

AUTOREFERAT

1. *Imię i nazwisko:* Agnieszka Dzikowska

2. *Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej*

Magister biologii w zakresie biologii molekularnej, 1985,

Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Praca magisterska pt.: „Charakterystyka końca 3' genu kodującego karbamoiltransferazę ornitynową *Aspergillus nidulans*”.

Promotor: prof. dr hab. Piotr Węgleński.

Doktor nauk biologicznych w zakresie Genetyki, 1995, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Rozprawa doktorska pt.: „Klonowanie i charakterystyka genu *otaA*, kodującego transaminazę ornitynową *Aspergillus nidulans*”.

Promotor: prof. dr hab. Piotr Węgleński (Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

Recenzenci: prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski (Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski) oraz prof. dr hab. Andrzej Paszewski (Instytut Biochemii i Biofizyki, PAN).

3. *Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych*

Aktualne zatrudnienie

Docent - Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Asystent - Instytut Biochemii i Biofizyki PAN (IBB PAN)

Dotychczasowe zatrudnienie

1980-1985 - studia magisterskie na Wydziale Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego

1985-1995 - asystent i starszy asystent w Zakładzie Genetyki, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego

1995- 2010 - adiunkt w Zakładzie Genetyki / Instytucie Genetyki i Biotechnologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego

od 2010 - docent - Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego

1995 - 2008 - adiunkt w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (IBB PAN)

od 2008 - asystent w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (IBB PAN)

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

Osiągnięcie naukowe stanowią cztery publikacje. We wszystkich tych publikacjach opracowałam koncepcję pracy, zaplanowałam eksperymenty, wykonałam ich istotną część i opiekowałam się studentami lub doktorantami, którzy ze mną pracowali. We wszystkich tych publikacjach byłam autorem lub współautorem korespondującym. W przypadku publikacji Macios i wsp., 2012 byłam również kierownikiem grantu, z którego finansowane były opublikowane badania.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Transkrypcyjne i post-transkrypcyjne systemy regulacji ekspresji genów u modelowego grzyba strzępkowego *Aspergillus nidulans*

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego z uwzględnieniem indywidualnego udziału wnioskodawcy

(kopie prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zamieszczono w Załączniku 6)

1. Dzikowska A., Kacprzak M., Tomecki R., Koper M., Scazzocchio C., Weglenski P. (2003) Specific induction and carbon/nitrogen repression of arginine catabolism gene of *Aspergillus nidulans* – functional analysis of the *otaA* promoter. Fungal Genetics and Biology, 38,175-186.

IF₂₀₀₃ - 2,746; IF_{5-letni} - 3,231; punktacja MNiSW - 35; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - 25

Mój wkład oceniam na 85%. Autor korespondencyjny.

- Opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów.

- Wykonanie większości eksperymentów (mutageneza *in vitro*, otrzymanie i analiza transformantów TΔ3, T/C2/ TA3+4 i T/A5 (Tab. 1); analiza mutantów *creA1* i *areB403/901* (Tab.3); analiza supresji prolinowej (Fig. 2B)
 - Opieka nad trójką magistrantów (M. Kacprzak, M. Koper, R. Tomecki), którzy wykonali pozostałą eksperymentalną część pracy.
 - Analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie manuskryptu oraz wszystkich rycin i tabel, odpowiedź na uwagi recenzentów, przeprowadzenie konsultacji z pozostałymi współautorami
2. Olszewska, A., Król, K., Weglenski, P, **Dzikowska, A.** (2007) Arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* is regulated by the *rrmA* gene coding for the RNA – binding protein. Fungal Genetics and Biology 44:1285-97.
IF₂₀₀₇ - **3,425**; IF_{5-letni} - **3,231**; punktacja MNiSW- **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - **10**
Mój wkład oceniam na -**70%**. Autor korespondencyjny.
- Opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów.
 - Wykonanie części eksperymentów (analiza genetyczna i enzymatyczna mutantów *rrmA* (Fig.2 i 3); analiza transkrypcji genów *agaA* i *otaA* w mutancie *rrmA* (Fig.7).
 - Opieka nad dwoma doktorantkami (A. Olszewska i K. Król), które wykonały pozostałą eksperymentalną część pracy.
 - Analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie manuskryptu oraz wszystkich rycin i tabel, odpowiedź na uwagi recenzentów, przeprowadzenie konsultacji z pozostałymi współautorami
3. Macios M, Caddick M, Weglenski P, Scazzocchio C, **Dzikowska A** (2012) The GATA factors AREA and AREB negatively regulate arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* in response to nitrogen and carbon source. Fungal Genetics and Biology 49:189-198.
IF₂₀₁₂ - **3,263**; IF_{5-letni} - **3,231**; punktacja MNiSW-**35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - **20**
Mój wkład oceniam na - **85%**. Autor korespondencyjny.
- Opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów.
 - Wykonanie ok. 50% eksperymentów (analiza transkrypcji genów *agaA* i *otaA* w szczepie dzikim (Fig.1); analiza mutantów w genach *areA* i *areB* (Fig.3);

otrzymanie podwójnych mutantów i analiza transkrypcji genów *agaA* i *otaA* w części pojedynczych i podwójnych mutantów (Fig.2, Fig.4 i Fig.5).

- Opieka (promotor pomocniczy) nad doktorantką Marią Macios, która wykonała pozostałą eksperymentalną część pracy.
- Analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie manuskryptu oraz wszystkich rycin i tabel, odpowiedź na uwagi recenzentów, przeprowadzenie konsultacji z pozostałymi współautorami
- Napisanie projektu i kierowanie grantem MNiSW/NCN (nr 0175/B/P01/2009/37), z którego były finansowane badania. Projekt został rozliczony pozytywnie.

4. Krol K, Morozov IY, Jones MG, Wyszomirski T, Węgleński P, **Dzikowska A**, Caddick MX. (2013) RrmA regulates the stability of specific transcripts in response to both nitrogen source and oxidative stress" *Molecular Microbiology* 89:975-988.

IF₂₀₁₃ - **5,026**; IF_{5-letni} - **4,347**; punktacja MNiSW₂₀₁₅ - **35** (MNiSW₂₀₁₄ - **40**); liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - **3**

Publikacja ta została wykonana we współpracy z grupą prof. Marka Caddick'a z University of Liverpool. Udział grupy polskiej i angielskiej w tej publikacji jest taki sam (po 50% na każdym etapie publikacji). Wraz z prof. Markiem Caddick'iem jestem współautorem korespondencyjnym w tej pracy. **Praca Krol et al., została omówiona w „Lab Times. News for the European Life Sciences” 7 (30-31) 2013 (załącznik nr 6)**

Mój wkład oceniam na - **30%** (**60%** po stronie polskiej). Współautor korespondencyjny.

- Opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów w części dotyczącej udziału RrmA w regulacji ekspresji genów *agaA* i *otaA* oraz w stresie oksydacyjnym (część 4,5 i 6 Wyników).
- Wykonanie części eksperymentów (analiza mutantu *rrmAA* - Fig. 4B).
- Opieka nad doktorantką, Kingą Król, która wykonała pozostałą eksperymentalną część pracy.
- Przygotowanie wszystkich danych do analizy statystycznej
- Przygotowanie części rycin i tabel
- Wraz z prof. Markiem Caddick'iem: analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie manuskryptu, odpowiedzi na uwagi recenzentów, przeprowadzenie konsultacji z pozostałymi współautorami

Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie każdej z powyższych prac zamieszczono w Załączniku nr 7.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania – **14,46**

Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania – **145**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science / All Databases) – **58**.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania
(pogrubioną czcionką cytowane są publikacje, których habilitantka jest współautorką)

WSTĘP

Grzyby strzępkowe, zwane też nitkowatymi, są znakomitymi organizmami modelowymi do badania regulacji metabolizmu i jednocześnie są ważne z punktu widzenia zastosowań w przemyśle biotechnologicznym, produkcji żywności i zdrowia człowieka. Są wykorzystywane do otrzymywania wielu ważnych związków, jak antybiotyki, do produkcji istotnych przemysłowo enzymów i heterologicznej ekspresji białek. Do grzybów strzępkowych należą istotne patogeny zarówno roślinne, jak i ludzkie oraz zwierzęce.

***Aspergillus nidulans* jest najlepszym organizmem modelowym do badania regulacji metabolizmu u grzybów strzępkowych** i jest najczęściej wykorzystywany do badań nad regulacją ekspresji genów u tych organizmów, zarówno w **badaniach podstawowych, jak i aplikacyjnych związanych z biotechnologią i medycyną**. *A. nidulans* jest jednym z pierwszych organizmów modelowych zastosowanych w badaniach nad regulacją ekspresji genów u *Eukaryota*¹. Od ponad 10 lat znana jest sekwencja genomu tego grzyba². Ważną zaletą tego organizmu modelowego są bazy danych AspGD i FunGDB, gromadzące wszystkie dane pochodzące z analiz genomicznych, transkryptomicznych i proteomicznych odnośnie rodzaju *Aspergillus*.

Grzyby szybko dostosowują swoje procesy fizjologiczne do zmieniającego się stężenia i rodzaju składników odżywczych, dostępnych w środowisku. Taka metaboliczna „elastyczność” jest możliwa dzięki ścisłej kontroli katabolizmu, poprzez współdziałanie **specyficznych systemów regulacyjnych**, aktywowanych przez specyficzne induktory, z ogólnymi systemami regulacyjnym, takim jak **kataboliczna represja węglowa** i **metaboliczna represja azotowa**. Regulacja specyficzna umożliwia włączenie odpowiednich dla danego związku systemów pobierania i szlaków katabolicznych, a systemy ogólne odpowiadają za preferencyjne wykorzystanie najbardziej ekonomicznego źródła węgla lub azotu, oraz umożliwiają grzybom wykorzystanie różnych innych związków w warunkach niedoboru źródeł preferowanych. Tego typu systemy regulacyjne u jednokomórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, znacząco różnią się od systemów grzybów strzępkowych.

Grzyby potrafią również dostosować się do warunków stresu, np. **stresu oksydacyjnego**, uruchamiając odpowiednie ścieżki odpowiedzi na stres, prowadzące do spowolnienia wzrostu³ i globalnych zmian transkrypcyjno/translacyjnych, które wpływają m.in. na metabolizm węgla i azotu^{4,5}. W ogólnym zarysie mechanizmy te są podobne u wszystkich grzybów, jednak w szczegółach różnią się znacząco między drożdżami a grzybami strzępkowymi^{6,7}.

Systemy regulacji specyficznej u grzybów strzępkowych

Ogólnie rzecz biorąc, u grzybów transkrypcja genów kodujących enzymy specyficznego szlaku katabolicznego i odpowiednie białka transportujące (permeazy), jest indukowana tylko w obecności specyficznego induktora, którym w większości przypadków jest substrat danego szlaku. Induktor aktywuje specyficzny dla danego szlaku czynnik transkrypcyjny, który z kolei aktywuje ekspresję odpowiednich genów. Na przykład, aktywator PrnA *A. nidulans* jest aktywowany przez prolinę i indukuje ekspresję genów kodujących enzymu szlaku katabolizmu proliny i permeazę proliny⁸. Większość specyficznych aktywatorów transkrypcji u grzybów wiąże DNA poprzez domenę dwujądrowego palca cynkowego (Zn₂Cys₆), która jest specyficzna tylko dla grzybów.

Kataboliczna represja węglowa u grzybów strzępkowych

Glukoza jest preferowanym źródłem węgla dla grzybów strzępkowych, podobnie jak dla innych organizmów. Gdy jest dostępna w środowisku (**warunki represji**

węglowej), zablokowane jest pobieranie i wykorzystanie innych źródeł węgla. U *A. nidulans* głównym czynnikiem zaangażowanym w kataboliczną represję węglową jest represor CreA, zawierający domenę wiążącą DNA typu palca cynkowego C2H2, która wiąże sekwencję SYGGRG⁹. W obecności glukozy CreA hamuje ekspresję genów związanych z pobieraniem i katabolizmem innych związków węgla. Aktywność CreA jest prawdopodobnie regulowana przez ubikwitynację/ deubikwitynację, w której biorą udział CreB, CreC i CreD, jednak mechanizm tego procesu nie jest znany^{10,11}. Transkrypcja genu *creA* nie jest regulowana przez represor CreA, a aktywność CreA nie jest regulowana ani na poziomie transportu do jądra, ani na poziomie degradacji białka¹². Podobne mechanizmy represji węglowej, łącznie z ortologami CreA, znaleziono również u innych grzybów strzępkowych, takich jak istotne biotechnologicznie *Aspergillus niger* i *Penicillium chrysogenum*, patogeny roślin *Magnaporthe grisea* i *Fusarium fujikuroi* oraz ludzki patogen *Aspergillus fumigatus*^{13,14}.

Metaboliczna represja azotowa u grzybów strzępkowych

Preferowanym źródłem azotu dla grzybów strzępkowych są jony amonowe oraz glutamina. Ich obecność w podłożu (**warunki represji azotowej**) hamuje pobieranie i wykorzystanie innych źródeł azotu. System metabolicznej represji azotowej moduluje ekspresję genów związanych z pobieraniem i katabolizmem alternatywnych źródeł azotu, co prowadzi do ich ekspresji tylko w warunkach braku glutaminy i jonów amonowych w środowisku (**warunki derepresji azotowej**). Głównym regulatorem azotowym u *A. nidulans* jest czynnik transkrypcyjny AreA, aktywator ogólny z rodziny GATA, aktywujący ekspresję wielu genów związanych z metabolizmem azotowym. Zawiera on wiążącą DNA domenę GATA (palec cynkowy typu Cys2Cys2) i wiąże sekwencję HGATAR¹⁵. AreA może bezpośrednio aktywować transkrypcję genów docelowych, kodujących enzymy kataboliczne i odpowiednie permeazy, może uczestniczyć w procesie remodelowania chromatyny, zwiększać acetylację histonów i bezpośrednio stymulować wiązanie aktywatora specyficznego¹⁶⁻¹⁸.

Aktywność AreA jest regulowana na kilku poziomach. Aktywność AreA hamowana jest przez oddziaływanie z korepresorem NmrA. W odpowiedzi na glutaminę lub jony amonowe, NmrA wiąże się z palcem cynkowym oraz z silnie konserwowanym C-końcem AreA, uniemożliwiając jego oddziaływanie z DNA^{19,20}. Delecja C-końca AreA lub delecja genu *nmrA* prowadzą do derepresji wielu genów związanych z katabolizmem

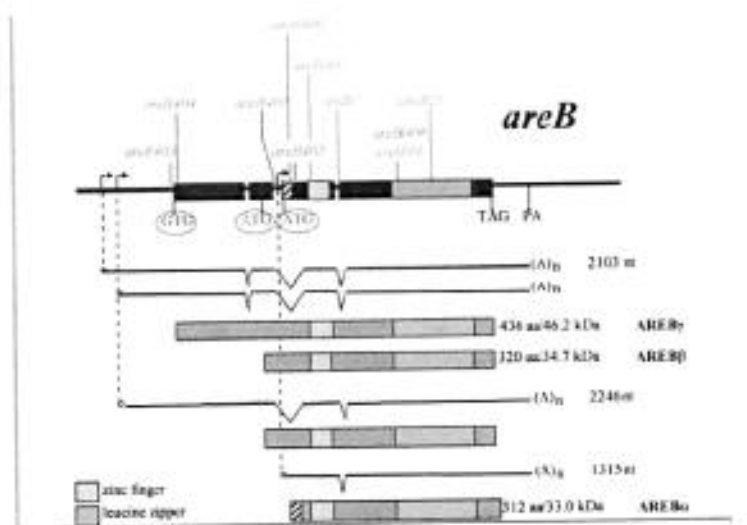
związków azotowych. Aktywność AreA jest również modulowana przez oddziaływanie z koaktywatorem TamA^{21,22}.

Aktywność AreA jest dodatkowo kontrolowana na poziomie akumulacji białka w jądrze. W warunkach głodu azotowego, gdy żadne źródło azotu nie jest dostępne, AreA jest gromadzone w jądrze komórkowym. Natomiast po dodaniu do pożywki preferowanego źródła azotu lub w warunkach głodu węglowego, AreA jest eksportowane z jądra do cytoplazmy^{23,24}. Regulowany proces lokalizacji jądrowej zaobserwowano również w przypadku AreA z *F. fujicuroi*²⁵.

Podobne mechanizmy represji azotowej, łącznie z ortologami AreA, znaleziono również u innych grzybów strzępkowych, takich jak *Neurospora crassa* (Nit2), *P. chrysogenum* (NRE), *F. fujicuroi* (AreA), istotny biotechnologicznie *A. niger*, patogen roślin *M. grisea* i ludzki patogen *A. fumigatus*^{14,26-29}. U *F. fujicuroi* wykazano, że AreA bierze udział nie tylko w regulacji genów związanych z katabolizmem azotu, ale również reguluje ekspresję genów, których produkty uczestniczą w syntezie metabolitów wtórnych, takich jak gibereliny³⁰.

AreB, drugi czynnik GATA zaangażowany w represję azotową u grzybów strzępkowych

Drugim czynnikiem GATA biorącym udział w regulacji azotowej u *A. nidulans* jest czynnik AreB. Na N - końcu białka znajduje się domena GATA wiążąca DNA, a na C - końcu domena dimeryzacyjna - suwak leucynowy. AreB jest homologiem zaangażowanych w metabolizm azotowy, negatywnych regulatorów transkrypcji z rodziny GATA, takich jak Dal80p i Gzf3p z *S. cerevisiae* czy NREB z *P. chrysogenum*³¹. Gen *areB* koduje trzy warianty białka AreB, wszystkie zawierające domenę GATA i domenę dimeryzacyjną. Te trzy warianty AreB różnią się na N-końcu, co wynika z alternatywnego wycinania intronów, wykorzystania dwóch różnych promotorów i trzech różnych kodonów start (Rys.1).



Rys.1. Transkrypty i produkty translacji genu *areB*

Cztery różne transkrypty *areB* (linie ciągłe) pokazano razem z odpowiadającymi im produktami translacji (AreBa, β i γ – prostokąty), przedstawionymi poniżej. Domena GATA – na żółto, na niebiesko - domena dimeryzacyjna. Miejsca startu translacji ATG/GTG – w owalach. Mutacje w *areB* zaznaczono nad sekwencją genu^(wg 31).

Ekspresja genu *areB* jest regulowana przez źródło azotu. Regulacja dwóch promotorów tego genu jest różna: ekspresja krótszego transkryptu (*areBa*) jest najwyższa w warunkach derepresji azotowej (azotan jako źródło azotu), natomiast dłuższe transkrypty (*areBβ* and *areBγ*) są wyrażane głównie w warunkach represji azotowej (jony amonowe jako źródło azotu). W regulacji tej może brać udział jakiś czynnik GATA, ponieważ w obu promotorach *areB* zidentyfikowano sekwencje GATA³¹.

U *F. fujicuroi* wykazano, że AreB, podobnie jak AreA, gromadzi się w jądrze w warunkach głodu azotowego. U tego grzyba, obydwa te czynniki GATA wykazują podobną lokalizację w większości testowanych warunków: w warunkach głodu azotowego są zlokalizowane głównie w jądrze, a w warunkach represji azotowej - głównie w cytoplazmie. Wykazano również, że w warunkach głodu azotowego jedna z form AreB oddziałuje z AreA²⁵.

Posttranskrypcyjna regulacja ekspresji genów.

Ilość cząsteczek transkryptu, które mogą brać udział w procesie translacji, zależy zarówno od tempa jego syntezy, jak i degradacji. Regulacja stabilności transkryptu jest efektywnym sposobem modulacji ekspresji genu na poziomie posttranskrypcyjnym, w odpowiedzi na sygnały ze środowiska. Wykazano, że stabilność wielu mRNA zmienia się

znacząco w odpowiedzi na specyficzne sygnały oraz że tempo degradacji różnych grup transkryptów może być regulowane przez specyficzne białka wiążące RNA^{32,33}. Większość eukariotycznych mRNA jest chroniona przed działaniem egzorybonukleaz dzięki obecności struktury czapeczki na 5' końcu i ogona poli(A) na 3' końcu, które oddziałują z kompleksem wiążącym czapeczkę (CBC) lub białkami wiążącymi poli(A) (PABS). Degradacja mRNA najczęściej rozpoczyna się od deadenylacji, czyli skrócenia ogona poli(A) przez deadenylazy. Następnie usuwana jest czapeczka i RNA jest degradowany w kierunku 5'→3' przez egzozonukleazę Xrn1 lub w kierunku 3'→5' przez egzozom i kompleks SKI³⁴. Transkrypty różnią się między sobą tempem degradacji, a kontrola tego procesu jest kluczowa dla regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. U *A. nidulans* za deadenylację transkryptów w cytoplazmie odpowiada głównie kompleks Ccr4/Caf1/Not. Ccr4 bierze udział w podstawowym procesie degradacji, natomiast Caf1 przyspiesza rozpad transkryptów w odpowiedzi na specyficzne sygnały³⁵.

Wykazano, że aktywność AreA, głównego regulatora azotowego u *A. nidulans* jest modulowana posttranskrypcyjnie w odpowiedzi na rodzaj i dostępność źródła azotu. Tempo degradacji mRNA *areA* zależy od źródła azotu – transkrypt jest niestabilny w obecności glutaminy. Wykazano, że zależy to od rejonu w 3'UTR transkryptu i deadenylazy Caf1³⁵⁻³⁷.

Geny katabolizmu argininy – model do badania specyficznych i ogólnych systemów regulacyjnych u A. nidulans

U *A. nidulans* wykorzystanie argininy, jako źródła azotu i węgla, zależy od aktywności i indukowalności dwóch enzymów katabolicznych, arginazy i aminotransferazy ornitynowej (OAT), kodowanych przez geny *agaA* i *otaA*. Ekspresja obydwu genów jest indukowana przez egzogenną argininę^{38,39}, w czym pośredniczy specyficzny aktywator ArcA typu Zn2C6⁴⁰. Ekspresja *agaA* i *otaA* zależy również od źródła węgla i azotu. Wykazaliśmy, że regulatory ogóle AreA i CreA wiążą się z promotorem *otaA* in vitro³⁹. Wszystko to pokazuje, że geny katabolizmu argininy są dobrym modelem do badania interakcji między różnymi systemami regulacyjnymi. Dodatkowymi zaletami tego systemu są proste metody oznaczania aktywności arginazy i OAT, a także prosta metoda identyfikacji potencjalnych genów regulatorowych poprzez poszukiwanie supresorów auksotroficznych mutacji prolinowych⁴¹.

Głównym celem przedstawionych badań jest pogłębienie wiedzy na temat specyficznych i ogólnych systemów regulacji u grzybów strzępkowych oraz zrozumienie mechanizmów koordynujących działanie tych systemów, zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i posttranskrypcyjnym. Początkowo, badania były skoncentrowane na modelowych genach katabolizmu argininy, jednak ostatnio skupiamy się głównie na regulatorach ogólnych.

TRANSKRYPCYJNE SYSTEMY REGULACYJNE

Publikacje

(numery referencji zgodne z numeracją w części Bibliografia)

*autor korespondencyjny

⁴²Dzikowska A*, Kacprzak M., Tomecki R., Koper M., Scazzocchio C., Weglenski P. (2003) Specific induction and carbon/nitrogen repression of arginine catabolism gene of *Aspergillus nidulans* – functional analysis of the *otaA* promoter. *Fungal Genetics and Biology*, 38:175-186.

⁴³Macios M, Caddick M, Weglenski P, Scazzocchio C, Dzikowska A* (2012) The GATA factors AREA and AREB negatively regulate arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* in response to nitrogen and carbon source. *Fungal Genetics and Biology* 49:189-198

Indukcja specyficzna genów katabolizmu argininy

Jak już wspomniano powyżej, arginina specyficznie indukuje ekspresję genów katabolizmu argininy, w czym pośredniczy specyficzny aktywator ArcA. W promotorze *otaA* zidentyfikowaliśmy rejon (12 nukleotydowe powtórzenia typu „directrepeats”), odpowiedzialny za indukcję ekspresji przez argininę (AnUAS_{arg}). Delecja tego rejonu prowadzi do braku indukcji OAT przez argininę, zarówno w szczepie *arcA*⁺, jak i w szczepie z mutacją *arcA*^{d47} typu nabycia funkcji, kodującą super-aktywator. Wskazuje to, że sekwencja AnUAS_{arg} jest potencjalnym miejscem wiązania ArcA⁴².

Sekwencja AnUAS_{arg} jest bardzo podobna do sekwencji UAS_{arg}*S.cerevisiae*⁴⁴, odpowiedzialnej za indukcję przez argininę i wiązanej przez ArgRIIp, aktywator typu Zn2C6, działający w kompleksie z dwoma białkami MADS (Mcm1p i ArgRIp) – kombinatorycznymi regulatorami transkrypcji⁴⁵. Zidentyfikowaliśmy gen *mcmA* *A. nidulans*. cDNA tego genu został sklonowany, zsekwencjonowany i zgłoszony do bazy GeneBank⁴⁶. Substytucja *mcmA*_{170A} w domenie MADS McmA⁴⁷ prowadzi do obniżenia

aktywności genów katabolizmu argininy i jest epistatyczna w stosunku do allelu typu nabycia funkcji *arcA^{d4748}* (dane niepublikowane). Wykazaliśmy również, że wyrażone w *E. coli* i oczyszczone białko McmA wiąże się z promotorami *otaA* i *agaA* in vitro^{49,50} (dane niepublikowane). Wszystkie te dane wskazują, że podobnie jak u *S. cerevisiae*, w procesie indukcji przez argininę ekspresji genów *otaA* i *agaA* bierze udział kompleks specyficznego aktywatora ArcA i transkrypcyjnego regulatora z rodziny MADS – McmA. Obecnie prowadzimy badania interakcji między ArcA i McmA.

Kataboliczna represja węglowa genów katabolizmu argininy

Obecność glukozy w podłożu prowadzi do obniżenia zarówno podstawowego, jak i indukowanego poziomu aktywności OAT, co sugeruje, że ogólny represor węglowy CreA jest zaangażowany w regulację genu *otaA*. Wykazaliśmy, że dwie sekwencje docelowe w promotorze *otaA* wiązane przez CreA in vitro³⁹, są również funkcjonalne in vivo⁴². Delecje lub mutacje punktowe w obrębie tych sekwencji, prowadzą do silnej derepresji aktywności OAT, co pokazuje, że CreA jest bezpośrednio zaangażowane w represję węglową *otaA* oraz że CreA wpływa na obniżenie podstawowego poziomu ekspresji tego genu.

Metaboliczna represja azotowa genów katabolizmu argininy

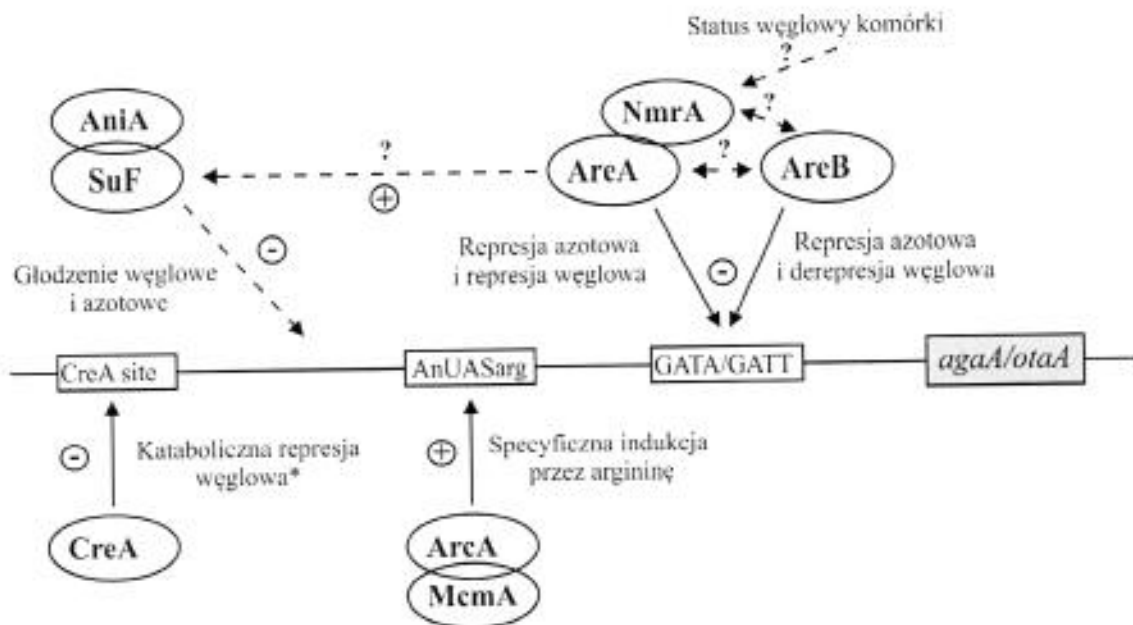
Obecność jonów amonowych w podłożu prowadzi do obniżenia indukowanego poziomu aktywności OAT, co sugeruje, że ogólny aktywator azotowy AreA jest zaangażowany w regulację genu *otaA*. Wykazaliśmy, że AreA wiąże się z promotorem *otaA* in vitro³⁹, jednak mutacje sekwencji docelowych i analiza in vivo nie potwierdziły tej hipotezy, co prawdopodobnie wynikało ze specyfiki użytego systemu transformacji i selekcji⁴². W tej samej publikacji pokazaliśmy jednak, że inny, negatywnie działający czynnik GATA (AreB) bierze udział w represji azotowej *otaA*, ponieważ mutacje typu utraty funkcji w genie *areB* prowadzą do braku represji *otaA* w obecności jonów amonowych. **Geny katabolizmu argininy były pierwszymi genami *A. nidulans*, dla których wykazano, że są regulowane przez AreB⁴².**

U *F. fujicuroi* wykazano, że AreB, podobnie jak AreA, bierze również udział w regulacji genów metabolizmu wtórnego, m.in. genów biosyntezy giberelin. Co więcej, u tego grzyba AreB może działać zarówno jako represor, jak i aktywator transkrypcji. Międzygatunkowa komplementacja wykazała, że niektóre funkcje AreB są zachowane u *F. fujicuroi* i *A. nidulans*, podczas gdy inne ewolucyjnie się "rozeszły"²⁵.

Dalsza analiza pojedynczych i podwójnych mutantów w genach *areA* i *areB* wykazała, że AreA i AreB, dwa czynniki transkrypcyjne z rodziny GATA, negatywnie regulują ekspresję genów katabolizmu argininy *agaA* i *otaA* w warunkach represji azotowej, gdy w podłożu obecne są jony amonowe. Co więcej, analiza ta pokazała, że **funkcja tych dwóch regulatorów azotowych w regulacji genów katabolizmu argininy, zależy nie tylko od źródła azotu, ale również od źródła węgla.** AreA jest represorem tych genów, w przeciwieństwie do większości innych przypadków, gdzie działa jako aktywator (patrz powyżej). AreA i AreB różnie odpowiadają na źródło węgla. W warunkach represji węglowej (1% glukoza) głównym represorem azotowym genów *agaA* i *otaA* jest AreA, natomiast w warunkach derepresji węglowej i limitującego stężenia źródła węgla (0.1% fruktoza), głównym regulatorem negatywnym tych genów jest AreB⁴³.

Efekt ten nie zależy od represora węglowego CreA. Czynnikiem łączącym regulację azotową z węglową może być korepresor NmrA. Wykazaliśmy, że oddziaływanie NmrA z C – końcem AreA jest konieczne do represji azotowej *agaA* i *otaA* w obydwu testowanych warunkach węglowych⁴³. Wykazano, że NmrA wiąże dinukleotydyndinotyno-amido-adeninowe i może pełnić funkcję sensora red-ox, ponieważ formy utlenione (NAD⁺ i NADP⁺) są wiązane przez to białko preferencyjnie^{51,52}. Wiadomo, że trakcie procesu patogenezy roślin, homologi NmrA u *M. grisea* przekazują sygnał NADP do czynników GATA^{53,54}. Dlatego proponujemy, że u *A. nidulans* NmrA może brać udział w modulacji aktywności AreA i AreB, w odpowiedzi na zmieniające się warunki węglowe.

Model regulacji genów katabolizmu argininy przedstawiono na Rys. 2. Podsumowując, transkrypcja genów *agaA* i *otaA* jest indukowana przez argininę, w czym pośredniczy specyficzny aktywator ArcA, działający w kompleksie z czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny MADS – McmA. W katabolicznej represji węglowej *otaA*, przynajmniej częściowo pośredniczy główny regulator ogólny CreA, jednak nie dotyczy to najprawdopodobniej *agaA*. W warunkach głodzenia azotowego i/lub węglowego, ekspresja genów katabolizmu argininy jest negatywnie regulowana przez kompleks suF/AniA⁵⁵, który prawdopodobnie jest regulowany przez AreA. Represja azotowa genów katabolizmu argininy zależy od czynników GATA AreA i AreB, oraz korepresora NmrA. W tym przypadku, AreA i AreB aktywnie hamują transkrypcję i różnie odpowiadają na źródło węgla, w procesie niezależnym od CreA. Jedną z możliwości, jest przekazywanie sygnałów o statusie węglowym komórki przez NmrA do AreA i AreB.



Rys.2. Model regulacji ekspresji genów *agaA* i *otaA* u *A. nidulans*.

Miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych przedstawiono w ramkach, a czynniki transkrypcyjne w owalach. Strzałki – pozytywne (+) i negatywne (-) interakcje regulacyjne. Linie przerywane i znak zapytania – potencjalne mechanizmy regulacyjne lub interakcje między białkami. * - CreA uczestniczy prawdopodobnie tylko w katabolicznej represji węglowej genu *otaA*^(19,40).

Aktualnie prowadzone badania

Głównym celem aktualnie prowadzonych badań (grant NCN nr2014/15/B/NZ3/02396) jest pogłębienie wiedzy na temat azotowych i węglowych systemów regulacji ogólnej u grzybów strzępkowych, oraz zrozumienie mechanizmów koordynujących działanie tych systemów i ich powiązania z odpowiedzią na stres oksydacyjny.

1. Lokalizacja AreB i AreA. Badania lokalizacji AreB i AreA u patogena roślin *F. fujicuroi* wykazały, że obydwie te czynniki GATA wykazują podobną lokalizację w większości testowanych warunków²⁵. Badania te nie brały jednak pod uwagę warunków węglowych i nie rozróżniały dobrze różnych form AreB. Wykonamy badania u *A. nidulans* określające lokalizację w komórce AreA i trzech wariantów AreB, w zależności od warunków azotowo - węglowych.

Otrzymaliśmy już szczep wyrażający fuzję AreBβ z T-Sapphire (odmiana GFP) oraz fuzję histonu H1 z RFP, co umożliwia potwierdzenie lokalizacji jądrowej. Wykazaliśmy, że na glukozie i/lub jonach amonowych AreBβ znajduje się głównie w jądrze, a warunkach głodu węglowego lub azotowego, głównie w cytoplazmie (Macios i

Dzikowska, dane niepublikowane). Otrzymamy analogiczne szczepy dla AreBa i AreB γ , oraz szczep wyrażający fuzję AreA z GFP, i przeprowadzimy szczegółową analizę lokalizacji badanych białek w zależności od źródła węgla i azotu. Zbadamy, czy lokalizacja trzech form AreB jest taka sama; czy i w jaki sposób zależy ona od warunków węglowo-azotowych oraz czy lokalizacja AreA i AreB jest taka sama we wszystkich testowanych warunkach.

2. Oddziaływanie AreB z AreA. Aby wykazać, czy i w jakich warunkach AreA i AreB oddziałują ze sobą u *A. nidulans*, zastosujemy oparty na białku YFP system BiFC (ang. Bimolecular fluorescence complementation), wykorzystany przez naszych współpracowników do analogicznych badań w *F. fujicuroi*²⁵. Wykazaliśmy już, że podobnie jak u *F. fujicuroi*, u *A. nidulans* AreB β nie oddziałuje z AreA w żadnych badanych warunkach (Macios i Dzikowska, dane niepublikowane). Przeprowadzimy taką samą analizę BiFC dla AreBa i AreB γ w różnych warunkach węglowo azotowych. Zbadamy, czy różne formy AreB różnie oddziałują z AreA; czy i w jaki sposób zależy to od źródła węgla i azotu; oraz czy te interakcje są takie same, jak u patogena roślin *F. fujicuroi*.

3. Identyfikacja białek oddziałujących z AreB. Aby zidentyfikować białka oddziałujące z AreB wykonamy analizę proteomiczną opisanych powyżej szczepów wyrażających fuzję AreB z T-Sapphire hodowanych w różnych warunkach węglowo-azotowych. Powstające *in vivo* kompleksy będą izolowane przy użyciu odpowiednich przeciwciał anti-T-Sapphire, a białka identyfikowane przy pomocy analizy MasSpec. Wykonaliśmy już taką częściową analizę dla szczepu AreB β ::T-Sapphire, która pokazała, że AreB β oddziałuje z kompleksem CAAT (ogólnym regulatorem transkrypcji, działającym zarówno jako aktywator, jak i represor) oraz kilkoma kinazami i fosfatazą, co sugeruje fosforylację AreB, która może być elementem ścieżki przekazywania sygnału do tego czynnika transkrypcyjnego³⁶ (dane niepublikowane). Wykonamy analogiczną, kompletną analizę proteomiczną dla trzech form AreB, która pokaże, czy trzy formy AreB oddziałują z takimi samymi białkami i czy te interakcje zależą od warunków węglowo/azotowych.

4. Identyfikacja promotorów regulowanych przez AreB. W ramach zrealizowanego projektu („Preludium” dla doktorantki Marii Macios) wykonaliśmy analizę transkryptomoczną (RNA-Seq) deletanta *areB* i szczepu dzikiego, hodowanych w różnych warunkach węglowo-azotowych. Analiza transkryptomoczną została wykonana przez

Centre for Genomic Research (CGR), Uniwersytetu w Liverpool, we współpracy z prof. Markiem Caddick'iem z Institute of Integrative Biology, Uniwersytetu w Liverpool. Zidentyfikowaliśmy wiele genów, których poziom transkrypcji obniża się lub podwyższa w tym mutancie i zależy to od źródła węgla i/lub azotu. Potwierdza to naszą hipotezę, że AreB jest ogólnym regulatorem azotowo/węglowym. Należy jednak pamiętać, że część tych efektów ma charakter pośredni. Aby zidentyfikować promotory bezpośrednio regulowane przez AreB, otrzymamy szczep *A. nidulans* wyrażający fuzję AreB ze znacznikiem HA i wykonamy analizę typu ChIP-Seq (immunoprecypitacja chromatyny połączona z sekwencjonowaniem wysokoprzepustowym) z grzybni hodowanej w różnych warunkach azotowo/węglowych. Ta część projektu zostanie wykonana przez CGR, we współpracy z grupą prof. Marka Caddick'a.

5. Analiza genomiczna mutantów oraz charakterystyka genów *suF* i *aniA*. Nasze ostatnie badania sugerują, że w regulacji azotowo/węglowej genów katabolizmu argininy u *A. nidulans* bierze udział jeszcze jeden niezidentyfikowany represor. Jest bardzo prawdopodobne, że jest on kodowany przez geny *aniA* i *suF*. Zaproponowano, że produkty tych genów tworzą kompleks, który hamuje ekspresję genów katabolizmu argininy w warunkach represji węglowo/azotowej⁵⁵. Jest bardzo prawdopodobne, że jest to kolejny, jeszcze niescharakteryzowany regulator ogólny. Aby potwierdzić tę hipotezę geny *suF* i *AniA* zostaną zidentyfikowane poprzez sekwencjonowanie genomów odpowiednich mutantów. Po zidentyfikowaniu genów *suF* i *aniA* zidentyfikujemy ich homologi u innych organizmów, wykonamy delecje obu genów i zanalizujemy fenotyp deletantów, co pozwoli zrozumieć rolę tych genów w regulacji azotowo / węglowej. Ta część projektu zostanie wykonana przez CGR, we współpracy z grupą prof. Marka Caddick'a .

POSTTRANSKRYPCYJNE SYSTEMY REGULACYJNE

Publikacje

(numery referencji zgodne z numeracją w części Bibliografia)

*autor korespondencyjny

⁵⁵Olszewska, A., Król, K., Węglenski, P., Dzikowska, A*. (2007) Arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* is regulated by the *rrmA* gene coding for the RNA – binding protein. Fungal Genetics and Biology 44:1285-97.

⁵⁸Krol K, Morozov IY, Jones MG, Wyszomirski T, Węgleński P, Dzikowska A *, Caddick MX *. (2013) RrmA regulates the stability of specific transcripts in response to both nitrogen source and oxidative stress" *Molecular Microbiology* 89:975-988

RrmA, regulator stabilności transkryptów w odpowiedzi na warunki węglowo-azotowe oraz na stres oksydacyjny

Poszukując genów biorących udział w regulacji metabolizmu argininy/proliny, zastosowaliśmy mutagenezę transpozonową i zidentyfikowaliśmy gen *rrmA*. cDNA genu został sklonowany, zsekwencjonowany i zgłoszony do bazy danych GeneBank⁵⁹. Zaproponowano, że *rrmA* koduje białko wiążące RNA, ponieważ jego potencjalny produkt zawiera trzy domeny RRM, typowe dla takich białek. W mutancie *rrmA::impala* typu utraty funkcji, poziomy transkryptów *otaA* i *agaA* są znacząco wyższe niż w szczepie dzikim. Wiadomo było również, że homologi RrmA innych grzybów biorą udział w posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji specyficznych genów poprzez modulację stabilności ich transkryptów, dlatego zaproponowaliśmy, że RrmA bierze udział w regulacji degradacji mRNA *agaA* i *otaA*. Plejotropowy charakter mutacji *rrmA::impala* wskazywał, że funkcja RrmA nie jest ograniczona do regulacji genów katabolizmu argininy⁵⁷.

Dalsze badania funkcji RrmA prowadziliśmy we współpracy z grupą Prof. Marka Caddick'a z Institute of Integrative Biology, Uniwersytetu w Liverpool, która wykazała, że RrmA wiąże 3'UTR mRNA *areA* in vitro i reguluje tempo jego deadenyacji i degradacji w warunkach represji azotowej⁵⁸. Wykorzystując szczep wyrażający fuzję RrmA::GFP wykazaliśmy, że RrmA jest zlokalizowane w cytoplazmie. RrmA reguluje również stabilność transkryptów *agaA* i *otaA* w odpowiedzi na represję azotową, głodzenie azotowe i/lub węglowe oraz na stres oksydacyjny. RrmA reguluje także stabilność transkryptów innych genów w odpowiedzi na zmieniające się warunki azotowe. W warunkach stresu oksydacyjnego i głodzenia węglowego białko to wpływa na proces powstawania ciałek P (ang. P bodies), o których wiadomo, że biorą udział w degradacji mRNA⁵⁸.

Homologiem RrmA jest białko Csx1p ze *Schizosaccharomyces pombe*, o którym wiadomo, że bierze udział w regulacji odpowiedzi na stres oksydacyjny. Dysrupcja genu *CSX1* prowadzi do destabilizacji transkryptu *atfA*, kodującego podstawowy czynnik transkrypcyjny biorący udział w tym procesie⁶⁰. Podobnie, delecja genu *rrmA* podwyższa wrażliwość *A. nidulans* na stres oksydacyjny, ale mechanizm tego procesu jest inny, ponieważ stabilność mRNA *atfA* nie zmienia się w szczepie *ΔrrmA*. Jednak delecja ta

destabilizuje transkrypty *eifE* i *dhsA*, co może tłumaczyć wrażliwość szczepu *ΔrrmA* na stres oksydacyjny⁵⁸, ponieważ *eifE* koduje czynnik translacyjny eIF5A, który jest posttranslacyjnie modyfikowany przez białko DhsA i który bierze udział w odpowiedzi na stres^{61,62}.

Opisane powyżej dane wskazują, że **RrmA jest elementem ogólnego systemu regulującego stabilność różnych transkryptów w odpowiedzi na warunki węglowo / azotowe oraz stres oksydacyjny**. Co ciekawe, w zależności od warunków środowiska RrmA bierze udział zarówno w procesach stabilizacji, jak i destabilizacji specyficznych mRNA. Sugeruje to, że w zależności od transkryptu, RrmA współpracuje z różnymi czynnikami.

Aktualnie prowadzone badania

Aby wyjaśnić rolę RrmA w procesie regulacji tempa degradacji mRNA, należy zidentyfikować białka, które z nim oddziałują. Poszukując powstających *in vivo* kompleksów białkowych, w skład których wchodzi RrmA, przeprowadzimy kompletną analizę szczepu wyrażającego fuzję RrmA::GFP, hodowanego w warunkach represji/derepresji azotowej oraz w warunkach stresu oksydacyjnego. Powstające *in vivo* kompleksy będą izolowane przy użyciu odpowiednich przeciwciał anty-GFP, a białka identyfikowane przy pomocy analizy MasSpec. Wstępna analiza w warunkach represji azotowej wykazała, że RrmA oddziałuje z Lsm7⁶³ (dane niepublikowane). Wiadomo, że kompleks białek Lsm1-7 bierze udział w degradacji mRNA, uczestniczy w odłączaniu czapeczki i ochronie 3' końca transkryptu⁶⁴. Otrzymane przez nas wyniki sugerują, że RrmA mogłoby regulować tempo degradacji transkryptu poprzez oddziaływanie z kompleksem Lsm1-7.

PODSUMOWANIE

Prezentowane wyniki dotyczą transkrypcyjnych i post-transkrypcyjnych systemów biorących udział w regulacji ekspresji genów u modelowego grzyba strzępkowego *Aspergillus nidulans*. Większość opublikowanych badań odnosi się do genów katabolizmu argininy, które są dobrym modelem, gdyż ich ekspresja regulowana jest zarówno przez systemy specyficzne (indukcja przez argininę), jak i ogólne (represja węglowa i azotowa).

Zaproponowaliśmy model transkrypcyjnej regulacji ekspresji tych genów oraz wykazaliśmy, że aktywność dwóch głównych azotowych regulatorów transkrypcji u *A. nidulans*, AreA i AreB, zależy od źródła węgla. Wyniki grupy prof. Marka Caddick'a z Uniwersytetu w Liverpool wykazały, że stabilność mRNA *areA* jest regulowana w zależności od źródła azotu. Wspólnie wykazaliśmy, że zależy to od wiążącego RNA białka RrmA, które reguluje stabilność również innych transkryptów, w odpowiedzi na zmieniające się w środowisku źródło węgla i/lub azotu oraz na stres oksydacyjny.

Opublikowane wyniki pogłębiły naszą widzę, dotyczącą specyficznych i ogólnych systemów regulacji ekspresji genów u grzybów strzępkowych i są bardzo dobrym punktem wyjścia do już prowadzonych badań, dotyczących **mechanizmów koordynacji systemów regulacji azotowej i węglowej oraz ich powiązania z procesami odpowiedzi na stres oksydacyjny u tych organizmów**. Zrozumienie molekularnych podstaw tych procesów jest istotne, gdyż mają one **kluczowe znaczenie dla fizjologii komórki**. Wiedza ta jest również niezbędna przy **optymalizacji ekspresji genów w przemyśle biotechnologicznym**, a także będzie prowadzić do **lepszego zrozumienia mechanizmów patogenezы grzybów**.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) Pozostałe osiągnięcia naukowo - badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Publikacje

(numery referencji zgodne z numeracją w części Bibliografia)

*autor korespondencyjny

⁶⁵Dzikowska A, Weglenski P.(1989) Enhancement of *Aspergillus nidulans* transformation by the *ansI* sequence. Acta Microbiol Pol. 38: 217-23.

⁶⁶Dzikowska A*, Le Caer JP, Jonczyk P, Weglenski P. (1994) Purification of arginase from *Aspergillus nidulans*. Acta Biochim Pol. 41: 467-71.

Pierwsze opublikowane wyniki moich badań miały aspekt głównie metodyczny. Wprowadziłam technikę transformacji *A. nidulans* w Zakładzie Genetyki UW. Opublikowane badania dotyczyły podniesienia wydajności transformacji i kotransformacji przy zastosowaniu autonomicznie replikującej się w drożdżach sekwencji *ansI*⁶⁵, co miało istotne znaczenie dla podejmowanego w następnych latach klonowania kolejnych genów

A. nidulans. Opracowałam również metodę czyszczenia arginazy z *A. nidulans*⁶⁷.
Dysponując czystym białkiem, określiliśmy sekwencję kilku wewnętrznych peptydów, co stało się punktem wyjścia do klonowania genu *agaA* kodującego arginazę³⁸.

b) Pozostałe osiągnięcia naukowo - badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Publikacje

(numery referencji zgodne z numeracją w części Bibliografia)

*autor korespondencyjny

- ³⁹Dzikowska A, Swianiewicz M, Talarczyk A, Wisniewska M, Goras M, Scazzocchio C, Weglenski P. (1999) Cloning, characterisation and regulation of the ornithine transaminase (*otaA*) gene of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*. 35: 118-26.
- ³⁸Borsuk P, Dzikowska A, Empel J, Grzelak A, Grzeskowiak R, Weglenski P. (1999). Structure of the arginase coding gene and its transcript in *Aspergillus nidulans* *Acta BiochimPol*. 46: 391-403.
- ⁴⁵Szafron L, Jagielski T, Dzikowska A*. (2009). MADS-box proteins - combinatorial transcriptional regulators in fungi, animals and plants. *Postepy Biochem*. 55(1):54-65. Review.
- ²⁵Michielse C.B., A. Pfannmüller, M. Macios, P. Rengers, A. Dzikowska and Tudzynski B. (2014) The interplay between the GATA transcription factors AreA, the global nitrogen regulator and AreB in *Fusarium fujikuroi*. *Molecular Microbiology* 91:472-493.
- ⁴⁶Dzikowska A*, Grzelak A, Gawlik J, Szewczyk E, Mrozek P, Borsuk P, Koper M, Empel J, Szczesny P, Piłsnyk S, Pekala M, Weglenski P. (2015) „KAEA (SUDPRO), a member of the ubiquitous KEOPS/EKC protein complex, regulates the arginine catabolic pathway and the expression of several other genes in *Aspergillus nidulans*”. *Gene* 573:310-320.

Zgłoszenia do bazy danych GeneBank

*autor korespondencyjny

- ⁴⁹Dzikowska A*, Swianiewicz M, Talarczyk A, Wisniewska M, Goras M and Weglenski P. (1999) *Emmericella nidulans* ornithine transaminase (*otaA*) gene, complete cds. GeneBank Accession No. U74303
- ⁴⁶Dzikowska A*, Walczuk B. and Weglenski P. (2005) *Emmericella nidulans* MCMA (*mcmA*) mRNA, complete cds. GeneBank Accession No. AY957455
- ⁵⁰Olszewska A, Weglenski P. and Dzikowska A*. (2007) *Emmericella nidulans* putative RNA binding protein (*rrmA*) mRNA, complete cds. GeneBank Accession No. DQ066726

W publikacji³⁹ opisane zostały wyniki, które weszły w skład mojej pracy doktorskiej, oraz wyniki badań, które prowadziłam już po doktoracie. Klonowanie i charakterystyka genu *otaA* są elementem doktoratu. W trakcie tych badań gen został sklonowany, zsekwencjonowany i zgłoszony do bazy GeneBank⁶⁹. Po otrzymaniu stopnia doktora, kontynuowałam badania dotyczące regulacji ekspresji genów katabolizmu argininy u *A. nidulans*. Opublikowane w omawianej publikacji wyniki³⁹, dotyczące regulacji transkrypcyjnej genu *otaA* i wiązania regulatorów AreA i CreA do promotora tego genu in vitro, otrzymałam już po doktoracie. Brałam również udział w klonowaniu genu *agaA*, co wraz z jego charakterystyką i analizą transkrypcji zostało przedstawione w publikacji³⁸.

Jestem współautorką trzech zgłoszeń do bazy danych GeneBank. Pierwsze z nich (*otaA*)⁶⁹ miało miejsce jeszcze przed opublikowaniem sekwencji genomu *A. nidulans*, dwa pozostałe (cDNA *mcmA* i *rrmA*)^{46, 59} - przed opublikowaniem sekwencji wszystkich zidentyfikowanych cDNA *A. nidulans*.

W ramach badań nad rolą regulatora AreB u grzybów strzępkowych nawiązałam współpracę z grupą prof. Bettiny Tudzynski z Westfälische Wilhelms University, zajmującą się regulacją azotową u patogena roślin *F. fujicuroi*. Wyniki badań dotyczących współdziałania regulatorów ArcA i AreB u tego grzyba zostały opublikowane we wspólnej pracy²⁵ i częściowo zostały omówione powyżej. Dzięki współpracy obydwu grup, stosując metodę komplementacji heterologicznej, zbadaliśmy, czy funkcja AreB u patogena roślin *F. fujicuroi* i grzyba saprofitycznego *A. nidulans*, jest zachowana ewolucyjnie, tzn. czy gen z jednego grzyba komplementuje odpowiednią mutację u drugiego grzyba. Wykazaliśmy, że funkcje homologów AreB u *F. fujicuroi* i *A. nidulans*, są tylko częściowo konserwowane ewolucyjnie²⁵.

Biorę udział w badaniach dotyczących funkcji genu *kaeA* u *A. nidulans* i jestem autorem korespondencyjnym pracy na ten temat⁶⁸. Gen ten koduje jedno z najbardziej konserwowanych ewolucyjnie białek, którego najlepiej udowodnioną funkcją jest udział w specyficznej modyfikacji tRNA. Postuluje się również, że białko *kaeA* może brać udział w regulacji transkrypcji, na czym koncentrują się nasze badania. Dane genetyczne i biochemiczne pokazują, że u *A. nidulans* *KaeA* bierze udział w regulacji genów katabolizmu argininy. Analiza transkryptomyczna mutantu *kaeA* wykazała, że *KaeA* jest regulatorem wielu innych genów, w tym ogólnego regulatora transkrypcji *rcoA*^{TUPI}⁶⁸. Badania dotyczące funkcji *KaeA* u *A. nidulans* są kontynuowane.

Jestem autorem korespondencyjnym pracy przeglądowej dotyczącej czynników transkrypcyjnych z rodziny MADS⁴⁵, do której należy m. in. ludzkie białko SRF, roślinne regulatory różnicowania np. AGAMOUS, a także regulatory grzybowe, jak drożdżowe Mcm1p, czy McmA *A. nidulans*, biorące udział w regulacji genów katabolizmu argininy.

5. Dane bibliometryczne

(według bazy danych Web of Science/All Databases)

(Wykaz wszystkich publikacji wraz z danymi bibliometrycznymi zamieszczono w załączniku nr 4)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje wnioskodawcy, zgodnie z rokiem opublikowania – **25,119+** dwie spoza listy Web of Science

Liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje wnioskodawcy, zgodnie z rokiem opublikowania – **263**

Liczba cytowań wszystkich publikacji wnioskodawcy do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – **128**

Index Hirsha według bazy Web of Science – **7**

BIBLIOGRAFIA

- 1 Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., Macdonald, K. D. & Bufton, A. W. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141-238 (1953).
- 2 Galagan, J. E. *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115 (2005).
- 3 Li, Q., McNeil, B. & Harvey, L. M. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Free Radic Biol Med* **44**, 394-402 (2008).
- 4 Li, Q., Abrashev, R., Harvey, L. M. & McNeil, B. Oxidative stress-associated impairment of glucose and ammonia metabolism in the filamentous fungus, *Aspergillus niger* B1-D. *Mycol Res* **112**, 1049-1055 (2008).
- 5 Pusztahelyi, T. *et al.* Comparison of transcriptional and translational changes caused by long-term menadione exposure in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **48**, 92-103 (2011).
- 6 Miskei, M., Karanyi, Z. & Pócsi, I. Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**, S105-120 (2009).
- 7 Moye-Rowley, W. S. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell* **2**, 381-389 (2003).
- 8 Gomez, D., Cubero, B., Cecchetto, G. & Scazzocchio, C. PrnA, a Zn₂Cys₆ activator with a unique DNA recognition mode, requires inducer for in vivo binding. *Mol Microbiol* **44**, 585-597 (2002).
- 9 Cubero, B. & Scazzocchio, C. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Embo J* **13**, 407-415 (1994).
- 10 Lockington, R. A. & Kelly, J. M. The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB in vivo in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **43**, 1173-1182 (2002).
- 11 Boase, N. A. & Kelly, J. M. A role for creD, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Mol Microbiol* **53**, 929-940 (2004).

- 12 Roy, P., Lockington, R. A. & Kelly, J. M. CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localisation or degradation of CreA. *Fungal Genet Biol* **45**, 657-670 (2008).
- 13 Ruijter, G. J. & Visser, J. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol Lett* **151**, 103-114 (1997).
- 14 Fleck, C. B., Schobel, F. & Brock, M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: Nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol* **301**, 400-407.
- 15 Ravagnani, A. *et al.* Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *Embo J* **16**, 3974-3986 (1997).
- 16 Muro-Pastor, M. I., Gonzalez, R., Strauss, J., Narendja, F. & Scazzocchio, C. The GATA factor AreA is essential for chromatin remodelling in a eukaryotic bidirectional promoter. *Embo J* **18**, 1584-1597 (1999).
- 17 Berger, H. *et al.* The GATA factor AreA regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA. *Mol Microbiol* **59**, 433-446 (2006).
- 18 Berger, H. *et al.* Dissecting individual steps of nitrogen transcription factor cooperation in the *Aspergillus nidulans* nitrate cluster. *Mol Microbiol* **69**, 1385-1398 (2008).
- 19 Platt, A. *et al.* Nitrogen metabolite signalling involves the C-terminus and the GATA domain of the *Aspergillus* transcription factor AREA and the 3' untranslated region of its mRNA. *EMBO J* **15**, 2791-2801 (1996).
- 20 Kotaka, M. *et al.* Structural analysis of the recognition of the negative regulator NmrA and DNA by the zinc finger from the GATA-type transcription factor AreA. *J Mol Biol* **381**, 373-382 (2008).
- 21 Small, A. J., Hynes, M. J. & Davis, M. A. The TamA protein fused to a DNA-binding domain can recruit AreA, the major nitrogen regulatory protein, to activate gene expression in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **153**, 95-105 (1999).
- 22 Downes, D. J. *et al.* Dual DNA binding and coactivator functions of *Aspergillus nidulans* TamA, a Zn(II)2Cys6 transcription factor. *Mol Microbiol* (2014).
- 23 Todd, R. B., Fraser, J. A., Wong, K. H., Davis, M. A. & Hynes, M. J. Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryot Cell* **4**, 1646-1653 (2005).
- 24 Hunter, C. C. *et al.* Multiple nuclear localization signals mediate nuclear localization of the GATA transcription factor AreA. *Eukaryot Cell* **13**, 527-538 (2014).
- 25 Michielse, C. B. *et al.* The interplay between the GATA transcription factors AreA, the global nitrogen regulator and AreB in *Fusarium fujikuroi*. *Mol Microbiol* **91**, 472-493, doi:10.1111/mmi.12472 (2014).
- 26 Fu, Y. H. & Marzluf, G. A. nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* **10**, 1056-1065 (1990).
- 27 Haas, H. & Marzluf, G. A. NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Curr Genet* **28**, 177-183 (1995).
- 28 Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B. & Marzluf, G. A. Isolation, characterization and disruption of the areA nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol Gen Genet* **261**, 106-114 (1999).
- 29 Wong, K. H., Hynes, M. J. & Davis, M. A. Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryot Cell* **7**, 917-925 (2008).
- 30 Mihlan, M., Homann, V., Liu, T. W. & Tudzynski, B. AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol Microbiol* **47**, 975-991 (2003).
- 31 Conlon, H. *et al.* The *Aspergillus nidulans* GATA transcription factor gene areB encodes at least three proteins and features three classes of mutation. *Mol Microbiol* **40**, 361-375 (2001).
- 32 Bevilacqua, A., Ceriani, M. C., Capaccioli, S. & Nicolini, A. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* **195**, 356-372 (2003).
- 33 Alonso, C. R. A complex 'mRNA degradation code' controls gene expression during animal development. *Trends Genet* **28**, 78-88 (2012).
- 34 Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 121-127 (2004).
- 35 Morozov, I. Y. *et al.* Distinct roles for Caf1, Ccr4, Edc3 and CutA in the co-ordination of transcript deadenylation, decapping and P-body formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **76**, 503-516 (2010).
- 36 Morozov, I. Y., Martinez, M. G., Jones, M. G. & Caddick, M. X. A defined sequence within the 3' UTR of the areA transcript is sufficient to mediate nitrogen metabolite signalling via accelerated deadenylation. *Mol Microbiol* **37**, 1248-1257 (2000).

- 37 Morozov, I. Y., Galbis-Martinez, M., Jones, M. G. & Caddick, M. X. Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA. *Mol Microbiol* **42**, 269-277 (2001).
- 38 Borsuk, P. *et al.* Structure of the arginase coding gene and its transcript in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochim Pol* **46**, 391-403 (1999).
- 39 Dzikowska, A. *et al.* Cloning, characterisation and regulation of the ornithine transaminase (*otaA*) gene of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **35**, 118-126 (1999).
- 40 Empel, J. *et al.* *arcA*, the regulatory gene for the arginine catabolic pathway in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **266**, 591-597 (2001).
- 41 Bartnik, E. & Weglenski, P. Regulation of arginine catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Nature* **250**, 590-592 (1974).
- 42 Dzikowska, A. *et al.* Specific induction and carbon/nitrogen repression of arginine catabolism gene of *Aspergillus nidulans*--functional in vivo analysis of the *otaA* promoter. *Fungal Genet Biol* **38**, 175-186 (2003).
- 43 Macios, M., Caddick, M., Weglenski, P., Scazzocchio, C. & Dzikowska, A. The GATA factors AREA and AREB together with the co-repressor NMRA, negatively regulate arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* in response to nitrogen and carbon source. *Fungal Genet Biol* **49**, 189-198 (2012).
- 44 El Bakkoury, M., Dubois, E. & Messenguy, F. Recruitment of the yeast MADS-box proteins, ArgRI and Mcm1 by the pleiotropic factor ArgRIII is required for their stability. *Mol Microbiol* **35**, 15-31 (2000).
- 45 Szafron, L., Jagielski, T. & Dzikowska, A. MADS-box proteins-combinatorial transcriptional regulators in fungi, animals and plants. *Postepy Biochem* **55**, 54-65 (2009).
- 46 Dzikowska, A., Walczuk, B. & Weglenski, P. *Emericella nidulans* MCMA (*mcmA*) mRNA, complete cds. *GeneBank Accession No. AY957455* (2005).
- 47 Yamakawa, Y. *et al.* Regulation of cellulolytic genes by McmA, the SRF-MADS box protein in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical and biophysical research communications* **431**, 777-782, doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.031 (2013).
- 48 Macios, M. Rola białka MCMA w regulacji katabolizmu argininy u *Aspergillus nidulans*. MSc Thesis. Department of Biology. University of Warsaw. (2008).
- 49 Klimek, K. Oczyszczanie białka MCMA-czynnika transkrypcyjnego z rodziny MADS *Aspergillus nidulans*. BSc Thesis. Department of Biology. University of Warsaw. (2010).
- 50 Klimek, K. Wiązanie czynników transkrypcyjnych MCMA i ARCA do promotorów genów *otaA* i *agaA* *Aspergillus nidulans* in vitro. MSc Thesis. Department of Biology. University of Warsaw. (2012).
- 51 Lamb, H. K. *et al.* The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. *J Biol Chem* **278**, 32107-32114 (2003).
- 52 Lamb, H. K., Stammers, D. K. & Hawkins, A. R. Dinucleotide-sensing proteins: linking signaling networks and regulating transcription. *Sci Signal* **1**, pe38 (2008).
- 53 Wilson, R. A., Gibson, R. P., Quispe, C. F., Littlechild, J. A. & Talbot, N. J. An NADPH-dependent genetic switch regulates plant infection by the rice blast fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21902-21907 (2010).
- 54 Fernandez, J. *et al.* Principles of carbon catabolite repression in the rice blast fungus: Tps1, Nmr1-3, and a MATE-family pump regulate glucose metabolism during infection. *PLoS Genet* **8**, e1002673 (2012).
- 55 Bartnik, E., Guzewska, J. & Weglenski, P. Mutations simultaneously affecting ammonium and glucose repression of the arginine catabolic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **126**, 85-92 (1973).
- 56 Garbicz, D. Identyfikacja potencjalnych interaktorów białka AREB – ogólnego regulatora azotowego u *Aspergillus nidulans*. MSc Thesis. Department of Biology. University of Warsaw. (2015).
- 57 Olszewska, A., Krol, K., Weglenski, P. & Dzikowska, A. Arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* is regulated by the *rrmA* gene coding for the RNA-binding protein. *Fungal Genet Biol* **44**, 1285-1297 (2007).
- 58 Krol, K. *et al.* RrmA regulates the stability of specific transcripts in response to both nitrogen source and oxidative stress. *Mol Microbiol* **89**, 975-988 (2013).
- 59 Olszewska, A., Weglenski, P. & Dzikowska, A. *Emericella nidulans* putative RNA binding protein (*rrmA*) mRNA, complete cds. *GeneBank Accession No. DQ066726* (2007).
- 60 Rodriguez-Gabriel, M. A. *et al.* RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *Embo J* **22**, 6256-6266 (2003).
- 61 Park, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem* **139**, 161-169 (2006).

- 62 Li, C. H., Ohn, T., Ivanov, P., Tisdale, S. & Anderson, P. eIF5A promotes translation elongation,
63 polysome disassembly and stress granule assembly. *PLoS One* **5**, e9942 (2010).
- 63 Halat, P. Identyfikacja białek oddziałujących z białkiem RRMA *Aspergillus nidulans* w warunkach
64 represji azotowej, stresu oksydacyjnego oraz warunkach kontrolnych. MSc Thesis. Department of
65 Biology. University of Warsaw. (2013).
- 64 Tharun, S. Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function. *Int Rev Cell Mol Biol*
65 **272**, 149-189 (2009).
- 65 Dzikowska, A. & Weglenski, P. Enhancement of *Aspergillus nidulans* transformation by the ans1
66 sequence. *Acta Microbiol Pol* **38**, 217-223 (1989).
- 66 Dean, R. A. *et al.* The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**, 980-
67 986 (2005).
- 67 Dzikowska, A., Le Caer, J. P., Jonczyk, P. & Weglenski, P. Purification of arginase from *Aspergillus*
68 *nidulans*. *Acta Biochim Pol* **41**, 467-471 (1994).
- 68 Dzikowska, A. *et al.* KAEA (SUDPRO), a member of the ubiquitous KEOPS/EKC protein complex,
69 regulates the arginine catabolic pathway and the expression of several other genes in *Aspergillus*
nidulans. *Gene* **573**, 310-320, doi:10.1016/j.gene.2015.07.066 (2015).
- 69 Dzikowska, A. *et al.* *Emericella nidulans* ornithine transaminase (*ota1*) gene, complete cds. . *GeneBank*
Accession No. U74303 (1999).

- 62 Li, C. H., Ohn, T., Ivanov, P., Tisdale, S. & Anderson, P. eIF5A promotes translation elongation,
63 polysome disassembly and stress granule assembly. *PLoS One* 5, e9942 (2010).
- 64 Halat, P. Identyfikacja białek oddziałujących z białkiem RRMA *Aspergillus nidulans* w warunkach
65 represji azotowej, stresu oksydacyjnego oraz warunkach kontrolnych. MSc Thesis. Department of
66 Biology. University of Warsaw. (2013).
- 67 Tharun, S. Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function. *Int Rev Cell Mol Biol*
68 272, 149-189 (2009).
- 69 Dzikowska, A. & Weglenski, P. Enhancement of *Aspergillus nidulans* transformation by the ans1
sequence. *Acta Microbiol Pol* 38, 217-223 (1989).
- Dean, R. A. *et al.* The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434, 980-
986 (2005).
- Dzikowska, A., Le Caer, J. P., Jonczyk, P. & Weglenski, P. Purification of arginase from *Aspergillus*
nidulans. *Acta Biochim Pol* 41, 467-471 (1994).
- Dzikowska, A. *et al.* KAEA (SUDPRO), a member of the ubiquitous KEOPS/EKC protein complex,
regulates the arginine catabolic pathway and the expression of several other genes in *Aspergillus*
nidulans. *Gene* 573, 310-320, doi:10.1016/j.gene.2015.07.066 (2015).
- Dzikowska, A. *et al.* *Emericella nidulans* ornithine transaminase (*otaA*) gene, complete cds. . *GeneBank*
Accession No. U74303 (1999).

A. Dzikowska