

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Nadexprese
dimethylallyltryptophansynthasy
v produkčním kmeni *Claviceps purpurea*

Bakalářská práce

Veronika Vaňková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Michaela Hradilová

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Michaely Hradilové.

V Olomouci dne 3. 5. 2018

SOUHRN

Claviceps purpurea je parazitická houba, produkující námelové alkaloidy, které nacházejí svůj význam ve farmaceutickém průmyslu pro výrobu léčiv. Zvýšená produkce alkaloidů genetickými modifikacemi vybraných kmenů *Claviceps purpurea* by mohla snížit náklady na výrobu těchto léků. Gen *dmaW* kóduje enzym 4-dimethylallyltryptophan syntasu, která katalyzuje první krok biosyntetické dráhy alkaloidů, jenž by mohl být zároveň krokem regulačním. A právě nadexprese tohoto genu by mohla vést ke zvýšené produkci námelových alkaloidů.

V teoretické části byla za použití uvedené literatury popsána charakteristika rodu *Claviceps* a životní cyklus *C. purpurea* produkujících alkaloidy *in planta* a v submerzní kultuře. Dále byla zpracována kapitola zabývající se námelovými alkaloidy, jejich chemickou strukturou, farmakologickým účinkem, biosyntézou a její regulací. Poslední kapitola teoretické části je zaměřena na vybrané metody analýzy námelových alkaloidů.

V praktické části práce byla provedena transformace protoplastů *C. purpurea* produkčního kmene P1 konstrukty *pNDH-OGG::dmaW* (vektor obsahující *dmaW* z *C. purpurea* 20.1 fúzovaný na N konci s *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem) a *pNDH-OGG* (vektor obsahující *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem), tento druhý vektor sloužil jako kontrolní. Cílem této transformace bylo zvýšit expresi genu *dmaW* a tím zvýšit produkci alkaloidů v submerzní kultuře. Úspěšnost transformace byla potvrzena pomocí diagnostické PCR. Přibližný obsah námelových alkaloidů v myceliu a médiu získaných houbových kultur byl stanoven Van Urk testem, zatímco metodou HPLC byl stanoven přesný kvalitativní i kvantitativní obsah alkaloidů. Bylo zjištěno, že nadexprese enzymu katalyzujícího první krok biosyntézy námelových alkaloidů může zvýšit produkci těchto látek.

SUMMARY

Claviceps purpurea is a phytopathogenic fungus producing ergot alkaloids, whose purpose can be found in the pharmaceutical industry in the pharmaceuticals manufacturing. An increased production of alkaloids by genetic modifications of selected strains of *Claviceps purpurea* could reduce the manufacturing costs of these pharmaceuticals. *DmaW* gene encodes an enzyme 4-dimethylallyltryptophansynthase, which catalyzes the first step of alkaloid biosynthetic pathway, which could also be the step of regulation. The overexpression of this gene could lead to increased production of ergot alkaloids.

In a theoretical part of the thesis, using the mentioned literature, the characteristic of the *Claviceps* genus and the life cycle of *C. purpurea* producing alkaloids *in planta* and in submerged culture are described. Next chapter introduces ergot alkaloids, their chemical structure, pharmacological effect, biosynthesis and its regulation. The last chapter of the theoretical part specifies the selected methods of analysis of ergot alkaloids.

The practical part of the thesis is focused on the transformation of protoplasts of the producing strain P1 of *C. purpurea* with constructs *pNDH-OGG::dmaW* (a vector containing *dmaW* from *C. purpurea* 20.1 fused at N-terminal to *gfp* under the constitutive *OliC* promoter) and *pNDH-OGG* (a vector containing *gfp* under the constitutive *OliC* promoter), this vector was used as a control. The purpose of this transformation was to increase the expression of *dmaW* gene and thereby increase the production of alkaloids in the submerged culture. A success of the transformation was confirmed by diagnostic PCR. An approximately ergot alkaloids content in mycelium and in a medium of procured fungal cultures was determined by Van Urk test, while HPLC method was used for determination of an exact qualitative and quantitative content of alkaloids. This research led to a conclusion that overexpression of an enzyme catalysing the first step of ergot alkaloids biosynthesis can increase the production of these substances.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí Mgr. Michaele Hradilové za odborné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi při vedení mé bakalářské práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat doc. Mgr. Petrovi Galuszkovi, Ph.D. za provedení analýzy vzorků metodou HPLC.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	<i>Claviceps purpurea</i>	3
3.1.1	Taxonomie.....	3
3.1.2	Charakteristika rodu <i>Claviceps</i>	3
3.1.3	Životní cyklus.....	4
3.1.3.1	Kmeny <i>C. purpurea</i> produkující alkaloidy <i>in planta</i>	4
3.1.3.2	Kmeny <i>C. purpurea</i> produkující alkaloidy v submerzní kultuře.....	6
3.2	Námelové alkaloidy.....	7
3.2.1	Chemická struktura námelových alkaloidů.....	7
3.2.2	Farmakologický účinek.....	9
3.2.3	Biosyntéza námelových alkaloidů u <i>C. purpurea</i>	11
3.2.4	Regulace biosyntézy námelových alkaloidů.....	15
3.2.4.1	Vliv koncentrace fosfátu.....	15
3.2.4.2	Vliv koncentrace Trp.....	15
3.2.4.3	Modifikace histonů.....	15
3.2.4.4	Inhibice koncovým produktem.....	17
3.3	Metody analýzy alkaloidů.....	17
3.3.1	Spektroskopie, kolorimetrie.....	18
3.3.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	19
3.3.2.1	Obecný princip HPLC.....	19
3.3.2.2	Analýza námelových alkaloidů.....	20
4	MATERIÁL A METODY	23
4.1	Biologický materiál.....	23
4.2	Použité chemikálie.....	23
4.3	Použité roztoky a jejich příprava.....	25
4.4	Použité primery.....	26
4.5	Použité soupravy.....	26
4.6	Seznam použitých laboratorních přístrojů a pomůcek.....	27
4.7	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	28
4.7.1	Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> TOP10 tepelným šokem.....	28
4.7.2	Izolace plasmidové DNA.....	28

4.7.3	Precipitace plasmidové DNA	29
4.7.4	Restrikce plasmidové DNA.....	29
4.7.5	Přečištění restrikční směsi.....	29
4.7.6	Elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu	30
4.7.7	Transformace <i>Claviceps purpurea</i> P1	30
4.7.7.1	Příprava protoplastů	30
4.7.7.2	Transformace protoplastů.....	30
4.7.8	Ověření transformace <i>C. purpurea</i> P1 pomocí diagnostické PCR.....	31
4.7.8.1	Izolace genomické DNA	31
4.7.8.2	Diagnostická PCR	31
4.7.9	Izolace homokaryotické kultury.....	33
4.7.10	Měření obsahu alkaloidů v transformantech <i>C. purpurea</i> P1	33
4.7.10.1	Příprava vzorků	33
4.7.10.2	Van Urk test	34
4.7.10.2.1	Médium	34
4.7.10.2.2	Mycelium	35
4.7.10.3	HPLC analýza	35
4.7.10.3.1	Příprava médií	35
4.7.10.3.2	Příprava mycelií	36
4.7.10.3.3	Podmínky měření	36
5	VÝSLEDKY	38
5.1	Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> s následnou izolací a restrikcí plasmidové DNA, elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu.....	38
5.2	Transformace <i>C. purpurea</i> P1	39
5.3	Izolace homokaryotické kultury.....	40
5.4	Analýza obsahu námelových alkaloidů.....	41
5.4.1	Příprava vzorků	41
5.4.1.1	Van Urk test	42
5.4.1.2	HPLC	47
6	DISKUZE.....	52
7	ZÁVĚR.....	56
8	LITERATURA	57

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

2-OG	2-oxoglutarát
3' OS	3' okrajová sekvence
5' OS	5' okrajová sekvence
bp	páry bází (z angl. base pairs)
<i>cloA</i>	gen kódující P450 monooxygenasu <i>C. purpurea</i>
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMAT	4- γ,γ -dimethylallyltryptophan
DMATS	4-dimethylallyltryptophan syntasa
<i>dmaW</i>	gen kódující dimethylallyltryptophan syntasu <i>C. purpurea</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfáty
<i>easA</i>	gen kódující chanoklavin-I-aldehyd oxidoreduktasu <i>C. purpurea</i>
<i>easC</i>	gen kódující katalasu <i>C. purpurea</i>
<i>easD</i>	gen kódující chanoklavin-I dehydrogenasu <i>C. purpurea</i>
<i>easE</i>	gen kódující chanoklavin-I-syntasu <i>C. purpurea</i>
<i>easF</i>	gen kódující 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferasu <i>C. purpurea</i>
<i>easG</i>	gen kódující agroklavin syntasu <i>C. purpurea</i>
<i>easH</i>	gen kódující dioxygenasu <i>C. purpurea</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMS	ethymethansulfonát
fw primer	primer ve směru 3' \rightarrow 5' (z angl. forward)
gDNA	genomická DNA
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
Hph	gen rezistence na hygromycin
LB médium	Luria-Bertani médium
LPS	neribozomální peptidová syntasa
<i>lpsA1</i>	gen kódující trimodulární lysergyl peptidovou syntasu LPS1 <i>C. purpurea</i>
<i>lpsA2</i>	gen kódující syntasu LPS4 <i>C. purpurea</i>
<i>lpsB</i>	gen kódující monomodulární syntasu LPS2 <i>C. purpurea</i>
<i>lpsC</i>	gen kódující monomodulární syntasu LPS3 <i>C. purpurea</i>
LSD	diethyamid kyseliny lysergové
MeDMAT	N-methyl dimethylallyltryptophan
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PEG	polyethylenglykol

PhP	4'-fosfopantetein
PoliC	promotor podjednotky 9 mitochondriální ATPasy <i>Aspergillus nidulans</i>
PPi	pyrofosfát
rev primer	primer ve směru 5' → 3' (z angl. reverse)
RT	pokožová teplota (z angl. room temperature)
SAM	S-adenosylmethionin
SDS	dodecylsírán sodný
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TGluc	glukanasový terminátor <i>Botrytis cinerea</i>
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
Trp	tryptophan
WT	divoký kmen (z angl. wild type)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Sklerocia <i>C. purpurea</i> vyrůstající ze žita.....	3
Obr. 2: Životní cyklus houby <i>Claviceps purpurea</i>	5
Obr. 3: Porovnání vegetativního a produkčního mycelia.....	6
Obr. 4: Chemická struktura ergolinu.....	8
Obr. 5: Základní struktura ergopeptinů.....	9
Obr. 6: Srovnání podobnosti struktur neurotransmiterů s deriváty D-lysergové kyseliny.....	10
Obr. 7: Schéma genového klastru pro biosyntézu námelových alkaloidů v <i>C. purpurea</i>	11
Obr. 8: Schéma biosyntetické dráhy námelových alkaloidů u <i>C. purpurea</i>	12
Obr. 9: Pravidelná a obrácená prenylace katalyzovaná prenyltransferasami z nadrodiny DMATS	13
Obr. 10: Účinky inhibitorů HDACi a HATi na produkci námelových alkaloidů v kmeni P1 <i>C. purpurea</i>	16
Obr. 11: Obecné schéma HPLC zařízení.....	20
Obr. 12: Schéma nasednutí primerů pro diagnostickou PCR předpokládaných transformantů <i>pNDH-OGG::dmaW/gfp</i>	32
Obr. 13: Schéma nasednutí primerů pro diagnostickou PCR předpokládaných transformantů <i>pNDH-OGG</i>	322
Obr. 14: Schéma přípravy jednoho vzorku pro stanovení alkaloidů.....	34
Obr. 15: Příprava vzorků médií přes kolonky SPE Cartridges C18 a vakuovou komůrku pro HPLC analýzu obsahu námelových alkaloidů.....	36
Obr. 16: Elektroforetogram DNA fragmentů získaných restrikcí vektorů <i>pNDH-OGG</i> a <i>pNDH-OGG::dmaW</i> enzymem <i>Pst</i> I.....	38
Obr. 17: Transformanti <i>C. purpurea</i> P1.....	39
Obr. 18: Elektroforetogram DNA amplikonů amplifikovaných z genomické DNA primárních trasformantů <i>C. purpurea</i> P1 exprimujících <i>gfp</i> nebo <i>dmaW</i> s <i>gfp</i>	40
Obr. 19: Elektroforetogram DNA amplikonů amplifikovaných z genomické DNA homokaryotů <i>C. purpurea</i> P1 exprimujících <i>gfp</i> nebo <i>dmaW</i> s <i>gfp</i>	41
Obr. 20: Elektroforetogram DNA amplikonů amplifikovaných z genomické DNA transformantů <i>C. purpurea</i> P1 exprimujících <i>dmaW</i> s <i>gfp</i> nebo <i>gfp</i> ze vzorků připravených pro analýzu námelových alkaloidů.....	42
Obr. 21: Vizuální hodnocení obsahu námelových alkaloidů Van Urk testem.....	43
Obr. 22: Kalibrační křivka závislosti absorbance roztoků ergotaminu na jeho koncentraci.....	43
Obr. 23: Vizuální hodnocení obsahu námelových alkaloidů Van Urk testem – média.....	44
Obr. 24: Vizuální hodnocení obsahu námelových alkaloidů Van Urk testem – mycelia.....	45

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Rozdělení ergopeptinů podle aminokyselin v pozici I a II.	9
Tab. 2: Složení restriční směsi pro linearizaci izolované plasmidové DNA.....	29
Tab. 3: Složení reakční směsi pro PCR s použitím s <i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerasy</i>	32
Tab. 4: Teplotní a časový profil PCR reakce s <i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerasou</i>	32
Tab. 5: Koncentrace mobilních fází A a B v průběhu analýzy.	37
Tab. 6: Koncentrace alkaloidů stanovená pomocí Van Urk testu - média.....	46
Tab. 7 Koncentrace alkaloidů stanovená pomocí Van Urk testu - mycelia.	46
Tab. 8: Vypočítané průměrné koncentrace alkaloidů v médiích houbových kultur se standardní chybou. Hodnoty byly změřeny Van Urk testem.	47
Tab. 9: Vypočítané průměrné koncentrace alkaloidů v myceliích houbových kultur se standardní chybou. Hodnoty byly změřeny Van Urk testem.	47
Tab. 10: Výsledky obsahu námelových alkaloidů v myceliích.....	48
Tab. 11: Výsledky obsahu námelových alkaloidů v médiích.....	49
Tab. 12: Vypočítané průměrné koncentrace alkaloidů v médiích houbových kultur se standardní chybou. Hodnoty měřeny metodou HPLC.....	50
Tab. 13: Vypočítané průměrné koncentrace alkaloidů v myceliích houbových kultur se standardní chybou. Hodnoty měřeny metodou HPLC.....	51

1 ÚVOD

Claviceps purpurea je vřeckovýtrusná houba, která napadá řadu jednoděložných rostlin, včetně hospodářských plodin, jako je ječmen, pšenice a žito. V konečné fázi infekce vyrůstá z napadených klasů místo obilky tmavě fialové až černé sklerocium neboli námel, který je významným zdrojem námelových alkaloidů. Tyto sloučeniny odvozené od L-tryptophanu se v dnešní době hojně využívají k výrobě léků např. k léčbě migrény, mozkové dysfunkce u starších osob či Parkinsonově nemoci. Farmakologickou aktivitu těchto sloučenin zajišťuje jejich strukturní podobnost se třemi neurotransmitéry – noradrenalinem, dopaminem a serotoninem.

Geny pro biosyntézu námelových alkaloidů jsou uspořádány do klastru, který obsahuje 14 genů. Produkt genu *dmaW* katalyzuje první krok biosyntetické dráhy námelových alkaloidů, kterým je prenylace L-tryptophanu dimethylallyldifosfátem za vzniku 4- γ , γ -dimethylallyltryptophanu. Zvýšená produkce námelových alkaloidů ve vybraných kmenech *C. purpurea*, by mohla vést ke snížení nákladů na výrobu těchto léků, což představuje zajímavý přínos pro mnoho farmaceutických firem. Jedním z možných přístupů vedoucích ke zvýšení produkce těchto látek je i příprava geneticky upravených kmenů *C. purpurea* s nadexpresí vybraných genů biosyntézy alkaloidů.

V této bakalářské práci byly transformovány protoplasty *Claviceps purpurea* produkčního kmene P1 konstruktem *pNDH-OGG::dmaW* (vektor obsahující *dmaW* z *C. purpurea* 20.1 fúzovaný na N konci s *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem), pro kontrolu byl k transformaci použit vektor *pNDH-OGG* (vektor obsahující *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem). Transformace byla úspěšně potvrzena pomocí diagnostické PCR, v získaných transformantech (v myceliích i médiích) byl detekován zvýšený obsah alkaloidů pomocí Van Urk testu i pomocí HPLC.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerši na téma *Claviceps purpurea* se zaměřením na biosyntézu námelových alkaloidů, jejich využití a na metody analýzy alkaloidů.
2. Transformace *Escherichia coli* TOP10 vektory *pNDH-OGG* a *pNDH-OGG::dmaW*.
3. Transformace produkčního kmene *C. purpurea* P1 vektory *pNDH-OGG* a *pNDH-OGG::dmaW*.
4. Ověření získaných transformantů *C. purpurea* pomocí diagnostické PCR.
5. Izolace homokaryotických kultur.
6. Kvantitativní a kvalitativní změření obsahu námelových alkaloidů v získaných transformantech pomocí Van Urk testu a HPLC.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 *Claviceps purpurea*

3.1.1 Taxonomie

Říše:	houby (<i>Fungi</i>)
Oddělení:	houby vřeckovýtrusné (<i>Ascomycota</i>)
Třída:	vřeckovýtrusné houby (<i>Ascomycetes</i>)
Řád:	masenkotvaré (<i>Hypocreales</i>)
Čeleď:	paličkovicovité (<i>Clavicipitaceae</i>)
Rod:	paličkovice (<i>Claviceps</i>)
Druh:	paličkovice nachová (<i>Claviceps purpurea</i>)

3.1.2 Charakteristika rodu *Claviceps*

Zástupci rodu *Claviceps* parazitují na více než 600 jednoděložných rostlinách čeledi sítinovité, šáchorovité a lipnicovité, včetně hospodářsky významných plodin, mezi které patří žito, pšenice a ječmen (Bové, 1970). Rod *Claviceps* obsahuje více než 30 druhů, z nichž většina napadá úzké spektrum rostlin. Výjimku však tvoří vřeckovýtrusná houba *Claviceps purpurea*, která je schopná infikovat více než 400 druhů rostlin, čímž se řadí k nejznámějším druhům v Evropě (Taber, 1985).

Na napadených klasech se místo zrn vytváří přezimující stádium této houby tzv. sklerocium neboli námel (Obr. 1), zdroj námelových alkaloidů, které při požití vyvolávají onemocnění zvané ergotismus (Eadie, 2003). Vzájemný vztah mezi symptomy ergotismu a konzumací námele objevil v 50. letech 19. století Louis René Tulasne, který jako první popsal životní cyklus *C. purpurea* (Tulasne, 1853).



Obr. 1: Sklerocia *C. purpurea* vyrůstající ze žita.

První poznatky o toxicitě námelových alkaloidů pocházejí z roku 600 př. n. l. Ve středověku byla zaznamenána rozsáhlá epidemie, která byla zapříčiněna konzumací žitného chleba, jenž byl vyroben ze zrn infikovaných rostlin (Tudzynski *et al.*, 2001). Gangrenózní forma ergotismu byla rozšířena ve Francii a v dalších evropských zemích západně od řeky Rýn, zatímco konvulsivní forma měla ohnisko ve střední a východní Evropě a Skandinávii (Romberg, 1853). Gangrenózní ergotismus se projevuje jako ischémie v končetinách spojená se změnami barvy pokožky, ztrátou citlivosti, otoky, a nakonec i s amputací postižené tkáně, zatímco konvulsivní ergotismus se projevuje halucinacemi a deformacemi trupu a končetin (van Dongen *et de Groot*, 1995).

Přestože se epidemie ergotismu v dnešní době stále ještě v některých zemích vyskytují (Demeke *et al.*, 1979), v našich podmínkách, při dodržování zásad správné zemědělské praxe a na základě současných poznatků, je riziko otravy námelovými alkaloidy minimální. Tyto otravy jsou spíše spojeny s předávkováním léky obsahujícími námelové alkaloidy.

Námel byl používán již v roce 1582 porodními asistentkami k urychlení porodu (Hoffman, 1978). Avšak nečistota a neschopnost reprodukce obsahu alkaloidů znemožnila jejich využití v medicíně. Pokrok nastal až s vývojem moderních metod, které umožnily získat alkaloidy v odpovídající čistotě (Tudzynski *et al.*, 2001). Některé druhy námelových alkaloidů slouží k výrobě terapeutických látek pro léčbu migrény, v gynekologii a jako léky proti Parkinsonově nemoci (de Groot *et al.*, 1998).

3.1.3 Životní cyklus

3.1.3.1 Kmeny *C. purpurea* produkující alkaloidy *in planta*

C. purpurea napadá řadu trav a obilovin, ale díky své vysoké orgánově specifické je schopná infikovat pouze mladé a neoplozené semeníky (Lee, 2009). V počáteční fázi infekce nejsou žádné obranné reakce hostitele, což je pravděpodobně zapříčiněno růstem hyf, které napodobují růst pylové láčky (Tudzynski *et Scheffer*, 2004).

V jarním období začíná první kolo infekce (Obr. 2) neoplozených semeníků paličkovici nachovou pomocí větrem přenášených askospor, pocházejících z perithecia klíčiho sklerocia (tzv. primární infekce). Spory jehličkovitého tvaru dopadají na blizny trav (1), kde následně klíčí (Esser *et Tudzynski*, 1978). Poté bez použití fyzického tlaku nebo specifických infekčních struktur pronikají houbová vlákna přes kutikulu do hostitelské rostliny. Po penetraci vytváří houba silné a nerozvětvené hyfy, které prorůstají ve směru růstu pylové láčky až k bazální části semeníku (2), kde se napojují na cévní tkáň, vzniká rozvětvené mycelium tzv. sphacelium. Toto sphacelium obklopuje celý semeník a produkuje konidie, které se vytvářejí přibližně 7 dnů po infekci společně s medovicí (3) (Lee, 2009), jejíž přítomnost značí úspěšnou infekci hostitelské rostliny. Velkou část této kapaliny kromě konidií tvoří cukry – atraktivní lákadlo

pro hmyz, který je přenáší mezi jednotlivými rostlinami, dochází k druhé fázi infekce tzv. sekundární infekci trav a obilovin (4). Produkce medovice se po dvou týdnech zastavuje, následuje vývoj tuhého sklerocia, které se vytváří z infikovaných semeníků. Sklerocia dozrávají po 5 týdnech (5), kdy vypadávají na zem, kde přezimovávají (6). Jakmile teplota vzroste na 20 °C, sklerocia začnou klíčit (7) a vytvoří stromata (8), celý cyklus se opakuje (Tudzynski *et* Scheffer, 2004).



Obr. 2: Životní cyklus houby *Claviceps purpurea* (Hulvová *et al.*, 2013).

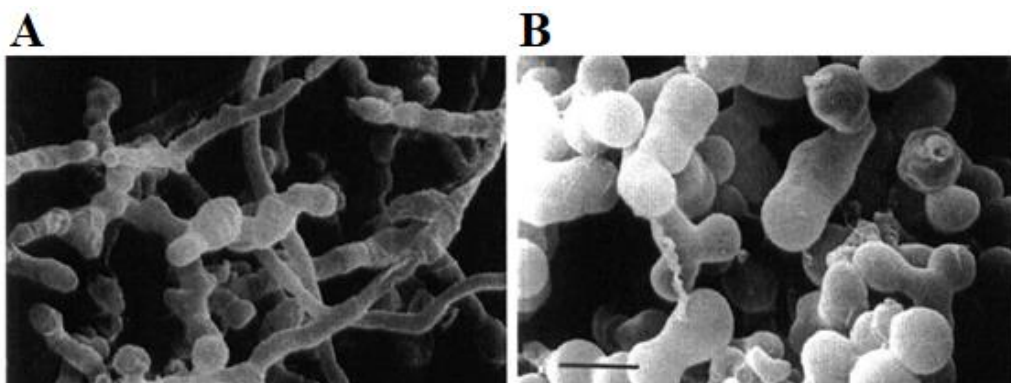
- 1: odkrytý květ žita
- 2: pronikání hyf semeníkem
- 3: tvorba medovice
- 4: sekundární přenos infekce hmyzem
- 5: tvorba zralých sklerocií
- 6: hibernace sklerocií
- 7: klíčení sklerocií
- 8: uvolnění askospor

3.1.3.2 Kmeny *C. purpurea* produkující alkaloidy v submerzní kultuře

Některé kmeny *C. purpurea* jsou schopné za určitých podmínek (např. přítomnost Trp v médiu, vysoký osmotický tlak média, nízká hladina fosfátu) produkovat alkaloidy v submerzní kultuře (kultivace probíhající v tekutém médiu, které je neustále třepáno a provzdušňováno), nicméně nikdy nedochází ke tvorbě sklerocií (Řeháček *et al.*, 1971; Robbers *et al.*, 1972; Mantle *et Nisbet*, 1976). Některé z těchto kmenů si ponechaly schopnost sporulace (spory bývají většinou haploidní a využívají se k selekci homokaryotické kultury), jiné kultury (např. P1) tuto schopnost v průběhu mutagenese ztratily (Tudzynski *et al.*, 1999).

Tyto kmeny byly z velké části získány UV mutagenézí nebo použitím mutagenních sloučenin jako jsou ethymethansulfonát (EMS) nebo N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) (Strnadová, 1964; Brauer *et Robbers*, 1987). Jinou možností selekce představuje screening na základě morfologie či pigmentace nebo na základě zvýšené aktivity tryptophan syntasy či jiných enzymů zapojených do biosyntézy tryptophanu nebo alkaloidů (Schmauder *et Gröger*, 1983).

V submerzní kultuře rozlišujeme celkem tři fáze růstu kultury – růst kolonie na pevném médiu, růst vegetativního mycelia (A) tzv. vegetativní prekultury a tvorbu produkčního mycelia (B) (Didec-Brumec *et al.*, 1996). Obecně jsou tyto kmeny kultivovány na živných médiích a dále očkovány z jednoho tuhého média na další buď pomocí částí mycelií nebo spor. Jak části mycelií, tak i spory se dále rozrůstají a vytváří tzv. vegetativní mycelium. Toto mycelium je tvořeno dlouhými hyfami s tenkými buněčnými stěnami, velkým počtem jader, malými vakuolami a několika mitochondriemi, buňky obsahují málo lipidů (Obr. 3). Na druhou stranu kultura produkující alkaloidy má zcela odlišnou morfologii – hyfy jsou krátké a tlusté (tzv. polyedrické) se silnou buněčnou stěnou, buňky obsahují redukované množství jader a mitochondrií, velké vakuoly a velké množství lipidů v cytoplazmě (Lösecke *et al.*, 1980, 1982; Spalla, 1973).



Obr. 3: Porovnání vegetativního a produkčního mycelia. Čára představuje 10 μm (Didec-Brumec *et al.*, 1996).

A: vegetativní mycelium

B: produkční mycelium

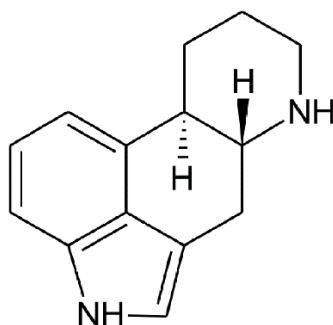
Největší problém v případě submerzních kultur rodu *Claviceps* představuje degenerace těchto kultur. U *C. paspali* bylo dokázáno, že během pasážování dochází k morfologickým změnám kultury a zároveň k velmi výraznému poklesu v produkci alkaloidů. Po několika kolech opakované kultivace bylo možné pozorovat na miskách s *C. paspali* dva typy kolonií – hnědé produkující sporulující mycelium a bílé neprodukující nesporelující kolonie, jejichž počet se zvyšoval se zvyšujícím se počtem kultivací, až nakonec, na poslední misce po 10. kultivaci bylo možné pozorovat pouze tyto bílé kolonie (Segal *et* Germanier, 1974). Obecně lze říci, že tyto kmeny lze rozkultivovat 6–9krát, aniž by došlo k významnému poklesu v produkci alkaloidů (Malinka *et al.*, 1988). Je tedy naprosto nezbytné udržovat tyto kultury jak na živných médiích, tak je i dlouhodobě uskladnit, tak, aby se co nejvíce eliminovaly biologické efekty spojené s transferem kultury a jejím stárnutím (Hwang, 1966; Mizrahi *et* Miller, 1968).

3.2 Námelové alkaloidy

Námelové alkaloidy jsou indolové sloučeniny odvozené od L-tryptofanu. V přírodě představují největší skupinu dusíkatých houbových metabolitů (Schiff, 2006). S objevem fosilního druhu *Paleoclaviceps parasiticus* se výskyt námelových hub datuje již od křídy (Poinar *et al.*, 2015). Zdrojem námelových alkaloidů kromě rodu *Claviceps* mohou být i jiné rody hub z oddělení vrčkovýtrusných např. *Penicillium* (Kozlovsky *et al.*, 2005; Zhelifonova *et al.*, 2010), *Aspergillus* (Coyle *et* Panaccione, 2005; Rigbers *et* Li, 2008) a *Epichloë* (Leuchtmann *et al.*, 2000; Guerre, 2015). Symbióza s rody *Epichloë* přináší pro hostitele řadu výhod, mezi které patří např. zvýšená odolnost vůči suchu a odolnost vůči hmyzu a patogenům. Na druhou stranu produkce námelových alkaloidů s sebou nese i řadu nevýhod. Jednou z nich je například tvorba indolových diterpenů způsobujících třes u ovcí a dalších pasoucích se zvířat. Mezi symptomy toxicity námelovými alkaloidy u pasoucích se zvířat patří zvýšená teplota, snížená laktace a fertilita, vasokonstrikce a suché gangrény se ztrátou kopyt (Burke *et al.*, 2001; Gadberry *et al.*, 2003). Ekologický význam námelových alkaloidů není ještě zcela prostudován, avšak již nyní existují důkazy o tom, že poskytují ochranu samotné houbě nebo jejímu rostlinnému hostiteli před požíváním hmyzem a savci (Florea *et al.*, 2017).

3.2.1 Chemická struktura námelových alkaloidů

Většina námelových alkaloidů produkovaných *C. purpurea* obsahuje tetracyklický ergolinový kruh (Obr. 4). Výjimku však tvoří přirozené klavinové alkaloidy, které jsou tricyklické, a jejichž prekurzorem je chanoklavin-I. Jedná se například o chanoklavin-II a isochanoklavin-I (Křen *et* Cvak, 1999).



Obr. 4: Chemická struktura ergolinu (Hulvová *et al.*, 2013).

Ergolinový kruh, který je syntetizován z tryptofanu, methylové skupiny S-adenosyl methioninu a izoprenové jednotky odvozené od kyseliny mevalonové, může být methylován v pozici N-6 nebo substituován v pozici C-8. Podle substituentu v pozici C-8 pak mohou být námelové alkaloidy rozděleny do tří skupin – klavinové alkaloidy, alkaloidy kyseliny D-lysergové a její jednoduché deriváty a peptidové alkaloidy (ergopeptidy) (Schiff, 2006).

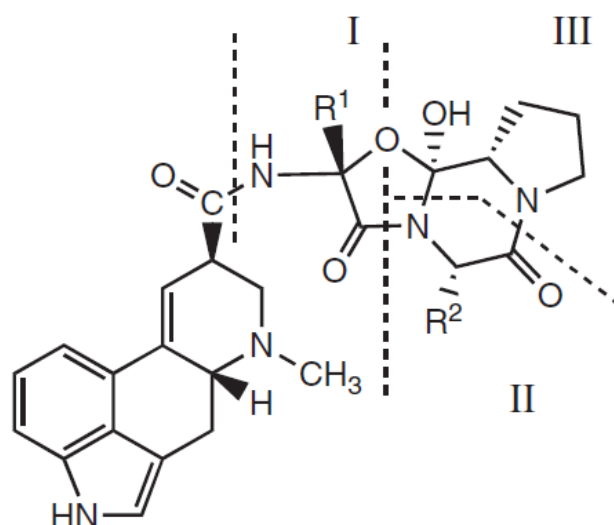
Klavinové alkaloidy obsahují tricyklický (6,7-sekoergoliny) nebo kompletní tetracyklický systém (ergoliny). Tyto alkaloidy mohou obsahovat dvojnou vazbu v pozicích 8, 9 nebo 9, 10 nebo mohou mít v pozici 8 a nebo 9 navázaný další substituent, kterým obvykle bývá methylová, hydroxylová nebo hydroxymethylová skupina (Křen *et Cvak*, 1999). Z izolovaných 35 klavinových alkaloidů nemá ani jeden lékařské využití (Schiff, 2006).

Vzhledem k velmi snadné izomeraci kyseliny lysergové na kyselinu isolysergovou, existuje většina derivátů této kyseliny ve dvou izomerních formách. Deriváty kyseliny lysergové mohou být na základě amidace C-8 karboxylové skupiny rozděleny do dvou typů sloučenin: jednoduché nepeptidové amidy, které nesou malé uhlíkaté řetězce a peptidové amidy, které se vyskytují ve formě tripeptidů (Roberts *et al.*, 2009).

Mezi běžné 5R,8R-nepeptidové amidy patří ergometrin, methylergometrin, kyselina paspalová a synteticky připravovaný diethylamid kyseliny lysergové (LSD). Ergometrin (též ergonovin nebo ergobasin), odvozený od kyseliny D-lysergové a 2-aminopropanolu, je produkován některými druhy *C. purpurea* společně s ergopeptidy. Amidové deriváty kyseliny lysergové mají významný farmakologický účinek (Schiff, 2006). Ergonovine a jeho semisyntetický derivát methylergonovin a methylsergid nacházejí uplatnění v gynekologii a porodnictví k prevenci a léčbě poporodního krvácení (de Groot *et al.*, 1998).

U ergopeptidových alkaloidů rozlišujeme ergopeptiny a ergopeptamy. Ergopeptiny jsou tvořené jednou β -aminokyselinou – kyselinou lysergovou, 9,10-dihydrolysergovou nebo 8-hydroxylysergovou kyselinou a třemi α -aminokyselinami tvořícími tzv. cyklol (Obr. 5) (Křen *et Cvak*, 1999). Ergopeptiny jsou konečné produkty biosyntetické dráhy námelových alkaloidů. Rozmanitost těchto sloučenin zajišťuje tripeptidový komplex, jehož součástí je L-prolin, který

představuje v pořadí vždy třetí aminokyselinu. Podle výskytu jednotlivých aminokyselin na pozici jedna a dva lze rozlišit několik ergopeptinů (Tab. 1). Ergopeptamy jsou necyklolové alkaloidy, mezi které patří např. ergokristam, ergokomam a α -ergokryptam (Flieger *et al.*, 1981).



Obr. 5: Základní struktura ergopeptinů, které se navzájem liší v navázaných aminokyselinách v pozici I a II. Aminokyselina v pozici III je vždy L-prolin (Schardl *et al.*, 2006).

Tab. 1: Rozdělení ergopeptinů podle aminokyselin v pozici I a II. (Haarmann *et al.*, 2005).

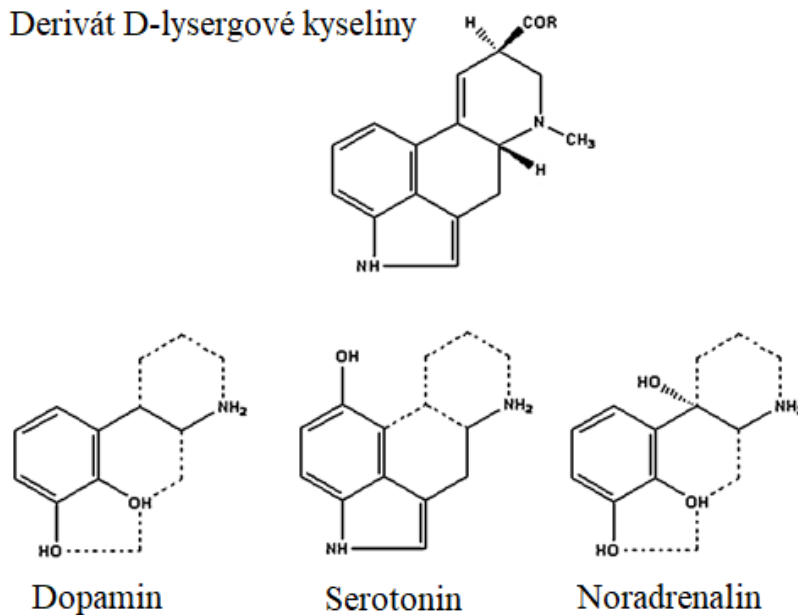
Pozice II	Pozice I		
	Alanin	Kyselina α -amino butanová	Valin
Fenylalanin	Ergotamin	Ergostin	Ergokristin
Leucin	α -Ergosin	α -Ergoptin	α -Ergokryptin
Isoleucin	β -Ergosin	β -Ergoptin	β -Ergokryptin
Valin	Ergovalin	Ergonin	Ergokornin
Kyselina α -amino butanová	Ergobin	Ergobutin	Ergobutyryn

3.2.2 Farmakologický účinek

Přírodní námelové alkaloidy mají široký specifický účinek, a tak mohou vyvolat nežádoucí vedlejší účinky. Proto je nutné tyto přírodní látky chemicky upravit, aby se zúžila jejich specifita (Vendrell *et al.*, 2007).

Farmakologická aktivita námelových alkaloidů, konkrétně derivátů kyseliny D-lysergové je zajištěna na základě jejich strukturní podobnosti se třemi neurotransmitery: noradrenalinem, dopaminem a serotoninem (Obr. 6). Přičemž alkaloidy jsou schopny reagovat s receptory pro tyto neurotransmitery (Berde *et Stürmer*, 1978). Substituent, který je navázaný na karboxylové skupině D-lysergové kyseliny poté určuje vztah alkaloidů k neurotransmiterům – mohou působit jako agonisté nebo antagonisté (Stadler *et Giger*, 1984).

Derivát D-lysergové kyseliny



Obr. 6: Srovnání podobnosti struktur neurotransmiterů s deriváty D-lysergové kyseliny (Haarmann *et al.*, 2009).

Farmakologické účinky klavinových alkaloidů byly prokázány pouze u druhu *Aspergillus fumigatus*. Obě sloučeniny 9-deacetoxyfumigaklavin a 9-deacetylumigaklavin vykazují cytotoxický účinek proti lidským leukemickým buňkám (Gee *et al.*, 2009).

Z alkaloidů odvozených od kyseliny lysergové se v lékařství hojně využívají ergometrin, ergotamin a dihydroergotamin. Ergometrin, první syntetizovaný námelový alkaloid, našel využití v prevenci a léčbě poporodního krvácení. Tento alkaloid stimuluje hladkého děložního svalstvo, což způsobuje zvýšení rychlosti a síly kontrakce, stimulační efekt souvisí s agonistickými účinky na serotoninové receptory 5-HT₂ (5-hydroxytryptamin) (Schiff, 2006). Ergotamin byl izolován jako čistá látka v roce 1918 Arthurem Stollem a patří mezi nejdůležitější ergopeptidy produkované *C. purpurea* (van Dongen *et de Groot*, 1995). Společně se svým semi-syntetickým derivátem dihydroergotaminem se využívají k léčbě migrény (Wallwey *et Li*, 2011).

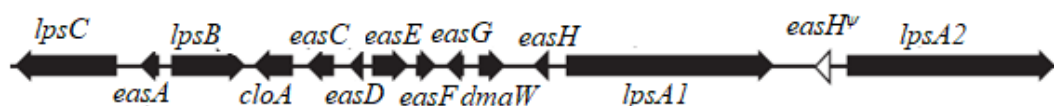
Mezi další farmakologicky významné alkaloidy patří dihydroergotoxin a bromkryptin. Dihydroergotoxin, směs několika ergopeptidů, se využívá ke snížení vysokého krevního tlaku a k léčbě mozkové dysfunkce u starších osob (de Groot *et al.*, 1998), neboť ergotoxiny působí jako inhibitory při uvolňování peptidového hormonu prolaktinu. Bromkryptin se využívá k léčbě Parkinsonovy nemoci a hyperprolaktinémie, inhibuje uvolnění prolaktinu z hypofýzy (Wallwey *et Li*, 2011).

Ze semi-syntetických derivátů námelových alkaloidů je nejznámější diethylamid kyseliny lysergové známý pod názvem LSD. Tato látka byla vyvinuta pro léčbu psychických poruch (Wallwey *et Li*, 2011). V roce 1938 byla syntetizována Albertem Hofmannem a následně

testována jako antidepresivum pro léčbu schizofrenie a alkoholismu (Hofmann, 1980). Přestože během testování byla prokázána paranoia, našla tato sloučenina uplatnění v léčbě neuróz, sexuálních dysfunkcí a již zmíněné schizofrenie (Tudzynski *et al.*, 2001). Díky svým halucinogenním účinkům bylo používání této látky v 60. letech téměř na celém světě zakázáno (Haarmann *et al.*, 2009).

3.2.3 Biosyntéza námelových alkaloidů u *C. purpurea*

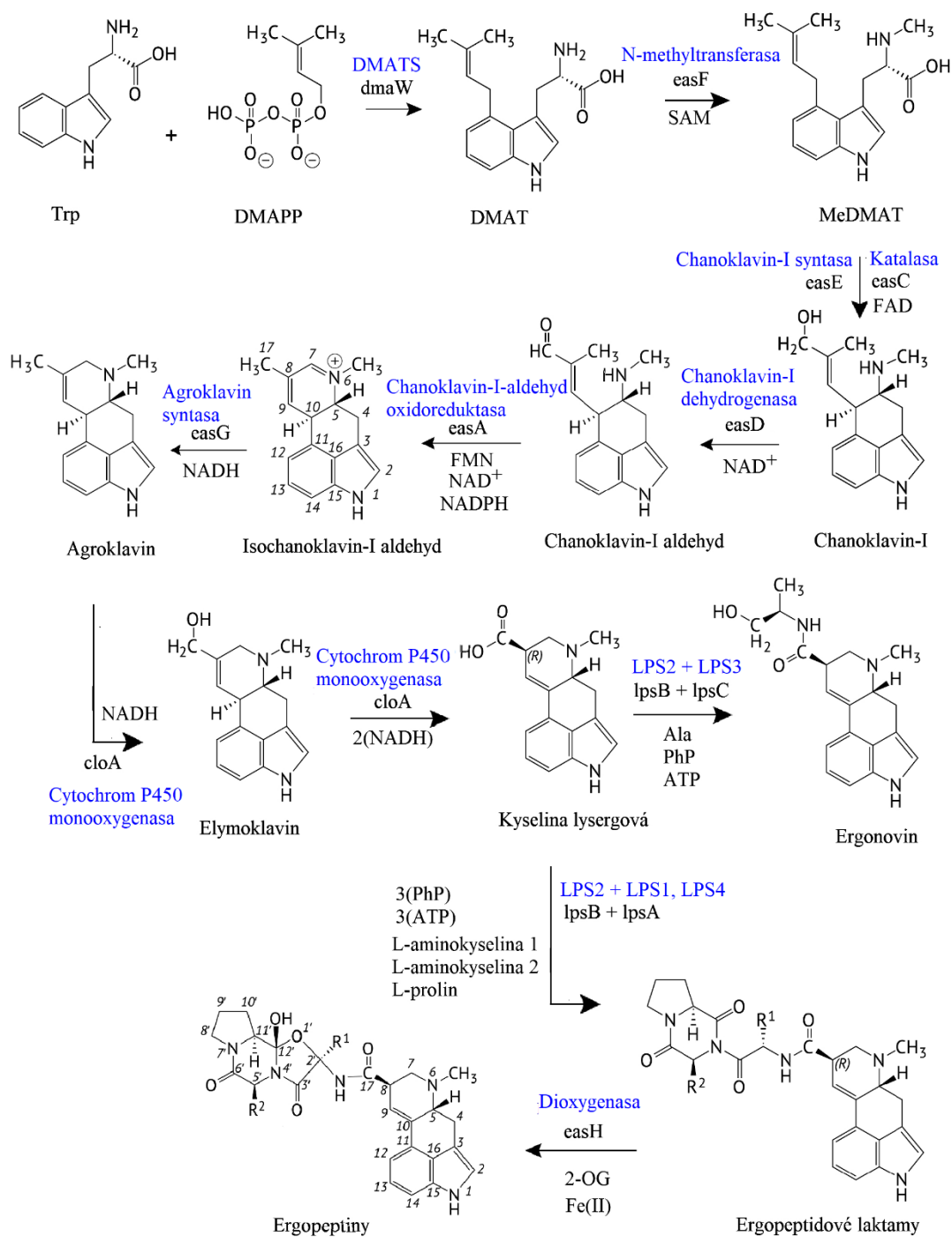
Geny pro biosyntézou sekundárních metabolitů v houbách jsou většinou uspořádány do jednoho kontinuálního segmentu na chromozomu neboli klastru (Hoffmeister *et Keller*, 2007). Pomocí metody „chromosome walking“ byl jako první v *C. purpurea* identifikován klastr genů pro biosyntézu námelových alkaloidů (tzv. EAS klastr) (Tudzynski *et al.*, 1999). Tento klastr obsahuje celkem 14 genů - *dmaW*, *easF*, *easC*, *easE*, *easD*, *easA*, *easG*, *cloA*, *lpsB*, *lpsA1*, *lpsA2*, *lpsC*, *easH* a *easH^v* (Obr. 7), jeho velikost je více než 68,5 kb (Wallwey *et Li*, 2011; Schardl *et al.*, 2013). V dalším rozvoji výzkumu *C. purpurea* sehrála také velký význam sekvenace genomu *C. purpurea* 20.1 (Schardl *et al.*, 2006).



Obr. 7: Schéma genového klastru pro biosyntézu námelových alkaloidů v *C. purpurea*. (upraveno podle Florea *et al.*, 2017).

Na základě izotopicky značených prekurzorů bylo zjištěno, že mezi prekurzory ergolinového systému patří tři primární metabolity: L-tryptophan (L-Trp), dimethylallyldifosfát (DMAPP) a methionin, přičemž DMAPP slouží jako donor izoprenové jednotky a methionin jako donor methylové skupiny (Floss 1976; Groger *et Floss*, 1998).

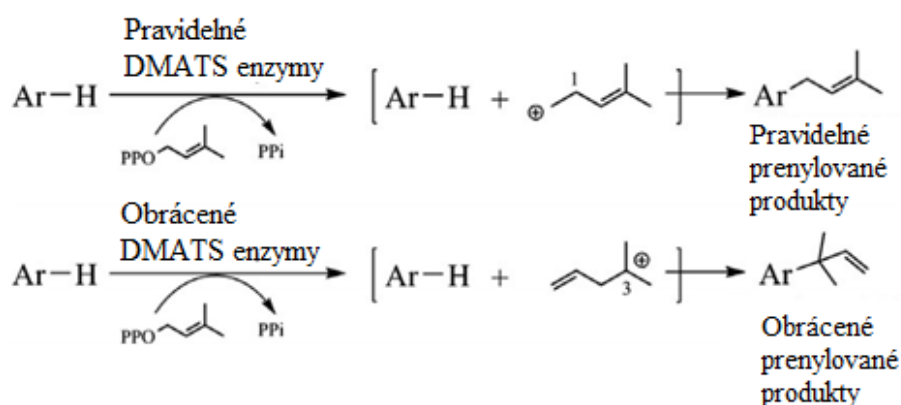
Biosyntetická dráha námelových alkaloidů (Obr. 8) začíná prenylací L-tryptophanu s DMAPP za vzniku 4- γ,γ -dimethylallyltryptophanu (DMAT). Reakce je katalyzována 4-dimethylallyltryptophan syntasou (DMATS) (Heinstein *et al.*, 1971; Gebler *et al.*, 1992). Příslušný gen byl označen jako *dmaW* (Tsai *et al.*, 1995).



Obr. 8: Schéma biosynthetické dráhy námelových alkaloidů u *C. purpurea*. Názvy enzymů jsou zapsány modře (upraveno podle Florea *et al.*, 2017).

DMAT, 4- γ , γ -dimethylallyltryptophan
 DMATS, 4-dimethylallyltryptophan syntasa
 DMAPP, dimethylallyldifosfát
 Me-DMAT, N-methyl-dimethylallyltryptophan
 LPS, neribozomální peptidová syntasa
 PhP, 4'-fosfopantetein
 2-OG, 2-oxoglutarát
 SAM, S-adenosylmethionin

DMATS je první specifický enzym biosyntézy námelových alkaloidů, který byl izolován a purifikován z mycelia *C. purpurea* SD 58 (Heinstein *et al.*, 1971, Lee *et al.*, 1976). Tento enzym katalyzuje prenylaci L-Trp na C-4 indolovém kruhu (Unsöld *et Li*, 2005; Steffan *et al.*, 2009). S vývojem bioinformatických přístupů bylo v roce 2012 analyzováno téměř 200 genů z houbových genomů se sekvenční homologií na DMATS. Celkem bylo nalezeno 17 enzymů s podobnou funkcí jako DMATS (Li, 2009; Yin *et al.*, 2010, Liu *et Walsh*, 2009; Zou *et al.*, 2010). Obecně všechny prenyltransferasy reagují s DMAPP a katalyzují reakce na aromatických substrátech v pravidelném nebo obráceném připojení (Obr. 9) (Luk *et Tanner*, 2009; Yin *et al.*, 2010). V případě pravidelné prenyltransferasy je prenylová část připojena přes C-1 k aromatickému jádru (jedná se např. o DMATS *C. purpurea*). Oproti tomu obrácená prenyltransferasa katalyzuje spojení prenylových skupin přes C-3 k aromatickému substrátu.



Obr. 9: Pravidelná a obrácená prenylace katalyzovaná prenyltransferasami z nadrodiny DMATS (Yu *et Li*, 2012).

Co se týče DMATS *C. purpurea* SD58, Lee *et al* (1976) popsali, že se jedná o monomerní protein s molekulovou hmotností 70–73 kDa, zatímco podle Cress *et al* (1981) se jedná o homodimer s velikostí podjednotky 34 kDa. Poslední analýzu pomocí gelové filtrační chromatografie a SDS-PAGE provedli Gebler *et Poulter* (1992), kteří přečistili DMAT syntasu z *C. fusiformis* a charakterizovali ji jako homodimerický protein s molekulovou hmotností 105 kDa a s velikostí podjednotky 52 kDa. Narozdíl od ostatních prenyltransferas je DMAT syntasa *C. purpurea* aktivní i v nepřítomnosti dvojmocných kovových iontů (Gebler *et Poulter* 1992).

Druhým krokem biosyntézy námelových alkaloidů je methylace DMAT za vzniku N-methyl dimethylallyltryptofanu (MeDMAT). Tento krok je katalyzován 4-dimethylallyltryptofan N-methyltransferasou, která je kódována genem *easF*. Dárce methylové skupiny je S-adenosylmethionin (SAM) (Otsuka *et al.*, 1980).

Následně dochází k několika oxidačním a redukčním reakcím, které vedou k tvorbě chanoklavinu-I, poté chanoklavinu-I aldehydu a agroklavinu. Chanoklavín-I syntasa, kódována

genem *easE*, patří mezi flavin-dependentní oxidoreduktasy a podílí se na oxidaci MeDMAT na chanoklavin-I (Lorenz *et al.*, 2010). Dalším enzymem, který se podílí na této konverzi je katalasa kódovaná genem *easC*.

Chanoklavin-I se dále oxiduje na chanoklavin-I aldehyd pomocí chanoklavin-I dehydrogenasy, která je kódována genem *easD* (Wallwey *et al.*, 2011). Poté následuje izomerizace dvojné vazby chanoklavin-I aldehydu za vzniku isochanoklavin-I aldehydu. Reakce je katalyzována chanoklavin-I-aldehyd oxidoreduktasou (tzv. old yellow enzyme), která je kódována genem *easA* (Coyle *et al.*, 2010). Isochanoklavin-I aldehyd se dále redukuje na agroklavin pomocí agroklavin syntasy v přítomnosti NADPH. Agroklavin syntasa je kódována genem *easG* (Matuschek *et al.*, 2011).

Dalšími kroky biosyntetické dráhy je oxidace agroklavinu na elymoklavin a jeho následná oxidace na kyselinu lysergovou v případě *C. purpurea* a kyselinu paspalovou v případě *C. paspali* (Kim *et al.*, 1983; Robinson *et al.*, 2015). Tento krok je katalyzovaný NADPH-dependentní cytochrom P450 monooxygenasou, která je kódována genem *cloA* (Haarmann *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2014). Tento enzym je s největší pravděpodobností zodpovědný za všechna tři kola 2 elektronové oxidace, která jsou zapotřebí ke vzniku lysergové kyseliny z agroklavinu (Haarmann *et al.*, 2006).

Genový klastř pro biosyntézu ergopeptinů u *C. purpurea* je tvořen čtyřmi geny, které kódují neribozomální peptidové syntetasy: *lpsA1*, *lpsB*, *lpsC* a *lpsA2*. Gen *lpsA1* kóduje trimodulární lysergyl peptidovou syntasu LPS1, která má podobnou funkci jako syntasa LPS4, která je kódována genem *lpsA2* (Haarmann *et al.*, 2005). Jejich odlišnost spočívá nejspíše ve schopnosti vázat různé aminokyseliny, které se využívají pro tvorbu ergopeptinů. V kmeni *C. purpurea* P1, který produkuje ergotamin jako hlavní alkaloid a α -ergokryptin jako minoritní, je enzym LPS4 s největší pravděpodobností zodpovědný za tvorbu α -ergokryptinu, zatímco enzym LPS1 katalyzuje tvorbu ergotaminu (Haarmann *et al.*, 2005). Gen *lpsB* kóduje monomodulární enzym LPS2 a gen *lpsC* kóduje monomodulární syntasu LPS3 (Haarmann *et al.*, 2005). Enzym LPS2 aktivuje řetězec D-lysergové kyseliny pro syntézu ergopeptidového laktamu (Walzel *et al.*, 1997). Po aktivaci je kyselina přenesena na enzym LPS1, který obsahuje tři domény pro vazbu L-aminokyselin. Po navázání všech čtyř substituentů dochází ke vzniku ergopeptidového laktamu (Riederer *et al.*, 1996; Correia *et al.*, 2003). Následná oxidativní cyklizace laktamu je katalyzována dioxygenasou, která je kódována genem *easH*, jedná se o konečný krok tvorby ergopeptinů (Havemann *et al.*, 2014). Gen *easH*^v je pravděpodobně pseudogenem (Schardl *et al.*, 2006). LPS2 společně s LPS3 katalyzuje biosyntézu ergonovinu, který vzniká vytvořením peptidové vazby mezi L-alaninem a karboxylovou skupinou D-lysergové kyseliny (Ortel *et al.*, 2009).

3.2.4 Regulace biosyntézy námellových alkaloidů

Na rozdíl od většiny klastrů zodpovědných za biosyntézu sekundární metabolitů v jiných houbách, nebyl doposud v klastru pro biosyntézu námellových alkaloidů rodu *Claviceps* identifikován žádný gen, kódující transkripční faktor. Předpokládá se však, že gen *easG* by mohl být vhodným kandidátem kódující regulační faktor. Ortologní geny se nacházejí v klastrech druhu *C. fusiformis*, *Neotyphodium lolii* a *Aspergillus fumigatus* a vykazují určitou podobnost s proteiny NmrA, které mají regulační funkci u jiných hub (Lorenz *et al.*, 2009).

3.2.4.1 Vliv koncentrace fosfátu

U kmenů *C. purpurea*, které produkují alkaloidy v submerzní kultuře je biosyntéza námellových alkaloidů regulována koncentrací fosfátu v kultivačním médiu, tzv. fosfátový efekt (Robbers *et al.*, 1972; Pažoutová *et Řeháček*, 1984). Obecně lze říci, že vysoká koncentrace anorganického fosfátu inhibuje syntézu alkaloidů, zatímco nízká koncentrace fosfátu má pozitivní efekt na produkci alkaloidů. Navíc bylo dokázáno, že téměř všechny geny z klastru mají rozdílnou expresi v závislosti na nízké a vysoké koncentraci fosfátu. Při nízké koncentraci fosfátu jsou transkribovány geny *dmaW*, *lpsA1* a *lpsB*, zatímco při vysoké koncentraci fosfátu nebyla transkripce těchto genů téměř detekována (Correia *et al.*, 2003).

3.2.4.2 Vliv koncentrace Trp

Nejvýznamnější sloučeninou, která zvyšuje produkci alkaloidů v médiu je Trp. Jak již bylo řečeno, jedná se o jeden z hlavních prekurzorů biosyntézy alkaloidů, jehož aktivační role byla rozpoznána v roce 1964 (Floss *et Mothes*, 1964). Vzhledem k tomu, že transport Trp je závislý na intracelulární koncentraci Trp, na teplotě a pH a preferován je L-Trp, předpokládá se, že je tento transport zprostředkován specifickými permeasami (Robertson *et al.*, 1973).

















Obecně lze říci, že použitím tryptofanu lze částečně překonat fosfátový efekt – indukovanou inhibici syntézy námellových alkaloidů (Robbers, 1984). Spekuluje se, že zvýšení produkce alkaloidů vyvolané přidáním Trp do média s nízkým i vysokým obsahem fosfátu by mohla souviset se zvýšením aktivity DMAT syntasy (Krupinski *et al.*, 1976). Navíc Trp slouží nejen jako substrát pro DMATS, ale také tento enzym allostericky aktivuje. Pro maximální dosažení stimulace je potřeba přidat tryptofan do média během růstové fáze (Didec-Brumec *et al.*, 1996).

3.2.4.3 Modifikace histonů

V aktivaci a represí genů, kódující sekundární metabolity u hub mají též důležitý význam histonové modifikace. Bok *et Keller* (2004) objevili, že histon methyltransferasa – LaeA má významnou funkci pro regulaci klastru v rodu *Aspergillus*. Delecí genu *laeA* došlo kablokování exprese několika genů v klastru, zatímco nadexpresí byla pozorována zvýšená

transkripce a tvorba produktů. Sekvence genomu ukázala, že biosyntetické geny se nacházejí v oblasti telomer, které jsou bohaté na heterochromatin (Rehmeier *et al.*, 2006). LaeA protein pocházející z *A. nidulans* může iniciovat přeměnu heterochromatinu na euchromatin, interferencí prostřednictvím methylas nebo deacetylas spojenou se změnou struktury histonů. Proto se předpokládalo, že nadměrná exprese genu *laeA* z *A. nidulans* povede k aktivaci genů klastru pro námelové alkaloidy v různých kmenech *C. purpurea*. Pro analýzu exprese genu *laeA* byl použit kmen 20.1, který produkuje alkaloidy pouze v hostitelské rostlině nikoliv v axenické kultuře, mutantní kmen P1 schopný produkovat alkaloidy v axenické kultuře a kmen ECC93 produkující malé množství alkaloidů v axenické kultuře. Analýzy ukázaly, že gen *laeA* z *A. nidulans* nemá žádný vliv na expresi genů z klastru v různých kmenech *C. purpurea* (Lorenz *et al.*, 2009).

Testování hypotézy, zda acetylace/deacetylace histonů ovlivňuje expresi genů v klastru *C. purpurea* bylo provedeno s použitím dvou syntetických inhibitorů: histon acetyltransferas (HATi) a histon deacetylas (HDACi), z nichž jeden byl vždy součástí kultivačního média. Kmen P1 *C. purpurea* byl kultivován jak na médium T25N, které indukuje tvorbu alkaloidů, tak i na médiu BII, které neindukuje tvorbu alkaloidů. Kultivace byla ukončena po 7 dnech. Jako kontrola byla použita kultura, která byla inkubována bez jakýkoliv inhibitorů v médiu. Test byl vyhodnocen Van Urk testem (Obr. 10) (Ehmann, 1977).

HDACi	kontrola	HC-toxin	SAHA	ST17
medium				
T25N				
BII				
T25N				
BII				
HATi	kontrola	garcinol	w51	w56
medium				

Obr. 10: Účinky inhibitorů HDACi a HATi na produkci námelových alkaloidů v kmenu P1 *C. purpurea*, která byla kultivována buď v indukovaném T25N médiu nebo neindukovaném BII médiu. Jako kontrola byla použita sloučenina DMSO. Modré zbarvení značí produkci alkaloidů – Van Urk test (Ehmann, 1977; Lorenz *et al.*, 2009).

Podle výsledků je biosyntéza alkaloidů inhibována přidavkem HDACi, zatímco přidavkem HATi došlo k masivní indukci biosyntézy, nezávisle na kultivačních podmínkách. Tyto výsledky ovšem nekorelují s obecným modelem, kdy HDACi stimulují acetylaci histonů, přičemž dochází k rozvolnění heterochromatinu na euchromatin, který je více přístupný expresi genů, a tak by HDACi měly zvyšovat hladinu alkaloidů a HATi snižovat. Možným vysvětlením je, že přeměna chromatinu nepůsobí přímo na klastr, ale na neznámý represor biosyntézy alkaloidů, který je pomocí HDACi aktivován, zatímco HATi omezují jeho aktivitu (Lorenz *et al.*, 2009).

3.2.4.4 Inhibice koncovým produktem

U kmenů *C. purpurea*, které produkují kyselinu lysergovou a její deriváty, nikoliv ergopeptiny, je biosyntéza alkaloidů inhibována koncovými produkty dráhy – elymoklavinem a agroklavinem. Elymoklavin inhiboval purifikovanou DMAT syntetasu z 90 %, agroklavín vykazoval 70 % inhibici. Navíc *in vitro* studie ukázaly, že elymoklavín též inhibuje enzym katalyzující tvorbu agroklavínu (Erge *et al.*, 1973), DAHP syntetasu – enzym katalyzující první krok šikimátové dráhy (Schmauder *et Groeger*, 1983) a anthranilát syntasu – klíčový enzym biosyntézy Trp, který je navíc zpětnovazebně inhibován L-Trp (Mann *et Floss*, 1977).

3.3 Metody analýzy alkaloidů

Stanovení kontaminovaného krmiva nebo potravin námelovými alkaloidy je velmi důležité pro prevenci otrav hospodářských zvířat a spotřebitelů. Enzymové imunosorbentní testy (ELISA) umožňují rychlé stanovení celkové kontaminace námelovými alkaloidy na několika vzorcích současně, ale neposkytují žádné informace o jednotlivých alkaloidech (Cody *et Valtier*, 1997). Zatímco metody, které jsou založeny na kapalinové chromatografii s fluorescenční detekcí (Storm *et al.*, 2008) nebo hmotnostní spektrometrii (Lehner *et al.*, 2005) stanovují jednotlivé námelové alkaloidy a jejich epimery, které mohou mít rozdílnou toxicitu.

Sklerocia obsahující námelové alkaloidy nejsou homogenně distribuována mezi zrny, a tak musí být velikost vzorků poměrně velká (1–5 kg). Vzorky je potřeba vysušit a zaznamenat ztrátu hmotnosti (Krska *et al.*, 2008a). Naměřený obsah alkaloidů je poté potřeba zkorrigovat na původní váhu. Sklerocia bývají již dlouho kvantifikována mikroskopicky, avšak nyní jsou k dispozici sofistikované a automatizované metody pro počítání sklerocií přímo v klasech (Köppen *et al.*, 2013).

K instrumentálním metodám, které měří obsah celkových nebo jednotlivých alkaloidů patří enzymově spojené imunosorbentní testy (ELISA), kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (LC-FLD) či ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS)

a nejdůležitější vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která byla odvozena od klasické kolonové chromatografie. Mezi další alternativní metody patří plynová chromatografie spojená s hmotností spektrometrií (GC-MS), chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a kapilární zónová elektroforéza (CZE) (Crews, 2015).

Výše zmíněné instrumentální metody vyžadují účinnou extrakci alkaloidů a určitý stupeň přečištění. Během přípravy vzorků je důležité dodržovat jednotlivé postupy, aby nedošlo k jejich epimerizaci. Aktivní a neaktivní izomery nelze rozlišit barevnými reakcemi pro námelové alkaloidy (Crews, 2013).

3.3.1 Spektroskopie, kolorimetrie

K detekci námelových částic v obilovinách mohou být využity metody založené na vizuálním či spektroskopickém stanovení. Tyto metody vyžadují průchod vzorku – obilovin o určité hmotnosti (např. 250 g) přes řadu sít a sbírání frakce o průměrné velikosti 1–3,5 mm (Komarova *et* Tolkachev, 2001).

První kolorimetrický test sloužící ke kvantitativní spektroskopické analýze byl založený na reakci námelových alkaloidů s koncentrovanou kyselinou sírovou (Tanret, 1875). Mezi nejčastěji používaná činidla patří Ehrlichovo, Allportovo a Van Urkovo činidlo, obsahující p-dimethylaminobenzaldehyd (p-DMB) (van Urk, 1929; Allport *et* Cocking, 1932; Scott *et* Lawrence, 1980). Reakční mechanismus je založen na reakci dvou molekul námelových alkaloidů s molekulou p-DMB za tvorby produktu na indolovém jádře.

První semikvantitativní analytická metoda pro stanovení námelových alkaloidů, využívající stejný princip jako kolorimetrie, byla objevena Eversem (1927). O dva roky později popsal van Urk (1929) reakci námelových alkaloidů s p-DMB, která slouží pro kvantitativní analýzu. Van Urkovo činidlo obsahuje p-DMB v roztoku kyseliny sírové a reaguje s indolovými alkaloidy za vzniku modrého zbarvení s absorpční při 580 nm po expozici světlem. Činidlo bylo vylepšeno přidáním chloridu železitého a dusitanu sodného, které urychlují reakci. Tato technika se využívá při screeningových analýzách pro určení celkového obsahu námelových alkaloidů ve sklerociích (Komarova *et* Tolkachev, 2001).

Kolorimetrické testy jsou poměrně vysoce citlivé metody, jejichž intenzita zbarvení je úměrná obsahu námelových alkaloidů v roztoku. Tyto metody dokáží stanovit až 90 % aktivní složky, zatímco vedlejší produkty oxidace nejsou detekovány (Döbbelin *et* Hartmann, 1980). Na druhou stranu tyto testy nedokáží rozlišit epimery námelových alkaloidů, jednotlivé námelové alkaloidy a sloučeniny obsahující amin např. tryptophan, který lze stanovit jen při vlnové délce větší než 580 nm (Crews, 2013).

3.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie patří mezi separační metody, které jsou založeny na principu rozdílné distribuce látek ve vzorku mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní. Nepohyblivá fáze (stacionární fáze) se nachází uvnitř kolony, přes kterou proudí fáze pohyblivá (mobilní fáze).

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) byla odvozena od klasické kolonové chromatografie a patří k jedním z nejdůležitějších metod analytické chemie. Analýza metodou HPLC probíhá za vysokého tlaku, který se vytváří během transportu mobilní fáze přes kolonu pomocí čerpadla. Vzorek je unášen mobilní fází a na stacionární fázi, kterou představuje kolona, dochází k jeho zachycování. Kolony jsou složeny z částic o velikosti 3–10 μm a rozsah zachycení analytu je dán jeho afinitou k stacionární fázi.

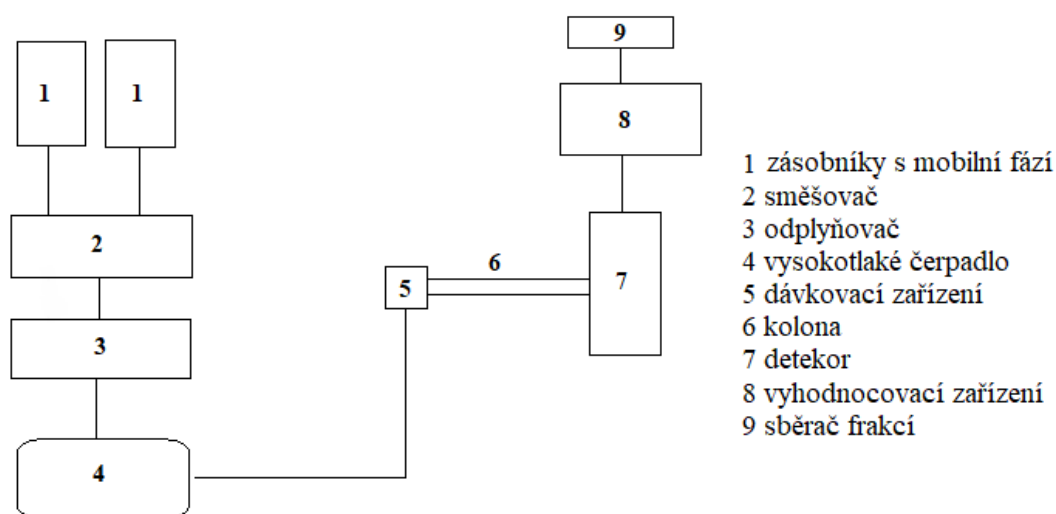
HPLC je mnohem všestrannější metoda než plynová chromatografie, jelikož není omezena na těkavé a tepelně stabilní vzorky a výběr mobilních a stacionárních fází je širší. K výhodám HPLC patří přísně kontrolované průtoky generované mechanickými pumpami na rozdíl od kapilárního toku v TLC a lepší přesnost a citlivost k UV a fluorescenční detekci. HPLC patří k nejpoužívanějším diagnostickým metodám pro nejpřesnější kvantitativní i kvalitativní analýzu námelových alkaloidů (Schoenmakers, 1986; Hanai, 1999; Shelby, 1999).

3.3.2.1 Obecný princip HPLC

Během separace (Obr. 11) je mobilní fáze vedena ze zásobníku (1) do směšovače (2), kde dochází k jejímu promíchávání a následně je vedena do odplyňovače (3). Odplynění mobilní fáze je velmi důležitý krok, proto aby nedocházelo vlivem tlaku ke tvorbě bublin v systému. Mobilní fáze je přes vysokotlaké čerpadlo (4) přiváděna přes dávkovací zařízení (5) na kolonu (6). Kolona (stacionární fáze) je nejdůležitější částí HPLC, neboť její změna má největší vliv na rozlišení analytů během metody. Nejběžnější matricí pro HPLC jsou křemičité kolony, které jsou robustní, derivatizovatelné a nemají tendenci se pod tlakem stlačovat (Wittwer *et Kluckhohn*, 1973). Oxid křemičitý je také chemicky stabilní vůči většině organickým rozpouštědlům a systémům s nízkým pH. Selektivitu stacionární nebo mobilní fáze určuje převážně struktura analyzované látky a podíl jednotlivých funkčních skupin v molekule v závislosti na přítomnosti určitých prvků (O, H, C, N) (Flieger *et al.*, 1997). Chromatografické kolony bývají nejčastěji zhotoveny z nerezové oceli, ale využívají se i skleněné nebo plastové.

Průtok mobilní fáze kolonou musí splňovat následující kritéria: být konstantní, bezpulzní a reprodukovatelný. Z kolony eluát proudí do detekčního zařízení (7) a signál z detektoru je vyhodnocován pomocí počítače nebo jiného zařízení (8). Signál se převádí do chromatografu, který vyjadřuje časovou závislost intenzity určité veličiny a je tvořen píky. Eluát může být

po odchodu z detektoru sbírán a použit pro další analýzu (9). Separace vzorku je založena na rozdílné míře migrace přes kolonu vyplývající z různého rozdělení vzorku mezi stacionární a mobilní fázi. V závislosti na rozdělení různých složek probíhá eluce v různých časech (Churáček *et Jandera*, 1981; Schwedt, 1997; Klouda 2003). K detekci se používá ultrafialové světlo (UV) (Lehner *et al.*, 2005), fluorescence (FLD) (Rottinghaus *et al.*, 1991) nebo může být analýza spojena s hmotnostní spektrometrií (MS) (Krska *et al.*, 2008b). Výběr detektoru závisí na potenciální interferenci a chemické povaze zkoumaného analytu. Pokud zkoumaná látka vykazuje slabou nebo žádnou absorpci UV, lze na nahradit UV detektor detektorem indexu lomu (RI).



Obr. 11: Obecné schéma HPLC zařízení

3.3.2.2 Analýza námelových alkaloidů

První separace námelových alkaloidů metodou HPLC na normální fázi (polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze) byla provedena na silikagelu. Námelové alkaloidy se eluovaly v pořadí: ergopeptiny > ergopeptiny > ergometrin a klaviny, což je velmi podobné s elucí na TLC deskách. Chromatografie na normální fázi je však zatížena několika nevýhodami, mezi které patří např. nízké výsledky, nenápadné píky a velká adsorpce polární složek, a proto byla později tato chromatografie nahrazena chromatografií na reverzní fázi (nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze), která se v současnosti využívá ke stanovení námelových alkaloidů v extraktech rostlin, obilovin a tělních tkáních (Szepesy *et Gazdag*, 1976; Žorž *et al.*, 1980, Crews, 2013).

Separace námelových alkaloidů metodou HPLC na reverzní fázi byla objevena v 70. a 80. letech. Nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze způsobují, že polární píky se eluují dříve než nepolární píky. Obecně platí, že kolona reverzní fáze HPLC je vyrobena zabalením kolony se sférickými silikagelovými kuličkami, které jsou pokryty hydrofóbní stacionární fází. Stacionární fáze se do matrice zavádí reakcí chlorosilanu s hydroxylovými skupinami přítomnými

na povrchu silikagelu (Gupta *et al.*, 2012). Mobilní fáze se u tohoto typu chromatografie skládá z vodného pufru a organického rozpouštědla, které nemá UV aktivitu a je mísitelná s vodou (Miyabe *et Suzuki*, 1994). Tato mobilní fáze pak ovlivňuje rozlišení, selektivitu a účinnost. Námelové alkaloidy jsou eluovány podle jejich zvyšující se hydrofobicity v pořadí: klaviny < amidy kyseliny lysergové < ergopeptiny < ergopeptininy. Ergopeptininy (8-epimery) se eluují vždy později než jejich odpovídající ergopeptiny (Nelson *et Flotz*, 1992).

U kmenů *C. purpurea* produkujících námelové alkaloidy v submerzní kultuře začíná příprava vzorku pro analýzu HPLC rozpuštěním mycelia v acetonu a 4% kyselině vinné v poměru 1:1. Po 3 h extrakci je extrakt filtrován přes skelnou vatu. Získaný vzorek je za vakua odpařen a odparek je následně rozpuštěn v 80% MeOH. U přípravy vzorku ze sklerocií je postup obdobný, nicméně extrakce probíhá pouze v přítomnosti acetonu (Pertot *et al.*, 1977). Jako eluční roztoky se u HPLC používají methanol-voda nebo acetonitril-voda, lehce upravující pH. Při alkalickém pH jsou námelové alkaloidy separovány jako volné báze, které poskytují mnohem lepší selektivitu ve srovnání s chromatografickým iontovým párem, který se vytváří při nízkém pH (Otero *et al.*, 1993).

Chromatografické chování námelových alkaloidů ve stacionární a mobilní fázi je ovlivněno pravděpodobně bazickým dusíkem N-6 s volným elektronovým párem na ergolinovém kruhu. Další faktor ovlivňující chromatografické oddělení námelových alkaloidů, například klavinů, je polarita postranního řetězce na pozici C-8 (Flieger *et al.*, 1997). Pokud by měl roztok vzorku větší polaritu než mobilní fáze, mohlo by dojít ke zkreslení píku na chromatografu (Di Mavungu *et al.*, 2012). Selektivitu chromatografické separace námelových alkaloidů a jejich epimerů určuje sterické uspořádání amidové skupiny na pozici C-8 ergolinového kruhu. Časy eluce se tak mění v závislosti na změně konfigurace na C-8. V ergopeptinech má amidová skupina pseudoequatoriální polohu k ergolinovému kruhu, zatímco ergopeptininy mají polohu pseudoaxiální, která je stabilizována intramolekulární vodíkovou vazbou bazického dusíku N-6 s vodíkem amidové skupiny na C-8 (Flieger *et al.*, 1997). Epimerické formy lze snadno oddělit pomocí gradientů mobilní fáze. Separace lze dosáhnout jak s izokratickou tak s gradientní mobilní fází. Během izokratické eluce se v průběhu analýzy nemění eluční síla mobilní fáze, zatímco během gradientové eluce eluční síla v průběhu analýzy vzrůstá (Crews, 2015).

K separaci ergotaminu a jednoduchých derivátů kyseliny lysergové se používá mobilní fáze, která je tvořena směsí acetonitrilu a roztoku uhličitanu amonného (Müller *et al.*, 2006). Nejlepších výsledků separace námelových alkaloidů a jejich epimerů bylo dosaženo se stacionární reverzní fází, silikagel chemicky ošetřen oktadecylsilanem C18 a eluční směsí acetonitrilu a vodného uhličitanu amonného nebo se stacionární fází vyrobenou ze silikagelu chemicky upraveného pomocí n-propylaminu a eluční směsí ethanolu a diethyletheru (Flieger *et al.*, 1997).

K detekci námelových alkaloidů ve sklerociu, obilných zrnech a v potravinách na bázi obilovin se nejčastěji používají fluorescenční detektory. Ergopeptiny a ergopeptininy absorbují při vlnových délkách 310 nm a dihydroergopeptiny při 280 nm (Edlund, 1981). Pro přírodní ergopeptiny je doporučována kombinace vlnových délek detektoru během excitace 310 nm a emise při 415 nm (Shelby *et al.*, 1997). Fluorescenční signál ergotaminu je přibližně dvojnásobný oproti ostatním hlavním námelovým alkaloidům *C. purpurea*. Intenzita fluorescencce a pozice maxima emisního spektra alkaloidů je závislá na pH rozpouštědla (Hooper *et al.*, 1974).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- Chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (NEB)
- *Claviceps purpurea* P1 (Tudzynski *et al.*, 1999)
- *pNDH-OGG::dmaW* (Mgr. Michaela Hradilová, nepublikováno)
- *pNDH-OGG* (Schumacher, 2012)

4.2 Použité chemikálie

- 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
- 4-dimethylaminobenzaldehyd (AppliChem)
- 6x Loading Dye vzorkovací pufr (Thermo Fisher Scientific)
- 10x NEB 3.1 pufr (NEB)
- 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergotamin (Teva Czech Industries)
- Aceton (Penta)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich)
- Agar (Himedia)
- Agarosa (Amresco)
- Amid kyseliny nikotinové (Sigma-Aldrich)
- Amoniak vodný roztok 25% (Lach:ner)
- Ampicilin (Sigma-Aldrich)
- Bromid ethidia (NeoLab)
- D-glukosa monohydrát (Lach:ner)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (AppliChem)
- DMSO (Duchefa)
- dNTPs (Fermentas)
- Dusičnan vápenatý tetrahydrát (Lach:ner)
- Dusitan sodný (Lach:ner)
- EDTA (Penta)
- Ergotamin (Teva Czech Industries)
- Ethanol 96% (Penta)
- *GoTaq* G2 Flexi DNA polymerasa (5000 U $\cdot\text{ml}^{-1}$, Promega)
- Heptahydrát síranu zinečnatého (Neo-Lab)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Lach:ner)
- Hydroxid sodný (Penta)

- Hygromycin Gold (InvivoGen)
- Chlorid hořečnatý (Promega)
- Chlorid draselný (Lach:ner)
- Chlorid sodný (Lach:ner)
- Chlorid vápenatý (Penta)
- Isopropanol (Lach:ner)
- Kvasinkový extrakt (Sigma-Aldrich)
- Kyselina citronová monohydrát (Sigma-Aldrich)
- Kyselina octová 80% (Lach:ner)
- Kyselina sírová 96% (Lach:ner)
- Kyselina vinná (Lach:ner)
- L-asparagin monohydrát (Sigma-Aldrich)
- LB Broth (Sigma-Aldrich)
- L-cystein (Erba-Lachema)
- Lyzační enzym z *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Lach:ner)
- Methanol 80% (HPLC čistota, Lach:ner)
- Nuclease-free voda (Qiagen)
- Octan draselný (Penta)
- Octan sodný (Penta)
- PEG 6000 (AppliChem)
- Pepton (Merck)
- *Pst*I restriční endonukleasa (20000 U·ml⁻¹, NEB)
- Sacharosa (Lach:ner)
- SDS (Penta)
- Síran hořečnatý heptahydrát (Penta)
- Síran železnatý heptahydrát (Sigma-Aldrich)
- Směs ergopeptinů – standard pro HPLC (Teva Czech Industries)
- Sorbitol (Duchefa)
- Tris (Duchefa)
- Trypton (Duchefa)
- Uhličitan amonný (Lach:ner)

4.3 Použité roztoky a jejich příprava

- **5mmol·l⁻¹ octan draselný:** 39,25 g octanu draselného, doplnit destilovanou vodou na 80 ml
- **0,2mol·l⁻¹ malát draselný (pH 5,2):** K 600 ml 0,2mol·l⁻¹ hydroxidu draselného přilít takové množství 0,2mol·l⁻¹ kyseliny maleinové, aby bylo pH = 5,2, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **Agarosový gel, 1% (w/v):** 1 g agarosy rozpustit ve 100 ml TAE pufru
- **InocN médium (pH 5,2):** 100 g sacharózy, 10 g monohydrátu kyseliny citronové, 0,12 g chloridu draselného, 0,5 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g heptahydrátu síranu hořečnatého, 1 g tetrahydrátu dusičnanu vápenatého, 0,075 g amidu kyseliny nikotinové, 0,006 g heptahydrátu síranu zinečnatého, 0,007 g heptahydrátu síranu železnatého, pH upravit pomocí 10% NH₄OH doplnit destilovanou vodou na 1 l, sterilizovat autoklávováním (105 °C, 15 min)
- **Kultivační BII agar (pH 5,2):** 100 g sacharózy, 5 g peptonu, 5 g L-asparaginu, 1 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g heptahydrátu síranu hořečnatého, 12 g agaru, doplnit destilovanou vodou na 1 l, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **Kultivační BII médium (pH 5,2):** 100 g sacharózy, 5 g peptonu, 5 g L-asparaginu, 1 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g heptahydrátu síranu hořečnatého, doplnit destilovanou vodou na 1 l, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **LB agar (pH 7,2):** 9,5 g chloridu sodného, 15,5 g LB Broth, 15 g agaru, doplnit destilovanou vodou na 1 l, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **LB médium (pH 7,2):** 9,5 g chloridu sodného, 15,5 g LB Broth, doplnit destilovanou vodou na 1 l, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **Lyzační pufr (pH 8,5):** 4,84 g Tris, 2,92 g chloridu sodného, 1,86 g EDTA, 1 g SDS, doplnit destilovanou vodou na 200 ml, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **Mantle agar (pH 5,2):** 100 g sacharózy, 10 g L-asparaginu, 1 g tetrahydrátu dusičnanu vápenatého, 0,25 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,25 g heptahydrátu síranu hořečnatého, 0,125 g chloridu draselného, 0,033 g heptahydrátu síranu železnatého, 0,027 g heptahydrátu síranu zinečnatého, 0,01 g L-cysteinu, 0,1 g kvasinkového extraktu, 20 g agaru, pH upravit pomocí NaOH, doplnit destilovanou vodou na 1 l, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **Mobilní fáze A:** 0,15% kyselina octová (pH = 4,4) a acetonitril v poměru 4:1
- **Mobilní fáze B:** acetonitril a destilovaná voda v poměru 4:1
- **PEG roztok (pH 7,5):** 7,5 g 25% PEG 6000, 1,5 ml 1mol·l⁻¹ chloridu vápenatého, 3 ml 1mol·l⁻¹ Tris, doplnit destilovanou vodou na 30 ml, sterilizovat filtrací (0,22 μm)

- **Protoplastizační roztok (pH 5,2):** 100 mg lyzačního enzymu z *Trichoderma harzianum*, 20 ml SMaC, sterilizovat filtrací (0,22 µm)
- **Roztok dusitanu sodného, 0,1% (w/v):** 0,1 g dusitanu sodného, doplnit destilovanou vodou na 100 ml
- **SMaC pufr (pH 5,2):** 5,88 g chloridu vápenatého, 123,88 g sorbitolu, doplnit 0,2mol·l⁻¹ malátem draselným na 800 ml, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **SOC médium (pH 7,0):** 20 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 0,5 g chloridu sodného rozpustit v 950 ml destilované vody a přidat 10 ml 0,25mol·l⁻¹ roztoku chloridu draselného. pH upravit hydroxidem sodným a objem doplnit destilovanou vodou na 1 l. Sterilizovat autoklávováním. Nakonec přidat 5 ml 2mol·l⁻¹ chloridu hořečnatého a 20 ml 1mol·l⁻¹ roztoku glukózy. Sterilizovat filtrací (0,22 µm).
- **STC pufr (pH 7,5):** 7,36 g chloridu vápenatého, 1,22 g Tris, 154,87 g sorbitolu, doplnit destilovanou vodou na 1 l, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **TAE pufr (pH 8,0):** 40mmol·l⁻¹ Tris, 1mmol·l⁻¹ EDTA
- **T25N indukční médium (pH 5,2):** 300 g sacharózy, 15 g monohydrátu kyseliny citronové, 0,12 g chloridu draselného, 0,5 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g heptahydrátu síranu hořečnatého, 1 g tetrahydrátu dusičnanu vápenatého, 0,075 g amidu kyseliny nikotinové, 0,006 g heptahydrátu síranu zinečnatého, 0,007 g heptahydrátu síranu železnatého, pH upravit pomocí 10% NH₄OH, doplnit destilovanou vodou na 1 l, sterilizovat autoklávováním (115 °C, 20 min)
- **Van Urk činidlo:** 0,1 g 4-dimethylaminbenzaldehydu, 50 ml 96% kyseliny sírové, doplnit destilovanou vodou do 100 ml

4.4 Použité primery

Sigma-Aldrich (lyofilizované primery byly rozpuštěny v nuclease free vodě na koncentraci 100 mmol·l⁻¹, pro účely PCR byly primery naředěny na koncentraci 10 mmol·l⁻¹)

- PoliC_OE_sek1_fw 5´ -CCCGGAAACTCAGTCTCCTT-3´
- Tgluc_rev 5´ -GTCTTCCGCTAAAACACCCC-3´
- Hyg_pNDH-OGG_fw 5´ -GAATTCAGCGAGAGCCTGAC-3´
- Hyg_pNDH-OGG_rev 5´ -ACATTGTTGGAGCCGAAATC-3´

4.5 Použité soupravy

- NucleoBond Xtra MidiPrep kit (Macherey-Nagel)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel)

4.6 Seznam použitých laboratorních přístrojů a pomůcek

- Autokláv HST 5-6-8 (Zirbus)
- Bürkerova komůrka (Marienfeld)
- Centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene)
- Digestoř (Merci)
- Digitální fotoaparát Lumix TZ6 (Panasonic)
- Elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra)
- Elektromagnetická míchačka (Boeco)
- Filtr s velikostí pórů 0,22 μm (Techno Plastic Products AG)
- Flowbox (Merci)
- HPLC Nexera (Shimadzu)
- Inkubátor, 28 °C, 37 °C (Memmert)
- Kolonka SPE Cartridges C18 (Applied Separations)
- Kolonka Spin-X 0,22 μm (Costar)
- Kolona Zorbax eclipse C18 (Agilent)
- Laboratorní homogenizátor SJB-S 450 (Siehe)
- Laboratorní vibrační mlýnek pro kryogenní mletí (Retsch)
- Lyofilizátor SeduVac (LaboGene)
- Mikrocentrifuga FVL-2400N (Unimed)
- Miracloth membrána (Calbiochem)
- NanoDrop NAS 99 (ACT gene)
- Nytexová membrána (Fluka)
- SpeedVac SPD (Thermo Electron Corporation)
- Stereomikroskop (Zeiss)
- Světelný mikroskop Helago B-382PHi-ALC (Helago)
- Termoblok (BIOER)
- Termocykler T-gradient (Biometra)
- Třepačka Orbit 1000 (Labnet)
- UV/VIS spektrofotometr (Agilent)
- UV-transiluminátor UVT-20 M-HC (Herolab)
- Vakuová komůrka Supelco (Visiprep)
- Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra)

4.7 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.7.1 Transformace buněk *Escherichia coli* TOP10 tepelným šokem

Pro transformaci chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10 byly použity plasmidy *pNDH-OGG::dmaW* (obsahující *dmaW* fúzované s *gfp* na N konci, pod konstitutivním *OliC* promotorem) a *pNDH-OGG* (*gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem). Buňky *E. coli* TOP10 byly uchovány v mrazáku při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a proto byly inkubovány do rozmrazení na ledu. Poté byl k buňkám (50 μl) pipetován 1 μl plasmidu, směs byla opatrně pomocí pipety promíchána a následně inkubována 30 min na ledu. Transformace byla provedena tepelným šokem při $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 s. Po 5 min inkubaci bylo ke směsi pipetováno 950 μl SOC média. Po 1 h inkubaci na třepačce při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo na Petriho misky s LB agarem a ampicilinem (finální koncentrace $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) pipetováno po 10 μl a 50 μl transformační směsi. Sterilní hokejkou byla směs důkladně rozetřena po celém povrchu misky. Buňky byly kultivovány dnem vzhůru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc.

Následující den byly narostlé kolonie pomocí sterilního párátko přeneseny do skleněných zkumavek s 5 ml tekutého LB média a ampicilinem (finální koncentrace $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kultivace na třepačce (180 rpm, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) do dalšího dne.

Další den bylo 100 μl narostlých kultur pipetováno do Erlenmeyerových baněk obsahujících 100 ml tekutého LB média s ampicilinem (finální koncentrace $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Kultivace do dalšího dne na třepačce při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7.2 Izolace plasmidové DNA

Izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí kitu NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel). Narostlé bakteriální kultury obsahující plasmidy *pNDH-OGG::dmaW* a *pNDH-OGG* byly přelity z Erlenmeyerových baněk do 50ml Falcon zkumavek, centrifugace 10 min (4700 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Buněčný pelet byl resuspendován v 8 ml RES pufru, do kterého byla přidána RNasa (finální koncentrace $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ke směsi bylo přidáno 8 ml LYS lyzačního pufru a opakovaným převrácením zkumavky (10–15 x) byla směs promíchána, inkubace 5 min při RT. Mezitím byla na Falcon zkumavku umístěna NucleoBond Xtra kolonka s filtrem, která byla ekvilibrována 12 ml EQU pufru, jenž byl pipetován na horní lem filtru. Po uplynutí 5 min bylo ke směsi s lyzačním pufrům přidáno 8 ml NEU neutralizačního pufru a opakovaným převrácením zkumavky (10–15x) byla směs opět promíchána. Neutralizovaná buněčná suspenze byla pipetována po okraji filtru a poté byla kolonka promyta 5 ml EQU pufru. Po promytí byl filtr z kolonky odebrán a samotná kolonka byla promyta 8 ml WASH pufru. Plasmidová DNA byla eluována 5 ml ELU elučního pufru.

4.7.3 Precipitace plasmidové DNA

Izolovaná plasmidová DNA byla zakoncentrována a odsolena pomocí isopropanolu a octanu sodného. K 1 ml izolované plasmidové DNA v elučním pufru bylo přidáno 700 μl isopropanolu a 100 μl octanu sodného ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $\text{pH} = 5,2$). Směs byla centrifugována po dobu 30 min (14000 rpm , $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Pelet byl promyt 500 μl 70% ethanolu (w/v, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$), centrifugace 10 min za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a pelet byl ponechán 30 min v digestoři k vysušení. Poté byl resuspendován v 100 μl nuclease-free vody. Pomocí Nanodropu byla změřena koncentrace precipitované plasmidové DNA.

4.7.4 Restrikce plasmidové DNA

Pro zvýšení účinnosti transformace *C. purpurea* P1 byla izolovaná plasmidová DNA linearizována restrikční endonukleasou *PstI* (Tab. 2). Pro restrikci bylo použito 150 μg izolované plasmidové DNA. Restrikce probíhala v 10x zředěném NEB pufru 3.1 při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ přes noc.

Tab. 2: Složení restrikční směsi pro linearizaci izolované plasmidové DNA

Složka	Množství
Restrikční endonukleasa <i>PstI</i> ($20000 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$)	3,5 μl
10x NEB 3.1 pufr	30 μl
Plasmidová DNA	150 μg
Doplněno do 300 μl nuclease-free vodou	

4.7.5 Přečištění restrikční směsi

Před transformací *C. purpurea* P1 bylo potřeba provést přečištění restrikčních směsí, obsahujících linearizované plasmidy *pNDH-OGG::dmaW* a *pNDH-OGG* pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

K restrikční směsi byl přidán 2x větší objem NT1 pufru. Směs byla důkladně promíchána a poté pipetována na kolonku se sběrnou mikrozkuvkou. DNA byla navázána na kolonku a po 30 s centrifugaci (11000 g , RT) byla kolonka 2 x promyta 700 μl NT3 pufru a centrifugována po dobu 30 s (11000 g , RT). Následně byla kolonka přenesena do nové 1,5ml mikrozkuvky a centrifugována 1 min naprázdno (11000 g , RT). Po dalším přenesení kolonky do nové 1,5ml mikrozkuvky byla DNA eluována 35 μl nuclease-free vody ($65 \text{ }^\circ\text{C}$), inkubace 1 min (RT) a centrifugace 1 min (11000 g , RT). Pomocí Nanodropu byla změřena koncentrace získané DNA.

4.7.6 Elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu

Elektroforetická separace plasmidové DNA byla provedena ke kontrole jejího správného štěpení, zda byla plasmidová DNA opravdu linearizována.

K 1 µg naštěpené i nenaštěpené plasmidové DNA (*pNDH-OGG*, *pNDH-OGG::dmaW*) byl přidán vzorkovací pufr 6x Loading Dye, jako-standard byl použit 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Horizontální elektroforetická separace DNA probíhala v 1% agarosovém gelu a 1x TAE pufru. Pro zviditelnění fragmentů DNA bylo ke 100 ml 1% agarosy pipetováno 20 µl 0,5% ethidium bromidu. Separace probíhala při napětí 100 V po dobu 40 min. Separované vzorky v gelu byly detekovány pomocí UV-transiluminátoru a dokumentačního systému Alpha DigiDoc RT s programem Alpha Innotech.

4.7.7 Transformace *Claviceps purpurea* P1

4.7.7.1 Příprava protoplastů

C. purpurea P1 byla kultivována v 50 ml BII média ve 250ml Erlenmayerově baňce. Kultivace probíhala po dobu 3 dnů na třepačce (180 rpm, 28 °C).

Narostlé mycelium bylo centrifugováno po dobu 10 min (14000 rpm, RT). Pelet byl promyt SMAc puforem a centrifugován dalších 10 min za stejných podmínek. V průběhu centrifugace byl připraven protoplastizační roztok – 20 ml SMAc pufru bylo smícháno s 100 mg lyzačního enzymu z *Trichoderma harzinarum*, roztok byl filtrován přes filtr s velikostí pórů 0,22 µm. Po centrifugaci byl pelet resuspendován v protoplastizačním roztoku.

Po 1 h inkubaci (80 rpm, RT) byl roztok filtrován přes Nytexovou membránu, filtrát byl centrifugován 10 min (900 g, RT). Supernatant byl odstraněn a pelet byl 2x promyt STC puforem, centrifugace 10 min (900 g, RT). Poté byly protoplasty resuspendovány v 1 ml STC pufru a pomocí Bürkerovy komůrky byla pod světelným mikroskopem zkontrolována jejich hustota (optimální hustota protoplastů – $5 \cdot 10^8$ protoplastů v 1 ml pufru).

4.7.7.2 Transformace protoplastů

Do tří 12ml Falcon zkumavek byla připravena transformační směs obsahující 10 µl (10 µg) naštěpené a přečištěné plasmidové DNA *pNDH-OGG::dmaW* a do tří 12ml Falcon zkumavek byla připravena transformační směs obsahující 10 µl (10 µg) naštěpené a přečištěné plasmidové DNA *pNDH-OGG*. Ke směsi bylo přidáno 80 µl STC a 50 µl PEG roztoku. Po promíchání bylo směsi pipetováno 100 µl protoplastů.

Po 20 min inkubaci při RT byly do směsi přidány 2 ml PEG roztoku, inkubace 5 min, RT. Nakonec byly ke směsi přidány 4 ml STC, které zastavily transformaci.

Ve flowboxu bylo pro každou 12ml Falcon zkumavku připraveno 10 Petriho misek. Do první misky bylo nalito 20 ml BII transformačního agarů a 11 μl protoplastů. Tato miska sloužila jako kontrola protoplastů, zda jsou schopné růstu i po odstranění buněčné stěny. Do druhé misky bylo nalito 20 ml BII transformačního agarů a 690 μl transformační směsi. Tato miska sloužila ke kontrole transformace, zda v jejím průběhu nebyly protoplasty usmrceny. Do zbylého BII transformačního agarů, který byl rozlit do osmi misek, bylo přidáno 690 μl transformační směsi. Po 24 hod regeneraci bylo těchto osm misek převrstveno 10 ml BII kultivačního agarů obsahujícího hygromycin (finální koncentrace v 30 ml média 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Po týdnů byli narostlí transformanti přeočkováni na BII transformační agar s hygromycinem (finální koncentrace 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

4.7.8 Ověření transformace *C. purpurea* P1 pomocí diagnostické PCR

4.7.8.1 Izolace genomické DNA

Den před izolací genomické DNA byla z BII transformačního agarů vyřezána narostlá mycelia, která byla umístěna do 2ml mikrozkuvek s propíchnutými víčky, zalita tekutým dusíkem a lyofilizována přes noc.

Následující den byly K lyofilizovaným myceliím vloženy 2–3 skleněné kuličky, které usnadnily rozcení materiálu ve vibračním mlýnku (25 Hz, 30 s).

Následující centrifugace probíhaly za podmínek 14000 rpm a 4 °C. Do každé mikrozkuvky bylo přidáno 600 μl Lyzačního pufru, směs byla inkubována 10 min na vortexu. Poté bylo ke směsi přidáno 400 μl 5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku octanu draselného. Po 20 min centrifugaci byl supernatant přepipetován do nových 2ml mikrozkuvek, do kterých byl přidán 1 ml isopropanolu, obsah mikrozkuvek byl důkladně promíchán. Následovala 30 min centrifugace, získaný pelet byl promyt 500 μl 70% ethanolu (w/v, -20°C), centrifugace 5 min. Supernatant byl opatrně odpipetován a pelet byl vysušen v digestoři. Po 30 min byl pelet rozpuštěn ve 100 μl nuclease-free vody. Pomocí NanoDropu byla změřena koncentrace izolované genomické DNA.

4.7.8.2 Diagnostická PCR

Ověření získaných transformantů bylo provedeno pomocí diagnostické PCR (Tab. 3, 4). Jako pozitivní kontroly byly použity plasmidy *pNDH-OGG* a *pNDH-OGG::dmaW*, jako negativní kontrola byla použita nuclease-free voda. Ke kontrole přítomnosti transgenů byla použita také gDNA z WT P1. Byly použity dvě sady primerů: PoliC_OE_sek1 + Tgluc_rev, které nasedají v promotoru *OliC* a terminátoru *Gluc* a Hyg_pNDH-OGG_fw + Hyg_pNDG-OGG_rev, které nasedají do čtecího rámce hygromycinové rezistence (Obr. 12, 13). Vzorčky byly rozděleny v 1% agarosovém gelu a 1x TAE pufru při 120 V po dobu 25 min dle 4.7.6.

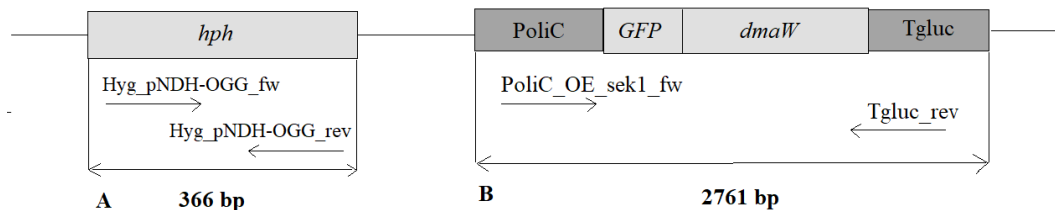
Tab. 3: Složení reakční směsi pro PCR s použitím s *GoTaq G2 Flexi* DNA Polymerasy.

Složka	Objem [μl]
5x <i>GoTaq Flexi</i> pufr	2,5
<i>GoTaq G2 Flexi</i> DNA Polymerasa (5000 U·ml ⁻¹)	0,07
MgCl ₂ (25 mmol·l ⁻¹)	0,75
dNTPs (10 mmol·l ⁻¹)	0,25
Fw primer (10 mmol·l ⁻¹)	0,25
Rev primer (10 mmol·l ⁻¹)	0,25
H ₂ O	7,43
gDNA <i>C. purpurea</i> P1 (100 ng)	1
Celkový objem	12,5

Tab. 4: Teplotní a časový profil PCR reakce s *GoTaq G2 Flexi* DNA Polymerasou.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Počáteční denaturace	95	120
Denaturace	95	30
Annealing	58	30
Elongace	72	1 kb cca 1 min
Finální elongace	72	300

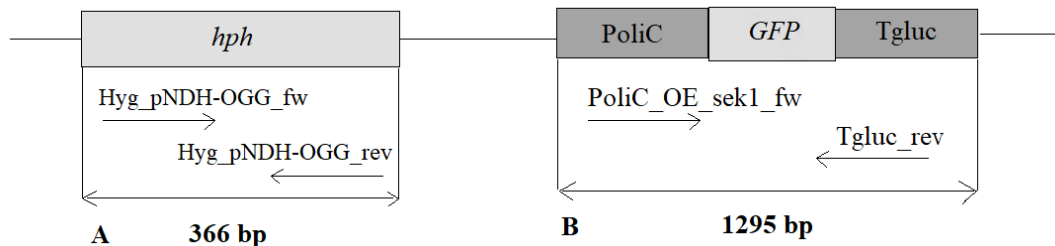
Cyklus 2-4 byl opakován 35x



Obr. 12: Schéma nasednutí primerů pro diagnostickou PCR předpokládaných transformantů *pNDH-OGG::dmaW*.

A: úsek *hph* rezistenčního genu

B: *pNDH-OGG::dmaW*



Obr. 13: Schéma nasednutí primerů pro diagnostickou PCR předpokládaných transformantů *pNDH-OGG*.

A: úsek *hph* rezistenčního genu

B: *pNDH-OGG*

4.7.9 Izolace homokaryotické kultury

Vzhledem k tomu, že genom *C. purpurea* P1 nebyl dosud sekvenován a buňky tohoto kmene obsahují více než 10 jader v buňce (Spalla *et* Marnati, 1978), je velká pravděpodobnost, že získání transformanti byli heterokaryoti. Z tohoto důvodu byli pomocí metody sekání špiček hyf získání homokaryoti.

Transformanti byli po dobu 1 týdne kultivováni na Mantlu agaru s hygromycinem (finální koncentrace 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Poté byly pomocí sterilní lancety pod stereomikroskopem uříznuty špičky hyf transformantů, které byly přeneseny na nový Mantle agar s hygromycinem (finální koncentrace 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Tento postup byl kvůli vyšší pravděpodobnosti získání homokaryotické kultury opakován celkem 3x, vždy po týdnu.

Následně byla z narostlých transformantů izolována gDNA (4.7.8.1), k ověření přítomnosti transgenů byla provedena diagnostická PCR (4.7.8.2) a následná elektroforetická separace v agarosovém gelu (4.7.6).

4.7.10 Měření obsahu alkaloidů v transformantech *C. purpurea* P1

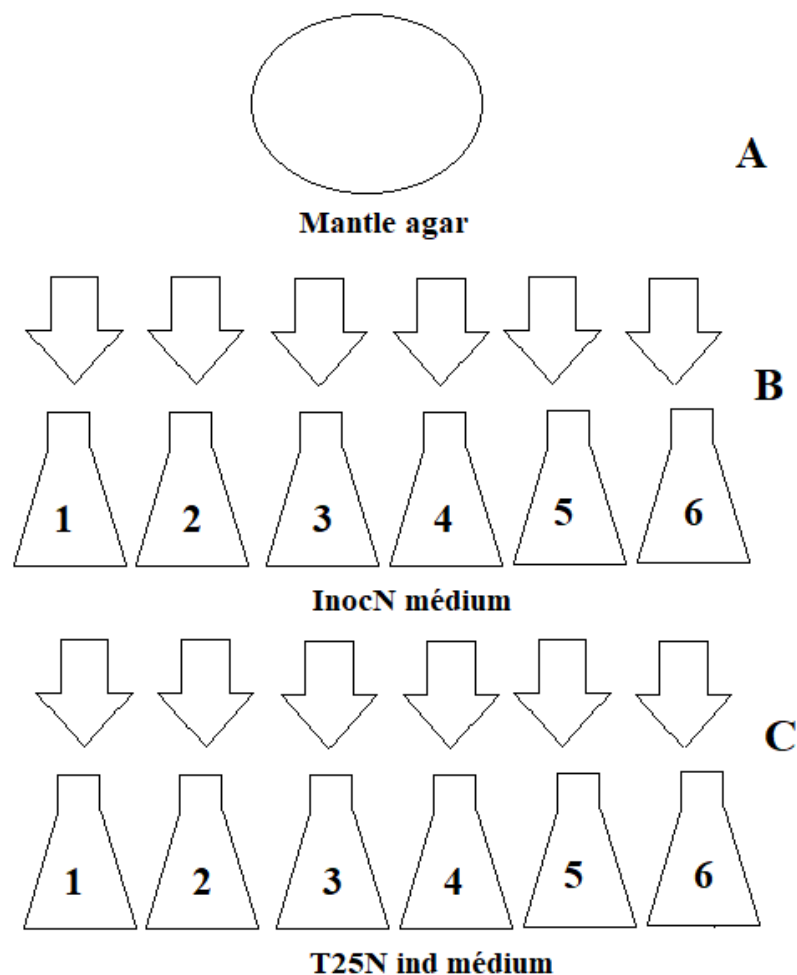
4.7.10.1 Příprava vzorků

Celkem 3 transformanti *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* fúzované s *gfp* pod konstitutivním promotorem *OliC*, jeden transformant *C. purpurea* P1 exprimující *gfp* pod konstitutivním promotorem *OliC* a WT *C. purpurea* P1 byli po dobu 2 týdnů kultivováni na Mantle agaru s hygromycinem (Obr. 14) (A) (finální koncentrace 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Poté byl každý transformant příp. WT *C. purpurea* P1 přeočkován do šesti 250ml Erlenmeyerových baněk (B) obsahujících 50 ml inokulačního média InocN (= 6 biologických replikátů od každého vzorku) následovala inkubace po dobu 5 dnů na třepačce ve tmě (200 rpm, 28 °C).

Po pěti dnech byla kultura z baněk přelita do 50ml Falcon zkumavek, 40 min centrifugace (4700 rpm, RT). K 6,79 g peletu bylo přidáno 40 ml destilované vody objem vody se přímo úměrně měnil podle hmotnosti peletu. Směs byla pomocí tyčového mixéru homogenizována a následně byly vždy 2 ml této kultury pipetovány do 250ml Erlenmeyerových baněk obsahujících T25N indukční médium (C) (jeden vzorek z InocN vždy do jedné baňky s T25N indukčním médiem, stále tedy 6 biologických replikátů), inkubace 14 dnů na třepačce ve tmě (200 rpm, 28 °C).

Po 14 dnech byla narostlá houbová kultura filtrována přes Miracloth membránu na Büchnerově nálevce pod vakuem. Médium bylo přelito do 50ml Falcon zkumavek, dále uchováno při -20 °C. Mycelium bylo umístěno do 15ml Falcon zkumavek s propíchnutými víčky, zalito tekutým dusíkem a lyofilizováno po dobu 3 dnů. Poté bylo lyofilizované mycelium rozdrceno špachtlí.

Z lyofilizovaného a rozdrceného mycelia byla izolována gDNA (4.7.8.1), která byla opět použita na diagnostickou PCR pro ověření přítomnosti transgenů (4.7.8.2), následovala elektroforetická separace DNA v 1% agarosovém gelu a 1x TAE pufru při 120 V po dobu 25 min (4.7.6).



Obr. 14: Schéma přípravy jednoho vzorku pro stanovení alkaloidů. Celkový počet vzorků byl 5 (1x WT *C. purpurea* P1, 1x transformant exprimující *gfp*, 3x transformant exprimující *dmaW* s *gfp*).

4.7.10.2 Van Urk test

V odebraném médiu a mycelium houbové kultury bylo pomocí Van Urk testu (van Urk, 1929) přibližné množství alkaloidů.

4.7.10.2.1 Médium

T25N indukční médium bylo po 1 ml pipetováno do třech 2ml mikrokumavek (= 3 replikáty). K médiu byl pipetován 1 ml Van Urk činidla. Směs byla důkladně promíchána, inkubace 10 min při RT. Poté byla směs přelita do 2,5ml kyvety a umístěna

do spektrofotometru, kde byl při vlnové délce 590 nm proměřen tento vzorek jako slepý vzorek (tzv. blank). Poté bylo ke směsi přidáno 50 μl 0,1% (w/v) dusitanu sodného a pomocí pipety byla směs promíchána a na spektrofotometru za stejných podmínek byla změřena absorbance.

K vytvoření kalibrační křivky byl použit zásobní roztok ergotaminu v acetonitrilu o koncentraci 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, který byl dále ředěn pomocí acetonitrilu na koncentraci 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,05 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 0,01 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z naměřených hodnot absorbancí byla sestavena kalibrační křivka a pomocí regresní rovnice bylo spočítáno přibližné množství alkaloidů ve vzorcích.

4.7.10.2.2 Mycelium

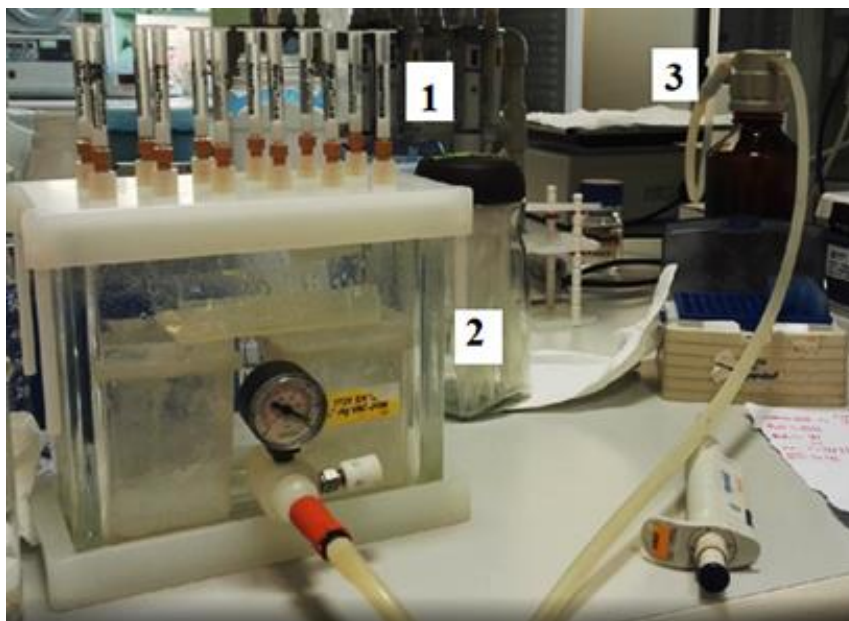
K 50 mg mycelia ve třech 2ml mikrozkuvkách (= 3 replikáty) bylo pipetováno 600 μl acetonu a 600 μl 4% kyseliny vinné, inkubace přes noc na třepačce (280 rpm, RT). Následující den byla směs centrifugována po dobu 10 min (14000 rpm, RT). V získaném supernatantu byl pomocí Van Urk testu dle 4.7.10.2 změřen přibližný obsah alkaloidů.

4.7.10.3 HPLC analýza

4.7.10.3.1 Příprava médií

Ke 2 ml T25N indukčního média byl přidán 1 ml destilované vody. Na kolonku SPE Cartridges C18 (Applied Separations) umístěnou na vakuové komůrce Supelco (Visiprep) (Obr. 15) bylo pipetováno 5 ml acetonitrilu, pod vakuem byla kolonka acetonitrem promyta a aktivována. Tento krok byl opakován s 5 ml destilované vody. Po aktivaci byl na kolonku pipetován vzorek média smíchaný s vodou, který protékal kolonkou pod vakuem po dobu přibližně 5 minut, aby došlo k navázání alkaloidů. Poté byla kolonka promyta 5 ml destilované vody a alkaloidy byly následně eluovány 3 ml 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ uhličitanu amonného a acetonitrilu v poměru 1:4. Vzorky byly odpařeny ve Speedvacu pod vakuem při 37 °C přes noc, pelet byl rozpuštěn v 1 ml 80% methanolu (HPLC čistota), inkubace 5 min na třepačce (280 rpm, RT).

Vzorky byly pipetovány na kolonky Spin-X 0,22 μm (Costar), centrifugace 1 min (14000 rpm, RT). 100 μl ze směsi, která kolonkou protekla bylo pipetováno do skleněných vialek (Thermo Scientific), na koloně HPLC bylo analyzováno 5 μl této směsi.



Obr. 15: Příprava vzorků médií přes kolonky SPE Cartridges C18 a vakuovou komůrku pro HPLC analýzu obsahu námellových alkaloidů.

- 1: SPE kolonky
- 2: vakuová komůrka
- 3: promývačka

4.7.10.3.2 Příprava mycelií

50 mg mycelia bylo rozpuštěno v 600 μ l acetonu a 600 μ l 4% kyseliny vinné. Směs byla inkubována přes noc na třepačce (280 rpm, RT) a následující den byla centrifugována po dobu 10 min (14000 rpm, 25 °C). Supernatant byl přepipetován do nových 2ml mikrozkušavek a odpařen ve Speedvacu pod vakuem při 37 °C přes noc. Pelet byl rozpuštěn v 500 μ l 80% methanolu (HPLC čistota).

Vzorky byly pipetovány na kolonky Spin-X 0,22 μ m (Costar), centrifugace 1 min (14000 rpm, RT). 100 μ l ze směsi, která kolonkou protekla bylo pipetováno do skleněných vialek (Thermo Scientific), na koloně HPLC bylo analyzováno 5 μ této směsi.

4.7.10.3.3 Podmínky měření

HPLC analýza námellových alkaloidů byla provedeno na přístroji Nexera (Shimadzu). Vzorky byly separovány na koloně Zorbax eclipse C18 (Agilent) s rozměry 2,1 x 50 mm a velikostí částic 1,8 μ m.

K analýze alkaloidů byly použity: mobilní fáze (A) obsahující 0,15% kyseliny octové (pH = 4,4) a acetonitrilu (4:1) a mobilní fáze B, která byla složena z acetonitrilu a vody (4:1).

V Tab. 5 je znázorněn průběh gradientu koncentrací mobilních fází A a B. Analýza probíhala 25 min.

Jako standard bylo použito 5 μl 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergotaminu a 5 μl identifikační směsi ergopeptinů (TEVA Czech Industries).

Analýzu provedl doc. Mgr. Petr Galuszka Ph.D.

Tab. 5: Koncentrace mobilních fází A a B v průběhu analýzy.

čas [min]	mobilní fáze B [obj. %]	mobilní fáze A [obj. %]
0	9	91
5.-7.	15	85
7.-11.	45	55
do 13.	45	55
do 15.	60	40
do 18.	60	40
do 19.	9	91

5 VÝSLEDKY

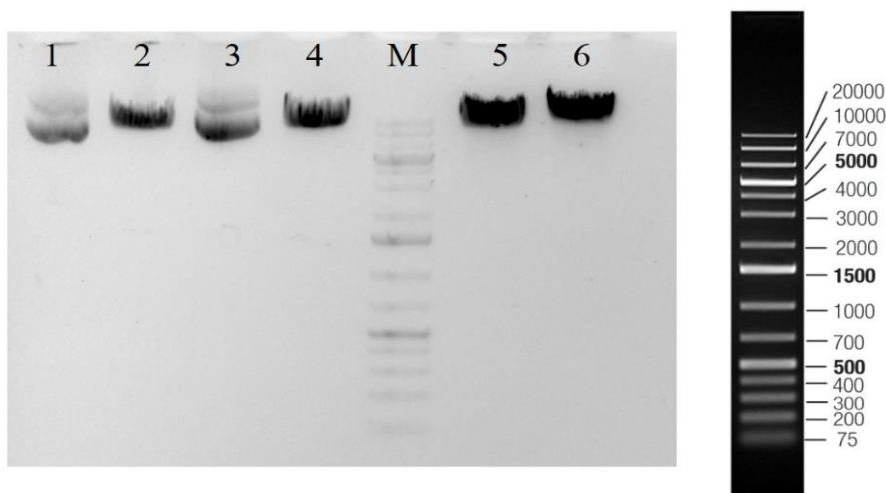
5.1 Transformace buněk *Escherichia coli* s následnou izolací a restrikcí plasmidové DNA, elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu

Vektory *pNDH-OGG::dmaW* (vektor obsahující *dmaW* fúzované na N konci s *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem) a *pNDH-OGG* (vektor obsahující *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem) byly transformovány pomocí tepelného šoku do bakteriálních buněk *E. coli* TOP10. Transformační směs byla rozetřena na misky s LB agarem a Ampicilinem (4.7.1).

Z narostlých bakteriálních kultur byla pomocí NucleoBond Xtra Midi kitu izolována plasmidová DNA (4.7.2). Získaná Plasmidová DNA byla dále koncentrována a precipitována isopropanolem a octanem sodným (4.7.3).

Pro zvýšení účinnosti transformace *Claviceps purpurea* P1 byla plasmidová DNA linearizována restrikční endonukleasou *PstI* (4.7.4), restrikční směs byla přečištěna pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu (4.7.5).

Poté, co byla v agarosovém gelu (Obr. 16) (4.7.6) ověřena velikost získaných DNA fragmentů (*pNDH-OGG* – 11094 bp, *pNDH-OGG::dmaW* – 12557 bp), byla tato DNA použita k transformaci protoplastů *C. purpurea* P1 (4.7.7.2).



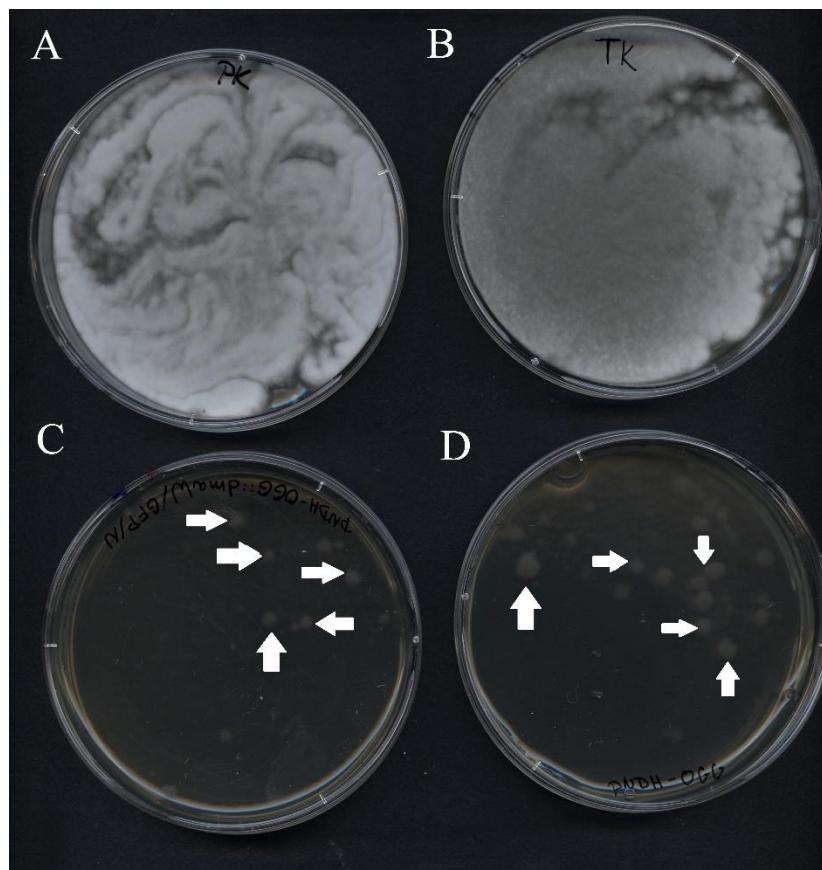
Obr. 16: Elektroforetogram DNA fragmentů získaných restrikcí vektorů *pNDH-OGG* a *pNDH-OGG::dmaW* enzymem *PstI*.

- 1: *pNDH-OGG* nenaštěpený (11094 bp)
- 2: *pNDH-OGG* štěpený restrikční endonukleasou *PstI*, nepřečištěný (11094 bp)
- 3: *pNDH-OGG::dmaW* nenaštěpený (12557 bp)
- 4: *pNDH-OGG::dmaW* restrikční endonukleasou *PstI*, nepřečištěný (12557 bp)
- M: 1 kb Plus DNA Ladder
- 5: *pNDH-OGG* štěpený restrikční endonukleasou *PstI*, přečištěný (11094 bp)
- 6: *pNDH-OGG::dmaW* štěpený restrikční endonukleasou *PstI*, přečištěný (12557 bp)

5.2 Transformace *C. purpurea* P1

Protoplasty *C. purpurea* P1 (4.7.7.1), byly transformovány pomocí polyethylenglykolu linearizovanými vektory *pNDH-OGG* a *pNDH-OGG::dmaW* (4.7.7.2).

Z primárních transformantů *C. purpurea* P1 rezistentních k Hygromycinu (Obr. 17) byla izolována genomická DNA (4.7.8.1), která byla následně použita jako templát pro diagnostickou PCR (4.7.8.2). Na tuto PCR byly použity dvě sady primerů: primery PoliC OE_sek1_fw a Tgluc_rev byly pipetovány do první PCR reakční směsi (očekávaná velikost DNA fragmentů: *pNDH-OGG* – 1295 bp, *pNDH-OGG::dmaW* – 2761 bp), primery Hyg_pNDH-OGG_fw a Hyg_pNDH-OGG_rev byly pipetovány do druhé PCR reakční směsi (očekávaná velikost DNA fragmentů v případě obou vektorů byla 366 bp). Velikost získaných DNA fragmentů byla ověřena elektroforézou v agarosovém gelu (4.7.6) (Obr. 18).



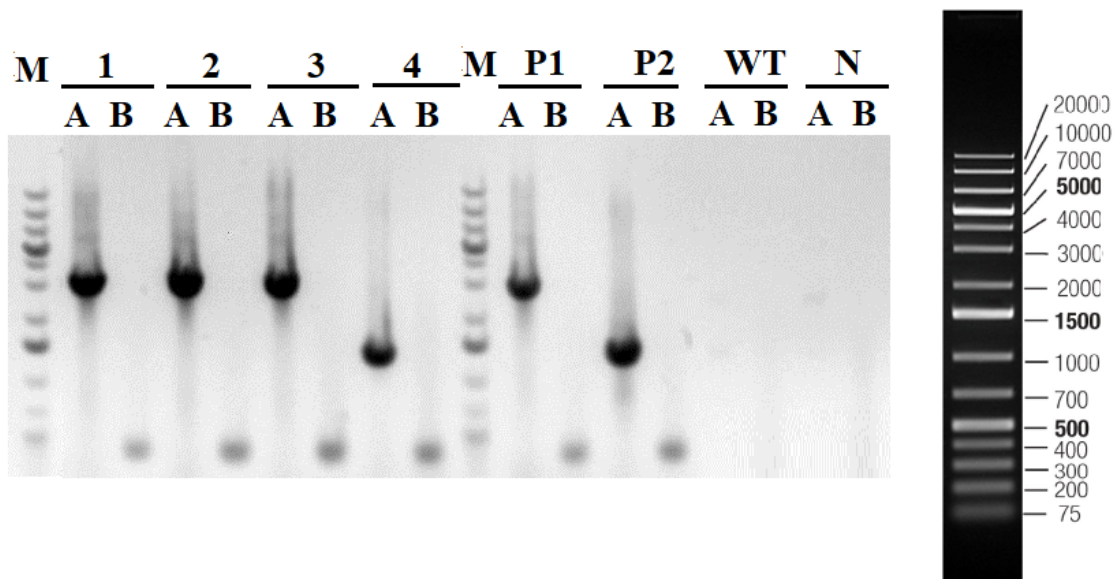
Obr. 17: Transformanti *C. purpurea* P1, kontroly transformace a protoplastizace. Šipky ukazují na jednotlivé transformanty.

A: kontrola protoplastizace

B: kontrola transformace

C: transformace *C. purpurea* P1 linearizovaným vektorem *pNDH-OGG::dmaW*

D: transformace *C. purpurea* P1 linearizovaným vektorem *pNDH-OGG*



Obr. 18: Elektroforetogram DNA ampliconů amplifikovaných z gDNA primárních transformantů *C. purpurea* P1 exprimujících *gfp* nebo *dmaW* s *gfp*.

1–3: tři nezávislí transformanti *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp* (A – 2761 bp, B – 366 bp)

4: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *gfp* (A – 2761 bp, B – 366 bp)

M: 1 kb Plus DNA Ladder

WT: WT *C. purpurea* P1

N: negativní kontrola (H₂O)

P1: pozitivní kontrola *pNDH-OGG::dmaW* (A – 1295 bp, B – 366 bp)

P2: pozitivní kontrola *pNDH-OGG* (A – 1295 bp, B – 366 bp)

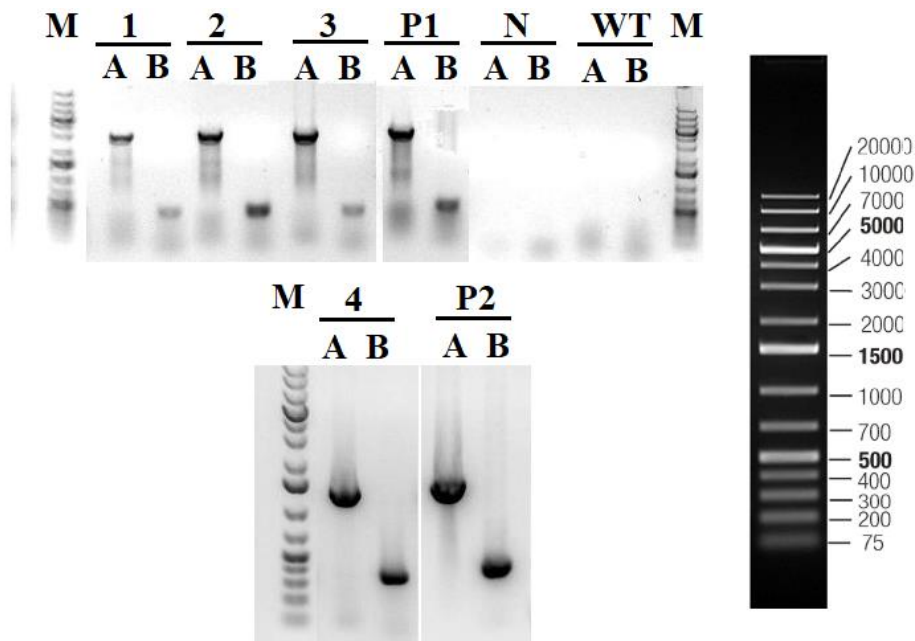
A: primery PoliC OE_sek1_fw a Tgluc_rev

B: primery Hyg_pNDH-OGG_fw a Hyg_pNDH-OGG_rev

5.3 Izolace homokaryotické kultury

Pro izolaci homokaryotické kultury byli vybráni tři nezávislí transformanti *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp* a jeden transformant exprimující *gfp*. Opakovanou izolací špiček hyf (3×) těchto transformantů (4.7.9) byli obdrženi homokaryotní mutanti, ze kterých byla následně izolována gDNA (4.6.8.1).

Přítomnost vektorů *pNDH-OGG::dmaW* nebo *pNDH-OGG* v získaných homokaryotech byla potvrzena diagnostickou PCR (4.7.8.2), na kterou byly použity opět dvě různé sady primerů. První PCR směs obsahovala primery PoliC OE_sek1_fw a Tgluc_rev (očekávaná velikost DNA fragmentů: *pNDH-OGG* – 1295 bp, *pNDH-OGG::dmaW* – 2761 bp), druhá PCR směs obsahovala primery Hyg_pNDH-OGG_fw a Hyg_pNDH-OGG_rev (očekávaná velikost DNA fragmentů v případě obou vektorů byla 366 bp). Velikost získaných DNA fragmentů byla ověřena elektroforézou v agarosovém gelu (4.7.6) (Obr. 19).



Obr. 19: Elektroforeogram DNA ampliconů amplifikovaných z gDNA homokaryotů *C. purpurea* P1 exprimujících *gfp* nebo *dmaW s gfp*, tyto mutanti byli získáni po třech kolech sekání špiček hyf.

1–3: tři nezávislí transformanti *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW s gfp* (A – 2761 bp, B – 366 bp)

4: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *gfp* (A – 1295 bp, B – 366 bp)

M: 1 kb Plus DNA Ladder

WT: WT *C. purpurea* P1

N: negativní kontrola (H₂O)

P1: pozitivní kontrola *pNDH-OGG::dmaW* (A – 2761 bp, B – 366 bp)

P2: pozitivní kontrola *pNDH-OGG* (A – 1295 bp, B – 366 bp)

A: primery PoliC OE_sek1_fw a Tgluc_rev

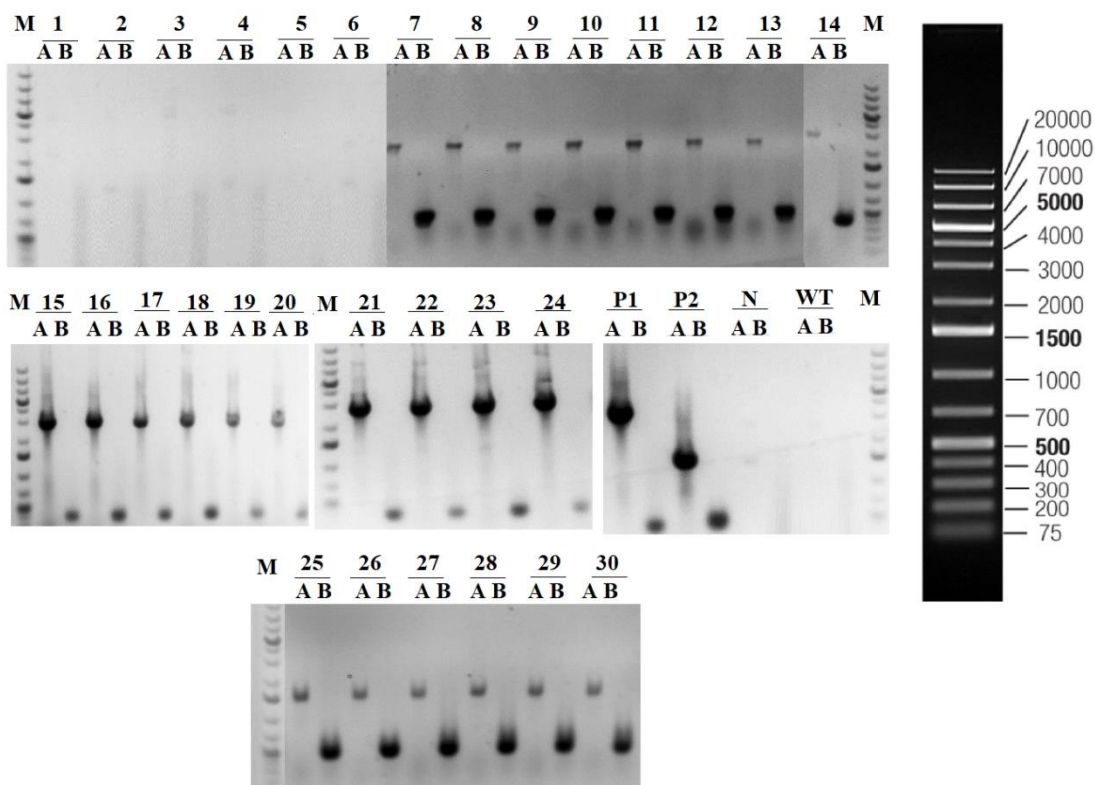
B: primery Hyg_pNDH-OGG_fw a Hyg_pNDH-OGG_rev

5.4 Analýza obsahu námelových alkaloidů

5.4.1 Příprava vzorků

Celkem tři nezávislí transformanti *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW s gfp*, jeden transformant *C. purpurea* P1 exprimující *gfp* a WT *C. purpurea* P1 byli kultivováni v inokulačním InocN médiu (od každé houby bylo vytvořeno 6 biologických replikátů). Následně byly tyto houby přeočkovány do indukčního média T25N. Mycelium i média byly uchovány pro další analýzy.

Ze vzorků mycelií byla izolována gDNA (4.7.8.1), která byla použita jako templát pro diagnostickou PCR (4.7.8.2), na kterou byly použity dvě různé sady primerů. První PCR směs obsahovala primery PoliC OE_sek1_fw a Tgluc_rev (očekávaná velikost DNA fragmentů: *pNDH-OGG* – 1295 bp, *pNDH-OGG::dmaW* – 2761 bp), druhá PCR směs obsahovala primery Hyg_pNDH-OGG_fw a Hyg_pNDH-OGG_rev (očekávaná velikost fragmentů v případě obou vektorů byla 366 bp). Velikost získaných fragmentů byla ověřena elektroforetickou separací v agarosovém gelu (4.7.6) (Obr. 20).



Obr. 20: Elektroforeogram DNA ampliconů amplifikovaných z gDNA transformantů *C. purpurea* P1 exprimujících *dmaW* s *gfp* nebo *gfp* ze vzorků připravených pro analýzu námelových alkaloidů.

1–6: šest biologických replikátů WT *C. purpurea* P1

7–12, 13-18, 19-24: vždy šest biologických replikátů tří nezávislých transformantů *C. purpurea* P1 exprimujících *dmaW* s *gfp* (A – 2761 bp, B – 366 bp)

25–30: šest biologických replikátů transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *gfp* (A – 1295 bp, B – 366 bp)

M: 1 kb Plus DNA Ladder

WT: WT *C. purpurea* P1

N: negativní kontrola (H₂O)

P1: pozitivní kontrola *pNDH-OGG::dmaW* (A – 2761 bp, B – 366 bp)

P2: pozitivní kontrola *pNDH-OGG* (A – 1295 bp, B – 366 bp)

A: primery PoliC OE_sek1_fw a Tgluc_rev

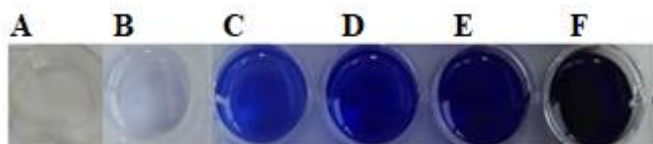
B: primery Hyg_pNDH-OGG_fw a Hyg_pNDH-OGG_rev

5.4.1.1 Van Urk test

Pomocí Van Urk testu bylo z médií a mycelií (4.7.10.2.1, 4.7.10.2.2) houbových kultur (WT *C. purpurea* P1, tři nezávislí transformanti *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp* a jeden transformant *C. purpurea* P1 exprimující *gfp*) stanoveno přibližné množství námelových alkaloidů. Každý biologický replikát i standard (ergotamin) byl analyzován 3x (3 technické replikáty), vzorky byly přepipetovány do 24 jamkové destičky a vyfoceny (Obr. 21, 23, 24).

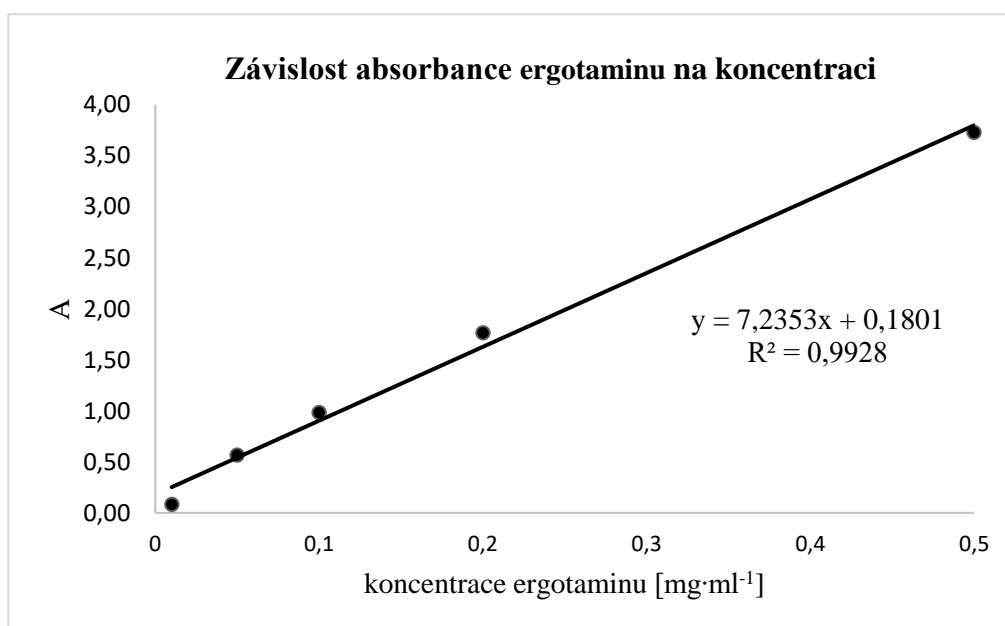
Ze zásobního roztoku ergotaminu byla sestavena kalibrační křivka závislosti absorbance jednotlivých roztoků ergotaminu na jeho koncentraci (Obr. 22). Z regresní rovnice bylo spočítáno množství alkaloidů ve vzorcích médií (Tab. 6) a mycelií (Tab. 7).

Z naměřených hodnot byl spočítán aritmetický průměr a směrodatná chyba, výsledky byly statisticky zpracovány pomocí F-testu a t-testu (Tab. 8, 9).

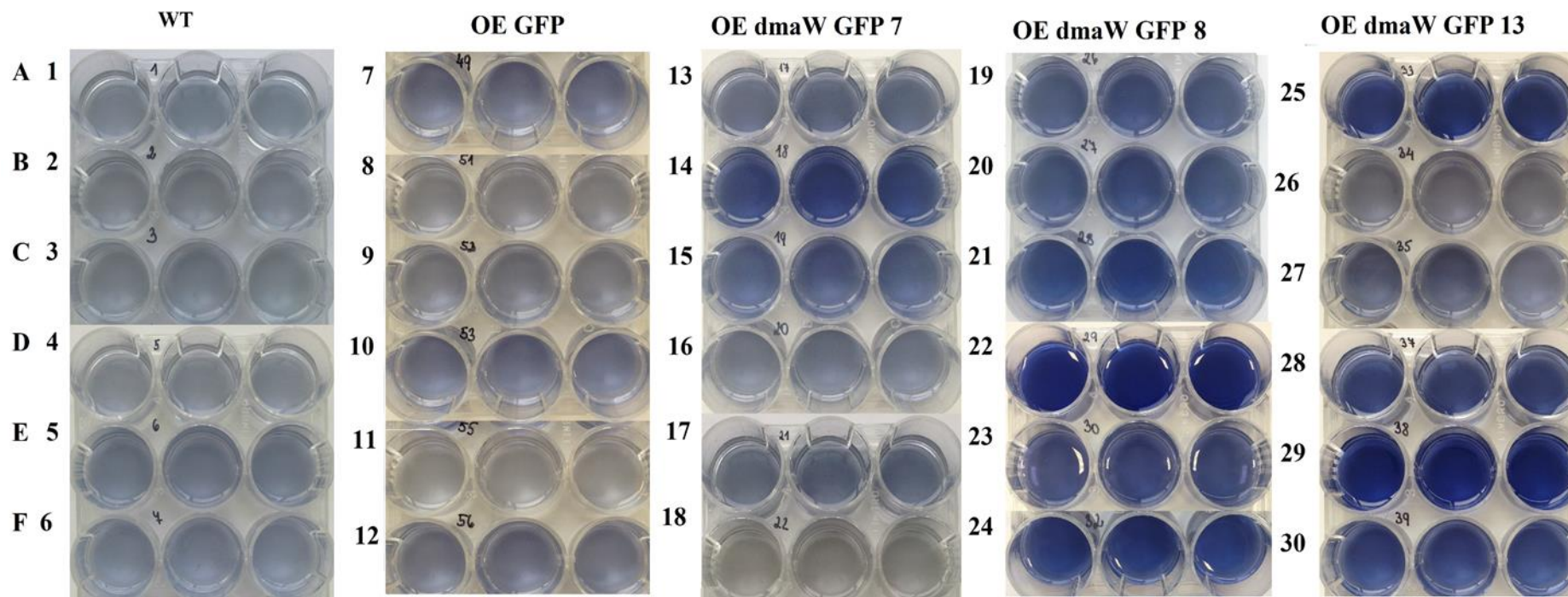


Obr. 21: Vizuální hodnocení obsahu námelových alkaloidů Van Urk testem – roztok ergotaminu, který byl použit jako standard.

- A: $0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
- B: $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
- C: $0,05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
- D: $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
- E: $0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
- F: $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obr. 22: Kalibrační křivka závislosti absorbance roztoků ergotaminu na jeho koncentraci



Obr. 23: Vizuální hodnocení obsahu námelových alkaloidů Van Urk testem – média z WT *C. purpurea* P1 (WT), transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *gfp* (OE GFP) a tří nezávislých transformantů *C. purpurea* P1 exprimujících *dmaW* s *gfp* (OE dmaW GFP 7, OE dmaW GFP 8, OE dmaW GFP 13). Každý ze šesti biologických replikátů byl analyzován 3x (3 technické replikáty).

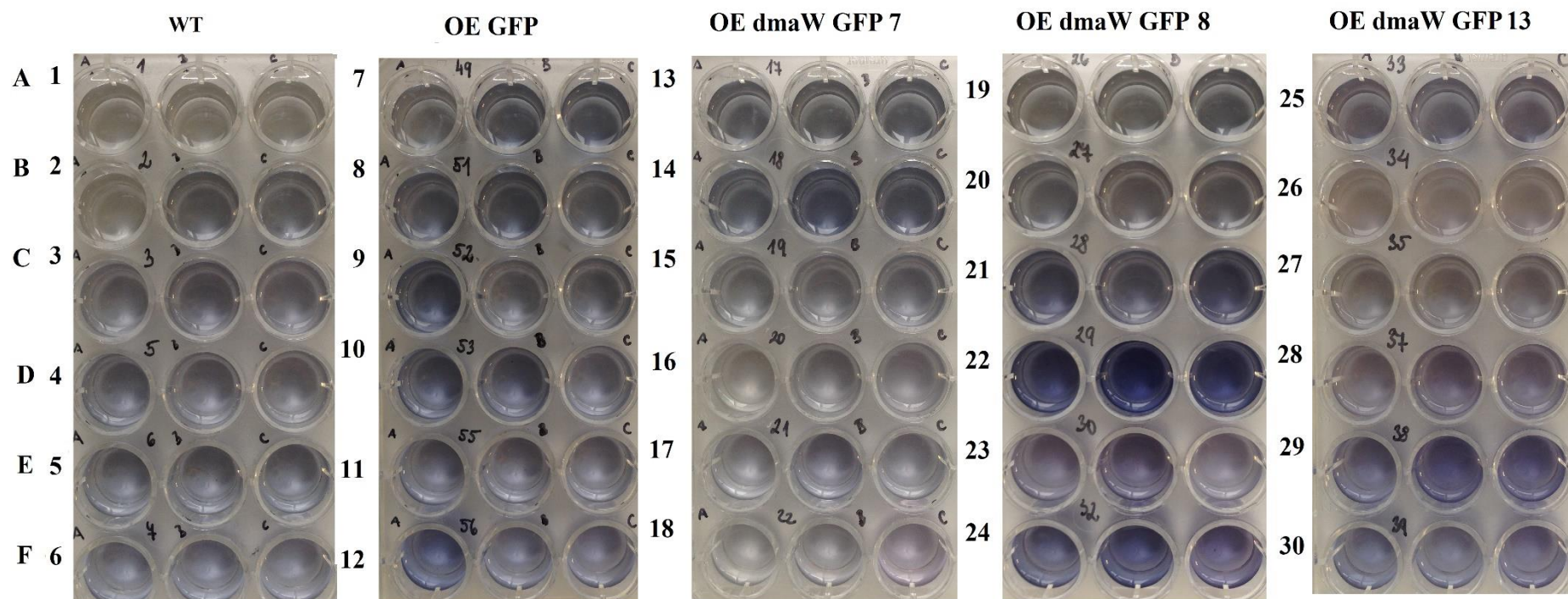
1–6: šest biologických replikátů WT *C. purpurea* P1

7–12: šest biologických replikátů transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *gfp*

13–18: šest biologických replikátů transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *dmaW* s *gfp*, transformant č. 7

19–24: šest biologických replikátů transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *dmaW* s *gfp*, transformant č. 8

25–30: šest biologických replikátů transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *dmaW* s *gfp*, transformant č. 13



Obr. 24: Vizuální hodnocení obsahu námelových alkaloidů Van Urk testem – mycelia z WT *C. purpurea* P1 (WT), transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *gfp* (OE GFP) a tří nezávislých transformantů *C. purpurea* P1 exprimujících *dmaW* s *gfp* (OE dmaW GFP 7, OE dmaW GFP 8, OE dmaW GFP 13). Každý ze šesti biologických replikátů byl analyzován 3x (3 technické replikáty).

1–6: šest biologických replikátů WT *C. purpurea* P1

7–12: šest biologických replikátů transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *gfp*

13–18: šest biologických replikátů transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *dmaW* s *gfp*, transformant č. 7

19–24: šest biologických replikátů transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *dmaW* s *gfp*, transformant č. 8

25–30: šest biologických replikátů transformanta *C. purpurea* P1 exprimujícího *dmaW* s *gfp*, transformant č. 13

Tab. 6: Koncentrace alkaloidů stanovená pomocí Van Urk testu – média WT *C. purpurea* P1 (WT), *C. purpurea* P1 exprimujícího *gfp* (OE GFP) a tři transformantů *C. purpurea* P1 exprimujících *dmaW s GFP* (OE D 7, OE D 8, OE D 13). Každý ze šesti biologických replikátů (A–F) byl analyzován 3x (1-3).

Vzorek	Počet měření	Koncentrace alkaloidů v médiích [mg·ml ⁻¹]					
		A	B	C	D	E	F
WT	1	0,034	0,019	0,019	0,021	0,040	0,032
	2	0,036	0,020	0,023	0,027	0,038	0,032
	3	0,019	0,028	0,035	0,029	0,039	0,032
OE GFP	1	0,045	0,027	0,029	0,059	0,019	0,039
	2	0,040	0,030	0,028	0,051	0,023	0,038
	3	0,046	0,029	0,049	0,036	0,019	0,041
OE D7	1	0,114	0,143	0,097	0,064	0,062	0,019
	2	0,087	0,140	0,095	0,049	0,068	0,019
	3	0,086	0,143	0,101	0,052	0,065	0,024
OE D8	1	0,129	0,129	0,176	0,256	0,125	0,149
	2	0,120	0,129	0,175	0,277	0,125	0,168
	3	0,126	0,122	0,183	0,271	0,125	0,152
OE D13	1	0,137	0,053	0,066	0,109	0,171	0,101
	2	0,143	0,048	0,064	0,117	0,166	0,100
	3	0,142	0,049	0,064	0,110	0,173	0,104

Tab. 7 Koncentrace alkaloidů stanovená pomocí Van Urk testu – mycelia WT *C. purpurea* P1 (WT), *C. purpurea* P1 exprimujícího *gfp* (OE GFP) a tři transformantů *C. purpurea* P1 exprimujících *dmaW s GFP* (OE D 7, OE D 8, OE D 13). Každý ze šesti biologických replikátů (A–F) byl analyzován 3x (1-3).

Vzorek	Počet měření	Koncentrace alkaloidů v myceliích [mg·ml ⁻¹]					
		A	B	C	D	E	F
WT	1	-0,011	-0,011	-0,005	-0,003	0,001	-0,008
	2	-0,022	-0,004	-0,002	-0,003	0,002	0,007
	3	-0,014	-0,003	-0,006	-0,003	-0,002	-0,005
OE GFP	1	-0,005	0,002	0,013	0,006	-0,006	0,000
	2	0,003	0,005	-0,006	0,001	-0,003	-0,004
	3	0,005	0,002	-0,002	-0,002	-0,008	0,012
OE D7	1	0,004	0,007	-0,003	0,053	-0,010	-0,011
	2	0,010	0,010	-0,002	0,000	0,005	-0,006
	3	0,008	0,009	0,003	-0,010	-0,006	-0,004
OE D8	1	0,002	0,009	0,022	0,026	0,012	0,017
	2	-0,007	0,005	0,012	0,040	0,010	0,023
	3	0,012	0,007	0,026	0,028	-0,016	0,017
OE D13	1	0,010	-0,004	-0,003	0,007	0,019	0,010
	2	0,008	-0,003	0,003	0,011	0,018	0,004
	3	0,010	-0,004	-0,001	0,004	0,019	0,009

Tab. 8: Vypočítané průměrné koncentrace alkaloidů v médiích houbových kultur se standardní chybou. Hodnoty byly změřeny Van Urk testem.

F-test a t-test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

	Vzorek	Průměrná koncentrace alkaloidů [mg·ml ⁻¹]
Média	WT	0,029 ± 0,002
	OE GFP	0,035 ± 0,004
	OE D7	0,079 ± 0,016*
	OE D8	0,163 ± 0,021**
	OE D13	0,107 ± 0,016**

WT: WT *C. purpurea* P1

OE GFP: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *gfp*

OE D7: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 7

OE D8: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 8

OE D13: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 13

Tab. 9: Vypočítané průměrné koncentrace alkaloidů v myceliích houbových kultur se standardní chybou. Hodnoty byly změřeny Van Urk testem.

F-test a t-test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

	Vzorek	Průměrná koncentrace alkaloidů [mg·ml ⁻¹]
Mycelia	WT	-0,005 ± 0,002
	OE GFP	0,001 ± 0,001
	OE D7	0,003 ± 0,003*
	OE D8	0,014 ± 0,004**
	OE D13	0,007 ± 0,003*

WT: WT *C. purpurea* P1

OE GFP: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *gfp*

OE D7: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 7

OE D8: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 8

OE D13: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 13

5.4.1.2 HPLC

Množství námelových alkaloidů ve vzorcích médií a mycelií bylo též stanoveno metodou HPLC (4.7.10.3). Z naměřených hodnot (Tab. 10, 11) byl spočítán aritmetický průměr a směrodatná chyba, výsledky byly statisticky zpracovány pomocí F-testu a t-testu (Tab. 12, 13).

Tab. 10: Výsledky obsahu námelových alkaloidů v myceliích WT *C. purpurea* P1 (WT), transformantovi *C. purpurea* P1 exprimujícím *gfp* (OE GFP) a ve třech nezávislých transformantech *C. purpurea* P1 exprimujících *dmaW* s *gfp* (OE D7, OE D8, OE D13). Hodnoty byly změřeny metodou HPLC. Každý ze šesti biologických replikátů (1–6) byl analyzován 1x.

ng v 1 mg vzorku						
Vzorek č.	Ergotamin	Ergotaminin	α -ergokryptin	α -ergokryptinin	Celkem	
WT	1	447,9	124,5	65,9	16,2	654,5
	2	394,7	107,0	54,1	13,5	569,3
	3	268,4	25,9	7,8	2,0	304,1
	4	439,7	118,6	51,6	12,5	622,4
	5	514,9	158,7	66,0	20,4	760,0
	6	414,0	116,8	42,4	9,2	582,4
OE GFP	1	521,4	146,0	64,9	13,8	746,1
	2	440,2	113,1	41,4	8,4	603,1
	3	627,8	151,8	86,1	19,2	884,9
	4	535,9	142,7	58,8	14,2	751,6
	5	356,8	98,3	26,9	5,6	487,6
	6	456,8	125,8	46,1	14,0	642,7
OE D7	1	896,0	239,4	90,1	18,2	1243,7
	2	1107,2	302,9	127,4	35,4	1572,9
	3	687,1	190,6	78,1	18,1	973,9
	4	399,4	112,0	37,7	8,5	557,6
	5	504,3	139,8	60,9	13,5	718,5
	6	256,6	71,9	20,2	4,3	353,0
OE D8	1	983,1	253,6	150,4	29,7	1416,8
	2	992,8	279,6	96,1	20,6	1389,1
	3	1524,9	399,7	162,8	33,3	2120,7
	4	1821,6	560,7	272,5	69,4	2724,2
	5	993,2	255,2	98,3	25,6	1372,3
	6	1357,1	437,0	175,4	42,7	2012,2
OE D13	1	1126,8	345,8	157,5	48,4	1678,5
	2	630,8	178,3	64,2	20,1	893,4
	3	762,6	228,1	106,2	29,4	1126,3
	4	945,8	285,8	127,3	38,8	1397,7
	5	1175,6	376,8	227,7	82,8	1862,9
	6	1054,0	319,3	170,2	58,3	1601,8

Tab. 11: Výsledky obsahu námelových alkaloidů v médiích WT *C. purpurea* P1 (WT), transformantovi *C. purpurea* P1 exprimujícím *gfp* (OE GFP) a ve třech nezávislých transformantech *C. purpurea* P1 exprimujících *dmaW* s *gfp* (OE D7, OE D8, OE D13). Hodnoty byly změřeny metodou HPLC. Každý ze šesti biologických replikátů (1–6) byl analyzován 1x.

	Vzorek č.	μg v 1 ml vzorku						Celkem
		Ergotamin	Ergotaminin	α -ergokryptin	α -ergokryptinin	Elymoclavin	Ergosin	
WT	1	88,7	40,5	13,3	1,8	19,3	2,1	165,7
	2	49,1	19,4	6,2	1,6	17,7	1,9	95,9
	3	48,7	18,7	3,7	0,9	7,5	1,3	80,8
	4	58,7	21,2	6,1	1,4	29,0	2,0	118,4
	5	71,2	30,3	8,6	2,4	15,1	3,0	130,6
	6	72,7	27,9	6,7	1,8	22,8	2,2	134,1
OE GFP	1	85,3	29,3	9,6	2,4	31,4	2,3	160,3
	2	67,3	22,0	5,7	1,3	17,9	1,9	116,1
	3	68,5	21,4	8,6	1,9	32,3	2,0	134,7
	4	93,7	31,1	9,0	2,3	22,5	3,5	162,1
	5	52,9	20,2	3,9	1,4	9,8	1,2	89,4
	6	84,4	31,3	7,7	2,1	18,3	2,0	145,8
OE D7	1	130,2	49,9	10,4	3,6	125,8	6,1	326,0
	2	213,7	80,0	22,4	7,2	121,0	8,8	453,1
	3	150,4	54,3	15,8	5,3	92,5	3,9	322,2
	4	107,8	38,7	8,4	2,8	80,5	3,5	241,7
	5	108,6	39,2	10,8	3,9	83,5	3,4	249,4
	6	57,2	20,7	3,8	1,3	75,8	2,0	160,8
OE D8	1	169,3	61,7	21,8	8,0	133,1	8,0	401,9
	2	188,9	79,4	15,5	6,9	167,2	7,3	465,2
	3	280,3	110,8	26,5	11,0	192,4	11,1	632,1
	4	339,7	126,0	45,2	17,0	225,6	12,4	765,9
	5	212,7	85,3	19,8	8,8	191,9	8361,5	8880,0
	6	240,9	97,5	29,9	10,9	186,1	13,3	578,6
OE D13	1	216,3	86,0	26,7	9,5	88,5	10,6	437,6
	2	104,2	41,3	9,4	3,5	63,4	4,3	226,1
	3	125,4	47,6	14,5	4,8	103,8	6,3	302,4
	4	163,9	64,6	19,8	7,6	102,1	7,5	365,5
	5	227,8	91,4	37,4	13,5	137,5	12,9	520,5
	6	165,8	62,5	22,9	7,7	87,2	8,2	354,3

Tab. 12: Vypočítané průměrné koncentrace alkaloidů v médiích houbových kultur se standardní chybou. Hodnoty měřeny metodou HPLC. Na výsledky byl aplikován F-test a t-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Médium	Průměrné množství alkaloidů [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]						
	Vzorek	Ergotamin	Ergotaminin	α -ergokryptin	α -ergokryptinin	Elymoclavin	Ergosin
WT	64,9 ± 5,8	26,3 ± 3,1	7,4 ± 1,2	1,7 ± 0,2	18,6 ± 2,7	2,1 ± 0,2	120,9 ± 11,2
OE GFP	75,4 ± 5,6	25,9 ± 1,9	7,4 ± 0,8	1,9 ± 0,2	22,0 ± 3,2	2,1 ± 0,3	134,7 ± 10,4
OE D7	128,0 ± 19,5*	47,1 ± 7,4*	11,9 ± 2,4*	4,0 ± 0,8*	96,5 ± 8,0***	4,6 ± 0,9*	292,2 ± 37,1**
OE D8	238,6 ± 23,5***	93,5 ± 8,6***	26,5 ± 3,9**	10,4 ± 1,3**	182,7 ± 11,5***	1402,3 ± 1270,6	1954,0 ± 1265,4
OE D13	167,2 ± 18,1**	65,6 ± 7,5**	21,8 ± 3,7*	7,8 ± 1,3**	97,1 ± 9,1***	8,3 ± 1,1**	367,8 ± 38,3***

WT: WT *C. purpurea* P1

OE GFP: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *gfp*

OE D7: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 7

OE D8: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 8

OE D13: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 13

Tab. 13: Vypočítané průměrné koncentrace alkaloidů v myceliích houbových kultur se standardní chybou. Hodnoty měřeny metodou HPLC. Na výsledky byl aplikován F-test a t-test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Mycelium	Průměrné množství alkaloidů [ng·mg ⁻¹]				
	Vzorek	Ergotamin	Ergotaminin	α ergokryptin	α -ergokryptinin
WT	413,3 ± 30,5	108,6 ± 16,5	48,0 ± 8,1	12,3 ± 2,3	582,1 ± 56,8
OE GFP	489,8 ± 34,7	129,6 ± 7,8	54,0 ± 7,7	12,5 ± 1,8	686,0 ± 51,5
OE D7	641,8 ± 118,9	176,1 ± 31,9	69,1 ± 14,3	16,3 ± 4,0	903,3 ± 168,8
OE D8	1278,8 ± 130,4***	364,3 ± 46,1**	159,2 ± 24,1**	36,9 ± 6,6*	1839,2 ± 203,5**
OE D13	949,3 ± 79,9***	289,0 ± 27,8***	142,2 ± 21,0**	46,3 ± 8,4**	1426,8 ± 135,4***

WT: WT *C. purpurea* P1

OE GFP: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *gfp*

OE D7: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 7

OE D8: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 8

OE D13: transformant *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *gfp*, transformant č. 13

6 DISKUZE

Houba *Claviceps purpurea*, patřící mezi vláknité houby z oddělení *Ascomycota*, napadá neoplozená ovaria více než 400 druhů jednoděložných rostlin (Bové, 1970). Prvotním projevem této houbové infekce je tvorba medovice, tekutiny obsahující spóry *C. purpurea*. Tato tekutina je poté pomocí větru a hmyzu šířena na další dosud nenapadené klasy obilovin, dochází k tzv. sekundární infekci. V konečné fázi infekce je napadená obilka nahrazena tmavě červenohnědým sklerociem (tzv. námel) (Hulvová *et al.*, 2013). Toto sklerocium je významným zdrojem námelových alkaloidů, které se hojně využívají ve farmaceutickém průmyslu např. k léčbě migrén či Parkinsonovi nemoci (Schiff, 2006).

V současné době našly ve farmaceutickém průmyslu uplatnění jak kmeny *C. purpurea* produkující alkaloidy *in planta* (polní infekce), tak kmeny, které produkují alkaloidy v submerzních kulturách (Křen *et Cvak*, 1999). V obou případech je hlavním cílem základního výzkumu získání kmene *C. purpurea* s co nejvyšší a zároveň stabilní produkcí alkaloidů (Hulvová *et al.*, 2013). Na Oddělení molekulární biologie, CRH již byly v rámci výzkumu týkajícího se *C. purpurea* provedeny některé genetické modifikace této houby s cílem zvýšit produkci námelových alkaloidů (Mgr. Helena Hulvová, Mgr. Michaela Hradilová, nepublikováno).

Např. v bakalářské práci Věry Juračkové (2014) byla provedena transformace protoplastů *C. purpurea* kmenů Gal130 a Gal012 konstruktem *p444::easG*, za účelem nadexprese genu *easG*, pro expresi byl použit konstitutivní promotor *gpdA*. Gen *easG* kóduje agroklavin syntasu, která redukuje isochanoklavin-I aldehyd na agroklavin (Matuschek *et al.*, 2011). Nicméně úspěšnost transformace nebyla v této bakalářské práci potvrzena.

Lucie Bražinová ve své bakalářské práci (2012) transformovala protoplasty *C. purpurea* kmene Gal130 konstruktem *dmaW-p444* za účelem nadexprese genu *dmaW*, pro expresi tohoto genu byl opět použit konstitutivní promotor *gpdA*. Produkt tohoto genu, dimethylallyltryptophan syntasa (DMATS) je prvním specifickým enzymem biosyntézy námelových alkaloidů (Lee *et al.*, 1976). V této bakalářské práci byla nadexprese genu *dmaW* potvrzena metodou Real-Time PCR, avšak produkce námelových alkaloidů v získaném mutantovi ověřena nebyla.

V této předložené bakalářské práci byly transformovány protoplasty *C. purpurea* kmene P1. Tento kmen *C. purpurea* je schopný produkovat alkaloidy pouze v submerzní kultuře (Robbers *et al.* 1972) a vlivem mutagenese ztratil schopnost sporulace (Tudzynski *et al.*, 1999). Protoplasty této houby byly transformovány vektorem *pNDH-OGG::dmaW* (vektor obsahující *dmaW* z *C. purpurea* 20.1 fúzované na N konci s *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem), pro kontrolu byly protoplasty též transformovány vektorem *pNDH-OGG* (vektor obsahující *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem). Pro transformaci *C. purpurea* byl vybrán gen kódující

DMATS z toho důvodu, že tento enzym katalyzuje první krok biosyntézy námelových alkaloidů, tudíž jeho nadexprese by mohla vést ke zvýšené produkci alkaloidů.

Po transformaci protoplastů *C. purpurea* P1 byly z primárních transformantů vybráni tři nezávislí mutanti exprimující *dmaW* s *gfp* a jeden mutant exprimující *gfp*. Vzhledem k tomu, že buňky toho kmene obsahují více než 10 jader (Spalla *et Marnati*, 1978), byli získáni transformanti s velkou pravděpodobností heterokaryoti. Pro účely dalších analýz bylo nutné získat homokaryoty. Ti byli izolováni metodou, při níž byly izolovány jednotlivé špičky hyf (Leslie *et al.*, 2006). Kvůli vyšší pravděpodobnosti získání homokaryota, byla tato metoda opakována třikrát. Pro definitivní potvrzení homokaryotické kultury, by bylo potřeba sekvenovat části gDNA, do kterých byl vektor vložen a poté provést např. Southern blot. Z časových důvodů k těmto metodám přistoupeno nebylo.

Za účelem ověření vyšší produkce alkaloidů v submerzní kultuře byli získáni mutanti společně s WT *C. purpurea* P1 kultivováni v médiu s nižším obsahem fosfátu, který aktivuje produkci alkaloidů (Krupinski *et al.*, 1976). Nejdříve byl obsah alkaloidů stanoven Van Urk testem, který však slouží pouze k orientačnímu stanovení celkového obsahu námelových alkaloidů (van Urk, 1929). Van Urkovo činidlo v roztoku kyseliny sírové reaguje s indolovými jádry za vzniku modrého zbarvení s absorpční při 580 nm po expozici světlem. Modré zbarvení roztoku je pak přímo úměrné obsahu alkaloidů ve vzorku, jako standard byl použit ergotamin, majoritní alkaloid produkovaný *C. purpurea* P1 (Haarmann *et al.*, 2008). Vypočítané hodnoty korelovaly s intenzitou modrého zbarvení roztoku.

WT *C. purpurea* P1 vykazoval čiré až světle modré zbarvení v médiu i myceliu, přičemž v médiích byla intenzita modrého zbarvení (stejně jako v případě všech transformantů) silnější, což naznačuje vyšší obsah alkaloidů. Vzorky *C. purpurea* P1 exprimující *gfp* měly stejně jako WT převážně čirou barvu, občas se zde vyskytovala světle modrá barva naznačující vyšší produkci. Výrazná změna zbarvení roztoků nastala až se vzorky transformantů *C. purpurea* P1 exprimujících *dmaW* s *gfp*. Transformant označený jako OE *dmaW* GFP 7 vykazoval oproti ostatním dvěma transformantům (OE *dmaW* GFP 8, OE *dmaW* GFP 13) nižší intenzitu modrého zbarvení, obsahoval tedy méně alkaloidů. Na druhou stranu byl obsah alkaloidů u tohoto transformanta stále vyšší než u WT.

Koncentrace alkaloidů v myceliích dosahovala velmi nízkých hodnot. Po přepočítání obsahu alkaloidů v celkovém množství kultury (výsledky neukázány) lze říci, že *C. purpurea* P1 produkuje námelové alkaloidy do média (přibližně 6x více než v myceliu). Tento fakt koreluje s dostupnou literaturou (Haarmann *et al.*, 2008).

Druhou metodou použitou pro stanovení obsahu námelových alkaloidů ve vzorcích médií a mycelií houbových kultur byla metoda HPLC. Tato metoda je mnohem přesnější a lze využít ke kvantitativnímu i kvalitativnímu stanovení alkaloidů (Rottinghaus *et al.*, 1993). V případě WT *C. purpurea* P1 byly v médiích stanoveny alkaloidy ergosin (ergopeptin skládající

se z aminokyselin Alanin + Leucin + Prolin), ergotamin (ergopeptin skládající se z aminokyselin Alanin + Fenylalanin + Prolin), α -ergokryptin (ergopeptin skládající se z aminokyselin Valin + Leucin + Prolin) a jejich diastereoizomery ergotaminin a α -ergokryptinin. V médiích byl také detekován elymoklavin. Dle dostupné literatury se jedná o alkaloidy, které lze stanovit metodou HPLC v médiu WT *C. purpurea* P1 (Haarmann *et al.*, 2008).

Na základě získaných výsledků lze říci, že hlavním alkaloidem produkovaným WT *C. purpurea* P1 do média je opravdu ergotamin, který společně s ergotamininem tvoří přibližně 75,4 % produkce. Minoritními alkaloidy produkovanými do média jsou α -ergokryptin a ergosin. α -ergokryptin společně s α -ergokryptininem tvoří přibližně 7,5 % celkové produkce, ergosin představuje přibližně 1,7 % celkové produkce. Zbylou část produkce (15,4 %) pokrývá elymoklavin.

Na základě výsledků lze říci, že koncentrace alkaloidů v médiu WT *C. purpurea* P1 byla přibližně stejná jako u transformanta exprimujícího *gfp*, zároveň obě houby produkovaly stejné typy alkaloidů. V případě všech tří transformantů exprimujících *dmaW* s *gfp* byla celková průměrná produkce alkaloidů 2,4x (OE D7), 16,2x (OE D8) a 3,0x (OE D13) vyšší v porovnání s WT. Nicméně pouze u dvou mutantů ze tří byl tento nárůst signifikantní. Co se týče jednotlivého zastoupení alkaloidů, ke kvalitativní změně u žádného z transformantů nedošlo. U všech transformantů exprimujících *dmaW* s *gfp* došlo k signifikantnímu zvýšení hladiny ergotaminu a jeho diastereoizomeru ergotamininu, též se ve všech případech zvýšila produkce α -ergokryptinu a jeho diastereoizomeru α -ergokryptininu. Signifikantní nárůst ergosinu byl pozorován pouze u dvou transformantů. Nejvyšší nárůst v produkci byl zaznamenán u elymoklavinu, kdy transformanti vykazovali 5,2x (OE D7), 9,8x (OE D8) a 5,2x (OE D13) vyšší produkci tohoto alkaloidu v médiu oproti WT.

V myceliích WT *C. purpurea* P1 byly metodou HPLC stanoveny alkaloidy ergotamin a α -ergokryptin a jejich diastereoizomery ergotaminin a α -ergokryptinin. Ergosin ani elymoklavin v myceliích detekovány nebyly. Na základě získaných hodnot lze opět říci, že hlavním alkaloidem produkovaným *C. purpurea* P1 do mycelia je ergotamin, který společně s ergotamininem tvoří 89,7 % celkové produkce. Minoritním alkaloidem, který bylo možné stanovit v myceliu je α -ergokryptin, který společně s α -ergokryptininem představuje zbylých 10,3 %.

Koncentrace alkaloidů v myceliu WT *C. purpurea* P1 byla stejně jako v případě médií, přibližně stejná jako u transformanta exprimujícího *gfp*, zároveň obě houby opět produkovaly stejné typy alkaloidů. Všichni tři transformanti exprimující *dmaW* s *gfp* produkovaly v myceliu více alkaloidů než WT, konkrétně 1,6x (OE D7), 3,2x (OE D8) a 2,5x (OE D13) více než WT. Nicméně pouze u dvou mutantů ze tří byl tento nárůst signifikantní. U těchto dvou mutantů byl též signifikantní nárůst ergotaminu a erotamininu i α -ergokryptinu a α -ergokryptininu. Co se

týče jednotlivého zastoupení alkaloidů, ke kvalitativní změně v produkci alkaloidů u těchto transformantů, stejně jako v případě médií, opět nedošlo.

Na základě výše zmíněných výsledků lze usuzovat, že nadexprese *dmaW* u *C. purpurea* P1 umožňuje vyšší produkci alkaloidů v submerzní kultuře. V budoucnu je však potřeba ještě ověřit nadexpresi *dmaW* v získaných transformantech pomocí qPCR a western blotu.

7 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala vlivem nadexprese dimethylallyltryptophansyntasy na zvýšení produkce námelových alkaloidů v produkčním kmeni *Claviceps purpurea*. Literární rešerše byla vypracována na téma obecné charakteristiky rodu *Claviceps* se zaměřením na životní cyklus *Claviceps purpurea* produkující alkaloidy *in planta* nebo v submerzní kultuře. Dále byla zpracována podkapitola o chemické struktuře námelových alkaloidů a jejich farmakologickém účinku. Další podkapitoly teoretické části byly věnovány biosyntéze námelových alkaloidů u *C. purpurea*, její regulaci a metodám analýzy námelových alkaloidů.

V experimentální části byly transformovány buňky *Escherichie coli* TOP10 konstrukty *pNDH-OGG::dmaW* (vektor obsahující *dmaW* z *C. purpurea* 20.1 fúzované na N konci s *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem) a *pNDH-OGG* (vektor obsahující *gfp* pod konstitutivním *OliC* promotorem). Poté byla provedena transformace protoplastů produkčního kmene *Claviceps purpurea* P1 naštěpenou a přečištěnou plasmidovou DNA. Získaní transformanti byli úspěšně ověřeni pomocí diagnostické PCR a metodou sekání hyf byla získána homokarytická kultura. Pomocí Van Urk testu bylo stanoveno přibližné množství námelových alkaloidů v médiu a myceliu houbové kultury. Podrobnější kvalitativní a kvantitativní analýza obsahu námelových alkaloidů byla provedena metodou HPLC.

Výsledkem bakalářské práce je transformace produkčního kmene *Claviceps purpurea* P1 za účelem zvýšení exprese genu *dmaW*, který je klíčový pro biosyntézu námelových alkaloidů. Transformanti obsahující konstrukt *pNDH-OGG::dmaW* vykazovali zvýšený obsah námelových alkaloidů oproti WT *C. purpurea* P1. V budoucnu bude nadexprese *dmaW* u těchto transformantů ověřena pomocí Real-time PCR a western blotu.

8 LITERATURA

- Allport N. L., Cocking T. T. (1932): The colorimetric assay of ergot. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 341.
- Berde B., Stürmer E. (1978): Introduction to the pharmacology of ergot alkaloids and related compounds as a basis of their therapeutic application. Berde B., Schild H. O. (eds), *Ergot alkaloids and related compounds*, pp. 1–28, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Bok J. W., Keller N. P. (2004): *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp., *Eukaryotic Cell*, 3, 527–535.
- Bové F. J. (1970): The story of ergot. pp. 297, S. Karger, New York, USA.
- Brauer K. L., Robbers J. E. (1987): Induced parasexual processes in *Claviceps* sp. strain SD58. *Applied and Environmental Mikrobiology*, 53, 70–73.
- Bražinová L. (2012): Transformace produkčního kmene *Claviceps purpurea*. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Burke J. M., Spiers D. E., Kojima F. N., Perry G. A., Salfen B. E., Wood S. L., Patterson D. J., Smith M. F., Lucy M. C., Jackson W. G., Piper E. L. (2001): Interaction of endophyte-infected fescue and heat stress on ovarian function in the beef heifer. *Biology of reproduction*, 65, 260–268.
- Cody J. T., Valtier S. (1997): Immunoassay analysis of lysergic acid diethylamide. *Journal of Analytical Toxicology*, 21, 459–464.
- Correia T., Grammel N., Ortel I., Keller U., Tudzynski P. (2003): Molecular cloning and analysis of the ergopeptine assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chemistry and Biology*, 10, 1281–1292.
- Coyle C. M., Panaccione D. G. (2005): An ergot alkaloid biosynthesis gene and clustered hypothetical genes from *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental mikrobiology*, 71, 3112–3118.
- Coyle C. M., Cheng J. Z., O'Connor S. E., Panaccione D. G. (2010): An old yellow enzyme gene controls the branch point between *Aspergillus fumigatus* and *Claviceps purpurea* ergot alkaloid pathways. *Applied and environmental mikrobiology*, 76, 3898–3903.
- Cress W. A., Chayet L. T., Rilling H. C. (1981): Crystallization and partial characterization of dimethylallyl pyrophosphate: L-tryptophan dimethylallyltransferase from *Claviceps* sp. SD58. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 10917–10923.
- Crews C. (2013): Methods for analysis of ergot alkaloids. In: Ramawat K., Mérillon J. M. (eds): *Natural products*, pp. 1133–1152, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Crews C. (2015): Analysis of ergot alkaloidy. *Toxins*, 7, 2024–2050.

- de Groot A. N. J. A., van Dongen, P. W. J., Vree, T. B., Hekster, Y. A., van Roosmalen J. (1998): Ergot alkaloids. Current status and review of clinical pharmacology and therapeutic use compared with other oxytocics in obstetrics and gynaecology. *Drugs*, 56, 523–535.
- Demeke T., Kidane Y., Wuhib E. (1979): Ergotism: a report on an epidemic. *Ethiopian Medical Journal*, 17, 107–113.
- Di Mavungu J. D., Malysheva S. V., Sanders M., Larionova, D., Robbens J., Dubruel P., van Peteghem C., de Saeger S. (2012): Development and validation of a new LC-MS/MS method for the simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their corresponding epimers. Application to some food and feed commodities. *Food Chemistry*, 135, 292–303.
- Didec-Brumec M., Gaberc-Porekar V., Alacevic M. (1996): Relationship between the *Claviceps* life cycle and productivity of ergot alkaloids. *Critical reviews in biotechnology*, 16, 257.
- Döbbelin W, Hartmann V. (1980): Wahl der analysenmethode und ihr einflub auf die qualitätsbeurteilung von ergotalkaloidzubereitungen. *Deutsche Apotheker-Zeitung*, 120, 1821–1823.
- Eadie M. J. (2003): Convulsive ergotism-epidemics of the serotonin syndrome. *The lancet neurology*, 2, 429–434.
- Edlund P. O. (1981): Determination of ergot alkaloids in plasma by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 226, 107–115.
- Ehmann A., (1977): The van Urk-Salkowski reagent, a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *Journal of Chromatography*, 132, 267–276.
- Erge D., Maier W., Gröger D. (1973): Untersuchungen über die enzymatische Umwandlung von Chanoclavine-I. *Biochemie und physiologie der pflanzen*, 164, 234–247.
- Esser K., Tudzynski P. (1978): Genetics of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Theoretical and applied genetics*, 53, 145–149.
- Evers N. (1927): A colour test for ergot alkaloids. *Pharm. J. Pharmacist*, 25, 721–723.
- Flieger M., Wurst M., Shelby R. (1997): Ergot alkaloids – sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiologica*, 42, 3–30.
- Flieger M., Wurst M., Stuchlík J., Reháček Z. (1981): Isolation and separation of new natural lactam alkaloids of ergot by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 207, 139–144.
- Florea S., Panaccione D.G., Schardl L., (2017): Ergot alkaloids of the family *clavicipitaceae*. *Phytopathology*, 107, 504–518.
- Floss H.G. (1976): Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. *Tetrahedron*, 32, 873–912.

- Floss H. G., Mothes, U. (1964): Über den einfluss von tryptophan und analogen verbindungen auf die biosynthese von clavinalkaloiden in saprophytischer kultur. *Archiv für mikrobiologie*, 48, 213–221.
- Gadberry M. S., Denard T. M., Spiers D. E., Piper E. L. (2003): Effects of feeding ergovaline on lamb performance in a heat stress environment. *Journal of Animal Science*, 81, 1538–1545.
- Gebler J. C., Poulter C. D. (1992): Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 296, 308–313.
- Gebler J. C., Woodside A. B., Poulter D. C., (1992): Dimethylallyltryptophan synthase. an enzyme-catalyzed electrophilic aromatic substitution. *Journal of the american chemical society*., 114, 7354–7360.
- Gee M. H., Yu Z. G., Zhang J., Wu J. H., Tan R. X. (2009): Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Natural Products*, 72, 753–755.
- Groger D., Floss H. G. (1998): Chapter 5 Biochemistry of ergot alkaloids-achievements and challenges. In: Cordell G.A., editor. *The alkaloids-chemistry and biology*, pp. 171–218, New York Academic Press.
- Guerre P. (2015): Ergot alkaloids produced by endophytic fungi of the genus *Epichloë*. *Toxins*, 7, 773–790.
- Gupta V., Jain A. D. K., Gill N. S., Gupta K. (2012): Development and validation of HPLC method. *International research journal of pharmaceutical and applied sciences*, 2, 17–25.
- Haarmann T., Lorenz N., Tudzynski P. (2008): Use of a nonhomologous end joining deficient strain ($\Delta ku70$) of the ergot fungus *Claviceps purpurea* for identification of a nonribosomal peptide synthetase gene involved in ergotamine biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 35–44.
- Haarmann T., Machado C., Lübke Y., Correia T., Schardl Ch. L., Panaccione D. G., Tudzynski P. (2005): The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: Extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry*, 66, 1312–1320.
- Haarmann T., Ortel I., Tudzynski P., Keller U. (2006): Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. *ChemBioChem*, 7, 645–652.
- Haarmann T., Rolke Y., Giesbert S., Tudzynski P. (2009): Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Molecular plant pathology*, 10, 563–577.
- Hanai T. (1999): *HPLC: A practical guide*. pp. 137, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.
- Havemann J., Vogel D., Loll B., Keller U. (2014): Cyclolization of D-lysergic acid alkaloid peptides. *Chemistry and Biology*, 21, 146–155.

- Heinstein P. F., Lee S. L., Floss H. G. (1971): Isolation of dimethylallylpyrophosphate: Tryptophan dimethylallyl transferase from the ergot fungus (*Claviceps spec.*). Biochemical and biophysical research communications, 44, 1244–1251.
- Hoffmeister D., Keller N. P. (2007): Natural products of filamentous fungi-enzymes, genes, and their regulation. Natural product reports, 24, 393–416.
- Hofmann A. (1978): Historical review on ergot alkaloids. Pharmacology, 16, 1–11.
- Hofmann A. (1980): LSD, My problem child. McGraw-Hill, New York.
- Hooper W. D., Sutherland J. M., Eadie M. J., Tyrer J. H. (1974): Fluorimetric assay of ergotamine. Analytica chimica acta, 69, 11–17.
- Hulvová H., Galuszka P., Frébortová J., Frébort I. (2013): Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. Biotechnology advances, 31, 79–89.
- Hwang S. W. (1966): Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. Applied and environmental microbiology, 14, 784–788.
- Churáček J., Jandera P. (1981): Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie. 1. vydání, pp. 140, Státní nakladatelství technické literatury, Praha.
- Juračková V. (2014): Genetická modifikace *Claviceps purpurea*. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Kim S. U., Cho Y. J., Floss H. G., Anderson J. A. (1983): Conversion of elymoclavine to paspalic acid by a particulate fraction from an ergotamine producing strain of *Claviceps* sp. Planta Medica, 48, 145–148.
- Klouda P. (2003): Moderní analytické metody. 2. vydání, pp. 132, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava.
- Komarova E. L., Tolkachev O. N. (2001): The chemistry of peptide alkaloids. Part 2. Analytical methods for determining ergot alkaloids. Pharmaceutical Chemistry Journal, 35, 542–549.
- Köppen R., Rasenko T., Merkel S., Moench B., Koch M. (2013): Novel solid-phase extraction for epimer-specific quantitation of ergot alkaloids in rye flour and wheat germ oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 10699–10707.
- Kozlovsky A. G., Zhelifonova V. P., Antipova T. V. (2005): The fungus *Penicillium citrinum*, isolated from permafrost sediments, as a producer of ergot alkaloids and new quinoline alkaloids quinocitrinines. Applied biochemistry and mikrobiology, 41, 499–502.
- Krska R., Berthiller F., Schuhmacher R., Nielsen K. F., Crews C. (2008a): Determination of ergot alkaloids: purity and stability assessment of standards and optimization of extraction conditions for cereal samples. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 91, 1363–1371.

- Krska R., Stubbings G., Macarthur R., Crews C. (2008b): Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC–MS–MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 563–576.
- Krupinski V. M., Robbers J. E., Floss H. G. (1976): Physiological Study of Ergot: Induction of Alkaloid Synthesis by Tryptophan at the Enzymatic Level. *Journal of Bacteriology*, 125, 158–165.
- Křen V., Cvak L. (1999): Ergot, the genus *Claviceps*. pp. 173–200, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Lee M. R. (2009): The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: from antiquity to 1900. *The journal of the Royal college of physicians Edinburg*, 39, 179–184.
- Lee S. L., Floss H. G., Heinstein P. (1976): Purification and properties of dimethylallylpyrophosphate: tryptophan dimethylallyl transferase, the first enzyme of ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps* sp. SD 58. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 177, 84–94.
- Lehner A. F., Craig M., Fannin N., Bush L., Tobin T. (2005): Electrospray + tandem quadrupole mass spectrometry in the elucidation of ergot alkaloids chromatographed by HPLC: Screening of grass or forage samples for novel toxic compounds. *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 1484–1502.
- Leslie J. F., Summerell B. A. (2006): *The fusarium laboratory manual*. Blackwell Pub., Ames, Iowa.
- Leuchtman A., Schmidt D., Bush L. P. (2000): Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 1025–1036.
- Li S. M. (2009): Evolution of aromatic prenyltransferases in the biosynthesis of indole derivatives. *Phytochemistry*, 70, 1746–1757.
- Liu X., Walsh C. T. (2009): Characterization of cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan dimethylallyltransferase in cyclopiazonic acid biosynthesis: Substrate promiscuity and site directed mutagenesis studies. *Biochemistry*, 48, 11032–11044.
- Lorenz N., Haarmann T., Pažoutová S., Jung M., Tudzynski P. (2009): The ergot alkaloid gene cluster: Functional analyse and evolutionary aspects. *Phytochemistry*, 70, 1822–1832.
- Lorenz N., Olšovská J., Šulc M., Tudzynski P. (2010): Alkaloid cluster gene *ccsA* of the ergot fungus *Claviceps purpurea* encodes chanoclavine I synthase, a flavin adenine dinucleotide-containing oxidoreductase mediating the transformation of N-methyl-dimethylallyltryptophan to chanoclavine I. *Applied and environmental microbiology*, 76, 1822–1830.
- Lösecke W., Neumann D., Schmauder H., Gröger D. (1982): Changes in cytoplasmic ultrastructure during submerged cultivation of a peptide alkloids-producing strain of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 22, 49–61.

- Lösecke W., Neumann D., Schmauder H., Gröger, D. (1980): Ultrastructure of submerged non-alkaloid producing strains of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 175, 552–561.
- Luk L. Y. P., Tanner M. E. (2009): Mechanism of dimethylallyltryptophan synthase: Evidence for a dimethylallyl cation intermediate in an aromatic prenyltransferase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 13932–13933.
- Malinka E. A., Khutornoi A. M., Vodzinskii S. V., Zhilina Z. I., Kamalov G. L. (1988): Photocatalytic reduction of methyl viologen and water in the presence of zinc porphyrins. *Reaction kinetics and catalysis letters*, 36, 407–410.
- Mann D. F., Floss H. G. (1977): Purification and properties of anthranilate synthetase from the ergot fungus, *Claviceps spec.*, strain SD 58. *Lloydia*, 40, 136–145.
- Mantle P. G., Nisbet L. J. (1976): Differentiation of *Claviceps purpurea* in axenic culture. *Journal of General Microbiology*, 93, 321–334.
- Matuschek M., Wallwey C., Xie X., Li S. M. (2011): New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: an agroclavine synthase EasG catalyses, via a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine. *Organic and biomolecular chemistry*, 9, 4328–4335.
- Miyabe K., Suzuki M. (1994): Adsorption characteristics of reversedphase liquid chromatography with various alkyl bonded phases. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 27, 785–789.
- Mizrahi, A., Miller, G. (1968): Long-term preservation of a nonsporulating strain of *Claviceps paspali*. *Journal of Applied Microbiology*, 16, 1100–1101.
- Müller C, Klaffke H. S., Krauthuse W., Wittkowski R. (2006): Determination of ergot alkaloids in rye and rye flour. *Mycotoxin research*, 22, 197–200.
- Nelson C. C., Flotz R. L. (1992): Chromatographic and mass spectrometric methods for determination of lysergic acid diethylamide (LSD) and metabolites in body fluids. *Journal of chromatography A*, 580, 97–109.
- Ortel I., Keller U. (2009): Combinatorial assembly of simple and complex d-lysergic acid alkaloid peptide classes in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 6650–6660.
- Otero G. C. F., Lucangioli S. E., Carducci C. N. (1993): Adsorption of drugs in high-performance liquid chromatography injector loops. *Journal of Chromatography A*, 654, 87–91.
- Otsuka H., Quigley F. R., Gröger D., Anderson J. A., Floss H. G. (1980): *In vivo* and *in vitro* evidence for N-methylation as the second pathway-specific step in ergoline biosynthesis. *Planta Medica*, 40, 109–119.
- Pažoutová S., Řeháček, Z. (1984): Phosphate regulation of phosphatases in submerged cultures of *Claviceps purpurea* 129 producing clavine alkaloids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20, 389–392.

- Pertot E., Puc A., Kremser M. (1977): Lyophilization of Nonsporulating Strains of the Fungus *Claviceps*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 4, 289–294.
- Poinar, G. J., Alderman, S., and Wunderlich, J. (2015): One hundred million year old ergot: Psychotropic compounds in the Cretaceous. *Palaeodiversity*, 8, 13–19.
- Rehmeyer C., Li, W., Kusaba M., Kim Y. S., Brown D., Staben C., Dean R., Farman M., (2006): Organization of chromosome ends in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Nucleic Acids Research*, 34, 4685–4701.
- Riederer B., Han M., Keller U. (1996): D-Lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 27524–27530.
- Rigbers O., Li S. M. (2008): Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 26859–26868.
- Robbers J. E. (1984): The fermentative production of ergot alkaloids. In: Mizrahi A, Wezel A. L. (eds.) *Advances in biotechnological processes*, vol. 3, pp. 197–239, Alan R. Liss, New York.
- Robbers J. E., Robertson I. W., Hornemann K. M., Jindra J., Floss H. G. (1972): Physiological studies on ergot: further studies on the induction of alkaloid synthesis by tryptophan and its inhibition by phosphate. *Journal of Bacteriology*, 112, 791–796.
- Roberts C. A., Kallenbach R. L., Hill N. S., Rottinghaus G. E., Evans T. J. (2009): Ergot alkaloid concentrations in tall fescue hay during production and storage. *Crop Science*, 49, 1496–1502.
- Robertson L. W., Robbers J. E., Floss H. G. (1973): Some characteristics of tryptophan uptake in *Claviceps* species. *Journal of Bacteriology*, 144, 208–219.
- Robinson S. L., Panaccione D. G. (2015): Diversification of ergot alkaloids in natural and modified fungi. *Toxins*, 7, 201–218.
- Robinson S. L., Panaccione D. G., Cullen D. (2014): Heterologous expression of lysergic acid and novel ergot alkaloids in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*, 80, 6465–6472.
- Romberg M. H. (1853): *Manual of nervous diseases of man*. pp. 395–401, Sydenham society, London.
- Rottinghaus G. E., Schultz L. M., Ross P. F., Hill N. S. (1993): An HPLC method for the detection of ergot in ground and pelleted feeds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5, 242–247.
- Rottinghaus G. E., Garner G. B., Cornell C. N., Ellis J. L. (1991): HPLC method for quantitating ergovaline in endophyte-infested tall fescue: Seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades, and seed heads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 112–115.

- Řeháček Z., Kozová J., Řičicová A., Kašlík J., Sajdl P., Švarc S., Basappa S. C. (1971): Role of endogenous tryptophan during submerged fermentation of ergot alkaloids. *Folia Microbiologica*, 16, 35–40.
- Scott P. M., Lawrence G. A. (1980): Analysis of ergot alkaloids in flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 1258–1261.
- Segal E., Germanier R. (1974): Degeneration phenomenon of alkaloid-producing strains of *Claviceps paspali*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 14, 145–151.
- Shelby R. A. (1999): Toxicology of ergot alkaloids in agriculture. *Ergot Toxicology*. Overseas Publishers Association pp. 469–477.
- Shelby R. A., Flieger M. (1997): Improved method of analysis for ergovaline in tall fescue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1797–1800.
- Schardl C. L., Panaccione D. G., Tudzynski P., (2006): Ergot alkaloids – biology and molecular biology. *The alkaloids. Chemistry and biology*, 63, 45–86.
- Schardl C. L., Young C. A., Hesse U., Amyotte S. G., Andreeva K., Calie P. J., Fleetwood D. J., Haws D. C., Moore N., Oeser B., *et al.* (2013): Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: Multi-genome analysis of the *Clavicipitaceae* reveals dynamics of alkaloid loci. *PLoS Genetics*, 9, e1003323–.
- Schiff P. L. (2006): Ergot and its alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 70, 1–10.
- Schmauder H. P., Gröger D. (1983): Selection and properties of potential alkaloid forming *Claviceps* strains – mutagenesis and culture of ergosine forming mutants. *Biotechnologia Acta*, 3, 379–382.
- Schoenmakers P. J. (1986): Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development. Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co. New York.
- Schumacher J. (2012): Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 483–497.
- Schwedt G. (1997): The essential guide to analytical chemistry. 2 vydání, pp. 248, New York, Wiley.
- Spalla C. (1973): Genetic problems of production of ergot alkaloids in saprophytic and parasitic conditions. In: Vanek Z., Rehacek Z., Cudlin J. (eds.) *Genetics of industrial microorganisms*. Elsevier, Amsterdam, 2, 393–403.
- Spalla C., Marnati M. P. (1978): Genetic aspects of the formation of ergot alkaloids. In: Hütter R., Leisinger T., Nüesch J., Wehrli W. (eds.) *Antibiotics and other secondary metabolites*. Academic, New York, 219–232.

- Stadler P. A., Giger R. (1984): Ergot alkaloids and their derivatives in medical chemistry and therapy. Krosgard-Larson P., Christensen C. H., Kofod H. (eds.), Natural products and drug development. Munksgaard, Copenhagen, 463–485.
- Steffan N., Grundmann A., Yin W. B., Kremer A., Li S. M. (2009): Indole prenyltransferases from fungi: A new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives. *Current medicinal chemistry*, 16, 218–231.
- Storm I. D., Rasmussen P. H., Strobel B. W., Hansen H. C. B. (2008): Ergot alkaloids in rye flour determined by solid-phase cation-exchange and high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Food Contamination*, 25, 338–346.
- Strnadová K. (1964): UV-mutanten bei *Claviceps purpurea*. *Planta medica*, 12, 521–527.
- Szepesy G., Gazdag M. (1976): Determination of dihydroergotoxine alkaloids by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 122, 479–485.
- Taber, W. A. (1985): Biology of *Claviceps*. In: Biology of industrial microorganisms (Demain A. L., Solomon N. A. (eds.), The Benjamin Cummings Publishing Company, London, UK, 449–486.
- Tanret Ch. (1875): Sur la présence d'un nouvel alcaloïde, l'ergotinine, dans le seigle ergoté. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences Fr.*, 81, 896–897.
- Tsai H. F., Wang H., Gebler J. C., Poulter C. D., Schardl C. L. (1995): The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216, 119–125.
- Tudzynski P., Correia T., Keller U. (2001): Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 593–605.
- Tudzynski P., Hölter K., Correia T., Arntz C., Grammel N., Keller U. (1999): Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Molecular Genetics and Genomics*, 261, 133–141.
- Tudzynski P., Scheffer J. (2004): *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular Plant Pathology*, 5, 377–388.
- Tulasne L. R. (1853): Memoire sur l'ergot des glumacees. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol.*, 20, 5–56.
- Unsöld I. A., Li S. M. (2005): Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, 151, 1499–1505.
- van Dongen P. W. J., de Groot A. N. J. A. (1995): History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *European journal of obstetrics, Gynecology and reproductive biology*, 60 109–116.
- van Urk H. W. (1929): Ein nieuwe gevoelige reactie op de moederkoodnalkaloiden ergotamine, ergotoxine en ergotinine en de toepassing voor het onderzoek en de colorimetrische bepaling in moederkoornpreparaten. *Pharmaceutisch Weekblad*, 66, 473–481.

- Vendrell M., Angulo E., Casadó V., Lluís C., Franco R., Albericio F., Royo M. (2007): Novel ergopeptides as dual ligands for adenosine and dopamine receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 3062–3069.
- Wallwey Ch., Li S. (2011): Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Natural Product Reports*, 28, 496–510.
- Walzel B., Riederer B., Keller U. (1997): Mechanism of alkaloid cyclopeptide formation in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chemistry and Biology*, 4, 223–230.
- Wittwer J. D., Kluckhohn J. H. (1973): Liquid chromatographic analysis of LSD. *Journal of Chromatographic Science*, 11, 1–6.
- Yin W. B., Yu X., Xie X. L., Li, S. M. (2010): Preparation of pyrrolo [2,3-b] indoles carrying a β -configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using a recombinant prenyltransferase CdpC3PT. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8, 2430–2438.
- Yu X., Li S. M. (2012): Prenyltransferases of the Dimethylallyltryptophan Synthase Superfamily. *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part B*. Elsevier, 516 259-278.
- Zhelifonova V. P., Antipova T. V., Kozlovsky A. G. (2010): Secondary metabolites in taxonomy of the penicillium fungi. *Microbiology*, 79, 277–286.
- Zou H. X., Xie X. L., Linne U., Zheng X. D., Li S. M. (2010): Simultaneous C7-and N1-prenylation of cyclo-L-Trp-L-Trp catalyzed by a prenyltransferase from *Aspergillus oryzae*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8, 3037–3044.
- Žorž M., Čulig J., Kopitar Z., Milivojević D., Marušič A., Bano M. (1985): HPLC method for determination of ergot alkaloids and some derivatives in human plasma. *Human Toxicology*, 4, 601–607.