

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Vliv vybraných podmínek prostředí na obsah a distribuci
pigmentů v buňkách bakterie *Deinococcus radiodurans***

Bakalářská práce

Eliška Šťastná

Školitel: RNDr. David Bína, Ph.D.

České Budějovice

2023

Šťastná, E., 2023: Vliv vybraných podmínek prostředí na obsah a distribuci pigmentů v buňkách bakterie *Deinococcus radiodurans* [The influence of selected environmental conditions on the content and distribution of pigments in cells of the *Deinococcus radiodurans* bacterium. Bc. Thesis, in Czech.] – 29 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

This bachelor thesis investigates the effect of light conditions on carotenoid production in the bacterium *Deinococcus radiodurans*. The theoretical part of the thesis is aimed at summarizing information about *Deinococcus radiodurans*, focusing on the mechanisms of protection and the structures involved in protection. In the experimental part, it was investigated how and whether light of different wavelengths affects the production and composition of pigments in *D. radiodurans* cells.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 13.4.2023

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Davidovi Bínovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost v průběhu vypracovávání mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala panu Františkovi Matouškovi za pomoc s kapalinovou chromatografií a extrakcí pigmentů.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat za odbornou pomoc s průtokovou cytometrií panu Jason Lawrence Deanovi, BSc.Hons.

Mé největší díky patří rodině a přátelům, kteří mi byli po celou dobu psaní mé práce velkou oporou.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Charakteristika čeledi <i>Deinococcaceae</i>	1
1.2 <i>Deinococcus radiodurans</i>	1
1.2.1 Obecná charakteristika bakterie <i>Deinococcus radiodurans</i>	1
1.2.2 Mechanismy ochrany <i>D. radiodurans</i>	2
1.2.3 S-layers.....	4
1.3 Karotenoidy	5
1.4 Deinoxanthin.....	6
1.5 Bakteriofytochromy	7
2. Cíle práce.....	8
3. Materiály a metody.....	9
3.1 Použité chemikálie a přístroje.....	9
3.2 Metody	10
3.2.1 Příprava média a očkování nových kultur.....	10
3.2.2 Extrakce a analýza pigmentů.....	11
4. Výsledky	12
4.1. Bioinformatika	12
4.2 Analýza pigmentů	14
4.3 Pigmentové složení buněk	17
4.3.1 Karotenoidy.....	17
4.3.2 Další pigmenty	18
5. Diskuse.....	20
6. Závěr	22
7. Seznam použité literatury	23

1. Úvod

1.1 Charakteristika čeledi *Deinococcaceae*

Čeď *Deinococcaceae* je charakteristická svou výjimečnou schopností přežit vysoké dávky ionizujícího záření, DNA poškozujících látek či vysychání (Battista 1997). Jelikož bakterie náležící do této skupiny dokáží vydržet dávky záření až 1000× vyšší než většina obratlovců, jsou považovány za jedny z nejvíce odolných organismů nejen vůči záření (Munteanu et al., 2015). Původně byly bakterie z této čeledi řazeny do rodu *Micrococcus* (Anderson et al., 1956), nicméně pozdější taxonomické zkoumání a analýza 16S a 5S rRNA sekvencí odhalila, že tento předpoklad nebyl správný. Studií nebyla potvrzena žádná příbuznost mezi deinokoky a *Micrococcaceae*. Naopak bylo prokázáno, že členové rodu *Deinococcus* vykazují příbuznost s rody *Deinobacter* a *Thermus* (Hensel et al., 1986; Weisburg et al., 1989; Van den Eynde et al., 1990).

Čeď *Deinococcaceae* zahrnuje kryofilní, mezofilní i termofilní heterotrofní bakterie (Battista 1997). Druhy tohoto rodu byly izolovány ze široké škály prostředí (Murray et al., 1992; Brooks et al., 1981), např. ze zvířecích exkrementů, odpadních vod (Ito et al., 1983) či zpracovaného masa (Anderson et al., 1956). Skutečnost, že některé druhy byly získány i z prachu nebo vzduchu a textilií (Christensen et al., 1981) ukazuje na schopnost těchto bakterií přežít i v suchém prostředí. Faktem však zůstává, že většina druhů byla izolována z půdy a substrátů bohatých na organické látky (Murray et al., 1992; Brooks et al., 1981).

1.2 *Deinococcus radiodurans*

1.2.1 Obecná charakteristika bakterie *Deinococcus radiodurans*

Bakterie *D. radiodurans* byla poprvé izolována v roce 1956 A. W. Andersonem z konzervovaného masa při studiu sterilizačních schopností gama záření (Anderson et al., 1956). Jedná se o druh, jenž obývá i nehostinná prostředí a dokáže přežít nepříznivé podmínky, které jsou pro mnohé druhy často letální. Přirozené prostředí této extremofilní bakterie doposud nebylo přesně definováno.

Jde o nepatogenní, obligátně aerobní, nefotosyntetickou, kulovitou bakterii, o průměru 1,5 – 3,5 μm , která typicky vytváří tetrakoky (Battista 1997). Na základě Gramovy barvicí reakce je *D. radiodurans* klasifikován jako grampozitivní bakterie, nicméně díky charakteristickému složení lipidů a přítomnosti složitého buněčného obalu se podobá spíše bakteriím gramnegativním (Lancy, 1978). Vytváří hladké, konvexní kolonie, které se vyznačují růžovou, oranžovou až červenou barvou (Battista 1997) a to především díky schopnosti syntetizovat karotenoidy (Tian et al., 2010). Kolonie *D. radiodurans* se v případě laboratorní kultivace pěstují nejčastěji v médiu TGY (kvasnicový extrakt, glukóza, trypton) při $\text{pH} \sim 7,00$. Optimální teplota pro pěstování kolonií je 30°C až 37°C , růst ustává při teplotách pod 4°C a nad 45°C (Battista, 1997).

Genom *D. radiodurans* je složen ze dvou chromozomů, jednoho plazmidu a jednoho megaplazmidu, které kódují celkem asi 3195 genů (Makarova et al., 2001). Makarova et al. (2001) při komplexní genomové analýze odhalili přítomnost asi 1000 genů s neznámou funkcí a rovněž přítomnost mnoha typických bakteriálních genů kódujících replikaci a opravu DNA.

Zajímavé je, že v genomu *D. radiodurans* je kódován menší počet genů pro opravy DNA než u některých dalších druhů prokaryotních organismů, více citlivých na záření, jako je např. *Escherichia coli*. Kromě toho obsahuje *D. radiodurans* i geny dříve pozorované pouze u eukaryotních organismů případně archea. Tyto geny získal pravděpodobně horizontálním přenosem genů (Makarova et al., 2001), jenž hrál zřejmě důležitou roli v evoluci bakterií a archea (Nelson et al., 1999).

1.2.2 Mechanismy ochrany *D. radiodurans*

Jak již bylo zmíněno, *D. radiodurans* je dobře znám pro svou extrémní odolnost vůči vysokým dávkám ionizujícího záření, UV záření, vysychání a mnohým faktorům indukujícím oxidační poškození DNA a dalších buněčných makromolekul. *D. radiodurans* je schopen odolat vysokému poškození DNA díky efektivním mechanismům oprav a ochrany proteinů (Slade et al., 2011).

Tyto antioxidační mechanismy jsou vybaveny jak běžnými enzymy, zachytávajícími reaktivní formy kyslíku (např. katalázou a superoxiddismutázou), tak mnohými neenzymatickými antioxidanty (např. karotenoidy). Důležitou roli ve výše zmíněných antioxidačních systémech hrají komplexy dvoumocného manganu (Qi et al., 2020). Tyto systémy mají klíčový význam v oblasti medicíny, jelikož oxidativní stres způsobený

reaktivními formami kyslíku je spojován se stárnutím a vznikem rakoviny. Proto by studium strategií, které využívá *D. radiodurans* v boji proti oxidativnímu stresu, mohlo vést k objevení nových možností pro léčbu rakoviny (Slade et al., 2011).

Reaktivní kyslíkové formy, zkráceně ROS, jsou chemické sloučeniny obsahující kyslík a volné radikály. Tyto volné radikály jsou molekuly s jedním nebo více volnými elektronovými páry a jsou velice reaktivní, což znamená, že se snadno spojují s jinými molekulami v těle a mohou poškodit jejich strukturu nebo funkci (Sies, 2015; Valko et al., 2006). Za reaktivní formy kyslíku jsou považovány hydroxylové radikály ($\cdot\text{OH}$), superoxidový anion (O_2^-) a peroxid vodíku (H_2O_2) (Halliwell, 1992).

ROS jsou v těle běžně produkovány jako vedlejší produkt při procesech dýchání, ale jejich produkce může být zvýšená různými faktory, jedním z nich je například stres. Pokud jsou ROS přítomny v organismu v nadměrném množství, mohou způsobovat poškození buněk a tkání a jak již bylo zmíněno jsou také spojovány se vznikem rakoviny (Halliwell, 1992; Kregel et al., 2007). Nicméně ROS jsou také důležité pro normální fungování těla a jsou zapojeny do procesů, jako je imunitní odpověď, buněčná signalizace a regulace genové exprese. Správná rovnováha ROS je proto důležitá pro udržení zdraví a dobře fungujícího organismu (Finkel et al., 2000).

K ochraně před reaktivními formami kyslíku (ROS) využívá *D. radiodurans* několik mechanismů, z nichž některé jsou pro tuto bakterii unikátní. Prvním z nich je produkce antioxidantů, kterými mohou být například thioredoxin, glutaredoxin, superoxiddismutáza či kataláza. Tyto enzymy neutralizují ROS, které se vyskytují v buňce a snižují tak poškození buněčných struktur (Daly, 2009; Slade et al., 2011).

Dalším mechanismem obrany je účinný mechanismus oprav poškozené DNA, který jí umožňuje rychle opravit a obnovit poškozené DNA řetězce. Tento způsob obrany je důležitý pro přežití vysokých dávek ionizujícího záření, které mohou způsobit rozsáhlé poškození DNA (Blasius et al., 2008).

Třetím mechanismem je regulace genové exprese, která umožňuje buněčnému jádru rychle reagovat na stresové podněty a přizpůsobit se novým podmínkám. Například po vystavení ionizujícímu záření se některé geny upraví tak, aby se zvýšila produkce antioxidantů nebo aby se stimulovaly další ochranné mechanismy (Daly, 2009; Slade et al., 2011; Hua et al., 2015).

Posledním mechanismem je ochrana buněčných struktur. Bakterie *D. radiodurans* má pevnou buněčnou stěnu, která pomáhá chránit buňku před jejím poškozením a před oxidativním stresem. Navíc je schopna vytvářet vnitřní struktury, tzv. polyfosfátová granula, které obsahují antioxidanty a chrání buňku před oxidativním stresem. Výše uvedené mechanismy společně umožňují *D. radiodurans* přežít vysoké dávky ionizujícího záření a oxidativního stresu a vysvětlují extrémní odolnost vůči těmto stresovým podmínkám (Blasius et al., 2008).

1.2.3 S-layers

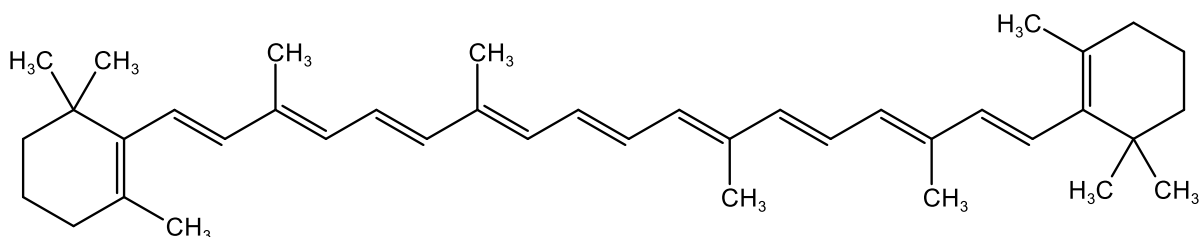
D. radiodurans má k ochraně ještě povrchovou vrstvu, která je známá jako S-vrstva (Farci et al., 2016). S-vrstva je charakterizována jako dvourozměrný agregát proteinů (Sleytr, 1978), který se nachází na vnější straně buněčné stěny (Messner et al., 1992; Bahl et al., 1997). Tato buněčná struktura je rozšířená mezi eubakteriemi a archea (Sára et al., 2000), avšak její funkce se zdá být proměnlivá a spojená s různými ekologickými faktory (Fagan et al., 2014). V případě bakterie *D. radiodurans* obsahuje S-vrstva specifický vzor proteinů (Farci et al., 2014) a karotenoid deinoxanthin, jenž bakteriím dodává jejich charakteristické růžovooranžové zbarvení a napomáhá jim k přežití v extrémních podmínkách, jako je vysychání a ultrafialové záření (Lemee et al., 1997). S-vrstva se skládá z několika proteinů uspořádaných do dvou částí. První částí je oblast pórů, hlavními složkami zde jsou protein DR_0774 (PilQ), pilin uspořádaný do dodekamerů tvořících pilační systém typu IV a protein DR_2508, také známý jako Hexagonally Packed Intermediate (HPI). Druhá část se nachází mezi póry a skládá se z proteinu DR_2577, který je mimo jiné známý jako SlpA a tvoří hlavní složku S-vrstvy (Farci et al., 2015).

Podle studie Farci et al. (2016) jsou mutanti *D. radiodurans*, kteří postrádají protein S-vrstvy DR_2577 mnohem citlivější na UV záření a vysychání. Výzkum také prokázal, že tento protein váže karotenoid deinoxanthin, silný antioxidant. Spektroskopickou charakterizací komplexu deinoxanthin-DR_2577 bylo odhaleno, že tento komplex má ochrannou funkci, a tudíž by S-vrstva mohla sloužit jako první linie obrany proti ultrafialovému záření zejména ve vysušených buňkách, které nemají tolik účinný vnitřní ochranný systém.

1.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou skupinou přírodních, hydrofobních pigmentů, vyskytující se v řadě rostlin, bakterií, řas, hub a dalších organismů. Zatímco rostliny a mikroorganismy jsou schopny karotenoidy endogenně syntetizovat v reakci na rozličné environmentální stresy, živočichové je obvykle musí přijímat v potravě (Kirti et al., 2014). V případě fotosyntetických organismů se karotenoidy uplatňují jako pomocné pigmenty ve světlosběrných komplexech, kde zvyšují absorpci světelné energie. Vedle toho mají karotenoidy také obrannou funkci proti některým meziproduktům fotosyntézy nebo se u bakterií podílejí na posílení membrány či působí proti reaktivním formám kyslíku (ROS) (Tian et al., 2010). Jedná se o v tučích rozpustné molekuly, které jsou z chemického hlediska chápány jako polyizoprenoidy složené z izoprenových jednotek C₅ (Kirti et al., 2014). Karotenoidy jsou lineární molekuly obsahující v řetězci systém konjugovaných dvojných vazeb s delokalizovanými π -elektrony. Buď jsou jejich molekuly čistě alifatické, nebo mohou na svých koncích obsahovat pětičlenné či šestičlenné cykly, jež mohou být nahrazeny funkční skupinou. Vlastnosti karotenoidů ovlivňující jejich rozpustnost a vstřebatelnost jsou do jisté míry dány tvarem molekul, jenž závisí na izomerní formě (Britton et al., 1995). Jak již bylo řečeno, karotenoidy obsahují systém konjugovaných dvojných vazeb, díky čemuž se mohou vytvářet různé stereoizomerní formy (*cis/trans* formy) (Hencken et al., 1992). Na rozdíl od tužších lineárních *trans* forem nemají *cis*-izomery takovou tendenci krystalizovat a agregovat, a tudíž mohou být snadněji absorbovány, transportovány a solubilizovány (Britton et al., 1995).

Karotenoidy mohou být dle chemického složení rozděleny do dvou hlavních skupin, karoteny a xantofyly. Karoteny jsou chápány jako nepolární uhlovodíkové karotenoidy, skládající se z atomů uhlíku a vodíku (Kirti et al., 2014). Jedním z nejznámějších karotenů je například β -karoten (Obr. 1), provitamin vitaminu A (Mortensen et al., 1997).

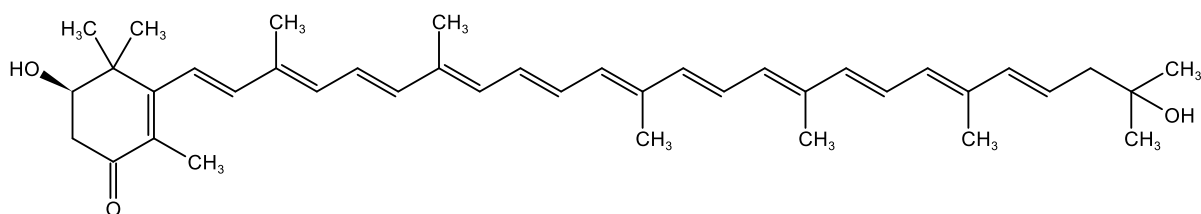


Obr. 1: Strukturní vzorec β -karotenu.

V případě xantofylů se jedná o kyslíkaté deriváty uhlovodíků, obsahující alespoň jednu kyslíkatou funkční skupinu, kterou může být například hydroxylová skupina, keto skupina či karboxylová skupina (Kirti et al., 2014), jejíž přítomnost dává xantofylům polárnější charakter, než mají karoteny. Dle přítomnosti kyslíkaté skupiny v molekule mohou být xantofyly rozděleny do dvou skupin, hydroxykarotenoidy obsahující hydroxylovou skupinu a oxokarotenoidy obsahující keto skupinu. (Mortensen et al., 1997).

1.4 Deinoxanthin

Deinoxanthin (Obr. 2), sumárním vzorcem $C_{40}H_{54}O_3$ a systematickým názvem (5*R*)-5-hydroxy-3-[(1*E*,3*E*,5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*,15*E*,17*E*,19*E*,21*E*)-24-hydroxy-3,7,12,16,20,24-hexamethylpentacosa-1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21-undecaenyl]-2,4,4-trimethylcyclohex-2-en-1-one podle IUPAC¹ (PubChem, 2019), je karotenoid s monocyklickou strukturou, který obsahuje jednu keto skupinu a dvě hydroxylové funkční skupiny. Polyenový řetězec deinoxanthinu je organizován do 2-hydroxy-4-oxo- β konce a významně ovlivňuje jeho biologické vlastnosti. Deinoxanthin patří díky svým strukturním vlastnostem do reaktivní skupiny xantofylů, což jsou, jak již bylo zmíněno, karotenoidy obsahující kyslík. To je důvod, proč jsou xantofyly polárnější a reaktivnější než běžné karotenoidy (Tian et al., 2007).



Obr. 2: Strukturní vzorec deinoxanthinu.

Tian et al. (2007) ve své práci publikovali výsledky chemiluminiscenční analýzy, které ukázali, že deinoxanthin má mnohem silnější schopnost vychytávat H_2O_2 a singletový kyslík než ostatní testované karotenoidy. Těmi byly dva xantofyly (zeaxanthin a lutein) a dva karoteny (β -karoten a lykopen). Kromě toho bylo zjištěno, že deinoxanthin má ochranný účinek na DNA. Tyto výsledky naznačují, že vyšší antioxidační účinek deinoxanthinu přispívá k resistenci mikroorganismu *D. radiodurans*. Rozšířené konjugované dvojné vazby

¹ International Union of Pure and Applied Chemistry

a přítomnost hydroxylové skupiny v poloze C-1' v chemické struktuře deinoxanthinu mohou být odpovědné za jeho výjimečnou antioxidační aktivitu.

Kromě samotného deinoxanthinu byly mezi více než deseti červenými pigmenty, jež se nacházejí v extraktech *D. radiodurans* identifikovány i jeho méně běžné varianty jako jsou dihydro- a deoxyderiváty (Tian et al., 2008).

Kim et al. (2021) ve své práci ukázali, že deinoxanthin vykazuje toxicitu pro sinice tvořící vodní květy, zejména pro *Microcystis aeruginosa*, a může tak být využit jako účinný prostředek na jejich likvidaci. Autoři dále popisují proces výroby deinoxanthinu z kultury *Deinococcus metallilatus* za použití sójové moučky. Celkově tato studie ukazuje potenciál deinoxanthinu jako přírodního prostředku na likvidaci sinicových květů v tekoucích vodách.

Přestože pozitivní vliv karotenoidů na přežívání nepříznivých podmínek buňkami *D. radiodurans* je dobře zdokumentován, regulace syntézy karotenoidů vnějšími podmínkami je známa podstatně méně. Nicméně, Davis et al. (1999) překvapivě ukázali, že *D. radiodurans* obsahuje fotoreceptor červeného světla, který hraje roli v regulaci syntézy deinoxanthinu. A to přesto, že *D. radiodurans* není fototrofní organismus a není tedy patrné, jakou roli hraje receptor neionizujícího, viditelného záření v syntéze ochranných pigmentů.

1.5 Bakteriofytochromy

Fytochromy jsou rostlinné receptory, které mají schopnost vnímat červené a daleké červené světlo (Smith, 2000). Původně se předpokládalo, že tyto receptory jsou přítomny pouze ve fotosyntetických organismech (Hughes, et al., 1999). Nicméně poté byly nalezeny proteiny podobné fytochromům i u nefotosyntetizujících bakterií *D. radiodurans* (Davis et al., 1999), tyto proteiny tvoří skupiny zvané bakteriofytochromy (BphPs). Na rozdíl od fytochromů, kde je chromoforem fytochromobilin, se bakteriofytochromy spojují s biliverdinem, což je látka, vznikající při rozkladu hemu a jejíž navázání umožňuje proteinům reagovat na světlo (Bhoo et al., 2001).

Bakteriofytochromy jsou fotosenzitivní proteiny nacházející se u bakterií a jsou schopny zaznamenat světelné podněty v oblasti infračerveného spektra. Tyto proteiny fungují jako fotoreceptory, které při absorpci světla mění svou strukturu a následně ovlivňují enzymatickou aktivitu. Bakteriofytochromy mají také funkci jako kinázy histidinu, což znamená, že mají schopnost fosforylovat histidinové zbytky (Bhoo et al., 2001).

Výzkum Girauda et al. (2008) ukázal, že bakteriofytochromy se vyskytují především u tzv. anoxygenních fotosyntetických bakterií, které se od rostlin a jiných fotosyntetických organismů odlišují tím, že primárním zdrojem energie pro ně není fotosyntéza. Tyto bakterie využívají různých mechanismů pro získávání energie z prostředí, jako je například oxidace síry nebo železa. Bakteriofytochromy také mohou ovlivňovat syntézu fotosyntetických komplexů v bakteriích. Celkově lze říci, že bakteriofytochromy jsou důležitými bakteriálními fotoreceptory, jelikož dokáží ovlivnit enzymatickou aktivitu a syntézu fotosyntetických komplexů, což má vliv na metabolismus bakterií a jejich schopnost přežít v přírodě (van der Horst et al., 2007)

Jak již bylo několikrát zmíněno, *D. radiodurans* je extremofilní bakterie, která dokáže přežít extrémní podmínky, včetně vysokého záření, vysokých teplot a sucha. Výzkum Jianga et al. (1999) ukazuje, že bakteriofytochromy nacházející se v genomu *D. radiodurans* významně ovlivňují přežití této bakterie v extrémních podmínkách. Přítomnost fytochromu v nefototrofním organismu byla ve své době vnímána jako překvapivá (Davis et al., 1999).

Smysl regulace syntézy karotenoidů, které jsou součástí ochrany proti stresu pomocí fytochromu, není rovněž patrný, jelikož fytochromy slouží jako receptory červeného světla, které není ionizující. Na druhou stranu, absorpční spektrum chromoforu fytochromu má pásy i v blízké UV oblasti, je tedy možné, že fytochrom může sloužit i k detekci jiných, krátkých, vlnových délek, podobně, jak to bylo navrženo pro některé rostlinné fytochromy (Chun et al., 2001). Je také možné, že funkcí fytochromu je více: nedávná práce Junga et al. (2021) ukázala, že přítomnost fytochromu zvyšuje přežití *D. radiodurans* při vystavení chemickým a fyzikálním vlivům poškozujícím DNA, jako je UV-C záření, γ -záření a mitomycin, ale tento efekt překvapivě nebyl závislý na schopnosti buněk syntetizovat karotenoidy.

Bhoo et al. (2001) ve své práci uvádí, že bakteriofytochrom z bakterie *D. radiodurans* reaguje na světelné podněty a dokáže ovlivňovat expresi genů v závislosti na intenzitě světla. To naznačuje, že bakteriofytochrom hraje důležitou roli při regulaci genové exprese u těchto bakterií.

2. Cíle práce

Teoretická část:

- Provést literární rešerši známých poznatků na téma *Deinococcus radiodurans*, jeho objevení, způsob života a mechanismy ochrany se zaměřením na některé struktury, jež se v těchto mechanismech uplatňují.

Experimentální část:

- Zjistit, jakým způsobem a zda vůbec ovlivňuje úprava světelných podmínek produkci karotenoidů u *Deinococcus radiodurans*.
- Stanovit karotenoidní složení v buňkách *D. radiodurans*.
- Zjistit průměrné množství karotenoidů v jedné buňce *D. radiodurans* v závislosti na světelných podmínkách.

3. Materiály a metody

3.1 Použité chemikálie a přístroje

Extrakce pigmentů:

- 100% methanol pro HPLC
- 100% aceton pro HPLC

Příprava media pro kultivaci *D. radiodurans*:

- kvasnicový extrakt (Sigma Aldrich)
- pepton (Sigma Aldrich)
- glukóza
- agar
- destilovaná voda
- 50 mM Na-fosfátový pufr; pH 7,8

Kapalinová chromatografie byla provedena za použití systému Waters 600 s detektorem PDA 2996 detector (Waters, USA) Kolona: reverzní-fáze, Zorbax SB-C18 column (4.6 x 150 mm, 5 μ m, silica-based, non-endcapped; Agilent, USA) Gradient: lineární gradient, solvent A (80:20 methanol:0.5 M octan amonný (aq., pH 7.2 v/v)), solvent B (90:10 acetonitril:voda), solvent C (100 % ethylacetát) (Jeffrey et al. 2005).

Rozbíjení buněk pro extrakci pigmentů bylo provedeno za pomoci sonikátoru BioLogics, Inc., Model 3000MP Ultrasonic Homogenizer.

Extrahovaným pigmentům byla poté změřena absorpční spektra v rozsahu 350 nm – 750 nm za pomoci spektrofotometru Shimadzu UV-2600.

Průtoková cytometrie byla provedena na přístroji Apogee A50 za použití vlnové délky 488 nm.

3.2 Metody

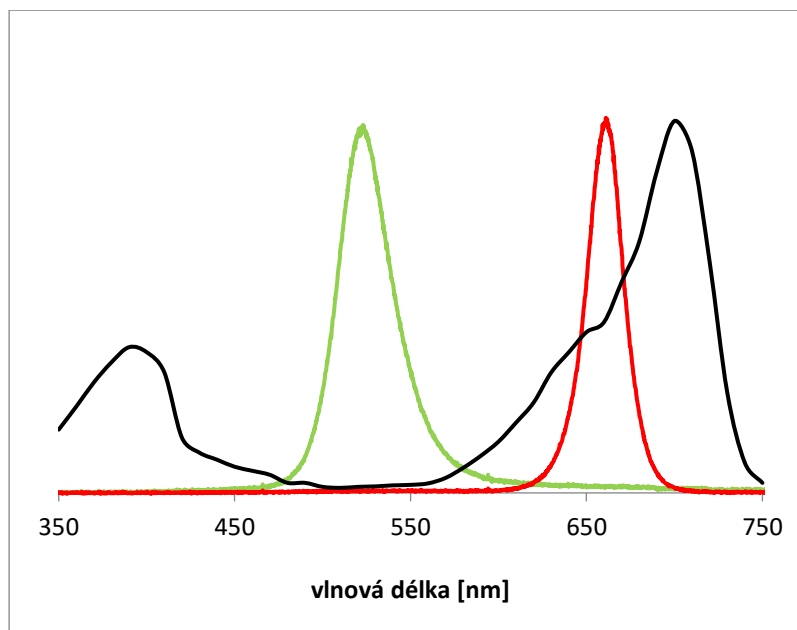
3.2.1 Příprava média a očkování nových kultur

Kultura *D. radiodurans* byla pořízena z České sbírky mikroorganismů na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Pro kultivaci *D. radiodurans* bylo připraveno médium 8 dle CCM². V 1 l destilované vody bylo rozpuštěno 5 g kvasnicového extraktu, 5 g peptonu, 10 g glukózy a 20 g agar, poté bylo pH média upraveno na 7,2 za pomoci Na-fosfátového pufru. Médium bylo v lahvích sterilizováno v autoklávu a poté za použití flow boxu nalito do uzavíratelných Petriho misek. Misky byly utěsněny parafilmem a uloženy v lednici. V případě kapalného média byl postup stejný, s tím, že při přípravě média byl vynechán agar a po sterilizaci v autoklávu bylo médium ponecháno v lahvích a uchováno v lednici.

Očkování nových kultur probíhalo za použití flow boxu. Bakteriologická očkovací smyčka, byla v plameni vyžihána a po jejím vychladnutí byl seškrábnut povrch již existující kolonie. Poté byl materiál smyčkou opatrně nanesen na agar v nové Petriho misce, miska byla uzavřena, utěsněna parafilmem, náležitě popsána a uložena do inkubátoru s teplotou nastavenou na cca 30°C. Smyčka byla opět vyžihána v plameni a celý postup byl opakován do naočkování požadovaného množství misek (Frébotová, 2017).

V osvětlovacích pokusech byly misky s bakteriemi vystaveny monochromatickému světlu o ozáření 50 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (změřeno pomocí přístroje Hansatech Quantitherm). Kontrolou pro každý pokus byla stejně připravená miska zabalená do alobalu, umístěná co nejbližší osvětlené misce. Jako zdroj světla byly použity LED s maximem vyzařování 520 nm (zelená) a 660 nm (červená). Spektra zdrojů porovnaná s absorpčním spektrem fytochromu jsou v Obr. 3.

² Czech Collection of Microorganisms, <https://ccm.sci.muni.cz/>



Obr. 3: Spektra světelných zdrojů použitých v této práci (zelená, červená) a spektrum fotoreceptoru fytochromu z *D. radiodurans* (černá).

3.2.2 Extrakce a analýza pigmentů

Po sedmi dnech kultivace byly kultury z obou misek seškrábnuty do 2 ml Eppendorf zkumavek, z každé misky byly získány minimálně dva vzorky. Následně byly vzorky zváženy a byla provedena extrakce pigmentů, a to za teploty 0°C na ledové tříšti za přístupu pouze zeleného světla. Postupně byl každý ze vzorků resuspendován v 1500 μ l methanolu, krátce zvortexován za maximálních otáček a následně byly buňky rozbity za pomoci sonikátoru. Sonifikace probíhala 2 minuty s cyklem 15/5 s (sonifikace/pauza) a za výkonu 20%. Poté byl vzorek stočen za použití stolní centrifugy (60 s při 13 400 ot./min) a supernatant byl přepipetován do čisté Eppendorf zkumavky. Zbýlý pelet byl opět resuspendován v 1500 μ l methanolu a celý proces byl zopakován. Následně bylo k peletu přidáno 1500 μ l acetonu a výše uvedený postup byl proveden ještě jednou. Nakonec byly všechny získané supernatanty spojeny a takto získanému extraktu byla změřena absorpční spektra. Extrakce byla provedena celkem 3x pro tři různé bakteriální kolonie.

Ve druhé části práce byl celý proces zopakován stejným způsobem. Nicméně zelené světlo bylo vyměněno za červené o stejné intenzitě a z každé misky byly získány pouze dva vzorky.

Pro určení přesného počtu buněk ve vzorcích byla využita metoda průtokové cytometrie. Tato analytická metoda umožňuje měření a analýzu fyzikálních a chemických

vlastností buněk a jiných biologických částic. Princip spočívá v průchodu buněk laserovým paprskem, při kterém dochází k rozptylu a lomu světla, jenž bývá označován jako přímý rozptyl (FSC) a boční rozptyl (SSC). Přímý rozptyl je přímo úměrný velikosti buňky a boční rozptyl charakterizuje vnitřní struktury buňky. Tyto jevy jsou následně detekovány a měřeny optickým a elektronickým systémem přístroje. Kromě toho má průtokový cytometr také schopnost detekovat fluorescenci částic, které jím procházejí. Na analyzované částice jsou navázána fluorescenční barviva, absorbující světlo o určité vlnové délce, jež je emitováno laserem. Následně je vyzářeno záření s odlišnou vlnovou délkou (Šinkorová, et al., 2008; Pekarčíková et al., 2014).

K řešení otázky, zda barva světla ovlivňuje složení pigmentů, tj. zastoupení různých derivátů deinoxanthinu v *D. radiodurans* byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jedná se o metodu používanou k rozdělení složek směsi za účelem stanovení jejich přítomnosti a koncentrace v daném vzorku. Od běžné sloupcové chromatografie se HPLC liší v přítomnosti vysokotlakého čerpadla, jež umožňuje mobilní fázi procházet kolonou v níž se nachází stacionární fáze vázaná na částice velké několik mikrometrů (Křížek et al., 2015).

4. Výsledky

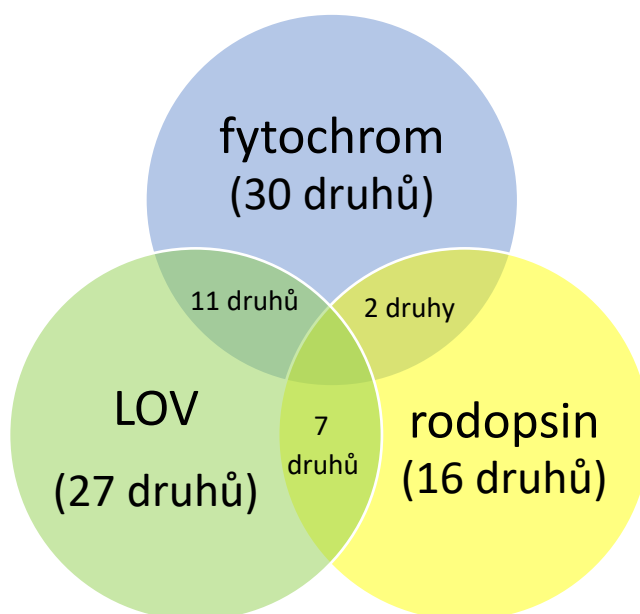
4.1. Bioinformatika

Od doby popisu bakteriálního fytochromu v *D. radiodurans* se ukázalo, že v bakteriích existuje velké množství receptorů pro světlo různých vlnových délek, z nichž alespoň některé hrají roli v ochraně před nepříznivými podmínkami (van der Horst et al., 2007). Ale jejich přítomnost u rodu *Deinococcus* a speciálně u druhu *D. radiodurans* nebyla přehledně zpracována. Vzhledem k tomu, že přítomnost dalších receptorů světla v *D. radiodurans* má velký vliv na interpretaci výsledků experimentů popsanych v této práci, byla provedena systematická analýza rodu *Deinococcus* na přítomnost hlavních tříd prokaryotních fotoreceptorů podle citovaného přehledu podle van der Horsta et al. (2007):

a) PYP obsahující kyselinu 4-hydroxyskořicovou; **b)** proteiny s doménou LOV (light-oxygen-voltage) s navázaným flavinmononukleotidem; **c)** bílkoviny s doménou BLUF (blue-light sensing using flavin) obsahující flavinadenindinukleotid; **d)** bakteriofytochrom obsahující biliverdin; **e)** rodopsin obsahující chromofor reinal.

Na základě citované práce byly použity sekvence následujících proteinů dostupných v databázi PDB: a - 2PHY, b - 1G28, c - 1YRX, d - 2O9C, e - 1UAZ pro prohledání genových sekvencí bakterií rodu *Deinococcus* pomocí online nástroje BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se základním nastavením na vyhledávání podle sekvence aminokyselin (protein-protein, blastp).

Bylo zjištěno, že u druhů z rodu *Deinococcus* se vyskytují pouze tři z pěti analyzovaných receptorů, konkrétně fytochrom, rodopsin a LOV-obtaining proteiny. Počty druhů, u nichž se jednotlivé struktury vyskytují a počty druhů obsahující více než jednu z uvedených sekvencí zobrazuje Obr. 4.

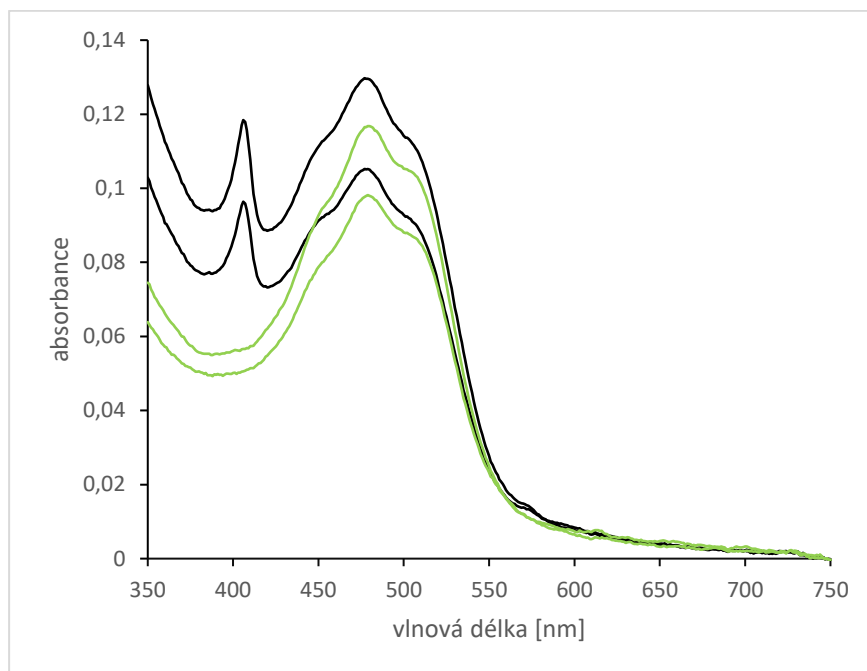


Obr. 4: Typy fotoreceptorových bílkovin v bakteriích z rodu *Deinococcus*.

Vyhledávání podle fotoreceptorů našlo 73 druhů rodu *Deinococcus*. Fytochrom je nejběžnějším receptorem rodu. Poměrně běžně se také vyskytuje situace, kdy druh obsahuje více než jeden typ fotoreceptoru. Ze skupiny bakterií rodu *Deinococcus*, které obsahují bakteriofytochrom, obsahují některé druhy i jiné z výše uvedených sekvencí. Protein LOV byl nalezen u druhů jako je: *D. deserti*; *D. ruber*; *D. arcticus*; *D. hopiensis*; *D. malanensis*; *D. humi*; *D. peraridilitoris*; *D. aestuarii*; *D. xiangnanensis* a *D. saudiensis*. U dvou druhů, *D. aquiradiocola* a *D. koreensis* je fytochrom doprovázen rodopsinem. Důležitým zjištěním je, že *D. radiodurans* obsahuje pouze sekvenci bakteriofytochromu, stejně tak jako bakterie *D. metallilatus*, jenž byl studován v práci Kima et al. (2021).

4.2 Analýza pigmentů

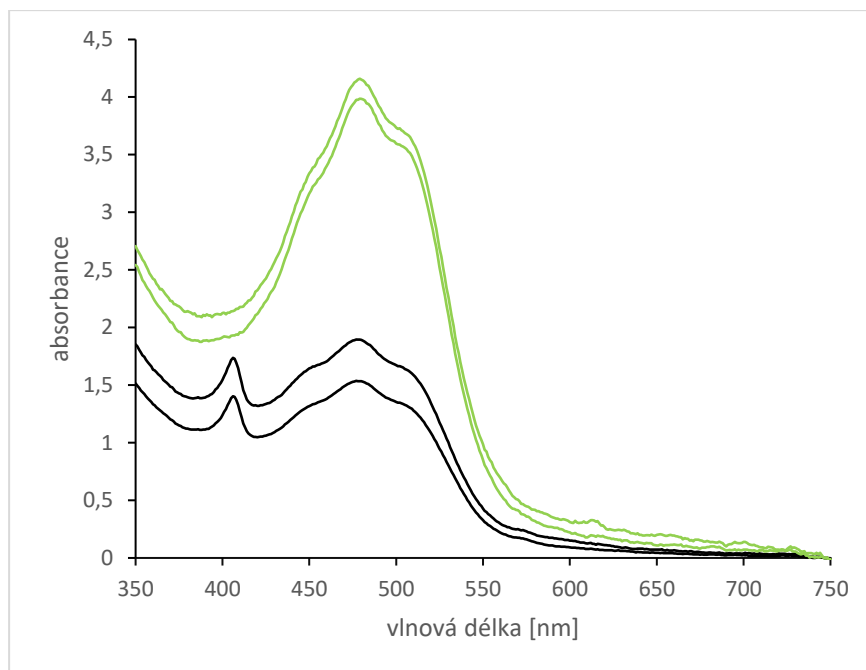
Na Obr. 5 jsou znázorněna absorpční spektra extraktu buněk *D. radiodurans* z experimentu s ozářením zeleným světlem. Data odpovídají dvěma vzorkům odebraným z osvětlené misky a dvěma vzorkům odebraným z paralelně pěstované zatemněné misky.



Obr. 5: Absorpční spektra extrahovaných pigmentů z *D. radiodurans*. Zelená čára – osvětlená kultura, černá čára – kontrolní kultura (ve tmě).

Z tvaru absorpčních spekter, zobrazených na Obr. 5, je patrné, že všechny extrakty vzorku získaného z *D. radiodurans* obsahují deinoxanthin popř. směs substituovaných deinoxanthinů s absorpčním maximem při 480 nm, což je typická vlnová délka při které karotenoidy, včetně deinoxanthinu, absorbují (Kim, et al., 2021). Na Obr. 6 pak jsou tatáž spektra jako v Obr. 5, ale po normalizaci na gram bakteriální kultury, tj. po vydělení navázkou. Je vidět, že tomto případě obsahovala ozářená kultura relativně více karotenoidu. Především se zdá být zřejmé, že použitá metoda extrakce pigmentů je dobře reprodukovatelná a rozdíl v obsahu pigmentu mezi kulturami je větší než rozptyl jednotlivých stanovení pigmentů.

Ve spektrech z neosvětlené kultury je dále vidět výrazný pík u 405 nm. Jedná se s největší pravděpodobností o molekulu typu hemu, jehož přítomnost v *D. radiodurans* byla popsána již dříve (Pokorná 2021 a viz níže).



Obr. 6: Absorpční spektra po vydělení příslušnými navážkami buněk.

Stejná spektra jako v Obr. 6 byla získána z celkem 3 vzorků pěstovaných na zeleném a 3 na červeném světle, s příslušnými zatemněnými kontrolami. Pro určení koncentrace karotenoidu byla použita absorbance u 480 nm (A_{480}) a extinkční koeficient (ϵ) $120\,000\text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Práce jako např. Tian et al. (2018) používají pro kvantifikaci deinoxanthinu ex. koeficient $\sim 109\,000$ odpovídající karotenoidu fukoxanthinu. Nicméně vzhledem k tomu, že deinoxanthin je polohou maxima spektroskopicky bližší delšímu karotenoidu astaxanthinu, byl zde použit extinkční koeficient, který je blíže tomuto karotenoidu.

Nejprve byla vypočtena koncentrace karotenoidů (mol/l) podle rovnice 1:

$$c = \frac{A}{\epsilon \times l} \quad (1)$$

kde A je absorbance; ϵ je molární absorpční koeficient a l je tloušťka optické vrstvy (1,00 cm). Vynásobením takto získané molární koncentrace objemem extraktu (0,0045 l) lze obdržet látkové množství v molech ($n = c \times V$) a po jeho vynásobení molární hmotností hmotnost karotenoidu v extraktu (2).

$$m = c \times V \times M \quad (2)$$

Vzhledem k tomu, že jsem pracovala se směsí substituovaných karotenoidů, použila jsem pro ni přibližnou molární hmotnost 600 g/mol. Výsledky stanovení karotenoidů z celkem

šesti nezávislých růstových pokusů (tři na červeném a tři na zeleném světle) jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1: Koncentrace celkového karotenoidu v kulturách bakterie *D. radiodurans* vztažené na gram čerstvé hmotnosti bakteriální biomasy. Pro každý experiment je uvedena hodnota kontroly (zatemněná miska, tma); světlo/tma je poměr koncentrace osvětlení ku kontrole pro jednotlivé experimenty.

	nmol/g (buněk)		μg / g (buněk)		Světlo/tma
	tma	světlo	tma	světlo	
Červené světlo	154	177	92	106	1,15
	59	67	36	40	1,12
	64	89	38	53	1,39
Zelené světlo	77	110	46	66	1,42
	63	139	38	83	2,19
	81	88	49	53	1,09

Shrnutím výsledků uvedených v Tab. 1 získáme pro kulturu pěstovanou ve tmě koncentraci (průměr ± směrodatná odchylka) 50 ± 20 μg(deinoxanthin)/g(buněk), a pro červené a zelené světlo 67 ± 29 respektive 67 ± 12 μg(deinoxanthin)/g(buněk). Tedy vidíme, že osvětlení vede ke zvýšení produkce karotenoidů buňkami *D. radiodurans* ale že po zprůměrování hodnot se dá vliv světla různých vlnových délek pokládat za stejný. Rozptyl dat z různých experimentů je ovšem značný.

Pro účely další analýzy byl stanoven počet bakteriálních buněk na gram kultury pomocí průtokové cytometrie. Kultura z misek byla odebrána do zvážených Eppendorf zkumavek, doplněna růstovým médiem na 300 μl a opatrně zhomogenizována pomocí malého ručního homogenizátoru. Pro samotnou analýzu byla takto připravená kultura 100× naředěna a analyzována pomocí průtokového cytometru (v laboratoři Michala Koblížka na MBÚ Třeboň). Zpracované vzorky jsou v Tab. 2.

Tab. 2: Počty buněk v navážkách jednotlivých vzorků.

Vzorek	Navážka (mg)	Stanovený počet buněk v 1 μl	Počet buněk ve vzorku (300 μl)	Počet buněk v 1 g vzorku
A – červená	38,8	6617	$1,99 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^9$
B – červená	72,5	11 905	$3,57 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^9$
C - tma	18,9	5263	$1,58 \cdot 10^8$	$8,4 \cdot 10^9$

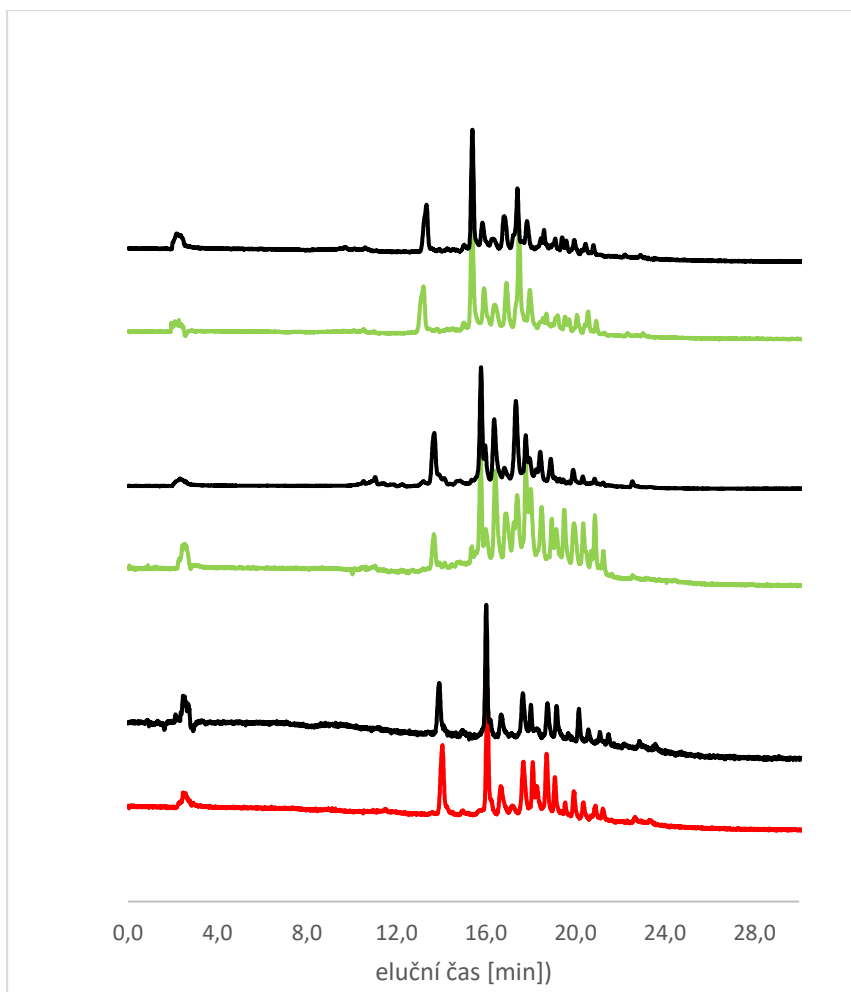
Je vidět, že kultura pěstovaná ve tmě měla v tomto případě větší množství buněk na gram než kultura na světle. Bohužel se nám z časových důvodů nepodařilo provést tento experiment více než jednou, proto není zřejmé, jestli je tento rozdíl významný nebo se jedná o odchylku v rámci variability vzorků. Dále budu tedy pracovat s těmito hodnotami.

Lze předpokládat, že po sedmi dnech kultivace bude kultura *D. radiodurans* ve stavu blízkém stacionární fázi, z čehož podle literatury plyne, že bude tvořena především tetradami (Floc'h et al., 2019). Tedy počet buněk bude průměrně čtyřikrát větší než počet zjištěný pomocí cytometrie. Průměrná koncentrace pigmentu na gram buněk v zatemněné kultuře byla $8,3 \cdot 10^{-8}$ mol/g, tzn. použitím údaje z Tab. 2, $8,4 \cdot 10^9$ tetrad na gram získáme hodnotu **$2,5 \cdot 10^{-18}$ mol** nebo **$1,5 \cdot 10^6$ molekul** karotenoidu na jednu bakteriální buňku. Pro červené světlo (průměrná koncentrace pigmentu na gram buněk = $11,1 \cdot 10^{-8}$ mol/g) jsou odpovídající údaje přibližně **$5,5 \cdot 10^{-18}$ mol** a **$3,3 \cdot 10^6$ molekul** na buňku, tzn. osvětlené buňky by měly obsahovat zhruba dvakrát více karotenoidu.

4.3 Pigmentové složení buněk

4.3.1 Karotenoidy

V předchozí části se ukazuje, že osvětlení vede ke zvýšení koncentrace karotenoidu v buňkách a že tento efekt pravděpodobně nezáleží na vlnové délce dopadajícího záření. V další práci byla řešena otázka, zda barva světla ovlivňuje složení pigmentů, tj. zastoupení různých derivátů deinoxanthinu. V Obr. 7 jsou ukázány reprezentativní HPLC chromatogramy z kultur *D. radiodurans* pěstovaných na světle různých vlnových délek (vyznačeno barevně) a také chromatogramy kontrolních zatemněných vzorků.



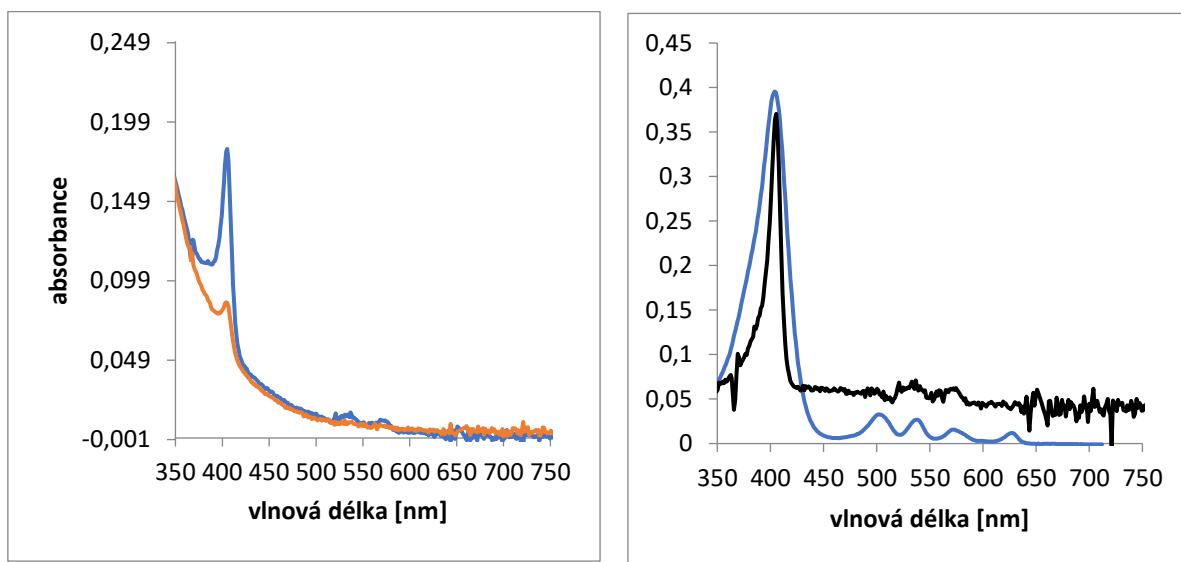
Obr. 7: HPLC chromatogramy detegované u 480 nm z pigmentových extraktů z buněk *D. radiodurans*. Barva osvětlení je označena barvou čáry, tj. zelená, červená; černá = zatemněné kontroly. Data byla normalizována na největší pík (~16 min).

Data by mohla naznačovat, že na světle se zvyšuje pestrost pigmentového složení, to se ukazuje jako relativní zvětšení menších píků v chromatogramu, což je nejlépe vidět na prostředním záznamu v Obr. 7, ale k rozhodnutí této otázky by bylo potřeba nasbírat výrazně větší množství dat. V tuto chvíli se nicméně dá tato část uzavřít s tím, že není dostatečný důvod pro tvrzení, že vlnová délka má podstatný vliv na složení karotenoidových pigmentů v *D. radiodurans*.

4.3.2 Další pigmenty

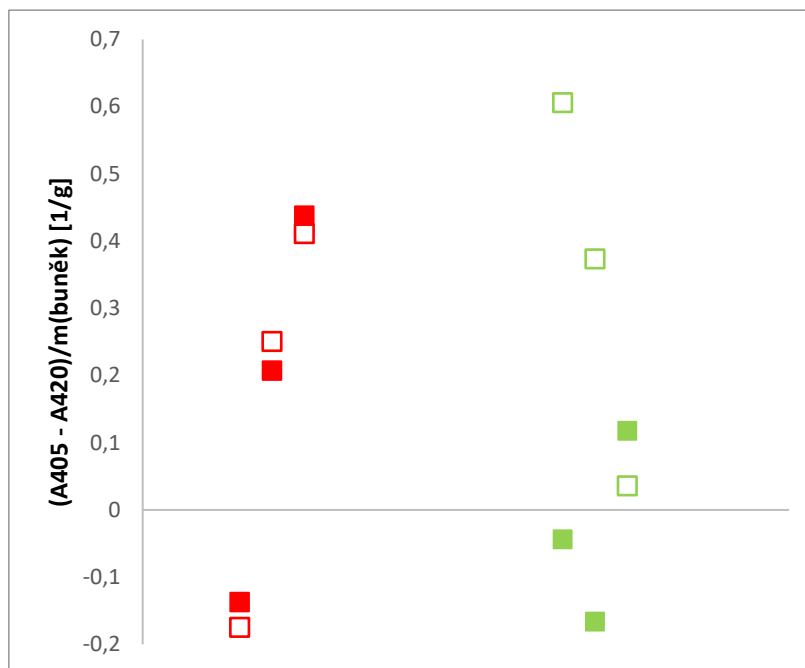
Jak bylo zmíněno výše, absorpční spektrum buněčných extraktů často obsahuje ve viditelné oblasti kromě karotenoidů ještě nápadný pás kolem 405 nm. V chromatogramech z HPLC se tato složka vyskytuje v časech kolem 2 minuty, tj. v čele eluce, jedná se tedy

o poměrně silně polární molekulu. Na Obr. 8 je pokus získat spektrum této molekuly odečtením absorpčních spekter z HPLC změřených v čase 2 minuty pro extrakt z kultury ve tmě a na zeleném světle (levý panel). V pravém panelu obrázku je rozdílové spektrum srovnané se spektrem porfyrinu (dále PP, <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/149.html>).



Obr 8: Levý panel – absorpční spektra z HPLC, frakce s elučním časem 2 minuty z kontrolní kultury (ve tmě, modrá) a buněk rostoucích na zeleném světle. Pravý panel – rozdíl spekter z levého panelu (černá) a spektrum porfyrinu z reference. Rozdílové spektrum je posunuto nahoru pro lepší přehlednost.

Na pravém panelu Obr. 8 vidíme, že rozdílové spektrum obsahuje několik absorpčních maxim v oblasti 500-650 nm, podobně jako PP a polohy absorpčních maxim rozdílového spektra jsou podobné pásům PP, je tedy pravděpodobné, že se jedná o stejnou molekulu. Z grafu na Obr. 6 je vidět, že pás u 405 nm není přítomen ve všech vzorcích, bylo tedy provedeno srovnání všech osvětlených vzorků, ve kterých byl analyzován obsah pigmentů. Vzhledem k tomu, že absorpční pás PP u 405 nm se překrývá se spektrem karotenoidu, byl pro odhad množství použit rozdíl absorbance u 405 nm a 420 nm.



Obr. 9: Absorbance PP u 405 nm vztažená na navážku buněk *D. radiodurans*. Prázdné body – kontrolní vzorky (tma), plné body – osvětlené vzorky (červená, zelená).

Tento rozdíl byl následně normalizován na navážku buněk. Výsledná data jsou v Obr. 9. Je zřejmé, že osvětlení není jediný faktor, který ovlivňuje množství PP, neboť ve dvou ze šesti experimentů ani kultura rostoucí ve tmě nejevila akumulaci PP. Na druhou stranu, PP byl přítomen ve zbývajících čtyřech kontrolních kulturách a obou vzorcích pěstovaných na červeném světle. Naproti tomu PP se nehromadil v žádném ze vzorků ze zeleného světla.

5. Diskuse

Pozorování uvedená v této práci potvrdila, že syntéza karotenoidů v *D. radiodurans* je ovlivněna světlem. Podle analýzy sekvencí *D. radiodurans* je jediným receptorem světla u tohoto druhu fytochrom. Ovšem navzdory očekávání, zelené světlo, které téměř není absorbováno fytochromem, (Obr. 3) mělo dokonce větší efekt než červené světlo (viz Tab. 1). Zvýšení koncentrace karotenoidu vlivem světla v rozsahu 1.2-1.5× je srovnatelné s dřívějšími pracemi (Davis et al., 1999). Fytochrom se zdá být nejvíce rozšířeným fotoreceptorem v rodu *Deinococcus*, ale v jiných druzích se vyskytují i jiné typy receptorů. Bylo by tedy zajímavé zjistit, jestli se u nich liší odpověď na světlo.

Obsah karotenoidu v buňkách *D. radiodurans* vyšel kolem 50-70 μg na gram čerstvé váhy buněk. Pokud bych uvažovala přepočít na sušinu místo použité čerstvé váhy, hodnota bude jistě větší, ale stále je řádově mnohem menší, než co pro totožný druh uvádí nedávná práce Jeonga et al. (2020), kteří uvádějí hodnoty v řádu desítek až stovek miligramů na gram sušiny. Důvod není zřejmý, nicméně je třeba uvést, že starší práce např. Liu et al. (2013) uvádí kolem 70 μg karotenoidu na gram sušiny v mnohem lepším souladu s mými výsledky.

Nerozřešenou otázkou zůstává vliv světla na distribuci karotenoidu v buňkách. Původním záměrem práce bylo provést též analýzu pigmentu v různých frakcích buněk, např. buněčných stěnách a izolovaném povrchovém SBDC proteinu, protože předchozí práce ukázaly, že tento protein váže různé deriváty deinoxanthinu (Adamec et al., 2020) a není vyloučeno, že je schopen vázat pigment v různém poměru k proteinu. Bohužel došlo k poruše kultivačního zařízení a nebylo tedy možné napěstovat dostatečné množství buněk pro izolace. Nicméně, získaná data umožňují alespoň odhad zastoupení karotenoidu v SBDC proteinu, která mohou sloužit jako podklad pro další práci. Bylo zjištěno, že jedna buňka bakterie obsahuje řádově $\sim 10^6$ molekul karotenoidu. Podle práce Floc'h et al. (2019) je objem buňky *D. radiodurans* ve stacionární fázi $1,6 \mu\text{m}^3$. Přiblížíme-li buňku jako kouli, má tedy poloměr zhruba 700 nm a povrch $6 \cdot 10^6 \text{ nm}^2$. SBDC protein má strukturu trimeru ve tvaru trojúhelníku o straně $\sim 15 \text{ nm}$, tj. plochu $\sim 100 \text{ nm}^2$ a váže tři karotenoidy (Farci et al., 2022). Pak se na povrch buňky vejde $6 \cdot 10^6 / 100 = 60000$ trimerů SBDC proteinu, tj. 180000 karotenoidů a to je přibližně 18 % celkového obsahu karotenoidu v buňce, což je horní odhad, protože buňka v tetradě nemá pravděpodobně celý povrch pokrytý. Ostatní karotenoidy pak budou pravděpodobně v plazmatické membráně, protože karotenoidy jsou nepolární molekuly.

Kromě karotenoidů, byl dalším pozorovaným chromoforem porfyrin s absorpčním maximem kolem 405 nm. Tato molekula byla poměrně velmi polární, což plyne z toho, že absorpční pás 405 nm se objevoval ve frakcích v HPLC eluovaných na samém počátku analýzy. To je v souladu s pozorováním v práci Pokorná (2019). Z absorpčního spektra získaného odečtením absorpce těchto frakcí z HPLC, získaných ze vzorku na světle a ve tmě, bylo získáno přibližné spektrum této molekuly. Velmi dobře se shoduje například se spektrem protoporfyrinu IX (PPIX), který je obvyklým prekurzorem hemu. Nicméně, podle Dailey et al. (2017) syntéza hemu v *D. radiodurans* neprobíhá drahou kde je meziproduktem PPIX, nýbrž koproporfyrin III (KPIII), který má nicméně velmi podobné absorpční spektrum (Fyrestam, 2018). Pozorovanou molekulou je tedy nejpravděpodobněji KPIII. To je také podpořeno výsledky HPLC analýzy. Podle chromatogramu v práci Tichého et al. (2016) je

KPIII (na rozdíl od PPIX) polárnější než chlorofylidy (chlorofyly bez lipidu). Vzhledem k tomu, že víme, v metodě použité v této práci je eluční čas bezlipidových chlorofylů typu c 5-10 minut (Staleva-Musto et al., 2019) musí být pozorovaná látka s elučním časem kolem 2 minut polárnější než Chl c. Jedná se tedy o KPIII.

KPIII se nikdy nehromadil v buňkách vystavených zelenému světlu (Obr.5), důvod pro toto pozorování není zřejmý. Není ovšem vyloučeno, že na zeleném světle dochází k jeho fotooxidaci, jako se to děje v případě PPIX (Cox a Whitten, 1982). Pokud ano, zjevně to neovlivňuje syntézu biliverdinu, který se vyrábí z hemu (Lamparter, 2004) a slouží jako chromofor fytochromu, protože syntéza karotenoidů na zeleném světle nebyla negativně ovlivněna.

6. Závěr

V průběhu experimentální části této práce se za pomoci osvětlovacích pokusů podařilo potvrdit, že světlo o různých vlnových délkách stimuluje produkci karotenoidů v buňkách bakterie *Deinococcus radiodurans*.

Dále byl za pomoci dat z průtokové cytometrie zjištěn obsah karotenoidů na jednu bakteriální buňku, který činil $3,3 \cdot 10^6$ molekul pro buňky vystavené červenému světlu a $1,5 \cdot 10^6$ molekul pro buňky pěstované ve tmě. Lze tedy říci, že buňky pěstované na světle obsahovaly přibližně dvakrát více karotenoidů než buňky zatemněné.

7. Seznam použité literatury

- Adamec, F., Farci, D., Bína, D., Litvín, R., Khan, T., Fuciman, M., ... & Polívka, T. (2020). Photophysics of deinoxanthin, the keto-carotenoid bound to the main S-layer unit of *Deinococcus radiodurans*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19, 495-503. DOI: 10.1039/d0pp00031k.
- Anderson, A. W. (1956). Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol*, 10, 575-578.
- Bahl, H., Scholz, H., Bayan, N., Chami, M., Leblon, G., Gulik-Krzywicki, T., ... & Resch, S. (1997). IV. Molecular biology of S-layers. *FEMS microbiology reviews*, 20(1-2), 47-98. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00304.x.
- Battista, J. R. (1997). Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annual review of microbiology*, 51(1), 203-224. DOI: 10.1146/annurev.micro.51.1.203.
- Bhoo, S. H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B., & Vierstra, R. D. (2001). Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature*, 414(6865), 776-779. DOI: 10.1038/414776a.
- Blasius, M., Hübscher, U., & Sommer, S. (2008). *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit?. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 43(3), 221-238. DOI: 10.1080/10409230802122274.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558. DOI: 10.1096/fasebj.9.15.8529834.
- Brooks, B. W., & Murray, R. G. E. (1981). Nomenclature for “*Micrococcus radiodurans*” and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 31(3), 353-360. DOI: 10.1099/00207713-31-3-353.
- Cox, G. S., & Whitten, D. G. (1982). Mechanisms for the photooxidation of protoporphyrin IX in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 104(2), 516-521. DOI: 10.1021/ja00366a023.

- Dailey, H. A., Dailey, T. A., Gerdes, S., Jahn, D., Jahn, M., O'Brian, M. R., & Warren, M. J. (2017). Prokaryotic heme biosynthesis: multiple pathways to a common essential product. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(1), e00048-16. DOI: 10.1128/MMBR.00048-16.
- Daly, M. J. (2009). A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 237-245. DOI: 10.1038/nrmicro2073.
- Davis, S. J., Vener, A. V., & Vierstra, R. D. (1999). Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science*, 286(5449), 2517-2520. DOI: 10.1126/science.286.5449.2517.
- Fagan, R. P., & Fairweather, N. F. (2014). Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), 211-222. DOI: 10.1038/nrmicro3213.
- Farci, D., Bowler, M. W., Esposito, F., McSweeney, S., Tramontano, E., & Piano, D. (2015). Purification and characterization of DR_2577 (SlpA) a major S-layer protein from *Deinococcus radiodurans*. *Frontiers in microbiology*, 6, 414. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00414.
- Farci, D., Bowler, M. W., Kirkpatrick, J., McSweeney, S., Tramontano, E., & Piano, D. (2014). New features of the cell wall of the radio-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(7), 1978-1984. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.02.014
- Farci, D., Haniewicz, P., de Sanctis, D., Iesu, L., Kereïche, S., Winterhalter, M., & Piano, D. (2022). The cryo-EM structure of the S-layer deinoxanthin-binding complex of *Deinococcus radiodurans* informs properties of its environmental interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 298(6). DOI: 10.1016/j.JBC.2022.102031.
- Farci, D., Slavov, C., Tramontano, E., & Piano, D. (2016). The S-layer protein DR_2577 binds deinoxanthin and under desiccation conditions protects against UV-radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Frontiers in microbiology*, 7, 155. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00155.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *nature*, 408(6809), 239-247. DOI: 10.1038/35041687.

- Floc'h, K., Lacroix, F., Servant, P., Wong, Y. S., Kleman, J. P., Bourgeois, D., & Timmins, J. (2019). Cell morphology and nucleoid dynamics in dividing *Deinococcus radiodurans*. *Nature communications*, 10(1), 3815. DOI: 10.1038/s41467-019-11725-5.
- Frébortová, J. (2017). *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Fyrestam, J. (2018). Porphyrins and heme in microorganisms. *Stockholm University, Sweden*.
- Giraud, E., & Verméglio, A. (2008). Bacteriophytochromes in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Photosynthesis research*, 97, 141-153. DOI: 10.1007/s11120-008-9323-0.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of neurochemistry*, 59(5), 1609-1623. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.
- Hencken, H. (1992). Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science*, 71(4), 711-717. DOI: 10.3382/ps.0710711.
- Hensel, R., Demharter, W., Kandler, O. T. T. O., Kroppenstedt, R. M., & Stackebrandt, E. (1986). Chemotaxonomic and molecular-genetic studies of the genus *Thermus*: evidence for a phylogenetic relationship of *Thermus aquaticus* and *Thermus ruber* to the genus *Deinococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(3), 444-453.
- Hughes, J., & Lamparter, T. (1999). Prokaryotes and phytochrome. The connection to chromophores and signaling. *Plant physiology*, 121(4), 1059-1068. DOI: 10.1104/pp.121.4.1059.
- CHRISTENSEN, E. A., & KRISTENSEN, H. (1981). Radiation-resistance of microorganisms from air in clean premises. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, 89(1-6), 293-301. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1981.tb00192_89B.x
- Chun, L., Kawakami, A., & Christopher, D. A. (2001). Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiology*, 125(4), 1957-1966. DOI: 10.1104/pp.125.4.1957
- Ito, H., Watanabe, H., Takehisa, M., & Iizuka, H. (1983). Isolation and identification of radiation-resistant cocci belonging to the genus *Deinococcus* from sewage sludges and animal feeds. *Agricultural and biological chemistry*, 47(6), 1239-1247. DOI: 10.1080/00021369.1983.10866087

- Jeong, S. W., Kim, J. H., Kim, J. W., Kim, C. Y., Kim, S. Y., & Choi, Y. J. (2020). Metabolic engineering of extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans* for the production of the novel carotenoid deinoxanthin. *Microorganisms*, 9(1), 44. DOI: 10.3390/microorganisms9010044.
- Jiang, Z., Swem, L. R., Rushing, B. G., Devanathan, S., Tollin, G., & Bauer, C. E. (1999). Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science*, 285(5426), 406-409. DOI: 10.1126/science.285.5426.406.
- Jung, J. H., Jeong, S., Im, S., Kim, M. K., Seo, H. S., & Lim, S. (2021). Lack of the Bacterial Phytochrome Protein Decreases *Deinococcus radiodurans* Resistance to Mitomycin C. *Frontiers in Microbiology*, 12, 659233. DOI: 10.3389/fmicb.2021.659233
- Kim, W., Kim, M., Hong, M., & Park, W. (2021). Killing effect of deinoxanthins on cyanobloom-forming *Microcystis aeruginosa*: Eco-friendly production and specific activity of deinoxanthins. *Environmental Research*, 200, 111455. DOI: 10.1016/j.envres.2021.111455.
- Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Mukesh Kumar, A., & Jyoti, S. (2014). Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. *Advances in Biology*, 2014, 1-13. DOI: 10.1155/2014/837891.
- Kregel, K. C., & Zhang, H. J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292(1), R18-R36. DOI: 10.1152/ajpregu.00327.2006.
- Křížek, M., Šíma, J., & Budějovice, Č. (2015). *Analytická chemie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- Lamparter, T. (2004). Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS letters*, 573(1-3), 1-5. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.07.050.
- Lancy Jr, P., & Murray, R. G. E. (1978). The envelope of *Micrococcus radiodurans*: isolation, purification, and preliminary analysis of the wall layers. *Canadian journal of microbiology*, 24(2), 162-176. DOI: 10.1139/m78-029.
- Lemee, L., Peuchant, E., Clerc, M., Brunner, M., & Pfander, H. (1997). Deinoxanthin: a new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron*, 53(3), 919-926. DOI: 10.1016/S0040-4020(96)01036-8.

Liu, C., Sun, Z., Shen, S., Lin, L., Li, T., Tian, B., & Hua, Y. (2014). Identification and characterization of the geranylgeranyl diphosphate synthase in *Deinococcus radiodurans*. *Letters in applied microbiology*, 58(3), 219-224. DOI: 10.1111/lam.12181.

Makarova, K. S., Aravind, L., Wolf, Y. I., Tatusov, R. L., Minton, K. W., Koonin, E. V., & Daly, M. J. (2001). Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(1), 44-79. DOI: 10.1128/MMBR.65.1.44-79.2001.

Messner, P., & Sleytr, U. B. (1992). Crystalline bacterial cell-surface layers. *Advances in microbial physiology*, 33, 213-275. DOI: 10.1007/978-3-642-73537-0.

Mortensen, A., & Skibsted, L. H. (1997). Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2970-2977. DOI: 10.1021/jf970010s.

Munteanu, A. C., Uivarosi, V., & Andries, A. (2015). Recent progress in understanding the molecular mechanisms of radioresistance in *Deinococcus* bacteria. *Extremophiles*, 19, 707-719. DOI: 10.1007/s00792-015-0759-9.

Murray, R. G. (1992). The family deinococcaceae. *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, 3732-3744. DOI: 10.1007/978-1-4757-2191-1_42

Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., ... & Fraser, C. M. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399(6734), 323-329. DOI: 10.1038/20601.

Pekarčíková, L., Knopfová, L., Ondroušková, E., & Šmarda, J. (2014). Využití průtokové cytometrie pro analýzu mitochondriální buněčné smrti. *Klinická onkologie*, 27(3), 15-21.

Pokorná, N (2021). Carotenoid pool of extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans*. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, 37 s.

PubChem. (2019): Deinoxanthin. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Deinoxanthin> [11.4.2023].

- Qi, H. Z., Wang, W. Z., He, J. Y., Ma, Y., Xiao, F. Z., & He, S. Y. (2020). Antioxidative system of *Deinococcus radiodurans*. *Research in microbiology*, 171(2), 45-54. DOI: 10.1016/j.resmic.2019.11.002
- Sára, M., & Sleytr, U. B. (2000). S-layer proteins. *Journal of bacteriology*, 182(4), 859-868. DOI: 10.1128/JB.182.4.859-868.2000.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 4, 180-183. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
- Slade, D., & Radman, M. (2011). Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75(1), 133-191. DOI: 10.1128/MMBR.00015-10.
- Sleytr, U. B. (1978). Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls: structure, chemistry, assembly, and function. *International review of cytology*, 53, 1-64. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)62240-8.
- Smith, H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature*, 407(6804), 585-591. DOI: 10.1038/35036500.
- Staleva-Musto, H., West, R., Trathnigg, M., Bína, D., Litvín, R., & Polívka, T. (2019). Carotenoid–chlorophyll energy transfer in the fucoxanthin–chlorophyll complex binding a fucoxanthin acyloxy derivative. *Faraday Discussions*, 216, 460-475. DOI: 10.1039/C8FD00193F.
- Šinkorová, Z., & Zárýbnická, L. (2008). Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. I. část. *MMSL*, 77(3), 98-103.
- Tian, B., & Hua, Y. (2010). Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus*–*Thermus* bacteria. *Trends in microbiology*, 18(11), 512-520. DOI: 10.1016/j.tim.2010.07.007.
- Tian, B., Sun, Z., Xu, Z., Shen, S., Wang, H., & Hua, Y. (2008). Carotenoid 3', 4'-desaturase is involved in carotenoid biosynthesis in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology*, 154(12), 3697-3706. DOI: 10.1099/mic.0.2008/021071-0
- Tian, B., Xu, Z., Sun, Z., Lin, J., & Hua, Y. (2007). Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(6), 902-911. DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.01.016.

Tian, L., Xu, X., Jiang, L., Zhang, Z., & Huang, H. (2018). Optimization of fermentation conditions for carotenoid production in the radiation-resistant strain *Deinococcus xibeiensis* R13. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42, 631-642. DOI: 10.1007/s00449-018-02069-3.

Tichý, M., Bečková, M., Kopečná, J., Noda, J., Sobotka, R., & Komenda, J. (2016). Strain of *Synechocystis* PCC 6803 with aberrant assembly of photosystem II contains tandem duplication of a large chromosomal region. *Frontiers in Plant Science*, 7, 648. DOI: 10.3389/fpls.2016.00648.

Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.

Van den Eynde, H., Van de Peer, Y., Vandenabeele, H., Van Bogaert, M., & De Wachter, R. (1990). 5S rRNA sequences of myxobacteria and radioresistant bacteria and implications for eubacterial evolution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(4), 399-404.

van der Horst, M. A., Key, J., & Hellingwerf, K. J. (2007). Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too. *Trends in microbiology*, 15(12), 554-562. DOI: 10.1016/j.tim.2007.09.009.

Weisburg, W. G., Giovannoni, S. J., & Woese, C. R. (1989). The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Systematic and applied microbiology*, 11(2), 128-134. DOI: 10.1016/S0723-2020(89)80051-7.

Wright, S. W., Jeffrey, S. W., & Mantoura, R. F. C. (Eds.). (2005). *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. Paris, France: Unesco Pub..