

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Kvasinkové rekombinační klonování a jeho využití
pro přípravu konstruktů k transformaci
Claviceps purpurea, funkční ověření vybraných
konstruktů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Michaela Hradilová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Josef Vrabka
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a 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

podpis diplomanta

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu Mgr. Josefu Vrabkovi za odborné rady, trpělivost, ochotu a čas věnovaný při zpracování teoretické i experimentální části této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc. a Oddělení buněčné biologie, CRH za možnost pracovat s epifluorescenčním mikroskopem.

V neposlední řadě děkuji všem zaměstnancům Oddělení molekulární biologie, CRH za vytvoření příjemné atmosféry a především ochotu kdykoliv pomoci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Michaela Hradilová
Název práce	Kvasinkové rekombinační klonování a jeho využití pro přípravu konstruktů k transformaci <i>Claviceps purpurea</i> , funkční ověření vybraných konstruktů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Josef Vrabka
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Claviceps purpurea je fytopatogenní houba parazitující na více než 400 rostlinných druzích, zejména žitě, ječmeni a prosu. V infikovaných květenstvích se vytváří tzv. námel, sklerocium s vysokým obsahem námelových alkaloidů. Tyto alkaloidy jsou využívány ve farmaceutickém průmyslu. Pro studium *C. purpurea* byla v minulosti zavedena metoda genetické transformace. Experimentální přístupy byly navíc usnadněny nedávným sekvenováním genomu *C. purpurea* 20.1. Vhodnou technikou pro přípravu konstruktů k transformaci *C. purpurea* je kvasinkové rekombinační klonování, které představuje cenově dostupnou, jednoduchou a vysoce účinnou alternativou klasického klonování. Připravené konstrukty mohou navíc obsahovat fluorescenční značku, tudíž mohou být použity k lokalizaci proteinů, studiu proteinových interakcí či sledování průběhu infekce v hostitelské tkáni.

Tato práce je zaměřena na optimalizaci a využití metody kvasinkového rekombinačního klonování k přípravě konstruktů pro transformaci *C. purpurea*. Touto metodou byly připraveny konstrukty pro expresi i delecii vybraných genů *C. purpurea*. Konstrukty pro expresi genu *lpsA1*, který kóduje neribosomální lysergylpeptidovou syntetasu LPS1, byly transformovány do dvou kmenů *C. purpurea*. Pro ověření jejich přítomnosti a funkčnosti byly zvoleny metody diagnostické PCR, qPCR a Western blotu. Metodou epifluorescenční mikroskopie byla určena lokalizace GFP-fúzního proteinu. Transformanti byly společně s odpovídajícími kontrolami infikovány na žito. Získaná sklerocia budou testována na změnu v obsahu produkovaných námelových alkaloidů.

Klíčová slova	Kvasinkové rekombinační klonování, <i>Claviceps purpurea</i> , lysergylpeptidová syntetasa LPS1
Počet stran	92
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Michaela Hradilová
Title	Yeast recombinational cloning and its use for construct preparation to transform <i>Claviceps purpurea</i> , functional testing of selected constructs.
Type of thesis	Diploma
Department	Department of molecular biology
Supervisor	Mgr. Josef Vrabka
The year of presentation	2016

Abstract

Claviceps purpurea is a phytopathogenic fungus which infects more than 400 plant species, especially rye, barley and millet. Late stage of infection is characteristic by formation of ergot, a sclerotium with high content of ergot alkaloids. These alkaloids are widely used in pharmaceutical industry. For study of *C. purpurea* a method of genetic transformation was implemented in the past. Moreover experimental approaches were facilitated by the recent sequencing of the genome of *C. purpurea* 20.1. The yeast recombinational cloning that represents an affordable, simple and highly effective alternative to classical cloning is a suitable technique for constructs preparation to transform this fungi. Furthermore the prepared constructs may contain a fluorescent label, therefore they can be used to localize protein of interest, study of protein interactions or monitoring the path of infection in the host tissue.

This work is focused on optimizing and utilization of yeast recombinational cloning for preparation of constructs to transform *C. purpurea*. Using this method constructs for expression and deletion of selected *C. purpurea* genes have been prepared. The constructs for expression of *lpsA1* gene which encodes a nonribosomal lysergylpeptide synthetase LPS1 have been transformed into two strains of *C. purpurea*. Methods of diagnostic PCR, qPCR and Western blot were chosen to verify their presence and functionality. Using epifluorescence microscopy the localization of GFP fusion protein was done. Transformants and the corresponding controls were infected on rye. Sclerotia will be tested for alternation in content of produced alkaloids.

Keywords	Yeast recombinational cloning, <i>Claviceps purpurea</i> , lysergylpeptide synthetase LPS1
Number of pages	92
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 <i>Claviceps purpurea</i>	2
2.1.1 Charakteristika	2
2.1.2 Molekulární biologie <i>C. purpurea</i>	3
2.1.2.1 Mutageneze	3
2.1.2.2 Integrace DNA do genomu <i>C. purpurea</i>	5
2.1.2.2.1 Delece genů založená na HR	5
2.1.2.2.2 Konstitutivní exprese genů založená na NHEJ	8
2.1.2.3 Ověření transformace <i>C. purpurea</i>	8
2.2 Nové metody editace genomu pomocí programovatelných nukleas	9
2.2.1 TALEN	10
2.2.1.1 Mechanismus TALEN	10
2.2.1.2 Využití TALEN u hub	12
2.2.2 CRISPR/Cas	12
2.2.2.1 Mechanismus CRISPR/Cas	12
2.2.2.3 Využití CRISPR/Cas9 u hub	14
2.2.3 TALEN versus CRISPR/Cas	17
2.3 Příprava konstruktů pomocí kvasinkového rekombinačního klonování	18
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1 Materiál	21
3.1.1 Biologický materiál	21
3.1.2 Vektory	21
3.1.3 Chemikálie	21
3.1.4 Roztoky a média	24
3.1.4.1 Roztoky a média pro práci s <i>C. purpurea</i>	24
3.1.4.2 Roztoky a média pro práci s <i>E. coli</i>	26
3.1.4.3 Roztoky a média pro práci s <i>S. cerevisiae</i>	27
3.1.4.4 Roztoky pro SDS-PAGE	28
3.1.4.5 Roztoky pro Western blot	29
3.1.4.6 Roztoky pro imunoprecipitaci GFP-fúzních proteinů pomocí GFP Trap_A	29
3.1.4.8 Roztoky pro barvení polyakrylamidových gelů stříbrem	30
3.1.4.9 Roztoky pro horizontální agarosovou elektroforézu	30
3.1.5 Použité kity	30
3.1.6 Software a programy	31
3.1.7 Laboratorní pomůcky	31
3.1.8 Přístroje	31
3.2 Primery	32
3.2.1 Návrh primerů pro kvasinkové rekombinační klonování	32
3.2.1.1 Primery pro tvorbu konstruktů pro delecí vybraných genů <i>C. purpurea</i>	32
3.2.1.2 Primery pro tvorbu konstruktů pro konstitutivní expresi vybraných genů <i>C. purpurea</i>	34
3.2.2 Další použité primery	36

3.3 Metody.....	37
3.3.1 Kvasinkové rekombinační klonování	37
3.3.1.1 Příprava DNA pro tvorbu konstruktů pro konstitutivní expresi vybraných genů <i>C. purpurea</i>	37
3.3.1.1.1 Klonování do <i>pDRIVE</i> plasmidu	37
3.3.1.1.1.1 PCR.....	37
3.3.1.1.1.2 Elektroforéza v agarosovém gelu	38
3.3.1.1.1.3 Purifikace DNA amplikonů z PCR reakční směsi.....	38
3.3.1.1.1.4 Ligace do <i>pDRIVE</i> plasmidu	39
3.3.1.1.1.5 Transformace <i>E. coli</i>	39
3.3.1.1.1.6 Izolace plasmidové DNA alkalickou lýzí	39
3.3.1.1.1.7 Kontrolní restrikce	40
3.3.1.1.1.8 Kontrolní PCR	41
3.3.1.1.1.9 Přečištění plasmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu, sekvenace.....	41
3.3.1.1.2 Příprava DNA na transformaci <i>S. cerevisiae</i>	42
3.3.1.2 Příprava DNA pro tvorbu konstruktů pro delecii vybraných genů <i>C. purpurea</i>	42
3.3.1.3 Restrikce shuttle vektoru.....	42
3.3.1.4 Ošetření vektoru alkalickou fosfatasou.....	43
3.3.1.5 Transformace <i>S. cerevisiae</i> a <i>E. coli</i>	43
3.3.1.5.1 Příprava buněk <i>S. cerevisiae</i>	43
3.3.1.5.2 Transformace <i>S. cerevisiae</i>	44
3.3.1.5.3 Izolace plasmidové DNA z <i>S. cerevisiae</i>	45
3.3.2 Transformace <i>C. purpurea</i>	46
3.3.2.1 Příprava DNA.....	46
3.3.2.1.1 Izolace plasmidové DNA pomocí NucleoBond Xtra kitu.....	46
3.3.2.1.2 Precipitace DNA octanem sodným a isopropanolem.....	47
3.3.2.2 Příprava protoplastů	47
3.3.2.3 Transformace protoplastů	48
3.3.3 Ověření transformace <i>C. purpurea</i>	48
3.3.3.1 Izolace genomové DNA <i>C. purpurea</i>	48
3.3.3.2 Diagnostická PCR	49
3.3.4 Monosporická izolace	50
3.3.5 qPCR.....	50
3.3.5.1 Příprava biologického materiálu	50
3.3.5.2 Izolace RNA.....	50
3.3.5.3 Přepis RNA na cDNA	51
3.3.5.4 SYBR Green qPCR.....	52
3.3.6 Western blot.....	53
3.3.6.1 Izolace proteinů	53
3.3.6.2 Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové.....	54
3.3.6.3 SDS-PAGE.....	54
3.3.6.4 Western blot	55
3.3.6.6 Imunodetekce	56
3.3.7 Imunoprecipitace GFP-fúzních proteinů	57
3.3.7.1 GFP-Trap_A.....	57
3.3.7.2 Western blot a barvení SDS polyakrylamidových gelů stříbrem.....	57
3.3.8 Epifluorescenční mikroskopie	58
3.3.9 Očkování žita	58

4 VÝSLEDKY	59
4.1 Kvasinkové rekombinační klonování.....	59
4.1.1 Příprava DNA pro tvorbu konstruktů pro konstitutivní expresi vybraných genů <i>C. purpurea</i>	60
4.1.1.1 Klonování do <i>pDRIVE</i> plasmidu.....	60
4.1.1.1.1 Gen <i>lpsA1</i>	60
4.1.1.1.2 Ostatní geny.....	62
4.1.1.2 Příprava DNA pro transformaci <i>S. cerevisiae</i>	64
4.1.2 Příprava DNA pro tvorbu konstruktů pro delecii vybraných genů <i>C. purpurea</i>	65
4.1.3 Transformace <i>S. cerevisiae</i> a <i>E. coli</i>	66
4.2 Transformace <i>C. purpurea</i>	69
4.3 Diagnostická PCR	69
4.4 Monosporická izolace.....	71
4.5 Funkční ověření konstruktů.....	72
4.7 Epifluorescenční mikroskopie	74
4.8 Očkování žita.....	77
5 DISKUZE	78
6 ZÁVĚR	82
7 LITERATURA	83
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	91

CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše na téma molekulární biologie *C. purpurea* se zaměřením na využití metody kvasinkového rekombinačního klonování v souvislosti s přípravou konstruktů k transformaci, nové techniky genetické manipulace využitelné pro editaci genomu vláknitých hub
- Optimalizace a použití metody kvasinkového rekombinačního klonování pro přípravu konstruktů k transformaci *C. purpurea*
- Transformace dvou kmenů *C. purpurea* vybranými konstrukty
- Ověření integrace plasmidů v homokaryotních transformantech
- Funkční ověření konstruktů a lokalizace GFP-fúzního proteinu
- Infekce žita získanými transformanty a odpovídajícími WT kontrolami

1 ÚVOD

Claviceps purpurea je biotrofní parazit napadající řadu obilovin a trav. V napadených klasech se místo obilek vytváří modrošedá až černá sklerocia (tzv. námel), útvary typické produkcí námelových alkaloidů. Vliv těchto sloučenin na centrální nervovou soustavu spočívá v jejich strukturní podobnosti s neurotransmitéry noradrenalinem, adrenalinem a serotoninem. Ačkoliv tyto alkaloidy mohou při požití vyvolat otravu známou jako ergotismus či oheň svatého Antonína, je řada z nich využívána ve farmaceutickém průmyslu k výrobě léčiv. Jedná se například o ergotamin, alkaloid odvozený od kyseliny lysergové, který je v posledním kroku syntetizován neribosomální lysergylpeptidovou syntetasou LPS1. Funkce tohoto trimodulárního enzymu byla potvrzena delecí odpovídajícího genu *lpsA1* v *C. purpurea* P1. Přestože byl tento enzym v minulosti purifikován a dále charakterizován, nebyli do dnešní doby připraveni transformanti nadprodukcující LPS1. Nadprodukce tohoto proteinu v *C. purpurea* by mohla vést k vyššímu zastoupení ergotaminu ve sklerociu, zároveň by tento poznatek mohl pomoci lepšímu pochopení vlastní biosyntézy alkaloidů, která není dosud plně objasněna.

Konstrukty pro transformaci *C. purpurea* jsou nejčastěji připravovány kvasinkovým rekombinačním klonováním. Pro funkční analýzu genů mohou být protoplasty této houby transformovány delečním konstruktem obsahujícím 3' a 5' okrajové sekvence cílového genu a selekční marker nebo konstruktem obsahujícím cílový gen pod kontrolou konstitutivního případně nativního promotoru. Pokud je navíc zájmový protein fúzován s fluorescenční značkou může být konstrukt využit k lokalizaci proteinu nebo studiu proteinových interakcí. Možnost přípravy těchto konstruktů a jejich následné využití k transformaci *C. purpurea* představuje velmi účinný nástroj molekulární biologie, kterého může být využito například ke studiu biosyntézy námelových alkaloidů a její regulace či porozumění interakce houby s hostitelem.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Claviceps purpurea*

2.1.1 Charakteristika

Claviceps purpurea je vřeckovýtrusná houba z rodu *Claviceps*, jehož zástupci napadají více než 600 jednoděložných rostlin, nejčastěji žito, ječmen a pšenici (Bové, 1970). Ačkoliv tato houba patří mezi biotrofní parazity může být *C. purpurea* kultivována v axenické kultuře, což společně s faktem, že v roce 2013 byl sekvenován celý genom *C. purpurea* 20.1 výrazně usnadňuje experimentální přístup (Mantle a Nisbet, 1976, Schardl *et al.*, 2013).

Pro *C. purpurea* je typická produkce námelových alkaloidů, které se vyskytují v námelu, což je označení pro sklerocium této houby (Obr. 1). Produkce námelových alkaloidů však není typická jen pro zástupce rodu *Claviceps*, byla také pozorována i u jiných hub např. *Ascomycetes*, *Phycomycetes*, *Basidiomycetes* či *Fungi imperfecti* (Abe *et al.*, 1967). S námelem se můžeme setkat ve formě modrošedých až černých růžkovitých útvarů, které vyrůstají z napadeného klasu (Tudzynski a Scheffer, 2004).

Námel je jedovatý a při požití může u člověka a hospodářských zvířat vyvolat otravu zvanou ergotismus či způsobit ztráty v produkci zemědělských plodin (Woods *et al.*, 1966; Schneider *et al.*, 1996). I přes tyto nežádoucí účinky, našly námelové alkaloidy velké uplatnění ve farmaceutickém průmyslu při výrobě léčiv (Graham a Wolff, 1938; Thorner *et al.*, 1974; Thobois, 2006).



Obr. 1 Sklerocium *C. purpurea* (námel) vyrůstající z napadeného klasu žita.

2.1.2 Molekulární biologie *C. purpurea*

2.1.2.1 Mutageneze

Z počátku byli mutanti *C. purpurea* získáváni UV mutagenezí (Strnadová, 1964), ozářením rentgenovými nebo gamma paprsky (He *et al.*, 1995) či chemickou mutagenezí pomocí ethyl-methansulfonátu (EMS), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu (NTG) (Brauer a Robbers, 1987) nebo pomocí kyseliny dusité (Strnadová, 1976). Získaní mutanti pak byli selektováni na základě rozdílné morfologie (Strnadová a Kybal, 1976), auxotrofie (Strnadová, 1967), pozměněné produkce námelových alkaloidů (Kobel a Sanglier, 1973) či na základě rezistence vůči fungicidům - benomylu, bavistinu či cercobinu (Tudzynki *et al.*, 1982). Metoda mutageneze našla velké uplatnění při přípravě kmenů *C. purpurea* s pozměněnou produkcí námelových alkaloidů, které mohly být dále využity v průmyslu (Didek-Brumec *et al.*, 1987). Jedná se například o průmyslový kmen Gal404 (Valík *et al.*, 2000), který byl mimo jiné použit v experimentální části této práce a který byl získán z kmene CCM 8177. Sklerocium tohoto kmene bylo nejdříve převedeno do axenické kultury, která byla následně vystavena gamma paprskům. Získané izoláty byly očkovány na žito. Sklerocium obsahující nejvyšší obsah námelových alkaloidů bylo opět převedeno do saprofytické kultury a celý proces byl zopakován. Nakonec byl získán kmen *C. purpurea*, u kterého došlo k nárůstu obsahu ergotaminu (o 1,5 % na celkových 93,5 %), poklesu ergostinu a ergometrinu. Široce využívaným kmenem *C. purpurea* získaným mutagenezí je také kmen P1 odvozený od kmene 1029, který je charakteristický produkcí námelových alkaloidů v axenické kultuře, převážně pak ergotaminu (Keller, 1983).

Standardní metoda transformace *C. purpurea* využívající polyethylenglykol byla poprvé aplikována v roce 1989, kdy byl připraven konstrukt obsahující gen rezistence na phleomycin s *trpC* promotorem *Aspergillus nidulans* (van Engelenburg *et al.*, 1989). Phleomycinový rezistenční gen *Sh ble* ze *Streptoalloteichus hindustanus* kóduje protein, který se váže na phleomycin, čímž inhibuje jeho DNA štěpící aktivitu (Dumas *et al.*, 1994). Kromě konstruktů obsahujících gen rezistence na phleomycin byl na transformaci protoplastů *C. purpurea* použit také konstrukt obsahující gen rezistence na hygromycin s *gpdA* promotorem *A. nidulans* (Comino *et al.*, 1989). Hygromycinový rezistenční gen *Hph* z bakterie *Escherichia coli* kóduje hygromycin B fosfotranferasu,

kteřá fosforylací inaktivuje aminoglykosidové antibiotikum hygromycin B (Blochlinger a Diggelmann, 1984). Vzhledem k tomu, že oba vyvinuté systémy využívající heterologní promotory s genem rezistence vůči antibiotiku vykazovaly nízkou frekvenci transformace a konstrukty byly navíc integrovány do genomu *C. purpurea* ve více kopiích a na více místech, použili Smit a Tudzynski v roce 1992 homologní transformační systém založený na komplementaci OMPD (orotidin-5'-monofosfát dekarboxylasa) deficientních mutantů *pyr* genem *C. purpurea*. Později byl u *C. purpurea* použit další homologní systém, který byl založen na fúzi genu rezistence na phleomycin s promotorem *gpd* genu kódujícím glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu *C. purpurea* (Jungehülsing *et al.*, 1994). Kromě genu rezistence na phleomycin či hygromycin se na transformaci protoplastů *C. purpurea* používají též konstrukty, jejichž součástí je gen rezistence na fosfinitricin (Mey *et al.*, 2002a; Mey *et al.*, 2002b). Tento *bar* rezistenční gen ze *Streptomyces* kóduje fosfinitricinacetyltransferasu, která acylací zabraňuje odštěpení alaninových zbytků z protoxinu bialaphos a tím jeho aktivaci ve formě L-fosfinitricinu, který inhibuje glutaminsynthetasu (Thompson *et al.*, 1987).

Protoplasty používané na transformaci *C. purpurea* mohou být získány z konidií (asexuální spóry) nebo z mladých mycelií (Mey *et al.*, 2002a). Mezi nejčastěji používané enzymy pro přípravu protoplastů *C. purpurea* patří Lyzační enzym z *Trichoderma harzianum*, Driselasa či β -glukuronidasa (Keller *et al.*, 1980; Oeser *et al.*, 2002).

U *C. purpurea* byla také podobně jako u mnoha jiných vláknitých hub provedena úspěšná transformace pomocí gramnegativní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (de Groot *et al.*, 1998; Rho *et al.*, 2001), přičemž bylo zjištěno, že T-DNA je integrována do genomu *C. purpurea* převážně v jedné kopii a to zcela náhodně (Tudzynski a Scheffer, 2004).

V současné době našla metoda genetické transformace *C. purpurea* uplatnění například při studiu biosyntetických drah, kdy je narušen čtecí rámec zájmového genu, který se tak stává nefunkčním. Na základě odlišných fenotypových a biochemických vlastností získaného mutantu oproti WT, lze následně usoudit na roli deletovaného genu v příslušné biosyntetické dráze (Haarmann *et al.*, 2008; Hinsch *et al.*, 2015).

2.1.2.2 Integrace DNA do genomu *C. purpurea*

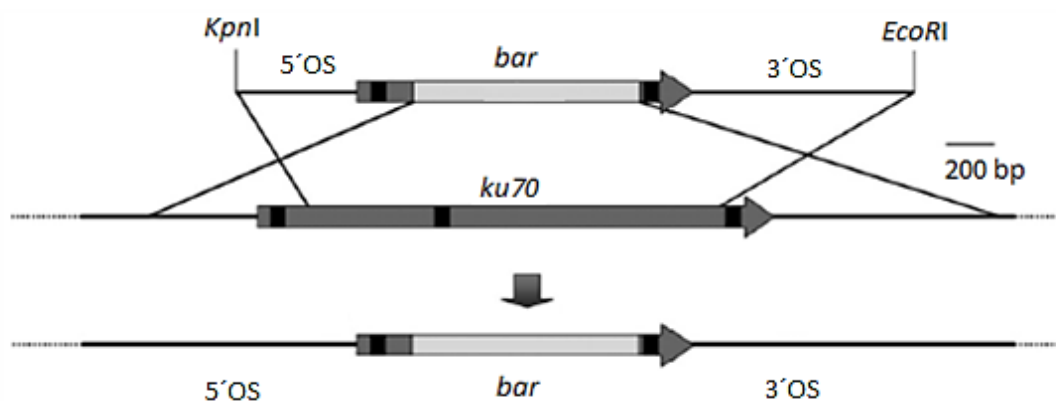
Do dnešní doby byly popsány dva mechanismy sloužící k opravě DNA - nehomologní spojení konců (NHEJ - non-homologous end joining) a homologní rekombinace (HR - homologous recombination). Integrace exogenní DNA do genomu *C. purpurea* je založena právě na těchto dvou mechanismech. V případě NHEJ dochází k vložení exogenní DNA náhodně do genomu, dochází k ektopické inzerci konstruktů. V přítomnosti homologní DNA je poškozená DNA opravena pomocí HR, přičemž dochází k inzerci exogenní DNA do homologní oblasti (Holliday, 1964).

Pravděpodobnost integrace homologní DNA pomocí HR se u jednotlivých hub liší, u *C. purpurea* je pravděpodobnost pouhých 1-2 % (Oeser *et al.*, 2002), zatímco u fytopatogenních hub *Ustilago maydis* a *Botrytis cinerea* je tato pravděpodobnost vyšší než 50 % (Levis *et al.*, 1997; Banuett, 2002).

2.1.2.2.1 Delece genů založená na HR

Na principu HR je založena metoda delece genů *C. purpurea*. Protoplasty této houby jsou transformovány lineárním konstruktem obsahujícím 5' okrajovou sekvenci (5' OS) a 3' okrajovou sekvenci (3' OS) cílového genu, mezi kterými je gen rezistence na antibiotikum sloužící jako selekční marker. Gen rezistence je transkribován v opačném směru než cílový gen (Giesbert *et al.*, 1998; Scheffer *et al.*, 2005a).

Ke zvýšení pravděpodobnosti rekombinace delečního konstruktů byl připraven mutant $\Delta ku70$ (Haarmann *et al.*, 2008). Ku70 je jednou ze tří podjednotek hlavního systému NHEJ, přičemž tato podjednotka vytváří společně s Ku80 heterodimer, který navádí DNA-PK (DNA-dependentní protein kinasa) na konce poškozené DNA, čímž stabilizuje její následné spojení (Spagnolo *et al.*, 2006). Gen *ku70* (Obr. 2) byl deletován v *C. purpurea* 20.1 i v *C. purpurea* P1. Zatímco *C. purpurea* 20.1 je patogenní a produkuje námelové alkaloidy pouze během interakce s hostitelem, *C. purpurea* P1 produkuje alkaloidy v axenické kultuře. Získaní transformanti $\Delta ku70$ nevykazovali odlišné fenotypové ani biochemické vlastnosti oproti WT. Za účelem posouzení změny frekvence rekombinace delečního konstruktů byl mutant $\Delta ku70$ *C. purpurea* P1 transformován lineárním konstruktem pro deleci genu *lpsA1* (Haarmann *et al.*, 2008).



Obr. 2 Strategie delece genu *ku70* v *C. purpurea*. Černě jsou znázorněny introny, odstíny šedé představují exony (Haarmann *et al.*, 2008, upraveno).

Gen *lpsA1* kóduje neribosomální lysergylpeptidovou synthetasu 1 (LPS1) o velikosti 394 kDa, která je společně s dalšími třemi geny pro neribosomální peptidové synthetasy (NRPS) *lpsA2* (kódující LPS4), *lpsB* (kódující LPS2) a *lpsC* (kódující LPS3) součástí genového klastru pro biosyntézu námelových alkaloidů u *C. purpurea*, přičemž LPS1 společně s LPS2 katalyzují syntézu ergotaminu z kyseliny D-lysergové (Haarmann *et al.*, 2005). Genem *lpsA1* a jeho nadexpresí se také mimo jiné zabývá tato diplomová práce.

Vzhledem k tomu, že u sedmi z jedenácti získaných transformantů došlo k integraci delečního konstruktů v homologní cílové oblasti, došlo po delecí *ku70* v *C. purpurea* k výraznému zvýšení frekvence rekombinace delečního konstruktů ve srovnání s WT (50-60 %). Výsledný mutant $\Delta lpsA1$ *C. purpurea* P1 nebyl schopen vytvářen ergotamin.

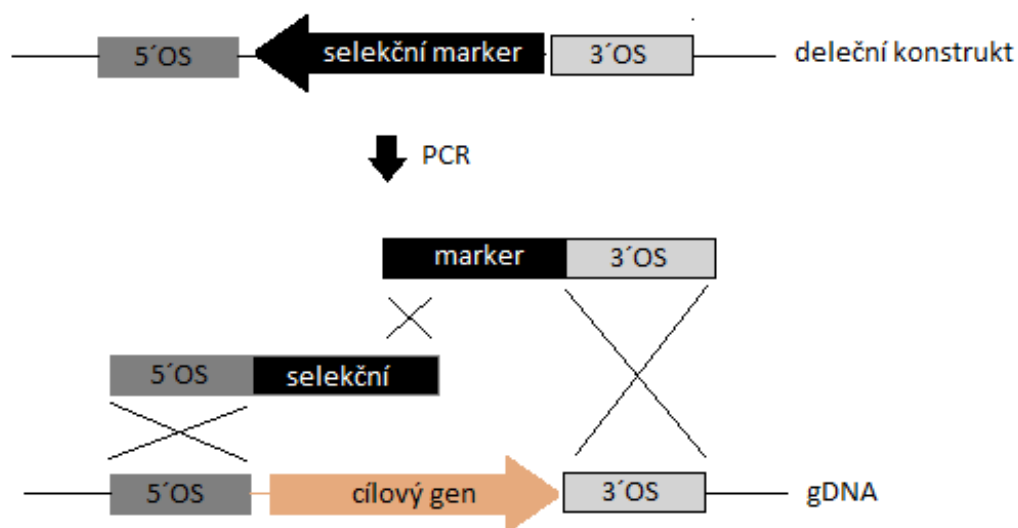
Na základě těchto výsledků se zdálo, že kmeny $\Delta ku70$ *C. purpurea* 20.1a $\Delta ku70$ *C. purpurea* P1 by mohly být použitelné pro následné delece vybraných genů. Nicméně, po delší době se ukázalo, že získaní transformanti vykazují redukovaný růst a ztrácí schopnost napadnout žito (Haarmann *et al.*, 2008).

I přes nemožnost dalšího využití připravených kmenů $\Delta ku70$ *C. purpurea*, bylo do dnešní doby připraveno přes 20 různých delečních mutantů *C. purpurea* (Hinsch a Tudzynski, 2015).

V posledních letech je pro transformace hub na základě HR hojně využívána tzv. metoda Split markeru (Obr. 3), která odstraňuje falešně pozitivní výsledky, tedy transformanty s ektopickou inzercí (Goswami, 2012; Gravelat *et al.*, 2012). Tato technika, která byla poprvé aplikována u kvasinek (Fairhead *et al.*, 1996), spočívá v přípravě dvou PCR fragmentů amplifikovaných z připraveného delečního konstruktů,

přičemž každý PCR fragment obsahuje dvě třetiny selekčního markeru a 5' OS nebo 3' OS cílového genu (Colot *et al.*, 2006; You *et al.*, 2009). Pomocí této metody lze tedy dosáhnout toho, že na selečním médiu rostou pouze transformanti nesoucí funkční marker. Tento přístup je aplikován i u *C. purpurea* a prvotní výsledky napovídají, že metoda Split markeru funguje pouze pro konstrukty nesoucí rezistenci na hygromycin (Tudzynski P., osobní komunikace).

Jiným přístupem pro snížení počtu transformantů s ektopickou inzercí je použití tzv. negativního selekčního markeru fúzaného s delečním konstruktem obsahujícím 5' OS, selekční marker a 3' OS cílového genu. Jako negativní selekční marker se používá gen kódující thymidin kinasu herpes simplex viru (*HSVtk*), přičemž produkt tohoto genu přeměňuje 5-fluoro-2'-deoxyuridin přítomný v médiu na sloučeninu, která je pro houby toxická. V případě, že dojde k integraci cílového vektoru pomocí HR do homologní oblasti, negativní selekční marker se nezačlení do genomu a získaní transformanti jsou schopni růst na médiu s 5-fluoro-2'-deoxyuridem. Pokud dojde k integraci cílového vektoru náhodně do genomu, negativní selekční marker zůstává přítomen, tito transformanti nejsou schopni růst na médiu s 5-fluoro-2'-deoxyuridem (Gardiner a Howlett, 2004). Tento přístup transformace u *C. purpurea* do dnešní doby použit nebyl, nicméně u fytopatogenních hub *Magnaporthe grisea* a *Fusarium oxysporum* byl již úspěšně aplikován (Khang *et al.*, 2005).



Obr. 3 Metoda Split markeru. Na transformaci se používají dva PCR fragmenty, z nichž každý obsahuje dvě třetiny selekčního markeru a 5' OS nebo 3' OS cílového genu (Choquer *et al.*, 2008, upraveno).

2.1.2.2 Konstitutivní exprese genů založená na NHEJ

Na principu NHEJ je založena metoda transformace protoplastů *C. purpurea* vektorem obsahujícím cílový gen pod nativním nebo konstitutivním promotorem a seleční marker (gen rezistence). Tyto konstrukty mohou být využity např. pro komplementaci delečních mutantů nebo pomocí fúze zájmového proteinu s fluorescenční značkou pro studium subcelulární lokalizace proteinů či pro sledování průběhu infekce v infikovaném pletivu (Leroch *et al.*, 2011; Schumacher, 2012).

Reportérové geny mohou být také využity pro bimolekulární fluorescenční komplementaci (BiFC), metodu používanou pro studium proteinových interakcí. Tato metoda je založena tom, že každý, ze dvou sledovaných proteinů je označen fragmentem fluorescenčního proteinu, který sám o sobě nemá schopnost fluorescence. K vytvoření fluorescenčního signálu dochází pouze v případě vzájemné interakce sledovaných proteinů (Weinthal a Tzfira, 2009). Herrmann *et al.* (2014) pomocí této metody prokázali, že protein CpBem1 zapojený do regulace NADPH signalizační dráhy a kinasa CpCla4 vzájemně interagují ve špičce hyf *C. purpurea*.

2.1.2.3 Ověření transformace *C. purpurea*

Analýza primárních, většinou heterokaryotních transformantů *C. purpurea* se provádí pomocí diagnostické PCR. Homokaryotní transformanti, kteří nemusí být dále kultivováni pod selekčním tlakem antibiotika, jsou získáni monosporickou izolací (Tudzynski a Scheffer, 2004).

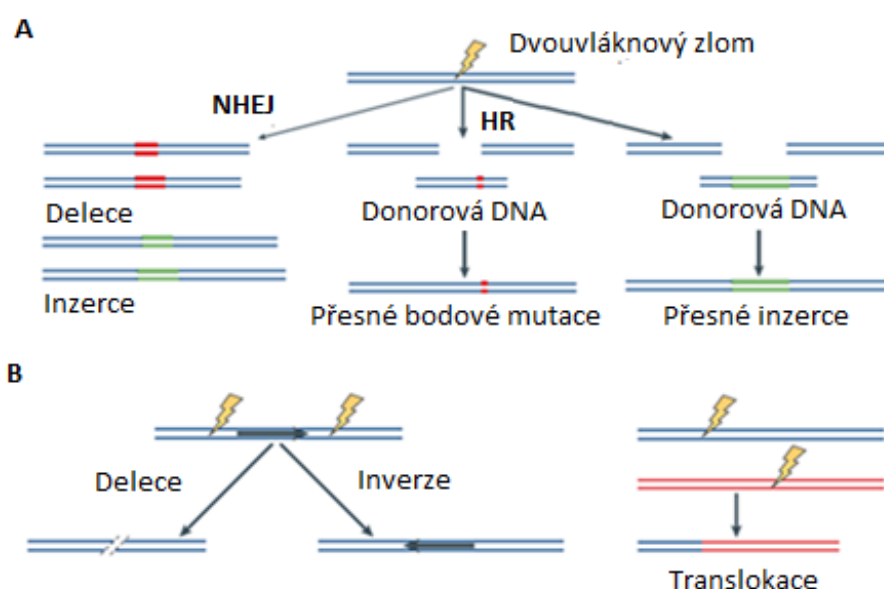
Integrace delečního konstruktů v homologní oblasti DNA je potvrzena diagnostickou PCR a pomocí Southern blotu, který zároveň slouží k ověření počtu inzercí do genomu. Pro jednoznačné stanovení fenotypu delečních mutantů nesmí být v genomu více inzercí. U transformantů s konstruktem pro konstitutivní expresi dochází většinou k vícečetné integraci, proto musí být fenotyp ověřen na více nezávislých mutantech. K potvrzení exprese je používán Northern blot (případně RT-qPCR). Využití Western blotu není u *C. purpurea* časté, studium na proteinové úrovni je zaměřeno spíše na mikroskopické techniky (Nathues *et al.*, 2004; Neubauer *et al.*, 2016).

2.2 Nové metody editace genomu pomocí programovatelných nukleas

V posledních letech našly při editaci genomu hub velké uplatnění tzv. programovatelné nukleasy, které vytváří dvouvláknový zlom na cílové DNA. Jedná se o TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) a CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR Associated System)(Joung a Sander, 2013; Doudna a Charpentier, 2014).

Vytvoření dvouvláknového zlomu vede k aktivaci opravných mechanismů DNA (Obr. 4). Výsledkem opravy DNA pomocí NHEJ mohou být různě dlouhé inserce nebo delece (indely), které vedou k posunu čtecího rámce, dochází k delecí mutovaného genu. Výsledkem opravy DNA pomocí HR mohou být přesné bodové mutace nebo inserce (Szostak *et al.*, 1983; Hefferin a Tomkinson, 2005). Pomocí programovatelných nukleas lze také vytvořit dva dvouvláknové zlomy v *cis* pozici na stejném chromozomu, což vede k delecí nebo inverzi ohraničeného úseku DNA, vytvoření dvou zlomů na různých chromozomech vede k translokaci (Gupta *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013).

Bylo zjištěno, že použití programovatelných nukleas k vytvoření zlomu na cílové DNA zvyšuje účinnost metod, které jsou založeny na homologní rekombinaci (Arazoe *et al.*, 2015a; Arazoe *et al.*, 2015b). Další výhodou těchto programovatelných nukleas je možnost odstranění selekčního markeru (Feng *et al.*, 2014; Gao a Zhao, 2014a).



Obr. 4 Editace genomu pomocí programovatelných nukleas. A - Vytvoření jednoho dvouvláknového zlomu na cílové DNA, oprava poškozené DNA pomocí NHEJ nebo HR. B - Vytvoření dvou dvouvláknových zlomů na stejném chromozomu a na různých chromozomech (Joung a Sander, 2013, upraveno).

2.2.1 TALEN

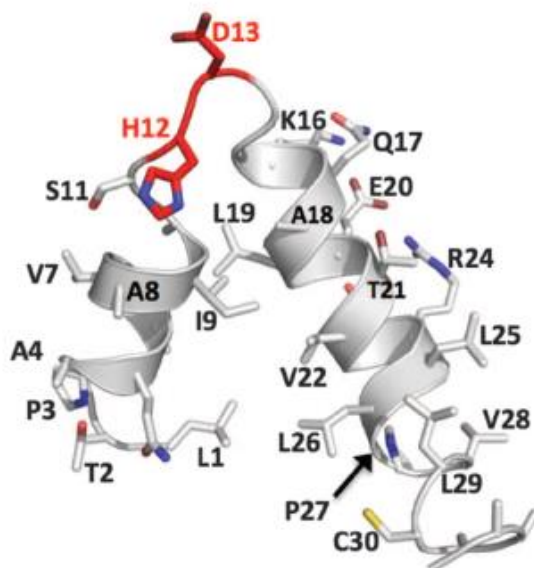
2.2.1.1 Mechanismus TALEN

TALEN (Transcription Activator-like Effector Nucleases) byly vytvořeny fúzí TAL efektorů s *FokI* katalytickou doménou endonukleasy typu II *Flavobacterium okeanoikoites* (Christian *et al.*, 2010).

TAL efekторы jsou sekretovány gramnegativními bakteriemi rodu *Xanthomonas* při napadení hostitelské rostliny. Jakmile se TAL efekторы dostanou do jádra rostlinné buňky a naváží se na specifické promotorové sekvence DNA, dojde k aktivaci exprese genů, které usnadňují průběh bakteriální infekce (Boch a Bonas, 2010). TAL efekторы byly objeveny také u patogenních bakterií *Ralstonia solanacearum* či *Burkholderia rhizoxinica* (de Lange *et al.*, 2013; de Lange *et al.*, 2014).

Společným rysem přirozeně se vyskytujících TAL efektorů je přítomnost DNA vazebné domény v centrální části proteinu, která je složena ze 7-34 vysoce homologních přímých repetic, přičemž každá repetice je složena ze 33-34 aminokyselin. Kromě DNA vazebné domény TAL efekторы obsahují na C-konci proteinu jaderný lokalizační signál a aktivační doménu. Krystalová struktura TALE DNA vazebné domény ukázala, že jednotlivé aminokyseliny každé repetice vytváří strukturu dvou α -helixů spojených aminokyselinami v pozicích 12 a 13, které vytváří tzv. RDV (repeatvariable diresidues) smyčku (Obr. 5). Prostřednictvím RDV, tedy dvou hypervariabilních zbytků, rozeznávají jednotlivé moduly TAL efektorů příslušné báze. Aminokyselina v pozici 12 přispívá ke stabilizaci této smyčky tvorbou vodíkové vazby s aminokyselinou v pozici 8, aminokyselina v pozici 13 se pak specificky váže prostřednictvím vodíkové vazby a/nebo van der Waalsových sil k bázi ve velkém žlábků na cílové DNA (Boch a Bonas, 2010; Bochtler, 2012; Mak *et al.*, 2012).

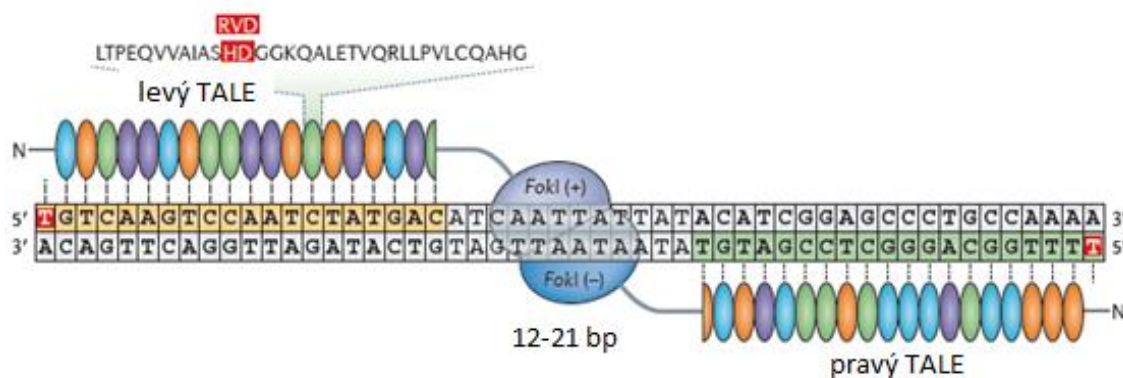
Na základě poznatku z roku 2009, kdy dva vědecké týmy nezávisle na sobě rozluštily 'TALE kód', tedy vztah mezi RDV a nukleotidem, na který se modul váže, mohou být konstruovány umělé TAL efekторы s požadovanou DNA vazebnou specifitou (Bogdanove a Voytas, 2011). Bylo zjištěno, že RDV HD (Histidin, kyselina Asparagová), NI (Asparagin, Isoleucin), NN (Asparagin, Asparagin) a NG (Asparagin, Glycin) rozpoznávají téměř výhradně cytosin, adenin, guanin/adenin, thymin, v uvedeném pořadí (Boch *et al.*, 2009; Moscou a Bogdanove, 2009).



Obr. 5 Struktura repetice TAL efektoru PthXoI. Červeně jsou vyznačena RDV rezidua rozpoznávající cytosin (Mak *et al.*, 2012).

Druhou částí TALE nukleas používaných pro editaci genomu je *FokI* katalytická doména endonukleasy typu II, která ve formě dimeru štěpí cílovou DNA, přičemž vzdálenost mezi levým a pravým TAL efektem je 12-21 nukleotidů (Obr. 6). Dvouvláknový zlom vytvořený TALEN je poté zpracován mechanismem NHEJ nebo HR (Bitinaite *et al.*, 1998; Wah *et al.*, 1998).

Za účelem modifikace genomu byly TAL efekty fúzovány nejen s nukleasami, ale například i s transkripčními aktivátory (Miller *et al.*, 2011), represory (Mahfouz *et al.*, 2012) či místně specifickými rekombinasami (Mercer *et al.*, 2012).



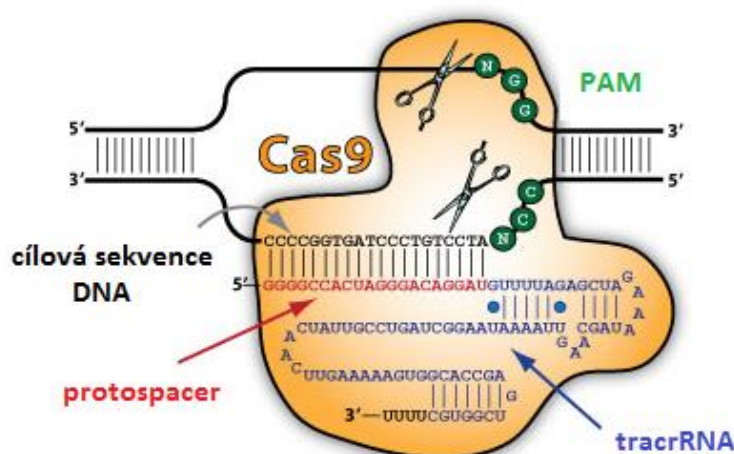
Obr. 6 Schématické znázornění TALEN (Kim a Kim, 2014).

DNA, virální i plasmidové. Tato funkce byla potvrzena v roce 2007, kdy byla část fágového genomu začleněna do genomu buněk *Streptococcus thermophilus*, čímž tyto buňky získaly rezistenci vůči bakteriofágu (Barrangou *et al.*, 2007).

Bylo prokázáno, že sekvence cizorodé DNA si bakterie vkládají do tzv. CRISPR oblastí ve svém genomu (Brouns *et al.*, 2008), kde jsou následně tyto oblasti transkribovány jako crRNA (CRISPR RNA) a společně s tracrRNA (transactivating crRNA) vytváří strukturu gRNA (guide RNA), která navádí CRISPR asociovaný protein Cas9 na místo štěpení cizorodé DNA (Obr. 8). Za účelem editace genomu byla vytvořena tzv. sgRNA (single guide RNA), která je kombinací crRNA a tracrRNA (Jinek *et al.*, 2012).

Cas9 je multifunkční protein tvořený dvěma endonukleasovými doménami, HNH a RuvC (Nishimasu *et al.*, 2014). Přesného zacílení RNA naváděné Cas9 nukleasy na specifickou sekvensi DNA je dosaženo díky 20 bp sekvenci crRNA (tzv. protospacer), která se na základě komplementarity bazí páruje s cílovou DNA, přičemž doména HNH Cas9 vnáší zlom do části DNA komplementární k crRNA a RuvC doména vnáší zlom na komplementární vlákno DNA (Gasiunas *et al.*, 2012).

Účinnost štěpení, tedy tvorby dvouvláknového zlomu na cílové DNA, závisí na přítomnosti PAM (Protospacer Adjacent Motifs) o délce 3 bp, která se nachází za protospacerem (Mojica *et al.*, 2009). Tato sekvence se u jednotlivých Cas9 proteinů liší, v případě Cas9 *Streptococcus pyogenes* je za PAM považována sekvence NGG, se sníženou účinností též NAG (Hsu *et al.*, 2013).



Obr. 8 CRISPR/Cas9 (<https://www.systembio.com/crispr-cas9-plasmids>, staženo 27. 3. 2016).

Výše popsaná Cas9 nukleasa vytváří na cílové DNA dvouvláknový zlom, což následně vede k aktivaci opravných mechanismů DNA, přičemž poškozená DNA je pak zpracována mechanismem HR nebo NHEJ (Chen *et al.*, 2013a; Nodvig *et al.*, 2015).

Jinou formou Cas9 je Cas9 D10A vykazující pouze štěpící aktivitu. Pokud tedy dojde ke vzniku jednovláknového zlomu na cílové DNA, nedochází k aktivaci NHEJ a v přítomnosti homologního templátu dochází ke zpracování poškozené DNA pouze pomocí HR (Cong *et al.*, 2013).

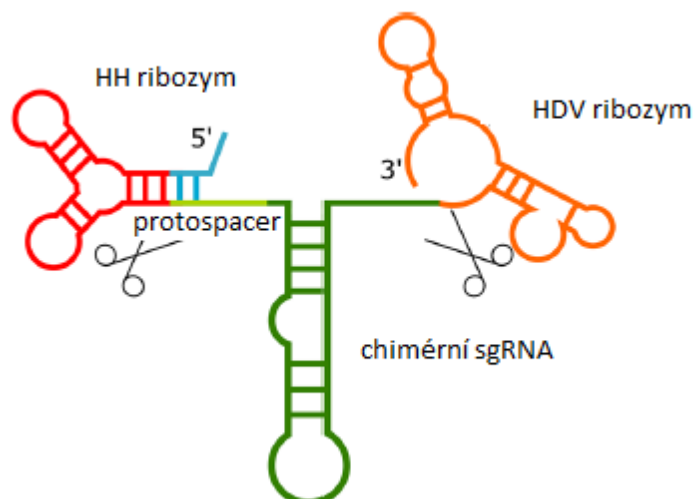
Jinou verzí Cas9 je dCas9 obsahující mutace H840A v HNH doméně a D10A v RuvC doméně. Tyto mutace způsobující, že dCas9 nemá nukleasovou aktivitu, avšak má zachovanou schopnost vázat se na cílovou DNA, čehož může být využito například při kontrole genové exprese (Qi *et al.*, 2013) či u lokalizace proteinů, kdy může být dCas9 fúzován s GFP (Chen *et al.*, 2013b).

Do dnešní doby byly objeveny tři typy CRISPR/Cas systémů (I, II a III), přičemž základem CRISPR technologie používané pro editaci genomu se stal systém II (Makarova *et al.*, 2011).

2.2.2.3 Využití CRISPR/Cas9 u hub

V nedávné době byl CRISPR/Cas systém aplikován i u celé řady hub, například u zástupců rodu *Aspergillus* (Fuller *et al.*, 2015; Katayama *et al.*, 2015; Novig *et al.*, 2015), u fytopatogenní houby *Magnaporthe oryzae* (Arazoe *et al.*, 2015b) či u hub *Ustilago maydis* a *Trichoderma reesei* (Liu *et al.*, 2015; Schuster *et al.*, 2015).

Nodvig *et al.* (2015) vyvinuli systém založený na CRISPR/Cas9 pro editaci genomu vláknitých hub. Vzhledem k tomu, že v genomu *Aspergillus nidulans* nebyl dosud identifikován RNAP III promotor (promotor, který je přepisován RNA polymerasou III) a sgRNA je obvykle transkribována pod kontrolou tohoto promotoru (Ma *et al.*, 2014), byla v průběhu tohoto experimentu použita chimérická sgRNA exprimovaná pod RNAP II promotorem (promotor, který je přepisován RNA polymerasou II). Tento přístup, který byl již dříve aplikován u kvasinek či savčích buněk (Gao a Zhao, 2014b; Jacobs *et al.*, 2014; Nissim *et al.*, 2014) spočívá v tom, že chimérická sgRNA je součástí většího transkriptu syntetizovaného RNA polymerasou II. Aktivací dvou ribozymů HH (hammerhead) a HDV (hepatitis delta virus), mezi které byla sgRNA vložena, pak dochází v jádře k vyštěpení sgRNA z tohoto transkriptu (Obr. 9).

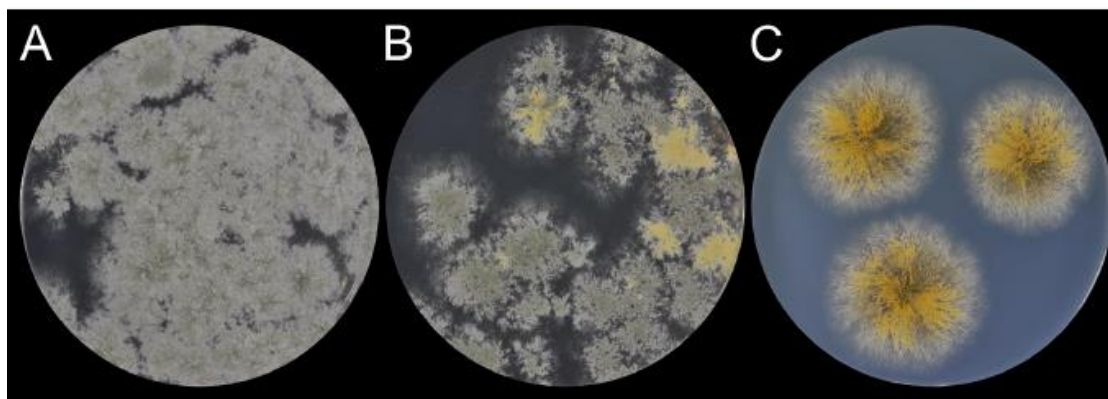


Obr. 9 Chiménní sgRNA (Nodvig *et al.*, 2015, upraveno).

Hlavním důvodem použití ribozymů při získání sgRNA pod kontrolou RNAP II promotoru je fakt, že RNA polymerasa II vytváří RNA, která je dále procesována. Na rozdíl od RNA, jež je pod kontrolou RNAP III je tedy doba, po kterou je tato RNA přítomna v jádře velmi krátká (Hahn, 2004; White, 2011).

Ačkoliv byly pro expresi sgRNA popsány i metody využívající RNAP II promotor (Upadhyay *et al.*, 2013; Jia a Wang, 2014) vedlo použití tohoto promotoru u vláknitých hub k nižší účinnosti mutagenese než v případě použití RNAP III promotoru. Nižší účinnost mohla být způsobena právě tím, že sgRNA, která byla exprimována pod RNAP II promotorem byla ihned po vytvoření transportována do cytoplazmy, nedošlo tedy k vytvoření hybridní DNA/RNA v místě zlomu (Arazoe *et al.*, 2015b).

Nodvig *et al.* (2015) nejdříve otestovali účinnost připraveného systému u *Aspergillus nidulans*, který byl transformován CRISPR/Cas9 plasmidem obsahujícím sgRNA gen s protospacerem zacilujícím exon 4 genu *yA* chromosomu 1. Pro mutaci byl vybrán *yA* gen kódující p-difenoloxidasu, neboť u tohoto genu je velmi lehké ověřit jeho aktivitu. V případě, že je *yA* inaktivní, dochází ke žlutému zbarvení konidií, zatímco konidie WT jsou zbarveny zeleně. Z výsledků je patrné (Obr. 10), že v případě exprese *Cas9* i sgRNA byly kolonie *A. nidulans* zbarveny žlutě nebo obsahovaly žluté sektory. Pro zajímavost bylo 12 zeleně zbarvených kolonií *A. nidulans* získaných po transformaci inokulováno na nové médium, v případě všech kolonií došlo po čase k vytvoření žlutých sektorů, což naznačuje, že tato RNA řízená mutagenese je závislá na čase (Novig *et al.*, 2015).



Obr. 10 Mutace *yA* genu *A. nidulans* pomocí CRISPR/Cas. A - *A. nidulans* transformovaný plasmidem pFC331 kódujícím Cas9, bez sgRNA, B - *A. nidulans* transformovaný plasmidem pFC334 kódujícím Cas9 a sgRNA zacilující *yA* gen, C - Kultivace zelených kolonií *A. nidulans* na pevném médiu z panelu B (Novig *et al.*, 2015, upraveno).

Liu *et al.* (2015) se se zaměřili na využití CRISPR/Cas systému u modelového organismu *T. reesei*. Vzhledem k tomu, že u *T. reesei* nebyl doposud identifikován RNAP III promotor, připravili Liu *et al.* (2015) mutanta *T. reesei* exprimujícího pouze Cas9. Následně byla připravena kazeta obsahující sgRNA zacilující *lae1* gen kódující předpokládanou methyltransferasu pod T7 promotorem. Kazeta byla ligována do *pMD-18T* plasmidu a použita jako templát pro následnou *in vitro* transkripci. Protoplasty *T. reesei* byly ko-transformovány RNA fragmenty získanými *in vitro* transkripcí a donorovou DNA (deleční konstrukt obsahující 5' OS, selekční marker *ura5* a 3' OS genu *lae1*). Tento gen kóduje orotátfosforibosyltransferasu, která katalyzuje syntézu pyrimidinových ribonukleotidů (Bai *et al.*, 1999). Pomocí PCR byla u všech 14 získaných transformantů potvrzena delece genu *lae1*.

Tito vědci se také zaměřili na frekvenci HR v závislosti na délce 5' OS a 3' OS *lae1*. Z výsledků vyplynulo, že nejvyšší frekvence HR byla při použití oblastí o délce ≥ 600 bp (100 %), nicméně i při použití oblastí o délce pouhých 200 bp, dosahovala úspěšnost transformace 93 %.

Pomocí výše popsaného CRISPR/Cas9 systému se podařilo skupině Liu *et al.* (2015) v *T. reesei* simultánně deletovat 2 geny - *lae1* a *vib1* (kódující předpokládané spojení mezi glukosovou signální dráhou a represí katabolitu uhlíku) (16% úspěšnost) a dokonce i tři geny - *lae1*, *vib1* a *clr2* (transkripční faktor zapojený do regulace exprese celulasového genu) (4,2% úspěšnost).

2.2.3 TALEN versus CRISPR/Cas

I přes to, že oba systémy, TALEN i CRISPR/Cas, vykazují vysokou cílovou specifitu, dochází v případě CRISPR/Cas ke zvýšené přítomnosti tzv. off-target efektů. Tyto efekty jsou způsobeny tím, že se sgRNA váže na DNA s tolerancí až 5 párů bazí, které nejsou komplementární, čímž dochází ke vnesení mutací nejen do cílové DNA, ale napříč celým genomem (Cho *et al.*, 2014). Z analýzy sekvenování genomu dvou transformantů *U. maydis* odhalili Schuster *et al.* (2015) až 4 krát vyšší počet těchto mutací než bylo pozorováno u lidských buněk (Kim *et al.*, 2015). Toto zvýšené množství vnesených mutací však bylo s největší pravděpodobností způsobeno použitím lyzačního enzymu v průběhu transformace, neboť žádná z 84 a 60 nalezených mutací nebyla poblíž PAM sekvence. Tyto efekty mohou být do značné míry eliminovány použitím proteinu Cas9, který vykazuje pouze štěpící aktivitu (Cas9D10A) a dvou sgRNA (Mali *et al.*, 2013) nebo použitím kratší sgRNA o velikosti do 17 bp (Fu *et al.*, 2014). Na rozdíl od CRISPR/Cas se v případě použití TALE nukleas vyskytují tyto efekty poměrně zřídka (Hockemeyer *et al.*, 2011; Guilinger *et al.*, 2014), u iPS buněčné linie (indukované pluripotentní kmenové buňky) dokonce nebyly pozorovány vůbec a to ani v místech homologních s cílovou DNA (Park *et al.*, 2014).

Výhodou TALEN je také možnost zacílení tohoto systému na jakoukoliv oblast DNA, zatímco v případě CRISPR/Cas musí za cílovou sekvencí následovat PAM sekvence. Na druhou stranu musí v případě TALE nukleas dojít k integraci levého i pravého TALEN (Gaj *et al.*, 2013).

Nevýhodou TALE nukleas je citlivost na metylaci cytosinu zejména v místech CpG dinukleotidů (mechanismus využívaný při DNA umlčování). Ačkoliv se tato methylace často vyskytuje v oblasti promotoru, může se také objevit v kódující oblasti DNA, což vede ke snížené aktivitě TALE nukleas (Herman *et al.*, 1994; Valton *et al.*, 2012). Další nespornou výhodou CRISPR/Cas systému je jednoduchost při návrhu a konstrukci, čímž se snižuje finanční náročnost.

Po přihlédnutí ke všem výhodám a nevýhodám je CRISPR/Cas systém zvažován i pro mutagenézi *C. purpurea* (Vrabka J., osobní komunikace).

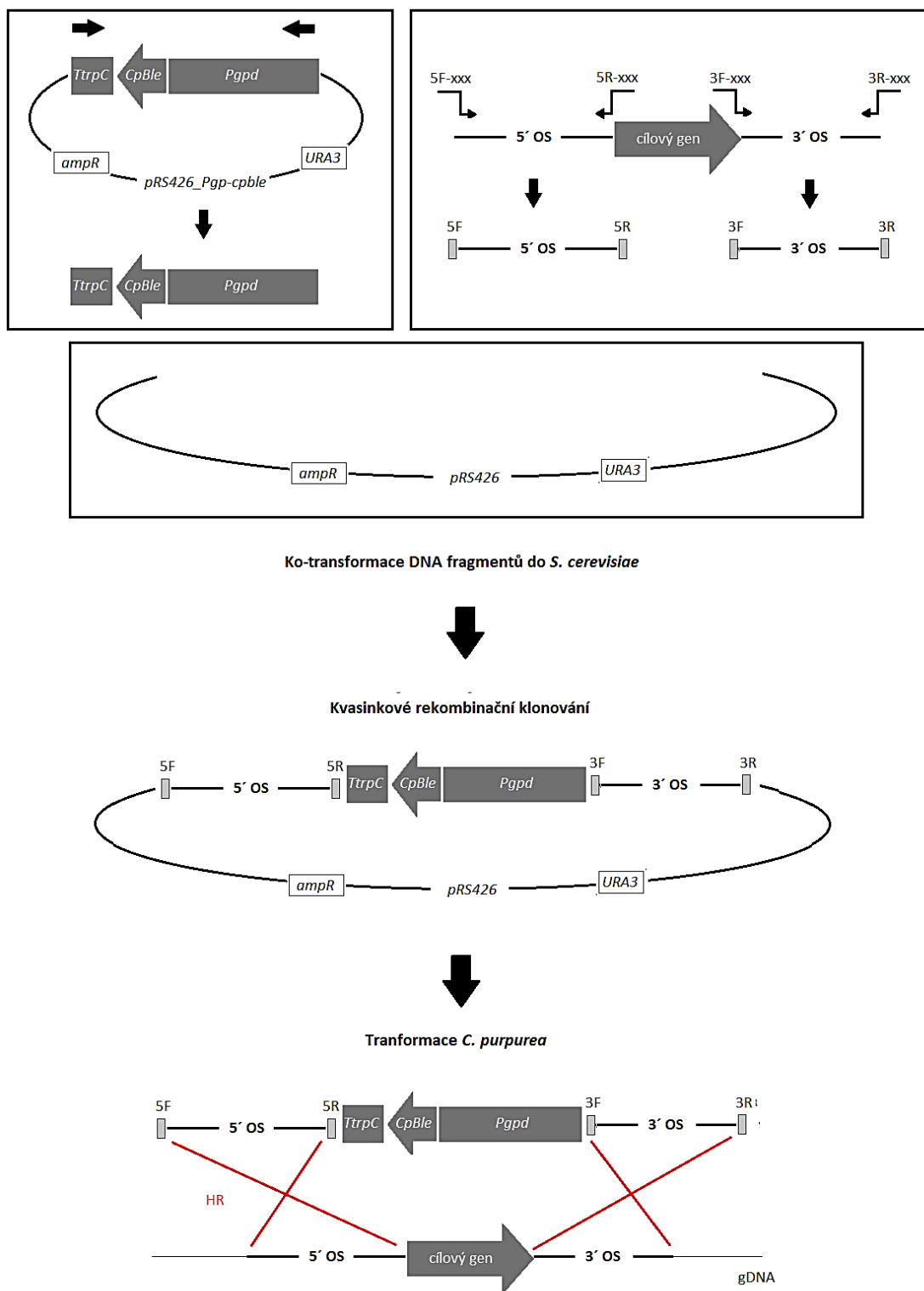
2.3 Příprava konstruktů pomocí kvasinkového rekombinačního klonování

Konstrukty pro delecí a nadexpresi vybraných genů pro transformaci *C. purpurea* jsou nejčastěji připravovány pomocí kvasinkového rekombinačního klonování (Hinsch *et al.*, 2015; Neubauer *et al.*, 2016). Toto klonování, které se liší od klasického klonování, nevyžaduje ligaci DNA, je založeno na homologní rekombinaci v *S. cerevisiae* (Orr-Weaver *et al.*, 1981; Vo *et al.*, 1997).

Tato metoda je snadná, časově nenáročná, cenově dostupná a navíc nabízí možnost klonování více DNA fragmentů do cílového vektoru v jednom kroku (Iizasa a Nagano, 2006; Kuijpers *et al.*, 2013). V případě konstruktů pro delecí genů *C. purpurea* jsou do cílového vektoru klonovány 5' OS, rezistenční kazeta obsahující gen rezistence na phleomycin nebo hygromycin pod konstitutivním promotorem *Gpd* nebo *TrpC*, a 3' OS (Obr. 11). Tyto DNA fragmenty jsou amplifikovány metodou PCR z příslušných DNA templátů či gDNA (Schürmann *et al.*, 2013). Geny rezistence jsou transkribovány v opačném směru než cílový gen (Staben *et al.*, 1989).

DNA amplikony jsou společně s linearizovaným vektorem ko-transformovány do *S. cerevisiae* (Winston *et al.*, 1995). Aby bylo zabráněno recirkularizaci linearizovaného plasmidu, používají se na restrikci vektoru dva rozdílné restrikční enzymy nebo při použití jednoho enzymu je vektor dále ošetřen alkalickou fosfatásou. Tento enzym patřící do skupiny hydrolas odstraňuje fosfátovou skupinu na 5' nebo 3' uhlíku deoxyribosy, což zabraňuje následnému spojení 5' konce jedné molekuly s 3' koncem druhé molekuly (Seeburg *et al.*, 1977; Pereira *et al.*, 1995). Nejspíše díky vysoké schopnosti *S. cerevisiae* opravovat poškozenou DNA včetně odstraněné fosfátové skupiny však tento způsob ošetření linearizovaného vektoru není tak účinný jako v případě *in vitro* ligace. Z tohoto důvodu byla vyvinuta metoda založená na ošetření linearizovaného vektoru dATP a *Taq* DNA polymerasou, která tento nukleotid přidá na 3' konec DNA (Hu, 1993; Bessa *et al.*, 2012).

Limitací tohoto klonování je použití prodloužených primerů obvykle o délce nejméně 50 bp, z toho 20-30 bp musí obsahovat sekvenci homologní na sekvenci DNA, do které je DNA amplikon klonován. Bylo dokázáno, že čím delší je tato homologní sekvence, tím se zvyšuje účinnost transformace *S. cerevisiae*. Při použití sekvence 20 bp byla účinnost transformace do 20%, při použití delší sekvence (80 bp, 250 bp, 500 bp) byla tato účinnost vyšší než 80% (Matsuo *et al.*, 2010).



Obr. 11 Strategie tvorby delečních konstruktů pomocí kvasinkového rekombinačního klonování (Hinsch a Tudzynski, 2015, upraveno).

Dalším omezením této metody je nutnost použití vektoru obsahujícího počátek replikace pro *S. cerevisiae* a selekční marker, například *ura3* (Christianson *et al.*, 1992; Schumacher, 2012). Následná selekce buněk *S. cerevisiae* je poté založena na tom, že použitý uracil-auxotrofní kmen *S. cerevisiae* není schopen syntetizovat uracil, avšak vektor použitý na transformaci obsahuje *ura3* gen kódující orotidin-5-fosfát dekarboxylasu, která katalyzuje syntézu pyrimidinových ribonukleotidů (Sakai *et al.*, 1991).

Přítomnost DNA insertů v plasmidu může být ověřena pomocí metody colony PCR nebo restrikcí plasmidové DNA (Singh a Weijl, 2002). Výsledný konstrukt je pak z plasmidové DNA *S. cerevisiae* amplifikován metodou PCR (Colot *et al.*, 2006).

Jinou možností při transformaci *S. cerevisiae* je použití shuttle vektoru, který kromě počátku replikace pro *S. cerevisiae* obsahuje také počátek replikace pro *E. coli*. Plasmidová DNA izolovaná z *S. cerevisiae* je pak transformována do buněk *E. coli*, ve kterých je plasmid pomnožen (Sikorski a Hieter, 1989).

Výsledný konstrukt je z plasmidové DNA izolované z *E. coli* amplifikován metodou PCR nebo je z plasmidu pomocí restrikčních enzymů vyštěpen. V případě použití restrikčních enzymů jsou v primerech pro amplifikaci 5' OS a 3' OS zanesena unikátní restrikční místa, tak aby pomocí jednoho nebo dvou enzymů došlo k vyštěpení konstruktů obsahujícího 5' OS, rezistenční kazetu a 3' OS (Mey *et al.*, 2002a). Na transformaci *C. purpurea* může být též použita nelinearizovaná či jen linearizovaná plasmidová DNA (Scheffer *et al.*, 2005b; Herrmann *et al.*, 2014).

Z důvodu absence metodiky pro rychlou přípravu konstruktů k transformaci *C. purpurea* byly postupy, optimalizace a výsledky v této diplomové práci využity k zavedení této metodiky na Oddělení Molekulární biologie, CRH.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Claviceps purpurea Gal404 (TEVA Czech Industries, Česká republika)

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

Elektrokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP 10 (NEB, Velká Británie)

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

Žito (*Secale cereale*) kultivar Lo37-PxLo55-N (KWS Lochow GmbH) se samčí sterilitou

3.1.2 Vektory

- *pDRIVE* (Qiagen, Německo)
- *pRS426* (Christianson *et al.* 1992)
- *pNAB-OCT*, *pNDH-OCT*, *pNDB-OGG*, *pNDH-OGG*, *pRS426_Pgpd-cpble* (Schumacher, 2012)
- *pDRIVE::CpTF1*, *pDRIVE::CpTF2* (Biová, 2016)
- *pDRIVE::5' OS lpsA2*, *pDRIVE::3' OS lpsA2*

3.1.3 Chemikálie

Na restrikce byly použity následující restrikční endonukleasy (NEB, Velká Británie):

- *BamHI*-HF - 20 000 U.ml⁻¹
- *EcoRI*-HF - 20 000 U.ml⁻¹
- *EcoRV*-HF - 20 000 U.ml⁻¹
- *HindIII* - 20 000 U.ml⁻¹
- *NheI*-HF - 20 000 U.ml⁻¹
- *NcoI*-HF - 20 000 U.ml⁻¹
- *NotI*-HF - 20 000 U.ml⁻¹
- *PstI* - 20 000 U.ml⁻¹
- *PvuI*-HF - 20 000 U.ml⁻¹
- *SalI*-HF - 10 000 U.ml⁻¹

- *SbfI* - 10 000 U.ml⁻¹
- *SnaBI* - 5 000 U.ml⁻¹
- *SpeI*-HF - 20 000 U.ml⁻¹
- *SphI*-HF - 20 000 U.ml⁻¹
- *XbaI* - 20 000 U.ml⁻¹
- *XhoI* - 20 000 U.ml⁻¹

a pufrы pro restrikční endonukleasy (NEB, Velká Británie):

- 10x Cut Smart pufr
- 10x NEB 2.1 pufr

Další použité enzymy a pufrы:

- Fast AP termosenzitivní alkalická fosfatasa (1000 U.ml⁻¹) a 10x Fast AP pufr pro termosenzitivní alkalickou fosfatasu (Thermo Scientific, USA)
- GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (5000 U.ml⁻¹) a 5x Gotaq Flexi pufr (Promega, USA)
- Lyzační enzym *Trichoderma harzianum* (Sigma, USA)
- Phusion High-Fidelity DNA polymerasa (2000 U.ml⁻¹) a 5x Phusion GC pufr (NEB, Velká Británie)
- RevertAid H Minus transkriptasa (200000 U.ml⁻¹) a 5x Reakční pufr pro reverzní transkriptasu (Thermo Scientific, USA)
- RNAsa A (10 mg.ml⁻¹) (Fermentas, Kanada)
- TurboDNasa (2000 U.ml⁻¹) a 6x Reakční pufr pro DNasu (Thermo Scientific, USA)

Použitá antibiotika

- ampicilin (Sigma, USA)
- hygromycin Gold (InvivoGen, Francie)

Standardy pro agarosovou a polyakrylamidovou elektroforézu:

- 50 bp DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- PageRuller unstained protein ladder (Thermo Scientific, USA)
- SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Thermo Scientific, USA)

Protilátky použité na Western blot:

- primární protilátka AntiGFP produkovaná v králíkovi (Abcam, Velká Británie)
- sekundární kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům Goat anti-Rabbit značená křenovou peroxidasou (Thermo Scientific, USA)

Další použité chemikálie:

- 6x vzorkovací pufr (Thermo Scientific, USA), agar (HiMedia, Indie), agarosa (Amresco, USA), akrylamid (Sigma, USA), amidočern (Merck, Německo), amoniak vodný roztok 25% (Lach:ner, Česká republika), bisakrylamid (Sigma, USA), bromfenolová modř (Sigma, USA), bromid ethidia (NeoLab, Německo), buthanol (Penta, Česká republika), BSA (Sigma, USA), dATP (Fermentas, Kanada), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Česká republika), D-glukosa monohydrát (Lach:ner, Česká republika), dNTPs (Fermentas, Kanada), DMSO (Duchefa, Nizozemí), DNA ze spermií lososa (10 mg.ml^{-1}) (Sigma, USA), dusičnan stříbrný (Sigma, USA), EDTA (Penta, Česká republika), ethanol 96% (Lach:ner, Česká republika), formaldehyd 37% (Lach:ner, Česká republika), Gamborg B5 medium (Duchefa, Nizozemí), gb SG PCR Master Mix (Generi biotech, Česká republika), GFP-Trap_A (ChromoTek, Německo), glycerol (Lach:ner, Česká republika), glycin (Lach:ner, Česká republika), Hoechst 33258 (Sigma, USA), hydrogenfosforečnan draselný (Lach:ner, Česká republika), hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lachema, Česká republika), hydroxid draselný (Lach:ner, Česká republika), hydroxid sodný (Penta, Česká republika), chlorid hořečnatý 25 mmol.l^{-1} (Promega, USA), chlorid hořečnatý 50 mmol.l^{-1} (NEB, Velká Británie), chlorid lithný (Sigma, USA), chlorid sodný (Lach:ner, Česká republika), chlorid vápenatý (Penta, Česká republika), inhibitory proteas koktejl 50x (Thermo Scientific, USA), IPTG (Duchefa, Nizozemí), isopropanol (Lach:ner, Česká republika), kvasinkové dusíkaté báze bez aminokyselin (Difco, USA), kvasinkový extrakt (Sigma, USA), kyselina citrónová monohydrát (Sigma, USA), kyselina chlorovodíková 36% (Lachema, Česká republika), kyselina maleinová (Roth, Německo), kyselina octová 80% (Lach:ner, Česká republika), kyselina sírová 98% (Lach:ner, Česká republika), L-asparagin monohydrát (Sigma, USA), LB Broth (Sigma, USA), L-cystein (Lachema, Česká republika), methanol (Lach:ner, Česká republika), β -merkptoethanol (Sigma, USA), NP-40 (Sigma, USA), nuclease-free voda (Qiagen, Německo) octan draselný (Penta, Česká republika), octan lithný (Sigma, USA), octan sodný (Penta, Česká republika), Oligo(dT) primer (Sigma, USA), PEG 3350 (Sigma, USA), PEG 6000 (AppliChem, Německo), pepton (Merck, Německo), persíran amonný (Lach:ner, Česká republika), PMSF (Thermo Scientific, USA), Protein Assay

roztok (BioRAD, USA), Rox - pasivní referenční barvivo (Generi biotech, Česká republika), sacharosa (Lach:ner, Česká republika), SDS (Penta Česká republika), síran hořečnatý heptahydrát (Penta, Česká republika), síran železnatý heptahydrát (Sigma, USA), skelná vata (Sigma, USA), sorbitol (Duchefa, Nizozemí), směs aminokyselin a výživových látek bez uracilu (Clontech, USA), Super Signal West Pico Chemiluminiscenční substrát (Thermo Scientific, USA), sušené mléko odtučněné (Laktino, Česká republika), TEMED (Sigma, USA), thiosíran sodný pentahydrát (Sigma, USA), Tris (Duchefa, Nizozemí), Triton X-100 (Sigma, USA), trypton (Duchefa, Nizozemí), Tween-20 (Sigma, USA), uhličitan sodný (Sigma, USA), x-gal (Duchefa, Nizozemí).

3.1.4 Roztoky a média

Všechny níže uvedené roztoky a média, které byly autoklávovány, byly sterilizovány při 120°C po dobu 20 min.

3.1.4.1 Roztoky a média pro práci s *C. purpurea*

0,2 mol.l⁻¹ hydrogenfosforečnan sodný

1,43 g hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, doplněno do 20 ml destilovanou vodou

0,2 mol.l⁻¹ hydroxid draselný

6,73 g hydroxid draselný, doplněno do 600 ml destilovanou vodou

1 mol.l⁻¹ chlorid vápenatý

11,1 g chlorid vápenatý, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, autoklávováno

0,1 mol.l⁻¹ kyselina citrónová

0,77 g kyselina citrónová monohydrát, doplněno do 40 ml destilovanou vodou

0,2 mol.l⁻¹ kyselina maleinová

13,93 g kyselina maleinová, doplněno do 600 ml destilovanou vodou

0,2 mol.l⁻¹ malát draselný

k 600 ml 0,2 mol.l⁻¹ hydroxidu draselného bylo přilito takové množství 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny maleinové, aby pH = 5,2

4 mol.l⁻¹ octan draselný

49,05 g octan draselný, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, autoklávováno

1 mol.l⁻¹ Tris-HCl

12,11 g Tris, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 7,5, autoklávováno

BII agar pro selekci

100 g sacharosa, 5 g pepton, 5 g L-asparagin monohydrát, 1g hydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 8, autoklávováno

Gamborg B5 médium

0,75 g agarosa, 0,3 g Gamborg B5 medium, 1 g D-glukosa, doplněno do 100 ml destilovanou vodou

Hoechstovo barvivo

Zásobní roztok: 5 mg Hoechst 33258 v 10 ml McIlvainova pufru

pracovní koncentrace: 50 µg.ml⁻¹

Kultivační BII agar

100 g sacharosa, 5 g pepton, 5 g L-asparagin monohydrát, 1g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, 0,01 g síran železnatý heptahydrát, 12 g agar, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,8, autoklávováno

Kultivační BII médium

100 g sacharosa, 5 g pepton, 5 g L-asparagin monohydrát, 1g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, 0,01 g síran železnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,8, autoklávováno

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

Mantle agar

100 g sacharosa, 10 g L-asparagin, 1 g dusičnan vápenatý tetrahydrát, 0,25 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,25 g síran hořečnatý heptahydrát, 0,125 g chlorid draselný, 0,033 g síran železnatý heptahydrát, 0,27 g síran železnatý heptahydrát, 0,01 g L-cystein, 0,1 g kvasinkový extrakt, 20 g agar, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,2, autoklávováno

McIlvainův pufr

17,39 ml 0,2 mol.l⁻¹ hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, 2,61 ml 0,1 mol.l⁻¹ kyselina citrónová

PEG roztok

7,5 g PEG 6000, 1,5 ml 1 mol.l⁻¹ chlorid vápenatý, 3 ml 1 mol.l⁻¹ Tris, doplněno do 30 ml destilovanou vodou, sterilizováno přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm

Protoplastizační roztok

100 mg lyzační enzym z *Trichoderma harzianum* rozpuštěno ve 20 ml SmaC pufru, sterilizováno přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm

SmaC pufr

123,88 g sorbitol, 5,88 chlorid vápenatý, doplněno do 800 ml 0,2 mol.l⁻¹ malátem draselným, autoklávováno

STC pufr

154,84 g sorbitol, 1,22 g Tris, 7,36 g chlorid vápenatý, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 7,5, autoklávováno

Transformační BII agar

200 g sacharosa, 5 g pepton, 5 g L-asparagin monohydrát, 1g hydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 8, autoklávováno

3.1.4.2 Roztoky a média pro práci s *E. coli*

0,1 mol.l⁻¹ IPTG

23,8 mg IPTG rozpuštěno v 1ml DMSO

3 mol.l⁻¹ octan sodný

24,6 g Octan sodný, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 5,2, autoklávováno

0,1 mol.l⁻¹ x-gal

20 mg x-gal rozpuštěno v 1 ml nuclease-free vody, sterilizováno přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm

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

LB médium

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

Roztok P1

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

SOC médium

20 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu a 0,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 950 ml destilované vody. Poté bylo do roztoku přidáno 10 ml $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridu draselného, pH = 7. Objem byl doplněn destilovanou vodou do 1 l. Po autoklávování bylo do roztoku přidáno 20 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ D-glukosy a 5 ml $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridu hořečnatého.

3.1.4.3 Roztoky a média pro práci s *S. cerevisiae*

$1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octan lithný

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

PEG roztok

25 g PEG 3350 rozpuštěno v 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 (Clontech, USA), 16 g agar, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,8, autoklávováno

SD-Ura médium

20 g D-glukosa monohydrát, 6,7 g kvasinkové dusíkaté báze bez aminokyselin, 0,77 g směs aminokyselin a výživových látek bez uracilu (Clontech, USA), 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 médium

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

3.1.4.4 Roztoky pro SDS-PAGE

30% (w/v) akrylamid + 0,8% (w/v) bisakrylamid

7,5 g akrylamidu rozpuštěno v 17 ml sterilní vody, poté přidáno 0,2 g bisakrylamidu, objem doplněn sterilní vodou na 25 ml

10x Elektrodový pufr

30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 8,3

4x SDS vzorkovací pufr

4 ml glycerol, 3,2 ml 0,75 mmol.l⁻¹ Tris (pH = 6,8), 2,3 ml sterilní vody, 0,8 g SDS, 10 mg bromfenolové modři, 0,5 ml β-merkaptioethanolu

čínidlo Bradfordové

BioRad Protein Assay roztok a sterilní voda v poměru 1:4

Extrakční pufr

0,24 g Tris, 0,88 g NaCl, 50 μl Triton X-100, doplněno do 100 ml vodou pH = 8

Pufr pro zaostřovací gel

9,08 g Tris, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 6,8

Pufr pro separační gel

27,25 g Tris, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 9,2

Separací gel (5%)

1,25 ml 30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid, 1,25 ml Pufr pro separační gel, 4,88 ml sterilní voda, 0,075 ml 10% (w/v) SDS, 0,0075 ml TEMED, 0,075 ml persíran amonný (100 mg/ml)

Separací gel (10%)

2,5 ml 30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid, 1,25 ml Pufr pro separační gel, 3,63 ml sterilní voda, 0,075 ml 10% (w/v) SDS, 0,0075 ml TEMED, 0,075 ml persíran amonný (100 mg/ml)

Zaostřovací gel (4%)

1 ml 30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid, 1,25 ml Pufr pro zaostřovací gel, 5,13 ml sterilní voda, 0,075 ml 10% (w/v) SDS, 0,0075 ml TEMED, 0,075 ml persíran amonný (100 mg/ml)

3.1.4.5 Roztoky pro Western blot

10x Přenosový pufr

15 g Tris, 72 g glycin, doplněno do 500 ml destilovanou vodou, pH = 8,5

Blokovací pufr

5 g sušené odtučněné mléko, 2 g BSA, rozpuštěno ve 100 ml TBS-T pufru

TBS pufr

2,42 g Tris, 29,22 g chlorid sodný, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 7,5

TBS-T pufr

2,42 g Tris, 29,22 g chlorid sodný, 0,5 ml Tween-20, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 7,5

Roztok amidočerně

0,1 g amidočerně, 10 ml 80% kyselina octová, 4 ml methanol, doplněno do 100 ml destilovanou vodou

3.1.4.6 Roztoky pro imunoprecipitaci GFP-fúzních proteinů pomocí GFP Trap_A

1 mol.l⁻¹ Tris

12,11 g Tris, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 10,3

Eluční pufr

1,5 g glycin, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 2,5

Lyzační pufr

0,12 g Tris, 0,88 g chlorid sodný, 0,015 g EDTA, 500 µl NP-40, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 7,5

Promývací pufr

0,12 g Tris, 0,88 g chlorid sodný, 0,015 g EDTA, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 7,5

Promývací pufr s vyšší koncentrací Chloridu sodného

0,12 g Tris, 2,92 g chlorid sodný, 0,015 g EDTA, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 7,5

Ředící pufr

0,12 g Tris, 0,88 g chlorid sodný, 0,015 g EDTA, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 7,5

3.1.4.8 Roztoky pro barvení polyakrylamidových gelů stříbrem

Roztok 1

50% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

Roztok 2

5% (v/v) ethanol, 1% (v/v) kyselina octová

Roztok thiosíranu sodného

0,02 g thiosíran sodný pentahydrát, doplněno do 100 ml destilovanou vodou

Roztok 3

0,2 g dusičnan stříbrný, 75 μ l 37% formaldehyd, doplněno do 100 ml destilovanou vodou

Vyvíjecí roztok

6 g uhličitan sodný, 50 μ l 37% formaldehyd, 2 ml Roztoku thiosíranu sodného, doplněno do 100 ml destilovanou vodou

Zastavovací roztok

5% (v/v) kyselina octová

3.1.4.9 Roztoky pro horizontální agarosovou elektroforézu

2% (w/v) agarosový gel

2 g agarosy rozpuštěn ve 100 ml TAE pufru

1% (w/v) agarosový gel

1 g agarosy rozpuštěn ve 100 ml TAE pufru

0,7% (w/v) agarosový gel

0,7 g agarosy rozpuštěno ve 100 ml TAE pufru

TAE pufr

40 mmol.l⁻¹ Tris, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 8

3.1.5 Použité kity

NucleoBond Xtra MidiPrep kit (Macherey Nagel, Německo)

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

RNAqueous Total RNA Isolation Kit (Ambion, USA)

Qiagen PCR cloning kit (Qiagen, Německo)

QIAprep spin miniprep kit (Qiagen, Německo)

3.1.6 Software a programy

AlphaDigiDoc RT Gel Dokumentační systém (Alpha Innotech, USA)

BioEdit (Hall, 1999)

DataAssist (Applied Biosystems, USA)

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

GenScript (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/sequencing_primer_design)

ChemiDoc MP dokumentační systém (BIO-RAD, USA)

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

Zeiss ZEN Blue software (ZEISS, Německo)

3.1.7 Laboratorní pomůcky

96 jamkové destičky MicroAmp Fast Optical (Applied Biosystems), Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo), filtr s velikostí pórů 0,22 μm , skleněné kuličky 425-600 μm (Sigma, USA), nytexová membrána (Fluka, Německo), Miracloth membrána (Calbiochem, Česká republika), plastová fólie MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems), Immobilon-P PVDF membrána 0,45 μm (Merck, Německo) a další pomůcky Oddělení Molekulární biologie, CRH.

3.1.8 Přístroje

Autokláv HST 5-6-8 (Zirbus, Německo), centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene, Dánsko), centrifuga ROTANTA 460R (Hettlich, Německo), elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo), elektroporátor ECM 399 (BTX, USA), epifluorescenční mikroskop Axio Imager M2 (Zeiss, Německo), flowbox (Merci, Česká republika), inkubátor (28°C) (Memmert, Německo), inkubátor (37°C) (Medline Scientific limited, Německo), lyofilizátor SeduVac (LaboGene, Dánsko), NanoDrop NAS 99 (ACT gene, USA), PC s dokumentačním systémem Alpha DigiDoc, Pikofuga (Biosan, Litva), StepOne - termocycler pro qPCR (Applied Biosystems), stereomikroskop (ZEISS, Německo), světelný mikroskop Helago (Helago, Česká republika), systém Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD, USA), termoblok (BIOER, Čína), termocycler T-gradient (Biometra, Německo), třepačka Orbit 1000 (Labnet, USA), UV/VIS spektrofotometr (Agilent, USA), vodní lázeň (Labicom, Česká republika), vortex (Labnet, USA), zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo).

3.2 Primery

Pro návrh primerů byly použity programy BioEdit, Primer3 a GenScript. Pro vyhledávání nukleotidové sekvence genů a okrajových sekvencí (OS) genů *C. purpurea* byla použita ENA databáze.

Lyofilizované primery (Sigma-Aldrich, USA) byly dle návodu rozpuštěny v předem stanoveném množství nuclease-free vody na koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Primery pro kvasinkové rekombinační klonování o délce 45 - 49 bp byly přečištěny pomocí HPLC.

3.2.1 Návrh primerů pro kvasinkové rekombinační klonování

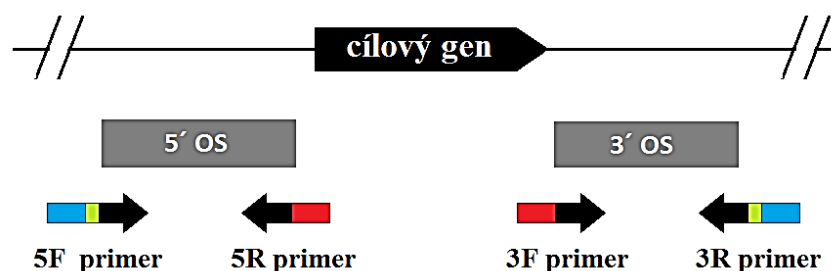
3.2.1.1 Primery pro tvorbu konstruktů pro delecí vybraných genů

C. purpurea

V rámci této práce byly navrženy primery pro přípravu konstruktů pro delecí genů CPUR_00903 (anotovaný jako linoleátdiolsynthasa), CPUR_01124 (anotovaný jako transkripční faktor zapojený do regulace biosyntézy námelových alkaloidů), CPUR_04032 (anotovaný jako Δ^{12} -desaturasa mastných kyselin), CPUR_04073 (kódující neribosomální lysergylpeptidovou syntetasu LPS4) a CPUR_05433 (kódující transkripční faktor zapojený do regulace biosyntézy ergochromů) *C. purpurea*, dále jen označovány *CpLDS1*, *CpTF1*, *CpFAH*, *lpsA2* a *CpTF2*, ve stejném pořadí.

Primery pro amplifikaci 5' OS a 3' OS deletovaných genů byly navrženy tak, aby velikost DNA amplikonů byla v rozmezí 600-1000 bp. Schéma nasednutí navržených primerů je na Obr. 12. Každý forward primer pro amplifikaci 5' OS obsahuje sekvenci, která koresponduje s vektorem *pRS426* (modrá), reverse primer pak obsahuje sekvenci, která koresponduje s terminátorovou sekvencí Phleomycinové rezistenční kazety (červená). Forward primer pro amplifikaci 3' OS oblasti obsahuje sekvenci, která koresponduje s promotorovou sekvencí Phleomycinové rezistenční kazety (červená) a reverse primer obsahuje sekvenci, která koresponduje se sekvencí vektoru *pRS426* (modrá).

Do každého forward primeru pro 5' OS a reverse primeru pro 3' OS byla zanesena restriční místa (zelená, žlutá), která byla umístěna tak, aby z výsledného *pRS426* plasmidu s DNA inserty (5' OS, Phleomycinová rezistenční kazeta a 3' OS) mohla být pomocí jedné restriční endonukleasy vyštěpena DNA obsahující pouze 5' OS, Phleomycinovou rezistenční kazetu a 3' OS.



Obr. 12 Schéma návrhu primerů pro amplifikaci 3' OS a 5' OS cílového genu *C. purpurea*.

Seznam primerů použitých na amplifikaci 3' OS a 5' OS cílových genů:

3F CPUR 00903
5' - **CTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGAC**TCGTTTATACCTACTCTGTGCGA -3'
3R CPUR 00903
5' - **AACAATTTACACAGGAAACAGCGGATCC**CCGTGGCAGGTAGATGACTT -3'
5F CPUR 00903
5' - **CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGGATCC**CCATCTCGTGATTGCCTTCC -3'
5R CPUR 00903
5' - **CCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAAC**ACTTGCTCTTCTCGGGAACA -3'
3F CPUR 01124
5' - **CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGAC**CATCCCGTGCTACTTTTGGT -3'
3R CPUR 01124
5' - **AACAATTTACACAGGAAACAGCGGATCC**CAGTTGGTCGAGATCGAGGT -3'
5F CPUR 01124
5' - **GGGTTTTCCAGTCAGACGGGATCC**CGACGCGATGCCTGAGAAGCGGAG -3'
5R CPUR 01124
5' - **ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAAC**ACTCTGCAGGCAGTCCAAAA -3'
3F CPUR 04032
5' - **CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGAC**TTTGTTCGTGGAGGTGCTTG -3'
3R CPUR 04032
5' - **AACAATTTACACAGGAAACAGCGAATTC**TCCTGGTGAATATGGGTGCA -3'
5F CPUR 04032
5' - **CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGAATTC**CTTTTGTGTGCTCCGAGGT -3'
5R CPUR 04032
5' - **CCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAAC**GCAGAGTAATTCGTTGCCCT -3'
3F CPUR 04073
5' - **CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGAC**TGTGGTCAACGCCGAGAGTA -3'
3R CPUR 04073
5' - **ACAATTTACACAGGAAACAGCGGATCC**TGGAGAGTCTGGGCATCTAAC -3'
5F CPUR 04073
5' - **CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGGATCC**CTGGACGGGCAATCAATCAG -3'
5R CPUR 04073
5' - **CCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAAC**CAGCAGAGCCGGACGATATA -3'
3F CPUR 05433
5' - **CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGAC**TCCAGTGTCCCTGAGTCGT -3'
3R CPUR 05433
5' - **ATAACAATTTACACAGGAAACAGCGAATTC**CACAGTGTAACCCGAGGAA -3'
5F CPUR 05433
5' - **GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCGAATTC**GGCCATTCGAGAGGTTATTC -3'
5R CPUR 05433
5' - **ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAAC**GGTAAGAGAGGGTCCACGAG -3'

3.2.1.2 Primery pro tvorbu konstruktů pro konstitutivní expresi vybraných genů *C. purpurea*

V průběhu této práce byly také navrženy primery pro přípravu konstruktů pro konstitutivní expresi genů CPUR_00903, CPUR_01124, CPUR_04032, CPUR_04074 (kódující neribosomální lysergylpeptidovou syntetasu LPS1, dále jen *lpsA1*), CPUR_04076 (kódující dimethylallyltryptophansynthasu DMATS, dále jen *dmaW*), CPUR_04612 (anotovaný jako flavinmonooxygenasa, dále jen *CpYUCCA*) a CPUR_04616 (anotovaný jako IAM hydrolasa, dále jen *CpIaaH*) *C. purpurea*.

Vybrané konstrukty byly připraveny tak, aby jejich čtecí rámce zahrnovaly fluorescenční proteiny mCherry nebo GFP (kodon optimalizované GFP na *Botrytis cinerea*).

Pokud byla fluorescenční značka umístěna na C-konec zájmového proteinu, byly primery pro kvasinkové rekombinační klonování navrženy tak, že každý forward primer obsahuje sekvenci korespondující se sekvencí promotoru *OliC* (modrá), reverse primery obsahují sekvenci korespondující se sekvencí *mCherry* (červená) nebo *GFP* (zelená), reverse primery pro tvorbu konstruktů bez fluorescenční značky obsahují sekvenci korespondující se sekvencí terminátoru *Tub* (růžová) či *Gluc* (šedá).

Pokud byla fluorescenční značka umístěna na N-konec zájmového proteinu, byly primery pro kvasinkové rekombinační klonování navrženy tak, že forward primer obsahuje sekvenci korespondující se sekvencí *GFP* (žlutá), reverse primer obsahuje sekvenci korespondující se sekvencí terminátoru *Gluc* (šedá).

Seznam pramerů použitých na přípravu konstruktů pro konstitutivní expresi vybraných genů:

CPUR 00903 OE_mC_fw
5´- CATCACATCACAATCGATCCAACCATGTCTAGCGGAGAGATGATTGGTG -3´

CPUR 00903 OE_mC_rev
5´- CTTACCTCGCCCTTGCTTACCATATCCTCCCACGTAATCTTCATACTCG -3´

CPUR 00903 OE_Ttub_rev
5´- GTAGGAATGACATCAGATATTC AATCCTCCCACGTAATCTTCATAC -3´

CPUR 01124 OE_mC_fw
5´- CTCCATCACATCACAATCGATCCAACCATGGCTCCGGCGGAAGATG -3´

CPUR 01124 OE_mC_rev
5´- GATTACTTACCTCGCCCTTGCTTACCATGTCAATGTGCTCCTTTTTTCAG -3´

CPUR 04032 OE_mC_fw
5´- CATCACATCACAATCGATCCAACCATGTCAGAAAACGCAGTTCTGCGGC -3´

CPUR 04032 OE_mC_rev
5´- CTTACCTCGCCCTTGCTTACCATCTGAGTCTTCATTGAAATGGGCTTCG -3´

CPUR 04032 OE_Ttub_rev
5´- CAAAGTAGGAATGACATCAGATATCTACTGAGTCTTCATTGAAATGGGC -3´

lpsA1 A OE 1 fw PolIC
5´- CATCACATCACAATCGATCCAACCATGTCTATTCCAATTCCGGAGAAAC -3´

lpsA1 D OE 8 rev GFP
5´- CTTACCTCACCTTGGAACCATCCGTGCCTTGCCCGTCGCATCATCTC -3´

lpsA1 D OE 9 rev Tgluc
5´- CATACTTATCTACATACGTCACCGTGCCTTGCCCGTCGCATCATC -3´

dmaW PolIC OE fw
5´- CACATCACAATCGATCCAACCATGTGACCGCAAAGGACCCAGGAAAC -3´

dmaW GFP C rev
5´- CTTACCTCACCTTGGAACCATCTTCGTTGAGAGGTCACAGCGCCGG -3´

dmaW OE Tgluc rev
5´- CTAATCATACTTATCTACATACGCTACTTCGTTGAGAGGTCACAGC -3´

dmaW GFP OE fw
5´- GAACTTTACAAAGCGCCGCTATGTGACCGCAAAGGACCCAGGAAAC -3´

CPUR 04612 OE_mC_fw
5´- CTCCATCACATCACAATCGATCCAACCATGCCACCGATCCAATGG -3´

CPUR 04612 OE_mC_rev
5´- CTTACCTCGCCCTTGCTTACCATATTCTCTTCATACTTGTATAAGCCC -3´

CPUR 04612 OE_Ttub_rev
5´- GTAGGAATGACATCAGATATTC AATCTCTTCATACTTGTATAAGCCC -3´

CPUR 04616 OE_mC_fw
5´- CCATCACATCACAATCGATCCAACCATGGGCTCACTCCCTGTTCTAC -3´

CPUR 04616 OE_mC_rev
5´- GATTACTTACCTCGCCCTTGCTTACCATAAGCTTGGGTGGAGGTAAAGG -3´

CPUR 04616 OE GFP rev
5´- CTTACCTCACCTTGGAACCATAAGCTTGGGTGGAGGTAAAGGACCC -3´

CPUR 05433 OE_mC_fw
5´- CCATCACATCACAATCGATCCAACCATGGACCATTCCATTGGCGGC -3´

CPUR 05433 OE_mC_rev
5´- CCTCGCCCTTGCTTACCATCAATCTTCGCAGCATGTTAATTATATTTG -3´

3.2.2 Další použité primery

Název primeru	Nukleotidová sekvence primeru od 5' konce
Cp ACTIN_SYBR_fw	5'- GCTCTTCCTCACGCCATT -3'
Cp ACTIN_SYBR_rev	5'- TTCACGCTCGGCAGTAGT -3'
CpBle1_fw 5'-	CGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGCGATCGAGACCTAATACAGC-3'
CpBle1_rev5'-	GTTGGAGATTTTCAGTAACGGTAAGTGGGCATTGCAGATGAGCTGTAT-3'
CpBle sek1 fw	5'- GACCTTGTCAACCCCGCCGACAC -3'
CpBle sek2 rev	5'- GGAACACAAGCTGGCAGTCGACC -3'
Cp GPD_1_SYBR_fw	5'- TGTCTTACCACCACCGA -3'
Cp GPD_1_SYBR_rev	5'- GCCGTCATAGGTCTTCTCGT -3'
CPUR_00903 sek 1 fw	5'- CTGATCCCGAGGCAATCTAC -3'
CPUR_00903 sek 2 fw	5'- GAAGCTTCTGGGGGATGAC -3'
CPUR_00903 sek 3 fw	5'- GAACCACAGCATCTTGACG -3'
CpYUCCA sek1_fw	5'- GCTCGGAACTATGAGGATGG -3'
dia_CpAUX_mC_rev	5'- GGAATGTCCACGAGGGTGTTT -3'
hph_fw	5'- CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCC -3'
lpsA1_20.1_SYBR_fw	5'- GACGAGAAGATGACGCACAC -3'
lpsA1_20.1_SYBR_rev	5'- AGCCTATCGACCATGTGCTG -3'
lpsA1-a_fw	5'- TGGACCTGATTTCAAAGCTCG -3'
lpsA1-a_rev	5'- TTGCTGTCCAAGTCGATTCG -3'
lpsA1-b_fw	5'- CTTCTGCAAGCCCTCTTTGC -3'
lpsA1-b_rev	5'- CTC AACGTCGGTAAGCTCCA -3'
lpsA1-c_fw	5'- CGCCTCGTTTTCTAAGACTTCC -3'
lpsA1-c_rev	5'- GACGCGTTGGGAATAGCAAT -3'
lpsA1-d_fw	5'- TGCTATTCCCAACGCGTCAT -3'
lpsA1-d_rev	5'- TCTTCTTTGGACAGGTTGCG -3'
lpsA1-a_fw_sek1	5'- AAGAGAACGACCAGCTCACA -3'
lpsA1-a_rev_sek2	5'- AGCTTCACAACAAATGGCGT -3'
lpsA1-b_fw_sek3	5'- CACCACGCGCTATATGATGG -3'
lpsA1-b_rev_sek4	5'- GCCCAGACCGTTCATCAAAG -3'
lpsA1-c_fw_sek5	5'- TCTTCAGATCGAGCCACACA -3'
lpsA-d_fw_sek6	5'- GGAGATCCTCGTCGCAAAAC -3'
lpsA1-d_rev_sek 7	5'- CCCCTGCTCTACGATACGAG -3'
lpsA1-d_rev_sek 8	5'- ATCACACGAGCTGGTTACCA -3'
lpsA1-A OE sek2 fw	5'- TCTCTCCCTATCCCCGGAAA -3'
lpsA1-B OE sek3 fw	5'- GAAAAGCTCCTTCCTGTGCC -3'
lpsA1-C OE sek4 fw	5'- GTGGTTCTGCATGTGGTTTG -3'
lpsA1-D OE sek5 fw	5'- GACGAGAAGATGACGCACAC -3'
Phleo Hi3f2	5'- GTGTTTCAGGATCTCGATAAGATACG -3'
Phleo out Hefe3	5'- GAGCTCGGTATAAGCTCTCC -3'
PoliC OE sek1 fw	5'- CCCGAAACTCAGTCTCCTT -3'
pRS426 fw	5'- GCGTCGCGCCATTCGCCATTC -3'
pRS426 rev	5'- CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGC -3'
SP6	5'- ATTTAGGTGACACTATAGAA -3'
T7 promoter	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'
Tgluc rev	5'- GTCTTCCGCTAAAACACCCC -3'
TtubSR1	5'- GAGGTGTGAGCATGGAAGTGATG -3'

3.3 Metody

3.3.1 Kvasinkové rekombinační klonování

Pomocí kvasinkového rekombinačního klonování byly připraveny konstrukty pro delecí a konstitutivní expresi vybraných genů *C. purpurea*. Pro přípravu delečních konstruktů byl použit shuttle vektor *pRS426*, pro přípravu konstruktů pro expresi vybraných genů byly použity shuttle vektory *pNDH-OCT*, *pNDB-OGG*, *pNAB-OCT* a *pNDH-OGG*, které se liší přítomností genu rezistence na antibiotikum (*hph* nebo *ble*) a genem kódujícím mCherry či GFP. Použité vektory obsahují počátek replikace pro *S. cerevisiae* a *E. coli*.

3.3.1.1 Příprava DNA pro tvorbu konstruktů pro konstitutivní expresi vybraných genů *C. purpurea*

3.3.1.1.1 Klonování do *pDRIVE* plasmidu

3.3.1.1.1.1 PCR

Metodou PCR pomocí Phusion High-Fidelity DNA polymerasy byly z gDNA *C. purpurea* 20.1 amplifikovány *CpLDS1*, *CpFAH*, *lpsA1*, *dmaW*, *CpYUCCA*, *CplaaH* a části A, B, C a D *lpsA1* (Tab. 1, 2). Jako negativní kontrola byla vždy použita H₂O.

Po skončení elongace bylo vždy k PCR reakční směsi napipetováno 0,3 μl GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy pro vytvoření nespecifických adenosinů na koncích DNA ampliconů pro TA klonování, inkubace 10 min při 72°C.

Tab. 1 Složení PCR směsi s použitím Phusion High-fidelity DNA polymerasy.

Složka	Objem [μl]
5x HF pufr	10
dNTPs (10 mmol.l ⁻¹)	1
Fw primer (10 mmol.l ⁻¹)	2,5
Rev primer (10 mmol.l ⁻¹)	2,5
Phusion High-fidelity DNA polymerasa (2000 U.ml ⁻¹)	0,5
Templát – gDNA <i>C. purpurea</i> (100 ng.μl ⁻¹)	1,5
Nuclease-free H ₂ O	32
Celkový objem	50

Tab. 2 Nastavení podmínek PCR s použitím Phusion High-Fidelity DNA polymerasy.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
1. Počáteční denaturace	98	30
2. Denaturace	98	7
3. Annealing	61	20
4. Elongace	72	1 kb cca 20-30 s
5. Konečná elongace	72	600

Cyklus 2-4 byl opakován 35x

3.3.1.1.2 Elektroforéza v agarosovém gelu

Získané DNA amplikony byly analyzovány pomocí horizontální elektroforézy v agarosovém gelu. K 5 μ l vzorku byl napipetován 1 μ l 6x vzorkovacího pufru, jako standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder. Fragmenty DNA do velikosti 10 kb byly separovány v 1% agarosovém gelu, fragmenty DNA větší než 10 kb byly separovány v 0,7% agarosovém gelu. Pro zviditelnění DNA bylo do 50 ml agarosového gelu napipetováno 10 μ l 0,5% bromidu ethidia. Po nanesení vzorků a standardu na gel byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při konstantním napětí 120 V. Po 40 min byl pořízen snímek gelu pomocí dokumentačního systému AlphaDigi a programu Allpha DigiDoc RT.

3.3.1.1.3 Purifikace DNA amplikonů z PCR reakční směsi

Poté, co byla v agarosovém gelu zkontrolována velikost získaných DNA amplikonů, byly PCR směsi přečištěny pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu (Macherey Nagel, Německo).

K PCR směsi byl napipetován dvojnásobný objem NTI pufru. Směs byla napipetována na kolonku se sběrnou mikrozkučkou, centrifugace 30 s (11000 g, RT). Kolonka byla 2 x promyta 700 μ l NT3 pufru, centrifugace vždy 30 s (11000 g, RT). Poté byla kolonka přenesena do nové 1,5 ml mikrozkučky a naprázdno centrifugována 1 min (11000 g, RT). Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkučky a inkubována 5 min při 70°C. Následně bylo na kolonku napipetováno 50 μ l nuclease-free vody (70°C), inkubace 1 min při RT, centrifugace 1 min (11000 g, RT). Na Nanodropu byla změřena koncentrace získané DNA.

Tab. 3 Ligace DNA insertů do *pDRIVE* plasmidu.

Složka	Množství
DNA insert	2 µg
2x ligační master mix	10 µl
<i>pDRIVE</i> klonovací vektor (50 ng/µl)	1 µl
Doplněno do 20 µl nuclease-free vodou	

3.3.1.1.1.4 Ligace do *pDRIVE* plasmidu

Purifikované DNA fragmenty byly ligovány do *pDRIVE* plasmidu dle Tab. 3. Po 2 h inkubaci při RT byla ligasa inaktivována 10 min při 70°C.

3.3.1.1.1.5 Transformace *E. coli*

Klonovací vektor *pDRIVE* s DNA insertem byl transformován do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10 pomocí elektroporace.

Po 20 min inkubaci 50 µl elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10 v 1,5 ml mikrozkuhavce na ledu, byl k buňkám napipetován 1 µl inaktivované ligační směsi, směs byla opatrně promíchána. Po 5 min inkubaci na ledu byla směs přepipetována do předem vychlazené elektroporační kyvety, která byla následně vložena do elektroporátoru, kde byl buňkám udělen elektrický puls 1800 V po dobu 5 ms. Okamžitě po udělení elektrického pulsu bylo k buňkám napipetováno 250 µl SOC média, směs byla přepipetována do nové 1,5 ml mikrozkuhavky, inkubace 1 h při 37°C na třepačce (200 rpm).

Ve flow-boxu bylo napipetováno 50 µl a 150 µl transformační směsi na LB agar s Ampicilinem (výsledná koncentrace v médiu 100 µg.ml⁻¹), 40 µl 0,1 mol.l⁻¹ IPTG a 10 µl 0,1 mol.l⁻¹ x-gal. Směs byla pomocí sterilní hokejky rozetřena, inkubace do dalšího dne při 37°C.

Následující den byly ve flow-boxu pomocí sterilního parátka vypíchnuty z misek s LB agarem a ampicilinem bíle zbarvené kolonie *E. coli*, které byly přeneseny do 5 ml LB média s ampicilinem (výsledná koncentrace v médiu 100 µg.ml⁻¹), inkubace při 37°C na třepačce (200 rpm) do dalšího dne.

3.3.1.1.1.6 Izolace plasmidové DNA alkalickou lýzí

Další den bylo 5 ml bakteriální kultury *E. coli* postupně centrifugováno ve 2 ml mikrozkuhavce po dobu 3 min (14 000 rpm, RT). Pelet byl resuspendován ve 300 µl P1

roztoku. Poté bylo ke směsi napipetováno 300 μ l P2 roztoku, směs byla promíchána. Po 5 min inkubaci na ledu bylo do směsi přidáno 300 μ l P3 roztoku, směs byla opět promíchána. Po 5 min inkubaci na ledu byla směs centrifugována 10 min (14 000 rpm, 4°C). Supernatant byl společně s 1 ml Isopropanolu přepipetován do nových 2 ml mikrozkuhavek, centrifugace 30 min (14 000 rpm, RT). Pelet byl promyt 500 μ l 70% Ethanolu (-20°C), centrifugace 5 min (14 000 rpm, RT). Pelet byl vysušen v digestoři a resuspendován ve 100 μ l nuclease-free vody. Na Nanodropu byla změřena koncentrace získané DNA.

3.3.1.1.7 Kontrolní restrikce

Pro ověření úspěšnosti ligace DNA insertu do *pDRIVE* plasmidu byla plasmidová DNA podrobena restrikční analýze. Na restrikci byla použita jedna nebo dvě restrikční endonukleasy ve vhodném pufru (Tab. 4, 5), směs byla inkubována při 37°C do dalšího dne. Restrikční směsi byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy dle 3.3.1.1.2. Jako standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder.

Tab. 4 Obecné složení restrikční směsi obsahující jednu nebo dvě restrikční endonukleasy pro ověření přítomnosti DNA insertu v plasmidu.

Složka	Množství
Pufr (10x)	2 μ l
Enzym 1	3U (použitý objem závisí na koncentraci enzymu)
Enzym 2	3U (použitý objem závisí na koncentraci enzymu)
Plasmidová DNA	3 μ g
Doplněno do 20 μ l nuclease-free vodou	

Tab. 5 Přehled restrikčních endonukleas a pufků použitých pro restrikční analýzu plasmidové DNA za účelem ověření přítomnosti DNA insertu v *pDRIVE* plasmidu.

Plasmid	Enzym 1	Enzym 2	Pufr (10x)
<i>pDRIVE::CpLDS1</i>	<i>EcoRI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pDRIVE::CpFAH</i>	<i>EcoRI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pDRIVE::lpsA1</i>	<i>EcoRI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pDRIVE::část A lpsA1</i>	<i>EcoRI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pDRIVE::část B lpsA1</i>	<i>EcoRI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pDRIVE::část C lpsA1</i>	<i>EcoRI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pDRIVE::část D lpsA1</i>	<i>SalI</i> -HF	<i>SphI</i> -HF	Cut Smart
<i>pDRIVE::dmaW</i>	<i>EcoRI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pDRIVE::CpYUCCA</i>	<i>BamHI</i> -HF	<i>XbaI</i>	Cut Smart
<i>pDRIVE::CpIaaH</i>	<i>EcoRI</i> -HF	-	Cut Smart

3.3.1.1.1.8 Kontrolní PCR

Pro kontrolu přítomnosti DNA insertu v *pDRIVE* plasmidu byla plasmidová DNA použita jako PCR templát pro amplifikaci DNA insertu pomocí GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy a primerů nasedajících na SP6 a T7 prmotor *pDRIVE* plasmidu (Tab. 6, 7). PCR směsi byly analyzovány v agarosovém gelu dle 3.3.1.1.1.2. Jako standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder.

Tab. 6 Nastavení podmínek PCR s použitím GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
1. Počáteční denaturace	95	120
2. Denaturace	95	30
3. Annealing	58	30
4. Elongace	72	1 kb cca 60 s
5. Konečná elongace	72	600

Cyklus 2-4 byl opakován 35x

Tab. 7 Složení PCR směsi s použitím GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy.

Složka	Objem [μl]
5x GoTaq pufr	2,5
dNTPs (10 mmol.l ⁻¹)	0,25
Forward primer (10 mmol.l ⁻¹)	0,25
Reverse primer (10 mmol.l ⁻¹)	0,25
GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (5000 U.ml ⁻¹)	0,07
Templát - gDNA <i>C. purpurea</i> (100 ng.μl ⁻¹)	1
H ₂ O	7,43
Celkový objem	12,5

3.3.1.1.1.9 Přečištění plasmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu, sekvenace

Za účelem definitivního ověření přítomnosti DNA insertu v *pDRIVE* plasmidu byl plasmid izolovaný alkalickou lýzí přečištěn pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu (Qiagen, Německo) a sekvenován (Seqme s. r. o.).

K plasmidové DNA izolované alkalickou lýzí byl napipetován 5 x větší objem PB pufru, směs byla promíchána a napipetována na QIAprep kolonku se sběrnou mikrozkuvkou. Po 1 min centrifugaci (16000 g, RT) byla kolonka promyta 750 μl PE pufru, centrifugace 1 min (16000 g, RT). Poté byla kolonka přenesena do nové 1,5 ml mikrozkuvky a centrifugována naprázdno po dobu 1 min (16000 g, RT). Kolonka byla opět přenesena do nové 1,5 ml mikrozkuvky a bylo na ni napipetováno 40 μl

nuclease-free vody (65°C), inkubace 1 min při RT, centrifugace 1 min (16000 g, RT). Na Nanodropu byla změřena koncentrace získané DNA.

3.3.1.1.2 Příprava DNA na transformaci *S. cerevisiae*

Z připravených *pDRIVE* plasmidů s DNA insertem byly metodou PCR pomocí Phusion High-Fidelity DNA polymerasy dle 3.3.1.1.1.1 amplifikovány geny se stop kodonem (v případě tvorby konstruktů pro expresi genu bez fluorescenční značky nebo C-terminální fúze GFP či mCherry) nebo bez stop kodonu (v případě N-terminální fúze GFP nebo mCherry). Jako templáty byly též použity plasmidy *pDRIVE::CpTF1* a *pDRIVE::CpTF2* (Biová, 2016). Velikost DNA ampliconů byla ověřena elektroforézou v agarosovém gelu dle 3.3.1.1.1.2. Jako standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder.

3.3.1.2 Příprava DNA pro tvorbu konstruktů pro delecí vybraných genů *C. purpurea*

Pro přípravu delečních konstruktů byly 5' OS a 3' OS cílových genů amplifikovány metodou PCR pomocí Phusion High-Fidelity DNA polymerasy dle 3.3.1.1.1.1. Jako templát byla použita gDNA *C. purpurea* 20.1 nebo plasmidy *pDRIVE::5' OS lpsA2* a *pDRIVE::3' OS lpsA2*.

Phleomycinová rezistenční kazeta byla amplifikována z vektoru *pRS426_Pgpd-cpble* pomocí Phusion High-Fidelity DNA polymerasy dle 3.3.1.1.1.1.

Velikost získaných DNA ampliconů byla ověřena elektroforézou v agarosovém gelu dle 3.3.1.1.1.2. Jako standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder.

3.3.1.3 Restrikce shuttle vektoru

Vektory použité pro kvasinkové rekombinační klonování byly štěpeny restrikními endonukleasami. Restrikní směs vždy obsahovala 2,5 µg shuttle vektoru, 2,5U enzymu 1, případně i enzymu 2 ve 20 µl reakci (Tab. 8).

V případě linearizace *pNDH-OCT*, *pNAB-OCT*, *pNDB-OGG* a *pNDH-OGG* enzymem *NcoI*-HF byly vektory linearizovány mezi promotorem *OliC* a *mCherry* či *GFP*. V případě linearizace *pNDB-OGG* enzymem *NotI*-HF byl vektor štěpen mezi *GFP* a *Gluc* terminátorem. Při použití enzymů *NcoI*-HF a *NotI*-HF byl gen kódující GFP nebo mCherry z vektoru vyštěpen.

Tab. 8 Přehled restričních endonukleas a pufrů použitých pro štěpení shuttle vektorů použitých na kvasinkové rekombinační klonování.

Vektor	Enzym 1	Enzym 2	Pufr (10x)
<i>pNDH-OCT</i>	<i>NcoI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pNDH-OCT</i>	<i>NcoI</i> -HF	<i>NotI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNAB-OCT</i>	<i>NcoI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pNAB-OCT</i>	<i>NcoI</i> -HF	<i>NotI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNDB-OGG</i>	<i>NcoI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pNDB-OGG</i>	<i>NcoI</i> -HF	<i>NotI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNDB-OGG</i>	<i>NotI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pNDH-OGG</i>	<i>NcoI</i> -HF	-	Cut Smart
<i>pNDH-OGG</i>	<i>NcoI</i> -HF	<i>NotI</i> -HF	Cut Smart
<i>pRS426</i>	<i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i> -HF	Cut Smart

Velikost získaných DNA fragmentů byla ověřena pomocí elektroforézy v agarosovém gelu dle 3.3.1.1.2. Jako standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder.

3.3.1.4 Ošetření vektoru alkalickou fosfatase

Linearizovaný shuttle vektor byl před transformací *S. cerevisiae* ošetřen alkalickou fosfatase (Tab. 9). Po 10 min inkubaci při 37°C byla alkalická fosfatase inaktivována 5 min při 75°C.

Tab. 9 Ošetření restriční směsi alkalickou fosfatase.

Složka	Objem [μl]
10x pufr pro alkalickou fosfatase	2
Alkalická fosfatase (1000 U.ml ⁻¹)	1
Restriční směs obsahující naštěpený shuttle vektor	10
Nuclease-free H ₂ O	7
Celkový objem	20

3.3.1.5 Transformace *S. cerevisiae* a *E. coli*

3.3.1.5.1 Příprava buněk *S. cerevisiae*

První den byla pomocí sterilního párátko ve flowboxu přenesena kolonie uracil-auxotrofního kmene *S. cerevisiae* FGSC 9721 z YPD agaru do 5 ml YPD média, inkubace při 28°C do dalšího dne na třepačce (200 rpm).

Druhý den byly 2 ml narostlé kultury *S. cerevisiae* přepipetovány do 50 ml YPD média ve 250 ml Erlenmayerově baňce, inkubace při 28°C na třepačce (200 rpm) do doby než OD₆₀₀ ≈ 1 (cca 4 h).

50 ml narostlé kultury *S. cerevisiae* bylo centrifugováno v 50 ml Falcon zkumavce po dobu 10 min (5600 g, RT). Pelet byl promyt 50 ml sterilní vody, centrifugace 10 min (5600 g, RT). Pelet byl resuspendován v 1 ml 100 mmol.l⁻¹ octanu lithného, centrifugace 10 min (5600 g, RT). Pelet byl resuspendován ve 400 µl 100 mmol.l⁻¹ octanu lithného.

3.3.1.5.2 Transformace *S. cerevisiae*

Ve flowboxu byly nachystány 1,5 ml mikrozukavky, přičemž jedna mikrozukavka vždy sloužila jako pozitivní kontrola transformace a jedna jako negativní kontrola transformace. Do nachystaných 1,5 ml mikrozukavek byly napipetovány chemikálie a DNA dle Tab. 10. V případě pozitivní kontroly byl do mikrozukavky napipetován pouze nenaštěpený vektor (2,5 µg), v případě negativní kontroly bylo do mikrozukavky napipetováno pouze 1,5 µl naštěpeného vektoru.

DNA ze spermií lososa (přenašeč DNA) o koncentraci 10 mg.ml⁻¹ a objemu 100 µl v 1,5 ml mikrozukavce byla denaturována 5 min při 95°C, inkubace 5 min na ledu.

Do 360 µl připravené transformační směsi bylo napipetováno 10 µl připravené denaturované DNA ze spermií lososa a 50 µl buněčné suspenze *S. cerevisiae*. Po 30 min inkubaci při 30°C byly směsi inkubovány 30 min při 42°C. Směs byla krátce stočena na pikofuze a větší část supernatantu byla odpipetována. Pelet byl resuspendován ve zbylém supernatantu a pomocí sterilní hokejky byla směs ve flowboxu rozetřena na misky s SD agarem bez uracilu, inkubace při 28°C 3 dny.

Po třech dnech byl ve flowboxu na SD-Ura agar s narostlými koloniemi *S. cerevisiae* napipetován 1 ml SD-Ura média a pomocí sterilní hokejky byly v médiu kolonie *S. cerevisiae* resuspendovány. Vzniklá suspenze buněk byla přepipetována do 4 ml SD-Ura média, inkubace 2 h při 28°C na třepačce (200 rpm).

Tab. 10 Chemikálie a DNA použité na transformaci *S. cerevisiae* FGSC 9721.

Chemikálie, DNA	Množství [µl]
50% PEG 3350	240
1 mol.l ⁻¹ LiOAc	36
naštěpený shuttle vektor (<i>pRS426</i> , <i>pNAB-OCT</i> , <i>pNDH-OCT</i> , <i>pNDB-OGG</i> , <i>pNDH-OGG</i>)	1,5
PCR fragment (deleční konstrukty - 5' OS, Phleomycinová rezistenční kazeta, 3' OS konstrukty pro expresi genů - gen s/bez stop kodonu)	5
Doplněno do 360 µl nuclease-free vodou	

3.3.1.5.3 Izolace plasmidové DNA z *S. cerevisiae*

Ze 4 ml kultury *S. cerevisiae* v SD-Ura médiu byla izolována plasmidová DNA pomocí alkalické lýze dle 3.3.1.1.1.6. Poté, co byl pelet resuspendován v P1 roztoku, byly do směsi přidány skleněné kuličky 425-600 µm k rozrušení buněčné stěny. Pelet DNA byl resuspendován ve 20 µl nuclease-free vody. Na Nanodropu byla změřena koncentrace získané DNA.

Získaná plasmidová DNA byla použita na transformaci *E. coli* dle 3.3.1.1.1.6. Plasmidová DNA izolovaná z bakteriálních kultur *E. coli* byla podrobena restriční analýze (Tab 11, 12) a PCR.

Na kontrolní PCR byla použita GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa dle 3.3.1.1.1.8. V případě delečních konstruktů byly použity kombinace primerů 5F + Phleo Hi3f2 a Phleo out Hefe3 + 3R, v případě konstruktů pro expresi genů byly použity primery PoliC_OE_sek1_fw, Ttub SR1 nebo Tgluv_rev. Primer Phleo Hi3f2 nasedá do terminátoru Phleomycinové rezistenční kazety, Phleo out Hefe3 nasedá do čtecího rámce Phleomycinové rezistenční kazety, PoliC_OE_sek1_fw nasedá do promotoru *OliC*, Ttub_rev nasedá do *Tub* terminátoru a Tgluc_rev nasedá do *Gluc* terminátoru. Získané DNA fragmenty byly analyzovány v agarosovém gelu dle 3.3.1.1.1.2. Jako standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder.

Tab. 11 Restriční endonukleasy a pufrы použité pro restriční analýzu pro ověření přítomnosti DNA insertu v *pNDH-OCT*, *pNAB-OCT*, *pNDB-OGG* nebo *pNDH-OGG* s/bez fluorescenční značky.

Plasmid	Enzym 1	Enzym 2	Pufr (10x)
<i>pNDH-OCT::CpLDS1mCherry</i> ⁺	<i>EcoRI</i> -HF	<i>PvuI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNDH-OCT::CpLDS1 mCherry</i> ⁻	<i>EcoRI</i> -HF	<i>PvuI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNDH-OCT::CpTF1 mCherry</i> ⁺	<i>SnaBI</i>	<i>NheI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNDH-OCT::CpFAH mCherry</i> ⁺	<i>SnaBI</i>	<i>BamHI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNDH-OCT::CpFAH mCherry</i> ⁻	<i>SnaBI</i>	<i>BamHI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNDH-OGG::lpsA1 gfp</i> ⁺	<i>SnaBI</i>	-	Cut Smart
<i>pNDH-OGG::lpsA1 gfp</i> ⁻	<i>SnaBI</i>	-	Cut Smart
<i>pNDB-OGG::dmaW gfp</i> ⁺ (GFP na C-konci)	<i>NheI</i>	<i>XbaI</i>	NEB 2.1
<i>pNDB-OGG::dmaW gfp</i> ⁺ (GFP na N-konci)	<i>NheI</i>	<i>XbaI</i>	NEB 2.1
<i>pNDB-OGG::dmaW gfp</i> ⁻	<i>NheI</i>	<i>XbaI</i>	NEB 2.1
<i>pNAB-OCT::CpYUCCA mCherry</i> ⁺	<i>EcoRI</i> -HF	<i>SpeI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNAB-OCT::CpYUCCA mCherry</i> ⁻	<i>EcoRI</i> -HF	<i>SpeI</i> -HF	Cut Smart
<i>pNDH-OCT::CpIaaH mCherry</i> ⁺	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>	NEB 2.1
<i>pNDH-OGG::CpIaaH gfp</i> ⁺	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>	NEB 2.1
<i>pNDB-OGG::CpIaaH gfp</i> ⁺	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>	NEB 2.1
<i>pNDH-OCT::CpTF2 mCherry</i> ⁺	<i>EcoRI</i> -HF	<i>EcoRV</i> -HF	Cut Smart

Tab. 12 Restrikční endonukleasy a pufrы použité pro restrikční analýzu pro ověření přítomnosti DNA insertů v *pRS426*.

Plasmid	Enzym	Pufr (10x)
<i>pRS426::ΔCpLDS1</i>	<i>BamHI</i> -HF	Cut Smart
<i>pRS426::ΔCpTF1</i>	<i>BamHI</i> -HF	Cut Smart
<i>pRS426::ΔCpFAH</i>	<i>EcoRI</i> -HF	Cut Smart
<i>pRS426::ΔlpsA2</i>	<i>BamHI</i> -HF	Cut Smart
<i>pRS426::ΔCpTF2</i>	<i>EcoRI</i> -HF	Cut Smart

Shuttle vektory obsahující DNA inserty byly opět přečištěny pomocí QIASpin MiniPrep kitu (Qiagen, USA) dle 3.3.1.1.9. Přítomnost DNA insertu byla ověřena sekvenováním (Segme s. r. o.).

3.3.2 Transformace *C. purpurea*

Za účelem funkčního ověření připravených konstruktů byly plasmidy *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁺* a *pNDH-OGG::lpsA gfp^I* společně s *pNDH-OGG* (volné GFP) použity na transformaci *C. purpurea* 20.1 a *C. purpurea* Gal404.

3.3.2.1 Příprava DNA

3.3.2.1.1 Izolace plasmidové DNA pomocí NucleoBond Xtra kitu

První den bylo 10 μ l kultury *E. coli* TOP10 nesoucí *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁺*, *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁻* nebo *pNDH-OGG* napipetováno do 5 ml LB média s ampicilinem (výsledná koncentrace v médiu 100 μ g.ml⁻¹), inkubace do dalšího dne při 37°C na třepačce (200 rpm).

Následující den bylo 400 μ l narostlé kultury *E. coli* přepipetováno do 200 ml LB média s ampicilinem (výsledná koncentrace v médiu 100 μ g.ml⁻¹), inkubace do dalšího dne při 37°C na třepačce (200 rpm).

Další den byla z 200 ml narostlé kultury *E. coli* izolována plasmidová DNA pomocí NucleoBond Xtra MidiPrep kitu (Macherey Nagel, Německo). Po 20 min centrifugaci (5600 g, 4°C) kultury byl pelet resuspendován v 8 ml RES pufru a směs byla přepipetována do nové 50 ml Falcon zkumavky. Ke směsi bylo napipetováno 8 ml Lyzačního pufru, směs byla promíchána převrácením zkumavky 5 x. Po 5 min inkubaci při RT bylo do směsi přidáno 8 ml Neutralizačního pufru, směs byla promíchána otočením zkumavky 5 x. NucleoBondXtra kolonka byla společně s vloženým filtrem

upevněna na 50 ml Falcon zkumavku, která sloužila k odchytku tekutého odpadu. Kolonka byla společně s vloženým filtrem ekvilibrována 12 ml Ekvilibračního pufru. Poté byla na filtr nalita homogenní suspenze precipitátu. Kolonka s filtrem byly promyty 5 ml Ekvilibračního pufru. Filtr byl odstraněn a na kolonku bylo napipetováno 8 ml Promývacího pufru. Poté byla kolonka upevněna na novou 50 ml Falcon zkumavku a DNA byla eluována 5 ml Elučního pufru (50°C).

3.3.2.1.2 Precipitace DNA octanem sodným a isopropanolem

Plasmidová DNA izolovaná pomocí NucleoBond Xtra MidiPrep kitu byla precipitována octanem sodným a isopropanolem. K 5 ml plasmidové DNA bylo napipetováno 500 µl 3M octanu sodného (pH = 5,2) a 3,5 ml isopropanolu. Směs byla promíchána, centrifugace 30 min (21000 g, 4°C). Pelet byl promyt 1,5 ml 70% ethanolu (-20°C), centrifugace 10 min (21000 g, 4°C). Pelet byl vysušen a resuspendován v 600 µl nuclease-free vody. Na Nanodropu byla změřena koncentrace získané DNA.

Izolované plasmidy (200 µg) byly linearizovány restriční endonukleasou *SbfI* s použitím Cut Smart pufru. Poté, co byla v agarosovém gelu dle 3.3.1.1.1.2 zkontrolována velikost linearizovaného plasmidu, byla restriční směs přečištěna pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu (Macherey Nagel, Německo) dle 3.3.1.1.1.3.

3.3.2.2 Příprava protoplastů

První den bylo 50 ml BII kultivačního média v 50 ml Erlenmayrově baňce inokulováno *C. purpurea* 20.1 nebo *C. purpurea* Gal404, inkubace 3 dny při 28°C na třepačce (200 rpm) ve tmě.

Po třech dnech bylo 50 ml narostlé kultury centrifugováno v 50 ml Falcon zkumavce po dobu 10 min (5600 g, RT). Mycelium bylo promyto 50 ml SmaC pufru, centrifugace 10 min (5600 g, RT). K myceliu bylo nalito 20 ml Protoplastizačního roztoku, inkubace 2 h při 28°C na třepačce (80 rpm). Po 2 h byla směs zfiltrována přes Nytexovou membránu, filtrát byl centrifugován 10 min (900 g, RT). Získané protoplasty byly 2x promyty 5 ml STC pufru, centrifugace vždy 10 min (900 g, RT). Pelet byl resuspendován v 1 ml STC pufru.

Pod mikroskopem byla v Bürkerově komůrce zkontrolována hustota získaných protoplastů (optimální hustota $5 \cdot 10^8$ protoplastů v 1 ml STC pufru).

3.3.2.3 Transformace protoplastů

Ve flowboxu byla do 12 ml Falcon zkumavky napipetována transformační směs - 10 μl (5-10 μg) přečištěné linearizované plasmidové DNA, 90 μl STC pufru a 100 μl protoplastů. Po 20 min inkubaci směsi při RT byly do zkumavky napipetovány 2 ml PEG roztoku. Po 5 min inkubaci při RT byly do směsi napipetovány 4 ml STC pufru.

Na transformace bylo ve flow-boxu přichystáno 200 ml BII transformačního agarů (50°C) a 10 Petriho misek. Do první Petriho misky bylo nalito 20 ml BII agarů a napipetováno 11 μl protoplastů. Tato miska sloužila pro kontrolu protoplastizace (zda jsou získané protoplasty schopné růstu). Do druhé misky bylo nalito 20 ml BII agarů a přidáno 690 μl transformační směsi. Tato miska sloužila pro kontrolu transformace (zda nebyly protoplasty během transformace usmrceny). Do zbylých 8 misek bylo rozlito 160 ml BII agarů, přičemž do každé misky bylo napipetováno 690 μl transformační směsi.

Po 24 h bylo 8 Petriho misek s BII agarem a transformační směsí převrstveno 10 ml BII transformačního agarů (50°C) s hygromycinem (koncentrace hygromycinu v použitých 10 ml BII agarů byla 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), inkubace 9 dní při 28°C ve tmě.

Po 9 dnech byla narostlá mycelia *C. purpurea* přenesena na BII agar pro selekci s hygromycinem (výsledná koncentrace v médiu byla 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

3.3.3 Ověření transformace *C. purpurea*

3.3.3.1 Izolace genomové DNA *C. purpurea*

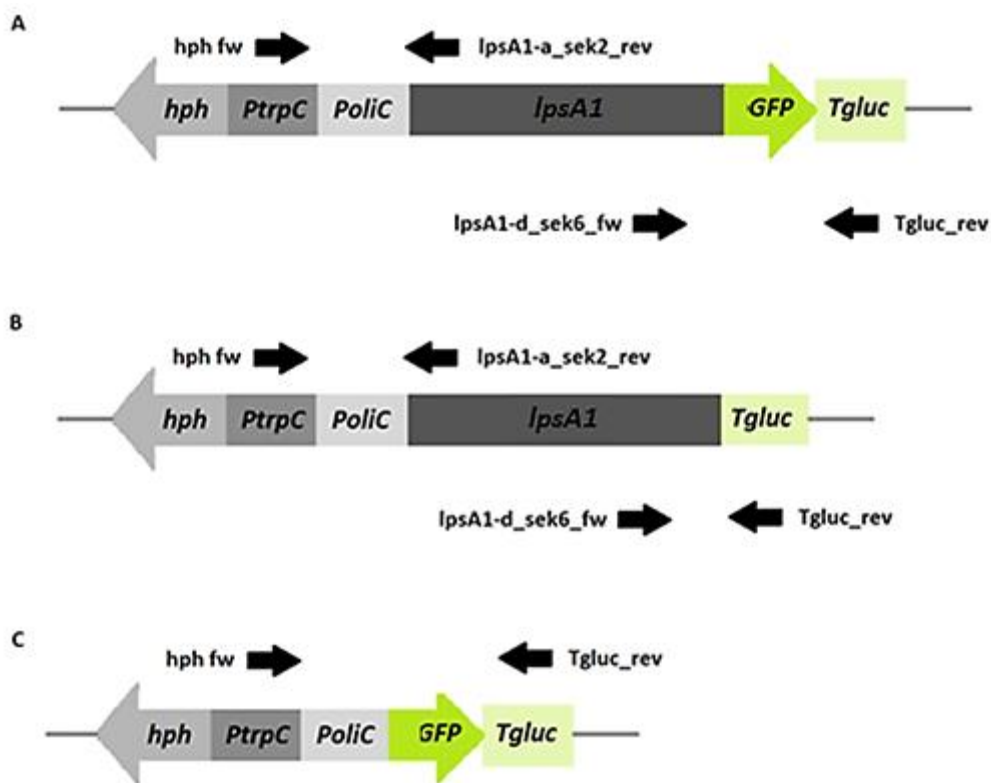
Den před izolací genomické DNA byly ve flowboxu vyřezány části mycelií předpokládaných transformantů *C. purpurea*. Mycelia byla přenesena do 2 ml mikrozkuvek, jejichž víčka byla propíchnuta sterilní jehlou. Mikrozkuvky byly umístěny do kádinky, zality tekutým dusíkem a lyofilizovány přes noc.

Následující den bylo každé mycelium přeneseno do nové 2 ml mikrozkuvky, zalito tekutým dusíkem a pomocí špachtle rozdrceno. Ke vzorku bylo napipetováno 600 μl Lyzačního pufru. Po 20 min inkubaci na třepačce (200 rpm) při RT bylo ke vzorku s Lyzačním pufrem napipetováno 400 μl 5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanu draselného, inkubace 20 min (-20°C). Po 20 min centrifugaci (14 000 rpm, 4°C) byl supernatant společně s 1 ml Isopropanolu přepipetován do nových 2 ml mikrozkuvek. Obsah mikrozkuvek byl promíchán, inkubace 45 min (-20°C). Po 30 min centrifugaci

(14 000 rpm, 4°C) byl pelet promyt 500 µl 70% ethanolu (-20°C), centrifugace 5 min (14 000 rpm, 4°C). Poté, co byl pelet vysušen, byl resuspendován v 50 µl nuclease-free vody. Na Nanodropu byla změřena koncentrace získané DNA.

3.3.3.2 Diagnostická PCR

Získaná gDNA byla dále použita jako templát pro diagnostickou PCR (Obr. 13) s použitím GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy dle 3.3.1.1.8 za účelem ověření přítomnosti plasmidů použitých na transformaci. Jako pozitivní kontroly byly použity plasmidy *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁺*, *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁻* a *pNDH-OGG*. DNA amplikony byly analyzovány v agarosovém gelu dle 3.3.1.1.2. Jako standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder.



Obr. 13 Schéma nasadnutí primerů použitých na diagnostickou PCR. A - *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁺*, B - *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁻*, C - *pNDH::OGG*.

3.3.4 Monosporická izolace

Transformanti *C. purpurea* byli pěstováni na sporulačním Mantle agaru po dobu 3 týdnů při 28°C na světle. Po třech týdnech byly na každou misku napipetovány 3 ml vody. Spóry *C. purpurea* byly z agaru setřeny pomocí sterilní gumové tyčinky, směs byla filtrována přes skelnou vatu do nové 1,5 ml zkumavky.

Spóry byly ředěny vodou 10x, 100x a 1000x. Následně bylo 200 µl roztoku spór z každého ředění napipetováno na BII agar pro selekci s hygromycinem (finální koncentrace v médiu 200 µg.ml⁻¹) a na BII kultivační agar.

Po 48 h a po 72 h byly z BII agarů s hygromycinem pod stereomikroskopem vyřezány klíčící spóry, které byly přeneseny na nový BII agar s hygromycinem (finální koncentrace v médiu 200 µg.ml⁻¹), kultivace 7 dní.

Po týdnu byla z narostlých mycelií *C. purpurea* izolována gDNA dle 3.3.3.1.1, přítomnost *pNDH-OGG::lpsA1 gfp*⁺, *pNDH-OGG::lpsA1 gfp*⁻ a *pNDH-OGG* byla opět potvrzena diagnostickou PCR dle 3.3.3.2.

3.3.5 qPCR

3.3.5.1 Příprava biologického materiálu

Transformanti *C. purpurea* získaní z monosporické izolace byly společně s odpovídajícími WT kontrolami kultivovány v 50 ml BII kultivačního média ve 250 ml Erlenmayerových baňkách na třepačce (200 rpm) při 28°C ve tmě po dobu 3 dní.

Po 3 dnech byla mycelia filtrována přes Miracloth membránu a opatrně přenesena do nových 50 ml Falcon zkumavek, ve kterých byla zalita tekutým dusíkem. Poté, co byla víčka Falcon zkumavek propíchnuta sterilní jehlou, byly zkumavky umístěny do lyofilizátoru, lyofilizace probíhala přes noc.

Následující den bylo lyofilizované mycelium ve třetí misce zalito tekutým dusíkem a pomocí tloučku rozdceno. Takto připravený materiál byl použit na izolaci RNA.

3.3.5.2 Izolace RNA

Z 10 mg lyofilizovaného mycelia *C. purpurea* byla pomocí RNAqueous Total RNA Isolation kitu (Ambion, USA) izolována RNA. Ke vzorku ve 2 ml mikrozkušavce byl napipetován 1 ml Lyzačního pufru. Po 15 min inkubaci na třepačce (200 rpm) při RT byl vzorek centrifugován po dobu 5 min (21000 g, RT). Supernatant byl společně s 1 ml

64% ethanolu přepipetován do nové 2 ml mikrozkušavky. Směs byla postupně po 700 μ l přepipetována do kolonky se sběrnou mikrozkušavkou, centrifugace vždy 30 s (11 000 g, RT). Směs, která kolonkou protékla, byla odstraněna. Kolonka byla promyta 700 μ l Promývacího pufru 1, centrifugace 30 s (11000 g, RT). Poté byla kolonka 2 x promyta 500 μ l Promývacího pufru 2/3, centrifugace vždy 30 s (11000 g, RT). Poté, co byla kolonka centrifugována naprázdno po dobu 30 s (11000 g, RT), byla přenesena do nové sběrné mikrozkušavky a bylo na ni napipetováno 60 μ l Elučního pufru (80°C). Po 1 min inkubaci při RT následovala centrifugace 1 min (11000 g, RT). Na kolonku bylo napipetováno dalších 40 μ l Elučního pufru (80°C). Po 1 min inkubaci při RT opět následovala centrifugace 1 min (11000 g, RT). Kolonka byla odstraněna a na NanoDropu byla změřena koncentrace získané RNA.

Ze získané RNA byla odstraněna kontaminace DNA. K 50 μ l RNA bylo napipetováno 6 μ l 10x reakčního pufru pro Turbo DNasu a 2 μ l Turbo DNasy (2000 U.ml⁻¹), inkubace při 37°C po dobu 45 min. Poté byly do směsi napipetovány další 2 μ l Turbo DNasy (2000 U.ml⁻¹), inkubace opět při 37°C po dobu 45 min.

K přečištění RNA byl použit roztok chloridu lithného, který je součástí RNAqueous Total RNA Isolation kitu. K 60 μ l RNA bylo napipetováno 30 μ l LiCl, inkubace při - 20°C přes noc. Další den byla směs centrifugována 20 min (14 000 rpm, 4°C). Pelet byl promyt 1 ml 70% ethanolu, centrifugace 5 min (14 000 rpm, 4°C). Poté, co byl pelet vysušen, byl rozpuštěn ve 25 μ l nuclease-free vody. Na NanoDropu byla změřena koncentrace získané RNA.

3.3.5.3 Přepis RNA na cDNA

Ke 2 μ g RNA byl napipetován 1 μ l 100 μ mol.l⁻¹ Oligo(dT) primeru, objem směsi byl doplněn nuclease-free vodou na 13 μ l. Reakční směs byla inkubována 5 min při 65°C, poté byla ihned přenesena na led. Na ledu byly do reakční směsi přidány 2 μ l dNTP o koncentraci 10 mmol.l⁻¹, 4 μ l 5x reakčního pufru pro reverzní transkriptasu a 1 μ l RevertAid H Minus reverzní transkriptasy (200000 U.ml⁻¹), směs byla inkubována 60 min při 42°C a poté 10 min při 70°C. Získaná cDNA byla ředěna 30x nuclease-free vodou.

3.3.5.4 SYBR Green qPCR

K provedení qPCR byl použit gb SG PCR Master mix, který již obsahuje *Taq* DNA polymerasu, pufr, dNTP, MgCl₂ a fluorescenční barvivo SYBR Green. K této směsi byl dle Tab. 13 napipetován primer premix (1,2 μl 100 μmol.l⁻¹ fw primeru a 1,2 μl 100 μmol.l⁻¹ rev primeru ve 100 μl nuclease-free vody, oba primery nasedaly na *lpsAI*) a cDNA templát.

Reakce probíhaly v 96 jamkových destičkách MicroAmp Fast Optical, které byly překryty plastovou fólií MicroAmp Optical Adhesive Film. Každá reakce byla nastavena ve třech technických replikátech. K provedení qPCR byl použit přístroj StepOne, podmínky pro PCR byly nastaveny dle Tab. 14. Po proběhnutí PCR byla provedena analýza křivek tání, PCR směsi byly analyzovány ve 2% agarosovém gelu dle 3.3.1.1.1.3. Jako standard byl použit 50 bp DNA ladder.

Pro vyhodnocení změny expresního profilu byla použita metoda relativní kvantifikace $\Delta\Delta C_T$, pro endogenní kontrolu byly vybrány dva provozní geny *C. purpurea*: *Act* kódující γ -aktin (AEI72275.1) a *Gpd* kódující glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasu (X73282.1).

Tab. 13 Složení reakční směsi pro SYBR green qPCR.

Složka	Objem [μl]
2x gb SG PCR Master mix	4
Referenční barvivo Rox (5 μmol.l ⁻¹)	1
cDNA templát	2,5
Primer premix	2,5
Celkový objem	10

Tab. 14 Nastavení podmínek pro SYBR green RT-PCR.

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

Cyklus 2-4 byl opakován 40x.

K vyhodnocení dat byl použit program DataAssist, přičemž jednotlivé vzorky byly zařazeny do biologických skupin (jako kalibrátor byla použita odpovídající WT kontrola). DataAssist pracoval se 100% účinností primerů, v rámci vyhodnocení výsledků byly vyloučeny hodnoty C_T vyšší než 36 a technické replikáty s rozdílnými C_T hodnotami (pomocí Grubbsova testu), za pomoci metody Benjamin-Hochberga byly též odstraněny falešně pozitivní výsledky. Program každé biologické skupině přiřadil na základě nepárového dvouvýběrového t-testu p-hodnotu.

3.3.6 Western blot

Lyofilizovaná mycelia WT a transformantů *C. purpurea* exprimujících GFP nebo LPS1-GFP byla použita také na SDS-PAGE, Western blot a následnou imunodetekci. Jako pozitivní kontrola byl na Western blot použit vzorek transgenní buněčné suspenzní kultury *Arabidopsis thaliana*, ekotyp *Landsberg erecta* (LER) exprimující GFP (poskytl Mgr. David Zalabák, PhD.).

3.3.6.1 Izolace proteinů

K 10 mg lyofilizovaného mycelia v 1,5 ml mikrozkuhavce bylo napipetováno 100 μ l Extrakčního pufru, 0,5 μ l 20 mmol.l⁻¹ PMSF a 2 μ l 50x koktejlu inhibitorů proteas. V případě pozitivní kontroly byly 4 ml transgenní buněčné kultury centrifugovány po dobu 10 min (21000 g, 4°C). Získaný pelet byl ve třecí misce zalit tekutým dusíkem a pomocí tloučku rozdcen. K 0,5 g takto připraveného materiálu bylo napipetováno 500 μ l Extrakčního pufru, 2,5 μ l 20 mmol.l⁻¹ PMSF a 10 μ l 50x koktejlu inhibitorů proteas.

Po 15 min inkubaci vzorku s Lyzačním pufrům při 4°C na třepačce (200 rpm) byl vzorek centrifugován po dobu 5 min (21000 g, 4°C). Supernatant byl přepipetován do nové 1,5 ml mikrozkuhavky.

Tab. 15 Kalibrační křivka pro stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové.

BSA o koncentraci 2 mg.ml ⁻¹ (μl)	Výsledná koncentrace BSA (μg.ml ⁻¹)
1	2
2	4
3	6
4	8
5	10
6	12
7	14
8	16

3.3.6.2 Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové

V získaném proteinovém extraktu bylo metodou Bradfordové stanoveno celkové množství proteinů.

Pro vytvoření kalibrační křivky byl použit zásobní roztok BSA o koncentraci 2 mg.ml⁻¹. Požadované množství BSA (Tab. 15) bylo vždy napipetováno do 1ml připraveného činidla Bradfordové. Po 10 min inkubaci roztoku při RT byla na spektrofotometru změřena absorbance při 595 nm. Ze získaných hodnot byla sestavena kalibrační křivka. Z regresní rovnice této křivky byla vypočítána koncentrace proteinů v získaných proteinových extraktech.

3.3.6.3 SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE byla zvolena tloušťka zaostřovacího a separačního gelu 1 mm, byl použit gel o velikosti přibližně 10x10 cm. Vzhledem k velikosti GFP a LPS1 byly proteiny extrahované z *C. purpurea* exprimující GFP a z pozitivní kontroly separovány v 10% separačním gelu, proteiny extrahované z *C. purpurea* exprimující LPS1-GFP byly separovány v 5% separačním gelu. Vždy byl použit 4% zaostřovací gel.

Nejprve byl připraven separační gel. Poté, co byla polymerace gelu nastartována přidávkem TEMEDu a persíranu amonného, bylo 5 ml tohoto roztoku napipetováno mezi dělicí skla, roztok byl převrstven buthanolem, inkubace 45 min při RT.

Jakmile separační gel ztuhnul, byl z povrchu gelu odstraněn buthanol a povrch gelu byl několikrát opláchnut destilovanou vodou, zbytky vody byly z gelu odstraněny pomocí filtračního papíru. Poté byl připraven zaostřovací gel. Polymerace gelu byla opět zahájena přidávkem TEMEDu a persíranu amonného. Na povrch separačního gelu bylo napipetáno 2,5 ml zaostřovacího gelu, do gelu byl zasunut hřebínek, inkubace 45 min při RT.

Poté, co zaostřovací gel ztuhnul, byl z gelu odstraněn hřebínek a jamky byly propláchnuty destilovanou vodou. Dělicí skla s připraveným gelem byla vložena do elektroforetické vany, která byla naplněna 1x elektrodoým pufrem.

Vzorky pro SDS-PAGE byly připraveny následovně: k 15 μ l vzorku (20 μ g) v 1,5 ml mikrozkuhavce bylo napipetováno 5 μ l 4x SDS loading dye. Po 5 min inkubaci vzorku při 95°C byl vzorek přenesen na led, centrifugován 1 min (21000 g, RT).

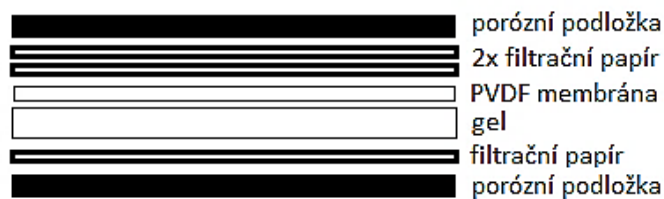
Poté, co byly jamky gelu propláchnuty 1x elektrodoým pufrem, bylo do jamek nanášeno 20 μ l vzorku. Jako standard byl použit PageRuller standard. Po nanášení vzorků a standardu na gel byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji proudu. Pro zakoncentrování vzorků v zaostřovacím gelu probíhala elektroforéza prvních 20 min při konstantním proudu 0,01 A. Jakmile začala probíhat separace proteinů v separačním gelu, byl proud zvýšen na 0,03 A po dobu 1 h. V případě použití 5% separačního gelu probíhala elektroforéza přibližně po dobu 2 h (do té doby než z gelu vyputovaly proteiny do velikosti cca 50 kDa, což bylo sledováno za pomoci SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standardu).

Po ukončení elektroforézy byl odpojen zdroj proudu, gel byl z elektroforetické vany vyjmut a inkubován 10 min při RT v 1x přenosovém pufru na třepačce (50 rpm).

3.3.6.4 Western blot

Pro Western blot byla použita PVDF membrána s velikostí pórů 0,45 μ m, která byla aktivována ponořením do methanolu po dobu 30 s.

Pro přenos proteinů z SDS polyakrylamidového gelu na membránu bylo připraveno 950 ml 1x Přenosového pufru, na celkový objem 1 l byl pufr doplněn 50 ml methanolem. Aktivovaná PVDF membrána byla přenesena do 1x Přenosového pufru s methanolem, inkubace 10 min při RT na třepačce (50 rpm). Pro Western blot byl poskládán tzv. sandwich dle Obr. 14. Po odstranění vzduchových bublin byl sandwich umístěn do blotovací komůrky, která byla naplněna 1x Přenosovým pufrem s methanolem. Komůrka byla uzavřena, připojena ke zdroji napětí a umístěna do lednice. Přenos probíhal nejdříve 90 min při 100 V, poté bylo napětí sníženo na 15 V přes noc.



Obr. 14 Sandwichové uspořádání Western blotu.

3.3.6.5 Barvení PVDF membrány roztokem Amidočerně

Pro ověření úspěšnosti přenosu proteinů z SDS polyakryamidového gelu na PVDF membránu, byla membrána po přenosu inkubována 30 s v Roztoku amidočerně. Poté byla membrána opláchnuta destilovanou vodou. Pro úplné odbarvení byla membrána inkubována v destilované vodě po dobu 30 min při RT na třepačce (50 rpm).

Pro snadnější orientaci byl na membráně tužkou vyznačen Standard a jamky.

3.3.6.6 Imunodetekce

Všechny následující inkubace probíhaly při RT na třepačce (50 rpm).

PVDF membrána byla inkubována 90 min v Blokovacím roztoku. Poté byla membrána opláchnuta v TBS-T pufru po dobu 1 min. K 10 ml Blokovacího roztoku bylo nalito 40 ml TBS-T pufru. Do 2 ml takto připraveného roztoku byly napipetovány 2 μ l primární protilátky AntiGFP (ředění 1:1000). Membrána byla inkubována po dobu 90 min v roztoku s primární protilátkou. Poté byla membrána promyta 1 x 5 min v TBS pufru a 2 x 5 min v TBS-T pufru. Do 25 ml naředěného Blokovacího roztoku bylo napipetováno 5 μ l sekundární protilátky (ředění 1:5000). Vzhledem k tomu, že primární protilátka AntiGFP byla produkována v králíkovi, byla jako sekundární protilátka použita kozí protilátka proti králíčím imunoglobulinům Goat anti-Rabbit značená křenovou peroxidasou. Po 90 min inkubaci membrány v blokovacím roztoku se sekundární protilátkou, byla membrána promyta 1 x 10 min v TBS-T pufru a poté 2 x 10 min v TBS pufru. Nakonec bylo na membránu napipetováno 6 ml Super Signal West Pico Chemiluminiscenčního substrátu. Chemiluminiscenční signál byl detekován pomocí dokumentačního systému ChemiDoc MP.

3.3.7 Imunoprecipitace GFP-fúzních proteinů

3.3.7.1 GFP-Trap_A

Pro imunoprecipitaci GFP-fúzních proteinů pomocí GFP-Trap_A bylo k 30 mg lyofilizovaného mycelia WT nebo transformantů *C. purpurea* v 1,5 ml mikrozkuhavce bylo napipetováno 300 μl Lyzačního pufru, 1,5 μl 20 mmol.l^{-1} PMSF a 6 μl 50x koktejlu inhibitorů proteas. Směs byla inkubována na ledu po dobu 30 min, přičemž každých 10 minut byla směs pomocí pipety promíchána. Poté bylo ke směsi přidáno 700 μl Ředícího pufru s 3,5 μl 20 mmol.l^{-1} PMSF a 14 μl 50x koktejlu inhibitorů proteas. Z naředěné směsi bylo odebráno 50 μl vzorku na SDS-PAGE (označeno jako lyzát).

Všechny následující centrifugace probíhaly při 2500 g a 4°C. 25 μl GFP-Trap_A (malý rekombinantní fragment V_HH anti-GFP protilátky produkovaný v alpace kovalentně navázaný na 90 μm agarosové kuličky, dále jen agarosové kuličky) v 1,5 ml mikrozkuhavce bylo ekvilibrováno 500 μl Ředícího pufru (4°C), centrifugace 2 min. Poté, co byl supernatant byl odpipetován, byl tento krok 2 x opakován. K agarosovým kuličkám byl napipetován 1 ml lyzátu. Po 1 h inkubaci směsi na třepače (200 rpm) při 4°C byla směs centrifugována po dobu 2 min. Ze získaného supernatantu bylo odebráno 50 μl vzorku pro následnou SDS-PAGE (označeno jako nenavázané proteiny). Zbylý supernatant byl odpipetován a agarosové kuličky byly promyty 500 μl Promývacího pufru (4°C), centrifugace 2 min. Poté byly agarosové kuličky promyty 500 μl Promývacího pufru s vyšší koncentrací chloridu sodného (4°C), centrifugace 2 min. Na závěr byly kuličky promyty 500 μl Promývacího pufru (4°C), centrifugace 2 min. Ke kuličkám bylo napipetováno 50 μl Elučního pufru a po 30 s, kdy byla směs intenzivně promíchávána pomocí pipety, byla směs centrifugována po dobu 2 min. Supernatant byl přepipetován do nové 1,5 ml mikrozkuhavky, pro neutralizaci bylo k supernatantu ihned napipetováno 5 μl 1 mol.l^{-1} Tris (pH = 10,3). Takto připravený vzorek byl použit na SDS-PAGE (označeno jako navázané proteiny).

3.3.7.2 Western blot a barvení SDS polyakrylamidových gelů stříbrem

Vzorky označené jako lyzát, nenavázané proteiny a navázané proteiny byly separovány ve dvou SDS polyakrylamidových gelech, přičemž proteiny v jednom gelu byly po proběhnutí SDS-PAGE dle 3.3.6.3 vizualizovány stříbrem a druhý gel byl použit na Western blot a následnou imunodetekci dle 3.3.6.4, 3.3.6.5 a 3.3.6.6.

Při barvení proteinů v SDS polyakryamidovém gelu se postupovalo následovně (všechny inkubace probíhaly na třepačce při 60 rpm a RT, všechny použité roztoky byly připraveny vždy těsně před jejich použitím): gel byl nejdříve inkubován 30 min v Roztoku 1, poté 15 min v Roztoku 2. Následně byl gel 3 x opláchnut destilovanou vodou, inkubace vždy 5 min. Poté byl gel inkubován 1 min v Roztoku thiosíranu sodného a následně byl opláchnut 3 x destilovanou vodou, inkubace vždy 30 s. Po 20 min inkubaci gelu v Roztoku 3 obsahujícím dusičnan stříbrný a formaldehyd, byl na gel nalit Vyvíjecí roztok. V závislosti na zbarvení gelu byl gel cca po 3-10 min přesunut do Zastavovacího roztoku. Pomocí dokumentačního systému ChemiDoc MP byl pořízen snímek gelu.

3.3.8 Epifluorescenční mikroskopie

Mikroskopické preparáty vzorků byly připraveny následujícím způsobem: na podložní sklo byl napipetován 1 ml Gamborg B5 média, po ztuhnutí média byl na povrch umístěn malý čtverec mycelia. Podložní sklo se vzorkem bylo umístěno do Petriho misky s navlhčenými papírovými ubrousky, inkubace 2 dny ve tmě při 28°C.

Po dvou dnech byl čtverec mycelia z povrchu média odstraněn, na zbylou narostlou část vzorku bylo napipetováno přibližně 100 μ l Hoechstova barviva 22358 o koncentraci 50 μ g.ml⁻¹. Takto připravený preparát byl překryt krycím sklíčkem.

Preparáty byly snímány pod epifluorescenčním mikroskopem Axio Imager M2 (GFP – excitace 488 nm, emise – 509 nm; Hoechst 22358 – excitace 352 nm, emise - 461 nm). Obrázky byly zpracovány v Zeiss ZEN Blue softwaru (Ver.2010a).

3.3.9 Očkování žita

Klasy sterilního žita byly inokulovány získanými transformanty a odpovídající WT kontrolami.

WT a transformanti *C. purpurea* byli pěstováni po dobu 3 týdnů na sporulačním Mantle agaru při 28°C na světle, spóry byly získány dle 3.3.4. Pod světelným mikroskopem bylo v Bürkerově komůrce spočítáno množství spór, výsledná koncentrace spór v 1 ml vody byla vždy upravena na přibližnou hodnotu 12.10⁸. Získané inokulum bylo pomocí pipety aplikováno na klasy žita ve fázi kvetení. Žito bylo pěstováno ve skleníku za následujících podmínek: 16 h světlo/8 h tma (15-20°C).

4 VÝSLEDKY

4.1 Kvasinkové rekombinační klonování

Pomocí kvasinkového rekombinačního klonování byly připraveny konstrukty pro konstitutivní expresi (Tab. 16) a delecí (Tab. 17) vybraných genů *C. purpurea*.

Tab. 16 Přehled připravených konstruktů pro konstitutivní expresi vybraných genů *C. purpurea*. *Hph* - gen rezistence na Hygromycin, *ble* - gen rezistence na Phleomycin.

Gen	Vektor	Gen rezistence na antibiotikum	Značka	Umístění značky
<i>CpLDS1</i>	<i>pNDH-OCT</i>	<i>hph</i>	mCherry	C-konec proteinu
<i>CpLDS1</i>	<i>pNDH-OCT</i>	<i>hph</i>	-	-
<i>CpTF1</i>	<i>pNDH-OCT</i>	<i>hph</i>	mCherry	C-konec proteinu
<i>CpFAH</i>	<i>pNDH-OCT</i>	<i>hph</i>	mCherry	C-konec proteinu
<i>CpFAH</i>	<i>pNDH-OCT</i>	<i>hph</i>	-	-
<i>lpsA1</i>	<i>pNDH-OGG</i>	<i>hph</i>	GFP	C-konec proteinu
<i>lpsA1</i>	<i>pNDH-OGG</i>	<i>hph</i>	-	-
<i>dmaW</i>	<i>pNDB-OGG</i>	<i>ble</i>	GFP	C-konec proteinu
<i>dmaW</i>	<i>pNDB-OGG</i>	<i>ble</i>	GFP	N-konec proteinu
<i>dmaW</i>	<i>pNDB-OGG</i>	<i>ble</i>	-	-
<i>CpYUCCA</i>	<i>pNAB-OCT</i>	<i>ble</i>	mCherry	C-konec proteinu
<i>CpYUCCA</i>	<i>pNAB-OCT</i>	<i>ble</i>	-	-
<i>CpIaaH</i>	<i>pNDH-OCT</i>	<i>hph</i>	mCherry	C-konec proteinu
<i>CpIaaH</i>	<i>pNDH-OGG</i>	<i>hph</i>	GFP	C-konec proteinu
<i>CpIaaH</i>	<i>pNDB-OGG</i>	<i>hph</i>	GFP	C-konec proteinu
<i>CpTF2</i>	<i>pNDH-OCT</i>	<i>hph</i>	mCherry	C-konec proteinu

Tab. 17 Přehled připravených konstruktů pro delecí vybraných genů *C. purpurea*. *CpBle* - gen rezistence na phleomycin (kodon optimalizované na *C. purpurea*).

Gen, pro který byl připraven deleční konstrukt	Vektor	Gen rezistence
<i>CpLDS1</i>	<i>pRS426</i>	<i>CpBle</i>
<i>TF1</i>	<i>pRS426</i>	<i>CpBle</i>
<i>CpFAH</i>	<i>pRS426</i>	<i>CpBle</i>
<i>lpsA2</i>	<i>pRS426</i>	<i>CpBle</i>
<i>TF2</i>	<i>pRS426</i>	<i>CpBle</i>

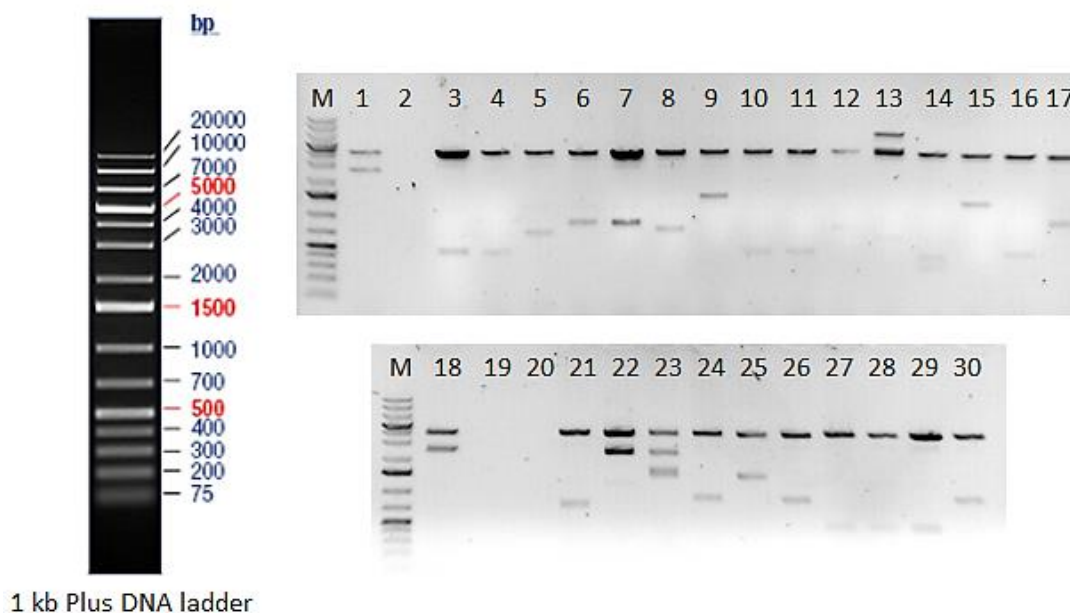
4.1.1 Příprava DNA pro tvorbu konstruktů pro konstitutivní expresi vybraných genů *C. purpurea*

4.1.1.1 Klonování do *pDRIVE* plasmidu

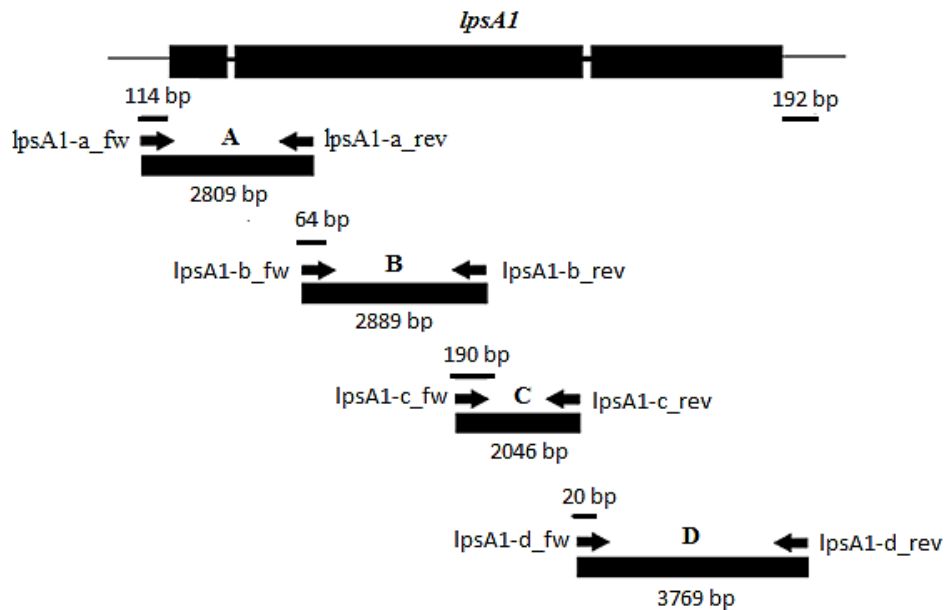
4.1.1.1.1 Gen *lpsA1*

Pomocí metody PCR byla z gDNA *C. purpurea* 20.1 amplifikována sekvence genu *lpsA1*, který kóduje neribosomální lysergylpeptidovou syntetasu LPS1. Na PCR byly použity primery *lpsA1*-a_fw a *lpsA1*-d_rev nasedající do 5' UTR a 3' UTR oblastí tohoto genu. Poté, co byla velikost získaného DNA amplikonu (11240 bp) ověřena v agarosovém gelu, byl DNA fragment z PCR směsi purifikován a ligován do *pDRIVE* plasmidu (3852 bp). Vektor *pDRIVE* s DNA insertem byl transformován do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10.

Za účelem ověření přítomnosti DNA insertu v *pDRIVE* plasmidu byla plasmidová DNA izolovaná z bakteriálních kultur podrobena restriční analýze enzymem *EcoRI*-HF (Obr. 15). Očekávaná velikost DNA fragmentů byla 3852 bp, 4488 bp a 6752 bp.



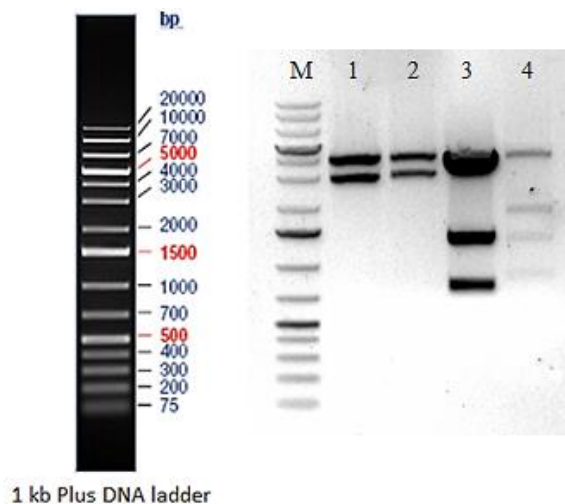
Obr. 15 Elektroforetogram plasmidů *pDRIVE::lpsA1* (1-30) po restrikci enzymem *EcoRI*-HF. M - 1kb Plus DNA ladder.



Obr. 16 Schématické znázornění rozdělení sekvence genu *lpsA1* na kratší úseky označené A-D.

Vzhledem k neúspěšnému klonování *lpsA1*, byla sekvence tohoto genu rozdělena na čtyři kratší úseky (Obr. 16), které byly amplifikovány a klonovány samostatně. Úspěšnost ligace DNA byla ověřena pomocí PCR a restrikční analýzou. Velikost DNA fragmentů po restrikci byla následující (Obr. 17):

- *pDRIVE::část A lpsA1* - 2809 bp, 3852 bp (*EcoRI*-HF)
- *pDRIVE::část B lpsA1* - 2889 bp, 3852 bp (*EcoRI*-HF)
- *pDRIVE::část C lpsA1* - 737 bp, 1309 bp, 3852 bp (*EcoRI*-HF)
- *pDRIVE::část D lpsA1* - 824 bp, 1249 bp, 1696 bp, 3852 bp (*SalI*-HF, *SphI*-HF).



Obr. 17 Elektroforetogram reprezentativních vzorků *pDRIVE* plasmidů s částmi *lpsA1* po restrikci. 1 - *pDRIVE::lpsA1* část A, 2 - *pDRIVE::lpsA1* část B, 3 - *pDRIVE::lpsA1* část C, 4 - *pDRIVE::lpsA1* část D, M - 1 kb Plus DNA ladder.

Tab. 18 Přehled počtu izolovaných plasmidů v průběhu klonování genu *lpsAI* a jeho částí do *pDRIVE* plasmidu.

Název	Počet ověřených kolonií	Z toho pozitivních
<i>pDRIVE::lpsAI</i>	30	0
<i>pDRIVE::část A lpsAI</i>	17	5
<i>pDRIVE::část B lpsAI</i>	18	4
<i>pDRIVE::část C lpsAI</i>	17	7
<i>pDRIVE::část D lpsAI</i>	38	3

Plasmidová DNA s požadovaným insertem (Tab. 18) byla purifikována a přítomnost DNA insertu byla potvrzena sekvenováním.

4.1.1.1.2 Ostatní geny

Pomocí metody PCR byly z gDNA *C. purpurea* amplifikovány sekvence genů *CpLDS1*, *CpFAH*, *dmaW*, *CpYUCCA* a *CpIaaH* (Tab. 19). Velikost DNA amplikonů byla ověřena v agarosovém gelu.

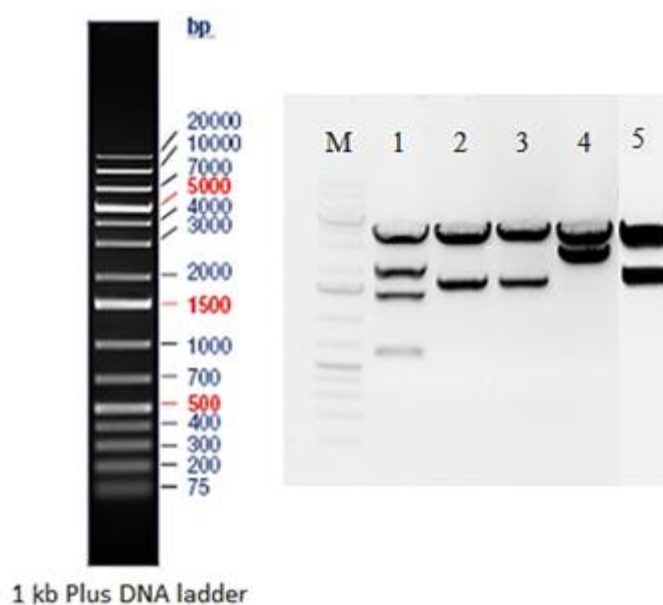
Tab. 19 Přehled DNA amplikonů, které byly klonovány do *pDRIVE* plasmidu.

Gen	Fw primer Rev primer	Velikost DNA amplikonu [bp]	Kmen <i>C. purpurea</i> (gDNA)
<i>CpLDS1</i>	CPUR 00903 OE_mC_fw CPUR 00903 OE_Ttub_rev	3742	20.1
<i>CpFAH</i>	CPUR 04032 OE_mC_fw CPUR 04032 OE_Ttub_rev	1475	20.1
<i>dmaW</i>	full_dmaW_20.1_fw full_dmaW_20.1_rev	1466	20.1
<i>CpYUCCA</i>	full_CpYUCCA_fw full_CpYUCCA_rev	1972	20.1
<i>CpIaaH</i>	CPUR 04616 OE_mC_fw CPUR 04616 OE_mC_rev	1470	20.1

Plasmidová DNA izolovaná z bakteriálních kultur *E. coli* (Tab. 20) byla podrobena PCR a restrikční analýze. Velikost DNA fragmentů po restrikci byla následující (Obr. 18):

- *pDRIVE::CpLDS1* - 558 bp, 1293 bp, 1891 bp, 3852 bp (*EcoRI*-HF)
- *pDRIVE::CpFAH* - 1475 bp, 3852 bp (*EcoRI*-HF)
- *pDRIVE::dmaW* - 1466 bp, 3852 bp (*EcoRI*-HF)
- *pDRIVE::CpYUCCA* - 1972 bp, 3852 bp (*Bam*HI-HF + *Xba*I)
- *pDRIVE::CpIaaH* - 1470 bp, 3852 bp (*EcoRI*-HF).

Přítomnost DNA insertu v *pDRIVE* plasmidu byla potvrzena sekvenováním.



Obr. 18 Elektroforetogram reprezentativních vzorků *pDRIVE* plasmidů s příslušnými DNA inserty po restrikci. 1 - *pDRIVE::CpLDS1*, 2 - *pDRIVE::CpFAH*, 3 - *pDRIVE::dmaW*, 4 - *pDRIVE::CpYUCCA*, 5 - *pDRIVE::CpIaaH*, M - 1 kb Plus DNA ladder.

Tab. 20 Přehled počtu izolovaných plasmidů v průběhu klonování DNA ampliconu do *pDRIVE* plasmidu.

Název	Počet ověřených kolonií	Z toho pozitivních
<i>pDRIVE::CpLDS1</i>	10	2
<i>pDRIVE::CpFAH</i>	15	5
<i>pDRIVE::dmaW</i>	10	2
<i>pDRIVE::CpYUCCA</i>	10	9
<i>pDRIVE::CpIaaH</i>	15	12

4.1.1.2 Příprava DNA pro transformaci *S. cerevisiae*

Metodou PCR byly z *pDRIVE* plasmidů s příslušnými DNA inserty amplifikovány geny se stop kodonem (v případě tvorby konstruktů bez fluorescenční značky nebo s fluorescenční značkou na N-konci proteinu) nebo bez stop kodonu (v případě tvorby konstruktů s fluorescenční značkou na C-konci proteinu) (Tab. 21). Jako templát byly navíc použity plasmidy *pDRIVE::CpTF1* a *pDRIVE::CpTF2*. Velikost získaných DNA ampliconů byla zkontrolována v agarosovém gelu.

Tab. 21 Přehled DNA ampliconů klonovaných do shuttle vektoru s/bez fluorescenční značky.

DNA amplicon	Templát	Fw primer Rev primer	Velikost [bp]
<i>CpLDS1</i>	<i>pDRIVE::CpLDS1</i>	CPUR 00903 OE_mC_fw CPUR 00903 OE_Ttub_rev	3742
<i>CpLDS1</i> bez stop kodonu	<i>pDRIVE::CpLDS1</i>	CPUR 00903 OE_mC_fw CPUR 00903 OE_mC_rev	3739
<i>CpTF1</i> bez stop kodonu	<i>pDRIVE::CpTF1</i>	CPUR 01124 OE_mC_fw CPUR 01124 OE_mC_rev	1008
<i>CpFAH</i>	<i>pDRIVE::CpFAH</i>	CPUR 04032 OE_mC_fw CPUR 04032 OE_Ttub_rev	1475
<i>CpFAH</i> bez stop kodonu	<i>pDRIVE::CpFAH</i>	CPUR 04032 OE_mC_fw CPUR 04032 OE_mC_rev	1472
<i>lpsA1 část A</i> od start kodonu	<i>pDRIVE::lpsA1 část A</i>	lpsA1 A OE 1 fw PoliC lpsA1-a_rev	2694
<i>lpsA1 část B</i>	<i>pDRIVE::lpsA1 část B</i>	lpsA1-b_fw lpsA1-b_rev	2889
<i>lpsA1 část C</i>	<i>pDRIVE::lpsA1 část C</i>	lpsA1-c_fw lpsA1-c_rev	2046
<i>lpsA1 část D</i> po stop kodon (včetně)	<i>pDRIVE::lpsA1 část D</i>	lpsA1-d_fw lpsA1 D OE 9 rev Tgluc	3573
<i>lpsA1 část D</i> bez stop kodonu	<i>pDRIVE::lpsA1 část D</i>	lpsA1-d_fw lpsA1 D OE 8 rev GFP	3570
<i>dmaW</i>	<i>pDRIVE::dmaW</i>	dmaW PoliC OE fw dmaW OE Tgluc rev	1466
<i>dmaW</i>	<i>pDRIVE::dmaW</i>	dmaW GFP OE fw dmaW OE Tgluc rev	1466
<i>dmaW</i> bez stop kodonu	<i>pDRIVE::dmaW</i>	dmaW PoliC OE fw dmaW GFP N rev	1463
<i>CpYUCCA</i>	<i>pDRIVE::CpYUCCA</i>	CPUR 04612 OE_mC_fw CPUR 04612 OE_mC_rev	1972
<i>CpYUCCA</i> bez stop kodonu	<i>pDRIVE::CpYUCCA</i>	CPUR 04612 OE_mC_fw CPUR 04612 OE_Ttub_rev	1969
<i>CpIaaH</i> bez stop kodonu	<i>pDRIVE::CpIaaH</i>	CPUR 04616 OE_mC_fw CPUR 04616 OE_mC_rev	1467
<i>CpIaaH</i> bez stop kodonu	<i>pDRIVE::CpIaaH</i>	CPUR 04616 OE_mC_fw CPUR 04616 OE_GFP_rev	1467
<i>CpTF2</i> bez stop kodonu	<i>pDRIVE::CpTF2</i>	CPUR 05433 OE_mC_fw CPUR 05433 OE_mC_re	1464

V agarosovém gelu byla také zkontrolována velikost shuttle vektorů použitých pro kvasinkové rekombinační klonování po restrikci příslušnými enzymy. Na restrikci byl použit jeden nebo dva enzymy. Pokud byly použity dva enzymy, byl gen kódující GFP (780 bp) nebo mCherry (771 bp) z vektoru vyštěpen.

4.1.2 Příprava DNA pro tvorbu konstruktů pro delecí vybraných genů

C. purpurea

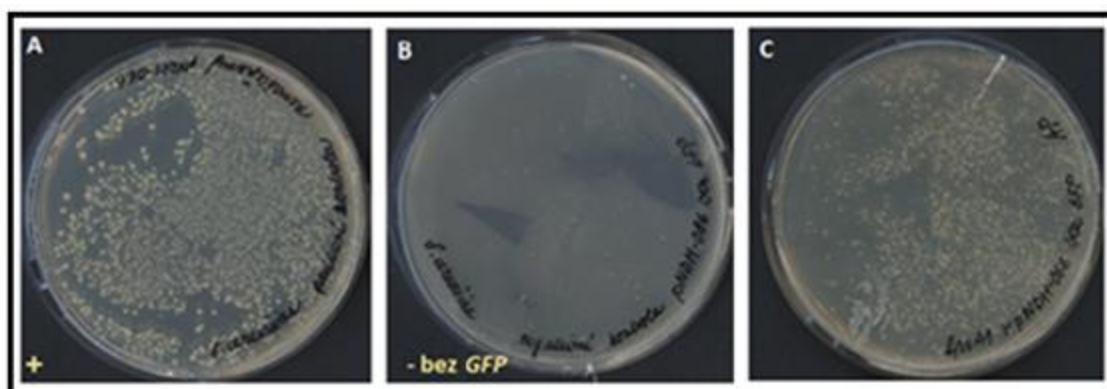
Metodou PCR byly amplifikovány 5' OS a 3' OS genů *CpLDS1*, *CpFAH*, *CpTF1*, *lpsA2* a *CpTF2* (Tab. 22). Phleomycinová rezistenční kazeta (1847 bp) byla amplifikována s použitím primerů CpBle1_fw a CpBle1_rev z shuttle vektoru *pRS426_Pgpd-cpble* (7325 bp). Shuttle vektor *pRS426* (5726 bp) byl linearizován enzymy *XhoI* a *EcoRI*-HF. Velikost DNA fragmentů byla ověřena v agarosovém gelu.

Tab. 22 Přehled amplifikovaných 5' OS a 3' OS cílových genů použitých na přípravu delečních konstruktů.

DNA amplikon	Templát	Fw primer Rev primer	Velikost DNA amplikonu[bp]
5' OS <i>CpLDS1</i>	gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1	5F CPUR 00903 5R CPUR 00903	942
3' OS <i>CpLDS1</i>	gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1	3F CPUR 00903 3R CPUR 00903	874
5' OS <i>CpTF1</i>	gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1	5F CPUR 01124 5R CPUR 01124	960
3' OS <i>CpTF1</i>	gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1	3F CPUR 01124 3R CPUR 01124	780
5' OS <i>CpFAH</i>	gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1	5F CPUR 04032 5R CPUR 04032	878
3' OS <i>CpFAH</i>	gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1	3F CPUR 04032 3R CPUR 04032	938
5' OS <i>lpsA2</i>	<i>pDRIVE::5' OS CPUR 04073</i>	5F CPUR 04073 5R CPUR 04073	667
3' OS <i>lpsA2</i>	<i>pDRIVE::3' OS CPUR 04073</i>	3F CPUR 04073 3R CPUR 04073	677
5' OS <i>CpTF2</i>	gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1	5F CPUR 05433 5R CPUR 05433	960
5' OS <i>CpTF2</i>	gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1	3F CPUR 05433 3R CPUR 05433	889

4.1.3 Transformace *S. cerevisiae* a *E. coli*

Připravené DNA fragmenty byly ko-transformovány do uracil auxotrofního kmene *S. cerevisiae* FGSC 9721. V případě pozitivní kontroly byly na transformaci použity nenaštěpené shuttle vektory, jako negativní kontroly byly použity linearizované shuttle vektory. Z narostlých kolonií *S. cerevisiae* (Obr. 19) byla pomocí alkalické lýze izolována plasmidová DNA, která byla následně použita na transformaci elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10.



Obr. 19 Ukázky výsledků transformace *S. cerevisiae* FGSC 9721.

A - pozitivní kontrola transformace (*pNDH-OGG*),

B - negativní kontrola transformace (naštěpený *pNDH-OGG*),

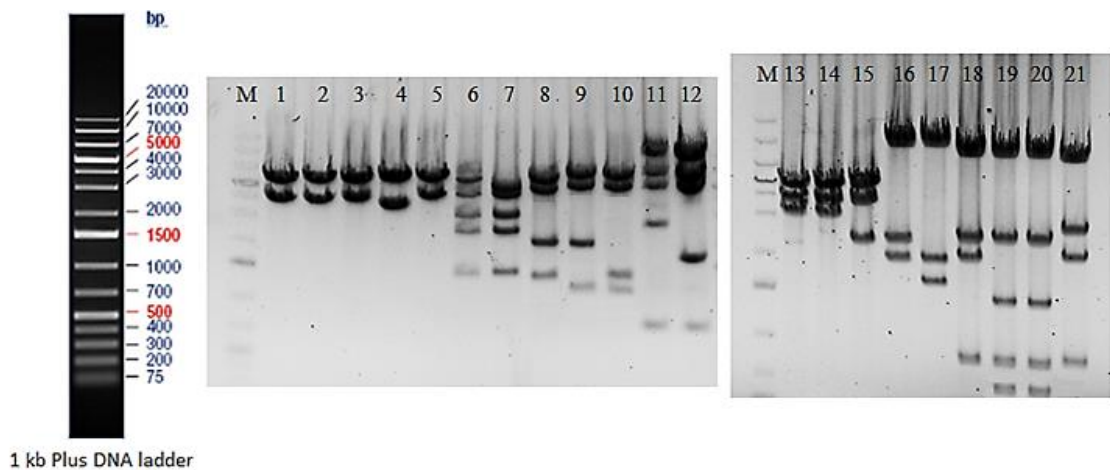
C - transformace *S. cerevisiae* transformační směsí obsahující DNA amplicon *lpsA1*.

K ověření přítomnosti DNA insertu v shuttle vektoru byla plasmidová DNA izolovaná z bakteriálních kultur *E. coli* podrobena PCR a restrikční analýze. Velikost DNA fragmentů po restrikci byla následující (Obr. 20):

- *pRS426::ΔCpLDS1* - 3663 bp, 5693 bp (*Bam*HI-HF)
- *pRS426::ΔCpTF1* - 3587 bp, 5693 bp (*Bam*HI-HF)
- *pRS426::ΔCpFAH* - 3663 bp, 5693 bp (*Eco*RI-HF)
- *pRS426::ΔlpsA2* - 3191 bp, 5693 bp (*Bam*HI-HF)
- *pRS426::ΔCpTF2* - 3696 bp, 5693 bp (*Eco*RI-HF)
- *pNDH-OCT::CpLDS1mCherry*⁺ - 1144 bp, 2060 bp, 2660 bp, 3810 bp, 4998 bp (*Eco*RI-HF + *Pvu*I-HF)
- *pNDH-OCT::CpLDS1 mCherry*⁻ - 1293 bp, 2128 bp, 2660 bp, 3810 bp, 4371 bp (*Eco*RI-HF + *Pvu*I-HF)
- *pNDH-OCT::CpTF1 mCherry*⁺ - 1068 bp, 1876 bp, 4162 bp, 5193 bp
- (*Sna*BI + *Nhe*I-HF)

- *pNDH-OCT::CpFAH mCherry⁺* - 913 bp, 1851 bp, 4393 bp, 5607 bp
- (*Sna*BI + *Bam*HI-HF)
- *pNDH-OCT::CpFAH mCherry⁻* - 909 bp, 1085 bp, 4396 bp, 5605 bp
- (*Sna*BI + *Bam*HI-HF)
- *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁺* - 669 bp, 2368 bp, 4508 bp, 5713 bp, 8842 bp (*Sna*BI)
- *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁻* - 669 bp, 1591 bp, 4429 bp, 5713 bp, 8842 bp (*Sna*BI)
- *pNDB-OGG::dmaW gfp⁺* (N-terminální fúze GFP) - 3202 bp, 3821 bp, 4871 bp, (*Nhe*I + *Xba*I)
- *pNDB-OGG::dmaW gfp⁺* (C-terminální fúze GFP) - 3202 bp, 3821 bp, 4871 bp (*Nhe*I + *Xba*I)
- *pNDB-OGG::dmaW gfp⁻* - 2425 bp, 3821 bp, 4871 bp (*Nhe*I + *Xba*I)
- *pNAB-OCT::CpYUCCA mCherry⁺*- 2040 bp, 2441 bp, 8011 bp
- (*Eco*RI-HF + *Spe*I-HF)
- *pNAB-OCT::CpYUCCA mCherry⁻* - 1637 bp, 2040 bp, 8011 bp
- (*Eco*RI-HF + *Spe*I-HF)
- *pNDH-OCT::CpIaaH mCherry⁺* - 880 bp, 2134 bp, 2575 bp, 7169 bp
- (*Hind*III + *Pst*I)
- *pNDH-OGG::CpIaaH gfp⁺* - 477 bp, 880 bp, 1460 bp, 2575 bp, 7160 bp, (*Hind*III + *Pst*I)
- *pNDB-OGG::CpIaaH gfp⁺* - 477 bp, 880 bp, 1460 bp, 2575 bp, 6506 bp, (*Hind*III + *Pst*I)
- *pNDH-OCT::CpTF2 mCherry⁺* - 911 bp, 2158 bp, 2816 bp, 6876 bp
- (*Eco*RI-HF + *Eco*RV-HF).

Plasmidová DNA s DNA insertem (Tab. 23) byla purifikována a přítomnost DNA insertu byla ověřena sekvenováním.



Obr. 20 Elektroforetogram reprezentativních vzorků shuttle vektorů s DNA inserty po restrikci.

1 - *pRS426::ΔCpLDS1*

2 - *pRS426::ΔCpTF1*

3 - *pRS426::ΔCpFAH*

4 - *pRS426::ΔlpsA2*

5 - *pRS426::ΔCpTF2*

6 - *pNDH-OCT::CpLDS1 mCherry⁺*

7 - *pNDH-OCT::CpLDS1 mCherry⁻*

8 - *pNDH-OCT::CpTF1 mCherry⁺*

9 - *pNDH-OCT::CpFAH mCherry⁺*

10 - *pNDH-OCT::CpFAH mCherry⁻*

11 - *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁺*

12 - *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁻*

13 - *pNDB-OGG::dmaW gfp⁺* (N-terminální fúze GFP)

15 - *pNDB-OGG::dmaW gfp⁻*

14 - *pNDB-OGG::dmaW gfp⁺* (C-terminální fúze GFP)

17 - *pNAB-OCT::CpYUCCA mCherry⁺*

16 - *pNAB-OCT::CpYUCCA mCherry⁻*

18 - *pNDH-OCT::CpIaaH mCherry⁺*

19 - *pNDH-OGG::CpIaaH gfp⁺*

20 - *pNDB-OGG::CpIaaH gfp⁺*

21 - *pNDH-OCT::CpTF2 mCherry⁺*

M - 1 kb Plus DNA ladder.

Tab. 23 Přehled o počtu izolovaných plasmidů v průběhu přípravy konstruktů pro delecii a konstitutivní expresi vybraných genů *C. purpurea*.

Název	Počet izolovaných plasmidů	Z toho pozitivních
<i>pRS426::ΔCpLDS1</i>	10	10
<i>pRS426::ΔCpTF1</i>	15	15
<i>pRS426::ΔCpFAH</i>	10	9
<i>pRS426::ΔlpsA2</i>	15	14
<i>pRS426::ΔCpTF2</i>	10	9
<i>pNDH-OCT::CpLDS1 mCherry⁺</i>	30	29
<i>pNDH-OCT::CpLDS1 mCherry⁻</i>	10	9
<i>pNDH-OCT::CpTF1 mCherry⁺</i>	10	6
<i>pNDH-OCT::CpFAH mCherry⁺</i>	30	27
<i>pNDH-OCT::CpFAH mCherry⁻</i>	30	20
<i>pNDH::OGG::lpsA1 gfp⁺</i>	30	10
<i>pNDH::OGG::lpsA1 gfp⁻</i>	60	10
<i>pNDB::OGG::dmaW gfp⁺</i> (N-terminální fúze GFP)	14	12
<i>pNDB::OGG::dmaW gfp⁺</i> (C-terminální fúze GFP)	14	11
<i>pNDB::OGG::dmaW gfp⁻</i>	8	8
<i>pNAB-OCT::CpYUCCA mCherry⁺</i>	15	14
<i>pNAB-OCT::CpYUCCA mCherry⁻</i>	15	4
<i>pNDH-OCT::CpIaaH mCherry⁺</i>	15	4
<i>pNDH-OGG::CpIaaH gfp⁺</i>	15	12
<i>pNDB-OGG::CpIaaH gfp⁺</i>	15	13
<i>pNDH-OCT::CpTF2 mCherry⁺</i>	10	10

4.2 Transformace *C. purpurea*

Připravené plasmidy *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁺* a *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁻* byly společně s *pNDH-OGG* (volné GFP) použity na transformaci *C. purpurea* kmene 20.1 a Gal404.

Výše zmíněné plasmidy byly izolovány pomocí NucleoBondXtra MidiPrep kitu, precipitovány isopropanolem a octanem sodným a linearizovány enzymem *SbfI*. Poté, co byla v agarosovém gelu ověřena velikost získaných DNA fragmentů (*pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁺* - 22021 bp, *pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁻* - 21244 bp, *pNDH-OGG* - 11094 bp) byla restriční směs purifikována a použita na transformaci protoplastů.

4.3 Diagnostická PCR

Z předpokládaných primárních transformantů byla izolována gDNA, která byla použita na diagnostickou PCR ke kontrole integrace konstruktů. Velikost DNA ampliconů byla následující:

Transformanti exprimující GFP (Obr. 21)

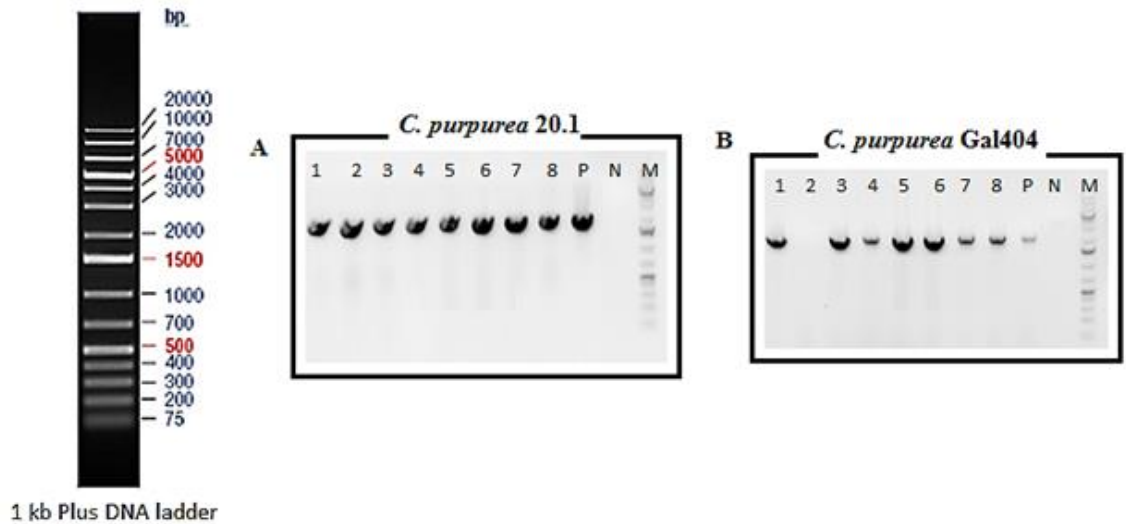
- 1814 bp (primery *hph_fw* a *Tgluc_rev*)

Transformanti exprimující LPS1-GFP (Obr. 22)

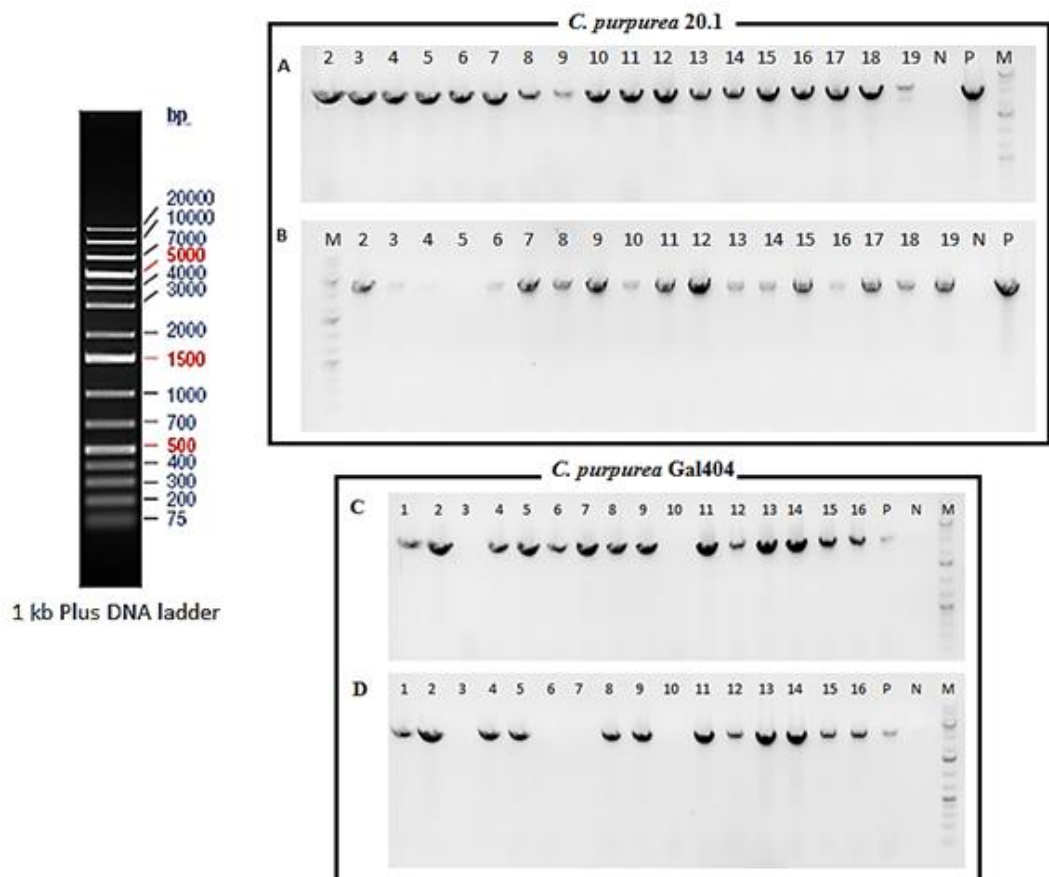
- 2954 bp (primery *hph_fw* a *lpsA1_sek2_rev*)
- 3795 bp (primery *lpsA1-d_sek6_fw* a *Tgluc_rev*)

Transformanti exprimující LPS1 (Obr. 23)

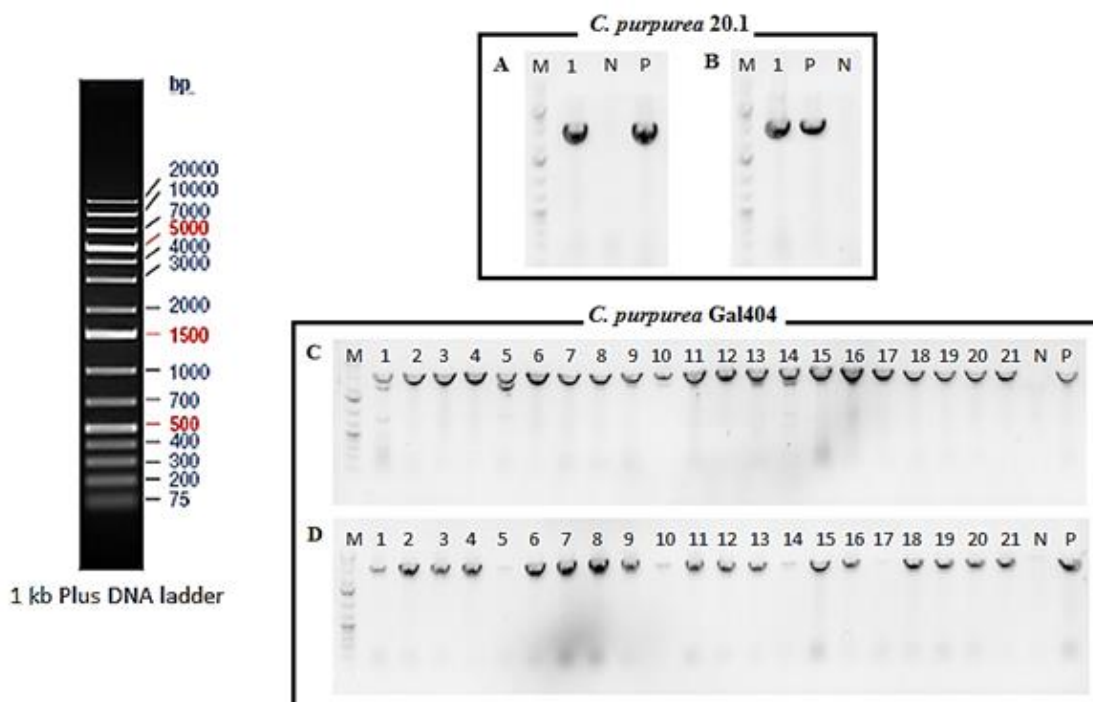
- 2954 bp (primery *hph_fw* a *lpsA1_sek2_rev*)
- 3018 bp (primery *lpsA1-d_sek6_fw* a *Tgluc_rev*)



Obr. 21 Elektroforetogramy DNA ampliconů amplifikovaných z gDNA předpokládaných transformantů *C. purpurea* 20.1 (1-8) a *C. purpurea* Gal404 (1-8) exprimujících GFP.N - negativní kontrola (H₂O), P - pozitivní kontrola (*pNDH-OGG*), M - 1 kb Plus DNA ladder.



Obr. 22 Elektroforetogramy DNA ampliconů amplifikovaných z gDNA předpokládaných transformantů *C. purpurea* 20.1 (2-19) a *C. purpurea* Gal404 (1-16) exprimujících LPS1-GFP. A, C - primery *hph_fw* a *lpsA1-sek2_rev*, B, D - primery *lpsA1-d_sek6_fw* a *Tgluc_rev*, N - negativní kontrola (H₂O), P - pozitivní kontrola (*pNDH-OGG::lpsA1 gfp⁺*), M - 1 kb Plus DNA ladder.



Obr. 23 Elektroforetogramy DNA ampliconů amplifikovaných z gDNA předpokládaných transformantů *C. purpurea* 20.1 (1) a *C. purpurea* Gal404 (1-21) exprimujících LPS1. A, C - primery hph_fw a lpsA1-sek2_rev, B, D - primery lpsA1-d_sek6_fw a Tgluc_rev, N - negativní kontrola (H₂O), P - pozitivní kontrola (*pNDH-OGG::lpsA1gfp*), M - 1 kb Plus DNA ladder.

4.4 Monosporická izolace

Pro monosporickou izolaci byly vybrány:

- 3 transformanti *C. purpurea* 20.1 exprimující GFP
- 3 transformanti *C. purpurea* 20.1 exprimující LPS1-GFP
- 1 transformant *C. purpurea* 20.1 exprimující LPS1
- 3 transformanti *C. purpurea* Gal404 exprimující GFP
- 3 transformanti *C. purpurea* Gal404 exprimující LPS1-GFP
- 3 transformanti *C. purpurea* Gal404 exprimující LPS1

Metodou monosporické izolace byli získáni homokaryotní mutanti, u nichž byla přítomnost plasmidů *pNDH-OGG::lpsA1 gfp*⁺, *pNDH-OGG::lpsA1 gfp*⁻ a *pNDH-OGG* opět potvrzena pomocí diagnostické PCR.

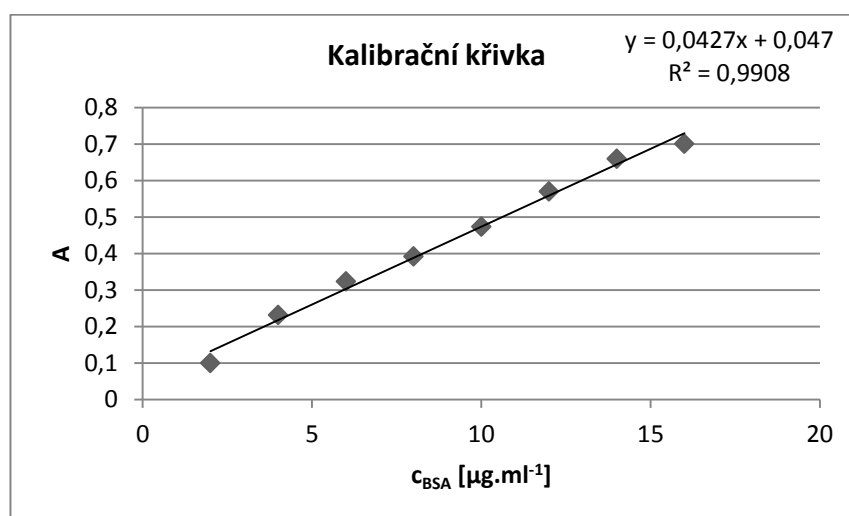
4.5 Funkční ověření konstruktů

Funkčnost konstruktů použitých na transformaci byla ověřena pomocí qPCR a Western blot analýzou. Vzorky použité na Western blot:

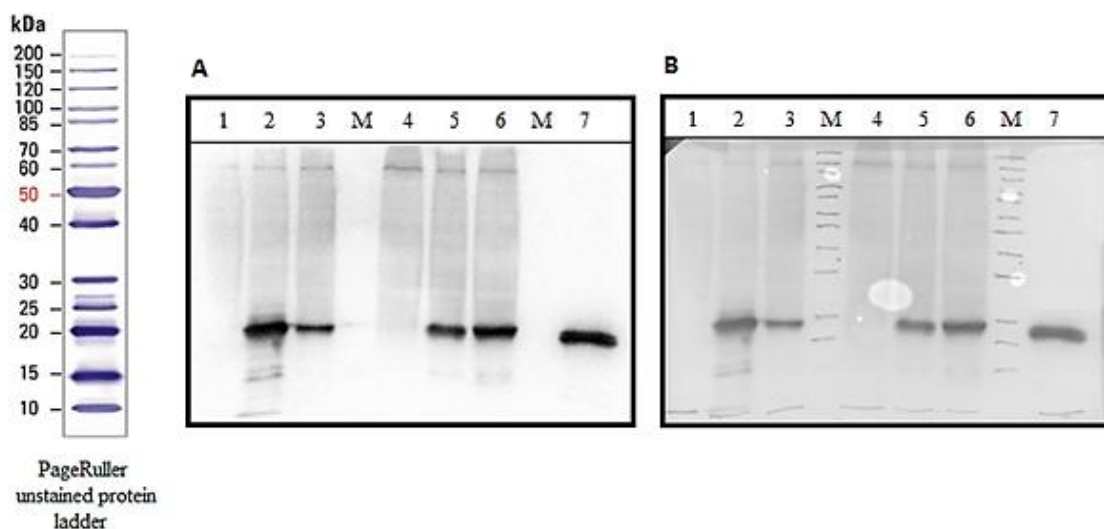
- transformanti *C. purpurea* 20.1 exprimující GFP
- transformanti *C. purpurea* 20.1 exprimující LPS1-GFP
- transformanti *C. purpurea* Gal404 exprimující GFP
- transformanti *C. purpurea* Gal404 exprimující LPS1-GFP
- negativní kontrola - odpovídající WT kontroly
- pozitivní kontrola - transgenní buněčná suspenzní kultura *Arabidopsis thaliana*, ekotyp *Landsberg erecta* (LER) exprimující GFP (poskytl Mgr. David Zalabák, PhD.)

Z uvedených vzorků byly izolovány proteiny. Po sestrojení kalibrační křivky závislosti absorbance roztoků BSA na koncentraci BSA (Obr. 24), byla v získaných proteinových extraktech metodou Bradfordové stanovena koncentrace proteinů.

Proteiny byly separovány v SDS polyakrylamidovém gelu a přeneseny na PVDF membránu, kde byly vizualizovány roztokem Amidočerně. Proteiny LPS1-GFP (421 kDa) a GFP (27 kDa) byly detekovány pomocí primární protilátky anti-GFP produkované v králíkovi. Jako sekundární protilátka byla použita protilátka Goat anti-Rabbit produkovaná v koze proti králičím imunoglobulinům, která byla značena křenovou peroxidasou. Chemiluminiscenční signál byl detekován po přidání substrátu pro křenovou peroxidasu pomocí systému ChemiDoc MP (Obr. 25).



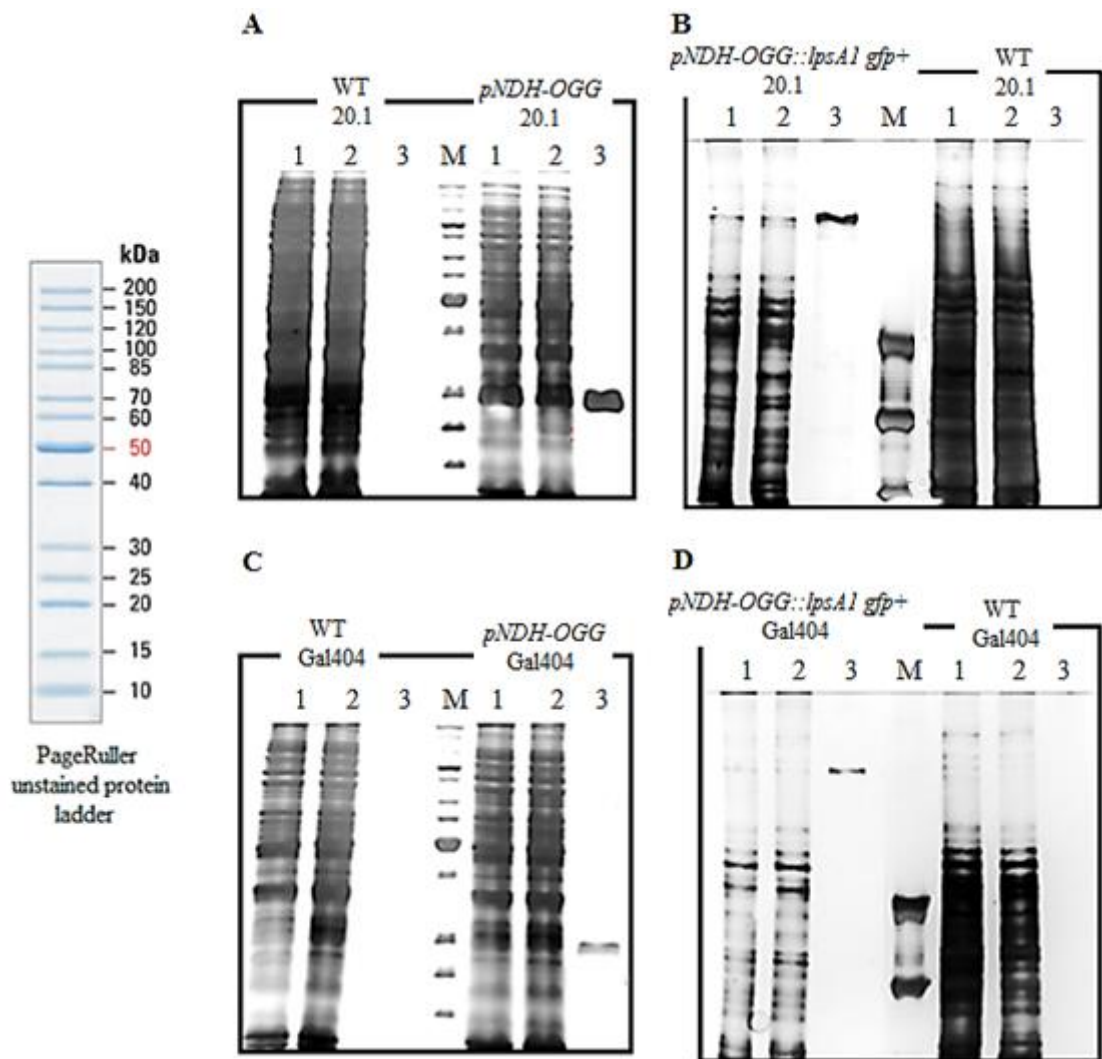
Obr. 24 Kalibrační křivka závislosti absorbance roztoků BSA na koncentraci BSA.



Obr. 25 Fotografie PVDF membrány se separovanými proteiny po imunodetekci protilátkou antiGFP (A), překryv s membránou s vyznačeným markerem (B).

- 1 - WT *C. purpurea* 20.1 (negativní kontrola)
- 2 - *C. purpurea* 20.1 exprimující GFP, transformant 1
- 3 - *C. purpurea* 20.1 exprimující GFP, transformant 2
- 4 - WT *C. purpurea* Gal404 (negativní kontrola)
- 5 - *C. purpurea* Gal404 exprimující GFP, transformant 1
- 6 - *C. purpurea* Gal404 exprimující GFP, transformant 2
- 7 - transgenní buněčná suspenzní kultura *Arabidopsis thaliana*, ekotyp *Landsberg erecta* (LER) exprimující GFP (pozitivní kontrola)
- M - PageRuller unstained protein ladder.

GFP-fúzní proteiny byly imunoprecipitovány pomocí GFP-Trap_A. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek *C. purpurea* exprimující GFP, jako negativní kontrola byl použit WT *C. purpurea*. Proteiny označené jako lyzát, nenavázané proteiny a navázané proteiny získané během imunoprecipitace pomocí GFP-Trap_A byly separovány ve dvou SDS polyakrylamidových gelech. Separované proteiny byly následně barveny stříbrem (Obr. 26) nebo přeneseny na PVDF membránu, kde byly vizualizovány roztokem Amidočerně a poté detekovány pomocí již zmíněných protilátek.



Obr. 26 Fotografie SDS polyakrylamidových gelů se separovanými proteiny barvenými stříbrem po imunoprecipitaci GFP-fúzních proteinů pomocí GFP-Trap_A.

A-B - WT, transformanti exprimující GFP nebo LPS1-GFP *C. purpurea* 20.1

C-D - WT, transformanti exprimující GFP nebo LPS1-GFP *C. purpurea* Gal404

1 - lyzát

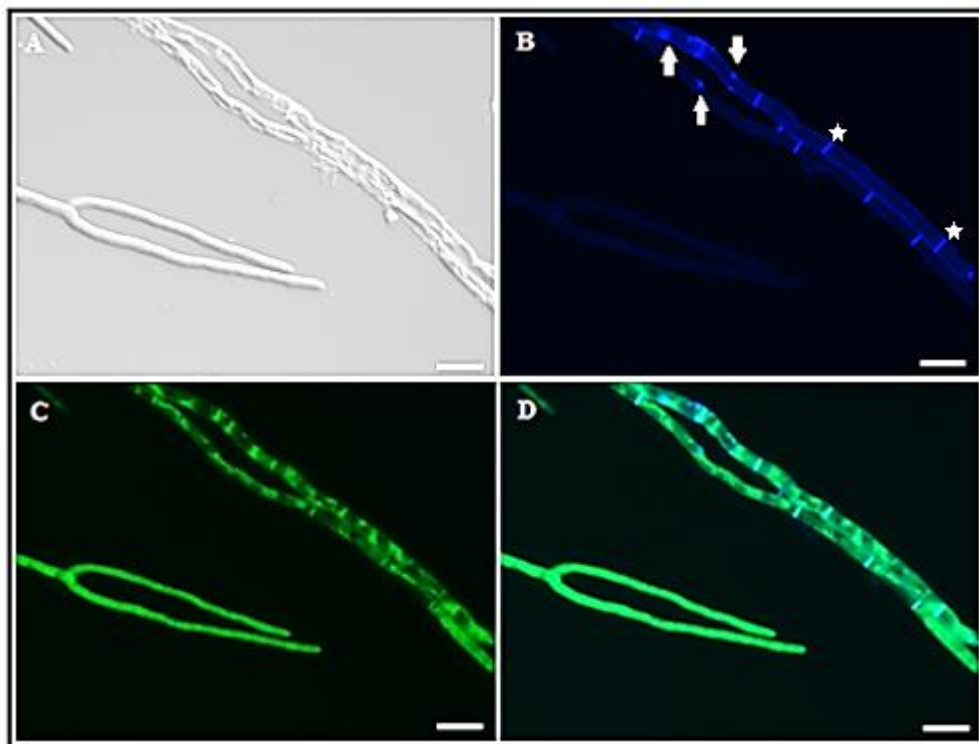
2 - nenasazené proteiny

3 - nasazené proteiny

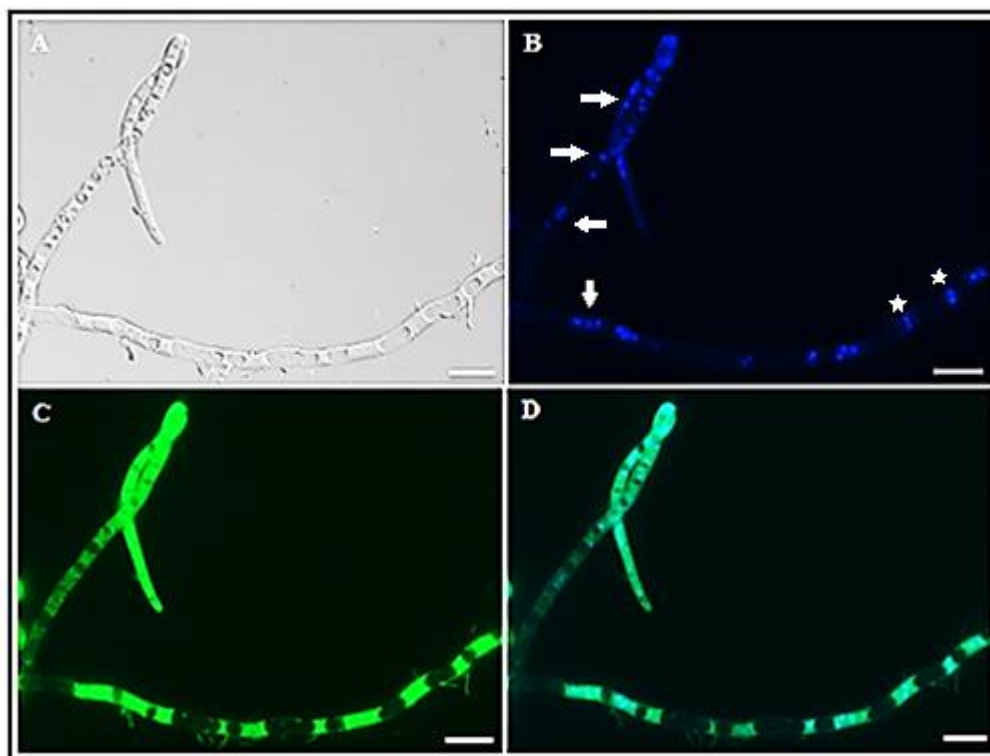
M - PageRuler unstained protein ladder.

4.7 Epifluorescenční mikroskopie

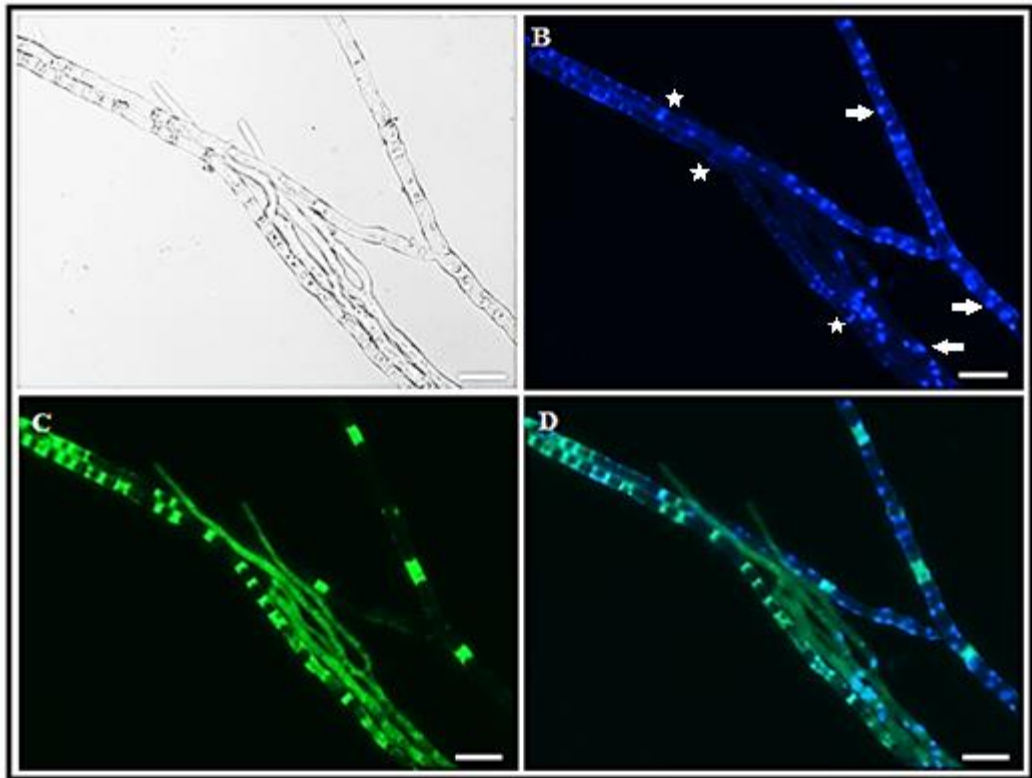
V hyfách *C. purpurea* exprimujících LPS1-GFP byla pomocí epifluorescenčního mikroskopu Axio Imager M2 sledována lokalizace LPS1. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek *C. purpurea* exprimující GFP. Pomocí barviva Hoechst 22358 byla ve dvoudenních hyfách *C. purpurea* vizualizována DNA a buněčné přepážky (septa) (Obr. 27-30).



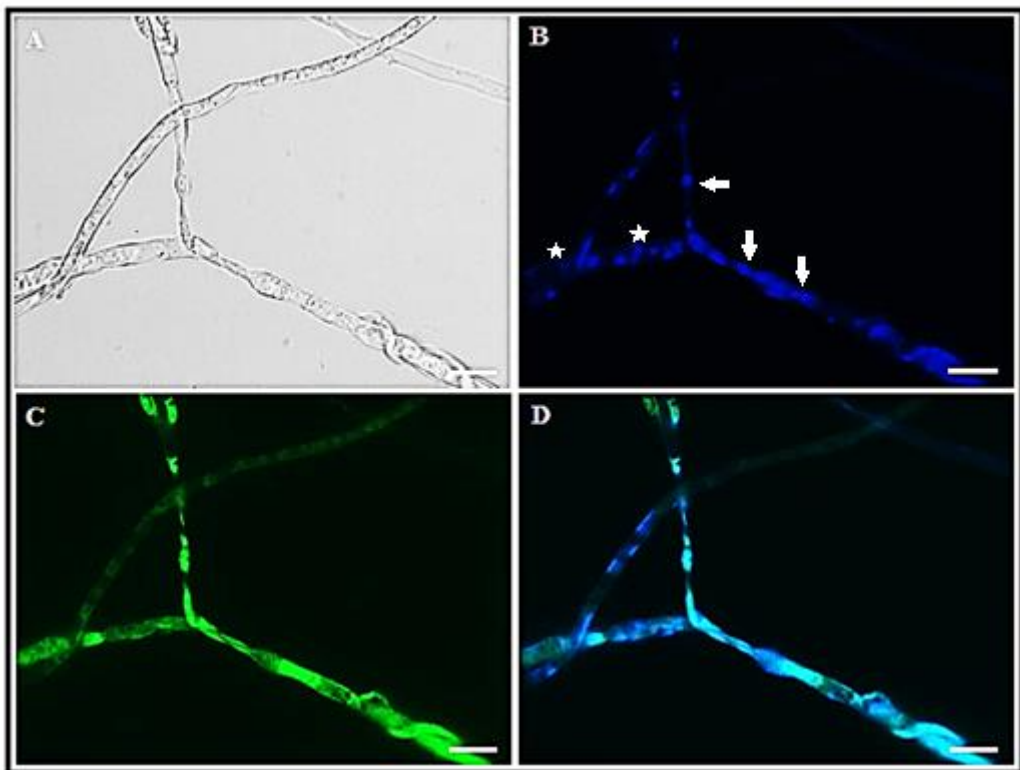
Obr. 27 Hyfy *C. purpurea* Gal404 exprimující GFP (pozitivní kontrola).
 A - procházející světlo, B - vizualizace DNA (šipky) a sept (hvězdičky) pomocí Hoechst 33258,
 C - GFP, D - překryv. Měřítko odpovídá 20 μm .



Obr. 28 Hyfy *C. purpurea* Gal404 exprimující LPS1-GFP
 A - procházející světlo, B - vizualizace DNA (šipky) a sept (hvězdička) pomocí Hoechst 33258,
 C - fúzní protein LPS1-GFP, D - překryv. Měřítko odpovídá 20 μm .



Obr. 29 Hyfy *C. purpurea* 20.1 exprimující GFP (pozitivní kontrola).
 A - procházející světlo, B - vizualizace DNA (šipky) a sept (hvězdičky) pomocí Hoechst 33258,
 C - GFP, D - překryv. Měřítko odpovídá 20 μm .



Obr. 30 Hyfy *C. purpurea* 20.1 exprimující LPS1-GFP.
 A - procházející světlo, B - vizualizace DNA (šipky) a sept (hvězdičky) pomocí Hoechst 33258,
 C - fúzní protein LPS1-GFP, D - překryv. Měřítko odpovídá 20 μm .

4.8 Očkování žito

Získaní transformanti byly společně s WT *C. purpurea* 20.1 a *C. purpurea* Gal404 (Obr. 31) infikovány na žito.



Obr. 31 Infekce žito *C. purpurea* Gal404 exprimující LPS1 (A, C) a odpovídající WT kontrolou (B, D).

A, B - Produkce medovice (30 dní po inokulaci)

C, D - Tvorba skleoricí (50 dní po inokulaci)

5 DISKUZE

Na přípravu konstruktů k transformaci vláknitých hub se v současnosti téměř výhradně využívají nové techniky klonování DNA, které snižují časovou i cenovou náročnost. Odhadovaná doba klonování delečního konstruktů (tvořeného třemi úseky) s použitím restrikce a ligace do plasmidu a následnou amplifikaci v *E. coli* je minimálně jeden měsíc. Využitím nových metod lze tuto dobu zkrátit na jeden týden. Tyto výhody poskytuje i kvasinkové rekombinační klonování (Joska *et al.*, 2014), kterým se zabývá tato diplomová práce. V dnešní době existují i další alternativy klonování, jako např. GIBSON (Gibson *et al.*, 2009), AQUA (Beyer *et al.*, 2015) či USER cloning (Geu-Flores *et al.*, 2007), které mohou v budoucnosti, hlavně díky dalšímu zrychlení přípravy, nahradit i kvasinkové rekombinační klonování.

Pomocí této metody byly připraveny konstrukty pro delecii a konstitutivní expresi vybraných genů *C. purpurea*. Většina konstruktů pro expresi byla připravena tak, aby fluorescenční značka mCherry nebo GFP (Leroch *et al.*, 2011; Schumacher, 2012) byla umístěna na C-konci zájmového proteinu. Na produkci funkčního proteinu však může mít vliv přítomnost fluorescenční značky i její umístění (Wink, 2006), proto byly také připraveny kontrolní konstrukty bez fluorescenčních proteinů a konstrukt, ve kterém je GFP fúzováno s N-koncem zájmového proteinu. Výhodou konstruktů obsahujících mCherry nebo GFP je jednak možnost jejich využití k lokalizaci fúzních proteinů pomocí fluorescenční mikroskopie (Herrmann *et al.*, 2014), ale také možnost ověření jejich přítomnosti pomocí Western blot analýzy s použitím protilátky proti fluorescenční značce. Všechny konstrukty byly také připravovány s ohledem na jejich další využití pro komplementaci získaných delečních mutantů, proto nesou jiný gen rezistence oproti delečnímu. Část z připravených plasmidů již byla úspěšně použita k transformaci *C. purpurea*.

Protože se jednalo o první testování kvasinkového rekombinačního klonování na pracovišti, bylo nutné tuto metodu optimalizovat. Ošetření linearizovaných vektorů alkalickou fosfatase výrazně pomohlo v úspěšnosti klonování. Ačkoliv je dle literatury (Bessa *et al.*, 2012) lepší variantou ošetření vektorů *Taq* polymerasou s dATP jako substrátem, vykazovala tato směs v porovnání s použitím alkalické fosfatasy nižší účinnost. Úspěšnost klonování byla u všech připravených konstruktů potvrzena jejich sekvenací. V nukleotidových sekvencích nebyly nalezeny žádné SNP (jednonukleotidový polymorfismus, z ang. single nucleotide polymorfism), inzerce ani

delece a to ani v případě, kdy byly do cílového vektoru klonovány čtyři různé DNA fragmenty najednou.

Gen *lpsAI* *C. purpurea* (10755 bp) kóduje trimodulární neribosomální lysergylpeptidovou syntetasu LPS1 (394 kDa), která je zodpovědná za syntézu ergopeptinů, zejména ergotaminu (Walzel *et al.*, 1997; Haarmann *et al.*, 2008). Problém při přípravě konstruktů s tímto genem nastal při klonování získaného DNA amplikonu do *pDRIVE* plasmidu. Přečištění PCR reakce fragmentovalo dlouhý amplikon, restrikce a sekvenování plasmidů ukázalo, že je přítomna vždy jen část klonovaného genu. Z tohoto důvodu byla sekvence *lpsAI* rozdělena na čtyři kratší úseky, které byly klonovány do *pDRIVE* plasmidu samostatně. Po ověření sekvence byly tyto plasmidy použity jako templát pro amplifikace ke kvasinkovému rekombinačnímu klonování. Možnost rekonstruovat takto velký gen spojením více dílčích úseků by mohl být využit k vytvoření „nového“ proteinu, složeného z nové kombinace NRPS modulů.

Při přípravě konstruktů se objevil také problém s izolací plasmidů. Příčinou byla nejspíše velikost těchto plasmidů, která přesáhla 20 kb, roli také sehrál typ použitého shuttle vektoru tzv. high-copy plasmid (Schumacher, 2012) a větší počet DNA fragmentů použitých na rekombinaci v kvasince. Sekvenování získaných konstruktů bylo úspěšné a především jednoznačné, z čehož vyplývá, že lze pomocí metody kvasinkového rekombinačního klonování připravit i konstrukty o velikosti nad 20 kb poskládané z více různých DNA fragmentů.

Připravené konstrukty *pNDH-OGG::lpsAI gfp⁺* a *pNDH-OGG::lpsAI gfp⁻* byly společně s *pNDH-OGG* (volné GFP) použity na transformaci protoplastů dvou kmenů *C. purpurea* 20.1 a Gal404. Protože při transformaci dochází z velké části k mnohonásobné integraci konstruktů do genomu, je nutné dále pracovat s více mutanty, na kterých se ověří získaný fenotyp. Pro další práci byli tedy vybráni tři nezávislí transformanti, pouze v případě *C. purpurea* 20.1 exprimující LPS1 byl získán jen jeden transformant. Integrace plasmidové DNA byla ověřena diagnostickou PCR.

Transformanti bývají nejčastěji heterokaryotní, to znamená, že buňka s 2 jádry má pouze jedno jádro s integrací transformačního konstruktů. Homokaryoti získání monosporickou izolací mají zafixovanou genetickou informaci a lze je kultivovat bez selekčního tlaku antibiotika.

Pro ověření obou konstruktů v *C. purpurea* byla použita metoda qPCR, v případě konstruktů *pNDH-OGG::lpsAI gfp⁺* byla navíc zvolena metoda Western blotu. Elektroforetická separace proteinů o velikosti nad 200 kDa a jejich následný přenos

z gelu na membránu se však potýká hned s několika problémy. Při separaci proteinů v SDS polyakrylamidovém gelu platí, že migrace proteinů vykazuje lineární závislost na logaritmu jejich molekulové hmotnosti tj. velké proteiny se mnohem hůře separují (Laemmli, 1970). Řešením tohoto problému je obvykle použití gelů o nízké koncentraci akrylamidu nebo gradientových gelů (Casas-Terradellas *et al.*, 2006).

V SDS polyakrylamidovém gelu byly nejlépe separovány proteiny extrahované z LER kultury a *C. purpurea* exprimujících GFP. Pomocí Western blotu byl v obou vzorcích detekován GFP (27 kDa). Tímto byla zároveň ověřena funkčnost primární a sekundární protilátky. Pro následnou separaci fúzního proteinu LPS1-GFP (421 kDa) byl zvolen 5% SDS polyakrylamidový gel, který byl již dříve použit při analýze LPS1 (Riederer *et al.*, 1996). Nicméně přítomnost GFP-fúzního proteinu v transformantech prokázána nebyla. Příčinou mohl být například neúspěšný přenos tohoto proteinu z gelu na membránu, neboť u větších proteinů dochází k jejich precipitaci v gelu (Towbin *et al.*, 1979). Tento problém může být zčásti vyřešen přidáním SDS do přenosového pufru. Druhým důvodem neúspěšné detekce mohla být nízká koncentrace proteinu ve vzorku. Proto bylo přistoupeno na metodu imunoprecipitace GFP-fúzních proteinů pomocí GFP-Trap_A. Ačkoliv došlo k vychytání GFP-fúzního proteinu, následný Western blot byl opět neúspěšný a to i v případě, kdy bylo do přenosového pufru přidáno 0,05% SDS. Na druhou stranu, byl v gelu po separaci proteinů vizualizován band o velikosti nad 200 kDa, který byl přítomen pouze ve vzorcích transformantů *C. purpurea* exprimujících LPS1-GFP a nikoliv v odpovídajících kontrolách. S největší pravděpodobností se tedy jedná o hledaný LPS1-GFP. Pro separaci GFP a LPS1-GFP byl také použit komerční gradientový gel (NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gel - Thermo Scientific, USA), jehož výhodou je možnost simultánního rozdělení malých i velkých proteinů. Nicméně separace proteinů v tomto gelu nebyla ani zdaleka ideální. Z tohoto důvodu byly GFP a LPS1-GFP separovány samostatně vždy s odpovídající WT kontrolou.

Ačkoliv se pro velké proteiny doporučuje tzv. tankový přenos přes noc při nízkém napětí a chlazení, může být velmi účinného přenosu vysokomolekulárních proteinů také dosaženo zahřátím gelu při přenosu (Kurien a Scofield, 2009). Tato varianta byla zvažována, nicméně z časových důvodů nebyl Western blot dále optimalizován.

Pomocí epifluorescenčního mikroskopu byla sledována lokalizace LPS1-GFP. Stejně jako u *C. purpurea* exprimující GFP, byl fluorescenční signál detekován v cytosolu. Tento fakt koreluje i s literaturou, podle které jsou bakteriální a houbové neribosomální

peptidové syntetasy lokalizovány právě v cytosolu (Eisfeld, 2009; Imperi a Visca, 2013). Pomocí barviva Hoechst 33258 byla vizualizována DNA. Toto barvivo se u hub také využívá k vizualizaci buněčných přepážek (tzv. sept), jimiž jsou jednotlivé buňky odděleny (Hua'an *et al.*, 1991).

Protože oba použité kmeny *C. purpurea* produkují námelové alkaloidy jen ve sklerociích, byli získaní transformanti společně s WT kontrolami infikováni na žito. V budoucnosti bude v získaných sklerociích metodou HPLC stanoveno množství námelových alkaloidů. Jelikož sklerocia mutanta *C. purpurea* 20.1 s deletovaným genem *lpsA1* neprodukovala ergotamin (Haarmann *et al.*, 2009), očekává se, že sklerocia těchto transformantů budou obsahovat zvýšené množství ergopeptidů nebo dojde ke zvýšení obsahu ergotaminu oproti ostatním ergopeptidům.

6 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma molekulární biologie *Claviceps purpurea* se zaměřením na využití metody kvasinkového rekombinačního klonování v souvislosti s přípravou konstruktů k transformaci. V rešerši byly také zmíněny nové techniky genetické manipulace vláknitých hub.

V experimentální části bylo přistoupeno k optimalizacím metody kvasinkového rekombinačního klonování, které bylo následně využito k přípravě konstruktů k transformaci *C. purpurea*. Dva z připravených konstruktů pro expresi genu *lpsA1* byly transformovány do dvou kmenů *C. purpurea* 20.1 a Gal404. Poté, co byla u homokaryotních mutantů potvrzena integrace plasmidů pomocí diagnostické PCR, byla metodou qPCR ověřena jejich funkčnost. K detekci GFP-fúzního proteinu byla navíc použita metoda Western blotu. Nicméně ani v případě, kdy byl GFP-fúzní protein nejdříve precipitován pomocí GFP-Trap_A, nebyl Western blot úspěšný. Na druhou stranu, byl v SDS polyakrylamidovém gelu po separaci vizualizován band o velikosti odpovídající LPS1-GFP, tudíž nejspíše pouze nedošlo k jeho přenosu z gelu na membránu. Získaní transformanti byli společně s odpovídajícími WT kontrolami infikováni na žito. Z časových důvodů budou získaná sklerocia analyzována v budoucnosti.

7 LITERATURA

- Abe M., Yamatodani S., Yamano T., Kozu Y., Yamada S. (1967): Production of alkaloids and related substances by fungi. Examination of filamentous fungi for their ability of producing ergot alkaloids. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, **41**, 68-71.
- Arazoe T., Ogawa T., Miyoshi K., Yamato T., Ohsato S., Sakuma T., Yamamoto T., Arie T., Kuwata S. (2015a): Tailor-made TALEN system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnology and bioengineering*, **112**, 1335-1342.
- Arazoe T., Miyoshi K., Yamato T., Ogawa T., Ohsato S., Arie T., Kuwata S. (2015b): Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnology and bioengineering*, **112**, 2543-2549.
- Bai X., Larsen M., Meinhardt F. (1999): The *URA 5* gene encoding orotatephosphoribosyl transferase of the yeast *Kluyveromyces lactis*: Cloning, sequencing and use as a selectable marker. *Yeast*, **15**, 1393-1398.
- Banuet F., Herskowitz I. (2002): Bud morphogenesis and the actin and mikrotubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, **37**, 149-170.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A., Horvath P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709-1712.
- Bessa D., Pereira F., Moreira R., Johansson B., Queirós O. (2012): Improved gap repair cloning in yeast: treatment of the gapped vector with Taq DNA polymerase avoids vector self-ligation. *Yeast*, **29**, 419-423.
- Beyer H. M., Gonschorek P., Samodelov S. L., Meier M., Weber W., Zurbriggen M. D. (2015): AQUA cloning: A versatile and simple enzyme-free cloning approach. *PloS one*, **10**, DOI: 10.1371/journal.pone.0137652.
- Biová J. (2016): *Studium transkripčních faktorů v houbě Claviceps purpurea*. Bakalářská práce, UPOL, Česká republika.
- Bitinaite J., Wah D. A., Aggarwal A. K., Schildkraut I. (1998): FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the national academy of sciences*, **95**, 10570-10575.
- Blochlinger K., Diggelmann H. (1984): Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Molecular and cellular biology*, **4**, 2929-2931.
- Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2011): TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, **333**, 1843-1846.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, **326**, 1509-1512.
- Boch J., Bonas U. (2010): Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual review of phytopathology*, **48**, 419-436.
- Bochtler M. (2012): Structural basis of the TAL effector-DNA interaction. *Biological Chemistry*, **393**, 1055-1066.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. (2005): Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, **151**, 2551-2561.
- Bové F. J. (1970): *The story of ergot*. S. Karger, New York, USA, 297 stran.
- Brauer K. L., Robbers J. E. (1987): Induced parasexual processes in *Claviceps* sp. strain SD58. *Applied and environmental mikrobiology*, **53**, 70-73.
- Brouns S. J., Jore M. M., Lundgren M., Westra E. R., Slijkhuis R. J., Snijders A. P., Dickman M. J., Makarova K. S., Koonin E. V., van der Oost J. (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, **321**, 960-964.
- Casas-Terradellas E., Garcia-Gonzalo F. R., Hadjebi O., Bartrons R., Ventura F., Rosa J. L. (2006): Simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular weights using low-percentage acrylamide and a gradient SDS-PAGE gel. *Electrophoresis*, **27**, 3935-3938.

- 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 Sciences*, **103**, 10352-10357.
- Comino A., Kolar M., Schwab H., Sočić H. (1989): Heterologous transformation of *Claviceps purpurea*. *Biotechnology letters*, **11**, 389-392.
- Cong L., Ran., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jing W., Marraffini L. A., Zhang F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**, 819-823.
- De Groot M. J., Bundock P., Hooykaas P. J., Beijersbergen A. G. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature biotechnology*, **16**, 839-842.
- de Lange O., Schreiber T., Schandry N., Radeck J., Braun K. H., Koszinowski J., Heuer H., Straus A., Lahaye, T. (2013): Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. *New Phytologist*, **199**, 773-786.
- de Lange O., Wolf C., Dietze J., Elsaesser J., Morbitzer R., Lahaye, T. (2014): Programmable DNA-binding proteins from *Burkholderia* provide a fresh perspective on the TALE-like repeat domain. *Nucleic acids research*, **42**, 7436-7449.
- Didek-Brumec M., Puc A., Socic, H., Alacevic M. (1987): Isolation and characterization of a high-yielding *Claviceps purpurea* strain producing ergotoxins. *Prehrambeno-tehnoloska i biotehnoloska revija*, **25**, 103-109.
- Doudna J. A., Charpentier E. (2014): The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346**. DOI:10.1126/science.1258096.
- Dumas P., Bergdoll M., Cagnon C., Masson J. M. (1994): Crystal structure and site-directed mutagenesis of a bleomycin resistance protein and their significance for drug sequestering. *The European Molecular Biology Organization journal*, **13**, 2483.
- Eisfeld K. (2009): Non-ribosomal peptide synthetases of fungi. *Physiology and Genetics*, **15**, 305-330.
- Fairhead C., Llorente B., Denis F., Soler M., Dujon B. (1996): New vectors for combinatorial deletions in yeast chromosomes and for gap-repair cloning using split-marker recombination. *Yeast*, **12**, 1439-1457.
- Feng Z., Mao Y., Xu N., Zhang B., Wei P., Yang D., Wang Z., Zhang Z., Zheng R., Yang L., Zeng L., Liu X., Zhu J. (2014): Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 4632-4637.
- Fu Y., Sander J. D., Reyon D., Cascio V. M., Joung J. K. (2014): Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology*, **32**, 279-284.
- Fuller K. K., Chen S., Loros J. J., Dunlap J. C. (2015): Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell*, **14**, 1073-1080.
- Gao Y., Zhao Y. (2014a): Specific and heritable gene editing in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 4357-4358.
- Gao Y., Zhao Y. (2014b): Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing. *Journal of interative plant biology*, **56**, 343-349.
- Gardiner D. M., Howlett B. J. (2004): Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. *Current genetics*, **45**, 249-255.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 2579-2586.
- Gay T., Gersbach C. A., Barbas C. F. (2013): ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, **31**, 397-405.
- Geu-Flores F., Nour-Eldin H. H., Nielsen M. T., Halkier B. A. (2007): USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic acids research*, **35**, 55-61.

- Gibson D. G., Young L., Chuang R. Y., Venter J. C., Hutchison C. A., Smith H. O. (2009): Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, **6**, 343-345.
- Giesbert S., Lepping H. B., Tenberge K. B., Tudzynski P. (1998): The xylanolytic system of *Claviceps purpurea*: cytological evidence for secretion of xylanases in infected rye tissue and molecular characterization of two xylanase genes. *Phytopathology*, **88**, 1020-1030.
- Goswami R. S. (2012): Targeted gene replacement in fungi using a split-marker approach. *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols*, **835**, 255-269.
- Graham J. R. a Wolff H. G. (1938): Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Archives of Neurology and Psychiatry*, **39**, 737-763.
- Gravelat F. N., Askew D. S., Sheppard D. C. (2012): Targeted gene deletion in *Aspergillus fumigatus* using the hygromycin-resistance split-marker approach. *Host-Fungus Interactions: Methods and Protocols*, **845**, 119-130.
- Guilinger J. P., Pattanayak V., Reyon D., Tsai S. Q., Sander J. D., Joung J. K., Liu D. R. (2014): Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA cleavage specificity. *Nature methods*, **11**, 429-435.
- Gupta A., Hall V. L., Kok F. O., Shin M., McNulty J. C., Lawson N. D., Wolfe S. A. (2013): Targeted chromosomal deletions and inversions in zebrafish. *Genome research*, **23**, 1008-1017.
- Haarmann T., Machado C., Lübke Y., Correia T., Scharld 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., Lorenz N., Tudzynski P. (2008): Use of a nonhomologous end joining deficient strain ($\Delta ku70$) of the ergot fungus *Claviceps purpurea* for identification of a nonribosomal peptide synthetase gene involved in ergotamine biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology*, **45**, 35-44.
- Hahn S. (2004): Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature structural and molecular biology*, **11**, 394-403.
- He H., Zhu P., Li H. (1995): Strain improvement of alpha-ergokryptine-producing *Claviceps purpurea* by protoplast mutagenesis. *Acta Mycologica Sinica*, **15**, 215-219.
- Hefferin M. L., Tomkinson A. E. (2005): Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA repair*, **4**, 639-648.
- Herman J. G., Latif F., Weng Y., Lerman M. I., Zbar B., Liu S., Samid D., Duan D. S., Gnarr J. R., Linehan W. M. (1994): Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 9700-9704.
- Herrmann A., Tillmann B. A., Schürmann J., Bölker M., Tudzynski P. (2014): Small-GTPase-associated signaling by the guanine nucleotide exchange factors CpDock180 and CpCdc24, the GTPase effector CpSte20, and the scaffold protein CpBem1 in *Claviceps purpurea*. *Eukaryotic cell*, **13**, 470-482.
- Hinsch J., Tudzynski P. (2015): 17 *Claviceps*. *Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi*, 229.
- 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.
- Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C. S., Gao Q., Cassady J. P., Cost G. J., Zhang L., Santiago Y., Miller J. C., Zeitler B., Cherone J. M., Meng X., Hinkley S. J., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D., Jaenisch R. (2011): Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature biotechnology*, **29**, 731-734.
- Holliday R. (1964): A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research*, **5**, 282-304.
- Hsu P. D., Scott D. A., Weinstein J. A., Ran F. A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E. J., Wu X., Shalem O., Cradick T. J., Marraffini L. A., Bao G., Zhang F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, **31**, 827-832.
- Hu G. (1993): DNA Polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' of a DNA fragment. *DNA and cell biology*, **12**, 763-770.
- Hua'an Y., Sivasithamparam K., O'Brien P. A. (1991): An improved technique for fluorescence staining of fungal nuclei and septa. *Australasian Plant Pathology*, **20**, 119-121.

- Chen C., Fenk L. A., de Bono M. (2013a): Efficient genome editing in *Caenorhabditis elegans* by CRISPR-targeted homologous recombination. *Nucleic acids research*, **41**, 193-196.
- Chen C., Gilbert L. A., Cimini B. A., Schnitzbauer J., Zhang W., Li G., Park J., Blackburn E. H., Weissman J. S., Qi L. S., Huang B. (2013b): Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, **155**, 1479-1491.
- Cho S. W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H. S., Bae S., Kim J. S. (2014): Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research*, **24**, 132-141.
- Choquer M., Robin G., Le Pêcheur P., Giraud C., Levis C., Viaud M. (2008): Ku70 or Ku80 deficiencies in the fungus *Botrytis cinerea* facilitate targeting of genes that are hard to knock out in a wild-type context. *FEMS microbiology letters*, **289**, 225-232.
- Christian M., Cermak T., Doyle E. L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, **186**, 757-761.
- 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.
- Iizasa E., Nagano Y. (2006): Highly efficient yeast-based in vivo DNA cloning of multiple DNA fragments and the simultaneous construction of yeast/*Escherichia coli* shuttle vectors. *Biotechniques*, **40**, 79-83.
- Imperi F., Visca P. (2013): Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of *Pseudomonas aeruginosa*: A membrane-associated siderasome. *FEBS letters*, **587**, 3387-3391.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, **169**, 5429-5433.
- Jacobs J. Z., Ciccaglione K. M., Tournier V., Zaratiegui M (2014): Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. *Nature communications*, **5**. DOI:10.1038/ncomms6344.
- Jia H, Wang N. (2014): Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgrRNA. *PloS one*, **9**. DOI:10.1371/journal.pone.0093806.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816-821.
- Joung J. K., Sander J. D. (2013): TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews Molecular cell biology*, **14**, 49-55.
- Joska T. M., Mashruwala A., Boyd J. M, Belden W. J (2014): A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient and versatile. *Journal of microbiological methods*, **100**, 46-51.
- Jungehülsing U., Arntz C., Smit R., Tudzynski P. (1994): The *Claviceps purpurea* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene: cloning, characterization, and use for the improvement of a dominant selection system. *Current genetics*, **25**, 101-106.
- Katayama T., Tanaka Y., Okabe T., Nakamura H., Fujii W., Kitamoto K., Maruyama J. I. (2015): Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Letters*, **38**, 637-642.
- Keller U., Zocher R., Kleinkauf H. (1980): Biosynthesis of ergotamine in protoplasts of *Claviceps purpurea*. *Journal of General Microbiology*, **118**, 485-494.
- Keller U. (1983): Highly efficient mutagenesis of *Claviceps purpurea* by using protoplasts. *Applied and environmental microbiology*, **46**, 580-584.
- Khang C. H., Park S. Y., Lee Y. H., Kang S. (2005): A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, **42**, 483-492.
- Kim H., Kim J. S. (2014): A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, **15**, 321-334.
- Kim D., Bae S., Park J., Kim E., Kim S., Yu A. R., Hwang J., Kim J., Kim J. S. (2015): Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR/Cas9 off-target effects in human cells. *Nature methods*, **12**, 237-243.

- Kobel H., Sanglier J. J. (1973): Qualitative changes in the alkaloid spectrum of *Claviceps purpurea* after mutation. *Genetics of Industrial Microorganism* (eds. Vanek Z.), Academia Prague, 393-415.
- Kuijpers N. G., Solis-Escalante D., Bosman L., van der Broek M., Pronk J. T., Daran J. M., Daran-Lapujade P. (2013): A versatile, efficient strategy for assembly of multifragment expression vectors in *Saccharomyces cerevisiae* using 60 bp synthetic recombination sequences. *Microbial Cell Factories*, **12**. DOI:10.1186/1475-2859-12-47.
- Kurien B. T., Scofield R. H. (2009): Ultrarapid electrophoretic transfer of high and low molecular weight proteins using heat. *Protein blotting and detection*, **536**, 181-190.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leroch M., Mernke D., Koppenhoefer D., Schneider P., Mosbach A., Doehlemann G., Hahn M. (2011): Living colors in the gray mold pathogen *Botrytis cinerea*: codon-optimized genes encoding green fluorescent protein and mCherry, which exhibit bright fluorescence. *Applied and environmental microbiology*, **77**, 2887-2897.
- Levis C., Fortini D., Brygoo Y. (1997): Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Current Genetics*, **32**, 157-162.
- Liu R., Chen L., Jiang Y., Zhou Z., Zou G. (2015): Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery*, **1**. DOI:10.1038/celldisc.2015.7.
- Ma Y., Zhang L., Huang X. (2014): Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS Journal*, **281**, 5186-5193.
- Mahfouz M. M., Li L., Piatek M., Fang X., Mansour H., Bangarusamy D. K., Zhu J. K. (2012): Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein. *Plant molecular biology*, **78**, 311-321.
- Mak A. N. S., Bradley P., Cernadas R. A., Bogdanove A. J., Stoddard B. L. (2012): The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, **335**, 716-719.
- Makarova K. S., Aravind L., Wolf Y. I., Koonin E. V. (2011): Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology Direct*, **6**, 38-56.
- Mali P., Aach J., Stranges P. B., Esvelt K. M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G. M. (2013): Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature biotechnology*, **31**, 833-838.
- Mantle P. G. a Nisbet L. J. (1976): Differentiation of *Claviceps purpurea* in axenic culture. *Journal of general microbiology*, **93**, 321-334.
- Matsuo Y., Kishimoto H., Horiuchi T., Tanae K., Kawamukai K. (2010): Simple and effective gap-repair cloning using short tracts of flanking homology in fission yeast. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **74**, 685-689.
- Mercer A. C., Gaj T., Fuller R. P., Barbas C. F. (2012): Chimeric TALE recombinases with programmable DNA sequence specificity. *Nucleic acids research*, **40**, 11163-11172.
- Mey G., Held K., Scheffer J., Tenberge K. B., Tudzynski P. (2002a): CPMK2, an SLT2-homologous mitogen-activated protein (MAP) kinase, is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Molecular microbiology*, **46**, 305-318.
- Mey G., Oeser B., Lebrun M. H., Tudzynski P. (2002b): The biotrophic, non-appressorium-forming grass pathogen *Claviceps purpurea* needs a Fus3/Pmk1 homologous mitogen-activated protein kinase for colonization of rye ovarian tissue. *Molecular plant-microbe interactions*, **15**, 303-312.
- Miller J. C., Tan S., Qiao G., Barlow K. A., Wang J., Xia D. F., Meng X., Paschon D. E., Leung E., Hinkley S. J., Dulay G. P., Hua K. L., Ankoudinova I., Cost G. J., Urnov F. D., Zhang H. S., Holmes M. C., Gregory P. D. G., Dulay G. P. (2011): A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*, **29**, 143-148.

- Mojica F. J., Diez-Villasenor C., Soria E., Juez G. (2000): Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genome of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, **36**, 244-246.
- Mojica F. J. M., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Almendros C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, **155**, 733-740.
- Moscou M. J., Bogdanove A. J. (2009): A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, **326**, 1501-1501.
- Nathue E., Joshi S., Tenberge K. B., von den Driesch M., Oeser B., Bäumer N., Mihlan M., Tudzynski P. (2004): CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *Molecular plant-microbe interactions*, **17**, 383-393.
- Neubauer L., Dopstadt J., Humpf H. U., Tudzynski P. (2016): Identification and characterization of the ergochrome gene cluster in the plant pathogenic fungus *Claviceps purpurea*. *Fungal Biology and Biotechnology*, **3**. DOI:10.1186/s40694-016-0020-z.
- Nishimasu H., Ran F. A., Hsu P. D., Konermann S., Shehata S. I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. (2014): Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, **156**, 935-949.
- Nissim L., Perli S. D., Fridkin A., Perez-Pinera P., Lu T. K. (2014): Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells. *Molecular cell*, **54**, 698-710.
- Nodvig C. S., Nielsen J. B., Kogle M. E., Mortensen U. H. (2015): A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS one*, **10**. DOI:10.1371/journal.pone.0133085.
- 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.
- Park C. Y., Kim J., Kweon J., Son J. S., Lee J. S., Yoo J. E., Cho S. R., Kim J. H., Kim J. S., Kim D. W. (2014): Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPSC cells using TALENs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 9253-9258.
- Pereira M., Pereira J. H., Thedei J. G., Rossi A., Martinez-Rossi N. M. (1995): Purification of *Neurospora crassa* alkaline phosphatase without DNase activity for use in molecular biology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **11**, 505-507.
- Qi L. S., Larson M. H., Gilbert L. A., Doudna J. A., Weissman J. S., Arkin A. P., Lim W. A. (2013): Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, **152**, 1173-1183.
- Rho H. S., Kang S., Lee Y. H. (2001): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and cells*, **12**, 407-411.
- Riederer B., Han M., Keller U. (1996): D-lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 27524-27530.
- Sakai Y., Kazarimoto T., Tani Y. (1991): Transformation system for an asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii*: cloning of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (URA3), isolation of uracil auxotrophic mutants, and use of the mutants for integrative transformation. *Journal of bacteriology*, **173**, 7458-7463.
- Seeburg P. H., Shine J., Martial J. A., Baxter J. D., Goodman H. M. (1977): Nucleotide sequence and amplification in bacteria of a structural gene for rat growth hormone. *Nature*, **270**, 486-494.
- 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., Sullivan D. M., Scott B., Tudzynski P., An Z., Arnaoudova E. G., Bullock C. T., Charlton N. D., Chen L., Cox M., Dinkins R. D., Florea S., Glenn A. E., Gordon A., Guldener U., Harris D. R., Hollin W., Jaromczyk J., Johnson R. D., Khan A. K., Leistner E., Leuchtman A., Li C., Li G., Liu J., Liu J., Liu M., Mace W., Machado C., Nagabhyru P., Pan J., Schmid J., Sugawara K., Steiner U., Takach J. E., Tanaka E., Webb J. S., Wilson E. V., Wiseman J. L., Yoshida R., Zeng Z. (2013): Plant-symbiotic fungi as chemical

- engineers: multi-genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *PLoS Genetics*, **9**, DOI: 10.1371/journal.pgen.1003323.
- Scheffer J., Chen C., Heidrich P., Dickman M. B., Tudzynski, P. (2005a): A CDC42 homologue in *Claviceps purpurea* is involved in vegetative differentiation and is essential for pathogenicity. *Eukaryotic cell*, **4**, 1228-1238.
- Scheffer J., Ziv C., Yarden O., Tudzynski P. (2005b): The COT1 homologue CPCOT1 regulates polar growth and branching and is essential for pathogenicity in *Claviceps purpurea*. *Fungal Genetics and Biology*, **42**, 107-118.
- Schneider D. J., Miles C. O., Garthwaite I., Van Halderen A., Wessels J. C., Lategan H. J. (1996): First report of field outbreaks of ergot-alkaloid toxicity in South Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, **63**, 97-108.
- 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.
- Schürmann J., Buttermann D., Herrmann A., Giesbert S., Tudzynski P. (2013): Molecular characterization of the NADPH oxidase complex in the ergot fungus *Claviceps purpurea*: CpNox2 and CpPls1 are important for a balanced host-pathogen interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**, 1151-1164.
- Schuster M., Schweizer G., Reissmann S., Kahmann R. (2015): Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genetics and Biology*, **89**, 3-9.
- Singh M. V., Weil P. A. (2002): A method for plasmid purification directly from yeast. *Analytical biochemistry*, **307**, 13-17.
- Sikorski R. S., Hieter P. (1989): A system of shuttle vectors and yeast host strain designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Smit R., Tudzynski P. (1992): Efficient transformation of *Claviceps purpurea* using pyrimidine auxotrophic mutants: cloning of the OMP decarboxylase gene. *Molecular and General Genetics*, **23**, 297-305.
- Spagnolo L., Rivera-Calzada A., Pearl L. H., Llorca O. (2006): Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Molecular cell*, **22**, 511-519.
- Staben C. Jensen B., Singer M., Pollock J., Schechtman M., Kinsey J., Selker E. (1989): Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genetics Reports*, **36**, 79-81.
- Strnadová K. (1964): UV-mutanten bei *Claviceps purpurea*. *Planta medica*, **12**, 521-527.
- Strnadová K. (1967): Der Alkaloidgehalt und der Alkaloidtyp auxotropher UV-Mutanten des Mutterkorns bei parasitischer Kultur auf Roggen. *Flora*, **157**, 517-523.
- Strnadová K. (1976): A method of preparation and application of nitrous acid as a mutagen in *Claviceps purpurea*. *Folia microbiologica*, **21**, 455-458.
- Strnadová K. a Kybal J. (1976): Morphological changes of *C. purpurea* induced by mutagenic effect of nitrous acid. *Planta medica*, **30**, 395-398.
- Szostak J. W., Orr-Weaver T. L., Rothstein R. J., Stahl F. W. (1983): The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, **33**, 25-35.
- 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.
- Thompson C. J., Movva N. R., Cramer R., Davies J. E., Lauwereys M., Botterman J. (1987): Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygrosopicus*. *European Molecular Biology Organization journal*, **6**, 2519.
- Thorner M. O., McNeilly A. S., Hagan C., Besser G. M. (1974): Long-term treatment of galactorrhoea and hypogonadism with bromocriptine. *British Medical Journal*, **2**, 419-422.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**, 4350-4353.
- Tudzynski P., Esser K., Gröschel H. (1982): Genetics of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Theoretical and Applied Genetics*, **61**, 97-100.
- Tudzynski P., Scheffer J. (2004). *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular Plant Pathology*, **5**, 377-388.

- Upadhyay S. K., Kumar J., Alok A., Tuli R. (2013): RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, **3**, 2233-2238.
- Valík J., Kovářová T., Boháč J. (GALENA A. S., Opava-Komárov, CZ): *Průmyslový produkční kmen mikroorganismu Claviceps purpurea (Fr.) Tul.* 287130, B6, 18. 7. 2000, 5 stran.
- Valton J., Dupuy A., Daboussi F., Thomas S., Maréchal A., Macmaster R., Melliand K., Juillerat A., Duchateau P. (2012): Overcoming transcription aktivátor-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *Journal of Biochemical Chemistry*, **287**, 38427-38432.
- 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.
- Vo K. T., Michaelis S., Paddon C. (1997): Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic acids research*, **25**, 451-452.
- Wah D. A., Bitinaite J., Schildkraut I., Aggarwal A. K. (1998): Structure of FokI has implications for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 10564-10569.
- Walzel B., Riederer B., Keller U. (1997): Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chemistry nad Biology*, **4**, 223-230.
- Weinthal D., Tzfira T. (2009): Imaging protein-protein interactions in plant cells by bimolecular fluorescence complementation assay. *Trends in plant science*, **14**, 59-63.
- White R. J. (2011): Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nature Reviews Genetics*, **12**, 459-463.
- Wink M. (2006): An introduction to molecular biotechnology. *Molecular Fundamentals, Methods and Application in Modern Biotechnology*, DOI: 10.1002-9783527609468.fmatter.
- 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.
- Woods A. J., Jones J. B., Mantle P. G. (1966): An outbreak of gangrenous ergotism in cattle. *Veterinary Record*, **78**, 742-749.
- Xiao A., Wang Z., Hu Y., Wu Y., Luo Z., Yang Z., Zu Y., Li W., Huang P, Tong X., Zhu Z., Lin S., Zhu Z. (2013): Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic acids research*, **41**, 141-146.
- You B. J., Lee M. H., Chung K. R. (2009): Gene-specific disruption in the filamentous fungus *Cercospora nicotianae* using a split-marker approach. *Archives of microbiology*, **191**, 615-622.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3' OS	3' okrajová sekvence
5' OS	5' okrajová sekvence
<i>Act</i>	gen kódující aktin
<i>bar</i>	gen rezistence na fosfinitricin
BiFC	Bimolekulární fluorescenční komplementace (z angl. Bimolecular fluorescence complementation)
<i>ble</i>	gen rezistence na phleomycin
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
Cas9	CRISPR asociovaný protein <i>Streptococcus pyogenes</i>
Cas9 D10A	Cas9 bez nukleasové aktivity
cDNA	komplementární DNA
<i>clr2</i>	gen kódující transkripční faktor zapojený do regulace exprese celulasového genu
<i>CpBle</i>	kodon-optimalizovaný gen rezistence na phleomycin pro <i>C. purpurea</i>
<i>CpFAH</i>	gen kódující předpokládanou Δ^{12} - desaturasu mastných kyselin <i>C. purpurea</i> (CPUR_00903)
<i>CplaaH</i>	gen kódující předpokládanou IAM hydrolasu <i>C. purpurea</i> (CPUR_04616)
<i>CpLDS1</i>	gen kódující předpokládanou linoleátdiolsynthasu <i>C. purpurea</i> (CPUR_00903)
<i>CpTF1</i>	gen kódující předpokládaný transkripční faktor zapojený do regulace biosyntézy námelových alkaloidů <i>C. purpurea</i> (CPUR_01124)
<i>CpTF2</i>	gen kódující transkripční faktor regulující expresi genů klastru biosyntézy ergochromů <i>C. purpurea</i> (CPUR_05433)
<i>CpYUCCA</i>	gen kódující předpokládanou flavinmonooxygenasu <i>C. purpurea</i> (CPUR_04616)
crRNA	CRISPR RNA
CRISPR/Cas	z angl. Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated system
dCas9	katalyticky inaktivní Cas9
<i>dmaW</i>	gen kódující dimethylallyltryptophansynthasu <i>C. purpurea</i> (CPUR_04076)
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EMS	ethyl-methylsulfonát
fw primer	označení primeru ve směru 3' → 5' (z angl. forward)
gDNA	genomická DNA
gRNA	z angl. guide RNA
GFP	zelený fluorescenční protein
<i>GFP</i>	gen kódující zelený fluorescenční protein
<i>hph</i>	gen rezistence na hygromycin
IAM	indolyl-3-acetamid
IPTG	isopropyl β -D-1-galaktopyranosid
<i>ku70</i>	gen kódující podjednotku NHEJ systému Ku70
Ku80	podjednotka NHEJ systému
<i>lae1</i>	gen kódující předpokládanou methyltransferasu
LER kultura	buněčná suspenzní kultura <i>Arabidopsis thaliana</i> , ekotyp <i>Landsberg erecta</i>
LPS1	lysergylpeptidová syntetasa 1 <i>C. purpurea</i>
LPS2	lysergylpeptidová syntetasa 2 <i>C. purpurea</i>
LPS3	lysergylpeptidová syntetasa 3 <i>C. purpurea</i>
LPS4	lysergylpeptidová syntetasa 4 <i>C. purpurea</i>

<i>lpsA1</i>	gen kódující lysergylpeptidovou synthetasu 1 <i>C. purpurea</i> (CPUR_04074)
<i>lpsA2</i>	gen kódující lysergylpeptidovou synthetasu 4 <i>C. purpurea</i>
<i>lpsB</i>	gen kódující lysergylpeptidovou synthetasu 2 <i>C. purpurea</i> (CPUR_04073)
<i>lpsC</i>	gen kódující lysergylpeptidovou synthetasu 3 <i>C. purpurea</i>
<i>mCherry</i>	gen kódující fluorescenční protein mCherry
mCherry	červený fluorescenční protein
NHEJ	nehomologní spojení konců DNA
NP-40	nonyl-fenoxy-polyethoxyethanol
NRPS	neribosomální peptidová synthetasa
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
<i>Hph</i>	gen rezistence na hygromycin
HR	homologní rekombinace
<i>HSVtk</i>	gen kódující thymidin kinasu herpes simplex viru
OMPD	orotidin-5'-monofosfát dekarboxylasa
PAM	z angl. Protospacer adjacent motifs
PEG	polyethylenglykol
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
<i>Pgpd</i>	promotor glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasy <i>Aspergillus nidulans</i>
<i>PoliC</i>	promotor podjednotky 9 mitochondriální ATPasy <i>Aspergillus nidulans</i>
PVDF	polyvinylidenfluorid
<i>PtrpC</i>	promotor indol-3-fosfátsynthetasy
<i>pyr</i>	gen zapojený do biosyntézy pyrimidinů
rev primer	označení primeru ve směru 5' → 3' (z angl. reverse)
RDV	dva hypervariabilní zbytky (z angl. repeat variable diresidues)
RNAP II	RNA polymerasa II
RNAP III	RNA polymerasa III
RT	pokožová teplota (z angl. room temperature)
<i>SDH</i>	gen kódující scytalon dehydratasu
SDS	dodecylsírán sodný
sgRNA	z angl. single guide RNA
<i>SRS2</i>	gen kódující ATP-dependenční DNA helikasu
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TALEN	z angl. Transcription activator-like effector nucleases
TEMED	tetramethylethyldiamin
<i>Tgluc</i>	Glukanasový terminátor <i>Botrytis cinerea</i>
tracrRNA	z angl. transactivating crRNA
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
<i>Ttrpc</i>	terminátor indol-3-fosfátsynthetasy <i>Botrytis cinerea</i>
<i>Ttub</i>	Tubulinový terminátor <i>Botrytis cinerea</i>
Tween-20	PEG-20-ether monosorbitanester kyseliny laurové
<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-β-D-galaktopyranosid