

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2012

Josef Vrabka

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Regulace produkce ergoidních alkaloidů
houbou *Claviceps purpurea* během infekce
rostliny žita

Diplomová práce

Josef Vrabka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Petr Galuszka Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem uvedenou diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne:

Poděkování

Děkuji Doc. Mgr. Petru Galuszkovi Ph.D a Mgr. Heleně Hulvové za odbornou pomoc při vypracování diplomové práce a firmě Teva Czech Industries s.r.o za finanční podporu projektu a poskytnutý biologický materiál.

Souhrn

Claviceps purpurea je parazitický biotrof jednoděložných rostlin, průmyslově významný produkcí ergoidních alkaloidů, přítomných ve sklerociích nazývaných námel. Ergoidní alkaloidy jsou využívány k výrobě léků proti bolesti hlavy a migréně, Alzheimerovy a Parkinsonovy nemoci. Geny kódující enzymy biosyntézy byly identifikovány v genovém klastru a pro většinu genů byla určena jejich funkce v syntetické dráze. Pro úspěšnou infekci rostliny a její průběh byly identifikovány genetické faktory, označované jako geny patogenicity.

Exprese genů klastru syntézy ergoidních alkaloidů a patogenicity byla sledována v osmi sběrech v rozmezí dvou měsíců v průmyslových kmenech Gal404 a Gal130 pomocí kvantitativní RT-PCR. Pro tyto účely byla vypracována metodika pro kvantifikaci genové exprese *C. purpurea*, jejíž součástí bylo navržení primerů a ověření jejich účinnosti. Přítomnost alkaloidů v napadených klasech byla ověřena pomocí kapalinové chromatografie.

U genů patogenicity bylo zjištěno opoždění exprese genů degradace buněčné stěny *cppg1*, *cppg2* a *xyl2* u kmene Gal130 oproti kmeni Gal404. Tento výsledek potvrzuje zpoždění vývoje houby v hostiteli, který byl předpokládán i z pozdní produkce medovice. Geny biosyntézy ergoidních alkaloidů dosáhly nejvyšší exprese ve stejné době ve srovnatelných hodnotách, přestože byly očkovány s rozdílem 12 dnů. Regulace exprese těchto genů je zřejmě závislá na faktorech prostředí, s nejvyšší pravděpodobností je regulačním mechanismem intenzita slunečního záření. Ergoidní alkaloidy ergotamin a ergokristin byly detekovány v napadených klasech již 23 dní po infekci, jejich koncentrace byla velmi variabilní.

Summary

Claviceps purpurea is a parasitic biotroph of monocot plants, used in industry due its ability to produce alkaloids occurred in sclerotia called ergot. Ergot alkaloids are utilized to produce drugs against migraine and headaches, Alzheimer's and Parkinson's disease. Genes encoding the biosynthetic enzymes have been identified in the gene cluster and the function of the most of them was linked to particular biosynthetic steps. Several genetic factors important for successful infection of plants, known as pathogenicity genes, have been characterized.,

Expression of the genes encoding enzyme for ergot alkaloid synthesis and pathogenicity genes was monitored by quantitative RT-PCR in two industrial strains Gal404 and Gal130 within two months after infection. For this purpose, a methodology for quantifying gene expression in *C. purpurea* was developed. Methodology included primers design and verification of their effectiveness. The presence of alkaloids in the infected ears was verified by HPLC.

The strong up-regulation of pathogenicity genes involved in degradation of cell wall *cppg1*, *cppg2* and *xyl2* was found delayed in the strain Gal130 as compared with strain Gal404. This finding confirms the late growth of fungi in the host, which was expected from the delayed production of honeydew. Ergot alkaloid biosynthesis genes reached the highest expression in both strains at the same time in comparable values, even though they were inoculated with difference of 12 days. Regulation of expression of these genes is probably dependent on environmental factors, most likely regulatory mechanism is dependent on the intensity of solar radiation. Ergot alkaloids ergotamin and ergokristin were detected in infected ears already 23 days past inoculation, their concentration was very variable.

Obsah

1 Cíle práce	9
2 Úvod	10
3 Současný stav problematiky	11
3.1 Biologie <i>Claviceps purpurea</i>	11
3.2 Životní cyklus <i>Claviceps purpurea</i>	12
3.3 Molekulární faktory ovlivňující patogenezí	15
3.3.1 Enzymy degradace buněčné stěny	15
3.3.2 Enzymy degradující reaktivní formy kyslíku	15
3.3.3 Složky signálních drah	16
3.4 Námelové alkaloidy	17
3.4.1 Ergotismus	17
3.4.2 Námelové alkaloidy a jejich farmakologické využití	19
3.4.2.1 Klavinové alkaloidy	19
3.4.2.2 Kyselina lysergová a její amidy	20
3.4.2.3 Ergopeptiny	21
3.4.3 Biosyntéza námelových alkaloidů	23
3.4.4 Geny biosyntézy námelových alkaloidů	26
3.4.5 Regulace klastru pro syntézu námelových alkaloidů	27
3.5 Evoluce klastru genů syntézy námelových alkaloidů	29
3.5.1 Vnitrodruhová variabilita klastru	29
3.5.2 Mezidruhová evoluce klastru	29
3.5.3 Evoluce klastru mezi producenty námelových alkaloidů	31
4 Materiál a metodika	32
4.1 Biologický materiál	32
4.2 Použité roztoky a média	32
4.3 Postup	33
4.3.1 Očkování žita kmeny <i>C. purpurea</i>	33
4.3.2 Izolace RNA	34
4.3.3 Přepis RNA do cDNA	34
4.3.4 Návrh primerů pro geny klastru a patogenicity	34
4.3.5 Expresní profilace pomocí qRT-PCR	35

4.3.6 Elektroforéza v agarózovém gelu	36
4.3.7 Účinnost primerů v qRT-PCR reakci	36
4.3.8 Měření obsahu alkaloidů	37
5 Výsledky	39
5.1 Návrh a ověření účinnosti primerů	39
5.2 Analýza obsahu alkaloidů	41
5.3 Analýzy genové exprese	44
5.3.1 Exprese genů patogenicity	44
5.3.1.1 Exprese genů kódujících složky signálních drah	45
5.3.1.2 Exprese genů zapojených v metabolismu ROS	46
5.3.1.3 Exprese genů degradace buněčné stěny	47
5.3.2 Exprese genů klastru syntézy ergoidních alkaloidů	49
5.3.3 Porovnání exprese genů klastru mezi myceliem a sklerociem kmene Gal404	52
6 Diskuze	54
7 Závěr	58
8 Literatura	60

1 Cíle práce

Cílem teoretické části diplomové práce je zpracování současného stavu problematiky produkce námelových alkaloidů a genetických faktorů patogenecity u *Claviceps purpurea*.

Cílem praktické části je vypracování metodiky pro kvantifikaci genové exprese genů klastru pro syntézu námelových alkaloidů a genů patogeneze *C. purpurea* pomocí kvantitativní RT-PCR. Součástí metodiky je návrh specifických primerů a zjištění jejich účinnosti pro geny klastru. Navržená metodika je využita k vytvoření expresního profilu pro kmeny *C. purpurea* Gal404 a Gal130 v průběhu jejich infekce na hybridním žitu (*Secale cereale*) se samčí sterilitou v časovém období dvou měsíců od inokulace. Kmeny Gal404 a Gal130 se odlišují v hlavním produkovaném alkaloidu – ergotamin resp. ergokristin. Přítomnost alkaloidů v napadených klasech žita je ověřena metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC).

2 Úvod

Claviceps purpurea (paličkovice nachová) je zástupcem vřeckovýtrusných hub (*Ascomycetes*), parazitujícím na širokém okruhu jednoděložných rostlin. Charakteristickým prvkem napadení rostliny je tvorba sklerocií (označovaných jako námel) v konečné fázi infekce. Námel je přírodním zdrojem ergoidních alkaloidů, v současnosti využívaných ve farmaceutickém průmyslu. Ve středověkú byl námel často příčinou epidemií otrav ergoidními alkaloidy přítomnými v žitné mouce. Využití ergoidních alkaloidů ve farmakologii nastartovalo vědecký zájem o tuto mimořádnou houbu. Technikami molekulární biologie byla nalezena a charakterizována většina genů zapojených v biosyntetické dráze ergoidních alkaloidů. *C. purpurea* je pravý biotrof, který v průběhu infekce nezabíjí živé buňky hostitele a roste intercelulárně. Pro úspěšný vývoj v hostiteli byly u *C. purpurea* charakterizovány geny, jejichž funkce je nezbytná ke zdárnému průběhu infekce. Doposud nebyly publikovány experimenty zabývající se expresí těchto genu v průběhu napadení hostitele a většina informací o regulaci genové exprese se týkají *C. purpurea* rostoucí v axenické kultuře.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Biologie *Claviceps purpurea*

Rod *Claviceps* zahrnuje více než 30 druhů, většinou s definovaným a úzkým okruhem hostitelů, kteří jsou vždy anemofilní jednoděložné rostliny. *Claviceps purpurea* (paličkovice nachová, Obr. 1) je v tomto ohledu výjimkou, může parazitovat na více než 400 druzích jednoděložných rostlin, často ekonomicky významných obilovinách jako jsou žito, pšenice, rýže, proso a kukuřice (Taber, 1985). Na napadených rostlinách se v konečné fázi infekce vytváří tmavé a tvrdé sklerocia, označované jako námel (angl. ergot). Námel obsahuje alkaloidy, které sehráli v historii důležitou roli – ve středověku byl námel používán k urychlení porodu nebo způsobení potratu, později jako lék na poporodní krvácení. Toto využití nezdědka vedlo k otravě nazývané ergotismus, protože celkový obsah alkaloidů v námelu je velmi proměnlivý. Otrava námelovými alkaloidy byla často způsobena konzumací chleba, upečeného z kontaminované žitné mouky. Tyto otravy nabývaly epidemických rozměrů, při kterých umíraly tisíce lidí. Až v roce 1853 mykolog Louis René Tulasne rozpoznal vztah mezi námelem na žitě a ergotismem. V dnešní době je kontaminace mouky díky častým kontrolám a chemickému ošetření žita téměř vyloučena. Systematické zařazení *Claviceps purpurea* je následující:

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

V posledních letech se stává světovou hrozbou jiný zástupce rodu *Claviceps* – *Claviceps africana*. *C. africana* byla identifikována na čiroku (*Sorghum bicolor*) v Africe (Frederickson *et al.*, 1991), odkud se rozšířila do Asie, Ameriky a Austrálie.

Čirok je pátou nejvýznamnější plodinou na světě používanou jako potravina, krmivo pro dobytek a průmyslové účely. Ztráty v produkci čiroku způsobené infekcí houbou dosahovaly až 80% v Indii a 25% v Zimbabwe (Bandyopadhyay *et al.*, 1998).



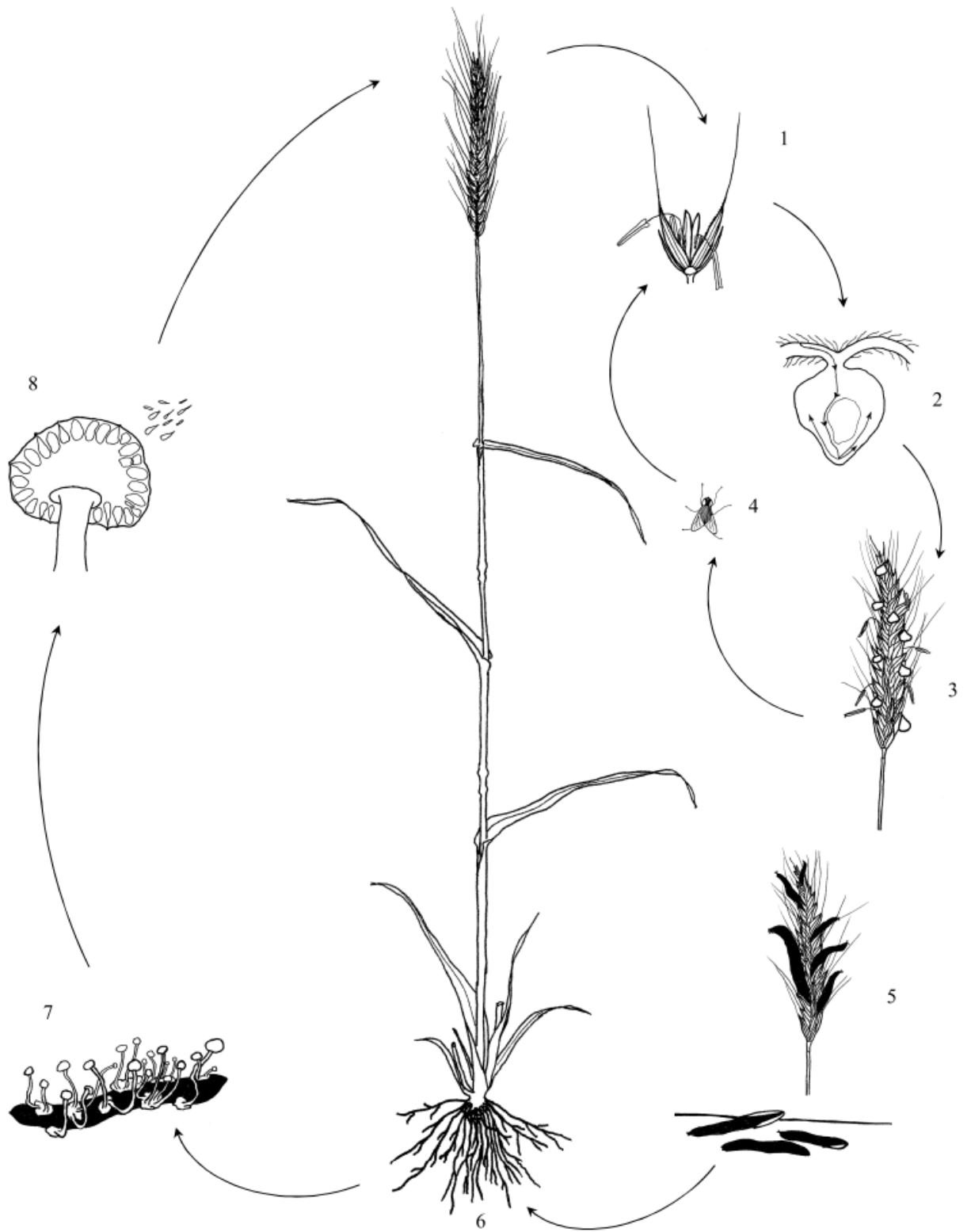
Obr. 1: *Claviceps purpurea*: kultivace na agarovém médiu (1), napadený klas žita (2) a sklerocia (3)

3.2 Životní cyklus *Claviceps purpurea* (obr. 2.)

Cyklus je zahájen větrem přenášenými askospórami, pocházejícími z plodnic - perithecií (8) přezimujícího sklerocia (7). Pro průběh infekce je dostatečná jediná homokaryotická spóra, proto je paličkovice homothalická houba (Esser *et al.*, 1978). Spóra, která přistane na blizně (1), prorůstá hyfy přes kutikulu (bez tvorby struktur pro narušení fyzickým tlakem) a růst pokračuje čnělkou do pletiva semeníku (2). *C. purpurea* roste především intercelulárně a získává živiny degradací pektinu střední lamely (Tenberge *et al.*, 1996). Na bazální straně semeníku se napojuje na cévní svazek a je zahájena specifická interakce mezi parazitem a hostitelem. Dochází k nárůstu sphacelia a produkci konidií, které jsou vynášeny na povrch v tekutině, bohaté na cukry, odvozené z floému – medovici (3). Produkce medovice je prvním makroskopickým příznakem infekce rostliny. Sladká medovice umožňuje šíření infekce v několika směrech. Láká hmyz, který rozšiřuje konidie na neinfikované rostliny (4). Medovice stéká po klasu, kde infikuje další květy, případně se konidie přenesou i fyzickým kontaktem dvou klasů. Dva týdny po infekci je tvorba medovice

ukončena a začíná tvorba fialového sklerocia (námel). Sklerocia dozrávají během pěti týdnů po infekci a slouží jako přezimující stádium pro příští rok (5), proto je nutné chránit sklerocium před vysycháním, UV zářením a mykoparasy. Tvrdé sklerocium je tvořeno plektenchymatickou bílou dřevinou a vnějším, fialově zbarveným obalem. Sklerocium je jediným stádiem *C. purpurea* v přírodě, obsahujícím námelové alkaloidy (Oeser *et al.*, 2002).

Paličkovice nachová napadá pouze mladé, neoplozené semeníky trav a obilovin. Podstata orgánové specifity není objasněna, růst houby však nápadně připomíná oplození rostliny, zřejmě je využito podobných mechanismů, které jsou zapojeny do interakce pylové zrna-blizna. *C. purpurea* je pravý biotrof, v žádné fázi vývoje nezabíjí buňky hostitelé pro svoji výhodu v kolonizaci a živiny získává pouze z živých buněk. Narozdíl od ostatních biotrofů, může být *C. purpurea* pěstována v kultuře, což značně usnadňuje experimentální přístupy (Tudzynski *et al.*, 2004).



Obr. 2: Životní cyklus *Claviceps purpurea* (Hulvová et al., 2012)

3.3 Molekulární faktory ovlivňující patogenezi

Molekulární faktory patogeneze *C. purpurea* lze rozdělit do tří skupin – enzymy degradující buněčnou stěnu, enzymy degradující reaktivní formy kyslíku a složky signálních drah.

3.3.1 Enzymy degradace buněčné stěny

Tyto enzymy jsou důležité z několika důvodů – umožňují houbě prorůst semeníkem a zásobují houbu živinami (degradace střední lamely). Struktura buněčné stěny travin je odlišná oproti ostatním rostlinám – obsahuje poměrově méně pektinů a více glukurono-arabino-xylanů k hlavní polysacharidové složce, celulóze (Carpita *et al.*, 1993). Přesto je růst *C. purpurea* v pletivu semeníku spojen s detekovanou degradací pektinu (Tenberge *et al.*, 1996). Byly identifikovány dva geny kódující polygalakturonasy – *cpgg1* a *cpgg2*, vykazující vzájemnou 95% identitu a nacházející se v genomu houby v těsné blízkosti, vzniklé nedávnou genovou duplikací. Mutanti s knock-outovanými *cpgg1/2* geny vykazovali o 98% sníženou patogenicitu. Dalším z charakterizovaných enzymů byly xylanasy, jejichž aktivita byla detekovaná i v submerzní kultuře. Byly identifikovány a klonovány dva odpovědné geny – *cpxy1* a *cpxy2*, deleční mutanti ovšem vykazovali jen zpoždění v přirozeném průběhu infekce (Giesbert *et al.*, 1998, Tudzynski *et al.*, 2004). Naproti tomu delece genu pro celulasu *cpcel1* neměla žádný efekt na infekci žita, ale přítomnost jiných genů pro celulasu nemůže být vyloučena (Muller *et al.*, 1997).

3.3.2 Enzymy degradující reaktivní formy kyslíku

Produkce reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) je jednou z prvních obranných reakcí rostliny před patogenem. ROS brání hostitelské buňky rychlým zesíťováním proteinů buněčné stěny a zároveň ničí membrány a inaktivuje proteiny patogenu. ROS jsou zapojeny do indukce hypersensitivní reakce (HR), která vede k rychlé nekróze v místě infekce. Přestože infekce žita *C. purpurea* není provázena viditelnou obranou žita, byla prokázána produkce H₂O₂ v pletivech žita napadené *C. purpurea*, lze tedy předpokládat, že růst houby pletivem je provázen antioxidační obranou. Byly identifikovány čtyři katalasové isoenzymy produkované *C. purpurea* v axenické kultuře, CAT A-D (Garre *et al.*, 1998). Isoenzymy CAT C/D jsou sekretované formy, CAT D byla přítomna v medovici napadených rostlin. Oba isoenzymy jsou kódovány jedním genem *cpcat1*, delece genu vedla ke ztrátě obou

isoenzymů, ale průběh infekce žita nebyl nijak narušen. Delece genu *cpsod1* pro Cu, Zn superoxididismutasu (SOD) neměla vliv na kolonizaci žita (Moore *et al.*, 2002). Naproti tomu, delece genu *cptf1* pro transkripční faktor s bZIP DNA vazebným motivem vedla ke zvýšení H₂O₂ v okolí hyf a okolním pletivu, snížení aktivity isoformů katalas a *C. purpurea* tvořila méně medovice a sklerocií. Protože deleční mutanti genu *cpcat1* pro sekretované katalasy nebyly ve vývoji nijak zpomaleni, přítomnost H₂O₂ je pravděpodobně způsobena zvýšenou produkcí endogenních ROS. CPTF1 má zřejmě dvojí roli v regulaci ROS – snižuje aktivitu ROS tvořících systémů *C. purpurea* a zároveň pozitivně reguluje katalasové geny (Nathues *et al.*, 2004).

Bylo prokázáno, že pro zdárný průběh infekce jsou potřebné i samotné ROS, fungující jako „druzí poslové“. Endofyt *Epichloe festucae* (blízký příbuzný *C. purpurea*) potřebuje enzym NADPH oxidasu (NOX) kódovaný genem *noxA* pro symbiotický vztah s hostitelem (Tanaka *et al.*, 2006). Homologní gen *cpnox1* u *C. purpurea* je důležitý pro normální průběh infekce. Deleční mutant byl schopen prorůst bliznou k ovariu, ale další růst byl inhibován. V některých případech došlo k opožděné produkci medovice, ale sklerocia nebyly nikdy dostatečně vyžralá (Giesbert *et al.*, 2008).

Důležitou součástí ROS systému je u *C. purpurea* histidin kinasa CpHK2, sloužící jako senzor oxidativního stresu. Mutant Δ *cpkh2* byl ve svém vývoji významně opožděn oproti přirozenému kmeni (Nathues *et al.*, 2007)

3.3.3 Složky signálních drah

Analýza GTPasy Rac odhalila její důležitost pro patogenicitu *C. purpurea*, stejně tak i enzym patřící do skupiny p21-aktivovaných kinas (PAK) kódovaný genem *cla4*. Mutanti Δ *rac* a Δ *cla4* nebyli schopni sporulovat, v axenické kultuře tvořili atypické mycelium (Obr. 3), při použití mycelia pro infekci žita neprorůstaly hyfy bliznou a rostly ve shlucích na povrchu. Podobnost projevů pro oba geny je způsobena jejich přirozenou interakcí ověřenou pomocí yeast two-hybrid experimentu, kinasa Cla4 je efektozem Rac (Rolke *et al.*, 2008). Mutant GTPasy Δ *cdc42* tvořil více konidií, byl schopný prorůst bliznou, ale růst byl zastaven v pletivu čnělky (Scheffer *et al.*, 2005)

Narušení nebo zpoždění infekce bylo identifikováno u mutantů mitogen-aktivovaných protein kinas CPMK1/2 a serin-threonin protein kinasy COT1 (Mey *et al.*, 2002a,b; Scheffer *et al.*, 2004). Důležitým je i napětím-aktivovaný vápníkový

kanál MID1, bez něhož *C. purpurea* není schopna napadnout hostitele (Bormann *et al.*, 2009).



Obr. 3: Morfologie kolonií „wild-type“ a mutantů Δrac a $\Delta cla4$ *C. purpurea* (Rolke *et. al.*, 2008)

3.4 Námelové alkaloidy

Rod *Claviceps* je producentem téměř 70 námelových (ergoidních) alkaloidů, většina alkaloidů obsahuje tetracyklický ergolin. Profil produkováných alkaloidů se liší mezi jednotlivými druhy, většinou je jeden z alkaloidů obsažen ve větší míře např. *C. fusiformis* produkuje elymoklavin, *C. africana* dihydroergoidní alkaloidy, *C. paspali* deriváty kyseliny paspalové. Námelové alkaloidy rozdělujeme na tři skupiny – alkaloidy klavinového typu, deriváty kys. lysergové a ergopeptiny.

Produkce námelových alkaloidů (20 000 kg v roce 2010) je v současnosti rovnoměrně rozdělena mezi polní produkci průmyslových kmenů (celkový obsah alkaloidů až 1,5% suché hmoty sklerocia) a fermentační kultivaci. Biosyntéza námelových alkaloidů fermentací je pozitivně regulována tryptofanem, sloužícím jako prekurzor a induktor (Krupinski *et al.*, 1976). Biosyntéza je negativně regulována koncentrací fosfátu a amoniaku (Socic *et al.*, 1992)

3.4.1 Ergotismus

Otrava námelovými alkaloidy (ergotismus) byla pravděpodobně známa již Asyřanům (De Costa, 2002). První dokumentovaná epidemie ergotismu byla popsána ve Francii v roce 944-945, při které zahynulo 10 000 lidí. O padesát let později si ergotismus vyžádal dokonce 40 000 obětí (Schiff, 2006). Otrava námelovými alkaloidy je spojována s čarodějnickými procesy v Salemu v roce 1692, nebyla však jednoznačně prokázána (Woolf, 2000). Dvě odlišné formy ergotismu byly popsány již středověkými autory, kteří se domnívali, že jsou způsobeny různými látkami, což bylo později vyvráceno. V současnosti je většina otrav u lidí způsobena předávkováním léky odvozených z ergoidních alkaloidů.

Gangrenózní ergotismus se projevuje obecnou malátností, bolestí v končetinách, většinou v lýtku. V několika týdnech končetina otéká, tvoří se zánět a přichází palčivá bolest se střídavými pocity chladu a tepla. V poslední fázi končetina znecitliví, bolest mizí, koncové oblasti černají a mohou odpadnout bez jakékoliv bolesti. Tyto projevy získaly ve středověku název oheň sv. Antonína (Obr. 4), podle Nemocnice řádu sv. Antonína, založené roku 1093 ve Vienne ve Francii. Zde se shromažďovali nemocní pacienti z celé západní Evropy (Lee, 2009).

Konvulzivní ergotismus má symptomy tíže v hlavě a končetinách, průjem, brnění v končetinách (mravenčení). Nemoc pokračuje záškuby svalů okolo úst a očí. Silné otravy jsou doprovázeny křečmi končetin, v mnoha případech pacienti trpěli poruchou spánku přerůstající v kóma a smrt. Úmrtnost se pohybovala mezi 10 až 20%, tato hodnota je překvapivě nízká na tehdejší absenci lékařské péče.

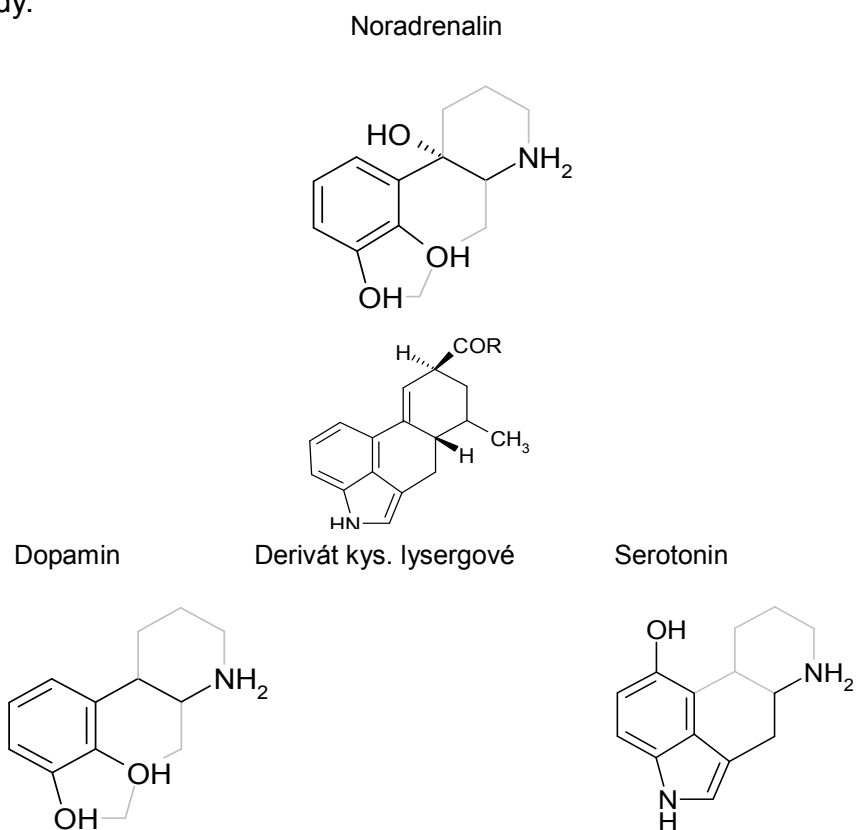
Konzumace námelových alkaloidů je nebezpečná i pro dobytek, krmný trávou se symbioticky žijícími endofyty rodu *Epichloë* (*Clavicipitaceae*) produkujícími ergopeptin ergovalin. Otrava se projevuje přehřátím, špatným přibýváním na váze, sníženou fertilitou a v extrémních případech může dojít k úmrtí (Bacon *et al.*, 1986).



Obr. 4: Sv. Antonín na středověké dřevorezbě (Lee, 2009)

3.4.2 Námelové alkaloidy a jejich farmakologické využití

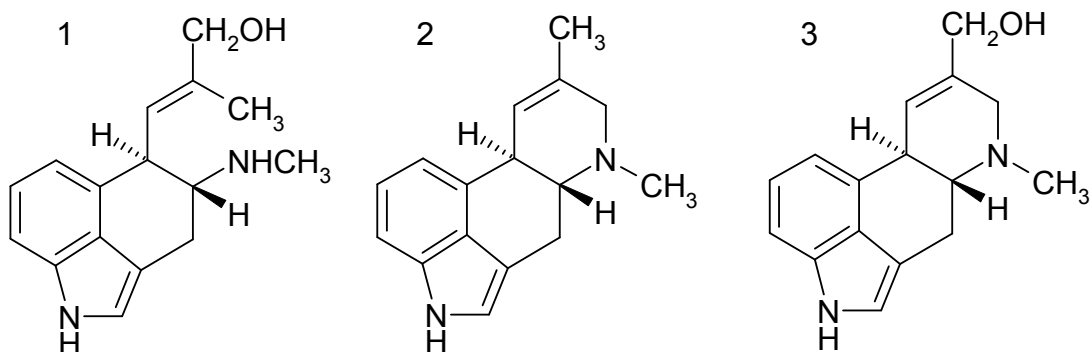
Účinky námelových alkaloidů vycházejí ze strukturní podobnosti mezi deriváty kyseliny D-lysergové a neurotransmitery jako jsou dopamin, serotonin a noradrenalin (Berde *et al.*, 1978). V současnosti jsou využívány jak přirozené, tak semi-syntetické námelové alkaloidy.



Obr. 5: Strukturní podobnost námelových alkaloidů a neurotransmiterů

3.4.2.1 Klavinové alkaloidy

Struktura klavinových alkaloidů může být tricyklická (secoergoliny) nebo tetracyklická (ergoliny). Přestože bylo izolováno a charakterizováno 35 klavinových alkaloidů z *C. purpurea*, žádný není farmaceuticky využíván (Schiff, 2006). Klavinové alkaloidy – chanoklavin, chanoklavin-I aldehyd, agroklavin, elymoklavin - jsou meziprodukty biosyntézy ergopeptinů (Obr. 6). Významným producentem klavinových alkaloidů je *Aspergillus fumigatus*. U některých byly identifikovány selektivní a silné cytotoxické účinky proti lidským leukemickým buňkám (Ge *et al.*, 2009).

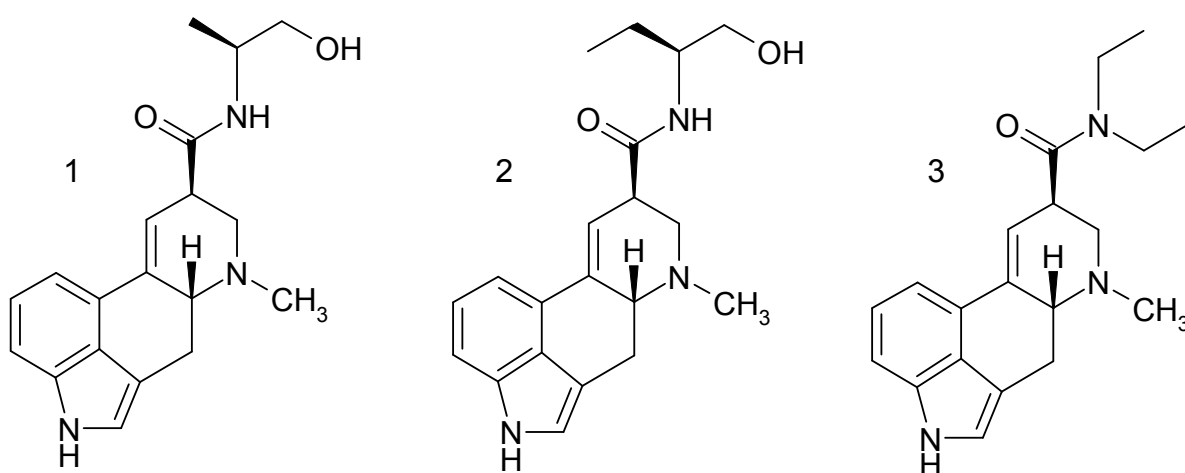


Obr. 6: Klavinové alkaloidy: secoergolin chanoklavin-I (1); ergoliny agroklavin (2) a elymoklavin (3)

3.4.2.2 Kyselina lysergová a její amidy

Nejvýznamnějším ergoamidem je přirozeně se vyskytující ergometrin (někdy též označován jako ergonovin a ergobasin, Obr. 7). Užití ergometrinu je v prevenci a léčbě poporodního krvácení (De Costa, 2002), nesmí však být použit pro indukci porodu, protože může ohrozit zásobení placenty a plodu kyslíkem (Schiff, 2006). Dalšími semi-syntetickými látkami patřícími mezi deriváty ergometrinu jsou methylegometrin (Obr. 7) a methysergid.

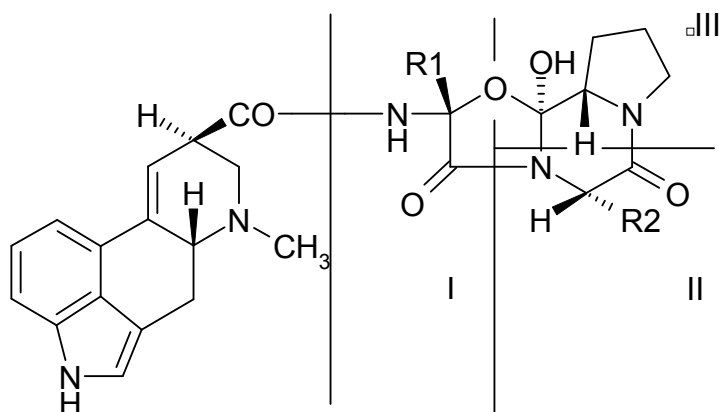
K semi-syntetickým derivátům patří i diethylamid kyseliny lysergové (LSD – obr. 7) syntetizován 1938 Albertem Hoffmanem, psychoaktivní účinky byly objeveny až v roce 1943. LSD bylo používáno k léčbě psychických onemocnění, ale kvůli zneužívání halucinogenních účinků bylo užívání LSD v průběhu šedesátých let zakázáno prakticky na celém světě.



Obr. 7: Deriváty kys. Lysergové - ergometrin (1), methylegometrin (2) a LSD (3)

3.4.2.3 Ergopeptiny

Ergopeptiny jsou deriváty kys. lysergové, která nese tripeptidovou složku připojenou ke karboxylové skupině peptidovou vazbou. Součástí tripeptidu je vždy aminokyselina prolin a spolu s dalšími dvěmi aminokyselinovými zbytky vytvářejí tricyklický postranní řetězec (Obr. 8).



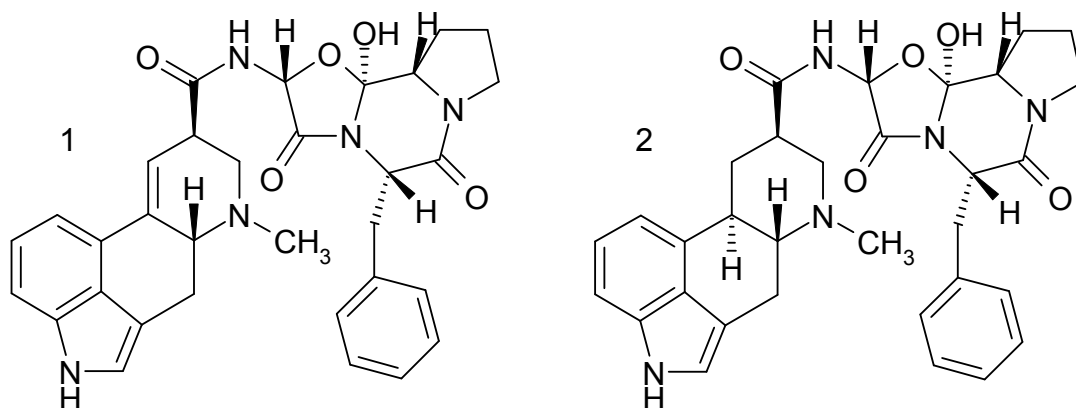
	Ergotaminy	Ergoxiny	Ergotoxiny
Pozice I			
Pozice II	Alanin	Kyselina α -amino butanová	Valin
Fenylalanin	Ergotamin	Ergostin	Ergokristin
Leucin	α -Ergosin	α -Ergoptin	α -Ergokryptin
Isoleucin	β -Ergosin	β -Ergoptin	β -Ergokryptin
Valin	Ergovalin	Ergonin	Ergokornin
Kyselina α -amino butanová	Ergobin	Ergobutin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

Obr. 8: Obecná struktura ergopeptinů a složení postranního řetězce

Prvním charakterizovaným ergopeptinem byl ergotamin (Obr. 9), izolovaný Arthurem Stollem a jeho skupinou v roce 1918. Tripeptid ergotaminu je složen z aminokyselin L-alaninu, L-fenylalaninu a L-prolinu. Ergotamin je produkován *C. purpurea* jako hlavní alkaloid. Do objevu nesteroidních analgetik (např. ibuprofen) byl ergotamin hlavním prostředkem léčby migrény, v současnosti je však jeho využití na ústupu. Předávkování ergotaminem navíc vedlo ke gangrenóznímu ergotismu, kvůli jeho silnému vasokonstričnímu účinku. Léky na migrénu byly zneužívány jako prostředek k vyvolání potratu, jeho požití však často vedlo jen ke silným stahům dělohy, které však nevedly k vyloučení plodu a způsobovaly vážné zdravotní problémy. Smrtelná dávka ergotaminu může být již při užití 30 μ g (Lee, 2009).

Dihydroergotamin (Obr. 9), připravovaný hydrogenací ergotaminu, je alternativou ergotaminu pro léčbu migrény a bolestí hlavy. Špatně se vstřebává

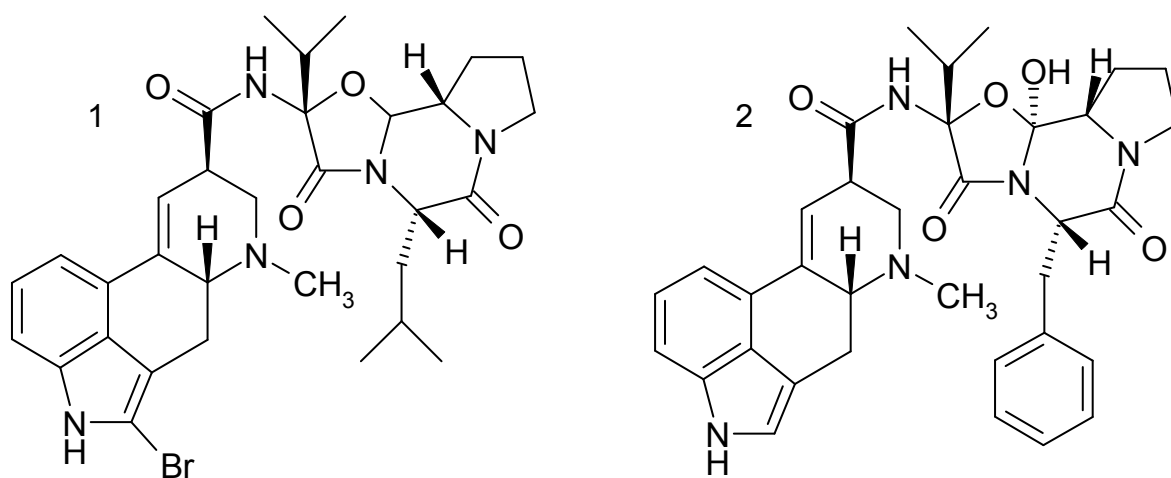
v gastrointestinálním traktu, proto je používán v nosních kapkách a jiném než perorálním podávání, tím je zároveň sníženo riziko otrav (Schiff, 2006).



Obr. 9: Struktura ergotaminu (1) a dihydroergotaminu (2)

Bromokryptin (Obr. 10) připravovaný z α -ergokryptinu je agonista dopaminového D_2 receptoru. Bromokryptin inhibuje uvolňování prolaktinu z adenohypofýzy, proto je využíván v léčbě onemocnění spojených se změnami hladiny prolaktinu v krvi, jako jsou např. hyperprolaktinémie a galaktorea, ale i pro léčbu Parkinsonovi nemoci a diabetu (Holt *et al.*, 2010).

Dihydroergotoxin mesyláty jsou připravovány ze směsi námelových alkaloidů, pojmenované jako ergotoxin, ve které byly později identifikovány tři peptidové alkaloidy – ergokryptin, ergokristin (Obr. 10) a ergokornin. Užití je v léčbě stařecké demence a Alzheimerovy choroby.



Obr. 10: Struktura bromokryptinu (1) a ergokristinu (2).

3.4.3 Biosyntéza námelových alkaloidů

Obecné schéma biosyntetické dráhy je ukázáno na Obr. 11, k jejímu objasnění přispěly experimenty s izotopově značenými prekurzory (Floss, 1976).

Prvním krokem syntézy je prenylace L-tryptofanu na pozici C4 indolového kruhu katalyzovaná enzymem 4-dimethylallyltryptofan syntasou (DMATS), donorem prenylu je dimethylallylpyrofosfát. Enzym DMATS byl charakterizován u mnoha organismů (Gebler *et al.*, 1992; Markert *et al.*, 2008; Unsold *et al.*, 2005).

Produkt reakce je metylován na amino skupině za vzniku N-methyl-dimethylallyl tryptofanu (Otsuka *et al.*, 1980), donorem methylové skupiny je S-adenosyl methionin (SAM). Enzym 4-dimethylallyltryptofan N-methyltransferasa katalyzující tuto reakci byl identifikován u houby *Aspergillus fumigatus* (Rigbers *et al.*, 2008).

Následuje vícekroková syntéza chanoklavinu-I. Enzym podílející se na reakci „chanoklavin-I syntasa“ byl identifikován, jedná se o enzym s FAD vazebnou doménou. Není zcela jasné, zda je tato reakce katalyzována jedním, či více enzymy (Lorenz *et al.*, 2010).

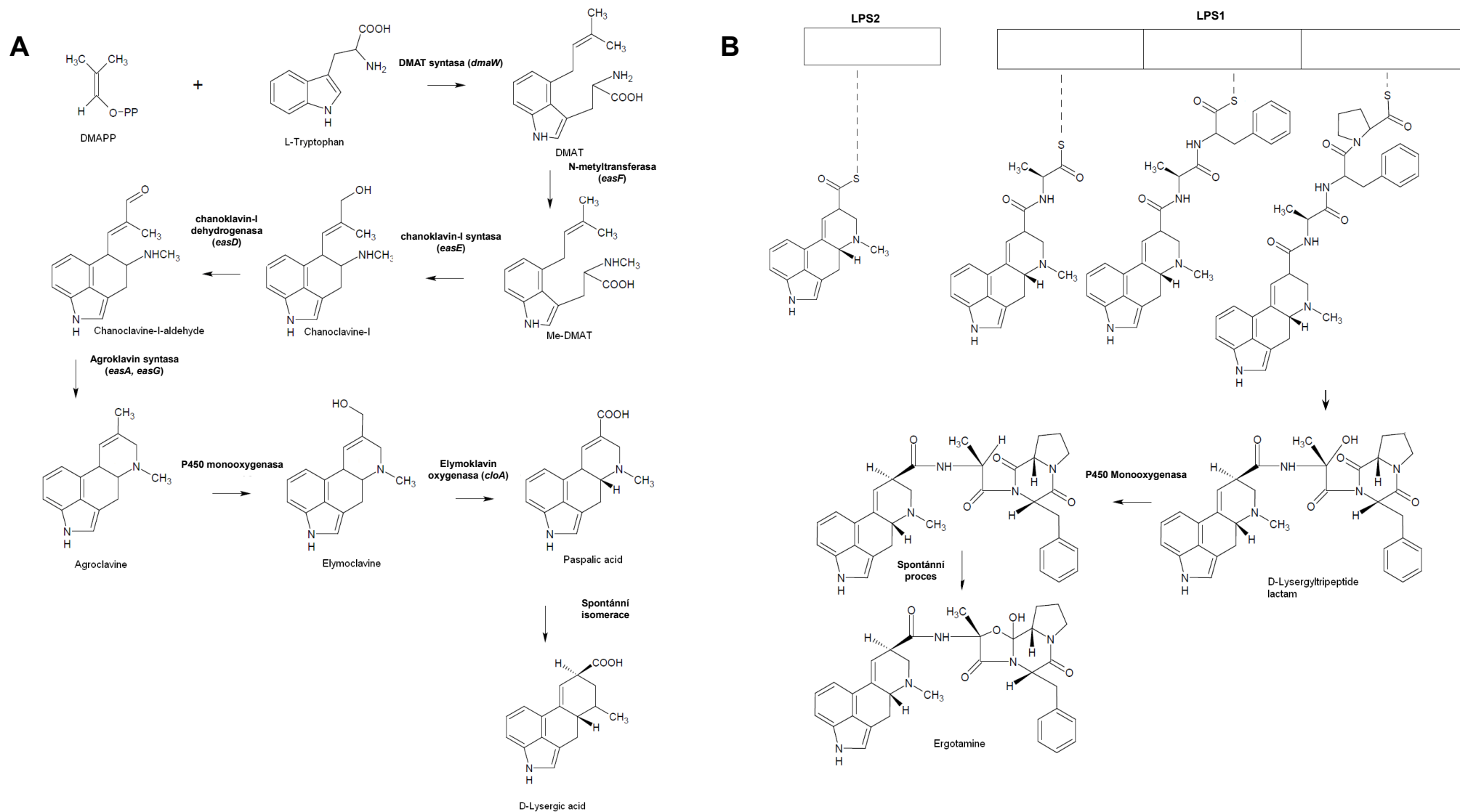
Chanoklavin-I je redukován na chanoklavin-I aldehyd enzymem chanoklavin-I dehydrogenasou v přítomnosti NAD⁺ (Wallwey *et al.*, 2010). Chanoklavin-I aldehyd je posledním společným meziproduktem v biosyntéze námelových alkaloidů u *Claviceps purpurea* a *Aspergillus fumigatus*.

Chanoklavin-I aldehyd izomeruje na isochanoklavin-I aldehyd neenzymatickou redukcí pomocí glutathionu nebo 2-merkaptoetanolu a následně je redukován na agroklavin enzymem agroklavin syntasou v přítomnosti NADPH (Matuschek *et al.*, 2011).

Agroklavin je přeměněn na elymoklavin agroklavin oxygenasou (Kim *et al.*, 1981). Elymoklavin oxygenasa (označována jako klavin oxygenasa – CLOA) je zodpovědná za oxidaci elymoklavínu na kyselinu paspalovou (Kim *et al.*, 1983; Haarmann *et al.*, 2006). Obě oxygenasy patří do skupiny NADPH-dependentních cytochrom P450 monooxygenas.

Spontánní isomerací kyseliny paspalové vzniká kyselina D-lysergová (Grogger *et al.*, 1998), která je u paličkovice dále využita pro syntézu ergopeptinů. Pro tyto reakce jsou důležité enzymy neribosomálních peptidových syntas (zkratka NRPS; Riederer *et al.*, 1996; Correia *et al.*; 2003, Ortel *et al.*, 2009). Aktivace kyseliny D-lysergové je katalyzována enzymem D-lysergyl peptid syntasou 2 (LPS2) o velikosti

141 kDa. Komplex kyseliny D-lysergové a LPS2 enzym spojený thioesterovou vazbou se poté naváže na enzym LPS1 o velikosti 370 kDa, na kterém kyselina D-lysergová kondenzuje se třemi aminokyselinami (aminokyselina v pozici III je téměř vždy prolin) a následně je uvolněna jako D-lysergyl tripeptid laktam (Walzel *et al.*, 1997). Ten je zatím neznámou P450 monooxygenasou oxidován na ergopeptin. Paličkovice nachová syntetizuje nejen ergopeptiny, ale i alkylamidy kyseliny D-lysergové (např. ergometrin). Jejich tvorba je uskutečněna pomocí LPS2 enzymu pro aktivaci kys. D-lysergové a enzymu ergometrin syntasy (LPS3) s využitím NADPH (Ortel *et al.*, 2009).



Obr. 11: Biosyntetická dráha vedoucí ke kyselině lysergové (A) a její využití k syntéze ergotaminu (B) (Hulvová *et al.*, 2012)

3.4.4 Geny biosyntézy námelových alkaloidů

Prvním klonovaným genem biosyntézy námelových alkaloidů byl gen *dmaW* u druhu *Claviceps fusiformis* (Tsai *et al.*, 1995), kódující enzym DMATS. Degenerované primery pro gen *dmaW* byly získány z aminokyselinové sekvence purifikovaného enzymu. Ortologní gen byl identifikován u *C. purpurea*, a jeho sekvence následně použita k odhalení celého klastru genů metodou chromosome walking (Obr. 12) kódující enzymy syntézy námelových alkaloidů (Tudzynski *et al.*, 1999; Haarmann *et al.*, 2005).

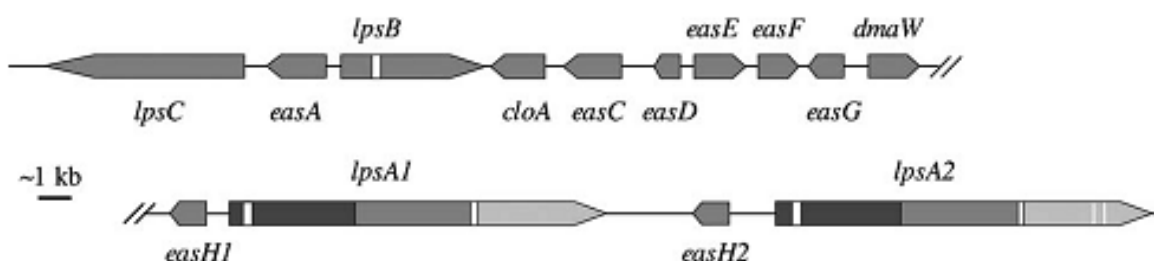
Produkt genu *easF* nebyl u *C. purpurea* zatím charakterizován, ale nukleotidová sekvence uveřejněná v databázi NCBI vykazuje 68% podobnost s genem FgaMT u *Asp. fumigatus*, lze tedy předpokládat, že kóduje enzym 4-dimethylallyltryptofan N-methyltransferasu (Rigbers *et al.*, 2008). Sekvence genu *easE* (nově *ccsA*) kóduje chanoklavin-I syntasu (Lorenz *et al.*, 2010). Deleční mutant genu *easC* (kódující zřejmě katalasu) u *C. purpurea* neprodukoval žádné alkaloidy a byla snížena transkripce ostatních genů klastru (Haarmann *et al.*, 2009). Ortologní gen *easC* u *Asp. fumigatus* kóduje katalasu nutnou pro syntézu chanoklavinu-I (Goetz *et al.*, 2011). Gen *FgaDH*, ortholog genu *easD* u *Asp. fumigatus* nese informaci pro enzym chanoklavin-I dehydrogenasu, s podobností 67% na aminokyselinové úrovni (Wallwey *et al.*, 2010).

Nahrazení genu *easA* delečního mutantu *Asp. fumigatus* genem *easA* *C. purpurea* vedla k syntéze agroklavinu, setoklavinu a isosetoklavinu – námelových alkaloidů typických pro houby z čeledi *Clavicipitaceae*, neodpovídajících však alkaloidům normálně produkovaných *Asp. fumigatus* (festuklavin, fumigaklavin A, B a C). Protein *easA* se podílí na funkci „agroklavin syntetasy“. Z těchto výsledků lze usuzovat, že gen *easA* svojí variabilitou tvoří bod, ve kterém se odděluje dráha syntézy klavinových alkaloidů (*Asp. fumigatus*) a ergoidních alkaloidů čeledi *Clavicipitaceae* (Coyle *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2010). Bylo však prokázáno, že syntéza agroklavinu z chanoklavin-I aldehydu může proběhnout neenzymatickou redukcí pomocí glutathionu v přítomnosti NADPH a katalyzou produktem *easG* genu *in vitro*, syntéza agroklavinu byla mnohem účinnější pokud v reakční směsi nebyl přítomen produkt genu *easA* (Matuschek *et al.*, 2011). Pro přesnější pochopení role genu *easA* v biosyntéze agroklavinu u *C. purpurea* bude nutné vytvořit a charakterizovat knock-out mutanty tohoto genu.

Gen *cloA* kóduje další P450 monooxygenasu v klastru, katalyzující přeměnu

elymoklavinu na kyselinu paspalovou (Haarmann *et al.*, 2006). Součástí klastru jsou čtyři geny pro neribozomální peptid syntasy (NRPS) - *lpsA1/2*, *lpsB* a *lpsC*. Funkční analýzy genu *lpsB* ukázaly, že kóduje enzym LPS2, zodpovědný za aktivaci kyseliny lysergové (Correia *et al.*, 2003). Deleční mutant genu *lpsA1* *C. purpurea* kmene P1 již nebyl schopen produkovat majoritní alkaloid ergotamin, ale stále byl schopný tvorby ergokryptinu, produktem genu *lpsA1* je tedy NRPS enzym LPSA-1. Protože ergokryptin je ergopeptin s bočním řetězcem odvozeným ze tří aminokyselin, bude za jeho tvorbu zodpovědný paralogní gen *lpsA2*, vzniklým pravděpodobně duplikací genu *lpsA1* (Tudzynski *et al.*, 1999; Haarmann *et al.*, 2005; Haarmann *et al.*, 2007). Posledním NRPS genem klastru je *lpsC*, kódující enzym ergometrine syntasy LPS3 (Ortel *et al.*, 2009).

V roce 2005 byla kódující oblast klastru rozšířená o další dva geny *easH1/2* (Haarmann *et al.*, 2005), sekvence však byly zveřejněny v databázi NCBI až v polovině roku 2011. Gen *easH1* je predikován jako homolog genu *fum3p* hydroxylasy v syntéze fuminosinu u rodu *Fusarium*. Enzym EasH1 může hydroxylovat ergopeptidové laktamy na ergopeptiny, gen *easH2* je pravděpodobně pseudogen (Schardl *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2004)



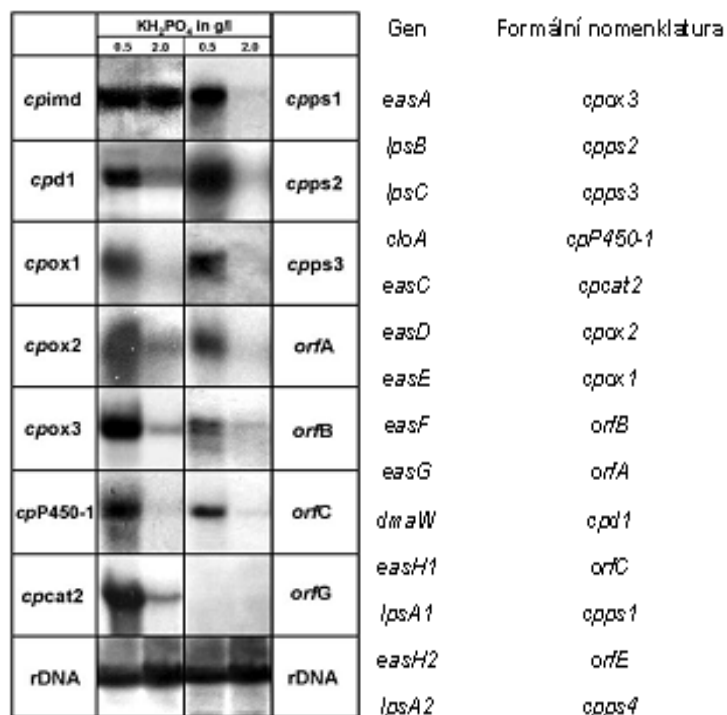
Obr.12: Klastr genů syntézy námelových alkaloidů (Schardl *et al.*, 2006)

3.4.5 Regulace klastru pro syntézu námelových alkaloidů

Označení klastr genů je používán pro geny, jejichž produkty katalyzují jednu biosyntetickou dráhu a vykazují společnou regulaci. Byla prokázána regulace koncentrací fosfátu na expresi genů klastru, zvýšená koncentrace snížila expresi všech genů v klastru, proto byl původně zahrnutý gen *cpimd* z klastru vyloučen (obr. 13; Haarmann *et al.*, 2005).

V regulaci klastru pro syntézu námelových alkaloidů *C. purpurea* nebyl identifikován žádný transkripční faktor, narozdíl od jiných hub s produkcí sekundárních metabolitů. U rodu *Aspergillus* byla nalezena methyltransferasa LaeA, delece příslušného genu snížila nebo zastavila transkripci genů zapojených

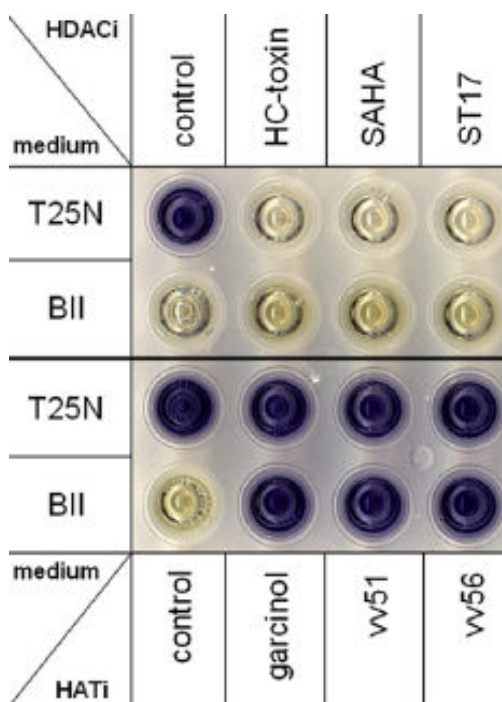
v produkci penicilinu (antibiotikum), sterigmatocystinu (karcinogen) a lovastatinu (enzymový inhibitor užívaný ve farmacii). Zvýšení exprese *LaeA* vedlo k zvýšení produkce sekundárních metabolitů, transformace *C. purpurea* genem *laeA* z *Asp. fumigatus* neměla žádný vliv na produkci námelových alkaloidů (Bok *et al.*, 2004; Lorenz *et al.*, 2009). Methyltransferasa *LaeA* je součástí tzv. velvet komplexu, regulující vývoj a kontrolující produkci sekundárních metabolitů v závislosti na světle (Bayram *et al.*, 2008).



Obr. 13: Expresní analýza genů klastru pro syntézu námelových alkaloidů v závislosti na koncentraci fosfátu v médiu (Haarmann *et al.*, 2005)

Cenným nástrojem výzkumu syntézy námelových alkaloidu u *C. purpurea* je produkční kmen P1 skupiny prof. P. Tudzynského. Tento kmen byl získán mutagenézí a je schopen tvorby námelových alkaloidů v médiu. Produkce kmene P1 byla výrazně ovlivněna remodelací chromatinu pomocí inhibitorů histon acetyltransferas (HATi) a deacetylas (HDACi), výsledek je zobrazen na Obr. 14. Kmen P1 kultivovaný v médiu indukujícím produkci námelových alkaloidů (T25N) po přidavku inhibitorů histon deacetylas ztratil svoji jedinečnou schopnost. Opačný účinek byl pozorován s použitím inhibitorů histon acetyltransferas v neindukujícím médiu (BII). Tyto výsledky napovídají, že remodelace chromatinu zřejmě nepůsobí

přímo na klastr, ale na domnělý represor, který je rozvolněním chromatinu pomocí inhibitorů histon deacetylas (simulujících proces acetylace histonů) aktivován. Inhibitory histon acetyltransferas udržují represor v neaktivním stavu (Lorenz *et al.*, 2009).



Obr. 14: Efekt inhibitorů histon acetyltransferas a deacetylas v produkci námelových alkaloidů. Modré zbarvení signalizuje přítomnost alkaloidů v médiu – Van Urk test (Lorenz *et al.*, 2009)

3.5 Evoluce klastru genů syntézy námelových alkaloidů

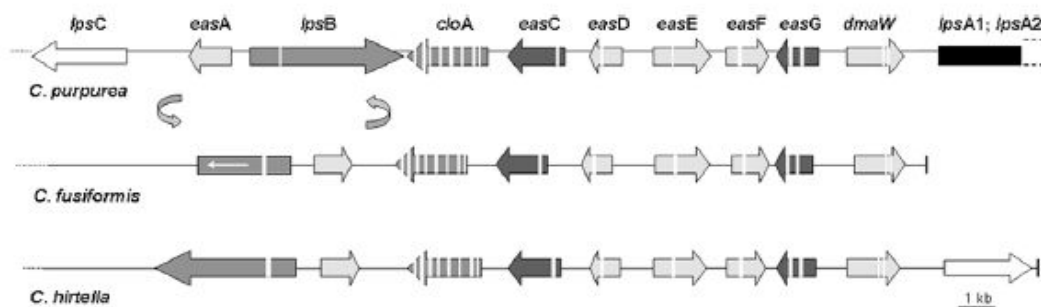
3.5.1 Vnitrodruhová variabilita klastru

Různorodost produkovaných alkaloidů mezi kmeny P1 (hlavní produkovaný alkaloid – ergotamin) a ECC93 (ergokristin) byla studována na úrovni neribozomálních peptid syntetas. Inaktivace genu *lpsA1* u kmene P1 vedla k zastavení syntézy ergotaminu, ale syntéza málo zastoupeného ergokryptinu byla beze změny. Toto zjištění potvrdilo, že produkce typu ergopeptinu je z větší míry určena specifitou neribozomálních peptid syntetas (Haarmann *et al.*, 2008)

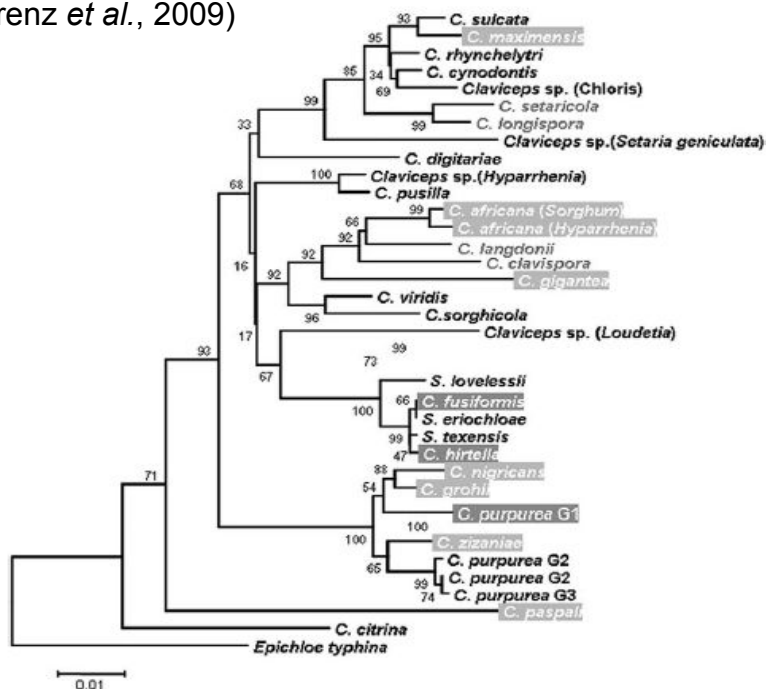
3.5.2 Mezidruhová evoluce klastru

Porovnáním tří druhů – *C. purpurea* (kmen P1), *C. fusiformis* a *C. hirtella* byla odhalena struktura a rozdíly mezi jednotlivými klastry (Obr. 15). Syntéza alkaloidů u *Claviceps fusiformis* je zakončena u agroklavinu a elymoklavinu. Klastr neobsahuje

NRPS kódované geny *lpsA1/2* a *lpsC* zodpovědné za ergopeptiny, gen *lpsB* je zkrácen a jedná se o pseudogen. Gen *cloA* nenesl zřetelnou inaktivační mutaci, přesto jeho funkční komplementace do *C. purpurea* vedla k akumulaci agroklavinu a elymoklavinu, produkt genu je tedy nefunkční. Nahrazení genu *cloA* u *C. fusiformis* genem *cloA* z *C. purpurea* umožnilo syntézu kyseliny lysergové. Klastř *C. fusiformis* se vyvinul z komplexnějšího předchůdce ztrátou NRPS genů a mutacemi v genech *lpsB* a *cloA* (Lorenz *et. al.*, 2007). Syntéza alkaloidů u *C. hirtella*, přestože podle evolučních studií patří do stejné větve jako *C. fusiformis* (Obr. 16), pokračuje ke složitějším alkaloidům (ergometrin). Klastř neobsahuje velké NRPS geny *lpsA1/2* a jsou patrné přesmyky v pořadí genů klastřu, ale gen *lpsB* ani *cloA* není narušen, gen *lpsC* zodpovědný za syntézu ergometrinu je přemístěn na pravou stranu klastřu (Lorenz *et al.*, 2009).



Obr. 15: Klastř genů syntézy námelových alkaloidů u tří zástupců rodu *Claviceps* (Lorenz *et al.*, 2009)

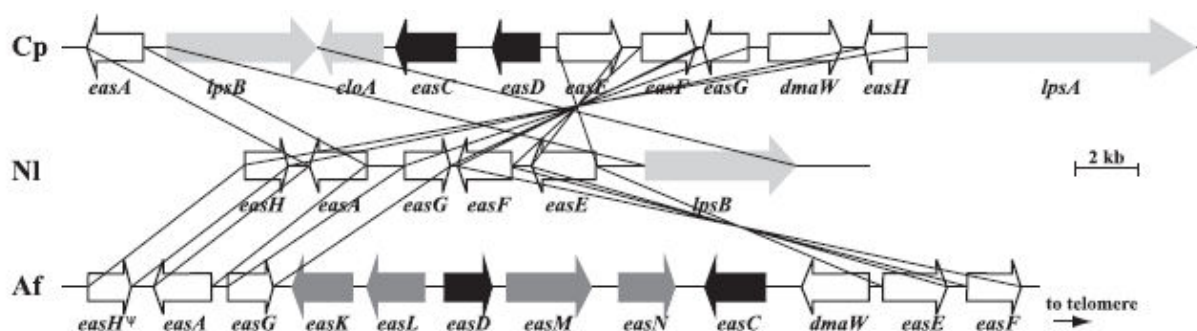


Obr. 16: Evoluční vztahy 37 zástupců rodu *Claviceps* a jejich izolátů (kmenů) založená na sekvenci pro β -tubulin (Lorenz *et al.*, 2009)

3.5.3 Evoluce klastru mezi producenty námelových alkaloidů

Fylogenetické analýzy genu *dmaW*, zodpovědného za první krok syntézy námelových alkaloidů, odhalily monofyletický původ genu u hub s produkcí námelových alkaloidů (Liu *et al.*, 2009).

Klastrování genů syntézy námelových alkaloidů bylo odhaleno u organismů *Aspergillus fumigatus* (Coyle *et al.*, 2005) a endofytu *Epichloë festucae*, jehož anamorf se nazývá *Neotyphodium lolii* (Fleetwood *et al.*, 2007). Produkce alkaloidů u *Asp. fumigatus* končí u klavinů, *E. festucae* tvoří ergopeptiny, nejčastěji zastoupený je ergovalin. Změny v klastrech jsou mnohem větší než mezi druhy *Claviceps*, ale ve všech klastrech byly identifikovány geny homologní s *C. purpurea* (Obr. 17).



Obr. 17: Srovnání klastrů syntézy námelových alkaloidů u *Claviceps purpurea* (Cp), *Neotyphodium lolii* (NI) a *Aspergillus fumigatus* (Af) (Fleetwood *et al.*, 2007), pozice genů *ipsA*, *dmaW* a *cloA* u *N.lolii* není známa.

4 Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

elektrokompetentní buňky *E.coli* TOP10 (Invitrogen, USA)

Claviceps purpurea Gal 404 (TEVA Czech Industries, Česká republika)

Claviceps purpurea Gal 130 (TEVA Czech Industries, Česká republika)

hybridní žito (*Secale cereale*) se samčí sterilitou plasmotyp Pampa linie 25x130 (Instytut Hodowli i Aklimatizacji Roslin, Radzikow, Polsko)

4.2 Použité roztoky a média

Extrakční roztok pro námelové alkaloidy

5 ml 26% ammoniak (Lach-Ner, Česká republika), 900 ml aceton (Penta, Česká republika), 100 ml destilovaná voda

Mobilní fáze pro UPLC

Roztok A – pufr : acetonitril (Sigma-Aldrich, USA) 4:1 (v/v), pufr – 0.5% (v/v) triethylamin (Sigma-Aldrich, USA), pH 4,4 upraveno pomocí koncentrované kys. fosforečné (Lachema, Česká republika)

Roztok B – voda : acetonitril 1:4 (v/v)

Identifikační směs ergoidních alkaloidů (Teva Czech Industries)

Rozpuštěno 0,1 mg ergotaminu, ergostinu, 8-OH-ergotaminu, ergocorninu, α -ergokryptinu, β -ergokryptinu, ergokristinu, ergogalinu, ergotamininu, ergostininu, ergocorninu, α -ergokryptininu, β -ergokryptininu, ergogalininu a ergokristininu v 10 ml 90 % methanolu (v/v; Penta, Česká republika)

LB agar:

25 g Luria Broth high salt (Duchefa, Holandsko), 15 g agaru (Himedia, Indie) rozpuštěno v 1 l destilované vody, autoklávováno

LB médium:

25 g Luria Broth high salt (Duchefa, Holandsko) bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody, autoklávováno

3% agarosový gel:

30 g agarosy (Amresco, USA) bylo rozpuštěno v 1 l TAE pufru

SOC médium:

20 g tryptonu (Duchefa, Holandsko), 5 g kvasničného extraktu (Sigma, USA), 0,5 g chloridu sodného (Sigma, USA) bylo rozpuštěno v 950 ml destilované vody a přidáno 10 ml 250 mM roztoku chloridu draselného (Lachema, Česká republika). pH bylo upraveno titrací 5 M hydroxidem sodným (Penta, Česká republika) na 7,0 a objem byl doplněn destilovanou vodou na 1 l. Roztok byl sterilizován autoklávováním a poté bylo přidáno 5 ml 2 M roztoku chloridu hořečnatého (Finnzymes, Finsko) a 20 ml sterilního 1 M roztoku glukosy (Penta, Česká republika). Roztok byl sterilizován filtrací přes 0,2 µm filtr (Sambrook *et al.*, 2001)

TAE pufr:

40 mM Tris (Duchefa, Holandsko), 1 mM EDTA (Penta, Česká republika), pufováno kyselinou octovou na pH 8,0 (Sambrook *et al.*, 2001)

Mantle agar:

100 g sacharosa (Penta, Česká republika), 10 g L-asparagin (Sigma-Aldrich, USA), 1 g tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Penta, Česká republika), 0,25 g dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Česká republika), 0,25 g heptahydrát síranu hořečnatého (Penta, Česká republika), 0,125 g chlorid draselný (Lachema, Česká republika), 0,033 g heptahydrát síranu železnatého (Neo-Lab, Německo), 0,027 g heptahydrát síranu zinečnatého (Neo-Lab, Německo), 0,01 g L-cystein (Sigma-Aldrich, USA), 0,1 g kvasinkový extrakt (Sigma, USA), 20 g agar (Himedia, Indie) rozpuštěno v 1 l destilované vody, pH 5.2 (HCl), autoklávováno

4.3 Postup

4.3.1 Očkování žita kmeny *C. purpurea*

Kmeny *C. purpurea* Gal130 a Gal404 byly kultivovány na Petriho miskách na sporulačním Mantle agaru při 28°C, přítomnost konidií byla kontrolována pomocí mikroskopu. Misky byly zality vodou a takto vzniklé inokulum bylo pomocí injekce aplikováno do klasů rostlin sterilního žita ve fázi metání. Žito rostlo ve skleníku při teplotě 22-25°C a před vysazením bylo jarovizováno ve stádiu 2 týdních semenáčků při 4°C po dobu 50 dnů.

4.3.2 Izolace RNA

Infikované klasy byly zamrazeny tekutým dusíkem a rozdrceny ve hmoždíři. Pro vlastní izolaci RNA byl použit kit RNAqueous[®] (Ambion, USA) podle postupu výrobce. RNA byla eluována 100 µl elučního roztoku, který je součástí kitu. Odstranění DNA kontaminací bylo provedeno kitem Turbo DNA-free[™] (Ambion, USA). Ke 100 µl roztoku RNA bylo přidáno 10 µl 10x Turbo DNase buffer a 3 µl Turbo DNase (2 U/µl), roztok inkubován 45 minut při 37°C, poté přidány další 2 µl Turbo DNase a inkubováno dalších 45 minut.

K přečistění RNA byly použity magnetické kuličky Agencourt RNA clean XP (Beckmann-Coulter, USA). K 50 µl roztoku RNA bylo přidáno 25 µl roztoku mag. kuliček a 20 µl isopropanolu (Lach-ner, Česká republika), směs byla 30 s vortexována a umístěna do magnetického stojánu na 5 min, poté byl odpipetován supernatant a kuličky promyty třikrát 70% ethanolem (Penta, Česká republika). Pelet kuliček byl vysušen v digestoři a RNA eluována 25 µl RNase free vody (Ambion, USA).

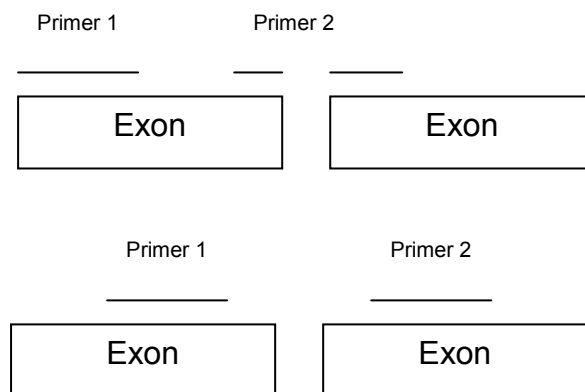
4.3.3 Přepis RNA do cDNA

Koncentrace RNA byla měřena na spektrofotometru NAS-99 (ACTGene, USA), k přepisu bylo použito vždy 2 µg RNA, které se doplnily RNase free vodou do konečného objemu 13 µl a přidán 1 µl Oligo d(T)₁₈ primeru (Fermentas, Litva). Směs byla zahřáta na 70°C 5 min a poté ochlazená na ledu. Na ledu byly přidány 4 µl 5x Reaction buffer a 2 µl 10 mM dNTP mix (Fermentas) a směs byla inkubována 5 min při 37°C. K směsi byl přidán 1 µl RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/µl, Fermentas) a reakce probíhala při 42°C 90 min, reakce byla ukončena zahřátím na 70°C po dobu 10 min.

4.3.4 Návrh primerů pro geny klastru a patogenicity

Nukleotidové sekvence genů byly získány z databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pomocí programu Primer Express[®] v3.0 (Applied Biosystems) byly vybrány dva páry primerů. První pár primerů byl vybrán tak, aby jeden primer nasedal na přechod mezi exony (Obr. 18), v druhém páru primerů nasedal každý na jiném exonu. Primery byly syntetizovány firmou Metabion (Německo). Lyofilizované primery byly rozpuštěny v destilované vodě v množstvích doporučených dodavatelem pro dosažení koncentrace 100 pmol/µl, pro qRT-PCR

reakci byl vždy vytvořen premix primeru – 1,2 μl z obou primerů (100 pmol/ μl) přidáno do 100 μl destilované vody.



Obr. 18: Návrh primerů pro geny expresní profilace

4.3.5 Expresní profilace pomocí qRT-PCR

Kvantitativní RT-PCR byla prováděna na přístroji ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) v továrním nastavení teplotního profilu reakce. Reakce probíhaly v 96 jamkových deskách MicroAmp® Fast Optical (Applied Biosystems), pokrytých folií MicroAmp® Optical Adhesive Film. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 1.

K vyhodnocení změny exprese byla použita metoda relativní kvantifikace $\Delta\Delta C_T$ pro kterou byly vybrány dva provozní geny *C. purpurea* – gen *tefA* kódující translační elongační faktor 1-alfa a gen *tub* kódující beta-tubulin. Jako kalibrátor byla vybrána biologická skupina sběru 3 dny po inokulaci, pokud není vyznačeno jinak.

Pro geny patogeneze byl použit program DataAssist® (Applied Biosystems) pracující se 100% účinností primerů. Jednotlivé klasy zařazeny do skupin biologických replikátů. Program byl nastaven pro vyloučení C_t hodnot vyšších než 36 a technických replikátů s odlišnými hodnotami pomocí Grubbsova testu. Program pracuje s nepárovým dvouvýběrovým t-testem, výsledná p-hodnota pravděpodobnosti byla navýšena metodou Benjamin-Hochberga pro odstranění falešně pozitivních výsledků.

Expresí genů klastru námelových alkaloidů byla zpracována programem RealTime StatMiner® (Integromics). Tento program umožňuje změnu účinnosti

primerů, které byly zjištěny v rámci praktické části diplomové práce. Nastavení programu odpovídalo programu DataAssist[®], byly vyloučeny C_t hodnoty vyšší než 36 a odlišné hodnoty mezi technickými replikáty. Pro statistické vyhodnocení byl vybrán neparametrický Wilcoxonův test (někdy označován jako Mann-Whitney test) a vybrána metoda Benjamin-Hochberga k odmítnutí falešně pozitivních výsledků.

Tabulka 1. Složení reakční směsi qRT-PCR

Power SYBR [®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)	5 μ l
Primer premix	2,5 μ l
cDNA templát	2,5 μ l
Celkový objem	10 μ l

4.3.6 Elektroforéza v agarózovém gelu

Separace probíhali v 3% agarózovém gelu v TAE pufru, do 100 ml 3% agarózového gelu bylo přidáno 30 μ l 10% ethidium bromidu (v/v; Sigma-Aldrich, USA). Ke vzorkům byl přidán 6x vzorkovací pufr (TaKaRa, Japonsko) pro výslednou koncentraci 1x. Pro zjištění velikostí fragmentů byl na gelu zároveň separován 50 bp žebřík (Fermentas, Litva). Separace probíhala při 120 V.

4.3.7 Účinnost primerů v qRT-PCR reakci

Pro vybrané sady primerů byla zjištěna jejich účinnost v PCR reakci. Amplikony, získané v qRT-PCR reakci, byly separovány elektroforézou v 3% agarózovém gelu v TAE pufru, vyřezány z gelu a izolovány pomocí QIAquick Gel extraction spin kitu (Qiagen, USA) dle postupu výrobce. Získané amplikony byly ligovány do pDRIVE plasmidu pomocí Qiagen PCR cloning kitu (Qiagen, USA) a směs inkubována při 16°C přes noc a ligasa inaktivována při 70°C 10 min. Poté byl přidán 1 μ l ligační směsi k 50 μ l elektrokompetentních E. coli TOP10 bakterií, elektroporace probíhala při napětí 1800 V a trvání pulsu 4 ms v přístroji BTX PEP ECM 399 (BTX, USA). Po pulsu bylo k bakteriím přidáno 200 μ l SOC média a bakterie vysety na LB agar s antibiotikem ampicilinem o koncentraci 50 μ g/ml a pro metodu α -komplementace bylo na misku rozetřeno 40 μ l roztoku XGal (0,1 M roztok v N,N'-dimetylformamidu) a 40 μ l IPTG (0.1 M vodný roztok), inkubace přes noc při

37 °C. Druhý den byly bílé kolonie přeneseny pomocí sterilního párátko do 2 ml tekutého LB média obsahující antibiotikum ampicilin (50 µg/µl) a inkubovány přes noc při 37 °C na třepačce. Namnožené bakterie byly použity pro izolaci plasmidu pomocí QIAprep Miniprep kitu (Qiagen, USA) dle návodu výrobce a velikost inzertu ověřena restrikcí EcoRI restrikční endonukleasou (Fermentas, Litva) a následnou elektroforetickou separací na 3% agarózovém gelu. Plasmidy nesoucí inzert o správné velikosti byly použity jako templát do qRT-PCR reakce v kalibrační řadě začínající koncentrací 1 ng/ml a snižující se koncentrací vždy na polovinu. Kalibrační řada měla vždy 12 reakcí a každá reakce byla nejméně jedenkrát replikována. Získané C_t hodnoty pro různé koncentrace plasmidu byly zaneseny do grafu v programu MS Excel® (Microsoft) a ze sklonu logaritmické spojnice trendu byla zjištěna účinnost pomocí webové stránky:

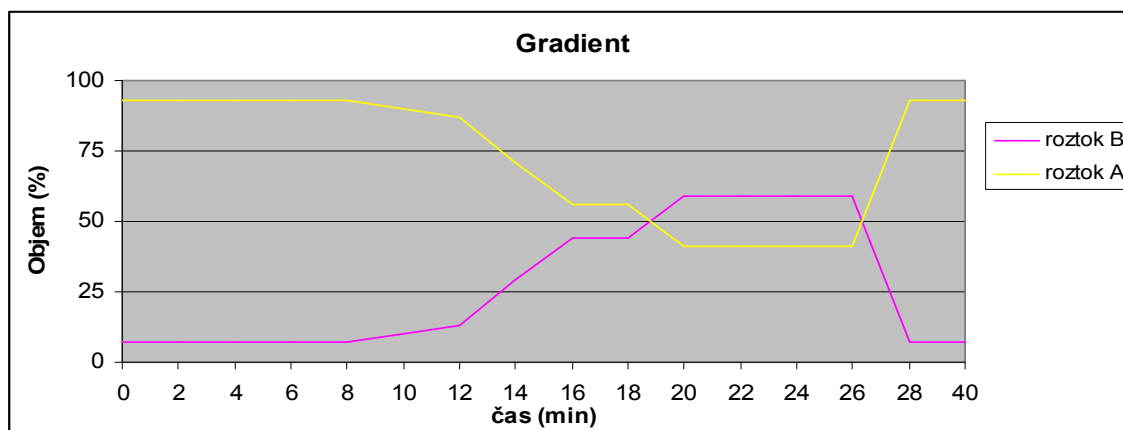
<http://www.genomics.agilent.com/CalculatorPopupWindow.aspx?CallID=8>

4.3.8 Měření obsahu alkaloidů

Rozdrcené klasy byly použity pro měření obsahů alkaloidů, dle metodiky firmy TEVA Czech Industries s.r.o. K 0,5 g rozdrceného materiálu bylo přidáno 50 ml extrakčního roztoku, objem extrakčního roztoku se přímo úměrně měnil podle hmotnosti rozdrceného materiálu. Alkaloidy byly extrahovány dvě hodiny na třepačce. Směs byla přefiltrována přes skelnou vatu a 10 ml bylo odpařeno ve varné baňce v rotační vakuové odparce (výrobce) při teplotě 60 °C vodní lázni. Odparek byl rozpuštěn v 250 µl 90% methanolu (vodný roztok; Penta, Česká republika), přefiltrován a 100 µl roztoku bylo přidáno k 900 µl roztoku B mobilní fáze. Ze vzniklého roztoku bylo 400 µl pipetováno do vialek pro HPLC analýzu.

HPLC analýza byla prováděna na přístroji Shimadzu Nexera na koloně Zorbax eclipse C18 (2,1 x 50 mm, velikost částic 1,8 µm), injekční objem do kolony byl 5 µl. Průběh gradientu koncentrací roztoků A a B v mobilní fázi je znázorněn v tab. 2. Jako standard byl použit 20µM ergotaminu (Teva Czech Industries) a identifikační směs obsahující deset různých ergoidních alkaloidů (Teva Czech Industries, šarže AM-QC-LC239)

Tab. 2: Koncentrace roztoků A a B v mobilní fázi



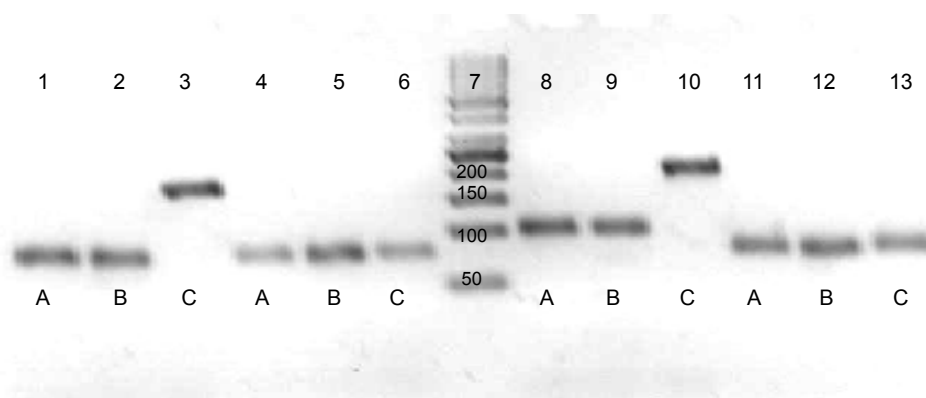
Čas (min)	0	8	10	12	14	16	18	20	26	28	40
Roztok A (obj. %)	93	93	90	87	71	56	56	41	41	93	93
Roztok B (obj. %)	7	7	10	13	29	44	44	59	59	7	7

5 Výsledky

5.1 Návrh a ověření účinnosti primerů

Byly provedeny sběry infikovaného žita v časových intervalech 3, 7, 13, 23, 34, 45, 55 a 65 dní po inokulaci, vždy tři náhodně vybrané klasy z různých rostlin pro daný sběr a kmen (Gal 404/130). Z klasů byla izolována celková RNA, přepsána do cDNA a jednotlivé klasy použity v expresní profilaci a měření obsahu alkaloidů.

Primery navržené v programu Primer Express[®] v3.0 (Applied Biosystems) byly otestovány pro tři templáty – cDNA infikovaného žita, cDNA mycelia a genomické DNA *C. purpurea* Gal404 (Obr. 19). Elektroforetickou separací v 3% agarózovém gelu byla ověřena velikost ampliconů a vybrány primery pro qRT-PCR reakci.



Obr. 19: Elektroforetogram vzorku z qRT-PCR. 1-3 gen *Cppg2* (primer přes intron), 1 – 79 bp, 2 – 79 bp, 3 – 180 bp; 4-6 gen *Cdc42* (primer přes intron), 4 – 76 bp, 5 – 76 bp, 6 – 76 bp; 8-10 gen *Cdc42* (primery na exonech), 8 – 99 bp, 9 – 99 bp, 10 – 204 bp; 11-13 gen *Cot1* (primer přes intron), 11 – 79 bp, 12 – 79 bp, 13 – 79 bp. A - cDNA templát z infikovaného žita, B – cDNA mycelia, C – genomická DNA *C. purpurea*; 7 – 50 bp žebřík (Fermentas)

Přehled navržených primerů, které byly použity pro expresní analýzu je uveden v tabulce 2. Pro geny *dmaW*, *lpsA*, *easF*, *nox1* a *xyl2* byly pro srovnání, či z důvodu nízké eficiency jedné sady použity dvě sady primerů označené čísly 1 a 2. Zkratky EF a TUB jsou označení pro endogenní kontroly. Z důvodu vysoké homologie mezi geny *lpsA1* a *lpsA2* byli primery pro tento gen vybrány tak, aby nasedali na oba tyto geny.

Účinnosti primerů pro geny syntézy námelových alkaloidů jsou uvedeny v tabulce 3. Hodnota R^2 určuje regresní koeficient, udává blízkost C_T hodnot datové

řady a přímky regrese.

Tab. 2: Primery pro expresní profil *C. purpurea*

Gen	Forward primer	Reverse primer	Velikost amplikonu cDNA templátu (bp)
Geny klastru námelových alkaloidů <i>C. purpurea</i>			
easC	gcatatggagagttcgaggttacg	tcgaggggttgctcgtggaaa	115
dmaW 1	ttcaggattcgtaccggtatca	caaatgtgtgcaaataacgctcaa	110
dmaW 2	cggttttcggcatgaatgac	caaatgtgtgcaaataacgctcaa	211
easG	atcaaggacgtcacatataccgtact	cctgtgccacctcgtcgtga	256
easA	tcgtgcgatgacaatgg	tcgctggcgtagaatgtct	57
easE	gtagtgagtgcgaatggtgacct	ggcccagaataggtcttgattg	66
easD	aattgtgtttctccagggcatca	ggctttgggctcgaattga	60
lpsA 1	gcatgtggagagaccaggagtat	tccggcaagggaatatcg	91
lpsA 2	ccgagtcgcgacagaac	tactcctggctctctccacatgc	53
easF1	tctagaccttggtagecgtaacct	tcaagcgcaaagtacaaaacgt	92
easF2	aggagatcgagatattgaagcaa	aggttagcgtaccaaggctctaga	90
lpsC	tcctttaaccggcgtttgtg	tggacgcatgtggctattagt	62
lpsB	tcaatctgttcgatcttgttacct	gggtaacaagatcgaacagattga	81
cloA	tgtattgggacaactctggcata	cgggagaagaagtacgagata	61
EF	caagcccggatggtcgтта	ctgctcgtggtgcattttcc	78
TUB	ctcagcaaatgtttgaccttaaga	agatggcagagcatgtcaggta	80
Geny patogeneze <i>C. purpurea</i>			
Cdc42	cttggcgccggttaagtagct	cgattgcctcgtcaaagaca	76
Cla4	gtccacttaccgatgtcattga	ccccggcaagtctcgttac	82
Cot1	aggcttcattcatcgtgacataaa	gccgaaatccgtcaacttga	79
Cppg1	tggcactcgcgtcatcttc	ggccttcccactcttgggtatc	59
Cppg2	gacctgagcgacttgaacgat	ggccttcccactcttgggtatt	79
Cptf1	tgatgacgacgacgatatgatg	gggcagcaacgcgattt	104
Mid1	gaatgtgaagaggcaggacgat	tgcaattgggtgcagcat	100
Mk1	aaggagtacacgaaggccattg	gggtcaactgatggtgataatcttt	109
Mk2	gcaaacgctggctacatgac	accagacatcaatggctttgg	104
Nox1/1	cagcaggccgcgtgat	cctaaccggcagtcctttctt	102
Nox1/2	gggtgtgtacttctgtggtccttcag	cctaaccggcagtcctttctt	127
Rac	aaatacttggaatgctctgctctca	gaggattcaagacagcacgaatg	82
Xyl2/1	tacgcttgggatgtcgtcaa	cgccgaggaggtttagtaga	79
Xyl2/2	tggacgatacaagggcaagat	gccgtcctgctcgaagatc	63

Tab.3: Účinnost vybraných primerů pro geny syntézy námelových alkaloidů

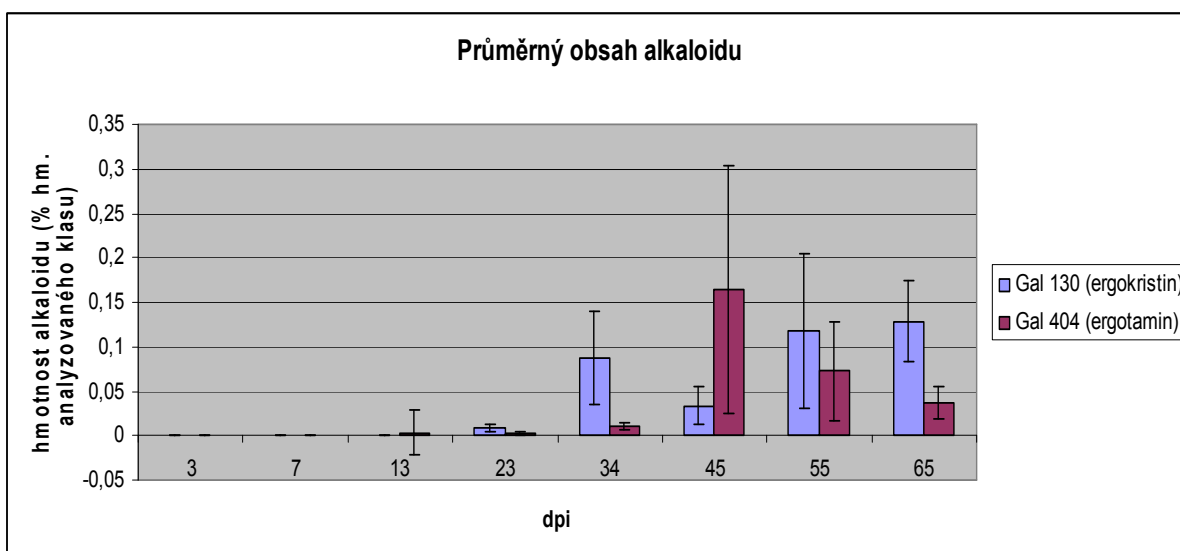
Gen	Sklon	R ²	Účinnost [%]
easC	-3.217	0,9979	104.575
dmaW 1	-3.753	0,9987	84.701
dmaW 2	-4.300	0,9959	70.835
easG	-3.785	0,9992	83.738
easA	-3.251	0,9984	103.046
easE	-3.533	0,9999	91.899
easD	-3.486	0,999	93.576
lpsA 1	-3.663	0,9991	87.486
easF 1	-4.415	0,9991	68.457
lpsC	-3,488	0,9992	93.491
lpsB	-3,405	0,9961	96.643
cloA	-3.480	0,9985	93.796
EF	-3.637	0,9985	88.36
TUB	-3.680	0,9996	86.963

5.2 Analýza obsahu alkaloidů

Tabulka 4 ukazuje obsahy hlavních námelových alkaloidů charakteristických pro kmeny Gal130 (ergokristin) a Gal404 (ergotamin) v průběhu infekce rostliny žita naměřené HPLC metodou. Obsah alkaloidů je uveden jako podíl z hmotnosti rozdrčeného klasu použitého k analýze. K větší přehlednosti je uveden průměrný obsah alkaloidů v klasech s uvedenými standardními odchylkami (Obr. 20). Pro výpočet obsahu byl použit součet ploch píku alkaloidů (ergokristin, ergotamin) a jejich oxidačních produktů (ergokristinin, ergotaminin). *C. purpurea* neprodukuje jen jeden ergoidní alkaloid, ale vždy jsou přítomny i jiné typy. Kmen Gal404 obsahoval příměsi alkaloidů β-ergokryptinu a ergokristinu, kmen Gal130 příměs α-ergokryptinu. Obsah těchto alkaloidů rostl zároveň s obsahem hlavního produkovaného alkaloidu, jejich obsah dosahoval maximálně 10% obsahu hlavního alkaloidu.

Tab. 4: Obsah alkaloidů v analyzovaných klasech

Dny po inokulaci	Klas	Obsah alkaloidu jako podíl hmotnosti klasu (hm. ‰)	
		Gal404 (ergotamin)	Gal130 (ergokristin)
3	I	0	0
	II	0	0
	III	0	0
7	I	0	0
	II	0	0
	III	0	0
13	I	0,03	0
	II	0	0
	III	0,05	0
23	I	0,04	0,04
	II	0,02	0,07
	III	0	0,12
34	I	0,08	0,80
	II	0,1	0,39
	III	0,16	1,43
45	I	1,59	0,25
	II	3,06	0,58
	III	0,27	0,18
55	I	0,80	1,24
	II	1,24	2,00
	III	0,14	0,28
65	I	0,23	1,80
	II	0,58	1,07
	III	0,31	0,97



Obr. 20: Průměrný obsah ergoidních alkaloidů v analyzovaných klasech

Sklerocia z infikovaných rostlin kmenem Gal404, které nebyly použity pro expresní profilaci, byly použity pro analýzu obsahů ergotaminu. Sklerocia byly rozdělena podle velikostí – sklerocia do 1 cm, do 2,5 cm a nad 2,5cm. Obsah ergotaminu je opět uveden jako podíl hmotnosti analyzovaného sklerocia. Pro zajímavost byl změřen obsah ergotaminu v myceliu kmene Gal404 starém 14 dní, ergotamin byl přítomný v malém množství pouze u jednoho z 5 vzorků, proto není u obsahu ergotaminu v myceliu uvedena standardní odchylka.

Tab. 5: Obsah ergotaminu v myceliu a sklerociích kmene Gal404 rozdělených dle velikosti. A – velikost do 1 cm, B – velikost do 2,5 cm, C – velikost nad 2,5 cm.

Sklerocia	Obsah ergotaminu (hm.%)
Gal 404 A	1,37 ± 0,13
Gal 404 B	1,47 ± 0,16
Gal 404 C	1,62 ± 0,18
Gal 404 mycelium	0,002

5.3 Analýzy genové exprese

Společným prvkem většiny expresních analýz je pokles exprese studovaného genu ve sběrech 7 a 13 dní po inokulaci. Příčina tohoto poklesu je zdůvodněna v kapitole 6 Diskuze.

5.3.1 Exprese genů patogenicity

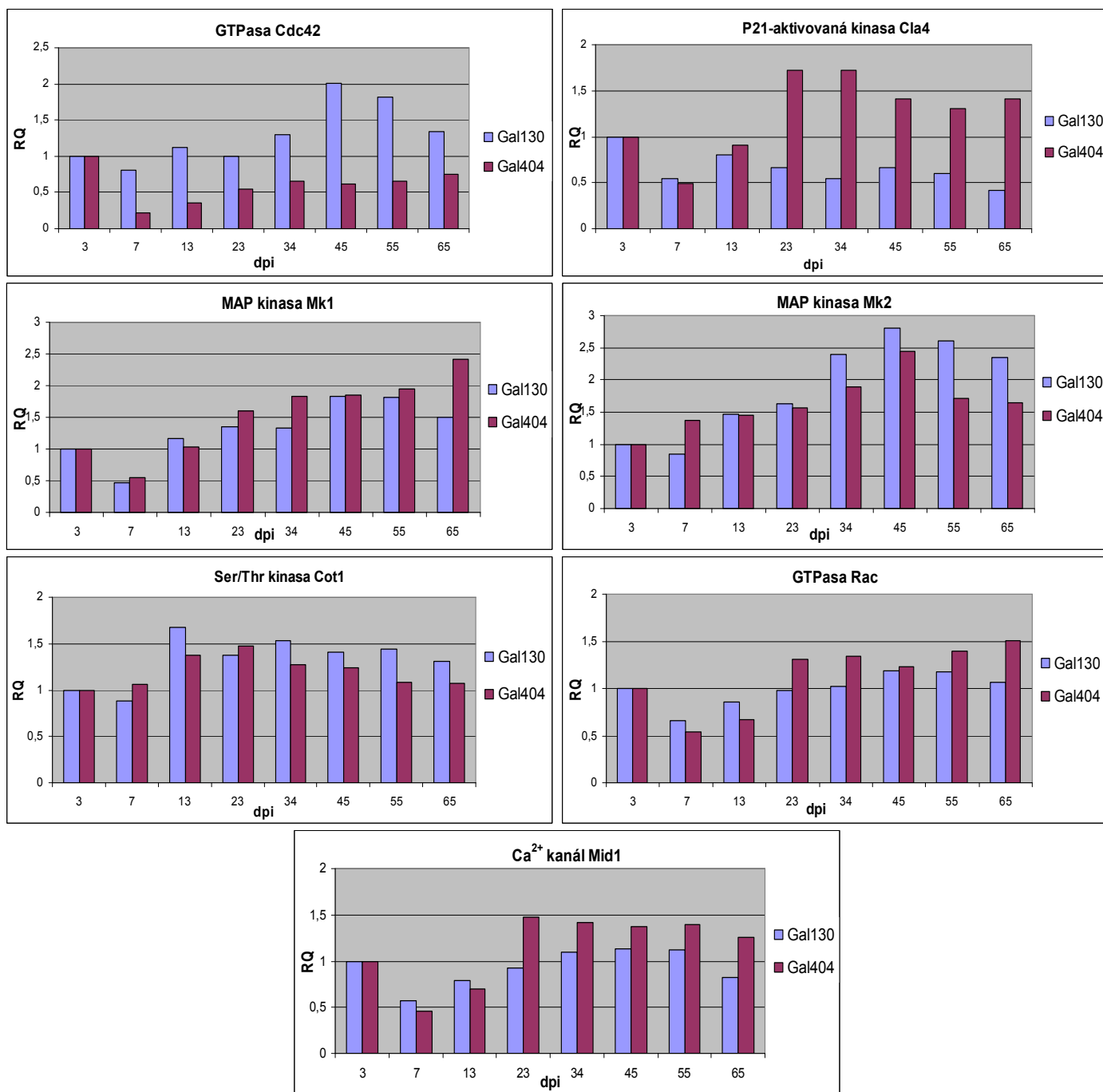
Pro snazší orientaci jsou v tabulce 6 uvedeny produkty a funkce genů patogenicity.

Tab. 6: Geny patogenicity užívané v expresní studii

Gen	Protein	Funkce
<i>Cppg1/2</i>	polygalakturonasa	degradace pektinu ovaria
<i>Xyl2</i>	endo-1,4- β -xylanasa	hydrolýza xylanu
<i>Rac</i>	GTPasa	buň. Signalizace
<i>Cdc42</i>	GTPasa	buň. Signalizace
<i>Cla4</i>	P21-aktivovaná kinasa	buň. Signalizace
<i>Cot1</i>	Ser/Thr kinasa	buň. Signalizace
<i>Mid1</i>	Ca ²⁺ kanál	signalizace Ca ²⁺ příjmu
<i>Mk1/2</i>	MAP kinasa	buň. signalizace
<i>Tf1</i>	transkripční faktor	odpověď na oxidativní stres
<i>Nox1</i>	NADPH-oxidasa	tvorba reaktivních forem kyslíku

5.3.1.1 Expres genů kódujících složky signálních drah (obr. 21)

Expres těchto genů se příliš v průběhu infekce nelišila, geny vykazovaly podobný trend růstu exprese i mezi kmeny Gal130 a Gal404, výraznější rozdíl mezi kmeny byl pouze u genu *cla4*. Nárůst exprese byl nejvyšší u genu *Mk2* ve sběru 45 dpi, nárůst byl ovšem pouze 2,5x oproti sběru 3 dpi.



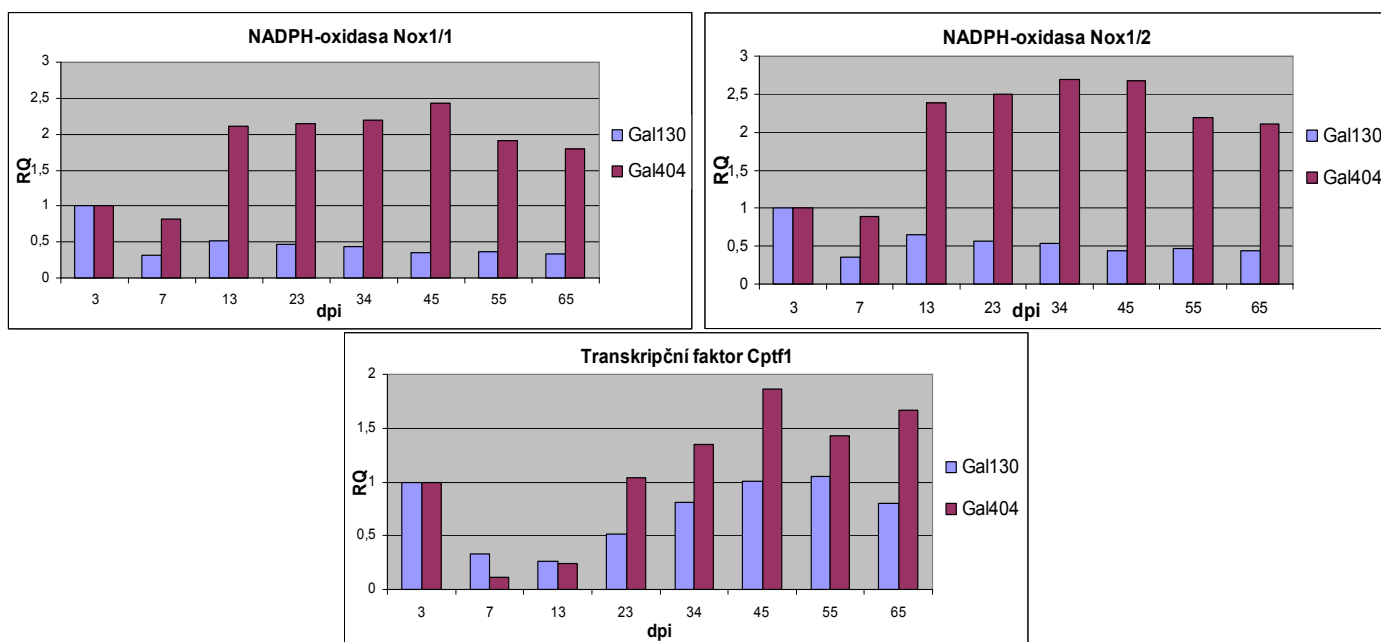
Obr. 21: Expres genů patogenicity: složky signálních drah. Kalibrátorem ve všech případech je sběr 3 dny po inokulaci (dpi).

Tab. 7: Statistické vyhodnocení exprese genů patogenicity u tří náhodně vybraných klasů nepárovým t-testem – složky signálních drah.

Dpi	p-hodnota							
	3	7	13	23	34	45	55	65
Cla4 Gal130	1	0,3729	0,3329	0,0888	0,0884	0,1503	0,053	0,0464
Cla4 Gal404	1	0,0835	0,7637	0,0923	0,0968	0,2643	0,2162	0,1702
Cdc42 Gal130	1	0,6383	0,5645	0,9924	0,3367	0,1186	0,083	0,2956
Cdc42 Gal404	1	0,0102	0,0305	0,0817	0,1112	0,233	0,1068	0,2209
Cot1 Gal130	1	0,6362	0,0621	0,0888	0,0884	0,1539	0,053	0,2105
Cot1 Gal404	1	0,5995	0,0531	0,046	0,146	0,2643	0,3602	0,5753
Mk1 Gal130	1	0,3729	0,5065	0,2799	0,2602	0,1503	0,026	0,0239
Mk1 Gal404	1	0,0216	0,7637	0,0598	0,0244	0,1322	0,0407	0,0079
Mk2 Gal130	1	0,6383	0,149	0,0888	0,0884	0,0395	0,026	0,0354
Mk2 Gal404	1	0,1161	0,0531	0,0598	0,0244	0,0135	0,0407	0,0589
Rac Gal130	1	0,5026	0,5645	0,9924	0,9235	0,5093	0,5752	0,7673
Rac Gal404	1	0,0216	0,0531	0,046	0,1035	0,2643	0,018	0,0079
Mid1 Gal130	1	0,49	0,3529	0,7541	0,7118	0,525	0,617	0,3114
Mid1 Gal404	1	0,0216	0,1134	0,1773	0,1218	0,278	0,1357	0,2243

5.3.1.2 Expresse genů zapojeným v metabolismu ROS (obr. 22)

Rozdíl v expresi genu *Nox1* byl výrazný mezi kmeny Gal404 a Gal130, rozdíl byl potvrzen u obou sad použitých primerů (*Nox1/1* a *Nox1/2*). Růst exprese genu *cptf1* vykazoval stejný trend růstu u obou kmenů. Nejvyšší exprese dosahovala 2,5-násobek exprese v kalibrátoru. Kalibrátorem je sběr 3 dpi.



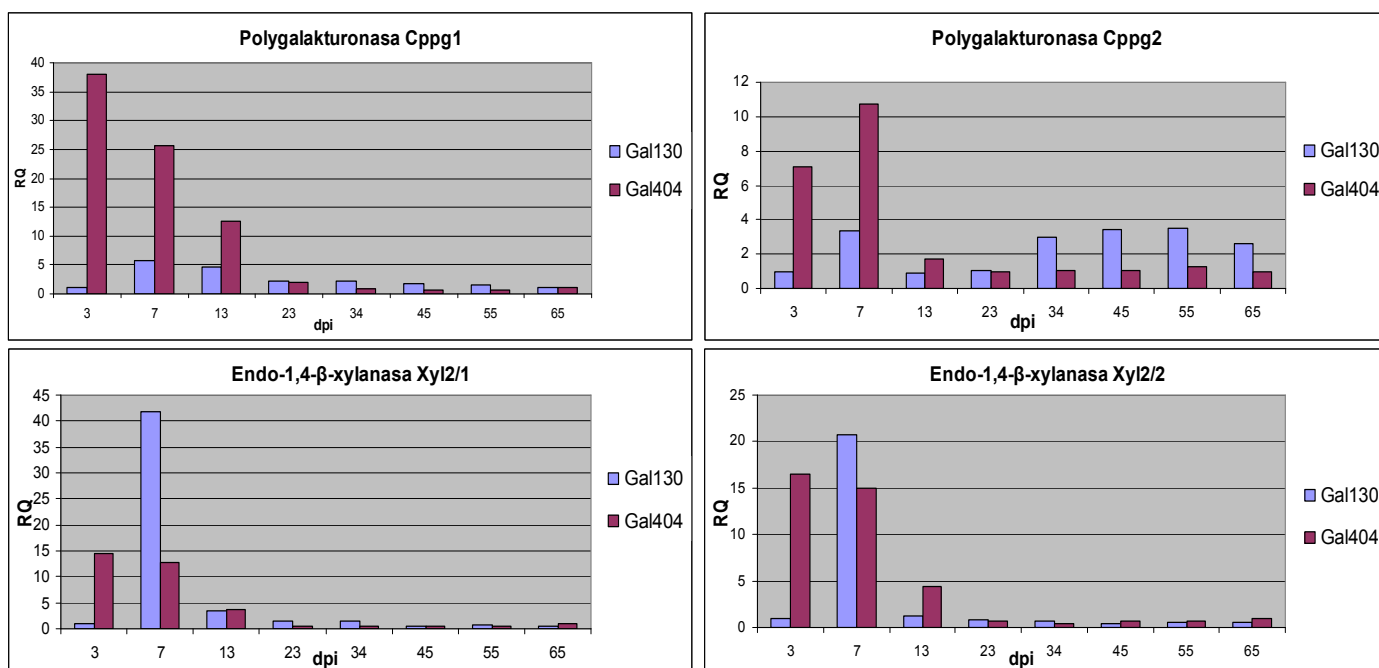
Obr. 22: Expresse genů patogenicity: geny zapojené v metabolismu ROS.

Tab. 7: Statistické vyhodnocení exprese genů zapojených v metabolismu ROS nepárovým t-testem u tří náhodně vybraných klasů.

dpi	p-hodnota							
	3	7	13	23	34	45	55	65
Cptf1 Gal130	1	0,3729	0,0621	0,0888	0,3508	0,9931	0,7306	0,2819
Cptf1 Gal404	1	0,0216	0,0332	0,8812	0,1942	0,1216	0,1702	0,1012
Nox1/1 Gal130	1	0,3729	0,149	0,0888	0,1801	0,0581	0,053	0,0464
Nox1/1 Gal404	1	0,5449	0,0531	0,0598	0,0866	0,0946	0,1137	0,0996
Nox1/2 Gal130	1	0,3729	0,1301	0,0888	0,2509	0,0581	0,0592	0,0354
Nox1/2 Gal404	1	0,6739	0,0856	0,0891	0,0968	0,1216	0,1137	0,103

5.3.1.3 Expresse genů degradace buněčné stěny (obr. 23)

V expresi těchto genů byl pozorován největší rozdíl mezi kmeny, nejvyšší exprese byla 3 dny po inokulaci u kmene Gal404, u kmene Gal130 byla exprese nejvyšší 7 dní po inokulaci. Pro gen *xy12* byly použity 2 sady primerů, vykazující obdobný profil exprese. Odlišný trend byl pouze u genu *cppg2*, tento trend byl podobný i u kmene Gal130. Nárůst exprese těchto genů dosahovala podstatně vyšších hodnot oproti ostatním genům patogenicity, v případě genu *xy12* sady 1 dosáhla exprese 40-násobku exprese kalibrátoru.



Obr. 23: Expresse genů patogenicity: geny degradace buněčné stěny. Pro vyšší přehlednost byl jako kalibrátor pro kmen Gal404 zvolen sběr 65 dpi, kalibrátor kmene Gal130 byl sběr 3 dpi.

Tab. 8: Statistické vyhodnocení exprese genů zapojených v degradaci buňečné stěny nepárovým t-testem u tří náhodně vybraných klasů

dpi	p-hodnota							
	3	7	13	23	34	45	55	65
Cppg1 Gal130	1	0,1984	0,1421	0,3421	0,3367	0,4473	0,5752	0,7673
Cppg1 Gal404	0,0087	0,0034	0,0027	0,4906	0,5674	0,5172	0,3049	1
Cppg2 Gal130	1	0,123	0,7478	0,8583	0,0855	0,0395	0,026	0,0439
Cppg2 Gal404	0,0198	0,0034	0,1741	0,8316	0,8695	0,9207	0,5223	1
Xyl2/1 Gal130	1	0,123	0,2711	0,6728	0,6974	0,5093	0,6403	0,5216
Xyl2/1 Gal404	0,019	0,0046	0,0244	0,4906	0,3283	0,52	0,3049	1
Xyl2/2 Gal130	1	0,1984	0,6465	0,6728	0,4468	0,1539	0,2592	0,2563
Xyl2/2 Gal404	0,019	0,0069	0,0292	0,6205	0,3283	0,6322	0,3723	1

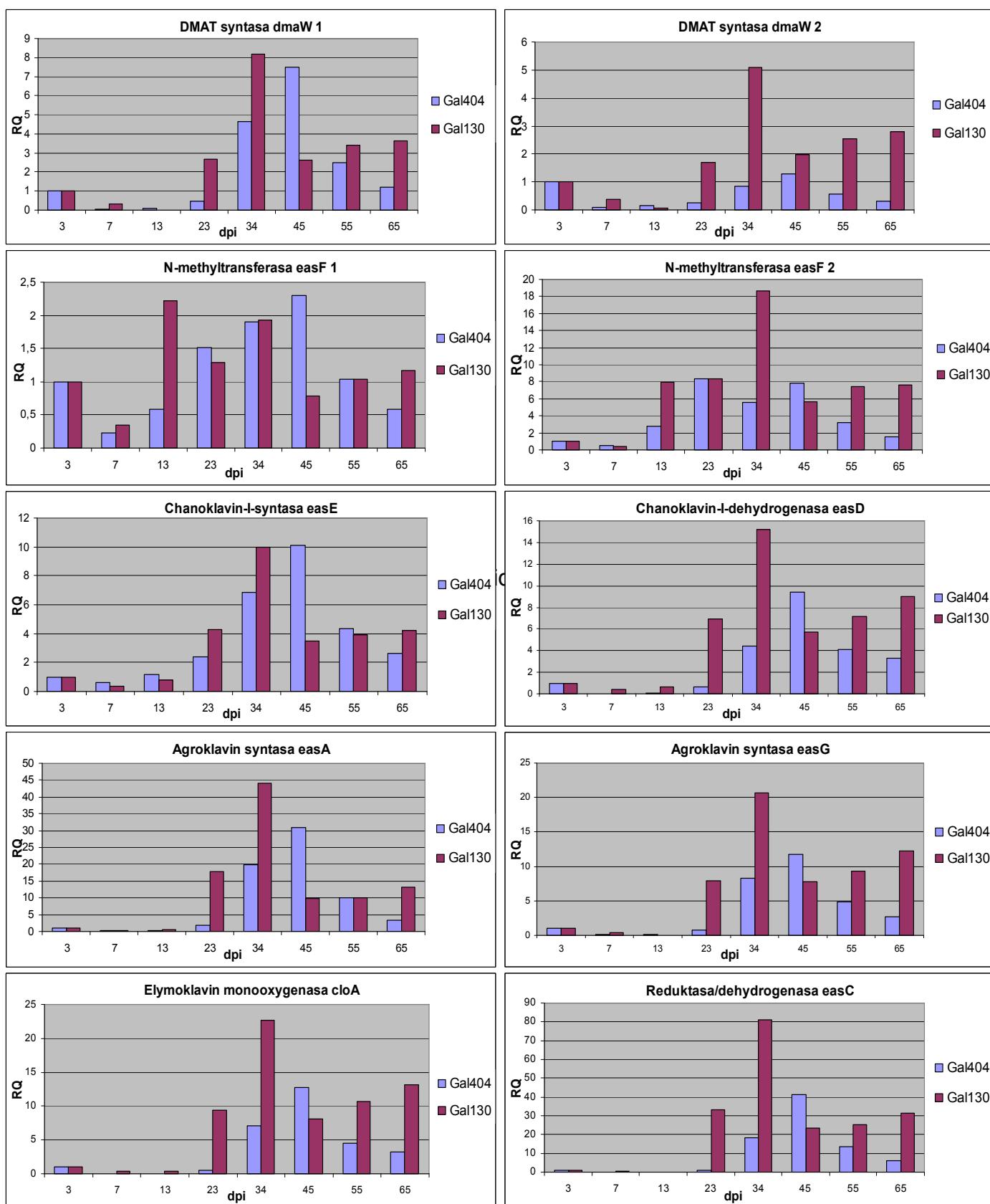
5.3.2 Exprese genů klastru syntézy ergoidních alkaloidů

Analyzované geny dosahovali nejvyšší exprese 34 dnů po inokulaci u kmene Gal130 a 45 dní po inokulaci u kmene Gal404. Změny exprese genů u jednotlivých sběrů vykazovaly velmi podobné trendy. Exprese genů kmene Gal404 narůstá do maxima 45 dpi a poté klesá. U kmene Gal130 exprese narůstá do maxima 34 dpi, klesá a zvolna roste až do posledního sběru 65 dpi. Pro geny *dmaW*, *easF* a *lpsA* byly použity 2 sady primerů, sada 1 genu *lpsA* s ověřenou účinností nebyla pro expresní studii použita, protože výsledky s těmito primery poskytovaly špatné a nereprodukovatelné výsledky již v technických replikátech.

V tabulce 8 jsou uvedeny funkce produktů analyzovaných genů, grafy exprese jsou seskupeny na geny zapojené v syntéze kys. lysergové společně se zatím necharakterizovaným genem *easC* (obr. 24) a geny neribozomálních lysergyl peptid syntas (obr. 25).

Tab. 8: Geny klastru syntézy ergoidních alkaloidů analyzované v expresní profilaci

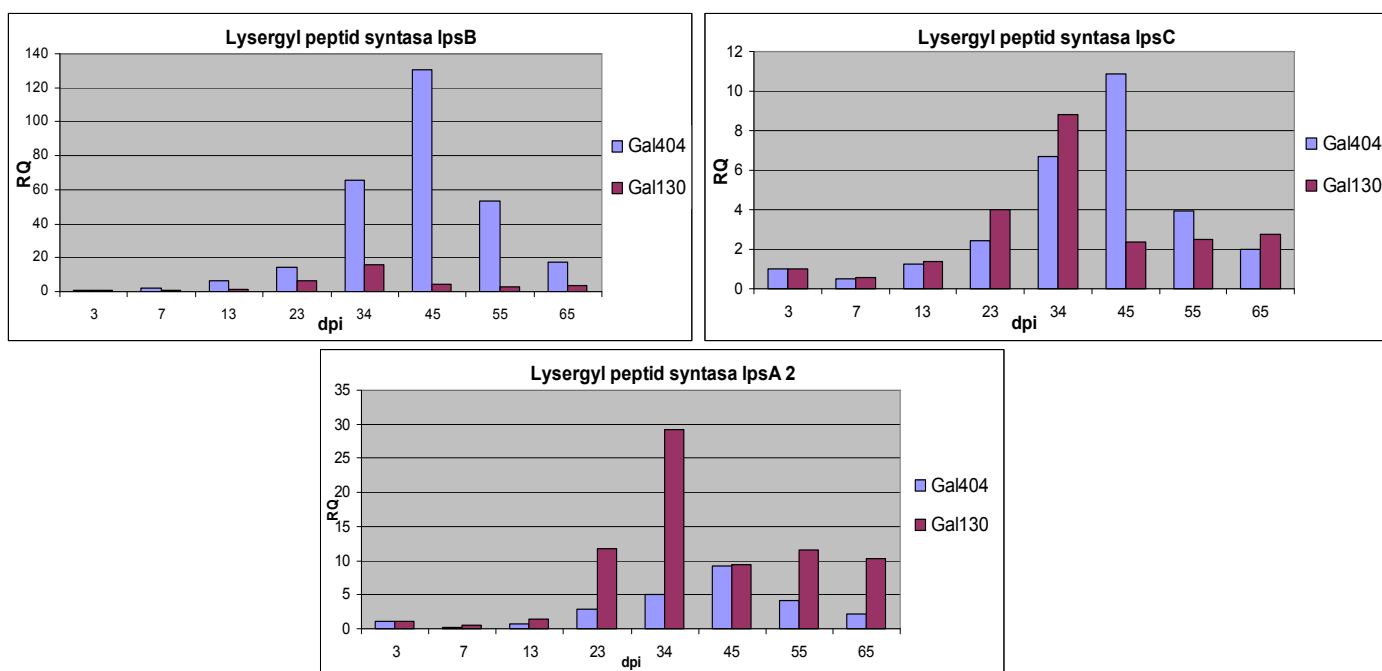
Gen	Funkce
<i>easA</i>	Agroklavin syntasa
<i>lpsB</i>	LPS 2, aktivace kys. lysergové
<i>lpsC</i>	LPS 3, syntéza ergometrinu
<i>cloA</i>	Elymoklavin monooxygenasa
<i>easC</i>	Reduktasa/dehydrogenasa
<i>easD</i>	Chanoklavin-I-dehydrogenasa
<i>easE</i>	Chanoklavin-I-syntasa
<i>easF</i>	4-dimethylallyltryptofan N-methyltransferasa
<i>easG</i>	Agroklavin syntasa
<i>dmaW</i>	DMAT syntasa
<i>lpsA1</i>	LPS 1, syntéza ergopeptinů
<i>lpsA2</i>	LPS 1, syntéza ergopeptinů



Obr. 24: Expresie genů klastru syntézy ergoidních alkaloidů – geny kódující enzymy syntézy kys. lysergové a necharakterizovaný gen easC

Tab. 9: Statistické vyhodnocení nepárovým t-testem exprese genů klastru syntézy ergoidních alkaloidů u tří náhodně sebraných klasů – geny kódující enzymy syntézy kys. lysergové a gen easC

dpi	p-hodnota							
	3	7	13	23	34	45	55	65
dmaW 1 Gal130	1	0,2222	0,1415	0,4465	0,0871	0,0943	0,2424	0,0871
dmaW 1 Gal404	1	0,1029	0,1415	0,2424	0,1029	0,1029	0,4465	1
dmaW 2 Gal130	1	0,4122	0,1415	0,6625	0,0871	0,4122	0,2424	0,0871
dmaW 2 Gal404	1	0,1029	0,1415	0,1617	0,6625	0,6625	1	0,4465
easF 1 Gal130	1	0,2222	0,1415	0,6625	0,1904	1	0,6625	0,3827
easF 1 Gal404	1	0,1029	0,3827	0,4465	0,4122	0,6625	1	0,4465
easF 2 Gal130	1	0,2222	0,1415	0,1029	0,0871	0,0943	0,1415	0,0871
easF 2 Gal404	1	1	0,3827	0,2424	0,2222	0,2222	0,4465	0,7135
easE Gal130	1	0,2222	0,6625	0,1029	0,0871	0,0943	0,2424	0,0871
easE Gal404	1	0,1029	0,3827	0,1617	0,1029	0,1029	0,1132	0,1132
easD Gal130	1	0,2222	0,1415	0,1029	0,0871	0,0943	0,1415	0,0871
easD Gal404	1	0,1029	0,1415	0,2424	0,1029	0,1029	0,1132	0,1132
easA Gal130	1	0,2222	0,1415	0,1029	0,0871	0,0943	0,1415	0,0871
easA Gal404	1	0,1029	0,1415	0,1617	0,1029	0,1029	0,1132	0,1132
easG Gal130	1	0,2222	0,1415	0,1029	0,0871	0,0943	0,1415	0,0871
easG Gal404	1	0,1029	0,1415	0,6625	0,1029	0,1029	0,1132	0,1132
cloA Gal130	1	0,2222	0,1415	0,1029	0,0871	0,0943	0,1415	0,0871
cloA Gal404	1	0,1029	0,1414	0,2423	0,1029	0,1029	0,1131	0,1131
easC Gal130	1	0,2222	0,2962	0,1029	0,0871	0,0943	0,1415	0,0871
easC Gal404	1	0,1029	0,1415	0,6625	0,1029	0,1029	0,1132	0,1132



Obr. 25: Expresa genů lysergyl peptid syntas *lpsB*, *lpsC* a *lpsA* klastru ergoidních alkaloidů

Tab. 10: Statistické vyhodnocení exprese genů lysergyl peptid syntas *lpsB*, *lpsC* a *lpsA* klastru ergoidních alkaloidů nepárovým t-testem u tří náhodně vybraných klasů.

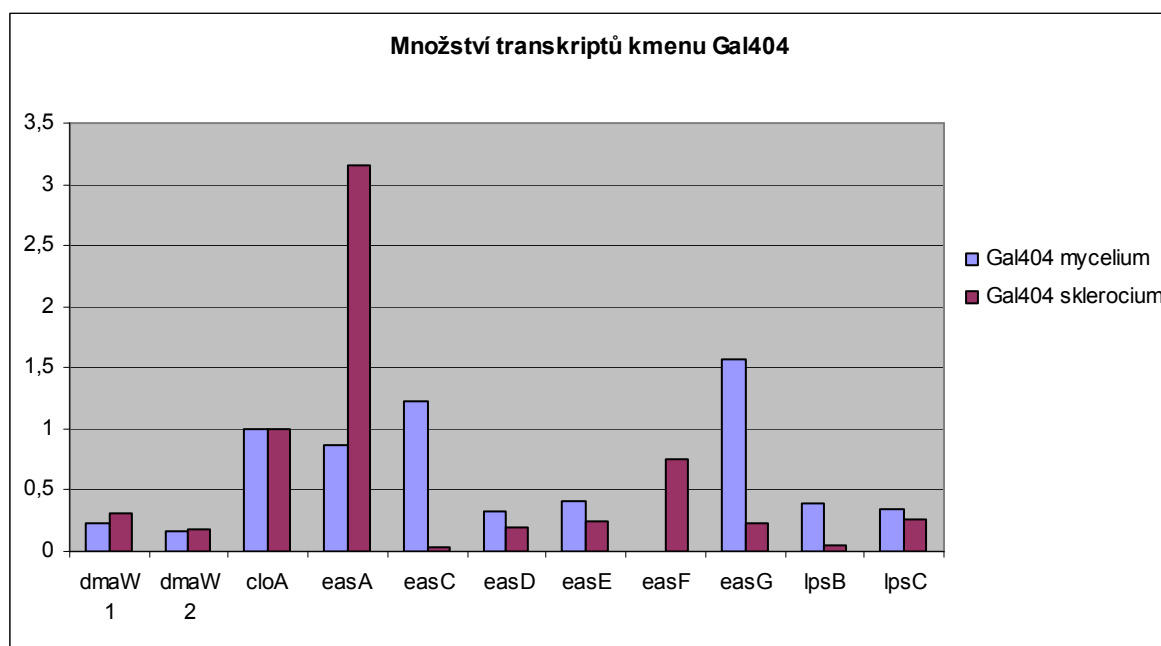
dpi	p-hodnota							
	3	7	13	23	34	45	55	65
<i>lpsB</i> Gal130	1	0,2222	0,4465	0,1029	0,0871	0,0943	0,6625	0,0871
<i>lpsB</i> Gal404	1	0,4121	0,2666	0,1617	0,1029	0,1029	0,1132	0,1132
<i>lpsC</i> Gal130	1	0,2222	0,4465	0,1029	0,0871	0,0943	0,6625	0,0871
<i>lpsC</i> Gal404	1	0,2222	0,3827	0,1617	0,1029	0,1029	0,1132	0,1132
<i>lpsA</i> 2 Gal130	1	0,2222	0,6625	0,1029	0,0871	0,0943	0,1415	0,0871
<i>lpsA</i> 2 Gal404	1	0,1029	0,2666	0,1617	0,1029	0,1029	0,1132	0,1132

5.3.3 Porovnání exprese genů klastru mezi myceliem a sklerociem

Díky vypracovaným kalibračním řadám pro jednotlivé geny bylo možné porovnat hladiny jednotlivých transkriptů u kmene Gal404 mezi myceliem a sklerociem (tab. 11). Porovnání je zpracováno do grafu (Obr. 26), ve kterém je pro názornost nastaveno množství transkriptů genu *cloA* ve sklerociu i myceliu na hodnotu 1, sada prumerů pro gen *lpsA* nebyla zpracována.

Tab. 11: Množství transkriptu v myceliu a sklerociu kmene Gal404

Gen	Mycelium Gal404	Sklerocium Gal404	Sklerocium/mycelium
dmaW1	909	206889	228
dmaW2	639	121412	190
cloA	3858	669455	174
easA	3343	2114882	633
easC	4753	20602	4
easD	1266	126210	100
easE	1604	163605	102
easF	1	499949	499949
easG	6037	151671	25
lpsB	1485	37286	25
lpsC	1355	175920	130



Obr. 26: Rozdíl v množství transkriptu mezi myceliem a sklerociem

6 Diskuze

Průmyslové kmeny *Claviceps purpurea* Gal404 a Gal130, užitá v této diplomové práci, byly získány náhodnou mutagenezí a intenzivní selekcí vhodných mutantů na obsah alkaloidů ergotaminu (kmen Gal404) a ergokristinu (kmen Gal130) firmou Teva Czech Industries. Kritériem selekce je co nejvyšší obsah žádaného alkaloidu s minimální příměsí jiných alkaloidů pro jednodušší průmyslové zpracování.

Výsledkům této diplomové práce předcházela podobný experiment s expresní profilací na více průmyslových kmenech *C. purpurea*, kromě kmenů Gal404 a Gal130 byl použit k analýze i kmen Gal310 (producent převážně ergokorninu, α - a β -ergokryptinu) a Gal020 (producent α - a β -ergokryptinu). Tento experiment byl první zkouškou navrhnuté metodiky. Pro analýzy byl sbírán jen jeden infikovaný klas pro daný kmen ve sběrech 5, 10, 15 a 20 dní po inokulaci a jako kalibrátor užito mycelium kmene Gal404. Při zpracování výsledků byl zjištěn pouze mírný nárůst exprese u všech kmenů, proto bylo zvoleno u dalších experimentů více sběrů v delším časovém úseku. K zlepšení statistické výpovědi byly v této diplomové práci sbírány tři náhodné infikované klasy v daném sběru. Překvapivým výsledkem byla vysoká exprese genů klastru syntézy ergoidních alkaloidů v myceliu, při měření obsahu ergotaminu byla jeho přítomnost ověřena jen ve stopovém množství pouze u jednoho z pěti různě starých mycelií. Značné rozdíly v expresi genů mezi mycelií vedly k výběru prvního sběru (3 dny po inokulaci) jako kalibrátoru pro $\Delta\Delta C_T$ metodu relativní kvantifikace.

Relativně vysoká exprese genů klastru v myceliu je s nejvyšší pravděpodobností vysvětlením snížené exprese většiny genů (kromě genů degradace buň. stěny) ve sběrech 7 a 13 dní po inokulaci. Pro inokulaci klasů žita bylo mycelium příslušného kmene zalito vodou, se kterou byly na rostlinu aplikovány nejen konidie, ale i části mycelia. Naměřená exprese ve sběru 3 dny po inokulaci je tedy zčásti zbytkovou expresí mycelia. V následujícím sběru je již mycelium na povrchu klasu neaktivní a degradováno a je měřena exprese jen konidií prorůstajících semeníkem. V příštích experimentech bude inokulum filtrováno přes skelnou vatu k odstranění částí mycelia.

Primery vybrané pro expresní profilaci kmenů Gal130 a Gal404 *C. purpurea* byly navrženy na základě sekvencí uveřejněných v databázi NCBI, získaných

z kmene P1 *C. purpurea*. Sekvence amplikonů z RT-PCR vykazovaly minimální nukleotidový polymorfismus v porovnání se sekvencemi na které byly primery navrženy. Důvodem relativně nízkých hodnot účinnosti některých primerů zřejmě tedy nebude sekvenční variabilita genů mezi průmyslovými kmeny a kmenem P1. Polymorfismus ve dvou nukleotidech byl pouze detekován u kmene Gal404 u 91 bp dlouhého amplikonu genu *lpsA*. Sada primerů *lpsA* 1 byla navržena tak, aby primery co nejlépe nasedaly na oba geny *lpsA1* a *lpsA2*, z důvodu jejich silné homologie sekvencí u kmene P1, která neumožňovala návrh primerů na každý gen zvlášť. Sada 1 primerů *lpsA* s účinností 87,5% nakonec nebyla pro expresní analýzu použita, amplifikace pomocí těchto primerů byla značně náhodná a technické replikáty dosahovaly vysokého rozptylu C_t hodnot. Proto byla použita sada primerů *lpsA* 2 nasedající na exony, s neověřenou účinností ale replikovatelnou amplifikací. V příštích experimentech by již mohla být známa sekvence genů *lpsA1* a *lpsA2* studovaných průmyslových kmenů, která by umožnila návrh 100% specifických pro odlišení obou genů.

Expresní profil genů patogenicity poskytl zajímavé výsledky zejména u genů degradace buňečné stěny *cpgg1*, *cpgg2* a *xyl2* (2 sady primerů). Expese genů nabývala u kmene Gal404 maxima již 3 dny po inokulaci (dpi), zatímco u kmene Gal130 až 7 dpi. Tento rozdíl odpovídá i pozorování pozdní produkce medovice u kmene Gal130. Nárůst exprese u genů degradace buněčné stěny byl podstatně vyšší než ostatních genů patogenicity, v případě genu *cpgg1* byla expese ve sběru 3 dpi na 40-násobku exprese genu v kalibrátoru. Výraznější rozdíl mezi kmeny byl pozorován u obou sad primerů pro gen *nox1* kódující NADPH oxidasu. Nízká expese tohoto genu u kmene Gal 130 oproti kmeni Gal404 mohla způsobit zpomalení vývoje houby, deleční mutant vykazoval v některých případech opoždění vývoje (Giesbert *et al.*, 2008). U ostatních genů patogenicity dosahoval nárůst exprese maximálně trojnásobku exprese kalibrátoru.

Expresní profil pro geny klastru syntézy námelových alkaloidů kmenů Gal130 a Gal404 vykazoval podobný trend s maximem exprese 34, respektive 45 dpi. Toto zjištění nelze brát jako kmenově specifické, protože inokulace žita obou kmenů neproběhla v jeden den. Kmen Gal404 byl očkován 20. 12. 2011 a kmen Gal130 2. 1. 2012. Pokud vezmeme v potaz tento rozdíl, zjistíme, že maximální expese byla dosažena u obou kmenů ve stejné době. Expese genů klastru byla zřejmě ovlivněna vnějšími podmínkami. Rostliny žita napadené *C. purpurea* rostly ve skleníku

s kontrolovanou teplotou v rozmezí 22-25°C. Faktor, který nebyl ve skleníku kontrolován, byla intenzita slunečního záření, která je závislá na počasí. V zimních měsících, kdy experiment proběhl, jsou rostliny pouze dosvětlovány umělým osvětlením před východem slunce a po soumraku tak, aby byla simulována délka dne odpovídající dlouhému dni v období metání obilovin. Vliv světla na expresi genů klastru by potvrdil hypotézu přítomnosti velvet komplexu či podobného regulačního mechanismu reagujícího na světelné záření u *C. purpurea*. Otázkou však zůstává, zda může být exprese genů syntézy ergoidních alkaloidů regulována ve sklerociích světlem tak, jako bylo popsáno u exprese genů klastru pro syntézu sekundárních metabolitů např. sterigmatocystinu u *Aspergillus nidulans* nebo penicilinu u *Penicillium chrysogenum* (Bayram *et al.*, 2011), vzhledem k silné pigmentové vrstvě v povrchových pletivech sklerocií. Ve svých maximech exprese byla u většiny genů srovnatelná u obou studovaných kmenů. Rozdíly u 2 sad primerů pro gen *easF* jsou zapříčiněny rozdílnou účinností primerů. U sady 2 nebyla účinnost určena a pro potřeby relativní kvantifikace byla stanovena jako 100%, ve skutečnosti však mohla být podstatně nižší (účinnost sady 1 byla pouhých 68%). Nízká exprese genu *easF* by mohla být způsobena jiným regulačním mechanismem tohoto genu. Exprese genu *lpsB* kmene Gal404 byla desetinásobně vyšší než u kmene Gal130. Gen kóduje první NRPS enzym LPS2 zapojený v syntéze ergopeptinů. Trojnásobný rozdíl v expresi detekované sadou 2 primeru *lpsA* je výsledek špatně komentovatelný, nedokážeme rozlišit, který z genů (*lpsA1/2*) je detekován a primery nemají ověřenou účinnost. Exprese genu *lpsC*, kódující ergometrin syntasu, byla v maximu podstatně nižší než u ostatních lysergyl peptid syntas, přítomnost ergometrinu u analyzovaných kmenů nebyla ověřena, ve standardní identifikační směsi nebyl tento alkaloid přítomen. Tyto rozdíly v expresi genů pro lysergyl peptid syntasy neměly znatelný vliv na obsah alkaloidů (oba kmeny jsou producenty ergopeptinů).

Porovnání počtu kopií transkriptů v myceliu a sklerociu kmene Gal404 ukázalo rozdíly v poměrném zastoupení genů v obou stádiích. Rozdíly byly nejpodstatnější u genů *easC* a *easF*. Gen *easC* byl výrazně více exprimován v myceliu než ostatní geny. Knock-out tohoto genu neprodukoval žádné alkaloidy a byla u něj snížena transkripce ostatních genů klastru (Haarmann *et al.*, 2009), proto byl považován za možný regulační bod exprese celého klastru. Naše výsledky ukazují, že je zřejmě opravdu regulován jiným mechanismem než ostatní geny klastru Obrovská

pozorovaná up-regulace genu *easF* mezi myceliem a sklerociem (Tab. 11) by mohla být z části způsobená špatně fungujícími primery, což je vidět srovnáním profilů exprese za použití obou sad na obrázku 24. Nicméně nízká exprese v mycéliu by mohla být důvodem proč v tomto vývojovém stádiu nejsou přítomny alkaloidy, Mírné rozdíly v expresi byly pozorovány i u genů *lpsB*, *easG* a *easA*. U těchto genů se proto také nedá vyloučit rozdílný mechanismus regulace exprese na rozdíl od ostatních genů klastru. Ostatní geny byly přítomny v obou stádiích relativně ve stejném poměru. Odlišnost dvou sad primerů genu *dmaW* by mohla být brána jako pravděpodobná chyba stanovení.

Analýza alkaloidů ergotaminu pro kmen Gal404, ergokristinu kmene Gal130 a jejich oxidačních produktů (označovaných přidáním koncovky –in, tzn. ergotaminin a ergokristinin) potvrdila vysokou variabilitu obsahu v jednotlivých napadených klasech žita. I přes vysoké rozdíly lze říci, že 45 dpi byl obsah ergotaminu u kmene Gal404 nejvyšší, což odpovídá i maximu genové exprese tohoto kmene. Nejvyšší obsah ergotaminu v klasu byl 0,3% hmotnosti, při analýze obsahu ve sklerociích byl rozdíl v obsazích závislý na jejich velikosti. Delší a větší sklerocia měly větší obsah ergotaminu (1,62% hmotnosti sklerocia). Při analýze mycelií, které měli překvapivě vysokou expresi genů klastru, byl u jednoho z nich naměřen obsah ergotaminu 0,002% hmotnosti, ale jednalo se spíše o výjimkou. Obsah ergokristinu u kmene Gal130 rostl od sběru 23 dpi bez pozorovatelného maxima.

V současné době se na oddělení Molekulární biologie katedry Biochemie, kde byla vypracována tato diplomová práce, pracuje na projektu sekvenování transkriptomu *C. purpurea* kmenů Gal404 a Gal130, které by mohlo přinést nové poznatky o regulaci produkce ergoidních alkaloidů. K sekvenování budou využity sekvenační technologie nové generace, především tzv. 454 pyrosekvenování.

7 Závěr

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše zabývající se parazitickou houbou *Claviceps purpurea*, jejími genetickými faktory infekce a růstu v hostiteli a geny seskupenými v klastru pro syntézu ergoidních alkaloidů.

Praktická část diplomové práce obsahuje metodiku pro expresní profilaci vybraných genů patogenicity a klastru syntézy ergoidních alkaloidů. Byly navrženy primery, pro geny klastru byla zjištěna jejich účinnost. Primery byly navrženy podle sekvencí uveřejněných ve veřejné databázi NCBI kmene P1. Sekvenční variabilita genů mezi kmeny způsobila nižší účinnost primerů pro analyzované kmeny Gal130 a Gal404, v některých případech dosahovala účinnost pouze 70%. Primery byly použity pro vypracování profilu exprese genů na infikovaných klasech žita (*Secale cereale*), rostoucích ve skleníku, v osmi časových sběrech – 3, 7, 13, 23, 34, 45, 55 a 65 dní po inokulaci (dpi).

U genů patogenicity byl zjištěn výrazný rozdíl v expresi genů *cppg1*, *cppg2* a *xy12* kódující enzymy degradace buněčné stěny. U kmene Gal130 byla exprese těchto genů nejvyšší až 7 dpi, oproti kmeni Gal404, který měl nejvyšší expresi již 3 dpi. Tento výsledek ukazuje, že průběh infekce u kmene Gal130 je opožděn, opožděné pozorování makroskopických příznaků infekce – tvorba medovice – výsledek také potvrzují.

Geny biosyntézy námelových alkaloidů dosáhli nejvyšší exprese u kmene Gal404 45 dpi, u kmene Gal130 již 35 dpi. Kmen Gal404 byl očkovan 12 dní před kmenem Gal130, expresní maxima obou kmenů tedy byly ve stejném období. Z tohoto výsledku lze usuzovat, že exprese genů biosyntézy námelových alkaloidů není kmenově specifická, ale zřejmě ovlivněna faktory prostředí a to nejspíše intenzitou slunečního záření. Exprese genů klastru v maximech byla mezi kmeny srovnatelná, až na gen *lpsB*, jehož exprese byla u kmene Gal404 desetinásobně vyšší.

Klasy použité pro kvantifikaci genové exprese byly analyzovány na obsah alkaloidů ergokristinu (kmen Gal130) a ergotaminu (kmen Gal404). Přítomnost alkaloidů byla detekovatelná již 13 dpi, ale v minimálním množství. Rozdíl obsahu alkaloidů mezi klasy byl značný, přesto lze říci, že u kmene Gal404 odpovídal

nejvyšší obsah ergotaminu 45 dpi, tento sběr byl zároveň i expresním maximem tohoto kmene. U kmene Gal130 obsah ergokristinu rostl od sběru 23 dpi bez viditelného maximálního obsahu.

8 Literatura

Bacon C. W., Lyons P. C., Porter J. K., and Robbins. J. D, 1986. Ergot toxicity from endophyte-infected grasses: a review. *Agron. J.* 78, 106–116.

Bandyopadhyay R., Frederickson D. E., McLaren N. W., Odvody G. N., Ryley M. J., 1998. Ergot: a new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. *Plant Dis* 82, 356–367.

Bayram Ö., Braus G. H., 2011. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev*, 1-24.

Bayram Ö., Krappmann S., Ni M., Bok J.W., Helmstaedt K., Valerius O., 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504–1506.

Berde B., Stürmer E., 1978. Introduction to the pharmacology of ergot alkaloids and related compounds. Berde B, Schild H.O. (eds) *Ergot alkaloids and related compounds*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1–28.

Bok J.W., Keller N.P., 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* 3, 527–535.

Bormann J., Tudzynski P., 2009. Deletion of Mid1, a putative stretch-activated calcium channel in *Claviceps purpurea*, affects vegetative growth, cell wall synthesis and virulence. *Microbiology* 155, 3922–3933.

Carpita N.C., Gibeaut D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30.

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*. *Chem Biol* 10, 1281–1292.

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 microbiology* 76, 3898-3903.

Coyle C. M., Panaccione D. G., 2005. An ergot alkaloid biosynthesis gene and clustered hypothetical genes from *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 71, 3112-3118.

De Costa C., 2002. St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine. *The Lancet* 359, 1768-70.

Ding Y., Bojja R. S., Du L., 2004. Fum3p, a 2-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase Required for C-5 Hydroxylation of Fumonisin in *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1931-1934.

Esser K., Tudzynski P., 1978. Genetics of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. I. Proof of a monoecious life-cycle and segregation patterns for mycelial morphology and alkaloid production. *Theor. Appl. Genet.* 53, 145–149.

Fleetwood D.J., Scott B., Lane G.A., Tanaka A., Johnson R.D., 2007. A complex ergovaline gene cluster in epichloe endophytes of grasses. *Appl Environ Microbiol* 73, 2571–2579.

Floss H. G., 1976. Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. *Tetrahedron* 32, 873–912.

Frederickson D. E., Mantle P. G., deMilliano W. A. J., 1991. *Claviceps africana* sp. nov., the distinctive ergot pathogen of sorghum in Africa. *Mycol. Res.* 95, 1101-1107.

Garre V., Müller U., Tudzynski P., 1998a. Cloning, characterization, and targeted disruption of *cpcat1*, coding for an in planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 11, 772–783.

Garre V., Tenberge K.B., Eising R., 1998b. Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection of rye: putative role in pathogenicity and suppression of host defense. *Phytopathology*, 88, 744–753.

Ge M. H., Yu Z. G., Zhang J., Wu J. H., Tan R. X., 2009. Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *J. Nat. Prod.* 72, 753-755.

Gebler J.C., Poulter D., 1992. Purification and characterization of dimethylallyl tryptophansynthase from *Claviceps purpurea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 296, 308–313.

Giesbert S, Schürg T, Scheele S, Tudzynski P. 2008. The NADPH oxidase Cpnox1 is required for full pathogenicity of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Mol Plant Pathol* 9, 317–27.

Giesbert S., Lepping H.-B., Tenberge K.B., Tudzynski, P., 1998. The xylanolytic system of *Claviceps purpurea*: cytological evidence for secretion of xylanases in infected rye tissue and molecular characterization of two xylanase genes. *Phytopathology* 88, 1020–1030.

Goetz K.E., Coyle C.M., Cheng J.Z., O'Connor S.E., Panaccione D.G., 2011. Ergot cluster-encoded catalase is required for synthesis of chanoclavine-I in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* 57, 201–211.

Gröger D., Floss H.G., 1998. Biochemistry of ergot alkaloids—achievements and challenges. Cordell G.A., editor. *The alkaloids—chemistry and biology*. New York: Academic Press; 1998. p. 171–218.

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., Lübbe Y., Correia T., Schardl C.L., Pannacione D.G., 2005. The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry* 66, 1312–1320.

Haarmann T., Rolke Y., Giesbert S., Tudzynski P., 2009. Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Mol Plant Pathol* 10, 563–577.

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.

Holt R. I. G., Barnett A. H., Bailey C. J., 2010. Bromocriptine: old drug, new formulation and new indication. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12, 1048-1057.

Hulvová H., Galuszka P., Frébortová J., Frébort I., 2012. Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnol Adv* (publikováno online)

Cheng J. Z., Coyle C. M., Panaccione D. G., O'Connor S. E., 2010. Controlling a structural branch point in ergot alkaloid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 12835-12837.

Keller U., 1999. Biosynthesis of ergot alkaloids. In: Křen V, Cvak L, editors. *Ergot: the genus Claviceps*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 95-164.

Kim I. S., Kim S. U., Anderson J. A., 1981. Microsomal Agroclavine hydroxylase of *Claviceps* species. *Phytochemistry* 20, 2311-2314.

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 Med.* 48, 145-148.

Krupinski V.M., Robbers J.E., Floss H.G., 1976. Physiological study of ergot: induction of alkaloid synthesis by tryptophan at the enzymatic level. *J Bacteriol* 125, 158–65.

Lee M. R., 2009. The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: from antiquity to 1900. *J R Coll Physicians Edinb* 39,179–84.

Liu M., Panaccione D.G., Schardl C.L., 2009. Phylogenetic analyses reveal monophyletic origin of the ergot alkaloid gene *dmaW* in fungi. *Evol Bioinform* 5, 15–30.

Lorenz N., Haarmann T., Pažoutová S., Jung M., Tudzynski P., 2009. The ergot alkaloid gene cluster: functional analyses and evolutionary aspects. *Phytochemistry* 70, 1822–32.

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. *Appl Environ Microbiol* 761, 1822–30.

Lorenz N., Wilson E.V., Machado C., Schardl C.L., Tudzynski P., 2007. Comparison of ergot alkaloid biosynthesis gene clusters in *Claviceps* species indicates loss of late pathway steps in evolution of *C. fusiformis*. *Appl Environ Microbiol* 73, 7185–91.

Markert A., Steffan N., Ploss K., Hellwig S., Steiner U., Drewke C., 2008. Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between *Ipomoea asarifolia* (*Convolvulaceae*) and a clavicipitalean fungus. *Plant Physiol* 2008;147:296–305.

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. *Org Biomol Chem* 9, 4328–4335.

Mey G., Held K., Scheffer J., Tenberge K.B., Tudzynski P., 2002a. CPMK2, an Slit2-homologous MAP-kinase is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP-kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Molec. Microbiol.* 46, 305–318.

Mey G., Oeser B., Lebrun M.H., Tudzynski P., 2002b. The biotrophic, non-appressoria forming grass pathogen *Claviceps purpurea* needs a *Fus3/Pmk1* homologous MAPkinase for colonization of rye ovarian tissue. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 5, 303–312.

Moore S., de Vries O.M.H., Tudzynski P., 2002. The major Cu,Zn SOD of the phytopathogen *Claviceps purpurea* is not essential for pathogenicity. *Molec. Plant Pathol.* 3, 9–22.

Müller U., Tenberge K.B., Oeser B., Tudzynski P., 1997. Cel1, probably encoding a cellobiohydrolase lacking the substrate binding domain, is expressed in the initial infection phase of *Claviceps purpurea* on *Secale cereale*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 268–279.

Nathues E., Jörgens C, Lorenz N, Tudzynski P., 2007. The fungal histidin kinase CpHK2 has impact on spore germination, oxidative stress and fungicide resistance, and virulence of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Mol Plant Pathol* 8, 653–665.

Nathues E., Joshi S., Tenberge K.B., von den Driesch M., Oeser B., Bäumer N., Mihlan M., Tudzynski P., 2004. CPTF1 a CREB-like transcription factor is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *Mol. Plant–Microbe. Interact.* 17, 383–393.

Oeser B., Tenberge K.B., Moore S., Mihlan M., Heidrich P.M., Tudzynski P., 2002. Pathogenic development of *Claviceps purpurea*. Molecular Biology of Fungal Development (Osiewacz, H., ed.), 419–455. New York: Marcel Dekker

Ortel I., Keller U., 2009. Combinatorial assembly of simple and complex D-lysergic acid alkaloid peptide classes in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. J Biol Chem 284, 6650–6660.

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 Med 40, 109–119.

Riederer B., Han M., and Keller U., 1996. D-Lysergyl Peptide Synthetase from the Ergot Fungus *Claviceps purpurea*. J. Biol. Chem. 271, 27524–27530

Rigbers O., Li S., 2008. Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: overproduction and biochemical characterization of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase. The Journal of biological chemistry 283, 26859-26868.

Rolke Y., Tudzynski P., 2008. The small GTPase Rac and the PAKkinase Cla4 in *Claviceps purpurea*: interaction and impact on polarity, development and pathogenicity. Mol Microbiol 68, 405–23.

Sambrook J., Russel D.W. (2001) Molecular cloning a laboratory manual 3, Cold Spring Harbor, New York.

Schardl C.L., Panaccione D.G., Tudzynski P., 2006. Ergot alkaloids – biology and molecular biology. The Alkaloids. Chemistry and Biology 63, 45–86.

Scheffer J., Chen C., Heidrich P., Dickman M.B., Tudzynski P., 2005. A CDC42 homologue in *Claviceps purpurea* is involved in vegetative differentiation and is essential for pathogenicity. Eukaryot Cell 4, 1228–38.

Scheffer J., Ziv C., Yarden O., Tudzynski P., 2005. The COT1 homologue CPCOT1 regulates polar growth and branching and is essential for pathogenicity in *Claviceps purpurea*. *Fungal Genetics and Biology* 42, 107-118.

Schiff P.L., 2006. Ergot and its alkaloids. *Am J Pharm Educ* 70, 98-107.

Sočič H, Gaberc-Porekar V., 1992. Biosynthesis and physiology of ergot alkaloids. In: Arora DK, Elander RP, Mukerji KG, editors. *Handbook of applied mycology: fungal biotechnology*. New York: Dekker. 475–515.

Taber W. A., 1985. Biology of *Claviceps*. In: Demain AL, Solomon NA, editors. *Biology of industrial microorganism*. San Francisco: The Benjamin Cummings Publishing Company, 449–486.

Tanaka A., Christensen M. J., Takemoto D., Park P., Scott B., 2006. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *The Plant Cell* 18, 1052-1066.

Tenberge K.B., Homann V., Oeser B., Tudzynski P., 1996. Structure and expression of two polygalacturonase genes of *Claviceps purpurea* oriented in tandem and cytological evidence for pectinolytic enzyme activity during infection of rye. *Phytopathology* 86, 1084–1097.

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. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 119–125.

Tudzynski P., Hölter K., Correia T., Arntz C., Grammel N., Keller U., 1999. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol Gen Genet* 261, 133–141.

Tudzynski P., Scheffer J., 2004. *Claviceps purpurea*: molecular aspects of unique pathogenic lifestyle. *Molecular plant pathology* 5, 377-388.

Unsold I. A., Li S., 2005. Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 151, 1499-1505.

Wallwey C., Li S., 2011. Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.* 28, 496-510.

Wallwey C., Matuschek M., Li S., 2010. Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH. *Arch Microbiol* 192, 127-134.

Walzel B., Riederer B., Keller U., 1997. Mechanism of alkaloid cyclopeptide formation in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chem Biol* 4, 223–230.

Woolf A., 2000. Witchcraft or Mycotoxin? The Salem witch trials. *Clinical Toxicology* 38, 457-460.