

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Transformace zelené řasy *Desmodesmus*
*quadricauda***

Bakalářská práce

Jana Zahradníková

Školitelka: Mgr. Monika Hlavová, Ph.D.

(Mikrobiologický ústav, AV ČR, Třeboň)

České Budějovice 2017

Zahradníková J., 2017: Transformace zelené řasy *Desmodesmus quadricauda*. [Transformation of green algae *Desmodesmus quadricauda*. Bc. Thesis. In Czech]. – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Abstract:

The aim of this study was to investigate if electroporation can be used for a preparation of stable transformants of the green alga *Desmodesmus quadricauda*. I tested a sensitivity of *D. quadricauda* cells to several antibiotics in order to choose a suitable selection marker. I also tried to optimize electroporation conditions. I tested several electroporation methods and I tried transformation of cells of asynchronous cultures and in different stages of the cell cycle in synchronous culture. I tested the effect of sonication and glass beads on cell wall of coenobia in order to slightly damage it, release individual cells and, thus, affect the transformation efficiency.

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně pouze s použitím literatury uvedené v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské 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 svého 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

.....
Jana Zahradníková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce Mgr. Monice Hlavové, Ph.D. za odborné vedení této práce, laskavý přístup a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře buněčných cyklů řas Mikrobiologického ústavu, AV ČR v Třeboni za jejich vstřícnost a přátelskou atmosféru, která mi umožnila věnovat se zdejšímu výzkumu, načerpat nové vědomosti a zkušenosti. V neposlední řadě děkuji svým přátelům a rodině za podporu v průběhu celého studia.

Obsah

1 ÚVOD	1
2 PŘEHLED LITERATURY	2
2.1 Modelový organismus	2
2.2 Buněčný cyklus s násobným dělením.....	3
2.2.1 Buněčný cyklus <i>D. quadricauda</i>	4
2.3 Transformace jednobuněčných řas	5
2.3.1 Metody transformace jednobuněčných zelených řas	6
2.3.1.1 Transformace pomocí skleněných kuliček	6
2.3.1.2 Transformace pomocí bombardování mikroprojektily	7
2.3.1.3 Transformace pomocí vláken z karbidu křemíku (SiC)	7
2.3.1.4 Transformace pomocí elektroporace	7
2.3.2 Selekční markery a reportérové geny.....	9
2.3.2.1 Hygromycin.....	10
2.3.2.2 Zeocin.....	10
2.3.2.3 Paromomycin	11
2.3.2.4 Zelený fluorescenční protein (GFP)	11
3 CÍLE PRÁCE	12
4 METODY.....	13
4.1 Kultivace řas	13
4.2 Dezintegrace cenobií pomocí kuliček a sonikace.....	14
4.3 Transformace pomocí elektroporace	15
4.4 Ověření citlivosti divokého kmene na antibiotika.....	16
4.5 Izolace plazmidové DNA	17
4.6 PCR.....	18
5 VÝSLEDKY	20
5.1 Testování citlivosti <i>D. quadricauda</i> k antibiotikům.....	20

5.2 Elektroporace <i>D. quadricauda</i>	22
5.3 Narušení buněčné stěny cenobia <i>D. quadricauda</i>	25
5.3.1 Mechanické narušení buněčné stěny pomocí kuliček a sonikace	25
5.4 Elektroporace <i>D. quadricauda</i> s využitím kuliček	27
6 DISKUZE.....	28
7 ZÁVĚR.....	32
8 SEZNAM LITERATURY	33
9 ZDROJ OBRÁZKŮ	40

1 ÚVOD

Svou práci jsem vypracovala na Mikrobiologickém ústavu, AV ČR, v Laboratoři buněčných cyklů řas v Třeboni. Výzkum zaměřený na problematiku regulace buněčného cyklu řas má v laboratoři již dlouhou tradici. V práci jsem se zaměřila na transformaci zelené řasy *Desmodesmus quadricauda*, která se v této laboratoři využívá jako jeden z hlavních modelových organismů.

D. quadricauda je sladkovodní jednobuněčná zelená řasa z třídy Chlorophyta, která se doposud využívala zejména při studiu buněčného cyklu, fotosyntézy, vlivu toxických látek a těžkých kovů na morfologii a fyziologii řas. Princip násobného dělení této řasy, který je unikátní a odlišný od klasického binárního dělení většiny eukaryotních buněk, se spolu s buněčným cyklem *Chlamydomonas reinhardtii* stal modelovým typem. Zatímco u *C. reinhardtii* existuje již více ověřených transformačních postupů, které umožňují efektivní genovou manipulaci za účelem studia genové exprese a mechanismu regulace buněčného cyklu, u *D. quadricauda* zatím nebyl vytvořen transformační postup, který by vedl k produkci stabilních transformantů za účelem podrobnějšího genetického výzkumu.

V současné době probíhá snaha o osekvenování genomu *D. quadricauda*, které by spolu s nalezením vhodného transformačního postupu mohlo vytvořit z této zelené řasy nový modelový organismus pro genetický výzkum.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Modelový organismus

Desmodesmus quadricauda, třída zelenivky (Chlorophyceae), kmen zelené řasy (Chlorophyta), je fotoautotrofní jednobuněčná zelená řasa, která je významnou součástí sladkovodního fytoplanktonu a podílí se na výživě vodních živočichů. Každá buňka obsahuje jádro a jeden chloroplast s jedním pyrenoidem (Procházka et al., 1998).



Obr. 1: *Desmodesmus quadricauda* [1].

Nejčastější forma, ve které se *D. quadricauda* vyskytuje, je forma čtyřbuněčného cenobia (Obr. 1). Cenobium je zvláštní typ kolonie, která je tvořena buňkami jedné generace. Vzniká při vegetativním dělení mateřské buňky na buňky dceřiné, ty pak zůstávají ve společném obalu. Řasa *D. quadricauda* se rozmnožuje zejména vegetativně, a to mechanismem násobného dělení, které se běžně vyskytuje u řas kmenu Chlorophyta. Vzniklá cenobia jsou za běžných podmínek nejčastěji čtyř či osmibuněčná, jen za specifických podmínek vzácněji dvoubuněčná (Komárek a Růžička, 1969). Vznik mnohobuněčných cenobií je závislý na okolních podmínkách – na teplotě, množství světla a živin (Šetlík et al., 1972), na fotoperiodě (Steenbergen, 1975) a na celkové rychlosti růstu buněk (Gavis et al., 1979).

Buňky seskupené v cenobia mají elipsoidní tvar a jsou bezbičíkaté. Na okrajových buňkách cenobia se nachází 2 ostny, které jsou přímou součástí buněčné stěny (Fott, 1967). Buněčná stěna se skládá ze 3 základních vrstev, podobně jako u ostatních řas kmenu Chlorophyta. Vnitřní vrstva je složena zejména z celulózy a odděluje jednotlivé buňky, vnější pektinová vrstva spojuje buňky cenobia. Tato pektinová vrstva vzniká ještě předtím, než se dceřiné cenobium uvolní z mateřské buňky (Bisaptura a Weyer, 1963).

Řasy rodu *Desmodesmus* se v současné době často využívají při výzkumu akumulace těžkých kovů a jejich vlivu na morfologii a fyziologii řas (Kizilkaya et al., 2012; Celekli et al., 2013; Umysová et al., 2015; Kováčik et al., 2015), obsáhlý je také výzkum produkce biopaliv a funkce zelených řas při čištění odpadních vod (Wong et al., 2015; Hamouda et al., 2016). Další velmi důležitou oblastí výzkumu *D. quadricauda* je studium buněčného cyklu a jeho regulace, podrobněji viz kapitola 2.2.

2.2 Buněčný cyklus s násobným dělením

Za buněčný cyklus se považuje období od vzniku buňky až po její rozdělení na buňky dceřiné. Buněčný cyklus se dělí na čtyři základní fáze. Ve fázi G1 buňka roste a připravuje se na dělení, v S fázi probíhá replikace DNA, v G2 fázi buňka dále roste, v M fázi probíhá dělení jader a v C fázi, označované jako cytokineze, probíhá dělení buňky (Howard and Pelc, 1953). Buněčný cyklus lze také rozdělit na dvě základní fáze – růstovou fázi, při které buňka akumuluje energii a zvětšuje svůj objem (odpovídá fázi G1), a reprodukční fázi, charakteristickou syntetickými procesy, jako je např. replikace DNA (Mitchison, 1971).

Řasa *D. quadricauda* a řada dalších druhů řas se rozmnožují násobným dělením. Během jednoho buněčného cyklu se rozdělí na 2^n buněk (n je počet dělení), z jedné mateřské buňky tak vzniknou více než 2 buňky dceřiné (obvykle 4, 8, 16). Využití zelených řas jako modelového organismu pro výzkum buněčného cyklu se ukázalo jako vhodné řešení pro studium jednotlivých fází buněčného cyklu a umožnilo osvětlit způsob jejich vzájemného překrývání (Zachleder a Šetlík, 1990).

Existuje více typů násobného dělení zelených řas, jedním z nejvíce studovaných je buněčný cyklus řasy *Chlamydomonas* (Lien a Knutsen, 1979) a buněčný cyklus řasy *Scenedesmus* (Šetlík et al., 1972; Zachleder et al., 1997). Pro všechny typy buněčných cyklů, které probíhají způsobem násobného dělení, platí, že během jednoho buněčného cyklu proběhne více růstových a reprodukčních fází, které se navzájem překrývají. Počet těchto fází během jednoho cyklu a míra jejich překrývání je závislá na vnějších podmínkách prostředí (Šetlík et al., 1972; Bišová a Zachleder, 2014).

Základním předpokladem, aby se buňka mohla rozdělit na dvě či více dceřiných buněk, je několikanásobné zvětšení buněčného objemu během G1 fáze následované dosažením minimálně jednoho bodu rozhodnutí (“commitment point”, CP). Po dosažení prvního CP buňka směřuje k S fázi – tím se spustí reprodukční procesy spojené s přechodem do dalších fází buněčného cyklu, současně však může docházet k dalšímu růstu buňky. Pokud buňka dosáhne více CP během jednoho buněčného cyklu, je předurčena k rozdělení na 2^n buněk, přičemž n odpovídá počtu dosažených CP a následně i počtu dělení.

V počáteční fázi buněčného cyklu (G1) je nezbytná role světla, které umožňuje fotosyntézu, tj. akumulaci energie potřebné pro další fáze buněčného cyklu. Pokud je buňka vystavena intenzivnímu světlu dostatečně dlouhou dobu a stihne dosáhnout jednoho či více CP, další fáze buněčného cyklu (S, G2, M) mohou probíhat ve tmě bez vnějšího přísunu

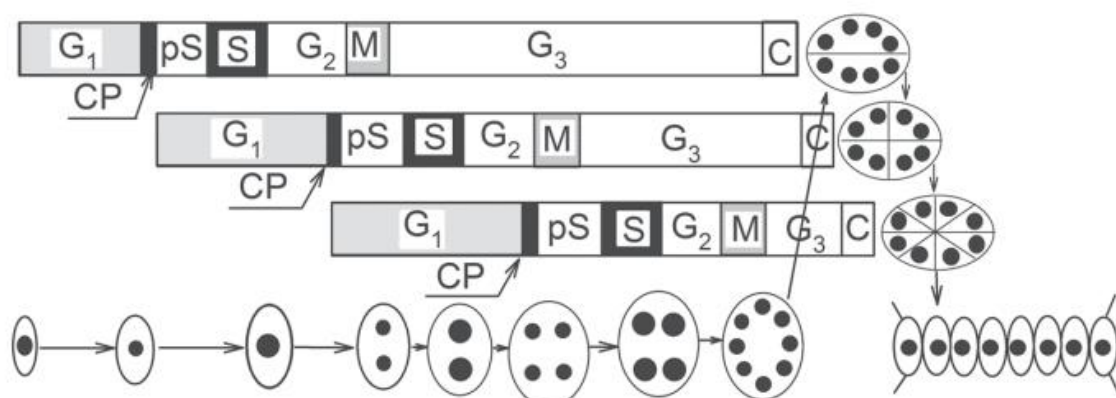
energie (Zachleder a Šetlík, 1990). Tohoto jevu se úspěšně využívá při přípravě synchronních řasových kultur (Bishop a Senger, 1971).

2.2.1 Buněčný cyklus *D. quadricauda*

Buněčný cyklus *D. quadricauda* se vyznačuje násobným dělením, při němž se mateřská buňka za jednu generaci rozdělí na 2^n buněk, přičemž n je počet dělení. Buňky po dělení zůstávají ve formě cenobia a sdílí společnou buněčnou stěnu (Bišová a Zachleder, 2014).

Mnohonásobné dělení *D. quadricauda* naznačuje, že během jednoho buněčného cyklu proběhne více růstových a reprodukčních fází, které se vzájemně překrývají, tzn. že v buňce probíhají současně. Pro průběh fáze G_1 potřebuje buňka dostatek světla a živin, aby mohla zvětšit svůj objem a dosáhnout prvního CP (Šetlík a Zachleder, 1984). Po jeho dosažení se v buňce spustí reprodukční pochody, které začínají předsyntetickou fází - pS (Zachleder et al., 1997) a pokračují replikací DNA a mitózou. Během této reprodukční fáze však buňka může stále růst a tak se připravovat na dosažení druhého CP, které opět spustí kaskádu reprodukčních dějů.

Po každé fázi M následuje u řasy *D. quadricauda G_3 fáze, která představuje pauzu mezi mitózou a cytokinezi (Zachleder et al., 1997). Buňky se tak během buněčného cyklu stanou mnohojadernými, cytokineze proběhne až v úplném závěru buněčného cyklu, kdy jsou všechny fáze M dokončeny (Obr. 2) (Zachleder et al., 2002).*



Obr. 2: Obrázek znázorňuje proces střídání fází buněčného cyklu *D. quadricauda* (Zachleder et al., 1997).

Kromě obvyklých fází buněčného cyklu (G1, S, G2, M) lze v buněčném cyklu *D. quadricauda* ještě rozlišit předsyntetickou fází (pS) a G3 fází. Předsyntetická fáze je součástí pozdní G1 fáze, začíná dosažením CP a končí počátkem S fáze. Tato fáze se od klasické G1 fáze liší tím, že může probíhat i při zastaveném růstu, tudíž není potřeba vnějšího zdroje energie (Zachleder et al., 1997).

2.3 Transformace jednobuněčných řas

Metody genetického inženýrství otevírají nové možnosti pro využití jednobuněčných řas v biotechnologiích. Jednobuněčné řasy jsou nejčastěji využívány jako modelové organismy pro výzkum fotosyntézy, regulace buněčného cyklu a získávání živin z prostředí. Velkou výhodou využití jednobuněčných zelených řas pro výzkum je jejich velmi nenáročný způsob kultivace ve fotobioreaktorech, rychlý a snadno kontrolovatelný růst. Pomocí genetické manipulace těchto organismů lze získat experimentální materiál pro výzkum mnoha buněčných, metabolických a regulačních procesů, navíc tak lze získat i alternativní systémy pro produkci proteinů využívaných v medicíně, jako jsou například hormony a protilátky (Scranton et al., 2015), nebo k produkci proteinů jako výživových doplňků a krmiv (León-Bañares et al., 2004).

Prvním úspěšným pokusem, při němž se podařilo vytvořit stabilní transgenní organismus kmene *Chlorophyta*, byla transformace *C. reinhardtii* v roce 1989 (Kindle et al., 1989). Nejprve se podařilo provést stabilní transformaci chloroplastu (Boynton et al., 1988) a poté i jádra (Kindle et al., 1989). Řasa *C. reinhardtii* se od té doby stala hlavním modelovým organismem pro výzkum transformace zelených řas. Její hlavní výhoda spočívá v kompletně osekvenovaném genomu, který mimo jiné umožňuje vést přehlednější výzkum v této oblasti (Merchant et al., 2007).

Dalším úspěšně transformovaným zástupcem zelených řas se stala *Chlorella sorokiniana* v roce 1996 (Davson et al., 1997), *Chlorella kessleri* v roce 1999 (El-Sheekh, 1999) a později i *Dunaliella tertiolecta* (Walker et al., 2005). V roce 2013 se podařilo vytvořit metodu pro transformaci zelené řasy *Scenedesmus obliquus* pomocí elektroporace (Guo et al., 2013), u *D. quadricauda* dosud nebyla stabilní transformace genomu provedena.

2.3.1 Metody transformace jednobuněčných zelených řas

Základním předpokladem pro úspěšnou transformaci buňky je krátkodobé narušení buněčné membrány a zvýšení její propustnosti, které umožní malým molekulám DNA vstoupit do buňky. Narušení membrány musí probíhat takovým způsobem, aby daná buňka byla schopná přežít transformaci bez významného poškození (León-Bañares et al., 2004).

Existuje mnoho metod transformace řas, které se používají v laboratořích. Vzájemně se liší zejména svou efektivitou, která se přímo vztahuje k použitému organismu, a náročností na přístrojové vybavení laboratoře. Lze je rozdělit na metody, které k transformaci buněk využívají mechanického poškození buněčné membrány, nebo metody využívající elektrických vlastností membrány k zvýšení její propustnosti.

2.3.1.1 Transformace pomocí skleněných kuliček

Metoda transformace buněk pomocí skleněných kuliček byla nejprve použita u kvasinek (Costanzo & Fox, 1988), poté byla upravena a úspěšně využita pro transformaci zelených řas. Její princip spočívá ve vytvoření směsi, která obsahuje médium s buňkami určenými k transformaci, skleněné kuličky, DNA a polyethylenglykol. Tato směs je poté po určitou stanovenou dobu intenzivně míchána, čímž dojde k mechanickému narušení povrchu buněk a vniknutí molekul DNA dovnitř buněk. Hlavním důvodem pro přidání polyethylenglykolu do směsi (výsledná koncentrace cca 5%) je mnohonásobné zvýšení schopnosti regenerace buněk po transformaci (Kindle, 1990).

Hlavní přednost této metody spočívá v jednoduchosti postupu, nenáročnosti na přístrojové vybavení a vysoké efektivitě transformace v porovnání s jinými metodami. Metoda transformace pomocí skleněných kuliček byla úspěšně použita u *C. reinhardtii* (Kindle, 1990) a *Dunaliella salina* (Feng et al., 2009).

Nevýhodou této metody je, že je velmi málo účinná při transformaci řas, které mají silnou buněčnou stěnu odolnou vůči mechanickému poškození. V takovém případě je nutné pro transformaci použít mutantní kmeny bez buněčné stěny, nebo buňky krátce před transformací inkubovat v roztoku autolyzinu (Kindle, 1990). Autolyzin je enzym, který hydrolyzuje buněčnou stěnu organismu, ve kterém je produkován. Přirozeně se uplatňuje ve stádiu pohlavního rozmnožování, kdy je zapotřebí krátkodobě odstranit buněčnou stěnu, aby mohlo dojít ke splynutí gamet (Jaenicke et al., 1987).

2.3.1.2 Transformace pomocí bombardování mikroprojektily

Tato metoda byla poprvé použita pro transformaci rostlinných buněk jako další alternativa pro organismy, u nichž jiné metody transformace nebyly vhodné (Klein et al., 1987). Metoda byla úspěšně aplikována při transformaci chloroplastu řasy *C. reinhardtii* a později i jejího jádra (Boynton et al., 1988; Kindle, 1989).

Princip této metody spočívá v tom, že malé mikročástice těžkých kovů (obvykle se používá zlato nebo wolfram) pokryté DNA jsou vystřelovány vysokou rychlostí do roztoku buněk. Mikročástice tímto způsobem prostoupí buněčnou stěnou i membránou a vpraví molekuly DNA do buňky (Vain et al., 1993). Hlavní výhodou této metody spočívá v tom, že lze do buněk vpravit poměrně velké množství DNA a ani buněčná stěna zde není překážkou. Hlavní nevýhodou této metody je její náročnost na přístrojové vybavení laboratoře. Také její účinnost není příliš vysoká ve srovnání s metodou skleněných kuliček (Kindle, 1990).

2.3.1.3 Transformace pomocí vláken z karbidu křemíku (SiC)

První studie s využitím této metody transformace byla uskutečněna u rostlin kukuřice *Zea mays* a tabáku *Nicotiana tabacum* (Kaeppler et al., 1990). Využití této metody pro transformaci zelených řas bylo poprvé provedeno u *C. reinhardtii* (Dunahay, 1993).

Metoda transformace buněk pomocí vláken z karbidu křemíku (SiC) se velmi podobá metodě skleněných kuliček a její efektivita je s touto metodou srovnatelná. Směs buněk, DNA a SiC vláken se po určité době intenzivně míchá, vlákna SiC naruší povrch buněk a umožní vniknutí molekul DNA do buňky (Kaeppler et al., 1990). Její hlavní výhodou ve srovnání s metodou skleněných kuliček je to, že touto metodou lze transformovat řasy s buněčnou stěnou, navíc buňky při této metodě mají vyšší schopnost přežití (Dunahay, 1993).

2.3.1.4 Transformace pomocí elektroporace

Elektroporace je metoda, která využívá intenzivních elektrických pulzů ke zvýšení propustnosti buněčné membrány. Pokud buňku vystavíme po dobu několika milisekund silnému elektrickému poli, v membráně dočasně vzniknou póry, skrze které mohou molekuly DNA, RNA, či proteinů prostoupit dovnitř buňky. Pokud jsou podmínky nastaveny správně, většina buněk je schopna regenerovat a buněčnou membránu opětovně zacetit (Neumann et al., 1982).

K elektroporaci se v laboratořích používá přístroj, který generuje krátké intenzivní elektrické pulzy. Samotná elektroporace buněk probíhá v plastových nebo skleněných kyvetách, které mají po stranách hliníkové elektrody. Elektroporace nejlépe probíhá za snížené teploty 0 - 4 °C. Při nízkých teplotách se zpomalí opětovné zavírání membránových pórů a tím se zvýší efektivita transformace. Úspěšnost elektroporace ovlivňuje mnoho faktorů, je to například síla elektrického pole, doba trvání pulzu, složení média, teplota a typ buněčné membrány buňky. Pro každý organismus je tedy nutné tyto podmínky optimalizovat, aby bylo dosaženo pozitivního výsledku (Brown et al., 1991).

Využití elektroporace pro transformaci zelených řas bylo úspěšné. Jako u všech ostatních metod, i tato metoda dosahuje spolehlivé účinnosti, zejména pokud je daný organismus nejprve zbaven buněčné stěny. Tento přístup je ale poměrně náročný, protože je obtížné vytvořit mutantní linii řas bez buněčné stěny případně buněčnou stěnu enzymaticky rozkládat a vystavit tak buňky stresovým podmínkám ještě před samotnou transformací. Díky elektroporaci se však podařilo vytvořit metodu transformace zelených řas bez nutnosti odstranění buněčné stěny. Při této metodě byl využit přístroj NEPA21, který se od ostatních přístrojů liší tím, že je schopen generovat několik pulzů ve třech krocích ve velmi krátkém časovém úseku. Tímto způsobem byl do řasy *C. reinhardtii* vložen plazmid pHyg3 s hygromycinovou rezistencí, účinnost této metody však stále zůstává přibližně 3 x nižší v porovnání s elektroporací protoplastů (Shimogawara et al., 1998; Yamano et al., 2013).

2.3.2 Selekční markery a reportérové geny

Selekční markery se využívají při transformaci organismů, aby bylo možné rozpoznat a oddělit buněčné linie, které byly úspěšně transformované. Nejlepší selekční markery jsou takové, které vykazují silnou fenotypovou selekci – netransformované buňky rostou na selekčním médiu velmi zřídka (nejlépe vůbec), zatímco transformované buňky rostou velmi intenzivně (León-Bañares et al., 2004).

V počátcích genetické manipulace zelených řas bylo nejvíce pozornosti věnováno transformaci *C. reinhardtii*. Jako první se při transformaci začaly využívat homologní geny daného organismu. Nejprve byl nalezen mutantní kmen, který obsahoval defektní gen, jenž organismu znemožňoval přežít za určitých specifických podmínek. K transformaci byl jako reportérový gen použit funkční homologní gen izolovaný z daného organismu (León-Bañares et al., 2004). Jedním z významných reportérových genů pro *C. reinhardtii* je *Nit1*, který kóduje nitrát reduktázu. Ta umožňuje řasám růst v médiu s nitrátem jako jediným zdrojem dusíku, snižuje tedy významně potřebu amonných iontů. K transformaci se používají mutantní *nit1* kmeny, které mají tento gen nefunkční, zároveň ale musí mít aktivní *Nit2* gen, který hraje důležitou roli v expresi *Nit1*. Mezi další homologní reportérové geny patří *Arg7*, který kóduje argininosukcinát lyázu. U *C. reinhardtii* tento gen může homologní rekombinací nahradit mutaci v tomto genu. Jako selekční médium se používá acetátové médium bez argininu. (Shimogawara et al., 1998; Kindle, 1990).

Hlavní výhodou využití homologních reportérových genů pro transformaci je shoda jejich kodonů se systémem kodonů daného organismu, proto jejich exprese probíhá bez významných problémů. Dále jsou méně náchylné k umlčování genů pomocí metylace a jejich začlenění do genomu je úspěšnější než u heterologních genů (Kindle et al., 1989, León-Bañares et al., 2004). Nevýhoda však spočívá v tom, že je složité nejprve získat příslušnou mutantní linii daného organismu s nefunkčním genem. U haploidních organismů se tento problém projevuje méně, ale u diploidních organismů by byl tento proces příliš komplikovaný. Proto se postupem času opustilo od těchto reportérových genů a přednost dostaly geny s rezistencí k různým antibiotikům (selekční markery).

V současné době je možné vybírat z velkého množství selekčních markerů, které většinou obsahují rezistenci k antibiotikům, navíc je také možné využít upravených reportérových genů pro GFP protein, luciferázu, β glukuronidázu atd. a s jejich pomocí detekovat úspěšnost transformace. K nejvíce využívaným selekčním markerům patří geny kódující rezistenci k bleomycinu, paromomycinu, streptomycinu, hygromycinu,

chloramfenikolu a další. Vzhledem k tomu, že většina zelených řas je rezistentní k některým antibiotikům, je výběr vhodného antibiotika jako selekčního markeru značně omezený a je závislý na předchozím testování rezistence daného kmene řasy k vybranému antibiotiku (Radakovits et al., 2010).

2.3.2.1 Hygromycin

Hygromycin je jedno z nejvíce využívaných antibiotik pro selekci transgenních rostlin a řas. Hygromycin B patří mezi aminoglykosidová antibiotika (patří sem také kanamycin, gentamycin, streptomycin...). Hlavním mechanismem jeho účinku na organismy je inhibice proteosyntézy (Pittenger et al., 1953). Gen rezistence k hygromycinu (*aph7*) byl poprvé získán ze *Streptomyces hygrosopicus*. Tento gen kóduje hygromycin fosfotransferázu, která detoxikuje hygromycin B ATP-dependenční fosforylací (Waldron et al., 1985). Gen *aph7* byl pro účely transformace *C. reinhardtii* vložen do plazmidu pHyg3, kde je exprimován pod beta 2 tubulinovým promotorem pocházejícím z *C. reinhardtii* (Berthold et al., 2002). Tento plazmid se úspěšně využívá při výrobě transgenních linií *C. reinhardtii*.

2.3.2.2 Zeocin

Zeocin je glykopeptidové antibiotikum patřící do bleomycinové rodiny. Bylo izolované ze *Streptomyces verticillus* a obsahuje ionty mědi Cu^{2+} v chelátové formě, které jsou samy o sobě neaktivní a dodávají zeocinu modré zbarvení. Zeocin je mutagen, který funguje jako interkalační činidlo. Při vstupu zeocinu do buňky se měď redukuje na Cu^+ a je z molekuly odstraněna. V tento moment dojde k aktivaci zeocinu, který je schopný navázat se na DNA a způsobit v ní dvouvláknové zlomy, které buňka dokáže opravit jen velmi obtížně. Působením zeocinu tak nejčastěji dochází k nevratným změnám v řetězci DNA a následné apoptóze (Berdy, 1980).

Gen rezistence k zeocinu (*ble*) byl vyizolován z *Streptomyces hindustanus*. Tento gen kóduje malý acidický protein se silnou afinitou k bleomycinovým antibiotikům. Po navázání tohoto proteinu k zeocinu dojde k inaktivaci a zamezení mutagenního efektu antibiotika (Gatignol et al., 1988). Zeocin se nejčastěji používá v molekulární biologii jako antibiotikum určené k selekci buněčných linií, které obsahují geny s rezistencí proti tomuto antibiotiku, nebo jako selekční marker při přípravě transgenních kultur. Vzhledem k jeho mutagennímu efektu a relativní citlivosti na světlo a teplo je v některých případech vhodnější využít jiný

selekční marker, který je stabilnější a nemá přímý vliv na poškození DNA (León-Bañares et al., 2004).

2.3.2.3 Paromomycin

Paromomycin je aminoglykosidové antibiotikum, které bylo poprvé izolované ze *Streptomyces krestomuceticus* (Davidson et al., 2009). Mechanismus jeho účinku na mikroorganismy spočívá v inhibici proteosyntézy. Paromomycin se v buňce váže na 16S rRNA, která je součástí 30S malé ribozomální podjednotky u prokaryot. Tím dojde ke vzniku komplexu, který brání účinné translaci mRNA (Vicens et al., 2001).

2.3.2.4 Zelený fluorescenční protein (GFP)

Zelený fluorescenční protein (zkratka GFP – Green Fluorescent Protein) byl poprvé izolován z medúzy *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962). Zelená fluorescence se projevuje po ozáření modrým světlem, emisní maximum je při 509 nm, což odpovídá zelenému světlu. Gen pro GFP se využívá v biologii zejména jako reportérový gen pro vizualizaci exprese a lokalizace proteinů v buňce. Využití GFP ve srovnání s jinými molekulárně-genetickými metodami má mnoho výhod. GFP protein je relativně malý (238 aminokyselin), jeho gen se dá snadno spojit se zájmovým genem, samotná molekula chromoforu obsahuje pouze 3 aminokyseliny, které v buňce automaticky cyklizují. Zobrazení lokalizace proteinu pomocí fluorescenční mikroskopie je snadno detekovatelné a neinvazivní (Phillips, 2001; Cody et al., 1993).

Využití genu pro GFP jako reportérového genu bylo úspěšné v mikrobiologii zejména u bakterií. Při výrobě transgenních linií *C. reinhardtii* se nejprve využívaly homologní geny, využití heterologních genů při transformaci *C. reinhardtii* narazilo na problém s genovou expresí. Přestože se buňky podařilo úspěšně daným genem transformovat, jeho exprese byla nízká z různých, zejména epigenetických důvodů. Ukázalo se, že k tomu ve velké míře přispívá rozdílný systém a využití kodonů. *C. reinhardtii* obsahuje výhradně kodony s vysokým obsahem G/C párů. Fuhrmann et al. (1999) přistoupili k výrobě modifikovaného genu pro GFP, s názvem *cgfp*, jehož sekvence je přizpůsobena využití kodonů u *C. reinhardtii*. Gen *cgfp* byl dále spojen s genem *ble* pro bleomycinovou rezistenci pod promotorem *rbcS2*. Takto přizpůsobený gen pro GFP se ukázal jako plně funkční, zároveň se stal prvním uměle syntetizovaným genem exprimovaným v zelené řase (Fuhrmann et al., 1999).

3 CÍLE PRÁCE

- Ověření citlivosti divokého kmene *D. quadricauda* k antibiotikům.
- Testování kultivačních podmínek na účinnost transformace – synchronizace kultur, transformace v různých fázích buněčného cyklu.
- Testování různých podmínek transformace.
- Využití sonikace a kuliček za účelem narušení buněčné stěny cenobia *D. quadricauda*.
- Ověření transformantů pomocí PCR.

4 METODY

4.1 Kultivace řas

Pro kultivaci *D. quadricauda* jsem použila živné médium ½ ŠS (Šetlík – Simmer) (Zachleder a Šetlík, 1982). Jeho složení je uvedené v tabulce I. Řasy jsem kultivovala na světle při konstantní teplotě 25°C na Petriho miskách s pevným živným médiem, nebo v tekutém živném médiu ve fotobioreaktorech.

Při kultivaci na Petriho miskách jsem do živného média ½ ŠS přidala agar, přičemž jeho výsledné zastoupení v roztoku bylo 1,5 %. Výslednou směs jsem sterilizovala v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut a po částečném vychladnutí přibližně na 50 °C rozlévala do misek ve vrstvě silné 0,5 cm.

Při kultivaci ve válcích jsem použila tekuté živné médium ½ ŠS. Řasy jsem kultivovala v laboratorních fotobioreaktorech tvaru válců o objemu 300 ml při konstantní teplotě 30 °C, která byla udržovaná pomocí vodní lázně. Válce byly z jedné strany osvětlovány zářivkami (Osram DULUX L, 55 W/840) o vlnové délce, která se pohybovala mezi 400-720 nm, což odpovídá hodnotám viditelného světla nezbytného pro fotosyntetické reakce. Intenzita světla byla udržovaná na 490 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$. Směs byla provzdušňovaná stálým přívodem vzduchu obsahujícího 2 % oxidu uhličitého (v/v).

Tab. I: Složení živného média ½ ŠS.

Sloučeniny	Výsledná koncentrace v médiu
KNO ₃	2,021 g/l
K ₂ HPO ₄	0,140 g/l
KH ₂ PO ₄	0,340 g/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,988 g/l
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,011 g/l
Fe/NaEDTA	0,018 g/l
H ₃ BO ₃	3,10 mg/l
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,43 mg/l
MnSO ₄ . 4H ₂ O	1,20 mg/l
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,24 mg/l
CoSO ₄ . 7H ₂ O	1,40 mg/l
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ . 4H ₂ O	1,84 mg/l

Pokud pokusy vyžadovaly synchronní kultury, řasy byly kultivovány po dobu 2-3 dní střídavě ve světelných a tmavých periodách (14 h světla, 10 h tmy). Nesynchronní kultury rostly na trvalém světle.

4.2 Dezintegrace cenobií pomocí kuliček a sonikace

Pro pokus jsem použila několik typů a velikostí kuliček: skleněné kuličky o průměru 0,5 mm, mořský písek, zirkonové kuličky o průměru 0,7 mm, 2,0 mm a 4,0 mm. Řasy jsem kultivovala v tekutém živném médiu ½ ŠS ve válcích na nepřetržitém světle po dobu několika dnů (asynchronní kultura). Řasy jsem odebrala do 50 ml zkumavky a odstředila v odstředivce (Rotina 380 R, Hettich) při 5000 rpm po dobu 3 minut, naředila živným médiem ½ ŠS, koncentrace řas byla 1×10^7 buněk/ml. Do 2 ml zkumavky jsem odebrala 1 ml řas a přidala 500 µl kuliček/písku. Zkumavky jsem intenzivně míchala po dobu 1 min, 2 min, 3 min a 5 min. Vzorky jsem fixovala 100 µl 2,5 % glutaraldehydu (Sigma).

Řasy jsem obarvila fluorescenčním barvivem Calcofluor white (Sigma) v poměru 1 µl barviva na 15 µl vzorku řas. Obarvené vzorky jsem inkubovala ve tmě po dobu 5 minut a následně prohlížela ve světelném mikroskopu a ve fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX 51).

Při přípravě buněk pro sonikaci jsem postupovala obdobně. Řasy kultivované ve válci jsem odebrala do 50 ml zkumavky, odstředila při 5000 rpm po dobu 3 min (Rotina 380 R, Hettich), naředila živným médiem ½ ŠS na výslednou koncentraci 1×10^7 buněk/ml. Z tohoto objemu jsem 20 ml řas odebrala do čisté 50 ml zkumavky, kterou jsem umístila na led. Sonikace probíhala na sonikátoru (Bandelin Sonopuls HD 2200) při frekvenci 20 kHz. Vzorky jsem odebírala po 1 minutě, maximální testovaná doba sonikace byla 20 minut.

4.3 Transformace pomocí elektroporace

Řasy určené k transformaci jsem kultivovala v tekutém živném médiu ½ ŠS ve fotobioreaktorech po dobu 3 dnů za podmínek viz kapitola 4.1. Buňky jsem napěstovala do maximální koncentrace 2×10^6 buněk/ml, při vyšší koncentraci se snižuje kompetentnost buněk k transformaci.

Z řasové kultury jsem odebrala vzorek a množství buněk jsem spočítala v Bürkerově komůrce. Pro jednu transformaci jsem z kultury do zkumavky odebrala 1×10^8 buněk. Toto množství buněk v živném médiu jsem stočila v odstředivce vychlazené na 5 °C po dobu 5 minut při 3000 rpm (Rotina 380 R, Hettich). Supernatant jsem vylila a řasový pelet jsem ihned přenesla na led.

Na jednu transformaci jsem k buňkám přidala 250 µl živného média TAP (složení v tabulce II) s 60 mM sorbitolem. Směs jsem ve zkumavce promíchala pipetou a přenesla do 1,5 ml zkumavky. Dále jsem do zkumavky přidala příslušnou plazmidovou DNA, množství přidané pDNA bylo přibližně 200 ng. Poté jsem celou směs inkubovala při 42 °C podobu 1 minuty a následně přenesla zpět na led a tam ji inkubovala po dobu 10 – 15 minut. Směs jsem poté přenesla do kyvet vychlazených na ledu. Pro elektroporaci jsem použila kyvety se vzdáleností elektrod 4 mm. Transformace probíhala na elektroporátoru (ECM 630, BTX) za předem stanovených podmínek. Celkem jsem použila 3 typy podmínek: 400 V, 200 Ω a 150 µF s časovou konstantou 14 ms nebo 400 V, 200 Ω a 250 µF s časovou konstantou 20 ms nebo 1000 V, 600 Ω a 50 µF s časovou konstantou 3 ms.

Po elektroporaci jsem řasovou suspenzi inkubovala po dobu 20 minut při pokojové teplotě, následně jsem ji přenesla do 100 ml baněk s 10 ml živného média TAP s 60 mM sorbitolem a dala jsem ji míchat na třepačku na světlo nebo do tmy po dobu 12-18 h. V této fázi je důležité s buňkami zacházet šetrně a zbytečně je nepipetovat, protože jsou po transformaci velmi citlivé na mechanické poškození.

Po regeneraci jsem buňky odstředila při 2000 rpm po dobu 2 minut (Rotina 380 R, Hettich). Supernatant jsem vylila, řasy rozmíchala v 1 ml živného média TAP a vysela po 330 µl na Petriho misky s živným médiem ½ ŠS obsahujícím selekční antibiotikum (hygromycin, zeocin). Poté byly řasy kultivovány na stálém světle po dobu 7-10 dnů, dokud se na miskách neobjevily viditelné kolonie.

Při každé transformaci a pro každou variantu podmínek jsem odebrala kontrolní vzorek suspenze řas, který prošel totožným procesem, viz výše, kromě jediného kroku, kterým je přidání plazmidové DNA. Tuto kontrolní suspenzi jsem nakonec vysela jak

na misky s živným médiem ½ ŠS s obsahem selekčního antibiotika, tak na misky s čistým živným médiem ½ ŠS.

Tab. II: Složení živného média TAP.

Sloučeniny	Výsledná koncentrace v médiu
NH ₄ Cl	0,4 g/l
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 g/l
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,05 g/l
K ₂ HPO ₄	0,108 g/l
KH ₂ PO ₄	0,054 g/l
C ₄ H ₁₁ NO ₃	2,42 g/l
CH ₃ COOH	1 g/l
H ₃ BO ₃	3,086 mg/l
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	1,180 mg/l
CoSO ₄ . 7 H ₂ O	1,404 mg/l
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	1,244 mg/l
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,430 mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O	1,840 mg/l

4.4 Ověření citlivosti divokého kmene na antibiotika

Pro pokus jsem vybrala tři druhy antibiotik, paromomycin, zeocin a hygromycin. Testování proběhlo pomocí takzvaného „spot“ testu na Petriho miskách s pevným živným médiem ½ ŠS s přidaným antibiotikem o předem stanovené koncentraci (použitá koncentrace antibiotik byla stanovena na základě předchozích pokusů s *C. reinhardtii*).

Zásobní pevné živné médium ½ ŠS (s agarem) jsem rozehrála v mikrovlnné troubě a zchladila na teplotu mezi 50 – 60 °C. Médium jsem odměřila v odměrných válcích a odlila do několika kádínek. Po celou dobu jsem pracovala se sterilním sklem. K živnému médiu jsem přidala antibiotika tak, abych dodržela předem určenou výslednou koncentraci daného antibiotika v médiu. Od každého antibiotika jsem testovala několik různých koncentrací. Výsledná koncentrace paromomycinu v živném médiu byla 12 µg/ml, 24 µg/ml, 36 µg/ml a 48 µg/ml, koncentrace zeocinu v živném médiu byla 10 µg/ml a 20 µg/ml, koncentrace

hygromycinu 20 µg/ml a 40 µg/ml. Takto připravené živné médium jsem rozlila na Petriho misky.

Ze zásobní misky s pevným živným médiem ½ ŠS jsem odebrala kolonie divokého kmene řasy *D. quadricauda*. Řasy jsem rozmíchala ve zkumavce v několika mililitrech vody. Pomocí Bürkerovy komůrky jsem spočítala koncentraci řasové suspenze. Výslednou suspenzi o koncentraci 3×10^7 buněk/ml jsem přenesla do jamek mikrotitrační destičky. Do prvního sloupce destičky jsem do každé jamky přenesla 200 µl řasové suspenze. Do ostatních pěti sloupců jsem napipetovala různé množství sterilní destilované vody. V prvních dvou řadách proběhlo ředění 10x. Do každé jamky 2 až 5 sloupce jsem napipetovala 180 µl destilované vody a 20 µl řasové suspenze z jamky předchozí. V řadách 3 a 4 proběhlo ředění 5x (160 µl destilované vody a 40 µl řasové suspenze) a v řadách 5 a 6 proběhlo ředění 2x (100 µl destilované vody a 100 µl řasové suspenze).

Z takto připravené titrační destičky jsem suspenzi řas přenesla pomocí frogovacího razítka na předem připravené Petriho misky s živným médiem ½ ŠS obsahující různé koncentrace antibiotik, a také na kontrolní misky s čistým živným médiem ½ ŠS. Řasy jsem kultivovala po dobu několika dní na světelné polici, dokud se neobjevily jednotlivé kolonie.

4.5 Izolace plazmidové DNA

Plazmidy se udržují v bakteriálních buňkách zmražené ve formě glycerolových stoků. Malé množství zmrzlých bakterií jsem seškrábala a přenesla na misky s pevným živným médiem LB (obsahujícím navíc selekční antibiotikum ampicilin o koncentraci 100 µg/ml) tak, abych následně mohla izolovat jednotlivé bakteriální kolonie, a kultivovala v inkubátoru při 37 °C přes noc. Poté jsem izolovala jednotlivé kolonie a přenesla je do kultivační zkumavky s 3 ml živného média LB s ampicilinem. Složení živného média LB je uvedené v tabulce III. Zkumavku jsem ponořila do vodní lázně o teplotě 37 °C a bakterie za soustavného třepání kultivovala 16 - 18 h.

Plazmidovou DNA jsem izolovala kitem (QIAprep Spin Miniprep Kit (250), QIAGEN) podle návodu výrobce. Celkem jsem izolovala 2 plazmidy, plazmid pMF124 s zeocinovou rezistencí a genem pro GFP (Fuhrmann et al., 1999) a plazmid pHyg3 s hygromycinovou rezistencí (Berthold et al., 2002). Koncentraci izolované DNA v roztoku jsem změřila na spektrofotometru (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific).

Tab. III: Složení živného média LB pro kultivaci bakterií.

Sloučenina	Množství na 1 l média
Pepton	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
Ampicilin	100 mg

4.6 PCR

Prvním krokem nezbytným pro PCR reakci je izolace DNA. Z vybraných kolonií řas jsem izolovala DNA kitem (Plant/Seed DNA MiniPrep, Zymo Research) dle návodu výrobce. Do PCR zkumavek jsem přenesla 1,5 µl vzorku DNA a přidala 18,5 µl master mixu (složení v tabulce IV). Všechny použité chemikálie jsou od výrobce New England BioLabs.

Tab. IV: Složení master mixu (objemy platné pro jeden vzorek).

Pořadí přidávání látek	Látka	Množství (pro 1 vzorek)
1.	H ₂ O	13,3 µl
2.	OneTaq standard buffer 10x	4 µl
3.	dNTP (2,5 mM)	0,4 µl
4.	primer č. 1 (10 mM)	0,4 µl
	primer č. 2 (10 mM)	0,4 µl
5.	OneTaq polymeráza	0,1 µl

Před přidáním master mixu k vzorku DNA jsem směs promíchala a odstředila. PCR zkumavku s DNA a přidaným master mixem jsem opět odstředila a přemístila do termocykleru (Bio-Rad) vyhřátého na 94 °C. Samotná PCR reakce probíhala při reakčních podmínkách uvedených v tabulce V. Ověřovala jsem přítomnost genu pro 18S rRNA a genu *ble* kódujícího rezistenci k zeocinu u divokého kmene a transformantů.

Tab. V: Schéma reakčních podmínek pro PCR reakci.

Reakční teplota	Čas (min)		
94 °C	0,30	iniciační denaturace	} 35x
94 °C	0,30	denaturace	
55 °C (pro 18SrRNA) 65 °C (pro <i>ble</i>)	0,30	anelace primeru	
68 °C	2	polymerizace	
68 °C	5	závěrečná polymerizace	
10 °C		konec reakce	

Vzorky amplifikované DNA jsem použila pro elektroforézu. Z PCR zkumavek jsem odebrala 20 µl vzorku a smíchala s 2 µl vzorkového pufru (10x loading dye, Thermo Fisher Scientific) a přenesla na 1 % agarózový gel s obsahem etidium bromidu. Jako marker byl použit 1kb DNA ladder (Gene Ruler, 0,1 µg/µl, 50 µg; Thermo Fisher Scientific) a to o objemu 3 µl na jamku.

Molekuly DNA jsem rozdělila na agarózovém gelu při 100 V, 500 mA po dobu 30 minut. Výsledky byly zobrazené pomocí transluminátoru (Ultra-Lum).

5 VÝSLEDKY

Cílem pokusů bylo provést transformaci *D. quadricauda* s využitím metody elektroporace. Nejprve bylo nutné vybrat vhodné antibiotikum, které by bylo možné použít jako selekční marker, pomocí kterého lze rozlišit úspěšně transformované buňky. Jeden z použitých plazmidů obsahoval reportérový gen pro GFP, který je též možno použít pro ověření úspěšnosti transformace. Dále proběhlo několik pokusů o narušení buněčné stěny *Chlorella* mechanickým způsobem za účelem oddělení jednotlivých buněk, nebo alespoň oslabení jejich buněčné stěny a tím zvýšení účinnosti transformace.

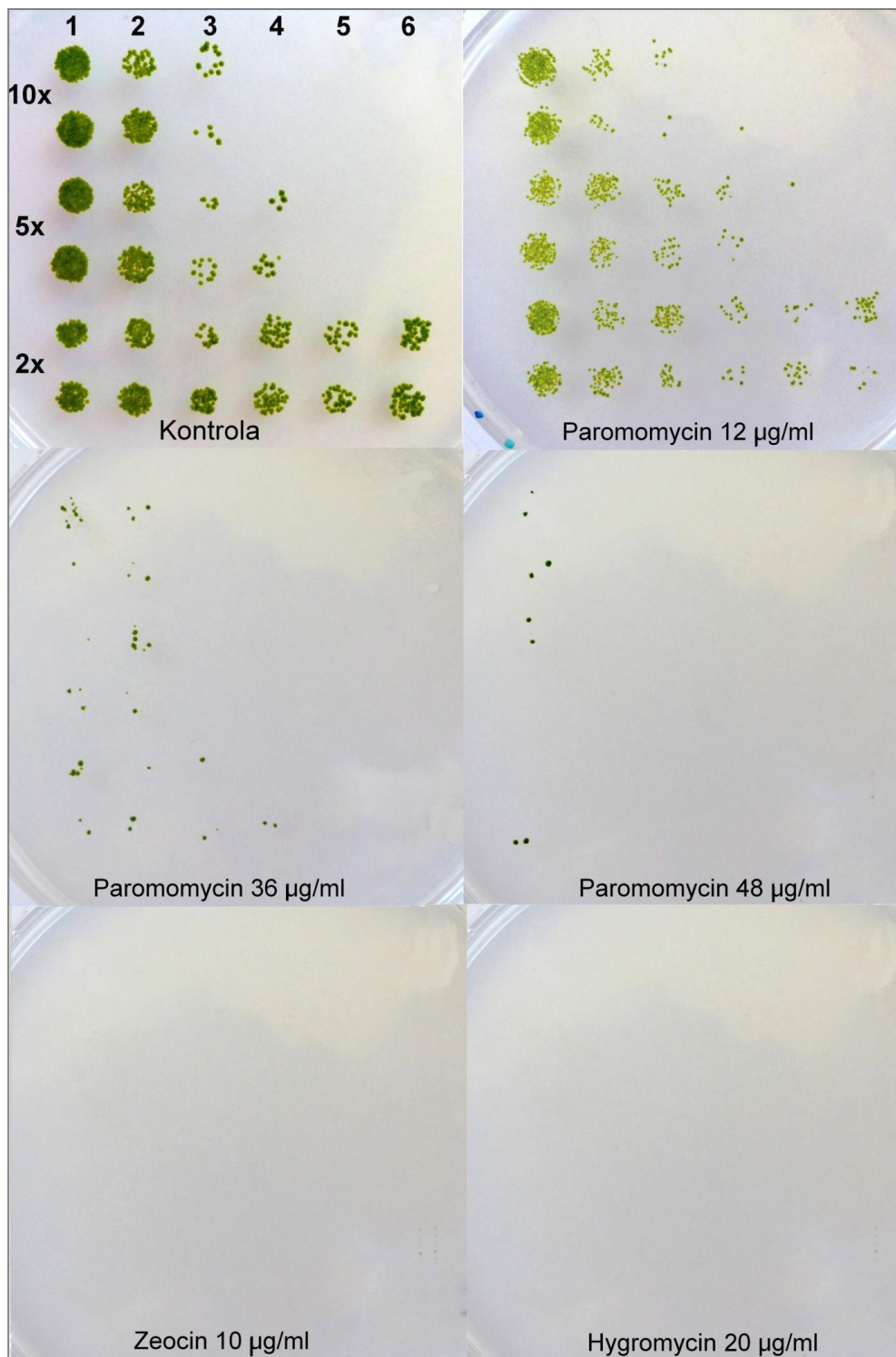
5.1 Testování citlivosti *D. quadricauda* k antibiotikům

Nejprve jsem pomocí „spot“ testu ověřovala citlivost *D. quadricauda* k různým antibiotikům. Na základě výsledku tohoto testu jsem vybrala vhodné antibiotikum, které jsem poté použila jako selekční marker pro selekci úspěšně transformovaných buněk.

Pro testování jsem vybrala tři různá antibiotika – paromomycin, hygromycin a zeocin. Řasy jsem testovala na Petriho miskách s pevným živným médiem ½ ŠS s přidaným antibiotikem. Pro každé antibiotikum jsem stanovila několik koncentrací, které vycházely ze známých koncentrací antibiotik používaných při selekci transformantů zelené řasy *C. reinhardtii* – paromomycin 12 µg/ml, 24 µg/ml, 36 µg/ml a 48 µg/ml, zeocin 10 µg/ml a 20 µg/ml, hygromycin 20 µg/ml a 40 µg/ml. Řasy jsem nejprve naředila v mikrotitrační destičce v destilované vodě a pomocí frogovacího razítka přenesla na misky s antibiotiky. Misky s řasami byly kultivovány na světle podobu několika dnů, dokud se neobjevily kolonie (viz obr. 3).

Na základě pokusu se ukázalo, že buňky *D. quadricauda* vykazují citlivost k použitým koncentracím zeocinu a hygromycinu, na miskách s antibiotiky nepřežila jediná kolonie. Z pokusu je dále zřejmé, že *D. quadricauda* je částečně rezistentní k testovaným koncentracím paromomycinu. I při nejvyšší použité koncentraci paromomycinu 48 µg/ml se objevilo několik kolonií.

Při tomto pokusu bylo ověřeno, že některé divoké kmeny řas jsou částečně rezistentní k účinku některých antibiotik, konkrétně u *D. quadricauda* se projevila částečná rezistence k paromomycinu. Naopak hygromycin a zeocin se potvrdily jako vhodné druhy antibiotik, které lze využít jako selekční markery pro transformaci.



Obr. 3: Testování citlivosti *D. quadricauda* k antibiotikům. Vlevo nahoře je kontrolní miska s čistým živným médiem $\frac{1}{2}$ ŠS, vpravo nahoře testovaná koncentrace paromomycinu 12 µg/ml, vlevo uprostřed koncentrace 36 µg/ml paromomycinu, vpravo uprostřed 48 µg/ml paromomycinu, vlevo dole 10 µg/ml zeocinu, vpravo dole 20 µg/ml hygromycinu. Způsob ředění ve sloupcích viz kapitola 4.4.

5.2 Elektroporace *D. quadricauda*

Během pokusů jsem testovala mnoho různých podmínek transformace *D. quadricauda* a jejich vzájemných kombinací. Pro transformaci byly použity 2 různé plazmidy – plazmid pHyg3 a pMF124.

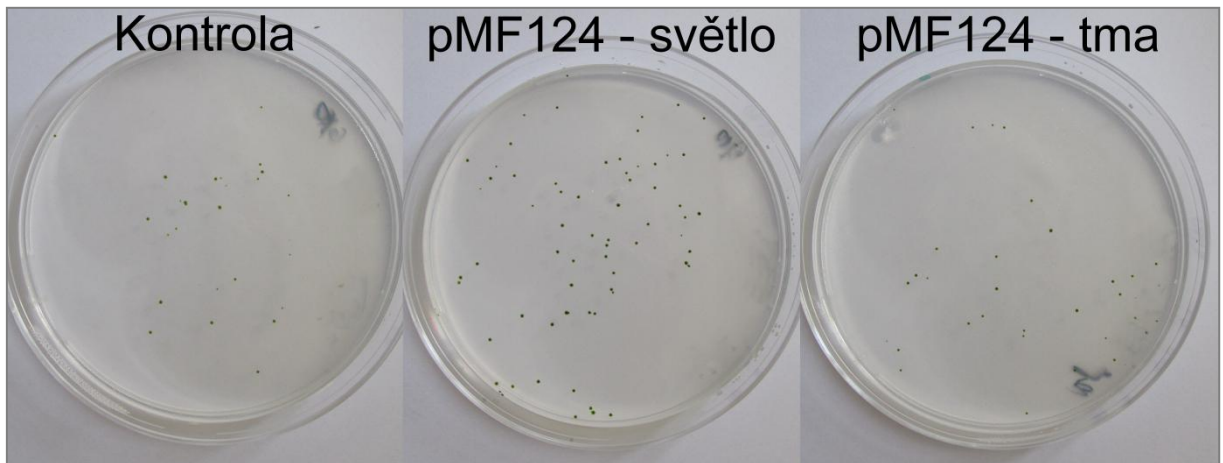
K pokusu jsem použila asynchronní kulturu řas kultivovanou na nepřetržitém světle po dobu 3 dnů, dále synchronní kulturu kultivovanou za podmínek střídání světla a tmy v poměru 14h/11h po dobu 3 dnů. V případě synchronní kultury jsem řasy odebírala v 7 h a v 11 h buněčného cyklu, tj. v době, kdy v buňkách probíhala replikace DNA. Suspenze řas s přidanou DNA inkubovaná podle postupu viz kapitola 4.3, byla podrobena elektroporaci. Testovala jsem 3 druhy různých podmínek: 400 V, 200 Ω , 150 μ F s časovou konstantou 14 ms; 400 V, 200 Ω , 250 μ F s časovou konstantou 20 ms; 1000 V, 600 Ω , 50 μ F s časovou konstantou 3 ms. Řasy jsem po elektroporaci inkubovala 12 – 18 h na světle nebo ve tmě a poté je vysela na selekční médium s obsahem příslušného antibiotika.

Při tomto postupu se v některých případech podařilo získat několik kolonií. Ve většině případů se transformace nezdařila a při transformaci pomocí plazmidu pHyg3 na miskách se selekčním médiem nenarostly žádné transformanty (viz obr. 4). Při pokusu se synchronní kulturou odebranou v 7 h a 11 h cyklu transformovanou plazmidem pMF124 se po 10 dnech kultivace na světelné polici objevilo několik kolonií na miskách s transformanty, zároveň se ale podobné množství kolonií objevilo i na kontrolních miskách s kulturou bez plazmidu. Tento jev se stejným výsledkem se opakoval i při transformaci asynchronní kultury plazmidem pMF124 (obr. 5). Narostlé kolonie jsem přeočkovala na nové misky se selekčním médiem a opět kultivovala po dobu 7-10 dnů. Při tomto postupu z původních několika kolonií po prvním přeočkování narostla přibližně polovina a při třetím přeočkování na selekční médium nepřežily kolonie žádné. Kolonie transformantů narostlých na miskách byly zřejmě falešně pozitivní. Tento jev se projevil pouze u transformace plazmidem pMF124.

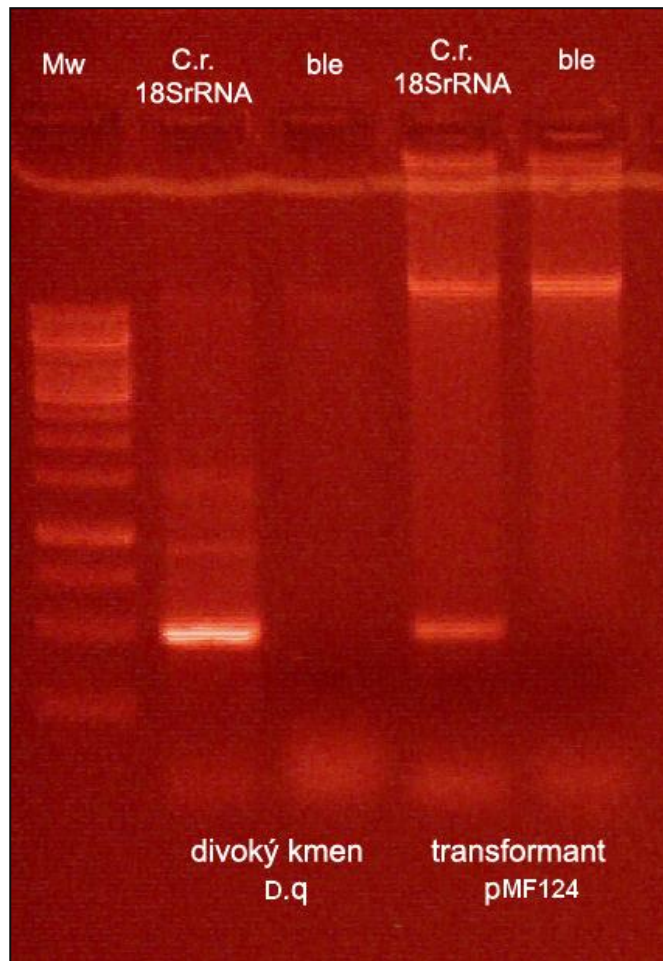
Při ověření transformantů pomocí PCR reakce se potvrdilo, že kolonie, které v malém množství přežily na selekčním médiu, neobsahují gen *ble*, který kóduje rezistenci k zeocinu, a jsou tedy falešně pozitivní. Jako pozitivní kontrola byl použit gen pro 18S rRNA, která je součástí malé ribozomální podjednotky 40S u eukaryot (viz obr. 6). Na základě těchto pokusů, při kterých se nepodařilo získat stabilní transformanty, jsem se pokoušela zvýšit účinnost transformace tím, že jsem se pokusila o narušení buněčné stěny cenobii za účelem uvolnění jednotlivých buněk.



Obr. 4: Transformace asynchronní kultury pomocí plazmidu pHyg3, podmínky elektroporace 400 V, 200 Ω , 150 μ F s časovou konstantou 14 ms, regenerace na světle. Zleva: kontrola na čistém živném médiu ½ ŠS, kontrola na médiu s 20 μ g/ml hygromycinu, transformanty pHyg3 na médiu s 20 μ g/ml hygromycinu.



Obr. 5: Transformace asynchronní kultury pomocí plazmidu pMF124, podmínky elektroporace 400 V, 200 Ω , 150 μ F s časovou konstantou 14 ms, regenerace na světle a ve tmě. Všechny misky obsahují zeocin 10 μ g/ml. Zleva: kontrolní miska, transformanty pMF124 regenerované na světle, transformanty pMF124 regenerované ve tmě.



Obr. 6: Výsledek PCR reakce pro gen *ble* (212 bp). Jako pozitivní kontrola byl použit gen pro 18SrRNA (500 bp). Jako velikostní marker byl použit GeneRuler 1 kb DNA ladder. Velikost fragmentů v bp (zdola nahoru, 14 fragmentů): 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000.

5.3 Narušení buněčné stěny cenobia *D. quadricauda*

Vzhledem k velmi nízké až nulové účinnosti transformace *D. quadricauda* jsem se pokusila o narušení vnější buněčné stěny cenobia za účelem uvolnění jednotlivých buněk, oslabení jejich buněčné stěny a zvýšení její propustnosti pro DNA.

5.3.1 Mechanické narušení buněčné stěny pomocí kuliček a sonikace

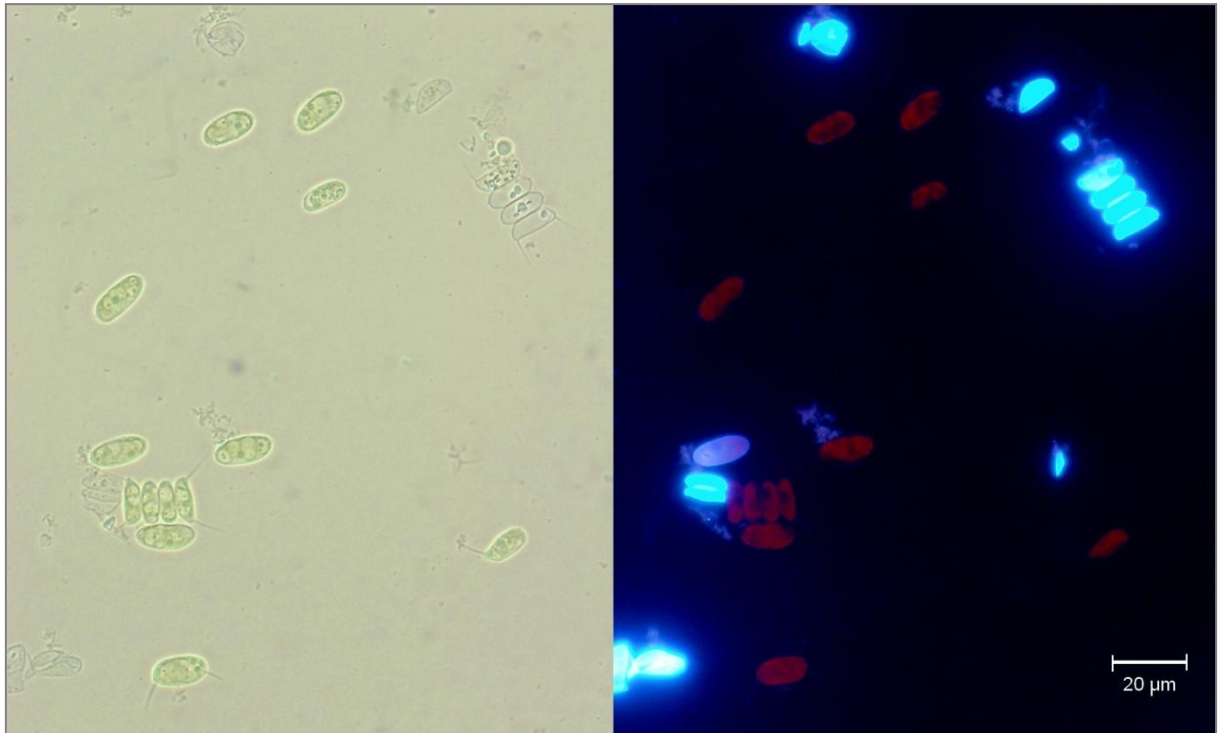
Pro pokus o rozbití vnější buněčné stěny cenobia jsem použila několik velikostí a typů kuliček, dále jsem použila mořský písek a metodu sonikace, která se využívá k rozbití buněčné stěny u bakterií (Zhang et al., 2007).

K suspenzi buněk *D. quadricauda* v médiu jsem přidala kuličky či mořský písek v poměru 2:1. Tuto směs jsem intenzivně míchala. V minutových intervalech jsem odebírala vzorky, které jsem ihned fixovala glutaraldehydem (výsledná koncentrace GA v roztoku byla 0,25 %). Vzorky jsem analyzovala pod světelným i fluorescenčním mikroskopem obarvené barvivem Calcofluor white (Sigma-Aldrich), které barví chitin a celulózu v buněčných stěnách.

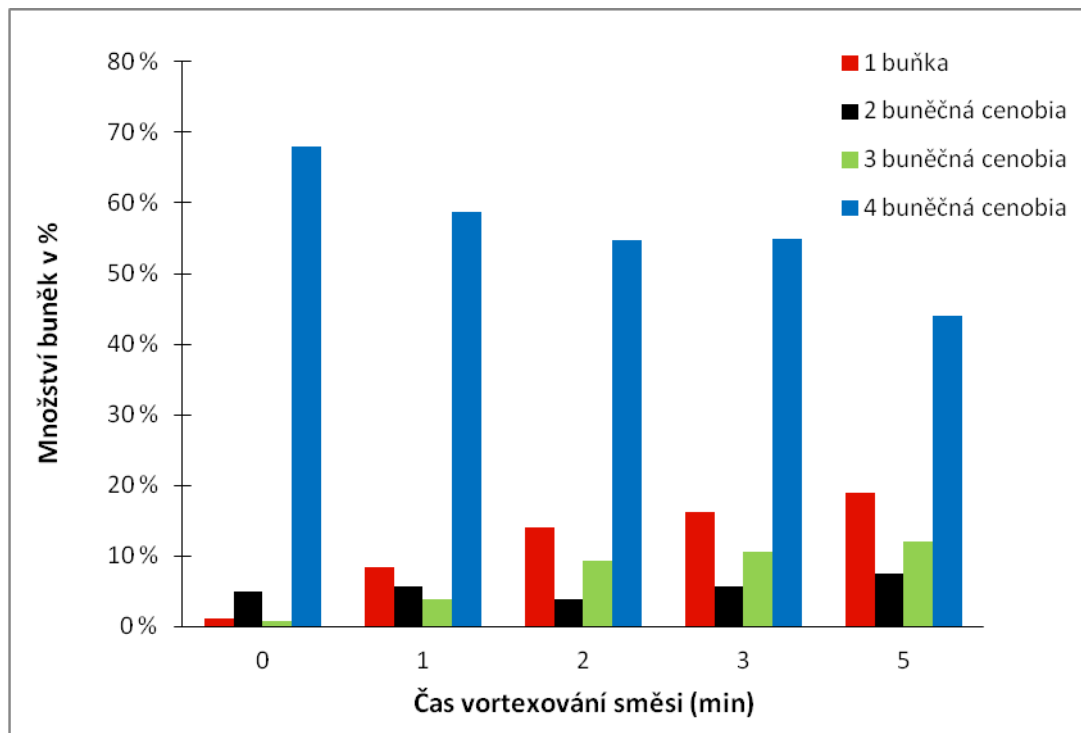
Pro pokus jsem použila 4 druhy kuliček: skleněné o průměru 0,5 mm, zirkonové o průměru 0,7 mm, 2,0 mm a 4,0 mm a mořský písek. Malé velikosti kuliček 0,5 mm a 0,7 mm způsobily už po 1 minutě míchání výrazné poškození buněk. Většina buněk byla zcela rozbitá a cytoplazmy buněk vylité, přežilo jen malé procento buněk. Naopak mořský písek nezpůsobil buňkám téměř žádné poškození a i po pěti minutách intenzivního míchání všechny buňky zůstaly nepoškozené v cenobiích.

Zirkonové kuličky o průměru 2 mm prokázaly nejlepší efekt. Po pěti minutách mixování bylo malé procento buněk zcela rozbito, zároveň se v roztoku nacházelo větší množství samostatných buněk oddělených od mateřského cenobia (viz obr. 7 a 8). Zirkonové kuličky velikosti 4 mm měly podobný efekt, který ale nebyl tak výrazný.

Metoda sonikace buněčné suspenze na ledu při frekvenci 20 kHz se ukázala jako neúčinná, vzhled buněk po 20 minutách sonikace byl srovnatelný s kontrolou, nedošlo tedy k rozpadu cenobií.



Obr. 7: Mikrofotografie buněk *D. quadricauda* po 5 min míchání s kuličkami o průměru 2 mm. Vlevo foto ve světelném poli, vpravo modře fluorescence buněčných stěn, červeně autofluorescence chlorofylu.



Obr. 8: Graf znázorňuje proces rozpadu cenobií při míchání směsi pomocí zirkonových kuliček o průměru 2 mm po dobu 0, 1, 2, 3 a 5 minut.

5.4 Elektroporace *D. quadricauda* s využitím kuliček

Při úpravě transformačního protokolu jsem do metody vložila mezikrok, při kterém jsem buňky těsně před elektroporací smísila s kuličkami a intenzivně míchala na mixéru za účelem uvolnění jednotlivých buněk. Tím by se měla potenciálně zvýšit účinnost transformace.

Buňky jsem kultivovala ve válci v tekutém živném médiu ½ ŠS po dobu 3 dnů, následně jsem spočítala jejich koncentraci v Bürkerově komůrce a množství řas potřebné pro transformaci jsem odebrala do zkumavky a odstředila. K řasám jsem přidala odpovídající množství živného média TAP se sorbitolem a směs promíchala. Tuto suspenzi jsem rozdělila po 1 ml do 2 ml zkumavek a přidala 500 µl kuliček o průměru 2 mm nebo 4 mm. Řasy v roztoku s kuličkami jsem intenzivně míchala po dobu 3 minut. Poté jsem roztok řas přenesla do čistých zkumavek a dál pokračovala dle metody (viz kapitola 4.3).

K elektroporaci s využitím kuliček jsem použila plazmid pHyg3, jako selekční médium jsem použila živné médium ½ ŠS obsahující 20 µg/ml hygromycinu. Plazmid pMF124 jsem při dalších pokusech s kuličkami nepoužívala, protože zeocin se při předchozích pokusech neosvědčil jako stabilní selekční marker.

Při takto upravené metodě elektroporace jsem nezískala žádné stabilní transformanty. Ani při opakovaných pokusech se na miskách se selekčním médiem neobjevily žádné kolonie.

6 DISKUZE

Jednobuněčné zelené řasy jsou výborným experimentálním materiálem. Lze je snadno kultivovat v laboratorních podmínkách, jsou poměrně nenáročné na množství živin a většina z nich vykazuje velmi rychlý růst. Hlavní zájmovou oblastí je zejména výzkum fotosyntézy, buněčného cyklu a metabolismu zelených řas, výzkum účinnosti akumulace makromolekulárních látek, produkce krmiv a biopaliv. Z výše uvedených důvodů je zřejmé, že genetická manipulace zelených řas otevírá nové možnosti na poli výzkumu těchto organismů (Rosenberg et al., 2008).

Dosud se podařilo transformovat více než 30 různých druhů řas. Ve většině případů jde o stabilní transformanty, v některých případech se podařilo připravit pouze dočasné transformanty (Radakovits et al., 2010). Hlavním zájmovým organismem v oblasti transformace jednobuněčných zelených řas je *C. reinhardtii*. Na tomto modelovém organismu byly testovány téměř všechny dosud používané metody transformace, kam patří metoda skleněných kuliček, vlákna z karbidu křemíku, bombardování mikroprojektily a elektroporace (Kindle, 1990; Boynton et al., 1988; Kindle, 1989; Dunahay, 1993; Yamano et al., 2013). Každá z těchto metod má rozdílnou náročnost provedení, pro každý organismus je velmi důležité vybrat vhodnou metodu a optimalizovat její podmínky tak, aby transformace proběhla úspěšně (Brown et al., 1991).

V této práci se zabývám transformací jednobuněčné zelené řasy *D. quadricauda*. Tato řasa byla dlouhou dobu předmětem zájmu při výzkumu buněčného cyklu, pro který je specifické mnohonásobné dělení. Jako nejvhodnější metodu pro transformaci této řasy jsem vybrala elektroporaci, která byla mimo jiné použita při transformaci blízce příbuzného organismu *Scenedesmus obliquus*, který rovněž patří do čeledi *Scenedesmaceae* (Guo et al., 2013). Metoda elektroporace patří mezi nejpoužívanější metody transformace. Účinnost elektroporace je při správně zvolených podmínkách relativně vysoká, patří mezi šetrnější metody a její funkčnost se projevila i u organismů, které mají buněčnou stěnu (Brown et al., 1991). Tato kritéria byla hlavní při výběru vhodné metody.

Metoda skleněných kuliček, která je rovněž velmi oblíbená a jednoduchá, vyžaduje nejprve enzymatické rozložení buněčné stěny, jinak je nefunkční (Kindle, 1990). Metody využití vláken z karbidu křemíku a bombardování mikroprojektily fungují i při transformaci buněk s buněčnou stěnou, ale pro svou náročnost na materiál a přístrojové vybavení laboratoře jsou obtížně dostupné. Proto dostala přednost elektroporace, jejíž princip je založen na krátkodobé permeabilizaci buněčné membrány, která umožňuje migraci větších

molekul DNA či proteinů dovnitř buňky (Neumann et al., 1982). Jako u všech ostatních metod i tato lépe funguje u organismů bez buněčné stěny, ale protože modelový organismus *D. quadricauda* má několikvrstvou buněčnou stěnu, která je navíc odolná většině štěpicích enzymů, pokusila jsem se o elektroporaci této řasy bez odstranění buněčné stěny i za cenu nižší účinnosti transformace (Yamano et al., 2013).

Před samotnou transformací jsem testovala rezistenci ke třem vybraným antibiotikům (paromomycinu, hygromycinu a zeocinu) za účelem výběru vhodného selekčního markeru. Jako selekční markery jsem na základě pokusu vybrala zeocin a hygromycin, ke kterým *D. quadricauda* vykazoval nejvyšší citlivost. Naopak v přítomnosti paromomycinu byl *D. quadricauda* schopný přežít i při nejvyšší testované koncentraci 48 µg/ml (viz obr. 3), a proto se neosvědčil jako vhodný selekční marker. Důvod nízké citlivosti řasy *D. quadricauda* k paromomycinu může být ten, že paromomycin není přijímán buňkou v dostatečné míře, nebo buňka může mít vyvinuty mechanismy na eliminaci negativního účinku tohoto antibiotika.

Protože genom *D. quadricauda* zatím nebyl osekvenovaný, při výběru plazmidu jsem vycházela z podobnosti modelového organismu s dobře prozkoumanou řasou *C. reinhardtii* a k transformaci jsem použila dva plazmidy připravené primárně pro tuto řasu. Plazmid pHyg3 (Berthold et al., 2002) a plazmid pMF124 (Fuhrmann et al., 1999).

Stanovit optimální podmínky elektroporace pro daný organismus je poměrně obtížné. Předchozí práce, které se zabývají elektroporací různých kmenů řasy *Chlamydomonas* naznačují, že i v rámci jednoho druhu organismu se vyskytuje různá účinnost transformace při stejných podmínkách elektroporace. V některých případech bylo prokázáno, že elektroporace buněk s buněčnou stěnou je účinnější při aplikaci několika elektrických pulzů za sebou v krátkém intervalu (Brown et al., 1991; Yamano et al., 2013). Kromě síly elektrického pole, kde závisí zejména na napětí a délce pulzu, je důležitá i teplota a osmolarita média. Při použití hypotonického média při elektroporaci může dojít k lýzi buněk, proto je vhodné použít médium obohacené 40 mM – 60 mM glukózou, případně jiným sacharidem tak, aby bylo pro daný organismus izotonické (Shimogawara et al., 1998). Vliv teploty na účinnost transformace je dalším z diskutovaných parametrů. V převážně většině metodik se využívá elektroporace za nízkých teplot okolo 0 °C. Důvodem je zpomalení opětovného zavírání membránových pórů, což poskytuje molekulám DNA delší čas pro vniknutí do buňky (Guo et al., 2013; Sun et al., 2005). Naopak jiné pokusy naznačují, že elektroporace při velmi nízkých teplotách okolo 0° C je málo účinná, protože při pomalém uzavírání membránových pórů jsou buňky více náchylné k lýzi, nejlepší

účinnosti dosahuje v rozmezí 10 – 20 °C (Shimogawara et al., 1998). Z výše uvedeného vyplývá, že je důležité vhodně sladit jednotlivé podmínky tak, aby se podařilo transformovat co nejvíce buněk a zároveň zachovat jejich životaschopnost.

Pokusy o vytvoření stabilních transformantů *D. quadricauda* byly neúspěšné, přestože jsem testovala několik různých podmínek elektroporace. Při sestavování metody elektroporace jsem vycházela ze zkušeností z předchozích pokusů s *C. reinhardtii* a *S. obliquus* (Guo et al., 2013), přesto se mi nepodařilo vytvořit vhodné podmínky. Buňky byly po elektroporaci životaschopné, na čistém živném médiu ½ ŠS rostly ve velké hustotě, zatímco na selekčním médiu se neobjevila jediná kolonie. V několika případech transformace plazmidem pMF124 došlo k tomu, že kolonie transformantů i kontrolní kmen rostly na selekčním médiu se zeocinem (viz obr. 5). Příčinou je zřejmě nízká tepelná a světelná stabilita zeocinu, který mohl být při více než týdenní kultivaci řas na světelné polici v médiu degradován (Wang, 2008). Existuje mnoho důvodů, proč mohla být transformace plazmidovou DNA neúspěšná. Prvním předpokládaným důvodem je to, že buněčná stěna *D. quadricauda* je velmi silná, tvořená několika vrstvami, které jsou složeny z velmi odolných materiálů, tvořících mechanickou bariéru pro průchod DNA do buňky (Voigt et al., 2014). Další variantou je, že DNA vnikla do buňky, ale byla rozpoznána jako cizí a degradována, inaktivována nebo systém kodonů genu nebyl kompatibilní s daným organismem, případně byl použit nevhodný promotor.

Při transformaci synchronní kultury řas, kterou jsem získala střídáním světla a tmy v poměru 14h/11h v průběhu kultivace, jsem se pokusila o transformaci řas přibližně v době replikace DNA. Předpokládala jsem, že v této fázi buněčného cyklu je větší pravděpodobnost, že buňky začlení cizí DNA do svého genomu. Na základě předešlých studií buněčného cyklu *D. quadricauda* jsem zvolila 7 h a 11 h buněčného cyklu (Hlavová et al., 2011). Výsledek transformace synchronní kultury byl v obou případech negativní.

Na základě faktu, že buněčná stěna cenobia *D. quadricauda* je třívrstvá a velmi odolná štěpicím enzymům, rozhodla jsem se ji těsně před samotnou elektroporací narušit mechanicky pomocí kuliček a pomocí sonikace. Vzhledem k tomu, že se *D. quadricauda* rozmnožuje výhradně vegetativně a vyskytuje se pouze ve formě několikabuněčného cenobia (Fott, 1967), cílem pokusů bylo narušit vnější stěnu cenobia a oddělit od sebe jednotlivé buňky. Metoda sonikace se běžně používá při homogenizaci buněk a funguje dobře zejména u prokaryot. Při sonikaci záleží především na použité frekvenci ultrazvuku, nízké frekvence kolem 20 kHz zvyšují destrukční účinek ultrazvuku na buňky (Joyce et al., 2003). Při použití

sonikace u *D. quadricauda* jsem nepozorovala žádný účinek na strukturu cenobií, tato metoda zřejmě nedokáže narušit buněčnou stěnu eukaryot, která je více odolná než u prokaryot.

Homogenizace pomocí skleněných kuliček je jedna z neúčinnějších a nejjednodušších metod. Požadavky na provedení jsou minimální, při homogenizaci lze použít různě koncentrované roztoky, jediným požadavkem je, aby roztok buněk byl dostatečně tekutý. Míra poškození buněk závisí na poměru kuliček a roztoku - čím menší je objem roztoku vůči kuličkám, tím větší je poškození (Lamanna et al., 1954). Při použití zirkonových kuliček velikosti 2 mm v poměru kuliček a roztoku 1:2 došlo při míchání k rozbití velkého množství cenobií a oddělení jednotlivých buněk. Cílem bylo narušit buněčnou stěnu před elektroporací a zachovat životaschopnost buněk. Kuličky menších velikostí způsobily ještě výraznější poškození buněk, při kterém došlo nejen k rozbití buněčné stěny, ale k úplnému usmrcení většiny buněk. Nejlepší žádaný efekt měly v tomto případě kuličky velikosti 2 mm, které jsem následně použila při modifikaci transformačního protokolu. Bohužel ani touto modifikací transformačního protokolu se mi nepodařilo získat stabilní transformanty.

7 ZÁVĚR

Z mých pokusů vyplývá, že *D. quadricauda* vykazuje citlivost vůči zeocinu a hygromycinu, tato antibiotika lze použít k selekci mutantních linií. Zjistila jsem, že zeocin je vzhledem ke svému mutagennímu efektu a nízké teplotní a světelné stabilitě méně vhodný při selekci mutantních linií řas, proto jsem v pozdějších pokusech dala přednost hygromycinu.

Testovala jsem několik různých podmínek elektroporace, pokusila jsem se o transformaci buněk *D. quadricauda* v různých fázích buněčného cyklu synchronní i asynchronní kultury. Testovala jsem účinek sonikace a zirkonových kuliček na buněčnou stěnu cenobií. Účinek sonikace na narušení buněčné stěny nebyl prokázán. Zirkonové kuličky o velikosti 2 mm způsobily alespoň částečný rozpad cenobií na jednotlivé buňky.

Transformace plazmidem pHyg3 nevedla ke vzniku transformantů. Transformace plazmidem pMF124 v některých případech vedla k přežívání falešně pozitivních kolonií. Při testování pomocí PCR se potvrdilo, že tyto kolonie neobsahují gen rezistence k zeocinu (*ble*).

Žádná z výše uvedených metod a jejich kombinací nevedla ke vzniku stabilních transformantů *D. quadricauda*.

8 SEZNAM LITERATURY

Berdy, J. (1980). Bleomycin-Type Antibiotics. In *Amino Acid and Peptide Antibiotics*. *CRC Press*. 1980: 459-497.

Berthold, P., Schmitt, R., & Mages, W. (2002). An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph 7"gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist*, 153(4): 401-412.

Bisalputra T., Weier T. E. (1963). The cell wall of *Scenedesmus quadricauda*. *American Journal of Botany* 50: 1011–1019.

Bishop, N. I., & Senger, H. (1971). [3] Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*. *Methods in Enzymology*, 23: 53-66.

Bišová, K., & Zachleder, V. (2014). Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *Journal of Experimental Botany*, 65(10): 2585-2602.

Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., & Johnson, A. M. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240(4858): 1534.

Brown, L. E., Sprecher, S. L., & Keller, L. R. (1991). Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Molecular and Cellular Biology*, 11(4): 2328-2332.

Çelekli, A., Kapı, M., & Bozkurt, H. (2013). Effect of cadmium on biomass, pigmentation, malondialdehyde, and proline of *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(5): 571-576.

Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., & Ward, W. W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*, 32(5): 1212-1218.

Costanzo, M. C., & Fox, T. D. (1988). Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics*, 120(3): 667-670.

- Davidson, R. N., den Boer, M., & Ritmeijer, K.** (2009). Paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(7): 653-660.
- Dawson, H. N., Burlingame, R., & Cannons, A. C.** (1997). Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Current Microbiology*, 35(6): 356-362.
- Dunahay, T. G.** (1993). Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques*, 15(3): 452-455.
- El-Sheekh, M. M.** (1999). Stable transformation of the intact cells of *Chlorella kessleri* with high velocity microprojectiles. *Biologia Plantarum*, 42(2): 209-216.
- Feng, S., Xue, L., Liu, H., & Lu, P.** (2009). Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method. *Molecular Biology Reports*, 36(6): 1433-1439.
- Fott B.** (1967). *Sinice a řasy*. Academia, Praha.
- Fuhrmann, M., Oertel, W., & Hegemann, P.** (1999). A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 19(3): 353-361.
- Gatignol, A., Durand, H., & Tiraby, G.** (1988). Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Letters*, 230(1-2): 171-175.
- Gavis J., Chamberlin C. & Lystad L. D.** (1979). Coenobial cell number in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) as a function of growth rate in nitrate-limited chemostats. *Journal of Phycology* 15: 273-275.
- Guo, S. L., Zhao, X. Q., Tang, Y., Wan, C., Alam, M. A., Ho, S. H., Bai, F. W. & Chang, J. S** (2013). Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Biotechnology*, 163(1): 61-68.
- Hamouda, R. A., Yeheia, D. S., Hussein, M. H., & Hamzah, H. A.** (2016). Removal of heavy metals and production of bioethanol by green alga *Scenedesmus obliquus* grown in different concentrations of wastewater. *Sains Malaysiana*, 45(3): 467-476.

- Hlavová, M., Čížková, M., Vítová, M., Bišová, K., & Zachleder, V.** (2011). DNA damage during G2 phase does not affect cell cycle progression of the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *PloS One*, 6(5): e19626.
- Howard, A., Pelc, S. R.** (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, 6: 261-273.
- Jaenicke, L., Kuhne, W., Spessert, R., Wahle, U., & Waffenschmidt, S.** (1987). Cell-wall lytic enzymes (autolysins) of *Chlamydomonas reinhardtii* are (hydroxy)proline-specific proteases. *European Journal of Biochemistry*, 170(1-2): 485-491.
- Joyce, E., Phull, S. S., Lorimer, J. P., & Mason, T. J.** (2003). The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(6): 315-318.
- Kaeppler, H. F., Gu, W., Somers, D. A., Rines, H. W., & Cockburn, A. F.** (1990). Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Reports*, 9(8): 415-418.
- Kindle, K. L.** (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 87(3): 1228-1232.
- Kindle, K. L., Schnell, R. A., Fernández, E., & Lefebvre, P. A.** (1989). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *The Journal of Cell Biology*, 109(6): 2589-2601.
- Kizilkaya, B., Türker, G., Akgül, R., & Doğan, F.** (2012). Comparative study of biosorption of heavy metals using living green algae *Scenedesmus quadricauda* and *Neochloris pseudoalveolaris*: equilibrium and kinetics. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33(3): 410-419.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., & Sanford, J. C.** (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327(6117): 70-73.
- Komárek J., Růžička J.** 1969. Effect of temperature on the growth and variability of *Scenedesmus quadricauda* (TURP.) BREB. *Studies on Phycology*. Praha Academic Press.

- Kováčik, J., Babula, P., Hedbavny, J., Kryštofová, O., & Provazník, I.** (2015). Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object. *Chemosphere*, 120: 23-30.
- Lamanna, C., & Mallette, M. F.** (1954). Use of glass beads for the mechanical rupture of microorganisms in concentrated suspensions. *Journal of Bacteriology*, 67(4): 503.
- León-Bañares, R., González-Ballester, D., Galván, A., & Fernández, E.** (2004). Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends in Biotechnology*, 22(1): 45-52.
- Lien, T a Knutsen, G.** (1979). Synchronous growth of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae): a review of optimal conditions. *Journal of Phycology*, 15 (2): 191-200.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., ... & Marshall, W. F.** (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848): 245-250.
- Mitchison, J. M.** (1971). The Biology of the Cell Cycle. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H.** (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1(7): 841.
- Phillips, G. J.** (2001). Green fluorescent protein – a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiology Letters*, 204(1): 9-18.
- Pittenger, R., Wolfe, R., Hoehn, M., Marks, P., Daily, W., & McGuire, J. M.** (1953). Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiotics & Chemotherapy (Northfield, Ill.)*, 3(12): 1268-1278.
- Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J, kol.** (1998). Fyziologie rostlin. *Academia*, Praha.
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A., & Posewitz, M. C.** (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*, 9(4): 486-501.

- Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Wilkinson, L., & Betenbaugh, M. J.** (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5): 430-436.
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., & Mayfield, S. P.** (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *The Plant Journal*, 82(3): 523-531.
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., & Usuda, H.** (1998). High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*, 148(4): 1821-1828.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y.** (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3): 223-239.
- Steenbergen C.L.M.** (1975). Light-dependent morphogenesis of unicellular stages in synchronized cultures of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. (Chlorophyceae). *Acta Botanica Nederlandica*, 24: 391-396.
- Sun, Y., Yang, Z., Gao, X., Li, Q., Zhang, Q., & Xu, Z.** (2005). Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. *Molecular Biotechnology*, 30(3): 185-192.
- Šetlík I., Berková E., Doucha J., Kubín S., Vendlová J., Zachleder V.** (1972). The coupling of synthetic and reproduction processes in *Scenedesmus quadricauda*. *Archives of Hydrobiology, Algological Studies*, 7: 172-217.
- Šetlík, I., & Zachleder, V.** (1984). The multiple fission cell reproductive patterns in algae. *The Microbial Cell Cycle. CRC Press, Boca Raton (USA)*: 253-279.
- Umysová, D., Vítová, M., Doušková, I., Bišová, K., Hlavová, M., Čížková, M., Machát J., Kováčik, J., Babula, P., Hedbavny, J., Kryštofová, O., & Provazník, I.** (2015). Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object. *Chemosphere*, 120: 23-30.
- Vain, P., McMullen, M. D., & Finer, J. J.** (1993). Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports*, 12(2): 84-88.

- Vicens, Q., & Westhof, E.** (2001). Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure*, 9(8): 647-658.
- Voigt, J., Stolarczyk, A., Zych, M., Malec, P., & Burczyk, J.** (2014). The cell-wall glycoproteins of the green alga *Scenedesmus obliquus*. The predominant cell-wall polypeptide of *Scenedesmus obliquus* is related to the cell-wall glycoprotein gp3 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*, 215: 39-47.
- Waldron, C., Murphy, E. B., Roberts, J. L., Gustafson, G. D., Armour, S. L., & Malcolm, S. K.** (1985). Resistance to hygromycin B. *Plant Molecular Biology*, 5(2): 103-108.
- Walker, T. L., Becker, D. K., Dale, J. L., & Collet, C.** (2005). Towards the development of a nuclear transformation system for *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Applied Phycology*, 17(4): 363-368.
- Wang, F.** (Ed.). (2008). *Biomarker methods in drug discovery and development*. Springer Science & Business Media.
- Wong, Y. K., Yung, K. K. L., Tsang, Y. F., Xia, Y., Wang, L., & Ho, K. C.** (2015). *Scenedesmus quadricauda* for nutrient removal and lipid production in wastewater. *Water Environment Research*, 87(12): 2037-2044.
- Yamano, T., Iguchi, H., & Fukuzawa, H.** (2013). Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(6): 691-694.
- Zachleder, V., Bišová, K., Vítová, M., Kubín, Š., & Hendrychová, J.** (2002). Variety of cell cycle patterns in the alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta) as revealed by application of illumination regimes and inhibitors. *European Journal of Phycology*, 37(03): 361-371.
- Zachleder, V., Schläfli, & O. Boschetti, A.** (1997). Growth-controlled oscillation in activity of histone H1 kinase during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) 1. *Journal of Phycology*, 33(4): 673-681.

Zachleder, V., & Šetlík, I. (1982). Effect of irradiance on the course of RNA synthesis in the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda*. *Biologia Plantarum*, 24(5): 341-353.

Zachleder, V., & Šetlík, I. (1990). Timing of events in overlapping cell reproductive sequences and their mutual interactions in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of Cell Science*, 97(4): 631-638.

Zhang, P., Zhang, G., & Wang, W. (2007). Ultrasonic treatment of biological sludge: floc disintegration, cell lysis and inactivation. *Bioresource Technology*, 98(1): 207-210.

9 ZDROJ OBRÁZKŮ

[1] *Scenedesmus quadricauda*. In: *Pearltrees* [online]. [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.pearltrees.com/seine/chlorophyta/id8360233/item81120402>