

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2019-474  
(22) Přihlášeno: 19.07.2019  
(40) Zveřejněno: 27.01.2021  
(Věstník č. 4/2021)  
(47) Uděleno: 04.08.2021  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 15.09.2021  
(Věstník č. 37/2021)

C12N 1/15 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 15/80 (2006.01)  
C12N 15/52 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01)  
C12R 1/645 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:  
LORENZ N. et al.: „Alkaloid cluster gene ccsA of the ergot fungus *Claviceps purpurea* encodes chanoclavine I synthase, a flavin adenine dinucleotide-containing oxidoreductase mediating the transformation of N-methyl-dimethylallyltryptophan to chanoclavine I,“ *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 6, 2010, str. 1822 - 1830, ISSN 0099-2240; GOETZ K. E. et al.: „Ergot cluster-encoded catalase is required for synthesis of chanoclavine I in *Aspergillus fumigatus*,“ *Current Genetics*, vol. 57, no. 3, 2011, str. 201 - 211, ISSN 0172-8083; COYLE C. M. et al.: „An ergot alkaloid biosynthesis gene and clustered hypothetical genes from *Aspergillus fumigatus*,“ *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 6, 2005, str. 3112 - 3118, ISSN 0099-2240; DIDEK-BRUMEC M. et al.: „Activation of ergot alkaloid biosynthesis in prototrophic isolates by *Claviceps purpurea* protoplast fusion,“ *Journal of Biotechnology*, vol. 20, no. 3, 1991, str. 271 - 278, ISSN 0168-1656.  
WO 2014030096.

(73) Majitel patentu:  
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ  
(72) Původce:  
Mgr. Michaela Králová, Olomouc, CZ  
Mgr. Josef Vrabka, Město Albrechtice, CZ  
prof. RNDr. Ivo Frébort, CSc., Ph.D., Bystročice, CZ  
(74) Zástupce:  
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:  
**Houba *Claviceps purpurea* se zvýšenou  
produkcí námelových alkaloidů, způsob její  
přípravy, expresní kazeta**

(57) Anotace:  
Předkládané řešení poskytuje houbu *Claviceps purpurea* se zvýšenou produkcí námelových alkaloidů, která obsahuje v genomu vloženou nukleotidovou sekvenci obsahující alespoň jeden gen vybraný z genu *trpE*<sup>S76L</sup> kódujícího anthranilát syntasu s mutací S76L, a genu *dmaW* kódujícího dimethylallyltryptofan syntetasu, přičemž vložený gen je pod kontrolou konstitutivního promotoru. Dále je popsán způsob přípravy takové houby, a expresní kazeta pro použití při tomto způsobu.

## Houba *Claviceps purpurea* se zvýšenou produkcí námelových alkaloidů, způsob její přípravy, expresní kazeta

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká geneticky upravené houby *Claviceps purpurea*, která je široce používána ve farmaceutickém průmyslu jako produkční mikroorganismus pro svou schopnost produkovat námelové alkaloidy, a způsobu genetické úpravy této houby.

10

### Dosavadní stav techniky

*Claviceps purpurea*, vřeckovýtrusná houba z řádu *Hypocreales*, patří mezi nejznámější producenty námelových alkaloidů. Tyto alkaloidy, deriváty kyseliny D-lysergové, jsou široce využívány ve farmakologickém průmyslu. Využití těchto látek v lékařství je dáno jejich strukturální podobností s neurotransmitery adrenalinem, noradrenalinem a serotoninem, přičemž alkaloidy interagují s receptory pro tyto neurotransmitery. V současnosti jsou námelové alkaloidy využívány především v porodnictví, k léčbě bolestí hlavy a nemocí souvisejících s prolaktinem. V neposlední řadě našly námelové alkaloidy využití též při léčbě Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby.

Produkce námelových alkaloidů pro účely farmaceutického průmyslu je rovnoměrně rozdělena mezi polní produkci a produkci v submerzních kulturách. Kmeny *C. purpurea* schopné produkce námelových alkaloidů v submerzních kulturách či houby schopné vyšší produkce alkaloidů *in planta* byly od 60. let 20. stol. získávány UV mutagenézí, chemickou mutagenézí pomocí ethylmethansulfonátu (EMS) nebo *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidinu (NTG) (Brauer KL, Robbers JE. (1987), *Applied and Environmental Microbiology*, 53(1), 70-73), působením kyseliny dusité (Strnadová K., Kybal J. (1976), *Planta Medica*, 30, 395-398) či ozářením rentgenovými nebo gamma paprsky. Tímto způsobem byl získán i kmen P1 *C. purpurea* odvozený od kmene 1029 (Keller U. (1983), *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 580-584). V tomto kmeni *C. purpurea* byl navíc poprvé identifikován klastř genů pro biosyntézu námelových alkaloidů (tzv. EAS klastř) (Tudzynski P, Höltner K, Correia T, Arntz C, Grammel N, Keller U. (1999), *Molecular and General Genetics MGG*, 261(1), 133-141). Tento klastř obsahuje celkem 13 genů, přičemž první gen biosyntézy označený jako *dmaW* kóduje dimethylallyltryptofan synthetasu (DMATS, EC: 2.5.1.34), která katalyzuje prenylaci *L*-tryptofanu dimethylallyldifosfátem (DMAPP) za vzniku 4- $\gamma$ , $\gamma$ -dimethylallyltryptofanu (DMAT). Protože se jedná o klíčový enzym katalyzující první reakci biosyntézy námelových alkaloidů, podléhá tento enzym regulaci, je aktivován tryptofanem. Kromě aktivace DMATS aminokyselina tryptofan též zpětnovazebně inhibuje klíčový enzym vlastní biosyntézy anthranilát synthasy (EC: 4.1.3.27), která katalyzuje přeměnu chorismátu na anthranilát v přítomnosti amoniaku (Krupinski VM., Robbers JE, Floss HG. (1976), *Journal of Bacteriology*, 125(1), 158-165). Druhým krokem biosyntézy námelových alkaloidů je methylace DMAT za vzniku *N*-methyl-dimethylallyltryptofanu (MeDMAT). Tento krok je katalyzován 4-dimethylallyltryptofan *N*-methyltransferasou, která je kódována genem *EasF*. Následně dochází ke tvorbě chanoklavinu-I, přičemž reakce je katalyzována chanoklavin-I-synthasou, která je kódována genem *EasE*. Tato reakce je též katalyzována katalasou, která je kódována genem *EasC*. Chanoklavin-I je dále oxidován na chanoklavin-I-aldehyd, reakce je katalyzována chanoklavin-I-dehydrogenasou, která je kódována genem *EasD*. Poté následuje isomerace dvojně vazby chanoklavin-I-aldehydu za vzniku isoklavin-I-aldehydu. Tato reakce je katalyzována chanoklavin-I-aldehyd oxidoreduktasou, která je kódována genem *EasA*. Isoklavin-I-aldehyd je redukován na agroklavin za katalýzy agroklavin synthasy, která je kódována genem *EasG*. Následuje oxidace agroklavinu na elymoklavin a jeho následná oxidace na kyselinu lysergovou. Tyto reakce jsou katalyzovány NADPH-dependentní cytochrom P450 monooxygenasou, která je kódována genem *CloA*. Klastř pro biosyntézu ergopeptinů je u *C. purpurea* tvořen čtyřmi geny *lpsA1*, *lpsA2*, *lpsB* a *lpsC*, které kódují neribozomální peptidové synthetasy. Gen *lpsA1* kóduje trimodulární lysergyl peptidovou synthetasu LPS1. Tento enzym má

- podobnou funkci jako enzym LPS4, který je kódován genem *lpsA2*. Odlišnost těchto enzymů spočívá nejspíše pouze ve schopnosti vázat různé aminokyseliny, které jsou součástí ergopeptinů. Gen *lpsB* kóduje monomodulární enzym LPS2, který aktivuje řetězec kyseliny D-lysergové. Po aktivaci kyseliny D-lysergové enzymem LPS2 je kyselina přenesena na LPS1, který obsahuje tři domény pro vazbu tří aminokyselin. Po jejich navázání dochází ke vzniku peptidového laktamu, jehož následná cyklizace je katalyzována dioxxygenasou, která je kódována genem *easH*. Gen *lpsC* kóduje monomodulární syntetasu LPS3, která společně s LPS2 katalyzuje biosyntézu ergonovinu (Florea S., Panaccione D. G., Schardl C. L. (2017), *Phytopathology*, 107(5), 504-518).
- Metoda genetické transformace *C. purpurea* využívající polyethyleglykol byla poprvé použita v roce 1989 (van Engelenburg F, Smit R, Goosen T, van den Broek H, Tudzynski P. (1989), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 364-370). V případě genů zapojených do biosyntézy námelových alkaloidů byli touto metodou získáni deleční mutanti  $\Delta EasE$  *C. purpurea* P1 a následní komplementanti  $\Delta EasE$  *C. purpurea* P1 exprimující *EasE-gfp* (Lorenz N., Olšovská J., Šulc M., Tudzynski P. (2010), *Applied and Environmental Mikrobiology*, 76(6), 1822-1830) a deleční mutanti  $\Delta lpsA1$  v *Aku70* *C. purpurea* P1 (Haarmann T., Lorenz N., Tudzynski P. (2008), *Fungal Genetics and Biology*, 45(1), 35-44).
- V roce 2012 byly za použití metody kvasinkového rekombinačního klonování připraveny vektory obsahující *trpC* promotor *A. nidulans* a gen kódující *ogfp* (*egfp* kodon optimalizovaný pro expresi v houbě *Botrytis cinerea*) (Schumacher J. (2012), *Fungal Genetics and Biology*, 49, 483-497). Tyto vektory byly dále použity na transformaci *C. purpurea* pro účely lokalizace či nadexprese vybraných genů. Jednalo se o nadexpresi regulační podjednotky NADPH oxidasového komplexu *CpNoxR*, katalytické podjednotky *CpNox1*, funkční podjednotky *CpNox2* a tetraspaninu *CpPls1* (Schürmann J., Buttermann D., Hermann A., Giesbert S., Tudzynski P. (2013), *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(10), 1151-1164) či nadexpresi Rho GTPas *CpRac* a *CpCdc42*, GEF faktorů *CpCdc24* a *CpDock180*, GTPasového efektoru *CpSte20* či proteinu *CpBem1* (Herrmann A, Tillmann BA, Schürmann J, Bölker M, Tudzynski P. (2014), *Eukaryotic Cell*, EC-00332). Tyto vektory byly také použity například pro nadexpresi a lokalizaci tRNA-IPT (Hinsch J., Galuszka P., Tudzynski P. (2016), *New Phytologist*, 211(3), 980-992) a *ZmCkx1* v *C. purpurea* 20.1 (Kind S., Hinsch J., Vrabka J., Hradilová M., Majeská-Čudejková M., Tudzynski P., Galuszka P. (2018), *Current Genetics*, 64(6), 1303-1319).
- Kmen P1 není jediným kmenem *C. purpurea*, který produkuje námelové alkaloidy (konkrétně ergotamin a ergotaminin,  $\alpha$ -ergokryptin a  $\alpha$ -ergokryptinin) v submerzní kultuře, tuto vlastnost mají také například kmen 275 FI produkující ergotamin (Arcamone F., Cassinenelli G., Femirni G., Penco S., Pennella P., Pol C. (1970), *Canadian Journal of Microbiology*, 16(10), 923-931) nebo kmen 59 (Křen V., Pažoutová S., Sedmera P., Rylko V., Řeháček Z. (1986), *FEMS Microbiology Letters*, 37(1), 31-34). Další rozvoj techniky významně podpořilo získání sekvence genomu *C. purpurea* kmene 20.1 (Schardl CL et al. (2013), *PLoS Genetics*, 9(2), e1003323).

Úkolem předkládaného vynálezu je zvýšit produkci námelových alkaloidů houbami *C. purpurea* reprodukovatelným postupem.

#### Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje geneticky upravené transformanty houby *Claviceps purpurea* pro zvýšenou produkci námelových alkaloidů, které obsahují v genomu vloženou nukleotidovou sekvenci obsahující alespoň jeden gen vybraný z genu (*trpE*) kódujícího anthranilát syntasasu s mutací S76L, a genu *dmaW* kódujícího dimethylallyltryptofan syntetasu, přičemž vložený gen je pod kontrolou konstitutivního promotoru. Manipulací genů pro biosyntézu aminokyseliny tryptofanu a jeho následnou přeměnu na klíčový meziprodukt biosyntézy námelových alkaloidů dochází k výraznému zvýšení produkce těchto alkaloidů v modifikované houbě, což umožní jejich efektivnější a ekonomičtější produkci.

U houby *Claviceps purpurea* se vložením genu kódujícího klíčový enzym pro produkci aminokyseliny tryptofanu anthranilát synthasu s mutací S76L, pod konstitutivní promotor, odblokuje zpětnovazební inhibice biosyntézy této aminokyseliny, čímž se posílí biosyntetická dráha vedoucí k produkci námelových alkaloidů. Biosyntéza námelových alkaloidů se také zvýší vložením genu pro přeměnu tryptofanu na dimethylallyltryptofan, klíčový meziprodukt biosyntézy námelových alkaloidů, pod konstitutivní promotor. Takto geneticky upravené mikroorganismy jsou vhodné pro uplatnění při výrobě námelových alkaloidů pro farmaceutický průmyslový sektor.

Gen kódující anthranilát synthasu (TrpE) s mutací S76L, tj. gen nesoucí mutaci kodónu aminokyseliny serinu (kodón AGC) v pozici 76 na kodón leucinu (kodón CTC) má sekvenci SEQ ID NO. 1.

Gen kódující dimethylallyltryptofan synthetasy (DmaW) má sekvenci SEQ ID NO. 2.

Oba dva uvedené geny jsou geny pocházející z houby *Claviceps purpurea*, případně upravené vnesením mutace, a vložené do genomu houby *Claviceps purpurea* pod kontrolu konstitutivního promotoru. Výsledný mikroorganismus tedy nese své původní geny *trpE* a *dmaW*, a zároveň nese genetickou transformací vnesený uvedený alespoň jeden gen pod kontrolou konstitutivního promotoru.

Vložená nukleotidová sekvence dále obsahuje terminátor (například Gluc terminátor) a může obsahovat kodon-optimalizovaný gen *ogfp* kódující zelený fluorescenční protein pro expresi v *Botrytis cinerea*.

V rámci předkládaného vynálezu bylo zjištěno, že množství námelových alkaloidů v submerzní kultuře, myceliu i médiu transformovaného *Claviceps purpurea* podle předkládaného vynálezu je významně vyšší než množství námelových alkaloidů v nemodifikovaném kmenu *Claviceps purpurea*.

Vložené nukleotidové sekvence jsou řízeny konstitutivním promotorem. Zvláště výhodnými konstitutivními promotory jsou *OliC* promotor jaderného genu kódujícího podjednotku 9 mitochondriální ATP synthetasy nebo *gpdA* promotor genu kódujícího glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu, oba z *Aspergillus nidulans*.

V jednom výhodném provedení jsou geneticky upravené transformanty houby *Claviceps purpurea* pro zvýšenou produkci námelových alkaloidů podle předkládaného vynálezu vybrány ze skupiny zahrnující kmeny označené v příkladech jako OE TrpE S76L 4, OE *ogfp\_dmaW* 8, a uložené v České sbírce mikroorganismů (CCM) pod názvem a označením kmene „*Claviceps purpurea* PN s vloženým genem TrpE s mutací S76L (Cp TrpE SL)“, resp. „*Claviceps purpurea* PN s vloženým genem *ogfp-dmaW* (Cp *dmaW*)“.

Předmětem vynálezu je také způsob přípravy geneticky upravených transformantů houby *Claviceps purpurea*, při němž se připraví expresní kazeta obsahující nukleotidovou sekvenci obsahující alespoň jeden gen vybraný z genu kódujícího anthranilát synthasu s mutací S76L, a genu *dmaW* kódujícího dimethylallyltryptofan synthetasy, přičemž tento gen je pod kontrolou konstitutivního promotoru, a terminátor, popřípadě také kodon-optimalizovaný gen *ogfp* kódující zelený fluorescenční protein pro expresi v *Botrytis cinerea*, a tato expresní kazeta se vloží do genomu houby *Claviceps purpurea*.

Expresní kazeta může být připravena například kvasinkovou rekombinací.

S výhodou se expresní kazeta vloží pomocí metody transformace protoplastů.

Předmětem vynálezu je dále expresní kazeta, která obsahuje konstitutivní promotor, alespoň jeden gen vybraný z genu kódujícího anthranilát synthasu s mutací S76L, a genu *dmaW* kódujícího dimethylallyltryptofan synthetasu, a terminátor. Promotorem je s výhodou *OliC* promotor jaderného genu kódující podjednotku 9 mitochondriální ATP synthetasy z *Aspergillus nidulans* nebo *gpdA* promotor genu kódujícího glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu z *Aspergillus nidulans*. Terminátorem je s výhodou Gluc terminátor.

Expresní kazeta může volitelně dále jako kódující sekvenci obsahovat kodon-optimalizovaný gen *ogfp* kódující zelený fluorescenční protein pro expresi v *Botrytis cinerea*, který slouží jako N-koncová fúzní doména cílového enzymu.

V jednom výhodném provedení expresní kazeta obsahuje: *OliC* promotor::*trpE*<sup>S76L</sup>::Gluc terminátor a má sekvenci SEQ ID NO. 3.

V dalším výhodném provedení expresní kazeta obsahuje: *OliC* promotor::*ogfp-dmaW*::Gluc terminátor a má sekvenci SEQ ID NO. 4.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále použití uvedených expresních kazet pro přípravu houby *Claviceps purpurea* jako produkčního mikroorganismu pro výrobu námelových alkaloidů.

**Nukleotidová sekvence genu *trpE* kódujícího anthranilát synthasu s mutací S76L (1840 bp, SEQ ID NO. 1)**

ATGGCGAGCCCGGTAAGTACTGCATGCGCCCCCTCTGGCCGAATTGGCCCTCTTCCCG  
 GCGCGGCGCAGTAGGAATAGCCTCCAAAAAGACACAAAGCCTGACTCTTGAGAATC  
 GCGAATCCAAAAAACACAGCAGGCCATCGTCCCTACGCTCGAGACCGTGCGATCC  
 ATCATTGCGAAACCCCCCGTCGGATCCGCCAAAAAAGCCACCCCTCGTGCCCGTATAC  
 CGCCAAATCTCCTCGGACCTCATCACCCCTCGGCGGCCTACCTCAAAATCTCAGCC  
 GCCTCCTCCTCCGACTACTCCTTCTCTTCGAGTCCGCCGCCACAGAGCAAGTCGGCC  
 GGTATCTCTTCGTAGGCGCCGGCCCGCGCAAAGTCCTCGCCACCGGACCAGGCTACG  
 GCCCCGAAACAGACCCCTTCCCGCACTGGAAGCAGAACTAGCTCAACATGTCTGTCG  
 CGCATGTGCCAGGTCTCCAGCTGCCTCCTCTTACCGGCGGCGCAATCGGCTACGTGG  
 GCTACGACTGCGTACGGTACTTTGAGCCCAAGACCGCGCGGCCCATGAAAGATGTCC  
 TACAAATCCCAGAATCACTCTTCATGCTCTTCGACACAATTGTCTCGGTTTGATCGCTT  
 CTACGGCATCATCAAGGTCATCAGCTACGTGGCCGTTCCGGAAGACGACGGTACCAC  
 CAGCCTAGAAAGAGGCCTACGAAAAAGCCGAGCGCGCAATCCACCAACTCGTCCAGG  
 TCCTCAACTCAACAGAGATTGACCTCCCGACCCAAGACCCCATCCAGCTCGGCCACG  
 AAGCCACCTCGAATATCGGCCAAGCGGGCTACGAGGCCACGTGACCAAACCTCAAG  
 GAGCACATCGTCAAGGGGGATATCTTCCAGTGTGTGCCCTCGCAGCGGTTTGCGCGC  
 CCGACGAGTCTGCACCCGTTCAATATCTACAGGCATCTCCGGACGGTGAATCCCTCG  
 CCGTACCTCTTTTATGTGAATTGCAAGGATTTCCAGATTGTAGGTGCCTCGCCTGAAT  
 TGCTCGTCAAGTCCGAGGCGGGCGTATCATCACGCATCCCATTGCTGGGACAGTCA  
 AGCGCGGCAGCACACCCGAGGAGGACCAGCGCTTGGCGGATGAGCTGAGTAGTTTCG  
 CTCAAGGACCGCGCGGAGCATGTCTGTTGATTGGCTCGGAATGACATCAAC  
 CGCGTAGGGGACCCGTATTCCGTCCGCGTGGACCGCCTTATGGTCGTGGAGAAGTTT  
 AGCCATGTCCAGCATCTTGTTCGAGGTCTCAGGGGTGCTGCGGCCGGATAAGACG  
 CGCTTTGATGCGTTTCGATCGGTTTTCCCCGCGGGGACGGTCTCGGGAGCGCCCAAG  
 GTGCGGGCGATGGAACCTGATTGCCGAGTTGGAGAAGGAGAAGAGGGGGGTGTATGC  
 TGGCGCGGTGGGCTACTTTGGGTATGGGAGCCAGGATGAGAATGGGGGCGCTGTGG  
 AGGGGGCTATGGATACGTGTATTGCGTTGAGGACGATGTTGGTCAAGGACGGGGTG  
 GCGTATTTGCAGGCAGGTTCTGTACAGATCTTGGTTGAGCCAAGGATCCCCCCCCCTCT  
 CTCCCCCTTTCTTGCTGTACGTTACGCATTTCTATGCACGGTACGCACTCCTGAGA  
 GAAAATACAGTTTGCTAACACTTCCCCCCCCCTTTTTTTTGGCTTTCGATTTAGGAGGC  
 GGAATTGTGTTTGATTTCAGACGAATACGATGAGTGGATCGAGACGATCAACAAGCTC

GGCAGCAACATGACGTGCATCAAGTCAGCAGAGGAGATGTATTACCAGCAGCAGCA  
AAACGAGAAAACCATAG

Nukleotidová sekvence genu *dmaW* kódujícího dimethylallyltryptofan syntasu (1466 bp,  
SEQ ID NO. 2)

ATGTCGACCGCAAAGGACCCAGGAAACGGTGTGTACGAAATTTTGAGTCTGATTTTT  
GATTTCCCGAGCAATGAACAGCGACTATGGTGGCACAGTACCGCGCCTATGTTTGCG  
GCGATGCTTGACAATGCCGGCTACAATATCCACGACCAATACCGGCATCTGGGCATT  
10 TTCAAGAAGCACATTATCCCTTTTCTTGGTGTCTATCCAACAAAAGACAAGGAAAGA  
TGGCTCAGCATCCTCACCAGATGTGGCCTTCCTTTGGAATTGAGCTTGAATTGTACCG  
ACTCTGTTGTTTCGATATACATACGAGCCCATCAATGAAGTGACGGGGACGGAGAAA  
GATCCGTTCAATACATTGGCAATTATGGCAAGTGTCAAAACTTGACACAGATTCAA  
GCGGGTATCGACTTGGAGTGGTTTAGTTACTTCAAAGATGAGCTGACGCTGGACGAA  
15 TCGGAATCGGCCACACTTCAAAGTAATGAGCTGGTCAAGGAGCAGATAAAGACGCA  
GAACAAGTTGGCCTTGGATCTCAAAGAAAGCCAGTTCGCGCTCAAAGTTTACTTCTA  
TCCGCATCTTAAATCGATCGCGACCGGCAAATCCACACACGATCTCATCTTCGACTC  
TGTGTTCAAACGTGTCGCAGAAGCATGACAGCATAACAGCCCGCGTTCCAGGTATTGTG  
CGACTATGTTTCGCGGGCGAAATCATTCCGCAGAATCAGACCAACACATAGCCCTACA  
20 TCGCGGACTCTTGTCATGCGATTTGATCGATCCCGCCAAGTCTCGCGTCAAGATATAC  
CTGCTGGAGAAGACGGTCTCGTTGTCGTTGATGGAAGATCTGTGGACGCTGGGCGGC  
CAACGAGTCGACGCATCCACCATGGACGGCCTTGACATGCTTCGCGAGCTCTGGAGC  
CTGCTAAAAGTTCCCACTGGCCACTTGGAGTATCCAAAAGGGTATCTGGAATTGGGA  
GAAATTCCGAACGAGCAGCTCCCATCCATGGCCAACTATACACTGCACCACAACAAC  
25 CCCATGCCTGAGCCCCAGGTGTATTTACGGTTTTTCGGCATGAATGACGCCGAAATC  
AGCAATGCTTTGACCATCTTCTTCCAACGTCACGGATTTGACGACATGGCGAAAAAG  
TACCGAGTCTTTCTTCAGGATTCATAGTGAGTGCTCCGAGCCCGATCGATAGGCAAC  
AGGTGTCTAACAATTAGCCCCCTTTCTCCTACAGCCCGTATCATGACTTTGAGTCATT  
GAACTACCTCCACGCATATATCTCATTCTCTTACCGTCGAAACAAGCCGTATTTGAGC  
30 GTATATTTGCATACGTTTGAGACTGGTTCGTTGGCCCCGTGGTGAGTCTACCGAACTTT  
ATCAACATGGGCTCCGCAAGCTGAACAATTTCTAGTTGCCGACAGCCCAATTTCTTT  
CGACGCCTACCGGCGCTGTGACCTCTCAACGAAGTAG

### SEQ ID NO. 3

Pozice jednotlivých funkčních úseků

OliC promotor – 1-845 bp

trpE S76L – 846 – 2685 bp

Gluc terminátor – 2686 – 3185 bp

TGCAGCTGTGGAGCCGCATTCCCGATTCCGGGCCGGATTGGTCAAGATTTGCGTCCGA  
45 GGTGCCGTCTATCATTCTAGCTTGCGGTCTTGGGCTTGTGACTGGTCGCGAGCTGCCA  
CTAAGCGGGGCAGTACCATTTTATCGGACCCATCCAGCTATGGGACCCACTCGCAAA  
TTTTTACATCATTTTCTTTTGTCTAGTAACGGCCACCTTTTGTAAGCGTAACCAGC  
AAACAAATTGCAATTGGCCCGTAGCAAGGTAGTCAGGGCTTATCGTGATGGAGGAG  
AAGGCTATATCAGCCTCAAAAATATGTTGCCAGCTGGCGGAAGCCCGGAAGGTAAG  
50 TGGATTCTTCGCCGTGGCTGGAGCAACCGGTGGATTCCAGCGTCTCCGACTTGGACT  
GAGCAATTCAGCGTCACGGATTCACGATAGACAGCTCAGACCGCTCCACGGCTGGC  
GGCATTATTGGTTAACCCGGAAGCTCAGTCTCCTTGGCCCCGTCCCGAAGGGACCCG  
ACTTACCAGGCTGGGAAAGCCAGGGATAGAATACACTGTACGGGCTTCGTACGGGA  
GGTTCGGCGTAGGGTTGTTCCCAAGTTTTTACACACCCCCCAAGACAGCTAGCGCACG  
55 AAAGACGCGGAGGGTTTGGTGAAAAAAGGGCGAAAATTAAGCGGGAGACGTATTTA

GGTGCTAGGGCCGGTCTCCTCCCCATTTTTCTTCGGTTCCTTTCTCTCCTGGAAGACT  
 TTCTCTCTCTCTTCTTCTTCTTCCATCCTCAGTCCATCTTCTTTCCCATCATCCATC  
 TCCTACCCCCATCTCAACTCCATCACATACAATCGATCCAACCATGGCGAGCCCG  
 GTAAGTACTGCATGCGCCCCCTCTGGCCGAATTGGCCCTCTTCCCGGCGCGGCGCAGT  
 5 AGGAATAGCCTCCAAAAAGACACAAAGCCTGACTCTTGAGAATCGCGAATCCAAAA  
 AAACACAGCAGGCCATCGTCCCTACGCTCGAGACCGTGCGATCCATCATTGCGAAAC  
 CCCCCGTCGGATCCGCCAAAAAAGCCACCCTCGTGCCCGTATACCGCCAAATCTCCT  
 CGGACCTCATACCCCCCTCGGCGGCCTACCTCAAAATCTCAGCCGCCTCCTCCTCCG  
 ACTACTCCTTCTCTTCTCGAGTCCGCCGCCACAGAGCAAGTCGGCCGGTATCTCTTCGT  
 10 AGGCGCCGGCCCGCGCAAAGTCCTCGCCACCGGACCAGGCTACGGCCCCGAAACAG  
 ACCCCCTTCCCGCACTGGAAGCAGAACTAGCTCAACATGTCGTCGCGCATGTGCCAG  
 GTCTCCAGCTGCCTCCTCTTACCGGCGGCGCAATCGGCTACGTGGGCTACGACTGCG  
 TACGGTACTTTGAGCCCAAGACCGCGCGGCCCATGAAAGATGTCCTACAAATCCAG  
 AATCACTCTTCATGCTCTTCGACACAATTGTCGCGTTTGATCGCTTCTACGGCATCAT  
 15 CAAGGTCATCAGCTACGTGGCCGTTCCGGAAGACGACGGTACCACCAGCCTAGAAG  
 AGGCCTACGAAAAAGCCGAGCGCGCAATCCACCAACTCGTCCAGGTCTCTCAACTCA  
 ACAGAGATTGACCTCCCGACCCAAGACCCCATCCAGCTCGGCCACGAAGCCACCTCG  
 AATATCGGCCAAGCGGGGCTACGAGGCCACGTGACCAAACCTCAAGGAGCACATCGT  
 CAAGGGGGATATCTTCCAGTGTGTGCCCTCGCAGCGGTTTGCGCGCCCGACGAGTCT  
 20 GCACCCGTTCAATATCTACAGGCATCTCCGGACGGTGAATCCCTCGCCGTACCTCTTT  
 TATGTGAATTGCAAGGATTTCCAGATTGTAGGTGCCTCGCCTGAATTGCTCGTCAAGT  
 CCGAGGCCGGGCGTATCATCACGCATCCCATTGCTGGGACAGTCAAGCGCGGCAGC  
 ACACCCGAGGAGGACCAGCGCTTGGCGGATGAGCTGAGTAGTTGCTCAAGGACCG  
 CGCGGAGCATGTCATGCTTGTGATTGTTGGCTCGGAATGACATCAACCGCGTAGGGGA  
 25 CCCGTATTCCGTCCGCGTGGACCGCCTTATGGTTCGTGGAGAAGTTTAGCCATGTCCA  
 GCATCTTGTTTCGCAGGTCTCAGGGGTGCTGCGGCCGGATAAGACGCGCTTTGATGC  
 GTTTCGATCGGTTTTTCCCGCGGGGACGGTCTCGGGAGCGCCCAAGGTGCGGGCGAT  
 GGAACCTGATTGCCGAGTTGGAGAAGGAGAAGAGGGGGGTGTATGCTGGCGCGGTGG  
 GCTACTTTGGGTATGGGAGCCAGGATGAGAATGGGGGCGCTGTGGAGGGGGCTATG  
 30 GATACGTGTATTGCGTTGAGGACGATGTTGGTCAAGGACGGGGTGGCGTATTTGCAG  
 GCAGGTTTCGTACAGATCTTGGTTGAGCCAAGGATTCCCCCCCCCTCTTCTCCCTTTTC  
 TTGCTGTCACGTTACGCATTTCTATGCACGGTACGCACTCCTGAGAGAAAATACAGT  
 TTGCTAACACTTCCCCCCCCCTTTTTTTTTGCTTTTCGATTTAGGAGGCGGAATTGTGTTT  
 GATTACAGACGAATACGATGAGTGGATCGAGACGATCAACAAGCTCGGCAGCAACAT  
 35 GACGTGCATCAAGTCAGCAGAGGAGATGTATTACCAGCAGCAGCAAAACGAGAAAA  
 CCACATAGCGTATGTAGATAAGATGTATGATTAGGGGTTGAGGGGAAGGATTATGG  
 CTGAGGAAGTGGTTTTCTGATTCGTCTTGTACATAAGTATTAGCATGGACCCTTGTGGA  
 GGTATTTGCTCAAAGGGGGTGTTTTAGCGGAAGACAAAAGAGGGGCGGAATTAAATC  
 TCAATCCGTTTTCAACTTTGAAAATCTTGATCCAACATTGTGATTCCATGTATTTGTG  
 40 CAACCAAGTTTTTCATCATTGATTCTGCTGTAATGTGAACAACTACAAGTAGGAGG  
 ACATTTGTTTTAAAGTTTTTCAGCTCACGTGGTATTGTGGCCTGACAGGAGCACAAACG  
 CCGTTTTTGAGAAAAACGAAAGTTTGGAATTGACCATCCACAACCACATGCGTTTCCT  
 ATGATACACCTCATGTGGCGTTACCATATGATATTCGGTTTTCATATCTAGGCAAAGA  
 GGAGAACATCATACGTACATCTGATTTGACAACCCCTTCCCCCAACAAGAT  
 45

#### SEQ ID NO. 4

Pozice jednotlivých funkčních úseků

50 OliC promotor – 1-845 bp

ogfp bez stop kodonu – 846 – 1622 bp

dmaW – 1623 – 3088 bp

55

Gluc terminátor – 3089 – 3588 bp

TGCAGCTGTGGAGCCGCATTCCCGATTTCGGGCGCGATTGGTCAAGATTTGCGTCCGA  
 GGTGCCGTCTATCATTCTAGCTTGCGGTCTTGGGCTTGTGACTGGTTCGCGAGCTGCCA  
 5 CTAAGCGGGGAGTACCATTTTTATCGGACCCATCCAGCTATGGGACCCACTCGCAAA  
 TTTTACATCATTTTTCTTTTTGCTCAGTAACGGCCACCTTTTGTAAGCGTAACCAGC  
 AAACAAATTGCAATTGGCCCGTAGCAAGGTAGTCAGGGCTTATCGTGATGGAGGAG  
 AAGGCTATATCAGCCTCAAAAATATGTTGCCAGCTGGCGGAAGCCCGGAAGGTAAG  
 TGGATTCTTCGCCGTGGCTGGAGCAACCGGTGGATTCCAGCGTCTCCGACTTGGACT  
 10 GAGCAATTCAGCGTCACGGATTACGATAGACAGCTCAGACCGCTCCACGGCTGGC  
 GGCATTATTGGTTAACCCGGAACTCAGTCTCCTTGGCCCCGTCCCGAAGGGACCCG  
 ACTTACCAGGCTGGGAAAGCCAGGGATAGAATACTGTACGGGCTTCGTACGGGA  
 GGTTTCGGCGTAGGGTTGTTCCCAAGTTTTACACACCCCCCAAGACAGCTAGCGCACG  
 AAAGACGCGGAGGGTTTGGTGAAAAAAGGGCGAAAAATTAAGCGGGAGACGTATTTA  
 15 GGTGCTAGGGCCGGTCTCCTCCCCATTTTTCTTCGGTTCCCTTTCTCTCCTGGAAGACT  
 TTCTCTCTCTTCTTCTTCTTCCATCCTCAGTCCATCTTCCCTTTCCCATCATCCATC  
 TCCTCACCCCCATCTCAACTCCATCACATCACAATCGATCCAACCATGGTTTCCAAGG  
 GTGAGGTAAGTAATCCCGTGCAATGTCCCAAGACTCTTCTCTAATACTTCTACCAGG  
 AGCTTTTCACTGGCGTCGTTCCAATCTTGGTGAAGTTCGATGGTGACGTCAATGGCCA  
 20 TAAGTTCTCAGTCAGCGGAGAGGGTGAGGGAGACGCTACATATGGTAAATTGACTCT  
 TAAGTTCATCTGCACCACAGGTAAATTGCCTGTACCTTGGCCTACACTCGTCACCACC  
 CTCACCTACGGAGTTCAATGCTTTTTCCCGTTACCCAGATCACATGAAACAACATGAC  
 TTTTTCAAGTCTGCAATGCCAGAGGGATATGTCCAAGAGAGAACAATCTTCTTTAAG  
 GATGACGGAAATTATAAGACTCGTGCCGAGGTAAAGTTCGAGGGTGATACTCTCGTC  
 25 AACCGTATTGAGTTGAAGGGCATCGATTTCAAGGAAGACGGAAATATCCTCGGCCAT  
 AAGCTTGAATACAACACTACAACAGTCACAACGTTTATATCATGGCCGACAAGCAAAA  
 AAATGGAATCAAGGTCAACTTCAAAATCAGACACAACATTGAGGATGGCTCTGTTCA  
 ATTGGCAGATCACTACCAACAGAATACTCCAATTGGTGATGGTCCAGTCTTGCTCCC  
 AGATAACCATTACCTCTCCACTCAATCTGCTCTTTCAAAGGACCCTAACGAAAAGCG  
 30 TGACCACATGGTTCTTCTCGAATTTGTACAGCAGCCGGAATTACCTTGGGAATGGA  
 TGAACTTTACAAAGCGGCCGCTATGTGACCGCAAAGGACCCAGGAAACGGTGTGT  
 ACGAAATTTTGAGTCTGATTTTTGATTTCCCCAGCAATGAACAGCGACTATGGTGGC  
 ACAGTACCGCGCCTATGTTTGCGGCGATGCTTGACAATGCCGGCTACAATATCCACG  
 ACCAATACCGGCATCTGGGCATTTTCAAGAAGCACATTATCCCTTTTCTTGGTGTCTA  
 35 TCCAACAAAAGACAAGGAAAGATGGCTCAGCATCCTCACCAGATGTGGCCTTCCTTT  
 GGAATTGAGCTTGAATTGTACCGACTCTGTTGTTGATATACATACGAGCCCATCAA  
 TGAAGTGACGGGGACGGAGAAAGATCCGTTCAATACATTGGCAATTATGGCAAGTG  
 TCCAAAAACTTGCACAGATTCAAGCGGGTATCGACTTGGAGTGGTTTAGTTACTTCA  
 AAGATGAGCTGACGCTGGACGAATCGGAATCGGCCACACTTCAAAGTAATGAGCTG  
 40 GTCAAGGAGCAGATAAAGACGCAGAACAAGTTGGCCTTGGATCTCAAAGAAAGCCA  
 GTTCGCGCTCAAAGTTTACTTCTATCCGCATCTTAAATCGATCGCGACCGGCAAATCC  
 ACACACGATCTCATCTTCGACTCTGTGTTCAAACGTGTCGAGAAGCATGACAGCATA  
 CAGCCCGCGTTCCAGGTATTGTGCGACTATGTTTCGCGGCGAAATCATTCCGCAGAA  
 TCAGACCAACACATAGCCCTACATGCGCGACTCTTGTCATGCGATTTGATCGATCCC  
 45 GCCAAGTCTCGCGTCAAGATATACCTGCTGGAGAAGACGGTCTCGTTGTCCGTGATG  
 GAAGATCTGTGGACGCTGGGCGGCCAACGAGTCGACGCATCCACCATGGACGGCCT  
 TGACATGCTTCGCGAGCTCTGGAGCCTGCTAAAAGTTCCCACTGGCCACTTGGAGTA  
 TCCAAAAGGGTATCTGGAATTGGGAGAAATTCCGAACGAGCAGCTCCCATCCATGGC  
 CAACTATACACTGCACCACAACAACCCCATGCCTGAGCCCCAGGTGTATTTACGGT  
 50 TTTCGGCATGAATGACGCCGAAATCAGCAATGCTTTGACCATCTTCTTCCAACGTAC  
 GGATTTGACGACATGGCGAAAAAGTACCGAGTCTTCTTTCAGGATTCATAGTGAGTG  
 CTCCGAGCCCGATCGATAGGCAACAGGTGTCTAACAATTAGCCCCCTTTCTCTTACA  
 GCCCGTATCATGACTTTGAGTCATTGAACTACCTCCACGCATATATCTCATTCTCTTA  
 CCGTCGAAACAAGCCGTATTTGAGCGTATATTTGCATACGTTTGAGACTGGTTCGTTG  
 55 GCCCGTTGGTGAGTCTACCGAACTTTATCAACATGGGCTCCGCAAGCTGAACAATTT

CCTAGTTGCCGACAGCCCAATTTCTTTTCGACGCCTACCGGCGCTGTGACCTCTCAACG  
 AAGTAGCGTATGTAGATAAGATGTATGATTAGGGGTTGAGGGGAAGGATTATGGCT  
 GAGGAAGTGGTTTCTGATTCTGCTTGTACATAAGTATTAGCATGGACCCTTGTGGAG  
 GTATTTGCTCAAAGGGGGTGTTTTAGCGGAAGACAAAAGAGGGCGGAATTAAATCT  
 5 CAATCCGTTTTCAACTTTGAAAATCTTGATCCAACATTGTGATTCCATGTATTTGTGC  
 AACCAAGTTTTTCATCATTGATTCTGCTGTAATGTGAACAACTACAAGTAGGAGGA  
 CATTGTTTAAAGTTTTAGCTCACGTGGTATTGTGGCCTGACAGGAGCACAAACGC  
 CGTTTTTGAGAAAACGAAAGTTTGGAATTGACCATCCACAACCACATGCGTTTCCTA  
 TGATACACCTCATGTGGCGTTACCATATGATATTCGGTTTCATATCTAGGCAAAGAG  
 10 GAGAACATCATACGTACATCTGATTTGACAACCCCTTCCCCCAACAAGAT

### Objasnění výkresů

15 Obr. 1: Schéma přípravy expresních vektorů pomocí kvasinkového rekombinačního klonování. Vektor *pNDH-OGG* obsahující *ogfp* (A), klonování mutované verze *TrpE* (amplifikace genu *TrpE* z genomové DNA ve dvou částech, hvězdičkou je znázorněna poloha mutace) do *pNDH-OGG* s vyštěpeným *ogfp* (B), klonování *dmaW* (na N-konci DMATS fúze s *ogfp*) do *pNDH-OGG* (C). 3': 3' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea*, 5': 5' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea*.

20 Obr. 2: PCR detekce transgenů v geneticky modifikovaných houbách *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících mutovanou verzi *TrpE* (*TrpE*<sup>S76L</sup>) pod kontrolou konstitutivního *OliC* promotoru (*PoliC*). Detekovaná oblast transgenní DNA je znázorněna pomocí šipek. Černé šipky znázorňují primery nasedající na promotor *OliC* a terminátor *GluC*, mezi kterými se nachází vložený gen. Šedé šipky znázorňují primery nasedající do čtecího rámce *hph* genu, 3': 3' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea*, 5': 5' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea* (A). Detekce části promotoru *OliC*, genu a části terminátoru *GluC*. Velikost ampliconu 2353 bp (B). Detekce *hph* genu. Velikost ampliconu 366 bp (C). M: marker molekulových hmotností, 3, 4, 12: nezávislí transformanti *C. purpurea* s integrovaným transgenem, PK: pozitivní kontrola (plazmidová DNA nesoucí transgen),  
 30 NK: negativní kontrola (gDNA kontrolní WT houby).

Obr. 3: PCR detekce transgenů v geneticky modifikované houbě *C. purpurea* (kmen P1) exprimující *ogfp* pod kontrolou konstitutivního *OliC* promotoru (*PoliC*). Detekovaná oblast transgenní DNA je znázorněna pomocí šipek. Černé šipky znázorňují primery nasedající  
 35 na promotor *OliC* a terminátor *GluC*, mezi kterými se nachází vložený gen. Šedé šipky znázorňují primery nasedající do čtecího rámce *hph* genu, 3': 3' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea*, 5': 5' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea* (A). Detekce části promotoru *OliC*, genu a části terminátoru *GluC*. Velikost ampliconu 1292 bp (B). Detekce *hph* genu. Velikost ampliconu 366 bp (C). M: marker molekulových hmotností, 1: transformant *C. purpurea* s integrovaným transgenem, PK: pozitivní kontrola (plazmidová DNA nesoucí transgen), NK: negativní kontrola  
 40 (gDNA kontrolní WT houby).

Obr. 4: PCR detekce transgenů v geneticky modifikovaných houbách *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících *dmaW* fúzované s *ogfp* (*ogfp-dmaW*) pod kontrolou konstitutivního *OliC* promotoru  
 45 (*PoliC*). Detekovaná oblast transgenní DNA je znázorněna pomocí šipek. Černé šipky znázorňují primery nasedající na promotor *OliC* a terminátor *GluC*, mezi kterými se nachází vložený gen. Šedé šipky znázorňují primery nasedající do čtecího rámce *hph* genu, 3': 3' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea*, 5': 5' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea* (A).

50 Detekce části promotoru *OliC*, genu a části terminátoru *GluC*. Velikost ampliconu 3098 bp (B). Detekce *hph* genu. Velikost ampliconu 366 bp (C). M: marker molekulových hmotností, 7, 8, 13: nezávislí transformanti *C. purpurea* s integrovaným transgenem, PK: pozitivní kontrola (plazmidová DNA nesoucí transgen), NK: negativní kontrola (gDNA kontrolní WT houby).

Obr. 5: RT-PCR detekce transgenů v geneticky modifikovaných houbách *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících mutovanou verzi *TrpE* (*TrpE*<sup>S76L</sup>) nebo *dmaW* fúzané s *ogfp* (*ogfp-dmaW*) a volné *ogfp* pod kontrolou konstitutivního *OliC* promotoru (*PoliC*). Detekce *hph* genu. Velikost ampikonu 366 bp (A). Detekce  $\gamma$ -aktinu. Velikost ampikonu 636 bp (B). M: marker molekulových hmotností, NK: negativní kontrola (gDNA kontrolní WT houby), 4, 12: nezávislí transformanti *C. purpurea* exprimující mutovanou verzi *TrpE*<sup>S76L</sup>; 1: transformant *C. purpurea* exprimující *ogfp*; 8, 13: nezávislí transformanti *C. purpurea* P1 exprimující *dmaW* s *ogfp*.

Obr. 6: PCR detekce transgenů v myceliích WT a geneticky modifikovaných hub *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících mutovanou verzi *TrpE* (*TrpE*<sup>S76L</sup>) pod kontrolou konstitutivního *OliC* promotoru (*PoliC*) po 10ti denní inkubaci v T25N indukčním médiu. Detekovaná oblast transgenní DNA je znázorněna pomocí šipek. Černé šipky znázorňují primery nasedající na promotor *OliC* a terminátor *GluC*, mezi kterými se nachází vložený gen, 3': 3' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea*, 5': 5' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea* (A). Detekce části promotoru *OliC*, genu a části terminátoru *GluC*. Velikost ampikonu 2353 bp (B). M: marker molekulových hmotností, 4, 12: : nezávislí transformanti *C. purpurea* exprimující mutovanou verzi *TrpE*<sup>S76L</sup>, PK: pozitivní kontrola (plazmidová DNA nesoucí transgen - mutovanou verzi *TrpE*<sup>S76L</sup>), NK: negativní kontrola (gDNA kontrolní WT houby), A-F: 6 biologických replikátů.

Obr. 7: PCR detekce transgenů v myceliích WT a geneticky modifikovaných hub *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících mutovanou verzi *TrpE* (*TrpE*<sup>S76L</sup>) pod kontrolou konstitutivního *OliC* promotoru (*PoliC*) po 10ti denní inkubaci v T25N indukčním médiu. Detekovaná oblast transgenní DNA je znázorněna pomocí šipek. Šedé šipky znázorňují primery nasedající do čtecího rámce *hph* genu, 3': 3' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea*, 5': 5' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea* (A). Detekce *hph* genu. Velikost ampikonu 366 bp (B). M: marker molekulových hmotností; 4, 12: : nezávislí transformanti *C. purpurea* exprimující mutovanou verzi *TrpE*<sup>S76L</sup>, PK: pozitivní kontrola (plazmidová DNA nesoucí transgen - mutovanou verzi *TrpE*<sup>S76L</sup>), NK: negativní kontrola (gDNA kontrolní WT houby), A-F: 6 biologických replikátů.

Obr. 8: PCR detekce transgenů v myceliích WT a geneticky modifikovaných hub *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících *ogfp* nebo *dmaW* fúzané s *ogfp* (*ogfp-dmaW*) pod kontrolou konstitutivního *OliC* promotoru (*PoliC*) po 14ti denní inkubaci v T25N indukčním médiu. Detekovaná oblast transgenní DNA je znázorněna pomocí šipek. Černé šipky znázorňují primery nasedající na promotor *OliC* a terminátor *GluC*, mezi kterými se nachází vložený gen, 3': 3' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea*, 5': 5' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea* (A). Detekce části promotoru *OliC*, genu a části terminátoru *GluC*. Velikost ampikonu 1292 bp nebo 3098 bp (B). M: marker molekulových hmotností, 1: transformant *C. purpurea* exprimující *ogfp*; 7, 8, 13: : nezávislí transformanti *C. purpurea* exprimující *ogfp-dmaW*, PK1: pozitivní kontrola (plazmidová DNA nesoucí *ogfp*), PK2: pozitivní kontrola (plazmidová DNA nesoucí transgen – *dmaW* s *ogfp*), NK: negativní kontrola (gDNA kontrolní WT houby), A-F: 6 biologických replikátů.

Obr. 9: PCR detekce transgenů v myceliích WT a geneticky modifikovaných hub *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících *ogfp* nebo *dmaW* fúzané s *ogfp* (*ogfp-dmaW*) pod kontrolou konstitutivního *OliC* promotoru (*PoliC*) po 14ti denní inkubaci v T25N indukčním médiu. Detekovaná oblast transgenní DNA je znázorněna pomocí šipek. Šedé šipky znázorňují primery nasedající do čtecího rámce *hph* genu, 3': 3' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea*, 5': 5' flank nitrát reduktasy *Botrytis cinerea* (A). Detekce *hph* genu. Velikost ampikonu 366 bp (B). M: marker molekulových hmotností, 1: transformant *C. purpurea* exprimující *ogfp*, 7, 8, 13: : nezávislí transformanti *C. purpurea* exprimující *ogfp-dmaW*, PK1: pozitivní kontrola (plazmidová DNA nesoucí *ogfp*), PK2: pozitivní kontrola (plazmidová DNA nesoucí transgen - *dmaW* s *ogfp*), NK: negativní kontrola (gDNA kontrolní WT houby), A-F: 6 biologických replikátů.

Příklady uskutečnění vynálezu

## Příklad 1: Příprava geneticky modifikovaných hub

## 1. Příprava expresních vektorů

Byly připraveny dva expresní vektory (SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 3): první vektor obsahoval gen *dmaW*, který kóduje dimethylallyltryptofan syntasu, DMATS (*EnsemblFungi: CPUR\_04076*, SEQ ID NO. 2) další vektor obsahoval mutovanou verzi genu *TrpE* (*TrpE<sup>S76L</sup>*) pro anthranilát syntasu (*EnsemblFungi: CPUR\_05013*, SEQ ID NO. 1). Oba výše zmíněné geny byly umístěny pod kontrolu konstitutivního *OliC* promotoru jaderného genu *Aspergillus nidulans* kódujícího podjednotku 9 mitochondriální ATP synthetasy. V případě genu *dmaW* bylo na N-konci DMATS ponecháno *ogfp* tj. kodon optimalizované *egfp* pro expresi v *Botrytis cinerea* (Leroch M, Memke D, Koppenhoefer D, Schneider P, Mosbach A, Doehlmann G, Hahn M. (2011), *Applied and Environmental Microbiology* 77.9 (2011): 2887-2897).

Oba výše zmíněné expresní vektory byly připraveny kvasinkovým rekombinačním klonováním (Obr. 1) (Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkowich KA, Dunlap JC. (2006), *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10352–10357) za použití vektoru *pNDH-OGG* (Schumacher J (2012), *Fungal Genetics and Biology*, 49(6), 483-497). Sekvence genů *dmaW* a *TrpE* byly amplifikovány z genomové DNA *Claviceps purpurea*, kmene 20.1 pomocí Phusion High-Fidelity DNA polymerázy (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). V případě genu *TrpE* s mutací *S76L* byla sekvence tohoto genu amplifikována ve dvou krocích, přičemž do sekvence použitých primerů byla vnesena požadovaná mutace.

Sekvence primerů použitých na amplifikaci genu *dmaW* s přesahem na *ogfp* a s přesahem na terminátor *GluC*

5'- GAACTTTACAAAGCGGCCGCTATGTCGACCGCAAAGGACCCAGGAAAC - 3' (SEQ ID NO. 5)

5'- GTGACCTCTCAACGAAGTAGCGTATGTAGATAAGATGTATGATTAGG - 3' (SEQ ID NO. 6).

Sekvence primerů použitých na amplifikaci genu *TrpE* s mutací *S76L* – část 1 s přesahem na promotor *OliC* a s požadovanou mutací

5'- CCATCACATCACAATCGATCCAACCATGGCGAGCCCGGTAAGTACTGC - 3' (SEQ ID NO. 7)

5'- TACGAAGAGATACCGGCCGACTTGCTCTGTGGCGGCGGACTCGAA - 3' (SEQ ID NO. 8).

Sekvence primerů použitých na amplifikaci genu *TrpE* s mutací *S76L* – část 2 s požadovanou mutací a přesahem na terminátor *GluC*

5'- CACAGAGCAAGTCGGCCGGTATCTCTTCGTAGGC - 3' (SEQ ID NO. 9)

5'- CATACATCTTATCTACATACGCTATGTGGTTTTCTCGTTTTGCTGCTGCTG GTA- 3 (SEQ ID NO. 10).

V případě klonování mutované verze *TrpE<sup>S76L</sup>* byl vektor *pNDH-OGG* štěpen restrikčními endonukleázami *NotI* a *NcoI* (New England Biolabs), v případě klonování genu *dmaW* byl vektor *pNDH-OGG* štěpen restrikční endonukleázou *NotI* (New England Biolabs).

Získané DNA fragmenty byly transformovány do uracil auxotrofního kmene *Saccharomyces cerevisiae* (kmen FGSC 9721, Fungal Genetics Stock Center, Manhattan, USA). Transformace byla provedena dle Winston F, Dollard C, Ricupero-Hovasse SL. (1995), *Yeast*, 11(1), 53-55. V mikrozkuhavce byly smíchány 50% PEG 3350, 1M LiOAc, naštěpený vektor *pNDH-OGG* a PCR fragment amplifikovaný z gDNA *C. purpurea* 20.1. K této směsi byly přidány buňky *S. cerevisiae* FGSC 9721, které byly předem promyty sterilní vodou a 100 mM octanem lithným, ve kterém byly následně i resuspendovány. Jako pozitivní kontrola sloužila mikrozkuhavka, do které byl pipetován nenaštěpený vektor *pNDH-OGG*, v případě negativní kontroly byl do mikrozkuhavky pipetován pouze naštěpený vektor bez DNA amplikonu. Do takto připravených mikrozkuhovek byla přidána denaturovaná DNA ze spermií lososa (Sigma-Aldrich). Takto připravená směs byla inkubována při 30 °C, poté při 42 °C a následně byla rozetřena na misky s SD agarem bez uracilu (20 g *D*-glukosa monohydrát, 6,7 g kvasinkové dusíkaté báze bez aminokyselin, 0,77 g směsi aminokyselin a výživových látek bez uracilu, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH upraveno na 5,8, autoklávováno 20 min při 120 °C). Po třech dnech inkubace při 28 °C byly narostlé kolonie *S. cerevisiae* FGSC 9721 z agaru setřeny a pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu (Qiagen, Hilden, Německo) z nich byla izolována plazmidová DNA, která byla následně použita na transformaci bakterií *Escherichia coli* (kmen TOP 10) (New England Biolabs). K buňkám *E. coli* TOP 10 v mikrozkuhavce byla pipetována plazmidová DNA. Po inkubaci na ledu byl buňkám udělen teplotní šok při 42 °C a směs byla opět přenesena na led. Poté bylo ke směsi přidáno 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 mM chloridu draselného, pH upraveno na 7,0 a doplněno destilovanou vodou do 1 l. Po autoklávování 20 min při 120 °C bylo do roztoku přidáno 20 ml 1M *D*-glukosy a 5 ml 2M chloridu hořečnatého) a po 1h inkubaci při 37 °C byly buňky *E. coli* TOP10 rozetřeny na misky s LB agarem (9,5 g chlorid sodný, 15,5 g LB Broth, 15 g agar, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH upraveno na 7,2, autoklávováno 20 min při 120 °C) a Ampicilinem (Sigma-Aldrich) o finální koncentraci 100 µg/ml. Misky byly inkubovány do dalšího dne při 37 °C. Poté byla z narostlých kolonií *E. coli* TOP10 izolována pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu (Qiagen) plazmidová DNA. Výsledné konstrukty byly ověřeny pomocí restriční analýzy a komerční sekvenace (SEQme, Dobříš, Česká republika).

## 2. Transformace *Claviceps purpurea* a následná selekce získaných hub

Na transformaci protoplastů *C. purpurea* (kmen P1) (Tudzynski P, Hölter K, Correia T, Arntz C, Grammel N, Keller U. (1999), *Molecular and General Genetics MGG*, 261(1), 133-141) byla použita připravená plazmidová DNA a též vektor *pNDH-OGG* obsahující volné *ogfp*. Před transformací byly vektory linearizovány restriční endonukleázou *Pst*I (New England Biolabs), restriční směsi byly přečištěny pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu (MACHEREY-NAGEL GmbH and Co. KG, Berlín, Německo). Takto připravené vektory byly transformovány do *C. purpurea* (kmen P1), která produkuje v submerzní kultuře ergotamin, ergotaminin,  $\alpha$ -ergokryptin a  $\alpha$ -ergokryptinin (Haarmann T, Lorenz N, Tudzynski P. (2008), *Fungal Genetics and Biology*, 45(1), 35-4). Transformace protoplastů *C. purpurea* (kmen P1) probíhala následujícím postupem. Po 3 dnech byla kultura *C. purpurea* P1 v BII médiu (100 g sacharóza, 5 g pepton, 5 g *L*-asparagin monohydrát, 1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, 0,01 g síran železnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH upraveno na 5,8, autoklávováno 20 min při 120 °C) centrifugována a poté byla promyta SmaC pufrem (123,88 g sorbitol, 5,88 chlorid vápenatý, doplněno do 800 ml 0,2 M malátem draselným, autoklávováno 20 min při 120 °C). K myceliu byl přidán protoplastizační roztok (100 mg lyzační enzym z *Trichoderma harzianum* ve 20 ml SmaC pufru, sterilizováno přes filtr s velikostí pórů 0,22 µm). Po 2h inkubaci při 28 °C byla směs filtrována přes Nytexovou membránu (Fluka, Německo). Filtrát byl centrifugován a 2x promyt STC pufrem (154,84 g sorbitol, 1,22 g Tris, 7,36 g chlorid vápenatý, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH upraveno na 7,5, autoklávováno 20 min při 120 °C), ve kterém byl pelet následně resuspendován. Ve zkuhavce byla smíchána přečištěná linearizovaná plazmidová DNA, STC pufr a protoplasty *C. purpurea* P1. Po 20min inkubaci byl do zkuhavky přidán PEG 6000, po další 5min inkubaci byl přidán STC pufr.

Do první Petriho misky byl nalit transformační BII agar (200 g sacharóza, 5 g pepton, 5 g L-asparagin monohydrát, 1 g hydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH upraveno na 8,0, autoklávováno 20 min při 120 °C) a protoplasty *C. purpurea* P1 (pro kontrolu protoplastizace). Do druhé misky byl nalit transformační BII agar a transformační směs (pro kontrolu transformace), do zbylých misek pak transformační BII agar a transformační směs; tyto misky byly po 24 h přelity BII transformačním agarem s Hygromycinem gold (InvivoGen, San Diego, Kalifornie, USA) tak, aby finální koncentrace antibiotika v médiu byla 200 µg/ml. Jako marker pro selekci transgenních hub byl tedy použit gen rezistence k hygromycinu (*hph*), který je součástí vektoru *pNDH-OGG*. Houby narostlé po transformaci byly přeneseny na nové BII médium obsahující Hygromycin ve finální koncentraci 200 µg/ml. Houby byly kultivovány ve tmě při 26 °C.

### 3. Izolace genomové DNA, detekce transgenu pomocí PCR analýzy

Z mycelií transformantů *C. purpurea* (kmen P1) byla izolována genomová DNA (Cenis JL. (1992), Nucleic Acids Res 20:2380). K lyofilizovaným myceliím transformantů *C. purpurea* P1 v mikrozkuhavce byl přidán 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 upraveno na 8,5), po 15min inkubaci byl ke směsi přidán 5 mol.l<sup>-1</sup> octan draselný. Po 20min inkubaci při -20 °C byly vzorky centrifugovány, supernatant byl smíchán s isopropanolem. Po 45min inkubaci při -20 °C byly vzorky centrifugovány a pelet byl promyt 70% ethanolem (-20 °C). Pelet byl vysušen a resuspendován v beznukleázové (nuclease-free) vodě.

Integrace transgenu byla ověřena na genomové úrovni metodou PCR s použitím GoTaq G2 Flexi DNA polymerázy (Promega corporation, Madison, Wisconsin, USA) a využitím dvou sad primerů. U každého předpokládaného transformanta byla ověřována přítomnost *hph* genu, který je součástí vektoru *pNDH-OGG* (5'-GAATTCAGCGAGAGCCTGAC-3' (SEQ ID NO. 11) a 5'-ACATTGTTGGAGCCGAAATC-3' (SEQ ID NO. 12)) a přítomnost transgenu (5'-CCCGGAAACTCAGTCTCCTT-3' (SEQ ID NO. 13) a 5'-GTCTTCCGCTAAAACACCCC-3' (SEQ ID NO. 14)). Jako negativní kontrola byla použita genomová DNA z WT *C. purpurea* (kmen P1), jako pozitivní kontroly byly použity připravené plasmidové DNA s jednotlivými geny (obr. 2 až 4).

Vybrané získané transformanty s nejvyššími aktivitami byly uloženy v České sbírce mikroorganismů, CCM:

*OE TrpE*<sup>S76L</sup> 4 = CCM8984 (*Cp TrpE SL*)

*OE ogfp-dmaW* 8 = CCM8983 (*Cp dmaW*)

### 4. Izolace homokaryotických kultur *C. purpurea*

Homokaryotické kultury hub *C. purpurea* (kmen P1) byly získány metodou sekání špiček hyf. Houby byly po dobu 1 týdne pěstovány na Mantle agaru (100 g sacharóza, 10 g L-asparagin monohydrát, 1 g dusičnan vápenatý tetrahydrát, 0,25 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,25 g síran hořečnatý heptahydrát, 0,033 g síran železnatý heptahydrát, 0,027 g síran zinečnatý heptahydrát, 0,01 g L-cystein, 0,1 g kvasinkový extrakt, 20 g agar, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH upraveno na 5,2, autoklávováno 20 min při 112 °C), a poté byly pod stereomikroskopem řezány špičky hyf za dichotomálním větvením, špičky hyf byly přeneseny na nový Mantle agar. Tento postup byl opakován třikrát.

Ze všech získaných homokaryotických kultur *C. purpurea* byla izolována genomová DNA a pomocí metody PCR byla znovu ověřena přítomnost transgenu a *hph* genu.

## Příklad 2: Studium exprese transgenní DNA

RNA z transformantů a WT (divokého typu) *C. purpurea* (kmen P1) byla izolována pomocí RNAqueous kitu (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Takto získaná RNA byla ošetřena DNAsou (Thermo Fischer Scientific) a poté přesrážena LiCl (Thermo Fischer Scientific). Následně proběhl přepis do cDNA pomocí reverzní transkriptázy RevertAid H Minus M-MULV (Thermo Fischer Scientific). RT-PCR byla provedena pomocí GoTaq G2 Flexi DNA polymerázy (Promega corporation), byly použity dvě sady primerů. Jedna sada primerů byla použita na amplifikaci *hph* genu (5'-GAATTCAGCGAGAGCCTGAC-3' (SEQ ID NO. 11) a 5'-ACATTGTTGGAGCCGAAATC-3' (SEQ ID NO. 12)), druhá na amplifikaci genu kódujícího  $\gamma$ -aktin, který sloužil jako endogenní kontrola (*EnsemblFungi: CPUR 01270*, 5'-CGCTCTCGTCATCGACAAT-3' (SEQ ID NO. 15) a 5'-ATTTCACGCTCGGCAGTAGT-3' (SEQ ID NO. 16)) (obr. 5).

Příklad 3: Měření obsahu námelových alkaloidů v submerzních kulturách hub *C. purpurea* P1

## 1. Příprava vzorků

Transformanti *C. purpurea* (kmen P1) byli společně s WT *C. purpurea* (kmen P1) kultivováni po dobu 3 týdnů na Mantle agaru. Poté byla každá houba očkovaná do 6ti 250 ml Erlenmayerových baněk s 50 ml tekutého preinokulačního InoCN média (100 g sacharóza, 10 g kyselina citronová monohydrát, 0,12 g chlorid draselný, 0,5 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, 1 g dusičnan vápenatý tetrahydrát, 0,075 g amid kyseliny nikotinové, 0,006 g síran zinečnatý heptahydrát, 0,007 g síran železnatý heptahydrát, pH upraveno pomocí 10% NH<sub>4</sub>OH na 5,2, doplněno destilovanou vodou na 1 l, autoklávováno 15 min při 105 °C). Po 5 dnech inkubace ve tmě při 26 °C a na třepačce (200 ot./min) byly kultury centrifugovány po dobu 5 min (4700 ot./min, 22 °C). Ke každému myceliu byla v závislosti na jeho hmotnosti přidána sterilní voda (k 6,97 g mycelia bylo přidáno 40 ml vody). Pomocí ručního mixéru (BangCo, Brno, Česká republika) byla kultura homogenizována a 2 ml získané biomasy byly pipetovány do 250ml Erlenmayerovy baňky obsahující 50 ml indukčního T25N média (300 g sacharóza, 15 g kyselina citronová monohydrát, 0,12 g chlorid draselný, 0,5 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, 1 g dusičnan vápenatý tetrahydrát, 0,075 g amidu kyseliny nikotinové, 0,006 g síran zinečnatý heptahydrát, 0,007 g síran železnatý heptahydrát, pH upraveno pomocí 10% NH<sub>4</sub>OH na 5,2, doplněno destilovanou vodou na 1 l, autoklávováno 20 min při 115 °C). Kultury *C. purpurea* exprimující *TrpE*<sup>S76L</sup> byly společně s WT inkubovány po dobu 10 dní ve tmě při 26 °C na třepačce (200 ot./min), kultury exprimující *ogfp-dmaW* a volné *ogfp* byly společně s WT kultivovány po dobu 14 dní ve tmě při 26 °C na třepačce (200 ot./min).

Po kultivaci byly kultury filtrovány přes Miracloth membránu (Merck, Darmstadt, Německo), pro další analýzy byla použita média i mycelia. U médií byl změřen jejich objem, mycelia byla lyofilizována po dobu 48 h v lyofilizátoru SCANVAC (Trigon-plus, Říčany u Prahy, Česká republika).

## 2. Detekce transgenu pomocí PCR analýzy

Ze získaných lyofilizovaných mycelií byla opět izolována genomová DNA a pomocí metody PCR byla ve vzorcích ověřena přítomnost transgenu a *hph* genu (viz příklad 1, bod 3., detekce transgenu pomocí PCR analýzy) (obr. 6 až 9).

50

## 3. Extrakce námelových alkaloidů z médií

2 ml T25N indukčního média z kultivace WT a transformantů *C. purpurea* (kmen P1) byly smíchány se 2 ml vody, vzorky byly pipetovány na kolonky SPE Catridges Octadecyl C18/18% (Applied Separations, Allentown, PA, USA), které byly aktivovány 5 ml acetonitrilu a následně

55

5 ml vody. Po promytí kolonek 5 ml vody, byly námelové alkaloidy eluovány 3 ml směsí uhličitanu amonného a acetonitrilu v poměru 1:4. Eluát byl odpařen za vakua při 37 °C v SPD SpeedVac přístroji (Thermo elektron, Waltham, MA, USA), získaný odparek byl rozpuštěn v 1 ml 80% methanolu. Následně byl vzorek filtrován přes kolonky Costar SpinX 22 µm (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Na UHPLC bylo analyzováno 5 µl této směsi.

#### 4. Extrakce námelových alkaloidů z mycelií

150 mg lyofilizovaného mycelia z kultivace WT a transformantů *C. purpurea* (kmen P1) bylo extrahováno 1 ml směsí acetonu a 4% kyseliny vinné v poměru 1:1. Po inkubaci na třepačce přes noc při pokojové teplotě byla směs centrifugována po dobu 10 min (14 000 ot./min, 22 °C), supernatant byl odpařen za vakua při 37 °C v SPD SpeedVac přístroji, získaný odparek byl rozpuštěn v 500 µl 80% methanolu. Následně byl vzorek filtrován přes kolonky Costar SpinX 22 µm (Sigma-Aldrich). Na UHPLC bylo analyzováno 5 µl této směsi.

#### 5. Stanovení obsahu námelových alkaloidů

Připravené vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC (ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie) s využitím systému Nexera (Shimadzu, Praha, Česká republika), který byl vybaven C18 kolonou s obrácenou fází (Zorbax RRHD Eclipse Plus 1,8 µm, 2,1 mm X 150 mm, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Mobilní fáze A obsahovala 0,15% (w/w) kyselinu octovou (pH = 4,4) a acetonitril v poměru 4:1, mobilní fáze B obsahovala acetonitril a vodu v poměru 4:1. Ve vzorcích byly stanovovány následující námelové alkaloidy: ergotamin, ergotaminin, α-ergokryptin a α-ergokryptinin (metodika: Čudejková MM, Vojta P, Valík J, Galuszka P. (2016), *New Biotechnology*, 33(5), 743-754, 2016). Monitoring byl proveden při 317 nm. Koncentrace alkaloidů byla odečtena z plochy píků za použití LabSolution softwaru (Shimadzu). Koncentrace jednotlivých alkaloidů byla přepočítána na 1 mg lyofilizovaného mycelia a 1 ml T25N indukčního média.

Ze získaných dat byly pomocí Grubbsova testu vyloučeny odlehlé hodnoty, získaná data byla podrobena testu Kruskal-Wallis ANOVA s Bonferroniho korekcí (Statistika 12 software).

V tab. 1 je shrnuto průměrné množství námelových alkaloidů v 1 mg lyofilizovaného mycelia (WT, *OE ogfp*, *OE ogfp\_dmaW* 8, *OE ogfp\_dmaW* 13). Z tabulky jasně vyplývá, že v případě transformantů exprimujících jen *ogfp* nedošlo oproti WT (divokému typu) *C. purpurea* P1 k žádné změně. Na druhou stranu transformanti exprimující *dmaW* fúzané s *ogfp* jednoznačně vykazují zvýšené hladiny jak ergotaminu, tak ergotamininu. U transformanta č. 13 došlo ještě k významnému nárůstu α-ergokryptininu.

V tab. 2 je shrnuto průměrné množství námelových alkaloidů v 1 ml T25N indukčního média (WT, *OE gfp*, *OE gfp\_dmaW* 8, *OE gfp\_dmaW* 13). Z tabulky jednoznačně vyplývá, že v případě transformantů exprimujících *ogfp* opět nedošlo k žádné změně vůči WT *C. purpurea* P1. Na druhou stranu transformanti exprimující *dmaW* fúzané s *ogfp* vykazují významně zvýšené hladiny všech stanovovaných alkaloidů, tedy ergotaminu, ergotamininu, α-ergokryptinu a α-ergokryptininu.

V tab. 3 je shrnuto průměrné množství námelových alkaloidů v 1 mg lyofilizovaného mycelia (WT, *OE TrpE<sup>S76L</sup>* 4, *OE TrpE<sup>S76L</sup>* 12). Významný nárůst všech stanovovaných alkaloidů (ergotaminu, ergotamininu, α-ergokryptinu a α-ergokryptininu) byl zaznamenán pouze v případě transformanta č. 4.

V tab. 4 je shrnuto průměrné množství námelových alkaloidů v 1 ml T25N indukčního média (WT, *OE TrpE<sup>S76L</sup>* 4, *OE TrpE<sup>S76L</sup>* 12). Z tabulky jasně vyplývá, že v případě obou transformantů došlo ke zvýšení hladin ergotaminu i ergotamininu, u transformanta č. 4 došlo i ke zvýšení α-ergokryptinu a α-ergokryptininu.

Tab. 1: Průměrné množství námelových alkaloidů (ergotamin, ergotaminin,  $\alpha$ -ergokryptin,  $\alpha$ -ergokryptinin) v myceliích WT a transformantů *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících *ogfp* (*OE ogfp*) a *dmaW* fúzané s *ogfp* (*OE ogfp-dmaW 8*, *OE ogfp-dmaW 13*). Množství alkaloidů bylo přepočteno na 1 mg lyofilizovaného mycelia v kultuře po 14ti dnech kultivace  $\pm$  směrodatná chyba. Hodnoty pochází ze 6 biologických replikátů. Data byla analyzována pomocí testu Kruskal-Wallis ANOVA: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

|                        | Průměrné množství alkaloidů v myceliu (ng/mg) |                      |                       |                         |
|------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
|                        | ergotamin                                     | ergotaminin          | $\alpha$ -ergokryptin | $\alpha$ -ergokryptinin |
| WT                     | 442,25 $\pm$ 20,45                            | 125,14 $\pm$ 8,84    | 56,01 $\pm$ 4,51      | 14,35 $\pm$ 1,88        |
| <i>OE ogfp</i>         | 489,83 $\pm$ 38,03                            | 129,60 $\pm$ 8,56    | 54,01 $\pm$ 8,43      | 12,53 $\pm$ 1,96        |
| <i>OE ogfp dmaW 8</i>  | 1278,63 $\pm$ 142,90 **                       | 364,27 $\pm$ 50,50 * | 136,59 $\pm$ 16,59    | 30,38 $\pm$ 3,74        |
| <i>OE ogfp dmaW 13</i> | 1076,39 $\pm$ 87,35 *                         | 335,66 $\pm$ 32,21 * | 142,19 $\pm$ 23,04    | 46,31 $\pm$ 9,16 *      |

Tab. 2: Průměrné množství námelových alkaloidů (ergotamin, ergotaminin,  $\alpha$ -ergokryptin,  $\alpha$ -ergokryptinin) v médiích WT a transformantů *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících *ogfp* (*OE ogfp*) a *dmaW* fúzané s *ogfp* (*OE ogfp-dmaW 8*, *OE ogfp-dmaW 13*). Množství alkaloidů bylo přepočteno na 1 ml média v kultuře po 14ti dnech kultivace  $\pm$  směrodatná chyba. Hodnoty pochází ze 6 biologických replikátů. Data byla analyzována pomocí testu Kruskal-Wallis ANOVA: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

|                        | Průměrné množství alkaloidů v médiu (ug/ml) |                     |                       |                         |
|------------------------|---------------------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|
|                        | ergotamin                                   | ergotaminin         | $\alpha$ -ergokryptin | $\alpha$ -ergokryptinin |
| WT                     | 64,84 $\pm$ 6,37                            | 23,49 $\pm$ 2,35    | 6,27 $\pm$ 0,79       | 1,66 $\pm$ 0,20         |
| <i>OE ogfp</i>         | 75,36 $\pm$ 6,15                            | 25,89 $\pm$ 2,13    | 7,43 $\pm$ ,089       | 1,84 $\pm$ 0,21         |
| <i>OE ogfp dmaW 8</i>  | 238,62 $\pm$ 25,77 **                       | 93,46 $\pm$ 9,40 ** | 22,72 $\pm$ 2,52 *    | 9,14 $\pm$ 0,82 **      |
| <i>OE ogfp dmaW 13</i> | 167,24 $\pm$ 19,85 *                        | 65,57 $\pm$ 8,18 *  | 21,78 $\pm$ 4,01 *    | 7,76 $\pm$ 1,46 *       |

Tab. 3: Průměrné množství námelových alkaloidů (ergotamin, ergotaminin,  $\alpha$ -ergokryptin,  $\alpha$ -ergokryptinin) v myceliích WT a transformantů *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících mutovanou verzi *TrpE* (*OE TrpE<sup>S76L</sup> 4*, *OE TrpE<sup>S76L</sup> 12*). Množství alkaloidů bylo přepočteno na 1 mg lyofilizovaného mycelia v kultuře po 10ti dnech kultivace  $\pm$  směrodatná chyba. Hodnoty pochází ze 6 biologických replikátů. Data byla analyzována pomocí testu Kruskal-Wallis ANOVA: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

|                        | Průměrné množství alkaloidů v myceliu (ng/mg) |                        |                        |                         |
|------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
|                        | ergotamin                                     | ergotaminin            | $\alpha$ -ergokryptin  | $\alpha$ -ergokryptinin |
| WT                     | 314,50 $\pm$ 7,05                             | 65,86 $\pm$ 4,79       | 44,43 $\pm$ 5,49       | 8,10 $\pm$ 1,16         |
| <i>OE TrpE S76L 4</i>  | 1681,29 $\pm$ 150,35 ***                      | 450,85 $\pm$ 47,73 *** | 291,00 $\pm$ 27,84 *** | 73,64 $\pm$ 10,06 ***   |
| <i>OE TrpE S76L 12</i> | 977,35 $\pm$ 103,06                           | 281,40 $\pm$ 49,59     | 161,76 $\pm$ 45,08     | 33,15 $\pm$ 5,42        |

Tab. 4: Průměrné množství námelových alkaloidů (ergotamin, ergotaminin,  $\alpha$ -ergokryptin,  $\alpha$ -ergokryptinin) v médiích WT a transformantů *C. purpurea* (kmen P1) exprimujících mutovanou verzi *TrpE* (*OE TrpE<sup>S76L</sup> 4*, *OE TrpE<sup>S76L</sup> 12*). Množství alkaloidů bylo přepočteno 1ml média v kultuře po 10ti dnech kultivace  $\pm$  směrodatná chyba. Hodnoty pochází ze 6 biologických replikátů. Data byla analyzována pomocí testu Kruskal-Wallis ANOVA: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

|                        | Průměrné množství alkaloidů v médiu (μg/ml) |                   |                  |                  |
|------------------------|---------------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|
|                        | ergotamin                                   | ergotaminin       | α-ergokryptin    | α-ergokryptinin  |
| WT                     | 42,20 ± 3,10                                | 12,17 ± 0,96      | 5,85 ± 0,80      | 1,79 ± 0,30      |
| <i>OE TrpE S76L 4</i>  | 287,78 ± 59,09 **                           | 110,05 ± 22,84 ** | 50,05 ± 6,28 *** | 16,84 ± 3,61 *** |
| <i>OE TrpE S76L 12</i> | 166,84 ± 15,40 *                            | 61,37 ± 5,36 *    | 18,85 ± 1,78     | 6,55 ± 0,44      |

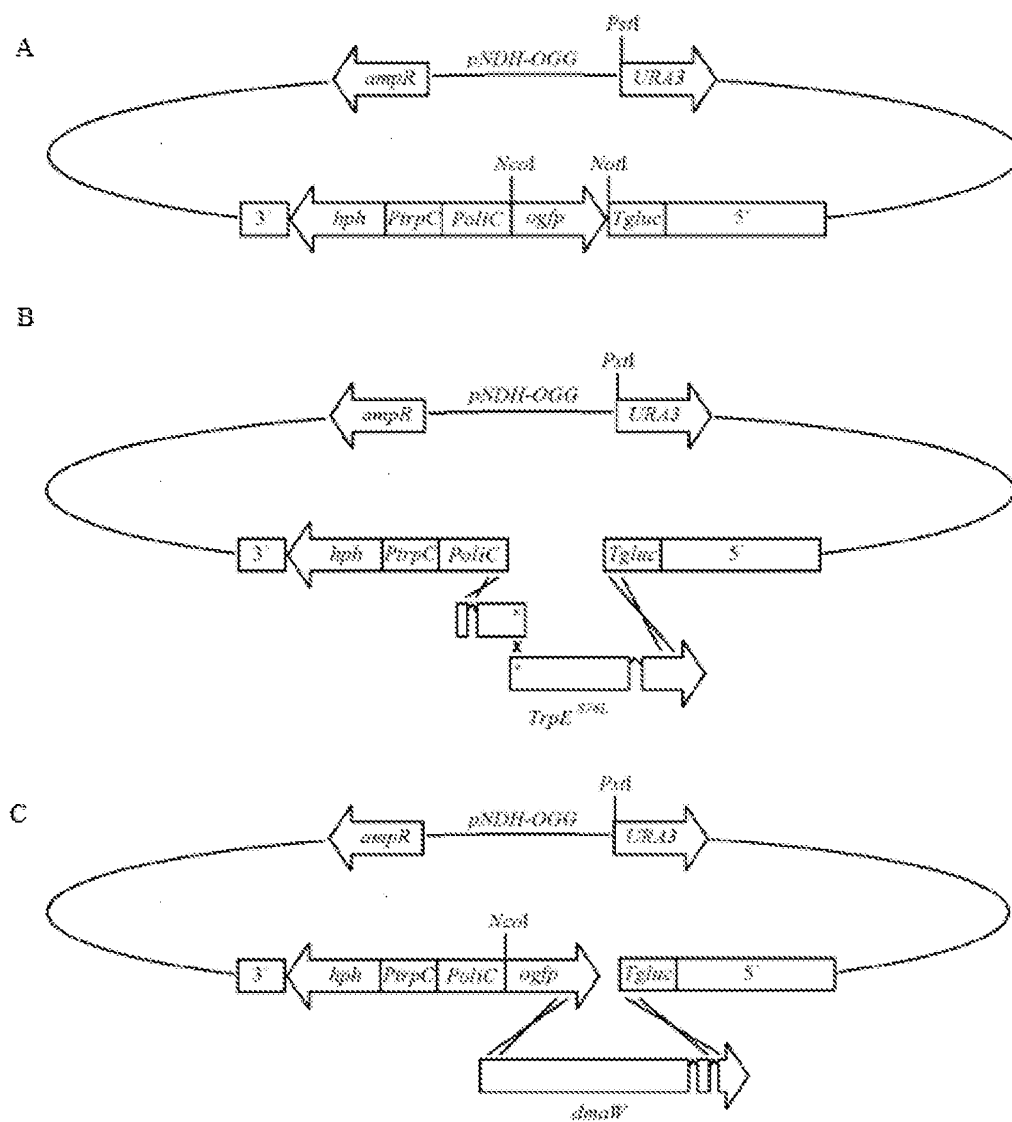
## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Houba *Claviceps purpurea* pro produkci námellových alkaloidů, **vyznačená tím**, že obsahuje v genomu vloženou nukleotidovou sekvenci obsahující alespoň jeden gen vybraný z genu *trpE*<sup>S76L</sup> majícího sekvenci SEQ ID NO. 1 a kódujícího anthranilát synthasu s mutací S76L, a genu *dmaW* majícího sekvenci SEQ ID NO. 2 a kódujícího dimethylallyltryptofan synthetasu, přičemž vložený gen je pod kontrolou konstitutivního promotoru.
2. Houba podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že dále obsahuje kodon-optimalizovaný gen *ogfp* kódující zelený fluorescenční protein pro expresi v *Botrytis cinerea*.
3. Houba podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že konstitutivním promotorem je *OliC* promotor jaderného genu kódujícího podjednotku 9 mitochondriální ATP synthetasy z *Aspergillus nidulans* nebo *gpdA* promotor genu kódujícího glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu z *Aspergillus nidulans*.
4. Houba *Claviceps purpurea* podle nároku 1, s vloženou sekvencí SEQ ID NO. 2 a s vloženým kodon-optimalizovaným genem *ogfp*, uložená v České sbírce mikroorganismů pod číslem CCM 8983, která produkuje námellové alkaloidy.
5. Houba *Claviceps purpurea* podle nároku 1, s vloženou sekvencí SEQ ID NO. 1, uložená v České sbírce mikroorganismů pod číslem CCM 8984, která produkuje námellové alkaloidy.
6. Způsob přípravy houby *Claviceps purpurea* podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačený tím**, že se připraví expresní kazeta obsahující nukleotidovou sekvenci obsahující alespoň jeden gen vybraný z genu kódujícího anthranilát synthasu s mutací S76L a majícího sekvenci SEQ ID NO. 1, a genu *dmaW* kódujícího dimethylallyltryptofan synthetasu a majícího sekvenci SEQ ID NO. 2, přičemž uvedený alespoň jeden gen je pod kontrolou konstitutivního promotoru, a terminátor, popřípadě také kodon-optimalizovaný gen *ogfp* kódující zelený fluorescenční protein pro expresi v *Botrytis cinerea*, a tato expresní kazeta se vloží do genomu houby *Claviceps purpurea*.
7. Způsob podle nároku 6, **vyznačený tím**, že se expresní kazeta připraví metodou kvasinkové rekombinace, a následně se expresní kazeta vloží metodou transformace protoplastů.
8. Expresní kazeta ke způsobu podle nároku 6 nebo 7, **vyznačená tím**, že obsahuje konstitutivní promotor, alespoň jeden gen vybraný z genu kódujícího anthranilát synthasu s mutací S76L a majícího sekvenci SEQ ID NO. 1, a genu *dmaW* kódujícího dimethylallyltryptofan synthetasu a majícího sekvenci SEQ ID NO. 2, a terminátor, popřípadě také kodon-optimalizovaný gen *ogfp* kódující zelený fluorescenční protein pro expresi v *Botrytis cinerea*.
9. Expresní kazeta podle nároku 8, **vyznačená tím**, že má sekvenci SEQ ID NO. 3 nebo SEQ ID NO. 4.
10. Použití expresní kazety podle nároku 8 nebo 9 pro přípravu houby *Claviceps purpurea* podle nároku 1.
11. Použití houby *Claviceps purpurea* podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5 jako produkčního mikroorganismu pro výrobu námellových alkaloidů.

6 výkresů

+

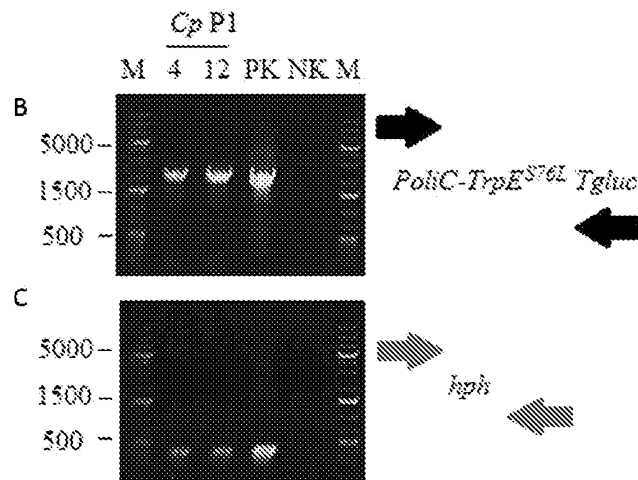
8 stránek sekvencí



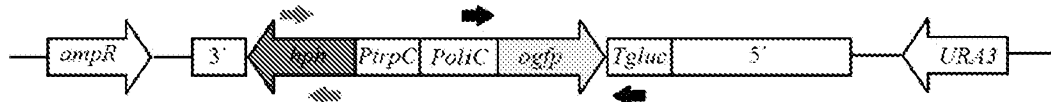
Obr. 1



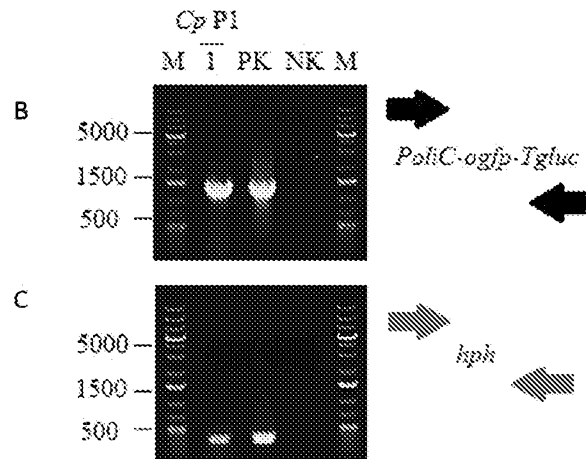
A



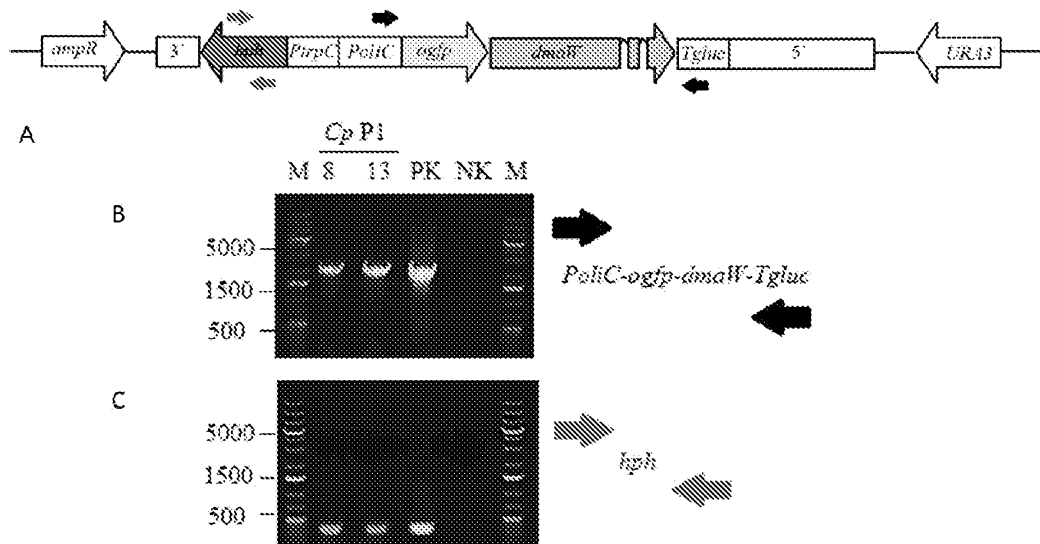
Obr. 2



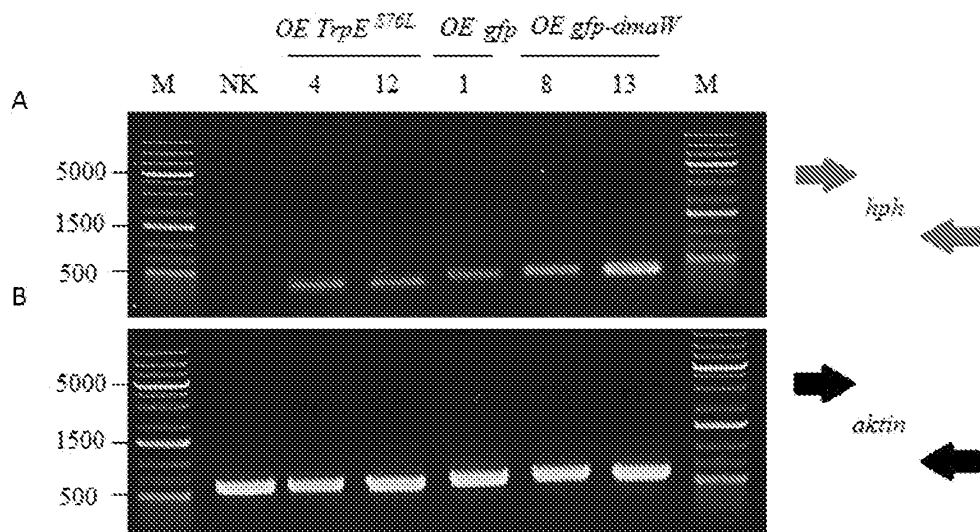
A



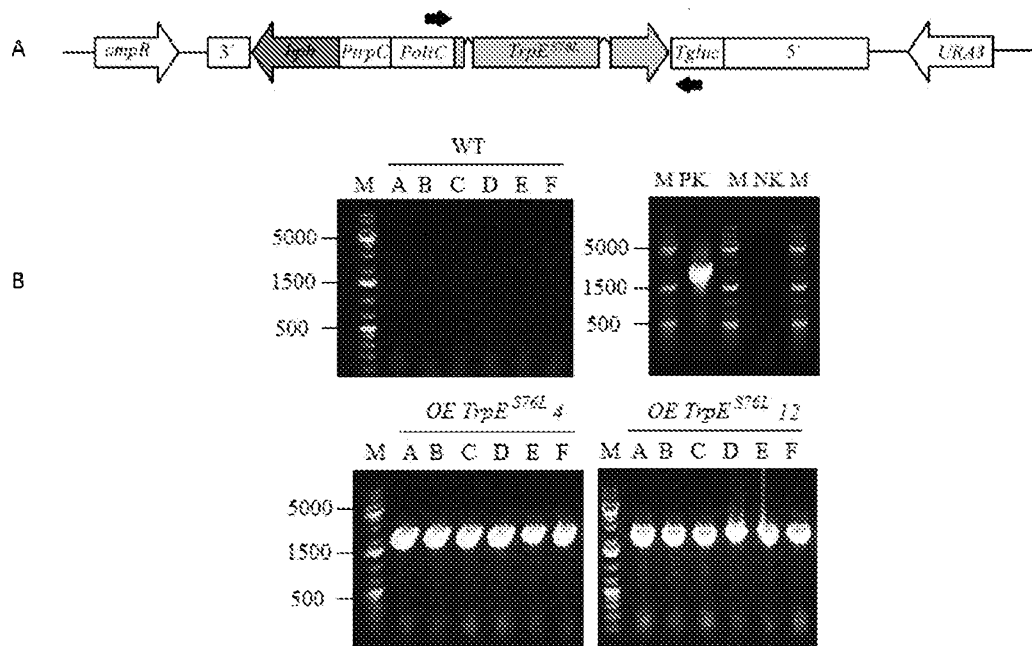
Obr. 3



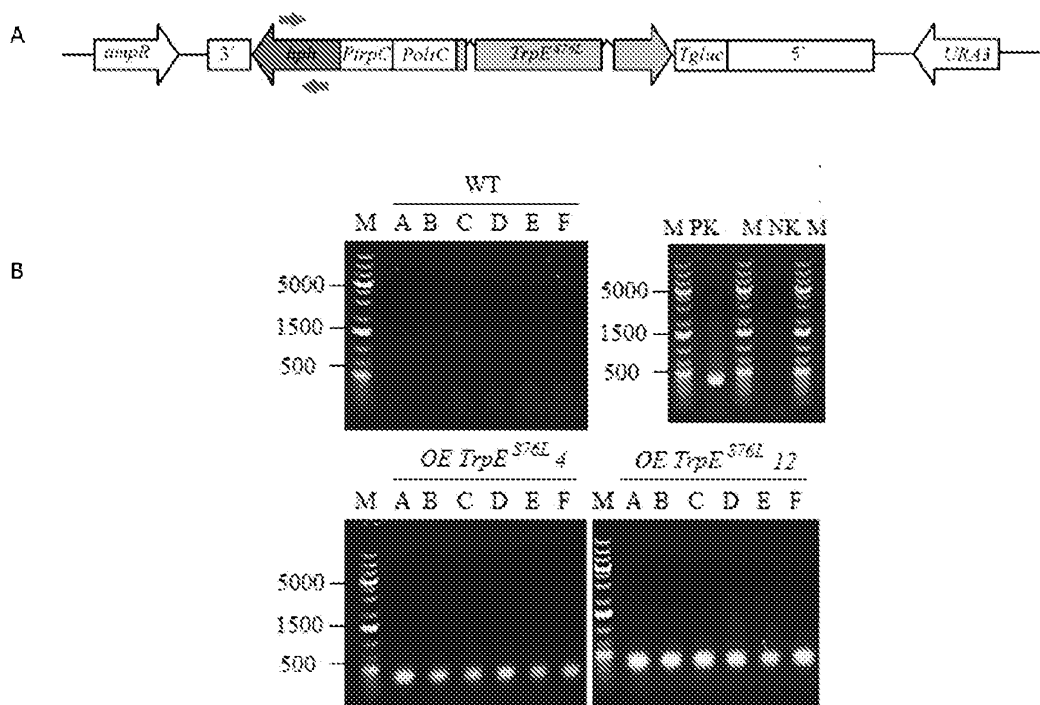
Obr. 4



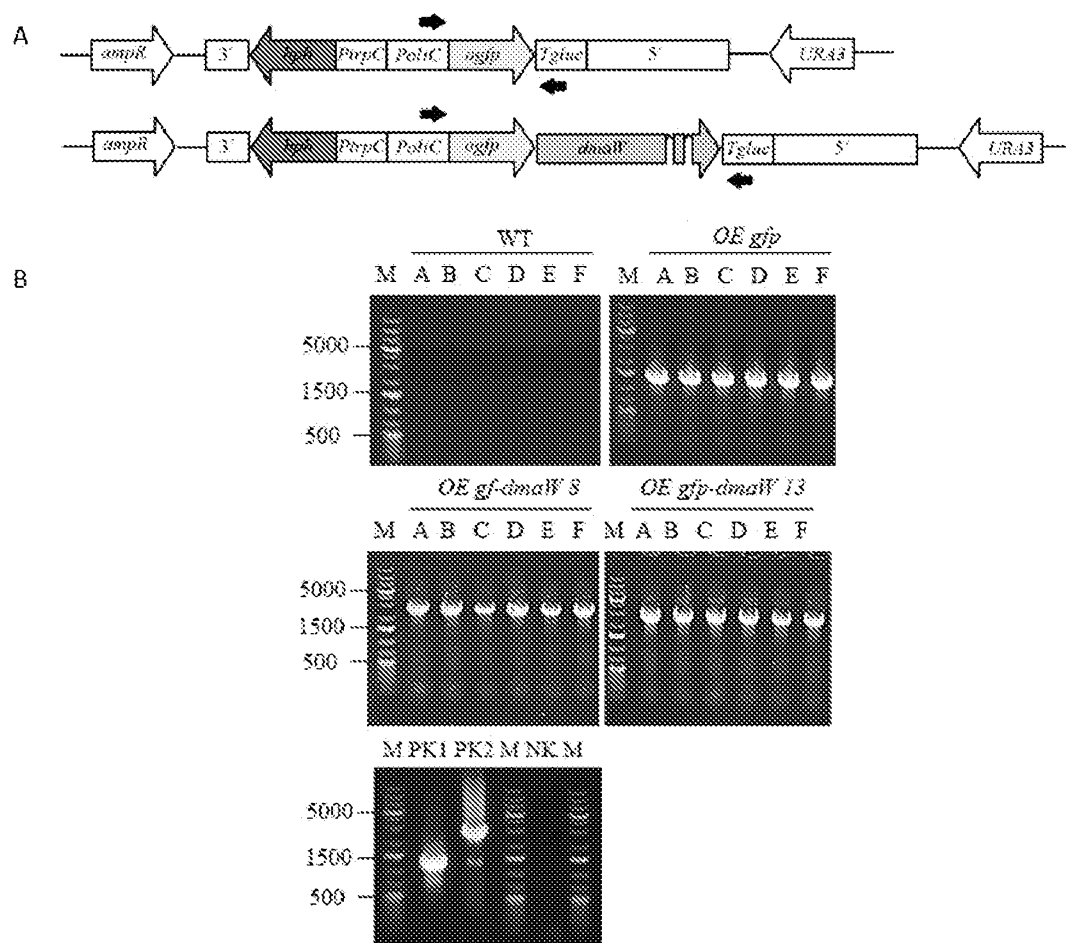
Obr. 5



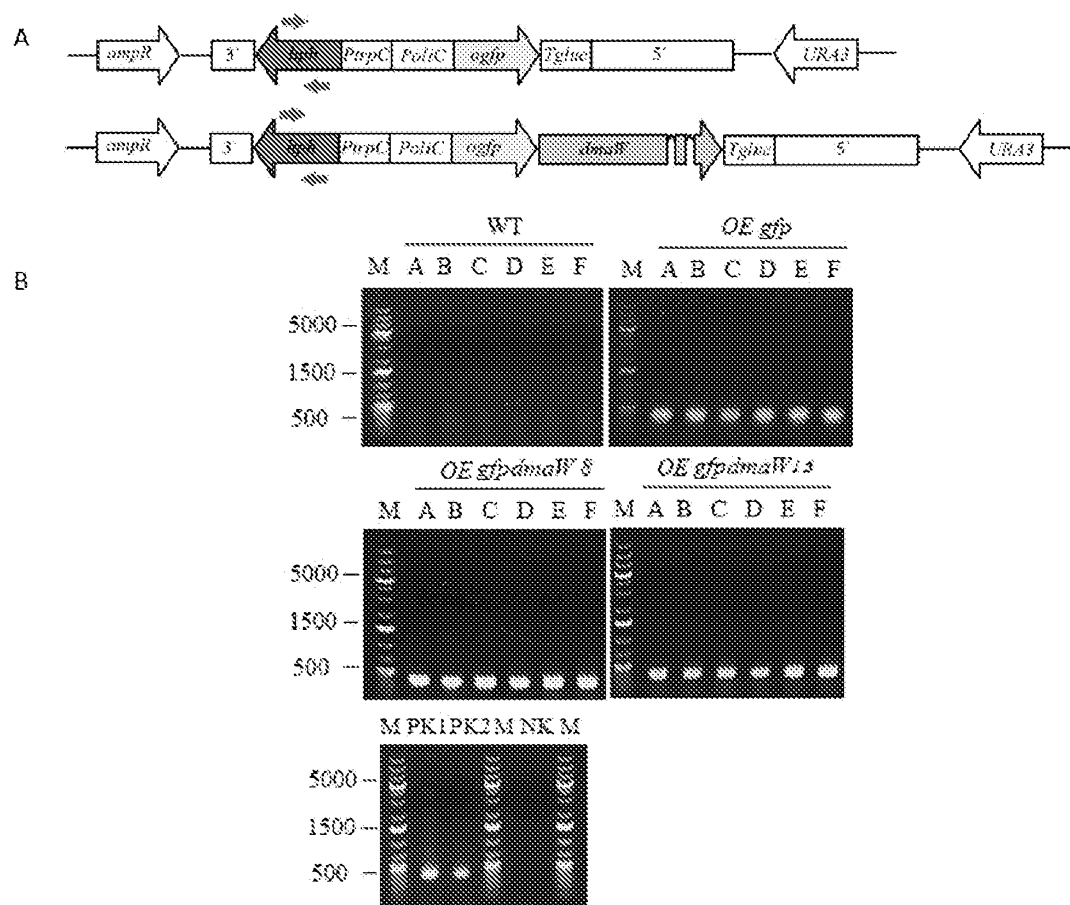
Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9

## SEQUENCE LISTING

<110> Univerzita Palackého v Olomouci

<120> Houba *Claviceps purpurea* se zvýšenou produkcí námelových alkaloidů, způsob její přípravy, expresní kazeta

<130> F

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1840

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Gene *trpE* from *Claviceps purpurea*, mutated to encode for 376L

<400> 1

```

atggcgagac cggtaagtac tgcattggccc cctctggccc aattggccct attcccgccc      60
cggcgcagta ggastagcct ccaaaaagac acaaaagcctg actcttgaga atcgcgagtc      120
caaaaaaana cagcaggccc tggcccttac gctcgagacc gtgagatcca taattgcgaa      180
aacccccgtc ggatccgcca aaaaagccac cctcgtgccc gtataccgcc aaatctcttc      240
ggacctcttc acccctcggc cggcctacct caaaatctca ggcgcctcct cctccgaata      300
ctcctctctc ttgaggtccg ccgcccacaga gcaagtcggc cggatatctc tggtaggggc      360
cggcaccgagc aaagtctctg ccacccggac aggcctacggc ccgcaaacag acccctcttc      420
cgacactggaa gcagaactag ctcaacatgt cgtcgcgcat gtgccaggtc tccagctgcc      480
tctctttacc ggccgcccga tgggtctacgt gggctacgac tgcgtacggt actttgagcc      540
caagaccggc cggccctgca aagatgtctt acaaatccca gaataactct tcatgctctt      600
cgacacaaat gtgcggtttg atcgcttcta cggcatcctc aaggtcatca gctacgtggc      660
cgttcgggaa gacgacggta ccacccagct agaaagggcc taccgaaaag ccgagcgggc      720
aatccaccaa ctggtccagg tcttcaactc aacagagatt gacctccga cccaagaccc      780
catccagctc ggccacgaag ccacctcgaa tatcgcccaa ggggggtacg aggcaccagt      840
gaccaaaactc aaggagcaca tggccsaggg ggatatcttc cagtgtgtgc cctccgagcg      900
gtttgcgggc ccgaagagtc tgcacccgtt caatatctac aggcctcttc ggaagggtga      960
tacctcgccg taacctcttt atgtgaattg caaggatttc cagattgtag gtgcctcgcc      1020
tgaattgctc gtcaagtcag aggcggggcg tatcattacg catccattg ctgggacagt      1080
caagcggggc agcacacccg aggaaggaca gcgcttggcg gatgagctga gtagttcgct      1140
caaggacggc cgggagcctg tcatgcttgt tgatttggct cggaatgaca tcaaccgcgt      1200
aggggacccg tattccgtcc gggtggaccc ccttatggtc gtggagaaat ttagcactgt      1260
ccagcatctt gtttcgacag tctcaggggc gctcggggcg gataagacgc gctttgatgc      1320
gtttcgatcg gttttccccc cggggacggc ctccgggagc cccaaggtgc gggcgatgga      1380

```

```

aaccgattgac gagctgggaga aggagagaagag ggggggtgtat gctgggagcgg tgggctactt 1440
tgggttatggg agccaggatg agaatggggg cgtctgtggag ggggctatgg atactgtgtat 1500
tgggttgagg agcatgctgg tcaaggagcgg ggtggggtat ttgacggcag gttcgtacag 1560
atcttggttg agccaaggat tccccccct ctcttcccc ctcttggctg tcaagttaag 1620
catctctatg cagggtacgc actcctgaga gaaataacag ttgctcaaa cttccccccc 1680
cttttttttt gctttcagatt caggagggcg aattgtgttt gattcagacg aatacgatga 1740
gtggatcgag acgatcaaa agctcggcag caacatgacg tgcataaagt cagcagagga 1800
gatgtattac cagcagcagc aaaaagagaa aaccacatag 1840

```

```

<210> 2
<211> 1466
<212> DNA
<213> Claviceps purpurea

```

```

<400> 2
atgttcgacgg caaaggaccc aggaacacgg gtgtacgaaa ttttgagctt gatttttcat 60
ttccccagca atgacacagc actatggtgg cacagtaccc cgcctatgtt tggggcagatg 120
cttgacaatg ccggctacaa tatccacgac caataccggc actcgggcat tttcaagagc 180
cacattatcc cttttcttgg tgtctatcca acaaaagaca aggaagatg gtcacgctc 240
ctcacacagat gtggccttcc tttggcaatg agcttgaaat gtacggactc tgttgttcga 300
tatcacatag agcccatcaa tgaagtggac ggggagggaga aagatccgtt caatacattg 360
gcaatttatg caagtgtcca aaactctgca cagatccaa ggggtatcga cttggagctg 420
tttgaattat tcaagatga gttgacgctg gacgaatcgg aatcggccac acttcaaatg 480
aatgagctgg tcaaggagca gataaagacg cagaacaagt tggccttggc tctcaagaa 540
agccagtttg cgtccaaagt tttctcttat ccgcatttta aatcagatcc gacgggcaaa 600
tccacacacg atcccatctt cgaactctgt ttcaaaactgt cgcagagaca tgacagcata 660
cagcccgctt tccaggtatt gtgagactat gtttcgcggc gaactcattc cgcagactca 720
gaccaaacaa tagcctaca tgcgcgactc ttgtcatgag atttgatcga tccgcgcaag 780
tctcgcgtca agatatacct gctggagaa ggggtcttgt tgtccgtgat ggaagatctg 840
tggagcgtgg ggggcacacg agtcgaagca tccaccatgg accgccttga catgcttcgc 900
gagctcttga gctgtctaaa agttcccaat gggcacttgg agtatccaa aggggtatctg 960
gaattgggag aaattccgaa cgaagcagctt ccatccatgg ccaactatac actgcaccaa 1020
aacaaccccc tgcctgagcc ccagggtgtat ttcaaggctt cgggcacgaa tgaagccgga 1080
atcagcaatg ctttgacat cttcttccaa cgtccagcat ttgagacat ggggaaaaag 1140
taacgagttt tcttcagga ttcatagtga gtgtccagag ccgcatcgat aggcacacag 1200
tgttcaaaa ttggccccct ttctccataa gcccgtatca tgactttgag tcaattgaat 1260
accctcaacg atatatctca ttctcttaac gtccgaacaa ggcgtatctg agcgtatatt 1320
tgcataagtt tggagctggt cgttggcctg ttggtgagtc taccgaactt tatcaacatg 1380

```

```

ggctccgcaa gctggaacaat ttccctagttg ccgacagccc aattctcttc gacgcttacc 1440
ggcgctgtga cctctcaacg aagtag 1466

<210> 3
<211> 3185
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Expression cassette OliC::trpE::Gluc

<400> 3
tgcagctgtg gagccgcatc ccgattcgg gccggattgg tcaagatttg cgtccgaggt 60
gcgctctatc attctagctt ggcgtccctgg gcttgctgact ggtccgagac tgcacctaag 120
cggggcgagta ccattttctc ggaccctatcc agctatggga cccactcgca aatttttaca 180
tcattttctt ttgtctcagt aacggccacc ttttgttaag cgtaccnagc aacccaattg 240
caatttgccc gttagcaaggt agtcagggtct tatcgtgatg gaggagaggt ctatatcagc 300
ctcaaaaata tgttgccagc tggcgggaagc ccggaaggtc agtggtattc tggcgttggc 360
tggagcaaac ggttagattc agcgtctccg acttggaatg agcaattcag cgtcacggat 420
tcacgtaga cagctcagac cgtcccaagg ctggcggcat tatgggtta ccgggaact 480
cagttctctt ggcccctgcc cgaaggagcc cgaactacca ggctgggaaa gccagggata 540
gaatacactg tacgggcttc gtacgggagg ttccggctag ggttggtccc aagttttaca 600
cacccccaaa gacagctcag gacagaaaga cggcgagggt ttggtgaaaa aagggcgaaa 660
attcaagcgg agagctattt aggtgctagg gccggctctc tccccatttc tcttcggttc 720
ctttctcttc ctggaagact ttctctctct ctctctctct tcttccatcc tcagtcctac 780
ttcttttccc atcatcctc tctccacccc catctcaact ccatcactc acaatcgatc 840
caaccatggc gagcccggtc agtactgcat ggcgccctct ggccgaattg gccctcttcc 900
cggcggcggc cagtaggaat agcctccaaa aagacacaaa gactgaactc tgagaatcgc 960
gaatccaaaa aaacacagca ggccatcgtc cctacgctcg agaccgtgct atccatcatt 1020
gcgaaaacccc ccgtcggatc cgcacaaaaa gcccacctcg tgcctgtata ccgccaaatc 1080
tccctcggac tcatcacccc ctccggcgcc taactcaaaa tctcagcgc cctctcctcc 1140
gaactctcct tctctctga gtccgcgcgc acagagcaag tcggccggta tctctctgta 1200
ggcgcgcggc cgcgcgaagt cctcgcaccc ggaaccaggc acggcccccga aacagacccc 1260
cttcccgcc tggaaacaga actagctcaa catgtcgtcg cgcctgtgcn aggtctctcag 1320
ctgctctctc ttacggcgag cgcacatcggc taagtgggct acgaatgctt aggtactctt 1380
gagcccaaga ccgcgcggcc catgaaagat gtctacaaa tcccagatc actctctatg 1440
ctcttcgaca caattgtcgc gtttgatcgc ttctacggca tcatcaaggt catcagctac 1500
gtggtcgttc cggaaagaca cggtaacacc agcctagaag aggcctacga aaaagccag 1560
cgcgcacccc acaacccgct ccaggtcttc aactcaacag agattgaact cccgacccaa 1620

```

```

gaaccccatcc agctccggcca cgaagccacc ccgaatatcc gccaaagcggg ctacgaagcc 1680
caagctgaccc aactcaaggga gacacatcgtc saggggggata tcttcnagtg tctgcccccc 1740
cagcgggtttg ccgcccggac gagtctgac ccgttcacata tctacagcca tctnccggac 1800
gtgaaccccc cgcctgacct cttcttatgtg aattgcaagg atttcnagat tctaggtgcn 1860
tcgcctcgast tgcctcgtcaa gtccgagggc ggccgtatca tcacgcctcc cattgctggg 1920
acagtcacagc gcggcagcac acccgaggag gccacagcgt tggccggatga gctgagtagt 1980
tcgctcaagg accgcccggg gnatgtcatg cttgttgatt tggctcggaa tgaatcaac 2040
ccgctagggg acccgtattc cgtcccgctg gccccgctta tggctcggga gaagttagc 2100
catgtccagc atctctgttc gacggtctca ggggtcgtgc ggcgggataa gacgcgttt 2160
gatgcgtttc gatccgtttt ccccgccggg accgtctcgg gaggcgcaca ggtgcggcg 2220
atggacactga ttgcaggatt ggagaaaggag aagagggggg tctatgctgg ccggtggtgg 2280
taatttgggt atggagacca ggatgagaa ggagggcgctg tggagggggc tatggatag 2340
tgtattgctg taggagagat gttggtcaag gacggggctg cgtatttgca ggcaggttc 2400
taccgatctt ggttgagcca aggatcccc cccctctctt cccctttctt tctgctcag 2460
ttacgcattt ctatgcacgg tacgcactcc tgagagaaaa taccgtttgc taacacttc 2520
ccccctttt ttttctctt cgaattagga ggcgggaattg tgtttgattc agacgaatac 2580
gatgagtgga tggagagagc caacaaagcc ggccagcaaca tgacgtgcat caagtcagca 2640
gagagagatg attacnagca gcagcaaaa gagaaaacca catagcgtat gtagataaga 2700
tgtatgatca ggggttgagg ggaaggatta tggctgagga agtggtttct gattcgtctt 2760
gtacataagt attagcatgg accctctgtg aggtatttgc tcaaaagggg tgttttagc 2820
gaagacaaaa gagggcgga ttasatctca atcgtttctt aactttgaaa atcttgatcc 2880
aacattgtga ttccatgtat tctgtcaaac agtttttcca tcattgattc tctgtgaatg 2940
tgaacaaact acaagtagga ggaattttgt taaagtttt cagctcagct ggtattgtgg 3000
cctgacagga gacaaaaac cgtttttgag aaaaagaaag tttggaattg accatccaca 3060
accacatggc ttccctatga taccctcat gtggcggtta catatgatat ccggtttcat 3120
atctagggca agagggagac atcatagta catctgattt gacaaaccc tcccccaac 3180
aagat
3185

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 3588

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Expression cassette Oligo:rogfp-dnaW::Gluc

&lt;400&gt; 4

```

gcagctgtg gagccgcatc ccgattcgg gccggattgg tcaagatttg cgtccgaggt 60

```

```

gccgtctatc attctagatt gggtcctgg gcttgtgact ggtcgcgagc tgcactaac 120

```

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cgggggagta  | cattttttatc | ggaccccatcc | agttatgggga | cccaactgga  | aattttttaca | 180  |
| tcattttttt  | tttggtcagc  | aacggccccc  | ttttgttaaag | cgtaaccacc  | aaacaaattg  | 240  |
| caattggccc  | gttagcaagg  | agtcagggct  | tatcgtgagt  | gaggagaggg  | ctatatcagc  | 300  |
| ctcaaaaata  | tgttgcacgc  | tggcgggaag  | cgggagggta  | agtggatttt  | tggcgtgggc  | 360  |
| tggagcaaac  | ggtgggattc  | agcgtcttcg  | acttggactg  | agcaattcac  | cgtcaaggat  | 420  |
| tcaogtaga   | cagctcagac  | cgtccacagg  | ctggcggcat  | tattggttta  | cccggaacct  | 480  |
| cagtctcttt  | ggccccgtcc  | cgaagggaac  | cgaactacca  | ggctgggaaa  | gccagggata  | 540  |
| gaatacaact  | taagggtctc  | gtacgggagc  | ttcggcgtag  | ggttgttccc  | aagtttttaca | 600  |
| caacccccaa  | gacagctagc  | gcacgaagga  | cggggagggc  | ttgggtgaaa  | aaggggcaga  | 660  |
| attcaagggg  | agacgtattt  | aggtgcttag  | gcgggtctcc  | tccccatttt  | tcttcggttc  | 720  |
| ctttttcttc  | ctggaaagat  | ttttctctct  | ctttctctct  | tcttcacatc  | tcagttccatc | 780  |
| ttctctctcc  | atcatccatc  | tctccacccc  | cattctcaact | ccatccacatc | acaaatcgatc | 840  |
| caaacatggt  | ttccaagggt  | gaggttagga  | atccccgtga  | atgtcccaag  | actcttctct  | 900  |
| aatactctta  | ccaggagctt  | ttcaactggc  | tcgttccaat  | cttggctgaa  | ctcgatgggtg | 960  |
| acgtcaatgg  | ccataagttc  | tcagtcagcg  | gagagggtga  | gggagacgct  | acatatggta  | 1020 |
| aattgactct  | taagttcatc  | tgcacccacg  | gtaaattgac  | tgtaccttgg  | cttacactcg  | 1080 |
| tcacacacct  | caactaacga  | gttcaatgct  | tttcccggtt  | cccagatcac  | atgaaacaaa  | 1140 |
| atgacctttt  | caagtctgca  | atgncagagg  | gatattgtcc  | agagagaaac  | atcttcttta  | 1200 |
| aggatgacgg  | aaattataag  | actcgtgccc  | aggttaagtt  | cgggggtgat  | actctcgtca  | 1260 |
| accgtattga  | gttgaagggt  | atcgatttca  | aggaaagacg  | aaatatcttc  | ggccataagc  | 1320 |
| ttgaatacaa  | ctacaacagt  | caacaagttt  | atatcatggc  | cgacaagcaa  | aaaaatggaa  | 1380 |
| tcagggtcaa  | cttcaaaatc  | agacacaaac  | ttgaggatgg  | ctctgttcaa  | tgggcagatc  | 1440 |
| actacacaca  | gaatactcca  | attgggtgat  | gtccagtctt  | ggtccacagat | aaccaattcac | 1500 |
| tctccactca  | atctgctctc  | tcaaaggcac  | ctaaagaaa   | gctgtaccaa  | atggttcttc  | 1560 |
| togaatttgt  | cacagcagcc  | ggaattacct  | tgggaattga  | tgaattttac  | aaagcggccg  | 1620 |
| ctatgtcgac  | cgcacaggac  | cagggaaacg  | gtgtgtacga  | aatttttgagt | ctgatttttg  | 1680 |
| atttccccag  | caatgaacag  | cgaattatgt  | ggcacagta   | cgcgccttat  | tttgcggcga  | 1740 |
| tgccttgacaa | tgcgggttac  | aatactcacg  | accaataccg  | gcatctgggc  | attttcaaga  | 1800 |
| agcacattat  | cccttttctc  | ggtgtctctc  | caacaaaaga  | caaggaaaag  | tggctcagca  | 1860 |
| tactcaacag  | atgtggcctt  | cttttgggat  | tgaagttgaa  | ttgtaccgac  | tctgttgttc  | 1920 |
| gatatacata  | cgaagccatc  | aatgaagtga  | cggggagcga  | gaaagatccg  | ttcaatacat  | 1980 |
| tggcaattat  | ggcaagtgtc  | caaaaacttg  | cacagattca  | agcgggtatc  | gaattggagt  | 2040 |
| ggtttcagtt  | cttcaaaagc  | gagctgacgc  | tggacgaatc  | ggaaatcgcc  | acacttcaaa  | 2100 |
| gtaatgagct  | ggtcaaggag  | cagataaaga  | cgcagaaaca  | gttggccttg  | gatctcaagg  | 2160 |

```

aaagccaggt  cgcgcctcaaa  gtttaatttt  atcggcatct  taaatcgatc  gcgcacggca  2220
aatccacaca  cgaatctcatc  ttcgactctg  tgttcaacct  gtcgagagaag  catganagca  2230
taacagccccc  gttccaggtta  ttgtgcgaact  atgttttcgc  gcgaatatat  tccgcagaat  2340
cagacccaca  catagcctta  catgcgcgac  tcttgttatg  cgaattcgatc  gatcccgcca  2400
agtcctcgcgt  caagatatat  ctgctggaga  agcgggtctc  gttgtccgtg  atggaagatc  2460
tgtggcagct  gggcggccaa  cgaagtgcag  catcacctat  ggaaggcctt  gacatgcttc  2520
ggcagctctg  gagcctgcta  aaagtcccca  ctggcaccct  ggagtatcca  aaagggtatc  2530
tggcaattggg  agaaettcag  aacgagcagc  tccctccat  ggccaactat  acactgcacc  2640
acaacaaacc  catgcctgag  ccccggtgt  atttcacgt  tttcggcatg  atgacgcgcg  2700
aaatcagaaa  tgcctttgac  atctcttcc  aaagtcacgg  atttgacgac  atggcgaaaa  2760
agtaacaggt  cttctctcag  gattcatagt  gagtgtctcg  agcccgatcg  ataggcaaca  2820
ggtgtctaac  aattagcccc  cttctctcca  cagcccgcat  catgactctg  agtcattgaa  2830
ctacctccac  gcatatatct  catctctcca  cgttcgaaac  aagccttatt  tgagcgtata  2840
tttgcatacg  ttgagacttg  gtgctggcc  cgttggtgag  tctacgaaac  tttctccaca  3000
tgggctccgc  aagctgaaca  atttctagt  tgcggacagc  ccaatttctt  tcgacgcta  3060
ccggcgtctg  gacctctcaa  cgaagtagcg  tatgtagata  agatgtatga  ttaggggttg  3120
aggggaaagg  ttatggctga  ggaagtggct  tctgattcgt  cctgtacata  agtattagca  3180
tggacccctg  tggaggtatt  tgcctcaagg  ggggtgttta  ggggaagaca  aaagagggcg  3240
gaattcaacc  tcaatcgtt  ttcaactctg  aaaaatttga  tccacatttg  tgattccatg  3300
tatttctgca  accaagtttt  tcatcatgga  ttctgtgtga  atgtgaacca  actaacagta  3360
ggaggacact  tgtttaaagt  tttcagccca  cgttggtattg  tggcctgaca  ggagccaaaa  3420
cgcgcgtttt  gagaaacga  aagcttgga  ttgaacctcc  caaacacat  ggccttctta  3430
tgatacaact  catgtggcgt  tcccatatga  tattcggctt  catatctagg  caaaggagg  3540
aacatcatan  gtacatctga  ttgacaaa  ccttccccc  aacaagat  3598

```

```

<210> 5
<211> 48
<212> DNA
<213> artificial

```

```

<220>
<223> dmaW primer

```

```

<400> 5
gaactttaca  aagcggcgcg  tatgtcgacc  gcaaaaggac  caggaaan  48

```

```

<210> 6
<211> 47
<212> DNA
<213> artificial

```

```

<220>

```

<223> dmaW primer

<400> 6  
gtgacccctc aacgaagtag cgtatgtaga taagatgtat gattagg 47

<210> 7  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> trpE(S76L) primer

<400> 7  
ccatcacatc acastcgatc caaccatggc gagcccggtc agtactgc 48

<210> 8  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> trpE(S76L) primer

<400> 8  
taagaagaga tcccgccgcg attgctctgt ggccggcgac tggac 49

<210> 9  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> trpE(S76L) primer

<400> 9  
cacagagcaa gtccggccgt atctcttcgt aggc 34

<210> 10  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> trpE(S76L) primer

<400> 10  
caccatcttt atctacatc cctatgtggt ttctctgttt tgcctgctt ggta 54

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> hph detection primer

<400> 11  
gaattcagcg agagcctgac 20

<210> 12  
<211> 20

```

<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> hph detection primer

<400> 12
acattgttgg agcgcgaatc
20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> transgene detection primer

<400> 13
cccggaact cagtctactt
20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> transgene detection primer

<400> 14
gtcttcacgt aasacacccc
20

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> gamma-actin detection primer

<400> 15
cgctctcgta atcgacaat
19

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> gamma-actin detection primer

<400> 16
atttcacgt cggcagtagt
20

```