

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta



Bakalářská diplomová práce

**Evoluce vybraných enzymů šikimátové dráhy a dráhy pro
syntézu hemu u červených řas skupiny Florideophyceae**

Kateřina Voráčová

Školitel: ing. Miroslav Oborník, PhD.

České Budějovice 2007

Voráčová, K. 2007. Evoluce vybraných enzymů šikimátové dráhy a dráhy pro syntézu hemu u červených řas skupiny Florideophyceae. Bakalářská práce, 45 stran

Voráčová, K. 2007. Evolution of selected enzymes of the shikimate pathway and the haem biosynthetic pathway in Rhodophyta (class Florideophyceae). Bc. Thesis, 45 pp
Faculty of Biological Science, University of South Bohemia, Czech Republic

Annotation

Diatoms derived their plastid from red algae through the secondary endosymbiosis. Most of the endosymbiont genes have been transferred from the engulfed alga to the secondary host nucleus, therefore evolution of these genes corresponds to the evolution of plastids rather than to the evolution of the host organisms. Similarly, genes coding for ferrochelatase and DAHP synthase from diatoms are closely related to those from plants and green algae. Contrary to this, red algal genes do not cluster within this clade. I tried to amplify and sequence genes coding for ferrochelatase and DAHP synthase from representatives of the class Florideophyceae to investigate their phylogenetic position.

Tato práce byla financována z grantových prostředků Laboratoře molekulární taxonomie, číslo grantu: IAA500220502.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 14. 5. 2007

Kateřina Voráčová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Miroslavu Oborníkovi za možnost pracovat na tak zajímavém tématu a za důvěru. A neméně bych chtěla poděkovat úplně všem z laborky za nezištnou pomoc, cenné rady a skvělou „pracovní“ náladu. Dík patří Honzovi, že mě nakopl a pomohl se znovu rozjet, Tomíkovi za řešení PCR problému, Kátě za první seznámení s laboratorní praxí, Ogarovi za všechny rady a ochotu a hlavně Luďovi za neuvěřitelnou pomoc ve finiši. A samozřejmě svoji rodině, která mi to všechno umožnila.

Obsah

ÚVOD	5
1. Cíle práce	6
2. Červené řasy	6
2.1. Červené řasy – charakteristika	6
2.2. Taxonomie červených řas	7
2.2.1. Florideophyceae	9
3. Plastidy – původ a typy plastidů	9
3.1. Primární plastidy	10
3.2. Komplexní plastidy	11
3.2.1. Sekundární plastidy	11
3.2.2. Terciální a další plastidy	12
3.3. Transport proteinů do plastidu	13
4. Chromalveolátová teorie	14
5. Metabolické dráhy.....	15
5.1. Syntéza hemu	15
5.1.1. Původ genů u hem–syntetické dráhy u fotosyntetických eukaryot.....	18
5.2. Šikimátová dráha.....	18
5.2.1. Původ šikimátové dráhy	21
5.2.2. DAHP syntáza	22
MATERIÁL A METODY	23
1. Materiál	23
2. Laboratorní metodika: izolace DNA, PCR amplifikace, klonování, sekvenace.....	23
3. Analýza sekvencí	27
VÝSLEDKY	34
DISKUSE.....	36
1. Ferochelatáza.....	36
2. DAHP syntáza.....	38
2.1. DAHPs typ I.....	38
2.2. DAHPs typ II	38
ZÁVĚR.....	41
LITERATURA.....	42

Úvod

Chromalveolátová teorie předpokládá, že společný eukaryotický předek skupiny Chromalveolata, zahrnující Alveolata a Chromista, pohltil v procesu sekundární endosymbiózy červenou řasu (Cavalier-Smith 1999). V rámci nejjednodušší interpretace lze předpokládat, že metabolické dráhy (jejich enzymy) v plastidech budou stejného původu jako tytéž dráhy u červených řas. Z tohoto scénáře se vymyká ferochelatáza a 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát 7-fosfát (DAHP) syntáza. Rozsivky, stejně jako rostliny, používají ve svém plastidu ferochelatázu cyanobakteriálního (plastidového) původu. Naopak červené řasy (*Cyanidioschyzon*, *Porphyra*, *Galdieria*) kódují ferochelatázu podobnou homologům z proteobaktérií a prvoků kmene Apikomplexa (Sato et al. 2004, Oborník a Green 2005). Původ ferochelatázy u červených řas je pravděpodobně výsledkem horizontálního genového transferu (HGT), který se udál až po tom, co byli předchůdci těchto řas před 1,3 miliardy lety pohlceni v procesu sekundární endosymbiózy. Existuje i alternativní vysvětlení - v procesu sekundární endosymbiózy byly pohlceny řasy jiných skupin než Cyanidiophyceae (*Cyanidioschyzon*, *Galdieria*) a Bangiophyceae (*Porphyra*), tedy těch se známým genomem případně s dostupnou EST databází. A tyto skupiny červených řas hypoteticky mohou obsahovat cyanobakteriální ferochelatázu známou z rostlin a rozsivek (Oborník and Green 2005). U DAHP syntázy, enzymu šikimátové dráhy, je situace poněkud odlišná. Rostliny, červené řasy i rozsivky používají v plastidu DAHP syntázu typu II, DAHP syntáza typu I známá z nefotosyntetických eukaryot a bakterií nevykazuje s typem II sekvenční homologii. DAHP syntáza rostlin a rozsivek tvoří ve fylogenetickém stromě vysoce podpořenou monofyletickou skupinu (Richards et al. 2006), což rovněž ukazuje na plastidový původ tohoto genu u rozsivek. Avšak vzhledem k tomu, že sinice mají DAHP syntázu typu I, lze předpokládat, že pochází spíše z jádra hostitele (řasy). Naproti tomu zástupce červených řas (*Cyanidioschyzon merolae*) obsahuje dva geny pro DAHP syntázu evidentně různého původu. Ovšem podobně jako u ferochelatázy ani jeden z nich se nenachází v blízkosti skupiny obsahující zelené řasy a rozsivky (Richards et al. 2006).

1. Cíle práce

Osvojit si techniky související s izolací DNA, PCR a sekvenací a seznámit se s metodami konstrukce fylogenetických stromů na základě molekulárních dat.

Amplifikovat a osekvenovat geny kódující ferochelátázu a DAHP syntázu u řas skupiny Florideophyceae a pomocí fylogenetických analýz zjistit, zda řasy skupiny Florideophyceae obsahují ferochelátázu a DAHP syntázu známou z červených řas nebo jestli používají formu jako rostliny a rozsivky.

2. Červené řasy

2.1. Červené řasy – charakteristika

Červené řasy (Rhodophyta, ruduchy) jsou fotosyntetické, eukaryotické organismy. Vyznačují se znaky charakteristickými pro Eukaryota: jadernou membránou, způsobem uložení genetické informace v buňce, složitým systémem vnitřních membrán, který buňku člení na jednotlivé kompartmenty a v neposlední řadě také stavbou cytoplazmatické membrány.

Je to velká a rozmanitá skupina organismů, čítajících cca známých 5 910 druhů (<http://www.algaebase.org>). Centrum diverzity ruduch je především v teplých mořích. Počet druhů ubývá směrem od rovníku k pólům a pouze 150 – 200 druhů z celkového počtu je sladkovodních. Vybírají si zejména stanoviště v litorální a sublitorální zóně, ovšem díky pigmentům (fykoerytrin) pronikají i do větších hloubek (Kalina 1994). Mezi zástupci jsou makroskopické řasy i mikroskopické jednobuněčné organismy. S rozdíly a různorodostí mezi červenými řasami se setkáváme jednak v oblasti morfologie, ultrastruktury či životní strategie, tak i na poli molekulárních dat (Saunders and Hommersand 2004). Co je tedy spojuje? Důležitým společným znakem jsou především fotosyntetické pigmenty. Červené řasy postrádají chlorofyl *b* a *c*, ale nalezneme u nich chlorofyl *a*, malé množství chlorofylu *d* (prokázáno jen u některých skupin), α - a β -karoten, zeaxantin, lutein a fykobiliny: r-fykocyanin, r-allofykocyanin a r-fykoerytrin. Fykobiliny jsou lokalizovány ve fykobilizomech, které jsou na povrchu volných tylakoidů. Místem fotosyntézy je primární plastid s dvojitou membránou (Kalina a Váňa 2005). Kromě fotosyntetického aparátu je plastid sídlem celé řady dalších biochemických

drah. Hlavní zásobní látkou je florideový škrob (α -1,4-glukan), od pravého škrobu zelených řas se liší tím, že neobsahuje amylozu. Je skladován v cytoplasmě. Dalšími důležitými určujícími znaky typickými pro tuto skupinu jsou absence bičíku a centriol (Saunders and Hommersand 2004, Kalina a Váňa 2005). Pokud mluvíme o stavbě buňky neměli bychom zapomenout na buněčnou stěnu. Její základní strukturu tvoří pravidelná síť celulóznic mikrofibril. Celulóza je ovšem v buněčné stěně obsažena jen několika procenty. Podstatnou složkou jsou amorfní, vysoce hydrofilní polygalaktany (polymery galaktosy), jejichž složky jsou propojeny sulfátovými můstky. U některých druhů dochází ke kalcifikaci stěny, tj. ukládání kalcitových nebo aragonitových krystalů (Kalina 1994). Při mitóze a následné cytokinezy, která probíhá centripetálním zaškrcením protoplastu, zůstává v přehrádce otvor s polopropustnou pórovitou zátkou (pit-plug). Stavba pórových zátek se liší u jednotlivých skupin, čehož se také používá pro jejich klasifikaci (Kalina a Váňa 2005). Další ultrastrukturální znaky využívané při klasifikaci jsou uspořádání tylakoidů a spojení Golgiho aparátu s endoplazmatickým retikulem, jadernou membránou, případně mitochondrií. Co se týká životních strategií, vyvinula se u ruduch řada adaptací - nalezneme mezi nimi endolitické, epifitické, parazitické a aerofytické druhy (Kalina 1994).

2.2. Taxonomie červených řas

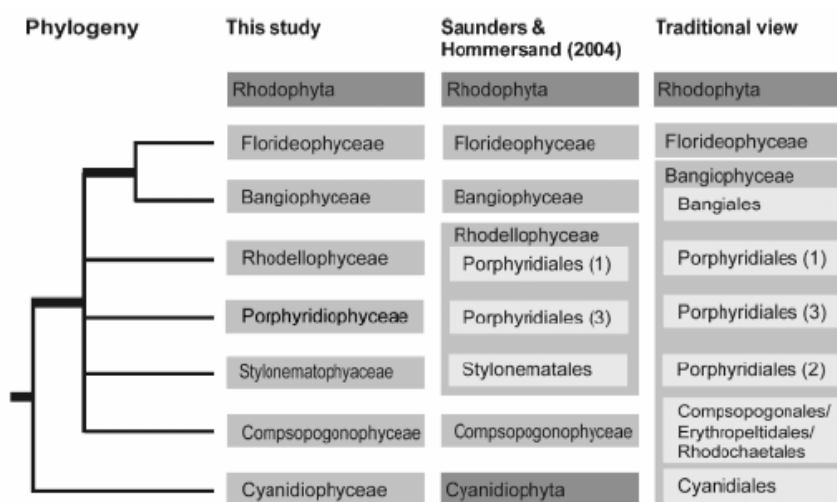
Řasy je termín užíváný z čistě praktického důvodu. Zahrnuje totiž skupinu organismů, které spojuje přítomnost fotosyntetické organely – plastidu. Tyto organismy jsou často zcela nepříbuzné a můžeme je nalézt rozptýlené mezi hlavními říši Eukaryot (Keeling 2004). Do jedné z těchto říší: Plantae (Archaeplastida) řadíme i Rhodophyta. Jak vyplývá z fylogenetických analýz pro jaderné, plastidové a mitochondriální geny, jde o jasně definovanou samostatnou vývojovou linii (Yoon et al. 2006).

Tradičně byly červené řasy děleny na dvě třídy: Bangiophyceae a Florideophyceae (Saunders and Hommersand 2004, Yoon et al. 2006), třída Bangiophyceae zahrnovala tyto řády: Bangiales, Cyanidiales, Compsopogonales, Erythropeltiales, Porphyridiales a Rhodocheteales. Původní systém používal při

klasifikaci zejména samičí reprodukční znaky a stádia vývoje po oplození (Harper and Saunders 2001). S přibýváním informací a molekulárních dat bylo jasné, že toto oddělení potřebuje revizi. První práce v této oblasti jsou z roku 1994, byly při nich použity sekvence pro SSU rDNA (Ragan et al. 1994) a *rbcL* (Freshwater et al. 1994), obě shodně odhalily Bangiophyceae jako parafyletickou skupinu (Saunders and Hommersand 2004). Dalším velkým krokem vpřed jsou práce: Saunders and Hommersand (2004) a Yoon et al. (2006), které dostupné poznatky seskupily a shrnuly. První jmenovaní autoři využili pro identifikaci hlavních linií molekulární data a ultrastrukturní znaky (především stavbu pórových zátek a asociace Golgiho aparátu s dalšími strukturami, viz výše). Druhá skupina autorů pro stanovení vztahů v rámci ruduch, zejména u Bangiophyceae (25 rodů, 48 taxonů), použila 48 sekvencí pro PSI P700 chl *a* apoprotein A1 (*psaA*) a *rbcL*.

Podle současného modelu rozlišujeme sedm tříd: Cyanidiophyceae, Bangiophyceae (dříve Bangiales v rámci parafyletických Bangiophyceae), Compsopogonophyceae, Florideophyceae, Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae a Stylonematophyceae (Yoon et al. 2006).

Na čem se Saunders and Hommersand (2004) a Yoon et al. (2006) shodují je umístění Cyanidiophyceae na bázi a na monofylii Florideophyceae a Bangiophyceae (původně Bangiales). Vztahy mezi zbylými třídami jsou stále nejasné. Srovnání dobře vystihuje obrázek (Obr. 1).



Obr. 1. Taxonomie červených řas. Převzato z Yoon et al. (2006)

2.2.1. Florideophyceae

Třída Florideophyceae v současnosti obsahuje ze všech červených řas nejvyšší počet taxonů – cca 5699 (www.algabase.com). K jejímu zformování došlo zhruba před 800 milióny let (Yoon et al. 2004, Yoon et al. 2006). Podle Harper and Saunders (2001), kteří použili data pro SSU a LSU rDNA, má třída Florideophyceae čtyři linie. Linie 1 obsahuje pouze řád: Hildenbrandiales, který v analýzách vychází jako nejbazálnější linie (Harper and Saunders 2001). Linie 2 zahrnuje řády: Acrochaetiales, Balliales, Batrachospermales, Corallinales, Nemaliales, Palmariales a Rhodogorgonales. Linie 3 má jediný řád: Ahnfeltiales. A linie 4 obsahuje řády: Bonnemaisoniales, Ceramiales, Gelidiales, Gigartinales, Gracilariales, Halymeniales, Plocamiales a Rhodymeniales.

Box 1. Červené řasy v běhu času

Prvním relativně dobře zachovalým nálezem je taxon *Bangiomorpha pubescens* (Yoon 2006). Jde o 1200 milión let starou fosílii z naleziště Hunting Formation v Somerset Island, Kanada. Součástí nálezů byly také spory, což by indukovalo existenci sexuálního procesu. Dalším důležitým nálezem bylo několik fosilií v oblasti Doushantuo Formation, Čína (Saunders and Hommersand 2004). Jejich odhadované stáří je 600–550 miliónů let, vyznačují se již některými znaky typickými pro řasy třídy Florideophyceae. Pokud je tato interpretace správná, znamenalo by to, že k oddělení linií Bangiophyceae x Florideophyceae došlo relativně brzo, v Neoproterozoiku nebo ještě dřív (Saunders and Hommersand 2004). Na základě výše zmíněných fosilií a s použitím molekulárních hodin vyplývá, že k vyštěpení červených řas došlo před 1449-1513 milióny let a jejich radiaci na pět hlavních linií - před 1200 milióny let, krátce po vyčlenění (před 1350-1416 milióny let) první třídy Cyanidiophyceae (Yoon et al. 2006). Vyštěpení Florideophyceae zhruba před 800 milióny let (Yoon et al. 2004).

Podle Yoon et al. (2004) k primární endosymbióze došlo před 1600 milióny lety a k rozdělení fylogenetických linií na červené a zelené řasy někdy před 1450 milióny let a sekundární endosymbiózu u chromalveolát datuje kolem 1255 milióny let zpět.

3. Plastidy – původ a typy plastidů

Symbióza je soužití dvou organismů, které mohou být naprosto systematicky nepříbuzné. V případě endosymbiózy symbiont žije uvnitř těla nebo buňky hostitele.

Hostitel tím získává bioenergetickou a biosyntetickou „továrnu“. Symbiont naopak postupně ztrácí autonomii a je přeměněn na organelu (Dyall, Brown and Johnson 2004).

Plastid je organela, v níž je lokalizován fotosyntetický aparát buňky a řada dalších biochemických cest - jedná se především o syntézu složek různých sloučenin např. aromatických aminokyselin, hemu, isoprenoidů a mastných kyselin (Keeling 2004). Jsou známy i nefotosyntetické plastidy, např. plastid u Apicomplexa (viz níže, Keeling 2004). Primární plastid vznikl stejně jako mitochondrie endosymbiózou bakterie (v případě plastidu se jedná o cyanobaktérii) a eukaryotické buňky. Plastidy sdílí s mitochondriemi také další společné znaky: obě to jsou semiautonomní organely s vlastním genomem, DNA je bez histonů, mají vlastní proteiny-syntetizující aparát a při transkripci je první aminokyselinou fMet (stejně jako u bakterií). To všechno jsou důkazy, které podporují endosymbiotickou teorii (Mereschkowsky 1905 – anglický překlad), dnes již přijímanou jako fakt. Rozlišujeme několik typů plastidů:

3.1. Primární plastidy

Primární plastidy vznikly procesem označovaným jako primární endosymbióza, při kterém eukaryotická buňka pohltila Gram-negativní fotosyntetickou bakterií, příbuznou dnešním cyanobaktériím. Má se za to, že k tomuto procesu došlo jednou v dávné historii eukaryot (výjimka viz pozn.), podle molekulárních hodin zhruba před 1600 – 1500 milióny let (Yoon et al. 2004). Tento předek dal vzniknout třem hlavním liniím říše Plantae (Archaeplastida): Glaucophyta, červené řasy a zelené řasy (včetně vyšších rostlin). Monofyletický původ plastidů u těchto skupin je podpořen fylogenetickými analýzami pro plastid-kódující geny, strukturou plastidového genomu a přítomností stejného světlosběrného proteinového komplexu u červených a zelených řas (Keeling 2004). Důležitým morfologickým znakem primárních plastidů je dvojitá obalová membrána. U glaucophyt je ještě zachována prokaryotická peptidoglykanová vrstva mezi těmito membránami. Během procesu endosymbiózy došlo u pohlcené cyanobakterie k řadě přeměn. Endosymbiont byl z velké části redukován a většina jeho genů byla přenesena do jádra hostitele nebo ztracena, pouze malé množství genů bylo ponecháno v genomu plastidu (Stoebe and Maier 2002).

Je třeba připomenout, že některé analýzy postavené zejména na obsahu genů v organelárních genomech či jejich pořadí tvrdí, že plastidy mohly vzniknout vícekrát v evoluci a výše zmíněné genomové charakteristiky, které jsou běžně přijímané jako důkazy monofýlie plastidů, jsou výsledkem konvergentní evoluce.

Pozn: zřejmě druhým případem primární endosymbiózy je améba *Paulinella chromatophora* a její plastid (Yoon et al. 2006).

3.2. Komplexní plastidy

Některé organismy získaly komplexní plastidy pohlcením fotosyntetického eukaryota, tedy zelené nebo červené řasy. Nový plastid má oproti primárnímu plastidu vyšší počet membrán, obvykle 3 až 4. Proces endosymbiózy, kterým tyto plastidy vznikly zahrnuje postupnou redukci jádra řasy až jeho úplná eliminace a přenos genů řasy (primární hostitel) do jádra nového (sekundárního) hostitele.

3.2.1. Sekundární plastidy

Sekundární endosymbiózou se plastidy rozšířily do dalších oddělení eukaryot. Eukaryotická buňka v tomto procesu pohltila eukaryotickou buňku obsahující primární plastid. Sekundární plastidy jsou charakterizovány dalšími membránami, takže v celkovém součtu jsou sekundární plastidy nejčastěji čtyř- nebo tří-membránové. Dvě vnitřní membrány jsou původní dvě membrány primárního plastidu, třetí je cytoplazmatická membrána primárního hostitele a vnější pak membrána fagotrofní vakuoly sekundárního hostitele (Keeling 2004). U třímembránových plastidů došlo zřejmě k redukci z původního čtyřmembránového stavu a to pravděpodobně třetí membrány (počítáno zevnitř) (Cavalier-Smith 2000). Jádro primárního hostitele je většinou úplně redukováno nebo zčásti zachováno jako tzv. nukleomorf, ten nalezneme u skrytěnek a řas ze skupiny Chlorarachniophyta (Gilson and McFadden 2002). Geny, které byly u primárního hostitele kódovány v jádře a jejich produkty poté transportovány do primárního plastidu, jsou nyní přesunuty do jádra sekundárního hostitele (Martin and Herrmann 1998).

Rozlišujeme sedm taxonomických skupin, které obsahují sekundární plastid - dvě pohltily zelenou řasu (Euglenida - krásnoočka a Chlorarachniophyta) a zbylé mají plastid

odvozený od červené řasy. U skupiny Glaucophyta není doposud známo, že by prošla procesem sekundární endosymbiózy (Keeling 2004). Řasy se sekundárním plastidem jsou Euglenida (krásnoočka), Chlorarachniophyta, Cryptophyta (syn. skrytěnky, kryptomonády), Heterokonta, Haptophyta, Dinoflagellata (obrněnky) a Apicomplexa (výtrusovci).

U skupiny Apicomplexa ztratil plastid svoji fotosyntetickou funkci. Přesto zůstal zachován jako místo biosyntézy některých esenciálních komponentů (Mazumdar et al. 2006). Zhruba polovina obrněnek hostí sekundární plastid, který obsahuje chlorofyl c_2 a peridinin (pigment, karotenoid) a endosymbiontem byla červená řasa (Zhang, Green and Cavalier-Smith 2000, Fast et al. 2001, Keeling 2004). U obrněnek s tímto typem plastidu je plastidový genom tvořen sadou minikroužků. Každý minikroužek kóduje jeden gen. Takto bylo do současné doby objeveno pouze 14 genů uložených na tomto nezvyklém genomu (Zhang, Cavalier-Smith, and Green 2002).

3.2.2. Terciální a další plastidy

Mezi obrněnkami nalezneme mimo jiné také řadu těch, které mají plastid jiného než sekundárního původu. Jsou to tzv. terciální plastidy, které vznikly pohlcením řasy obsahující sekundární plastid v procesu označovaným jako terciální endosymbióza (Yoon, Hackett, and Bhattacharia 2002a). Obrněnky s terciálním plastidem jsou např. toxický *Dinophysis acuminata* (endosymbiont – skrytěnka), *Karenia brevis*, *K. mikimotoi* a *Karlodinium micrum* (endosymbiont – Haptophyta) a *Kryptoperidinium foliaceum* (endosymbiont – rozsivka) (Yoon, Hackett, and Bhattacharya 2002). Další proces, který můžeme u obrněnek pozorovat je vícenásobná sekundární endosymbióza, při níž je sekundární plastid nahrazen plastidem získaným pohlcením řasy s primárním plastidem (Keeling 2004). Konkrétně jde o *Lepidodinium viride* a *Gymnodinium chlorophorum*, kde endosymbiontem byla zelená řasa (Bodil 2005). Další typ plastidů, se kterým se můžeme setkat, jsou kleptochloroplastidy, či dočasné plastidy. Nejde o plastidy v klasickém slova smyslu, jejich přítomnost v buňce není trvalá. Jsou přijímány jako součást potravy a po nějakou dobu ponechány v buňce, kde plní fotosyntetickou funkci (Keeling 2004).

S kleptoplastidy se kromě obrněnek setkáme i u některých nálevníků (Minnhagen and Janson 2006).

V současné době se předpokládá, že evoluce fotosyntetických organel zahrnuje dvě primární (předek ruduch, zelených řas a glaucophyt; plastid u *Paulinella chromatophora*), čtyři sekundární (u euglen; u Chlorarachniophyta; plastid u *Lepidodinium/Gymnodinium* a plastid u společného předka chromalveolát) a tři terciální endosymbiózy (plastid u rodu *Karlodinium/Karenia*; plastid u rodu *Dinophysis* a plastid u rodu *Kryptoperidinium*).

3.3. Transport proteinů do plastidu

Většina genů endosymbionta byla přesunuta do jádra hostitele. Tyto jaderně-kódované plastidové proteiny jsou syntetizovány v cytosolu a poté jsou transportovány do organely. Každý prekurzor má na svém N-konci adresovou sekvenci neboli transitní peptid. Primární plastidy mají dvojitou membránu s transportními kanály – proteinový komplex TOC ve vnější membráně a komplex TIC ve vnitřní membráně. Komplexy TOC a TIC jsou rozpoznávány transitním peptidem, který plastidový prekurzor bezpečně dovede do stroma plastidu, kde je odštěpen peptidázami. U komplexních plastidů je situace o něco složitější. Vzhledem k tomu, že tyto plastidy mají větší počet membrán, signál pro transport musí mít víc úrovní. Transportní sekvence je opět na N-konci plastidového prekurzoru, tentokrát je ovšem dvojdílná. První doména sekvence je signální peptid pro import do endoplazmatického retikula (ER). Za ní pak následuje klasický chloroplastový transitní peptid. Tato kombinace signální peptid – transitní peptid je řadě modifikací nezbytná pro import proteinů do všech komplexních plastidů. Transport proteinu do komplexního plastidu probíhá přes endomembránový systém (sekretory pathway) eukaryotické buňky. Druhá doména je poměrně variabilní a u skupin s komplexními plastidy se zřejmě modifikace mechanismu transportu vyvinuly nezávisle v závislosti na konkrétní formě plastidu (Ishida 2005).

4. Chromalveolátová teorie

Vyřešení vztahů v rámci eukaryot a zakořenění vlastního stromu je stále otevřená otázka. V současnosti máme dva modely pro rozdělení eukaryot na jednotlivé fylogenetické linie. Keeling (2005) rozlišuje pět hlavních říší: Plantae, Excavata, Rhizaria, Unikonta a Chromalveolata (neoficiální názvy). Simpson and Roger (2004) navíc dělí Unikonta na dvě samostatné říše: Opisthokonta a Amoebozoa (viz Obr. 2).

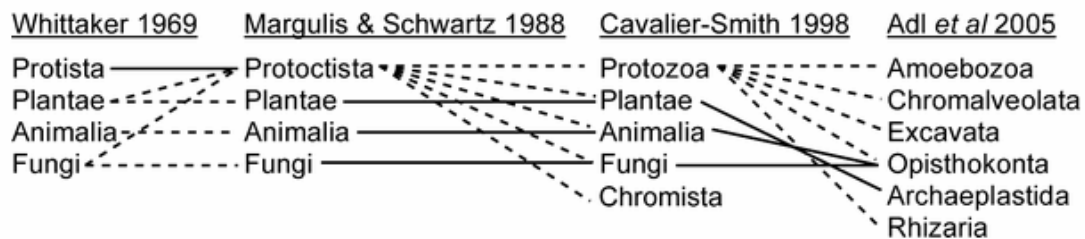
Chromalveolata je velmi diversifikovaná skupina organismů zahrnující organismy od fotosyntetických řas až po parazity člověka. Chromalveolátová teorie o existenci této říše byla původně založená na podobnosti plastidů, vyskytujících se u řady zástupců této skupiny (Cavalier-Smith 1999, Harper, Waanders, and Keeling 2005). Monofýlii chromalveolát podporují analýzy jaderných genů i analýzy jaderně – kódovaných proteinů transportovaných do plastidu (Harper, Waanders and Keeling 2005, Keeling 2005).

Zjednodušeně chromalveoláta dělíme na Alveolata a Chromista. Alveolata jsou zřejmě monofyletická skupina (Leander and Keeling 2003, Harper, Waanders, and Keeling 2005), obsahující: parazitické výtrusovce (Apicomplexa), nálevníky (Ciliophora) a obrněnky (Dinoflagellata). Mezi Chromista řadíme Haptophyta, Cryptophyta a Stramenopila (Heterokonta) (Yoon, Hackett and Bhattacharya 2002). Heterokonta je skupina organismů, jejichž zástupci jsou jak fotosyntetičtí, tak druhotně heterotrofní. Předpokládá se, že společný předek chromalveolát pohltil v procesu sekundární endosymbiózy červenou řasu (Cavalier-Smith 1999). Sekundární plastid byl následně ztracen v některých liniích, v jiných byl v menší či větší míře redukován.

Sekundární plastid nalezneme u výtrusovců, skupiny Haptophyta, kryptomonád, rozsivek (Bacillariophyta), chloromonád (Raphidophyta), Eustigmatophyta, zlativek (Chrysophyta), hnědých řas (Phaeophyta) a Bolidiophyta. Zajímavá situace je u obrněnek, které mají několik typů plastidů: sekundární plastid (plastid obsahující peridinin), terciální plastid a nový sekundární plastid, kterým nahradily původní sekundární plastid (viz plastidy).

Hypotéza, že k sekundární endosymbióze u společného předka skupiny Chromalveolata došlo jednou a většina plastidů u této skupiny je výsledkem tohoto procesu (viz výše) má řadu zastánců i odpůrců. Podle Andrzej Bodyla (2005) je docela

dobře možné, že plastidy u Chromista a Alveolata vznikly nezávislými endosymbiózami a většina mohla navíc projít i terciální endosymbiózou. Opírá se zejména o následující předpoklady: plastidy chromalveolát jsou typově poměrně různorodé a vyskytují se ve více monofyletických liniích než jak je tomu u plastidů původem ze zelené řasy; dále červené řasy se zdají být z nějakého důvodu vhodnějšími objekty pro proces transformace v organelu než zelené řasy a v poslední řadě je to různost mechanismu transportu do plastidu mezi obrněnkami, výtrusovci a zástupci skupiny Stramenopila.



Obr. 2. Přehled názorů na systematiku eukaryot. Převzato z Parfrey et al. (2006)

5. Metabolické dráhy

Metabolická dráha je sled reakcí, které probíhají v buňce za účasti biokatalyzátorů. Většina drah zahrnuje řadu kroků uspořádaných v kaskádě na sebe navazujících reakcí. Dráhy jsou mezi sebou propojeny ve složitém mechanismu metabolismu buňky. Jednotlivé enzymy v dráze jsou kódovány geny, které mohou mít různý původ. Mosaikový původ některých metabolických drah byl např. popsán u syntézy hemu (Oborník and Green 2005), šikimátové dráhy (Richards et al. 2006), syntézy polyamidů (Illingworth et al. 2003) a syntézy tryptofanu (Jiroutová et al. 2007).

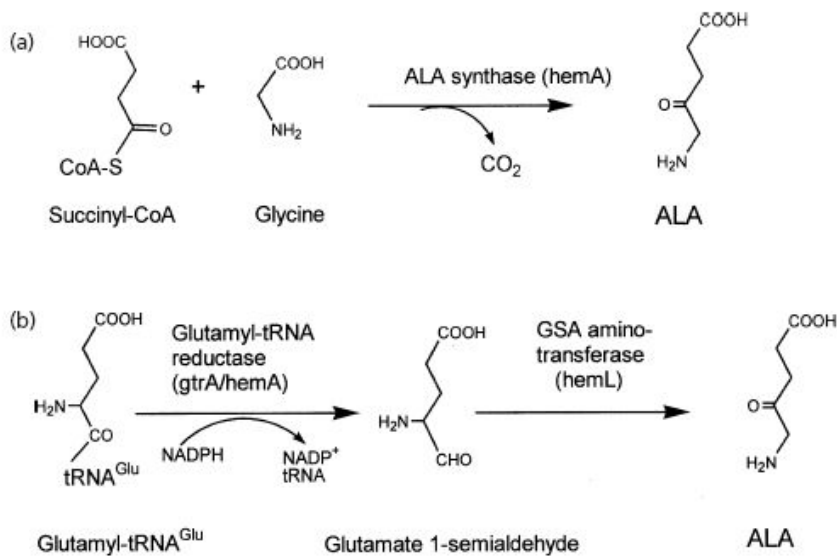
5.1. Syntéza hemu

Hem je využíván téměř všemi živými organismy, vyjma některých extrémofilů a patogenních bakterií (Dailey et al. 2000). Strukturou je to tetrapyrrol porfinu (cyklická sloučenina složená ze čtyř pyrolových kruhů) s navázaným iontem železa. Tvoří prostetickou skupinu (složka, která tvoří součást aktivního jádra enzymu a je

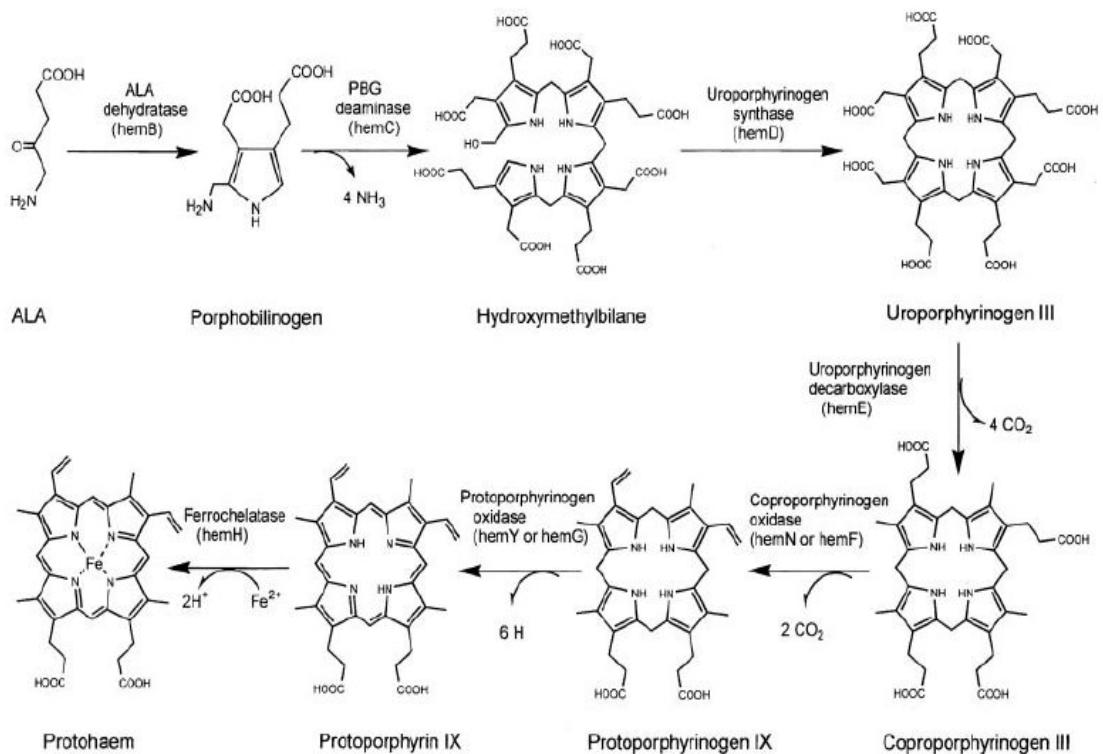
nezbytná pro aktivitu enzymu) v mnoha důležitých enzymech. Hem je základním pilířem aerobního života, je přenašečem kyslíku v hemoglobinu a jako redoxní složka u cytochromů (hemproteiny, které se účastní přenosu elektronů v dýchacím řetězci a v tylakoidní membráně) umožnil vyšší využití energie ze substrátu díky vyššímu počtu elektron-transportních řetězců (Dailey 1997).

Dráha syntézy hemu je esenciální metabolická dráha, která zajišťuje prekursory pro syntézu cytochromů, fotosyntetických pigmentů (chlorofyl, fykobiliny) a centrální strukturu vitamínu B₁₂ tvořenou čtyřmi pyrolovými kruhy. Ne všechny organismy dokáží hem syntetizovat a musí jej proto přijímat v potravě (Rao et al. 2005). První studie o této dráze jsou ze čtyřicátých let dvacátého století a poslední enzym této dráhy byl identifikován až v šedesátých letech (Dailey et al. 2000).

Prvním krokem dráhy je syntéza kyseliny 5-aminolevulinátové (ALA). Existují dvě cesty syntézy ALA - první je C₅ dráha s glutamátem jako prekurzorem. Druhá dráha s prekurzory glycinem a sukcinylem koenzymem A (sukcinyl CoA) katalyzovaná ALA syntázou (obr. 3). Syntézu ALA přes C₅ dráhu nalezneme u fotosyntetických eukaryot a prokaryot (není v alfa-proteobakteriích). Naopak nefotosyntetická eukaryota (zvířata, apikomplexa, houby) a alfa-proteobaktérie tvoří ALA pomocí ALA syntázy (Oborník and Green 2005). Je zřejmé, že nefotosyntetická eukaryota mají tuto cestu syntézy ALA převzatou od α -proteobaktérií, jež daly vzniknout mitochondrii (Oborník and Green 2005). Další kroky od ALA k protoporphyrinogenu IX jsou katalyzovány šesti enzymy a mezi organismy se nijak zásadně neliší (Oborník and Green 2005). Biosyntéza hemu viz (Obr. 3 a Obr. 4).



Obr. 3. Dva různé způsoby syntézy ALA. Převzato z Panek and O'Brian (2002)



Obr. 4. Hem-syntetická dráha: od ALA po hem. Převzato z Panek and O'Brian (2002)

Poslední krok syntézy hemu je katalyzován ferochelátázou (E.C. 4.99.1.1, protoheme ferolyáza). Tento enzym katalyzuje připojení dvojmocného železa k protoporphyrinu IX za vzniku protohemu (hemu) a poprvé byl identifikován v ptačích erythrocytech roku 1956 (Dailey 2000).

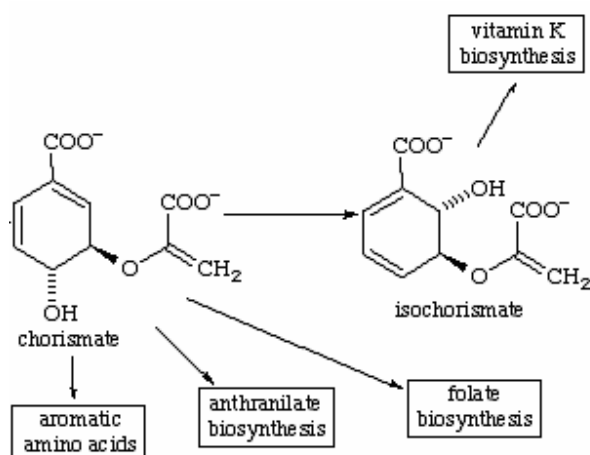
5.1.1. Původ genů u hem–syntetické dráhy u fotosyntetických eukaryot

Místem biosyntézy je u nefotosyntetických eukaryot cytosol a mitochondrie (Ralph et al. 2004). U fotosyntetických eukaryot probíhá syntéza v plastidu (Cornah, Terry, and Smith 2003), malé množství ferochelátázové aktivity bylo ovšem zjištěno i v mitochondrii (Papenbrock and Grimm 2001). U fotosyntetických eukaryot je původ této dráhy mosaikový (Oborník and Green 2005). Většina genů pro enzymy hem-syntetické dráhy pochází z cyanobaktérie a do jádra eukaryota se přesunula endosymbiotickým genovým trasferem (EGT). Výjimkou je porphobilinogen deamináza (PBG deamináza), která má α -proteobakteriální (pravděpodobně mitochondriální) původ a glutamyl-tRNA syntáza (zajišťuje konverzi L-glutamátu na glutamyl-tRNA), která představuje pravděpodobně původní eukaryotickou formu (Oborník and Green 2005). Zajímavá situace je u ferochelátázy. Rozsivky (*Thalassiosira pseudonata* a *Phaeodactylum tricorutum*), které získaly plastid endosymbiózou ruduchy, a rostliny mají gen pro ferochelátázu, který odpovídá homologům u cyanobaktérií. Naopak ferochelátáza ruduch (*Porphyra yezoensis*, *Galdieria sulfuraria* a *Cyanidioschyzon merolae*) odpovídá homologům u proteobaktérií a zástupců výtrusovců (*Plasmodium falciparum*, *P. yoelii* a *Toxoplasma gondii*) (Oborník and Green 2005).

5.2. Šikimátová dráha

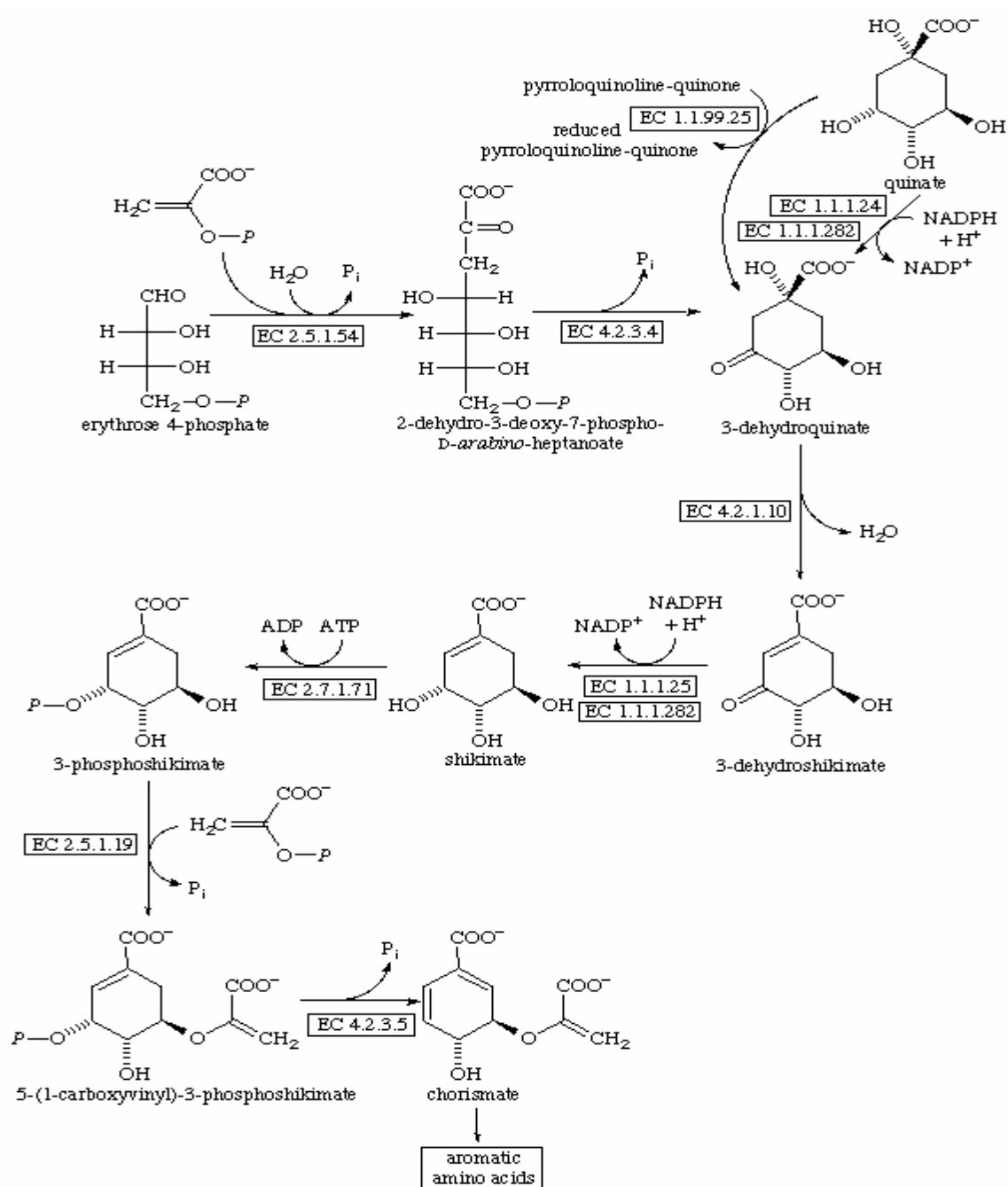
Šikimátová dráha slouží k syntéze aromatických aminokyselin a představuje tak jednu z nejdůležitějších metabolických drah živých organismů. Nalezneme ji u bakterií, rostlin, hub, apikomplex (Campbell et al. 2004, Elandalloussi et al. 2005), u zvířat přítomna není (Roberts et al. 2002). Toho se využívá při konstrukci řady herbicidů, antibiotik a vakcín. Syntézu aromatických aminokyselin můžeme rozdělit na dvě části.

První je společná pro všechny tři aromatické aminokyseliny a začíná kondenzací fosfoenolpyruvátu (PEP, meziprodukt glykolýzy) a erythrosa-4-fosfátu (EP, meziprodukt regenerační fáze pentózového cyklu) a přes řadu kroků ústí ve společný prekurzor aromatických aminokyselin - chorismát. Chorismát je nezbytný nejen pro biosyntézu aromatických AK (fenylalaninu, tryptofanu a tyrosinu), ale účastní se také dalších metabolických drah (Obr. 5). Druhá část syntetické dráhy od chorismátu se větví a je specifická pro danou aminokyselinu.



Obr. 5. Chorismát jako prekurzor některých biochemických drah. Převzato z (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/misc/shikim.html>)

Syntéza chorismátu zahrnuje sedm kroků (obr. 6), přičemž jednotlivé meziprodukty mohou sloužit jako prekurzory v biosyntéze jiných sloučenin. Prvním krokem je kondenzace fosfoenolpyruvátu (PEP) a erythrosa-4-fosfátu (EP) za vzniku DAHP (2-dehydro-3-deoxy-7-fosfo-D-arabino-heptonát). Tato reakce je katalyzována enzymem DAHP syntázou (3-deoxy-7-fosfoheptulonat syntáza, EC 2.5.1.54). Následující kroky jsou katalyzovány enzymy v tomto pořadí: 3-dehydroquinát syntáza (*AroB*), 3-dehydroquinát dehydratáza (2 isoenzymy *AroD* a DHQáza II), šikimát 5-dehydrogenáza (*AroE*), šikimát kináza (*AroL/K*), 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza (*AroA*) a chorismát syntáza (*AroC*). Použité zkratky enzymů jsou odvozeny od systému u *E. coli* (*Aro*-).



Obr. 6. Šikimátová dráha - syntéza chorismátu, převzato z (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/misc/shikim.html>)

Použité zkratky v Obr. 6

Enzymy	
EC 2.5.1.54	DAHP syntáza
EC 4.2.3.4	3-dehydroquininate syntáza
EC 1.1.99.25	quininate dehydrogenáza (pyrroloquinoline-quinone)
EC 1.1.1.24	quininate dehydrogenáza
EC 1.1.1.282	quininate/shikimate dehydrogenáza
EC 4.2.1.10	3-dehydroquininate dehydratáza
EC 1.1.1.25	shikimate dehydrogenáza
EC 2.7.1.71	shikimate kináza
EC 2.5.1.19	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferáza
EC 4.2.3.5	chorismát syntáza

5.2.1. Původ šikimátové dráhy

Enzymy jsou kódovány v jádře a biosyntéza probíhá buď v cytosolu nebo v plastidu (u fotosyntetických eukaryot). Většina rostlinných šikimátových enzymů má na N-konci transportní peptid pro transport do plastidu. Z toho se odvozuje, že biosyntéza probíhá v plastidu, to ovšem bylo experimentálně prokázáno jen u některých enzymů dráhy (Richards et al. 2006).

Cytosolická verze dráhy představuje zřejmě původní eukaryotickou formu (Richards et al. 2006). Důležitým rysem je spojení pěti enzymů do funkčního pentameru AROM. Tato forma se nachází u hub (vřeckovýtrusné houby a stopkovýtrusné houby) a byla identifikována také u chromalveolát: *Toxoplasma gondii* – výtrusovci (Campbell et al. 2004), *Tetrahymena thermophila* – Ciliata, *Phytophthora ramorum* a *P. sojae* – Oomycota (Richards et al. 2006). Monofylie AROM genů je podpořena fylogenetickými analýzami (Campbell et al. 2004, Richards et al. 2006). Redukované AROM geny byly nalezeny u rozsivky (Chromalveolata) – *Thalassiosira pseudonata* a u houby spájivé (Zygomycota, Unikonta) – *Rhizopus oryzae* (Richards et al. 2006). V případě rozsivky jsou ortologem k AROM genům zfúzované geny *AroDE*, u houby to jsou geny *AroBD*. Kromě hypotézy, že jde o původní eukaryotickou formu biosyntézy, která byla během vývoje u řady eukaryotických linií ztracena nebo nahrazena, nabízí Richards et al. (2006) i alternativní vysvětlení: AROM geny mohly vzniknout u jedné eukaryotické skupiny a pak se intraeukaryotickým genovým transferem rozšířit do dalších skupin.

Eugleny mají zřejmě obě formy biosyntézy – cytosolickou i plastidovou, které používají podle kultivačních podmínek. Organismy rostoucí ve tmě realizují syntézu v cytosolu, naopak organismy vystavené slunečnímu záření vykazují syntézu lokalizovanou v plastidu (Reinbothe et al. 1994).

Většina bakterií má funkčně separované geny, avšak u některých můžeme nalézt i funkčně spojené geny (Richards et al. 2006). Enzymy kódované jako samostatné polypeptidy mají také rostliny, výjimkou jsou geny *AroD* a *AroE*, u kterých došlo k fúzi (Richards et al. 2006). Zfúzované geny *AroDE* u rostlin jsou zřejmě proteobakteriálního původu a nejedná se tedy o homolog k pentameru AROM (Richards et al. 2006).

Fotosyntetická eukaryota mají mosaikový původ genů. Přestože je pravděpodobně celá dráha lokalizovaná v plastidu, cyanobakteriální původ vykazují jen dva geny (*AroL/K*, *AroC*). Tři geny (*AroB*,) mají proteobakteriální charakter. Zbývající dva geny (*AroE* a *AroD*), u nichž došlo k fúzi, mají odlišný původ u rostlin a u řasovek (viz výše). Řasivky si tedy zřejmě ponechaly část původní eukaryotické dráhy, avšak u rostlin už byly všechny geny nahrazeny homology prokaryotického původu.

5.2.2. DAHP syntáza

DAHP syntáza (DAHPs) existuje ve dvou pravděpodobně nepříbuzných formách – menší typ I (*AroI*) a typ II (*AroII*). Sekvenční shoda genů je <10% , což indukuje jejich evolučně nezávislý původ (Herrmann and Weaver 1999). Objevil se ovšem i názor, že by snad mohli mít společného velmi vzdáleného předka díky některým shodným krystalografickým rysům (Webby et al. 2005). Typ I se navíc dělí na dvě rodiny (α a β) (Gosset, Bonner, and Jensen 2001). Většina organismů má DAHP syntázu ve více kopiích, např. *E.coli* – tři paralogy (*AroI- α*) (Gosset, Bonner, and Jensen 2001). U proteobaktérií, hub a řasovek můžeme nalézt obě formy genu a některé proteobaktérie, houby i řasovky mají dokonce obě formy současně. Cyanobaktérie mají zřejmě pouze typ I, kdežto u fotosyntetických eukaryot byl identifikován zatím jen typ II (Richards et al. 2006). U DAHP syntázy typu I tvoří houby a řasovky monofyletickou skupinu uvnitř zřejmě polyfyletických proteobaktérií a cyanobaktérií (Richards et al. 2006).

Richards et al. (2006) u DAHPs II identifikoval dvě linie eukaryot. Jedna zahrnuje pouze rostliny a rozsivky. Druhá zahrnuje houby, Chromalveolata (*Toxoplasma*, *Tetrahymena*, *Phytophthora*) a na bázi této skupiny se nachází zástupce červených řas – *Cyanidioschyzon merolae*. Proteobakterie tvoří monofyletickou skupinu a docházelo u nich zřejmě k častému HGT. Právě homology AroII u chromalveolát a hub podle Richards et al. (2006) pravděpodobně představují původní eukaryotní formu genu. Zatímco fotosyntetická eukaryota – rostliny a rozsivka (*Thalassiosira*) získaly protobakteriální formu AroII pravděpodobně díky HGT. *C. merolae* jako zástupce červených řas má dva paralogy genu pro DAHPs, z nichž jeden se nachází na bázi skupiny zahrnující houby a chromalveoláta a druhý nalezneme mezi proteobakteriemi (Richards et al. 2006).

Materiál a metody

1. Materiál

Pro izolaci DNA z řas byly použity tyto zástupci oddělení Florideaophyceae:

- *Hildenbrandia rivularis* (Hildenbrandiales)
- *Lemanea fluviatis* (Batrachospermales)
- *Batrachospermum* sp. (Batrachospermales)
- *Laurencia obtusa* (Ceramiales)
- *Pleurocapsa cuprea* (klasifikována jako sinice, ale podle pigmentů a morfologie jde zřejmě o druh příbuzný Hildenbrandiaceae, Lenka Caisová - ústní sdělení)

2. Laboratorní metodika: izolace DNA, PCR amplifikace, klonování, sekvenace

Izolace DNA

Vzorky získaných taxonů řas byly uchovávány v 75% etanolu. Genomová DNA byla extrahována podle protokolu: DNA Isolation Protocol for Red Seaweed (Rhodophyta) (Wattier, Prodöhl, and Maggs 2000) s drobnými úpravami v postupu.

Postup: vysušené vzorky jsem rozdrtila, přidala extrakční pufr, SDS a proteinázu K a umístila na cca 16 hodin do třepačky (při tomto kroku jsme rozrušili silnou buněčnou

stěnu a purifikovali DNA degradací kontaminujících proteinů). Vzorky jsem zcentrifugovala a odsála supernatant, který jsem nechala stát 30 minut na ledu. Poté jsem vzorky opět zcentrifugovala a odsála supernatant, tento krok jsem opakovala ještě jednou (tímto krokem jsme se zbavily buněčných zbytků a tlusté polysacharidové stěny). Následně jsem DNA srážela ethanolem, případně jsem použila izolační kit podle návodu výrobce (JETQUICK Tissue DNA Spin Kit). Izolovaná DNA byla uskladněna při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PCR amplifikace

Geny pro ferochelatazu i DAHP syntázu byly amplifikovány metodou PCR s navrženými primery (viz. tabulka). Primery byly navrženy na základě alignmentů získaných z dostupných sekvencí v elektronických databázích: databáze GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), databáze JGI Eukaryotic Genomics (http://genome.jgi-psf.org/euk_cur1.html), *Porphyra* EST Database (Kazusa), *Galdieria sulphuraria* database (<http://genomics.msu.edu/galdieria/>), *Cyanidioschizon merolae* Genome Project (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>).

1. PCR amplifikace

Reakční směs byla připravena pro celkový objem $50\ \mu\text{l}$ a obsahovala: $5\ \mu\text{l}$ $10\times$ PCR pufru (10mM Tris-HCl, pH 8.5, $50\ \text{mM}$ KCl), $2.0\ \mu\text{l}$ $2.5\ \text{mM}$ dNTP, $0.4\ \mu\text{l}$ DNA polymerázy, $1\ \mu\text{l}$ $25\ \mu\text{M}$ „forward“ primeru, $1\ \mu\text{l}$ $25\ \mu\text{M}$ „reverse“ primeru, $1.0\ \mu\text{l}$ templátové DNA a zbytek do celkového objemu $50\ \mu\text{l}$ byl doplněn sterilní destilovanou vodou. Amplifikace probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 minut, následovalo 35 cyklů (denaturace: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 1 min, annealing: $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 2 min), na závěr probíhala syntéza DNA při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 minut. Amplifikační program jsem obměňovala různou teplotou annealingu (hybridizace primerů) a u reakční směsi jsem použila hořčičkový gradient.

2. Uneven PCR amplifikace (Chen and Wu 1997)

Reakční směs byla připravena pro celkový objem $50\ \mu\text{l}$: $5\ \mu\text{l}$ $10\times$ PCR pufru (10mM Tris-HCl, pH 8.5, $50\ \text{mM}$ KCl), $2.0\ \mu\text{l}$ $2.5\ \text{mM}$ dNTP, $0.4\ \mu\text{l}$ DNA polymerázy, $1\ \mu\text{l}$ $25\ \mu\text{M}$ prvního „specifického“ primeru, $0.2\ \mu\text{l}$ $25\ \mu\text{M}$ „náhodného“ primeru, $1.0\ \mu\text{l}$ templátové DNA a zbytek do celkového objemu $50\ \mu\text{l}$ byl doplněn sterilní destilovanou

vodou. Amplifikační program měl tyto kroky: počáteční denaturace při 94 °C, 5 minut, následovalo 20 cyklů (94 °C – 1 min, 55 °C – 1 min, 72 °C – 3 min, 94 °C - 1 min, 40 °C – 1 min, 72 °C – 3min), elongace 72 °C – 10 min.

Poté jsem připravila reakční směs, kde jsem jako templátovou DNA použila PCR reakční směs z předchozího cyklu. Celkový objem reakční směsi byl opět 50 µl: 5 µl 10 x PCR pufru (10mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl), 2.0 µl 2.5 mM dNTP, 0.4 µl DNA polymerázy, 1 µl 25 µM druhého „specifického“ primeru, 0.2 µl 25 µM „náhodného“ primeru, 1.0 µl templátové DNA a zbytek do celkového objemu 50 µl byl doplněn sterilní destilovanou vodou. Amplifikační program byl stejný jako u předchozí reakční směsi.

Produkty PCR byly elektroforeticky rozděleny na 1% agarózovém gelu a vizualizovány na UV transiluminátoru (TFX-35.M Vilber Lourmat). Velikost produktu byla odvozena podle DNA Ladder: 2-Log Ladder (BioLabs, New England). Fotodokumentace byla provedena digitálním fotopřístrojem a počítačovým programem Kodak Digital Science 1D. V elektroforetickém rozdělení bylo použito 20.0 µl PCR směsi, PCR produkty odpovídající velikosti byly z gelu vyříznuty a přečištěny pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) – podle návodu výrobce. Získané přečištěné PCR produkty byly uskladněny při teplotě –20°C.

Navržené primery (viz tabulka)

Zda sekvence použité v aligmentu pro navržení primerů jsou ve správném čtecím rámci jsem překontrolovala v programu Editseq (DNASTAR). Sekvence byly dočasně převedeny do aminokyselin a alignovány v programu MegAlign (DNASTAR) metodou ClustalW. V případě ferochelátázy jsem navrhla primery zvlášť podle vyšších rostlin, zelených řas, cyanobaktérií a rozsivek a zvlášť podle dostupných sekvencí červených řas (*Porphyra yezoensis*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulfuraria*). Pro DAHP syntázu jsem navrhla tyto sady primerů: „rostlinný typ“ (vyšší rostliny, rozsivky), „universální typ“ (červené řasy, *Arabidopsis thaliana*, *Bradyrhizobium japonicum*), „typ eukaryota“ (*C. merolae* 2, houby, Apicomplexa) a na základě získané částečné sekvence genu rovněž specifické primery.

Typ primeru (Ferochelatóza)		Sekvence primeru
typ červené řasy	PCR forward	ATGCADTWYNGBGANCC
typ červené řasy	PCR reverse	AYTGNGCVCGRTAGCAG
typ červené řasy	PCR forward	CCNTAYCTNCAYRTNGTNCCNGCNTTYTAYGAYC
typ červené řasy	PCR reverse	YTGNGCNCGRARCARTTNCGRRTNGC
typ červené řasy	PCR forward1	CAYRTHGTNCCNGCNTTYTAYGAYCAT
typ červené řasy	PCR forward2	AGYTTYCAYGGNGTNCCNGARAARCA
typ červené řasy	PCR reverse	TGNGCSCGRARCARTTSCGRRTNGC
rostlinný typ	PCR forward	GGYAYCCM TTYACDGAGGA
rostlinný typ	PCR reverse	GGHACDCCRTGDGCRCWGA
rostlinný typ	PCR forward	AAAYCTNTTKCNGAYCCNGANATHAT
rostlinný typ	PCR reverse	CCNATHAGYTTYGTNWSYGARCAATHGARAC

Typ primeru (DAHPs)		Sekvence primeru
rostlinný typ	PCR forward	GAYSRHGSYCATDTNGA
rostlinný typ	PCR reverse	CDCCDRKGCAYTCDGTSAC
universální typ	PCR forward1	TGGDBVWSBGAYMSVATGCACGGMAAYAC
universální typ	PCR forward2	AGRCAGCYMGAYSRTGSCCATGTCCA
typ eukaryota	PCR forward1	ATNGCNGGNCARTWYGCVAARCCNCG
typ eukaryota	PCR forward2	TNCARGGHGGNGACTGYGCCGARNYSTT
specifické	PCR reverse	GATAGCGGCTGGATAGATCCTA
specifické	PCR reverse	GCAGGTAGAATATCGGTGAACG
specifické	PCR reverse	TCGCAATAGGTGKTGTAGCGGTC
specifické	PCR reverse	CCTTGATGGTGTTCCTGTCAT
Rostl+Cyanobac	PCR forward	CYGGYCARTTYGCMAARCCNM
Rostl+Cyanobac	PCR forward	GGWMGMATGGCYGGYCARTTYGCMAARCC
Rostl+Cyanobac	PCR forward	GGWMGMATGGCYGGYCARTTYG
Rostl+Cyanobac	PCR forward	GGHGGNGAYTGYG CYGA
Rostl+Cyanobac	PCR forward	CCBMTBGTKTTYGCNGGNGA
"náhodný" primer	oba směry	ANNAWATTCCA

Tabulka: primery použité při PCR amplifikaci

Použité zkratky: Rostl = rostliny, rozsivky; Cyanobac = cyanobaktérie

Klonování PCR produktu

Vyizolované fragmenty DNA byly zaklonovány pomocí kitu (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) podle návodu výrobce. Použila jsem klonovací TOPO[®] vektor a kompetentní buňky *E. coli* DH5 α . Pozitivní kolonie byly přeočkovány do LB média (s přidaným ampicilinem - 12 μ l) a kultivovány v třepačce (200 rpm) při teplotě 37°C po dobu 12 – 16 hodin. Pro izolaci plasmidové DNA z bakteriální kultury byl použit kit

QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Přítomnost fragmentu DNA v plasmidu byla ověřena pomocí restriční analýzy.

Sekvenování

Sekvenační reakce byla provedena v laboratoři Genomiky. Produkty sekvenační reakce byly analyzovány v přístroji ABI 3130 (Applied Biosystems). Koncentrace plasmidové DNA odpovídala 300 ng/μl, a byl použit sekvenační primer M13 forward a M13 reverse (TOPO TA Cloning Kit).

3. Analýza sekvencí

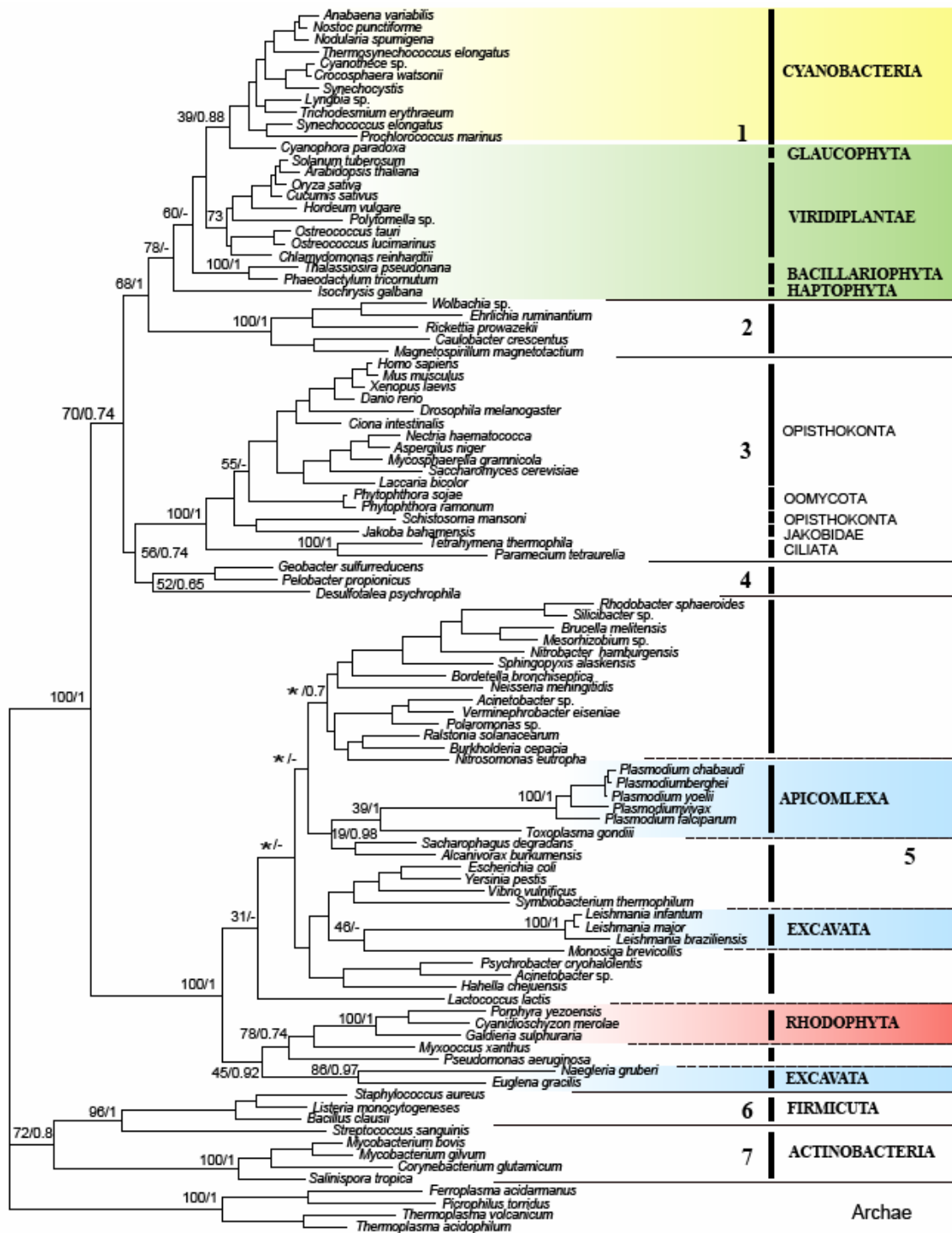
Sekvence byly získány z databází – NCBI GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), JGI Eukaryotic Genomics (http://genome.jgi-psf.org/euk_cur1.html), Protist EST Database (PEP, <http://www.bch.umontreal.ca/pepdb/pep.html>), Porphyra EST Database (Kazusa), Galdieria sulphuraria database (<http://genomics.msu.edu/galdieria/>), The *Leishmania* Friedlin Genome Project (http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/). Základní alignment byl sestaven programem MAFFT 5.8 (Kato et al. 2005), který byl následně ručně upraven v programu BioEdit (Hall 1999). Na základě Akaike information criterion programem Prottest (Abascal et al. 2005), byl zvolen WAG+I+G aminokyselinový evoluční model jako nejvhodnější pro všechny datasety. Analýza metodou maximum likelihood (ML) byla provedena pomocí programu PHYML 2.4.4. (Guindon and Gascuel 2003). Byla provedena analýza pomocí Bayesiánské fylogeneze (BI) a programu MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Statistická podpora ML stromů byla vyjádřena bootstrapovou analýzou (100 opakování), podpora u BI byla vyjádřena pomocí pravděpodobnosti (posterior probability) z 500,000 generací. Prvních 100,000 generací bylo z rekonstrukce topologie vyloučeno.

Pro výchozí dataset pro ferochelátázu, který obsahoval 137 aminokyselinových (AA) sekvencí, byla spočítána analýza ML. Na základě výsledku byly ponechány v alignmentu zástupci hlavních monofyletických skupin a zkrácený alignment (102 sekvencí) byl použit pro novou ML a BI analýzu (Obr. 7).

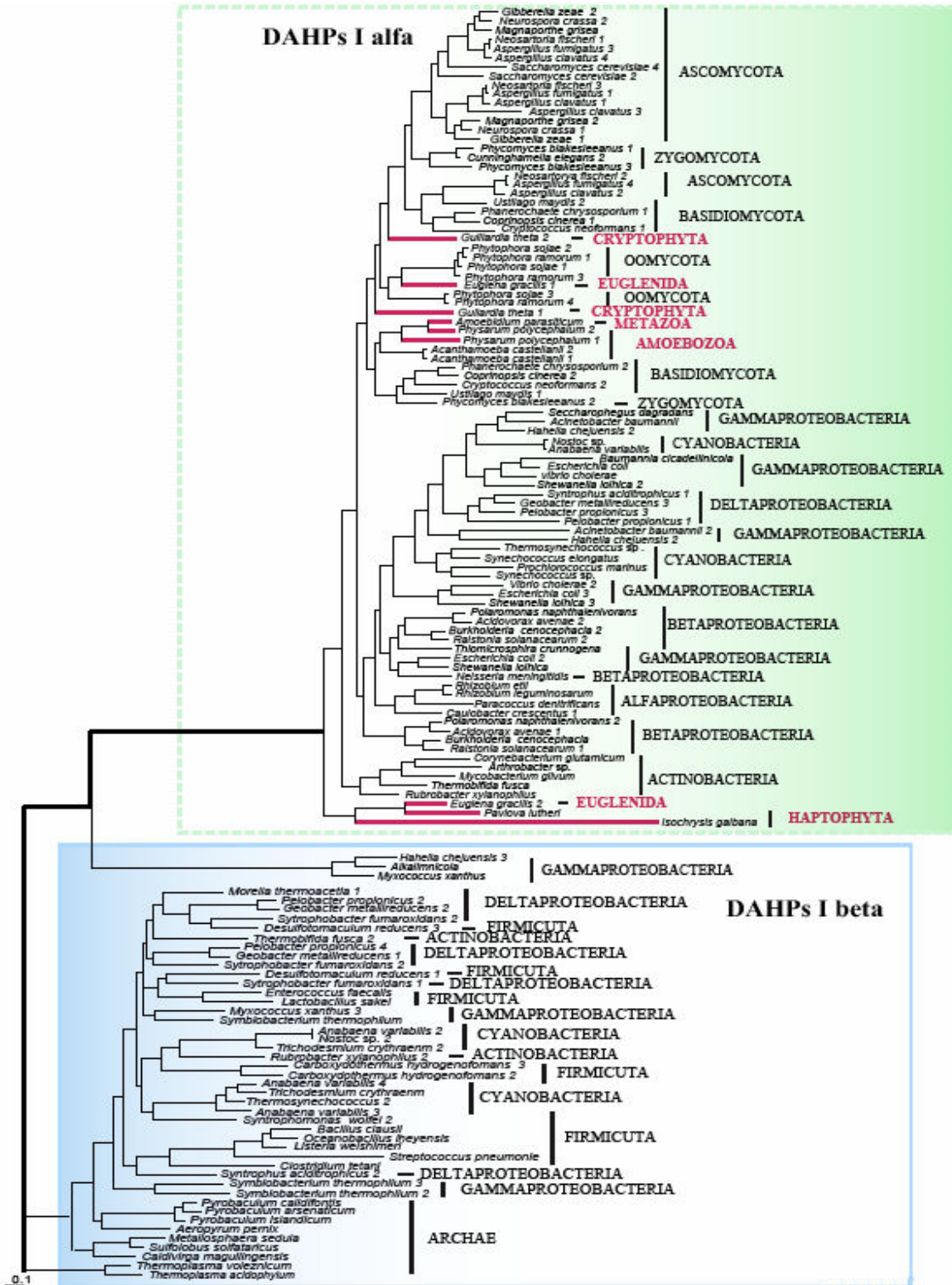
Výchozí dataset pro DAHP syntázu I obsahoval 350 AA sekvencí a pro DAHP syntázu II 168 AA sekvencí. Oba byly analyzovány v programu AsaturA (Van de Peer et al. 2002). Na základě výsledku byly v základních datasetech ponecháni zástupci hlavních linií a odstraněny příliš krátké neúplné sekvence. Nové alignmenty obsahovaly 136 sekvencí (DAHPs I), 72 sekvencí (DAHPs II), tyto jsem pro kontrolu analyzovala metodou ML (Obr. 8 – DAHPs I, jako outgroup jsem použila zástupce Archaeobacteria). Nový alignment u DAHPs I z předchozího kroku jsem omezila na rodinu AroI- α a plus tři zástupce AroI- β , které jsem použila jako outgroup. Tento dataset (66 sekvencí) jsem analyzovala metodou ML i BI (Obr. 9). Pro dataset jen se členy DAHPs rodiny alfa (63 sekvencí) byla opět použita analýza metodou ML, jako outgroup byli použiti zástupci aktinobaktérií (Obr. 10). Fylogenetická analýza nového alignmentu pro DAHPs II byla provedena metodami ML a BI (Obr. 11).

Statistické podpory u jednotlivých stromů jsem uváděla jen u hlavních skupin a pro zástupce, kteří se týkali mé práce.

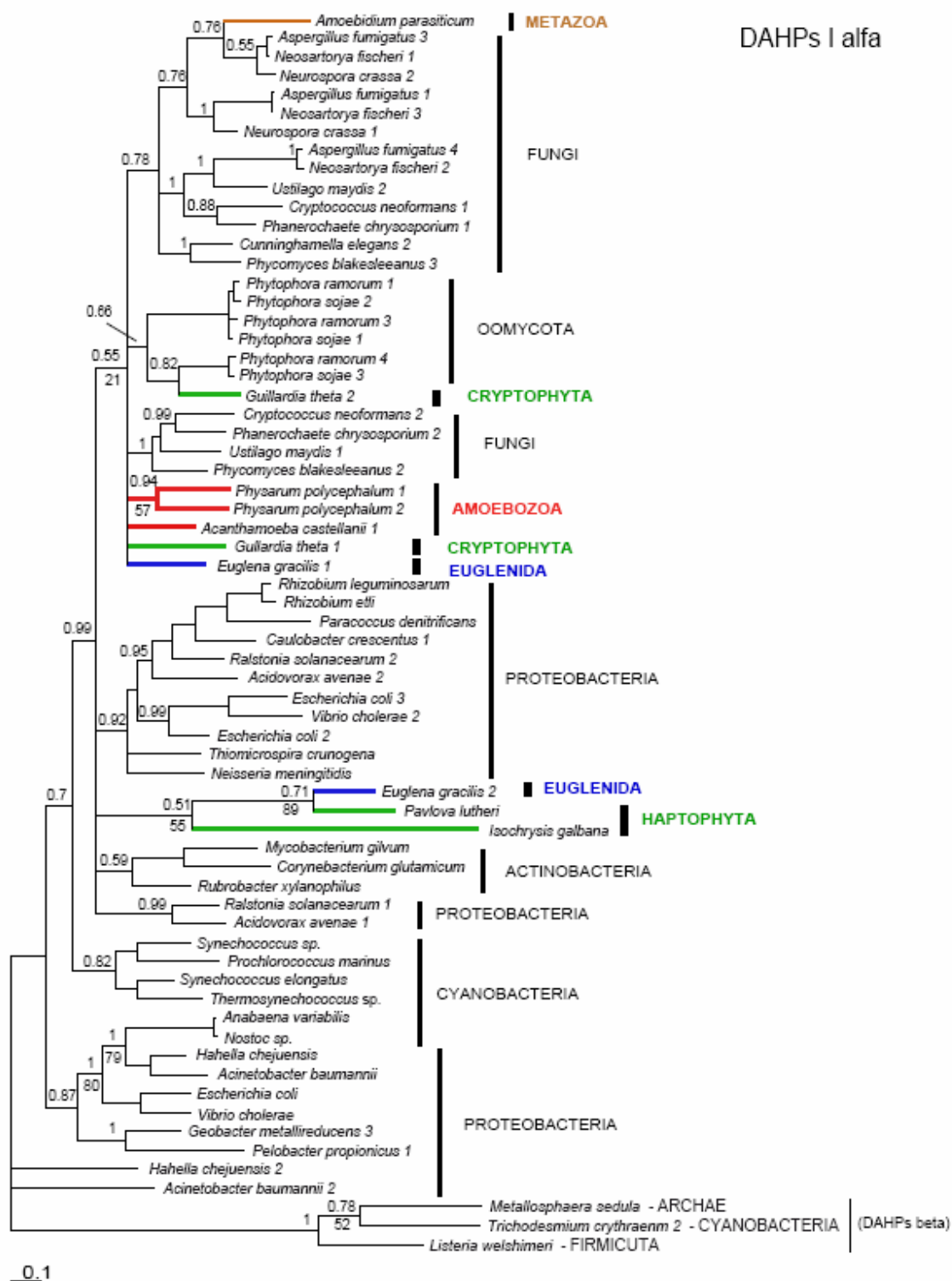
Cílem této práce tedy bylo získat sekvence genů pro ferochelátázu a DAHPs u zástupců třídy Florideophyceae a pomocí fylogenetické analýzy, zjistit zda tyto geny odpovídají homologům u rozsivek a tím se vyjádřit k hypotéze o potenciálním původu rozsivkového plastidu právě z červených řas této třídy.



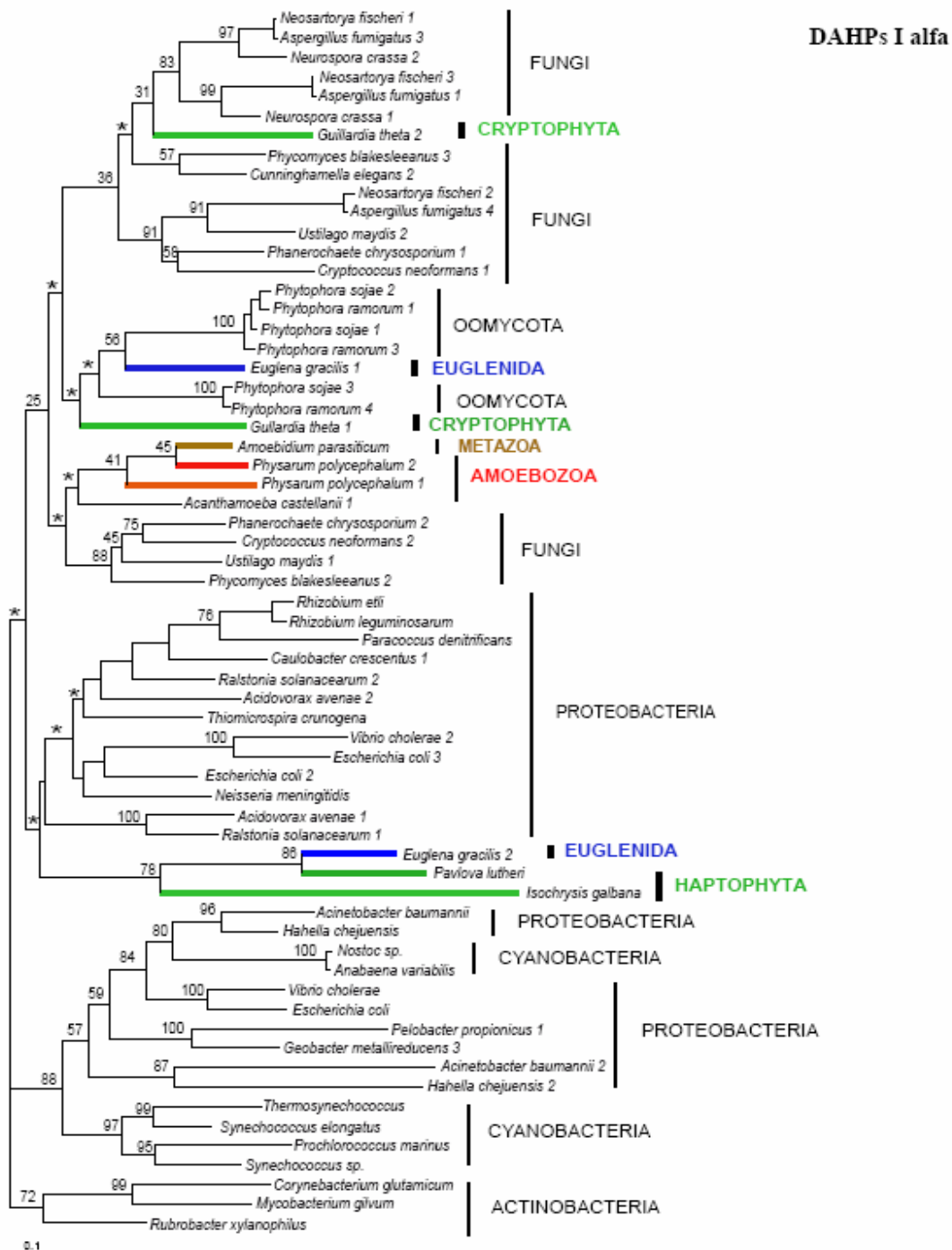
Obr. 7. Ferochelátáza. Fylogenetický strom ML za použití programu PHYML 2.4.4. (počet kategorií=4, Loglik=-40229.98945, gamma shape parameter=1.576, PINVAR=0.025). Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: bootstrapová analýza/posterior probability. Označení * = podpora < 35, tam kde se topologie ML a BI neshodují podpora BI = .



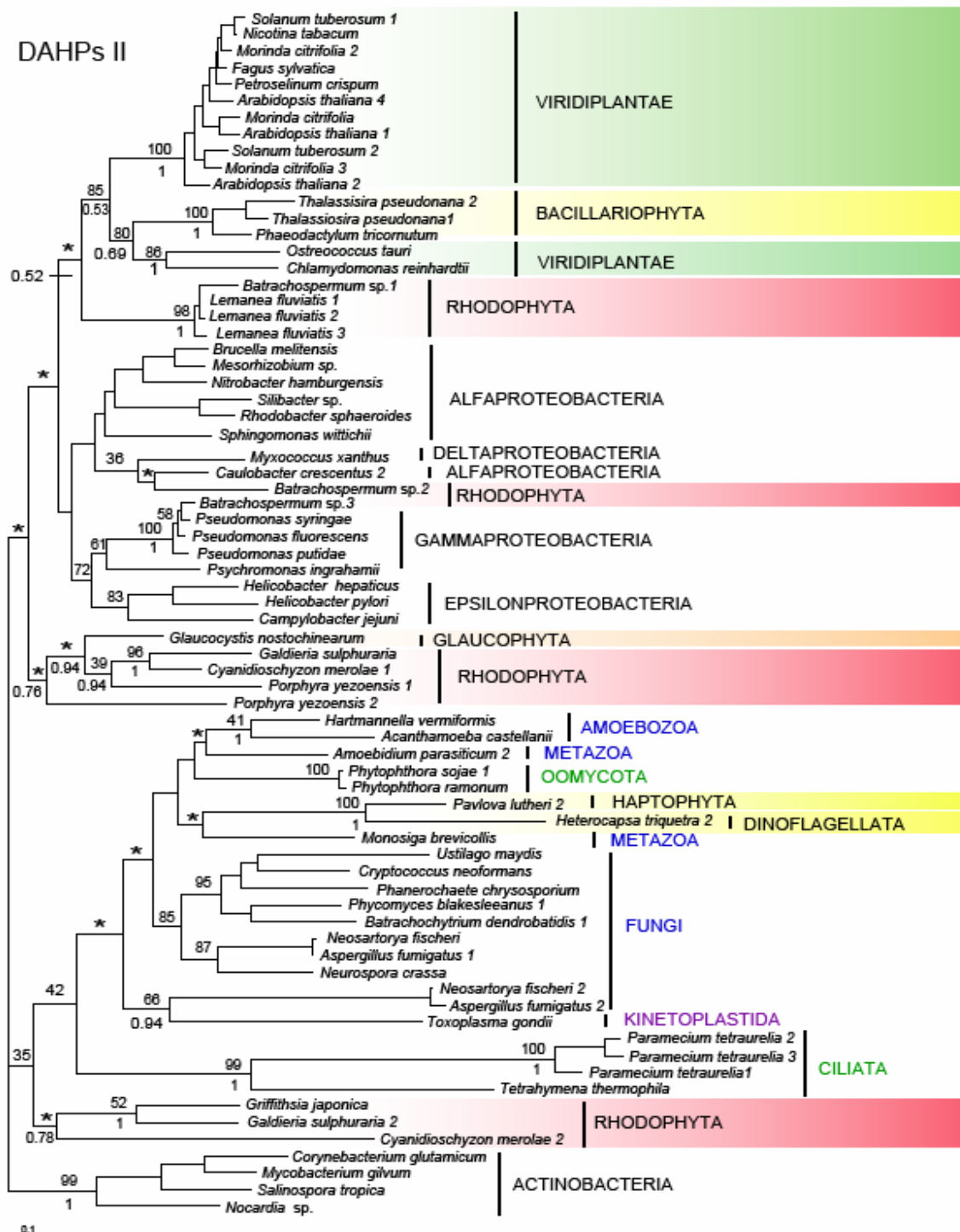
Obř. 8. DAHPs I – rodiny alfa/beta. Maximum likelihood strom. (počet kategorií=4, Logk=-45260.24706, gamma shape parameter=0.992, PINVAR=0.032), bez statistické podpory.



Obr. 9. Fylogenetický strom pro DAHPs I rodiny alfa sestavený analýzou BI. Hodnoty nad větvemi jsou statistické podpory posterior probability, označení: * = podpora < 35, tam kde se topologie shoduje se stromem ML, je uvedena bootstrapová podpora pod větví.



Obr. 10. Fylogenetický strom ML pro DAHPs I rodiny alfa. (počet kategorií=4, Loglik=-22603.39291, gamma shape parameter=1.053, PINVAR=0.096). Statistická podpora je vyjádřena bootstrapovou analýzou, hodnoty < 25 = * .



Obr.11. Maximum likelihood strom pro DAHPs typu II. (počet kategorií=4, Loglk=-30087.42823, gamma shape parameter=1.429, PINVAR=0.089). Hodnoty nad/pod větvemi jsou statistické podpory bootstrapová analýza/posterior probability). Hodnoty <math>P < 0.05</math> = *.

Výsledky

Gen pro ferochelátázu se mi amplifikovat a osekvenovat nepodařilo. U DAHPs se mi podařilo osekvenovat cca 300 nukleotidů dlouhý 3' konec genu u druhů – *Batrachospermum* sp. a *Lemanea fluviatis* (3 různé sekvence u *Lemanea fluviatis* a 3 různé sekvence u *Batrachospermum* sp.). Jako úspěšná se ukázala být amplifikace metodou uneven PCR s „universálními“ primery (viz tabulka) při nasedací teplotě primerů 55 °C.

Ferochelátáza

U všechny analyzovaných taxonů byl nalezen pouze jeden gen kódující ferochelátázu. Fylogenetická analýza odhalila několik hlavních linií. Topologie fylogenetických stromů ML a BI (Obr. 7) se zásadně neliší, jako outgroup v obou případech byly použity zástupci skupiny Archae. Hlavní linie: linie 1: fotosyntetická eukaryota (Glaucophyta, rostliny, zelené řasy, rozsivky a Haptophyta) a cyanobaktérie; linie 2: alfa-proteobaktérie; linie 3: nefotosyntetická eukaryota z různých taxonomických skupin (Opisthokonta, Oomycota, Jakobidae, Ciliata); linie 4: delta-proteobaktérie; linie 5: proteobaktérie, ruduchy, výtrusovci, *Euglena*, *Leishmania* a *Naegleria*; linie 6: Firmicuta; linie 7: aktinobaktérie.

DAHP syntáza

Fylogenetické analýzy odhalily, že oba typy DAHPs (AroI a AroII) mají kromě hub a oomycet také *Pavlova lutheri* (Haptophyta) a *Acanthamoeba castelani*, *Physarum polycephalum* (Amoebozoa), *Amoebidium parasiticum* (Opisthokonta). V případě DAHPs typu I byly jasně identifikovány dvě rodiny alfa/beta (Obr. 8). Obě rodiny DAHPs I mají zástupci sinice, proteobakterií a aktinobakterií. V rámci rodiny alfa byly identifikovány navíc zástupci hub, oomycet, amoebozoí, haptofyt, skrytěnka a krásnoočko (Obr. 9, Obr. 10). Naproti tomu DAHPs I rodiny beta je typická pro Firmicuta a Archaea. U hub, oomycet a proteobakterií bylo identifikováno v rámci DAHPs I rodiny alfa více paralogů a tyto taxony netvoří monofyletické skupiny. Rovněž sinice ve fylogenetickém stromě netvoří monofyletickou skupinu. Firmicuta,

aktinobaktérie a proteobaktéri také netvoří v rámci DAHP I rodiny beta monofyletické skupiny.

DAHPs typu II (Obr. 11) byla identifikována (kromě výše zmíněných taxonů vlastních oba typy) u rostlin, zelených a červených řas, ciliátů, trubénky, výtrusovce, obrněnky a zástupce Glaucophyta. Gen pro DAHP syntázu typu AroII byl nalezen rovněž u zástupce skupiny Chlorarachniophyta – *Bigelowiella natans* a zástupce skupiny Amoebozoa - *Physarium parasiticum*. V obou případech se však jednalo o velmi malé fragmenty a proto nebyly zařazeny do fylogenetických analýz. U některých rostlin bylo nalezeno více paralogů (nejvíce 8 u *Physcomitrella patens*). Dva paralogy jsem našla u rozsivky *Thalassiosira pseudonana*, většiny červených řas a některých hub. Pouze jediný zástupce deltaproteobaktérií měl ve svém genomu DAHP syntázu typu II. Jednu z dobře podpořených větví tvoří zástupci rostlin, zelených řas a rozsivek, přičemž na bázi této linie se se slabou statistickou podporou nachází čtyři částečné sekvence získané z červených řas skupiny Floridiophyceae (3 sekvence *Lemanea fluviatis* a 1 sekvence *Batrachospermum* sp.). Další dvě sekvence *Batrachospermum* sp. se nachází v blízkosti alfaproteobaktérií, respektive gammaproteobaktérií. Ostatní červené řasy jsou ve dvou různých liniích. Ani jedna z nich není s dobrou statistickou podporou sesterská k některé z hlavních dobře podpořených linií.

Diskuse

1. Ferochelatáza

Z výsledků publikace Oborník and Green (2005) vyplývá, že gen pro ferochelatázu u rostlin, zelených řas a rozsivek je příbuzný homologům u sinic. To naznačuje plastidový (sinicový) původ genu u těchto fotosyntetických eukaryot. Oproti tomu ferochelatáza červených řas je ve výše zmíněném fylogenetickém stromě blíž ferochelatáze proteobaktérií a výtrusovců. Mým cílem tedy bylo osekvenovat gen pro ferochelatázu u červených řas jiných skupin než je doposud známo, tj. *Cyanidioschyzon merolae* (Cyanidiophyceae), *Porphyra yezoensis* (Bangiophyceae), *Galdieria sulphuraria* (Cyanidiophyceae). To se mi nepodařilo, takže jsem dataset vzhledem k použitým taxonům v práci Oborník and Green (2005) rozšířila o sekvence dalších taxonů, které byly dostupné v různých elektronických databázích. Soubor fotosyntetických eukaryot se tak obohatil o druhy: *Euglena gracilis* (Euglenida), *Cyanophora paradoxa* (Glaucophyta) a *Isochrysis galbana* (Haptophyta).

Topologie fylogenetického stromu (BI i ML) se zčásti shoduje s topologií ML fylogenetického stromu publikovaného Oborník and Green (2005), navíc se tu objevují samostatné linie delta-proteobaktérií a alfa-proteobaktérií. Zajímavá situace je u linie 5, kde jsou vedle proteobaktérií různých skupin i skupiny, jejichž zástupci patří do tří taxonomicky nepříbuzných samostatných vývojových linií (*Plasmodium*, *Toxoplasma* – Apicomplexa; *Leishmania* – Excavata; Rhodophyta; *Euglena*, *Naegleria* – Excavata). Zde byl pravděpodobně původní eukaryotický gen nahrazen genem z proteobaktérií. Mechanismem přenosu byl zřejmě horizontální genový transfer (HGT). Topologie obou fylogenetických stromů naznačuje, že k HGT zřejmě došlo u každé skupiny nezávisle. Poněkud diskutabilní je pozice *E. gracilis*, která se v obou stromech nachází blíž k rodu *Naegleria* než k parazitům rodu *Leishmania*, se kterou patří taxonomicky společně do oddělení Kinetoplastida (bičivky). Ovšem tyto topologie nejsou příliš podpořené a k HGT u Excavata mohlo dojít jednou, stejně jako vícekrát. Navíc větve vedoucí k oběma taxonům (*E. gracilis* a *N. gruberi*) jsou dosti dlouhé a jejich sesterská pozice může být daná nedostatečným zastoupením proteobaktérií. U výtrusovců a ruduch je situace poněkud komplikovanější. Vzhledem k tomu, že výtrusovci a rozsivky (Chromalveolata)

mají plastid původem z červené řasy, scénářů je hned několik. U obou skupin mohlo zcela nezávisle dojít k HGT a nahrazení genu pro ferochelátázu homologem z proteobaktérií až poté, co předek chromalveolát pohltil v procesu sekundární endosymbiózy červenou řasu. Tato červená řasa mohla mít gen cyanobakteriálního původu, a tento gen si ze sekundární plastidu vypůjčily i rozsivky. Další možnost je, že ferochelátáza původem ze sinic byla u ruduch nahrazena proteobakteriálním genem u fylogenetických linií vedoucích k *Porphyra yezoensis* (Bangiophycea), *Cyanidioschyzon merolae* a *Galdieria sulphuraria* (Cyanidiophyceae), ale ne u červené řasy, kterou společný předek chromalveolát pohltil během sekundární endosymbiózy. U výtrusovců pak k HGT došlo až po sekundární endosymbióze. Případně sekundární endosymbiózy u chromalveolát byly dvě. Na základě statistických podpor se totiž nedá vyvrátit sesterské postavení výtrusovců a červených řas. Navíc větev vedoucí k výtrusovcům je poměrně dlouhá a jejich postavení proto dost nejisté. Výtrusovci proto mohli pohltil červenou řasu patřící k liniím vedoucích k *Porphyra yezoensis* (Bangiophycea), *Cyanidioschyzon merolae* a *Galdieria sulphuraria* (Cyanidiophyceae), u nichž mohl být původní gen nahrazen proteobakteriálním díky HGT ještě před tímto pohlcením. Kdežto Heterokonta pohltily jinou třídu červených řas než Cyanidiophyceae a Bangiophycea a tato třída, stejně jako rozsivky a Haptophyta, stále používá ferochelátázu původem ze sinic.

Bohužel amplifikovat ferochelátázu ruduch se mi nepodařilo. Tudíž nemohu potvrdit ani vyvrátit hypotézu, zda předek chromalveolát pohltil v procesu sekundární endosymbiózy jiné červené řasy než ze skupin Cyanidiophyceae a Bangiophycea nebo se vyjádřit k hypotéze, že sekundární endosymbiózy u chromalveolát byly dvě. Hlavním problémem bylo zřejmě to, že ferochelátáza je poměrně málo konzervativní gen. Tudíž navržené primery nebyly dost specifické a amplifikovaly se nespécifické produkty nebo vůbec nic. Nepomohla ani optimalizace nasedací teploty primerů a koncentrace hořčíku (pro zvýšení hybridizační schopnosti primerů) v reakci PCR.

2. DAHP syntáza

Situace u DAHP syntázy je poněkud odlišná, existuje ve dvou formách AroI a AroII a řada organismů má navíc více paralogů.

2.1. DAHPs typ I

V souladu s Gosset, Bonner, and Jensen (2001) se mi podařilo identifikovat dvě rodiny u AroI – α a β . V rámci obou rodin očividně docházelo k častému HGT, což u bakterií není neobvyklý proces (Andersson 2005). Přínosem této práce bylo nalezení DAHPs I u dalších eukaryot - vzhledem k datasetu Richards et al. (2006). Některá z těchto eukaryot mají rovněž DAHPs typu II, což je v souladu s hypotézou Richards et al. (2006), že společný předek eukaryot měl obě verze DAHPs. Zajímavým výsledkem je nalezení DAHPs typu I u skrytěnky a zástupce Haptophyta, což jsou organismy se sekundárním plastidem původem z červené řasy.

2.2. DAHPs typ II

Stejně jako u Richards et al. (2006) tvoří rostliny a rozsivky dobře podpořenou monofyletickou linii, navíc spolu s dalším druhem rozsivky a zástupci zelených řas, jež ve výše zmíněné práci nebyly zahrnuty. Dataset byl rovněž obohacen o další červené řasy (*Porphyra yezoensis*, *Galdieria sulphuraria*, *Griffithsia japonica*). Jejich postavení ve fylogenetickém stromě rovněž odpovídá pozici obou sekvencí jediného druhu zahrnutého v práci Richards et al. (2006) – *Cyanidioschyzon merolae*. Dále byly navíc získány sekvence dalších eukaryot, z nichž mě nejvíce zajímali ty druhy, které mají plastid původem z červené řasy: obrněnka *Heterocapsa triquetra* a zástupce haptofyt *Pavlova lutheri*. Monofyletické postavení rostlin, zelených řas a rozsivek ukazuje na společný (plastidový) původ tohoto genu u těchto fotosyntetických eukaryot. U sinic však DAHPs typu II nebyla nalezena, což by mohlo znamenat, že společný předek říše Plantae získal DAHPs typu II pomocí HGT z jiných bakterií. A tento gen byl potom přenesen rovněž do genomu rozsivek po sekundární endosymbióze. Další možností je, že cyanobaktérie původně obsahovaly oba paralogy, tj. DAHP I i II, přičemž DAHP II byla během evoluce ztracena. To by ovšem znamenalo, že DAHP syntáza u fotosyntetických eukaryot

nepochází z proteobakterií, jak se zdá z publikovaných analýz, nýbrž byla získána endosymbiotickým transferem ze sinic, které samy později tento gen ztratily. V obou případech se z navrženého scénáře vymykají červené řasy jejichž geny pro DAHP syntázu neodpovídají homologům rostlin, zelených řas a rozsivek. To by se dalo vysvětlit podobně jako u ferochelatózy tím, že červená řasa, která byla pohlcena v procesu sekundární endosymbiózy mohla mít DAHPs stejného původu jako u zelených řas a rostlin a ta následně přešla i do genomu sekundárního hostitele – rozsivky. U ostatních červených řas zahrnutých do analýzy mohl být tento gen nahrazen homologem z jiných bakterií pomocí HGT, nebo si ponechali svůj původní eukaryotický gen. Získaná topologie však může být též značně ovlivněna možným výskytem paralogů vzniklých duplikací genu pro DAHP syntázu v průběhu evoluce. V případě DAHP syntázy je existence různých paralogů značně pravděpodobná, protože u některých rostlin je přítomno až 8 různých kopií tohoto genu. Některé paralogy mohly být v průběhu evoluce ztraceny, což se mohlo odrazit v přítomnosti či absenci konkrétního genu v různých taxonech.

Mým úkolem bylo zjistit, zda červené řasy z jiných skupin kódují DAHP syntázu podobnou té u ostatních červených řas, nebo jestli u nich nenaleznou gen příbuzný genům rozsivek, rostlin a zelených řas. Podařilo se mi osekvenovat pouze část tohoto genu u dvou druhů třídy Floridiophyceae, přičemž u každého z nich jsem získala tři různé sekvence. Některé ze získaných sekvencí skutečně tvoří monofyletickou skupinu se zelenými řasami, rostlinami a rozsivkami, i když s prakticky žádnou statistickou podporou. To by podporovalo hypotézu, že někteří dnes žijící zástupci červených řas si stále ponechali gen pro DAHPs příbuzný těm z rostlin, zelených řas a rozsivek. Nově zahrnuté taxony fotosyntetických eukaryot, které mají sekundární plastid ruduchového původu – *Pavlova lutheri* a *Heterocapsa triquetra* se nacházejí spolu s nefotosyntetickými eukaryoty v jedné skupině. Tato skupina pravděpodobně reprezentuje původní eukaryotické geny. To, že geny hub, nálevníků a *Toxoplasma gondii* představují zřejmě původní eukaryotické geny bylo rovněž diskutováno Richards et al. (2006). Jeden z paralogů *C. merolae* a *G. sulphuraria* a sekvence *G. japonica* tvoří monofyletickou skupinu na bázi této linie, což by mohlo znamenat, že si tyto řasy rovněž ponechaly svůj původní jaderný gen pro DAHPs. Tato pozice však není téměř vůbec

statisticky podpořena. O původu druhého paralogu u *C. merolae* a *G. sulphuraria*, jež tvoří monofyletickou skupinu s oběma paralogy *P. yezoensis* a zástupcem Glaucophyta - *Glaucocystis nostochinearum*, lze na základě výsledků fylogenetických analýz těžko usuzovat. Může se jednat o gen společný pro skupinu Plantae, který byl ovšem u zelených řas a tedy i rostlin druhotně ztracen.

Závěr

Amplifikace a osekvenování genu pro ferochelatazu u ruduch se mi nezdařilo. Rozhodně chci pokračovat v úsilí, navrhnout nové sady primerů a zaměřit se na amplifikaci metodou uneven PCR, která se ukázala být úspěšná v případě DAHPs. Přínosem této práce je tedy alespoň obohacení datasetu o další druhy dostupné z různých elektronických databázích a jeho analýza.

U DAHPs se situace vyvíjela o něco optimističtěji, podařilo se mi získat částečné sekvence genu u dvou druhů ruduch třídy Florideophyceae. Výsledky fylogenetických analýz ovšem přinesly spíš než uspokojivé odpovědi řadu nových otázek. Každopádně toto téma je stále otevřené a mým prvořadým cílem bude osekvenovat zbývající část genu u obou červených řas a následně získaná data použít v nové analýze.

Literatura

Abascal, F., Zardova, R., and Posada, D. 2005. ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21:2104-2105.

Adl, S. M.; Simpson, A. G. B.; Farmer, M. A.; Andersen, R. A.; Anderson, O. R.; Barta, J. R.; Bowser, S. S.; Brugerolle, G.; Fensome, R. A.; Fredericq, S.; James, T. Y.; Karpov, S.; Kugrens, P.; Krug, J.; Lane, C. E.; Lewis, L. A.; Lodge, J.; Lynn, D. H.; Mann, D. G.; McCourt, R. M.; Mendoza, L.; Moestrup, O.; Mozley-Standridge, S. E.; Nerad, T. A.; Shearer, C. A.; Smirnov, A. V.; Speigel, F. W.; Taylor, M. F. J. R. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protist. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52:399-451.

Andersson, J. O. 2005. Lateral gene transfer in eukaryotes. *CMLS* 62:1182-1197.

Bodyl, A. 2005. Do plastid-related characters support the chromalveolate hypothesis? *J. Phycol.* 41:712-719.

Campbell, S. A., T. A. Richards, E. J. Mui, B. U. Samuel, J. R. Coggins, R. McLeod, and C. W. Roberts. 2004. A complete shikimate pathway in *Toxoplasma gondii*: an ancient eukaryotic innovation. *Int. J. Parasitol.* 34:5-13.

Cavalie-Smith, T. 1999. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol* 46:347-366.

Cavalie-Smith, T. 2000. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci* 5:174-182.

Cavalier-Smith, T. 2002. Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr. Biol.* 12:R62-R64.

Cornah, J. E., Terry, M. J., and Smith, A. G. 2003. Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway? *Trends Plant Sci.*; 8(5):224-30.

Dailey, H. A. 1997. Enzymes of heme biosynthesis. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2:411-417.

Dailey, H. A., Dailey, T. A., Wu, C.-K., Medlock, A., E., Rose, J. P., and Wang, K.-F. 2000. Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1909-1926.

Dyall, S. D., Brown, M. T., and Johnson, P. J. 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*.304(5668):253-7.

- Elandalloussi, L. M., P. M. Rodrigues, R. Afonso, R. B. Leite, P. A. Nunes, and M. L. Cancela. 2005.** Shikimate and folate pathways in the protozoan parasite, *Perkinsus olseni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **142**:106-109.
- Fast, N. M., Kissinger, J. C., Roos, D. S., and Keeling, P. J. 2001.** Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for Apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol. Biol. Evol.* **18**:418–426.
- Freshwater, D. W., Fredericq, S., Butler, B. S., Hommersand, M. H., and Chase, M. W. 1994.** A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **91**:7281-5.
- Gilson, P. R. and McFadden, G. I. 2002.** Jam packed genomes: a preliminary, comparative analysis of nucleomorphs. *Genetica.* **115**:13–28.
- Gosset, G., Bonner, C. A., and Jensen, R. A. 2001.** Microbial origin of plant-type 2-Keto-3-Deoxy-D-*arabino*-Heptulosonate 7-Phosphate Synthases, Exemplified by the Chorismate- and Tryptophan-Regulated Enzyme from *Xanthomonas campestris*. *J Bacteriology* **183**(13):4061-4070.
- Guindon, S., and Gascuel, O. 2003.** PHYML – a simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Bil* **52**:696-704.
- Hall, T. A. 1999.** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc Acid Res* **41**:95-98.
- Harper, J. T., Waanders, E., and Keeling, P. J. 2005.** On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:487-496.
- Harper, J. T., and Saunders, G. W. 2001.** Molecular systematics of the florideophyceae (Rhodophyta) using nuclear large and small subunit rDNA sequence data. *Journal of Phycology* **37** (6), 1073–1082.
- Hoef-Emden, K., Marin, B., and Melkonian M. 2002.** Nuclear and nucleomorph SSU rDNA phylogeny in the cryptophyta and the evolution of cryptophyte diversity. *Journal of Molecular Evolution.* **55** (2): 161-179.
- Chen, X., and Wu, R. 1997.** Direct amplification of unknown genes and fragments by Uneven polymerase chain reaction. *Gene.* **185**(2):195-9.
- Illingworth, C., Mayer, M. J., Elliott, K., Hanfrey, C., Walton, N. J., and Michael, A. J. 2003.** The diverse bacterial origins of the *Arabidopsis* polyamine biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* **549**(1-3):26-30.

Ishida, K. 2005. Protein targeting into plastids: a key to understanding the symbiogenetic acquisition of plastids. *J Plant Res* **118**:237-245.

Jiroutová, K., Horák, A., Bowler, Ch., and Oborník, M. 2007. Tryptophan biosynthesis in stramenopiles: replacement of nuclear-encoded genes of plastid (cyanobacterial) origin by eukaryotic homologues from primary and secondary host. submitted to *JME*.

Kalina, T. 1994. Systém a vývoj sinic a řas. Nakladatelství Karolinum v Praze.

Kalina, T., Váňa, J. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Nakladatelství Karolinum v Praze.

Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Myata, T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nuc Acid Res* **33**:511-518.

Keeling, P. J. 2004. Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *American Journal of Botany*. **91**:1481-1493.

Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., Roger, A. J., and Gray, M. W. 2005. The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution*. **20** (12):670-676

Leander, B. S., and Keeling, P. J. 2003. Morphostasis in alveolate evolution. *Trends in Ecology and Evolution*. **18** (8):395-402.

Martin, W., and Herrmann, R.G. 1998. Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *Plant Physiology*. **118**:9-17.

Mazumdar, J., Wilson, E. H., Masek, K., Hunter, Ch. A., and Striepen, B. 2006. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii* *Proc Natl Acad Sci USA*. **103** (35):13192-13197.

Mereschkowsky 1905. Über Natur and Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche (annotated english translation – Marin, W., Kowalik, K. V. 1999. *Eur J Phycol*, **34**:287-295).

Minnhagen, S., and Janson, S. 2006. Genetic analyses of *Dinophysis* spp. support kleptoplastidy. *FEMS Microbiology Ecology* **57**:47–54.

Oborník, M., and Green, B. R. 2005. Mosaic Origin of the Heme Biosynthesis Pathway in Photosynthetic Eukaryotes. *Mol. Biology and Evolution*. **22**(12):2343-53.

Panek, H., and O'Brian, M. R. 2002. A whole genom view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology*. **148**:2273-2282.

Papenbrock, J., and Grimm, B. 2001. Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis - studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta*. **213**:667-681.

Parfrey, L. W., Barbero, E., Lasser, E., Dunthorn, M., Bhattacharya, D., Patterson, D. J., and Katz, L. A. 2006. Evaluating Support for the Current Classification of Eukaryotic Diversity. *PLoS Genet*. **2**(12):e220.

Ragan, M. A., Bird, C. J., Rice, E. L., Gutell, R. R., Murphy, C.A., and Singh, R. K. 1994. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **91**:7276-80.

Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M.J., Foth, B. J., Tonkin, C. J., Roos, D. S., and McFadden G. I. 2004. metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*. **2**:1-15.

Rao, A. U., Carta, L. K., Lesuisse, E., and Hamza, I. 2005. Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(12): 4270–4275.

Richards, T. A., Dacks, J. B. Campbell, S. A., Blanchard, J. L., Foster, P. G., McLeod, R., and Roberts, C. W. 2006. Evolutionary Origins of the Eukaryotic Shikimate Pathway: Gene Fusions, Horizontal Gene Transfer, and Endosymbiotic Replacements. *Eukaryotic Cell*. **5**(9):1517-1531.

Reinbothe, C., Ortel, B., Parthier, B., and Reinbothe, S. 1994. Cytosolic and plastid forms of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Euglena gracilis* are differentially expressed during light-induced chloroplast development. *Mol. Gen. Genet*. **245**:616-622.

Roberts, C. W., F. Roberts, R. E. Lyons, M. J. Kirisits, E. J. Mui, J. Finnerty, J. J. Johnson, D. J. Ferguson, J. R. Coggins, T. Krell, G. H. Coombs, W. K. Milhous, D. E. Kyle, S. Tzipori, J. Barnwell, J. B. Dame, J. Carlton, and R. McLeod. 2002. The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *J. Infect. Dis*. **185**(Suppl. 1):S25-S36.

Ronquist, F., and Heuvelsbeck, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference unedr mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572-1574.

Sato, S., Clough, B., Coates, L., and Wilson, R. J. M. 2004. Enzymes for heme biosynthesis are found in both the mitochondrion and plastid of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protist* **155**:117-125.

Saunders, G. W., and Hommersand, M. H. 2004. Assessing red algal supraordinary diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *American Journal of Botany*. **91**:1494-1507.

Stoebe, B., and Maier, U. 2002. One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* **219**:123-130.

Wattier, R. A., Prodöhl, P. A., and Maggs, C. A. 2000. DNA Isolation Protocol for Red Seaweed (Rhodophyta). *Plant Molecular Biology Reporter* **18**:275-281.

Webby, C. J., Baker, H. M., Lott, J. S., Baker, E. N., and Parker, E. J. 2005. The Structure of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate Synthase from *Mycobacterium tuberculosis* Reveals a Common Catalytic Scaffold and Ancestry for Type I and Type II Enzymes. *J Mol Biol.* **354**(4):927-39.

Williams, B. A. P., and Keeling, J. P. 2003. Cryptic organelles in parasitic protists and fungi. *Advances in Parasitology.* **54**:9-67.

Yoon, H. S., Hackett, J. D., and Bhattacharya, D. 2002a. A genomic and phylogenetic perspective on endosymbiosis and algal origin. *Journal of Applied Phycology.* **18**:475-481.

Yoon, H. S., Hackett, J. D., and Bhattacharya, D. 2002. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. *PNAS.* **99** (18):11724-11729.

Yoon, H. S., Hackett, J. D., Pinto, G., and Bhattacharya, D. 2002. The single, ancient origin of chromist plastids. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:15507–15512.

Yoon, H. S., Hackett, J. D., Pinto, G., and Bhattacharya, D. 2004. Molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **21**:809-18.

Yoon, H. S., Müller, K. M., Sheath, R. G., Ott, F. D., and Bhattacharya, D. 2006. Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *Journal of Phycology.* **42**:482-492.

Yoon, H. S., Reyes-Prieto, A., Melkonian, M., and Bhattacharya, D. 2006. Minimal plastid genome evolution in the *Paulinella* endosymbiont. *Current Biology.* **16**(17):R670-R672.

Zhang, Z., Green, B. R., and Cavalier-Smith, T. 2000. Phylogeny of ultra-rapidly evolving dinoflagellate chloroplast genes: a possible common origin for sporozoan and dinoflagellate plastids. *J. Mol. Evol.* **51**:26–40.

Zhang, Z., Cavalier-Smith, T., and Green, B. R. 2002. Evolution of Dinoflagellate Unigenic Minicircles and the Partially Concerted Divergence of Their Putative Replicon Origins. *Molecular Biology and Evolution.* **19**:489-500.