



Organizmy modelowe

Grzyby filamentalne
(strzępkowe)

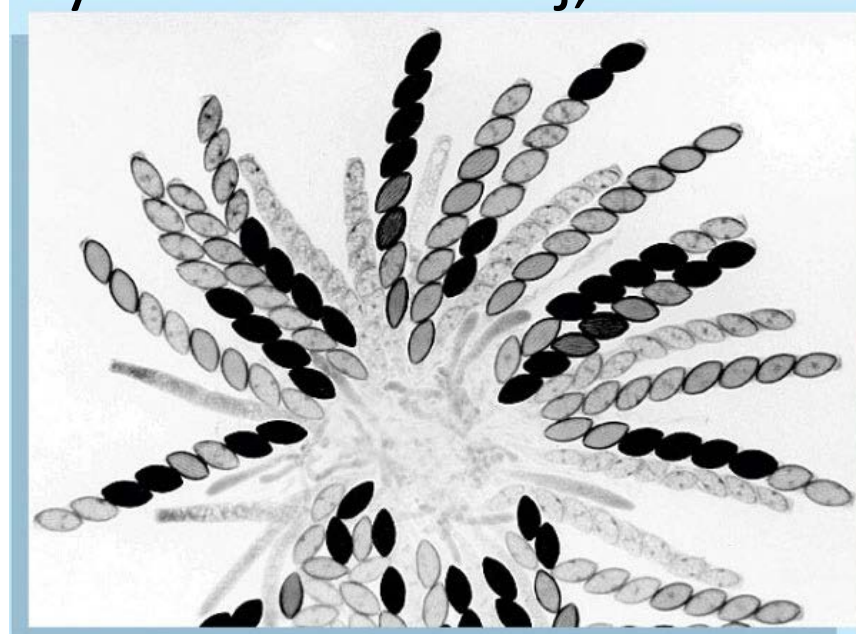
dr hab Agnieszka Dzikowska

Instytut Genetyki i Biotechnologii

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

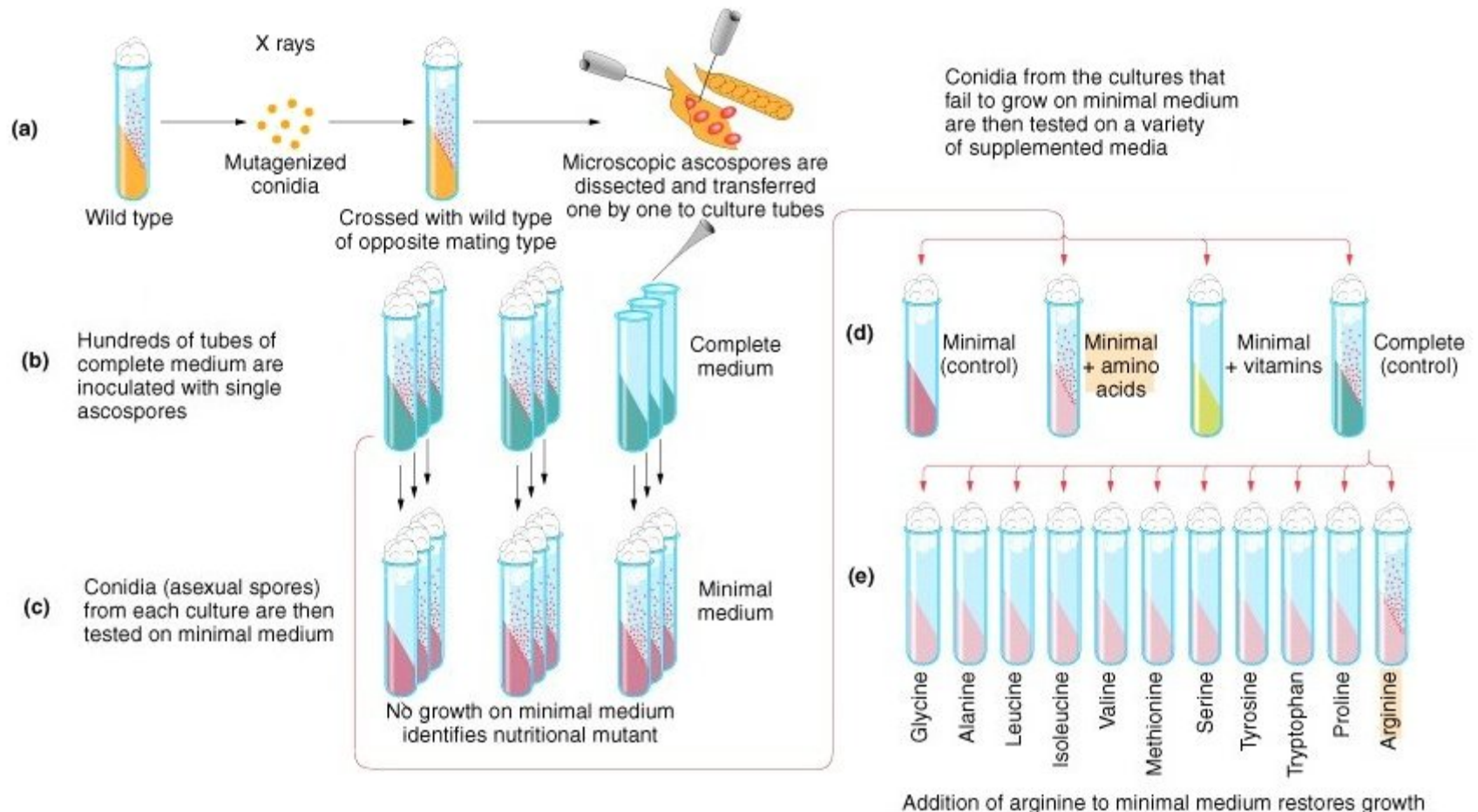
Hipoteza jeden gen –jeden enzym

- 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⁻



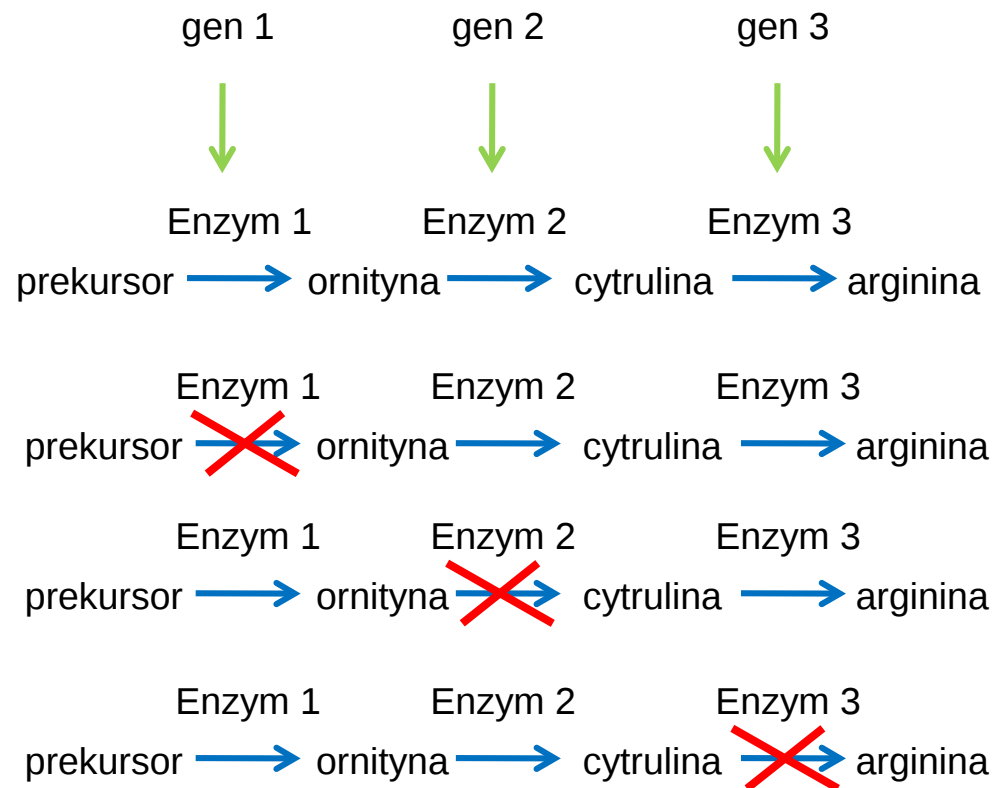


Eksperyment Beadl'a

2) jeden gen – jeden enzym

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

	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 filamentalne jako organizmy modelowe w dzisiejszych czasach

Grzyby filamentalne są istotne, gdyż:

- Są patogenami zwierząt i roślin
- Mają ogromne znaczenie w biotechnologii

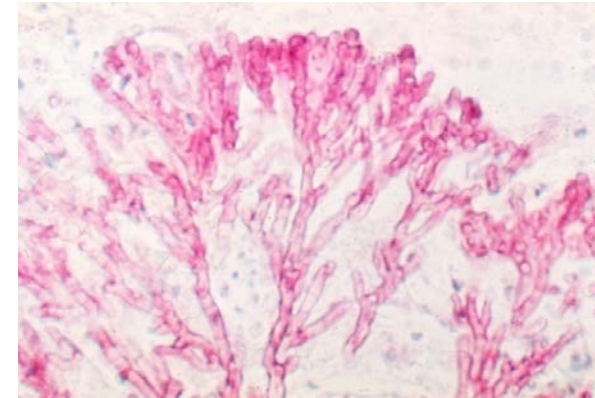
W badaniach podstawowych są dobrym modelem w

- Biologii komórki
- W badaniach specyficznych systemów regulacji genetycznej



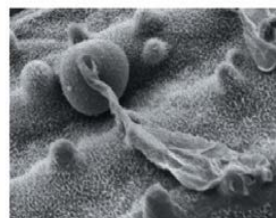
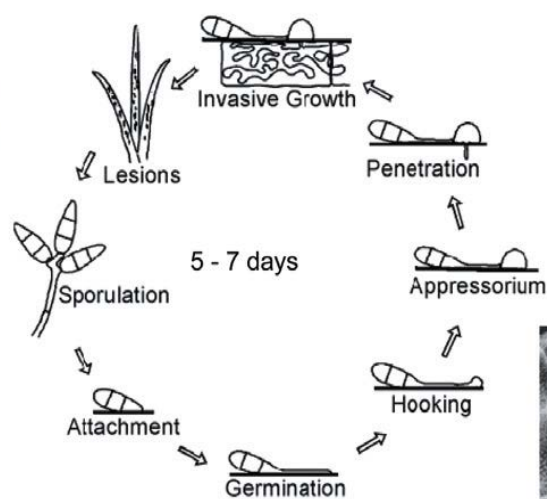
Grzyby filamentalne – patogeny zwierząt i człowieka

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



Grzyby filamentalne – patogeny roślin

Magnaporthe oryzae
rice blast disease

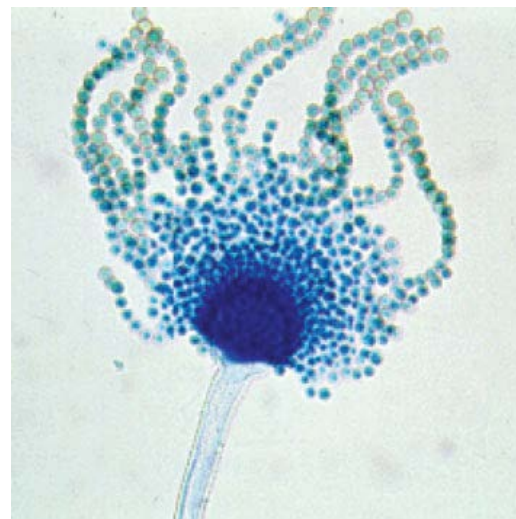


Grzyby filamentalne – patogeny roślin

Aspergillus flavus

Aspergillus parasiticus

Wytwarzają aflatoksyny, wywołujące
nekrozę komórek wątroby
i nowotwór wątroby



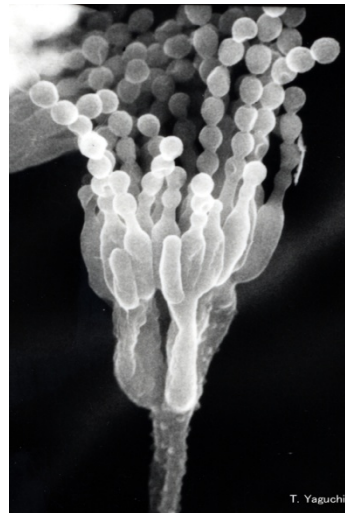
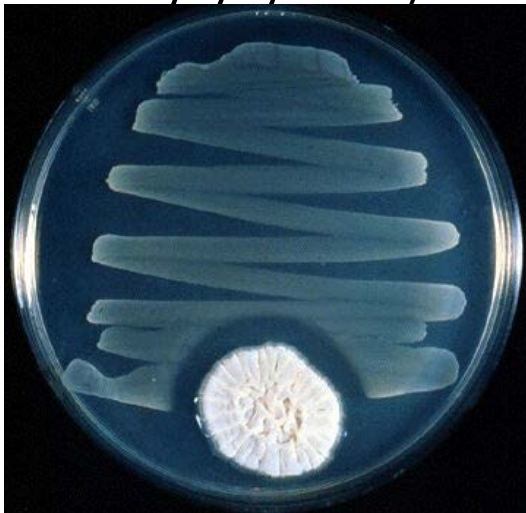
Fotografie –

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_%28hyaline%29/Aspergillus/flavus.html

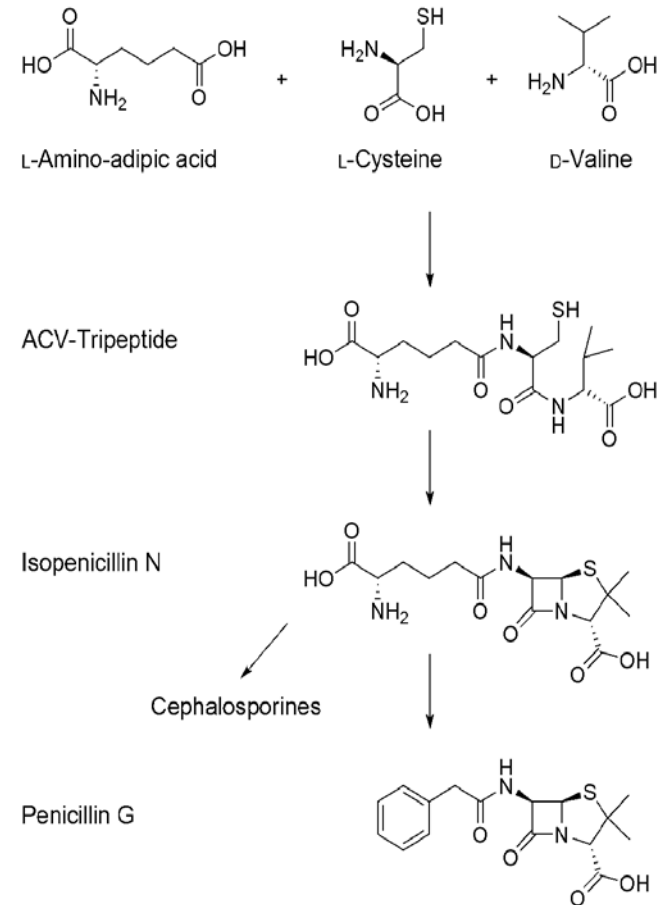
<http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/2005/9-19/aflatoxin.html>

Znaczenie grzybów filamentalnych 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)



Pędzlak - konidiofor



Fotografie –

<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 -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 filamentalnych 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>



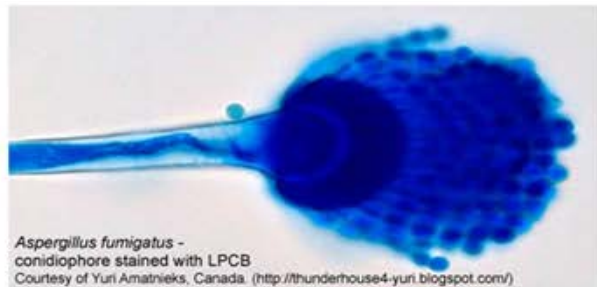
Rekombinowane enzymy otrzymywane z grzybów filamentalnych

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>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.

Genomy grzybów filamentalnych

AspGD - *Aspergillus* Genome Database



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 *Emmericella 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, 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 InterPro database on our Domain Download pages. Do

<https://fungidb.org/fungidb/>



[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](#)

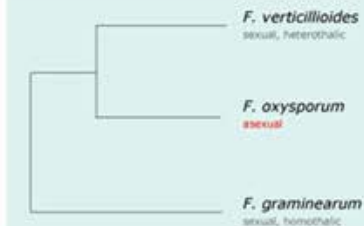
Fusarium Comparative Database



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 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

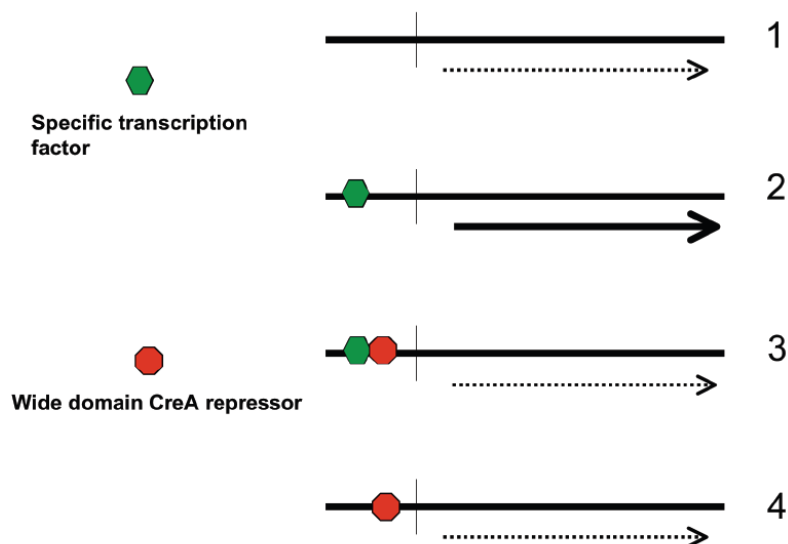
- Umożliwia optymalne wykorzystanie źródeł węgla
- Prowadzi do wykorzystywania alternatywnych źródeł węgla tylko wtedy, gdy nie jest dostępna glukoza
- Związana jest z zablokowaniem ekspresji genów kodujących odpowiednie enzymy i transportery alternatywnych źródeł węgla
- U grzybów jest to system regulacji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



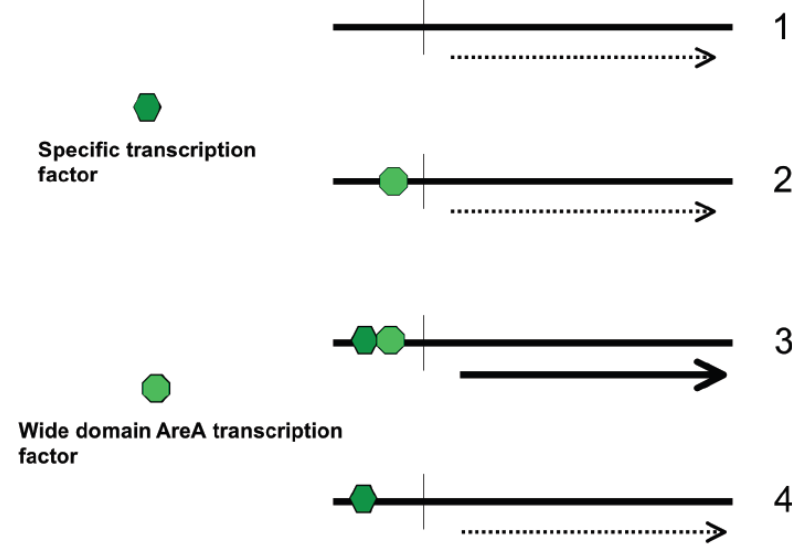
Kataboliczna represja azotowa

- Umożliwia optymalne wykorzystanie źródeł azotu
- Prowadzi do wykorzystywania alternatywnych źródeł azotu tylko wtedy, gdy nie jest dostępna glutamina lub 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 typu ogólny (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)



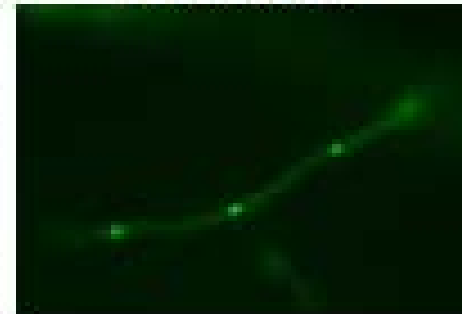
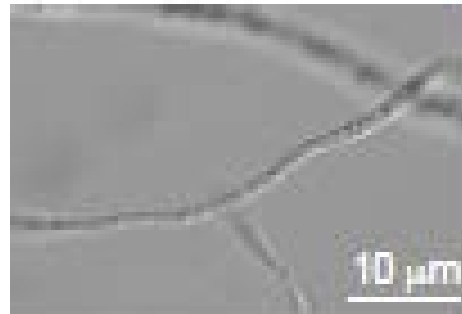
Kataboliczna represja azotowa

Regulacja aktywności AREA - 1

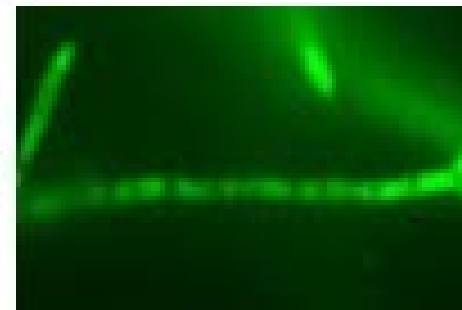
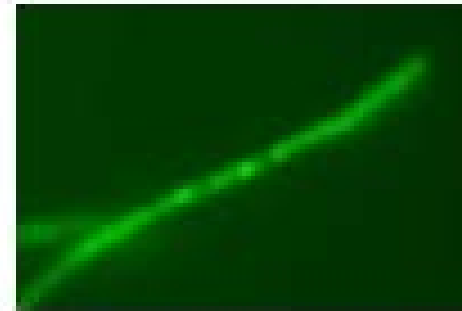
Lokalizacja AREA w jądrze zależy od źródła azotu

GFP::AreA

Głód azotowy



Represja azotowa
(+ glutamina)



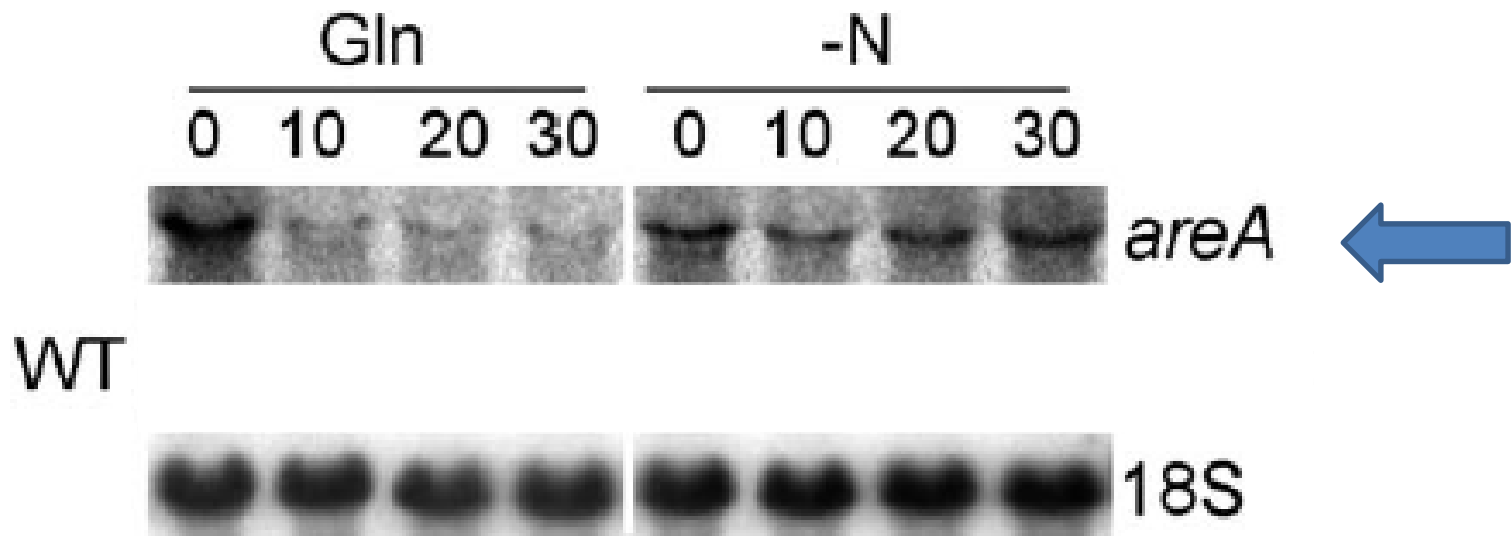
Michielse, Pfannmueller, Macios, Rengers, Dzikowska and Tudzynski (2014)

Molecular Microbiology 91:472

Kataboliczna represja azotowa

Regulacja aktywności AREA - 2

Stabilność transkryptu *areA* zależy od źródła azotu

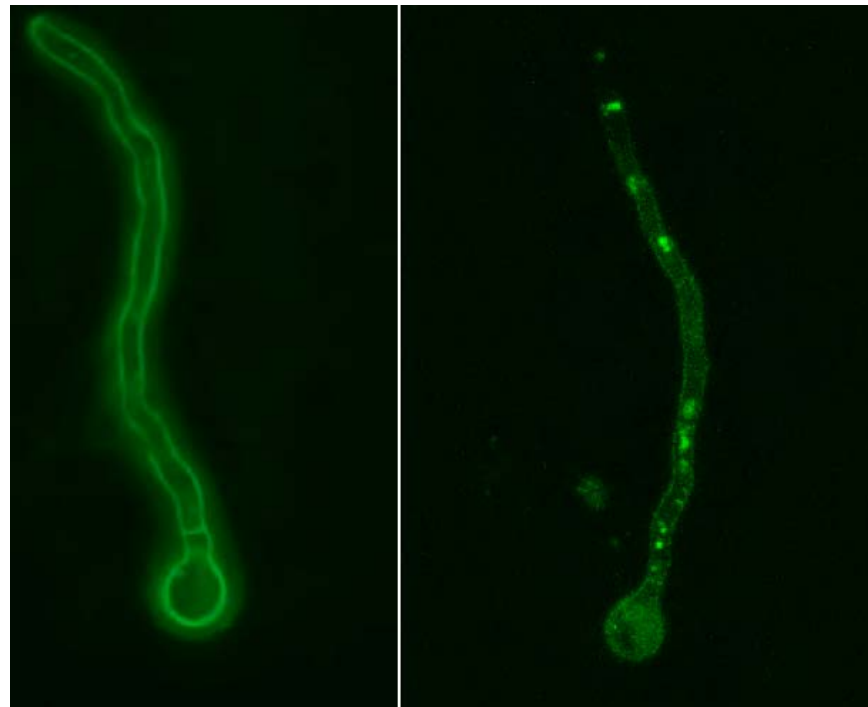


Zahamowanie transkrypcji przez proflawinę



Kataboliczna represja azotowa

Internalizacja transportera proliny po dodaniu NH_4^+

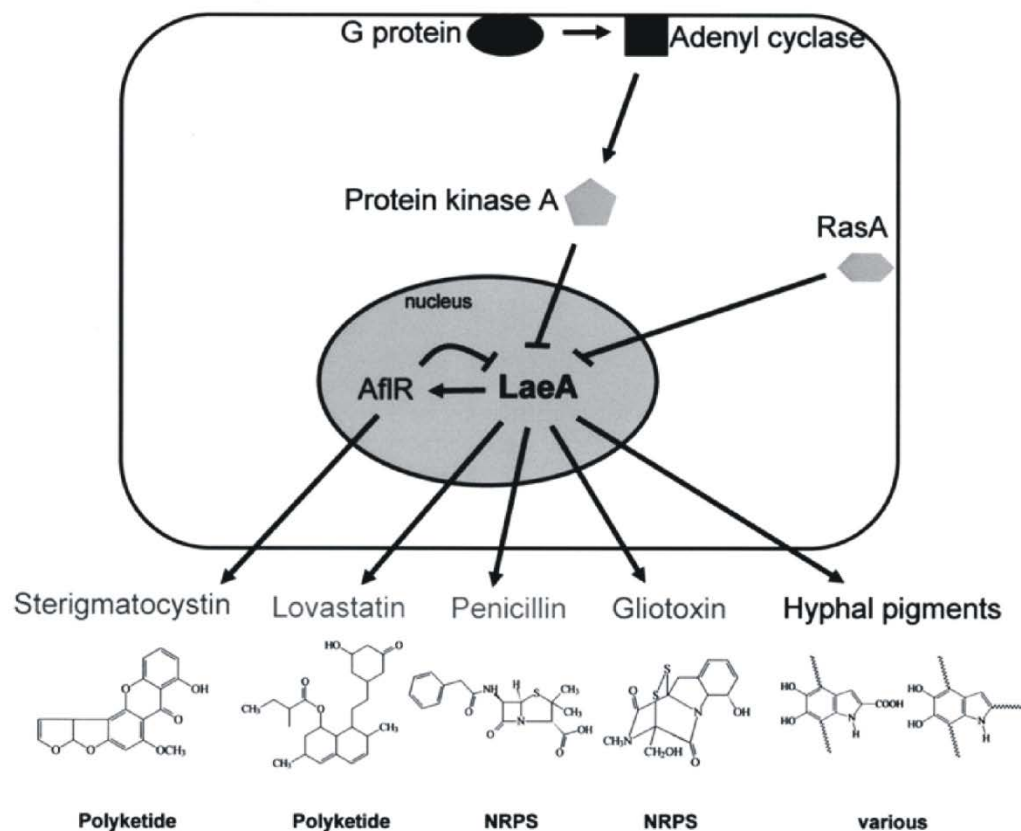


+pro

NH_4^+

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

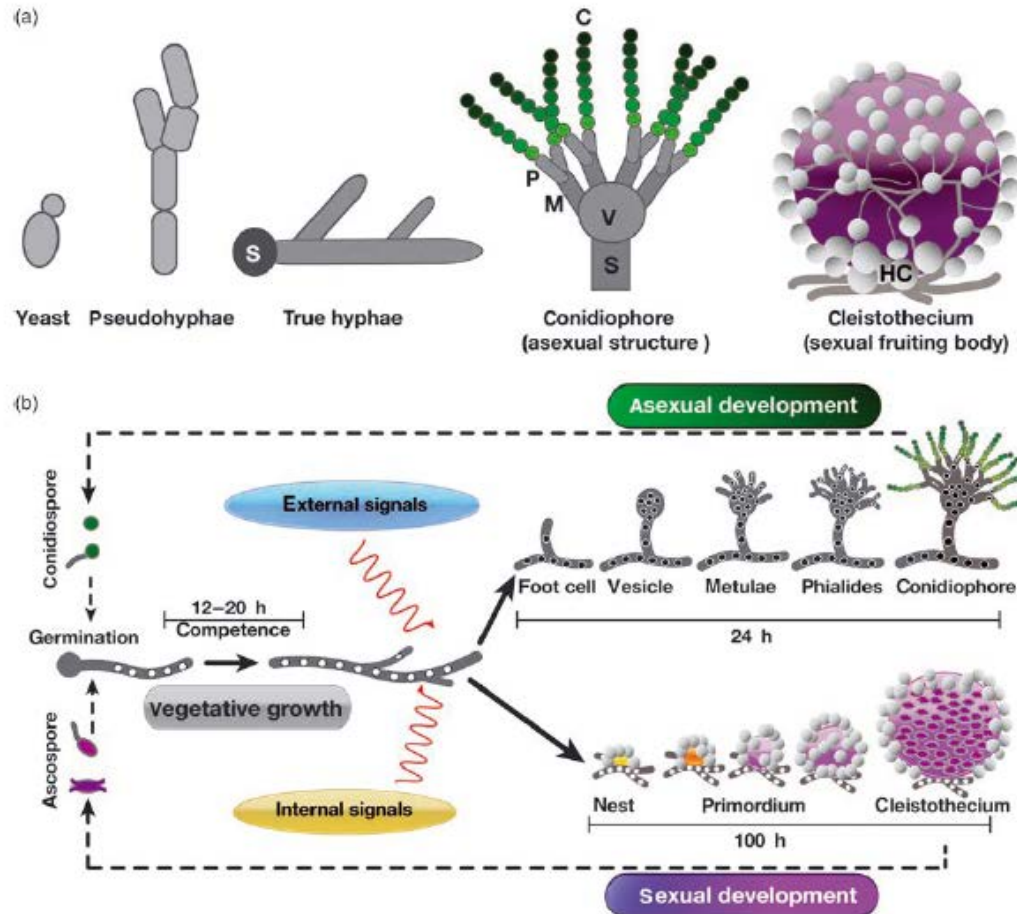
LaeA – regulator metabolizmu wtórnego



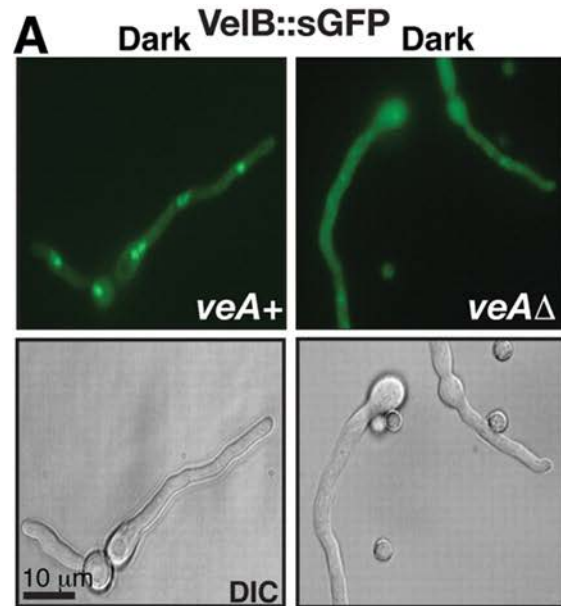
Bok J W, and Keller N P Eukaryotic Cell 2004;3:527-535

Eukaryotic Cell

Morfologiczne różnicowanie grzybów

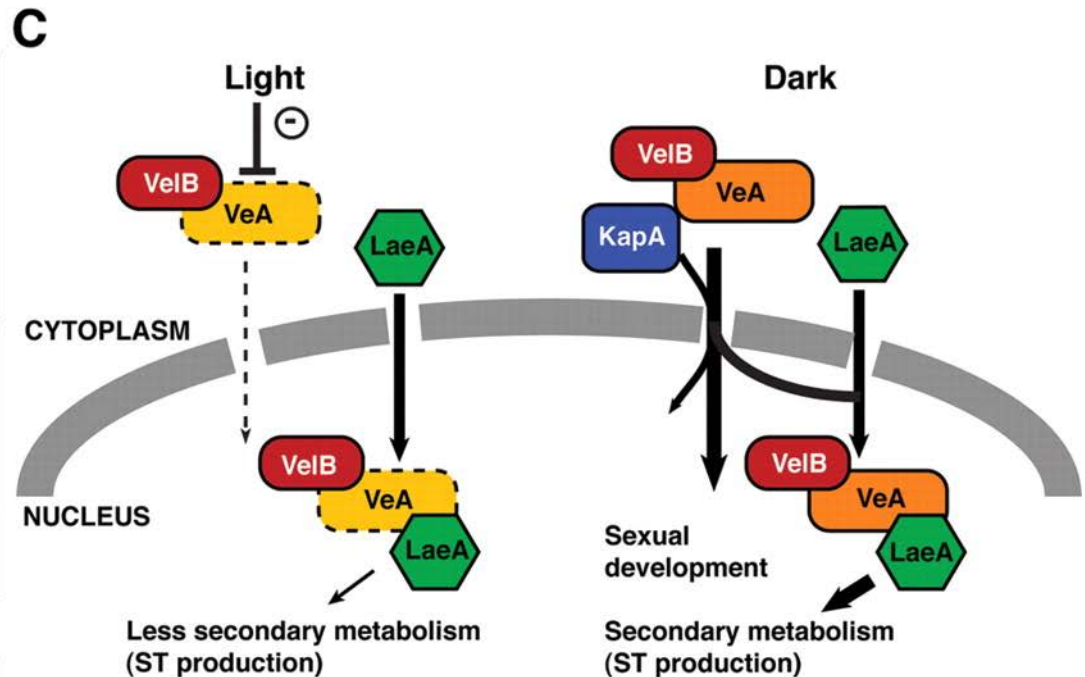


Współdziałanie regulatora LaeA i białek z rodziny velvet w regulacji metabolizmu wtórnego



B

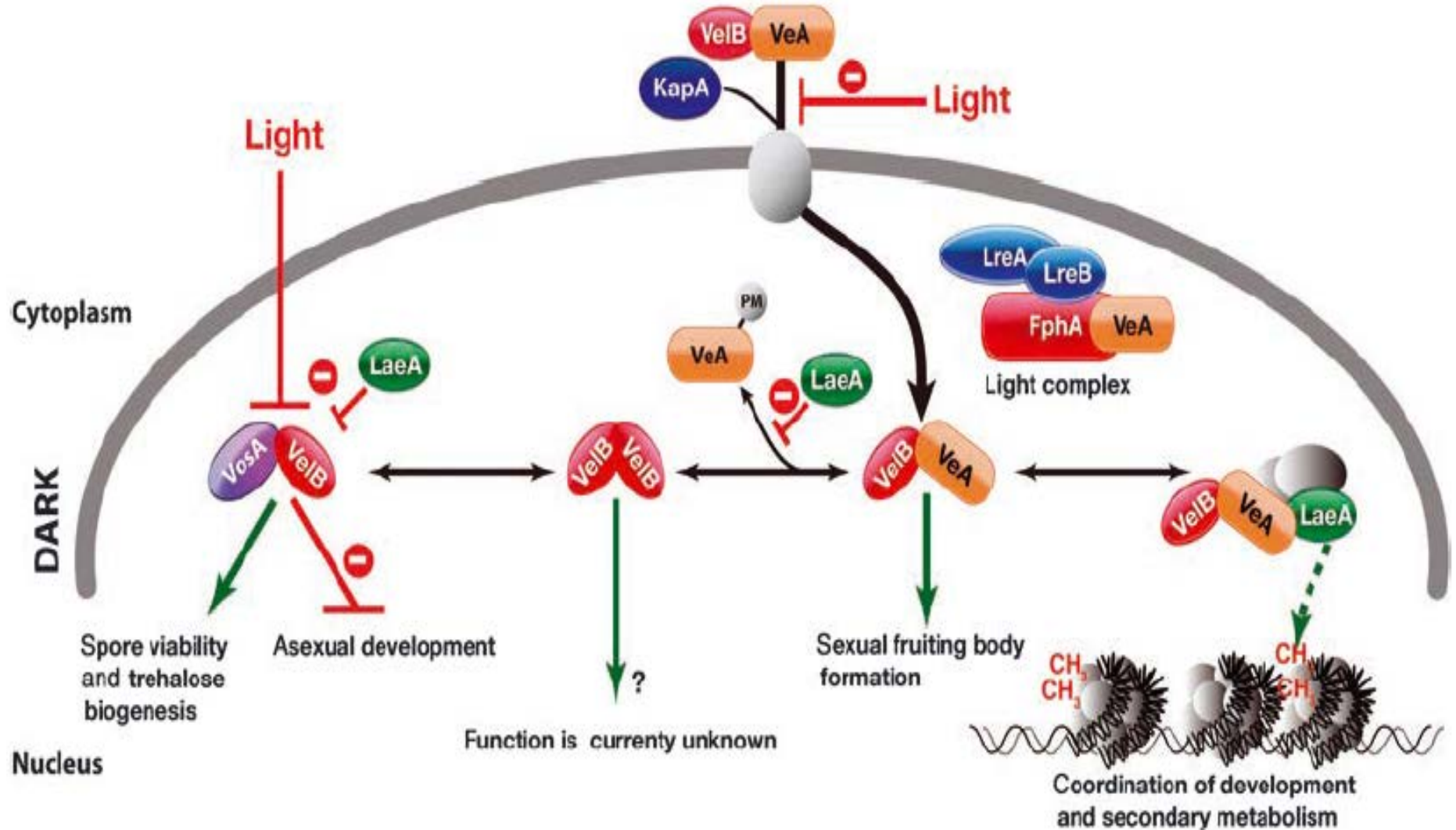
Nuclear / Cytoplasmic ratio for VelB	
in <i>veA+</i>	in <i>veAΔ</i>
2.90 ± 0.89	1.04 ± 0.29



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

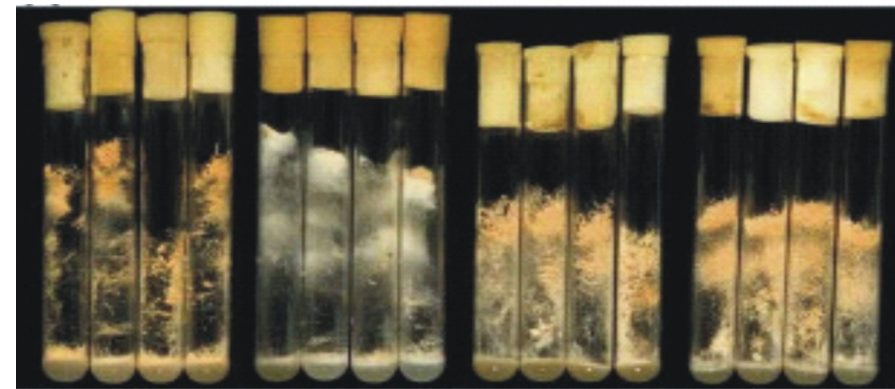
Mechanizm działania aktywatora LaeA

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

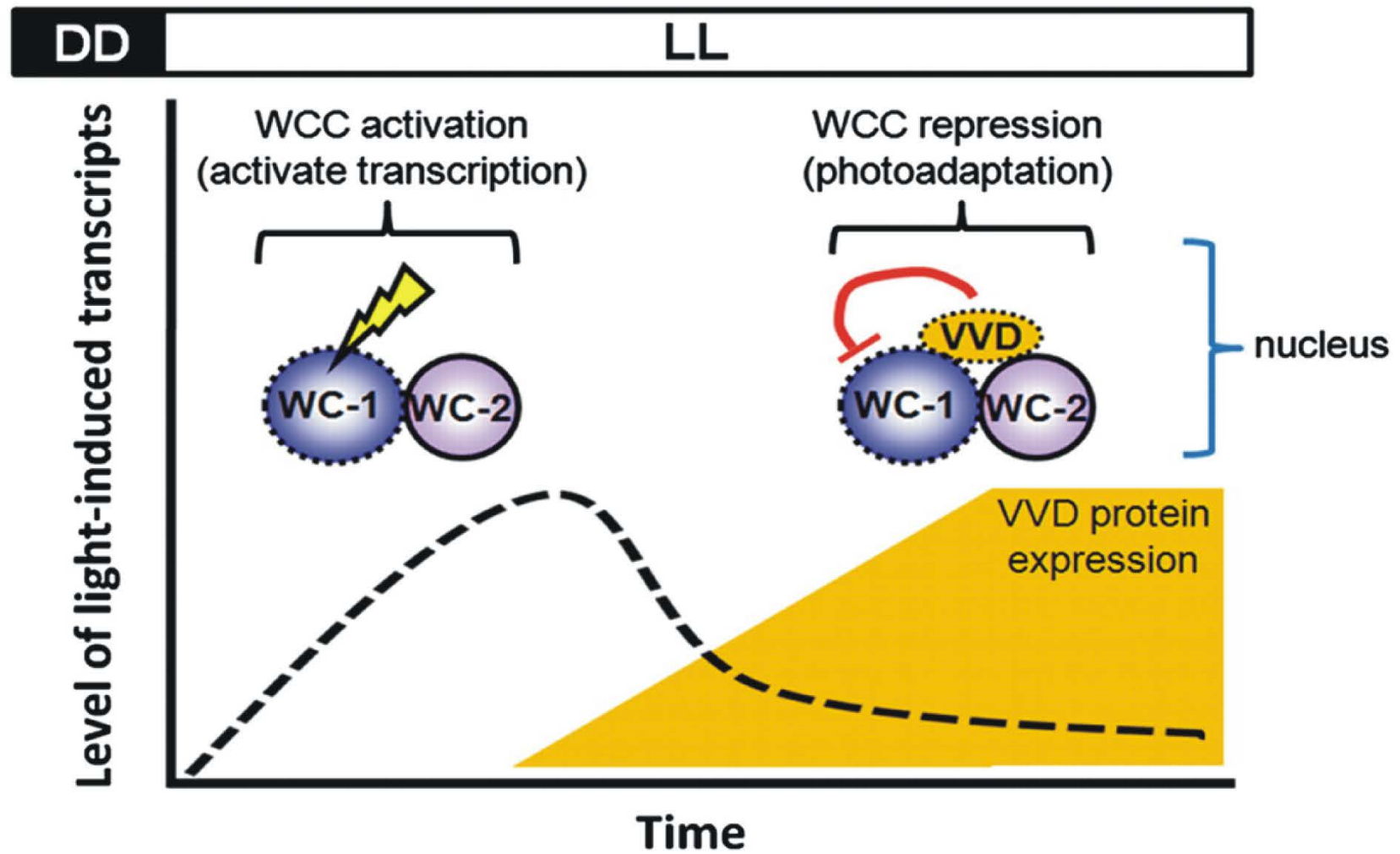


Regulacja przez światło

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

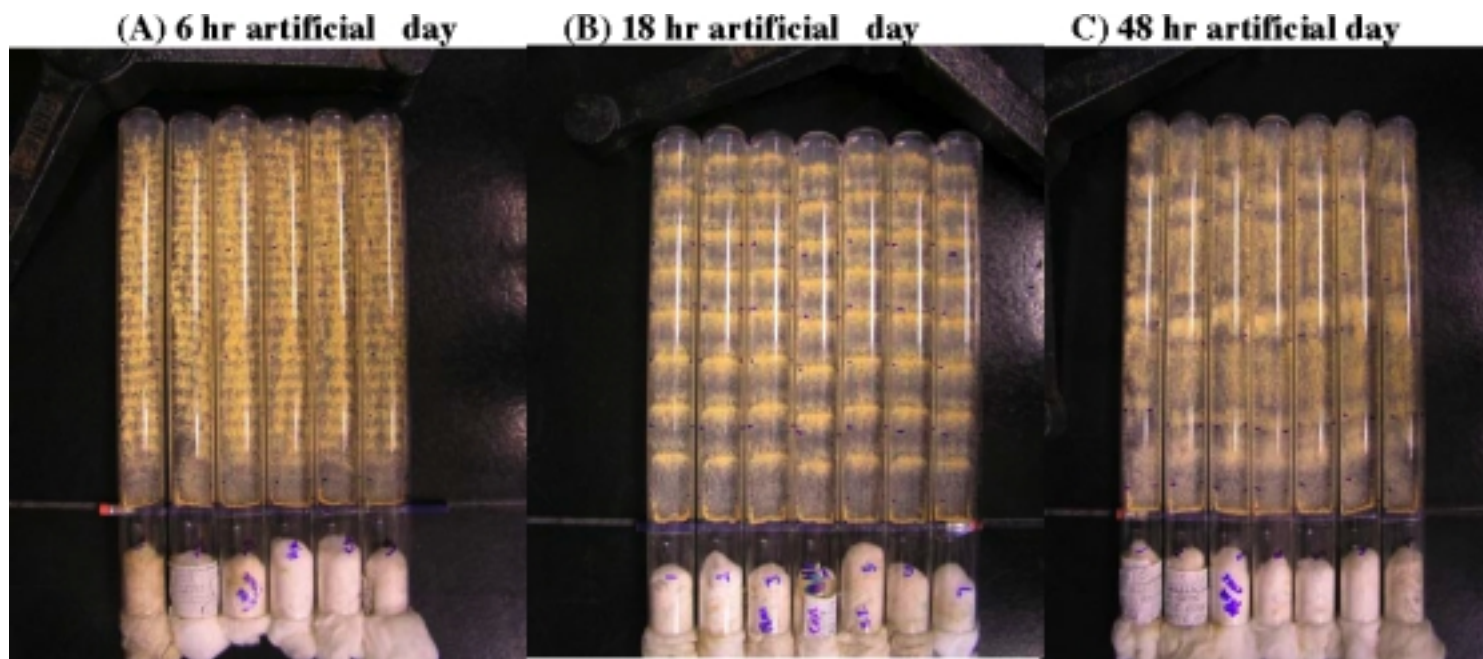


Photoadaptation in Neurospora.



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

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

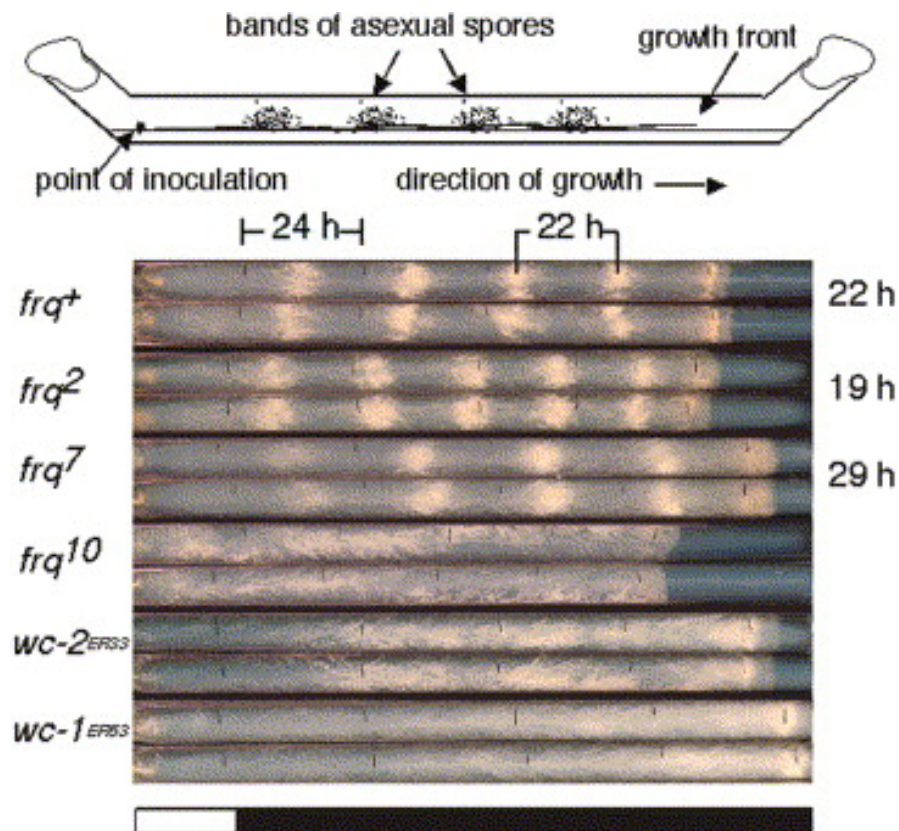


Zegar biologiczny jest niezależny od sygnałów zewnętrznych. To oscylator wewnętrzny synchronizowany przez czynniki zewnętrzne (światło, temperatura)

Fotografie –

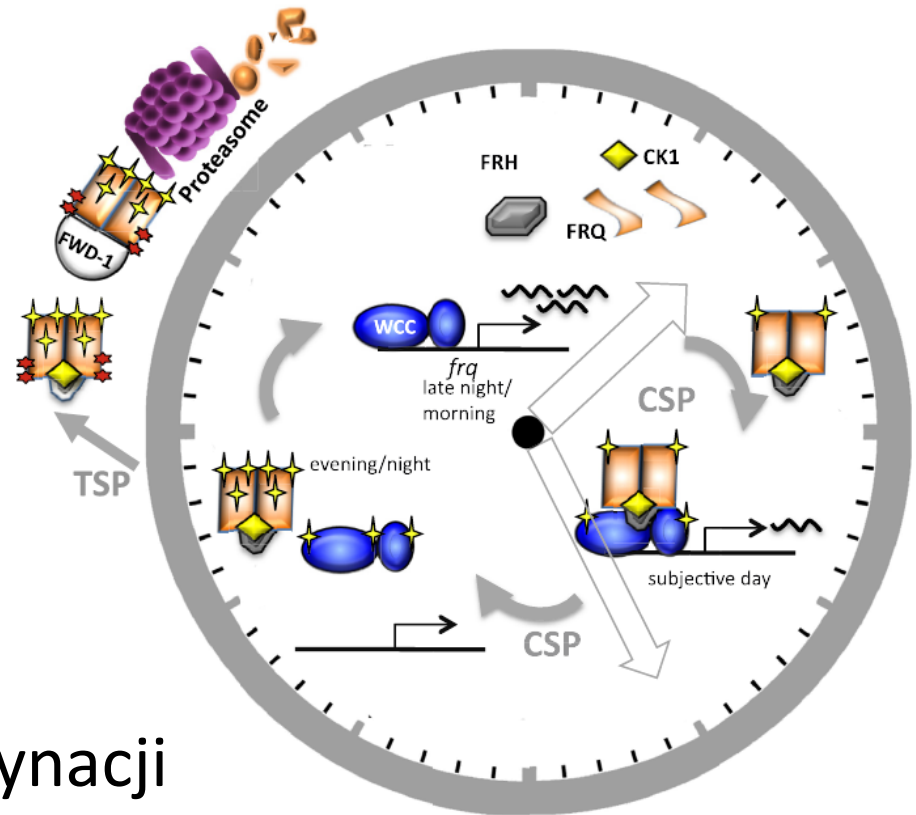
Dong i wsp., PLoS ONE. 2008; 3(8): e3105.

Neurospora crassa – rytm okołodobowy



Neurospora crassa – rytm okołodobowy

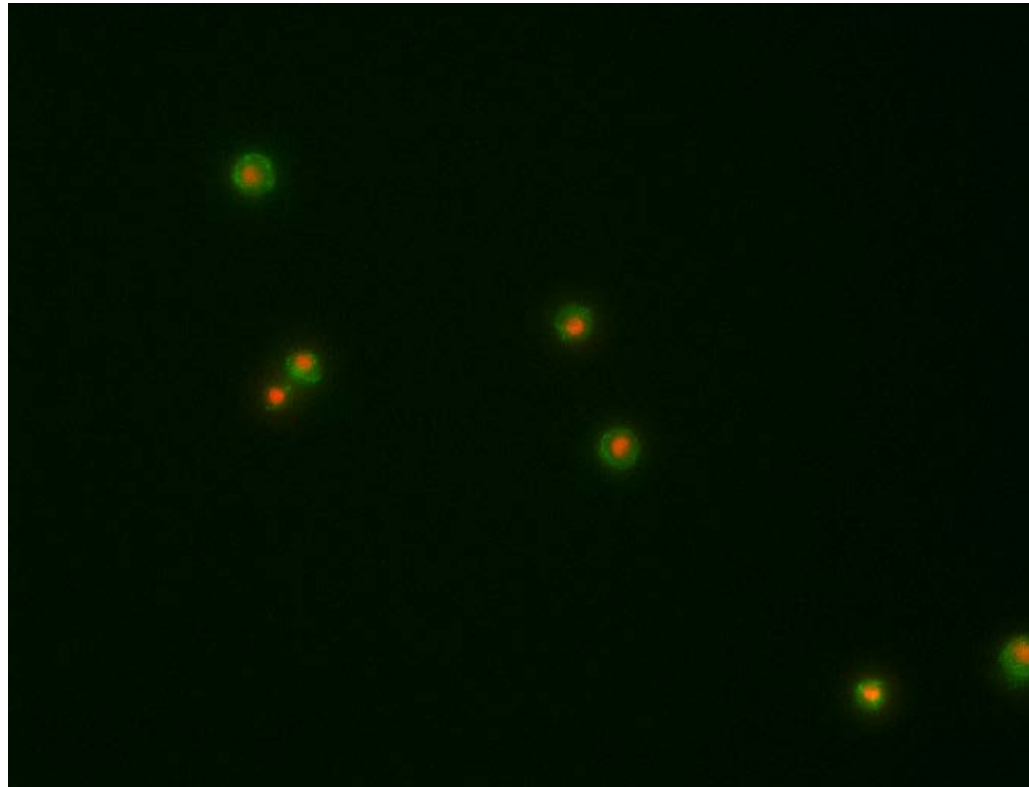
- Negatywne transkrypcyjno-translacyjne sprzężenie zwrotne
- Kompleks WCC aktywuje ekspresję *frq*
- Ufosforylowane FRQ hamuje aktywność WCC
- Dalsza fosforylacja FRQ prowadzi do jego ubiquitynacji i degradacji





Biologia komórki

Kiełkowanie konidiów - mitoza



[film conidia germination](#)

Oakley B., unpublished



Biologia komórki

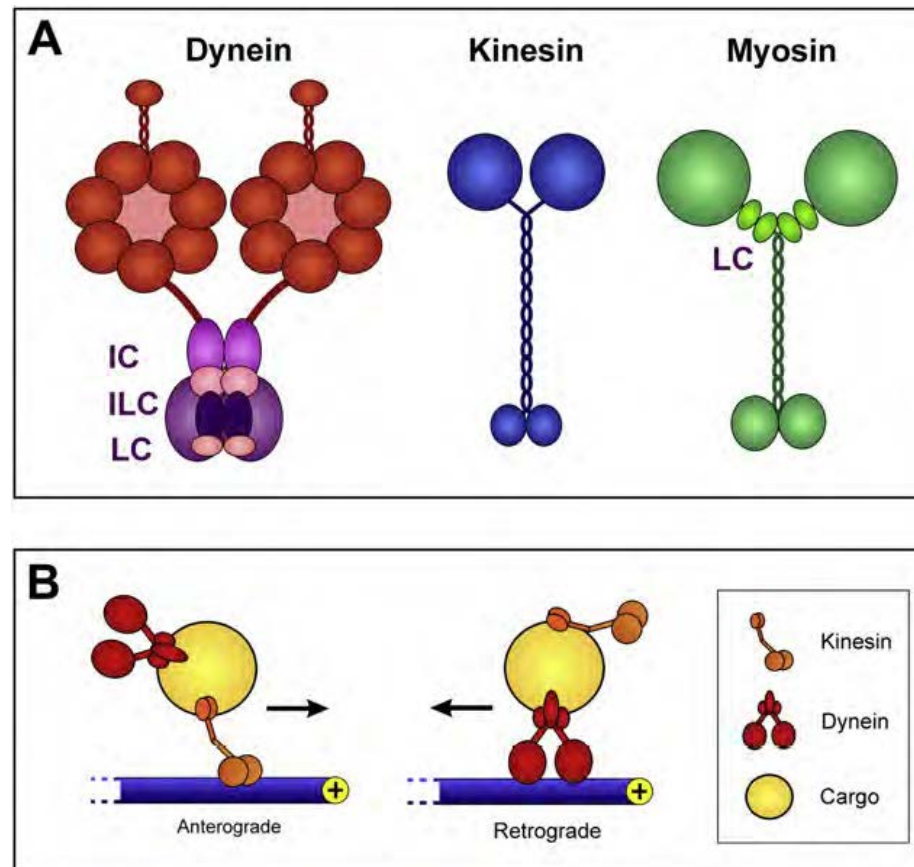
Mutanty związane z podziałami komórki

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

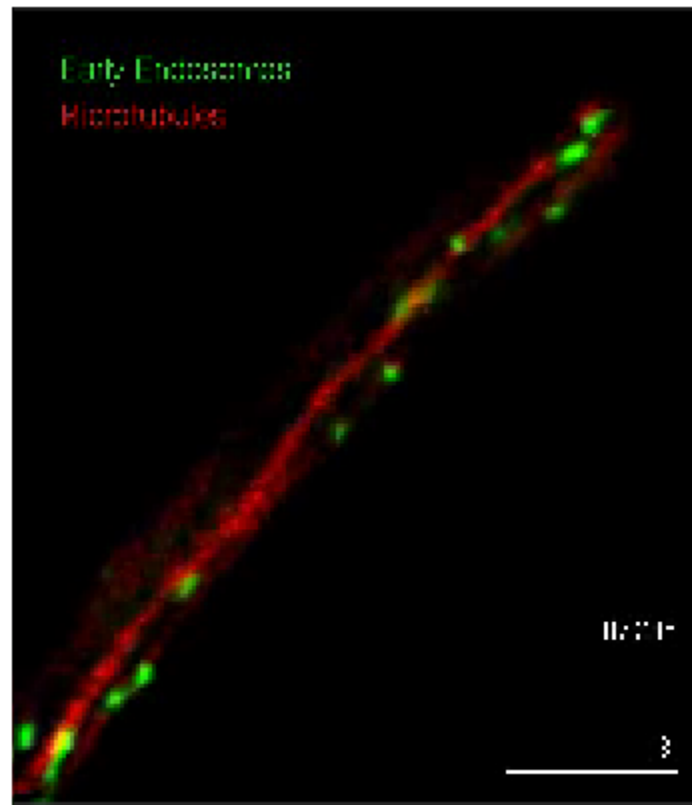


Quesadilla de huitlacoche
Meksykański przysmak z głowni kukurydzy



Biologia komórki

Ruch endosomów wzdłuż mikrotubul



[2i_EEsOnMTs.wmv](#)

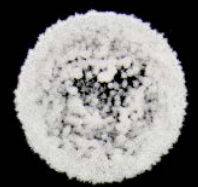
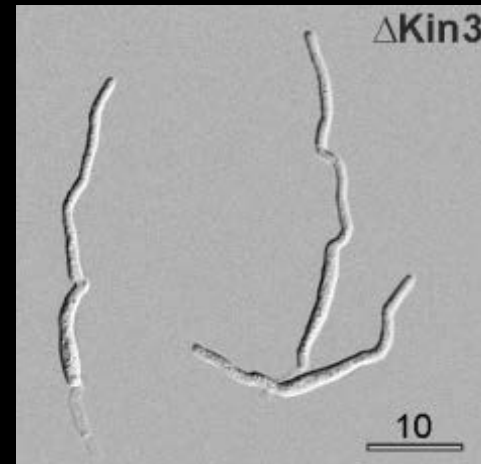
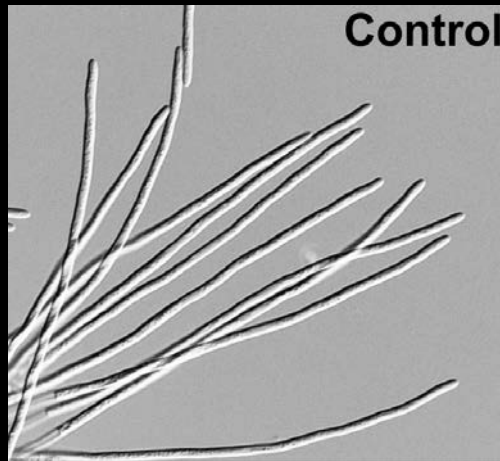


Hok1 - a master coordinator of bi-directional endosome motility in *Ustilago maydis*

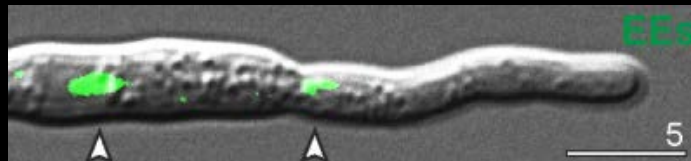
Bielska, Schuster, Roger, Berepiki, Soanes, Talbot and Steinberg
(2014) JCB 204:789



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



Kinesin-3 mutant

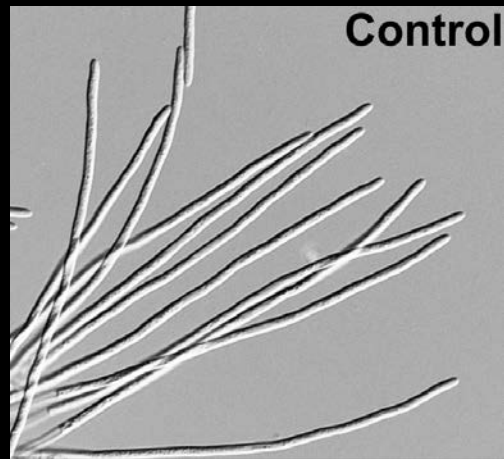


Dynein mutant



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

A screen for mutants defective in EE motility



wildtype



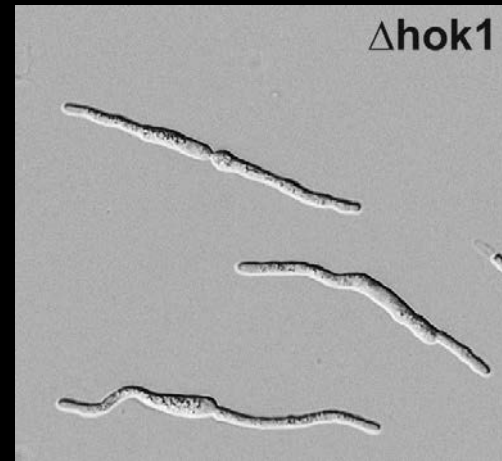
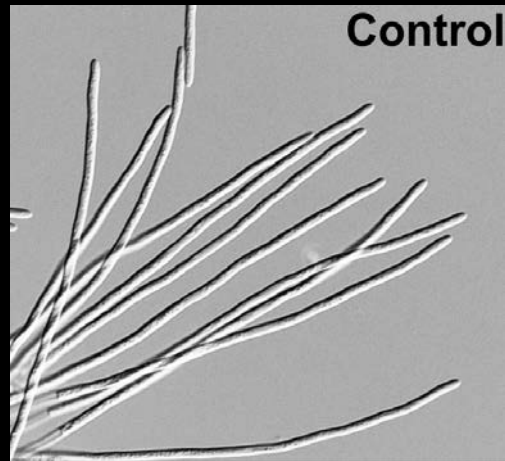
EMD5 mutant



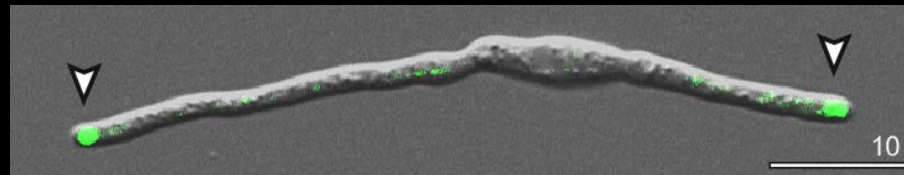
[EMD5 and control](#)



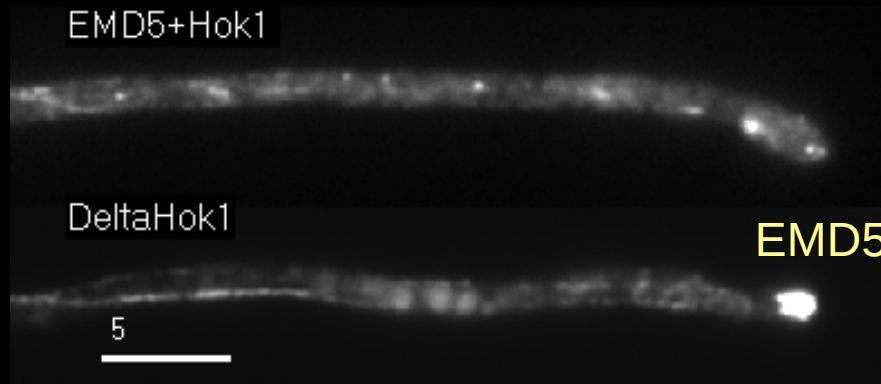
A screen for mutants defective in EE motility



hok1 null



EMD5 + Hok1::GFP

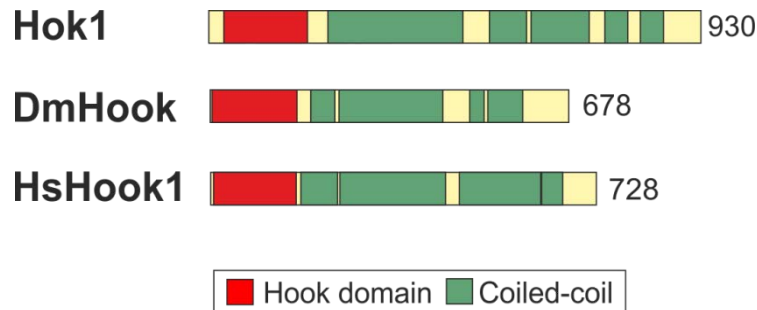


hok1 null

EMD5+HookGFP and DHok1

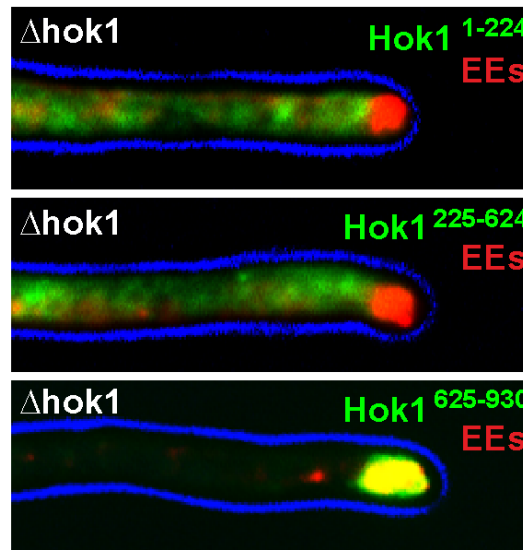
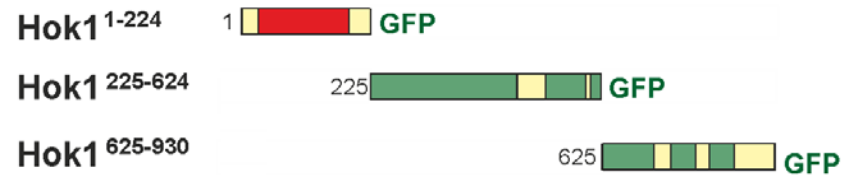
[cztery szczepy.mp4](#)

Hook proteins are required for bi-directional EE motility

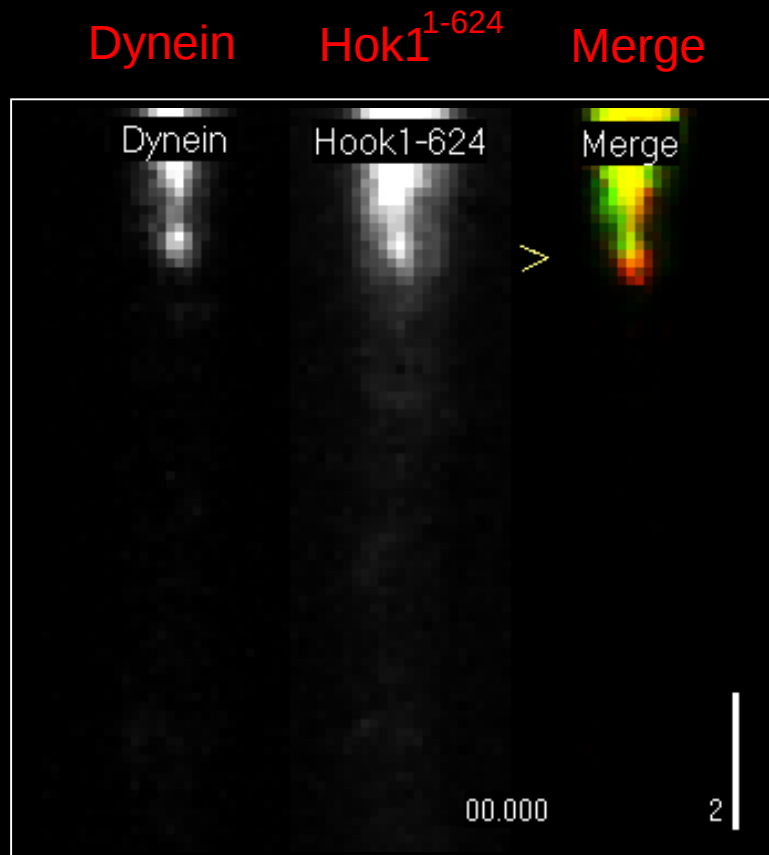


- DmHook required for endocytic sorting (in Drosophila)
- Humans have 3 Hook proteins
 - Hook1: Endocytic recycling and sorting
 - Hook2: Primary cilium formation
 - Hook3: Golgi organization
- binds to microtubules and organelles- Is it a linker/adaptor protein?

Hok1 targets to EEs via its C-terminal part

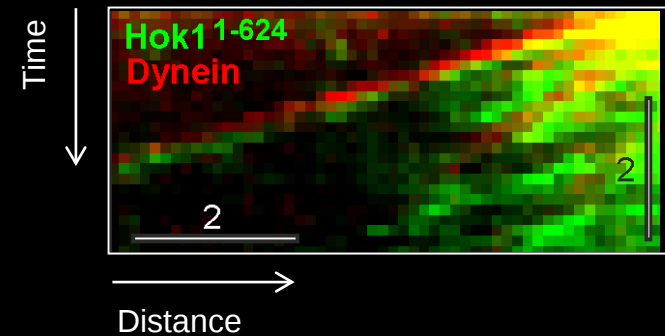


The N-terminal half (aa 1-624) of Hok1 binds to dynein

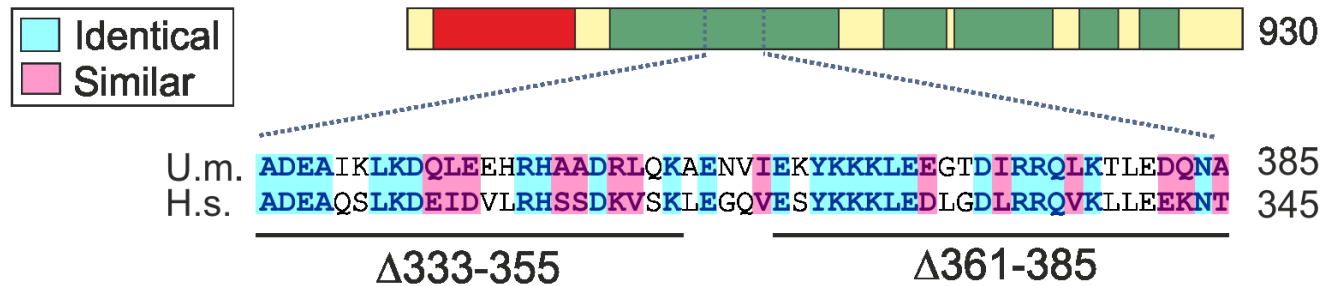


Hok1¹⁻⁶²⁴  GFP

The schematic shows a horizontal bar representing the Hok1 protein. It is divided into several segments: a yellow segment, a red segment, a yellow segment, a green segment, a yellow segment, and a green segment. The red segment is labeled 'Hok1¹⁻⁶²⁴' and the green segment is labeled 'GFP'.

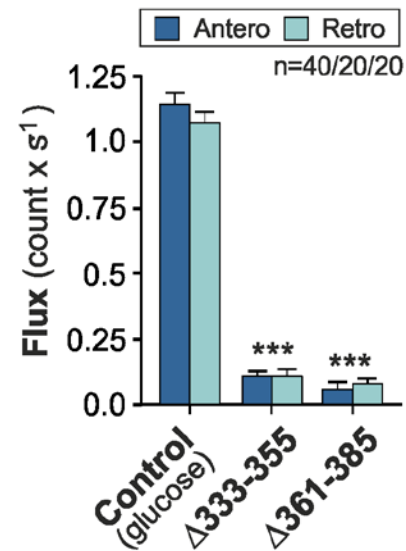
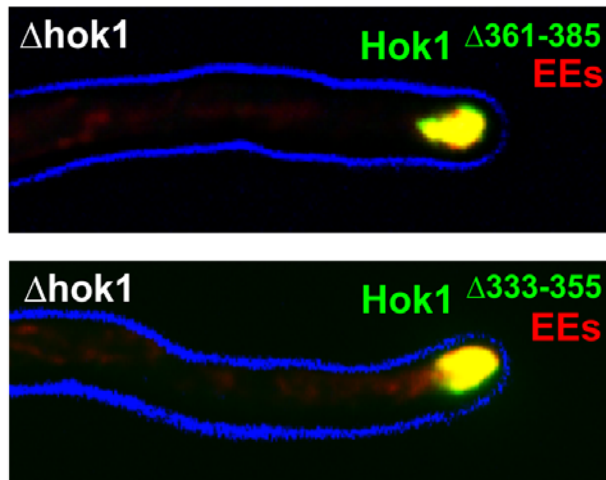
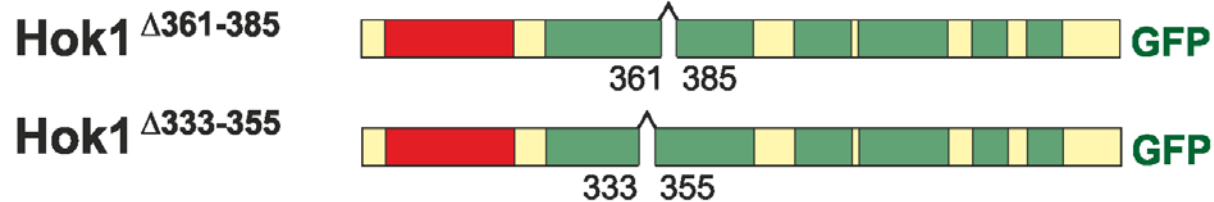


A highly conserved region in the first coiled-coil of Hok1 is essential for dynein binding

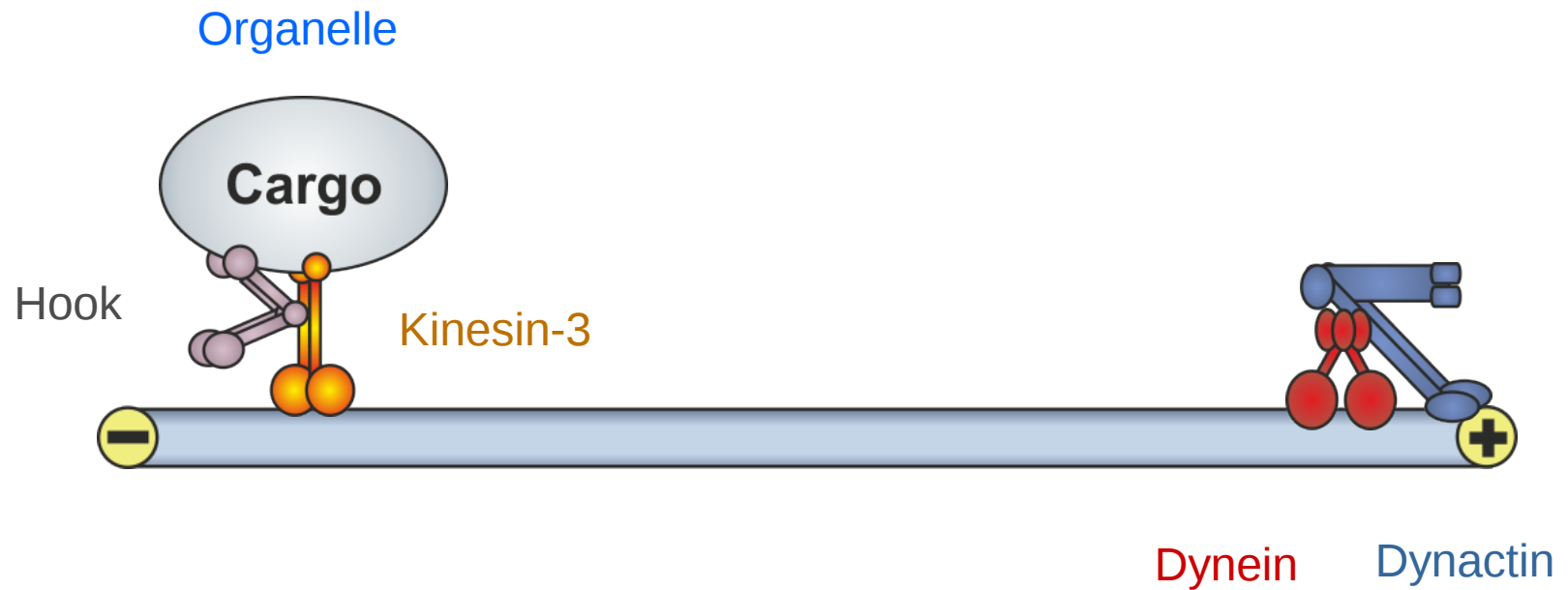


~50% identical with human Hook3

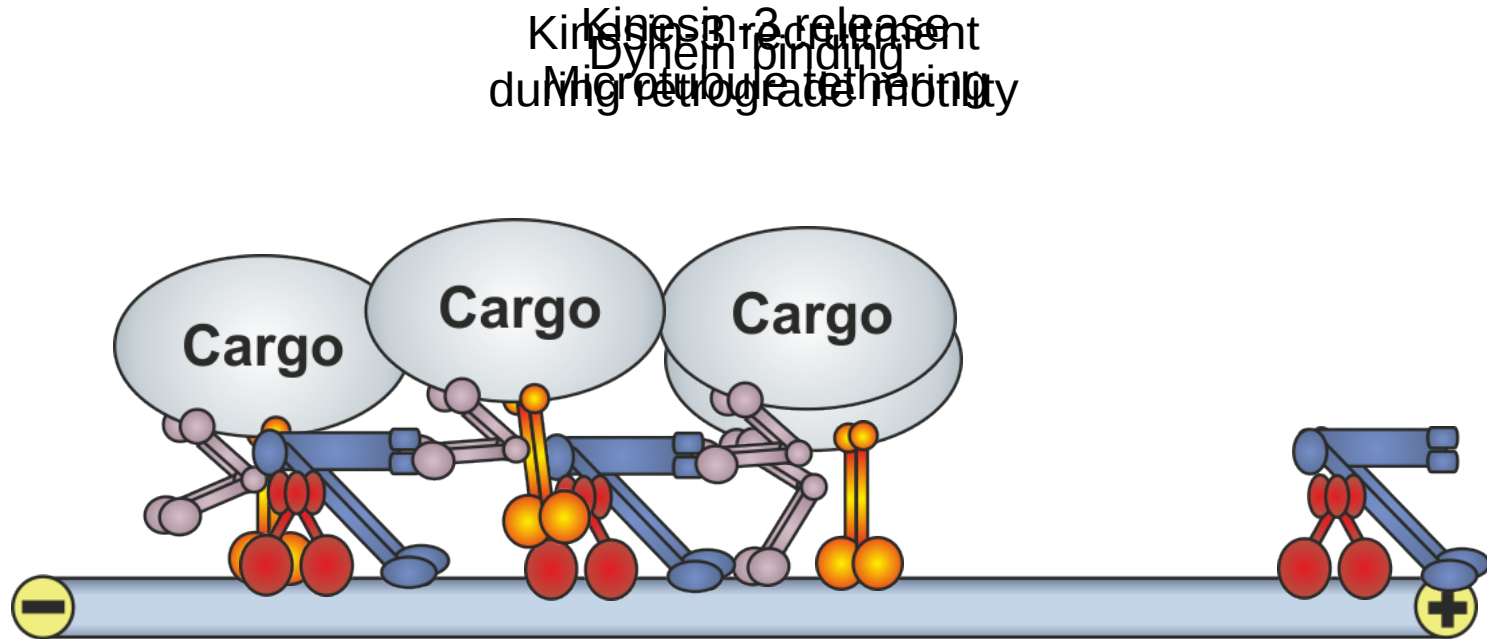
A highly conserved region in the first coiled-coil is essential for dynein binding



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



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



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

