



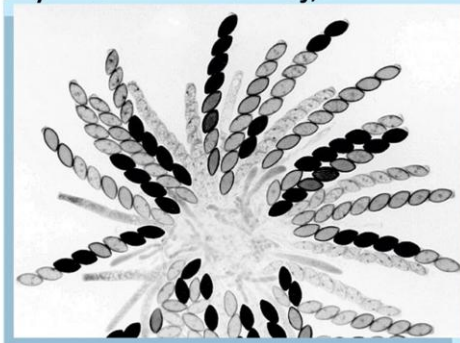
GRZYBY FILAMENTALNE (strzępkowe) to grupa grzybów, głównie workowców, wytwarzających strzępki i rozmnażających się głównie wegetatywnie – wytwarzają konidia.

Na zdjęciu – konidiofor *Aspergillus* (kropidlak), nazwany tak w 1729 przez Pietro Antonio Micheliego, księdza i botanika, któremu struktura konidiforu przypominała znajome kropidło (łac. *Aspergillum*)

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)

Fotografia - Arnold and Hilton (2003)
Nature 422, 821-822



NEUROSPORA CRASSA JAKO MODEL W BADANIACH, KTÓRE TOROWAŁY DROGĘ OD GENETYKI KLASYCZNEJ DO GENETYKI MOLEKULARNEJ

Georg Beadl zaproponował, żeby zamiast poszukiwać enzymów związanych z daną mutacją, lepiej poszukać mutacji związanych z już znanymi szlakami metabolicznymi (przedtem pracował na mutantach barwy oka *v* i *cn Drosophila* i próbował zidentyfikować enzymy, których u tych mutantów brakuje)

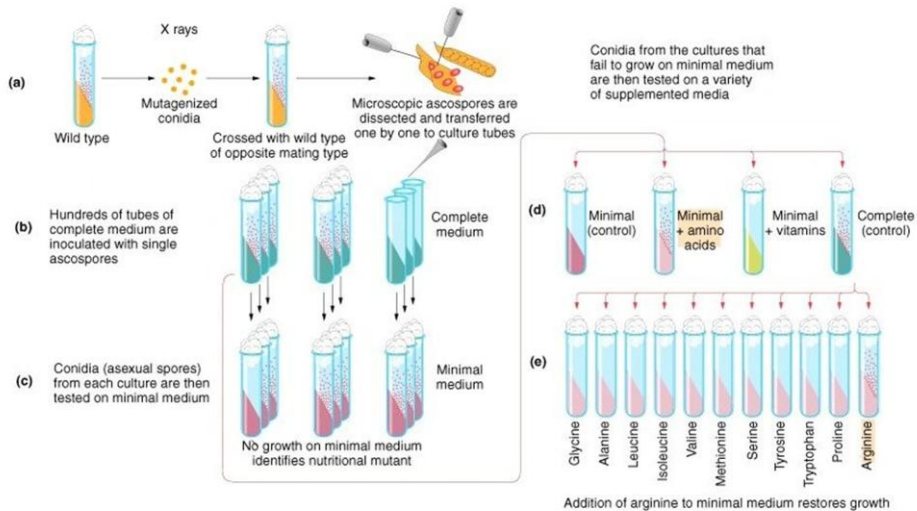
Hipoteza jeden gen – jeden enzym została opublikowana w 1941. o jej nowatorstwie świadczy fakt, że nie wiedziano jeszcze wówczas, że materiałem genetycznym jest DNA (pracę Avery, MacLeod, McCarty pokazującą, że materiałem genetycznym jest DNA opublikowano w 1944 –doświadczenia ze zjadliwymi i niezjadliwymi szczepami *Streptococcus pneumoniae*)

Dla zainteresowanych:

Maxine Singer and Paul Berg (2004) „George Beadle: from genes to proteins”
NATURE REVIEWS | GENETICS 5:949

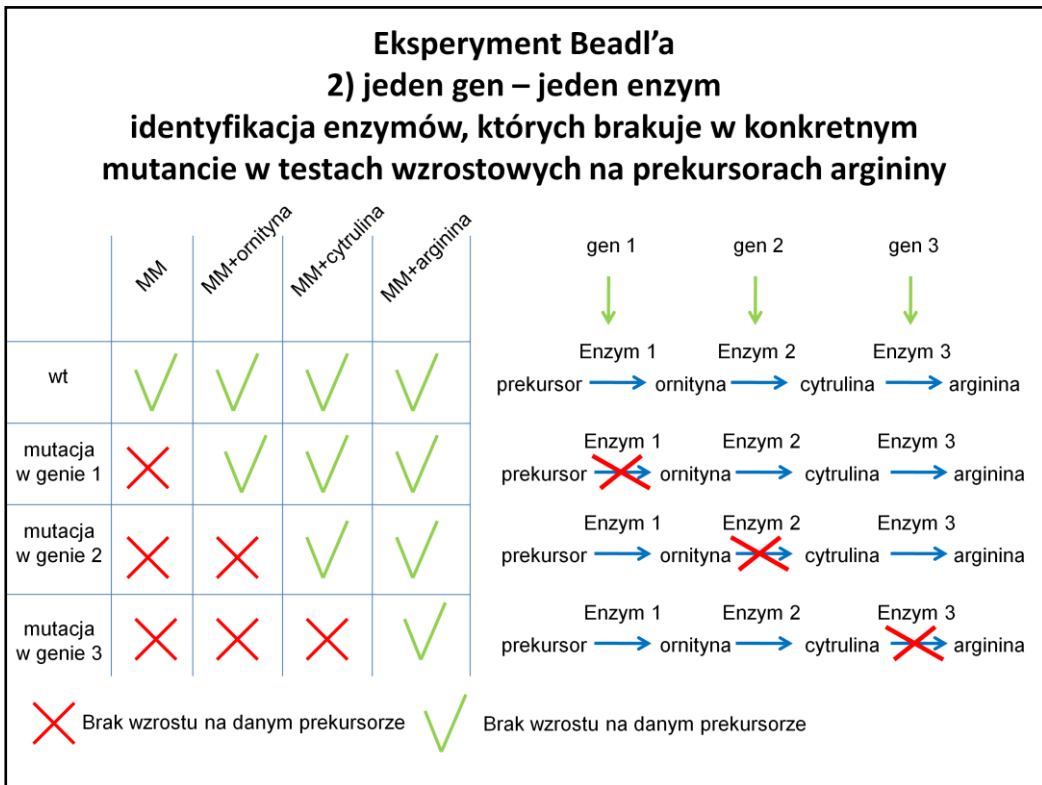
Eksperyment Beadl'a

1) Izolacja mutantów auksotroficznych arg⁻



Rysunek - <http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr09-01.html>

U *Neurospora* konidia są wielojądrowe, dlatego, by otrzymać grzybnie pochodzącą z jednego jądra (homogenną genetycznie), grzybnie z konidiów po mutagenie trzeba krzyżować. W wyniku mejozy powstają jednojądrowe askospory.



Beadl i Tatum wykazali, że pojedyncze mutacje prowadzą do braku aktywności tylko jednego enzymu ze szlaku biosyntezy argininy. Wprowadzili termin - BLOK METABOLICZNY.

Dzisiaj hipoteza jest dalej prawdziwa, choć nasza wiedza jest już znacznie bogatsza. Dlatego nie można tej hipotezy traktować dosłownie i należy pamiętać m.in. o tym, że

Jeden gen – koduje jeden polipeptyd (są białka składające się z kilku podjednostek)

- bezpośrednim produktem genu jest RNA (mRNA /splicing/alternative splicing niekodujące RNA)

- mogą powstawać różne produkty tego samego genu

- gen to nie tylko sekwencja kodująca

Jest to nadal aktualne podejście współczesne, służące do identyfikacji genów biorących udział w danym procesie poprzez mutagenezę i poszukiwanie mutantów, w których ten proces jest zaburzony.

Grzyby strzępkowe jako organizmy modelowe w dzisiejszych czasach

Grzyby strzępkowe są istotne, gdyż:

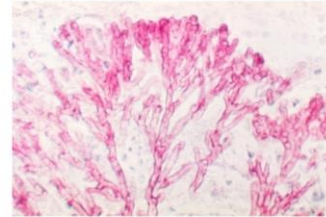
- są patogenami zwierząt i roślin
- mają ogromne znaczenie w biotechnologii

W badaniach podstawowych są dobrym modelem

- w biologii komórki
- w badaniach specyficznych systemów regulacji genetycznej

Grzyby strzępkowe – patogeny zwierząt i człowieka

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



Fotografia - <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=1077>

A. fumigatus żyje w kompoście – lubi ciepło . Brak szczególnych czynników wirulencji. Po prostu wrasta w naczynia krwionośne płuc, jak na zdjęciu. Przenika do płynu mózgowo-rdzeniowego.

Zdolność do wzrostu w warunkach stresu

8-fold increase in *Aspergillus* disseminated infections from the 70s to the present day.

Between 9 and 17% of all deaths in transplant recipients are due to *Aspergillus* infections.

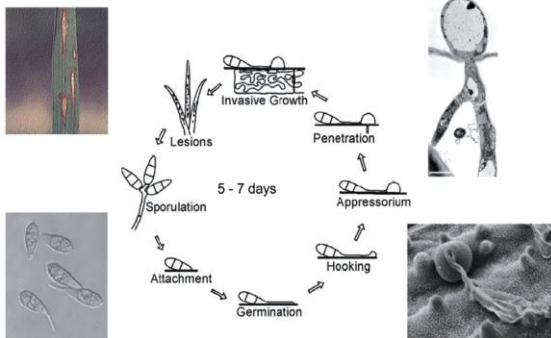
Mortality in transplant patients infected with *Aspergillus sp. is* never lower than 60% of patients treated with antifungals and 100% in non-treated patients.

Skutki uboczne - Amfoterycyna B powoduje uszkodzenia nerek i wątroby

50% of *A. fumigatus* are azole resistant - odporne na flukonazol i vorikonazol)

Grzyby strzępkowe – patogeny roślin

Magnaporthe oryzae
rice blast disease



Dean et al., 2012 Mol. Plant. Pathology13: 414–430

Its importance is underscored by the fact that approximately one-half of the world's population relies on rice for its primary caloric intake

30% upraw ryżu może być niszczone przez *Magnaportheae* (workowiec)

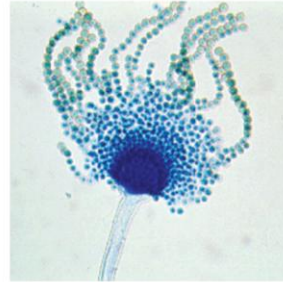
Dla zainteresowanych:

Dean et al., 2012 Mol. Plant. Pathology13: 414–430, **The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology**

Grzyby strzępkowe – patogeny roślin

Aspergillus flavus
Aspergillus parasiticus

Wytwarzają aflatoksyny, wywołujące
nekrozę komórek wątroby
i nowotwór wątroby



Fotografie –

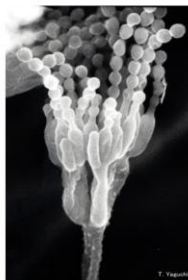
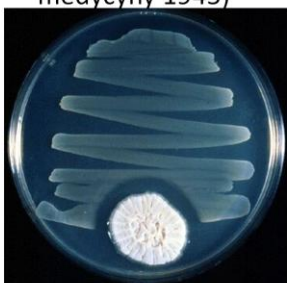
http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_%28hyaline%29/Aspergillus/flavus.html
<http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/2005/9-19/aflatoxin.html>

Aflatoxin B1 (produced by *A. flavus* and *A. parasiticus*) is particularly important, since it is the most toxic and potent hepatocarcinogenic natural compound ever characterized

Znaczenie grzybów strzępkowych w biotechnologii - 1

- Antybiotyki, np. penicylina wytwarzana przez pędzłaka *Penicillium chrysogenum* w procesie nierybosomowej syntetazy peptydów (NRPS), przykład po prawej

- Coś takiego odkrywca penicyliny Alexander Fleming zaobserwował na swoich zapomnianych szalkach – (publikacja 1929, Nagroda Nobla z medycyny 1945)

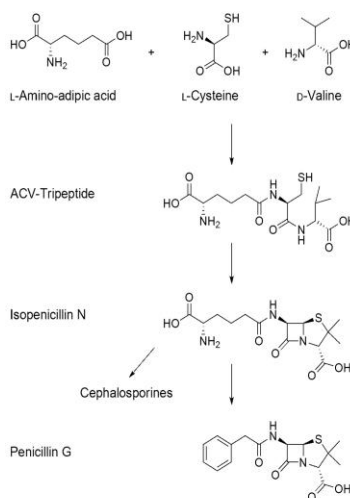


Fotografie –

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

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

Pędzlak - konidiofor



Penicylinę po raz pierwszy zastosowano w czasie II wojny doleczenia zakażeń u rannych żołnierzy. Penicylina należy do antybiotyków beta- laktamowych. Oporność bakterii na penicylinę związana jest z wytwarzaniem beta-laktamazy.

Znaczenie grzybów strzępkowych w biotechnologii -2

Grzyby są wykorzystywane w biotechnologii od tysiącleci

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

Sery -[*Penicillium camemberti*](#) and [*Penicillium roqueforti*](#) are the molds on [Camembert](#), [Brie](#), [Roquefort](#), and many other cheeses.

Pektynazy są wykorzystywane w przemyśle spożywczym do klarowania soków owocowych od 1930

amylazy i glukoamylazy do hydrolizy skrobi

Lipazy są stosowane jako detergenty

Naturalnie wyselekcjonowane szczepy *A. niger* przetwarzające 90% dostarczonego źródła węgla w kwas cytrynowy

Kwas itakonowy jest stosowany do produkcji polimerów – żywic, poliestrów i plastików

Znaczenie grzybów strzępkowych w biotechnologii -3

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

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

- Gibereliny – regulatory wzrostu i rozwoju roślin

Fusarium (Gibberella) fujicuroi

wywołuje chorobę zwaną

Bakanae disease - Foolish Seedling



Fotografie –

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

Fungal statins (lovastatin, pravastatin and others [37]), which act as inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase, the regulatory and rate-limiting enzyme of cholesterol biosynthesis in liver,

Statyny z *Aspergillus terreus*

Pierwszy raz odkryto gibereliny w Japonii. Wyizolowano je z grzyba *Gibberella fujikuroi*. Grzyb ten infekował ryż na tamtejszych plantacjach. Siewki tej rośliny zarażone grzybem zaczynały charakteryzować się gwałtownym i nadmiernym wzrostem, jak na zdjęciu. Giberelinę po raz pierwszy wyizolowali w latach 1935-38 Yabuto i Sumiki z pożywki na której rósł grzyb *Fusarium moniliforme* syn.

[*Gibberella fujikuroi*](#)

Rekombinowane enzymy otrzymywane z grzybów strzępkowych

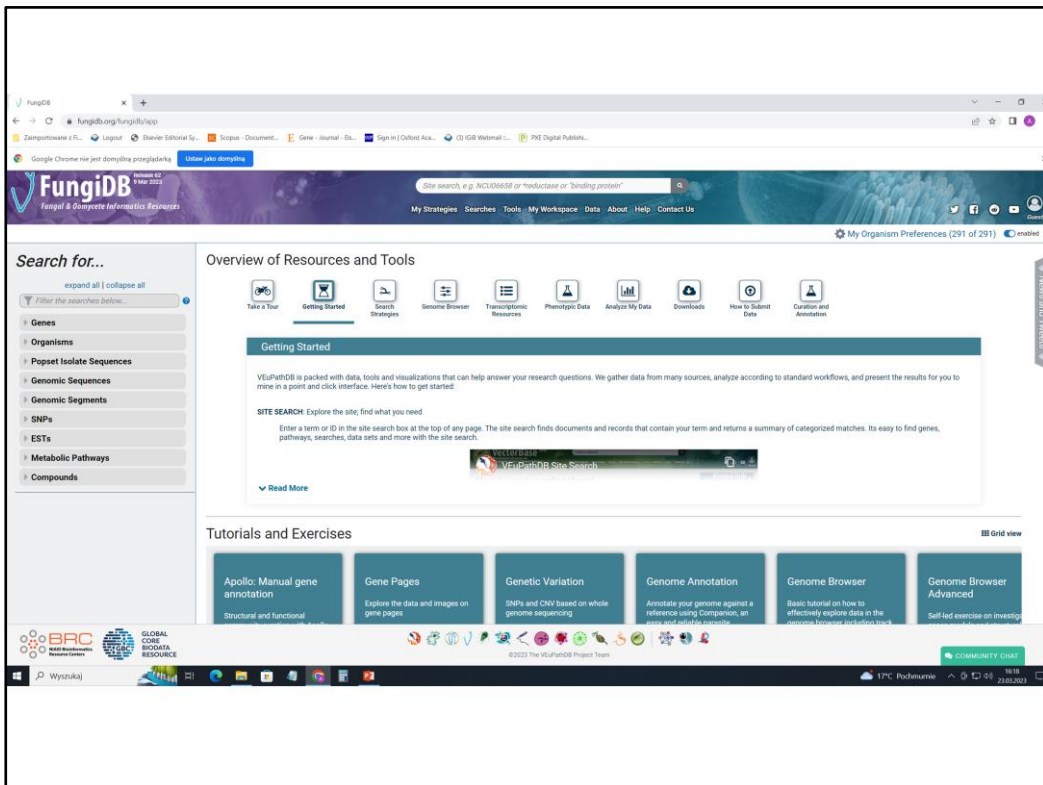
Enzym	Gospodarz	Dawca
Katalaza	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
Cellulaza	<i>A. oryzae</i>	<i>Humicola sp.</i>
Cellulaza	<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
β -galaktozydaza	<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
β -glukanaza	<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
Lipaza	<i>A. oryzae</i>	<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.

Over 60% of the enzymes used in the detergent, food, and starch processing industries are recombinant products

In 1994, Novo Nordisk introduced Lipolase, the first commercial recombinant lipase for use in a detergent, by cloning the *Humicola lanuginose* (workowiec) lipase gene into the *A. oryzae* genome

Wydajność produkcji enzymów przez rekombinowane szczepy grzybów dochodzi do ponad 20g/l. Enzymy są wydzielane na zewnątrz komórki, co znacząco ułatwia procedurę oczyszczania. Dlatego grzyby nazywane są CELL FACTORIES



Dobry organizm modelowy powinien mieć opublikowaną sekwencję genomu oraz powinny istnieć bazy danych, w których zbierane są dane dotyczące genomu, transkryptomu i proteomu

Seqwencja genomu *A. nidulans* została opublikowana w Nature w 2005. W tym samym numerze genomu *A. fumigatus* i *A. oryzae*.

**Nowa baza danych dla grzybów to Fungi DB <https://fungidb.org/fungidb/>
Grzyby i legniowce (organizmy strzępkowe grzybopodobne, teraz oddzielne królestwo)**

W chwili obecnej znane są już genomy bardzo wielu grzybów (zobacz FungiDB), co ma ogromne znaczenie dla badań ewolucyjnych.

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

Ward, 2012 Biotechnology Advances 30 (2012) 1119–1139

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

Specyficzne systemy regulacyjne są związane z regulacją niewielkiej grupy genów, np. genów związanych z katabolizmem argininy. Systemy ogólne regulują bardzo wiele genów w odpowiedzi np. na dostępność glukozy, czy jonów amonowych.

Wiele systemów regulacyjnych jest specyficznych dla niższych Eucaryota.

Regulacja ekspresji genów u drożdży często się różni od analogicznych systemów u innych grzybów strzępkowych.

Kataboliczna represja węglowa

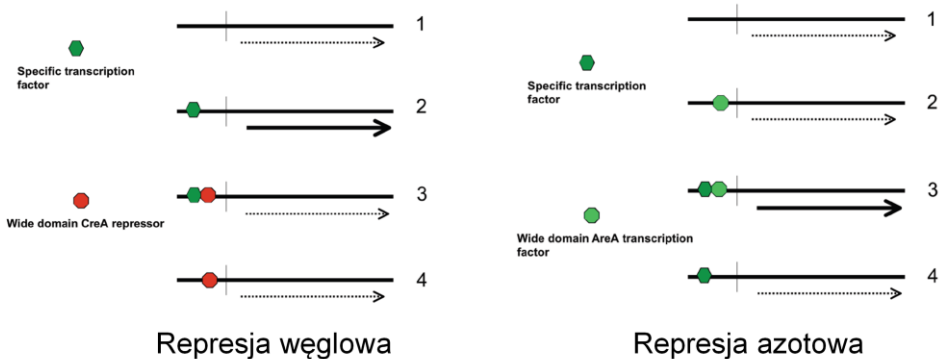
- Umożliwia optymalne wykorzystanie źródeł węgla
- Prowadzi do wykorzystywania alternatywnych źródeł węgla tylko wtedy, gdy nie jest dostępna glukoza
- Związana jest z zablokowaniem ekspresji genów kodujących odpowiednie enzymy i transportery alternatywnych źródeł węgla
- U grzybów jest to system regulacji 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 (Cys4)

AreA – pierwszy opisany regulator ogólny u Euaryota – Arst and Cove 1973.

Współdziałanie systemów regulacji specyficznej i ogólnej



Specyficzne aktywatory u grzybów najczęściej zawierają domenę wiążącą DNA typu Zn₂Cys₆ (dwujądrowy palec cynkowy)

Scazzocchio, C "Aspergillus: a multifaceted genus, Encyclopædia of Microbiology, Moselio Schaechter, General Editor, Elsevier Press.

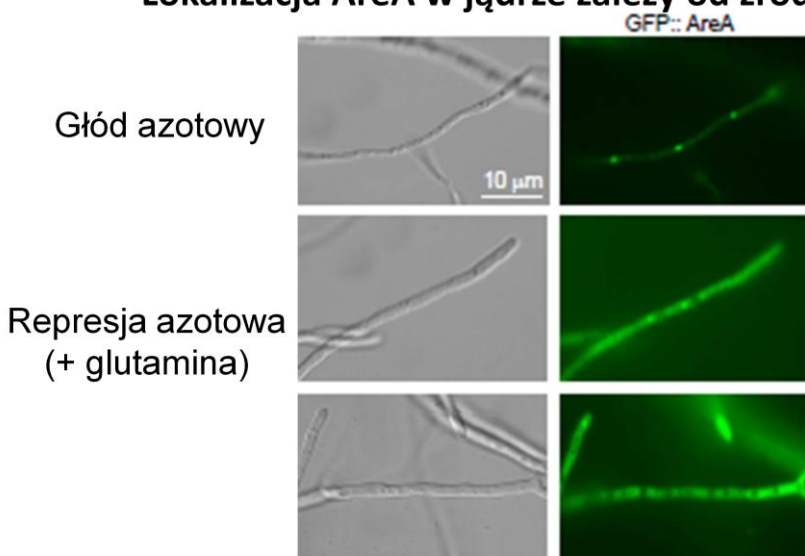
Istotne jest współdziałanie systemów regulacji ogólnej i specyficznej.

W przypadku genów związanych z katabolizmem alternatywnych źródeł węgla (po lewej), wysoka ekspresja zachodzi gdy nie ma glukozy (odłącza się CreA) i jest specyficzny induktor, np. ksyloza, aktywujący specyficzny aktywator (wariant 2).

W przypadku genów związanych z katabolizmem alternatywnych źródeł azotu (po prawej), wysoka ekspresja zachodzi gdy nie ma glutaminy/NH₄ (przyłącza się AreA) i jest specyficzny induktor, np. arginina , aktywujący specyficzny aktywator (wariant 3).

Wiele genów jest regulowanych przez obydwa systemy ogólne – zarówno represje azotową jak i węglową, np. geny związane z katabolizmem aminokwasów, które mogą być wykorzystywane zarówno jako źródło węgla, jak i azotu.

Kataboliczna represja azotowa
Regulacja aktywności AreA - 1
Lokalizacja AreA w jądrze zależy od źródła azotu

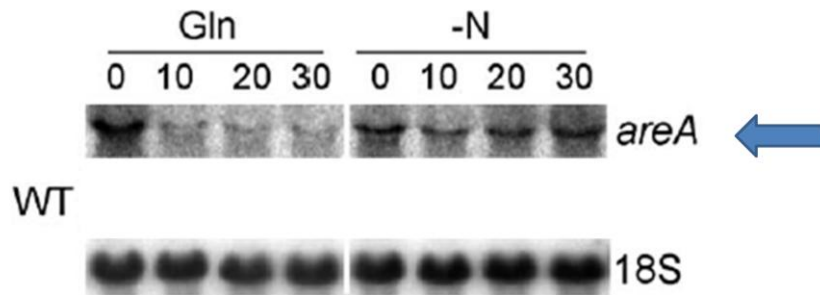


Michielse, Pfannmueller, Macios, Rengers, Dzikowska and Tudzynski (2014)
Molecular Microbiology 91:472

Gdy glutamina/NH₄ są obecne, aktywator AreA znajduje się głównie w cytoplazmie (dwa dolne zdjęcia). W czasie głodu azotowego, aktywator AreA jest transportowany do jądra (górne zdjęcie), gdzie aktywuje transkrypcję genów związanych z katabolizmem alternatywnych źródeł węgla.

Pokazano szczep wyrażający fuzję GFP::AreA

**Kataboliczna represja azotowa
Regulacja aktywności AreA - 2
Stabilność transkryptu *areA* zależy
od źródła azotu**



Zahamowanie transkrypcji przez proflawinę

Król, Morozov, Jones, Wyszomirski, Węgleński, Dzikowska, Caddick (2013)
Molecular Microbiology (2013) 89:975

Na slajdzie przedstawiono wyniki eksperymentu, w którym badana jest stabilność transkryptu genu *areA* w grzybní hodowanej na glutaminie, jako źródle azotu (Gln), lub głodzonej na pożywce bez azotu (-N). Do hodowli dodawany jest inhibitor transkrypcji w czasie 0 i pobierane są próbki co 10 minut. Z próbek izolowany jest RNA i przeprowadza się hybrydizację typu Northern.

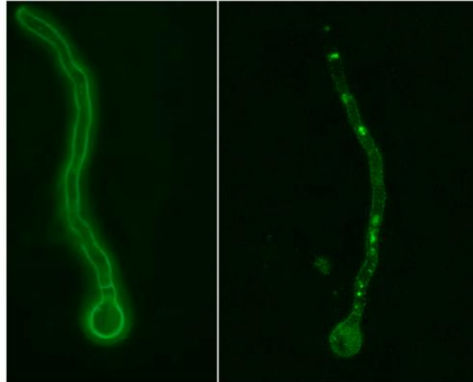
Górny panel – hybrydizacja z sondą *areA*

Dolny Panel – hybrydizacja z sondą specyficzną do 18S rRNA – kontrola ilości naniesionego RNA

Wyniki pokazują, że

- w warunkach głodu azotowego transkrypt jest stabilny, jego ilość nie zmienia się nawet po 30' od zahamowania transkrypcji.
- W obecności Gln ilość transkryptu *areA* obniża się gwałtownie już po 10' od zahamowania transkrypcji.

Kataboliczna represja azotowa Internalizacja transportera proliny po dodaniu NH_4^+

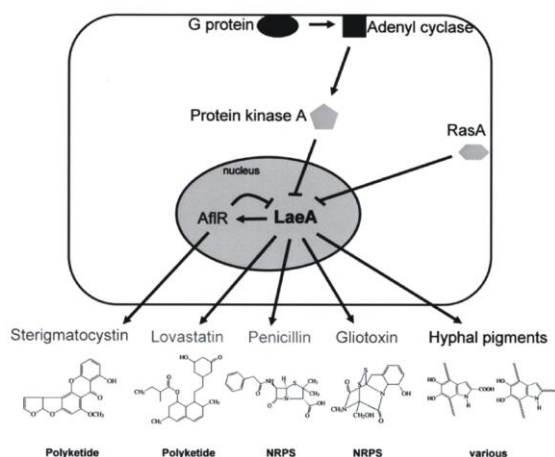


+pro NH_4^+
Konidia hodowane na pożywce z proliną, a następnie z NH_4^+
fuzja transportera proliny PrnB::GFP

Scazzocchio, C. "Aspergillus: a multifaceted genus," Encyclopædia of Microbiology,
Moselio Schaechter, General Editor, Elsevier Press.

System represji azotowej reguluje również aktywność transporterów (permeaz) alternatywnych źródeł azotu, które są nieaktywne w obecności Gln/ NH_4 . W obecności preferowanego źródła azotu geny kodujące takie transportery (np. permeazę proliny PrnB) nie ulegają transkrypcji, a same permeazy obecne w błonie komórkowej ulegają internalizacji do wakuoli.

LaeA – regulator metabolizmu wtórnego



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

Eukaryotic Cell

Journals.ASM.org | Copyright © American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

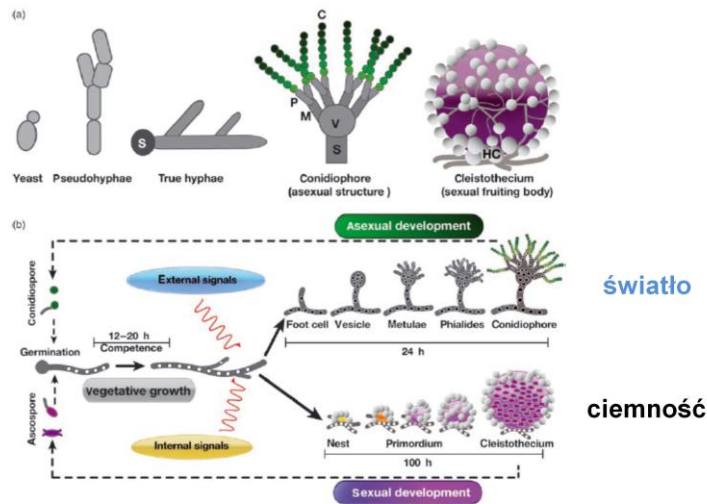
Metabolizm wtórny – związki, które nie są niezbędne do przeżycia, np. poliketidy, peptydy syntetyzowane w procesie NRPS, pigmenty. Toksyny.. Regulatorem ogólnym genów metabolizmu wtórnego jest białko LaeA.

LaeA (lack of aflatoxine expression) is conserved in filamentous fungi, but not in yeasts.

LaeA regulates positively the synthesis of isopenicillin, sterigmatocystin, gliotoxin and lovastatin.

LaeA does not only control secondary metabolism, but also has key functions in sexual and asexual development which are connected with light.

Morfologiczne zróżnicowanie grzybów



Bayram and Braus, FEMS Microbiol. Rev. 2012, 1-24

Differentiation and secondary metabolism are correlated processes in fungi that respond to light. In *Aspergillus nidulans*, light inhibits sexual reproduction as well as secondary metabolism.

Fig. 1. Fungal cell types and life cycle of the filamentous model fungus *Aspergillus nidulans*. (a) Yeast form: unicellular fungal growth mode; pseudohyphae (elongated cells): filamentous growth form with individual cells; true hyphae: filaments (often separated by permeable septae); conidiophore: composed asexual structure of *A. nidulans*; cleistothecium: spherical closed sexual fruiting body of *Aspergillus* species. S, stalk; V, vesicle; M, metulae; P, phialides; C, conidia; HC, Hu" lle cells. (b) Life cycle of the model fungus *A. nidulans* from vegetative filamentous growth to asexual or sexual alternatives of development.

Dla zainteresowanych:

Bayram and Braus, FEMS Microbiol. Rev. 2012, 1-24 - **Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins**



The velvet family of regulatory proteins plays a key role in coordinating secondary metabolism and differentiation processes such as asexual or sexual sporulation and sclerotia or fruiting body formation.

The velvet family shares a protein domain that is present in most parts of the fungal kingdom from chytrids to basidiomycetes., not in *S. cerevisiae*.

Different members of the velvet protein family interact with each other and the non velvet protein LaeA, primarily in the nucleus.

We identified the heterotrimeric velvet complex VelB/VeA/LaeA connecting light-responding developmental regulation and control of secondary metabolism. VeA, which is primarily expressed in the dark, physically interacts with VelB, which is expressed during sexual development. VeA bridges VelB to the nuclear master regulator of secondary metabolism, LaeA. Deletion of either *velB* or *veA* results in defects in both sexual fruiting-body formation and the production of secondary metabolites.

VeA supports nuclear localization of VelB and formation of the velvet complex. (A) Fluorescence patterns in strains expressing *velB::sgfp* in the dark in *veA+* and *veAΔ* backgrounds.

C. Model: (Light) VeA is mostly retained in the cytoplasm, VelB supports asexual spore formation, and LaeA shows low activity. (Dark) An increased amount of VeA is imported into the nucleus by KapA and, in addition, supports the nuclear transport of VelB. Dotted lines indicate the decreased amount of VeA that is present in the cell in the light and the impairment of VeA nuclear transport in the light. VelB/VeA control development and LaeA activity by formation of the velvet complex that affects secondary metabolite clusters expression.

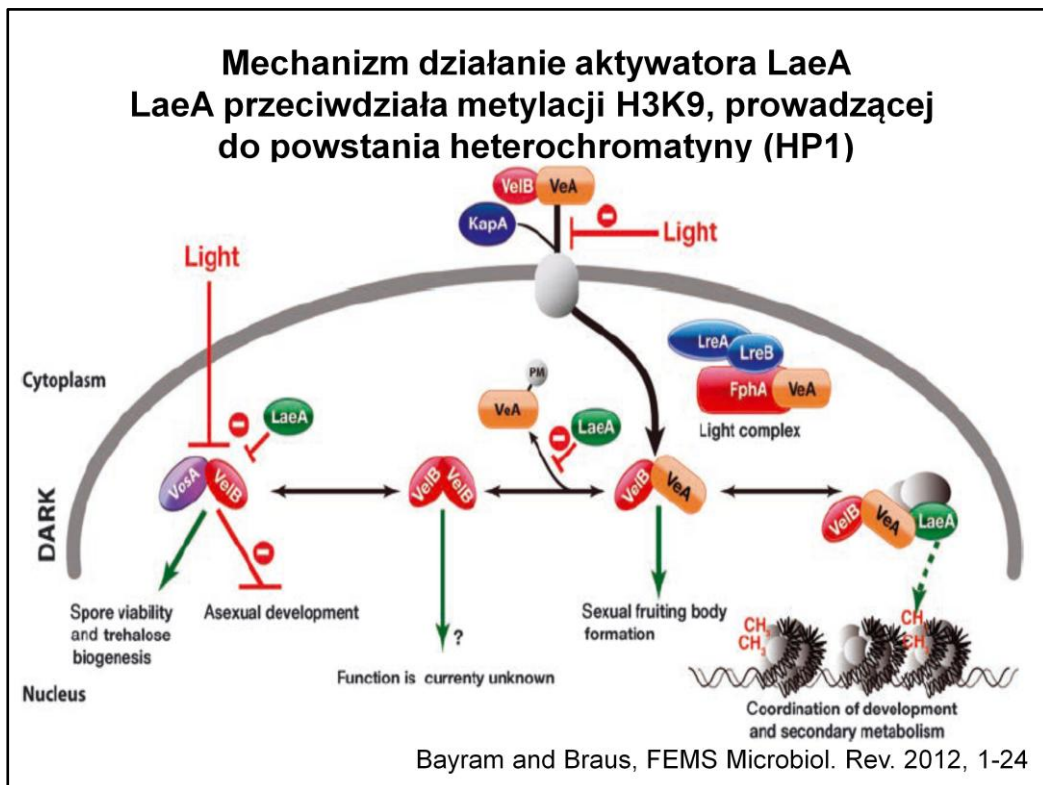


Fig. 3. Interactions between velvet family proteins and LaeA in *Aspergillus nidulans*. The α -importin KapA supports the entry of the VeA–VelB dimer into the nucleus in the dark. In the nucleus, the VelB–VeA dimer can interact with LaeA, forming the heterotrimeric velvet complex that regulates secondary metabolism and development. VelB can also form homodimers and is part of another heterodimer, VosA–VelB. VosA–VelB represses asexual development and is required for the viability of spores by activating trehalose biogenesis. In a submerged culture during vegetative growth, VosA–VelB represses differentiation and initiates trehalose biogenesis. Light decreases the cellular levels of VosA and VelB (red lines) and allows asexual sporulation, whereas the initiated trehalose biogenesis during vegetative growth still occurs. In the dark, VosA–VelB is present and negatively regulates asexual conidiation and still supports trehalose biosynthesis. VeA interacts with the red light receptor FphA that is associated with the blue light receptors LreA and LreB. PM, Post-translational modification.

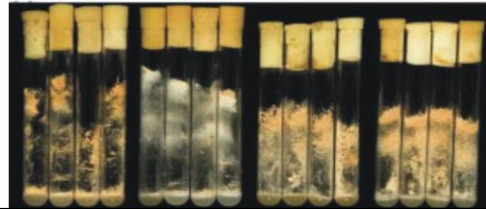
LaeA shows a domain typical of histone methyltransferases, the SAM domain, while lacking a second domain found in these enzymes - the SET domain.

LaeA has been proposed to counteract to H3K9 methylation in the sterigmatocystin gene cluster (H3K9 methylation results in binding of HP1 and induction of heterochromatin formation)

LaeA is involved in reversal of this heterochromatic signature inside the cluster,

Regulacja przez światło

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



Fotografie –

Lee, Fungal Ecology, 2012, 5: 223–229

Barwnik w konidiach – NEUROSPORAKSANTYNA - brak w mutantach wc

Filamentous fungi have a complete set of photoreceptors responding to different wavelengths, which includes opsins (green), phytochromes (red), cryptochromes (blue), and proteins carrying LOV domains

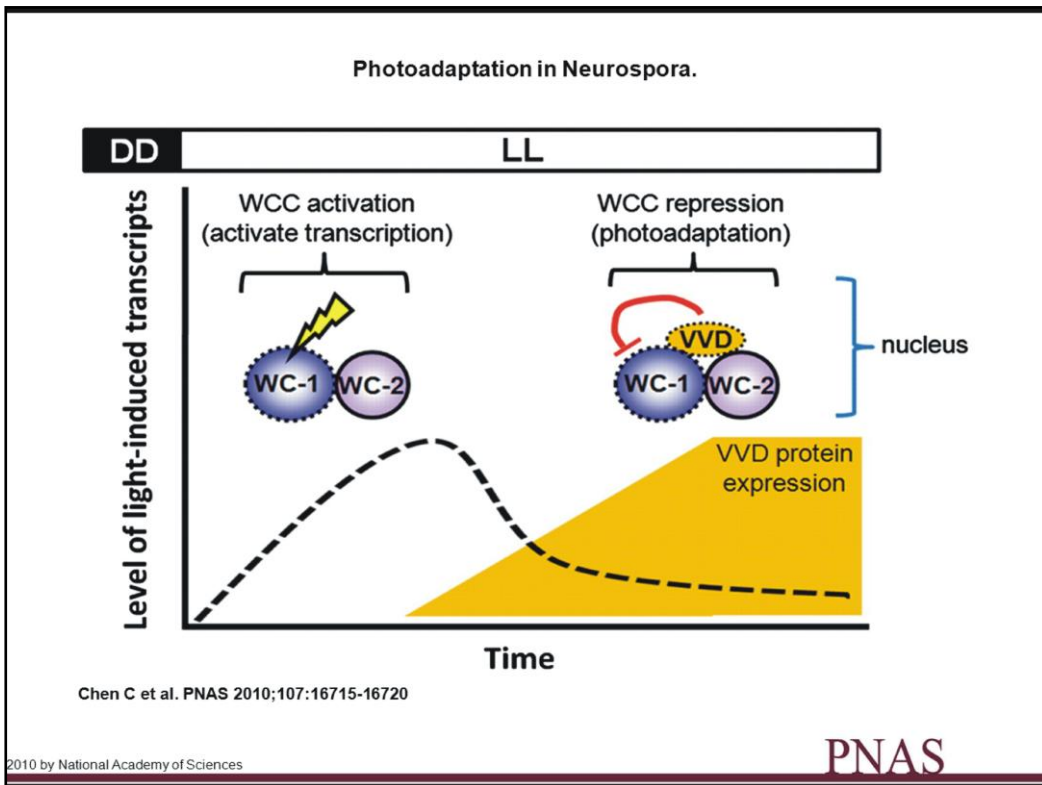
In *N. crassa*, beyond the VVD and WC-1 (NcWC-1) blue-light photoreceptors, the genome of this fungus also encodes an opsin (*nop-1*), a cryptochrome (*cry*) and two phytochromes (*phy-1* and *phy-2*). Similarly, in *Aspergillus nidulans*, a phytochrome (*FphA*) and an orthologue to the NcWC-1 protein (*LreA*) have been described.

(Salinas et al., 2020)

Domena LOV (light, oxygen, voltage changes)

VVD – umożliwia fotoadaptację, czyli dostosowanie się do nowych, rosnących dawek światła, przez zahamowanie pierwotnej odpowiedzi na światło

Na zdjęciu – mutanty wc nie produkują neurosporaksantyny, której ekspresja jest indukowana przez światło.

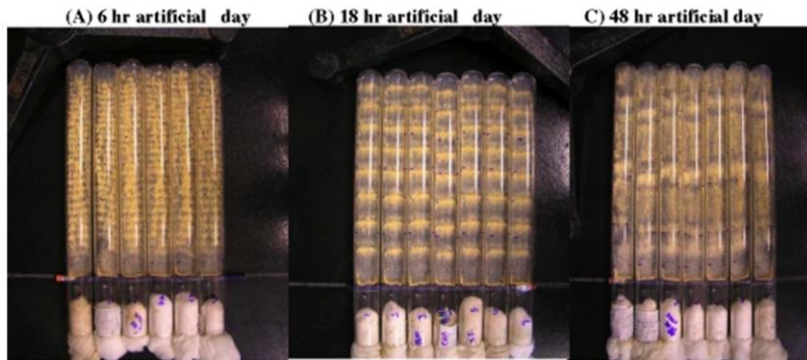


Photoadaptation in Neurospora.

After light activation, the WCC transiently binds to the promoter of light-responsive genes to activate transcription, including *vvd*. The induced VVD protein accumulates in the nucleus and physically interacts with WCC to regulate photoadaptation by repressing WCC activity in constant light.

The kinetics of photoadaptation are predominantly regulated by the amount of VVD protein in the system. Components capable of sensing light directly through a chromophore are marked with dashed lines

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



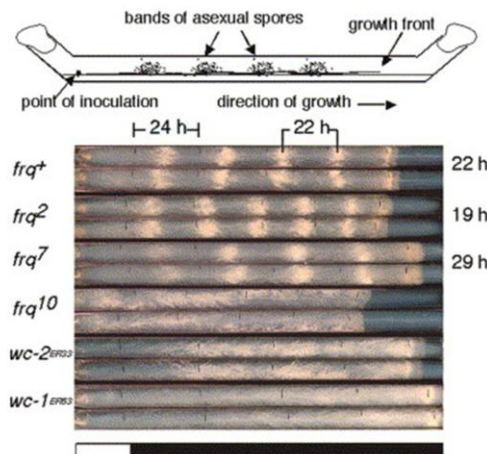
Zegar biologiczny jest niezależny od sygnałów zewnętrznych. To oscylator wewnętrzny synchronizowany przez czynniki zewnętrzne (światło, temperatura)

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

Rytm okołodobowy – zmiany w ekspresji genów w ciągu doby, które są niezależne od światła.

Neorspora - konidiowanie tuż przed świtem (żółte prążki to grzybnia wytwarzająca żółte konidia) – na zdjęciu wpływ długości dnia na konidiowanie Neurospora

Neurospora crassa – rytm okołodobowy

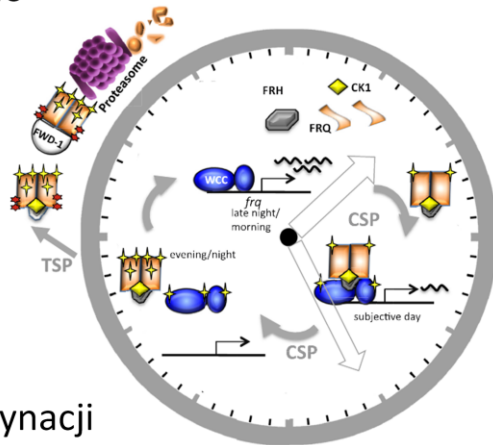


Crosthwaite FEBS Letters 567 (2004) 49–54

Konidiowanie w ciemności – dziki szczep *Neurospora* koniduje w ciemności co 22 h, bez dostępu światła. Mutant w genach *frq* (frequency) i *wc* mają zaburzony ten rytm

Neurospora crassa – rytm okołodobowy

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

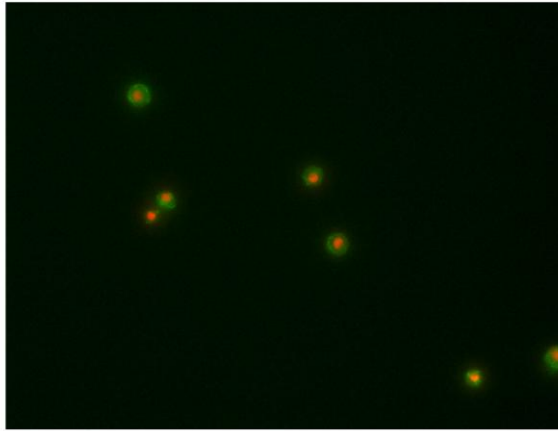


Montenegro-Montero A, Canessa P, Larrondo LF. Adv Genet. 2015;92:107-84.

The *Neurospora* circadian oscillator. In the late subjective night, the WCC recognizes the Clock-box on the *frq* promoter activating its transcription, a process which involves various chromatin remodelers, including SWI/SNF (not shown). Right after its synthesis, FRQ dimerizes and associates with FRH, forming the FRQeFRH complex or FFC. The association with FRH is critical for stabilizing the intrinsically disordered nature of FRQ. The FFC recruits CK1, which catalyzes several phosphorylation events on FRQ. Through these Clock-Signaling Phosphorylations (CSP), FRQ starts moving from a hypophosphorylated to a hyperphosphorylated state. The kinetics of these CSP determine the speed of the circadian cycle. The FFC promotes the CK1-dependent phosphorylation of WC-1, which also involves the participation of other kinases (not shown). These modifications on the WCC decrease its affinity for the C-box, therefore reducing *frq* expression. Importantly, WC-1 is more stable when phosphorylated and transcriptionally inactive, than when active. As FRQ reaches a hyperphosphorylated state, it loses its ability to interact with CK1 and the WCC. At that point, it can no longer efficiently repress WCC activity. At the same time, dephosphorylation of WC-1 and WC-2, as well as de novo synthesis of these proteins, provide active WCC to reinitiate the cycle. Independently, and based on kinetics that do not affect time keeping, Termination-Signaling Phosphorylations (TSP) on FRQ, marked as red (dark gray in print versions) dots, lead to its recognition by FWD-1 and its associated cullinSCF complex (not shown), which leads to FRQ ubiquitylation and turnover by the proteasome. In this revised model of *Neurospora* clock function, events included inside the drawing of the clock are critical to determine period, while those outside depend on the timing of previous events, but do not participate in setting the speed of the clock.

Biologia komórki

Kiełkowanie konidiów - mitoza



[film conidia germination](#)

Oakley B., unpublished

Film – conidia germination

**Mitozy następują synchronicznie do stadium 8 jąder,
potem tworzy się septa.**

**Dobry model do identyfikacji mutantów z zaburzonym
procesem mitozy.**

Biologia komórki

Mutanty związane z podziałami komórki

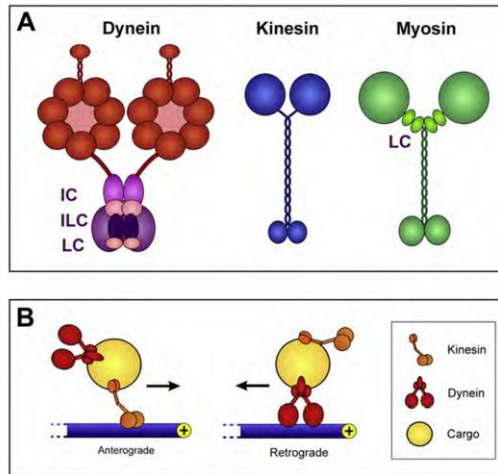
Mutanty temperaturo-wrażliwe:

- 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

Grzyby strzępkowe są dobrym modelem w badaniach z zakresu biologii komórki. Pierwsze mutanty z zaburzonym procesem mitozy zostały zidentyfikowane u *Aspergillus nidulans* (wymienione na slajdzie).

Biologia komórki – transport wewnętrzny komórki



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

Motory molekularne – kompleksy białek transportujące cargo (np. endosomy) wzdłuż włókien:

- Miozyna – udział w transporcie związanym z włóknami aktynowymi
- Kinezyzna i dyneina – transportują cargo wzdłuż mikrotubul

Kinezyzna do +, czyli w kierunku „czubka” strzępki

Dyneina do – , czyli w kierunku przeciwnym

Pierwsze mutanty z zaburzonym procesem transportu zostały zidentyfikowane u *Aspergillus nidulans*

Nim- mutanty w genach kodujących cykliny/kinazy/fosfatazy związane z tym transportem

nudA encodes de dynein heavy chain, *nudG* the dynein light chain,

bimC kinezyzna – pierwszy dowód na to, że kinezyzny biorą udział w mitozie

Kinezyzny – kilka grup, kinezyzna 3 - główna motor transportu wczesnych endosomów (early endosomes) in neuronal axons, nie ma homologa drożdżowego

Biologia komórki

Ruch endosomów wzdłuż mikrotubul

Ustilago maydis

Patogen roślin – głownia kukurydzy



Quesadilla de huitlacoche

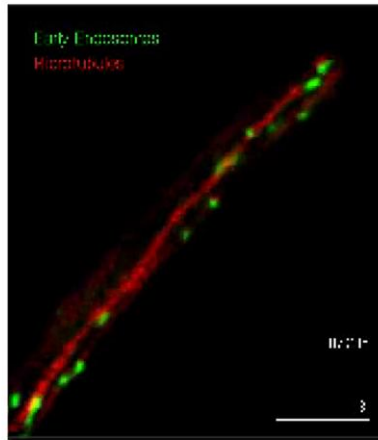
Meksykański przysmak z głowni kukurydzy

Dobrym modelem do badania transportu endosomów wzdłuż mikrotubul jest *Ustilago maydis*, patogen kukurydzy.

Basidiomycetes – jednokomórkowe sporidia są tworzone w pożywce, po infekcji rośliny wytwarzane są strzępki.

Biologia komórki

Ruch endosomów wzdłuż mikrotubul



[2i_EEsOnMTs.wmv](#)

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

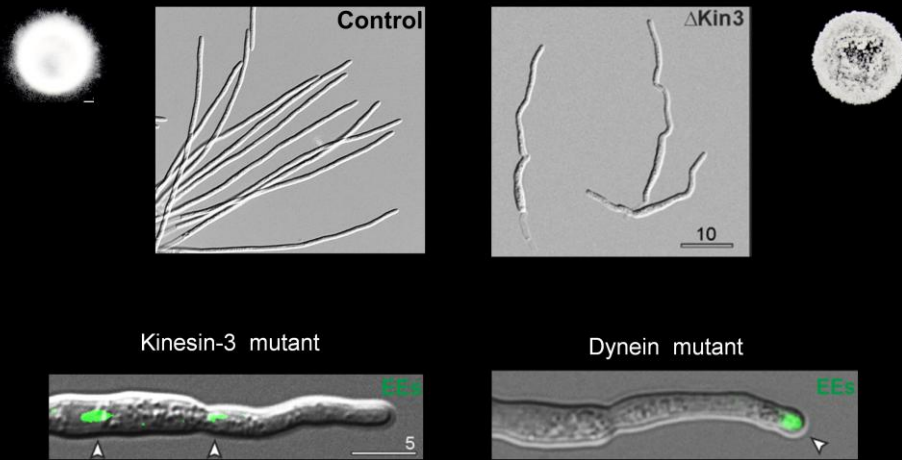
Movie 30 (z publikacji j.w.) - Motility of early endosomes along microtubules in a hyphal cell. The organelles move rapidly in a bi-directional fashion along single microtubules or microtubule

Zadawano sobie pytanie, jakie białka pełnią funkcję adaptorów dla kinezyn i dynein, czyli czynników łączących motor z cargo.

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

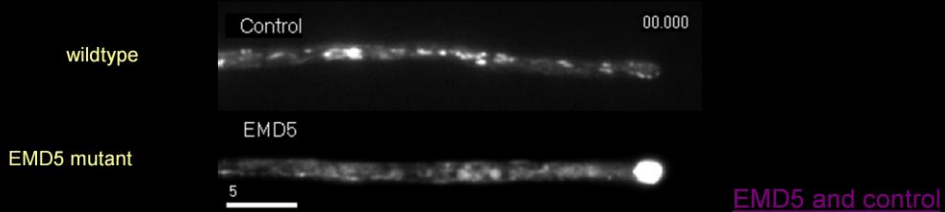
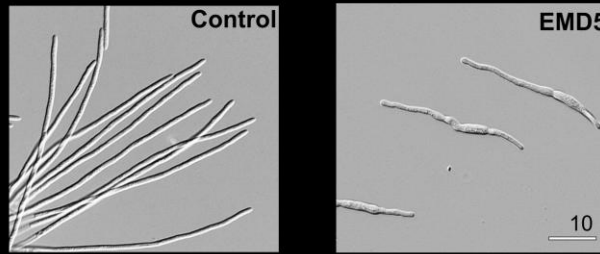


Bielska, Schuster, Roger, Berepiki, Soanes, Talbot and Steinberg
(2014) JCB 204:789

U mutantów w genie kodującym :
dyneinę - EE gromadzą się na czubku strzępki,
Kinezynę –EE nie dochodzą do czubka

EE widzimy dzięki wyznakowaniu GFP jednego z białek endosomalnych.

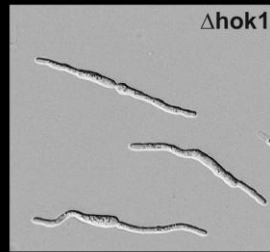
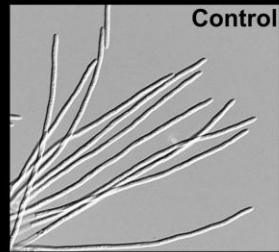
A screen for mutants defective in EE motility



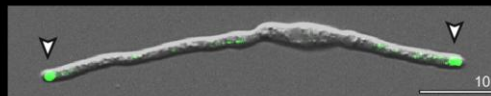
Zidentyfikowano gen w mutancie Emd5 - endosome motility defect

Identyfikacja genu poprzez sekwencjonowanie całego genomu mutantanta

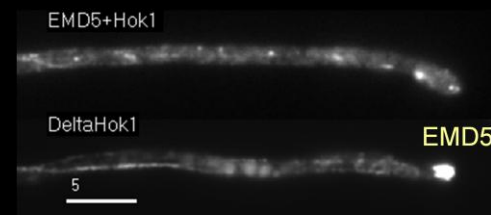
A screen for mutants defective in EE motility



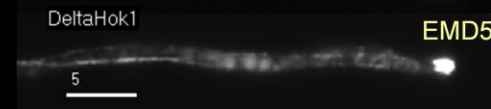
hok1 null



EMD5 + Hok1::GFP



hok1 null



EMD5+HookGFP and DHok1

[cztery szczepy.mp4](#)

Mutacja Emd5 jest zlokalizowana w genie Hok1.
Hok1 is required for bidirectional motility of EEs.

Hook proteins are required for bi-directional EE motility



- DmHook required for endocytic sorting (in Drosophila)

- Humans have 3 Hook proteins

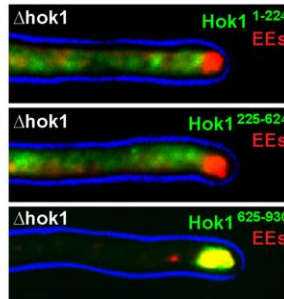
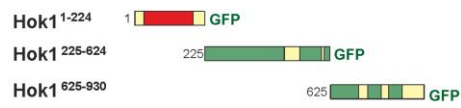
Hook1: Endocytic recycling and sorting

Hook2: Primary cilium formation

Hook3: Golgi organization

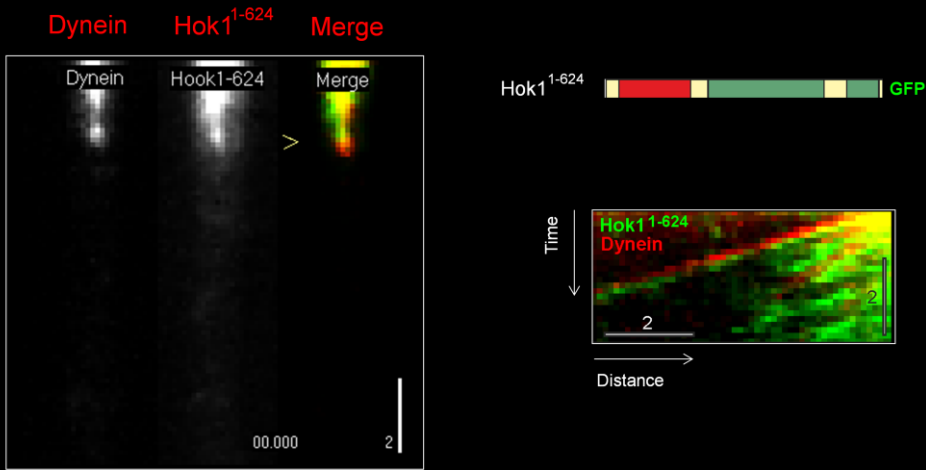
- binds to microtubules and organelles- Is it a linker/adaptor protein?

Hok1 targets to EEs via its C-terminal part



the C-terminal region of Hok1 anchors the protein to its cargo, which confirms findings in humans

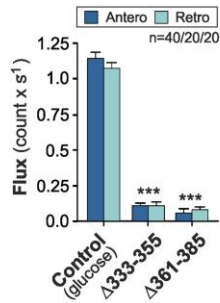
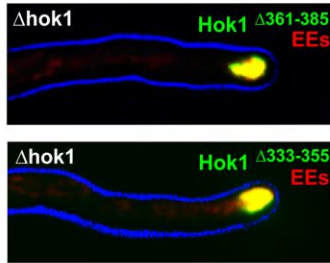
The N-terminal half (aa 1-624) of Hok1 binds to dynein



Common path analysis

N-terminal domain and the CC region of Hok1, when targeted to EEs, are sufficient to restore EE motility, suggesting that Hok11–624 interacts with dynein.

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



Both these Hok delta proteins localized to polar EE clusters (Fig. 4 B), but neither was able to restore EE motility or cell growth

A conserved coiled-coil (CC) domain within the N-terminal region of Hok1 controls both dynein and kinesin-3 attachment to EEs.

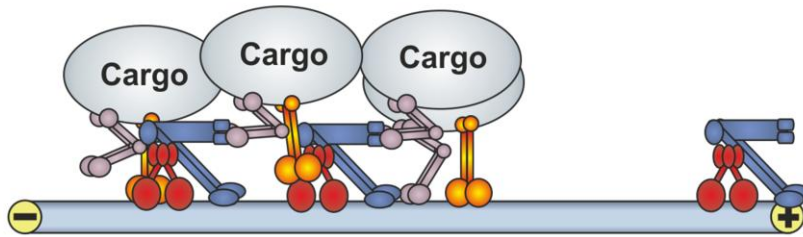
Model: A role of Hook in anterograde-to-retrograde turning



Hok1 mediates both dynein and kinesin-3 recruitment to EEs and thus regulates bidirectional EE motility.

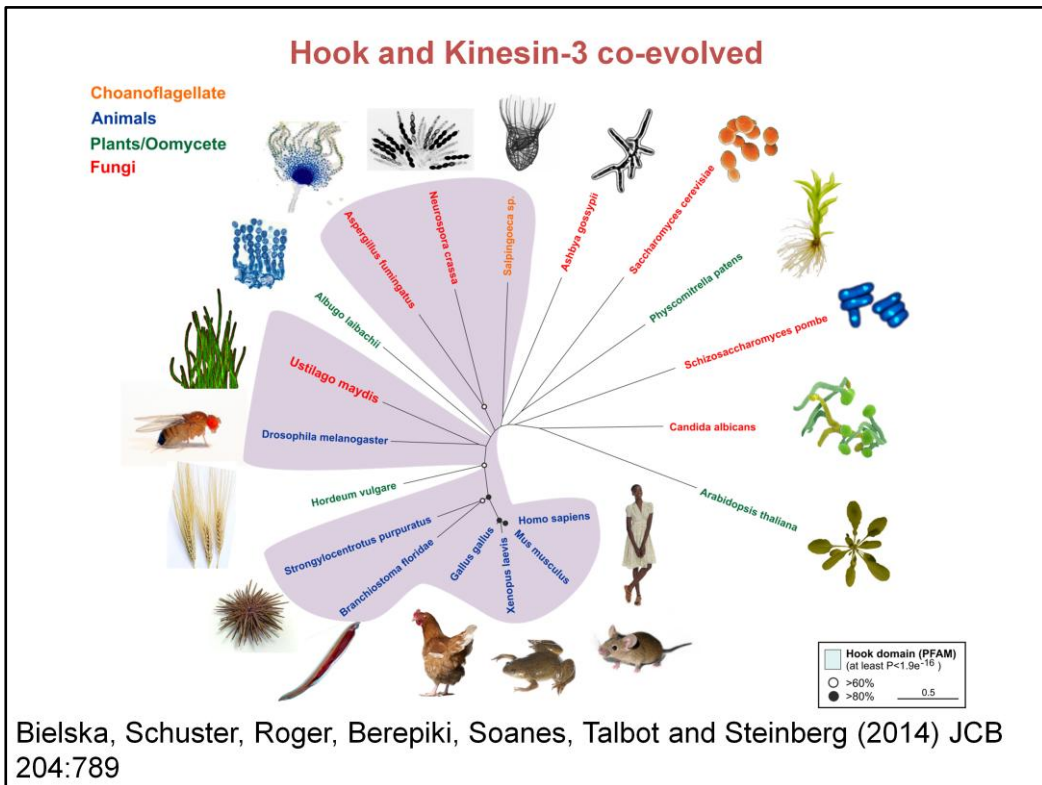
Model: A role of Hook in anterograde-to-retrograde turning

Kinesin 2 release
by Hook binding
during retrograde activity



Is the function of Hok1 conserved ?

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



a chimeric protein of Hok1 and human Hook3 is functional in *U. maydis*, suggesting that the core function in motor coordination is conserved.

However, only the conserved CC stretch of human Hook3 was functional when integrated into Hok1, whereas several other Hok1-Hook3 chimeric proteins failed to rescue the *delta**hok1* phenotype.

Therefore, we consider it likely that the detailed mechanism of Hook function is different between fungi and humans.