

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium transkripčních faktorů v houbě

Claviceps purpurea

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jana Biová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.
Rok:	2016

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. 2016

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí Mgr. Márii Majeské Čudejkové, Ph.D. za vedení a pomoc při sepisování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Josefu Vrabkovi, Bc. Michaele Hradilové a ostatním na Oddělení molekulární biologie, CRH za pomoc a cenné rady. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Oddělení buněčné biologie, CRH za zapůjčení fluorescenčního mikroskopu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Biová
Název práce	Studium transkripčních faktorů v houbě <i>Claviceps purpurea</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

C. purpurea je parazitická houba, která produkuje námelové alkaloidy. Námelové alkaloidy mají z hospodářského hlediska dvojí význam, jednak můžou způsobit kontaminaci hospodářských plodin, nebo mohou být využity ve farmaceutickém průmyslu. Cílem této práce bylo připravit nadprodukční a deleční mutanty dvou genů u tohoto organismu. A to genů *Cpur01124* a *Cpur05433*, pravděpodobně kódujících transkripční faktory. V rámci experimentální práce byly transformovány protoplasty *C. purpurea* kmene 20.1 připravenými konstrukty pomocí PEG. Přítomnost konstruktů v genomu byla po selekci transformovaných hub pomocí antibiotika potvrzena pomocí PCR. Byli identifikováni nadprodukční mutanti obou vybraných genů, u kterých byla potvrzena i funkčnost vloženého konstruktů pomocí fluorescenční mikroskopie. Deleční mutanty ani jednoho z vybraných genů se připravit nepodařilo.

Klíčová slova	<i>Claviceps purpurea</i> , transkripční faktory, transformace, <i>Cpur01124</i> , <i>Cpur05433</i>
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jana Biová
Title	Study of transcription factors in the fungus <i>Claviceps purpurea</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of molecular biology, CRH
Supervisor	Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

C. purpurea is a parasitic fungus that produces ergot alkaloids. Ergot alkaloids are economically unfavorable or favorable substances. They can cause the contamination of agronomically important crops or on other side they can be used in pharmaceutical industry. The aim of this work was to prepare overexpressing and knock-out mutants of two genes of this organism. The two genes *Cpur01124* and *Cpur05433* are putative transcription factors. In the experimental part of this work, the protoplasts of *C. purpurea* strain 20.1 were transformed with prepared constructs using PEG. After selection of transformed fungi on media with antibiotics, the presence of the construct in the genome was confirmed by PCR. Overexpressing mutants of both selected genes were identified and function of the introduced constructs was confirmed using fluorescent microscopy. Successful preparation of knock-out mutants was not confirmed.

Keywords	<i>Claviceps purpurea</i> , transcription factors, transformation, <i>Cpur01124</i> , <i>Cpur05433</i>
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod	8
2	Současný stav řešené problematiky	9
2.1	<i>Claviceps purpurea</i> její životní cyklus a využití	9
2.1.1	Význam a využití námelových alkaloidů	10
2.2	Transkripční faktory	11
2.2.1	Obecné transkripční faktory a jejich zapojení v transkripci	12
2.2.2	Specifické transkripční faktory a jejich funkce v procesu transkripce	12
2.2.3	Strukturní motivy transkripčních faktorů	14
2.2.4	Transkripční faktory u hub	16
2.3	Sekundární metabolismus u hub	19
2.3.1	Role transkripčních faktorů v regulaci sekundárního metabolismu hub	20
3	Experimentální část	22
3.1	Materiál	22
3.1.1	Biologický materiál	22
3.1.2	Chemikálie	22
3.1.3	Komerční kity	24
3.1.4	Roztoky a média	24
3.1.5	Sekvence primerů	25
3.1.6	Pomůcky a přístroje	26
3.2	Metody	27
3.2.1	Izolace plasmidové DNA	27
3.2.2	Štěpení plasmidové DNA pomocí restrikčních enzymů	27
3.2.3	Elektroforéza v agarosovém gelu	27
3.2.4	Purifikace naštěpené DNA	28
3.2.5	Příprava protoplastů pro transformaci <i>C. purpurea</i>	28
3.2.6	Transformace protoplastů <i>C. purpurea</i>	28
3.2.7	Izolace genomické DNA	30
3.2.8	Polymerasová řetězová reakce (PCR)	30
3.2.9	Monosporická izolace nadprodukčních mutantů	32
3.2.10	Potvrzení úspěšnosti transformace pomocí fluorescenční mikroskopie	32
4	Výsledky a diskuze	33
4.1	Příprava nadprodukčních mutantů <i>C. purpurea</i>	33
4.1.1	Ověření funkčnosti vložených konstruktů pomocí fluorescenční mikroskopie	35
4.2	Příprava delečních mutantů <i>C. purpurea</i>	38
4.2.1	Transformace protoplastů	38
5	Závěr	42
6	Literatura	43
7	Seznam použitých symbolů a zkratk	49

Cíle práce

- vypracování literární rešerše na téma transkripčních faktorů obecně a u hub a biologie *Claviceps purpurea*
- zvládnutí samostatné laboratorní práce a technik molekulární biologie
- transformace *Claviceps purpurea* konstrukty pro delecii a nadprodukcii vybraných transkripčních faktorů

1 ÚVOD

Claviceps purpurea je parazitická houba významná z důvodu produkce skupiny sekundárních metabolitů známých jako námelové alkaloidy. Ty ovlivňují centrální nervový systém a cévní soustavu. Námelové alkaloidy mají z hospodářského hlediska dvojitý význam. Protože *C. purpurea* infikuje některé hospodářsky významné plodiny, může docházet k jejich kontaminaci těmito alkaloidy a tím i k finančním ztrátám v zemědělství. Druhým významem námelových alkaloidů je jejich použití ve farmaceutickém průmyslu. Sekundární metabolity jsou rozmanitá skupina obvykle nízkomolekulárních látek, které se nejčastěji vyskytují jen v určitých typech buněk v konkrétní fázi života organismu. Jejich význam pro organismus, který je produkuje, je v mnoha případech nejasný. Na regulaci jejich metabolických drah se podílí i transkripční faktory. Transkripční faktory jsou proteiny, které jsou zapojené v regulaci exprese genů, pomocí slabých vazebných interakcí s DNA. V teoretické části této práce je vypracovaná literární rešerše na téma biologie a využití *C. purpurea*, transkripčních faktorů, strukturních motivů transkripčních faktorů, transkripčních faktorů u hub a sekundárního metabolismu u hub. V experimentální části je popsána příprava delečních a nadprodukčních mutantů vybraných genů (*Cpur01124* a *Cpur05433*). Část výsledky a diskuze pak popisuje výsledky provedených experimentů a diskutuje je s literaturou.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Claviceps purpurea* její životní cyklus a využití

Claviceps purpurea (Paličkovice nachová) se řadí k eukaryotickým organismům, do říše hub (*Fungi*), oddělení vřeckovýtrusné houby (*Ascomycota*), čeledi paličkovcovité (*Clavicipitaceae*), rodu paličkovice (*Claviceps*). Tento rod parazitických hub infikuje více než 600 druhů jednoděložných rostlin z čeledí lipnicovité (*Poaceae*), sítinovité (*Juncaceae*) a šáchorovité (*Cyperaceae*) po celém světě (Bové, 1970). Samotný druh *C. purpurea* infikuje více než 400 druhů rostlin (Taber, 1985), včetně významných hospodářských plodin zejména obilovin (Bové, 1970). Infekce obilovin způsobuje finanční ztráty v zemědělství (Alderman *et al.*, 1996), na druhou stranu jsou produkty sekundárního metabolismu námele využívány ve farmaceutickém průmyslu. *C. purpurea* produkuje námelové alkaloidy, které byly v minulosti opakovaně příčinou otrav (ergotismus, také nazývaný oheň svatého Antonína) u lidí i dobytka, a jsou spojovány i s čarodějnickými procesy (Barger, 1931).

Parazitická infekce začíná dosednutím askospory na rozkvetlém květu hostitelské rostliny. Spora se zachytí na pestíku, kde začne klíčit a vzniká hyfa. Hyfa pronikne do semeníku po dráze, kterou obvykle postupuje pylová láčka při oplození rostliny. Z trasy se odchýlí až v mikropylární oblasti, kde dojde k vytvoření spojení s vodivým pletivem hostitelské rostliny, které je důležité pro výživu parazitující houby. Hyfa se začne větvit a v semeníku rostliny roste mycelium (Tudzynski a Scheffer, 2004). *C. purpurea* napadá pouze neoppylené semeníky (Tenberge, 1999). Přibližně týden po infekci květu začne mycelium v semeníku produkovat konidie, nepohlavní spory. Ty jsou vylučovány v lepkavé hmotě bohaté na cukry – tzv. medovici, která láká hmyz. Hmyz přenáší konidie na ještě nenakažené květy, infekce se šíří a zvyšuje se počet nakažených rostlin. Produkce medovice je prvním snadno pozorovatelným znakem úspěšného napadení rostliny houbou *C. purpurea* (Tenberge, 1999). Následující stádium infekce je spojeno s diferenciací buněk a syntézou lipidů. Buňky se diferencují na tzv. sklerotinizované buňky produkující lipidy tvořící až 50 % celkové hmotnosti buňky (Kobel a Sanglier, 1986). K syntéze alkaloidů dochází pouze ve sklerotinizovaných buňkách, které vytvářejí tzv. sklerocia (Obr. 1) – podlouhlé tmavé výběžky, které můžeme pozorovat v klasu napadené rostliny (Kobel a Sanglier, 1986). Zralá sklerocia vypadnou z klasu a přečkají zimu, aby z nich



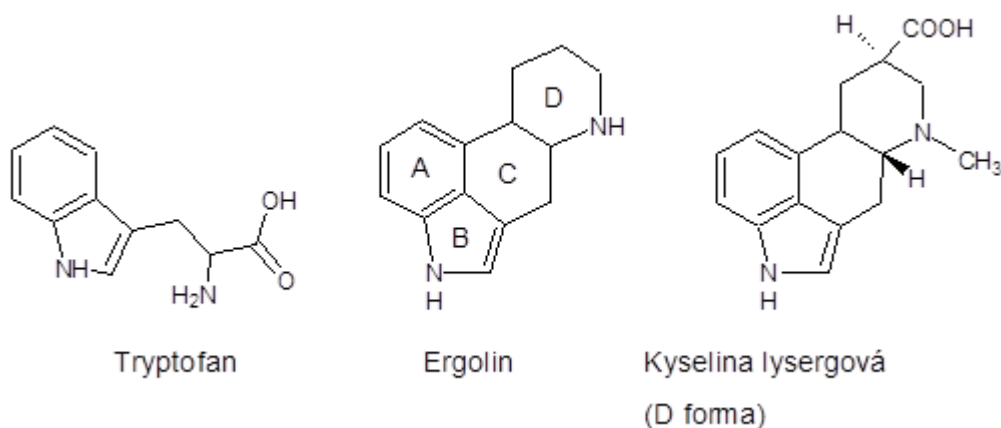
Obr. 1 Obrázek sklerocia na klasu žita a obrázek plodnic, které na jaře ze sklerocia vyrůstají (Holec a Beran, 2012).

na jaře mohly vyrůst perithecia, plodnice tvarem připomínající houbu s kulatou hlavičkou (Obr. 1). V nich asi 4 týdny po vyklíčení vznikají askospory podlouhlého tvaru. Tyto pohlavní spory po přenosu větrem infikují nové hostitele a životní cyklus *C. purpurea* se opakuje (Tudzynski a Scheffer, 2004).

2.1.1 Význam a využití námelových alkaloidů

K námelovým alkaloidům patří velká skupina látek odvozených od ergolinu (Obr. 2). Ergolin je možné odvodit od L-tryptofanu (Obr. 2), který byl dokázán jako prekurzor u biosyntézy některých námelových alkaloidů (Floss, 1976). Námelové alkaloidy můžeme rozdělit na tři podskupiny: klaviny, kyselinu lysegovou a její deriváty a ergopeptiny. Nejjednoduššími členy skupiny jsou klaviny, které mají otevřený D kruh (viz číslování v ergolinu). Dále můžeme najít kyselinu lysergovou (Obr. 2) a její deriváty, nejčastěji amidy. Nejsložitějšími zástupci skupiny jsou pak ergopeptiny (Schardl *et al.*, 2006). V přirozených podmínkách se obvykle vyskytují zástupci všech tří podskupin dohromady a tvoří různé směsi. Toto je pravděpodobně důvod, proč se při otravách námelovými alkaloidy vyskytuje velké množství různých účinků (Cvak, 1999; Tudzynski *et al.*, 2001).

To, že námelové alkaloidy ovlivňují cévní systém a centrální nervovou soustavu bylo známo již ve středověku a námel byl využíván v lékařství, zejména v porodnictví (Haarmann *et al.*, 2009). Velkým problémem však bylo nestabilní



Obr. 2 Vybrané chemické sloučeniny.

množství a složení alkaloidů v jednotlivých zdrojích, které mohlo způsobit předávkování nebo nežádoucí účinky (Cvak, 1999; Tudzynski *et al.*, 2001). Až v době, kdy byly zavedeny a optimalizovány metody izolace jednotlivých alkaloidů, bylo umožněno použití těchto látek i v moderní medicíně (Cvak, 1999).

Pro industriální produkci námelových alkaloidů se využívá cílené infikování obilovin houbami *C. purpurea*, *C. paspali*, *C. fusiformis* (Flieger *et al.*, 1997), anebo průmyslová fermentace. Pro vybrané podmínky pěstování byly intenzivně šlechtěny speciální kmeny s vyššími výnosy a stabilnějším složením alkaloidů (Cvak, 1999). Při výrobě léčiv se využívají jak původní (přírodně se vyskytující), tak semisyntetické námelové alkaloidy. Množství druhů a tím pádem účinků je ohromné. Námelové alkaloidy se používají v léčivech působících např. proti migréně, pro zužování cév, inhibujících prolaktin a pro léčbu Parkinsonovy nemoci (Berde a Stürmer, 1978). Podle informací z 8. 7. 2013 Státního ústavu pro kontrolu léčiv bylo z důvodů závažných nežádoucích účinků doporučeno ukončení používání přípravků obsahujících námelové alkaloidy k léčbě některých onemocnění, u kterých se tyto léky dříve používaly k léčbě. Je možné je dále používat k léčení akutních migrén a některých onemocnění mozku (SUKL, 2013).

2.2 Transkripční faktory

Transkripční faktory jsou proteiny, které jsou velmi důležité pro správné fungování buněk a tedy i celých organismů. Tyto proteiny se podílí na růstu a vývoji organismů na jejich diferenciaci, a to tím že regulují expresi genů (Pabo a Sauer, 1992). Exprese genů je realizována v průběhu procesu transkripce pomocí RNA polymerasy.

2.2.1 Obecné transkripční faktory a jejich zapojení v transkripci

U eukaryotických organismů se transkripce účastní tři RNA polymerasy, přičemž jenom RNA polymerasa II přepisuje geny kódující proteiny. Velmi podstatnou roli při procesu transkripce pomocí RNA polymerasy II mají takzvané obecné transkripční faktory, které rozeznávají oblast promotoru, na kterou nasedá RNA polymerasa II a kde se vytváří tzv. iniciační komplex (Alberts *et al.*, 2008).

Promotor velmi často obsahuje TATA box (sekvence bohatá na báze adenin a thymin) a iniciační motiv (sekvence bohatá na pyrimidinové báze), který obsahuje počáteční místo transkripce (Orphanides *et al.*, 1996). Sekvence TATA boxu je rozpoznávána pomocí vazebné domény transkripčního faktoru TFIID. Vazba mezi vysoce konzervovaným C-koncem TATA vazebné domény a sekvencí TATA boxu způsobí ohyb dvoušroubovice DNA, který pravděpodobně brání zpětnému sbalení do nukleosomů (Nikolov *et al.*, 1996). TFIID obsahuje i jiné vazebné domény, které ovlivňují vazbu TATA vazebné domény. K tomu dochází při interakci s ostatními regulačními sekvencemi. Na nukleoproteinový komplex tvořený TATA boxem a TFIID se váže TFIIB a spojuje jej s komplexem vzniklým z RNA-polymerasy II a TFIIF, který je podobný σ faktoru bakterií. TFIIB je také zodpovědný i za určení správného místa začátku transkripce (Orphanides *et al.*, 1996). Při transkripci se uplatňují i další obecné transkripční faktory, mezi nimi je třeba zmínit TFIIE a TFIIH. Oba proteiny se pravděpodobně podílí na procesu rozdělování dvojvlákna DNA (Orphanides *et al.*, 1996). TFIIH obsahuje kromě domény s helikasovou aktivitou, která je závislá na přítomnosti ATP (Schaeffer *et al.*, 1993), i doménu s kinasovou aktivitou. Jejím úkolem je fosforylovat C-koncovou doménu RNA-polymerasy II (Lu *et al.*, 1992). Po vytvoření iniciačního komplexu a fosforylaci C-koncové domény RNA-polymerasy II, je RNA-polymerasa II připravena začít syntézu vlákna primární mRNA. Nejdříve však musí být uvolněna z iniciačního komplexu vázaného na promotoru. RNA-polymerasa podstoupí konformační změny a přeruší vytvořené vazby s většinou proteinů iniciačního komplexu a polymerizace může být zahájena (Alberts *et al.*, 2008).

2.2.2 Specifické transkripční faktory a jejich funkce v procesu transkripce

Kromě obecných transkripčních faktorů, bez kterých by u eukaryotických organismů nemohla probíhat samotná transkripce, jsou známy také specifické transkripční

faktory. Specifické transkripční faktory (*trans* elementy) interagují s regulačními sekvencemi v DNA (*cis* elementy) a regulují expresi genů, která závisí například na typu buňky, na stádiu vývinu nebo na působení extracelulárních faktorů (Alberts *et al.*, 2008). *Cis* elementy je možné rozdělit na základě jejich funkce do dvou základních skupin: zesilovače a zeslabovače. *Trans* elementy můžeme rozdělit na aktivátory a represory.

Zesilovače jsou *cis* regulační sekvence DNA, které po interakci s *trans* elementem zvyšují aktivitu promotoru a tím zesilují transkripci. Zesilovače se mohou nacházet v bezprostřední blízkosti promotoru, ale také ve větší vzdálenosti od promotoru, a to ve směru i protisměru transkripce (Rosypal 1999). Aby mohl zesilovač ovlivnit funkci promotoru je potřebná jejich interakce, a jako nejpravděpodobnější mechanismus této interakce se považuje vytvoření “kličky“ z vlákna DNA, která umožní interakci *trans* elementů navázaných v místě zesilovače a promotoru. Utvoří se tak proteinový komplex, který obvykle obsahuje i RNA-polymerasu (Bulger a Groudine, 2009). Zesilovače se nejčastěji nachází v nekódujících oblastech DNA (Marsman a Horsfield, 2012), avšak byly nalezeny i v exonových oblastech (Ritter *et al.*, 2012).

Zeslabovače, které také patří mezi *cis* regulační elementy, jsou sekvence DNA, které pomocí interakce s *trans* elementy, obvykle nazývanými represory, zeslabují transkripci vybraného genu. Zeslabovače se mohou vyskytovat v intronových i exonových oblastech DNA (Ogbourne a Antalis, 1998).

Aktivátory jsou proteiny, které zesilují nebo umožňují transkripci vazbou na konkrétní sekvenci DNA, odkud pak ovlivňují základní iniciační komplex. Aktivátory mohou být specifické pro jediný gen nebo skupinu genů. Řadíme mezi ně i obecné transkripční faktory, které se účastní tvorby iniciačního komplexu. V primární struktuře aktivátorů velmi často nacházíme kyselé aminokyseliny nebo sekvence bohaté na prolin (Latchman, 1997).

Represory jsou proteiny, které ztěžují, zpomalují nebo znemožňují transkripci. Toho lze dosáhnout třemi způsoby. Prvním způsobem je negativní ovlivnění rozvolnění chromatinu, které zamezuje v přístupu k požadované DNA a tím ovlivní vazbu iniciačního komplexu. Další možností je vazba na iniciační komplex, která způsobí jeho konformační změnu. Posledním způsobem je vazba na aktivátor, která zapříčiní jeho nefunkčnost (Gaston a Jayaraman, 2002).

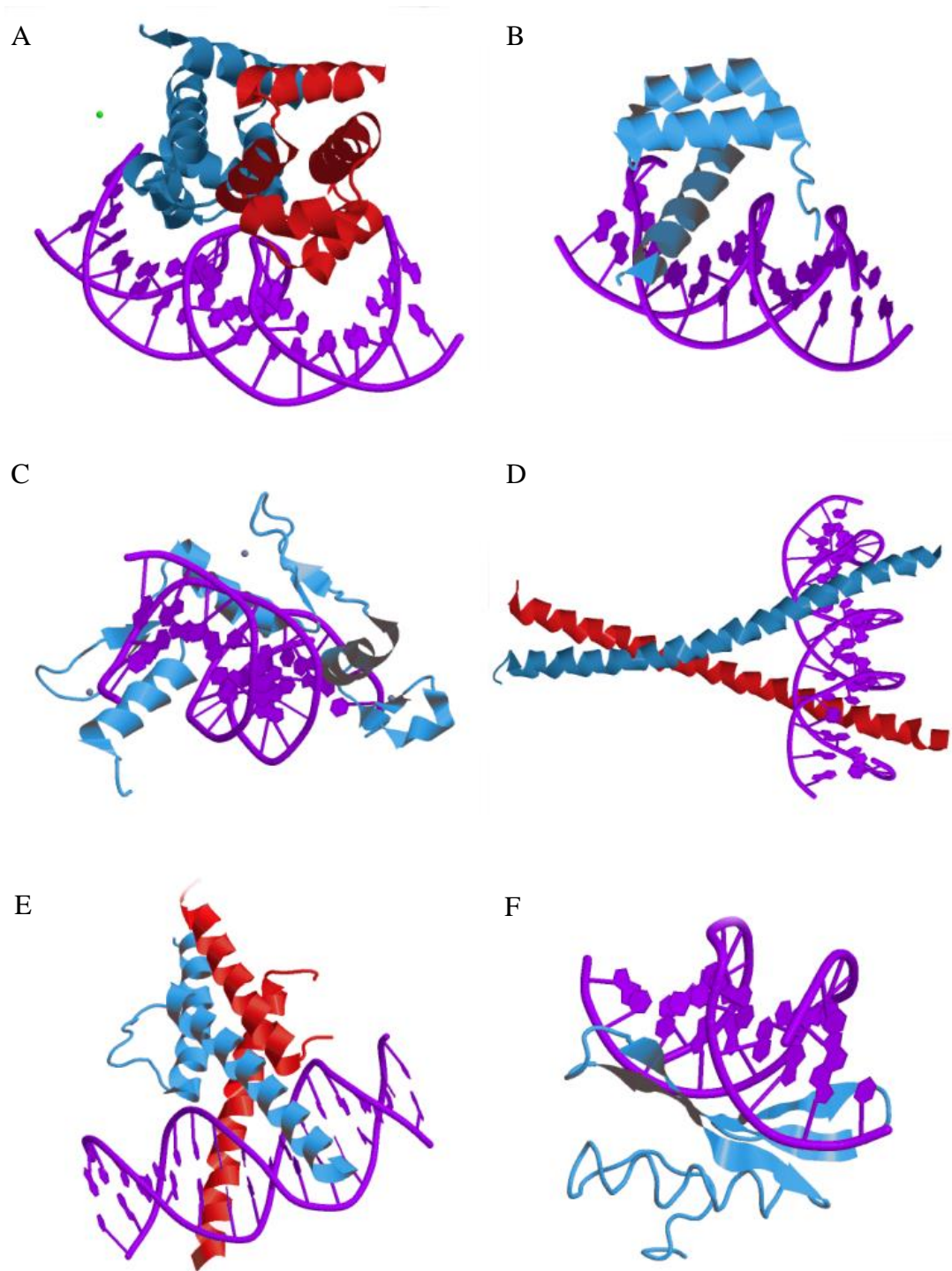
2.2.3 Strukturní motivy transkripčních faktorů

U proteinů, které interagují s dvoušroubovicí DNA, můžeme nalézt několik typů strukturních motivů. Interakce DNA-protein by měla být dostatečně pevná a specifická. Tuto podmínku splňuje série vazebných interakcí mezi jednou bází DNA a jednou aminokyselinou proteinu. Jedna samostatná vazba obvykle není dostatečně silná a specifická (Lodish *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008). Mezi typické strukturní motivy vyskytující se u transkripčních faktorů patří: helix-otočka-helix, homeodoména, zinkové prsty, leucinový zip, helix-smyčka-helix a β -skládané listy.

Motiv helix-otočka-helix („helix-turn-helix“) je velmi rozšířený. Můžeme jej najít u eukaryotických i prokaryotických organismů (Matthews *et al.*, 1982; Bagby *et al.*, 1995). Jak vyplývá z názvu, tento strukturní motiv obsahuje 2 α -helixy spojené dohromady „otočkou“ (krátkým úsekem aminokyselin v nehelikálním uspořádání). Celé seskupení je udržováno v patřičném tvaru pomocí slabých vazebných interakcí. Vazba na DNA probíhá ve velkém žlábků dvoušroubovice, do kterého zapadá rozpoznávací α -helix (Obr. 3 A). Velmi často jsou v těchto typech proteinů přítomné i další interakce s bázemi DNA, které uskutečňují aminokyseliny na nestočených úsecích proteinu. Jejich úkolem je pomoci se správným navázáním. Tento motiv se obvykle vyskytuje jako symetrický dimer, a proto se váže pouze na úseky DNA, které jsou značně podobné na obou stranách (Harrison a Aggarwal, 1990).

Homeodoména („homeodomain“) je velice podobná předchozímu proteinovému motivu. Obsahuje 3 α -helixy a úsek 60 aminokyselin, který má ve všech proteinech skupiny velmi podobné složení (Obr. 3 B). Opět obsahuje rozpoznávací α -helix, který dosedá na dvoušroubovicí DNA ve velkém žlábků a vytváří i další vazby DNA-protein mimo rozpoznávací α -helix a velký žlábek (Pabo a Sauer, 1992).

Dalším vazebným motivem transkripčních faktorů je skupina motivů nazývaných zinkové prsty („zinc fingers“). Společným znakem těchto proteinů je přítomnost α -helixu a jednoho nebo více atomů zinku vázaných koordinační vazbou v proteinu. α -helix rozpoznává konkrétní sekvenci bází a interaguje s ní ve velkém žlábků dvoušroubovice DNA (Obr. 3 C). Kovový iont je obvykle navázán na aminokyseliny cystein a histidin. Rozdíl mezi různými podskupinami zinkových prstů je ve struktuře v druhé části proteinu. Mohou obsahovat β -skládaný list a je velmi časté, že se celý motiv několikrát po sobě opakuje. Součástí motivu může být také druhý α -helix. Zinkové prsty můžeme dělit i podle počtu cysteinových a histidinových



Obr. 3 Obrázky vybraných strukturních motivů transkripčních faktorů. A helix-otočka-helix, B homeodoména, C zinkový prst, D leucinový zip, E helix-smyčka-helix, F β -skládaný list. Obrázky struktur jsou staženy z PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, 8.4.2016).

residuí, která jsou zapojena ve vazbě centrálního zinkového atomu (Pabo a Sauer, 1992).

Motiv leucinového zipu („leucine zipper“) je složený ze dvou α -helixů, které tvoří dimer. Výrazný rozdíl oproti seskupení helix-otočka-helix je ve způsobu spojení

α -helixů dohromady. Na jedné straně každého z α -helixů leucinového zipu je umístěna skupina aminokyselin s hydrofobními postranními řetězci (obvykle leuciny), které tvoří hydrofobní interakci. Je nutné, aby hydrofobní řetězce proteinů správně zapadaly jeden do druhého, protože jinak není možný vznik dostatečně pevné vazby. Celý motiv má tvar přibližně písmene Y, kdy horní díl písmene je navázán na molekulu DNA a noha představuje hydrofobní spojení dvou řetězců (Obr. 3 D). Toto uspořádání umožňuje vytvořit nestejnoměrný dimer (heterodimer), který je schopen interagovat s nesymetrickou DNA (Miller, 2009).

Dalším proteinovým motivem, který je schopen tvořit i heterodimer, je helix-smyčka-helix („helix-loop-helix“). Ten obsahuje dva α -helixy, jeden kratší a druhý delší, spojené ohebnou smyčkou (Obr. 3 E). Oba α -helixy se váží na dvoušroubovici DNA a zároveň mohou být spojené s dalším proteinem (Massari a Murre, 2000).

Ne všechny proteiny, které tvoří vazbu s DNA, mají jako rozpoznávací strukturu α -helix. Schopnost interagovat s DNA mají i proteiny, které obsahují ve své struktuře β -skládaný list. Obvykle jde o dva β -skládané listy stočené do sebe, které mají vysunutou rozpoznávací sekvenci aminokyselin směrem k rozpoznávané sekvenci bázi v DNA (Obr. 3 F). I zde dochází k interakci ve velkém žlábkou dvoušroubovice DNA (Pabo a Sauer, 1992).

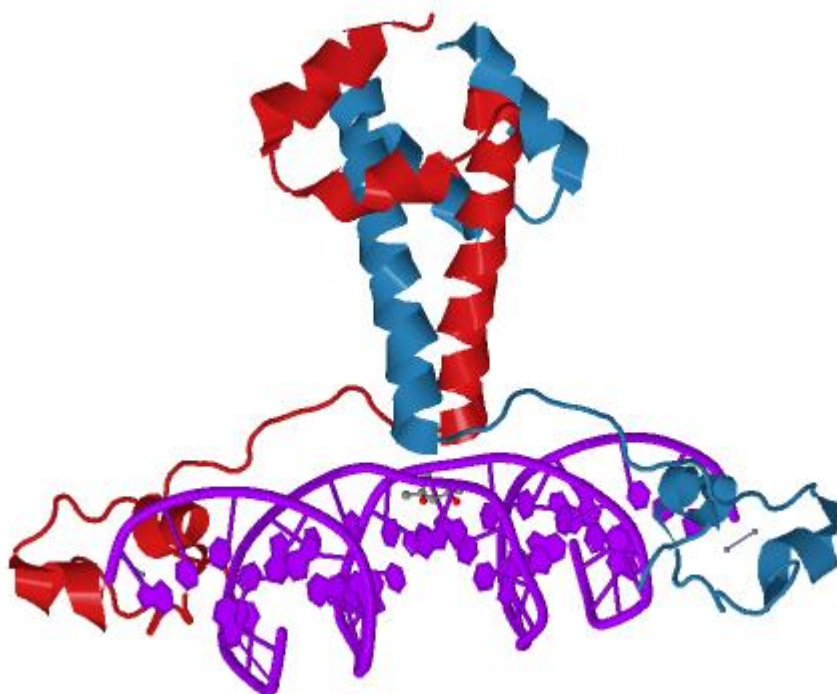
2.2.4 Transkripční faktory u hub

Podle informací z roku 2008 obsahovala databáze SUPERFAMILY 12 „super rodin“ proteinů interagujících s DNA, nalezených u zástupců z říše hub. Databáze PFAM obsahovala 37 proteinových domén nalezených u transkripčních faktorů hub (Shelest, 2008). Přehled všech „super rodin“ a PFAM domén typických pro transkripční faktory, které byly identifikovány u hub, se nachází v tabulce (Tab. 1). Většina ze zástupců proteinů hub v obou databázích však byla ve skupině i s proteiny nalezenými u zástupců z jiných říší, avšak byly identifikovány i motivy typické jenom pro říši hub (Tab. 2).

Největší skupinou transkripčních faktorů, které můžeme najít pouze u hub, jsou proteiny, u kterých můžeme najít motiv zinkového klastru (Shelest, 2008). Tento proteinový vazebný motiv patří mezi zinkové prsty a stejně jako ostatní proteiny skupiny obsahuje koordinačně vázané ionty zinku (Krishna *et al.*, 2003). V tomto případě je motiv složen ze dvou iontů zinku vázaného pomocí šesti postranních

řetězců cysteinů do zinkového binukleárního klastru. Z toho důvodu je motiv velmi často označován, jako Zn2Cys6 motiv (MacPherson *et al.*, 2006). Jedním z prvních objevených transkripčních faktorů s tímto motivem je aktivátor metabolismu galaktosy GAL4 (Obr. 4) z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Pan a Coleman, 1990). Zn2Cys6 vazebný motiv byl později nalezen i u vláknitých hub. Jako příklad je možné uvést transkripční faktor zapojený v regulaci metabolismu inulinu InuR u organismu *Aspergillus niger* (Yuan *et al.*, 2008) nebo transkripční faktor BglR zapojený v regulaci genu pro enzym β -glukosidasu u organismu *Trichoderma reesei* (Nitta *et al.*, 2012).

Další skupinou transkripčních faktorů, které se vyskytují pouze u hub, jsou proteiny z APSES rodiny, která je pojmenovaná po svých prvních identifikovaných členech (ASM-1, Phd1, StuA, EFGTF-1 a Sok2). Vazebný motiv těchto transkripčních faktorů můžeme zařadit k helix-smyčka-helix typu proteinů interagujících s DNA. Proteiny APSES rodiny jsou obvykle zapojené v regulaci vývoje hub, např. při sporulaci nebo diferenciaci buněk (Ramírez-Zavala a Domínguez, 2008). Společným znakem všech APSES proteinů je vysoce zachovaná sekvence 97 aminokyselin u všech zástupců rodiny (Dutton *et al.*, 1997).



Obr. 4 Obrázek strukturního motivu Zn2Cys6 proteinu GAL4. Dostupné z <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3COQ> (10.4.2016) (Hong *et al.*, 2008).

Tab. 1 Tabulka PFAM domén a super rodin, které se vyskytují u transkripčních faktorů hub.

	Kód v databázi
PFAM domény	
APSES rodina	PF02292
Bakteriální THT protein	PF00165
BED zinkový prst	PF02892
bZIP TF 1	PF00170
C2H2 zinkový prst	PF00096
C5H2 zinkový prst	PF02928
CCAAT-vázající TF podjednotka	PF02045
CCR4 Not1	PF04054
CP2 TF	PF04516
DDT doména	PF02791
Doména podobná Myb	PF00249
Doména podobná TFIID C1	PF07975
FMN vázající doména	PF04299
GATA zinkový prst	PF00320
GRF zinkový prst	PF06839
Helix-otočka-helix	PF01381
Helix-otočka-helix Psq doména	PF05225
Helix-smyčka-helix	PF00010
Homeobox	PF00046
HSF DNA vázající typ	PF00447
MAT α 1 aktivátor	PF04769
MIZ zinkový prst	PF02891
NDT80/PhoG podobná doména	PF05224
NF-X1 zinkový prst	PF01422
PAS ohyb	PF00989
Pro houby specifická TF doména	PF04082
RFX DNA vazebná doména	PF02257
SART-1 rodina	PF03343
SGT1 protein	PF07093
STE podobný TF	PF02200
TEA/ATTS doména	PF01285
Typ SRF	PF00319
Vidlicovitá doména	PF00250
YL1 jaderný protein	PF05764
Základní leucinový zip 2	PF07716
Zinkový kloub	PF00098
Zn2Cys6 binukleární klastr	PF00172
Super rodiny	
C2H2 a C2HC zinkové prsty	57667
Doména okřídleného helixu	46785
Doména podobná glukokortikoidovému receptoru	57716
Doména podobná λ represoru	47413
Helix-smyčka-helix	47459
Homeodoména	46689
Mlu1-box vázající protein	54616
Nukleové kyseliny vázající protein	50249
p53	49417
SRF	55455
Zinková doména kvasinek pro regulaci mědi	57879
Zn2/Cys6 DNA vazebná doména	57701

Tab. 2 Tabulka PFAM domén a superodín, které se vyskytují pouze u transkripčních faktorů hub.

	Kód v databázi
PFAM domény	
APSES rodina	PF02292
MAT α 1 aktivátor	PF04769
Pro houby specifická TF doména	PF04082
Zn2Cys6 binukleární klastr	PF00172
Super rodiny	
Mlu1-box vázající protein	54616
Zinková doména kvasinek pro regulaci mědi	57879
Zn2/Cys6 DNA vazebná doména	57701

Jako příklad lze uvést StuA protein, který ovlivňuje tvorbu spor u *Aspergillus niger* (Miller *et al.*, 1992).

V genomu *C. purpurea* bylo identifikováno celkem 1214 genů kódujících potencionální transkripční faktory a jiné regulátory genové exprese. Jiné regulátory genové exprese představují proteiny, které nemusí nutně fyzicky interagovat s DNA, ale podílejí se na regulaci exprese genů (Majeská Čudejková *et al.*, 2016). Jedním z transkripčních faktorů známých v *C. purpurea* je například protein kódovaný genem *cptf1*. Jde o bZIP (základní leucinový zip protein) transkripční faktor. Experimentálně bylo zjištěno, že CPTF1 ovlivňuje gen *cpct1*, zodpovědný za produkci katalas, a tím i odpověď organismu na oxidativní stres. Kromě toho ovlivňuje i virulenci. (Nathues *et al.*, 2004).

2.3 Sekundární metabolismus u hub

Produkty sekundárního metabolismu hub – sekundární metabolity jsou obvykle nízkomolekulární látky. Jejich prekursory velmi často pochází z drah primárního metabolismu (Keller *et al.*, 2005). Jako příklad lze uvést námelové alkaloidy a jejich prekurzor L-tryptofan (Floss, 1976). Sekundární metabolity na rozdíl od metabolitů primárních nejsou pro růst organismu, který je vytváří, nezbytně nutné (Brakhage 2013). Dále je pro sekundární metabolity typické, že se v organismu vyskytují pouze v určité fázi životního cyklu a v konkrétním buněčném typu, zatímco v ostatních typech buněk se nevyskytují. Velmi často je u hub tato fáze spojena se vznikem spor. Tímto se sekundární metabolity odlišují od primárních metabolitů, které jsou obvykle přítomny ve všech typech buněk organismu. (Calvo *et al.*, 2002).

Význam sekundárních metabolitů pro houbu samotnou je zatím v mnoha případech nejasný. Výzkumy některých sekundárních metabolitů hub ukázaly, že

mnohé z nich jsou látky toxické pro řadu různých organismů např. bakterie, jiné houby ale i vyšší obratlovce. Nejhojněji se sekundární metabolity hub využívají ve farmaceutickém průmyslu. Stejně jako je široké spektrum chemických sloučenin, které patří mezi sekundární metabolity hub, je i široké spektrum jejich působení. K velmi častým účinkům patří zabránění růstu konkrétních skupin organismů nebo buněk (např. bakterií, nádorových buněk, hub, virů, některých parazitů a dalších), čehož se využívá pro výrobu celé řady léčiv (Peláez, 2004). Jako jeden z pravděpodobných důvodů produkce sekundárních metabolitů houbou se udává, že mohou poskytovat konkurenční výhodu oproti ostatním organismům, které se vyskytují ve stejném prostředí a houbě konkurují (Fox a Howlett, 2008). Jako příklad lze uvést i první využívané antibiotikum penicilin z organismu *Penicillium chrysogenum*, které inhibuje růst mnoha druhů bakterií (Fleming, 1929). Další pravděpodobnou funkcí sekundárních metabolitů hub může být obrana před predátory. Příkladem může být *Aspergillus nidulans*, u kterého sekundární metabolity zabezpečují rezistenci proti fungivorním chvostoskokům. (Rohlfis *et al.*, 2007).

2.3.1 Role transkripčních faktorů v regulaci sekundárního metabolismu hub

Stejně jako všechny procesy v živých organismech je i syntéza sekundárních metabolitů přísně kontrolována. Geny zapojené do biosyntézy sekundárních metabolitů u vláknitých hub bývají velmi často seřazeny vedle sebe na chromosomu a tvoří tak klastr genů (Keller a Kohn, 1997). Takové uspořádání genů usnadňuje regulaci celé metabolické cesty. Tyto klastry genů velmi často obsahují také gen kódující transkripční faktor, který reguluje expresi genů v klastru (Hoffmeister a Keller, 2007). Nejčastěji se vyskytujícím typem transkripčních faktorů v genových klastrech pro biosyntézu sekundárních metabolitů jsou proteiny s motivem zinkového klastru (Shwab a Keller, 2008). Jedním z takovýchto transkripčních faktorů je například gen *aflR*, který je součástí klastru pro biosyntézu mykotoxinu aflatoxinu u *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* a sterigmatocystinu u *Aspergillus nidulans* (Woloshuk *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1996; Fernandez *et al.*, 1998; Price *et al.*, 2006). Gen *aflR* kóduje transkripční faktor s motivem zinkového klastru, konkrétně Zn(II)₂Cys₆ zinkový binukleární protein. Mutanti s defektním genem *aflR* neprodukují aflatoxin/sterigmatocystin a nedochází

u nich ani k expresi genů aflatoxin/sterigmatocystin klastru (Yu *et al.*, 1996). Avšak tento transkripční faktor nereguluje expresi genů jen v rámci klastru, ve kterém se nachází, ale může regulovat i transkripci genů mimo klastr (Price *et al.*, 2006).

Produkce sekundárních metabolitů ale není kontrolována pouze klastr specifickým transkripčním faktorem. V některých klastrech genů pro sekundární metabolity transkripční faktor zatím nebyl ani nalezen (Brakhage, 2013). Biosyntéza sekundárních metabolitů bývá také regulována různými exogenními signály, jako např. množství dusíku, sacharidů, pH (Shwab a Keller, 2008). Transkripční faktory zprostředkující tyto environmentální signály nebývají součástí genového klastru a jsou to například *AreA* (reakce na koncentraci dusíku v prostředí) (Hynes, 1975) a nebo *PacC* (reakce na pH prostředí) (Tilburn *et al.*, 1995). Je známo, že *PacC* reguluje biosyntézu penicilinu u *Aspergillus nidulans* v závislosti na pH prostředí přičemž v alkalickém prostředí je produkce penicilinu vyšší (Shah *et al.*, 1991; Martín, 2000).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Všechny experimenty byly prováděny s divokým kmenem *C. purpurea* 20.1.

Pro transformace *C. purpurea* byla použita DNA získaná z plasmidů následujících bakterií, které byly připraveny Michaelou Hradilovou (2016).

Escherichia coli s plasmidem pNDH-OCT::CPUR01124

Escherichia coli s plasmidem pNDH-OCT::CPUR05433

Escherichia coli s plasmidem pRS::CPUR01124

Escherichia coli s plasmidem pRS::CPUR05433

Dále byl použit mutant *C. purpurea* nadprodukující mCherry. Mutant byl připraven Michaelou Hradilovou (2016).

Claviceps purpurea OE::mCherry

3.1.2 Chemikálie

Pro experimenty a přípravu médií a roztoků byly použity následující chemikálie:

Agarosa (HiMédia, ČR)

Ampycilin (Sigma-Aldrich, USA)

Bromid ethidia (NeoLab, Německo)

Dihydrogenfosforečnan draselný (AppliChem, Německo)

DMSO (Duchefa, Nizozemsko)

DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo scientific, USA)

D-sorbitol (Duchefa, Nizozemsko)

EDTA (Penta, ČR)

Ethanol (Penta, ČR)

Gamborg B5 (Duchefa, Nizozemsko)

Heptahydrát síranu hořečnatého (Penta, ČR)

Heptahydrát síranu zinečnatého (NeoLab, Německo)

Heptahydrát síranu železnatého (NeoLab, Německo)

Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)

Hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR)

Hydroxid sodný (Penta, ČR)

Hygromycin (Roche, Švýcarsko)
Chlorid draselný (Lach-Ner, ČR)
Chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)
Chlorid vápenatý (Penta, ČR)
IPTG (Duchefa, Nizozemsko)
Isopropanol (Lach-Ner, ČR)
Kvasinková extrakt (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina citronová (Lachema, ČR)
Kyselina citronová (NeoLab, Německo)
Kyselina chlorovodíková 36 % (Lachema, ČR)
LB Broth (Luria low salt) (Sigma-Aldrich, USA)
Lyzační enzym z *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich, USA)
Octan draselný (Penta, ČR)
PEG 6000 (AppliChem, Německo)
Pepton (Merck, Německo)
Phleomycin (InvivoGen, USA)
Sacharosa (Lach-Ner, ČR)
SDS (Lachema, ČR)
Tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Penta, ČR)
Tris (Duchefa, Nizozemsko)
Xgal (Duchefa, Nizozemsko)
 α -Asparagin mono hydrát (HiMédia, ČR)

Pro PCR byly použity následující látky:

5x Green GoTaq Flexi pufr (Promega, USA)
dNTPs (Fermentas, Kanada)
GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo scientific, USA)
GoTaq 2G Flexi DNA polymerasa (Promega, USA)
Chlorid hořečnatý (Promega, USA)
Nuclease-free voda (Promega, USA)
Primery (Sigma-Aldrich, USA)

Pro štěpení plasmidové DNA byly použity následující enzymy a pufr:

BamHI-HF (BioLabs, USA)
CutSmart pufr (BioLabs, USA)

EcoRI-HF (BioLabs, USA)

HindIII-HF (BioLabs, USA)

3.1.3 Komerční kity

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo)

PureYield Plasmid Midiprep System (Promega, USA)

3.1.4 Roztoky a média

1% (w/v) agarosový gel - 4 g agarosa, 400 ml TAE pufr

BII agar (pH 5,2-6) - 100 g sacharosa, 5 g pepton, 5 g L-asparagin monohydrát, 1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, 12 g agarosa, doplněno do 1 l destilovanou vodou, upraveno pH na 5,2-6, autoklávováno

BII médium pro kultivaci (pH 5,2-6) - 100 g sacharosa, 5 g pepton, 5 g L-Asparagin monohydrát, 1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, upraveno pH na 5,2-6, autoklávováno

BII médium pro transformaci (pH 8) - 40 g sacharosa, 1 g pepton, 1 g L-Asparagin monohydrát, 0,2 g hydrogenfosforečnan draselný, 0,1 g síran hořečnatý heptahydrát, 2,4 g agarosa, doplněno do 200 ml destilovanou vodou, upraveno pH na 8, autoklávováno

Gamborgovo médium – 3,05 g Gamborgova B5 média, 10 g glukosa, 7,5 g agarosa, doplněno do 1 l destilovanou vodou

Hoechst barvivo – 5 mg Hoechst 33258, 10 ml McIlvaine pufru

IPTG roztok – 23,8 mg IPTG, rozpuštěno v 1 ml destilované vody, sterilizace filtrací

KAc roztok – 39,25 g octan draselný, doplněno do 80 ml destilovanou vodou

Lyzační pufr – $200\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,5, $250\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid sodný, $25\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, 5 g SDS, doplněno do 100 ml

Mantle agar – 100 g sacharosa, 10 g L-asparagin, 1 g dusičnan vápenatý, 0,25 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,25 g heptahydrát síranu hořečnatého, 0,125 g chlorid draselný, 0,033 g heptahydrát síranu železnatého, 0,027 g heptahydrát síranu zinečnatého, 0,01 g L-cystein, 0,1 g kvasinkový extrakt, 20 g agarosa, doplněno do 1 l, upraveno na pH 5,2, autoklávováno

McIlvaine pufr – 17,39 ml $0,2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrogenfosforečnan sodný, 2,61 ml $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny citronové, upraveno na pH 7,2

PEG roztok – 7,5 g PEG 6000, $0,05\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid vápenatý, $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, doplněno do 30 ml destilovanou vodou, sterilizace filtrací

Roztok lyzačního enzymu – 100 mg lyzační enzym z *Trichoderma harzianum*, 20 ml SMaC pufru, sterilizace filtrací

SMaC pufr – $0,05\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid sodný, $0,85\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ D-sorbitol, $0,2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ malát draselný, autoklávováno

SOC médium – 20 g trypton, 5 g kvasinkový extrakt, 5 g chlorid sodný, rozpuštěno v 950 ml destilované vody, přidáno 10 ml $250\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid draselný pH 7, doplněno do 1 l, autoklávováno, přidáno 20 ml $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ glukosa a 5 ml $2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid hořečnatý

STC roztok – $0,85\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ D-sorbitol, $0,01\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, $0,05\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chlorid vápenatý, upraveno na pH 7,5 a autoklávováno

TAE pufr – $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, $40\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-acetát, upraveno na pH 8

Tekuté BII médium - 100 g sacharosa, 5 g pepton, 5 g L-Asparagin monohydrát, 1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, upraveno pH na 5,2-6, autoklávováno

Tekuté LB médium - 15,5 g LB Broth (Luria low salt), 9,5 g chlorid sodný, doplněno do 1 l destilovanou vodou, autoklávováno

Tuhé LB médium - 15,5 g LB Broth (Luria low salt), 9,5 g chlorid sodný, 15 g agarosa, doplněno do 1 l destilovanou vodou, autoklávováno

Xgal roztok – 20 mg Xgal, rozpuštěno v 1 ml DMSO

3.1.5 Sekvence primerů

Pro reakce PCR byly použity tyto primery:

CP_poliC_fw	5'-GTCTCCGACTTGGACTGAGC-3'
dia_CPUR01124_fw	5'-GAAGGTTTCATGTCAGTCCGC-3'
dia_CPUR01124_rev	5'-TCCCTATTTCCACCACCACC-3'
dia_CPUR01124_WT_fw	5'-CATAGTTGATGCTGGGACGC-3'
dia_CPUR05433_fw	5'-GGAGGTAGGTAGTGCGTTGT-3'
dia_CPUR05433_rev	5'-TTGCGGACACAAAGAGAAGC-3'
dia_CPUR05433_WT_fw	5'-GACGACGTACATGGAGGACA-3'

phleo_Hi3F2	5'-GTGTTCAAGATCTCGATAAGATAC G-3'
phleo_out_HeFe3	5'-GAGCTCGGTATAAGCTCTCC-3'
TtubSR1	5'-GAGGTGTGAGCATGGAAGTGATG-3'

Všechny primery byly rozpuštěny v Nuclease-free vodě podle doporučení výrobce, tak aby byla výsledná koncentrace $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro PCR reakci byly použity naředěné zásobní roztoky primerů o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.1.6 Pomůcky a přístroje

Bürkerova komůrka (Marienfield, Německo)
 Centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene, Dánsko)
 Elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)
 Elektromagnetická míchačka (Boeco, Německo)
 Epifluorescenční mikroskop Axio Imager M2 (Zeiss, Německo)
 Filtr $0,22 \mu\text{m}$ (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko)
 Flowbox (MERCY, ČR)
 Gel Doc EZ System (Bio Rad, USA)
 Inkubátor (Mettler, Německo)
 Lyofilizátor SeduVac (LaboGene, Dánsko)
 Megafufa Heraeus 40R (Thermo scientific, USA)
 Mikroskop Olympus CX21FS3 (Olympus, Japonsko)
 Myraclothová membrána (Calbiochem, ČR)
 NanoDrop NAS 99 spektrofotometr (ACT, USA)
 Termoblok (BIOER, Čína)
 Termocykler T-gradient (Biometra, Německo)
 Třepačka Orbit 1000 (Labnet, USA)
 UV transiluminátor (East Port Scientific, ČR)
 Vortex (Labnet, USA)
 Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

3.2 Metody

Všechna práce s *C. purpurea* probíhala ve flowboxu. Pro transformace byl použit kmen *C. purpurea* 20.1, který byl pěstován na BII agaru v inkubátoru při teplotě 26°C.

3.2.1 Izolace plasmidové DNA

Do 5 ml tekutého LB média s Ampicilinem ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bylo přidáno 20 μl kultury *Escherichia coli* s vybraným plasmidem (pNDH-OCT::CPUR01124 nebo pNDH-OCT::CPUR05433 pro přípravu nadprodukcčních mutantů a pRS::CPUR01124 nebo pRS::CPUR01124 pro přípravu delečních mutantů). Médium s kulturou bylo kultivováno po dobu 16 h při 37 °C a za třepání při 180 rpm. Poté bylo 400 μl této směsi přidáno do 200 ml nového LB média s Ampicilinem ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Vzniklé médium s kulturou vybraného plasmidu bylo kultivováno po dobu 16 h při teplotě 37 °C a za třepání při 180 rpm. Plasmid byl izolován pomocí kitu PureYield Plasmid Midiprep System podle návodu výrobce.

3.2.2 Štěpení plasmidové DNA pomocí restrikčních enzymů

Získaná plasmidová DNA byla štěpena pomocí restrikčních endonukleas. Plasmid pNDH-OCT::CPUR01124 byl štěpen pomocí enzymu EcoRI-HF, plasmid pNDH-OCT::CPUR05433 byl štěpen enzymem BamHI-HF a HindIII-HF, plasmid pRS::CPUR01124 byl štěpen pomocí enzymu Bam-HF a plasmid pRS::CPUR01124 byl štěpen enzymem EcoRI-HF. Restrikční směs byla vytvořena podle návodu výrobce, s odpovídajícím množstvím CutSmart pufru, enzymu a plasmidové DNA podle celkového objemu reakce. Restrikční směs byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C a ověřena pomocí elektroforetické separace.

3.2.3 Elektroforéza v agarosovém gelu

Pro ověření úspěšnosti polymerasové řetězové reakce (PCR) a restrikce plasmidové DNA pomocí restrikčních enzymů byla použita elektroforéza v agarosovém gelu. Restrikční nebo PCR směs byla obarvena pomocí DNA Gel Loading Dye (6x) podle pokynů výrobce a tato směs byla napipetována do 1% agarosového gelu, který obsahoval 10 μl 0,5% roztoku bromidu ethidia na 100 ml agarosového gelu. Pro určení velikosti fragmentů DNA byl použit GeneRuler 1 kb plus DNA ladder. Elektroforetická separace fragmentů DNA probíhala v elektroforetické komůrce v 1x

TAE pufru po dobu 40 min při napětí 120 V. Vizualizace elektroforetické separace DNA byla provedena pomocí UV transiluminátoru.

3.2.4 Purifikace naštěpené DNA

Vybraný DNA fragment byl po elektroforetické separaci vyříznut z agarosového gelu na UV transiluminátoru pomocí sterilního skalpelu. Z vyříznutého kousku agarosového gelu byla DNA vyizolována pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up podle pokynů výrobce. DNA z restrikční směsi byla izolována stejným kitem. Koncentrace a čistota DNA byla změřena pomocí přístroje NanoDrop.

3.2.5 Příprava protoplastů pro transformaci *C. purpurea*

Tekutá kultura *C. purpurea* určená pro transformaci byla připravena dva dny předem, třetí den byla provedena samotná transformace. Pro napěstování tekuté kultury *C. purpurea* bylo použito mycelium rostoucí na BII agaru, ze kterého bylo vyřezáno 6-8 čtverečků mycelia o rozměrech asi 2 až 2,5 mm, které byly přidány do 50 ml BII média pro kultivaci v 250 ml velké Erlenmeyerově baňce. Erlenmeyerova baňka byla zakryta hliníkovou fólií a tekutá kultura byla poté inkubována dva dny při teplotě 28°C a 180 rpm.

V den transformace byla napěstovaná kultura *C. purpurea* centrifugována 10 min při 3500 rpm při pokojové teplotě, supernatant byl odebrán a pelet byl přemyt pomocí 20 ml SMaC pufru. Promytý pelet byl opětovně centrifugován 10 min při 3500 rpm při pokojové teplotě. Supernatant byl odlit a k peletu byl přidán roztok lyzačního enzymu. Pelet byl opatrně rozsuspendován v roztoku lyzačního enzymu a vzniklá směs byla 1 h třepána při 80 rpm a teplotě 28 °C. Následně byla směs přefiltrována přes Miracloth membránu. Filtrát byl stočen při 2000 rpm po dobu 10 min při teplotě 6 °C. Pelet byl dvakrát promyt pomocí 5 ml STC pufru. V obou případech byl stočen při 2000 rpm po dobu 10 min při teplotě 6 °C. Pelet byl opatrně rozsuspendován v 1 ml STC pufru. Pomocí Bürkerovy komůrky a mikroskopu byla určena koncentrace protoplastů a poté byla upravena na koncentraci $5 \cdot 10^8$ protoplastů v 1 ml.

3.2.6 Transformace protoplastů *C. purpurea*

Protoplasty byly transformovány za účelem přípravy delečních nebo nadprodukčních mutantů vybraného genu. Pro selekci nadprodukčních mutantů bylo použito antibiotikum Hygromycin a pro selekci delečních mutantů bylo použito antibiotikum

Phleomycin. Transformace protoplastů probíhala v 15 mililitrových zkumavkách, do kterých bylo napipetováno 5-10 μg DNA (maximální objem 10 μl), přičemž roztok DNA byl doplněn do 100 μl pomocí STC pufru. K této směsi bylo přidáno 50 μl PEG roztoku a 100 μl protoplastů a pak následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 20 min. Následně byly ke směsi přidány 2 ml PEG roztoku, inkubace 5 min. Poté byly k transformační směsi přidány 4 ml STC pufru.

Při použití antibiotika Hygromycin bylo předem připravené BII médium pro transformaci (vždy 200 ml) ochlazeno po autoklávování na teplotu 50 °C. Do první Petriho misky označené jako kontrola protoplastů bylo umístěno 20 ml BII média pro transformaci, které obsahovalo 11 μl připravených protoplastů. V druhé Petriho misce označené jako kontrola transformace i ve všech ostatních Petriho miskách bylo promícháno 690 μl transformační směsi s 20 ml BII média pro transformaci. Po ztuhnutí média ve všech připravených Petriho miskách byly Petriho misky kultivovány při teplotě 26 °C po dobu 2 dnů. Poté byly všechny Petriho misky kromě kontroly transformace a kontroly protoplastů přelity 10 ml BII média pro transformaci s Hygromycinem o koncentraci v médiu 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Petriho misky byly inkubovány při teplotě 26 °C. Pokud byla na Petriho miskách s kontrolou protoplastů a kontrolou transformace přítomna mycelia, byla mycelia z ostatních 8 Petriho misek přenesena na nové Petriho misky s BII agarem s koncentrací antibiotika (Hygromycin) 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V opačném případě byla transformace opakována.

Při použití antibiotika Phleomycin bylo předem připravené BII médium pro transformaci bylo ochlazeno po autoklávování na teplotu 50 °C. Do první Petriho misky označené jako kontrola protoplastů bylo rozmícháno v 20 ml BII média pro transformaci 11 μl roztoku protoplastů. V druhé Petriho misce označené jako kontrola transformace bylo promícháno 690 μl transformační směsi v 20 ml BII média pro transformaci. Následně bylo do zbylého množství BII média pro transformaci přidáno antibiotikum Phleomycin, tak aby konečná koncentrace antibiotika v médiu byla 33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do zbývajících Petriho misek sady bylo dáno vždy 20 ml BII média pro transformaci s antibiotikem a v něm bylo rozmícháno 690 μl transformační směsi.

Po ztuhnutí média v připravených Petriho miskách byly misky kultivovány při teplotě 26 °C. Pokud byla na miskách kontrola protoplastů a kontrola transformace přítomna mycelia, byla mycelia z ostatních 8 misek sady přenesena na nové Petriho

misky s BII agarem s koncentrací antibiotika (Phleomycin) 100 µg·ml⁻¹. V opačném případě byla transformace opakována.

3.2.7 Izolace genomické DNA

Za účelem získání templátové DNA pro PCR byla provedena izolace genomické DNA z vybraných mycelií. Přeočkovaná mycelia z Petriho misek s BII agarem s vybraným antibiotikem, která vykazovala rezistenci proti tomuto antibiotiku, byla označena a jejich vzorek byl přenesen do 1,5 mililitrových mikrozkuavek a lyofilizován.

Poté byly vzorky rozdrceny v tekutém dusíku. Ke každému takto homogenizovanému myceliu bylo přidáno 600 µl lyzačního pufu a mikrozkuavky byly několik minut intenzivně promíchávány. Ke směsi pak bylo přidáno 400 µl KAc roztoku, vzorky byly promíchány a inkubovány 15-20 min při -20 °C. Následovala centrifugace při 14 000 rpm po dobu 20 min při teplotě 4 °C. Supernatant byl přenesen do nových 2 mililitrových mikrozkuavek a byl k němu přidán 1 ml vychlazeného 100% isopropanolu. Směs byla několikrát promíchána a poté byla centrifugována při 14 000 rpm po dobu 30 min při teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a následovalo promytí peletu pomocí 300 µl 70% ethanolu, centrifugace při 14 000 rpm po dobu 5 min při teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn, pelet byl vysušen při pokojové teplotě a rozpuštěn ve 100 µl sterilní destilované vody.

3.2.8 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

PCR reakční směs pro potvrzení přítomnosti nadprodukčních mutantů byla nastavena podle tabulky Tab. 3 a PCR program podle tabulky Tab. 4. Jako templát byla použita genomická DNA obou nadprodukčních mutantů a primery CP_poliC_fw a TtubSR1. Pro potvrzení přítomnosti delečních mutantů vybraných genů byly provedeny tři PCR pro každý vzorek, reakce A, B a C. Reakční směsi pro PCR byly nastaveny podle Tab. 3, a PCR program pro gen *Cpur01124* podle Tab. 5 a pro gen *Cpur05433* podle Tab. 6.

Pro gen *Cpur01124* byly použity primery v reakční směsi:

- A) dia_CPUR01124_fw a phleoHi3F2
- B) phleo_Hefe3 a dia_CPUR01124_rev
- C) dia_CPUR01124_WT_fw a dia_CPUR01124_rev

Pro gen *Cpur05433* byly použity primery v reakční směsi:

- A) dia_CPUR05433_fw a phleoHi3F2

- B) phleo_Hefe3 a dia_CPUR05433_rev
- C) dia_CPUR05433_WT_fw a dia_CPUR05433_rev

Jako negativní kontrola byla použita Nuclease-free voda. Pro identifikaci nadprodukčních mutantů byly jako pozitivní kontrola použity plasmid pNDH-OCT::CPUR01124 pro gen *Cpur01124* a plasmid pNDH-OCT::CPUR05433 pro gen *Cpur05433*.

Výsledek PCR byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy, která probíhala po dobu 20 min.

Tab. 3 Reakční směsi pro PCR

Množství	Látka
7,43 µl	Voda (Nuclease-free)
2,5 µl	Flexi pufr (5x)
0,25 µl	Forward primer 10 µ mol·l ⁻¹
0,25 µl	Reverse primer 10 µ mol·l ⁻¹
0,25 µl	dNTP 10 µ mol·l ⁻¹
0,07 µl	GoTaq polymerasa (3,5 U)
1 µl	Templátová DNA (50-100 ng/µl)

Tab. 4 PCR program pro identifikaci nadprodukčních mutantů

Krok	Teplota	Doba trvání
1.	95°C	2 min
2.	95°C	30 s
3.	58°C	30 s
4.	72°C	3 min (krok 2-4 opakování 35x)
5.	72°C	5 min

Tab. 5 PCR program pro identifikaci delečních mutantů genu *Cpur01124*

Krok	Teplota	Doba trvání
1.	95°C	2 min
2.	95°C	30 s
3.	58°C	30 s
4.	72°C	1 min 15 s (krok 2-4 opakování 35x)
5.	72°C	5 min

Tab. 6 PCR program pro identifikaci delečních mutantů genu *Cpur05433*

Krok	Teplota	Doba trvání
1.	95°C	2 min
2.	95°C	30 s
3.	58°C	30 s
4.	72°C	1 min 30 s (krok 2-4 opakování 35x)
5.	72°C	5 min

3.2.9 Monosporická izolace nadprodukčních mutantů

Mycelia, u kterých byla pomocí PCR potvrzena přítomnost konstruktů pro nadprodukcí vybraných genů, byla přeočkována na Petriho misky s Mantle agarem a kultivována při teplotě 26°C po dobu 3 týdnů. Poté byly na misky nanесeny 3 ml nedestilované sterilní vody, která byla opatrně promíchána se sporamaи. Směs vody se sporamaи byla odebrána a přítomnost spor byla potvrzena pod světelným mikroskopem. Na Petriho miskách s BII agarem obsahujícím 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Hygromycinu byly přidány různé objemy odebraného roztoku spor (10 μl , 100 μl a 1000 μl), a tyto spory byly inkubovány týden při teplotě 26 °C. Po 1 týdnu byly z Petriho misek, na kterých byla mycelia narostlá jednotlivě, přeočkovány části mycelií na nové Petriho misky s tuhým BII médiem s antibiotikem o stejné koncentraci.

3.2.10 Potvrzení úspěšnosti transformace pomocí fluorescenční mikroskopie

Konstrukty pro tvorbu nadprodukčních mutantů obsahovaly gen pro protein mCherry. Na podložní sklíčko byla nanесena tenká vrstva Gamborgova média a na něj byl dán čtvereček mycelia vybraných nadprodukčních mutantů o rozměrech asi 2 až 2,5 mm. Mycelium bylo kultivováno po dobu 3 dnů při teplotě 26 °C v uzavřené nádobě s vlhkými papírovými ubrousky.

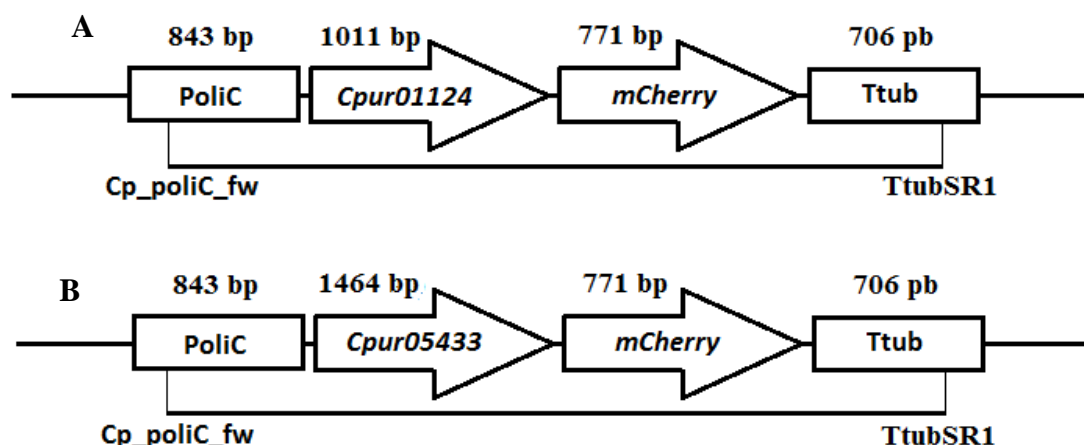
Mycelium bylo z preparátu odstraněno tak, aby hyfy, které vyrostly na Gamborgově médiu, zůstaly zachovány. Na vzorek bylo přidáno 10 μl 10 x ředěného Hoechst barviva, a pak byl vzorek zakryt krycím sklíčkem. Preparát byl pozorován pod fluorescenčním mikroskopem při vlnové délce 610 nm pro protein mCherry a při vlnové délce 461 nm pro Hoechst barvivo. Pro excitaci proteinu mCherry byla použita vlnová délka 587 nm a pro excitaci Hoechst barviva byla použita vlnová délka 350 nm. Pomocí kamery, která byla součástí mikroskopu, byly vytvořeny fotografie, které byly zpracovány v programu Zeiss ZEN Blue software (Ver.2010a).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci této bakalářské práce byli připravováni nadprodukční i deleční mutanti dvou genů u vláknité houby *C. purpurea*, divokého kmene 20.1. Oba vybrané geny *Cpur01124* a *Cpur05433* pravděpodobně kódují transkripční faktory. Jejich pravděpodobná funkce je založena na přítomnosti strukturních motivů v aminokyselinové sekvenci proteinů, které kódují, a které jsou typické pro transkripční faktory hub. Konkrétně protein kódovaný genem *Cpur01124* obsahuje motiv C2H2 a protein kódovaný genem *Cpur05433* obsahuje motiv Zn2Cys6 (<http://www.uniprot.org>, Schardl *et al.*, 2013). Studium mutantů s nefunkčním cílovým genem a mutantů nadprodukujících cílový gen/protein umožňuje studovat funkci cílového genu. Z toho důvodu, bylo účelem této bakalářské práce připravit mutanty genů *Cpur01124* a *Cpur05433* a pomoci tak při studiu jejich funkce.

4.1 Příprava nadprodukčních mutantů *C. purpurea*

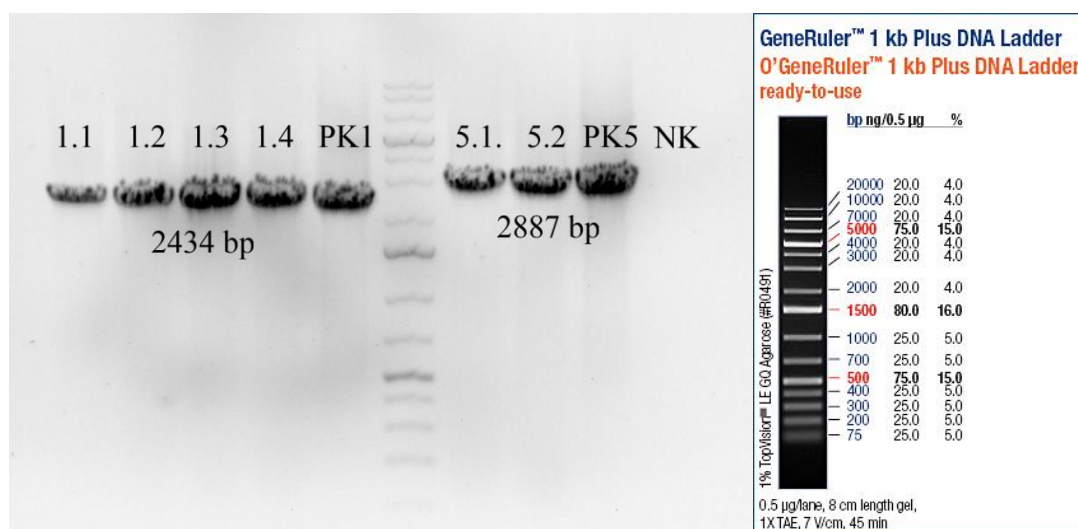
Při transformaci pomocí PEG (3.2.6) byl do protoplastů *C. purpurea* 20.1 vnesen purifikovaný (3.2.4) lineární konstrukt OE::CPUR01124 nebo OE::CPUR05433, který byl pomocí restrikčních enzymů vyštěpen (3.2.2) z vyizolované plasmidové



Obr. 5 Zjednodušené schéma konstruktů OE::CPUR01124 (A) a OE::CPUR05433(B) pro transformaci s cílem získání nadprodukčních mutantů vybraných genů s naznačením míst, kde nasedají primery pro PCR. Gen rezistence na antibiotikum není pomocí PCR amplifikován, a proto zde není uveden. PolIc označuje sekvenci použitého promotoru, na ni nasedá primer Cp_poliC_fw. Šipky označují vybrané geny nebo gen pro protein mCherry. Ttub představuje sekvenci terminátoru, na kterou nasedá primer TtubSR1. Vodorovná čára nad oběma primery označuje amplifikovanou sekvenci.

DNA (3.2.1). Z plasmidu pNDH-OCT::CPUR01124 byl vyštěpen konstrukt OE::CPUR01124 a z plasmidu pNDH-OCT::CPUR05433 byl vyštěpen konstrukt OE::CPUR05433. Oba konstrukty obsahovaly kromě vybraných genů fúzovaných s fluorescenčním proteinem mCherry, také gen pro rezistenci na Hygromycin. Vybraný gen s proteinem mCherry byl po transformaci produkován pod konstitutivním promotorem PoliC a byl použit terminátor Ttub (Obr. 5). Transformované protoplasty byly kultivovány na Petriho miskách se selekčním BII agarem s antibiotikem až do doby, kdy na povrch Petriho misek vyrostla mycelia, ta byla následně přeočkována na nové Petriho misky s BII agarem s antibiotikem (3.2.6).

DNA izolovaná (3.2.7) z mycelií, která i po přeočkování na nové Petriho misky vykazovala rezistenci proti antibiotiku, byla testována pomocí PCR (3.2.8), která sloužila pro ověření výskytu konstruktů v genomu mutanta. Pro PCR byly použity primery CP_poliC_fw a TtubSR1 (Obr. 5). Na záznamu z agarosové elektroforézy (3.2.3), která sloužila pro vizualizaci produktů reakcí PCR (Obr. 6), byl u pozitivních nadprodukčních mutantů přítomen jeden DNA fragment o velikosti 2434 bp pro nadprodukční mutanty genu *Cpur01124* a jeden DNA fragment o velikosti 2887 bp pro nadprodukční mutanty genu *Cpur05433*. Jako pozitivní kontrola byly použity plasmidy, ze kterých byly vyštěpeny konstrukty, použité při transformaci. Jako



Obr. 6 Elektroforetogram vizualizovaných fragmentů DNA amplifikovaných pomocí PCR. Vzorky 1.1-1.4 jsou nadprodukční mutanti genu *Cpur01124* a vzorky 5.1 a 5.2 jsou nadprodukční mutanti genu *Cpur05433*. PK1 je pozitivní kontrola pro mutanty genu *Cpur01124* a PK5 je pozitivní kontrola pro mutanty genu *Cpur05433*. NK označuje negativní kontrolu. Pro určení velikosti fragmentů DNA byl použit DNA ladder (na elektroforetogramu mezi PK1 a 5.1), ukázaný na pravé straně obrázku.

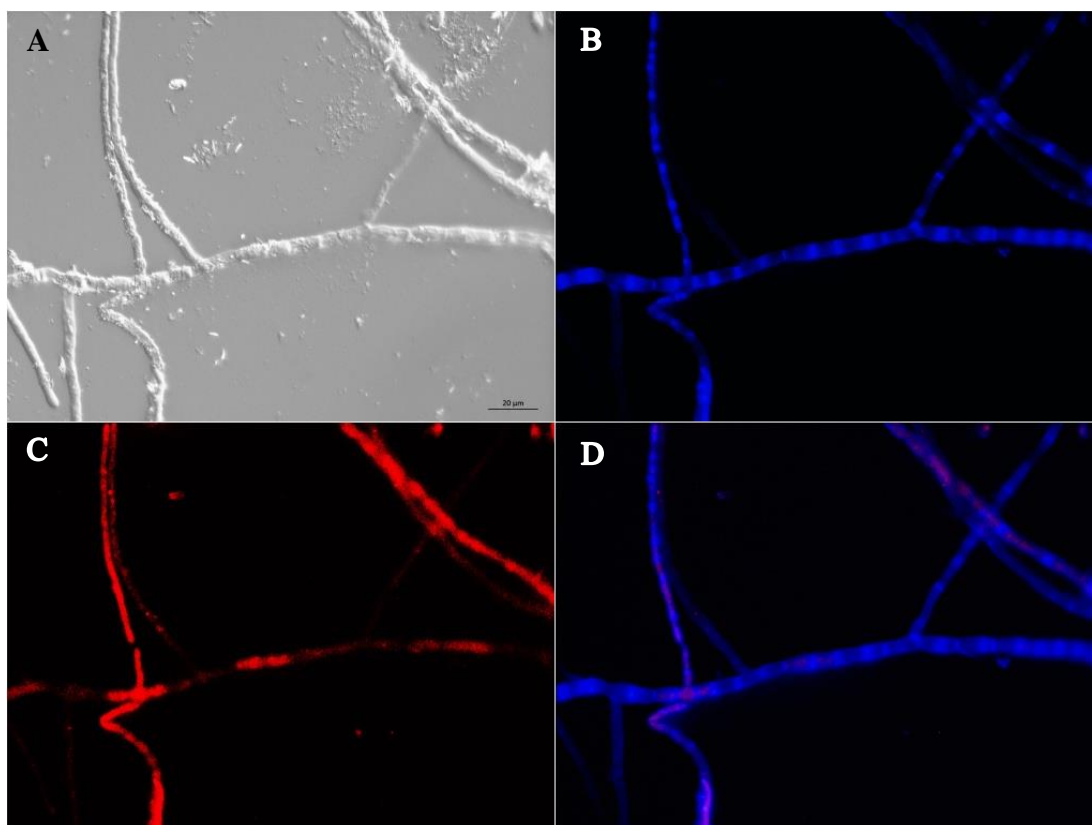
negativní kontrola byla použita Nuclease-free voda. PCR s cílem identifikovat nadprodukční mutanty byla provedena před i po monosporické izolaci (3.2.9), takže každý mutant byl zkontrolován alespoň dvakrát. Monosporická izolace sloužila pro získání mycelii s genetickou informací z jediného jádra. Protože zatímco spory *C. purpurea* jsou jednojaderné, hyfy tohoto organismu jsou heterokaryotní (Esser K. a Tudzinski, 1978). Celkem byli identifikováni čtyři nadprodukční mutanti genu *Cpur01124* a dva nadprodukční mutanti genu *Cpur05433*. Každý nadprodukční mutant byl pro další použití kultivován na BII agaru s Hygromycinem ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

4.1.1 Ověření funkčnosti vložených konstruktů pomocí fluorescenční mikroskopie

Za účelem ověření funkčnosti konstruktů vložených do genomu mutantů byl ve vzorcích připravených mutantů sledován výskyt proteinu mCherry (3.2.10). Pomocí fluorescenčního proteinu mCherry, který byl sledován u vyselektovaných nadprodukčních mutantů obou vybraných genů, bylo možné potvrdit i expresi vložených genů. Přítomnost proteinu mCherry, znamenala funkčnost vloženého konstruktů a tedy i nadprodukcí vybraných transkripčních faktorů (*Cpur01124* a *Cpur05433*).

Z nadprodukčních mutantů obou genů byly připraveny preparáty barvené Hoechst barvivem. Ty byly následně pozorovány pod světelným a fluorescenčním mikroskopem (3.2.11). Jako negativní kontrola, která měla vyloučit možnost autofluorescence, byl použit preparát připravený z divokého zástupce *C. purpurea* kmene 20.1. Jako pozitivní kontrola byl použit mutant pNDH-OCT::mCherry připravený Michaelou Hradilovou (Obr. 7). Přítomnost fluorescenčního proteinu mCherry byla potvrzena u všech pozorovaných vzorků (Obr. 8 C a G). U negativní kontroly nebyla pozorována autofluorescence, která by mohla komplikovat určování výskytu fluorescenčního proteinu mCherry ve vzorcích nadprodukčních mutantů.

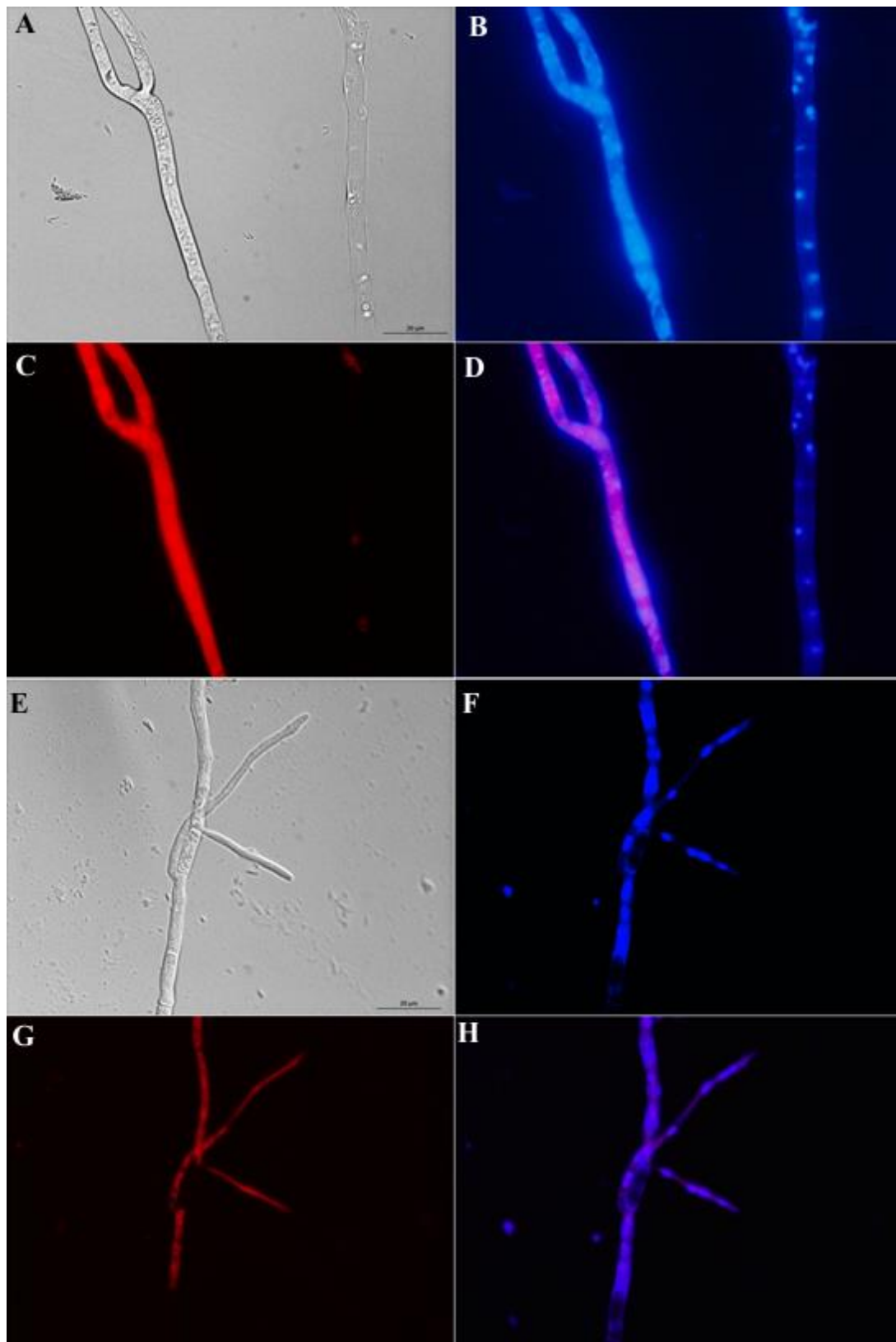
Provedené barvení pomocí barviva Hoechst 33258 při pH 7,2, které bylo použito pro zviditelnění jader, bohužel neobarvilo pouze jádra, ale i septa a buněčné stěny. V literatuře je zmínka o tom, že u starších hyf při tomto barvení nejsou jádra vždy zřetelně viditelná (Maheshwari, 2005). Navíc v závislosti na pH, při kterém bylo barvivo použito, může docházet kromě jader i k obarvení septa a buněčné stěny. Dále je možné, že použité pH může záviset i na druhu sledovaného organismu. Například u *Rhizoctonia solani* bylo jako optimální pro barvení jader určeno pH 7,26-7,44



Obr. 7 Na snímcích A, B, C, D jsou vybrané hyfy pozitivní kontroly. Měřítka na fotografii odpovídá 20 µm. Snímek A je zobrazení pod světelným mikroskopem. Snímky B, C, D ukazují hyfy pod fluorescenčním mikroskopem, B – pozorování při vlnové délce 461 nm (Hoechst), C - pozorování při vlnové délce 610 nm (mCherry) a D - překryv B a C.

(Kangatharalingam a Ferguson, 1984). Oproti tomu Hua'an *et al.* (1991) udávají, jako ideální pro barvení jader hodnotu pH 7,8 a jako ideální pro barvení sept hodnotu pH 10,5 pro všechny testované organismy.

V rámci této bakalářské práce se podařilo připravit několik linií nadprodukcí mutantů vybraných genů kódujících transkripční faktory. Identifikovat mutanty a potvrdit tak úspěšnost transformace se podařilo jak pomocí PCR, tak pomocí fluorescenční mikroskopie. Pomocí PCR byla dokázána přítomnost vneseného konstrukt v genomu mutanta. Fluorescenční mikroskopie zas prokázala, že vnesený konstrukt je funkční a u mutantů dochází jak k expresi vnesených genů, tak i k nadprodukcí žádaných proteinů. Získané mutanty je možné dále použít pro studium funkce obou genů, například pomocí pozorování fenotypu nebo virulence či průběhu infekce.



Obr. 8 Na snímcích A, B, C, D jsou vybrané hyfy nadprodukčního mutanta genu *Cpur01124*, fotografie E, F, G, H ukazují vybrané hyfy nadprodukčního mutanta genu *Cpur05433*. Snímky A a E jsou pořízeny pod světelným mikroskopem a snímky B, C, D, F, G, H jsou pořízeny pod fluorescenčním mikroskopem, B a F - při vlnové délce 461 nm (Hoechst), C a G - při vlnové délce 610 nm (mCherry), D - překryv obrázků B a C, H - překryv obrázků F a G. Měřítka na fotografii odpovídá 20 μm .

Recentně byla publikována studie, kde u *C. purpurea* byl nadprodukční mutant jednoho z vybraných genu (*Cpur05433*) použit pro objasnění funkce genového klastru, kterého je tento gen součástí. Tento genový klastr ovlivňuje zbarvení sklerocií. Zároveň bylo potvrzeno, že gen je transkripční faktor (Neubauer *et al.*, 2016).

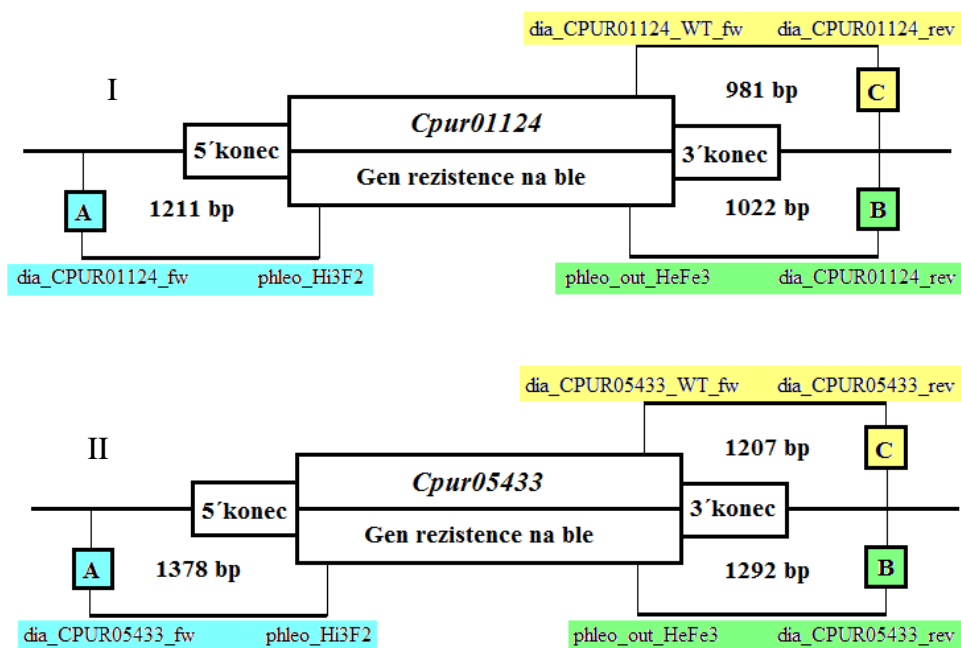
4.2 Příprava delečních mutantů *C. purpurea*

Příprava delečních mutantů, tj. mutantů s nefunkčním vybraným genem, je založena na principu homologní rekombinace. Tento proces může probíhat během meiosis i mitosis. Během meiosis homologní rekombinace zajišťuje výměnu homologních úseků mezi chromosomy rodičů a zajišťuje tak variabilitu potomstva a vznik nových kombinací genů. Během mitosis pak homologní rekombinace, jako jeden z opravných mechanismů, které mají zajistit stabilitu uchovávané genetické informace, zajišťuje opravu poškozené DNA. Umožňuje opravu poškozené dvoušroubovice DNA podle homologních sekvencí (Filippo *et al.*, 2008). Homologní rekombinace během mitosis (opravy DNA) se využívá pro přípravu delečních mutantů, kdy díky počátečním a koncovým (homologním) sekvencím genu obsažených v konstruktě by při transformaci mělo dojít k náhradě genu za vnesený konstrukt.

4.2.1 Transformace protoplastů

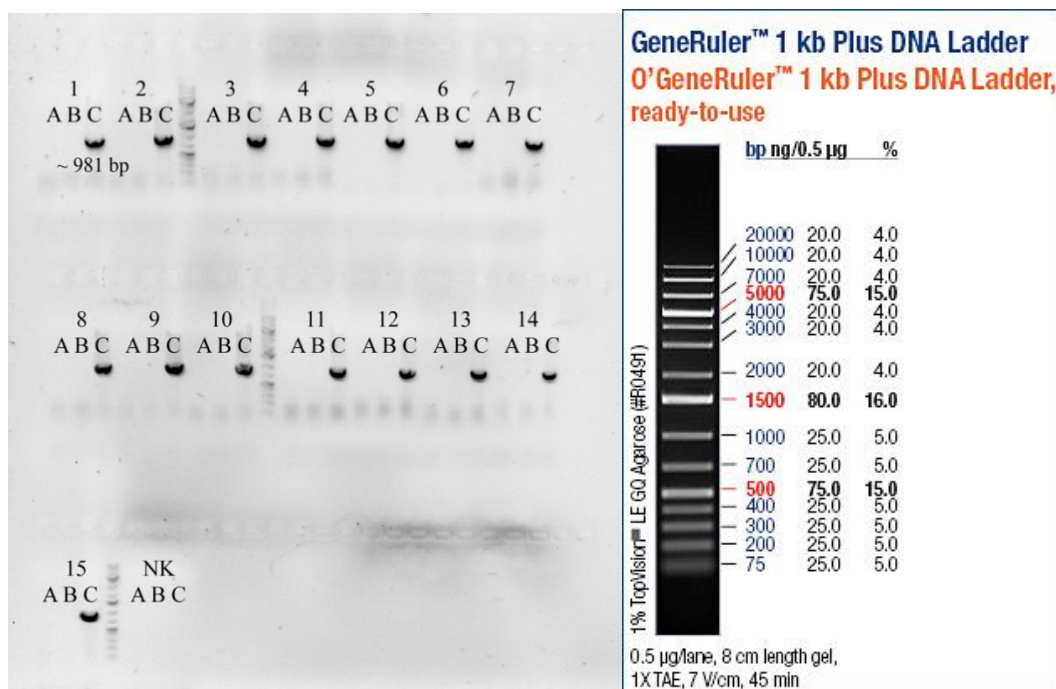
Pomocí restrikčních enzymů byl z vyizolovaných plasmidů (3.2.1) vyštěpen (3.2.2) lineární konstrukt KO::CPUR01124 (z plasmidu pRS::CPUR01124) nebo KO::CPUR05433 (z plasmidu pRS::CPUR05433). Konstrukt vždy obsahuje počáteční (5') i koncovou (3') sekvenci požadovaného genu, ten je však nahrazen genem pro rezistenci na antibiotikum Phleomycin (Obr. 9). Toto uspořádání má zajistit začlenění konstruktů na přesně definované místo v genomu dle principu homologní rekombinace. Konstrukty byly připraveny Michaelou Hradilovou.

Bylo provedeno několik transformací protoplastů *C. purpurea* (3.2.6) oběma konstrukty. Následovala kultivace transformovaných protoplastů v Petriho miskách se selekčním BII agarů s antibiotikem Phleomycinem. Mycelia, která vyrostla z transformovaných protoplastů, byla přeočkována na nové Petriho misky se selekčním BII agarů.



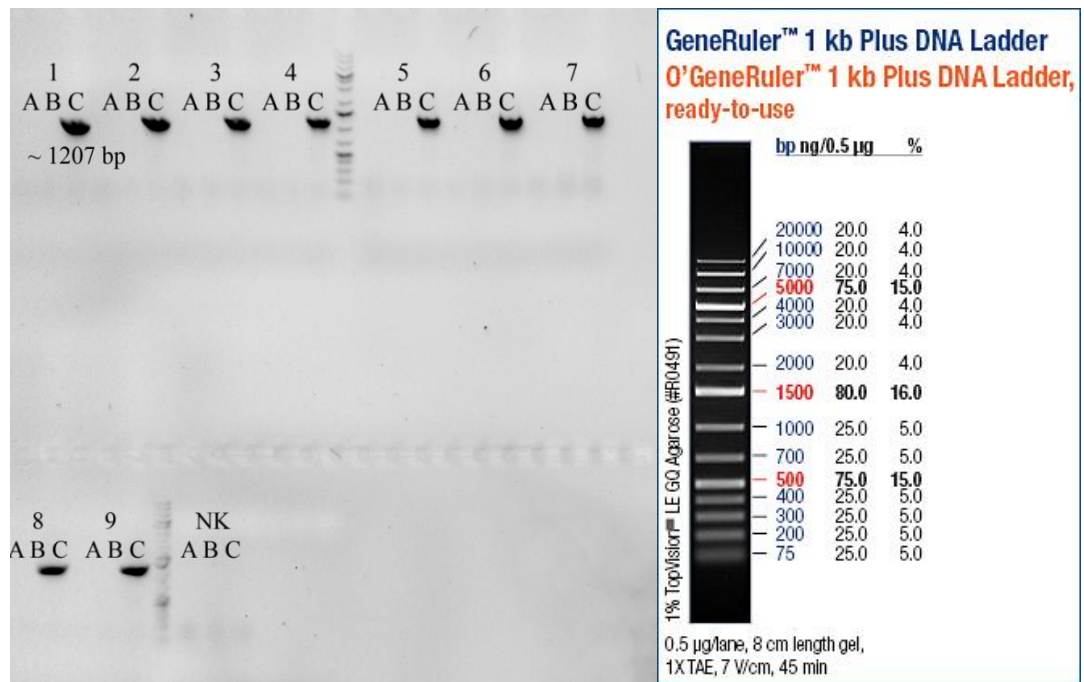
Obr. 9 Zjednodušené schéma konstruktů KO::CPUR01124 (I) a KO::CPUR05433 (II) pro přípravu delečních mutantů vybraných genů, včetně místa nasedání primerů a velikosti produktů PCR. Modře jsou označeny primery v PCR směsi A, zeleně v PCR směsi B a žlutě v PCR směsi C. Velikost napsaná v obdélníku nad/pod příslušnými primery odpovídá velikosti amplifikovaného produktu PCR. Obdélníky odpovídají genům – původní (nahore) nebo nahrazený pomocí transformace (dole). 5' a 3' konce jsou homologní úseky umožňující homologní rekombinaci.

Z mycelií, která vykazovala odolnost vůči antibiotiku i na druhém selekčním médiu, byla izolována genomická DNA (3.2.7). Ta byla použita jako templátová DNA pro PCR (3.2.8). Reakce byly nastaveny podle schématu (Obr. 9). Každý vzorek byl podroben třem PCR reakcím, které se lišily dvojicí použitých primerů. Podle přítomnosti či nepřítomnosti amplifikovaného fragmentu DNA o určité velikosti, bylo možné transformované linie rozlišit na deleční mutanty nebo rezistentní mutanty. Pokud byl ve směsi A a B přítomný fragment o správné velikosti (A - 1211 bp pro *Cpur01124* nebo 1378 bp pro *Cpur05433*, B - 1022 bp pro *Cpur01124* nebo 1292 bp pro *Cpur05433*), byl testovaný vzorek identifikován jako deleční mutant daného genu. Pokud byl pozitivní výsledek v PCR směsi C (981 bp pro *Cpur01124* nebo 1207 bp pro *Cpur05433*), testovaný vzorek byl rezistentní mutant, u kterého se transformační konstrukt integroval na jiné místo v genomu.



Obr. 10 Elektroforetogram, na kterém byly vizualizovány produkty PCR při identifikaci delečních mutantů genu *Cpur01124*. Písmena A, B, C označují směsi primerů. Ani jeden ze vzorků 1-15 není deleční mutant vybraného genu (fragment pouze se směsí primerů C). NK označuje negativní kontrolu. Použitý ladder pro odhad velikostí DNA fragmentů je na obrázku vpravo.

Celkem bylo pomocí PCR reakcí testováno 175 transformovaných mycelií rezistentních na antibiotikum za účelem identifikace delečního mutantu genu *Cpur01124* (Obr. 10) a 81 transformovaných mycelií rezistentních na antibiotikum pro identifikaci delečního mutantu genu *Cpur05433* (Obr. 11). I přes to nebyl získán deleční mutant ani jednoho z vybraných genů, a byli získáni jenom rezistentní mutantí (Obr. 10 a 11). To může být způsobeno tím, že u vláknitých hub bývá účinnost transformace pomocí homologní rekombinace obvykle nízká (Martín, 2014). Velmi často dochází k zabudování DNA na nehomologní místo v genomu, tedy zcela nespecificky (Ballance *et al.*, 1983, Walz a Kück 1993). U *C. purpurea* je udávána pravděpodobnost homologního zabudování DNA konstruktů do genomické DNA obvykle 1-2 %. Pro zvýšení pravděpodobnosti homologní rekombinace, byl v roce 2008 připraven $\Delta ku70$ mutant u *C. purpurea*, který má nefunkční gen *ku70*, který je důležitý pro průběh nehomologní rekombinaci. U tohoto mutantu se pravděpodobnost homologní rekombinace zvýšila na 50-60 % (Haarmann *et al.*, 2008). Bohužel pozdější experimenty ukázaly, že $\Delta ku70$ mutant je nestabilní, velmi rychle podléhá degenerativním změnám, a z tohoto důvodu je nevhodný pro dlouhodobé studium a další experimenty (Hinsch a Tudzynsky, 2015).



Obr. 11 Elektroforetogram, na kterém byly vizualizovány produkty PCR při identifikaci delečních mutantů genu *Cpur05433*. Písmena A, B, C označují směsi primerů. Ani jeden ze vzorků 1-9 není deleční mutant vybraného genu (fragment pouze se směsí primerů C). NK označuje negativní kontrolu. Použitý ladder pro odhad velikosti DNA fragmentů je na obrázku vpravo.

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla v teoretické části zpracována literární rešerše na téma biologie a význam *C. purpurea*, a na téma transkripční faktory. Byly popsány jejich funkce, jejich strukturní motivy, a specifikovány transkripční faktory hub a jejich zapojení do sekundárního metabolismu.

V experimentální části této práce byly provedeny transformace protoplastů *C. purpurea* připravenými konstrukty pomocí PEG za účelem připravit nadprodukční a deleční mutanty vybraných genů (*Cpur01124* a *Cpur05433*). Podle dosavadních informací o vybraných genech zakládajících se na přítomnosti strukturních motivů v aminokyselinové sekvenci kódovaného proteinu, se předpokládá, že jde o geny kódující transkripční faktory.

Transformované houby selektované pomocí antibiotika byly testovány na přítomnost konstruktů v genomu pomocí PCR, která vedla k identifikaci nadprodukčních mutantů obou genů. Pomocí fluorescenční mikroskopie byla potvrzena funkčnost vložených konstruktů. Tyto nadprodukční mutanti mohou dále posloužit pro studium funkce nadprodukovaných genů/proteinů. Deleční mutanti ani jednoho z vybraných genů nebyli i přes opakované pokusy získáni. Dosažené výsledky byly diskutovány s literaturou.

6 LITERATURA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): *Molecular biology of the cell*. 5th ed., Garland Science, New York, U.S.A., 1601 stran.
- Alderman S.C., Coats D.D., Crowe F.J. (1996): Impact of ergot on Kentucky bluegrass grown for seed in northeastern Oregon. *Plant disease* **80**, 853-855.
- Bagby S., Kim S., Maldonado E., Tong K.I., Reinberg D., Ikura M. (1995): Solution structure of the c-terminal core domain of human TFIIB: Similarity to cyclin a and interaction with TATA-binding protein. *Cell* **85**, 857-867.
- Ballance D.J., Buxton F.P., Turner G. (1983): Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochemical and biophysical research communications* **112**, 284-289.
- Barger G. (1931): *Ergot and ergotism: a monograph*. Gurney and Jackson, London, The United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, 279 stran.
- Berde B., Stürmer E. (1978): Introduction to the Pharmacology of Ergot Alkaloids and Related Compounds as a Basis of Their Therapeutic Application. In: *Ergot Alkaloids and Related Compounds. Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Heidelberg, Německo, 1-28.
- Bové F.J. (1970): *The story of ergot: For physicians, pharmacists, nurses, biochemists, biologists and others interested in the life sciences*. Karger, Basel, Switzerland, 297 stran.
- Brakhage A.A. (2013): Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews microbiology* **11**, 21-32.
- Bulger M., Groudine M. (2009): Enhancers: The abundance and function of regulatory sequences beyond promoters. *Developmental Biology* **339**, 250-257.
- Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W., Keller N.P. (2002): Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and molecular biology reviews* **66**, 447-459.
- Cvak L. (1999): Industrial production of ergot alkaloids. In: *Ergot: the genus Claviceps* (Křen V., Cvak L., eds.), Harwood Academic Publisher, Reading, The United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, 373-409.
- Dutton J.R., Johns S., Miller B.L. (1997) StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *The EMBO journal* **16**, 5710-5721.
- 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. *Theoretical and Applied Genetics* **53**, 145-149.

- Fernandes M., Keller N.P., Adams T.H. (1998): Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Molecular microbiology* **28**, 1355-1365.
- Filippo J.S., Sung P., Klein H. (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual review of biochemistry* **77**, 229-257.
- Fleming A. (1929): On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *The British journal of experimental pathology* **10**, 226-236.
- Flieger M., Wurst M., Shelby R. (1997): Ergot alkaloids – Sources, structures and analytical methods. *Folia microbiologica* **42**, 3-30.
- Floss H.M. (1976): Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. *Tetrahedron* **32**, 873-912.
- Fox E.M., Howlett B.J. (2008): Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current opinion in microbiology* **11**, 481-487.
- Gaston K., Jayaraman P.S. (2002): Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 723-741.
- 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., Rolke Y., Giesbert S., Tudzynski P. (2009): Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Molecular plant pathology* **10**, 563-577.
- Harrison S.C., Aggarwal A.K. (1990): DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annual review of biochemistry* **59**, 933-969.
- Hinsch J., Tudzynski P. (2015): *Claviceps* the ergot fungus, . In: *Molecular biology of food and water borne mycotoxigenic and mycotic fungi*, CRC press, Boca Raton, U.S.A, 229-250.
- Hofmeister D., Keller N.P. (2007): Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural product reports* **24**, 393-416.
- Holec J., Beran M. (2012): *Přehled hub střední Evropy*. 1st ed., Academia, Praha, Česká republika, 624 stran.
- Hong M., Fitzgerald M.X., Harper S., Luo C., Speicher D.W., Marmorstein R. (2008): Structural basis for dimerization in DNA recognition by gal4. *Structure* **16**, 1019-1026.
- Hua'an Y., Sivasithamparam K., O'Brien P.A. (1991): An improved technique for fluorescence staining of fungal nuclei and septa. *Australasian Plant Pathology* **20**, 119-121.

- Hynes M.J. (1975): Studies on the role of the *AreA* gene in the regulation of nitrogen catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Australian Journal of Biological Sciences* **28**, 301-314.
- Kangatharalingam N., Ferguson M.W. (1984): A simple and rapid technique for fluorescence staining of fungal nuclei. *Current microbiology* **10**, 99-103.
- Keller N.P., Hohn T.M. (1997): Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology* **21**, 17-29.
- Keller N.P., Turner G., Bennett J.W., (2005): Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature reviews microbiology* **3**, 937-947.
- Kobel H., Sanglier J.J (1986): Ergot alkaloids. In: *Biotechnology* (Rehm H.J., Reed G., eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Německo, 569-609.
- Krishna S.S., Majumdar M., Grishin N.V. (2003): Structural classification of zinc fingers : survey and summary. *Nucleic Acids Research* **31**, 532-550.
- Latchma D.S. (1997): Transcription factors: An overview. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* **29**, 1305-1312.
- Lodish H.F., Berk A., Kaiser Ch.A., Krieger M., Scott M.P. (2007): *Molecular cell biology*. 6th ed., Macmillan Higher Education, London, The United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, 1150 stran.
- Lu H., Zawel L., Fisher L., Egly J.M., Reinberg D. (1992): Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358**, 641-645.
- MacPherson S., Larochelle M., Turcotte B. (2006): Fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology molecular biology reviews* **70**, 583-604.
- Maheshwari R. (2005): Nuclear behavior in fungal hyphae. *FEMS microbiology letters* **249**, 7-14.
- Majeská Čudejková M., Vojta P., Valík J., Galuszka P. (2016): Quantitative and qualitative transcriptome analysis of four industrial strains of *Claviceps purpurea* with respect to ergot alkaloid production. *New biotechnology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.006>.
- Marsman J., Horsfield J.A. (2012): Long distance relationships: Enhancer–promoter communication and dynamic gene transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**, 1217–1227.
- Martín J.F. (2000): Molecular Control of Expression of Penicillin Biosynthesis Genes in Fungi: Regulatory Proteins Interact with a Bidirectional Promoter Region. *Journal of Bacteriology* **182**, 2355-2362.

- Martín J.F. (2014): Fungal transformation: from protoplasts to target recombination system. In: *Genetic transformation systems in fungi* vol. 1 (Berg M.A., Maruthachalam K., eds.), Springer, New York, U.S.A., 3-18.
- Massari M.E., Murre C. (2000): Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 429-440.
- Matthews B.W., Ohlendorf D.H., Anderson W.F., Takeda Y. (1982): Structure of the DNA-binding region of lac repressor inferred from its homology with cro repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 1428–1432.
- Miller K.Y., Wu J., Miller B.L. (1992): StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes and development* **6**, 1770-1782.
- Miller M. (2009): The importance of being flexible: the case of basic region leucine zipper transcriptional regulators. *Current Protein and Peptide Science* **10**, 249–269.
- Nathues E., Joshi S., Tenberge K.B., 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*. *Molecular plant-microbe interactions* **17**, 383-393.
- Neubauer L., Dopstadt J., Humpf H.U., Tudzynski P. (2016): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Fungal biology and biotechnology* DOI: 10.1186/s40694-016-0020-z
- Nikolov D. B., Chen H., Halay E.D., Hoffmann A., Roedert R.G., Burley A.S.K. (1996): Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Cell biology* **93**, 4862-4867.
- Nitta M., Furukawa T., Shida Y., Mori K., Kuhara S., Morikawa Y., Ogasawara W. (2012): A new Zn(II)2Cys6-type transcription factor BglR regulates β -glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. *Fungal genetics and biology* **49**, 388-397.
- Ogbourne S., Antalis T.M. (1998): Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochemical journal* **331**, 1-14.
- Orphanides G., Lagrange T., Reinberg D. (1996): The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes and development* **10**, 2657-2683.
- Pabo C.O., Sauer R.T. (1992): Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annual review of biochemistry* **61**, 1053-1095.
- Pan T., Coleman J.E. (1990): GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)2Cys6 binuclear cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 2077-2081.
- Peláez F. (2004): Biological activities of fungal metabolites. In: *Handbook of industrial mycology*. (An Z. eds.), Marcel Dekker, New York, U.S.A., 49-92.

- Price M.S., Yu J., Nierman W.C., Kim H.S., Pritchard B., Jacobus C.A., Bhatnagar D., Cleveland T.E., Payne G.A. (2006): The aflatoxin pathway regulator *AflR* induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS microbiology letters* **255**, 275-279.
- Ramírez-Zavala B., Domínguez A. (2008): Evolution and phylogenetic relationships of APSES proteins from *Hemiascomycetes*. *FEMS Yeast Research* **8**, 511-519.
- Ritter I.D., Dong Z., Guo S., Chuang J.H. (2012): Transcriptional Enhancers in Protein-Coding Exons of Vertebrate Developmental Genes. *PLoS ONE* **7**, p. e35202. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035202> (5.3.2016).
- Rohlf M., Albert M., Keller N.P., Kempken F. (2007): Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biology letters* **3**, 523-525.
- Rosypal S. (1999): *Úvod do molekulární biologie. Druhý díl*. 3rd ed., Stanislav Rosypal, Brno, ČR., 296 stran.
- Shah A.J., Tilburn J., Adlard M.W., Arst H.N. (1991): pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *FEMS microbiology letters* **61**, 209-212.
- Shelest E. (2008): Transcription factors in fungi. *FEMS microbiology letters* **286**, 145-151.
- Shwab E.K., Keller N.P. (2008): Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Micological research* **112**, 225-230.
- Schaeffer L., Roy R., Humbert S., Moncollin V., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H., Chambon P., Egly J.M. (1993): DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* **260**, 58-63.
- Schardl C.L., Young C.A., Hesse U., Amyotte S.G., Andreeva K., Calie P.J., Fleetwood D.J., Haws D.C., Moore N., Oeser B., Panaccione D.G., Schweri K.K., Voisey C.R., Farman M.L., Jaromczyk J.W., Roe B.A., O'Sullivan D.M., Scott B., Tudzynski P., An Z., Arnaoudova E.G., Bullock C.T., Charlton N.D., Chen L., Cox M., Dinkins R.D., Florea S., Glenn A.E., Gordon A., Güldener U., Harris D.R., Hollin W., Jaromczyk J., Johnson R.D., Khan A.K., Leistner E., Leuchtman A., Li C., Liu J., Liu J., Liu M., Mace W., Machado C., Nagabhyru P., Pan J., Schmid J., Sugawara K., Steiner U., Takach J.E., Tanaka E., Webb J.S., Wilson E.V., Wiseman J.L., Yoshida R., Zeng Z. (2003): Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *PLOS geneticks* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003323>.
- Schardl C.H.L., Panaccione D.G., Tudzynski P. (2006): Ergot alkaloids – Biology and molecular biology. *The alkaloids chemistry and biology* **63**, 45-86.
- SUKL (2013): *Námelové alkaloidy – omezení použití*, Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha, Česká republika

- Taber W.A. (1985): Biology of *Claviceps*. In: *Biotechnology series*. Vol. 6, (Demain A.L., Nadine A.S., eds.), Benjamin Cummings Publishing Company, New York, U.S.A., 449-486.
- Tenberge K.B. (1999): Biology and life strategy of the ergot fungi. In: *Ergot: the genus Claviceps* (Křen V., Cvak L., eds.), Harwood Academic Publisher, Reading, The United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, 25-56.
- Tilburn J., Sarkar S., Widdick D.A., Espeso E.A., Orejas M., Mungroo M., Peñalva M.A., Arst H.N. (1995): The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO journal* **14**, 779-790.
- Tudzynski P., Correia T., Keller U. (2001): Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Applied microbiology and biotechnology* **57**, 593-605.
- Tudzynski P., Scheffer J. (2004): *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular plant pathology* **5**, 377-388.
- Walz M., Kück U. (1993): Targeted integration into the *Acremonium chrysogenum* genome: disruption of the *pcbC* gene. *Current genetics* **24**, 421-427.
- Woloshuk C.P., Foutz K.R., Brewer J.F., Bhatnagar D., Cleveland T.E., Payne G.A. (1994): Molecular characterization of *aflR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology* **60**, 2408-2414.
- Yu J.H., Butchko R.A., Fernandes M., Keller N.P., Leonard T.J., Adams T.H. (1996): Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. Flavus*. *Applied microbiology and biotechnology* **29**, 549-555.
- Yuan X.L., Roubos J.A., Hondel C.A., Ram A.F.J. (2008): Identification of InuR, a new Zn(II)2Cys6 transcriptional activator involved in the regulation of inulinolytic genes in *Aspergillus niger*. *Molecular genetics and genomics* **279**, 11-26.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ble	Phleomycin
bp	páry bází
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Deoxynukleotidy
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
PEG	Polyethylenglykol
SDS	Dodecylsírán sodný
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid