

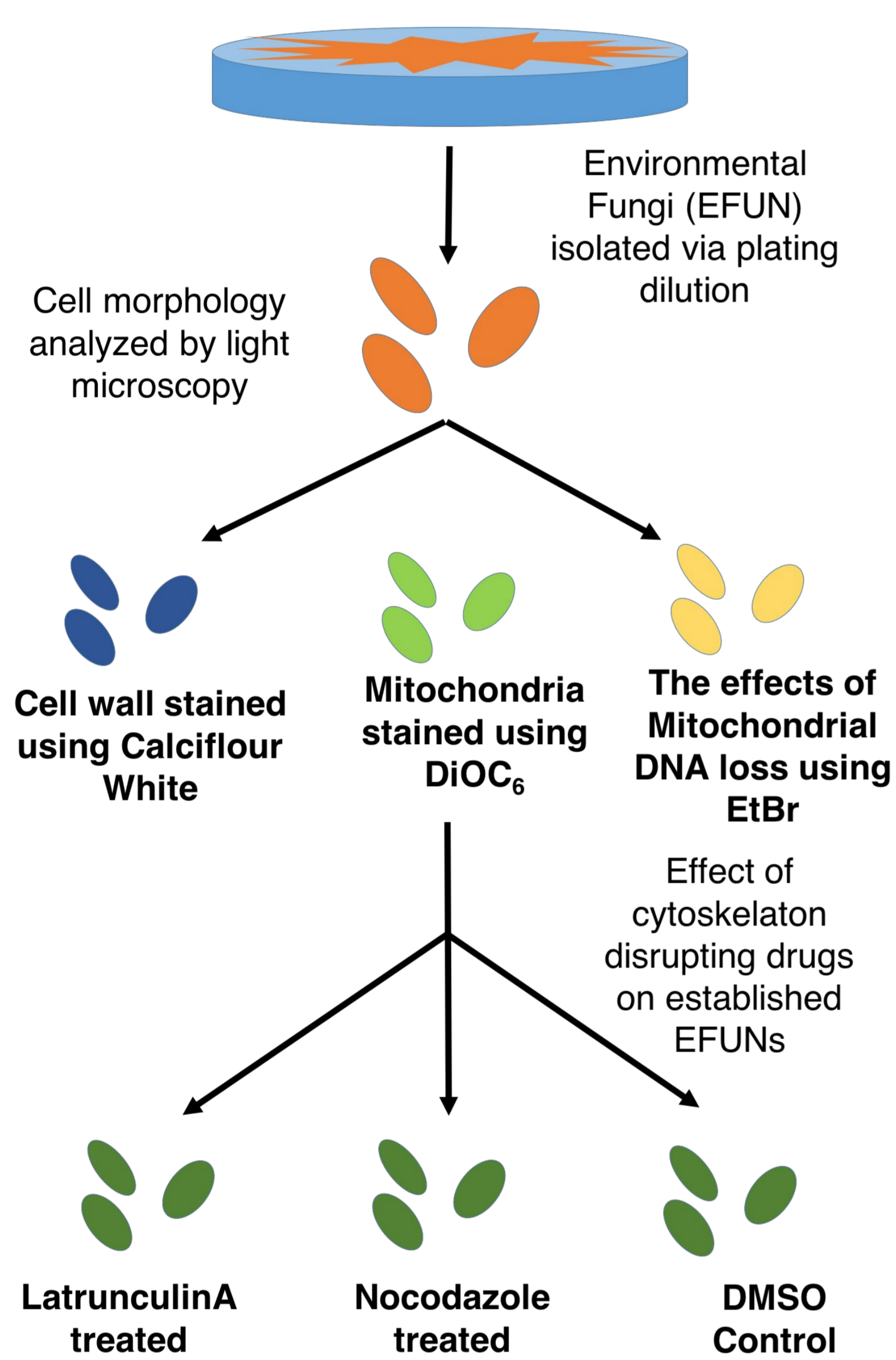
Previously uncharacterized environmental fungi present new opportunities to study mitochondrial assembly and function

Rostislav Dobrosmyslov, Daria Ereshko, Sveta Fomicheva, Arina Makeeva, Liza Reizis, Alexander Sharipov, Wiktoria Trzebiatowska, Daria Shafranskaya, Maria Anastasina, Cory Dunn

Abstract:

New technologies for sequencing and modifying genes offer an opportunity to utilize a wider range of model systems for studying study questions of biological interest. The fungus *Saccharomyces cerevisiae* has been the predominant organism of investigation of mitochondrial assembly; The use of distantly related fungi will expand our understanding of mitochondrial biogenesis. Here, we examine mitochondrial morphology and dynamics in fungal strains isolated from Adam Mickiewicz University in Poznań, as well as testing the effect of cytoskeletal perturbations on mitochondrial structure. Furthermore, we investigate the effects of a drug known to deplete mitochondrial DNA (mtDNA) from *S. cerevisiae* on these uncharacterized environmental strains. Finally, we amplified a segment of ribosomal DNA that can be informative of the phylogenetic clade of the studied organisms.

Methodology:



Morphological analysis:

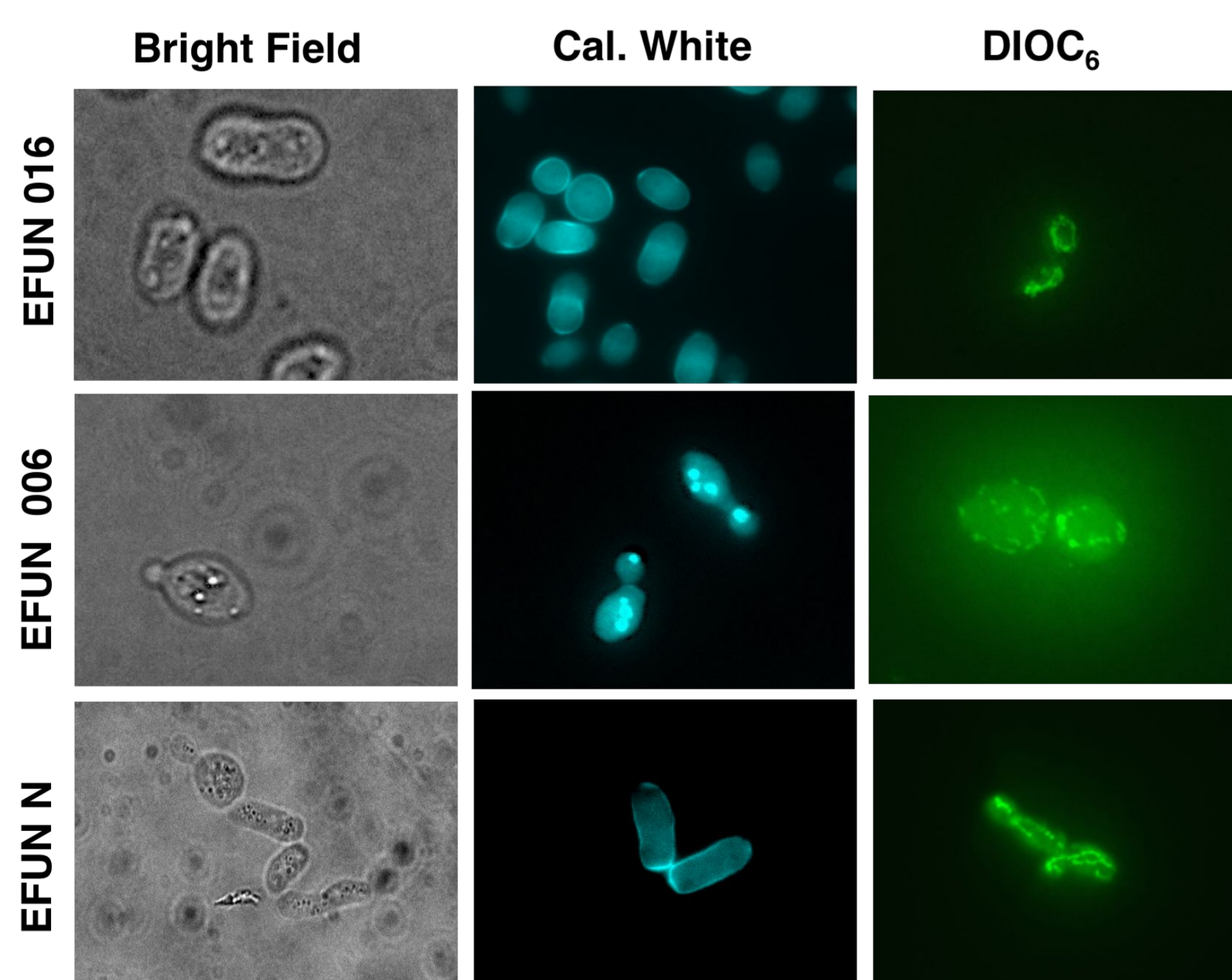


Figure 1: Newly isolated environmental fungal samples (EFUNs) contain tubular mitochondria. EFUNs were examined by brightfield and fluorescence microscopy in order to confirm their fungal natures. In an attempt to stain the fungal cell wall, EFUNs were treated with Calcofluor White. To localize mitochondria, cells were treated with the dye DiOC₆. These results clearly confirm these strains to be non-bacterial.

Mitochondrial morphology maintenance:

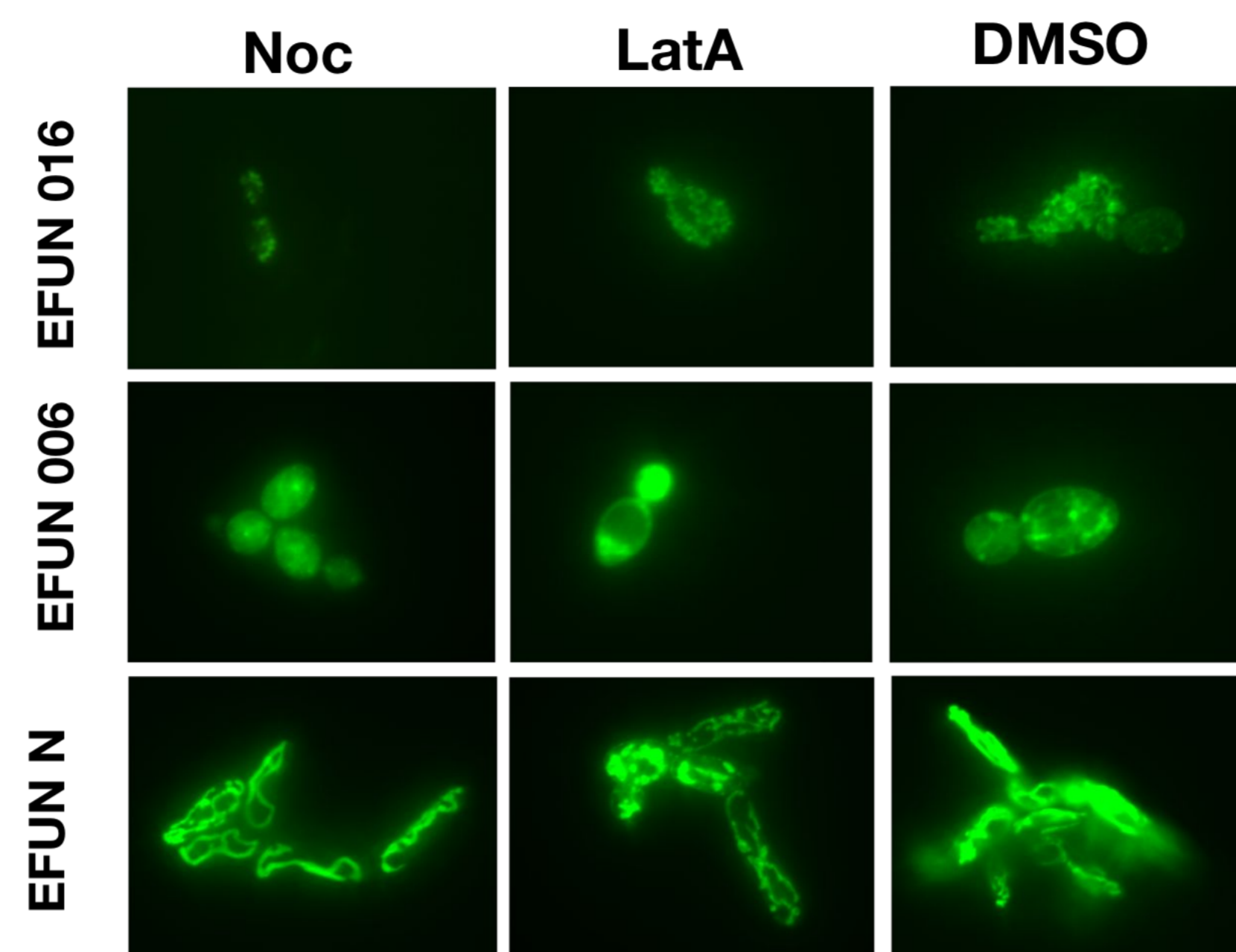
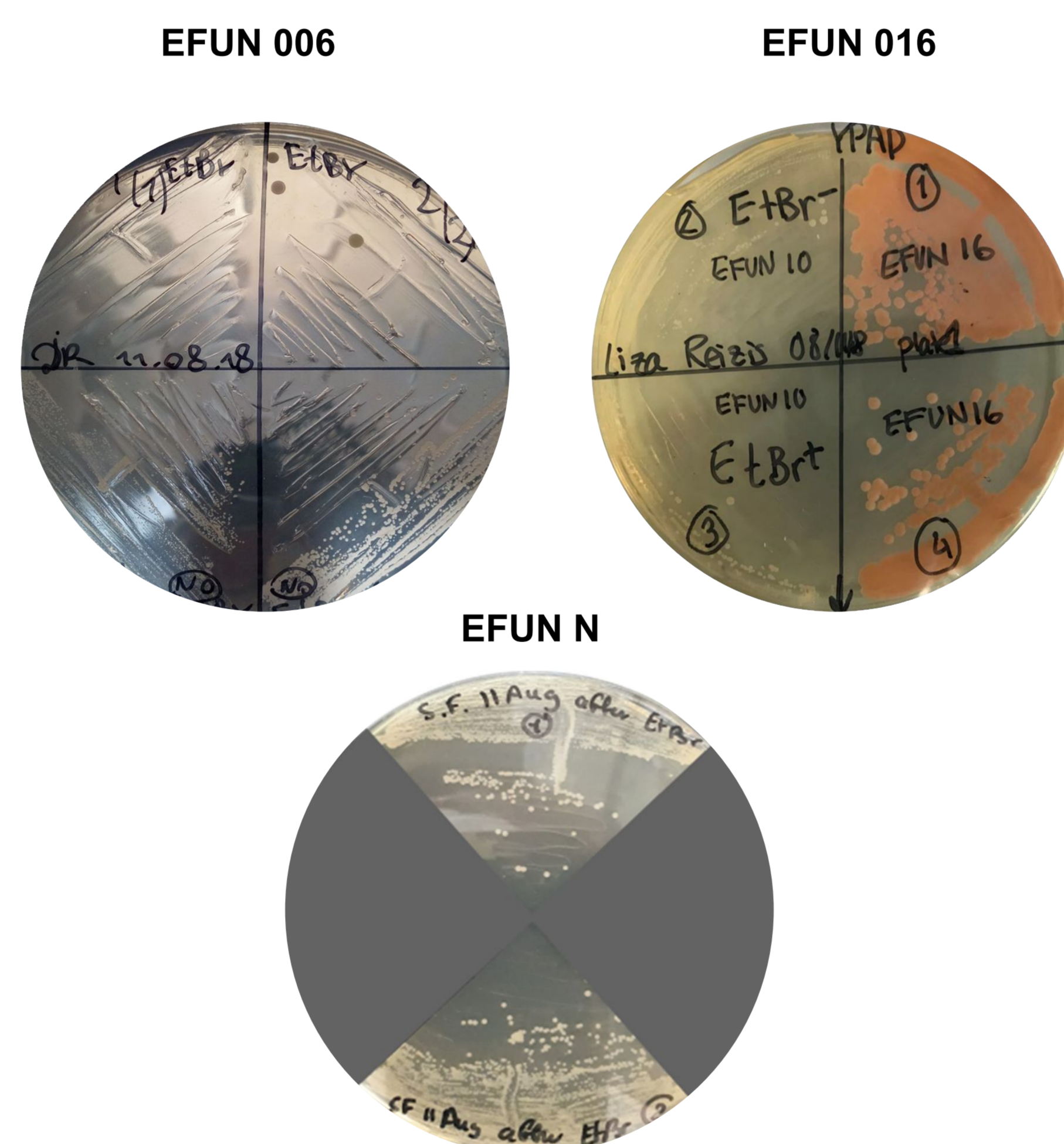


Figure 2: Disruption of the actin cytoskeleton appears to disrupt mitochondrial morphology in EFUN isolates. Mitochondrial distribution in cells relies on the actin microfilaments or microtubules. We studied which type of cytoskeleton is essential for mitochondrial maintenance in EFUN. Toward this goal, we disrupted actin microfilaments or microtubules in cells using Latrunculin A (LatA, 1 μM/ml) or Nocodazole (Noc, 15 μg/ml), respectively, and investigated the morphology of mitochondria using fluorescence microscopy following DiOC₆ staining. DMSO vehicle was added to a control sample. In all of the studied EFUNs mitochondrial morphology was altered following Latrunculin A treatment, suggesting that mitochondrial distribution relies on actin microfilaments in these fungi.

Effect of mitochondrial toxin on EFUNs:



Name of sample	Sample treated with 50 μg/ml EtBr	Sample untreated
EFUN 006	+/-	++
EFUN 016	+++	++
EFUN N	+++	+++

Figure 3: Two EFUNs show resistance to the effects of a mitochondrial toxin on proliferation. Isolates were either treated with 50 μg/ml of EtBr on glucose-containing medium for 3 d at 30°C or left untreated. Cells were then transferred to similar medium lacking EtBr for 2 additional days. We qualitatively examined the relative proliferation rate of our isolates. Those isolates, unaffected by EtBr, may be insensitive to mtDNA depletion by EtBr, or alternatively, resistant to the effects of mtDNA destruction. Two wedges of the EFUN N plate were obscured for clarity, and some doubt remains about the identity of EFUN 006. Relative proliferation is indicated in tabular format.

Effects of an anti-bacterial drug on mitochondria:

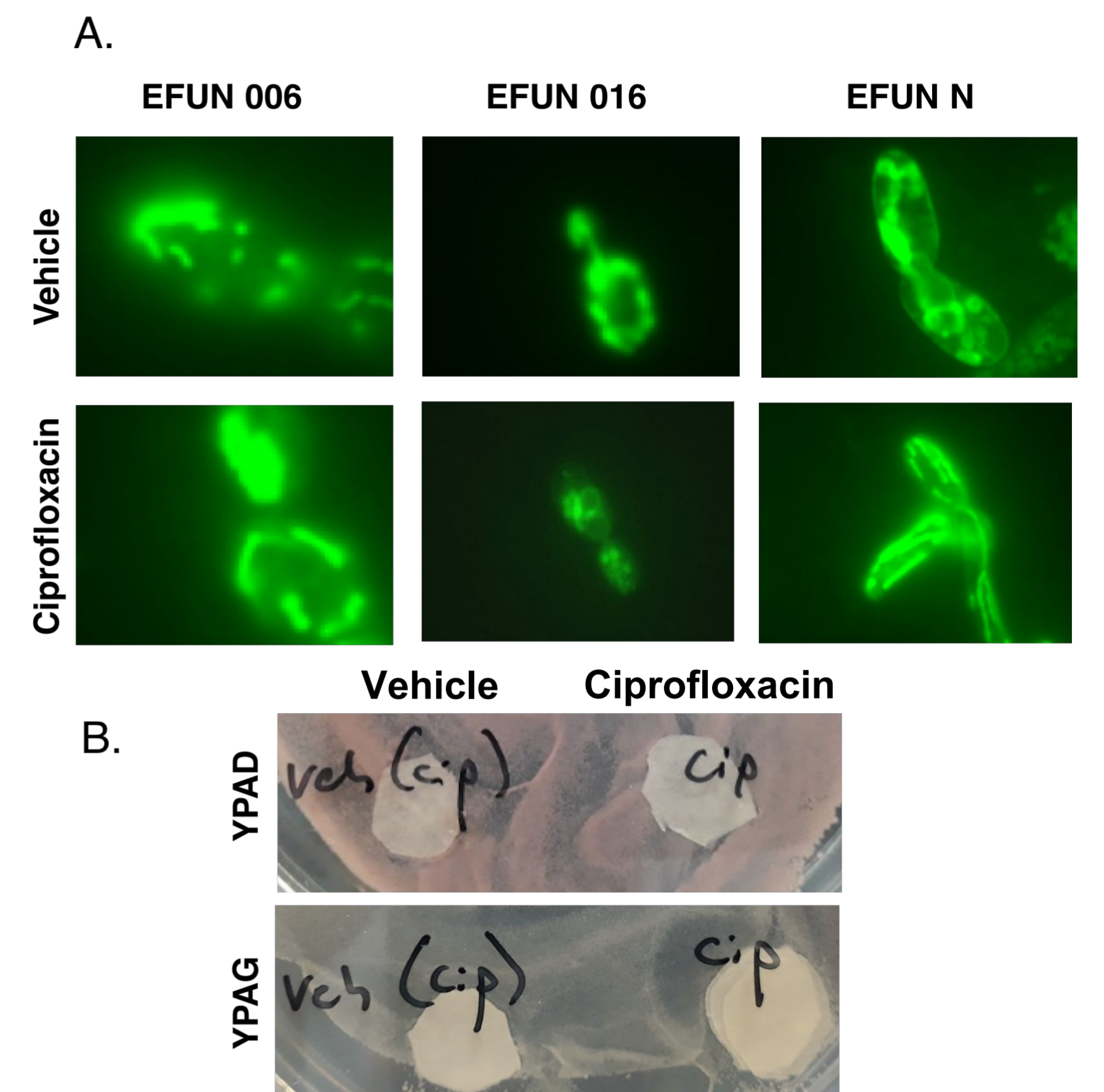


Figure 4: The antibiotic ciprofloxacin has no apparent effect on mitochondrial function of EFUN isolates or of *S. cerevisiae*. (A) The indicated EFUNs were treated with 100 μg/ml ciprofloxacin or vehicle for 5 hrs before DiOC₆ staining and fluorescence microscopy. (B) Paper discs were dipped in ciprofloxacin stock solution (25 mg/ml) or vehicle and placed upon a petri dish saturated with wild-type *S. cerevisiae* strain CDD6. Cells were then incubated for 2 days.

Phylogenetic analysis of EFUN isolates:

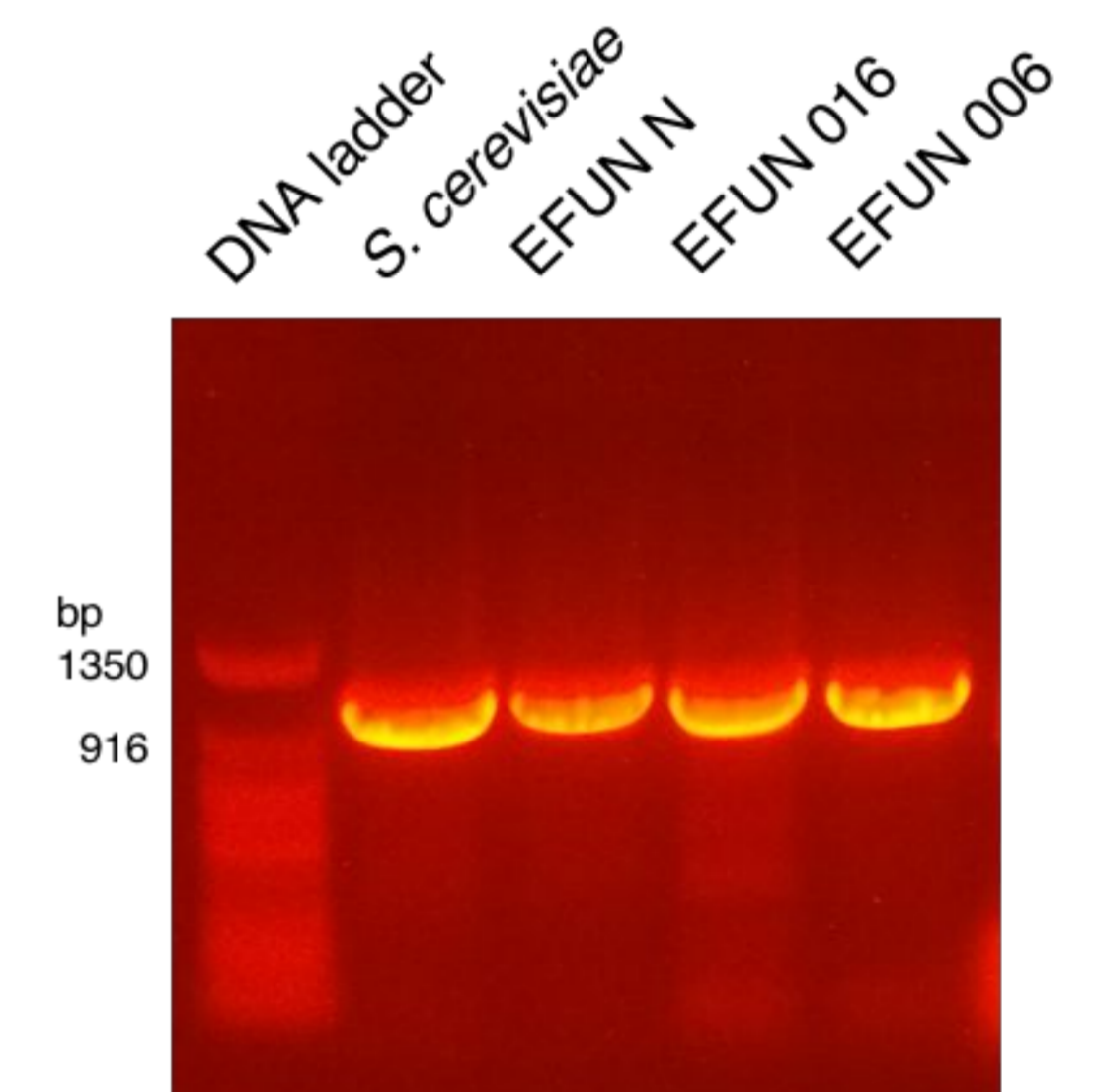


Figure 5: Amplification of a fragment of ribosomal DNA. We wish to identify the isolates used in this study. Toward this goal, we amplified DNA encoding 18S ribosomal RNA (rDNA) using universal primers expected to amplify from all domains of life. Products were subjected to electrophoresis through a 1% agarose gel and stained using EtBr. Sequencing of these products will be performed in order to identify the evolutionary clades to which these isolates belong.

Conclusions:

Several fungal strains were isolated from the environment and found to have tubular mitochondria.

In all of the isolates, our preliminary data suggest that actin microfilaments are required for normal mitochondrial distribution.

Several isolates appear relatively insensitive to the effects of a toxin that typically depletes mitochondrial DNA.

The anti-bacterial drug ciprofloxacin appears to have no discernible effect on yeast mitochondria.

Acknowledgements:

We thank Prof. Agnieszka Chacińska (University of Warsaw) for providing yeast media, Dr. Przemysław Nuc (Adam Mickiewicz University) and doctor Ana Gutierrez (Austria Institute of Science and Technology) for logistical assistance as well as Petr Volnov, for assistance with high-throughput image processing and programming.



ADAM MICKIEWICZ
UNIVERSITY
IN POZNAŃ



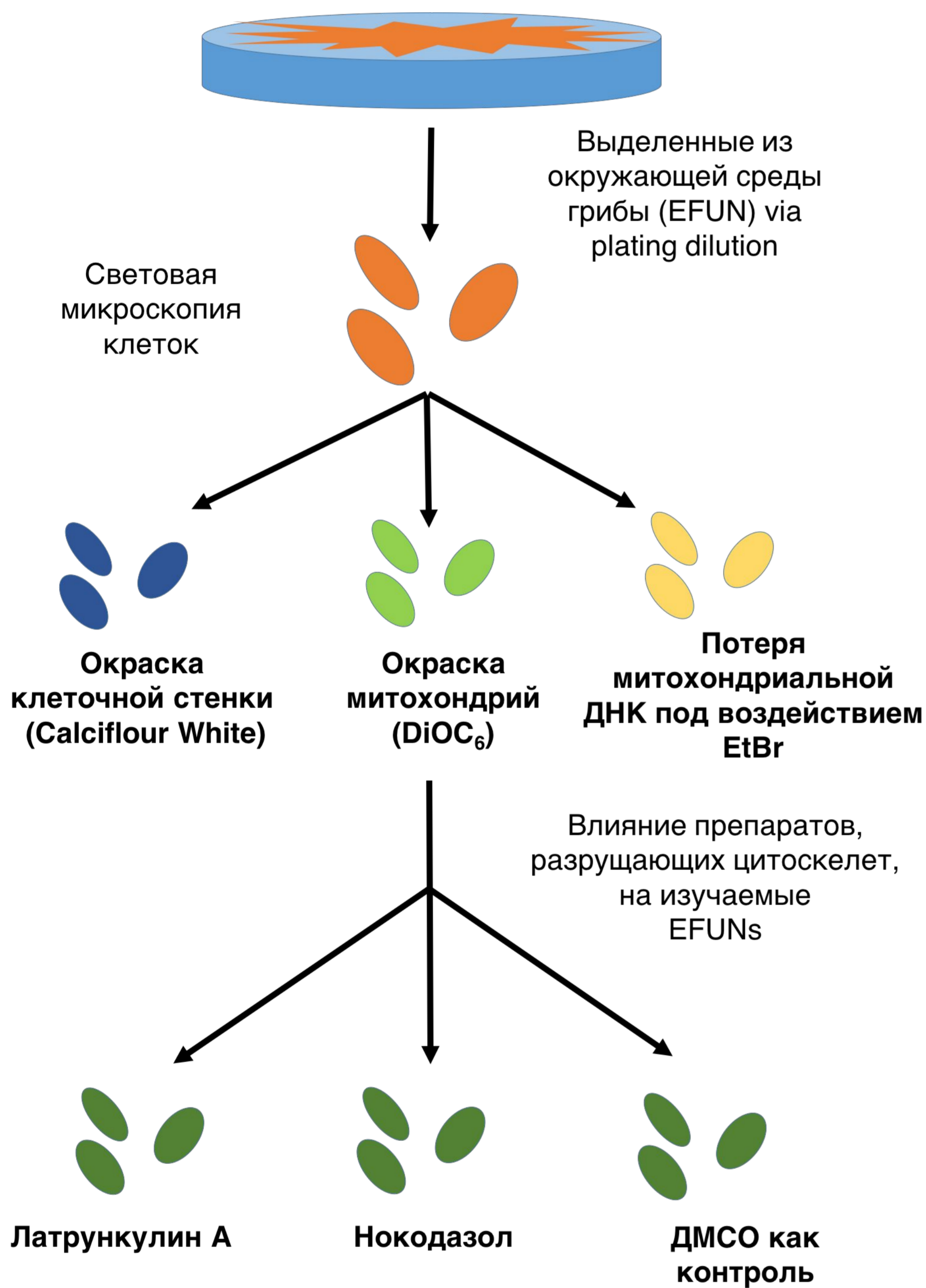
Ранее неописанные грибковые штаммы, выделенные из окружающей среды, открывают новые возможности в области исследования морфологии и функционирования митохондрий

Ростислав Добросмыслов, Дарья Ерешко, Света Фомичева, Арина Макеева, Лиза Рейзис, Александр Шарипов, Виктория Трзбятковска, Дарья Шафранская, Мария Анастасина, Кори Данн

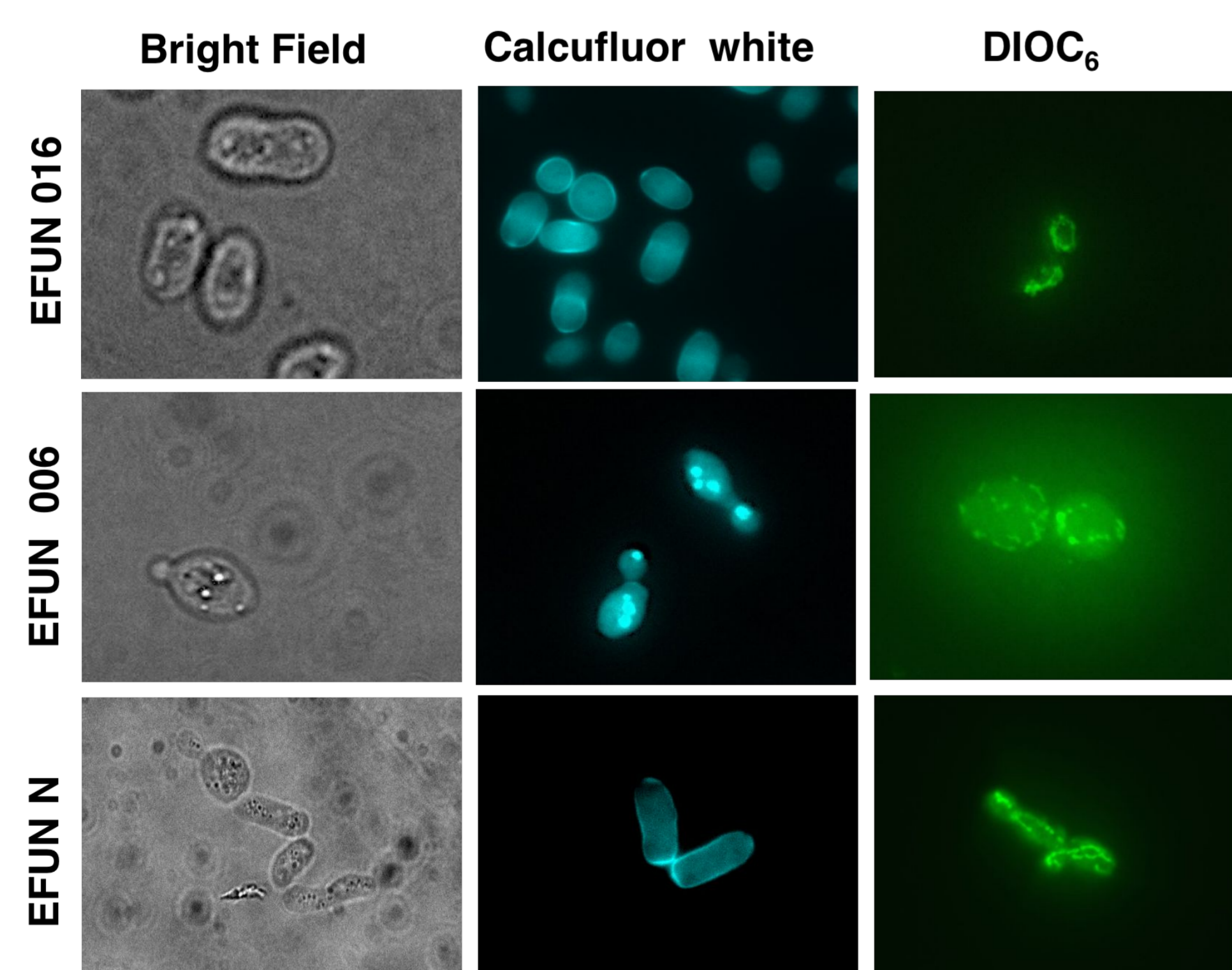
Введение

Новые технологии геномного секвенирования и методы генной инженерии позволяют расширить спектр моделей для изучения важных биологических проблем. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются одним из самых часто используемых модельных организмов для изучения митохондрий. Однако исследование грибов, не являющихся близкими родственниками данных дрожжей, может быть полезным для расширения нашего понимания о митохондриальном биогенезе. В нашем проекте мы занимались исследованием морфологии и распределения митохондрий в штаммах дрожжей, выделенных в Университете Адама Мицкевича (Познань), и определением эффектов, возникающих при нарушениях в структуре цитоскелета, на морфологию митохондрий. Более того, мы исследовали влияние лекарственных препаратов, разрушающих митохондриальную ДНК в клетках *S. cerevisiae*, на не описанные ранее штаммы из окружающей среды. Также мы амплифицировали фрагмент рибосомальной ДНК, с помощью которого можно определить положение изучаемых организмов в филогенетическом ряду.

Методы исследования:

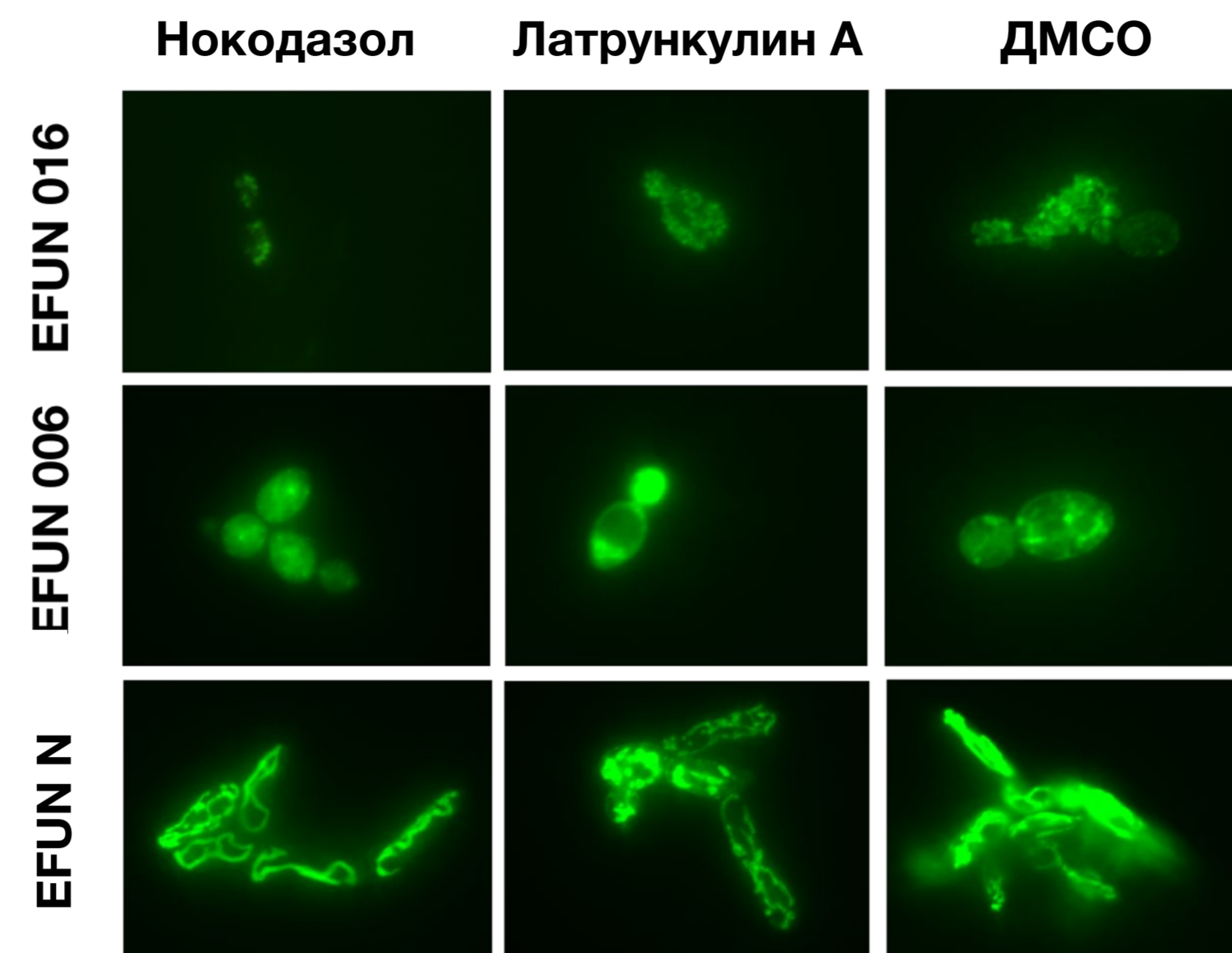


Анализ морфологии EFUN:



Изображение 1: Микрофотографии изолированных EFUN. Левая панель — световые микрофотографии EFUN. Средняя панель — микрофотографии EFUN с флуоресцентно помеченной клеточной стенкой (calcufluor white). Правая панель — микрофотографии EFUN с флуоресцентно помеченными митохондриями (DiOC₆). Морфология клеток и наличие у них митохондрий подтверждают наше предположение, что EFUN являются грибами.

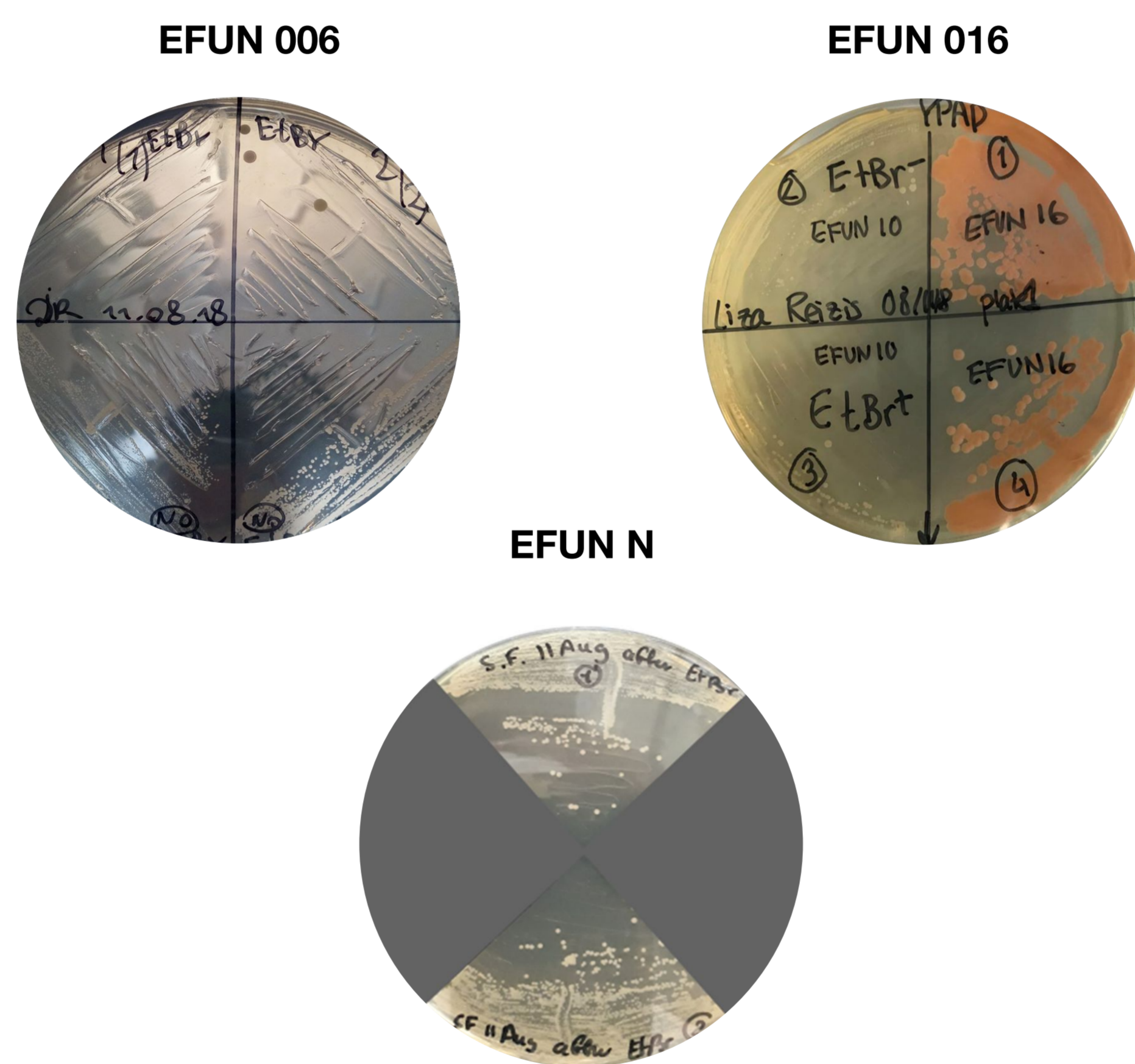
Поддержание формы митохондрий:



Изображение 2: Нарушение структуры актинового цитоскелета вызывает нарушение морфологии митохондрий в изолятах EFUN.

Митохондрии в клетке могут распределяться с помощью микротрубочек, а могут — с помощью микрофиламентов актина. Чтобы выяснить, каким образом митохондрии распределяются в клетках EFUN, мы использовали ингибиторы микротрубочек и микрофиламентов актина — нокодазол (15 мкг/мл) и латрункулин А (10 мкг/мл), соответственно. Морфологию митохондрий изучали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Влияние митохондриальных токсинов на EFUN:

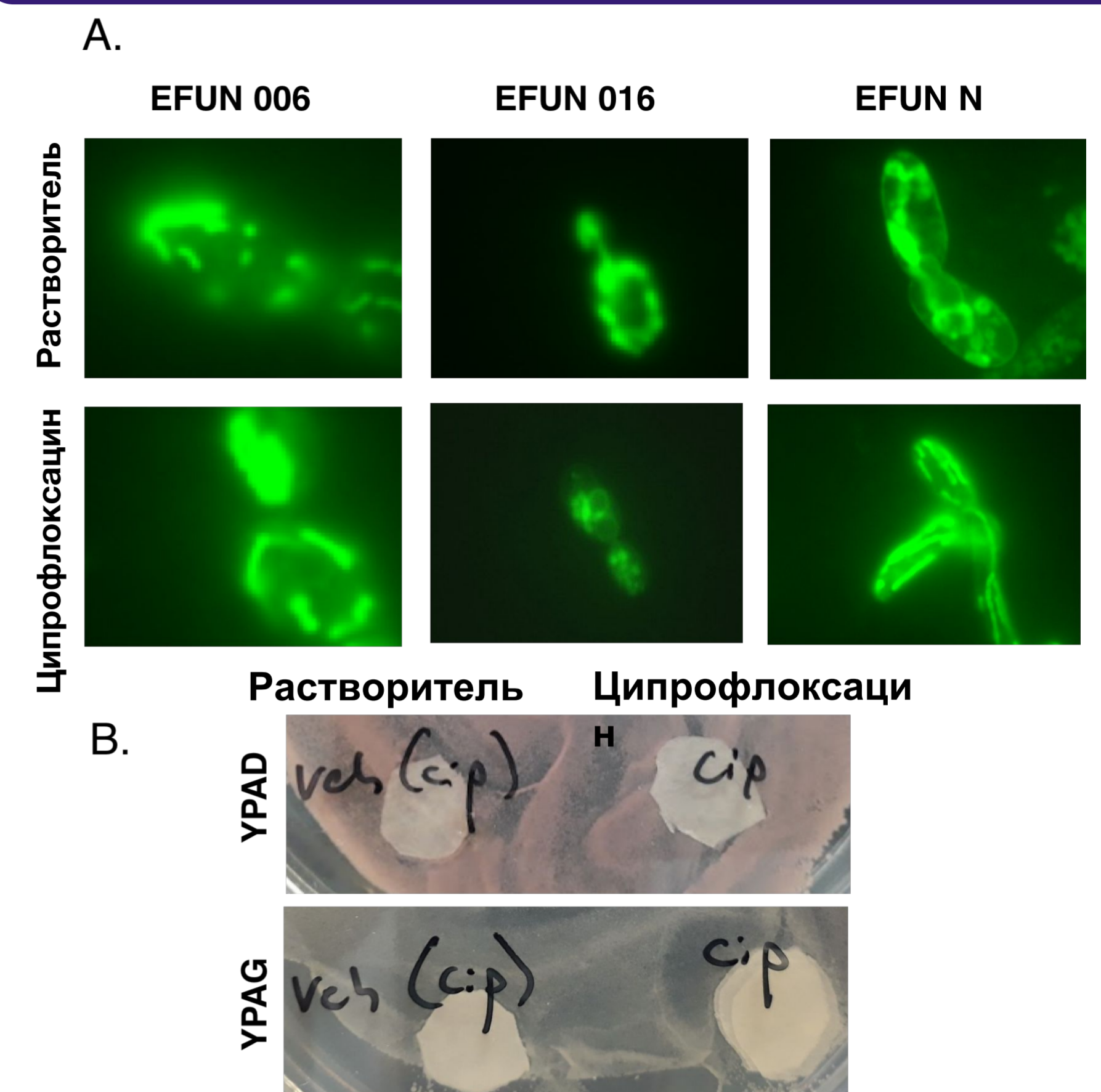


Название образца	EtBr (50 мкг/мл)	Контроль
EFUN 006	+/-	++
EFUN 016	+++	++
EFUN N	+++	+++

Изображение 3: Два изолята EFUN устойчивы к митохондриальному токсину: Изоляты EFUN выращивали на средах с 50 мкг/мл EtBr или без него в течение трех дней при температуре 30°C. Затем клетки пересевали на богатую среду без EtBr еще на два дня. После этого, мы провели качественную оценку роста изолятов EFUN. Мы предположили, что изоляты, невосприимчивые к EtBr, могут быть устойчивы к повреждениям или потерям мтДНК. Два сектора на одной из представленных чашек Петри не показаны для простоты изображения; также есть некоторые сомнения относительно корректной идентификации EFUN 006.

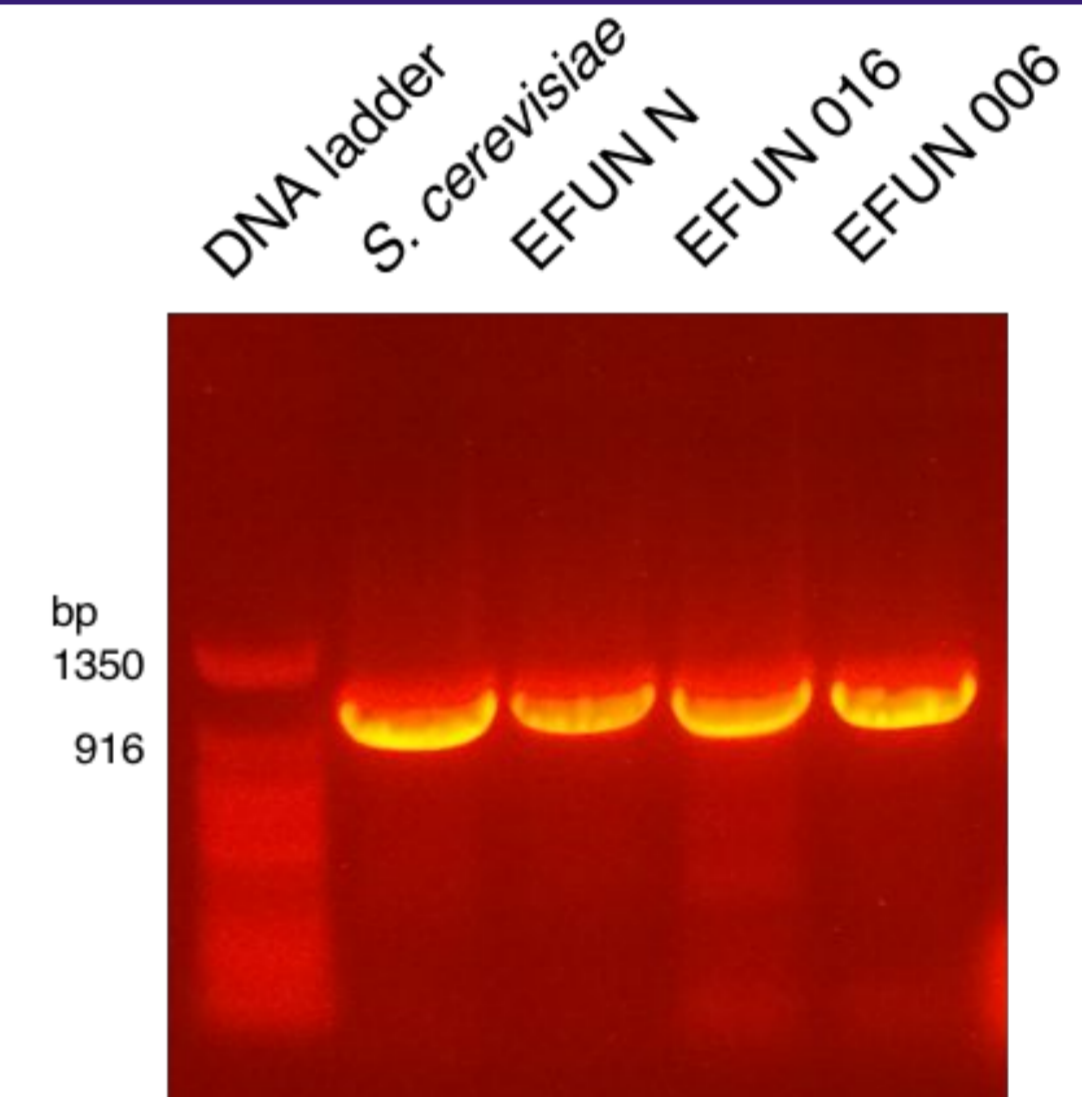
Таблица показывает оценку роста EFUN на богатой среде (YPAD) после инкубации с EtBr или без него. +++ растут довольно быстро; ++ растут умеренно; +/- растут очень медленно.

Влияние антибактериальных препаратов на митохондрии:



Изображение 4: Антибиотик ципрофлоксацин не имеет явного эффекта на митохондриальные функции в клетках дрожжей EFUN или *S. cerevisiae*. (A) Выделенные EFUN культивировали в присутствии ципрофлоксацина (100 µg/ml) или растворителя в течение 5 часов перед окраской DiOC₆ и флуоресцентной микроскопией. (B) Бумажные фильтры в ципрофлоксацине (25 mg/ml) или растворителе были помещены на чашки Петри, засеянные диким типом *S. cerevisiae* штамм CDD6. Клетки инкубировались на протяжении двух дней.

Филогенетический анализ EFUN:



Изображение 5: Мы вычислили позицию EFUN в филогенетическом дереве, определив время их расхождения от ближайшего предка по последовательности генов 18S рРНК. Для этого мы выделили геномную ДНК EFUN и амплифицировали фрагменты генов их 18S рРНК, которые будут отправлены на секвенирование после окончания школы. ДНК гель-электрофорез амплифицированных фрагментов генов 18S рРНК EFUN.

Выводы:

Нам удалось собрать и выделить ряд ранее неописанных грибковых штаммов из окружающей среды, у которых мы впоследствии определили трубчатый тип митохондрий.

Во всех выделенных грибах актиновые микрофиламенты играют ключевую роль в распределении митохондрий в клетке. Кроме того, мы обнаружили несколько грибов, устойчивых к действию разрушающего митохондриальную ДНК токсина.

Наконец, мы установили, что антибиотик ципрофлоксацин не оказывает выраженного эффекта на митохондрии дрожжевых грибов.

Благодарности

Мы благодарим профессора Агнешка Хачинска (Варшавский университет) за предоставление питательных сред, доктора Пржемыслав Нуца (Университет Адама Мицкевича), доктора Ану Гутьерез (Институт Науки и Технологии, Австрия), и Петра Вольнова за техническую помощь.



ADAM MICKIEWICZ
UNIVERSITY
IN POZNAŃ

