



# Organizmy modelowe

Grzyby strzępkowe  
(filamentalne)

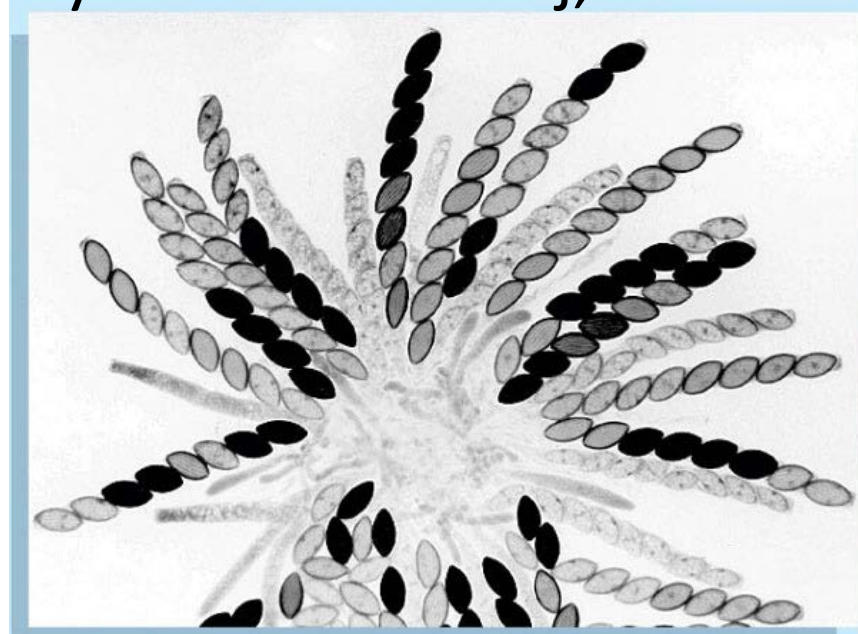
dr hab Agnieszka Dzikowska

Instytut Genetyki i Biotechnologii

Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel

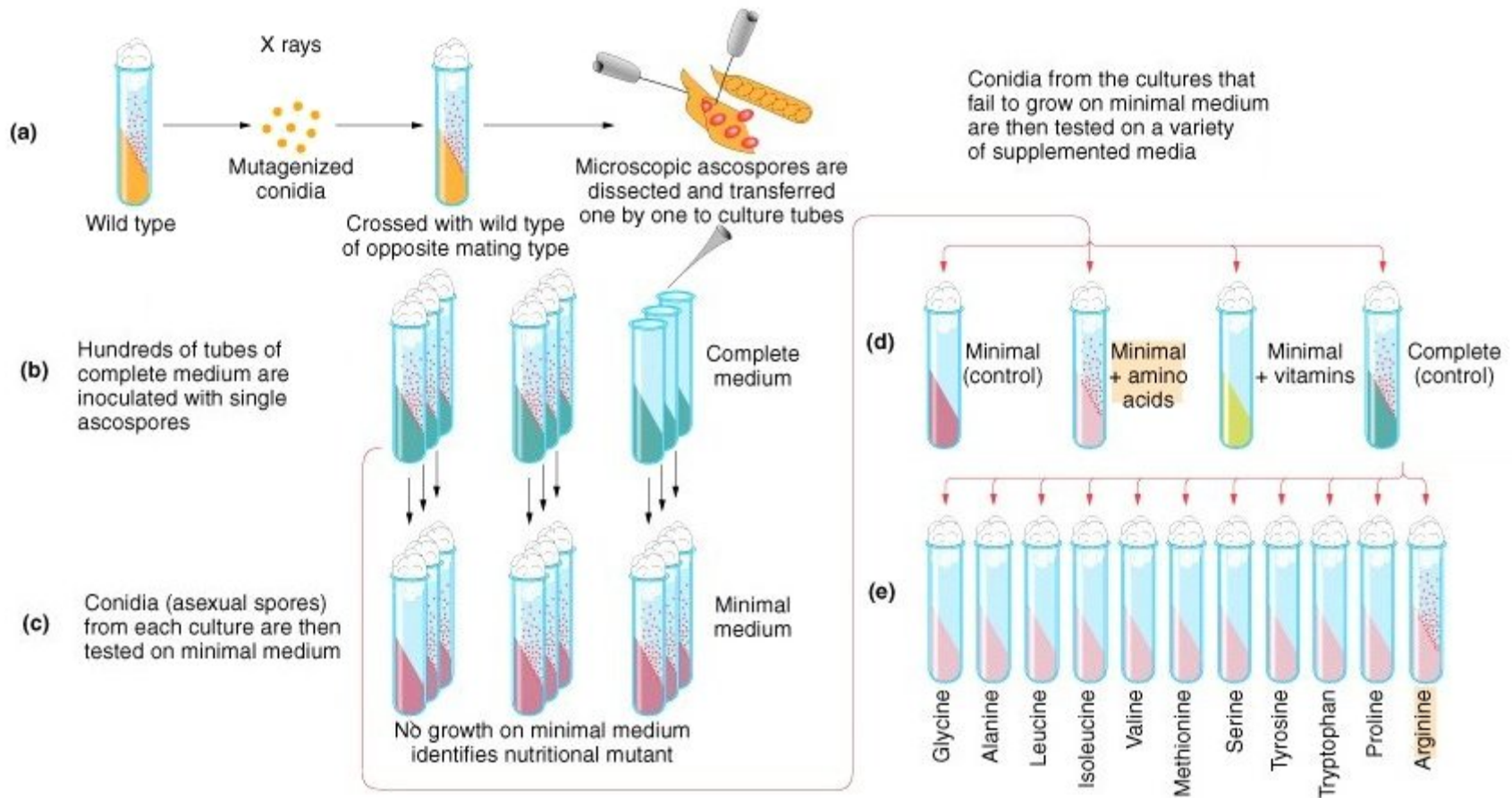
# Hipoteza jeden gen –jeden enzym

- George Beadle i Edward Tatum (publikacja w 1941; Nagroda Nobla 1958)
- Jako model wybrali *Neurospora crassa* (workowiec, w cyklu płciowym wytwarza askospory, można hodować na zdefiniowanej pożywce minimalnej, były opracowane metody genetyki klasycznej)



# Eksperyment Beadl'a

## 1) Izolacja mutantów aukstotroficznych arg<sup>-</sup>



Addition of arginine to minimal medium restores growth

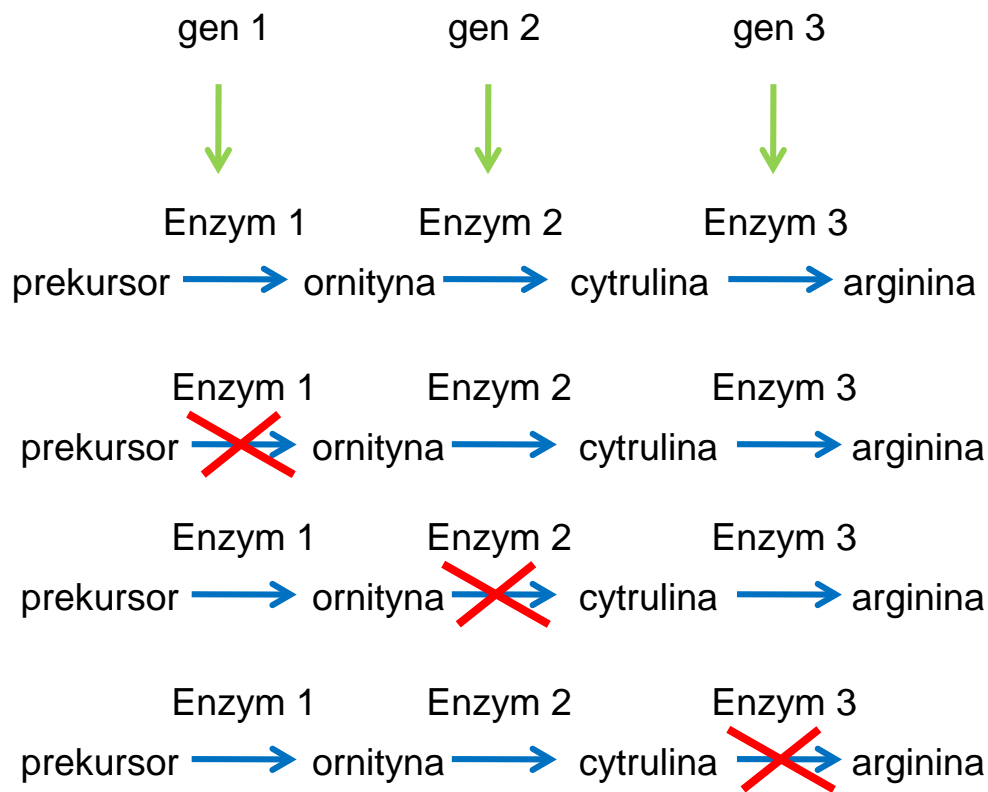


# Eksperyment Beadl'a

## 2) jeden gen – jeden enzym

identyfikacja enzymów, których brakuje w konkretnym mutancie w testach wzrostowych na prekursorach arginy

	MM	MM+ornityna	MM+cytrulina	MM+arginina
wt	✓	✓	✓	✓
mutacja w genie 1	✗	✓	✓	✓
mutacja w genie 2	✗	✗	✓	✓
mutacja w genie 3	✗	✗	✗	✓



✗ Brak wzrostu na danym prekursorze      ✓ Brak wzrostu na danym prekursorze

# Grzyby strzępkowe jako organizmy modelowe w dzisiejszych czasach

Grzyby strzępkowe są istotne, gdyż:

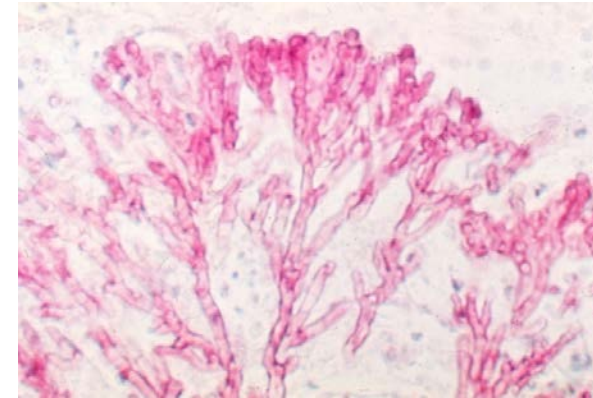
- są patogenami zwierząt i roślin
- mają ogromne znaczenie w biotechnologii

W badaniach podstawowych są dobrym modelem

- w biologii komórki
- w badaniach specyficznych systemów regulacji genetycznej

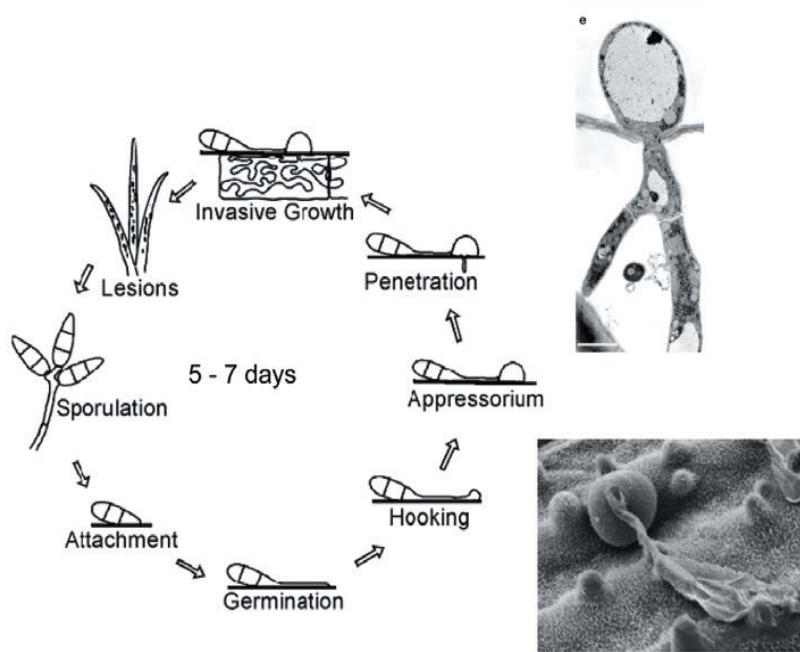
# Grzyby strzępkowe – patogeny zwierząt i człowieka

- *Aspergillus fumigatus* - patogen oportunistyczny
- Szczególnie narażeni pacjenci o obniżonej odporności (AIDS, leki immunosupresyjne po przeszczepach)
- Alergie płucne
- Chroniczna inwazyjna aspergilloza płuc
- Aspergilloza centralnego układu nerwowego
- Skuteczne nieliczne antybiotyki, jak amfoterycyna B , flukonazol czy worikonazol



# Grzyby strzępkowe – patogeny roślin

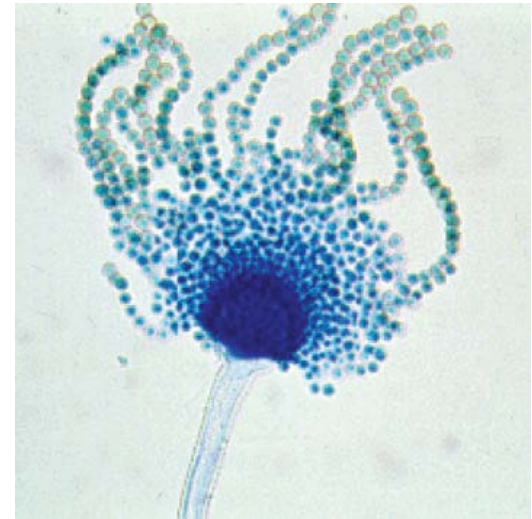
*Magnaporthe oryzae*  
rice blast disease



# Grzyby strzępkowe – patogeny roślin

*Aspergillus flavus*  
*Aspergillus parasiticus*

Wytwarzają aflatoksyny, wywołujące nekrozę komórek wątroby i nowotwór wątroby



Fotografie –

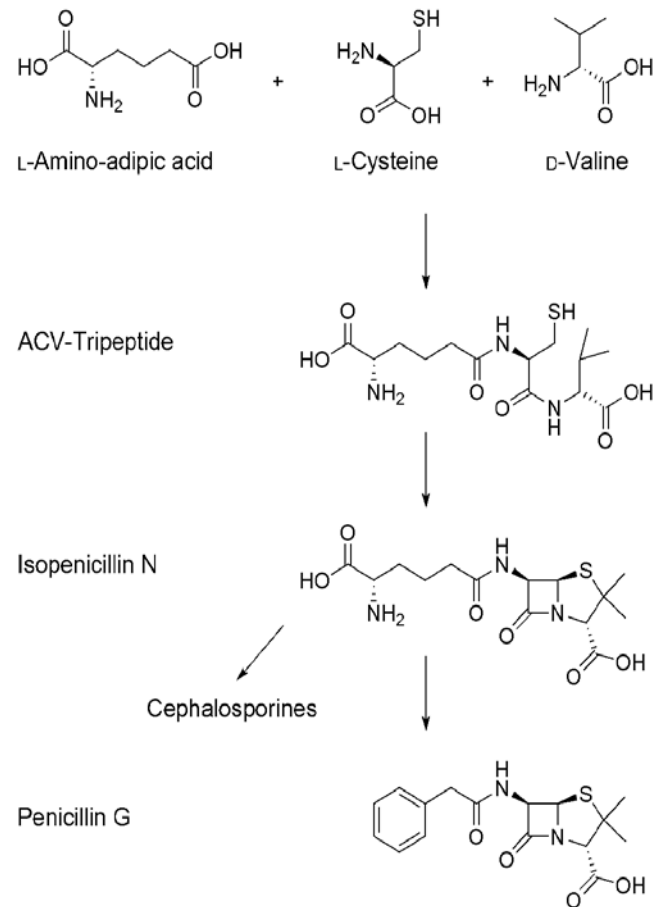
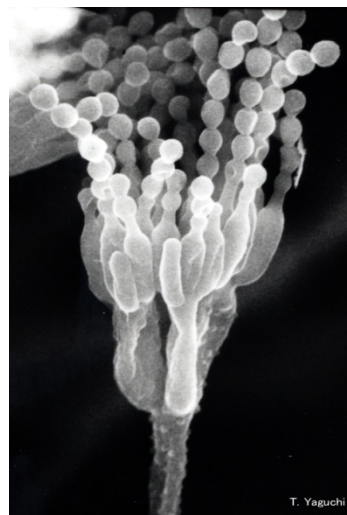
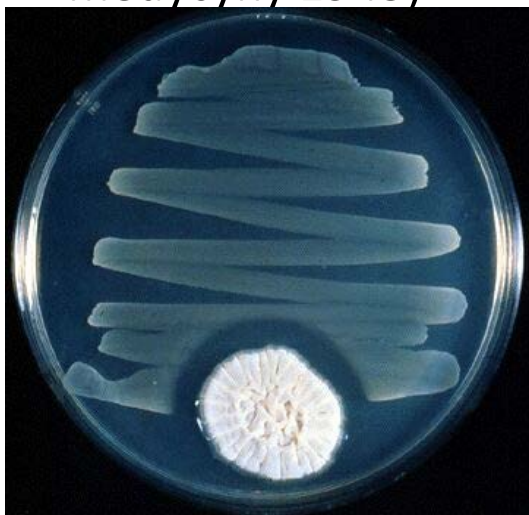
[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_%28hyaline%29/Aspergillus/flavus.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_%28hyaline%29/Aspergillus/flavus.html)

<http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/2005/9-19/aflatoxin.html>



# Znaczenie grzybów strzępkowych w biotechnologii - 1

- Antybiotyki, np. penicylina wytwarzana przez pędzla *Penicillium chrysogenum* w procesie nierybosomowej syntetazy peptydów (NRPS), przykład po prawej
- Coś takiego odkrywca penicyliny Alexander Fleming zaobserwował na swoich zapomnianych szalkach – (publikacja 1929, Nagroda Nobla z medycyny 1945)



Fotografie –

Pędzlak - konidiofor

<http://dc351.4shared.com/doc/WtSeJLlt/preview.html>

[http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/p/Penicillium\\_chrysogenum\\_SEM.htm](http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/p/Penicillium_chrysogenum_SEM.htm)



# Znaczenie grzybów strzępkowych w biotechnologii -2

Grzyby są wykorzystywane w biotechnologii od tysiącleci

- - metody tradycyjne - piwo/wino , chleb (drożdże), sery, sake (alkoholowa specjalność Japończyków wytwarzana z udziałem *Aspergillus oryzae*)
- Enzymy - z *Penicillium* i *Aspergillus* otrzymuje się pektynazy, lipazy, amylazy, cellulazy, proteazy
- Związki organiczne, np. kwas cytrynowy z *Aspergillus niger* czy itakonowy z *Aspergillus terreus*

# Znaczenie grzybów strzępkowych w biotechnologii -3

- Naturalne statyny - pierwszą statynę wyizolowano z *Penicilium citrinum* w 1976 roku

Statyny grzybowe – lowastatyna dopuszczona przez FDA w 1987 r. - rynek wart miliony \$

- Gibereliny – regulatory wzrostu i rozwoju roślin

*Fusarium (Gibberella) fujicuroi*

wywołuje chorobę zwaną

Bakanae disease - Foolish Seedling



Fotografie –

<http://www.plantwise.org/Uploads/CompendialImages/Normal/bakan2ab.jpg>

# Rekombinowane enzymy otrzymywane z grzybów strzępkowych

Enzym	Gospodarz	Dawca
Katalaza	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
Cellulaza	<i>A. oryzae</i>	<i>Humicola sp.</i>
Cellulaza	<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
$\beta$ -galaktozydaza	<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
$\beta$ -glukanaza	<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
Lipaza	<i>A. oryzae</i>	<i>Humicola lanuginose</i> <i>Candida sp.</i> <i>Rhizomucor sp.</i> <i>Thermomyces sp.</i>
Chymozyna	<i>A. niger var. awamori</i>	krowa
Proteaza	<i>A. oryzae</i>	<i>Rhizomucor sp.</i>

wg. Ghoraii et al. 2009, Archer, 2000, Dunn-Coleman et al. 1991, Pariza i Johnson 2001.



### Search for...

expand all | collapse all

Filter the searches below...

- Genes
- Organisms
- Popset Isolate Sequences
- Genomic Sequences
- Genomic Segments
- SNPs
- ESTs
- Metabolic Pathways
- Compounds

## Overview of Resources and Tools


- Take a Tour
- Getting Started**
- Search Strategies
- Genome Browser
- Transcriptomic Resources
- Phenotypic Data
- Analyze My Data
- Downloads
- How to Submit Data
- Curation and Annotation

### Getting Started

VEuPathDB is packed with data, tools and visualizations that can help answer your research questions. We gather data from many sources, analyze according to standard workflows, and present the results for you to mine in a point and click interface. Here's how to get started:

**SITE SEARCH:** Explore the site; find what you need

Enter a term or ID in the site search box at the top of any page. The site search finds documents and records that contain your term and returns a summary of categorized matches. Its easy to find genes, pathways, searches, data sets and more with the site search.



[Read More](#)

## Tutorials and Exercises

- Apollo: Manual gene annotation**  
Structural and functional
- Gene Pages**  
Explore the data and images on gene pages
- Genetic Variation**  
SNPs and CNV based on whole genome sequencing
- Genome Annotation**  
Annotate your genome against a reference using Companion, an easy and reliable parasite
- Genome Browser**  
Basic tutorial on how to effectively explore data in the genome browser including track
- Genome Browser Advanced**  
Self-led exercise on investigating



# **Ekspresja białek heterologicznych może być podwyższona w wyniku:**

- Zastosowania silniejszych promotorów
- Wprowadzeniu kilku kopii genu
- Zmiany systemu regulacji
- Podwyższenia stabilności transkryptów
- Wprowadzeniu genu kodującego aktywniejszą wersję białka
- Zmianę systemów modyfikacji i degradacji białka
- Optymalizację procesu ekspresji i sekrecji białka

Aby to osiągnąć konieczne jest poznanie specyficznych i ogólnych systemów regulacji genetycznej



# Systemy regulacji genetycznej możemy podzielić na:

- Systemy regulacji ogólnej, główne to:
  - kataboliczna represja węglowa
  - kataboliczna represja azotowa
  - regulacja genów metabolizmu wtórnego
  - odpowiedź na stres oksydacyjny
  - regulacja związana z pH
  - regulacja przez światło i rytm okołodobowy
- Systemy regulacji specyficznej

Systemy te mogą działać na poziomie transkrypcji lub post-transkrypcyjnie

# Kataboliczna represja węglowa

- Umożliwia optymalne wykorzystanie źródeł węgla
- Prowadzi do wykorzystywania alternatywnych źródeł węgla tylko wtedy, gdy nie jest dostępna glukoza
- Związana jest z zablokowaniem ekspresji genów kodujących odpowiednie enzymy i transportery alternatywnych źródeł węgla
- U grzybów jest to system regulacji negatywnej (inaczej niż u *E.coli*). Ogólny represor CreA z domeną wiążącą DNA w postaci palca cynkowego typu Cys2His2.

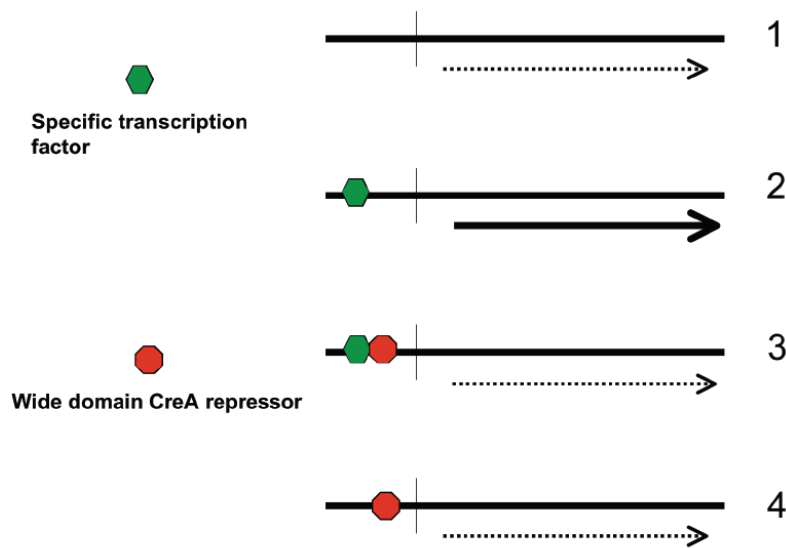




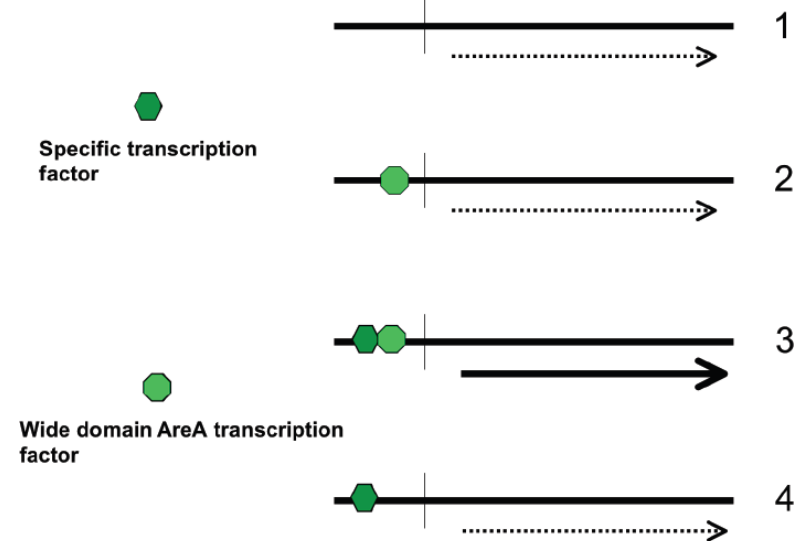
# Kataboliczna represja azotowa

- Umożliwia optymalne wykorzystanie źródeł azotu
- Prowadzi do wykorzystywania alternatywnych źródeł azotu tylko wtedy, gdy nie jest dostępna glutamina lub  $\text{NH}_4^+$
- Związana jest z zablokowaniem ekspresji genów kodujących odpowiednie enzymy i transportery alternatywnych źródeł azotu
- U grzybów jest to system regulacji pozytywnej  
Ogólny aktywator AreA z domeną wiążącą DNA w postaci palca cynkowego (Cys4)

# Współdziałanie systemów regulacji specyficznej i ogólnej



Represja węglowa



Represja azotowa

Specyficzne aktywatory u grzybów najczęściej zawierają domenę wiążącą DNA typu  $Zn_2Cys_6$  (dwujądrowy palec cynkowy)



# Kataboliczna represja azotowa

## Regulacja aktywności AreA - 1

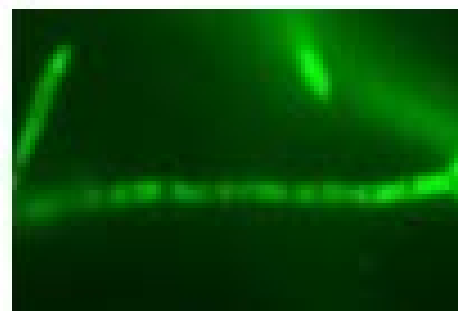
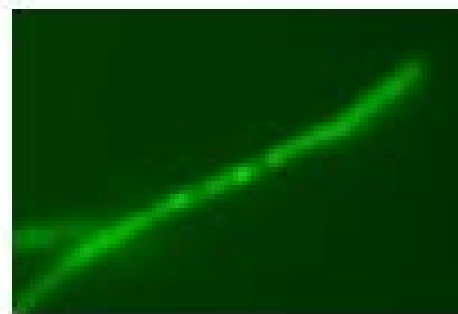
### Lokalizacja AreA w jądrze zależy od źródła azotu

GFP::AreA

Głód azotowy



Represja azotowa  
(+ glutamina)



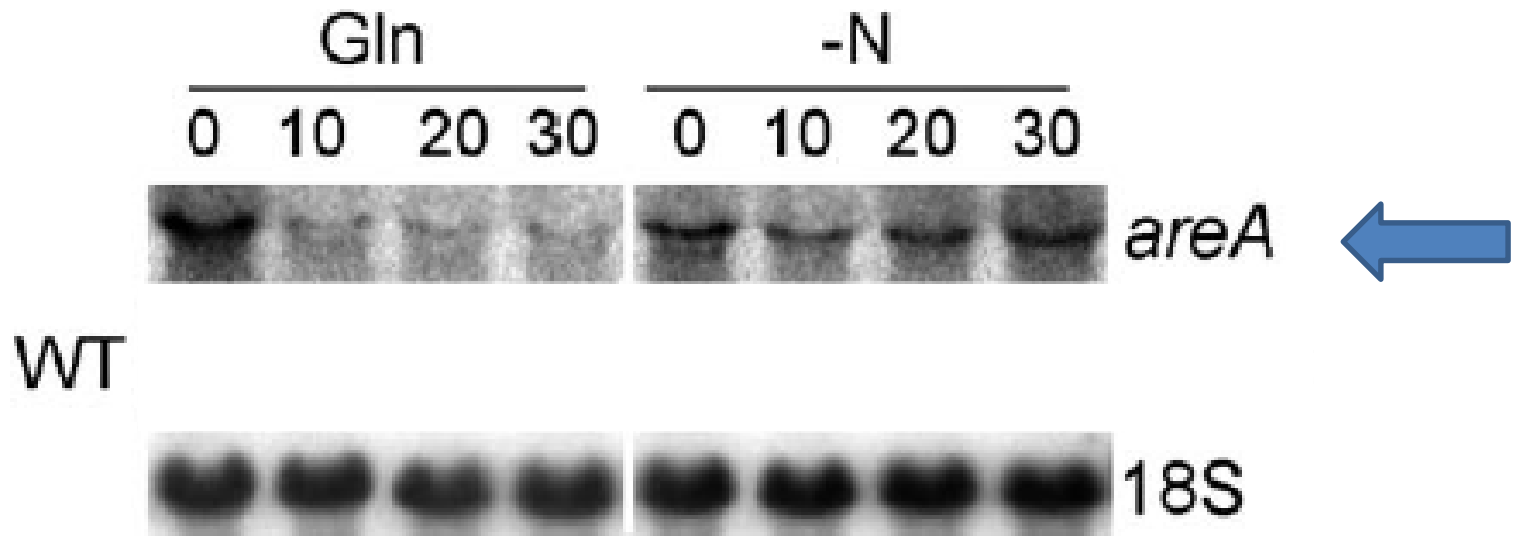
Michielse, Pfannmueller, Macios, Rengers, Dzikowska and Tudzynski (2014)

Molecular Microbiology 91:472

# Kataboliczna represja azotowa

## Regulacja aktywności AreA - 2

### Stabilność transkryptu *areA* zależy od źródła azotu

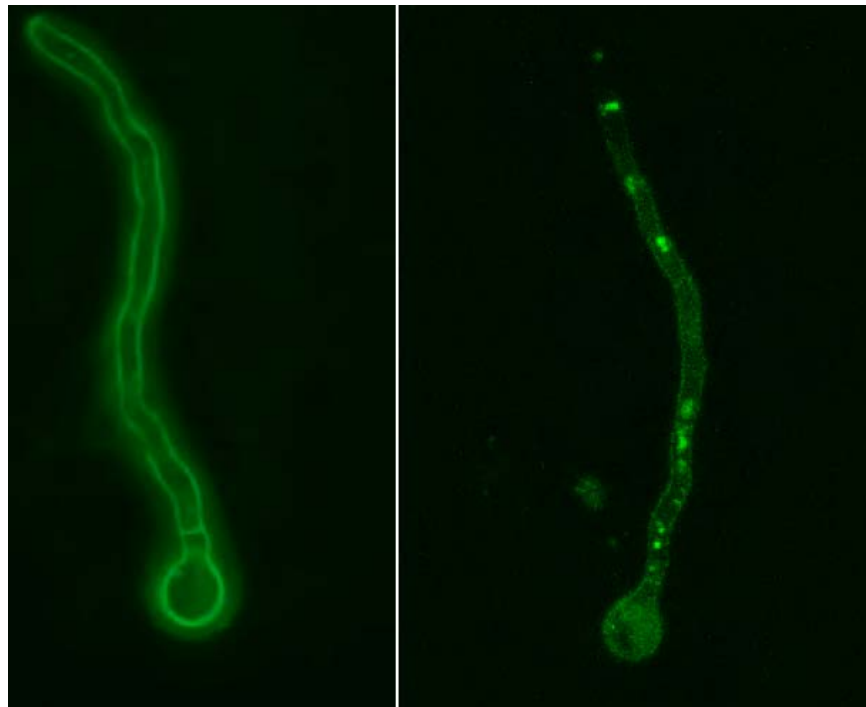


Zahamowanie transkrypcji przez proflawinę



# Kataboliczna represja azotowa

## Internalizacja transportera proliny po dodaniu $\text{NH}_4^+$

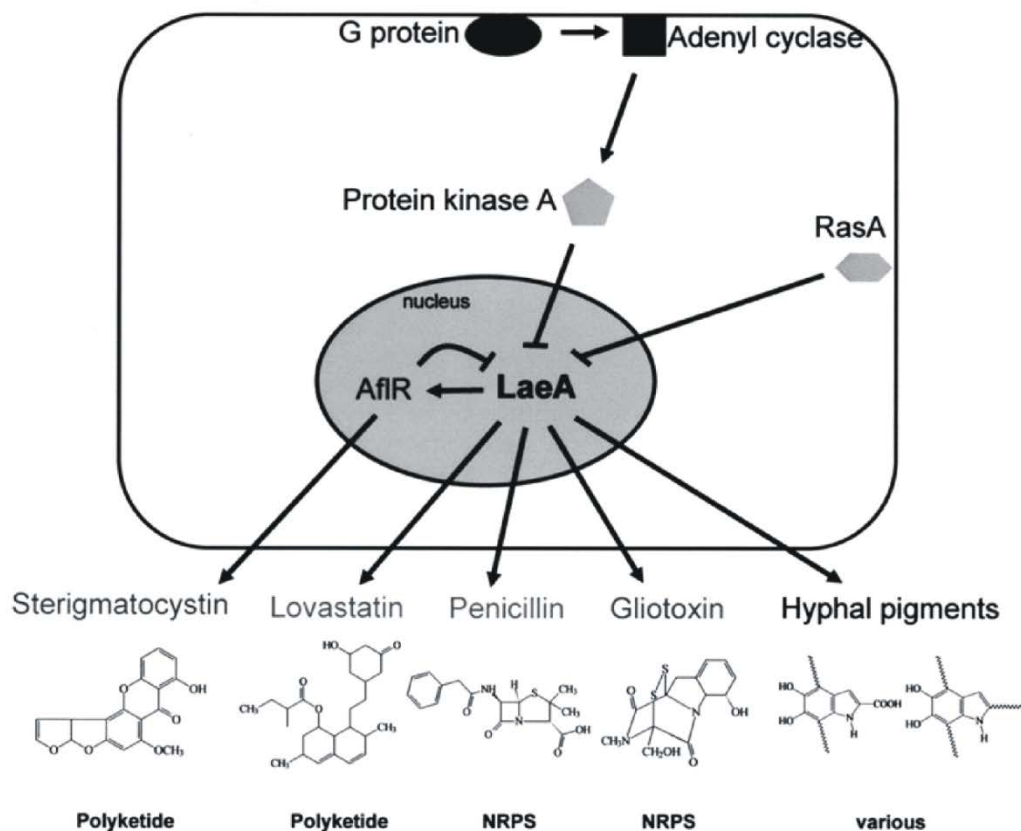


+pro

$\text{NH}_4^+$

Konidia hodowane na pożywce z proliną, a następnie z  $\text{NH}_4^+$   
fuzja transportera proliny PrnB::GFP

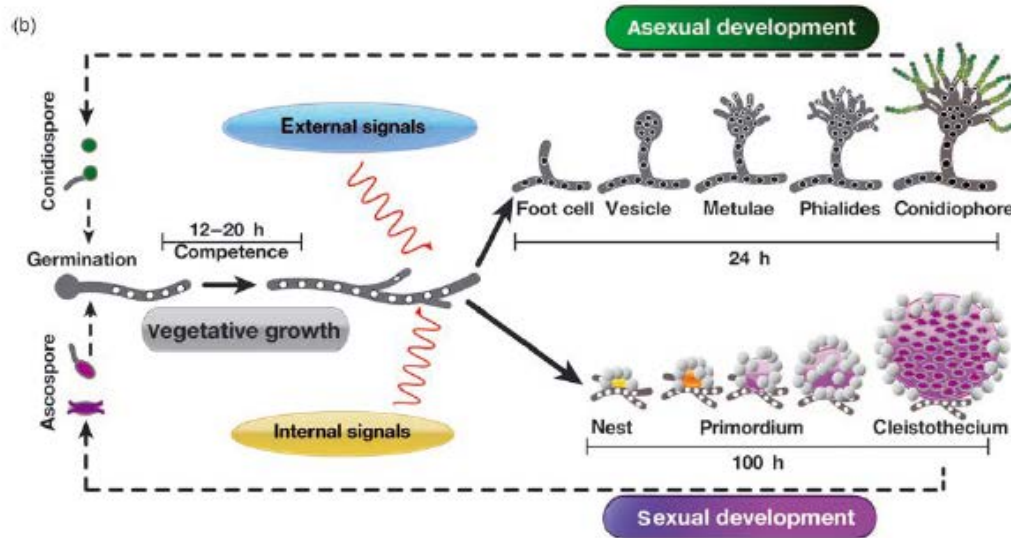
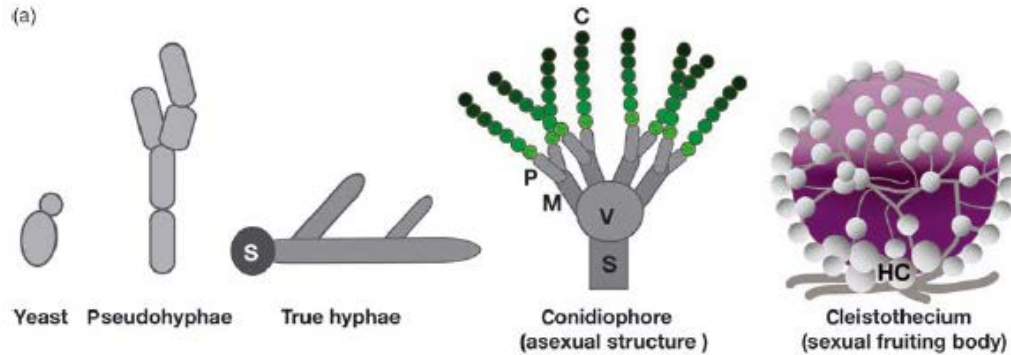
# LaeA – regulator metabolizmu wtórnego



Bok J W, and Keller N P Eukaryotic Cell 2004;3:527-535

Eukaryotic Cell

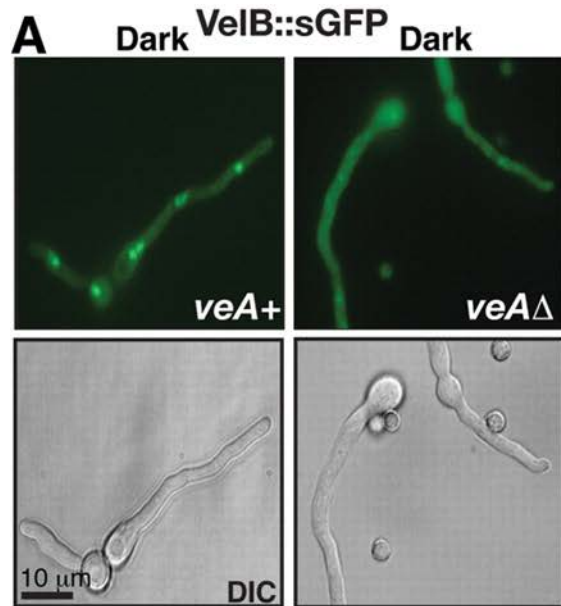
# Morfologiczne różnicowanie grzybów



światło

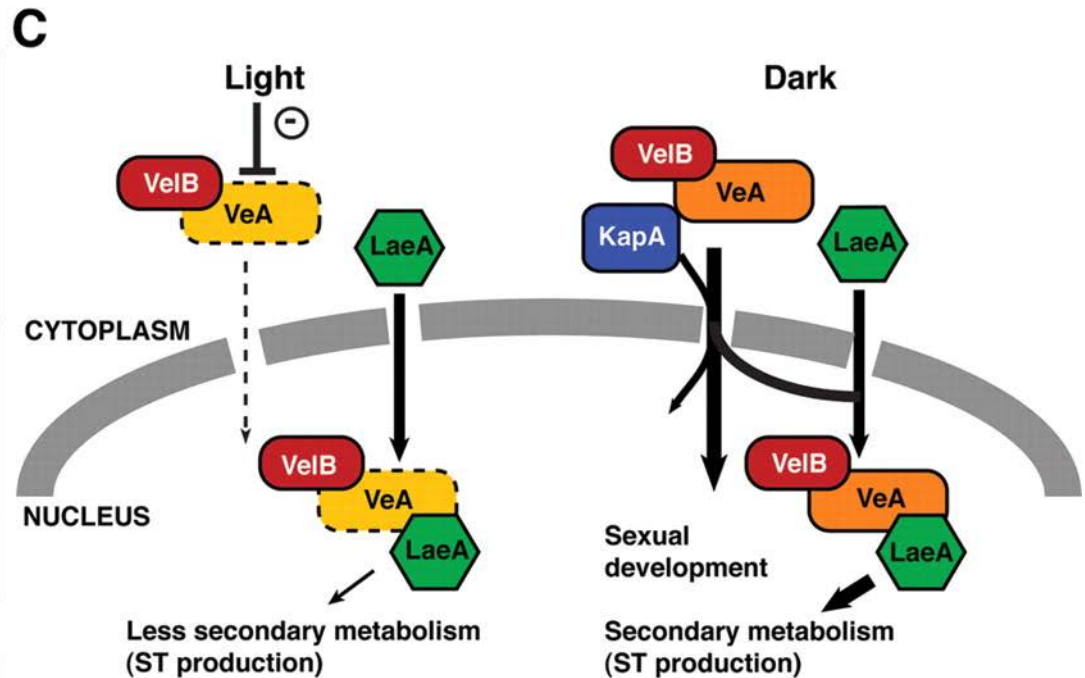
ciemność

# Współdziałanie regulatora LaeA i białek z rodziny velvet w regulacji metabolizmu wtórnego



**B**

Nuclear / Cytoplasmic ratio for VelB	
in <i>veA+</i>	in <i>veAΔ</i>
2.90 $\pm$ 0.89	1.04 $\pm$ 0.29

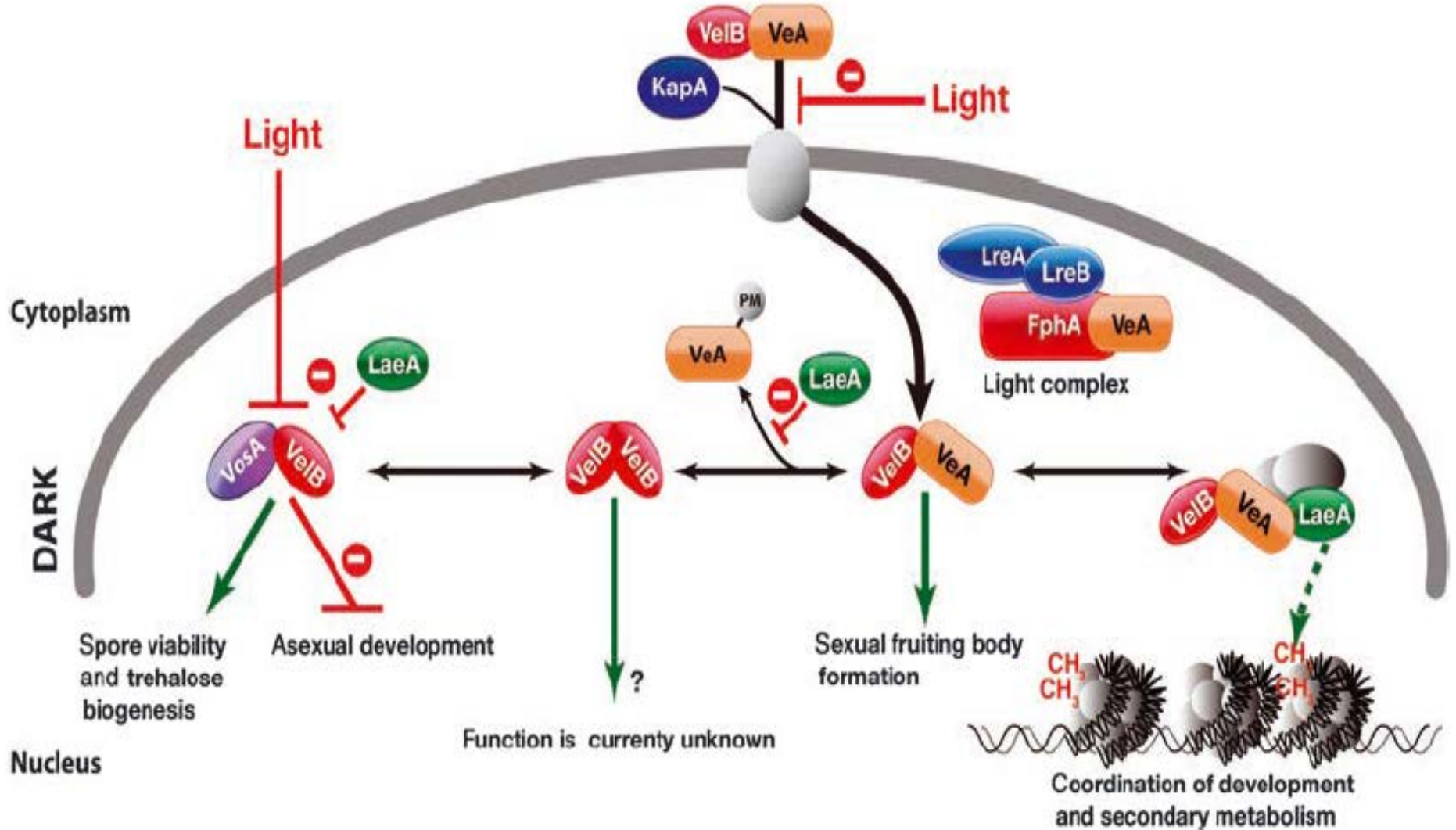


Özgür Bayram et al. Science 2008;320:1504-1506



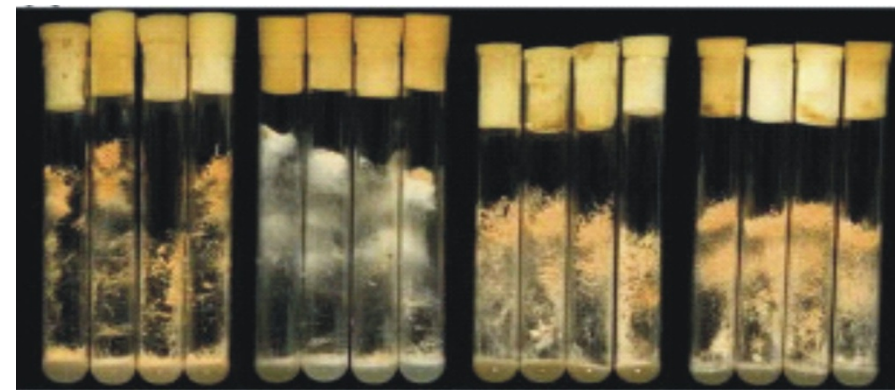
# Mechanizm działania aktywatora LaeA

## LaeA przeciwdziała metylacji H3K9, prowadzącej do powstania heterochromatyny (HP1)

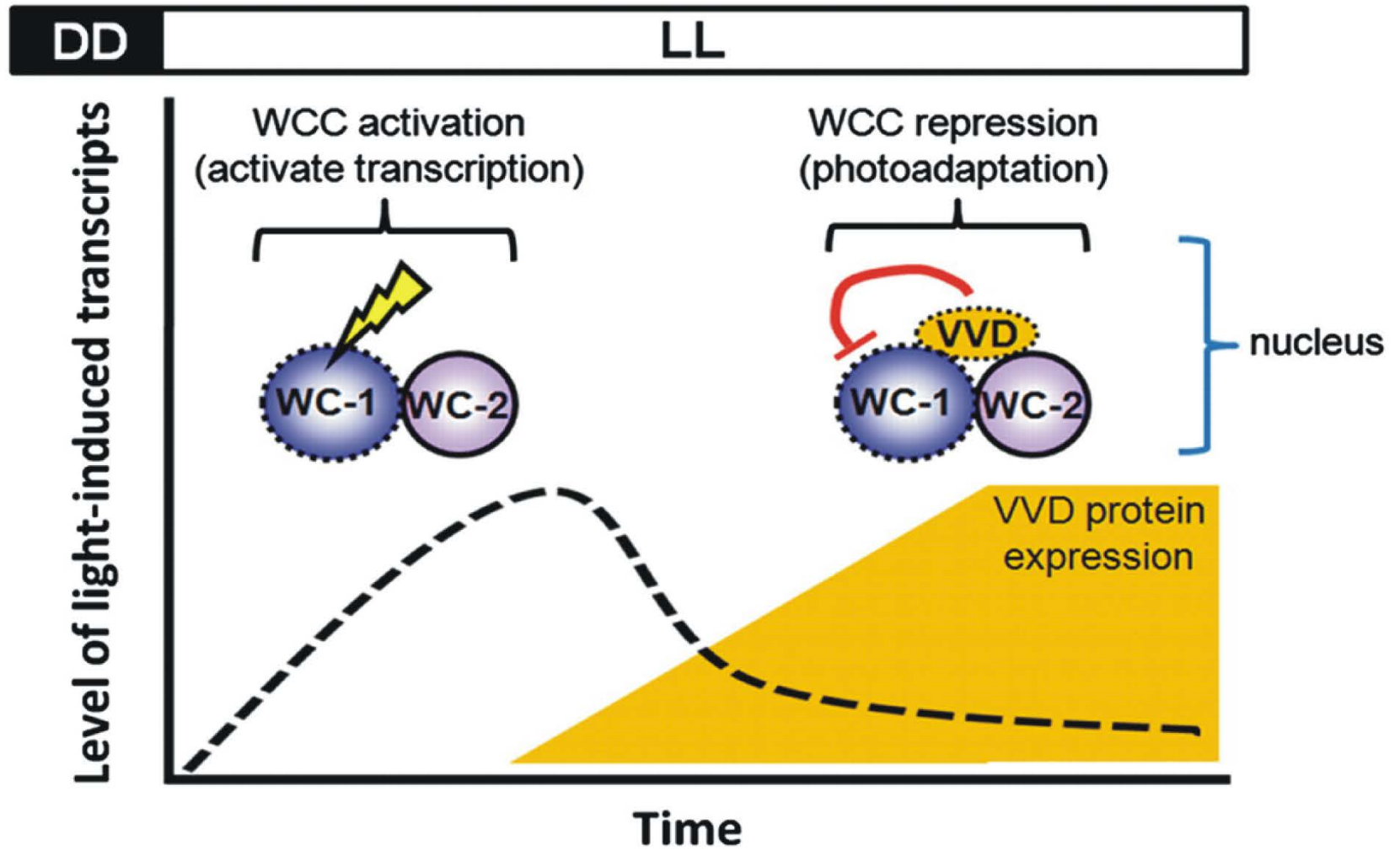


# Regulacja przez światło

- Grzyby dostosowują konidiowanie do pory dnia
- Fotoreceptory reagujące na różne długości fali
- U *Neurospora* - 6% genów indukowanych przez światło
- U *Neurospora white collar* kompleks (kompleks białek WC1+WC2) – aktywacja transkrypcji w odpowiedzi na światło niebieskie
- WC1 pełni funkcję fotoreceptora, zawiera domenę LOV, która wiąże chromofor flawinowy (FAD)
- Za fotoadaptację odpowiada białko VVD

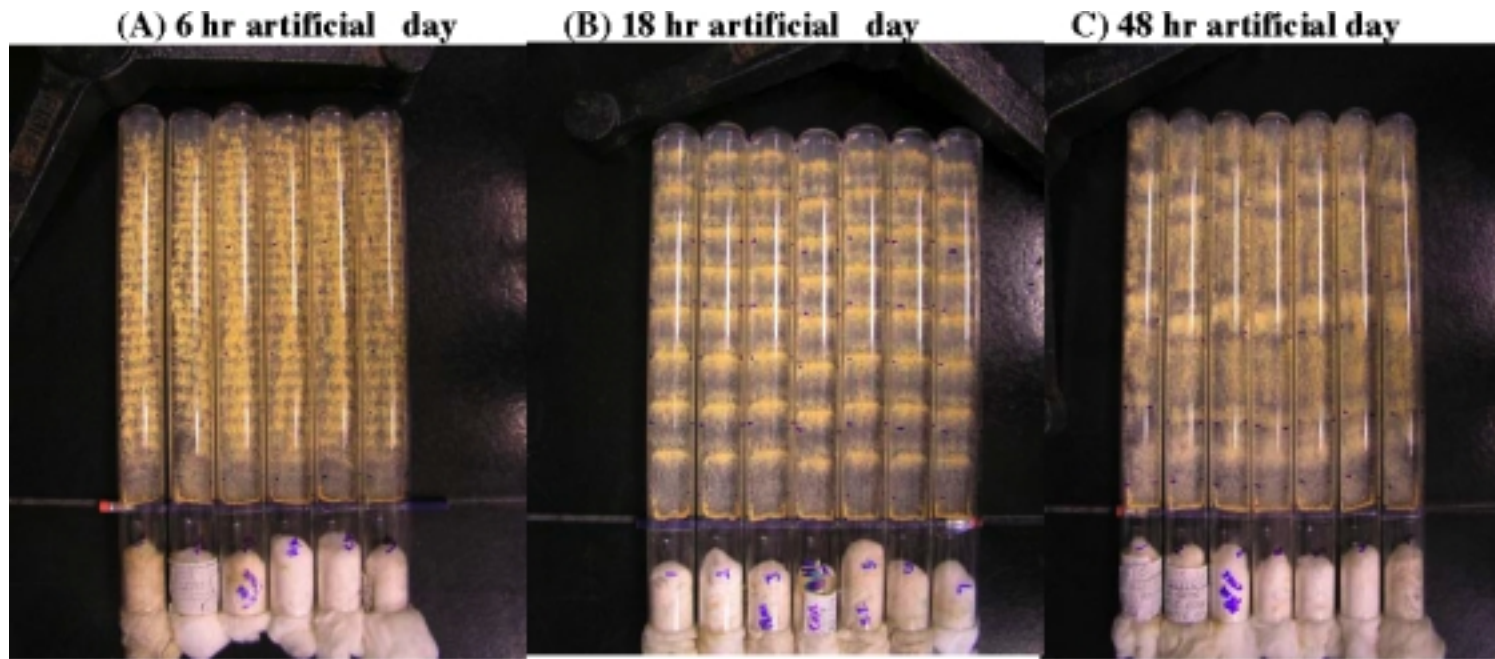


# Photoadaptation in Neurospora.



Chen C et al. PNAS 2010;107:16715-16720

# *Neurospora crassa* – rytm okołodobowy (circadian rhythm – *circa diem*)

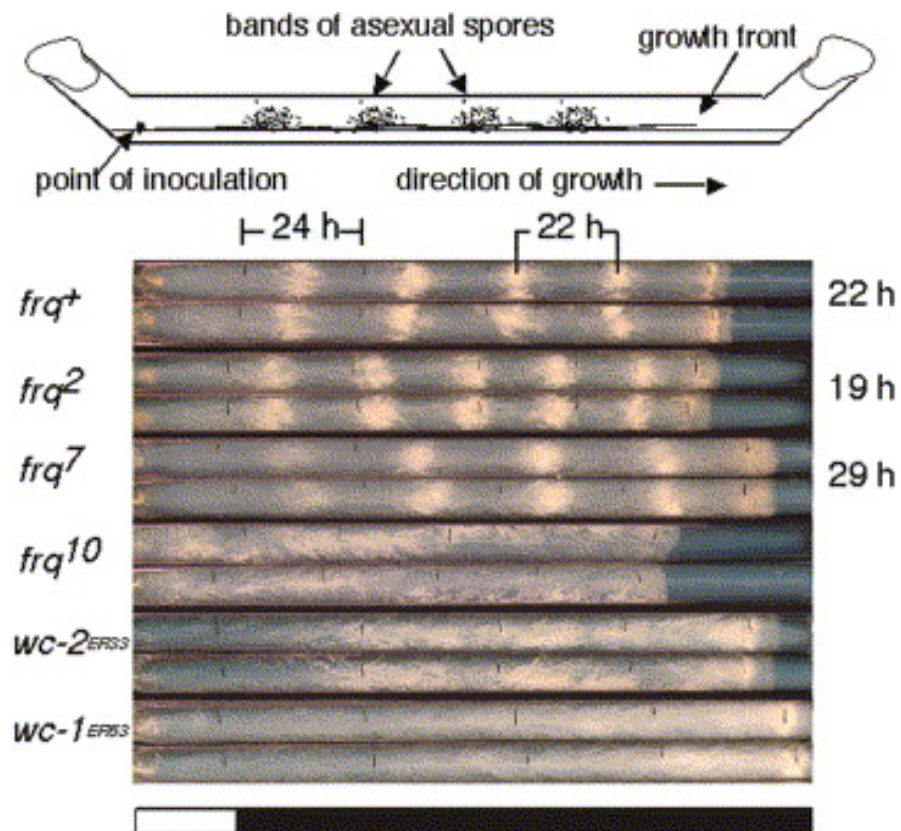


**Zegar biologiczny jest niezależny od sygnałów zewnętrznych. To oscylator wewnętrzny synchronizowany przez czynniki zewnętrzne (światło, temperatura )**

Fotografie –

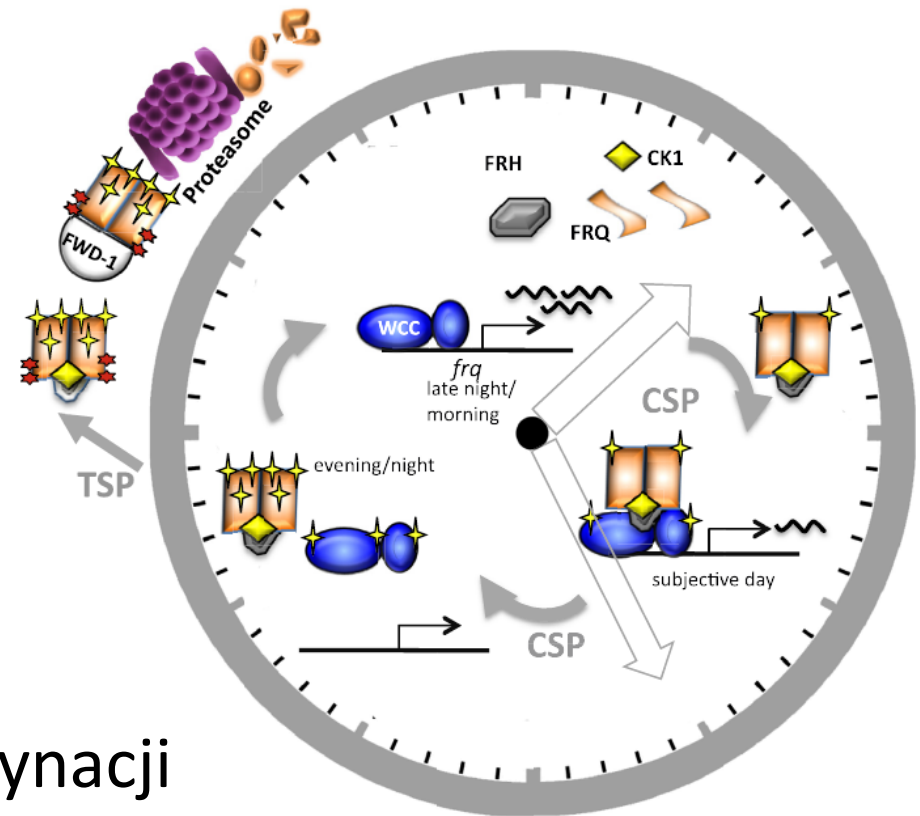
Dong i wsp., PLoS ONE. 2008; 3(8): e3105.

# *Neurospora crassa* – rytm okołodobowy



# *Neurospora crassa* – rytm okołodobowy

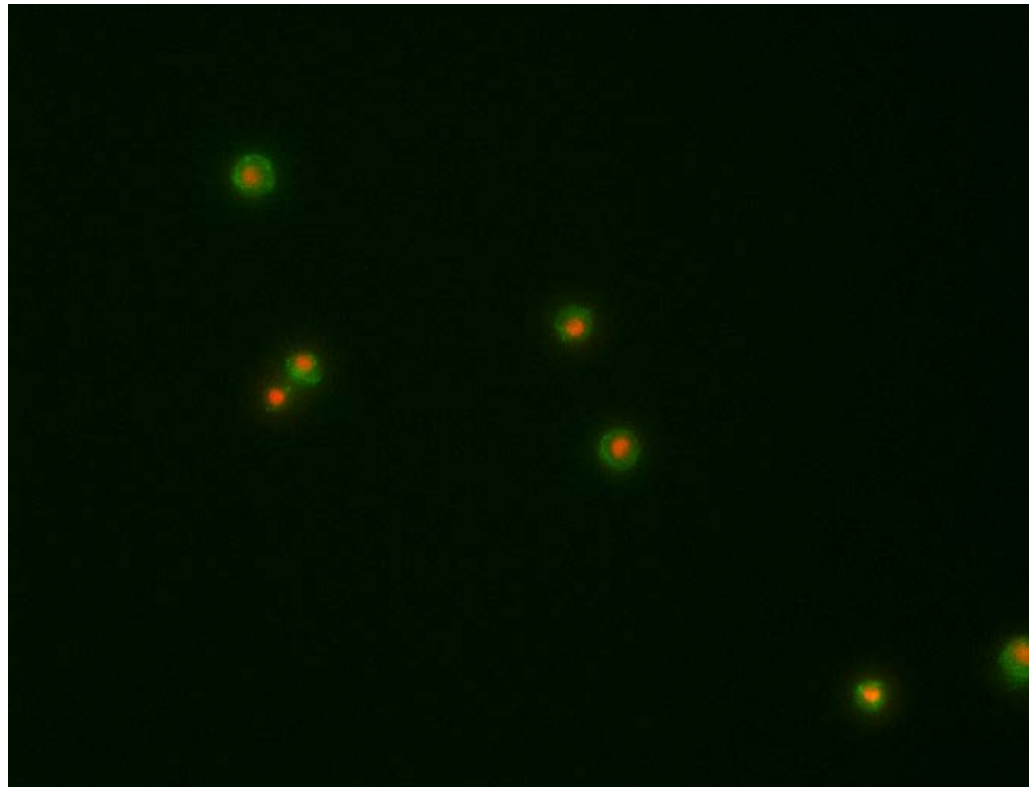
- Negatywne transkrypcyjno-translacyjne sprzężenie zwrotne
- Kompleks WCC aktywuje ekspresję *frq*
- Ufosforylowane FRQ hamuje aktywność WCC
- Dalsza fosforylacja FRQ prowadzi do jego ubikwitynacji i degradacji





# Biologia komórki

## Kiełkowanie konidiów - mitoza



[film conidia germination](#)

Oakley B., unpublished



# Biologia komórki

## Mutanty związane z podziałami komórki

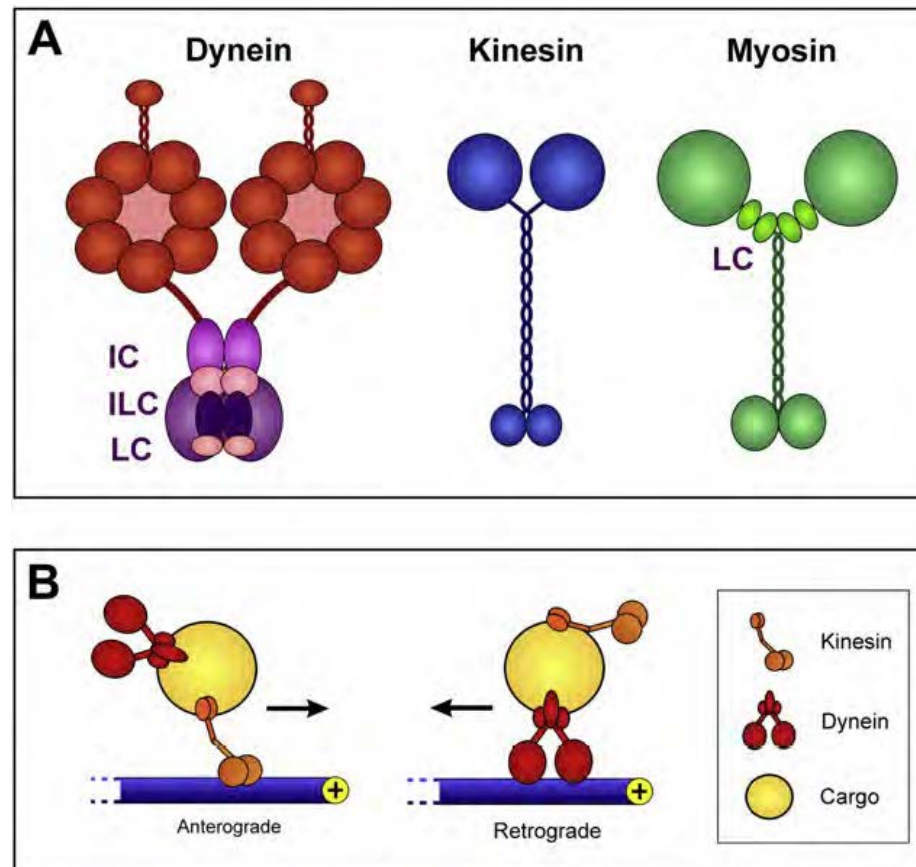
Mutanty temperaturo-wrażliwe:

- niezdolne do rozpoczęcia mitozy  
*nim* (never in mitosis)
- zablokowane na różnych etapach mitozy  
*bim* (blocked in mitosis)
- jądra niezdolne do migracji  
*nud* (nuclear distribution)

Mutanty odporne na benomyl – pierwsze geny tubulinowe



# Biologia komórki – transport wewnątrz komórki





# Biologia komórki

## Ruch endosomów wzdłuż mikrotubul

### *Ustilago maydis*

Patogen roślin – głownia kukurydzy

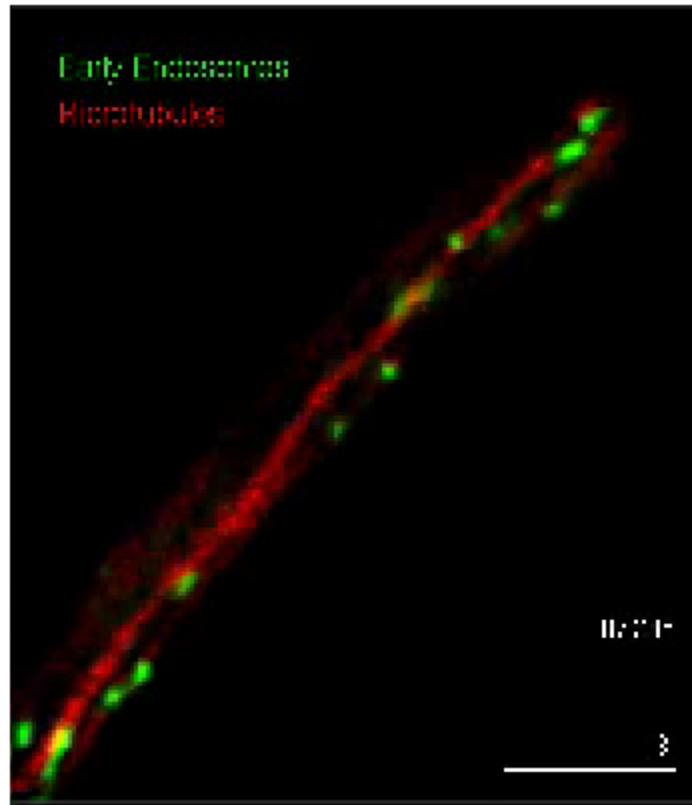


*Quesadilla de huitlacoche*  
Meksykański przysmak z głowni kukurydzy



# Biologia komórki

## Ruch endosomów wzdłuż mikrotubul



[2i\\_EEsOnMTs.wmv](#)

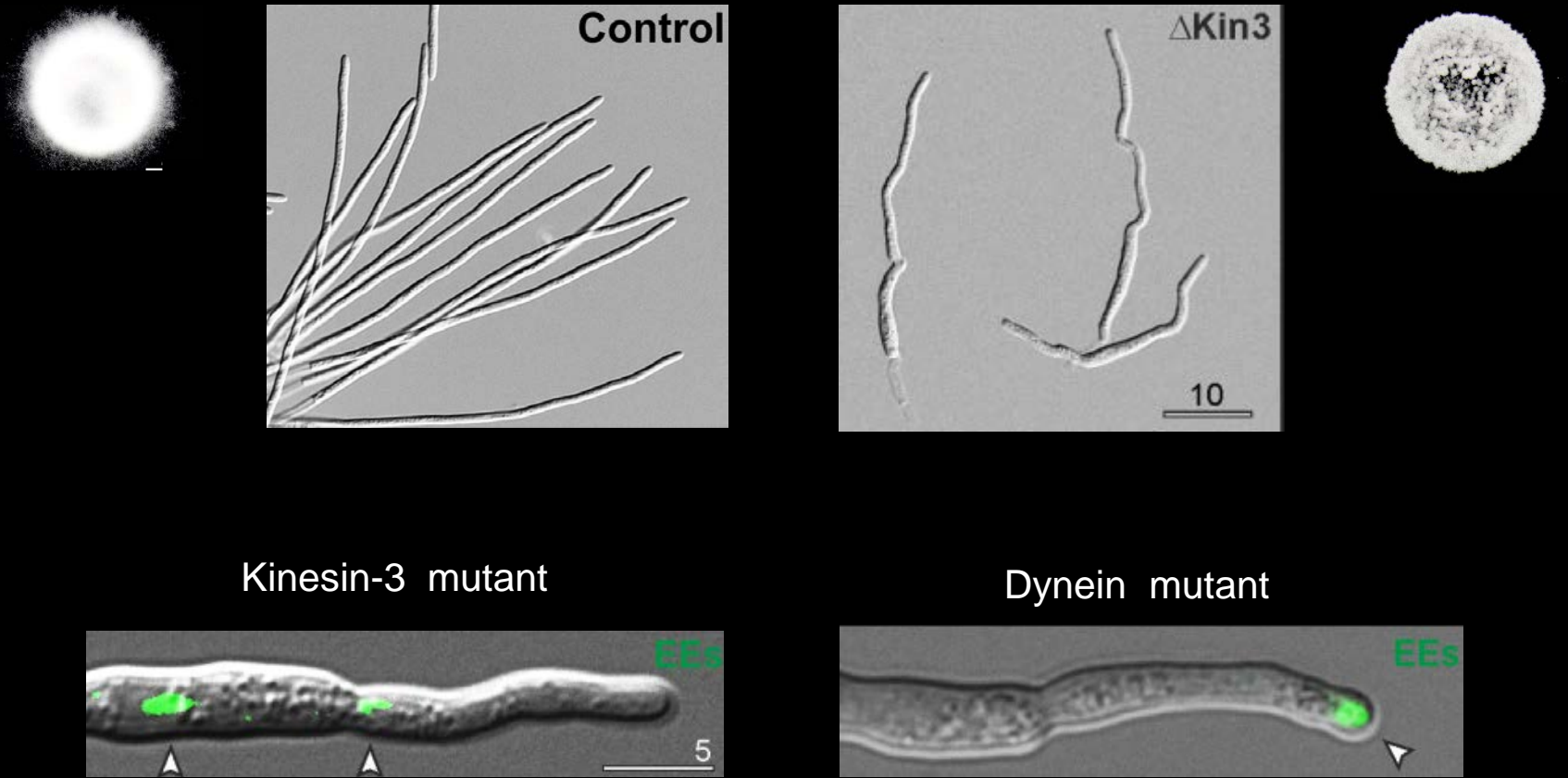
Steinberg i Schuster Fungal Biol Rev 25 ( 2011) 14-37



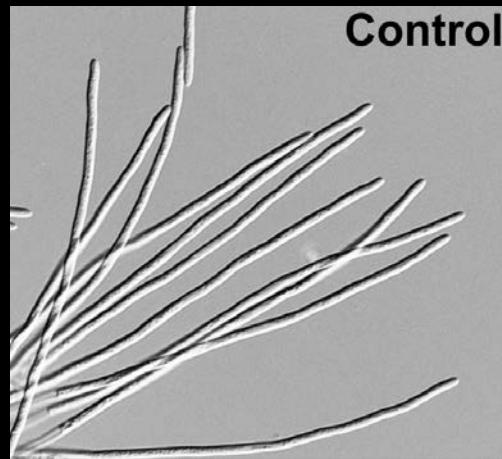
Hok1 - a master coordinator of  
bi-directional endosome motility  
in *Ustilago maydis*

Bielska, Schuster, Roger, Berepiki, Soanes, Talbot and Steinberg  
(2014) JCB 204:789

# A screen for mutants defective in early endosome (EE) motility



# A screen for mutants defective in EE motility



wildtype

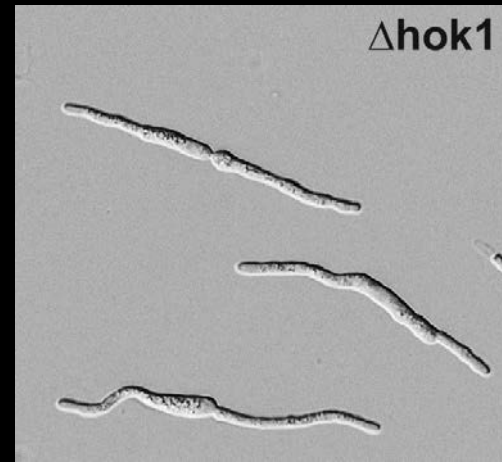
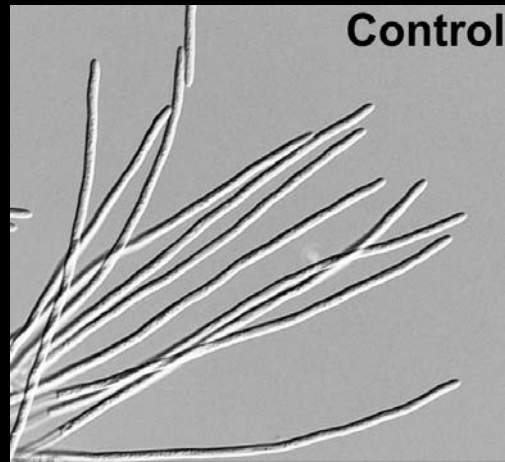


EMD5 mutant

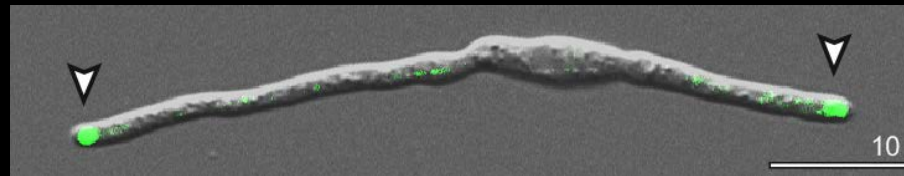


[EMD5 and control](#)

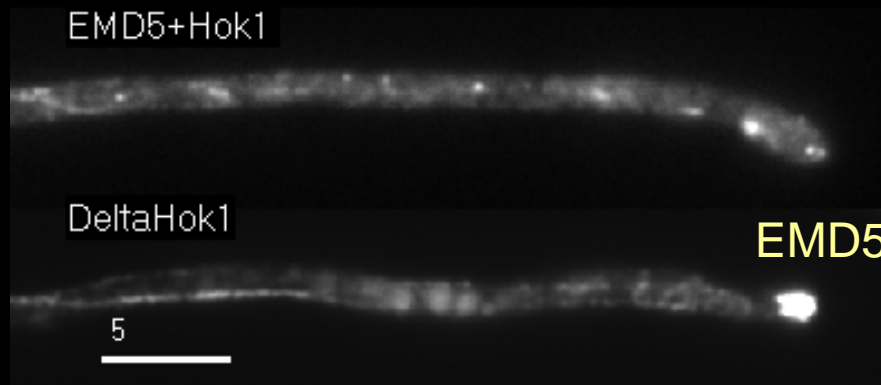
# A screen for mutants defective in EE motility



*hok1* null



EMD5 + Hok1::GFP



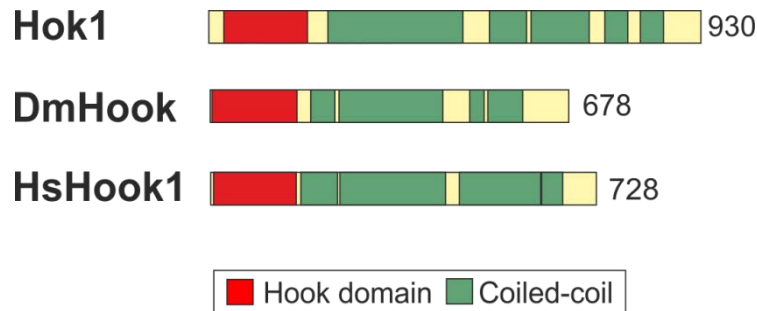
*hok1* null

DeltaHok1

EMD5+HookGFP and DHok1

[cztery szczepy.mp4](#)

## Hook proteins are required for bi-directional EE motility



- DmHook required for endocytic sorting (in Drosophila)

- Humans have 3 Hook proteins

Hook1: Endocytic recycling and sorting

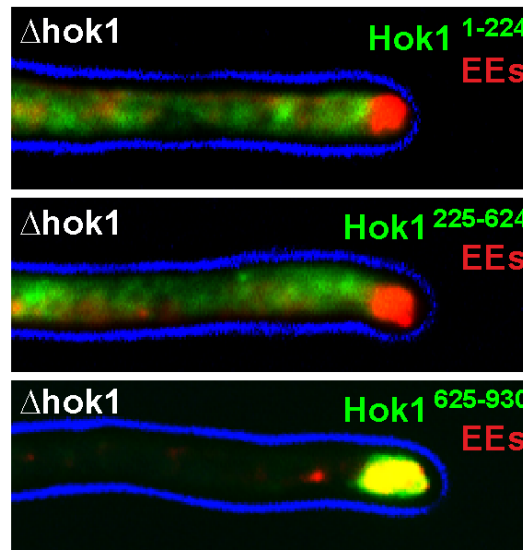
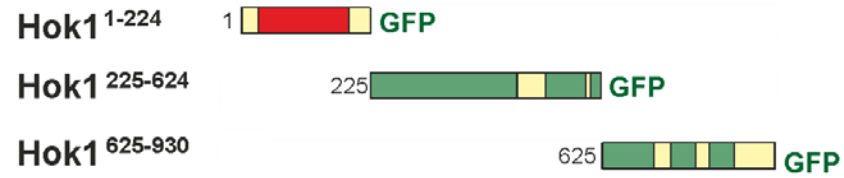
Hook2: Primary cilium formation

Hook3: Golgi organization

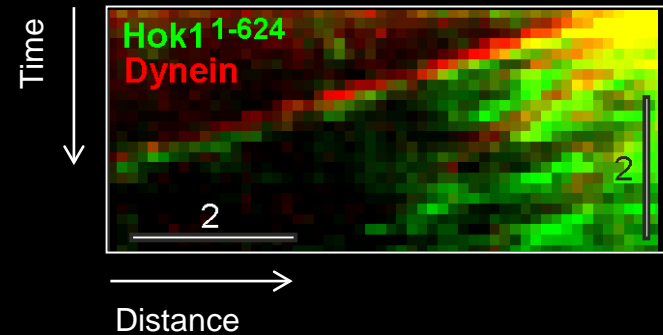
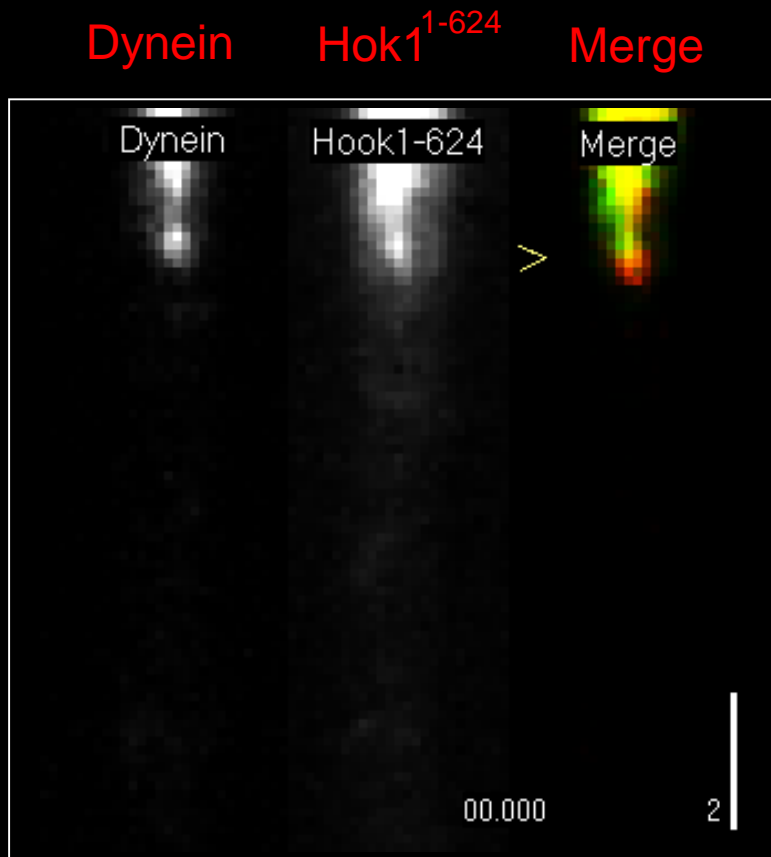
- binds to microtubules and organelles- Is it a linker/adaptor protein?



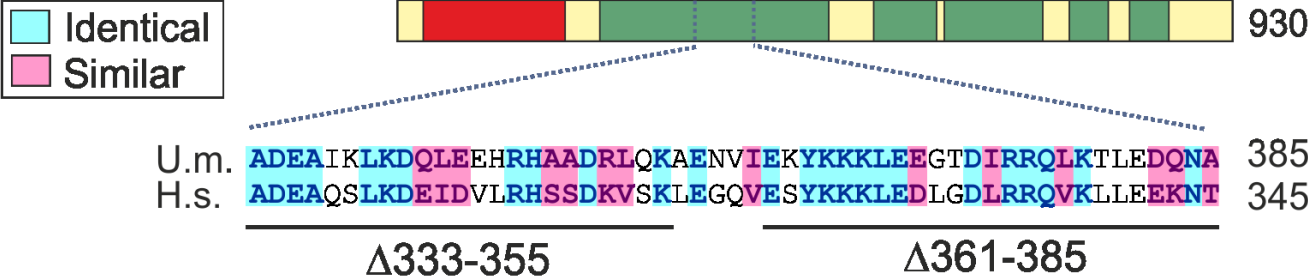
# Hok1 targets to EEs via its C-terminal part



# The N-terminal half (aa 1-624) of Hok1 binds to dynein

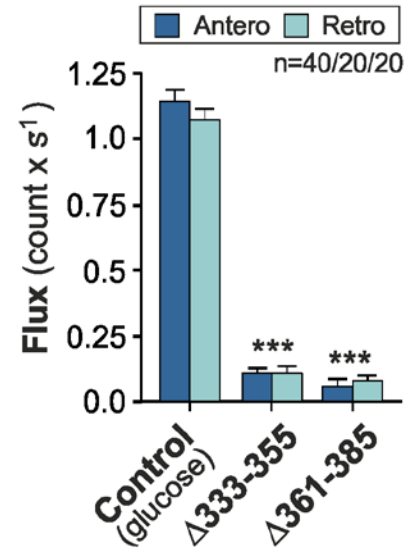
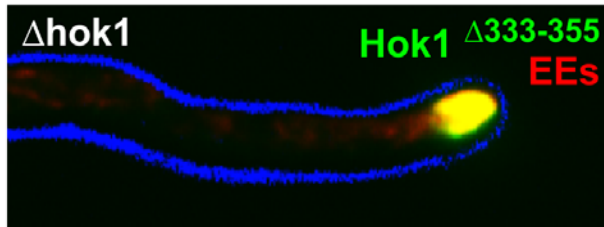
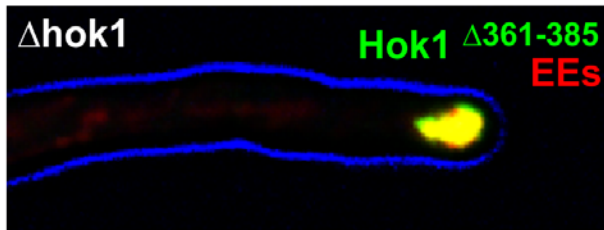


# A highly conserved region in the first coiled-coil of Hok1 is essential for dynein binding



~50% identical with human Hook3

# A highly conserved region in the first coiled-coil is essential for dynein binding

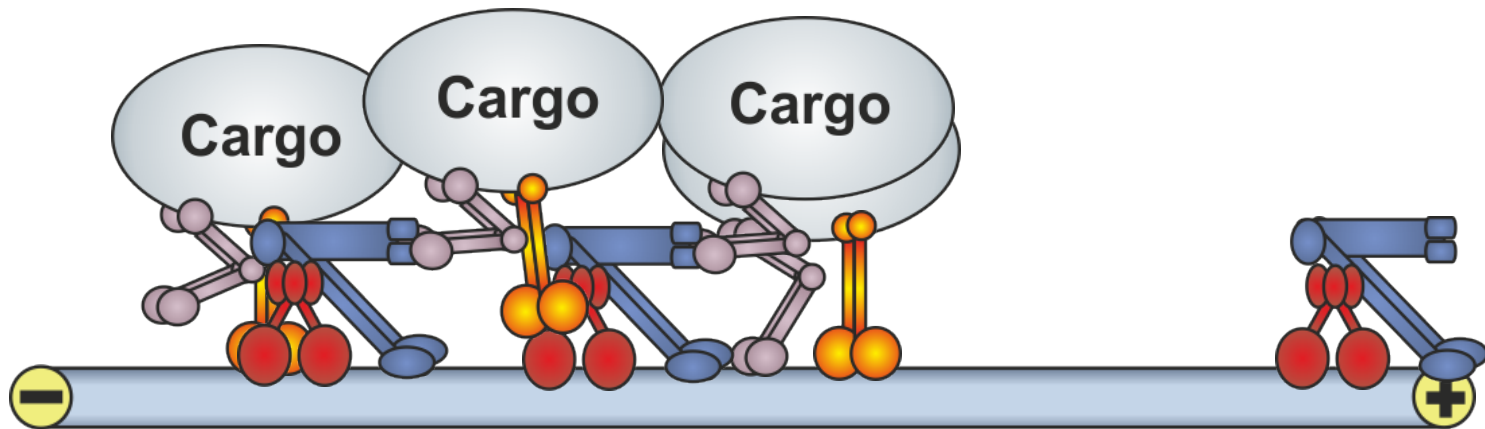


# Model: A role of Hook in anterograde-to-retrograde turning



## Model: A role of Hook in anterograde-to-retrograde turning

Kinesin 2 release  
Dynein binding  
during retrograde turning



Is the function of Hok1 conserved ?

# Hook and Kinesin-3 co-evolved

Choanoflagellate  
Animals  
Plants/Oomycete  
Fungi

