

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

**MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE NOVÉHO
FOTOSYNTETICKÉHO KMENE PRVOKŮ Z KORÁLŮ**

JAROMÍR CIHLÁŘ

Školitel: Doc. Ing. Miroslav Oborník, PhD.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

2010

Cihlář J (2010): Molekulární charakterizace nového fotosyntetického kmene prvoků z korálů. [Molecular characterization of novel photosynthetic protozoan phylum from corals. Mgr. Thesis, in Czech.] – 43 p., The University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: Novel photosynthetic protozoan phylum from corals was investigated using molecular biology tools to infer its phylogenetic position. According to the data, isolates RM11-26 are also photosynthetic relatives of apicomplexan parasites representing independent lineage from *Chromera velia*.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou. Souhlasím se zveřejněním elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

30.4.2010, České budějovice

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych velice ráda poděkoval svému školiteli, Mírovi Oborníkovi, za prokázanou pomoc, cenné rady a trpělivost. Také bych chtěl poděkovat ostatním členům laboratoře molekulární taxonomie za jejich ochotu mi ve všem pomoci a poradit. Také bych rád poděkoval Olince Bazalové za výraznou psychickou podporu. Moje nemalé díky patří obzvláště rodičům a babičce za jejich materiální, ale i neocenitelnou psychickou, podporu.

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1. Úvod | 6 |
| 1.1 Vznik a význam fotosyntézy | 6 |
| 1.2 Vznik a evoluce plastidu | 6 |
| 1.2.1 Primární endosymbióza | 6 |
| 1.2.2 Sekundární endosymbióza | 7 |
| 1.2.3 Terciární endosymbióza | 8 |
| 1.3 Alveolata | 9 |
| 1.3.1 Kmen Ciliophora | 9 |
| 1.3.2 Kmen Dinophyta | 9 |
| 1.3.3 Kmen Apikomplexa | 10 |
| 1.4 <i>Chromera velia</i> | 12 |
| 1.5 Izolát RM 11 (nepopsaná řasa CCMP3135) | 13 |
| 1.6 Biosyntéza nukleotidů – možný cíl antiparazitické chemoterapie | 14 |
| 1.6.1 Uridin fosforyláza | 14 |
| 2. Cíle práce | 15 |
| 3. Metody | 16 |
| 3.1 Kultivace materiálu | 16 |
| 3.2 Izolace DNA | 16 |

| | |
|--|----|
| 3.3 Izolace RNA a syntéza cDNA | 16 |
| 3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 17 |
| 3.5 Amplifikace genu pro uridin fosforylázu | 17 |
| 3.6 Elektroforéza v agarózovém gelu, izolace PCR produktu z gelu | 19 |
| 3.7 Molekulární klonování, transformace, izolace plasmidu | 19 |
| 3.8 Sekvenování | 19 |
| 3.9 Analýza a úpravy sekvencí | 20 |
| 3.10 Příprava datasetů a alignment sekvencí | 20 |
| 3.11 Fylogenetické analýzy | 20 |
| 4. Výsledky | 21 |
| 4.1 Fylogenetická pozice RM11-26 | 21 |
| 4.1.1 Analýza genu pro aktin | 21 |
| 4.1.2 Analýza genu H2B | 22 |
| 4.1.3 Analýza GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) | 25 |
| 4.1.4 Analýza <i>psbA</i> genu (photosystem II subunit D1) | 26 |
| 4.2 Fylogenetická pozice <i>C. velia</i> na základě analýz genu pro UP | 28 |
| 5. Diskuze | 31 |
| 5.1 Fylogenetická pozice izolátů RM11, 24, 25, 26 | 31 |
| 5.2 Fylogenetická pozice <i>C. velia</i> na základě analýz genu pro UP | 33 |
| 6. Závěr | 35 |
| 7. Citace | 36 |
| 8. Přílohy | 43 |

1. Úvod

1.1 Vznik a význam fotosyntézy

Fotosyntéza se vyvinula u prokaryotických organismů pěti hlavních skupin. Bakterie ze skupin Chlorobi [zelené sírné bakterie], heliobacteria (obsahují pouze zjednodušený fotosystém I), proteobacteria a Chloroflexi [zelené nesírné bakterie] (obsahují pouze zjednodušený fotosystém II) provozují fotosyntézu, v jejímž důsledku nedochází k uvolňování kyslíku. Fotosyntéza, při které se uvolňuje kyslík, přišla na svět až se sinicemi, u kterých se vyvinuly oba fotosystémy (Xiong, 2007). Nejstarší fosilní důkazy o existenci takového fotosyntetického života na Zemi pochází z doby před 2,6 až 2,7 miliardami let, krátce před vznikem kyslíku na Zemi před 2,3 miliardami let (Kasting, 2001; Bekker et al., 2004). Tento děj naprosto vyhubil tehdejší ekosystém, pro který byl kyslík toxický. Jak s nadsázkou tvrdí profesorka B. R. Green z UBC ve Vancouveru, dalo by se říct, že oxigenní fotosyntéza způsobila největší environmentální katastrofu v dějinách Země (Green, osobní sdělení). Na druhou stranu fotosyntéza dala vzniknout novým formám života, jejichž přežití je na ní závislé. A ne jenom kvůli kyslíku, který dýchají, ale hlavně kvůli živinám, které fotosyntetické organismy produkují.

1.2 Vznik a evoluce plastidu

1.2.1 Primární endosymbióza

Dlouho byla fotosyntéza doménou bakterií. Naprostou revoluci v evoluci fotosyntézy pak způsobil proces zvaný endosymbióza, při kterém došlo k inkorporaci fotosyntetizujícího endosymbionta do hostitelské, eukaryotické buňky, včetně vzájemného genetického a metabolického propojení. V případě fotosyntetizujících organismů na Zemi došlo k tomuto jevu opakovaně, ovšem pouze při primární endosymbióze byl oním symbiontem fotosyntetický prokaryot. Výsledek tohoto procesu, primární plastid, vznikl endosymbiózou eukaryotického heterotrofa a sinice přibližně před 1,6 miliardami let (Hedges et al., 2004; Yoon et al., 2004). Cyanobakteriální endosymbiont si v průběhu evoluce

ponechal pouze část genů spojených s metabolismem, zatímco ostatní geny byly jako nepotřebné ztraceny, nebo byly přesunuty do jádra hostitelské buňky procesem endosymbiotického genového transferu (Douglas, 1998; Gray, 1999). Tímto způsobem byl původní genom volně žijící cyanobakterie o velikosti přibližně 3.500 kb zredukován až na 72 kb dlouhý genom zeleného primárního plastidu (*Ostreococcus tauri*) / 165 kb dlouhý genom červeného primárního plastidu (*Cyanidium caldarium*) (Martin a Hermann, 1998; Martin et al., 2005). Výsledkem této endosymbiózy jsou Archaeplastida, která se dělí na Chloroplastida = Viridiplantae (zelené řasy a rostliny), Rhodophyta (ruduchy) a Glaucophyta (Rodriguez-Ezpelenta, 2005). Primární plastidy jsou obaleny dvěma membránami, které odpovídají vnitřní a vnější membráně pohlčené cyanobakterie (Jarvis a Soll, 2001). Původně plastidové geny přenesené endosymbiotickým genovým transferem do jádra eukaryotické buňky (primární hostitel) jsou nyní překládány v cytoplasmě a jejich produkty jsou díky N-terminální cílící sekvenci označované jako chloroplastový transitní peptid, targetovány do plastidu, kde jsou používány v plastidovém metabolismu (McFadden, 1999; Vesteg et al., 2009).

1.2.2 Sekundární endosymbióza

Primární endosymbiózou však invaze fotosyntézy do eukaryot nekončí. Asi před 1,3 miliardami let (Yoon et al., 2004) došlo k jevu označovanému jako sekundární endosymbióza, kdy byla řasa s primárním plastidem pohlčena heterotrofním eukaryotem a postupně se vyvinula ve fotosyntetickou organelu, tzv. sekundární či komplexní plastid (Archibald a Keeling, 2002; Palmer, 2003; Keeling, 2004). Během sekundární endosymbiózy došlo k dalšímu endosymbiotickému transferu genů eukaryotického symbionta (plastidových, i těch z jádra pohlčené řasy), které byly přesunuty do jádra sekundární hostitelské buňky. Proto se vyvinul nový protein – targetovací systém umožňující jaderně kódované proteiny transportovat přes 3 – 4 membrány do komplexního plastidu. Proteiny cílené do komplexního plastidu tak mají, kromě transitního peptidu, též signální peptid na N-konci proteinu, který cílí protein do endoplasmatického retikula a přes dvě vnější membrány komplexního plastidu. Transitní peptid pak dopraví protein kanonickou dráhou přes dvě vnitřní membrány, které vlastně odpovídají původním membránám primárního plastidu (McFadden, 1999).

Sekundární řasy se objevují ve třech eukaryotických superskupinách: skupiny Euglenophyta a Chlorarachniophyta získaly plastid pohlcením zelené řasy (Bhattacharya et al., 2004; Yoon et al., 2004) v separátních endosymbiózách. Sekundární plastid těchto skupin obsahuje chlorofyl *a* & *b* a je ohraničen třemi, resp. čtyřmi membránami; Chromista (Heterokonta = Stramenopila, Haptophyta, Cryptophyta) a Alveolata (Ciliophora, Dinophyta a Apicomplexa) získaly plastid pohlcením červené řasy. Jejich plastid, pokud je fotosyntetický, obsahuje chlorofyl *a* & *c* a je obalen čtyřmi, resp. třemi membránami u peridinových dinoflagelátů (Delwiche, 1999). Vzhledem k hojnému výskytu heterotrofních skupin uvnitř těchto řas se předpokládá, že ztráta fotosyntézy či celého plastidu byla v evoluční historii častým jevem.

Vysvětlení původu těchto řas vede v zásadě dvěma cestami. První předpokládá, že endosymbióza je natolik složitý proces, že musí být počet takových událostí v evoluci extrémně omezen. Tento pohled pochází z dílny oxfordského profesora Thomase Cavaliera-Smithe, který tvrdí, že celá skupina Chromalveolata vznikla díky jediné akvizici červenořasového endosymbionta v evoluční historii eukaryot. Druhá cesta – série sekundárních endosymbióz (Falkovski et al., 2004), či původ řas v terciární endosymbióze (Bodyl, 2005). Jiní autoři se však domnívají (Oborník et al., 2009), že heterotrofie u současných alveolátů vznikla důsledkem druhotné ztráty schopnosti fotosyntetizovat. K tomuto jevu došlo buď úplnou ztrátou plastidu, nebo ztrátou jeho fotosyntetické funkce. Ke ztrátě plastidu však mohlo dojít pouze do té doby, než převzala organela některou z esenciálních funkcí v buňce a její ztráta by se tak stala pro buňku letální. Plastid mohl být navíc ztracen pouze tehdy, pokud si hostitelská buňka uchovala schopnost přežívat heterotrofně. Z toho vyplývá, že heterotrofní Chromalveolata musela svého endosymbionta či plastid ztratit krátce po jeho získání, tedy v době, než se jejich metabolismy propojily a staly se navzájem závislé.

1.2.3 Terciární endosymbióza

Plastidy některých dinoflagelátů vznikly terciární endosymbiózou. Terciární endosymbióza proběhla několikrát nezávisle na sobě (Saldarriaga et al., 2001), a tak mají někteří dinoflageláti terciární plastid z kryptomonád (Vesk et al., 1996), rozsivek (Chesnick et al., 1997), nebo jiných heterokont. Dinoflageláti také pravděpodobně prošli další sekundární

endosymbiózou a pohltili zelenou mikrořasu ze skupiny prasinophyt (Watanabe et al., 1987; Oborník et al., 2009).

1.3 Alveolata

Skupina Alveolata je definovaná fylogeneticky a na základě přítomnosti morfologických znaků, jako jsou kortikální alveoly (ploché měchýřky pod cytoplasmatickou membránou). Dalším charakteristickým znakem této skupiny jsou zřetelné otvory na povrchu buňky zvané mikropóry (Patterson, 1999). Na základě výše popsaných morfologických znaků, ale i molekulárních analýz, jsou do této skupiny řazeny kmeny Ciliophora, Dinophyta a Apicomplexa (Gajadhar et al., 1991; Wolters, 1991; Fast et al., 2002).

1.3.1 Kmen Ciliophora

Zástupci kmene Ciliophora (nálevníci) jsou jednobuněčné převážně volně žijící fagotrofní organismy obývající různorodá prostředí. Jejich buňky jsou pokryty brvami (ciliemi), které nálevníkům umožňují pohyb. Nálevníci mají, v rámci prvoků, důmyslnou stavbu buňky zahrnující specializované buněčné organely. Potravu přijímají buněčnými ústy (cytostom), která mohou být obklopena brvami tzv. orálními kinetidy. Osmotická regulace buňky je zprostředkována jednou, nebo více kontraktilními vakuolami (Lynn, 2008). U nálevníků se setkáváme s jaderným dimorfismem, což znamená že, kromě standardního často zmnoženého jádra (makronukleus) dále obsahují další, minimálně jedno, diploidní jádro (mikronukleus). Makronukleus (vegetativní jádro) obsahuje geny, které se účastní růstu, buněčného, metabolismu a nepohlavního rozmnožování. Mikronukleus (generativní jádro) obsahuje kompletní DNA a je spojován s pohlavním rozmnožováním (Adl et al., 2005; Lynn, 2008). V buňce nálevníků nebyly nalezeny žádné stopy plastidů, v jádře však bylo objeveno 16 plastidových genů (Bhattacharya et al., 2004).

1.3.2 Kmen Dinophyta

Kmen Dinophyta je velmi různorodou skupinou jednobuněčných, převážně mořských bičíkatých organismů, která zahrnuje více než 4000 druhů. Asi polovina z nich je čistě heterotrofních. Dále se mohou živit fotoautotrofně, mixotrofně, osmotrofně, fagotrofně nebo paraziticky (Taylor, 1987). Některé obrněnky produkují toxiny. Mohou tak lidem způsobovat vážné intoxikace při požití kontaminovaných mořských živočichů, nebo při vdechnutí mořské vody (Wang, 2008). Buňky obrněnek jsou obaleny thékou, která je

tvořena buněčnou membránou, pod níž je uložena vezikulární vrstva tvořená plochými měchýřky. Tyto měchýřky mohou být vyplněny celulózními destičkami, které pak tvoří tvrdý pancíř. U dalších druhů jsou tyto měchýřky bez výplně, ty jsou pak označovány jako nahé (Graham a Wilcox, 2000).

Asi polovina všech dinoflagelátů nese sekundární plastid pigmentovaný chlorofylem *c* a karotenem peridininem. Peridininový plastid je obalen třemi membránami a má pravděpodobný původ v červených řasách. Genom peridininového plastidu je redukovaný, obsahuje 12-14 genů, které se nacházejí na minikroužcích (2-3 kb velké), připomínající plasmidy (Zhang et al., 1999, 2001; Barbrook a Howe, 2000; Barbrook et al., 2001). Zbylé druhy nesou terciární plastid (Tengs, 2000), sekundární zelený plastid (*Lepidodinium* spp.) nebo kleptoplastidy (Schnepf a Elbrächter, 1999; Graham a Wilcox, 2000).

Jaderný genom obrněnek je obrovský (3000 – 216 000 Mbp), tvoří jej vysoký počet morfologicky podobných (Loeblich, 1976) a trvale kondenzovaných chromozómů (Dodge, 1964). DNA je v chromosomech sbalena pomocí DNA vázající proteinů, které jsou podobné bakteriálním „histon-like“ proteinům (Rizio, 2003; Wong et al., 2003). U některých druhů však byla objevena exprese histonových proteinů: H2A u *Alexandrium tamarense* (Hackett et al., 2005), H2A a H4 u *Crypthecodinium cohni* (Sanchez-Puerta et al., 2007) a H3 u *Pyrocystis lunula* (Okamoto a Hastings, 2003). Ty však mohou mít jinou než DNA vazebnou funkci. V porovnání s jeho velikostí, obsahuje genom dinoflagelátů pouze 50% unikátních sekvencí (Allen et al., 1975; Hinnebusch et al., 1980). Dinoflageláti rovněž, jako jediní známí eukaryoti, obsahují modifikovaný nukleotid 5-hydroxymethyluracil ve své DNA (Rae a Steele, 1978).

1.3.3 Kmen Apikomplexa

Kmen Apikomplexa je tvořen velkou skupinou jednobuněčných, striktně parazitických organismů i volně žijících dravců, obsahující více než 4600 druhů (Adl et al., 2005). Zástupci tohoto kmene jsou původci mnoha vážných onemocnění zvířat a lidí, včetně malárie, která je nejvýznamnější lidskou parazitickou nemocí. Zástupci rodu *Plasmodium* každoročně usmrtí 1,1 až 1,3 milionů lidí. Každým rokem je evidováno 350 až 500 milionů nově nakažených, další více než 1 miliarda lidí je v ohrožení touto nákazou (Tuteja, 2007). Nově sem patří i jednobuněční mořští predátoři rodu *Colpodella*, kteří jsou ostatním

výtrusovcům příbuzní na základě molekulárních analýz (Kuvardina et al., 2002) a navíc obsahují primitivní apikální komplex (Leander et al., 2003).

Ultrastrukturně je kmen Apicomplexa definován především přítomností apikálního komplexu - souboru organel, který umožňuje výtrusovcům parazitický způsob života (Levine et al., 1980). Většina zástupců tohoto kmene rovněž nese sekundární, silně redukovaný, nefotosyntetický plastid označovaný jako apikoplast (McFadden et al., 1996; Köhler et al., 1997), který zřejmě získaly sekundární endosymbiózou podobně jako ostatní zástupci skupiny Chromalveolata (Cavalier-Smith, 1999).

Apikoplast, prvně pozorovaný v druhé polovině 20. století, byl považován za neznámou a dosti přehlíženou multimembránovou strukturu, nacházející se mezi jádrem a apikálním komplexem. Byl nalezen u všech tří hlavních linií – haemosporidií (*Plasmodium* a *Leucocytozoon*), kokcidií (*Toxoplasma* a *Eimeria*) a piroplasmid (*Babesia* a *Theileria*) – kmene apikomplexa (Forth a McFadden, 2003; Oborník et al., 2009). U některých parazitických výtrusovců došlo v evoluci ke ztrátě plastidů (Williams a Keeling, 2003). Týká se to patrně některých gregarin (Oborník et al., 2002; Tosso a Omoto, 2007) a rodu *Cryptosporidium* (Zhu et al., 2000). Když se v roce 1974 poprvé povedlo získat extrachromozomální DNA z *Plasmodium lophurae*, byl nalezené 35 kb kruhové DNA molekule přisuzován mitochondriální původ (Kilejian, 1974, 1975). Později však byla z mnoha druhů rodu *Plasmodium* izolována jiná, lineární extrachromozomální DNA o délce do 6 kb (Suplick et al., 1988, 1990; Vaidya et al., 1989; Aldritt et al., 1989; Joseph et al., 1989), která byla identifikována jako mitochondriální. Prvně izolovaná 35 kb molekula DNA byla později lokalizována v již zmíněné multimembránové struktuře, což vedlo spolu s molekulární fylogenezí k přesvědčení o jejím plastidovém původu (McFadden et al., 1996; Köhler et al., 1997). Protože Apikomplexa v průběhu své evoluční historie ztratila geny kódující fotosyntetické proteiny obvykle používané pro určování plastidové fylogeneze, byly fylogeneticky analyzovány geny, které v apikoplastu zbyly. Strukturní analýzy ribozomálního operonu a fylogenetické analýzy genů pro ribozomální RNA odhalily původ apikoplastu v červených řasách (McFadden a Waller, 1997; Blanchard a Hicks, 1999; Stoebe a Kowalik, 1999; Zhang et al., 2000). Navíc další fylogenetické analýzy založené na GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) jaderně kódovaném proteinu, který je targetován do plastidu, prokázaly monofyletický původ plastidů skupin Apicomplexa,

Dinoflagellata, Heterokonta a Cryptophyta (Fast et al., 2001; Harper a Keeling, 2003). Nicméně definitivní potvrzení původu apikoplastu přinesla až nedávno objevená řasa vyizolovaná z korálu *Pleisiastera purpurea* Robertem Mooreem a pojmenovaná *C. velia* (Moore et al., 2008).

1.4 *Chromera velia*

Chromera velia je fotosyntetická řasa se sekundárním plastidem, která reprezentuje nejbližšího známého fotosyntetického předka parazitů kmene apicomplexa (Moore et al., 2008, Oborník et al., 2009). Původně byla jediným dostupným stádiem *C. velia* samostaně žijící, nepohyblivá hnědá buňka kulovitého tvaru o průměru 5-7 μm . Byla však popsána možnost existence, tehdy pozorovaného, ale nezaznamenaného, bičíkatého stádia (Moore et al., 2008). Poslední výzkumy *C. velia*, založené na světelné a elektronové transmisní a skenovací mikroskopii, odhalily dvoubičíkaté, vysoce pohyblivé stádium, obsahující některé buněčné struktury připomínající apikální komplex. Dále byla popsána transformace kulovité buňky v bičíkatou buňku v exponenciálně rostoucí kultuře po expozici světlem (Oborník et al., 2010). V buňce *C. velia* byla objevena přítomnost kortikálních alveolů a mikropórů, což potvrzuje její příslušnost mezi alveoláty (Moore et al. 2008). Buňky *C. velia* obsahují jediný, za to veliký plastid kónického tvaru, který je ohraničen čtyřmi membránami. Thylakoidní lamely jsou uspořádány ve svazcích po třech. Plastid je pigmentován jediným chlorofylem α , chlorofyl c chybí. Roli hlavního karotenoidu plní isofucoxantin a v malém množství β, β -karoten. Jediná mitochondrie obsahuje tubulární kristy. Na základě výše popsaných vlastností a fylogenetických analýz (popsány níže) této řasy byl ustanoven nový kmen v rámci alveolát, pojmenovaný Chromerida (Moore et al., 2008).

Fylogenetická pozice *C. velia* byla zkoumána různými přístupy. Fylogeneze založená na genech pro ribozomální RNA podporuje její blízkou příbuznost s jednobuněčnými predátory rodu *Colpodella* (jaderný *ssrRNA* gen) a výtrusovci (jaderný *lsrRNA* gen; tento gen není pro *colpodelly* dostupný) (Moore et al., 2008). Na rozdíl od dinoflagelátů (Rizio, 2003; Wong et al., 2003; Chan et al., 2006) byla u *C. velia* zjištěna přítomnost regulérních histonů H2A a H2B. Jelikož všichni členové skupiny chromalveolata mají nahrazený, pravděpodobně duplikací, původně plastidový gen pro glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenasu (GAPDH) jaderně kódovanou verzí, byly u *C. velia* fylogeneticky analyzovány oba dva jaderně kódované geny pro GAPDH (Oborník et al., 2009). Tyto analýzy, alespoň u plastidově

targetované verze GAPDH, prokázaly její blízkou příbuznost s ekvivalentní verzí GAPDH u výtrusovců. Pozice cytosolické verze zatím zůstala nejasná. Nejnovější fylogenetická studie pozice *C. velia* na základě konkatenovaných datasetů z osmi jaderných genů dále potvrdila její blízkou příbuznost se zástupci kmene Apicomplexa (Janouškovec et al., 2010).

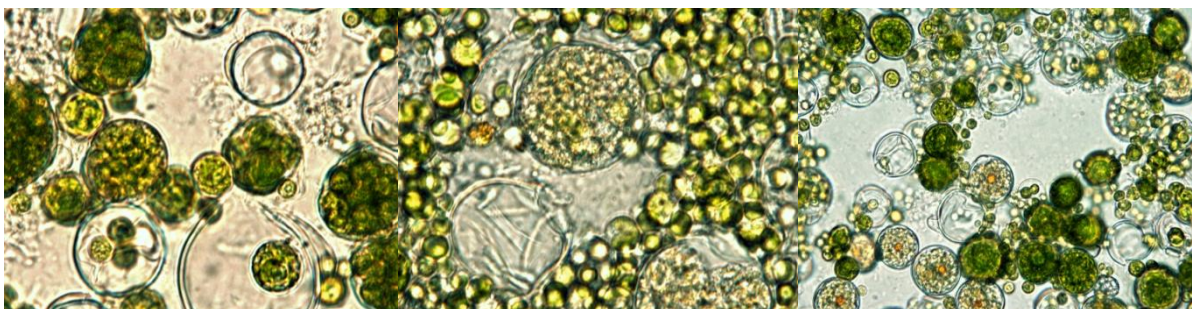
1.5 Izolát RM 11 (nepopsaná řasa CCMP3135)

RM11 je další fotosyntetická řasa patřící mezi alveoláty, která byla vyizolována z útesových korálů. Buňky RM11 mají jasně zelenou barvu a stejně jako *C. velia* oscilují mezi kulovitým a bičíkatým stádiem, které opět blíže připomíná Apicomplexa rodu *Colpodella* (viz. obr. 1). Kulovité stádium obsahuje jediný plastid obklopený čtyřmi membránami s tylakoidy v tripletu, podobně jako *C. velia* a obrněnek. Fylogenetické analýzy konkatenovaných datasetů z osmi jaderných genů *C. velia* a RM11 (sekvence celkové genomické DNA byly získány 454-sekvenováním) ukázaly, že jsou obě řasy blíže příbuzné se zástupci kmene Apicomplexa a že překvapivě tvoří dvě odlišné linie (Janouškovec et al. 2010).



Obr. 1: RM 11. Cystické stádium, shluk kulovitých buněk, bičíkaté stádium.

RM24, 25 a 26 jsou další fotosyntetičtí alveoláti vyizolovaní z útesových korálů, kteří se podobají RM11 (viz. obr. 2) a stejně jako RM11 oscilují mezi kulovitým a bičíkatým stádiem. Morfologicky ani fylogeneticky však zatím nebyli blíže prozkoumání.



Obr. 2: RM24, RM25, RM26

1.6 Biosyntéza nukleotidů – možný cíl antiparazitické chemoterapie

V případě rychle se dělících buněk parazitických protozoí, jako jsou zástupci kmene Apicomplexa, je zřejmá jejich potřeba konstantního příjmu nukleotidů. Ty jsou důležité pro replikaci DNA, její následnou transkripci do RNA, ale i pro syntézu dalších součástí a kofaktorů různých metabolických drah. Jelikož tyto parazité nemají metabolické dráhy pro syntézu purinů a pyrimidinů *de novo*, spoléhají se na příjem nukleotidů přímo od hostitele. Přijaté nukleotidy si však musí interkonvergovat pro svou potřebu (Hyde, 2007). Proto je zřejmé, že selektivní inhibice enzymů, účastnících se této přeměny, nabízí mnoho potencionálních cílů pro antiparazitickou chemoterapii. Fylogenetické analýzy tří genů druhu *Cryptosporidium parvum*: uridine kinase-uracil phosphoribosyltransferázy, tymidine a inosin monophosphatedehydrogenázy navíc odhalily, že geny pro tyto enzymy byly pravděpodobně získány laterálním genovým transferem z proteobakterií (Stripen et al., 2004). Proto je zde možnost, že podobným mechanismem získaly své enzymy účastnící se biosyntézy nukleotidů i ostatní rody kmene Apicomplexa, zejména rod *Plasmodium*. Jelikož horizontální transfer podobných genů nebyl zatím prokázán u žádných jiných eukaryot, včetně obratlovců a tedy i člověka, je zřejmé, že léčiva zaměřená proti těmto enzymům by znamenala velký pokrok v cílené antiparazitické chemoterapii.

1.6.1 Uridin fosforyláza

Příkladem enzymu, proti kterému by mohla být cílena antiparazitická léčba je uridin fosforyláza (viz. kap. 5). V savčích buňkách jsou pyrimidiny syntetizovány *de novo*. Nezanedbatelné množství pyrimidinů je ale získáváno i z degradovaných nukleových kyselin. Jedním z enzymů, účastnících se této recyklace je uridin fosforyláza (UP). Tento enzym se v buňkách většiny savců vyskytuje ve dvou formách (UP1 a UP2) (Pizzorno et al., 2002; Johansson, 2003) a metabolizuje reverzibilní fosforylaci uridinu na uracil.

2. Cíle práce

- Molekulární charakterizace nového kmene fotosyntetických alveolátů vyizolovaných z korálů na základě fylogenetických analýz protein kódujících genů.
- Molekulární charakterizace *C. velia* na základě fylogenetických analýz genu pro uridin fosforylázu.

3. Metody

3.1 Kultivace materiálu

Buněčné kultury druhu *Chromera velia* a kultury RM 11, 24, 25, 26 byly pěstovány v kultivačních nádobách v f/2 médiu při 26°C v termostatu Lovibond (Liebher) s 12 : 12 hodinovým světelným cyklem.

3.2 Izolace DNA

Buňky byly seškrábány ze stěn kultivační nádoby, převedeny do 1,5 ml mikrozkuřavky a zcentrifugovány (13.000 rpm, 5 min.). Supernatant byl odstraněn, k peletu bylo přidáno 50 μ l lyzačního pufru a malé množství homogenizačního písku. Poté byl pelet homogenizován plastovým homogenizátorem. K homogenátu bylo přidáno 250 μ l lyzačního pufru a 300 μ l proteinázy K (20 mg / ml). Lýze probíhala při 56°C po dobu 4-6 hodin. Lyzát byl centrifugován (13.000 rpm, 5 min.), supernatant převeden do nové mikrozkuřavky a pelet odstraněn. Pak byla provedena fenol – chloroformová extrakce DNA (Sambrook a Russel, 2001). K supernatantu (cca 600 μ l) bylo přidáno stejné množství fenolu a směs byla 5 minut promíchávána převracením. Pak byla směs zcentrifugována (14.000 rpm, 5 min., 4°C). Vzniklá vodní fáze byla převedena do čisté mikrozkuřavky a celý postup byl opakován do doby, kdy bylo rozhraní mezi vodnou a organickou fází úplně čisté. Poté byla k extrakci použita směs fenolu : chloroformu v poměru 1 : 1 a nakonec samotný chloroform. DNA ve vzniklé vodní fázi byla precipitována 96% etanolem v poměru 1 : 3 a uložena do -20°C na 3 hodiny. Po následné centrifugaci (14.000 rpm, 10 min., 4°C) byl etanol odstraněn a vzniklý pelet vysušen. DNA byla resuspendována v 50 μ l ddH₂O a uložena v -20°C.

3.3 Izolace RNA a syntéza cDNA

Buňky byly seškrábány ze stěn kultivační nádoby, převedeny do 1,5 ml mikrozkuřavky a zcentrifugovány (13000 rpm, 5 min.). Supernatant byl odstraněn, pelet byl za použití tekutého N₂ v mikrozkuřavkách hluboce zmražen a homogenizován na ledu plastovým homogenizátorem. Homogenát byl smíchán s Tri-Reagentem v množství 1ml TR / 50-100 mg buněk. RNA byla vyzolována podle návodu výrobce (Molecular Research Center, Inc.), resuspendována v 50 μ l DEPC ddH₂O (Ambion) a její koncentrace změřena na

spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). RNA byla skladována v -80°C. Syntéza cDNA byla provedena za použití Super Script® III reverzní transkriptázy a náhodných hexamerů podle návodu výrobce (Invitrogen).

3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Požadované geny byly získány metodou polymerázové řetězové reakce (dále jen PCR). Reakční směs měla, až na různé páry primerů, vždy stejné složení: 2 µl 10x Taq PCR pufru (Top-Bio); 1,6 µl 2,5 mM DTP mix (Top-Bio); 0,5 µl (25 pmol) každého z primerů; 1,25U Taq DNA polymerázy (Top-Bio); 1 µl DNA / cDNA (50 – 200 ng/µl); ddH₂O do 20 µl. Objem reakční směsi mohl být podle potřeby proporcionalně upraven. PCR programy se lišily v závislosti na amplifikovaném genu (teplotami nasedání primerů). Obecně se však program skládal z: 5 minut počáteční denaturace při 95°C; 35 cyklů po: 1 minuta denaturace při 94°C, 1 minuta nasedání primerů při $T_m = XX^\circ\text{C}$, 1 minuta prodlužování primerů při 72°C; 10 minut závěrečného prodlužování primerů.

Gen pro psbA byl získán z cDNA pomocí primerů psbA_U140Forw a psbA11_Rew (Janouškovec, 2008). Gen pro GAPDH byl získán z cDNA pomocí primerů GAPDH1 a GAPDH2 (Harper and Keeling, 2003). Gen pro histon H2B byl získán z cDNA pomocí primerů H2B1 a H2B2 (Chrudimský, 2007). Gen pro aktin byl získán z cDNA pomocí primerů RMActF a RMActR, které byly navrženy na základě aligmentů získaných z dostupných sekvencí v elektronických databázích: GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a JGI Eukaryotic Genomics (<http://genome.jgipsf.org/>). Srovnávací PCR (kontrola přítomnosti inzertu v plasmidu, viz. kap. 3.6) byla prováděna v 10 µl reakční směsi, PCR programem o 20 cyklech, za použití primerů M13f a M13r (přehled sekvencí použitých primerů a jejich nasedacích teplot je v tabulce 1).

3.5 Amplifikace genu pro uridin fosforylázu

V rámci jiného projektu bylo získáno 132 Mbp sekvencí ze 454 sekvenování genomu *C. velia*. Sekvence genu pro uridin fosforylázu *Plasmodia falciparum* byla pomocí programu BLAST porovnána se získanými sekvencemi. Homologie výsledného kontigu byla poté ověřena pomocí NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Podle tohoto kontigu byly navrženy primery (přehled v tabulce 1) pro 5' a 3'RACE - metodu **Rapid Amplification of**

cDNA Ends, umožňující úplnou amplifikaci genů včetně 5' a 3' konců. 5' a 3'RACE byla provedena pomocí FirstChoice[®] RLM-RACE Kitu podle návodu výrobce (Ambion)

Tabulka 1: Přehled sekvencí a nasedacích teplot použitých primerů.

| Primery použité k amplifikaci genů z RM 11-26 | | | |
|---|--------------------------------------|--|----------------------|
| Gen | Primery | Sekvence primerů (5'-3') | T_m |
| <i>psbA</i> | psbA_U140Forw psbAL1_Rev | ACCGTYTYTAYATCGGTTGGTTCGG CRTGCATWACTTCCATWCC | 45°C |
| GAPDH | GAPDH1 GAPDH2 | CCAAGGTCGGNATHAAYGGNTTYGG CGAGTAGCCCCAYTCRTTRTCRTACCA | 56°C |
| Histon H2B | H2B1 H2B2 | GTBYTSAARCARGTNCAYCCNGANACKGG ACKGCRTGYTTNGCNARTTCKCCKGG | 60°C |
| Aktin | RMActF1 RMActR1 | CATGTACGTGGCCATCCA GCCACCACCTTGATCTTCAT | 52°C |
| sekvenační primery | M13f M13r | GTAAAACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGAC | 53°C |
| Primery použité v RACE amplifikaci genu pro uridin fosforylázu | | | |
| Gen | Primery | Sekvence primerů (5'-3') | T_m |
| Uridine phosphorylase 5' RACE | UP1r UP2r UP3r UP4r UP5r | CTTAGCTCCTGCCTTGATCAGCTC CTCTGATAATGACCTTAGCTCCTGC CCTGCTCTGATAATGACCTTAGCTC TCACCGCCGCTGTAGCAATCACAATC TCGGGATCATCAACCTCGTCGC | 58°C |
| Uridine phosphorylase 3' RACE | UP3R1f UP3R2f UP3R3f UP3R4f | CATCTGCCTTGCCAGCGTG CGCAAGCTGTCTAGTCTGTG GAGTTGAAGTTCAACCGAGAG GTGTGCACAGACAACTGAAAG | |

3.6 Elektroforéza v agarózovém gelu, izolace PCR produktu z gelu

Fragmenty DNA získané pomocí PCR byly rozděleny pomocí elektroforézy v 1% (w/v) agarózovém gelu (Serwa, 100 mg/100 ml 1x TAE) s obsahem 0,1 μ l Gel Red (Biotio) / 10 ml gelu. K určení velikosti DNA fragmentů byl použit molekulární marker: 1kb plus DNA ladder (New England Biolabs, Inc.). Produkty byly vizualizovány na UV transluminátoru (TFX-35.M Vilber Lourmat). Fotodokumentace gelů byla provedena digitálním fotoaparátem (Kodak) a softwarem Kodak Digital science 1D verze 3.0.2.

Proužky gelu obsahující PCR produkty byly vyříznuty a vloženy do 1,5 ml mikrozkuřavky. DNA byla z gelu izolována pomocí QIAquick® Gel Extaction Kit a QIAEX® II Gel extraction kit podle návodu výrobce (Qaigen).

3.7 Molekulární klonování, transformace, izolace plasmidu

PCR produkty byly zaklonovány do plasmidu pGEM® T-Easy vector podle návodu výrobce (Promega). K ligační reakci bylo přidáno 50 μ l kompetentních buněk *E.coli* XL1 a směs byla ponechána 30 minut na ledu. Poté byla provedena transformace bakterií tepelným šokem (45 sekund, 42°C) následovaná opětovným zchlazením na ledu (2 minuty). K transformovaným buňkám bylo přidáno 250 μ l SOC, a pak byly třepány 1 hodinu při 200 rpm a 37°C. Nakonec byly transformované buňky naneseny na agarové misky (LB agar, Roth) s ampicilinem, ošetřené 40 μ l X-galu a 4 μ l IPTG. Misky byly uloženy do termoboxu (37°C). Po 16 hodinách byly vybrány bílé kolonie a provedena srovnávací PCR. Bakteriální kolonie obsahující PCR inzert byly přeneseny do zkumavek s 3 ml LB média (Roth) a 12 μ l ampicilinu (12,5 μ g/ml) a 12 – 14 hodin inkubovány v 37°C při 200 rpm.

Plasmidová DNA byla izolována pomocí QIAprep®Spin Miniprep Kit podle návodu výrobce (Promega).

3.8 Sekvenování

Plasmidová DNA o koncentraci 250 – 300 ng/ μ l byla sekvenována laboratoří genomiky za použití primerů M13f a M13r. Sekvenační reakce byla analyzována přístrojem ABI 3130 (AppliedBiosystems).

3.9 Analýza a úpravy sekvencí

Hrubé sekvence byly analyzovány v programu Sequence Scanner 1.0 (Applied Biosystems) a dále upravovány programy SeqMan II a EditSeq z programového balíku DNASTAR (DNASTAR, Inc.). Výsledné sekvence byly identifikovány pomocí NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.10 Příprava datasetů a alignment sekvencí

Sekvence genů byly získány ze serverů NCBI GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a JGI Eucaryotic Genomics (http://genome.jgipsf.org/euk_cur.html). Aminokyselinové sekvence byly alignovány v programu MAFFT (Kato et al., 2005) GENAFPAIR modelem a dále upraveny v programu BioEdit (Hall 1999). Nukleotidové sekvence byly v programu BioEdit přeloženy do aminokyselinových a alignovány Clusta W algoritmem. Zalignované sekvence byly přeloženy zpět na nukleotidy a dále upraveny pro fylogenetické analýzy.

3.11 Fylogenetické analýzy

Aminokyselinové datasety byly analyzovány metodou maximum likelihood (ML) v programu PHYML 3.0 (Guidon et al., 2005) modelem LG a gama distribucí ve čtyřech kategoriích, všechny parametry byly odhadovány z datasetů a podpořeny bootstrapovou analýzou všech odvozených stromů (100 replikací). Všechny datasety byly dále analyzovány metodou baesiánské interference (BI) v program MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) modelem WAG podpora u BI byla vyjádřena pomocí pravděpodobnosti (posterior probability) z 2.000.000 generací. Prvních 250.000 generací bylo z rekonstrukce topologie vyloučeno.

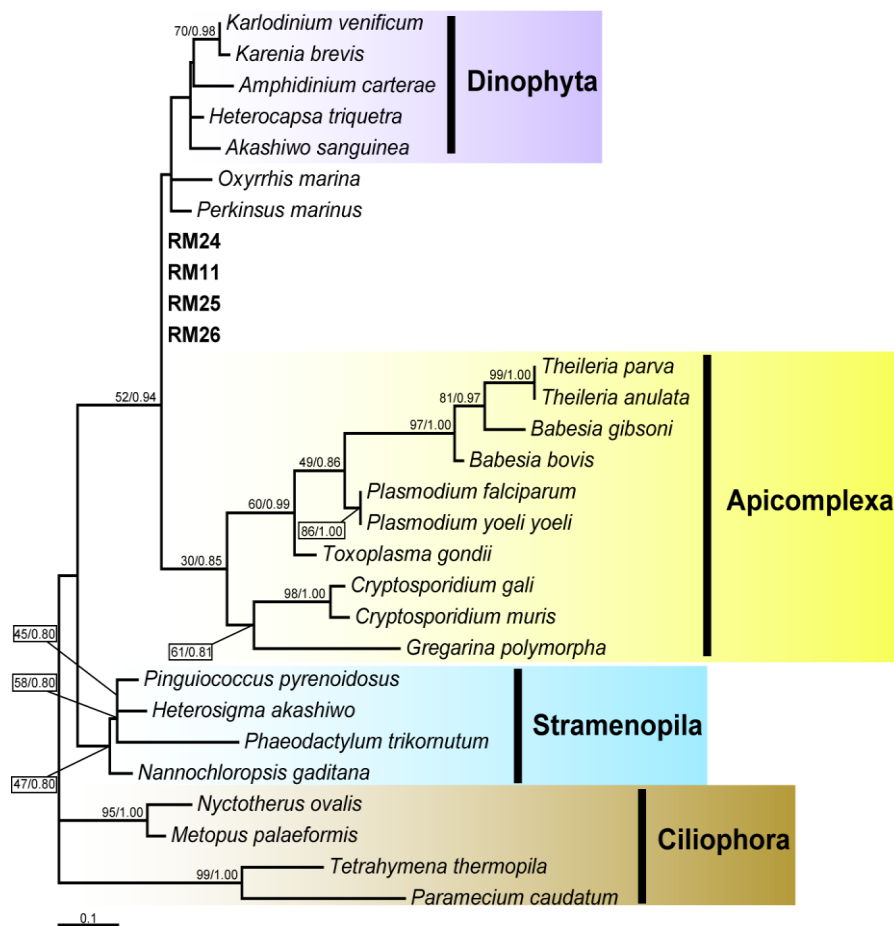
4. Výsledky

4.1 Fylogenetická pozice RM11-26

Na základě fylogenetických analýz tří jaderně kódovaných genů pro aktin, histon H2B a GAPDH a plastidového genu *psbA* jsem se pokusil určit fylogenetickou pozici izolátů RM11 (CCMP3155), RM24, RM25 a RM26.

4.1.1 Analýza genu pro aktin

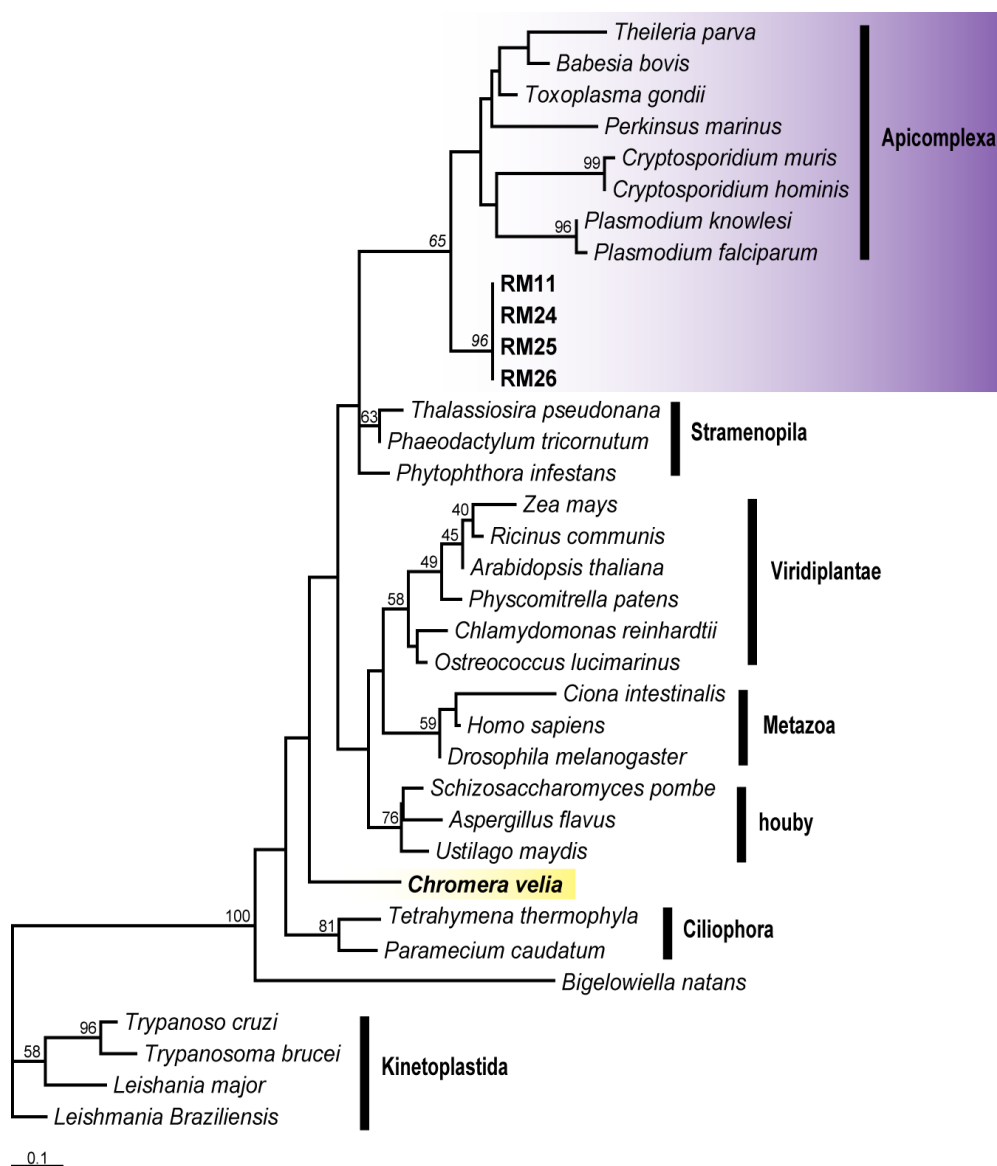
Sekvence genu pro aktin o délce 912 bp byly shodné u všech čtyř izolátů. Sestavil jsem AA dataset s různými zástupci Alveolátů a Stramenopil a provedl fylogenetickou analýzu metodou maximum likelihood (ML) a baesiánské interference (BI) (viz. obr. 3). Výsledná topologie je však díky nízkému rozlišení této analýzy nejasná. RM11 spolu s ostatními izoláty sedí na bázi dinoflagelátů. Tato topologie je ale, stejně jako celý zbytek stromu, málo podpořená.



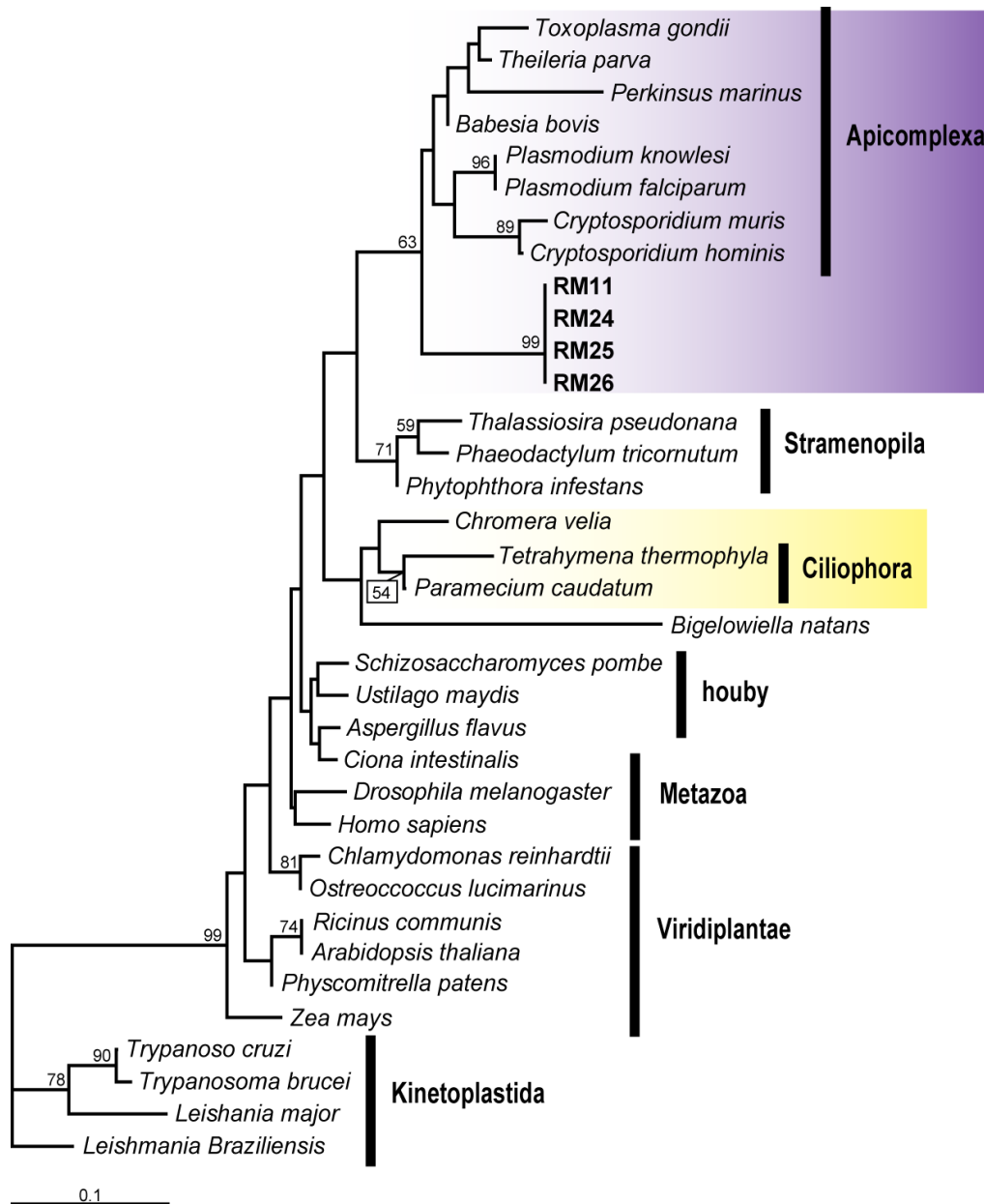
Obr. 3: Aktin. Fylogenetický strom ML za použití programu PHYML 3.0 (model LG, gama distribucí ve čtyřech kategoriích, všechny parametry byly odhadovány z datasetů). Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: bootstrapová analýza/posterior probability.

4.1.2 Analýza genu H2B

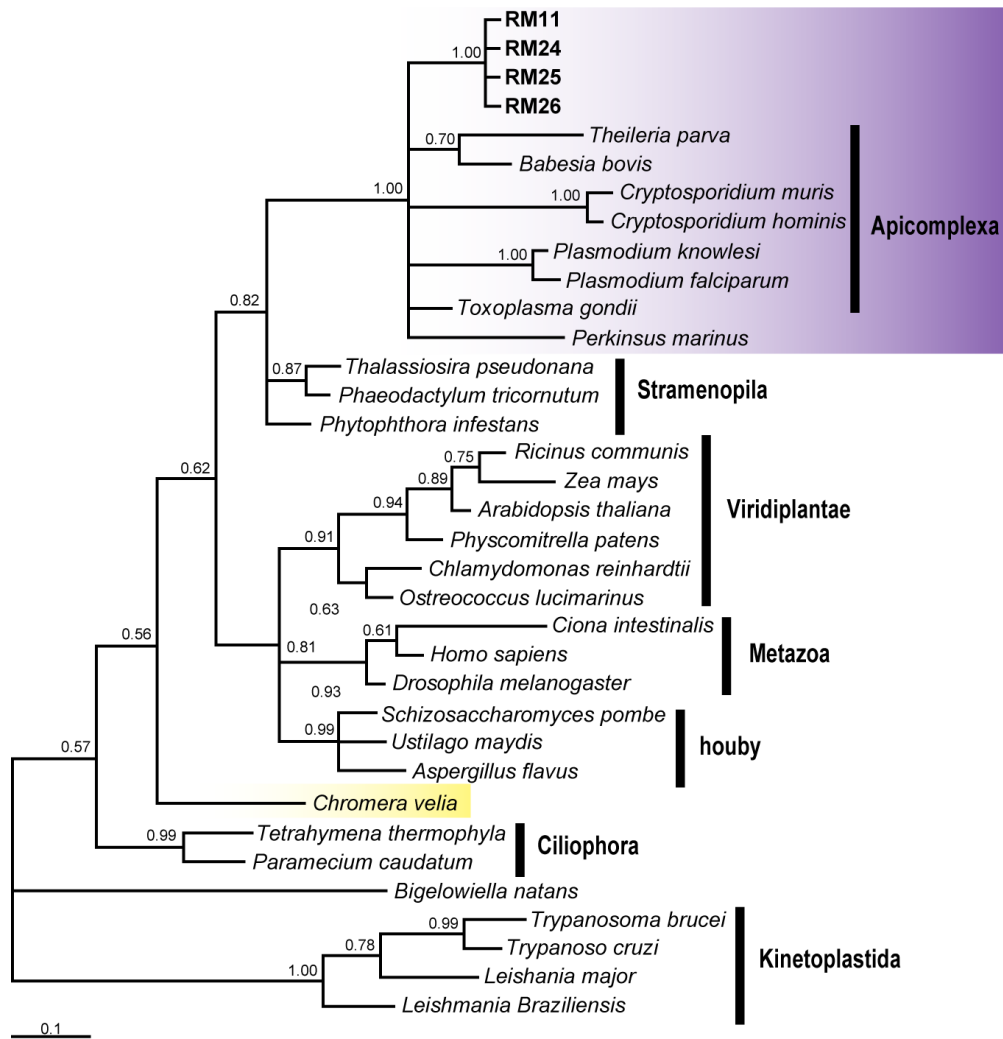
Získal jsem sekvence genu H2B o délce 178 bp. Přesto že jde o velmi krátký a konzervovaný gen, provedl jsem na něm založenou fylogenetickou analýzu. Metodami ML, BI a programem AsaturA (Bootstrapová analýza = 1000 replikací) (viz. obr. 4, 5 a 6). Dva ze tří stromů (AA ML strom, AsaturA strom) vykazují topologii RM11 a spol., jako sesterskou skupinu se skupinou Apicomplexa, pozice *C. velia* je ale nerozlišená. S ohledem na délku genu jsem provedl též analýzu z nukleotidového datasetu (viz. obr. 7). Bootstrapová analýza ukázala slabou podporu získané topologie.



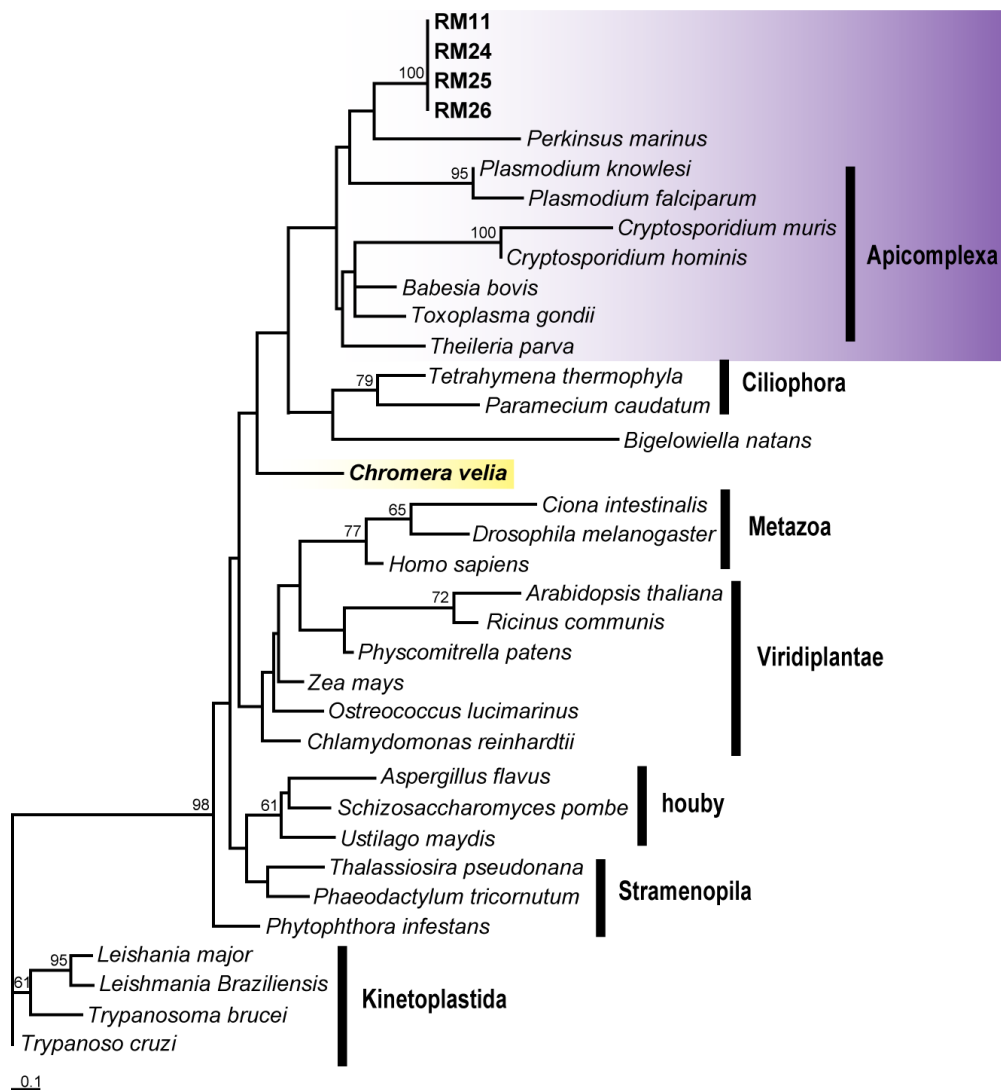
Obr. 4: Histon H2B. Fylogenetický strom ML za použití programu PHYML 3.0 (model LG, gama distribucí ve čtyřech kategoriích, všechny parametry byly odhadovány z datasetů). Statistická podpora je vyjádřena bootstrapovou analýzou.



Obr. 5: Histon H2B. Fylogenetický strom za použití programu AsaturA (Substitution matrix = LG, Poison correction, cutoff value = 2.784). Statistická podpora je vyjádřena bootstrapovou analýzou.



Obr. 6: Histon H2B. Fylogenetický strom BI za použití programu MrBayes (mode WAG) Statistická podpora je vyjádřena hodnotou posterior probability.

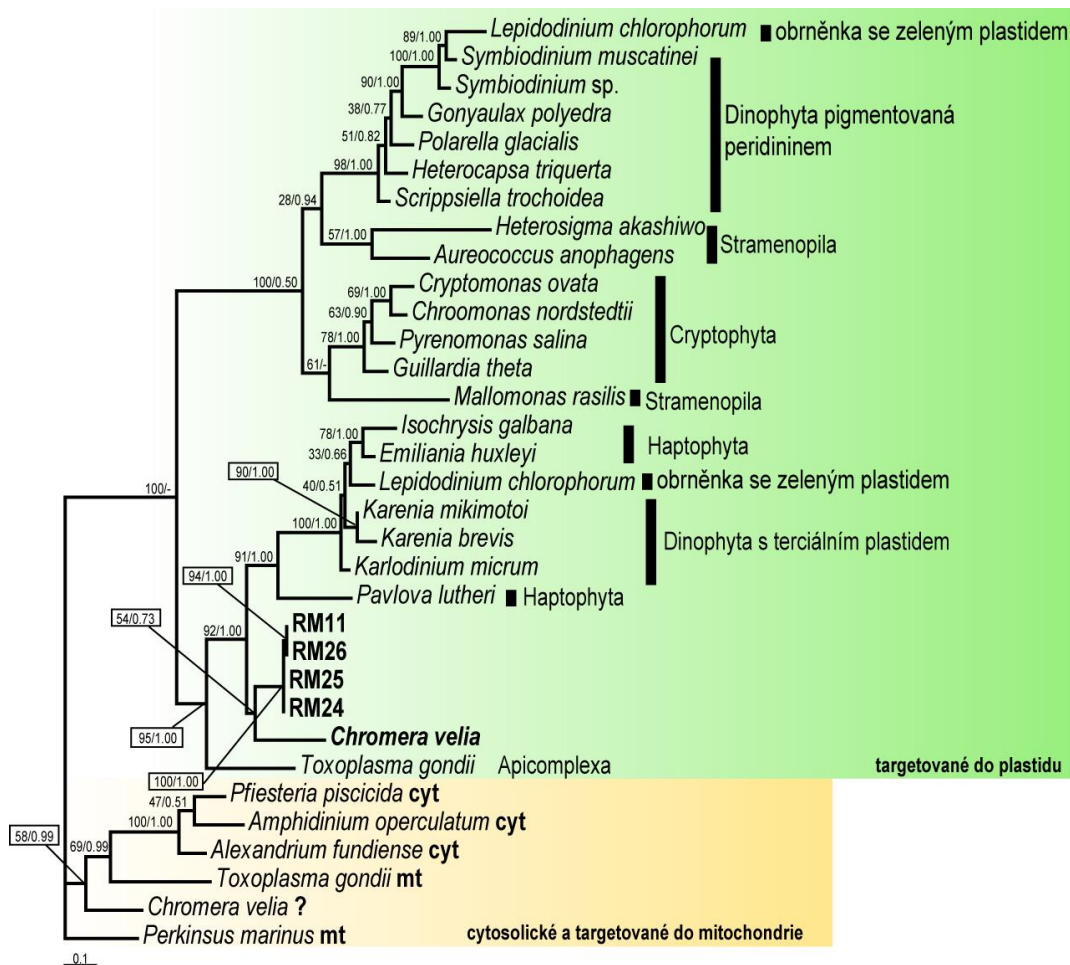


Obr. 7: Histon H2B. Fylogenetický strom ML za použití programu PHYML 3.0 (model GTR, gama distribucí ve čtyřech kategoriích, všechny parametry byly odhadovány z datasetů). Statistická podpora je vyjádřena bootstrapovou analýzou.

4.1.3 Analýza GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

Sekvence genu pro GAPDH o délce 966 bp jsem převedl do aminokyselinového kódu a porovnal je s dostupnými sekvencemi téhož genu na Blast Search. V rámci toho jsem si potvrdil, že mnou amplifikované sekvence odpovídají jaderně kódované, plastidově targetované verzi genu. Výchozí dataset obsahoval sekvence tohoto genu z ostatních sekundárních a terciárních řas včetně *C. velia*. Jako outgroup jsem použil cytosolické verze genu pro GAPDH. Fylogenetickou analýzu jsem provedl metodou ML a BI (viz. obr. 8). Fylogenetická analýza odhalila variabilitu mezi izoláty RM11 a RM26 / RM24 a RM25 což naznačuje, že by mohlo jít o dva samostatné druhy. Jejich AA sekvence se liší ve dvou

aminokyselinách. Všechny čtyři izoláty pak spolu s *C. velia* tvoří sesterskou skupinu příbuznou s obrněnkami s terciálním plastidem. Zjištěná topologie odpovídá té z nedávno publikovaného review (Oborník et al., 2009).

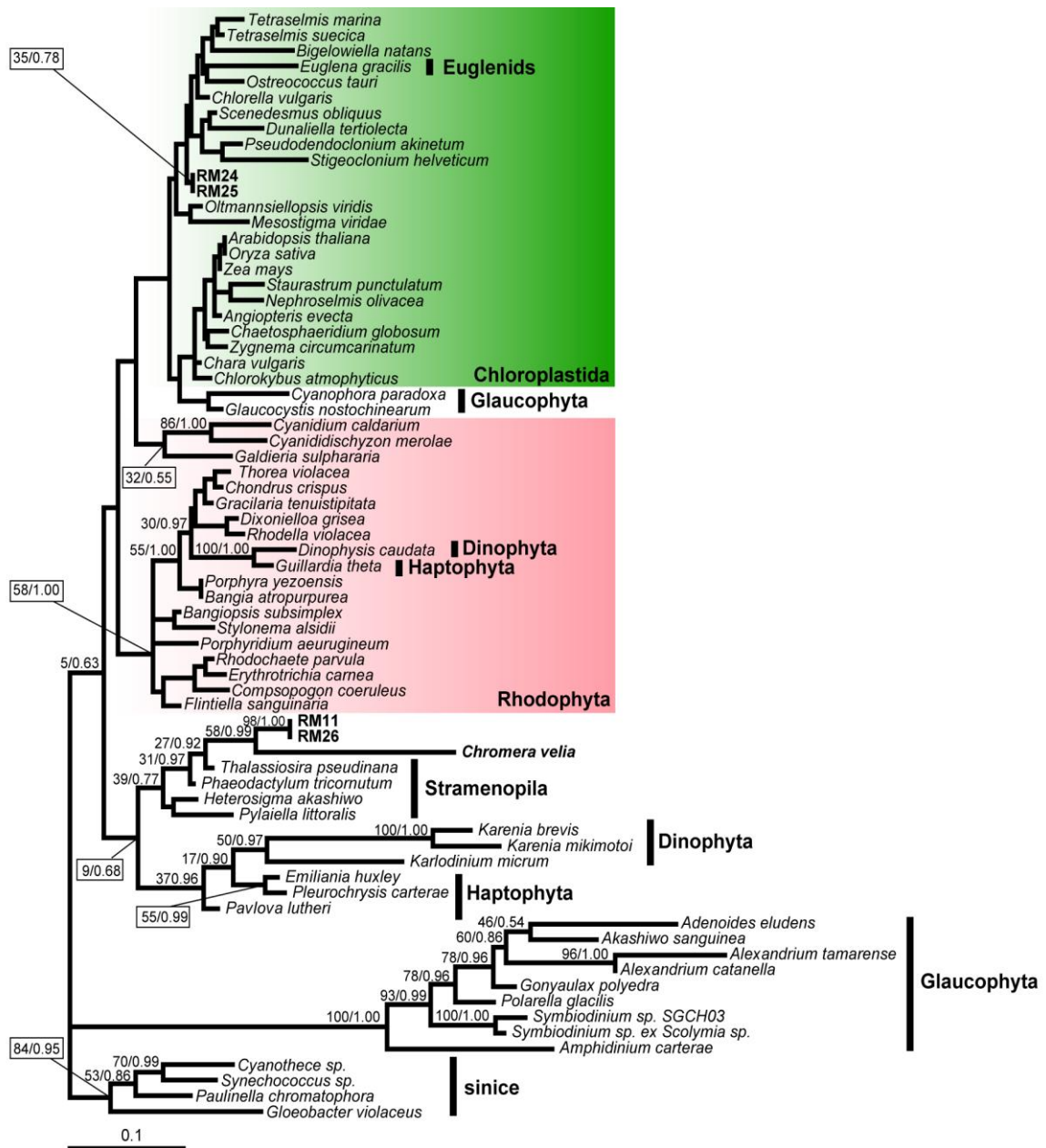


Obr. 8: GAPDH. Phylogenetický strom ML za použití programu PHYML 3.0 (model LG, gama distribucí ve čtyřech kategoriích, všechny parametry byly odhadovány z datasetů). Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: bootstrapová analýza/posteriori probability.

4.1.4 Analýza *psbA* genu (photosystem II subunit D1)

Amplifikací cDNA jsem získal sekvenční údaje genu *psbA* o délce 829 bp (RM11, RM26) a 839 bp (RM24, RM25). Dataset, který jsem použil pro fylogenetickou analýzu, dále obsahoval sekvenční údaje *psbA* jednotlivých linií fotosyntetických řas včetně *C. velia*. Fylogenetickou analýzu jsem provedl metodou ML a BI (viz. obr. 9). Z analýzy vyplývá, že izoláty RM11 a RM26 tvoří sesterskou skupinu s *C. velia* příbuznou s roztvíkmi. Izoláty RM24 a RM25 tvoří samostatnou větev v rámci zelených řas, která ovšem není statisticky podpořená. Tato

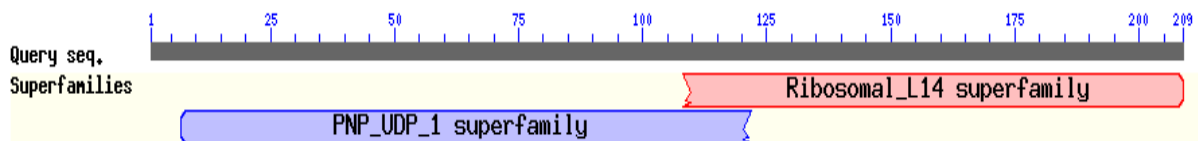
topologie naznačuje, že izoláty RM24 a RM25 obsahují zelený plastid, nebo jejich kultury kontaminovala nějaká nespecifikovaná zelená řasa.



Obr. 9: *psbA*. Fylogenetický strom ML za použití programu PHYML 3.0 (model LG, gama distribucí ve čtyřech kategoriích, všechny parametry byly odhadovány z datasetů). Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: bootstrapová analýza/posteriori probability.

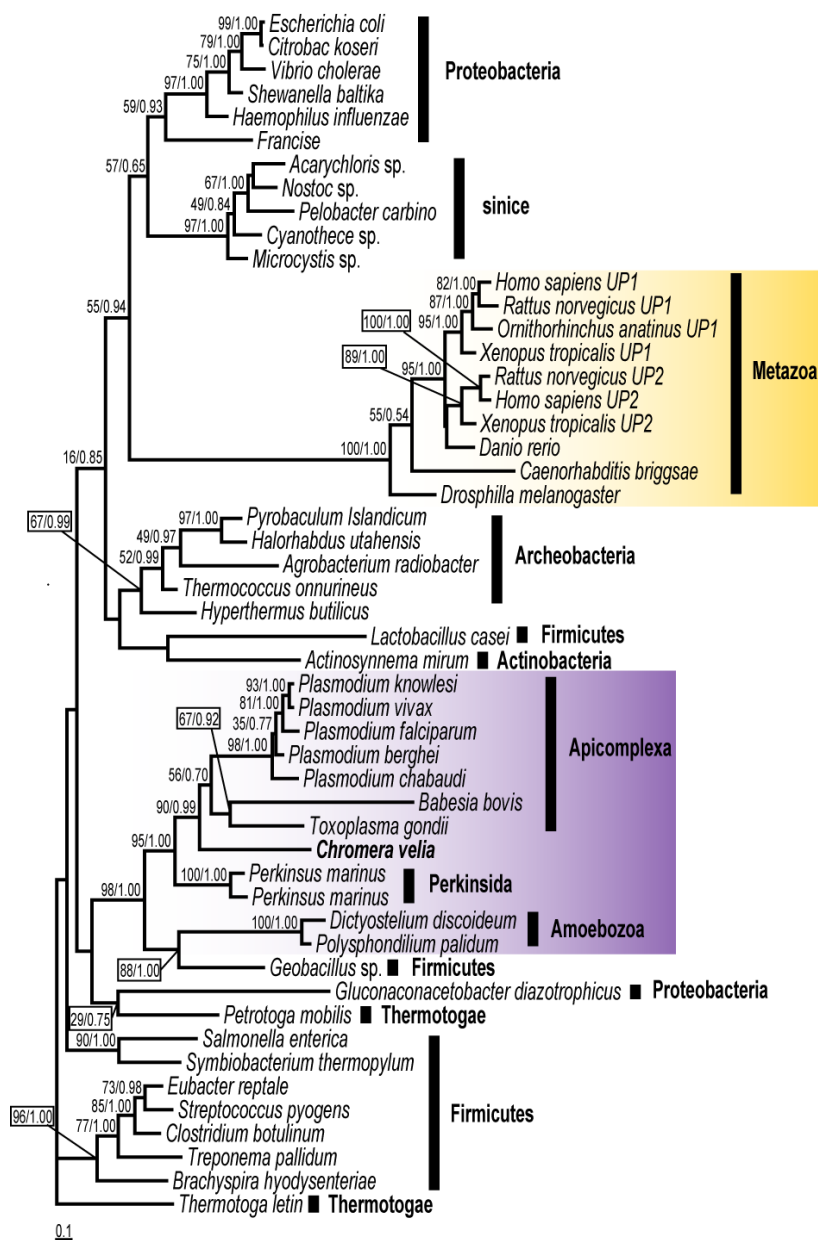
4.2 Fylogenetická pozice *C. velia* na základě analýz genu pro UP

Částečnou sekvenci genu pro UP jsem získal ze 454 sekvencí. Celý gen pak metodou RACE. 5' RACE sekvenci o délce 397 bp jsem spolu se sekvencí, podle které jsme navrhli primery (217 bp), jsem v programu SeqMan spojil se sekvencí 3' RACE o délce 602 bp. Spojená sekvence (978 bp) obsahovala 738 bp dlouhý kódovaný úsek, který jsem převedl do aminokyselin. Výslednou AA sekvenci jsem identifikoval pomocí Blast Search. Tato identifikace odhalila v mojí sekvenci dvě odlišné proteinové domény, které se v rámci deseti aminokyselin sekvenčně překrývaly (viz. obr. 10). První doména odpovídala PNP_UDP_1 superrodině, do které patří gen uridine phosphorylase (UP). Druhá doména odpovídala ribozomální L14 superrodině, přičemž odpovídající kus sekvence vykazoval podobnost s ribozomálním proteinem L23. Na základě tohoto zjištění jsem sestavil dva nezávislé datasety pro oba geny. Do datasetu s genem pro L23 jsem zahrnul homologní sekvenci RM11, kterou se mi podařilo získat ze 454 sekvenačních dat. Homologní sekvenci genu pro UP z RM11 se mi stejným způsobem získat nepodařilo.

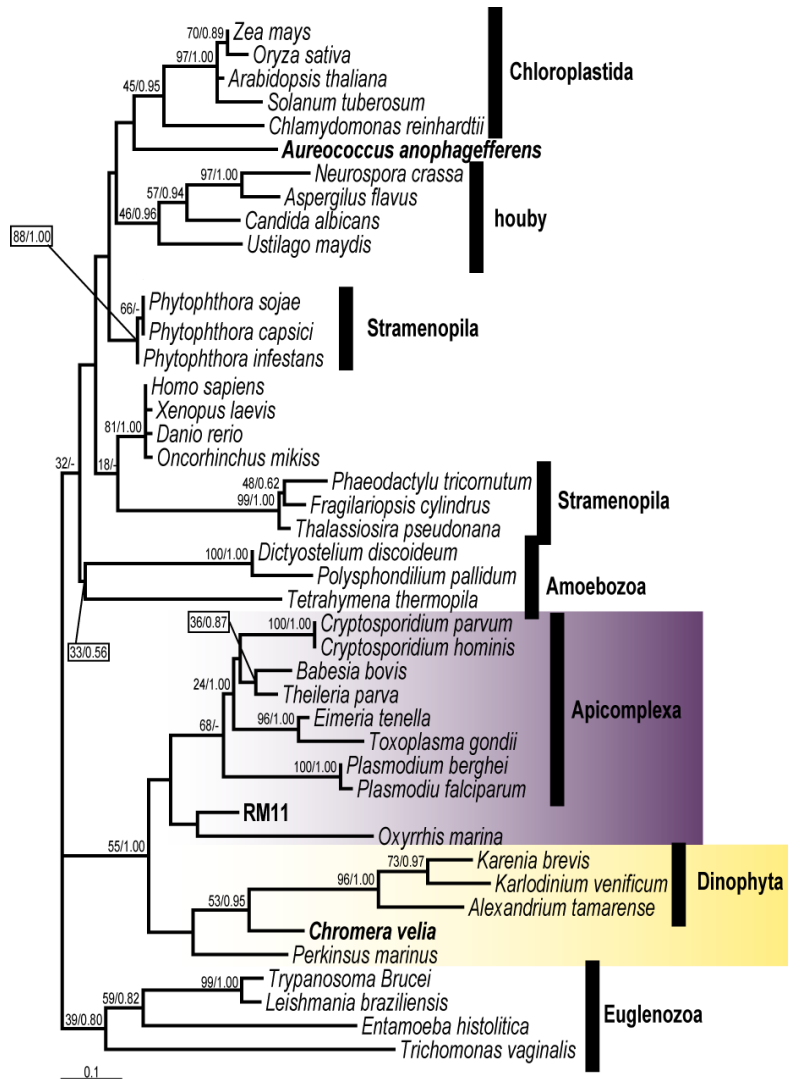


Obr. 10: Rozvržení proteinových domén v sekvenci získaného genu pro uridine phosphorylasu (zdroj <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Fylogenetické analýzy obou genů jsem provedl metodami ML a BI (viz. obr. 11 a 12). Analýza genu pro UP odhalila 1) pozici *C. velia* na bázi skupiny Apicomplexa a 2) že stejně jako apicomplexa získala tento gen laterálním genovým transferem z bakterií. Dále jsem zjistil, že tento gen je naprosto odlišný od toho v živočiších. Analýza genu pro L23 odhalila pozici *C. velia* na bázi skupiny Dinoflagellata, zatím co pozice RM11 je spolu s *Oxyrrhis marina* na bázi skupiny Apicomplexa. Pozice RM11 však není statisticky podpořená.



Obr. 11: Uridin fosforyláza. Fylogenetický strom ML za použití programu PHYML 3.0 (model LG, gama distribucí ve čtyřech kategoriích, všechny parametry byly odhadovány z datasetů). Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: bootstrapová analýza/posteriori probabilita.



Obr. 12: ribozomální protein L23. Fylogenetický strom ML za použití programu PHYML 3.0 (model LG, gama distribucí ve čtyřech kategoriích, všechny parametry byly odhadovány z datasetů). Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: bootstrapová analýza/posteriori probability.

5. Diskuze

5.1 Fylogenetická pozice izolátů RM11, 24, 25, 26

RM11, 24, 25 a 26, nově objevení fotosyntetičtí alveoláti, byli stejně jako *C. velia* vyizolováni z korálů Robertem Moorem. Na rozdíl od *C. velia*, u které byly provedeny fylogenetické analýzy několika genů (Moore et al., 2008; Oborník et al., 2009; Janouškovec et al., 2010), je fylogenetická pozice těchto izolátů neznámá. Krátce před sepsáním mé diplomové práce byl připraven k vydání článek popisující výsledky analýz provedených na kompletně osekvenovaných plastidových genomech *C. velia* a RM11 (CCMP3155) (Janouškovec et al., 2010). Tyto analýzy odhalily, že RM11 má ve svém plastidu nekonzervovanější geny ze všech sekundárních plastidů, zatím co *C. velia* je má naopak extrémně odvozené. Byl také potvrzen společný původ plastidů RM11 a *C. velia* a ostatních chromalveolátů na základě analýzy ribozomálního operonu v plastidu. Fylogenetické analýzy na základě konkatenovaných plastidových genů naznačují, že izolát RM11 je blíže příbuzný výtrusovcům, než *C. velia*. Na druhou stranu, analýza jaderných genů upřednostňuje v této pozici řasu *C. velia* (Janouškovec et al., 2010). Stejnou pozici ukazuje i dřívější fylogenetická analýza *C. velia* a RM11 na základě jaderného genu pro rRNA (viz. obr 13).

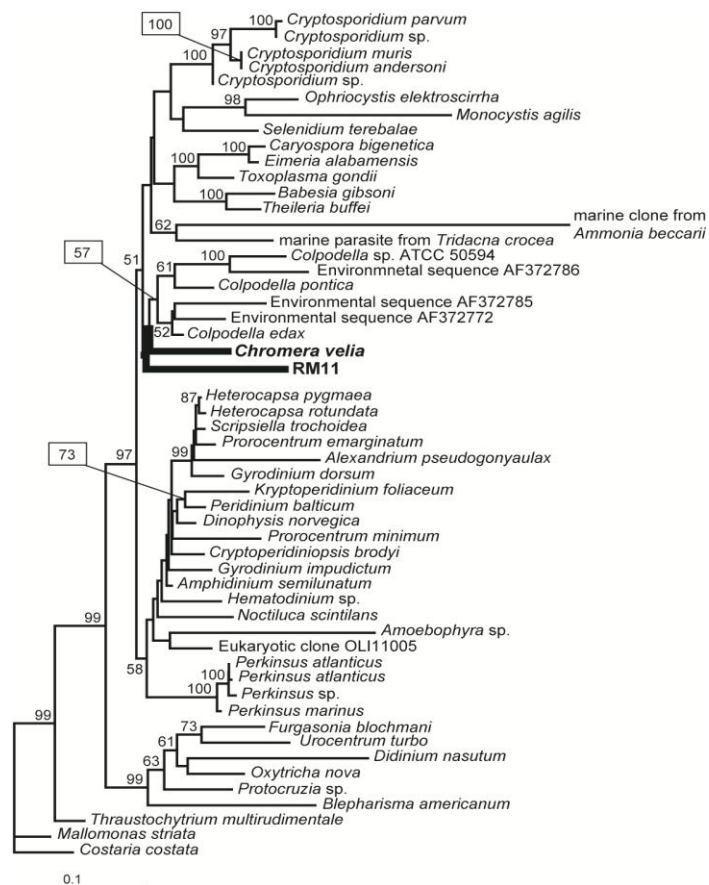
V této práci jsem se primárně zabýval právě určením fylogenetické pozice nově objevených fotosyntetických alveolátů a to na základě analýz tří jaderných (gen pro aktin, histon H2B a GAPDH) a jednoho plastidového genu, kódujícího fotosyntetický protein, *psbA*. Geny pro aktin byly u všech čtyř kmenů sekvenčně totožné. Jejich fylogenetická analýza odhalila velmi málo podpořenou topologii, podle které všechny tyto izoláty patří na bázi kmenu Dinoflagellata (viz. obr. 3). Z toho vyplývá, že ačkoliv jde o poměrně dlouhý gen, jeho vysoká konzervovanost napříč celou superskupinou Chromalveolata neumožňuje zjistit statisticky důvěryhodnou pozici studovaných izolátů.

Stejně jako v případě genu pro aktin byly geny pro histon H2B sekvenčně totožné u všech studovaných izolátů podobných RM11 (RM24, 25, 26). Tento gen byl ze všech izolátů amplifikován hlavně s cílem ověřit, zda RM11 podobné kmeny obsahují regulérní histony a jestli jsou tyto stejného původu jako u *C. velia* (Oborník et al., 2009). I přes to, že histon H2B je extrémně malý, byla na jeho základě provedena fylogenetická analýza. Dva ze čtyř vytvořených stromů odhalily, že RM11-26 tvoří sesterskou skupinu k parazitům kmene

Apicomplexa, pozice *C. velia* však zůstala nepodpořená. Jak už bylo řečeno, geny *C. velia* jsou hodně odvozené, čímž může být fylogenetická analýza ovlivněna. V sekvenci histonu z RM11-26 bylo pak díky evoluční konzervovanosti nalezeno dostatek informace k určení fylogenetické pozice (viz. obr. 4, 5). Tyto výsledky jsou v souladu s recentní analýzou plastidových a jaderných genů z *C. velia* a CCMP3155 (Janouškovec et al., 2010).

V případě genu pro GAPDH se ukázala překvapivá sekvenční odlišnost mezi geny z RM11 a RM26 na jedné straně a RM24, RM25 na straně druhé. Ač byly sekvence stejně dlouhé, jejich translace *in silico* odhalila, že se liší ve dvou aminokyselinách. Fylogenetická analýza dále prokázala, že všechny izoláty tvoří společně s *C. velia* sesterskou skupinu sedící mezi obrněnkami s terciárním plastidem z haptophyt a výtrusovcem *Toxoplasma gondii*, přesně tak, jak již bylo dříve referováno pro *C. velia* (Oborník et al., 2009).

Ze sekvencí genu *psbA* vyšlo najevo, že na rozdíl od *C. velia*, jejíž plastid používá nekanonický genetický kód (UGA kóduje tryptofan) (Moore et al., 2008), všechny čtyři izoláty RM11 (CCMP3155), RM24, RM25, RM26 používají univerzální genetický kód. To je v souladu se zjištěním Janouškovec et al., 2010 u kmene RM11. Analýza *psbA* genu pak odhalila další sekvenční nesrovnalosti v rámci RM11 a RM26 na jedné straně a RM24, RM25 na straně druhé. Z provedené fylogenetické analýzy pak vyplynulo, že izoláty RM11 a RM26 jsou příbuznou skupinou s rozsivkami a že izoláty RM24 a RM25 tvoří samostatnou větev v rámci zelených řas (viz. obr 9). Tato skutečnost může být vysvětlena dvojitým způsobem. Nabízí se možnost, že RM24 a RM25 obsahují zelený plastid, který nahradil původní červený. Analogie k tomuto hypotetickému jevu existuje u blízkých obrněnek, kde druhy jako *Lepidodinium viride* a *Lepidodinium chlorophorum* obsahují sekundární plastid vzniklý pohlcením prasinophyta (Watanabe et al., 1987). Jelikož ale existuje možnost, že kultury těchto izolátů mohly být kontaminovány některou ze zelených řas, je potřeba ověřit genetickou homogenitu izolátů RM24-25, popřípadě analýzou pigmentů odhalit, zda kultura obsahuje pouze pigmenty řas odpovídající výsledkům fylogenetické analýzy.



Obr. 13: Maximum likelihood fylogenetický strom (loglik = -13786.16268) získaný ze sekvencí SSU rRNA genu. Strom byl vytvořen GTR modelem pro substituci nukleotidů s diskretní gama distribucí v 8+1 kategoriích. Všechny parametry (gamma shape = 0.442; pinvar = 0.235) byly odhadnuty z datasetu. Alignment obsahoval 1285 nukleotidových pozic. Hodnoty nad větvemi udávají ML bootstrapové podpory (model HKY85, hodnoty pinvar a ti/tv koeficientu byly odhadnuty z datasetu, jedna kategorie pozic, 500 opakování). Strom byl vytvořen v programu PhyML a bootstrapový dataset pomocí SeqBoot (Phylip) (Oborník, nepublikováno).

5.2 Fylogenetická pozice *C. velia* na základě analýz genu pro UP

Druhým cílem mé práce bylo získat, osekvenovat a fylogeneticky analyzovat gen pro uridin fosforylázu z *C. velia*. Uridin fosforyláza se v buňkách parazitů kmene Apicomplexa účastní interkonverze nukleotidů přijatých z napadené buňky (Hyde, 2007). Tento gen byl vybrán, protože může být potencionálním cílem antiparazitické léčby. Navíc existuje možnost, že by parazité kmene Apicomplexa tento gen, podobně jako jiné geny účastníci se interkonverze nukleotidů, mohly získat laterálním genovým transferem z bakterií (Stripen et al., 2004), čímž se liší od svých hostitelů.

Po získání kompletní sekvence genu pro uridin fosforylázu vyšlo najevo, že tento gen je zfúzován a z části nahrazen genem pro ribozomální protein L23. Fylogenetické analýzy pak odhalily, že v případě UP *C. velia* leží na bázi skupiny Apicomplexa, zatím co v případě L23

tvoří bázi skupiny Dinoflagellata (viz. obr 11, 12) a dále ukázaly, že všechna Apicomplexa včetně jejich fotosyntetických předchůdců RM11-26 obsahují uridin fosforylázu velmi odlišnou od těch u živočichů.

6. Závěr

V této práci byly molekulárně a fylogeneticky charakterizovány nové kmeny fotosyntetických alveolátů (RM11-CCMP3155, RM24, RM25, RM26) na základě analýz čtyř genů: aktin, histon H2B, GAPDH a *psbA*. Z analýz vyplývá, že RM11-26 jsou příbuzné parazitům kmene Apicomplexa. Tento příbuzenský vztah se zdá být pevnější, než v případě *C. velia*, která obsahuje vysoce divergentní geny. Kmeny RM11-26 nepoužívají, na rozdíl od *C. velia*, nekanonický kód pro tryptophan u plastidově kódovaných proteinů. Fylogenetická analýza na základě fotosyntetického proteinu *psbA* ukazuje možnost, že by RM24 a RM25 mohly obsahovat zelené sekundární plastidy. Je zde však i alternativní možnost kontaminace kultury, která není na rozdíl od *C. velia* axenická, nespecifikovanou zelenou řasou.

Dále byla určena fylogenetická pozice dalšího fotosyntetického alveoláta *C. velia* na základě analýz genu pro uridin fosforylázu. Ukázalo se, že všechna Apicomplexa i jejich fotosyntetičtí předchůdci RM11-26 obsahují uridin fosforylázu velmi odlišnou od těch u živočichů, tedy potenciálních či skutečných hostitelích. Lze předpokládat, že pokud by byl tento gen inhibován specifických inhibítorem, nemusel by tento inhibitor fungovat na savčí homolog.

Fotosyntetičtí alveoláti RM11-26 reprezentují separátní větev od *C. velia*, která je však také příbuzná parazitickým prvokům kmene Apicomplexa.

7. Citace

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., Spiegel F. W., Taylor M. F. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Euk Microbiol* **52**: 399–451.

Aldritt S. M., Joseph J. T., Wirth D. F. (1989). Sequence identification of cytochrome *b* in *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Cell Biol* **9**: 3614–3620.

Allen J. R., Roberts T. M., Loeblich A. R., Klotz L. C. (1975). Characterization of the DNA from the dinoflagellate *Cryptecodinium cohnii* and implications for nuclear organization. *Cell* **6**: 161-169.

Archibald J. M., Keeling P. J. (2002). Recycled plastids: a green movement in eukaryotic evolution. *Trends Genet* **18**: 557-584.

Barbrook A. C., Howe C. J. (2000). Minicircular plastid DNA in the dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Mol Gen Genet* **263**: 152-158.

Barbrook A. C., Symington H., Nisbet R. E. R., Iarkum A., Howe C. J. (2001). Organisation and expression of the plastid genome of the dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Mol Genet Genomics* **266**: 632-638.

Bekker A., Holland H. D., Wang P. L., Rumble D. III, Stein H. J., Hannah J. L., Coetzee L. L., Beuknes N. J. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* **427**: 117-120.

Bhattacharya D., Yoon H. S., & Hackett J. D. (2004). Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *Bioessays* **26**: 50-60.

Blackman M. J. and Bannister L. H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* **117**: 11-25.

Blanchard J. L., Hicks J. S. (1999). The non-photosynthetic plastid in malarial parasite and other apicomplexans is derived from outside the green plastid lineage. *J Euk Microbiol* **46**: 367–375.

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

Chesnick J. M., Kooistra W. H. C. F., Wellbrock U., Medlin L. K. (1997). Ribosomal RNA analysis indicates a benthic pennate diatom ancestry for the endosymbionts of the

dinoflagellates *Peridinium foliaceum* and *Peridinium balticum*. *J Eukaryot Microbiol* **44**: 314-320.

Chrudimský T. (2007) Molecular characterization of novel symbiotic alveolate isolated from corals. Master thesis.

Delwiche C. (1999). Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *Am Nat* **154**: S164-S167.

Dodge J. D. (1964). Chromosome structure in the Dinophyceae. II. Cytochemical studies. *Arch Microbiol* **48**: 66-80

Douglas S. E. (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 655-661.

Falkowski P. G., Katz M. E., Knoll A. H., Quigg A., Raven J. A., Schofield O., Taylor F. J. R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* **305**: 354-360.

Fast N. M., Kissinger J. C., Roos D. S., Keeling P. J. (2001). Nuclear-encoded, plastid targeted genes suggests a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol Biol Evol* **18**: 418-426.

Fast N. M., Xue L., Bingham S., Keeling P. J. (2002). Re-examining alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. *J Eukaryot Microbiol* **49**: 30-37.

Fensome R. A., Taylor F. R. J., Norris G., Serjeant W. A. S., Wharton D. I., Williams G. L. (1993). A classification of living and fossil dinoflagellates. *Micropalaeontol Spec Publ* **7**: 1-351.

Forth B. J., McFadden G. I. (2003). The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other apicomplexa parasites. *Int Rev Cytol* **224**: 57-110.

Gajadhar A. A., Marqard W. C., Hall R., Gunderson J., Ariztia-Carmona E., Sogin M. L. (1991). Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptothecodinium cohnii* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates and ciliates. *Mol Biochem Parasitol* **45**: 147-154.

Graham L. E., Wilcox L. W. (2000). Algae Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ 07458.

Gray M. W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Opin Genet Dev* **9**: 678-687.

Guidon S., Gascuel O. (2003). PHYML—a simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704.

Hacket J.D., Sheetz T. E., Yoon H. S., Soares M. B., Bonaldo M. F., Casavant T. L., Bhattacharya D. (2005). Insights into a dinoflagellate genome through expressed sequence tag analysis. *BMC Genomics* **6**: 80.

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., Keeling P. J. 2003. Nucleus-encoded, plastid targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. *Mol Biol Evol* **20**: 1730–1735.

Hedges S. B., Blair J. E., Venturi M. L., Shoe J. L. (2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol Biol* **4**: 2.

Hinnenbusch A. G., Klotz L. C., Immergut E., Loeblich A. R. (1980). Deoxyribonucleic acid sequence organization in the genome of the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Biochemistry* **19**: 1744-1755.

Hyde E. (2000) Targeting Purine and Pirimidine metabolism in human apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets* **8(1)**: 31-47.

Janouškovec J. (2007). The plastid of RM12 the photosynthetic ancestor of Apicomplexa. Master thesis.

Janouškovec J., Horák A., Oborník M., Lukeš J., Keeling P. J. (2010). A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate and heterokont plastids. IN PRESS

Jarvis P., Soll J. (2001). Toc, Tic and chloroplast protein inport. *Biochem Biophys Acta* **1541**: 64-79.

Joseph J. T., Aldritt S. M., Unnasch T., Puijalon O., Wirth D. F. (1989). Characterization of a conserved extrachromosomal element isolated from the avian malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Cell Biol* **9**: 3621–3629.

Kasting J. F. (2001). The rise of atmospheric oxygen. *Science* **293**: 819-820.

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

Keeling P. J. (2004). The diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *Am. J. Bot.* **91**: 1481-1493.

Kilejian A. (1974). Mitochondrial DNA from *Plasmodium lophurae*. *J Protozool* **21**: 434.

Kilejian A. (1975). Circular mitochondrial DNA from avian malarial parasite *Plasmodium lophurae*. *Biochem Biophys Acta* **390**: 276–284.

Köhler S., Delwiche C. F., Denny P. W., Tilney L. G., Webster P., Wilson R. J. M., Palmer J. D., Roos D. S. (1997). A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* **275**: 1485–1489.

Kuvarina O. N., Leander B. S., Aleshin V. V., Milnikov A. P., Keeling P. J., Simdyanov T. G. (2002). The phylogeny of colpodelids (Alveolata) using small subunit rRNA gene sequences suggests they are the free-living sister group to apicomplexans. *J Eukaryot Microbiol* **49(6)**: 498-504.

Leander B. S., Kuvarina O. N., Aleshin V. V., Milnikov A. P., Keeling P. J. (2003). Molecular phylogeny and surface morphology of *Colpodella edax* (Alveolata): Insights into phagotrophic ancestry of apicomplexans. *J Eukaryot Microbiol* **50(5)**: 334-340.

Loeblich A. R. (1976). Dinoflagellate evolution: speculation and evidence. *J Protozool* **23**: 13-28.

Lynn D. H. (2008). The ciliated protozoa: characterization, classification, and guide to the literature. [Heidelberg] : Springer

Martin W., Hermann R. G. (1998). Gene transfer from organelles to nucleus: How much, What happens, and why? *Plant Physiol* **118**: 9-17.

Martin B., Nowack E. C. M. & Melkonian M. (2005). A plastid in making: Evidence for a Second Primary Endosymbiosis. *Protist* **156**: 425-432.

McFadden G. I., Reith M. E., Munholland J., Lang-Unnasch N. (1996). Plastid in human parasites. *Nature* **381**: 482.

McFadden G. I., Waller R. F. (1997). Plastids in parasites of humans. *Bioessays* **19**: 1033–1040.

McFadden G. I. (1999). Plastids and protein targeting. *J Eukaryot Mikrobiol* **46**: 339-346.

Moore R. B., Oborník M., Janouškovec J., Chrudimský T., Vancová M., Green D. H., Wright S. W., Davies N. W., Bolch C. J. S., Heimann K., Šlapeta J., Hoegh-Guldberg O., Logsdon J. M., Carter D. (2008). A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* **451**: 959–963.

Oborník M., Jirků M., Šlapeta J. R., Modrý D., Koudela B., Lukeš J. (2002). Notes on coccidian phylogeny, based on the apicoplast small subunit ribosomal DNA. *ParRes* **88**: 260-263.

Oborník M., Janouškovec J., Chrudimský T., Lukeš J. (2009). Evolution of the apicoplast and its hosts. From heterotrophy to autotrophy and back again. *J Parasitol* **39**: 1-12.

- Oborník M., Vancová M., Lai D. H., Janouškovec J., Keeling P. J., Lukeš J.** (2010) Morphology and ultrastructure of *Chromera velia*. **IN PRESS**
- Okamoto O. K., Hastings J. W.** (2003). Genome-wide analysis of redox-regulated genes in a dinoflagellate. *Gene* **321**: 73-81.
- Palmer J. D.** (2003). The symbiotic birth and spread of plastids: how many times and whodunit? *J. Phycol.* **39**: 1-9.
- Patterson D. J.** (1999). The Diversity of Eukaryotes. *The American Naturalist* vol. **65**.
- Rae P. M. M.** (1976). Hydroxymethyluracil in eukaryote DNA: A natural feature of the Pyrrophyta (Dinoflagellates). *Science* **194**: 1062-1064.
- Rizzo P. J.** (2003). Those amazing dinoflagellate chromosomes. *Cell Res* **13**: 215-217.
- Rodriguez-Ezpeleta N., Brinkmann H., Burey S. C., Roure B., Burger G., Löffelhardt W., Bohnert, H. J., Philippe H., Lang B. F.** (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae & glaucophytes. *Curr Biol* **15**: 1325-1330.
- Ronquist F., Heuvelsbeck J. P.** (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference unedr mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572-1574.
- Saldarriaga J. F., Taylor F. R. J., Keeling P. J., Cavallier-Smith T.** (2001). Dinoflagellate molecular SSU rDNA phylogeny suggest multiple plastid losos and replacements. *J Mol Evol* **53**: 204-213.
- Sambrook J., Russel D. W.** (2001). Molecular cloning, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Puerta M. V., Lippmeier J. C., Apt K. E. Delwiche C. F.** (2007). Plastid genes in non-photosynthetic dinoflafellate. *Protist* **158**: 105-117.
- Schnepf E. and Elbrächter M.** (1999). Dinophyte chloroplasts and phylogeny-a review. *Grana* **38**: 81-97.
- Stoebe B., Kowallik K. V.** (1999). Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends Genet* **15**: 344–347.
- Stripen B., Andrea J. P., Huang J., Li C., Gubbels M. J., Umejiego N. N., Hedstrom L., Kissinger J. C.** (2004). Gene transfer in the evolution of parasite nukleotide biosynthesis. *PNAS* **101** (9)
- Suplick K., Akella R., Saul A., Vaidya A. B.** (1988). Molecular cloning and partial sequence of a 5.8 kilobase pair repetitive DNA from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **30**: 289–290.

- Suplick K., Morrissey J., Vaidya A. B.** (1990). Complex transcription from the extrachromosomal DNA encoding mitochondrial functions of *Plasmodium yoelii*. *Mol Cell Biol* **10**: 6381–6388.
- Taylor F. J. R.** (1987). The biology of dinoflagellates. *Blackwell Scientific Publications*
- Tosso M. A., Omoto CH. K.** (2007). Gregarina nimpadrodes may lack both a plastid genome and organelle. *J Eucaryot Microbiol* **54**: 66-72.
- Tuteja, R.** (2007). Malaria – an overview. *FEBS J.* **274**: 4670–4679.
- Vaidya A. B., Akella R., Suplick K.** (1989). Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6 - kilobase-pair DNA of a malarial parasite. *Mol Biochem Parasitol* **35**: 97–107.
- Vesk M., Dibbayawan T. P., Vesk P. A.** (1996). Immunogold localization of picroerythrin in chloroplast of *Dinophysis acuminata* and *Dinophysis fortii* (Dinophysiales, Dinophyta). *Phycologia* **35**: 234-238.
- Wang D. Z.** (2008). Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Mar Drugs* **6(2)**:349-71
- Watanabe M. M., Takeda Y., Sasa T., Inouye I., Sawaguchi T., Chihara M.** (1987). A green dinoflagellate with chlorophyll *a* and *b* morphology fine structure of the chloroplast and chlorophyll composition. *J Phycol* **23**: 382-389.
- Westeg M., Vacula J., Krajčovič J.** (2009). On the Origin of Chloroplast, Import Mechanisms of Chloroplasts-Targeted Proteins, and Loss of Photosynthetic Ability. *Folia Microbiol* **54**: 303-321.
- Wolters J.** (1991). The troublesome parasites: molecular and morphological evidence that the Apicomplexa belong to the dinoflagellate-ciliate clade. *BioSystems* **25**: 75-84.
- Wong J. T. Y., New D. C., Wong J. C. W., Hung V. K. L.** (2003). Histone-like proteins of the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* have homologies to bacterial DNA-binding proteins. *Cell* **2**: 646-650.
- Xiong J.** (2007). Photosynthesis: what color was its origin? *Genome Biol* **7**: 245
- Yoon H. S., Hackett J. D., Ciniglia C., Pinto G., Bhattacharya D.** (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* **21**: 809-818.
- Zhang Z., Green B. R., Cavalier-Smith T.** (1999). Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes. *Nature* **400**: 155-159.

Zhang Z. D., Cavalier-Smith T., Green B. R. (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., Green B. R. (2001). A family of selfish minicircular chromosomes with jumbled chloroplast gene fragments from a dinoflagellate. *Mol Biol Evol* **18**: 315-321.

Zhu G., Marchewka M. J., Keithly J. S. (2000). *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology* **146**: 315-321.

8. Přílohy

f2 médium: 35 g Marine Tropic Salt + 20 ml Marine Watter Solution / 1l; pH 8,0

Lyzační pufr (Wattier et al., 2000): 100 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl + 0,4 μ l SDS (20% w/v)

SOC médium: 2% bacto-tryptone; 0,5% bacto-yeast extract; 0,05% NaCl; 2,5 mM, KCl, 10 mM MgCl₂; 10 mM Mg SO₄; 20 mM glukóza; pH 7,0

TAE (50x): 242 g Tris; 57,1 ml kyselina octová; 100 ml 0,5M EDTA (ph 8,0); doplnit do 1l destilované H₂O