

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Josef Vrabka

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Sekvenční variabilita klastrových genů u
kmenů *Claviceps purpurea* produkující
ergoidní alkaloidy**

Bakalářská práce

Josef Vrabka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

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

Prohlášení

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

V Olomouci dne:

Poděkování

Děkuji Doc. Mgr. Petru Galuszkovi Ph.D a Mgr. Heleně Hulvové za odbornou pomoc při zpracování bakalářské práce.

Souhrn

Claviceps purpurea je parazitická houba z oddělení *Ascomycetes* využívaná ve farmakologickém průmyslu díky její schopnosti produkovat námelové alkaloidy. Námelové alkaloidy slouží jako výchozí surovina pro výrobu léků na léčbu migrény, bolestí hlavy, Parkinsonovy nemoci a Alzheimerovy choroby. Enzymy biosyntetické dráhy jsou kódovány geny nacházejícími se v klastru. Gen *dmaW* kóduje enzym prvního kroku biosyntézy, spojení isoprenylové skupiny s tryptofanem. Gen *easC* je předpokládaný regulační gen celého klastru.

Metodou PCR s užitím proof-reading Phusion[®] polymerasy byly z genomové DNA WT *C. purpurea* získány amplikony genů *dmaW* a *easC*, které byly ligovány do pDrive plasmidu a klonovány do TOP10 *E. coli* elektroporací. Metodou α -komplementace byly vybrány kolonie pozitivních bakterií. Plasmidy s inzertem byly zpětně izolovány a zaslány na sekvenaci. Sekvence genu *dmaW* se u jednotlivých klonů lišily a byly rozřazeny do 4 podobných skupin. Tento výsledek nasvědčuje, že gen *dmaW* se ve WT *C. purpurea* vyskytuje ve více kopiích. Sekvence genu *easC* se nevyznačovaly variabilitou v nukleotidovém složení. Nulová variabilita v genu *easC* potvrzuje hypotézu jeho možné funkce jako regulačního genu celého klastru.

Summary

Claviceps purpurea is a parasitic fungus of the division *Ascomycetes* used in pharmacological industry due to its ability to produce ergot alkaloids. Ergot alkaloids are used as basic drug-stock for production of medicaments to treat migraine, headaches, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Biosynthetic pathway enzymes are encoded by genes located within a cluster. Gene *dmaW* encodes an enzyme in the first step of biosynthesis, the isoprenylation of tryptophan. Gene *easC* is supposed to control the expression of entire gene cluster.

By PCR using proof-reading Phusion[®] polymerase, gene amplicons of *dmaW* and *easC* were obtained from genomic DNA of wild-type *C. purpurea* strain, which were ligated into pDrive plasmid and cloned into TOP10 *E. coli* using electroporation. Colonies of positive bacteria were chosen using α -complementation method. Plasmids with inserts were isolated and sequenced. Sequences of *dmaW* varied in individual clones and were divided into 4 groups based on homology. This result suggests that the gene *dmaW* in wild-type *C. purpurea* strain occurs in multiple copies. Sequences of *easC* did not show any variability in nucleotide composition. Zero variability in the gene *easC* confirms its putative function as the regulatory gene of the cluster.

Obsah

1 Cíle práce	9
2 Úvod	10
3 Současný stav řešené problematiky	11
3.1 Taxonomické zařazení	11
3.2 Biologie rodu <i>Claviceps</i>	11
3.3 Životní cyklus <i>Claviceps purpurea</i>	12
3.4 Námelové alkaloidy	13
3.4.1 Ergotismus	13
3.4.2 Chemická struktura námelových alkaloidů	13
3.4.3 Farmakologické využití	16
3.5 Biosyntéza námelových alkaloidů	17
3.6 Klastř genů pro syntézu námelových alkaloidů	18
3.6.1 Regulace genů klastřu	20
3.7 Evoluce genového klastřu	22
3.7.1 Evoluce uvnitř druhu	22
3.7.2 Mezidruhová evoluce	22
4 Materiál a metodika	25
4.1 Biologický materiál	25
4.2 Chemikálie	25
4.3 Přístroje	27
4.4 Roztoky	27
4.5 Použité kity	28
4.6 Postup	29
4.6.1 Příprava agarových kultur	29
4.6.2 Příprava submerzní suspenze konídií	29
4.6.3 Izolace genomické DNA	29
4.6.4 Restrikce EcoRI	30
4.6.5 PCR amplifikace	30
4.6.6 Elektroforéza v agarosovém gelu	31
4.6.7 Purifikace a izolace DNA z agarosového gelu	31
4.6.8 Klonování amplifikovaných DNA úseků do <i>E. coli</i> TOP10	32

4.6.9 Screening pomocí α -komplementace (modro-bílá selekce)	34
4.6.10 Izolace plasmidu s vloženým inzertem	34
5 Výsledky	35
5.1 Vyhodnocení sekvencí genu <i>dmaW</i> WT <i>C. purpurea</i>	36
5.2 Vyhodnocení sekvencí genu <i>easC</i> WT <i>C. purpurea</i>	44
6 Diskuze	50
7 Závěr	51
8 Seznam zkratk	52
9 Použitá literatura	53

1 Cíle práce

Cílem teoretické části bakalářské práce je zpracování literární rešerše na téma syntézy ergoidních alkaloidů u rodu hub *Claviceps* se zaměřením na jednotlivé geny klastru biosyntézy.

Informace získané zpracováním literární rešerše jsou využity v experimentální části, jejíž cílem je zvládnutí základních metodik molekulární biologie (izolace nukleových kyselin, PCR, klonování) a softwarových aplikací pro manipulaci s genetickou informací. Tyto metodiky jsou uplatněny k vlastní izolaci genomové DNA z kmenů rodu *Claviceps*, nastavení základní PCR reakce, izolaci amplikonu a jeho klonování pomocí restrikčních enzymů do bakteriálních plasmidů. Praktická část je zakončena vyhodnocením sekvenačních reakcí a porovnání sekvencí genů *dmaW* a *easC* mezi zástupci rodu *Claviceps*.

2 Úvod

Paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*) je parazitická houba jednoděložných rostlin, způsobující ve středověku epidemie otrav alkaloidy produkovanými tímto organismem, tzv. námelové alkaloidy. Námelové alkaloidy jsou v dnešní době využívány ve farmakologii pro výrobu léků. Produkce námelových alkaloidů u divokého kmene (wild-type) *C. purpurea* není dostatečně vysoká, proto jsou využívány náhodně mutované kmeny se zvýšenou produkcí. Současně je snaha o podrobnou charakterizaci genů v klastru, kódujících enzymy biosyntetické dráhy námelových alkaloidů.

V diplomové práci Mgr. Heleny Hulvové (Hulvová H., 2009) byly zpracovány geny *dmaW* a *easC* WT *C. purpurea*, u genu *dmaW* byl zjištěn nukleotidový polymorfismus a inzerce oproti publikovaným sekvencím, ale podrobnější zpracování tohoto problému nebylo cílem diplomové práce. Tato bakalářská práce se zaměřuje na problém variability sekvencí genů *dmaW* a *easC* v divokém kmeni *C. purpurea*, která může být příčinou snížené produkce námelových alkaloidů.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Taxonomické zařazení:

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

3.2 Biologie rodu *Claviceps*

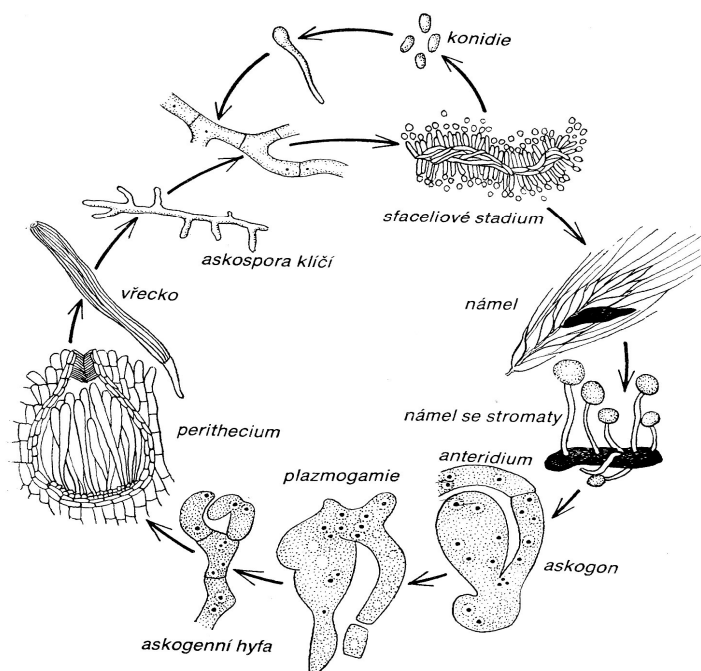
Zástupci rodu *Claviceps* jsou parazity na více než 600 jednoděložných rostlinách, včetně ekonomických důležitých plodin jako je žito, pšenice, ječmen, rýže, kukuřice, proso a oves (Bové, F.J., 1970).

Paličkovice nachová je nejrozšířenějším druhem v Evropě se širokým spektrem hostitelských rostlin (napadá více než 400 rostlinných druhů). Ve středověku paličkovice nachová způsobovala onemocnění zvané ergotismus (oheň sv. Antonína). Toto onemocnění bylo způsobeno alkaloidy obsaženými ve sklerociích, které byli společně s žitem pomlety na mouku a zkonsumovány jako chléb. V současnosti je, díky chemickému ošetření osiva a dostatečné kontrole, kontaminace mouky možná pouze při hrubém porušení hygienickým opatření.

Claviceps purpurea infikuje výhradně mladé, zpravidla neoplozené semeníky trav a obilovin. Základ této přísné orgánové specifčnosti je nejasný, ale pravděpodobně zahrnuje specifické rozpoznání povrchu blizny. Rané fáze infekce jsou podobné procesu oplodnění rostlin, tj. adheze pylu a především růstu pylové láčky v pletivu pestíku. Houba zřejmě napodobuje růst pylové láčky a může používat určité složky signálu z interakce pyl-blizna, aby zabránila rozpoznání ze strany rostliny. To pravděpodobně vysvětluje i absenci obranné reakce v rostlinné tkáni (Tudzynski, P. and Scheffer, J., 2004).

3.3 Životní cyklus *Claviceps purpurea*

Claviceps purpurea - paličkovice nachová (Urban Z., Kalina T., 1980) parazituje v semeníku žita a jiných trav. Jarní infekci způsobují askospory (obr. 1), které se zachycují na bliznách. Tam vyklíčí, hyfa pronikne do semeníku a rozrůstá se dále v myceliu, přičemž nastává rozrušení hostitelského pletiva a vzniká vatovité mycelium (pseudostroma); v němž i na něm jsou komůrky vystlané krátkými konidiofory, na nichž se formují drobné konidie plovoucí v medovici, která se hojně vyměšuje a vytlačována odkapává společně s konidii. Na ni je přilákán hmyz, jenž přispívá k velmi intenzivnímu rozšiřování houby během sezóny. Napadené semeníky se transformují do fialově černého, nápadně vyčnívajícího sklerocia (námel). Sklerocium vypadne z klasu a přezimuje na půdě nebo pod povrchem. Na jaře z něho vyrůstá několik hlavičkovitých stromat. Stroma má bělavou část sterilní (stopka), která nese kulovitou purpurovou nebo fialovou fertilní část. V té vznikají perithecia. Pod jejím povrchem se vytvoří drobné dutinky, do nichž pronikají hyfy diferencované jako askogon a anteridium. Během vývoje vřecek se vytvoří morfologicky rozlišená stěna perithecia, oddělující perithecium od ostatního pletiva stromatu. Vřecka jsou dlouze válcovitá, vyrůstají z báze perithecia. Obsahují po osmi niťovitých askosporách. Askospory jsou vystřelovány a unášeny vzdušnými proudy směrem nahoru a přichycují se na bliznách.



Obr. 1. Životní cyklus *Claviceps purpurea* (Urban Z., Kalina T., 1980)

3.4 Námelové alkaloidy

Alkaloidy obsažené v námelu jsou druhově specifické, pro každý druh je charakteristické široké spektrum derivátů a jejich variabilní množství. Produkce námelových alkaloidů není omezena jen na zástupce rodu *Claviceps*, ale i několik zástupců rodu *Epichloë*. a *Neotyphodium*, kteří žijí jako endosymbionti v travách.

3.4.1 Ergotismus

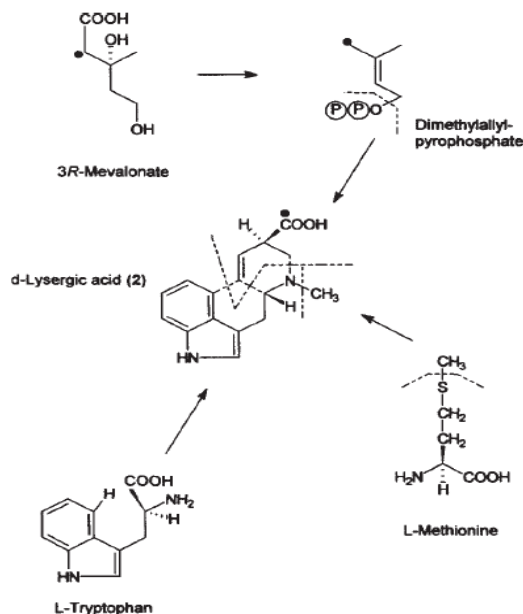
Jako ergotismus je označováno onemocnění způsobené námelovými alkaloidy. Rozlišujeme 2 druhy ergotismu – ergotismus konvulsivní, který je charakteristický paranoiou, halucinacemi, záškuby a křečemi, a ergotismus gangrenózní provázený ztrátou periferního citění, otoky a nakonec i ztrátou postižených tkání. (Eadie, 2003)

První dobře zdokumentovaná epidemie ergotismu (Matossian,1989) byla v letech 944-945, ve které zahynulo okolo 20 000 (skoro jedna polovina tamní populace) lidí žijících v Paříži a regionu Aquitane ve Francii. Pravděpodobně i pomalé zotavení po epidemických moru v Evropě ve 14. století byla částečně způsobena sníženou fertilitou obyvatelstva v důsledku otravy námelovými alkaloidy.

Otrava námelovými alkaloidy nebyla dlouho spojována s žádným konkrétním viníkem, první pozorování byla na začátku 17. století, která nemoc spojovala s kontaminací žita námelem. Teprve v roce 1853 mykolog Louis René Tulasne jednoznačně potvrdil vztah mezi žitem napadeným paličkovicí nachovou a ergotismem.

3.4.2 Chemická struktura námelových alkaloidů

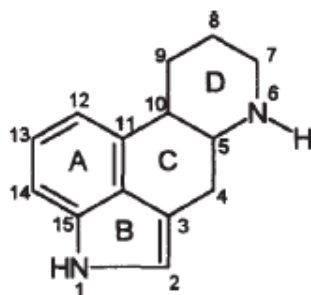
Námelové alkaloidy jsou substituované 3,4-indol deriváty. Základním strukturním elementem je ergolin, který je syntetizován z tryptofanu, metylové skupiny S-adenosyl methioninu a isoprenové jednotky odvozené od mevalonové kyseliny (obr. 2).



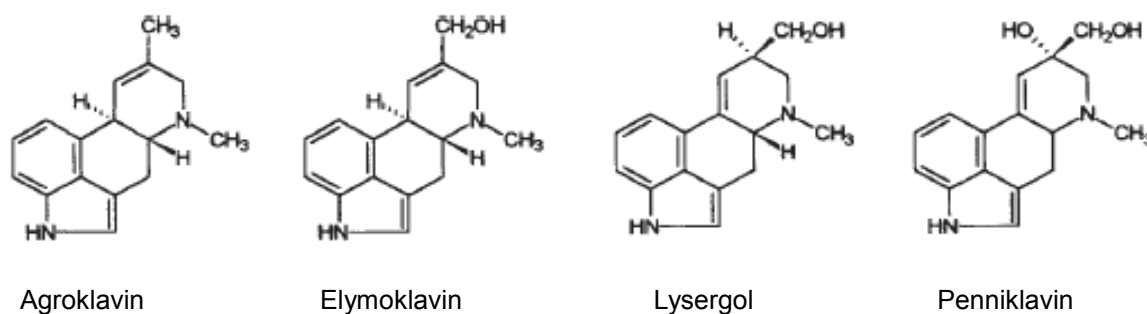
Obr.2. Biosyntetické prekurzory syntézy námelových alkaloidů (Křen V, Cvak L., 1999)

Obecně lze námelové alkaloidy rozdělit do tří skupin – klaviny, D-lysergová kyselina a její deriváty a ergopeptiny.

Klaviny jsou substitované 6,8-ergoliny (obr. 3). Přestože bylo izolováno a charakterizováno přes 35 klavinů (obr. 4), žádný z nich není využíván (Schiff P. L., 2006).

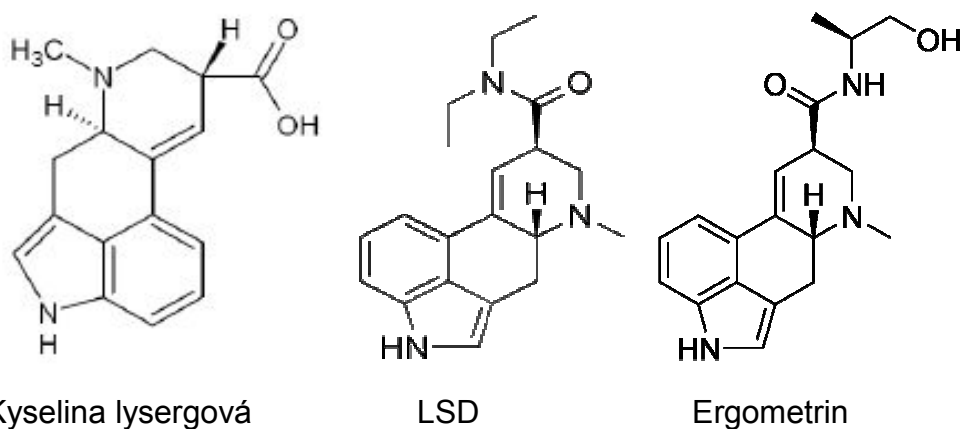


Obr. 3. Struktura ergolinu (Křen V, Cvak L., 1999)



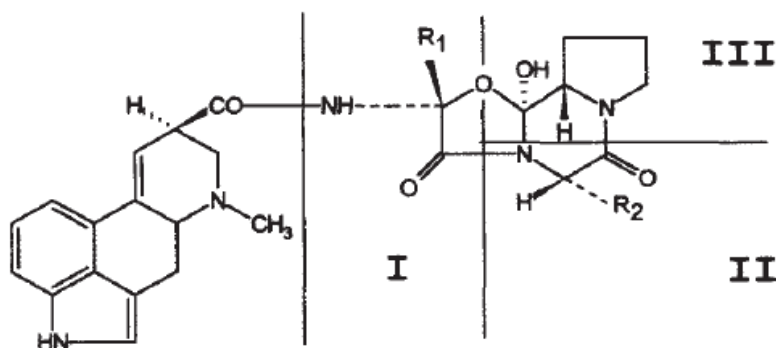
Obr. 4. Vybraní zástupci klavinových alkaloidů (Křen V, Cvak L., 1999)

Kyselina D-lysergová a její přírodní i syntetické deriváty, především amidy, které vykazují farmakologicky výhodné účinky (obr. 5)



Obr. 5. Kyselina lysergová a její nejznámější deriváty LSD a ergometrin (Řeháček et al, 1990)

Ergopeptiny jsou D-lysergyl peptidy. Ke kyselině D-lysergové je připojen tripeptid, vždy obsahující L-prolin. V závislosti na aminokyselinovém složení připojeného řetězce je určen druh ergopeptinu (obr. 6)



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

Obr. 6. Složení bočního aminokyselinového řetězce v přírodních ergopeptinech (Křen V, Cvak L., 1999)

3.4.3 Farmakologické využití

Již ve středověku porodní asistentky věděly o terapeutickém potenciálu námelu a používali je k léčbě problémů v těhotenství, nebo k vyvolání potratu. Nicméně nečistota, nemožnost reprodukce obsahu a poměrného složení alkaloidů nedoložila využití námelových alkaloidů v medicíně. To umožnily až moderní metody 20. století (Tudzynski P. *et al*, 2001)

Farmakologická aktivita je způsobena především strukturální podobností mezi D-lysergovou kyselinou (i její deriváty) a neurotransmitery jako jsou noradrenalin, dopamin a serotonin; námelové alkaloidy reagují s příslušnými receptory pro tyto neurotransmitery (Berde a Stürmer, 1978). V závislosti na substituentu navázaném na karboxylové skupině D-lysergové kyseliny mají námelové alkaloidy ve vztahu k neurotransmiterům funkci agonistů nebo antagonistů (Stadler a Giger, 1984).

Klaviny a jednoduché amidy kyseliny D-lysergové s malými substituenty vykazují silnou anti-serotogenní aktivitu kvůli zvýšené vaznosti k serotoninovým (5-HT) receptorům.

Ergometrin (ergonovin) je první námelový alkaloid připravený synteticky. Nejvýraznější efekt ergonovinu je přímá stimulace děložní hladké svaloviny, což vede ke zvýšení svalového tonu a zvýšení rychlosti a síly rytmické kontrakce. Užívá se pro léčbu a profylaxi potratů komplikovaných zpožděním nebo nadměrným krvácením a léčbu poporodního krvácení (Schiff P. L., 2006).

Methysergid se přirozeně nenachází v námelu, je však připravován metylací z methylergometrinu (Cvak L., 1999). Je indikován pro prevenci vaskulárních bolestí hlavy, ale léčba je omezena pro pacienty, kteří trpí častými či těžkými a neovladatelnými bolestmi hlavy, kteří nereagují na jiné preventivní opatření.

Ergotamin a jeho derivát dihydroergotamin jsou léky na migrénu a bolesti hlavy. Častými vedlejšími účinky léčby jsou nevolnost a zvracení, proto je lék podáván s adjuvans (např. metoklopramid), které tyto vedlejší účinky snižuje.

Bromokryptin je syntetický derivát α -ergokryptinu, byl prvním klinicky významným inhibitorem hormonu prolaktinu, používaným k léčbě prolaktin-souvisejících problémů, jako jsou galaktorea, prolaktin-dependentní karcinom mléčné žlázy, amenorea a akromegalie (Schneider *et al.*, 1977). Účinky bromokryptinu jsou podobné dopaminu a jsou užívány i jako základ léčby Parkinsonovy choroby (Keller and Da Prada, 1979).

Dihydroergotoxin mesyláty (ergoloid mesyláty) se aplikují pacientům

k symptomatické terapii demence související s věkem a jako lék na Alzheimerovu chorobu.

3.5 Biosyntéza námelových alkaloidů

Tvorba námelových alkaloidů je u divokých kmenů omezena pouze na zrající sklerocia, Kmeny produkující alkaloidy v axenické kultuře byly získány náhodnou mutagenezí, např. kmen P1 používaný v mnoha molekulárních analýzách *C. purpurea* (Lorenz 2009).

Biosyntéza alkaloidů v axenické kultuře je přísně regulována ve většině kmenů: tryptophan funguje jako prekursor a induktor, zatímco fosfát, glukóza a amoniak syntézu inhibuje (Socic and Gaberc-Porekar, 1992).

První krok biosyntézy je isoprenylace tryptofanu na 4-dimethylallyltryptofan (obr. 7, část A), katalyzovaný enzymem L-tryptofan dimethylallylsyntasou (DMATS). Tento enzym byl prvním charakterizovaným enzymem ve tvorbě námelových alkaloidů, jedná se o homodimer o molekulové hmotnosti 105 kDa (Gebler a Poulter, 1992).

Následuje methylace dimethylallyltryptofanu do N6 pozice, vzniká N-methyldimethylallyltryptofan. Methyl je získán z methylové skupiny S-adenosyl methioninu (Otsuka *et al.*, 1980). Reakce je katalyzována enzymem 4-dimethylallyltryptofan N-methyltransferasou (Rigbers and Li, 2008).

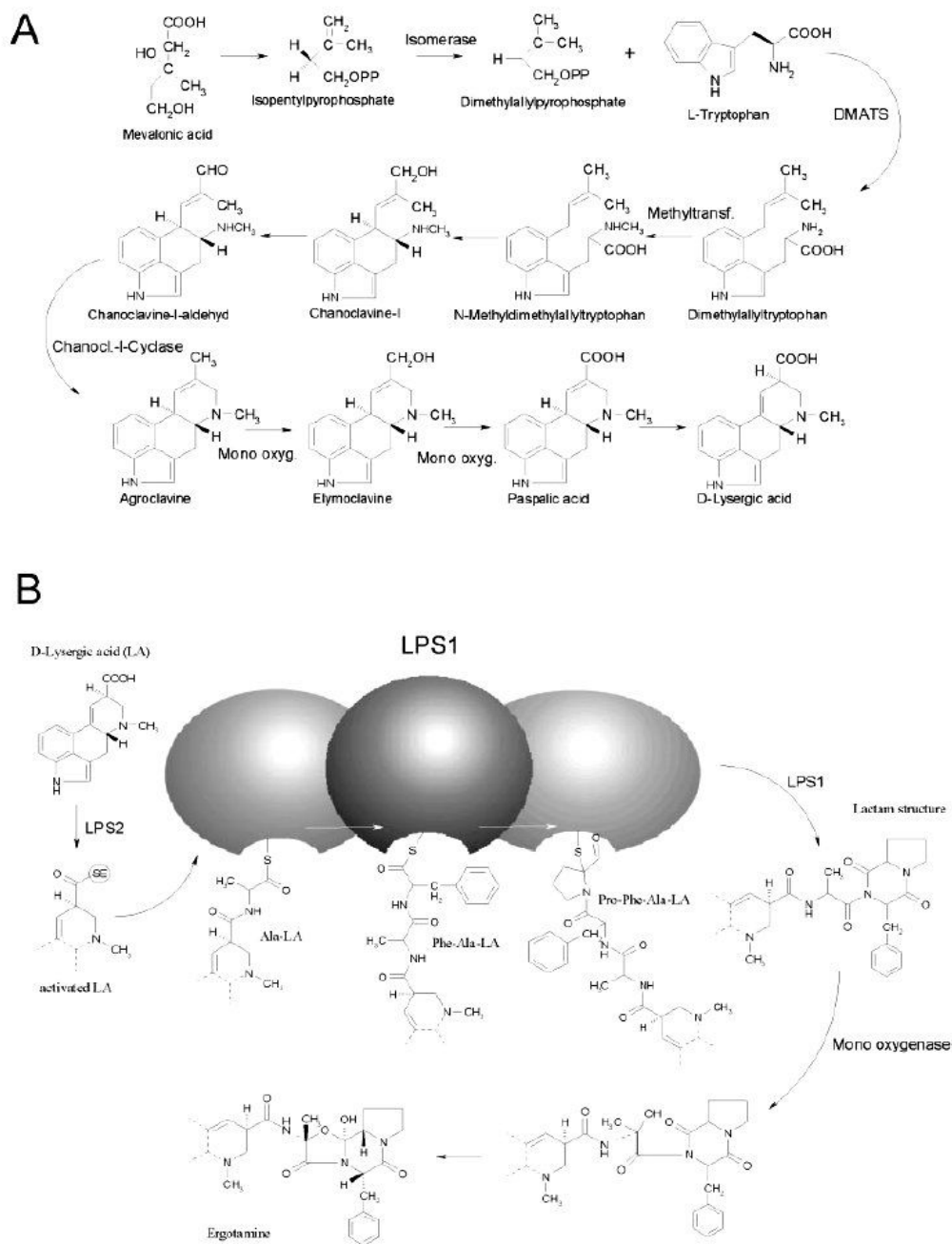
Třetím krokem je vytvoření třetího a čtvrtého cyklu s meziprodukty (chanoklavin I, chanoklavin I aldehyd) dekarboxylací a oxidací, vzniká agroklavin. Reakce je katalyzována enzymem chanoklavin-I-syntetasou (Erge *et al.* 1973).

Syntéza pokračuje přeměnou agroklavinu na elymoklavin katalyzovaná enzymem agroklavin 17-monooxygenasou (Kim *et al.*, 1981). Elymoklavin je přeměněn na kyselinu paspalovou enzymem elymoklavin 17-monooxygenasou (Kim *et al.*, 1983). Oba enzymy jsou zástupci cytochrom P450 monooxygenas.

Kyselina paspalová spontánně izomeruje na D-lysergovou kyselinu. Kyselina D-lysergová je počátečním substrátem pro tvorbu ergopeptinů (obr. 7, část B), nebo svých amidů.

Syntéza ergopeptinů (obr. 7, část B) je zajištěna enzymy ze skupiny neribosomálních peptidových syntetas (Riederer *et al.*, 1996; Tudzynski *et al.*, 1999). Kyselina D-lysergová je aktivována enzymem D-lysergyl peptid syntetasa 2 (LPS 2). K aktivované kyselině D-lysergové jsou enzymem D-lysergyl peptid syntetasa 1

(LPS 1) připojeny postupně aminokyseliny peptidového řetězce, aminokyselinou v pozici III je téměř vždy prolin.



Obr. 7. Biosyntetická dráha námelových alkaloidů. **A** biosyntéza kyseliny D-lysergové. **B** Biosyntéza ergopeptinů (příklad syntézy ergotaminu). Tudzynski *et al.*, 1999

3.6 Klastř genů pro syntézu námelových alkaloidů

Poprvé byl genový klastř identifikován metodou „chromosome walking“ začínající v genu *dmaW* (Tudzynski *et al.*, 1999). V současnosti je v klastřu identifikováno 14 otevřených čtecích rámců (obr. 8), z nichž jen část je funkčně

studována a charakterizován příslušný enzym, který kódují.

Na základě oligonukleotidů odvozených z částečné sekvence aminokyselin enzymu DMATS byl poprvé klonován gen *dmaW*, původně z *C. fusiformis* (Tsai *et al.*, 1995), později z kmene P1 *C. purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999). Ortologní geny byly identifikovány například u druhů *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* a *Leptosphaeria maculans*. Liu *et al.* (2009) prokázali monofyletický původ tohoto genu.

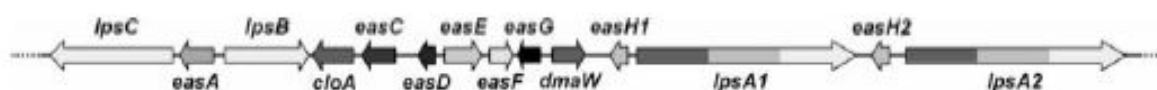
Dalšími charakterizovanými geny byly geny kódující neribosomální peptidové syntetasy – *lpsA1* (LPS1) a *lpsB* (LPS2). V roce 2005 Haarmann *et al.* rozšířil klastr kmenu P1 z původních 11 genů (Correia *et al.*, 2003) na 14 genů objevením dalších dvou genů pro NRPS – *lpsC* a *lpsA2*, které pravděpodobně vznikly duplikací a jednoho blíže nespecifikovaného genu.

Gen *lpsC* je pravděpodobně gen pro LPS3 enzym, neribozomální peptid syntetasu, interagující s LPS1 za vzniku alkanolamidu D-lysergové kyseliny (Ortel *et al.*, 2009).

Pro všechny enzymy katalyzující kroky vedoucí ke kyselině D-lysergové nebyli doposud určeny jejich geny. Přehled genů a jejich předpokládané funkce jsou shrnuty v tabulce 1.

Produkt genu *cloA* katalyzuje přeměnu elymoclavinu na kyselinu paspalovou (Haarmann *et al.*, 2006), jedná se o P450 monooxygenasu. Mutant $\Delta cloA$ nebyl schopen tvořit ergopeptiny, produkoval pouze meziprodukty (agroklavin, elymoklavin, chanoklavin).

Gen *easE* kóduje enzym chanoklavin-I-syntetasu (Lorenz *et al.*, 2010), katalyzující přeměnu N-methyl-dimethylallyltryptofanu na chanoklavin I. Enzym 4-dimethylallyltryptofan N-methyltransferasa je produktem genu *easF* (Rigbers and Li, 2008), původně charakterizovaného u *Aspergillus fumigatus*. *A. fumigatus* sdílí stejnou biosyntetickou dráhu s *C. purpurea* vedoucí k agroklavinu.



Obr. 8. Schéma genového klástru pro syntézu námelových alkaloidů, směr transkripce je označen šipkami (Lorenz *et al.*, 2009)

Tab. 1. Geny klastru pro syntézu námelových alkaloidů (přepřacováno podle Lorenz *et al.*, 2009)

Gen	Formální nomenklatura	Funkce (předpokládaná)
<i>easA</i>	<i>cpox3</i>	Reduktasa/dehydrogenasa
<i>lpsB</i>	<i>cpps2</i>	LPS 2
<i>lpsC</i>	<i>cpps3</i>	LPS 3
<i>cloA</i>	<i>cpP450-1</i>	Elymoklavin monooxygenasa
<i>easC</i>	<i>cpcat2</i>	Reduktasa/dehydrogenasa
<i>easD</i>	<i>cpox2</i>	Reduktasa/dehydrogenasa
<i>easE</i>	<i>cpox1</i>	Chanoklavin-I-syntetasa
<i>easF</i>	<i>orfB</i>	4-dimethylallyltryptofan N-methyltransferasa
<i>easG</i>	<i>orfA</i>	Reduktasa/dehydrogenasa (NmrA protein)
<i>dmaW</i>	<i>cpd1</i>	DMAT syntetasa
<i>easH1</i>	<i>orfC</i>	Oxygenasa/hydroxylasa
<i>lpsA1</i>	<i>cpps1</i>	LPS 1
<i>easH2</i>	<i>orfE</i>	Hydroxylasa
<i>lpsA2</i>	<i>cpps4</i>	LPS 1

















3.6.1 Regulace genů klastru

Na rozdíl od většiny klastrů zodpovědných za produkci sekundárních metabolitu v houbách nebyl v ergoidním klastru rodu *Claviceps* zatím nalezen odpovídající gen kódující transkripční faktor. Možným kandidátem, kódujícím regulační faktor, je gen *easG*. Ortologní geny jsou přítomny v klastrech *C. fusiformis* (přístupový kód z GenBank databáze: ABV57825), *Neotyphodium lolii* (ABM91452) a *Aspergillus fumigatus* (XM_751041) a vykazují homologii s NmrA proteiny, u kterých byla identifikována regulační funkce již u jiných hub (Lorenz *et al.*, 2009). Podrobnější výzkum genu *easG* a jeho produktu nebyl ale zatím realizován.

Zajímavým způsobem regulace klastru je úprava histonů. Bok a Keller (2004) prokázali, že histon methyltransferasa (LaeA) hraje důležitou roli v regulaci klastru u rodu *Aspergillus*. Deleční mutant $\Delta leaA$ blokoval expresi mnoha genů klastru, zatímco zvýšená exprese genu *leaA* v mutantu korelovala se zvýšenou genovou expresí a tvorbou produktů. Exprese *laeA* genu z *A. nidulans* v *C. purpurea* ale

neměla žádný vliv na expresi genů ergoidního klastru, tím se vliv histon methyltransferasy v regulaci klastru námelových alkaloidů neprokázal.

Naproti tomu byl prokázán vliv acetylce/deacetylce histonů na expresi klastrových genů (Obr. 9). K tomuto pokusu byli použity syntetické inhibitory histon acetyltransferas (HATi) a deacetyltransferas (HDACi), které byly přidány do kultivačního média. Médium T25N je indukující pro tvorbu alkaloidů, médium BII tvorbu alkaloidů neindukuje. Výsledky testu jsou zobrazeny v obr. Xxxx. Získané data ukazují, že biosyntéza alkaloidů je reprimována přídávkem HDACi a indukována pomocí HATi. Tyto výsledky byly překvapivé, byl očekáván opačný efekt. Obecně HDACi simulují funkci histon acetyltransferas, jejichž působením se kondenzovaný chromatin rozvolňuje na euchromatin, který je snadněji přístupný expresi genů. Proto by měli HDACi hladinu alkaloidů zvyšovat a naopak HATi snižovat. Pravděpodobným vysvětlením je, že v euchromatinu se nachází hypotetický represor, který je silněji exprimován a omezuje tvorbu alkaloidů (Lorenz *et al.*, 2009).

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

Obr. 9: Efekt inhibitorů histon acetyltransferas (garcinol, w51, w56) a deacetyltransferas (HC-toxin, SAHA, ST17) na produkci ergoidních alkaloidů (modré zbarvení indikuje produkci alkaloidů – Van Urk test (Ehmann, 1977), převzato z Lorenz *et al.*, 2009

3.7 Evoluce genového klastru

3.7.1 Evoluce uvnitř druhu

Haarmann *et al.* (2005) zkoumal variabilitu neribosomálních peptid syntetas (NRPS) u dvou kmenů *C. purpurea* - kmen P1 (produkující hlavně ergotamin) a kmen ECC92 (produkující ergocristin). Jeho analýzy prokázaly variabilitu v doménách NRPS zodpovědných za připojování aminokyselin ke kyselině lysergové. Tato variabilita je rozhodující v tvorbě konečného ergopeptinu.

3.7.2 Mezidruhová evoluce

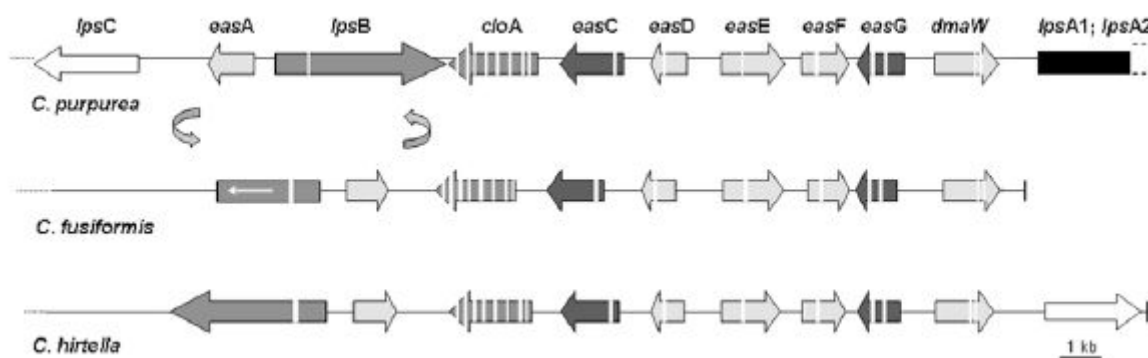
Jen velmi málo zástupců rodu *Claviceps* produkuje ergopeptiny, konečné produkty celé biosyntetické dráhy. V mnoha druzích je biosyntéza alkaloidů zakončena na úrovni klavinů nebo amidů kyseliny lysergové. Hlavní otázkou zůstává zda genový klaster v *C. purpurea* je konečným bodem evoluce klastru a ostatní druhy mají v klastru zahrnuty pouze geny vedoucí k syntéze prekurzorů (Lorenz *et al.*, 2009).

Lorenz *et al.* (2007) sekvenoval klaster pro tvorbu námelových alkaloidů u druhu *C. fusiformis* (obr. 10), produkující pouze agroklavin a elymoklavin. Klaster obsahoval geny shodné s geny v klastru *C. purpurea*, kromě tří genů pro NRPS (*lpsC*, *lpsA₁/A₂*). Částečně byla změněna pozice genů okolo. V genu pro jedinou zbývající NRPS - *lpsB* byly identifikovány mutace vedoucí k narušení čtecího rámce a gen byl označen jako pravděpodobný pseudogen. Elymoklavin je v *C. purpurea* oxidován na kyselinu lysergovou produktem genu *cloA*. Homolog *cloA* v *C. fusiformis* gen *cfcloA* nevykazoval žádnou inaktivující mutaci. Gen *cfcloA* byl exprimován v *C. purpurea*, ale nekódoval funkční enzym a syntéza alkaloidů byla ukončena u agroklavinu/elymoklavinu. Naopak gen *cloA* exprimovaný v *C. fusiformis* byl plně funkční a elymoklavin byl oxidován na kyselinu lysergovou. To prokazuje, že syntéza alkaloidů u *C. fusiformis* je zakončena na úrovni elymoklavinu nefunkčním produktem genu *cfcloA*. Klaster *C. fusiformis* se vyvinul z komplexnějšího klastru (např. klaster *C. purpurea*) ztrátou funkce genů kódujících enzymy v krocích po syntézu elymoklavinu.

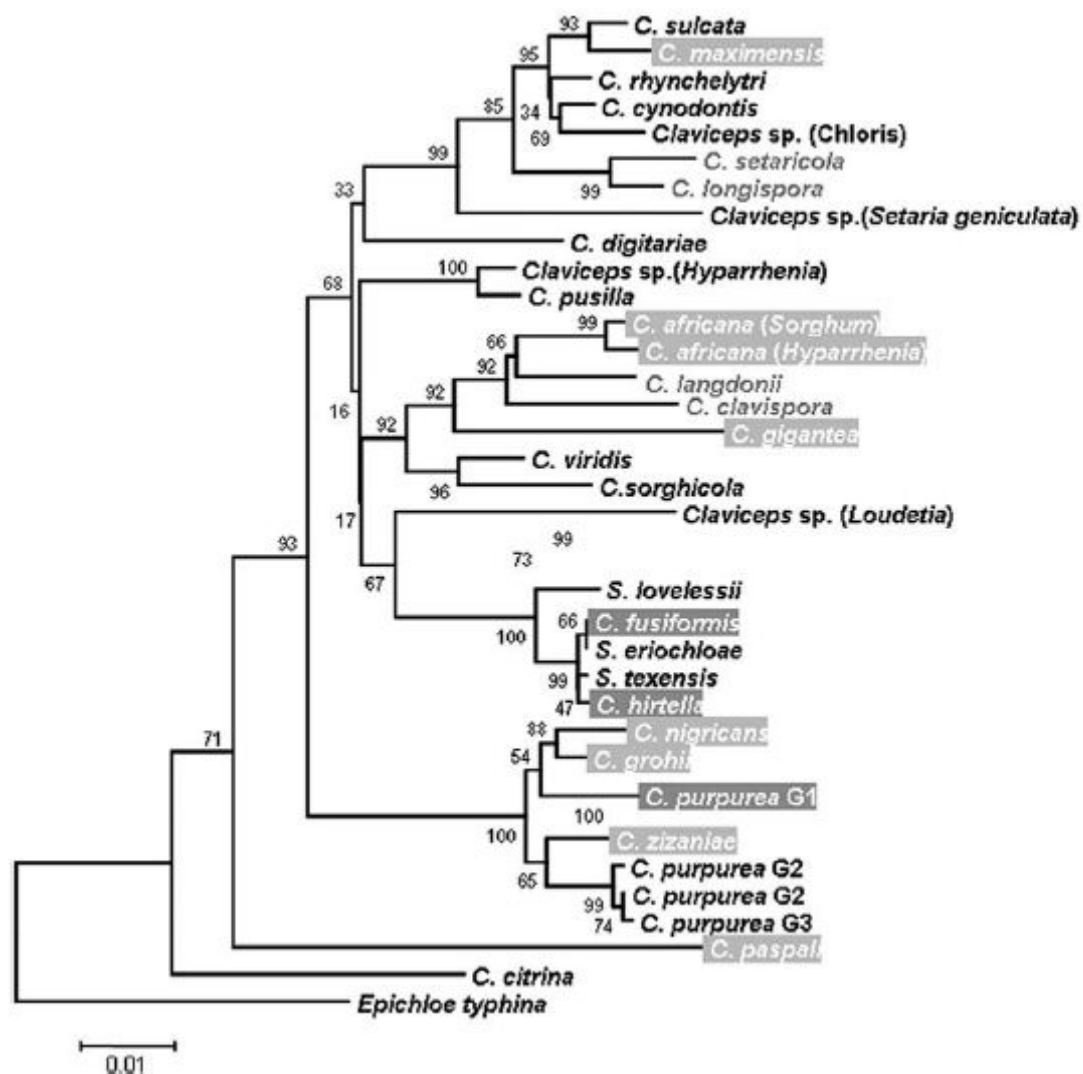
Blízký příbuzný *C. fusiformis* druh *Claviceps hirtella* (obr. 11) syntetizuje deriváty kyseliny lysergové. Klaster je strukturou velmi podobný klastru *C. fusiformis*, ale funkce genu *lpsB* je zachována a gen *lpsC* je umístěn na opačné straně oproti *C. purpurea* (obr. 10). Tyto změny umožňují houbě pokračovat v syntéze alkaloidů přes

elymoklavin, *C. hirtella* produkuje i ergometrin. Sekvence *cloA* u *C. hirtella* a *C. fusiformis* vykazuje stejnou strukturu exonů a intronů, zůstává nejasné proč produkt *cloA* u *C. hirtella* je funkční, zatímco u *C. fusiformis* je nefunkční (Lorenz *et al.*, 2009).

Je zajímavostí, že všichni zástupci rodu *Claviceps*, kteří syntetizují námelové alkaloidy, produkuje buď klaviny nebo ergopeptiny, nejsou žádné druhy kumulující kyseliny paspalovou nebo D-lysergovou. Pokusy s delečním mutantem genu *lpsB* v *C. purpurea* (Correia *et al.*, 2003) nebo nahrazení nefunkčního genu *cfcloA* *C. fusiformis* genem *cloA* *C. purpurea* (Lorenz *et al.*, 2007) prokázaly, že akumulace kyseliny D-lysergové nemá pro houbu žádný toxický efekt. Je nejasné, proč je produkce striktně omezena na klaviny nebo ergopeptiny. Možným vysvětlením je vliv na přezimování, které je nezbytné pro kolonizaci v příštím roce. Námelové alkaloidy mohou chránit sklerocia před snědením herbivory a rozkladem mikroorganismy. Klaviny a ergopeptiny mohou být sekretovány, zatímco kyselina D-lysergová zůstává v myceliu (Lorenz *et al.*, 2009).



Obr. 10. Schematické zobrazení pozice a orientace námelového klastru u tří zástupců rodu *Claviceps*. Šipky znázorňují směr transkripce. Barvy symbolizují zařazení do skupin: světle šedá: geny pro kroky do syntézy kyseliny D-lysergové, středně šedá: geny potřebné pro další produkci a aktivaci D-lysergové kyseliny, tmavě šedá: geny neznámé funkce, černá: NRPS geny pro inkorporaci aminokyselinové složky ergopeptinů, bílé pruhy: znázorňují pozici a délku intronů (Lorenz *et al.*, 2009)



Obr. 11. Evoluční vztahy mezi 37 zástupci rodu *Claviceps* na základě sekvencí tubulinu, druh *Epichloe typhina* je použit jako „outgroup“ (Lorenz *et al.*, 2009)

4 Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

WT kmen *Claviceps purpurea* (získán z firmy TEVA Czech Industries, Opava)
elektrokompetentní buňky *E.coli* kmen TOP10, Invitrogen, USA

4.2 Chemikálie

1 kb DNA ladder: Fermentas, Litva

5x HF pufr: Finzymes, Finsko

6x vzorkovací pufr: TaKaRa, Japonsko

Agar: Himedia, Indie

Agarosa: Amresco, USA

Amoniak: Lach-Ner, Česká republika

Ampicilin: Sigma, USA

Citrónová kyselina: Neo-Lab, Německo

CTAB (Cetyltrimethylamoniumbromid): Sigma, USA

D-Glukosa monohydrát: Penta, Česká republika

Dihydrogenfosforečnan draselný: Penta, Česká republika

dNTP směs 10mM : Fermentas, Litva

D-Sorbitol: Duchefa, Holandsko

EB pufr: Qiagen, USA

EDTA: Penta, Česká republika

EcoRI restriční endonukleasa: 10U/μl, Fermentas, Litva

EcoRI 10x pufr: Fermentas, Litva

Ethanol: Penta, Česká republika

Ethidiumbromid: Sigma Aldrich, USA

Hydroxid draselný: Penta, Česká republika

Hydroxid sodný: Penta, Česká republika

Chlorid draselný: Lachema, Česká republika

Chlorid hořečnatý: Finzymes, Finsko

Chlorid sodný: Sigma, USA

Chlorid vápenatý: Fluka, Německo

Chloroform: Neo-Lab, Německo

Chlorovodíková kyselina: Lachema, Česká republika
IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid): Duchefa, Holandsko
Isoamylalkohol: Sigma, USA
Isopropanol: Lach-Ner, Česká republika
Komplexon III: Penta, Česká republika
Kukuřičný extrakt: TEVA Czech Industries, Česká republika
Kvasinkový extrakt: Sigma, USA
L-Asparagin monohydrát: Sigma-Aldrich, USA
LB Broth hight salt: Duchefa, Holandsko
Luria broth agar: Duchefa, Holandsko
Lyzační enzym z *Trichoderma harzianum*, Sigma, USA
Maleinová kyselina: Penta, Česká republika
 β -merkptoethanol: Fluka, Německo
N,N'-dimetylformamidu: Penta, Česká republika
Octan amonný: Lachema, Česká republika
Octová kyselina: Lachema, Česká republika
pDrive plasmid, Qiagen, USA
Pepton: Duchefa, Holandsko
Phusion[®] DNA polymerasa: 2U/ μ l, Finnzymes, Finsko
Sacharosa: Penta, Česká republika
SDS: Penta, Česká republika
Síran hořečnatý heptahydrát: Penta, Česká republika
Síran zinečnatý heptahydrát: Neo-Lab, Německo
Sorbitol: Duchefa, Holandsko
Taq polymerasa, Katedra biochemie UP Olomouc, Šmehilová M., 2005
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Duchefa, Holandsko
Trypton: Duchefa, Holandsko
Ultračistá deionizovaná voda, RNase, DNase free: Invitrogen, USA
XGal: Duchefa, Holandsko

Primery použité pro PCR amplifikaci byly dodány firmou MetaBion, Německo. Lyofilizované primery pro PCR amplifikaci byly vždy rozpuštěny v ultra čisté vodě v množstvích doporučených dodavatelem pro dosažení koncentrace 100 pmol/ μ l. Pracovní koncentrace primeru pro nastavení PCR byla 10 pmol/ μ l.

4.3 Přístroje

Autokláv: Sanyo MLS-3020U Labo Autoclave, Japonsko

Digestoř: Forlab DG Fume cupboard, Forlab, Belgie

Digitální fotoaparát: DC120, Kodak s UV clonou, USA

Elektroporátor: BTX PEP ECM 399, BTX, USA

Flowbox: Steril-Polaris Schoeller Instruments, Německo

Inkubátor: Lovibond, Německo

Mikrocentrifuga: Hettich Zentrifugen Mikro 200R, Německo

Mikroskop: Olympus CX 21, Japonsko

UV/VIS Spektrofotometr: Agilent, USA

Termoblok: Boekel Digital Dry Bath Incubator, Boekel, USA

Termocykler: TGradient Biometra, Německo

Třepačka: Grant-Bio POS300, Grant, Velká Británie

UV transiluminátor: VL TFP-M/WL, Vilber Lourmat, Francie

Horizontální elektroforéza: Compaq XS/S, Biometra, Německo

Vortex: Biosan Combi-spin, Biosan, Litva

Zdroj napětí pro elektroforézu: Standard Power Pack P25 Biometra, Německo

4.4 Roztoky

TSN1 médium (ztužené sporulační) [11]:

50 g sacharóza rafinovaná, 50 g sorbitol, 6 g kukuřičný extrakt, 1 g síran hořečnatý heptahydrát, 0,25 g síran zinečnatý heptahydrát, 0,5 g dihydrogenfosforečnan draselný, 2 g kvasničný autolyzát, 7 g kyselina citrónová, 7 ml 26% amoniak, 20 g agar, doplněno destilovanou vodou do 1l, upraveno na pH 6,5 hydroxidem sodným a autoklavováno

TSN3 submerzní médium [11]:

50 g sacharóza rafinovaná, 50 g sorbitol, 6 g kukuřičný extrakt, 30 g chlorid sodný, 1 g dihydrofosforečnan draselný, 0,25 g síran zinečnatý heptahydrát, 1 g síran hořečnatý heptahydrát, 7 g kyselina citronová, 7 ml 26 % amoniak, doplněno destilovanou vodou do 1l, upraveno na pH 6,6 hydroxidem sodným a autoklavováno

Extrakční pufr:

100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2% SDS, 1% β -merkaptoethanol, pH 8,0

1% agarosový gel:

10 g agarosy bylo rozpuštěno v 1 l TAE pufru

LB agar:

30,5 g Luria Broth agaru, 9,5 g chloridu sodného rozpuštěno v 1 l destilované vody, autoklavováno

LB médium:

25 g Luria Broth high salt bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody, autoklavováno

SOC médium:

20 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 0,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 950 ml destilované vody a bylo přidáno 10 ml 250 mM roztoku chloridu draselného. pH bylo upraveno titrací 5 M hydroxidem sodným na 7,0 a objem byl doplněn vodou na 1 l. Roztok byl sterilizován autoklavováním a poté bylo přidáno ještě 5 ml 2 M roztoku chloridu hořečnatého a 20 ml sterilního 1 M roztoku glukosy (sterilizace byla provedena přefiltrováním přes 0,2 μ m filtr, Sambrook *et al.*, 2001)

TAE pufr:

40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 8,0 (Sambrook *et al.*, 2001)

4.5 Použité kity

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, USA

Qiagen PCR cloning kit, Qiagen, USA

QIAprep Mini Kit, Qiagen, USA

4.6 Postup

4.6.1 Příprava agarových kultur:

Sterilizované ztužené sporulační médium TSN1 bylo plněno do Endových zkumavek po 20 ml a uloženo tak, aby vytvořilo šikmou plochu. Médium bylo zaočkováno 0,2 ml submerzní suspenze konídií a kultivace probíhala při teplotě 23°C po dobu 18 – 20 dní.

4.6.2 Příprava submerzní suspenze konídií:

Submerzní suspenze konídií byla připravena inokulací v laminárním boxu suspenzí inokulačních částic, setřených z povrchu šikmého agaru zásobní kultury (ztužené sporulační médium TSN1) do sterilního tekutého média TSN3. Kultivace probíhala na třepačce s 200 ot./min při teplotě 23 °C po dobu 9 – 12 dní.

4.6.3 Izolace genomické DNA:

Pro izolaci DNA byl použit 1 ml submerzní suspenze konídií, suspenze byla v mikrozkuhavce zcentrifugována (4 min, 14 000 RPM, 4 °C). Supernatant byl odlit a pelet resuspendován 500 µl sterilní vody a znovu centrifugován (4 min, 14 000 RPM, 4 °C). Supernatant byl odlit a k peletu bylo přidáno 700 µl extrakčního pufru, do kterého bylo přidáno 5 µl proteinasy K.

Do 1/3 objemu mikrozkuhavky byly přidány skleněné kuličky (glass-beads acid washed) a mikrozkuhavka byla střídavě 5krát 1 min vortexována a 1 min inkubována na ledu.

Mikrozkuhavka byla inkubována 60 min při 60 °C, po inkubaci byly skleněné kuličky odstraněny a do mikrozkuhavky přidáno 200 µl 5 M chloridu sodného a 90 µl 10 % CTAB a roztok byl inkubován 10 min při 65 °C.

K roztoku byl přidán 1 objem roztoku chloroform:isoamylalkohol (24:1), objem mikrozkuhavky promíchán převrácením a inkubován 15 min na ledu a následovala centrifugace (14 000 RPM, 4 °C, 10 min).

Vrchní fáze z mikrozkuhavky byla převedena do nové mikrozkuhavky společně s ½ objemu 5 M octanu amonného. Následovala inkubace na ledu po dobu 30 min a centrifugace (14 000 RPM, 4 °C, 10 min).

Supernatant byl převeden do nové mikrozkuhavky k 0,55 objemu

isopropanolu a centrifugován (14 000 RPM, 4 °C, 10 min). Supernatant byl odlit a pelet 2krát resuspendován s 200 µl 70 % etanolem, který byl uchován při teplotě -20 °C a centrifugován (14 000 RPM, 4 °C, 10 min). Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v 50 µl EB pufru.

4.6.4 Restrikce EcoRI

Vyizolovaná genomická DNA byla štěpena restrikčním enzymem EcoRI přes noc při 37 °C.

Složení restrikční směsi

Chemikálie	Objem [µl]
Restrikční endonukleasa EcoRI	1
EcoRI pufr	2
Genomická DNA	4
Sterilní voda	13
Celkový objem	20

4.6.5 PCR amplifikace

K amplifikaci DNA úseků genů *dmaW* a *easC* byla použita Phusion® polymerasa s „proof reading“ aktivitou (minimalizace chyb při syntéze nového DNA vlákna). Primery byly navrženy na základě sekvencí získaných z GenBank.

	Gen <i>dmaW</i>	Gen <i>easC</i>
Fw primer	5´-ATGTCGACCGCAAAGGACCCAG-3´	5´-ATGGCTTCTGAGGTCTCTG-3´
Rev primer	5´-CTACTTYGTKGAGAGKTCACAGCG-3´	5´-TTACTCCACTATCTCTTCGG-3´

Složení PCR směsi:

Chemikálie	Objem [µl]
H ₂ O	33,5
5x HF pufr	10
DNA templát	3
dNTP 10mM	1
Fw primer 10µM	1
Rev primer 10 µM	1

Phusion polymerasa	0,5
Celkový objem	50

PCR reakce byla provedena v gradientovém termocycleru s následujícím programem:

Číslo kroku	Název kroku	Teplota [°C]	Čas [s]
1	Počáteční denaturace	98	30
2	Denaturace	98	10
3	Annealing	63 (<i>dmaW</i>) 53 (<i>easC</i>)	30
4	Elongace	72	45
5	Konečná elongace	72	600

Kroky 2-4 byly opakovány v 36 cyklech.

Po provedení PCR s Phusion® polymerasou byl do reakční směsi přidán 1 µl standardní Taq polymerázy pro vytvoření tzv. lepivých konců na amplikonech. PCR s Taq polymerázou probíhala 10 min při 72 °C.

4.6.6 Elektroforéza v agarosovém gelu

Pro separaci byl použit 1% agarosový gel v TAE pufru. Do 150 ml agarosového gelu bylo přidáno 40 µl 10% ethidium bromidu (v/v), gel byl nalit do příslušné formy a vložen hřebínek pro vytvoření jamek. Po ztuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické vany, do které byl přilít TAE pufr po rysku. Ke vzorkům bylo přidáno 5 µl 6x vzorkovacího pufru, z gelu byl odstraněn hřebínek a do jamek nepipetovány vzorky se vzorkovacím pufrem. Do první jamky byl napipetován marker 1 kb DNA ladder pro přibližné určení velikostí amplifikovaných úseků. Separace probíhala při 120 V. Separace byla zastavena, když světle modré pruhy (barvivo v 6x vzorkovacím pufru) dosáhly poloviny délky gelu.

4.6.7 Purifikace a izolace DNA z agarosového gelu

Agarosový gel byl po skončení elektroforetické separace přenesen na UV transiluminátor pro ověření velikosti amplifikovaných PCR segmentů a srovnání velikostí s markerem 1 kb DNA ladder.

K izolaci DNA ampliconů byl použit QIAquick Gel extraction spin kit.

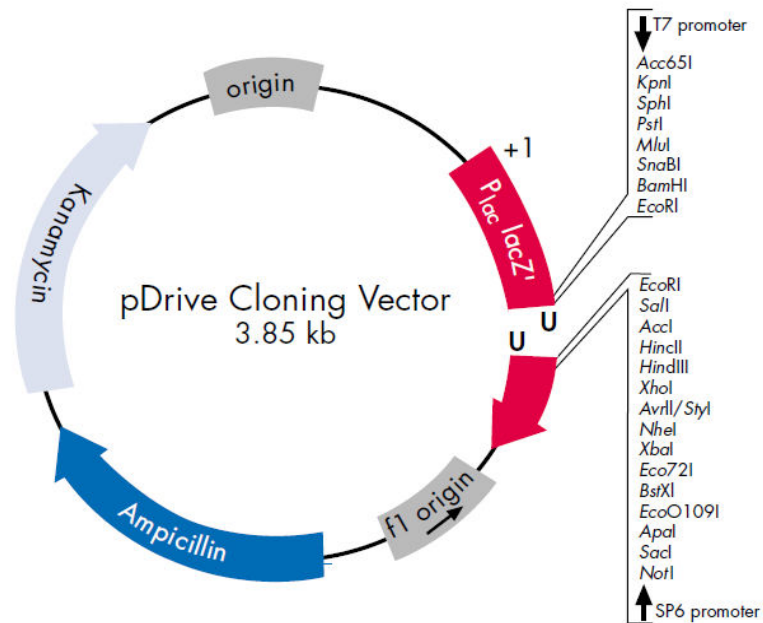
Segmenty odpovídající velikostí požadovaným genům (*dmaW* 1,5 kb, *easC* 1,5 kb) byly z gelu vyřezány sterilním skalpelem a přeneseny do mikrozkušavek. Do mikrozkušavky byly přidány 3 objemy QG pufru na váhu vyřezaného gelu, 100 mg gelu odpovídá 100 μ l QG pufru. Směs byla inkubována při 50 °C 10 min k rozpuštění gelu. Po úplném rozpuštění gelu byl přidán 1 objem isopropanolu na váhu gelu (100 mg gelu odpovídá 100 μ l isopropanolu) a směs byla promíchána převrácením. Celý obsah mikrozkušavky byl převeden do QIAquick spin kolonky a ta byla centrifugována 1 min při 14 000 RPM a teplotě 4 °C. Otáčky a teplota pro centrifugaci jsou shodné pro celý postup izolace, proto bude dále uváděna jen doba centrifugace. Rostok, který protekl skrze kolonu, byl odstraněn a do kolony naneseo 500 μ l QG pufru pro odstranění možných zbytků agarosy, centrifugace 1 min. Rostok, který protekl, byl odstraněn a na kolonu bylo naneseo 750 μ l PE pufru, centrifugace 1 min. Odpad po skončení centrifugace byl odstraněn kolonka centrifugována 1 min pro odstranění zbylého PE pufru. Kolona byla přenesena do čisté mikrozkušavky, do kolony naneseo 20 μ l EB pufru, centrifugace 1 min.

4.6.8 Klonování amplifikovaných DNA úseků do *E. coli* TOP10

2 μ l v EB pufru izolovaných DNA segmentů bylo odebráno pro ligaci do pDrive plasmidu (obr. 12) - Qiagen PCR cloning kit.

Složení ligační směsi:

Chemikálie	Objem [μ l]
Rostok DNA v EB pufru	2
Ligační směs 2x	2,5
pDrive cloning vektor (50 μ g/ μ l)	0,5
Celkový objem	5



Obr. 12. pDrive cloning vektor (Qiagen PCR cloning kit handbook, 2001)

Ligační směs byla inkubována při 16 °C přes noc. Druhý den byl provedena inaktivace ligasy při teplotě 70 °C po dobu 10 min.

Elektrokompetentní *E. coli* TOP10 buňky byly použity pro elektroporaci a vložení plasmidu s insertem. Elektrokompetentní *E. coli* je uchovávána při – 70 °C, před vlastní elektroporací je uložena na ledu. Pro elektroporaci bylo smícháno v laminárním boxu 50 µl *E. coli* a 1 µl ligační směsi v kyvetě elektroporátoru a udělen elektrický impuls o napětí 1800 V a době trvání 4 ms. Okamžitě po impulsu bylo do kyvety přidáno 200 µl SOC média a směs byla z kyvety přenesena v laminárním boxu do sterilní mikrozskumavky, které se nechaly inkubovat 1 h na třepačce při teplotě 37 °C.

Pro kultivaci byly použity LB agarové plotny obsahující antibiotikum ampicilin v koncentraci 50 µg/ml. Na povrchu agaru bylo rozetřeno hokejkou 40 µl roztoku XGal (0.1 M roztok v N,N'-dimetylformamidu) a 40 µl IPTG (0.1 M vodný roztok) a nanášeno 50 µl transformovaných bakterií. Petriho misky byly zalepeny pomocí Parafilmu a inkubovány při 37 °C přes noc.

Druhý den byly bílé kolonie (modro/bílá selekce) přeneseny pomocí sterilního párátko do 2 ml tekutého LB média obsahující antibiotikum ampicilin (50 µg/µl) a inkubovány přes noc při 37 °C. Namnožené bakterie byly použity pro izolaci plasmidu.

4.6.9 Screening pomocí α -komplementace (modro-bíla selekce)

Součástí plasmidu pDrive jsou geny rezistence na antibiotika (ampicilin a kanamycin) pro selekci a plasmid zároveň obsahuje *lacZ* gen, jehož součástí je MCS („multiple cloning site“). V tomto místě dochází k ligaci úseků DNA, která způsobí přerušení *lacZ* genu a bakterie není schopna produkce funkční β -galaktosidasy. Jako substrát pro tento enzym je použit bezbarvý cukr Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid). Ten je funkčním enzymem β -galaktosidasou metabolizován na galaktosu a 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol, který je oxidován na modrou látku 5,5'-dibromo-4,4'-dichloroindigo. Ten označuje kolonie bakterií, ve kterých není plasmid s vloženým DNA insertem. IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid) má funkci induktoru *lacZ* operonu.

4.6.10 Izolace plasmidu s vloženým insertem

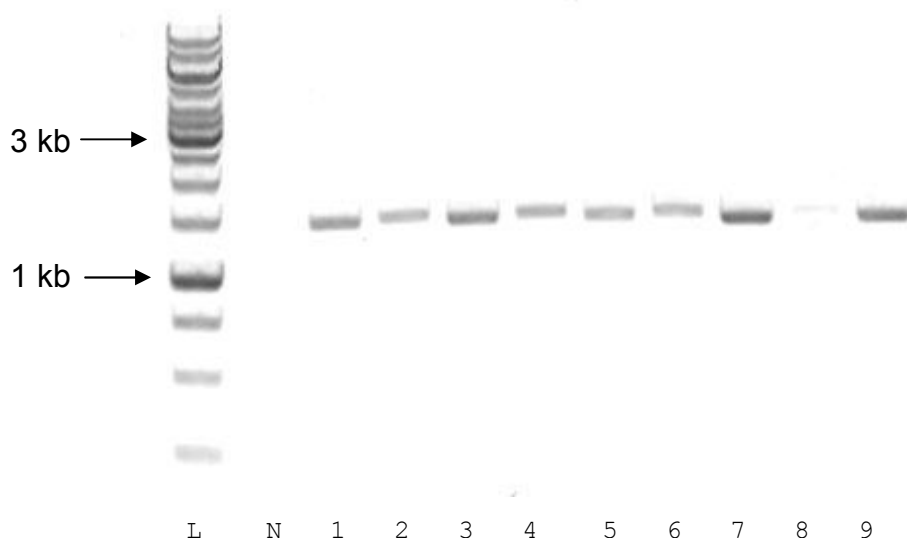
K izolaci plasmidů byl použit QIAprep Miniprep kit využívající metodu alkalické denaturace.

Z bakteriální kultury bylo odebráno 1,5 ml do mikrozkušavky, následovala centrifugace (6 000 RPM, 4 °C, 5 min). Supernatant byl odlit a pelet nesuspendován v 250 μ l P1 pufru. Bylo přidáno 250 μ l P2 pufru, směs byla promíchána převrácením. Do mikrozkušavky bylo přidáno 350 μ l N3 pufru a okamžitě byla promíchána převrácením 4-6krát. Směs byla centrifugována 10 min (14 000 RPM, 4 °C). Supernatant byl pipetován do QIAprep spin kolony, proběhla centrifugace 1 min (14 000 RPM, 4 °C). Tekutina, která protekla byla odstraněna do odpadu. Do kolony bylo nanášeno 500 μ l PB pufru, centrifugace 1 min (14 000 RPM, 4 °C). Z jímací zkumavky byla odstraněna tekutina a do kolony přidáno 750 μ l PE pufru, centrifugace 1 min (14 000 RPM, 4 °C). Tekutina, která protekla, byla odstraněna a kolona centrifugována další 1 min (14 000 RPM, 4 °C) pro odstranění zbytkového promývacího pufru. K vymytí DNA byla kolona přenesena do čisté mikrozkušavky a do středu membrány bylo aplikováno 30 μ l EB pufru. Kolona se nechala 1 min stát a pak následovala centrifugace 1 min (14 000 RPM, 4 °C).

Úspěšnost ligace do plasmidu byla ověřena restriční analýzou podle postupu 4.6.4, ligační směs byla analyzována elektroforézou v agarosovém gelu a odečtena velikost inzeru.

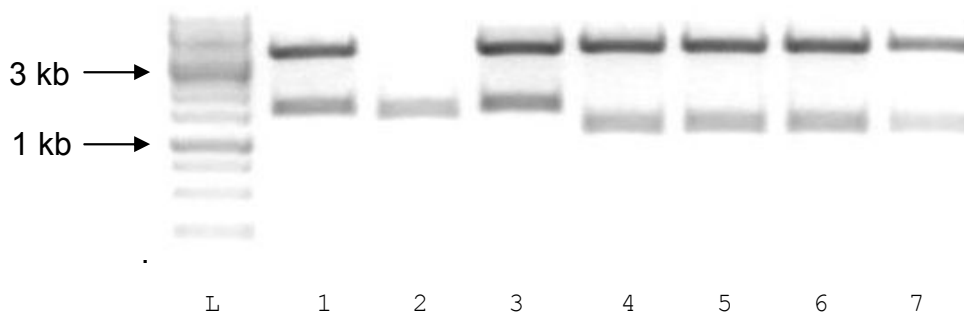
5 Výsledky

Byla izolována genomová DNA z wild-type kmene *Claviceps purpurea* (4.6.3), genomová DNA byla štěpena restriční endonukleasou EcoRI (4.6.4). Metodou PCR (4.6.5) byly z fragmentované genomové DNA amplifikovány geny *dmaW* a *easC*, které byly separovány elektroforézou (4.6.6) v agarosovém gelu (obr. 13).



Obr. 13. Elektroforetogram vzorků z PCR. L – 1 kb DNA ladder, N – negativní kontrola, jamka 1, 3, 5, 7, 9 - gen *dmaW*, jamka 2, 4, 6, 8 - gen *easC*

DNA amplikony byly vyřezány z agarosového gelu a izolovány do EB pufru (4.6.7), poté ligovány do pDrive plasmidu (4.6.8). Plasmidy s vloženým inzertem byly elektroporovány do elektrokompetentních bakterií TOP10 *E.coli*. Selekcce bakterií byla provedena na LB médiu s ampicilinem metodou alfa-komplementace (4.6.9). Bílé kolonie bakterií byly přeneseny do tekutého LB média. Namnožené bakterie byly použity ke zpětné izolaci plasmidu a restriční analýze (4.6.10) pro potvrzení přítomnosti inzertu (obr. 14). Izolované plasmidy byly odeslány na sekvenaci (ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.) s univerzálními primery komplementárními k promotorové sekvenci T7 a SP6 v pDrive vektoru. Získané sekvence byly upraveny v programu BioEdit a porovnány s odpovídajícími geny kmene P1 a druhů příbuzných *C. purpurea*.

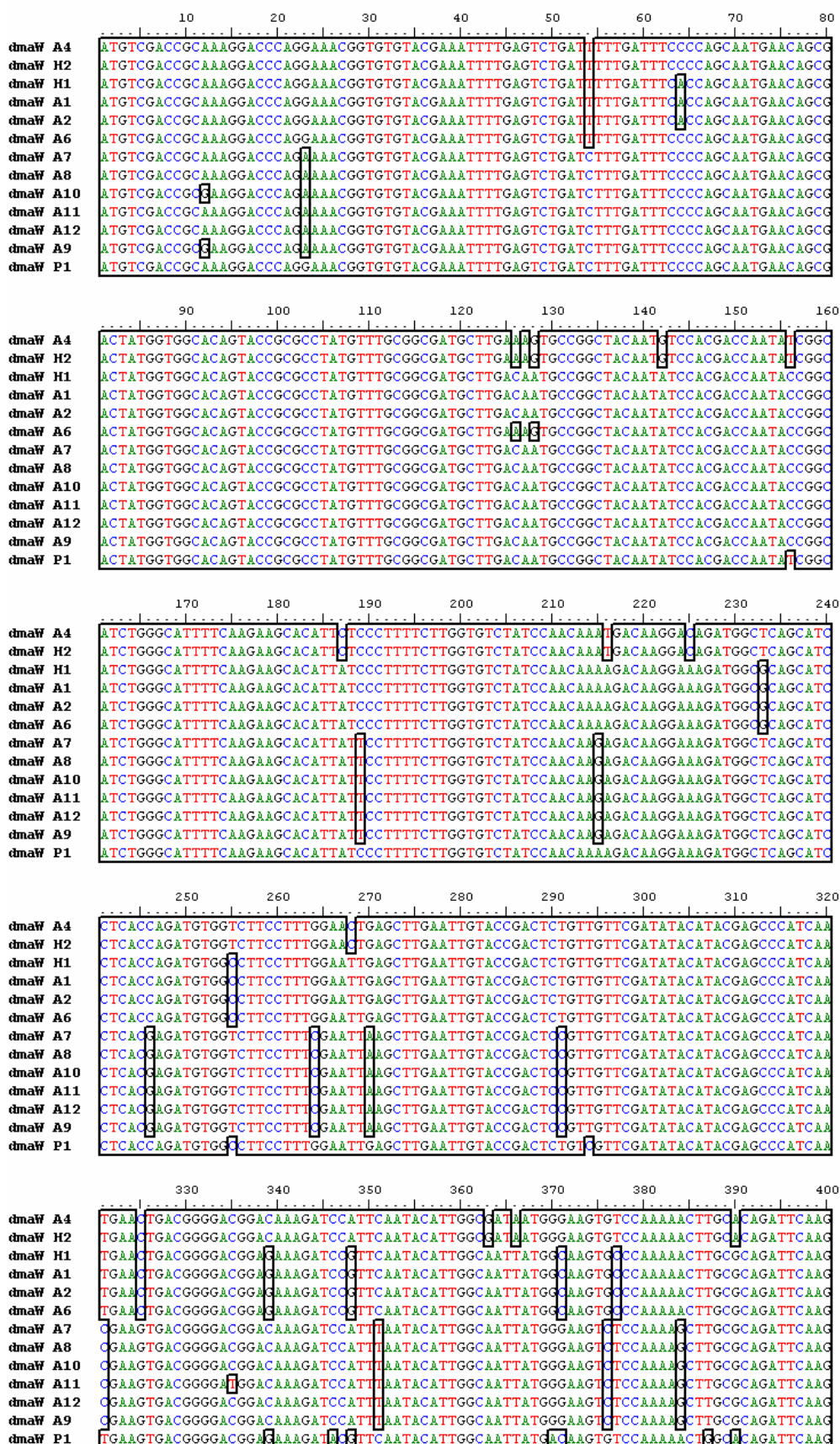


Obr. 14. Elektroforetogram pDrive plasmidu s vloženými inzertami po restrikci EcoRI restrikční endonukleasou. L – 1 kb DNA ladder, jamka 1, 3 – pDrive s *easC* inzertem, jamka 4, 5, 6 – pDrive s *dmaW* inzertem, jamka 2 – neúspěšná ligace

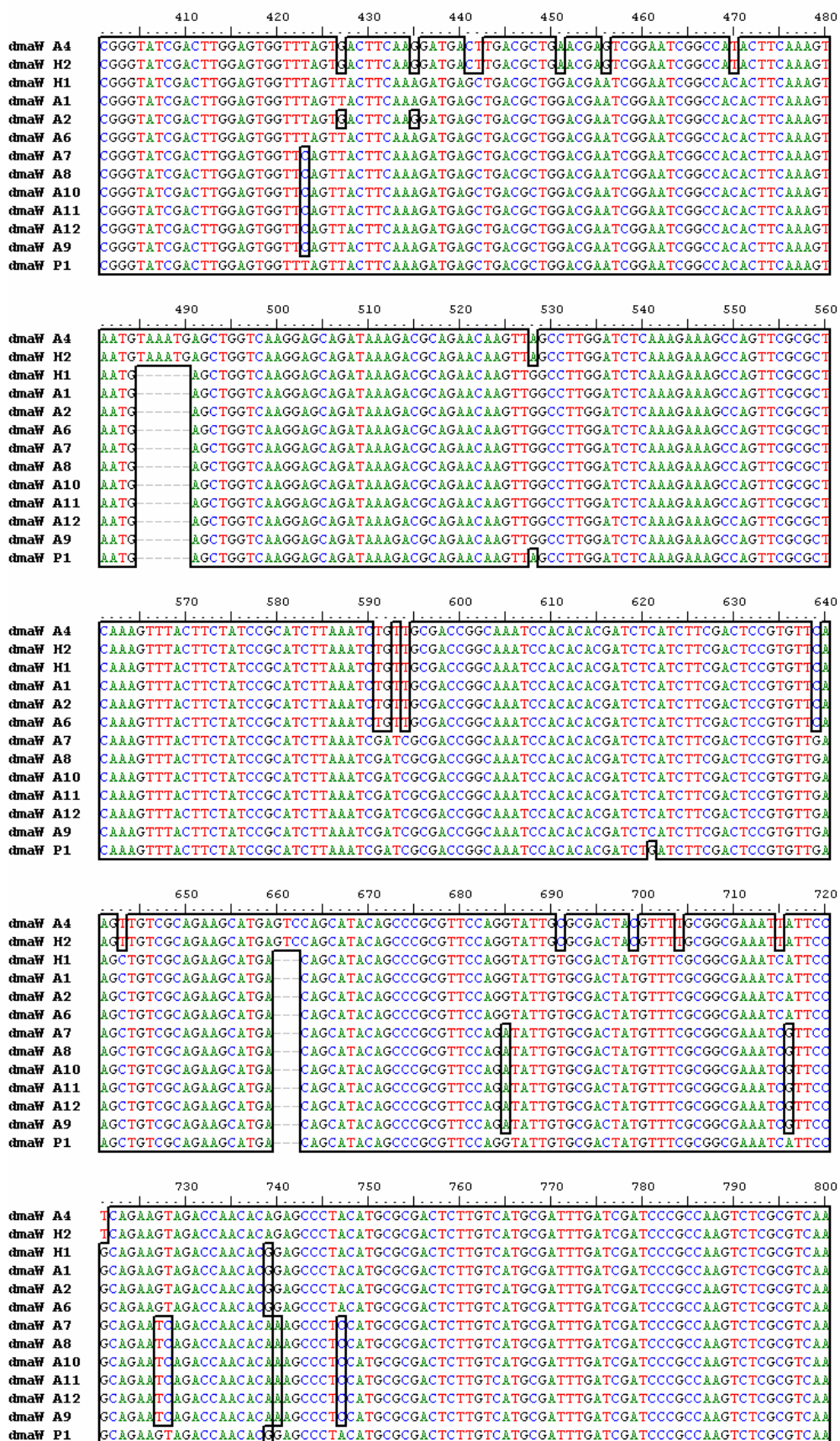
5.1 Vyhodnocení sekvencí genu *dmaW* WT *C. purpurea*

Bylo zpracováno 10 sekvencí genu *dmaW* WT *C. purpurea* (*dmaW* A1, A2, A4, A6 – A12), které byly porovnány se dvěma sekvencemi genu *dmaW* WT *C. purpurea* (*dmaW* H1, H2) zpracovanými v diplomové práci Mgr. Heleny Hulvové (Hulvová H., 2009) a genem *dmaW* referenčního kmene P1 (NCBI accession number: AY259840). Srovnání těchto sekvencí je zobrazeno na obr. 15.

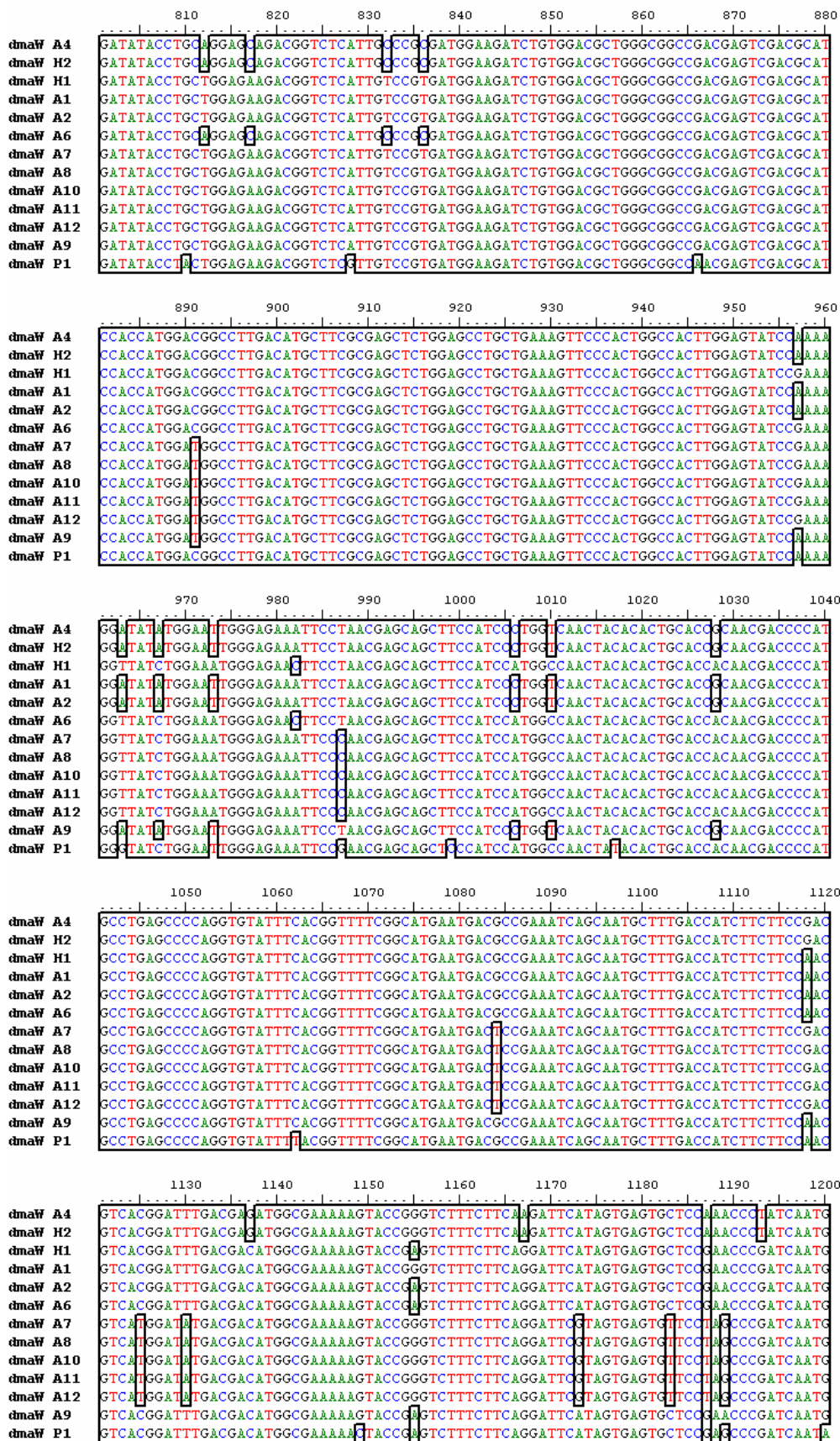
Všechny tyto sekvence byly porovnány pro zjištění podobnosti jednotlivých sekvencí, výsledky se nalézají v tabulce 2. Sekvence s podobností větší než 99% byly zařazeny do skupin zastupujících jedinečné kopie genu *dmaW* WT *C. purpurea*. V tabulce 3 je rozložení jednotlivých sekvencí do skupin. Skupina byla v pozdějším vyhodnocování brána jako jedinečná sekvence reprezentující celou skupinu. V případě variability ve složení nukleotidů mezi zástupci ve skupině, byl jako správný vybrán ten, který byl zastoupen ve více sekvencích. Získané klony z genomické DNA byly porovnány s cDNA sekvencí pro gen *dmaW* v NCBI databázi a *in silico* vystříženy dvě intronové sekvence nacházející se v 3'koncové oblasti genu. Takto upravené geny pro *dmaW* S1–S4 byly přeloženy do sekvence aminokyselin a vyhledány homologní sekvence DMAT syntasy (gen *dmaW* kóduje DMAT syntasu) pomocí webového rozhraní nástroje BLAST. Grafické znázornění podobnosti ortologních proteinů je na obr. 16. Kromě *dmaW* genu z kmene P1 *C. purpurea* byly v NCBI databázi nalezeny ortologní geny z dalších zástupců čeledi *Clavicipitaceae* – *C. fusiformis*, *Balansia obtecta*, *C. purpurea* kmene T5 a blíže necharakterizovaní zástupci čeledi *Clavicipitaceae*. Přístupové kódy z NCBI se nalézají v tabulce 4.



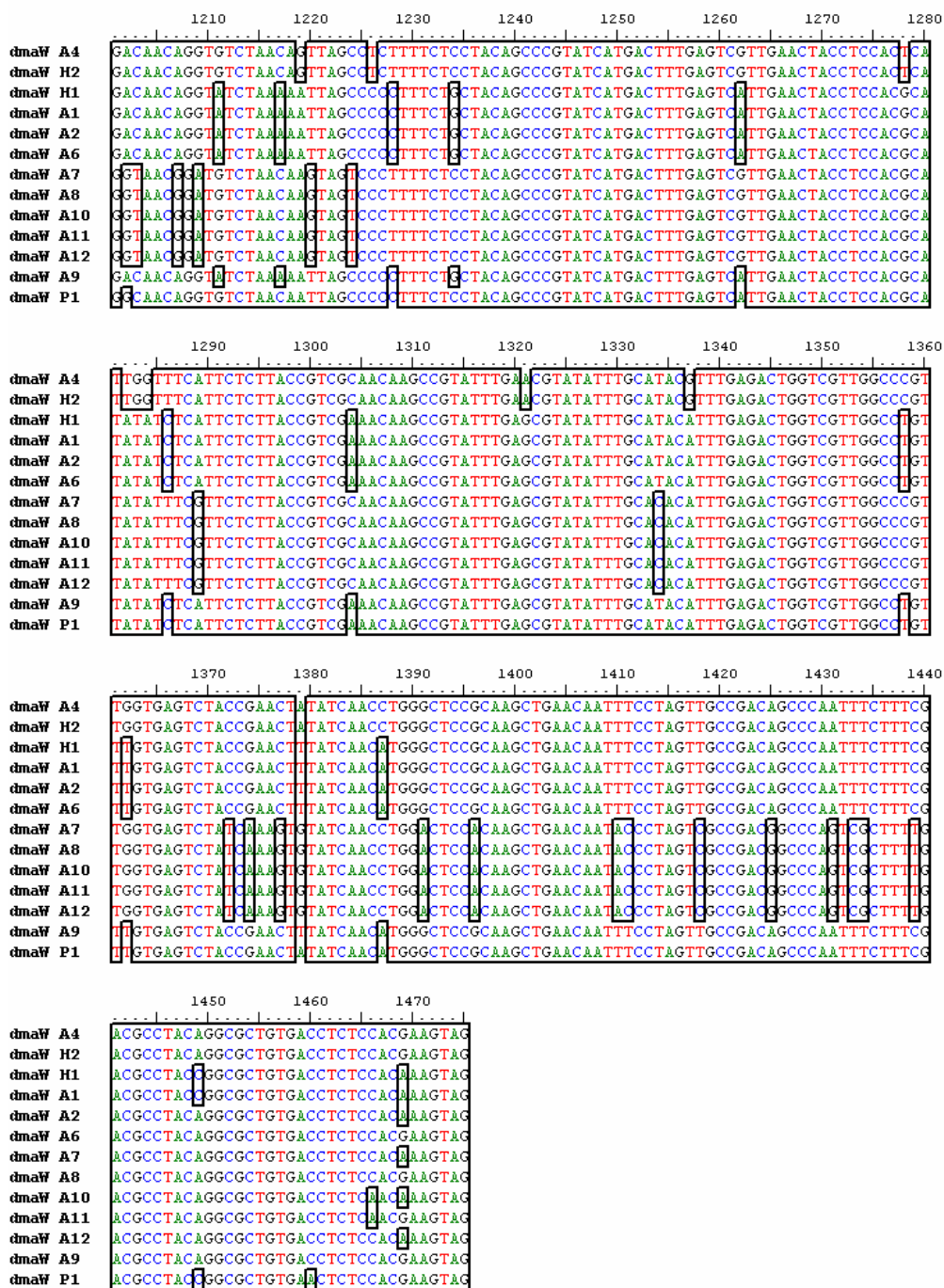
Obr. 15. Srovnání DNA sekvencí genu *dmaW* kmenu P1 a WT *C. purpurea* (část 1)



Obr. 15. Srovnání DNA sekvencí genu *dmaW* kmenu P1 a WT *C. purpurea* (část 2)



Obr. 15. Srovnání DNA sekvencí genu *dmaW* kmenu P1 a WT *C. purpurea* (část 3)



Obr. 15. Srovnání DNA sekvencí genu *dmaW* kmenu P1 a WT *C. purpurea* (část 4)

Tab. 2. Homologie DNA sekvencí genu *dmaW* kmenu P1 a WT *C. purpurea*

	dmaW A4	dmaW H2	dmaW H1	dmaW A1	dmaW A2	dmaW A6	dmaW A7	dmaW A8	dmaW A9	dmaW A10	dmaW A11	dmaW A12	dmaW P1
dmaW A4	ID	1	0,945	0,951	0,952	0,951	0,924	0,924	0,939	0,922	0,923	0,924	0,932
dmaW H2	1	ID	0,945	0,951	0,952	0,951	0,924	0,924	0,939	0,922	0,923	0,924	0,932
dmaW H1	0,945	0,945	ID	0,993	0,992	0,993	0,947	0,946	0,969	0,946	0,945	0,947	0,967
dmaW A1	0,951	0,951	0,993	ID	0,997	0,987	0,944	0,943	0,974	0,942	0,942	0,944	0,966
dmaW A2	0,952	0,952	0,992	0,997	ID	0,987	0,942	0,942	0,974	0,941	0,94	0,942	0,965
dmaW A6	0,951	0,951	0,993	0,987	0,987	ID	0,944	0,944	0,967	0,942	0,943	0,944	0,963
dmaW A7	0,924	0,924	0,947	0,944	0,942	0,944	ID	0,999	0,965	0,998	0,997	1	0,937
dmaW A8	0,924	0,924	0,946	0,943	0,942	0,944	0,999	ID	0,965	0,997	0,998	0,999	0,937
dmaW A9	0,939	0,939	0,969	0,974	0,974	0,967	0,965	0,965	ID	0,965	0,964	0,965	0,955
dmaW A10	0,922	0,922	0,946	0,942	0,941	0,942	0,998	0,997	0,965	ID	0,997	0,998	0,936
dmaW A11	0,923	0,923	0,945	0,942	0,94	0,943	0,997	0,998	0,964	0,997	ID	0,997	0,936
dmaW A12	0,924	0,924	0,947	0,944	0,942	0,944	1	0,999	0,965	0,998	0,997	ID	0,937
dmaW P1	0,932	0,932	0,967	0,966	0,965	0,963	0,937	0,937	0,955	0,936	0,936	0,937	ID

Legenda:

dmaW A1, A2, A4, A6 – A12: sekvence získané v této práci

dmaW H1, H2: sekvence zpracované v Hulvová H. (2009)

dmaW P1: referenční sekvence

Tab. 3. Skupiny genu *dmaW* WT *C. purpurea*

Skupina	Zástupci
<i>dmaW</i> S1	<i>dmaW</i> A4, H2
<i>dmaW</i> S2	<i>dmaW</i> H1, A1, A2, A6
<i>dmaW</i> S3	<i>dmaW</i> A7, A8, A10, A11, A12
<i>dmaW</i> S4	<i>dmaW</i> A9

	10	20	30	40	50	60	70	80
DMAT 1	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDNAGYSVHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
DMAT 2	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDNAGYNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
DMAT 3	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDTAGVNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
DMAT 4	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDTAGVNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
DMAT 5	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDTAGVNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
DMAT 6	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDTAGVNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
dmaW S1	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLESAGYNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
dmaW S2	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDNAGYNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
dmaW S3	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDNAGYNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
dmaW S4	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDNAGYNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							
dmaW P1	MSTAKDPGNGVYEILSLIFDFPSNEQRLWVHSTAPMFAAMLDNAGYNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYPTKDKERWLSI							

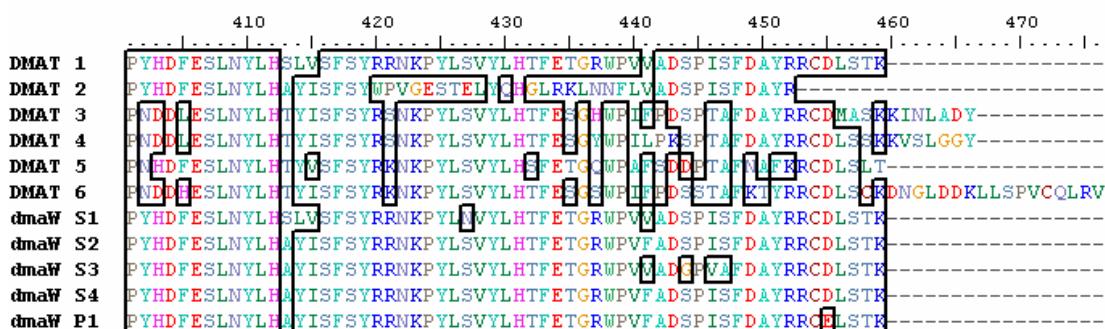
	90	100	110	120	130	140	150	160
DMAT 1	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
DMAT 2	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
DMAT 3	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
DMAT 4	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
DMAT 5	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
DMAT 6	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
dmaW S1	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
dmaW S2	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
dmaW S3	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
dmaW S4	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							
dmaW P1	LTRCGLPPELSLNCTDSVVRYYEPIINEMTGTGTEKDPNTLAIMGSLQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESAITLQD							

	170	180	190	200	210	220	230	240
DMAT 1	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
DMAT 2	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
DMAT 3	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
DMAT 4	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
DMAT 5	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
DMAT 6	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
dmaW S1	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
dmaW S2	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
dmaW S3	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
dmaW S4	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							
dmaW P1	NVNELVKCEIKTONKALDLKESQFALKVYFPHLKSIAATGKSTHDLIFDSVFKLSQKHDSIQPAFQVLCDDVSSRRN							

	250	260	270	280	290	300	310	320
DMAT 1	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
DMAT 2	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
DMAT 3	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
DMAT 4	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
DMAT 5	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
DMAT 6	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
dmaW S1	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
dmaW S2	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
dmaW S3	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
dmaW S4	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							
dmaW P1	HSABSDQHRALHARLLSCDLIDPAKSRVKIYLLERIVSVLSAMEDLWTLGRRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVP							

	330	340	350	360	370	380	390	400
DMAT 1	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
DMAT 2	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
DMAT 3	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
DMAT 4	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
DMAT 5	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
DMAT 6	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
dmaW S1	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
dmaW S2	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
dmaW S3	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
dmaW S4	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							
dmaW P1	TGHLEYPKGYELGEIPNEQLPSMANYTLHHNDMPPEPQVYFVFGMNDAEISNALTIFFRHGFDDMAKKYRVFLQDSY							

Obr. 16. Srovnání aminokyselinových sekvencí DMAT syntasy (část 1)



Obr. 16. Srovnání aminokyselinových sekvencí DMAT syntasy (část 2)

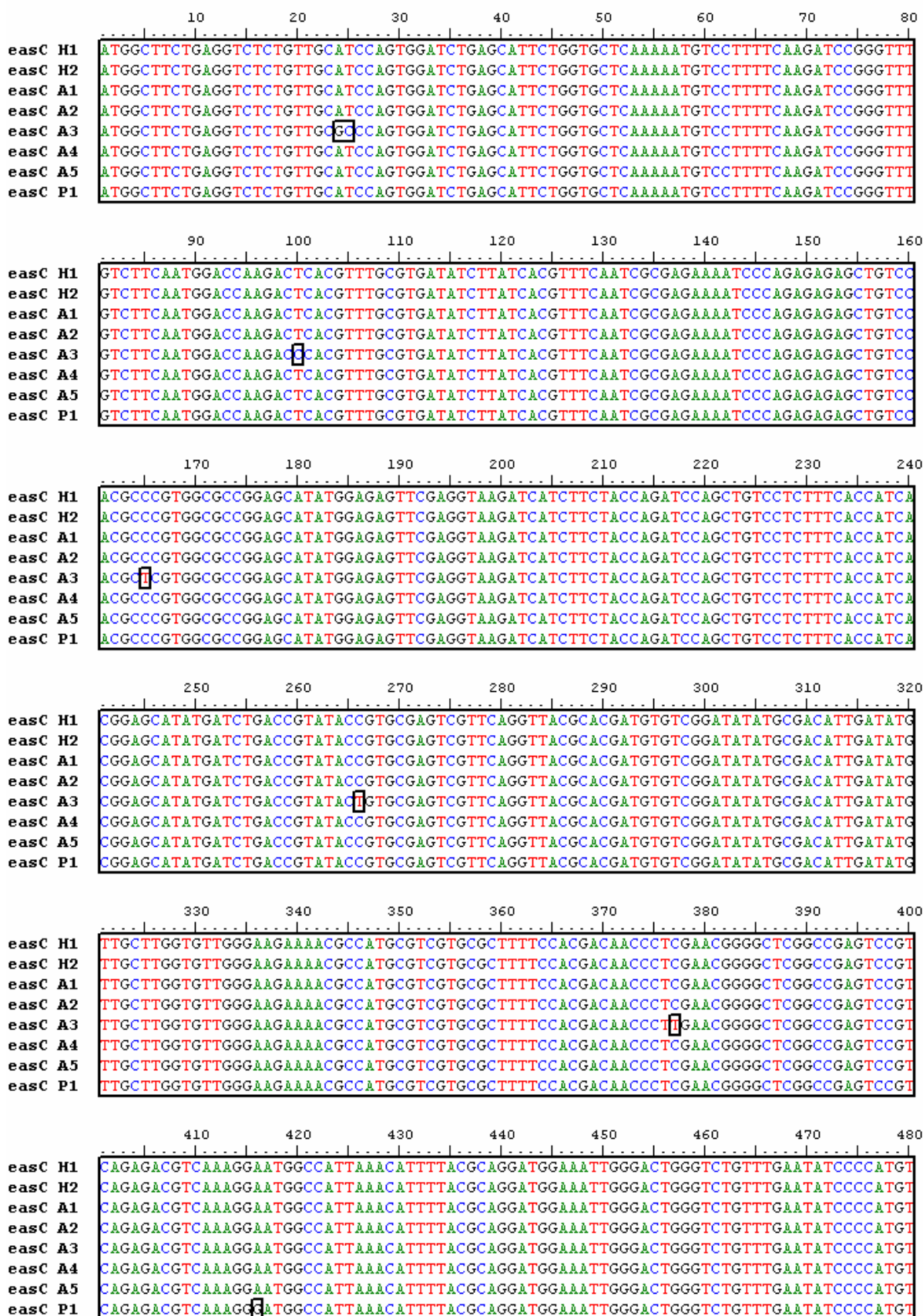
Tab. 4. Přístupové kódy z NCBI k sekvencím použitých ve srovnání DMAT syntas a jejich zdrojový organismus.

Název	NCBI přístupový kód	Organismus
DMAT 1	Q9C141.1	<i>Claviceps purpurea</i> kmen T5
DMAT 2	CAC37397.1	<i>Claviceps purpurea</i> kmen T5
DMAT 3	AAZ29613.1	<i>Clavicipitaceae</i> sp.
DMAT 4	AAZ29614.1	<i>Clavicipitaceae</i> sp.
DMAT 5	Q12594.1	<i>Claviceps fusiformis</i>
DMAT 6	Q6X1E1.1	<i>Balansia obtecta</i>
dmaW P1	CAB39314	<i>Claviceps purpurea</i> kmen P1

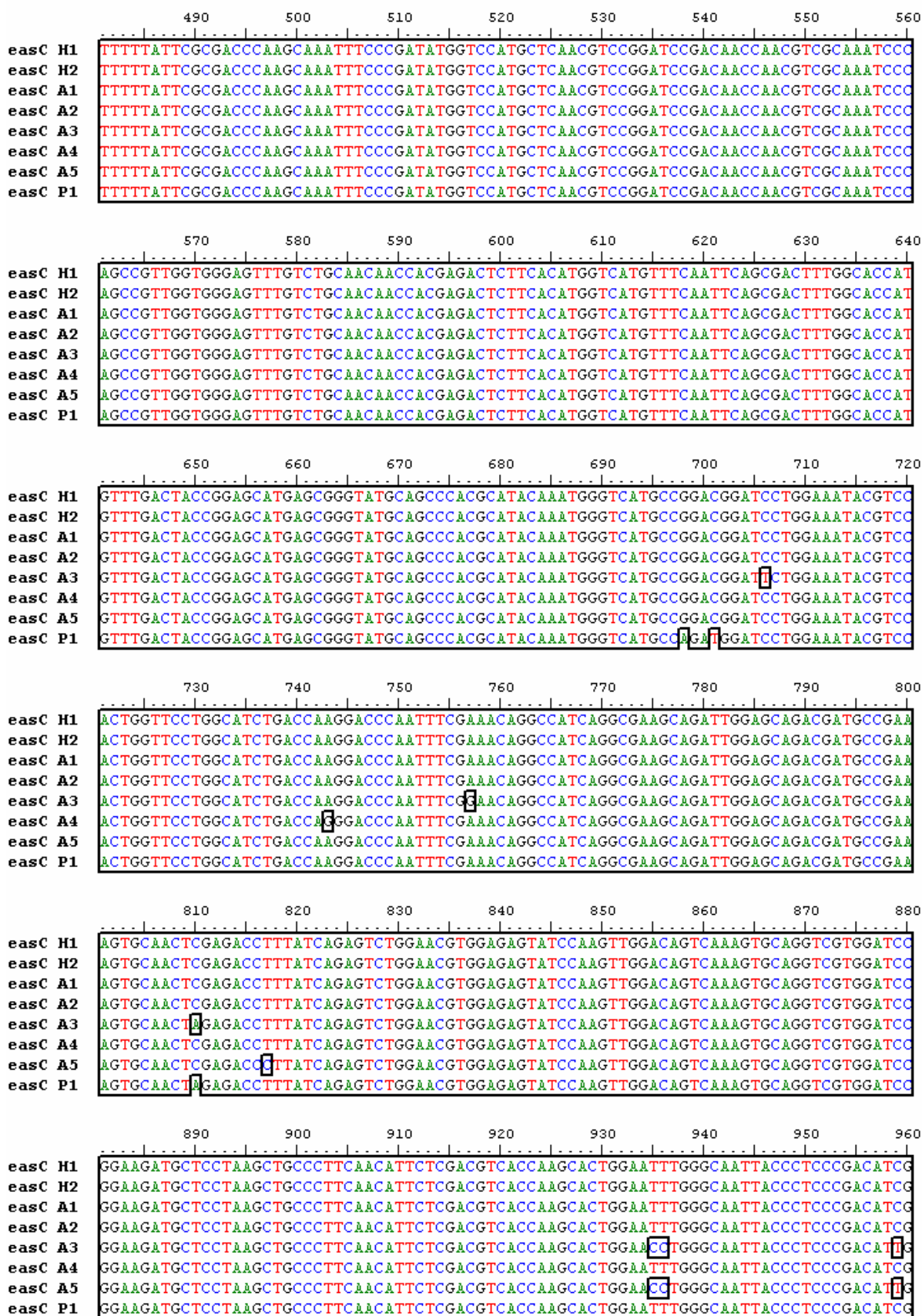
5.2 Vyhodnocení sekvencí genu *easC* WT *C. purpurea*

Bylo porovnáno 5 sekvencí genu *easC* WT *C. purpurea* (*easC* A1-A5) se dvěma sekvencemi genu *easC* WT *C. purpurea* (*easC* H1, H2) zpracovanými v diplomové práci Mgr. Heleny Hulvové (Hulvová H., 2009) a genem *easC* referenčního kmene P1 (NCBI přístupový kód: AJ703808). Grafické znázornění je na obr. 17.

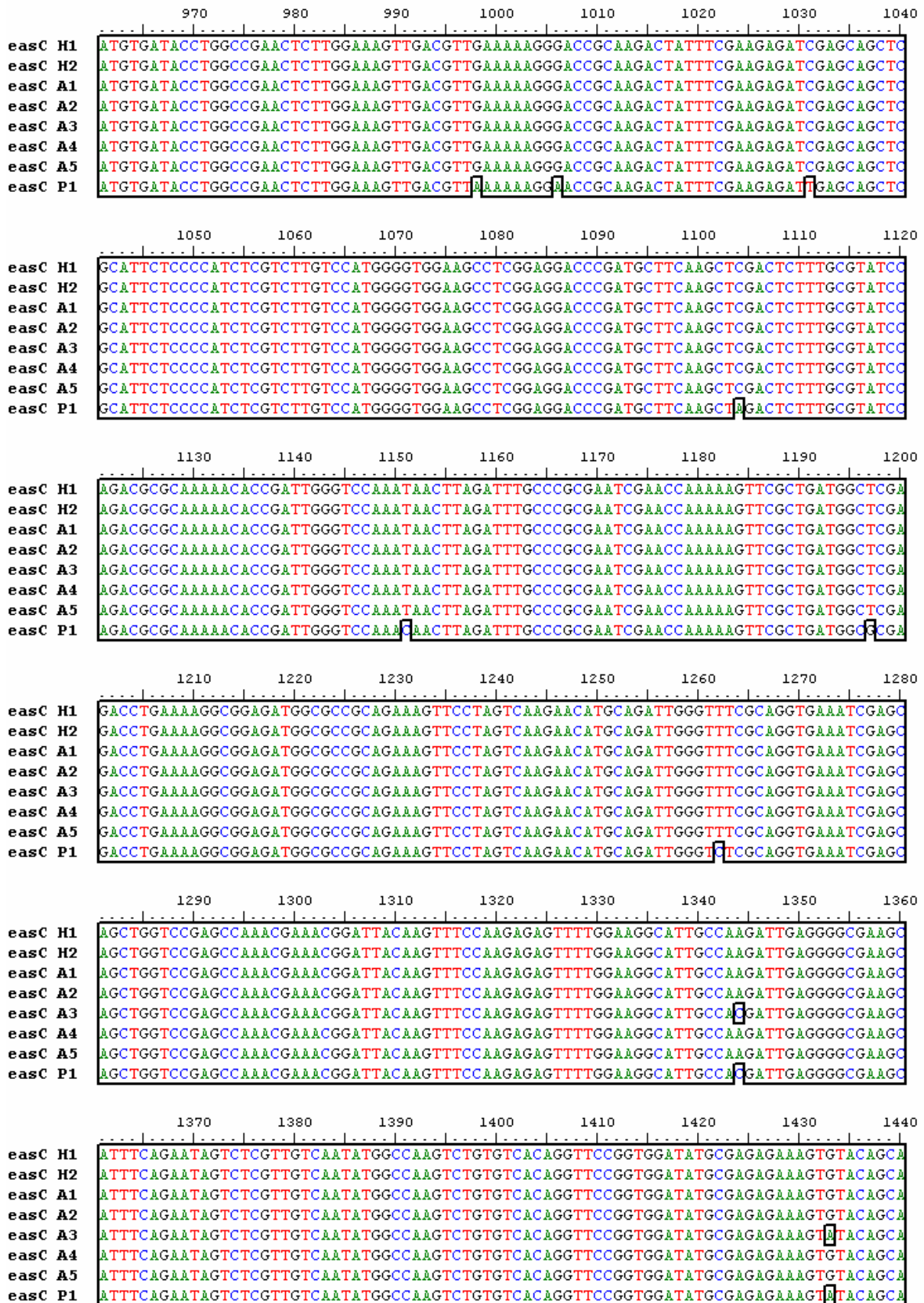
Vysoká homologie mezi všemi sekvencemi zapříčinila jejich zařazení do jedné skupiny *easC* S1, která byla přeložena do sekvence aminokyselin. Před přepisem do aminokyselinové sekvence byl z genů *in silico* vystřižen jeden intron nacházející se v 5'koncové oblasti genu. Mírně vyšší variabilitu (Tab. 5) oproti ostatním sekvencím vykazoval klon označený jako *easG* A3. Polymorfismus oproti ostatním klonům čítal 15 nukleotidů a vyústil celkem do čtyř změn v aminokyselinovém složení. Vzhledem k tomu, že se jedná o variabilitu vyšší než je mezi ostatními sekvencemi z WT kmene a kmenem referenčním P1 (dvě záměny v aminokyselinovém složení) může jít o odlišnou alelu a nebo pravděpodobněji o kontaminaci v genomické DNA izolované z WT, DNA z jiného kmene *C.purpurea* se kterými se na pracovišti pracovalo. K proteinu *easC* byl nalezen další ortologní protein pomocí webového rozhraní nástroje BLAST (obr. 18) z houby *Claviceps fusiformis*.



Obr. 17. Srovnání DNA sekvencí genu easC kmenu P1 a WT *C. purpurea* (část 1)



Obr. 17. Srovnání DNA sekvencí genu *easC* kmenu P1 a WT *C. purpurea* (část 2)



Obr. 17. Srovnání DNA sekvencí genu *easC* kmenu P1 a WT *C. purpurea* (část 3)

1450 1460 1470 1480 1490 1500

```

easC H1 CGTTGGCTCTGATTGCCGATGATCTTGGCCGATAGAGTGAGAACCATGACCGAAGAGATAGTGGAGTAA
easC H2 CGTTGGCTCTGATTGCCGATGATCTTGGCCGATAGAGTGAGAACCATGACCGAAGAGATAGTGGAGTAA
easC A1 CGTTGGCTCTGATTGCCGATGATCTTGGCCGATAGAGTGAGAACCATGACCGAAGAGATAGTGGAGTAA
easC A2 CGTTGGCTCTGATTGCCGATGATCTTGGCCGATAGAGTGAGAACCATGACCGAAGAGATAGTGGAGTAA
easC A3 CGTTGGCTCTGATTGCCGATGATCTTGGCCGATAGAGTGAGAACCATGACCGAAGAGATAGTGGAGTAA
easC A4 CGTTGGCTCTGATTGCCGATGATCTTGGCCGATAGAGTGAGAACCATGACCGAAGAGATAGTGGAGTAA
easC A5 CGTTGGCTCTGATTGCCGATGATCTTGGCCGATAGAGTGAGAACCATGACCGAAGAGATAGTGGAGTAA
easC P1 CGTTGGCTCTGATTGCCGATGATCTTGGCCGATAGAGTGAGAACCATGACCGAAGAGATAGTGGAGTAA

```

Obr. 17. Srovnání DNA sekvencí genu *easC* kmenu P1 a WT *C. purpurea* (část 4)

Tab. 5. Homologie DNA sekvencí genu *easC* kmenu P1 a WT *C. purpurea*

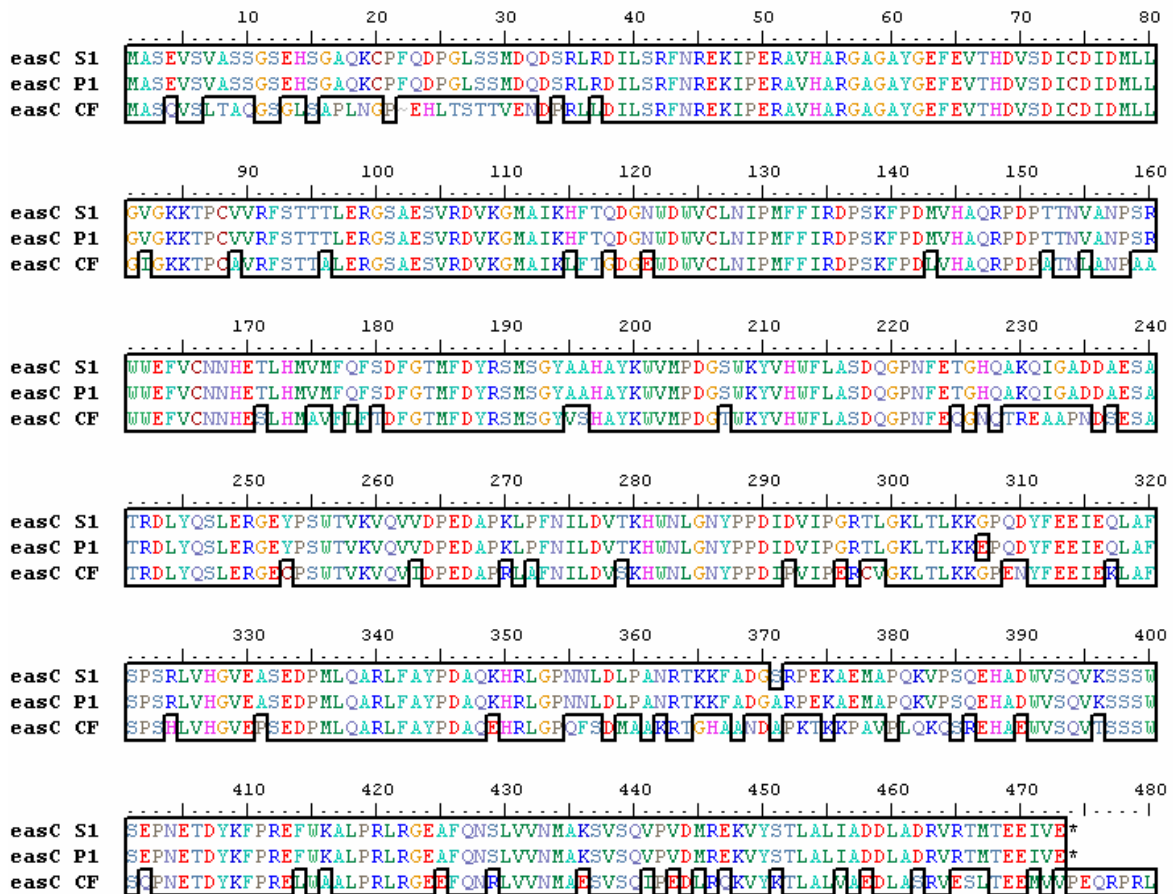
	easC H1	easC H2	easC A1	easC A2	easC A3	easC A4	easC A5	easC P1
easC H1	ID	0,999	1	1	0,99	0,999	0,996	0,99
easC H2	0,999	ID	0,999	0,999	0,989	0,998	0,996	0,99
easC A1	1	0,999	ID	1	0,99	0,999	0,996	0,99
easC A2	1	0,999	1	ID	0,99	0,999	0,996	0,99
easC A3	0,99	0,989	0,99	0,99	ID	0,989	0,99	0,986
easC A4	0,999	0,998	0,999	0,999	0,989	ID	0,996	0,99
easC A5	0,996	0,996	0,996	0,996	0,99	0,996	ID	0,987
easC P1	0,99	0,99	0,99	0,99	0,986	0,99	0,987	ID

Legenda:

easC A1 – A5: sekvence získané v této práci

easC H1, H2: sekvence zpracované v Hulvová H. (2009)

easC P1: referenční sekvence



Obr. 18. Srovnání aminokyselinových sekvencí easC proteinů. (NCBI přístupové kódy: easC P1: CAG28311, easC CF (*Claviceps fusiformis*): ABV57821)

6 Diskuse

Gen *dmaW* byl ve WT *Claviceps purpurea* nalezen ve čtyřech odlišných kopiích, z nichž některé budou zřejmě pseudogeny. Screening dostupných sekvenčních databází objevil jeden popsáný pseudogen pro DMAT syntasu u blíže nespecifikovaného kmene *C.purpurea* nesoucí 7 nukleotidovou inzerci ve čtecím rámci (NCBI přístupový kód AJ312752). Kopie čtyř nalezených genů se odlišovaly od referenční sekvence genu *dmaW* kmene P1 (produkujícího námellové alkaloidy v axenické kultuře), ale měly také vysokou diversitu v rámci divokého kmene. Může se jednat o dvě a dvě alely kódované dvěma lokusy, které vznikly duplikací po fragmentaci části klastru pro produkci námellových alkaloidů.

V ergoidním klastru byly nalezeny sekvence dlouhých terminálních repetitiv a neautonomních transpozómů, umožňující časté spontánní přestavby. Navíc byl klastr sekundárních metabolitů u *Aspergillus fumigatus* nalezen v telomerové oblasti, která je často předmětem rekombinace, chromozomálních zlomů a duplikací (Coyle *et al.*, 2005). Geny klastru jsou pravděpodobně podrobeny mutacím způsobujícím ztrátu funkce, delecím apod. Pseudogen *dmaW* byl již nalezen v neurčeném kmeni *C. purpurea* (Arntz and Tudzynski 2001).

Pro PCR byla použita Phusion[®] polymerasa, která minimalizuje nekomplementární připojení nukleotidu, proto by tyto odlišnosti neměli být chyby v amplifikaci. Vedle bodových mutací byla u jedné z kopií nalezena inzerce tří a šesti nukleotidů. Tyto změny mohou být příčinou snížené produkce námellových alkaloidů u divokého kmene oproti průmyslovým kmenům. V porovnání proteinu DMAT syntasy kódovaného genem *dmaW* se všechny skupiny WT *C. purpurea* odlišovaly od proteinů získaných z NCBI databáze.

Mezi sekvencemi genu *easC* WT *C. purpurea* byla nalezena minimální variabilita, referenční gen *easC* kmene P1 se odlišoval jen v několika nukleotidech. Po překladu těchto sekvencí do proteinu se odlišovaly pouze ve dvou aminokyselinách. Tento výsledek odpovídá hypotéze, že gen *easC* má v klastru regulační funkci, která nedovoluje vznik a udržení mutací v populaci houby .

7 Závěr

V této bakalářské práci byla zpracována literární rešerše na téma syntézy ergoidních alkaloidů u rodu hub *Claviceps* se zaměřením na geny kódující příslušné enzymy, které jsou seskupeny v klastru.

V praktické části byly analyzovány sekvence genů *dmaW* a *easC* z divokého kmene *Claviceps purpurea*. Gen *dmaW* se podle uvedených výsledků v genomu WT *C. purpurea* vyskytuje ve čtyřech kopiích, které se od sebe odlišují nejen bodovými mutacemi, ale v jednom případě i dvěma inzercemi. Sekvence se odlišovaly i od referenční sekvence genu *dmaW* kmene P1. Souhrn těchto změn zřejmě způsobuje sníženou tvorbu námelových alkaloidů u WT *C. purpurea*.

Gen *easC*, vykazující homologii ke katalasám, se v jednotlivých sekvencích lišil minimálně a zřejmě je v genomu *C. purpurea* přítomen jedenkrát. Jeho konzervativní pořadí nukleotidů napovídá správnosti hypotézy jeho regulační funkce s působností na celý klastr.

8 Seznam zkratek

CTAB - cethyltrimethylamoniumbromid

DMATS – dimethylallyltryptofan synthasa

DMAPP – dimethylallylpyrofosfát

dmaW – gen kódující dimethylallyltryptofan syntasu

easC – gen kódující hypotetickou katalasu

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid

lacZ – gen kódující β -galaktosidasu

LPS - D-lysergyl peptid syntetasa

LSD – diethylamid D-lysergové kyseliny

NCBI – Národní centrum pro biotechnologické informace

NRPS – neribosomální peptid syntasa

PCR – polymerázová řetězová reakce

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

9 Použitá literatura

Arntz C., Tudzynski P., 2001. Molecular analysis of dimethyl-allyl-tryptophan-synthase-genes. Nепublikováno.

Berde B., Sturmer E., 1978. Introduction to the pharmacology of ergot alkaloids and related compounds as a basis of their therapeutic application. pp 1-28, Handbook of Experimental Pharmacology 49, Ergot Alkaloids and Related Compounds, Springer-Verlag, Berlin.

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

Bove F.J., 1970. The story of ergot, Basel & New York, Karger

Correia, T., Grammel, N., Ortel, I., Tudzynski, P., Keller, U., 2003. Molecular cloning and analysis of the ergopeptine assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. Chem. Biol. 10, 1281–1292

Eadie, M.J., 2003. Convulsive ergotism: epidemics of the serotonin syndrome? The Lancet Neurology, Volume 2, Issue 7, Pages 429 - 434

Erge D., Maier W., Gröger D., 1973. Untersuchungen über die enzymatische Umwandlung von chanoclavine-I. Biochem. Physiol. Pflanzen 164, 234-247.

Gebler J.C., Poulter C.D., 1992. Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. Arch Biochem Biophys 296:308-313

Haarmann T., Machado C., Lübke Y., Correia T., Schardl C. L., Panaccione D. G., Tudzynski P., 2005. The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: Extension of the cluster sequence and intra species evolution. Phytochemistry 66, 1312-1320.

Haarmann, T., Ortel, I., Tudzynski, P., Keller, U., 2006. Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. *ChemBioChem* 7, 645–652.

Hulvová H., 2009. Genová modifikace *Claviceps purpurea* za účelem zvýšení obsahu námellových alkaloidů, Diplomová práce, Katedra biochemie, Universita Palackého

Keller H.H., Da Prada M., 1979. Central dopamine agonistic activity and microsomal biotransformation of lisuride, lergotrile and bromocriptine. *Life Sci* 24:1211–122

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

Kim S. U., Cho Y. J., Floss H. G., Anderson J. A., 1983. Conversion of Elymoclavine to paspalic acid by a particulate fraction from an ergotamine producing strain of *Claviceps* sp. *Planta Med.* 48, 145-148.

Křen V, Cvak L., 1999. Ergot, the genus *Claviceps*. Medicinal and aromatic Plants Vol. 6. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers; 1999:373-409. *Lancet Neurol.* 2, 429–434

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

Lorenz N., Olšovská J., Šulc M., Tudzynski P., 2010. Alkaloid cluster gene *ccsA* of the ergot fungus *Claviceps purpurea* encodes chanoclavine I synthase, a flavin adenine dinucleotide-containing oxidoreductase mediating the transformation of N-methyl-dimethylallyltryptophan to chanoclavine I. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Mar;76(6):1822-30. Epub 2010 Jan 29.

Lorenz, N., *et al.*, 2009. The ergot alkaloid gene cluster: Functional analyse and evolutionary aspects. *Phytochemistry* 70: 1822-1832

Lorenz, N., Wilson, E.V., Machado, C., Schardl, C., Tudzynski, P., 2007. Comparison of ergot alkaloid biosynthesis gene clusters in *Claviceps* species indicate loss of late pathway steps in evolution of *C. fusiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7185–7191.

Matossian, M.K., 1989. *Poisons of the past: molds, epidemics and history*. New Haven, CT: Yale University Press.

Ortel I., Keller U., 2009. Combinatorial assembly of simple and complex D-lysergic acid alkaloid peptide classes in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *J. Biol. Chem.* 284(11), 6650-6660.

Otsuka T, Anderson J.A., Floss H.G., 1979. The stage of N-methylation as the second pathway-specific step in ergoline biosynthesis. *Chem Comm* 15:660–662

Riederer B., Han M., Keller U., 1996. D-lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *J. Biol. Chem.* 271, 27524–27530.

Rigbers, O., Li, S.M., 2008. Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. Overproduction and biochemical characterization of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 283, 26859–26868.

Řeháček Z., Sajdl P., 1990. *Ergot alkaloids*. Academia-Praha, Czech Republic

Schiff P. L., 2006. Ergot and Its Alkaloids. *Am. J. Pharmaceut. Educ.* 70 (5), 98.

Schneider H.R., Stadler P.A., Stuetz P., Troxler F., Seres J., 1977. Synthesis and properties of bromocriptine. *Experientia* 33: 1412–1413

Socic H., Gaberc-Porekar V., 1992. Biosynthesis and physiology of ergot alkaloids. In: Arora D.K., Elander R.P., Mukerji K.G. *Handbook of applied mycology, vol 4. Fungal biotechnology*. Dekker, New York, 475-515

Stadler P.A., Giger R., 1984. Ergot alkaloids and their derivatives in medical chemistry and therapy. In: Krosgard-Larson P, Christensen CH, Kofod H (eds) Natural products and drug development. Munksgaard, Copenhagen pp 463–485

Šmehilová M. (2005) Purifikace a využití termostabilní DNA-polymerasy exprimované v *Escherichia coli*, Diplomová práce, Katedra biochemie, Universita Palackého

Tsai H.F., Wang H., Gebler J.C., Poulter C.D., Schardl C.L., 1995. The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. Biochemical and Biophysical Research Communications 216: 119-125.

Tudzynski P., Correia T., Keller U., 2001. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 593-605.

Tudzynski, P. and Scheffer, J., 2004. *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. Mol. Plant Pathol. 5, 377–388.

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

Urban Z., Kalina T., 1980. Systém a evoluce nižších rostlin