

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky

**Genetická analýza chlorofylid reduktázy
u aerobních anoxygenních fototrofů**

Diplomová práce
2011

Bc. Markéta Muroňová

Vedoucí práce : Mgr. Michal Koblížek Ph.D. - MBÚ AV ČR Třeboň

MUROŇOVÁ, M. (2011): Genetická analýza chlorofylid reduktázy u aerobních anoxygenních fototrofů. [Genetic analysis of chlorophyllid reductase in aerobic anoxygenic phototrophs. Msc. Thesis, in Czech] - 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis is concerned with designing specific primers for the gene *bchY* of chlorophyllid reductase from biosynthetic pathway of bacteriochlorophyll *a* and using this gene as a molecular marker for detection of aerobic anoxygenic phototrophs. The phylogenetic analyses based on gene *bchY* was done from selected AAP isolates and natural microbial communities in lakes in the Tyrolian Alps.

Tato práce byla podpořena projektem GAČR P501/10/0221.

Prohlašuji, že svoji 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 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, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 3.1.2011

.....

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu této diplomové práce Mgr. Michalu Koblížkovi Ph.D. za přátelský a trpělivý přístup při vedení mé práce. Dále Mgr. Zuzaně Čuperové za cenné rady a připomínky a také kolektivu MBÚ Třeboň za příjemnou atmosféru. Děkuji také své rodině a přátelům za podporu.

Obsah

1.	Úvod	1
1.1	Aerobní anoxygenní fototrofní bakterie	1
1.1.1	Taxonomie	2
1.1.2	Morfologie	4
1.2	Fotosyntéza AAP	4
1.2.1	Princip bakteriální fotosyntézy	5
1.2.2	Pigmenty	6
1.2.3	Syntéza bakteriochlorofylu <i>a</i> a enzym chlorofylid reduktáza	7
1.2.4	Regulace syntézy pigmentů	11
1.3	Výskyt AAP	11
1.4	Genetická analýza	12
2.	Cíle práce	15
3.	Materiál a metody	16
4.	Výsledky	24
4.1	Testování publikovaných primerů	24
4.2	Návrh primerů a jejich testování	24
4.3	Amplifikace genu <i>bchY</i> u vybraných kmenů AAP	27
4.4	Amplifikace genu <i>bchY</i> z přírodní směsné DNA	29
4.5	Fylogenetická analýza	29
5.	Diskuze	33
6.	Závěr	35
7.	Seznam použitých zdrojů	36
8.	Seznam zkratk	41
.		

1. Úvod

Nejdůležitější místo ve vodním ekosystému zauímají oxgyenní fotosyntetické mikroorganismy obsahující chlorofyl, což jsou řasy a sinice, tzv. fytoplankton. Jde o primární producenty fotosyntetického organického uhlíku. Naproti tomu heterotrofní organismy, což jsou především bakterie a zooplankton, organický uhlík využívají. Mezi těmito dvěma metabolickými skupinami se nachází fotoheterotrofní bakterie, které využívají energii získanou ze světla a zároveň vyžadují zdroj organického uhlíku, což se jeví jako výhodná strategie. Do této třetí skupiny patří aerobní anoxygenní fototrofové. (KOBÍŽEK & PRÁŠIL 2002)

1.1 *Aerobní anoxygenní fototrofní bakterie*

Aerobní anoxygenní fototrofní bakterie (AAP – Aerobic Anoxygenic Phototrophs) byly objeveny roku 1978, kdy byla v Tokijském zálivu na povrchu řas, v povlacích sinic, v písku a v mořské vodě objevena nová skupina bakterií obsahující bakteriochlorofyl *a* (BChl *a*) (HARASHIMA et al. 1978, SHIBA et al. 1979).

Mnoho let se věřilo, že anoxygenní fotosyntéza je spojena s výlučně anaerobními podmínkami, a tudíž je typická pro anaerobní bakterie (YURKOV & CSOTONYI 2009). Anaerobní purpurové bakterie jsou nejbližší fylogenetičtí příbuzní AAP, využívají téměř stejný fotosyntetický aparát, avšak fotosyntéza AAP vyžaduje naopak aerobní prostředí (YURKOV & BEATTY 1998). Jak již název AAP napovídá, jedná se o bakterie, které neprodukují kyslík, jelikož nevyužívají redukci vody jako donoru elektronu. Další odlišností je, že AAP neobsahují Calvinův cyklus a proto vyžadují zdroj organického uhlíku. Fotosyntézou, coby doplňkovým zdrojem energie, mohou uspokojit až 50 % svých energetických potřeb (KOBÍŽEK & PRÁŠIL 2002).

Existuje tedy pět základních rysů, které AAP odlišují od anoxygenních fototrofů: 1. vyžadují přítomnost kyslíku pro fotosyntézu, 2. světlo inhibuje syntézu BChl, 3. není přítomen Calvinův cyklus a nejsou schopny asimilovat inorganický uhlík, 4. mají menší

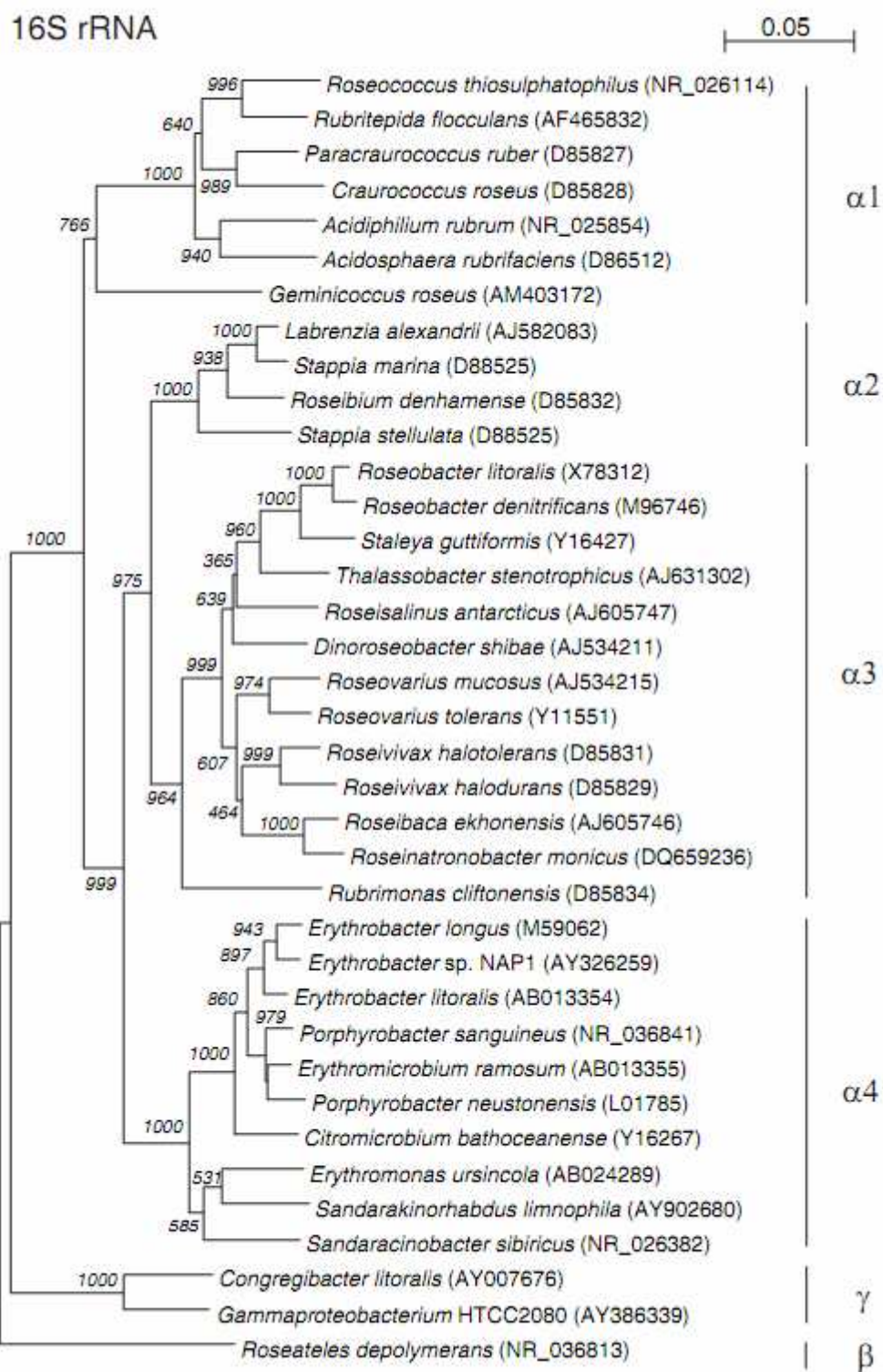
počet fotosyntetických jednotek v buňce, 5. některé skupiny obsahují velké množství karotenoidů (YURKOV & CSOTONYI 2003, RATHGEBER et al. 2004).

1.1.1 Taxonomie

Počet známých druhů AAP neustále vzrůstá. V současnosti je popsáno 52 druhů v 33 rodech, přičemž v posledních čtyřech letech bylo objeveno až 18 nových druhů (YURKOV & CSOTONYI 2009).

Všechny AAP se řadí mezi *Proteobacteria*, kde se nachází i nejbližce příbuzné purpurové nesírné bakterie. Většina druhů byla dosud popsána ve třídě α -proteobakterií, ale je již znám jeden zástupce β -proteobakterií – *Roseateles depolymerans* a jeden druh z podtřídy γ – *Congregibacter litoralis* (YURKOV & CSOTONYI 2003).

α -proteobakterie se dále dělí na podskupiny α -1 až α -4. Do podskupiny α -1 spadají druhy půdní, z termálních pramenů a kyselých odpadních vod. Podskupina α -2 obsahuje mořské zástupce: *Labrenzia*, *Roseibium*, *Stappia marina* a *Hoeflea phototrophica*. α -3 podskupinu tvoří mořské a halofilní AAP s typickým rodem *Roseobacter*. A poslední podskupina α -4 zahrnuje hned několik druhů jak z mořských, tak i sladkovodních prostředí – např. *Blastomonas*, *Citromicrobium*, *Erythrobacter*, *Porphyrobacter* (YURKOV & CSOTONYI 2009). (Obr.1)



Obr. 1: **Fylogenetická analýza hlavních zástupců AAP na základě sekvenční 16S rRNA (Neighbor-joining, Bootstrap 1000) (KOBÍLÍZEK – nepublikováno)**

1.1.2 Morfologie

Třída *Proteobacteria*, do níž taxonomicky spadají AAP, je pojmenovaná po starořeckém bohu Proteovi, který uměl měnit svůj tvar, stejně jako existuje nepřeberné množství různě tvarovaných forem proteobakterií. Není tedy překvapující, že také morfologie aerobních anoxygenních fototrofů je velmi různorodá. Společným rysem všech AAP je pouze gramnegativní buněčná stěna (YURKOV & BEATTY 1998).

Byly popsány druhy kokální – *Roseococcus*, *Craurococcus*, vejcovité – *Roseobacter*, *Erythromonas*, tyčinkovitý tvar buněk mají například *Erythrobacter*, *Roseivivax*, *Acidiphilium* a konečně skupina pleomorfních druhů jako je *Citromicrobium bathiomarinum*, který zaujímá během dělení tvar „Y“ nebo rod *Porphyrobacter*, jež vytváří membránové výběžky, které zvětšují jeho povrch, a tak lépe získává živiny (YURKOV & CSOTONYI 2009).

Různorodost charakterizuje i způsob života AAP. Existují jak samostatné buňky s bičíky, tak buňky přisedlé na dně nebo jako povlak purpurových bakterií či sinic (YURKOV & CSOTONYI 2009). Některé druhy se naopak shlukují do kolonií tvaru rozety (hvězdicovité růžice) – *Staleyia guttiformis*, *Stappia marina* či připomínají květ pampelišky nebo mozkový korál – kmeny BL7, BL14, C8 (RATHGEBER et al. 2004, KIM et al. 2006).

Rozmanitost se promítá také do způsobu dělení. Bylo pozorováno nejčastější dělení binární, dále pučení – *Porphyrobacter neustonensis* (FUERST et al. 1993), zaškrcování – *Erythrobacter ezovicum* (YURKOV & BEATTY 1998) a zvláštní dělení, při němž vznikají tři dceřiné buňky – *Citromicrobium bathyomarinum* (YURKOV et al. 1999).

1.2 Fotosyntéza AAP

Fotosyntetické komplexy AAP jsou umístěny v cytoplazmatické membráně. Základní funkční jednotkou je reakční centrum (RC), které katalyzuje světlem indukovaný přenos elektronů vedoucí ke stabilnímu rozdělení nábojů. Stejně jako u nesírných purpurových

bakterií se jedná o feofytin-chinonové RC II, které je tvořeno proteinovými podjednotkami H, M, L – kódované geny *pufHML*, čtyřmi molekulami BChl *a*, dvěma molekulami bakteriofeofytinu (BPhe), dvěma molekulami ubichinonu, jednoho iontu nehemového železa a jedné molekuly karotenoidu (YURKOV & BEATTY 1998).

Ke zvýšení účinnosti sbírání světla jsou v cytoplazmatické membráně další pigment-proteinové komplexy – vnitřní světlosběrná anténa (LH1 – light-harvesting). Ten zvětšuje povrch pro zachycování světelného záření a jelikož absorbuje v jiných vlnových délkách než RC, doplňuje tak jeho spektrální rozsah. LH1 se skládá z dvojice proteinů α a β – kódované geny *pufAB*, z BChl *a* a karotenoidů. Obklopuje RC a tvoří kruhový LH1-RC komplex přítomný u všech AAP (YURKOV & CSOTONYI 2009). Absorbční maxima tohoto komplexu jsou 800nm pro RC a 870nm pro LH1 (YURKOV & CSOTONYI 2003). U některých druhů je světlosběrný systém rozšířen ještě o vnější anténu LH2. LH2 má podobné složení jako LH1, tvoří menší kruhy umístěné kolem vnějšího obvodu LH1 a vzhledem ke dvěma různým orientacím BChl *a* má dvě absorbční maxima v 800nm a 850nm (YURKOV & CSOTONYI 2009).

Charakteristickým znakem AAP fotosyntézy je nepřítomnost genů pro syntézu enzymu RubisCO, který zaujímá klíčové postavení v Calvinově cyklu. AAP tak nejsou schopny asimilovat CO₂ a nevykazují tedy autotrofní růst (YURKOV & BEATTY 1998).

1.2.1 Princip bakteriální fotosyntézy

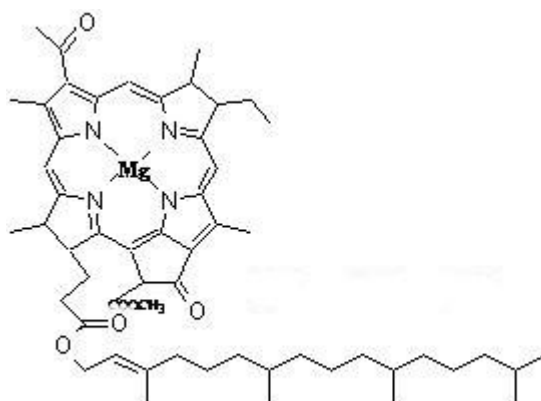
Energetický tok elektronů AAP se velmi podobá procesu získávání energie u anaerobních anoxygenních bakterií. Fotosyntéza je zahájena dopadem a absorpcí fotonů světelného záření světlosběrným systémem, tato energie je transportována do RC, kde dochází k fotooxidaci speciálního páru BChl *a*. Excitovaný BChl *a*, primární donor, se tak stává redukčním činidlem a předává elektron BPhe přes přídatný BChl. BPhe dále předá negativně nabitou částici primárnímu akceptoru, což je molekula ubichinonu Q_A. Odtud elektron putuje přes nehemové železo na ubichinon Q_B. Tento cyklus se ještě jednou opakuje. Po přijetí druhého elektronu se Q_B plně redukuje a přijme dva protony z cytoplazmy, dále se odpoutá od RC, difunduje do lipidové

dvojvrstvy, kde uvolní získané protony i elektrony. Protony jsou transportovány do periplazmatického prostoru a elektrony jsou přeneseny cytochromem *c* zpět na speciální pár BChl *a*, který je tak redukován do výchozího stavu. Tímto cyklickým tokem elektronů vzniká protonový gradient na cytoplazmatické membráně, kdy se snižuje koncentrace protonů v cytoplazmě a naopak se zvyšuje jejich koncentrace v periplazmě. Zde probíhá fotofosforylace, kdy dochází k vyrovnávání gradientu elektrochemického potenciálu protonů a pomocí ATP syntézy vzniká ATP z molekuly ADP a fosforečnanu. Fotofosforylace je u AAP v anaerobních podmínkách snížena (YURKOV & BEATTY 1998, YURKOV & CSOTONYI 2009, ZUBKOV 2009).

Ačkoli je princip fotosyntézy AAP v podstatě shodný s anaerobní bakteriální fotosyntézou, existuje několik předpokladů, proč AAP nejsou schopny fotosyntézy v nepřítomnosti kyslíku. Například mnohonásobně vyšší redoxní potenciál primárního akceptoru Q_A u AAP by měl v podstatě znemožňovat přenos elektronů z Q_A na Q_B . Avšak redoxní potenciál je kompenzován vysokou koncentrací oxidovaného ubichinonu pocházejícího z aerobní respirace. V bezkyslíkatém prostředí by ubichinon nebyl schopen přenášet elektrony od speciálního páru BChl *a*, jelikož by se nacházel v redukovaném stavu. Nicméně tento mechanismus je stále předmětem studia (RATHGEBER et al. 2004, YURKOV & CSOTONYI 2009).

1.2.2 Pigmenty

Hlavním světlosběrným pigmentem u AAP je bakteriochlorofyl (BChl) (YURKOV & CSOTONYI 2009). Jediným typem BChl nalezeným ve všech dosud popsáných druzích AAP je BChl *a* s postranním řetězcem tvořeným fytolem stejně jako u nesírných purpurových bakterií (YURKOV & BEATTY 1998) (Obr. 2). Typický je také nízký obsah BChl *a* v buňkách, ve srovnání s nesírnými purpurovými bakteriemi je až desetkrát nižší (YURKOV & CSOTONYI 2003).



Obr. 2: Chemická struktura bakteriochlorofylu *a*

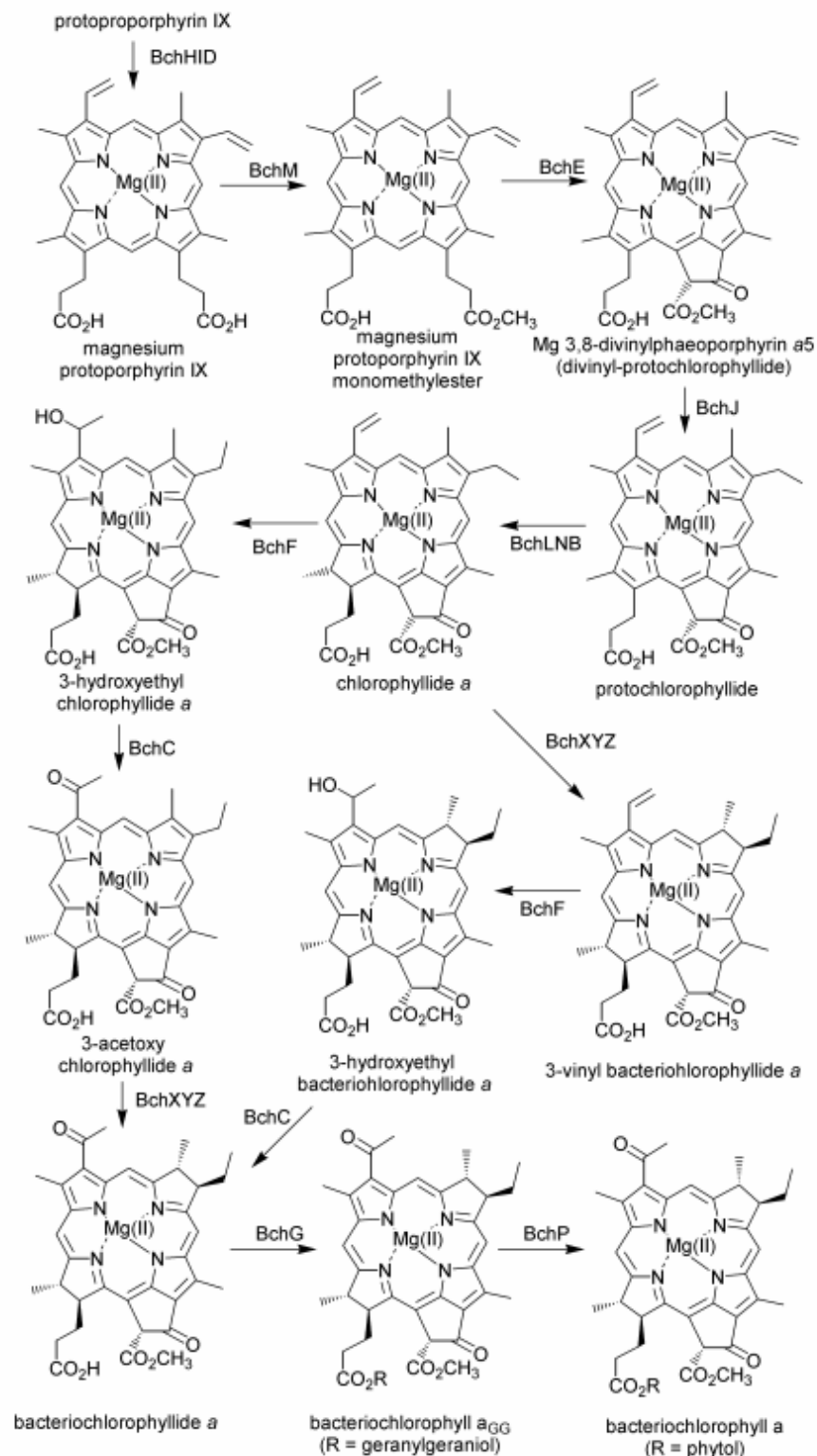
Řada druhů AAP produkuje množství karotenoidů, které určují jejich barevnou pestrost. Mnohé z těchto karotenoidů nemají světlosběrnou funkci a neúčastní se fotosyntézy (KOBLÍŽEK et al. 2003). Jsou uloženy v cytoplasmě nebo vázány v cytoplasmatické membráně či buněčné stěně (YURKOV & BEATTY 1998, KOBLÍŽEK et al. 2003) a jsou pravděpodobně využity k ochraně reakčního centra před toxickou fotooxidací při aerobní fotosyntéze (YURKOV & BEATTY 1998). Složení karotenoidů je druhově specifické, některé druhy obsahují až 20 různých typů – např. *Erythromicrobium ramosum*. Nicméně většinové zastoupení mají karotenoidy, které AAP propůjčují výrazně oranžové odstíny oproti nesírným purpurovým bakteriím (YURKOV & BEATTY 1998).

1.2.3 Syntéza bakteriochlorofylu *a* a enzym chlorofylid reduktáza

Syntéza BChl *a* začíná z jednoduchých prekurzorů glycinu a sukcinyl CoA. Prvotní kroky této biosyntetické dráhy jsou společné s biosyntetickou dráhou hemu, vitamínu B₁₂ a chlorofylu až k poslednímu společnému meziprojektu protoporfyrinu IX. Syntéza chlorofylu a BChl dále pokračuje odděleně, a to vložím hořčíku do tetrapyrolového jádra pomocí enzymu chelatázy za vzniku magnesium protoporfyrinu IX. Dráha dále pokračuje přes společné meziprojektu až k chlorofylidu *a* (Chlide *a*), odkud již pokračuje vlastní syntéza BChl *a*. Biosyntetická dráha BChl *a* je znázorněn na Obr. 3,

včetně meziproductů a genů kódujících jednotlivé enzymy (Tab. 1) (WILLOWS & KRIEGEL 2009).

Enzym chlorofylid reductáza biosyntetické dráhy BChl *a* převádí chlorofylid *a* na 3-vinyl bakteriochlorofylid *a*, skládá ze tří podjednotek X, Y, Z kódovaných geny *bchX,Y,Z*. Při jeho disfunkci dochází k akumulaci chlorofylidu *a* a jeho derivátů v buňce. Enzym byl identifikován v *Rhodobacter capsulatus* společně s enzymem protochlorofylid reductáza, jež má podobnou funkci. Enzym chlorofylid reductáza je přítomen ve všech anoxygenních fototrofních organismech včetně zelených, sirných a nesirných bakterií na rozdíl od oxygenních fototrofů (BOLLIVAR et al. 1994, WILLOWS & KRIEGEL 2009).

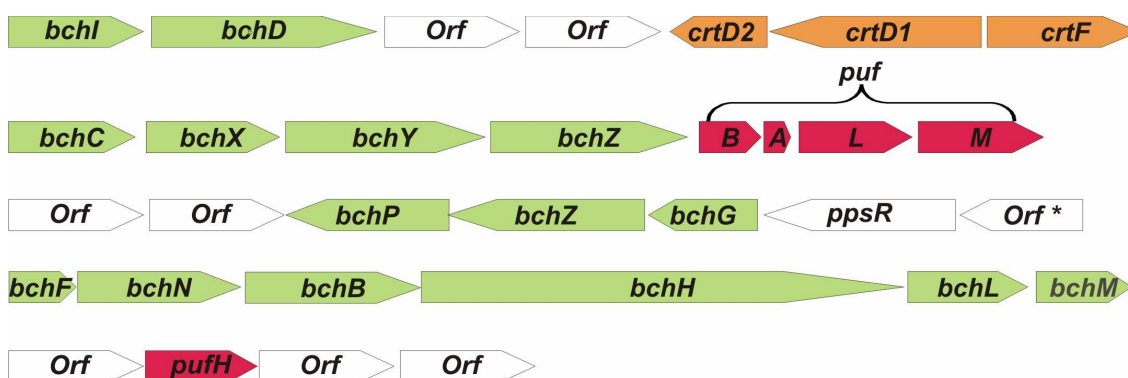


Obr. 3: Biosyntetická dráha bakteriochlorofylu *a* od protoporphyrinu IX včetně genů kódujících jednotlivé enzymy (WILLOWS & KRIEDEL 2009)

Tab. 1: Enzymy a geny biosyntetické dráhy bakteriochlorofylu *a* od protoporfyrinu IX (zpracováno dle WILLOWS & KRIEGEL 2009)

Enzym	označení genu	EC kódy enzymů
Magnesium chelatáza	<i>bchl, bchD, bchH</i>	6.6.1.1
Magnesium protoporfyrin IX: SAM O-metyltransferáza	<i>bchM</i>	2.1.1.11
Magnesium protoporfyrin IX monometyl ester oxidativní cykláza	<i>bchE, acsF</i>	1.14.13.81
Protochlorofylid reduktáza	<i>bchLNB</i>	1.18.-.-
8-vinyl reduktáza	<i>bchJ</i>	1.3.1.75
Chlorofylid reduktáza	<i>bchX, bchY, bchZ</i>	1.18.-.-
3-vinyl bakteriochlorofylid <i>a</i> hydroxyláza	<i>bchF</i>	
3-hydroxyetyl bakteriochlorofylid <i>a</i> dehydrogenáza	<i>bchC</i>	
Bakteriochlorofyl syntáza	<i>bchG</i>	2.5.1.62
Geranylgeranyl reduktáza	<i>bchP</i>	

Všechny geny účastníci se biosyntetické dráhy BChl jsou označovány předponou „*bch*“. Tyto geny jsou v genomu sdruženy do tzv. fotosyntetického genového klastru, který zahrnuje kromě genů pro biosyntézu BChl *a* také geny pro syntézu karotenoidů, podjednotek fotosyntetického aparátu *a* některé další geny *a* regulátory (Obr. 4). Organizace genů do fotosyntetického genového klastru je typické pro proteobakterie, u oxygenních fotosyntetických organismů se nevyskytuje (SWINGLEY et al. 2009).



Orf* - Coenzyme B12-binding protein

Obr. 4: Fotosyntetický genový klastr – *Erythrobacter* NAP1 (ZROTALOVÁ & KOBLÍŽEK – nepublikováno)

1.2.4 Regulace syntézy pigmentů

Hlavními faktory ovlivňujícími syntézu pigmentů jsou přítomnost kyslíku a intenzita slunečního záření (YURKOV & BEATTY 1998).

Typickým znakem AAP je potřeba přítomnosti kyslíku, která ovlivňuje syntézu BChl. Ten je produkován pouze v aerobním prostředí (HARASHIMA et al. 1980). Množství BChl je ovlivněno koncentrací kyslíku v prostředí, přičemž různé druhy AAP upřednostňují různé koncentrace kyslíku pro maximální syntézu BChl (YURKOV & CSOTONYI 2009).

Z důvodu existence různých typů karotenoidů se jejich regulace kyslíkem značně liší. V případě karotenoidů vázaných na reakční centra má koncentrace kyslíku zásadní vliv. Naopak u většiny karotenoidů neúčastnících se fotosyntézy je tento vliv velmi malý (HARASHIMA et al. 1980).

Druhým faktorem regulace syntézy pigmentů je intenzita světla. U AAP i tlumené světlo potlačuje syntézu BChl, která tedy probíhá za tmy. Důvodem může být ochrana před reaktivními formami kyslíku (YURKOV & CSOTONYI 2009).

Na syntézu pigmentů mají vliv také další faktory jako slanost, teplota či pH prostředí. AAP často produkují větší množství BChl pokud se nenachází v optimálních podmínkách pro jejich růst. Jelikož mají AAP převážně heterotrofní metabolismus, na syntézu pigmentů uplatňuje vliv také množství organického substrátu (YURKOV & CSOTONYI 2009).

1.3 Výskyt AAP

Po objevení AAP převažovala představa, že se jedná o neobvyklou skupinu bakterií vyskytující se pouze ve specifických ekologických nikách, zejména ve vodách bohatých na živiny (YURKOV & BEATTY 1998). Nicméně s rostoucím zájmem o AAP a s intenzitou výzkumu se zjistilo, že v této skupině bakterií panuje velká druhová rozmanitost a stále dochází k popisu nových druhů z různých prostředí. AAP byly nalezeny prakticky ve všech ekosystémech, které byly na jejich přítomnost zkoumány.

AAP byly objeveny nejen v mořských vodách, ale též ve vodách volného oceánu (KOBÍLÍZEK et al. 2003, YURKOV & CSOTONYI 2003, COTTRELL et al. 2006), v sladkovodním prostředí, eutrofním i oligotrofním (MAŠÍN et al. 2008, YURKOV & CSOTONYI 2009). Nyní tvoří AAP funkční skupinu bakterií představující téměř desetinu mikroorganismů obývajících eufotickou zónu světových moří a jsou důležitou součástí mořského koloběhu uhlíku (YURKOV & CSOTONYI 2009).

Výzkum AAP se soustředil i mimo vodní prostředí a do zdánlivě nepříznivých prostředí pro ostatní mikrobiální populaci. V Japonsku byly izolovány dva půdní druhy *Craurococcus roseus* a *Paracraurococcus ruber* (SAITOH et al. 1998) a nedávno byly AAP objeveny také v půdních krustách v Kanadě (CSOTONYI et al. 2010). Přítomnost AAP byla prokázána v hypersalinních jezerech Austrálie (SUZUKI et al. 1999a, SUZUKI et al. 1999b), v na živiny bohatých mikrobiálních nárostech (YURKOV & CSOTONYI 2003), v kyselých vodách odpadního důlního systému a v kyselých termálních pramenech v Japonsku (WAKAO et al. 1996), v termálních pramenech o teplotě 50°C v Japonsku a Portugalsku (HANADA et al. 1997, RAINEY et al. 2003) a překvapivě i v blízkosti hlubokomořských hydrotermálních vývěrů v hloubce kolem 2000 m v Tichém oceánu (YURKOV et al. 1999).

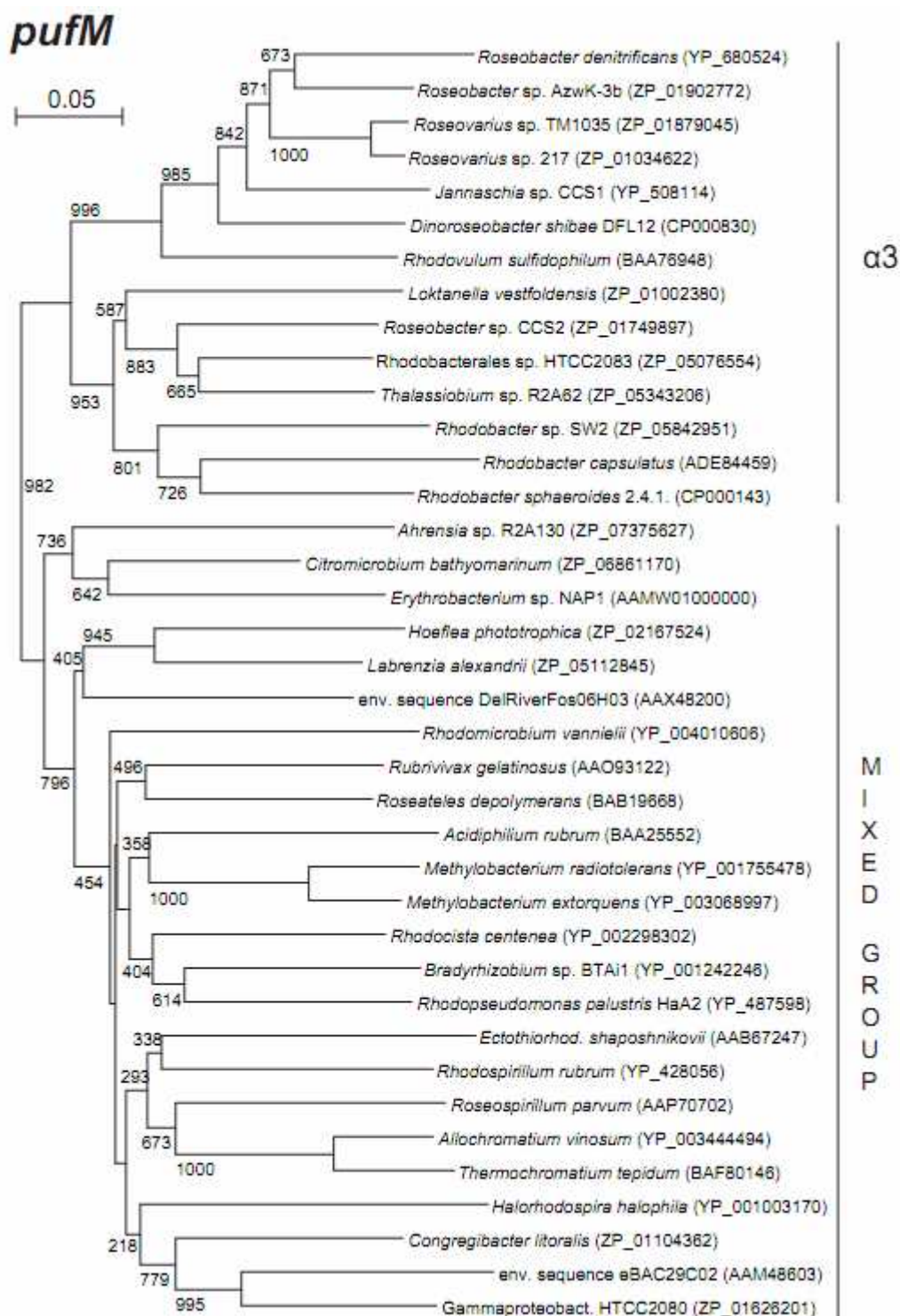
V České republice byly AAP nalezeny v různých sladkovodních prostředích - v lomu Velká Amerika, v pískovně Cep a v šumavských jezerech Plešné a Čertovo jezero, kde AAP tvoří přes polovinu bakteriální biomasy. Dále pak v menším množství ve vodních nádržích Slapy a Římov, v mezotrofním jezeře Radnice a pískovně Tušů. Menší množství bylo nalezeno v řekách Lužnice a Vltava. (MAŠÍN et al. 2008)

1.4 Genetická analýza

Ke sledování výskytu AAP v přírodním prostředí se využívá různých metod a přístupů jako například infračervená mikroskopie, infračervená fluorometrie, pigmentová analýza HPLC a molekulární fylogenetická analýza DNA. K molekulární analýze anoxygenních fototrofních bakterií v různých prostředích byly hojně využívány primery pro gen *pufM*, kódující M podjednotku reakčního centra II, které je typické pro

všechny purpurové bakterie. Gen *pufM* se však vyskytuje pouze v proteobakteriích a fylogenetická analýza na základě tohoto genu bohužel dobře neodpovídá příbuznosti podle 16S rRNA (BÉJA et al. 2002, YUTIN et al. 2005) (Obr. 5).

K detekci přítomnosti anoxygenních fototrofů v přírodních vzorcích je nejvhodnější zvolit geny pro enzym chlorofylid reduktázu - geny *bchXYZ*, což je jediný enzym z unikátní dráhy pro BChl *a*, který je přítomný ve všech anoxygenních fototrofních organismech včetně zelených, sirných a nesirných bakteriích na rozdíl od oxygenních fototrofů a není v některých genomech přítomen v mnoha kopiích jako geny *bchF* a *bchG*. Analýza X, Y a Z podjednotek chlorofylid reduktázy ukázala, že pouze Y podjednotka kódovaná genem *bchY* obsahuje konzervativní sekvenci odlišující tento protein od příbuzných homologů. Tudíž gen *bchY* byl zvolen jako univerzální marker pro anoxygenní fotosyntézu (YUTIN et al. 2009).



Obr. 5: Fylogenetická analýza hlavních zástupců AAP na základě genu *pufM* (Neighbor-joining, Bootstrap 1000) (KOBLÍŽEK – nepublikováno)

2. Cíle práce

1. Navržení specifických primerů pro gen *bchY* chlorofylid reduktázy.
2. Amplifikace genu *bchY* u vybraných izolovaných kmenů AAP.
3. Genetická analýza *bchY* genů u přirozených společenstev ve vybraných sladkovodních lokalitách.

3. Materiál a metody

Sledované geny:

Byl analyzován gen *bchY* kódující Y podjednotku enzymu chlorofylid reduktázy, který je součástí biosyntetické dráhy bakteriochlorofylu *a*.

Lokality:

Navržený set primerů byl testován při fylogenetické analýze mikrobiálního společenstva v přírodních vzorcích horských jezer v Tyrolských Alpách (Rakousko) a jejich základní charakteristiky jsou popsány v tabulce (Tab. 2, Tab. 3)

Tab. 2 Charakteristika lokalit (ČUPEROVÁ et al. 2011)

Název	Nadmořská výška (m.n.m.)	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Maximální hloubka (m)	Rozloha (ha)	Plocha povodí (ha)
Vysokohorská jezera						
Gossenköllesee (GKS)	2417	47°13′	11°00′	9,9	1,7	30
Oberer Plenderlesee (OPL)	2344	47°12′	11°02′	7,5	2,1	97
Jezera na hranici lesa						
Drachensee (DRA)	1874	47°02′	10°56′	24	4,5	188
Jezera pod hranicí lesa						
Achensee (ACH)	929	47°27′	11°42′	133	680	10 500
Piburgersee (PIB)	913	47°11′	10°53′	24,6	13,4	265

Tab. 3 Charakteristika lokalit (ČUPEROVÁ et al. 2011)

Název	Datum odběru	Teplota (°C)	pH	DOC (mg.L ⁻¹)	Chla (µg.L ⁻¹)
Vysokohorská jezera					
Gossenköllesee (GKS)	12.8.2009	12,9	7,24	0,38	1,04
Oberer Plenderlesee (OPL)	10.8.2009	10	7,08	0,31	0,69
Jezera na hranici lesa					
Drachensee (DRA)	11.8.2009	12,6	8,12	0,38	0,69
Jezera pod hranicí lesa					
Achensee (ACH)	14.8.2009	19,2	8,41	1,4	1,44
Piburgersee (PIB)	13.8.2009	22,2	8,15	2,3	2,43

Odběr a filtrace vzorků vody z lokalit:

Voda z lokalit byla odebrána ze tří hloubek eufotické zóny pomocí Schindler-Patalas odběráku. Pro potřeby analýzy DNA byl vytvořen integrální vzorek vody. Filtrace vzorků vody na analýzu DNA byla provedena v terénní laboratoři u jezera Gossenköllesee v co možná nejrychlejším čase od vzorkování jezer (max. 3 hodiny). Voda z jezer o objemu 500 ml byla pomocí vakuové pumpy filtrována na polykarbonátový filtr (0,2 μm ; Whatman, USA), který byl uložen v mrazicím boxu (-20 °C) a následně zpracován v laboratoři Mikrobiologického ústavu AVČR Třeboň (MBÚ Třeboň). Odběr i filtrace byly provedeny Mgr. Zuzanou Čuperovou (MBÚ Třeboň).

Izolace DNA:

Izolace přírodní směsné DNA byla prováděna dle ZHOU et al. 1996:

Do sterilní 2 ml mikrozkušavky vložíme filtr se směsnou DNA a přidáme 0,25 g skleněných kuliček, 500 μl TENP pufru, 500 μl fenol-chloroform-isoamylalkoholu (25:24:1, ROTH), 60 μl 25 % SDS a vortexujeme 5 až 10 minut. Dále vzorek inkubujeme 10 minut při 60 °C v termo bloku a poté 1 minutu na ledu. Vzorek centrifugujeme při 4 °C (6 minut, 10 000 rpm). Odebereme vrchní fázi do nové sterilní mikrozkušavky, přidáme 500 μl fenol-chloroform-isoamylalkoholu (25:24:1) a opatrně vzorek převracíme. Poté opět centrifugujeme při 4 °C (6 minut, 10 000 rpm) a pokud jsou na rozhraní obou fází viditelné sraženiny, předchozí bod opakujeme do úplného pročištění. K přečištěné fázi přidáme 120 μl 3M Na-acetátu, 1 ml 96% etanolu, opatrně promícháme a uložíme vzorek v mrazicím boxu na nejméně 1,5 hodiny (precipitace DNA). Poté vzorek centrifugujeme při 4 °C (60-90 minut, 13 000 rpm). Pipetou opatrně odstraníme supernatant, k peletu přidáme 850 μl 80% etanolu a vzorek inkubujeme 10 minut na ledu. Opatrně promícháme a opět centrifugujeme při 4 °C (15 minut, 13 000 rpm). Supernatant odstraníme a pelet vysušíme (1 hodinu při pokojové teplotě). Poté pelet rozpustíme v 50 μl PCR vody a extrahovanou DNA uložíme v hluboko mrazicím boxu (-80 °C).

K izolaci kultur AAP byl použit RTP Bacteria DNA Mini Kit (Invitex, Německo).

Návrh reverzních primerů:

Znamé sekvence genu *bchZ* vybraných AAP byly získány z databáze National Center for Biotechnology Information (NCBI) vyhledáváním nukleotidových sekvencí službou BLASTN byly alignovány pomocí programu ClustalX 2.0.9 (Conway Institute UCD Dublin, Irsko).

Pro alignment byly použity nukleotidové sekvence genu *bchZ* těchto organismů: *Methylobacterium radiotolerans* (CP001001), *Halorhodospira halophila* (CP000544), *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. (CP000143), *Bradyrhizobium* BTAi1 (NC 009485), *Roseovarius* sp. TM1035 (ABCL01000003), *Jannaschia* sp. CCS1 (CP000264), *Roseobacter denitrificans* (CP000362), *Roseobacter* sp. CCS2 (AAYB01000001), *Roseovarius* sp. 217 (AAMV01000001), Uncultured proteobacterium DelRiverFos13D03 (AY912081), *Roseobacter* sp. AzwK3b (ABCR01000004), *Congregibacter litoralis* (AAOA01000014), Uncultured proteobacterium DelRiverFos06H03 (AY912082), Uncultured proteobacterium eBACred25D05 (AY671989), Marine gamma proteobacterium HTCC2080 (AAVV01000005), Uncultured marine proteobacterium clone EBAC000-29C02 (AE008920), *Methylobacterium populi* (CP001029), *Methylobacterium* sp. 4-46 (CP000943), *Dinoroseobacter shibae* (CP000830), Uncultured marine proteobacterium clone EBAC000-60D04 (AE008921), *Rhodopseudomonas palustris* (NC 005296), *Rhodospirillum centenum* (CP000613), Uncultured marine proteobacterium clone EBAC000-65D09 (AE008919), *Rhodobacter capsulatus* (Z11165), *Rhodospirillum rubrum* (AF018954), *Loktanella vestfoldensis* (AAMS01000002), *Erythrobacter longus* (AB035570), *Erythrobacter* sp. NAP1 (AAMW01000003), *Methylocella silvestris* (CP001280), *Rubrivivax gelatinus* (AB034704), *Roseobacter litoralis* (ABIG01000015).

Amplifikace genu *bchY*, vizualizace a purifikace PCR produktu:

Metoda PCR byla použita s následujícími parametry: TC-3000 Cyclyer (Techne, Velká Británie), úvodní denaturace 94°C 4 min., následně 35 cyklů: 1 min. denaturace při 94°C., 1 min. nasedání při 54°C, 2 min. extenze 68°C a závěrečná extenze 10 min. 68°C. Reakční směs obsahovala 10 µl JumpStart REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma, USA), 0,4 µl 20µM primerů forward a reverse, 0,5 µl templátové DNA a DEPC H₂O do objemu 20 µl. Při úspěšné amplifikaci byla PCR reakce opakována v objemu 70 µl se zachováním všech parametrů a poměru všech reagensů. Primery syntetizovala firma Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika).

Výsledné PCR produkty byl vizualizovány pomocí agarosové elektroforézy a UV lampy s parametry: 1% Tris-acetát-EDTA agarosový gel obarvený 0,5 µg/ml ethidium bromidem, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas Inc., Kanada), EC300XL2 (Thermo Scientific, USA) 80 V, 60 min.

PCR produkt byl purifikován dle návodu pomocí Gen Elute PCR Clean-Up Kit NA1020 (Sigma, USA):

Vložíme GenElute Miniprep Binding Column do potřebného počtu 2 ml mikrokumavek a přidáním 0,5 ml Column Preparation Solution zvýšíme vazbu DNA k membráně. Poté centrifugujeme (1 min., 12 000 rpm) a odstraníme eluát. K PCR produktu přidáme Binding Solution v poměru 5:1 a směs přeneseme do kolonky. Centrifugujeme (1 min., 12 000 rpm), odstraníme eluát a kolonku vložíme zpět do mikrokumavky. Přidáme 0,5 ml dle návodu zředěného Wash Solution, centrifugujeme (1min., 12 000 rpm), odstraníme eluát a opět vložíme kolonku do mikrokumavky. Centrifugujeme bez přidání jakékoli látky (2min., 12 000 rpm) a odstraníme eluát i s mikrokumavkou. Kolonku vložíme do nové 2 ml mikrokumavky, přidáme 50 µl Elution Solution a inkubujeme v 18°C (1 min). K uvolnění DNA do mikrokumavky centrifugujeme (1min., 12 000 rpm) a přečištěný PCR produkt uložíme v -20°C.

Stanovení koncentrace DNA:

Konečná koncentrace purifikovaného PCR produktu byla měřena dle instrukcí na přístroji Quant-iT dsDNA Assay Kit (Invitrogen, USA) na základě fluorescence a od roku 2010 na přístroji Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) na základě absorpčního spektra.

Klonování:

Při klonování bylo postupováno dle instrukcí pGEM-T and pGEMT-T Easy Vector Systems (Promega, USA). Ligační směs obsahovala: 5 μ l 2x Rapid Ligation Buffer, 1 μ l pGEM-T Easy Vector (50ng), 2 μ l přečištěného PCR produktu (DRA 93 ng/ μ l, PIB 115,5 ng/ μ l), 1 μ l T4 DNA Ligase a 1 μ l DEPC H₂O a byla inkubována přes noc v 7°C pro zvýšení účinnosti transformace.

Pro výrobu LB ploten s ampicilinem, IPTG a X-Gal bylo použito 15 g agaru na 1 l LB media (10 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-yeast extrakt, 5 g NaCl), směs se dále autoklávovala a nechala zchladnout na 50°C. Médium se rozlije po 25 ml do Petriho misek a poté se přidá do každé misky 25 μ l 100 μ g/ml ampicilinu. Po ztuhnutí média v miskách rozprostře se po celém povrchu 100 μ l 0,1M IPTG a 20 μ l 50mg/ml X-Gal, necháme zaschnout a inkubujeme 30 min. při 37°C

Transformační protokol byl použit dle dodaného návodu s použitím SOB media (2 g Bacto-tryptone, 0,5 g Bacto-yeast extrakt, 1 ml 1M NaCl, 0,25 ml 1M KCl, 1 ml 2M Mg²⁺) a vysoce kompetentních buněk *Escherichia coli* (chemikompetentní DH5 α , připraveny Mgr. Čuperovou Zuzanou MBÚ Třeboň).

Úspěšné zaklonování insertu do pGEM-T Easy Vector narušilo kódující sekvenci genu *lacZ* β -galaktosidázy a rekombinantní klony byly identifikovány po výsevu na LB plotny s ampicilinem, IPTG a X-Gal na základě barevné odlišnosti. Pozitivní kolonie byly přeočkovány na plotny s očíslovanými mřížkami a inkubovány přes noc v 37°C. Jednotlivé narostlé kolonie byly přeočkovány do mikrotitračních destiček (30 μ l DEPC H₂O do každé komůrky) a uloženy do -20°C na 30 min.

Následným rozmrznutím jsme získali templát pro ověření pozitivitu pomocí kontrolní PCR reakce s primery pro použitý vektor – T7-promotor 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3' a SP6 5'- GAT TTA GGT GAC ACT ATA G– 3'.

PCR reakce byla použita s následující parametry: TC-3000 Cycler (Techne, Velká Británie), úvodní denaturace 94°C 4 min., následně 32 cyklů: 1 min. denaturace při 94°C., 45 s nasedání při 45°C, 1,5 min. extenze 72°C a závěrečná extenze 10 min. 72°C. Reakční směs obsahovala 5 µl 10x PCR pufr bez MgCl₂, 8 µl 25mM MgCl₂, 0,2 µl Taq DNA Polymeráza (5U/µl), 5 µl 2,5mM dNTPs, 0,86 µl 20µM primerů T7 a SP6, 5 µl templátové DNA a DEPC H₂O do objemu 50 µl.

Sekvenování:

Pro sekvenační reakci bylo třeba 10 µl každého PCR produktu o koncentraci 50-2500 ng/µl a 2 µl 10 pmol každého primeru na jeden vzorek. Automatická sekvenování byla zpracována společnostmi StarSEQ (Německo), Středisko sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu AV ČR Praha a Macrogen (Soul, Korea).

Zpracování sekvenačních dat:

Všechny obdržené sekvence byly ručně kontrolovány v programu Chromas 1.5 (Technelysium, Austrálie), nepoužitelná sekvenační data byla odstraněna a vybrané sekvence byly porovnány s databází NCBI vyhledáváním nukleotidových sekvencí službou BLASTN zda se jedná o sekvence příbuzné podjednotce Y chlorofylid reduktázy. Webovou utilitou EMBOSS-transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>) bylo ověřeno, zda jsou sekvence přeložitelné do aminokyselin bez chyb. Pomocí programu ClustalX 2.0.9 (Conway Institute UCD Dublin, Irsko) byly spojeny sekvence získané forward a reverse primery, výsledné sekvence byly přeloženy do sekvence aminokyselin pro ověření jejich správnosti webovou utilitou EMBOSS-transeq a porovnány se známými sekvencemi z databáze NCBI proteinovým vyhledáváním BLASTP.

Fylogenetická analýza:

Upravená sekvenční data byla převedena do sekvence aminokyselin v programu EMBOSS-transeq a v programu ClustalX 2.0.9 (Conway Institute UCD Dublin, Irsko) byl proveden alignment a následně byl vytvořen jeden fylogenetický stromy z izolovaných kmenů AAP a již známých proteinových sekvencí AAP získaných z databáze NCBI a druhý z proteinových sekvencí klonů DRA a PIB a již známých proteinových sekvencí AAP získaných z databáze NCBI. Byla použita klastrovací metoda Neighbor-joining s ověřovací metodou Bootstrap (1 000). Získaná data byla dále upravena a vizualizovaná v programech NJPlot Win95 (PERRIÈRE & GOUY 1996) a TreeView 1.6.6 (Roderic D. M. Page, Velká Británie).

Pro fylogenetickou analýzu izolátů AAP byly použity tyto proteinové sekvence podjednotky Y z databáze NCBI: *Rhodobacter* SW2 (ZP 5842945), *Roseobacter* AzwK-3b (ZP 01902778), *Roseovarius* TM1035 (ZP 01879051), *Roseovarius* 217 (ZP 01034628), *Roseobacter litoralis* Och149 (ZP 02142890), *Roseobacter denitrificans* Och114 (YP 680531), *Loktanella vestfoldensis* SKA53 (ZP 01002374), *Jannaschia* CCS1 (YP 508120), *Dinoroseobacter shibae* DFL12 (YP 001534852), *Rhodobacter sphaeroides* 241 (YP 353336), *Rhodobacter capsulatus* SB1003 (YP 003576860), *Rhodocista centenea* SW (YP 002298297), *Rhodopseudomonas palustris* BisA53 (YP 780260), *Citromicrobium bathyomarinum* JL354 (ZP 06861175), *Rubrivivax gelatinosus* (AAO93117), *Erythrobacter* NAP1 (ZP 01041662), *Erythrobacter longus* (BAA96511), *Rhodomicrobium vannielii* ATCC17100 (YP 004010600), *Bradyrhizobium* BTAi1 (YP 001242252), *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831 (YP 001755484), *Hoeflea phototrophica* DFL43 (ZP 02167518), *Congregibacter litoralis* KT71 (ZP 01104366), *Gammaproteobacterium* HTCC2080 (ZP 01626205), *Allochromatium vinosum* DSM180 (YP 003444503), *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170 (YP 428061), *Halorhodospira halophila* SL1 (YP 001003175).

Pro fylogenetickou analýzu kmenů DRA a PIB byly použity tyto proteinové sekvence podjednotky Y z databáze NCBI: Hypothetical protein GOS Venter 1106120 (EDE57947), Hypothetical protein GOS Venter 409986 (EDI57219), Hypothetical

protein GOS Venter 1682787 (EDJ50967), Uncultured proteobacterium DelRiverFos06H03 (AAX48205), Uncultured proteobacterium eBACred25D05 (AAT90311), Uncultured proteobacterium DelRiverFos13D03 (AAX48168), Uncultured marine proteobacterium eBAC65D09 (AAL76353), Uncultured marine proteobacterium eBAC60D04 (AAM48654), Uncultured marine proteobacterium eBAC29C02 (AAM48599), *Betaproteobacterium* VA01, *Rhodobacter* SW2 (ZP 05842945), *Roseovarius* TM1035 (ZP 01879051), *Roseobacter denitrificans* OCh114 (YP 680531), *Loktanella vestfoldensis* SKA53 (ZP 01002374), *Jannaschia* CCS1 (YP 508120), *Dinoroseobacter shibae* DFL12 (YP 001534852), *Rhodobacter sphaeroides* 241 (YP 353336), *Rhodobacter capsulatus* SB1003 (YP 003576860), *Rhodocista centenea* SW (YP 002298297), *Rhodopseudomonas palustris* BisA53 (YP 780260), *Citromicrobium bathyomarinum* JL354 (ZP 06861175), *Rubrivivax gelatinosus* (AAO93117), *Erythrobacter* NAP1 (ZP 01041662), *Rhodomicrobium vanniellii* ATCC17100 (YP 004010600), *Bradyrhizobium* BTAi1 (YP 001242252), *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831 (YP 001755484), *Hoeflea phototrophica* DFL43 (ZP 02167518), *Congregibacter litoralis* KT71 (ZP 01104366), *Allochromatium vinosum* DSM180 (YP 003444503), *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170 (YP 428061), *Halorhodospira halophila* SL1 (YP 001003175).

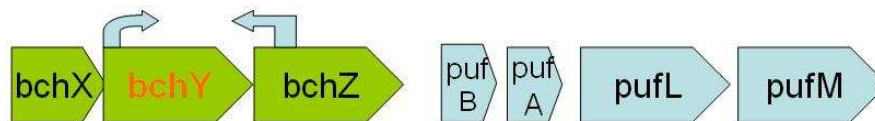
4. Výsledky

4.1 Testování publikovaných primerů

Pro gen *bchY* chlorofylid reduktázy byl v roce 2009 publikován návrh primerů Yutin a kolektivem: *bchY_fwd* 5'- CCN CAR WSN ATG TGY CCN GCN TTY – 3' a *bchY_rev* 5'- GGR TCN RCN GGR AAN ATY TCN CC – 3'. Velikost PCR produktu amplifikovaného těmito primery je 510 bp (YUTIN et al. 2009). Tyto primery byly testovány PCR s teplotou nasedání 52°C na vlastních vybraných izolovaných kmenech AAP: NAP1 *Erythrobacter* sp., BS110 *Roseobacter* sp., B11 *Roseobacter*, VA01 *Betaproteobacterium*, Chep-kr *Rhodobacterales*, Zelen-kr *Rhodobacterales*. Amplifikací těmito primery jsme získali požadovaný PCR produkt u všech testovaných kmenů, nicméně u kmenů BS110 *Roseobacter* sp., B11 *Roseobacter*, Chep-kr *Rhodobacterales*, Zelen-kr *Rhodobacterales* jsme získali větší množství nespecifických produktů, především výrazný pás o velikosti přibližně 400 bp.

4.2 Návrh primerů a jejich testování

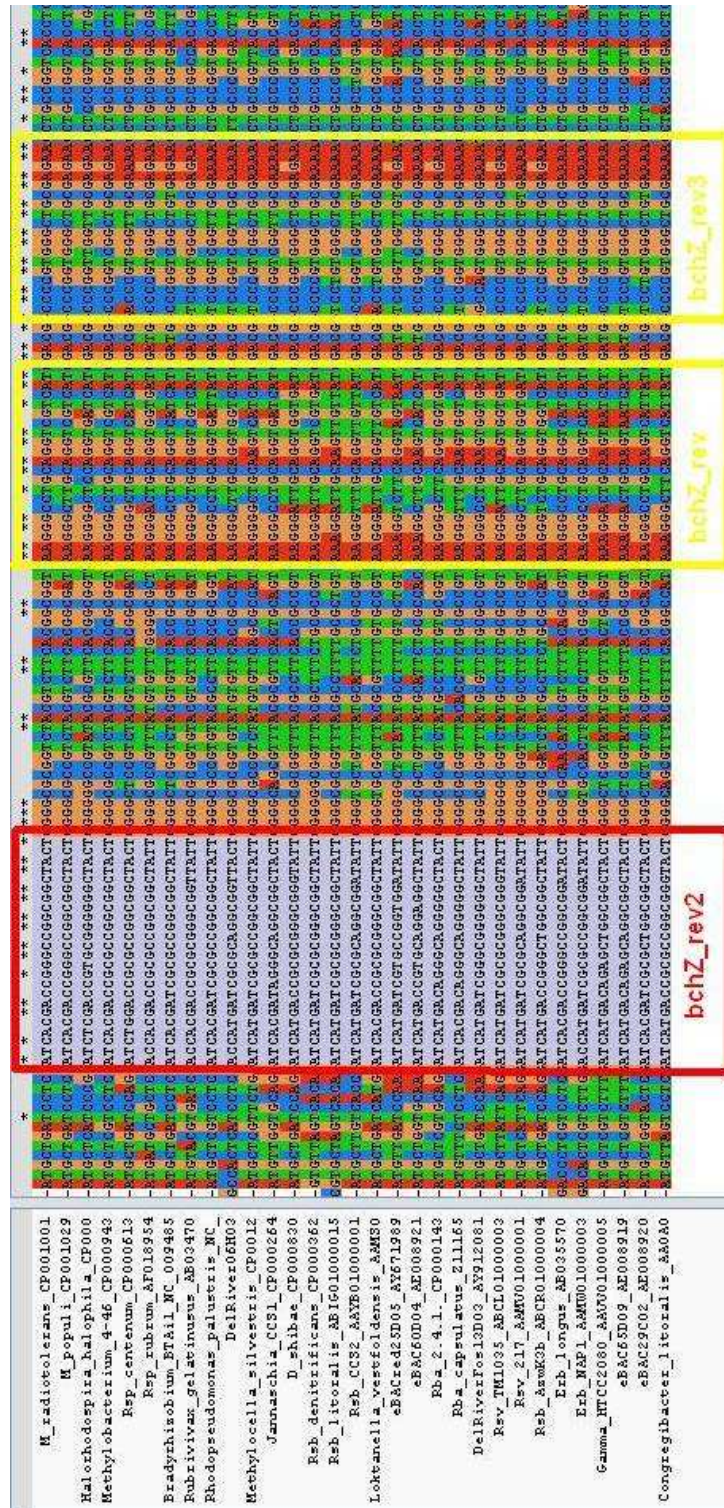
Vzhledem k tomu, že sekvence amplifikované pomocí publikovaných primerů byly poměrně krátké, přistoupili jsme k návrhu vlastních univerzálnějších reverzních primerů pro gen *bchY*. Jelikož se geny *bchX*, *bchY* a *bchZ* nachází v jednom operonu, bylo možné navrhnout reverzní primery na počátku genu *bchZ* (Obr. 6). Známé nukleotidové sekvence genu *bchZ* vybraných AAP byly získány z databáze NCBI a alignovány. Nejvyhovující konzervované oblasti vhodné pro navržení reverzního primeru genu *bchY* byly nalezeny na počátku sekvence kódující podjednotku Z a byly tedy navrženy tři degenerované reverzní primery: *bchZ_rev* 5'- ATV AYN ACY TGM ARN CCY TT – 3', *bchZ_rev2* 5'- ART ABC CSC CNG CNC KRT CRW GRT – 3', *bchZ_rev3* 5'- TTY TCR CAR CCS ACV GGD – 3'. (Obr. 7)



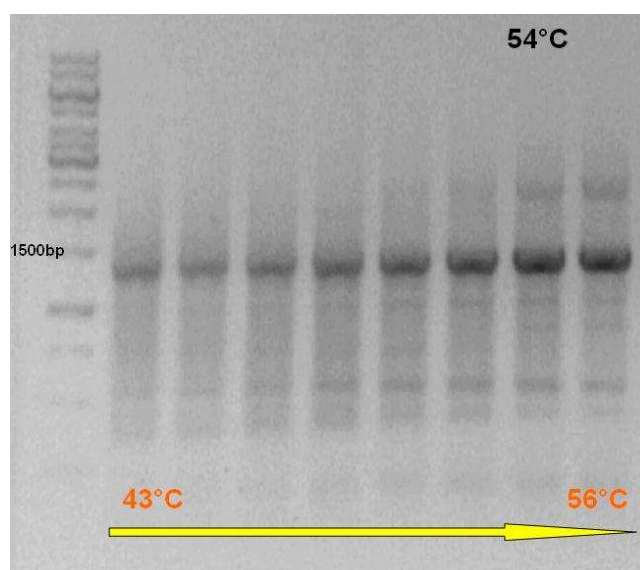
Obr. 6: Geny bchX, bchY a bchZ v operonu chlorofylid reduktázy biosyntetické dráhy BChl *a* a schématické znázornění návrhu primerů

K nalezení optimálních podmínek amplifikace byly nově navržené primery testovány pomocí gradientové PCR. Postupně byly ověřeny všechny nové primery bchZ_rev, bchZ_rev2, bchZ_rev3 v kombinaci s dříve publikovaným primerem bchY_fwd (YUTIN et al. 2009). Reakční směs obsahovala 10 μ l JumpStart REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma), 20 μ M primerů forward a reverse, 0,5 μ l templátové DNA a DEPC H₂O do objemu 20 μ l. Parametry PCR byly následující: úvodní denaturace 94°C 4 min., následně 35 cyklů: denaturace 94°C 1 min., teplota nasedání byla zvolena od 43°C do 60°C po krocích asi 1,43°C vzhledem k parametrům použitých primerů, extenze 68°C 2 min. a závěrečná extenze 68°C 10 min, přístroj MJ Mini Personal Thermal Cycler (BIO-RAD). Pro gradientovou PCR byly použity izoláty AAP: Chep-kr *Rhodobacterales*, COL2P *Roseobacter*, SL25 *Roseovarius* sp., BS110 *Roseobacter* sp., NAP1 *Erythrobacter* sp., F6-06 *Rhodobacter*, *Rhodobacter. sphaeroides*.

Největší úspěšnost byla prokázána u kombinace publikovaného primeru bchY_fwd (YUTIN et al. 2009) a navrženého primeru bchZ_rev2 s teplotou nasedání primerů 54°C. Velikost amplifikovaného PCR produktu je asi 1500 bp, který zahrnuje téměř kompletní sekvenci genu *bchY* pro podjednotku Y chlorofylid reduktázy na rozdíl od 510 bp amplifikovaných publikovanými primery. (Obr. 8)



Obr. 7: Alignment vybraných sekvencí podjednotky Z enzymu chlorofylid reduktázy s vyznačením míst, kde byly návrženy reverzní primery (zpracováno v programu ClustalX 2.0.9)

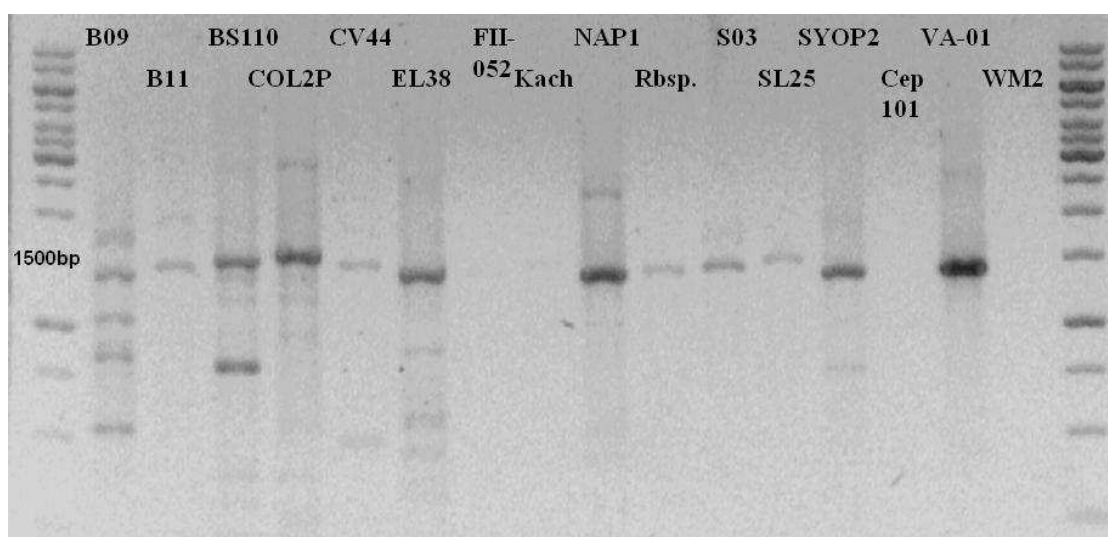


Obr. 8: Gradientová PCR

Kmen NAP1 *Erythrobacter* sp. s kombinací primerů bchY_fwd a bchZ_rev2 s rozsahem teplot nasedání 43-56°C, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas Inc., Kanada).

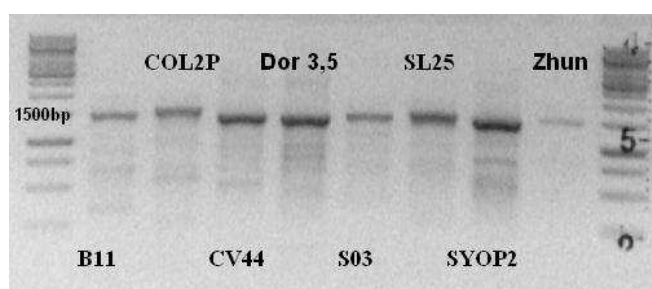
4.2 Amplifikace genu *bchY* u vybraných kmenů AAP

Po zvolení nejvhodnější kombinace primerů bchY_fwd 5'- CCN CAR WSN ATG TGY CCN GCN TTY – 3' a bchZ_rev2 5'- ART ABC CSC CNG CNC KRT CRW GRT – 3' a optimálních podmínek PCR reakce byla testována amplifikace gen *bchY* u 18 vybraných izolátů AAP: B09 *Roseobacter*, B11 *Roseobacter*, BS110 *Roseobacter* sp., COL2P *Roseobacter*, CV44 *Citromicrobium* sp., EL38 *Staleyia guttiformis*, FII-052 *Rhodobacter*, Kach α -4 *proteobacterium*, NAP1 *Erythrobacter* sp., *Rhodobacter sphaeroides*, S03 *Roseobacter* sp., SL25 *Roseovarius* sp., SYOP2 *Roseobacter* sp., Cep101 α -4 *proteobacterium*, VA-01 *Betaproteobacterium*, WM2 *Rhodobacterales*, Dor-3,5 *Roseinatronobacter* sp., Zhun-kr *Roseobacter*. (Obr. 9, Obr. 10)



Obr. 9: Amplifikace genu *bchY* u vybraných kmenů AAP

Použité primery *bchY_fwd* a *bchZ_rev2*, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas Inc., Kanada)



Obr. 10: Reamplifikace genu *bchY* u vybraných kmenů AAP

Použité primery *bchY_fwd* a *bchZ_rev2*, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas Inc., Kanada)

Amplifikace u izolátů AAP byla provedena opakovaně a 14 PCR produktů o koncentraci vyšší než 50 ng/μl byly čtyřikrát odeslány na sekvenaci, přičemž nejlepší sekvenční data byla získána z posledních dvou sekvenací u společnosti MacroGen (Soul, Korea), která byla dále použita pro fylogenetickou analýzu. Ostatní nepřilíš zdařilé sekvence byly použity pouze pro kontrolu či doplnění.

4.3 Amplifikace genu *bchY* z přírodní směsné DNA

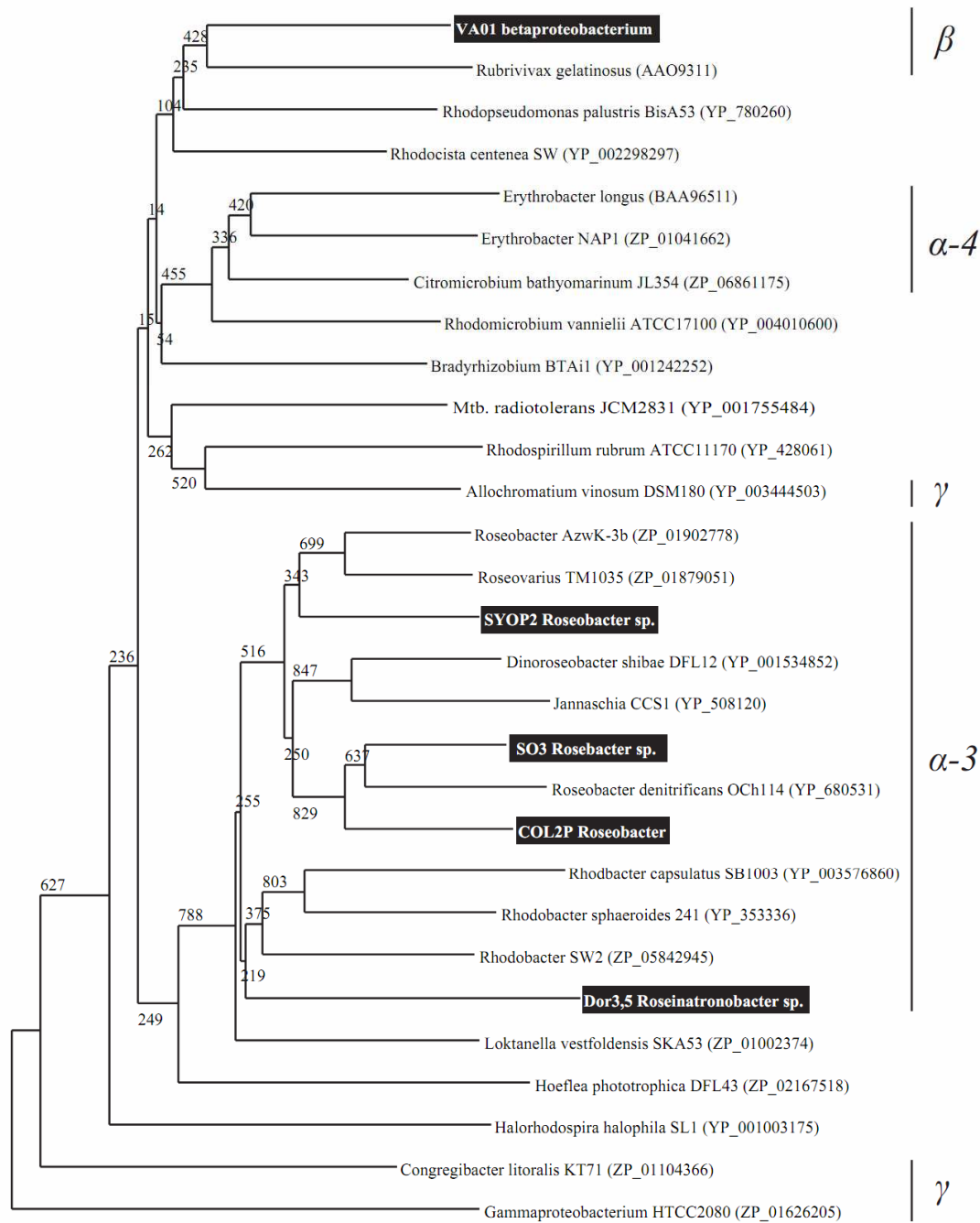
Kombinace primerů *bchY_fwd* a *bchZ_rev2* a optimální podmínky PCR reakce byly použity také pro amplifikaci genu *bchY* z přírodní směsné DNA z pěti jezer Tyrolských Alp (Tab. 2, Tab. 3). Amplifikace byla neúspěšná pouze u jezera Gossenköllesee (GKS). Pro následné klonování byla zvolena jezera Drachensee (DRA), nacházející se na hranici lesa, a Piburgersee (PIB), ležící pod hranicí lesa – subalpinské jezero. PCR produkty použité na klonování měly koncentraci DRA 93 ng/μl a PIB 115,5 ng/μl. 78 bílých pozitivních kolonií z Drachensee a 63 kolonií z Piburgersee bylo přeočkovány na plotny s očíslovanými mřížkami a na sekvenaci bylo odesláno 17 pozitivních klonů z jezera Drachensee a 23 pozitivních klonů z jezera Piburgersee.

4.4 Fylogenetická analýza

Použitelná sekvenční data byla dále zpracována a byly získány částečné nukleotidové sekvence genu *bchY* u těchto šesti kmenů AAP: 1305 bp VA01 *Betaproteobacterium*, 594 bp Dor3,5 *Roseinatronobacter* sp., 1290 bp COL2P *Roseobacter*, 1278 bp SO3 *Roseobacter* sp., 879 bp SYOP2 *Roseobacter* sp., 702 bp SL25 *Roseovarius* sp. Získaná data byla po překladu do aminokyselin použita k fylogenetické analýze izolovaných kmenů AAP srovnáním s proteinovými sekvencemi podjednotky Y chlorofylid reduktázy vybraných AAP získaných z databáze NCBI. (Obr. 11)

bchY

0.05



Obr. 11: **Fylogenetická analýza vybraných izolovaných kmenů AAP na základě genu *bchY* (Neighbor-joining, Bootstrap 1000)**

Ze sekvenačních dat přírodní směsné DNA bylo získáno 11 částečných nukleotidových sekvencí 1332-1341 bp z jezera Drachensee a 18 částečných nukleotidových sekvencí 1332-1377 bp z jezera Piburgersee. Tato data byla přeložena do aminokyselin a použita k fylogenetické analýze přírodní směsné DNA horských jezer srovnáním s proteinovými sekvencemi podjednotky Y chlorofylid reduktázy vybraných AAP získaných z databáze NCBI. (Obr. 12)

5. Diskuze

Cílem této práce byl návrh specifickými primery pro gen *bchY* chlorofylid reduktázy biosyntetické dráhy bakteriochlorofylu *a* a použití tohoto genu jako molekulárního markeru pro detekci aerobních anoxygenních fototrofů a pro fylogenetickou analýzu vybraných izolovaných kmenů AAP a mikrobiálního společenstva vybraných lokalit.

Z navržených univerzálních reverzních primerů a publikovaných primerů byla vybrána nejvhodnější kombinace publikovaného primeru *bchY_fwd* (YUTIN et al. 2009) a reverzního primeru *bchZ_rev2* pro podjednotku Y enzymu chlorofylid reduktázy biosyntetické dráhy bakteriochlorofylu *a* a byl získán vhodný univerzální marker pro detekci aerobních anoxygenních fototrofů z přírodních vzorků vody. Geny *bchX*, *bchY* a *bchZ* chlorofylid reduktázy jsou řazeny za sebou v jednom operonu, tudíž mohl být primer *bchZ_rev2* navržen na počátku genu *bchZ*. Tímto byl amplifikován úsek o velikosti asi 1400 bp a získána sekvence pro Y podjednotku chlorofylid reduktázy ve srovnání s velikostí 510 bp PCR produktu získaného amplifikací s použitím publikovaných primerů *bchY_fwd* a *bchY_rev* (YUTIN et al. 2009).

Nový set primerů byl testován na vybraných izolovaných kmenech AAP z různých prostředí, což potvrzuje jeho schopnost detekce AAP ze sladkých i mořských vod. Kombinace primerů fungovala u přibližně dvou třetin izolátů, především pro α -3 proteobakterie a β -proteobakterie. Neúspěch amplifikace u ostatních skupin mohl být způsoben primerem *bchY_fwd*, který byl velmi degenerovaný a byl navržen především pro mořské anoxygenní fototrofní bakterie (YUTIN et al. 2009). Nukleotidové sekvence sekvenované s použitím tohoto primeru vykazovaly velké množství chyb a to i u dat sekvenovaných firmou Macrogen (Soul, Korea), která se ukázala jako nejspolehlivější ze všech vyzkoušených společností.

Fylogenetická analýza spolehlivě přiřadila kmeney COL2P *Roseobacter* (Středozemní moře), Dor-3,5 *Roseinatronobacter* sp. (jezero Doroninskoe, Burjatsko), S03 *Roseobacter* sp. (Jižní Oceán), SL25 *Roseovarius* sp. (Great Salt lake, Utah), SYOP2 *Roseobacter* sp. (pobřeží Austrálie) mezi mořské α -3 proteobakterie a VA-01

Betaproteobacterium (lom Velká Amerika) mezi β -proteobakterie. Ve srovnání s analýzou podle genu *pufM* jsou zřetelněji odlišitelné jednotlivé skupiny proteobakterií.

Funkčnost navrženého setu primerů byla ověřena také na mikrobiálních společenstvech v přírodních vzorcích pěti horských jezer Gössenköllesee (GKS), Oberer Plenderlesee (OPL), Drachensee (DRA), Achensee (ACH) a Piburgersee (PIB) (Rakousko). Neúspěšná amplifikace u jezera GKS je zajímavá, jelikož u toho jezera byla Mgr. Čuperovou provedena analýza pomocí genů *pufL* a *pufM* a společenstvo obsahovalo především zástupce *Sphingobium* - α -4 proteobakterie. Je možné, že navržené primery tuto skupinu nebyly schopny amplifikovat, jelikož sekvence genu *bchZ*, které jsme použili pro návrh primerů, u těchto organismů nejsou k dispozici. Na základě úspěšné amplifikace genu *bchY* z jezer DRA, ACH a PIB a zhodnocení fyzikálních a chemických vlastností jezer, bylo pro následnou fylogenetickou analýzu zvoleno jezero DRA nacházející se na hranici lesa a PIB jako subalpinské jezero.

Fylogenetická analýza horských mikrobiálních společenstev ukázala, že z 96 % byly amplifikovány β -proteobakterie a pouze jedna α -2 proteobakterie. Zde se může jednat o novou sladkovodní skupinu AAP β -proteobakterií, u kterých je dosud popsán pouze sladkovodní druh *Roseateles depolymerans* (SUYAMA et al. 1999). Vzorky z alpských jezer také vykazují příbuznost se sladkovodním kmenem Uncultured proteobacterium DelRiverFos06H03 (Delaware river, USA), což potvrzuje přítomnost β -proteobakterií ve sladkovodním prostředí (WAIDNER & KIRCHMAN 2005). Dalším příbuzným kmenem se ukázal Venter 1106120, jehož místo odběru není v databázi NCBI přesně specifikováno. Jedna získaná sekvence PIB76 se ukázala jako vzdáleně příbuzná druhu *Hoeflea phototrophica* jež patří do α -2 proteobakterií.

Tato práce zdůrazňuje vhodnost použití jednotných molekulárních markerů pro odhalení heterogenity mikrobiálních populací jako doplněk tradičních metod jako je infračervená mikroskopie, infračervená fluorometrie, pigmentová analýza HPLC. Také vyzdvihuje nutnost dalšího studia přítomnosti AAP v různých přírodních lokalitách k odhalení rozmanité fylogenetické příbuznosti.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo navržení specifických primerů pro gen *bchY* chlorofylid reduktázy biosyntetické dráhy bakteriochlorofylu *a* a použití tohoto genu jako molekulárního markeru pro detekci aerobních anoxygenních fototrofů. Tento cíl byl splněn, byly navrženy tři degenerované univerzální reverzní primery *bchY_rev*, *bchY_rev2* a *bchY_rev3* a na základě jejich testování na vybraných izolovaných kmenech AAP byl vybrán nejvhodnější set primerů: publikovaný *bchY_fwd* (YUTIN et al. 2009) a *bchZ_rev2*.

Dalším cílem byla amplifikace genu *bchY* u vybraných izolovaných kmenů AAP. Pomocí navržených primerů byl tento gen úspěšně amplifikován u 14 z 18 AAP kmenů a získané sekvence byly použity pro fylogenetickou analýzu.

Posledním cílem této práce byla genetická analýza *bchY* genů u přirozených společenstev ve vybraných sladkovodních lokalitách. Gen *bchY* byl amplifikován navrženým setem primerů v přírodních vzorcích dvou horských jezer v Tyrolských Alpách (Rakousko). Po zaklonování bylo získáno 11 nukleotidových sekvencí z jezera Drachensee a 18 sekvencí z jezera Piburgersee, které byly následně použity pro fylogenetickou analýzu mikrobiálního společenstva těchto jezer, která přiřadila získané sekvence do β -proteobakterí.

5. Seznam použitých zdrojů

BÉJA, O., SUZUKI, M.T., HEIDELBERG, J.F., NELSON, W.C., PRESTON, C.M., HAMADA, T., EISEN, J.A., FRASER, C.M., DELONG, E.F. (2002) Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* 415: 630-633.

BOLLIVAR, D.W., SUZUKI, J.Y., BEATTY, J.T., DOBROWOLSKI, J.M., BAUER, C.E. (1994) Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Biol* 237: 622-640.

COTTRELL, M.T., MANNINO, A., KIRCHMAN, D.L. (2006) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Midatlantic Bight and the North Pacific Gyre. *Appl Env Microbiol* 72: 687-703.

CSOTONYI, J.T., SWIDERSKI, J., STACKEBRANDT, E., YURKOV, V. (2010) A new environment for aerobic anoxygenic phototrophic bacteria: biological soil crusts. *Environ Microbiol Rep* 2: 651-656.

ČUPEROVÁ, Z., SOMMARUGA, R., HOJEROVÁ, E., KOBLÍŽEK, M. (2011) Aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria in Alpine lakes - rukopis

FUERST, J.A., HAWKINS, J.A., HOLME, A., SLY, L.I., MOORE, C.J., STACKEBRANDT, E. (1993) *Porphyrobacter neustonensis* gen. nov, sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-synthesizing budding bacterium from fresh water. *Int J Syst Bacteriol* 43: 125-134.

HANADA, S., KAWASE, Y., HIRAISHI, A., TAKAISHI, S., MATSUURA, K., SHIMADA, K., NAGASHIMA, K.V.P. (1997) *Porphyrobacter tepidarius* sp. nov., a moderately thermophilic aerobic photosynthetic bacterium isolated from hot spring. *Int J Syst Bacteriol* 47: 408-413.

HARASHIMA, K., SHIBA, T., TOTSUKA, T., SIMIDU, U., TAGA, N. (1978) Occurrence of bacteriochlorophyll *a* in strain of an aerobic heterotrophic bacterium. *Agric Biol Chem* 42: 1627-1628.

HARASHIMA, K., HAYASAKI, J., IKORI, T., SHIBA, T. (1980) O₂-stimulated synthesis of bacteriochlorophyll and carotenoids in marine bacteria. *Plant Cell Physiol* 21: 1283-1294.

KIM, B.C., PARK, J.R., BAE, J.-W., RHEE, S.-K., KIM, K.-H., OH, J.-W., PARK, Y.H. (2006) *Stappia marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 75-79.

KOBLÍŽEK, M., BEJA, O., BIDIGARE, R.R., CHRISTENSEN, S., BENETIZ-NELSON, B., VETRIANI, C., KOLBER, M.K., FALKOWSKI, P.G., KOLBER, Z.S. (2003) Isolation and characterization of *Erythro bacter* sp. Strains from the upper ocean. *Arch Microbiol* 180: 327-338.

KOBLÍŽEK, M., PRÁŠIL, O. (2002) Fototrofní bakterie. *Vesmír* 81: 505-507.

MAŠÍN, M., NEDOMA, J., PECHAR, L., KOBLÍŽEK, M. (2008) Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs on temperature freshwater systems. *Environ Microbiol* 10: 1988-1996.

PERRIÈRE, G., GOUY, M. (1996) An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78: 364-369.

RAINEY, F.A., SILVA, J., NOBRE M.F., SILVA M.T., DA COSTA, M.S. (2003) *Porphyrobacter cryptus* sp. nov., a novel slightly thermophilic, aerobic, bacteriochlorophyll *a*-containing species. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 35-41.

RATHGEBER, C., BEATTY, J.T., YURKOV, V. (2004) Aerobic phototrophic bacteria: new evidence for the diversity, ecological importance and applied potential of this previously overlooked group. *Photosynth Res* 81: 113-128.

SAITOH, S., SUZUKI, T., NISHIMURA, Y. (1998) Proposal of *Craurococcus roseus* gen. nov., sp. nov. and *Paracraurococcus ruber* gen. nov., sp. nov., novel aerobic bacteriochlorophyll a-containing bacteria from soil. *Int J Syst Bacteriol* 48: 1043-1047.

SHIBA, T., SIMIDU, U., TAGA, N. (1979) Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll a. *Appl Environ Microbiol* 38: 43-45.

SUYAMA, T., SHIGEMATSU, T., TAKAICHI S., NODASAKA, Y., FUJIKAWA, S., HOSOYA, H., TOKIWA, Y., KANAGAWA, T., HANADA, S. (1999) *Roseateles depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll a-containing obligate aerobe belonging to the β -subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 49: 449-457.

SUZUKI, T., MUROGA, Y., TAKAHAMA, M., NISHIMURA, Y. (1999a) *Roseivivax halodurans* gen. nov., sp. nov. and *Roseivivax halotolerans* sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacteria isolated from a saline lake. *Int J Syst Bacteriol* 49: 629-634.

SUZUKI, T., MUROGA, Y., TAKAHAMA, M., SHIBA, T., NISHIMURA, Y. (1999b) *Rubrimonas cliftonensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacteria isolated from a saline lake. *Int J Syst Bacteriol* 49: 201-205.

SWINGLEY, W.D., BLANKENSHIP, R.E., RAYMOND, J. (2009) Evolutionary relationship among purple photosynthetic bacteria and the origin of proteobacterial photosynthetic system. In: Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T. (eds) *The purple phototrophic bacteria*. Springer Science + Business Media B.V., pp. 17-29.

Waidner, L.A., Kirchman, D.L. (2005) Aerobic anoxygenic photosynthesis genes and operons in uncultured bacteria in the Delaware River. *Environ Microbiol* 7: 1896-1908.

Wakao, N., Yokoi, N., Isoyama, N., Hiraishi, A., Shimada, K., Kobayashi, M., Kise, H., Iwaki, M., Itoh, S., Takaichi, S., Samuraj, Y. (1996) Discovery of natural photosynthesis using Zn-containing bacteriochlorophyll in an aerobic bacterium *Aciciphilium rubrum*. *Plant Cell Physiol* 37: 889-893.

Willows, R.D., Kriegel, A.M. (2009) Biosynthesis of bacteriochlorophylls in purple bacteria. In: Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T. (eds) *The purple phototrophic bacteria*. Springer Science + Business Media B.V., pp. 57-79.

Yurkov, V., Beatty, J.T. (1998) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 695-724.

Yurkov, V., Csotonyi, J.T. (2003) Aerobic anoxygenic phototrophs and heavy metalloid reducers from extreme environments. In: Pandalai S.G. (ed) *Recent Research Developments in Bakteriology* 1: 247-300. Transworld Research Network, Trivandrum.

Yurkov, V., Csotonyi, J.T. (2009) New light on Arobic Anoxygenic Phototrophs. In: Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T. (eds) *The purple phototrophic bacteria*. Springer Science + Business Media B.V., pp. 31-55.

Yurkov, V., Krieger, S., Stackebrandt, E., Beatty, J.T. (1999) *Citromicrobium bathiomarinum*, a novel aerobic bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vent plume waters that contains photosynthetic pigment-protein complexes. *J Bacteriol* 181: 4517-4525.

Yutin, N., Suzuki, M.T., Béja, O. (2005) Novel primers reveal wider diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Appl Environ Microbiol* 71: 8958-8962.

YUTIN, N., SUZUKI, M.T., ROSENBERG, M., ROTEM, D., MADIGAN M.T., SÜLING, J., IMHOFF, J.F., BÉJA, O. (2009) BchY-based degenerate primers target all types of anoxygenic photosynthetic bacteria in a single PCR. *Appl Environ Microbiol* 75: 7556-7559.

ZHOU, J., BRUNS, M.A., TIEDJE, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316-322.

ZUBKOV, L.Y. (2009) Photoheterotrophy in marine prokaryotes. *J Plant Res* 31: 933-938.

6. Seznam zkratek

AAP – aerobic anoxygenic phototrophs, tj. aerobní anoxygenní fototrofové

ACH – Achensee (Rakousko)

ATP – adenosin trifosfát

BChl – bakteriochlorofyl

BPhe – bakteriofeofytin

Chlide – chlorofylid

DEPC – diethylpyrokarbonát

dNTP - deoxyribonukleotid trifosfát

DOC – dissolved organic carbon, tj. rozpuštěný organický uhlík

DRA – Drachensee (Rakousko)

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

GKS – Gössenköllesee (Rakousko)

IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid

LB – lysogeny broth nebo Luria-Bertani medium

LH – light-harvesting, tj. světlosběrná anténa

NCBI – National Center for Biotechnology Information

OPL – Oberer Plenderlesee (Rakousko)

PIB – Piburgersee (Rakousko)

PCR – polymerase chain reaction, tj. polymerázová řetězová reakce

RC – reakční centrum

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galaktopyranosid