

UNIVERZITET U BEOGRADU
MULTIDISCIPLINARNE DOKTORSKE STUDIJE

Tanja M.D. Pajić

**PRIMENA SAVREMENIH TEHNIKA
NELINEARNE OPTIČKE MIKROSKOPIJE *IN*
VIVO NA PROUČAVANJE FIZIOLOGIJE
KONČASTIH GLJIVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
MULTIDISCIPLINARY DOCTORAL STUDIES

Tanja M.D. Pajić

**APPLICATION OF ADVANCED TECHNIQUES
OF NONLINEAR OPTICAL MICROSCOPY *IN*
VIVO FOR THE PHYSIOLOGICAL STUDY OF
FILAMENTOUS FUNGI**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentori:

dr Mihailo Rabasović, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za fiziku Beograd, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Prof. dr Miroslav Živić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Aleksandar Krmpot, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za fiziku Beograd, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

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

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

dr Nataša Nestorović, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za biofiziku, Instituta za fiziku u Beogradu, Univerzitet u Beogradu. Deo eksperimenata je urađen i u Institutu za fiziologiju i biohemiju „Ivan Đaja“, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, kao i na Odseku za nauku o živim sistemima, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu.

*Želim da se zahvalim mojim **mentorima**, profesoru **dr Miroslavu Živiću**, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na prilici da budem deo njegovog istraživačkog tima i na avangardnoj ideji za lasersku hirurgiju ćelijskog zida gljiva što smatram da je veliki značaj za nauku u Srbiji i **dr Mihailu Rabasoviću**, višem naučnom saradniku sa Instituta za fiziku u Beogradu, koji me je ljubazno dočekaao kao kandidata na multidisciplinarnim studijama iz biofotonike i kao biologa uveo u svet fotonike.*

*Najveću zahvalnost dugujem **dr Nataši Todorović** koja je u svako doba dana i noći bila spremna da pored svih svoji obaveza izdvoji vreme za mene i koja mi je u najtežim tencijama davala neophodnu snagu i volju da istrajem. Od samog početka je verovala u mene i na tome joj dugujem posebnu zahvalnost.*

*Posebno želim da zahvalim **dr Aleksandru Krmpotu** na pruženoj prilici za odlazak na stručno usavršavanje na eminentnom Institutu Karolinska u Švedskoj i iscrpnim predavanjima, koji nije žalio svoj trud i vreme da nam prenese svoje naučno znanje i iskustva koja su za poštovanje.*

***Nataša, Aleksandre, Mihailo, Miroslove**, hvala na prenesenom znanju, podršci i podsticajima.*

*Zahvaljujem **dr Marini Stanić** na kolegijalnosti, stručnim savetima i nesebičnom deljenju ličnih iskustava u eksperimentalnom radu.*

*Želim da se zahvalim i **dr Nataši Nestorović** koja je prva uspela da „probije led“ tako što me je na poseban način nagovorila da imam svoju prvu samostalnu usmenu prezentaciju rezultata na Evropskom kongresu iz mikroskopije, što mi je dodatno ulilo samopouzdanje za dalji rad i napredak u nauci.*

*Hvala kolegenici **dr Katarini Stevanović** na dugogodišnjoj saradnji u zemlji i inostranstvu i na svemu što smo zajednički savladale i svojim razlikama pomogle jedna drugoj. Hvala kolegama **Jovani Lukičić** i **Mihajlu Radmiloviću** na kolegijalnosti, druženju i razmeni iskustava.*

*Hvala mladim kolegama iz kancelarije **Marti Bukumiri, Jovani Jelić, Miljani Piljević** i **Aleksi Denčevskom** na druženju, entuzijazmu i mladalačkoj energiji kojom oplemenjuju našu grupu.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj **porodici** i **suprugu**, pre svega roditeljima bez čije podrške ne bih bila ovde.*

Primena savremenih tehnika nelinearne optičke mikroskopije *in vivo* na proučavanje fiziologije končastih gljiva

Sažetak

Končaste gljive imaju ogroman ekološki, medicinski i biotehnološki značaj. Proučavanje njihove fiziologije i dinamike *in vivo* je ključno za razumevanje njihove interakcije sa okolinom i razvoj novih terapijskih strategija za patogene koji izazivaju bolesti. Trenutno poznavanje bilo kojih aspekata fiziologije končastih gljiva zaostaje za nivoom dostupnim za životinje ili biljke.

U ovoj disertaciji, prema našim saznanjima, urađena je prva femtosekundna laserska nanohirurgija ćelijskog zida končastih gljiva, koja je omogućila elektrofiziološka merenja na protoplastima oslobođenim iz hifa. Razvijena je ponovljiva i visoko precizna metoda za dobijanje vijabilnih protoplasta. Oslobođanje protoplasta iz rezova na ćelijskom zidu generisanih nanohirurgijom je postignuto iz različitih regiona hifa. Ćelijska membrana dobijenih protoplasta formirala je čvrste kontakte visokog otpora ($G\Omega$) sa elektrofiziološkom pipetom. Napravljen je kompletan protokol od gajenja gljiva do laserske nanohirurgije, što je omogućilo registraciju jonskih struja. U poređenju sa prethodnim studijama koje su koristile heterologno eksprimirane kanale, ova tehnika pruža mogućnost da se identifikuju nove jonske struje i da se proučavaju svojstva jonskih kanala u protoplastima končastih gljiva u njihovom prirodnom okruženju.

Modaliteti nelinearne laserske mikroskopije, dvofotonska ekscitaciona fluorescencija (TPEF) i mikroskopija detektovanja signala trećeg harmonika (THG), su primenjeni za oslikavanje strukturnih i funkcionalnih promena ćelijskog metabolizma *Phycomyces blakesleeanus*. THG mikroskopija je omogućila oslikavanje dinamike lipidnih kapi (LK) u živim hifama *P. blakesleeanus* u uslovima gladovanja i prisustvu selenita. Selen je mikronutrijent neophodan za ljude i životinje a končaste gljive su jedni od glavnih puteva za ulazak Se u ekosisteme. Kako metoda THG ranije nije primenjivana na končastim gljivama, metodološki pristup je morao biti razvijen i optimizovan. Promene u dinamici LK su zatim kvantifikovane sa THG slika korišćenjem metode *Korelaciona analiza slike*. Pokazano je da se THG oslikavanje bez obeleživača, praćeno kvantifikacijom ovom metodom, može pouzdano koristiti kod končastih gljiva za *in vivo* kvantifikaciju LK bez potrebe za obeležavanjem i/ili fiksacijom. Ispitan je i uticaj selenita, gladovanja i povišene temperature na dinamiku mitohondrija kod *P. blakesleeanus* primenom TPEF modaliteta i uspostavljeni su novi protokoli oslikavanja končastih gljiva. Dobijeni rezultati oslikavaju prednosti primene nelinearne mikroskopije u istraživanju fiziologije končastih gljiva i dinamičkih promena ćelijskog metabolizma.

Ključne reči: končaste gljive, nelinearna mikroskopija, laserska nanohirurgija na nivou ćelije, oslikavanje bez obeleživača, *in vivo*, dinamika lipidnih kapi, dinamika mitohondrija, gladovanje, selenit, elektrofiziologija

Naučna oblast: Biološke nauke

Uža naučna oblast: Biofotonika

Application of advanced techniques of nonlinear optical microscopy *in vivo* for the physiological study of filamentous fungi

Abstract

Filamentous fungi are of enormous ecological, medical and biotechnological importance. Studying their physiology and dynamics *in vivo* is crucial for understanding their interaction with the environment as well as for developing new therapeutic strategies for disease-causing pathogens. Current knowledge of any aspects of filamentous fungal physiology lags behind that available for animals or plants.

In this dissertation, to the best of our knowledge, the first femtosecond laser nanosurgery was performed on the cell wall of filamentous fungi, enabling electrophysiological measurements on the protoplasts released from the hyphae. A reproducible and highly precise method for obtaining viable protoplasts was developed. Protoplasts were released from different regions of the hyphae through the incision made in the cell wall by nanosurgery. The cell membrane of the obtained protoplasts formed tight high-resistance ($G\Omega$) contacts with the electrophysiological pipette. A complete protocol was established, from cultivation of the fungi to laser nanosurgery enabling registration of ion currents. Compared to previous studies using heterologously expressed channels, this technique provides the opportunity to identify new ionic currents and to study the properties of ion channels of the protoplasts of filamentous fungi in their native environment.

Nonlinear laser microscopy modalities, two-photon excitation fluorescence (TPEF) and third harmonic generation (THG) microscopy, were applied to image structural and functional changes in the cellular metabolism of *Phycomyces blakesleeanus*. THG microscopy enabled the visualization of lipid droplet (LD) dynamics in living hyphae of *P. blakesleeanus* undergoing nitrogen starvation and in the presence of selenite. Selenium is a micronutrient necessary for humans and animals, and filamentous fungi are one of the main routes by which Se enters ecosystems. As the THG method was not applied to filamentous fungi before, the methodological approach had to be developed and optimized. Changes in LD dynamics were quantified using *Image correlation analysis* of THG images. It was shown that label-free THG imaging followed by quantification by this method can be reliably used for *in vivo* LD quantification in filamentous fungi without the need for labeling and/or fixation. The influence of selenite, nitrogen starvation and elevated temperature on mitochondrial dynamics in *P. blakesleeanus* was also investigated using the TPEF modality, and new protocols for imaging filamentous fungi were established. The results obtained illustrate the advantages of using nonlinear microscopy to study the physiology of filamentous fungi and the dynamic changes in cell metabolism.

Keywords: filamentous fungi, nonlinear microscopy, laser cell nanosurgery, label-free imaging, *in vivo*, lipid droplet dynamics, mitochondrial dynamics, starvation, selenite, electrophysiology

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biophotonics

Lista skraćenica

BF mikroskopija – (eng. Bright-Field) – mikroskopija svetlog polja
CFW – Calcofluor White (4,4'-Bis[4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-6-anilino-1,3,5-triazin-2-yl]amino]stilbene-2,2'-disulphonic acid)
CW laseri - (eng. continuous wave) – kontinualni laseri
DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindol
FAD – flavin adenin dinukleotid
fs laser – femtosekundni laser
FWHM – (eng. full width at half maximum) – puna širina na pola maksimalne visine
HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina
HiperR – hiperosmotski rastvor za plazmolizu hifa *P. blakesleeanus*
ICS – (eng. Image Correlation Spectroscopy) – korelaciona analiza slike
I.P. – indeks prelamanja
IR – infracrveno zračenje (eng. infrared) – elektromagnetno zračenje u opsegu 780 nm – 1 mm
IzoR – izoosmotski rastvor za *P. blakesleeanus*
LK – lipidne kapi
MNVnDM - Metoda nametnute voltaže na deliću membrane (eng. *patch-clamp*)
MK – masne kiseline
NA – numerička apertura
NADP – nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NLSM – (eng. Nonlinear Laser Scanning Microscopy) – nelinearna laserska skenirajuća mikroskopija
NitR – nitratni rastvor za deplazmolizu hifa *P. blakesleeanus*
NR – Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one)
PDA – (eng. Potato Dextrose Agar) – krompir agarni medijum
PSA – (eng. Particle Size Analysis) – Analiza veličine čestica
Rh123 - Rhodamine123 (2-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl) benzoic acid methyl ester)
ROS – (eng. Reactive Oxygen Species) – reaktivne vrste kiseonika
SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. scanning electron microscopy)
SHG – (eng. Second Harmonic Generation) - mikroskopija detektovanja signala drugog harmonika
SMT – standardni minimalni tečni medijum
SZO – Svetska zdravstvena organizacija
TAG – (eng. Triacylglycerol) – triaciglicerol
THG – (eng. Third Harmonic Generation) – mikroskopija detektovanja signala trećeg harmonika
Ti:Sa laser – titan-safirni laser
TPEF – (eng. Two/Three Photon Excitation Fluorescence) – Dvo/Trofotonska ekscitaciona/pobuđena fluorescencija
VIS - (eng. visible) – VIS filter
VGlutR – rastvor za deplazmolizu hifa *P. blakesleeanus* sa visokim sadržajem glutamata
UV – ultraljubičasto zračenje (eng. ultraviolet) – elektromagnetno zračenje u opsegu 100 – 400 nm
Yb:KGW laser – iterbijumski laser

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Ekologija i značaj končastih gljiva	1
1.1.1	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	4
1.2	Fiziologija i metabolizam končastih gljiva	7
1.2.1	Odgovor končastih gljiva na nedostatak azota i promenu temperature	12
1.2.2	Efekti selenita na končaste gljive	14
1.3	Nelinearna laserska skenirajuća mikroskopija	16
1.3.1	Pregled nelinearne optičke mikroskopije	16
1.3.2	Jedinstvene prednosti NLSM	19
1.3.3	Femtosekundna laserska nanohirurgija za istraživanje jonskih struja u membranama končastih gljiva	21
1.3.4	THG oslikavanje dinamike lipidnih kapi u končastim gljivama bez obeležavanja	24
2	ČILJEVI istraživanja	26
3	MATERIJAL I METODE	28
3.1	Eksperimentalni model i medijumi za rast	28
3.1.1	Čvrst krompirov medijum i uzgoj micelijuma <i>P. blakesleeanus</i> za štok spora	28
3.1.2	Standardni minimalni tečni medijum	29
3.2	Rastvori	29
3.2.1	Hiperosmotski rastvori za plazmolizu gljiva	29
3.2.2	Izoosmotski rastvor	30
3.2.3	Rastvori za snimanje MNVnDM	30
3.3	Gajenje gljiva za eksperimente i tretmani	31
3.3.1	Gladovanje uzrokovano nedostatkom azota	31
3.3.2	Tretman natrijum selenitom za ispitivanje uticaja na lipidne kapi, mitohondrije i morfologiju pojedinačnih hifa <i>P. blakesleeanus</i>	32
3.3.3	Tretman povišenom ambijentalnom temperaturom	32
3.3.4	Praćenje metaboličkog stanja zasnovanog na autofluorescenci endogenih flurofora NAD(P)H i FAD	33
3.3.5	Gajenje gljiva za kolokalizacione eksperimente	33
3.3.6	Gajenje gljiva za ćelijsku nanohirurgiju	33
3.4	Priprema uzoraka za TPEF oslikavanje i ćelijsku hirurgiju	34
3.4.1	Fluorescentno bojenje organela i ćelijskog zida <i>P. blakesleeanus</i>	34

3.4.2	Plazmoliza i deplazmoliza hifa <i>P. blakesleeanus</i>	36
3.5	Instrumentalne postavke i uslovi snimanja	37
3.5.1	Nelinearna laserska skenirajuća mikroskopija	37
3.5.1.1	TPEF modalitet - Femtosekundna laserska nanohirurgija.....	38
3.5.1.2	TPEF modalitet - Dvofotonsko oslikavanje.....	39
3.5.1.3	THG modalitet.....	40
3.5.2	Svetlosna mikroskopija	41
3.5.3	Skenirajuća elektronska mikroskopija	41
3.5.4	Postavka sistema za primenu tehnike nametnute voltaže na deliću membrane i elektrofiziološka registracija struja	42
3.5.5	Merenje efekta kalcijuma na oslobađanje protoplasta	43
3.5.6	Merenje prinosa biomase i potrošnje kiseonika	43
3.6	Analiza rezultata.....	43
3.6.1	Analiza slika	43
3.6.2	Analiza struja	46
3.6.3	Statistička analiza	46
4	REZULTATI	47
4.1	Laserska nanohirurgija ćelijskog zida pojedinačnih hifa končaste gljive <i>P. blakesleeanus</i>	47
4.1.1	<i>In vivo</i> dvofotonsko oslikavanje, laserska nanohirurgija ćelijskog zida i metoda nametnute voltaže na deliću membrane	47
4.1.2	Procedura laserske nanohirurgije – glavni koraci i ključni faktori	49
4.1.3	Oslikavanje hirurškog reza u ćelijskom zidu i oslobođenog protoplasta elektronskom mikroskopijom	53
4.1.4	Uticaj različitih parametara na oslobađanje protoplasta	55
4.1.5	Laserska nanohirurgija ćelijskog zida na različitim lokacijama duž hifa.....	57
4.2	Strukturno i funkcionalno oslikavanje ćelijskog metabolizma <i>P. blakesleeanus</i>	59
4.2.1	THG oslikavanje bez obeležavanja i kvantifikacija lipidnih kapi u živim hifama <i>P. blakesleeanus</i>	59
4.2.1.1	Uslovi oslikavanja lipidnih kapi detekcijom signala trećeg harmonika	59
4.2.1.2	Preklapanje AutoTPEF i THG signala u hifama.....	61
4.2.1.3	Kolokalizacija signala lipidnih kapi snimljenih pomoću TPEF i THG modaliteta.....	62
4.2.1.4	Analiza THG slika i kvantifikacija lipidnih kapi - uticaj gladovanja ograničenom dostupnošću azota kao neophodnim nutrijentom.....	64

4.2.1.5	Analiza lipidnih kapi pomoću PSA i ICS.....	66
4.2.1.6	Uticaj azotnog gladovanja na broj i veličinu lipidnih kapi.....	67
4.2.2	<i>In vivo</i> (auto)TPEF oslikavanje organela u pojedinačnim hifama <i>P. blakesleeanus</i>	69
4.2.2.1	Uticaj povišene temperature na dinamiku mitohondrija i lipidnih kapi	74
4.2.2.2	Uticaj azotnog gladovanja na dinamiku mitohondrija.....	77
4.2.3	Ispitivanje uticaja natrijum selenita na dinamiku lipidnih kapi, mitohondrija i morfologiju hifa <i>P. blakesleeanus</i> – THG i TPEF oslikavanje	78
4.2.3.1	Uticaj natrijum selenita na dinamiku lipidnih kapi <i>P. blakesleeanus</i> - THG oslikavanje bez obeležavanja.....	78
4.2.3.2	Uticaj natrijum selenita na morfologiju i zastupljenost mitohondrija u hifama <i>P. blakesleeanus</i> korišćenjem vitalnih boja i TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije.....	81
4.2.3.3	Uticaj natrijum selenita na morfometrijske parametre hifa.....	83
5	DISKUSIJA	85
5.1	Fs laserska nanohirurgija ćelijskog zida končaste gljive <i>P. blakesleeanus</i>	85
5.2	THG oslikavanje lipidnih kapi u živim hifama <i>P. blakesleeanus</i>	88
5.3	Efekti selenita i povišene temperature na lipidne kapi u živim hifama <i>P. blakesleeanus</i>	89
5.4	Efekti selenita, gladovanja i povišene temperature na mitohondrije u živim hifama <i>P. blakesleeanus</i>	90
6	ZAKLJUČCI	94
7	LITERATURA	96

1 UVOD

1.1 Ekologija i značaj končastih gljiva

Končaste gljive su izuzetno raznolika, kosmopolitska grupa organizama iz carstva gljiva, od velikog značaja za funkcionisanje biosfere (Bahram and Netherway 2022). Pretpostavlja se da ima više od pet miliona vrsta gljiva, od kojih je do sada opisano oko 150.000 (Blackwell 2011); (Bhunjun et al. 2022). Nazvane su po svojim izduženim ćelijama končastog oblika, hifama. Hife imaju relativno konstantan prečnik (1 μm do 30 μm) i rastu izduživanjem vrha formirajući trodimenzionalne mreže zvane micelijum (Fricker et al. 2017; Islam et al. 2017). Specijalizovane hife se proizvode kako bi omogućile bespolno razmnožavanje sa sporama ili konidijama. Iako se pojedinačne hife moraju posmatrati pod mikroskopom, micelijum gljive može biti izrazito velikih dimenzija. *Armillaria ostoyae* (medna gljiva) u istočnom Oregonu se smatra najvećim organizmom na Zemlji jer se njen micelijum prostire na više od 900 hektara tla (Ferguson et al. 2003). Procenjuje se da je stara najmanje 2.000 godina. Jedna od najvažnijih karakteristika je nesumnjivo sposobnost formiranja vegetativnog višćelijskog micelijuma koja omogućava končastim gljivama da brzo i efikasno kolonizuju nove teritorije. Naseljavaju gotovo sve ekosisteme na Zemlji, u rasponu od kopnenih i vodenih sredina (Nagahama et al. 2011) do ekstremnih okruženja kao što su pustinje (Gonçalves et al. 2016) i polarni regioni (Freeman et al. 2009), pa čak i svemirske stanice (Cortese et al. 2020). Ovaj kapacitet za izuzetnu prilagodljivost različitim uslovima životne sredine odražava nekoliko suštinskih karakteristika biologije gljiva, kao što su njihova metabolička svestranost i njihova sposobnost da tolerišu stres iz okoline.

Končaste gljive su apsorptivni heterotrofi koji dobijaju hranljive materije iz svog okruženja putem oslobađanja ekstraćelijskih enzima koji razgrađuju složene organske molekule u jednostavnije koje zatim apsorbuju. Oslobađajući hranljive materije nazad u zemljište gljive imaju značajnu ulogu u kruženju ugljenika, azota i drugih esencijalnih elemenata. One mogu prilagoditi svoj rast, metabolizam i razvojne procese u skladu sa promenama sredine kako bi optimizovale svoj opstanak i reprodukciju u različitim staništima. Čak i na istom staništu sastav hranljivih materija može varirati, stvarajući različita mikorstaništa (M.J., Hutchings, D.K., Wijesinghe, E.A. 2000). Zahvaljujući micelijumskoj mreži, gljive prevazilaze problem diskontinualne distribucije hranljivih materija, preuzimajući resurse iz mikrostaništa bogatih hranljivim materijama i prenoseći ih u druge delove micelijuma, često na velike udaljenosti (Burnett 2003; Davidson and Olsson 2000; Simonin et al. 2012). Na ovaj način se postiže nutritivna homeostaza unutar svih hifa micelijuma.

Končaste gljive stupaju u interakciju sa drugim organizmima u složenim ekološkim sistemima. Zajedno uz bakterije, gljive predstavljaju najvažniju grupu razlagača u skoro svim ekosistemima, a mikorizne gljive formiraju simbiotske zajednice sa skoro 80% kopnenih biljaka (Genre et al. 2020), snabdevajući biljke fosfatom, sumporom i azotom u zamenu za organske materije. Štaviše, biodiverzitet mikoriznih gljiva u zemljištu ima kritičan uticaj na održavanje biodiverziteta biljaka i ekosistema (Van Der Heijden et al. 1998). Pored toga, neke gljive su patogene i izazivaju bolesti kod životinja ili biljaka (M. C. Fisher et al. 2012), a gljive koje ugrožavaju zdravlje ljudi su od ogromnog biomedicinskog značaja (Gow et al. 2022).

Značaj proučavanja končastih gljiva proizilazi iz osobina organizama ove grupe (raznolikost, kosmopolitska rasprostranjenost i uloga razlagača u biosferi) kao i iz pojedinih karakteristika koje imaju ogroman praktičan značaj ili potencijal za primenu. Prirodni metabolički kapaciteti končastih gljiva su izuzetno raznovrsni i namenski se koriste za proizvodnju primarnih i sekundarnih metabolita, proteina i enzima, hrane i vitamina (Copetti 2019; Lübeck and Lübeck 2022).

Končaste gljive proizvode široku lepezu bioaktivnih jedinjenja sa farmaceutskim potencijalom (Bills et al. 2009; Bladt et al. 2013; Hyde et al. 2019; de Matos et al. 2023). Mnoga medicinski važna jedinjenja, kao što su antibiotici (penicilin i drugi), imunosupresivi i lekovi za snižavanje holesterola (lovastatin), ali i drugi globalno značajni lekovi, izvedeni su iz končastih gljiva (Nielsen et al. 2017; Ozcengiz and Demain 2013; Nielsen et al. 2017; Boecker et al. 2018; Srinivasan, Thangavelu, and Uthandi 2022). Sa druge strane, končaste gljive iz roda *Trichoderma* se koriste za proizvodnju biofungicida kao ekološka zamena hemijskim fungicidima protiv gljivnih fitopatogena (Tyśkiewicz et al. 2022).

Zahvaljujući svojoj sposobnosti sinteze velikog broja različitih sekundarnih metabolita (većinom neispitanih), končaste gljive se koriste više od jednog veka kao visoko produktivne ćelijske fabrike za proizvodnju enzima i jedinjenja malih molekula kao što su organske kiseline i pomenuti antibiotici (Wösten 2019; Robey et al. 2021). Limunska kiselina (koristi se kao aroma i proizvod za čišćenje) se komercijalno proizvodi skoro jedan vek uz upotrebu *Aspergillus niger*. Končaste gljive se koriste u različitim procesima proizvodnje hrane, obezbeđujući vitamine, lipide i masne kiseline (Hyde et al. 2019; Strong et al. 2022). Njihova jedinjenja takođe doprinose ukusu i aromi mnogih fermentisanih namirnica i pića. Končaste gljive proizvode sekundarne metabolite koji sadrže širok spektar pigmenata, uključujući karotenoide (β -karoten (pro-vitamin A), likopen, astaksantin i dr.), poliketide (melanin, kvinoni, naftokvinoni, azafiloni), riboflavin (vitamin B2), ankaflavin, monascin (Afroz Toma et al. 2023; L. Lin and Xu 2022). Ovi pigmenti daju različite boje i nijanse, od žute (*Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus versicolor*, *Blakeslea trispora*, *Fusarium sporotrichoides*, *Trichoderma virens*), preko zelene (*Chlorociboria* sp.), i plave (*Lactarius* sp., *Penicillium herquei*) do crne (*A. niger*) (Afroz Toma et al. 2023). Pored toga što je najčešća primena gljivnih pigmenata u prehrambenoj industriji gde se koriste kao boje za hranu, oni imaju i širok spektar farmakoloških aktivnosti, uključujući imunomodulatorno, antioksidativno, antibakterijsko, antimikrobno i antikancerogeno dejstvo (Afroz Toma et al. 2023; L. Lin and Xu 2022). β -karoten, prekursor vitamina A, je od velikog značaja za zdravu kožu, imuni sistem i vid (Naz et al. 2020). Končaste gljive iz reda Mucorales, *B. trispora*, *M. circinelloides* i *P. blakesleeanus* su jedni od glavnih proizvođača β -karotena (Naz et al. 2020; Torres et al. 2016). Prirodni pigmenti imaju prednosti u odnosu na sintetičke pigmente zbog svojih ekološki prihvatljivih i bezbednih svojstava.

Neke končaste gljive pripadaju tzv. „masnim/uljanim“ gljivama, odnosno, masnim/uljanim mikroorganizmima (Langseter et al. 2021), koje karakteriše velika količina lipida koje mogu skladišiti u obliku lipidnih kapi u svojim ćelijama. U odgovarajućim uslovima u njihovim ćelijama lipidi mogu da čine i do 70% biomase (Ratledge 2002; Cerdá-Olmeda and Avalos 1994). Ovi lipidi se smatraju vrednim alternativnim resursom za različite biotehnoške primene kao što su proizvodnja biodizela, hemikalija, aditiva za ljudsku i stočnu hranu, kao i efikasna bioremedijacija otpadnih voda (Passoth 2017; Mhlongo et al. 2021). Dodatno, akumulacija lipida je uključena u otpornost gljiva na toksine (W. Chang et al. 2015) i virulenciju patogenih gljiva (N. Liu et al.

2019). Nedavna studija je pokazala da su jedinjenja koja inhibiraju sintezu masnih kiselina (glavnih komponenti lipida) kod patogenih gljiva, obećavajući novi antimikotici ključni za odbranu od gljivičnih infekcija kod ljudi (Iyer et al. 2023).

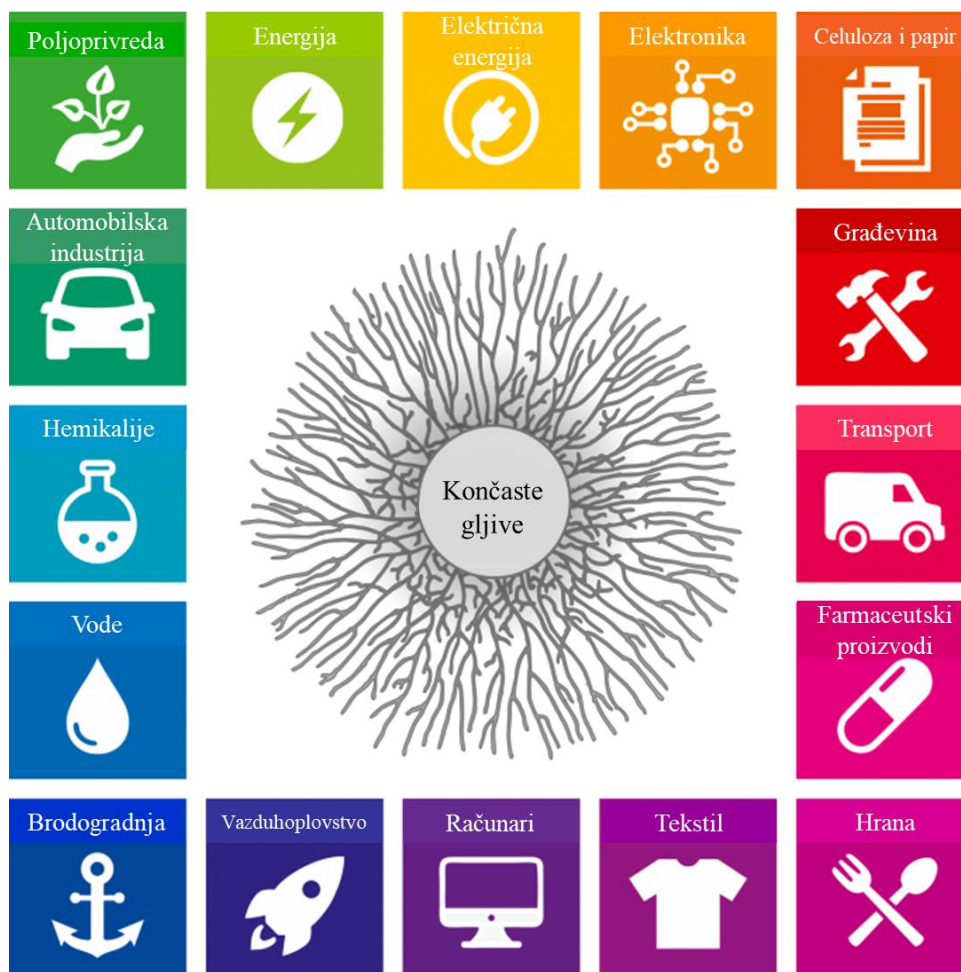
Zbog svega ovoga, končaste gljive imaju značajnu primenu u biotehnologiji, poljoprivredi, ekologiji, medicini i raznim granama industrije doprinoseći tzv. kružnoj bio-ekonomiji (slika 1.1), dok njihovo relativno lako uzgajanje čini proizvodnju održivom (Meyer et al. 2020; Moreno-Giménez et al. 2023). Primena končastih gljiva nije ograničena na fermentaciju i upotrebu njihovih enzima, kiselina ili sekundarnih metabolita. Končaste gljive su našle primenu i u sledećim tehnologijama: razvoj „miko koža“ za industriju tekstila (Amobonye et al. 2023) i robotiku (Gandia and Adamatzky 2024), građevinskih materijala (Adamatzky and Gandia 2022; Shen et al. 2024), biosenzora (Singh et al. 2020), tretmana otpadnih voda (Ghosh et al. 2023), održive zamene za meso (Wikandari et al. 2023; Khan et al. 2024), itd. (slika 1.1) (Gandia et al. 2021; Jo et al. 2023). Obnovljivi materijali zasnovani na micelijumu imaju potencijal da zamene proizvode na bazi nafte kao što je plastika. Ovi micelijumski materijali, čisti ili kompozitni, bi se mogli koristiti kao toplotna i akustična izolacija, ili kao ambalaža (Wösten 2019).

Određene končaste gljive (iz tri razdela Ascomycota, Basidiomycota i Zigomycota) imaju sposobnost da razgrađuju zagađivače i toksine u životnoj sredini. One mogu razložiti širok spektar zagađivača, uključujući naftne ugljovodonike, pesticide, farmaceutska jedinjenja, teške metale i industrijske boje, čime pomažu u čišćenju zagađenih lokacija (Ghosh et al. 2023).

Končaste gljive su organizmi sa različitim ekološkim ulogama i dubokim uticajima na ekosisteme i ljudska društva. Razumevanje njihovog značaja i ekologije je od suštinskog značaja za očuvanje biodiverziteta, upravljanje ekosistemima i iskorišćavanje njihovih korisnih potencijala u različitim oblastima. Procenjuje se da će istraživanja na končastim gljivama postojati sve potrebna i važnija sa razvojem efekata globalnog zagrevanja (M. C. Fisher et al. 2018).

Trenutno poznavanje bilo kojih aspekata fiziologije končastih gljiva, daleko zaostaje za nivoom dostupnim za životinje ili biljke. Jedan od uzroka za to je nepostojanje primenljivih eksperimentalnih protokola kao i niz često nepremostivih prepreka da se tehnike i procedure istraživanja razvijene na životinjskim i biljnim ćelijama uspešno direktno primene na ćelije končastih gljiva.

Končasta gljiva korišćena u ovoj studiji je saprotrofna masna gljiva *P. blakesleeanus* sa veoma brzom stopom rasta (ispod 36 h od spora do stacionarne faze).



Slika 1.1. **Industrije koje profitiraju od metaboličkih kapaciteta končastih gljiva.** U centru slike je ilustrativni primer razgranatog micelijuma. Preuzeto i izmenjeno iz (Meyer et al. 2020).

1.1.1 *Phycomyces blakesleeanus*

P. blakesleeanus je končasta saprotrofna gljiva iz razdela Mucoromycota (klasa Mucoromycetes, red Mucorales, familija Phycomycetaceae) koja se smatra drevnom grupom gljiva. Molekularne filogenetske studije, zasnovane na sekvenciranju DNK, pozicioniraju Mucoromycota kao bazalnu grupu unutar carstva gljiva (Fungi), koja je filogenetski bliža životinjama nego biljkama (Wainright et al. 1993). Ekologija Mucoromycota je povezana sa biljkama, u vidu mikoriznih odnosa, endofita korenskog sistema ili kao uloge razlagača biljnog materijala (Spatafora et al. 2017). Mucoromycota je sestrinska grupa viših gljiva (Ascomycota i Basidiomycota), koje takođe karakterišu dominantni stilovi života vezani za biljke. Neki predstavnici su paraziti drugih gljiva, životinja i ljudi, ali u pitanju su oportunističke infekcije domaćina sa kompromitovanim imunološkim sistemom, a u nekim slučajevima se radi i o derivaciji iz saprobnog ekologije (Hoffmann et al. 2013). Mucorales je jedan od 3 reda iz razdela Mucoromycota koji je najčešće izolovana grupa gljiva jer su u pitanju brzorastući kolonizatori supstrata bogatih ugljenikom koji

se relativno lako uzgajaju. Infekcije izazvane organizmima iz reda Mucorales su progresivne i angioinvazivne (Cuvelier et al. 1998; Powers-Fletcher et al. 2016). Udisanje spora može dovesti do rinocerebralne i plućne bolesti kod odgovarajućeg domaćina (Sharma and Goel 2022). Mucorales uključuje i taksone koji uzrokuju retke, ali sve češće dijagnostikovane ljudske mikoze (npr. *Mucor sp.*, *Apophysomices sp.*) (Hoffmann et al. 2013). Kožna bolest se može razviti kao rezultat direktne inokulacije spora u traumatizovanu kožu, što može izazvati oštećenje tkiva i nekrozu. Sa druge strane, određeni taksoni iz reda Mucorales imaju blagotvorno dejstvo na čoveka kroz ranije pomenutu proizvodnju β -karotena, prirodnog antioksidanta koji ima veliku komercijalnu vrednost (upotrebom u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji) (Hoffmann et al. 2013; Naz et al. 2020).

P. blakesleeanus se obično nalazi u zemljištu, raspadajućem biljnom materijalu i drugim organskim supstratima u različitim vlažnim staništima širom sveta (slika 1.2a) (Cerdá-Olmedo and Lipson 1987). Kao i druge končaste gljive, *P. blakesleeanus* igra ključnu ulogu u procesima ekosistema kao što su razgradnja organskih jedinjenja, te kruženje ugljenika, azota i drugih esencijalnih elemenata. Na rast i razvoj *P. blakesleeanus* utiču različiti faktori životne sredine kao što su svetlost, temperatura, vlažnost i dostupnost hranljivih materija.

Životni ciklus *P. blakesleeanus* karakteriše polno i bespolno razmnožavanje koje je učestalije (Bergman et al. 1969). Bespolno razmnožavanje se dešava obrazovanjem i oslobađanjem spora iz sporangija, dok polno razmnožavanje uključuje spajanje specijalizovanih hifa da bi se formirale vrlo otporne zigospore, prilagođene da se odupru nepovoljnim uslovima sredine. Vegetativne spore su evolutivno prilagođene za efikasno širenje u velikom broju, a niska metabolička aktivnost im omogućava dugotrajno preživljavanje. Ipak, lepljive spore roda *P. blakesleeanus* se ne šire na velike udaljenosti jer zavise od sisara koji ih raznose, pre nego ptica, što pokazuje divergencija ostrvskih sojeva (Camino, Idnurm, and Cerdá-Olmedo 2015). Micelijum se širi radialno i simetrično od prvobitnog mesta klijale spore, brzinom od oko 2 cm/dan na 20°C (Bergman et al. 1969). Hife micelijuma su višejedarne končaste ćelije (većinski 10-20 μ m u prečniku) bez septi koje se odlikuju vršnim rastom i debelim ćelijskim zidom (Cerdá-Olmedo and Lipson 1987). Posebna karakteristika reda Mucorales je hitozanska priroda ćelijskog zida. Naime, zid pored hitina (25%), u velikoj meri sadrži i deacilovani oblik hitina, hitozan (Bergman et al. 1969). Tokom bespolnog razmnožavanja, iz micelijuma izrastaju vazdušne cenocitične strukture nalik stabiljci, sporangiofori, koji nose na svom vrhu krupne sporangije ($\varnothing$ ~500 μ m) (slika 1.2) sa haploidnim sporama (prosečne veličine 9 x 5 μ m) (Bergman et al. 1969). Sporangiofori su duge (> 10 cm) pojedinačne ćelije koje poseduju sposobnost reagovanja na različite spoljašnje stimulse: gravitaciju, ultraljubičasti (eng. ultraviolet - UV), vidljivi i infracrveni (eng. infrared - IR) deo elektromagnetnog spektra sa mogućnošću detektovanja jačine intenziteta i prostornog rasporeda svetlosti, zatim uočavanje i izbegavanje predmeta u blizini njihove zone rasta, mehaničko istezanje, pritisak, različite hemikalije/mirise, temperaturu itd. (Cerdá-Olmedo 2001; Ortega et al. 2021). Na ove nadražaje reaguju promenom pravca i brzine rasta (npr. rastući prema plavom delu spektra ili se odbijajući od nekog predmeta u blizini). Za razliku od sporangiofora, nije otkriven uticaj svetlosti na rast micelijuma. Međutim, svetlost kvantitativno utiče na nivo sinteze karotenoida tj. akumulaciju žuto-narandžastog pigmenta β -karotena i inicijaciju sporangifora (Bergman et al. 1969).



Slika 1.2. *Phycomyces blakesleeanus* a) *P. blakesleeanus* u prirodi na organskoj materiji. Vide se nezreli spongiofori sa žutim sporangijama i zreli sa crnim sporangijama. Preuzeto i izmenjeno od Christian Schwarz, <https://inaturalist.nz/observations/67963416>. b) *P. blakesleeanus* u Petrijevoj šolji (Ø 100 mm) na čvrstom medijumu, vide se zreli sporangiofori (4 dana stari) sa tamnim sporangijama na vrhu.

Zbog svojih jedinstvenih karakteristika i kratkog životnog ciklusa (uz kompletno sekvenciran genomom soja NRRL1555), *P. blakesleeanus* se više od jednog veka koristi kao model organizam u naučnim istraživanjima, najčešće pionirski u novim istraživačkim oblastima (Bergman et al. 1969; Cerda-Olmedo and Lipson 1987; Cerdá-Olmedo 2001). Najistaknutija karakteristika zbog koje je ova gljiva opsežno proučavana je izražena fototropna (Weiss and Weisenseel 1990) i antigravitropna (Galland 2014) reakcija džinovskih sporangiofora. Ova karakteristika ga je učinila vrednim model organizmom za proučavanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi fototropizma i cirkadijalnih ritmova kod gljiva. Odgovor na gravitaciju je mnogo sporiji nego na svetlost i zahteva prisustvo plutajućih lipidnih globula i proteinskih kristala vakuole. Upravo zbog svoje antigravitropske reakcije džinovskih sporangiofora i lakog gajenja, *P. blakesleeanus* je bio i model sistem za istraživanje jedinstvenih uslova u svemiru (Schneringer 1987), kako bi se razumela percepcija gravitacije i drugih signala u eukariotskoj ćeliji izloženoj mikrogravitaciji.

Sporangiofori su našli posebnu primenu i u elektrofiziologiji. Naime, isecanjem sporangiofora u nivou zone rasta, dolazi do spontanog formiranja citoplazmatskih kapi (CK), dinamičnih sistema okruženih membranom, koje se poslednjih 20 godina koriste kao model sistem za registraciju jonskih struja kod končastih gljiva (Živić et al. 2005; Živić et al. 2009; Križak et al. 2015). CK mogu da regenerišu ćelijski zid (Križak et al. 2015) a nedavno je pokazano da poseduju mitohondrije i jedra i da se membrana CK uspešno depolarizuje vanadatom (specifično blokira protonsku pumpu ćelijske membrane gljiva) što potvrđuje ćelijsku prirodu membrane CK (Stevanović et al. 2023).

Kao što su sporangiofori opsežno korišćeni u fotobiološkim istraživanjima, tako je micelijum *P. blakesleeanus* korišćen za istraživanje biosintetskog puta β -karotena. Određeni mutanti, kao i divlji soj gajen u posebnim uslovima, mogu proizvoditi velike količine β -karotena (do 10 mg/g

suve mase) (Cerdá-Olmedo 2001) zbog čega se ova gljiva svrstava među karotenoidne gljive. Svetlost, posebno plava svetlost je glavni pokretač karotenogeneze (Dzurendova et al. 2023). *P. blakesleeanus* pripada i takozvanim masnim gljivama. *P. blakesleeanus*, kao i končaste gljive iz nekih drugih taksonomskih grupa (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mortierella*), je sposoban da akumulira velike količine lipida/masti. Lipidi čine 20% suve težine micelijuma *P. blakesleeanus*, odnosno 41% kada se gaji pod određenim uslovima (Mehrotra and Nand 1970), a gliceridi, fosfolipidi i ergosterol (provitamin D2) su glavni sastojci. *P. blakesleeanus* je i izvor riboflavina (vitamin B2), piridoksina (vitamin B6), biotina (vitamin B7), niacina (vitamin B3 – prekursor koenzima NAD i NADP) i γ -linoleinske kiseline (Cerdá-Olmedo and Lipson 1987; Barrero, Oltra, and Poyatos 1996). Sisari ne sintetišu ovu kiselinu, ali je ona, kao i druge polinezasićene masne kiseline (vitamin F), neophodna u njihovoj ishrani. Metabolizmom γ -linoleinske kiseline se dobijaju fiziološki aktivna jedinjenja koja imaju blagotvorno dejstvo na snižavanje holesterola i prevenciju ateroskleroze (Horrobin 1992). *P. blakesleeanus* je i potencijalni izvor jestivog ulja (Cerdá-Olmeda and Avalos 1994). Lepeza različitih korisnih lipida i vitamina ga čine pogodnim eksperimentalnim modelom za proučavanje lipidnog metabolizma.

Nije poznato da *P. blakesleeanus* proizvodi toksine, niti da je patogen za čoveka, životinje ili biljke. Zapravo, sve toplokrvne životinje imaju prirodnu zaštitu od ove gljive zbog činjenice da je maksimalna temperatura rasta *P. blakesleeanus* 30°C (Cerdá-Olmedo 2001; Camino, Idnurm, and Cerdá-Olmedo 2015).

P. blakesleeanus ima značaj kao model organizam za naučna istraživanja, kako u ekologiji gljiva kao razlagač hranljivih materija, tako i u fiziološkim i biotehnološkim istraživanjima. Njegova sposobnost da razgradi organske supstrate i njegov brz rast čine ga obećavajućim kandidatom za različite bioprocese.

1.2 Fiziologija i metabolizam končastih gljiva

Fiziologija i metabolizam končastih gljiva su kompleksni sistemi ogromnog broja povezanih procesa koji upravljaju njihovim rastom, razvojem i interakcijom sa okolinom.

U končastim gljivama, kao i svim eukariotskim ćelijama, se odigravaju metabolički procesi bitni za održavanje ćelijskih funkcija i rasta, kao što su glikoliza, ciklus trikarboksilnih kiselina, oksidativna fosforilacija i pentozofosfatni put. Primarni metabolizam obezbeđuje energiju u obliku adenozin tri fosfata (ATP), nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), flavin adenin dinukleotid (FADH₂) i gradivne blokove, kao što su aminokiseline, nukleotidi i lipidi, potrebne za ćelijske aktivnosti i sintezu biomase. Istraživanje energetskog i metabolizma lipida *P. blakesleeanus* nije tako opsežno proučavano u poređenju sa drugim aspektima njihove biologije, kao što su fotobiologija i sporulacija. Istraživanja u ovoj oblasti mogu poboljšati naše razumevanje fiziologije gljiva, njihovog metabolizma i strategija prilagođavanja.

Sposobnost prilagođavanja promenljivoj dostupnosti hranljivih materija kojima su končaste gljive izložene ukazuje na izuzetnu metaboličku fleksibilnost ovih organizama. Masne gljive su sposobne da transformišu širok spektar supstrata u lipide i akumuliraju ih i do 70% svoje mase. Lipidi služe kao bitne komponente ćelijskih membrana, molekuli za skladištenje energije i signalni molekuli. Glavne klase lipida pronađene u *P. blakesleeanus* su: gliceridi, fosfolipidi, steroli i karoteni

(Bergman et al. 1969). Oleinska (27%), γ -linoleinska (23%) i palmitinska kiselina (21%) su najzastupljenije masne kiseline u micelijumu *P. blakesleeanus*, a slede linolna (15%) i stearinska (4,5%) kiselina. U zavisnosti od uslova gajenja i starosti micelijuma količina lipida i odnos pojedinih masnih kiselina se razlikuje (Cerdá-Olmeda and Avalos 1994). Na primer, u starijim kulturama su prisutne dugolančane (preko 22 ugljenika u lancu) zasićene i nezasićene masne kiseline. U odnosu na masne kiseline, steroli čine oko 0,5% suve težine, dok koncentracija β -karotena dosta varira od uslova gajenja.

Ćelijski metabolizam je složen, integrisan set procesa koji je podržan ključnim organelama, kao što su **lipidne kapi** (LK) i **mitohondrije**, koje učestvuju u brojnim energetske i signalnim mehanizmima. Vizualizacija dinamike LK i mitohondrija u fiziološkim i patološkim stanjima u nativnom okruženju bi omogućila bolje poznavanje njihove fiziologije.

Neutralni lipidi (triacilgliceroli (TAG) i steril estri (SE)) predstavljaju inertni oblik skladištenja masnih kiselina (MK) deponovanih u LK i mobilisu se da obezbede metaboličku energiju ili gradivne blokove membrana. Lipidne kapi (sinonimi: lipidna tela, uljane kapi) su visoko filogenetski konzervirane organele u eukariotskim ćelijama (Tauchi-Sato et al. 2002) koje igraju važnu ulogu u ćelijskom metabolizmu. Poznato je da LK koordinišu promet i potrošnju lipida u različite svrhe u ćeliji, kao što su proizvodnja energije, zaštita od oksidativnog stresa ili biogeneza membrana tokom brzog ćelijskog rasta (Jarc and Petan 2019). U fiziologiji končastih gljiva LK su posebno zanimljive zbog pokazane uloge lipidnih rezervi u rezistenciji na fungicide (W. Chang et al. 2015) kao i zbog uloge u razmeni energenata između biljke i gljive koje se nalaze u mikoriznom odnosu (Bago et al. 2002). Štaviše, ćelije kvasca modifikovane tako da u potpunosti nemaju lipidne kapi, izuzetno su podložne raznim stresovima (Petschnigg et al. 2009) što u celini pokazuje da studije na LK mogu potencijalno dovesti do novih antifungalnih tretmana. Tokom uzajamno korisne interakcije gljiva-biljka, gljive transportuju azot do biljaka i zauzvrat dobijaju do 30% organskih jedinjenja ugljenika koje sintetišu biljke (Smith and Read 2008). Poznato je da su organski molekuli koji se šalju iz biljke u gljive lipidi (Luginbuehl et al. 2017; Jiang et al. 2017) i da se lipidne kapi formiraju u velikim količinama u hifi u blizini kontaktnog područja sa biljkom (Keymer et al. 2017). Lipidne kapi su kod ljudi od značajnog medicinskog interesa zbog svoje uloge u poremećajima vezanim za metabolizam lipida, kao što su gojaznost i dijabetes tipa II (T. C. Walther and Farese 2009), kao i Alchajmerova i Parkinsonova bolest, i neki oblici kancera (Murphy 2012). Shvatanje njihovog značaja u normalnom ćelijskom metabolizmu kao i u broju patologija je u suprotnosti sa relativno oskudnim znanjem o fiziologiji LK (T. C. Walther and Farese 2009; Reue 2011; Y. Yu et al. 2017). Sigurno je da LK igraju značajnu ulogu u energetske homeostazi, posebno u metabolizmu lipida, skladištenju i transportu, ali se dubinsko razumevanje LK kao organele još uvek razvija (T. C. Walther, Chung, and Farese 2017; Olzmann and Carvalho 2018).

Lipidne kapi se sastoje od hidrofobnog jezgra, pretežno od TAG (sastavljenih od tri lanca masnih kiselina vezanih za glicerol) i SE okruženih fosfolipidnim monoslojem (Thiam and Ikonen 2021). Na površini njihove jednoslojne membrane nalaze se proteini sa strukturnim i regulatornim funkcijama. Lipidne kapi su takođe mesto za skladištenje β -karotena (Bu et al. 2022). Formiraju se *de novo* pupljenjem endoplazmatičnog retikuluma, a ređe rastom i deljenjem već postojećih LK na manje (Wilfling et al. 2014). Ostalo je nejasno da li LK mogu spajati ili možda obrazovati klastere u nekim, svakako retkim, slučajevima (Boström et al. 2005). Enzimi neophodni za sintezu i razgradnju lipida su visoko konzervirani među različitim taksonima, za razliku od regulatornih

proteina LK. Na primer, familija perilipina, proteina sa glavnom ulogom u regulaciji LK kod životinja je odsutna kod mnogih gljiva (Bickel, Tansey, and Welte 2009). Nedavno je funkcionalnim skriningom identifikovan skup novih proteina koji su uključeni u regulaciju biogeneze LK kod končastih gljiva, čiji gubitak funkcije dovodi do nepravilne biogeneze, posebno u pogledu broja i veličine LK (Al Mamun, Reza, and Islam 2023). Navedeni rad je pokazao da gljive razvijaju dodatne proteine za regulaciju LK što znači da su LK kod gljiva mnogo bitnije nego što se pretpostavljalo.

Veličina LK znatno varira između različitih tipova ćelija (Thiam and Beller 2017), pa tako mogu dostići prečnik od 100 μm u sisarskim adipocitima (Suzuki et al. 2011), dok su kod kvasaca u proseku manje od 1 μm (Thiam, Farese, and Walther 2013). U većini ćelija su uglavnom male i mnogobrojne, 1-20 μm u prečniku (Thiele and Spandl 2008). Takođe, njihova veličina i broj varira i u okviru iste ćelije i prosečne vrednosti se mogu menjati kao odgovor na razne signale (Guo et al. 2009). Lipidne kapi su izuzetno pokretne organele i kod končaste gljive *Ustilago maydis* je ustanovljeno da koriste mikrotubularni transport, pre nego aktinski (Meadows 2012).

Lipidne kapi su dinamične strukture koje formiraju funkcionalne interakcije sa molekulima i drugim organelama uključenim u lipidni i energetski metabolizam (Meyers, Weiskittel, and Dalhaimer 2017). Pošto LK nisu povezane direktno sa vezikularnim transportom, transfer lipida se dešava putem bliskih fizičkih interakcija između LK i drugih organela (mitohondrija, peroksizoma, endoplazmatičnog retikuluma i lizozoma, vakuolom kod kvasaca) (Renne and Hariri 2021; Barbosa, Savage, and Siniossoglou 2015). Pokazano je da u uslovima gladovanja dolazi do selektivnog i efikasnog transfera MK iz LK u mitohondrije radi β -oksidacije, pri čemu mitohondrije i lipidna tela formiraju kontaktna mesta radi isporuke lipida mitohondrijama (Rambold, Cohen, and Lippincott-Schwartz 2015). U nedostaku glukoze, masne kiseline se mobilisu iz LK i razgrađuju putem β -oksidacije u mitohondrijama (kod sisara) ili peroksizomima (kod biljaka i kvasaca) kako bi se sintetisao ATP i metabolički intermedijeri (Rambold, Cohen, and Lippincott-Schwartz 2015; Barbosa, Savage, and Siniossoglou 2015). Na ovaj način se izgladnele ćelije obezbeđuju energijom. Prenos masnih kiselina između LK i mitohondrija je dvosmeran i obavljaju ih dve različite populacije mitohondrija, perikapljivne mitohondrije (PKM), vezane za LK, i citoplazmatske mitohondrije (CM). Prenosom masnih kiselina iz mitohondrija u LK dolazi do sinteze TAG i zaštite mitohondrija i ćelije od lipotoksičnosti (Thiam, Farese, and Walther 2013). Lipidne kapi služe kao puferski sistemi za višak lipida štiteći ćeliju i druge organele od lipotoksičnosti koja se dešava kao posledica neravnoteže između unosa, skladištenja i korišćenja lipida.

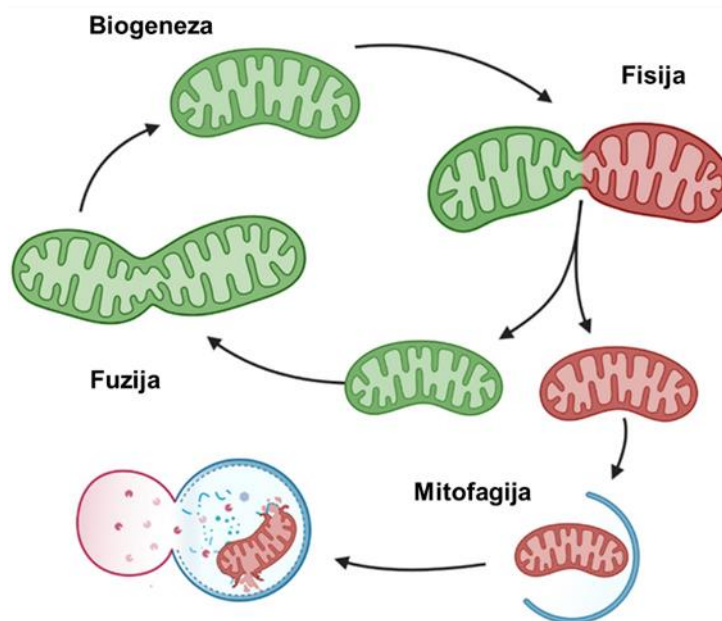
U slučaju smeđeg masnog tkiva, Benador i saradnici su primetili da izolati PKM imaju povećanu oksidaciju piruvata, povećan kapacitet sinteze ATP-a i podržavaju ekspanziju LK putem sinteze TAG, dok CM prolaze kroz oksidaciju masnih kiselina (Benador et al. 2018). Mitohondrije koje su u kontaktu sa LK imaju povišen bioenergetski kapacitet, smanjen nivo β -oksidacije i sporije cikluse fuzije i fisije (Wang et al. 2011). Zanimljivo je da ove dve populacije ostaju razdvojene jer PKM imaju svoju jedinstvenu dinamiku fuzije i fisije, sprečavajući da se PKM stapa sa CM i homogenizuje mitohondrijsku populaciju. Heterogenost mitohondrija može biti od velike prednosti za ćeliju, posebno zato što omogućava metaboličku fleksibilnost u pogledu korišćenja goriva i reagovanja na stres (Ngo et al. 2021).

Mitohondrije su izuzetno dinamične organele obavijene dvema membranama koje imaju različite funkcije. Spoljašnja glatka membrana ima funkciju u signalizaciji a unutrašnja obrazuje nabore,

kriste, i mesto je respiracije i oksidativne fosforilacije. Mitohondrije su primarna mesta proizvodnje ATP-a koji se koristi kao izvor hemijske energije. Takođe imaju ključnu ulogu u β -oksidaciji masnih kiselina, sintezi intermedijarnih metabolita i homeostazi kalcijuma (Ca^{2+}). Mitohondrije rastu ugradnjom novosintetisanih materijala u postojeće organele koje se na kraju dele. Njihovo kretanje je usmereno interakcijama sa aktinskim filamentima i/ili mikrotubulama, u zavisnosti od organizma (Boldogh and Pon 2006; Fuchs et al. 2002).

Smatra se da je *P. blakesleeanus* striktno aeroban organizam (Cerdeira-Olmedo and Lipson 1987). Respiratorni lanac gljiva je kompleksniji nego kod životinja jer sadrži dodatne enzimske komplekse kao što je alternativna oksidaza (AOX) koja nije osetljiva na cijanid (Stanić et al. 2013). *P. blakesleeanus* spada u gljive koje imaju mogućnost alternativne respiracije.

Mitohondrije imaju sposobnost dinamičkih promena oblika. Mogu se izdužiti ili fragmentisati kroz procese fuzije i fisije koji su neophodni za održavanje mitohondrijalne funkcije i bioenergetskog kapaciteta, dok se putem mitofagije vrši kontrola kvaliteta organela (slika 1.3) (Westermann 2012). Za normalno funkcionisanje mitohondrija i održavanje fiziološke homeostaze, važna je fina ravnoteža između fuzije i fisije (Green, Hossain, and Eckmann 2022). Tokom fuzije dolazi do izduživanja i fizičkog spajanja dve ili više različitih mitohondrija, dok se prilikom fisije mitohondrije fragmentišu (Zemirli, Morel, and Molino 2018). Fuzija generiše proširenje mitohondrijalne mreže i omogućava efikasno mešanje/razmenu metabolita, enzima i DNK kroz čitavu mrežu mitohondrija, optimizujući funkciju mitohondrija i sprečavajući nakupljanje mutacija tokom starenja. Fisija je neophodna za pokretljivost mitohondrija, mitohondrijalno nasleđivanje u G2/M fazi ćelijskog ciklusa i igra važnu ulogu u uklanjanju oštećenih organela autofagijom (Twig, Hyde, and Shirihai 2008). Kod fluorescentno obeleženih mitohondrija u ćelijama sisara se ustanovilo da podela često generiše dve neujednačene organele, jednu sa visokim i drugu sa smanjenim membranskim potencijalom (Twig et al. 2008). Ove druge imaju manju verovatnoću za ponovnu fuziju sa mitohondrijalnom mrežom, često bivaju lišene mitohondrijalne DNK i drugih bitnih komponenti respiratornog sistema, postaju disfunkcionalne i bivaju uklonjene iz ćelije (Twig et al. 2008). Može se zaključiti da fisija praćena selektivnom fuzijom obezbeđuje mehanizam za segregaciju oštećenih i disfunkcionalnih mitohondrija, čime doprinosi kontroli kvaliteta mitohondrija. Broj, veličina i oblik mitohondrija mogu varirati u zavisnosti od tipa ćelija, razvojne faze, metaboličke aktivnosti i fizioloških uslova. Mitohondrije mogu imati različite oblike, uključujući sferne, tubularne i filamentozne. Tubularna morfologija konstatnog prečnika je uobičajena i vidi se u mnogim tipovima ćelija u normalnim fiziološkim uslovima (Rafelski 2013). Tubularne mitohondrije mogu biti izdužene ili blago zakrivljene. Mitohondrije mogu formirati međusobno povezane mreže izduženih tubula, posebno u ćelijama sa visokim energetskeim zahtevima. Ove mreže olakšavaju razmenu materijala između mitohondrija i podržavaju efikasnu proizvodnju energije (Westermann 2012). U odnosu na preovlađujuć oblik mitohondrija u ćeliji, govori se o „intermedijarnom“ morfološkom tipu populacije mitohondrija kada su u ćeliji podjednako prisutne i tubularne i sferne mitohondrije kao rezultat ravnoteže procesa fuzije i fisije, zatim „filamentozni“ tip kada u ćeliji preovladavaju izdužene mitohondrije koje mogu hiperfuzionisati i „fragmentisan“ tip kada preovladavaju sferne mitohondrije različitih veličina (Tronstad et al. 2014).



Slika 1.3. **Mehanizam dinamike mitohondrija.** Morfologija mitohondrija, prikaz fuzije i fisije. Izmenjeno i preuzeto iz (C. R. Fisher et al. 2022).

Kod gljiva, mitohondrijalna morfologija može uveliko varirati u zavisnosti od specifične vrste gljiva, razvojne faze, uslova okoline i metaboličkih zahteva. Mitohondrije končastih gljiva su opisane kao tipično tubularne organele orijentisane prema uzdužnoj osi hife, ali veoma dinamične, čiji su oblik i distribucija podložni stalnim promenama (Suelmann and Fischer 2000; Fuchs et al. 2002; Westermann and Prokisch 2002). Konfokalnom mikroskopijom je ustanovljeno da su u rastućem vrhu hifa mitohondrije uglavnom u vidu izduženih tubula, zbijene i paralelno orijentisane (Fischer-Parton et al. 2000). U subapikalnom regionu su ređe raspoređene i u vidu kraćih tubula. Upotreba potenciometrijskih boja, kao što je rodamin 123, omogućava merenje potencijala mitohondrijalne membrane, a intenzitet bojenja rastućih hifa pokazuje da su mitohondrije na vrhu hifa veoma aktivne. Iako se čini da ovo odražava visoke energetske potrebe povezane sa apikalnim rastom, jedna studija sugerise da mitohondrije na rastućem vrhu troše malo kiseonika (mala proizvodnja ATP) (Natalia N. Levina and Lew 2006). Izgleda da je glavna uloga ovih mitohondrija u sekvestraciji Ca^{2+} i održavanju visokog gradijenta Ca^{2+} potrebnog za rast vrha (Silverman-Gavrila and Lew 2002). Kod *Neurospora crassa*, zapreminski udeo citoplazme koji zauzimaju mitohondrije je najveći u regionu 5 do 15 μm iza vrha (Lew 1999). Merenje respiratorne aktivnosti duž hife kiseoničnim mikrosenzorom je prvo primećena 15 μm iza vrha (Lew and Levina 2004). I kod gljiva izdužene tubularne mitohondrije mogu formirati razgranate mreže kroz citoplazmu. Veličina mitohondrija može se dinamički menjati kao odgovor na metaboličku aktivnost i uticaje okoline. Mitohondrijska mreža se kod kvasca fragmentira i formira mnogo malih, okruglih mitohondrija po ulasku u stacionarnu fazu (Westermann 2012).

Održavanje morfologije i distribucije mitohondrija zahteva aktivan transport organela duž citoskeleta i zavisi od događaja fuzije i fisije membrane mitohondrija (Westermann and Prokisch 2002). Mitohondrije se transportuju različitim citoskeletnim elementima kod različitih gljiva. Dok je kod kvasca i končaste gljive *Aspergillus sp.* kretanje mitohondrija zavisno od aktina, kod končaste gljive *Neurospora sp.*, zapravo većine gljiva i animalnih ćelija, ono je zavisno od

mikrotubula. U životinjskim ćelijama kao što su neuroni, mikrotubule su primarno sredstvo za transport mitohondrija na velike udaljenosti, dok je aktinski citoskelet neophodan za kratka rastojanja (Boldogh and Pon 2006).

Promene u morfologiji i funkciji mitohondrija mogu uticati na sposobnost gljiva, virulenciju i osetljivost na antifungalne agense (Verma, Shakya, and Idnurm 2018; Black et al. 2021). Informacije o biologiji LK i mitohondrija kod gljiva, kao što su veličina, distribucija i dinamika formiranja, i njihova uloga u fiziologiji ćelije, važne su sa fiziološke, ekološke, medicinske i biotehnološke tačke gledišta.

1.2.1 Odgovor končastih gljiva na nedostatak azota i promenu temperature

Končaste gljive mogu da koriste širok spektar izvora ugljenika i azota za rast i metabolizam. Regulacija metabolizma ugljenika i azota je usko povezana sa rastom, razvojem i proizvodnjom sekundarnih metabolita (Mukherjee, Mishra, and Deshmukh 2017). Azot je neophodan za sintezu polipeptida i nukleinskih kiselina i ćelijski rast. Kod mnogih organizama, rast u uslovima delimičnog ili potpunog nedostatka azota utiče na preraspodelu ugljenika iz anaboličkih puteva koji su inhibirani usled nedostatka supstrata koji sadrži azot, u one kojima azot nije potreban i izaziva akumulaciju neutralnih lipida u LK (Aguilar et al. 2017). Poznato je da ograničenje azota izaziva autofagiju kod končastih gljiva (Y. Chen et al. 2018), što dovodi do promena u metabolizmu lipida i povećanja broja LK (Weng et al. 2014; Aguilar et al. 2017). U zavisnosti od metaboličkog stanja ćelija, broj, veličina, sastav i distribucija LK se mogu menjati (Olzmann and Carvalho 2019). Njihova povećana biogeneza se javlja kao odgovor na restrikciju hranljivih materija, ali i na oksidativni stres (Cabodevilla et al. 2013).

U uslovima gladovanja izazvanog nedostatkom azota, mikroalge povećavaju skladištenje ugljenika u obliku LK, istovremeno smanjujući fotosintezu i na kraju prekidajući rast (Munz et al. 2020). Kada je fitopatogena gljiva *Ustilago maydis* uzgajana u odsustvu azota, došlo je do velike akumulacije LK (Aguilar et al. 2017). Najzastupljenije masne kiseline su bile palmitinska, linolna i oleinska i bile su sintetisane *de novo*. Što se tiče veličine i broja LK, kontrolne ćelije su sadržale veliki broj malih LK (prosečne veličine 0,3 μm), dok se u izgladnjivanim ćelijama broj LK smanjio ali se njihova veličina povećala (1,2 μm). Kod mnogih organizama, rast u uslovima odsustva azota utiče na tok i distribuciju ugljenika. Dešava se lipogeneza, pri čemu se sintetišu TAG koji se akumuliraju i skladište u LK (Aguilar et al. 2017). Da bi se stimulisala akumulacija lipida, uglavnom se koristi smanjenje ili potpuno uklanjanje izvora azota.

Kada ćelije imaju izobilje hranljivih materija, MK se akumuliraju u LK. Tokom izgladnjivanja dolazi do transfera MK u mitohondrije radi proizvodnje ATP putem oksidativne fosforilacije, uključujući MK uskladištene u LK (Finn and Dice 2006). Izgladnele ćelije koriste prvenstveno LK kao kanal za snabdevanje mitohondrija sa MK za β -oksidaciju. Postoje dva mehanizma za mobilizaciju MK iz LK. Prvi je putem lipofagije. Drugi je lipolitička potrošnja LK gde citoplazmatske neutralne lipaze direktno hidrolizuju TAG na površini LK (Zechner 2015). Transfer MK iz LK u mitohondrije zahteva blizak kontakt mitohondrija sa LK. Pored ovoga, pokazalo se da je potrebna i fuzija mitohondrija za distribuciju i oksidaciju prenesenih MK (Rambold, Cohen, and Lippincott-Schwartz 2015). Autofagija izazvana gladovanjem je pospešivala nakupljanje novih MK u LK povećavajući broj LK tokom vremena (Rambold, Cohen,

and Lippincott-Schwartz 2015). MK koje se u većoj količini oslobode u citoplazmu, a ne preusmere se odmah u organele, mogu izazvati lipotoksičnost ćelije, kroz nastanak štetnih bioaktivnih lipida ili poremećaj integriteta mitohondrijalne membrane (Unger et al. 2010). U nedavnoj studiji je pokazano da u uslovima nedostatka azota, u masnoj končastoj gljivi *M. circinelloides*, AMP deaminaza (AMPD) pokreće akumulaciju lipida utičući na koncentraciju unutarćelijskog adenozin monofosfata (AMP) (Li et al. 2023). Iako AMPD igra ulogu ključnog regulatora u azotnom gladovanju i metabolizmu lipida kod masnih gljiva, akumulacija lipida nije u potpunosti zavisna od AMPD što ukazuje da je ispitivani fenomen regulisan višestrukim kompleksnim mehanizmima.

U ćelijama pod stresom, LK održavaju energetske i redoks homeostazu i štite od lipotoksičnosti. Njihova mobilnost i dinamične interakcije sa mitohondrijama omogućavaju efikasnu isporuku MK za optimalnu proizvodnju energije.

U stresnim uslovima, kao što su nedostatak hranljivih materija, oksidativni stres ili promene u energetskim zahtevima ćelija, mitohondrije mogu da pretrpe dinamične promene oblika kao deo njihovog adaptivnog odgovora. U uslovima blagog stresa, mitohondrije se fuzionišu formirajući visoko povezane tubularne mreže (Zemirli, Morel, and Molino 2018). Sa druge strane, pri oksidativnom stresu, mitohondrije podležu intenzivnoj fisiji, dobijaju sferičan oblik (mitosfere) i postaju hiperpolarisane (Menges et al. 2017). Slična morfologija je zapažena i kod ćelija u procesu ćelijske smrti (Javadov, Chapa-Dubocq, and Makarov 2018; Cereghetti, Costa, and Scorrano 2010). Tokom gladovanja, u sisarskim ćelijama, dolazi do povećanja nivoa cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) što dalje aktivira cAMP zavisnu protein kinazu (PKA) koja inhibira fisiju mitohondrija kroz fosforilaciju fisionog proteina Drp1 (Gomes, Benedetto, and Scorrano 2011; Rambold et al. 2011). Inhibicija fisije dovodi do izduživanja mitohondrija koje su pošteđene od zahvatanja fagoforom i naknadne degradacije. Dakle, usled stresa uzrokovnog gladovanjem, mitohondrije se hiperfuzionišu i izdužuju iz razloga što su duže mitohondrije zaštićene od degradacije i povećana im je aktivnost ATP sintaze, čime se optimizuje sinteza ATP-a u uslovima odustva nutrijenata i povećava se stopa preživljavanja ćelija (Gomes i Scorrano, 2011).

Globalno zagrevanje i sa time povezane promene životne sredine utiču na različite načine na sve žive organizme. Temperatura direktno utiče na brzinu biohemijskih reakcija i proizvodnju ATP-a, a kada je iznad fizioloških granica može doći do oštećenja ćelijskih struktura i funkcija (Slimen et al. 2014). Temperatura je jedan od najkritičnijih faktora koji utiče na rast i reprodukciju gljiva. Većina gljiva su mezofili i rastu na temperaturama u rasponu od 5°C do 35°C (Dix and Webster 1995). Sposobnost preživljavanja na većim temperaturama je jedinstvena karakteristika termofilnih i termotolerantnih gljiva, pa tako svi humani patogeni imaju sposobnost rasta na 37°C. Oportunistički patogen imunokompromitovanih ljudi, *Aspergillus fumigatus* je saprotrofna termotolerantna končasta gljiva koja je sposobna za brz rast na 37°C i toleriše temperature do 60°C, što je gornji temperaturni limit za eukariotske organizme (Swu Jane Lin, Schranz, and Teutsch 2001; Tansey and Brock 1972). *P. blakesleeanus* pripada mezofilnim gljivama i može preživeti u rasponu od 0°C do 30°C, sa najoptimalnijim rastom standardne kulture na 22-23°C (Cerdá-Olmedo and Lipson 1987; Camino, Idnurm, and Cerdá-Olmedo 2015). Na temperaturi od 27°C rast sporangiofora naglo opada.

Mitohondrije su najvažniji izvor toplote u ćelji, uglavnom zbog aktivnosti oksidativne fosforilacije (Clarke and Pörtner 2010) i kao posledicu mitohondrijalnog metabolizma, imaju temperaturu do 15°C višu od sredine kojoj su ćelije izložene (Terzioglu et al. 2023). Elektronska mikroskopija je

pokazala da su mitohondrije u mioblastima izložene toplotnom stresu (5°C više od optimalnih 37°C) imale dominantno sferičan oblik i da je ovaj efekat uticao na smanjenje njihovog broja, kao i na smanjenje membranskog potencijala (Lu et al. 2023). Nasuprot efektu na mitohondrije, ista povišena temperatura promovira akumulaciju LK u preadipocitima (Y. Huang et al. 2021).

Nedavna studija je pokazala da ne samo pečurke, već i končaste gljive i kvasci mogu održavati hladniju temperaturu od okoline procesima evaporacije/isparavanja, sugerirajući da je hipotermija opšta karakteristika carstva gljiva (Cordero et al. 2023). Sa druge strane, sposobnost nekih gljiva da toleriraju više temperature predstavlja ozbiljan problem za zdravlje ljudi, s obzirom na to da bi se kao rezultat klimatskih promena mogle pojaviti nove patogene vrste gljiva (Casadevall, Kontoyiannis, and Robert 2019).

1.2.2 Efekti selenita na končaste gljive

Selen (Se) je kao metaloidni mikronutrijent neophodan za ljude i životinje, dok biljkama i gljivama nije neophodan. Selen je u biološkim sistemima glavna komponenta selenoenzima, kao što je glutathion peroksidaza koja štiti ćelije od oksidativnog oštećenja (Čertík et al. 2013). Značajan je u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa, regulaciji funkcije štitne žlezde, nervnog, reproduktivnog i imunog sistema (Rayman 2012; Tinkov et al. 2020). Smatra se i da dovoljan unos Se usporava starenje i da u kombinaciji sa β -karotenom pojačava imuni odgovor ljudi (Wood et al. 2000; Birringer, Pilawa, and Flohé 2002). Selen može da zameni sumpor u selenoamino kiselinama (selenometionin, selenocistein, selenocistin), jer se vezuje na sličan način, i inkorporira se u vitalne selenoproteine, kao što je glutathion peroksidaza, koji su neophodni za normalan rast i razvoj (Rahmanto and Davies 2012; Guignardi and Schiavon 2017). Katalitička aktivnost ovih selenoproteina je veća nego ortologa sa sumporom.

Dostupnost i biološka aktivnost Se zavise od njegove doze i hemijskog oblika (Weekley and Harris 2013). U količinama u tragovima, selen povećava antioksidativni kapacitet u velikom broju selenoproteina, dok je u višim koncentracijama toksičan zbog svojih prooksidativnih efekata kao što su oksidacija proteinskih tiola i stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (Spallholz, Palace, and Reid 2004). Selen se u prirodi nalazi u četiri oksidaciona stanja, u obliku selenida (-2), elementarnog selen (0), selenita (+4) i selenata (+6) (Barceloux 1999). Selenit i selenat pokazuju toksične efekte zbog svoje rastvorljivosti i dostupnosti (Perrone, Monteiro, and Nunes 2015), zbog čega je transformacija selenskih oksidacija u elementarni Se (0) važna za detoksikaciju i biogeohemijski ciklus (Werkneh, Gebretsadik, and Gebru 2023). Elementarni Se je nerastvorljiv, inertan i u malim koncentracijama netoksičan za ljude i životinje (Khubulava et al. 2019; Werkneh, Gebretsadik, and Gebru 2023). Međutim, koncentracija Se u nekim zemljištima je niska, posledično i u hrani. Stoga postoje preporuke da se poveća unos Se kroz dodatke ishrani kod onih ljudi koji imaju nedovoljan unos Se (Rayman 2012).

Končaste gljive su jedan od glavnih puteva za ulazak Se u ekosisteme i sposobne su da koncentrišu Se u micelijumu (Falandysz 2008). Neke gljive uspešno usvajaju neorganske oblike Se kao što su seliniti i selenati i pretvaraju ga u organski oblik koji je manje toksičan kroz procese redukcije, metilacije i oksidacije Se (Sabuda et al. 2022). Pored toga, gljive su jednostavne za manipulisanje i prirodno bez selenoproteina kodiranih u genomu (Mariotti et al. 2019). Nedavno je pokazano da *P. blakesleeanus* može transformisati toksični selenit redukujući ga do nerastvorljivih i

neškodljivih elementarnih nanočestica Se (eng. skr. SeNPs) (Žižić et al. 2022), što ih čini jednim od malobrojnih gljiva za koje je dosad pokazano da imaju ovu sposobnost (H. Zhang et al. 2019; Žižić et al. 2022). Međutim njihova sposobnost redukcije ne znači istovremeno i njihovu toleranciju na oksidaciju Se (Gharieb, Wilkinson, and Gadd 1995; Wadhwani et al. 2016). Transformacija se dešava preko selenodiglutationa ili selenodicisteina. Nanočestice Se imaju jaka antimikrobna, antikancerska, antiinflamatorna i antioksidativna svojstva (G. Huang et al. 2018; Hernández-Díaz et al. 2021). Pokazalo se da su ovi dobri efekti zavisni od veličine pa tako čestice manje od 100 nm imaju bolju antioksidativnu aktivnost (Avendaño et al. 2016).

Efekat selenita na lipidni metabolizam i metabolizam amino kiselina je ispitivan u ćelijama kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida utilis* (Kieliszek et al. 2019). Korišćen u koncentraciji od 20 mg/L, Se^{4+} je doveo do povećanja sadržaja nezasićenih masnih kiselina i povećane količine asparginske kiseline, lizina, leucina i glutaminske kiseline u odnosu na kontrolu. Takođe, Se^{4+} je uticao na morfologiju ćelija. Prisustvo Se^{4+} je inhibiralo proliferaciju ćelija i deformisalo ćelijski zid i membranu. Došlo je do smanjenja pritiska u ćelijama, neravnomernog zadebljanja i savijanja ćelijskog zida. Još jedna studija na kvascu *C. utilis* je pokazala da prisustvo Se^{4+} inhibira rast ćelija ali paralelno izaziva povećanje biosinteze glutathiona (G. Zhang et al. 2019). Autori sugerišu da je Se^{4+} smanjio protok ugljenika ka formiranju ćelijske mase, ali da je povećao protok ka aminokiselinama za biosintezu glutathiona i srodnih proteina. Istraživanja na kvascima obogaćenih Se su pokazala da se efekat Se^{4+} zasniva na njegovoj inkorporaciji u proteine zamenjujući sumpor, čime utiče na njihovu strukturu i katalitičke funkcije (Kieliszek, Błazejak, and Kurek 2017). Zaključak studija uticaja Se na različitim rodovima kvasaca je da Se^{4+} izaziva stresno stanje i da za posledicu ima metaboličke poremećaje koji utiču na rast, morfološke strukture i sadržaj lipida.

Kada su u pitanju mitohondrije, pokazalo se da visoke koncentracije selenita ($\geq 10 \mu\text{M}$) i duža vremena izlaganja ($\geq 20 \text{ h}$) kod PLHC-1 ćelija (ćelijska linija hepatoma ribe) dovode do povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i indukuju značajan gubitak potencijala mitohondrijalne membrane (Selvaraj et al. 2013). Selen remeti funkciju mitohondrija što dovodi do povećanja unutarćelijskih ROS. Pokreće se mitohondrijalni apoptotski put i dolazi do smrti ćelija. Oštećenje potencijala mitohondrijalne membrane je rani znak i osetljiv marker citotoksičnosti. Kada su membrane mitohondrija oštećene, one propuštaju vodonik peroksid, hidroksilne radikale i superoksid anjone (Gupta 2003). Akumulirani slobodni radikali oksidiraju fosfolipide ćelijske membrane i druge makromolekule što rezultira gubitkom potencijala mitohondrijalne membrane. Ovo dalje vodi gubitku strukturnog integriteta ćelije i smrti. Kada su hepatociti kalifornijske pastrmke bili izloženi koncentracijama Se^{4+} od 100 i 200 μM , vitalnost ćelija je bila smanjena 20-40% (Misra, Kwong, and Niyogi 2012). Povećani oksidativni stres je rezultirao apoptozom. Više studija je potvrdilo da izloženost i neorganskom i organskom Se povećava oksidativni stres i programiranu ćelijsku smrt u različitim sisarskim ćelijskim linijama: humanim kancerskim ćelijama prostate (Xiang, Zhao, and Zhong 2009), ćelijskim linijama limfoma (Last et al. 2006), humanim ćelijama hepatoma H2pG2 (Celik et al. 2004), NB4 ćelijskoj liniji humane akutne promijelocitne leukemije (Guan et al. 2009).

Iako je mehanizam ćelijske smrti izazvane selenitom zavisna od doze i dužine izlaganja, najverovatnije i drugi faktori imaju udela, kao što su različiti sredinski faktori ili različiti tipovi ćelija koji na različite načine mogu metabolizovati različite oblike selenita.

Metodološki pristupi istraživanjima opisani u gorenavedenim studijama su pretežno bili biohemijskog, molekularno-biološkog i klasičnog mikološkog karaktera, uz značajne doprinose vizualizacija struktura korišćenjem elektronsko mikroskopskih tehnika i tehnika mikroskopije korišćenjem X-zraka uz pomoć sinhrotrona. Međutim, iako se na problemu biosinteze nanočestica selenita u končastim gljivama radi već neko vreme, koliko je nama poznato, u literaturi nema podataka o fiziološkim efektima selenita na morfologiju ćelijskih struktura končastih gljiva *in vivo*, bez prethodne fiksacije i nemonovnog uvođenja artefakata koji prate i dodatne manipulacije biološkim materijalom (Kreysing et al. 2020)

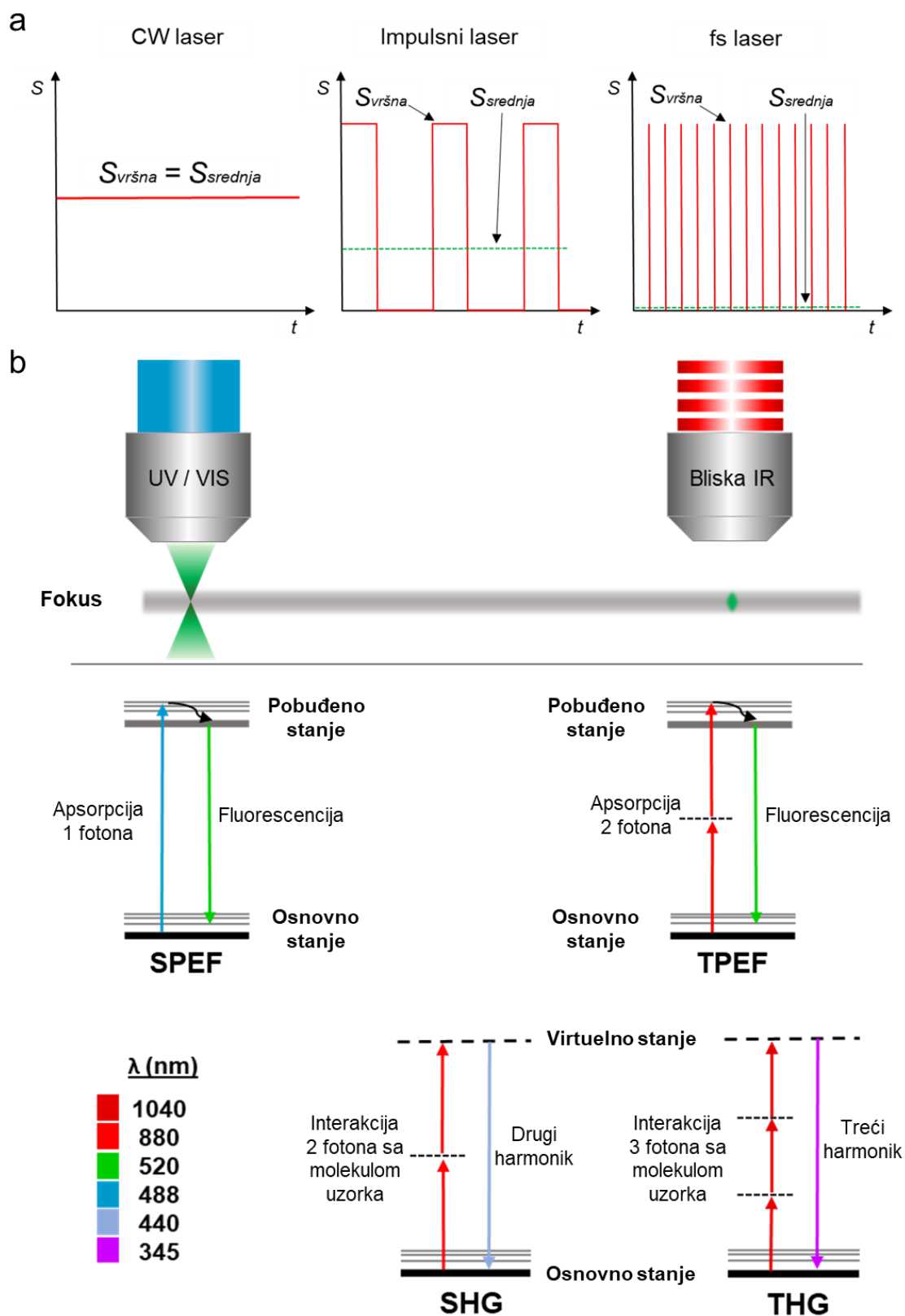
1.3 Nelinearna laserska skenirajuća mikroskopija

1.3.1 Pregled nelinearne optičke mikroskopije

Nelinearna laserska skenirajuća mikroskopija (NLSM) je napredna optička tehnika koja koristi ultrakratke laserske impulse za strukturno i funkcionalno oslikavanje, kao i lasersku manipulaciju živih organizama. Njene primene obuhvataju širok spektar oblasti, od fundamentalnih bioloških istraživanja do kliničke dijagnostike i šire.

Nelinearna laserska skenirajuća mikroskopija se suštinski razlikuje od konvencionalnih tehnika svetlosne mikroskopije jer je zasnovana na nelinearnoj interakciji svetlosti i materije. Linearnost signala se generalno definiše kroz njegovu zavisnost od intenziteta upadnog zračenja. Intenzitet laserskog zračenja (I) zavisi od primenjene snage lasera (S) i površine na koju se fokusira laserski snop (P) ($I=S/P$). U linearnim optičkim procesima kakva je jednofotonska pobuda (eng. Single Photon Excitation Fluorescence - SPEF), sa porastom intenziteta laserskog snopa dolazi do linearnog povećanja intenziteta signala uzorka. Međutim, u nelinearnim optičkim procesima, intenzitet dobijenog signala nije direktno proporcionalan intenzitetu laserskog snopa. Kod nelinearnih efekata drugog reda dvostruko povećanje intenziteta lasera rezultira četvorostrukim povećanjem intenziteta izlaznog signala (Boyd 2008). Kod nelinearnih procesa trećeg reda izlazni signal se povećava osam puta.

Nelinearni optički procesi su malo verovatni a dešavaju se kada više fotona koincidira u vremenu i prostoru (Boyd 2008). Što je veći intenzitet upadnog laserskog zračenja, veća je verovatnoća ovog procesa. Da bismo generisali nelinearni optički signal u uzorku, potrebna je velika vršna snaga (snaga pojedinačnog impulsa) koja se može postići ultrakratkim impulsima čije je trajanje reda stotina femtosekundi (fs). Femtosekundni impulsi se generišu u laserima sa sinhronizovanim modovima. Sa pojavom prvih femtosekundnih lasera konstruišu se i prvi nelinearni mikroskopi. Kada se ultrakratki impulsi fokusiraju na uzorak, signal se generiše samo unutar fokalne zapremine objektiva gde je gustina fotona najveća (Denk, Strickler, and Webb 1990; Masters, So, and Mantulin 2009; Rabasović et al. 2015). Za razliku od kontinualnih lasera (CW) koji neprekidno emituju zračenje konstantne snage, kod fs lasera imamo periodično ispaljivanje impulsa velike vršne snage u jako kratkom vremenskom intervalu (slika 1.4a). Dakle, velika vršna snaga fs lasera omogućava generisanje nelinearnog signala, dok je prosečna snaga mala a proces veoma brz, tako da nema fotooštećenja uzorka. Interakcija uzorka i laserskog zraka se dešava samo u fokalnoj zapremini, za razliku od linearne mikroskopije, gde imamo interakciju u celoj ozračenoj zapremini (slika 1.4b) (Diaspro et al. 2006).



Slika 1.4. Upoređivanje interakcije fotona i molekula u slučajevima kontinualne i fs pobude. a) cw laseri

neprekidno emituju zračenje konstantne snage dok fs laseri periodično ispaljuju impulse velike vršne snage u izuzetno kratkom vremenskom intervalu (trajanje impulsa reda 100 fs; vreme između impulsa reda 10 ns) dok je srednja snaga niska. S – snaga; t – vreme. b) Prelazi na energetskim nivoima u slučaju linearnog i nelinearnih signala. Razlike između jednofotonske pobude (SPEF) (interakcija uzorka i laserskog zraka u celoj ozračenoj zapremini – zeleno prikazan konus) i multifotonske pobude (TPEF, SHG, THG) uzorka (interakcija se dešava samo u fokalnoj zapremini - zeleni elipsoid) Kod SHG i THG se 2, odnosno 3 fotona pretvaraju u jedan emisijski foton 2, odnosno 3 puta manje talasne dužine (dvostruk/trostruko veće energije).

Najpoznatiji modaliteti NLSM su dvofotonski pobuđena fluorescentna mikroskopija (eng. Two Photon Excitation Fluorescence – **TPEF**) (Denk, Strickler, and Webb 1990; Masters, So, and Mantulin 2009) i oni u kojima se detektuju signali drugog i trećeg harmonika (eng. Second/Third Harmonic Generation – **SHG/THG**) (Yelin and Silberberg 1999; Campagnola and Loew 2003; Weigelin, Bakker, and Friedl 2016).

Jedan od najčešće korišćenih nelinearnih procesa u NLSM-u je dvofotonska pobuda, koja se zasniva na istovremenoj apsorpciji dva fotona od strane elektrona fluorescentnog molekula, pobuđujući ga na viši energetski nivo (Boyd 2008). Razlika energije između dva stanja jednaka je zbiru energija apsorbovanih dva fotona. Pošto je energija fotona obrnuto proporcionalna njegovoj talasnoj dužini, dva apsorbovana fotona moraju imati talasnu dužinu oko dva puta veću (tj. duplo manja apsorpciona energija) od potrebne za jednofotonsko pobuđivanje (slika 1.4b dole). Ovakav događaj se postiže ultrabrzim laserima (koji generišu ultrakratke impulse) velike snage (~ 150.000 W) koji osiguravaju veliku gustinu fotona na izuzetno malom prostoru (žiža objektiva velike numeričke aperture) što povećava verovatnoću da će dva fotona istovremeno reagovati sa jednom fluoroforom (Boyd 2008). Iako se dva fotona koriste za pobuđivanje elektrona u stanje više energije, emituje se samo jedan foton pri prelasku elektrona u osnovno stanje. Kako je u pitanju neelastičan proces, deo energije fotona se predaje uzorku i emituje se foton sa nešto većom energijom, odnosno nešto manjom talasnom dužinom od pobudne. Talasna dužina emisije nakon dvofotonske i jednofotonske pobude je ista. S obzirom da se deo energije predaje uzorku javlja se fotoizbeljivanje i delimična fotodestrukcija koje su značajno manje u odnosu na fotoizbeljivanje i fotodestrukciju kod jednofotonskog pobuđivanja jer je interakciona zapremina daleko manja (Masters, So, and Mantulin 2009). Jedna od prednosti dvofotonske pobude je ta što se sve fluorofore, koje se standardno pobuđuju jednofotonskim metodama, mogu pobuditi i dvofotonski, što ne važi i obrnuto. NLSM sistemi obično koriste lasere podesive talasne dužine u bliskoj IR oblasti. IR je značajna jer smanjuje rasejanje i apsorpciju u tkivu, u odnosu na manje talasne dužine.

SHG i THG su nelinearni procesi u kojima se upadni fotoni pretvaraju u fotone dvostruke ili tri puta veće frekvencije. Kod SHG i THG, za razliku od TPEF, nema deponovanja energije na uzorak čak ni u interakcionoj zapremini odnosno u fokusu. SHG i THG su i koherentni procesi pa emitovani fotoni imaju isti pravac kao i upadni fotoni. Ove tehnike su posebno korisne za snimanje nefluorescentnih struktura kao što su vlakna kolagena i lipidne kapi. Intenzitet signala zavisi od veličine i organizacije struktura koje daju signal, kao i od snage i polarizacije ekscitacione svetlosti (Aghigh et al. 2023). SHG signal se generiše u materijalima koji su necentrosimetrični i imaju uređenu strukturu (kolagen, elastin) ili na granicama (površinama) centrosimetričnih materijala (skrob) (Boyd 2020). Dešava se kada dva fotona upadnog laserskog zraka reaguju sa uzorkom emitujući fotone sa dvostruko većom energijom i polovinom talasne dužine. THG je nelinearni koherentni optički efekat u kome upadni laserski snop interaguje sa uzorkom stvarajući svetlost tačno tri puta kraće talasne dužine od upadne. THG se uglavnom javlja na granicama sredina gde

se naglo menja indeks prelamanja, poput granica između stakla i vazduha, stakla i vode, vode i lipidnih struktura (Boyd 2008).

Više o oslikavanju THG metodom u poglavlju 1.3.4.

1.3.2 Jedinstvene prednosti NLSM

NLSM nudi nekoliko jedinstvenih prednosti u odnosu na konvencionalne tehnike linearne mikroskopije, što je čini moćnim alatom za oslikavanje bioloških uzoraka u visokoj rezoluciji i visokog kontrasta. Jedinstvene prednosti NLSM su *in vivo* i oslikavanje bez obeleživača, relativno velika dubina prodiranja, slike visokog kontrasta (bolji odnos signal/šum), trodimenzionalno (3D) oslikavanje u visokoj rezoluciji i smanjeno oštećenje i fotoizbeljivanje uzorka zahvaljujući upotrebi infracrvenih ultrabrzih lasera (Parodi et al. 2020). Paralelno sa tehnikama oslikavanja, nelinearna mikroskopija omogućava selektivnu modifikaciju i direktnu manipulaciju ćelija i unutarćelijskih struktura, pružajući izuzetno korisno sredstvo za fiziološka i morfološka istraživanja u polju laserske mikro/nanohirurgije.

Nelinearna optička mikroskopija može postići veću dubinu prodiranja u biološke uzorke u poređenju sa tradicionalnom jednofotonskom mikroskopijom. Glavni razlog je taj što se svetlost na većim talasnim dužinama manje rasejava od one na kraćim talasnim dužinama. Verovatnoća rasejanja je obrnuto proporcionalna četvrtom stepenu talasne dužine (Born et al. 1999). Glavno svojstvo koje kontroliše koliko duboko se može oslikavati je rasipanje svetlosti. Infracrveni laseri koji se koriste za multifotonsku mikroskopiju se rasipaju mnogo manje od na primer svetlosti iz vidljivog ili UV dela spektra koji se koriste u tradicionalnoj mikroskopiji. Drugi razlog je taj što biološki uzorci jedva apsorbuju svetlost u spektralnom opsegu od 700 nm do 1000 nm, što je uobičajen opseg infracrvenih fs lasera koji se koriste u nelinearnoj mikroskopiji. Dublje prodiranje posledično omogućava snimanje debljih uzoraka i živih organizama bez nanošenja značajnog fotooštećenja okolnog tkiva. Kao rezultat toga, NLSM je veoma pogodan za *in vivo* studije.

Ključna prednost multifotonske mikroskopije je ta što se pobuda dešava samo u maloj zapremini fokusa zbog čega ova tehnika ima smanjenu fototoksičnost i fotoizbeljivanje. Upotreba impulsnih lasera kod NLSM minimizira fotoizbeljivanje (postepeni pad sposobnosti većine fluorofora da fluoresciraju) i fotooštećenje (toksični efekat aktiviranih fluorofora na ćelije) uzorka u poređenju sa kontinualnim laserima, zbog smanjenje ekscitacione zapremine. Visoki vršni intenziteti fs laserskih impulsa koji se koriste u NLSM omogućavaju efikasnu ekscitaciju fluorofora samo u fokusu dok minimiziraju ukupnu izloženost uzorka laserskoj svetlosti. Ova smanjena fototoksičnost omogućava produžena oslikavanja i čuva vijabilnost živih ćelija i organizama.

Dvodimenzionalno (2D) i trodimenzionalno (3D) oslikavanje u visokoj rezoluciji: NLSM pruža poboljšane mogućnosti vizuelizacije određene ravni u uzorku (generisanje signala samo u fokalnoj zapremini) u poređenju sa linearnim tehnikama. Skoro nijedan pobuđeni signal se ne generiše van fokalne zapremine. Pošto su nelinearni procesi inherentno ograničeni na žižnu ravan, NLSM omogućava bolju diskriminaciju signala od pozadine van fokusa, što rezultira jasnijim i detaljnijim slikama. Dakle, nije potreban pinhol. Ova sposobnost vizuelizacije određene ravni je posebno korisna za oslikavanje debelih uzoraka i smanjenje efekata rasejanja svetlosti u biološkim tkivima.

Skeniranjem lasera preko oblasti od interesa moguće je napraviti 2D sliku fluorescencije koja se javlja u živim tkivima/ćelijama. Skeniranje u različitim fokalnim ravnima omogućava formiranje 3D modela visoke rezolucije. Prikupljene tokom vremena, ove slike ili konstruisani modeli mogu se koristiti za kreiranje filma dinamike bioloških procesa u visokoj rezoluciji. Vremenska rezolucija procesa koji se mogu pratiti na mikroskopu ograničena je brzinom skeniranja ogledala i količinom vremena koje je potrebno da se stvori značajan fluorescentni signal na svakom pikselu (vreme zadržavanja (eng. dwell time)).

Nelinearne tehnike kao što su TPEF, SHG i THG omogućavaju oslikavanje bioloških struktura bez obeležavanja (eng. label-free) na osnovu njihovih intrinzičnih optičkih svojstava/inherentnih kontrasta. Ovo eliminiše potrebu za egzogenim fluorescentnim obeleživačima, što smanjuje vreme potrebno za pripremu uzorka i potencijalne artefakte povezane sa obeležavanjem i/ili fiksiranjem uzorka (Martins, Martins, and Santos 2018). TPEF je stoga metoda izbora za pobuđivanje endogenih fluorofora kao što su nikotinamid adenin dinukleotid (NAD(P)H), flavin adenin dinukleotid (FAD), lipofuscin, melanin, ergosterol, riboflavin i karotenoidi. Autofluorescencija endogenih fluorofora NAD(P)H i FAD, koje su deo lanca transporta elektrona u mitohondrijama, omogućava metaboličko oslikavanje ćelija (Palero et al. 2011; Kolenc and Quinn 2019). Oslikavanje bez obeleživača je posebno korisno za vizuelizaciju nefluorescentnih struktura kao što su lipidne kapi (Débarre et al. 2006) i vlakna kolagena, čija orijentacija i distribucija mogu ukazivati na patološko stanje tkiva (Golaraei et al. 2016). Kombinovanje različitih tehnika NLSM, tj. više modaliteta, je dodatna prednost ove mikroskopije koja daje nove sveobuhvatnije informacije o uzorku koji je predmet istraživanja.

Jedinstvene prednosti NLSM je čine vrednim alatom za širok spektar primena, od osnovnih istraživanja do kliničke dijagnostike. Različiti modaliteti NLSM omogućavaju povezivanje strukturnih i biohemijskih informacija različitih bioloških uzoraka. Tehnike nelinearne mikroskopije se danas uspešno primenjuju za *in vivo* oslikavanje raznih fizioloških aktivnosti kod različitih biljnih i životinjskih vrsta – tzv. funkcionalno oslikavanje (eng. functional imaging). Zatim *in vivo* oslikavanje moždane aktivnosti pacova, *in vivo* i oslikavanje bez obeleživača embriogeneze model organizama (*Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*) (G. J. Tserevelakis et al. 2010; Olivier et al. 2010).

Međutim, pomenute upotrebe tehnika nisu direktne i pravolinijske već zahtevaju poseban dizajn, specifične modifikacije i nove protokole koje treba ustanoviti od slučaja do slučaja.

1.3.3 Femtosekundna laserska nanohirurgija za istraživanje jonskih struja u membranama končastih gljiva

Poznato je da jonski kanali igraju važnu ulogu u fiziologiji svih ćelija, pa očekivano i gljiva (Prole and Taylor 2012), uključujući unos jona i hranljivih materija (M. Liu et al. 2006), transdukciju signala (X. Zhang et al. 2016) i odgovor na osmotski stres (Lew and Nasserifar 2009). Za razliku od životinjskih i biljnih ćelija, ne zna se mnogo o funkciji jonskih kanala u gljivama. Do danas, samo nekoliko kanala u končastim gljivama je klonirano i/ili okarakterisano elektrofiziološkim tehnikama, uglavnom heterolognom ekspresijom kanalnih proteina identifikovanih skринingom na homologe poznatih proteina kvasca, životinjskih ili biljnih proteina (Zhou et al. 1991; Roberts et al. 1997; Silverman-Gavrila and Lew 2002; Roberts 2003; Oddon, Diatloff, and Roberts 2007; Živić et al. 2009; Roberts, Milnes, and Caddick 2011; Malvezzi et al. 2013; Križak et al. 2015; Zhao and Tombola 2021; Dionysopoulou et al. 2022). Glavni razlog za skoro potpuni nedostatak studija o prirodnim membranama je rigidan, hitinski ćelijski zid koji blokira pristup elektrofiziološkoj pipeti. Ovo onemogućava korišćenje metode nametnute voltaže na deliću membrane (MNVnDM), zlatnog standarda za registraciju jonskih struja. Da bi membrana bila dostupna za staklenu elektrofiziološku pipetu za metodu MNVnDM, ceo ili deo zida se mora ukloniti. Ogoljen protoplast (živi deo gljive bez ćelijskog zida obavijen membranom) bi se zatim oslobodio kroz otvor na zidu hife da bi se omogućio pristup elektrofiziološkoj pipeti. Formiranje kontakta visokog otpora (prisni gigaomski kontakt) između vrha staklene pipete i membrane, što je preduslov za tehniku MNVnDM, moguće je samo ako je membrana čista (Sperelakis 2011).

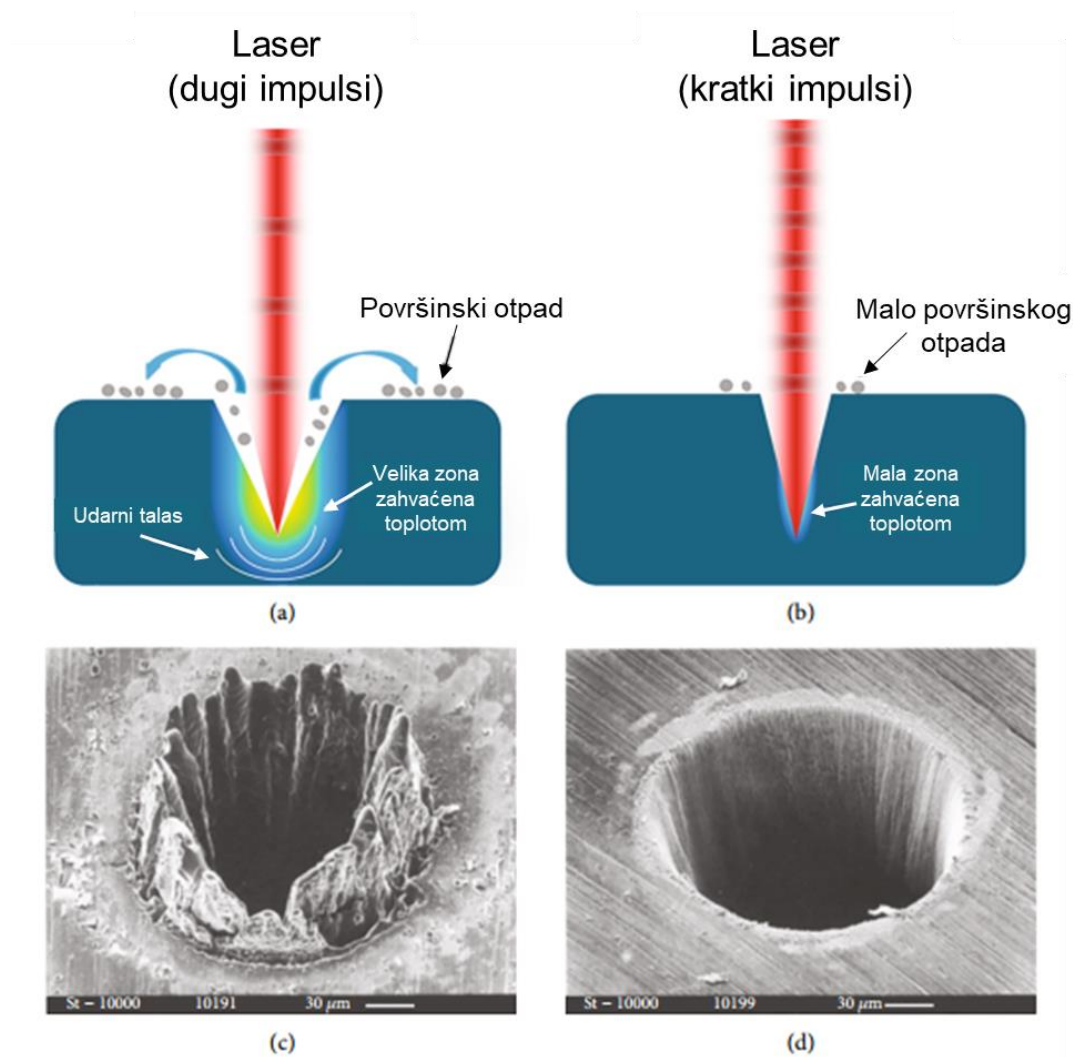
Postoji nekoliko načina za uklanjanje ćelijskog zida: mehanički, enzimski i laserskom hirurģijom na nivou ćelija (eng. cell surgery) (Henriksen and Assmann 1997; Shakoor et al. 2022). Mehanička disekcija tkiva za oslobađanje malog broja protoplasta nikada nije uspela kod končastih gljiva, dok se koristi u biljnim tkivima da bi se izbegli štetni efekti enzimskog tretmana na ćelijsku membranu (S. Sun, Furtula, and Nothnagel 1992). Enzimsko uklanjanje ćelijskog zida bilo je uspešno kod biljaka (Elzenga, Keller, and Van Volkenburgh 1991; Fairley, Laver, and Walker 1991), ali nije dalo pozitivne rezultate kod končastih gljiva *Neurospora* (N. N. Levina et al. 1995) i *Saprolegnia* (Garrill A, Jackson SL, Lew RR 1993). Nije bilo moguće postići kontakte sa otporom većim od 200 i 500 MΩ. Ovo je u suprotnosti sa nalazima na biljkama, i može se objasniti činjenicom da se hitinski ćelijski zid gljiva strukturno i molekularno izrazito razlikuje od ćelijskog zida biljaka koji je na bazi celuloze.

S druge strane, moguće je selektivno ukloniti mali lokalizovani deo ćelije, na primer, sićušni deo ćelijskog zida, korišćenjem tehnike laserske ablacije (Ronchi, Terjung, and Pepperkok 2012), a da pritom najveći deo zida ostane netaknut. Na ovaj način, polaritet gljivnih ćelija je očuvan, a deo ćelijske membrane je dostupan za prilazak elektrofiziološkom pipetom za merenja visoke rezolucije (MNVnDM). Lasersko uklanjanje ćelijskog zida sa elektrofiziološkim snimanjem je ranije korišćeno na nekim algama i biljkama (Taylor and Brownlee 1992; De Boer et al. 1994; Henriksen et al. 1996; Miedema, Henriksen, and Assmann 1999; Henriksen and Assmann 1997) i kod samo dve končaste gljive (Roberts et al. 1997; Véry and Davies 1998). Međutim, ovi eksperimenti su rađeni sa UV laserima pre više od dvadeset godina i nikada nisu evoluirali u rutinski protokol. UV laseri korišćeni u ovim studijama su radili sa nanosekundnim (ns) laserskim impulsima, za koje je poznato da uzrokuju fototermalna i fotomehanička oštećenja uzoraka (Oraevsky et al. 1996; Gabel 2008; Uchugonova 2012). U današnje vreme, najnoviji razvoj laserske tehnologije i mikroskopije, posebno ultrabrzi fs laseri, omogućavaju operacije sa izuzetno

visokom preciznošću (slika 1.5). Glavna prednost fs lasera je ta što proizvode zanemarljive toplotne efekte u poređenju sa ns laserima jer su njihovi impulsi kraći od vremena termičke difuzije (pikosekunde do nanosekunde) (Kohli, Elezzabi, and Acker 2005). Zbog netermalne prirode fs lasera u interakciji sa ćelijskim materijalom, smatra se da je uglavnom prisutna ablacija (Oraevsky et al. 1996; Gabel 2008; A. Vogel et al. 2005; Ronchi, Terjung, and Pepperkok 2012), koja uzrokuje minimalno oštećenje okolnog ćelijskog materijala. Dodatno, energija impulsa za fs lasersku ablaciju je u opsegu ispod nJ, znatno ispod energije impulsa UV-ns lasera. Pored toga, talasne dužine fs lasera koji se koriste za ćelijsku hirurgiju su u bliskom IR opsegu, što nije toliko štetno za ćeliju kao UV talasne dužine, što je posebno važno za neželjeno rasejanje tokom hirurgije.

Femtosekundni laseri emituju ultrakratke laserske impulse koji omogućavaju značajno smanjenje veličine disekcije u poređenju sa ns laserima (Oraevsky et al. 1996; Gabel 2008; A. Vogel et al. 2005). To ih čini idealnim za preciznu ćelijsku hirurgiju od nano- do mikro-razmera. U fs laserskoj nanohirurgiji na nivou ćelija, laserski snop je fokusiran na difrakcijom ograničenu fokalnu zapreminu, na ćelijskom zidu ili membrani, pomoću objektiva sa velikom numeričkom aperturom (NA) (Gabel 2008; A. Vogel et al. 2005; Ronchi, Terjung, and Pepperkok 2012). Pored toga, hirurški proces postignut sa fs laserima omogućava uklanjanje veoma malih količina materijala sa velikom preciznošću, stvarajući mali rez na ćelijskom zidu/membrani ili drugim ćelijskim strukturama. Visoki vršni intenziteti fs laserskih impulsa indukuju proces multifotonske interakcije i obezbeđuju niži energetske prag za uklanjanje ćelijskog zida/membrane (Gabel 2008; A. Vogel et al. 2005; Ronchi, Terjung, and Pepperkok 2012). Tipični vršni intenzitet za fs lasersku ablaciju je reda veličine 10^{12} W/cm^2 (George J. Tserevelakis et al. 2012; de Medeiros et al. 2020). Ukratko, ultrakratki laserski impulsi sa relativno malom energijom omogućavaju preciznije submikrometerske hirurške rezove od ns lasera (Oraevsky et al. 1996; Gabel 2008; A. Vogel et al. 2005; S. H. Chung and Mazur 2009).

Laserska nanohirurgija je postala važan alat u mnogim biološkim oblastima zbog svoje preciznosti, neinvazivnosti, svestranosti, raznovrsnosti i prilagodljivosti. Ova tehnika je korišćena kao mikrodisekcijski alat za proučavanje funkcije mikrotubula, mitohondrija i drugih organela u ćelijama, tkivima i celim organizmima, kao i za optotransfekciju i druge oblike molekularne isporuke zasnovane na laserima (Heinemann et al. 2022). Druge potencijalne primene ovog tehnološkog napretka uključuju studije ćelijske mehanike, unutarćelijskog transporta i ćelijske signalizacije, kao i razvoj novih terapija za bolesti kao što su kancer i genetski poremećaji. U kontekstu gljiva, fs laserska nanohirurgija bi se mogla koristiti za selektivno uklanjanje delova ćelijskog zida. Kombinacija laserske ablacije i lokalizovanog MNVnDM bi omogućila registraciju jonskih struja kroz ćelijsku membranu, uz zadržavanje informacija/podataka o lokaciji dela membrane sa koje su napravljeni strujni zapisi. Ovo bi omogućilo otkrivanje asimetrične distribucije jonskih kanala duž hifa i istraživanje uključenosti jonskih kanala u uspostavljanju polariteta gljivnih ćelija, integraciji signala i hifalnom tropizmu, što sve igra ključnu ulogu u uspostavljanju virulencije gljiva (Pérez-Martín et al. 2016) i interakciji sa okolnim organizmima ili životnom sredinom (Gutjahr and Parniske 2013; Bassilana, Puerner, and Arkowitz 2020). Sve ovo je bila motivacija da se razvije i optimizuje protokol koji omogućava visokokvalitetno snimanje struja metodom nametnute voltaže na deliću membrane na ćelijskoj membrani gljivnih protoplasta oslobođenih kroz zid subćelijskom nanohirurgijom korišćenjem fs titanijum-safirnog (Ti:Sa) lasera.



Slika 1.5. Šema interakcije lasera sa materijalom (čelična folija). a) dugi laserski impulsi b) kratki laserski impulsi c) Elektronska mikrografija ablacionog kratera napravljenog ns laserom (780 nm, 3,3 ns, 0,5 J/cm²) d) Elektronska mikrografija ablacionog kratera napravljenog fs laserom (780 nm, 200 fs, 0,5 J/cm²). Izmenjeno i preuzeto iz (Z. Lin and Hong 2021).

1.3.4 THG oslikavanje dinamike lipidnih kapi u končastim gljivama bez obeležavanja

Mikroskopija detektovanja THG kao tehnika nelinearnog oslikavanja bez obeležavanja je moćan alat za vizuelizaciju različitih ćelija i struktura tkiva (Weigelin, Bakker, and Friedl 2016). THG se uglavnom primenjuje za oslikavanje struktura životinjskih ćelija (Weigelin, Bakker, and Friedl 2016; Barzda et al. 2005; Witte et al. 2011; Tsai et al. 2012; Weigelin, Bakker, and Friedl 2012; E. Gavgiotaki et al. 2015) i tkiva (Witte et al. 2011; Oron et al. 2004; C.-K. Sun et al. 2003; Aptel et al. 2010; Débarre et al. 2006; Genthial et al. 2017; Evangelia Gavgiotaki et al. 2020), kao i za dinamiku ćelijskih procesa (funkcionalno oslikavanje) (Farrar et al. 2011; Canioni et al. 2001). Takođe, THG mikroskopija je korišćena za proučavanje humanih zuba i fosila kičmenjaka (Y.-C. Chen, Lee, et al. 2015), 3D projektovanog humanog masnog tkiva (T. Chang et al. 2013) i malih organizama (*Drosophila melanogaster*, *D. rerio*, *Xenopus laevis*, ranih embriona miša (Oron et al. 2004; Débarre et al. 2004; C. K. Sun et al. 2004; Watanabe et al. 2010) i *C. elegans* (G. J. Tserevelakis et al. 2010; Aviles-Espinosa et al. 2013)). Pored animalnih uzoraka, THG mikroskopija je primenjena i na biljke (Débarre et al. 2006; M. M. L. Yu et al. 2008; Prent et al. 2005; Tokarz et al. 2014; Cisek et al. 2009; Barzda 2008), alge (Cisek et al. 2009; Barzda 2008) i kvasce (Yelin and Silberberg 1999; Segawa et al. 2012), dok su THG studije o končastim gljivama oskudne.

THG fenomen je nelinearni koherentni proces rasejanja indukovano strukturalnim svojstvima. Kod THG, združena energija tri fotona se konvertuje u jedan foton. Pošto je THG proces trećeg reda, potrebni su ultrakratki laserski impulsi sa velikom gustinom vršne snage u optičkom fokusu da bi se obezbedio dovoljan signal. Jak signal trećeg harmonika se generiše na granicama gde postoji velika promena indeksa prelamanja ili nelinearna osetljivost trećeg reda (Barad et al. 1997; Boyd 2008). Zbog većeg indeksa prelamanja (I.P.) lipida (I.P.(lipidi) = 1,46-1,48 na 1100-480 nm) (IY, EN, and VV 2018) u odnosu na citoplazmu (I.P. = 1,36-1,39 na 633 nm) (P. Y. Liu et al. 2016) THG signal se efikasno stvara na granici između vode i struktura bogatih lipidima (Y.-C. Chen, Hsu, et al. 2015; Small et al. 2018; Bautista et al. 2014). Ovo uključuje ćelijske membrane i lipidne kapi.

Kako su LK dinamične organele sa važnom ulogom u homeostazi lipida eukariotskih ćelija, a studije LK na ćelijama gljiva još uvek u povoju, postoji potreba za razvojem protokola za novim eksperimentalnim pristupima ovom problemu. Kao što je gore pomenuto, THG mikroskopija je posebno pogodna tehnika za proučavanje fiziologije LK (Débarre et al. 2006; Bautista et al. 2014; George J. Tserevelakis et al. 2014). Prednosti THG mikroskopije su u tome što je neinvazivna, proizvodi inherentno konfokalne slike, ne zahteva fiksaciju ili spoljno obeležavanje – slično mikroskopijama baziranim na Ramanovom rasejanju (Siddhanta et al. 2017; C. Zhang et al. 2017; Brackmann et al. 2009; C. Zhang and Boppart 2020; Dong et al. 2021; Yasuda, Takeshita, and Shigeto 2019), mikroskopiji diferencijalnog interferencijskog kontrasta (Kurian, Pietro, and Read 2018) i *light sheet* mikroskopiji (Siddhanta et al. 2017), i minimalno je fototoksična što omogućava *in vivo* studije. Razlike između tehnika zasnovanih na Ramanovom rasejanju i THG mikroskopije je jednostavnija šema ekscitacije i minimalni rizik od aberacijskih artefakata u THG mikroskopiji. Kombinovanje THG sa fluorescentnom mikroskopijom je korisno za identifikaciju molekularnog izvora THG signala (tj. lipofilne fluorescentne boje za ciljanje LK) (Witte et al. 2011; E. Gavgiotaki et al. 2015; George J. Tserevelakis et al. 2014). Jednom kada se identifikuju strukture povezane sa THG-om, mogu se dalje pratiti korišćenjem THG mikroskopije *in situ*.

Kvantifikacija slika koje sadrže LK može biti izazovna. Željeni parametri uključuju broj, gustinu, veličinu i morfologiju LK. Lako dostupni softveri za analizu slika i programski jezici za ovu svrhu su *ImageJ*, *Cell Profiler*, *Imaris*, *AMIRA*, *Volociti*, *MATLAB*, *D programiranje*, kako za fluorescentne slike (Adomshick, Pu, and Veiga-Lopez 2020; Jüngst, Klein, and Zumbusch 2013; Exner et al. 2019; Rambold, Cohen, and Lippincott-Schwartz 2015) tako i za slike lipidnih kapi snimljene tehnikama bez obeležavanja (Débarre et al. 2006; T. Chang et al. 2013; Watanabe et al. 2010). Automatska kvantifikacija LK koristi ili metode bazirane na postavljanju granične vrednosti signala (eng. thresholding) na slikama ili *watershed* metode (bazirane na morfologiji/segmentaciji) (Dejgaard and Presley 2014), i obično su optimizovane za određenu ćelijsku liniju. Bilo bi poželjno imati opštiju platformu za analizu slika koja ne zahteva opsežno postavljanje praga specifično za ćelijsku liniju. U tom smislu, korelaciona analize slike (eng. Image Correlation Spectroscopy - ICS) je obećavajući metod jer se zasniva na merenju prostorno korelisanih fluktuacija. Ova metoda je primenjena na konfokalne slike gde se meri prostorna varijacija intenziteta fluorescencije, što se dalje može povezati sa gustinom čestica i stanjem agregacije (Nohe and Petersen 2007). S druge strane, ICS je retko korišćena za nelinearne tehnike. Dosad je primenjena samo kod TPEF (Wiseman et al. 2000) i nedavno kod SHG oslikavanja (Slenders et al. 2018).

Izazov korišćenja THG oslikavanja končastih gljiva je taj što su LK u končastim gljivama prilično malih dimenzija ($< 1,5 \mu\text{m}$) za razliku od npr. onih u ćelijama belih adipocita gde dimenzije LK mogu dostići $100 \mu\text{m}$ (Suzuki et al. 2011). Radi testiranja ovako razvijenog protokola, bilo bi poželjno pokazati njihovu primenljivost u uslovima koji zasigurno dovode do promena sadržaja LK, i u nekim uslovima za koje još ne postoje podaci, a može se pretpostaviti na osnovu prethodnih saznanja da bi mogli dovesti i do promena u LK.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Predmet ove doktorske disertacije je primena različitih modaliteta nelinearne laserske mikroskopije za proučavanje fiziologije i energetskeg metabolizma živih ćelija končastih gljiva. Pomenute tehnike treba da omoguće da se u živom organizmu, u intaktnom stanju, vrše posmatranja i merenja od značaja za razumevanje niza fizioloških procesa. Predmet rada ove disertacije je podeljen na dva osnovna cilja. Prvi cilj je da se fs laser iskoristi za manipulaciju na ćelijama u svrhu razvijanja laserske nanohirurgije ćelijskog zida končastih gljiva kojim bi se omogućila registracija struja kroz pojedinačne jonske kanale na ćelijskoj membrani, koje su gotovo u potpunosti nepoznate kod končastih gljiva. Drugi cilj je razvijanje i optimizovanje metode nelinearne mikroskopije za strukturno i funkcionalno oslikavanje ćelijskog metabolizma končaste gljive *P. blakesleeanus*, korišćenjem dva modaliteta nelinearne optičke mikroskopije, THG i TPEF. Ova dva glavna cilja su podeljena na dodatne potciljeve i zadatke.

- 1. Razvijanje i optimizovanje metode laserske nanohirurgije ćelijskog zida na modelu žive gljive *P. blakesleeanus* radi dobijanja preciznog reza kako bi se obezbedilo dobijanje intaktne ćelijske membrane i omogućilo dobijanje gigaomskog kontakta koji je neophodan uslov za registrovanje struja kroz pojedinačne jonske kanale. Ovaj cilj je razrađen kroz sedam potciljeva:**

- 1.1 Osmisliti protokol gajenja koji će dati hife pogodne za nanohirurgiju.

- 1.2 Testirati niz uslova za hiper- i hipoosmotskog tretmana za plazmolizu, odnosno deplazmolizu hifa gljiva sa ciljem da se ćelijska membrana maksimalno brzo odvoji i dovoljno efikasno, ponovljivo i reverzibilno povuče od ćelijskog zida, a protoplast uspešno oslobodi kroz hirurški napravljen rez. Uporedo odrediti optimalne koncentracije inhibitora regeneracije ćelijskog zida tokom produžene kompletne procedure hirurgije i metode nametnute voltaže na deliću membrane.

- 1.3 Naći uslove za uspešno uklanjanje ćelijskog zida sa hifa gljive *P. blakesleeanus* kroz utvrđivanje lokacije sečenja duž hife, izbor talasne dužine, obrasca za sečenje, objektiva, snage odnosno energije impulsa, vremena zadržavanja laserskog snopa u tački (dwell time).

- 1.4 Analizirati uticaj različitih parametara kao što su širina hifa, dužina reza, udaljenost reza od hifalnog protoplasta, postojanje citoplazmatskog mosta i koncentracija Ca^{2+} na verovatnoću oslobađanja protoplasta.

- 1.5 Ispitati da li različita lokacija hirurgije duž hifa utiče na verovatnoću oslobađanja i broj izašlih protoplasta.

- 1.6 Okarakterisati hirurški rez i protoplast pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM).

1.7 Registrovati struju pojedinačnih jonskih kanala na membrani protoplasta korišćenjem metode nametnute voltaže na deliću membrane kao test uspešnosti izvršene laserske nanohirurgije.

2. Razvijanje i optimizovanje metode nelinearne mikroskopije za strukturno i funkcionalno oslikavanje ćelijskog metabolizma končaste gljive *P. blakesleeanus*. Ovaj cilj je razrađen kroz šest potciljeva:

2.1 Ispitivanje mogućnosti za oslikavanje lipidnih kapi kod živih i neobojenih pojedinačnih hifa gljive *P. blakesleeanus* koristeći THG modalitet nelinearne laserske mikroskopije.

2.2 Razvoj metoda za kvantifikaciju lipidnih kapi pomoću *Image Correlation Spectroscopy* koji dosad nije korišćen za analizu THG slika uopšte, a može obezbediti informacije o broju i veličini LK. Poređenje rezultata sa uobičajenim softverskim prebrojavanjem čestica dostupnim u slobodnim paketima kao što je *ImageJ*.

2.3 Primena THG modaliteta na oslikavanje LK u hifama podvrgnutim različitim eksperimentalnim tretmanima. Ovaj potcilj je razrađen na dva zadatka.:

2.3.1 Tretman za koji je poznata vrsta i smer očekivanog efekta na LK – izgladnjivanje uskraćivanjem azota. Potvrditi da li se THG oslikavanjem može izmeriti fiziološka promena broja, veličine, distribucije veličina i lokalizacije LK.

2.3.2 Tretman za koji nije poznato kakve efekte ima na LK – natrijum selenit. Ispitati uticaj različitih koncentracija natrijum selenita na metabolizam hifa.

2.4 Primena TPEF modaliteta na oslikavanje mitohondrija u hifama podvrgnutim istim tretmanima kao i prilikom THG oslikavanja LK – Izgladnjivanje uskraćivanjem azota i tretman natrijum selenitom.

2.5 Ispitati uticaj povišene temperature gajenja na promene energetskog metabolizma, dinamiku LK i mitohondrije.

2.6 Testirati mogućnost dobijanja informacije o redoks stanju ćelija (promeni metaboličkog stanja) pomoću dvofotonske mikroskopije korišćenjem autofluorescencije endogenih fluorofora NAD(P)H i FAD i redoks odnosa koji je definisan kao količnik intenziteta dobijenih signala ($[FAD]/[NAD(P)H]$) u živim hifama gljive *P. blakesleeanus*. Potvrditi validnosti metode praćenjem promena redoks odnosa pod dejstvom rotenona – blokatora kompleksa I respiratornog lanca.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Eksperimentalni model i medijumi za rast

Za sve eksperimente u ovoj tezi korišćen je divlji soj NRRL 1555(-) končaste gljive *P. blakesleeanus* Burgeff koji je najverovatnije autohton za jugoistočnu Ameriku (Camino, Idnurm, and Cerdá-Olmedo 2015). Eksperimenti su izvođeni na pojedinačnim ćelijama ove gljive, hifama, za čiji rast je korišćen minimalni tečni medijum, dok je za pravljenje zaliha vegetativnih spora korišćen čvrst krompirov medijum.

3.1.1 Čvrst krompirov medijum i uzgoj micelijuma *P. blakesleeanus* za štok spora

Za zasejavanje spora u cilju obnavljanja njihovih rezervi korišćen je čvrst PDA (eng. potato dextrose agar) medijum. 1 L PDA medijuma se priprema na sledeći način: u staklenu čašu postavljenu na mešalicu se doda 600 mL destilovane vode i 40 g PDA (Neogen, Culture Media, Heywood, UK), koji predstavlja glavni izvor ugljenih hidrata, i 20 g agara (Neogen, Culture Media, Heywood, UK) neophodnog za zgušnjavanje/učvršćivanje medijuma. Ova hranljiva podloga se dodatno obogaćuje sa 0.5 mg ili 1 mL 0.05% vitamina B1 (Sigma-Aldrich) i 5 g ekstrakta kvasca (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) koji u najvećoj meri sadrži aminokiseline, peptide i neorganske soli i predstavlja lako dostupan izvor azota i minerala koji poboljšavaju rast ćelija. Nakon mešanja i dobijanja homogene tečne smeše, čaša se dopuni do 1 L destilovanom vodom. Dok je medijum još uvek u tečnom stanju, razlije se u staklene boce i steriliše 15 minuta na 121°C u autoklavu. pH ovog medijuma je neutralan, oko 7 i nije ga potrebno dodatno podešavati pre sterilizacije. Sterilisan medijum se odmah razliva u Petri šolje (prečnika 100 mm) do jedne trećine njihove dubine (maksimalno $\frac{1}{2}$) i ostavi da se ohladi i stegne. Na ohlađen medijum, u svakoj Petri šolji, zasejava se po 100 μ L aktiviranih spora u koncentraciji od 10^2 spora/mL. Da bi se aktivirao proces klijanja, spore se inkubiraju u vodenom kupatilu 15 minuta na 49-50 °C. Petri šolje sa zasejanim sporama se zatim postavljaju u prozirne plastične kutije sa poklopcem prethodno sterilisane UV lampom i navlažene destilovanom vodom po dnu. Ovim se postiže održavanje konstantne vlažnosti vazduha tokom rasta gljiva. Kutije sa Petrijevim šoljama su pozicionirane u komori za uzgoj na standardnoj temperaturi za rast od $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (Cerdá-Olmedo and Lipson 1987), relativnoj vlažnosti vazduha od 95% i pod konstantnim belim osvetljenjem od 10 W/m^2 . Nakon 4 dana, kada gljive dostignu poslednju fazu rasta, sporangiofori sa zrelim sporangijama se potapaju u sterilnu destilovanu vodu gde one u kontaktu sa vodom pucaju i oslobađaju spore. Oslobađanjem spora u prethodno definisanoj količini destilovane vode (1,5 mL vode po gusto izrasloj Petrijevoj šolji) dobijaju se desetine mililitara štoka spora koncentracije 10^7 spora/mL koji se čuvaju u zamrzivaču na -20°C . Štok se prethodno alikvotira u zaprimene od po 1 mL u ependorf tubice od 2 mL čime se sprečava nepotrebno i štetno ponavljajuće otapanje veće količine suspenzije spora. Koncentracija štokova se proverava na hemocitometru prema standardnoj proceduri preračunavanja za dati tip hemocitometra.

3.1.2 Standardni minimalni tečni medijum

Standardni minimalni tečni (SMT) medijum (Sutter 1975) sadrži sledeća jedinjenja (za 1 L): 20 g D (+) glukoze (izvor ugljenika za gljivu), 2 g L-asparagin monohidrata (izvor azota), 5 g KH_2PO_4 , 500 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i mikroelemente (28 mg CaCl_2 , 1 mg tiamin hidrohlorida, 2 mg limunske kiseline, 1,8 mg $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 300 μg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 μg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i 50 μg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Mikroelementi se prave i čuvaju kao 100x koncentrovani štok. Glukoza se autoklavira zasebno. pH ovog medijuma je 4,5, a osmolarnost oko 200 mOsm.

3.2 Rastvori

Svi rastvori su pravljeni sa dejonizovanom vodom kao rastvaračem i filtrirani korišćenjem filtera sa veličinom pora od 0,22 μm . pH svih rastvora je podešen na 7. Željena osmolarnost rastvora za plazmolizu i deplazmolizu je podešavana sorbitolom, dok su izoosmotski i pipetni rastvori podešavani saharozom. Hemikalije korišćene za pravljenje rastvora su date u tabeli 1.

Tabela 1. Spisak hemikalija i proizvođača

Naziv hemikalije	Proizvođač
KCl – kalijum hlorid	<i>Centrohem</i>
$\text{C}_5\text{H}_8\text{KNO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – kalijum glutamat monohidrat (monohidrat kalijumove soli L-glutaminske kiseline)	<i>Sigma-Aldrich, MO, SAD</i>
MgCl_2 – magnezijum hlorid	<i>VWR Chemicals</i>
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – kalcijum hlorid dihidrat	<i>Fisher Scientific, VB</i>
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – kalcijum nitrat	<i>Sigma-Aldrich, MO, SAD</i>
HEPES	<i>Sigma-Aldrich, MO, SAD</i>
$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ - D-Sorbitol	<i>Alfa Aesar</i>
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ - Saharoza	<i>Serva</i>

3.2.1 Hiperosmotski rastvori za plazmolizu gljiva

Za plazmolizu hifa *P. blakesleeanus* korišćen je standardni i hiperosmotski vanćelijski rastvor pojačane jonske jačine.

Za eksperiment sa uticajem kalcijuma na oslobađanje protoplasta, korišćeni su rastvori sledećeg sastava (u mM): standardni Ca^{2+} rastvor: 60 KCl, 65 K-glutamat, 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 1 ili 3 CaCl_2 , osmolarnost 555 – 560 mOsm; rastvor sa visokim sadržajem Ca^{2+} je imao isti jonski sastav kao i standardni Ca^{2+} rastvor sa tom razlikom što je molarnost CaCl_2 bila 30 mM a ukupna osmolarnost rastvora 600 – 617 mOsm.

Hiperosmotski vanćelijski rastvor (HiperR) sa pojačanom jonskom jačinom korišćen za plazmolizu i tokom nanohirurgije sadrži (u mM): 60 KCl, 65 K-glutamat, 2 MgCl_2 , 30 CaCl_2 , 10 HEPES. Za deo eksperimenata, rastvor je modifikovan da bi se uskladio sadržaj jona sa rastvorom za deplazmolizu i da bi se istražila jonska osnova snimljenih struja. Za eksperimente sa rastvorom

na bazi nitrata, HiperR je modifikovan zamenom CaCl_2 sa $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Za eksperimente sa rastvorima na bazi glutamata, odnos KCl i K-glutamata u HiperR je promenjen na 1:4 ili 1:0, dok je zbirna koncentracija ostala 125 mM. Osmolarnost ovih rastvora je bila 620 mOsm. U nekim eksperimentima, korišćeni su nešto više hiperosmotski uslovi, 680 mOsm (osmolarnost rastvora za deplazmolizu je u tom slučaju bila 640 mOsm). Od 13 pokušaja pristupa pipetom, samo 2 su bila uspešna koristeći ove uslove.

3.2.2 Izoosmotski rastvor

Izoosmotski rastvor (IzoR) koršćen za razblaženje Calcofluor White (CFW) boje sadrži (u mM): 60 KCl, 65 K-glutamat, 2 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 10 HEPES i podešen je saharozom do 495 mOsm.

3.2.3 Rastvori za snimanje MNVnDM

3.2.3.1 Vanćelijski rastvori za deplazmolizu

Tokom deplazmolize i izmene rastvora, za dobijanje nitrarnog rastvora, rastvor HiperR (60 mM KCl, 65 mM K-glutamat, 2 mM MgCl_2 , 30 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 10 mM HEPES) je mešan sa odgovarajućim rastvorom za deplazmolizu (NitR: 125 mM KCl, 5 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES) u potrebnom odnosu da bi se jonski sastav finalnih rastvora u komorici za registraciju struja doveo na sledeće (u mM): 82.75 Cl^- , 125 K^+ , 48.75 glutamat⁻, 23.75 Ca^{2+} , 45 NO_3^- , 2 MgCl_2 , 10 HEPES; Za dobijanje rastvora sa visokom sadržajem glutamata rastvor HiperR sa CaCl_2 i visokim sadržajem glutamata (25 mM KCl, 100 mM K-glutamat, 30 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES) je mešan u potrebnom odnosu sa odgovarajućim rastvorom za deplazmolizu (VGlutR: 0 mM KCl, 125 mM K-glutamat, 5 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 HEPES) da bi se jonski sastav finalnih rastvora u komorici za registraciju struja doveo na sledeće (u mM):: 70.25 Cl^- , 125 K, 106.25 glutamat⁻, 23.75 Ca^{2+} , 2 MgCl_2 , 10 HEPES. Konačna osmolarnost vanćelijskog rastvora u mikroskopskoj komorici za snimanje je bila 595 ± 10 mOsm, za 25 mOsm hiperosmotska/viša u poređenju sa pipetnim rastvorom (570 mOsm).

3.2.3.2 Pipetni rastvori

Rastvori za elektrofiziološke pipete su sadržali (u mM): pipetni rastvor korišćen u kombinaciji sa NitR: 125 KCl, 5 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES (570 mOsm); rastvor sa malo hlorida: 50 KCl, 5 K-glutamat, 1 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES (650 mOsm). Pipetni rastvor korišćen u kombinaciji sa VGlutR: 125 KCl, 5 K-glutamat 1 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES (618 mOsm).

3.3 Gajenje gljiva za eksperimente i tretmani

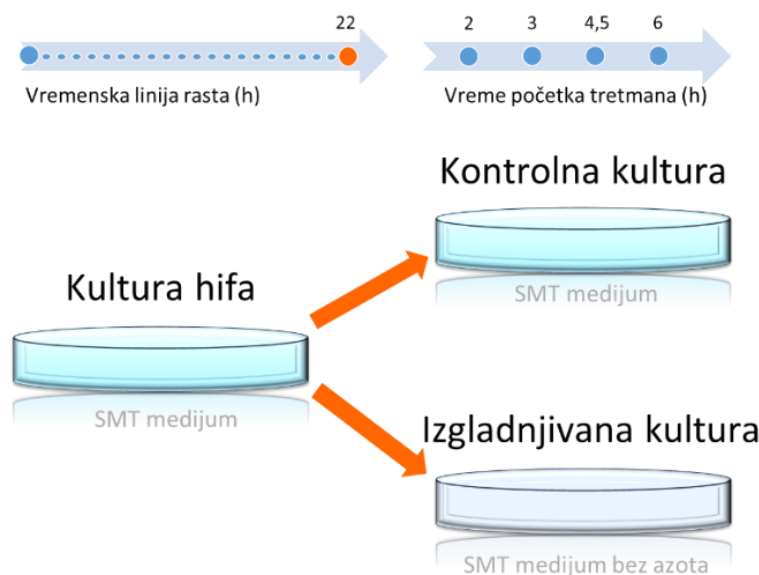
U svim eksperimentima, gljive su gajene u minimalnom tečnom medijumu u osvetljenoj komori za uzgoj. Prvo se štokovi gljiva 10^7 spora/mL odmrzavaju na sobnoj temperaturi, a zatim se vrši aktivacija spora inkubacijom u vodenom kupatilu na 49-50 °C u trajanju od 10 do 15 minuta. Po 1 mL aktiviranih spora se zatim zasejava u 11 mL SMT (ili izmenjenog SMT) medijuma u velikim Petri šoljama (Ø 100 mm). SMT medijum se neposredno pre svakog zasejavanja filtrira. Dalji koraci, kao i temperatura na kojoj su gljive gajene, zavise od eksperimenata. Svi eksperimenti su rađeni na gljivama u ekspanzionalnoj fazi rasta. Rast končastih gljiva u tečnim kulturama je okarakterisan sa tri glavne i dve prelazne faze u rastu: faza kašnjenja (lag faza), tokom koje se gljiva prilagođava novoj sredini, sintetiše enzime, aktivira metaboličke puteve i priprema se za brz rast, faza ubrzanja, zatim ekspanzionalna (log) faza rasta koju karakteriše brz rast hifa sa konstatnom stopom rasta, faza usporavanja (dostupna koncentracija ugljenika počinje da pada ispod potrebne za maksimalan rast) i stacionarna faza tokom koje se rast gljiva usporava usled daljeg iscrpljivanja izvora ugljenika u kulturi i akumulacije otpadnih proizvoda (Moore, Robson, and Trinci 2020).

3.3.1 Gladovanje uzrokovano nedostatkom azota

Ispitivan je uticaj gladovanja uzrokovano nedostatkom azota na morfologiju mitohondrija, veličinu i udeo lipidnih kapi u pojedinačnim hifama. U slučaju LK, oslikavanje nebojenih uzoraka je rađeno pomoću THG modaliteta, dok su mitohondrije bile obojene bojom rodamin 123 (poglavlje 3.4.1.2) i oslikavane TPEF metodom.

Za eksperimente sa azotnim gladovanjem, gljive u koncentraciji 10^7 spora/mL su prvo uzgajane u SMT medijumu u Petri šoljama (Ø 100 mm) na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i nakon 22 h podeljene u dve grupe, kontrolnu i grupu koja je izgladnjivana. Gljive iz kontrolne grupe su sakupljene centrifugiranjem (10 minuta) i resuspendovane u SMT medijumu. Gljive iz druge grupe su takođe centrifugirane 10 minuta ali resuspendovane u SMT medijumu bez azota, tj. SMT medijumu bez L-asparagina (slika 3.1). Nebojene gljive su snimane u različitim vremenskim tačkama nakon gladovanja uzrokovano nedostatkom azota (3, 4,5, 6 i više sati (do 8,5)) na sobnoj temperaturi. Podaci prikupljeni iz vremenskih tačaka 6-8,5 h su objedinjeni i predstavljaju grupu sa produženim azotnim gladovanjem (na graficima označeni kao 6 h). Sve kulture gljiva koje su korišćene za snimanje su bile u ekspanzionalnoj fazi rasta gde je ukupno vreme od aktivacije spora bilo u opsegu od 24 do 30,5 h.

U slučaju obojenih gljiva, mitohondrije su posmatrane samo nakon 5h gladovanja.



Slika 3.1. Eksperimentalni dizajn izgladnjivanja hifa potpunim nedostatkom azota u hranljivom medijumu. Vremenske tačke uzorkovanja su označene plavim tačkama.

3.3.2 Tretman natrijum selenitom za ispitivanje uticaja na lipidne kapi, mitohondrije i morfologiju pojedinačnih hifa *P. blakesleanus*

Za ispitivanje hroničnog uticaja natrijum selenita na LK metodom THG i morfologiju pojedinačnih nebojenih hifa BF mikroskopijom, potrebno je zasejati gljive 24 h pre početka eksperimenta prema uputstvu iz odeljka 3.3 i odmah ih podeliti na kontrolu i tretman. Dakle, spore se inicijalno zaseju u SMT medijum na optimalnoj temperaturi $22 \pm 1^\circ\text{C}$ u velikoj Petri šolji ($\varnothing$ 100 mm), a zatim se gaje u različitim koncentracijama natrijum selenita u manjim Petri šoljama ($\varnothing$ 35 mm). U male Petri šolje se prebacije određena zapremina suspenzije spora iz velike Petri šolje i dodaje određena zapremina 20 mM štoka natrijum selenita kako bi se dobili uzorci sa konačnim koncentracijama selenita od 25 μM , 100 μM , 500 μM i 1000 μM . Konačna zapremina u svim Petri šoljama je bila 2 mL. Kontrolna Petri šolja je sadržala samo suspenziju spora iz velike Petri šolje u istoj zapremini od 2 mL kao i tretmani.

Isti protokol gajenja je korišćen za ispitivanje uticaja natrijum selenita na morfologiju mitohondrija u obojenim hifama (poglavlje 3.4.1.2) metodom TPEF, sa tom razlikom što su koncentracije selenita bile 500 μM i 1000 μM .

3.3.3 Tretman povišenom ambijentalnom temperaturom

Za ispitivanje uticaja povišene temperature na LK i mitohondrije, gljive su gajene u SMT medijumu kako je opisano u poglavlju 3.3 na dve različite temperature, 22°C i 25°C . I lipidne kapi

i mitohondrije su oslikavane TPEF metodom a bojene prema uputstvu u poglavljima 3.4.1.1 (LK) i 3.4.1.2 (mitohondrije).

3.3.4 Praćenje metaboličkog stanja zasnovanog na autofluorescenci endogenih flurofora NAD(P)H i FAD

Gljive su gajene u SMT medijumu kako je opisano u poglavlju 3.3 na 22°C i snimane metodom TPEF. Za potrebe ovog eksperimenta gljive nisu bojene.

3.3.5 Gajenje gljiva za kolokalizacione eksperimente

Za kolokalizacione eksperimente, gljive su gajene u SMT medijumu kako je opisano u poglavlju 3.3 na 22°C, obojene *Nile Red* bojom (poglavlje 3.4.1.1) i snimane metodom TPEF simultano sa THG metodom (poglavlje 3.5.1.2).

3.3.6 Gajenje gljiva za ćelijsku nanohirurgiju

Za ovaj eksperiment gljive su uzgajane na pokrovnim staklima (Ø 15 mm) obloženim tankim slojem kolagena kao imobilizatorom i postavljene na dno ploča sa 6 bunarića (eng. 6 well plate). Spore su prvo zasejane u koncentraciji 10^7 spora/mL u otvorenim Petri šoljama (Ø 100 mm) u izmenjenom SMT medijumu na 21-22°C. Korišćena je duplo manja količina glukoze kako bi se smanjila osmolarnost medijuma sa ciljem da se gljive prilagode uslovima niže osmolarnosti i time obezbedi brža plazmoliza tokom pripremne faze nanohirurgije. Osmolarnost je dodatno smanjena razblaživanjem medijuma za 10% i konačna osmolarnost takvog medijuma je bila 140 mOsm. Odmah nakon zasejavanja u Petri šolje po 15 µL suspenzije spora iz ove kulture je korišćeno za inokulisanje pokrovnih stakalaca sa kolagenom. Ovih 15 µL suspenzije spora se dodatno razblaži sa 50 µL razblaženog SMT medijuma, razvuče preko kolagena i ostavi sat vremena na sobnoj temperaturi kako bi se sporama omogućilo da se pričvrste za kolagen. Nakon sat vremena, dodaje se još 2 mL razblaženog SMT medijuma u bunariće kako bi se izbeglo isušivanje i obezbedila dovoljna količina medijuma za rast spora. Ovaj metod se pokazao kao najbolji u pogledu vezivanja i rasta hifa. Eksperiment se uvek izvodio na gljivama u eksponencijalnoj fazi rasta, starosti 19-30 h. Većina hifa su bile jednostavne izdužene ćelije sa još uvek vidljivom sporom, dok su neke tek počele da formiraju bočne grane.

3.3.6.1 Podloge i mapiranje pokrovnih stakalaca

Pre zasejavanja hifa na kolagen, urađeno je testiranje vezivanja hifa za više različitih podloga za oblaganje supstrata, kao i direktna modifikacija površine pokrovnih stakalaca. U tabeli 2 su prikazane testirane podloge i njihov efekat na lepljenje tj. njihova efikasnost u vezivanju hifa. Od svih testiranih podloga, hife su se najbolje vezivale i rasle na kolagenu tipa I (iz tetive repa pacova,

proizvođač Sigma-Aldrich), i to 50% razblaženom kolagenu koji je prethodno polimerisao na sobnoj temperaturi tokom 24 h. Testirana je i njegova polimerizacija u sušnici na 37°C u trajanju 3 do 5 sati ali sa slabijim rezultatima u vezivanju hifa za njegovu površinu. Zatim je testirana optimalna debljina kolagena i utvrđeno da je to 10 µL radnog rastvora kolagena na pokrovnom staklu prečnika 15 mm. Pre tretiranja kolagenom, pokrovna stakla su „mapirana“ urezivanjem brojeva veličine do pola milimetra. Ovo je postignuto korišćenjem lupe i dijamantske olovke za pisanje po staklu. Mapiranje pokrovnih stakalaca, na kojima su gajene gljivne ćelije, je bilo neophodno da bi se tačno odredili položaji hifa pre i posle hirurgije, jer se sama nanohirurgija i elektrofiziologija obavljaju na dva odvojena mikroskopa. Pokrovna stakla sa imobilisanim hifama se pre eksperimenta postavljaju na dno mikroskopske komore a komora se zatim puni odgovarajućom količinom hiperoosmotskog rastvora.

Radni rastvor kolagena, 50% razblažen od početne koncentracije 10 mg/mL, je pripremljen prema protokolu (Slater, Partridge, and Nandivada 2018). 1 mL radnog rastvora kolagena sadrži 500 µL nepolimerisanog kolagena, 398 µL sterilne dejonizovane H₂O, 100 µL 10xPBS-a i 2 µL 1M NaOH. Kolagen i radni rastvor kolagena se čuvaju u frižideru na 4°C. Prilikom rada sa kolagenom neophodno je da isti bude konstantno na ledu kako bi se sprečilo njegovo polimerisanje na višim temperaturama. Mapirana pokrovna stakla na koja se razliva rastvor kolagena se prethodno sterilišu u 70% etanolu 15 minuta, isperu destilovanom vodom i ostavljaju pod UV svetlom još 30 minuta.

Tabela 2. Efekasnost različitih podloga u vezivanju gljiva za pokrovno staklo. Procena vezivanja gljiva je izvršena prebrojavanjem hifa koje su ostale pričvršćene za pokrovno staklo nakon izmene rastvora u 4 vidna polja (posmatrano objektivom 20x, NA=0,8) na svetlosnom mikroskopu. Veoma visoka snaga vezivanja: više od 80% hifa po vidnom polju; visoka: između 40 i 80 hifa po vidnom polju; srednja: između 10 i 40 hifa po vidnom polju; slaba: između 1 i 10 hifa po vidnom polju; bez vezivanja: manje od 3 hife na celom pokrovnom staklu.

Podloge i modifikacije

Želatin

Silikon

Laminin

Laminin + poli L lizin

Konkanavalin A

Kolagen tip I

Konkanavalin A + kolagen

Modifikacija pokrovnog stakla plazmom

Snaga vezivanja

slaba

srednja

bez vezivanja

slaba

slaba

veoma visoka

visoka

bez vezivanja

3.4 Priprema uzoraka za TPEF oslikavanje i ćelijsku hirurgiju

3.4.1 Fluorescentno bojenje organela i ćelijskog zida *P. blakesleeanus*

Sva bojenja su rađena na živim hifama na sobnoj temperaturi (20°C), u mraku i bez ispiranja, osim u slučaju bojenja ćelijskog zida. Radni rastvori svih boja su pravljani korišćenjem SMT medijuma, osim u slučaju CFW boje za koju je korišćen izoosmotski ratsvor. Radni rastvori boja su dodavani

direktno u suspenziju hifa. U tabeli 3 su prikazane korišćene boje i njihove talasne dužine maksimalne ekscitacije i emisije, kao i talasne dužine korišćene za dvofotonsku ekscitaciju.

Tabela 3. Ekscitacioni i emisijski maksimumi korišćenih boja za obeležavanje ćelijskog zida i organela u živim hifama *P. blakesleeanus*.

<i>Boja</i>	<i>Objekat bojenja</i>	<i>Miksimum 1-fotonske ekscitacije (nm)</i>	<i>Maksimum emisije (nm)</i>	<i>Talasna dužina 2-fotonske eksc. (nm)</i>
Nile red	lipidne kapi	553	585	1040
Rhodamine 123	mitohondrije	514	529	800
DAPI	jedra	359	457	730
Calcofluor White	ćelijski zid	350	432	730

3.4.1.1 Bojenje lipidnih kapi

Za oslikavanje TPEF metodom, lipidne kapi su bojene Nile Red (NR) bojom (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one, Acros Organics) i inkubirane 10 minuta.

Za eksperiment sa uticajem temperature na dinamiku LK testirane su koncentracije od 1,26, 0,63 i 0,25 μM pri čemu se koncentracija od 0,63 μM pokazala najpogodnijom (najbolji odnos signal/šum za najmanju korišćenu snagu lasera).

Za potrebe kolokalizacionog eksperimenta, lipidne kapi u živim hifama u eksponencijalnoj fazi rasta (26 h) su obojene sa manjom koncentracijom, 0,126 μM , jer su korišćene veće snage lasera kako bi se istovremeno dobio i THG signal za koji je potrebna veća snaga nego za TPEF.

3.4.1.2 Bojenje mitohondrija

Za eksperimente sa uticajem selenita, azotnog gladovanja i povišene temperature, mitohondrije su bojene upotrebom Rhodamine123 (Rh123) (2-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl) benzoic acid methyl ester, Sigma-Aldrich) boje čiji ulazak u ove organele zavisi od potencijala njihove membrane. Testirane su koncentracije od 1, 5, 10 i 42 μM , pri čemu je koncentracija od 5 μM davala najbolji odnos signal/šum. Veće koncentracije nisu davale značajno poboljšanje u signalu poreklom iz mitohondrija u odnosu na 5 μM , a u medijumu je stvaran preveliki šum za efikasno oslikavanje. Boja je inkubirana 30 minuta.

3.4.1.3 Bojenje jedara

Jedra su bojena DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich) bojom koja se vezuje za nukleinske kiseline i standardno se koristi za obeležavanje jedara kod živih i fiksiranih ćelija. Korišćena je koncentracija od 0,4 μM i boja je inkubirana 15 minuta u suspenziji hifa u SMT medijumu.

3.4.1.4 Bojenje ćelijskog zida

Za vizualizaciju ćelijskog zida, za potrebe eksperimenta sa nanohirurgijom, korišćena je boja Calcofluor White (Sigma-Aldrich). CFW ima visok afinitet za komponente ćelijskog zida (hitin i drugi polisaharidi) i maksimum apsorpcije na 345 nm u uslovima jednofotonske ekscitacije (Maeda and Ishida 1967). Žive hife u eksponencijalnoj fazi rasta (19-30 h) su inkubirane sa 1% CFW u izoosmotskom rastvoru (495 mOsm) 10 minuta. S obzirom da je ovaj korak predstavljao i korak preplazmolize, sa ciljem da se smanji osmotski šok pri prelasku iz medijuma za rast u hiperosmotski rastvor, u razblaženje boje je dodat i 10 μ M brefeldin A. Nakon inkubacije, hife su isprane tri puta u SMT medijumu.

3.4.2 Plazmoliza i deplazmoliza hifa *P. blakesleeanus*

Za eksperimente sa nanohirurgijom, plazmoliza je izvedena u dva koraka predstavljenih preplazmolizom i plazmolizom. U koraku preplazmolize (desetominutna inkubacija) hife su prenete iz hipoosmotskog medijuma za rast (140 mOsm) u izoosmotski rastvor (495 mOsm) koji je sadržao CFW boju. Korak preplazmolize je poslužio da se olakša plazmoliza koja je inicirana prenošenjem hifa u hiperosmotski rastvor (HiperR) u kome su ostajale tokom oslikavanja i nanohirurgije. Hiperosmotski rastvor (620 mOsm, izuzev u jednom podskupu eksperimenata gde je korišćen 680 mOsm HiperR) je sadržao visoku koncentraciju kalcijuma (30 mM), u obliku CaCl_2 ili $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Za početak plazmolize je smatrano vreme u kome je primećeno povlačenje protoplasta na dva ili više mesta duž hifa u najmanje 25-30% hifa u vidnom polju. Povlačenje protoplasta sa vrha hife nije korišćeno kao kriterijum za merenje vremena plazmolize. Nakon hirurške procedure, usledio je korak blage deplazmolize. Pažljivo je uklonjena $\frac{1}{4}$ HiperR i polako i postepeno dodavan komorični rastvor (520 mOsm, NitR ili VglutR) u istoj zapremini, što je vodilo ka konačnoj osmolarnosti od 595 ± 10 mOsm u mikroskopskoj komorici. Razlika od 25 ± 10 mOsm između HiperR i komoričnog rastvora je omogućila protoplastima da izađu. Međutim, u većini (64%) eksperimenata, protoplasti su izlazili kroz hirurški rez na zidu dok su hife još uvek bile u HiperR.

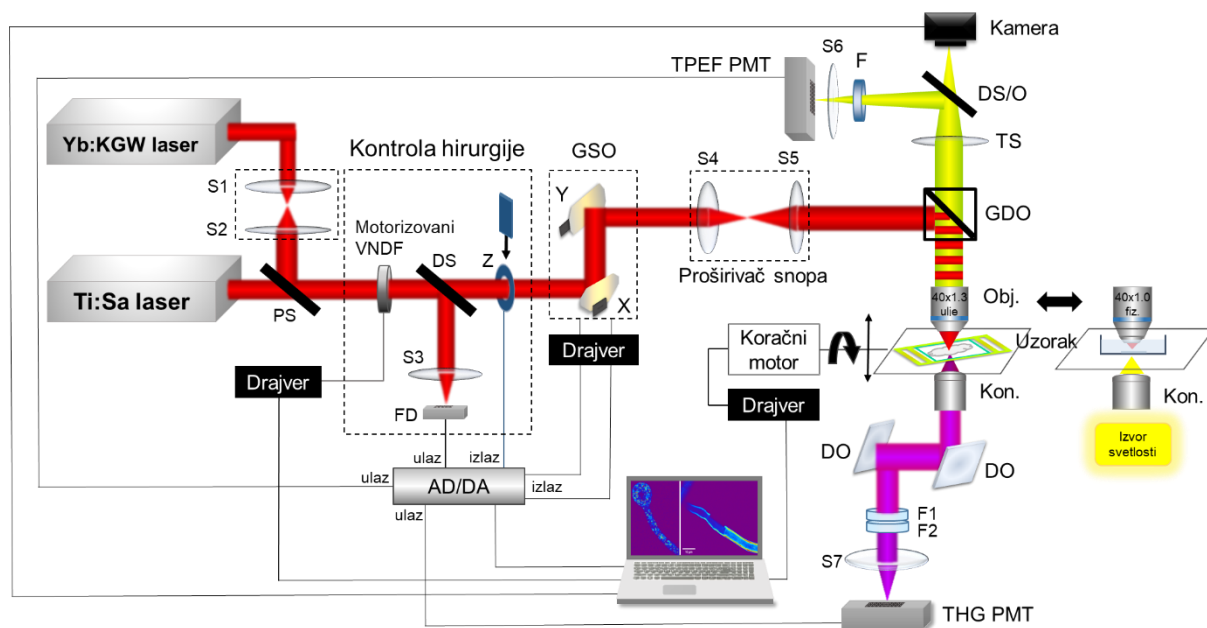
Da bi se sprečila regeneracija ćelijskog zida tokom hirurgije i elektrofizioloških merenja, gljive su tretirane inhibitorom egzocitoze (10 μ M brefeldin A), koji je dodavan u IzoR u koraku preplazmolize, i inhibitorom mitohondrijalnog disanja (2 mM natrijum azid) koji je dodavan u HiperR i rastvore za komoricu. Koncentracija je izabran na osnovu prethodno izmerenih efekta i doze u našoj laboratoriji (Stanić 2014). Dakle, natrijum azid je bio kontinuirano prisutan u svim rastvorima, izuzev tokom bojenja ćelijskog zida. Testirano je dodavanje koktela enzima hitinaze i hitozanaze koji razgrađuju ostatke ćelijskog zida a za koje smo pretpostavili da bi mogli biti prisutni na mestu reza. Utvrđeno je da nemaju efekta i nisu korišćeni u optimizovanim uslovima.

3.5 Instrumentalne postavke i uslovi snimanja

3.5.1 Nelinearna laserska skenirajuća mikroskopija

Laserska nanohirurgija, TPEF i THG oslikavanje živih gljivnih ćelija su izvedeni nelinearnim laserskim skenirajućim mikroskopom (slika 3.2) konstruisanim u Laboratoriji za biofiziku na Institutu za fiziku Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalna postavka nelinearnog mikroskopa je zasnovana na značajno modifikovanom Zeiss Janaval uspravnom (eng. upright) mikroskopu, prilagođenom za lasersko skeniranje i dodatno modifikovana dodavanjem transmisione grane za THG oslikavanje. Pored postojećih komponenti dodata je i kompletna postavka za pobudu, glavno dihroično ogledalo, refleksiona i transmisiona detekciona grana. Postavka ima dva ultrabrza lasera.

Za THG oslikavanje nebojenih hifa, kao i za dvofotonsku pobudu NR boje, korišćen je iterbijumski (Yb:KGW) femtosekundni laser sa pasivnom sinhronizacijom modova pomoću SESAM ogledala (Time-Bandwidth Products AG, Time-Bandwidth Yb GLX; Ciriš, Švajcarska) koji generiše impulse trajanja od 200 fs i sa učestanošću ponavljanja od 83 MHz na 1040 nm. Talasna dužina lasera je odabrana tako da THG signal čija je talasna dužina 3 puta kraća (347 nm) i dalje bude u opsegu konvencionalne UV optike. Laserski zrak se prvo propušta kroz kolimišući 1:1 proširivač snopa (S1 i S2) za kompenzaciju divergencije, a zatim se kombinuje na preklapaču snopova (PS) sa laserskim snopom titan-safirnog (Ti:Sa) lasera koji se koristi za (auto)TPEF oslikavanje i fs hirurgiju. Laser promenljive talasne dužine (700 - 1000 nm) kod koga je sinhronizacija modova postignuta pomoću Kerovog sočiva Ti:Sa laser (Mira 900, Coherent Inc. CA, SAD) generiše impulse od 160 fs pri učestanosti ponavljanja od 76 MHz i energijom pojedinačnog impulsa od 30 nJ. Ti:Sa laser se pumpa sa kontinualnim Nd:YVO4 laserom, sa udvojenom učestanošću, na 532 nm (VERDI V10, Coherent Inc. CA, SAD). Kontrola snage za nanohirurgiju i oslikavanje je postignuta korišćenjem motorizovanog varijabilnog neutralnog filtera (eng. variable neutral density filter – VNDF) i brzog mehaničkog zatvarača (Z) (eng. shutter) za blokiranje ili propuštanje laserskog zraka. Oba laserska snopa, nakon kombinovanja, prolaze kroz VNDF i Z. Zraci se zatim rasterski skeniraju preko uzorka pomoću dva galvo-skenirajuća ogledala (Cambridge Technologies, 6215H; Bedford, Masačusets, SAD). Nakon skeniranja, laserski zraci prolaze kroz 1:3,75 proširivač snopa (S4 i S5) koji je korišćen da bi se popunila zadnja apertura objektiva i postigla 4f konfiguracija. Zraci se dalje usmeravaju na uzorak niskopropusnim glavnim dihroičnim ogledalom (GDO) (propušta do 700 nm / reflektuje iznad 700 nm), Thorlabs, Nju Džerzi, SAD). Za dobro fokusiranje laserskih zraka u uzorak korišćeni su objektiv velike numeričke aperture (NA). Fiziološki (eng. dip-in) objektiv (Carl Zeiss W Plan-Apochromat 40x, NA=1,0) koji služi za direktno uranjanje/potapanje u rastvore sa uzorkom je korišćen za nanohirurgiju, dok je za oslikavanje korišćen uljni imerzioni objektiv velike numeričke aperture (Carl Zeiss, EC Plan-Neofluar 40x, NA=1,3).



Slika 3.2. Šema NLSM postavke. Ti:Sa – fs laser za ćelijsku hirurgiju i TPEF oslikavanje, Yb:KGW – fs laser za TPEF i THG oslikavanje, S1 i S2 – sočiva (eng. lens) proširivača snopa 1:1 za rekolicaciju, PS – preklopač snopova (eng. beam combiner), VNDF – motorizovani varijabilni neutralni filter za regulaciju snage lasera, Z – brzi mehanički zatvarač, GSO – galvanoskenirajuća ogledala, S4 i S5 – sočiva proširivača snopa 1:3,75 za oslikavanje, GDO – glavno dihroično ogledalo (reflektuje preko 700 nm), Obj. – mikroskopski objektivi, Kon. – asferično kondenzorsko sočivo, DO – dihroična ogledala koja reflektuju THG signal (347 nm) a propuštaju Yb laser (1040 nm), TS – sočivo tubusa, DS/O – delitelj snopa ili pomično ogledalo (eng. mirror toggle), F – VIS filter (400-700 nm) ili VIS + emisijski interferencijski filter (479/20 uskopojasni filter za fluorescenciju DAPI-ja ili 530/43 uskopojasni filter za fluorescenciju Rh123 ili 570 nm dugopropusni za fluorescenciju NR), F1 – Hoya glass UV filter sa maksimumom transmisije na 340 nm, F2 – filter propusnog opsega 275-375 nm, S3, S6 i S7 – sočiva za fokusiranje zraka, TPEF PMT – fotomultiplikator za TPEF signal, THG PMT – fotomultiplikator za THG signal, FD – fotodioda, AD/DA – akviziciona kartica. Električno povezivanje je označeno punim linijama.

3.5.1.1 TPEF modalitet - Femtosekundna laserska nanohirurgija

Fiziološki objektiv je korišćen da bi se omogućio rad u istoj mikroskopskoj komori tokom laserske hirurgije i elektrofiziološke procedure na dva odvojena sistema. Elektrofiziološka snimanja su rađena na odvojenom sistemu sa invertovanim mikroskopom koji omogućava mernoj pipeti da priđe, odnosno pristupi uzorku odozgo. Kako se hirurgija i oslikavanje rade na nelinearnom uspravnom mikroskopu sa objektivom pozicioniranim iznad uzorka i kako taj isti uzorak treba preneti na patch sistem sa invertovanim mikroskopom gde je objektiv sa donje strane uzorka a pipeta sa gornje, neophodna je upotreba fiziološkog objektiva i mikroskopske komore. U suprotnom, ukoliko se ne bi koristio fiziološki objektiv, uzorak bi morao biti između dva mikroskopska stakla. Kombinacija fiziološkog objektiva i komore obezbeđuje brži prelaz sa nelinearnog na patch sistem i sprečava perturbaciju uzorka i mogući gubitak dobijenih protoplasta prilikom uklanjanja gornjeg pokrovnog stakla.

Da bi se odredio položaj za hirurgiju na ćelijskom zidu hife, potrebno je vizualizovati ćelijski zid i uveriti se da postoji dovoljna apsorpcija laserskog zraka na talasnoj dužini određenoj za hirurgiju.

Intrinzična autofluorescencija hitina omogućava oslikavanje ćelijskog zida. Ipak, hife su obojene CFW bojom da bi se povećala apsorpcija laserskog zraka i posledično smanjila vrednost snage lasera potrebne za oslikavanje uzorka i nanohirurgiju. TPEF je korišćen za oslikavanje ćelijskog zida hifa obojenog bojom CFW, koristeći istu talasnu dužinu kao i za hirurgiju, 730 nm. Fluorescentni signali su prikupljeni u refleksionoj grani pomoću sočiva objektiva i nakon prolaska kroz GDO i sočiva tubusa (TS) (eng. tube lens) filtriran pomoću VIS filtera propusnog opsega 400–700 nm (Canon, preuzet iz EOS50D kamere). TPEF signali su detektovani nakon što su fokusirani sočivom od 50 mm žižne daljine (S6) na ulazni prozor fotomultiplikatora (TPEF PMT) (RCA, PF10006). Upravljanje galvo ogledalima, akvizicija TPEF signala i mehanički zatvarač su kontrolisani pomoću *National Instrument* kartice (USB-6351) pri brzini uzorkovanja od 1,2 MHz sample/s. Regulacija snage i aksijalni položaj mikroskopskog postolja su kontrolisani mikrokontrolerom. Uzorak, pokrovno staklo sa imobilisanim hifama na dnu otvorene mikroskopske komore, je bio postavljen na motorizovano translativno, odnosno pokretno postolje. Motorizovano postolje se pokreće koračnim motorom koji može da pomera uzorak duž z-ose sa rezolucijom od 0,3 μm . Ovo je neophodno kako bi se precizno ciljalo sredina uzdužnog preseka ćelijskog zida.

Za nanohirurgiju je korišćen prilagođeni dodatak softvera za oslikavanje. Ovaj dodatak omogućava upisivanje proizvoljnog obrasca na TPEF sliku, dok je moguće kontrolisati vreme zadržavanja (dwell time) i prosečnu snagu laserskog zraka. Procedura hirurgije je sledeća: prvo se snima TPEF slika hifa, zatim se obrazac (obično kao BMP slika) uvozi i superponira na TPEF sliku, dok se skaliranje, tačna pozicija i ugao rotacije obrasca mogu podesiti. Nakon toga se definiše prosečna snaga lasera i vreme zadržavanja (dwell time). Brzi mehanički zatvarač se otvara na početku i zatvara na kraju hirurške procedure, nakon čega se snaga lasera i softver automatski vraćaju u režim oslikavanja. Tokom hirurgije, laserski zrak se pomera od tačke do tačke za vreme ($< \mu\text{s}$) mnogo kraće od vremena zadržavanja (reda 1 s).

3.5.1.2 TPEF modalitet - Dvofotonsko oslikavanje

Za (auto)TPEF oslikavanje živih hifa korišćen je Ti:Sa laser. Talasna dužina Ti:Sa lasera je podešena na 730 nm za autoTPEF oslikavanje jer većina endogenih fluoroforma (NAD(P)H, flavini, itd.) može biti pobuđena na ovoj talasnoj dužini (S. Huang, Heikal, and Webb 2002) s jedne strane, i zbog tehničkog ograničenja (opseg talasnih dužina lasera i cut-off-a dihroičnog ogledala) s druge strane. AutoTPEF signali su selektovani pomoću VIS filtera. Za dvofotonsku pobudu boje DAPI je takođe korišćena talasna dužina od 730 nm, dok je signal detektovan kroz interferencioni filter MF479/40 (ThorLabs, USA) sa centrom transmisije na 479 nm i propusnim opsegom 459–499 nm. Za pobudu boje Rh123 je korišćena talasna dužina od 800 nm a signal je detektovan kroz interferencioni filter MF530/43 (ThorLabs, USA), sa centrom transmisije na 530 nm i propusnim opsegom 508–551 nm. S obzirom da VIS filter propušta vidljivu svetlost a blokira IR i UV, isti je dodatno korišćen u kombinaciji sa pomenutim uskopojasnim emisionim filterima kako bi se uklonila rasejana laserska svetlost. Za razliku od prethodnih indikatora, NR boja je dvofotonski pobuđena Yb:KGW laserom na talasnoj dužini od 1040 nm a TPEF signal detektovan pomoću apsorpcionog 570 dugopropusnog (obojeno staklo, nepoznat proizvođač) filtera. Za potrebe kolokalizacionih eksperimenata TPEF signal od NR je detektovan simultano sa THG signalom, što je omogućeno dodatnom modifikacijom softvera za simultano snimanje.

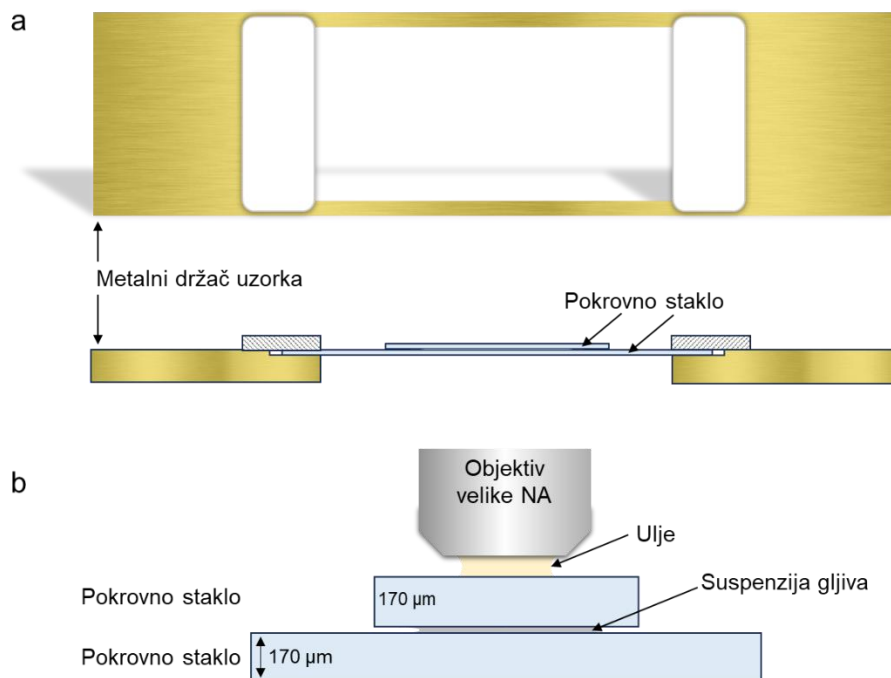
Brzina uzorkovanja od 1,2 MHz sample/s je omogućilo dovoljno veliku brzinu slika pri niskoj rezoluciji za praćenje/monitoring uživo, npr 3 slike po sekundi za 256x256 piksela/tačke sa 6 usrednjavanja. Za slike visoke rezolucije, potrebno je 24 s za sliku od 1024x1024 piksela sa 30 usrednjavanja. Lateralna i aksijalna rezolucija mikroskopa sa objektivom 40x NA=1,3 procenjene su na 300 nm i 1000 nm.

3.5.1.3 THG modalitet

THG signal je detektovan u smeru prostiranja laserskog zračenja (transmisiona grana). Prvo, signal je prikupljen asferičnim sočivom (kondenzor) sa velikom NA (NA=0,9). Zatim je signal reflektovan sa dva dihroična ogledala (DO) koja reflektuju 347 nm ali propuštaju 1040 nm da bi sprečili da laserski snop stigne do detektora. Dalje, signal je filtriran od ostatka laserskih fotona pomoću filtera propusnog opsega 275-375 nm (Thorlabs FGUV11M) i Hoya glass UV filtera (Newport FSR-U340) sa maksimalnom transmisijom na 340 nm. THG signal je detektovan korišćenjem fotomultiplikatora (THG PMT) (H7422, Hamamatsu, Japan), nakon što je fokusiran sočivom žižne dužine 50 mm (S7) na ulazni prozor PMT-a.

Korišćen je specijalno dizajniran metalni držač uzorka (dimenzija 75 x 25 mm) koji omogućava da se žive hife sa (nutritivnim) medijumom postave između dva pokrova stakla #1,5 (debljine 170 μ m) kako bi se ispunili kriterijumi za najbolji NA objektiva, ali i da se izbegne gubitak THG signala debelim predmetnim staklom koji se inače standardno koristi u mikroskopiji sa biološkim uzorcima. Da bi uzorak bio što tanji ali i obezbedio bolji THG signal, korišćeno je 20 μ L suspenzije gljiva. Optimizacijom pripremanja preparata za THG oslikavanje, utvrđeno je da je ova količina suspenzije hifa dovoljna da se hife održe u životu i ne dođe do sušenja uzorka tokom snimanja, a u isto vreme dovoljno mala da obezbedi tanak uzorak za snimanje u transmisiji. S obzirom da se THG signal najbolje oslikava na granicama sredina, poželjno je da uzorak bude uz gornje staklo kako ne bi bilo dodatnog rasejavanja, što je i postignuto ovako dizajnirani preparatom. Držač je postavljen između objektiva i asferičnog kondenzera (Kon.) na motorizovanom postolju koji se može pomerati u koracima od 0,3 μ m duž pravca prostiranja lasera (z-osa) za optičko sečenje uzorka i 3D oslikavanje.

Na slici 3.3 je prikazana šema dizajniranog držača uzorka za THG snimanje sa prikazanom debljinom pokrovnih stakalaca i uzorka, kao i idealne pozicije za THG oslikavanje i dobijanje najboljeg odnosa signal-šum na slikama. Ovako „usendvičeni“ preparati sa 20 μ L suspenzije hifa su takođe korišćeni i kod TPEF oslikavanja mitohondrija kako bi se obezbedili uzorci sa jednim slojem hifa između pokrovnih stakalaca.



Slika 3.3. Šema držača uzorka za THG oslikavanje. a) Izgled držača uzorka (gore) i poprečni presek držača uzorka sa umetnutim pokrovnim staklom (dole). b) Poprečni presek „usendvičenog“ uzorka. Visina suspenzije gljiva između dva pokrovna stakla: 10 – 20 μm. Donje i gornje pokrovno staklo su dodatno bili pričvršćeni lakom na 4 četiri ivice manjeg gornjeg stakla (nije prikazano na šemi). Imerziono ulje: I.P. 1,518.

Tokom oslikavanja kontrolne i izgladnele grupe vremenske tačke su skupljane uzastopno. Korišćenje tehnika za oslikavanje bez obeleživača, kao što je THG, omogućilo nam je da snimimo uzorke sa minimalnim kašnjenjem nakon uzimanja gljiva iz kulture. Ukupno vreme držanja uzorka pod mikroskopom da bi se dobile najmanje 3 THG slike žive hife bilo je između 25 i 37 minuta. Efektivno, vremenske tačke za kontrolu i tretman su pomerene za 30-40 minuta jedna u odnosu na drugu u jednom eksperimentalnom danu, a zatim su sledećeg dana pomerene u suprotnom smeru.

3.5.2 Svetlosna mikroskopija

Bright-field (BF) slike su snimljene digitalnim fotoaparatom Canon EOS 50D (Tokijo, Japan) čiji je senzor postavljen u ravan slike sočiva tubusa (TS). Delitelj snopa ili pomično ogledalo DS/O omogućava korišćenje bilo kamere za BF ili TPEF PMT za fluorescentno oslikavanje. Za eksperiment sa uticajem selenita na dužinu hifa, za merenje dužine hifa korišćen je objektiv Carl Zeiss 12,5x NA=0,25.

3.5.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija

Karakterizacija laserski napravljenog reza i oslobođenog protoplasta je urađena pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) visoke rezolucije (4 nm) sa emisijom pištoljem (FEGSEM-Mira3, TESCAN). Uzorci za SEM su pripremljeni prema standardnom protokolu sa

fiksacijom paraformaldehidom, nakon čega je usledilo sušenje uzoraka u uređaju za sušenje koji radi na principu kritične tačke (eng. critical point dryer) (K850, Quorum Technologies, Laughton, UK) kao što je prethodno opisano (Žižić et al. 2022). Uzorci su naparavani kombinacijom 10 nm zlato/paladijuma korišćenjem uređaja za naparavanje (eng. sputter coater) (Quorum Technologies, Laughton, UK) da bi bili provodljivi za SEM analizu.

3.5.4 Postavka sistema za primenu tehnike nametnute voltaže na deliću membrane i elektrofiziološka registracija struja

Mikroskopska komorica je postavljena na invertovani mikroskop (Zeiss Axiovert 10, Germany) sa Luis & Newman mikromanipulatorskim sistemom. Struje su merene pomoću EPC8 pojačivača (HEKA), digitalizovane na 10 kHz sa Instrutech 1600 konverterom/prevaračem (HEKA), niskopropusno filtrirane na 3 kHz, snimljene i obrađene u programu Pulse (HEKA). Pipete koje su korišćene za snimanje u konfiguracijama „na ćeliji“ (eng. on-cell) i „unutra-spolja“ (eng. inside-out) su imale otpore od 10 do 20 M Ω , dok su one korišćene za snimanje u konfiguracijama „cela ćelija“ (eng. whole cell) i „spolja-spolja“ (eng. outside-out) bile u opsegu od 5 do 10 M Ω . Pipete su izvučene od debelozidnog borosilikatnog stakla sa filamentom na Flaming-Brown P97 izvlakaču pipeta (Sutter Instruments) i polirane na sistemu za poliranje toplotom - *Microforge* (L/MCPZ 101, List Medical-Elektronic).

Formiranje gigaomskog kontakta, odnosno povećanje otpora kontakta između pipete i membrane praćeno je kontinuiranim testiranjem odgovora na pravougaoni naponski stimulus. Pre uranjanja u komorični rastvor, kroz pipetu je nametnut pozitivan pritisak od 60 ± 10 mbar kako bi se osiguralo da moguće nečistoće budu uklonjene sa vrha pipete pre kontakta. Nakon kontakta sa membranom, što rezultira povećanjem otpora za nekoliko M Ω , oslobađanje pozitivnog pritiska često nije bilo dovoljno za uspostavljanje gigaomskog kontakta. Primenjivan je i blagi negativni pritisak da se membrana uvuče u pipetu, da bi isti zatim ponovo bio otpušten kako bi se sprečilo da protoplast bude usisan u pipetu. Formiranje gigaomskog kontakta (eng. seal) je obično trajalo nekoliko sekundi do pola minuta. Gigaomski kontakt je postignut kada je otpor kontakta dostigao ili premašio 1 G Ω . Snimanje u konfiguraciji „na ćeliji“ se retko koristilo jer nije pružalo zadovoljavajuću kontrolu napona. Istrzanje delića membrane je postignuto brzim pomeranjem pipete od protoplasta u horizontalnom pravcu. Aktivnost membranskih struja u istrgnutim konfiguracijama („unutra-spolja“ ili „spolja-spolja“) je snimana primenom kontinualnih protokola. Kontinualni protokoli su primenjivani na različitim naponima (eng. holding voltages - V_h) radi merenja amplitude aktivnih kanala i konstruisanja strujno-naponskog dijagrama. Alternativno, standardni protokol je primenjen pri ulasku u konfiguraciju „cela ćelija“: V_h od 50 mV, nakon čega sledi serija pravougaonih naponskih stimulusa rastućih amplituda od -110 mV do +110 mV, u koracima od po 20 mV. Trajanje svakog pravougaonog stimulusa je bilo 500 ms sa periodom odmora od 0.5-1 s. Serijski otpori u konfiguraciji cela ćelija nisu kompenzovani. Svi eksperimenti su izvedeni na 20°C.

3.5.5 Merenje efekta kalcijuma na oslobađanje protoplasta

Efekat Ca^{2+} na verovatnoću oslobađanja protoplasta iz nanohirurških rezova je meren korišćenjem TPEF slika snimljenih neposredno nakon što su rezovi napravljeni. Za ovu seriju eksperimenata korišćen je uljani objektiv 40x numeričke aparture 1.3. Nanohirurgija i oslikavanje su izvedeni u rastvorima sa standardnom koncentracijom Ca^{2+} i sa visokim sadržajem Ca^{2+} , ali bez naknadne primene MNVnDM.

3.5.6 Merenje prinosa biomase i potrošnje kiseonika

Da bi se izmerio prinos biomase u kontrolnim izoosmotskim (500 mOsm) i hiperosmotskim uslovima (760 i 860 mOsm), micelijum *P. blakesleeanus* je prvo uzgajan u petri šoljama u SMT medijumu 16 sati. Biomasa je merena 30 i 90 minuta nakon tretmana sa hiperosmotskim i izoosmotskim rastvorima. Micelijum je prvo iscentrifugiran, odliven je medijum i dodati su rastvori pomenute osmolarnosti. Prinos (eng. yield gain) je određen za svaku kulturu kao razlika biomase u svakoj vremenskoj tački i prosečne biomase kontrole na početku rasta.

Potrošnja kiseonika micelijuma *P. blakesleeanus* je merena korišćenjem kiseonične elektrode tipa Clark (Qubit Systems). Suspenzija micelijuma je razblažena u svežem tečnom minimalnom medijumu do odgovarajuće koncentracije (potrošnja kiseonika između 15-25 $\mu\text{mol/L} \times \text{min}$) i aerisana 1 minut pre merenja. Dva mililitra suspenzije ($n=3$) je prebačeno u elektrodnu komoru od 4 mL i održavano na konstantnoj temperaturi od 25°C.

3.6 Analiza rezultata

3.6.1 Analiza slika

3.6.1.1 Analiza THG slika

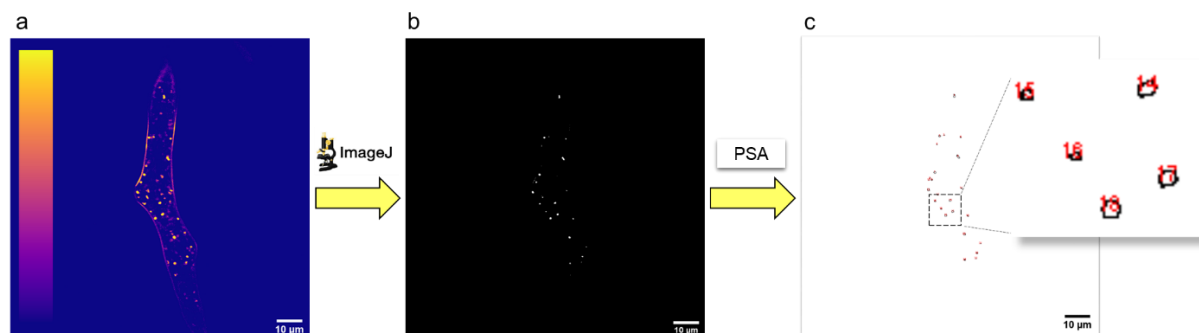
Analiza THG slika (2D) lipidnih kapi izvedena je korišćenjem programa *ImageJ* (W. Rasband, National Institute of Health, Marilend, SAD, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Za obradu 3D slika i 4D trodimenzionalnih snimaka korišćeni su algoritmi za normalizaciju slika napisani u MatLab-u (domaći kod kreiran u Laboratoriji za biofiziku Instituta za fiziku Beograd) i program VolView (verzija 3.4, Kitware Inc., Klifton Park, SAD). Za kvantifikaciju broja i veličine lipidnih kapi nakon gladovanja korišćene su dve metode za analizu slika: Analiza veličine čestica (eng. Particle Size Analysis – PSA) i korelaciona analiza slike (eng. Image Correlation Spectroscopy - ICS).

U **PSA proceduri** slike su prvo prostorno skalirane i automatski je postavljen prag/granična vrednost signala (eng. threshold) primenom algoritma *Maksimalna entropija* (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/entropy.html>) (slika 3.4). Granična vrednost/prag za sve slike je bila između 0,03 i 0,1 procenata. Nakon ovog koraka, svaka slika je konvertovana u osmobitnu masku, koja je korišćena za dobijanje podataka o lipidnim kapima, pomoću opcije *Analyze Particles* u programu ImageJ. Cirkularnost ($4\pi \times [\text{površina}]/[\text{obim}]^2$) je ograničena na interval od 0,3 do 1, gde vrednost 1 predstavlja savršen krug a 0 beskonačno izdužen poligon. Donja granica

za veličinu čestica je bila postavljena na 0,3 μm . Za potrebe kvantifikacije LK, ovom metodom je izračunat broj, pojedinačna i ukupna površina LK i feretov prečnik. Feretov prečnik je najduža udaljenost između bilo koje dve tačke duž izabranih objekata, u našem slučaju lipidnih kapi.

ICS procedura se takođe sprovodi u programu *ImageJ* dok je za analizu dobijenih korelacionih krivi korišćen OriginPro 8.5. Prvo se računa srednja vrednost pozadinskog intenziteta THG slika kao prosečna vrednost piksela u malom regionu od interesa (eng. region of interest – ROI) koji je izvan hife. Zatim se pozadinski intenzitet oduzima od slike (veličine 1024x1024 piksela) 1, 2,3 ili 20 puta. Dobijena slika nakon oduzimanja se sačuva u .png formatu, zatvori i ponovo otvori u *ImageJ*-u, nakon čega sledi autokorelacija. Proračun autokorelacije je urađen korišćenjem Furijeove analize nakon čega se dobija nova, tzv. rezultujuća ICS slika. Putanja za ovu funkciju u *ImageJ*-u je sledeća: *Process > FTT > FD Math*. Rezultujuća slika se zatim normalizuje deljenjem sa ukupnim brojem piksela i kvadratom prosečnog intenziteta originalne slike. Nakon povlačenja linije kroz centar rezultujuće slike dobija se profil intenziteta koji se dalje analizira u programu OriginPro.

Za analizu uticaja natrijum selenita na LK je takođe korišćena PSA metoda. Procenat površine hife koju zauzimaju lipidne kapi je računat tako što se ukupna površina lipidnih kapi jedne hife podeli sa površinom iste hife. Površina hife je računata pomoću opcije *Measure* nakon što se *Freehand* alatom obeleže granice hife.



Slika 3.4. PSA procedura. a) Originalna, neobrađena THG slika neobojene hife. Vide se okrugle lipidne kapi i ćelijski zid. b) Slika sa postavljenim pragom signala (threshold) (Max entropy). Nakon postavljanja praga primenom algoritma za maksimalnu entropiju signali slabijeg intenziteta se gube i ostaju samo lipidne kapi koje daju najjači THG signal. c) 8-bitna maska sa zaokruženim lipidnim kapima nakon PSA analize.

3.6.1.2 Analiza TPEF slika

Za analizu 2D TPEF slika uticaja selenita na mitohondrije i povišene temperature na lipidne kapi i mitohondrije, korišćena je PSA metoda u programu *ImageJ*. Analiza mitohondrija i LK je obuhvatala izračunavanje površine pojedinačnih mitohondrija/lipidnih kapi i ukupne površine mitohondrija, odnosno LK po hifi. Procenat površine hife koju zauzimaju mitohondrije ili LK je računat kao količnik ukupne površine mitohondrija ili lipidnih kapi u hifi i površine iste te hife. Površina hife je računata pomoću opcije *Measure* nakon što se alatom *Freehand* obeleže granice

hifa. Analiza zastupljenosti morfoloških tipova mitohondrija na nivou celih hifa je urađena vizuelnom inspekcijom na osnovu dominantno zastupljenih oblika mitohondrija.

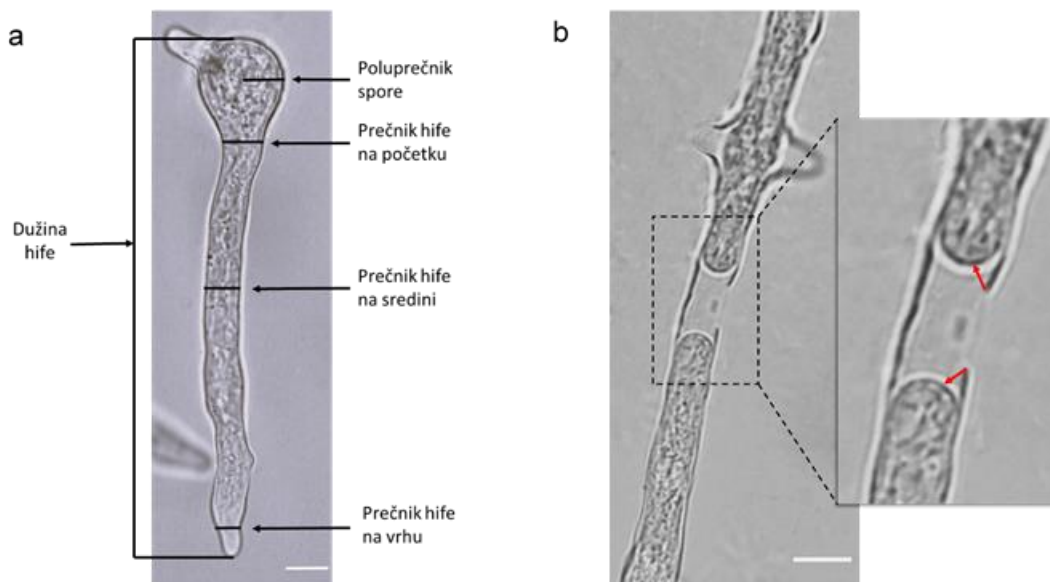
Za kreiranje 3D i 4D prikaza korišćen je domaći algoritam napisan u MatLab-u i program VolView (verzija 3.4, Kitware Inc., Klifton Park, SAD).

Kompozitne slike preklapanja (auto)TPEF i THG signala, kao i preklapanje signala autofluorescencije NAD(P)H i FAD su urađene u programu *ImageJ* pomoću opcije *Image/Merge Channels*.

3.6.1.3 Analiza BF slika

Analiza BF slika hifa radi ekstrakcije morfometrijskih parametara izvedena je korišćenjem programa *ImageJ*. Za utvrđivanje uticaja različitih koncentracija selenita i starosti hifa na bojenje mitohondrija bojom Rh123, kao i uticaj selenita na morfologiju pojedinačnih hifa, analizirana je dužina i prečnik hife na sredini i pri vrhu (slika 3.5a). Za određivanje prečnika hife korišćen je alat *Straight Line* i opcija *Analyze/Measure*, dok je za određivanje dužine hife korišćen alat *Freehand*.

U eksperimentima laserske nanohirurgije, analizirani su sledeći parametri: prečnik ekstrudiranih protoplasta, dužina napravljenih hirurških rezova u ćelijskom zidu, udaljenost reza od protoplasta (slika 3.5b) i prečnik hifa na mestima sečenja. Za sva merenja je korišćen alat *Straight Line* i opcija *Analyze/Measure*.



Slika 3.5. a) Reprezentativna BF slika hife korišćena za ekstrakciju morfometrijskih podataka. Glavne merene karakteristike su označene crnim linijama. Skala: 10 μm . b) BF slika plazmolizovane hife sa isečenim ćelijskim zidom. Crvenim strelicama je označeno merenje udaljenosti reza od ćelijske membrane protoplasta. Skala: 10 μm .

3.6.2 Analiza struja

Analiza podataka o snimljenim strujama u ćelijskoj membrani izašlih protoplasta izvršena je korišćenjem programskih paketa Pulse i Clampfit (Molecular Devices, SAD). Potencijali reverzije (V_{rev}) za svaki jon su izračunati pomoću kalkulatora dostupnog na https://www.physiologyweb.com/calculators/ernst_potential_calculator.html. Provodljivost g (pS) je izvedena kao nagib strujno-naponske zavisnosti za svaku detektabilnu struju pojedinačnih kanala snimljenu na tri ili više različitih V_h . V_{rev} je ekstrapoliran iz linearnog IV dijagrama. U retkim slučajevima gde je struja bila ispravljena (nelinearni IV odnos), linearni deo IV zavisnosti je korišćen za ekstrapolaciju. Vodio se računa o osmišljavanju rastvora tako da teorijski V_{rev} za svaki jon bude dovoljno odvojen od ostalih da bi se omogućilo grubo kategorisanje struja na osnovu jona koji najviše doprinosi V_{rev} -u (definisan kao jon čiji je V_{rev} bio blizu V_{rev} snimljene struje pojedinačnog kanala).

3.6.3 Statistička analiza

Za izradu svih grafika i statistička poređenja korišćen je program *GraphPad Prism 6* (San Dijego, Kalifornija, SAD), izuzev za predstavljenje udela morfoloških tipova mitohondrija gde je korišćen program *Excel 2016*. Grafici podataka koji su prikazani u obliku pravougaonika sa brčićima (eng. Box plot with whiskers) su okruženi opsegom 25-75%, pri čemu vodoravna linija predstavlja medijanu, a granice brčića minimalnu i maksimalnu vrednost. Jednosmerna ili dvosmerna ANOVA za višestruka poređenja sa *Holm-Sidak* korekcijom, kao i neupareni dvostrani t-test sa *Velšovom* korekcijom za nejednake varijanse su korišćeni za izračunavanje statističkih značajnosti. Nivoi pouzdanosti za statističku značajnost su bili 0.05 (*), 0.01 (**), 0.005 (***), 0.0001 (****). Gde je bilo prikladno, korišćen je neupareni dvostrani *Mann-Whitney* test.

Histogrami dužine rezova su formirani od svih vrednosti u svakoj grupi sa opsegom vrednosti od 3 μm i ucrtani na gornjoj granici osega na x-osi. Histogrami udaljenosti hifalnih protoplasta od mesta reza, kao i širine hifa na mestu reza, su formirani od svih vrednosti u svakoj grupi sa opsegom vrednosti od 2 μm i ucrtani na gornjoj granici osega na x-osi. Verovatnoće oslobađanja su izračunate iz svih dostupnih podataka. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

Histogrami koji pokazuju raspodelu veličina LK nakon gladovanja su generisani iz svih prečnika LK u svakoj grupi sa opsegom vrednosti na svaka 0,3 μm tako što je broj LK iz datog opsega normalizovan na zbir površina hifa u toj eksperimentalnoj grupi (kontroli ili tretmanu). Greške u histogramima koji pokazuju raspodele broja LK/površina hife su računate iz relativne greške (broj hifa u tom opsegu veličina, po jedinici površine hife) koja je bila pomnožena sa vrednošću „broja LK po površini hife“ za taj opseg vrednosti. Relativna greška (broj hifa u tom opsegu vrednosti/površina hifa) je dobijena sabiranjem relativne greške (broj LK/površina hife) i relativne greške (površina hife). Podaci iz tabele koja prikazuje poređenje broja i veličine LK dobijenih kvantifikacionom analizom ICS i PSA, prikazani su kao srednja vrednost $\pm$ standardna greška (SE).

Statističke značajnosti uticaja prečnika hifa i različitih koncentracija natrijum selenita na bojenje mitohondrija bojom Rh123 su testirane t-testom, dok je za kontrolne podatke korišćen *Mann-Whitney* test. Razlike su smatrane značajnim na nivou pouzdanosti od 95%.

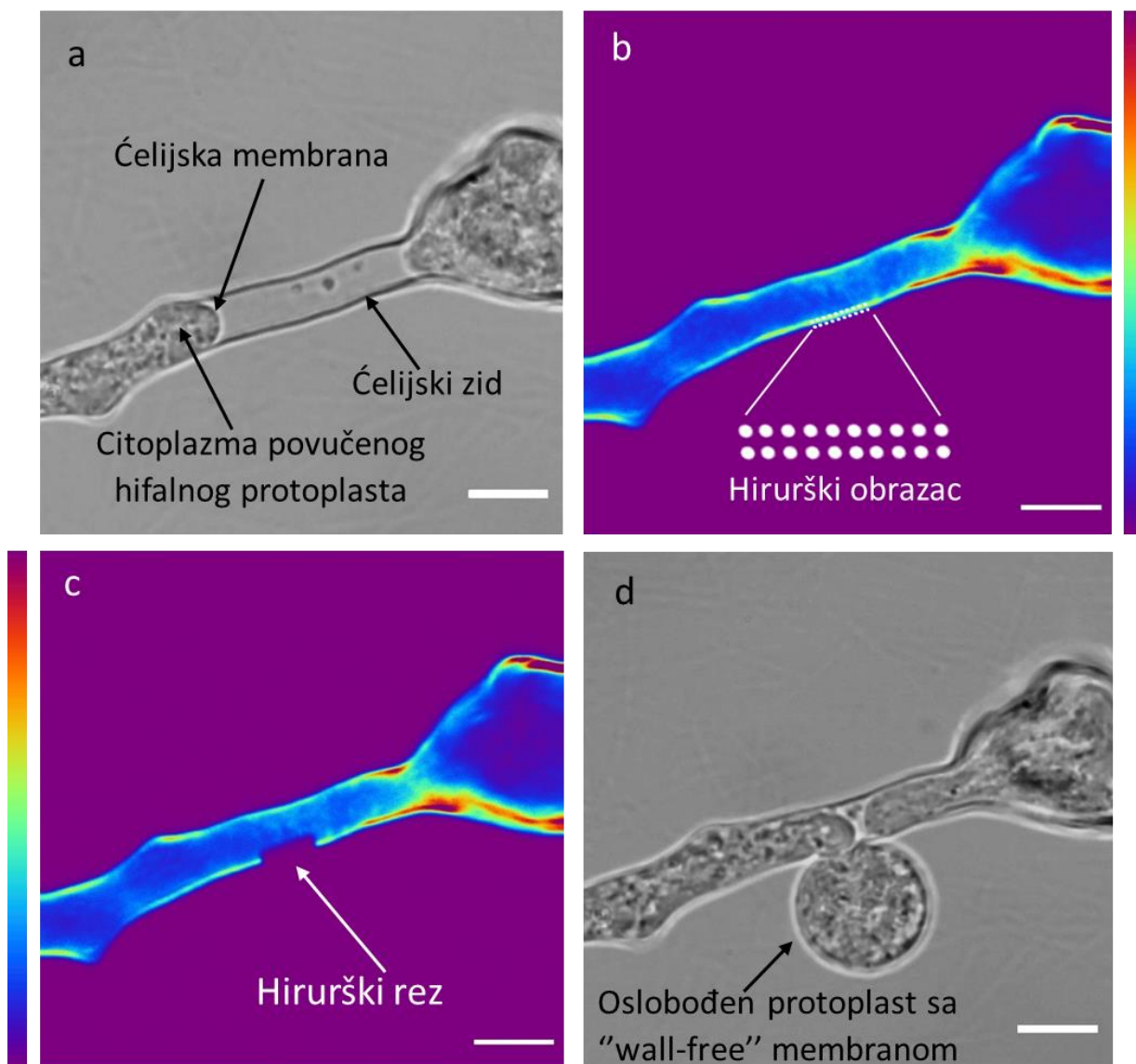
Statističke značajnosti uticaja selenita na dinamiku LK i morfologiju hifa su testirane studentovim t-testom sa nivoom pouzdanosti od 95%. Podaci su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna greška (SE).

4 REZULTATI

4.1 Laserska nanohirurgija ćelijskog zida pojedinačnih hifa končaste gljive *P. blakesleanus*

4.1.1 *In vivo* dvofotonsko oslikavanje, laserska nanohirurgija ćelijskog zida i metoda nametnute voltaže na deliću membrane

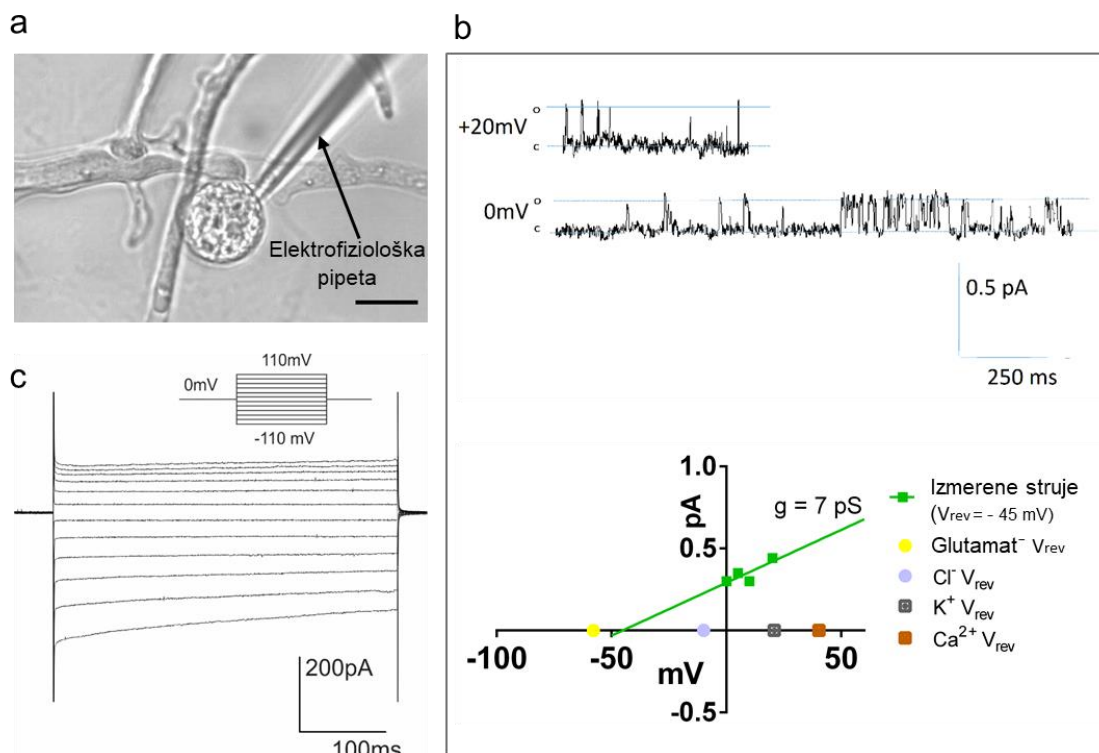
Nelinearni laserski skenirajući mikroskop koji koristi fs laserske impulse je neophodan preduslov za primenu precizne laserske ablacije. NLSM sistem takođe omogućava *in vivo* snimanje pojedinačnih ćelija i ćelijskih struktura korišćenjem dvofotonske ekscitacione fluorescencije (TPEF) pre i posle laserske nanohirurgije. Laserski generisani rezovi na delovima ćelijskog zida končaste gljive *P. blakesleanus* su uspešno napravljeni koristeći dobro fokusirane laserske impulse od 160 fs (slika 4.1). Da bi se uklonio mali deo ćelijskog zida u određenom delu hifa, ćelijski zid se mora vizualizovati i razdvojiti od ćelijske membrane i drugih ćelijskih struktura. Pošto su ćelijski zid i ćelijska membrana u bliskom kontaktu (Knepper, Savory, and Day 2011), hife su plazmolizovane i držane u hiperosmotskom rastvoru da bi se citoplazma sa ćelijskom membranom povukla i odvojila od ćelijskog zida pre procedure, kao što je prikazano na slici 4.1a. Plazmolizovane hife, obojene bojom CFW i tretirane inhibitorom egzocitoze i respiratornim inhibitorom (natrijum azidom) kako bi se sprečila regeneracija ćelijskog zida, podvrgnute su nanohirurgiji. Deo hife gde je došlo do povlačenja hifalnog protoplasta od ćelijskog zida odabran je za nanohirurgiju pozicioniranjem tačkastog obrasca (slika 4.1b) na slobodan deo zida. Laserski generisani rez je jasno vidljiv na TPEF slikama (Slika 4.1c), kao i na BF slikama. Vijabilnost ćelija nakon nanohirurgije je rutinski verifikovana BF mikroskopijom. Samo vijabilne ćelije zadržavaju karakteristično strujanje citoplazme. Glavna funkcija strujanja citoplazme je transport subćelijskih čestica kao što su mitohondrije, LK i glikogen (Bergman et al. 1969). Protoplasti obavijeni ćelijskom membranom su izlazili kroz rezove u ćelijskom zidu bez deformisanja ili pucanja (slika 4.1d). Tako oslobođeni okrugli protoplasti bili su održivi i do nekoliko sati tokom elektrofizioloških merenja. Reprezentativni snimci struja dobijenih MNVnDM iz oslobođenih protoplasta u konfiguracijama „spolja-spolja“ i „cela ćelija“ su prikazani na sl. 4.2b i 4.2c.



Slika 4.1. In vivo laserska nanohirurgija ćelijskog zida končaste gljive *P. blakesleeanus* korišćenjem fs laserskih impulsa. a) BF i b) TPEF slika plazmolizovane i obojene hife pre hirurgije. Tačkasti obrazac 20x2 je postavljen na ćelijski zid u delu hife bez citoplazme. Prosečna snaga lasera u ravni uzorka za oslikavanje je bila 1.1 mW (*dwell time* 2,5 µs) na 730 nm. c) TPEF slika iste hife nakon hirurgije. Hirurški rez je označen strelicom. Snaga lasera u ravni uzorka za hirurgiju je 6,1 mW (*dwell time* 1 s) na 730 nm. Skala intenziteta za TPEF signal: ljubičasta – najniži TPEF signal, tamno crvena – najviši TPEF signal. Skala intenziteta je linearna i pokriva ceo opseg podataka. d) BF slika iste hife sa protoplastom oslobođenim kroz hirurški rez nakon sečenja laserom. Skala: 10 µm. Sve slike su snimljene uljano-imerzionim objektivom Zeiss 40x, NA=1,3.

Od svih hifa koje su bile podvrgnute hirurgiji 36% je dalo protoplaste koji su bili dovoljno veliki (veći od 7 µm) i prostorno dostupni pipeti za registraciju. Za registraciju struja korišćene su sve konfiguracije metode NVnDM. Familija struja dobijena sa cele membrane protoplasta u konfiguraciji „cela ćelija“ je imala tipičan izgled (slika 4.2c). Struje pojedinačnih kanala snimljene u konfiguracijama „unutra-spolja“ ili „spolja-spolja“ su bile raznovrsnije. Korišćeni su rastvori sa asimetričnim koncentracijama jona da bi se identifikovao opšti tip jonske selektivnosti (K^+ , Cl^- ,

glutamat⁻ ili Ca²⁺) za svaku snimljenu struju pojedinačnih kanala na osnovu potencijala reverzije (V_{rev}) (slika 4.2b). Dalje analiziranje dobijenih struja je van opsega ove disertacije.

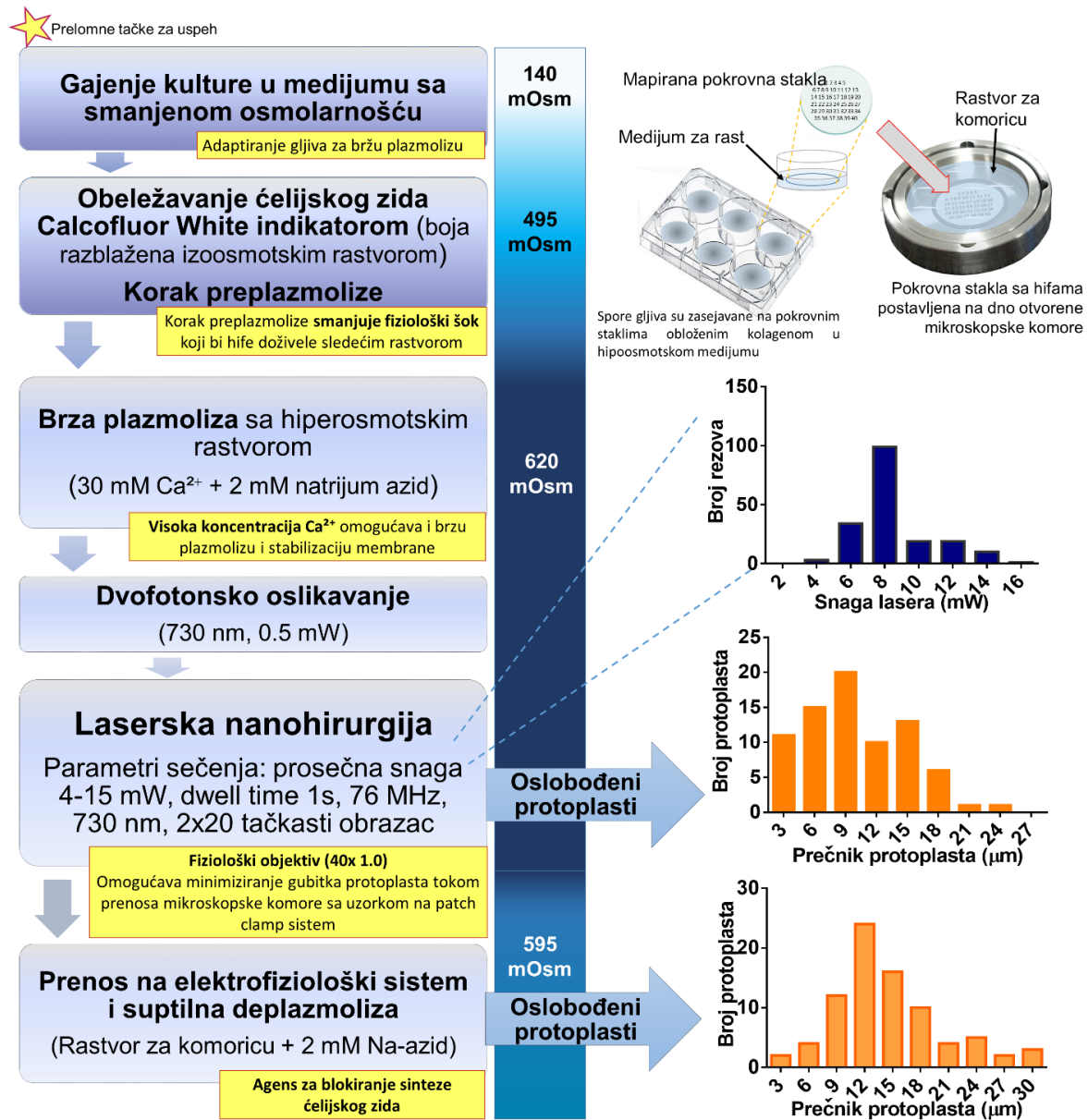


Slika 4.2. Struje registrovane sa ćelijske membrane protoplasta oslobođenih nakon laserske nanohirurgije, snimljene metodom nametnute voltaže na deliću membrane u različitim konfiguracijama. a) BF slika elektroфизиološke pipete u kontaktu sa membranom protoplasta oslobođenog kroz hirurški rez. Skala: 20 μm . BF slika je snimljena objektivom Zeiss 20x, NA=0,5. b) Vrh: reprezentativni snimak struje pojedinačnog kanala dobijen iz oslobođenog protoplasta na $V_h + 20 \text{ mV}$ i 0 mV . O: otvoren kanal; C: zatvoren kanal. Kalibraciona skala je na desnoj strani. Dole: Strujno-naponski (IV) dijagram strujnog zapisa prikazanog iznad. Na apscisi su prikazani potencijali reverzije glavnih jona u rastvorima u komorici i pipeti, što ukazuje da je struja uglavnom nošena glutamatom. Dobijena provodljivost (g) je data iznad linearnog fita kroz merene tačke. Snimljeno je u VGlutR rastvoru. c) Reprezentativna struja snimljena sa cele membrane u konfiguraciji „cela ćelija“. Snimljeno u NitR sa pipetnim rastvorom niskog sadržaja hlorida. Protokol naponske stimulacije koji je korišćen za dobijanje strujnog zapisa je prikazan u umetku. Kalibraciona skala je na dnu.

4.1.2 Procedura laserske nanohirurgije – glavni koraci i ključni faktori

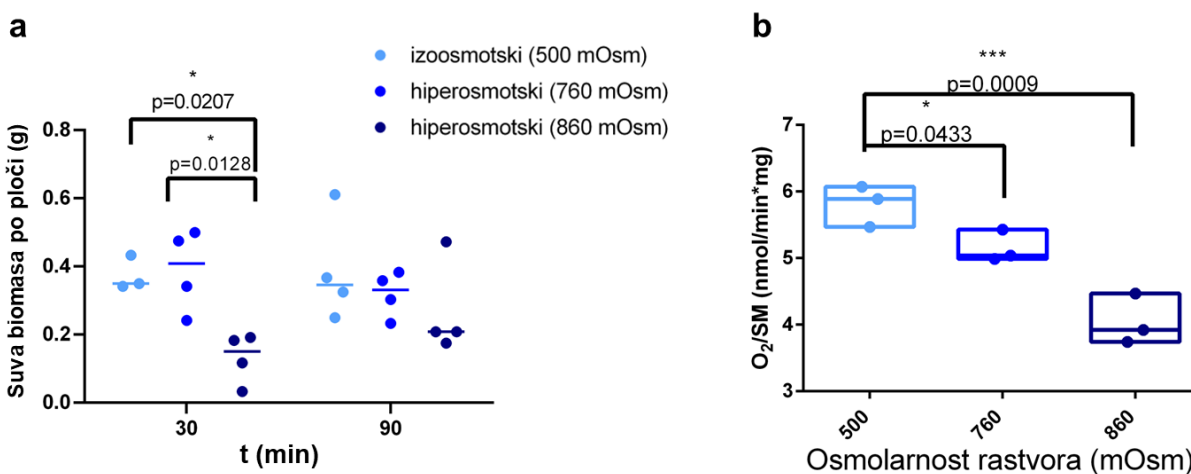
Glavni koraci uspešne fs laserske nanohirurgije ćelijskog zida gljiva za dobijanje vijabilnih protoplasta za analizu MNVnDM su prikazani na slici 4.3. Prvi važan korak je bio smanjenje osmolarnosti medijuma za rast kako bi se gljive prilagodile uslovima sa nižim osmolarnostima i bile osetljive na rastvor za plazmolizu. Ovo je obezbedilo bržu plazmolizu tokom pripreme faze nanohirurgije. Smanjenjem osmolarnosti medijuma za rast za 30%, vreme plazmolize je smanjeno sa 30 ± 10 minuta na 5 ± 2 minuta. Uvođenje dvostepene plazmolize i povećanje koncentracije Ca²⁺ u hiperosmotskom rastvoru je sledeći, i možda najvažniji faktor za uspešnu hirurgiju i dobijanje vijabilnih oslobođenih protoplasta na kojima je bilo moguće dobiti gigaomski kontakt.

Koncentracija Ca^{2+} je povećana da bi se ubrzala plazmoliza (< 1 min) i obezbedio stabilizujući efekat na protoplaste (Véry and Davies 1998). Korak preplazmolize smanjio je fiziološki šok koji nastaje kada se gljive prenose direktno iz medijuma u hiperosmotski rastvor (razlika od 450 mOsm). Ovo je postignuto bojenjem gljiva razblaženom bojom u standardnom izoosmotskom rastvoru.



Slika 4.3. Glavni koraci laserske nanohirurgije i prekretnice za uspešno uklanjanje ćelijskog zida hifa *P. blakesleeanus*. Osmolarnost vanćelijskog rastvora u svakom koraku procedure je naznačena na plavoj gradijent traci. Detaljan opis postupka je opisan u poglavlju Materijal i metode. Distribucija prosečne snage lasera koja je korišćena za nanohirurgiju ćelijskog zida *P. blakesleeanus* je prikazana na gornjem grafiku, a distribucije veličine protoplasta oslobođenih u dva uzastopna koraka (dole) su date kao histogrami sa gornjom granicom opsega stubića na apscisi.

Da bi se odredila optimalna osmolarnost rastvora za plazmolizu, testiran je uticaj hiperosmotskih rastvora srednje (760 mOsm) i veće (860 mOsm) osmolarnosti u odnosu na izoosmotske (500 mOsm) uslove na rast i vijabilnost hifa, tokom 30 i 90 minuta. Izabrana vremena odgovaraju tipičnom i maksimalnom trajanju celokupne hiperosmotske inkubacije tokom nanohirurške procedure. Kao što se može videti na slici 4.4a, hiperosmotski uslovi od 760 mOsm nisu značajno uticali na rast gljiva ni u jednoj vremenskoj tački, dok je oštriji hiperosmotski tretman izazvao značajno smanjenje prinosa biomase nakon 30 minuta. Tokom dugotrajne inkubacije došlo je do adaptacije na tretman više osmolarnosti, uzrokujući odsustvo uticaja hiperosmotskih uslova na rast kulture. U istim uslovima je provereno i disanje gljiva. Oba hiperosmotska tretmana su imala značajan uticaj na disanje (slika 4.4b), smanjujući ga za 11% i 30%. Na osnovu ovih rezultata izabran je tretman blagim hiperosmotskim rastvorom od 620 mOsm kako bi se umanjio negativan uticaj plazmolize na hife i osiguralo dobijanje vijabilnih protoplasta sa intaktnom ćelijskom membranom.



Slika 4.4 Disanje i rast *P. blakesleeanus* u hiperosmotskim uslovima. a) Rast kulture u Petri šoljama, izražen kao prinos gljivne biomase u rastvorima povećane osmolarnosti (nakon 30 i 90 min inkubacije). Srednja linija predstavlja medijanu. $N = 3-4$. b) Disanje gljiva nakon 90 minuta u rastvorima povećane osmolarnosti, izraženo kao potrošnja kiseonika u minuti i normalizovano na suhu masu (SM) kulture. $N = 3$.

Da bi se postigla preciznost i omogućila uspešna nanohirurgija i oslikavanje, hife gljiva su imobilisane na pokrovnom stakalcu. Testirano je više materijala za oblaganje supstrata (tabela 2, poglavlje 3.3.6.1, *Materijal i metode*) i otkriveno je da kolagenski premaz obezbeđuje bolju imobilizaciju hifa, istovremeno omogućavajući pristup pipeti.

Ćelijski zid hifa končaste gljive *P. blakesleeanus* je slabo autofluorescentan i može se vizualizovati ekscitacijom na 730 nm, najverovatnije kao signal od komponenti ćelijskog zida koje sadrže hitin (hitin i hitozan) (Rabasović et al. 2015; L. Y. Chung et al. 1994). Uklanjanje ćelijskog zida postupkom laserske nanohirurgije nije bilo dovoljno efikasno na nativnim hifama. Nakon bojenja ćelijskog zida bojom CFW, hirurgija je bila skoro 100% uspešna. Sve predstavljene nanohirurške procedure su izvedene sa obojenim ćelijskim zidom kako bi se poboljšala apsorpcija laserske energije.

Dvofotonsko oslikavanje ćelijskog zida izvedeno je sa veoma malom prosečnom snagom lasera od 0,5 mV i energijom impulsa od 0,007 nJ u ravni uzorka. Talasna dužina od 730 nm je korišćena

i za multifotonsko oslikavanje i za nanohirurgiju, skraćujući vreme procedure time što talasne dužine nisu menjane. Prečnik hifa ($< 15 \mu\text{m}$) predstavlja veliki izazov za uspešno odsecanje dela ćelijskog zida bez ugrožavanja ostatka ćelije. Nakon optimizacije hirurške procedure, izabrali smo tačkasti obrazac 2×20 i pozicionirali ga na delu ćelijskog zida bez citoplazme na TPEF slici. U zavisnosti od stepena plazmolize, odnosno dužine mesta dostupnog za sečenje, obrazac 2×20 tačaka za hirurgiju se skalira (prilagođava se razmera, ugao i položaj) do veličine koja će odrezati što je moguće veći deo zida bez kritičnog približavanja ćelijskoj membrani. Na osnovu izabrane dužine hirurškog obrasca, debljine ćelijskog zida i blizine protoplasta, snaga sečenja je izabrana u delu programa koji služi za iscertavanje. Parametri hirurgije koje je bilo moguće kontrolisati su bili: vreme zadržavanja (dwell time) po tački, snaga lasera i talasna dužina. Sam postupak hirurgije je automatizovan i traje oko 20s. Pre hirurških eksperimenata, izvršeni su testovi da se odredi prosečna snaga lasera potrebna za presecanje malog dela ćelijskog zida i određen je prag oštećenja (eng. damage threshold). Prag oštećenja bio je približno 3,5 mV (koristeći fiziološki objektiv 40x, NA=1,0). Ukupna distribucija laserskih snaga u ravni uzorka koja je korišćena za nanohirurgiju prikazana je na gornjem grafikonu na slici 4.3, odakle se može videti da je u većini slučajeva korišćen niži opseg snaga. Snage lasera od 6 do 12 mV su korišćene u 90% hirurgija ćelijskog zida (slika 4.3 gornji grafik). Vreme zadržavanja (dwell time) od 1 s po tački je održavano na istoj vrednosti tokom hirurške procedure na svim hifama. Femtosekundni impulsi (160 fs) pri brzini ponavljanja od 76 MHz i veoma niske energije impulsa (0,05-0,20 nJ) u ravni uzorka obezbedili su uspešno sečenje zida sa visokom prostornom rezolucijom hirurških rezova.

Zatim je izvedena suptilna deplazmoliza kako bi se stimulisalo oslobađanje protoplasta bez preteranog istezanja membrane koja stupa u interakciju sa pipetom. Da bi se izbegao hipoosmotski stres i održao integritet ćelijske membrane protoplasta, osmolarnost rastvora u mikroskopskoj komorici je smanjena za samo nekoliko desetina mOsm tako da su zadržani blago hiperosmotski uslovi. Kako su neki protoplasti izlazili i odmah nakon hirurgije u standardnim hiperosmotskim uslovima (slika 4.3 srednji grafik), zamena potpune deplazmolize sa suptilnom je omogućila dodatni izlazak protoplasta većih prečnika (slika 4.3 donji grafik), a sprečila hipoosmotski stres. Optimizovana koncentracija natrijum azida, koja inhibira proizvodnju ćelijskog zida, je bila konstantno prisutna u svim rastvorima, što je bio još jedan bitan faktor uspeha u produženim snimanjima.

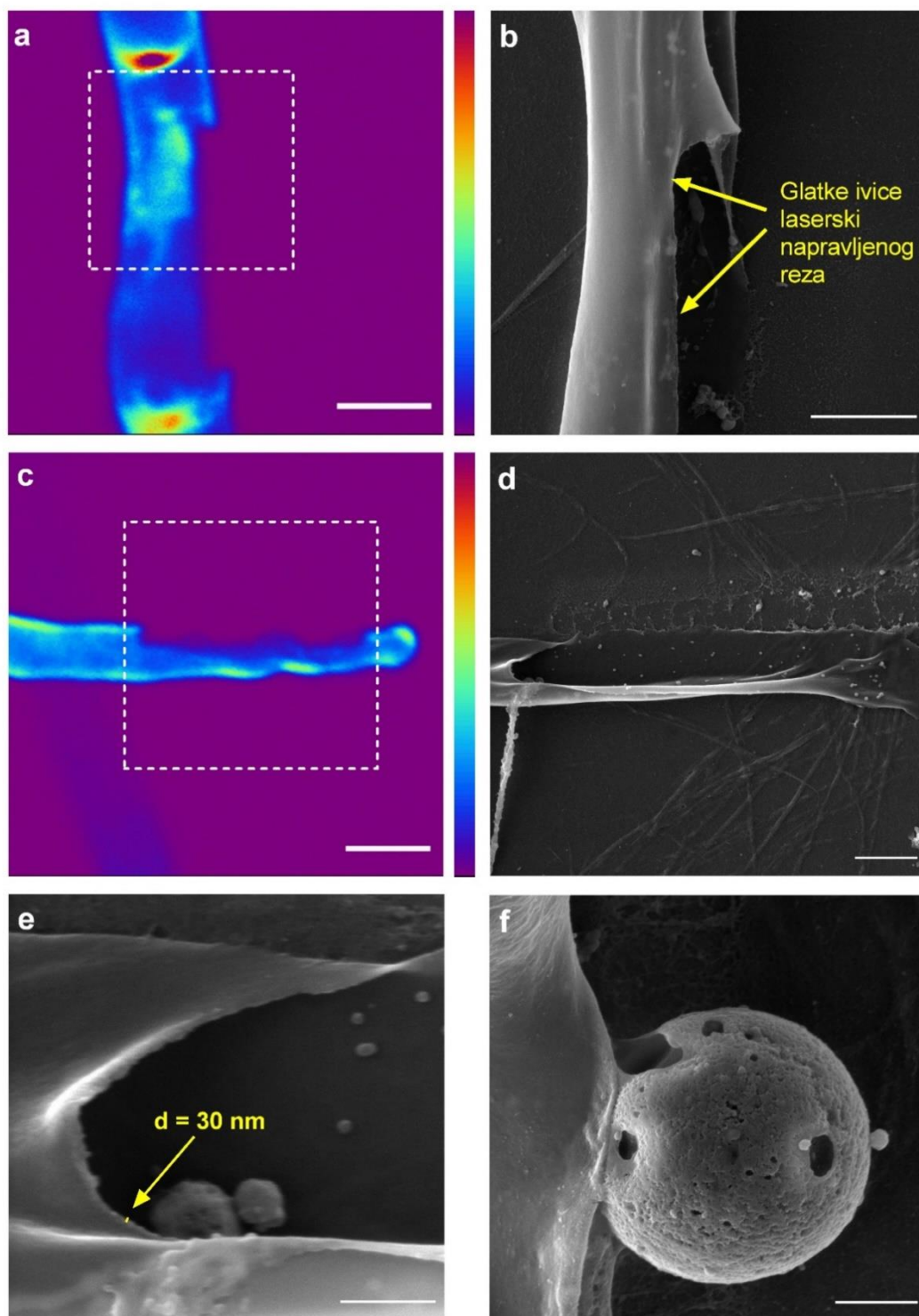
Budući da su sistemi za nanohirurgiju (uspravni nelinearni mikroskop) i elektrofiziologiju (invertni mikroskop) odvojeni, fiziološki objektiv je imao ključnu ulogu. Pošto se objektiv za uranjanje normalno koristi bez gornjeg pokrovnog stakla, moguće je prići uzorku odozgo i potpuno uroniti vrh objektiva u rastvor koji okružuje uzorak. Shodno tome, nema potrebe za uklanjanjem pokrovnog stakla što bi inače dovelo do mogućeg gubitka dela izašlih protoplasta. S druge strane, mapirana pokrovna stakla na kojima su gljive uzgajane i postavljene na dno otvorene mikroskopske komore omogućila su preciznu lokalizaciju hifa podvrgnutih nanohirurgiji.

Ceo proces (hirurgija na nivou ćelije + metoda nametanja voltaže na deliću membrane) je prilično složen i određeni koraci se moraju precizno pratiti da bi se dobila visoka stopa uspešnosti i ponovljivosti. Koncentracija hemikalija, osmolarnost rastvora, vremenski parametri i parametri sečenja se takođe moraju držati u okviru određenog uskog opsega.

4.1.3 Oslikavanje hirurškog reza u ćelijskom zidu i oslobođenog protoplasta elektronskom mikroskopijom

Da bismo proverili izgled ivica hirurških rezova na ćelijskim zidovima plazmolizovanih hifa, gljive koje su prethodno bile podvrgnute laserskoj nanohirurgiji smo oslikali pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa.

Kao što je prikazano na slici 4.5, slike sa SEM-a su pokazale precizne rezove bez pukotina, sa glatkim ivicama proreza na zidu hifalnih ćelija napravljenih femtosekundnim laserom ($N = 11$ rezova na 10 slika). Oslobođena membrana protoplasta nije imala velike komade preostalog ili deponovanog materijala ($N = 2$) (slika 4.5f). Korišćeni hirurški parametri su omogućili lokalizovano uklanjanje ćelijskog zida sa prosečnom debljinom od 30 nm (slika 4.5e), ponekad čak i na izuzetno malim udaljenostima od ćelijske membrane (0,5 – 3 μm), ostavljajući oslobođeni protoplast vijabilnim. Srednja dužina rezova izmerena sa TPEF slika bila je $6,7 \pm 2,9 \mu\text{m}$ ($N = 185$), dok je sa SEM slika bila $9,3 \pm 4,4 \mu\text{m}$ ($N = 6$). Širina rezova merena na SEM slikama bila je $2,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ($N = 3$).



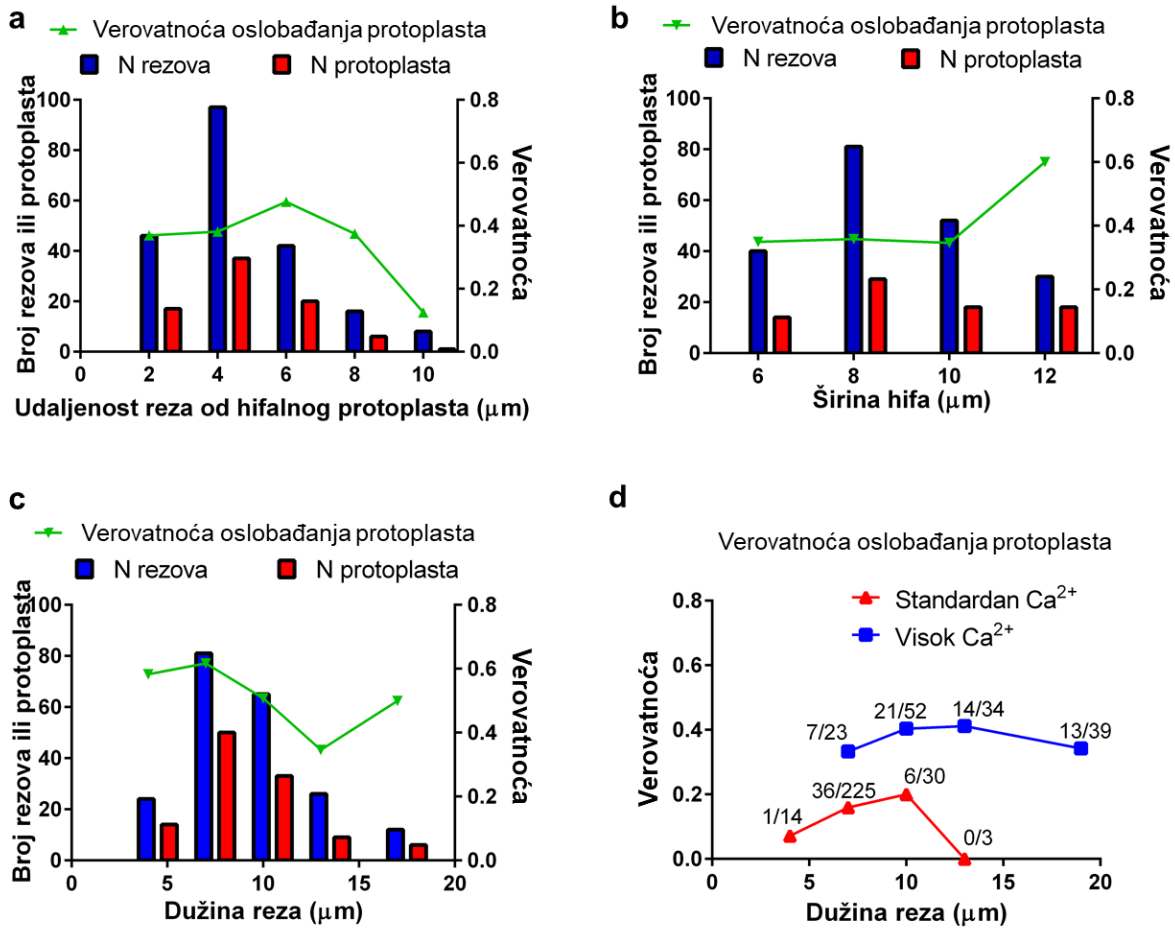
Slika 4.5. SEM slike rezultata femtosekundne laserske nanohirurgije ćelijskog zida *P. blakesleeanus*. a) TPEF slika laserski generisanog reza u ćelijskom zidu hifa. Prosečna snaga lasera u ravni uzorka je bila 1,0 mW za oslikavanje (dwell time 2,5 μ s) i 7,5 mW za hirurgiju (dwell time 1 s). Skala: 5 μ m. b) SEM slika istog laserski generisanog reza prikazanog pod a. Skala: 2 μ m. c) TPEF slika reza napravljenog fs laserom. Prosečna snaga lasera u

ravni uzorka je bila 1,0 mW za oslikavanje (dwell time 2,5 μ s) i 7,6 mW za hirurgiju (dwell time 1 s). Skala: 5 μ m. Sve TPEF slike su dobijene pomoću uljanog imerzionog objektiva Zeiss 40x NA=1,3. Skala intenziteta za TPEF signal: ljubičasta/plava – najniži TPEF signal, tamno crvena – najviši TPEF signal. Skala intenziteta je linearna i pokriva ceo opseg podataka. d) SEM slika celog laserski generisanog reza, istog reza kao što je prikazano pod c. Skala: 2 μ m. e) Uvećana slika pod d sa prikazom debljine ćelijskog zida hife (d). Skala: 0,5 μ m. f) SEM slika oslobođenog protoplasta kroz hirurški rez napravljen prosečnom snagom lasera od 6,7 mW na 730 nm. Skala: 1 μ m.

4.1.4 Uticaj različitih parametara na oslobađanje protoplasta

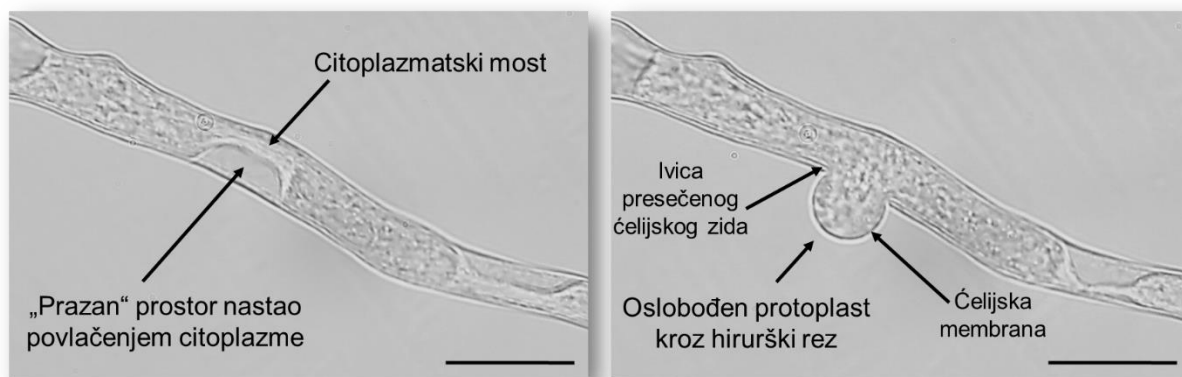
Nakon uspešno napravljenog reza u ćelijskom zidu primećeno je oslobađanje protoplasta u okolni medijum. Međutim, nisu svi rezovi oslobodili protoplaste. Ustanovljeno je da nekoliko faktora utiče na verovatnoću oslobađanja protoplasta (P_o = broj protoplasta / broj rezova). **Udaljenost laserskog reza od membrane protoplasta** u hifi tokom procedure uticala je na to koliko se protoplasta može dobiti po završetku procedure hirurškog uklanjanja zida. Kao što se može videti na slici 4.6a, kada je protoplast u hifi udaljen više od 6 μ m od mesta reza, verovatnoća oslobađanja protoplasta opada sa vrednošću od približno 0,4 i najniža je na najvećim testiranim rastojanjima. Ovaj rezultat je dodatna potvrda da protoplasti nisu oštećeni u ovom protokolu, čak i kada je mesto nanohirurgije u neposrednoj blizini povučenog hifalnog protoplasta. Izgleda da **širina hifa** (sh), koja odražava ukupnu veličinu hifa, nije uticala na verovatnoću dobijanja oslobođenih protoplasta za $sh < 10 \mu$ m. Šire hife ($sh > 10 \mu$ m) su bile povoljnije za oslobađanje protoplasta: $P_o = 0,6$, dok je za manje hife P_o bio 0,35 (slika 4.6b). Konačno, **veličina reza** je takođe uticala na verovatnoću oslobađanja protoplasta, pri čemu su manji rezovi oslobađali više protoplasta. Kao što je prikazano na slici 4.6c, verovatnoća se smanjila pri većim dužinama reza, sa $P_o = 0,62$ za dužine reza od $5,5 \pm 1,5 \mu$ m na $P_o = 0,35$ za dužine reza od $11,5 \pm 1,5 \mu$ m. Još jedna potvrda da su sve hife bile vijabilne nakon nanohirurške procedure je ta da su sve zadržale svoj karakterističan protok/strujanje citoplazme i zdrav izgled, kao i to da su se deplazmolizovale kada su prenete u manje hiperosmotske uslove. Stoga, zavisnost P_o od veličine reza je posledica uticaja osnovnih fizioloških ili mehaničkih aspekata koji kontrolišu oslobađanje protoplasta.

U izdvojenom skupu eksperimenata, ispitano je oslobađanje protoplasta neposredno nakon nanohirurgije (bez koraka deplazmolize) pod nešto drugačijim uslovima plazmolize i hirurgije kao što je objašnjeno u poglavlju 3.5.5, *Materijal i metode*. Ispitano je da li je visoka koncentracija Ca^{2+} korišćena tokom procedure uticala na oslobađanje protoplasta (slika 4.6d). Upoređeno je oslobađanje protoplasta pri visokoj koncentraciji Ca^{2+} (30 mM) sa oslobađanjem protoplasta pri standardnoj koncentraciji Ca^{2+} (1 i 3 mM zbirno). Kod standardnog $[Ca^{2+}]$ verovatnoća oslobađanja protoplasta je jasno zavisila od veličine reza i bila je prilično niska ($< 0,2$). Povećanje $[Ca^{2+}]$ na 30 mM je povećalo verovatnoću dobijanja protoplasta, za istu veličinu reza, na 0,4. Zavisnost verovatnoće oslobađanja protoplasta od koncentracije Ca^{2+} sugerise da je fiziološki mehanizam uključen u proces izbacivanja protoplasta kroz hirurški napravljen rez u ćelijskom zidu hifa.



Slika 4.6. Parametri koji utiču na verovatnoću oslobađanja protoplasta. Verovatnoća oslobađanja protoplasta iz reza dobijenog nanohirurgijom je superponirana na odgovarajući stubić vrednosti parametara. a) Udaljenost laserskog reza od hifalnog protoplasta tokom nanohirurgije: raspodela i zavisnost verovatnoće oslobađanja protoplasta. b) Širina hifa na mestu nanohirurgije: raspodela i zavisnost verovatnoće oslobađanja protoplasta. c) Dužina hirurškog reza: raspodela i zavisnost verovatnoće oslobađanja protoplasta. d) Efekat povećane koncentracije kalcijuma na verovatnoću oslobađanja protoplasta (neposredno nakon hirurgije, bez koraka deplazmolize) u funkciji dužine reza (posebna serija eksperimenata). Visok $[\text{Ca}^{2+}]$: 30 mM, korišćen u nanohirurškom protokolu. Hiperosmotski rastvor je bio 600-617 mOsm tokom perioda oslobađanja protoplasta. Standardan $[\text{Ca}^{2+}]$: 3 mM i 1 mM (zbirni podaci). Korišćeni hiperosmotski rastvor tokom vremena oslobađanja protoplasta bio je 555-560 mOsm. Za svaki opseg vrednosti (3 μm) veličine reza na histogramu, odgovarajući broj dobijenih protoplasta podeljen brojem hirurških rezova je prikazan iznad krive verovatnoće. Na svim graficima vrednosti na apscisama predstavljaju gornju granicu opsega vrednosti. Za a-c: N_{tot} (rezovi) = 203 (a); 209 (b); 208 (c). N_{tot} (protoplast) = 71 (a); 81 (b); 112 (c). Za d: N_{tot} (rezovi) = 272 (standardni Ca^{2+}); 148 (visoki Ca^{2+}). N_{tot} (protoplast) = 43 (standardni Ca^{2+}); 55 (visoki Ca^{2+}).

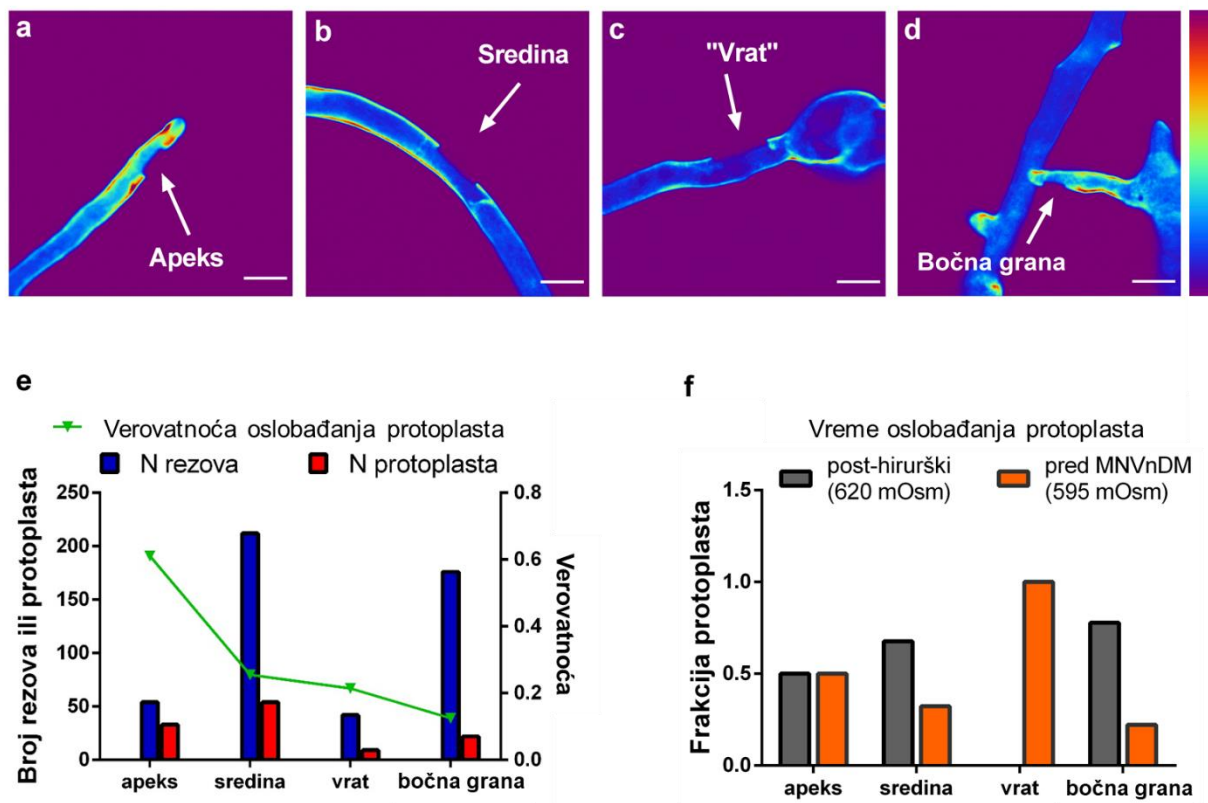
Takođe je primećen nešto bolji prinos protoplasta u onim plazmolizovanim hifama koje su imale citoplazmatski most (slika 4.7) preko „praznog“ regiona blizu mesta sečenja ($P_o = 0,44$) u poređenju sa onima čiji su hifalni protoplasti bili potpuno odvojeni ($P_o = 0,36$).



Slika 4.7 BF slike plazmolizovane hife sa citoplazmatskim mostom pre hirurgije (levo) i sa oslobođenim protoplastom neposredno nakon izvršene hirurgije (desno). Slike su snimljene uljano-imerzionim objektivom Zeiss 40x, NA=1,3. Skala: 20 μ m.

4.1.5 Laserska nanohirurgija ćelijskog zida na različitim lokacijama duž hifa

Pošto su hife polarizovane ćelije, od velikog je značaja da se protoplasti mogu ciljano osloboditi iz različitih regiona hife što bi omogućilo ispitivanje prostorne distribucije membranskih proteina, među kojima i jonskih kanala. Stoga smo iskoristili smo preciznost i fleksibilnost nanohirurške metode da napravimo rezove i dobijemo protoplaste iz lokalizovanih delova sledećih hifalnih regiona: 1. vrh (apeks), koji predstavlja brzo rastući deo hife (slika 4.8a); 2. sredina (sl. 4.8b); 3. „vrat“, koji predstavlja osnovu hife, neposredno do spore (sl. 4.8c); 4. bočna grana (sl. 4.8d). Prosečna snaga lasera koja je korišćena za rezove na različitim odeljcima nije varirala, dok je rastojanje reza od hifalnog protoplasta u vreme nanohirurgije moralo da se prilagođava zbog užeg prostora u odeljku bočne grane (udaljenost reza od hifalnog protoplasta je bio kraći u odeljku bočne grane nego u srednjem odeljku: $p = 0,0220$; u poređenju sa odeljkom na vrhu: $p = 0,0003$). Slika 4.8e prikazuje broj rezova sa Po vrednošću za svako mesto. Ovaj parametar je bio najveći u apikalnom regionu (0,6), dok je u bočnim granama bio prilično nizak (0,13). Zanimljivo je da su protoplasti oslobađani iz različitih regiona pod različitim osmotskim uslovima (slika 4.8f). Na primer, protoplasti iz vrata se nikada nisu pojavili u hiperosmotskom rastvoru koji se koristi za nanohirurgiju (100% protoplasta dobijenih iz vrata je oslobođeno tokom deplazmolize), dok su se protoplasti iz vrha hifa oslobađali podjednako dobro i u hiperosmotskim i u rastvorima za deplazmolizu. Uspešnost u postizanju gigaomskog kontakta bila je najveća za protoplaste iz bočnih grana (55%), dok je za protoplaste iz drugih regiona iznosila 25-30%.



Slika 4.8. Nanohirurgija se može primeniti na različita mesta duž hife. TPEF slike hifa sa hirurškim rezovima na različitim lokacijama duž hife: a) apeks b) sredina c) vrat i d) bočna grana obojenih hifa. Bele strelice pokazuju na laserom napravljene rezove u ćelijskom zidu hifa. Sve slike su snimljene uljnim imerzionim objektivom Zeiss 40x, NA=1,3. Skala: 10 μ m. Skala intenziteta za TPEF signal: ljubičasta/plava – najniži TPEF signal, tamno crvena – najviši TPEF signal. Skala intenziteta je linearna i pokriva ceo opseg podataka. e) Verovatnoća oslobađanja protoplasta po lokacijama reza (apeks, sredina, vrat i bočna grana) sa odgovarajućim dobijenim brojem rezova. f) Osmotski uslovi tokom oslobađanja protoplasta na različitim mestima su prikazani kao frakcije ukupnog broja protoplasta oslobođenih na svakom mestu i dobijenih u svakom od korišćenih rastvora: „post-hirurški“ – u 620 mOsm; „komorični rastvor“ – u 595 mOsm.

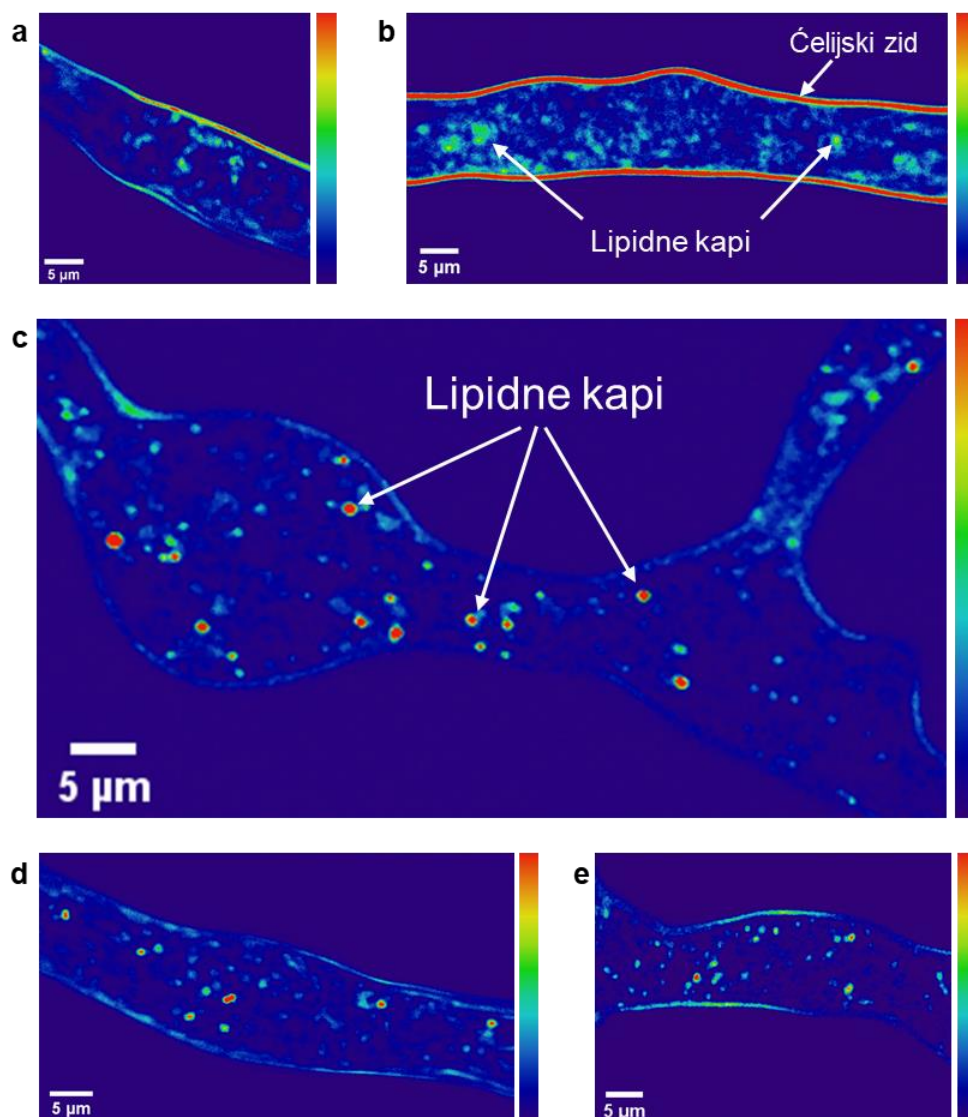
4.2 Strukturno i funkcionalno oslikavanje ćelijskog metabolizma *P. blakesleeanus*

4.2.1 THG oslikavanje bez obeležavanja i kvantifikacija lipidnih kapi u živim hifama *P. blakesleeanus*

4.2.1.1 Uslovi oslikavanja lipidnih kapi detekcijom signala trećeg harmonika

Intenzitet THG signala snažno zavisi od lokalnih uslova snimanja i u ovom poglavlju će biti opisani ključni elementi za razvoj protokola THG oslikavanja lipidnih kapi končaste gljive *P. blakesleeanus*. Za THG oslikavanje živih hifa testirano je nekoliko tipova objektiv sa različitim NA. Kada se fiziološki objektiv, 40x, NA=1,0 (slika 4.9a), koji ima veliko radno rastojanje (2,5 mm), zaroni u mikroskopsku komoru sa suspenzijom gljiva (gljive u SMT medijumu), mali deo pobudne svetlosti lasera stiže do žižne ravni, rasejanje je veliko i fokus se gubi, što se i očekuje za debele uzorke. Kada se uzme ista suspenzija gljiva na kojoj se ranije nisu mogle videti lipidne kapi i stavi između dva pokrova stakla (hife gljiva su sada u sendviču između dva pokrova stakla debljine 0,17 mm) i primeni uljni imerzioni objektiv, 40x, NA=1,3, vide se jasno istaknute lipidne kapi (slika 4.9c). Debljina ovako pripremljenog uzorka je 20-30 μm , dok je u komori njegova debljina oko 3 mm. THG signal lipidnih kapi se može videti i sa objektivom 20x, NA=0,8, ali samo sa povećanom snagom (slika 4.9b). Izbor radnog tačnog medijuma je takođe bitan. Rastvori koji sadrže samo soli i sorbitol mogu poboljšati odnos signal/šum u odnosu na medijume koji pored soli sadrže veće molekule kao što su vitamini. Kada su ćelije gljiva iscentrifugirane i resuspendovane u izoosmotski ekstraćelijski rastvor bilo je moguće videti lipidne kapi i sa fiziološkim objektivom 40x 1,0 (slika 4.9e). Dobijeni kvalitet slike je blizak onom koji se dobija sa uljnim imerzionim objektivom 40x 1,3 i usendvičenim hifama u izoosmotskom rastvoru između dva pokrova stakla (slika 4.9d). U ovom slučaju, manja gustina ćelija i manji broj velikih molekula u oslikavanju usendvičenog uzorka, uz naknadno smanjenje apsorpcije THG signala od strane ćelijskih membrana i velikih molekula, omogućava vizualizaciju lipidnih kapi u debljem uzorku. Na kraju može se zaključiti da se najbolji signal dobija sa usendvičenim uzorkom i imerzionim objektivom.

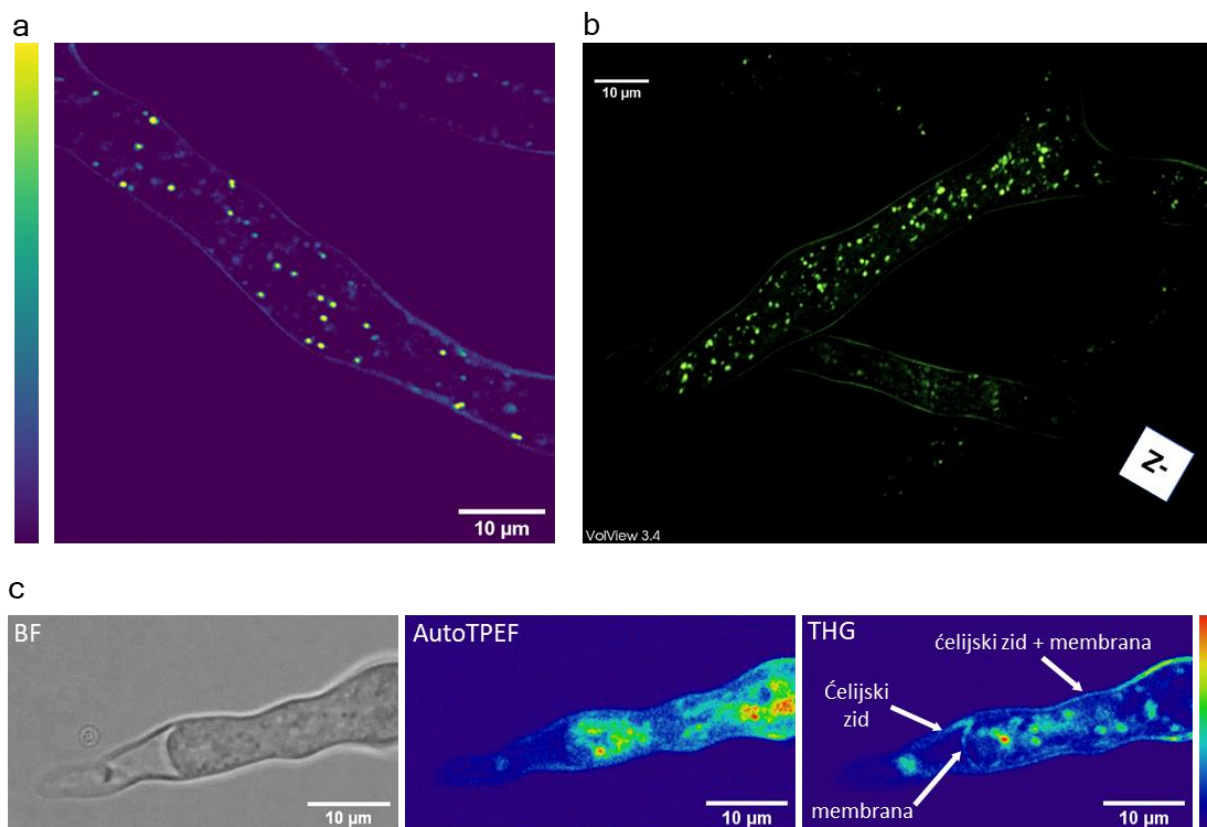
Poboljšanjem našeg nelinearnog mikroskopa, pre svega softvera, i upotrebom specijalno dizajniranog držača usendvičenog uzorka (pogledati poglavlje 3.5.1.3, *Materijal i metode*), vizualizacija uglavnom submikronske LK u živim hifama je bila uspešna. Ovo je dalje omogućilo kvantitativnu analizu njihovog dinamičnog ponašanja.



Slika 4.9. Testiranje uslova THG oslikavanja lipidnih kapi u hifama *P. blakesleeanus* bez obeležavanja. Hife u SMT medijumu: a) u komorici, fiziološki objektiv 40x, NA=1,0 (prosečna snaga lasera u ravni uzorka 58 mW), b) između dva pokrovna stakla, objektiv 20x, NA=0,8 (prosečna snaga lasera u ravni uzorka 51 mW), c) između dva pokrovna stakla, uljni imerzioni objektiv 40x, NA=1,3 (prosečna snaga lasera u ravni uzorka 23 mW). **Hife u izoosmotskom rastvoru nakon ispiranja:** d) između dva pokrovna stakla, uljni imerzioni objektiv 40x, NA=1,3 (prosečna snaga lasera u ravni uzorka 34 mW), e) u komorici, fiziološki objektiv 40x, NA=1,0 (prosečna snaga lasera u ravni uzorka 39 mW). Skala intenziteta za THG signal: tamno plavo – najniži signal, crveno – najviši signal.

THG slike, jedan presek (2D) i 3D rekonstrukcija, neobojenih živih hifa *P. blakesleeanus* u fazi eksponencijalnog rasta prikazani su na slici 4.10a i 4.10b. THG signal sa granica ćelije potiče od hitinskog ćelijskog zida i ćelijske membrane koja prati oblik ćelijskog zida. Hife su postavljene u tečni medijum za rast između dva pokrovna stakala. Visoka rezolucija mikroskopskog sistema (ograničena difrakcijom), debljina hifa (oko 10 µm) i transparentnost medijuma omogućavaju da se cele hife optički preseku i 3D model rekonstruiše (slika 4.10b i video na: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-23502-4#Sec15>). Očigledno je da su strukture sa

jakim THG signalom istaknute među svim entitetima u citoplazmi. Prema literaturi, najverovatnije se radi o lipidnim kapima jer imaju veliki indeks prelamanja u poređenju sa ostatkom citoplazme.



Slika 4.10. Oslikavanje hifa *P. blakesleeanus* u eksponencijalnoj fazi rasta u STM bez obeležavanja. a) 2D THG slika. Prosečna snaga lasera u ravni uzorka je bila 23 mW. b) 3D model sastavljen od 23 THG slike sa prostornim razmakom po z-osi od 0,9 µm. Prosečna snaga lasera u ravni uzorka je bila 26 mW. c) Multimodalno oslikavanje: BF slika (levo), autoTPEF slika (sredina) i THG (desno) slika iste žive neobojene hife. Hifa je plazmolizovana, a povučena ćelijska membrana je vidljiva samo na THG slici. Prosečna snaga lasera u ravni uzorka bila je 2,7 mW (TPEF) i 55 mW (THG). Intenzitetska skala za oba signala TPEF i THG: tamno plava – najniži signal, crvena – najviši signal. Sve slike su snimljene uljnim imerzionim objektivom Zeiss 40x, NA=1,3.

Ćelijski zid i ćelijska membrana su u prisnom kontaktu koji se ne može razlučiti na slikama nativnih hifa dobijenim tehnikama ograničenim difrakcijom (rezolucija od približno 250 nm). Da bi vizualizovali ćelijski zid i ćelijsku membranu odvojeno, hife su plazmolizovane tako da se ćelijska membrana povuče od ćelijskog zida na rastojanje koje je vidljivo na mikroskopu (slika 4.10c). Povučena citoplazma je jasno vidljiva na BF (slika 4.10c levo) i autoTPEF slikama (slika 4.10c u sredini), ali ćelijska membrana se može razlikovati samo na THG slici (slika 4.10c desno) pošto se njen indeks prelamanja razlikuje od citoplazme.

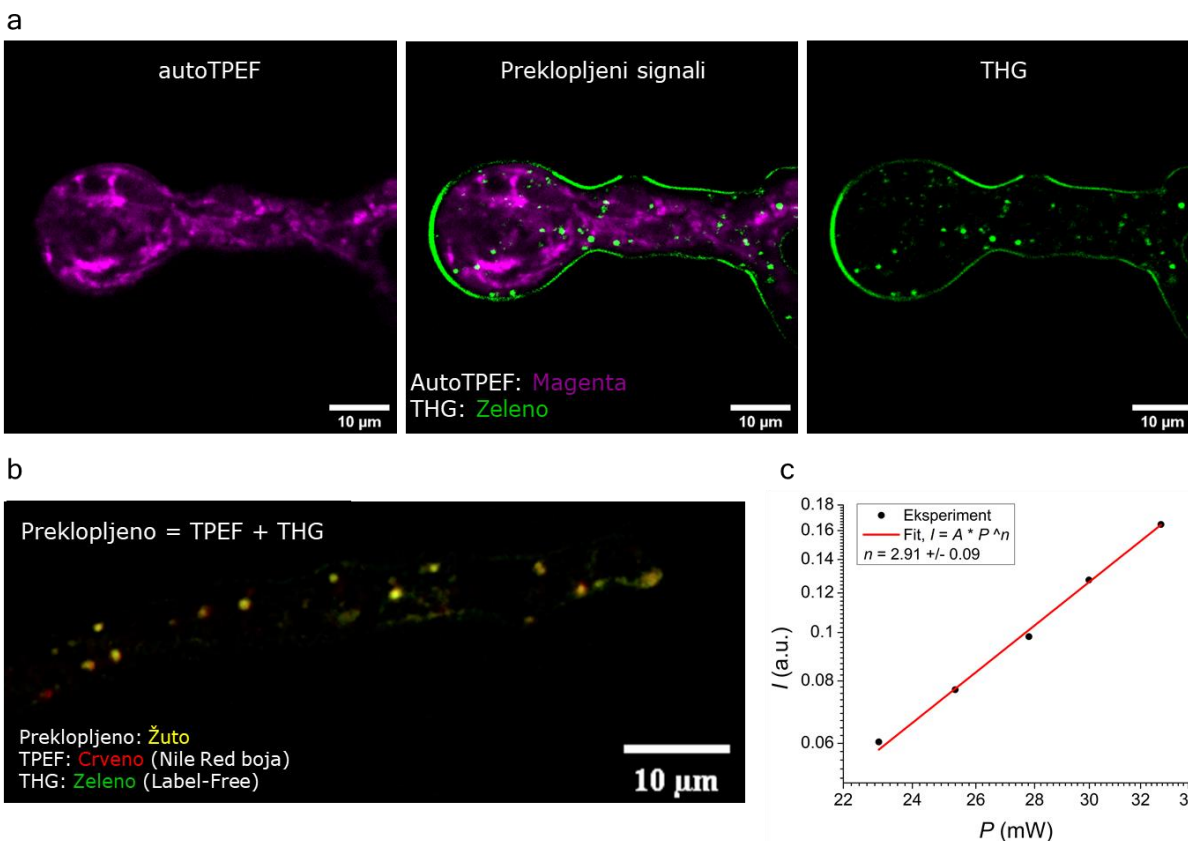
4.2.1.2 Preklapanje AutoTPEF i THG signala u hifama

Dok THG oslikavanje nije nužno specifično za LK, jer se THG signal proizvodi bilo kakvom promenom indeksa prelamanja, LK i dalje proizvode značajno veći THG signal u poređenju sa

drugim strukturama u citoplazmi ćelija poput *P. blakesleeanus*. Ova činjenica se može koristiti za razdvajanje LK u ćeliji od drugih entiteta citoplazme koji su u mnogo nižem opsegu signala. Kao prvi korak ka potvrdi da su komponente sa visokim THG signalom u neobeležanim živim hifama *P. blakesleeanus* LK, izvršeno je snimanje istih hifa detekcijom autofluorescentnog signala nakon dvofotonske pobude na 730 nm (Slika 4.11a levo). Da bi se osiguralo da entiteti sa visokim THG signalom (slika 4.11a desno) nisu artefakti koji mogu biti uzrokovani npr. oštećenjem velikim intenzitetom lasera, THG i autoTPEF slike su preklapljene (slika 4.11a u sredini), jasno pokazajući da nema značajnog povećanja TPEF signala na istim lokacijama. Hife su bile u fazi eksponencijalnog rasta, kao na slici 4.10.

4.2.1.3 Kolokalizacija signala lipidnih kapi snimljenih pomoću TPEF i THG modaliteta

Dok su mnoge studije oslikavanja bez obeležavanja na različitim biološkim uzorcima pokazale da jak THG kontrast u citoplazmi proizilazi uglavnom od LK (Débarre et al. 2006; Bautista et al. 2014; George J. Tserevelakis et al. 2014), oslikavanje THG modalitetom nikada nije primenjeno na hifama *P. blakesleeanus*. Kako bi se nezavisnom metodom potvrdilo da su citoplazmatske okrugle strukture na THG slikama hifa lipidne kapi, izvedeni su kolokalizacioni eksperimenti (slika 4.11b). Hife su obojene bojom *Nile Red*, jednom od standardnih boja za lipide (Greenspan, Mayer, and Fowler 1985). NR je dvofotonski pobuđena istim laserom koji je korišćen za THG. TPEF signal od NR je sakupljen kroz VIS filter propusnog opsega 400-700 nm i 570 nm dugopropusnog filtera, koji efikasno izoluje fluorescentni signal u spektralnom regionu od 570-700 nm. Laserski snop je fokusiran pomoću imerzionog objektiva Zeiss Plan Neofluar 40x, NA=1.3, a oba signala TPEF i THG su detektovani istovremeno. Pre merenja, vrlo mala zapremina uzorka (20 µL suspenzije gljiva) dodata je između dva pokrovna stakala. Ovo omogućava hifama da ostanu žive tokom snimanja, ali i da budu imobilisane što je moguće bliže pokrovnom stakalcu, čime se postiže najbolja moguća rezolucija. Simultano oslikavanje je bilo neophodno jer su hife bile žive a LK mobilne organele, pa bi u suprotnom slučaju prelaska snimanja sa jednog na drugi modalitet došlo do pomeranja LK što bi posledično ugrozilo preklapanje TPEF i THG signala poreklom od LK. Zahvaljujući dodatnoj modifikaciji u softveru naše aparature bilo je moguće raditi istovremeno snimanje oba signala, THG i TPEF.



Slika 4.11. TPEF i THG slike hifa *P. blakesleeanus* u eksponencijalnoj fazi rasta u STM pokazuju da su lipidne kapi predominantni izvor tačkastog THG signala. a) Preklopljene autoTPEF i THG slike iste nebojene hife pokazuju da nema preklapanja autoTPEF i THG signala. Prosečna snaga lasera u ravni uzorka bila je 28 mW na 1040 nm (za THG) i 3,4 mW na 730 nm (autoTPEF). b) *In vivo* kolokalizacija obojenih lipidnih kapi snimljenih TPEF i THG modalitetom. Prosečna snaga lasera u ravni uzorka bila je 32 mW i za THG i za TPEF na 1040 nm. Pirsonov koeficijent korelacije $R_{total} = 0,844$ (ImageJ, dodatak *The Colocalization Threshold*). Sve slike su snimljene uljnim imerzionim objektivom Zeiss 40x, NA=1,3. c) Zavisnost intenziteta THG signala (I) od snage lasera (P). Stepenn dobijen iz fita je $2,91 \pm 0,09$. Uzorak (u STM medijumu) je bio pozicioniran između dva pokrova stakla.

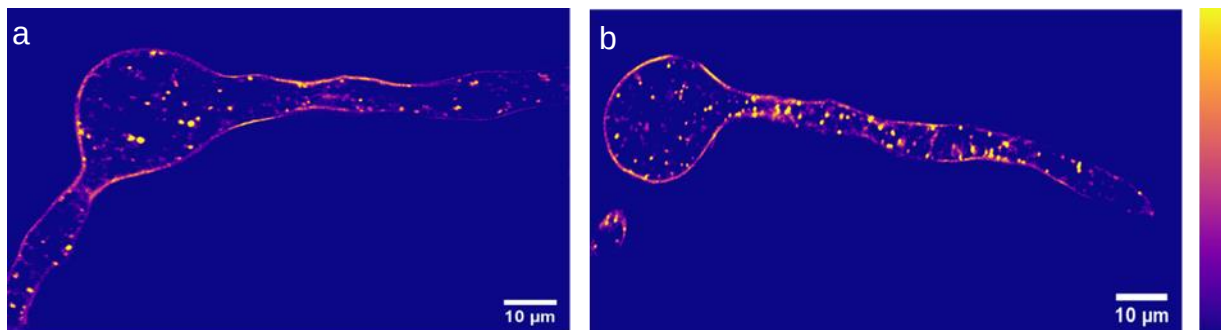
Kvantitativno poređenje TPEF i THG slika (kolokalizaciona analiza) izvršeno je na osnovu Pirsonovog koeficijenta korelacije i unakrsne korelacione analize slike (eng. Image Cross-Correlation Spectroscopy - ICCS). Pirsonov korelacioni koeficijent je bio u opsegu $0,74 < R_{total} < 0,88$ (ImageJ, *The Colocalization Threshold* dodatak). Prema ICCS analizi, udeo THG-detektovanih klastera koji su u interakciji sa TPEF-detektovanim klasterima je iznosio 0,89, što ukazuje na visok stepen prostorne korelacije između fluktuacija generisanih iz lipidne probe i THG signala. Stepenn kolokalizacije dobijen u ovom radu je u skladu ili veći sa onim dobijenim u oslikavanju bez obeleživača na živim i nekim fiksiranim uzorcima (E. Gavgiotaki et al. 2015) (Yi et al. 2013).

Dodatno je testirana zavisnost intenziteta THG signala (koja potiče od lipidnih kapi) od primenjene snage lasera (slika 4.11c). Za izračunavanje srednje vrednosti intenziteta THG signala za različite vrednosti snage lasera uzet je mali ROI (deo hife), gde je odnos signal/šum bio optimalan. Na grafiku se jasno vidi treći stepenn zavisnosti signala od primenjene snage lasera.

Na osnovu eksperimenta kolokalizacije (Slika 4.11b) i rezultata prikazanih na Slici 4.11a i c, moglo bi se smatrati da većina okruglih svetlih entiteta na THG slikama *P. blakesleeanus* predstavlja LK.

4.2.1.4 Analiza THG slika i kvantifikacija lipidnih kapi – uticaj gladovanja ograničenom dostupnošću azota kao neophodnim nutrijentom

Radi kvantifikacije LK, analizirali smo mali skup THG slika pomoću dve metode za analizu slika: Analiza veličine čestica (eng. Particle Size Analysis - PSA) i Korelaciona analiza slike (eng. Image Correlation Spectroscopy - ICS) (obe dostupne u *ImageJ-u*). Kako bi se ove dve metode testirale i međusobno uporedile, upotrebljene su kulture hifa uzgajane u medijumu sa potpunim odsustvom azota (N-gladovanje) i njihove sestrinske kulture odgovarajuće starosti iz iste serije uzgajane u standardnom medijumu, kao kontrolne kulture. Kako je već rečeno u Uvodu, nedostatak azota izaziva autofagiju kod končastih gljiva (Y. Chen et al. 2018) što dovodi do promene u metabolizmu lipida i povećanja broja LK. THG snimanje je izvedeno na hifama u fazi eksponencijalnog rasta, naizmenično između kontrolnih (Slika 4.12a) i izgladnjivanih (Slika 4.12b) grupa hifa koje odgovaraju uzrastu. Sa slike 4.12 je očigledno, čak i golim okom, da postoji značajan porast broja LK nakon azotnog gladovanja u trajanju od 4,5 h. Nakon potvrde da je dobijeno očekivano povećanje broja LK, dve metode kvantifikacije su dalje testirane, kao i osetljivost THG metode za detekciju LK.

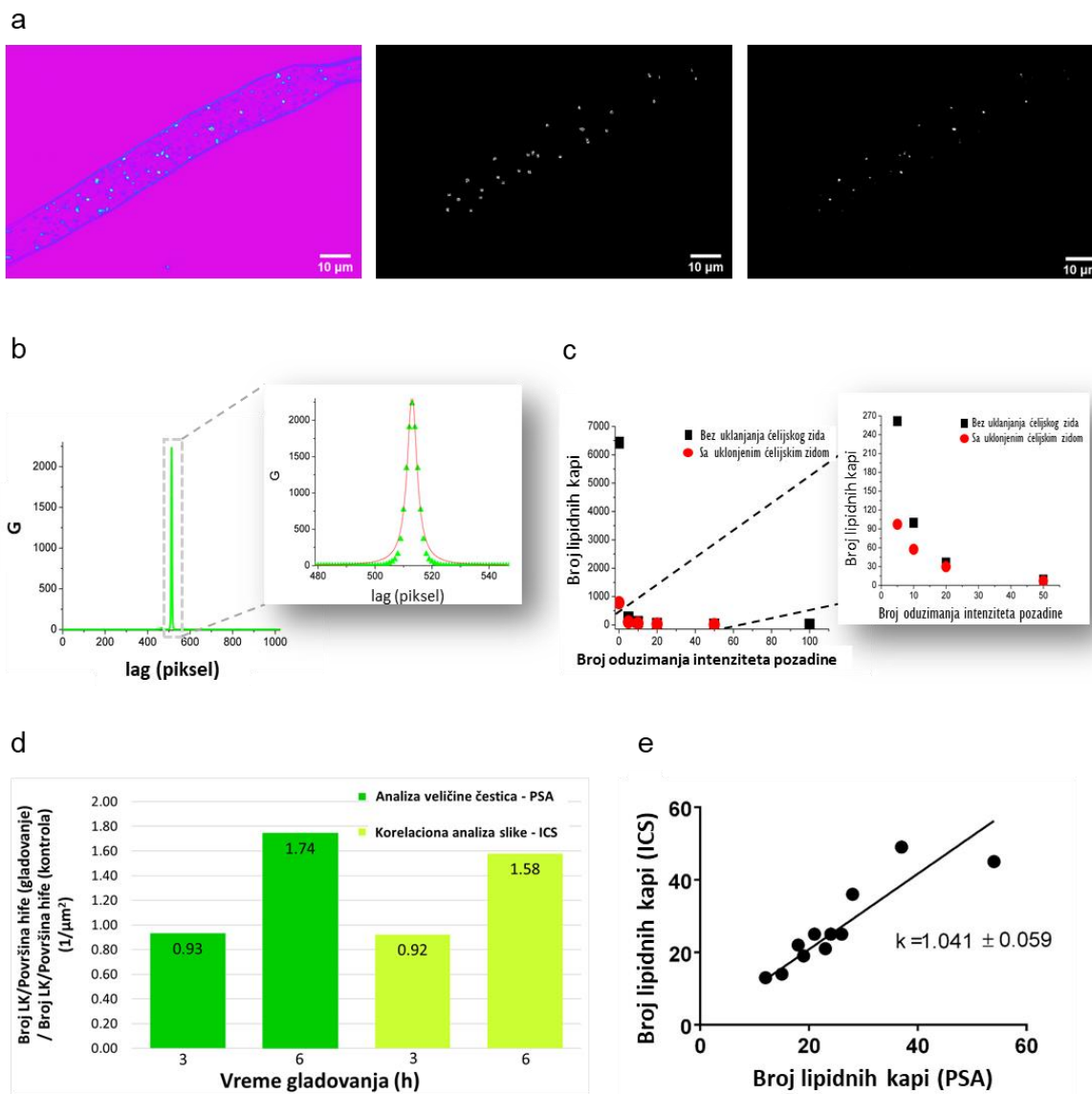


Slika 4.12. THG slike lipidnih kapi kontrolne i izgladnjivane hife. a) Hifa gajena u kontrolnim uslovima. b) Hifa gajena 4,5 h u uslovima nedostatka azota. Obe slike su snimljene imerzionim Zeiss 40x, NA=1,3 objektivom dok je prosečna snaga u ravni uzorka bila 24 mW (a) i 26 mW (b). Skala intenziteta za THG signal: ljubičasto – najniži THG signal, žuto – najviši THG signal.

Za PSA metodu (dostupnu u *ImageJ-u* kao „*Analyze particles*“) na neobrađenoj THG slici (slika 4.13a levo) prvo je definisan prag signala, (thresholding), a zatim je konvertovana u 8-bitnu masku, nakon čega je program automatski izračunao broj čestica koje predstavljaju LK na analiziranim slikama (slika 4.13a sredina). Pored broja čestica, kvantifikovani su i prečnik i površina.

Zbog postavljanja praga i ograničene rezolucije slike (veličine piksela), PSA može biti neosetljiva na entitete sa veoma malim ili slabim signalom. Kao rezultat toga, neke LK u nastajanju mogu biti izostavljene i neće biti prikazane u konačnim rezultatima. Kako bi ovaj problem bio rešen, primenjen je ICS koji izdvaja informacije o svojstvima čestica (broj i veličinu) na osnovu

prostornih fluktuacija intenziteta signala na slikama. ICS je takođe primenljiv na slike koje su difuzne.



Slika 4.13. Korelaciona analiza slike (ICS) i Analiza veličine čestica (PSA) na THG slikama. a) Obrada za PSA i ICS analizu iste THG slike. Levo: Neobrađena THG slika hife *P. blakesleeanus* u eksponencijalnoj fazi rasta u standardnom tečnom medijumu. Sredina: 8-bitna maska dobijena PSA analizom (crna pozadina). Desno: Slika sa oduzetom pozadinom za ICS analizu. Naime, slika sa leve strane (neobrađena THG slika) je obrađena primenom oduzimanja pozadine 20x. Slike su prikazane u punom dinamičkom opsegu (8 bita). THG slika je snimljena imerzionim objektivom Zeiss 40x, NA=1,3, dok je prosečna snaga lasera u ravni uzorka bila 27 mW. b) ICS analiza: Autokorelaciona funkcija (G kriva) je uzeta kao kriva kroz centar intenziteta korelisane THG slike žive i neobeležene hife. Autokorelaciona kriva je fitovana Lorencijanovom funkcijom kako bi se izdvojila vrednost *FWHM*. c) ICS analiza, efekat uklanjanja ćelijskog zida: Broj LK dobijenih iz G krive nakon svakog oduzimanja pozadine sa THG slike gde je ćelijski zid ručno izrezan (crveni krugovi) i za istu THG sliku gde ćelijski zid nije izrezan pre oduzimanja pozadine (crni kvadrati). d) Poređenje podataka izvedenih iz ICS i PSA analize dobijenih iz istog skupa THG slika kultura koje su gladovale 3 i 6 sati ($N = 3$ za svaku grupu). Odnos broja LK po jedinici površine hife, u N-

izglađnjivanim hifama, prema broju LK po jedinici površine hife u kontrolama odgovarajućeg uzrasta. e) Podudaranje kvantifikacije LK dobijen ICS i PSA analizom. Za svaku sliku, broj LK dobijen ICS analizom je prikazan u odnosu na broj LK dobijen PSA analizom za istu sliku. Podaci za oba grafika su dobijeni iz THG slika bez obeleživača čija je analiza predstavljena u Tabeli 4.

Zbog morfologije hifa, bilo je neophodno obraditi THG slike pre primene ICS analize. Čelijski zid hifa je uklonjen sa slike jer ometa korelacionu analizu (stvarajući podnožja na korelacionoj (G) krivi) zbog oštrog diskontinuiteta u intenzitetu na periferiji hifa duž celog obima. Primenili smo višestruka oduzimanja pozadine (eng. background) (prosečan intenzitet piksela ROI-a izvan hife) sve dok zid nije nestao (Rocheleau, Wiseman, and Petersen 2003). Poslednji postupak je prikazan na slici 4.13a desno i očigledno je da je THG signal iz većine LK mnogo intenzivniji od signala zida (približno $> 10x$).

Nakon uklanjanja čelijskog zida, postupak korelacione analize slike je izveden u *ImageJ-u*. Kao rezultat, dobija se prostorna autokorelaciona slika iz koje se G kriva izdvaja uzimanjem profila intenziteta kroz centar slike. Primer G krive je prikazan na slici 4.13b. Broj LK je izračunat korišćenjem sledeće formule:

$$N_{LK} = \frac{N_{pix} \cdot N_{pix}}{r^2 \pi \cdot G(0)}$$

gde je N_{pix} veličina piksela slike $2^n \times 2^n$ (gde je n ceo broj), r je srednji poluprečnik LK uzet kao polovina $FWHM$ G krive, a $G(0)$ je maksimalna vrednost G krive. r i $G(0)$ se izdvajaju iz Lorencovog fita G krive (umetak slike 4.13b). Treba napomenuti da se morfologija LK značajno razlikuje od morfologije klastera koji se obično ispituju ICS analizom. Stoga, u našem slučaju, višestruka oduzimanja pozadine ne dovode do zaravnjavanja G krive u odnosu na broj oduzimanja kako bi se moglo očekivati prema literaturi (Rocheleau, Wiseman, and Petersen 2003). Zaravnjavanje G krive prikazane u literaturi (Rocheleau, Wiseman, and Petersen 2003) se koristi kao kriterijum koliko puta se pozadina mora oduzeti pre nego što se primeni ICS. Naši kriterijumi za broj oduzimanja pozadine su bili: a) prestanak značajnog smanjenja broja LK nakon svakog sledećeg oduzimanja (slika 4.13c, crni kvadrati), b) približno podudaranje broja LK po hifi sa PSA metodom i c) iskustvo (čelijski zid nestaje sa slike posmatrane okom). Pregledom desetina slika, kako kontrolnih tako i tretiranih hifa, zaključili smo da je u proseku (u zavisnosti od početnog kvaliteta slike) 20 uzastopnih oduzimanja bilo dovoljno za pouzdanu ICS analizu.

Da bismo proverili da li bi dodatno uklanjanje čelijskog zida dalo drugačiji broj LK, izvršili smo ručno uklanjanje čelijskog zida. To je urađeno razgraničenjem i opsecanjem pre višestrukih oduzimanja pozadine. Nakon 20 uzastopnih oduzimanja pozadine, ova metoda ne daje značajno različite rezultate u broju LK u poređenju sa slikama na kojima čelijski zid nije ručno isečen (ilustrovano grafikom na slici 4.13c).

4.2.1.5 Analiza lipidnih kapi pomoću PSA i ICS

Poređenje broja i veličine LK dobijenih pomoću ICS i PSA je dat u Tabeli 4. Broj LK po površini hifa je u proseku približno isti, ali je srednji prečnik dobijen pomoću ICS nešto manji. Ovo odstupanje se može objasniti različitim definicijama za veličinu objekta koji se koristi u ove dve metode.

Tabela 4. Poređenje broja i veličine lipidnih kapi dobijenih kvantifikacionom analizom dve metode, ICS i PSA. $N = 3$ za svaku prikazanu grupu.

	Korelaciona analiza slike		Analiza veličine čestica	
	ICS		PSA	
Kontrola / Tretman	Broj LK / površina hife ($1/\mu\text{m}^2$) $\times 10^{-3}$ (SV $\pm$ SE)	Srednji prečnik LK (μm) (SV $\pm$ SE)	Broj LK / površina hife ($1/\mu\text{m}^2$) $\times 10^{-3}$ (SV $\pm$ SE)	Srednji prečnik LK (μm) (SV $\pm$ SE)
Kontrolna za 3h N-glادovanja	16 ± 1	$0,56 \pm 0,06$	16 ± 2	$0,74 \pm 0,02$
3h N-glادovanje	15 ± 5	$0,60 \pm 0,10$	15 ± 6	$0,74 \pm 0,03$
Kontrolna za 6h N-glادovanja	15 ± 4	$0,52 \pm 0,08$	13 ± 3	$0,78 \pm 0,02$
6h N-glادovanje	24 ± 3	$0,46 \pm 0,02$	22 ± 4	$0,74 \pm 0,04$

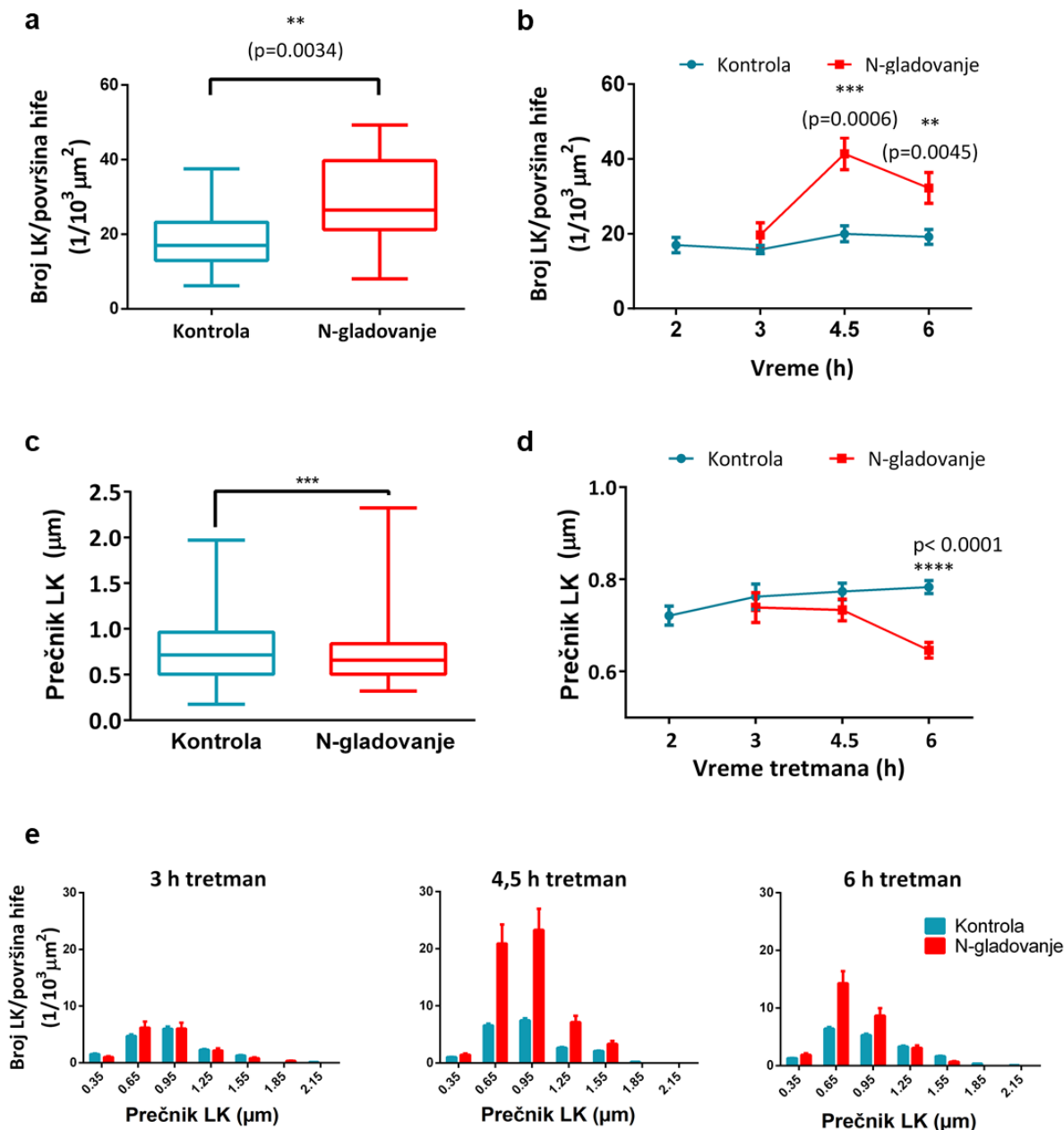
Da bismo procenili promenu LK broja u tretiranim hifama, izračunali smo odnos broja LK po površini u tretiranim hifama u odnosu na kontrolne (Slika 4.13d). Ukupan broj LK nakon 3 sata gladovanja ne pokazuje značajnu promenu. Sa dužim vremenom gladovanja broj LK se povećava za više od 50%.

Koristeći ICS analizu, broj prebrojanih entiteta bio je $80 \pm 12\%$ broja LK koji je pronađen vizuelnom inspekcijom ($N = 12$) i u bliskoj korelaciji sa podacima dobijenim PSA metodom. Kada se brojevi LK dobijenih pomoću obe metode ucrtaju za svaku pojedinačnu sliku kao zasebne tačke (slika 4.13e), linija regresije ima nagib blizu 1, što potvrđuje da je ICS jednako pouzdan kao i PSA metoda u otkrivanju i prebrojavanju LK. Koeficijent regresije - R^2 , bio je približno 0,8.

4.2.1.6 Uticaj azotnog gladovanja na broj i veličinu lipidnih kapi

Da bismo u potpunosti koristili THG oslikavanje (vreme ekspozicije za sliku od 1024×1024 piksela sa 30 usrednjavanja traje maksimalno 24 s) i naknadnu analizu kao LK esej, izvršili smo niz snimanja i merenja u vremenu, kultura končastih gljiva uzgajanih u kontrolnim i uslovima bez azota. Da bi se izbegli mogući neželjeni efekti manipulacije micelijom tokom pripreme za početak tretmana (npr. centrifugiranja) na dobijene rezultate, kulture gljiva su snimane tek po proteku 2 sata od početka tretmana (gladovanje izazvano nedostatkom azota ili kontrola).

Broj LK po jediničnoj površini ćelija (Broj LK/površina hife) u svim snimljenim hifama u kulturama gljiva koje su uzgajane u medijumu bez azota (N-glادovanje) bio je značajno veći u poređenju sa kontrolom (Slika 4.14a). Da bi se ispitala dinamika zapaženog povećanja broja LK, kontrolna i N-glادovanje grupa su podeljene na četiri grupe u odnosu na trajanje tretmana (Slika 4.14b). Vrednosti broja LK po površini hifa su prikazane u zavisnosti od vremena. Broj LK po površini hife u kontrolama ostao je približno isti tokom posmatranja, sa blagim trendom povećanja u kasnijim vremenskim tačkama rasta koji nije bio statistički značajan (Slika 4.14b). Kod hifa iz grupe N-glادovanje došlo je do izrazitog i statistički značajnog porasta broja LK po površini hife u odnosu na kontrolu nakon 4,5 h od tretmana, i ovaj trend se održao do završetka eksperimenta (Slika 4.14b).



Slika 4.14. Kvantifikacija LK sa THG slika hifa *P. blakesleeanus*. Hife su kultivisane u medijumu bez azota ili u standardnom tečnom medijumu 2-6 sati (ili duže od 6 a najviše 8 sati) nakon početka tretmana. Dobijene THG slike LK su analizirane PSA metodom. $n = 6$ nezavisnih kultura. a) N-glادovanje povećava broj LK po jedinici površine. Broj LK dobijen iz pojedinačnih hifa je normalizovan na površinu hife ($10^3 \mu\text{m}^2$). Kontrola ($N = 47$), N-glادovanje ($N = 16$). Rezultati objedinjeni za sve vremenske tačke u kontroli i N-glادovanju. Neupareni dvostrani t-test sa Welch korekcijom, $p = 0,0038$. b) Vremenski tok Broj LK/jedinična površina, pokazuje da je povećanje broja LK uzrokovano N-glادovanjem značajno nakon 4,5 h ($p = 0,0006$) i u kasnijim vremenima ($p = 0,0045$), u poređenju sa odgovarajućom kontrolom. Dvosmerna ANOVA, sa Holm-Sidac-ovom korekcijom. Srednja vrednost $\pm$ SE, $N(\text{kontrola}) = 8; 7; 11; 21$ za vremenske tačke 2; 3; 4,5; 6 (u satima (h)). $N(\text{N-glادovanje}) = 6; 3; 7$ za vremenske tačke 3; 4,5; 6 (u satima (h)). c) N-glادovanje smanjuje prečnik LK. Prečnici LK iz kontrole ($N = 1173$) i N-glادovanje grupe ($N = 432$). Rezultati objedinjeni za sve vremenske tačke u kontroli i N-glادovanju. Dvostrani Mann-Whitney ($p = 0,0008$). d) Vremenski tok promene prečnika LK koji pokazuje da je smanjenje uzorkovano gladovanjem značajno samo pri produženim vremenima gladovanja. Dvosmerna ANOVA, Holm-Sidac korekcija ($p < 0,0001$) u poređenju sa

odgovarajućom kontrolom. Srednja vrednost $\pm$ SE, N(kontrola) = 176; 124; 302; 571 za vremenske tačke 2; 3; 4,5; 6 (u satima (h)). N(N-gladovanje) = 100; 118; 214 za vremenske tačke 3; 4,5; 6 (u satima (h)). e) Poređenje distribucija povećanog broja LK nakon 4,5 i 6 sati gladovanja. Najveće LK se gube u najdužim vremenima gladovanja. Histogrami raspodele prečnika LK sa opsegom vrednosti od 0,3 μ m, za kontrolnu i N-gladovanje grupu. Broj LK za svaki opseg vrednosti histograma podeljen je zbirom površina hifa odgovarajuće grupe. Greške su računane kako je navedeno u poglavlju 3.6.3, *Materijal i metode*. Brojevi na x osi predstavljaju gornju granicu opsega vrednosti histograma.

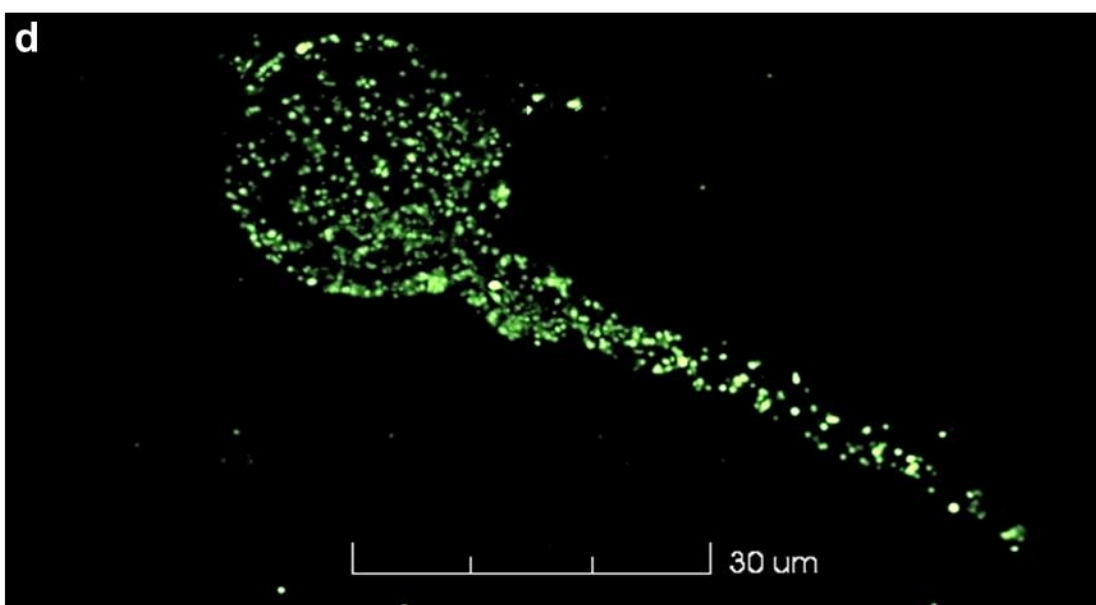
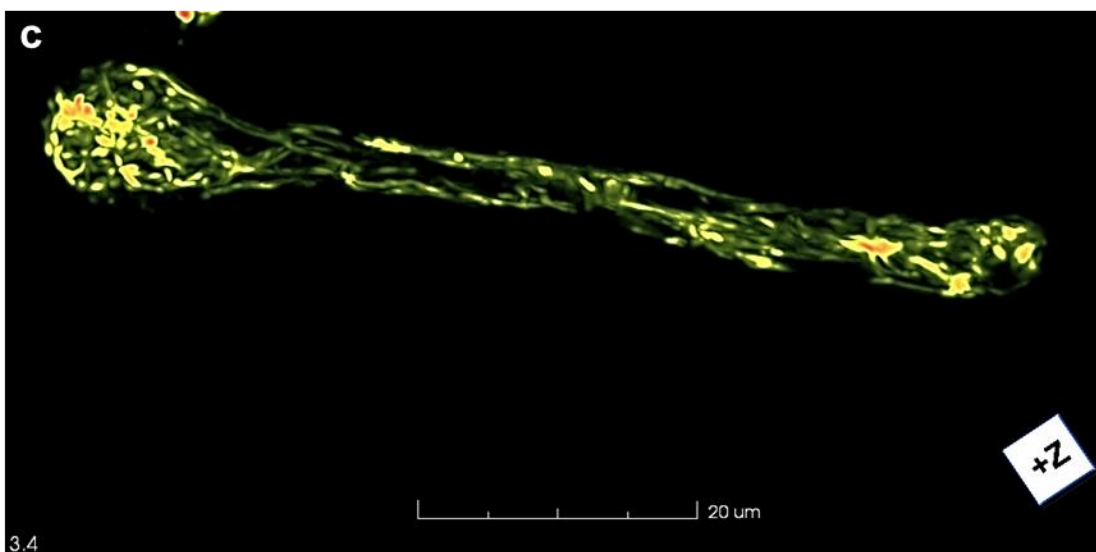
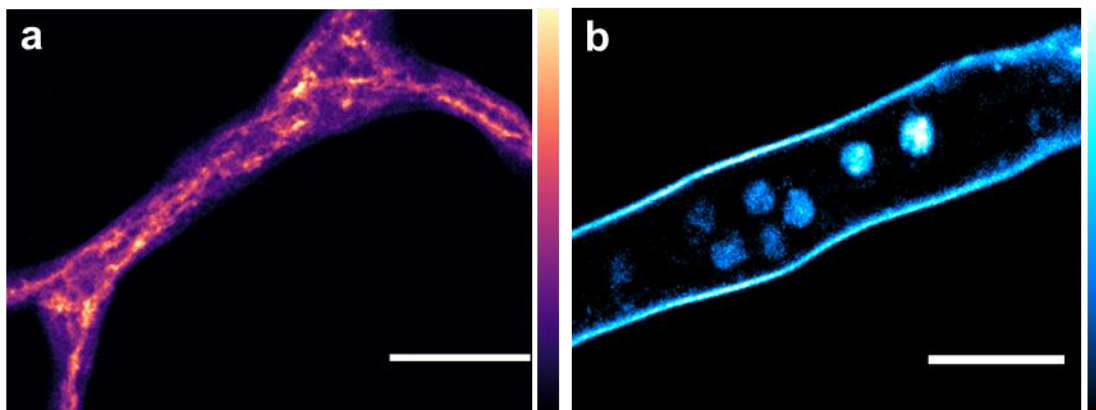
Srednji prečnik LK je bio statistički značajno manji u kulturama iz grupe N-gladovanje u poređenju sa kontrolom, kada su poređeni sumarni rezultati grupa, bez obzira na vreme tretmana (Slika 4.14c). Međutim, ako se analizira dinamika ovog procesa (Slika 4.14d), vidi se da u kontrolama nije bilo statistički značajne promene srednjeg prečnika LK, dok je tek posle 6h od početka tretmana došlo do izrazitog i statistički značajnog smanjenja srednjeg prečnika LK kod hifa iz grupe N-gladovanje u odnosu na kontrolu.

Analiza histograma raspodele prečnika lipidnih kapi 3, 4,5 i 6h od početka tretmana, (slika 4.14e) pokazuje da su LK manje od 1,6 μ m brojnije u grupi N-gladovanje nego u odgovarajućoj kontroli 4,5 h od početka tretmana, dok se na 6 h povećava samo broj LK manjih od 1 μ m. Stoga se smanjenje prosečnog prečnika LK do kojeg je došlo između 4,5 h i 6 h kod hifa koje su gladovale (Slika 4.14d) može objasniti značajnim gubitkom populacije LK većih od 0,6 μ m tokom produženog rasta u uslovima N-gladovanja. Sumarno, utvrđeno je da je ukupna promena u LK tokom rasta bez dostupnog azota povećanje broja LK nakon 3 h od početka tretmana, koje je praćeno gubitkom populacije LK većih od prosečnih tokom produženog gladovanja.

4.2.2 *In vivo* (auto)TPEF oslikavanje organela u pojedinačnim hifama *P. blakesleeanus*

U ovom poglavlju će biti prikazana kolekcija TPEF slika i 3D prikaza koji ilustruju trodimenzionalnu organizaciju, distribuciju i dinamičko ponašanje ključnih organela energetskog metabolizma, kao i redoks odnos intrinzičnih kofaktora u živim hifama. Detaljna kvantifikaciona analiza 2D slika dobijenih na ovaj način će biti prikazana u poglavljima 4.2.2.1, 4.2.2.3 i 4.2.3.2.

Na slici 4.15a je prikazana 2D slika autofluorescentnog signala poreklom od NAD(P)H nakon ekscitacije na 730 nm. Kako se NAD(P)H uglavnom nalazi u mitohondrijama a ređe u citoplazmi, na slici se mogu uočiti tubularne i sferne strukture. Ipak, za potrebe kvantifikacije dinamike mitohondrija, potreban je bolji odnos signal/šum i nedvosmislena potvrda ovih organela. Na slici 4.15b je prikazana 2D TPEF slika jedara obojenih bojom DAPI, dok su 3D TPEF slike izduženih tubularnih mitohondrija obojenih rodaminom 123 i LK obojene bojom NR prikazane na slici 4.15c i d.



Slika 4.15. Upoređivanje slika hifa *P. blakesleeanus* dobijenih detektovanjem različitih signala: a) autoTPEF signal predominantno poreklom od NAD(P)H (730 nm, 7,6 mW, VIS) Skala: 20 μ m. Skala intenziteta za autoTPEF signal: crna – najniži TPEF signal, svetlo roze – najviši TPEF signal. b) TPEF signal poreklom od jedara obojenih bojom DAPI (730 nm, 4,4 mW, VIS + 479/40). Skala: 10 μ m. Skala intenziteta za autoTPEF signal: tamno plava – najniži TPEF signal, bela – najviši TPEF signal. c) 3D slika mitohondrija obojenih bojom Rh123 (800 nm, 5,2 mW, VIS + 530/43). 3D Model je napravljen od 21 TPEF slike koje su bile odvojene 0,9 μ m duž z-ose. d) 3D slika lipidnih kapi obojenih bojom NR (1040 nm, 3,4 mW, VIS + 570LP). 3D model napravljen od 15 TPEF slika sa razmakom 0,9 μ m. Sve slike su snimljene imerzionim Zeiss 40x, NA=1,3 objektivom.

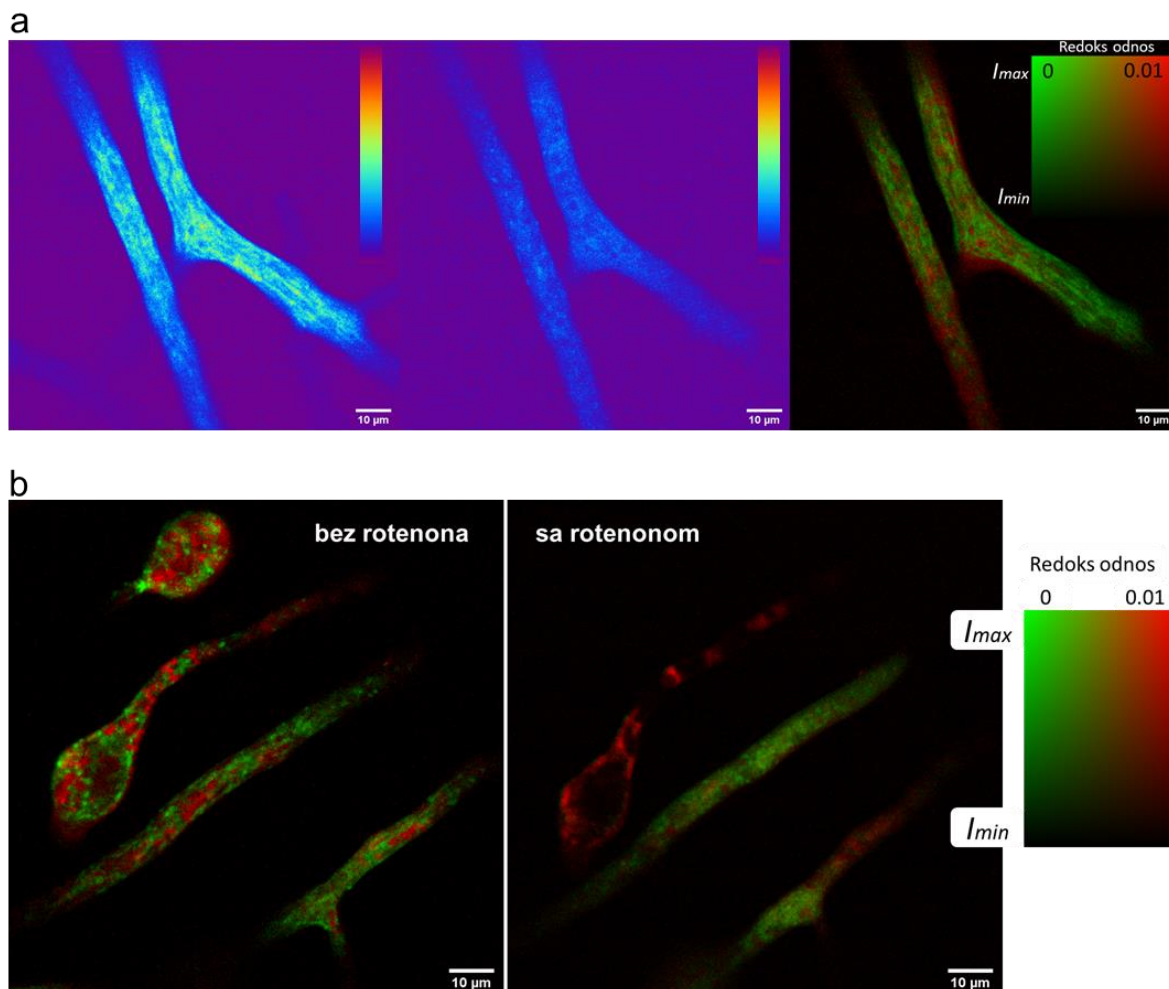
Dobijeni podaci otkrivaju da je većina organela ravnomerno raspoređena u citoplazmi hifa, što implicira da svoju funkciju obavlja duž cele dužine hife tokom ekspanzijske faze rasta.

In vivo* oslikavanje metaboličkog statusa *P. blakesleeanus

Zbog povezanosti puteva sinteze i razgradnje lipida sa putevima oksidativnog metabolizma, odnosno redoks potencijalom ćelije (Veech et al. 2019) i uloge LK u odbrani od oksidativnog stresa (Jarc and Petan 2019). Oslikavanjem endogenih fluorofora NAD(P)H i FAD moguće je odrediti relativne promene u oksidaciono-redukcionom stanju u ćelijama. Promene u koncentracijama NAD(P)H i FAD u citoplazmi i mitohondrijama mogu se detektovati pomoću optičkog redoks odnosa koji pokazuje metaboličku aktivnost ćelija (Z. Liu et al. 2018). NLSM zbog svojih osobina omogućava da odredimo redoks odnos jer su metabolički kofaktori FAD i NAD(P)H prirodno fluorescentni i imaju različite maksimume pobude i emisije. Na slici 4.16a se može videti autofluorescentni signal od NAD(P)H i FAD u hifama *P. blakesleeanus* i njihov redoks odnos nakon preklapanja slika i deljenja ova dva signala.

Da bismo dobili redoks odnos izračunali smo odnos intenziteta autofluorescencije FAD-a i NAD(P)H-a. Ovo je urađeno za svaki piksel na ove dve slike, i na taj način je dobijena nova slika. Vrednosti odnosa su korigovane zbog različite efikasnosti detekcije za različite uslove snimanja. Korekcioni faktor je dobijen na osnovu snimanja rodamina B pod istim uslovima na kojima su snimani FAD i NAD(P)H. Vrednost redoks odnosa na slici je predstavljena bojom (color bar na slici 4.16), dok intenzitet slike predstavlja srednju vrednost intenziteta FAD-a i NAD(P)H-a. Redoks odnos koji je dobijen je upravo onakav kakav se očekuje kod zdravih ćelija.

U cilju validacije metode koristili smo rotenon kao stimulus sa poznatim delovanjem na promenu odnosa NADH i FAD. Naime, rotenon izaziva inhibiciju kompleksa I mitohondrijalnog respiratornog lanca, odnosno inhibira oksidaciju NADH u NAD što dovodi do povećane količine NADH u ćeliji, ali bez promene u količini FAD. U skladu sa očekivanjem, nakon dodavanja rotenona dolazi do pojačanog signala NADH, dok se signal od FAD autofluorescence ne menja. Ovo se jasno vidi na rezultujućim slikama optičkog redoks odnosa pre i nakon dodavanja rotenona kao smanjenje redoks odnosa zbog veće količine NADH (4.16b).

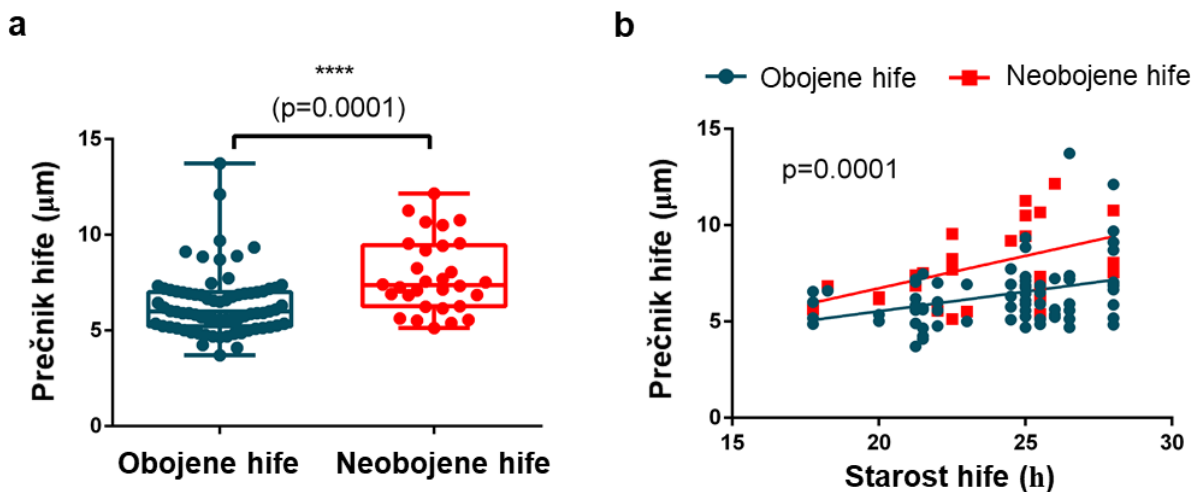


Slika 4.16. Optički redoks odnos endogenih fluoroforma NAD(P)H i FAD u hifama *P. blakesleeanus*. a) Optički redoks odnos endogenih fluoroforma NAD(P)H i FAD. Levo: AutoTPEF slika NAD(P)H autofluorescence u hifama *P. blakesleeanus*. Talasna dužina pobude 730 nm. Emisioni filter 479/40 nm. Sredina: AutoTPEF slika FAD autofluorescence u istim hifama. Talasna dužina pobude 860 nm. Emisioni filter 530/43 nm. Intenzitetska skala za TPEF signal: ljubičasta/plava – najniži TPEF signal, tamno crvena – najviši TPEF signal. Obe slike su snimljene imerzionim Zeiss 40x 1,3 objektivom. Desno: Rezultujuća slika optičkog redoks odnosa NAD(P)H i FAD. Zelena boja predstavlja najniži redoks odnos dok crvena boja predstavlja najviši redoks odnos. Formula po kojoj je izračunat redoks odnos: $\frac{[FAD]}{[NAD(P)H]} \times \left(\frac{R_{NAD(P)H}}{R_{FAD}} \right)$, $R_{NAD(P)H}$ i R_{FAD} su srednje vrednosti intenziteta rodamina B izmerene u identičnim uslovima oslikavanja FAD i NAD(P)H. b) Rezultujuće slike redoks odnosa NAD(P)H i FAD pre i nakon dodavanja rotenona.

Uticaj starosti i prečnika hifa na obeležavanje bojom Rh123

Tokom optimizacije bojenja mitohondrija bojom Rh123, primećeno je da se ne boje sve hife podjednako uspešno. Naime, uočeno je da su se starije hife u manjem broju bojile ovom bojom. Da bi se utvrdilo da li zaista postoji razlika u bojenju različitih veličina i uzrasta hifa ispitan je uticaj starosti i prečnika hifa na bojenje Rh123. U grupi kontrolnih hifa je pokazano da postoji statistički značajna razlika ($p = 0,0001$) u starosti i prečniku između hifa koje su se obojile i onih koje nisu. Hife većeg prečnika uglavnom odgovaraju starijim hifama, tako da između ova dva

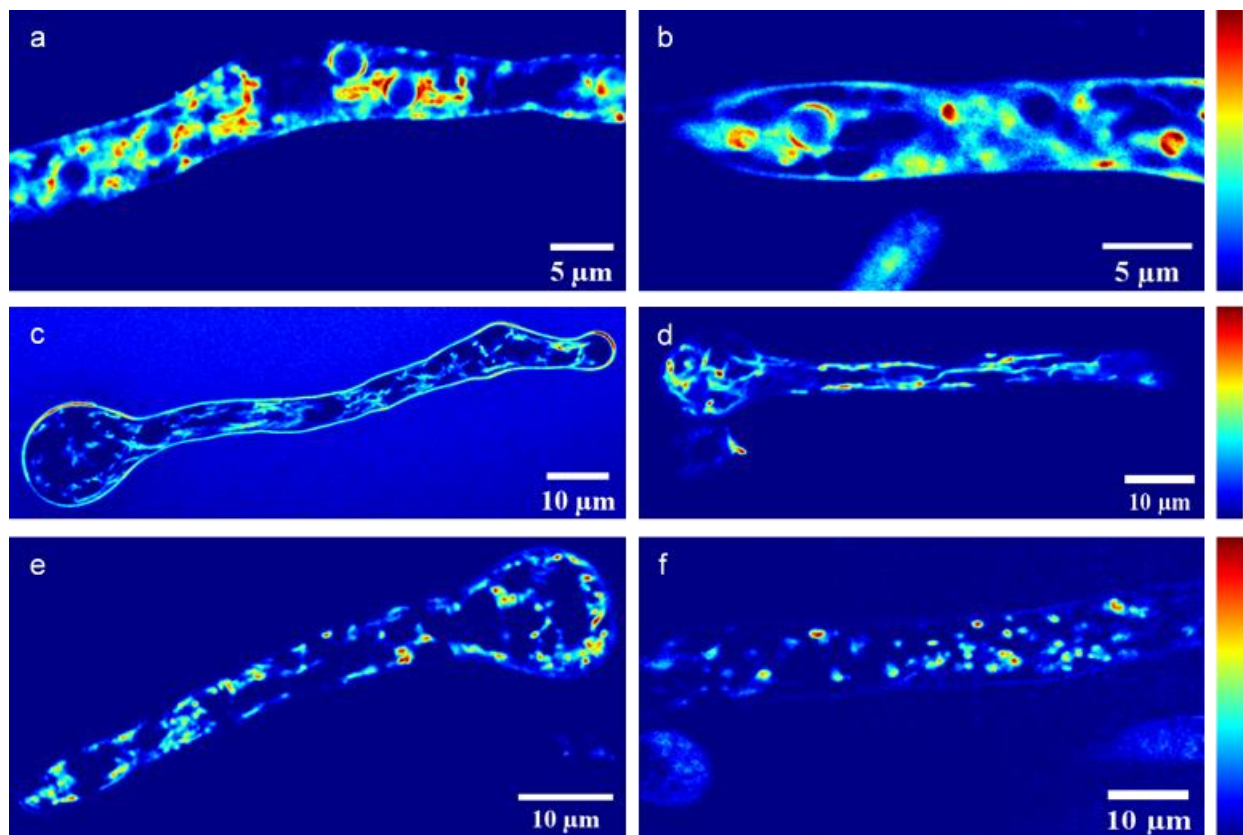
parametra postoji korelacija. Sa porastom prečnika i starosti, hife su se manje bojile. Srednji prečnik za obojene hife u kontroli je oko 6 μm , dok je za neobojene oko 7.5 μm , što se može uočiti sa grafika (Slika 4.17).



Slika 4.17. Zavisnost bojenja mitohondrija bojom Rh123 od starosti hifa i njihovog prečnika. a) Poredjenje prečnika hifa koje su se obojile i koje se nisu obojile bojom Rh123 u kontrolnoj grupi. $N(\text{obojene}) = 48$, $N(\text{neobojene}) = 22$. b) isti podaci pod (a) prikazani u zavisnosti od starosti gljiva u trenutku oslikavanja. Regresione prave se razlikuju (F test).

Morfološki tipovi populacija mitohondrija u hifama *P. blakesleeanus*

U hifama gljive *P. blakesleeanus* je uočeno šest morfoloških tipova hifa prema preovlađujućem obliku mitohondrija (u daljem tekstu morfološki tip mitohondrija): intermedijarni tip – normalan, intermedijarni sa malim polukružnim tubulama; tubularni, izdužene tubule; fragmentisan (male elipsoidne tubule) i fragmentisan tip sa mitohondrijama isključivo sfernog oblika. Morfološki tipovi mitohondrija koji su identifikovani tokom ovog rada su prikazani na Slici 4.18.



Slika 4.18. TPEF slike morfoloških tipova mitohondrija u hifama *P. blakesleeanus*. a) intermedijarni tip (prisutne su tubularne mitohondrije oko okruglih struktura veličine jedara, kao i kraće tubule i elipsoidne mitohondrije). b) intermedijarni tip sa dodatnim polukružnim tubulama oko okruglih struktura manjih veličina od jedara (veličina se podudara sa veličinom lipidnih kapi). c) tubularne mitohondrije. d) izdužene tubularne mitohondrije. e) fragmentisan tip morfologije koji obuhvata jako kratke tubule, elipsoidne i okrugle mitohondrije. f) fragmentisan tip morfologije koji podrazumeva samo male sferne mitohondrije. Sve slike su obojene 5 μ M Rh123 i snimljene imerzionim Zeiss 40x, NA=1,3 objektivom. Prosečna snaga u ravni uzorka je bila 4,2 mW (a), 4,2 mW (b), 4,3 mW (c), 5,2 mW (d), 4,1 mW (e), 4,5 mW (f). Skala intenziteta za TPEF signal: tamno plavo – najniži TPEF signal, tamno crveno – najviši TPEF signal.

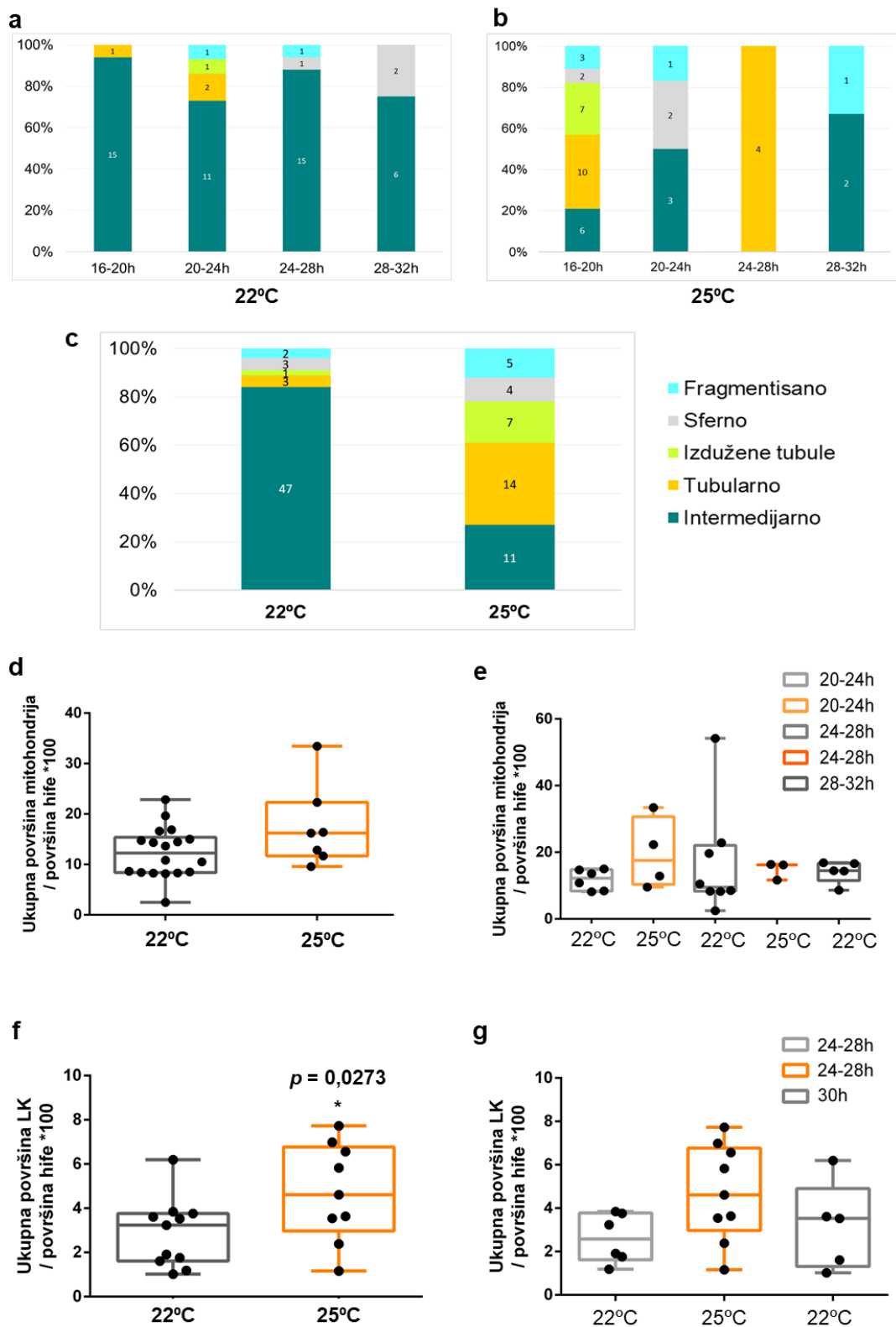
4.2.2.1 Uticaj povišene temperature na dinamiku mitohondrija i lipidnih kapi

Ispitan je uticaj povišene temperature gajenja na gustinu lipidnih kapi u živim hifama *P. blakesleeanus*. Uporedo je ispitano kako povišena temperatura utiče na morfologiju mitohondrija i promenu njihove zastupljenosti u hifama.

Povećanje ambijentalne temperature za 3°C, sa 22°C na 25°C, je imalo dramatičan efekat na morfologiju mitohondrija, izazivajući pojavu pretežno tubularne morfologije (slika 4.19a,b,c). Dok u kontrolnim uslovima u najvećem procentu (>70%) preovlađuje intermedijarni tip morfologije u svim vremenskim tačkama eksponencijalnog rasta (slika 4.19a), na 25°C se uočava dinamičnija promena morfologije (slika 4.19b). Tubularna morfologija je dominantna kod mlađih hifa eksponencijalne faze (16-20 h) i u potpunosti preovlađuje na vrhuncu ove faze (24-28 h), dok

su u ostatku eksponencijalne faze dominantne mitohondrije intermedijarne morfologije. Sa grafika 4.19c gde su sva vremena gupisana, jasno se uočava dvostruko povećanje fragmentisane i sferne morfologije na povišenoj temperaturi. Međutim, najizraženija promena u odnosu na kontrolu je višestruko povećanje tubularnih mitohondrija, kako srednjih tubula, tako i izduženih, što je karakteristično za stanja blagog stresa ili kada se ćelija nalazi u uslovima gde je potrebno proizvoditi više energije. Na grafiku 4.19b vidimo da se izdužene tubule pojavljuju kod najmlađih hifa eksponencijalne faze u uslovima povišene temperature. Procenat ukupne površine mitohondrija je takođe pokazao trend rasta kada se gaji na 25°C (slika 4.19d,e) ali bez statističke značajnosti, što pokazuje da se ukupna površina mitohondrija ne menja značajno. Dakle, ukupna površina mitohondrija se ne menja značajno sa promenom temperature ali zato one dinamično menjaju svoju morfologiju kroz procese intenzivne fuzije i fisije. Uočeni odgovori na malo povećanje temperature ukazuje na fiziološku adaptaciju metabolizma hifa.

Povećanje ambijentalne temperature na 25°C izazvalo je statistički značajno ($p = 0,0273$) povećanje procenta površine hifa koju zauzimaju LK sa $2,9 \pm 1,6$ na $4,7 \pm 2,2$ (slika 4.19f). Takođe se uočava i blagi trend povećanja površine hifa koju zauzimaju LK kod starijih hifa na standardnoj temperaturi gajenja (22°C) (slika 4.19g).

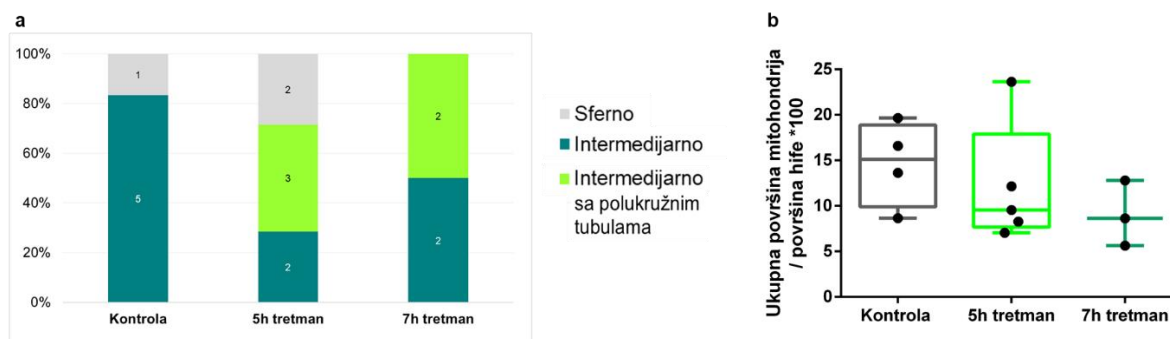


Slika 4.19. Zastupljenost morfoloških tipova i udeo mitohondrija u kontrolnim i uslovima povišene temperature gajenja. Procentualna zastupljenost morfoloških tipova mitohondrija u a) kontroli +22°C (kontrolna temperatura, standardno korišćena u svim gajenjima) i na b) povećanoj ambijentalnoj temperaturi +25°C. c) Procentualna

zastupljenost morfoloških tipova mitohondrija u kontroli i na povećanoj temperaturi - objedinjene sve starosti hifa. (kontrola ($N = 56$ hifa) i tretmani gajeni na 25°C ($N = 41$ hifa)). Zastupljeni morfološki tipovi mitohondrija (intermedijarni, tubularne, izdužene tubule, fragmentisane i sferne) su prikazani različitim bojama, a vrednosti na stubićima predstavljaju broj analiziranih hifa. d) Udeo površine hife koji zauzimaju mitohondrije u uslovima povećanja ambijentalne temperature, izražen u procentima. e) Isti podaci kao pod (d) prikazani u zavisnosti od starosti gljiva u trenutku oslikavanja. f) Procenat površine hife koji zauzimaju LK u uslovima povećanja ambijentalne temperature. Razlika između grupa je značajna, $p = 0,0273$. Kontrola ($N = 11$ hifa) i tretmani gajeni na 25°C ($N = 9$ hifa). g) Isti podaci kao pod (f) prikazani u zavisnosti od starosti gljiva u trenutku oslikavanja.

4.2.2.2 Uticaj azotnog gladovanja na dinamiku mitohondrija

S obzirom da je samo malo povećanje temperature izazvalo izuzetno dinamičnu promenu morfologije mitohondrija, ispitan je i uticaj gladovanja na zastupljenost pojedinih morfoloških tipova mitohondrija i udeo površine koji mitohondrije zauzimaju u hifi. Delovanje azotnog gladovanja je ispitan u dva nezavisna eksperimenta, posle 5 i 7 h od početka tretmana. Na slici 4.20a. se može videti da se u potpunom odsustvu azota, u odnosu na kontrolu, pojavljuje novi morfološki tip mitohondrija – intermedijarni sa polukružnim tubulama, koji obavlja neke strukture koje po veličini odgovaraju lipidnim kapima. U kontroli, očekivano, dominira intermedijarni oblik mitohondrija, dok je u tretmanu N-gladovanjem njihov udeo smanjen. Srednje i izdužene tubule, kao i fragmentisan tip mitohondrija nisu uočene ni u kontroli ni u tretmanima, sa izuzetkom sferne morfologije koja je bila prisutna u kontroli i u toku prvih 5 h tretmana N-gladovanjem. Zanimljiva je pojava posebnog intermedijarnog tipa mitohondrija sa manjim polukružnim tubulama, koji se pojavljuju samo u ovom tipu tretmana. Međutim, u pitanju je mala veličina uzorka, te se ne mogu donositi konačni zaključci. Analiza površine hifa koju zauzimaju mitohondrije je pokazala da tokom azotnog gladovanja dolazi do njenog smanjenja u odnosu na kontrolu koje nije statistički značajno (slika 4.20b).

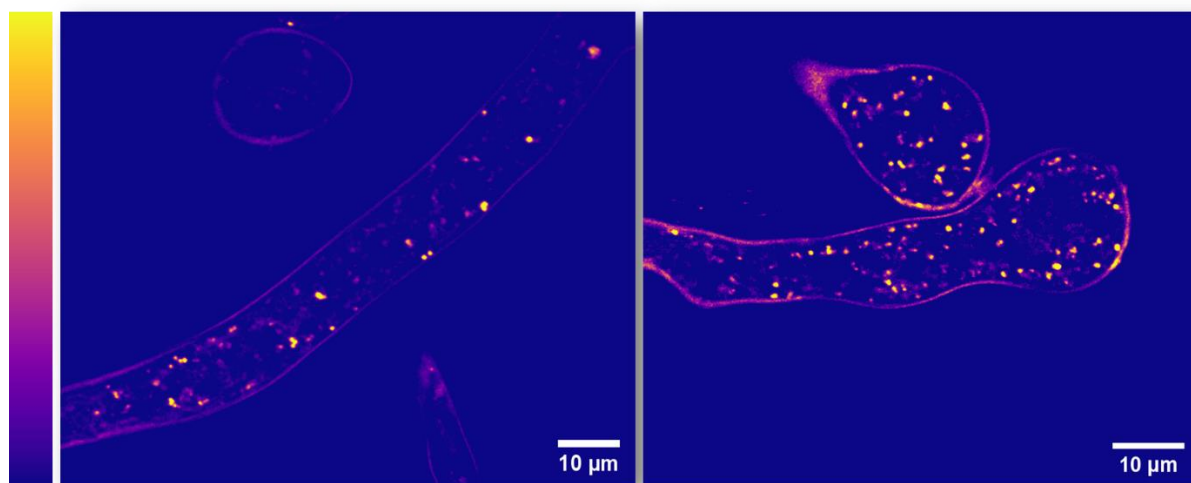


Slika 4.20. Zastupljenost morfoloških tipova i udeo mitohondrija u kontrolnoj i N-gladovanje grupi. a) Procentualna zastupljenost morfoloških tipova mitohondrija na nivou celih hifa u azotnom gladovanju i kontroli. Zastupljeni morfološki tipovi mitohondrija (intermedijarni, intermedijarni sa polukružnim tubulama i sferni) su prikazani različitim bojama, a vrednosti na stubićima predstavljaju broj analiziranih hifa. b) Udeo površine hife koji zauzimaju mitohondrije u N-gladovanju u odnosu na kontrolu. Vrednosti dobijene za hife starosti 24-31 h su grupisane u oba grafika.

4.2.3 Ispitivanje uticaja natrijum selenita na dinamiku lipidnih kapi, mitohondrija i morfologiju hifa *P. blakesleeanus* – THG i TPEF oslikavanje

4.2.3.1 Uticaj natrijum selenita na dinamiku lipidnih kapi *P. blakesleeanus* - THG oslikavanje bez obeležavanja

Uticaj različitih koncentracija natrijum selenita (25 μM , 100 μM , 500 μM i 1000 μM) na dinamiku lipidnih kapi pojedinačnih hifa (starosti 24 h – 31 h) gljive *P. blakesleeanus* ispitan je u 3 nezavisna eksperimenta. Na THG slikama dobijenim iz kontrolnih i hifa tretiranih selenitom (Se^{4+}), mogu se lako uočiti lipidne kapi i povećana gustina LK u tretiranoj grupi (slika 4.21).

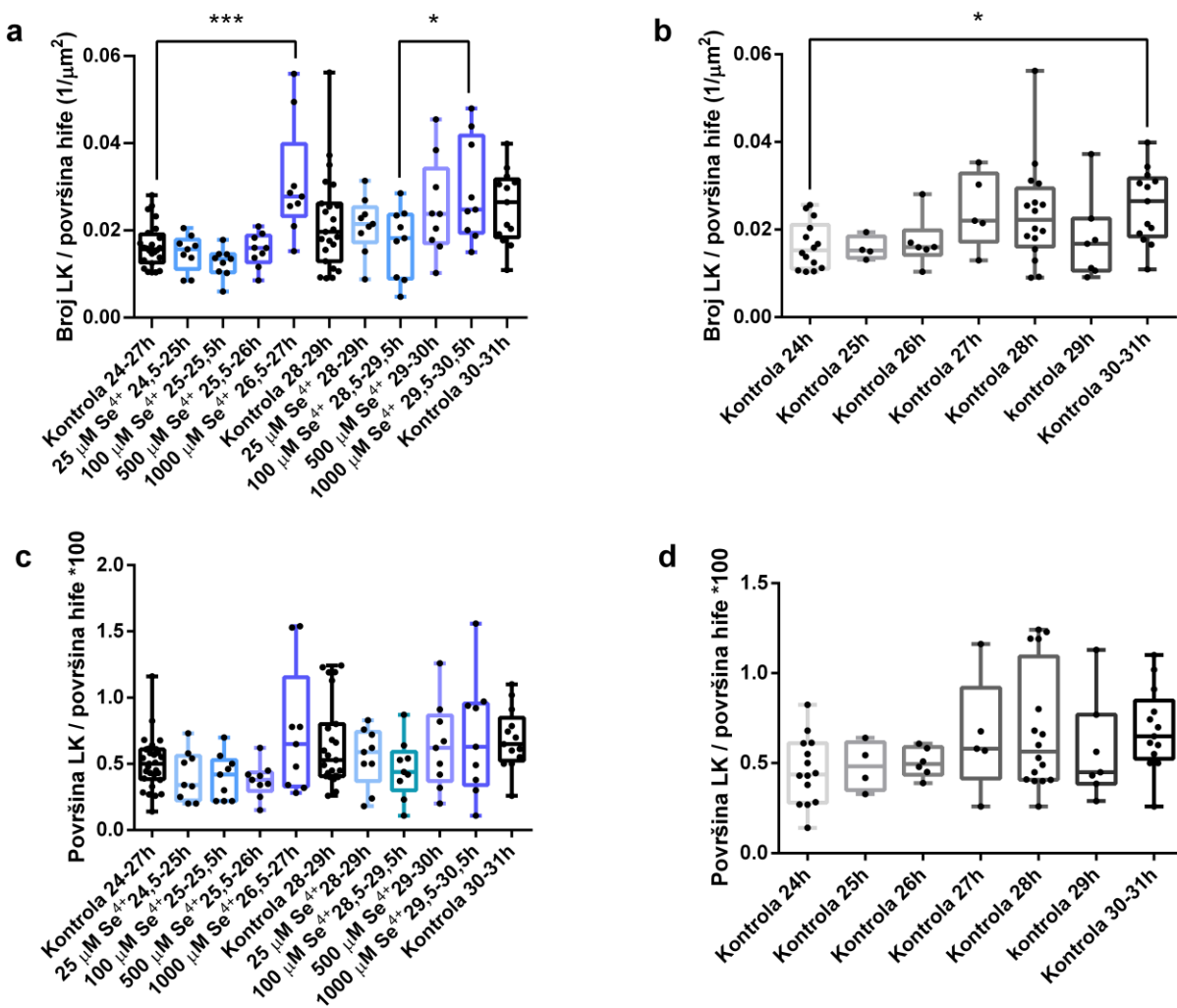


Slika 4.21. THG slike lipidnih kapi u neobeležanim hifama *P. blakesleeanus*. **Levo:** Kontrola. Hife gajene u SMT medijumu, stare 28h. **Desno:** Kultura tretirana natrijum selenitom. Hife gajene u SMT medijumu sa dodatim 1000 μM natrijum selenitom, stare 26h. Obe slike su snimljene uljano-imerzionim Zeiss 40x, NA=1,3 objektivom dok je prosečna snaga u ravni uzorka bila 28,3 mW (a) i 24,9 mW (b). Svetle tačke predstavljaju lipidne kapi. Skala intenziteta za THG signal: tamno plavo – najniži THG signal, žuto – najviši THG signal.

Sa THG slika kontrolnih i hifa tretiranih Se^{4+} , određena je gustina (slika 4.22a,b), površina (slika 4.22c,d) i veličina lipidnih kapi (slika 4.23). Gustina LK je izračunata kao: broj LK u hifi / površina te hife (μm^2). Grafik na slici 4.22a pokazuje da je u grupi hifa mlađih od 27 h, nakon tretmana selenitom (1000 μM), prosečna gustina LK statistički značajno porasla skoro dva puta (1,95x, $p = 0,0003$) u poređenju sa kontrolom. Statistički značajna razlika ($p = 0,0368$) u gustini hifa uočena je i u starijoj populaciji hifa između grupa tretiranih 1000 μM i 100 μM selenitom, sa značajnim porastom gustine LK u korist veće koncentracije selenita. U grupi hifa starosti od 24 h do 26 h koje su tretirane manjim koncentracijama natrijum selenita (25 μM , 100 μM i 500 μM) uočava se trend smanjenja broja LK u odnosu na kontrolnu grupu gljiva. Sa druge strane, kod starijih hifa, 28 h - 30 h, tretiranih istim koncentracijama Se^{4+} , uočava se blago povećanje gustine LK u odnosu na kontrolu (28 h), izuzev koncentracije 100 μM koja izaziva smanjenje prosečne gustine LK. U oba vremenska bloka uočava se identičan obrazac efekta četiri korišćene koncentracije selenita:

gustina LK je najmanja za korišćenu koncentraciju Se^{4+} od 100 μM , zatim blago povećanje broja LK sa većom koncentracijom od 500 μM i konačno statistički značajno povećanje broja LK za najveću korišćenu koncentraciju (1000 μM). Postavlja se pitanje da li je povećanje broja lipidnih kapi kod grupa tretiranih natrijum selenitom koncentracije 1000 μM posledica deobe postojećih lipidnih kapi ili nastanka novih. Trend blagog povećanja gustine LK kod najstarijih kontrola je takođe evidentan (slika 4.22b) sa statistički značajnom razlikom ($p = 0,0473$) između najstarije (31 h) i najmlađe kontrole (24 h).

Na grafiku 4.22c i 4.22d možemo videti koji procenat površine hife zauzimaju lipidne kapi u tretmanima i kontrolama. I ovde se uočava blagi trend porasta procenta površine hife koju zauzimaju LK u hifama starijih kontrolnih grupa, ali bez statističke značajnosti. Kada se pogledaju tretmani na mlađim micelijumima (24 h – 27 h), takođe imamo sličnu situaciju kao i sa gustinom LK: najmanji procenat površine hife zauzimaju lipidne kapi tretirane koncentracijom od 100 μM , dok najveća korišćena koncentracija Se^{4+} , 1000 μM , dovodi do toga da lipidne kapi zauzimaju najveći procenat površine hife u odnosu na ostale koncentracije i kontrolu staru 24 h. Kada posmatramo starije micelijume (28 h – 31 h), uočavamo da svi tretmani imaju slične srednje vrednosti, izuzev koncentracije od 100 μM koja i ovde pokazuje najmanje vrednosti. Kada se grafici 4.22 c i d, uporede sa graphicima 4.22 a i b, može se zaključiti da su promene procenta površine koju zauzimaju LK po površini hife verovatno posledica promene broja LK, a ne povećanja ili smanjenja njihove veličine.

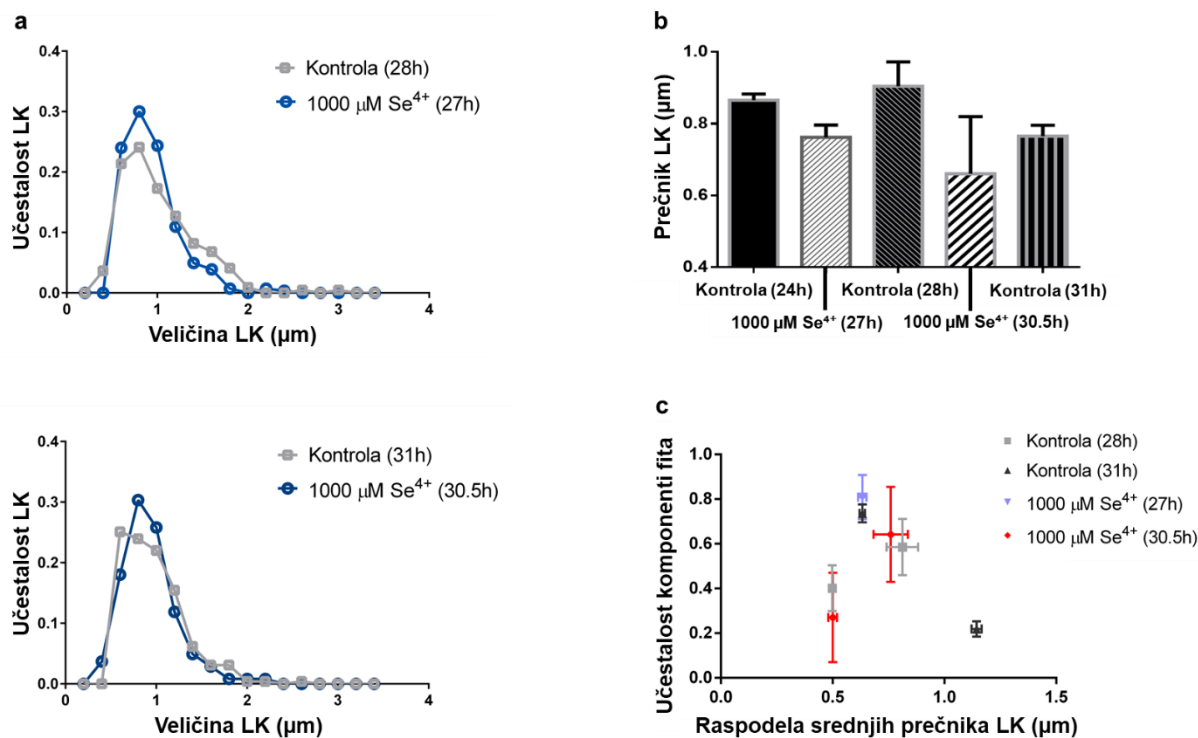


Slika 4.22. Gustina i zastupljenost lipidnih kapi u kontrolnim i grupama tretiranih natrijum selenitom. a) Broj LK po površini hife u tretiranim grupama i objedinjenim kontrolama. b) Broj LK po površini hife u kontrolnim uslovima razdvojeno pa satima. c) Procenat površine hife koje zauzimaju LK u tretiranim grupama i objedinjenim kontrolama. d) Procenat površine hife koje zauzimaju LK u kontrolnim uslovima razdvojeno pa satima. $N = 137$ analiziranih hifa. $N_{kontrola} = 14, 4; 6; 5; 16; 7; 13$ za vremenske tačke 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30-31 (u satima (h)). $N_{selenit} = 9$ za svaku grupu.

Kako je jedino najveća korišćena koncentracija Se^{4+} imala statistički značajan efekat na LK, izmereni su prečnici lipidnih kapi u grupi tretiranoj $1000 \mu\text{M Se}^{4+}$ i odgovarajućim kontrolama. Raspodela veličina LK je prikazana kao raspodela prečnika izmerenih LK što se može videti na histogramima na slici 4.23a. Na histogramima možemo videti da u svakoj kontrolnoj i tretiranoj grupi najviše ima lipidnih kapi veličine manjih od $1 \mu\text{m}$. Najmanji broj lipidnih kapi ima prečnik veći od $1,2 \mu\text{m}$ i ovaj broj je manji u tretiranoj grupi u odnosu na kontrolu. Odavde se može zaključiti da koncentracija $1000 \mu\text{M}$ deluje na LK tako što dovodi do proizvodnje manjih lipidnih kapi ili deljenja već postojećih na manje. Sa grafika 4.23b vidimo da se prosečna veličina LK nije značajno menjala, što ne podržava očekivanja da stres indukuje stvaranje novih LK. Sa druge strane, distribucija veličina LK pokazuje da su LK tretirane selenitom češće male (oko $1 \mu\text{m}$ i manje) u poređenju sa LK u kontrolama. Pored toga, distribucija LK u kontrolama, ali ne i u

tretiranoj grupi, uvek je imala znak „desnog ramena“ koji pokazuje da je prisutna odvojena populacija LK sa prečnikom većim od proseka grupe. Isti nalaz se jasnije vidi na grafiku na slici 4.23c, gde dobijeni parametri Gausove funkcije odgovaraju raspodeli prečnika LK.

Lipidne kapi u gljivi *P. blakesleeanus* su veoma male (srednji prečnici u svim grupama su manji od 1 μm), dok je granica lateralne rezolucije prikazanih slika oko 0,3 μm . Manje LK od prosečnih su jedva bile iznad granice. Stoga je blizina granice rezolucije verovatno uzrok naše nemogućnosti da pouzdano otkrijemo Se^{4+} indukovanu generaciju najmanjih LK i naknadno smanjenje srednjeg prečnika.

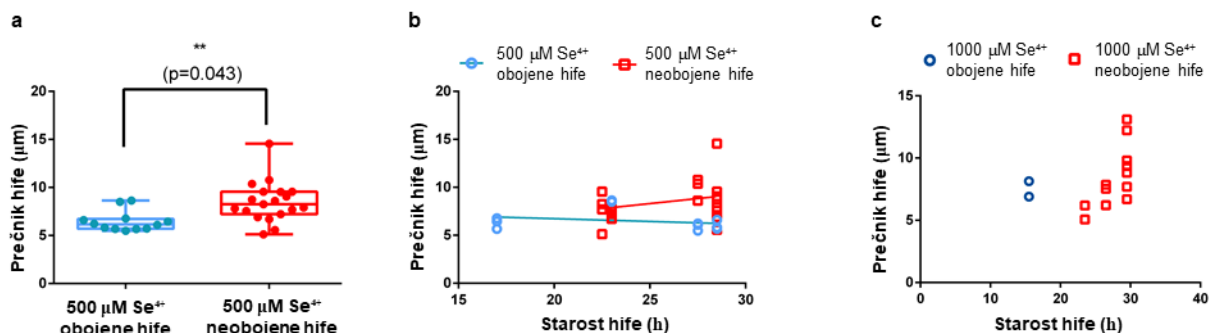


Slika 4.23. Veličina lipidnih kapi u kontrolnoj i grupi tretiranoj natrijum selenitom (1000 μM). a) Raspodela veličina LK za tretiranu i kontrolnu grupu najbliže starosti hifa. Vrh: 27 h tretman / 28 h kontrola. Dole: 30,5 h tretman / 31 h kontrola. b) Srednja vrednost prečnika $\pm$ SD lipidnih kapi u svim grupama. $N = 200\text{--}400$ LK za svaku grupu. c) Dobijeni parametri Gausovog fita za distribuciju veličine LK.

4.2.3.2 Uticaj natrijum selenita na morfologiju i zastupljenost mitohondrija u hifama *P. blakesleeanus* korišćenjem vitalnih boja i TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije

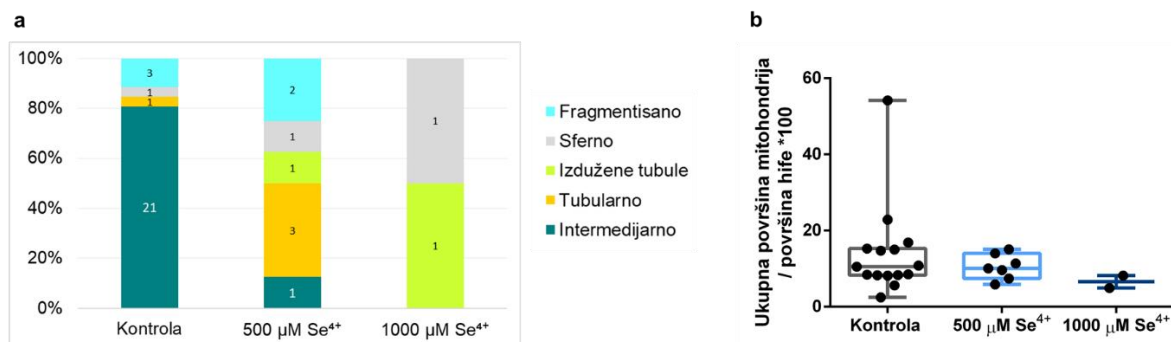
U poglavlju 4.2.2 je pokazano da su se starije hife većih prečnika slabije bojile bojom Rh123. Sličan fenomen je uočen i u grupama koje su tretirane Se^{4+} . U grupi hifa tretiranih 500 μM Se^{4+} su se takodje razlikovali prečnici obojenih i neobojenih hifa i ova razlika je bila statistički značajna ($p = 0,043$) (slika 4.24a,b). Kada je u pitanju tretman Se^{4+} koncentracije 1000 μM , nema statistički

značajne razlike u dužini prečnika obojenih i neobojenih hifa, ali se sa grafika 4.24c vidi da se starije i deblje hife većinski nisu bojile, odnosno, samo su najmlađe hife, starosti 17 h bile obojene. Mali broj obojenih hifa i posledično mali uzorak za analizu, su uzrok što za ove eksperimentalne grupe nije dobijena statistička značajnost. Kako su sve kulture hifa bojene na isti način i sve bile izložene jednakoj koncentraciji boje u jednakom trajanju, primećen fenomen ukazuje da kulture nisu uniformne, kao i da je sa povećanjem koncentracije Se^{4+} kojoj su kulture hifa izložene, broj obojenih hifa indikatorom Rh123 manji.



Slika 4.24. Zavisnost bojenja mitohondrija bojom Rh123 od koncentracije selenita. a) Poredjenje prečnika hifa koje su se obojile i koje se nisu obojile bojom Rh123 u grupi tretiranoj 500 μM Se^{4+} . b) Isti podaci pod (a) prikazani u zavisnosti od starosti gljiva u trenutku oslikavanja. c) Poredjenje prečnika obojenih i ne obojenih hifa bojom Rh123 u grupi tretiranoj 1000 μM Se^{4+} .

S obzirom na to da je u eksperimentima sa LK pokazano da jedino koncentracija Se^{4+} od 1000 μM izaziva statistički značajnu promenu, želeli smo da ispitamo efekat ove koncentracije i na dinamiku mitohondrija. Kako se mali broj hifa tretiranih ovom koncentracijom Se^{4+} bojio indikatorom Rh123, analizirana je i sledeća niža koncentracija Se^{4+} od 500 μM . Na slici 4.25a prikazana je zastupljenost morfoloških tipova mitohondrija hifa koje su bile izložene delovanju Se^{4+} koncentracija 500 i 1000 μM . Kod hifa tretiranih 500 μM Se^{4+} prisutni su svi morfološki tipovi mitohondrija kao i u kontroli, ali se uočava trend povećanja zastupljenosti tubularnog tipa. Kod hifa koje su bile izložene koncentraciji selenita od 1000 μM uočena su samo dva morfološka tipa, izdužene tubule i sferne mitohondrije. Kada se pogleda udeo površine hifa koje zauzimaju mitohondrije (slika 4.25b), primećuje se trend smanjenja gustine mitohondrija sa porastom koncentracije Se^{4+} u odnosu na kontrolu.



Slika 4.25. Procentualna zastupljenost morfoloških tipova i udeo mitohondrija u kontrolnoj i grupi tretiranoj selenitom. a) Procentualna zastupljenost morfoloških tipova mitohondrija izloženih delovanju selenita. Zastupljeni morfološki tipovi mitohondrija (intermedijarni, tubularne, izdužene tubule, fragmentisane i sferne) su prikazani

različitim bojama, a vrednosti na stubićima predstavljaju broj analiziranih hifa. b) Udeo površine hife koji zauzimaju mitohondrije tretirane selenitom u odnosu na kontrolu. (kontrola ($N = 15$ hifa), $500 \mu\text{M Se}^{4+}$ ($N = 7$ hifa) i $1000 \mu\text{M Se}^{4+}$ ($N = 2$ hife)). Vrednosti dobijene na hifama starosti 17 – 29 h su grupisane u oba grafika.

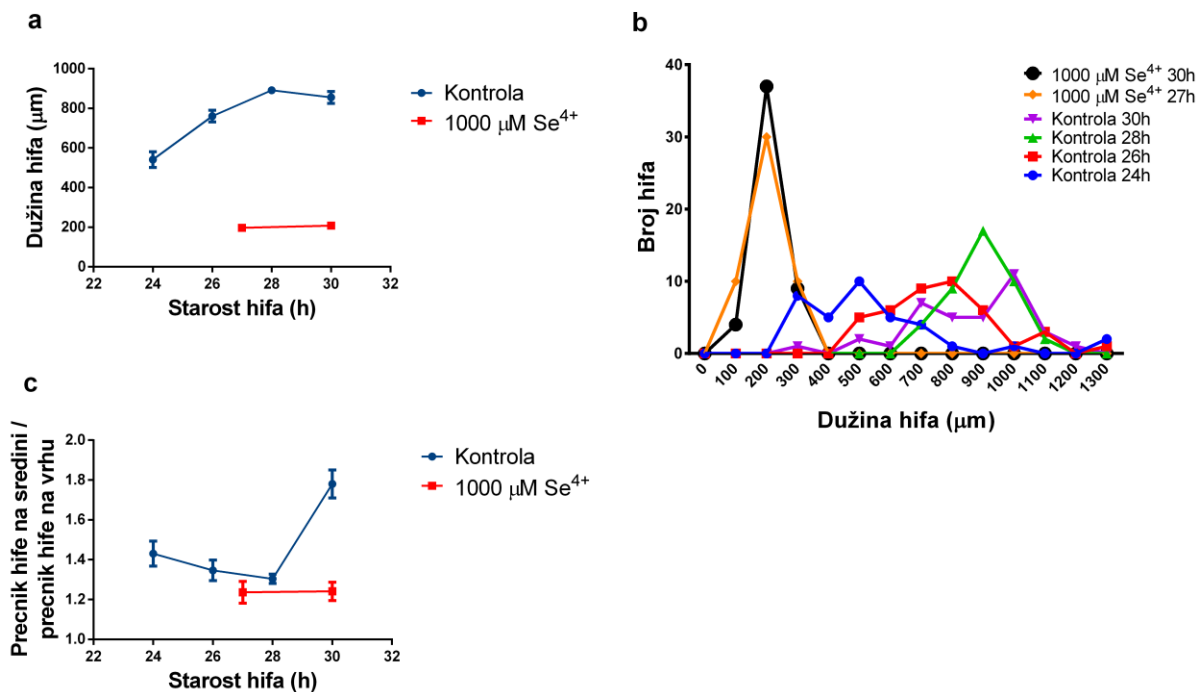
4.2.3.3 Uticaj natrijum selenita na morfometrijske parametre hifa

Tokom ispitivanja uticaja različitih koncentracija natrijum selenita na LK i mitohondrije, primećeno je da hife tretirane $1000 \mu\text{M}$ selenitom (Se^{4+}) imaju vidno drugačiju morfologiju (slika 4.26), te je analizirano nekoliko morfoloških parametara. Ispitane su dužine i prečnici hifa na sredini i vrhu.



Slika 4.26. BF slike kontrolnih i hifa *P. blakesleeanus* tretiranih selenitom. Levo: Kontrolne, 28h stare. **Desno:** Hife tretirane $1000 \mu\text{M}$ natrijum selenitom, 27h stare. Obe slike su snimljene imerzionim Zeiss objektivom 40x, NA=1,3. Skala: $50 \mu\text{m}$.

Najupečatljiviji efekat tretmana natrijum selenitom je bila inhibicija rasta hifa, sa više od četiri puta kraćim hifama u grupi tretiranoj Se^{4+} ($200 \pm 50 \mu\text{m}$, $N = 50$) nego u kontrolnoj ($900 \pm 100 \mu\text{m}$, $N = 40$ hifa) posle 30 h od početka rasta, što odgovara kraju eksponencijalnog rasta u kontrolnim uslovima (slika 4.27a). Kada se uporede kontrolne grupe, primećuje se da se dužina hifa povećava što su gljive starije pri čemu najveću dužinu uočavamo kod hifa starih 28 h. Razlike između dužina hifa su bile statistički značajne izuzev kada se porede kontrolne hife starosti 28 h i 30 h kao i kada se međusobno porede grupe tretirane selenitom. Pošto se dužina hife nije značajno povećala između 27 h i 30 h u grupi koja je tretirana Se^{4+} , čini se da je efekat posredovan selenitom inhibicija, a ne jednostavno kašnjenje u rastu praćeno nepromenjenom brzinom rasta u kasnijim vremenima. Neometano citoplazmatsko strujanje potvrdilo je da su hife bile žive u svim izmerenim vremenskim tačkama. Iz raspodele dužina (slika 4.27b) može se videti da je u kontrolnoj grupi „rasprostranjenost“ distribucije dužina veoma široka. Nasuprot tome, hife tretirane selenitom su manje raznovrsne i izgleda da su sinhronizovane u rastu.



Slika 4.27. Poređenje morfometrijskih parametara hifa iz kontrole i kulture tretirane Se^{4+} . a) Efekat Se^{4+} na dužinu hifa. Srednje vrednosti dužine hifa u kontroli i grupi tretiranoj 1000 μM natrijum selenitom u zavisnosti od vremena rasta. b) Histogram raspodela dužina hifa u kontroli i grupi tretiranoj 1000 μM selenitom. c) Odnos prečnika hife u sredini i prečnika hife na vrhu, izračunat za svaku merenu hifu pojedinačno i ucrtan u odnosu na vreme rasta.

Upoređivanjem prečnika specifičnih regiona hifa, utvrđene su značajne promene u odnosu širine sredine prema širini vrha hife, nakon tretmana selenitom, u tridesetom satu ($p < 0,0001$) (slika 4.27c). Tokom rasta u kontrolnim uslovima, ovaj odnos postepeno opada u periodu intenzivnog izduživanja (do 28 h), dok je u tački 30 h evidentno naglo povećanje odnosa.

5 DISKUSIJA

Metode nelinearne laserske mikroskopije su retko primenjivane na proučavanje končastih gljiva. NLSM je uglavnom korišćena u cilju identifikacije medicinski značajnih končastih gljiva putem detekcije autofluorescence ćelijskih zidova (Sung Jan Lin et al. 2009) ili za praćenje rasta i razvoja gljiva detekcijom autofluorescence endogenih fluorofora (H. Knaus 2014) korišćenjem TPEF. U ovoj doktorskoj disertaciji je primenom ultrabrzog IR fs lasera razvijena metoda oslikavanja i laserske nanohirurgije ćelijskog zida končaste gljive *P. blakesleeanus*, čime se navedena tehnika prvi put uvodi u našoj zemlji, ali ovo je i prvi put u svetu da su fs laseri nelinearnog mikroskopa iskorišćeni za hirurgiju končastih gljiva. Sinergijom dve napredne biofizičke metode, NLSM i MNVnDM, razvijen je nov eksperimentalni pristup koji je omogućio uspešnu lasersku nanohirurgiju i registrovanje jonskih struja sa native ćelijske membrane protoplasta hifa končaste gljive *P. blakesleeanus*. Uvođenje ove metode je otvorilo put za istraživanje fiziologije jonskih kanala direktno na ćelijskoj membrani končastih gljiva koja je inače nedostupna zbog prisustva čvrstog ćelijskog zida. Pored laserske nanohirurgije hifa, dva modaliteta nelinearne optičke mikroskopije, TPEF i THG, su primenjeni za utvrđivanje strukturnih i funkcionalnih promena ćelijskog (lipidnog i energetskog) metabolizma *P. blakesleeanus*, na nivou jedne ćelije. THG modalitet je prvi put upotrebljen za oslikavanje metabolizma LK bez obeleživača kod končastih gljiva koje predominantno imaju sitne LK. Takođe je primenjena ICS metoda kvantifikacije slika koja dosad nije primenjena na THG slikama uopšte, a koja je pokazala veću osetljivost, tj. bolju preciznost u ekstrakciji signala LK i definisanja njihove veličine. THG i TPEF su pružile osnovna saznanja o dinamici LK i mitohondrija u pojedinačnim hifama žive gljive *P. blakesleeanus*, tokom gladovanja usled nedostatka azota i pod dejstvom visokih koncentracija natrijum selenita i povišene temperature. S obzirom na to da su navedene metode prvi put primenjene na model sistemu končaste gljive, bilo je neophodno svaku od njih optimizovati i ustanoviti jedinstvene protokole.

5.1 Fs laserska nanohirurgija ćelijskog zida končaste gljive *P. blakesleeanus*

U ovom radu je opisana visoko ponovljiva laserska tehnika za nanohirurgiju ćelijskih zidova gljiva kako bi se dobili vijabilni protoplasti čija je ćelijska membrana dostupna i pogodna za MNVnDM. Slični pristupi, ali uz korišćenje UV laserskih impulsa su poznati u literaturi (Roberts et al. 1997; Véry and Davies 1998), ali posle početnih pozitivnih rezultata nisu dalje razvijani niti upotrebljavani. U poređenju sa ns laserima, fs laseri mogu ciljati određene regione sa visokom preciznošću bez oštećenja struktura van fokusa, što rezultira boljim hirurškim ishodima. Oni mogu proizvesti čiste i precizne rezove sa minimalnim termičkim ili mehaničkim oštećenjima, što se može i videti na prikazanim SEM slikama. Visoka preciznost fs laserske ablacije omogućila nam je da isečemo mali deo ćelijskog zida bez oštećenja ćelijske membrane protoplasta, koja je udaljena samo nekoliko mikrometara ili čak i manje. Još jedna prednost fs IR lasera u odnosu na ns UV lasere je talasna dužina koja se koristi. IR laseri imaju veću talasnu dužinu u poređenju sa UV laserima, što im omogućava da prodru dublje u tkiva zbog nelinearne dvofotonske apsorpcije koja se javlja samo u fokalnoj zapremini (A. Vogel et al. 2005). Kraće talasne dužine koje emituju UV laseri imaju veću energiju fotona, što povećava verovatnoću oštećenja ćelijske DNK (Markolf H.

Niemz 2004) i indukcije oksidativnog stresa i smrti ćelije (Tirlapur and König 2002). Još jedna prednost ove metode je upotreba istog fs IR lasera za dvofotonsko oslikavanje živih hifa kako bi se označila željena površina ćelijskog zida za hirurgiju. U poređenju sa prethodnim studijama gde su slike svetlog polja korišćene za obeležavanje i sečenje ćelijskog zida, ovde koristimo dvofotonsku fluorescenciju ćelijskog zida sa TPEF slika. Mogućnost odabira regiona na TPEF slikama za sečenje u velikoj meri je doprinela tačnosti i preciznosti celokupne metode ćelijske hirurgije (A. Vogel et al. 2005). Tokom primene ove metode, nisu primećeni štetni procesi vaporizacije, kavitacije i karbonizacije, ni na TPEF ni na BF slikama koje su snimljene nakon hirurške procedure. Ukoliko se neki od tih procesa i desio tokom hirurškog zahvata, morao bi biti izuzetno kratkog trajanja s obzirom na činjenicu da nije dolazilo do oštećenja membrane protoplasta koji su satima nakon hirurgije bili vijabilni. Naš sistem nam ne omogućava (monitoring tokom hirurgije) da snimamo šta se dešava tokom hirurgije, već neposredno nakon nje. Nije bilo mogućnosti da se uzorak snimi bilo kojim modalitetom tokom hirurškog zahvata. Takođe, na SEM slikama ne vidimo fragmente uklonjenog ćelijskog zida. Proces koji se mogu desiti tokom hirurgije i moguće transformacije odsečenih materijala su detaljno opisani u Vogel i Venugopalan 2003 (Alfred Vogel and Venugopalan 2003). Metoda nanohirurgije koja je ovde predstavljena može dovesti do uspešnih registracija struja metodom MNVnDM samo ako se uslovi za svaki korak održavaju u optimalnom opsegu, budući da mnogi faktori utiču na biološki aspekt postupka.

Prosečna snaga lasera koja je korišćena za rezove na različitim odeljcima duž hifa nije varirala. Najverovatnije iz razloga što je debljina zida duž mladih hifa koje su korišćene za hirurgiju, bila ujednačena, oko 30 nm ili nešto veća. Za delove hifa koje su udaljene 150 μ m i više od vrha, posebno kod hifa u stacionarnoj fazi rasta, bi verovatno trebalo dodatno podesiti snagu sečenja s obzirom da debljina ćelijskog zida na većim udaljenostima kod starijih hifa može biti i 10x veća (Riley 1977).

Gljive poseduju poseban signalni put koji se naziva odgovor na narušavanje integriteta ćelijskog zida (eng. cell wall integrity response). Ovaj signalni put se aktivira stresom ili oštećenjem ćelijskog zida, uključuje kinaze specifične za gljive (Yoshimi et al. 2022), i predstavlja osnovni mehanizam preživljavanja. Ovaj put je uključen u odgovor na osmotski stres (Köhler et al. 2017), morfogenezu i patogenost gljiva. Respiratorni inhibitor natrijum azid je korišćen u kompletnom toku protokola jer je, od najčešće korišćenih inhibitora respiratornog lanca, jedini sposoban za skoro potpunu inhibiciju klasičnog disanja tokom dužeg perioda (za razliku od cijanida) (Stanić et al. 2014) bez značajne indukcije alternativnog disanja (za razliku od antimicina) (Stanić et al. 2014) koji rezultira u dugoročnom smanjenju ukupnog disanja na 20% uz održavanje vijabilnosti. U uslovima tako izražene metaboličke supresije, bilo je razumno pretpostaviti da će svi unutarćelijski signalni putevi koji zavise od aktivnosti kinaze i stoga zahtevaju ATP, uključujući odgovor na narušavanje integriteta ćelijskog zida, biti suprimirani.

Prevenција formiranja novog zida bila je jedan od ključnih elemenata uspešnosti procedure, jer su u odsustvu azida protoplasti ostajali u hifama. U retkim slučajevima, kada je došlo do oslobađanja protoplasta u odsustvu azida, snažnim hipoosmotskim bubrenjem neposredno nakon napravljenog reza na zidu, ni u jednom slučaju nije došlo do obrazovanja gigaomskog kontakta između pipete i membrane protoplasta. Visoka koncentracija kalcijuma koja je korišćena tokom procedure može objasniti potpuno odsustvo struja nošenih kalijumom u našem sistemu. Izlazno ispravljeni K^+ kanali specifični za gljive (TOK, od eng. „two-pore outwardly rectifying potassium channel“) su pronađeni u genomu končastih gljiva i heterologna ekspresija pokazuje da oni sadrže funkcionalne

K⁺ kanale koji mogu biti prisutni u ćelijskoj membrani končastih gljiva (Ketchum et al. 1995; Roberts 2003). TOK kanali se blokiraju Ca²⁺ na vanćelijskoj strani membrane (Roberts 2003). Skoro apsolutna dominacija anjonskih struja (96% svih zabeleženih struja) bi stoga mogla biti rezultat eksperimentalnih uslova. Dalje, moguće je da hiperosmotski uslovi tokom procedure mogu uticati na aktivaciju ili svojstva registrovanih jonskih struja. Treba napomenuti da je osmolarnost vanćelijskih rastvora tokom formiranja gigaomskog kontakta i elektrofizioloških snimanja bila približno izosmotska (u odnosu na citoplazmu) za protoplaste – protoplasti su bili optimalno „naduvani“, jer u suprotnom membrana ne bi bila pogodna za ostvarivanje prisnog kontakta sa pipetom za registraciju. Kako su končaste gljive organizmi prilagođeni širokom spektru različitih uslova životne sredine, kao što je osmolarnost okolnog okruženja, postoji mogućnost da je izmenjena fiziologija uzrokovana promenom osmolarnosti biološki relevantno fiziološko stanje (Duran, Cary, and Calvo 2010).

Neposredno nakon hirurgije, često je primećeno oslobađanje protoplasta, i verovatnoća oslobađanja protoplasta je bila veća kada je rez na zidu napravljen u neposrednoj blizini hifalnog protoplasta. Oslobađanje protoplasta izazvano turgorovim pritiskom se ne može isključiti kao deo objašnjenja ovog fenomena, pošto je u intaktnim hifama pritisak u odnosu na ćelijski zid za 500 kPa veći, dajući turgor ćeliji (Lew 2011; Lew et al. 2006). Međutim, u hiperosmotskim uslovima, pritisak turgora je niži (Lew 2011), i dodatni ćelijski proces, verovatno posredovan citoskeletom, može biti uključen u oslobađanje protoplasta. Ovome u prilog govori i podatak da je povećana koncentracija kalcijuma pojačala oslobađanje protoplasta iz reza, kao što je pokazano na Slici 4.6d. Mogući razlog uspešnijeg formiranja gigaomskih kontakata u protoplastima oslobođenim iz bočnih grana je taj što je poželjno raditi na mladoj ćelijskoj membrani, kao što je često slučaj sa enzimski dobijenim biljnim protoplastima (Elzenga, Keller, and Van Volkenburgh 1991). Treba naglasiti da neposredna blizina protoplasta laserskim rezovima tokom nanohirurgije nije imala štetan uticaj na njihove ćelijske membrane, što se ogleda u njihovoj sposobnosti da ostvare kontakt visokog otpora sa elektrofiziološkom pipetom, pokazujući ponovo da protokol predstavljen u ovom radu može proizvesti, sa različitih lokacija, dosledno zdrave oslobođene protoplaste pogodne za MNVnDM. Struje snimljene sa protoplasta dobijenih nanohirurgijom bile su pretežno anjonske (Stevanović 2023; Pajić et al. 2024). Nalaz da su brojne anjonske provodljivosti prisutne na ćelijskoj membrani končastih gljiva u skladu je sa podacima dobijenim na nekoliko dostupnih kloniranih jonskih kanala končastih gljiva (Oddon, Diatloff, and Roberts 2007; Roberts, Milnes, and Caddick 2011) koji pokazuju prisustvo kanala sličnih CLC i bestrofinu. Otprilike jedna trećina (35%) registrovanih struja pripadala je grupi posredovanoj neselektivnim anjonskim kanalima koji transportuju i hloridne jone i organske kiseline, dok je 44% struja posredovano kanalima koji su visoko selektivni za hloride (Stevanović 2023; Pajić et al. 2024). Neke od zabeleženih struja (17%) bile su posredovane kanalima koji su visoko propusni za glutamat (Stevanović 2023; Pajić et al. 2024). Dodatni, još neidentifikovani jonski kanali mogu biti prisutni na ovim membranama. Perspektiva za dalju primenu predstavljene metode je da omogućiti otkrivanje i identifikaciju jonskih struja u nativnoj membrani protoplasta koje su do danas ostale neotkrivene zbog niske homologije osnovnih kanala sa životinjskim ili biljnim pandanima. Takav napredak bi unapredio razumevanje fiziologije končastih gljiva.

P. blakesleeanus, model sistem končastih gljiva korišćen u ovom radu, pripada redu Mucorales (filum Mucoromycota), čiji članovi formiraju mikorizne simbiotske odnose sa biljkama (Mansfield et al. 2023), dok su ostali članovi ozbiljni patogeni čoveka (Lax et al. 2020), čija je incidencija u porastu (G. Walther, Wagner, and Kurzai 2020; Pasrija and Naime 2022). Nedavno

objavljena preporuka SZO (World Health Organization 2022) identifikuje Mucorales kao grupu visokog prioriteta za praćenje, istraživanje i razvoj novih lekova. Stoga, otkrivanje i karakterizacija membranskih struja *P. blakesleeanus* uključenih u fiziološke odgovore hifa može potencijalno dovesti do identifikacije preko potrebnih novih meta za lekove za borbu protiv humanih patogena (M. C. Fisher et al. 2022), kao i do bolje zaštite ili eksploatacije mikorizne simbioze sa biljkama u ekosistemima i poljoprivredi (Mohan et al. 2014). Naknadne modifikacije opisane metode mogu biti potrebne u budućnosti kako bi se njena primena proširila na druge filume končastih gljiva. Potencijalne primene ovog tehničkog napretka obuhvataju čitav niz primena u biologiji gljiva.

5.2 THG oslikavanje lipidnih kapi u živim hifama *P. blakesleeanus*

THG oslikavanje lipidnih kapi, kao što je ovde opisano, je metoda koja se može direktno primeniti na žive mikorizne gljive srodne *Phycomyces*-u, bez potrebe za obeležavanjem.

Uslovi kultivisanja gljiva korišćeni u našoj studiji rezultirali su malom akumulacijom lipidnih kapi, kao što se i očekuje u uslovima produženog gladovanja u potpunom odsustvu azota, što je pokazano davno starim metodama (Nand and Mohrotra 1971). Analiza THG oslikavanja nam je omogućila da posmatramo i kvantifikujemo promene u broju LK (Tabela 4 i Slika 4.14), izazvane potpunim uklanjanjem azota, iako su gljive bile veoma malih dimenzija. Kao što je i pokazano ranije drugim metodama (Athenaki et al. 2018), potpuno izostavljanje azota izazvalo je samo prolazno povećanje broja LK, praćeno prometom lipida. Analiza THG oslikavanja je otkrila značajan pad rezerve lipida u kasnijim fazama rasta. Izgladnjivane hife su nakon 6 h gladovanja imale veći broj LK ali značajno manjih dimenzija, kao što se može videti na Slici 4.14. Ovaj rezultat se može objasniti time da gladovanje u odsustvu azota kod *P. blakesleeanus* dovodi do podele većih LK na manje i da na taj način povećava broj LK u tretiranim hifama, ili alternativno, da je proces stvaranja malih LK, koje prelaze limit naše rezolucije i postaju vidljive, ubrzan, kao i proces smanjivanja najvećih LK usled njihove razgradnje. Sumarno, navedeni nalazi ukazuju na značaj pristupa snimanja THG za šire istraživanje LK u končastim gljivama u različitim životnim uslovima.

Fluorescentne optičke tehnike oslikavanja se obično koriste za proučavanje lipidnih kapi *in vivo*, ali lipidi obično moraju biti obeleženi različitim bojama (Tatenaka et al. 2019). S druge strane, produženo snimanje pomoću fluorescentnih boja može biti fototoksično za ćelije i može poremetiti metaboličke procese, uključujući metabolizam lipida. Stoga su metode oslikavanja bez obeležavanja poželjnije za proučavanje živih ćelija (Fujita and Smith 2008; Helene Knaus, Blab, Jerre van Veluw, et al. 2013; Borile et al. 2021). Iako THG mikroskopija nije hemijski specifična, jaki THG signali se generišu samo na granicama dve sredine različitih optičkih gustina, odnosno indeksa prelamanja. Takvi regioni u biološkim uzorcima su prelaz lipid-voda, a daleko najsajnije strukture u živim ćelijama su LK (Débarre et al. 2006). Iz tog razloga, THG mikroskopija je posebno prikladna metoda za snimanje LK iz živih nefiksiranih ćelija, bez potrebe za dodatnim obeležavanjem.

THG oslikavanje, metoda bez obeležavanja koju smo primenili na žive hife masne gljive *P. blakesleeanus*, dala je slike (Slike 4.10 a i b) sa karakterističnim tačkama visokog intenziteta THG signala koji se pripisuju lipidnim kapima kao proizvodima normalne i stresne ćelijske fiziologije. Nekoliko linija dokaza ovo potkrepljuje. Prvo, nagla promena indeksa prelamanja između lipida

na granici lipidnih kapi i ostatka citoplazme generiše THG signal visokog intenziteta prema literaturi (Débarre et al. 2006). Drugo, da bi se isključila moguća tačkasta mesta oštećena laserom koje bi proizvele visok THG signal, izvršili smo TPEF snimanje neobojenih hifa pokazujući da su autoTPEF slike (Slika 4.11 a) lišene bilo kakvih istaknutih tačaka, prisutnih na THG slici iste hife. Treće, izveli smo eksperimente kolokalizacije gde su hife bile obojene bojom specifičnom za lipide i snimljene obema metodama, TPEF i THG. Tačke na obe slike (Slika 4.11 b) su se većinski preklapale, što potvrđuje da su sadržavale lipide. Pored toga, prateći istu logiku strmih promena indeksa prelamanja, pokazali smo da se ćelijski zid i ćelijska membrana u neobojenim hifama mogu snimiti i razlikovati THG metodom (Slika 4.10 c).

Postoji niz ograničenja u vezi sa snimanjem lipidnih boja. Zbog istovremene detekcije oba (TPEF i THG) signala u kolokalizacionim eksperimentima, ograničen je broj boja za oslikavanje živih ćelija koji bi mogao da se koristi. U ovoj studiji, fiksacija nije bila izbor, jer menja strukturu LK (Martins, Martins, and Santos 2018). Boja korišćena u ovom istraživanju, *Nile Red*, iako se standardno koristi kao specifična za LK, u određenim slučajevima može da se veže i za druge organele i strukture u ćeliji (“Nile Red,” n.d.). Signal koji potiče od drugih struktura izuzev LK može „iscuriti“ u opseg detekcije što bi na kraju moglo uticati na stepen kolokalizacije. Spektar fluorescencije NR varira u zavisnosti od hemijske polarnosti okruženja (Teo et al. 2021). THG oslikavanje zahteva znatno veće snage lasera u poređenju sa TPEF. Zbog toga je neophodno napraviti kompromis u pogledu primenjene snage lasera kada se istovremeno detektuju oba signala. „Cena koja se plaća“ za ovaj kompromis je gubitak nekih struktura (npr. malih LK, inače vidljivih pri većim snagama lasera) na THG slikama i pojava slabog, zamućenog TPEF signala od LK van fokusa, što inače nije vidljivo pri upotrebi nižih snaga lasera.

Da bi se dobili kvantitativni podaci iz THG slika, primenjene su dve metode za analizu slika, analiza veličine čestica (PSA) i korelaciona analiza slike (ICS). Obe metode mogu kvantifikovati broj lipidnih kapi i njihovu prosečnu veličinu, odnosno prečnik. Budući da je metoda ICS prvenstveno razvijena za fluorescentne slike i analizu klastera (Nohe and Petersen 2007), i koliko nam je poznato do sada nije korišćena za analizu THG slika, testirali smo je upoređujući rezultate sa PSA metodom, što je pokazano u Tabeli 4 i na Slici 4.13 d,e. Test je izveden na slikama hifa u normalnim i stresnim okolnostima (gladovanje uzrokovano nedostatkom azota). Poznato je da azotno gladovanje izaziva povećan broj lipidnih kapi (Weng et al. 2014; Aguilar et al. 2017) što je potvrđeno obema metodama i poklapanje rezultata dobijenih obema metodama je bilo zadovoljavajuće.

Sve u svemu, pokazalo se da su predložena metoda oslikavanja (THG) i metoda analize slika (ICS) pogodna za *in vivo* studije lipidnih kapi bez obeležavanja kod masnih gljiva. Primena THG metode u budućim studijama dinamike LK u gljivama mogla bi pomoći da se unapredi osnovno razumevanje ćelijske fiziologije gljiva, a zatim i procesa uključenih u kruženje ugljenika u prirodi.

5.3 Efekti selenita i povišene temperature na LK u živim hifama *P. blakesleeanus*

Da bi se pouzdano pratile LK *in vivo* putem oslikavanja, kao i da bi se izmerili efekti ćelijskih promena izazvanih oksidativnim stresom od strane Se^{4+} , neophodno je primeniti metodu snimanja

koja uzrokuje minimalnu dodatnu fototoksičnost. U suprotnom, oksidativni stres izazvan, na primer, konfokalnim snimanjem obeleženih LK, mogao bi potencijalno da ometa procese koji su u osnovi merenja. Iz tih razloga, THG je metod izbora za oslikavanje LK i kvantifikaciju uticaja selenita na broj i veličinu LK.

Naši rezultati prikazani na Slici 4.27 su pokazali da Se^{4+} utiče na inhibiciju rasta končaste gljive *P. blakesleeanus* i dovodi do povećane akumulacije LK, kao što je pokazano na Slici 4.22, ali samo u slučaju najveće korišćene koncentracije od 1000 μM . Tretman 1000 μM Se^{4+} je doveo do statistički značajnog povećanja broja LK u odnosu na kontrolu (približno 2x), dok su manje koncentracije pokazale samo trend povećanja kod starijih hifa, odnosno trend smanjenja kod mlađih. Ukupna površina LK u hifama se nije značajno menjala, kao ni prosečna veličina, ali se sa grafika distribucije prikazanog na Slici 4.23 vidi da su LK tretirane selinitom (1000 μM) uglavnom manjih dimenzija od kontrolnih. Može se pretpostaviti da koncentracija 1000 μM deluje na LK tako što dovodi do proizvodnje manjih LK ili deljenja već postojećih LK na manje. Tretman 1000 μM Se^{4+} je uticao i na morfologiju hifa, inhibirajući njihov rast više od 4x (Slika 4.27a). Dodatno, hife tretirane Se^{4+} su izgledale ujednačeno i sinhronizovano u rastu, u odnosu na kontrolu grupu koja je imala različitu morfologiju i veću distribuciju dužina hifa. Slični rezultati su prijavljeni i kod kvasaca, *S. cerevisiae* i *C. utilis*, gde je Se^{4+} u visokoj koncentraciji inhibirao rast ćelija i doveo do povećanja nezasićenih masnih kiselina (Kieliszek et al. 2019).

Prema literaturi, u micelijumu masne gljive *P. blakesleeanus* dolazi do značajnog povećanja (2x) količine lipida kada je ova gljiva izložena temperaturi od 25°C (Cerdá-Olmeda and Avalos 1994). Naši rezultati gajenja na istoj temperaturi od 25°C su pokazali povećanje količine lipida od 1,6 puta u odnosu na kontrolu. Treba uzeti u obzir da najmanje LK, koje su manje od rezolucije mikroskopskog sistema, nisu mogle biti detektovane, što je mogući uzrok odstupanja od literaturne vrednosti. Dakle, povećanje ambijentalne temperature je stimulus za povećanje površine koju zauzimaju LK, što je u skladu sa literaturom (Y. Huang et al. 2021).

5.4 Efekti selenita, gladovanja i povišene temperature na mitohondrije u živim hifama *P. blakesleeanus*

Zapaženo je, tokom izrade ove disertacije, kao što je i pokazano na Slikama 4.17 i 4.24, da se manji broj starijih hifa, kao i hifa tretiranih većim koncentracijama Se^{4+} boji bojom Rh123. Rh123 je katjonska, potenciometrijska boja koja se sekvstrira u aktivnim mitohondrijama i čija fluorescenca direktno zavisi od elektrohemijaskog gradijenta preko mitohondrijalne membrane (Baracca et al. 2003). Smanjenje membranskog potencijala mitohondrija uzrokuje smanjenje signala Rh123. Smanjeno bojenje Rh123 kod starijih hifa moglo bi da ukazuje na disfunkciju mitohondrija povezanu sa starenjem, ili, alternativno na otežano ulaženje boje u starije hife zbog veće debljine ćelijskog zida. Mitohondrije u ćelijama koje stare karakterišu mutacije u mitohondrijalnoj DNK (mtDNK), povećana proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), smanjen respiratorni kapacitet i smanjen potencijal mitohondrijalne membrane (López-Otín et al. 2023; Miwa et al. 2022). Opadanje membranskog potencijala mitohondrija sa starenjem je pokazano i kod končaste gljive *Podospora anserina* koja ima ograničen životni vek micelijuma (Koll et al. 2001). Iako micelijum većine končastih gljiva ima veoma dug životni vek, u

laboratorijskim uslovima one svoj životni vek završavaju po iscrpljivanju hranljivih materija iz podloge, tako da je starenje jedan od najverovatnijih razlog manjeg broja obojenih mitohondrija u starijim hifama. Razlog smanjenog bojenja hifa tretiranih većim koncentracijama Se^{4+} , takođe je najjednostavnije objasniti smanjenim potencijalom membrane mitohondrija, koji dokazano izaziva Se^{4+} (Selvaraj et al. 2013).

Neophodno je reći da je za oslikavanje u eksperimentima prikazanim u ovoj disertaciji uvek birana sredina hifa, izuzev u slučaju manjih hifa kada je cela hifa u vidnom polju, ili njen veći deo, i da ni u jednom slučaju nije primećen povećan fluorescentni signal od Rh123 u nekom delu hife (ili je intenzitet bio uniformno raspoređen duž hife ili hifa nije obojena).

Funkcija mitohondrija, a samim tim i ćelijski metabolički status, su usko povezani sa dinamičkim promenama morfologije mitohondrija, uključujući mitohondrijalnu fuziju, fisiju i mitofagiju (W. Chen, Zhao, and Li 2023). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju (Slika 4.25) ukazuju da je Se^{4+} indukovao pojavu izduženih tubularnih mitohondrija i veću zastupljenost srednjih tubularnih mitohondrija u odnosu na kontrolu. Prema literaturi (Zemirli, Morel, and Molino 2018; Sprenger and Langer 2019), prilikom blagog stresa dolazi do izduživanja i povećane fuzije tubularnih mitohondrija, a pri delovanju jačeg i/ili produženog stresa do pojačane fragmentacije ovih organela (kada ćelija ulazi u apoptozu ili se priprema za mitofagiju). Fuzija deluje kao zaštitni mehanizam mitohondrija od metaboličkih i stresnih izazova, jer su izdužene mitohondrije pošteđene od autofagne degradacije i imaju povećanu efikasnost proizvodnje ATP-a (Valera-Alberni and Canto 2018). Dodatno, fuzija se prvenstveno dešava između mitohondrija sa većim membranskim potencijalom, jer se pretpostavlja da imaju bolji kvalitet koji može pomoći u održavanju aktivnosti mreže (Twig et al. 2008). Na osnovu ovoga, može se pretpostaviti da je Se^{4+} koncentracije 500 μM imao efekat blagog stresa na hife *P. blakesleeanus*, dok je za efekat 1000 μM Se^{4+} teško izvesti pouzdan zaključak zbog malog broja obojenih hifa. Kod hifa izloženih 1000 μM selenitu javljaju se samo dva morfološka tipa, izdužene mitohondrije i sferne (fragmentisane). Zanimljivo je uporediti ove podatke sa rezultatima studije na animalnim ćelijama koja je urađena korišćenjem sofisticiranog softvera za analizu slika baziranog na mašinskom učenju, iz oslikavanja fluorescentnom mikroskopijom ćelija koje su bile obeležene genetski kodiranim fluorescentnim mitohondrijalnim markerima (Zahedi et al. 2018). U ovoj studiji, kod A549 humanih ćelija karcinoma pluća, selen tetrahlorid u koncentraciji 1000 μM je izazvao značajno bubrenje mitohondrija. Za razliku od naših rezultata, na ovim animalnim ćelijama se posle samo 5 h tretmana, morfologija mitohondrija promenila od primarno mrežastog tipa, preko oblika malih prstenova, do tačkastog. Tačkaste mitohondrije su porasle i formirale nabubrele mitohondrije. Autori pretpostavljaju da je najverovatniji uzrok povećanje mitohondrijalnih ROS (Ahmad et al. 2013), što je u skladu sa inhibicijom respiratornog lanca i gubitkom membranskog potencijala mitohondrija nakon tretmana metalima ili selenom (Belyaeva et al. 2008). U istoj studiji je testirana i 10x manja koncentracija (100 μM) selen tetrahlorida, gde ni nakon 24 h nije bilo moguće razlikovati kontrole od tretiranih ćelija, jer su obe grupe imale mrežasti fenotip mitohondrija. Autori su takođe pokazali smanjenje pokretljivosti mitohondrija u ćelijama tretiranim selenom i značajno, dozno zavisno povećanje oksidacije mitohondrijalnih proteina. Ista nabubrela morfologija mitohondrija koju su opisali Zahedi i saradnici, kao rezultat prisustva selenita u medijumu, zabeležena je u ćelijama bubrega (Liang et al. 2015). Na osnovu činjenice da nabubrela morfologija mitohondrija nije bila primećena tokom naših merenja uticaja selenita (Slika 4.25), može se zaključiti da se, u odnosu na animalne ćelije, gljiva *P. blakesleeanus* odlikuje većom otpornošću na Se^{4+} . Ovaj zaključak je u saglasnosti sa nedavno pokazanom sposobnošću ove gljive

da transformiše toksični Se^{4+} , pri izlaganju i 10x većoj koncentraciji, u neškodljive selenske nanočestice (Žižić et al. 2022).

Naši rezultati eksperimenata oslikavanja mitohondrijalne morfologije u uslovima uskraćivanja azota (Slika 4.21), nisu pokazali prisustvo izduženih mitohondrija ni nakon 5h, ni nakon 7h gladovanja. Morfologija mitohondrija izgladnjivanih hifa se nije značajno razlikovala od kontrole izuzev što se pojavio novi morfološki tip sa malim polukružnim tubulama, navodeći na mogućnost da se radi o PKM. Prema literaturi (Jarc 2019), upravo se ovakvim bliskim kontaktom između mitohondrija i LK omogućava izbegavanje lipotoksičnosti i oštećenja mitohondrija. Zanimljivo je da se promene mitohondrijalne morfologije u istim uslovima bitno razlikuju od naših nalaza na končastoj gljivi. Pokazano je, uglavnom genetskim manipulacijama na animalnim ćelijama, da izduživanje mitohondrija tokom gladovanja štiti ćelije od smrti (Gomes, Benedetto, and Scorrano 2011). Naime, nakon gladovanja, povećanje nivoa cAMP aktivira proteinsku kinazu A, koja fosforiliše fisione proteine zadržavajući ih u citoplazmi, što dovodi do nesuprotstavljene mitohondrijalne fuzije. Kod različitih animalnih ćelija (fibroblasti, ćelije humanog raka debelog creva, embrionalne ćelije bubrega) dolazi do izduživanja mitohondrija i njihovog hiperfuzionisanja kao odgovor na nedostatak amino kiselina (Rambold et al. 2011). Kod mišjih fibroblasta do izduživanja mitohondrija je došlo nakon 6h gladovanja. Ova elongacija je reverzibilna, jer pri vraćanju amino kiselina ćelije opet zadobijaju intermedijarnu morfologiju sa prosečnim veličinama tubularnih mitohondrija. Takođe je pokazano da gladovanje uzrokovano nedostatkom amino kiselina povećava disanje i membranski potencijal mitohondrija (Johnson et al. 2014).

Povećanje temperature gajenja *P. blakesleeanus* za samo 3°C je favorizovalo pojavu tubularne morfologije mitohondrija (srednje i izdužene tubule) sa 51% zastupljenosti, dok je u kontroli isti morfološki tip bio zastupljen sa 7%. Takođe je jasno povećanje fragmentisane i sferne morfologije (22%) u odnosu na kontrolu (9%) koja je imala dominantno zastupljenu intermedijarnu morfologiju (84%) u svim uzrasnim grupama. Kako je širi optimalni temperaturni opseg za rast *P. blakesleeanus* 16°C - 25°C (Bergman et al. 1969), povećana zastupljenost tubularne morfologije (51%) implicira da je gajenje *P. blakesleeanus* na gornjoj granici njenog optimalnog temperaturnog opsega za rast, imalo efekat blagog stresa.

Kod tretmana Se^{4+} i prilikom gladovanja, zabeležen je trend u smanjenju ukupne površine mitohondrija u hifi, ali bez statističke značajnosti, dok je kod tretmana povišenom temperaturom zabeležen trend rasta površine mitohondrija u hifi, ali takođe bez statističke značajnosti. Ovo sugeriše da se ukupna površina mitohondrija ne menja značajno u različitim stresnim uslovima i ukazuje na fiziološku adaptaciju metabolizma hifa.

NLSM sistem i njegovi različiti modaliteti su omogućili oslikavanje LK i metaboličkih molekula NAD(P)H i FAD bez obeležavanja, kao i produženo snimanje obeleženih mitohondrija i LK vitalnim bojama u živim hifama *P. blakesleeanus*. Korišćenjem TPEF modaliteta uspešno su lokalizovani NAD(P)H i FAD, i određen njihov optički redoks odnos. Osetljivost sistema je testirana izazivanjem poremećaja u ćeliji rotenonom, što je rezultiralo jasno uočljivim smanjenjem redoks odnosa, što dokazuje da su hife bile pod stresom. Ovo je u saglasnosti sa drugim studijama gde je korišćen redoks odnos za istraživanje metaboličkog statusa kod gljiva (Helene Knaus, Blab, Agronskaia, et al. 2013). Bilo bi zanimljivo u budućim eksperimentima ispitati kako se redoks odnos u živim hifama *P. blakesleeanus* menja u svakom od testiranih

eksperimentalnih tretmana, i koliko se može korelisati sa zapaženim promenama mitohondrijalne morfologije, jer smanjenje redoks odnosa obično ukazuje na povećanu ćelijsku metaboličku aktivnost, odnosno na povećanu potrošnju energije, na primer, za sintezu makromolekula (u diferencijaciji ćelija ili u sintezi lipida).

6 ZAKLJUČCI

U ovoj tezi je razvijana i optimizovana metoda fs laserske nanohirurgije ćelijskog zida na modelu žive končaste gljive *Phycomyces blakesleeanus*.

- Osmišljen je protokol gajenja koji je dao hife imobilisane na kolagenu i adaptirane na niže osmolarnosti plazmolitikuma i posledično bržu plazmolizu. Mapiranje pokrovnih stakalaca je omogućilo pouzdanu identifikaciju njihovih pozicija.
- Optimizacijom hiper- i hipoosmotskih rastvora dobila se idealna kombinacija za brzu plazmolizu i suptilnu deplazmolizu sa razlikom od samo nekoliko desetina mOsm. Uvedena je dvostepena plazmoliza koja je premostila fiziološki šok od 450 mOsm razlike i povećana je koncentracija Ca^{2+} što je dodatno ubrzalo plazmolizu na manje od 1 min.
- Optimizovani parametri fs hirurģije su uvek doveli do uspešnog odsecanja ćelijskog zida bez oštećenja ćelijske membrane *P. blakesleeanus*. Parametri uspešne hirurģije su sledeći: prosečna snaga - 8 mW, obrazac sećenja – 2x20 tačaka, ista talasna dužina hirurģije i oslikavanja zida - 730 nm, fiziološki objektiv velike NA, vreme zadržavanja laserskog snopa u tački (dwell time) – 1 s.
- Različiti parametri su uticali na oslobađanje protoplasta nakon hirurģije. Šire hife su oslobađale više protoplasta. Hirurģski rezovi manjih dimenzija su oslobađali više protoplasta pri čemu je najveća verovatnoća bila za rezove dužine $5,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$. Blizna membrane hifalnog protoplasta mestu sećenja je takođe bila značajna. Protoplasti su imali veću verovatnoću izlaska ako je mesto sećenja bilo udaljeno od membrane $6 \mu\text{m}$ i manje. Povećanje koncentracije Ca^{2+} sa 1 ili 3 mM na 30mM je dvostruko povećalo verovatnoću oslobađanja protoplasta za istu veličinu reza.
- Različite lokacije hirurģije duž hifa su uticale na verovatnoću oslobađanja i broj izašlih protoplasta. Najveći broj protoplasta je oslobođen sa vrha hifa, dok se najmanje oslobodilo iz rezova na bočnim granama. Osmotski uslovi su takođe uticali na oslobađanje protoplasta. Svi protoplasti dobijeni iz osnove hife („vrat“) su se oslobađali tokom deplazmolize, za razliku od protoplasta iz vrha hifa koji su se podjednako dobro oslobađali i u hiperosmotskom i u rastvorima za deplazmolizu.
- SEM slike su pokazale da je rez napravljen fs laserskom nanohirurģijom glatkih ivica, bez pukotina i odbačenog materijala oko ivica, što potvrđuje dobru optimizaciju parametara hirurģije. Membrana izašlih protoplasta je takođe „čista“.
- Struje su registrovane na 28% oslobođenih protoplasta metodom MNVnDM u svim konfiguracijama, što potvrđuje uspešnost izvršene laserske nanohirurģije.

Razvijena je i optimizovana metoda nelinearne mikroskopije za strukturno i funkcionalno oslikavanje ćelijskog metabolizma končaste gljive *Phycomyces blakesleeanus*.

- Ispitane su mogućnosti za oslikavanje LK kod živih i neobojenih pojedinačnih hifa gljive *P. blakesleeanus* koristeći THG modalitet NLSM. Ustanovljeno je da se najbolji signal dobija usendvičavanjem uzorka i imerzionim objektivom. Na THG slikama se jasno vide okrugle svetle strukture i ćelijski zid. Preklapanjem slika THG i autofluorescentnog signala dobijenog dvofotonskom pobudom na 730 nm je pokazano da se svetle strukture ne poklapaju sa autofluorescentnim signalom. Merenje zavisnosti intenziteta THG signala od primenjene snage lasera je jasno pokazao treći stepen zavisnosti. Identitet LK je dodatno potvrđen kolokalizacionom analizom. THG signal od LK i TPEF signal odgovarajuće boje za LK su se većinski poklopili.
- Ustanovljen je protokol kvantifikacije LK pomoću metode ICS koja je prvi put primenjena na THG slikama. Poređenjem ICS sa standardnom metodom za prebrojavanje čestica, PSA, dobijene su slične vrednosti, što potvrđuje da je ICS podjednako pouzdan metod kvantifikacije.
- Osetljivost THG metode je ispitana oslikavanjem LK u hifama podvrgnutim tretmanu za koji je poznata vrsta i smer očekivanog efekta na LK, kao što je izgladnjivanje uskraćivanjem N. Modalitet THG je omogućio jasnu detekciju LK, određivanje njihove distribucije, broja i veličine *in vivo*, kao i karakterizaciju dinamike LK u hifama izloženim nedostatku azota.
- Natrijum selenit u koncentraciji 1000 μM je imao jasan efekat na dinamiku LK, značajno povećavajući njihov broj u tretiranim hifama i indukujući pojavu manjih LK nego u kontroli.
- Primenom TPEF modaliteta i korišćenjem vitalnih boja bilo je moguće pratiti *in vivo* promene u dinamici mitohondrija u hifama podvrgnutim azotnom izgladnjivanju i tretmanu natrijum selenitom. Oba tretmana su pokazala jasan uticaj na promenu morfologije mitohondrija. Se^{4+} je u koncentracijama 500 μM i 1000 μM indukovao pojavu pretežno tubularne morfologije (srednje i izdužene tubule), dok je gladovanje podstaklo pojavu novog morfološkog tipa – intermedijarni tip sa polukružnim tubulama.
- Povećanje temperature za 3°C, sa standardnih 22°C za gajenje na 25°C koja je na granici optimalne za *P. blakesleeanus*, je dovelo do povećanja površine koju zauzimaju LK u hifama i indukovalo pojavu pretežno tubularne morfologije mitohondrija (srednje i izdužene tubule).
- Modalitetom TPEF je bilo moguće dobiti informaciju o redoks stanju ćelija (promeni metaboličkog stanja) korišćenjem autofluorescencije endogenih fluorofora NAD(P)H i FAD u živim hifama gljive *P. blakesleeanus*. Metoda je testirana praćenjem promena odnosa pod dejstvom blokatora respiratornog lanca (rotenon) pri čemu je došlo do smanjena redoks odnosa kao što je i bilo očekivano.

7 LITERATURA

- Adamatzky, Andrew, and Antoni Gandia. 2022. "Living Mycelium Composites Discern Weights via Patterns of Electrical Activity." *Journal of Bioresources and Bioproducts* 7 (1): 26–32. <https://doi.org/10.1016/J.JOBAB.2021.09.003>.
- Adomshick, Victoria, Yong Pu, and Almudena Veiga-Lopez. 2020. "Automated Lipid Droplet Quantification System for Phenotypic Analysis of Adipocytes Using CellProfiler." *Toxicology Mechanisms and Methods* 30 (5): 378–87. <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1747124>.
- Afroz Toma, Maria, Md Hasibur Rahman, Md Saydar Rahman, Mohammad Arif, K. H.M.Nazmul Hussain Nazir, and Laurent Dufossé. 2023. "Fungal Pigments: Carotenoids, Riboflavin, and Polyketides with Diverse Applications." *Journal of Fungi* 2023, Vol. 9, Page 454 9 (4): 454. <https://doi.org/10.3390/JOF9040454>.
- Aghigh, Arash, Stéphane Bancelin, Maxime Rivard, Maxime Pinsard, Heide Ibrahim, and François Légaré. 2023. "Second Harmonic Generation Microscopy: A Powerful Tool for Bio-Imaging." *Biophysical Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s12551-022-01041-6>.
- Aguilar, Lucero Romero, Juan Pablo Pardo, Mónica Montero Lomelí, Oscar Ivan Luqueño Bocardo, Marco A. Juárez Oropeza, and Guadalupe Guerra Sánchez. 2017. "Lipid Droplets Accumulation and Other Biochemical Changes Induced in the Fungal Pathogen *Ustilago Maydis* under Nitrogen-Starvation." *Archives of Microbiology* 199 (8): 1195–1209. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1388-8>.
- Ahmad, T., K. Aggarwal, B. Pattnaik, S. Mukherjee, T. Sethi, B. K. Tiwari, M. Kumar, et al. 2013. "Computational Classification of Mitochondrial Shapes Reflects Stress and Redox State." *Cell Death & Disease* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2012.213>.
- Al Mamun, Md Abdulla, M. Abu Reza, and Md Sayeedul Islam. 2023. "Identification of Novel Proteins Regulating Lipid Droplet Biogenesis in Filamentous Fungi." *Molecular Microbiology* 120 (5): 702–22. <https://doi.org/10.1111/MMI.15170>.
- Amobonye, Ayodeji, Japareng Lalung, Mukesh Kumar Awasthi, and Santhosh Pillai. 2023. "Fungal Mycelium as Leather Alternative: A Sustainable Biogenic Material for the Fashion Industry." *Sustainable Materials and Technologies* 38 (December): e00724. <https://doi.org/10.1016/J.SUSMAT.2023.E00724>.
- Aptel, Florent, Nicolas Olivier, Ariane Deniset-Besseau, Jean Marc Legeais, Karsten Plamann, Marie Claire Schanne-Klein, and Emmanuel Beaurepaire. 2010. "Multimodal Nonlinear Imaging of the Human Cornea." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51 (5): 2459–65. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4586>.
- Athenaki, M., C. Gardeli, P. Diamantopoulou, S. S. Tchakouteu, D. Sarris, A. Philippoussis, and S. Papanikolaou. 2018. "Lipids from Yeasts and Fungi: Physiology, Production and Analytical Considerations." *Journal of Applied Microbiology* 124 (2): 336–67. <https://doi.org/10.1111/JAM.13633>.
- Avendaño, Roberto, Nefertiti Chaves, Paola Fuentes, Ethel Sánchez, Jose I. Jiménez, and Max Chavarría. 2016. "Production of Selenium Nanoparticles in *Pseudomonas Putida* KT2440." *Scientific Reports* 2016 6:1 6 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep37155>.
- Aviles-Espinosa, R., G. J. Tserevelakis, S. I. C. O. Santos, G. Filippidis, A. J. Krmpot, M. Vlachos, N. Tavernarakis, et al. 2013. "Cell Division Stage in *C. Elegans* Imaged Using Third Harmonic Generation Microscopy." In *Biomedical Optics and 3-D Imaging (2010)*, Paper BTuD78, BTuD78. The Optical Society. <https://doi.org/10.1364/biomed.2010.btud78>.
- Bago, Berta, Philip E. Pfeffer, Warren Zipfel, Peter Lammers, and Yair Shachar-Hill. 2002. "Tracking Metabolism and Imaging Transport in Arbuscular Mycorrhizal Fungi." *Plant and Soil* 244 (1–2): 189–

97. <https://doi.org/10.1023/A:1020212328955/METRICS>.
- Bahram, Mohammad, and Tarquin Netherway. 2022. "Fungi as Mediators Linking Organisms and Ecosystems." *FEMS Microbiology Reviews* 46 (2): 1–16. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAB058>.
- Baracca, Alessandra, Gianluca Sgarbi, Giancarlo Solaini, and Giorgio Lenaz. 2003. "Rhodamine 123 as a Probe of Mitochondrial Membrane Potential: Evaluation of Proton Flux through FO during ATP Synthesis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1606 (1–3): 137–46. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00110-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00110-5).
- Barad, Y., H. Eisenberg, M. Horowitz, and Y. Silberberg. 1997. "Nonlinear Scanning Laser Microscopy by Third Harmonic Generation." *Applied Physics Letters* 70 (8): 922–24. <https://doi.org/10.1063/1.118442>.
- Barbosa, Antonio Daniel, David B. Savage, and Symeon Siniosoglou. 2015. "Lipid Droplet-Organelle Interactions: Emerging Roles in Lipid Metabolism." *Current Opinion in Cell Biology* 35 (August): 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2015.04.017>.
- Barceloux, Donald G. 1999. "Selenium." *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102417>.
- Barrero, Alejandro F., Juan E. Oltra, and Juan A. Poyatos. 1996. "Acidic Metabolites from *Phycomyces Blakesleeanus*." *Phytochemistry* 42 (5): 1427–33. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00146-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00146-X).
- Barzda, Virginijus. 2008. "Non-Linear Contrast Mechanisms for Optical Microscopy." In , 26:35–54. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8250-4_3.
- Barzda, Virginijus, Catherine Greenhalgh, Jürg Aus der Au, Steven Elmore, Johannes HGM van Beek, and Jeff Squier. 2005. "Visualization of Mitochondria in Cardiomyocytes." *Optics Express* 13 (20): 8263. <https://doi.org/10.1364/opex.13.008263>.
- Bassilana, Martine, Charles Puerner, and Robert A. Arkowitz. 2020. "External Signal-Mediated Polarized Growth in Fungi." *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.11.001>.
- Bautista, Godofredo, Simon G. Pfisterer, Mikko J. Huttunen, Sanjeev Ranjan, Kristiina Kanerva, Elina Ikonen, and Martti Kauranen. 2014. "Polarized Thg Microscopy Identifies Compositionally Different Lipid Droplets in Mammalian Cells." *Biophysical Journal* 107 (10): 2230–36. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.10.009>.
- Belyaeva, Elena A., Dorota Dymkowska, Mariusz R. Wieckowski, and Lech Wojtczak. 2008. "Mitochondria as an Important Target in Heavy Metal Toxicity in Rat Hepatoma AS-30D Cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 231 (1): 34–42. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2008.03.017>.
- Benador, Ilan Y., Michaela Veliova, Kiana Mahdavian, Anton Petcherski, Jakob D. Wikstrom, Essam A. Assali, Rebeca Acín-Pérez, et al. 2018. "Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics That Support Lipid Droplet Expansion." *Cell Metabolism* 27 (4): 869–885.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.003>.
- Bergman, K, P V Burke, E Cerdá-Olmedo, C N David, M Delbrück, K W Foster, E W Goodell, et al. 1969. "Phycomyces." *Bacteriological Reviews* 33 (1): 99. <https://doi.org/10.1128/BR.33.1.99-157.1969>.
- Bhunjun, Chitrabhanu S., Tuula Niskanen, Nakarin Suwannarach, Nopparat Wannathes, Yi Jun Chen, Eric H.C. McKenzie, Sajeewa S.N. Maharachchikumbura, et al. 2022. "The Numbers of Fungi: Are the Most Speciose Genera Truly Diverse?" *Fungal Diversity* 2022 114:1 114 (1): 387–462. <https://doi.org/10.1007/S13225-022-00501-4>.
- Bickel, Perry E., John T. Tansey, and Michael A. Welte. 2009. "PAT Proteins, an Ancient Family of Lipid Droplet Proteins That Regulate Cellular Lipid Stores." *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (6): 419–40. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2009.04.002>.
- Bills, G., J. Martin, J. Collado, G. Platas, D. Overly, J. Ruben Tormo, F. Vicente, G.J.M. Verkley, and P.W. Crous. 2009. "Measuring the Distribution and Diversity of Antibiosis and Secondary Metabolites in

- Filamentous Fungi." *SIMB News*, 133–47. <https://pure.knaw.nl/portal/en/publications/measuring-the-distribution-and-diversity-of-antibiosis-and-second>.
- Birringer, Marc, Sandra Pilawa, and Leopold Flohé. 2002. "Trends in Selenium Biochemistry." *Natural Product Reports* 19 (6): 693–718. <https://doi.org/10.1039/B205802M>.
- Black, Braydon, Christopher Lee, Linda C. Horianopoulos, Won Hee Jung, and James W. Kronstad. 2021. "Respiring to Infect: Emerging Links between Mitochondria, the Electron Transport Chain, and Fungal Pathogenesis." *PLOS Pathogens* 17 (7): e1009661. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009661>.
- Blackwell, Meredith. 2011. "The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species?" *American Journal of Botany* 98 (3): 426–38. <https://doi.org/10.3732/AJB.1000298>.
- Bladt, Tanja Thorskov, Jens Christian Frisvad, Peter Boldsen Knudsen, and Thomas Ostenfeld Larsen. 2013. "Anticancer and Antifungal Compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and Other Filamentous Fungi." *Molecules* 18 (9): 11338. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES180911338>.
- Boecker, Simon, Stefan Grätz, Dennis Kerwat, Lutz Adam, David Schirmer, Lennart Richter, Tabea Schütze, Daniel Petras, Roderich D. Süssmuth, and Vera Meyer. 2018. "*Aspergillus Niger* Is a Superior Expression Host for the Production of Bioactive Fungal Cyclodepsipeptides." *Fungal Biology and Biotechnology* 5 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40694-018-0048-3/TABLES/3>.
- Boer, A. H. De, B. Van Duijn, P. Giesberg, L. Wegner, G. Obermeyer, K. Köhler, and K. W. Linz. 1994. "Laser Microsurgery: A Versatile Tool in Plant (Electro) Physiology." *Protoplasma* 178 (1–2): 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF01404115>.
- Boldogh, Istvan R., and Liza A. Pon. 2006. "Interactions of Mitochondria with the Actin Cytoskeleton." *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (5–6): 450–62. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2006.02.014>.
- Borile, Giulia, Deborah Sandrin, Andrea Filippi, Kurt I. Anderson, and Filippo Romanato. 2021. "Label-Free Multiphoton Microscopy: Much More Than Fancy Images." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (5): 2657. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052657>.
- Born, Max, Emil Wolf, A. B. Bhatia, P. C. Clemmow, D. Gabor, A. R. Stokes, A. M. Taylor, P. A. Wayman, and W. L. Wilcock. 1999. "Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light." *Principles of Optics*, October. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139644181>.
- Boström, Pontus, Mikael Rutberg, Johanna Ericsson, Peter Holmdahl, Linda Andersson, Michael A. Frohman, Jan Borén, and Sven Olof Olofsson. 2005. "Cytosolic Lipid Droplets Increase in Size by Microtubule-Dependent Complex Formation." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (9): 1945–51. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000179676.41064.D4>.
- Boyd, Robert W. 2008. *Nonlinear Optics*. Academic Press, Elsevier. 3rd ed. Academic Press.
- Boyd, Robert W. 2020. *Nolinear Optics*. Edited by Academic Press. Academic Press. 4th edn. San Diego: Elsevier.
- Brackmann, Christian, Joakim Norbeck, Madeleine Åkeson, Daniel Bosch, Christer Larsson, Lena Gustafsson, and Annika Enejder. 2009. "CARS Microscopy of Lipid Stores in Yeast: The Impact of Nutritional State and Genetic Background." *Journal of Raman Spectroscopy* 40 (7): 748–56. <https://doi.org/10.1002/JRS.2356>.
- Bu, Xiao, Jing Yuan Lin, Chang Qing Duan, Mattheos A.G. Koffas, and Guo Liang Yan. 2022. "Dual Regulation of Lipid Droplet-Triacylglycerol Metabolism and ERG9 Expression for Improved β -Carotene Production in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbial Cell Factories* 21 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12934-021-01723-Y/TABLES/2>.
- Burnett, John. 2003. *Fungal Populations and Species*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198515524.001.0001>.
- Cabodevilla, Ainara G., Laura Sánchez-Caballero, Eleni Nintou, Violeta G. Boiadjeva, Fernando Picatoste,

- Albert Gubern, and Enrique Claro. 2013. "Cell Survival during Complete Nutrient Deprivation Depends on Lipid Droplet-Fueled β -Oxidation of Fatty Acids." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (39): 27777–88. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.466656>.
- Camino, Lola P., Alexander Idnurm, and Enrique Cerdá-Olmedo. 2015. "Diversity, Ecology, and Evolution in Phycomyces." *Fungal Biology* 119 (11): 1007–21. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2015.07.005>.
- Campagnola, Paul J., and Leslie M. Loew. 2003. "Second-Harmonic Imaging Microscopy for Visualizing Biomolecular Arrays in Cells, Tissues and Organisms." *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt894>.
- Canioni, L., S. Rivet, L. Sarger, R. Barille, P. Vacher, and P. Voisin. 2001. "Imaging of Ca^{2+} Intracellular Dynamics with a Third-Harmonic Generation Microscope." *Optics Letters* 26 (8): 515–17.
- Casadevall, Arturo, Dimitrios P. Kontoyiannis, and Vincent Robert. 2019. "On the Emergence of Candida Auris: Climate Change, Azoles, Swamps, and Birds." *MBio* 10 (4). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01397-19>.
- Celik, Handan Ak, Hikmet Hakan Aydin, Remziye Deveci, Ender Terzioğlu, Sabire Karacali, Guray Saydam, Ulus Akarca, and Yucel Batur. 2004. "Biochemical and Morphological Characteristics of Selenite-Induced Apoptosis in Human Hepatoma Hep G2 Cells." *Biological Trace Element Research* 99 (1–3): 27–39. <https://doi.org/10.1385/BTER.99:1-3:027>.
- Cerdá-Olmeda, E., and J. Avalos. 1994. "Oleaginous Fungi: Carotene-Rich from Phycomyces." *Progress in Lipid Research*. Pergamon. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0163-7827(94)90021-3).
- Cerdá-Olmedo, E., and ED Lipson. 1987. *Phycomyces*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cerdá-Olmedo, Enrique. 2001. "Phycomyces and the Biology of Light and Color." *FEMS Microbiology Reviews* 25 (5): 503–12. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2001.TB00588.X>.
- Cereghetti, G. M., V. Costa, and L. Scorrano. 2010. "Inhibition of Drp1-Dependent Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis by a Polypeptide Antagonist of Calcineurin." *Cell Death and Differentiation* 17 (11): 1785–94. <https://doi.org/10.1038/CDD.2010.61>.
- Čertík, Milan, Emília Breierová, Monika Oláhová, Ján Šajbidor, and Ivana Márová. 2013. "Effect of Selenium on Lipid Alternations in Pigment-Forming Yeasts." *Food Science and Biotechnology* 22 (SUPPL. 1): 45–51. <https://doi.org/10.1007/S10068-013-0047-3/METRICS>.
- Chang, Tyler, Maxwell S. Zimmerley, Kyle P. Quinn, Isabelle Lamarre-Jouenne, David L. Kaplan, Emmanuel Beaurepaire, and Irene Georgakoudi. 2013. "Non-Invasive Monitoring of Cell Metabolism and Lipid Production in 3D Engineered Human Adipose Tissues Using Label-Free Multiphoton Microscopy." *Biomaterials* 34 (34): 8607–16. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.066>.
- Chang, Wenqiang, Ming Zhang, Sha Zheng, Ying Li, Xiaobin Li, Wei Li, Gang Li, et al. 2015. "Trapping Toxins within Lipid Droplets Is a Resistance Mechanism in Fungi." *Scientific Reports* 2015 5:1 5 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep15133>.
- Chen, Wen, Huakan Zhao, and Yongsheng Li. 2023. "Mitochondrial Dynamics in Health and Disease: Mechanisms and Potential Targets." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1 8 (1): 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01547-9>.
- Chen, Yixiong, Kai Cen, Yuzhen Lu, Siwei Zhang, Yanfang Shang, and Chengshu Wang. 2018. "Nitrogen-Starvation Triggers Cellular Accumulation of Triacylglycerol in *Metarhizium robertsii*." *Fungal Biology* 122 (6): 410–19. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2017.07.001>.
- Chen, Yu-Cheng, Hsun-Chia Hsu, Chien-Ming Lee, and Chi-Kuang Sun. 2015. "Third-Harmonic Generation Susceptibility Spectroscopy in Free Fatty Acids." *Journal of Biomedical Optics* 20 (9): 095013. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.9.095013>.
- Chen, Yu-Cheng, Szu-Yu Lee, Yana Wu, Kirstin Brink, Dar-Bin Shieh, Timothy D. Huang, Robert R. Reisz, and Chi-Kuang Sun. 2015. "Third-Harmonic Generation Microscopy Reveals Dental Anatomy in Ancient Fossils." *Optics Letters* 40 (7): 1354. <https://doi.org/10.1364/ol.40.001354>.

- Chung, Lip Yong, Richard J Schmidt, Paul F Hamlyn, Brian F Sagar, Andrea M. Andrew, and Terence D Turner. 1994. "Biocompatibility of Potential Wound Management Products: Fungal Mycelia as a Source of Chitin/Chitosan and Their Effect on the Proliferation of Human F1000 Fibroblasts in Culture." *Journal of Biomedical Materials Research* 28 (4): 463–69. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280409>.
- Chung, Samuel H., and Eric Mazur. 2009. "Surgical Applications of Femtosecond Lasers." *Journal of Biophotonics* 2 (10): 557–72. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910053>.
- Cisek, Richard, Leigh Spencer, Nicole Prent, Donatas Zigmantas, George S. Espie, and Virginijus Barzda. 2009. "Optical Microscopy in Photosynthesis." *Photosynthesis Research* 102 (2): 111–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9500-9>.
- Clarke, Andrew, and Hans Otto Pörtner. 2010. "Temperature, Metabolic Power and the Evolution of Endothermy." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 85 (4): 703–27. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.2010.00122.X>.
- Copetti, Marina Venturini. 2019. "Fungi as Industrial Producers of Food Ingredients." *Current Opinion in Food Science* 25 (February): 52–56. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2019.02.006>.
- Cordero, Radames J.B., Ellie Rose Mattoon, Zulymar Ramos, and Arturo Casadevall. 2023. "The Hypothermic Nature of Fungi." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120 (19): e2221996120. https://doi.org/10.1073/PNAS.2221996120/SUPPL_FILE/PNAS.2221996120.SAPP.PDF.
- Cortesão, Marta, Tabea Schütze, Robert Marx, Ralf Moeller, and Vera Meyer. 2020. "Fungal Biotechnology in Space: Why and How?" In *Grand Challenges in Biology and Biotechnology*, 501–35. Springer Science and Business Media B.V. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7_18.
- Cuvelier, I., D. Vogelaers, R. Peleman, D. Benoit, V. Van Marck, F. Offner, K. Vandewoude, and F. Colardyn. 1998. "Two Cases of Disseminated Mucormycosis in Patients with Hematological Malignancies and Literature Review." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 17 (12): 859–63. <https://doi.org/10.1007/S100960050207>.
- Davidson, F. A., and S. Olsson. 2000. "Translocation Induced Outgrowth of Fungi in Nutrient-Free Environments." *Journal of Theoretical Biology* 205 (1): 73–84. <https://doi.org/10.1006/JTBI.2000.2045>.
- Débarre, Delphine, Willy Supatto, Emmanuel Farge, Bruno Moulia, Marie-Claire Schanne-Klein, and Emmanuel Beaurepaire. 2004. "Velocimetric Third-Harmonic Generation Microscopy: Micrometer-Scale Quantification of Morphogenetic Movements in Unstained Embryos." *Optics Letters* 29 (24): 2881. <https://doi.org/10.1364/ol.29.002881>.
- Débarre, Delphine, Willy Supatto, Ana Maria Pena, Aurélie Fabre, Thierry Tordjmann, Laurent Combettes, Marie Claire Schanne-Klein, and Emmanuel Beaurepaire. 2006. "Imaging Lipid Bodies in Cells and Tissues Using Third-Harmonic Generation Microscopy." *Nature Methods* 3 (1): 47–53. <https://doi.org/10.1038/nmeth813>.
- Dejgaard, Selma Y., and John F. Presley. 2014. "New Automated Single-Cell Technique for Segmentation and Quantitation of Lipid Droplets." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 62 (12): 889–901. <https://doi.org/10.1369/0022155414554835>.
- Denk, Winfried, James H. Strickler, and Watt W. Webb. 1990. "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy." *Science* 248 (4951): 73–76. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>.
- Diaspro, Alberto, Paolo Bianchini, Giuseppe Vicidomini, Mario Faretta, Paola Ramoino, and Cesare Usai. 2006. "Multi-Photon Excitation Microscopy." <https://doi.org/10.1186/1475-925X-5-36>.
- Dionysopoulou, Mariangela, Nana Yan, Bolin Wang, Christos Pliotas, and George Dhallinas. 2022. "Genetic and Cellular Characterization of MscS-like Putative Channels in the Filamentous Fungus *Aspergillus*

- Nidulans." *Channels* 16 (1): 148–58. <https://doi.org/10.1080/19336950.2022.2098661>.
- Dix, Neville J., and John Webster. 1995. "Fungi of Extreme Environments." *Fungal Ecology*, 322–40. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0693-1_12.
- Dong, Pu Ting, Cheng Zong, Zeina Dagher, Jie Hui, Junjie Li, Yuewei Zhan, Meng Zhang, Michael K. Mansour, and Ji Xin Cheng. 2021. "Polarization-Sensitive Stimulated Raman Scattering Imaging Resolves Amphotericin B Orientation in Candida Membrane." *Science Advances* 7 (2): 1–11. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd5230>.
- Duran, Rocio, Jeffrey W. Cary, and Ana M. Calvo. 2010. "Role of the Osmotic Stress Regulatory Pathway in Morphogenesis and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi." *Toxins* 2 (4): 367. <https://doi.org/10.3390/TOXINS2040367>.
- Dzurendova, Simona, Pernille Margrethe Olsen, Dana Byrtusová, Valeria Tafintseva, Volha Shapaval, Svein Jarle Horn, Achim Kohler, Martin Szotkowski, Ivana Marova, and Boris Zimmermann. 2023. "Raman Spectroscopy Online Monitoring of Biomass Production, Intracellular Metabolites and Carbon Substrates during Submerged Fermentation of Oleaginous and Carotenogenic Microorganisms." *Microbial Cell Factories* 22 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12934-023-02268-Y/TABLES/3>.
- Elzenga, J. Theo M., Christopher P. Keller, and Elizabeth Van Volkenburgh. 1991. "Patch Clamping Protoplasts from Vascular Plants Method for the Quick Isolation of Protoplasts Having a High Success Rate of Gigaseal Formation." *Plant Physiology* 97 (4): 1573–75. <https://doi.org/10.1104/PP.97.4.1573>.
- Exner, Tarik, Carlo A. Beretta, Qi Gao, Cassian Afting, Inés Romero-Brey, Ralf Bartenschlager, Leonard Fehring, Margarete Poppelreuther, and Joachim Füllekrug. 2019. "Lipid Droplet Quantification Based on Iterative Image Processing." *Journal of Lipid Research* 60 (7): 1333–44. <https://doi.org/10.1194/jlr.D092841>.
- Fairley, Katrina, Derek Laver, and N. Alan Walker. 1991. "Whole-Cell and Single-Channel Currents across the Plasmalemma of Corn Shoot Suspension Cells." *The Journal of Membrane Biology* 121 (1): 11–22. <https://doi.org/10.1007/BF01870647>.
- Falandysz, Jerzy. 2008. "Selenium in Edible Mushrooms." *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 26 (3): 256–99. <https://doi.org/10.1080/10590500802350086>.
- Farrar, Matthew J., Frank W. Wise, Joseph R. Fetcho, and Chris B. Schaffer. 2011. "In Vivo Imaging of Myelin in the Vertebrate Central Nervous System Using Third Harmonic Generation Microscopy." *Biophysical Journal* 100 (5): 1362–71. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.01.031>.
- Ferguson, B. A., T. A. Dreisbach, C. G. Parks, G. M. Filip, and C. L. Schmitt. 2003. "Coarse-Scale Population Structure of Pathogenic Armillaria Species in a Mixed-Conifer Forest in the Blue Mountains of Northeast Oregon." *Canadian Journal of Forest Research* 33 (4): 612–23. <https://doi.org/10.1139/x03-065>.
- Finn, Patrick F., and J. Fred Dice. 2006. "Proteolytic and Lipolytic Responses to Starvation." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 22 (7–8): 830–44. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2006.04.008>.
- Fischer-Parton, S., R. M. Parton, P. C. Hickey, J. Dijksterhuis, H. A. Atkinson, and Nick D. Read. 2000. "Confocal Microscopy of FM4-64 as a Tool for Analysing Endocytosis and Vesicle Trafficking in Living Fungal Hyphae." *Journal of Microscopy* 198 (Pt 3): 246–59. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2818.2000.00708.X>.
- Fisher, Cody R., Adam A. Shaaeli, Mara C. Ebeling, Sandra R. Montezuma, and Deborah A. Ferrington. 2022. "Investigating Mitochondrial Fission, Fusion, and Autophagy in Retinal Pigment Epithelium from Donors with Age-Related Macular Degeneration." *Scientific Reports* 2022 12:12 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26012-5>.
- Fisher, Matthew C., Ana Alastruey-Izquierdo, Judith Berman, Tihana Bicanic, Elaine M. Bignell, Paul

- Bowyer, Michael Bromley, et al. 2022. "Tackling the Emerging Threat of Antifungal Resistance to Human Health." *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>.
- Fisher, Matthew C., Nichola J. Hawkins, Dominique Sanglard, and Sarah J. Gurr. 2018. "Worldwide Emergence of Resistance to Antifungal Drugs Challenges Human Health and Food Security." *Science (New York, N.Y.)* 360 (6390): 739–42. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAP7999>.
- Fisher, Matthew C., Daniel A. Henk, Cheryl J. Briggs, John S. Brownstein, Lawrence C. Madoff, Sarah L. McCraw, and Sarah J. Gurr. 2012. "Emerging Fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health." *Nature* 484 (7393): 186–94. <https://doi.org/10.1038/nature10947>.
- Freeman, K. R., A. P. Martin, D. Karki, R. C. Lynch, M. S. Mitter, A. F. Meyera, J. E. Longcore, D. R. Simmons, and S. K. Schmidt. 2009. "Evidence That Chytrids Dominate Fungal Communities in High-Elevation Soils." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (43): 18315–20. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0907303106>.
- Fricker, Mark D., Luke L. M. Heaton, Nick S. Jones, and Lynne Boddy. 2017. "The Mycelium as a Network." *Microbiology Spectrum* 5 (3). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0033-2017/ASSET/7EF6828F-4F18-45D3-A115-0F253A317E34/ASSETS/GRAPHIC/FUNK-0033-2017-FIG10.GIF>.
- Fuchs, Horian, Holger Prokisch, Walter Neupert, and Benedikt Westermann. 2002. "Interaction of Mitochondria with Microtubules in the Filamentous Fungus *Neurospora Crassa*." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 9): 1931–37. <https://doi.org/10.1242/JCS.115.9.1931>.
- Fujita, Katsumasa, and Nicholas Isaac Smith. 2008. "Label-Free Molecular Imaging of Living Cells." *Mol. Cells OS*, 530–35.
- Gabel, Christopher V. 2008. "Femtosecond Lasers in Biology: Nanoscale Surgery with Ultrafast Optics." *Contemporary Physics* 49 (6): 391–411. <https://doi.org/10.1080/00107510802628263>.
- Galland, P. 2014. "The Sporangiphore of *Phycomyces Blakesleeana*: A Tool to Investigate Fungal Gravireception and Graviresponses." *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 16 Suppl 1 (SUPPL.1): 58–68. <https://doi.org/10.1111/PLB.12108>.
- Gandia, Antoni, and Andrew Adamatzky. 2024. "Fungal Skin for Robots." *Biosystems* 235 (January): 105106. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMS.2023.105106>.
- Gandia, Antoni, Jeroen G. van den Brandhof, Freek V.W. Appels, and Mitchell P. Jones. 2021. "Flexible Fungal Materials: Shaping the Future." *Trends in Biotechnology* 39 (12): 1321–31. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2021.03.002>.
- Garrill A, Jackson SL, Lew RR, Heath IB. 1993. "Ion Channel Activity and Tip Growth: Tip-Localized Stretch-Activated Channels Generate an Essential Ca²⁺ Gradient in the Oomycete *Saprolegnia Ferax*." *Eur J Cell Biol.* 60 (2): 358–65.
- Gavgiotaki, E., G. Filippidis, M. Kalognomou, A. A. Tsouko, I. Skordos, C. Fotakis, and I. Athanassakis. 2015. "Third Harmonic Generation Microscopy as a Reliable Diagnostic Tool for Evaluating Lipid Body Modification during Cell Activation: The Example of BV-2 Microglia Cells." *Journal of Structural Biology* 189 (2): 105–13. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.11.011>.
- Gavgiotaki, Evangelia, George Filippidis, Vassilis Tsafas, Savvas Bovasianos, George Kenanakis, Vasilios Georgoulas, Maria Tzardi, Sofia Agelaki, and Irene Athanassakis. 2020. "Third Harmonic Generation Microscopy Distinguishes Malignant Cell Grade in Human Breast Tissue Biopsies." *Scientific Reports* 10 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67857-y>.
- Genre, Andrea, Luisa Lanfranco, Silvia Perotto, and Paola Bonfante. 2020. "Unique and Common Traits in Mycorrhizal Symbioses." *Nature Reviews Microbiology* 18 (11): 649–60. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3>.
- Genthial, Rachel, Emmanuel Beaurepaire, Marie Claire Schanne-Klein, Françoise Peyrin, Delphine Farlay,

- Cécile Olivier, Yohann Bala, et al. 2017. "Label-Free Imaging of Bone Multiscale Porosity and Interfaces Using Third-Harmonic Generation Microscopy." *Scientific Reports* 7 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03548-5>.
- Gharieb, M. M., S. C. Wilkinson, and G. M. Gadd. 1995. "Reduction of Selenium Oxyanions by Unicellular, Polymorphic and Filamentous Fungi: Cellular Location of Reduced Selenium and Implications for Tolerance." *Journal of Industrial Microbiology* 14 (3–4): 300–311. <https://doi.org/10.1007/BF01569943>.
- Ghosh, Soumya, Iryna Rusyn, Olena V. Dmytruk, Kostyantyn V. Dmytruk, Helen Onyeaka, Marieka Gryzenhout, and Yusufjon Gafforov. 2023. "Filamentous Fungi for Sustainable Remediation of Pharmaceutical Compounds, Heavy Metal and Oil Hydrocarbons." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 11 (February): 1106973. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1106973/BIBTEX>.
- Golaraei, Ahmad, Lukas Kontenis, Richard Cisek, Danielle Tokarz, Susan J. Done, Brian C. Wilson, and Virginijus Barzda. 2016. "Changes of Collagen Ultrastructure in Breast Cancer Tissue Determined by Second-Harmonic Generation Double Stokes-Mueller Polarimetric Microscopy." *Biomedical Optics Express* 7 (10): 4054. <https://doi.org/10.1364/boe.7.004054>.
- Gomes, Ligia C., Giulietta Di Benedetto, and Luca Scorrano. 2011. "During Autophagy Mitochondria Elongate, Are Spared from Degradation and Sustain Cell Viability." *Nature Cell Biology* 13 (5): 589–98. <https://doi.org/10.1038/NCB2220>.
- Gonçalves, Vívian N., Charles L. Cantrell, David E. Wedge, Mariana C. Ferreira, Marco Aurélio Soares, Melissa R. Jacob, Fabio S. Oliveira, et al. 2016. "Fungi Associated with Rocks of the Atacama Desert: Taxonomy, Distribution, Diversity, Ecology and Bioprospection for Bioactive Compounds." *Environmental Microbiology* 18 (1): 232–45. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13005>.
- Gow, Neil A.R., Carolyn Johnson, Judith Berman, Alix T. Coste, Christina A. Cuomo, David S. Perlin, Tihana Bicanic, et al. 2022. "The Importance of Antimicrobial Resistance in Medical Mycology." *Nature Communications* 13 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32249-5>.
- Green, Adam, Tanvir Hossain, and David M. Eckmann. 2022. "Mitochondrial Dynamics Involves Molecular and Mechanical Events in Motility, Fusion and Fission." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (October): 1010232. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.1010232/BIBTEX>.
- Greenspan, Phillip, Eugene P. Mayer, and Stanley D. Fowler. 1985. "Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets." *The Journal of Cell Biology* 100 (3): 965. <https://doi.org/10.1083/JCB.100.3.965>.
- Guan, Liying, Binshe Han, Zhushi Li, Fangyuan Hua, Fang Huang, Wei Wei, Yang Yang, and Caimin Xu. 2009. "Sodium Selenite Induces Apoptosis by ROS-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Acute Promyelocytic Leukemia NB4 Cells." *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 14 (2): 218–25. <https://doi.org/10.1007/S10495-008-0295-5>.
- Guignardi, Zackary, and Michela Schiavon. 2017. "Biochemistry of Plant Selenium Uptake and Metabolism," 21–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56249-0_2.
- Guo, Yi, Kimberly R. Cordes, Robert V. Farese, and Tobias C. Walther. 2009. "Lipid Droplets at a Glance." *Journal of Cell Science* 122 (6): 749. <https://doi.org/10.1242/JCS.037630>.
- Gupta, Sudhir. 2003. "Molecular Signaling in Death Receptor and Mitochondrial Pathways of Apoptosis (Review)." *International Journal of Oncology* 22 (1): 15–20. <https://doi.org/10.3892/IJO.22.1.15/HTML>.
- Gutjahr, Caroline, and Martin Parniske. 2013. "Cell and Developmental Biology of Arbuscular Mycorrhiza Symbiosis." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122413>.
- Heijden, Marcel G.A. Van Der, John N. Klironomos, Margot Ursic, Peter Moutoglis, Ruth Streitwolf-Engel,

- Thomas Boller, Andres Wiemken, and Ian R. Sanders. 1998. "Mycorrhizal Fungal Diversity Determines Plant Biodiversity, Ecosystem Variability and Productivity." *Nature* 396 (6706): 69–72. <https://doi.org/10.1038/23932>.
- Heinemann, Dag, Miroslav Zabic, Mitsuhiro Terakawa, and Jens Boch. 2022. "Laser-Based Molecular Delivery and Its Applications in Plant Science." *Plant Methods*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00908-9>.
- Henriksen, Gordon H., and Sarah M. Assmann. 1997. "Laser-Assisted Patch Clamping: A Methodology." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 433 (6): 832–41. <https://doi.org/10.1007/S004240050352/METRICS>.
- Henriksen, Gordon H., Alison R. Taylor, Colin Brownlee, and Sarah M. Assmann. 1996. "Laser Microsurgery of Higher Plant Cell Walls Permits Patch-Clamp Access." *Plant Physiology* 110 (4): 1063–68. <https://doi.org/10.1104/pp.110.4.1063>.
- Hernández-Díaz, José A., Jorge J.O. Garza-García, Janet M. León-Morales, Adalberto Zamudio-Ojeda, Jenny Arratia-Quijada, Gilberto Velázquez-Juárez, Julio C. López-Velázquez, and Soledad García-Morales. 2021. "Antibacterial Activity of Biosynthesized Selenium Nanoparticles Using Extracts of *Calendula Officinalis* against Potentially Clinical Bacterial Strains." *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 5929 26 (19): 5929. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195929>.
- Hoffmann, K., J. Pawłowska, G. Walther, M. Wrzosek, G. S. de Hoog, G. L. Benny, P. M. Kirk, and K. Voigt. 2013. "The Family Structure of the Mucorales: A Synoptic Revision Based on Comprehensive Multigene-Genealogies." *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 30 (June): 57. <https://doi.org/10.3767/003158513X666259>.
- Horrobin, D. F. 1992. "Nutritional and Medical Importance of Gamma-Linolenic Acid." *Progress in Lipid Research* 31 (2): 163–94. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(92\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0163-7827(92)90008-7).
- Huang, Guanning, Zumei Liu, Lizhen He, Kar Him Luk, Siu To Cheung, Ka Hing Wong, and Tianfeng Chen. 2018. "Autophagy Is an Important Action Mode for Functionalized Selenium Nanoparticles to Exhibit Anti-Colorectal Cancer Activity." *Biomaterials Science* 6 (9): 2508–17. <https://doi.org/10.1039/C8BM00670A>.
- Huang, S, AA Heikal, and WW Webb. 2002. "Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD(P)H and Flavoprotein." *Biophysical Journal* 82 (5): 2811–25. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75621-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75621-X).
- Huang, Yanna, Hongyue Xie, Peng Pan, Qihong Qu, Qin Xia, Xiaotong Gao, Sanbao Zhang, and Qinyang Jiang. 2021. "Heat Stress Promotes Lipid Accumulation by Inhibiting the AMPK-PGC-1 α Signaling Pathway in 3T3-L1 Preadipocytes." *Cell Stress and Chaperones* 26 (3): 563–74. <https://doi.org/10.1007/S12192-021-01201-9>.
- Hyde, Kevin D., Jianchu Xu, Sylvie Rapior, Rajesh Jeewon, Saisamorn Lumyong, Allen Grace T. Niego, Pranami D. Abeywickrama, et al. 2019. "The Amazing Potential of Fungi: 50 Ways We Can Exploit Fungi Industrially." *Fungal Diversity* 2019 97:1 97 (1): 1–136. <https://doi.org/10.1007/S13225-019-00430-9>.
- Islam, M. R., G. Tudryn, R. Bucinell, L. Schadler, and R. C. Picu. 2017. "Morphology and Mechanics of Fungal Mycelium." *Scientific Reports* 2017 7:1 7 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13295-2>.
- IY, Yanina, Lazareva EN, and Tuchin VV. 2018. "Refractive Index of Adipose Tissue and Lipid Droplet Measured in Wide Spectral and Temperature Ranges." *Applied Optics* 57 (17): 4839. <https://doi.org/10.1364/AO.57.004839>.
- Iyer, Kali R., Sheena C. Li, Nicole M. Revie, Jennifer W. Lou, Dustin Duncan, Sara Fallah, Hiram Sanchez, et al. 2023. "Identification of Triazenyl Indoles as Inhibitors of Fungal Fatty Acid Biosynthesis with Broad-Spectrum Activity." *Cell Chemical Biology* 30 (7): 795–810.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.06.005>.

- Jarc, Eva, and Toni Petan. 2019. "Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress." *The Yale Journal of Biology and Medicine* 92 (3): 435. /pmc/articles/PMC6747940/.
- Javadov, Sabzali, Xavier Chapa-Dubocq, and Vladimir Makarov. 2018. "Different Approaches to Modeling Analysis of Mitochondrial Swelling." *Mitochondrion* 38 (January): 58. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2017.08.004>.
- Jiang, Yina, Wanxiao Wang, Qiujin Xie, Na Liu, Lixia Liu, Dapeng Wang, Xiaowei Zhang, et al. 2017. "Plants Transfer Lipids to Sustain Colonization by Mutualistic Mycorrhizal and Parasitic Fungi." *Science (New York, N.Y.)* 356 (6343): 1172–73. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAM9970>.
- Jo, Charles, Jing Zhang, Jenny M. Tam, George M. Church, Ahmad S. Khalil, Daniel Segrè, and Tzu Chieh Tang. 2023. "Unlocking the Magic in Mycelium: Using Synthetic Biology to Optimize Filamentous Fungi for Biomanufacturing and Sustainability." *Materials Today Bio* 19 (April): 100560. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2023.100560>.
- Johnson, Mark A., Sara Vidoni, Romina Durigon, Sarah F. Pearce, Joanna Rorbach, Jiuya He, Gloria Brea-Calvo, et al. 2014. "Amino Acid Starvation Has Opposite Effects on Mitochondrial and Cytosolic Protein Synthesis." *PLOS ONE* 9 (4): e93597. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0093597>.
- Jüngst, Christian, Matthias Klein, and Andreas Zumbusch. 2013. "Long-Term Live Cell Microscopy Studies of Lipid Droplet Fusion Dynamics in Adipocytes." *Journal of Lipid Research* 54 (12): 3419–29. <https://doi.org/10.1194/JLR.M042515>.
- Ketchum, Karen A., William J. Joiner, Andrew J. Sellers, Leonard K. Kaczmarek, and Steve A.N. Goldstein. 1995. "A New Family of Outwardly Rectifying Potassium Channel Proteins with Two Pore Domains in Tandem." *Nature* 376:6542 376 (6542): 690–95. <https://doi.org/10.1038/376690a0>.
- Keymer, Andreas, Priya Pimprikar, Vera Wewer, Claudia Huber, Mathias Brands, Simone L. Bucerius, Pierre Marc Delaux, et al. 2017. "Lipid Transfer from Plants to Arbuscular Mycorrhiza Fungi." *ELife* 6 (July): e29107. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.29107>.
- Khan, Rahim, Fatema Hossain Brishti, Brisha Arulrajah, Yong Meng Goh, Muhamad Hafiz Abd Rahim, Roselina Karim, Siti Hajar-Azhari, Sam Kin Kit, Farooq Anwar, and Nazamid Saari. 2024. "Mycoprotein as a Meat Substitute: Production, Functional Properties, and Current Challenges-a Review." *International Journal of Food Science and Technology* 59 (1): 522–44. <https://doi.org/10.1111/IJFS.16791>.
- Khubulava, S, N Chichivishvili, N Shavshishvili, K Mulkijanyan, and N Khodeli. 2019. "Effect of High Dose of Selenium Nanoparticles on Alimentary Tract in Rodents." *J Nanomed Nanotechnol, an Open Access Journal* 10 (2): 531. <https://doi.org/10.35248/2157-7439.19.10.531>.
- Kieliszek, Marek, Stanisław Błażej, Anna Bzducha-Wróbel, and Anna M. Kot. 2019. "Effect of Selenium on Lipid and Amino Acid Metabolism in Yeast Cells." *Biological Trace Element Research* 187 (1): 316–27. <https://doi.org/10.1007/S12011-018-1342-X>.
- Kieliszek, Marek, Stanisław Błażej, and Eliza Kurek. 2017. "Binding and Conversion of Selenium in Candida Utilis ATCC 9950 Yeasts in Bioreactor Culture." *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 352 22 (3): 352. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22030352>.
- Knaus, H. 2014. "Nonlinear Spectral Imaging of Fungi." Utrecht University. <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/307309>.
- Knaus, Helene, Gerhard A. Blab, Alexandra V. Agronskaia, Dave J. van den Heuvel, Hans C. Gerritsen, and Han A.B. Wösten. 2013. "Monitoring the Metabolic State of Fungal Hyphae and the Presence of Melanin by Nonlinear Spectral Imaging." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (20): 6345–50. <https://doi.org/10.1128/AEM.02291-13>.
- Knaus, Helene, Gerhard A. Blab, G. Jerre van Veluw, Hans C. Gerritsen, and Han A.B. Wösten. 2013. "Label-Free Fluorescence Microscopy in Fungi." *Fungal Biology Reviews* 27 (2): 60–66. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2013.05.003>.

- Knepper, Caleb, Elizabeth A. Savory, and Brad Day. 2011. "Arabidopsis NDR1 Is an Integrin-like Protein with a Role in Fluid Loss and Plasma Membrane-Cell Wall Adhesion." *Plant Physiology* 156 (1): 286–300. <https://doi.org/10.1104/PP.110.169656>.
- Köhler, Julia R., Bernhard Hube, Rosana Puccia, Arturo Casadevall, and John R. Perfect. 2017. "Fungi That Infect Humans." *Microbiology Spectrum* 5 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0014-2016>.
- Kohli, Vikram, Abdulhakem Y. Elezzabi, and Jason P. Acker. 2005. "Cell Nanosurgery Using Ultrashort (Femtosecond) Laser Pulses: Applications to Membrane Surgery and Cell Isolation." *Lasers in Surgery and Medicine* 37 (3): 227–30. <https://doi.org/10.1002/lsm.20220>.
- Kolenc, Olivia I., and Kyle P. Quinn. 2019. "Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD." *Antioxidants & Redox Signaling* 30 (6): 875. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7451>.
- Koll, F., C. Sidoti, V. Rincheval, and G. Lecellier. 2001. "Mitochondrial Membrane Potential and Ageing in *Podospira Anserina*." *Mechanisms of Ageing and Development* 122 (2): 205–17. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(00\)00232-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(00)00232-3).
- Kreysing, Eva, Silke Seyock, Hossein Hassani, Elke Brauweiler-Reuters, Elmar Neumann, Andreas Offenhäusser, E Kreysing, et al. 2020. "Correlating Surface Plasmon Resonance Microscopy of Living and Fixated Cells with Electron Microscopy Allows for Investigation of Potential Preparation Artifacts." *Advanced Materials Interfaces* 7 (6): 1901991. <https://doi.org/10.1002/ADMI.201901991>.
- Križak, Strahinja, Ljiljana Nikolić, Marina Stanić, Milan Žižić, Joanna Zakrzewska, Miroslav Živić, and Nataša Todorović. 2015. "Osmotic Swelling Activates a Novel Anionic Current with VRAC-like Properties in a Cytoplasmic Droplet Membrane from *Phycomyces Blakesleeanus* Sporangioophores." *Research in Microbiology* 166 (3): 162–73. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.02.004>.
- Kurian, Smija M., Antonio Di Pietro, and Nick D. Read. 2018. "Live-Cell Imaging of Conidial Anastomosis Tube Fusion during Colony Initiation in *Fusarium Oxysporum*." *PLoS ONE* 13 (5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0195634>.
- Langseter, Anne Marie, Simona Dzurendova, Volha Shapaval, Achim Kohler, Dag Ekeberg, and Boris Zimmermann. 2021. "Evaluation and Optimisation of Direct Transesterification Methods for the Assessment of Lipid Accumulation in Oleaginous Filamentous Fungi." *Microbial Cell Factories* 20 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12934-021-01542-1/TABLES/3>.
- Last, K., L. Maharaj, J. Perry, S. Strauss, J. Fitzgibbon, T. A. Lister, and S. Joel. 2006. "The Activity of Methylated and Non-Methylated Selenium Species in Lymphoma Cell Lines and Primary Tumours." *Annals of Oncology* 17 (5): 773–79. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDL004>.
- Lax, Carlos, Carlos Pérez-arques, María Isabel Navarro-mendoza, José Tomás Cánovas-márquez, Ghizlane Tahiri, José Antonio Pérez-ruiz, Macario Osorio-concepción, et al. 2020. "Genes, Pathways, and Mechanisms Involved in the Virulence of Mucorales." *Genes*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes11030317>.
- Levina, N. N., R. R. Lew, G. J. Hyde, and I. B. Heath. 1995. "The Roles of Ca²⁺ and Plasma Membrane Ion Channels in Hyphal Tip Growth of *Neurospora Crassa*." *Journal of Cell Science* 108 (11): 3405–17. <https://doi.org/10.1242/JCS.108.11.3405>.
- Levina, Natalia N., and Roger R. Lew. 2006. "The Role of Tip-Localized Mitochondria in Hyphal Growth." *Fungal Genetics and Biology : FG & B* 43 (2): 65–74. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2005.06.008>.
- Lew, Roger R. 1999. "Comparative Analysis of Ca²⁺ and H⁺ Flux Magnitude and Location along Growing Hyphae of *Saprolegnia Ferax* and *Neurospora Crassa*." *European Journal of Cell Biology* 78 (12): 892–902. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(99\)80091-0](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(99)80091-0).
- Lew, Roger. 2011. "How Does a Hypha Grow? The Biophysics of Pressurized Growth in Fungi." *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2591>.

- Lew, Roger R., and Natalia N. Levina. 2004. "Oxygen Flux Magnitude and Location along Growing Hyphae of *Neurospora Crassa*." *FEMS Microbiology Letters* 233 (1): 125–30. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2004.01.050>.
- Lew, Roger R., Natalia N. Levina, Lana Shabala, Marinela I. Anderca, and Sergey N. Shabala. 2006. "Role of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Ion Flux-Mediated Turgor Regulation in Fungi." *Eukaryotic Cell* 5 (3): 480–87. <https://doi.org/10.1128/EC.5.3.480-487.2006>.
- Lew, Roger R., and Shanar Nasserifar. 2009. "Transient Responses during Hyperosmotic Shock in the Filamentous Fungus *Neurospora Crassa*." *Microbiology* 155 (3): 903–11. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023507-0>.
- Li, Shaoqi, Ghizlane Tahiri, Junhuan Yang, Hassan Mohamed, Qing Liu, Wenyue Shi, Sergio López-García, Victoriano Garre, and Yuanda Song. 2023. "Role of AMP Deaminase in *Mucor Circinelloides*: Implications for Nitrogen Utilization and Lipid Biosynthesis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 71 (42): 15680–91. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.3C04574/SUPPL_FILE/JF3C04574_SI_001.PDF.
- Liang, Na, Fengyuan Wang, Xi Peng, Jing Fang, Hengmin Cui, Zhengli Chen, Weimin Lai, Yi Zhou, and Yi Geng. 2015. "Effect of Sodium Selenite on Pathological Changes and Renal Functions in Broilers Fed a Diet Containing Aflatoxin B1." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12 (9): 11196. <https://doi.org/10.3390/IJERPH120911196>.
- Lin, Lan, and Jianping Xu. 2022. "Production of Fungal Pigments: Molecular Processes and Their Applications." *Journal of Fungi* 2023, Vol. 9, Page 44 9 (1): 44. <https://doi.org/10.3390/JOF9010044>.
- Lin, Sung Jan, Hsin Yuan Tan, Chien Jui Kuo, Ruei Jr Wu, Shiou Han Wang, Wei Liang Chen, Shiou Hwa Jee, and Chen Yuan Dong. 2009. "Multiphoton Autofluorescence Spectral Analysis for Fungus Imaging and Identification." *Applied Physics Letters* 95 (4). <https://doi.org/10.1063/1.3189084/897666>.
- Lin, Swu Jane, Jennifer Schranz, and Steven M. Teutsch. 2001. "Aspergillosis Case-Fatality Rate: Systematic Review of the Literature." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 32 (3): 358–66. <https://doi.org/10.1086/318483>.
- Lin, Zhenyuan, and Minghui Hong. 2021. "Femtosecond Laser Precision Engineering: From Micron, Submicron, to Nanoscale." *Ultrafast Science*. <https://doi.org/10.34133/2021/9783514>.
- Liu, Min, Ping Du, Garrett Heinrich, Gary M. Cox, and Angie Gelli. 2006. "Cch1 Mediates Calcium Entry in *Cryptococcus Neoformans* and Is Essential in Low-Calcium Environments." *Eukaryotic Cell* 5 (10): 1788–96. <https://doi.org/10.1128/EC.00158-06>.
- Liu, N, Y Yun, Y Yin, M Hahn, Z Ma, and Y Chen. 2019. "Lipid Droplet Biogenesis Regulated by the FgNem1/Spo7-FgPah1 Phosphatase Cascade Plays Critical Roles in Fungal Development and Virulence in *Fusarium Graminearum*." *The New Phytologist* 223 (1): 412–29. <https://doi.org/10.1111/NPH.15748>.
- Liu, P. Y., L. K. Chin, W. Ser, H. F. Chen, C.-M. Hsieh, C.-H. Lee, K.-B. Sung, et al. 2016. "Cell Refractive Index for Cell Biology and Disease Diagnosis: Past, Present and Future." *Lab on a Chip* 16 (4): 634–44. <https://doi.org/10.1039/C5LC01445J>.
- Liu, Zhiyi, Dimitra Pouli, Carlo A. Alonzo, Antonio Varone, Sevasti Karaliota, Kyle P. Quinn, Karl Mönger, Katia P. Karalis, and Irene Georgakoudi. 2018. "Mapping Metabolic Changes by Noninvasive, Multiparametric, High-Resolution Imaging Using Endogenous Contrast." *Science Advances* 4 (3). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAP9302>.
- López-Otín, Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, and Guido Kroemer. 2023. "Hallmarks of Aging: An Expanding Universe." *Cell* 186 (2): 243–78. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.11.001>.
- Lu, Jiawei, Huixia Li, Debing Yu, Peng Zhao, and Yuan Liu. 2023. "Heat Stress Inhibits the Proliferation and

- Differentiation of Myoblasts and Is Associated with Damage to Mitochondria." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11 (April): 1171506. <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2023.1171506/BIBTEX>.
- Lübeck, Mette, and Peter Stephensen Lübeck. 2022. "Fungal Cell Factories for Efficient and Sustainable Production of Proteins and Peptides." *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 753 10 (4): 753. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10040753>.
- Luginbuehl, Leonie H., Guillaume N. Menard, Smita Kurup, Harrie Van Erp, Guru V. Radhakrishnan, Andrew Breakspear, Giles E.D. Oldroyd, and Peter J. Eastmond. 2017. "Fatty Acids in Arbuscular Mycorrhizal Fungi Are Synthesized by the Host Plant." *Science (New York, N.Y.)* 356 (6343): 1175–78. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN0081>.
- M.J., Hutchings, D.K., Wijesinghe, E.A., John. 2000. "The Effects of Heterogeneous Nutrient Supply on Plant Performance: A Survey of Responses, with Special Reference to Clonal Herbs." In *The Ecological Consequences of Environmental Heterogeneity*, 91-100. <http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=yMAP4DAL9A4C&pgis=1>.
- Maeda, Hiroshi, and Nakao Ishida. 1967. "Specificity of Binding of Hexopyranosyl Polysaccharides with Fluorescent Brightener." *Journal of Biochemistry* 62 (2): 276–78. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A128660/2/62-2-276.PDF.GIF>.
- Malvezzi, Mattia, Madhavan Chalat, Radmila Janjusevic, Alessandra Picollo, Hiroyuki Terashima, Anant K Menon, and Alessio Accardi. 2013. "Ca 2 p-Dependent Phospholipid Scrambling by a Reconstituted TMEM16 Ion Channel." <https://doi.org/10.1038/ncomms3367>.
- Mansfield, Thomas M., Felipe E. Albornoz, Megan H. Ryan, Gary D. Bending, and Rachel J. Standish. 2023. "Niche Differentiation of Mucoromycotinian and Glomeromycotinian Arbuscular Mycorrhizal Fungi along a 2-Million-Year Soil Chronosequence." *Mycorrhiza*, June. <https://doi.org/10.1007/s00572-023-01111-x>.
- Mariotti, Marco, Gustavo Salinas, Toni Gabaldón, and Vadim N. Gladyshev. 2019. "Utilization of Selenocysteine in Early-Branching Fungal Phyla." *Nature Microbiology* 2019 4:5 4 (5): 759–65. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0354-9>.
- Markolf H. Niemz. 2004. *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications*. Edited by Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Martins, Ana S., Ivo C. Martins, and Nuno C. Santos. 2018. "Methods for Lipid Droplet Biophysical Characterization in Flaviviridae Infections." *Frontiers in Microbiology* 0 (AUG): 1951. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01951>.
- Masters, Barry R., Peter T. C. So, and William W. Mantulin. 2009. "Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy." *Journal of Biomedical Optics* 14 (1): 019901. <https://doi.org/10.1117/1.3077566>.
- Matos, Rigoberto Moreira de, Bruna Vanessa Nunes Pereira, Attilio Converti, Carolina de Albuquerque Lima Duarte, and Daniela de Araújo Viana Marques. 2023. "Bioactive Compounds of Filamentous Fungi with Biological Activity: A Systematic Review." *Revista de Gestão Social e Ambiental* 17 (2): e03423. <https://doi.org/10.24857/rgsa.v17n2-020>.
- Meadows, Roland Benjamin Alexander. 2012. "Live Cell Imaging of Lipid Droplet Distribution and Motility in the Filamentous Fungus Ustilago Maydis." The University of Exeter.
- Medeiros, Gustavo de, Dimitri Kromm, Balint Balazs, Nils Norlin, Stefan Günther, Emiliano Izquierdo, Paolo Ronchi, et al. 2020. "Cell and Tissue Manipulation with Ultrashort Infrared Laser Pulses in Light-Sheet Microscopy." *Scientific Reports* 10 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54349-x>.
- Mehrotra, B. S., and K. Nand. 1970. "Mycological Fat Production in India. I. A Preliminary Survey of Fat Producing Moulds." *Annals Mycol* 24: 131–43.
- Menges, Stefanie, Georgia Minakaki, Patrick M. Schaefer, Holger Meixner, Iryna Prots, Ursula Schlötzer-Schrehardt, Kristina Friedland, et al. 2017. "Alpha-Synuclein Prevents the Formation of Spherical

- Mitochondria and Apoptosis under Oxidative Stress.” *Scientific Reports* 7 (February). <https://doi.org/10.1038/SREP42942>.
- Meyer, Vera, Evelina Y. Basenko, J. Philipp Benz, Gerhard H. Braus, Mark X. Caddick, Michael Csukai, Ronald P. De Vries, et al. 2020. “Growing a Circular Economy with Fungal Biotechnology: A White Paper.” *Fungal Biology and Biotechnology* 2020 7:1 7 (1): 1–23. <https://doi.org/10.1186/S40694-020-00095-Z>.
- Meyers, Alex, Taylor M. Weiskittel, and Paul Dalhaimer. 2017. “Lipid Droplets: Formation to Breakdown.” *Lipids* 52 (6): 465–75. <https://doi.org/10.1007/S11745-017-4263-0/METRICS>.
- Mhlongo, Sizwe I., Obinna T. Ezeokoli, Ashira Roopnarain, Busiswa Ndaba, Patrick T. Sekoai, Olivier Habimana, and Carolina H. Pohl. 2021. “The Potential of Single-Cell Oils Derived From Filamentous Fungi as Alternative Feedstock Sources for Biodiesel Production.” *Frontiers in Microbiology* 12 (January). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637381>.
- Miedema, Hendrik, Gordon H. Henriksen, and Sarah M. Assmann. 1999. “A Laser Microsurgical Method of Cell Wall Removal Allows Detection of Large-Conductance Ion Channels in the Guard Cell Plasma Membrane.” *Protoplasma* 209 (3): 58–67. <https://doi.org/10.1007/BF01415701>.
- Misra, Sougat, Raymond W.M. Kwong, and Som Niyogi. 2012. “Transport of Selenium across the Plasma Membrane of Primary Hepatocytes and Enterocytes of Rainbow Trout.” *The Journal of Experimental Biology* 215 (Pt 9): 1491–1501. <https://doi.org/10.1242/JEB.062307>.
- Miwa, Satomi, Sonu Kashyap, Eduardo Chini, and Thomas von Zglinicki. 2022. “Mitochondrial Dysfunction in Cell Senescence and Aging.” *The Journal of Clinical Investigation* 132 (13). <https://doi.org/10.1172/JCI158447>.
- Mohan, Jacqueline E., Charles C. Cowden, Peter Baas, Anurag Dawadi, Paul T. Frankson, Katherine Helmick, Elizabeth Hughes, et al. 2014. “Mycorrhizal Fungi Mediation of Terrestrial Ecosystem Responses to Global Change: Mini-Review.” *Fungal Ecology* 10 (1): 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.01.005>.
- Moore, David, Geoffrey D. Robson, and Anthony P. J. Trinci. 2020. “17.5 Fungal Growth in Liquid Cultures.” In *21st Century Guidebook to Fungi*, 15–18. https://www.davidmoore.org.uk/21st_century_guidebook_to_fungi_platinum/Ch17_05.htm.
- Moreno-Giménez, Elena, Mónica Gandía, Zara Sáez, Paloma Manzanares, Lynne Yenush, Diego Orzáez, Jose F. Marcos, and Sandra Garrigues. 2023. “FungalBraid 2.0: Expanding the Synthetic Biology Toolbox for the Biotechnological Exploitation of Filamentous Fungi.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 11. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1222812>.
- Mukherjee, Gunjan, Tulika Mishra, and Sunil K. Deshmukh. 2017. “Fungal Pigments: An Overview.” *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*, December, 525–41. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4768-8_26/COVER.
- Munz, Jacob, Yuan Xiong, Jaoon Young Hwan Kim, Young Joon Sung, Seungbeom Seo, Ran Ha Hong, Thamali Kariyawasam, et al. 2020. “Arginine-Fed Cultures Generates Triacylglycerol by Triggering Nitrogen Starvation Responses during Robust Growth in Chlamydomonas.” *Algal Research* 46 (March): 101782. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101782>.
- Murphy, Denis J. 2012. “The Dynamic Roles of Intracellular Lipid Droplets: From Archaea to Mammals.” *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0329-7>.
- Nagahama, Takahiko, Eriko Takahashi, Yuriko Nagano, Mohamed A. Abdel-Wahab, and Masayuki Miyazaki. 2011. “Molecular Evidence That Deep-Branching Fungi Are Major Fungal Components in Deep-Sea Methane Cold-Seep Sediments.” *Environmental Microbiology* 13 (8): 2359–70. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02507.x>.
- Nand, Krishna, and B S Mohrotra. 1971. “Mycological Fat Production in India. II. Effect of Hydrogen-Ion Concentration on Fat Synthesis.” *Sydowia* 24: 144–52. www.biologiezentrum.a.

- Naz, Tahira, Shaista Nosheen, Shaoqi Li, Yusuf Nazir, Kiren Mustafa, Qing Liu, Victoriano Garre, and Yuanda Song. 2020. "Comparative Analysis of β -Carotene Production by *Mucor Circinelloides* Strains CBS 277.49 and WJ11 under Light and Dark Conditions." *Metabolites* 10 (1). <https://doi.org/10.3390/METABO10010038>.
- Ngo, Jennifer, Corey Osto, Frankie Villalobos, and Orian S. Shirihai. 2021. "Mitochondrial Heterogeneity in Metabolic Diseases." *Biology* 10 (9). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10090927>.
- Nielsen, Jens Christian, Sietske Grijseels, Sylvain Prigent, Boyang Ji, Jacques Dainat, Kristian Fog Nielsen, Jens Christian Frisvad, Mhairi Workman, and Jens Nielsen. 2017. "Global Analysis of Biosynthetic Gene Clusters Reveals Vast Potential of Secondary Metabolite Production in *Penicillium* Species." *Nature Microbiology* 2 (April). <https://doi.org/10.1038/NMICROBIOL.2017.44>.
- "Nile Red." n.d. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N1142>.
- Nohe, Anja, and Nils O. Petersen. 2007. "Image Correlation Spectroscopy." *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2007 (417). <https://doi.org/10.1126/STKE.4172007PL7>.
- Oddon, Delphine M., Eugene Diatloff, and Stephen K. Roberts. 2007. "A CLC Chloride Channel Plays an Essential Role in Copper Homeostasis in *Aspergillus Nidulans* at Increased Extracellular Copper Concentrations." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1768 (10): 2466–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.022>.
- Olivier, Nicolas, Miguel A Luengo-Oroz, Louise Duloquin, Emmanuel Faure, Thierry Savy, Israël Veilleux, Xavier Solinas, et al. 2010. "Cell Lineage Reconstruction of Early Zebrafish Embryos Using Label-Free Nonlinear Microscopy." *Science (New York, N.Y.)* 329 (5994): 967–71. <https://doi.org/10.1126/science.1189428>.
- Olzmann, James A., and Pedro Carvalho. 2018. "Dynamics and Functions of Lipid Droplets." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20:3 20 (3): 137–55. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>.
- . 2019. "Dynamics and Functions of Lipid Droplets." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>.
- Oraevsky, Alexander A., Luiz B. Da Silva, Alexander M. Rubenchik, Michael D. Feit, M. E. Glinsky, Michael D. Perry, Beth M. Mammini, Ward Small IV, and Brent C. Stuart. 1996. "Plasma Mediated Ablation of Biological Tissues with Nanosecond-to-Femtosecond Laser Pulses: Relative Role of Linear and Nonlinear Absorption." *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics* 2 (4): 801–9. <https://doi.org/10.1109/2944.577302>.
- Oron, Dan, Dvir Yelin, Eran Tal, Sefi Raz, Rachel Fachima, and Yaron Silberberg. 2004. "Depth-Resolved Structural Imaging by Third-Harmonic Generation Microscopy." *Journal of Structural Biology* 147 (1): 3–11. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00125-4).
- Ortega, Joseph K.E., Revathi P. Mohan, Cindy M. Munoz, Shankar Lalitha Sridhar, and Franck J. Vernerey. 2021. "Helical Growth during the Phototropic Response, Avoidance Response, and in Stiff Mutants of *Phycomyces Blakesleeanus*." *Scientific Reports* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-83254-5>.
- Ozcengiz, Gulay, and Arnold L. Demain. 2013. "Recent Advances in the Biosynthesis of Penicillins, Cephalosporins and Clavams and Its Regulation." *Biotechnology Advances* 31 (2): 287–311. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2012.12.001>.
- Pajić, Tanja, Katarina Stevanović, Nataša V. Todorović, Aleksandar J. Krmpot, Miroslav Živić, Svetlana Savić-Šević, Steva M. Lević, et al. 2024. "In Vivo Femtosecond Laser Nanosurgery of the Cell Wall Enabling Patch-Clamp Measurements on Filamentous Fungi." *Microsystems & Nanoengineering* 2024 10:1 10 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41378-024-00664-x>.
- Palero, Jonathan A, Arjen N Bader, Henriëtte S de Bruijn, Angélique van der Ploeg van den Heuvel, Henricus J C M Sterenborg, Hans C Gerritsen, B Chance, et al. 2011. "In Vivo Monitoring of Protein-

- Bound and Free NADH during Ischemia by Nonlinear Spectral Imaging Microscopy." *Biomedical Optics Express*, Vol. 2, Issue 5, Pp. 1030-1039 2 (5): 1030–39. <https://doi.org/10.1364/BOE.2.001030>.
- Parodi, Valentina, Emanuela Jacchetti, Roberto Osellame, Giulio Cerullo, Dario Polli, and Manuela Teresa Raimondi. 2020. "Nonlinear Optical Microscopy: From Fundamentals to Applications in Live Bioimaging." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (October). <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.585363>.
- Pasrija, Ritu, and Mohammad Naime. 2022. "Resolving the Equation between Mucormycosis and COVID-19 Disease." *Molecular Biology Reports*. Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07085-3>.
- Passoth, Volkmar. 2017. "Lipids of Yeasts and Filamentous Fungi and Their Importance for Biotechnology." *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*, June, 149–204. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58829-2_6.
- Pérez-Martín, José, Paola Bardetti, Sónia Castanheira, Antonio de la Torre, and María Tenorio-Gómez. 2016. "Virulence-Specific Cell Cycle and Morphogenesis Connections in Pathogenic Fungi." *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.017>.
- Perrone, Daniel, Mariana Monteiro, and Juliana Côrtes Nunes. 2015. "The Chemistry of Selenium." In *Food and Nutritional Components in Focus*, 2015-Janua:3–15. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782622215-00003>.
- Petschnigg, J, H Wolinski, D Kolb, G Zellnig, CF Kurat, K Natter, and SD Kohlwein. 2009. "Good Fat, Essential Cellular Requirements for Triacylglycerol Synthesis to Maintain Membrane Homeostasis in Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (45): 30981–93. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.024752>.
- Powers-Fletcher, Margaret V., Brian A. Kendall, Allen T. Griffin, and Kimberly E. Hanson. 2016. "Filamentous Fungi." *Microbiology Spectrum* 4 (3). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.DMIH2-0002-2015>.
- Prent, Nicole, Richard Cisek, Catherine Greenhalgh, Raymond Sparrow, Neeresh Rohitlall, Maike-Svenja Milkereit, Chantal Green, and Virginijus Barzda. 2005. "Applications of Nonlinear Microscopy for Studying the Structure and Dynamics in Biological Systems." *Photonic Applications in Nonlinear Optics, Nanophotonics, and Microwave Photonics* 5971: 597106. <https://doi.org/10.1117/12.628801>.
- Prole, D L, and C W Taylor. 2012. "Identification and Analysis of Cation Channel Homologues in Human Pathogenic Fungi." *PLoS ONE* 7 (8): 42404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042404>.
- Rabasović, Mihailo D., Dejan V. Pantelić, Branislav M. Jelenković, Srećko B. Čurčić, Maja S. Rabasović, Maja D. Vrbica, Vladimir M. Lazović, Božidar P. M. Čurčić, and Aleksandar J. Krmpot. 2015. "Nonlinear Microscopy of Chitin and Chitinous Structures: A Case Study of Two Cave-Dwelling Insects." *Journal of Biomedical Optics* 20 (01): 1. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.1.016010>.
- Rafelski, Susanne M. 2013. "Mitochondrial Network Morphology: Building an Integrative, Geometrical View." *BMC Biology* 11 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-71/FIGURES/3>.
- Rahmanto, Aldwin Suryo, and Michael J. Davies. 2012. "Selenium-Containing Amino Acids as Direct and Indirect Antioxidants." *IUBMB Life* 64 (11): 863–71. <https://doi.org/10.1002/IUB.1084>.
- Rambold, Angelika S., Sarah Cohen, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2015. "Fatty Acid Trafficking in Starved Cells: Regulation by Lipid Droplet Lipolysis, Autophagy, and Mitochondrial Fusion Dynamics [Developmental Cell 32 (2015) 678-692]." *Developmental Cell* 32 (6): 678–92. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.007>.
- Rambold, Angelika S., Brenda Kostecky, Natalie Elia, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2011. "Tubular Network Formation Protects Mitochondria from Autophagosomal Degradation during Nutrient Starvation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (25): 10190–95. https://doi.org/10.1073/PNAS.1107402108/SUPPL_FILE/PNAS.201107402SI.PDF.

- Ratledge, Colin. 2002. "Regulation of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms." *Biochemical Society Transactions* 30 (5): A101–A101. <https://doi.org/10.1042/bst030a101>.
- Rayman, Margaret P. 2012. "Selenium and Human Health." *Lancet (London, England)* 379 (9822): 1256–68. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9).
- Renne, Mike F., and Hanaa Hariri. 2021. "Lipid Droplet-Organellar Contact Sites as Hubs for Fatty Acid Metabolism, Trafficking, and Metabolic Channeling." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (September). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.726261>.
- Reue, Karen. 2011. "A Thematic Review Series: Lipid Droplet Storage and Metabolism: From Yeast to Man." *Journal of Lipid Research* 52 (11): 1865–68. <https://doi.org/10.1194/JLR.E020602>.
- Riley, Graham J.P. 1977. "The Subcellular Distribution of Carotenoids in *Phycomyces Blakesleeana*." University of London.
- Roberts, Stephen K. 2003. "TOK Homologue in *Neurospora Crassa*: First Cloning and Functional Characterization of an Ion Channel in a Filamentous Fungus." *Eukaryotic Cell* 2 (1): 181–90. <https://doi.org/10.1128/EC.2.1.181-190.2003>.
- Roberts, Stephen K., Graham K. Dixon, Stuart J. Dunbar, and Dale Sanders. 1997. "Laser Ablation of the Cell Wall and Localized Patch Clamping of the Plasma Membrane in the Filamentous Fungus *Aspergillus*: Characterization of an Anion-Selective Efflux Channel." *New Phytologist* 137 (4): 579–85. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00862.x>.
- Roberts, Stephen K., James Milnes, and Mark Caddick. 2011. "Characterisation of AnBEST1, a Functional Anion Channel in the Plasma Membrane of the Filamentous Fungus, *Aspergillus Nidulans*." *Fungal Genetics and Biology* 48 (9): 928–38. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2011.05.004>.
- Robey, Matthew T., Lindsay K. Caesar, Milton T. Drott, Nancy P. Keller, and Neil L. Kelleher. 2021. "An Interpreted Atlas of Biosynthetic Gene Clusters from 1,000 Fungal Genomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (19): e2020230118. https://doi.org/10.1073/PNAS.2020230118/SUPPL_FILE/PNAS.2020230118.SD01.XLSX.
- Rocheleau, Jonathan V., Paul W. Wiseman, and Nils O. Petersen. 2003. "Isolation of Bright Aggregate Fluctuations in a Multipopulation Image Correlation Spectroscopy System Using Intensity Subtraction." *Biophysical Journal* 84 (6): 4011–22. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75127-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75127-3).
- Ronchi, Paolo, Stefan Terjung, and Rainer Pepperkok. 2012. "At the Cutting Edge: Applications and Perspectives of Laser Nanosurgery in Cell Biology." *Biological Chemistry* 393 (4): 235–48. <https://doi.org/10.1515/hsz-2011-0237>.
- Sabuda, Mary C., Jacqueline Mejia, Megan Wedal, Brayden Kuester, Tingying Xu, and Cara M. Santelli. 2022. "The Effect of Organic Carbon Form and Concentration on Fungal Selenite Reduction." *Applied Geochemistry* 136 (January): 105163. <https://doi.org/10.1016/J.APGEOCHEM.2021.105163>.
- Schneider, Julie A. 1987. "Phycomyces in Space: A Problem in Bioengineering." NASA. *Goddard Space Flight Center The 1986 Get Away Special Experimenter's Symposium*.
- Segawa, Hiroki, Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, and Hiro-o Hamaguchi. 2012. "Label-Free Tetra-Modal Molecular Imaging of Living Cells with CARS, SHG, THG and TSFG (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, Second Harmonic Generation, Third Harmonic Generation and Third-Order Sum Frequency Generation)." *Optics Express* 20 (9): 9551. <https://doi.org/10.1364/oe.20.009551>.
- Selvaraj, Vellaisamy, Justin Tomblin, Mindy Yeager Armistead, and Elizabeth Murray. 2013. "Selenium (Sodium Selenite) Causes Cytotoxicity and Apoptotic Mediated Cell Death in PLHC-1 Fish Cell Line through DNA and Mitochondrial Membrane Potential Damage." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 87 (January): 80–88. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2012.09.028>.
- Shakoor, Adnan, Wendi Gao, Libo Zhao, Zhuangde Jiang, and Dong Sun. 2022. "Advanced Tools and Methods for Single-Cell Surgery." *Microsystems & Nanoengineering* 8 (1): 1–21.

- <https://doi.org/10.1038/s41378-022-00376-0>.
- Sharma, Ayushi, and Anjana Goel. 2022. "Mucormycosis: Risk Factors, Diagnosis, Treatments, and Challenges during COVID-19 Pandemic." *Folia Microbiologica* 67 (3): 363. <https://doi.org/10.1007/S12223-021-00934-5>.
- Shen, Sabrina C, Nicolas A Lee, William J Lockett, Aliai D Acuil, Hannah B Gazdus, Branden N Spitzer, and Markus J Buehler. 2024. "Robust Myco-Composites: A Biocomposite Platform for Versatile Hybrid-Living Materials." *Materials Horizons*. <https://doi.org/10.1039/d3mh01277h>.
- Siddhanta, Soumik, Santosh Kumar Paidi, Kathryn Bushley, Ram Prasad, and Ishan Barman. 2017. "Exploring Morphological and Biochemical Linkages in Fungal Growth with Label-Free Light Sheet Microscopy and Raman Spectroscopy." *ChemPhysChem* 18 (1): 72–78. <https://doi.org/10.1002/cphc.201601062>.
- Silverman-Gavrila, Lorelei B., and Roger R. Lew. 2002. "An IP₃-Activated Ca²⁺ Channel Regulates Fungal Tip Growth." *Journal of Cell Science* 115 (24): 5013–25. <https://doi.org/10.1242/jcs.00180>.
- Simonin, Anna, Javier Palma-Guerrero, Mark Fricker, and N. Louise Glass. 2012. "Physiological Significance of Network Organization in Fungi." *Eukaryotic Cell* 11 (11): 1345–52. https://doi.org/10.1128/EC.00213-12/SUPPL_FILE/ZEK999093986SO1.PDF.
- Singh, Simranjeet, Vijay Kumar, Daljeet Singh Dhanjal, Siddharth Thotapalli, Sonali, and Joginder Singh. 2020. "Importance and Recent Aspects of Fungal-Based Biosensors." *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Recent Advances in Application of Fungi and Fungal Metabolites: Biotechnological Interventions and Futuristic Approaches*, January, 301–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821008-6.00018-9>.
- Slater, Katie, Jeff Partridge, and Himabindu Nandivada. 2018. "Tuning the Elastic Moduli of Corning[®] Matrigel[®] and Collagen I 3D Matrices by Varying the Protein Concentration Application Note." *Corning Incorporated, Life Sciences* 1 (1): 1–8.
- Slenders, Eli, Hannelore Bové, Mathias Urbain, Yannick Mugnier, Ali Yasin Sonay, Periklis Pantazis, Luigi Bonacina, Pieter Vanden Berghe, Martin Vandeven, and Marcel Ameloot. 2018. "Image Correlation Spectroscopy with Second Harmonic Generating Nanoparticles in Suspension and in Cells." *Journal of Physical Chemistry Letters* 9 (20): 6112–18. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.8b02686>.
- Slimen, Imen Belhadj, Taha Najar, Abdeljelil Ghram, Hajer Dabbebi, Moncef Ben Mrad, and Manef Abdrabbah. 2014. "Reactive Oxygen Species, Heat Stress and Oxidative-Induced Mitochondrial Damage. A Review." *International Journal of Hyperthermia* 30 (7): 513–23. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>.
- Small, David M., Jason S. Jones, Irwin I. Tandler, Paul E. Miller, Andre Ghatti, and Nozomi Nishimura. 2018. "Label-Free Imaging of Atherosclerotic Plaques Using Third-Harmonic Generation Microscopy." *Biomedical Optics Express* 9 (1): 214. <https://doi.org/10.1364/boe.9.000214>.
- Smith, Sally, and David Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. 3rd ed. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>.
- Spallholz, Julian E., Vince P. Palace, and Ted W. Reid. 2004. "Methioninase and Selenomethionine but Not Se-Methylselenocysteine Generate Methylselenol and Superoxide in an in Vitro Chemiluminescent Assay: Implications for the Nutritional Carcinostatic Activity of Selenoamino Acids." *Biochemical Pharmacology* 67 (3): 547–54. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.09.004>.
- Spatafora, Joseph W., M. Catherine Aime, Igor V. Grigoriev, Francis Martin, Jason E. Stajich, and Meredith Blackwell. 2017. "The Fungal Tree of Life: From Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies." *Microbiology Spectrum* 5 (5). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0053-2016>.
- Sperelakis, Nicholas. 2011. *Cell Physiology Source Book: Essentials of Membrane Biophysics*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66479-0>.

- Sprenger, Hans Georg, and Thomas Langer. 2019. "The Good and the Bad of Mitochondrial Breakups." *Trends in Cell Biology* 29 (11): 888–900. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2019.08.003>.
- Srinivasan, Naganandhini, Kiruthika Thangavelu, and Sivakumar Uthandi. 2022. "Lovastatin Production by an Oleaginous Fungus, *Aspergillus Terreus* KPR12 Using Sago Processing Wastewater (SWW)." *Microbial Cell Factories* 21 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12934-022-01751-2/FIGURES/8>.
- Stanić, Marina, Joanna Zakrzewska, Mirzeta Hadžibrahimović, Milan Žižić, Zoran Marković, Željko Vučinić, and Miroslav Živić. 2013. "Oxygen Regulation of Alternative Respiration in Fungus *Phycomyces Blakesleeanus*: Connection with Phosphate Metabolism." *Research in Microbiology* 164 (7): 770–78. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2013.03.002>.
- Stanić, Marina, M. Živić, Mirzeta Hadžibrahimović, Aleksandra Pajdić, S. Križak, M. Žižić, and Joanna Zakrzewska. 2014. "Effect of Long-Term Cyanide Exposure on Cyanide-Sensitive Respiration and Phosphate Metabolism in the Fungus *Phycomyces Blakesleeanus*." *Archives of Biological Sciences* 66 (2): 847–57. <https://doi.org/10.2298/ABS1402847S>.
- Stevanović, Katarina S., Bogdana Čepkenović, Strahinja Križak, Tanja Pajić, Nataša V. Todorović, and Miroslav Živić. 2023. "ATP Modulation of Osmotically Activated Anionic Current in the Membrane of *Phycomyces Blakesleeanus* Sporangiophore." *Scientific Reports* 13 (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-023-39021-9>.
- Stevanović, Katarina S. 2023. "Dominantne Struje Ćelijske Membrane Hifa i Membrane Citoplazmatskih Kapi Poreklom Iz Sporangiofora Gljive *Phycomyces Blakesleeanus*: Karakterizacija Izlazno-Ispravljачke Inaktivirajuće Struje Citoplazmatskih Kapi." *Универзитет у Београду. Универзитет у Београду, Студије при универзитету*. <https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/21935>.
- Strong, Peter James, Rachel Self, Kathrine Allikian, Edyta Szewczyk, Robert Speight, Ian O'Hara, and Mark D. Harrison. 2022. "Filamentous Fungi for Future Functional Food and Feed." *Current Opinion in Biotechnology* 76 (August): 102729. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2022.102729>.
- Suelmann, R, and R Fischer. 2000. "Mitochondrial Movement and Morphology Depend on an Intact Actin Cytoskeleton in *Aspergillus Nidulans*." *Cell Motil Cytoskeleton* 45 (1): 42–50. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(200001\)45:1<42::AID-CM4>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(200001)45:1<42::AID-CM4>3.0.CO;2-C).
- Sun, Chi-Kuang, Cheng-Chi Chen, Shi-Wei Chu, Tsung-Han Tsai, Yung-Chih Chen, and Bai-Ling Lin. 2003. "Multiharmonic-Generation Biopsy of Skin." *Optics Letters* 28 (24): 2488. <https://doi.org/10.1364/ol.28.002488>.
- Sun, Chi Kuang, Shi Wei Chu, Szu Yu Chen, Tsung Han Tsai, Tzu Ming Liu, Chung Yung Lin, and Huai Jen Tsai. 2004. "Higher Harmonic Generation Microscopy for Developmental Biology." *Journal of Structural Biology* 147 (1): 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.10.017>.
- Sun, S, V Furtula, and E A Nothnagel. 1992. "Mechanical Release and Lectin Labeling of Maize Root Protoplasts." *Protoplasma*. Vol. 169. Springer-Verlag.
- Sutter, Richard P. 1975. "Mutations Affecting Sexual Development in *Phycomyces Blakesleeanus* (Car Mutants/Defined Medium)" 72 (1): 127–30. <https://www.pnas.org>.
- Suzuki, Michitaka, Yuki Shinohara, Yuki Ohsaki, and Toyoshi Fujimoto. 2011. "Lipid Droplets: Size Matters." *Journal of Electron Microscopy* 60 (SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfr016>.
- Tansey, M. R., and T. D. Brock. 1972. "The Upper Temperature Limit for Eukaryotic Organisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (9): 2426. <https://doi.org/10.1073/PNAS.69.9.2426>.
- Tatenaka, Yuki, Hironori Kato, Munetaka Ishiyama, Kazumi Sasamoto, Masanobu Shiga, Hideki Nishitoh, and Yuichiro Ueno. 2019. "Monitoring Lipid Droplet Dynamics in Living Cells by Using Fluorescent Probes." *Biochemistry* 58 (6): 499–503. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.8B01071/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2018-010712_0004.JPEG.

- Tauchi-Sato, Kumi, Shintaro Ozeki, Toshiaki Houjou, Ryo Taguchi, and Toyoshi Fujimoto. 2002. "The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 44507–12. <https://doi.org/10.1074/JBC.M207712200>.
- Taylor, Alison R, and Colin Brownlee. 1992. "Localized Patch Clamping of Plasma Membrane of a Polarized Plant Cell: Laser Microsurgery of the Fucus Spiralis Rhizoid Cell Wall." *Plant Physiology* 99 (4): 1686–88. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1686>.
- Teo, Wulin, Andrew V. Caprariello, Megan L. Morgan, Antonio Luchicchi, Geert J. Schenk, Jeffrey T. Joseph, Jeroen J.G. Geurts, and Peter K. Stys. 2021. "Nile Red Fluorescence Spectroscopy Reports Early Physicochemical Changes in Myelin with High Sensitivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (8): e2016897118. https://doi.org/10.1073/PNAS.2016897118/SUPPL_FILE/PNAS.2016897118.SAPP.PDF.
- Terzioglu, Mügen, Kristo Veeroja, Toni Montonen, Teemu O. Ihalainen, Tiina S. Salminen, Paule Bénit, Pierre Rustin, Young Tae Chang, Takeharu Nagai, and Howard T. Jacobs. 2023. "Mitochondrial Temperature Homeostasis Resists External Metabolic Stresses." *ELife* 12. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.89232>.
- Thiam, Abdou Rachid, and Mathias Beller. 2017. "The Why, When and How of Lipid Droplet Diversity." *Journal of Cell Science* 130 (2): 315–24. <https://doi.org/10.1242/JCS.192021>.
- Thiam, Abdou Rachid, Robert V. Farese, and Tobias C. Walther. 2013. "The Biophysics and Cell Biology of Lipid Droplets." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nrm3699>.
- Thiam, Abdou Rachid, and Elina Ikonen. 2021. "Lipid Droplet Nucleation." *Trends in Cell Biology* 31 (2): 108–18. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2020.11.006>.
- Thiele, Christoph, and Johanna Spandl. 2008. "Cell Biology of Lipid Droplets." *Current Opinion in Cell Biology* 20 (4): 378–85. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2008.05.009>.
- Tinkov, Alexey A., Olga P. Ajsuvakova, Tommaso Filippini, Ji Chang Zhou, Xin Gen Lei, Eugenia R. Gatiatulina, Bernhard Michalke, et al. 2020. "Selenium and Selenoproteins in Adipose Tissue Physiology and Obesity." *Biomolecules* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/BIOM10040658>.
- Tirlapur, Uday K., and Karsten König. 2002. "Femtosecond Near-Infrared Laser Pulses as a Versatile Non-Invasive Tool for Intra-Tissue Nanoprocessing in Plants without Compromising Viability." *The Plant Journal* 31 (3): 365–74. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2002.01346.X>.
- Tokarz, Danielle, Richard Cisek, Serguei Krouglov, Lukas Kontenis, Ulrich Fekl, and Virginijus Barzda. 2014. "Molecular Organization of Crystalline β -Carotene in Carrots Determined with Polarization-Dependent Second and Third Harmonic Generation Microscopy." *Journal of Physical Chemistry B* 118 (14): 3814–22. <https://doi.org/10.1021/jp411387p>.
- Torres, Fábio Aurélio Esteves, Bruna Regina Zaccarim, Letícia Celia de Lencastre Novaes, Angela Faustino Jozala, Carolina Alves dos Santos, Maria Francisca Simas Teixeira, and Valéria Carvalho Santos-Ebinuma. 2016. "Natural Colorants from Filamentous Fungi." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (6): 2511–21. <https://doi.org/10.1007/S00253-015-7274-X>.
- Tronstad, Karl, Marco Nooteboom, Linn Nilsson, Julie Nikolaisen, Maciek Sokolewicz, Sander Grefte, Ina Pettersen, et al. 2014. "Regulation and Quantification of Cellular Mitochondrial Morphology and Content." *Current Pharmaceutical Design* 20 (35): 5634–52. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140305230546>.
- Tsai, Cheng-Kun, Yu-Shing Chen, Pei-Chun Wu, Tsung-Yuan Hsieh, Han-Wen Liu, Chiou-Yueh Yeh, Win-Li Lin, Jean-San Chia, and Tzu-Ming Liu. 2012. "Imaging Granularity of Leukocytes with Third Harmonic Generation Microscopy." *Biomedical Optics Express* 3 (9): 2234. <https://doi.org/10.1364/boe.3.002234>.
- Tserevelakis, G. J., G. Filippidis, A. J. Krmpot, M. Vlachos, C. Fotakis, and N. Tavernarakis. 2010. "Imaging

- Caenorhabditis Elegans Embryogenesis by Third-Harmonic Generation Microscopy." *Micron* 41 (5): 444–47. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.02.006>.
- Tserevelakis, George J., Evgenia V. Megalou, George Filippidis, Barbara Petanidou, Costas Fotakis, and Nektarios Tavernarakis. 2014. "Label-Free Imaging of Lipid Depositions in *C. Elegans* Using Third-Harmonic Generation Microscopy." *PLoS ONE* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084431>.
- Tserevelakis, George J., Stylianos Psycharakis, Bojan Resan, Felix Brunner, Evagelia Gavgiotaki, Kurt Weingarten, and George Filippidis. 2012. "Femtosecond Laser Nanosurgery of Sub-Cellular Structures in HeLa Cells by Employing Third Harmonic Generation Imaging Modality as Diagnostic Tool." *Journal of Biophotonics* 5 (2): 200–207. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100055>.
- Twig, Gilad, Alvaro Elorza, Anthony J.A. Molina, Hibo Mohamed, Jakob D. Wikstrom, Gil Walzer, Linsey Stiles, et al. 2008. "Fission and Selective Fusion Govern Mitochondrial Segregation and Elimination by Autophagy." *The EMBO Journal* 27 (2): 433–46. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601963>.
- Twig, Gilad, Brigham Hyde, and Orian S. Shirihai. 2008. "Mitochondrial Fusion, Fission and Autophagy as a Quality Control Axis: The Bioenergetic View." *Biochimica et Biophysica Acta* 1777 (9): 1092–97. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2008.05.001>.
- Tyśkiewicz, Renata, Artur Nowak, Ewa Ozimek, and Jolanta Jaroszuk-ściseł. 2022. "Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (4). <https://doi.org/10.3390/IJMS23042329>.
- Uchugonova, Aisada. 2012. "Nanosurgery of Cells and Chromosomes Using Near-Infrared Twelve-Femtosecond Laser Pulses." *Journal of Biomedical Optics* 17 (10): 101502. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.17.10.101502>.
- Unger, Roger H., Gregory O. Clark, Philipp E. Scherer, and Lelio Orci. 2010. "Lipid Homeostasis, Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome." *Biochimica et Biophysica Acta* 1801 (3): 209–14. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2009.10.006>.
- Valera-Alberní, Miriam, and Carles Canto. 2018. "Mitochondrial Stress Management: A Dynamic Journey." *Cell Stress* 2 (10): 253. <https://doi.org/10.15698/CST2018.10.158>.
- Veech, Richard L., Michael Todd King, Robert Pawlosky, Yoshihiro Kashiwaya, Patrick C. Bradshaw, and William Curtis. 2019. "The 'Great' Controlling Nucleotide Coenzymes." *Iubmb Life* 71 (5): 565. <https://doi.org/10.1002/IUB.1997>.
- Verma, Surbhi, Viplendra P.S. Shakya, and Alexander Idnurm. 2018. "Exploring and Exploiting the Connection between Mitochondria and the Virulence of Human Pathogenic Fungi." *Virulence* 9 (1): 426–46. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1414133>.
- Véry, Anne Aliénor, and Julia M Davies. 1998. "Laser Microsurgery Permits Fungal Plasma Membrane Single-Ion-Channel Resolution at the Hyphal Tip." *Applied and Environmental Microbiology* 64 (4): 1569–72. <https://doi.org/10.1128/aem.64.4.1569-1572.1998>.
- Vogel, A., J. Noack, G. Hüttman, and G. Paltauf. 2005. "Mechanisms of Femtosecond Laser Nanosurgery of Cells and Tissues." *Applied Physics B: Lasers and Optics*. <https://doi.org/10.1007/s00340-005-2036-6>.
- Vogel, Alfred, and Vasan Venugopalan. 2003. "Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues." *Chemical Reviews* 103 (2): 577–644. <https://doi.org/10.1021/cr010379n>.
- Wadhwani, Sweetie A., Utkarsha U. Shedbalkar, Richa Singh, and Balu A. Chopade. 2016. "Biogenic Selenium Nanoparticles: Current Status and Future Prospects." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (6): 2555–66. <https://doi.org/10.1007/S00253-016-7300-7/METRICS>.
- Wainright, Patricia O., Gregory Hinkle, Mitchell L. Sogin, and Shawn K. Stickel. 1993. "Monophyletic Origins of the Metazoa: An Evolutionary Link with Fungi." *Science* 260 (5106): 340–42. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8469985>.

- Walther, Grit, Lysett Wagner, and Oliver Kurzai. 2020. "Outbreaks of Mucorales and the Species Involved." *Mycopathologia*. Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00403-1>.
- Walther, Tobias C., and Robert V. Farese. 2009. "The Life of Lipid Droplets." *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (6): 459–66. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2008.10.009>.
- Walther, Tobias C, Jeeyun Chung, and Robert V Farese. 2017. "Lipid Droplet Biogenesis." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616>.
- Wang, Hong, Urmilla Sreenevasan, Hong Hu, Andrew Saladino, Brian M. Polster, Linda M. Lund, Da Wei Gong, William C. Stanley, and Carole Sztalryd. 2011. "Perilipin 5, a Lipid Droplet-Associated Protein, Provides Physical and Metabolic Linkage to Mitochondria." *Journal of Lipid Research* 52 (12): 2159–68. <https://doi.org/10.1194/JLR.M017939>.
- Watanabe, Tomoko, Anisha Thayil, Alexander Jesacher, Kate Grieve, Delphine Debarre, Tony Wilson, Martin Booth, and Shankar Srinivas. 2010. "Characterisation of the Dynamic Behaviour of Lipid Droplets in the Early Mouse Embryo Using Adaptive Harmonic Generation Microscopy." *BMC Cell Biology* 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-38>.
- Weekley, Claire M., and Hugh H. Harris. 2013. "Which Form Is That? The Importance of Selenium Speciation and Metabolism in the Prevention and Treatment of Disease." *Chemical Society Reviews* 42 (23): 8870–94. <https://doi.org/10.1039/C3CS60272A>.
- Weigelin, Bettina, Gert-Jan Bakker, and Peter Friedl. 2012. "Intravital Third Harmonic Generation Microscopy of Collective Melanoma Cell Invasion." *IntraVital* 1 (1): 32–43. <https://doi.org/10.4161/intv.21223>.
- Weigelin, Bettina, Gert Jan Bakker, and Peter Friedl. 2016. "Third Harmonic Generation Microscopy of Cells and Tissue Organization." *Journal of Cell Science* 129 (2): 245–55. <https://doi.org/10.1242/jcs.152272>.
- Weiss, J., and M. H. Weisenseel. 1990. "Blue Light-Induced Changes in Membrane Potential and Intracellular PH of Phycomyces Hyphae." *Journal of Plant Physiology* 136 (1): 78–85. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81619-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81619-6).
- Weng, Li Chi, Buntora Pasaribu, I. Ping Lin, Ching Hsiu Tsai, Chii Shiarng Chen, and Pei Luen Jiang. 2014. "Nitrogen Deprivation Induces Lipid Droplet Accumulation and Alters Fatty Acid Metabolism in Symbiotic Dinoflagellates Isolated from Aiptasia Pulchella." *Scientific Reports* 4: 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep05777>.
- Werkneh, Adhena Ayaliw, Gebretsadkan Gebremedhin Gebretsadik, and Shifare Berhe Gebru. 2023. "Review on Environmental Selenium: Occurrence, Public Health Implications and Biological Treatment Strategies." *Environmental Challenges* 11 (April): 100698. <https://doi.org/10.1016/J.ENVC.2023.100698>.
- Westermann, Benedikt. 2012. "Bioenergetic Role of Mitochondrial Fusion and Fission." *Biochimica et Biophysica Acta* 1817 (10): 1833–38. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2012.02.033>.
- Westermann, Benedikt, and Holger Prokisch. 2002. "Mitochondrial Dynamics in Filamentous Fungi." *Fungal Genetics and Biology : FG & B* 36 (2): 91–97. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00019-1).
- Wikandari, Rachma, Daniel Reinhart Tanugraha, Anang Juni Yastanto, Manikharda, Rebecca Gmoser, and José António Teixeira. 2023. "Development of Meat Substitutes from Filamentous Fungi Cultivated on Residual Water of Tempeh Factories." *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 997 28 (3): 997. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28030997>.
- Wilfling, Florian, Joel T. Haas, Tobias C. Walther, and Robert V. Farese Jr. 2014. "Lipid Droplet Biogenesis." *Current Opinion in Cell Biology* 29 (1): 39–45. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2014.03.008>.
- Wiseman, P. W., J. A. Squier, M. H. Ellisman, and K. R. Wilson. 2000. "Two-Photo Image Correlation

- Spectroscopy and Image Cross-Correlation Spectroscopy." *Journal of Microscopy* 200 (1): 14–25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00736.x>.
- Witte, Stefan, Adrian Negrean, Johannes C. Lodder, Christiaan P.J. De Kock, Guilherme Testa Silva, Huibert D. Mansvelder, and Marie Louise Groot. 2011. "Label-Free Live Brain Imaging and Targeted Patching with Third-Harmonic Generation Microscopy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (15): 5970–75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018743108>.
- Wood, Steven M., Carla Beckham, Ayako Yosioka, Hamid Darban, and Ronald R. Watson. 2000. "β-Carotene and Selenium Supplementation Enhances Immune Response in Aged Humans." *Integrative Medicine* 2 (2–3): 85–92. [https://doi.org/10.1016/S1096-2190\(00\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S1096-2190(00)00009-3).
- World Health Organization. 2022. *WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action*. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Vol. 1.
- Wösten, Han A.B. 2019. "Filamentous Fungi for the Production of Enzymes, Chemicals and Materials." *Current Opinion in Biotechnology* 59 (October): 65–70. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2019.02.010>.
- Xiang, Nong, Rui Zhao, and Weixiong Zhong. 2009. "Sodium Selenite Induces Apoptosis by Generation of Superoxide via the Mitochondrial-Dependent Pathway in Human Prostate Cancer Cells." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 63 (2): 351–62. <https://doi.org/10.1007/S00280-008-0745-3>.
- Yasuda, Mitsuru, Norio Takeshita, and Shinsuke Shigeto. 2019. "Inhomogeneous Molecular Distributions and Cytochrome Types and Redox States in Fungal Cells Revealed by Raman Hyperspectral Imaging Using Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares." Research-article. *Analytical Chemistry* 91 (19): 12501–8. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03261>.
- Yelin, D, and Y Silberberg. 1999. "Laser Scanning Third-Harmonic-Generation Microscopy in Biology" 5 (8): 169–75.
- Yi, Yung-Hsiang, Cheng-Hao Chien, Wei-Wen Chen, Tian-Hsiang Ma, Kuan-Yu Liu, Yu-Sun Chang, Ta-Chau Chang, and Szecheng J. Lo. 2013. "Lipid Droplet Pattern and Nondroplet-like Structure in Two Fat Mutants of *Caenorhabditis Elegans* Revealed by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy." *Journal of Biomedical Optics* 19 (1): 011011. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.1.011011>.
- Yoshimi, Akira, Ken Miyazawa, Moriyuki Kawauchi, and Keietsu Abe. 2022. "Cell Wall Integrity and Its Industrial Applications in Filamentous Fungi." *Journal of Fungi*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof8050435>.
- Yu, Marcia M.L., Stanislav O. Konorov, H. Georg Schulze, Michael W. Blades, Robin F.B. Turner, and Reinhard Jetter. 2008. "In Situ Analysis by Microspectroscopy Reveals Triterpenoid Compositional Patterns within Leaf Cuticles of *Prunus Laurocerasus*." *Planta* 227 (4): 823–34. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0659-z>.
- Yu, Yadong, Tao Li, Na Wu, Ling Jiang, Xiaojun Ji, and He Huang. 2017. "The Role of Lipid Droplets in *Mortierella Alpina* Aging Revealed by Integrative Subcellular and Whole-Cell Proteome Analysis." *Scientific Reports* 2017 7:1 7 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep43896>.
- Zahedi, Atena, Vincent On, Rattapol Phandthong, Angela Chaili, Guadalupe Remark, Bir Bhanu, and Prue Talbot. 2018. "Deep Analysis of Mitochondria and Cell Health Using Machine Learning." *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34455-y>.
- Zechner, Rudolf. 2015. "FAT FLUX : Enzymes, Regulators, and Pathophysiology of Intracellular Lipolysis ." *EMBO Molecular Medicine* 7 (4): 359–62. <https://doi.org/10.15252/EMMM.201404846/ASSET/736F3764-1433-4920-B609-7C1CE1A500A4/ASSETS/GRAPHIC/EMMM201404846-BIO-0001.PNG>.
- Zemirli, Naima, Etienne Morel, and Diana Molino. 2018. "Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2).

- <https://doi.org/10.3390/IJMS19020564>.
- Zhang, Chi, and Stephen A. Boppart. 2020. "Dynamic Signatures of Lipid Droplets as New Markers to Quantify Cellular Metabolic Changes." *Analytical Chemistry* 92 (24): 15943–52. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.0C03366>.
- Zhang, Chi, Junjie Li, Lu Lan, and Ji-Xin Cheng. 2017. "Quantification of Lipid Metabolism in Living Cells through the Dynamics of Lipid Droplets Measured by Stimulated Raman Scattering Imaging." *Analytical Chemistry* 89 (8): 4502–7. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04699>.
- Zhang, Gaochuan, Xingyun Yao, Chonglong Wang, Dahui Wang, and Gongyuan Wei. 2019. "Transcriptome Analysis Reveals the Mechanism Underlying Improved Glutathione Biosynthesis and Secretion in *Candida Utilis* during Selenium Enrichment." *Journal of Biotechnology* 304 (October): 89–96. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2019.08.015>.
- Zhang, Henglin, Hao Zhou, Jiandong Bai, Yan Li, Jing Yang, Qiao Ma, and Yuanyuan Qu. 2019. "Biosynthesis of Selenium Nanoparticles Mediated by Fungus *Mariannaea* Sp. HJ and Their Characterization." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 571 (June): 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2019.02.070>.
- Zhang, Xue, Ang Ren, Meng Jiao Li, Peng Fei Cao, Tian Xi Chen, Guang Zhang, Liang Shi, Ai Liang Jiang, and Ming Wen Zhao. 2016. "Heat Stress Modulates Mycelium Growth, Heat Shock Protein Expression, Ganoderic Acid Biosynthesis, and Hyphal Branching of *Ganoderma Lucidum* via Cytosolic Ca²⁺." *Applied and Environmental Microbiology* 82 (14): 4112–25. <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-16>.
- Zhao, Chang, and Francesco Tombola. 2021. "Voltage-Gated Proton Channels from Fungi Highlight Role of Peripheral Regions in Channel Activation." *Communications Biology* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01792-0>.
- Zhou, Xin Liang, Mary Ann Stumpf, Harvey C. Hoch, and Ching Kung. 1991. "A Mechanosensitive Channel in Whole Cells and in Membrane Patches of the Fungus *Uromyces*." *Science* 253 (5026): 1415–17. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1716786>.
- Živić, Miroslav, Marko Popović, Nataša Todorović, and Željko Vučinić. 2009. "Outwardly Rectifying Anionic Channel from the Plasma Membrane of the Fungus *Phycomyces Blakesleeana*." *Eukaryotic Cell* 8 (9): 1439. <https://doi.org/10.1128/EC.00059-09>.
- Živić, Miroslav, Marko Popović, Branka Živanović, and Željko Vučinić. 2005. "A New Model System for Investigation of Ionic Channels in Filamentous Fungi: Evidence for Existence of Two K⁺-Permeable Ionic Channels in *Phycomyces Blakesleeana*." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1048: 491–95. <https://doi.org/10.1196/annals.1342.075>.
- Žižić, Milan, Marina Stanić, Giuliana Aquilanti, Danica Bajuk-Bogdanović, Goran Branković, Ivanka Rodić, Miroslav Živić, and Joanna Zakrzewska. 2022. "Biotransformation of Selenium in the Mycelium of the Fungus *Phycomyces Blakesleeana*." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 414 (20): 6213–22. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04191-4>.

Biografija autora

Tanja Pajić je rođena 4. maja 1985. godine u Požarevcu. Završila je integrisane studije Opšte biologije, smer Fiziologija životinja, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2016. godine. Diplomirala je na temi „Uticaj blokatora anjonskih kanala na rast sporangiofora gljive *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff, 1925“. Tokom studija bila je aktivni član Studentske sekcije za neuronauke Društva za neuronauke Srbije, gde je kao organizator i volonter učestvovala u popularizaciji neuronauka i organizovanju manifestacija kao što su Festival nauke, Nedelja svesti o mozgu i druge. Na odeljenju za biofiziku, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, je kao volonter radila na primeni kvantitativnih metoda za analizu slika histoloških preparata nervnog i kardiovaskularnog tkiva od 2011. do 2013. godine. Multidisciplinarne doktorske studije pri Univerzitetu u Beogradu, studijski program Biofotonika je upisala 2016. godine i eksperimentalni deo teze je radila u Laboratoriji za Biofiziku, Instituta za fiziku u Beogradu. Tokom izrade disertacije, Tanja se bavila primenom femtosekundne laserske nanohirurgije ćelijskog zida končastih gljiva, kao i oslikavanjem njihovog metabolizma primenom različitih modaliteta nelinearne mikroskopije. Od 2018. godine je zaposlena na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku. Obučavala je mlađe studente i učestvovala u izvođenju 3 master rada studenata na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku. Godine 2019. je boravila na tromesečnom usavršavanju u Centru za molekularnu medicinu na Karolinska Institutu u Stokholmu (Švedska), gde se bavila fluorescentnom korelacionom mikroskopijom. Bila je angažovana na jednom nacionalnom projektu i trenutno je angažovana na jednom nacionalnom i jednom međunarodnom Evropskom projektu. U okviru doktorske disertacije publikovala je 2 naučna rada u međunarodnim časopisima kategorije M21a i M21. Koautor je još 2 naučne publikacije i autor i koautor 24 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 7 saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Član je više naučnih društava: Društvo biofizičara Srbije, Srpsko biološko društvo, Optičko društvo Srbije, Srpsko društvo za mikroskopiju i Srpsko društvo za bioinformatiku i računarsku biologiju.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Тања М.Д. Пајић

Број индекса 55/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена савремених техника нелинеарне оптичке микроскопије *in vivo* на
проучавање физиологије кончастих гљива

- 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 кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тања М.Д. Пајић

Број индекса 55/2016

Студијски програм Биофотоника

Наслов рада Примена савремених техника нелинеарне оптичке микроскопије *in vivo* на проучавање физиологије кончастих гљива

Ментори Др Михаило Рабасовић

Др Мирослав Живић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Примена савремених техника нелинеарне оптичке микроскопије *in vivo* на проучавање физиологије кончастих гљива

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

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

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

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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