

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Úloha homologu Gcn4 proteinu**

*Saccharomyces cerevisiae* u houby *Claviceps purpurea*

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Eva Mlynarčíková</b>
Studijní program:	N1407 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Josef Vrabka</b>
Rok:	2017

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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 .....

### **Poděkování**

Děkuji svému vedoucímu Mgr. Josefu Vrabkovi za odborné vedení, ochotu, trpělivost, pozitivní nadhled a čas, který mi při zpracování této práce věnoval. Ráda bych poděkovala také Mgr. Michaele Hradilové za její obětavost a snahu kdykoliv pomoci. V neposlední řadě patří mé poděkování zaměstnancům Oddělení molekulární biologie, CRH za cenné rady a vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eva Mlynarčíková
Název práce	Úloha homologu Gcn4 proteinu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> u houby <i>Claviceps purpurea</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Josef Vrabka
Rok obhajoby práce	2017

### Abstrakt

Nedostatek aminokyselin indukuje u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* expresi Gcn4 transkripčního faktoru, který stimuluje transkripci genů zapojených nejen do biosyntézy aminokyselin. Součástí transkripční sítě označované jako všeobecná kontrola aminokyselin (GAAC) je také regulace genů zapojených např. v syntéze purinů, kofaktorů či dalších transkripčních faktorů. S více než 500 cílovými geny tak Gcn4 protein hraje důležitou roli v odpovědi kvasinky na nepříznivé podmínky. U vláknitých hub jsou homology Gcn4 proteinu, Cpc1/CpcA, klíčovými faktory tzv. mezidráhové kontroly biosyntézy aminokyselin (CPC). Vedle jejich role v biosyntéze aminokyselin se Cpc1/CpcA faktory účastní vývoje a morfologie hub, syntézy sekundárních metabolitů či patogenity hub. Pro infekci fytopatogenní houby *Claviceps purpurea*, mezi jejíž hostitelské rostliny patří např. obiloviny či traviny, je charakteristická transformace napadených obilíků za tvorby tzv. námele. Tato sklerocia jsou charakteristická vysokým obsahem námellových alkaloidů, jež jsou využívány jako farmaceutika při léčbě neurologických onemocněních. V biosyntéze alkaloidů, jejichž prekurzorem je aminokyselina tryptofan, pak může mezidráhová kontrola aminokyselin v čele s Cpc1 proteinem hrát významnou roli.

Tato práce se věnuje studiu funkce Cpc1 proteinu a CPC u *C. purpurea*. Metodou kvasinkového rekombinačního klonování byly připraveny konstrukty pro delecii a konstitutivní overexpresi genu *Cpc1* u *C. purpurea* 20.1. U získaných  $\Delta Cpc1$  mutantů byla sledována schopnost růstu na minimálním mediu suplementovaným vybranými aminokyselinami, 3-aminotriazolem (3-AT; inhibitor biosyntézy His) a peroxidem vodíku. Konstruktem pro konstitutivní overexpresi genu *Cpc1* byl transformován také kmen P1, který je díky schopnosti produkce alkaloidů v axenické kultuře výhodným nástrojem pro studium jejich biosyntézy.

Klíčová slova	Mezidráhová kontrola aminokyselin, <i>Claviceps purpurea</i> , tryptofan, námellové alkaloidy
Počet stran	85
Počet příloh	-
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Eva Mlynarčíková
Title	A role of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Gcn4 homologue protein in fungus <i>Claviceps purpurea</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Department of molecular biology, CRH
Supervisor	Mgr. Josef Vrabka
The year of presentation	2017

### Abstract

Starvation for amino acid induces expression of Gcn4 transcriptional factor in yeast *Saccharomyces cerevisiae* which stimulates transcription not only amino acid biosynthesis genes. Part of the network known as general amino acid control (GAAC) is also regulation of genes involved in purine biosynthesis or synthesis of cofactors and other transcriptional factors. There are more than 500 Gcn4 target genes. Thus, this protein plays an important role for yeast response to unfavorable conditions. Gcn4 homologue proteins, Cpc1/CpcA, are key factors of so-called cross-pathway control (CPC) in filamentous fungi. In addition to the role in amino acid biosynthesis, Cpc1/CpcA factors participate in fungal development and morphology, biosynthesis of secondary metabolites or fungal pathogenicity. A specific transformation of infected grains to so-called ergot is characteristic for the infection of phytopathogenic fungus *Claviceps purpurea* with cereals and grasses as host plants. These sclerotia are characteristic by high levels of ergot alkaloids which are used as pharmaceuticals in the treatment of neurological diseases. The amino acid tryptophan is the precursor for the biosynthesis of alkaloids. Thus, cross-pathway control with Cpc1 can play an important role in this synthesis.

This thesis is focused on studying of Cpc1 protein and CPC function in *C. purpurea*. Using method of yeast recombinational cloning constructs for deletion and constitutive expression of *C. purpurea* 20.1 *Cpc1* gene. The ability to grow at minimal medium supplemented with selected amino acids, 3-aminotriazole (3-AT; histidine biosynthesis inhibitor) and hydrogen peroxide was monitored in the obtained  $\Delta Cpc1$  mutants. A strain P1, which is capable of producing alkaloids in axenic culture, was also transformed with the construct for constitutive expression of *Cpc1*. Thus, mutants can be an effective tool for studying production of these secondary metabolites.

Keywords	Cross-pathway amino acid control, <i>Claviceps purpurea</i> , tryptophan, ergot alkaloids
Number of pages	85
Number of appendices	-
Language	Czech

## Obsah

1 ÚVOD .....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	2
2.1 Transkripční faktory u hub .....	2
2.1.1 bZIP proteiny .....	2
2.1.1.1 Funkce bZIP transkripčních faktorů .....	3
2.2 Gcn4 protein .....	6
2.2.1 Regulace exprese Gcn4 proteinu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
2.2.1.1 Gcn2-dependentní regulace exprese Gcn4 proteinu .....	9
2.2.1.2 Gcn2-independentní regulace exprese Gcn4 proteinu .....	9
2.2.2 Degradace Gcn4 proteinu .....	9
2.2.3 Funkce Gcn4 proteinu .....	10
2.3 Mezidráhová kontrola aminokyselin u vláknitých hub .....	11
2.3.1 Regulace exprese Cpc1/CpcA proteinů .....	12
2.3.2 Role Cpc1/CpcA proteinů .....	13
2.4 <i>Claviceps purpurea</i> .....	16
2.4.1 Role tryptofanu v sekundárním metabolismu <i>Claviceps</i> .....	17
2.4.1.1 Námelové alkaloidy .....	18
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	20
3.1 Materiál .....	20
3.1.1 Biologický materiál .....	20
3.1.2 Vektory .....	20
3.1.3 Enzymy a chemikálie .....	20
3.1.3 Primery .....	22
3.1.5 Roztoky a média .....	23
3.1.5 Laboratorní pomůcky .....	27
3.1.6 Kity a návody .....	27
3.1.7 Programy a software .....	28
3.1.8 Přístroje .....	28
3.2 Metody .....	29
3.2.1 Aktivace mezidráhové kontroly aminokyselin u <i>C. purpurea</i> 20.1 .....	29
3.2.1.1 Příprava biologického materiálu .....	29
3.2.1.2 Příprava RNA .....	29
3.2.1.2.1 Izolace celkové RNA .....	29
3.2.1.2.2 Ošetření RNA DNAsou .....	30
3.2.1.2.3 Precipitace RNA pomocí chloridu lithného .....	30
3.2.1.2.4 Izolace RNA pomocí Agencourt RNAClean XP kitu .....	31
3.2.1.3 Reverzní transkripce .....	31
3.2.1.4 SYBR Green RT-qPCR .....	32
3.2.2 Kvasinkové rekombinační klonování .....	33
3.2.2.1 Konstrukt pro delecí genu Cpc1 .....	33
3.2.2.1.1 Izolace genomické DNA <i>C. purpurea</i> .....	33
3.2.2.1.2 Amplifikace komponent pro tvorbu konstruktů pro delecí genu Cpc1 .....	34
3.2.2.2 Konstrukt pro konstitutivní overexpresi genu Cpc1 .....	36
3.2.2.2.1 Amplifikace Cpc1 genu pro tvorbu konstruktů pro konstitutivní overexpresi genu Cpc1 .....	36
3.2.2.3 Restrikce shuttle vektorů .....	36
3.2.2.4 Elektroforéza v agarosovém gelu .....	36

3.2.2.5 Transformace <i>S. cerevisiae</i> .....	37
3.2.2.5.1 Příprava buněk <i>S. cerevisiae</i> .....	37
3.2.2.5.2 Proces transformace buněk <i>S. cerevisiae</i> .....	37
3.2.2.5.3 Izolace plasmidové DNA alkalickou lýzí .....	38
3.2.2.6 Transformace <i>Escherichia coli</i> tepelným šokem.....	39
3.2.2.7 Kontrolní restrikce .....	39
3.2.2.8 Přečištění plasmidové DNA pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep, sekvenace .....	40
3.2.3 Transformace <i>C. purpurea</i> .....	40
3.2.3.1 Příprava plasmidové DNA .....	40
3.2.3.1.1 Izolace plasmidové DNA pomocí kitu NucleoBond Xtra Midi... 40	
3.2.3.1.2 Precipitace plasmidové DNA isopropanolem a octanem sodným 41	
3.2.3.1.3 Restrikce plasmidové DNA .....	41
3.2.3.1.4 Přečištění restrikční směsi pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up.....	42
3.2.3.2 Příprava protoplastů <i>C. purpurea</i> .....	42
3.2.3.3 Transformace protoplastů <i>C. purpurea</i> .....	42
3.2.3.4 Diagnostická PCR .....	43
3.2.4 Southern blot .....	45
3.2.4.1 Příprava DIG-RNA próby .....	46
3.2.4.1.1 Ligace 3' okrajové sekvence genu <i>Cpc1</i> do pDRIVE vektoru na principu TA-klonování, transformace <i>E. coli</i> .....	46
3.2.3.1.2 Transkripce in vitro .....	47
3.2.4.2 Restrikce gDNA, ethanolová precipitace .....	47
3.2.4.3 Separace DNA fragmentů agarosovou elektroforézou, promývání gelu 48	
3.2.4.4 Kapilární přenos DNA fragmentů .....	49
3.2.4.5 Prehybridizace a hybridizace DNA s DIG-RNA próbou, posthybridizační promývání .....	49
3.2.4.6 Detekce.....	50
3.2.5 Fenotypizace $\Delta Cpc1$ mutantů <i>C. purpurea</i> 20.1.....	50
4 VÝSLEDKY .....	51
4.1 Aktivace mezidráhové kontroly aminokyselin u <i>C. purpurea</i> 20.1 .....	51
4.2 Příprava konstruktů pro delecii a konstitutivní overexpresi genu <i>Cpc1</i> u <i>C. purpurea</i> pomocí kvasinkového rekombinačního klonování.....	52
4.3 Transformace <i>C. purpurea</i> .....	55
4.3 Southern blot .....	58
4.3.1 Příprava DIG-RNA próby .....	58
4.3.2 Analýza DNA $\Delta Cpc1$ mutantů metodou Southern blot .....	60
4.4 Fenotyp $\Delta Cpc1$ mutantů kmene <i>C. purpurea</i> 20.1 .....	61
5 DISKUZE.....	64
6 ZÁVĚR .....	71
7 LITERATURA.....	72
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	82

## **Cíle práce**

- Zpracování literární rešerše na téma proteinu Gcn4 u *Saccharomyces cerevisiae* a jeho homologů u hub; biologie *Claviceps purpurea*.
- Příprava konstruktů pro delecí/konstitutivní overexpresi genu homologního Gcn4 proteinu *Saccharomyces cerevisiae* u *C. purpurea* pomocí kvasinkového rekombinačního klonování.
- Příprava mutantů s delecí/overexpresí genu homologního Gcn4 proteinu *Saccharomyces cerevisiae* u *C. purpurea*, charakterizace získaných mutantů.



## 1 ÚVOD

Rovnovážná hladina aminokyselin je nezbytným předpokladem pro optimální růst a vývoj organismů. U *S. cerevisiae* je tato rovnováha regulována tzv. všeobecnou kontrolou aminokyselin (GAAC), jejímž klíčovým faktorem je Gcn4 protein. Tento transkripční faktor s bZIP vazebnou doménou indukuje u kvasinky za podmínek nedostatku aminokyselin expresi více než 500 genů, a představuje tak klíčový prvek reakce *S. cerevisiae* na změnu prostředí. Exprese Gcn4 proteinu je regulována na úrovni translace pomocí otevřených čtecích rámců v 5' nepřekládané oblasti mRNA. Díky selektivní translaci mRNA během stavu s nedostatkem aminokyselin, kdy je celková proteosyntéza potlačena, je umožněna rychlá reakce kvasinky na nepříznivé podmínky. Obdobný mechanismus byl zjištěn u vláknitých hub, kde se tato transkripční síť označuje jako mezidráhová kontrola aminokyselin (CPC). Homologní Gcn4 proteiny hub rodu *Neurospora*, *Fusarium* či *Aspergillus* byly označeny jako Cpc1, resp. CpcA faktory. Oproti regulaci hladiny *GCN4* transkriptu je však množství Cpc1/CpcA proteinu zřejmě usměrňováno také autoregulací exprese. Vedle úlohy CPC v rovnováze aminokyselin má Cpc1/CpcA protein také funkci v morfologii a růstu houby, sekundárním metabolismu či patogenitě hub.

Parazitické houby rodu *Claviceps* napadají mnoho rostlin z řad travin či obilovin. Širokým rozsahem možných hostitelů se vyznačuje *C. purpurea*, jejíž pozdní fáze infekce je provázena náhradou napadených obilok černofialovými sklerocii, tzv. námelem. Pro sklerocia je typická tvorba alkaloidů, které díky své analogické struktuře s neurotransmitery adrenalinem či serotoninem ovlivňují centrální soustavu savců. Těchto účinků je využíváno při léčbě nemocí jako migréna či Parkinsonova choroba. Prekurzorem biosyntézy alkaloidů je aminokyselina tryptofan, která zároveň působí jako induktor jejich produkce. Možné zapojení CPC v regulaci biosyntézy alkaloidů tak představuje účinný nástroj nejen pro studium jejich samotné syntézy. Zjištění role Cpc1 proteinů v biosyntéze alkaloidů může sloužit taktéž pro optimalizaci jejich průmyslové produkce.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Transkripční faktory u hub

Transkripční faktory (TF) představují klíčové prvky regulačních sítí u eukaryotických organismů. V signálních sítích jsou posledním článkem mezi tokem signálu a expresí cílových genů. Váží se na specifické promotorové sekvence genů s cílem aktivovat nebo potlačit jejich expresi (Lachtman, 2008).

Pouhá přítomnost či absence specifického TF může poskytnout informace o případné existenci signálních drah v organismu. Vedle TF, které se nalézají v různých druzích, příp. vyšších taxonech, existují i skupiny TF charakteristické pouze pro určité říše organismů. Zatímco u říší jako jsou rostliny či živočichové se informace o specifických TF stále rozšiřují, o houbově specifických TF je známo velmi málo (Shelest, 2008). Z celkových 37 superrodin DNA-vázajících domén se u hub předpokládá pouze výskyt 12 z nich. Tři tyto superrodiny, „Zn-klastry“, „kvasinkové transkripční faktory regulované mědí se Zn-doménou“ a „DNA-vázající doména *Mlu1*-box-vázajícího proteinu MBP1“, se pak nachází pouze v říši houby. Některé houbové DNA-vázající domény se naopak nacházejí v různých taxonech. Příkladem mohou být bZIP domény s motivem leucinového zipu (basic leucine zipper, bZIP). Vedle hub jsou součástí transkripčních faktorů také živočichů, rostlin či několika málo druhů virů jako herpesviry či retroviry. Tyto dvě třídy domén patří k jedné ze dvou největších rodin dimerizujících TF (Shelest, 2008).

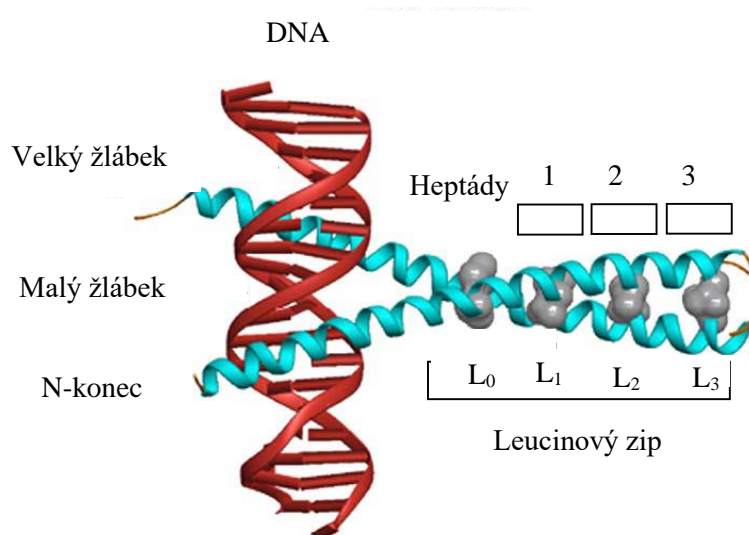
#### 2.1.1 bZIP proteiny

Proteiny s bZIP doménou obsahují dva funkčně rozličné regiony. Prvním je specifická sekvence, u které se na každé sedmé pozici nachází aminokyselina leucin. Tyto heptády pak vzájemnou interakcí aminokyselinových residuí vytvářejí amfipatické  $\alpha$ -helixy, jež se vzájemně ovíjejí a vytvářejí tzv. C-C motiv (coiled-coil). Tento „leucinový zip“ je nezbytný pro dimerizaci DNA-vázajících regionů. Pro účinnou C-C dimerizaci je typický minimální počet čtyř nebo pěti heptád. Druhou částí bZIP domény je vysoce konzervovaný bazický region na N-konci proteinu s mnoha residui bazických aminokyselin jako arginin či leucin. Úlohou tohoto regionu je zprostředkování sekvenčně-specifického navázání proteinu na DNA (Obr. 1; Landschultz *et al.*, 1988; Ellenberger *et al.*, 1992; Ellenberger, 1994; Hurst, 1995; Vinson *et al.*, 2006).

Motiv leucinového zipu s C-C dimerizací se nachází ve třech rodinách transkripčních faktorů. Proteiny s bazickým regionem s motivem helix-smyčka-helix a leucínovým zipem (basic region helix-loop-helix leucine zipper; bHLH-LZ; Murre *et al.*, 1989) se spolu s bZIP proteiny nacházejí jak u rostlin, tak živočichů. Třetí rodina obsahující vedle motivu leucinového zipu DNA-vázající homeodoménu se pak nachází výlučně u rostlin (Ruberti *et al.*, 1991).

### 2.1.1.1 Funkce bZIP transkripčních faktorů

U eukaryot představují bZIP proteiny důležité regulátory vývoje organismů a účastní se mnoha důležitých fyziologických dějů. U živočichů hrají významnou roli např. ve vývoji, metabolismu, cirkadiálním rytmu, učení či paměti. Jako environmentální biosenzory jsou součástí také odpovědi na stres a záření (Wagner, 2001; Deppmann *et al.*, 2006). Rostlinné bZIP faktory jsou důležité pro vývoj semen a zrání květů (Jakoby *et al.*, 2002). Nedávno byly u vláknitých hub prováděny charakterizace celých genových rodin bZIP transkripčních faktorů, např. u *Neurospora crassa* (Tian *et al.*, 2011) či *Magnaporthe oryzae* (Tang *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2015).



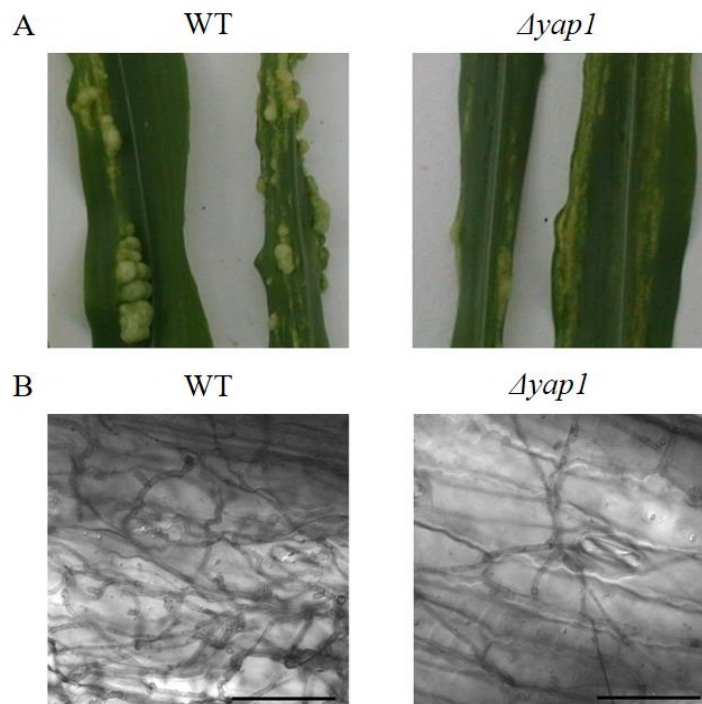
Obr. 1 Rentgenová struktura dimeru bZIP proteinu (Gcn4) navázaného na dvouvláknovou DNA. Modře jsou zobrazeny  $\alpha$ -helixy bZIP domény, šedě aminokyselina leucin, červeně DNA. Na N-konci se nachází bazický region. První tři heptády leucinového zipu jsou očíslovány (převzato a upraveno z Vinson *et al.*, 2006).

Regulace bZIP proteiny u vláknitých hub může být rozdělena do několika skupin, a to vývoj hub, biosyntéza aminokyselin, odpověď na přítomnost „nesložených“ proteinů (unfolded protein response, UPR), zužitkování živin či odpověď na různé typy stresu. Příkladem bZIP TF ve vývoji hub je FlbB protein, který je nezbytný pro nepohlavní vývoj *Aspergillus nidulans*. Nadexprese *flbB* inhibuje tvorbu konidií (Etxebeste *et al.*, 2008). Produkty genů *hac1* *Trichoderma reesei* (Saloheimo *et al.*, 2003) a *hacA* zástupců rodu *Aspergillus* (Saloheimo *et al.*, 2003; Mulder *et al.*, 2004; Richie *et al.*, 2009) aktivují dráhu UPR, která souvisí se skládáním, kontrolou kvality a transportem sekretovaných proteinů (Cao a Kaufman, 2012). Richie *et al.* (2009) také ukázali důležitost *hacA* TF pro virulenci *A. fumigatus*, jejíž oslabení bylo pozorováno u mutantů s delecí *hacA* genu. Dále u nich byla zjištěna zvýšená citlivost k fungicidním látkám narušujícím integritu membrány či buněčné stěny. UPR tak představuje zajímavý terapeutický cíl v boji proti tomuto patogenu. Mezi hlavní nutrienty, které jsou houbami využívány díky bZIP-dependentní regulaci, patří např. železo, dusík nebo různé sloučeniny obsahující síru, a to včetně aminokyselin. Pro udržení homeostázy železa u *A. nidulans* je nezbytným předpokladem přítomnost HapX proteinu, který hraje důležitou roli při situacích s nedostatkem či nadbytkem tohoto kovu (Hortschansky *et al.*, 2007; Gsaller *et al.*, 2014). Důležitou roli v regulačním mechanismu hub představuje MeaB protein, který umožňuje preferenční využití jednoduše asimilovatelných zdrojů dusíku, např. amoniaku, pro zachování ostatních zdrojů, tzv. potlačení metabolismu dusíku (nitrogen metabolite repression, NMR; Polley a Caddick, 1996; Wong *et al.*, 2007). Nicméně byla zjištěna i významná úloha MeaB faktoru v patogenitě *A. flavus* (López-Berges *et al.*, 2010; Amaike *et al.*, 2013). Metabolismus síry je u *N. crassa* a hub rodu *Aspergillus* pod kontrolou bZIP proteinů *cys-3* (Paietta, 2008), resp. *metR* (Natorff *et al.*, 2003, Amich *et al.*, 2013). U *A. fumigatus* byla navíc prokázána důležitá role regulace asimilace síry, v čele s *metR* faktorem, pro virulenci tohoto lidského patogena. U kmene s delecí *metR* genu byla narušena také regulace homeostázy železa (Amich *et al.*, 2013). Uplatnění bZIP proteinů v metabolismu hub se netýká pouze toho primárního, ale např. u *A. fumigatus* (Sekonyela *et al.*, 2013) nebo *Fusarium graminearum* (Son *et al.*, 2011) bylo zjištěno i jejich zapojení do regulace produkce sekundárních metabolitů.

Role bZIP TF byla prokázána také v obranné reakci proti oxidativnímu stresu. Příkladem mohou být YAP proteiny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Stephen *et al.*, 1995) či Cap1 faktor *Candida albicans* (Alarco a Raymond, 1999). Mezi vláknité houby, které využívají bZIP proteiny pro zajištění rezistence vůči oxidativnímu stresu, patří např. *N. crassa* (Tian *et al.*, 2011), *Cochliobolus heterostrophus* (Lev *et al.*, 2005) či houby rodu *Aspergillus* (Assano *et al.*, 2007; Hagiwara *et al.*, 2008; Sakamoto *et al.*, 2008; Balázs *et al.*, 2010).

Oxidativní stres hraje důležitou roli v interakci mezi patogenem a hostitelem (Shetty *et al.*, 2008). Moatf1 faktor *Magnaporthe oryzae* reguluje transkripci genů významných pro překonání obranné reakce rostlin zprostředkované reaktivními kyslíkovými radikály (reactive oxygen species, ROS), např. genů kódujících lakasy či peroxidasy (Guo *et al.*, 2010). Mutanti *Ustilago maydis* s delecí genu kódujícího bZIP protein yap1 vykazovali zvýšenou citlivost k peroxidu vodíku, jednomu z hlavních představitelů ROS (Kuźniak a Urbanek, 2000) a sníženou virulenci (Obr. 2). Molina a Kahmann (2007) dále ukázali indukovaný transport faktoru z cytosolu do jádra v důsledku přítomnosti peroxidu vodíku či během raného stádia infekce kukuřice. Nicméně ne vždy jsou tyto proteiny s virulencí spojeny. Temme a Tudzynski (2009) např. potvrdili roli Bap1 faktoru u *Botrytis cinerea* jako stěžejního regulátoru v ROS detoxifikaci *in vitro*, nicméně do patogeneze tento protein zapojen není. Cílové geny Bap1 nebyly během napadení rostliny exprimovány, ačkoli byl peroxid vodíku detekován.

Mezi významné zástupce bZIP transkripčních faktorů patří i Gcn4 faktor *S. cerevisiae* (Hinnebusch, 1986) a jeho homologní proteiny u vláknitých hub, např. Cpc1 *N. crassa* (Ebbole *et al.*, 1991) či CpcA u hub rodu *Aspergillus* (Wanke *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 2001; Krappmann *et al.*, 2004), které hrají klíčovou roli nejen v regulaci syntézy aminokyselin.



Obr. 2 Snížená patogenita *Ustilago maydis* s delecí *yap1* genu ( $\Delta yap1$ ) vůči kukuřici *Zea mays*. (A) Morfologie tumorů u wild-typu (WT) a  $\Delta yap1$  kmene na listech. (B) Rozvětvení hyf u WT a  $\Delta yap1$  kmene po dvou dnech inokulace, vizualizováno pomocí chlorazolové černi E, délka úsečky reprezentuje 50  $\mu\text{m}$  (převzato a upraveno Molina a Kahmann, 2007).

## 2.2 Gcn4 protein

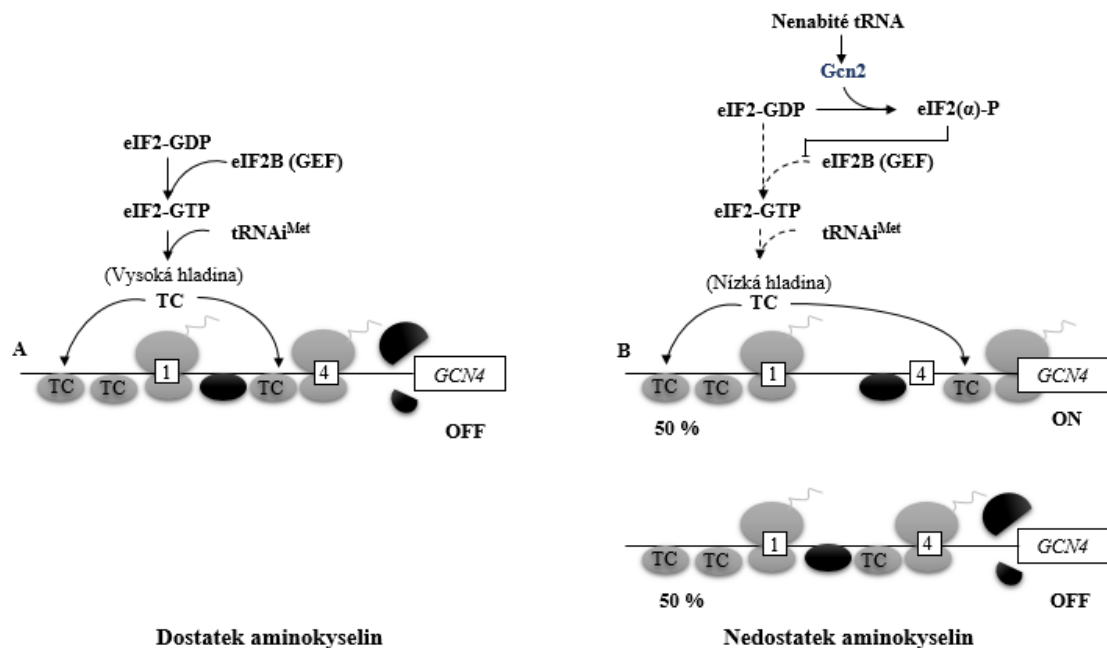
Pro udržení růstu a vývoje organismů je nezbytným předpokladem dostatečné množství aminokyselin. Porušení jejich rovnováhy vyžaduje zvýšenou transkripci genů jejich biosyntézy. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je tato transkripční síť označována jako všeobecná kontrola aminokyselin (general amino acid control, GAAC; Hinnebusch, 1986). Při nedostatku některé aminokyseliny dochází u *S. cerevisiae* k aktivaci mnoha genů biosyntézy aminokyselin (Hinnebusch a Natarajan, 2002) díky hlavnímu transkripčnímu faktoru Gcn4 (general control non-derepressed).

### 2.2.1 Regulace exprese Gcn4 proteinu *Saccharomyces cerevisiae*

Gcn4 jako transkripční faktor ovlivňuje expresi svých cílových genů, on sám je však regulován na úrovni translace své mRNA. Albrecht *et al.* (1998) pozorovali u *S. cerevisiae* kultivované s inhibítozem biosyntézy histidinu (3-aminotriazol, 3-AT; Klopotoski a Wiater, 1965) dvoufázovou odpověď aktivity Gcn4 proteinu, kdy již po 20 minutách byla indukována translace mRNA *GCN4* transkriptu.

Translační regulace exprese Gcn4 proteinu se děje přes otevřené čtecí rámce v 5' nepřekládané oblasti mRNA (upstream open reading frame; uORF), které se nacházejí před hlavním čtecím rámcem *GCN4* transkriptu (Hinnebusch, 2005). uORF jsou obecně tvořeny start kodonem, nejméně jedním dalším kodonem kódujícím aminokyselinu a terminačním kodonem. uORF mohou ovlivňovat translaci dalších otevřených čtecích rámců v 3' směru, kvalitativně i kvantitativně, regulací efektivity využívání start kodonu nebo výběru startovního místa, případně kombinací těchto mechanismů. Vedle ovlivnění translace mohou působit i na stabilitu mRNA (Hood *et al.*, 2009). Rozsáhlá studie založená na sekvenování RNA transkriptomu *S. cerevisiae* ukázala, že 6 % exprimovaných genů kvasinky obsahuje uORF (Nagalakshmi *et al.*, 2008). Jedním z nejvíce prostudovaných mechanismů regulace translace pomocí uORF je princip negativní regulace u *GCN4* transkriptu. Jejím výsledkem je selektivní translace mRNA Gcn4 proteinu za podmínek, kdy je celková syntéza proteinů potlačena. Ačkoli *GCN4* transkript obsahuje 4 uORF, pro regulační roli jsou klíčové pouze první (uORF1) a čtvrtý z nich (uORF4; Mueller, 1986). Účinná iniciace translace začíná na start kodonu uORF1. Po dosažení terminačního kodonu může dojít k opětovné reiniciaci translace ve směru k 3' konci mRNA na start kodonu dalšího uORF (nejčastěji uORF4), případně start kodonu vlastní sekvence *GCN4* transkriptu. Důležitou roli zde hraje množství ternárních komplexů, které jsou tvořeny iniciátorem translace eIF2, GTP a tRNA nesoucí iniciační aminokyselinu methionin (tRNA<sup>iMet</sup>). Ternární komplex po navázání na malou podjednotku (40S) ribosomu umožňuje její nasednutí na mRNA. Po dosažení start kodonu uORF1 se poté připojí velká podjednotka (60S) ribosomu za vzniku kompletního ribosomu, který zajišťuje překlad sekvence mRNA do jazyka aminokyselin. Jakmile je dosaženo stop kodonu uORF1, ribosom se rozpadne na podjednotky. Za stavu s dostatkem aminokyselin je hladina ternárního komplexu vysoká, což umožňuje rychlé opětovné sestavení kompletního ribosomu, a tedy možnost reiniciace translace již na uORF4. Jelikož je vzdálenost mezi stop kodonem uORF4 a start kodonem kódující sekvence *GCN4* příliš malá, reiniciace translace na start kodonu *GCN4* je omezená (Obr. 3A). Situace se však mění za stavu s nedostatkem aminokyselin, kdy již translace *GCN4* dále není potlačována.

Tento stav je charakterizován nízkou hladinou ternárního komplexu. Kolem poloviny 40S ribosomů, které po ukončení translace uORF1 opět „skenují“ mRNA ve směru k 3' konci, je umožněno sestavení kompletního ribosomu až na start kodonu samotného *GCN4* transkriptu, tj. jeho translace (Obr. 3B). U zbylé poloviny 40S ribosomů dojde k navázání ternárního komplexu ještě před dosažením uORF4 a po jeho následné translaci dochází disociaci ribosomů z mRNA (Hinnebusch, 2005). Důvodem pro bypass uORF2 až uORF4 za stavu s nízkou koncentrací ternárního komplexu je vzdálenost mezi uORF1 a uORF4, která není dostatečná pro zajištění znovunavázání potřebných faktorů pro reiniciaci translace před dosažením uORF4. Abastado *et al.* (1991) to ukázali experimentem s rostoucí vzdáleností mezi uORF1 a uORF4, kdy i za stavu charakterizovaném malým množstvím ternárního komplexu byla dereprese *Gcn4* proteinu potlačena a k translaci jeho mRNA nedocházelo.



Obr. 3 Model regulace genové exprese *Gcn4* na úrovni translace. Po ukončení translace uORF1 zůstává asi 50 % 40S podjednotek ribosomů přichycených na mRNA *GCN4* a pokračuje ve skenování sekvence mRNA. (A) Díky vysoké hladině ternárních komplexů (TC) za stavu s dostatkem aminokyselin 40S ribosomy rychle naváží TC. Tím dojde k reiniciaci translace na uORF4. (B) Stav s nedostatkem aminokyselin charakterizovaný nízkou hladinou TC. Kolem 50 % 40S ribosomů, které zůstávají přichycené na mRNA *GCN4*, nestihne navázat TC před start kodonem uORF4, čímž je umožněna translace vlastní sekvence *GCN4*. Hladina TC je snížena díky fosforylaci eIF2 proteinkinasou *Gcn2*, která jej mění ze substrátu na inhibitor eIF2B (GEF) a snižuje hladinu eIF2-GTP v buňce (podle Hinnebusch, 2005).



### 2.2.1.1 Gcn2-dependentní regulace exprese Gcn4 proteinu

Důležitou roli v negativní regulaci translace *GCN4* transkriptu hraje proteinkinasa Gcn2 (Obr. 3B; Abastado J. P., 1991; Braus *et al.*, 2004). Kinasová aktivita Gcn2 je indukována zvýšenou hladinou nenabitých tRNA, které se akumulují ve stavu s nedostatkem aminokyselin. Jediným známým substrátem Gcn2 je  $\alpha$ -podjednotka translačního iniciačního faktoru 2 (eIF2 $\alpha$ ), který slouží k doručení iniciační tRNA nesoucí methionin (Met-tRNA<sup>Met</sup>) na malou podjednotku ribosomu (40S) v prvním kroku iniciace translace. Po vzniku ternárního komplexu s Met-tRNA<sup>Met</sup> a GTP je eIF2 uvolněn jako inaktivní eIF2-GDP komplex. Fosforylace eIF2 $\alpha$  na Ser-51 proteinkinase Gcn2 nicméně ztěžuje vytvoření ternárního komplexu. Důvodem je inhibiční účinek fosforylovaného eIF2-GDP na eIF2B, který se podílí ve výměně GDP za GTP (guanine exchange factor, GEF), a tedy zajištění dostatečné hladiny GTP pro tvorbu ternárního komplexu (Benne a Hershey, 1978; Dever *et al.*, 1992).

### 2.2.1.2 Gcn2-independentní regulace exprese Gcn4 proteinu

Translace *GCN4* transkriptu může být nicméně za určitých podmínek indukována i nezávisle na aktivitě Gcn2 (ale v závislosti na uORF), a to např. přesunem kvasinky z media s dostatkem aminokyselin na minimální medium (Tzamarias *et al.*, 1989) nebo nedostatkem celkového dusíku (Grundmann *et al.*, 2001).

Také u mutantů s narušeným zpracováváním tRNA či jaderným exportem byla zjištěna translace Gcn4 nezávisle na kinasové aktivitě Gcn2 (Vazquez de Aldana *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 2000). Jelikož jsou defektní a nezpracované tRNA zachycovány v jádře, předpokládá se, že akumulace takovýchto tRNA vyvolává inhibici tvorby ternárních komplexů nebo jejich funkce v cytoplazmě (Qiu *et al.*, 2000).

### 2.2.2 Degradace Gcn4 proteinu

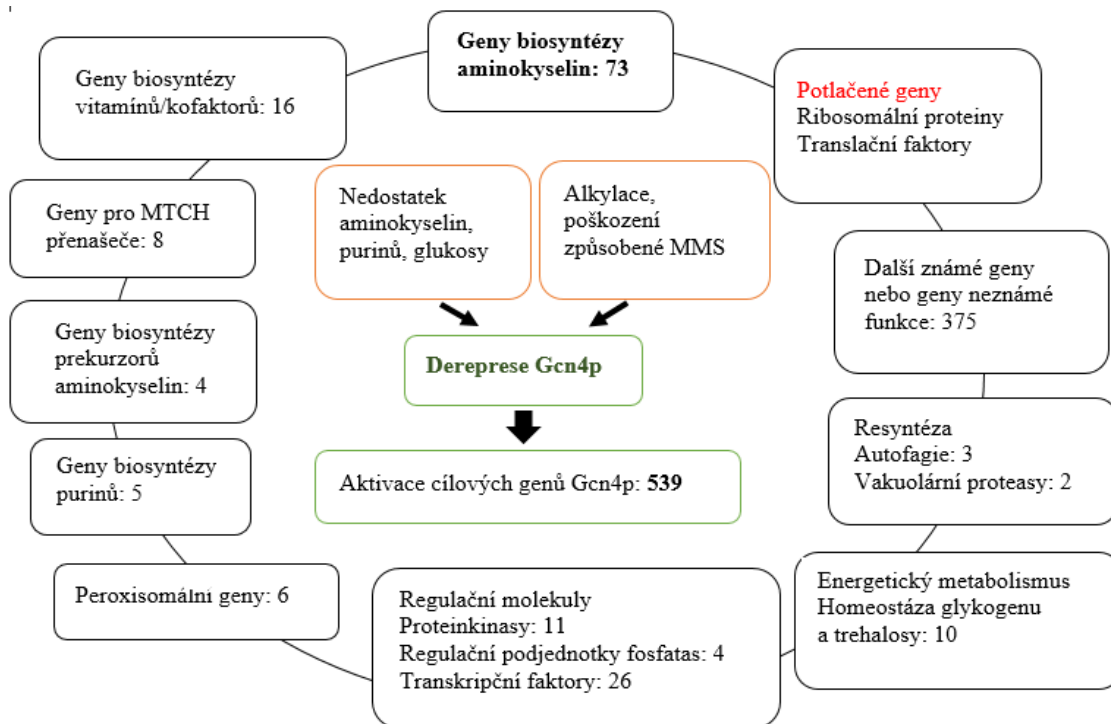
Úroveň degradace Gcn4 proteinu je vedle regulace jeho translace dalším bodem kontroly buněčné koncentrace tohoto faktoru (Irniger a Braus, 2003). U buněk *S. cerevisiae*, které mají dostatek všech nutrientů, je Gcn4 protein velmi rychle degradován (poločas života je zde stanoven na dobu kolem dvou až tří minut). U auxotrofních buněk kultivovaných v mediu s nedostatkem aminokyselin, jejichž syntézu si nejsou schopny zajistit, pak k degradaci proteinu dochází až pětikrát pomaleji.

Množství Gcn4 proteinu v buňce také stabilizuje cykloheximid (Kornitzer et al., 1994; Shemer *et al.*, 2002), který inhibuje syntézu proteinů eukaryotických buněk v elongačním kroku proteosyntézy (Kerridge, 1958).

U buněk, které mají dostatečný přísun živin, dochází k rychlé degradaci Gcn4 proteinu díky fosforylaci specifických residuí aminokyselin v transkripční aktivační doméně cyklin-dependentní proteinkinasami Pho85 a Srb10 (Chi *et al.*, 2001; Meimoun *et al.*, 2000) a následné ubikvitinylaci proteinu ubikvitin-konjugačním enzymem Cdc34 a ubikvitinligasou SCF<sup>CDC4</sup> (Chi et al., 2001; Kornitzer et al., 1994). Pries *et al.* (2002) pak naznačují, že lokalizace samotného Gcn4 proteinu v jádře není regulována hladinou aminokyselin, ačkoli regulace aktivity transkripčních faktorů pomocí jaderného transportu je u kvasinkových transkripčních faktorů běžná.

### 2.2.3 Funkce Gcn4 proteinu

Protein Gcn4 indukuje transkripci mnoha genů zapojených v biosyntéze aminokyselin (Hinnebusch, 1992). Nicméně při experimentech s nedostatkem jiných nutrientů se i zde zjistila zvýšená translace Gcn4 proteinu, což nasvědčuje jeho zapojení i v ostatních metabolických drahách. Mezi další cílové geny Gcn4 faktoru patří např. několik genů biosyntézy adeninu (Mösch *et al.*, 1991; Rolfes a Hinnebusch, 1993), genu *ATRI* kódující transmembránový protein potřebný pro rezistenci vůči 3-aminotriazolu (Coleman *et al.*, 1997; Kanazava *et al.*, 1988) nebo gen *LPDI* pro lipoamiddehydrogenasu (Zaman *et al.*, 1999). Natarajan *et al.* (2001) porovnáním celogenomového expresního profilu kmene s delecí genu *GCN4* *S. cerevisiae* s profilem wild-typu na mediu s 3-aminotriazolem ukázali, že k cílům Gcn4 proteinu patří více než 500 genů. Mezi nimi jsou kromě genů biosyntézy aminokyselin zahrnuty také geny v biosyntéze kofaktorů, biogeneze organel či mitochondriálního transportu. Gcn4 navíc indukuje i geny kódující 11 kinas nebo 26 transkripčních faktorů (Obr. 4).



Obr. 4 Schéma funkčních kategorií cílových genů transkripčního faktoru Gcn4. MMS - methylmethansulfonát (převzato a upraveno z Natarajan *et al.*, 2001).

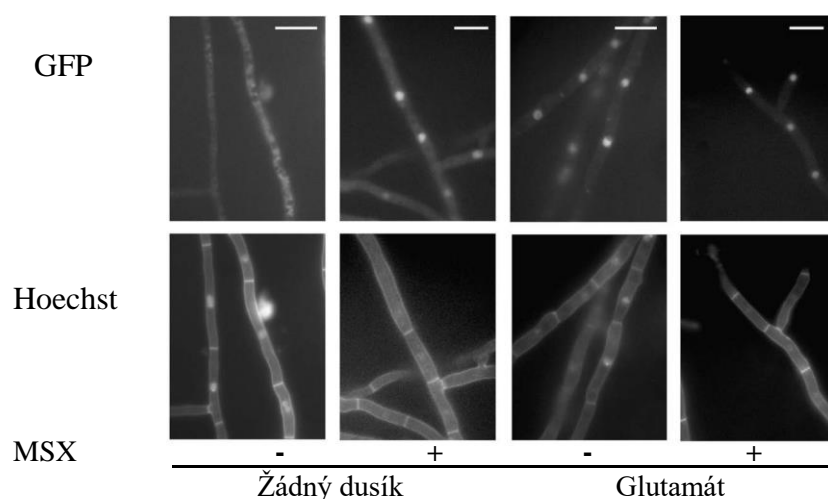
### 2.3 Mezidráhová kontrola aminokyselin u vláknitých hub

U vláknitých hub je GAAC *S. cerevisiae* označována jako mezidráhová kontrola biosyntézy aminokyselin (cross-pathway control, CPC). Byla pozorována u mutantu *Neurospora crassa* s narušenou dráhou biosyntézy tryptofanu, u něhož došlo ke zvýšení hladin enzymů biosyntézy histidinu a argininu (Carsiotis a Jones, 1974; Carsiotis *et al.*, 1974). Homolog kvasinkového Gcn4 proteinu byl označen jako Cpc1 (Paluh *et al.*, 1988). CPC regulace byla popsána i u hub rodu *Aspergillus* s hlavním regulačním proteinem označeným jako CpcA (Eckert *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001) nebo rodu *Fusarium* s Cpc1 proteinem (Schönig *et al.*, 2009; Timpner *et al.*, 2013).

Schönig *et al.* (2009) studovali vliv vybraných aminokyselin jako jediného zdroje dusíku na růst *Fusarium fujikuroi* s delecí *cpc1* ( $\Delta cpc1$ ) genu. V přítomnosti homoserinu a isoleucinu došlo k výrazné redukci růstu mutantů. Tento jev pozoroval u  $\Delta cpc1$  *N. crassa* již Barthelmess (1986), který navrhl jako vysvětlení této situace možnost inhibice společných kroků rozvětvené dráhy biosyntézy aminokyselin v důsledku jejich akumulace.

### 2.3.1 Regulace exprese Cpc1/CpcA proteinů

Regulace exprese homologních proteinů Cpc1/CpcA na úrovni translace je zřejmě stejná jako u modelu *S. cerevisiae* a Gcn4 faktoru. U vláknitých hub nicméně byly pozorovány i další mechanismy kontroly exprese. Důležitým bodem regulace hladiny Cpc1/CpcA proteinů je zřejmě možnost autoregulace exprese. Ta je u eukaryotických transkripčních faktorů relativně běžná (Serfling, 1989), nicméně u Gcn4 proteinu nebyla pozorována (Hinnebusch, 1988). Tzv. CPRE elementy (Cpc1/CpcA-response element) se nalézají především v oblasti promotoru některých cílových genů Cpc1/CpcA faktorů, a zvyšují účinnost jejich transkripce. Nicméně byla zjištěna přítomnost a zapojení CPRE sekvencí do regulace i samotných Cpc1/CpcA proteinů, patří u *N. crassa* (Ebbole *et al.*, 1991; Paluh *et al.*, 1998), *A. nidulans* (Hoffmann *et al.*, 2001) či *F. fujikuroi* (Schönig *et al.*, 2009). Intenzivněji byly CPRE studovány např. u *N. crassa* (Tian *et al.*, 2007). Schönig *et al.* (2009) dále ukázali vliv množství celkového dusíku na lokalizaci Cpc1 proteinu v buňkách *F. fujikuroi*. Při jeho nedostatku je Cpc1 lokalizován v cytoplazmě. Po přidání jedné aminokyseliny, např. glutamátu, jako jediného zdroje dusíku, a/neb MSX (methioninsulfoximin; inhibuje aktivitu glutaminsyntetasy; Brenchley, 1973) do media došlo k translokaci Cpc1 do jádra (Obr. 5). Příčinou této regulace na post-translační úrovni je zřejmě inhibovaná akumulace Cpc1 proteinu v jádře nebo jeho kontrolovaný export z jádra (Schönig *et al.*, 2009).

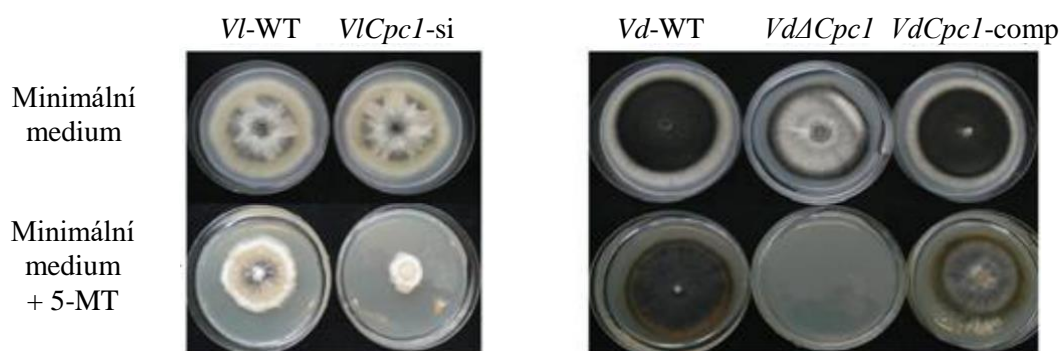


Obr. 5 Lokalizace Cpc1 proteinu *Fusarium fujikuroi* v závislosti na celkové hladině dusíku v buňce. Kultivace kmene s expresí Cpc1 značeného GFP probíhala na mediu neobsahující žádný dusík nebo mediu s glutamátem ( $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ) a v přítomnosti (+;  $2 \text{ mmol l}^{-1}$ ) nebo absenci (-) methioninsulfoximinu (MSX). GFP epifluorescence. Hoechst – barvivo buněčné stěny, sept a jader. Úsečka reprezentuje délku  $10 \mu\text{m}$  (převzato a upraveno z Schönig *et al.*, 2009).

### 2.3.2 Role Cpc1/CpcA proteinů

Vedle úlohy v rovnováze aminokyselin má Gcn4/CpcA/Cpc1 také mnoho rozličných funkcí v morfologii houby. V případě nedostatku aminokyselin řídí Gcn4 protein indukovaný adhezivní a pseudohyfální růst *S. cerevisiae* (Braus *et al.*, 2003; Herzog *et al.*, 2011; Valerius *et al.*, 2007), v případě *Candida albicans* pak dochází v přítomnosti 3-aminotriazolu (3-AT) k indukci vláknitého růstu buněk (Tripathi *et al.*, 2002).

U *Aspergillus nidulans* s nadexpresí CpcA proteinu nebyl při stresových podmínkách, jakým je např. nedostatek aminokyselin, pozorován vliv na růst nebo tvorbu pohlavních spor. Nicméně byl narušen vývoj komplexnějších a energeticky náročnějších plodnic před dokončením meiosis. Výsledkem byla mikrokleistocia plná hyf. Po přidání aminokyselin došlo k obnovení vývoje za tvorby zralých askospor (Hoffmann *et al.*, 2000). Ebbole *et al.* (1990) ukázali důležitou roli Cpc1 faktoru v průběhu nepohlavního cyklu *N. crassa*, jehož zvýšená exprese byla zjištěna během klíčení makrokonidií a během raného myceliárního růstu. Důvodem zřejmě byla nízká hladina aminokyselin v tomto stádiu růstu (Schmidt a Brody, 1976). Během postupného růstu houby byl zaznamenán pokles exprese Cpc1 proteinu, jež byla ve starších myceliárních kulturách jen stěží detekovatelná. Po přidání 3-AT však hladiny mRNA *cpc1* transkriptu i samotného proteinu Cpc1 opět vzrostly (Ebbole *et al.*, 1990). Umlčením *cpc1* genu u *Verticillium longisporum* nedošlo na minimálním mediu bez aminokyselin k ovlivnění růstu a vývoje oproti nemutovanému kmenu, nicméně na minimálním mediu s přidavkem 5-methyltryptofanu (5-MT), zpětnovazebným inhibitorem biosyntézy tryptofanu (Schürch *et al.*, 1974), došlo k retardaci růstu a snížení tvorby konidií. V případě *Verticillium dahliae* s delecí *cpc1* genu pak došlo za stejných podmínek k úplné inhibici růstu (Obr. 6; Timpner *et al.*, 2013). Také mutant s delecí genu *Cpc1* u *F. fujikuroi* vykazoval zvýšenou citlivost k 3-AT nebo MSX (Schönig *et al.*, 2009).



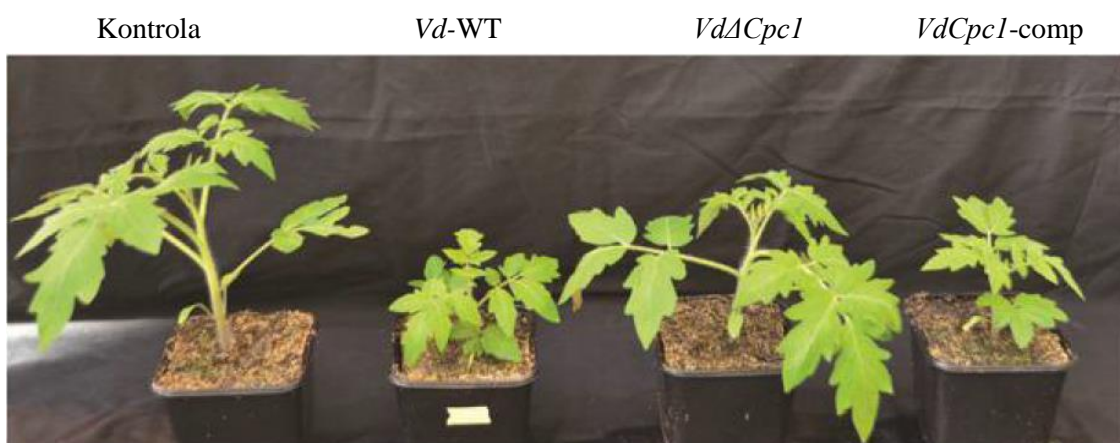
Obr. 6. Kolonie *Verticillium longisporum* s umlčeným *cpc1* genem (*VlCpc1-si*) a *Verticillium dahliae* s delecí *cpc1* genu (*VdΔCpc1*) v přítomnosti nebo absenci 5-methyltyptofanu (5-MT, 5 mmol<sup>-1</sup>) indukujícího stav s nedostatkem aminokyselin. Porovnáno s nemutovanými, wild typovými kmeny (WT) a komplementovaným *VdΔCpc1* kmenem (*VdCpc1-comp*). Růst na minimálním mediu po dobu 9 dnů (převzato a upraveno z Timpner et al., 2013).

Mezi studovaná témata se v poslední době řadí také vliv Cpc1/CpcA regulátoru mezidráhové kontroly aminokyselin na sekundární metabolismus. Busch *et al.* (2003) se věnovali vlivu mezidráhové kontroly na regulaci biosyntézy lysinu a penicilinu u *A. nidulans*, které mají ve svých biosyntetických drahách společný meziprodukt, neproteinogenní aminokyselinu  $\alpha$ -aminoadipát (Goulden a Chattaway, 1968). Výsledkem indukované aktivace CPC v čele s CpaA je potlačení biosyntézy penicilinu u *A. nidulans*. Možným vysvětlením je zmenšení hladiny  $\alpha$ -aminoadipátu přístupného pro biosyntézu penicilinu, k němuž došlo zvýšením biosyntézy lysinu v důsledku přítomnosti CpcA. Případně může exprese CpcA ovlivňovat geny biosyntézy penicilinu nepřímo prostřednictvím interference s jinými regulačními proteiny, které mohou být aktivovány zvýšenou hladinou CpcA (Busch *et al.*, 2003). U *Leptosphaeria maculans* došlo umlčením CpcA ke zvýšení produkce fyto toxinu sirodesminu. CpcA tedy zřejmě zvyšuje hladinu sirodesminu přímým působením na geny jeho biosyntézy anebo nepřímo přes dráhově specifický transkripční faktor sirZ (Elliot *et al.*, 2011).

Opačná situace vlivu Cpc1 proteinu na tvorbu sekundárních metabolitů byla pozorována u houby *F. fujikuroi* (Schönig *et al.*, 2009), která za podmínek pro růst limitujícího množství dusíku produkuje kyselinu giberelovou a pigment bikaverin. Přítomnost dusíku pak vede k téměř úplnému potlačení jejich biosyntézy, v přítomnosti glutaminu jako zdroje dusíku je odezva nejsilnější (Muñoz a Agosin, 1993).

Delece *glnA* genu kódujícího glutamínsynthetasu nicméně vede k silnému potlačení exprese genů biosyntézy těchto sekundárních metabolitů, a naopak ke zvýšení exprese Cpc1 proteinu (Teichert *et al.*, 2004). Nicméně Schönig *et al.* (2009) ukázali, že Cpc1 neovlivňuje regulaci těchto metabolitů. Důvodem může být skutečnost, že biosyntéza giberelinů neinterferuje s biosyntézou aminokyselin.

Nedávná studie ukázala, že CPC v čele s Cpc1 proteinem může být nezbytným faktorem pro virulenci hub. Timpner *et al.* (2013) pozorovali její snížení u fytopatogenů *Verticillium longisporum* a *Verticillium dahliae* s mutantní formou genu *cpc1*. Důvodem je skutečnost, že tyto mutanti nemohou reagovat na cévní systém svých hostitelů, *Brassica napus*, resp. *Solanum lycopersicum*, jejichž xylémová šťáva je pro patogeny klíčovým zdrojem nutrientů (Gibson *et al.*, 2011; King *et al.*, 2011). Mutantní kmen je schopen infikovat rostlinu, nicméně kvůli nedostatku aminokyselin v xylémové šťávě hostitele a nepřítomnosti Cpc1 proteinu je jeho kolonizace do ostatních částí rostlin znemožněna (Obr. 7; Timpner *et al.*, 2013)



Obr. 7 Posouzení virulence *Verticillium dahliae* s delecí *cpc1* genu (*VdΔCpc1*). Fotografie infikovaných rostlin rajčete (*Solanum lycopersicum*) byly pořízeny 21 dní po inokulaci. Kontrola – voda; *Vd*-WT – wild-type (nemutovaný kmen *V. dahliae*), *VdΔCpc1*-comp - komplementovaný *VdΔCpc1* kmen (převzato a upraveno z Timpner *et al.*, 2013).

## 2.4 *Claviceps purpurea*

Rod *Claviceps* představuje unikátní skupinu hub, která parazituje na skupině čítající více než 600 druhů jednoděložných rostlin. Mezi ně patří i některé ekonomicky významné plodiny, čímž dochází ke snížení jejich zemědělského výnosu (Bové, 1970). Většina hub je schopna infikovat pouze úzký okruh rostlin, výjimku pak představuje *C. purpurea* s téměř 400 druhy hostitelských rostlin (Taber, 1985). Pro infekci je charakteristická orgánová specifita, kdy jsou napadány pouze mladé, většinou neoplozené semeníky obilovin a trav. Dalším typickým znakem je absence obranných reakcí hostitele (Tudzynski a Scheffer, 2004). U rostlin jako žito, oves či pšenice dochází po infekci *C. purpurea* k transformaci napadených obilíků za tvorby fialově až černě zbarvených útvarů zvaných sklerocia (Obr. 8). Vzniklá sklerocia (označovaná také jako námeli) jsou charakteristická přítomností alkaloidů, které jsou příčinou onemocnění nazývaného ergotismus. Ačkoli pocházejí první zmínky o projevech ergotismu z období kolem roku 600 př. n. l., největší vlna epidemie byla zaznamenána ve středověku. Tehdy získalo toto onemocnění, způsobené obvykle pozřením chleba, k jehož výrobě byla použita kontaminovaná mouka, označení „oheň sv. Antonína“, příp. „svatý oheň“. Vedle projevů nemoci jako pálení v končetinách či křeče byli pacienti často sužováni paranoiou či halucinacemi (Haarman *et al.*, 2009). Důvodem je analogická struktura alkaloidů obsažených v námeli se strukturou neurotransmiterů dopaminu, serotoninu a noradrenalinu (Obr. 9; Loew *et al.*, 1978). Dnes se nicméně této skutečnosti využívá při léčbě onemocnění centrální nervové soustavy (Haarman *et al.*, 2009), jako např. Parkinsonova choroba. Zde se uplatňuje bromokryptin (2-bromoergokryptin) coby antagonist dopaminového receptoru (Thobois, 2006). Ergotamin, popř. dihydroergotamin, se pak od počátku minulého století využívá v léčbě migrén (Tfelt-Hansen a Koehler, 2008). Na seznamu ilegálně syntetizovaných drog vyráběných z námelových alkaloidů patří k nejznámějším představitelům diethylamid kyseliny lysergové (LSD) nasyntetizovaný ve 30. letech 20. století. Hoffman ve své knize později sepsal poznatky nejen o své práci, ale i vlastních zkušenostech s LSD (Hoffman, 1980).





Obr. 8 Tvorba medovice a sklerocií na klasu žita infikovaném *C. purpurea*.

#### **2.4.1 Role tryptofanu v sekundárním metabolismu *Claviceps***

Sekundární metabolity představují rozsáhlou skupinu látek s různými funkcemi od růstu a vývoje až po ochranu proti různým typům stresu. Většina známých sekundárních metabolitů je odvozena od několika primárních metabolických drah. Příkladem mohou být látky, na jejichž začátku biosyntézy vystupují aminokyseliny, např. tryptofan s charakteristickým nepolárním postranním řetězcem se strukturou aromatického indolového jádra (Obr. 9; Keller *et al.*, 2005). Tryptofan je syntetizován šikimátovou drahou, jejímž výsledným produktem je chorismát. Dalším krokem v syntéze tryptofanu je reakce katalyzovaná antranilátsynthasou, která přeměňuje chorismát na antranilát, kdy jako donor aminoskupiny vystupuje glutamin. Tento enzym hraje klíčovou roli v regulaci biosyntézy tryptofanu (Radwanski a Last, 1995). Houby rodu *Claviceps* produkují jednu z nejznámějších skupin sekundárních metabolitů odvozených od tryptofanu, námelové alkaloidy (Gerhards *et al.*, 2014). Dále se u *Claviceps* zjistila i možnost syntézy hormonů auxinů s hlavním představitelem kyselinou indol-3-octovou, jejichž prekurzorem je také tryptofan.

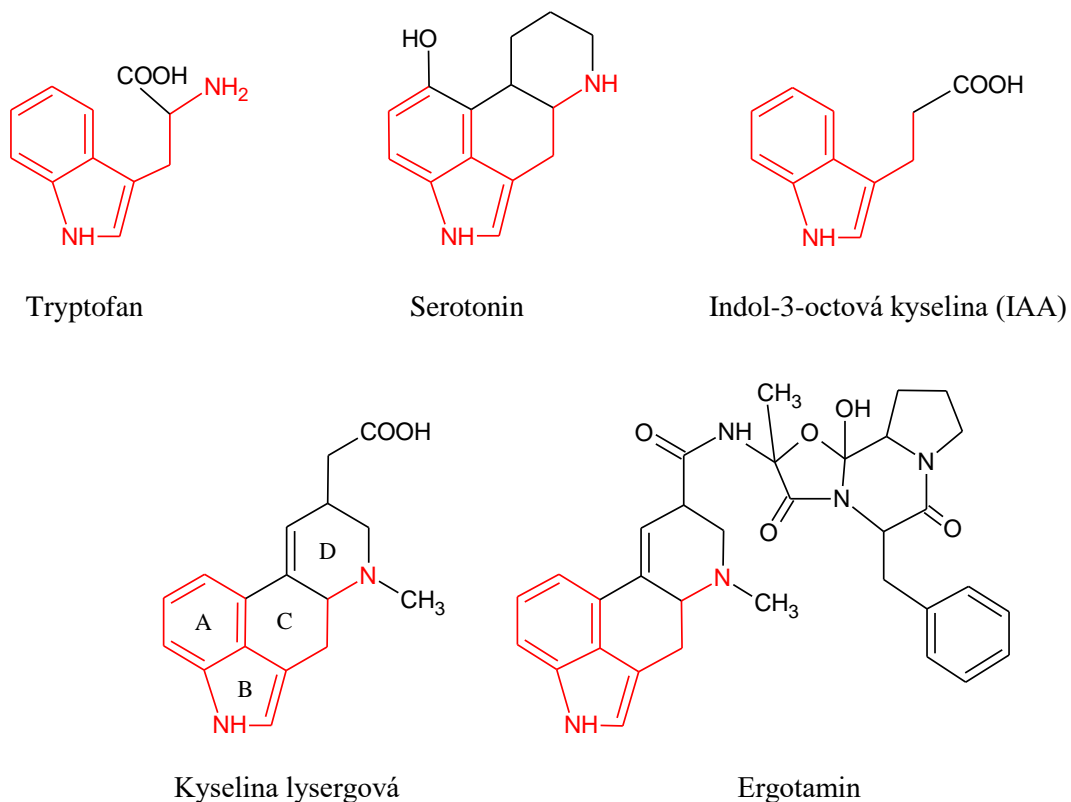
### 2.4.1.1 Námelové alkaloidy

Námelové alkaloidy patří ke skupině sekundárních metabolitů obsahujících dusík, který je v nich zakomponován do indolového jádra. Jejich výskyt byl poprvé zjištěn u námelové houby *C. purpurea*, díky které získaly své označení. Produkce byla nicméně pozorována i u dalších hub z oddělení Ascomycota, např. *Epichloë*, *Penicillium* či *Aspergillus* (Boichenko *et al.*, 2001; Wallwey a Li, 2011).

Rozmanitá skupina námelových alkaloidů je podle své struktury rozdělena do tří podskupin: jednoduché klaviny, kyselinu lysergovou a její amidy, a ergopeptiny, např. ergotamin, s vysoce komplexní strukturou, která je tvořena mj. aminokyselinami jako leucin, isoleucin nebo valin. Společným znakem námelových alkaloidů je přítomnost tetracyklického ergolinového (resp. ergolenového) skeletu tvořeného kruhy A, B, C, D (Obr. 9, Schardl *et al.*, 2006).

Tryptofan má klíčovou roli v biosyntéze námelových alkaloidů, neboť představuje prekurzor pro syntézu ergolinového kruhu (Weygand a Floss, 1963). Dráha biosyntézy začíná prenylací L-tryptofanu, kdy jako donor prenylové skupiny vystupuje dimethylallyldifosfát (DMAPP). Reakci katalyzuje 4-dimethylallyltryptofansynthasa (DMATS), která byla prvním charakterizovaným enzymem v syntéze námelových alkaloidů (Gebler a Poulter, 1992). U *C. purpurea* se všech čtrnáct genů biosyntézy alkaloidů nachází v jednom EAS (ergot alkaloid synthesis) klastru (Tudzynski *et al.*, 1999; Haarmann *et al.*, 2005; Wallwey a Li, 2011).

Tryptofan nicméně působí i jako induktor biosyntézy alkaloidů. Jeho stimulační efekt na produkci alkaloidů byl zaznamenán v případě, kdy byl přidán do media před počátkem jejich syntézy, nikoliv až po začátku jejich tvorby (Floss a Mothes, 1964; Bu'Lock a Barr, 1968; Vining, 1970; Robbers a Floss, 1970). Indukční efekt tryptofanu na zvýšení hladiny DMATS u námelové kultury podle Krupinski *et al.* (1976) zahrnuje *de novo* syntézu tohoto enzymu. Robbers *et al.* (1972) studovali inhibiční efekt vysoké koncentrace anorganického fosfátu na syntézu alkaloidů. Nadbytek fosfátu, který je nezbytný pro produkci proteinů a nukleových kyselin, zřejmě prodlužuje fázi růstu houby. Po ukončení růstové fáze se tryptofan, který se do té doby podílel převážně na syntéze proteinů, stává přístupnějším pro indukci a samotnou produkci alkaloidů. Prodloužení růstové fáze vede k inhibici syntézy alkaloidů z důvodu nedostatečné akumulace tryptofanu. Řeháček *et al.* (1971) poukázali na pravděpodobné zapojení mezidráhové kontroly mezi tryptofanem a histidinem při syntéze alkaloidů, kdy po aplikaci 3-AT došlo ke změně spektra alkaloidů.



Obr. 9 Strukturní vzorce aminokyseliny tryptofan a vybraných odvozených derivátů. Červeně je zaznačena společná struktura látek s tryptofanem. Písmena A, B, C, D značí jednotlivé kruhy ergolinového skeletu námelových alkaloidů.

Spektrum alkaloidů a schopnost jejich produkce se u různých kmenů *C. purpurea* liší. U modelového kmene *Cp* 20.1, jehož genom byl nedávno osekvenován (Schardl et al., 2013), k jejich hlavní produkci dochází až ve sklerociích. Pro studium jejich biosyntézy se pak nabízí využití kmenů jako *Cp* P1, u kterého jsou alkaloidy produkovány již v axenické kultuře a uvolňovány do kultivačního media (Tudzynski et al., 1999). Mechanismus kontroly a regulace produkce námelových alkaloidů dosud u *C. purpurea* není objasněn, nejsou identifikovány ani žádné transkripční faktory, které by na tento proces měly alespoň částečný vliv.

Při snaze o změny hladin námelových alkaloidů se pozornost věnuje především zásahům do EAS klastru. Modulace hladin *Cpc1* proteinu, možného klíčového faktoru pro udržování rovnováhy aminokyselin u *C. purpurea*, tak poskytuje zcela nový přístup v řešení této problematiky.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

*Claviceps purpurea* 20.1 (Schardl *et al.*, 2013)

*Claviceps purpurea* P1 (Keller 1983)

Chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (NEB, Velká Británie)

*Saccharomyces cerevisiae* FGSC 9721 (Winston *et al.*, 1995)

#### 3.1.2 Vektory

pDRIVE (Qiagen, USA)

pDRIVE::CPUR\_04242 (Mgr. Josef Vrabka)

pNDH-OGG (Schumacher, 2012)

pRS426 (Christianson *et al.*, 1992)

pRS426\_Pgpd-cpble (Schumacher, 2012)

#### 3.1.3 Enzymy a chemikálie

##### Enzymy

GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (5 000 U·ml<sup>-1</sup>; Promega, USA)

High-Fidelity DNA Polymerasa (2 000 U·ml<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie)

Lyzační enzym z *Trichoderma harzianum* (Sigma, USA)

RNasa A (10 mg·ml<sup>-1</sup>; Fermentas, Kanada)

T4 DNA ligasa (1 000 U·ml<sup>-1</sup>; Thermo Fisher Scientific, USA)

TURBO DNasa (2 000 U·ml<sup>-1</sup>; Thermo Fisher Scientific, USA)

Restrikční endonukleasy

*Acc65I* (20 000 U·ml<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie)

*BamHI*-HF (20 000 U·ml<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie)

*EcoRI*-HF (20 000 U·ml<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie)

*EcoRV*-HF (20 000 U·ml<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie)

*NcoI*-HF (20 000 U·ml<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie)

*NotI*-HF (20 000 U·ml<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie)

*PstI* (20 000 U·ml<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie)

*XhoI* (20 000 U·ml<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie)

### Pufry pro enzymy

GoTaq Flexi pufr (5x; Promega, USA)  
GC Phusion pufr (5x; NEB, Velká Británie)  
Cut Smart pufr (10x; NEB; Velká Británie)  
T4 DNA ligační pufr (10x; Thermo Fischer Scientific, USA)  
TURBO DNase pufr (10x; Thermo Fisher Scientific, USA)  
NEB 3.1 pufr (10x; NEB, Velká Británie)

### Antibiotika

Ampicilin (Sigma, USA)  
Hygromycin Gold (InvivoGen, Francie)  
Kanamycin (Sigma, USA)  
Phleomycin (Duchefa, Nizozemí)

### Další chemikálie

1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), 6x Loading Dye vzorkovací pufr (Thermo Fisher Scientific, USA), Agar (HiMedia, Indie), Agarosa (Amresco, USA), Amid kyseliny nikotinové (Sigma, USA), Anti-digoxigenin-AP (Roche, Švýcarsko), Blokovací reagent (Roche, Švýcarsko), Bromid ethidia (NeoLab, Německo), Citrát sodný dihydrát (Lach:ner, ČR), CDP-Star (Roche, Švýcarsko), *D,L*-Isoleucin (Penta, ČR), DEPC (Sigma-Aldrich, USA), DIG-labeled DNA molecular weight marker II (Roche, Švýcarsko), Dihydrogenfosforečnan draselný (AppliChem, Německo), Dihydrogenfosforečnan sodný (Lach:ner, ČR), DMSO (Duchefa, Nizozemí), DNA ze spermií lososa (10 mg·ml<sup>-1</sup>; Sigma, USA), dNTPs (Fermentas, Kanada), D-sorbitol (Sigma-Aldrich, USA), Dusičnan vápenatý tetrahydrát (Lach:ner, ČR), EDTA (Penta, ČR), Ethanol (Penta, ČR), Formamid (Fluka, Německo), gb SG PCR Master mix (Generi Biotech, ČR), Glukosa monohdrát (Lach:ner, ČR), Hydrogenfosforečnan draselný (Lach:ner, ČR), Hydrogenfosforečnan sodný (Lach:ner, ČR), Hydroxid draselný (Lach:ner, ČR), Hydroxid sodný (Penta, ČR), Chlorid hořečnatý (Promega, USA), Chlorid lithný (RNAqueous Total RNA Isolation kit, Ambion, USA), Chlorid sodný (Lach:ner, ČR), Chlorid vápenatý (Penta, ČR), Chloroform (Lach:ner, ČR), Isopropanol (Lach:ner, ČR), Kvasinkové dusíkaté báze bez aminokyselin (Difco, USA), Kvasinkový extrakt (Sigma, USA), Kyselina citronová (Lach:ner, ČR), Kyselina citronová monohdrát (Lach:ner, ČR), Kyselina maleinová

(Lachema, ČR), Kyselina octová (Lach:ner, ČR), *L*-asparagin monohydrát (HiMedia, Indie), LB Broth (Sigma-Aldrich, USA), *L*-Histidin (Sigma-Aldrich, USA), *L*-tryptofan (Sigma-Aldrich, USA), MgCl<sub>2</sub> (50 mmol·l<sup>-1</sup>; NEB, Velká Británie), *N*-laurosylsarkosin (Sigma, USA), Nuclease-free voda (Qiagen, Německo), Octan draselný (Penta, ČR), Octan lithný (Sigma, USA), PEG 3350 (Sigma, USA), PEG 6000 (AppliChem, Německo), Pepton (Merek, Německo), ROX referenční barvivo (Generi Biotech, ČR), Sacharosa (Lach:ner, ČR), SDS (Penta, ČR), SD-Ura komplement (směs aminokyselin a výživových látek bez uracilu; Clontech, USA), Síran hořečnatý pentahydrát (Lach:ner, ČR), Síran železnatý heptahydrát (Sigma, USA), Směs aminokyselin a výživových látek bez uracilu (Cloneth, USA), Tris (AppliChem, Německo), TRIzol reagent (Ambion, USA), Trypton (Duchefa, Nizozemí), Tween20 (NeoLab, Německo), X-gal (Sigma, USA).

### 3.1.3 Primery

5F CPUR\_04242

5'-CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGGATCCAAGTTCGACAGCGGAAAAGA-3'

5R CPUR\_04242

5'-CCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACGACAGGGGTATGCTCCAAGA-3'

3F CPUR\_04242

5'-CTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACTGGAAATCAAGCCAGAAACC-3'

3R CPUR\_04242

5'-AACAATTTACACAGGAAACAGCGGATCCTATCCGTCTCAACCACCACA-3'

CpAct\_SYBR\_fw 5'-GCTCTTCCTCACGCCATT-3'

CpAct\_SYBR\_rev 5'-TTCACGCTCGGCAGTAGT-3'

CpBle1\_fw

5'-CGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGCGATCGAGACCTAATACAGCCCC-3'

CpBle1\_rev

5'-GTTGGAGATTTTCAGTAACGTTAAGTGGGCATTGCAGATGAGCTGTATCTG-3'

Cpc1\_SYBR\_fw 5'-CCACGGCATAGAACAAATCC-3'

Cpc1\_SYBR\_rev 5'-CACCTCAAAGGGGGTAAAC-3'

CPUR\_04242\_PoliC\_OE\_fw

5'-CACATCACAATCGATCCAACCATGCGAGAGAAGGCATTGTACAAGAACG-3'

CPUR\_04242\_OE\_Tgluc\_rev

5'-CTAATCATAATCTTATCTACATACGTCATTGAGCACCCGCTTGCGATA-3'

dia_CpAEC_rev	5'- AACACCATGCACATCTCCG-3'
dia_CpAEC_WT_fw	5'- GTCAAATCAAGCGGTGGCG-3'
dia_CpCpc1_fw	5'- GAAAGACACGGGAAGCTCAA-3'
dia_CpCpc1_rev	5'- ACAGCTTGCCAGTTTTTCGAT-3'
dia_CpCpc1_WT_fw	5'- AGCGTCGCTCTATCGCTATC-3'
hph_fw	5'- GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC3'
hph_rev	5'-GTTGGAGATTTTCAGTAACGTTAAGTGGAT3'
Phleo_Hi3F2	5'-GTGTTTCAGGATCTCGATAAGATACG-3'
Phleo_out_Hefe3	5'-GAGCTCGGTATAAGCTCTCC-3'
PoliC_OE_sek1_fw	5'- CCCGGAAACTCAGTCTCCTT-3'
SP6_promotor	5'- ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'
T7_promotor	5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3'
Tgluc_rev	5'-GTCTTCCGCTAAAACACCCC-3'

Nukleová sekvence genu *Cpc1* (CPUR\_04242) *C. purpurea* 20.1 a jeho okrajových sekvencí byla vyhledána v ENA databázi. Primery byly navrženy pomocí programu Primer3. Pro práci se sekvencemi genů a primerů byl použit program na zarovnávání sekvencí BioEdit.

Lyofilizované primery (Sigma, USA) byly rozpuštěny v nuclease-free vodě na koncentraci 100 mmol<sup>-1</sup>.

### 3.1.5 Roztoky a média

#### Kultivace a transformace *C. purpurea*

##### *0,2mol<sup>-1</sup> malát draselný*

600 ml 0,2mol<sup>-1</sup> hydroxid draselný, 600 ml 0,2mol<sup>-1</sup> pufr kyseliny maleinové; z těchto roztoků připraveno 800 ml roztoku o pH = 5,2

##### *InocN medium*

100 g sacharosa, 10 g kyselina citrónová monohydrát, 0,12 g chlorid vápenatý, 0,5 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, 1 g dusičnan vápenatý tetrahydrát, 0,075 g amid kyseliny nikotinové, 0,006 g síran zinečnatý heptahydrát, 0,007 g síran železnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,2 (vodný roztok amoniaku), autoklávováno

*Kultivační BII agar*

12 g agar, 1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 5 g L-asparagin monohydrát, 5 g pepton, 100 g sacharosa, 0,5 g síran hořečnatý pentahydrát; doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,2; autoklávováno

*Kultivační BII medium*

1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 5 g L-asparagin monohydrát, 5 g pepton, 100 g sacharosa, 0,5 g síran hořečnatý pentahydrát; doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,2; autoklávováno

*NL-406 agar*

50 g manitol, 50 g sacharosa, 5,4 g kyselina citronová, 3 g kvasinkový extrakt, 0,1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,3 g síran hořečnatý heptahydrát, 0,01 g síran železnatý heptahydrát, 0,0044 g síran zinečnatý heptahydrát, 10 g agar; doplněno do 1 l destilovanou vodou; pH = 5,4 upraveno pomocí roztoku hydroxidu draselného ( $3 \text{ mol l}^{-1}$ )

*PEG roztok*

$0,05 \text{ mol l}^{-1}$  chlorid vápenatý, 25% PEG 6000,  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  Tris; pH = 7,5; sterilizováno přes  $0,22 \mu\text{m}$  filtr

*Protoplastizační roztok*

100 mg lyzační enzym z *Trichoderma harzianum*, 20 ml SMaC; pH = 5,2; sterilizováno přes  $22 \mu\text{m}$  filtr

*SMaC pufr*

$0,05 \text{ mol l}^{-1}$  chlorid vápenatý,  $0,85 \text{ mol l}^{-1}$  D-sorbitol, 800 ml  $0,2 \text{ mol l}^{-1}$  malát draselný; autoklávováno

*STC pufr*

$0,05 \text{ mol l}^{-1}$  chlorid vápenatý,  $0,85 \text{ mol l}^{-1}$  D-sorbitol,  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  Tris; pH = 7,5; autoklávováno

*Transformační BII agar*

2,4 g agar, 0,2 g hydrogenfosforečnan draselný, 1 g L-asparagin monohydrát, 1 g pepton, 40 g sacharosa, 0,1 g síran hořečnatý pentahydrát; doplněno do 200 ml destilovanou vodou, pH = 8; autoklávováno



### Kultivace a transformace *E. coli*

#### *LB medium*

9,5 g chlorid sodný, 15,5 g LB Broth, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 7,2; autoklávováno

#### *LB agar*

9,5 g chlorid sodný, 15,5 g LB Broth, 15 g agar, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 7,2; autoklávováno

#### *SOC medium*

20 g trypton, 5 g kvasinkový extrakt, 0,5 g chloridu sodného, rozpuštěno v 950 ml destilované vody. Poté přidáno 10 ml 250 mmol<sup>-1</sup> chloridu draselného, pH = 7. Objem doplněn destilovanou vodou do 1 l. Po autoklávování bylo do roztoku přidáno 20 ml 1mol<sup>-1</sup> D-glukosy a 5 ml 2mol<sup>-1</sup> chloridu hořečnatého

### Kultivace a transformace *S. cerevisiae*

#### *1 mol<sup>-1</sup> octan lithný*

10,2 g octan lithný, doplněno do 100 ml destilovanou vodou; autoklávováno

#### *PEG roztok*

25 g PEG 3350, doplněno do 50 ml destilované vody; autoklávováno

#### *SD-Ura agar*

20 g D-glukosa monohydrát, 6,7 g kvasinkové dusíkaté báze bez aminokyselin, 0,77 g směs aminokyselin a výživových látek bez uracilu 16 g agar, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,8, autoklávováno

#### *SD-Ura medium*

20 g D-glukosa monohydrát, 6,7 g kvasinkové dusíkaté báze bez aminokyselin, 0,77 g směs aminokyselin a výživových látek bez uracilu, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,8; autoklávováno

#### *YPD agar*

10 g kvasinkový extrakt, 20 g trypton, 20 g D-glukosa monohydrát, 17,5 g agar, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,8; autoklávováno

#### *YPD medium*

10 g kvasinkový extrakt, 20 g trypton, 20 g D-glukosa monohydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,8; autoklávováno

## Southern blot

### *10x blokovací reagent*

2 g blokovacího prášku v 20 ml pufru kyseliny maleinové; autoklávováno

### *20x SSC pufr*

$3\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorid sodný,  $300\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  citrát sodný dihydrát, pH = 7,0; autoklávováno

### *Blokovací roztok*

1 ml 10x blokovací reagent, 10 ml pufru kyseliny maleinové

### *Denaturační roztok*

$0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydroxid sodný,  $1,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorid sodný; autoklávováno

### *DEPC voda*

0,1% (v/v) DEPC v ddH<sub>2</sub>O, inkubováno přes noc při pokojové teplotě; autoklávováno

### *Detekční pufr*

$0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorid sodný,  $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris; pH = 9,5; autoklávováno

### *Na<sup>+</sup> fosfátový pufr*

2,14 g dihydrogenfosforečnan sodný, 8,74 g hydrogenfosforečnan sodný; rozpuštěno ve 40 ml DEPC vody; autoklávováno

### *Neutralizační roztok*

$1,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorid sodný,  $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris; pH = 7,5; autoklávováno

### *Prehybridizační roztok*

4 ml blokovací roztok, 10 ml formamid, 1 ml Na<sup>+</sup> fosfátový pufr, 0,2 ml N-laurosylsarkosin, 1,4 g SDS, 5 ml 20x SSC

### *Promývací pufr*

$0,15\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorid sodný,  $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  maleinová kyselina, 0,3% (v/v) Tween1; pH = 7,5; autoklávováno

### *Pufr kyseliny maleinové*

$0,15\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorid sodný,  $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  maleinová kyselina; pH = 7,5; autoklávováno

### *Pufr s nízkou stringencí*

0,1% (w/v) SDS, 2x SSC pufr; rozpuštěno v DEPC vodě

### *Pufr s vysokou stringencí*

0,1% (w/v) SDS,  $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  SSC pufr, rozpuštěno v DEPC vodě; autoklávováno

### Ostatní roztoky

#### *1% (w/v) agarosový gel*

1 g agarosy v 100 ml TAE pufru

#### *Lyzační pufr*

4,84 g Tris, 2,92 g chlorid sodný, 1,86 g EDTA, 1 g SDS, doplněno do 200 ml destilovanou vodou, pH = 8,5; autoklávováno

#### *Roztok P1*

0,6 g Tris, 0,3 g EDTA, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, RNAsa A o finální koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH = 8; autoklávováno

#### *Roztok P2*

0,8 g hydroxid sodný, 0,1 g SDS, doplněno do 100 ml destilovanou vodou; autoklávováno

#### *Roztok P3*

29,4 g octan draselný, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 5,5; autoklávováno

#### *TAE pufr*

$1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA,  $40\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-acetát; pH = 8

### **3.1.5 Laboratorní pomůcky**

3 MM Whatman papíry (Sigma-Aldrich, USA), Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo), Filtr s velikostí pórů  $0,22 \mu\text{m}$  (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko), MicroAmp Fast Optical 96-jamková destička (Applied Biosystems, USA), MicroAmp Optical Adhesive Film plastová folie (Applied Biosystems, USA), Nylonová membrána (Sigma, USA), Nytexová membrána (Fluka, Německo) a další pomůcky Oddělení molekulární biologie, CRH.

### **3.1.6 Kity a návody**

Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter; USA)

DIG RNA labeling Kit (Roche, Švýcarsko)

NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel, Německo)

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

QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Německo)

RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

Roche Molecular Biochemicals DIG Application Manual for Filter Hybridization (Roche, Švýcarsko)

### **3.1.7 Programy a software**

AlphaDigiDoc RT Gel Documentation System (Alpha Innotech, USA)

BioEdit (Hall, 1999)

Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

DataAssist (Applied Biosystems, USA)

ENA databáze (<http://www.ebi.ac.uk/ena>)

Excel (Microsoft Office, USA)

ImageJ (National Institutes of Health, USA)

Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>)

StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA)

### **3.1.8 Přístroje**

Centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene, Dánsko), Elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo), Elektromagnetická míchačka (Boeco, Německo), Flowbox (MERCY, ČR), Hybridizační pec (Thermo Electron Corporation, USA), Inkubátor (Mettler, Německo), Laboratorní homogenizátor SJB-S 450 (Siehe, Čína), Laboratorní vibrační mlýnek pro kryogenní mletí (Retsch, Německo), Lyofilizátor SeduVac (LaboGene, Dánsko), Magnetický stojánek (BioConsult, ČR), Megafuga Heraeus 40R (Thermo Fisher Scientific, USA), Mikrocentrifuga FVL-2400N (UNIMED, ČR), Mikroskop Helago B-382PHi-ALC (Helago, ČR), NanoDrop NAS 99 spektrofotometr (ACT gene, USA), Parní sterilizátor Sterivap (BMT Medical Technology, ČR), Rotátor Revolver (Labnet, USA), SpeedVac SPD (Thermo Electron Corporation, USA), Termoblok (BIOER, Čína), Termocykler T-gradient (Biometra, Německo), Termocykler StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), Třepačka Orbit 1000 (Labnet, USA), UV-kroslinker-DNA-CL-1 (Herolab, Německo), UV-transiluminátor UVT-20 M-HC (Herolab, Německo), Vortex (Labnet, USA), Vortex pro mikrozkušky V-32 (Biosan Ltd, ČR), Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo).

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Aktivace mezidráhové kontroly aminokyselin u *C. purpurea* 20.1

Pro prvotní studium aktivace mezidráhové kontroly aminokyselin v čele s Cpc1 proteinem u *C. purpurea* 20.1 byla zvolena metoda relativní kvantifikace genové exprese RT-qPCR. Byla sledována změna exprese genu *Cpc1* přechodem z nutričně bohatého media do minimálního media.

#### 3.2.1.1 Příprava biologického materiálu

*C. purpurea* 20.1 byla kultivována v 50 ml InocN media s peptonem (InocN-P; 5 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>) v 250ml Erlenmayerově baňce po dobu 6 dnů na třepačce (280 rpm; 28 °C). Následující centrifugace probíhaly při pokojové teplotě (RT), 15 000 rpm po dobu 10 min. Houbová kultura byla centrifugována v 50ml zkumavce Falcon, promyta 20 ml InocN-P media a většina supernatantu byla odstraněna. Ve zbylém mediu bylo mycelium homogenizováno a převedeno do Erlenmayerovy baňky (250 ml) s 50 ml čerstvého InocN-P media, kde byla myceliární suspenze kultivována do dalšího dne (280 rpm; 28 °C).

Následující den byla houbová kultura centrifugována a část mycelia bylo odebráno do 2ml zkumavky a lyofilizováno (lyofilizace mycelií probíhala vždy ve zkumavkách s děravým víčkem při -110 °C a 0,410 mbar přes noc). Zbylá kultura byla promyta 20 ml InocN media (bez peptonu). Po jejím resuspendování v 10 ml InocN media byly 3 Erlenmayerovy baňky s 50 ml InocN mediem, příp. InocN-P mediem inokulovány 2 ml myceliární suspenze a kultivovány na třepačce (280 rpm; 28 °C). V časových intervalech 30 min, 1 h, 4 h a 24 h byly z každého vzorku odebrány 3 x 2 ml houbové kultury. Po centrifugaci a odstranění supernatantu bylo mycelium lyofilizováno.

#### 3.2.1.2 Příprava RNA

##### 3.2.1.2.1 Izolace celkové RNA

Pro izolaci celkové RNA z lyofilizovaného mycelia, jež bylo rozdrceno pomocí špachtle za ochlazování tekutým dusíkem, byla použita metoda využívající TRIzol reagent (guanidin thiokyanát + fenol) a chloroform podle Chomczynski a Sacchi, 1987. Následné inkubace a centrifugace, není-li uvedeno jinak, probíhaly při pokojové teplotě (RT).

Rozdrcené mycelium (200 mg – 250 mg) v 2ml zkumavkách bylo resuspendováno v 1 ml TRIzol reagentu a umístěno na vortex pro mikrozkušavky, kde byla suspenze intenzivně protřepávána po dobu 15 min. Po centrifugaci (10 min.; 12 000 g; 4 °C) bylo 900 µl supernatantu přeneseno do čisté 1,5 ml zkumavky a spolu s 200 µl chloroformu byla směs 15 s intenzivně promíchávána na vortexu na mikrozkušavky a poté inkubována 5 min bez třepání. Po separaci fází směsi (centrifugace 5 min.; 14 000 g; 4 °C) bylo 400 µl horní vodné fáze přeneseno do nové 1,5ml zkumavky. Po přidání 200 µl chloroformu byla směs opět umístěna na vortex pro mikrozkušavky a intenzivně promíchávána (15 s). Po centrifugaci (5 min.; 14 000 g; 4 °C) bylo 350 µl vodní fáze přeneseno do čisté 1,5 ml zkumavky. Precipitace RNA byla zahájena přidáním 500 µl isopropanolu (100%, v/v; -20 °C) a jemným promícháním převrácením zkumavky. Po inkubaci 10 min. a centrifugaci (10 min.; 12 000 g) byl RNA precipitát promyt 1 ml 75% ethanolu (v/v, nuclease-free; centrifugace 5 min.; 8 000 g). Po odstranění supernatantu byl zbylý ethanol z velké části odstraněn volným odpařením na vzduchu (5 min. – 10 min.; úplné vysušení peletu by snížilo rozpustnost RNA). RNA pelet byl rozpuštěn v 50 µl nuclease-free vody. Koncentrace RNA byla změřena na Nanodropu.

#### **3.2.1.2.2 Ošetření RNA DNasou**

Možná DNA kontaminace ve vzorcích RNA byla odstraněna pomocí TURBO DNasy. K 50 µl vzorku bylo přidáno 6 µl TURBO DNase pufru (10x) a 2 µl (4 U) TURBO DNasy. Po promíchání jemným propipetováním byla směs inkubována 45 min. při 37 °C. Poté byly ke směsi přidány další 4 U TURBO DNasy, inkubace 45 min., 37 °C.

#### **3.2.1.2.3 Precipitace RNA pomocí chloridu lithného**

RNA ve vzorcích s koncentrací pod 50 µl<sup>-1</sup> byla zakoncentrována pomocí roztoku chloridu lithného, jež je součástí RNAqueous Total RNA Isolation kitu. K 60 µl vzorku bylo přidáno 30 µl LiCl, inkubace přes noc při -20 °C. Následující den byla směs centrifugována (20 min.; 14 000 rpm; 4 °C) a pelet RNA byl promyt 1 ml 70% ethanolu (v/v, Nuclease-free), centrifugace 5 min (14 000 rpm; 4 °C). Po vysušení peletu byla RNA rozpuštěna v 20 µl nuclease-free vody. Koncentrace získané RNA byla změřena na Nanodropu.

#### **3.2.1.2.4 Izolace RNA pomocí Agencourt RNAClean XP kitu**

RNA byla ze směsi po jejím ošetření DNasou, případně precipitaci chloridem lithným, izolována magnetickými kuličkami pomocí kitu Agencourt RNAClean XP. K izolaci byly použity vzorky s koncentrací RNA nad  $50 \mu\text{l}^{-1}$ . Následující inkubace probíhaly při pokojové teplotě (RT). K  $60 \mu\text{l}$  vzorku, příp.  $20 \mu\text{l}$  vzorku v  $0,2\text{ml}$  mikrozkušavkách bylo přidáno  $30 \mu\text{l}$  magnetických kuliček a  $25 \mu\text{l}$ , resp.  $8 \mu\text{l}$  isopropanolu (100 %, v/v). Směs byla promíchána pipetováním a inkubována 20 min. Po precipitaci RNA na magnetické kuličky byla zkumavka se směsí umístěna na magnetický stojánek na dobu 5 min. Po odstranění supernatantu byla zkumavka zaplněna 70% ethanolem (v/v, nuclease-free), inkubace 1 min. Po odstranění ethanolu byla RNA dvakrát promyta  $200 \mu\text{l}$  70% ethanolu (v/v, nuclease-free). Po vysušení ve flow-boxu (5 min. – 10 min.) byla RNA eluována  $20 \mu\text{l}$  nuclease-free vody (zkumavka s RNA byla umístěna mimo magnetický stojánek). Po 5 min. – 10 min. byla zkumavka s RNA eluátem umístěna na magnetický stojánek (5 min.), který byl poté opatrně přepipetován do nové mikrozkušavky. Koncentrace získané RNA byla změřena na Nanodropu.

#### **3.2.1.3 Reverzní transkripce**

Syntéza cDNA s využitím izolované RNA jako templátu byla provedena pomocí RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis kitu. K  $1 \mu\text{g}$  RNA ( $12 \mu\text{l}$ ) byl přidán  $1 \mu\text{l}$  Oligo(dT) primeru ( $100 \mu\text{mol}^{-1}$ ) a směs byla po jemném propipetování a centrifugaci v pikofuze inkubována 5 min. při  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ , následně ochlazená na ledu, krátce centrifugována v pikofuze a umístěna na led. Poté byly ke směsi přidány reagenty v následujícím pořadí:  $4 \mu\text{l}$  reakčního pufru (5x),  $2 \mu\text{l}$  dNTPs ( $10 \text{mmol}^{-1}$ ) a  $1 \mu\text{l}$  (200 U) RevertAID H Minus Reverse Transcriptase. Po jemném promíchání a centrifugaci byla reakční směs inkubována 1 h při  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ . Reakce byla ukončena inaktivací enzymu při  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  (10 min). Úspěšnost reakce byla ověřena měřením koncentrace cDNA na Nanodropu. Získaná cDNA byla poté naředěna na konečný objem  $80 \mu\text{l}$  nuclease-free vodou.

### 3.2.1.4 SYBR Green RT-qPCR

Získaná cDNA byla použita jako templát pro relativní kvantifikaci exprese *Cpc1* genu pomocí RT-qPCR. Pro kvantifikaci genové exprese byla využita detekce fluorescence interkalačního barviva SYBR Green (Ponchel *et al.*, 2003). K přípravě PCR reakční směsi (Tab. 1) byl použit gb SG PCR Master mix, jehož součástí je hot-start *Taq* DNA polymerasa s odpovídajícím pufrem, dNTP, MgCl<sub>2</sub> a fluorescenční barvivo SYBR Green. K této směsi byl přidán premix primerů, jež byl připraven smícháním 1,2 μl fw primeru (100 μmol l<sup>-1</sup>), 1,2 μl rev primeru (100 μmol l<sup>-1</sup>) a 97,6 μl nuclease-free vody, a referenční barvivo ROX.

Reakce, které byly nastaveny ve třech technických opakováních, probíhaly v 96-jamkových destičkách MicroAmp Fast Optical, které byly po napipetování reakčních směsí překryty plastovou fólií MicroAmp Optical Adhesive Film a krátce centrifugovány. Podmínky PCR reakce byly nastaveny podle Tab. 2. Analýza probíhala na přístroji StepOne se softwarem StepOnePlus Real-Time PCR System.

Změna exprese genu *Cpc1* byla vyhodnocena jako relativní kvantifikace (relative quantification, RQ) C<sub>T</sub> hodnot (cycle of threshold, cyklus prahu) metodou ΔΔC<sub>T</sub>:

$$\Delta C_T = C_{T,\text{sledovaný gen}} - C_{T,\text{referenční gen}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,\text{vzorek}} - \Delta C_{T,\text{kontrola}}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Jako referenční gen byl vybrán provozní gen *Act* kódující γ-aktin (CPUR\_01270). Pro amplifikaci cDNA *Cpc1* transkriptu byla použita kombinace primerů *Cpc1*\_SYBR\_fw a *Cpc1*\_SYBR\_rev, v případě genu *Act* set primerů *CpAct*\_SYBR\_fw a *CpAct*\_SYBR\_rev. Výsledky byly zpracovány pomocí softwaru DataAssist a programu Excel.

Tab. 1 Složení reakční směsi pro SYBR Green RT-qPCR reakci s gb SG PCR Master mixem

Složka	Objem [μl]
gb SG PCR Master mix (2x)	5,00
Referenční barvivo ROX (5 μmol l <sup>-1</sup> )	1,00
Primer premix	1,25
cDNA templát	2,50
H <sub>2</sub> O	1,75
Celkový objem	10,00



Tab. 2 Podmínky pro SYBR Green RT-qPCR reakci

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
1. Počáteční denaturace	95	600
2. Denaturace	95	60
3. Hybridizace primerů	61	30
4. Elongace	72	20
5. Závěrečná elongace	72	60

Cyklus 2-4 byl opakován 40x.

### 3.2.2 Kvasinkové rekombinační klonování

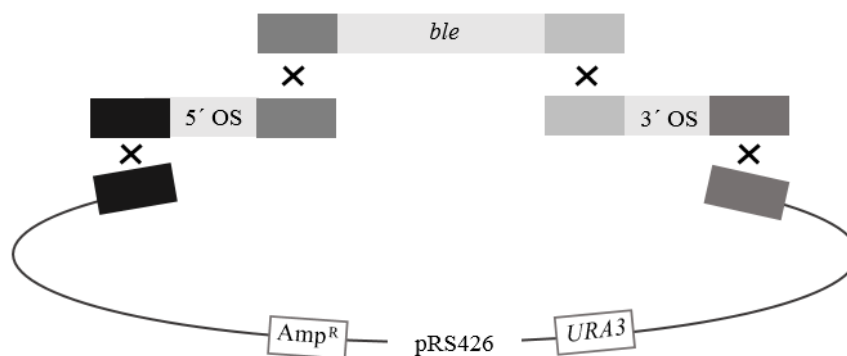
Konstrukty pro delecí a konstitutivní overexpresi genu *Cpc1* (CPUR\_04242) u *Claviceps purpurea* byly připraveny metodou kvasinkového rekombinačního klonování (Colot *et al.*, 2006; Hirsch *et al.*, 2015). Jedná se o poměrně snadnou metodu, mezi jejíž hlavní přednosti patří časová nenáročnost a cenová dostupnost. Konstrukty jsou vytvářeny na principu homologní rekombinace díky vlastnímu rekombinačnímu systému kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Obr. 11), a na rozdíl od běžného klonování zde tak nedochází ke spojení jednotlivých částí vektoru za katalýzy enzymu ligasy (Orr-Weaver *et al.*, 1981; Vo *et al.*, 1997).

#### 3.2.2.1 Konstrukt pro delecí genu *Cpc1*

Principem tvorby konstruktů pro delecí *Cpc1* genu je oddělená amplifikace 3' a 5' okrajových sekvencí (OS) genu z genomické DNA (gDNA) *C. purpurea* a jejich kotransformace do buňky *S. cerevisiae* spolu s rezistenční kazetou na phleomycin (*ble*) a binárním (shuttle) vektorem (pRS426; Obr. 10). Díky přítomnosti počátku replikaci *ori* je umožněna rychlá propagace konstruktů v buňkách *Escherichia coli* (Christianson *et al.*, 1992).

##### 3.2.2.1.1 Izolace genomické DNA *C. purpurea*

Pro izolaci genomické DNA (gDNA) *C. purpurea* 20.1 bylo použito lyofilizované mycelium. Izolace probíhala podle modifikovaného protokolu Cenise (1992).



Obr. 10 Strategie přípravy konstruktů pro delecí genu na základě homologní rekombinace využívající vektor pRS426. (OS) okrajové sekvence cílového genu. (*ble*) rezistenční kazeta na phleomycin. (*Amp<sup>R</sup>*) rezistence na ampicilin. (*URA3*) gen biosyntézy uracilu. Obdélníky stejné barvy znázorňují homologní sekvence, mezi kterými dochází k rekombinaci (označeno křížkem).

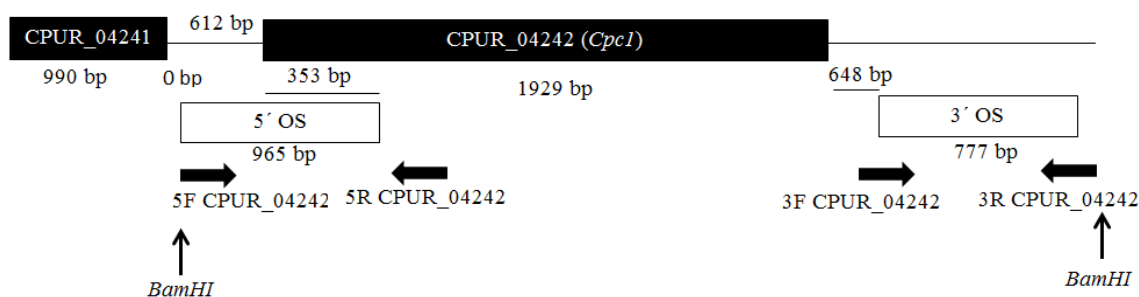
Lyofilizované mycelium v 2ml mikroskopické zkumavce bylo rozdrobeno pomocí skleněných kuliček (2,85 mm - 3,45 mm) v laboratorním mlýnku (25 Hz; 30 s). Centrifugace probíhaly při 21 000 g a 4 °C. Po přidání 600 µl Lyzačního pufru k myceliu a inkubaci 10 min. na třepačce (250 rpm; pokojová teplota, RT) bylo k suspenzi pro vysrážení polysacharidů a proteinů připipetován octan draselný (5 mol·l<sup>-1</sup>), centrifugace 20 min. Supernatant byl přepipetován k 1 ml isopropanolu v nové 2ml zkumavce. Po následné centrifugaci (30 min.) byl pelet gDNA promyt 300 µl 70% ethanolu (v/v, -20 °C), centrifugace 5 min. Po vysušení v digestoři (30 min.) byla gDNA rozpuštěna ve 100 µl sterilní vody. Koncentrace izolované gDNA byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop.

### 3.2.2.1.2 Amplifikace komponent pro tvorbu konstruktů pro delecí genu *Cpc1*

Okrajové sekvence genu *Cpc1* na 5' a 3' konci byly amplifikovány PCR s použitím Phusion High-Fidelity DNA Polymerasy (Tab. 3; Tab. 4) s využitím gDNA *C. purpurea* 20.1 jako templátu. Pro amplifikaci byly použity primery 5F\_CPUR\_04242 a 5R\_CPUR\_04242, resp. 3F\_CPUR\_04242 a 3R\_CPUR\_04242 (Obr. 11). Primery obsahovaly vedle sekvencí korespondujících s jednotlivými OS také sekvence homologní s koncovými sekvencemi štěpeného vektoru pRS426 (viz 3.2.1.3; 5F\_CPUR\_04242, resp. 3R\_CPUR\_04242). Primery 5R\_CPUR\_04242 a 3F\_CPUR\_04242 obsahovaly úseky sekvencí pro odpovídající promotorové, resp. terminátorové sekvence phleomycinové rezistenční kazety.

U primerů 5F\_CPUR\_04242 a 3R\_CPUR\_04242 bylo navíc mezi sekvencemi odpovídajícím jednotlivým OS a částem vektoru pRS426 vloženo restriční místo pro endonukleasu *Bam*HI pro možné vyštěpení výsledné kazety spolu s 5' a 3' OS z konstruktů.

Phleomycinová rezistenční kazeta (*ble*) obsahuje gen *ble*, jenž je exprimován pod *trpC* promotorem *Aspergillus nidulans* (van Engelenburg *et al.*, 1989). Kazeta byla amplifikována z vektoru pRS426\_Pgpd-cpble pomocí primerů CpBle1\_fw a CpBle1\_rev s využitím Phusion High-Fidelity DNA Polymerasy (Tab. 3, Tab. 4).



Obr. 11 Schéma navržení okrajových sekvencí genu *Cpc1* jako homologních sekvencí pro delecí genu *Cpc1* s vyznačenými primery pro jejich amplifikaci a restričním místem *Bam*HI pro možné vyštěpení kazety z konstruktů.

Tab. 3 Složení reakční směsi pro PCR reakci s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou

Složka	Objem [μl]
5x Phusion GC pufr	10,0
MgCl <sub>2</sub> (50 mmol·l <sup>-1</sup> )	0,5
dNTPs (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	1,0
Forward primer (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	2,5
Reverse primer (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	2,5
DMSO (100 %)	1,5
Templátová DNA (gDNA < 250 ng/plasmidová DNA < 10 ng)	1,5
Phusion High-Fidelity DNA polymerasa (2000 U·μl <sup>-1</sup> )	0,5
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	30,0
Celkový objem	50,0

Tab. 4 Podmínky pro PCR reakci s Phusion High-Fidelity DNA polymerasou

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
1. Počáteční denaturace	98	30
2. Denaturace	98	7
3. Hybridizace primerů	58	20
4. Elongace	72	30 s pro 1 kbp
5. Závěrečná elongace	72	300

Cyklus 2-4 byl opakován 35x.

### 3.2.2.2 Konstrukt pro konstitutivní overexpresi genu *Cpc1*

Vytvoření konstruktů pro konstitutivní overexpresi *Cpc1* genu u *C. purpurea* je založeno na kotransformaci genu *Cpc1* a pNDH-OGG binárního vektoru do buněk kvasinky *S. cerevisiae*. Díky přítomnosti *hph* genu ve vektoru je možná selekce transformantů *C. purpurea* na mediu s hygromycinem.

#### 3.2.2.2.1 Amplifikace *Cpc1* genu pro tvorbu konstruktů pro konstitutivní overexpresi genu *Cpc1*

Gen *Cpc1* *C. purpurea* 20.1 byl amplifikován z pDRIVE vektoru s insertem *Cpc1* (pDRIVE::CPUR\_04242) pomocí Phusion High-Fidelity DNA Polymerasy podle 3.2.2.1.2. Pro amplifikaci byly použity primery CPUR\_04242\_PoliC\_OE\_fw a CPUR\_04242\_OE\_rev, pro něž je charakteristické, že část sekvence CPUR\_04242\_PoliC\_OE\_fw primeru koresponduje se sekvencí promotoru *OliC*, v případě primeru CPUR\_04242\_Tgluc\_OE\_rev pak sekvencí terminátoru *Gluc*.

#### 3.2.2.3 Restrikce shuttle vektorů

Vektor pRS426 (2,5 µg) pro přípravu delečního konstruktů byl štěpen restrikčními endonukleasami *EcoRI-HF* a *XhoI* (každý 2,5 U) ve 20 µl reakci v prostředí Cut Smart pufu (10x; 37 °C; přes noc).

Pro vytvoření konstruktů pro konstitutivní expresi byl použit pNDH-OGG vektor, který byl štěpen restrikčními enzymy *NotI-HF* a *NcoI-HF* (dochází k vyštěpení *GFP* genu z vektoru; množství jednotlivých reagensů a podmínky byly stejné jako u restrikce pRS426 vektoru).

#### 3.2.2.4 Elektroforéza v agarosovém gelu

Velikost získaných amplikonů 5' a 3' OS genu *Cpc1*, *ble* kazety a *Cpc1* genu byla spolu se štěpenými vektory pRS426 a pNDH-OGG ověřena pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu. K 1 µl vzorku byl přidán 1 µl vzorkovacího pufu 6x Loading Dye, směs byla doplněna 4 µl sterilní vody. Jako standard byl použit 1 kb Plus DNA Ladder. Při konstatním napětí 120 V probíhala elektroforéza po dobu 20-30 min. Po přenesení gelu na UV-transiluminátor byl snímek vytvořen s použitím gelového dokumentačního systému Alpha DigiDoc RT s odpovídajícím programem (Alpha Innotech, USA).

### 3.2.2.5 Transformace *S. cerevisiae*

Konstrukt pro delecí *Cpc1* genu, příp. jeho konstitutivní expresi u *C. purpurea* 20.1 byl vytvořen pomocí uracil-auxotrofního kmene *S. cerevisiae* FGSC 9721. Selekce pozitivních kolonií je založena na schopnosti růstu na mediu bez uracilu. Díky přítomnosti genu *URA3* v pRS426 vektoru, resp. pNDH-OGG vektoru je opět umožněna syntéza této nukleové báze.

Pro samotnou transformaci *S. cerevisiae* byly použity získané amplikony 5' a 3' OS genu *Cpc1* spolu s *ble* kazetou, příp. samotného genu *Cpc1*, a naštěpené shuttle vektory bez další purifikace.

#### 3.2.2.5.1 Příprava buněk *S. cerevisiae*

Kolonie *S. cerevisiae* byla pomocí sterilního párátko přenesena z YPD agaru do 5 ml YPD media a kultivována přes noc při 28 °C na třepačce (200 rpm).

Následující den byly 2 ml čerstvě narostlé kultury *S. cerevisiae* připipetovány k 50 ml YPD media v 250ml Erlenmayerově baňce, suspenze buněk byla inkubována při 28 °C na třepačce (200 rpm) kolem 3-4 h. pro získání optimální hodnoty její optické hustoty  $OD_{600} \approx 1$ . Poté byla kultura *S. cerevisiae* centrifugována v 50ml Falcon zkumavce (10 min.; 5 600 g; RT) a pelet buněk byl promyt 50 ml sterilní vody (centrifugace 10 min.; 5 600 g; RT). Po následném promytí v 1 ml octanu lithného ( $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ) a centrifugaci (10 min.; 5 600 g; RT) byl pelet resuspendován ve 400  $\mu\text{l}$  octanu lithného ( $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ).

#### 3.2.2.5.2 Proces transformace buněk *S. cerevisiae*

Před samotnou transformací *S. cerevisiae* byla denaturována DNA ze spermií lososa ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) při 95 °C po dobu 5 min., poté inkubace 5 min. na ledu. Takto připravená DNA působí jako přenašeč fragmentů DNA, a zvyšuje tak účinnost transformace.

Do 1,5ml zkumavky byla napipetována transformační směs podle Tab. 5 a 10  $\mu\text{l}$  připravené denaturované DNA ze spermií lososa. Po promíchání směsi pipetováním k ní bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  suspenze buněk *S. cerevisiae*. Následovala inkubace při 30 °C (30 min.), poté byla směs inkubována 30 min. při 42 °C. Po krátké centrifugaci v pikofuze byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány ve zbývající tekutině. Buněčná suspenze byla pomocí sterilní

hokejky rozetřena na Petriho misku s SD agarem bez uracilu (SD-Ura), buňky byly inkubovány při 28 °C po dobu 3-4 dnů.

Tab. 5 Složení směsi pro transformaci *S. cerevisiae* FGSC 9721

Složka	Objem [μl]
PEG 3350 (50 %)	240,0
LiOAc (1 mol l <sup>-1</sup> )	36,0
Naštěpený shuttle vektor (deleční konstrukt – pRS426) (konstrukt pro konstitutivní expresi genu – pNDH-OGG)	1,5
PCR amplikon (deleční konstrukt - 5' OS genu <i>Cpc1</i> , 3' OS genu <i>Cpc1</i> , phleomycinová rezistenční kazeta) (konstrukt pro konstitutivní expresi genu – <i>Cpc1</i> gen)	5,0
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	x
Celkový objem	360,0

Byla provedena také pozitivní a negativní kontrola transsformace. Buněčná suspenze byla v případě negativní kontroly připipetována k samotnému naštěpenému pRS426 vektoru (1,5 μl), jako pozitivní kontrola sloužila směs buněk smíchaná s nenaštěpeným shuttle vektorem (2,5 μg). Složení směsi bylo až na nepřítomnost PCR amplikonů shodné s Tab. 5.

Kolonie *S. cerevisiae* obsahující konstrukty pRS426::Δ*Cpc1* a pNDH-OGG::OEC*Cpc1* byly poté resuspendovány pomocí sterilní hokejky v 1 ml SD-Ura mediu, následně byla suspenze buněk připipetována k 4 ml SD-Ura media, kultivace 2 h při 28 °C na třepačce (200 rpm).

### 3.2.2.5.3 Izolace plasmidové DNA alkalickou lýzí

Buněčná kultura *S. cerevisiae* (4 ml) byla postupně centrifugována ve 2ml mikrozkuhavce (3 min; 14 000 rpm; RT). Pelet byl resuspendován ve 300 μl P1 roztoku. Pro rozrušení buněčné stěny kvasinky bylo využito skleněných kuliček (425 μm – 600 μm) a laboratorního mlýnku (25 Hz; 5 min.). K suspenzi bylo poté napipetováno 300 μl P2 roztoku, směs byla promíchána a inkubována 5 min. na ledu. Následně bylo přidáno 300 μl P3 roztoku, inkubace 5 min. na ledě, centrifugace 10 min. (14 000 rpm; 4 °C). Supernatant byl přepipetován do nové 2ml zkumavky s 1 ml isopropanolu, centrifugace 30 min. (14 000 rpm; 4 °C). Po následném promytí 500 μl 70% ethanolu (v/v, - 20 °C), centrifugace 5 min. (14 000 rpm; 4 °C), byl pelet

vysušen v digestoři (30 min) a reuspendován v 100  $\mu\text{l}$  nuclease-free vody. Koncentrace získané plasmidové DNA byla změřena pomocí NanoDropu.

### 3.2.2.6 Transformace *Escherichia coli* tepelným šokem

Izolovaná plasmidová DNA byla použita pro transformaci chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10 metodou tepelného šoku.

Buňky *E. coli* (50  $\mu\text{l}$ ) v 1,5  $\mu\text{l}$  zkumavce byly po vytažení z mrazáku (-80 °C) inkubovány 30 min. na ledu. Poté bylo k buňkám napipetováno 5  $\mu\text{l}$  izolované DNA (~ 100 ng), po propipetování byla směs inkubována 30 min. na ledu. Následoval tepelný šok při 42 °C po dobu 30 s a 5 min. inkubace na ledu. K buněčné suspenzi bylo připipetováno 950  $\mu\text{l}$  SOC media (RT) a směs byla inkubována 60 min. při 37 °C na třepačce (250 rpm).

Na Petriho misky s LB agarem a ampicilinem (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$ , příp. 150  $\mu\text{l}$  transformační směsi, která byla pomocí sterilní hokejky rozetřena. Buňky byly kultivovány při 37 °C do následujícího dne.

Za pomoci sterilních párátěk byly vypíchnuty z Petriho misek s LB agarem kolonie *E. coli*, které byly po přenesení do 5 ml LB media s ampicilinem (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) kultivovány při 37 °C do dalšího dne.

Pro izolaci plasmidové DNA z buněk *E. coli* byla použita metoda alkalické lýze podle 3.2.2.1.5.3. Díky nepřítomnosti silné buněčné stěny buněk byl však krok s jejím rozbitím pomocí skleněných kuliček vynechán.

### 3.2.2.7 Kontrolní restrikce

Úspěšnost vytvoření konstruktů pomocí kvasinkového rekombinačního klonování byla ověřena kontrolní restrikční analýzou těchto konstruktů. Vektor pRS426:: $\Delta CpcI$  byl štěpen restrikční endonukleasou *NcoI-HF*, enzym *XhoI* byl pak použit pro restrikci pNDH-OGG::OEC*pcl* vektoru. Pro analýzu byl použit 1  $\mu\text{g}$  plasmidové DNA a 1 U restrikční endonukleasy. Obě reakce probíhaly v prostředí Cut Smart pufru (10x) v celkovém objemu 20  $\mu\text{l}$  při 37 °C do následujícího dne. Velikosti získaných DNA fragmentů byly analyzovány separací pomocí agarosové elektroforézy podle 3.2.2.4.

### 3.2.2.8 Přečištění plasmidové DNA pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep, sekvenace

Pro naprostou jistotu přítomnosti správných DNA fragmentů v pRS426 a pNDH-OGG vektorech byla nutná jejich kontrola sekvenováním (Seqme s. r. o.). Pro zvýšení čistoty DNA izolované alkalickou lýzí byly plasmidy přečištěny pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep.

K izolované plasmidové DNA byl napipetován PB pufr (5 x objem vzorku) a po promíchání byla směs napipetována na kolonku QIAprep, jež byla umístěna ve sběrné mikrozkuhavce. Následné centrifugace probíhaly při 16 000 g a RT. Po navázání DNA a centrifugaci (1 min) byla kolonka promyta 750  $\mu$ l PE pufru, centrifugace 1 min. Pro úplné odstranění PE pufru byla kolonka v nové 1,5 $\mu$ l mikrozkuhavce centrifugována naprázdno (1 min.). Po přenesení do další nové 1,5 $\mu$ l mikrozkuhavky byla DNA z kolonky eluována 40  $\mu$ l nuclease-free vody, inkubace 1 min. (RT), centrifugace 1 min. Koncentrace získané plasmidové DNA byla změřena na Nanodropu.

### 3.2.3 Transformace *C. purpurea*

Pro zjištění role transkripčního faktoru *Cpc1* u *C. purpurea* byl kmen *Cp* 20.1 transformován vektorem pRS426:: $\Delta$ *Cpc1* s cílem vytvořit mutanta s delecí tohoto genu. Tento kmen byl navíc spolu kmenem P1 transformován i pNDH OGG::*OECpc1* vektorem za účelem nadprodukce odpovídajícího proteinu.

#### 3.2.3.1 Příprava plasmidové DNA

##### 3.2.3.1.1 Izolace plasmidové DNA pomocí kitu NucleoBond Xtra Midi

Bakteriální kolonie obsahující vektor pRS426:: $\Delta$ *Cpc1*, příp. pNDH-OGG::*OECpc1* byla pomocí sterilního párátko vypíchnuta z Petriho misky s LB agarem a ampicilinem (100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a inokulována do 5 ml LB media s ampicilinem (100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Startovací kultura byla kultivována při 37 °C na třepačce (250 rpm) do dalšího dne.

LB medium (200 ml) s ampicilinem (100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) bylo inokulováno 200  $\mu$ l bakteriální kultury a kultivováno při 37 °C na třepačce (250 rpm) po dobu 12-16 h.

Následující den byla plasmidová DNA izolována pomocí NucleoBond Xtra Midi kitu. Bakteriální buňky byly centrifugovány (15 min.; 4 500 g; 4 °C) v 50ml Falcon zkuhavce



a buněčný pelet byl resuspendován v 8 ml RES pufru s přidáním RNAsou ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Po přidání 4 ml LYS lyzačního pufru byla směs promíchána převrácením zkumavky (4-6 x) za rozvoje modrého zbarvení a inkubována 5 min při RT. Následně bylo přidáno 6 ml P3 pufru pro neutralizaci směsi, která byla ihned promíchána převrácením zkumavky (4-6 x), čímž došlo k odbarvení suspenze, inkubace 5 min. na ledu. Před samotnou aplikací byla NucleoBond Xtra kolonka s filtrem, jež byla upevněná na 50ml Falcon zkumavku, ekvilibrována 12 ml EQU pufru, jenž byl nanesen na horní okraj filtru. Neutralizovaný buněčný lyzát byl před aplikací na kolonku s filtrem ještě 3x ve zkumavce převrácen. Po prvním promytí filtru 5 ml EQU pufru byl filtr z kolonky odstraněn. Samotná kolonka byla poté promyta 8 ml promývacího WASH pufru. Eluce plasmidové DNA probíhala 5 ml elučního ELU pufru 12ml Falcon zkumavky.

#### **3.2.3.1.2 Precipitace plasmidové DNA isopropanolem a octanem sodným**

Pro zakoncentrování plasmidové DNA izolované pomocí kitu NucleoBond Xtra Midi byla použita metoda precipitace plasmidové DNA s isopropanolem a octanem sodným. K 12 ml DNA v elučním pufru bylo napipetováno 3,5 ml isopropanolu a 500  $\mu\text{l}$  octanu sodného ( $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 5,2$ ). Následné centrifugace probíhaly při 21 000 g a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po precipitaci DNA byla směs centrifugována (30 min.) a pelet byl promyt 1,5 ml 70% ethanolu (v/v,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), centrifugace 10 min. Po jeho vysušení v digestoři (30 min.) byl pelet resuspendován v 600  $\mu\text{l}$  nuclease-free vody. Koncentrace zakoncentrované plasmidové DNA byla změřena na Nanodropu.

#### **3.2.3.1.3 Restrikce plasmidové DNA**

Izolovaná plasmidová DNA (100  $\mu\text{g}$ ) byla před samotnou transformací *C. purpurea* pro zvýšení její účinnosti štěpena restrikční endonukleasou. U pRS426:: $\Delta Cpc1$  vektoru byla pomocí enzymu *BamHI-HF* z konstruktu vyštěpena rezistenční kazeta spolu s okrajovými sekvencemi genu *Cpc1*, v případě pNDH-OGG::OEC*Cpc1* byl vektor linearizován endonukleasou *PstI*. Obě reakce probíhaly v přítomnosti 10 U enzymu a Cut Smart pufru (10x) při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  do následujícího dne. Úspěšnost restrikce plasmidů byla ověřena separací fragmentů pomocí elektroforézy v agarosovém gelu podle 3.2.2.4.

#### **3.2.3.1.4 Přečištění restrikční směsi pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up**

Restrikční směs obsahující naštěpený vektor pRS426:: $\Delta Cpc1$ , příp. linearizovaný pNDH-OGG::OECpc1 vektor byla před transformací *C. purpurea* přečištěna pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu.

Restrikční směs byla promíchána s NTI pufrem (2 x objem vzorku), a poté napipetována na kolonku se sběrnou mikrozkušavkou. Následné centrifugace probíhaly při 11 000 g a RT. Po navázání DNA na kolonku a centrifugaci (30 s) byla kolonka 2 x promyta 700  $\mu$ l NT3 pufrem, centrifugace 30 s. Po jejím přenesení do nové 1,5  $\mu$ l mikrozkušavky a její centrifugací naprázdno (1 min.) byla kolonka s DNA přenesena do nové 1,5  $\mu$ l mikrozkušavky. DNA byla eluována 50  $\mu$ l nuclease-free vody, inkubace 1 min. (RT), centrifugace 1 min. Koncentrace získané DNA byla změřena na Nanodropu.

#### **3.2.3.2 Příprava protoplastů *C. purpurea***

V 250ml Erlenmayerově baňce bylo inokulováno 50 ml BII kultivačního media částmi mycelia *C. purpurea* kmene 20.1, příp. P1. Kultivace houby probíhala při 28 °C na třepačce a (180 rpm) po dobu 3-4 dnů.

Houbová kultura byla centrifugována v 50ml Falcon zkumavce (10 min.; 5 600 g; RT) a mycelium bylo promyto 20 ml SmaC pufrem, centrifugace 10 min. (5 600 g; RT). Po přidání 20 ml protoplastizačního roztoku bylo mycelium inkubováno 2 h na třepačce (80 rpm) při 28 °C. Poté byla směs zfiltrována přes Nytexovou membránu. Filtrát s protoplasty byl centrifugován (10 min.; 900 g; RT) a po dvojitým promytím v 5 ml STC pufrem (centrifugace 10 min.; 900 g; RT) byl pelet protoplastů resuspendován v 1 ml STC pufrem.

Pomocí Bürkerovy komůrky a světelného mikroskopu byly získané protoplasty naředěny na optimální hustotu  $5 \cdot 10^8$  protoplastů v 1 ml STC pufrem.

#### **3.2.3.3 Transformace protoplastů *C. purpurea***

Do 12ml Falcon zkumavek byla postupně napipetována transformační směs obsahující 10  $\mu$ l (2,5 – 3,5  $\mu$ g) přečištěného naštěpeného pRS426:: $\Delta Cpc1$  vektoru, příp. linearizovaného vektoru pNDH-OGG::OECpc1, 90  $\mu$ l STC a 50  $\mu$ l PEG roztoku. Směs byla promíchána pipetováním, a poté k ní bylo přidáno 100  $\mu$ l protoplastů

*C. purpurea* 20.1, příp. *C. purpurea* P1. Po 20 min. inkubace při RT byly ke transformační směsi připipetovány 2 ml PEG roztoku a směs byla promíchána převrácením falkony. Po dalších 5 min. (RT) byla příprava transformační směsi dokončena přidáním 4 ml STC pufu.

Pro použití jedné transformační směsi bylo připraveno 10 prázdných Petriho misek (průměr 10 cm) a 200 ml BII transformačního agarů (50 °C). První miska sloužila pro kontrolu protoplastizace, tj. schopnosti opětovného růstu získaných protoplastů, neboť do ní bylo nalito 20 ml BII transformačního agarů a napipetováno 11 µl suspenze protoplastů. Do druhé misky bylo nalito 20 ml BII transformačního agarů spolu s 690 µl transformační směsi. Miska sloužila pro kontrolu možného usmrcení protoplastů během samotné transformace, tj. pro kontrolu transformarmačního procesu. V případě transformace s pRS426::Δ*Cpc1* vektorem bylo ke zbylým 160 ml BII transformačního agarů (50 °C) připipetováno 52,8 µl phleomycinu (100 mg·ml<sup>-1</sup>). Do zbylých 8 Petriho misek pak bylo vždy nalito 20 ml tohoto agarů a napipetováno 690 µl transformační směsi.

Při transformaci s pNDH-OGG::OE*Cpc1* vektorem byla transformační směs (690 µl) přidána do BII transformačního agarů (20 ml; 50 °C) bez antibiotika. Těchto osm misek bylo poté následující den převrstveno 10 ml BII transformačního agarů (50 °C) s hygromycinem (600 µg·ml<sup>-1</sup>; výsledná koncentrace po difuzi antibiotikem s mediem na misce byla 200 µg·ml<sup>-1</sup>).

Narostlé myceliární kolonie *C. purpurea* byly po 6-10 dnech přeneseny na BII transformační agar s phleomycinem (100 µg·ml<sup>-1</sup>), příp. hygromycinem (200 µg·ml<sup>-1</sup>).

#### **3.2.3.4 Diagnostická PCR**

Části mycelií z předpokládaných transformantů *C. purpurea* byly vyřezány a lyofilizovány. Následující den byla z lyofilizovaných mycelií izolovaná gDNA podle 3.2.2.1.1.

Získaná gDNA byla použita jako templát pro diagnostickou PCR s použitím Go*Taq* G2 Flexi DNA Polymerasy (Tab. 6, Tab. 7). Byly provedeny 3 typy reakcí. V případě delece *Cpc1* genu u *C. purpurea* 20.1 obsahovaly PCR premixy A a B vždy primery amplifikující část phleomycinové rezistenční kazety, a zároveň primery pro ověření správné integrace kazety do genomu (premix A primery Phleo\_Hi3F2 a dia\_CpCpc1\_fw, premix B kombinace primerů Phleo\_out\_Hefe3 a dia\_CpCpc\_rev).

Amplifikace DNA v případě premixu C diagnostikovala stálou přítomnost *Cpc1* genu v genomu díky použití primerů dia\_CpCpc1\_WT\_fw a dia\_CpCpc1\_rev, které část jeho sekvence amplifikovaly (Obr. 12).

Pro ověření primárních transformantů *C. purpurea* kmenů 20.1 a P1 s overexpresí genu *Cpc1* byl použit premix A amplifikující úsek *hph* rezistenčního genu (primery *hph\_fw* a *hph\_rev*) a premix B, jehož primery nasedají na sekvence promotoru *Olic*, resp. terminátoru *Gluc* (primery *PoliC\_OE\_ek1\_fw* a *Tgluc\_rev*; Obr. 13). Premix C sloužil pro kontrolu přítomnosti gDNA a PCR reakce, neboť obsahoval primery pro amplifikace části genu jiného genu než *Cpc1* (zde gen *CpAEC* kódující předpokládaný auxinový přenašeč (Hradilová, 2014) a primery *dia\_CpAEC\_WT\_fw* a *dia\_CpAEC\_rev*).

Odpovídající velikosti ampliconů byly analyzovány agarosovou elektroforézou podle 3.2.2.4.7.

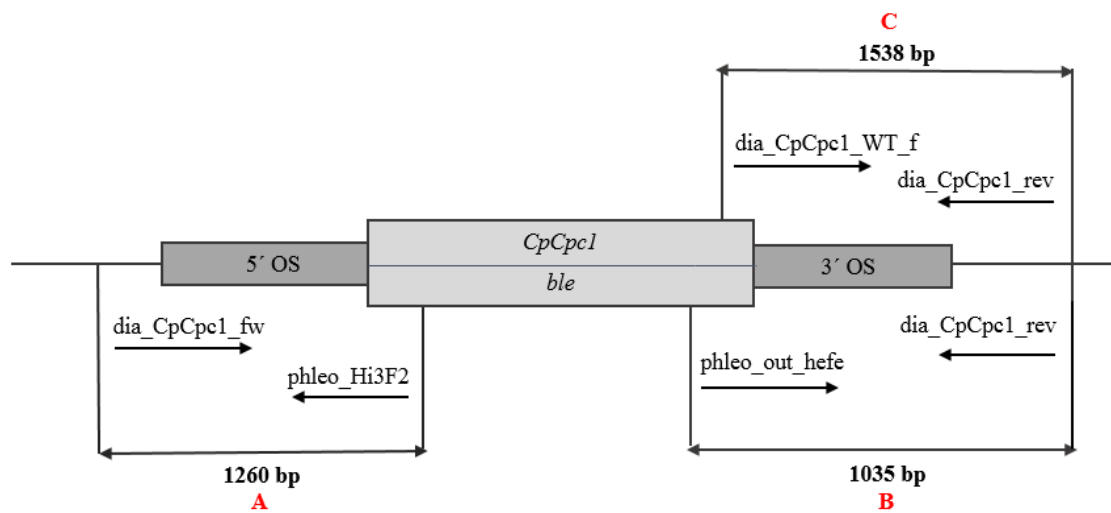
Tab. 6 Složení reakční směsi pro PCR reakci s *GoTaq G2 Flexi* DNA Polymerasou

Složka	Objem [μl]
GoTaq pufr (5x)	2,50
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol·l <sup>-1</sup> )	0,75
dNTPs (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	0,25
Forward primer (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	0,25
Reverse primer (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	0,25
Templát – plasmidová DNA (100 ng μl <sup>-1</sup> )	1,00
GoTaq G2 Flexi DNAPolymerasa (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	0,05
H <sub>2</sub> O	7,45
Celkový objem	12,5

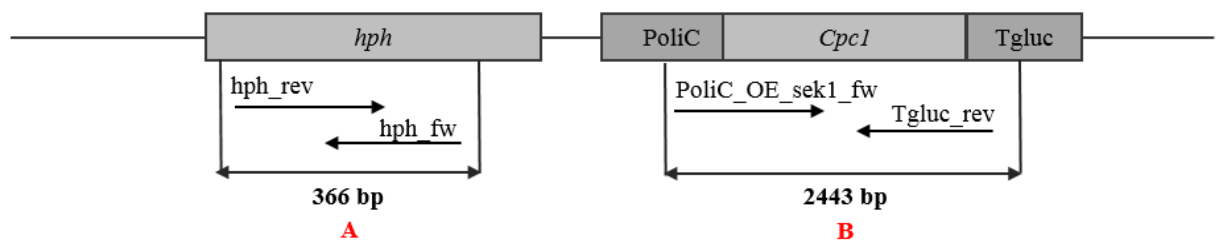
Tab. 7 Podmínky pro diagnostickou PCR reakci s *GoTaq G2 Flexi* DNA Polymerasou

Krok	Teplota[°C]	Čas[s]
1. Počáteční denaturace	95	120
2. Denaturace	95	30
3. Hybridizace primerů	58	30
4. Elongace	72	60 s pro 1 kbp
5. Závěrečná elongace	72	300

Cyklus 2-4 byl opakován 35x.



Obr. 12 Schéma nasedání primerů pro diagnostickou PCR předpokládaných mutantů s delecí genu *Cpc1* s velikostmi očekávaných amplikonů.



Obr. 13 Schéma nasedání primerů pro diagnostickou PCR předpokládaných mutantů s konstitutivní expresí genu *Cpc1* s velikostmi očekávaných amplikonů.

### 3.2.4 Southern blot

Integrace phleomycinové rezistenční kazety  $\Delta Cpc1$  mutantů do místa genu *Cpc1* v genomu *C. purpurea* 20.1 byla ověřena metodou Southern blot (Southern, 1975) podle Roche Molecular Biochemicals DIG Application Manual for Filter Hybridization pomocí digoxigeninem (DIG) značené RNA próby.

### 3.2.4.1 Příprava DIG-RNA próby

#### 3.2.4.1.1 Ligace 3' okrajové sekvence genu *CpcI* do pDRIVE vektoru na principu TA-klonování, transformace *E. coli*

Pro vytvoření hybridizační próby pro Southern blot byla z gDNA *Cp* 20.1, jež byla izolována podle (3.2.2.1.1), amplifikována 3' OS genu *CpcI* s využitím sady primerů 3F\_CPUR\_04242 a 3R\_CPUR\_04242 pomocí High-Fidelity DNA Polymerasy (3.2.2.1.2). Pro možné zaklonování DNA fragmentu do pDRIVE vektoru na principu TA klonování byla v kroku závěrečné elongace přidána GoTaq G2 Flexi DNA Polymerasa (1,5 U), která postrádá 3'-5' exonukleasovou aktivitu. Díky tomu mají získané DNA fragmenty na 3' konci přesah jednoho nukleotidu, typicky rezidua adeninu (Clark, 1988; Hu, 1993). Tyto DNA amplikony pak mohou být zaklonovány do tzv. T-vektorů, např. pDRIVE, které mají přesah jedné báze thyminu (Zhou a Gomez-Sanchez, 2000). Po ověření velikosti DNA amplikonu gelovou elektroforézou (3.2.2.4) byla PCR reakce přečištěna pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu (3.2.2.1.4) a rozpuštěna v 20  $\mu$ l nuclease-free vody.

Přečištěná DNA 3' OS *CpcI* genu byla za katalýzy T4 DNA ligasy ligována do pDRIVE vektoru podle Tab. 8. Po dvouhodinové inkubaci směsi při pokojové teplotě byl enzym inaktivován zahřátím na 70 °C (5 min.).

Ligační směs (2  $\mu$ l a 5  $\mu$ l) byla použita na transformaci chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10 tepelným šokem podle 3.2.2.6. Směs buněk (100  $\mu$ l, příp. 150  $\mu$ l) byla poté pomocí sterilní hokejky rozetřena na Petriho misky s LB agarem s kanamycinem (50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>), 10  $\mu$ l IPTG (0,1 mol·l<sup>-1</sup>) a 40  $\mu$ l X-gal (0,1 mol·l<sup>-1</sup>). Díky tomu byl následující den umožněn výběr pozitivních bakteriálních kolonií obsahujících vektor s insertem na základě modro-bílé selekce. Tyto kolonie byly pomocí sterilního párátko vypíchnuty a přeneseny do zkumavky s 5 ml LB media s kanamycinem (50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>) a kultivovány při 37 °C do dalšího dne.

Tab. 8 Složení ligační směsi pro reakci s T4 DNA ligasou

Složka	Objem [ $\mu$ l]
pDRIVE linearizovaný vektor (50 ng· $\mu$ l <sup>-1</sup> )	1
DNA insert (50 $\mu$ g – 250 $\mu$ g)	16
T4 DNA ligační pufr (10x)	2
T4 DNA ligasa	1
Celkový objem	20

Plasmidová DNA (1 µg) izolovaná alkalickou lýzí podle 3.2.2.1.5.3 (bez použití skleněných kuliček) byla podrobena kontrolní restrikci s enzymy *EcoRV*-HF (1 U) a *BamHI*-HF (1 U) v prostředí Cut Smart pufru (10x), reakce probíhala při 37 °C přes noc. Pro ověření úspěšnosti klonování byla provedena také PCR reakce s *GoTaq G2 Flexi* DNA Polymerasou (3.2.2.7) a párem primerů nasedajících na sekvenci SP6 a T7 promotorů pDRIVE vektoru. Odpovídající velikosti získaných DNA fragmentů byly ověřeny s využitím elektroforézy v agarosovém gelu (3.2.2.4).

#### **3.2.3.1.2 Transkripce *in vitro***

Digoxigeninem značená RNA próba byla připravena *in vitro* transkripcí pomocí DIG RNA labeling kitu. Jako templát byl použit pDRIVE plasmid s 3' OS *CpcI* genu (pDRIVE::3'OS\_ *CpcI*; 3 µg), který byl linearizovaný restrikční endonukleasou *Acc65I* (3 U) v prostředí pufru NEB 3.1 (10x; reakce probíhala přes noc při 37 °C). Po přečištění restrikční směsi (3.2.3.1.4) byl pro transkripci použit 1 µg plasmidové DNA, ke které byly přidány další reagenty podle Tab. 9. Po opatrném promíchání pipetou byla reakční směs inkubována při 37 °C. Po dvou hodinách byla reakce zastavena přidáním 2 µl EDTA (0,2 mol l<sup>-1</sup>; pH = 8).

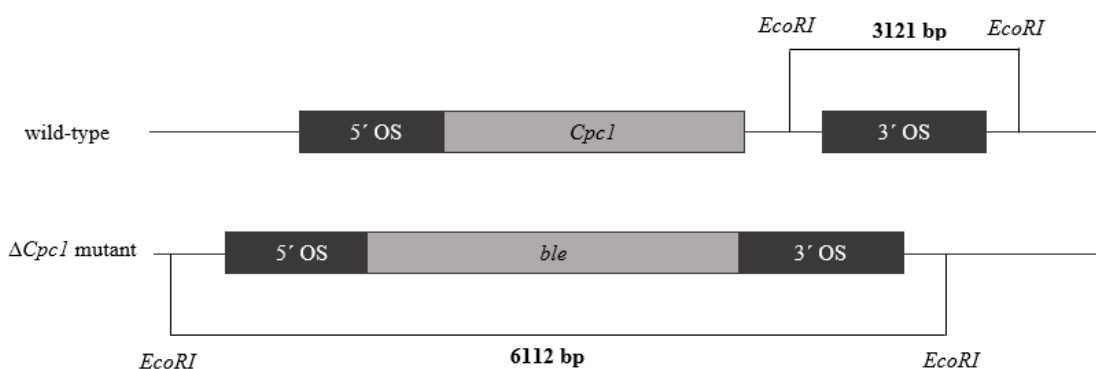
Úspěšnost reakce byla ověřena agarosovou elektroforézou (3.2.2.4). Pro analýzu byly použity 3 µl RNA transkriptu, které byly smíchány se vzorkovacím pufrem (6x). Vzorek byl inkubován po dobu 10 min. při 65 °C a následně byl přenesen na led.

#### **3.2.4.2 Restrikce gDNA, ethanolová precipitace**

Z předpokládaných mutantů *C. purpurea* 20.1 s delecí genu *CpcI* a WT *Cp* 20.1 byla izolována gDNA podle 3.2.2.1.1. Restrikční nukleasou *EcoRI*-HF (100 U) bylo v prostředí Cut Smart pufru (10x) štěpeno 15 µg gDNA těchto vzorků, reakce probíhaly při 37 °C do následujícího dne. Enzym *EcoRI*-HF byl vybrán na základě porovnání sekvence gDNA genu *CpcI* a jeho okolí se sekvencí phleomycinové rezistenční kazety. Díky specifickým restrikčním místům jsou tak po hybridizaci s RNA próbou odvozenou od 3' OS genu získány v případě mutantů a WT fragmenty odlišných velikostí (Obr. 14).

Tab. 9 Složení reakční směsi pro vytvoření DIG-RNA próby in vitro transkripce pomocí DIG RNA labeling kitu

Složka	Objem [μl]
Linearizovaný vektor, purifikovaný (1 μg)	13
dNTP (10x; ATP, 10 mmol·l <sup>-1</sup> ; CTP, 10 mmol·l <sup>-1</sup> ; GTP, 10 mmol·l <sup>-1</sup> ; UTP, 6,5 mmol·l <sup>-1</sup> ; DIG-11-UTP, 3,5 mmol·l <sup>-1</sup> )	2
Transkripční pufr (10x)	2
Inhibitor RNasy (20 U·μl <sup>-1</sup> )	1
SP6 RNA Polymerasa (20 U·μl <sup>-1</sup> )	2
Celkový objem	20



Obr. 14 Schéma restrikce gDNA restrikční endonukleasou *EcoRI*-HF u wild-typu a mutantu s delecí genu *CpI* ( $\Delta CpI$ ) s phleomycinovou rezistenční kazetou (*ble*) u *Cp* 20.1. (OS) okrajová sekvence; svislé čáry znázorňující restrikční místa pro *EcoRI*.

Pro přečištění a zakoncentrování gDNA z restrikční směsi byla využita metoda ethanolové precipitace. Ke směsi byla přidána 1/10 objemu octanu amonného (5 mol·l<sup>-1</sup>), po promíchání směsi na vortexu byla precipitace DNA zahájena přidáním 96% ethanolu (v/v, -20 °C), 2,5x celkovému objemu vzorku. Po mírném promíchání převrácením zkumavky byla směs inkubována 30 min. při -20 °C. Po centrifugaci (15 min.; 15 000 rpm; 4 °C) a odstranění supernatantu byl pelet promyt 1 ml 70% ethanolem (v/v, -20 °C), centrifugace 5 min. (15 000 rpm; 4 °C). DNA byla vysušena v digestoři (30 min.) a rozpuštěna v 15 μl nuclease-free vody.

### 3.2.4.3 Separace DNA fragmentů agarosovou elektroforézou, promývání gelu

Zakoncentrovaná štěpená gDNA byla separována pomocí elektroforézy v 0,8% agarosovém gelu podle 3.2.2.4. Vzorky (12 μl + 2 μl 6x vzorkovací pufr) byly spolu se standardem DIG-labeled DNA molecular weight marker II (5 μl + 1 μl 6x vzorkovací pufr) separovány při 90 V po dobu 90 minut.



Po elektroforetické separaci DNA byl gel nejprve promýván 30 min roztokem HCl ( $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) pro pozdější zvýšení efektivity přenosu velkých fragmentů DNA na pozitivně nabitou membránu v důsledku depurinace DNA. Po opláchnutí v destilované vodě byl gel promýván v Denaturačním roztoku (2 x 15 min.) s cílem denaturace DNA šroubovice. Po promytí sterilní vodou následovalo promývání v Neutralizačním roztoku (2 x 15 min.) a ekvibrace gelu v 20x SSC roztoku (10 min.).

#### **3.2.4.4 Kapilární přenos DNA fragmentů**

Separované fragmenty DNA byly z agarosového gelu přeneseny na pozitivně nabitou nylonovou membránu principem využívající kapilaritu. V tzv. sandwichi byly na vrchní stranu gelu postupně umístěny nylonová membrána, která byla před použitím ekvilibrována 5 min. v 20x SSC pufru, tři 3 MM Whatman papíry a stoh papírových ubrousků. Gel umístěný na přenosovém můstku byl se zásobníkem přenosového 20x SSC pufru propojen pomocí pruhu filtračního papíru. Lepší kontakt jednotlivých vrstev byl zajištěn zatížením aparatury. Přenos DNA fragmentů probíhal při laboratorní teplotě po dobu min 12 h.

Následující den byly fragmenty DNA přenesené na membránu imobilizovány vytvořením kovalentních vazeb pomocí UV-crosslinkingu. UV záření (500 J) bylo exponováno po dobu 100 s.

#### **3.2.4.5 Prehybridizace a hybridizace DNA s DIG-RNA próbou, posthybridizační promývání**

Membrána umístěná v hybridizačním válci byla při 50 °C inkubována s 50 ml Prehybridizačního roztoku po dobu 30 min. (neustálé promývání membrány bylo zajištěno umístěním válce do hybridizační pece). Poté následovala inkubace membrány s Hybridizačním roztokem. K jeho přípravě bylo použito 12,5 µl DIG-RNA próby, která byla smíchána s 125 µl nuclease-free vody. Po denuraci próby, tj. inkubaci 7 min. při 100 °C a následném ochlazení na ledu, byla směs přidána k 12,5 ml Prehybridizačního roztoku. Hybridizace probíhala v hybridizační precii při 50 °C do následujícího dne.

V rámci posthybridizačního promývání byla membrána nejprve promývána Pufrem s nízkou stringencí 2 x 15 min. (50 ml) při pokojové teplotě, a poté Pufrem s vysokou stringencí (50 ml; 2 x 15 min.) při 68 °C. Po promytí membrány v Promývacím pufru (50 ml; 3 min., RT) následovala inkubace s Blokovacím roztokem (30 min.; RT).

### 3.2.4.6 Detekce

Fragmenty DNA s hybridizovanou DIG-RNA próbou byly detekovány pomocí protilátky Anti-digoxigenin značenou alkalickou fosfatase (AP). Po 5min. centrifugaci (11 000 g; 4 °C) byly 4 µl této protilátky (6 U) byly přidány k 40 ml Blokovacího roztoku a membrána byla s tímto roztokem inkubována 30 min. na třepačce (RT). Pro odstranění nenavázané protilátky byla poté membrána promývána 2 x 15 min. (50 ml) v Promývacím pufru (RT). Následně byla membrána ekvilibrována v Detekčním pufru po dobu 3 min. (RT).

Vizualizace značených DNA fragmentů byla provedena pomocí CDP Star chemiluminiscenčního substrátu. K 990 µl Detekčního pufru bylo přidáno 10 µl tohoto substrátu (finální koncentrace 0,25 mmol·l<sup>-1</sup>), a takto připravený roztok byl napipetován na membránu umístěnou mezi plastovými listy fólie. Po 5min. inkubaci při RT byl roztok odstraněn a membrána byla ve fólii zafixována pomocí lepící pásky. Membrána byla umístěna s filmem do vyvolávací kazety, expozice filmu probíhala 15 min. Následné vyvíjení probíhalo v lázni s vývojkou (1 min.), přerušovací lázni s vodou (1 min.) a lázni s ustalovačem (1 min.).

### 3.2.5 Fenotypizace $\Delta Cpc1$ mutantů *C. purpurea* 20.1

Rychlost růstu vybraných mutantů s delecí genu *Cpc1* kmene *C. purpurea* 20.1 byla porovnávána s rychlostí růstu WT *Cp* 20.1 na Petriho miskách s NL 406 agarem s/bez přídavku kvasinkového extraktu, který byl dále suplementován L-tryptofanem (L-Trp; 4 mmol·l<sup>-1</sup>), L-histidinem (L-His; 4 mmol·l<sup>-1</sup>), D,L-isoleucinem (D,L-Ile; 4 mmol·l<sup>-1</sup>), 3-aminotriazolem (3-AT; 2 mmol·l<sup>-1</sup>) a peroxidem vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,5 mmol·l<sup>-1</sup>). Experiment byl proveden ve třech biologických opakováních. Průměry mycelií (měřeny ve třech nezávislých směrech) byly zaznamenány po 6 dnech růstu (28 °C), k měření byl použit program ImageJ. Výsledky byly zpracovány v programu Excel. Při vyhodnocování byla porovnávána změna růstu  $\Delta Cpc1$  mutantu na agaru se suplementem oproti samotnému NL-406 agaru, příp. NL-406 agaru s kvasinkovým extraktem (KE) oproti wild-typu:

$$\text{Relativní růst} = \frac{\frac{\Delta Cpc1_{NL-406 (+KE)+suplement}}{\Delta Cpc1_{NL-406 (+KE)}}}{\frac{WT_{NL-406 (+KE)+suplement}}{WT_{NL-406 (+KE)}}}$$

## 4 VÝSLEDKY

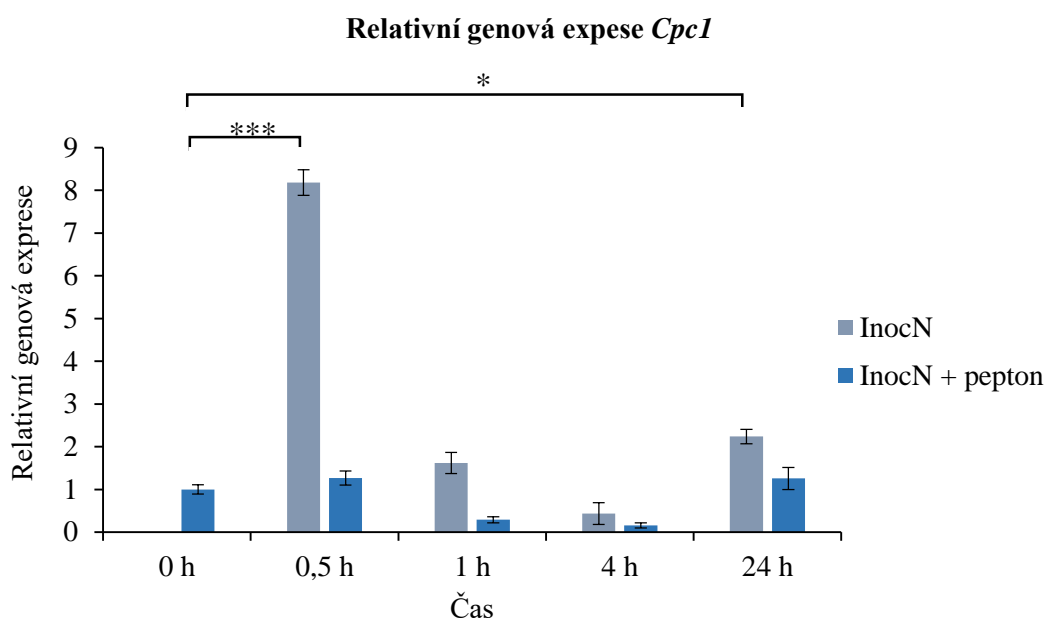
### 4.1 Aktivace mezidráhové kontroly aminokyselin u *C. purpurea* 20.1

Optimální hladina aminokyselin je nezbytným předpokladem pro správný vývoj každého organismu. U vláknitých hub je tento kontrolní bod regulován transkripčním faktorem Cpc1, který v tzv. mezidráhové kontrole biosyntézy aminokyselin (CPC) hraje klíčovou roli (Carsiotis a Jones, 1974; Carsiotis *et al.*, 1974). Porovnáním sekvencí těchto faktorů s kódujícími sekvencemi *C. purpurea* 20.1 byl odhalen gen CPUR\_04242, jehož odpovídající protein (označený Cpc1) má pravděpodobně klíčovou roli v mezidráhové kontrole aminokyselin u této parazitické houby.

Pro studium aktivace CPC u *C. purpurea* byla houbová kultura *Cp* 20.1 pěstována nejprve v InocN mediu s peptonem, který představuje bohatý zdroj nutrientů, a poté byla přesunuta do samotného InocN media. Po 30 min., 1 h, 4 h a 24 h byla část mycelia odebrána a lyofilizována (3.2.1.1).

Z lyofilizovaného mycelia byla izolovaná celková RNA pomocí TRIzol reagentu (3.2.1.2.1). Po jejím ošetření TURBO DNasou (3.2.1.2.2), a v případě nízké koncentrace přesrážení pomocí roztoku chloridu lithného (3.2.1.2.3), byla RNA ze směsi izolována s pomocí magnetických kuliček (3.2.1.2.4). Ze získané RNA byla reakcí reverzní transkripce, ve které byl použit Oligo(dT) primer, syntetizována cDNA (3.2.1.3). Ta byla použita jako templát pro SYBR Green RT-qPCR (3.2.1.4). Expresi genu *Cpc1*, vztažená na expresi referenčního genu kódujícího  $\gamma$ -aktin (*CpAct*), byla vyhodnocena metodou  $\Delta\Delta C_T$  (Obr. 14).

Zvýšení hladiny transkriptu *Cpc1* bylo u WT *Cp* 20.1 indukováno již během prvních minut po přesunu z nutričně bohatého media do minimálního media. Nicméně krátce na to došlo k jejímu poklesu, a po hodinové kultivaci houby v mediu byla zaznamenána hladina exprese *Cpc1* genu srovnatelná s hladinou exprese ve startovací kultuře. Další snížení množství transkriptu bylo zaznamenáno i po 4hodinové kultivaci. Mírné zvýšení exprese genu *Cpc1* bylo zjištěno po 24 h kultivaci v tomto mediu. Podobný trend, nicméně s mnohem menšími výkyvy hladin exprese genu, byl zaznamenán i při přesunu houby ze startovací kultury do čerstvého nutričně bohatého media.

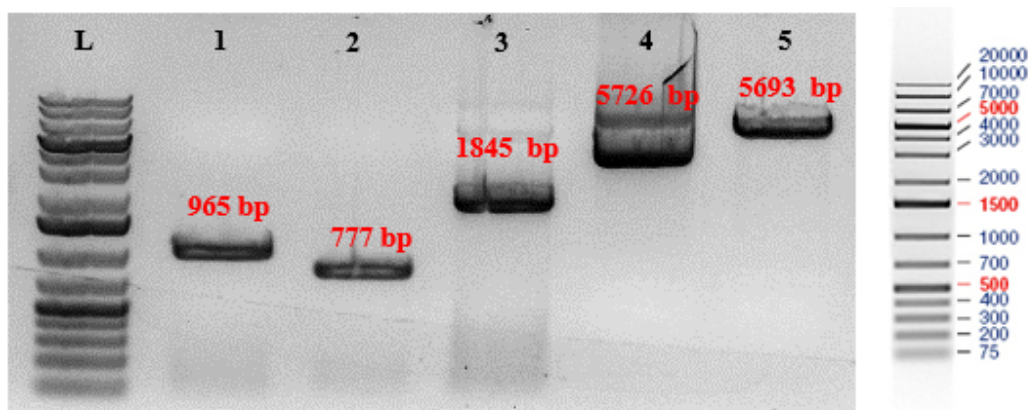


Obr. 14 Grafické vyhodnocení relativní exprese *Cpc1* genu u WT *C. purpurea* 20.1 při přechodu z nutričně bohatého media (InocN + pepton) do minimálního media (InocN) metodou RT-qPCR. Experiment byl proveden ve třech biologických a třech technických opakováních. Cílová cDNA byla normalizována k transkriptu provozního genu *CpAct*. Chybové úsečky znázorňují standardní odchylky. Hladina významnosti P (Studentův test) vzhledem k času odběru 0 h: \*P ≤ 0,05; \*\*P ≤ 0,01; \*\*\*P ≤ 0,001.

#### 4.2 Příprava konstruktů pro delecí a konstitutivní overexpresi genu *Cpc1* u *C. purpurea* pomocí kvasinkového rekombinačního klonování

Pro podrobnější studium funkce *Cpc1* proteinu u *Claviceps purpurea* byla zvolena strategie vytvoření mutantních kmenů *C. purpurea* s delecí a konstitutivní overexpresí odpovídajícího genu. Pro vytvoření transformačních konstruktů byla využita metoda kvasinkového rekombinačního klonování (3.2.2).

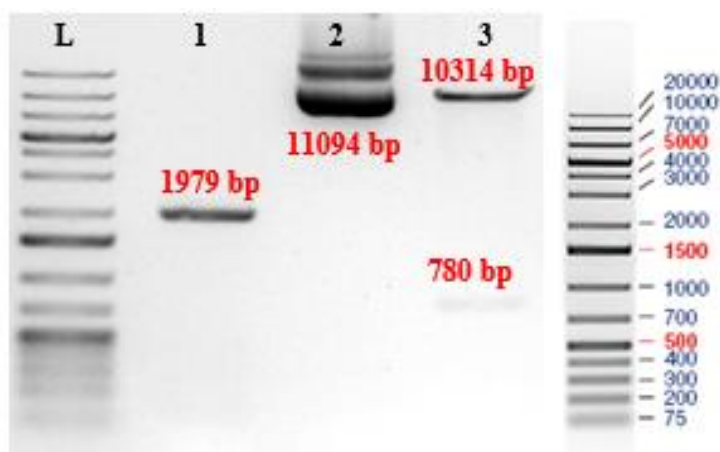
Příprava DNA pro konstrukt pro delecí *Cpc1* spočívala v amplifikaci 5' a 3' okrajových sekvencí (OS) genu z izolované gDNA *C. purpurea* 20.1 (3.2.2.1.1) coby budoucích homologních sekvencí pro rekombinaci. Pro PCR byly použity primery 5F\_CPUR\_04242 spolu s 5R\_CPUR\_04242 pro amplifikaci 5' OS (965 bp), v případě 3' OS byly použity primery 3F\_CPUR\_04242 a 3R\_CPUR\_04242 (777 bp). Phleomycinová rezistenční kazeta (*ble*) byla amplifikována z vektoru pRS426\_Pgpd-cpble kombinací primerů CpBle1\_fw a CpBle1\_rev (1845 bp; 3.2.2.1.2). Shuttle vektor pRS426 (5726 bp) byl podroben restrikci s endonukleasami *EcoRI*-HF a *XhoI* (3.2.1.3). Velikost získaných fragmentů byla ověřena elektroforézou v agarosovém gelu (3.2.2.4; Obr. 15).



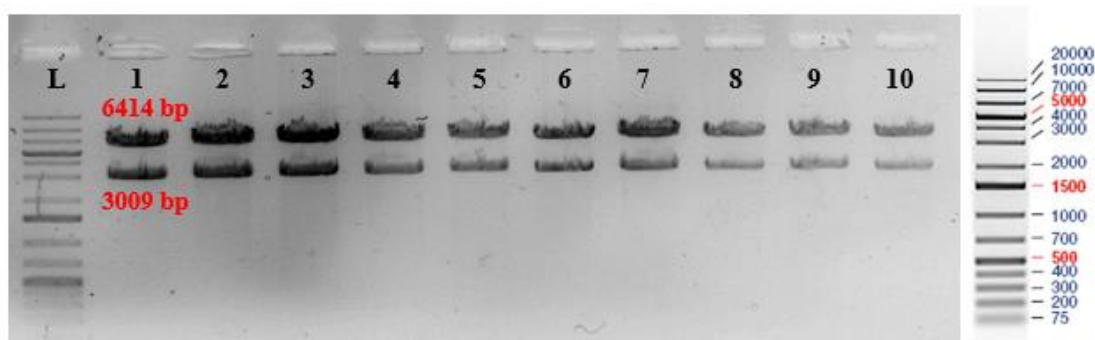
Obr. 15 Elektroforetogram DNA fragmentů použitých pro přípravu konstruktů pro delecí *CpcI* genu. (1) 5' okrajová sekvence (OS) genu *CpcI*; (2) 3' OS *CpcI*; (3) phleomycinová rezistenční kazeta; (4) pRS426 nenaštěpený; (5) pRS46 + *XhoI* + *EcoRI*-HF; (L) 1 kb Plus DNA Ladder.

pDRIVE plasmid s vloženým insertem genu *CpcI* (pDRIVE::CPUR\_04242) amplifikovaného z gDNA *C. purpurea* 20.1 byl využit jako templát pro amplifikaci tohoto genu pro přípravu konstruktů pro overexpresi *CpcI* (3.2.2.2.1). Jeho amplifikace probíhala v prostředí primerů CPUR\_04242\_PoliC\_OE\_fw a CPUR\_04242\_OE\_rev. Štěpení vektoru pNDH-OGG (12 243 bp) enzymy *NotI*-HF a *NcoI*-HF (3.2.1.3) bylo spolu s velikostí získaného amplikonu *CpcI* (1979 bp) ověřeno agarosovou elektroforézou (3.2.2.4; Obr. 16). Amplikon o velikosti 780 bp odpovídá vyštěpenému genu kódujícího GFP protein z pNDH-OGG vektoru.

Pro sestavení konstruktů byl využit vlastní rekombinační systém kvasinky *S. cerevisiae* (3.2.2.5). U obou konstruktů byla ze získaných kolonií kvasinky izolována plasmidová DNA alkalickou lýzí buněk (3.2.2.5.3), jež byla následně transformována do bakteriálních buněk *E. coli* metodou tepelného šoku (3.2.2.6). Pro ověření úspěšného vytvoření konstruktů byla plasmidová DNA izolována z buněk *E. coli* (10 kolonií) a podrobena kontrolní restrikci (3.2.2.7). V případě konstruktů pro delecí *CpcI*, pRS426:: $\Delta$ *CpcI*, byly po ošetření plasmidu enzymem *NcoI*-HF získány fragmenty o velikosti 3009 bp a 6414 bp (Obr. 17). Všech deset bakteriálních kultur s předpokládaným konstruktem pRS426:: $\Delta$ *CpcI* bylo pozitivních.



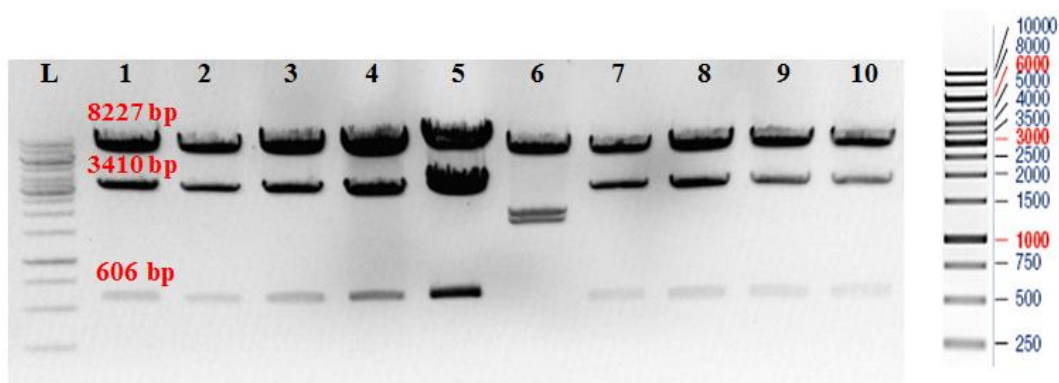
Obr. 16 Elektroforetogram DNA fragmentů použitých pro přípravu konstruktů pro konstitutivní expresi *CpcI* genu. (1) *CpcI*; (2) pNDH-OGG nenaštěpený; (5) pNDH-OGG + *NotI*-HF + *NcoII*-HF; (L) 1 kb Plus DNA Ladder. Fragment o velikosti 780 bp odpovídá genu GFP vyštěpeného z pNDH-OGG vektoru.



Obr. 17 Elektroforetogram DNA fragmentů získaných restrikcí enzymem *NcoI*-HF předpokládaných konstruktů pRS426:: $\Delta CpcI$  (1-10). (L) 1 kb Plus DNA Ladder.

Pro ověření pNDH OGG::*OECpcI* vektoru, konstruktů pro konstitutivní overexpresi *CpcI*, byla provedena kontrolní restrikce s endonukleasou *XhoI*. Agarosovou elektroforézou byly rozděleny fragmenty o velikosti 606 bp, 3410 bp a 8227 bp (Obr. 18). Z deseti vzorků izolovaných plasmidových DNA vykazovalo pozitivní výsledek devět z nich.

Správnost připravených konstruktů byla po přečištění pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu ověřena sekvenací (3.2.2.8).



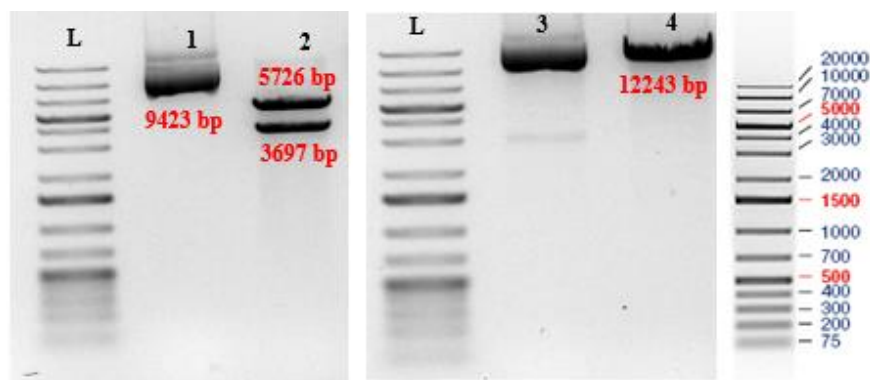
Obr. 18 Elektroforetogram DNA fragmentů získaných restrikcí enzymem *XhoI* předpokládaných konstruktů pNDH OGG::OEC*pc1* (1-10). (L) 1 kb DNA Ladder.

### 4.3 Transformace *C. purpurea*

Konstrukty pRS426:: $\Delta$ *Cpc1* a pNDH OGG::OEC*pc1* byly použity pro transformaci modelového kmene *C. purpurea*, *Cp* 20.1. Konstrukt pro konstitutivní expresi *Cpc1* byl využit i pro přípravu mutantů kmene *Cp* P1 (3.2.3)

Z bakteriálních kultur propagujících připravené konstrukty byla izolována plasmidová DNA pomocí NucleoBond Xtra MidiPrep kitu (3.2.3.1.1), která byla následně zakoncentrována isopropanolovou precipitací s octanem sodným (3.2.3.1.2). Před samotnou transformací byla izolovaná DNA pro zvýšení účinnosti transformace štěpena restrikčními endonukleasami (3.2.3.1.3). V případě konstruktů pRS426:: $\Delta$ *Cpc1* byla phleomycinová rezistenční kazeta s okrajovými sekvencemi genu *Cpc1* z konstruktů vyštěpena enzymem *BamHI*-HF. Pro linearizaci vektoru pNDH OGG::OEC*pc1* byla použita endonukleasa *PstI*. Po ověření velikosti odpovídajících fragmentů agarosovou elektroforézou (Obr. 19; 3.2.2.4) byla štěpená DNA z restrikční směsi přečištěna (3.2.3.1.4), a takto ošetřené konstrukty byly poté použity pro transformaci protoplastů *C. purpurea* (3.2.2.3).

Primární transformanti kmene *Cp* 20.1 s delecí *Cpc1* genu byli z transformačních misek přeočkováni na medium s vyšší koncentrací phleomycinu, a poté byli podrobena diagnostické PCR (3.2.3.4). Jako templát byla využita izolovaná gDNA (3.2.2.1.1). Pro ověření integrace phleomycinové rezistenční kazety do cílového místa v genomu byly v PCR použity kombinace primerů Phleo\_Hi3F2 a dia\_CpCpc1\_fw, resp. Phleo\_out\_Hefe3 a dia\_CpCpc1\_rev s odpovídajícími velikostmi ampliconů 1260 bp a 1035 bp. Primery dia\_CpCpc1\_WT\_fw a dia\_CpCpc1\_rev diagnostikovaly stálou přítomnost *Cpc1* genu v genomu *Cp* 20.1 (amplicon o velikosti 1538 bp). Velikost fragmentů byla ověřena elektroforézou (3.2.1.4).

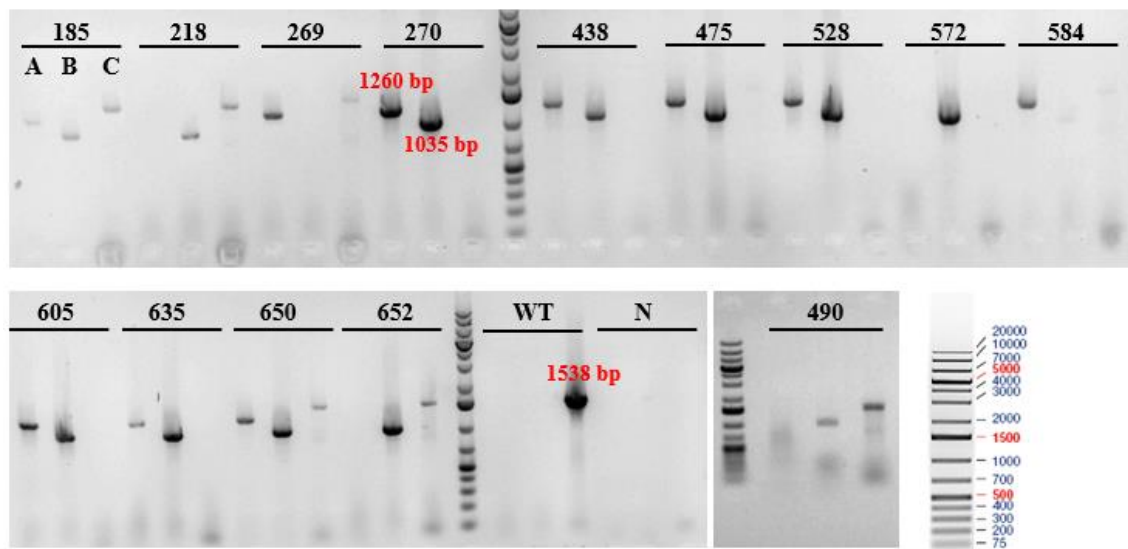


Obr. 19 Elektroforetogram DNA fragmentů získaných restrikcí konstruktů pRS426:: $\Delta CpcI$  a pNDH OGG::OECpcI. (1) pRS426:: $\Delta CpcI$  nenaštěpený; (2) pRS426:: $\Delta CpcI$  + BamHI-HF (fragment o velikosti 3697 bp odpovídá vyštěpené phleomycinové kazetě); (3) pNDH OGG::OECpcI nenaštěpený; (4) pNDH OGG::OECpcI + PstI (linearizace); (L) 1 kb Plus DNA Ladder.

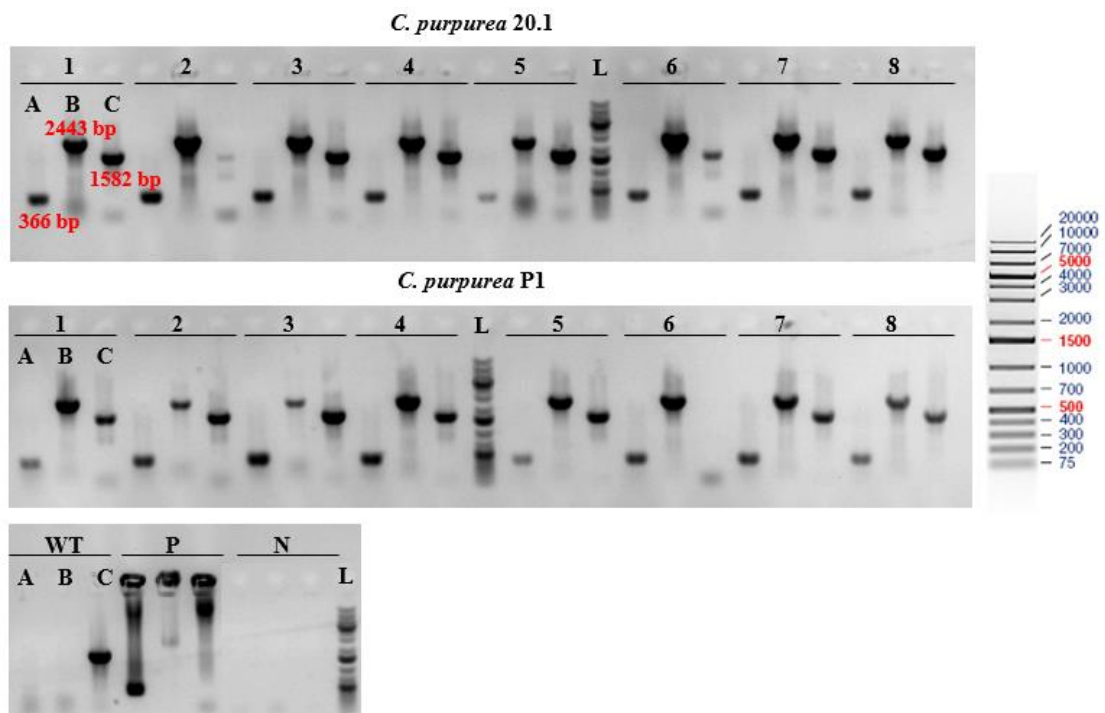
Ze 711 primárních transformantů integrace rezistenční kazety do místa *CpcI* genu zjištěna u 14 vzorků. V sedmi vzorcích (185, 218, 269, 490, 584, 650, 652) nicméně došlo k integraci kazety pouze na jedné alele, a druhá alela *CpcI* genu byla v genomu stále přítomna. U několika vzorků (218, 269, 490, 652) došlo během PCR k amplifikaci DNA pouze u jedné z obou sad primerů diagnostikující integraci phleomycinové kazety do cílového místa v genomu (Obr. 20).

Primární transformanti s pNDH OGG::OECpcI konstruktem pro overexpresi genu *CpcI* byli ověřeni diagnostickou PCR (3.2.3.4). Primery hph\_fw a hph\_rev v reakční směsi diagnostikovaly přítomnost hygromycinové kazety s velikostí odpovídajícího amplikonu 366 bp. Použitím kombinace primerů PoliC\_OE\_sek1\_fw a Tgluc\_rev, jež nasedají na úseky promotorové, resp. terminátorové sekvence konstruktů, byla amplifikována sekvence o velikosti 2443 bp. Pro kontrolu přítomnosti gDNA v PCR směsi byly použity primery dia\_CpAEC\_WT\_fw a dia\_CpAEC\_rev (1582 bp). Agarosovou elektroforézou byly velikosti amplikonů ověřeny (3.2.2.4). Pro oba kmeny *C. purpurea* bylo vybráno 8 primárních transformantů, u kterých byla integrace konstruktů pNDH OGG::OECpcI do genomu potvrzena (Obr. 21).





Obr. 20 Elektroforetogram DNA ampliconů získaných diagnostickou PCR předpokládaných transformantů *C. purpurea* 20.1 s delecí *Cpc1* genu. (A) primery dia\_CpCpc1\_fw + phleo\_Hi3F2; (B) primery dia\_CpCpc1\_rev + phleo\_outHefe3; (C) primery dia\_CpCpc1\_WT\_fw + dia\_CpCpc1\_rev; (WT) wild-type;; (N) negativní kontrola (H<sub>2</sub>O); (L) 1 kb Plus DNA Ladder.



Obr. 21 Elektroforetogram DNA ampliconů získaných diagnostickou PCR předpokládaných transformantů kmenů *C. purpurea* 20.1 a P1 s konstitutivní overexpresí *Cpc1* genu. (A) primery hph\_rev + hph\_fw; (B) primery poliC\_OE\_sek1\_fw + Tgluc\_rev; (C) primery dia\_CpAEC\_WT\_fw + dia\_CpAEC\_rev; (WT) wild-type; (P) pozitivní kontrola (pNDH-OGG::OECpc1); (N) negativní kontrola (H<sub>2</sub>O); (L) 1 kb Plus DNA Ladder.

### 4.3 Southern blot

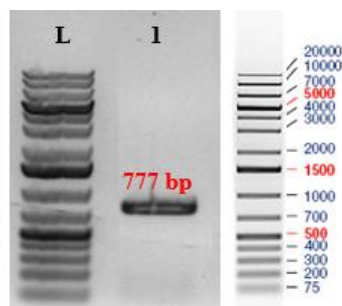
Pro ověření správné integrace phleomycinové rezistenční kazety do genomu *C. purpurea* 20.1 a případné odhalení ektopických inzercí byla použita metoda Southern blot využívající hybridizaci specifických DNA fragmentů se značenou sondou.

#### 4.3.1 Příprava DIG-RNA próby

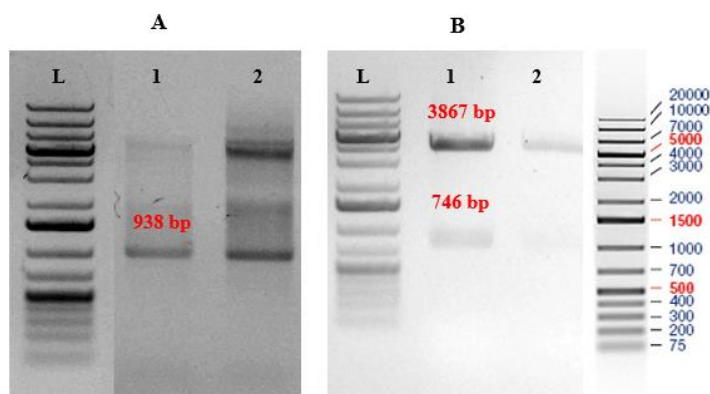
RNA próba pro Southern blot byla odvozena z 3' okrajové sekvence (OS) genu *Cpc1*, která představuje jednu ze dvou homologních sekvencí potřebných pro rekombinaci genu *Cpc1* s phleomycinovou rezistenční kazetou. Pro přípravu próby byl tento DNA fragment nejdříve zaklonován do vhodného vektoru (zde pDRIVE; 3.2.4.1.1) pro pozdější možnou *in vitro* transkripci. 3' OS byla pomocí páru primerů 3F\_CPUR\_04242 a 3R\_CPUR\_04242 za katalýzy High-Fidelity DNA Polymerasy (3.2.2.1.2) amplifikována z gDNA *Cp* 20.1 (3.2.2.1.1). V závěrečné elongaci byla přidána GoTaq G2 Flexi DNA Polymerasa umožňující pozdější zaklonování do pDRIVE vektoru principu TA-klonování. Velikost amplikonu (777 bp) byla ověřena agarosovou elektroforézou (3.2.2.4; Obr. 22).

Přečištěný DNA fragment (3.2.3.1.4) byl poté ligován do pDRIVE vektoru za katalýzy T4 DNA Polymerasy (3.2.4.1.1) a ligační směs byla použita pro transformaci chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10 metodou tepelného šoku (3.2.2.6). Výběr klonů s pDRIVE vektorem s vloženým insertem 3' OS *Cpc1* byl založen na modrobílé selekci. Ze dvou bakteriálních kolonií byla metodou alkalické lýze izolována plasmidová DNA (3.2.2.1.5.3). Úspěšnost klonování byla ověřena jednak kontrolní PCR s kombinací primerů nasedajících na SP6 a T7 promotor (938 bp; 3.2.2.7), tak restrikcí plasmidů párem endonukleas *EcoRV*-HF a *BamHI*-HF (746 bp a 3867 bp; 3.2.4.1.1). Velikosti získaných fragmentů byly ověřeny elektroforézou v agarosovém gelu (3.2.2.4; Obr. 23). U obou vzorků byla inserce 3' OS *Cpc1* genu do pDRIVE vektoru potvrzena.

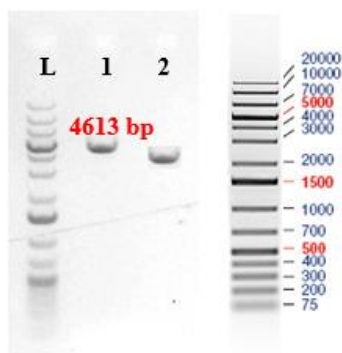
pDRIVE vektor s 3' OS *Cpc1* insertem, který byl linearizován za katalýzy endonukleasy *Acc65I* (Obr. 24), byl poté použit jako templát pro přípravu DIG-RNA próby *in vitro* transkripcí (3.2.4.1.2). Úspěšnost této reakce byla ověřena agarovou elektroforézou (3.2.2.4; Obr. 25).



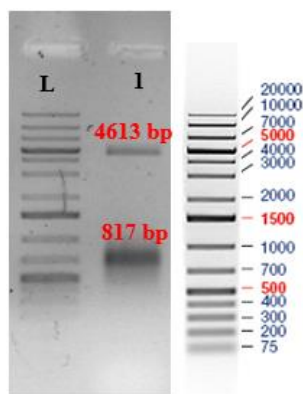
Obr. 22 Elektroforetogram 3' okrajové sekvence *CpcI* genu (1) pro přípravu RNA próby. (L) 1 kb Plus DNA Ladder.



Obr. 23 Elektroforetogram DNA fragmentů získaných kontrolní PCR reakcí (A) a restrikcí (B) předpokládaných vektorů pDRIVE::3'OS\_*CpcI* (1,2). (A) primery SP6\_promotor + T7\_promotor; (B) restrikční endonukleasy *EcoRV*-HF + *BamHI*-HF; (L) 1 kb Plus DNA Ladder.



Obr. 24 Elektroforetogram fragmentů získaných štěpením pDRIVE::3'OS\_*CpcI* restrikční endonukleasou *Acc65I*. (1) linearizovaný pDRIVE::3'OS\_*CpcI* enzymem *Acc65I*; (2) neštěpený pDRIVE::3'OS\_*CpcI*; (L) 1 kb Plus DNA Ladder.

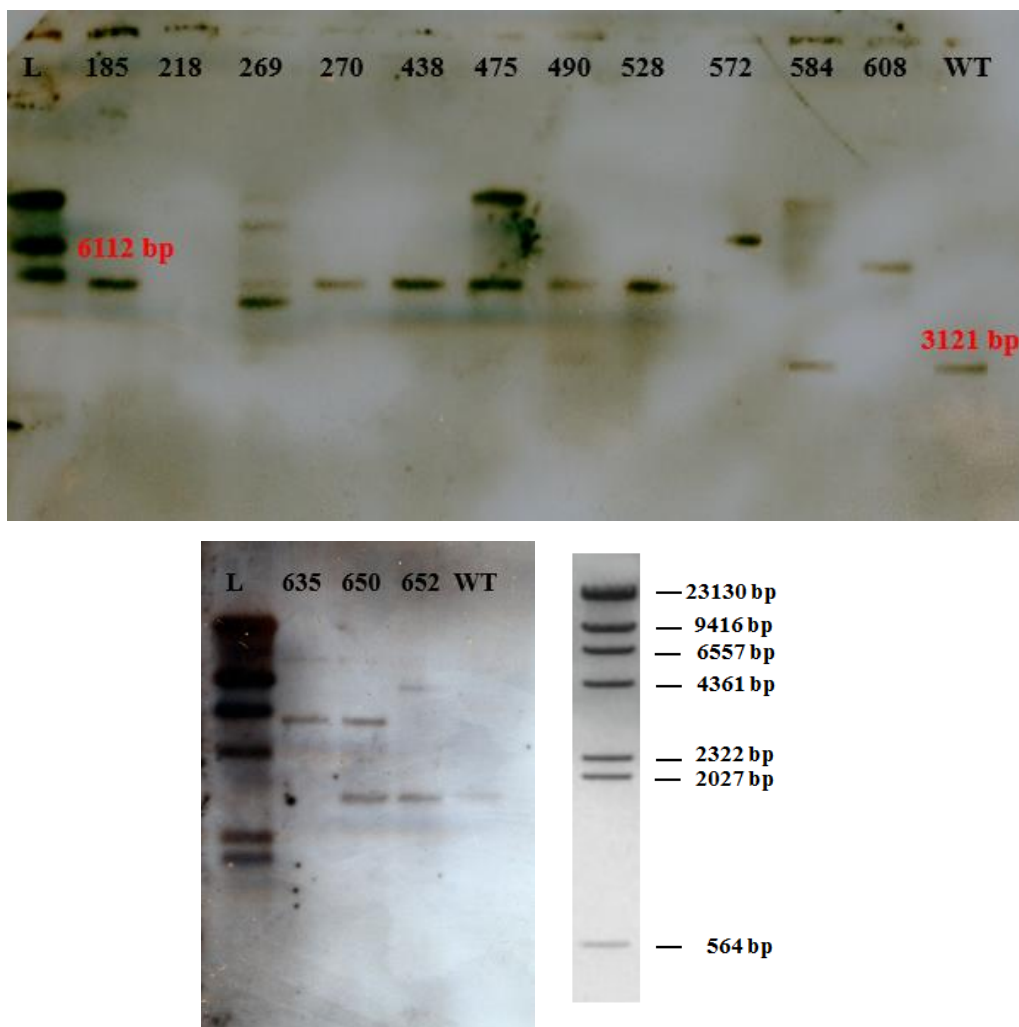


Obr. 25 Elektroforetogram DIG-RNA próby (1) odvozené z 3' OS *CpcI* genu pro Southern blot. (L) 1 kb Plus DNA Ladder. Fragment o velikosti 4613 bp odpovídá linearizovanému pDRIVE::3' OS\_*CpcI* vektoru.

#### 4.3.2 Analýza DNA $\Delta CpcI$ mutantů metodou Southern blot

Předpokládání  $\Delta CpcI$  mutantů byli pro Southern blot vybráni na základě výsledků diagnostické PCR (4.3). Ta odhalila integraci transformační kazety u 14 vzorků. Ze všech vzorků spolu s WT jako kontrolou byla izolována gDNA (3.2.2.1.1), která byla štěpena restriční endonukleasou *EcoRI*-HF. Velikost DNA fragmentu, jež následně hybridizoval s DIG-RNA próbou odvozenou od 3' OS genu *CpcI*, byla v případě  $\Delta CpcI$  mutantů 6112 bp, u wild-typu byl získán fragment o délce 3121 bp. Štěpená gDNA byla poté přečištěna a zakoncentrována ethanolovou precipitací (3.2.4.2). Elektroforézou v agarosovém gelu pak byly DNA fragmenty separovány (3.2.4.3), a poté přeneseny na nylonovou membránu (3.2.4.4). Po hybridizaci s RNA próbou odvozenou od 3' OS genu *CpcI* (3.2.4.5) a detekci s Anti-digoxigenin protilátkou, která má zároveň i enzymatickou aktivitu alkalické fosfatasy, byl k vizualizaci použit CDP Star chemiluminiscenční substrát (3.2.4.6).

Správná integrace transformační kazety do genomu *Cp* 20.1, tj. místa genu *CpcI*, byla zjištěna u 9 vzorků (Obr. 26). U vzorků 269, 490, 584 a 650 byla navíc zjištěna přítomnost fragmentu DNA délky 3121 bp, který značí přítomnost *CpcI* genu na druhé alele. V případě vzorků 185, 269, 475, 572, 584, 608, 635, 650 a 652 byly s RNA próbou hybridizovány fragmenty i jiných velikostí, které byly vizualizovány v důsledku ektopické inzerce rezistenční kazety do jiných míst v genomu *Cp* 20.1. U vzorku 218 nebyl detekován žádný DNA fragment. Integrace rezistenční kazety do místa *CpcI* genu na obou alelách a bez dalších ektopických inzercí byla zjištěna u vzorků 270, 438 a 528.



Obr. 26 Analýza DNA  $\Delta CpcI$  mutantů (záznam ze Southern blotu). gDNA vzorků byla štěpena enzymem *EcoRI*-HF, DIG-RNA proba byla odvozena od 3' OS *CpcI* genu. (185, 218, 269, 270, 438, 490, 528, 572, 584, 608, 635, 650, 652) předpokládání  $\Delta CpcI$  mutanti; (WT) wild-type; (L) DIG-Labeled Molecular Weight Marker II.

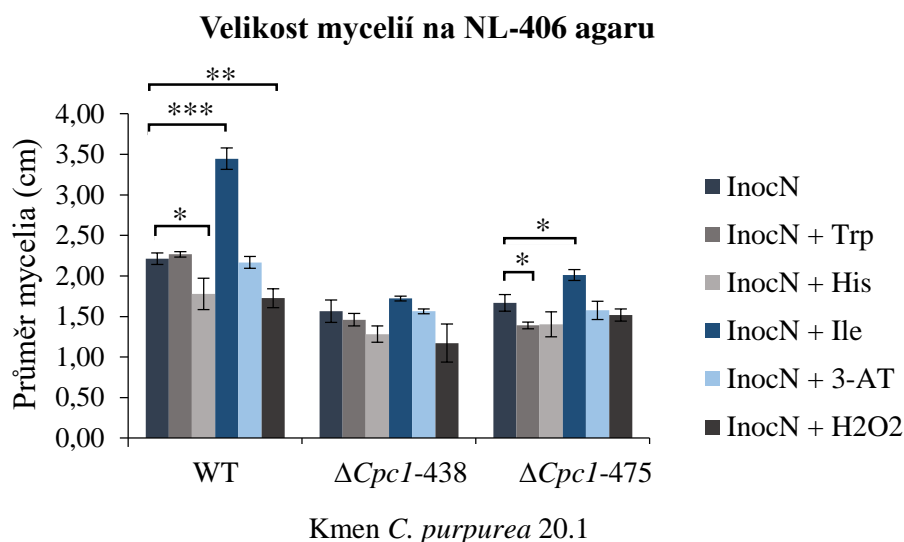
#### 4.4 Fenotyp $\Delta CpcI$ mutantů kmene *C. purpurea* 20.1

Role Cpc1 proteinu *C. purpurea* v mezidráhové kontrole aminokyselin byla testována porovnáním rychlosti růstu  $\Delta CpcI$  mutantů kmene *C. purpurea* 20.1 ( $\Delta 438$ ,  $\Delta 475$ ) oproti WT v absenci nutrientů či přítomnosti vybraných aminokyselin (L-Trp, L-His, D,L-Ile; 4 mmol $l^{-1}$ ) a kompetitivního inhibitoru L-His (3-aminotriazol; 3-AT; 2 mmol $l^{-1}$ ). Pro možné zapojení Cpc1 transkripčního faktoru v metabolismu kyslíkových radikálů byl jedním z přidaných látek také peroxid vodíku (0,5 mmol $l^{-1}$ ; 3.2.5). Primárním médiem bylo bezdusíkaté NL-406 medium. Části mycelií byly kultivovány na Petriho miskách s NL-406 agarem s/bez kvasinkového extraktu a příslušným aditivem. Po 6 dnech byly změřeny průměry mycelií.

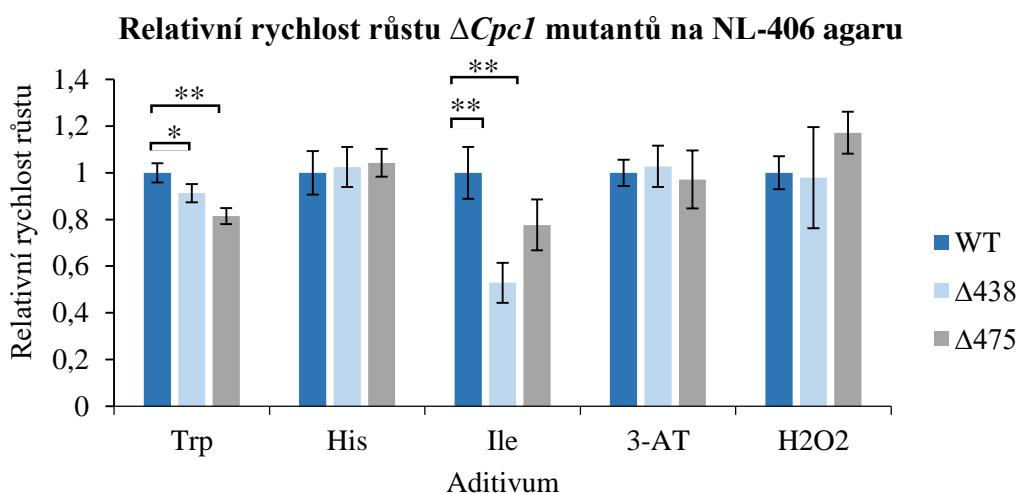
Jako nejlepší zdroj dusíku pro WT *Cp* 20.1 se ze tří testovaných aminokyselin ukázal isoleucin (Obr. 30), v jehož přítomnosti došlo k výraznému zvýšení rychlosti růstu oproti rychlosti růstu na minimálním mediu. WT na přítomnost 3-AT v minimálním mediu nereagoval, naopak suplementace peroxidem vodíku způsobila mírnou retardaci růstu.

U vybraných mutantů kmene *Cp* 20.1 delecí genu *CpcI* nevedla ke změně pigmentace (data nezobrazena), nicméně odlišný fenotyp oproti nemutovanému kmenu byl zaznamenán v rychlosti růstu. Již na minimálním mediu NL-406 bez jakéhokoli aditiva byl pozorován redukovaný růst obou  $\Delta CpcI$  mutantů oproti rychlosti růstu WT *Cp* 20.1 (v případě mutantu  $\Delta 475$  o 25 %, u  $\Delta 438$  o 30 %; Obr. 27). Pro vyhodnocení efektu vybraných aditiv na růst mutantů byly zjištěné velikosti mycelií  $\Delta CpcI$  mutantů vztaženy na jejich velikosti na samotném minimálním mediu, a poté na poměr těchto velikostí u WT. Na Obr. 28 je znázorněno grafické vyhodnocení relativní rychlosti růstu  $\Delta CpcI$  mutantů na minimálním NL-406 agaru po 6 dnech růstu. Největší rozdíl ve schopnosti růstu u obou mutantů oproti WT na mediu s vybranými suplementy byla zaznamenán na mediu s přidavkem Ile, kdy u mutantů nedošlo ke zvýšení rychlosti růstu jako v případě WT. Relativní snížení rychlostí obou mutantů bylo pozorováno i kultivací na mediu s Trp. Přidání His do media vedlo jak u WT, tak obou mutantů k mírnému snížení rychlosti růstu, nicméně tento efekt nebyl u mutantů s delecí *CpcI* výraznější. Přítomnost 3-AT v koncentraci 2 mmol·l<sup>-1</sup> růst WT ani mutantů neovlivnil. Relativní rychlost růstu v přítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v mediu byla u vzorku  $\Delta 475$  mírně zvýšena, nicméně tento rozdíl není statisticky významný.

Při růstu hub na NL-406 agaru s kvasinkovým extraktem, který představuje bohatý zdroj nutrientů, byly rychlosti růstu obou mutantů srovnatelné s rychlostí růstu WT. Tato skutečnost byla pozorována také v případech NL-406 agaru s kvasinkovým extraktem a aditivou použitými v kombinaci NL-406 agarem (data nezobrazena).



Obr. 27 Grafické vyhodnocení velikosti mycelií vybraných  $\Delta Cpc1$  mutantů ( $\Delta 438$ ,  $\Delta 475$ ) a WT *C. purpurea* 20.1 na NL-406 agaru s přidavkem L-Trp ( $4 \text{ mmol l}^{-1}$ ), L-His ( $4 \text{ mmol l}^{-1}$ ), D,L-Ile ( $4 \text{ mmol l}^{-1}$ ), 3-aminotriazolu (3-AT;  $2 \text{ mmol l}^{-1}$ ), peroxidu vodíku ( $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) po 6 dnech růstu. Experiment byl proveden ve třech biologických opakováních. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky. Hladina významnosti P (Studentův test) vzhledem k InocN mediu: \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ .



Obr. 28 Grafické vyhodnocení relativní rychlosti růstu vybraných  $\Delta Cpc1$  mutantů ( $\Delta 438$ ,  $\Delta 475$ ) oproti rychlosti růstu WT *C. purpurea* 20.1 na NL-406 agaru s přidavkem L-Trp ( $4 \text{ mmol l}^{-1}$ ), L-His ( $4 \text{ mmol l}^{-1}$ ), D,L-Ile ( $4 \text{ mmol l}^{-1}$ ), 3-aminotriazolu (3-AT;  $2 \text{ mmol l}^{-1}$ ), peroxidu vodíku ( $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) po 6 dnech růstu (vztaženo na NL-406 agar). Experiment byl proveden ve třech biologických opakováních. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky. Hladina významnosti P (Studentův test) vzhledem k WT: \* $P \leq 0,1$ ; \*\* $P \leq 0,05$ ; \*\*\* $P \leq 0,01$ .

## 5 DISKUZE

Reprogramování genové exprese za stavu nedostatku aminokyselin je u nižších eukaryot široce rozšířeným fenoménem. Tento regulační mechanismus je u hub vysoce konzervovaný. Ať už se jedná o všeobecnou kontrolu aminokyselin (GAAC) u *S. cerevisiae* (Hinnenbusch, 1986) či mezidráhový kontrolní systém biosyntézy aminokyselin (CPC) u vláknitých hub (Paluh *et al.*, 1988; Hoffmann *et al.*, 2001), je odpověď organismu na tyto podmínky zprostředkována transkripčním aktivátorem Gcn4, příp. homologním Cpc1/CpcA proteinem. Tyto faktory se na příslušné DNA sekvence váží prostřednictvím bZIP vazebné domény s motivem leucinového zipu (Ellenberger *et al.*, 1992). Její sekvence, která patří k vysoce konzervovaným úsekům této skupiny proteinů, se nachází také u Cpc1 proteinu *C. purpurea* (Obr. 29). Největší sekvenční podobnost tento faktor vykazuje s homologním proteinem *F. fujikuroi* (Tab. 9), nejmenší pak s Gcn4 proteinem *S. cerevisiae*. Příčinou je zřejmě evoluce vláknitých hub oproti jednobuněčné kvasince, rody *Fusarium* a *Claviceps* navíc náleží do stejné třídy Sordariomycetes.

Růst na minimálním mediu nespouští u *S. cerevisiae* odpověď GAAC, neboť kvasinka má možnost si všechny aminokyseliny nasyntetizovat. Ke spuštění dráhy GAAC může docházet při porušení rovnováhy hladin aminokyselin, zvláště těch, jejichž meziprodukty biosyntézy jsou součástí více biosyntetických drah. Stejný efekt způsobený inhibicí enzymů biosyntézy mohou způsobit také antimetabolity, např. analogy aminokyselin (Niederberger *et al.*, 1981). Nicméně pouhým přesunem z media s dostatkem aminokyselin do minimálního media dochází ke krátkodobé indukci GAAC systému, která je však kvůli neúčasti klíčové kinasy Gcn2 pouze dočasná (Penn *et al.*, 1984; Tzamarias *et al.*, 1989). Tato reakce na náhlý nedostatek aminokyselin byl pozorována i při obdobném přesunu *C. purpurea* z nutričně bohatého media do minimálního. Ke zvýšení exprese *Cpc1* došlo již v prvních půlhodině po přesunu, nicméně již po hodině bylo množství *Cpc1* transkriptu téměř na úrovni hladiny exprese v nutričně bohatém mediu. K částečnému zvýšení exprese *Cpc1* došlo i při přesunu do čerstvého nutričně bohatého media. Příčinou mohlo být dílčí vyčerpání aminokyselin v původním mediu a následné narušení rovnováhy jejich hladin z důvodu přísunu čerstvého media s dostatkem živin včetně aminokyselin.



```

Saccharomyces -----MSEYQPSLFALNPMGFSPLDGSKSTNEMVSASTSTAKPMVGLIF-DKFIKTEE
Aspergillus  -MSTPNIAQDFPELFDLQSN---RFGDDLSSPESNM-----LSPQINTSFF---SPMGEV
Neurospora   MFS--E--LDL-LDFA-----TFDGG-ATTEAAF-----ASPA-NQTYDLSVVSPSSV
Fusarium     MMNAAD--VELPEEFT-----AFDGG-ANT--AF-----SSPAVPSVDFDGGSSSSSI
Claviceps    MMNAAD--VDL-DEFT-----PFEGG-A-S--AF-----SSPAISSVMDFDGGSSISSA
              *           : .. :           *           .

Saccharomyces DPIIKQDTPSNLDFDIPQTATAPDAKTVLPIPELDDAVVESFFSSSTSDSTPMF-EYEN
Aspergillus  A-PPGTVSPKDLFFDA----SAPPSTTFTDLSTPPLD--TPG-F--FSQNTSPMINTEMD
Neurospora   S-NMGTVSPQELLHEPY-LSAPSSALTALTSPSLFDGSPD-F--DTFDISPNF-GHSD
Fusarium     G-NLATISPDQLFAHDFN-MSAPNSSALTALTSPSIYNESPE-F--DGVDVSPNF-GSAD
Claviceps    S-TFGTVSPHDLVQDPF-SSAPSSAALTALTSPSLYNESPD-V--DSFDASPNF-GNVD
              : * : * . : * : * * * : . : * : : :

Saccharomyces LEDNSKEWTSFLDNDIPVTTDDVSLADKAIESTEVEVSL-VPSNLEVSTTSFLPTPVLEDA
Aspergillus  LNAVPEEWESLFPQDGFSLDLSAALELAASLQQPKAT-G-----PPPTPVIRA-
Neurospora   LEN-PDTWFSLFPDATPLPQAQAQVQTQPQTQTQTEQQTQPLPELVQSVQPTVQPTVEQT
Fusarium     FDGAADPWFLFPQDSNVAPAQPTSVENS-----PELKSDE-----VDS-
Claviceps    FDGTGDSWYPLFPDESSHVDLQLAKSDLS-----LAEALSDKVSAV-----VDQ-
              :: . * ** : : : : :

Saccharomyces KLTQ-----TRKVKKPNSSVVKSHHVGKDDERLQHLGVVAYNRKQRSIPLSPIVP
Aspergillus  -----SASPAP--S-ASPAPSRQGTIHSVAVGYNARQR-KPLPPIKF
Neurospora   VHSVEASPATPSEDLEVLSPGSGHQRR-K-SSVSPSSGRHSSVAVGSRRRDKPLPPIIV
Fusarium     -----DNQSPAPSRR-K--SGTSPSTRHSSVAVGNARKRDKPLPPIVI
Claviceps    -----DA--AVVSRK-KAAVSPSSGRHSSIAGVNPKRDKPLPPIVI
              * .. . : * ** **

Saccharomyces E-SSDPAALKRARNTAARRSRARKLQRMKQLEDKVEELLKSNYHLENEVARLKKLVGER
Aspergillus  D-SADPAAMKRARNTAARKSRARKLERQEMERRIEELERMLEESKQREEYWRSMKATG
Neurospora   EDPSDVMAMKRARNTLAARKSRERKAQRLEELEAKIEELIA-----ERDRWKNLALAH
Fusarium     DDPSDVMAMKRARNTLAARKSRERKAALKLEELEDKIAKLEA-----ERDHWKRIALAQ
Claviceps    EDPNDDTAMKRARNTLAARKSRERKALHVEDLMNRIATLEA-----ERDHWKSVALS
              : * . : * * * * * * * * * * : : : : * . : : .

Saccharomyces -----
Aspergillus  TN----
Neurospora   GASTE-
Fusarium     TG--LQ
Claviceps    SQAGAQ

```

Obr. 29 Porovnání aminokyselinové (AMK) sekvence Gcn4 proteinu *S. cerevisiae* a jeho homologů u vláknitých hub *A. niger* (CpcA), *N. crassa* (Cpc1), *F. fujikuroi* (Cpc1) a *C. purpurea* (Cpc1). Sekvence byly získány z ENA databáze a zarovány pomocí programu Clustal Omega s využitím Needleman-Wunschova algoritmu. (\*) plně konzervované AMK reziduum; (bez tečky) žádná konzervace AMK; (1 nebo 2 tečky) částečná konzervace AMK. V modrém rámečku je vyznačena bZIP vazebná doména.

Tab. 9 Podobnost aminokyselinové sekvence (v %) Gcn4 proteinu *S. cerevisiae* a jeho homologů u vláknitých hub *A. niger* (CpcA), *N. crassa* (Cpc1), *F. fujikuroi* (Cpc1) a *C. purpurea* (Cpc1). Sekvence byly získány z ENA databáze. Data byla získána pomocí programu Clustal Omega s využitím Needleman-Wunschova algoritmu.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>N. crassa</i>	<i>F. fujikuroi</i>	<i>C. purpurea</i>
<i>S. cerevisiae</i>	100,00	30,38	29,32	25,34	24,66
<i>A. niger</i>	30,38	100,00	36,61	38,57	35,71
<i>N. crassa</i>	29,32	36,61	100,00	55,07	50,86
<i>F. fujikuroi</i>	25,34	38,57	55,07	100,00	62,45
<i>C. purpurea</i>	24,66	35,71	50,86	62,45	100,00

Pro další studium zapojení *Cpc1* proteinu v biosyntéze aminokyselin byly metodou kvasinkového rekombinačního klonování připraveny konstrukty pro delecí a konstitutivní overexpresi *Cpc1* genu. Kmen 20.1 je v současnosti jediným zástupcem rodu *Claviceps* s veřejně přístupnou genomovou skevencí (Schardl *et al.*, 2013). Znalost celogenomové sekvence velice usnadňuje transformační a diagnostické techniky.

Zatímco úspěšnost transformace při přípravě mutantů s konstitutivní expresí *Cpc1* genu díky náhodné integraci transformační kazety do genomu *C. purpurea* dosahovala 100 %, pravděpodobnost integrace exogenní DNA pomocí homologní rekombinace se u *C. purpurea* pohybuje kolem 1-2 % (Oeser *et al.*, 2002). Z více než 700 primárních transformantů bylo získáno 14 předpokládaných rekombinantů. V 10 případech byla přítomnost rezistenční kazety v genomu potvrzena PCR reakcí s oběma kombinacemi primerů, jež amplifikovaly úseky opačných konců kazety. Ve čtyřech vzorcích (185, 269, 490, 652) PCR reakce úspěšně proběhla pouze s jednou sadou primerů, nicméně u dvou těchto vzorků (269, 490) Southern blot analýza potvrdila správnou integraci kazety do místa *Cpc1* genu. U vzorku 652 kazeta do místa genu zřejmě integrována nebyla. Příčinou vzniku produktu v PCR reakci mohla být nedostatečná specifita diagnostického primeru nasedajícího na sekvenci v gDNA (ten zřejmě vykazoval homologii i se sekvencí gDNA v blízkosti ektopicky integrované transformační kazety). Žádný signál u vzorku 185 byl zřejmě způsoben nízkou koncentrací přenesené DNA. Inzerce rezistenční kazety pouze v místě *Cpc1* genu na obou alelách byla potvrzena u vzorků 270, 438 a 528, které budou použity pro další experimenty. Nicméně kvůli slabému signálu bude pro potvrzení inzerce kazety vhodné tento experiment zopakovat.

Gcn4 protein *S. cerevisiae* se podílí na regulaci transkripce více než 500 genů (Natarajan *et al.*, 2001), a představuje tak důležitý faktor pro kontrolu správného vývoje kvasinky. Jedním z projevů jeho nepřítomnosti je retardace růstu na minimálním mediu bez aminokyselin (Hong a Yoon, 2011). Tento fenotyp vykazovali i vybraní mutanti *C. purpurea* 20.1 s delecí *Cpc1* genu, u kterých byla zaznamenáno až 30% snížení rychlosti vegetativního růstu. Delece *GCN4* genu vede také ke zvýšené citlivosti k toxickým látkám narušující biosyntézu aminokyselin, jako jsou 3-aminotriazol (3-AT; kompetitivní inhibitor biosyntézy His), 5-methyltryptofan (5-MT; analog Trp) nebo L-methioninsulfoximin (MSX; inhibitor syntézy glutaminu), které indukují stav charakterizovaný nedostatkem příslušných aminokyselin.

Neschopnost mutantů s delecí *GCN4/Cpc1/CpcA* genu kompenzovat tento stav zvýšenou transkripcí genů zapojených do biosyntézy aminokyselin vede k prohloubení retardace, příp. inhibici jejich růstu v přítomnosti těchto látek. U  $\Delta Cpc1$  mutantů však v přítomnosti 3-AT ( $2 \text{ mmol l}^{-1}$ ) ke zpomalení růstu nedošlo. Příčinou může být nízká koncentrace inhibitoru, a proto bude tato skutečnost ověřena kultivací na mediu s vyšší koncentrací 3-AT. Nabízí se také možnost otestování dalších antimetabolik, např. 5-MT či MSX, na schopnost růstu těchto mutantů.

Biosyntéza aminokyselin je nedílnou součástí metabolismu dusíku. Ke zvýšení exprese genů jejich biosyntézy dochází pouze v případě, že jsou prekurzory dusíku dostupné v dostatečném množství. Za podmínek nedostatku celkového dusíku u *S. cerevisiae* dochází ke zvýšení transkripce genu *GCN4*, tj. obdobné reakci jako u stavu „pouhého“ nedostatku aminokyselin. Nicméně v následujícím kroku, translaci mRNA *GCN4* transkriptu, je GAAC blokována. Navíc dochází k indukci degradace již vytvořených proteinů. Nízká koncentrace Gcn4 proteinu nestačí na aktivaci GAAC, jež by zvýšila expresi genů biosyntézy aminokyselin. K inhibici jejich bazální exprese však nedochází. Vysoká hladina mRNA *GCN4* však umožňuje buňce rychle aktivovat GAAC v případě, že se vhodný zdroj dusíku v prostředí vyskytne (Grundmann *et al.*, 2001). Tímto zdrojem mohou být i samotné aminokyseliny. Pokud se však některá z nich v mediu nachází ve vysoké koncentraci ( $\text{mmol l}^{-1}$ ), může naopak vyvolat aktivaci GAAC podobně jako její nedostatek. Niederberger *et al.* (1981) tuto skutečnost vysvětlují rolí GAAC v koordinaci biologických funkcí kvasinky za podmínek nevyvážené dostupnosti aminokyselin. V případě nepřítomnosti Gcn4 proteinu pak následné zvýšení vnitřní hladiny této aminokyseliny, které by bylo za běžných podmínek regulováno GAAC systémem, vede k inhibici růstu. U *N. crassa* s delecí *Cpc1* genu byl tento jev potvrzen (Barthelmess, 1986). Ačkoli isoleucin představoval výhodný zdroj dusíku pro *C. purpurea*, u obou mutantů s delecí *Cpc1* bylo zaznamenáno výrazné snížení rychlosti růstu v přítomnosti Ile. Tento trend byl zaznamenán i při suplementaci Trp v mediu, ačkoli pro WT *Cp* 20.1 tato aminokyselina nepředstavovala tak výhodný zdroj dusíku jako Ile. Pro biosyntetické dráhy obou těchto aminokyselin je charakteristické, že jeden z jejich meziproduktů, chorismát u Trp, resp. homoserin u Ile, je prekurzorem pro syntézu i jiných aminokyselin. Chorismát je společným meziproduktem pro Trp, Tyr a Phe, homoserin je součástí biosyntetické dráhy Met a Thr (jedním z degradačních produktů Thr je pak meziprodukt syntézy Ile).

Tento inhibiční efekt může být způsoben tedy i suplementací meziproducty takovýchto rozvětvených biosyntetických drah. Růst *F. fujikuroi* s delecí  $\Delta Cpc1$  byl např. inhibován na mediu s homoserinem (Schönig *et al.*; 2009). His se neprojevil jako výhodný zdroj dusíku pro *C. purpurea*, v jeho přítomnosti naopak došlo k zpomalení růstu WT. U  $\Delta Cpc1$  mutantů k dalšímu snížení rychlosti růstu nedošlo. Příčinou může být jedinečná dráha biosyntézy His. Nabízí se však také zapojení alternativního kontrolního mechanismu, který je nezávislý na CPC. Možnost regulace genové exprese při nedostatku aminokyselin nezávisle na GAAC byla prokázána u *S. cerevisiae*. V minimálním mediu s 3-AT byla transkripce mnoha genů indukována jak u WT, tak u  $\Delta GCN4$  mutantů. Navíc byla za těchto podmínek indukována exprese i několika cílových genu Gcn4 proteinu. Mezi nimi je i několik genů syntézy aminokyselin, např. gen *HIS5* zapojený v biosyntéze His (Natarajan *et al.*, 2001).

Zpomalení růstu  $\Delta Cpc1$  mutantů za testovaných podmínek byla způsobená nepřítomností odpovídajícího proteinu, neboť při kultivaci mutantů na nutričně bohatém mediu, kdy CPC není potřeba, byla rychlost růstu mutantů srovnatelná s rychlostí růstu WT. Pro úplné potvrzení této skutečnosti bude však v budoucnu provedena komplementace mutantů genem *Cpc1* s následným opakováním experimentu. Rozdíly mezi oběma mutanty v reakcích na vysoké koncentrace vybraných aminokyselin mohly být způsobeny ektopickými inzercemi deleční kazety u vzorku  $\Delta 475$ , jež mohly narušit funkci dalších genů (výběr vzorků byl náhodný a proběhl ještě před ověřením mutantů Southern blotem).

Přítomnost peroxidu vodíku ( $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) inhibuje růst *C. purpurea*. Ačkoli se Gcn4 protein *S. cerevisiae* podílí na odpovědi v boji proti reaktivním kyslíkovým radikálům (Mascarenhas *et al.*, 2008), zapojení CPC u *C. purpurea* v odpovědi na přítomnost peroxidu vodíku prokázáno nebylo. V případě *F. fujikuroi* s delecí *Cpc1* genu také nebyl pozorován žádný efekt na růst v přítomnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Schönig *et al.*; 2009), zřejmě tedy tyto homologní proteiny evolučně vyspělejších organismů v reakci proti oxidativnímu stresu zapojeny nejsou.

Aminokyseliny jsou nedílnou součástí nejen primárního metabolismu, ale představují také prekurzory pro biosyntézu některých sekundárních metabolitů. U *A. nidulans* *CpcA* za podmínek nedostatku aminokyselin snižuje expresi genů zapojených do biosyntézy penicilinu, jehož prekurzorem je lysin. U mutantů s delecí *CpcA* genu byla naopak jeho produkce zvýšena (Busch *et al.*, 2003). Zástupci rodu *Claviceps* jsou významní tvorbou alkaloidů na bázi tryptofanu. Pro zjištění možného zapojení *Cpc1* faktoru

do biosyntézy a metabolismu těchto sekundárních metabolitů byli proto připraveni mutanti kmene P1 s konstitutivní overexpresí genu *Cpc1*. Kmen P1 byl vybrán z důvodu, že na rozdíl od modelového kmene *Cp 20.1* produkuje alkaloidy již v axenické kultuře a uvolňuje je do media. Představuje tak výhodný nástroj pro jejich studium (Tudzynski *et al.*, 1999). Pokud by vliv CPC na syntézu alkaloidů u *C. purpurea* byl analogický s produkcí penicilinu u *A. nidulans*, vedla by nadprodukce *Cpc1* k její inhibici. U *C. purpurea* však byla zjištěna indukce syntézy alkaloidů nejen jejich prekurzorem, aminokyselinou tryptofan, ale také jeho analogem 5-methyltryptofanem (5-MT), který stimuluje CPC. Následné zvýšení hladiny dimethylalyltryptofansyntasy (DMATS) nasvědčuje tomu, že tento indukční efekt zahrnuje *de novo* syntézu enzymu (Krupinski *et al.*, 1976). Rozdíl oproti regulaci produkci penicilinu u *A. nidulans* může souviset s nedostatečnou vnitřní hladinou Trp u *C. purpurea*, kdy její houba během axenické kultivace přijímá z media. *Cpc1* také může hrát roli již v samotném příjmu exogenního Trp, neboť k cílům GAAC u *S. cerevisiae* patří také geny kódující přenašeče aminokyselin (Natarajan *et al.*, 2001), Rychlost transportu Trp u *C. purpurea* je v přítomnosti neutrálních aromatických a alifatických aminokyselin (např. Phe, Ala, Leu), jež jsou přítomny v mmol<sup>-1</sup>-koncentraci, výrazně inhibována (Robertson *et al.*, 1973). V počáteční fázi produkce alkaloidů dochází také k výraznému poklesu hladiny Lys (Kybal *et al.*, 1976). Zdá se tedy, že optimální poměr aminokyselin představuje kritický bod pro syntézu alkaloidů, ve které může mít CPC v čele s *Cpc1* proteinem klíčovou roli. Z časových důvodů však nebyly hladiny alkaloidů ani aminokyselin u získaných mutantů měřeny a tato analýza bude provedena v budoucnu.

Podmínkou pro studium vlivu nadprodukce *Cpc1* proteinu na syntézu alkaloidů u *C. purpurea* jsou homokaryontní mutanti s konstitutivní overexpresí odpovídajícího genu. Transformací se však získávají nejčastěji heterokaryontní houby, u kterých není tato nová genetická informace dostatečně zafixována, a jejich kultivace tak musí probíhat v přítomnosti selekčního tlaku. Zatímco buňky kmene *Cp 20.1* jsou dikaryontní, kmen P1 je polykaryontní a je pro něj charakteristická přítomnost více než deseti jader v buňce. Tento kmen navíc není schopen produkovat konidie (Spalla a Marnati, 1981). Pro další studium funkce *Cpc1* proteinu budou proto připraveny monosporické izoláty získaných mutantů. V případě kmene *Cp 20.1* bude využita klíčivost jednojaderných spor na mediu s antibiotikem (Tudzynski a Scheffer, 2004). Metodou sekání špiček hyf, které obsahují pouze jedno jádro, budou získány monosporické izoláty kmene P1 (Goh, 1999).

Role Cpc1 u *C. purpurea* bude studována i v rámci možného zapojení CPC v parazitismu tohoto patogena. Vliv CPC na vztah mezi parazitem a hostitelem byl prokázán např. u *Verticillium longisporum* (Timpner *et al.*, 2013). Získání mutantů *C. purpurea* s delecí, příp. overexpresí genu *Cpc1* budou proto v budoucnu infikováni na žito a následně bude sledován jak průběh samotné infekce, tak změny ve spektru a množství alkaloidů ve sklerociích.

## 6 ZÁVĚR

Diplomová práce se věnovala mezidráhové kontrole aminokyselin (CPC) u *Claviceps purpurea*. Literární rešerše byla vypracována na téma všeobecné kontroly aminokyselin a Gcn4 transkripčního faktoru u *Saccharomyces cerevisiae*, jejíž mechanismus je u kvasinky důkladně prostudován. Dále byla pozornost věnována homologům Gcn4 proteinu u vláknitých hub. V teoretické části práce bylo taktéž zpracováno téma věnující se biologii *C. purpurea* se zaměřením na produkci alkaloidů.

V rámci experimentální části byla studována indukce CPC u *C. purpurea* 20.1 metodou RT-qPCR. Po potvrzení zvýšené exprese *Cpc1* transkriptu při přesunu houby z nutričně bohatého media do minimálního byly metodou kvasinkového rekombinačního klonování připraveny konstrukty pro delecí a konstitutivní overexpresi genu *Cpc1* u *C. purpurea* 20.1. Konstruktem pro konstitutivní overexpresi *Cpc1* byl transformován i kmen *Cp* P1. Úspěšnost transformace byla potvrzena metodou diagnostické PCR. V případě mutantů s delecí *Cpc1* genu byla integrace rezistenční kazety do místa genu *Cpc1v* genomu *Cp* 20.1 ověřena Southern blotem, který odhalil taktéž možné ektopické inserce. Vybraní  $\Delta Cpc1$  mutantů vykazovali na minimálním mediu bez zdroje dusíku redukovaný růst oproti WT *Cp* 20.1. V přítomnosti Ile, jenž se ukázal jako výhodný zdroj dusíku pro *C. purpurea*, k výrazné stimulaci růstu u mutantů s delecí *Cpc1* genu nedošlo. Předpokládaná inhibice růstu  $\Delta Cpc1$  mutantů v přítomnosti 3-AT zřejmě z důvodu nízké testovací koncentrace potvrzena nebyla. Růst mutantů s delecí *Cpc1* genu na mediu s  $H_2O_2$  nebyl odlišný ve srovnání s WT, neprokázalo se zapojení v odpovědi na oxidativní stres. V rámci studia vlivu nadprodukce *Cpc1* proteinu na *C. purpurea* budou ze získaných transformantů kmenů *Cp* 20.1 a P1 s overexpresí genu *Cpc1* v budoucnu připraveny monosporické izoláty. Spolu s mutanty s delecí genu *Cpc1* u nich budou sledovány možné změny jak v biosyntéze a metabolismu aminokyselin, tak produkci alkaloidů. Mutanti budou infikováni na žito a bude analyzována role mezidráhové kontroly aminokyselin v patogenezi tohoto parazita.

## 7 LITERATURA

Abastado J. P., Miller P. F., Jackson B. M., Hinnebusch A. G. (1991): Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for *GCN4* translational control. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 486-496.

Alarco A.-M., Raymond M. (1999): The bZIP Transcription Factor Cap1p Is Involved in Multidrug Resistance and Oxidative Stress Response in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* **181**, 700-708.

Albrecht G., Mösch H. U., Horrmann B. Reusser U., Braus G. H. (1998): Monitoring the Gcn4 protein-mediated response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 12696-12702.

Amaike S., Affeldt K. J., Franke W.-B., Choithani A., Keller N. P. (2013): The bZIP protein MeaB mediates virulence attributes in *Aspergillus flavus*. *Public Library of Science (PLoS) ONE* **8**, e74030.

Amich J., Schaffner L., Haas H., Krappmann S. (2013): Regulation of Sulphur Assimilation Is Essential for Virulence and Affects Iron Homeostasis of the Human-Pathogenic Mould *Aspergillus fumigatus*. *Public Library of Science (PLoS) Pathogens* **9**, e1003573.

Assano Y., Hagiwara D., Yamashino T., Mizuno T. (2007): Characterization of the bZIP-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 1800-1803.

Balázs A., Pócs I., Hamari Z., Letler É., Emri T., Miskei M., Oláh J., Tóth V., Hegedus N., Prde R. A., Molnár M., Pócsi I. (2010): AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetics and Genomics* **283**, 289-303.

Barthelme I. B. (1986): Regulation of amino acid synthetic enzymes in *Neurospora crassa* in the presence of high concentrations of amino acids. *Molecular and General Genetics* **203**, 533-537.

Benne R., Hershey J. W. B. (1978): The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **253**, 3078-3087.

Boichenko L. V., Boichenko D. M., Vinokurova N. G., Reshetilova T. A., Arinbasarov M. U. (2001): Screening for ergot alkaloid producers among microscopic fungi by means of the polymerase chain reaction. *Microbiology* **70**, 306-310.

Bové F. J. (1970): *The story of ergot*. S. Karger, New York, USA, 297 stran.

Braus G. H., Grundmann O., Brückner S., Mösch H. U. (2003): Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of The Cell* **14**, 4272-7284.

Braus, G.H., Pries, R., Düvel, K., Valerius, O. (2004) *Molecular Biology of Fungal Amino Acid Biosynthesis Regulation*. In: *The Mycota II, Genetics and Biotechnology*, 2nd edn, (Kück U., ed) Springer Press, Berlin, 239-269.

Brenchley, J. E. (1973): Effect of methionine sulfoximine and methionine sulfone on glutamate synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology* **114**, 666–673

Bu'Lock J. D., Barr J. G. (1968): A regulation mechanism linking tryptophan uptake and synthesis with ergot alkaloid synthesis in *Claviceps Lloydia* **31**, 342-354.

Busch S., Bode H. B., Brakhage A. A., Braus G. H. (2003): Impact of the cross-pathway control on the regulation of lysine and penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Current Genomics* **42**, 209-219.



Cao S. S., Kaufman R. J. (2012): Unfolded protein response. *Current Biology* **22**, 622-626.

Carsiotis M., Jones R. F.(1974): Cross-Pathway Regulation: Tryptophan-Mediated Control of Histidine and Arginine Biosynthetic Enzymes in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **119**, 889-892.

Carsiotis M., Jones R. F., Wesseling A. C. (1974): Cross-Pathway Regulation: Histidine-Mediated Control of Histidine, Tryptophan, and Arginine Biosynthetic Enzymes in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **119**, 893-898.

Cenis J. L. (1992): Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* **20**, 2380.

Clark J. M. (1988): Novel-non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acid Research* **16**, 9677-9686.

Coleman S. T., Tseng E. Moye-Rowley W. S. (1997): *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the *ATRI* structural gene. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 23224-23230.

Colot H. V., Park G., Turner G. E., Ringelberg C., Crew C. M., Litvinkova L., Weiss R. L., Borkovich K. A., Dunlap J. C. (2006): A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **103**, 10352-10357.

Deppmann C. D., Alvania R. S., Taparowsky E. J. (2006): Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interaction: insight into the evolution of closed interaction networks *Molecular Biology and Evolution* **23**, 1480-1492.

Dever T. E., Feng L., Wek R. C., Cigan A. M., Donahue T. F., Hinnebusch A. G. (1992): Phosphorylation of initiation factor 2 $\alpha$  by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of *GCN4* in yeast. *Cell* **68**, 585-596.

Ebbole D. J., Paluh J. L., Plamann M., Sachs M. S., Yanofsky C. (1991): *cpc-1*, the General Regulatory Gene for Genes of Amino Acid Biosynthesis in *Neurospora crassa*, Is Differentially Expressed during the Asexual Life Cycle. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 928-934.

Eckert S. E., Kubler E., Hoffmann B., Braus G. H. (2000): The tryptophan synthase-encoding *trpB* gene of *Aspergillus nidulans* is regulated by the cross-pathway control system. *Molecular Genetics and Genomics* **263**, 867-876.

Ellenberger T. (1994): Getting a grip in DNA recongition: structures of the basci region leucine zipper, and the basic region helix-loop-helix DNA-binding domains. *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 12-21.

Ellenberger T., Brandl C., Struhl K., Harrison S. (1992): The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted a helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* **71**, 1223-1237.

Elliott C. E., Fox E. M., Jarvis R. S., Howlett B. J. (2011): The cross-pathway control system regulates production of the secondary metabolite toxin, sirodesmin PL, in the ascomycete, *Leptosphaeria maculans*. *BioMed Central (BMC) Biotechnology* **11**, DOI: 10.1186/1471-2180-11-169.

Etxtebeste O., Ni M., Garzia A., Kwon N.-J., Fischer R., Yu J.-H., Espeso E. A., Ugalde U. (2008): Basic-Zipper-Type Transcription Factor FlbB Controls Asexual Development in *Aspergillus nidulans*. *Eucaryotic Cell* **7**, 38-48.

Floss H. G., Mothes U. (1964): Über den Einfluss von Tryptophan und analogen Verbindungen auf die Biosynthese von Clavinalkaloiden in saprophytischer Kultur. *Archiv für Mikrobiologie* **48**, 213-221.

Gebler J. C., Poulter C. D. (1992): Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics Journal* **296**, 308-313.

Gerhards N., Neubauer L., Tudzynski P., Li S.-M. (2014): Biosynthetic Pathways of Ergot Alkaloids. *Toxins* **6**, 3281-3295.

Gibson, D. M., King, B. C., Hayes, M. L., Bergstrom, G. C. (2011): Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. *Current Opinion in Microbiology* **14**, 264-270.

Goh T.-K. (199): Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Fungal Diversity* **2**, 47-63.

Goulden S. A., Chattaway F. W. (1968): Lysine Control of  $\alpha$ -Aminoadipate and Penicillin Synthesis in *Penicillium Chrysogenum*. *The Biochemical Journal* **110**, 55-56.

Grundmann, O., Mösch H. U., Braus G. H. (2001): Repression of *GCN4* mRNA translation by nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 25661-25671.

Gsaller F., Hortschansky P., Beattie S. R., Klammer V., Tuppatsch K., Lechner B. E., Rietzschel N., Werner E. R., Vogan A. A., Chung D., Mühlenhoff U., Kato M., Cramer R. A., Brakhage A. A., Haas H. (2014): The Janus transcription factor HapX controls fungal adaptation to both iron starvation and iron excess. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* **33**, 2261-2276.

Guo M., Guo W., Chen Y., Dong S., Zhang X., Zhang H., Song W., Wang W., Wang Q., Lv R., Zhang Z., Wang Y., Zheng X. (2010): The Basic Leucine Zipper Transcription Factor Moatf1 Mediates Oxidative Stress Responses and Is Necessary for Full Virulence of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **23**, 1053-1068.

Haarmann T., Machando 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., Rolke Y., Giesbert S., Tudzynski P. (2009): Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Molecular Plant Pathology* **10**, 563-577.

Hagiwara D., Asano Y., Yamashino T., Mizuno T. (2008): Characterization of the bZIP-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**, 2756-2760.

Hall T. A. (199): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* **41**, 95-98.

Herzog B., Streckfuss-Bömeke K., Braus G. H. (2011): A feedback circuit between transcriptional activation and self-destruction of Gcn4 separates its metabolic and morphogenic response in diploid yeasts. *Journal of Molecular Biology* **405**, 909-925.

Hinnebusch A. G. (1986): The general control of amino Acid biosynthetic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Reviews In Biochemistry* **21**, 277-317.

Hinnebusch A. G. (1992): General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Vol. 2, *gene expression*. (Broach J. R., Jones E. W., Pringle J. R., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, 319-414.

Hinnebusch A. G. (2005): Translation regulation of *GCN4* and the General amino acid control of yeast. *Annual Review of Microbiology* **59**, 407-450.

Hinnebusch A. G. Natarajan K. (2002): Gcn4p, a master regulator of gene expression is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryotic Cell* **1**, 22-32.

- Hinnebusch A. G. (1988): Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* **52**, 248-273.
- Hinsch J., Vrabka J., Oeser B., Novák O., Galuszka P., Tudzynski P. (2015): *De novo* biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*. *Environmental microbiology* **17**, 2935-2951.
- Hoffman (1980): *LSD: My Problem Child*. 1st ed. McGraw-Hill Book Company, New York, 209 stran.
- Hoffmann B., Valerius O., Andermann M., Braus G. H. (2001): Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene *cpcA* of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2846-2857.
- Hoffmann B., Wanke C., LaPaglia S. K., Braus G. H. (2000): c-Jun and RACK1 homologues regulate a control point for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **37**, 28-41.
- Hong S., Yoon S. (2011): Mcm1p binding sites in the *ARG1* promoter positively regulate *ARG1* transcription and *S. cerevisiae* growth in the absence of arginine and Gcn4p. *Amino Acids* **40**, 623-631.
- Hood H. M., Neafsey D. E., Galagan J., Sachs M. S. (2009): Evolutionary Roles of Upstream Open Reading Frames in Mediating Gene Regulation in Fungi. *The Annual Review of Microbiology* **63**, 385-409.
- Hortschansky P., Eisendle M., Al-Abdallah Q., Schmidt A. D., Bergmann S., Thön, Kniemeyer O., Abt B., Seeber B., Werner E. R., Kato M., Brakhage A. A., Haas H. (2007): Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex—a novel mechanism of gene regulation by iron. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* **26**, 3157-3168.
- Hradilová M. (2014): Funkce předpokládaného auxinového transportéru u houby *Claviceps purpurea*. Bakalářská práce, UP v Olomouci, Česká Republika.
- Hu G. (1993): DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA and Cell Biology* **12**, 763-770.
- Hurst H. C. (1995): Transcription factors 1: bZIP proteins *Proteine profile* **2**, 101-168.
- Chi Y., Huddleston M. J., Zhang X., Young R. A., Annan R. S., Carr S. A., Deshaies R. J. (2001): Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes and development* **15**, 1078-1092.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H., Hieter P. (1992): Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119-122
- Irniger S., Braus G. H. (2003): Controlling transcription by destruction: the regulation of yeast Gcn4p stability. *Current Genetics* **44**, 8-18.
- Jakoby M., Weisshaar B., Droge-Laser W., Vicente-Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T., Parcy F. (2002): bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **7**, 106-111.
- Kanazava S., Driscoll M., Struhl K. (1988): ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 664-673.
- Keller N., Turner G., Bennett J. W. (2005): Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 937-947.
- Keller U. (1983): Highly efficient mutagenesis of *Claviceps purpurea* by using protoplasts. *Applied and environmental microbiology* **46**, 580-584.

Kerridge D. (1958): The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of General Microbiology* **19**, 497-506.

King B. C., Waxman K. D., Nenni N. V., Walker L. P., Bergstrom G. C., Gibson D. M. (2011): Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnology for Biofuels* **4**, doi: 10.1186/1754-6834-4-4.

Klopotowski T., Wiater A. (1965): Synergism of aminotriazole and phosphate on inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **112**, 562-566.

Kong S., Park S.-Y., Lee Y.-H. (2015): Systematic characterization of the bZIP transcription factor gene family in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Environmental Microbiology* **17**, 1425-1443.

Kornitzer D., Raboy B., Kulka R. G., Fink G. R. (1994): Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* **13**, 6021-6030.

Krappmann S., Bignell E. M., Utz R., Rogers T., Hyeness K., Braus G. H. (2004): The *Aspergillus fumigatus* transcriptional activator CpcA contributes significantly to the virulence of this fungal pathogen. *Molecular Microbiology* **52**, 785-799.

Krupinski V. M., Robbers J. E., Floss H. G. (1976): Physiological Study of Ergot: Induction of Alkaloid Synthesis by Tryptophan at the Enzymatic Level. *Journal of Bacteriology* **125**, 158-165.

Kuźniak E., Urbanek H. (2000): The involvement of hydrogen peroxide in plant response to stresses. *Acta Physiologiae Plantarum* **22**, 195-203.

Kybal J., Kleinerová E., Bulant V. (1976): Ergot Alkaloids VI. Nitrogen Metabolism during the Development of Sclerotium of *Claviceps purpurea*. *Folia Microbiologica* **21**, 474-480.

Lachtman D. S. (2008): *Eucaryotic Transcription Factors*. 5th ed., Elsevier. New York, USA, 488 stran.

Landschultz W. H., Johnson P. F., McKnight S. L. (1988): The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764.

Lev S., Hadar R., Amedeo P., Baker S. E., Yoder O. C., Horwitz B. A. (2005): Activation of an AP-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliolobus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eucaryotic Cell* **4**, 443-454.

Loew D. M., van Deusen E. B., Meier-Ruge W. (1978): Effects on the central nervous system. In: *Ergot alkaloids and related compounds*. (Berde B., Schild H. O. eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 421-531.

López-Berges M. S., Risvall N., Prados-Rosales R. C., Di Pietro A. (2010): A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase tor and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell* **22**, 2459-2475.

Mascarenhas, C., Edwards-Ingram, L.C., Zeef, L., Shenton, D., Ashe, M.P., Grant, C.M. (2008): Gcn4 is required for the response to peroxide stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 2995–3007.

Meimoun A., Holtzman T., Weissman Z., McBride H. J., Stillman D. J., Fink G. R., Kornitzer D. (2000): Degradation of the transcription factor Gcn4 requires the kinase Pho85 and the SCF(CDC4) ubiquitin-ligase complex. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 915-927.

Molina L., Kahmann R. (2007): An *Ustilago maydis* Gene Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detoxification Is Required for Virulence. *The Plant Cell* **19**, 2293-2309.

Mösch H. U., Scheier B., Lahti R., Mäntsälä P., Braus G. H. (1991): Transcriptional activation of yeast nucleotide biosynthetic gene *ADE4* by *GCN4*. *The Journal of Biological Chemistry* **166**, 20453-20456.

Mueller P. P. (1986): Multiple upstream AUG codons mediate translational control of *GCN4*. *Cell* **445**, 201-207.

Mulder H. J., Salogeimo M., Penttilä M., Madrid S. M. (2004): The transcription factor HACA mediates the unfolded protein response in *Aspergillus niger*, and up-regulates its own transcription. *Molecular Genetics and Genomics* **271**, 130-14.

Muñoz, G. A., Agosin E. (1993) Glutamine involvement in nitrogen control of gibberellic acid production in *Gibberella fujikuroi*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 4317-4322.

Murre C., McCaw P. S., Vaessin H., Caudy M., Jan L. Y., Jank Y. N., Cabrera C. V., Buskin J. N., Hausschka S. D., Lassar A. B., Weintraub H., Baltimore D. (1989): Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537-544.

Nagalakshmi U., Wang Z., Waern K., Shou C., Raha D., Gerstein M., Snyder M. (2008): The Transcriptional Landscape of the Yeast genome Defined by RNA Sequencing. *Science* **320**, 1344-1349.

Natarajan K., Meyer M. R., Jackson B. M., Slade D., Roberts C., Hinnebusch A. G., Marton M. J. (2001): Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 4347-4368.

Natorff R., Sieńko M., Brzywczy J., Paszewski A. (2003): The *Aspergillus nidulans* metR gene encodes a bZIP protein which activates transcription of sulfur metabolism genes. *Molecular microbiology* **49**, 1081-1094.

Niederberger P., Miozzari G., Huetter R. (1981): Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **1**, 584-594.

Oeser B., Heidrich P. M., Müller U., Tudzynski P., Tenberge K. B. (2002): Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genetics and Biology* **36**, 176-186.

Orr-Weaver T. L., Szostak J. W., Rothstein R. J. (1981): Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 6354-6358.

Paietta J. V. (2008): DNA-binding specificity of the CYS3 transcription factor of *Neurospora crassa* defined by binding-site selection. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 1166-1171.

Paluh J. L., Orbach M. J., Legerton T. L., Yanofsky C. (1988): The cross-pathway control gene of *Neurospora crassa*, *cpc-1*, encodes a protein similar to GCN4 of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene v-jun-encoded protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **85**, 3728-3732.

Penn M. D., Thireos G., Greer H. (1984): Temporal Analysis of General Control of Amino Acid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of Positive Regulatory Genes in Initiation and Maintenance of mRNA Derepression. *Molecular and Cellular Biology* **4**, 520-528.

Polley S. D., Caddick M. X. (1996): Molecular characterisation of *meaB*, a novel gene affecting nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* **388**, 200-205.

Ponchel F., Toomes C., Bransfield K., Leong F. T., Douglas S. H., Field S. L., Bell S. M., Combaret V., Puisieux A., Mighell A. J., Robinson P. A., Inglehearn C. F., Isaacs J. D., Markham A. F. (2003): Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BioMed Central (BMC) Biotechnology* **3**, doi: 10.1186/1472-6750-3-18.

Pries R., Bomeke K., Irniger S., Grundmann O., Braus G. H. (2002): Amino acid-dependent Gcn4p stability regulation occurs exclusively in the yeast nucleus. *Eucaryotic Cell* **1**, 663-672.

Qiu, H., Hu C., Anderson J., Bjork G. R., Sarkar S., Hopper A. K., Hinnebusch A. G. (2000): Defects in tRNA processing and nuclear export induce *GCN4* translation independently of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 2505-2516.

Radwanski E., Last R. L. (1995): Tryptophan Biosynthesis and Metabolism: Biochemical and Molecular Genetics. *The Plant Cell* **7**, 921-934.

Richie D. L., Hartl L., Amanianda V., Winters M. S., Fuller K. K., Miley M. D., White S. McCarthy J. W., Latgé J.-P., Feldmesser M., Rhodes J. C., Askew D. S. (2009): A Role of the Unfolded Protein Response (UPR) in Virulence and Antifungal Susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. *Public Library of Science (PLoS) Pathogens* **5**, e1000258.

Robbers J. E., Floss G. H. (1970): Physiological studies on ergot: influence of 5-methyltryptophan on alkaloid biosynthesis and the incorporation of tryptophan analogs into protein. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **59**, 702-703.

Robbers J. E., Robertson L. W., Hornemann K. M., Jindra A., Floss G. H. (1972): Physiological Studies on Ergot: Further Studies on the Induction of Alkaloid Synthesis by Tryptophan and Its Inhibition by Phosphate. *Journal of Bacteriology* **112**, 791-796.

Robertson L. W., Robbers J. E., Floss H. (1973): Some Characteristics of Tryptophan Uptake in *Claviceps* species. *Journal of Bacteriology* **114**, 208-219.

Rolfes R. J., Hinnebusch A. G. (1993): Translation of the yeast transcriptional activator *GCN4* is stimulated by purine limitation: implications for activation of the protein kinase *GCN2*. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 5099-5111.

Ruberti I., Sessa G., Lucchetti S., Morelli G. (1991): A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* **10**, 1787-1791.

Řeháček Z., Kozová J., Řičicová A., Kašlík J., Sajdl P., Švarc S., Basappa S. C. (1971): Role of endogenous tryptophan during submerged fermentation of ergot alkaloids. *Folia Microbiologica* **16**, 35-40.

Sakamoto K., Arima T., Iwashita K., Yamada O., Gomi K., Akita O. (2008): *Aspergillus oryzae atfB* encodes a transcription factor for stress tolerance in conidia. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 922-932.

Saloheimo M., Valkonen M., Penttilä M. (2003): Activation mechanisms of the HAcI-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Molecular biology* **47**, 1149-1161.

Sekonyela R., Palmer J. M., Bok J.-W., Jain S., Berthier E., Forseth R., Schroeder F., Keller N. P. (2013): RsmA Regulates *Aspergillus fumigatus* Gliotoxin Cluster Metabolites Including Cyclo(L-Phe-L-Ser), a Potential New Diagnostic Marker for Invasive Aspergillosis. *Public Library of Science (PLoS) ONE* **8**, e62591.

Serfling E. (1989): Autoregulation – a common property of eukaryotic transcription factors? *Trends in Genetics* **5**, 131-133.

Shelest E. (2008): Transcription factors in fungi. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters* **286**, 145-151.

Shemer R., Meimoun A., Holtzman T., Kornitzer D. (2002): Regulation of the Transcription Factor Gcn4 by Pho85 Cyclin Pcl5. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 5395-5404.

Shetty N. P., Jørgensen H. J. L., Jensen J. D., Collinge D. B., Shetty H. S. (2008): Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **221**, 267-280.

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

Schardl C. L., Young C. A., Hesse U., Amyotte S. G., Andreeva K., Calie P. J., Fleetwood D. J., Haws D. C., Moore N., Oeser B., 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., Amaoudova E. G., Bullock C. T., Chariton N. K., Chen L., Cox M., Dinkins R. D., Florea S., Glenn A. E., Gordon A., Güldener U., Harris D. R., Hollin W., Jaromczyk J., Jonson R. D., Khan A. K., Leistner E., Leuchtman A., Li C., Liu J.-G., Liu J., Liu M., Mace W., Machado C., Nagabhyru P., Pan J., Schmidt J., Sugawara K., Steiner U., Takach J. E., Tanaka E., Webb J. S., Wilson E. V., Wiseman J. L., Yoshida R., Zeng Z. (2013): Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *Public Library of Science Genetics* **2**, 1-26

Schmidt J. C., Brody S. (1976): Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriology Review* **40**, 1-41.

Schönig B., Vogel S., Tudzynski B. (2009): Cpc1 mediates cross-pathway control independently of Mbf1 in *Fusarium fujikuroi*. *Fungal Genetics and Biology* **46**, 898-908.

Schumacher J. (2012): Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genetics and Biology* **49**, 483-497

Schürch, A., Miozarri, J., and Hütter, R. 1974. Regulation of tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Mode of action of 5-methyltryptophan and 5-methyltryptophan-sensitive mutants. *Journal of Bacteriology* **117**, 1131-1140.

Son H., Seo Y.-S., Min K., Park A. R., Lee J., Jin J.-M., Lin Y., Cao P., Hong S.-Y., Kim E.-K., Lee S.-H., Cho A., Lee S., Kim M.-G., Kim Y., Kim J.-E., Kim J.-C., Choi G., J., Yun S.-H., Lim J. Y., Kim M., Lee Y.-H., Choi Y.-D., Lee Y.-W. (2011): A Phenome-Based Functional Analysis of Transcription Factors in the Cereal Head Blight Fungus, *Fusarium graminearum*. *Public Library of Science (PLoS) Pathogens* **7**, 1-10.

Southern E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-508.

Spalla C., Marnati M. P. (1981): Aspect of the interspecific fusion of protoplast of alkaloid producing strain of *Claviceps purpurea* and *Claviceps paspali*. In: Overproduction of microbial products (Krumphanzl V., Sikyta B., Vanek Z. eds.), Academic Press, Londýn, Velká Británie, 563-568.

Stephen D. W. S., Rivers S. L., Jamieson D. J. (1995): The role of the *YAP1* a *YAP2* genes is the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **16**, 415-423.

Taber W. A. (1967): Fermentative production of hallucinogenic indole compounds. *Lloydia* **30**, 39-66.

Taber, W.A. (1985) Biology of *Claviceps*. In: *Biology of industrial microorganisms* (Demain A. L. a Solomon N. A. eds), The Benjamin Cummings Publishing Company, Londýn, Velká Británie, 449-486.

Tang Wei, Ru Yanyan, Hong L., Zhu Q., Zuo R., Guo X., Wang J., Zhang H., Zheng X., Wang P., Zhang Z. (2014): System-wide characterization of bZIP transcription factor proteins involved in infection-related morphogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *Environmental Microbiology* **17**, 1377-1396.

Teichert S., Schöning B., Richter S., Tudzynski B. (2004): Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. *Molecular Microbiology* **53**, 1661-1675.

Temme N., Tudzynski P. (2009): Does *Botrytis cinerea* Ignore H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress During Infection? Characterization of *Botrytis* Activator Protein 1. *Molecular Plant-Microbe Interaction Journal* **22**, 987-998.

Tfelt-Hansen P. C., Koehler P. J. (2008): History of the use of ergotamine and dihydroergotamine in migraine from 1906 and onward. *Cephalalgia* **28**, 877-886.

Thobois S. (2006): Proposed dose equivalence for rapid switch between dopamine receptor agonists in Parkinson's disease: A review of the literature. *Clinical Therapeutics* **28**, 1-12.

Tian C., Li J., Glass N. L. (2011): Exploring the bZIP transcription factor regulatory network in *Neurospora crassa*. *Microbiology* **157**, 747-759.

Timpner, C., Braus-Stromeyer, S.A., Tran, V.T. and Braus, G.H. (2013): The Cpc1 regulator of the cross-pathway control of amino acid biosynthesis is required for pathogenicity of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **26**, 1312-1324.

Tripathi G., Wiltshire C., Macaskill S., Tournu H., Budge S., Brown A. J. P. (2002): Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* **21**, 5448-5456.

Tudzynski P., Hölter K., Correia T., Arntz C., Grammel N., Keller U. (1999): Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Molecular and General Genetics* **261**, 133-141.

Tudzynski P., Scheffer J. (2004): *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular Plant Pathology* **5**, 377-388.

Tzamarias, D., Roussou I., Thireos G. (1989): Coupling of *GCN4* mRNA translational activation with decreased rates of polypeptide chain initiation. *Cell* **57**, 947-954.

Valerius O., Kleinschmidt M., Rachfall N., Schulze F., López Marín S., Hoppert M., Streckfuss-Bömeke K., Fischer C., Braus G. H. (2007): The *Saccharomyces* homolog of mammalian RACK1, Cpc2/Asc1p, is required for FLO11-dependent adhesive growth and dimorphism. *Molecular and Cellular Proteomics* **6**, 1968-1979.

van Engelenburg F., Smit R., Goosen T., van den Broek H., Tudzynski P. (1989): Transformation of *Claviceps purpurea* using a bleomycin resistance gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**, 364-370.

Vazquez de Aldana, C. R., Wek R. C., San Segundo P., Truesdell A. G., Hinnebusch A. G. (1994): Multicopy tRNA genes functionally suppress mutations in yeast eIF-2 $\alpha$  kinase GCN2: evidence for separate pathways coupling *GCN4* expression to uncharged tRNA. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 7920-7932.

Vining L. C. (1970): Effect of tryptophan on alkaloid biosynthesis in cultures of a *Claviceps* species. *Canadian Journal of Microbiology* **16**, 473-480.

Vinson C., Acharya A., Taparowky E. J. (2006): Deciphering B-ZIP transcription factor interactions *in vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1759**, 4-12.

Vo K. T., Michaelis S., Paddon C. (1997): Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic acids research* **25**, 451-452.

Wagner E. F. (2001): AP-1-introductory remarks. *Oncogene* **20**, 2334-2335.



- Wallwey C., Li S. M. (2011): Ergot alkaloids: Structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Natural Product Reports* **28**, 496-510.
- Wanke C., Eckert S., Albrecht G., Van Hartingsveldt W., Punt P. J., Van Den Hondel C. A. M. J. J., Braus G. H. (1997): The *Aspergillus niger* homologue, *cpcA*, is transcriptionally regulated and encodes an unusual leucine zipper. *Molecular Microbiology* **23**, 23-33.
- Weygand F., Floss H. G. (1963): The biogenesis of ergot alkaloids. *Angewandte Chemie International Edition in English* **2**, 243-247.
- Winston F., Dollard C., Ricupero-Hovasse S. L. (1995): Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* **11**, 53-55.
- Wong K. H., Hynes M. J., Todd R. B., Davis M. A. (2007): Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of the nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **66**, 534-551.
- Zaman Z., Bowman S. B., Kornfeld G. D., Brown A. J. P., Dawes I. W. (1999): Transcription factor GCN4 for control of amino acid biosynthesis also regulates the expression of the gene for lipoamide dehydrogenase. *Biochemical Journal* **340**, 855-862.
- Zhou M.-Y., Gomez-Sanchez C. E. (2000): Universal TA Cloning. *Current Issues in Molecular Biology* **2**, 1-7.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

+	pozitivní kontrola
-	negativní kontrola
-comp	komplementace genu (z angl. complemented)
-si	umlčení genu (z angl. silenced)
Δ	delece genu
3-AT	3-aminotriazol
40S	malá podjednotka ribosomu
5-MT	5-methyltryptofan
60S	velká podjednotka ribosomu
<i>Act</i>	gen kódující γ-aktin
<i>Amp<sup>R</sup></i>	gen rezistence na ampicilin
AP	alkalická fosfatasa
<i>ATR1</i>	gen kódující transmembránový protein potřebný pro rezistenci vůči 3-aminotriazolu
Bap1	protein zapojený v obranné reakci proti oxidativnímu stresu u <i>Botrytis cinerea</i>
bHLH-LZ	DNA-vázající doména s bazickým regionem s motivem helix-smyčka-helix a leucinovým zipem (z angl. basic region helix-loop-helix leucine zipper)
<i>ble</i>	gen rezistence na phleomycin
bZIP	DNA-vazebná doména s bazickým regionem s motivem leucinového zipu (z angl. basic leucine zipper domain)
Cap1	protein zapojený v obranné reakci proti oxidativnímu stresu u <i>Candida albicans</i>
Cdc34	ubikvitin-konjugační enzym
cDNA	komplementární DNA
CDP, res. CDP Star	2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1.3.7]decan])-4-yl]-1-fenylfosfát sodný
<i>CpAEC</i>	gen kódující předpokládaný auxinový přenašeč u <i>Claviceps purpurea</i>
CPC	mezidráhová kontrola aminokyselin (z angl. cross-pathway control)
<i>Cpc1</i>	gen kódující hlavní transkripční faktor mezidráhové kontroly aminokyselin
Cpc1	hlavní transkripční faktor mezidráhové kontroly aminokyselin
<i>CpcA</i>	gen kódující hlavní transkripční faktor mezidráhové kontroly aminokyselin
CpcA	hlavní transkripční faktor mezidráhové kontroly aminokyselin
CPRE	vazebná sekvence <i>Cpc1/CpcA</i> proteinů (z angl. <i>Cpc1/CpcA</i> -response element)
C <sub>T</sub>	cyklus prahu (z angl. cycle of threshold)
cys-3	protein zapojený v metabolismu síry u <i>Neurospora crassa</i>
DIG	digoxigenin
DMATS	4-dimethylallyltryptofansynthasa
DMSO	dimethylsulfoxid

dNTPs	deoxynukleotidy
EAS	syntéze námelových alkaloidů (ergot alkaloid synthesis)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eIF2	eukaryotní iniciační faktor 2 (z angl. eucaryotic initiation factor 2)
eIF2B	eukaryotní iniciační faktor 2B (z angl. eucaryotic initiation factor 2)
eIF2-GDP	eukaryotní iniciační faktor 2 s navázaným GDP (z angl. eucaryotic initiation factor 2)
eIF2-GTP	eukaryotní iniciační faktor 2 s navázaným GTP (z angl. eucaryotic initiation factor 2)
eIF2 $\alpha$	$\alpha$ -podjednotka eukaryotního iniciačního faktoru 2 (z angl. eucaryotic initiation factor 2)
<i>flbB</i>	gen kódující protein zapojený do nepohlavního vývoje <i>Aspergillus nidulans</i>
FlbB	protein zapojený do nepohlavního vývoje <i>Aspergillus nidulans</i>
fw primer	označení primeru ve směru 3' → 5' (z angl. forward)
GAAC	všeobecná kontrola aminokyselin (z angl. general amino acid control)
Gcn2	proteinkinasa zapojená do všeobecné kontroly aminokyselin (z angl. general control non-derepressed)
<i>GCN4</i>	gen kódující hlavní transkripční faktor mezidráhové kontroly aminokyselin (z angl. general control non-derepressed)
Gcn4	hlavní transkripční faktor všeobecné kontroly aminokyselin (z angl. general control non-derepressed)
gDNA	genomická DNA
GEF	protein podílející se na recyklaci GTP během translace (z angl. guanine exchange factor)
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
<i>glnA</i>	gen kódující glutaminsynthetasu
<i>hac1</i>	gen kódující protein aktivující odpověď na přítomnost „nesložených“ proteinů u <i>Trichoderma reesei</i>
<i>hacA</i>	gen kódující protein aktivující odpověď na přítomnost „nesložených“ proteinů u <i>Aspergillus</i>
hacA	protein aktivující odpověď na přítomnost „nesložených“ proteinů u <i>Aspergillus</i>
HapX	protein zapojený v metabolismu železa u <i>Aspergillus nidulans</i>
<i>hph</i>	gen rezistence na hygromycin
IAA	indol-3-octová kyselina
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-galaktopyranosid
LB medium	Luria-Bertani medium
<i>LPD1</i>	gen kódující lipoamiddehydrogenasu 1
MBP1	protein vázající se na MCB elementy (DNA sekvence s <i>Mlu1</i> restrikčním místem, které se účastní buněčného cyklu; z angl. <i>Mlu1</i> cell cycle box), (z angl. MCB binding protein 1)

MeaB	protein zapojený v metabolismu dusíku u <i>Aspergillus flavus</i>
metR	protein zapojený v metabolismu síry u <i>Aspergillus</i>
Met-tRNA <sup>iMet</sup>	transferová RNA s navázanou iniciační aminokyselinou translace methionin
<i>MluI</i> -box	sekvence DNA s <i>MluI</i> restrikčním místem
MMS	methylmethansulfonát
Moatf1	protein zapojený v interakci mezi <i>Magnoportha oryzae</i> a hostitelem
mRNA	mediátorová RNA
MSX	methioninsulfoximin
NMR	potlačení metabolismu dusíku (z angl. nitrogen metabolism repression)
OD <sub>600</sub>	optická densita při 600 nm
OE	overexprese genu
<i>ori</i>	počátek replikace v <i>Escherichia coli</i>
OS	okrajová sekvence genu
PEG	polyethylenglykol
Pho85	cyklin-dependentní proteinkinasa
<i>PoliC</i>	promotor genu kódujícího podjednotku 9 mitochondriální ATPasy (z <i>Aspergillus nidulans</i> )
<i>PtpC</i>	promotor genu kódujícího indol-3-fosfátsynthetasu (z <i>Aspergillus nidulans</i> )
rev primer	označení primeru ve směru 5' → 3' (z angl. reverse)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (z angl. reactive oxygen species)
ROX	6-karboxy-X-rhodamin
RQ	relativní kvantifikace (z angl. relative quantification)
RT	pokožová teplota (z angl. room temperature)
SCF <sup>CDC4</sup>	ubikvitinligasa
SDS	dodecylsírán sodný
sirZ	transkripční faktor stimulující produkci sirodesminu u <i>Leptosphaeria maculans</i>
Srb10	cyklin-dependentní proteinkinasa
SYBR Green	N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-fenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropan-1,3-diamin
TC	ternární komplex
TF	transkripční faktor
<i>TGluc</i>	terminátor genu kódujícího glukanasu (z <i>Botrytis cinerea</i> )
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
tRNA	transferová RNA
tRNA <sup>iMet</sup>	transferová RNA pro iniciační aminokyselinu translace methionin
Tween-20	PEG-20-ether monosorbitanester kyseliny laurové
uORF	otevřený čtecí rámec v 5' nepřekládané oblasti mediátorové RNA (z angl. upstream open reading frame)
uORF1	první (v pořadí) otevřený čtecí rámec v 5' nepřekládané oblasti mediátorové RNA (z angl. upstream open reading frame 1)

uORF2	druhý (v pořadí) otevřený čtecí rámeček v 5' nepřekládané oblasti mediátorové RNA (z angl. upstream open reading frame 2)
uORF4	čtvrtý (v pořadí) otevřený čtecí rámeček v 5' nepřekládané oblasti mediátorové RNA (z angl. upstream open reading frame 4)
UPR	odpověď na přítomnost „nesložených“ proteinů (z angl. unfolded protein response)
<i>URA3</i>	gen kódující orotidin-5-fosfátdekarboxylasu
<i>URA5</i>	gen kódující orotátfosforibosyltransferasu
WT	divoký kmen (z angl. wild type)
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
YAP	protein zapojený v obranné reakci proti oxidativnímu stresu u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
yap1	protein zapojený v obranné reakci proti oxidativnímu stresu a virulenci u <i>Ustilago maydis</i>