



Organizmy modelowe

Grzyby filamentalne
(strzępkowe)

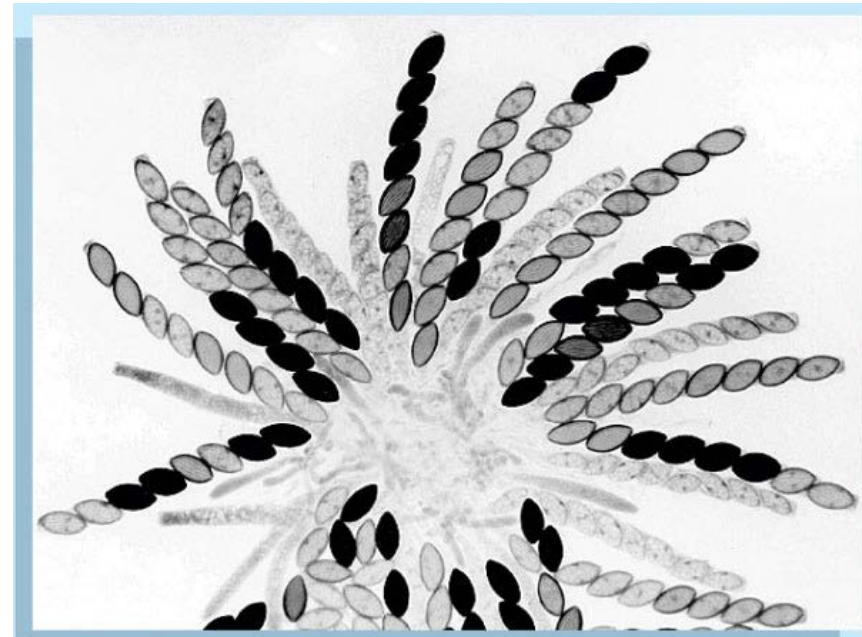
dr hab Agnieszka Dzikowska

Instytut Genetyki i Biotechnologii

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

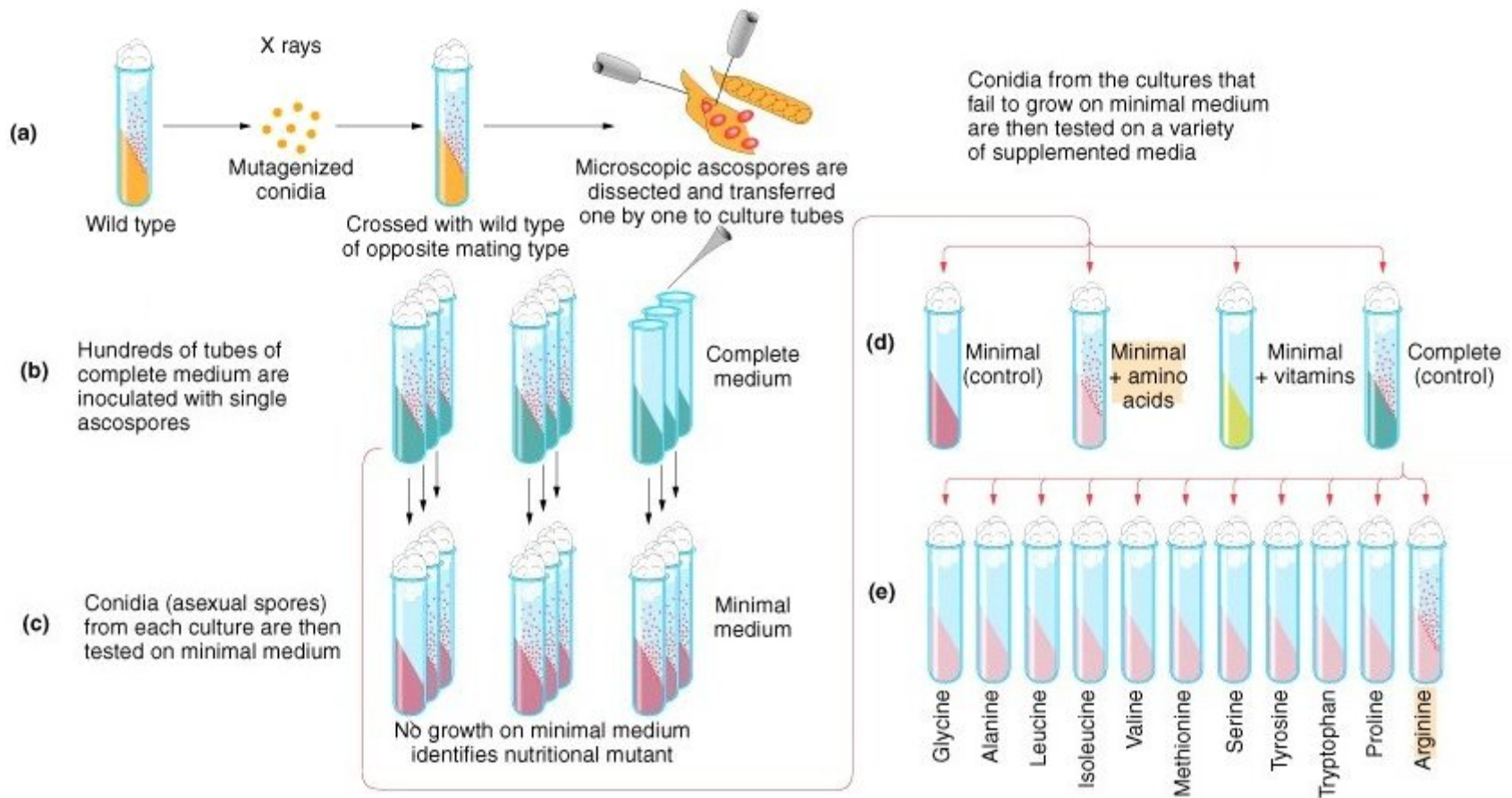
Jeden gen –jeden enzym

- George Beadle i Edward Tatum (1941; Nagroda Nobla 1958
 - *Neurospora crassa* – workowiec, cykl płciowy, zdefiniowana pożywka minimalna
- genetyka klasyczna



Eksperyment Beadl'a

Izolacja mutantów aukstotroficznych

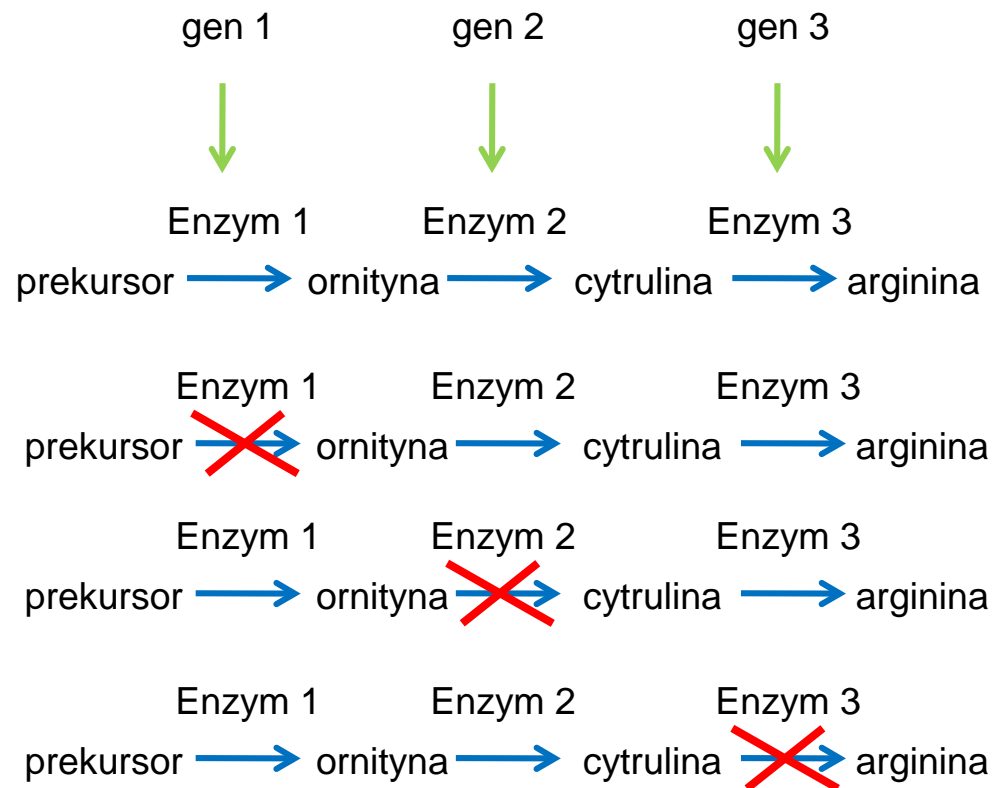


Addition of arginine to minimal medium restores growth

Eksperyment Beadl'a

jeden gen – jeden enzym

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



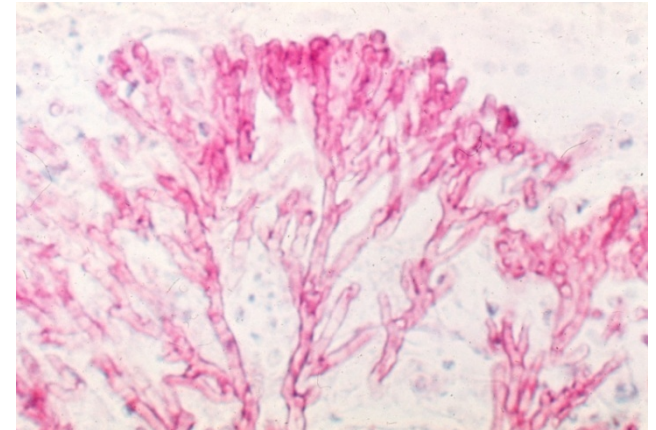
Grzyby filamentalne jako organizm modelowy w dzisiejszych czasach

- Patogeny zwierząt i roślin
- Znaczenie w biotechnologii
- Biologia komórki
- Specyficzne systemy regulacji genetycznej

Grzyby filamentalne – patogeny zwierząt i człowieka

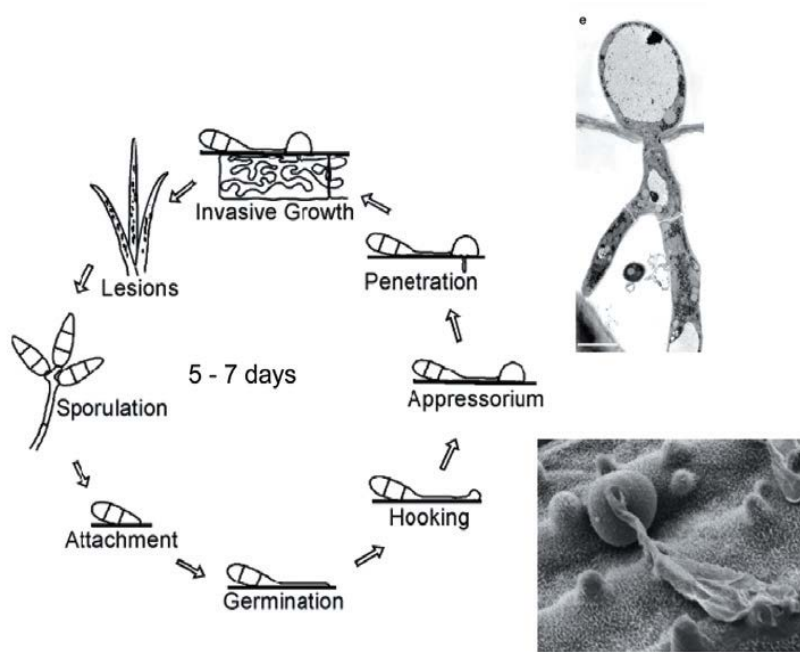
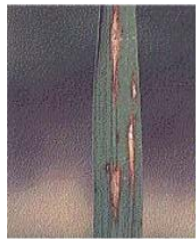
- *Aspergillus fumigatus* - patogen oportunistyczny
- Pacjenci o obniżonej odporności (leki immunosupresyjne, AIDS)
- Alergie płucne
- Chroniczna inwazyjna aspergilloza płuc
- Aspergilloza centralnego układu nerwowego

- Amfoterycyna B, flukonazol i vorikonazol



Grzyby filamentalne – patogeny roślin

Magnaporthe oryzae
rice blast disease



Grzyby filamentalne – patogeny roślin

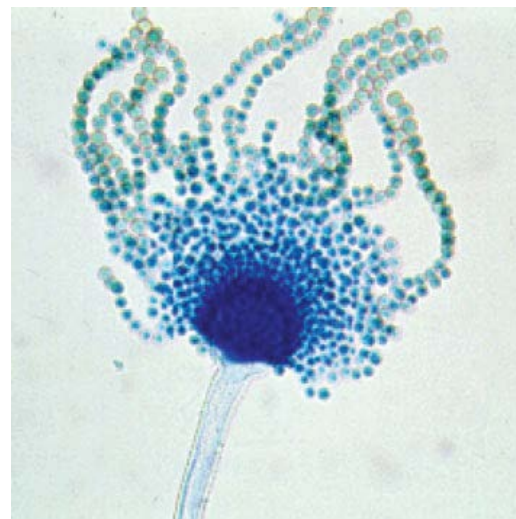
Aspergillus flavus

Aspergillus parasiticus

Aflatoksyny

nekroza komórek wątroby

nowotwór wątroby



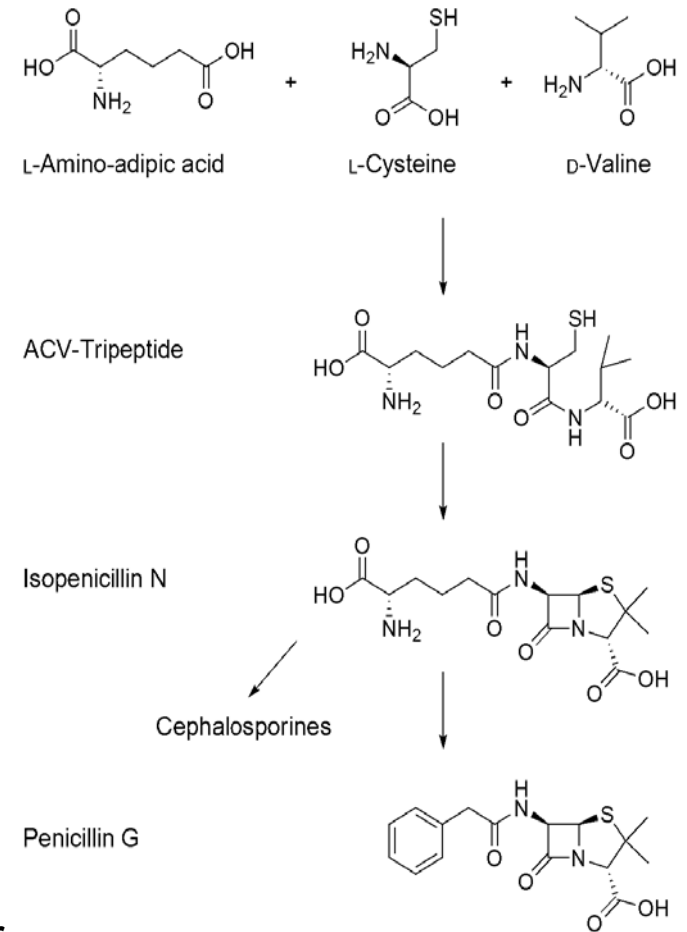
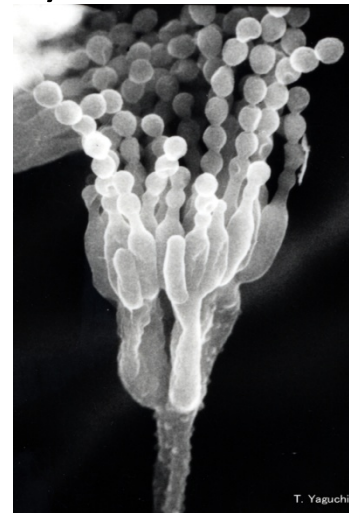
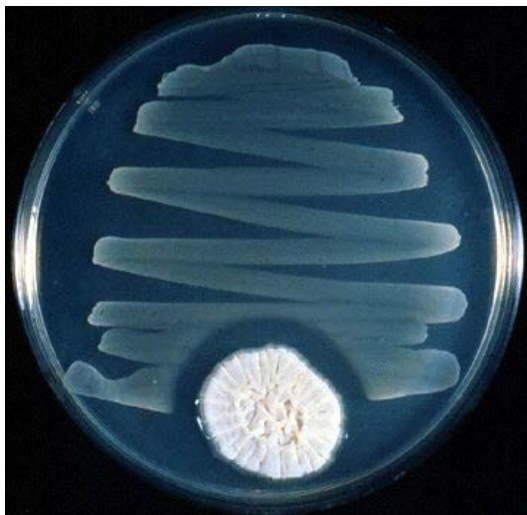
Fotografie –

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 filamentalnych w biotechnologii

- Antybiotyki - *Penicillium chrysogenum*
- NRPS (nierybosomowa syntetaza peptydowa)
- Alexander Fleming – 1929 (Nagroda Nobla z medycyny 1945)



Fotografie –

Pędzlak - konidiofor

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

http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/p/Penicillium_chrysogenum_SEM.htm



Znaczenie grzybów filamentalnych w biotechnologii

- Grzyby są wykorzystywane w biotechnologii od tysiącleci – piwo/wino , chleb, (drożdże) ,sery, sake (*Aspergillus oryzae*)
- Enzymy
Penicillium i *Aspergillus* - pektynazy, lipazy, amylazy, cellulazy, proteazy
- Związki organiczne – kwas cytrynowy, (*Aspergillus niger*), itakonowy (*Aspergillus terreus*)

Znaczenie grzybów filamentalnych w biotechnologii

- Naturalne statyny - pierwszą statynę wyizolowano z *Penicilium citrinum* w 1976 roku
Statyny grzybowe – lowastatyna dopuszczona przez FDA w 1987 r. - rynek wart 15 miliardów\$
- Gibereliny – regulatory wzrostu i rozwoju roślin

Fusarium (Gibberella)

fujicuroi

Bakanae - Foolish Seedling



Fotografie –

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

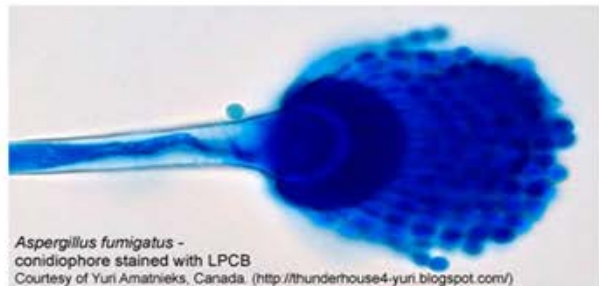
Rekombinowane enzymy otrzymywane z grzybów filamentalnych

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>
β -galaktozydaza	<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
β -glukanaza	<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
Lipaza	<i>A. oryzae</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.

Genomy grzybów filamentalnych

AspGD - *Aspergillus* Genome Database



Aspergillus fumigatus - conidiophore stained with LPCB
Courtesy of Yuri Amatiński, Canada. (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/>)

About AspGD

AspGD is an organized collection of genetic and molecular biological information about the filamentous fungi of the genus *Aspergillus*. Among its many species, the genus contains an excellent model organism (*A. nidulans*, or its teleomorph *Emericella nidulans*), an important pathogen of the immunocompromised (*A. fumigatus*), an agriculturally important toxin producer (*A. flavus*), and two species used in industrial processes (*A. niger* and *A. oryzae*). AspGD contains information about genes and proteins of multiple *Aspergillus* species; descriptions and classifications of their biological roles, molecular functions, and subcellular localizations; gene, protein, and chromosome sequence information; tools for analysis and comparison of sequences; and links to literature information, as well as a multispecies comparative genomics browser tool (Sybil) for exploration of orthology and synteny across multiple sequenced *Aspergillus* species.

New and Noteworthy

Additions and Improvement: Download and BLAST at AspGD

We are happy to announce six new genomes available to search with the AspGD

- *A. acidus*
- *A. aculeatus* ATCC16872
- *A. brasiliensis*
- *A. carbonarius* ITEM 5010
- *A. sydowii*
- *A. versicolor*

All six strains were sequenced by the Broad Institute. For these strains are available for download and BLAST subject to their terms of usage policy.

AspGD has added protein domain predictions for *Aspergillus* strains:

- *A. clavatus* NRRL 1
- *A. flavus* NRRL 3357
- *A. fumigatus* A1163
- *A. niger* ATCC 1015
- *A. terreus* NIH2624
- *N. fischeri* NRRL 181

Domain predictions were made using the European Bioinformatics Institute's Pfam database. See our Domain Download pages. Do



[History & Leadership](#) [Education](#) [Contribute](#) [Careers](#) [Contact Us](#)

[What is Broad](#)

[News and Publications](#)

[Science](#) [Data](#) [Software](#)

[Home](#) > [For the Scientific Community: Data](#) > [Fusarium Comparative](#) > [Fusarium Comparative Database](#)

[Login](#)

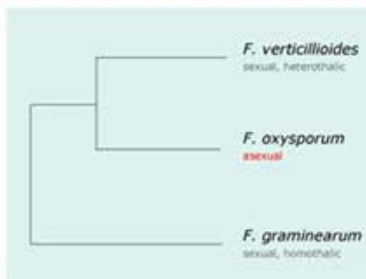
Fusarium Comparative Database



The *Fusarium* comparative genomics database provides access to multiple sequenced *Fusarium* genomes simultaneously to facilitate the comparative analysis among these closely related fungal species. The *Fusarium* comparative project is part of the Broad Fungal Genome Initiative and was funded by the U.S. Department of Agriculture's National Institute for Food and Agriculture.

The *Fusarium* Comparative Project

The genus *Fusarium* collectively represents the most important group of fungal plant pathogens, causing various diseases on nearly every economically important plant species. Of equal concern is the health hazard posed to humans and livestock by the plethora of *Fusarium* mycotoxins. Besides their economic importance, species of *Fusarium* also serve as key model organisms for biological and evolutionary research.



[Home](#) > [Data Neurospora crassa](#) > [Neurospora crassa Database](#)

Neurospora crassa Database



Tools

[BLAST Search](#): Find similarities to other sequences

[Feature Search](#): Search and view annotated features

N. crassa

[Home](#)

[Project Info](#)

[Genomes](#)

[Maps](#)

[Genes](#)

[Search](#)

[Phenotypes](#)

[FungiCyc](#)

[BLAST](#)



Ekspresja białek heterologicznych

- Silniejsze promotory
- Więcej kopii genów
- Zmiana systemu regulacji
- Stabilność transkryptów
- Aktywniejsze wersje białka
- Modyfikacje i degradacja białka
- Optymalizacja ekspresji i sekrecji białka



Systemy regulacji genetycznej

- Systemy regulacji ogólnej
 - kataboliczna represja węglowa
 - kataboliczna represja azotowa
 - odpowiedź na stres oksydacyjny
 - regulacja związana z pH
- Systemy regulacji transkrypcyjnej i post-transkrypcyjnej
- Systemy regulacji specyficznej

Kataboliczna represja węglowa

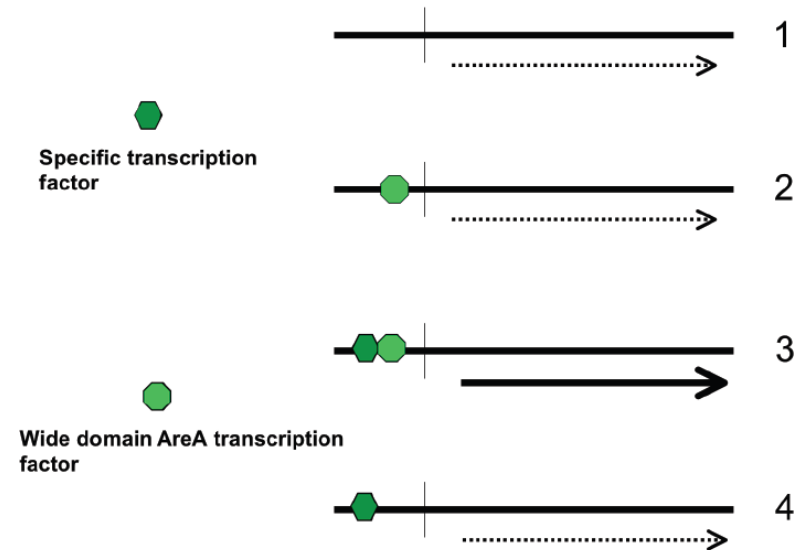
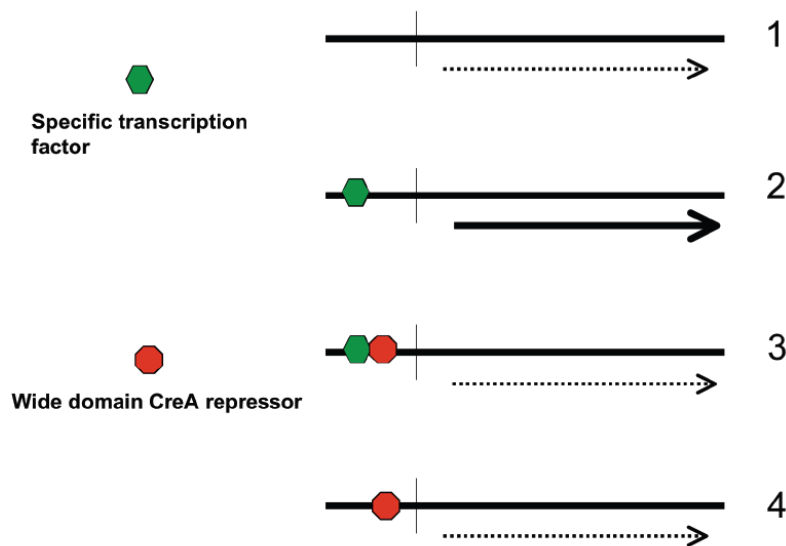
- Optymalne wykorzystanie źródeł węgla
- Wykorzystywanie alternatywnych źródeł węgla tylko wtedy, gdy nie jest dostępna glukoza
- Zablokowanie ekspresji genów kodujących odpowiednie enzymy i transportery
- System regulacji negatywnej (inaczej niż u *E.coli*) – ogólny represor CREA (Cys2His2)



Kataboliczna represja azotowa

- Optymalne wykorzystanie źródeł azotu
- Wykorzystywanie alternatywnych źródeł azotu tylko wtedy, gdy nie jest dostępna glutamina/ NH_4^+
- Zablokowanie ekspresji genów kodujących odpowiednie enzymy i transportery
- System regulacji pozytywnej – ogólny aktywator AREA (Cys4)

Współdziałanie systemów regulacji specyficznej i ogólnej



Represja węglowa

Represja azotowa

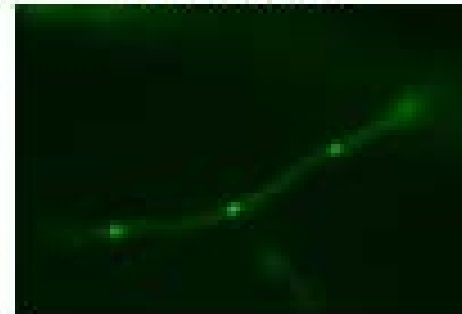
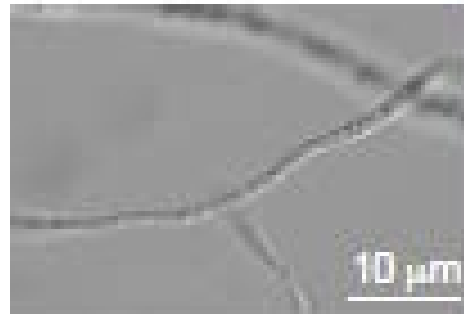
Specyficzny aktywator – Zn₂Cys₆ – dwujądrowy palec cynkowy

Kataboliczna represja azotowa

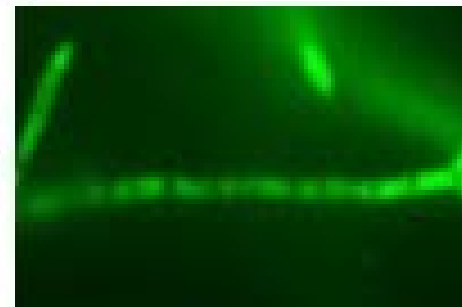
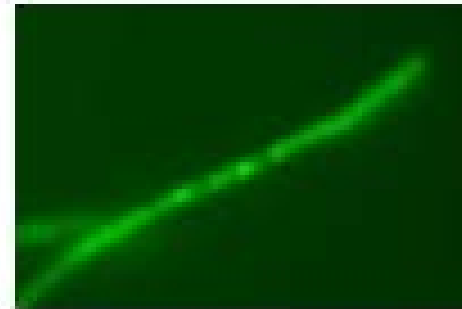
Lokalizacja AREA w jądrze zależy od źródła azotu

GFP::AreA

Głód azotowy



Represja azotowa
(+ glutamina)

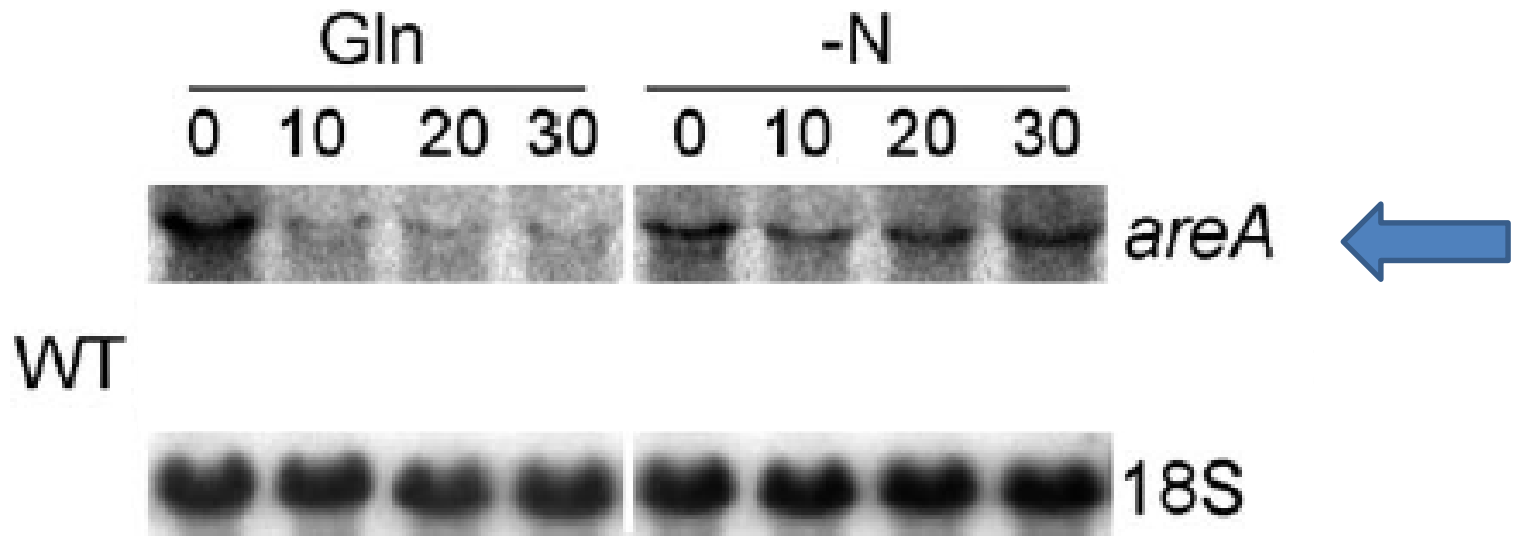


Michielse, Pfannmueller, Macios, Rengers, Dzikowska and Tudzynski (2014)

Molecular Microbiology 91:472

Kataboliczna represja azotowa

Stabilność transkryptu *areA* zależy od źródła azotu

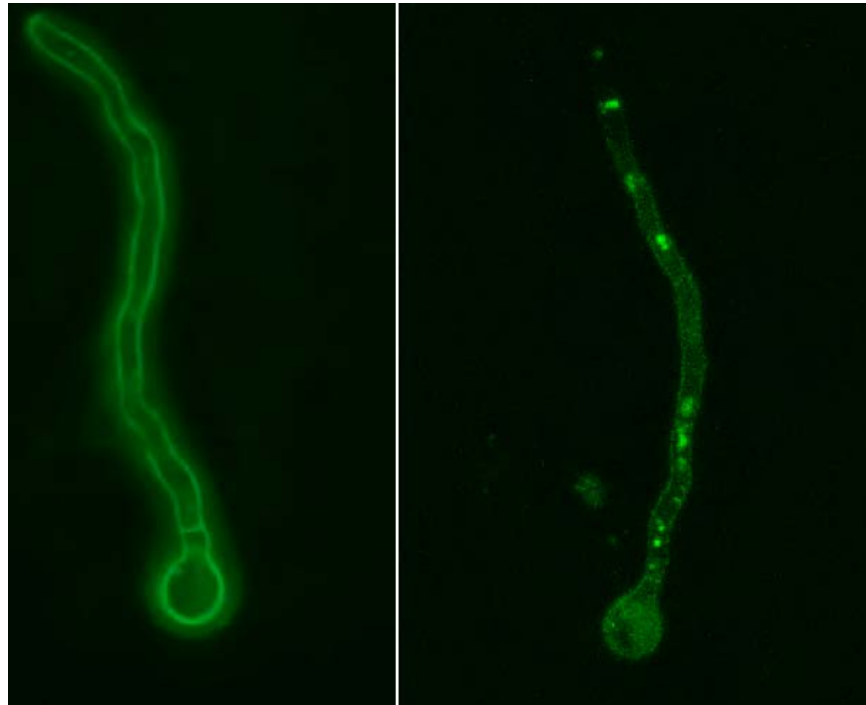


Zahamowanie transkrypcji przez proflawinę



Kataboliczna represja azotowa

Internalizacja transportera proliny po dodaniu

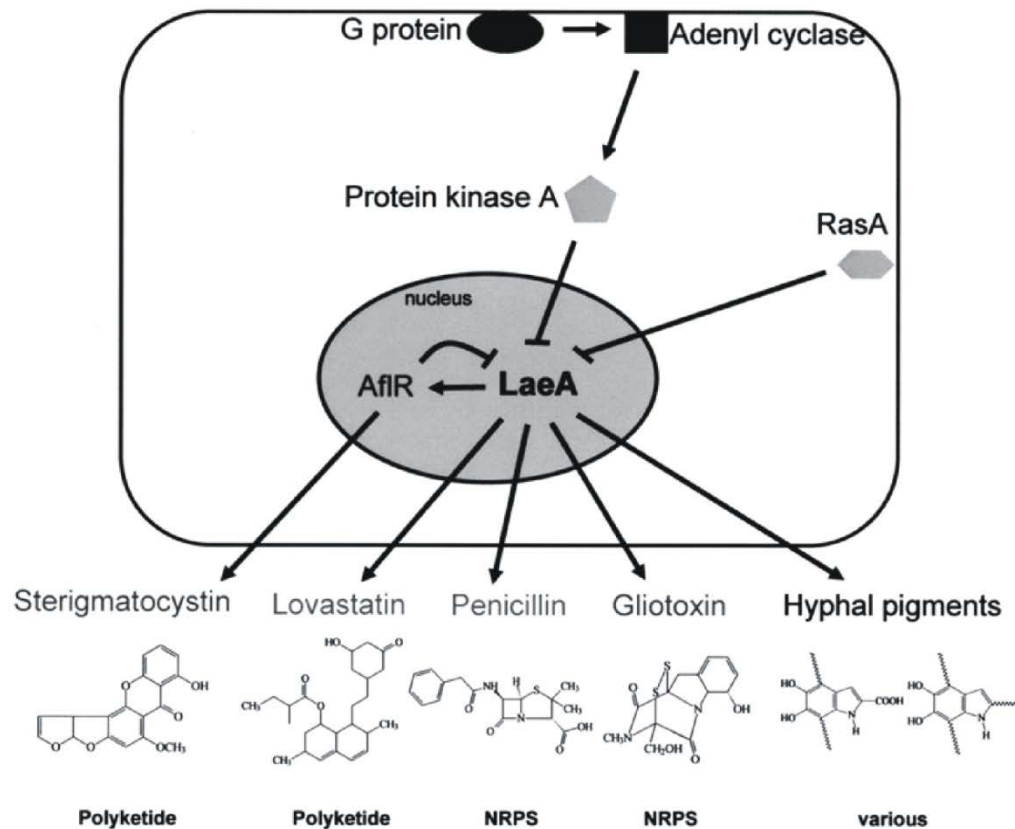


+pro

NH_4^+

Konidia hodowane na pożywce z proliną, a następnie z NH_4^+
fuzja transportera proliny prnB::GFP

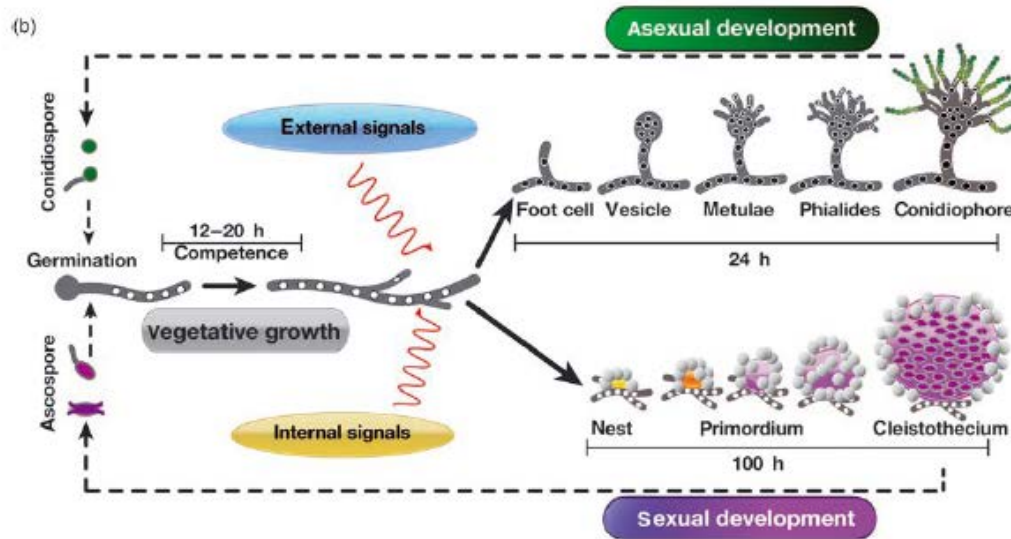
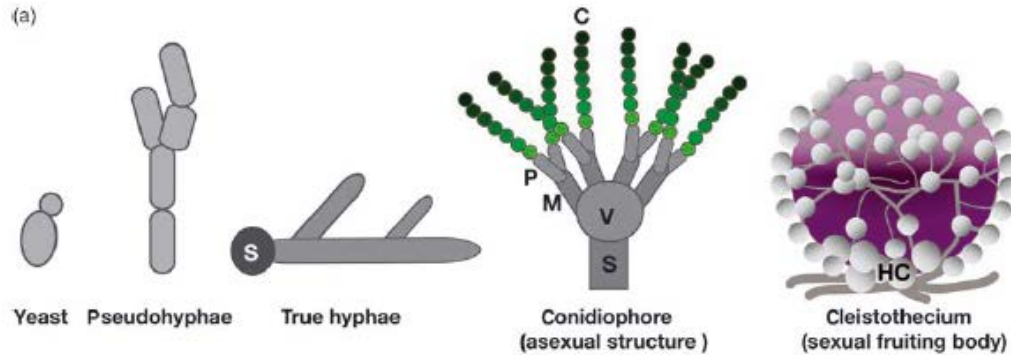
LaeA – regulator metabolizmu wtórnego



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

Eukaryotic Cell

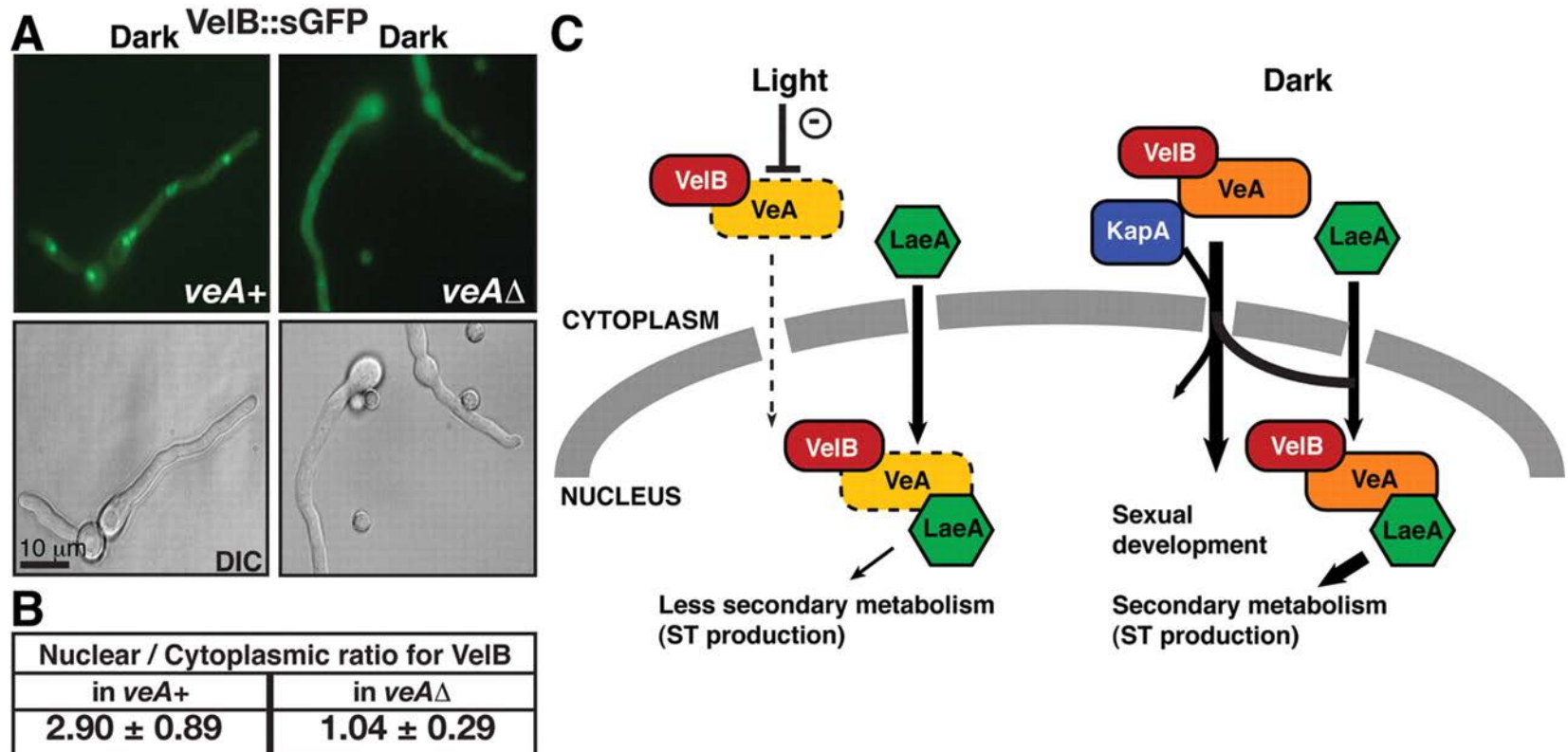
Morfologiczne różnicowanie grzybów



światło

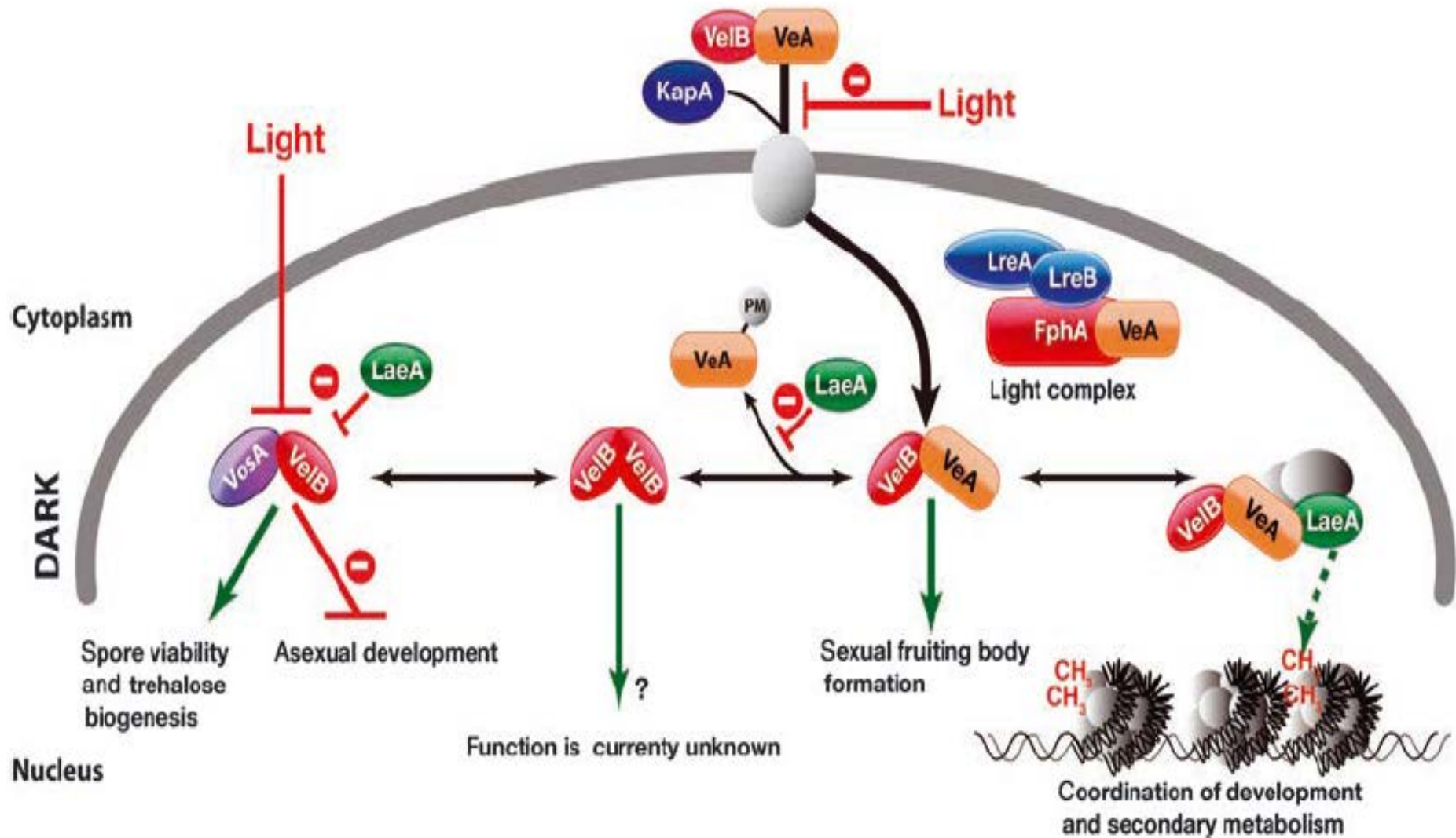
ciemność

Fig. 4. VeA supports nuclear localization of VeIB and formation of the velvet complex.



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





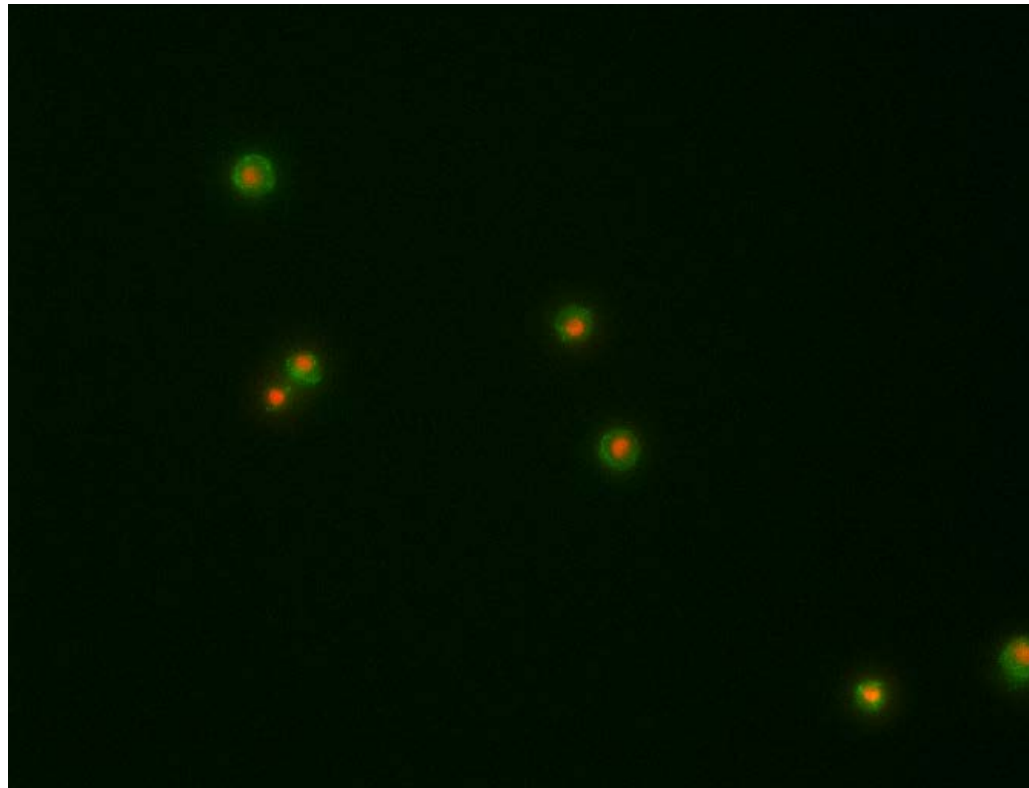
LaeA przeciwdziała metylacji H3K9, prowadzącej do powstania heterochromatyny (HP1)

PRZERWA



Biologia komórki

Kiełkowanie konidiów - mitoza



Oakley B., unpublished

[film](#)

Biologia komórki

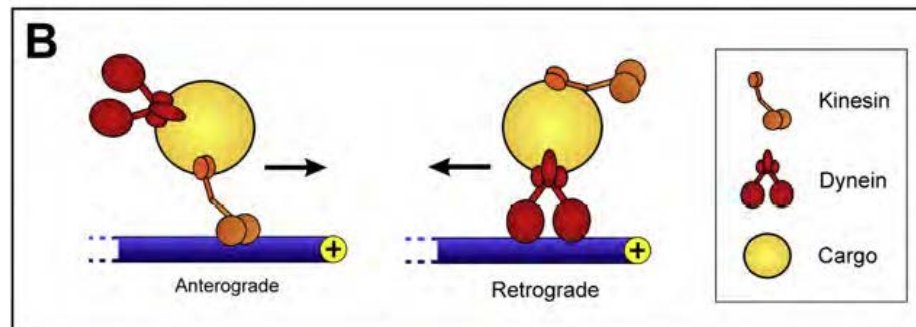
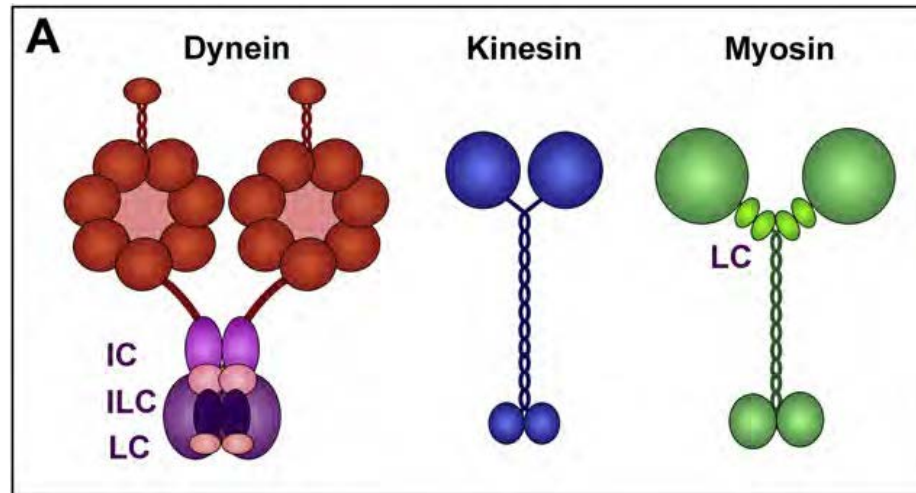
Mutanty związane z podziałami komórki

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





Biologia komórki

Ruch endosomów wzdłuż mikrotubul

Ustilago maydis

Patogen roślin – głownia kukurydzy

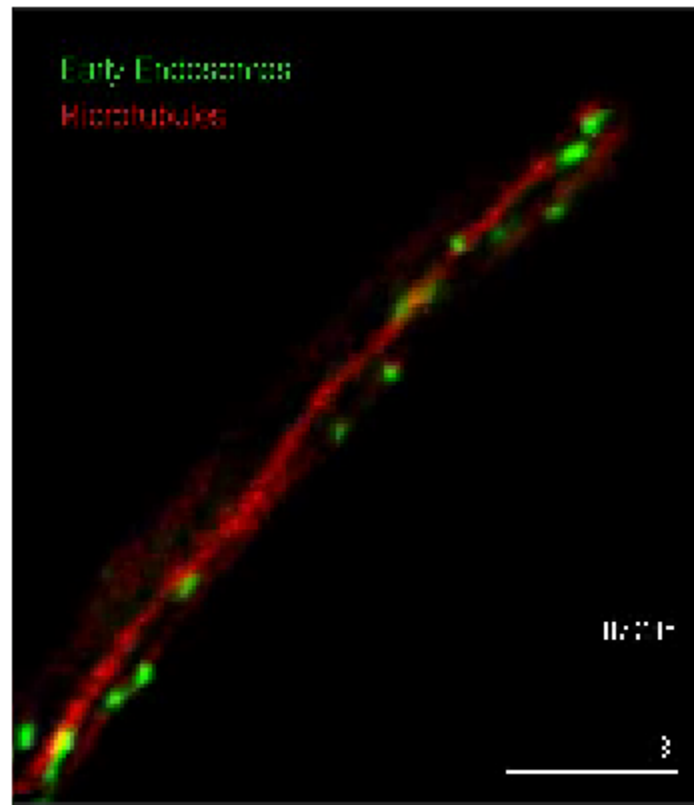


Quesadilla de huitlacoche



Biologia komórki

Ruch endosomów wzdłuż mikrotubul



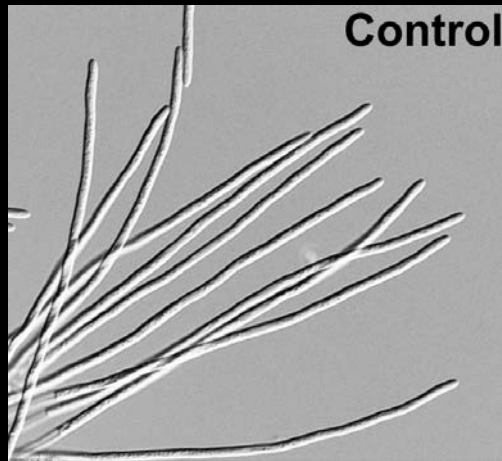
[2i_EEsOnMTs.wmv](#)

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

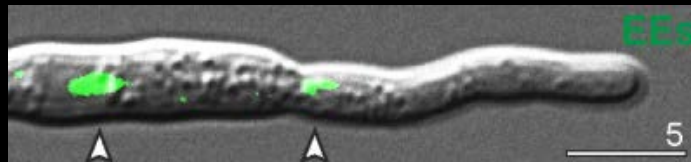
Hok1 - a master coordinator of
bi-directional endosome motility
in *Ustilago maydis*

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

A screen for mutants defective in EE motility



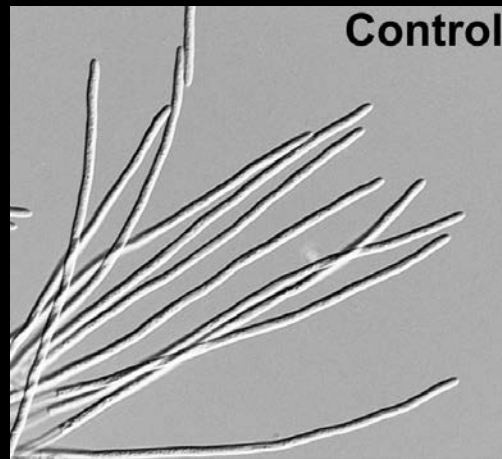
Kinesin-3 mutant



Dynein mutant



A screen for mutants defective in EE motility



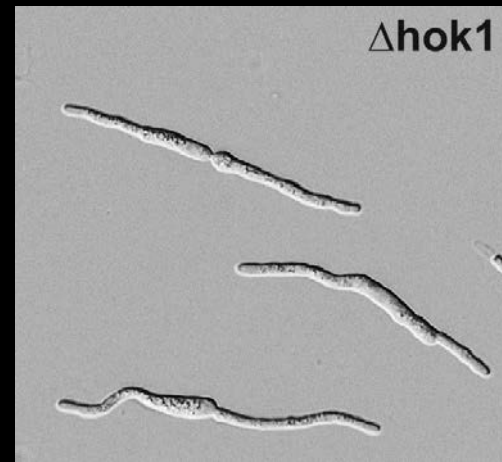
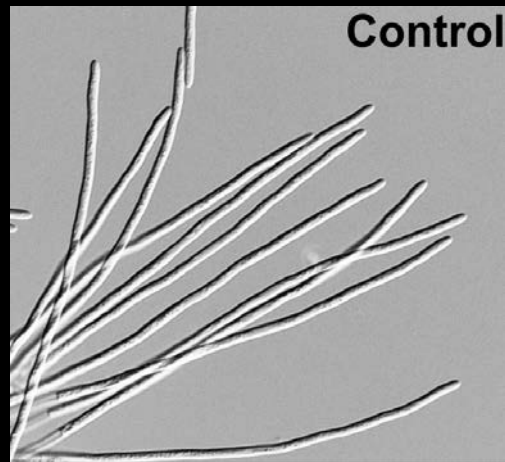
wildtype



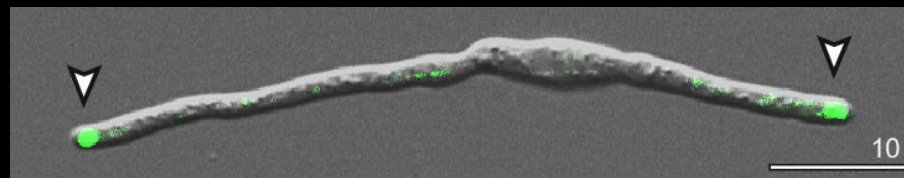
EMD5 mutant



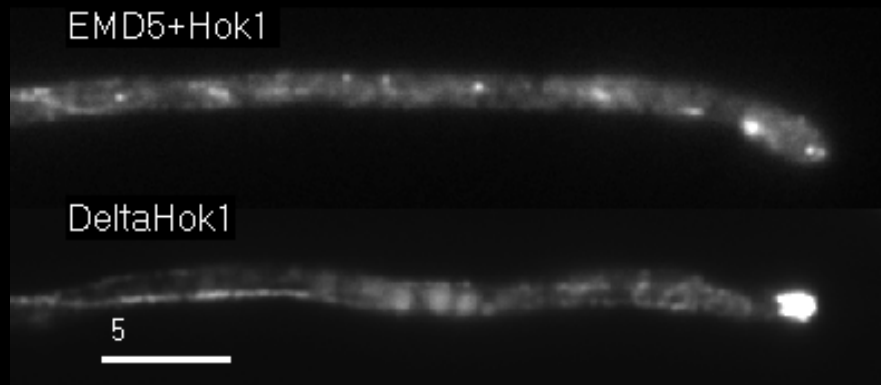
A screen for mutants defective in EE motility



hok1 null

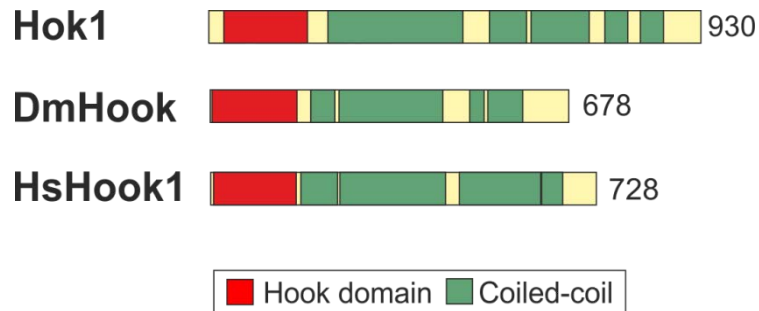


EMD5 + Hok1::GFP



hok1 null

Hook proteins are required for bi-directional EE motility



- DmHook required for endocytic sorting

- Humans have 3 Hook proteins

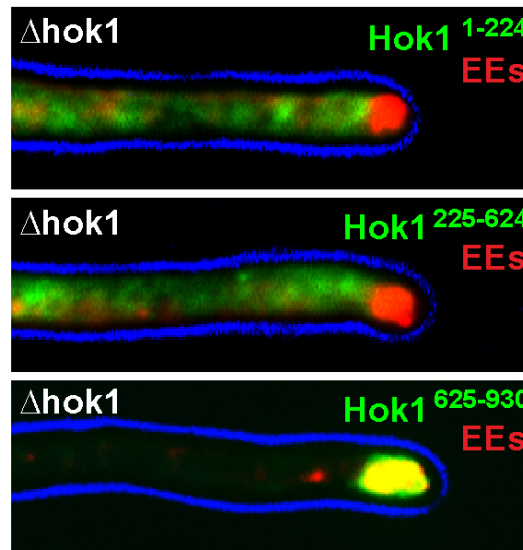
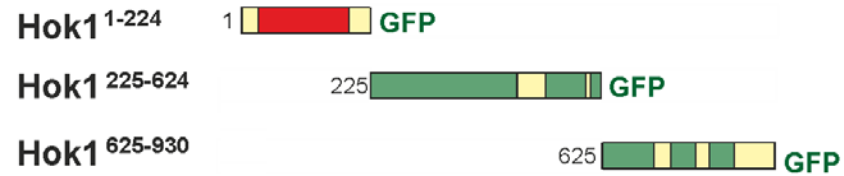
Hook1: Endocytic recycling and sorting

Hook2: Primary cilium formation

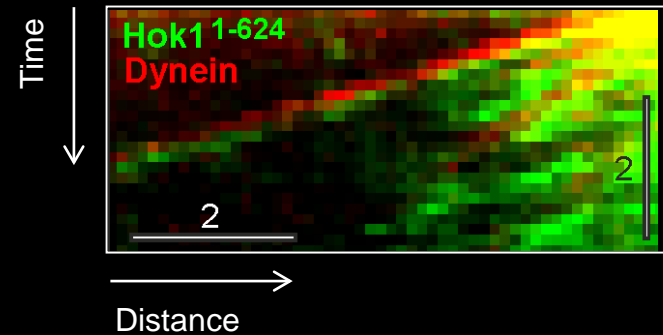
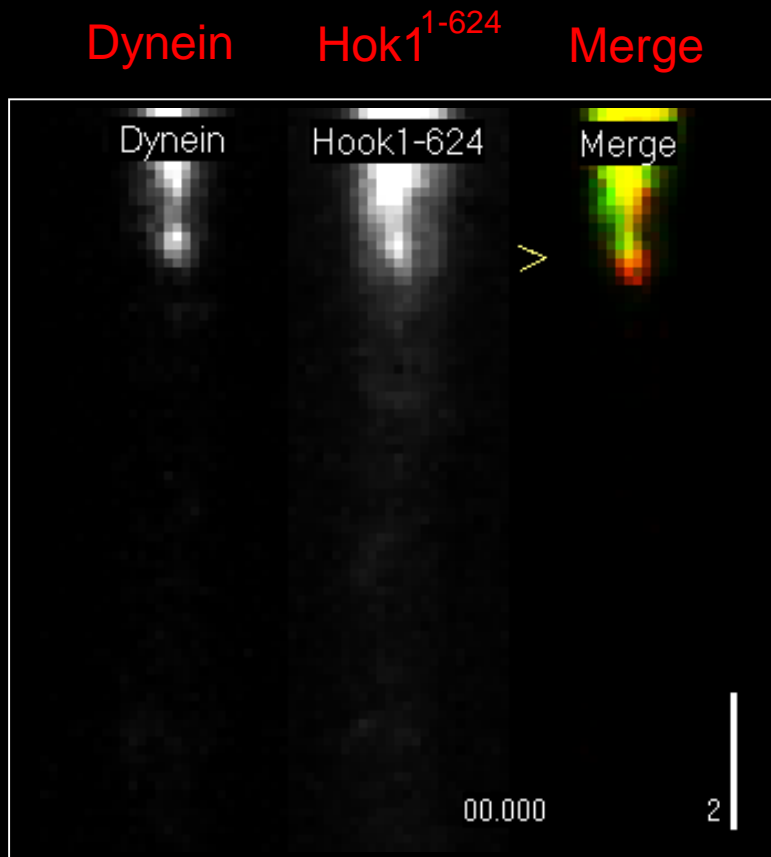
Hook3: Golgi organization

- binds to microtubules and organelles- a linker protein?

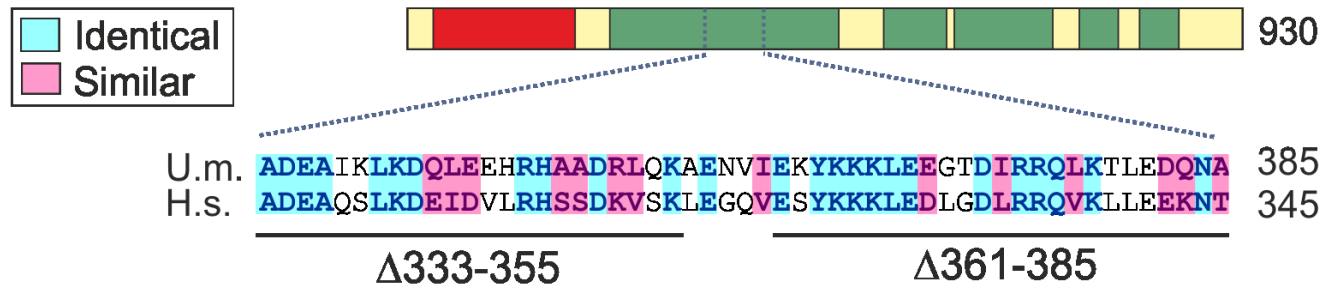
Hok1 targets to EEs via its C-terminal part



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

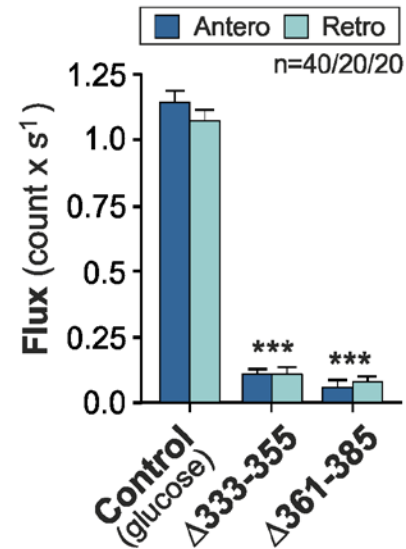
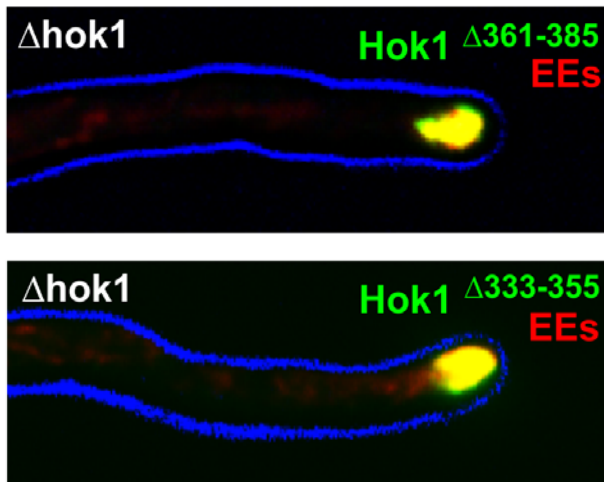
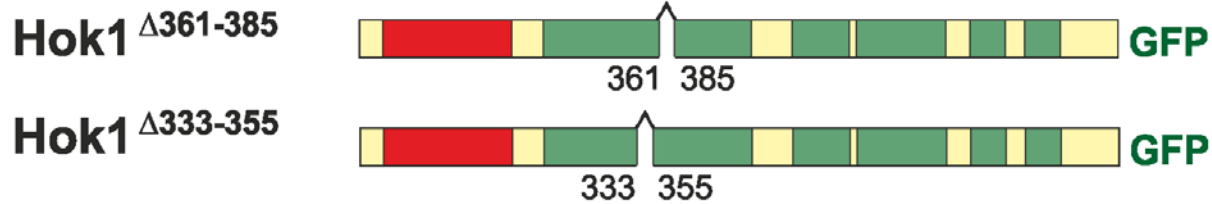


A highly conserved region in the first coiled-coil is essential for dynein binding



~50% identical with human Hook3

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

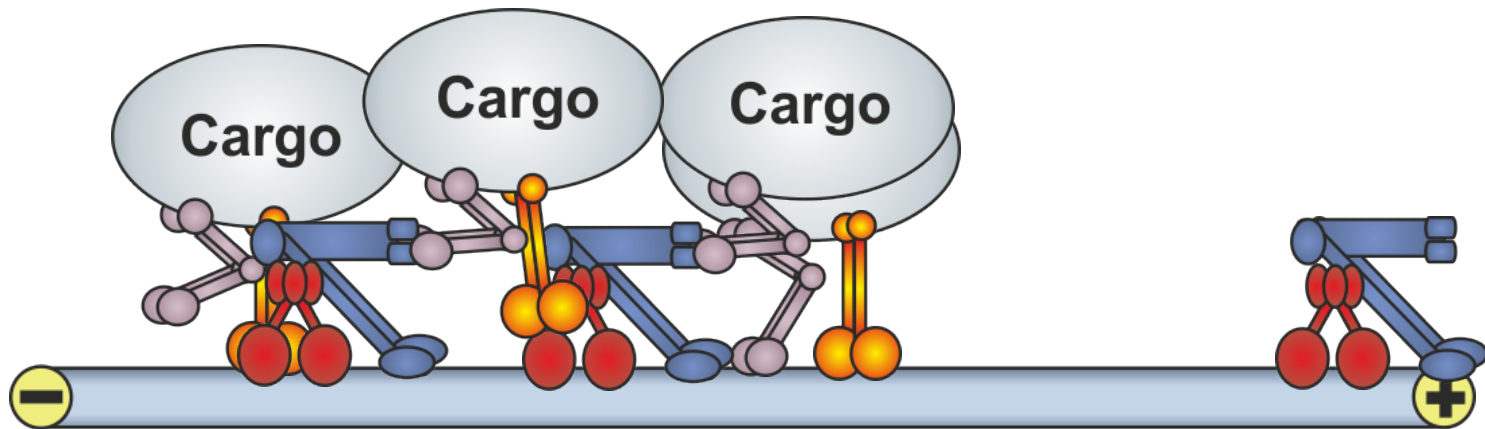


Model: A role of Hook in anterograde-to-retrograde turning



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

Kinesin 2 release
Dynein binding
during retrograde turning

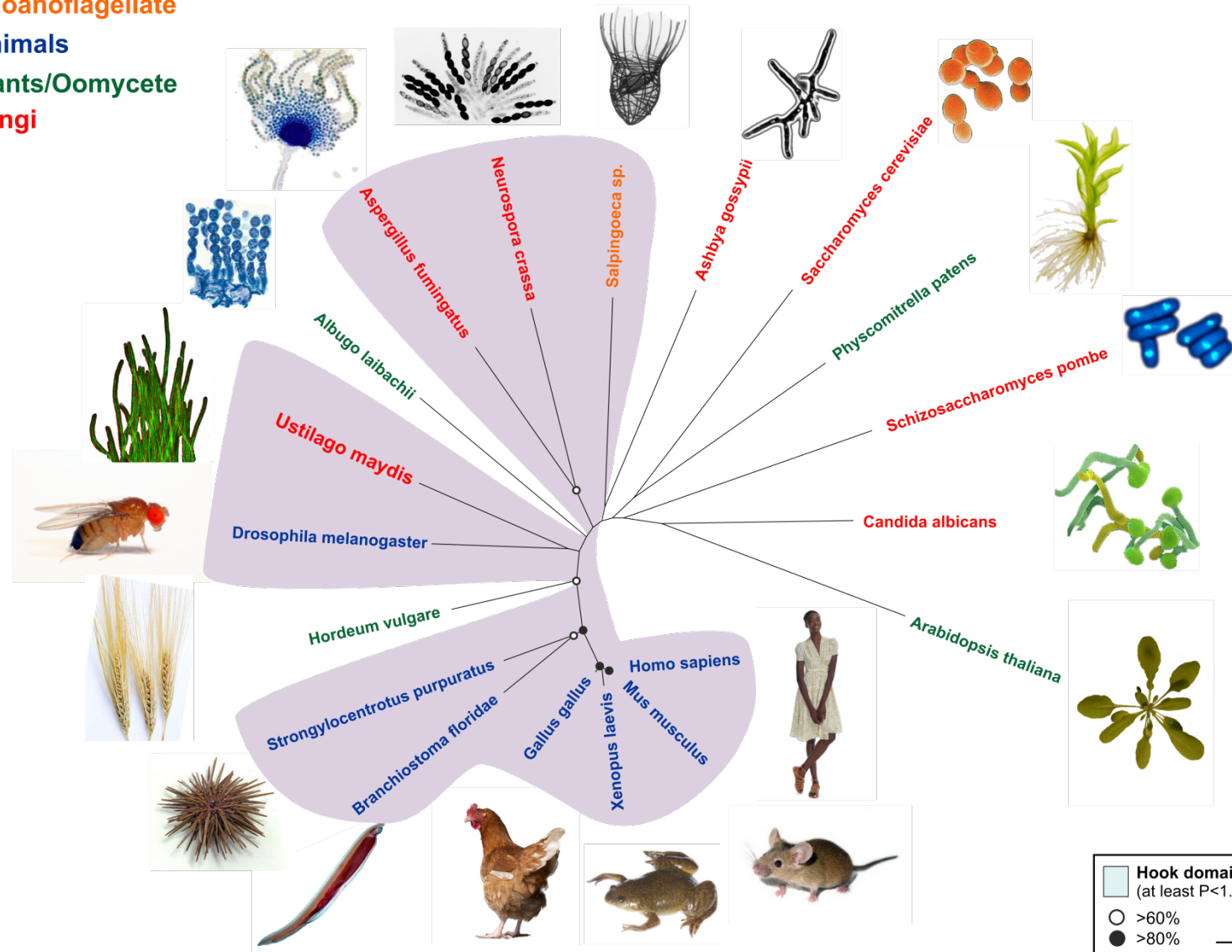


Is the function of Hok1 conserved ?

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

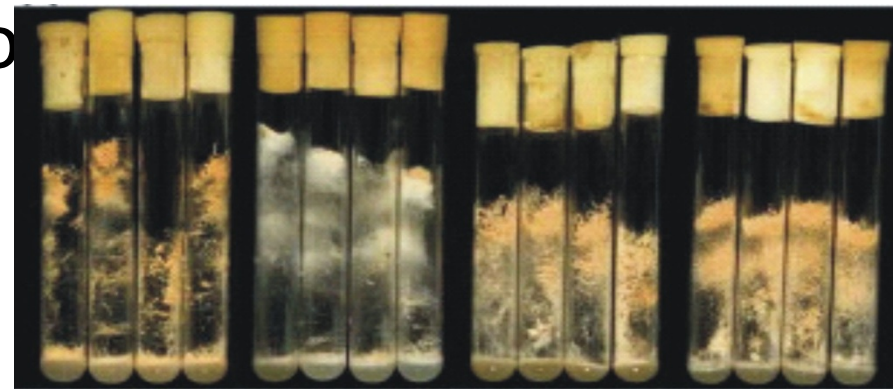
Hook and Kinesin-3 co-evolved

Choanoflagellate
Animals
Plants/Oomycete
Fungi

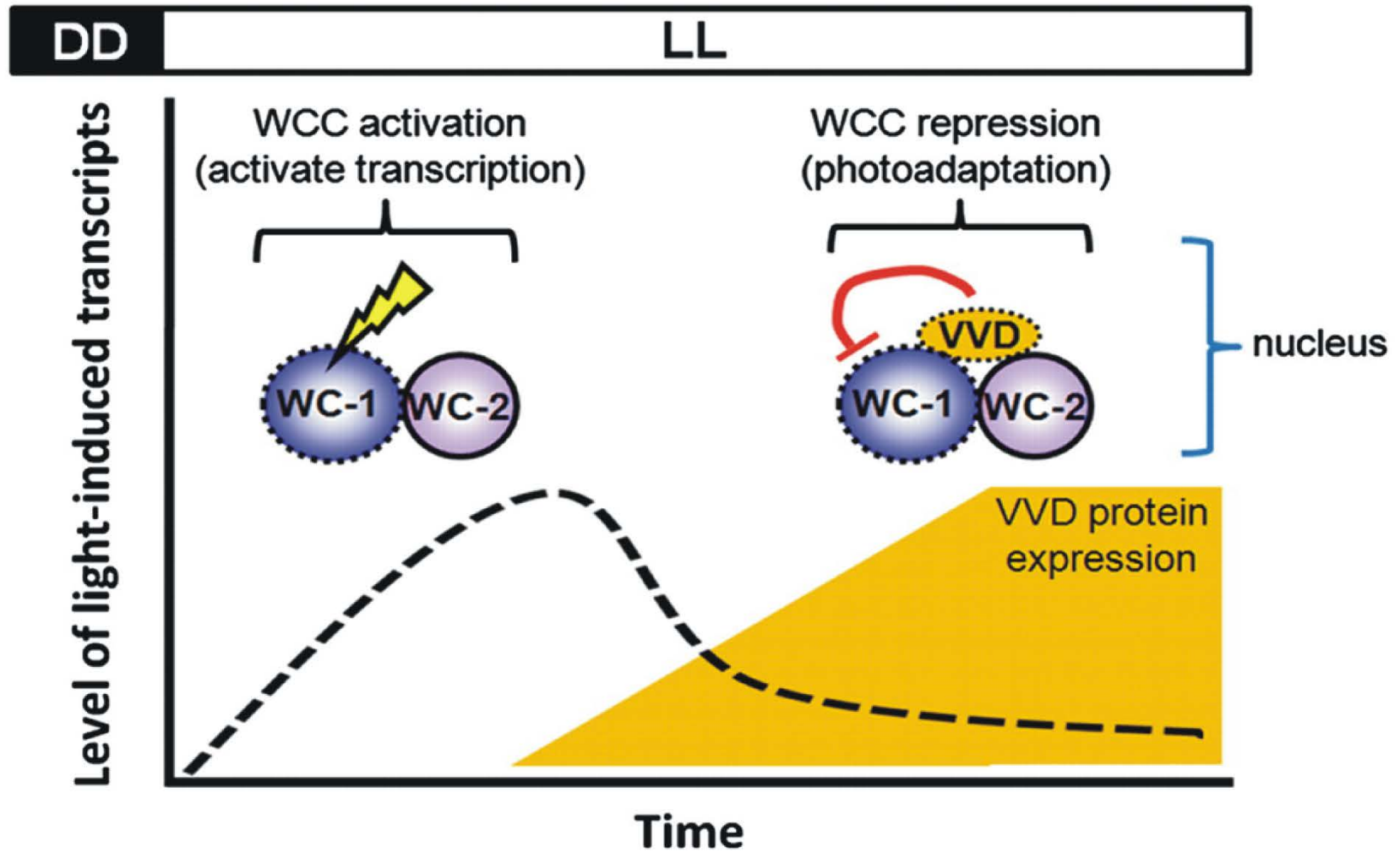


Regulacja przez światło

- Grzyby dostosowują konidiowanie do pory dnia
- Regulacja przez światło niebieskie (*Neurospora*)
(6% genów indukowanych przez światło)
- Regulacja przez światło czerwone (*Aspergillus*)
- White collar kompleks (WC1+WC2) – aktywacja transkrypcji
- WC1 – fotoreceptor - domena LOV – wiązanie chromoforu flawinowego
- Fotoadaptacja(VVD)

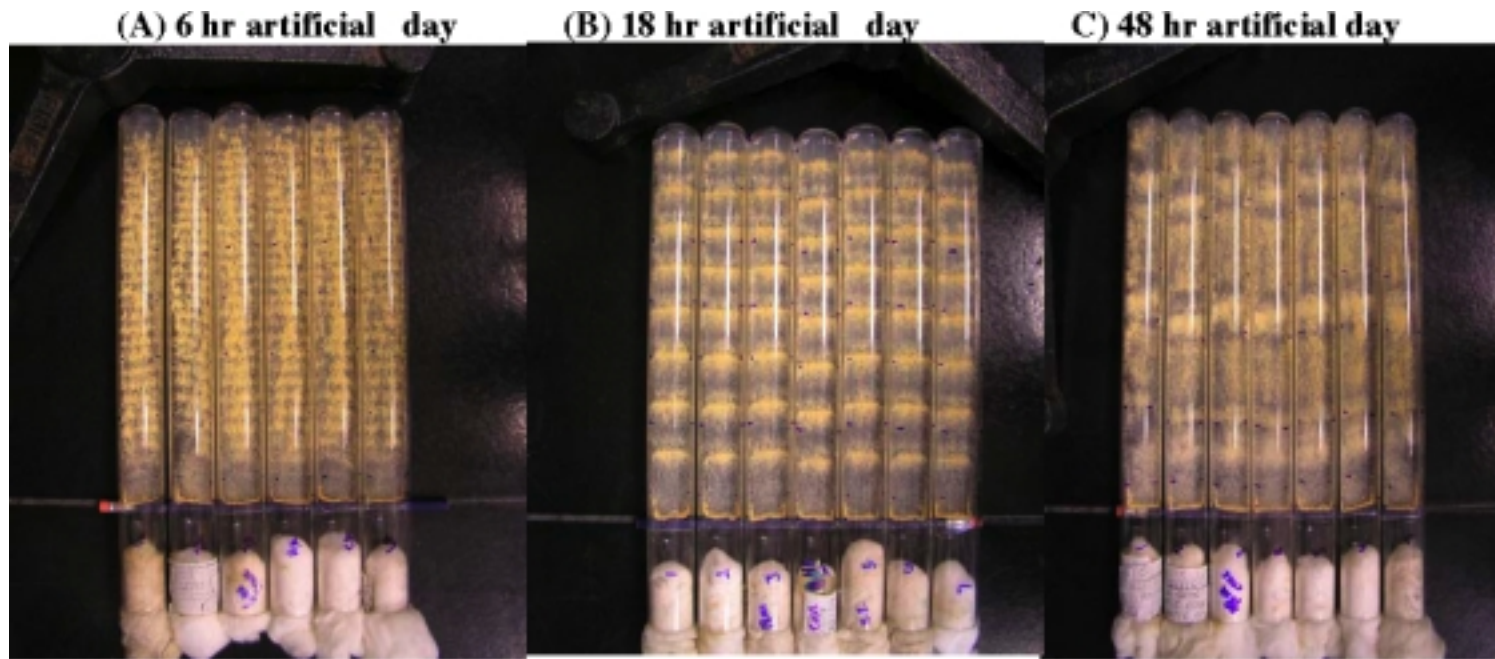


Photoadaptation in Neurospora.



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

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

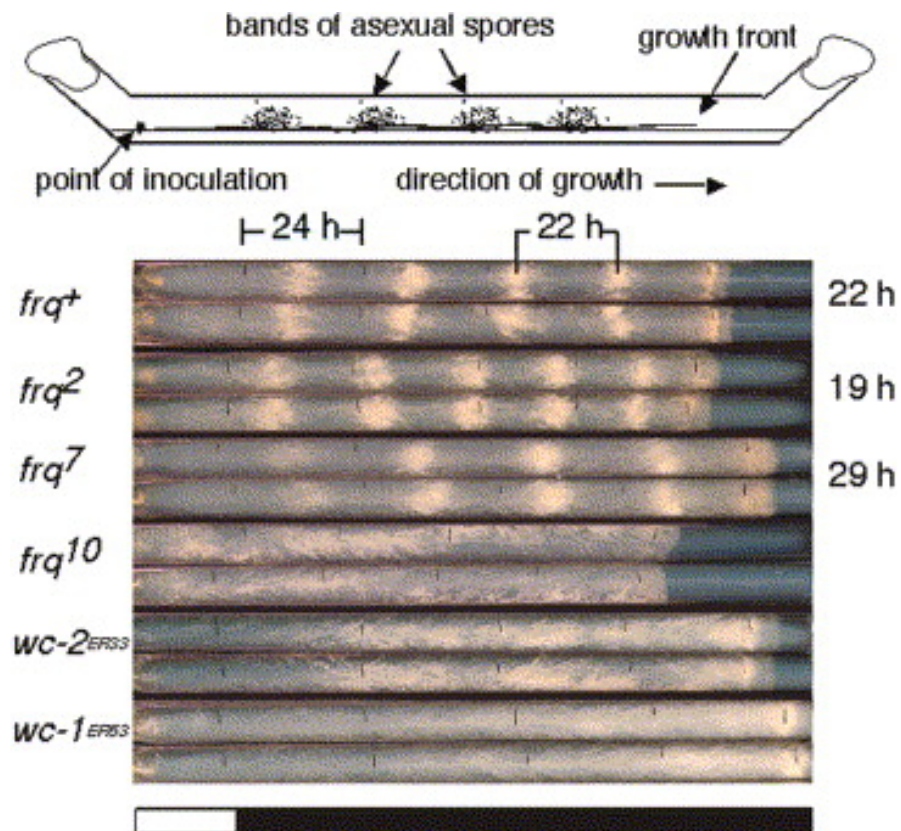


**Zegar biologiczny, niezależny od sygnałów zewnętrznych
Oscylator wewnętrzny synchronizowany przez czynniki
zewnętrzne (światło, temperatura)**

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

