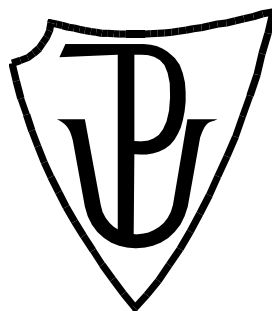


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Genetická modifikace *Claviceps purpurea*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Věra Juračková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Čudejková, Ph.D
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 6. 5. 2014

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí práce Mgr. Márii Čudejkové, Ph.D za věnovaný čas, odborné vedení, důkladné vysvětlení dané problematiky, všestrannou pomoc, cenné rady a především za trpělivost, které mi pomohly k dokončení bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Věra Juračková
Název práce	Genetická modifikace <i>Claviceps purpurea</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Mária Čudejková, Ph.D
Rok obhajoby	2014
Abstrakt	<p><i>C. purpurea</i> je parazitická houba produkující námelové alkaloidy, které jsou využívány ve farmaceutickém průmyslu pro výrobu léků. Zvýšení produkce námelových alkaloidů u <i>C. purpurea</i> by mohlo být dosaženo zvýšenou expresí genů zapojených do jejich biosyntetické cesty. Slibným kandidátem pro dosažení tohoto cíle je gen <i>cloA</i>, jehož produkt katalyzuje v biosyntetické cestě námelových alkaloidů přeměnu elymoclavinu na kyselinu paspalovou. V této bakalářské práci byl amplifikován a izolován gen <i>cloA</i>, který byl vložen do <i>pDrive</i> vektoru. Sekvence tohoto genu byla porovnána s referenční sekvencí. Gen <i>cloA</i> byl následně klonován do plasmidů <i>pMK</i> a <i>p444</i>, se kterými se bude dále pracovat za účelem použití pro transformaci <i>C. purpurea</i>. Protoplasty dvou kmenů <i>C. purpurea</i> byly transformovány konstruktem <i>p444::easG</i>, s cílem zvýšit expresi genu <i>easG</i>, který je rovněž zapojen do biosyntézy alkaloidů. Úspěšnost transformace nebyla potvrzena, protože antibiotikum použité pro selekci transformovaných protoplastů nebylo účinné.</p>
Klíčová slova	<i>Claviceps purpurea</i> , biosyntéza námelových alkaloidů, <i>cloA</i> , transformace
Počet stran	55
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Věra Juračková
Title	Genetic modification of <i>Claviceps purpurea</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of molecular biology, CRH
Supervisor	Mgr. Mária Čudejková, Ph.D
The year of presentation	2014
Abstract	<p><i>C. purpurea</i> is a parasitic fungus producing ergot alkaloids, which can be used in the pharmaceutical industry for the production of medicaments. Increasing the ergot alkaloid production in <i>C. purpurea</i> can be achieved by overexpression of the genes involved in ergot alkaloid biosynthetic pathway. A promising target for the genetic modification is the gene <i>cloA</i>, coding for the enzyme catalyzing conversion of elymoclavine to paspalic acid. Gene <i>cloA</i> was amplified and inserted into <i>pDrive</i> vector. The sequence of the gene was compared to a reference sequence. The gene was then cloned into the plasmids <i>pMK</i> and <i>p444</i>. However, an additional cloning has to be done to obtain complete plasmid for the transformation. Protoplasts of two <i>C. purpurea</i> strains were transformed by using the construct <i>p444::easG</i>, to overexpress gene <i>easG</i>, which is also involved in alkaloid biosynthetic pathway. The success of the transformation was not confirmed, because the antibiotic used for selection of transformed protoplasts was found to be ineffective.</p>
Key words	<i>Claviceps purpurea</i> , biosynthesis of ergot alkaloids, <i>cloA</i> , transformation
Number of pages	55
Number of appendices	-
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	8
1 ÚVOD.....	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 <i>Claviceps purpurea</i> – původce námele	10
2.1.1 Životní cyklus <i>C. purpurea</i>	11
2.2 Námelové alkaloidy.....	13
2.2.1 Farmakologické využití námelových alkaloidů	15
2.2.2 Biosyntéza námelových alkaloidů.....	17
2.3 Metody genetické transformace hub	21
2.3.1 Způsoby transformace.....	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Biologický materiál	24
3.2 Chemikálie.....	24
3.3 Použité roztoky.....	26
3.4 Použité kity.....	27
3.5 Přístroje	27
3.6 Metody a postupy	28
3.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	28
3.6.2 Přečištění PCR produktu pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit ...	29
3.6.3 Restrikce DNA	29
3.6.4 Elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu	30
3.6.5 Extrakce DNA z agarosového gelu kitem QIAquick Gel Extraction Kit .	30
3.6.6 Klonování genu <i>cloA</i> do vektorů <i>pDrive</i> , <i>pMK</i> a <i>p444</i>	31
3.6.7 Transformace buněk <i>E. coli</i>	32
3.6.8 Izolace plasmidové DNA kitem QIAprep Spin Miniprep Kit	33
3.6.9 Izolace plasmidové DNA pomocí alkalické lýze	34
3.6.10 Izolace plasmidové DNA kitem GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	34
3.6.11 „Colony“ PCR.....	35
3.6.12 Izolace protoplastů	36
3.6.13 Transformace protoplastů pomocí PEG.....	36
4 VÝSLEDKY	38
4.1 Amplifikace a klonování genu <i>cloA</i> do vektoru <i>pDrive</i>	38
4.2 Klonování genu <i>cloA</i> do plasmidu <i>pMK</i>	40
4.3 Klonování genu <i>cloA</i> do plasmidu <i>p444</i>	44
4.4 Ověření přítomnosti <i>cloA</i> ve vektorech <i>pMK</i> a <i>p444</i> pomocí „colony“ PCR ..	46
4.5 Transformace kmenů Gal130 a Gal012 vektorem <i>p444::easG</i>	47

5	DISKUZE	48
6	ZÁVĚR	51
7	ZDROJE	52
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	55

CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše na téma obecná charakteristika *C. purpurea* a biosyntéza ergoidních alkaloidů. Popis metod pro genetické modifikace hub.
- Příprava konstruktů *p444::cloA* pro transformaci *C. purpurea* za účelem zvýšení exprese genu *cloA*.
- Transformace dvou industriálních kmenů *C. purpurea* za účelem zvýšení exprese genu *easG*. Jedná se o kmeny Gal130, který majoritně produkuje ergokrystin a Gal012 produkující hlavně ergokryptin.
- Zhodnocení úspěšnosti transformace.
- Osvojení molekulárně-biologických technik, jako klonování, PCR a transformace vláknitých hub.

1 ÚVOD

Claviceps purpurea (Paličkovice nachová) je parazitická vřeckovýtrusná houba, která infikuje široké spektrum jednoděložných rostlin včetně významných plodin, jako je žito, pšenice, kukuřice a další. Tato houba vytváří mycelium v semenících rostlin, z kterého se později v průběhu infekce vytvoří tzv. sklerocia, která obsahují námelové alkaloidy. V historii tyto látky způsobily mnoho hromadných otrav, které vedly k úmrtím desítek tisíc lidí, ale navzdory tomu byly tyto látky využívány v porodnictví, jako pomoc při porodu nebo potratu. V dnešní době tyto látky navíc slouží jako lék pro léčbu migrény, Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby. Zvýšení produkce námelových alkaloidů ve vybraných industriálních kmenech *C. purpurea* by mohlo výrazně snížit náklady pro výrobu těchto léků.

Biosyntetická cesta námelových alkaloidů je poměrně dobře popsána, i když ne všechny enzymy katalyzující jednotlivé kroky již byly identifikovány. Geny kódující enzymy zapojené do této biosyntetické cesty tvoří genový klastr, přičemž funkce některých genů tohoto klastru jsou známy. Jedním z nich je gen *cloA* kódující enzym, který katalyzuje přeměnu elymoklavinu na kyselinu paspalovou a nebo gen *easG* zapojený do konverze chanoklavin I aldehydu na agroklaavin. Zvýšením exprese těchto genů bychom mohli dosáhnout zvýšení produkce alkaloidů v *C. purpurea*.

Teoretická část této bakalářské práce poskytuje literární přehled řešené problematiky na téma obecná charakteristika *C. purpurea*, biosyntéza ergoidních alkaloidů a metody genetické modifikace hub. V experimentální části a ve výsledcích je popsán postup a výsledek přípravy konstruktů *p444::cloA*, který bude použit pro transformaci *C. purpurea*, za účelem zvýšení exprese genu *cloA*. V další části práce je popsán postup transformace protoplastů dvou komerčních kmenů *C. purpurea*, za účelem zvýšit expresi genu *easG*. Jedním z těchto kmenů byl kmen Gal130 majoritně produkující ergokristin, druhým byl kmen Gal012 produkující hlavně ergokryptin. Výsledky, úspěchy i neúspěchy experimentální práce jsou diskutované v diskuzi.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Claviceps purpurea* – původce námele

Claviceps purpurea (Paličkovice nachová), druh rodu *Claviceps*, patří mezi vřeckovýtrusné houby (*Ascomycota*), řádu *Hypocreales* a čeledě *Clavicipitaceae*. Členové rodu *Claviceps* parazitují na více než 600 druzích jednoděložných rostlin včetně významných plodin, jako je žito, pšenice, ječmen, kukuřice, proso a oves a způsobují námellová onemocnění (Bové, 1970). Tento rod celkem zahrnuje více než 50 druhů (Pažoutová *et al.*, 2011), avšak převážná většina fyziologických a genetických výzkumů byla provedena na *C. purpurea*, což je nejvíce známý druh v Evropě. *C. purpurea* je výjimečný druh díky širokému spektru hostitelů, infikuje totiž více než 400 druhů rostlin a produkuje námellové alkaloidy.

Námel je houbové onemocnění, které je nejvíc známo jako onemocnění žita způsobené houbou *C. purpurea*. V průběhu onemocnění houba vytváří charakteristické útvary – sklerocia, která obsahují námellové alkaloidy (Obr. 1). Při kontaminaci obilí sklerociami může námel způsobit vážné zdravotní komplikace a otravy u lidí tzv. ergotismus (Lee, 2009).

První zmínka o otravách způsobených námelem pochází již z období kolem r. 600 př. n. l., nejznámější ale jsou epidemie ergotismu ze středověku, způsobující gangrénu končetin, poruchy funkce centrální nervové soustavy a smrt (van Dongen a de Groot, 1995). Avšak již ve středověku porodní asistentky věděly o léčebném potenciálu námellových alkaloidů a používaly je, navzdory riziku otravy, jako pomoc při porodu nebo potratu.



Obr. 1: Sklerocium na žitu (www.damyko.info).

2.1.1 Životní cyklus *C. purpurea*

Jarní infekci způsobují askospory, které jsou uvolňovány z perithecií tvořených na jaře z klíčících přezimujících struktur, sklerocií. Askospory se zachytávají na bliznách obilovin nebo trav, kde vyklíčí v hyfy. Hyfa poté sleduje cestu pylové láčky a teprve na spodní části semeníku, kdy hyfa opustí dráhu pylové láčky a dostává se do kontaktu s cévními svazky, se začíná tvořit rozvětvené mycelium tzv. sfacelium, které kolonizuje celý semeník. Paličkovice nachová je totiž vysoce orgánově specifická houba, která napadá pouze mladé semeníky (Urban a Kalina, 1980).

Přibližně 5-7 dní po infekci se v sfaceliu začnou tvořit konidie, které jsou vyměšovány společně s floémovou šťávou, jako tzv. medovice. Na tuto sladkou šťávu je přilákán hmyz, který přenáší konidie na další květy a stává se tak původcem sekundární infekce, díky níž dochází k velmi intenzivnímu rozšiřování houby během sezóny. Asi dva týdny po infekci produkce medovice ustane a ze semeníku se vytvoří fialovo-černé sklerocium (námel), které zraje asi 5 týdnů (Schumann, 2000; Haarmann *et al.*, 2009).

Námel vypadne z klasu na zem, kde přezimuje. Sklerocia jsou schopna přežít nepříznivé podmínky a poté na jaře následujícího roku z nich vyrůstá několik stopkatých, kulatých, nachových plodnic (stromat), ve kterých dochází k tvorbě pohlavních výtrusů. Na více místech pod povrchem paličkovité části stromatu se vytvářejí samčí antheridia a samičí askogonia. Přiblížením těchto pohlavních orgánů dojde k plazmogamii. Následuje dělení jader, po němž se vytvoří askogenní hyfy, na jejichž koncích se vytváří tzv. háky, kde dochází ke karyogamii za vzniku vřecka. Protáhlá vřecka obsahují nitřovité askospory, které jsou v době zralosti otvorem z perithecia vymršťovány. Za vhodných podmínek infikují obilné klasy, vyklíčí v podhoubí a vytvářejí nové sfaceliové stádium houby (Urban a Kalina, 1980; Haarmann *et al.*, 2009).



Obr. 2: Životní cyklus *Claviceps purpurea*: 1. otevřený květ žita, 2. invaze hyf do semeníku žita, 3. produkce medovice, 4. sekundární infekce pomocí hmyzu, 5. tvorba sklerocií, 6. přezimování sklerocií, 7. klíčení sklerocií, 8. uvolnění askospor (Hulvová *et al.*, 2013).

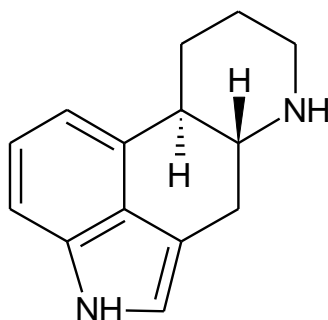
2.2 Námelové alkaloidy

Námelové alkaloidy představují známou skupinu houbových sekundárních metabolitů. Řadí se mezi dusíkaté heterocyklické deriváty, jejichž běžnou strukturní součástí je ergolin (obr. 3), který je syntetizován z tryptofanu. Námelové alkaloidy lze rozdělit do tří hlavních skupin: klavinové alkaloidy, D-lysergová kyselina a její deriváty a ergopeptidy (Schardl *et al.*, 2006).

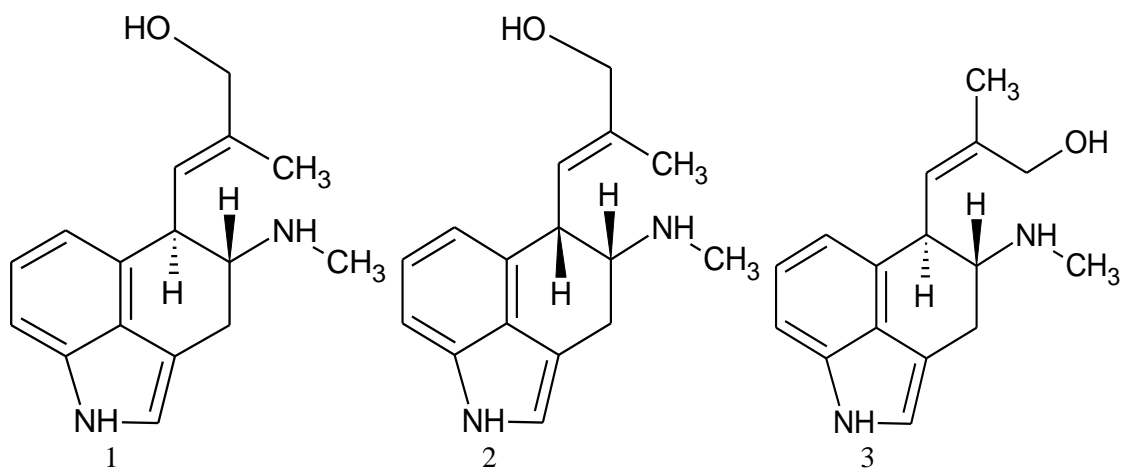
Většina námelových alkaloidů obsahuje tetracyklickou ergolinovou strukturu, výjimkou jsou přirozeně se vyskytující klavinové alkaloidy, které mají tricyklickou strukturu. Jedná se např. o chanoklavin-I, chanoklavin-II a isochanoklavin-I (obr. 4), z nichž pouze chanoklavin-I slouží jako prekurzor pro biosyntézu námelových alkaloidů. Klavinových alkaloidů bylo izolováno a charakterizováno alespoň 35 (obr. 5), ale žádný z této skupiny není využíván v lékařství.

K běžným nepeptidovým amidům obsažených v námelu patří ergonovin (ergometrin, ergobasin) methylergometrin, diethylamid kyseliny lysergové (LSD) a kyselina paspalová (obr. 6) (Schiff, 2006).

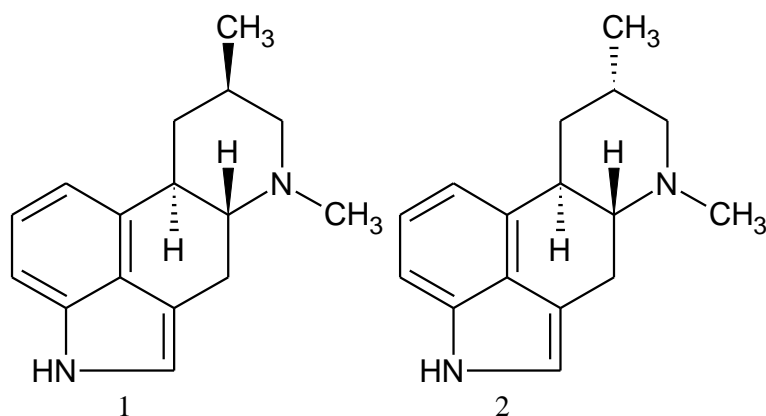
Ergopeptidy se skládají z fragmentů lysergové kyseliny a na ní připojeného L - prolinu, který je součástí tripeptidového komplexu a nachází se vždy na třetí pozici (Obr. 7). V závislosti na aminokyselinovém složení je určen druh ergopeptidu (Tab. 1). Tyto sloučeniny jsou konečnými produkty biosyntézy námelových alkaloidů (Schiff, 2006).



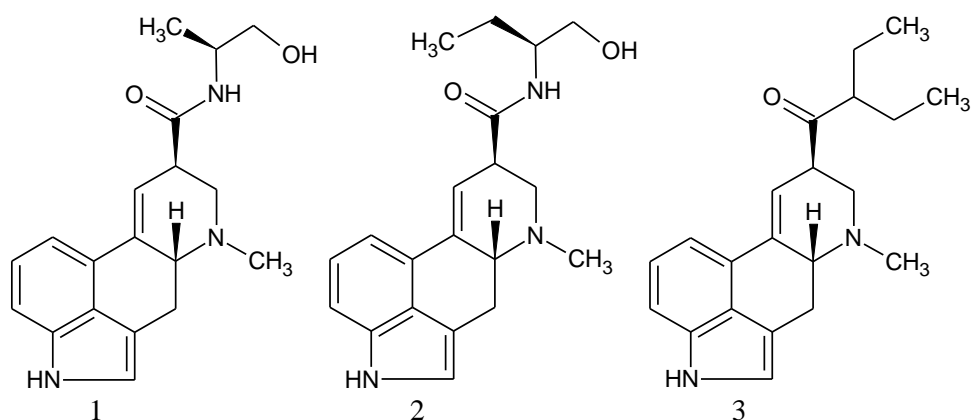
Obr. 3: Strukturní vzorec ergolinu (podle Hulvová *et al.*, 2013).



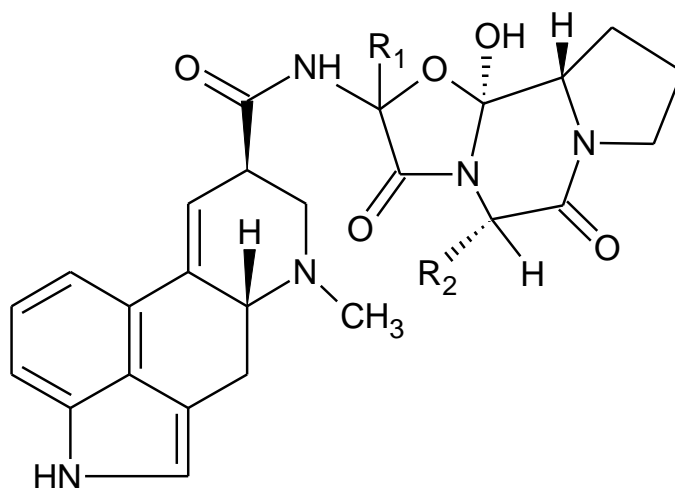
Obr. 4: Klavinové alkaloidy s tricyklickou strukturou: chanoklavin-I (1), chanoklavin-II (2), isochanoklavin-I (3) (podle Hulvová *et al.*, 2013).



Obr. 5: Klavinové alkaloidy s tetracyklickou strukturou: festuklavin (1) a pyroklavin (2) (podle Wallwey a Li, 2011).



Obr. 6: Amidy D-lysergové kyseliny: ergometrin (1), methylergometrin (2) a LSD (3) (podle Wallwey a Li, 2011).



Obr. 7: Základní strukturální vzorec ergopeptidů (podle Wallwey a Li, 2011).

Tab. 1: Druhy ergopeptidů v závislosti na aminokyselinovém složení (podle Haarmann *et al.*, 2005).

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

2.2.1 Farmakologické využití námellových alkaloidů

Specifické druhy námellových alkaloidů slouží jako základní suroviny pro výrobu léků používaných pro léčbu migrény, Parkinsonovy choroby, hypertenze a různých sexuálních poruch.

Námellové alkaloidy reagují s různými receptory centrálního nervového systému. Biologická aktivita sloučenin odvozených od D-lysergové kyseliny souvisí se strukturální podobností se třemi důležitými neurotransmitery, jako jsou noradrenalin, dopamin a serotonin (Obr. 7). Námellové alkaloidy reagují s příslušnými receptory pro tyto neurotransmitery. Některé námellové alkaloidy působí jako agonisté, jiné jako antagonisté. Vlastnosti námellových alkaloidů souvisí se substituenty navázanými na karboxylové skupině D - lysergové kyseliny (Haarmann *et al.*, 2009).

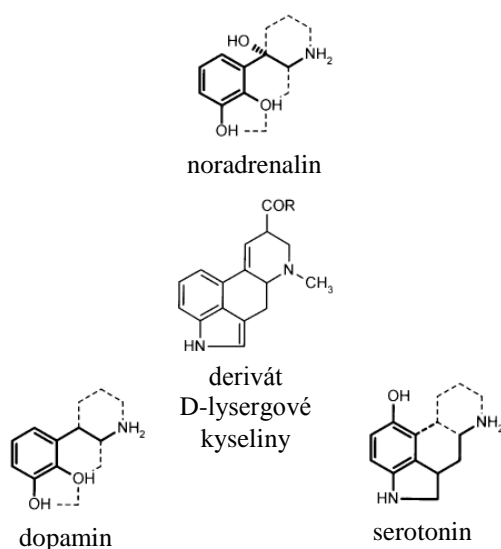
Mezi první purifikované alkaloidy patřil ergotinin (v roce 1875), ergotoxin (v roce 1906, později se však ukázalo, že jde o směs alkaloidů) a ergotamin (v roce 1918) (van Dongen a de Groot, 1995; de Costa, 2002). Purifikace alkaloidů dopomohla k objasnění jejich toxických a farmakologických účinků.

Ergotamin, nejdůležitější ergopeptid produkovaný houbou *C. purpurea*, a jeho derivát dihydroergotamin se převážně používají při léčbě migrény. V roce 1938 bylo prokázáno, že ergotamin zmírňuje bolesti hlavy a od roku 2003 se tato látka používá jako lék u vybraných pacientů se středně těžkou až těžkou migrénou. (Hansen a Koehler, 2008). Dihydroergotamin je používán také na léčbu ortostatické hypotenze (Jourdan *et al.*, 2007).

Dihydroergotoxin, směs několika ergopeptidů, se využívá pro snížení krevního tlaku a srdeční frekvence (Mercurio *et al.*, 1987).

U žen, které jsou těhotné nebo kojí může dojít ke stavu, kdy se zvýší hodnota prolaktinu. Patologický stav, hyperprolaktinémie, je spojen s dysfunkcí pohlavních žláz, neplodností a zvýšeným rizikem dlouhodobých komplikací, včetně osteoporózy. Látka bromokryptin se používá v tomto směru ke snížení hladiny prolaktinu. Bromokryptin se také používá pro potlačení laktace (de Groot *et al.*, 1998; Crosignani, 2006).

Mezi námelové alkaloidy používané v gynekologii a porodnictví patří ergometrin (ergonovin) a methylergometrin. Tyto látky se používají k prevenci a léčbě poporodního krvácení a jako léky k posílení činnosti děložního svalstva (de Groot *et al.*, 1998).



Obr. 8: Podobnost strukturních vzorců derivátů D-lysergové kyseliny s neurotransmitery (podle Tudzynski *et al.*, 2001).

2.2.2 Biosyntéza námellových alkaloidů

Námellové alkaloidy jsou produkovány především druhy rodu *Claviceps*, kdy *C. purpurea* je nejlépe studovanou houbou v oblasti biochemie syntézy námellových alkaloidů (Lorenz *et al.*, 2009). Bylo prokázáno, že enzymy specifické pro biosyntézu alkaloidů jsou kódovány klastrem genů, který byl poprvé identifikován u *C. purpurea* kmene P1 pomocí metody „chromosome walking“ s využitím *dmaW* genu (Tudzynski *et al.*, 1999). Tento klastr genů zahrnuje 14 genů a jeho velikost je 68,5 kb.

Enzym L-tryptofan dimethylallylsyntasa (DMATS) katalyzuje první krok biosyntézy námellových alkaloidů, kdy dochází k isoprenylaci tryptofanu za vzniku 4-dimethylallyltryptofanu (DMAT). Isoprenylová skupina je zde poskytována ve formě dimethylallyldifostátu (DMAPP), což je sloučenina odvozená od mevalonové kyseliny (Gebler a Poulter, 1992). Enzym DMATS katalyzuje rozhodující krok biosyntézy, proto podléhá přísné regulaci, kdy tryptofan slouží jako induktor, zatímco elymoklavin nebo agroklavin inhibují aktivitu enzymu DMATS, který je kódován genem *dmaW* (Cheng *et al.*, 1980; Tudzynski *et al.*, 1999).

Následujícím krokem dráhy je metylace DMAT za vzniku N-methylallyltryptofanu (MeDMAT), přičemž tento krok je katalyzován enzymem methyltransferasou (Otsuka *et al.*, 1980) a jako donor methylové skupiny zde hraje roli sloučenina S-adenosyl-L-methionin (Shiff, 2006). Enzym methyltransferasa je pravděpodobně produktem genu *easF* (Lorenz *et al.*, 2009).

Biosyntetická dráha námellových alkaloidů pokračuje několika kroky oxidace a redukce, kdy konverze z MeDMAT na agroklavin přes chanoklavin-I a chanoklavin-I aldehyd zahrnuje po sobě jdoucí kroky oxidace a redukce zprostředkované specifickou třídou enzymů oxidoreduktas. Chanoklavin-I syntetasa je enzym katalyzující konverzi MeDMAT na chanoklavin-I a u *C. purpurea* je tento enzym kódován genem *easE*. Produkt genu ukazuje nejvyšší podobnost s oxidoreduktasami jiných hub produkujících námellové alkaloidy např. *easE* z *Claviceps fusiformis* nebo *Neotyphodium lolii* (Lorenz *et al.*, 2010).

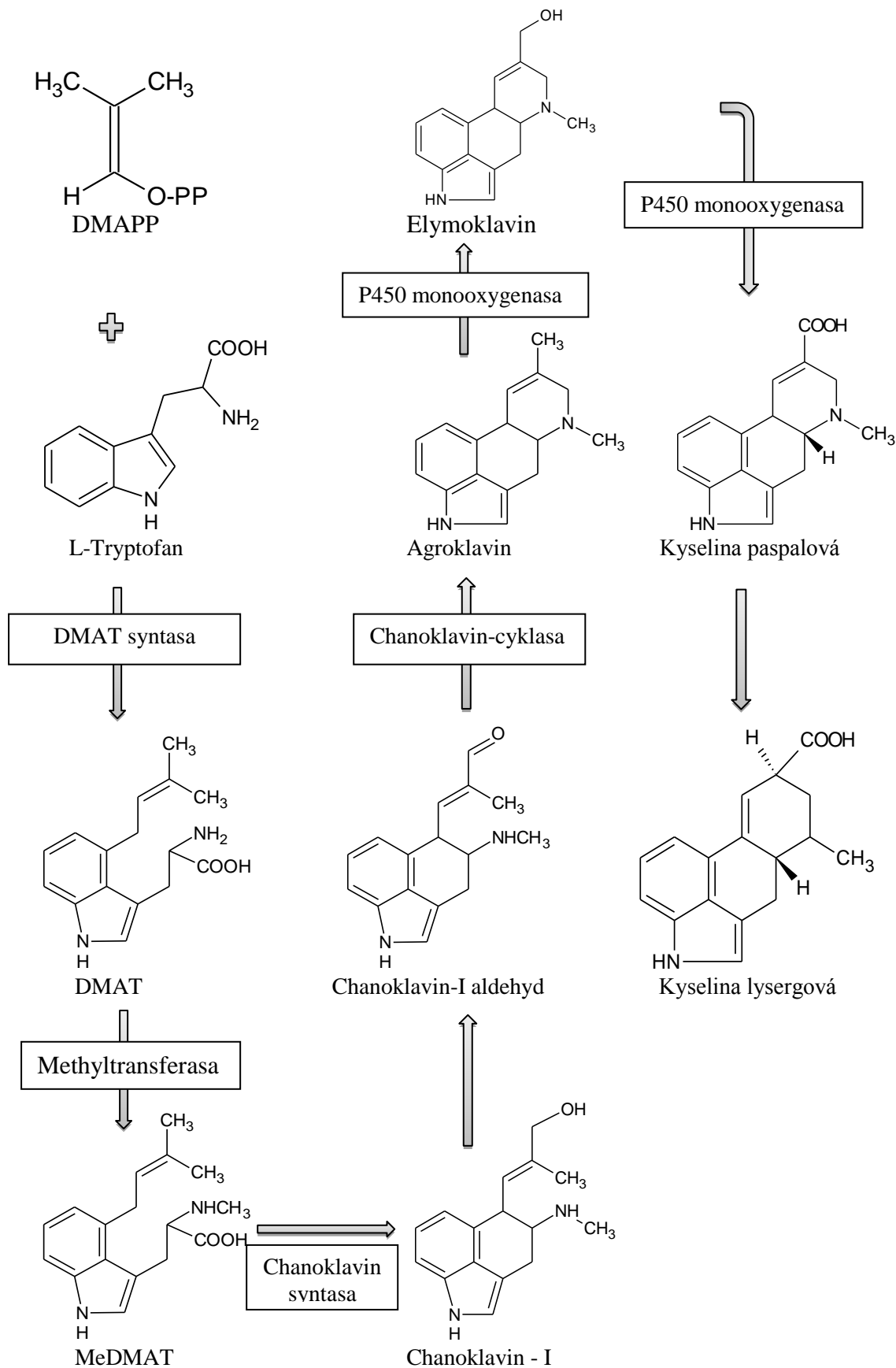
Chanoklavin-I je dále oxidován na chanoklavine-I aldehyd prostřednictvím alkoholdehydrogenasy kódované genem *easD* (Wallwey a Li, 2011). Konverze chanoklavin-I aldehydu na agroklavin je katalyzována enzymem EasG, který je produktem genu *easG*. Bylo studováno, zda se v tomto kroku neuplatňuje i enzym EasA

jako u vřeckovýtrusné houby *Aspergillus fumigatus*, ale jeho funkce se u *C. purpurea* nepotvrdila (Matuschek *et al.*, 2011).

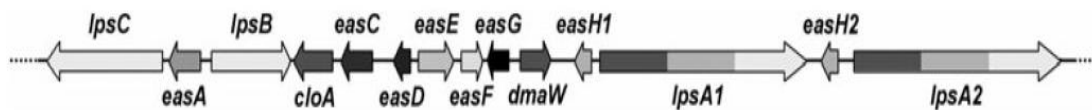
Biosyntetická dráha poté pokračuje s agroklaivin 17-monooxygenasou katalyzující oxidaci agroklaivinu na elymoklaivin (Kim *et al.*, 1981), kdy je elymoklaivin následně oxidován na kyselinu paspalovou, přičemž reakce je katalyzována prostřednictvím elymoklaivin 17-monooxygenasy. Oba výše uvedené enzymy patří do třídy cytochrom P450 monooxygenas (CYP450) (Maier *et al.*, 1988). Enzym elymoklaivin 17-monooxygenasa je prokazatelně kódován genem *cloA* (Haarmann *et al.*, 2006).

Kyselina paspalová je poté spontánně přeměněna na D-lysergovou kyselinu. Tuto kyselinu bylo obtížné detekovat v houbách produkujících námelové alkaloidy, jelikož se hromadí ve formě amidů nebo v peptidové formě (Schardl *et al.*, 2006).

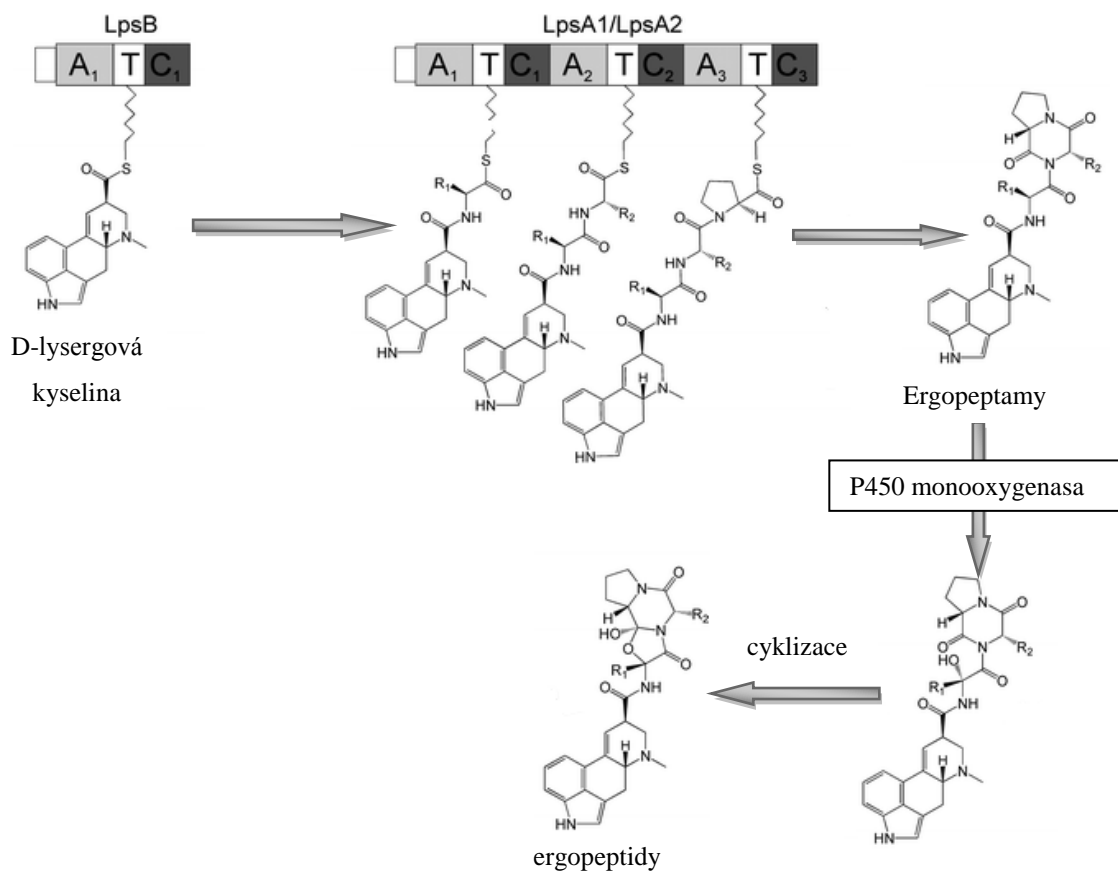
Ergopeptidy jsou syntetizovány z aktivované D-lysergové kyseliny za pomoci enzymů, které jsou označovány jako lysergyl peptidové syntetasy (LPS). Kyselina D-lysergová je nejdříve aktivována enzymem LPS2 a následně enzym LPS1 zprostředkuje postupné přidávání tří aminokyselinových zbytků na aktivovanou kyselinu a tvoří se D-lysergyl peptidové laktamy (Riederer *et al.*, 1996; Walzel *et al.*, 1997). Laktamy jsou pak dosud neidentifikovaným enzymem konvertovány na ergopeptidy (Schiff, 2006). Genový klastr biosyntézy námelových alkaloidů v *C. purpurea* u kmene P1 obsahuje 4 geny kódující neribosomální peptidové syntetasy, které nesou označení *lpsA1*, *lpsB*, *lpsC* a *lpsA2* (Haarmann *et al.*, 2005). Geny *lpsA1* a *lpsA2* kódují strukturálně a zřejmě i funkčně podobné trimodulární proteiny LPS1 a LPS4, zatímco monomodulární enzym LPS2 je kódován genem *lpsB* (Correia *et al.*, 2003; Haarmann *et al.*, 2005). Génový klastr obsahuje ještě jeden gen kódující neribosomální peptidovou syntetasu a to gen *lpsC*. Produktem tohoto genu je monomodulární enzym LPS3 (Schardl *et al.*, 2006). Enzym LPS1 ve spolupráci s enzymem LPS2 katalyzuje syntézu ergotaminu, zatímco enzym LPS4 spolu s LPS2 pravděpodobně katalyzuje syntézu ergokryptinu (Haarmann *et al.*, 2005; Haarmann *et al.*, 2007). LPS3 se označuje také jako ergometrin syntasa, protože katalyzuje tvorbu ergometrinu (Ortel a Keller, 2009).



Obr. 9: Schéma biosyntézy kyseliny lysergové (podle Lorenz *et al.*, 2009).



Obr. 10: Genový klastř pro biosyntézu námelových alkaloidů (Haarmann *et al*, 2009).



Obr. 11: Schéma biosyntézy ergopeptidů (podle Wallwey a Li, 2011).

2.3 Metody genetické transformace hub

Houby představují rozsáhlou skupinu eukaryotických organismů, tvořících samostatnou říši. Z biotechnologického hlediska jsou to zajímavé organismy, protože spojují výhody mikrobiálních systémů (např. fermentace a schopnost sekrece proteinů) s výhodami eukaryotických systémů (schopnost správně modifikovat proteiny eukaryotických organismů). Díky těmto vlastnostem se hlavně vláknité houby hojně využívají k heterologní produkci různých látek. Avšak je známo, že výtěžnost produkce bílkovin pocházejících z hub je o mnoho vyšší, než výtěžnost bílkovin pocházejících z jiných organismů (Sharma *et al.*, 2009). Samotné houby jsou zdrojem látek využívaných např. ve farmaceutickém průmyslu, proto metody genetické transformace hub nachází uplatnění i při studiu jednotlivých biosyntetických cest a za účelem zlepšení aplikačních vlastností daného organismu.

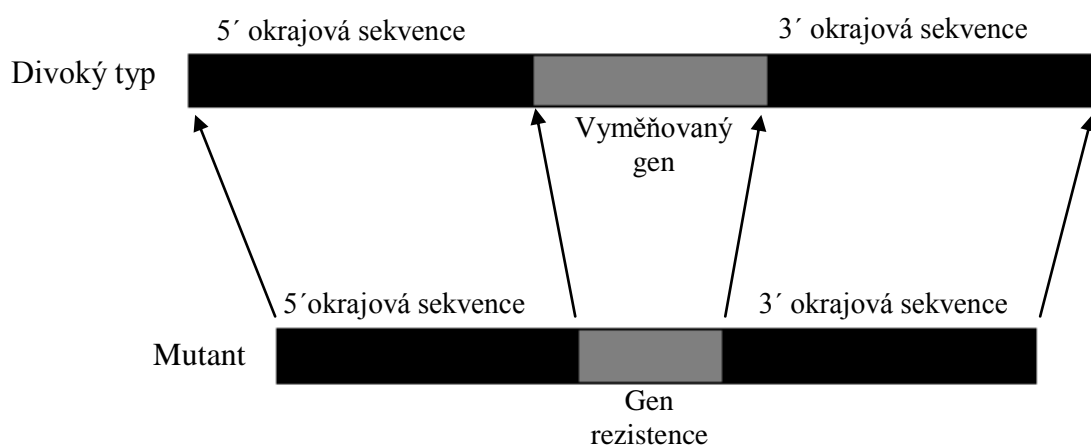
Při studiu biosyntetických cest se využívá metoda genetické transformace, při které dochází k narušení čtecího rámce studovaného genu, který se tak stává nefunkčním a k vytvoření tzv. knock-out linie. Tato metoda využívá proces homologní rekombinace, při které dochází k začlenění „poškozené“ DNA na konkrétní místo v genomu, a tedy k výměně funkčního genu za nefunkční (Obr. 12), (Kück a Hoff, 2010). Analýza fenotypových či biochemických změn „knock-out“ mutanta v porovnání s linií divokého typu („wild type“) tak umožní odhalení funkcí studovaných genů a tedy i jejich úlohu v biosyntetické cestě.

Za účelem zlepšení aplikačních vlastností určitého druhu hub (např. zvýšení produkce žádané látky) se používá metoda genetické modifikace, při které dochází k nehomologní rekombinaci tj. začlenění exogenní DNA na náhodné místo v genomu a tím ke zvýšení počtu kopií vybraného genu. U *C. purpurea* byly popsány oba dva způsoby rekombinace (Haarmann *et al.*, 2007).

Exogenní DNA představuje vektor tj. plazmidová DNA, která nese informaci určenou k začlenění do hostitelského genomu. Zjednodušeně, transformační vektor obsahuje sekvenci silně exprimovaného promotoru, sekvenci žádaného genu, sekvenci terminátoru a selekční marker.

Transformované linie mohou být selektovány na základě rezistence k antibiotikům nebo pomocí auxotrofie. Markery rezistence k antibiotikům se používají u různých druhů hub, pro které neexistují žádné nebo jen velmi málo auxotrofních mutantů (Ruiz-Díez, 2001). Využívá se např. gen rezistence k oligomycinu z *Aspergillus nidullans* (Ward *et al.*, 1986), bakteriální geny kódující rezistenci k bleomycinu a phleomycinu (Austin *et al.*, 1990) a gen pro rezistenci k hygromycinu B (Punt *et al.*, 1987). Jak bylo zmíněno, pro selekci se používají také auxotrofní kmeny, u kterých je mutací poškozen gen kódující klíčový enzym biosyntetické dráhy určité aminokyseliny nebo báze, přičemž selekční marker je funkční kopie téhož genu. Po úspěšné transformaci auxotrofního kmene je obnovena syntéza enzymu a příslušný kmen získá schopnost růstu na médiu bez této aminokyseliny. U vláknitých hub je používána pyrimidinová auxotrofie (Smit a Tudzynski, 1992).

Promotory, které se používají pro expresi heterologních genů se rozdělují do dvou skupin. Jedná se o konstitutivní promotory s vysokou úrovní exprese a indukovatelné promotory (Sharma *et al.*, 2009). Nejvíce používaným konstitutivním promotorem je *gpdA* promotor z *A. nidulans*, který je promotorem genu kódujícího glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasu (Punt *et al.*, 1991). Jak již bylo zmíněno, někdy jsou k expresi genů využívány sekvence indukovatelných promotorů. Jedná se např. o promotor genu *glaA* (glukoamylasa A) z *Aspergillus oryzae*, který může být indukován škrobem nebo maltózou (Hata *et al.*, 1992) nebo promotor genu *cbh1* (celobiohydrolasa I) z *Trichoderma reesei*, který může být indukován celulosou (Carle-Urioste *et al.*, 1997).



Obr. 12: Schéma homologní rekombinace.

2.3.1 Způsoby transformace

Příprava protoplastů za použití různých enzymů degradujících buněčnou stěnu v přítomnosti osmotických stabilizátorů je nejčastějším způsobem přípravy buněk pro transformaci. Výchozím materiálem mohou být asexuální spory (konidie), mladá mycelia nebo basidiospory. Nejčastěji používanými osmotickými stabilizátory jsou chlorid sodný, síran hořečnatý, mannitol a sorbitol. Inkorporace DNA do protoplastů se provádí v přítomnosti vápenatých iontů s následným přidáním vysoké koncentrace polyethylenglykolu (Hynes, 1996).

Pro transformaci hub je také využívána metoda elektroporace, která je založena na porušení membrány buňky, která se stává permeabilní v důsledku krátkého působení elektrického napětí. Narušení membrány umožňuje průnik rekombinantní DNA do buňky, která může vyústit v molekulární transformaci (Ruiz-Díez, 2001). Elektroporace se velmi často používá u vláknitých hub, jako jsou např. *Neurospora crassa*, *Penicillium urticae*, *Leptosphaeria maculans* a *Aspergillus oryzae* (Chakraborty *et al.*, 1991).

Pro některé druhy vláknitých hub není elektroporace účinnou metodou transformace protoplastů, proto bývá využívána biolistická transformace. Tato metoda slouží pro začlenění rekombinantní DNA do neporušených silnostěnných buněk hub. Pro tento typ transformace jsou využívány wolframové částice potažené DNA, které jsou vysokou rychlostí vedeny přímo do spor nebo hyf (Ruiz-Díez, 2001). Biolistická metoda může být aplikována na množství vláknitých hub, jako např. *N. crassa* nebo u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces pombe* (Armaleo *et al.*, 1990).

Pro genetickou transformaci vláknitých hub je někdy využívána i transformace pomocí gramnegativní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která efektivně přenáší část Ti plasmidu do vláknitých hub. Tato metoda je používána u mnoha vláknitých hub, jako je např. *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Fusarium venenatum*, *Trichoderma reesei* a další (de Groot, 1998).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Biologický materiál

Při práci byly transformovány industriální kmeny *C. purpurea*, Gal130 a Gal012, získané od firmy TEVA Czech Industries. Pro transformaci uvedených kmenů byl použit plasmid *p444:easG*. Dále byly při práci použity chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (*E. coli*), (NEB, Velká Británie). Pro klonování genu *cloA* byly použity plasmidy *pDrive* (QIAGEN PCR Cloning Kit, Qiagen, Německo), *p444* a *pMK* (Mr. Gene, GmbH, Německo).

3.2 Chemikálie

- 1 Kb plus DNA Ladder: Thermo Scientific, USA
- 5x GC pufr: NEB, Velká Británie
- 5x Flexi pufr: Promega, USA
- 6x DNA Loading Dye: Thermo Scientific, USA
- 10x 1.1 pufr: NEB, Velká Británie
- 10x CutSmart pufr: NEB, Velká Británie
- 10x EcoRI pufr: NEB, Velká Británie
- 10x M pufr: Takara, Japonsko
- 10x Phusion HF (High Fidelity) pufr: NEB, Velká Británie
- 10x pufr pro T4 DNA ligasu: NEB, Velká Británie
- Phusion HF DNA Polymerasa: NEB, Velká Británie
- Deoxynukleotidtrifosfáty (10 mM dNTPs): Fermentas, Kanada
- GoTaq Flexi DNA Polymerasa: Promega, USA
- Agar: Himedia, Indie
- Agarosa: Ampresco, USA
- Ampicilin: Sigma - Aldrich, USA
- Asp718 restriční endonukleasa: Roche, Švýcarsko
- D - Glukosa monohydrát: Lach - Ner, Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný: Lach - Ner, Česká republika
- D - Sorbitol: Duchefa, Holandsko
- EcoRI restriční endonukleasa: NEB, Velká Británie

- EDTA: Penta, Česká republika
- Ethanol: Lach - Ner, Česká republika
- Ethidiumbromid: NeoLab, Německo
- Glycerol: Lach - Ner, Česká republika
- Hydroxid sodný: Penta, Česká republika
- Chlorid draselný: Lach - Ner, Česká republika
- Chlorid hořečnatý: Finnzymes, Finsko
- Chlorid sodný: Lach - Ner, Česká republika
- Chlorid vápenatý: Penta, Česká republika
- Chlorovodíková kyselina: Lachema, Česká republika
- IPTG (Isopropyl β - D - 1 - thiogalactopyranosid): Duchefa, Holandsko
- Isopropanol: MACH, Česká republika
- Kanamycin: Duchefa, Holandsko
- KpnI restriční endonukleasa: NEB, Velká Británie
- Kvasinkový extrakt: Sigma - Aldrich, USA
- Kyselina octová: Lach - Ner, Česká republika
- L - asparagin monohydrát: Sigma - Aldrich, USA
- NheI restriční endonukleasa: Takara, Japonsko
- Nuclease Free Water: Qiagen, Německo
- Octan draselný: Penta, Česká republika
- Pepton: Duchefa, Holandsko
- Polyethylenglykol 6000: Fluka, Německo
- Phleomycin: Duchefa, Holandsko
- RNasa: Top - Bio, Sigma, USA
- Sacharosa: Lach - Ner, Česká republika
- Síran hořečnatý heptahydrát: Penta, Česká republika
- T4 DNA ligasa: NEB, Velká Británie
- Tris: Duchefa, Holandsko
- Trypton: Duchefa, Holandsko
- X - gal (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β - D - galaktopyranosid):
Duchefa, Holandsko
- XhoI restriční endonukleasa: NEB, Velká Británie

3.3 Použité roztoky

Všechny roztoky a média kromě TAE pufru a PEG roztoku byly sterilizované autoklávováním.

- **BII tekuté médium, pH 5,2 (500ml):** 25 g sacharosy, 2,5 g peptonu, 2,5 g L - asparaginu, 0,5 g dihydrogen fosforečnanu draselného a 0,25 g heptahydrátu síranu hořečnatého.
- **BII agar, pH 8 (400 ml):** 80 g sacharosy, 2 g peptonu, 2 g L - asparaginu, 0,4 g dihydrogen fosforečnanu draselného, 0,2 g heptahydrátu síranu hořečnatého a 4,8 g aragu.
- **LB tekuté médium (1 l):** 10 g chloridu sodného, 5 g kvasinkového extraktu a 10 g tryptonu.
- **LB agar (500 ml):** 5 g chloridu sodného, 2,5 g kvasinkového extraktu, 5 g tryptonu a 7,5 g agaru.
- **P1 roztok, pH 8 (250 ml):** 1,51 g Tris - HCl a 0,93 g EDTA - Na₂.2H₂O. Po autoklávování a ochlazení bylo přidáno 200 µl RNasy do 50 ml roztoku.
- **P2 roztok (250 ml):** 2 g NaOH a 2,5 g SDS.
- **P3 roztok, pH 5,5 (250 ml):** 73,6 g CH₃COOK.
- **PEG roztok (30 ml):** 7,5 g 25% polyethylenglykolu 6000, 1,5 ml CaCl₂ (1 mol·l⁻¹) a 3 ml Tris - HCl (1 mol·l⁻¹, pH= 7,5).
- **SOC médium, pH 7 (1 l):** 20 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 0,5 g chloridu sodného a 10 ml (0,25 mol·l⁻¹) roztoku chloridu draselného. Po autoklávování bylo přidáno: 5 ml (2 mol·l⁻¹) chloridu hořečnatého, 20 ml sterilního (1 mol·l⁻¹) roztoku glukosy.
- **0,2 mmol·l⁻¹ K - maleátový pufr, pH 5,2:** pufr byl připraven smícháním 0,2 mol·l⁻¹ KOH (6,73 g / 600 ml) a 0,2 mol·l⁻¹ roztoku kyseliny maleinové (13,93 g / 600 ml), po upravení pH byl tento pufr použit pro přípravu SMaC pufru.
- **SMaC pufr (800 ml):** 123,88 g sorbitu, 5,88 g CaCl₂ bylo rozpuštěno v 0,2 mol·l⁻¹ K - maleátovém pufru.
- **STC pufr, pH 7,5 (100 ml):** 15,484 g sorbitolu, 0,122 g Tris a 0,736 g chloridu vápenatého.

- **TAE pufr 50x, pH 8 (1 l):** 242 g Tris báze, 57,1 ml kyseliny octové, 100 ml (0,5 mol·l⁻¹) EDTA (pH=8).
- **1% Agarosový gel:** 1 g agarosy a 100 ml TAE pufru 1x. Agarosa byla rozpuštěna v pufru zahřátím v mikrovlnné troubě.

3.4 Použité kity

Izolace a purifikace DNA materiálů (plasmidy, PCR produkty) byly provedeny pomocí těchto komerčních souprav:

- QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Německo
- QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Německo
- QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Německo
- GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit, Sigma, USA

3.5 Přístroje

- Bürkerova komůrka: Marienfeld, Německo
- Centrifuga: Heraeus Megafuge 40R, Thermo Scientific, USA
- Digestoř: MERCI, Česká republika
- Digitální fotoaparát: DC120, Kodak s UV clonou, USA
- Elektroporátor: ECM 399, BTX, USA
- Elektroforetická komůrka: Biometra, Německo
- Flowbox: MERCI, Česká republika
- Inkubátor: Memmert, Německo
- Mikrocentrifuga: Eppendorf Microcentrifuge 5417R, Německo
- Mikroskop: Olympus CX 21, Japonsko
- Spektrofotometr NuDrop NAS 99: ACTGene, USA
- Termoblok: BIOER, Čína
- Termocykler T – gradient: Biometra, Německo
- Termocykler T – personal: Biometra, Německo
- Třepačka inkubovaná: Heidolph unimax 1010, Heidolph, Německo
- UV transiluminátor UV Superbright: Vilber Lourmat, Francie
- Vortex: Combi - spin, Biosan, Litva
- Zdroj napětí pro elektroforézu: Standard Power Pack P25, Biometra, Německo

3.6 Metody a postupy

3.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci kompletního genu *cloA* (z genomické DNA kmene Gal404), za účelem klonování do vektoru *pDrive*, byla provedena PCR za pomoci primerů *cloA* forward primer (5' - ATGTCGCTACAATGGCTGCAACA - 3'), *cloA* reverse primer (5' - TCAGGTCCATCGATCAGCCAGTA - 3') a Phusion polymerasy. Phusion polymerasa vykazuje 3' → 5' exonukleasovou aktivitu („proofreading“), a proto by amplifikovaný úsek DNA měl být přesnou kopií sekvence výchozí DNA, avšak ve výsledku má amplicon tupé konce, proto je potřeba v případě TA klonování do vektoru *pDrive* přidat Taq DNA polymerasu (1 µl Taq / 50 µl reakce) do posledního kroku závěrečné elongace a získat tak amplicon obsahující na 3' konci poly A převis.

Pro amplifikaci genu *cloA* (z plasmidu *pDrive::cloA*), za účelem klonování do vektoru *pMK*, byly použity primery *cloA* forward NheI: 5' - CTAGCTAGC-ATGTCGCTACAATGGCTGCAACA - 3', *cloA* reverse KpnI: 5' - GGGGTACC-TCAGGTCCATCGATCAGCCAGTA - 3' a pro klonování do vektoru *p444* byly použity primery *cloA* forward XbaI: 5' - GCTCTAGA-ATGTCGCTACAATGGCTGCAACA - 3' a *cloA* reverse SacII: 5' - TCCCCGCGG-TCAGGTCCATCGATCAGCCAGTA - 3'. Pro PCR s primery, které obsahovaly restriční místa pro vybrané enzymy, byl po optimalizaci PCR reakce použit pufr QC, místo pufru HF (Tab. 2) a teplota „annealingu“ změněna na 62 °C (Tab. 3).

Tab. 2. Složení reakční směsi pro PCR.

Složka	Objem [µl] / 1 reakce	Finální koncentrace
H ₂ O	36,61	
10x HF/QC pufr	5	1x
Fw primer (10 µmol·l ⁻¹)	2,5	0,5 µmol·l ⁻¹
Rew primer (10 µmol·l ⁻¹)	2,5	0,5 µmol·l ⁻¹
dNTPs (10 mmol·l ⁻¹)	1	0,2 mmol·l ⁻¹
DNA templát (c ~20 ng·ml ⁻¹)	2	40 ng·ml ⁻¹
Phusion polymerasa	0,39	0,78 U
Celkový objem	50	

Tab. 3: Program pro PCR reakci.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Opakování
1. Počáteční denaturace	98	60	1
2. Denaturace	98	30	33
3. „Annealing“	55/62	45	
4. Elongace	72	90	
5. Závěrečná elongace	72	600	1

3.6.2 Přečištění PCR produktu pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit

K PCR produktu bylo přidáno 5 objemů PB pufru (např. 500 µl PB pufru je nutno přidat k 100 µl PCR vzorku). Do 2 ml zkumavky byla umístěna QIAquick kolonka a na ni byla napipetována směs PCR produktu a PB pufru, následovala centrifugace 1 min. Po centrifugaci byl proteklý roztok odstraněn a kolonka s navázanou DNA PCR produktu vrácena zpět do zkumavky. Pro přečištění DNA bylo na kolonku napipetováno 750 µl PE pufru, centrifugace 1 min. Proteklý roztok byl opět odstraněn a kolonka vrácena do zkumavky a centrifugována 1 min. Kolonka byla následně přemístěna do čisté 1,5 ml zkumavky a pro eluci DNA bylo do středu kolonky napipetováno 50 µl vody. Vzorek byl ponechán asi 2 min odstát, poté probíhalala centrifugace 1 min. Všechny kroky centrifugace byly provedeny při 10 000 x g a laboratorní teplotě.

3.6.3 Restrikce DNA

Pro restrikci DNA byly použity různé restrikční enzymy, jako EcoRI, NheI, KpnI a jeho izoschizomer Asp718, XbaI, SacII, ApaI, BamHI, SmaI, XhoI, MluI a PstI. V případě restrikce za účelem ověření úspěšnosti klonování bylo k restrikci použito 1 - 2 µg DNA a pro účely klonování bylo štěpeno větší množství – cca 4 µg DNA. S výjimkou enzymu SmaI probíhaly všechny restrikce při teplotě 37 °C přes noc, anebo nejméně 3 hodiny. Štěpení enzymem SmaI probíhalo při teplotě 30 °C.

Tab. 4: Obecné složení restrikční směsi

Složení restrikční směsi
Restrikční enzym (1 U / 1 µg)
Pufr 1x
DNA
H ₂ O

3.6.4 Elektroforetická separace DNA v agarosovém gelu

Byl připraven 1% agarosový gel v 1x TAE pufru. Připravený gel byl nalit do horizontální elektroforetické vaničky a bylo do něj přidáno 10 μ l 0,5% ethidiumbromidu na cca 100 ml agarosového gelu. Následovalo vložení hřebínku pro vytvoření jamek na vzorky. Po ztuhnutí byl z gelu hřebínek odstraněn a gel byl přemístěn do elektroforetické komůrky, kde byl zalit TAE pufrem tak, aby byl dokonale ponořen.

Ke vzorku DNA byl přidán vzorkovací pufr ve finální koncentraci 1x a tento roztok byl napipetován do jamky v gelu. Pro stanovení velikosti fragmentů DNA byl použit 1 kb plus DNA ladder, který byl napipetován do jedné z jamek v množství 5 μ l. Po nanesení všech vzorků byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Separace fragmentů probíhala při 120 V cca 30 min.

3.6.5 Extrakce DNA z agarosového gelu kitem QIAquick Gel Extraction Kit

Po elektroforetické separaci DNA fragmentů v agarosovém gelu, byly z gelu vyříznuty vybrané fragmenty pomocí čistého skalpelu a umístěny do 2 ml zkumavky. K fragmentům bylo přidáno trojnásobné množství QG pufru (100 μ l k 100 mg gelu). Tato směs byla inkubována za stálého třepání při 50 °C, po dobu 10 min do úplného rozpuštění gelu. Ke směsi byl přidán 1 objem isopropanolu na váhu gelu. Po promíchání byl celý objem vzorku přepipetován do kolonky a centrifugován 1 min. Proteklý roztok byl následně slit a kolonka umístěna zpět do zkumavky. Pro úplné odstranění agarosy bylo na kolonku napipetováno 500 μ l QG pufru a byla provedena centrifugace a proteklý roztok byl odstraněn. Pro promytí bylo na kolonku aplikováno 750 μ l PE pufru a kolonka byla centrifugována a proteklý roztok odstraněn. Pro vysušení membrány v kolonce byla provedena centrifugace na sucho. Následovalo přemístění kolonky do čisté 1,5 ml zkumavky a pro eluci DNA bylo přímo do středu kolonky napipetováno 50 μ l vody. Kolonka byla před závěrečnou centrifugací ponechána asi 1 min ve stojanu. Všechny kroky centrifugace probíhaly 1 min při 17 900 x g a laboratorní teplotě.

3.6.6 Klonování genu *cloA* do vektorů *pDrive*, *pMK* a *p444*

Pro klonování PCR produktu (genu *cloA* s poly A převisy) byl použit QIAGEN PCR Cloning Kit obsahující vektor *pDrive*, který je založen na principu TA klonování. Pro ligaci genu *cloA* do vektorů *pMK* a *p444* byla použita T4 ligasa a klonování bylo založeno na principu kompatibilních lepivých konců. Podle níže uvedeného vzorce bylo vypočteno množství DNA, které bylo přidáno do reakční směsi pro ligaci. Po smíchání komponent ligační směsi (Tab. 5, 6) probíhala ligace přes noc v termocyleru při 16 °C. Poté byla ligasa inaktivována působením teploty 65 °C po dobu 10 min.

- Vzorec pro počítání množství DNA do ligační směsi:

$$\text{➤ množství DNA} = \frac{C_{\text{vektoru}} \text{ (ng)} \cdot \text{velikost insertu (bp)} \cdot \text{poměr (5x/10x)}}{\text{velikost vektoru}}$$

Tab. 5. Složení ligační směsi pro QIAGEN PCR Cloning Kit (5x / 10x koncentrace vektoru)

Složka	Objem [μl] (5x / 10x)	Finální koncentrace (5x / 10x)
2x Ligační směs	5	1x
H ₂ O	3 / 2,5	
DNA (<i>cloA</i>)	1 / 1,5	~ 180 / 274 ng
<i>pDrive</i> (50 ng·ml ⁻¹)	1	50 ng
Celkový objem	10	

Tab. 6. Složení ligační směsi pro ligaci s T4 ligasou (5x koncentrace vektoru)

Složka	Objem [μl]	Finální koncentrace (p444/pMK)
10x Pufr	1	1x
DNA (<i>cloA</i>)	1-5	~ 92 / 150 ng
vektor	1-5	50 ng
T4 DNA ligasa	1	0,4 U
Doplněno vodou na objem	10	

3.6.7 Transformace buněk *E. coli*

Pro transformaci buněk *E. coli* s plasmidy *pDrive::cloA*, *pMK::cloA* a *p444::cloA* (přesněji řečeno s ligačními směsi, které teoreticky obsahovaly tyto plasmidy) byly použity chemicky kompetentní buňky *E. coli* TOP10. Buňky *E. coli* TOP10 jsou uchovávány při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, proto byly před transformací ponechány na ledu pro rozmrznutí. Po roztavení byla k buňkám přidána ligační směs (5 μl ligační směsi k 50 μl buněk) a tato směs byla následně inkubována 30 min na ledu. Transformace byla provedena za pomoci tepelného šoku a to tak, že nejdřív byly buňky s plasmidovou DNA inkubovány 30 s při $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté 5 min na ledu. Následně bylo k buňkám přidáno 500 μl SOC média, ve kterém se transformované buňky inkubovaly hodinu na třepačce při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 200 rpm.

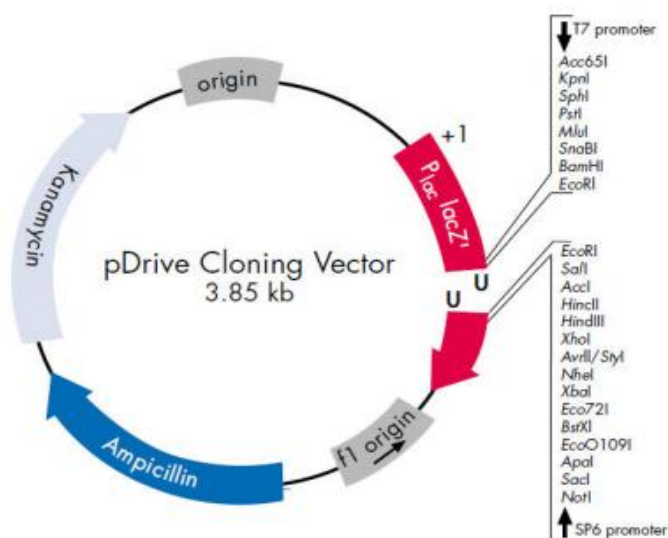
Po ukončení inkubace byly buňky rozetřeny na petriho misky s LB agarem obsahujícím ampicilin ($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, plasmidy *pDrive* a *p444*) nebo kanamycin ($50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, plasmid *pMK*). Pro modro / bílou selekci v případě plasmidu *pDrive* LB agar obsahoval také IPTG ($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a X - gal ($80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Systém modro / bíle selekce je založen na aktivitě enzymu β - galaktosidasy, který štěpí bezbarvý substrát X - gal za vzniku modrého produktu. Pokud je gen *lacZ* pro β - galaktosidasu ve vektoru *pDrive* narušen v důsledku inkorporace cizí DNA, (v našem případě genem *cloA*) (Obr. 13), kolonie transformovaných bakterií zůstanou bílé, zatímco netransformované bakterie vytvoří modré kolonie. IPTG se při testu používá jako induktor exprese genu *lacZ*.

Po rozetření transformovaných buněk na misky byly misky omotány parafilmem a inkubovány přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dnem vzhůru.

Po nárůstu kolonií byly tyto kolonie přeočkovány do tekutého LB média (2 ml) obsahujícího vybrané antibiotikum, pro vybraný plasmid, o stejné koncentraci jako v agaru. Následovala kultivace bakterií přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na třepačce při 180 rpm. Druhý den byla provedena izolace plasmidové DNA.

3.6.8 Izolace plasmidové DNA kitem QIAprep Spin Miniprep Kit

Plasmidová DNA byla extrahována za pomoci kitu v případě, že plasmid byl určen pro sekvenování. Z bakteriální kultury bylo odebráno 1,5 ml do zkumavky, následovala centrifugace 3 min při 6800 x g a laboratorní teplotě. Supernatant byl odlit a vzniklý bakteriální pelet resuspendován v 250 µl P1 pufru. K roztoku bylo přidáno 250 µl P2 pufru a směs byla promíchána převrácením zkumavky. Po promíchání bylo přidáno 350 µl N3 pufru a roztok byl opět promíchán převrácením zkumavky a centrifugován 10 min. Supernatant byl přepipetován do QIAprep spin kolonky a centrifugován 1 min. Po napipetování 500 µl PB pufru na kolonku byla provedena centrifugace 1 min. Proteklý roztok byl poté odstraněn a do kolonky bylo přidáno 750 µl PE pufru, centrifugace 1 min. Proteklý roztok byl opět odstraněn a kolonka byla centrifugována na sucho po dobu 1 min. Kolonka byla převedena do čisté zkumavky a pro eluci DNA bylo do středu aplikováno 50 µl vody. Poté byla ponechána 1 min odstat a proběhla finální centrifugace 1 min. Všechny kroky centrifugace, s výjimkou prvního kroku při centrifugaci bakteriální kultury, probíhaly při laboratorní teplotě a 17 900 x g.



Obr. 13: Mapa pDrive vektoru (www.ebiotrade.com)

3.6.9 Izolace plasmidové DNA pomocí alkalické lýze

Bakteriální kultury, cca 1,5 ml, byly přelity do 2 ml zkumavek. Kvůli separaci buněk od média byla kultura centrifugována 1 min při laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn a vzniklý pelet byl resuspendován v 300 µl P1 roztoku. Následně bylo ke vzorkům přidáno 300 µl lyzačního roztoku P2 a směs byla promíchána převrácením zkumavky. Po inkubaci 5 min bylo přidáno 300 µl P3 roztoku a směs byla opět promíchána převrácením zkumavky. Následovala inkubace 5 min na ledu, po které byla provedena centrifugace 10 min při 4 °C, při které došlo k separaci plasmidové DNA (v supernatantu) od proteinů a genomické DNA (pelet). Pro sražení plasmidové DNA byl supernatant přepipetován do nové zkumavky a smíchán s 500 µl isopropanolu. Promíchání bylo provedeno převrácením zkumavek. Následovala centrifugace 30 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl isopropanol opatrně odpipetován a vzniklý pelet obsahující plasmidovou DNA byl promyt 500 µl 70% ethanolu (-20 °C). Po následné centrifugaci 5 min při laboratorní teplotě byl ethanol pipetováním odstraněn a zkumavky byly ponechány otevřené, aby se všechen zbytkový ethanol odpařil. Na závěr byla plasmidová DNA resuspendována ve 20 µl vody. Všechny kroky centrifugace byly provedeny při 18 000 x g.

3.6.10 Izolace plasmidové DNA kitem GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit

Sběr bakterií pro extrakci plasmidové DNA byl proveden postupnou centrifugací 150 ml bakteriální kultury do 50 ml kónické zkumavky při 5000 x g po dobu 10 min při laboratorní teplotě. Bakteriální pelet byl kompletně resuspendován v 12 ml roztoku, který obsahoval RNasu. Lýze buněk byla provedena přidáním 12 ml lyzačního roztoku a následným převrácením zkumavky. Roztok byl ponechán 5 min odstát a následně bylo přidáno 12 ml neutralizačního roztoku. Směs byla promíchána převrácením zkumavky. Poté bylo k vzorkům přidáno 9 ml „Binding“ roztoku. Po promíchání byl lyzát nalit do filtrační stříkačky a ponechán 5 min se usadit. Membrána v Maxiprep kolonce byla aktivována přidáním 12 ml přípravného roztoku a centrifugací při 3000 x g po dobu 2 min, při laboratorní teplotě. Po odstranění proteklého roztoku byla na membránu kolonky přes filtrační stříkačku aplikována půlka objemu lyzátu a ten byl centrifugován při 3000 x g po dobu 2 min při laboratorní teplotě. Poté byl do kolonky přes filtrační stříkačku přidán zbytek lyzátu a centrifugace byla opakována. Proteklý roztok byl

odstraněn. Následně bylo do kolonky napipetováno 12 ml promývacího roztoku 1 a byla provedena centrifugace 2 min při 3000 x g a laboratorní teplotě. Po odstranění proteklého roztoku bylo do kolonky napipetováno 12 ml promývacího roztoku 2 a opět probíhala centrifugace 5 min při 3000 x g. Kolonka byla přeložena do čisté 50 ml kónické zkumavky a na membránu v kolonce byly přidány 3 ml ultračisté vody. Poté následovala centrifugace po dobu 5 min při 3000 x g a laboratorní teplotě, kdy byl eluát obsahující DNA následně přepipetován do čisté zkumavky a k němu bylo přidáno 0,1 objemu ($3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) octanu sodného, pH 5,2 a 0,7 objemu isopropanolu. Následovalo promíchání a centrifugace 30 min při 15 000 x g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet DNA promyt 1,5 ml 70% ethanolu, kdy následovala centrifugace 10 min při stejných podmínkách, jako v předcházejícím kroku. Supernatant byl poté opatrně odpipetován a pelet DNA byl po úplném odpaření ethanolu resuspendován v 70 μl vody.

3.6.11 „Colony“ PCR

Pro ověření úspěšnosti klonování byla použita i metoda „colony“ PCR. Při této metodě byly vybrané kolonie v malém množství sterilní špičkou pipety převáděny přímo do směsi PCR místo templátové DNA. Pro „colony“ PCR byly použity primery *cloA* forward primer: 5' - ATGTCGCTACAATGGCTGCAACA - 3', *cloA* part reverse primer: 5' - ATCCTCGTCATTCCAAGC – 3' a GoTaq polymerasa.

Tab. 7: Složení reakční směsi pro „colony“ PCR

Složka	Objem [μl] / 1 reakce	Finální koncentrace
Go Tag Flexi polymerasa	0,07	0,007 U
Flexi pufr 5x	2,5	1x
MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	0,75	$1,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
Fw primer ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	0,5	$0,4 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Rev primer ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	0,5	$0,4 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
dNTPs ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	0,25	$0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
H_2O	7,93	
Celkový objem	12,5	

Tab. 8: Program pro „colony“ PCR reakci

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Opakování
1. Počáteční denaturace	95	300	1
2. Denaturace	95	30	32
3. Annealing	62	30	
4. Elongace	72	90	
5. Závěrečná elongace	72	600	1

3.6.12 Izolace protoplastů

Protoplasty byly izolovány z mycelia, které rostlo 5 dní na třepačce při 28 °C a 180 rpm v tekutém BII médiu (pH 5,2). Mycelia z tekuté kultury byla centrifugována 10 min, při 5 600 x g a laboratorní teplotě. Po centrifugaci bylo médium z mycelia slito a mycelium bylo promyto pomocí SMaC pufru, následovala centrifugace 10 min, při stejných otáčkách a teplotě. Během centrifugace byl připraven protoplastizační pufr smícháním 20 ml SMaC pufru se 100 mg lyzačního enzymu na jeden vzorek a následným přefiltrováním roztoku přes 5 µm a 0,2 µm filtry. Po ukončení centrifugace byl SMaC pufr slit a k myceliu bylo přidáno 20 ml protoplastizačního pufru, ve kterém byla mycelia opatrně resuspendována. Následovala hodinová inkubace na třepačce při 28 °C a 80 rpm. Po inkubaci byl roztok přefiltrován přes nytexovou membránu do kádinky. Filtrát obsahující protoplasty byl nalit do 50 ml kónické zkumavky a centrifugován 10 min, při 1000 x g a laboratorní teplotě. Následně byl supernatant slit a sediment byl promyt 5 ml STC pufru a centrifugován 10 min, při 5 600 x g a laboratorní teplotě. Předcházející krok byl zopakován ještě jednou a poté byl supernatant slit a pelet resuspendován v 1 ml STC pufru. Na závěr byla pod mikroskopem ověřena přítomnost a kvalita protoplastů ve zředěném roztoku 100x a 10x.

3.6.13 Transformace protoplastů pomocí PEG

Tab. 9: Složení směsi pro transformaci protoplastů pomocí PEG

Složka	Vzorek [µl]	Negativní kontrola [µl]
DNA (<i>p444::easG</i> , 10 µg)	4	-
STC pufr	100	100
PEG	50	50
Protoplasty	100	100

Pro transformaci byly použity protoplasty připravené podle postupu uvedeného v podkapitole 3.6.12. Protoplasty byly transformovány vektorem *p444::easG*.

Po smíchání výše uvedených komponent (tab. 9) probíhala inkubace 20 min při laboratorní teplotě. Poté byly do každé zkumavky přidány 2 ml PEG a následovala inkubace 5 min při laboratorní teplotě. Pro zastavení transformace bylo přidáno 4 ml STC pufru. Na závěr bylo připraveno 10 Petriho misek, do kterých bylo nalito vždy inkubace 20 ml BII média (pH 8). Směs transformovaných i netransformovaných (negativní kontrola, kontrola životaschopnosti protoplastů po transformaci) protoplastů byla aplikovaná do ještě tekutého média a promíchána (800 μ l na misku). Do jedné misky s BII médiem bylo napipetováno 400 μ l protoplastů, které neprošly transformačním protokolem, pro kontrolu životnosti izolovaných protoplastů. Do zbytku média bylo přidáno antibiotikum phleomycin ($33 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a toto médium bylo nalito do zbylých misek, na nichž byla provedena selekce transformovaných protoplastů. Pro kontrolu byla na antibiotikum aplikována i negativní kontrola.

Po 5 dnech inkubace při 25 °C byli transformanti přeočkováni na BII médium s vyšší koncentrací phleomycinu ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

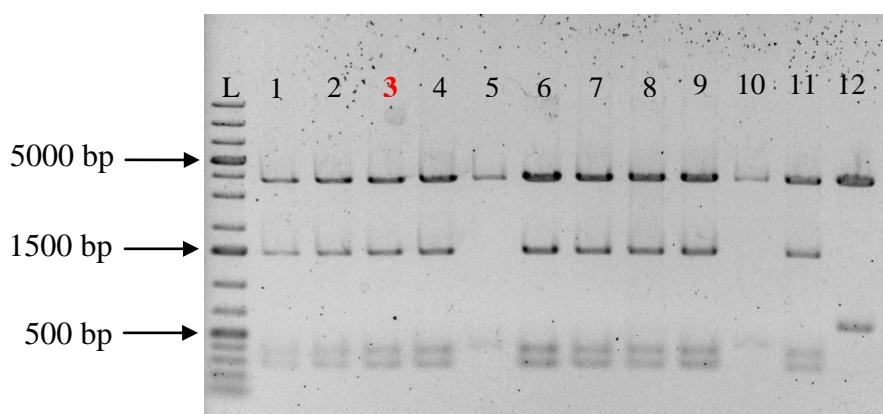
4 VÝSLEDKY

4.1 Amplifikace a klonování genu *cloA* do vektoru *pDrive*

Pomocí PCR s využitím primerů obsahujících 23 nukleotidů dlouhou sekvenci začátku a konce genu *cloA* byl amplifikován kompletní gen *cloA* z genomické DNA *C. purpurea* kmene Gal404 (3.6.1). Přečištěný PCR produkt (3.6.2) byl na základě TA klonování vložen do *pDrive* vektoru (3.6.6). Získaná ligační směs obsahující plasmid se zaligovaným genem byla použita pro transformaci bakteriálních buněk *E. coli* TOP10 pomocí tepelného šoku a transformované buňky byly selektovány na LB agarových plotnách s ampicilinem metodou modro / bílé selekce (3.6.7).

Bílé kolonie byly přeočkovány do tekutého LB média s ampicilinem pro namnožení bakterií, které byly použity pro izolaci plasmidové DNA (3.6.8). Tato DNA byla podrobena restriční analýze s využitím restriční endonukleasy EcoRI (3.6.3). Přítomnost genu *cloA* v *pDrive* vektoru byla potvrzena na základě velikosti vytvořených fragmentů vizualizovaných pomocí elektroforézy v agarosovém gelu (3.6.4).

Plasmid *pDrive::cloA*, označený číslem 3 (Obr. 14), byl následně poslán na sekvenaci firmě SEQme s.r.o. (Dobříš, Česká republika). Získaná sekvence byla upravena v programu BioEdit a srovnána s referenční sekvencí genu *cloA* (GenBank: JN186799.1) (Obr. 15), čímž bylo 100 % potvrzeno úspěšné zaklonování genu *cloA* do *pDrive* vektoru.



Obr. 14: Elektroferogram *pDrive::cloA* štěpený restriční endonukleasou EcoRI: 1-12: plasmidová DNA extrahována z vybraných kolonií 1-12. Velikost požadovaných fragmentů po štěpení *pDrive::cloA* enzymem EcoRI: 3850 bp, 1500 bp, 350 bp a 260 bp. L: 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

CloA_Gal404	ATGTCGCTACAAATGGCTGCAACAAACTCGGCACGAACTTTCTTGGACTTGGATTTTACTGACCACATGATTGGCTCTCACATCTCCACTGGTCTTGAAG
CloA_20.1	ATGTCGCTACAAATGGCTGCAACAAACTCGGCACGAACTTTCTTGGACTTGGATTTTACTGACCACATGATTGGCTCTCATATCTCCACTGGTCTTAAAG
CloA_Gal404	GCATCTATAATGCTATTTTCATCCCTTCGCAACATTCCGGGGCCCAAGCTTCCGGCATTGACCGACTTTTATGCCCTTTTACTGGAACCTGGATCCGAGAG
CloA_20.1	GCATCTATAATGCTATTTTCATCCCTTCGCAACATTCCGGGGCCCAAGCTTCCGGCATTGACCGACTTTTATGCCCTTTTACTGGAACCTGGATCCGAGAG
CloA_Gal404	TGAAGGATATTTCGAAGCAGTTCCAGTCCGCTTGCACGAGCAGTACAGTAAGTTATCAATCGGAAGCGCGTCAAGGGTCTGTCTTGCACAGCGCCGCAAG
CloA_20.1	TGAAGGATATTTCGAAGCAGTTCCAGTCCGCTTGCACGAGCAGTACAGTAAGTTATCAATCGGAAGCGCGTCAAGGGTCTGTCTTGCACAGCGCCGCAAG
CloA_Gal404	ATTCTCCCATCATTCGAAATGGTCCAAACAACTCCATACCCACACAGGTAGAATTTACGATGTGTAGTACTGCATATGCGCCAGACCTTGGAAATGGGG
CloA_20.1	ATTCTCCCATCATTCGAAATGGTCCAAACAACTCCATACCCACACAGGTAGAATTTACGATGTGTAGTACTGCATATGCGCCAGACCTTGGAAATGGGG
CloA_Gal404	CCGGGATATCAAACTTAACGCAAACTAACAAAACAACTCTTCAAAATCGGGTTCGAAATGGCTCAAGGATAACTGCTTCTATAAGTATTTCATATGGCCCT
CloA_20.1	CCGGGATATCAAACTTAACGCAAACTAACAAAACAACTCTTCAAAATCGGGTTCGAAATGGCTCAAGGATAACTGCTTCTATAAGTATTTCATATGGCCCT
CloA_Gal404	AGATGCCATGATTGAACCATATCAGTATCGGACCTATCGTACTCACCCTCGGCCCCATTATGCGCAGCGGGCCATTGACGGGTTCGGGCCCAAGCTTCGC
CloA_20.1	AGATGCCATGATTGAACCATATCAGTATCGGACCTATCGTACTCACCCTCGGCCCCATTATGCGCAGCGGGCCATTGACGGGTTCGGGCCCAAGCTTCGC
CloA_Gal404	AGTGACCTGACGAATTCGGCTCCGGAAATGATCAGACAGACCCAAAATGGACAGACCGTCAACATGGCGAAAGTTTGTAGAACCTTTCAGCGTGAGTATCA
CloA_20.1	AGTGACCTGACGAATTCGGCTCCGGAAATGATCAGACAGACCCAAAATGGACAGACCGTCAACATGGCGAAAGTTTGTAGAACCTTTCAGCGTGAGTATCA
CloA_Gal404	TTAAGGTTTGGGGTTGACCTCGAGCTGACGCATGAGAGATAGACGTCATGATTCTTTCACAATCTTTTCTCACTCGATATTTCTCTCAATGACGGCGCA
CloA_20.1	TTAAGGTTTGGGGTTGACCTCGAGCTGACGCATGAGAGATAGACGTCATGATTCTTTCACAATCTTTTCTCACTCGATATTTCTCTCAATGACGGCGCA
CloA_Gal404	TGAATACCATCCATTTCTCGAGGCATTCGACCAACTTATGACCAGAGCTGGCTGTGTAGTATTAACCTTCCCTCCATCGGAAAAAATACCGGAATCG
CloA_20.1	TGAATACCATCCATTTCTCGAGGCATTCGACCAACTTATGACCAGAGCTGGCTGTGTAGTATTAACCTTCCCTCCATCGGAAAAAATACCGGAATCG
CloA_Gal404	CTTACAACTAGCTCTGCCTAAAATGGCCAGCAACACACTGACTCTAGCCCGTCTGTATCTTTATTAAGTCTGACTATCCGATGCTTCCATGGTCCATGGCTTT
CloA_20.1	CTTACAACTAGCTCTGCCTAAAATGGCCAGCAACACACTGACTCTAGCCCGTCTGTATCTTTATTAAGTCTGACTATCCGATGCTTCCATGGTCCATGGCTTT
CloA_Gal404	GAGCCTCATCCCCGGGACAAGTTTCGCCGATTAACCTCCCTGACACAAAGTTCTCTAATGTAAGTAGACAAAGTCAATCCAGCCCAACTTTGGCTGAAC
CloA_20.1	GAGCCTCATCCCCGGGACAAGTTTCGCCGATTAACCTCCCTGACACAAAGTTCTCTAATGTAAGTAGACAAAGTCAATCCAGCCCAACTTTGGCTGAAC
CloA_Gal404	AAAGAACTCGTAATTAACATCAGGAATACCCAGTACTGCACGCTTGGAAATGACGAGGATATCGCAGAAACGAGGAAACGAGGAGCACTCAACCCCG
CloA_20.1	AAAGAACTCGTAATTAACATCAGGAATACCCAGTACTGCACGCTTGGAAATGACGAGGATATCGCAGAAACGAGGAAACGAGGAGCACTCAACCCCG
CloA_Gal404	GACTCTCACACCAACGTTACCTTTTCATTGAAAGCAGCAGTGCAAAAGAAAGACCCGCAATCCCTACCCGCTGGATGATGCTTCAATTTCCGTTCCG
CloA_20.1	GACTCTCACACCAACGTTACCTTTTCATTGAAAGCAGCAGTGCAAAAGAAAGACCCGCAATCCCTACCCGCTGGATGATGCTTCAATTTCCGTTCCG
CloA_Gal404	GAGGAAAGCAGCACTACGGCCATACCCACCGCCTGTGCATTTTATACATCTGTCTCCAAACAGTACCGGAAAACCTGGTGGTGGAGTTGGACAGGCA
CloA_20.1	GAGGAAAGCAGCACTACGGCCATACCCACCGCCTGTGCATTTTATACATCTGTCTCCAAACAGTACCGGAAAACCTGGTGGTGGAGTTGGACAGGCA
CloA_Gal404	TTCTTCAATCATTCCGAAACGAGTTTCGACTATACAAAGATCCAGAAATCTCCCTTATCTTGAAGTGCCTAATCTCTCCCTCCGCTTGGCAGCTTGTGACC
CloA_20.1	TTCTTCAATCATTCCGAAACGAGTTTCGACTATACAAAGATCCAGAAATCTCCCTTATCTTGAAGTGCCTAATCTCTCCCTCCGCTTGGCAGCTTGTGACC
CloA_Gal404	CTCTCCTGCAGAACGCCGTGATCAAGGAAAACCTTGGCCATCTCTGTCGCCAGTTCCCTGGCAGCTTACCCTGCAATTCACCCCAAGGGGGCATTACTATAGG
CloA_20.1	CTCTCCTGCAGAACGCCGTGATCAAGGAAAACCTTGGCCATCTCTGTCGCCAGTTCCCTGGCAGCTTACCCTGCAATTCACCCCAAGGGGGCATTACTATAGG
CloA_Gal404	TTCTTTTACGCTTCCCGCTGGGGTAAGCTCACCCTTTCTCTGAGTCTCGACATTTGGCTCATAACCTTCTTTGACCCCGCGGGCGCTCGCTAACG
CloA_20.1	TTCTTTTACGCTTCCCGCTGGGGTAAGCTCACCCTTTCTCTGAGTCTCGACATTTGGCTCATAACCTTCTTTGACCCCGCGGGCGCTCGCTAACG
CloA_Gal404	AAATAGAAATAGACGGGAGTGCATTAACCCAGCAAGCAATCACCTTTAATGAAAAGATCTCCCTTTCGCCCATACCTTTCCTCCGAAAACATGGATCGGT
CloA_20.1	AAATAGAAATAGACGGGAGTGCATTAACCCAGCAAGCAATCACCTTTAATGAAAAGATCTCCCTTTCGCCCATACCTTTCCTCCGAAAACATGGATCGGT
CloA_Gal404	CCAAAAGTCAGTTGGGCTTGATAAGTGAATATAGCCTTACGCCAGGACCTCCGCAATCTATTGGGACAAAGTAACTCACAGACAGAACGAAGCCTATGA
CloA_20.1	CCAAAATCAGTTGGGCTTGATAAGTGAATATAGCCTTACGCCAGGACCTCCGCAATCTATTGGGACAAAGTAACTCACAGACAGAACGAAGCCTATGA
CloA_Gal404	GTACGTGCAATGCCACTTTCCTGCTGACTAGACCCGTGGCCAAACAGCTTGGCATAATTGGAGCTTCCCTGCGCTTATCCGCTACTTCTTCCCGT
CloA_20.1	GTACGTGCAATGCCACTTTCCTGCTGACTAGACCCGTGGCCAAACAGCTTGGCATAATTGGAGCTTCCCTGCGCTTATCCGCTACTTCTTCCCGT
CloA_Gal404	TGACATGGCTGTGACGGGAACTCGGAGATCAGCTCCGCTGGTGCATCGATTTGTTGCTGTGAACCTTGGACATGTTGAGTCCAGATACTGGCTGAT
CloA_20.1	TGACATGGCTGTGACGGGAACTCGGAGATCAGCTCCGCTGGTGCATCGATTTGTTGCTGTGAACCTTGGACATGTTGAGTCCAGATACTGGCTGAT
CloA_Gal404	CGATGGACCTCA
CloA_20.1	CGATGGACCTCA

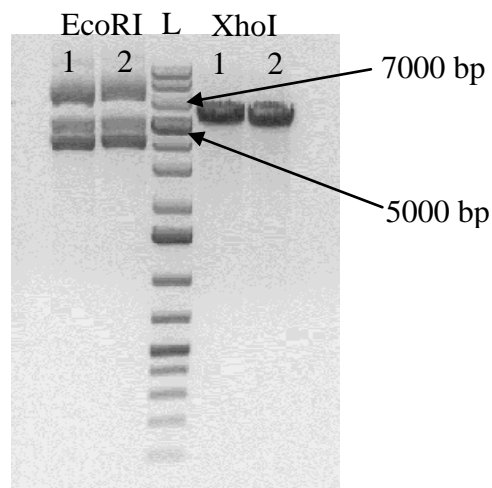
Obr. 15: Zarovnání sekvencí genu *cloA* CloA_Gal404: gen *cloA* amplifikován z genomické DNA *C. purpurea* kmene Gal404, zaklonován do vektoru *pDrive*, a sekvenován firmou SEQme s.r.o.. CloA_20.1: referenční sekvence genu *cloA* z databáze NCBI (GenBank: JN186799.1). * označuje přítomnost nukleotidových polymorfizmů.

4.2 Klonování genu *cloA* do plasmidu *pMK*

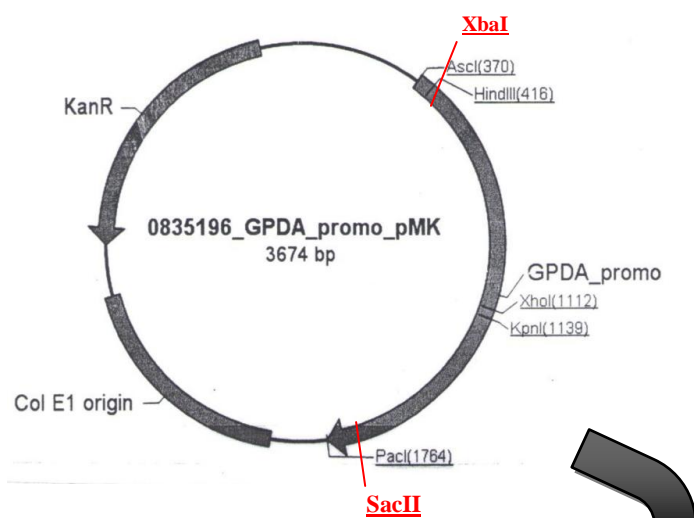
Pomocí PCR byl amplifikován kompletní gen *cloA* zaklonovaný v *pDrive* vektoru. Amplifikace byla provedena pomocí primerů obsahujících restrikční místa pro enzymy KpnI a NheI (3.6.1) a úspěšnost PCR byla zkontrolována přítomností 2112 bp fragmentu na agarosovém gelu (3.6.4). Po přečištění PCR produktu (3.6.2) byl tento produkt štěpen pomocí restrikčních endonukleas KpnI a NheI (3.6.3). Stejnými restričními endonukleasami byl štěpen vektor *pMK* (Obr. 17). Restrikce jednotlivými enzymy probíhala osobitně a štěpený fragment byl po každé restrikci přečištěn (3.6.2). Po štěpení druhým enzymem byly vzniklé fragmenty plasmidu separovány v agarosovém gelu (3.6.4), fragment velikosti 3674 bp byl z gelu vyřezán a postupem 3.6.5 přečištěn. Gen *cloA* byl do vektoru ligován pomocí T4 ligasy (3.6.6), na základě kompatibilních lepivých konců, mezi *gpdA* promotor a terminátor (Obr. 18).

Získaná ligační směs obsahující plasmid *pMK* se zaligovaným genem *cloA* byla vpravena pomocí tepelného šoku do bakteriálních buněk *E. coli* TOP10. Transformované buňky byly selektovány na LB agarových plotnách s kanamycinem (3.6.7). Ani po 24 hodinách nedošlo k nárůstu žádných kolonií a transformace tedy nebyla úspěšná.

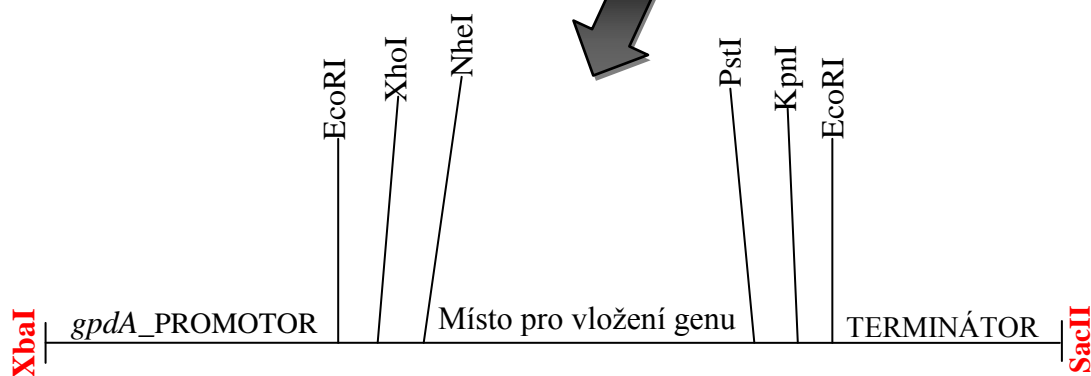
Celý postup klonování genu do vektoru *pMK* mezi *gpdA*_promotor a terminátor pomocí výše uvedených enzymů byl proto zopakován a došlo k nárůstu 2 kolonií, které byly přeočkovány do tekutého média s kanamycinem. Z narostlých buněk byla extrahována plasmidová DNA (3.6.9). Tato DNA byla podrobena restrikční analýze pomocí enzymů EcoRI a XhoI (3.6.3), která nepotvrdila přítomnost genu *cloA* v plasmidu *pMK*. Fragmenty separované při elektroforéze v agarosovém gelu neodpovídaly požadovaných velikostem (Obr. 16).



Obr. 16: Elektroferogram restrikční analýzy vybraných plasmidů *pMK::cloA* pomocí enzymů EcoRI a XhoI. 1,2: plasmidová DNA extrahována z kolonií 1-2. Velikost požadovaných fragmetnů po štěpení *pMK::cloA* enzymem EcoRI: 3670 bp, 1500 bp, 300 bp, 200 bp; a enzymem XhoI - 4943 bp, 728 bp, 97 bp. L: 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.



Obr. 17: Mapa vektoru *pMK*

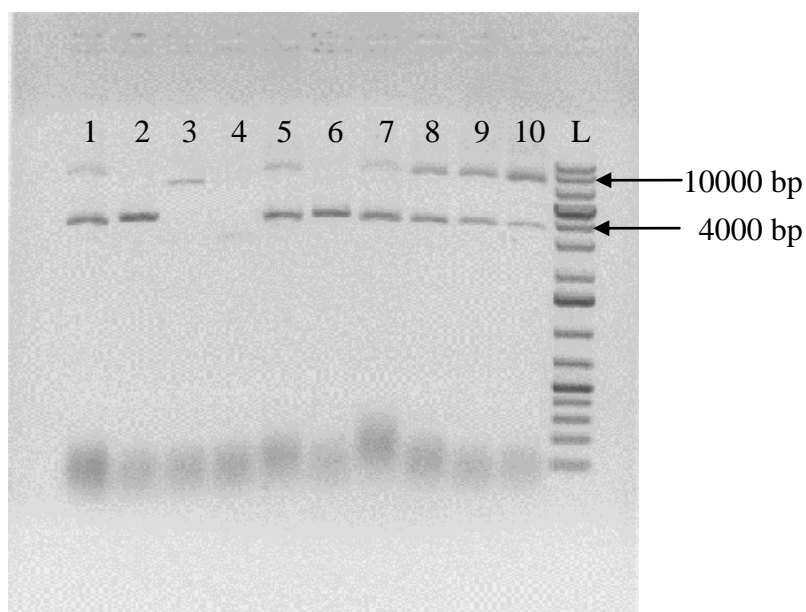


Obr. 18: Podrobná mapa vektoru *pMK*

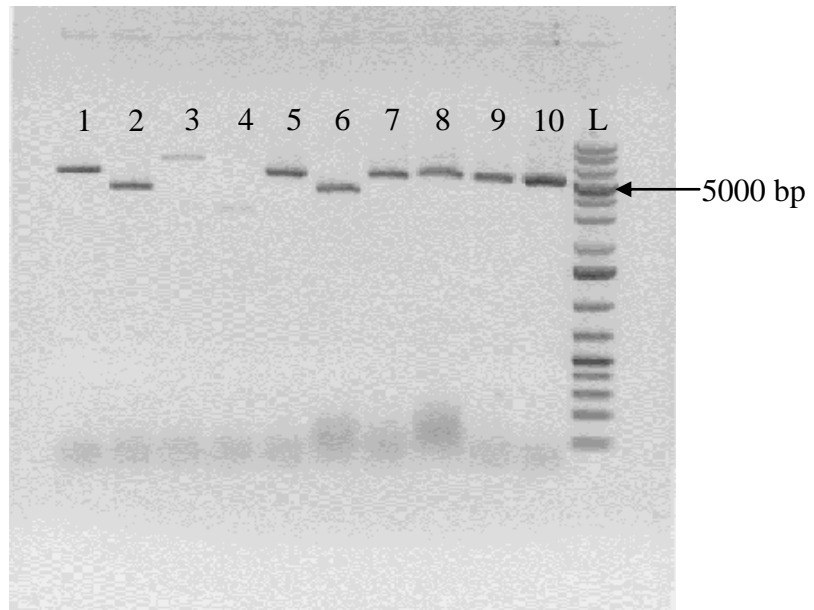
Po opakovaném neúspěšném klonování genu *cloA* do plasmidu *pMK* pomocí restričních enzymů *NheI* a *KpnI* byly použity jiné restriční endonukleasy. Enzym *KpnI* byl nahrazen svým izoschizomerem *Asp718* v kombinaci s enzymem *NheI* a byl zopakován stejný postup klonování genu *cloA* do vektoru *pMK* mezi *gpdA*_promotor a terminátor, jako při použití enzymů *KpnI* a *NheI*.

Po transformaci buněk *E.coli* plasmidem *pMK::cloA* (3.6.7) došlo k nárůstu mnoha kolonií. Vybrané kolonie byly přeočkovány do tekutého LB média s kanamycinem pro namnožení bakterií, které byly použity k izolaci plasmidové DNA (3.6.9). Následně byla provedena restriční analýza *pMK::cloA* pomocí enzymů *EcoRI*, *XhoI*, *PstI* a *MluI* (3.6.3). Jednotlivé fragmenty byly podle velikosti rozděleny elektroforézou v agarosovém gelu (3.6.4), přičemž ani jeden z použitých enzymů neprokázal úspěšné zaklonování genu do vektoru (Obr. 19, 20, 21).

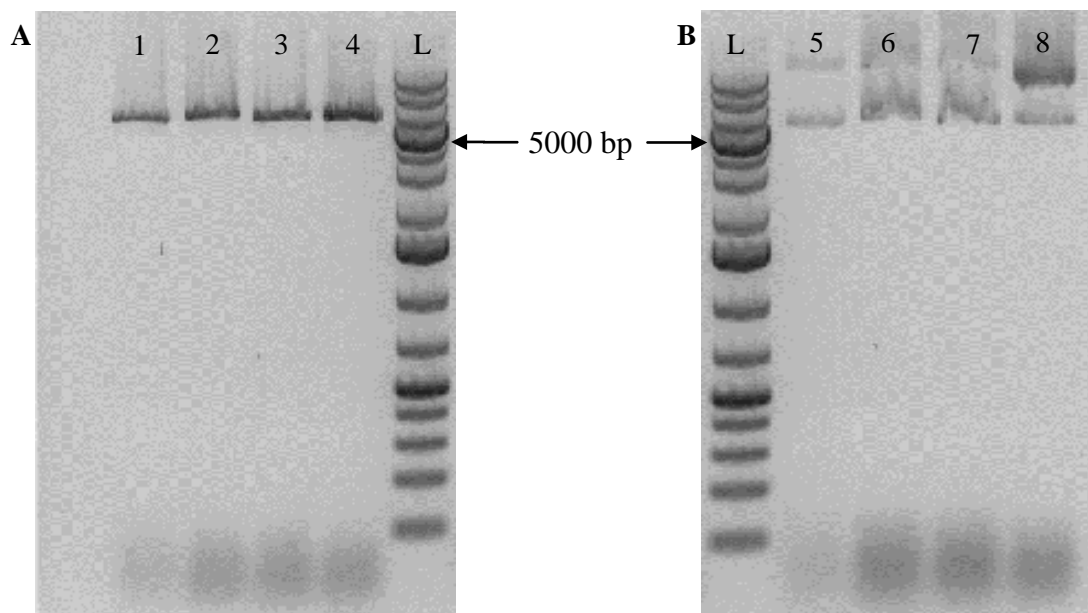
Klonování genu *cloA* do vektoru *pMK* pomocí restričních míst pro enzymy *Asp718* a *NheI* bylo opakováno, avšak se stejným, negativním výsledkem (Obr. 22).



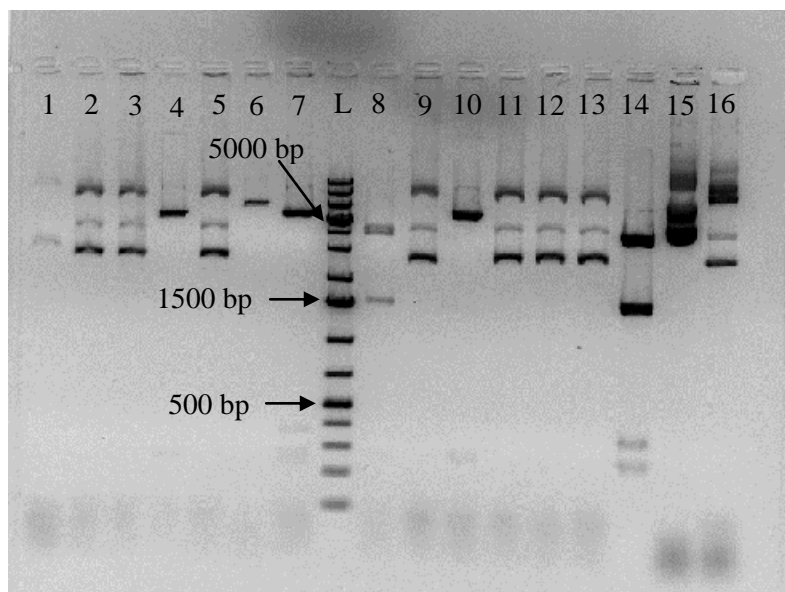
Obr. 19: Elektroferogram restriční analýzy vybraných plasmidů *pMK::cloA* pomocí *EcoRI*. 1-10: plasmidová DNA extrahována z kolonií 1-10. Velikost požadovaných fragmentů po restrikci *pMK::cloA* enzymem *EcoRI*: 3670 bp, 1500 bp, 300 bp, 200 bp. L: 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.



Obr. 20: Elektroforetogram restrikční analýzy vybraných plasmidů *pMK::cloA* pomocí enzymu XhoI. 1-10: plasmidová DNA extrahována z kolonií 1-10. Velikost požadovaných fragmentů po restrikci *pMK::cloA* enzymem XhoI: 4943 bp, 728 bp, 97 bp. L: 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.



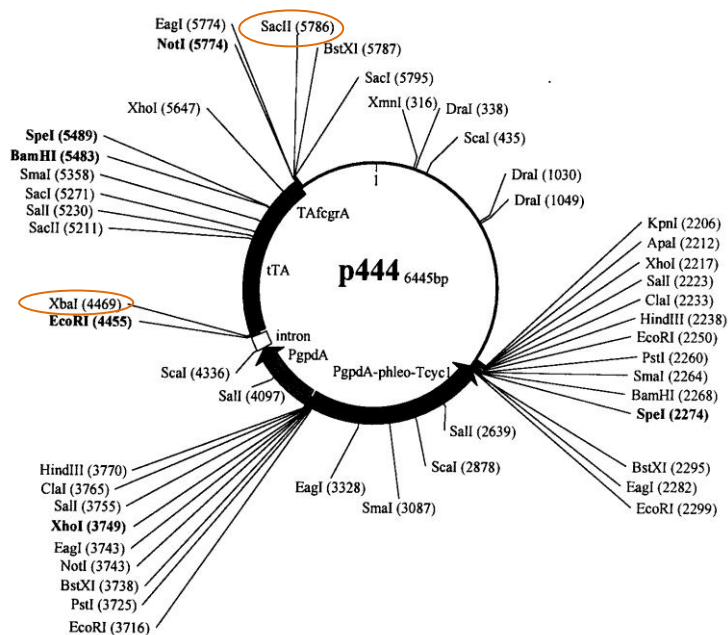
Obr. 21: Elektroferogram restrikční analýzy vybraných plasmidů *pMK::cloA* pomocí enzymů PstI (A) a MluI (B). 1-4: plasmidová DNA extrahována z kolonií 1-4. Velikost požadovaných fragmentů po restrikci *pMK::cloA* enzymem PstI: 2940, 2838 bp, a MluI: 5778 bp. L: 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.



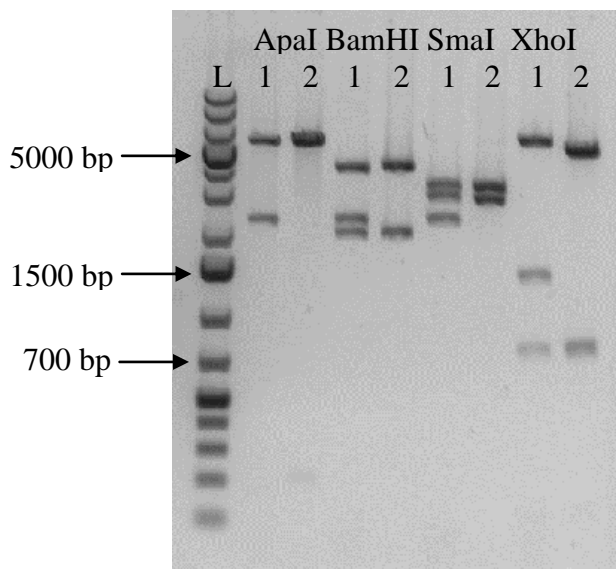
Obr. 22: Elektroferogram vybraných plasmidů *pMK::cloA* pomocí enzymu EcoRI. 1 - 13: plasmidová DNA extrahována z kolonií 1-13; 14: pozitivní kontrola (*pDrive::cloA*); 15: neštěpený plasmid *pMK::cloA*; 16: ligační směs *pMK::cloA*. Velikost požadovaných fragmentů po restrikci *pMK::cloA* enzymem EcoRI: 3670 bp, 1500 bp, 300 bp, 200 bp. L: 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

4.3 Klonování genu *cloA* do plasmidu *p444*

Pomocí PCR byl amplifikován kompletní gen *cloA* s využitím primerů obsahujících restrikční místa pro enzymy XbaI a SacII (3.6.1). Úspěšnost PCR byla zkontrolována přítomností 2112 bp fragmentu v agarosovém gelu (3.6.4). Takto amplifikovaný gen byl po přečištění (3.6.2) štěpen pomocí restrikčních enzymů XbaI a SacII (3.6.3) a byl klonován na základě kompatibilních konců do vektoru *p444* (Obr. 23) (3.6.6), který byl štěpen stejnými enzymy a podle postupu 3.6.5 extrahován z gelu. Plasmid s genem (*p444::cloA*) byl poté pomocí tepelného šoku transformován do buněk *E. coli* TOP 10, transformované buňky byly následně selektovány na LB agaru s ampicilinem (3.6.7). Vybrané narostlé kolonie byly přeočkovány do tekutého LB média s ampicilinem pro namnožení bakterií a po izolaci plasmidové DNA z bakteriálních kultur (3.6.9) byla provedena restrikční analýza pro potvrzení přítomnosti genu *cloA* pomocí enzymů ApaI, BamHI, SmaI a XhoI (3.6.3). Po elektroforetické separaci vzniklých fragmentů se nepodařilo potvrdit úspěšné zaklonování genu *cloA* do vektoru *p444*.



Obr. 23: Vektor *p444* s vyznačenými restrikčními místy pro zaklonování genu *cloA* (www.fgsc.net).

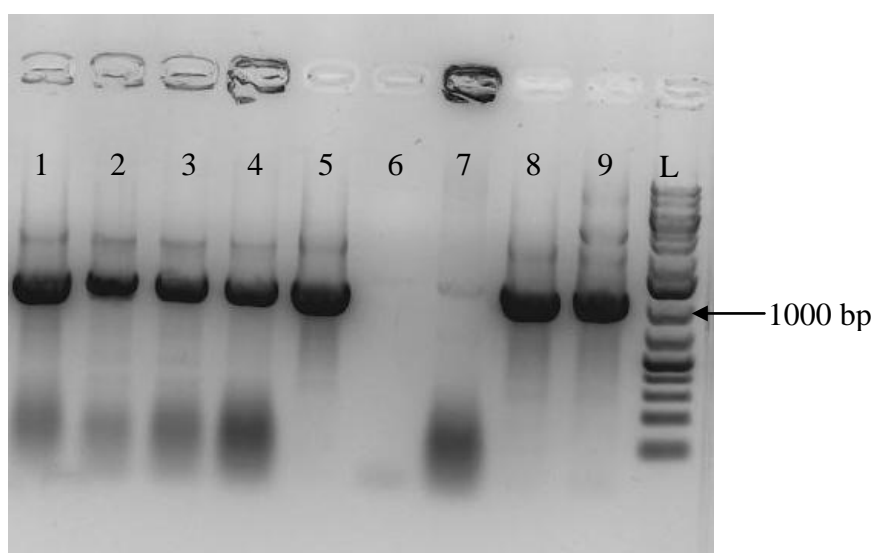


Obr. 24: Elektroferogram restrikční analýzy vybraných plasmidů *p444::cloA* pomocí ApaI, BamHI, SmaI a XhoI. 1,2: plasmidová DNA extrahována z kolonií 1-2. Velikost požadovaných fragmentů po restrikci *p444::cloA* enzymem ApaI: 4837 bp, 2404 bp; BamHI: 4848 bp, 2392 bp; SmaI: 4022 bp, 2396 bp, 823 bp; XhoI: 4171 bp, 1529 bp, 1441 bp. L: 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

4.4 Ověření přítomnosti *cloA* ve vektorech *pMK* a *p444* pomocí „colony“ PCR

Pro ověření úspěšného zaklonování genu *cloA*, jak do vektoru *pMK* tak do *p444* byla provedena také metoda „colony“ PCR podle postupu 3.6.11. U všech vybraných vzorků došlo k amplifikaci genu *cloA*, čímž byla potvrzena přítomnost tohoto genu ve vektorech *pMK* a *p444*.

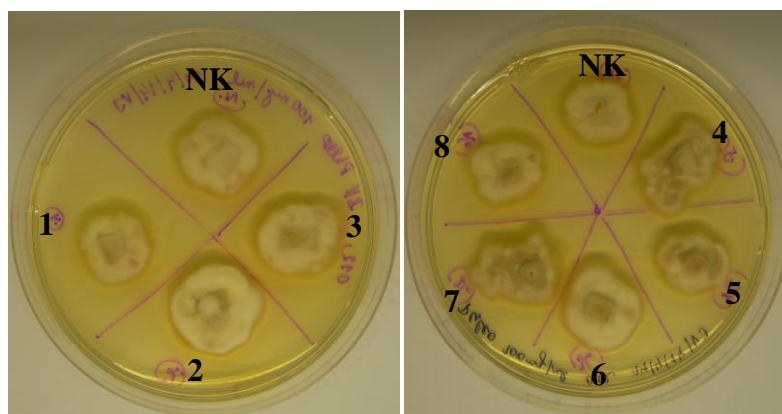
Protože výsledky restriční analýzy a „colony“ PCR byly rozporuplné, vybrané vzorky plasmidů *pMK::cloA* a *p444::cloA* byly poslány na sekvenaci firmě SEQme s.r.o. (Dobříš, Česká republika). Přítomnost genu *cloA* v těchto vektorech byla potvrzena.



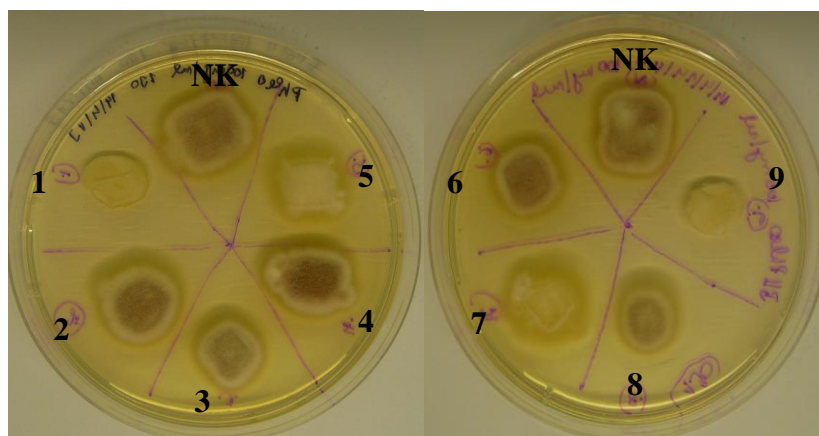
Obr. 25: Elektroferogram vybraných vzorků po „colony“ PCR. 1-5: kolonie bakterií, které byly transformované *pMK::cloA*; 6: Negativní kontrola (H₂O); 7-9: kolonie bakterií, které byly transformované *p444::cloA*. L: 1 kb plus GeneRuler DNA Ladder.

4.5 Transformace kmenů Gal130 a Gal012 vektorem *p444::easG*

Po izolaci protoplastů kmene Gal130 a Gal012 podle postupu 3.6.12 byly tyto protoplasty transformovány pomocí polyethylenglykolu, již připraveným vektorem *p444::easG* (3.6.13). Transformované protoplasty byly regenerovány v BII agarovém mediu (pH 8) obsahujícím antibiotikum phleomycin ($33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Po pěti denní inkubaci byla narostlá mycelia i s negativní (netransformovanou) kontrolou přeočkována na BII agar s vyšší koncentrací phleomycinu ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a výsledek ukázal, že použité antibiotikum nebylo účinné, protože došlo k nárůstu negativní kontroly na mediu s antibiotikem (Obr. 26, 27). Z tohoto důvodu již nebylo provedeno ověřování úspěšnosti transformace a transformace bude zopakována.



Obr. 26: Transformanti kmene Gal012, *p444::easG*. NK: negativní kontrola. 1-8: mycelia narostlá z transformovaných protoplastů 1-8.



Obr. 27: Transformanti kmene Gal130, *p444::easG*. NK: negativní kontrola. 1-9: mycelia narostlá z transformovaných protoplastů 1-9.

5 DISKUZE

Námelové alkaloidy jsou látky syntetizované ve sklerociích, tvořených paličkovici nachovou po napadení hostitele, nejčastěji žita. Tyto látky jsou hojně využívány ve farmaceutickém průmyslu na výrobu léků například k léčbě migrény, vysokého krevního tlaku, v porodnictví atd. Biosyntetické cesty námelových alkaloidů se účastní řada enzymů. Geny kódující tyto enzymy tvoří genový klastř obsahující 14 genů (Tudzinsky *et al.*, 1999) a některé z nich, již byly charakterizovány (Lorenz *et al.*, 2009).

Zvýšení produkce námelových alkaloidů představuje zajímavou biotechnologickou výzvu a pro farmaceutické firmy, využívající námelové alkaloidy pro výrobu léku, to může být také zajímavé a žádoucí. Na Oddělení molekulární biologie - CRH, kde byla provedena praktická část této bakalářské práce, byly v rámci výzkumu prováděny genetické modifikace této parazitické houby za účelem zvýšení produkce námelových alkaloidů pomocí nadprodukce různých genů biosyntetické dráhy. Např. v bakalářské práci Lucie Bražinové (2012), bylo snahou transformovat *C. purpurea* za účelem zvýšení exprese genu *dmaW*, jehož produkt katalyzuje první krok biosyntézy námelových alkaloidů (Tudzynski *et al.*, 1999). V této bakalářské práci byl středem zájmu gen *cloA* jehož produkt, elymoklavin 17 - monooxygenasa, katalyzuje v biosyntetické cestě námelových alkaloidů krok, kdy dochází k přeměně elymoklavinu na kyselinu paspalovou (Haarmaann *et al.*, 2006).

Pro transformaci *C. purpurea* byl vybrán plasmid *p444*, obsahující gen rezistence k phleomycinu, konstitutivní *gpdA* promotor z *Aspergillus nidulans* a *cgrA* terminátor z *Aspergillus fumigatus* (Obr. 23) (Vogt *et al.*, 2005). Byly navrženy dvě strategie přípravy expresního vektoru *p444::cloA* obsahujícího *gpdA* promotor, který měl zaručit zvýšenou expresi genu *cloA*. První strategie přípravy *p444::cloA* spočívala ve vložení genu *cloA* mezi *gpdA* promotor a terminátor ve vektoru *pMK* pomocí enzymu KpnI / Asp718 a NheI. Tato kombinace enzymů byla jediná možná, protože jiné enzymy, pro které byla v žádané pozici vhodná restrikční místa, štěpily také gen *cloA*. Fragment obsahující *gpdA* promotor spolu s genem *cloA* a terminátorem by pak byl z vektoru *pMK* vyštěpen pomocí enzymů XbaI a SacII a vložen do vektoru *p444*, což by vedlo k přípravě expresního vektoru, který by obsahoval dva promotory.

Druhou navrženou strategií byla příprava expresního vektoru *p444::cloA* tak, že nejprve byl z vektoru *p444* vyštěpen gen a *cgrA* terminátor pomocí restrikčních enzymů

XbaI a SacII a tento gen byl nahrazen genem *cloA*. V takovém případě genu chybí terminátor potřebný k ukončení transkripce, a proto bylo součástí této strategie terminátor do vektoru *p444* opět vložit.

Při práci se nám tyto strategie podařilo splnit jen z části, poněvadž restriční analýzy neprokázaly úspěšné klonování genu do těchto vektorů, přestože metoda „colony“ PCR potvrdila přítomnost genu ve vektorech *pMK* a *p444*. Kvůli rozporům ve výsledcích byly vybrané plasmidy osekvenovány s pomocí primerů pro gen *cloA*. Přítomnost genu byla ve vybraných plasmidech potvrzena. Protože sekvence plasmidu *pMK* nám je známa, byly navrženy primery pro sekvenování celého plasmidu. Sekvenování potvrdilo přítomnost genu *cloA* v plasmidu, ale ukázalo se, že gen není zaklonován v plasmidu *pMK*, ale v jiném plasmidu obsahujícím gen rezistence ke kanamycinu, jehož sekvence byla sekvenováním identifikovaná (Čudejková, osobní sdělení). To znamená, že pravděpodobně už na začátku klonování nám byl poskytnut nesprávný plasmid, který ale velikostně odpovídal plasmidu *pMK*.

V případě neúspěšné restriční analýzy plasmidu *p444::cloA* pravděpodobně došlo ke kontaminaci restriční směsí a v některých případech pravděpodobně i samotných enzymů. Z těchto důvodů bude potřeba klonování genu *cloA* zopakovat se správným plasmidem. Další možností je opakování restriční analýzy plasmidu *p444::cloA* s novými restričními enzymy, což z časových důvodů nebylo provedeno. Aby byl expresní vektor *p444::cloA* kompletní a vhodný pro transformaci *C. purpurea*, bude potřeba pokračovat v klonování a vložit za gen terminátor.

Pro transformaci protoplastů dvou kmenů *C. purpurea* (Gal130, Gal012) byl nakonec použit již připravený konstrukt *p444::easG*, poněvadž se nám expresní vektor *p444::cloA* ani jednou ze strategií nepodařilo pro transformaci včas připravit. Regenerace transformovaných protoplastů probíhala 5 dní na selekčním médiu obsahujícím phleomycin. Na miskách s transformanty kmene Gal130 byly narostlé malé kruhy mycelií, derivovány z jednoho protoplastu. Misky s transformanty kmene Gal012, u něhož byly izolovány protoplasty s větší koncentrací, byly po celém povrchu porosteny souvislými mycelií. Avšak negativní kontroly (tj. netransformované protoplasty rostoucí v selekčním médiu), u nichž neměl být pozorován růst mycelia, byly přerostené taktéž. I přes tento výsledek byla mycelia přeočkována na médium s vyšší koncentrací antibiotika a inkubovaná po dobu 7 dní, kdy jsme pozorovaly růst transformantů, ale opět i negativní kontroly. Ze skutečnosti, že selekce transformantů na médiu s nižší i s vyšší koncentrací antibiotika nebyla efektivní vyplývá, že použité

antibiotikum, phleomycin, nebylo účinné. Z tohoto důvodu další analýzy, jako ověření úspěšnosti transformace, nebyly provedeny. Nefunkční antibiotikum bylo nahrazeno nově zakoupeným a transformace se bude muset opakovat.

6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla zpracována literární rešerše na téma obecná charakteristika druhu *C. purpurea* se zaměřením na životní cyklus, charakteristiku námelových alkaloidů, jejich využití ve farmakologickém průmyslu a biosyntetickou cestu. Další podkapitoly rešerše byly věnovány popisu metod pro genetické transformace hub.

V praktické části byl amplifikován gen *cloA*, který byl následně klonován do vektoru *pDrive*. Kompletní sekvence genu byla ověřena sekvenováním. Ověřený konstrukt *pDrive::cloA* byl využit pro klonování genu *cloA* do vektorů *pMK* a *p444*. Klonování *cloA* do vektoru *pMK* bylo potvrzeno jako neúspěšné a z časových důvodů nebylo prokázáno jako úspěšné ani klonování do *p444* vektoru. Pro ověření správnosti konstruktu *p444::cloA* musí být provedena nová restriční analýza s novými enzymy a poté bude za gen přidán terminátor. Plasmid *p444::cloA* bude pak použit pro transformaci protoplastů, izolovaných z mycelia *C. purpurea*, pomocí polyethylenglykolu.

Transformace dvou komerčních kmenů *C. purpurea* za účelem zvýšení exprese genu *easG* nebyla potvrzena kvůli degradaci antibiotika, která měla za následek jeho neúčinnost. I když se v této práci nepodařilo připravit finální produkty – vektor vhodný pro transformaci a geneticky modifikované kmeny *C. purpurea* nadprodukuující enzym EasG, hlavní cíl této práce a to osvojení si molekulárně - biologických technik a schopnost samostatné práce v laboratoři byl splněn.

7 ZDROJE

- Armaleo D., Ye G. N., Klein T. M., Shark K. B., Sanford J. C., Johnston S. A. (1990): Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics*. **17**, 97-103.
- Austin B., Hall R. M., Tyler B. M. (1990): Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. *Gene*. **93**, 157–162.
- Bové F. J. (1970): The Story of Ergot. Basle: S. Karger.
- Carle-Urioste J. C., Escobar - Vera J., El - Gogary S., Henrique - Silva F., Torigoi E., Crivellaro O., Herrera - Estrella A., El - Dorry H. (1997): Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**, 10169 – 10174.
- Correia T., Grammel M., Ortel I., Keller U., Tudzynski P. (2003): Molecular cloning and analysis of the ergopeptine assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chemistry & Biology*. **10**, 1281 - 1292.
- Crosignani P. G. (2006): Current treatment issues in female hyperprolactinaemia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. **125**, 152–164.
- Damyko home page: <http://www.damyko.info/ForumA/viewtopic.php?t=3019> (25. 4. 2014).
- de Costa C. (2002): St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine. *Lancet*. **359**, 1768 - 1770.
- de Groot A. N. J. A., van Dongen P. W. J., Vree T. B., Hekster Y. A., van Roosmalen J. (1998): Ergot alkaloids. Current status and review of clinical pharmacology and therapeutic use compared with other oxytocics in obstetrics and gynaecology. *Drugs*. **56**, 523 – 535.
- de Groot M. J. A., Bundock P., Hooykaas P. J. J., Beijersbergen A. G. M. (1998): *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*. **16**, 839 – 842.
- Ebiotrade home page: <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/231122.htm> (5. 5. 2014).
- Fgsc home page: <http://www.fgsc.net/plasmid/image/636.jpg> (5. 5. 2014).
- Gebler J. C., Poulter C. D. (1992): Purification and characterization of dimethyl allyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **296**, 308 - 313.
- Haarmann T., Machado C., Lübke Y., Correia T., Schardl Ch., Panaccione D., Tudzynski P. (2005): The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. Extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry*. **66**, 1312 - 1320.
- Haarmann T., Ortel I., Tudzynski, P., Keller, U., (2006): Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. *Journal of Chemical Biology*. **7**, 645 – 652.
- Haarmann T., Lorenz N., Tudzynski P. (2007): Use of a nonhomologous end joining deficient strain (Dku70) 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., Rolke Y., Giesbert S., Tudzynski P. (2009): Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Molecular Plant Pathology*. **10**, 563 – 577.
- Hata Y., Kitamoto K., Gomi K., Kumagai Ch., Tamura G. (1992): Functional elements of the promoter region of the *Aspergillus Oryzae* glaA gene encoding glucoamylase. *Current Genetics*. **22**, 85 - 91.
- Hansen T. P. C., Koehler P. J. (2008): History of the use of ergotamine and dihydroergotamine in migraine from 1906 and onward. *Cephalalgia*. **28**, 877-886.
- Hynes M. J. (1996): Genetic transformation of filamentous fungi. *Journal of Genetics*. **75**, 297 - 311.
- Hulvová H., Galuszka P., Frébortová J., Frébort I. (2013): Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnology advances*. **31**, 79 - 89.

- Chakraborty B. N., Patterson N. A., Kapoor N. (1991): An electroporation - based system for high - efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. **37**, 858 - 863.
- Cheng L. J., Robbers J. E., Floss H. G. (1980): End - product regulation of ergot alkaloid formation in intact cells and protoplasts of *Claviceps* species, strain SD 58. *Journal of Natural Product*. **43**, 329 - 339.
- Jourdan G., Verwaerde P., Pathak A., Tran M. A., Montastruc J. L., Senard J. M. (2007): In vivo pharmacodynamic interactions between two drugs used in orthostatic hypotension - midodrine and dihydroergotamine. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. **21**, 45 - 53.
- Kim I. S., Kim S. U., Anderson J. A., (1981): Microsomal agroclavine hydroxylase of *Claviceps* species. *Phytochemistry*. **20**, 2311 - 2314.
- Kück U., Hoff B. (2010): New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **86**, 51 - 62.
- Lee M. R. (2009): The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: from antiquity to 1900. *The Journal of the Royal College of Physicians Edinburg*. **39**, 179 - 184.
- Lorenz N., Haarmann T., Pažoutová S., Jung M., Tudzynski P. (2009): The ergot alkaloid gene cluster: Functional analyses and evolutionary aspects. *Phytochemistry*. **70**, 1822 -1832.
- Lorenz N., Olšovská J., Šulc M., Tudzynski P. (2010): Alkaloid cluster gene *ccsA* of the ergot fungus *Claviceps purpurea* encodes chanoclavine I synthase, a flavin adenine dinucleotide - containing oxidoreductase mediating the transformation of *N* - methyl - dimethylallyltryptophan to chanoclavine I. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**, 1822 - 1830.
- Maier W., Schumann B., Gröger D. (1988): Microsomal oxygenases involved in ergoline alkaloid biosynthesis of various *Claviceps* strain. *Journal of Basic Microbiology*. **28**, 83 - 93.
- Matuschek M., Wallwey Ch., 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 - aldehyd to agroclavine. *Organic & Biomolecular chemistry*. **9**, 4328 - 4335.
- Mercuro G., Rossetti Z. L., Rivano C. A., Ruscazio M., Tocco L., Gessa G., Cherchi A. (1987): Peripheral dopamine receptors in the antihypertensive action of dihydroergotoxine in humans. *Hypertension*. **9**, 35 - 40.
- Ortel I., Keller U. (2009): Combinatorial assembly of simple and complex D - lysergic acid alkaloid peptide classes in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**, 6650 - 6660.
- Otsuka H., Quigley F. R., Gröger D., Anderson J. A., Floss H. G. (1980): In vivo and in vitro evidence for N-methylation as the second pathway - specific step in ergoline biosynthesis. *Planta Medica*. **40**, 109 - 119.
- Pažoutová S., Odvody G. N., Frederickson D. E., Chudíčková M., Olšovská M., Kolařík M. (2011): New *Claviceps* species from warm - season grasses. *Fungal diversity*. **49**, 145 -165.
- Punt P. J., Oliver R. P., Dingemans M. A., Pouwels P. H. (1987): Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*. **56**, 117 - 124.
- Punt P. J., Zegers N. D., Busscher M., Pouwels P. H. (1991): Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of highly expressed *Aspergillus nidulans gpdA* gene. *Journal of Biotechnology*. **17**, 19 - 33.
- Riederer B., Han M., Keller U. (1996): D-lysergyl peptide synthetase from ergot fungus *Claviceps purpurea*. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**, 27524 - 27530.
- Ruiz-Diez B. (2001): Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*. **92**, 189 - 195.
- Scharl C. L., Panaccione D. G., Tudzynski P. (2006): Ergot alkaloids - biology and molecular biology. *The Alkaloids*. **63**, 45 - 86.
- Sharma R., Katoch M., Srivastava P. S., Qazi G. N. (2009): Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **25**, 2083 - 2094.

- Schiff P. L., (2006): Ergot and its alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education*. **70**, 1 - 10.
- Schumann G. L. (2000): Ergot. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1016-01.
- Smit R., Tudzynski P. (1992): Efficient transformation of *Claviceps purpurea* using pirimidine auxotrophic mutants: cloning of the OMP decarboxylase gene. *Molecular Genetics and Genomics*. **234**, 297 - 305.
- Tudzynski P., Hölter K., Correia T., Arntz C., Grammel N., Keller U. (1999): Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Molecular Genetics and Genomics*. **261**, 133 - 141.
- Tudzynski P., Correa T., Keller U. (2001): Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **57**, 593- 605.
- van Dongen P. W. J., de Groot A. N. J. A. (1995): History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. **60**, 109-116.
- Vogt K., Bhabhra R., Rhodes J. C., Askew D. S. (2005): Doxycycline-regulated gene expression in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *BMC Microbiology*. **5**:1 <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-5-1.pdf>.
- Wallwey Ch., Li S. (2011): Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Natural Product Reports*. **28**, 496-510.
- Walzel B., Riederer B., Keller U. (1997): Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chemistry & Biology*. **4**, 223 – 230.
- Ward M., Wilkinson B., Turner G. (1986): Transformation of *Aspergillus nidulans* with a cloned, oligomycin-resistant ATP synthase subunit 9 gene. *Molecular and General Genetics*. **202**, 265-270.
- Urban Z., Kalina T. (1980): *Systém a evoluce nižších rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 415 stran.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- bp – pár bází
- CYP450 – Cytochrom P450 monooxygenasa
- DMAPP - Dimethylallyldifosfát
- DMAT – 4 – dimethylallyltryptofan
- DMATS – L – tryptofan dimethylallylsyntasa
- dNTPs – deoxynukleotidtrifosfáty
- EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová
- gpdA – Glyceraldehyd – 3 – fosfátdehydrogenasa z *Aspergillus nidulans*
- IPTG - Isopropyl β - D - 1 – thiogalactopyranosid
- LPS – lysergyl peptidové syntetasy
- LSD – Diethylamid kyseliny lysergové
- MeDMAT – N- methyl dimethylallyltryptofan
- PCR – polymerasová řetězová reakce
- PEG – Polyethylenglykol
- X – gal - 5 – bromo - 4 – chloro – 3 – indolyl – β - D – galaktopyranosid