloga	7
1.4.1. Molekularni kandidati za VRAC.....	8
1.4.2. Biofizičke karakteristike	12
1.4.3. Mehanizmi aktivacije i modulacije rada VRAC.....	13
1.4.4. Signalni mehanizmi uključeni u aktivaciju VRAC-a.....	14
1.4.5. Farmakologija VRAC.....	15
1.5. Osmotski aktivirane struje Recijusovih neurona pijavice i neurona kičmenjaka.....	15
1.6. Osmoregulacija kod gljiva i uloga jonskih kanala u osmoregulaciji	17
1.6.1. Odgovor ćelije pekarskog kvasca na promenu osmotskih uslova sredine.....	17
1.6.2. Osmoregulacija kod končastih gljiva.....	21
1.7. Specifičnosti ispitivanja aktivnosti jonskih kanala na gljivama	22
1.8. Gljive	25
1.9. <i>Phycomyces blakesleeanus</i> - model sistem za izučavanje membranskog transporta kod filamentoznih gljiva.....	27
1.9.1. Citoplazmatske kapi izolovane iz sporangiofora.....	27
2. CILJ RADA	30
3. MATERIJAL I METODE	31
3.1. Eksperimentalni objekat - priprema koncentrovanih štokova spora.....	31
3.2. Eksperimenti nametnute voltaže na deliću membrane – <i>patch clamp</i> eksperimenti.....	32
3.2.1 Gajenje eksperimentalnog objekta.....	32
3.2.2. Citoplazmatske kapi gljive <i>P. blakesleeanus</i> kao model sistem za ispitivanje jonskih kanala kod filamentoznih gljiva.....	32
3.2.3. Pripema citoplazmatskih kapi.....	33

3.2.4 Eksperimenti nametnute voltaže na deliću membrane u konfiguraciji <i>cela ćelija</i>	34
3.2.5. Voltažni protokoli, analiza rezultata i statistička obrada podataka.....	35
3.3. Rastvori i hemikalije korišćeni u eksperimentalnom radu.....	38
3.3.1. Rastvori	38
3.3.2 Hemikalije	40
3.4. Bojenje ćelijskog zida i merenje prečnika citoplazmatskih kapi u eksperimentima akutne promene osmotskih uslova.....	41
3.5. Merenja prinosa biomase – testovi toksičnosti	41
3.6 Eksperimenti na kiseoničnoj elektrodi.....	43
3.7. NMR eksperimenti	44
4. REZULTATI	46
4.1. Citoplazmatske kapi imaju sposobnost sinteze ćelijskog zida	46
4.2. Struje u konfiguraciji <i>cela ćelija</i> registrovane u uslovima osmotski indukovnog porasta zapremine	47
4.3. Izlazno ispravljena inaktivirajuća struja se smanjuje tokom vremena	49
4.4. IRIS je osmotski aktivirana struja	51
4.5. IRIS je voltažno zavisna jonska struja.....	54
4.6. Jonska osnova i selektivnost IRIS-a	57
4.7 IRIS blokiraju A9C i NFK.....	61
4.8. Efekti intracelularnog ATP i jona Mg^{2+}	62
4.9. GTP γ S aktivira IRIS.....	68
4.9.1 Struja aktivirana GTP γ S-om – amplituda, vremenska dinamika i jonska osnova	68
4.9.2 Voltažno zavisne karakteristike struje aktivirane GTP γ S-om.....	71
4.10 Blokatori IRIS-a zaustavljaju rast micelijuma gljive.....	72
4.10. Uticaj blokatora IRIS-a na disanje micelijuma gljive	75
5. DISKUSIJA	79
5.1. Karakterizacija membrane citoplazmatskih kapi dobijenih iz sporangiofore <i>P. blakesleanus</i>	79
5.2. Karakterizacija izlazno ispravljene brzoinaktivirajuće trenutna struje – IRIS	81

5.3. Regulacija aktivnosti IRIS je vrlo slična regulaciji VRAC u sisarskim ćelijama	84
5.4. Delovanje niflumične kiseline i antracen- 9- karboksilne kiseline na rast i energetske metabolizam micelijuma gljive <i>P. blakesleeanus</i>	86
6. ZAKLJUČCI.....	91
7. LITERATURA	93

1. UVOD

1.1. Jonski kanali i njihova uloga u ćeliji

Ćelije svih organizama se nalaze u manje ili više dinamičnim sredinama na čije izazove neprekidno odgovaraju i sa kojima su u tesnoj interakciji u cilju obezbeđivanja neophodnih uslova za svoje funkcionisanje. U promenljivim sredinama, najveći je izazov održati ćelijsku homeostazu a istovremeno obezbediti uslove za odvijanje svih procesa koji čine život. Zato su, između ostalog, ćelije prinuđene da neprekidno kontrolišu i održavaju sve svoje fundamentalne karakteristike, među kojima su svakako i oblik, ćelijska površina, zapremina i unutarćelijski hidrostatički pritisak (količinu vode u ćeliji). U ovim životno važnim procesima, odgovarajuće pravovremene reakcije na promene u spoljašnjoj sredini su od ključnog značaja, a prva na udaru u amortizaciji spoljnih promena i obezbeđivanju adekvatnih reakcija na spoljašnje signale je ćelijska membrana, koja okružuje svaku ćeliju i daje joj celovitost i nezavisnost. U sastav ćelijske membrane ulaze proteini čije su uloge raznovrsne, a za komunikaciju između spoljne i unutrašnje sredine među njima su zaduženi receptori, transporteri, pumpe i jonski kanali.

Osnovna uloga kanala na plazma membrani je da omogućuju komunikaciju ćelija sa vanćelijskom sredinom. Do danas je okarakterisan ogroman broj, funkcionalno veoma raznolikih jonskih kanala koji su integralni deo membrana ćelija od arhea i bakterija do eukariota. Njihova aktivnost leži u osnovi brojnih fizioloških procesa u ovim organizmima. To su transmembranski proteini koji obrazuju hidrofilnu poru kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane, kroz koju se može vršiti brz pasivni transport jona sa mesta višeg ka mestu nižeg elektrohemijskog gradijenta. Većina kanala je specijalizovana za prenos samo određene vrste jona, ali je utvrđeno da veliki broj kanala može, uz manju ili veću selektivnost, propuštati različite jonske vrste. Kao i sve proteine, i jonske kanale karakteriše odgovarajući prostorni raspored aminokiselina koje čine njihov polipeptidni lanac, odnosno određena konformacija. Kanali se mogu naći u dve osnovne konformacije: jednoj u kojoj joni nesmetano prolaze kroz poru i koju nazivamo otvoreno stanje kanala, i u drugoj, u kojoj je njihovo kretanje onemogućeno i označavamo je kao zatvoreno stanje. Do promene stanja kanala dolazi nakon

brze konformacione promene proteina koji ulaze u njegov sastav. Ova promena može biti izazvana na nekoliko načina na osnovu kojih i kanale svrstavamo u različite grupe:

1. Ligand-zavisni kanali - menjaju konformaciju vezivanjem odgovarajućeg vanćelijskog liganda za receptorsko mesto;
2. Voltažno-zavisni kanali - promenom membranskog potencijala;
3. Jonski kanali zavisni od sekundarnih glasnika - vezivanjem unutarćelijskog liganda za receptorsko mesto;
4. Mehanosenzitivni kanali - konformaciju menjaju pod dejstvom mehaničkog stimulusa: istezanje, pritisak, pomeranje.

Slobodno se može reći da jonske kanale karakteriše ogromna raznovrsnost, kako po pitanju strukture, tako i po pitanju funkcije.

U svom aktivnom stanju, jonski kanal predstavlja put za brz (više od 10^6 jona/sekundi) prolaz jona kroz membranu. Tokom prolaska kroz kanal, aminokiselinske sekvence peptida u sastavu kanala stupaju u interakciju sa jonima. Jonska selektivnost (odnosno odabir vrste jona koji mogu da prođu kroz kanal) i konduktivnost (brzina kojom joni prolaze) su osnovne karakteristike permeabilnosti svakog tipa kanala.

Jonski kanal najčešće karakteriše postojanje vratnice (kapije), koja omogućava otvaranje u odgovoru na stimulus: deo kanala prima stimulus, menja se konformacija, dolazi do strukturnog rearanžmana aminokiselinskih grupa i rezultujućeg otvaranja kapije. Odgovor na stimulus se završava zatvaranjem kapije ili novim strukturnim rearanžmanom delova kanala posle kojeg je kanal neko vreme neosetljiv na dalju stimulaciju. Ovaj proces, kojim kanali postaju neosetljivi na primenjeni stimulus naziva se inaktivacija (ili desenzitizacija kod ligand zavisnih jonskih kanala).

1.2. Omoregulacija – ćelijski nivo

Sve ćelije, pa i individualne ćelije višćelijskih organizama, sposobne su da osećaju, reaguju i adaptiraju se na promene u „aktivnosti“ vode u svojoj okolini (Hohmann, 2015). Osmoregulacija je proces kojim ćelija održava i vraća svoju zapreminu na početni nivo nakon

njene promene, reguliše turgor i omogućava nesmetano odvijanje svojih bioloških aktivnosti (*Nevoigt and Stahl, 1997*). Brojni procesi i karakteristike ćelija su direktno ili indirektno zavisni od ćelijske zapremine i količine vode u citoplazmi: rast i proliferacija, promene oblika ćelije, membranski transport, metabolizam, nekroza i apoptoza, međućelijske komunikacije posredstvom hormona, komunikacije između neurona, migracije ćelija, njihova ishrana i dr (*Hoffmann et al., 2006; Wehner et al., 2003*). Još u veoma ranoj evoluciji života, prve ćelije (protoćelije) suočene su sa problemom održavanja svoje zapremine pa su se i prva rešenja ovog problema, evolutivno gledano, pojavila veoma rano (*Morris, 2002*). Pošto je plazma membrana visokopropustljiva za vodu, razlike u osmotskim pritiscima između unutarćelijske i vanćelijske sredine dovode do kretanja vode *u* ili *van* ćelije, što za posledicu ima povećanje odnosno smanjenje njene zapremine. Tako je problem održavanja ćelijske zapremine unutar određenog opsega zapravo sveden na problem regulisanja protoka vode u željenom smeru, a on prvenstveno zavisi od razlike u osmotskom pritisku između dve strane plazma membrane. Pošto je osmotski pritisak direktno proporcionalan koncentraciji rastvorene osmotski aktivne supstance (osmolita), strategija koju su ćelije razvile da regulišu tok vode, a samim tim i svoju zapreminu, zasnovana je na regulaciji koncentracije osmolita u ćeliji. U principu, ćelije povećavaju nivo unutarćelijskih osmolita kako bi odgovorile na povećan osmotski pritisak spoljašnje sredine i sprečile gubitak vode i obratno. Generalno gledano, u adaptivnim reakcijama, ćelije kao odgovarajući osmolit koriste samo nekoliko tipova jedinjenja: 1) jone; 2) aminokiseline; 3) polihidroksilna jedinjenja (*Nevoigt and Stahl, 1997*). Uloga jona i jonskog transporta u ovim procesima je kod sisarskih ćelija detaljno proučena i kako se pokazalo, gotovo ključna, dok je kod biljaka, gljiva i mikroorganizama ona daleko manje istražena (*Suescun-Bolivar and Thome, 2015*).

Primarna reakcija ćelija na promenjene osmotske uslove jeste detekcija promene preko osmosenzora i uključivanje regulatornih mehanizama membrane koji se suprotstavljaju nastaloj promeni u cilju održavanja jednake količine vode u ćeliji. Načini na koji ćelije detektuju promene osmolariteta unutrašnje i spoljne sredine su još uvek predmet proučavanja, ali se smatra da postoje tri osnovna molekularna mehanizma kojima ćelija detektuje osmotske promene (*Haswell and Verslues, 2015*): 1) osmotska neravnoteža sa dve strane ćelijske membrane može biti detektovana transmembranskim proteinima čiji unutarćelijski domeni poseduju histidin kinaznu aktivnost a čija konformacija se menja nakon osmotske promene vanćelijske sredine (*Parsegian et al., 1995*) (za ovakve načine detekcije nema dovoljno dokaza; čak se i za SLN1 histidin kinazu kvasca mislilo da funkcioniše ovako ali novi dokazi

ne idu u prilog ovom mišljenju (*Saito and Posas, 2012*)); 2) povećanje tenzije ćelijske membrane usled osmotskih promena koje dovode do istežanja membrane (hiposmotski stimulus uzrokuje povećanje ćelijske zapremine koje dovodi do ove pojave, a hiperosmotski stimulus uzrokuje plazmolizu nakon koje se usled skupljanja protoplasta istežu delovi membrane inicijalno pričvršćeni za vanćelijsku sredinu; promene napetosti ćelijske membrane detektuju mehanosenzitivni (MS) jonski kanali koji se na ovaj način aktiviraju/deaktiviraju; 3) promene u vezama između ćelijskog zida i membrane koje detektuju adhezioni kompleksi ili proteini koji uspostavljaju direktnu zid-membrana vezu (*Knepper et al., 2011; Kohorn and Kohorn, 2012*). Male promene količine vode u ćeliji, izazvane promenom osmotskog potencijala *u* ili *van* ćelije, značajno utiču na membransku tenziju, dovodeći do istežanja ili skupljanja ćelijske membrane (*Zonia and Munnik, 2007*). Pored toga, već umeren gubitak vode dovodi do makromolekularnog „nagomilavanja“ što za posledicu ima ograničenu slobodnu difuziju molekula i na kraju usporavanje ćelijskih molekularnih procesa (*Wood, 2011; Mika and Poolman, 2011*). Imajući i ovo u vidu, osmoregulacija nije samo kritična za ćelijski oblik, turgor i morfogenezu, već obezbeđuje i optimalno okruženje za unutarćelijsku dinamiku. Ipak, inicijalni stimuli koje ćelija prepoznaje kao osmotski stres su još uvek nedovoljno jasni (*Poolman et al., 2002; Wood, 2011; Hohmann, 2015*). Poznati osmosenzori su obično transmembranski proteini koji prate istežanje/krivljenje ćelijske membrane i promene interakcija između membrane i ćelijskog zida. Osim njih, postoje i unutarćelijske osmosenzitivne histidin kinaze kakve su npr. pronađene kod nekih gljiva (*Meena et al., 2010*). Moguće je da su stimuli koje ovi proteini osećaju upravo povezani za makromolekularno nagomilavanje i/ili ograničenja u slobodnoj difuziji molekula.

Opisane membranske promene se dešavaju već nakon nekoliko sekundi od pojave osmotske perturbacije i za 1-10 minuta indukuju pojavu jonskih flukseva kroz ćelijsku membranu, koji su detektovani kako u životinjskim tako i u biljnim i ćelijama gljiva (*Wehner et al., 2003; Shabala and Lew, 2002; Lew et al., 2006*). Aktivirani jonski fluksevi teže da vrate osmotski potencijal sa dve strane membrane na početnu vrednost, što prati tok vode ka mestu višeg osmotskog pritiska a to konačno dovodi do promene zapremine ćelije. Tako, spoljašnji hiperosmotski stimulus koji dovodi do gubitka vode iz ćelije i smanjenja ćelijske zapremine, indukuje influks jona Na^+ , K^+ i Cl^- a efluks H^+ iz ćelije što uzrokuje vraćanje vode u ćeliju i povećanje ćelijske zapremine (tzv. Regulatorno Povećanje Zapremine (RPZ)). Sa druge strane, hiposmotski indukovano povećanje ćelijske zapremine aktivira efluks K^+ i Cl^- a

influks H^+ u ćeliju, što dovodi do izlaska vode iz ćelije i posledičnog smanjenja ćelijske zapremine (proces koji je označen kao Regulatorno Smanjenje Zapremine (RSZ)) (Zonia and Munnik, 2007).

Sekundarni odgovor na promene ćelijske zapremine uključuje aktivaciju nishodnih signalnih puteva koji utiču na brojne ćelijske funkcije (Wehner et al., 2003; Zonia and Munnik, 2004; Zonia and Munnik, 2005). Osmotski stres dovodi do porasta nivoa signalnih lipida (fosfatidilinozitol-bisfosfata i fosfatidinske kiseline), kako kod biljaka tako i kod životinja (Zonia and Munnik, 2007). Zatim dolazi do aktivacije MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinase*) kaskada i indukcije ekspresije gena. Promene zapremine ćelije direktno utiču i na organizaciju citoskeleta a Rho GTP-aze su glavna tačka konvergencije signala koji stižu iz membrane i citoskeletne organizacije. U ćelijama životinja Rho GTP-aze su regulisane zapreminom ćelije i jonskom jačinom citosola (Eggermont, 2003; Di Ciano-Oliveira et al., 2006). Tačan mehanizam aktivacije ovih GTP-aza promenom ćelijskog volumena još uvek se istražuje (Zonia and Munnik, 2007).

1.3. Mehanosenzitivni jonski kanali

Zastupljenost mehanosenzitivnih (MS) jonskih kanala kod *Archea*, *Bacteria* i *Eukarya* ustoličila je danas preovlađujuće mišljenje da je u pitanju evolutivno veoma stara grupa kanala, čiji se predak javio na samim počecima razvoja života. Smatra se da je mehanotransdukcija stara oko 3,8 milijardi godina, podjednako koliko su stare i prve životne forme (Martinac, 2012), što je dalo dovoljno vremena da se razvije velika raznovrsnost funkcija kod ove grupe kanala (Martinac and Kloda, 2003). Na osnovu onoga što o njima danas znamo, može se reći da su veoma raznorodni u pogledu selektivnosti, provodljivosti, voltažne zavisnosti i drugih funkcionalnih osobina i zapravo im je jedina zajednička osobina, da ih aktiviraju mehanički stimulusi. Od njihovog otkrića u ćelijama skeletnih mišića embriona pileta (Guhary and Sachs, 1984) i mišićnim ćelijama žabe (Brehm et al., 1984), otkriveni su u jako velikom broju različitih tipova ćelija (Morris, 1990; Martinac, 1993), a izučavanje ovih kanala je prešlo dug put: od iznenađujućeg otkrića, preko dileme oko njihovog postojanja (Morris and Horn, 1991), sve do molekularne identifikacije (Sukharev et al., 1994; Levina et al., 1999; Patel et al., 1998) i strukturne karakterizacije (Chang et al., 1998; Bass et al., 2002; Brohawn et al., 2012). Ipak, u poređenju sa ligand-zavisnim ili

voltažno-zavisnim jonskim kanalima, o MS kanalima se još uvek zna malo (Martinac, 2012). Najveće nepoznanice jesu mehanizam aktivacije i inaktivacije ovih kanala ali i mnogi detalji vezani za njihovu strukturu (Martinac, 2012). Danas se smatra da su MS kanali nastali kao prvobitni osmoregulatori, sposobni da registruju male promene u koncentraciji vode sa različitih strana membrane primordijalnih ćelija (Sachs, 1988; Kung and Saimi, 1995) i da je ova sposobnost kasnije uključena u funkciju regulacije ćelijske zapremine (Ubl et al., 1988; Christensen, 1987), ali i ostale, specijalizovanije oblike mehanotransdukcije (npr. kod gravitropizma) (Pickard and Ding, 1992). Najintenzivnije proučavani MS kanali su tri kanala u membrani bakterije *Escherichia coli*: MscL (eng. *large* – veliki), MscS/MscK (eng. *small/K⁺* - mali/K⁺) i MscM (mini) (Martinac et al., 1987; Martinac et al., 1992; Zoratti and Ghazi, 1993; Martinac, 2001; Strop et al., 2003; Martinac, 2011), nazvani ovako po svojoj jediničnoj provodljivosti od ~3 ns, ~1 nS, ~0.3 nS (Berrier et al., 1996). Međutim, detaljno su ispitivani i kod brojnih drugih *Bacteria* i *Archea* (Le Dain et al., 1998; Kloda and Martinac, 2002) kao i *Eukarya* (Hamill and Martinac, 2001). Kod životinja MS jonski kanali funkcionišu kao molekularni prenosiooci mehaničkih stimulusa u čulima sluha i dodira, pritiska u krvnim sudovima, regulaciji ćelijskog volumena ali i membranski-indukovanoj stimulaciji ćelija u procesima razvića (Martinac and Kloda, 2011; Nilius, 2007; Chalfie, 2009; Hamill and Martinac, 2001). Kod biljaka su otkriveni MS kanali uključeni u percepciju i regulaciju ćelijskog volumena (Qi et al., 2004; Roberts, 2006), veličine plastida (Haswell and Meyerowitz, 2006), ali i MS kanali zaduženi za influks kalcijuma u vrh rastuće polenove cevi (Dutta and Robinson, 2004). MS jonski kanali otkriveni su i kod gljiva. Identifikovani su u ćelijskoj membrani *Saccharomyces cerevisie* (Gustin et al, 1988), *Schizosaccharomyces plombe* (kvasac iz *Ascomycota*) (Zhou and Kung, 1992), kao i pasuljeve rđe - *Uromyces appendiculatus* (*Basidiomycota*) (Zhou et al., 1991). Ove kanale aktivira istežanje membrane (eng. *stretch*), a inhibira ih jon lantanoida gadolinijuma, Gd³⁺. Međutim, među njima postoje i značajne razlike. Tako kanal kod *S. cerevisie* karakteriše provodljivost od 35 pS, veća aktivnost pri depolarizaciji membrane i slaba diskriminacija između katjona i anjona (P_{K⁺}/P_{Cl⁻} = 1,6), kanal kod *S. plombe* karakteriše provodljivost od 180 pS, veća aktivnost pri hiperpolarizaciji membrane i veća selektivnost za katjone u odnosu na anjone (P_{K⁺}/P_{Cl⁻} = 3,6), a MS kanal kod *U. appendiculatus* karakteriše najveća provodljivost (600 pS), najveća selektivnost za katjone (P_{K⁺}/P_{Cl⁻} = 19,3), kao i veća aktivnost pri depolarizaciji ćelijske membrane. Fiziološka uloga ovih kanala kod gljiva nije pokazana, mada se smatra da učestvuju u detekciji turgora i u odgovoru na njegove promene, verovatno propuštajući Ca²⁺ u ćeliju (Zhou and Kung, 1992).

Način na koji jonski kanali detektuju hipoosmotski šok dobro je proučen kod bakterija i sisara. U ćelijskim membranama bakterija nalaze se dva glavna mehanosenzitivna kanala – već pomenuti MscS i MscL. Oba kanala direktno aktivira istežanje ćelijske membrane izazvano povećanim turgorom i uključena su u osmoregulaciju preko oslobađanja unutarćelijskih osmolita – jona ili malih organskih jedinjenja (*Okada et al., 2002; Sukharev, 2002; Sukharev et al., 1994*). Sisarske ćelije su razvile drugačiji mehanizam: one povećavaju zapreminu u odgovoru na hipoosmotski stimulus, to indukuje porast intracelularnog Ca^{2+} , a zatim dolazi do aktivnog oporavka ćelijske zapremine – RSZ, što sprečava pucanje ćelija (*Okada and Maeno, 2001*). Čitav proces obuhvata i difuziju jona K^+ i Cl^- van ćelije kao i gubitak vode. Nedavna istraživanja su utvrdila da je porast kalcijuma posredovan nekim od članova TRP familije jonskih kanala, uključujući TRPV4 (*Becker et al., 2005*) i TRPM7 (*Numata et al., 2007*) lokalizovanih u ćelijskoj membrani. Sisarski TRP kanali mogu biti regulisani komponentama aktinskog citoskeleta, integrinima i tirozin-kinaznim receptorima, što ih bitno razlikuje od bakterijskih MS kanala (*Pedersen et al., 2011*).

Još jedna grupa jonskih kanala uključenih u osmoregulaciju jesu eukariotski MscS-slični kanali (MSS). Oni strukturno odgovaraju bakterijskom MscS kanalu po svom transmembranskom domenu (*Haswell, 2007*). Nisu detektovani kod sisara već samo kod eukariotskih ćelija sa ćelijskim zidom (biljke, gljive i protiste). Evolutivno gledano, pretpostavlja se da su geni za ove kanale nastali inkorporacijom bakterijskog mscS gena u genome predaka ovih eukariota. Kod biljaka su inkorporirani u membrane hloroplasta dok su u ćelijama gljiva nađeni u membranama endoplazmatičnog retikuluma (ER) (*Nakayama and Iida, 2014*).

1.4. Anjonski kanal regulisan zapreminom ćelije (VRAC) – karakteristike i fiziološka uloga

Razmatranje pitanja jonskih kanala čija je osnovna uloga regulacija zapremine ćelija je istorijski gledano veoma zanimljiva priča o neuhvatljivoj molekularnoj prirodi ovih proteina, ključnih za opstanak ćelija svih živih bića. 2014. godine, nakon dvodecenijskog traganja za ovim kanalima, napokon je dat odgovor na ovo dugo otvoreno pitanje. Ono što je karakterisalo dugu potragu i delom je izdvojilo u odnosu na druge slične, jeste to što su struje čija je molekularna osnova tražena bile prisutne gotovo na svakom ispitanom tipu ćelija.

Prva istraživanja koja su pokazala da osmotski indukovano povećanje ćelijske zapremine može aktivirati transport jona kroz ćelijsku membranu obavljena su krajem sedamdesetih godina 20.veka na ćelijama Erlihovog ascitesnog tumora (*Hoffmann, 1978; Hoffman et al., 1979*) i ljudskim limfocitima početkom osamdesetih (*Grinstein et al., 1982a,b; Sarkadi et al., 1984*). Nekoliko godina kasnije, dve grupe istraživača, gotovo istovremeno opisuju anjonske struje regulisane zapreminom ćelije (*Cahalan and Lewis, 1988; Hazama and Okada, 1988*). Ove studije, sprovedene na humanim T limfocitima i intestinalnim epitelijalnim ćelijama, pokazale su da primena hipotoničnih stimulusa aktivira izlazno rektifikovanu Cl⁻ struju čija inhibicija koincidira sa inhibicijom RSZ. Zatim je ova struja identifikovana i na još nekoliko tipova ćelija, među kojima su hromafine ćelije, a nestacionarnom fluktuacionom analizom je prvi put procenjena i jedinična provodljivost jonskih kanala na negativnim potencijalima u osnovi ovih struja (*Doroshenko et al., 1991; Doroshenko and Neher, 1992*).

1.4.1. Molekularni kandidati za VRAC

Od kako su anjonske struje regulisane zapreminom ćelije elektrofiziološki okarakterisane, obavljana su brojna istraživanja kako bi se pronašli jonski kanali koji se nalaze u njihovoj osnovi. Osnovni problemi proizlazili su iz nemogućnosti pronalaženja visokoafinitetnog liganda za ove kanale ali i činjenice da je dugo bilo nemoguće naći ćelijsku liniju koja ne aktivira ove struje hipoosmotskom stimulacijom. Dodatno otežavajuća okolnost bili su i stimulišući efekti heterologe ekspresije proteina na aktivaciju endogenih anjonskih struja oocita žabe *Xenopus laevis*, inače uobičajenog sistema za heterologu ekspresiju gena za jonske kanale. Usled svega navedenog, bilo je teško doći do saznanja o tome koji proteini predstavljaju molekularni osnov ovih struja pa je do definitivnog rešenja ove misterije tokom protekle tri decenije bilo predstavljeno više molekularnih kandidata.

Tokom višegodišnje potrage za VRAC kanalom kao mogući kandidati su predlagani: anjonski izmenjivač AE1 Cl⁻/HCO₃⁻ (*Haynes and Goldstein, 1993*); transmembranski protein fosfoleman (FXFD regulator transporta, najverovatnije regulator Na⁺/K⁺ ATP-aze) (*Moorman et al., 1995; Moorman and Jones, 1998*); zatim voltažno zavisni anjonski kanal VDAC (eng. *voltage dependent anion channel*), porin u spoljašnjoj membrani mitohondrija (*Dermietzel et al., 1994*); p64 CLIC1 (*Redhead et al., 1992*) - inače unutraćelijski Cl⁻ kanal sa još uvek nedefinisanim ulogom u ćeliji. Međutim, nijedan od predloženih kandidata nije imao karakteristike koje su u potpunosti odgovarale opisanim strujama VRAC-a. Pre

nekoliko godina, kod voćne mušice, *Drosophila melanogaster*, opisan je još jedan potencijalni kandidat za ovaj kanal – bestrofin 1 (Chien and Hartzell, 2007). Ipak, već 2008. godine je pokazano da su VRAC struje očuvane kod makrofaga duplih *knockout* miševa za ovaj gen (Chien and Hartzell, 2008). Samo godinu dana kasnije, TMEM16A (Almacá et al., 2009) predložen je kao novi potencijalni kandidat za VRAC ali je ispoljavao potpuno drugačiju osetljivost na Ca^{2+} . Na kraju je i TMEM16F razmatran kao potencijalni kandidat, ali je i pored toga što je u prisustvu Ca^{2+} učestvovao u regulaciji zapremine ćelije i on odbačen (Shimizu et al., 2013). Najzad, 2014. godine, gotovo istovremeno, dve grupe istraživača su došle do identičnog otkrića o prirodi VRAC-a (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014) i identifikovale su protein LRRC8A (*Leucine-rich repeat containing 8A*) kao neophodnu komponentu VRAC-a. Qiu i saradnici su označili ovaj protein kao SWELL1. Familija proteina LRRC8 se sastoji od pet članova koji sadrže do 17 leucinom bogatih ponovaka, imaju molekulska masa od oko 95 kDa i sastoje se od oko 800 aminokiselinskih jedinica (Abascal and Zardoya, 2012). Izgleda da ovi proteini imaju zajedničkog pretka sa paneksinima sa kojima dele slabu homologiju u transmembranskom domenu. Na osnovu ovoga, moguće je da i oni formiraju heksamernu kanale, poput paneksina (Abascal and Zardoya, 2012). Obe grupe su ustanovile i da LRRC8A posreduje u bubrenjem-aktiviranom efluksu taurina, u kojem učestvuje VRAC, a pokazano je i da je *knockdown* LRRC8 gena jednako efikasan kao blok DCPIB-om. Pored svega ovoga, obe studije nisu ustanovile vezu preostale četiri izoforme ovog proteina, LRRC8B-E i VRAC struje, ali je pokazano da je osim izoforme A bar još jedna neophodna kako bi se kompletirao funkcionalan jonski kanal (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014). U prilog svemu navedenom takođe ide i to što je LRRC8 veoma široko eksprimiran protein, lokalizovan u plazma membrani (Qiu et al., 2014; Voss et al., 2014), kao i to da LRRC8A-posredovane struje učestvuju u RSZ kod HeLa ćelija (Qiu et al., 2014). Struje posredovane proteinom LRRC8A ne aktiviraju se samo porastom ćelijske zapremine već i izovolumetrijski, smanjenjem intracelularne jonske jačine (Qiu et al., 2014).

U obe studije je skeniran ukupan genom čoveka upotrebom malih interferirajućih RNK molekula – siRNA (*small interfering RNA*). Svaka grupa je targetirala preko 20.000 gena iz genomske biblioteke kako bi im smanjila ekspresiju i obe grupe su došle do jednog, identičnog gena, inače do tada nepoznate funkcije (LRRC8A tj. SWELL1). Pokazali su da smanjen nivo ekspresije ovog gena dovodi do redukcije VRAC struja u nekoliko tipova ćelija. Izgleda da heteromeri koji sadrže LRRC8A/D dominiraju pri procesima oslobađanja nenaelektrisanih osmolita (kao što su taurin i mio-inozitol), dok su za prolazak naelektrisanih

osmolita (kao što je aspartat) potrebni kanali koji sadrže LRRC8A/C/E subjedinice (*Schober et al., 2017*).

Voltažno zavisni hlorni kanal 3 (CIC-3)

Kada je u pitanju regulacija volumena, CIC-3 je kanal o kojem se dosta raspravljalo. Međutim, njegova uloga u ovom procesu, ali i funkcionisanje kao kanala je osporena. Prvi put je opisan 1997. godine (*Duan et al., 1997*) kao Cl^- kanal osetljiv na promenu zapremine ćelije sa biofizičkim i farmakološkim karakteristikama sličnim $I_{\text{Cl,swell}}$, što je bilo iznenađujuće imajući u vidu do tada opisane druge kanale iz ove familije (CIC-1 i -2) (*Jentsch et al., 2002; Jentsch 2008; Jentsch et al., 2005*). Ipak, ubrzo su ovi podaci odbačeni, pošto je bilo teško da druge grupe efikasno izvrše heterologu ekspresiju CIC-3 kanala, a kada su je obavili ustanovili su drugačija biofizička svojstva (*Friedrich et al., 1999; Zhao et al., 2007; Li et al., 2000*). Kasnije je objašnjeno da ove razlike potiču od različitih splajs-varijanti istog proteina (*Shimada et al., 2000*). Konačno, miševi sa nefunkcionalnim genom za CIC-3 nisu pokazali nikakvu razliku u $I_{\text{Cl,swell}}$ strujama (*Arreola et al., 2002; Gong et al., 2004; Yamamoto-Mizuma et al., 2004; Wang et al., 2005*). Iako su Hume i saradnici (*Duan et al., 1997*), kasnije objasnili ove rezultate kompenzatornim mehanizmima (*Yamamoto-Mizuma et al., 2004*) i pronašli funkcionalne fenotipove srčanih ćelija iz uslovnih nok-aut miševa (*Xiong et al., 2009*), svi pokazani rezultati odbacili su CIC-3 kao odgovornu komponentu za $I_{\text{Cl,swell}}$ struje. Definitivni argumenti protiv ključne uloge CIC-3 kanala u regulaciji ćelijske zapremine dati su u radovima koji su pokazali da je CIC-3 verovatnije unutarćelijski Cl^-/H^+ izmenjivač, poput njemu najbližih članova familije voltažno zavisnih hlornih kanala (CIC-4 i 5) (*Jentsch et al., 2002; Jentsch 2008; Jentsch et al., 2005*). Iz studija na srčanim (*McCloskey et al., 2007; Xiong et al., 2008*), glatkim mišićnim (*Zhou et al., 2005*) i ćelijama glioma (*Habela et al., 2008*), pokazano je da CIC-3 najverovatnije ima ulogu u regulaciji $I_{\text{Cl,swell}}$ struja kao i direktnu ulogu u osmoadaptaciji (*Bossus et al., 2013*). Regulacija $I_{\text{Cl,swell}}$ se izgleda obavlja preko funkcionalne veze CIC-3 i akvaporina-3, sa čijom ekspresijom korelira i ekspresija kanala (*Zhang et al., 2014*).

Voltažno zavisni hlorni kanal 2 (CIC-2)

CIC-2 je široko rasprostranjen Cl^- kanal i jedan je od prvih kloniranih hlornih kanala dokazano regulisan promenom zapremine ćelije (*Jentsch et al., 2008*). Kanal je ekspimiran i

okarakterisan u heterologom sistemu oocita žabe *Xenopus laevis* (Grunder et al., 1992) a zatim je u sisarskim ćelijama utvrđena njegova osetljivost na promenu ćelijske zapremine (Schwiebert et al., 1998; Xiong et al., 1999). Međutim, CIC-2 nije imao ista biofizička svojstva kao $I_{Cl,swell}$. Ovaj kanal karakteriše ulazna rektifikacija, voltažno zavisna aktivacija u hiperpolarizaciji i obrnuta selektivnost za halogene jone ($Cl^- > Br^- > I^-$) (Jentsch et al., 2002).

Intracelularni hlorni kanal 1 (CLIC1)

Sa biofizičke i biohemijske tačke gledišta, CLIC1 je jedan od najinteresantnijih kloniranih jonskih kanala. Predominantno se nalazi u citoplazmi ćelije kao solubilni protein koji nakon oksidacije dimerizuje, ugrađuje se u ćelijsku membranu i tu formira funkcionalan jonski kanal (Littler et al., 2004). CLIC1 karakteriše izlazna rektifikacija i sekvenca provodljivosti za halogene jone: $F^- > Cl^- > I^-$ (Valenzuela et al., 1997; Tonini et al., 2000). Samo u jednoj studiji je ispitivano njegovo učešće u regulaciji zapremine ćelije i tom prilikom je ustanovljeno da najverovatnije ne učestvuje u ovom procesu (Ducharme et al., 2007). Inhibitor CLIC1 kanala, indanilalkanoična kiselina-94 (eng. *Indanylalkanoic acid*, IAA-94) blokira i VRAC ali u veoma visokoj koncentraciji (Ducharme et al., 2007).

Bestrofin 1 (Best1)

Protein bestrofin je otkriven prilikom identifikovanja uzročnika jednog tipa nasledne makularne distrofije (monogenetska bolest oka) – bolesti koja se javlja rano u detinjstvu i dovodi do trajnog oštećenja vida. Mutacija u genu za ovaj protein uzrokuje pojavu žute pege u mrežnjači oka koja može značajno da redukuje vidno polje. Za protein bestrofin je utvrđeno je da predstavlja Cl^- kanal aktiviran jonima Ca^{2+} (Sun et al., 2002), a ubrzo je pokazano da pojedini članovi ove proteinske familije, hBest1 i mBest2, predstavljaju jonske kanale osetljive na promenu zapremine ćelije. Heterologom ekspresijom u HeLa, HEK293 i ARPE-19 ćelijama pokazano je da su ovi kanali inhibirani hiperosmotskim uslovima, dok je aktivaciju u hiposmotskim bilo teško utvrditi usled aktiviranja endogenih $I_{Cl,swell}$ struja ćelija u kojima su ovi jonski kanali ekspimirani (Fischmeister and Hartzell, 2005). Kod *Drosophila melanogaster* je utvrđeno postojanje dvojne regulacije aktivnosti ovog kanala: jonima Ca^{2+} i zapreminom ćelije (Chien and Hartzell, 2007). Za bestrofine je karakteristična selektivnost halogenih jona ($I^- > Br^- > Cl^-$) (Fischmeister and Hartzell, 2005). hBest1 karakteriše i voltažno zavisna inaktivacija na negativnim potencijalima i slaba izlazna

rektifikacija (*Sun et al., 2002*). Ekspresija ovih kanala je ograničena na specifična tkiva, što prilično ograničava fiziološki značaj ovih proteina u poređenju sa VRAC-om, ali treba imati u vidu i da ova familija nije još uvek dovoljno ispitana (*Hartzell et al., 2008*).

TMEM16A

Poslednja otkrivena familija Cl⁻ kanala su TMEM16 Cl⁻ kanali osetljivi na Ca²⁺. Ovu familiju su istovremeno opisale tri različite grupe autora (*Caputo et al., 2008; Schroeder et al., 2008; Yangetal, 2008*) a za TMEM16A je pretpostavljeno učešće u regulaciji zapremine ćelije nakon osmotskog rasta (*Almaca et al., 2009*). Međutim, karakteristike TMEM16A kanala ne odgovaraju poznatim osobinama I_{Cl,swell} struje (*Caputo et al, 2008; Schroeder et al., 2008; Yangetal, 2008*). Porast ćelijske zapremine i aktivacija Cl⁻ struja zavisnih od jona Ca²⁺ opisani su u različitim tipovima ćelija, naročito ćelijama epitela, ali ipak, TMEM16A, iako najverovatnije jeste odgovoran za regulaciju volumena u tim ćelijama, ne predstavlja sastavni deo konstitutivno prisutne I_{Cl,swell} struje.

1.4.2. Biofizičke karakteristike

Prva detaljnija biofizička karakterizacija struja regulisanih zapreminom ćelije objavljena je 1994 (*Nilius et al., 1994*). Osnovne biofizičke karakteristike VRAC-a opisane su detaljno na brojnim tipovima ćelija, kako na nivou čitavih ćelija, tako i na nivou pojedinačnih jonskih kanala. Struja se aktivira polako nakon hipotonične stimulacije ćelije spoljašnjim rastvorom i ispoljava umerenu izlaznu rektifikaciju kao posledicu voltažno-zavisnog povećanja provodljivosti pojedinačnih jonskih kanala (*Jackson and Strange, 1996; Nilius et al., 1997*). Tako, jedinična provodljivost ovih kanala iznosi 50-80 pS na pozitivnim, odnosno 10-20 pS na negativnim potencijalima membrane, što je opseg srednje provodljivosti jonskih kanala. Karakteristično za VRAC je da ispoljava voltažno zavisnu inaktivaciju na pozitivnim membranskim potencijalima kao i vremensku kinetiku inaktivacije zavisnu od van- i unutarćelijskog jonskog okruženja kao i veličine same struje (*Nilius et al., 1994; Nilius et al., 1997; Voets et al., 1997; Pedersen et al., 1998; Nilius and Droogmans, 2003*). Upravo zavisnost od ovako velikog broja faktora može biti objašnjenje razloga postojanja široke lepeze inaktivacionih kinetika kod različitih tipova ćelija. Inaktivacija se može primetiti i na nivou pojedinačnih kanala, kako je to pokazano na BC3H1 mioblastnim ćelijama (*Voets et al., 1997*). Anjonski kanal regulisan zapreminom ćelije ispoljava slabo-poljnu anjonsku

selektivnost (Ajsmanova anjonska sekvenca I) sa znatno većom provodljivošću za jodide nego za hloridne anjone. Kompletna sekvenca provodljivosti je: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{glicin} > \text{F}^- > \text{taurin} > \text{laktat}^- > \text{glukonat}^- > \text{glutamat}^- > \text{aspartat}^-$ (Nilius et al., 1994; Nilius et al., 1997; Nilius and Droogmans, 2001). Na osnovu fita relativnih permeabiliteta anjona u zavisnosti od njihovog Stokovog dijametra, veličina pore kanala procenjena je na oko 11 Å. Detaljnije je veličina pore ispitivana upotrebom 4-sulfonik-kaliks (n) arenkog anjona koja je pokazala da kaliks (4) arenki anjon prolazi a kaliks (6) aren blokira poru. To je značilo da su dimenzije pore oko 11 x 17 Å (Droogmans et al., 1999). Na osnovu ovih eksperimenata kasnije je objavljena i propustljivost VRAC-a za ATP (Hisadome et al., 2002). Ovakav jedinstven profil provodljivosti kanala važan je za ulogu ovog kanala u nesinaptičkoj ćelijskoj komunikaciji koja moduliše eksitabilnost i sinaptičku aktivnost neurona u mozgu. Osim što provodi hloride, VRAC provodi i aminokiseline kakve su taurin, glutamat ili aspartat (Kimmelberg et al. 1990; Banderali and Roy 1992; Jackson and Strange 1993; Hyzinski-Garcia et al. 2014).

1.4.3. Mehanizmi aktivacije i modulacije rada VRAC

Ekperimentalno, aktivacija VRAC-a je indukovana ćelijskim bubrenjem, ali je ustanovljeno da se ova struja može aktivirati i izovolumetrijski, redukovanjem unutarćelijske jonske jačine (Nilius et al., 1998; Sabirov et al., 2000; Voets et al., 1999). Pored toga, tokom apoptotskog stimulusa VRAC se takođe aktivira u odsustvu ćelijskog nadimanja, i dovodi do apoptotskog smanjenja zapremine (Maeno et al., 2000). Takođe, pokazano je da se VRAC može aktivirati izovolumetrijski prenosom signala preko purinergičkih i bradikininskih receptora (jedni bar delom uključuju prenos signala preko jona Ca^{2+} i fosforilacijom proteina (Mongin and Kimmelberg, 2002), a drugi su regulisani preko ROS i Ca^{2+} -skih nanodomena (Liu et al., 2009; Akita et al., 2011)). Pored opisanih načina, pokazano je da se VRAC može aktivirati izovolumetrijski upotrebom intracelularnog $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (Voets et al., 1998). Velike promene osmolariteta vanćelijske sredine su retke u fiziološkim uslovima kod kičmenjaka. Izovolumetrijski stimulusi, kakav je smanjenje unutarćelijske jonske snage tokom metaboličkih promena, na primer, sa te tačke gledišta mogu biti od mnogo većeg fiziološkog značaja. Interesantno je da tokom *whole cell patch clamp* eksperimenta, u kome je ćelija izložena hipotoničnom rastvoru, povećanje zapremine nikada ne prestaje, usled neprekidne dijalize rastvora kroz pipetu, iako je koncentracija osmolita konstantna. Zato se u ovakvim uslovima, zapremina ćelije ne može kontrolisati, ali unutarćelijska jonska jačina opada. Čini

se da aktivnost VRAC-a ne koreliše sa promenama volumena već sa opadanjem jonske jačine unutarćelijskog rastvora. I zaista, smanjenje jonske jačine u izoosmotskim uslovima ne dovodi do promene ćelijske zapremine ali rezultuje aktivnošću VRAC-a. Obrnuto, povećanje unutarćelijske jonske snage, korišćenjem hipertoničnog unutarćelijskog rastvora, dovodi do povećanja ćelijske zapremine, ali inhibira aktivaciju VRAC-a (Voets *et al.*, 1999). Aktivacija ovog kanala u izovolumetrijskim uslovima smanjenjem jonske jačine pokazana je i direktno na nivou pojedinačnih kanala u permeabilizovanim endotelijalnim ćelijama (Sabirov *et al.*, 2000). U svetlu svega rečenog, aktivacija VRAC-a povećanjem zapremine ćelije kao i koncept „zapreminskog senzora“ možda bi trebalo da budu preispitani (Pedersen *et al.*, 2015).

Aktivacija VRAC-a unutarćelijskim GTP γ S-om ukazuje na mogućnost da je GTP deo aktivacionog puta ovog kanala koji verovatno uključuje male G proteine (Voets *et al.*, 1998). U tom kontekstu, bitno je znati da je u nekoliko tipova ćelija pokazano da Rho i Rho kinaza regulišu rad VRAC-a (Tilly *et al.*, 1996; Nilius *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 2002; Klausen *et al.*, 2006). Pored njih, još nekoliko signalnih puteva uključeno je u modulaciju aktivnosti ovog jonskog kanala: Ras-Raf-MEK-ERK put kao i fosfatidilinozitol-3-kinazni put (Nilius and Droogmans, 2001; Hoffman *et al.*, 2009; Akita and Okada, 2014) koji uključuje ROS, membranske lipide i aktinske komponente citoskeleta. Mnoge od ovih aktivacionih kaskada pretpostavljaju da je od suštinskog značaja za modulaciju aktivnosti VRAC-a zapravo njegova fosforilacija.

1.4.4. Signalni mehanizmi uključeni u aktivaciju VRAC-a

Pitanje mehanizma kojim se VRAC aktivira tokom povećanja zapremine ćelije još uvek nema definitivni odgovor. Tokom proteklih godina predloženo je nekoliko mogućih mehanizama. Aktivnost ove struje je modulirana preko nekoliko unutarćelijskih signalnih puteva koji uključuju arahidonsku kiselinu, G-proteine, reaktivne kiseonične vrste (*reactive oxygen species* - ROS), aktinski citoskelet kao i procese fosforilacije/defosforilacije. Međutim, mehanizam detekcije promene zapremine još uvek nije definisan.

Nilius i saradnici su pokazali da je aktivacija VRAC-a kod CPAE ćelija pre povezana sa opadanjem unutarćelijske jonske snage nego sa promenom zapremine ćelije (Sabirov *et al.*, 2000). Izgleda da jonska snaga reguliše aktivnost kanala indirektno, preko fosforilacije tirozina, pošto inhibitori tirozin kinaza (tirfostin B46, tirfostin A25, genistein) zaustavljaju

njegovu aktivaciju (Voets et al., 1998). Postoje i drugi načini aktivacije VRAC-a. Reaktivne kiseonične vrste – ROS aktiviraju VRAC. Baumgartnerova grupa je predložila šemu po kojoj integri ni predstavljaju senzor promene zapremine i stimulišu NADPH oksidaznu produkciju ROS-a preko Src kinaze (Browe and Baumgarten, 2004). Poznato je da Src kinaza inhibira VRAC, i da je za tu interakciju potrebno da Src kinaza bude kompartmentalizovana u kaveolama, kao i da su homologni domeni 2 i 3 Src kinaze potrebni i dovoljni (Trouet et al., 2001). Na osnovu eksperimenata Baumgartnerove grupe može se reći da se detekcija promene zapremine odvija van ćelije, naverovatnije preko interakcije integrina i vanćelijskog matriksa (Browe and Baumgarten, 2004).

1.4.5. Farmakologija VRAC

U odsustvu molekularnog kandidata, brojne studije VRAC-a bile su usredsređene na ispitivanje farmakoloških osobina ovih struja. Utvrđeno je da postoji dosta jedinjenja koje delimično ili totalno inhibira VRAC. DIDS, NPPB i tamoksifen su najčešće korišćeni i ispitivani ali je pokazano da su dva najspecifičnija, koji inhibiraju VRAC u veoma malim koncentracijama, kisela di-aril-urea, NS3728 ($IC_{50} = 0,4 \mu M$) (Helix et al., 2003; Klausen et al., 2007) i DCPIB ($IC_{50} = 4,1 \mu M$) (Decher et al., 2001).

1.5. Osmotski aktivirane struje Recijusovih neurona pijavice i neurona kičmenjaka

Odgovor na promene osmotskih uslova sredine najdetaljnije je opisan kod sisarskih ćelija. Hipoosmotski i hiperosmotski stres dovode do dobro poznatih odgovora ispitivanih na najrazličitijim sisarskim ćelijama, ali sa ovakvom vrstom izazova suočene su gotovo sve žive vrste i svaka je na sebi svojstven način razvila mehanizme da reguliše zapreminu svojih ćelija. Ipak, mehanizmi regulacije zapremine ćelija i učešće jonskih kanala kod nesisarskih vrsta u ovom procesu su prilično slabo ispitivani. Do sada je poznato samo jedno istraživanje usmereno na anjonske struje kod Recijusovih neurona pijavica, aktivirane bubrenjem nervnih ćelija uzrokovanim hipoosmotskim uslovima sredine (Coulon et al., 2008).

Kada se imaju u vidu fiziološki uslovi u kojima funkcioniše Recijusov neuron pijavice, mala je verovatnoća da je osnovna uloga hlornih kanala aktiviranih promenom ćelijske zapremine da ograniče povećanje zapremine usled pada vanćelijskog osmolariteta okolne sredine. Pre

svoga, ovi neuroni se u fiziološkim uslovima gotovo nikada ne susreću sa hipotoničnom sredinom (*Zerbst-Boroffka, 1973*) a čak i da su joj izloženi, maksimalni efekat koji ova vrsta kanala može da ostvari, izbacivanjem kompletnog hlora iz citosola (≈ 10 mmol) (*Klees et al., 2005; Munsch et al., 1995*), zajedno sa K^+ kao pratećim jonom, je smanjenje osmolariteta citosola za samo 10%. Umesto toga, autori predlažu da su bubrenjem aktivirani hlorni kanali uključeni u regulaciju ćelijske zapremine u fiziološkim uslovima, pre svega u periodima posle visoke neuronalne aktivnosti. Povećana aktivnost neurona dovodi do povećanog usvajanja NaCl iz okolne sredine što za posledicu ima porast unutarćelijskog hlora i povećanje ćelijske zapremine (*Dierkes et al., 2006*). Povećanje zapremine može uticati na brojne ćelijske funkcije, dok porast koncentracije jona hlora u citosolu može značajno umanjiti ili čak preokrenuti efekte inhibitornih sinaptičkih signala. U tom slučaju, hlorni kanali aktivirani povećanjem ćelijske zapremine trebalo bi da ubrzaju oslobađanje hlora iz ćelije kako bi se njegova unutarćelijska koncentracija smanjila, a zapremina ćelije povratila na početni nivo.

Fiziološka uloga VRAC-a, kao regulatora zapremine ćelije nakon osmotskih perturbacija je najviše ispitivana u neuronima centralnog nervnog sistema, za koje se pretpostavlja da nakon bubrenja zavisnog od aktivnosti, regulišu zapreminu aktivacijom ovih struja (*Akita and Okada, 2014*). Važna sličnost je pokazana kod astrocita koji nabubre, npr. nakon ishemijskih oštećenja mozga, i koji onda oslobađaju veliku količinu glutamata kroz VRAC, što dovodi do ekscitotoksične neuronalne smrti (*Kimelberg, 2005; Kimelberg et al., 2006; Mongin, 2007*). Međutim, ovoj struji se pored opisane, pripisuje i mnoštvo drugih uloga, ali se manje perturbacije ćelijskog volumena i posledične promene jonske jačine unutarćelijskog rastvora smatraju za glavne okidače (signale) aktivnosti VRAC-a. Ipak, smatra se da su struje uključene i u druge procese: aktivacija u izovolumetrijskim uslovima dovodi do skupljanja i smanjenja ćelijskog volumena, za šta je pokazano da je bitan proces koji se odvija tokom apoptoze (*Maeno et al., 2000; Okada et al., 2001*). U nekoliko tipova tumorskih ćelija rezistentnih na lekove, pokazana je regulacija ka smanjenju aktivnosti VRAC-a koja je prouzrokovala smanjenu sklonost ka apoptozi (*Poulsen et al., 2010; Sorensen et al., 2014*). VRAC takođe može biti bitan u procesima angiogeneze, pošto je pokazano da njegovi blokatori zaustavljaju formiranje novih krvnih sudova u nekoliko model sistema (*Manolopoulos et al., 2000; Ziegelhoeffer et al., 2003*). VRAC ima i ulogu u ćelijskom ciklusu, npr. inhibicija ove struje zaustavlja ćelijsku proliferaciju (*Varela et al., 2004; Doroshenko et al., 2001*). Ovim strujama se pripisuje još jedna veoma važna fiziološka uloga

– tokom ćelijske migracije, koja je u nekoliko tipova ćelija inhibirana ukoliko je inhibiran VRAC (Soroceanu et al., 1999; Ransom et al., 2001), što ukazuje na moguću uključenost lokalnih promena ćelijskog volumena u pokretljivosti ćelije (Schwab et al., 2012).

1.6. Osmoregulacija kod gljiva i uloga jonskih kanala u osmoregulaciji

1.6.1. Odgovor ćelije pekarskog kvasca na promenu osmotskih uslova sredine

Kao i većina drugih fizioloških procesa kod gljiva, i odgovor na promenu osmotskih uslova sredine je najbolje proučen kod kvasaca. Pritom treba imati u vidu da je kod gljiva osmoregulacija najintenzivnije proučavana u uslovima hiperosmotskog stresa. Smanjena „aktivnost vode“, odnosno smanjena dostupnost slobodne vode u okruženju ćelije dovodi do gubitka vode iz ćelije, difuzijom niz koncentracioni gradijent vode. To dovodi do smanjivanja ćelijske zapremine i hiperosmotskog stresa (Hohmann, 2002; Wood, 2011). Ćelije kvasca funkcionišu u uskom opsegu unutrašnje koncentracije vode u kojoj se difuzioni procesi normalno odvijaju, što omogućava neometano funkcionisanje biohemijskih i molekularnobioloških procesa (Wood, 2011; Mika and Poolman, 2011). Čak i relativno umereni gubitak vode može prouzrokovati usporavanje ćelijske aktivnosti i unutarćelijskih procesa kod kvasca (Babazadeh et al., 2013; Miermont et al., 2013). Takođe je poznato da što je jači osmotski stres, više je vremena potrebno ćeliji da na njega odgovori (Van Wuytswinkel et al., 2000). Izlaganje ćelije kvasca *S. cerevisiae* povećanom osmolaritetu spoljašnje sredine dovodi do brzog gubitka vode i smanjenja ćelijske zapremine koje može dostići i više od 50% početne vrednosti u slučajevima jakog hiperosmotskog šoka (Albertyn et al., 1994). Kao odgovor na ovakav spoljni stimulus, ćelija brzo zatvara plazma membranski kanal za glicerol (Fps1p) i već nakon 15 s značajno redukuje transport ovog osmolita van ćelije (Luyten et al., 1995; Tamás et al., 1999). Ukoliko se stresni uslovi povećanog osmolariteta spoljašnje sredine nastave, kvasci odgovaraju povećanom sintezom, akumulacijom i membranskim zadržavanjem glicerola (Nevoigt and Stahl, 1997). Akumulacija počinje odmah nakon izlaganja ćelije hiperosmotskom medijumu a nivo koji dostiže zavisiće od intenziteta hiperosmotskog stimulusa sa kojim je ćelija suočena (Reed et al., 1987). Dužina adaptacije na nove sredinske uslove će takođe zavisiti od jačine spoljašnjeg stimulusa i biće im direktno proporcionalna (Hohmann, 2002). Visok nivo glicerola u ćeliji dostiže se tek nakon nekoliko sati adaptacije (Singh and Norton, 1991) i podrazumeva prethodnu aktivaciju dobro ispitane stres-specifične signalne kaskade kod

kvasaca koju aktivira hiperosmotski stres (*Saxena and Sitaraman, 2014*). Ovaj signalni put, označen kao HOG (eng. HOG – *high osmolarity glycerol*) (*Brewster, 1993*), dovodi do aktivacije enzima koji su uključeni u sintezu glicerola ali i do zatvaranja akvagliceroporina Fps1p, u cilju zadržavanja ovog osmolita u ćeliji (*Saxena and Sitaraman, 2014*). HOG signalni put funkcionira kroz dve funkcionalno redundantne signalne grane (*Saxena and Sitaraman, 2014; Suescun-Bolivar and Thome, 2015*) koje dovode do aktivacije Hog1 proteina, inače MAP (eng. *mitogen activated protein*) kinaze 14. Jednu granu (SLN1) aktivira hiperosmotski stres preko negativnog osmosenzornog regulatora, proteina Sln1 (*Saito, 2001; Hohmann, 2002*). Povećani spoljašnji osmolaritet dovodi do inhibicije proteina Sln1, koji je dvokomponentna histidin kinaza (HK) sastavljena od autofosforilišućeg membranskog HK senzora i histidin-posedujućeg fosfotransfernog proteina (Ypd1) u kompleksu sa regulatorom odgovora (Ssk1). Ypd1 je regulisan preko dva moguća regulatora odgovora na stres (Ssk1 i Ssk7) kojima je određena specifičnost signalnog puta koji se nizvodno od ovog proteina aktivira. Tako Ssk1 posreduje u odgovoru na osmotski, a Ssk7 reguliše odgovor na oksidativni stres (*Suescun-Bolivar and Thome, 2015*). Kada je ovaj dvokomponentni fosforelejni sistem neaktivan (hiperosmotski uslovi), MAP kinazna kaskada, koju čine Ssk2/Ssk22 (kao MAPKKK), Pbs2 (kao MAPKK) i Hog1 (MAPK), je aktivna i završava se fosforilacijom proteina Hog1, koji se zatim translocira u jedro u kojem fosforiliše najmanje tri transkripciona faktora (Hot1, Sko1, Smp1). To dovodi do aktivacije nekoliko gena uključenih u regulaciju hiperosmotskog stresa (*Rep et al., 2000; Alepuz et al., 2001*). U hipoosmotskim uslovima protein Sln1 je aktiviran i to „zaključava“ SLN1 put (*Hohmann, 2002; Hohmann, 2009*). Alternativna grana (SHO1) takođe konvergira ka Hog1 kinazi (MAPK) preko Pbs (MAPKK). Signalna transdukcija započinje aktivacijom dva mucinu slična transmembranska osmosenzorna proteina, Msb2 i Hkr1 (*Tatebayashi et al., 2007*), koji aktiviraju kaskadu sastavljenu od Sho1, male GTP-aze Cdc42, kinaznog proteina Ste20 i prvog proteina MAPK kaskade - Ste11/Ste50 (MAPKKK) (*Hohmann et al., 2002; Suescun-Bolivar and Thome, 2015*). Dalji prenos signala je isti kao u prethodno opisanoj grani.

Akumulacija kompatibilnih osmolita, kako bi se kompenzovao gubitak vode, je univerzalna strategija ćelija (*Yancey et al., 1982*). Rastvorene supstance su kompatibilne ukoliko su inertne u odnosu na unutarćelijske procese kao i gubitak odnosno povratak vode iz ćelija. Kod gljiva su najčešći kompatibilni osmoliti polioli (polihidroksilni alkoholi), a kod kvasaca je to glicerol kada rastu na medijumima koji sadrže šećer (*Hohmann, 2002; Blomberg and Adler, 1992*). Glicerol se koristi kao izvor ugljenika i energije i nalazi se u okruženju ćelija

kvasca kao produkt metabolizma gljiva. Glicerol se može preuzeti iz spoljne sredine N^+ -kuplovanim aktivnim transportom preko Stl1 (Ferreira et al., 2005) Kod kvasaca se glicerol stvara i kao normalan produkt metabolizma šećera (tokom vinskog vrenja npr. stvara se kao odgovor na osmotski stres usled povećane koncentracije šećera u širi). Za finu kontrolu intracelularnog sadržaja glicerola i za njegovo brzo oslobađanje tokom hipoosmotskog stresa kvasci koriste akvagliceroporin Fps1 (Ahmadpour et al., 2014). Delecijom gena za ovaj kanal ćelije kvasca postaju osetljive na hipoosmotski šok, pa se pretpostavlja da je ovo jedini, ili bar glavni put za oslobađanje glicerola iz ćelija. Iako je još jedan akvagliceroporin kodiran u genomu kvasca (Yfl054c) izgleda da on nema istu ulogu kao Fps1 (Ahmadpour et al., 2014; Oliveira et al., 2003).

Proteini koji detektuju fizikohemijske promene rastvarača uzrokovane promenom koncentracije ili strukture vode nazivaju se osmosenzori. Osim toga, oni mogu detektovati i mehaničke stimuluse izazvane promenama aktivnosti vode (Gustin et al., 1998; Wood, 1999). Obično se smatra da osmosenzori obavljaju svoju funkciju na površini ćelije, kao integralni membranski proteini, međutim, oni često mogu biti rastvoreni molekuli (Wood, 1999). Tako se kod *S. pombe* osmosenzorni proteini nalaze u citosolu (Gacto et al., 2003; Bahn, 2008) a nedavno su identifikovani i kod halotolerantnih kvasaca *Debaryomyces hansenii* i *Hortaea werneckii* (Meena et al., 2010; Plemenitas et al., 2014). Proteini uključeni u proces registrovanja i odgovora na promenu osmotskog pritiska kod pekarskog kvasca se nalaze u ćelijskoj membrani, a nedavno je pokazano da ergosterol i sfingolipidi ćelijske membrane mogu biti uključeni u modifikaciju veza između Sln1 i Sho1 proteina sa lipidnim raftovima membrane (Tanigawa et al., 2012). Pretpostavlja se da membranski raftovi učestvuju u ćelijskoj signalizaciji tako što lokalno menjaju strukturu membrane ili tako što utiču na povećanje afiniteta ili specifičnosti protein-protein interakcija (Golub et al., 2004). Uniformna distribucija Sln1 proteina u ćelijskoj membrani se usled osmotskog šoka menja i dovodi do grupisanja proteina (Reiser et al., 2003), a Tanigawa (Tanigawa et al., 2012) objašnjava da do ovoga dolazi zato što osmotski stres prouzrokuje delimičnu disocijaciju Sln1 proteina iz membranskih raftova.

Na hipoosmotske uslove sredine ćelije *S. cerevisiae* odgovaraju povećanjem zapremine koja se dešava nakon samo par sekundi od izlaganja spoljašnjem stimulusu (Hohmann, 2002). Već u prvoj minuti ćelija aktivira nekoliko regulatornih mehanizama koji dovode do porasta nivoa unutarćelijskog Ca^{2+} (Batiza et al., 1996) i otvaranja plazma membranskih kanala za glicerol – Fps1p (Tamás et al., 1999). Pokazano je da u odgovoru na hipoosmotski stimulus dolazi do

oslobađanja Ca^{2+} iz unutarćelijskih depoa i influksa Ca^{2+} iz spoljašnjeg medijuma, što sumarno dovodi do prolaznog povećanja koncentracije unutarćelijskog Ca^{2+} kvasca već nakon nekoliko sekundi od izlaganja stimulusu (Batiza et al., 1996). Iako kvasci poseduju jonske kanale homologe TRP- Ca^{2+} kanalu (od eng. *transient receptor potential*), TRPY1 ili Yvc1 u membranama vakuola, ovi kanali reaguju samo na hiperosmotski šok i dovode do povećanja koncentracije Ca^{2+} (Denis and Cyert, 2002). Tako i pored toga što je mehanizam odgovora na hipoosmotski šok kod *S. cerevisiae* relativno detaljno ispitan, još uvek nije poznato na koji način ga organelarni jonski kanali „osećaju“ (Nakayama and Iida, 2014). Signalni put u ćeliji pekarskog kvasca koji joj omogućava preživljavanje u hipoosmotskim uslovima sredine posredovan je protein kinazom C1 (PKC1) a uključuje MAP kinaznu kaskadu koju čine MAPKKK (Bck1), dve MAPKK (Mkk1 i Mkk2) i MAPK (Mpk1) (Davenport et al, 1995). Za manje od 1 min dolazi do povećane fosforilacije Mpk1 proteina (Davenport et al, 1995) a detektuje se i povećana aktivnost ove kinaze (Kamada et al., 1995). Nakon 3 min glicerol napušta ćeliju i to je inicijalni signal za smanjenje fosforilacije Mpk1 (Davenport et al., 1995). Efluks glicerola praćen je izlaskom vode iz ćelije kvasca koji omogućava vraćanje ćelijske zapremine na početnu veličinu za nekoliko minuta (Hohmann, 2002).

Izgleda da plazma mebranski transport glicerola, nenaelektrisanog osmolita, igra najvažniju ulogu u odgovoru na hipoosmotski stres kod gljiva (Zajc et al., 2014; Kogej et al., 2007; Lew et al., 2004). O ulozi jonskog transporta u ovom procesu ne zna se dovoljno (Hohmann, 2002). O značaju transportera za glicerol govori i evolutivna konzerviranost njihovih sekvenci. Proteinska sekvenca Fps1p proteina pokazuje visok nivo identičnosti sekvenci istog proteina kod *E.coli* (Nevoigt and Stahl, 1997). Na koji način ćelije kvasca detektuju promene u osmotskom pritisku spoljne sredine i kako se ovaj signal konvertuje u akumulaciju ili oslobađanje glicerola? Početni signal mogla bi biti promena u turgoru ili zapremini ćelije, pa je pokazano da dva transmembranska proteina kod kvasca imaju ulogu osmosenzora – Sln1p i Sho1p (Nevoigt and Stahl, 1997). Oba proteina uključena su u prenos signala preko specifične osmoregulatorne signalne kaskade koja kao MAP kinazu koristi HOG1 (*high osmolarity glycerol*) (Brewster et al., 1993). Ovaj signalni put je uključen u odgovor ćelije kvasca na hiperosmotske sredinske uslove dok aktivnost Fps1p kanala izgleda da nije kontrolisana na isti način (Luyten et al, 1995). Ovaj kanal može direktno da odgovara na promenu tenzija ćelijske membrane (Tamás et al., 1999). U odgovoru na osmotski stimulus

kod *S.cerevisiae*, osim HOG-puta, uključene su bar još tri signalne kaskade: Ras-cAMP, Ca²⁺-kaldmodulin/kalcineurinska i put protein kinaze C (PKC) (Varela and Mager, 1996).

I pored toga što je adaptacija na hipoosmotske uslove sredine od životne važnosti za ćelije kvasaca (*S. pombe* i *S. cerevisiae*), postoji samo nekoliko studija koje su se bavile ovim problemom (Batiza et al., 1996; Ahmadpour et al., 2014; Hohmann, 2002; Barba et al., 2008). Pre više od 20 godina, primenom metode nametnute voltaže na deliću membrane su detektovani MS kanali koji se aktiviraju pritiskom na plazma membranu *S. cerevisiae* i *S. pombe* (Zhou and Kung, 1992). Međutim, molekularni identitet ovih kanala još uvek nije otkriven (Nakayama and Iida, 2014). U perinuklearnom i kortikalnom ER-u ćelija *S. pombe* identifikovani su i okarakterisani Msy1 i Msy2 (Nakayama et al., 2014). Kao što je već pomenuto, u *S. cerevisiae* je opisan TRP homolog - TRPY1(Yvc1) prisutan u vakuolarnoj membrani, čijom aktivnošću se oslobađa unutarćelijski kalcijum, ali ovaj kanal reaguje na hiper- a ne hipo-osmotski stimulus (Denis and Cyert, 2002).

1.6.2. Osmoregulacija kod končastih gljiva

U odnosu na osmotski potencijal spoljašnje sredine, gljive su adaptirane na život u najrazličitijim staništima. Sposobne su da žive u izrazito hiperosmotskim uslovima (neke vrste *Aspergillus* na čak -40 MPa) (Jennings, 1990) ali mogu da žive i u izrazito hipoosmotskim, kakva je na primer sveža voda (oomiceta *Achlya bisexualis*). Izazovi na koje su se gljive morale adaptirati u ovako raznolikim staništima bitno se razlikuju. Spoljašnji osmotski potencijal je bitan faktor koji utiče na sposobnost gljiva da usvajaju vodu i time održe unutrašnji hidrostatički pritisak ćelije na zid koji ih okružuje (turgor) (Blomberg and Adler, 1992; Jennings, 1995). Iako su mišljenja o tačnoj ulozi koju turgor ima u vršnom rastenju kod gljiva i biljaka predmet dugotrajne debate, nesumnjivo je da pritisak na ćelijski zid predstavlja jedan od ključnih faktora u rastenju kod ovih organizama (Zonia and Munnik 2007; Lew, 2011). Da bi uspešno usvajale vodu u hiperosmotskim uslovima, gljive moraju povećati sopstveni unutrašnji osmotski potencijal akumuliranjem jona i/ili drugih kompatibilnih osmolita (poput glicerola). Nasuprot tome, u hipoosmotskim uslovima one oslobađaju osmotski aktivne supstance kako bi sprečile pucanje ćelijskog zida (Jennings, 1995; Lew 2004). Mehanizmi koje gljive koriste kako bi regulisale količinu vode u svojim ćelijama, a posledično i turgor, još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni. Izučavanje osmoregulacije kod filamentoznih gljiva uglavnom je usmereno na pronalaženje mehanizama

homologih onima kod kvasaca, pa je tako pokazano da i končaste gljive poseduju funkcionalne akvagliceroporne u ćelijskim membranama, MAP kinaznu kaskadu homologu HOG kaskadi kvasca (*Lew et al., 2006*) i aktivne gene za proteine biosintetskog puta glicerola čija se ekspresija povećava u reakcijama na hiperosmotski stres. Kompatibilni osmoliti čijom promenom koncentracije gljive regulišu svoj „vodni“ status jesu pre svega polihidroksilni alkoholi (glicerol, manitol), dok je fiziološka uloga jona u ovim procesima najmanje poznata. Stanje je ovakvo pre svega zato što je merenje jonskih struja kroz ćelijsku membranu gljiva još uvek teško moguće pa su jonski kanali u ovoj grupi organizama izrazito slabo okarakterisani.

Još jedna specifičnost adaptacije gljiva na hipoosmotski stres jeste činjenica da, u poređenju sa plazma membranom, tonoplast igra sekundarnu ulogu (*Hohmann, 2002*). Jedina dobro opisana reakcija vakuola u ćelijama gljiva jeste fuzija većeg broja manjih u jednu veliku citoplazmatsku strukturu kao odgovor na hipoosmotski stimulus (*Richards et al., 2010*). Tonoplast kvasaca nije specifično propustljiv za vodu (*Coury et al., 1999*), pa je to verovatan razlog zbog kojeg u osmoregulaciji prvenstveno učestvuje plazma membrana. Za razliku od njih, vakuola kod biljaka igra veoma važnu ulogu u osmoregulaciji a tonoplast je, usled prisustva brojnih akvaporina, odlično propustljiv za vodu (*Tyerman et al., 1999; Maurel and Chrispeels, 2001*). Jedini akvaporin sa dokazanom funkcijom u transportu vode čija je aktivnost nedvosmisleno povećana hipoosmotskim šokom kod kvasaca nije lociran u vakuoli već u plazma membrani (*Meyrial et al., 2001*).

1.7. Specifičnosti ispitivanja aktivnosti jonskih kanala na gljivama

Generalno slabo poznavanje jonskih kanala u membranama višećelijskih gljiva, pa logično i nepoznavanje njihove fiziološke uloge, posledica je relativno teškog pristupa ćelijskoj membrani ovih organizama mernim mikroelektrodama neophodnim za registrovanje jonskih struja kroz ćelijske membrane. Kod biljaka je to postignuto enzimskom razgradnjom ćelijskog zida i dobijanjem protoplasta. Sa membranom ovako dobijenih protoplasta bilo je teže dobiti gigaomski kontakt nego sa ćelijskom membranom životinjskih ćelija, ali je njegovo postizanje bilo moguće.

Kod gljiva je situacija sasvim drugačija. Hidrolizom ćelijskog zida kod končaste gljive *Neurospora crassa* dobijeni su protoplasti sa čijom membranom nije bilo moguće ostvariti

kontakt većeg otpora od 200 M Ω (*Levina et al., 1995*). Stoga, iako su u eksperimentima uočene četiri različite struje, one su tek veoma fragmentarno okarakterisane. Naime, za dve struje koje je blokirao TEA⁺, ali ne i Gd³⁺, je utvrđeno da su najverovatnije kalijumske jer je promena koncentracije K⁺ u pipeti, odnosno promena veličine elektrohemijskog gradijenta za K⁺ dovela do promene amplitude kanala. Pored toga utvrđeno je i da je odnos amplituda ova dva kanala oko 0,70. Slično tome, za druge dve struje koje je blokirao Gd³⁺, ali ne i TEA⁺, je utvrđeno da ih aktivira istezanje membrane, te da se radi o mehanosenzitivnim kanalima, da su struje kalcijumskog porekla i da im je odnos amplituda oko 0,66 (*Živić, 2005*). Smatra se da je osnovni razlog odsustva gigaomskog kontakta nedovoljno efikasna hidroliza ćelijskog zida usled čega zaostali komadići ćelijskog zida ometaju prisni kontakt pipete sa ćelijskom membranom protoplasta (*Roberts et al., 1997*). Razlog što se to ne dešava kod biljaka treba tražiti u tome što je ćelijski zid kod biljaka celulozne, a kod gljiva hitinske prirode (*Živić, 2005*).

Ovaj problem je prevaziđen kod kvasaca iz dva razloga. Njihov ćelijski zid je glukansko-mananske prirode, a što je još važnije oni su jednoćelijski organizmi. Naime, za dobijanje kvašćevih protoplasta se koristi veoma razblaženi rastvor enzima koji ne hidrolizuje ćelijski zid u potpunosti, već stvara samo pukotine u njemu, kroz koje protoplasti bivaju osmotski istisnuti (*Bertl et al., 1998b*). Smatra se da protoplaste koji aktivno napuste svoj ćelijski zid karakteriše čistija ćelijska membrana sa kojom je moguće ostvariti gigaomski kontakt (*Zhou and Kung, 1992*). Međutim, i kod ovako dobijenih protoplasta, gigaomski kontakt sa ćelijskom membranom se teško uspostavlja, ali je veoma stabilan. Za razliku od ćelijskih membrana, gigaomski kontakt sa membranom izolovanih vakuola kvasca se daleko lakše uspostavlja (*Bertl et al., 1998*). Iako efikasan, ovaj način dobijanja protoplasta se ne može primeniti na višecćelijske, končaste gljive. Stoga se moralo naći drugo rešenje. Kao metoda od izbora se nametnula lasersko odstranjivanje delova ćelijskog zida. Ova metoda je prvo primenjena na biljnim ćelijama (*Taylor and Brownlee, 1992*). Iako je sa biljnim protoplastima moguće ostvariti gigaomski kontakt, smatra se da proteaze koje su prisutne u koktelu enzima koji vrše hidrolizu ćelijskog zida mogu oštetiti i proteine jonskih kanala i izmeniti njihovu funkciju (*Henricksen et al., 1995*), te se pristupilo novoj, manje destruktivnoj metodi. Preparat za ovu tehniku se priprema tako što se prvo izvrši njegova delimična plazmoliza, potom se koristeći laserski zrak, koji se mikroskopskim objektivom fokusira na hifalnu ćeliju, buše otvori u onim delovima ćelijskog zida od kojih se citoplazma usled plazmolize povukla. Zatim se preparat premešta u hipoosmotski rastvor usled čega se citoplazma deplazmolizuje i

delovi ćelijske membrane izlaze kroz napravljene otvore na ćelijskom zidu (*Roberts et al., 1997*). Dakle i u ovom slučaju se membrana plazmolizom odvaja od ćelijskog zida, što je očigledno neophodan uslov za dobijanje gigaomskog kontakta sa ćelijskom membranom gljiva. Osnovni problem ove metode je da dobijeni delovi protoplasta veoma brzo sintetišu novi ćelijski zid (manje od 10 minuta), što onemogućava dobijanje dugotrajnih gigaomskih kontakata. Problem je rešen dodavanjem brefeldina A (inhibitora egzocitoze) koji je inhibirao sintezu ćelijskog zida i omogućio dobijanje stabilnih gigaomskih kontakata otpora od 1 do 50 GΩ, sa verovatnoćom od 40% i do 2 h posle oslobađanja protoplasta, pri čemu su čak u 80% slučajeva gigaomski kontakti trajali duže od 10 minuta (*Véry and Davies, 1998*). Zahvaljujući primeni ovakvog metoda uspešno je okarakterisan anjonski kanal na membrani gljive *Aspergillus niger* (*Roberts et al., 1997*). Za ovaj kanal je pokazano da je izlazni ispravljač, odnosno da omogućuje izlazak hlora iz ćelije, dok mu je propustljivost za K⁺ zanemarljiva. Jedinična provodljivost mu je 43 pS. Smatra se da igra značajnu ulogu u održavanju pH homeostaze u ćeliji, sprečavajući prekomerno zakiseljavanje citoplazme. Metoda laserskog odstranjivanja delova ćelijskog zida je samo još jednom primenjena na gljivama (*Véry and Davies, 1998*). Međutim, ovaj rad je bio metodski i u njemu je samo kao primer uspešnosti metode pomenuto postojanje dva kanala na ćelijskoj membrani gljive *Neurospora crassa*: anjonskog kanala sa jediničnom provodljivošću od 17 pS i K⁺ kanala koji funkcioniše kao ulazni ispravljač i čija je provodljivost 9 pS. Ova metoda nije dovela do očekivanog ubrzanja istraživanja jonskih kanala kod gljiva, jer do danas nije objavljena nijedna nova publikacija u kojoj je ona omogućila karakterizaciju jonskog kanala u ćelijskoj membrani gljiva. To ukazuje da je, pored dobrih strana, ova metoda isuviše složena, specifična i zahtevna da bi bila šire primenjena za izučavanje jonskih kanala kod gljiva (*Živić, 2005*).

U pokušaju da se reši problem dobijanja gigaomskog kontakta sa ćelijskom membranom končastih gljiva, korišćen je i sluzavi mutant *Neurospora crassa* koji je karakterističan po tome da ne sintetiše ćelijski zid (*Levina et al., 2002*). Međutim, pojavila su se dva osnovna problema, stalni ameboidni pokreti sluzavog mutanta su onemogućavali stabilan kontakt, a kada su oni inhibirani dodatkom konkavalina A (međusobno povezuje membranske glukoproteine), membrana je postala deformisana u stepenu koji je značajno otežavao dobijanje gigaomskog kontakta. Pored toga, primena blagog negativnog pritiska, odnosno usisavanja (neophodan korak u dobijanju gigaomskih kontakata) je, zbog specifičnog lipidnog sastava membrane mutanta (*Larkin-Thomas et al., 1997*), dovođila do uvlačenja velikog dela membrane, a ponekad i čitavog sluzavog mutanta u pipetu. Stoga je primena

pritiska morala biti svedena na minimum, te je za dobijanje konfiguracije *cela ćelija* korišćena metoda perforacije (*Horn and Marty, 1988*). U ovoj metodi antibiotik nistatin se ugrađuje u membranu u kojoj otvara neselektivne pore, omogućavajući slobodnu difuziju jona koja je neophodna za postizanje konfiguracije *cela ćelija*. Međutim, na ovaj način se nisu mogle dobiti istrgnute konfiguracije. Svi ovi problemi su onemogućili da se sluzavi mutant iskoristi za karakterizaciju jonskih kanala na ćelijskoj membrani *Neurospora crassa*.

1.8. Gljive

Iako podjednako rasprostranjene i raznovrsne, a bar podjednako ekološki i po biomasi značajne kao i druge dve grupe višećelijskih eukariota, životinje i biljke, gljive (*Fungi*) su znatno manje proučeni organizmi, i to na svim nivoima – od taksonomskog do molekularnog. Do sada je opisano oko 100.000 vrsta gljiva a to je manje od 3% od 3,5 – 5,1 milion vrsta koliko je procenjeno da postoji (*Blackwell, 2011*). Jedan od ključnih razloga slabe proučenosti je to što su gljive relativno kasno dobile taksonomski nivo carstva (*Whittaker, 1969*) tako da su sve do polovine 20. veka proučavane kao mikroorganizmi u okviru mikrobioloških istraživanja ili kao deo carstva biljaka. Razloge za ovo treba tražiti u davnospostavljenom i dugoodržanom mišljenju da gljive pripadaju carstvu biljaka (odnosno „povrća“) (*Lemery, 1675*), važećem i tokom prve polovine 20. veka, po kojem one vode poreklo od predačke alge koja je izgubila sposobnost fotosinteze (*Atkinson, 1915*). Ovo mišljenje dodatno je osnaženo polovinom 19. veka Hekelovom „Opštom morfologijom organizama“ (*Haeckel, 1866*) kojom je živi svet grupisan u tri carstva: Životinje (*Animalia*), Biljke (*Plantae*) i heterogeno carstvo *Protista* koje je obuhvatalo amebe, diatome, bakterije i sundere. Tako, iako se ideja da se gljive svrstaju u posebno carstvo javila relativno rano (*Necker, 1783*), tek 1969. Vitaker deli žive organizme u pet carstava od kojih je jedno *Fungi*. Krajem osamdesetih godina prošlog veka ova ideja postaje opšteprihvaćena (*Margulis and Schwartz, 1988; Cavalier-Smith, 1989; Mayr, 1990*) a tokom devedesetih, nakon intenzivnih molekularno-filogenetskih istraživanja napuštena je dogma o biljnom poreklu gljiva. Naime, danas je opšteprivaćeno mišljenje da su životinje i gljive sestrinske grupe (*Baldauf and Palmer, 1993; Keeling et al., 1998; Bricheux and Brugerolle, 1997; Roger et al., 1999*), iako se ne može govoriti o direktnoj evolutivnoj liniji koja ih povezuje već o indirektnoj vezi, preko zajedničkog predačkog filuma *Choanozoa* iz kojeg su nezavisno evoluirale (*Cavalier-Smith, 1998; Cavalier-Smith, 2010*).

U carstvo gljiva se danas svrstava pet filuma: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*, *Zygomycota* i *Chytridiomycota*. *Ascomycota* i *Basidiomycota* su evolutivno najmlađe grupe, evoluirale pre oko 300 miliona godina i često se svrstavaju u zajednički razdeo *Dikaryomycota* pošto je utvrđeno da su u pitanju sestrinske grupe monofiletskog porekla (*Barbee and Taylor, 1992*). Analiza genskih sekvenci za rRNK male ribozomalne subjedinice pokazala je da je razdeo *Glomeromycota* evoluirao nezavisno ali deli zajedničkog pretka sa dva prethodno pomenuta razdela (*Schüßler et al., 2001*). *Zygomycota* i *Chytridiomycota* su polifiletske grupe koje stoje u osnovi carstva gljiva a od ostalih su se odvojile pre oko 600-1400 miliona godina (*Heckman et al., 2001*). Analize gena za rRNK male ribozomalne subjedinice (*Jensen et al., 1998; Nagahama et al., 1995; Tanabe et al., 2000*) i mitohondrijalnog genoma (*Forget et al., 2002*) pokazale su da se *Chytridiomycota* zapravo nalazi unutar razdela *Zygomycota* kao i da ovo nisu prirodni taksoni, a evolutivni odnosi između njih tek treba detaljnije da se opišu (*Tanabe et al., 2004*).

Položaj *Zygomycota* u osnovi carstva gljiva i viši stepen srodnosti sa životinjama u odnosu na *Dikaryomycota*, čini ih interesantnim u traganju za novim evolutivnim vezama između gljiva i životinja. Molekularne analize dela sekvence citohroma c (*Dayhoff, 1976*) i nukleotidne sekvence 5S ribozomalne RNK (*Anderson et al., 1982*) pokazale su da je vrsta *Phycomyces blakesleeanus* (*Zygomycota*) podjednako filogenetski udaljena od viših gljiva koliko i od životinja (*Manella et al., 1987*), dok su joj najrodnije *Chytridiomycota* (*Walker and Doolittle, 1982*). Iz sličnih razloga su zanimljiva i fiziološka istraživanja ove grupe. Kod gljiva su do sada ona uglavnom obavljana na *Ascomycota*, pre svega na *Saccharomyces cerevisie* (pekarski kvasac), koji predstavlja jedan od najbolje istraženih eukariotskih organizama (*Bertl et al., 1998*). Takođe su dobro istražene i *Neurospora crassa* (*Perkins and Davis, 2000*), *Aspergillus spp.* (*Taylor et al., 1993*) i *Schizosaccharomyces plombe* koji takođe pripadaju *Ascomycota*. Iz klase *Basidiomycota* kao model sistemi u fiziološkim istraživanjima najčešće su korišćeni *Uromyces spp.* i *Ustilago maydis* (*Bölker, 2001*). Najslabije istražena grupa gljiva i sa fiziološkog stanovišta su *Zygomycota*. U stvari, samo jedna vrsta, *P. blakesleeanus*, je u većoj meri i sistematski istraživana (*Bergman et al., 1969; Ceredá-Olmedo and Lipson, 1987*). I pored toga, i u slučaju *P. blakesleeanus*, istraživanja su pre svega bila usmerena na rastenje sporangiofora (u najvećoj meri na njihovu fototropsku i geotropsku reakciju), sintezu i strukturu ćelijskog zida, ispitivanje polnog razmnožavanja i metaboličke puteve kod ove gljive (*Ceredá-Olmedo and Lipson, 1987*). Mnogi drugi procesi kod *Zygomycota* ostali su dugo gotovo u potpunosti nepoznati.

1.9. *Phycomyces blakesleeanus* - model sistem za izučavanje membranskog transporta kod filamentoznih gljiva

Za istraživanje bilo kog opšteg fiziološkog procesa kod *Zygomycota*, vrsta *P. blakesleeanus* je pogodan organizam usled jasno definisanih uslova gajenja, brzog rasteanja i kratkog životnog ciklusa, makroskopske veličine sporangiofora i postojanja velikog broja mutanata za različite fiziološke procese (*Ceredá-Olmedo and Lipson, 1987*). Vrsta *P. blakesleeanus* Burgeff pripada familiji *Mucoraceae*, redu *Mucorales*, klasi *Zygomycetes* i razdelu *Zygomycota*. U prirodi je slabo uočljiva, vodi saprofitski način života, ima široko rasprostranjenje, a najčešće se može naći u vlažnim sredinama na izmetu sisara (*Ceredá - Olmedo and Lipson, 1987*). Zahvaljujući intenzivnom sekvenciranju genoma gljiva u protekloj deceniji, od 2010. godine postao je dostupan relativno kompletan genom ove gljive (<http://genome.jgi.doe.gov/Phybl2/Phybl2.home.html>). *Phycomyces* poseduje još jednu neouobičajenu osobinu za višćelijske organizme: to je izuzetna sposobnost regeneracije, do koje može doći iz gotovo bilo kod dela tela gljive (*Galand and Ootaki, 1987*). Najimpresivnija je sposobnost gljive da se regeneriše iz delova iscurele citoplazme istisnute iz presečene sporangiofore, bilo na vlažnu podlogu (*Weide, 1939; Ceredá-Olmedo and Lipson, 1987*) ili u odgovarajući rastvor (*Zaichkin et al., 1975*). Imajući u vidu značaj citoplazmatičnih kapi dobijenih iz džinovskih internodijalnih ćelija *Charophyta* za izučavanje jonskih kanala kod biljaka, Živić i sar. iskoristili su ovu sposobnost i uspešno primenili *patch clamp* metodu na analognom model sistemu izolovanom iz gljive (*Živić et al., 2009*). Pošto su prva istraživanja jonskih kanala na ovom modelu već obavljena a citoplazmatska kap izolovana iz makrosporangiofora gljive se pokazala kao dobar sistem koji omogućava jednostavan pristup membrani gljive, u ovom radu je *P. blakesleeanus* odabran kao model organizam za ispitivanje ukupnih jonskih struja kod filamentoznih gljiva.

1.9.1. Citoplazmatske kapi izolovane iz sporangiofora

Iz do sada iznetih podataka je jasno da je osnovni problem u izučavanju jonskog transporta kod končastih gljiva methodske prirode. Kao jedno od mogućih rešenja ovog problema poslužile su citoplazmatične kapi iz džinovskih sporangiofora *P. blakesleeanus*. Već je rečeno da ova gljiva ima izuzetnu moć regeneracije i da se micelijum može regenerisati iz citoplazmatičnih kapi dobijenih presecanjem vrha sporangiofore u odgovarajućem rastvoru

(*Zaichkin et al., 1975*). Naime, autori su pokazali da prilikom presecanja vrha sporangiofore gljive u IVb fazi razvića u rastvoru sastava: 0.5 mM KNO₃, 0.5 mM NaCl, 1 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM Mg(NO₃)₂ i 500 mM saharoza, dolazi do isticanja citoplazme od koje se formiraju sferične kapi. Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da ove kapljice sadrže sve organele karakteristične za gljivu. U prvih 1-3 s one nemaju membranu (faza gimnoplasta), za 10-15 s oko njih se obrazuje membrana (faza protoplasta), za oko 2 h počinje sinteza ćelijskog zida, dok za 10-15 h neke od njih počinju da klijaju i na kraju regenerišu čitav organizam. Na ovaj način se dobija protoplast bez ostataka ćelijskog zida na veoma jednostavan način. Pored toga, pošto ima sposobnost regeneracije čitavog organizma, njegova membrana mora funkcionalno i strukturno odgovarati ćelijskom membrani hifa *Phycomyces*.

Dosadašnja elektrofiziološka istraživanja bila su usmerena na ekstracelularno registrovane ukupne jonske flukseve kroz membranu sporangiofora (*Živanović, 2005*) i jonske struje kroz pojedinačne jonske kanale, čijim registrovanjem je utvrđeno postojanje bar sedam različitih jonskih kanala od kojih je pet detaljnije okarakterisano (*Živić, 2005; Živić et al., 2009*). Naime, funkcionisanje jonskih kanala kod gljiva, kao što će kasnije biti pokazano, predstavlja jedan od najmanje istraženih fizioloških procesa.

Gljive odlikuje izuzetna sposobnost usvajanja neorganskih jedinjenja iz spoljašnje sredine zahvaljujući kojoj su našle široku biotehnološku (*Tobin et al., 1994*) ali i medicinsku primenu (*Han et al., 2009*). Uveliko se razmatra i korišćenje ovih organizama u procesima biosorpcije, pre svega radi uklanjanja teških metala i radionuklida iz zemljišta i vode (*Say et al., 2001*). Veliki odnos površina/zapremina, kao i adaptivni izazovi usled intezivne razmene materija sa okolnom sredinom naglašavaju značaj razumevanja transporta kroz ćelijsku membranu za razumevanje fiziologije gljiva. Sa druge strane, glavno mesto skladištenja materija u ćelijama gljiva je vakuola (*Klionsky et al., 1990*) pa su jonski transporteri u tonoplastu, uz one na ćelijskoj membrani, glavni regulatori unutarćelijske jonske homeostaze. I pored toga, membranski transport kod gljiva kao i proteini koji u njemu učestvuju, jonski kanali, pumpe i transporteri su relativno slabo izučeni, iako je njihovo poznavanje važno, kako za razumevanje biologije gljiva, tako i za buduću primenu saznanja o ovim procesima. Dosadašnja istraživanja jonskih kanala u carstvu gljiva obavljana su uglavnom na jednoćelijskim askomicetama – kvascima (*Lew et al., 1998; Martinac et al., 2008*), maloj i visokospecijalizovanoj grupi gljiva (oko 1% svih poznatih vrsta), dok je na višećelijskim filamentoznim gljivama ispitan mali broj jonskih kanala (*Živić M., 2005*). Prvi opisani jonski kanal u membrani filamentoznih gljiva je visokoprovodljivi (600pS) mehanosenzitivni

katjonski kanal na *Uromyces appendiculatus* (Zhou et al., 1991). Od tada su u nativnim ćelijskim membranama ovih organizama okarakterisana samo dva, i to anjonska kanala: izlazni ispravljач provodljivosti 43 pS u membrani *Aspergillus niger* (Roberts et al., 1997) i niskoprovodljivi izlazni ispravljач od 10 pS u membrani *Phycomyces blakesleeanus* (Živić et al., 2009). Sa stanovišta fiziološke uloge anjonski kanali na filamentoznim gljivama predstavljaju gotovo potpunu nepoznanicu (Roberts et al., 2011). Još dva jonska kanala su okarakterisana, ali nakon što su izolovani iz filamentoznih gljiva i eksprimirani u membrani kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: K⁺ izlazni ispravljач iz ćelijske membrane *Neurospora crassa* (Roberts, 2003) kao i Ca²⁺-zavisni anjonski kanal iz membrane *Aspergillus nidulans* (Roberts et al., 2011). Uočeno je još šest jonskih kanala u ćelijskoj membrani *N. crassa* ali su podaci o njima izuzetno oskudni (Levina et al., 1992). U konfiguraciji cela ćelija, ukupne jonske struje registrivane su samo na sluzavom mutantu *N. crassa* i osim zaključka da su katjonske i anjonske struje podjednako zastupljene, nije se išlo u njihovu detaljnu karakterizaciju (Levina et al., 2002). Osnovni razlog zbog kojeg su na filamentoznim gljivama jonske struje, i kanali koji se nalaze u njihovoj osnovi, ovako slabo izučeni, jeste što ovi organizmi imaju hitinski ćelijski zid koji je teško ukloniti. To onemogućava slobodan pristup plazma membrani što primenu metode nametnute voltaže na deliću membrane (eng. *patch clamp*), osnovne za registrovanje jonskih struja, čini teško izvodljivom (Levina et al., 2002; Roberts, 2003). *P. blakesleeanus* je pogodan objekat za ispitivanje jonskih kanala zbog izrazite sposobnosti regeneracije koja omogućava citoplazmatskim kapljicama, izolovanim iz vrha sporangiofore, da u kratkom vremenskom periodu (od nekoliko sekundi) sintetišu novu ćelijsku membranu (Zaichkin et al., 1975) koja se onda jednostavno može ispitivati *patch clamp* tehnikom. Preliminarna istraživanja, vršena merenjem ukupnih membranskih struja, pokazala su da u uslovima osmotskog nadimanja dolazi do aktivacije velikih anjonskih provodljivosti sa biofizičkim karakteristikama jonskog kanala regulisanog zapreminom ćelije – eng. *volume regulated anion channel* (VRAC), do sada opisanog samo kod kičmenjaka.

2. CILJ RADA

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je detaljna karakterizacija osmotski aktiviranih struja registrovanih sa cele membrane citoplazmatskih kapi dobijenih iz sporangiofora gljive *P. blakesleeanus* i utvrđivanje njihove uloge kako u odgovoru gljive na osmotske izazove u spoljašnjoj sredini, tako i u procesima njenog rasta i energetskog metabolizma. Da bi se ostvario ovaj osnovni cilj definisani su sledeći specifični ciljevi:

1. Utvrđivanje da li model sistem membrane citoplazmatskih kapi funkcionalno odgovara ćelijskoj membrani sporangiofore gljive *P. blakesleeanus*.
2. Registrovanje ukupnih jonskih struja kroz membranu cele citoplazmatske kapi i identifikacija dominantnih struja.
3. Karakterizacija osmotski aktiviranih jonskih struja određivanjem sledećih parametara:
 - a. biofizičke osobine,
 - b. jonska osnova,
 - c. osetljivost na agoniste i antagoniste,
 - d. zavisnost osobina struje od: koncentracije provodnog jona, intenziteta osmotskog stimulusa, koncentracije kalcijumovih jona i pH.
 - e. regulacija aktivnosti unutarćelijskim signalnim putevima.
4. Ispitivanje uloge osmotski aktiviranih jonskih kanala u procesima regulacije zapremine i rasta sporangiofore.
5. Utvrđivanje uticaja potvrđenih blokatora osmotski aktiviranih struja na rast, disanje i fosfatni metabolizam gljive.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalni objekat - priprema koncentrovanih štokova spora

Kao eksperimentalni objekat u ovom radu korišćen je divlji soj NRRL1555(-) (Burgeff) gljive *Phycomyces blakesleeanus*. Uslovi gajenja gljive su značajno varirali u zavisnosti od vrste eksperimenta, te će detaljno biti opisani prilikom opisa svakog od tipova eksperimenata. Sada će biti opisana samo priprema koncentrovanih štokova spora koja je zajednička za sve tipove eksperimenata.

Vegetativne spore gljive *P. blakesleeanus* su čuvane u zamrzivaču na -20°C u koncentrovanim štokovima od 10^7 spora/ml. Za dobijanje koncentrovanog štoka bilo je neophodno pripremiti krompirov medijum i na njega zasejati spore. Medijum je pripreman na sledeći način: 200 g sitno iseckanog krompira kuvano je sat vremena u 1 l destilovane vode, a zatim je ceđeno kroz dvoslojnu gazu. Zapremina dobijenog filtrata dopunjavana je do 1 l nakon čega je filtrat ponovo zagrevan do ključanja i u njega je dodavano: 15 g agara, 20 g glukoze, 1 mg vitamina B1 i 1,5 g ekstrakta kvasca. Dobijeni medijum je sterilisan 30 min na temperaturi od 120°C a zatim je razlivan u sterilne petri posude ~~pre~~čnika 9 cm do nivoa od 0,5 - 1 cm. Pre sejanja, iz postojećih koncentrovanih štokova, spore su razblaživane do koncentracije 10^2 spora/ml i inkubirane u vodenom kupatilu 15 min na temperaturi od 49°C da bi se aktivirao proces klijanja. Nakon hlađenja, kada medijum očvrsne, u svaku petri kutiju zasejavano je po 100 μl spora iz aktiviranog razblaženog štoka. Dodate spore su razmazivane sterilnim staklenim štapićem po medijumu nakon čega su petri kutije zatvarane i ostavljane u plastične kutije za gajenje. Ovako posejane spore su gajene u komori za uzgoj na temperaturi od 22°C pri relativnoj vlažnosti vazduha od 95%, izložene kontinuiranom belom fluorescentnom osvetljenju jačine 10 W/m^2 . Nakon 48 h spore razvijaju micelijum gotovo po čitavoj površini krompirovog medijuma, a zatim se petri kutije otvaraju i micelijumi ostavljaju da rastu u istim uslovima još 48h. Posle četiri dana gljive dostižu stupanj IVb u razvoju sporangiofora. Nakon dostizanja ovog stupnja, sporangije su potapane u destilovanu vodu što dovodi do pucanja njihovog zida i oslobađanja spora. Zapremina destilovane vode za prikupljanje i koncentrovanje spora je određivana prema izrazu: $1,4\text{ ml} \times \text{broj korišćenih petri kutija}$, tako da je konačna koncentracija spora iznosila 10^7 spora/ml.

3.2. Eksperimenti nametnute voltaže na deliću membrane – *patch clamp* eksperimenti

3.2.1 Gajenje eksperimentalnog objekta

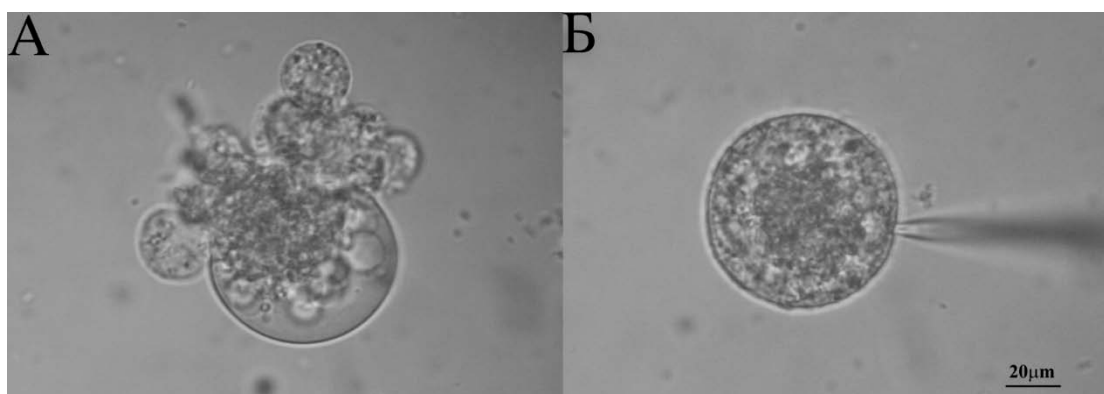
Pre sejanja za eksperimente nametnute voltaže na deliću membrane spore su razblaživane do koncentracije 10^2 spora/ml i inkubirane 15 minuta na temperaturi od 49°C. Krompirov medijum je nakon sterilizacije razlivan u staklene violice prečnika 1 cm i visine 4 cm do nivoa od oko 3 cm i ostavljan je da se ohladi. U svaku violicu dodavano je 20 μ l 10^2 aktiviranih spora. Kao i za dobijanje koncentrovanih štokova, gljive su gajene u komori za uzgoj smeštene u plastične kutije kao i u gore opisanim uslovima. Posle 4-5 dana rastenja gljive su dostizale IVb stupanj razvića sporangiofora. U ovom stadijumu, sporangiofore su korišćene za dobijanje citoplazmatičnih kapi koje su predstavljale eksperimentalni objekat u eksperimentima nametnute voltaže na deliću membrane.

3.2.2. Citoplazmatske kapi gljive *P. blakesleeanus* kao model sistem za ispitivanje jonskih kanala kod filamentoznih gljiva

Metod dobijanja citoplazmatskih kapi iz makrosporangiofora gljive *P. blakesleeanus* opisao je Zaičkin sa saradnicima (Zaichkin et al., 1975). Sposobnost citoplazme istisnute iz sporangiofore da formira membranu i regeneriše ćelijski zid, a zatim i micelijum poznata je već dugo (Weide, 1939) pa je pretpostavljeno da je membrana dobijenih citoplazmatskih kapi funkcionalni analog citoplazmatske membrane hifa ove gljive (Zaichkin et al., 1975). Ove pretpostavke dodatno su potvrdili Živić i saradnici 2009 (Živić et al., 2009). godine ispitivanjima funkcionalnosti membrane u pogledu njene sposobnosti sinteze ćelijskog zida i regeneracije kompletnog micelijuma ali i merenjima membranskog potencijala citoplazmatskih kapljica (Živić, 2009). Imajući sve ovo u vidu kao i činjenicu da je još 2005. godine pokazano da je *P. blakesleeanus* dobar model sistem za proučavanje struja kroz pojedinačne jonske kanale na ćelijskoj membranani filamentozne gljive *P. blakesleeanus* (Živić, 2005) u ovom radu je napravljen korak dalje i registrovane su ukupne jonske struje kroz membranu citoplazmatskih kapljica gljive.

3.2.3. Pripema citoplazmatskih kapi

Kao izvor citoplazmatskih kapi u svim eksperimentima korišćene su sporangiofore u IVb fazi razvića a vezikule su pripravane po modifikovanom metodu Zaičkina i saradnika (*Zaichkin et al., 1975*). Celokupna procedura pripeme preparata je obavljena direktno u komorici za registrovanje koja je prethodno punjena odgovarajućim rastvorom koji je u eksperimentima nametnute voltaže na deliću membrane predstavljao ekstracelularni rastvor (čiji sastav je zavisio od potreba eksperimenta). Korišćeni ekstracelularni rastvori bili su izosmotski sa citoplazmom sporangiofore (495 mOsm). Vrh sporangiofora je uranjan u rastvor koji se nalazio u komorici i odsecan je u oblasti zone izduživanja, oko 2 mm ispod sporangije. Po odsecanju vrha, citoplazma pod dejstvom turgora od oko 2 bara biva izbačena u rastvor i tu formira brojne citoplazmatske kapi. Sporangije se zatim pažljivo uklanjaju iz rastvora, pri čemu se vodi računa da ne puknu, kako bi se izbegla kontaminacija preparata prevelikim brojem spora. Bilo je nemoguće potpuno izbeći prisustvo spora u preparatu, ali se vodilo računa da koncentracija ne bude prevelika pošto se lako lepe za vrh mikroelektrode i mogu da ometaju formiranje gigaomskog kontakta sa membranom vezikula. Dobijene citoplazmatske kapi su inkubirane u rastvoru oko 15 minuta na sobnoj temperaturi da bi se membrane stabilisale.



Slika 1. Primeri citoplazmatskih kapi dobijenih u ekstracelularnom rastvoru po odsecanju vrha sporangiofore *P. blakesleeanus* u oblasti zone izduživanja, oko 1mm ispod sporangije. (A) Visoko vakuolizirana citoplazmatska kap (B) nevakuolizirana citoplazmatska kap.

Populacija dobijenih citoplazmatskih kapi je prilično heterogena, pre svega u pogledu veličine i vakuoliziranosti, a osim toga kapi se međusobno mogu razlikovati i po obojenosti i granulisanosti citoplazme. Kapi mogu biti od 10 do 80 μm u prëniku, bez, sa malo ili dosta

vakuola u unutrašnjosti a citoplazma im može biti izrazito žuto obojena i granulirana ili može biti potpuno transparentna. U eksperimentima nametnute voltaže na deliću membrane korišćene su vezikule sa žutom, granulisanom citoplazmom prečnika 20-40 μm . U jednoj seriji eksperimenta u kojima je meren, srednji prečnik svih korišćenih vezikula iznosio je $31 \pm 1.7 \mu\text{m}$ (n=37). Gigaomske kontakte sa membranom bilo je moguće dobiti do tri sata po pravljenu preparata, ali su vremenom citoplazmatske kapi spontano pucale, broj im se smanjivao, a neke od njih počinjale su i sintezu ćelijskog zida što je dodatno remetilo uspostavljanje gigaomskog kontakta, tako da je posle 2-2.5 h obično pripreman novi preparat. Za pripremu jednog preparata u proseku je korišćeno oko 20 sporangiofora.

3.2.4 Eksperimenti nametnute voltaže na deliću membrane u konfiguraciji *cela ćelija*

Jonske struje kroz membranu citoplazmatskih kapi snimane su metodom nametnute voltaže na deliću membrane u konfiguraciji *cela ćelija* (Hamill, 1981). Svi eksperimenti obavljani su na sobnoj temperaturi (20-25°C). Staklene pipete za pripremu mikroelektroda izvlačene su od debelozidnih borosilikatnih staklenih kapilara (SD 1,5 mm, UD 0,86 mm, Science Product, Hofheim, Germany) na horizontalnom izvlakaču Flaming Brown tipa, proizvođača Sutter (USA), upotrebom programa od najmanje četiri koraka izvlačenja. Komorica za registrovanje sa pripremljenim preparatom postavljena je na nosač invertovanog mikroskopa Zeiss Axiovert 10. Za registrovanje jonskih struja *patch clamp* metodom u konfiguraciji *cela ćelija* korišćeni su pojačavač AM Systems 2400, Digidata 1200 interfejs i program Clampex 7 (sve od Molecular Devices, CA, USA). Signali su uzorkovani frekvencijom 10 kHz i filtrirani upotrebom niskopropusnog filtra od 2 kHz. Kao referentna elektroda je korišćena Ag / AgCl elektroda sa sinterovanim cilindrom uronjenim u komoricu. U eksperimentima u kojima su joni hlora u komorici zamenjivani nekim drugim anjonima referentna elektroda je bila uronjena u posudu sa 1 M rastvorom KCl koja je preko staklene cevčice ispunjene 1 M rastvorom KCl u 1% agaru (agarski most) povezana sa komoricom. Parametri dobijene konfiguracije *cela ćelija* kao što su membranski kapacitet vezikule (C_m), membranski i pristupni otpor (R_m i R_a) očitavani su direktno tokom snimanja u *Membrane Resistance* modu programa Clampex 7. Serijski otpor nije kompenzovan. Analiza dobijenih zapisa obavljena je u programu za obradu zapisa snimljenih metodom nametnute voltaže na deliću membrane Clampfit 10.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Uspešnost dobijanja gigaomskog kontakta bila je oko 70%. Nakon prvog kontakta membrane i vrha pipete, mereni otpor pipete porastao bi za 1-3 M Ω a u roku od petnaestak sekundi nakon otpuštanja pozitivnog pritiska formirao bi se i gigaomski kontakt. Ponekad je bilo neophodno primeniti blagu sukciju. Uobičajeni gigaomski kontakti nisu bili velike otpornosti. Oko 90 procenata dobijenih gigaomskih kontakata bilo je u rasponu od 2-5 G Ω a samo oko 10% njih od 5-10 G Ω . Za uspešno dobijanje dobre konfiguracije *cela ćelija* najbolje se pokazala upotreba pipeta otpora vrha u opsegu od 2 do 5 M Ω (napunjenih standardnim unutarćelijskim rastvorom). Ukoliko je otpor vrha pipete bio preko 5 M Ω bilo je teško uspostaviti dobru konfiguraciju *cela ćelija* (uspešnost je bila manja od 10%) i kod ovako uspostavljenih konfiguracija membrana ispod pipete se relativno brzo spontano obnavljala zatvarajući formirani otvor na vezikuli i onemogućavajući dalje snimanje. Ukoliko su korišćene pipete otpornosti manje od 2 M Ω prilikom sukcije često je dolazilo do uvlačenja čitavih vezikula u vrh pipete ili se membrana vezikula lako dezintegrisala u potpunosti. Uspešnost uspostavljanja “dobrih” konfiguracija *cela ćelija* sveukupno je iznosila oko 15% nakon dobijanja gigaomskog kontakta.

Registrovani zapisi su smatrani “dobrim” i uzimani su u obzir za analizu ukoliko su zadovoljavali dva osnovna kriterijuma: 1. R_m meren na startnom potencijalu od -50 mV iznosio je najmanje 100 M Ω ; 2. R_a nije bio veći od jedne petine R_m i tokom snimanja se nije menjao više od 10%. Gustine struja (I_c) su dobijane deljenjem izmerene strujne amplitude u konfiguraciji *cela ćelija* izmerenom kapacitivnošću.

3.2.5. Voltažni protokoli, analiza rezultata i statistička obrada podataka

U zavisnosti od tipa eksperimenta, struje u konfiguraciji *cela ćelija* su pobuđivane različito dizajniranim voltažnim protokolima. Za registrovanje ukupnih jonskih struja kroz membranu najčešće je upotrebljavan standardni voltažni protokol (SVP): sa početne voltaže od -50 mV nametan je pravougaoni stimulus na potencijalu od -150 mV do +70 mV u koracima od 20 mV. Svaki korak je trajao 500 ms i praćen je sa 530 ms oporavka na početnom potencijalu od -50 mV pre sledećeg voltažnog koraka. Pošto membrane citoplazmatskih kapi nisu dobro podnosile ponavljano nametanje voltažnih stimulusa većih od -100 mV u hiperpolarizaciji odnosno +100 mV u depolarizaciji (pa bi često dolazilo do gubitka voltažne kontrole, aktivacije struja čija je amplituda prelazila 10 nA i posledično dezintegracije čitavih vezikula), kako bi se detaljnije okarakterisala izlazna depolarizacijom inaktivirana osmotski

aktivna strujna komponenta, korišćen je voltažni protokol sa identičnim startnim potencijalom i dužinom voltažnih pulseva kao SVP ali manjom početnom hiperpolarizacijom (-70 mV) i, tamo gde je to bilo moguće, većom krajnjom depolarizacijom (+110 mV).

Upotrebom opisanih voltažnih protokola dobijeni su strujni odgovori na osnovu kojih je merenjem strujnih amplituda i računanjem gustina struje, konstruisana kriva zavisnosti gustine struja od nametnute voltaže (I_c/V). Dobijena kriva je fitovana Bolcmanovom funkcijom:

$$I = \frac{a}{1 + \exp(z_g F(V_{0.5} - V) / RT)} + C \quad (1)$$

gde I predstavlja gustinu struje na početku voltažnog pulsa (izraženu u pA/pF) pri nametnutoj voltaži V (mV), F je Faradejeva konstanta (96480 C mol^{-1}), R univerzalna gasna konstanta ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) a T apsolutna temperatura izražena u K . Parametri fita su gustina struje na nivou zasićenja – a (pA/pF), minimalna gustina struje – C (pA/pF), naelektrisanje vratnica – z_g i voltaža na kojoj se javlja polovina maksimalne aktivacije struje – $V_{0.5}$ (mV).

Za konstruisanje krive aktivacije osmotski aktivirane struje, merene su amplitude “strujnih repića” na -50 mV nakon primenjenih depolarišućih stimulusa SVP-a. Amplitude struja su normalizovane u odnosu na maksimalnu amplitudu u eksperimentu a zatim su fitovane Bolcmanovom funkcijom (jednačina 1). Za izračunavanje inaktivacionih karakteristika osmotski aktivirane struje korišćen je inaktivacioni protokol (IP): struje su pobuđivane nametanjem kondicionih voltažnih prepulsa od -130 mV do +50 mV u skokovima od po 20 mV, i trajanju od 516 ms, nakon kojih je nametan test puls od +70 mV, trajanja 250 ms. Amplitude strujnih odgovora na početku test pulsa su normalizovane u odnosu na maksimalnu amplitudu u eksperimentu kako bi se konstruisala kriva zavisnosti od kondicionog prepulsa – kriva inaktivacije, koja je zatim fitovana Bolcmanovom funkcijom (jednačina 1). U oba slučaja, I predstavlja normalizovanu struju (repić ili struju na početku pulsa), $C=0$, $a=I$, $V_{0.5}$ je voltaža polu-aktivacije/inaktivacije a ostali parametri imaju isto značenje kao u jednačini 1.

Merenje kinetike inaktivacije vršeno je fitovanjem osmotski aktiviranih struja standardnom eksponencijalnom funkcijom:

$$I = I_p \exp(-t / \tau) + I_{ss} \quad (2)$$

gde I predstavlja vremenski zavisnu struju (pA), I_p je amplituda struje na početku pulsa (pA), I_{ss} je amplituda struje na kraju pulsa (pA), a τ je vremenska konstanta brzine inaktivacije (ms).

Korišćeni rampa protokol konstruisan je kao linearni voltažni puls od -120 mV do $+120$ mV, nagiba 0.72 mV/ms. Pre početka pulsa i po njegovom završetku nametnuta voltaža bila je 0 mV. Odgovori struja dobijeni primenom ovakvog voltažnog stimulusa korišćeni su za određivanje potencijala reverzije (E_{rev} ; mV) u simetričnom KCl (kontrolni uslovi) i asimetričnim uslovima u kojima su joni Cl^- zamenjeni jonima I^- u komorici (I/Cl^- uslovi). Aritmetička sredina tako dobijenog E_{rev} u kontrolnim uslovima je oduzeta od aritmetičke sredine dobijenog E_{rev} u asimetričnim uslovima i tako izračunat pomeraj potencijala reverzije (ΔE_{rev}) je korišćen za računanje odnosa provodljivosti membrane za jone I^- i Cl^- . Odnos provodljivosti, P_I/P_{Cl^-} , izračunat je na osnovu modifikovane Goldman-Hoćkin-Kacove jednačine:

$$\frac{P_I}{P_{Cl}} = \frac{[Cl^-]_i - [Cl^-]_o e^{\frac{\Delta E_{rev} F}{RT}}}{[I^-]_o e^{\frac{\Delta E_{rev} F}{RT}}} \quad (3)$$

gde je P – provodljivost (pS), F – Faradejeva konstanta ($96480 C mol^{-1}$), R - univerzalna gasna konstanta ($8,315 J K^{-1} mol^{-1}$), T – apsolutna temperature (K), $[Cl^-]$ i $[I^-]$ su koncentracije jona hlora i joda (mol/dm^3), a oznake o i i predstavljaju spoljašnju odnosno unutrašnju stranu membrane.

Struje osetljive na blokatore jonskih kanala ili promenu uslova sredine su dobijene oduzimanjem strujnih zapisa nakon izvršenog tretmana od kontrolnih zapisa struje u programu *Clampfit* 10.4.

Za statistička poređenja rezultata dobijenih pre i posle odgovarajućih tretmana korišćeni su studentov t-test ili Mann-Whitney test sa nivoom značajnosti od 5% ($p < 0.05$). Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška, a broj nezavisnih ponavljanja za svaki

eksperiment označen je kao *n*. Statistički testovi i fitovanje strujnih zapisa radjeni su u programima *SigmaPlot* (v.12.3, Systat software, Inc.) i *Clampfit* 10.4 (Molecular Devices, USA). a za grafičko i tabelarno prikazivanje rezultata korišćeni su *SigmaPlot* (v.12.3, Systat software, Inc.) i *MS Office*.

3.3. Rastvori i hemikalije korišćeni u eksperimentalnom radu

Sastav korišćenih vanćelijskih i unutarćelijskih rastvora zavisio je i menjao se u skladu sa potrebama trenutno obavljanog eksperimenta.

3.3.1. Rastvori

Najveći broj eksperimenata radjen je u uslovima osmotski indukovanog nadimanja ("hipoosmotki uslovi"), dobijenih korišćenjem 55 mOsm razlike između standardnog vanćelijskog i hiperosmotskog unutarćelijskog (pipetnog) rastvora. Standardni vanćelijski rastvor (SVR), izoosmotski sa citoplazmom vezikula, je korišćen za pripremu preparata za eksperimente i sadržao je (u mM): 125 KCl, 10 Hepes, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 225 saharoza (osmolaritet podešen na 495 mOsm), pH=7.2 (podešen sa 1M KOH). U najvećem broju eksperimenata, za punjenje pipette korišćen je standardni unutarćelijski rastvor (SUR) sledećeg sastava (u mM): 125 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 Hepes, 280 saharoza (osmolaritet podešen na 550 mOsm), pH=7.2 (podešen sa 1M KOH).

Pošto su u eksperimentima rađenim u gorepomenutim uslovima dobijene osmotski aktivirane struje velikih amplituda (reda veličine *nA*), nakon što je ustanovljeno da je ova struja nošena isključivo anjonima dalji eksperimenti su rađeni u uslovima sa manjom koncentracijom negativnih jona. Vanćelijski rastvor sadržao je (u mM): 65 K-glutamat, 60 KCl, 10 Hepes, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 225 saharoza (495 mOsm), pH=7 (1M KOH). Unutarćelijski rastvor bio je sledećeg sastava (u mM): 65 K-glutamat, 60 KCl, 10 Hepes, 2 MgCl₂, 280 saharoza (550 mOsm), pH=7 (1M KOH).

U eksperimentima čiji je cilj bio utvrđivanje jonske osnove osmotski aktivirane struje (*Rezultati, odeljak 4.6*) korišćen je vanćelijski rastvor sa smanjenom koncentracijom hloridnih jona (u mM): 10 KCl, 115 K-glutamat, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 Hepes, osmolaritet podešen na 495 mOsm saharozom, pH=7.2 (KOH). Nakon snimanja u ovakvim uslovima u komoricu je dodavan 10 mM KCl i merena je promena amplitude struje na početku zapisa. U istu svrhu merenja su vršena u simetričnim "hipoosmotskim" uslovima u kojima su kalijumovi joni potpuno zamenjeni jonima tetraetilamonijuma korišćenjem vanćelijskog i

unutarćelijskog rastvora identičnog sastava kao u kontrolnim uslovima osim što je 125 mM KCl zamenjen 125 mM TEA-Cl.

Za snimanja u izoosmotskim uslovima (*Rezultati, odeljak 4.4*), isti rastvor - SVR (495 mOsm), je korišćen kao van- i unutarćelijski. Utvrđivanje zavisnosti veličine struja od intenziteta osmotskog stimulusa (*Rezultati, odeljak 4.4*) ispitivano je upotrebom SUR-a povećanog osmolariteta (510, 520, 550, 590 mOsm; sve podešeno saharozom). Intenzitet osmotskog stimulusa je računat kao razlika u osmolaritetima između SVR i korišćenog SUR. Kako bi se dodatno ustanovila zavisnost struja od osmotskih uslova sredine, citoplazmatske kapi su akutno izlagane hiperosmotskim stresu. Tretman je obavljan prelaskom iz kontrolnih ("hipoosmotskih") uslova u hiperosmotske, dodavanjem 100 μ l SVR visokog osmolariteta (1000 mOsm, podešenog saharozom) u komoricu. Na ovaj način, osmolaritet rastvora u komorici je povećavan do 570 ± 10 mOsm (n=4), što je 10-30 mOsm više od rastvora u pipeti (550 mOsm).

Za određivanje selektivnosti struje u odnosu na različite anjone (*Rezultati, odeljak 4.6*) snimanja su obavljena u simetričnim uslovima: KCl je ekvimolarno zamenjen K-glukonom, K-glutatom i K-bikarbonatom u vanćelijskom i unutarćelijskom rastvoru. Iz tehničkih razloga¹, jedino su eksperimenti sa KI vršeni u asimetričnim uslovima: SVR je umesto 125 mM KCl sadržao 125 mM KI, a SUR je korišćen kao pipetni rastvor.

Odnosi provodljivosti (P_X/P_{Cl}) su računati kao odnosi srednjih gustina struje na početku zapisa registrovanih u opisanim uslovima na +70 mV.

Ispitivani blokatori anjonskih kanala (4,4'-Diizotiocijanostilben-2,2'-disulfonska kiselina – natrijum hidratna so – DIDS; antracen-9-karboksilna kiselina– A9C; niflumična kiselina – NFK; $ZnCl_2$) su dodavani hiperosmotski u komoricu nakon snimanja struja u kontrolnim uslovima. Osmolaritet svih rastvora je meren na osmometru Vapro 5520 (Wescor, Utah, USA). Nakon dodavanja blokatora u komoricu, osmolaritet vanćelijskog rastvora se nikada nije povećavao više od 10 mOsm.

¹ KI je nemoguće koristiti za pipetni rastvor jer su joni I elektronegativniji od jona Cl⁻ pa u dodiru sa srebro-srebrohloridnom elektrodom istisnu jone Cl⁻ sa elektrode što onemogućava snimanje jer se između merne i referentne elektrode javlja razlika potencijala koju je teško poništiti

Radi utvrđivanja zavisnosti dinamike inaktivacije osmotski aktivirane struje od ATP i koncentracije jona Mg^{2+} korišćeni su unutarćelijski rastvori sa 2 mM ATP (A i B) i različitim koncentracijama Mg^{2+} jona. Sastav rastvora bio je sledeći (u mM):

Rastvor A: 65 K-glutamat, 60 KCl, 10 Hepes, 2 $MgCl_2$, 2 EGTA, 2 MgATP, saharoza (550 mOsm), pH=7 (1 M KOH).

Rastvor B: 65 K-glutamat, 60 KCl, 10 Hepes, 0.5 $MgCl_2$, 2 EGTA, 2 Na_2ATP , saharoza (550 mOsm), pH=7 (1M KOH).

Koncentracije slobodnih Mg^{2+} jona računate su pomoću WEBMAXC STANDARD programa dostupnog na: <http://web.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm>. U rastvoru A nalazilo se 2 mM, a u rastvoru B 32 μM slobodnih Mg^{2+} jona.

Eksperimenti u kojima su ispitivane $GTP\gamma S$ -aktivirane jonske struje rađeni su u izoosmotskim uslovima. Korišćen je vanćelijski rastvor sledećeg sastava (u mM): 65 K-glutamat, 60 KCl, 10 Hepes, 2 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 225 saharoza (495 mOsm), pH=7 (1M KOH) i unutarćelijski rastvor istog sastava (bez $CaCl_2$), pH i osmolariteta u kojem je rastvaran 120 μM $GTP\gamma S$.

Nakon ovih eksperimenata, za utvrđivanje jonske osnove struje, kao vanćelijski i unutarćelijski rastvori korišćeni su rastvori bez hlora, identičnog sastava, pH i osmolariteta kao i u prethodnim eksperimentima samo što je KCl ekvimolarno zamenjen K-glutamatom. Korišćena koncentracija $GTP\gamma S$ u pipeti bila je ista kao i ranije, 120 μM .

3.3.2 Hemikalije

Korišćene supstance 4,4'-Diizotiocijanatosilben-2,2'-disulfonska kiselina – natrijum hidratna so- (DIDS), antracen-9-karboksilna kiselina (A9C), niflumična kiselina (NFK), Na_2ATP , MgATP, guanozin 5'-[γ -tio]trifosfat tetralitijumska so ($GTP\gamma S-Li_4$) i rastvor laktofenol-plavo boje su kupljeni od proizvođača Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Štokovi soli i ATP su pripremani u dejonizovanoj vodi; a DIDS, A9C i NFK su rastvarani u 70% etanolu. 50 mM štokovi A9C i NFK su skladišteni u frižideru na 5°C, a 35 mM štok DIDS u zamrzivaču na -20°C. Svi unutarćelijski rastvori su filtrirani, alikvotirani i skladišteni u zamrzivaču na -20°C, osim rastvora sa $GTP\gamma S-Li_4$ koji je čuvan na -65°C.

3.4. Bojenje ćelijskog zida i merenje prečnika citoplazmatskih kapi u eksperimentima akutne promene osmotskih uslova

Bojenje novoformiranog ćelijskog zida citoplazmatskih kapi vršeno je pomoću boje laktofenol-plavo. Rastvor ove boje sadrži tri komponente: fenol, laktat i cotton-plavo. Fenol je toksičan i ubija žive organizme, laktat se koristi za očuvanje ćelijskih struktura gljive a cotton-plavo boji hitin u ćelijskom zidu gljive (*Leck, 1999*). Citoplazmatske kapi su pripremane na isti način kao za eksperimente nametnute voltaže na deliću membrane samo u manjoj zapremini (200 μ l) standardnog vanćelijskog rastvora. Ovako pripremljeni preparati su ostavljeni u komorici na sobnoj temperaturi 2, 2.5 i 3 sata, posle čega je vršeno bojenje dodatkom 15 μ l komercijalnog rastvora laktofenol plavog (Sigma). Preparat je inkubiran u boji 2-3 minuta. Vizualizacija i fotografisanje citoplazmatskih kapi pre i nakon bojenja rađeni su na invertovanom *Carl Zeiss Axiovert* mikroskopu (Zeiss, Gotingen, Nemačka) upotrebom objektivna koji uveličava 40 puta u program *Axio Vision* (v. 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Nemačka).

Za merenje dijametara citoplazmatskih kapi u različitim osmotskim uslovima, preparat je pripreman u 300 μ l ćelijskog rastvora izoosmotskog sa citoplazmom (495 mOsm). Korišćen je isti sistem za mikroskopiranje kao u eksperimentima bojenja ćelijskog zida. Citoplazmatične kapi su inkubirane u izoosmotskom rastvoru 6 minuta a zatim su dodavanjem 30 μ l dejonizovane vode izlagane hipoosmotskom rastvoru (450 mOsm) još 16 minuta. Fotografisanje preparata obavljano je na svakih 60 sekundi a fotomikrografije su analizirane u programu *ImageJ* (ImageJ 1.47, NIH, USA). Iz tri nezavisna eksperimenta za merenje dijametara izabrane su 4 citoplazmatske kapi koje se nisu pomerale tokom izlaganja različitim osmotskim uslovima i njihove fotomikrografije su analizirane.

3.5. Merenja prinosa biomase – testovi toksičnosti

Za određivanje toksičnosti upotrebljivanih blokatora anjonskih kanala (NFK, A9C i DIDS) meren je prinos biomase micelijuma gljive i efekti ispitivanih blokatora na isti. Za ove eksperimente, gljiva je gajena u Petri kutijama smeštenim u uslovima za gajenje opisanim u odeljku 3.1.1, s tom razlikom što je umesto čvrstog krompir-medijuma korišćen modifikovani tečni minimalni medijum, dvostruko veće koncentracije D-glukoze i L-asparagina. Povećane

koncentracije D-glukoze i L-asparagina korišćene su kako bi se obezbedila dovoljna količina ugljenika i azota za rast micelijuma čime se podstiče veći prinos biomase. Optimalan pH medijuma za rast micelijuma je 4,5 (*Martinez-Cadena, 1995*). Kompletan sastav modifikovanog tečnog minimalnog medijuma je bio sledeći: 220 mM D-glukoza, 26,6 mM L-asparagin x H₂O, 2 mM MgSO₄ x 7H₂O, 36,7 mM KH₂PO₄, 0,376 mM CaCl₂, 3 μM tiamin x HCl, 1 μM limunska kiselina x H₂O, 3,7 μM Fe(NO₃)₃ x 9H₂O, 3,5 μM ZnSO₄ x 7H₂O, 1,8 μM MnSO₄ x H₂O, 0,2 μM CuSO₄ x 5H₂O i 0,2 μM NaMoO₄ x 2H₂O.

Pre sejanja, štok spora je odmrzavan i aktiviran 15 min na 49°C. Nakon toga su spore dobro homogenizovane intenzivnim mešanjem i zasejavan je 1 ml aktiviranog koncentrovanog štoka u 11 ml minimalnog medijuma tako da je finalna koncentracija zasejanih spora u Petri kutijama bila oko 10⁶/ml. Micelijum je gajen 16 h, nakon čega je tretiran ispitivanim blokatorima u sledećim koncentracijama (u μM): A9C – 50, 100, 200, 500, 1000, 2000; NFK – 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 i DIDS – 500. Kontrolna merenja biomase micelijuma obavljana su nakon 16 i 28 h a merenja radi utvrđivanja efeketa tretmana nakon 28 h. Svi tretmani i kontrolna merenja rađeni su u četiri ponavljanja. Posle navedenog vremena micelijum je filtriran pomoću vakuuma, ispiran destilovanom vodom i ostavljan u sušnici na 50°C 24 h. Njegova suva masa je određivana na vagi proizvođača KERN tačnosti 10⁻⁴g. Prinos biomase (PB, mg) računat je kao razlika: PB = (suva masa kontrole/tretmana)_{28h} – (prosečna suva masa kontrole)_{16h}, a efekat tretmana ustanovljava se kao efekat na prinos biomase nakon 12 h od aplikacije supstance čiji se efekat ispituje i računat je kao odnos PB/(prosečna suva masa kontrole)_{28h} x 100.

Grafici zavisnosti inhibicije rasta micelijuma u % od dekadnog logaritma koncentracije blokatora fitovani su sigmoidnim krivama sa tri parametra, odnosno jednačinom:

$$y = \frac{a}{1 + e^{-\frac{x-x_0}{b}}} \quad (4)$$

Dobijeni parametri fita su: *a* – maksimalni blok rasta micelijuma u %, *b* – brzina dostizanja maksimalne inhibicije rasta po dostizanju minimalne inhibitorne koncentracije blokatora i *x*₀ – dekadni logaritam koncentracije blokatora na kojoj se dostiže 50% bloka rasta (logIC₅₀, IC₅₀ - polovina maksimalne inhibitorne koncentracije).

3.6 Eksperimenti na kiseoničnoj elektrodi

Za eksperimente merenja disanja micelijuma, gljive su gajene u uslovima opisanim u odeljku 3.5 s tim što je vegetativni micelijum gajen do starosti od 24h. Potrošnja kiseonika je merena pomoću kiseonične elektrode tipa Klark (Qubit Systems Inc, Kingston, ON, Canada) opremljene softverom Logger Pro 3 (Vernier, Beaverton, OR, USA). Tokom merenja, temperatura komore sistema je održavana na 25°C pomoću protočnog vodenog kupatila. Pre merenja uzorci su aerisani oko 5 minuta. Za optimalan opseg početne brzine disanja smatra se 15-25 nmol/min a da bi se on postigao vrši se razblaženje merenog uzorka eksperimentalnim medijumom. Nivo razblaženja zavisi od starosti uzorka. Inicijalna koncentracija kiseonika u reakcionoj smeši bila je oko 200 nmol/ml. Softver LoggerPro beleži smanjenje koncentracije kiseonika (nmol/l) u vremenu. Određivanjem nagiba krive potrošnje kiseonika, pomoću jednačine:

$$\text{Relativna brzina disanja} = (y_1 - y_2) / (t_2 - t_1) \quad (5)$$

u kojoj y_1 i y_2 označavaju početnu i krajnju koncentraciju kiseonika (μmol), a t_2 i t_1 vremenske tačke (s) koje odgovaraju koncentracijama y_1 i y_2 , originalni podaci o potrošnji kiseonika se transformišu u brzinu disanja.

Apsolutna brzina disanja ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) se izračunava u odnosu na biomasu uzorka, izraženu u mg/ml i razblaženje uzorka, prema sledećoj jednačini:

$$\text{Apsolutna brzina disanja} = (\text{Relativna brzina disanja} \times \text{razblaženje uzorka}) / (\text{Biomasa uzorka}) \quad (6)$$

Disanje micelijuma je mereno u minimalnom tečnom medijumu u komori zapremine 4 ml (Qubit), sa konačnom zapreminom uzorka od 2 ml. Po završetku merenja odeđivanaje suva masa micelijuma, merenjem mase uzoraka na analitičkoj vagi nakon sušenja na sobnoj temperaturi tokom 3-5 dana.

Blokatori jonskih kanala A9C i NFK dodavani su u željenim koncentracijama direktno u komoru elektrode sa uzorkom. U slučaju 9AC primenjene su sledeće koncentracije: 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM , 500 μM i 800 μM . U slučaju NFK korišćene su sledeće koncentracije: 0.1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM i 250 μM .

Korišćeni su rastvori blokatora u 96% etanolu. Štok rastvora A9C je bio koncentracije 30 mM a NFK 10 mM. Za određivanje efekta blokatora na brzinu disanja svih uzoraka uziman je

period od 2 do 4 minuta nakon dodavanja blokatora u komoru. Efekat je izražavan u % prema formuli:

$$\text{inhibicija brzine disanja} = \frac{\text{disanje pre blokatora} - \text{disanje posle blokatora}}{\text{disanje pre blokatora}} * 100 \quad (7)$$

a dodatnim ispitivanjem je utvrđeno da etanol kao rastvarač blokatora nema značajno dejstvo na disanje uzoraka, te da ne interferira sa istraživanjem inhibitornog efekta blokatora jonskog kanala. Za svaku ispitivanu koncentraciju blokatora broj ponavljanja nije bio manji od 3 ($n \geq 3$).

Grafici zavisnosti inhibicije disanja od koncentracije blokatora fitovani su sigmoidnim krivama sa 4 parametra, odnosno jednačinom :

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-\frac{x-x_0}{b}}} \quad (8)$$

Dobijeni parametri fita su: y_0 – deo disanja koje blokira i najniža koncentracija blokatora, a – maksimalni blok disanja micelijuma u %, b – brzina dostizanja maksimalne inhibicije disanja po dostizanju minimalne inhibitorne koncentracije blokatora i x_0 – dekadni logaritam koncentracije blokatora na kojoj se dostiže 50 % bloka disanja ($\log IC_{50}$, IC_{50} - polovina maksimalne inhibitorne koncentracije).

3.7. NMR eksperimenti

Za NMR eksperimente, vegetativne spore gljive *P. blakesleeanus* su razblaživane 10 puta, do koncentracije od 10^6 spora/ml i inkubirane 15 minuta na temperaturi od 49°C. Spore su zasejavane u standardni tečni minimalni medijum, sastava opisanog u odeljku 3.5.

Pre sejanja, minimalni medijum je autoklaviran 35 minuta na temperaturi od 105°C a zatim je po 30 ml medijuma razlivano u erlenmajere zapremine 100 ml. U svaki erlenmajer je dodavano po 3 ml aktiviranih spora, tako da je konačna koncentracija spora u medijumu bila oko 10^5 spora/ml. Nakon sejanja, gljive u erlenmajerima su aerisane, kako bi se omogućila konstantna oksigenacija medijuma u toku gajenja a erlenmajeri su postavljeni na mešalicu smeštenu u komori za uzgoj sa uslovima za gajenje opisanim u odeljku 3.1 Nakon 24h, gljiva

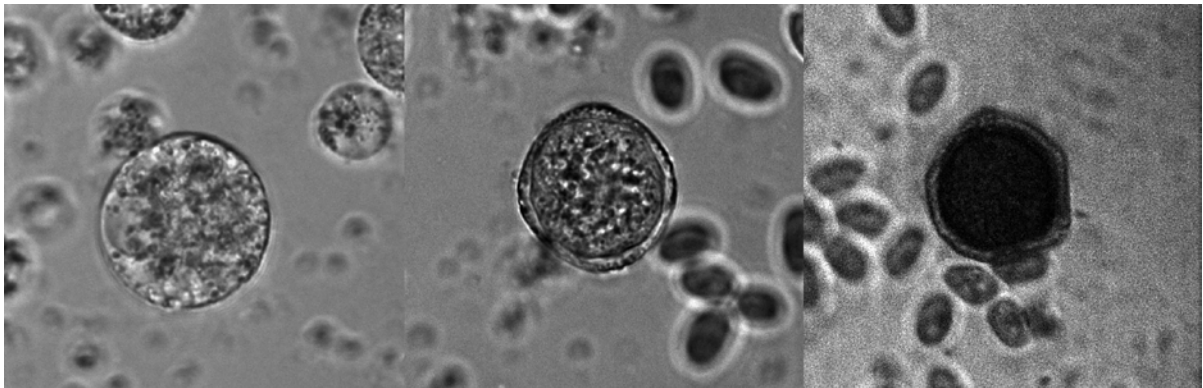
je u erlenmajerima razvijala micelijum koji je filtriran na vakuum pumpi i ispiran eksperimentalnim medijumom (0,2 mM KH_2PO_4 , 110 mM glukoza, 13,3 mM asparagin, bez mikroelemenata, pH = 4,5) korišćenim i u merenjima. Za svaki uzorak korišćeno je oko 0,6 g svežeg micelijuma koji je resuspendovan u aerisani eksperimentalni medijum do zapremine od 2 ml. Uzorci su prenošeni u NMR kivetu prečnika 10 mm i svaki je sadržao oko 300 mg/ml sveže mase micelijuma. A9C i NFK su dodavani uzorku do konačne koncentracije od 1 odnosno 2 mM (A9C) i 1 mM (NFK). Koncentracije A9C od 1 i 2 mM uporedive su sa 50 i 100 μM A9C korišćenim u oksimetrijskim merenjima ako se izraze po svežoj masi micelijuma (3 i 7 nmol/mg za NMR odnosno 4,1 i 8,2 nmol/mg za oksimetriju).

^{31}P NMR merenja su vršena na *Apollo upgrade, Bruker MSL 400* spektrometru, sa rezonantnom frekvencijom za ^{31}P od 161.978 MHz. Spektri su snimani u vremenskom domenu od 2 K, dužina pulsa je bila 14 (μs 45), vreme ponavljanja pulsa 300 ms, a spektralna širina 8000 Hz. Vreme akumulacije spektra je bilo 6 minuta. Pre Fourierove transformacije vršeno je eksponencijalno množenje signala faktorom od 25 Hz. Za određivanje hemijskog pomaka signala, kao spoljašnji standard je korišćena metilen difosfonična kiselina sa relativnim hemijskim pomakom od 17,05 ppm u odnosu na 85% H_3PO_4 . Minimalni broj ponavljanja eksperimenata za sve ispitivane koncentracije blokatora bio je n=3.

4. REZULTATI

4.1. Citoplazmatske kapi imaju sposobnost sinteze ćelijskog zida

U prethodnim istraživanjima je pokazano da membrana citoplazmatskih kapi generiše veoma negativan membranski potencijal (-112 mV sa standardnom devijacijom od ± 15 mV, Živić, 2009) i da je po toj osobini slična ćelijskoj membrani gljive. Da bi se dodatno funkcionalno okarakterisala membrana kapi ispitano je da li ima sposobnost sinteze ćelijskog zida koja je isključivo svojstvena ćelijskoj membrani gljive i jasno je razlikuje od svih unutarćelijskih membrana. Kao indikator prisustva ćelijskog zida korišćeno je bojenje laktofenol-plavim.

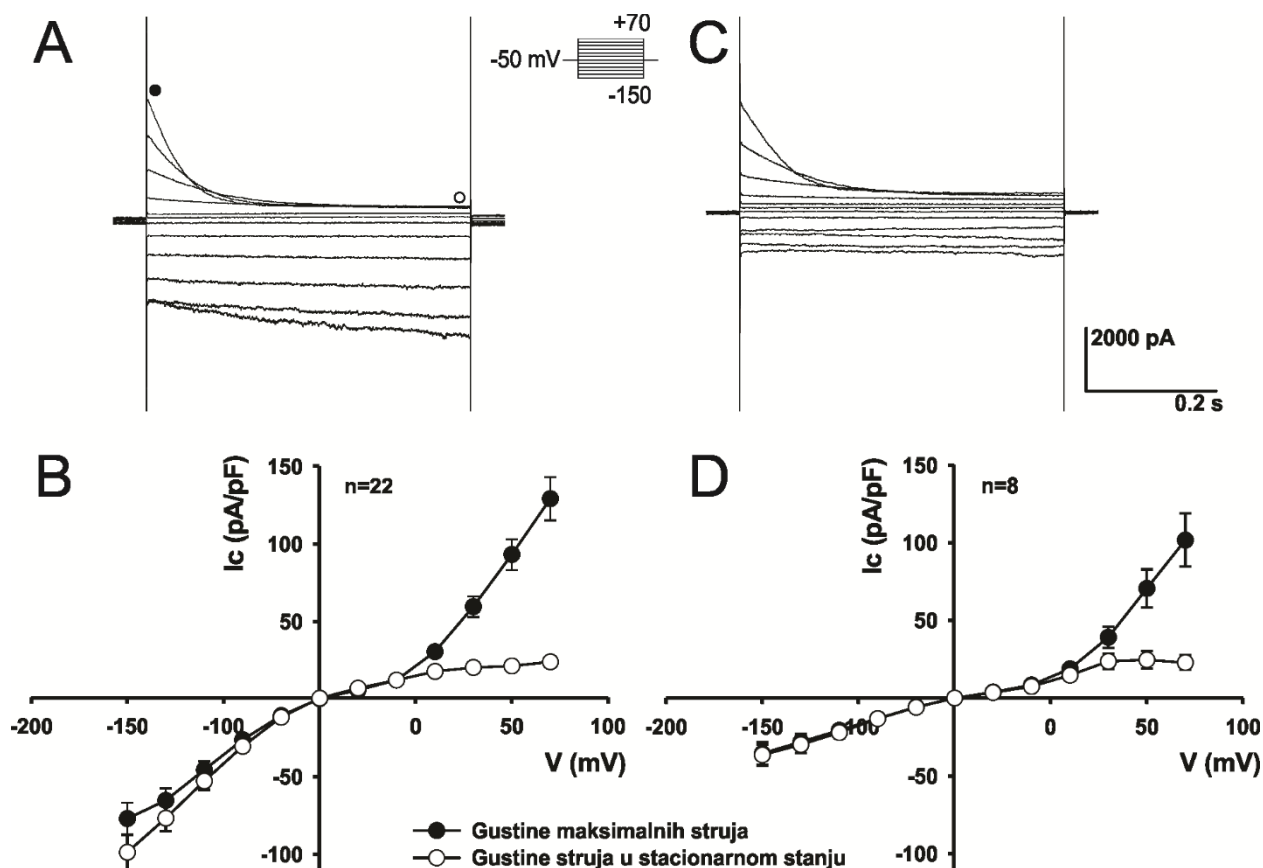


Slika 2. Citoplazmatske kapi izolovane iz sporangiofora *P.blakesleeanus*: A) citoplazmatska kap u standardnom vanćelijskom rastvoru fotografisana 2 h nakon pripreme preparata ne poseduje vidljiv ćelijski zid; B) citoplazmatska kap u istom rastvoru fotografisana 2.5 h od pripreme preparata sa jasno uočljivim ćelijskim zidom koji je u potpunosti okružuje; C) ista kap kao na slici B fotografisana odmah nakon bojenja laktofenol-plavo bojom. Nakon bojenja u preparatu ostaju vidljive samo citoplazmatske kapi sa formiranim ćelijskim zidom pošto bojenje dovodi do dezintegracije membrane i razlivanja citoplazme onih kapi koje nemaju čvrstu strukturu koja ih okružuje.

U preparatu starom 2 h nije bilo moguće uočiti ćelijski zid ni na jednoj formiranoj citoplazmatskoj kapljici – slika 2A. Dodavanje laktofenol-plavog dovelo je do pucanja membrana i razlivanja citoplazme svih vezikula. Nakon 2.5h oko 20 % postojećih vezikula formiralo je ćelijski zid jasno uočljiv i bez bojenja – slika 2B. Dodavanje boje u ovakav preparat izazvalo je pucanje membrane onih vezikula koje nisu formirale zid dok su one sa formiranim zidom ostale jasno okružene obojenom hitinskom strukturom – slika 2C.

4.2. Struje u konfiguraciji *cela ćelija* registrovane u uslovima osmotski indukovanog porasta zapremine

U indukovanim hipoosmotskim uslovima, kada je pipetni rastvor povećanog osmolariteta u odnosu na rastvor u komorici, u konfiguraciji *cela-ćelija* registrovane su struje prikazane na slici 3.

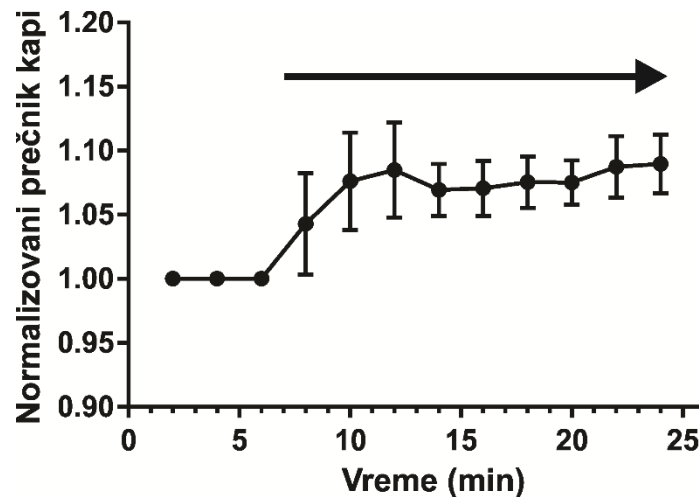


Slika 3. Jonske struje kroz membranu citoplazmatskih kapi gljive *P.blakesleeanus* registrovane u konfiguraciji *cela-ćelija*. A) i C) Originalni zapisi dva različita strujna odgovora dobijena primenom SVP u uslovima osmotski indukovanog nadimanja uslovljenog razlikom u osmolaritetu od 55 mOsm između SVR i SUR. Depolarišući potencijali aktiviraju IRIS u svim vezikulama dok hiperpolarišući potencijali dovode do sporoaktivirajuće ulazne struje u 73% zapisa (A) koja u preostalih 27% slučajeva nedostaje (C). Crni i beli kružić na slici A označavaju pozicije na kojima su merene amplitude struja na početku i kraju registrovanih zapisa. B) i D) Krive zavisnosti gustina struje(izračunatih na osnovu izmerenih vrednosti struja na početku i na kraju odgovora na SVP) od potencijala nametnutih na membranu vezikula. Grafikoni na slici odgovaraju tipu strujnog odgovora prikazanom na slici iznad. Primećuje se da nema razlike između gustina struje u izlaznom delu dok su ulazne gustine struja značajno različite između ova dva tipa strujnog odgovora.

Iako su snimani u identičnim uslovima, odgovori struja membrane citoplazmatske kapi na iste voltažne stimuluse mogu se svrstati u dva tipa, podeljena prema odgovoru na hiperpolarišuće stimuluse (Slika 3.A, C). Oba tipa karakteriše izlazno ispravljena (rektifikovana)brzo inaktivirajuća trenutna struja (IRIS), aktivirana depolarišućim potencijalima, uočljiva na početku zapisa jonskih struja. Nadalje,IRIS merena na početku pulsa (crni krug na Slici 3A) će biti označavana kao *maksimalna* i skraćeno obeležavana sa malim slovom *p*, I_p . U slučaju kada je merina na kraju pulsa (beli kružić na slici 3A) biće označavana kao *struja u stacionarnom stanju* i skraćeno obeležavana sa dva mala slova *s*, I_{ss} . Amplituda i kinetika IRISne pokazuje statistički značajnu razliku između dve grupe zapisa. Srednja gustina maksimalne struje za obe grupe zapisa na +70 mV iznosi 129 ± 14 pA/pF ($n=30$). Međutim, odgovori struja na hiperpolarišuće potencijale nisu uniformni pa je u 73% registrovanih odgovora primetna sporoaktivirajuća ulazna struja (slika 3A), gustine 99 ± 11 pA/pF na -150 mV ($n=22$) u stacionarnom stanju, dok je u 27% slučajeva ova struja odsutna (slika 3C) pa je gustina struje u stacionarnom stanju na -150 mV značajno manja (37 ± 7 pA/pF, $n=8$, $p<0.001$). Vrednosti otpora i kapacitivnosti membrane se ne razlikuju u ova dva tipa zapisa i iznose: $R_m = 154 \pm 14$ M Ω , $C_m = 34 \pm 3$ pF za prvi, odnosno $R_m = 152 \pm 13$ M Ω , $C_m = 32 \pm 4$ pF za drugi tip. Sa slike 3. je primetno da je IRIS dominantna struja u uslovima osmotski indukovanog nadimanja i na osnovu obavljenih eksperimenata možemo reći da je uvek prisutna dok je u tri četvrtine slučajeva pored IRIS-a zastupljena najmanje još jedna struja jasno uočljiva na hiperpolarišućim potencijalima. Zbog toga je u daljim eksperimentima često korišćen voltažni protokol sa početnim hiperpolarišućim stimulusima od -70 mV, kako bi se minimizirao uticaj dodatne ulazne struje.

Pošto su veličine membranskih struja, izražavane kao gustine (pA/pF) a ne kao amplitude struja (pA), provereno je da li membrana citoplazmatskih kapi predstavlja stabilan sistem konstantne površine u toku vremena. Mereni su prečnici kapina fotomikrografijama snimljenim u uzastopnim vremenskim trenucima u izoosmotskim uslovima i ustanovljeno je da se ne menjaju tokom vremena (standardna devijacija iznosila je 0,8%, $n = 6$). Nakon što je ustanovljeno da se zapremina citoplazmatskih kapine menja, praćene su promene C_m tokom eksperimenata nametnute voltaže na deliću membrane, kako bi se ustanovilo da li se površina membrane povećava nastajanjem membranskih invaginacija. U izoosmotskim uslovima, vrednosti C_m na kraju eksperimenta, normalizovane na početne vrednosti, iznosile su $94 \pm 6\%$ ($n = 3$), dok su u uslovima osmotski indukovanog nadimanja normalizovane C_m vrednosti bile u proseku $99 \pm 3\%$ ($n = 16$), te u oba slučaja nije bilo statistički značajnih

razlika između vrednosti C_m na početku i kraju eksperimenta. Na kraju, praćena je promena prečnikacitoplazmatskih kapiizloženih spoljašnjem hipoosmotkom stimulusu od 45mOsm (Slika 4). Hipoosmotski stimulus prva 4 minuta dovodi postepenog rasta prečnika vezikula za $8 \pm 4\%$ ($n = 4$), što odgovara povećanju zapremine od oko 27%.



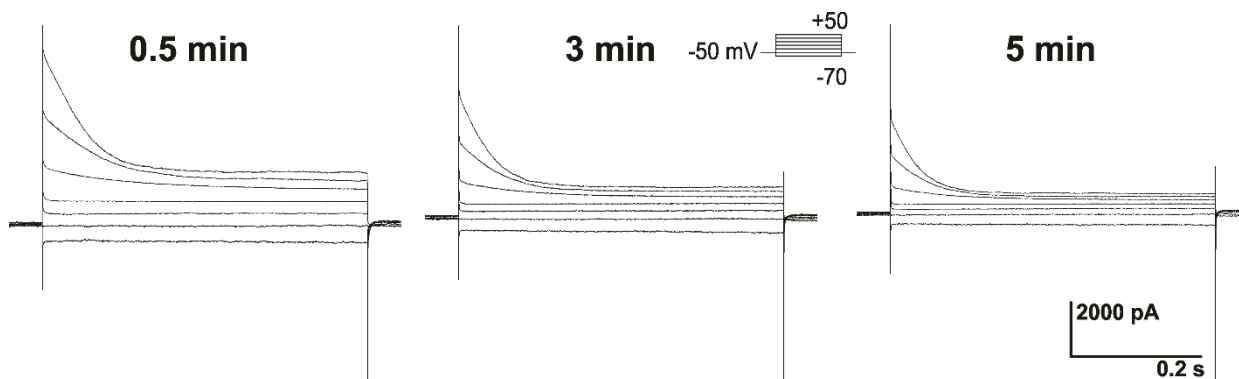
Slika 4. Promena prečnika citoplazmatskih kapiipripremljenih u izoosmotkom vanćelijskomrastvoru tokom trajanja hipoosmotkog stimulusa od 45 mOsm izazvanog 10% razblaživanjemizoosmotskog rastvoravodom (početak i trajanje hipoosmotkog stimulusa obeleženi strelicom). Prečnikkapipostepeno raste tokom vremena i dostiže maksimum nakon četiri minuta. Nakon ovog vremena, u istim uslovima, tokom narednih 15 minuta promena prečnika vezikula više nije uočljiva.

Nakon ovog vremena, u narednih 15 min nije uočena dalja promena prečnika fotografisanih citoplazmatskih kapi. Zaključeno je da ne postoji regulatorni proces koji bi tokom vremena doveo do smanjenja zapremine kapiizloženih 10 % hipoosmotkom spoljašnjem rastvoru.

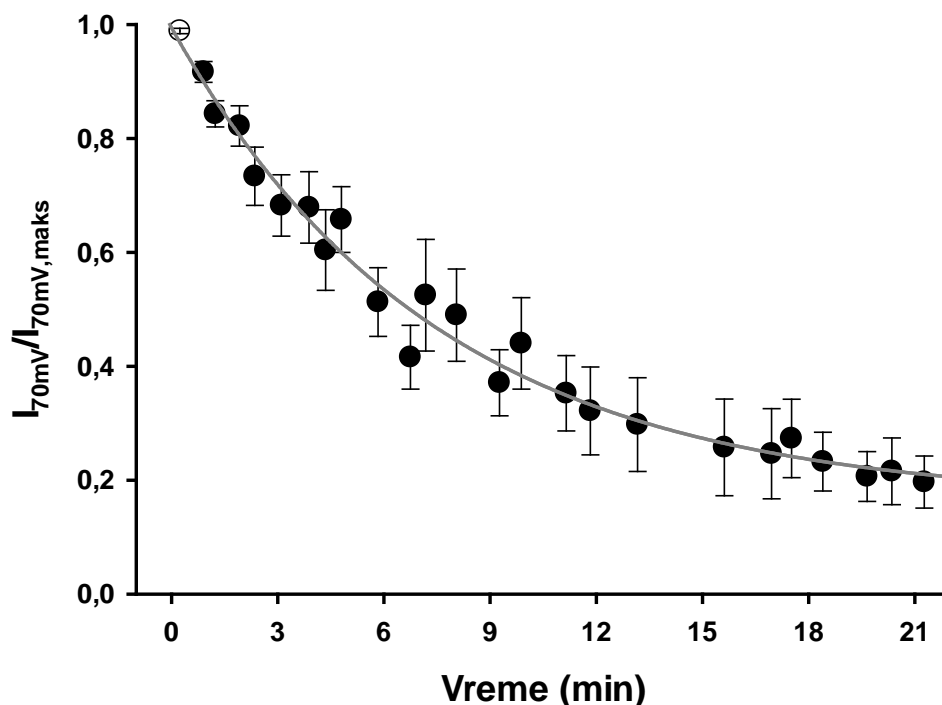
4.3. Izlazno ispravljena inaktivirajuća struja se smanjuje tokom vremena

Nakon uspostavljanja konfiguracije *cela ćelija* u eksperimentima nametnute voltaže na deliću membrane započinje zamena unutarvezikularnog sadržaja rastvorom iz pipete. U uslovima osmotski indukovano porasta zapremine, amplituda struje pobuđene ponavljanim identičnim voltažnim protokolima postepeno opada tokom vremena. Struje registrovane sa membrane iste kapitokom vremena postepeno se smanjuju, i na početku strujnog odgovora na voltažni

stimulus – maksimalne struje (I_p), kao i na kraju nametnutog voltažnog pulsa - struje u stacionarnom stanju (I_{ss}) (Slika 5).



Slika 5. Vremenska dinamika struja registrovanih sa membrane citoplazmatske kapi gljive *P. blakesleeanus*. Primer originalnog strujnog zapisa sa iste kapidobijenog primenom SVP-a u „hiposmotskim“ uslovima nakon 0.5, 3 i 5 minuta od uspostavljanja konfiguracije *cela ćelija*. Amplituda IRIS-a opada tokom vremena dok se brzina inaktivacije struje tokom vremena povećava.



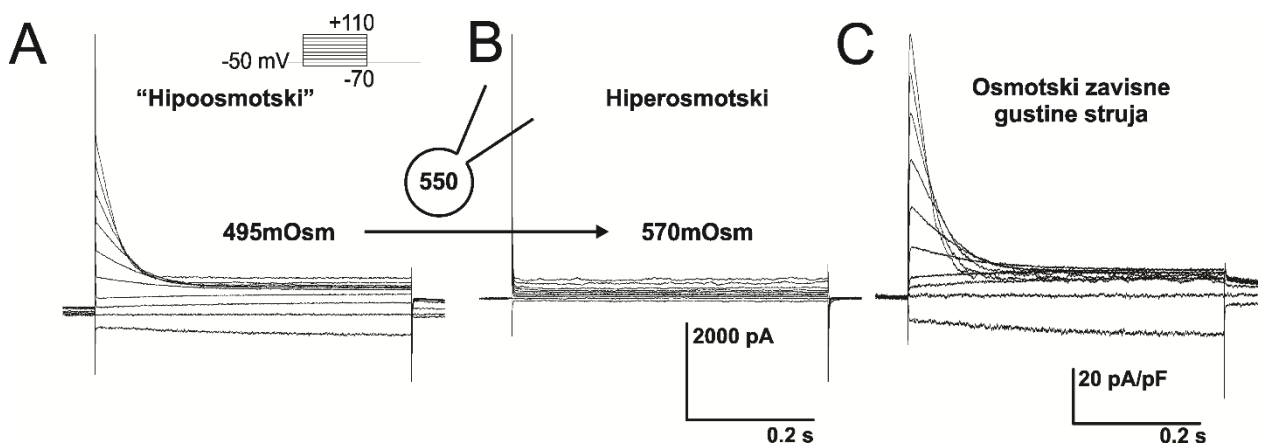
Slika 6. „Gašenje“ maksimalne struje. Amplituda maksimalne struje normirana na svoj maksimum eksponencijalno opada sa vremenom. Amplituda struje je merena na +70 mV, a maksimum na koji je normirana je obično bila prva registrovana vrednost na ovoj voltaži koja je u proseku dostizana 69 ± 13 s ($n=32$) nakon uspostavljanja konfiguracije *cela ćelija*.

Imajući ovo u vidu, za analize su birani kontrolni zapisi nakon tri minuta od uspostavljanja konfiguracije *cela ćelija*.

Ovo „gašenje“ struje u toku vremena prikazano je na slici 6. Vidi se eksponencijalni pad amplituda maksimalnih struja normalizovanih na njenu početnu, maksimalnu amplitudu. U proseku, izlazna struja (merena na +70 mV) opada na $68 \pm 5\%$ (n=32) u prva tri minuta nakon ulaska u konfiguraciju *cela ćelija*, oko 2 minuta se zadržava na tom nivou, a potom nastavlja da opada sve dok ne dostigne plato od $0,16 \pm 0,03$. Eksponencijalni fit koji najbolje opisuje brzinu smanjenja struje prikazan je na slici, a dobijena vrednost za τ je $7,47 \pm 0,71$ min.

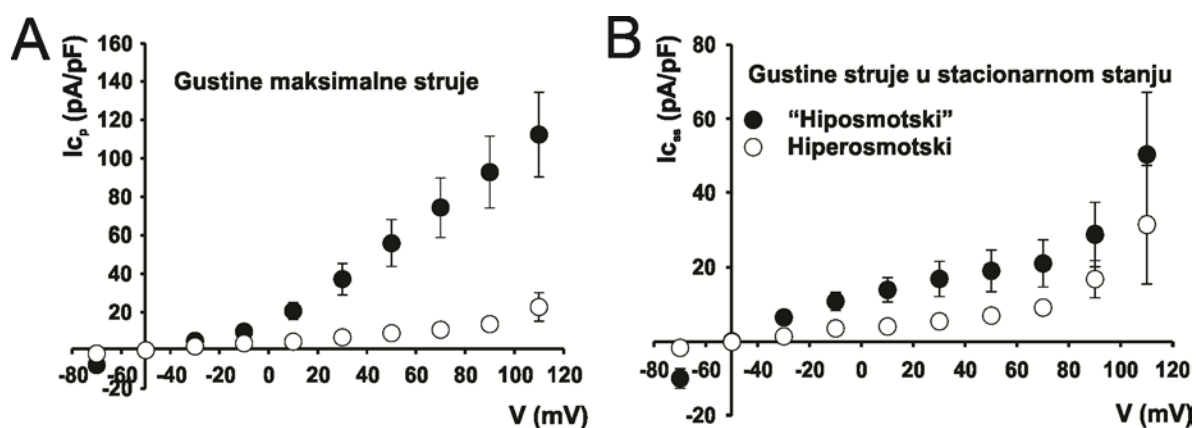
4.4. IRIS je osmotski aktivirana struja

U uslovima osmotski indukovano povećanja zapremine, IRIS je konstitutivno prisutna komponenta zapisa jonskih struja. Da bismo utvrdili da li je hipoosmotski stimulus neophodan za aktivaciju IRIS-a, izvršeni su eksperimenti akutne promene osmotskih uslova čiji rezultati su prikazani na slikama 7 i 9.



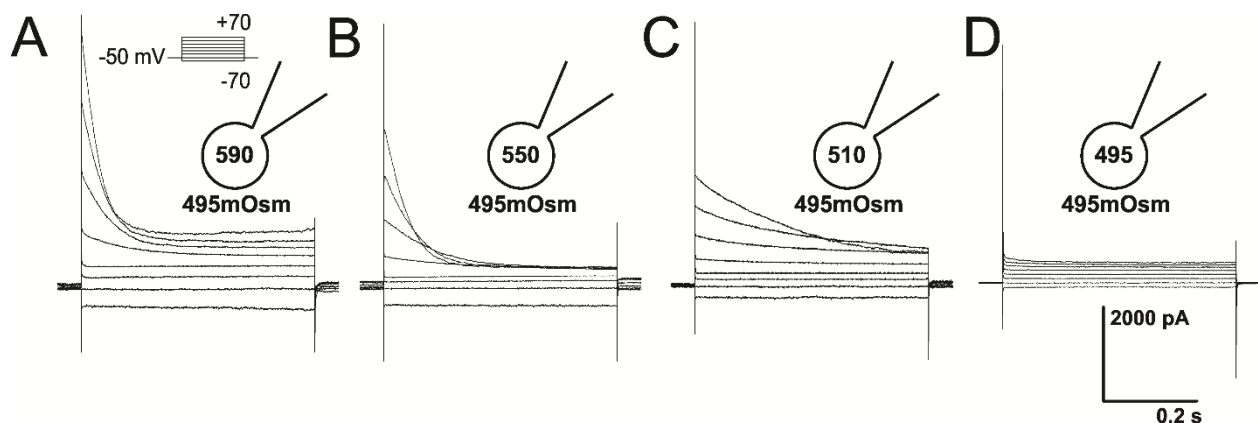
Slika 7. Reprezentativni zapisi struja registrovanih u konfiguraciji *cela-ćelija* sa membrane iste citoplazmatske kapipe (A) i posle (B) akutne promene osmotskih uslova iz hipo- u hiperosmotske. Inaktivirajuća komponenta struje potpuno nestaje nakon povećanja osmolariteta vanćelijskog rastvora sa 495 na 570 mOsm. Korišćeni voltažni protokol prikazan je na slici A iznad registriranih struja. C) Osmotski zavisne gustine struja dobijene iz eksperimenta prikazanog na slikama A i B pokazuju da osmotski zavisna struja karakteriše spora vremenski zavisna aktivacija u hiperpolarizaciji i vremenski zavisna inaktivacija koja počinje od +10 mV u depolarizaciji. Na kraju strujnih zapisa, prilikom vraćanja na startni potencijal od -50 mV, uočljive su repne struje, poreklom od nepotpuno inaktiviranih struja na prethodno nametnutim potencijalima.

Na slikama 7A i 7B. prikazane su struje registrovane sa iste kapipe i posle akutne promene osmolariteta spoljašnjeg rastvora. Zapis na slici 7A predstavlja struje snimljene u „hiposmotskim“ uslovima, a zapis na 7B struje registrovane nakon dodavanja saharoze u komoricu čime su osmotski uslovi promenjeni u blago hiperosmotske (oko 20 mOsm). Slika 7C predstavlja osmotski zavisnu komponentu ukupne struje koja je promenom uslova u hiperosmotske deaktivirana: mereno na + 50 mV gustina struje na početku zapisa redukuje se za čak $81 \pm 6\%$ tj. sa 56 ± 12 pA/pF na 8.9 ± 0.9 pA/pF (n=4, P<0.001) dok se gustine struja na krajevima voltažnih pulseva ne menjaju (Slika 8 A,B).



Slika 8. Promene gustina struje nakon akutne promene osmotskih uslova u kojima se nalaze kapiiz hpoosmotskih (crni kružići) u hiperosmotske (beli kružići). Prikazane su krive zavisnosti gustina struje (izračunatih na osnovi izmerenih strujnih amplituda u zapisima dobijenim u konfiguraciji *cela ćelija*) na početku (A) i na kraju voltažnog stimulusa (B) od nametnutog potencijala na membranu citoplazmatske kapi.

Sa slike 7B je upadljivo da se inaktivirajući deo struje u potpunosti gubi. Nestanak IRIS-a prilikom prelaska u hiperosmotske uslove je brz proces i dešava se odmah po promeni spoljašnjih uslova a mi smo ga registrovali već 10-20 s nakon dodavanja saharoze, što je i po brzini ali i po nivou smanjenja ukupne struje značajno drugačije od spontanog smanjenja IRIS-a koje se dešava u kontrolnim uslovima. Na slikama 9A-D prikazani su reprezentativni zapisi struja snimljeni u različitim osmotskim uslovima. Merenja su vršena u nizu nezavisnih eksperimenata na različitim citoplazmatskim kapima. IRIS je aktivirana osmotskim stimulusima opadajućeg intenziteta.

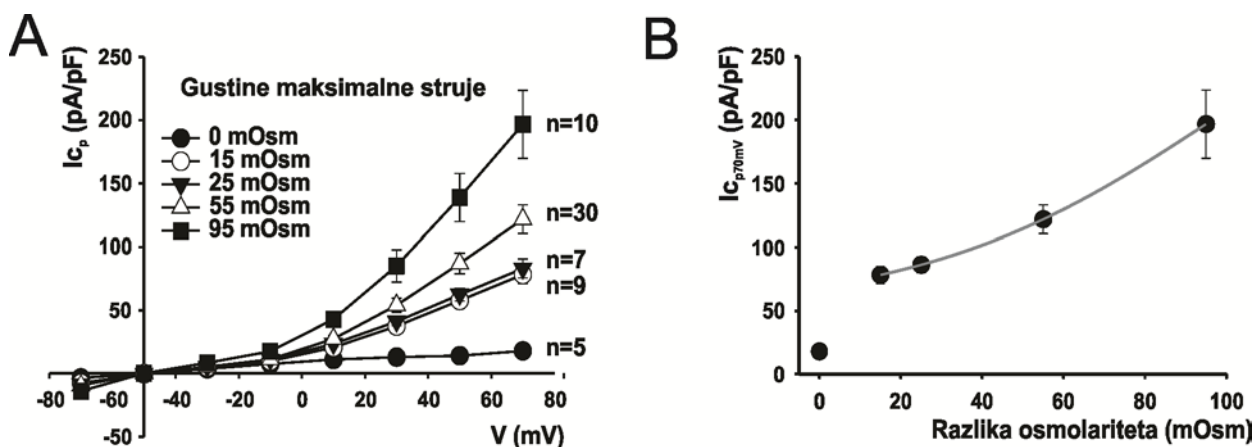


Slika9. Originalni zapisi struja registrovanih u konfiguraciji *cela-ćelija* sa membrane citoplazmatskih kapi *P. blekesleanus* u različitim uslovima osmotski indukovnog nadimanja. Variranje osmotskih uslova je postignuto upotrebom istog vanćelijskog i nekoliko unutarćelijskih rastvora različitih osmolariteta. Osmolariteti korišćenih rastvora i upotrebljavani voltažni protokol prikazani su na slici. Merenja su vršena u nizu nezavisnih eksperimenata na različitim citoplazmatskim kapima. Uočljivo je smanjenje amplitude struje i brzine vremenski zavisne inaktivacije IRIS-a sa smanjenjem intenziteta osmotskog stimulusa.

Kao što se može videti, najveća osmotska razlika aktivira najveću amplitudu IRIS-a na početku voltažnog protokola, dok najmanja razlika u osmolaritetu između rastvora u komorici i pipeti aktivira najmanje struje. Na slici 9D prikazane su struje registrovane u izoosmotskim uslovima i ono što je odmah uočljivo jeste da IRIS u potpunosti nedostaje. Poredjenje gustina maksimalne struje aktiviranih različitim osmotskim uslovima (računatih na + 70 mV) pokazuje njihovo statistički značajno smanjenje sa smanjenjem osmotskog stimulusa (Slika 10A).

Jedini par izračunatih vrednosti gustina struje koji nije statistiki značajno različit, jesu one indukovane razlikom od 15 i 25 mOsm. Međutim i one prate trend zavisnosti gustina maksimalnih struja od intenziteta osmotskog stimulusa prikazan na slici 10B. Na + 70 mV, gustina maksimalne struje u standardnim „hipoosmotskim“ uslovima iznosi 122 ± 11 pA/pF ($n=30$), a u izoosmotskim uslovima na istoj voltaži 19 ± 4 pA/pF ($n=5$) odnosno 84% manje, što u potpunosti odgovara već pomenutom smanjenju gustine maksimalne struje koje se dešava prilikom akutne promene osmotskih uslova i iznosi 81 ± 6 % na + 50 mV. Nepostojanje IRIS-a u izoosmotskim uslovima, smanjenje amplitude sa opadanjem osmotskog stimulusa, kao i gotovo trenutna inaktivacija prilikom akutne promene osmotskih

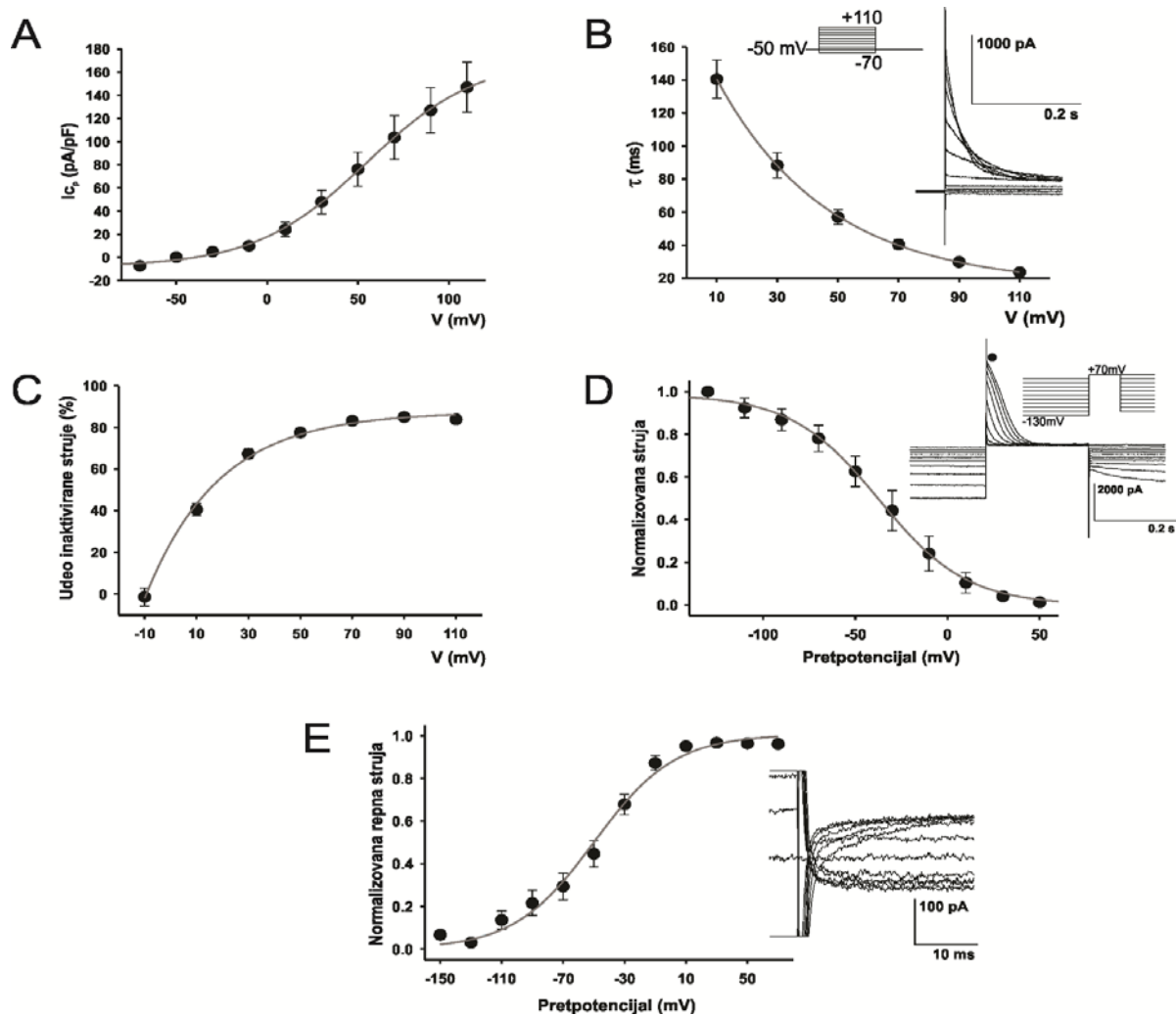
uslova u hiperosmotske pokazuju da je hipoosmotskistimulus neophodan uslov za aktivaciju ove struje.



Slika 10. A) Voltažna zavisnost gustine maksimalnih struja izračunatih iz zapisa registrovanih u konfiguraciji *cela ćelija* u izoosmotskim i uslovima osmotski indukovanog bubrenja uzrokovanog različitim intezitetom osmotskog stimulusa. Sa smanjenjem razlike u osmolaritetima između SVR i pipetnog rastora značajno opada gustina registrovane trenutne struje. Jedino u uslovima razlike u osmolaritetima od 15 i 25 mOsm ne postoji značajna razlika između izračunatih gustina struje, najverovatnije zato što su intenziteti osmotskih stimulusa bliski. Razlika osmolariteta između vanćelijskog i unutarćelijskog rastvora i broj nezavisnih eksperimenata za svaku osmotsku razliku prikazani su na slici. B) Kriva zavisnosti gustina maksimalne struje računate na potencijalu +70 mV ($I_{c_{p70mV}}$) od osmotske razlike između SVR i pipetnog rastvora. Prikazan je najbolji fit sigmoidne funkcije kroz dobijene eksperimentalne vrednosti gustina struje.

4.5. IRIS je voltažno zavisna jonska struja

Voltažna zavisnost IRIS-a prikazana je na slici 11A krivom zavisnosti gustine maksimalne struje od nametnute voltaže (I_{c_p}/V). Sa slike se vidi da gustina maksimalne struje raste sa depolarizacijom membrane. Primenom Boltzmanove funkcije (jednačina 1) na dobijene rezultate dobijene su sledeće vrednosti parametara: napon na kome je 50% struje aktivirano $V_{0.5} = 55 \pm 3$ mV i naelektrisanje vratnica $z_g = 0,82 \pm 0,1$ (n=8), što IRIS svrstava u struje srednje jačine ispravljanja. Kinetika inaktivacije IRIS-a predstavljena je na slici 11B krivom zavisnosti vremenske konstante inaktivacije, τ , od nametnutog potencijala, V. Za konstruisanje ove krive, strujni zapisi su fitovani standardnom eksponencijalnom funkcijom (jednacina 2) pa su dobijene vrednosti vremenskih konstanti grafički prikazane u funkciji nametnutog potencijala.

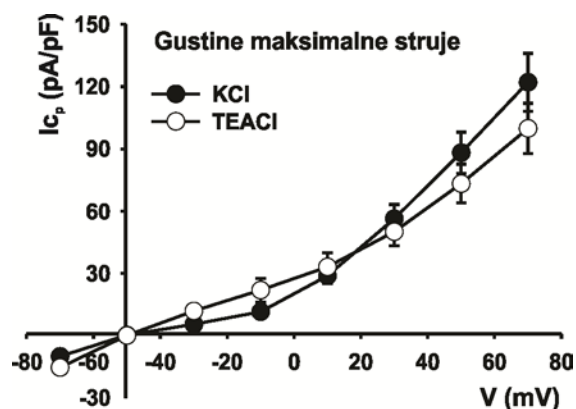


Slika 11. Voltažno i vremenski zavisne karakteristike IRIS-a. A) Zavisnost prosečne gustine maksimalne struje (I_{c_p}) ($n=8$) od nametnutog potencijala (V). Voltažna zavisnost aktivacije IRIS-a je fitovana Bolcman-ovom funkcijom (jednačina 1). Potencijal poluaktivacije iznosi $V_{0,5} = 55 \pm 3$ mV, a naelektrisanje vratnica je $z_g = 0.82 \pm 0.1$. B) Vremenska konstanta (τ) inaktivacije IRIS-a prikazana u funkciji nametnutog potencijala (V) eksponencijalno opada sa porastom potencijala. Na slici je prikazan i reprezentativni segment strujnog zapisa snimljenog u konfiguraciji *cela-ćelija* na kome se vidi region zapisa struja korišćen za fitovanje kojim su dobijene vrednosti τ . C) Voltažna zavisnost inaktiviranog dela IRIS-a. Procenat inaktivacije je računat kao $100\% \cdot (I_p - I_{ss}) / I_p$, a dobijene vrednosti su fitovane eksponencijalnom krivom koja dostiže plato na $+70$ mV ($82 \pm 2\%$, $n=8$). D) Inaktivaciona kriva IRIS-a: amplitude maksimalne strujenormalizovane na I_{p70max} i prikazane u funkciji odgovarajućeg prepotencijala ($n=3$) su fitovane Bolcman-ovom funkcijom sa sledećim parametrima fita: voltaža poluinaktivacije $V_{0,5} = -37 \pm 2$ mV inaelektrisanje vratnica $z_g = -1,1 \pm 0,1$. Inaktivacioni voltažni protokol i primer strujnih zapisa dobijenih njegovom upotrebom prikazani su na slici. Beli kružić obeležava mesto na kojem su merene amplitude maksimalnih struja. E) Aktivaciona kriva IRIS-a: amplitude repnih struja normalizovane su na maksimalnu vrednost, I_{max} , i prikazane u funkciji voltaža skokovitog voltažnog protokola ($n=12$). Izračunate eksperimentalne vrednosti fitovane su Bolcman-ovom funkcijom iz koje su dobijeni sledeći parametri fita: naelektrisanje vratnica $z_g = 0,98 \pm 0,01$ i voltaža poluaktivacije $V_{0,5} = -50 \pm 2$ mV. Na slici je prikazan i primer zapisa repnih struja kakve su korišćene za merenje amplituda.

Kriva zavisnosti τ od intenziteta primenjenog ~~žolta~~ pulsa pokazuje da vremenska konstanta eksponencijalno opada sa depolarizacijom membrane (slika 11B). To znači da je brzina inaktivacije IRIS-a voltažno zavisna proces koji se ubrzava sa depolarizacijom membrane. Prema tome, udeo IRIS-a koji se inaktivira tokom voltažnog pulsa raste, i to eksponencijalno (slika 11C), sa porastom primenjene voltaže i dostiže svoj maksimum od $82 \pm 2\%$ ($n=8$) na $+70$ mV. Sa daljim porastom depolarizujućeg stimulusa do $+110$ mV udeo IRIS-a koji se inaktivira se ne menja. Na slici 11D prikazana je inaktivaciona kriva IRIS-a ($n=3$). Inaktivacija je merena u uslovima stacionarnog stanja tako što je pre test pulsa od 70 mV nametan pretpotencijal od -130 mV do $+50$ mV. Amplitude maksimalne struje IRIS-a izazvane test pulsom posle svakog od pretpulsova su normirane na maksimalnu vrednost, dobijenu posle pretpulsa od -130 mV i prikazane u funkciji veličine pretpulsa. Trajanje test pulsa je odabrano tako da omogući potpunu inaktivaciju IRIS. Sa slike se vidi da amplituda koju IRIS dostiže, u odnosu na maksimalnu amplitudu, opada sa porastom potencijala koji prethodi test stimulusu. Ova opadajuća zavisnost je sigmoidalna i fitovana Bolcmanovom funkcijom daje sledeće parametre fita: potencijal polu-inaktivacije, $V_{0.5} = -37 \pm 2$ mV, i naelektrisanje vratnica $z_g = -1.1 \pm 0.1$. Kriva aktivacije IRIS-a (slika 5E, $n=12$) određena je iz amplituda “repnih” struja na -50 mV koje se javljaju pri povratku iz depolarizacije na startnom potencijalu predstavljaju struju kroz kanale koji su aktivirani tokom test pulsa a nisu se stigli zatvoriti neposredno po završetku pulsa. Izmerene struje su normalizovane i prikazane u zavisnosti od nametnutog potencijala korišćenog u depolarizujućem koraku SVP-a. Dobijena kriva sigmoidalno raste i dobro je fitovana Bolcmanovom funkcijom pri čemu su dobijeni sledeći parametri fita: voltaža polu-aktivacije $V_{0.5} = -50 \pm 2$ mV i $z_g = 0.98 \pm 0.01$. Iz aktivacione krive vidimo da je $45 \pm 6\%$ IRIS-a aktivirano na -50 mV (startni potencijal, u našim eksperimentima). U isto vreme, sa inaktivacione krive vidimo da na istom potencijalu $63 \pm 7\%$ IRIS-a ne ulazi u inaktivaciju, tako da bi na startnom potencijalu od -50 mV u snimljenim zapisima velika većina jonskih kanala koji nose IRIS trebalo da bude aktivna. Na osnovu ovih proračuna, može se zaključiti da je upravo aktivnost jonskih kanala koji se nalaze u osnovi IRIS-a, ključni razlog za relativno niske vrednosti R_m -a karakteristične za zapise jonskih struja registrovane metodom nametnute voltaže na deliću membrane u konfiguraciji *cela ćelija* sa citoplazmatičnih kapljica gljive *P. blakesleeanus*.

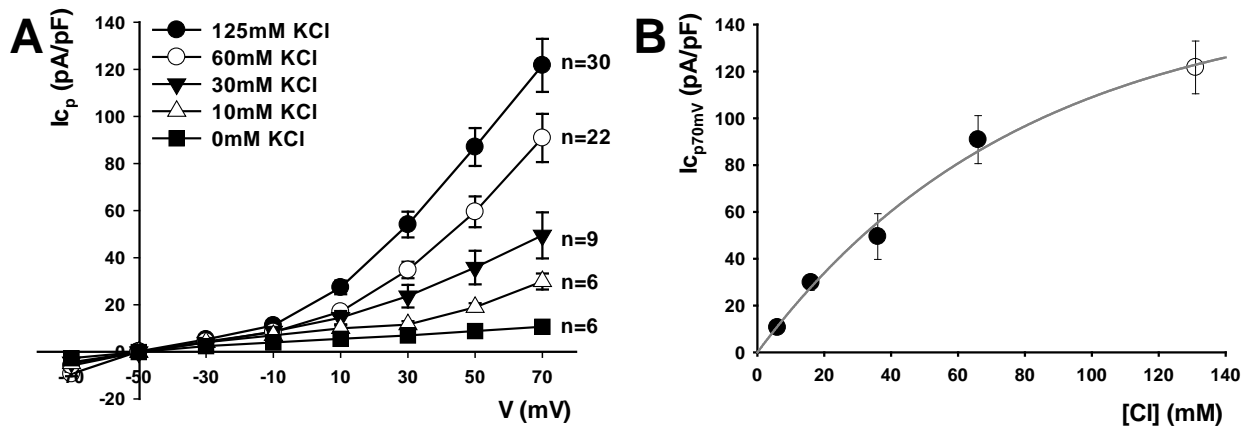
4.6. Jonska osnova i selektivnost IRIS-a

Kako bi se ispitala jonska osnova IRIS-a, nakon eksperimenata u kontrolnim uslovima, K^+ joni su ekvimolarno zamenjeni jonima TEA^+ i u pipetnom i u rastvoru za komoricu. U ovako dobijenom 125 mM simetričnom TEA-Cl izmerene su vrednosti amplituda maksimalne struje i uočeno je da gustine maksimalne struje ostaju nepromenjene u poređenju sa kontrolnim zapisima (Slika 12, n=6).



Slika 12. IRIS je anjonska struja: voltažna zavisnost gustine maksimalne struja u simetričnom 125mM KCl (crni kružići, n=30) i 125 mM TEA-Cl (beli kružići, n=6). Obe I_{c_p}/V krive su konstruisane na osnovu odgovarajućih strujnih zapisa dobijenih primenom SVP-a u uslovima osmotski indukovano bubrenja. Između prikazanih parova vrednosti gustina struje ni u jednom slučaju ne postoje značajne razlike.

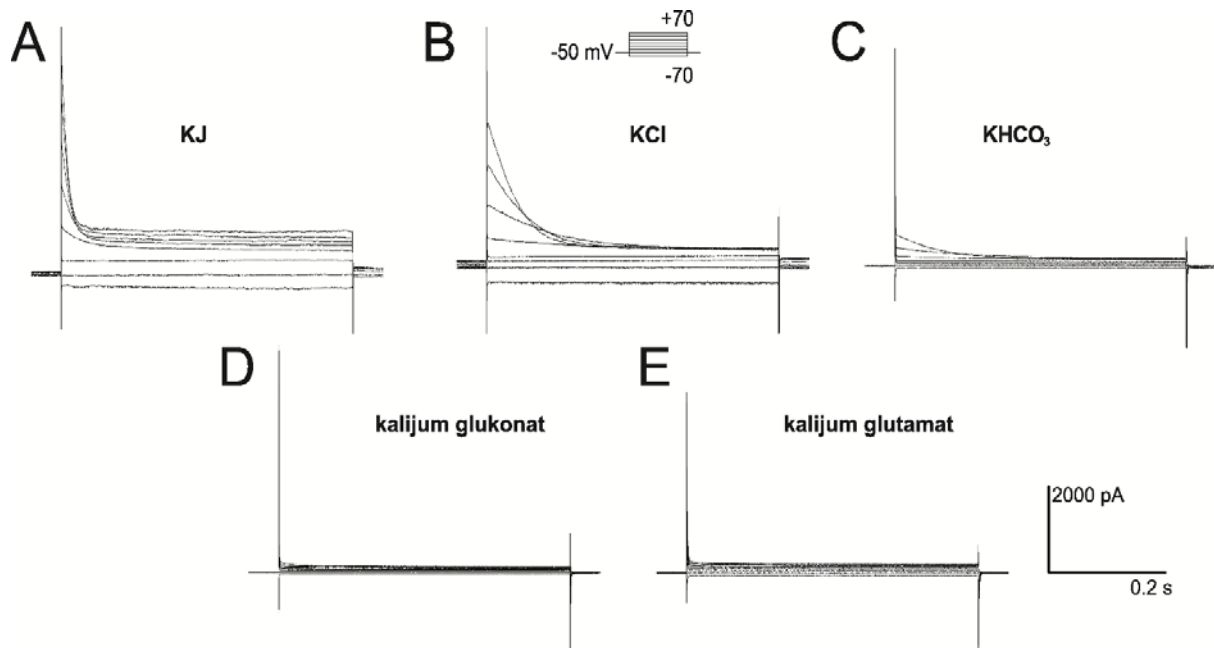
Zatim su urađeni eksperimenti sa simetričnom koncentracijom K^+ jona, a opadajućim koncentracijama jona Cl^- , tako što je i u SUR-u i u SVR-u deo KCl-a ekvimolarno zamenjivan rastvorom K-glutamata. Ovako su formirani simetrični uslovi u kojima je finalna koncentracija K^+ jona svuda iznosila 125 mM a koncentracije hlora bile su sledeće: 125, 60, 30, 10, 0 mM. Realne koncentracije hlora bile su nešto veće od prikazanih jer je u svim rastvorima prisutno 6 mM Cl^- poreklom od 1 mM $CaCl_2$ i 2 mM $MgCl_2$. Razlika u osmolaritetima između korišćenih van- i unutarćelijskih rastvora svuda je iznosila 55 mOsm. Rezultati eksperimenata su prikazani na slici 13A. Gustine maksimalnih struja na potencijalima od 30 mV do 70 mV su statistički značajno različite u svim testiranim koncentracijama hlora.



Slika 13. IRIS je nošena jonima hlora. A) Voltažna zavisnost gustine maksimalnih struja (I_{c_p}) dobijenih na osnovu strujnih zapisa registrovanih u konfiguraciji *cela-ćelija* u simetričnim uslovima sa opadajućim koncentracijama KCl. Deo KCl je ekvimolarno zamenjivan K-glutamatom u SVR i SUR tako da finalna koncentracija kalijuma nije menjana (125 mM) dok su finalne koncentracije jona hlora u eksperimentima opadale (125, 60, 30, 10, 0 mM plus stalno prisutni 6mM hlor iz $CaCl_2$ i $MgCl_2$). Svi eksperimenti obavljani su u identičnim “hiposmotskim” uslovima - 55 mOsm razlike između vanćelijskog i unutarćelijskog rastvora B) Zavisnost gustine maksimalne struje na +70mV od koncentracije jona hlora dobijena iz istih zapisa struja registrovanih u konfiguraciji *cela-ćelija* koji su korišćeni za konstrukciju I_{c_p}/V kriva na slici A. Prikazana kriva predstavlja najbolji fit kroz prikazane izračunate vrednosti gustina struje na +70 mV a pokazuje eksponencijalni porast gustina struje sa povećanjem koncentracije Cl^- jona.

Zapravo, sa smanjenjem koncentracije hlora značajno se smanjuju i gustine struja, što jasno ukazuje na anjonsku prirodu IRIS-a. Na slici 13B prikazana je zavisnost gustine struje na +70 mV od koncentracije Cl^- i vidi se da gustina eksponencijalno raste sa porastom koncentracije jona hlora i pokazuje sporo zasićenje na koncentracijama većim od 60 mM.

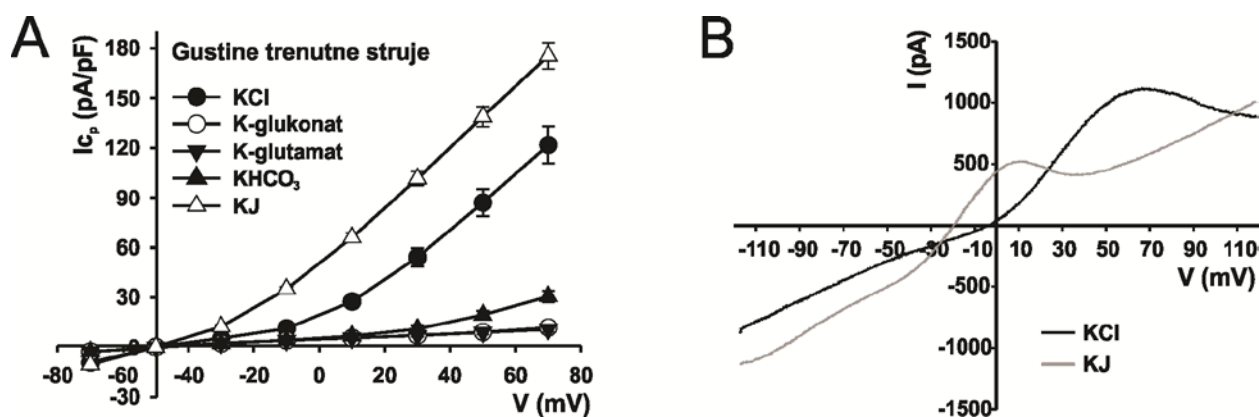
Kako bi se utvrdila selektivnost IRIS-a za različite anjone, merenja su obavljena u simetričnom 125mM K-glukonatu (n=5), K-glutamatu (n=6), $KHCO_3$ (n=5) i iz tehničkih razloga u asimetričnim Γ/Cl^- (n=5) uslovima. Reprezentativni zapisi snimljeni u svim gorepomenutim uslovima prikazani su na slici 14A-E.



Slika 14. Provodljivost IRIS-a za anjone: A) Reprezentativni zapis struja registrovanih u konfiguraciji *cela-ćelija* u Γ/Cl^- asimetričnim uslovima (125 mM KI u komorici, 125 mM KCl u pipeti). B-E) Reprezentativni zapisi struja registrovani u konfiguraciji *cela-ćelija* u simetričnim jonskim uslovima (125 mM KCl, K-bikarbonat, K-glukonat odnosno K-glutamat i u komorici i pipeti). Svi eksperimenti vršeni su u "hipoosmotskim" uslovima sa identičnom razlikom u osmolaritetima (55 mOsm) između pipetnog i rastvora u komorici (korišćeni voltažni protokol u svim eksperimentima prikazan je na slici B)

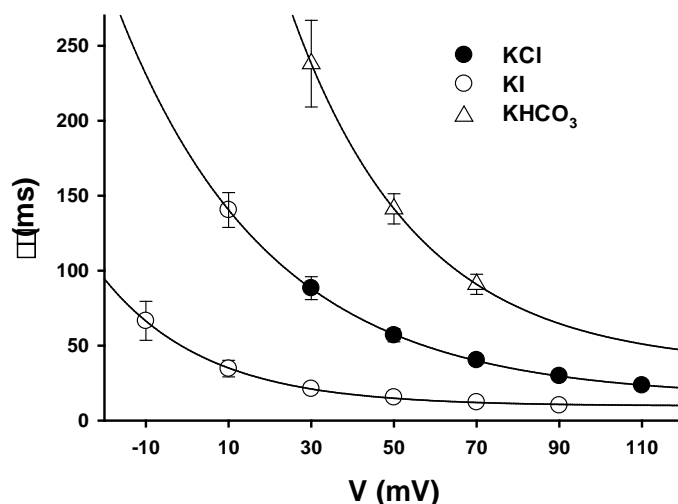
Poređenjem sa kontrolama (125 mM KCl) dobijeno je da je prosečna $I_{c_{p70mV}}$ u bikarbonatima četiri puta, u glukonatu 10 puta a u glutamatu 11 puta manja nego u hloridima ($P < 0.001$). Struje registrovane u KI pokazale su 1.4 puta veću gustinu u odnosu na kontrolne (slika 15A). Na osnovu obavljenih eksperimenata izračunata je sledeća sekvenca provodljivosti anjona za IRIS: $P_{\Gamma} : P_{\text{Cl}^-} : P_{\text{HCO}_3^-} : P_{\text{glukonat}} : P_{\text{glutamat}} = 1.4 : 1 : 0.25 : 0.01 : 0.088$. Vrednosti R_m u glukonatu, glutamatu i bikarbonatima su veće a u KI značajno manje nego u kontrolnim uslovima ($357 \pm 73 \text{ M}\Omega$, $P < 0.001$; $396 \pm 99 \text{ M}\Omega$, $P < 0.001$; $268 \pm 69 \text{ M}\Omega$, $P = 0.036$; $97 \pm 6 \text{ M}\Omega$, $P = 0.022$, redom), što još jednom potvrđuje da aktivnost jonskih kanala u osnovi IRIS-a, na startnom potencijalu, utiče na otpor membranske. Na slici 15B prikazani su originalni zapisi struja dobijeni primenom rampa protokola u kontrolnim i u Γ/Cl^- asimetričnim uslovima.

Sa slike se jasno može uočiti pomeraj potencijala reverzije sa $-4.8 \pm 0.8 \text{ mV}$ ($n=4$) u kontrolnim uslovima na $-18.3 \pm 0.8 \text{ mV}$ ($n=4$) koliko je iznosio u asimetričnim uslovima sa KI. Na osnovu dobijenog pomeraja, primenom modifikovane Goldman-Hoćkin-Kacove jednačine (jednačina 3), izračunato je da je IRIS 1,7 puta selektivnija za Γ nego za Cl^- .



Slika 15. Selektivnost IRIS-a za anjone: A) Voltažna zavisnost gustina maksimalne struje izračunata na osnovu zapisa registrovanih u konfiguraciji *cela-ćelija* u „hiposmotskim“ uslovima sa 55 mOsm razlike između pipetnog i rastvora u komorici. Registracija struja je obavljena u simetričnim jonskim uslovima a prikazani rezultati pokazuju da je gustina trenutne struje u KCl (n=30) četiri puta veća nego u KHCO₃ (n=5), 10 puta nego u K-glukonatu (n=5), a 11 puta veća nego u K-glutamatu (n=6). Kada se u komorici nalazio KI, gustina trenutne struje u KCl bila je 1.4 puta manja (n=5). B) Reprezentativni zapisi strujnih odgovora na rampa voltažni protokol (od -120 mV do +120 mV, nagib - 0.72 mV/ms) registrovani u simetričnom KCl (crna linija) i asimetričnim I/Cl⁻ uslovima (siva linija). Primetan je pomeraj potencijala reverzije sa -4.8 ± 0.8 mV (n = 4) u KCl-u na -18.3 ± 0.8 mV (n = 4) u KI. Brzina procesa aktivacije/inaktivacije je upadljivo veća kao i amplituda struje na početku i kraju voltažnog pulsa kada je u komorici bio KI. Strujni odgovori membrane registrovani su sa citoplazmatskih kapislične membranske kapacitivnosti $C_m \approx 33$ pA/pF.

Eksperimenti kojima je ispitivana provodljivost IRIS-a za različite anjone omogućili su da se ustanovi i zavisnost brzine inaktivacije ove struje od korišćenih provodnih jona. Na slici 16 prikazana je voltažna zavisnost vremenskih konstanti inaktivacije IRIS-a za jone Cl⁻, I⁻ i HCO₃⁻. Sa slike je vidljivo da je inaktivacija najbrža kada je IRIS nošena jonima I⁻, dok je ubedljivo najsporija u HCO₃⁻. Na osnovu ovih merenja, jasno je da je brzina inaktivacije IRIS-a zavisna od tipa anjona koje provodi i da sa porastom provodljivosti za određeni anjon ona raste. Ovo jasno ilustruju vrednosti vremenske konstante inaktivacije na +30mV koja u KI iznosi $\tau = 21 \pm 3$ ms, n=5, u KCl $\tau = 88 \pm 8$ ms, n= 10, a u KHCO₃ $\tau = 238 \pm 29$ ms, n=4.



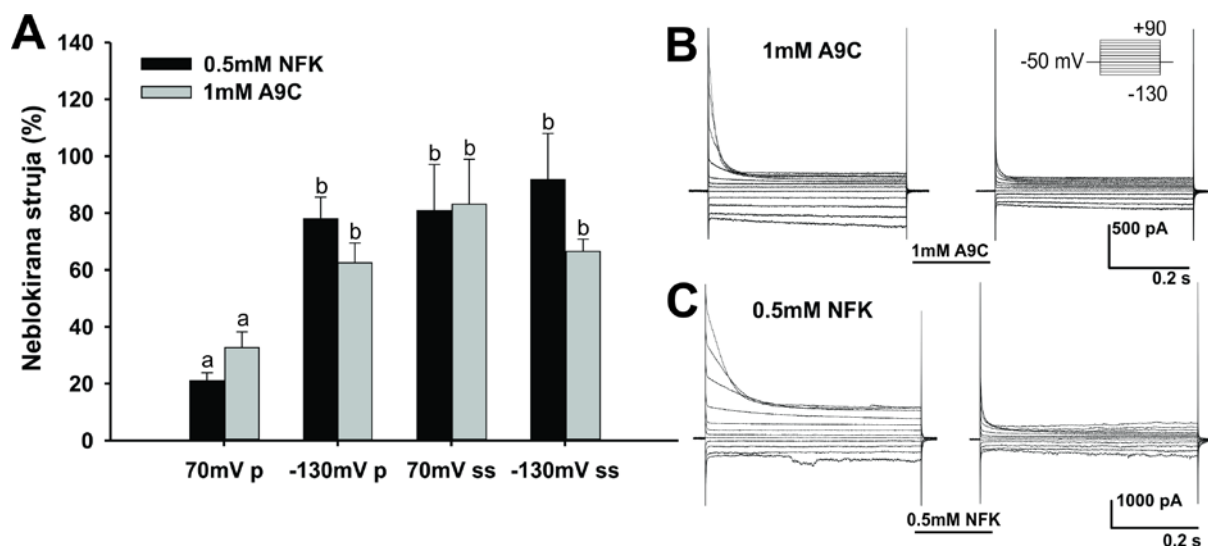
Slika 16. Voltažna zavisnost vremenske konstante inaktivacije IRIS-a za različite provodne jone. Inaktivacija IRIS-a je najbrža kada je IRIS nošena jonima koje najbolje provodi.

4.7 IRIS blokiraju A9C i NFK

Farmakološka svojstva IRISa testirana su upotrebom poznatih blokatora anjonskih kanala: 1mM A9C, 2 mM ZnCl₂, 500 μM DIDS, 0.5mM NFK, 10 μM DCPIB. Očakivani blokatora jedino su A9C i NFK pokazali značajan efekat, vidljiv nakon samo jednog minuta od trenutka primene blokatora. Rezultati bloka nakon dodavanja 1 mM A9C i 0.5 mM NFK prikazani su na slici 17.

Sa slike 17 se jasno uočava da je daleko najveći efekat i A9C i NFK na amplitudu izlazne maksimalne struje. Tako na +70 mV nakon dodatka 0.5mM NFK preostaje samo 21±5% (n=4) maksimalne struje, dok je nakon dodatka 1mM A9C to 32±5%(n=5), što je statistički značajno manje u odnosu na sve preostale merene neblokiranu struje koje se u A9C kreću u opsegu 63-83%, a u NFK 78-92%. Ovo ukazuje da je u uočeno smanjenje maksimalne struje na +70mV u slučaju oba blokatora posledica specifične inhibicije aktivnosti IRIS-a, a ne nekog nespecifičnog efekta ovih jedinjenja na citoplazmatske kapi. Pored toga dejstvo oba blokatora je veoma brzo, te A9C ostvaruje puni efekat već posle 77 ± 16 s (n=5) od dodavanja, dok NFK izaziva 50% bloka maksimalne struje na +70mV već posle 19 s (slika 21), dok potpun blok ostvaruje posle 178 ± 58 s (n=5) posle dodavanja. Ovakvo brzo dejstvo isključuje mogućnost značajnog doprinosa procesa "gašenja" IRIS (Slika 6) efektima blokatora.

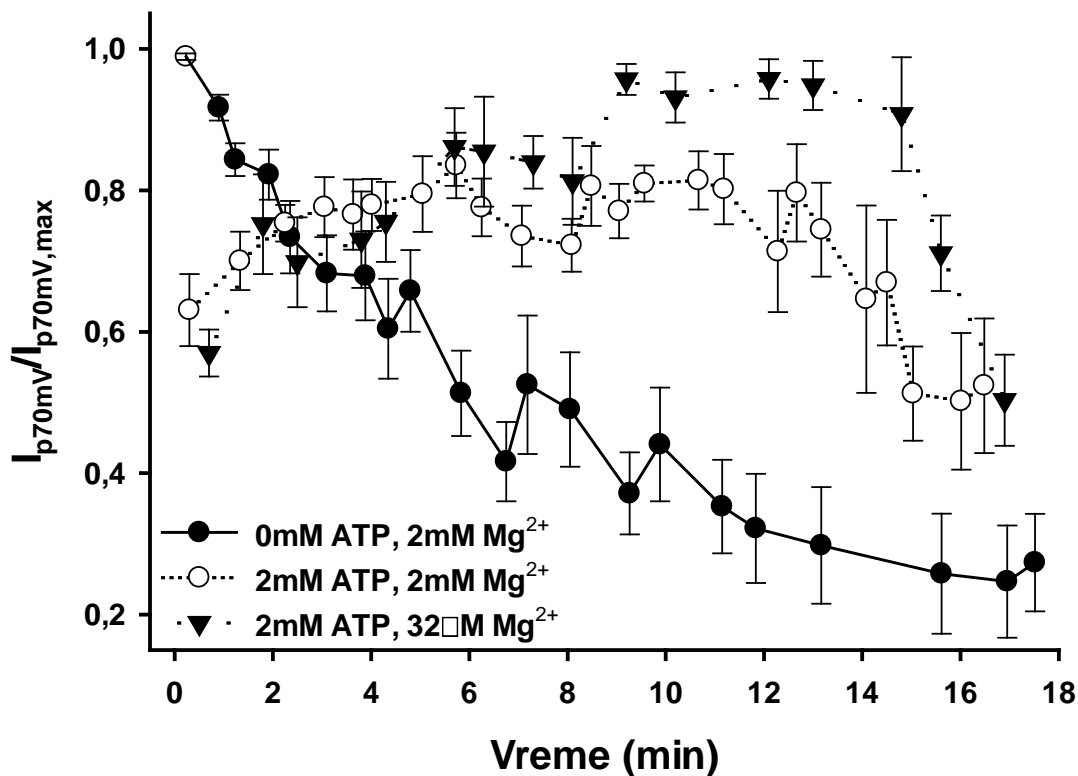
Ostali blokatori primenjeni u gore naznačenim koncentracijama nisu pokazali efekte na IRIS tokom 5 minuta od dodavanja vanćelijski rastvor.



Slika 17. Antracen-9-karboksilna kiselina i niflumična kiselina blokiraju IRIS. (A) Neblokirana struja predstavlja amplitudu struje 1.5-2 min posle dodatka 1 mM A9C, odnosno 0.5 mM NFK normalizovana na amplitudu struje pre dodatka odgovarajućeg blokatora. U slučaju NFK predstavljene su srednje vrednosti iz 4 eksperimenata, a u slučaju A9C iz 5 eksperimenata. Oznake na osama 70mV p/-130mV p predstavljaju amplitude maksimalne struje na 70 mV/-130 mV, a 70mV ss/-130mV ss predstavljaju amplitude struje u stacionarnom stanju na 70 mV/-130 mV. Vrednosti neblokiranе struje koje se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0.05$) su obeležene različitim slovima (a, b). (B) Reprezentativni primer struja registrovanih u konfiguraciji *cela-ćelija* sa membrane iste vezikule pre (levo) i posle (desno) dodavanja 1 mM A9C (voltažni protokol je prikazan na slici). (C) Reprezentativni primer struja registrovanih u konfiguraciji *cela-ćelija* sa membrane iste vezikule pre (levo) i posle (desno) dodavanja 0.5 mM NFK (voltažni protokol je prikazan na slici 17B).

4.8. Efekti intracelularnog ATP i jona Mg^{2+}

Zavisnost IRIS-a od ATP ispitivana je u eksperimentima u kojima su korišćeni pipetni rastvori sa 2 mM ATP: rastvori A i B. Osnovna razlika između ova dva rastvora je finalna koncentracija Mg^{2+} koja je u rastvoru A iznosila 2 mM a u rastvoru B 0.03 mM. Rezultati ovih eksperimenata prikazani su na slici 18.



Slika 18. Zavisnost amplitude maksimalne struje na +70 mV normalizovane na maksimalnu vrednost amplitude u toku eksperimenta od vremena proteklog od uspostavljanja konfiguracije *cela ćelija*. U odsustvu ATP-a sa 2 mM Mg²⁺ u pipeti maksimalna struja se trenutno aktivira i brzo inaktivira tokom vremena (crni kružići), dok se prisustvu 2 mM ATP sa istom koncentracijom Mg²⁺ u pipeti maksimalna struja aktivira sporije i duže ostaje u aktivnom stanju (beli kružići). Smanjenje koncentracije intracelularnog Mg²⁺ na 32μM dovodi do dodatnog porasta amplitude IRIS-a ali nema uticaj na dužinu trajanja aktivnog stanja (crni trouglovi). Struje su registrovane u uslovima osmotski indukovano bubrenja (55 mOsm razlike između pipetnog i rastvora u komorici) a pobuđene su SVP-om.

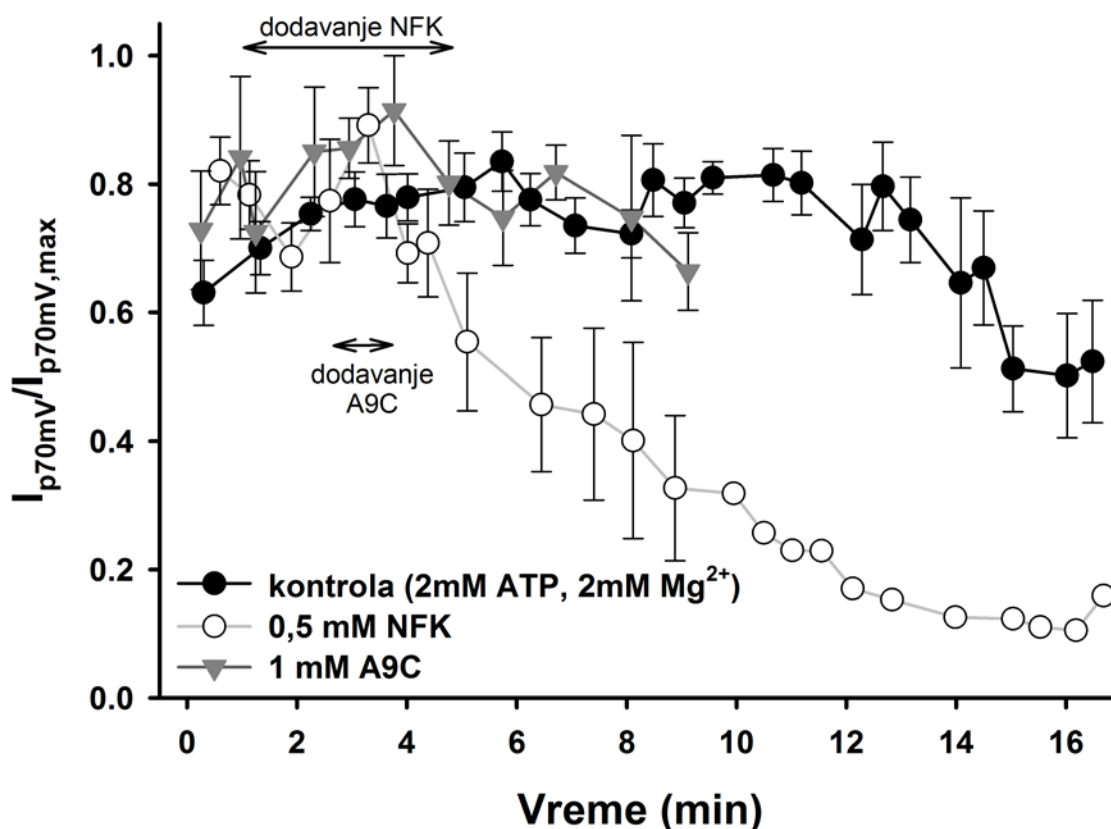
Zavisnost amplituda maksimalne struje normalizovanih na maksimalnu amplitudu, $I_{p70mV}/I_{pmax70mV}$, od proteklog vremena od ulaska u konfiguraciju *cela ćelija* (Slika 18), pokazuje da se u kontrolnim uslovima, bez ATP, maksimalna amplituda struje dostiže gotovo trenutno (1.2 ± 0.2 min ($n=32$) od početka eksperimenta). Na osnovu srednje krive normalizovanih amplituda struje dobijene iz 32 merenja (slika 18, crni kružići), zaključujemo da se tokom vremena jonski kanali u osnovi IRIS-a relativno brzo inaktiviraju, što se uočava kao opadanje amplituda struje koja već nakon 3 min pada ispod 70% svoje početne vrednosti. Nakon 6 minuta amplituda IRIS-a se redukuje za 50%, posle 10 min pada ispod 40% od

maksimalne vrednosti da bi posle 15 min nešto više od 20% ove struje ostalo aktivno. Nasuprot ovoj brznoj inaktivaciji struje u kontrolnim uslovima, unutarćelijski ATP dovodi do znatno sporije aktivacije IRIS-a u vremenu. Kada je u pipeti prisutan 2mM Mg^{2+} (Slika 17, beli kružići) odmah po ulasku u konfiguraciju *cela ćelija*, aktivira se oko 60% ove struje da bi se tek nakon 7 ± 1 minuta ($n=17$) dostigao njen maksimum, što je statistički značano duže u odnosu na kontrolne uslove ($P<0.001$). Sa slike se jasno uočava da normalizovana amplituda ne doseže vrednost 1 već se posle oko 3 minuta dostiže plato aktivacije čije vrednosti variraju između 72% i 83%, (u proseku $78 \pm 1\%$, $n=153$) i koji se održava sve do 13. minuta. Razlog ovoga je što se maksimalna aktivacija IRIS-a kod različitih vezikula dostiže nakon različitih vremenskih intervala (od 1-14minuta) pa je u proseku gledano 78% struje aktivirano u ovom vremenskom intervalu. Nakon 13minuta započinje smanjenje amplitude IRIS-a i već posle 2 minuta ona se vraća na početni nivo aktivacije, te 15-17minuta od početka eksperimenta oko 50% IRIS-a ostaje aktivirano. Možemo zaključiti da ATP usporava aktivaciju i da se ovako aktivirana struja tokom 10 minuta ostaje stabilno aktivna, što je značajno duže nego kada ATP nema.

Kada je kao intracelularni rastvor korišćen rastvor sa 2 mM ATP ali sa smanjenom koncentracijom Mg^{2+} na 32 μ M (Slika 18, crni trouglovi) situacija je bila ~~što~~ drugačija. Srednja kriva normalizovanih amplituda (Slika 18, crni trouglovi, $n=10$) pokazuje da se, baš kao i u slučaju više koncentracije Mg^{2+} , odmah po ulasku u konfiguraciju *cela-ćelija*, aktivira oko 60% IRIS. Međutim, dok aktivnost ove struje sa 2 mM Mg^{2+} ubrzo dostiže plato na kome se održava tokom 10minuta, aktivacija u 32 μ M Mg^{2+} je skokovita i odvija se kroz tri platoa (Slika 18). Prvi se uspostavlja od 1.8 do 4,3 minuta sa prosečnom vrednošću od $73 \pm 7\%$ ($n=27$), potom dolazi do statistički značajnog porasta do drugog platoa od $84 \pm 3\%$ ($n=20$, $P=0,012$) koji traje od 5,7 -8,1 minuta, da bi se na kraju dostigao maksimalni nivo aktivacije IRIS uspostavljanjem trećeg platoa od $95 \pm 1\%$ koji traje od 9 – 15 minuta. Ako se usrednje vremena dostizanja maksimalne aktivacije u svakom od 10 nezavisnih eksperimenata dobija se srednja vrednost od 10 ± 2 minuta, koja se nalazi u okviru trajanja trećeg platoa, a koja je duža, iako ne statistički značajno, od odgovarajuće u 2 mM Mg^{2+} . Amplituda trećeg platoa je veća kako od amplitude drugog platoa ($P=0,009$), tako i od prosečnog nivoa aktivacije IRIS u odgovarajućem vremenskom intervalu (9 - 13 minuta, $78 \pm 2\%$, $P<0,001$, $n = 49$) u uslovima sa 2 mM ATP i 2 mM Mg^{2+} u pipetnom rastvoru. Nakon toga počinje opadanje amplitude i, kao i u uslovima sa 2 mM ATP i 2 mM Mg^{2+} , dolazi do naglog pada aktivnosti tako da posle 17 minuta oko 50% IRIS-a ostaje aktivno. Efekat smanjene koncentracije jona Mg^{2+} na IRIS

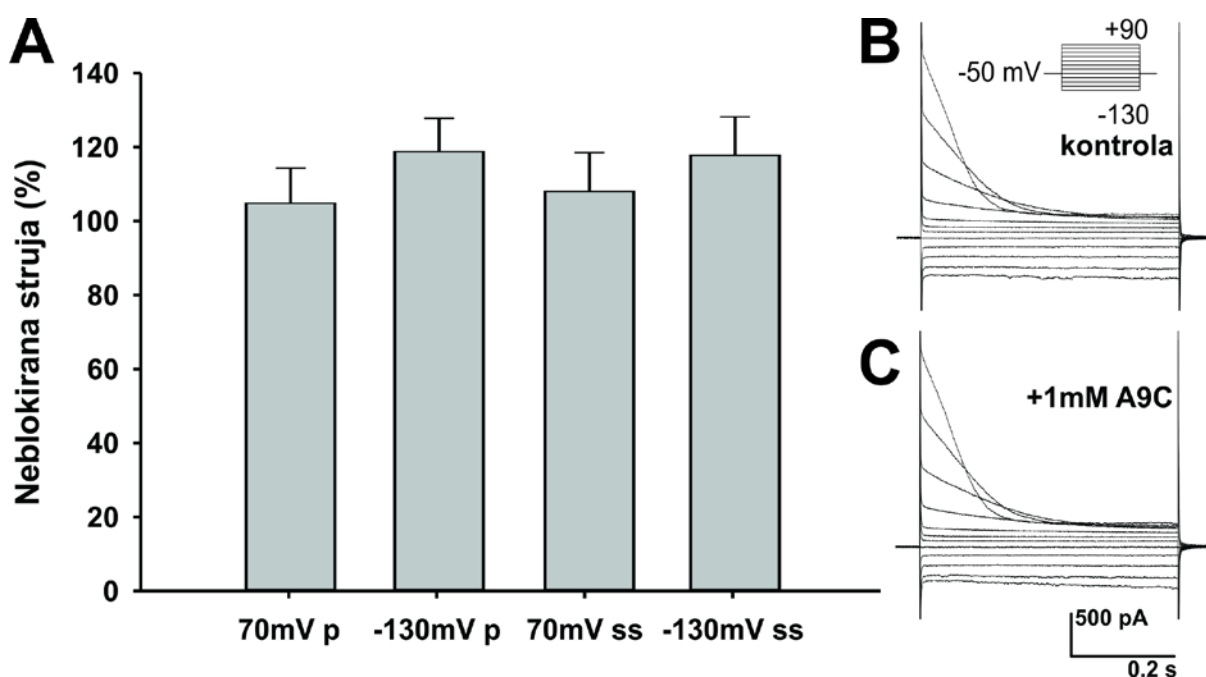
ogleda se u većoj aktivaciji ove struje što može biti posledica stabilizacije otvorene konformacije jonskih kanala u njenoj osnovi ili uklanjanjem faktora koji dovode do inaktivacije ovih kanala tako da VRAC-u slični kanali ostaju aktivni duži vremenski period.

Osim efekata na kinetiku aktivacije i vremenski interval koji u aktiviranom stanju provode jonski kanali u osnovi IRIS-a, ispitan je i uticaj unutarćelijskog ATP na dejstvo utvrđenih blokatora ove struje (Slika 19.)



Slika 19. Unutarćelijski ATP menja inhibitorno dejstvo A9C i NFK na IRIS. Prikazane krive predstavljaju zavisnost amplitude maksimalne struje na +70 mV normalizovane na maksimalnu vrednost amplitude u toku eksperimenta od vremena proteklog od uspostavljanja konfiguracije *cela ćelija*. Kontrolna kriva (crni kružići) pokazuje promenu normalizovane amplitude IRIS-a tokom vremena u prisustvu 2 mM ATP i 2 mM Mg²⁺ (vidi Sliku 18, beli kružići). Dodavanje 1 mM A9C (sivi trouglovi) u prisustvu ATP-a nema efekta na amplitudu IRIS-a (dok 0,5 mM NFK (beli kružići) blokira IRIS ali sporije nego kada u pipeti nema ATP-a (detaljnije – slika 20)). Vremenski intervali u toku kojih su dodavani A9C i NFK su označeni dvoglavim strelicama. Struje su registrovane u uslovima osmotski indukovanog bubrenja (55 mOsm razlike između pipetnog i rastvora u komorici) a pobuđene su SVP-om.

Slika 19. prikazuje zavisnost amplituda maksimalne struje na +70 mV normalizovanih na maksimalnu amplitudu i datom eksperimentu, $I_{p70mV}/I_{p70mVmax}$, od proteklog vremena od ulaska u konfiguraciju *cela-ćelija*. U svim eksperimentima pipetni rastvor je sadržao 2 mM ATP i 2 mM Mg^{2+} . Spontane promene normalizovane amplitude IRIS su već detaljno opisane (vidi Sliku 18, beli kružići). Dodavanje 1mM A9C u četiri nezavisna eksperimenta u intervalu od 2.7 - 3.7 minuta (na slici 19 predstavljeno dvoglavom strelicom) nije izazvalo statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolu u narednih 6 minuta. Ovo je velika razlika u odnosu na delovanje 1mM A9C u uslovima bez ATP kada je za oko 1 minuta blokirao 68% aktivnosti IRIS (Slika 17, sivi stubići).

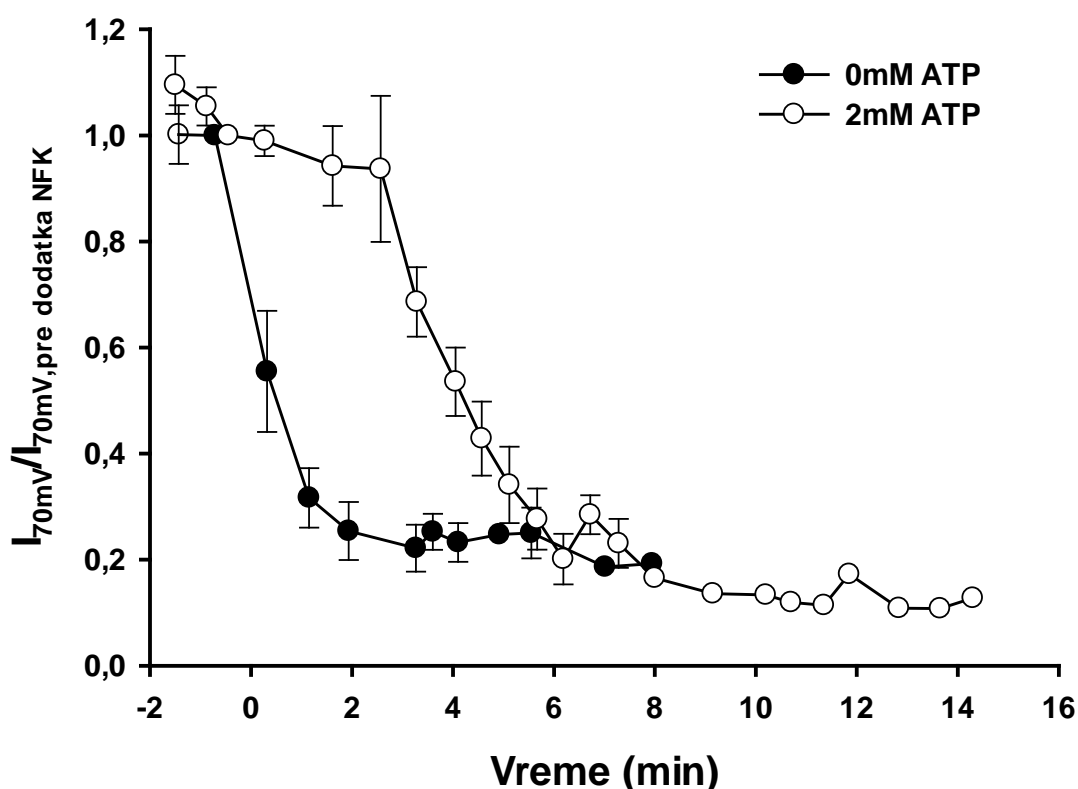


Slika 20. Antracen-9-karboksilna kiselina ne blokira a IRIS u prisustvu unutarćelijskog 2 mM ATP. (A) Neblokirana struja predstavlja amplitudu struje 1.5-2 min posle dodatka 1 mM A9C, normalizovana na amplitudu struje pre njegovog dodatka. Predstavljene su srednje vrednosti iz 4 eksperimenta. Oznake na osama 70mV p/-130mV p predstavljaju amplitude maksimalne struje na 70 mV/-130 mV, a 70mV ss/-130mV ss predstavljaju amplitude struje u stacionarnom stanju na 70 mV/-130 mV. Reprezentativni primer struja registrovanih u konfiguraciji *cela-ćelija* sa membrane iste vezikule pre (B) i posle (C) dodavanja 1 mM A9C (voltažni protokol je prikazan na slici 20B).

Radi dodatne provere prikazali smo na Slici 20A, baš kao na Slici 17, delovanje A9C preko neblokirane struje koja predstavlja amplitudu struje 1.5-2 minuta posle dodatka 1 mM A9C normalizovanu na amplitudu struje pre njegovog dodatka. Sa slike se jasno vidi da blok

IRIS sa 1mM A9C u potpunosti izostaje u prisustvu ATP. Štaviše dodavanje 1mM A9C izaziva blago povećanje pre svega ulaznih (oko 18%), a u nešto manjoj meri i izlaznih struja (Sika 20A), što je očigledno i na prikazanim originalnim zapisima (Slika 20B,C)..

Za razliku od A9C, NFK izaziva prvo statistički značajno smanjenje aktivnosti IRIS posle 5,1 minute od početka eksperimenta ($P=0,040$), da bi se trend opadanja nastavio sve do dostizanja platoa na oko 20% aktivnosti IRIS (Slika 19, beli kružići). Na ovaj nači je potvrđeno dejstvo NFK na IRIS i u prisustvu ATP. Kako je u 5 izvršenih eksperimenata NFK dodavana u prilično širokom vremenskom intervalu od 1 - 5 minuta da bi se jasnije ispratila kinetika njenog delovanja i uporedila sa onom u uslovima bez ATP prikazana je maksimalna amplituda struje na +70mV normalizovana na amplitudu izmerenu neposredno pre dodavanja NFK u uslovima sa i bez ATP (Slika 21).



Slika 21. Normalizovane amplitude IRIS-a u zavisnosti od vremena proteklog od trenutka dodavanja 0,5mM NFK: amplituda struje opada odmah nakon dodavanja blokatora kada u pipeti nema ATP-a (crni kružići) dok prisustvo ATP-a odlaže blokirajući efekat NFK preko 3 minuta (beli kružići). Struje su registrovane u uslovima osmotski indukovano bubrenja (55 mOsm razlike između pipetnog i rastvora u komorici) a pobuđene su SVP-om.

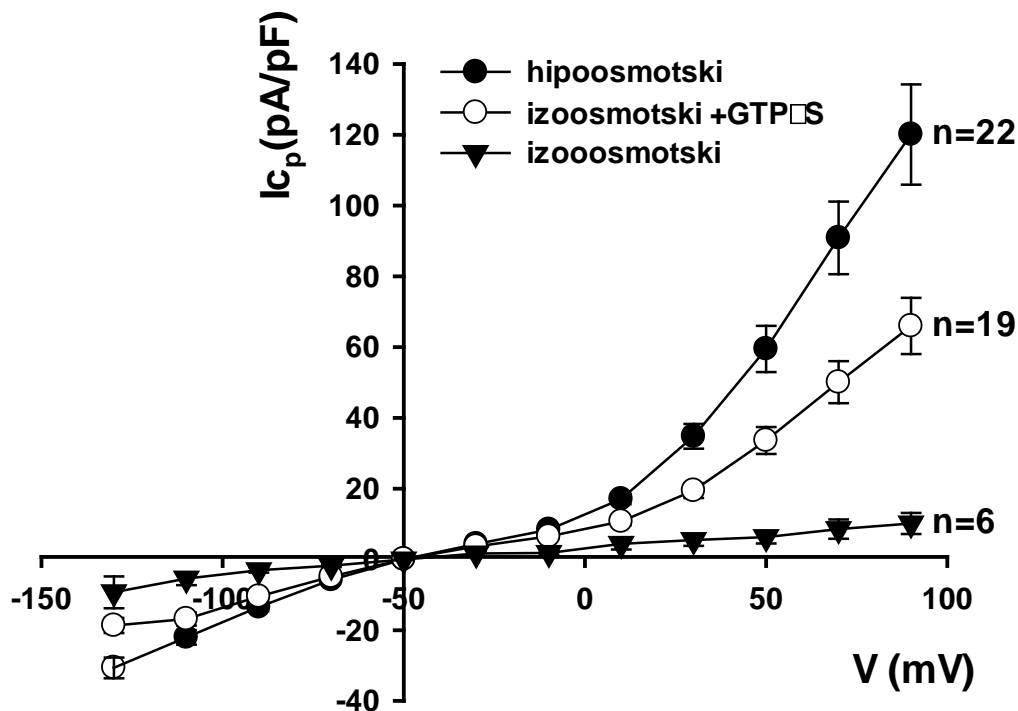
Vidimo da bez ATP-a 0,5 mM NFK (n=4) blokira IRIS veoma brzo: za manje od 60 s oko 50 % IRIS-a biva blokirano a za 2 min efekat bloka je potpun (blokirano je skoro 80% struje). Sa druge strane, sa 2 mM ATP-om u pipetnom rastvoru, efekat 0,5 mM NFK (n=5) je odložen za gotovo 3 min a nakon toga kinetika i intenzitet dejstva blokatora su gotovo nepromenjeni: za manje od 60s blokirano je više od 50% struje a za nepuna 2 min intenzitet bloka je skoro 80%. U oba slučaja se posle 6 min od aplikacije blokatora može izmeriti oko 20% preostale aktivne struje na početku voltažnih pulseva, koja najverovatnije ne potiče od IRIS-a.

4.9. GTP γ S aktivira IRIS

4.9.1 Struja aktivirana GTP γ S-om – amplituda, vremenska dinamika i jonska osnova

Nakon eksperimenata u kojima su ispitivana biofizička svojstva, jonska osnova, uticaj ATP i jona Mg²⁺ na IRIS, testirano je da li se ova struja može aktivirati u izoosmotskim uslovima intracelularnim mehanizmom aktivacije poznatim kod zapreminom regulisanog anjonskog kanala (*VRAC*–*volume regulated anion channel*) sisara. Ovaj put aktivacije uključuje G proteine, a eksperimentalna procedura aktivacije VRAC-a u odsustvu osmotskog stimulusa i promene ćelijske zapremine podrazumeva unutarćelijsko dodavanje GTP analoga sa povećanom metaboličkom stabilnošću–GTP γ S. Ovaj nehidrolizabilni analog GTP je rastvaran u unutarćelijskom rastvoru izoosmotskim sa rastvorom u komorici u koncentraciji od 120 μ M. Paralelno su čini i eksperimenti u istim uslovima, samo bez γ S GTP unutarćelijskom rastvoru. Rezultati su prikazani na slici 22B na kojoj su prikazane krive zavisnosti gustina maksimalne struje od nametnutog potencijala. Najmanje maksimalne struje, u hiperpolarizaciji i depolarizaciji registrovane su u izoosmotskim uslovima ($I_{c_p} = -5 \pm 2$ pA/pF na -110mV, $I_{c_p} = 9 \pm 3$ pA/pF na +70 mV; n=6), u kojima, kako je ranije utvrđeno, IRIS nije aktivna. Prosečan R_m iznosio je $431 \pm 110 \Omega$ u šest obavljenih merenja. Prisustvo GTP γ S u intracelularnom rastvoru dovodi do maksimalne aktivacije struje koja se u depolarizaciji inaktivira i značajno je veća ($p < 0.01$) od onih registrovanih u odsustvu ovog GTP analoga ($I_{c_p} = -17 \pm 2$ na -110mV, $P = 0,003$, $I_{c_p} = 50 \pm 6$ na +70 mV, $P < 0,001$; n=19). U 19 merenja prosečan R_m bio je $269 \pm 28 \Omega$, što je statistički značajno manje od vrednosti R_m u izoosmotskim uslovima bez GTP γ S. GTP γ S aktivirana maksimalna struja ipak je značajno manja od struje koju aktiviraju hipoosmotski uslovi indukovani razlikom osmolariteta od 55 mOsm između vanćelijskog i unutarćelijskog rastvora ($I_{c_p} = -22 \pm 2$ pA/pF na -110mV $P = 0,072$,

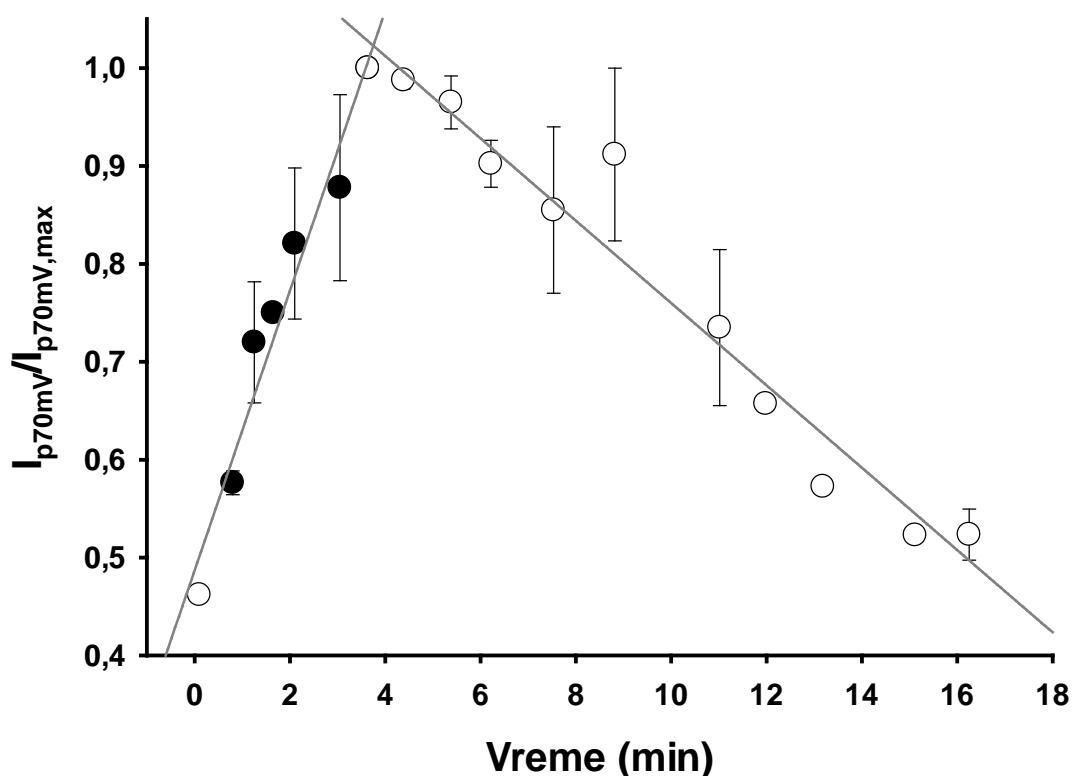
$I_{c_p}=90\pm 10$ pA/pF na +70 mV, $P=0,002$; $n=22$). R_m u 22 merenjau "hipoosmotskim" uslovima je bio statistički značajno manji nego ($P=0,038$) u izoosmotskim uz dodatak $GTP\gamma S$ i iznosio je 207 ± 25 M Ω .



Slika 22. Unutarćelijski $120\mu M$ $GTP\gamma S$ u izoosmotskim uslovima aktivira izlazno ispravljenu inaktivirajuću maksimalnu struju sličnu IRIS. A) Voltažna zavisnost srednjih vrednosti gustine maksimalnih struja (I_{c_p}) dobijenih na osnovu strujnih zapisa registrovanih u konfiguraciji *cela ćelija* u simetričnim uslovima u $60mM$ KCl i $65mM$ Kglutamatom. Prikazane su I_{c_p}/V krive u "hipoosmotskim" uslovima sa 55 mOsm razlike između vanćelijskog i unutarćelijskog rastvora (crni kružići) u izoosmotskim uslovima (crni trouglovi) i u izoosmotskim uslovima uz dodatak $120\mu M$ $GTP\gamma S$ u pipetnom rastvoru.

Kako IRIS pobuđenu hipoosmotskim stimulusom karakterišu izrazite promene amplitude u vremenu, ispitali smo ponašanje maksimalne struje aktivirane $GTP\gamma S$ -om u vremenu tako što smo amplitude maksimalne struje na +70mV normalizovali na maksimalnu amplitudu u datom eksperimentu i prikazali tako dobijene srednje vrednosti iz 5 nezavisnih eksperimenata u funkciji trajanja eksperimenta (Slika 23). Sa slike vidimo da se struja aktivira brzo i dostiže preko 50% svoje maksimalne aktivacije za 60 sekundi a maksimum nakon 3-4 minuta. Zatim sledi znatno sporija inaktivirajuća faza koja traje više od 10 min i nakon koje amplituda struje

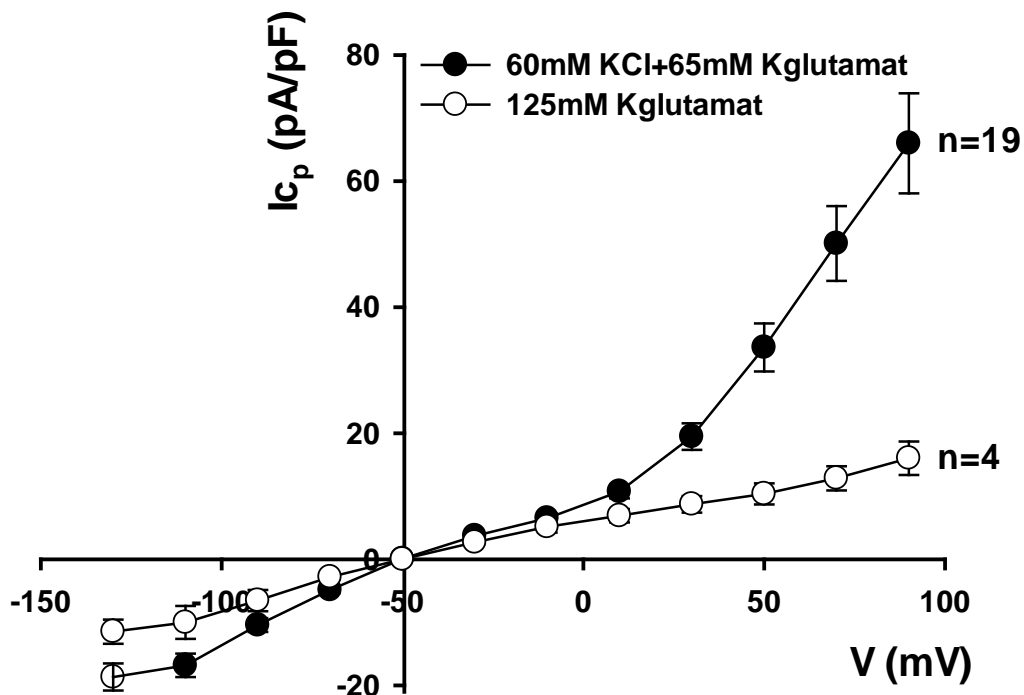
opada na oko 50% svoje maksimalne aktivnosti. I porast i pad aktivnosti kanala u vremenu su praktično linearni jer se veoma dobro ($R^2=0,95$) opisuju pravim linijama (Slika 23), pri tome je utvrđena brzina aktivacije utvrđena iz nagiba prave ($a=14\pm 1\%/min$) 3,3 puta veća od brzine inaktivacije maksimalne struje ($a=4,2\pm 0,3\%/min$). Ovakvo ponašanje maksimalne je značajno različito u odnosu na IRIS u odsustvu ATP, ali veoma podseća na promene IRIS u vremenu u prisustvu 2mM ATP u citoplazmatičnoj kapi (Slika 17).



Slika 23. Zavisnost amplitude maksimalne struje na +70 mV izazvane pomoću GTP γ S u izoosmotskim uslovima i normalizovane na maksimalnu vrednost amplitude u toku eksperimenta od vremena proteklog od uspostavljanja konfiguracije *cela-ćelija*. Aktivacija i inaktivacija maksimalne struje pokazuje izrazitu linearnu zavisnost pošto su veoma dobro opisane pravim linijama ($R^2=0,95$). Struje su pobuđene SVP-om.

Jonska osnova maksimalne struje aktivirane GTP γ S-om utvrđena je eksperimentom u kome je sav hlor iz pipetnog i rastvora u komorici ekvimolarno zamenjen glutamatom. Rezultat eksperimenta prikazan je na slici 24. Gustina maksimalne strujena je iznosila $I_{c_p}=13\pm 2$

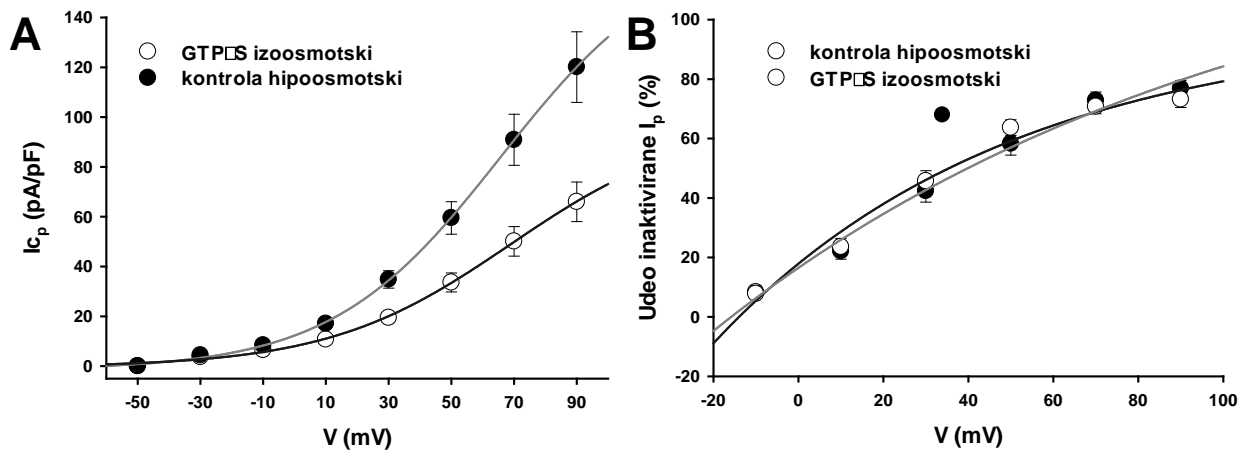
pA/pFa na -110 mV i $I_{c_p} = -17 \pm 2$ pA/pF na $+70$ mV ($n=6$). Prosečan R_m iznosio je 288 ± 48 M Ω . Poređenjem ovih gustina sa gustinama struja izračunatim u eksperimentima sa 60 mM KCl vidi se njihovo značajno smanjenje ($p < 0.001$) što jasno ukazuje na anjonsku prirodu struje koju GTP γ S aktivira.



Slika 24. Strujno-naponska kriva gustina maksimalne struje aktivirane unutarćelijskim 125 μ M GTP γ S u izoosmotskim uslovima u simetričnim rastvorima sa 60 mM KCl i 65 mM K-glutamatom (crni kružići, $n=19$) i 125 mM K-glutamatom (beli kružići, $n=4$). Struje su pobuđene SVP-om.

4.9.2 Voltažno zavisne karakteristike struje aktivirane GTP γ S-om

Sa slike 22 jasno se vidi da je struja aktivirana GTP γ S snažno izlazno ispravljena baš kao i IRIS. Ukoliko je su to struje nošene istim kanalom za očekivati je da su im parametri voltažne zavisnosti veoma slični. Da bi to proverili opisali smo strujno-naponske zavisnosti gustina maksimalnih struja aktiviranih hipoosmotskim stimulusom od 55 mOsm (Slika 25A, crni kružići, $n=22$) i 125 μ M GTP γ S (Slika 25A, beli kružići, $n=19$) Bolcmanovom funkcijom (jednačina 1).



Slika 25. Voltažno zavisne karakteristike IRIS-a i maksimalne aktivirane sa unutarćelijskim 125 μM GTP γ S u izoosmotskim uslovima. A) Zavisnost prosčne gustine maksimalni struja ($I_{c,p}$) aktiviranih hipoosmotskim stimulusom od 55mOSm (crni kružići, $n=22$) i unutarćelijskim 125 μM GTP γ S (beli kružići, $n=19$) od nametnutog potencijala (V). Voltažna zavisnost aktivacije obe struje je fitovana Bolcman-ovom funkcijom (jednačina 1). Potencijal poluaktivacije za IRIS iznosi $V_{0,5} = 66 \pm 2$ mV, a naelektrisanje vratnica je $z_g = -0,93 \pm 0,04$, a za struju aktiviranu GTP γ S $V_{0,5} = 69 \pm 6$ mV, a $z_g = -0,87 \pm 0,09$. B) Voltažna zavisnost inaktiviranog dela IRIS-a (crni kružići, $n=22$) i maksimalne struje aktivirane unutarćelijskim 125 μM GTP γ S (beli kružići, $n=19$). Procenat inaktivacije je računat kao $100\% \cdot (I_p - I_{ss})/I_p$, a dobijene vrednosti su fitovane rastućom eksponencijalnom krivom.

Gustina maksimalne struje raste sa depolarizacijom membrane, a dobijena kriva predstavlja rastuću sigmoidu i fitovana Bolcmanovom funkcijom daje sledeće parametre: voltaža poluaktivacije, $V_{0,5} = 69 \pm 6$ mV, a naelektrisanje vratnica, $z_g = -0,87 \pm 0,09$, što ovu struju svrstava u srednje ispravljene struje. Dobijeni parametri su veoma bliski parametarima izračunatim za IRIS (voltaža poluaktivacije $V_{0,5} = 66 \pm 2$ mV, a naelektrisanje vratnica $z_g = -0,93 \pm 0,04$), što predstavlja veoma važan argument za tvrdnju da obe struje provodi isti jonski kanal. Sasvim razumljivo i promene amplitude inaktivirane maksimalne struje u obe vrste eksperimentalnih uslova karakteriše praktično indentična zavisnost od nametnutog potencijala (Slika 25B)

4.10 Blokatori IRIS-a zaustavljaju rast micelijuma gljive

Fiziološki efekti blokatora osmotski aktivirane struje kod gljive *P.blekesleeanus* i potencijalna uloga ove struje, testirani su na micelijumu gljive u fazi intenzivnog rasta (od 16 do 28 h od sejanja). Blokatori su dodavani direktno u medijum u kome je micelijum star 16 h.

Testirani efekti više različitih koncentracija NFK i 9AC na rast micelijuma gljive *P. blakesleeanus* prikazani su u tabeli 1. Rast micelijuma praćen je merenjem suve biomase koju micelijum dostiže nakon definisanog vremenskog perioda (odjeljak 3.5).

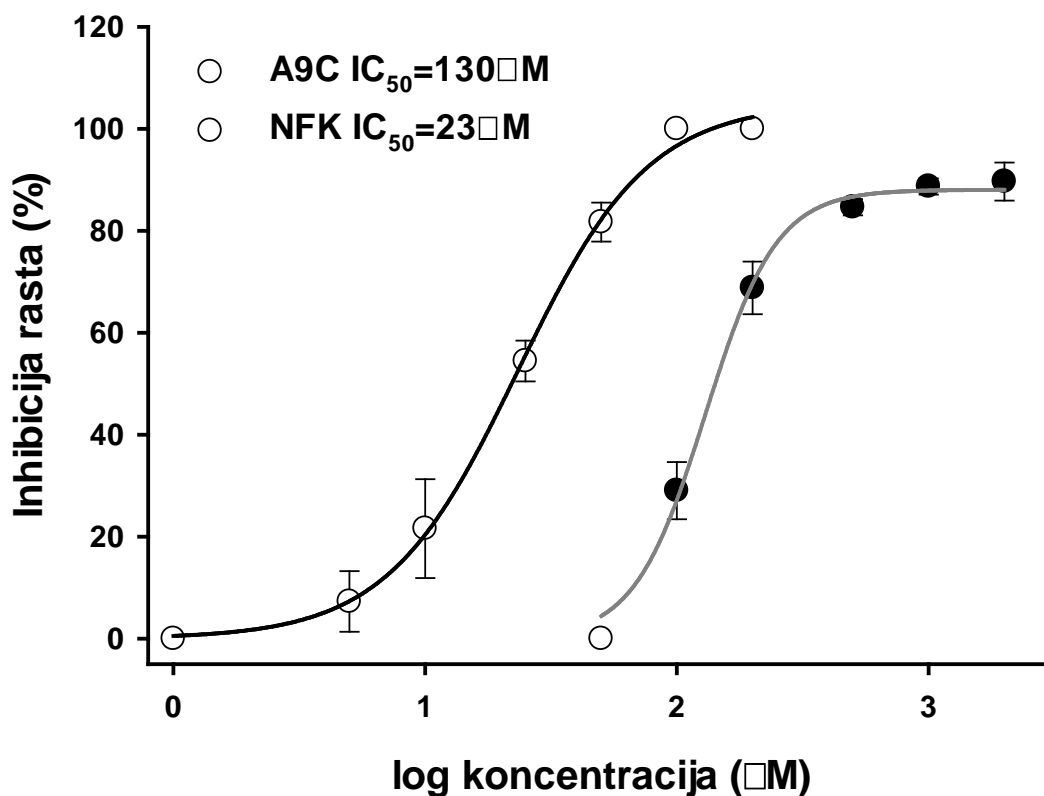
A9C	kontrola	50 μ M	100 μ M	200 μ M	500 μ M	1000 μ M	2000 μ M	
prinos (mg/ml)	10,4 \pm 1,2	10.5 \pm 0.4	7.4 \pm 0.6	3.3 \pm 0.5	1.6 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	1.1 \pm 0.4	
inh. (%)	/	-0.2 \pm 3.4	29.0 \pm 5.6	68.8 \pm 5.2	84.7 \pm 1.6	88.7 \pm 1.6	89.7 \pm 3.7	
NFK		1 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
prinos (mg/ml)	9.3 \pm 0.6	11.1 \pm 1.3	8.6 \pm 0.5	7.3 \pm 0.9	4.2 \pm 0.4	1.7 \pm 0.4	-0.6 \pm 0.3	-2.6 \pm 0.1
inh. (%)	/	-20 \pm 14	7.3 \pm 5.9	21.6 \pm 9.7	54.5 \pm 4.0	81.7 \pm 3.8	106.0 \pm 3.6	128.1 \pm 1.6

Tabela 1. Uticaj blokatora IRIS-a na rast micelijuma gljive *P. blakesleeanus* prikazan kao rast biomase micelijuma i procenat inhibicije ovog rasta za svaku ispitanu koncentraciju dva korišćena blokatora – A9C i NFK.

A9C nije pokazala nikakav efekat u koncentraciji od 50 μ M. Sa porastom koncentracije na 100 μ M prinos biomase značajno opada i procenat inhibicije iznosi 29 \pm 5,6. Sa daljim povećanjem koncentracije blokatora raste i procenat inhibicije povećanja biomase micelijuma i on dostiže svoj maksimum pri koncentraciji A9C od 1 mM (88,7 \pm 1,6). Dalji porast koncentracije blokatora nema statistički značajan efekat na inhibiciju rasta micelijuma.

Niflumična kiselina je pokazala intenzivnije efekte na prinos biomase micelijuma u pogledu korišćenih koncentracija. U koncentraciji od samo 5 μ M ona ostvaruje inhibiciju rasta od 7,3 \pm 5,9% dok pri koncentraciji od 100 μ M pokazuje potpuni fungistatčki efekat. Dalji porast upotrebljavane koncentracije pokazuje značajne fungicidne efekte na micelijum gljive *P. blakesleeanus*.

Rezultati prikazani u Tabeli 1. predstavljeni su grafički na slici 26. Na semilogaritamskom dijagramu prikazana je zavisnost procenta inhibicije porasta biomase micelijuma od primenjene koncentracije blokatora IRIS-a.



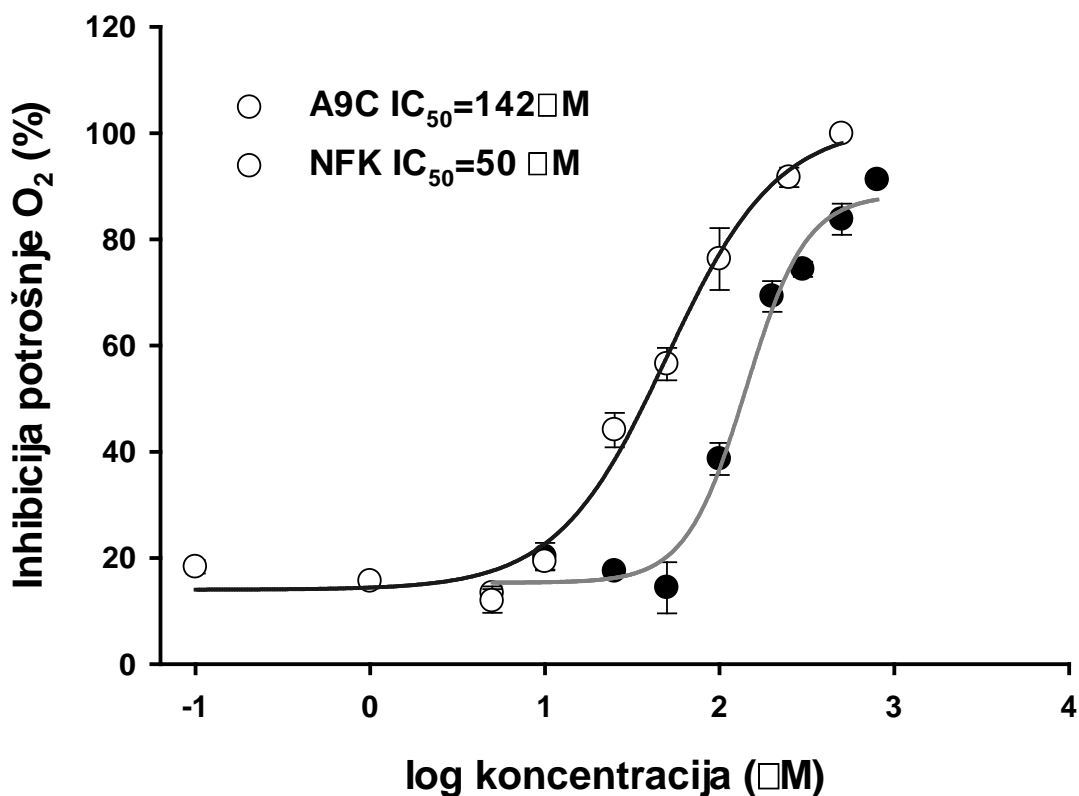
Slika 26. Procenat inhibicije rasta biomase micelijuma gljive *P. blakesleeanus* u zavisnosti od primenjene koncentracije blokatora IRIS-a. NFK (beli kružići) ispoljava znatno jači inhibični efekat na rast micelijuma u poređenju sa 9AC (crni kružići) i dostiže totalni fungistatički efekat (plato krive) pri koncentraciji oko 100 µM dok 9AC ostvaruje manji maksimalni efekat inhibicije (skoro 90%) pri znatno većim koncentracijama - oko 1 mM. Vrednosti koncentracija inhibicije 50% rasta micelijuma (IC_{50}), za oba blokatora, prikazane su na slici. One su dobijene iz fita obe krive sigmoidalnom funkcijom (jednačina četiri).

Na slici je uočljiv veoma potentan efekat NFK u relativno niskim koncentracijama (mikromolarni opseg) koji 9AC dostiže tek u koncentracijama većim za čitav red veličine. Ovako dobijene krive zavisnosti fitovane su sigmoidalnom funkcijom. Za koncentraciju inhibicije 50% rasta (IC_{50}) dobijene su sledeće vrednosti: IC_{50} (NFK) = 23 µM i IC_{50} (9AC) = 130 µM. Dobijeni rezultati pokazali su da blokatori IRIS-a, u koncentracijama nižim od koncentracija upotrebljivanih u elektrofiziološkim eksperimentima, imaju veoma potentne efekte na rast micelijuma gljive pa se postavilo pitanje fiziološke uloge struja koje oni inhibiraju ali i sporedni efekti koje ove supstance imaju na ćelije gljiva.

4.10. Uticaj blokatora IRIS-a na disanje micelijuma gljive

Efekti blokatora IRIS-a na disanje micelijuma gljive ispitivani su u eksperimentima u kojima je za merenje disanjakorišćena kiseonična elektroda, a ispitivani blokatori dodavani su direktno na micelijum. Ispitivana je dozna zavisnost uticaja blokatora na disanje, a rezultati merenja prikazani su na slici 27. Sa slike je jasno uočljivo da A9C i NFK ispoljavaju snažan inhibitorski efekat na disanje micelijuma *P. blakesleeanus*. Na semilogaritamskoj skali prikazana je zavisnost procenta inhibicije disanja od ispitivane koncentracije blokatora i odmah upada u oči da NFK ispoljava efekte u znatno nižim koncentracijama od A9C. Inhibitorski efekat A9C na disanje micelijuma se povećava sa povećanjem koncentracije blokatora. Vrednost koncentracije koja dovodi do inhibicije disanja od 50% (IC_{50}) iznosi 142 μM A9C. Nakon smanjenja upotrebene koncentracije blokatora ispod 25 μM značajno se smanjuje uticaj na inhibiciju disanja. Tako najniža ispitivana vrednost koncentracije (5 μM) A9C dovodi do inhibicije od $13,39 \pm 1,25\%$ ($n=3$), dok je za koncentraciju od 25 μM inhibicija disanja $17,53 \pm 0,94\%$ ($n=3$). Iznad 50 μM razlike u inhibitorskom efektu se povećavaju sa porastom koncentracije blokatora, a plato maksimuma inhibicije dostiže se pri koncentraciji od 500 μM A9C i iznosi 84 ± 3 ($n=3$). Maksimalni zabeleženi inhibitorski efekat ostvaruje se pri koncentraciji od 800 μM i iznosi $91,2 \pm 0,7\%$ ($n=3$).

NFK pokazuje inhibitorske efekte na disanje micelijuma u veoma niskim koncentracijama s tim što do koncentracije od 10 μM efekti nisu dozno zavisni: 0,1 μM NFK inhibira $18,34 \pm 1,24$ ($n=3$), 1 μM $15,66 \pm 0,28$ ($n=3$), 5 μM $11,92 \pm 2,23$ ($n=3$) a 10 μM $19,33 \pm 1,53\%$ ($n=5$). Tek pri većim koncentracijama NFK od 10 μM inhibicija disanja postaje značajno veća pa 25 μM inhibira $42,28 \pm 2,50$ ($n=5$), 50 μM $54,15 \pm 1,93$ ($n=6$), a 100 μM $81,96 \pm 2,10\%$ ($n=3$). Pri ovoj koncentraciji se ujedno dostiže i plato inhibicije a maksimalni zabeleženi inhibitorski efekat ima koncentracija od 250 μM i on iznosi $91,68 \pm 1,83\%$ ($n=3$). Koncentracija koja inhibira 50% disanja micelijuma je $IC_{50} = 50 \mu M$ što je 2,8 puta niža koncentracija od IC_{50} za A9C.



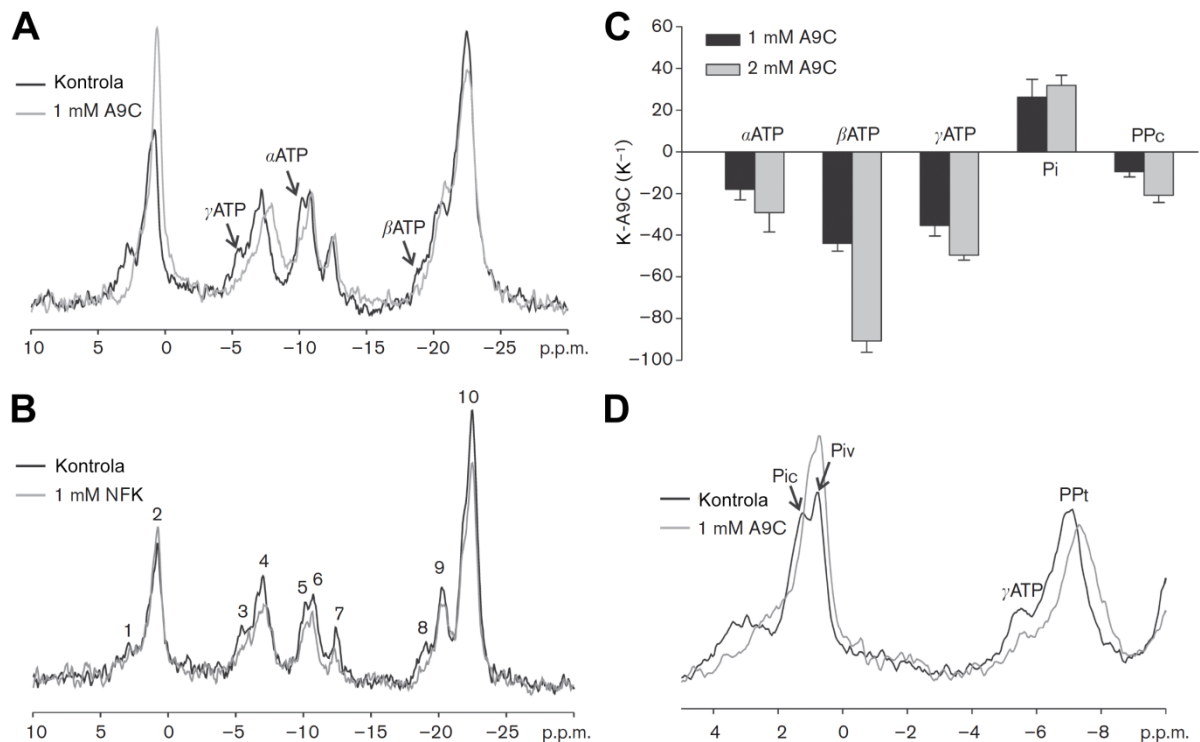
Slika 27. Zavisnost procenta inhibicije disanja micelijuma gljive *P. blekesleanus* od koncentracije upotrebljenog blokatora IRIS-a. NFK (beli kružići) pokazuje snažniji efekat na zaustavljenje disanja od A9C (crni kružići) i dostiže plato pri koncentraciji od 100 µM dok A9C isti procenat bloka (oko 83%) dostiže pri koncentraciji od 100 µM. Vrednosti koncentracija blokatora koje inhibiraju 50% respiracije micelijuma (IC_{50}) prikazane su na slici. One su dobijene iz fita obe krive sigmoidalnom funkcijom (jednačina pet).

4.11. Blokatori IRIS-a smanjuju koncentraciju ATP-a u micelijumu

Pošto su A9C i NFK pokazale značajan inhibični efekat na disanje micelijuma, sledeći korak bio je ispitivanje promena u energetskim metabolitima kakvi su ATP i polifosfati upotrebom NMR spektrometrije.

Kao što se može videti na slici 28.A i C, svi signali poreklom od ATP-a opadaju nakon dodavanja A9C. Najupečatljivija promena u spektru je smanjenje ATP signala, 44 odnosno 91% za 1 i 2 mM A9C - jedini ATP signal koji jednoznačno ukazuje na promene koncentracije ATP. Pošto se polifosfati (PolyP) smatraju energetskim rezervama (*Stanić et al., 2013, Freimoser et al., 2006*) kod prokariota i gljiva, očekivano je da procesi koji

potpuno troše ćelijske ATP rezerve dovedu do smanjenja i PPc signala – poreklom od centralnih fosfatnih grupa PolyP. U ovom slučaju, intenzitet PPc signala opada veoma malo, $9.45 \pm 2.51\%$ i $20.75 \pm 3.48\%$ za 1 i 2 mM 9AC, dok signal neorganskih fosfata raste za $26.26 \pm 0.08\%$ i $31.87 \pm 0.05\%$.



Slika 28. A i B. ^{31}P NMR spektri micelijuma *P. blakesleeanus* pre (crna) i posle (siva) dodavanja 1 mM A9C i 1 mM NFK. Signali se mogu dodeliti sledećim jedinjenjima: 1. fosfatni šećeri, 2. unutarćelijski neorganski fosfati, 4. krajnje fosfatne grupe polifosfata i pirofosfat, 5. αATP , 6. NAD(P)H i UDPG, 7. UDPG – drugi signal, 8. βATP , 9. preposlednje fosfatne grupe polifosfata, 10. centralne fosfatne grupe polifosfata. **C)** uticaj A9C na intenzitete odabranih ^{31}P NMR signala. Uočava se pad intenziteta amplituda svih ATP signala i signala poreklom od PPc i porast intenziteta signala poreklom od neorganskih fosfata. Broj ponovljenih merenja je $n=5$ za 1 mM 9AC i $n=3$ za 2 mM 9AC. **D)** Hemijski pomeraj signala obe vrste neorganskih fosfata (Pic – citoplazmatski i Piv – vakuolarni neorganski fosfati), i PPt (terminalni polifosfati) pod dejstvom 1 mM A9C.

Niflumična kiselina prouzrokuje malo smanjenje u intenzitetu svih signala osim Pi koji raste, ali znatno manje nego u slučaju A9C (Slika 2B). Razmatrajući efekte A9C mora se naglasiti da ona prouzrokuje pomeraj pH senzitivnih signala, Pi i PPt – krajnje fosfatne grupe

polifosfata (Slika 28A i D). Odvojeni signali citoplazmatskih (Pic) i vakuolarnih (Piv) neorganskih fosfata su bili vidljivi samo u 2 od 5 snimljenih spektara i u ovim spektrima je doadtak 1mM A9C izazvao pomeraj Pi od 0,3 ppm što odgovara zakišeljavanju citoplazme za oko 0,3 pH jedinice. U ostalim spektrima, signal ukupnih polifosfata pomeren je pod dejstvom 1mM A9C za 0.08 ± 0.04 ppm (n=4). Signali terminalnih polifosfata i pirofosfata beleže pomeraj od 0.42 ± 0.12 ppm (n=4) koji, po *Viereck-u (2004)*, može biti uzrokovan zakišljenjem vakuolarnog pH od oko 0.3 pH jedinice, od 5,8 do 5,5.

5. DISKUSIJA

5.1. Karakterizacija membrane citoplazmatskih kapi dobijenih iz sporangiofore *P. blakesleeanus*

Membrana citoplazmatskih kapi izolovanih iz sporangiofora končaste gljive *P. blakesleeanus* je trenutno jedini model sistem koji bi mogao da omogućiti izučavanje aktivnosti jonskih kanala u ćelijskoj membrani končastih gljiva *in situ*. Naime, istraživanja tokom devedesetih godina prošlog veka su pokazala da se posle enzimskog odstranjivanja ćelijskog zida sa ćelijskom membranom hife ne može ostvariti gigaomski kontakt, već samo kontakt otpora ne većeg od 200 M Ω što je omogućilo registrovanje nekih jonskih struja velike amplitude, ali ne i njihovo detaljno opisivanje (*Levina et al., 1995; Lew, 1998*). Smatra se da je osnovni razlog nemogućnosti dobijanja gigaomskog kontakta nedovoljno efikasna hidroliza ćelijskog zida usled čega zaostali komadići ćelijskog zida ometaju prisni kontakt pipete sa ćelijskom membranom protoplasta (*Roberts et al., 1997*). Lasersko isecanje ćelijskog zida hife je u dva navrata omogućilo dobijanje gigaomskog kontakta sa delom oslobođene ćelijske membrane i karakterizaciju jedne anjonske struje kod gljive *Aspergillus nidulans* (*Roberts et al., 1997*), kao i registraciju, ali ne i detaljno opisivanje jonske struje u ćelijskoj membrani *Neurospora crassa* (*Véry and Davies, 1998*). Međutim, već cele dve decenije ova metoda nije dala nove rezultate što dovodi u pitanje njenu primenljivost. Treći model sistem koji je trebalo da omogućiti opisivanje jonskih struja kroz membranu končastih gljiva *in situ* je bio sluzavi mutant *Neurospora crassa*, koji uopšte ne sintetiše ćelijski zid (*Levina et al., 2002*). Međutim, prilagođavanje na ovakav, za gljive, neuobičajen način života dovelo je do promena u sastavu ćelijske membrane, tako da je dobijanje gigaomskih kontakata bilo veoma otežano i samo uz korišćenje posebne metodologije mogla je biti dobijena konfiguracija cela ćelija, čiji je kvalitet bio takav da je omogućio registrovanje, ali ne i potpunu karakterizaciju registrovanih struja. S druge strane, dobijanje ostalih konfiguracija metoda nametnute voltaže na deliću membrane je bilo nemoguće, što je uslovalo da se proučavanje struja kroz pojedinačne jonske kanale na ovom objektu pokazalo kao nerešiv problem. Izvor materijala koji izgrađuje membranu citoplazmatskih kapi dobijenih iz sporangiofora gljive *P. blakesleeanus* još uvek nije pouzdano utvrđen. Jedna mogućnost je da membrana citoplazmatskih kapi nastaje od citoplazmatskih membranskih vezikula grupisanih u zoni

rasta sporangiofore (*Peat and Banbury, 1967*), za koje je dobro poznato da kod končastih gljiva predstavljaju osnovni materijal za izgradnju ćelijske membrane (*Grove and Bracker, 1970*). Druga mogućnost je da se membrana citoplazmatskih kapi obrazuje od delova vakuolarne membrane koja se prilikom obuhvatanja odgovarajućeg dela citoplazme izvrće tako da joj je površina koja je bila okrenuta ka unutrašnjosti vakuole biva okrenuta ka spoljašnjem rastvoru, slično načinu obrazovanja citoplazmatskih vezikula iz internodijalnih ćelija algi iz familije Characeae (*Berecki et al., 2001*). Mogućnost porekla od tonoplasta ne može biti u potpunosti isključena pošto je vakuola prisutna u regionu gde se vrši presecanje sporangiofore. Radi dobijanja citoplazmatskih vezikula i prilikom presecanja i curenja sadržaja sporangiofore dolazi do kidanja tonoplasta čiji bi delovi s toga mogli da obrazuju membranu bar nekih, ako ne svih citoplazmatskih kapi. Mešutim, nekoliko linija dokaza jasno ukazuje da je membrana citoplazmatskih kapi funkcionalno daleko sličnija ćelijskoj membrani nego tonoplastu. Prvo, membranski potencijal registrovan iz pet citoplazmatskih kapi pri spoljašnjem pH = 6 iznosi -112 ± 15 mV (8), što je veoma blisko vrednostima potencijala ćelijske membrane koji je pri istom pH izmeren na intaktnim sporangioforama (-112 ± 15 mV; 49). Prema našim saznanjima u literaturi ne postoje podaci o potencijalu tonoplasta sporangiofora *P. blakesleeanus*, ali su podaci dostupni za *Arabidopsis thaliana* (*Cookson et al., 2005*) i *N. crassa* (*Bertl and Slayman, 1990*) gde je potencijal tonoplasta za oko 30mV, odnosno 40mV pozitivniji od potencijala ćelijske membrane. Pozitivno naelektrisanje vakuole u odnosu na citoplazmu je uobičajeno i pospešuje transport i akumulaciju anjona u vakuoli (*Bertl and Slayman, 1990*), te se sa velikom verovatnoćom može očekivati i kod *P. blakesleeanus*. Drugo, dobijanje citoplazmatskih kapi iz internodijalnih ćelija algi iz familije Characeae zahteva smanjenje turgora pre sečenja (*Grove and Bracker, 1970*), dok što nije bio slučaj kod sporangiofora *P. blakesleeanus*. Kod druge alge *Acetabularia mediteranea*, sečenje potpuno turgescentnih ćelija je dovelo do obrazovanja citoplazmatskih kapi sa membranom poreklom od ćelijske membrane (*Bertl and Gradmann, 1987*). Treće, u ovom radu je pokazano da je 20% citoplazmatskih kapi obrazovalo ćelijski zid. Kod gljiva samo potpuno funkcionalna ćelijska membrana ima sposobnost sinteze ćelijskog zida, te stoga najmanje 20% citoplazmatskih kapi mora biti obavijeno funkcionalnom ćelijskom membranom. Iako se ne može isključiti mogućnost da je membrana citoplazmatskih kapi heterogenog porekla, struje kroz celu ćeliju snimljene u ovom radu odlikuje veoma sličan profil u hipoosmotskim uslovima, sa IRIS-om kao preovlađujućom strujom na depolarišućim potencijalima. Ovo ukazuje da citoplazmatske kapi koje su korišćene za registrovanje struja u ovom radu predstavljaju homogenu grupu. S toga

se može sa velikom verovatnoćom tvrditi da membrana citoplazmatskih kapi dobijenih iz sporangiofora končaste gljive *P. blakesleeanus* predstavlja funkcionalnu ćelijsku membranu i da s toga citoplazmatske kapi predstavljaju dobar model sistem za izučavanje aktivnosti plazmamebranskih jonskih kanala *in situ*.

5.2. Karakterizacija izlazno ispravljene brzoinaktivirajuće trenutna struje – IRIS

Dosada je u membrani citoplazmatskih kapi dobijenih iz sporangiofora končaste gljive *P. blakesleeanus* izučavana aktivnost struja kroz pojedinačne jonske kanale metodom nametnute voltaže na deliću membrane u istrgnutoj konfiguraciji *unutra-spolja*. Kao rezultat ovih istraživanja detaljno je okarakterisana izlazno ispravljena anjonska struja (Živić *et al.*, 2009), dok je registrovano postojanje još nekoliko jonskih struja (Živić, 2005). Međutim, ovo je prvo istraživanje u kome su ispitane ukupne struje kroz membranu citoplazmatskih kapi korišćenjem metode nametnute voltaže na deliću membrane u konfiguraciji *cela ćelija*, sa ciljem boljeg razumevanja fiziološke uloge registrovanih struja. Izlazno ispravljena (rektifikovana) brzoinaktivirajuća trenutna struja (IRIS), predstavlja daleko najdominantniju provodljivost membrane citoplazmatskih kapi u uslovima osmotskog povećanja zapremine i detaljno je opisana u ovom radu. U drugim organizmima je pokazano da je nekoliko tipova K^+ kanala istovremeno aktivirano u hipoosmotskim uslovima sa anjonskim kanalima, što čini ukupni aktivirani jonski fluks elektroneutralnim (Hoffman *et al.*, 2009). Međutim, u membrani citoplazmatskih kapi, sistema korišćenog u ovom radu, situacija je drugačija. U uslovima u kojima su joni Cl^- potpuno zamenjeni glukonom ili glutamatom primetno je gotovo apsolutno odsustvo IRIS-a. I dodatno, kada je umesto KCl korišćen $TEA-Cl$, IRIS je konstitutivno prisutan u uslovima osmotski indukovano povećanja premine. Ovi eksperimenti ukazuju na to da u membrani citoplazmatskih kapi gljive *P. blakesleeanus* nema K^+ kanala aktiviranih hipoosmotskim uslovima ili je njihov doprinos izlaznim strujama toliko mali da je u poređenju sa strujama koje nose joni hlora gotovo neprimetan.

Odgovor ćelija gljiva na hipoosmotske izazove najbolje je okarakterisan kod kvasca *S. cerevisiae* a primarna reakcija sastoji se od trenutnog nadimanja ćelije (Hohmann, 2002) praćenog otvaranjem Fps1p kanala glicerol na ćelijskoj membrani (Tamás *et al.*, 1999). Kroz ovaj kanal transportuje se glicerol kao primarni osmolit odgovoran za prilagođavanje na novonastale uslove viška vode u spoljašnjoj sredini kod ovih jednoćelijskih organizama što

dovodi do povratka zapremine ćelije na prvobitnu vrednost za svega nekoliko minuta (Hohmann, 2002). S toga izgleda da transport nenaelektrisanog osmolita glicerola ima osnovnu ulogu u prilagođavanju na hipoosmotske uslove kod gljiva (Zajc *et al.*, 2014; Kogej *et al.*, 2007; Lew *et al.*, 2004), dok o ulozi transporta jona u ovom procesu ne postoje pouzdani podaci (Hohmann, 2002).

Još jedna posebnost prilagođavanja gljiva na hipoosmotske uslove sredine je sekundarna uloga tonoplasta u odnosu na ulogu ćelijske membrane (Hohmann, 2002). Jedina dobro okarakterisana reakcija vakuola gljiva na hipoosmotske uslove jeste njihova brza fuzija koja dovodi do formiranja jedne velike ćelijske vakuole (Richards *et al.*, 2010). Nasuprot gljivama, vakuole biljnih ćelija igraju izuzetno značajnu ulogu u osmoadaptaciji, a njihova membrana je veoma propusna za vodu usled prisustva brojnih kanala za vodu (Maurel and Chrispeels, 2001; Tyerman *et al.*, 1999). Tonoplast kvasca izgleda da nije vodopropustljiv (Coury *et al.*, 1999), što bi mogao da bude uzrok primarne uloge ćelijske membrane u osmoregulaciji kod ovih organizama. Jedini poznati akvaporin sa dokazanom funkcijom u transportu vode čija ekspresija se jasno povećava pod dejstvom hipoosmotskog šoka kod kvasaca je lociran upravo u ćelijskoj membrani a ne na tonoplastu kvasaca (Meyrial *et al.*, 2001). Imajući u vidu sve navedeno, interesantno je da je hipoosmotsko nadimanje faktor koji snažno određuje jonske struje kroz membranu končastih gljiva. Ukupne struje registrovane na ćelijskoj membrani *N. crassa* u hiperosmotskim uslovima (Levina *et al.*, 2002) su veoma slične strujama registrovanim u našim eksperimentima u izoosmotskim uslovima. Promena uslova u hipoosmotske rezultuje dramatičnom promenom strujnog profila i pojavom IRIS-a kao najprimetnije konstitutivno aktivne komponente struja registrovanih u konfiguraciji *cela ćelija*.

IRIS se razlikuje od do sada opisanih anjonskih struja kod gljiva. Prilikom istraživanja pojedinačnih jonskih struja kroz membranu *P. blakesleeanus* iz 2009. godine (Živić *et al.*, 2009) okarakterisan je anjonski izlazni ispravljač (ORAC – *outwardly rectifying anionic channel*) čija je aktivnost registrovana u istrgnutoj konfiguraciji *unutra-spolja* metode nametnute voltaže na deliću membrane. Na ovaj način je registrovana provodljivost kroz pojedinačni jonski kanal, a zatim su okarakterisane i njegova selektivnost, kao i vremena otvaranja i zatvaranja. Kao i IRIS, ovaj kanal je provodljiviji za jone I nego za Cl⁻jone, ali ga odlikuje znatno veća voltažna zavisnost nego IRIS. Osim toga, vremenski zavisna aktivacija na depolarizujućim potencijalima potpuno razlikuje ovaj kanal od IRIS-a, koji na istim potencijalima membrane karakteriše inaktivacija. U istraživanju objavljenom 2011. godine

opisan je AnBEST1 – anjonski kanal iz ćelijske membrane *A. nidulans*, registrovan u konfiguraciji *cela ćelija* u heterologom sistemu (Roberts et al., 2011). Smatra se da je aktivnost istog kanala najverovatnije odgovorna i za anjonsku struju kroz pojedinačni jonski kanal koja je prethodno registrovana i okarakterisana u ćelijskoj membrani *A. niger*. Ova anjonska struja se jasno razlikuje od IRIS-a jer se ne inaktivira na depolarišućim potencijalima i karakteriše je Ca^{2+} -zavisna aktivacija, koja kod IRIS-a nije primećena. Osim ovih, opisan je i CLC-sličan anjonski kanal iz ćelijske i unutarćelijskih membrana kvasca *S. cerevisiae*, koji eksprimiran u ćelijskoj membrani HEK-293 ćelija kao produkt Gef1p gena (Lopez-Rodriguez et al., 2007), pokazuje trajnu voltažno-nezavisnu anjon-selektivnu provodljivost, po čemu se potpuno razlikuje od IRIS-a.

Međutim, iako u carstvu gljiva još uvek nije nađen anjonski kanal sličan IRIS-u, kod životinja se već dugo zna za jonsku struju sličnih karakteristika, označenu kao zapreminom regulisana anjonska struja (VRAC- *volume regulated anionic channel*). Ova anjonska struja konstitutivno je prisutna kod gotovo svih ćelija kičmenjaka (Nilius and Droogmans, 2003). Osnovne osobine VRAC-a koje su takođe prisutne kod IRIS-a su: 1) aktivacija u uslovima osmotski izazvanog povećanja zapremine; 2) umereno izlazno ispravljanje; 3) voltažna i vremenski zavisna inaktivacija na pozitivnim potencijalima i oporavak od inaktivacije na negativnim potencijalima; 4) izražena selektivnost za anjone u odnosu na katjone sa karakterističnom sekvencom provodljivosti koja odgovara Ajsmanovoj seriji I: $\text{I} > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{glukonat}^- > \text{glutamat}^-$; 5) progresivno smanjenje amplitude struje u vremenu koje usporava unutarćelijski ATP; 6) aktivacija GTP- γ -S u izoosmotskim uslovima (Shuba et al., 1996; Lewis et al, 1993). Jedina ustanovljena razlika između ove dve struje jeste neosetljivost IRIS-a na DIDS, inače dobro poznat blokator anjonskih kanala, uključujući i VRAC (Nilius and Droogmans, 2003). Ipak, treba imati u vidu da su neke do sada opisane VRAC-slične struje kod kičmenjaka, takođe neosetljive na DIDS (Pedersen et al., 1998).

Uloga VRAC-a u procesu regulisanja zapremine ćelije prilikom hipoosmotskog stimulusa, koji se naziva i regulisano opadanje zapremine, je nepobitno utvrđena (Okada, 2004). Imajući u vidu velike sličnosti u funkcionisanju VRAC-a i IRIS-a, kao i činjenicu da je aktivnost IRIS-a registrovana u svim eksperimentima u hipoosmotskim uslovima, bilo je za očekivati da će i kod citoplazmatičnih kapi pri prelasku iz izoosmotskih u hipoosmotske uslove doći do regulisanog opadanja zapremine usled aktivnosti IRIS-a. Međutim, hipoosmotski šok od 50 mOsm nije doveo do merljivog regulisanog opadanja zapremine. Odsustvoe očekivanog delovanja IRIS-a može biti posledica činjenice da je nametnuta osmotska razlika bila isuviše

mala da bi izazvala merljivi odgovor. Međutim, citoplazmatske kapljice su očigledno regulisale svoju zapreminu u eksperimentima nametnute voltaže na deliću membrane u kojima je registrovana aktivnost IRIS-a. Naime, prema modelu koji opisuje promene ćelijske zapremine izazvane dijalizom ćelije sa hiperosmotskim pipetnim rastvorom koji su razvili Ross i saradnici (*Ross et al., 1994*), bez nekog regulatornog mehanizma ćelijska zapremina bi rasla beskonačno, dovodeći neminovno do pucanja ćelije. Trajanje zapisa kod više od 50 % citoplazmatičnih kapi u hipoosmotskim uslovima bilo je uporedivo sa trajanjem zapisa u izoosmotskim uslovima, što ukazuje na postojanje aktivnog mehanizma regulisanja zapremine ćelije. Rezultati u ovom radu koji pokazuju da gotovo polovina citoplazmatičnih kapi nije regulisala zapreminu, odnosno osmotsku ravnotežu dovoljno brzo, su veoma slični onima dobijenim u eksperimentima na limfocitima (*Ross et al., 1994*) koji su vršeni na identičan način, što ukazuje da su se citoplazmatske kapi u našim eksperimentima verovatno ponašale na sličan način kao i kičmenjačke ćelije.

Posle višedecenijske potrage za molekulskim identitetom jonskog kanala odgovornog za VRAC, nedavno je rešena ova misterija i identifikovan protein označen kao LRR8a koji je deo molekulskog kompleksa koji propušta VRAC (*Voss et al., 2014*). Do sada je utvrđeno prisustvo ovog proteina samo kod kičmenjaka. Imajući u vidu funkcionalnu sličnost VRAC-a i IRIS-a bilo bi očekivano da se homologni gen nalazi i u genomu *P. blakesleeanus*. Genom ove gljive je sekvenciran (*Nordberg et al., 2014*), ali niti jedna sekvenca značajne sličnosti sa LRR8a nije još uvek nađena. Da li je to posledica činjenice da su proteinske sekvence IRIS-a i VRAC-a zapravo nedovoljno slične ili činjenice da genom *P. blakesleeanus* još uvek nije kompletno sekvencioniran ostaje da se vidi. Međutim, iako su struje sa osobinama VRAC-a do sada registrovane samo kod ćelija hordata, rezultati ovog rada ukazuju da bi VRAC ili veoma sličan jonski kanal mogao biti prisutan i daleko niže na filogenetskom stablu.

5.3. Regulacija aktivnosti IRIS je vrlo slična regulaciji VRAC u sisarskim ćelijama

Aktivacija IRISu prisustvu nehidrolizujućeg analoga GTP je nalaz koji ukazuje da su ORIC i VRAC pored toga što dele biofizičke osobine jonske struje, takodje i regulisane na isti način (*Doroshenko et al., 1991, Voets et al., 1998*). U eksperimentima na IRIS nije za sada testirano koji je to mehanizam zavistan od GTP koji omogućava njenu aktivaciju. Na sisarskim ćelijama je pokazano da je za aktivaciju VRAC neophodna aktivnost male GTPaze Rho,

pošto inaktivacija Rho onemogućava aktivaciju VRAC u odgovor na hipoosmotski stimulus (Tilly *et al.*, 1996).

Neki podaci iz literature ukazuju na važnost signalnog puta koji uključuje protein kinazu lokalizovanu na mestima fokalno adhezionih kontakata p125 i fosfatidilinozitol-3-kinazu, nishodno od Rho, za aktivaciju VRAC (Tilly *et al.*, 1996). Takođe je moguće da su Rho kinaze, serin/treonin kinaze koje su direktno aktivirane od strane Rho vezujući se za Rho kada je u kompleksu sa GTP, uključene u aktivaciju VRAC (Nilius *et al.*, 1999). Pored ovih signalnih puteva, zna se i za regulaciju aktivnosti VRAC putem tirozin kinazne fosforilacije/defosforilacije (Tilly *et al.*, 1993). Da li su ovi signalni putevi uključeni i u regulaciju aktivnosti IRIS tek treba da se ispita. Rho je prisutna kod gljiva, prvo je pronađena kod kvasaca (Madaule *et al.*, 1987). Zanimljivo je da je u radu Niliusa i saradnika pokazano da je VRAC aktiviran hipoosmotskim stimulusom značajno dugotrajnijeg toka aktivnosti (15 min) od VRAC aktiviranog intracelularnom perfuzijom GTP (5 min do opadanja na manje od 20%) dok je u našim eksperimentima sa IRIS pokazan suprotan efekat GTP na brzinu gašenja struje. Sama činjenica da struja aktivirana u prisustvu GTP opada, u sisarskim ćelijama i u našim eksperimentima, ukazuje da je i gašenje struje regulisan process zavistan od GTP, pre nego posledica proste potrošnje nekog neophodnog aktivacionog faktora. Na sisarskim ćelijama process gašenja VRAC ima veći afinitet za GDP (efikasniji je blok GDP na process gašenja nego na process aktivacije VRAC kada je prisutan i GTP), iz čega sledi da je moguće da brzinom gašenja dominira proces koji zavisi od trimera G proteina (Barritt and Gregory, 1997), a brzinom aktivacije process koji zavisi od monomera, kao što je Rho.

Proces gašenja struje kod IRIS i kod VRAC je veoma sličan, sa donekle različitom brzinom u uslovima korišćenim u ovom radu, što bi moglo biti uzrokovano razlikama u efikasnosti signalnih puteva koji su u osnovi procesa ili razlikom u osobinama samih jonskih kanala kroz koje prolaze IRIS i VRAC. Ne može se isključiti ni mogućnost da neki signalni put prisutan kod sisarskih ćelijapotpuno odsustvuje u ćeliji gljive.

Blokada struje jonima magnezijuma, odnosno potencijacija IRIS smanjenjem koncentracije Mg^{2+} jona veoma podseća na efekte unutarćelijskog Mg već opisane na VRAC (Lazarenko *et al.*, 2005) i drugim kanalima (Yang *et al.*, 2010). Mg^{2+} blok je voltažno zavistan i doprinosi voltažnoj zavisnosti brzine inaktivacije struje kod VRAC, što je osobina koja tek treba da se ispita kod IRIS.

Takodje, pokazali smo da je za aktivnost IRIS potreban ATP, što je slučaj i sa VRAC. Smatra se da se ATP vezuje nehidrolitički za VRAC kanal, budući da nehidrolizujući analog ATP ima isti efekat (*Jackson et al., 1994*). Ako pretpostavimo da je i kod IRIS prisutan isti princip delovanja ATP, naš nalaz da se i u prisustvu ATP dešava gašenje IRIS, iako veoma sporo, ukazuje da je neki regulatorni proces u citoplazmatskim kapima gljive *P. blakesleeanus* odgovoran za gašenje struje. Pitanje regulacije kako aktivacije tako i gašenja IRIS je od velikog značaja za razumevanje fiziološke uloge ove struje. Po analogiji sa VRAC, IRIS bi mogao imati ulogu u procesima polarizovanog rasta, apoptoze i ćelijskog kretanja, kao i za fiziologiju gljiva posebno interesantnu, ulogu u oslobađanju malih nenaelektrisanih osmolita i anjona.

5.4. Delovanje niflumične kiseline i antracen- 9- karboksilne kiseline na rast i energetski metabolizam micelijuma gljive *P. blakesleeanus*

U prethodnom poglavlju je pokazano da način delovanja dva potvrđena inhibitora IRIS-a, NFK i A9C snažno zavisi od prisustva ATP. Pored toga za oba blokatora je pokazano da blokiraju rast gljiva (*Baker et al., 2002; Hanke et al., 2001*), NFK se čak koristi kao topični fungicid (*Reynolds et al., 1989*), a postoje pretpostavke da NFK ispoljava svoje delovanje inhibirajući lanac disanja i time dovodeći do nestanka ATP (*Baker et al., 2002*). Imajući ovo u vidu u ovom radu je ispitano dejstvo ova dva blokatorana rast, disanje i fosfatni metabolizam gljive *P. blakesleeanus*.

I A9C i NFK su inhibirali rast micelijuma *P. blakesleeanus*, ali dok je NFK u potpunosti zaustavljala rast pri koncentracijama od 100 μM i višim, A9C nije bio u stanju da u potpunosti inhibira rast, već je dostizao plato dejstva pri koncentraciji od 500 μM . Sličan efekat inhibitori anjonskih kanala su imali na rast micelije *N. crassa* sa nizom efikasnosti: NFA>A9C>EA (etakrinska kiselina) (*Hanke et al., 2001*), a pokazano je da je rast *C. albicans* osetljiv na NFK (*Baker et al., 2002*). Kada je upoređeno delovanje A9C i NFK na *C. albicans* sa delovanjem komercionalnog fungicida Flukonazola, pokazano je da je njegovo dejstvo slabije od dejstva i A9C i NFK (*Stanić et al., 2017*). Pri tome je inhibitorno i fungicidno dejstvo NFK na *C. albicans* kod Stanić i saradnika (50% pri koncentraciji NFK od 0,37 mM; *Stanić et al., 2017*) bilo nešto manje nego kod Bejkera i saradnika (90%, pri koncentraciji NFK od 0,5 mM; *Baker et al., 2002*). Kod *P. blakesleeanus* IC₅₀ za NFK je bila

samo 23 μM , što pokazuje da je delovanje ispitanih inhibitora zavisno ne samo od vrste već i od soja ispitivane gljive. Pri tome se mora biti oprezan prilikom upoređivanja rezultata, jer je rast *P. blakesleeanus* i *C. albicans* određivan na različite načine, pošto je prva končasta gljiva, a drugi jednoćelijski kvasac.

Postoji relativno malo istraživanja koja su pokušala da objasne mehanizam preko koga blokatori anjonskih kanala inhibiraju rast i njihov najveći deo je obavljen na biljkama. Rezultati tih nekoliko istraživanja ukazuju da blokatori poput A9C i DIDS ne deluju na rast samostalno, već tako što inhibicija aktivnosti anjonskih kanala interferira sa auksin stimulisanim ili redukovanim rastom koleoptila ili hipokotila (*Burdach et al., 2014; Keller and Van Volkenburgh, 1996; Thomine et al., 1997*). Ovaj zaključak je izveden iz činjenice da kada se dodaju sami ovi blokatori imaju veoma slab efekat na razviće hipokotila (*Thomine et al., 1997*). Analiza efekata inhibitora anjonskih kanala kod končastih gljiva je bila ograničena veoma slabim poznavanjem njihovih jonskih kanala o čemu je već detaljno bilo reči.

Delovanje A9C i NFK na disanje končaste gljive *P. blakesleeanus*, pokazano u ovom radu, ukazuje da i drugi mehanizmi, pored inhibicije aktivnosti anjonskih kanala, mogu biti uključeni u zaustavljanje rasta izazvano delovanjem sa A9C i NFK. Kao što je već rečeno inhibicija rasta *C. albicans* pomoću NFK već je objašnjavana inhibicijom ćelijskog disanja i sledstvenim nestankom ATP (*Baker et al., 2002*). Stoga izgleda da bi kod gljiva, za razliku od biljaka, inhibicija rasta pomoću blokatora anjonskih kanala mogla biti posledica direktne inhibicije elektron transportnog lanca u mitohondrijama. Međutim, potpuno drugačiji rezultati su dobijeni na izolovanim mitohondrijama *Phaseoulus aureus* (*Verhaeren, 1980*) gde su različiti supstituisani derivati A9C delovali kao dekupleri odvajajući aktivnost elektrontransportnog lanca od sinteze ATP i dovodeći tako do povećavanja intenziteta ćelijskog disanja uz istovremeno smanjenje koncentracije ATP. Međutim, u ovom istraživanju sam A9C nije bio ispitivan. Drugi veoma poznati inhibitor anjonskih kanala, NPPB, je takođe imao dekuplujuće delovanje, kako u mitohondrijama, tako i na ćelijskoj membrani fagocita, narušavajući time ćelijski pH (*Lukacs et al., 1991*). A9C i NFK, baš kao i NPPB pokazuju strukturne sličnosti sa protonofornim dekuplerima koje se ogledaju u njihovoj značajnoj kiselosti, postojanju snažno elektrofilnih delova, kao i velikih hidrofobnih grupa koje omogućavaju njihovu dobru rastvorljivost u membranskim dvoslojima (*Lukacs et al., 1991*). Ove sličnosti ukazuju da bi mehanizam njihovog delovanja mogao biti i dekuplovanje elektrontransportnog lanca od sinteze ATP. Međutim, ni A9C ni NFK nisu ispoljili dekuplujući efekat bilo na micelijum, bilo na izolovane mitohondrije *P.*

blakesleanus (Stanić et al., 2017). Delovanje A9C i NFK na izolovane mitohondrije je bilo ili zanemarljivo ili značajno manje u poređenju sa intenzitetom delovanja na micelijum *P. blakesleanus* (Stanić et al., 2017). Sve ovo ukazuje da je delovanje A9C i NFK na ćelijsko disanje, baš kao što je prvobitno pretpostavljeno na osnovu istraživanja na biljkama, najverovatnije posredno, moguće preko inhibicije aktivnosti anjonskih kanala.

Unutarćelijsko zakišeljavanje je jedan od efekata nekih blokatora anjonskih kanala. Prema Braunu i Dadliju (*Brown and Dudley, 1996*) 100 μ M puls NFK je doveo do **žajnog** smanjenja unutarćelijskog pH (pH_u) od $0,46 \pm 0,02$ u epitelijalnim ćelijama bubrega u kulturi. NMR rezultati u ovom radu (Slika 28) pokazuju da primena A9C, ali ne i NFK, dovodi do zakišeljavanja citoplazme. Odsustvo efekata NFK može biti posledica nedovoljne osetljivosti metode, kao i nedovoljno dugog vremena akumulacije. Na spoljašnjem pH od 4,5, što je bio slučaj i u NMR eksperimentima i u eksperimentima oksimetrije, NFK bi trebalo uglavnom da bude u svom jednoprotovanom i najlipofilnijem obliku koji disosuje na anjon i proton po ulasku u citoplazmu (*Allen et al., 1998; Baker et al., 2002; Hanke et al., 2001*). Pošto A9C i NFK imaju inhibitorni efekat na IRIS, njihova primena u hipoosmotskim uslovima korišćenim u NMR (125 mOsm) i oksimetrijskim eksperimentima (300-320 mOsm) bi trebalo da dovede do hiperpolarizacije ćelijske membrane *P. blakesleanus*. Niska koncentracija Cl^- u vanćelijskom rastvoru (0 mM za NMR i 0,75 mM za eksperimente oksimetrije) u poređenju sa unutarćelijskom koncentracijom hlora u končastim gljivama koja se kreće u opsegu od 40 do 100 mM čini da IRIS uvek nosi jone hlora iz ćelije. Rezultujuća hiperpolarizacija ćelijske membrane bi dovela do smanjivanja aktivnosti protonske pumpe u ćelijskoj membrani (*Sanders et al., 1981; Seto-Young and Perlin, 1991*), koja je odgovorna za regulaciju pH_u . Unutarćelijsko zakišeljavanje koje je uočeno u NMR eksperimentima sa A9C bi trebalo da dovede do inhibicije fosfofruktokinaze, što predstavlja pH zavistan korak koji ograničava brzinu glikolize (*François et al., 1986*), smanjujući time dotok supstrata u mitohondrijalni elektrontransportni lanac, a time i sintezu ATP. Međutim, promene u pH bi trebalo da budu dodatno proverene osetljivijim metodom poput pH osetljivih fluorescentnih boja. NMR eksperimenti su pokazali da i A9C i NFK dovode do značajnog smanjenja koncentracije ATP. Pored toga, inhibicija aktivnosti IRIS bi mogla da dovede do povećane koncentracije Cl^- u citoplazmi *P. blakesleanus*, stimulišući tako aktivnost vakuolarne protonske pumpe (*Rausch et al., 1988*), što je u skladu sa uočenim uzvodnim pomerajem PpT signala koji odgovara promeni pH od 0,3 jedinice u vakuoli. Kako glukoza ne može biti korišćena kao izvor energije kod izolovanih mitohondrija ovaj mehanizam bi mogao objasniti

uočene razlike u delovanju A9C i NFK na disanje micelijuma i izolovanih mitohondrija (Stanić *et al.*, 2017).

Međutim, rezultati eksperimenata nametnute voltaže na deliću membrane su jasno pokazali da je IRIS u vremenskom opsegu u kojem dolazi do potpune blokade disanja (oko 2 minuta od primene) praktično neosetljiv kako na A9C, tako i na NFK u prisustvu fizioloških koncentracija ATP (Slike 19-21). Stoga delovanje na sam kanal možda nije prvi korak u nizu koji dovodi do blokade disanja i zaustavljanja rasta. Kao što je već detaljno opisano IRIS je veoma sličan VRAC kod životinja, čija aktivacija zahteva nehidrolitičko vezivanje ATP (Bryan-Sisneros *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 1998). Pokazano je postojanje tesne veze između energetskog statusa ćelije i aktivacije VRAC koja je direktnije povezana sa aktivnošću elektrontransportnog lanca nego preko opadanje koncentracije ATP (Patel *et al.*, 1998). U ovom istraživanju na fibroblastima miša VRAC je blokirana pomoću inhibitora elektrontransportnog lanca čak i u prisustvu fizioloških koncentracija ATP. Sličan rezultat su dobili i Balatori i saradnici (Ballatori *et al.*, 1994; Ballatori *et al.*, 1995) koji su pokazali da metabolički inhibitori poput antimicina A, 2,4 DNP i KCN smanjuju provodljivost VRAC za taurin u hepatocitama raže smanjujući ATP/ADP odnos u ćeliji. I inhibitor elektrontransportnog lanca i dekupler su inhibirali VRAC, odnosno u našem slučaju IRIS, što nije iznenađujuće pošto je u oba slučaja krajnji rezultat narušavanje procesa oksidativne fosforilacije. Narušavanje procesa oksidativne fosforilacije takođe može dovesti do obrtanja aktivnosti ATP sintaze koja počinje da deluje kao protonska pumpa i troši ATP (Rossi *et al.*, 2007), time dovodeći do dodatnog gubitka ATP i hiperpolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija. Ukoliko bi ovo bilo slučaj, primena klasičnih mitohondrijalnih dekuplera poput CCCP i 2,4 DNP bi trebalo da ima zaštitnički efekat na disanje u prisustvu A9C i NFK. Ovo nije bio slučaj ni sa jednim od ova dva dekuplera (lična komunikacija sa M. Stanić), ali oni takođe nisu imali dekuplujuće delovanje ni na netretiranom micelijumu, te promene potencijala unutrašnje membrane mitohondrija usled dejstva NFK i A9C ne mogu biti odbačene kao mogućnost u budućim istraživanjima. Nedostatak dekuplujućeg delovanja bi mogao biti posledica činjenice da se u izvršenim eksperimentima micelijum nalazio u ekspanzionalnoj fazi rasta, te mu je kapacitet rada elektrontransportnog lanca najverovatnije bio blizak maksimalnom pa se nije ni mogao značajno povećati usled dejstva dekuplera.

U ovom radu je jasno pokazano da A9C i NFK imaju brze i složene efekte na ćelijski metabolizam gljive *P. blakesleeanus*. Promene su zapažene u unutarćelijskom pH, nivou ATP i nekih drugih fosfatnih metabolita, brzini disanja micelijuma i aktivnosti IRIS. Iako nije

određen prvi korak u delovanju ispitanih inhibitora, ukoliko i postoji samo jedan prvi korak, jasno je da baš kao i u istraživanjima Patela i Balatorija (*Ballatori et al., 1994; 1995; Patel et al., 1998*), postoji čvrsta veza između energetske metabolizma ćelije i regulacije aktivnosti IRIS. Smanjenje u prinosu biomase posle dodavanja A9C i NFK bi jednostavno mogla biti posledica smanjenja koncentracije ATP, ali bi bilo neophodno proceniti bioenergetske parametre i posle duže inkubacije pošto su u ovom radu ispitivani samo trenutni efekti dodavanja A9C i NFK.

6. ZAKLJUČCI

Osnovni zaključci koji proizilaze iz ove doktorske disertacije jesu:

1. Primenom bojenja laktofenol - plavim je pokazano da 20% citoplazmatskih kapi dobijenih iz sporangiofora končaste gljive *P. blakesleeanus* obrazuje ćelijski zid. Kako kod gljiva samo potpuno funkcionalna ćelijska membrana ima sposobnost sinteze ćelijskog zida, to znači da je najmanje 20% citoplazmatskih kapi moralo biti obavijeno funkcionalnom ćelijskom membranom. Ako se ima u vidu da struje kroz celu ćeliju snimljene u ovom radu odlikuje veoma sličan profil u hipoosmotskim uslovima, može se zaključiti da citoplazmatske kapi koje su korišćene za registrovanje ovih struja predstavljaju homogenu grupu i da s toga njihova membrana predstavlja funkcionalnu ćelijsku membranu, a one dobar model sistem za izučavanje aktivnosti plazmamembranskih jonskih kanala *in situ*.
2. Izlazno ispravljena (rektifikovana) brzo inaktivirajuća trenutna struja (IRIS), predstavlja daleko najdominantniju provodljivost membrane citoplazmatskih kapi u uslovima osmotskog povećanja zapremine i detaljno je opisana u ovom radu.
3. Prema svojim osobinama IRIS se jasno razlikuje od svih do sada opisanih jonskih struja kod gljiva, ali pokazuje veoma velike sličnosti sa zapreminom regulisanom anjonskom strujom (*VRAC*- *volume regulated anionic channel*) kod kičmenjaka. Ove sličnosti su sledeće:
 - aktivacija u uslovima osmotski izazvanog povećanja zapremine;
 - umereno izlazno ispravljanje, sa naelektrisanjem vratnica od $z_g = 0,82 \pm 0,1$;
 - voltažno i vremenski zavisna inaktivacija na pozitivnim potencijalima i oporavak od inaktivacije na negativnim potencijalima;
 - izražena selektivnost za anjone u odnosu na katjone sa karakterističnom sekvencom provodljivosti koja odgovara Ajsmanovoj seriji I:

I: Cl^- : HCO_3^- : glukonat⁻: glutamat⁻ = 1,4: 1: 0,25: 0,01: 0,088;

- progresivno smanjenje amplitude struje u vremenu koje usporava unutarćelijski ATP;
 - aktivacija GTP- γ -S – om u izoosmotskim uslovima, što kao i kod VRAC znači da se i IRIS aktivira putem nekog GTP-zavisnog signalnog puta.
4. Za razliku od VRAC, IRIS ne inhibira DIDS, poznati blokator anjonskih kanala. IRIS veoma snažno inhibiraju niflumična kiselina (178 ± 58 s ($n=4$) posle dodavanja 0,5mM NFK preostaje svega $21 \pm 5\%$ ($n=4$) maksimalne struje) i A9C (77 ± 16 s ($n=5$) posle dodavanja 1 mM A9C preostaje $32 \pm 5\%$ ($n=5$) maksimalne struje). Međutim, blok IRIS sa 1 mM A9C u potpunosti izostaje u prisustvu 2 mM unutarćelijskog ATP. U slučaju NFK unutarćelijski ATP dovodi do kašnjenja dejstva za oko 3 minuta bez uticaja na intenzitet inhibicije.
 5. Uloga VRAC-a u procesu regulisanja zapremine ćelije prilikom hipoosmotskog stimulusa, koji se naziva i regulisano opadanje zapremine, je nepobitno utvrđena. Međutim, hipoosmotski šok od 45 mOsm nije doveo do merljivog regulisanog opadnja zapremine. Odsustvo ovog očekivanog delovanja IRIS-a može biti posledica činjenice da je nametnuta osmotska razlika bila isuviše mala da bi izazvala merljivi odgovor.
 6. A9C i NFK dovode do snažne inhibicije rasta i disanja micelijuma. NFK je efikasniji inhibitor sa vrednostima IC50 za rast od $23\mu\text{M}$, a za disanje $50\mu\text{M}$, dok su ove vrednosti za A9C $130\mu\text{M}$, odnosno $142\mu\text{M}$. Oba blokatora dovode do ~~čak 91%~~ smanjenja koncentracije ATP, koja u slučaju dodavanja 2mM A9C pada za čak 91%. A9C, ali ne i NFK, dovodi do zakiseljavanja kako citoplazme, tako i vakuole za oko 0,3 pH jedinice. Mehanizmi ovih procesa nisu sa sigurnošću utvrđeni, ali je pokazano da postoji čvrsta veza između energetske metabolizma ćelije i regulacije aktivnosti IRIS.

7. LITERATURA

1. Abascal F., Zardoya R. (2012) LRRC8 proteins share a common ancestor with pannexins, and may form hexameric channels involved in cell-cell communication. *Bioessays* 34:551–560.
2. Ahmadpour D., Geijer C., Tamás M.J., Lindkvist-Petersson K., Hohmann S. (2014) Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. *Biochim Biophys Acta* 1840:1482-1491.
3. Akita T., Okada Y. (2014) Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system. *Neurosci* 275:211-231.
4. Albertyn J.S., Hohmann S., Prior B.A. (1994) Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Curr Genet* 25:12-18.
5. Allen R.I., Box K.J., Comer J.E.A., Peake C., Tam K.Y. (1998) Multiwavelength Spectrophotometric Determination of Acid Dissociation Constants of Ionizable Drugs. *J Pharm Biomed Anal* 17:699–712.
6. Alepuz P.M, Jovanovic A., Reiser V., Ammerer G. (2001) Stress-induced MAP kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* 7:767-777.
7. Almaca J., Tian Y., Aldehni F., Ousingsawat J., Kongsuphol P., Rock J.R., Harfe B.D., Schreiber R., Kunzelmann K. (2009) TMEM16 proteins produce volume regulated chloride currents that are reduced in mice lacking TMEM16A. *J Biol Chem* 284:28571-28578.
8. Andersen, J., Andresini, W. and Delihias, N. (1982) On the phylogeny of *Phycomyces blakesleeanus* nucleotide sequence of 5 S ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.* 257: 9114-9118.
9. Arreola J. Begenisich J., Nehrke K., Nguyen H-V., Park K., Richardson L., Yang B., Schutte B.C., Lamb F.S., Melvin J. E. (2002) Secretion and cell volume regulation by salivary acinar cells from mice lacking expression of the *Clcn3* Cl⁻ channel gene. *J Physiol* 545:207-216.
10. Atkinson, G.F. (1915) Phylogeny and relationships in the ascomycetes. *Ann. Missouri Botan. Gardens* 2:315-376.
11. Babazadeh R., Adiels C.B., Smedh M., Petelenz-Kurdziel E., Goksoy M., Hohmann S. (2013) Osmostress-induced cell volume loss delays yeast Hog1 signaling by limiting diffusion processes and by Hog1-specific effects. *PLoS One* 8:e80901.

12. Bahn Y.S. (2008) Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot Cell* 7:2017-2036.
13. Banderali U., Roy G. (1992) Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 263(6):C1200-C1207.
14. Baker A., Northrop F. D., Miedema H., Devine G. R., Davies. J. M. (2002) The Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Niflumic Acid Inhibits *Candida Albicans* Growth. *Mycopathologia* 153, 25–28.
15. Ballatori N., Simmons T.W., Boyer J.L. (1994) A Volume-Activated Taurine Channel in Skate Hepatocytes: Membrane Polarity and Role of Intracellular ATP. *Am J Physiol Gastrointest LiverPhysiol* 267:G285–G291.
16. Ballatori N., Truong A.T., Jackson P.S., Strange K., Boyer J.L. (1995) ATP Depletion and Inactivation of an ATP-Sensitive Taurine Channel by Classic Ion Channel Blockers. *Mol Pharmacol* 48:472–476.
17. Baldauf, S. L. and Palmer, J. D. (1993) Animals and fungi are each other's closest relatives, congruent evidence from multiple proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90: 11558-11562.
18. Berbee M.L., Taylor J.W. (1992) Two ascomycete classes based on fruiting body characters and ribosomal DNA sequence. *Mol Biol Evol* 9:278-284.
19. Barritt G.J., Gregory R.B. (1997) An evaluation of strategies available for the identification of GTP-binding proteins required in intracellular signalling pathways. *Cell Signal* 9(3-4):207-18.
20. Batiza A.F., Schulz T., Masson P.H. (1996) Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J Biol Chem* 271:23357-23362.
21. Bass R.B., Strop P., Barclay M., Rees D. (2002) Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* 298:1582-1587.
22. Becker D., Blase C., Bereiter-Hahn J., Jendrach M. (2005) TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J Cell Sci* 118:2435-2440.
23. Berecki G, Eijken M, Van Iren F, Van Duijn B. (2001) Membrane orientation of droplets prepared from *Chara corallina* internodal cells. *Protoplasma* 218:76-82.
24. Berrier C., Besnard M., Ajouz B., Coulombe A., Ghazi A. (1996) Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J Membr Biol* 151:175-187.
25. Bertl, A., Bihler, H., Kettner, C. and Slayman, C.L. (1998). Electrophysiology in the eukaryotic model cell *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Physiol.* 436: 999-1013.
26. Bertl A., Slayman C.L. (1990). Cation-selective channels in the vacuolar membrane of *Saccharomyces*: dependence on calcium, redox state, and voltage. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7824–7828.

27. Bertl A., Gradmann D. (1987) Current-voltage relationships of potassium channels in the plasmalemma of *Acetabularia*. *J Membr Biol* 99:41-49.
28. Blackwell, M. (2011) The fungi: 1, 2, 3...5.1 millions species? *Am. J. Bot.* 98(23):428-436.
29. Blomberg A., Adler L. (1992) Physiology of Osmotolerance in Fungi. *Adv Microb Physiol* 33:145-212.
30. Browe D.M., Baumgarten C.M. (2004) Angiotensin II (AT1) Receptors and NADPH Oxidase Regulate Cl^- Current Elicited by $\beta 1$ Integrin Stretch in Rabbit Ventricular Myocytes. *J Gen Physiol* 124(3):273-287.
31. Bölker, M (2001) *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiol.* 147: 1395-1401.
32. Bossus M., Charmantier G., Blondeau-Bidet E., Valletta B., Boulo V., Lorin-Nebel C. (2013) The ClC-3 chloride channel and osmoregulation in the European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *J Compar Physiol B* 183(5):641-662.
33. Brehm P., Kullberg R., Moody-Corbett F. (1984) Properties of non-junctional acetylcholine receptor channels on innervated muscle of *Xenopus laevis*. *J Physiol* 350:631-648.
34. Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter, and M. C. Gustin. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259:1760–1763.
35. Bricheux, G., Brugerolle, G. (1997) Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 153: 205–213.
36. Brohawn S.G., del Mármol J., MacKinnon R. (2012) Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K^+ ion channel. *Science* 335:436-41.
37. Brown C.D., Dudley A.J. (1996) Chloride Channel Blockers Decrease Intracellular pH in Cultured Renal Epithelial LLC-PK1 Cells. *Br J Pharmacol* 118:443–444.
38. Bryan-Sisneros A., Sabanov V., Thoroed S.M., Doroshenko P. (2000) Dual Role of ATP in Supporting Volume-Regulated Chloride Channels in Mouse Fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1468:63–72.
39. Burdach Z., Kurtyka R., Siemieniuk A., Karcz W. (2014) Role of Chloride Ions in the Promotion of Auxin-Induced Growth of Maize Coleoptile Segments. *Ann Bot* 114:1023–1034.
40. Bergman, K., Burke, P.V., Cerda-Olmedo, E., David, C.N., Delbruck, M., Foster, K.W., and Goodell, E.W. (1969) *Phycomyces*. *Bacteriol. Rev.* 33: 99-157.
41. Cahalan M.D., Lewis R.S. (1988) Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes. *Soc Gen Physiol Ser* 43:281-301.

42. Caputo A., Caci E., Ferrera L., Pedemonte N., Barsanti C., Sondo E., Pfeffer U. (2008) TMEM16A, A Membrane Protein Associated With Calcium-Dependent Chloride Channel Activity. *Science*.
43. Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* 73: 203-266.
44. Cavalier-Smith, T. (2010) Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2010) 365, 111–132.
45. Cavalier-Smith, T. (1989) Systems of kingdoms. In ed. McGraw, Hill. *Yearbook of Science and Technology*, pp. 175-179. Edited by S. P. Parker. New York: McGraw-Hill.
46. Ceredá-Olmedo, Lipson, E.D. (1987) *Phycomyces*. 430pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1-430.
47. Chalfie M. (2009) Neurosensory mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:44-52.
48. Chang G., Spencer R., Lee A., Barclay M., Rees C. (1998) Structure of the MscL homologue from *Mycobacterium tuberculosis*, a gated mechanosensitive ion channel. *Science* 282:2220-2226.
49. Chien L.T., Hartzell H.C. (2007) *Drosophila* bestrophin-1 chloride current is dually regulated by calcium and cell volume. *J Gen Physiol* 130:513-524.
50. Chien L.T., Hartzell H.C. (2008) Rescue of volume-regulated anion current by bestrophin mutants with altered charge selectivity. *J Gen Physiol* 132(5):537-546.
51. Christensen O. (1987) Mediation of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through stretch-activated channels. *Nature* 330:66-68.
52. Coulon P., Wusten H.J., Hochstrate P., Dierkes P.W. (2008) Swelling-activated chloride channels in leech *Retzius* neurons. *J Exp Biol* 211:630-641.
53. Coury L.A., Hiller M., Mathai J.C., Jones E.W., Zeidel M.L., Brodsky J.L. (1999) Water transport across yeast vacuolar and plasma membrane – targeted secretory vesicles occurs by passive diffusion. *J Bacteriol* 181:4437-40.
54. Dayhoff, M.O. (1976) Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation, Washington. 5:(3); 352.
55. Davenport K.R., Sohaskey M., Kamada Y., Levin De, Gustin M.C. (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. *JBC* 270:30157-30161.
56. Decher N., Lang H.J., Nilius B., Bruggemann A., Busch A.E., Steinmeyer K. (2001) DCPIB is a novel selective blocker of I_{Cl,swell} and prevents swelling-induced

- shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br J Pharmacol* 134(7):1467-1479.
57. Denis, V., Cyert, M. S. (2002) Internal Ca^{2+} release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J. Cell Biol.* 156: 29-34.
 58. Dermietzel R., Hwang T.K., Buettner R., Hofer A., Dotzler E., Kremer M., Deutzmann R., Thinnes F.P., Fishman G.I., Spray D.C. (1994) Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:499-503.
 59. Di Ciano-Oliveira C., Thirone A.C.P., Szaszi K., Kapus A. (2006) Osmotic stress and the cytoskeleton: the R(h)ole of Rho GTPases. *Acta Physiol* 187:257-272.
 60. Dierkes P.W., Wusten H.J., Klees G., Muller A., Hochstrate P. (2006) Ionic mechanism of ouabain-induced swelling of leech *Retzius* neurons. *Pflugers Arch* 452:25-35.
 61. Duan D., Winter C., Cowley S., Hume J.R., Horowitz B. (1997) Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390:417-421.
 62. Ducharme G., Newell E.W., Pinto C., Schlichter L.C. (2007) Small-conductance Cl^- channels contribute to volume regulation and phagocytosis in microglia. *Eur J Neurosci* 26:2119-2130.
 63. Dutta R., Robinson K.R. (2004) Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts. *Plant Physiol* 135:1398-1406.
 64. Doroshenko P., Penner R., Neher E. (1991) Novel chloride conductance in the membrane of bovine chromaffin cells activated by intracellular $\text{GTP}\gamma\text{S}$. *J Physiol* 436:711-24.
 65. Doroshenko P., Neher E. (1992) Volume-sensitive chloride conductance in bovine chromaffin cell membrane. *J Physiol* 449:197-218.
 66. Doroshenko P., Sabanov V., Doroshenko N. (2001) Cell cycle-related changes in regulatory volume decrease and volume-sensitive chloride conductance in mouse fibroblasts. *J Cell Physiol* 187:65-72.
 67. Droogmans G., Maertens C., Prenen J., Nilius B. (1999) Sulphonic acid derivatives as probes of pore properties of volume-regulated anion channels in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 128:35-40.
 68. Eggermont J. (2003) Rho's role in cell volume: sensing, strutting, or signaling? *Am J Physiol Cell Physiol* 285:509-511.
 69. Ferreira C., van Voorst F., Martins A., Neves L., Oliveira R., Kielland-Brandt M.C., Lucas C., Brandt A. (2005) A member of the sugar transporter family, *Stl1p* is the glycerol/ H^+ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16(4):2068-76.

70. Fischmeister R., Hartzell H.C. (2005) Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels. *J Physiol* 562:477-491.
71. Forget, L., Ustinova, J., Wang, Z., Huss, V.A.R. and Lang, B.F. (2002) *Hyaloraphidium curvatum*: a linear mitochondrial genome, tRNA editing, and an evolutionary link to fungi. *Mol. Biol. Evol.* 19: 310–319.
72. Francois J., Van Schaftingen E., Hers H.G. (1986) Effect of Benzoate on the Metabolism of Fructose 2,6-Bisphosphate in Yeast. *Eur J Biochem* 154:141–145.
73. Friedrich T., Breiderhoff T., Jentsch T.J. (1999) Mutational analysis demonstrates that CIC-4 and CIC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* 274:896-902.
74. Galland P., Ootaki T. (1987) Differentiation and Cytology. In:ed. Cerda-Olmedo, E. and Lipson, E.D. *Phycomyces*, pp 281-316. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
75. Gong W., Xu H., Shimizu T., Morishima S., Tanabe S., Tachibe T., Uchida S., Sasaki S., Okada.Y. (2004) CIC-3-independent, PKC-dependent activity of volume-sensitive Cl channel in mouse ventricular cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 14:213-224.
76. Gacto M., Soto T., Vicente-Soler J., Villa T.G., Cansado J. (2003) Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions. *Int Microbiol* 6:211-219.
77. Golub T., Wacha S., Caroni P. (2004) Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol* 14:542-550.
78. Guhary F., Sachs F. (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* 352:685-701.
79. Gustin M.C., Albertyn J., Alexander M., Davenport K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1264–1300.
80. Gustin M.C, Zhou X.L, Martinac B., Kung C. (1988) A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science* 242:762-765.
81. Grinstein S., Clarke C.A., Dupre A., Rothstein A. (1982a) Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol* 80:801-823.
82. Grinstein S., Clarke C.A., Rothstein A. (1982b) Increased anion permeability during volume regulation human lymphocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 299:509-518.
83. Grove S.N., Bracker C.E. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkorper. *J Bacteriol* 104(2):989-1009.
84. Grunder S., Thiemann A., Pusch M., Jentsch T.J. (1992) Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360:759-762.

85. Habela C.W., Olsen M.L., Sontheimer H. (2008) CIC3 is a critical regulator of the cell cycle in normal and malignant glial cells. *J Neurosci* 28:9205-9217.
86. Hamill O.P., Martinac B. (2001) Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* 81:685-740.
87. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. (1981). Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 319:85-100.
88. Hanke G.T, Northrop F.D., Devine G.R., Bothwell J.H.F., Davies J.M. (2001) Chloride Channel Antagonists Perturb Growth and Morphology of *Neurospora Crassa*. *FEMS Microbiol Lett* 201:243–247.
89. Han C., Cui B., Qu J. (2009) Comparison of vanadium-rich activity of three species fungi of basidiomycetes. *Biol Trace Elem Res* 127: 278–283.
90. Haeckel E. (1866) *Generelle Morphologie der Organismen*. Berlin, Germany: Reimer.
91. Hartzell H.C., Qu Z., Yu K., Xiao Q., Chien L.T. (2008) Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiol Rev* 88:639-672.
92. Haswell E.S. (2007) MscS-like proteins in plants. *Curr Top Membr* 58:329-359.
93. Haswell E.S., Meyerowitz E.M. (2006) MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 16:1-11.
94. Haswell E.S., Verslues P.E. (2015) The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *J Gen Physiol* 145(5):389-394.
95. Haynes J.K., Goldstein L. (1993) Volume-regulatory amino acid transport in erythrocytes of the little skate, *Raja erinacea*. *Am J Physiol* 265:R173-R179.
96. Hazama A., Okada Y. (1988) Ca²⁺ sensitivity of volume-regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells. *J Physiol* 402:687-702.
97. Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos N. L., Hedges, S. B. (2001) Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293: 1129-1133.
98. Helix N., Strobaek D., Dahl B.H., Christophersen P. (2003) Inhibition of the Endogenous Volume-regulated Anion Channel (VRAC) in HEK293 Cells by Acidic Di-Aryl-Ureas. *J Membr Biol* 196(2):83-94.
99. Henriksen G.H., Taylor A.R., Brownlee C., Assman S.M. (1995) Laser microsurgery of high plant cell walls permits patch clamp acces. *Plant Physiol* 110:1063-1068.

100. Hisadome K., Koyama T., Kimura C., Droogmans G., Ito Y., Oike M. (2002) Volume-regulated Anion Channels Serve as an Auto/Paracrine Nucleotide Release Pathway in Aortic Endothelial Cells. *J Gen Physiol* 119(6):511-520.
101. Hoffmann E.K. (1978) Regulation of cell volume by selective changes in the leak permeabilities of Ehrlich ascites tumor cells. *Alfred Benzon Symp*, 39, 7-417.
102. Hoffmann E.K., Simonsen L.O., Sjöholm C. (1979) Membrane potential, chloride exchange and chloride conductance in Ehrlich mouse ascites tumour cells. *J Physiol* 296:61-84.
103. Hoffman EK et al., eds. (2006). Cell volume control in health and disease, 12th International Symposium, *Acta Physiol* 187:1-352.
104. Hohmann S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 60:300-72.
105. Hohmann S. (2009) Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 583:4025-4029.
106. Hohmann S. (2015) An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr Genet* 61(3):373-382.
107. Horn R., Marty A. (1988) Musvarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92:145-149.
108. Hyzinski-Garcia M.C., Rudkouskaya A., Mongin A.A. (2014) LRRC8A protein is indispensable for swelling-activated and ATP-induced release of excitatory amino acids in rat astrocytes. *592(22):4855-4862*.
109. Jackson P.S., Morrison R., Strange K. (1994) The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding. *Am J Physiol* 267:C1203–C1209.
110. Jackson P.S., Strange K. (1993) Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol Cell Physiol* 265(6):C1489-C1500.
111. Jackson P.S., Strange K. (1996) Single channel properties of a volume sensitive anion channel: Lessons from noise analysis. *Kidney International* 49:1695-1699.
112. Jennings D.H., Burke R.M. (1990) Compatible solutes - the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytol* 16:277-283.
113. Jennings D.H. (1995) *The Physiology of Fungal Nutrition*. Cambridge University Press, New York, USA.
114. Jensen, A.B., Gargas, A., Eilenberg, J., Rosendahl, S. (1998) Relationships of the insect-pathogenic order Entomophthorales (Zygomycota, Fungi) based on

- phylogenetic analyses of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (SSU rDNA). *Fungal Genet. Biol.* 24: 325–334.
115. Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik, A.A. (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82:503-568.
 116. Jentsch T.J. (2008) CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43:3-36.
 117. Jentsch T.J., Neagoe I., Scheel O. (2005) CLC chloride channels and transporters. *Curr Opin Neurobiol* 15:319-325.
 118. Kamada Y., Jung U.S., Piotrowski J., Levin D.E. (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* 9:1559-1571.
 119. Keeling, P. J., Deane, J. A., and McFadden. G. I. (1998) The phylogenetic position of alpha- and beta-tubulins from the Chlorarachnion host and *Cercomonas* (Cercozoa). *J. Eukaryotic Microbiol.* 45: 561–570.
 120. Keller C.P., VanVolkenburgh E. (1996) The Electrical Response of Avena Coleoptile Cortex to Auxins - Evidence in Vivo for Activation of a Cl⁻ Conductance. *Planta* 198:404–412.
 121. Kimelberg H.K., Goderie S.K., Higman S., Pang S., Waniewski R.A. (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10(5):1583-1591.
 122. Kimelberg H.K. (2005) Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* 50(4):389-397.
 123. Kimelberg H.K., MacVicar B.A., Sontheimer H. (2006) Anion channels in astrocytes: Biophysics, pharmacology, and function. *Glia* 54(7):747-757.
 124. Klausen T.K., Hougaard C., Hoffmann E.K., Pedersen S.F. (2006) Cholesterol modulates the volume-regulated anion current in Ehrlich-Lette ascites cells via effects on Rho and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(4):C757-C771.
 125. Klausen T.K., Bergdahl A., Hougaard C., Christophersen P., Pedersen S.F., Hoffmann E.K. (2007) Cell cycle-dependent activity of the volume- and Ca²⁺-activated anion currents in Ehrlich letre ascites cells. *Cell Physiol* 210(3):831-842.
 126. Klees G., Hochstrate P., Dierkes P.W. (2005) Sodium-dependent Potassium Channels in Leech P Neurons. *J Membr Biol* 208:27-38.
 127. Klionsky D.J., Herman P.K., Emr S.D. (1990) The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 54(3):266-292.

128. Kloda A., Martinac B. (2002) Mechanosensitive channels of *Bacteria* and *Archaea* share a common ancestral origin. *Eur Biophys J* 31:14-25.
129. Knepper C., Savory E.A., Day B. (2011) Arabidopsis NDR1 is an integrin-like protein with a role in fluid loss and plasma membrane-cell wall adhesion. *Plant Physiol* 156:286-300.
130. Kogej T., Stein M., Volkmann M., Gorbushina A.A., Galinski E.A., Gunde-Cimerman N. (2007) Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology* 153:4261-73.
131. Kohorn B.D., Kohorn S.L. (2012) The cell-wall associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front Plant Sci* 3: doi=10.3389/fpls.2012.00088.
132. Kung C., Saimi Y. (1995) Solute sensing vs. solvent sensing, a speculation. *J Eukaryot Microbiol* 42:199-200.
133. Larkin-Thomas P.L., Brody S., Cote G.G. (1997) Temperature compensation and membrane composition in *Neurospora crassa*. *Chronobiol Int* 14: 445-454.
134. Lazarenko P.M., Pohoriela N.Kh., Shuba IaM. (2005) Adenosine triphosphate-dependence of volume sensitive chloride current in LNCaP cell line of human prostate cancer. *Fiziol Zh* 51:51-61
135. Le Dain A.C., Saint N., Kloda A., Ghazi A., Martinac B. (1998) Mechanosensitive ion channels of the archaeon *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem* 273:12116-12119.
136. Lemery, N. (1675) Cours de Chymie contenant la maniere de faire les operations qui sont en usage dans la medecine, par une methode facile avec des raisonnements chaque operation, pour l'instruction de ceux qui veulent s'appliquer a cette science. Lemery, Paris. 32: 534-12.
137. Levina N., Totemeyer S., Stokes N.R., Louis P., Jones M.A., Booth I.R. (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J* 18:1730-1737.
138. Levina, N. N., Lew, R.R., Hyde, G. J. and Heath, I. B. (1995). The roles of Ca²⁺ and plasma membrane ion channels in hyphal tip growth of *Neurospora crassa*. *J Cell Sci* 108: 3405-3417.
139. Levina N.N., Dunnina-Barakovskaya A.Y, Shabala S., Lew, R.R. (2002) Blue light modulation of ion transport in the slime mutant of *Neurospora crassa*. *J Membrane Biol* 188:213-226.
140. Lew R.R. (1998). Mapping fungal ion channel locations. *Fungal Genet Biol* 24: 69–76.

141. Lew R.R. (2011) How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. *Nat Rev Microbiol* 9:509-518.
142. Lew R.R., Levina N.N., Walker S.K., Ashley Garrill A. (2004) Turgor regulation in hyphal organisms. *Fungal Genet Biol* 41:1007-15.
143. Lew R.R., Levina N.N., Shabala L., Anderca M.I., Shabala S.N. (2006) Role of a mitogen-activated protein kinase cascade in ion flux-mediated turgor regulation in fungi. *Eukaryot Cell* 5:480-487.
144. Lewis R.S., Ross P.E., Cahalan M.D. (1993) Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes. *J Gen Physiol* 101:801e26.
145. Littler D.R., Harrop S.J., Fairlie W.D, Brown L.J. (2004) The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition. *J Biol Chem* 279:9298-9305.
146. Li X., Shimada K., Showalter L.A., Weinman S.A. (2000) Biophysical properties of CIC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in Chinese hamster ovary-K1 cells. *J Biol Chem* 275:35994-35998.
147. Liu H., Akita T., Shimizu T., Sabirov R.Z., Okada Y. (2009) Bradykinin-induced astrocyte–neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. *J Physiol* 587(10):2197-2209.
148. Lopez-Rodriguez A., Carabez A.T., Coyne L., Halliwell R.F., Mileli R., Martinez-Torres A. (2007) The product of the gene *GEF1* of *Saccharomyces cerevisiae* transports Cl⁻ across the plasma membrane. *FEMS Yeast Res* 7(8):1218-1229.
149. Lukacs G.L., Nanda A., Rotstein O.D., Grinstein. S. (1991) The Chloride Channel Blocker 5-Nitro-2-(3-Phenylpropyl-Amino) Benzoic Acid (NPPB) Uncouples Mitochondria and Increases the Proton Permeability of the Plasma Membrane in Phagocytic Cells. *FEBS Lett* 288:17–20.
150. Luyten K., Albertyn J., Skibbe W.F., Prior B.A., Ramos J., Thevelein J.M., Hohmann S. (1995) Fps1p, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* 14:1360-1371.
151. Ma H., Snool L.A., Kaminsky S.G.W. Dahms T.E.S. (2005) Surface ultrastructure and elasticity in growing tips and mature regions of *Aspergillus* hyphae describe wall maturation. *Microbiology* 151:3679-3688.
152. Madaule P., Axel R., Myers A.M. (1987) Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(3):779-83

153. Maeno E., Ishizaki Y., Kanaseki T., Hazama A., Okada Y. (2000) Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(17):9487-9492.
154. Mannella, C.A., Frank, J. and Delihias, N. (1987) Interrelatedness of 5S RNA sequences investigated by correspondence analysis. *J.Mol.Evol.* 24: 228-235.
155. Manolopoulos V.G, Liekens S., Koolwijk P., Voets T., Peters E., Droogmans G., Lelkes P., De Clercq E., Nilius B. (2000) Inhibition of angiogenesis by blockers of volume-regulated anion channels. *Gen Pharmacol – Vasc S* 34(2):107-116.
156. Margulis, L. and Schwartz, K. V. (1988). *Five kingdoms: An illustrated guide to the Phyla of life on Earth* (2nd edition). W. H. Freeman and Co., San Francisco. 1-376.
157. Mayr, E. (1990) A natural system of organisms. *Nature* 348 491.
158. Martinac B. (2012) Mechanosensitive ion channels. An evolutionary and scientific tour de force in mechanobiology. *Channels* 6(4):1-3.
159. Martinac B., Kloda A. (2003) Evolutionary origins of mechanosensitive ion channels. *Progress Biophys Mol Biol* 82:11-24.
160. Martinac B. (1993) Mechanosensitive ion channels: biophysics and physiology. In *Thermodynamics of membrane receptors and channels* (ed.M.B.Jackson), 327-351. Boca Raton: CRC Press.
161. Martinac B., Buechner M., Delcour A.H., Adler J., Kung C. (1987) Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2297-2301.
162. Martinac B., Delcour A.H., Buechner M., Adler J., Kung C. (1992) Mechanosensitive ion channels in bacteria. In *Comparative Aspects of Mechanoreceptor Systems*. (ed. F. Ito), 3-18. Berlin:Springer-Verlag.
163. Martinac B. (2001) Mechanosensitive channels in prokaryotes. *Cell Physiol Biochem* 11:61-76.
164. Martinac B. (2011) Bacterial mechanosensitive channels as a paradigm for mechanosensory transduction. *Cell Physiol Biochem* 28:1051-60.
165. Martinac B., Kloda A. (2011) Mechanosensory transduction. In: Montal M. ed: *Comprehensive Biophysics*. Amsterdam: Elsevier, 1-55.
166. Martinac B., Saimi Y., Kung C. (2008) Ion Channels in Microbes. *Physiol Rev* 88(4):1449-1490.
167. Martínez-Cadena G., Saavedra-Calixto J., Messina-Valencia G., Domínguez-Gutiérrez G., Novoa-Martínez G. (1995) Effect of carbon source and pH of the growth medium on spore germination in *Phycomyces blakesleeanus*. *Arch Microbiol* 164(3):231-234.

168. Maurel C., Chrispeels M.J. (2001) Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol* 125:135-8.
169. McCloskey D.T., Doherty L., Dai Y-P., Miller L., Hume J.R., Yamboliev I.A. (2007) Hypotonic activation of short CIC3 isoform is modulated by direct interaction between its cytosolic C-terminal tail and subcortical actin filaments. *J Biol Chem* 282:16871-16877.
170. Meena N., Kaur H., Mondal A.K. (2010) Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in Group III hybrid histidine kinases from fungi. *J Biol Chem* 285:12121-12132.
171. Meyrial V., Laize V., Gobin R., Ripoche P., Hohmann S., Tacnet F. (2001) Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 268:334-43.
172. Miermont A., Waharte F., Hu S., McClean M.N., Bottani S., Leon S., Hersen P. (2013) Severe osmotic compression triggers a slow-down of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:5725-5730.
173. Mika J.T., Poolman B. (2011) Macromolecule diffusion and confinement in prokaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol* 22:117-126.
174. Mongin A.A. (2007) Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology* 14:183-193.
175. Mongin A.A., Kimelberg H.K. (2002) ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(2):C569-C578.
176. Moorman J.R., Ackerman S.J., Kowdley G.C., Griffin M.P., Mounsey J.P., Chen Z., Cala S.E, O'Brian J.J., Szabo G., Jones L.R. (1995) Unitary anion currents through phospholemman channel molecules. *Nature* 377:737-740.
177. Moorman J.R., Jones L.R. (1998) Phospholemman: A Cardiac Taurine Channel Involved in Regulation of Cell Volume. In: Schaffer S., Lombardini J.B., Huxtable R.J. (eds) *Taurine 3. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 442. Springer, Boston, MA.
178. Morris C.E. (2002) How did cells get their size? *Anat Rec* 268:239-251.
179. Morris C.E. (1990) Mechanosensitive ion channels. *J Membr Biol* 113:93-107.
180. Morris C.E., Horn R. (1991) Failure to elicit neuronal macroscopic mechanosensitive currents anticipated by single-channel studies. *Science* 251:1246-1249.

181. Munsch T., Reusch M., Deitmer J.W. (1995) Intracellular chloride activity of leech neurones and glial cells in physiological, low chloride saline. *J Comp Physiol* 176(2):273-280.
182. Nagahama, T., Sato, H., Shimazu, M., Sugiyama, J., (1995) Phylogenetic divergence of the entomophthoralean fungi: evidence from nuclear 18S ribosomal RNA gene sequences. *Mycologia* 87: 203–209.
183. Nakayama Y., Iida H. (2014) Organellar mechanosensitive channels involved in hypo-osmoregulation in fission yeast. *Cell Calcium* 56:467-471.
184. Necker N. J. (1783). *Traité sur la mycologie ou discours historique sur les champignons en general, dans lequel on demontre leur veritable origine et leur génération; d'ou dependent les effets pernecieux et funestes de ceux que l'on mange avec les moyens de les éviter.* Matthias Fontaine, Mannheim.
185. Nevoigt E., Stahl U. (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 21:231-241.
186. Nilius B., Sehrer J., Viana F., De Greef C., Raeymaekers L., Eggermont J., Droogmans G. (1994) Volume-activated Cl⁻ currents in different mammalian non-excitable cell types. *Pflugers Arch* 428:364-371.
187. Nilius B., Eggermont J., Voets T., Buyse G., Manolopoulos V., Droogmans G. (1997) Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol* 68:69-119.
188. Nilius B., Prenen J., Voets T., Eggermont J., Droogmans G. (1998) Activation of volume-regulated chloride currents by reduction of intracellular ionic strength in bovine endothelial cells. *J Physiol* 506(2):353-361.
189. Nilius B, Voets T., Prenen J., Barth H., Aktories K., Kaibuchi K., Droogmans G., Eggermont J. (1999) Role of Rho and Rho kinase in the activation of volume-regulated anion channels in bovine endothelial cells. *J Physiol* 516(Pt1):67-74.
190. Nilius B. (2007) TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:805-812.
191. Nilius B., Droogmans G. (2001) Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium. *Physiol Rev* 81(4):1415-1459.
192. Nilius B., Droogmans G. (2003) Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* 177:119-47.
193. Nordberg H., Cantor M., Dusheyko S., Hua S., Poliakov A., Shabalov I., et al. (2014) The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates *Nucleic Acids Res* 42:D26-31.

194. Numata T., Shimizu T., Okada Y. (2007) TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells. *Am J Physiol-Cell Ph* 292:c460-c467.
195. Okada K, Moe P.C., Blount P. (2002) Functional design of bacterial mechanosensitive channels. Comparison and contrasts illuminated by random mutagenesis. *J Biol Chem* 277:27682-27688.
196. Okada Y., Maeno E. (2001) Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Phys A* 130(3):377-383.
197. Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishima S. (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* 532:13-16.
198. Okada Y. (2004) Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 41:233–258.
199. Oliveira R., Lages F., Silva-Graca M., Lucas C. (2003) Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochim Biophys Acta – BM* 1613:57-71.
200. Parsegian V.A., Rand R.P., Rau D.C. (1995) Macromolecules and water: Probing with osmotic stress. *Methods Enzymol* 259:43-94.
201. Patel A., Honoré E., Maingret F., Lesage F., Fink M., Duprat F., Lazdunski M. (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J* 17:4283-4290.
202. Peat A., Banbury G.H. (1967) Ultrastructure, protoplasmic streaming, growth and tropisms of phycomyces sporangiophores. *New Phytol* 66(3):475-484.
203. Pedersen S.F., Prenen J., Droogmans G., Hoffmann E.K., Nilius B. (1998) Separate Swelling- and Ca²⁺-activated Anion Currents in Ehrlich Ascites Tumor Cells. *J Membr Biol* 163(2):97-110.
204. Pedersen S.F., Beisner K.H., Hougaard C., Willumsen B.M., Lambert I.H., Hoffmann E.K. (2002) Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease process in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J Physiol* 541(3):779-796.
205. Pedersen S.F., Kapus A., Hoffmann E.K. (2011) Osmosensory mechanism in cellular and systemic volume regulation. *J Am Soc Nephrol* 22:1587-1597.
206. Pedersen S.F., Klausen T.K., Nilius B. (2015) The identification of a volume-regulated anion channel: an amazing Odyssey. *Acta Physiol* 213(4):868-881.

207. Perkins D.D., Davis R.H. (2000) *Neurospora* at the millennium. *Fungal Gen Biol.* 31:153-167.
208. Pickard B.G., Ding J.P. (1992) Gravity sensing by higher plants. In *Comparative Aspects of Mechanoreceptor Systems* (ed. F. Ito), 81-110. Berlin: Springer-Verlag.
209. Plemenitas A., Lenassi M., Konte T., Kejzar A. et al. (2014) Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: a molecular perspective. *Front Microbiol* 5: 199. doi:10.3389/fmicb.2014.00199.
210. Poolman B., Blount P., Folgering J.H.A., Friesen R.H.E., Moe P.C., Heide T.v.d. (2002) How do membrane proteins sense water stress? *Mol Microbiol* 44(4):889-902.
211. Poulsen K.A., Andersen E.C., Hansen C.F., Klausen T.K., Hougaard C., Lambert I.H., Hoffmann E.K. (2010) Deregulation of apoptotic volume decrease and ionic movements in multidrug-resistant tumor cells: role of chloride channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C14-C25.
212. Qiu Z., Kishigami A., Nakagawa Y., Iida H., Sokabe M. (2004) A mechanosensitive anion channel in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 45:1704-1708.
213. Qiu Z., Dubin A.E., Mathur J., Tu B., Reddy K., Miraglia L.J., Reinhardt J., Orth A.P., Patapoutian A. (2014) SWELL1, a Plasma Membrane Protein, Is an Essential Component of Volume-Regulated Anion Channel. *Cell* 157(2):447-458.
214. Ransom C.B., O' Neal Y.T., Sontheimer S. (2001) Volume-Activated Chloride Currents Contribute to the Resting Conductance and Invasive Migration of Human Glioma Cells. *J Neurosci* 21(19):7674-7683.
215. Rausch T., S. Soffel, W. Hilgenberg. (1988) Anion-Sensitive Mg ATP-Dependent Proton Pumping in Microsomal Membranes from *Phycomyces Blakesleeanus* Bgff. *Plant Physiol* 88:1163–1167.
216. Redhead C.R., Edelman A.E., Brown D., Landry D.W., al-Awqati Q. (1992) A ubiquitous 64-kDa protein is a component of a chloride channel of plasma and intracellular membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(9):3716-3720.
217. Reed R.H., Chudek J.A., Foster R., Gadd G.M. (1987) Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeast. *Appl Environ Microbiol* 53:2119-2123.
218. Reiser V., Raitt D.C., Saito H. (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* 161:1035-1040.
219. Rep M., Krantz M., Thevelein J.M., Hohmann S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required

- for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway–dependent genes. *J Biol Chem* 275:8290-8300.
220. Reynolds J.E., Parfitt F., Parsons K.A.V., Sweetman. S.C. (1989) *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*. 29th Ed.London: The Pharmaceutical Press.
 221. Richards A., Veses V., Gow N.A.R. (2010) Vacuole dynamics in fungi. *Fungal Biol Re* 24:93-105.
 222. Roberts S.K., Dixon G.K., Dunbar S.J., Sanders D. (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. *New Phytol* 137:579-85.
 223. Roberts S.K. (2003) TOK homologue in *Neurospora crassa*: First cloning and functional characterization of ion channel in filamentous fungus. *Eukaryot Cell* 2:181-190.
 224. Roberts S.K., Milnes J., Caddick M. (2011) Characterisation of AnBEST1, a functional anion channel in the plasma membrane of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 48:928-38.
 225. Roberts S.K. (2006) Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytol* 169:647-666.
 226. Roger, A. J., O. Sandblom, W. F. Doolittle, and H. Philippe. (1999) An evaluation of elongation factor \square as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 16: 218–233.
 227. Rossi D.J., Brady J.D., Mohr. C. (2007) Astrocyte Metabolism and Signaling during Brain Ischemia. *Nat Neurosci* 10:1377–1386.
 228. Ross PE, Garber SS, Cahalan MD. (1994) Membrane chloride conductance and capacitance in Jurkat T lymphocytes during osmotic swelling. *Biophys J* 66:169-78.
 229. Sabirov R.Z., Prenen J., Tomita T., Droogmans G., Nilius B. (2000) Reduction of ionic strength activates single volume-regulated anion channels (VRAC) in endothelial cells. *Pflugers Arch* 439(3):315-320.
 230. Sachs F. (1988) Mechanical transduction in biological systems. *Crit Rev Biomed Eng* 16:141-169.
 231. Saito H. (2001) Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. *Chem Rev* 101:2497-2510.
 232. Saito H., Posas F. (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192(2):289-318.
 233. Sanders D., Hansen U., Slayman C.L. (1981) Role of the Plasma Membrane Proton Pump in pH Regulation in Non-Animal Cells *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5903–5907.

234. Say R., Denizli A., Yakup A.M. (2001) Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresour Technol* 76:67-70.
235. Sarkadi B., Attisano L., Grinstein S., Buchwald M., Rothstein A. (1984) Volume regulation of Chinese hamster ovary cells in anisoosmotic media. *Biochim Biophys Acta* 774:159-168.
236. Saxena A., Sitaraman R. (2014). Osmoregulation and the human mycobiome. *Frontiers in Microbiology* doi:10.3389/fmicb.2014.00167.
237. Schwab A. Fabian A., Hanley P., Stock C.. (2012) Role of Ion Channels and Transporters in Cell Migration. *Physiol Rev* 92(4):1865-1913.
238. Seto-Young D., Perlin D.S. (1991) Effect of Membrane Voltage on the Plasma Membrane H(+)-ATPase of *Saccharomyces Cerevisiae* *J Biol Chem* 266:1383–1389.
239. Singh K.K., Norton R.S. (1991) Metabolic changes induced during adaption of *Saccharomyces cerevisiae* to a water stress. *Arch Microbiol* 156:38-42.
240. Schober A.L., Wilson C.S., Mongin A.A. (2017) Molecular composition and heterogeneity of the LRRC8-containing swelling-activated osmolyte channels in primary rat astrocytes. *J Physiol* 595(22):6939-6951.
241. Schroeder B.C., Cheng T., Jan Y.N., Jan L.Y. (2008) Expression cloning of TMEM16A as a calcium activated chloride channel subunit. *Cell* 134:1019-1029.
242. Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Res.* 105: 1413-1421.
243. Schwiebert E.M., Cid-Soto L.P., Stafford D., Carter M., Blaisdell C.J., Zeitlin P.L., Guggino W.B., Cutting G.R. (1998) Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3879-3884.
244. Shabala S.N., Lew R.R. (2002) Turgor regulation in osmotically stressed *Arabidopsis* epidermal root cells. Direct support for the role of inorganic ion uptake as revealed by concurrent flux and cell turgor measurements. *Plant Physiol* 129:290-299.
245. Shimada K., Li X., Xu G., Nowak D.E., Showalter L.A., Weinman S.A. (2000) Expression and canalicular localization of two isoforms of the ClC-3 chloride channel from rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G268-276.
246. Shimizu T., Iehara T., Sato K., Fujii T., Sakai H., Okada Y. (2013) TMEM16F is a component of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channel. *Am J Physiol-Cell Ph* 304:C748-C759.

247. Shuba L.M., Ogura T., McDonald T.F. (1996) Kinetic evidence distinguishing myocytes volume-sensitive chloride current from other types in guinea-pig ventricular. *J Physiol* 491:69-80.
248. Strop P., Bass R., Rees D.C. (2003) Prokaryotic mechanosensitive channels. In *Advances in Protein Chemistry, Vol.63 (Membrane Proteins)* (ed.D.C.Rees), 177-209. Amsterdam: Academic Press.
249. Sorensen B.H., Thorsteinsdottir U.A., Lambert I.H. (2014) Acquired cisplatin resistance in human ovarian A2780 cancer cells correlates with shift in taurine homeostasis and ability to volume regulate. *Am J Physiol Cell Physiol* 307(12):C1071-C1080.
250. Soroceanu L., Manning T.J., Sontheimer H. (1999) Modulation of Glioma Cell Migration and Invasion Using Cl⁻ and K⁺ Ion Channel Blockers. *J Neurosci* 19(14):5942-5954.
251. Stanić M., Križak S., Jovanović M., Pajić T., Ćirić A., Žižić M., Zakrzewska J., Antić T.C., Todorović N., Živić M. (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. *Microbiol* 163(3):364-372.
252. Suescún-Bolívar L.P., Thomé P.E. (2015) Osmosensing and osmoregulation in unicellular eukaryotes. *World J. Microbiol Biotechnol* 31:435-443.
253. Sukharev S.I., Blount P., Martinac B., Blattner F.R., Kung C. (1994) A large mechanosensitive channel in *E.coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* 368:265-268.
254. Sukharev S. (2002) Purification of the small mechanosensitive channel of *Escherichia coli* (MscS): the subunit structure, conduction and gating characteristics in liposomes. *Biophys J* 83:290-298.
255. Sun H., Tsunenari T., Yau K.W., Nathans J. (2002) The vitelli form macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4008-4013.
256. Tamás M.J., Luyten K., Sutherland F.C.W., Hernandez A., Albertyn J., Valadi H., Li H., Prior B.A., Kilian S.G., Ramos J., Gustafsson L., Thevelein J.M. Hohmann S. (1999) Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation, *Mol Microbiol* 31:1087-104.
257. Tanabe, Y., O'Donnell, K., Saikawa, M., Sugiyama, J. (2000) Molecular phylogeny of parasitic Zygomycota (Dimargaritales, Zoopagales) based on nuclear small subunit ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16: 253–262.

258. Tanabe, Y., Saikawa, M., Watanabe, M. M. and Sugiyama. J. (2004) Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30: 438-449.
259. Tanigawa M., Kihara A., Terashima M., Takahara T., Maeda Y. (2012) Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* 32: 2861-2870.
260. Taylor, J.W., Bowman B., Berbee M.L., White. T.J. (1993) Fungal model organisms: phylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus* and *Neurospora*. *Syst Biol* 42:440-457.
261. Taylor A.R., Brownlee C. (1992) Localized patch clamping of plasma membrane of a polarized plant cell: laser microsurgery of the *Fucus spiralis* rhizoid cell-wall. *Plant Physiol* 99:1686–1688.
262. Tatebayashi K., Tanaka K., Yang H-Y, Yamamoto K., Matsushita Y. (2007) Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* 26:3521-3533.
263. Thomine S., Lelièvre F., Boufflet M., Guern J., Barbier-Brygoo H. (1997) Anion-Channel Blockers Interfere with Auxin Responses in Dark-Grown Arabidopsis Hypocotyls. *Plant Physiol* 115:533–542.
264. Tilly B.C., Van Den Berghe N., Tertoolen L.G., Edixhoven M.J., De Jonge H.R. (1993) Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J Biol Chem* 268(27):19919-22.
265. Tilly B.C., Edixhoven M.J., Tertoolen L.G., Morii N., Saitoh Y., Narumiya S., De Jonge H.R. (1996) Activation of the osmo-sensitive chloride conductance involves P21rho and is accompanied by a transient reorganization of the F-actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 7(9):1419-27.
266. Tobin M.J., White C., Gadd M.G. (1994) Metal accumulation by fungi: Applications in environmental biotechnology. *J Ind Microbiol* 2 (13), 126-130.
267. Tonini, R. Ferroni A., Valenzuela S.M., Warton K., Campbell T.J., Breit S.N., Mazzanti M. (2000) Functional characterization of the NCC27 nuclear protein in stable transfected CHO-K1 cells. *Faseb J* 14:1171-1178.
268. Trouet D., Carton I., Hermans D., Droogmans G., Nilius B., Eggermont J. (2001) Inhibition of VRAC by c-Src tyrosine kinase targeted to caveolae is mediated by the Src homology domains. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C248-C256.
269. Tyerman S.D., Bohnert H.J., Maurel C., Steudle E., Smith J.A.C. (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J Exp Bot* 181:4437-40.

270. Ubl J., Maurer H., Kolb H.A. (1988) Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of opossum kidney cells. *J Membr Biol* 104:223-232.
271. Valenzuela, S.M. Martin D.K., Por S.B., Robbins J.M., Warton K., Bootcov M.R., Schofield P.R., Campbell T.J., Breit S.N. (1997) Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J Biol Chem* 272:12575-12582.
272. Van Wuytswinkel O., Reiser V., Siderius M., Kelders M.C., Ammerer G., Ruis H., Mager W.H. (2000) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol Microbiol* 37(2):382-397.
273. Varela J.C.S., Mager W.H. (1996) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology* 142:721-731.
274. Varela D., Simon F., Riveros A., Jorgensen F., Stutzin A. (2004) NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *J Biol Chem* 279:13301–13304.
275. Verhaeren E.H.C. (1980) The Uncoupling Activity of Substituted Derivatives Anthracene Derivatives on Isolated Mitochondria from *Phaseolus Aureus*. *Phytochemistry* 19:501–503.
276. Véry A. A., Davies J. M. (1998). Laser microsurgery permits fungal plasma membrane single-ion-channel resolution at the hyphal tip. *Appl Environ Microbiol* 64: 1569-1572.
277. Voets T., Wei L., De Smet P., Van Driessche W., Eggermont J., Droogmans G., Nilius B. (1997) Downregulation of volume-activated Cl⁻ currents during muscle differentiation. *Am J Phy Cell Physiol* 272:C667-C674.
278. Voets T, Manolopoulos V, Eggermont J, Ellory C, Droogmans G, Nilius B. (1998) Regulation of a swelling-activated chloride current in bovine endothelium by protein tyrosine phosphorylation and G proteins. *J Physiol* 506:341-52.
279. Voets T., Droogmans G., Raskin G., Eggermont J., Nilius B. (1999) Reduced intracellular ionic strength as the initial trigger for activation of endothelial volume-regulated anion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(9):5298-5303.
280. Voss F.K., Ullrich F., Munch J., Lazarow K., Lutter D., Mah N., Andrade-Navarro M.A., von Kries J.P., Stauber T., Jentsch T.J. (2014) Identification of LRRC8 Heteromers as an Essential Component of the Volume-Regulated Anion Channel VRAC. *Science* 344:634-638.
281. Walker, W.F., Doolittle, W.F. (1982). Nucleotide sequences of 5S ribosomal RNA from four oomycete and chytrid water moulds. *Nucleic Acid Res.* 10: 5717-5721.

282. Wang J. Xu H., Morishima S., Tanabe S., Jishage K., Uchida S., Sasaki S., Okada Y., Shimizu T. (2005) Single-channel properties of volume-sensitive Cl⁻ channel in ClC-3-deficient cardiomyocytes. *Jpn J Physiol* 55:379-383.
283. Weide A. (1939) Beobachtungen an plasmaexplantaten von *Phycomyces*. *Arch Exp Zellforschung* 23:299-337.
284. Wehner F., Olsen H., Tinel H., Kinne-Saffran E., Kinne R.K.H. (2003) Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148:1-80.
285. Whittaker R.H. (1969) New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science* 163:150-160.
286. Wood J.M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:230–262.
287. Wood J.M. (2011) Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol* 65:215-238.
288. Xiong H., Li C., Garami E., Wang Y., Ramjeesingh M., Galley K., Bear C.E. (1999) ClC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J Membr Biol* 167:215-221.
289. Xiong D. Wang G-X., Burkin D.J., Yambliiev I.A., Singer C.A., Rawat S., Scowen P., Evans R., Ye L., Hatton W.J., Tian H., Keller P.S., McCloskey D.T., Duan D., Hume J.R. (2008) Cardiac-Specific Overexpression of the Human Short Clc-3 Chloride Channel Isoform in Mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36(4):386-393.
290. Xiong D. Heyman S., Airey J., Zhang M., Singer C.A., Rawat S., Ye L., Evans R., Burkin D., Tian H., McCloskey D., Valencik M., Britton F., Duan D. (2009) Cardiac-specific, inducible ClC-3 gene deletion eliminates native volume-sensitive chloride channels and produces myocardial hypertrophy in adult mice. *J Mol Cell Cardiol*
291. Yamamoto-Mizuma S. Wang G-X., Liu L.L., Schegg K., Hatton W.J. Duan D., Horowitz B., Lamb F., Hume J. (2004) Altered properties of volume-sensitive osmolyte and anion channels (VSOACs) and membrane protein expression in cardiac and smooth muscle myocytes from Clcn3^{-/-} mice. *J Physiol* 557:439-456.
292. Yang L., Frindt G., Palmer L.G. (2010) Magnesium modulates ROMK channel-mediated potassium secretion. *J Am Soc Nephrol* 21(12):2109-2116.
293. Yang, Y.D. et al. (2008) TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*.
294. Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217:1214-1222.

295. Zaichkin E.I., Orlova S.A., Fikhte B.A. (1975) Dynamics of membrane formation in isolated droplets of *Phycomyces blakesleeanus* cytoplasm. Doklady Akademii Nauk SSSR 225:1187-1189.
296. Zajc J., Kogej T., Galinski E.A., Ramos J., Gunde-Cimerman N. (2014) Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. Appl Environ Microbiol 80:247-56.
297. Zerbst-Boroffka I. (1973) Osmo- und Volumenregulation bei *Hirudo medicinalis* nach Nahrungsaufnahme. J Comp Physiol 84:185-204.
298. Zhao Z., Li X., Hao J., Winston J.H., Weinman S.A. (2007) The ClC-3 chloride transport protein traffics through the plasma membrane via interaction of an N-terminal dileucine cluster with clathrin. J Biol Chem 282:29022-29031.
299. Zhang H., Li H., Liu E., Guang Y., Yang L., Mao J., Zhu L., Chen L., Wang L. (2014) The AQP-3 water channel and the ClC-3 chloride channel coordinate the hypotonicity-induced swelling volume in nasopharyngeal carcinoma cells. Inter Jour Biochem Cell Biol 57:96-107.
300. Zhou X.L., Kung C. (1992) A mechanosensitive ion channel in *Schizosaccharomyces pombe*. EMBO J 11:2869–2875.
301. Zhou X.L., Stumpf M.A., Hoch H.C., Kung C. (1991) A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus *Uromyces*. Science 253:1415–1417.
302. Zhou J.G., Ren J.L., Qiu Q.Y., He H., Guan Y.Y. (2005) Regulation of intracellular Cl⁻ concentration through volume-regulated ClC-3 chloride channels in A10 vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 280:7301-7308.
303. Ziegelhoeffer T., Scholz D., Friedrich C., Helisch A., Wagner S. Fernandez B., Schaper W. (2003) Inhibition of Collateral Artery Growth by Mibefradil: Possible . Role of Volume-Regulated Chloride Channels. Endothelium J Endoth 10:237-246.
304. Zonia L., Munnik T. (2007) Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function. Trends Plant Sci 12(3):90-97.
305. Zonia L., Munnik T. (2004) Osmotically induced cell swelling versus cell shrinking elicits specific changes in phospholipid signals in tobacco pollen tubes. Plant Physiol 134:813-823.
306. Zonia L., Munnik T. (2005) Cracking the green paradigm: functional coding of phosphoinositide signals in plant stress responses. In Biology of Inositols and Phosphoinositides (Majumder AL and Biswas B, eds.), 205-236, Springer.

307. Zoratti M., Ghazi A. (1993) Stretch activated channels in prokaryotes. In Alkali Transport Systems in Prokaryotes (ed. E.P. Bakker), 349-358. Boca Raton: CRC Press.
308. Živanović B. (2005) Ca^{2+} and H^+ Ion Fluxes near the Surface of Gravitropically Stimulated *Phycomyces* Sporangiphore. Ann N Y Acad Sci 1048:487-490.
309. Živić M. (2005) Identifikacija jonskih kanala I uloga polifosfata u rastenju kod gljive *Phycomyces blakesleeanus*. Doktorska disertacija: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
310. Živić M., Todorović N., Popović M., Vučinić Ž. (2009) Outwardly Rectifying Anionic Channel from the Plasma Membrane of the Fungus *Phycomyces blakesleeanus* Eukaryotic Cell 8(9):1439-1448.

BIOGRAFIJA

Strahinja Križak je rođen u Prizrenu 20.02.1983. godine. U Smederevskoj Palanci završio je prirodno-matematički smer gimnazije "Sveta Đorđević", nakon čega je upisao Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Diplomirao je na smeru Molekularna biologija i fiziologija, odsek Genetičko inženjerstvo i biotehnologija 2011. godine, sa prosečnom ocenom 9,57. Iste godine upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu, smer Neuronauke, odsek Neurofiziologija sa biofizikom.

Eksperimentalni deo doktorske disertacije izradio je u okviru projekta OI173040 Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije. Glavni objekat naučnoistraživačkog rada kandidata je gljiva *Phycomyces blakesleeanus*, a osnovni pravci istraživanja ispitivanog objekta tiču se membranskog transporta i energetskog metabolizma.

Tokom 2009. godine radio je kao volonter na Institutu za povrtarstvo u Smederevskoj Palanci u laboratoriji za kulturu biljnih tkiva. 01.02.2012. godine zaposlen je kao istraživač-pripravnik na Institutu za multidisciplinarna istraživanja (IMSI), na Odseku za nauku o živim sistemima. U decembru 2012. godine izabran je u zvanje istraživač-saradnik na IMSI. Od 1.12.2016. godine zaposlen je u Specijalnoj ginekološkoj bolnici sa porodilištem „Jevremova“ u Beogradu.

Radi stručnog usavršavanja pohađao je sledeće međunarodne škole i kurseve:

1. Methods on the interface of Neurochemistry and Electrophysiology (NERKA), Belgrade, Serbia, 30.8.-2.9.2012;
2. DAAD Summer School on Techniques in Cellular Neuroscience, Petnica, Serbia, June 2013;
3. FEBS/EMBO Course, Biophysics of channels and transporters, Ettore Majorana Foundation and Centre, Erice, Sicily, Italy, 10.5.-19.5.2014.
4. Reproductive medicine between science and commercialization, ESHRE campus Symposium, Ljubljana, Slovenia, 30.11.-2.12.2017.

BIBLIOGRAFIJA

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21):

1. Milan Žižić, Tanja Dučić, Daniel Grolimund, Danica Bajuk-Bogdanović, Miroslav Nikolić, Marina Stanić M, **Strahinja Križak**, Joanna Zakrzewska (2015), „X-ray absorption near-edge structure micro-spectroscopy study of vanadium speciation in *Phycomyces blakesleeanus* mycelium“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(24):7487-7496.
2. Milan Žižić, Miroslav Živić, Vuk Maksimović, Marina Stanić, **Strahinja Križak**, Tijana Cvetić Antić, Joanna Zakrzewska (2014), „Vanadate Influence on Metabolism of Sugar Phosphates in Fungus *Phycomyces blakesleeanus*“, *PLoS ONE* 9(7): e102849. doi:10.1371/journal.pone.0102849

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22):

3. **Strahinja Križak**, Ljiljana Nikolić, Miroslav Živić, Marina Stanić, Milan Žižić, Joanna Zakrzewska, Nataša Todorović (2015), „Osmotic swelling activates a novel anionic current with VRAC-like properties in cytoplasmic droplet membrane from *Phycomyces blakesleeanus* sporangiophore“, *Research in Microbiology* 166(3): 162-173.
4. Marina Stanić, **Strahinja Križak**, Mirna Jovanović, Tanja Pajić, Ana Ćirić, Milan Žižić, Joanna Zakrzewska, Tijana Cvetić Antić, Nataša Todorović, 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*, 163(3):364-372.

Rad u međunarodnom časopisu (M23):

5. Marina Stanić, Miroslav Živić, Mirzeta Hadžibrahimović, Aleksandra Pajdić, **Strahinja Križak**, Milan Žižić and Joanna Zakrzewska (2014), „Effect of long term cyanide exposure on participation of cyanide sensitive respiration and phosphate metabolism of fungus *Phycomyces blakesleeanus*“, *Archives of biological science* 66(2):847-857.

Rad saopšten na skupu međunarodnog značaja štampan u celini (M33):

6. **Strahinja Križak**, Ljiljana Nikolić, Nataša Todorović, Marina Stanić, Milan Žižić, Željko Vučinić, Miroslav Živić, „Ion channels in cytoplasmic droplets membrane from fungus *Phycomyces blakesleeanus*“, *Regional Biophysics Conference 2012*, Kladovo-Belgrade, Serbia, September 03-07, Proceedings, 26-29.

7. Milan Žižić, Ivan Spasojević, Miroslav Živić, Jelena Bogdanović Pristov, Marina Stanić, **Strahinja Križak**, Joanna Zakrzewska, „The mechanism of vanadate reduction in *Phycomyces blakesleeanus* mycelium“, Regional Biophysics Conference 2012, Kladovo-Belgrade, Serbia, September 03-07, Proceedings, 42-44.

Rad saopšten na skupu međunarodnog značaja štampan u izvodu (M34):

8. Tanja Pajić, Mirna Jovanović, **Strahinja Križak**, Tijana Cvetić Antić, Miroslav Živić, Marina Stanić, „Anthracene-9-carboxylic and niflumic acid inhibit growth and respiration of fungus *Phycomyces blakesleeanus*“, Regional Biophysics Conference 2016, Trieste, Italy, 25-28 August, Book of Abstracts, pp. 63.
9. **Strahinja Križak**, Nataša Todorović, Tanja Pajić, Miroslav Živić, „GTP-activated inactivating anionic current in *P. blakesleeanus*“, Regional Biophysics Conference 2016, August 25-28, Trieste, Italy, Book of Abstracts, pp. 75.
10. Katarina K. Jovanović, **Strahinja Križak**, Aleksandar G. Savić, Miroslav Živić, Živoslav Lj. Tešić, Siniša Radulović, „Electrophysiological exploration of HeLa cells treated with ruthenium(II)-arene complex“, Regional Biophysics Conference 2014, Smolenice Castle, Slovakia, May 15-20, Book of Abstracts: pp.105.
11. **Strahinja Križak**, Ljiljana Nikolić, Miroslav Živić, Marina Stanić, Željko Vučinić, Milan Žižić, Nataša Todorović, „Anionic currents from the cytoplasmic droplets membrane of the fungus *Phycomyces blakesleeanus* - analysis of whole-cell steady state currents“, International Conference on Plant Biology 2013, Subotica, June 4-7 2013, Abstract: pp.48.
12. **Strahinja Križak**, Ljiljana Nikolić, Nataša Todorović, Željko Vučinić, Marina Stanić, Milan Žižić, Miroslav Živić, "Characterization of moderately rapidly inactivating anionic current in cytoplasmic droplets membrane from *Phycomyces blakesleeanus*", International Conference on Plant Biology 2013, Subotica, June 4-7, Abstract: pp.49.

Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampan u celini (M63):

13. Aleksandar G. Savić, **Strahinja Križak**, Željko Vučinić, Miroslav Živić, „Noise analysis of ion channel patch-clamp records – statistical and wavelet based approach“, ETRAN Konferencija, 11-14. jun 2012, Zbornik radova: VI.1-3.
14. Jelena Mihailović, Aleksandar G. Savić, **Strahinja Križak**, Željko Vučinić, Miroslav Živić, „A novel method for MRI images segmentation and coloring based on fuzzy C-means clustering algorithm“, ETRAN Konferencija, 11-14. jun 2012, Zbornik radova: VII-4.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Страхиња Крижак _____

Број индекса _____ Б3049/2011 _____

Изјављујем

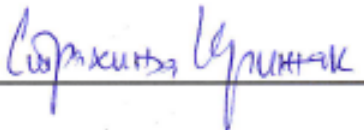
да је докторска дисертација под насловом

**Карактеризација осмотски активираних јонских струја у мембрани
цитоплазматских капи изолованих из спорангиофора гљиве *Phycomyces
blakesleeanus* Burgeff**

- 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, _____ 10.03.2018. _____



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Страхиња Крижак

Број индекса Б3049/2011

Студијски програм Биологија

Наслов рада Карактеризација осмотски активираних јонских струја у мембрани цитоплазматских капи изолованих из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff

Ментори др Мирослав Живић, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Наташа Тодоровић, научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду


Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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, 10.03.2018.



Изјава о коришћењу

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

Карактеризација осмотски активираних јонских струја у мембрани цитоплазматских капи изолованих из спорангиофора гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff

која је моје ауторско дело.

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

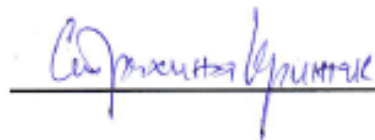
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, _____ **10.03.2018.**



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.
