

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



Diplomová práce

**Cirkadiánní rytmy u sekundární řasy
*Chromera velia***

Bc. Martina Jonáková

Školitel: Doc. Ing. Miroslav Oborník, Ph. D.
Školitel specialista: Mgr. David Doležel, Ph. D.

České Budějovice
2011

Jonáková, M., 2011: Cirkadiánní rytmy u sekundární řasy *Chromera velia* [Circadian rhythm of secondary alga *Chromera velia*; Mgr. Thesis, in Czech] - 49 pages, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

A life cycle of many known algae is influenced by the circadian clock. It seems probable that also *Chromera velia*, the closest known photosynthetic relative to Apicomplexa, uses circadian oscillator. We tested, if fluctuating of zoospore's abundance is driven by the circadian clock. This rhythm is stable even in the constant light condition. Furthermore, three cryptochrome genes, involved in circadian rhythms, were sequenced and consequently phylogenetically investigated. Two of them were classified as CRY-DASH, the third is CRY-DASH-like. The rhythmicity of CRY-DASH expression in *C. velia* was also investigated. The level of expression was also tested under constant light and dark condition. It was suggested that expression of these genes is associated with the circadian oscillator. This is the first study of the circadian clock in *C. velia*.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 14.12.2011

.....

Poděkování

Mé největší díky patří zejména mému školiteli Mírovi Oborníkovi za příkladné vedení mé diplomové práce, za jeho trpělivost a snahu mi poradit za všech okolností. Obrovské díky patří také Davidovi Doleželovi a jeho laboratoři za ochotu mi kdykoli a s čímkoli pomoci a samozřejmě také za to, že mi zasvětil do tajů RT-PCR. Za spoustu dobrých rad bych chtěla poděkovat celé laboratoři Molekulární taxonomie, zejména pak Alešovi za pomoc s fylogenetickou metodikou a Evě za obětavou pomoc s odběrem vzorků. V neposlední řadě jsem vděčná svým rodičům a sestře, že mi poskytli veškeré zázemí pro klidné studium, i za jejich obětavou pomoc s gramatickou korekturou. Chtěla bych zde také poděkovat svému příteli za morální podporu ve chvílích nejhorsích a za jeho věcné připomínky ke slohovým nedostatkům této práce.

Obsah

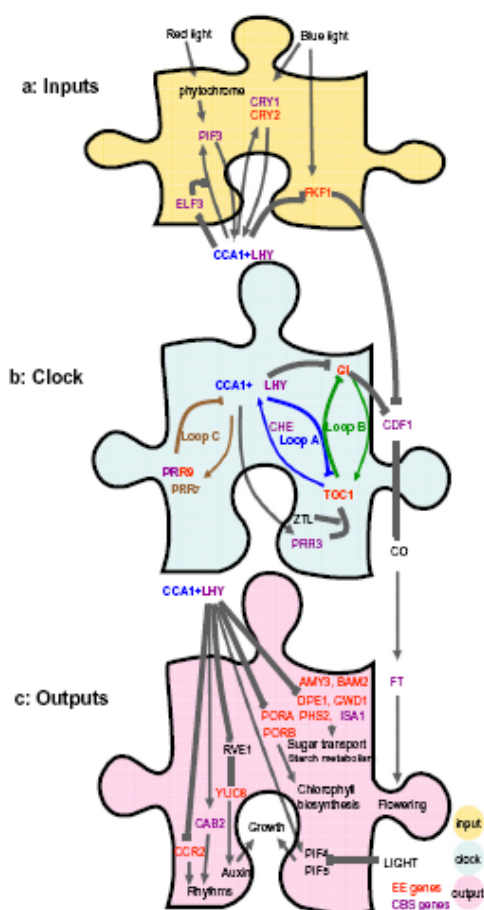
1. Úvod	
1. 1. Obecný mechanismus cirkadiánních hodin	1
2. Literární přehled	
2. 1. Cirkadiánní rytmy	
2. 1. 1. Stručný přehled cirkadiánních rytmů u živočichů	4
2. 1. 2. Stručný přehled cirkadiánních rytmů u rostlin	7
2. 1. 3. Cirkadiánní rytmy u řas	9
2. 3. Kryptochromy	12
2. 4. <i>Chromera velia</i>	15
2. 5. Proč právě <i>Chromera velia</i> ?	16
3. Cíle práce	18
4. Materiály a metody	
4. 1. Kultivace <i>C. velia</i>	19
4. 2. Pozorování bičíkatých stádií v průběhu dne	19
4. 3. Izolace cDNA	20
4. 4. Kandidátské geny, BLAST a navržení primerů	21
4. 5. PCR-RACE (Polymerase chain reaction – Rapid amplification of cDNA ends)	22
4. 6. Elektroforéza v agarózovém gelu	24
4. 7 Molekulární klonování, izolace plasmidu, testování přítomnosti inzertu	24
4. 8. Sekvenování	25
4. 9. Fylogenetické analýzy	25
4. 10. Odběr vzorků a příprava cDNA pro PCR v reálném čase (RT-PCR)	26
4. 11. RT-PCR	27
5. Výsledky	
5. 1. Pozorování cirkadiánní rytmicity bičíkatých stádií	29
5. 2 Hledání homologů kandidátských genů u <i>C.velia</i>	31
5. 3. Fylogenetické postavení homologů CRY u <i>C. velia</i>	31
5. 4. Rytmická exprese kryptochromů u <i>C.velia</i> v přirozeném denním režimu (LD 12:12)	34

5. 5. Rytmicita exprese kryptochromů u <i>C. velia</i> v konstantních podmínkách	35
6. Diskuze	
6. 1. Cirkadiálně řízené chování u řas	38
6. 2. Fylogenetická analýza skupiny proteinů CRY-DASH	39
7. Závěr	42
8. Použitá literatura	43

1. Úvod

1. 1. Obecný mechanismus cirkadiálních hodin

Podmínky prostředí se díky rotaci a oběhu naší planety pravidelně mění. Pro každý živý organismus je kriticky důležité, být na tyto změny připraven, a proto musí vědět v jaké fázi dne i roku se nachází. Mechanismus fungování vnitřních biologických časovačů lze přirovnat k lidským hodinovým strojkům, kde místo ozubených kol je využíván systém proteinů exprimovaných ve zpětnovazebných smyčkách. Analogicky k lidským hodinkám je celý systém taktéž resetovatelný, a tudíž nastavitelný, podle nových podmínek prostředí (shrnuli McWatters a Devlin, 2011). Postupně byly tzv. cirkadiální hodiny objevovány nejen u živočichů a rostlin, ale výzkum probíhá u jednobuněčných eukaryot a dokonce i u prokaryot (např. *Synechococcus*; Huang a kol., 1993). Nedávno byly cirkadiální rytmy prokázány i u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (Eeldering-Chen a kol., 2010).



Obrázek 1. Schematické znázornění některých rostlinných cirkadiálních systémů reagujících na červené nebo modré světlo (McWatters a Devlin, 2011).

I když se molekulární mechanismus cirkadiálních hodin u jednotlivých taxonů může velmi lišit, všem jsou společné tři hlavní rysy. Za určující pro jakýkoli cirkadiální rytmus se považuje: i) stálost cyklu za konstantních vnějších podmínek, ii) schopnost systému se resetovat vnějšími podmínkami, zejména podle světla a tmy, iii) stálost periody za různých teplotních podmínek tzv. teplotní kompenzace cirkadiálních hodin (Bünning, 1973).

Obecně je také možné si rozdělit jednotlivé složky cirkadiálního systému na tři, vzájemně propojené části. Každý fungující mechanismus musí mít kontakt s prostředím, který obvykle zprostředkovávají různé druhy receptorů. Informace z vnějšku přechází do samotného vnitřního oscilátoru, který musí mít prostředky, jak ovlivňovat fyziologii a chování organismu (Obr. 1) (shrnutí McWatters a Devlin, 2011).

Mechanismus cirkadiálních hodin je obvykle regulován na transkripční úrovni. Je založen na sadě transkripčních aktivátorů, které jsou zpětnovazebnou smyčkou regulovány sadou transkripčních regulačních proteinů a to ve stále stejných, opakujících se cyklech (shrnutí Bass a Takahashi, 2011). Je tedy možné sledovat cyklování mRNA složek cirkadiálního oscilátoru i genů, jím ovládaných. Takovou oscilaci je pak možné měřit pomocí RT-PCR za použití cDNA. Měli bychom si ale vždy uvědomovat, že rozsah našich poznatků je vždy ovlivněn použitými metodami, které často odhalení jakkoli jinak regulovaných metod vylučují (Mittag, 1998). Vnitrobuněčné pochody mohou například být, dle nedávných výzkumů, rytmicky řízeny i nezávisle na transkripci i translaci. Výborným modelem pro výzkum eukaryotických, na transkripci či translaci nezávislých pochodů, se staly lidské červené krvinky. Díky absenci jádra zde nemůže docházet k žádné expresi genů, a tím odpadá nutnost používat farmakologické inhibitory transkripce, které mohou mít neočekávatelné vedlejší účinky. Jak ukazují výsledky studie (O'Neill a Reddy, 2011), dokonce i červené krvinky podléhají denním rytmům. Jejich vysoce konzervovaná skupina peroxireduxinů má nezastupitelnou úlohu při kontrole hladiny peroxidu v buňce. Redukcí peroxidu se peroxireduxiny oxidují a bylo zjištěno, že tyto redoxní reakce probíhají trvale. Vzhledem k tomu, že krvinky žijí v těle za absence světla, byla vyzkoušena schopnost systému se resetovat na základě teplotního kolísání, které napodobovalo denní výkyvy lidské tělesné teploty. Systém se ukázal jako resetovatelný a dokonce byl schopen se udržet i za konstantních podmínek, bez vnějších vodítek. Při inkubaci buněk při různých teplotách se perioda rovněž významně nezměnila, a tak byla splněna i třetí z již výše zmiňovaných podmínek. Ačkoli je tento mechanismus očividně samostatně funkční, pokusy na jaderných myších fibroblastech potvrdily, že u jaderných buněk je cirkadiální cyklus peroxireduxinu ovlivňován i zpětnovazebnou, transkripčně-translační smyčkou (O'Neill a Reddy, 2011).

Jednobuněčné organismy ovšem nemusí regulovat svůj cirkadiánní systém pouze vnitrobuněčnými kaskádami. Nepříliš často diskutovaný způsob regulace cirkadiánních rytmů je i mezibuněčná signalizace, která upravuje délku cirkadiánních rytmů. Signální molekuly mohou být uvolňovány do média a umožňují tak synchronně reagovat celé kolonii. Příkladem může být cAMP v hlence *Dictyostelium discoideum* nebo gonyaulin produkovaný obrněnkou *Lingulodinium polyedrum* (dříve nazývanou *Gonyaulax polyedra*) (shrnutí Suzuki a Johnson, 2001).

2. Literární přehled

2. 1. Cirkadiánní rytmy

2. 1. 1. Stručný přehled cirkadiánních rytmů u živočichů

Schopnost vnímat světlo je důležitým předpokladem pro správné určení délky dne a je také jedním z nejdůležitějších faktorů prostředí, které mohou resetovat náš rytmus. Člověk je velice citlivý i na slabé světlo, například vnitřní osvětlení místnosti, které má také dopad na náš denní rytmus (Boivin a kol., 1996).

Obraz okolí se do našeho mozku dostává sítnicí. Pro to, aby naše cirkadiánní hodiny „věděly“, zda je den či noc však nepotřebujeme ani čípky ani tyčinky, které zprostředkovávají okolní obraz mozku. Vlastním fotoreceptorem našeho oscilátoru jsou gangliové buňky v sítnici, které zajišťují resetování našich hodin, dokonce i když jsou čípky a tyčinky nefunkční (Berson a kol., 2002). Z gangliových buněk je signál dále převeden do suprachiasmatických jader v přední části hypothalamu, která tvoří vlastní centrum našich hlavních biologických hodin. Tento hlavní oscilátor synchronizuje činnost mnoha dílčích podřízených oscilátorů přítomných v jednotlivých buňkách. Oba tyto druhy oscilátorů fungují na podobném principu a i zde jsou proteinové hladiny vzájemně regulovány zpětnovazebnými smyčkami (shrnutí Reppert a Weaver, 2002).

Centrální komponentou našich vnitřních hodin jsou transkripční faktory BMAL1 (Brain and muscle Arnt-like protein) a CLOCK (Circadian locomotor output). Tyto dva faktory se v heterodimerizované podobě váží na E-box a aktivují transkripci *per1*, *per2* a *per3* (Period 1, 2, 3) a zároveň dvou kryptochromů *cry1* a *cry2* (Cryptochrome 1, 2). Všech pět proteinů následně opouští jádro a v cytoplasmě jsou kinázami, zejména CK1 ϵ/δ (Casein kinase 1 ϵ/δ) fosforylovány. V této podobě se vracejí do jádra, kde reagují s heterodimerem a inhibují svou vlastní transkripci, což uzavírá první zpětnovazebnou smyčku. Druhá smyčka vzniká reakcí proteinů BMAL1 a CLOCK s hormonálními jadernými receptory Rev-Erba a Rora, které mohou řídit genovou expresi BMAL1 (shrnutí McClung, 2011).

Studium cirkadiánních rytmů u savců má zásadní medicínský dopad. Jak dokazují čím dál tím početnější studie na lidech, vnitřní oscilátor často významně ovlivňuje náš život. Zásadní narušení cirkadiánních rytmů může vyústit v různé druhy psychických problémů. S mutacemi genů našich vnitřních hodin jsou spojovány závažné poruchy chování, jako je např. bipolární afektivní porucha. Měnící se délka dne se může také do naší psychiky promítnout jako různé formy sezónních poruch nálad (známých např. jako „podzimní deprese, zimní deprese,...“) (Mansour a kol, 2006; Lavebratt a kol., 2010). Se stresovými situacemi

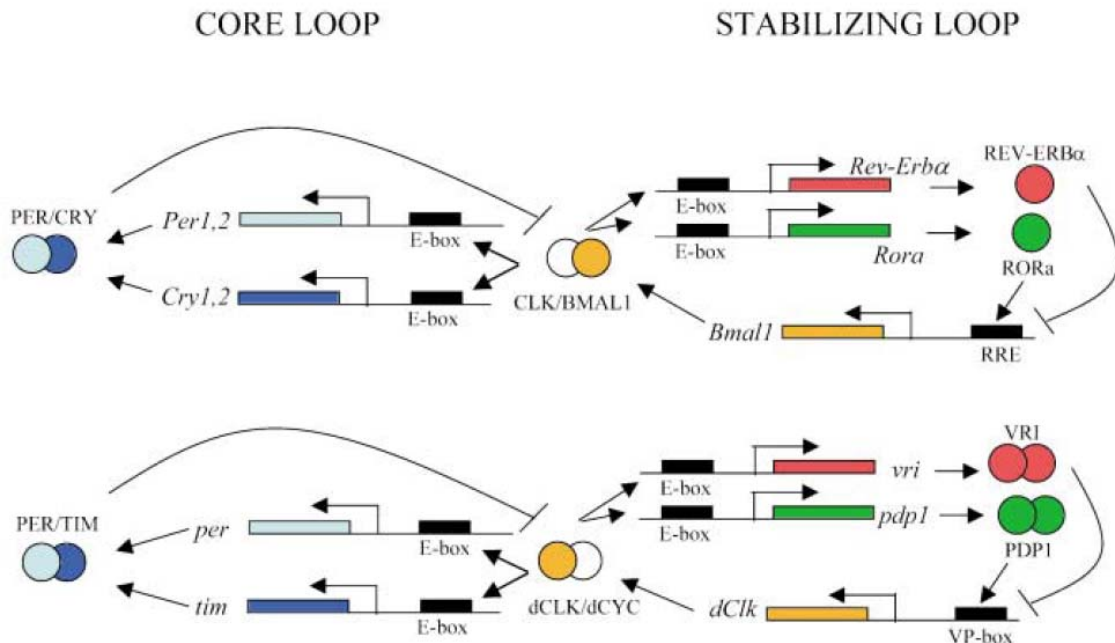
jsou také často spojeny změny stravovacích návyků, jak jistě zná každý z vlastní zkušenosti. Úzkou propojenost cirkadiálních rytmů nejen s psychikou, ale i s metabolismem se podařilo prokázat srovnáním myši mutantních v genu *clock* s divokým typem. Mutantní myši měly větší spotřebu kalorií, pokud jim byla potrava poskytována v neomezeném množství a odpovídajícím způsobem poté tloustly. Myši s nadváhou následně trpěly poruchami běžně provázejícími obezitu, jako například zvýšenou hladinou cukru v krvi (Turek a kol., 2005).

Studujeme-li faktory ovlivňující cirkadiální rytmy, je potřeba stanovit za přirozených podmínek spolehlivě oscilující ukazatele, které lze snadno měřit. U lidí se nejčastěji sledují změny tělesné teploty a kolísání hladin hormonů melatoninu a kortizolu. Kolísání tělesné teploty během dne je známo už více než 150 let. Měření tělesné teploty má mnoho výhod, studovaného člověka/zvíře příliš neruší a levně získaná data lze okamžitě zpracovat. Také hladiny zmiňovaných hormonů mohou poskytnout cenné informace a jejich odběr není drahý ani složitý. Hladina melatoninu u savců je poměrně snadno zjištělná odběrem slin, moči nebo krve. I hladina kortizolu je snadno měřitelná ve slinách nebo séru (shrnutí Hofstra a Weerd, 2008).

U hmyzu je nejčastěji měřeným projevem rytmicky pohybová aktivita, která se dá velice snadno měřit pomocí infračerveného paprsku procházejícího chovnou nádobkou (skleněnou trubicí). Infračervený paprsek je napojen na počítač, který zaznamenává čas, kdy byl přerušen. Obdobný systém se používá i v případě krys a myši, kdy je počítačově sledován pohyb běhacího kolotoče (Sharma, 2003).

Studium podstaty jednotlivých komponent cirkadiálního oscilátoru u *Drosophila melanogaster* bylo zahájeno objevem klíčového regulátoru denních rytmů, genu *per* už v roce 1971 (Konopka a Benzer, 1971). Dnes je možné sledovat průběh cirkadiálních rytmů genu *per* napojeného na per-luciferázový reportér (Brandes a kol 1996) i v rámci jednotlivých tkání. Kultivací jednotlivých částí těla much (hlavy, hrudi a zadečku) byla zjištěna přítomnost vlastních nezávislých cirkadiálních oscilátorů, které jsou schopné řídit cirkadiální rytmicitu jen v dané části těla (Plautza a kol., 1997). Souběžně s tímto projektem probíhala i studie vnitřního oscilátoru v kontextu s buněčnou fyziologií. Podařilo se rozebrat průběh cirkadiální exprese genu *per* do ještě větších detailů díky vytvoření buněčné kultury z muších endokrinních žláz („prothoracic glands“), kde byla promotérem genu *per* rovněž řízená exprese Per-luciferázového promotéru. Takto cirkadiálně řízený buněčný systém nám dává možnost studovat vnitřní oscilátor v kontextu s buněčnou fyziologií (Emery a kol., 1997). Výzkum genu *per* má o to větší význam, že je homologický k již zmiňovanému genu *per*

v savcích. Systém biologického oscilátoru u *D. melanogaster* je velice podobný již výše popisovanému systému u savců (Obr. 2) (shrnutí Emery a Reppert, 2004).



Obrázek 2. Porovnání cirkadiálního oscilátoru u savců (nahore) a u *D. melanogaster* (dole) (Emery a Reppert, 2004)

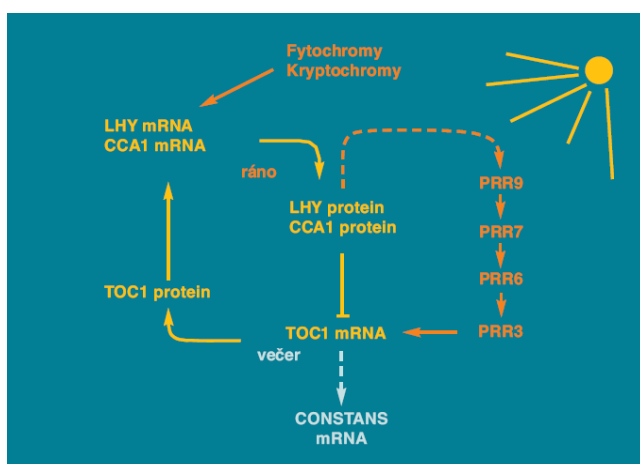
Centrální komponentou v případě oscilátoru *D. melanogaster* je heterodimer proteinů CLK a CYL (Cycle), který pozitivně reguluje expresi genů *per* a *tim* (Timeless). Protein Tim utvoří spolu s proteinem PER heterodimer, čímž je zabráněno jejich následné degradaci. Stejně jako v případě heterodimeru PER/CRY u savců, se TIM a PER vracejí do jádra a dokončí zpětnovazebnou smyčku (Core Loop) negativní regulací aktivity CLK/CYC, čímž sníží svou vlastní expresi (shrnutí Dubruille a Emery, 2008).

Druhá zpětnovazebná smyčka (stabilizing loop) zahrnuje cirkadiální regulaci transkripce genu *clk*, která je snižována regulačním proteinem VRI (Vrille) a zvyšována pozitivním regulátorem PDP1 (Par domain protein 1). Heterodimer CLK/CYC má ale rovněž funkci pozitivního regulátoru, díky schopnosti navázat se na E-box obou regulačních proteinů VRI i PDP1 (shrnutí Emery a Reppert, 2004).

2. 1. 2. Stručný přehled cirkadiánních rytmů u rostlin

Ačkoli jsou všechny doposud známé vnitrobuněčné hodiny založené na podobném principu zpětnovazebných smyček, rostliny disponují zcela jinými komponenty vlastního oscilátoru, což zřejmě znamená nezávislý evoluční původ jejich časovače. Vzhledem k autotrofnímu způsobu obživy je zřejmé, že i pro seřizování svých cirkadiánních rytmů bude mít klíčovou úlohu světlo. Pro rostlinu má klíčový význam zejména světlo červené a ultračervené, zachycované fytochromy, a pak také světlo modré a ultrafialové, na které reaguje fotolyázám příbuzná skupina fotoreceptorů – kryptochromy. Přesný mechanismus jejich účinku na cirkadiánní oscilátor, ale doposud není znám (shrnutí Lin a Todo, 2005; McWatters a Devlin, 2011).

Vlastní oscilátor rostlin sestává ze tří navzájem propojených zpětnovazebných smyček. Den pro rostlinu začíná aktivací dvou transkripčních faktorů CCA1 (Circadian clock associated 1) a LHY (Late elongated hypocotyl), které potlačují expresi proteinu TOC1 (Timing of Cab expression 1). Ten je však nezbytný pro transkripci jak CCA1, tak i LHY, takže po jeho vymizení se zastaví i exprese těchto dvou proteinů. Nedostatek LHY a CCA1 opět umožní expresi TOC1, a tak se smyčka uzavře. Druhé smyčky se také účastní CCA1 a LHY, ale tentokrát jsou potlačovány transkripčními faktory PRR (pseudoresponse regulátor) (Obr. 3). Ve třetí smyčce se opět objevuje TOC1, spolu s proteinem GI (Gigantea), kde TOC1 potlačuje GI, ale ten naopak podporuje expresi TOC1 (Obr. 1., část b) (shrnutí McWatters a Devlin, 2011; Štorchová, 2008).



Obrázek 3. Schematické znázornění dvou ze tří doposud objasněných zpětnovazebných smyček v *A. thaliana* (Štorchová, 2008)

Cirkadiánním oscilátorem je ovládána přímo nebo nepřímo transkripce celé řady genů. Výsledná hladina proteinu, ale vůbec nemusí odpovídat tomu, jak byla řízená jeho transkripce. U trojice genů *cab1*, *cab2* a *cab3* (Chlorophyll a/b binding protein 1, 2, 3) bylo zjištěno

cyklování během dne v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*, řízené cirkadiálními hodinami. Mezi těmito blízkými příbuznými geny byl zjištěn zajímavý rozpor. Hladina mRNA *cab2* a *cab3* rytmicky klesala a stoupala i v rostlinách přesunutých z pravidelného cyklu den/noc do podmínek konstantní tmy, zatímco množství *cab1* zůstávalo během dne téměř konstantní. Na druhou stranu byla ale u genu *cab1*, stejně jako u *cab2* prokázána cirkadiálně řízená transkripce. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je následná post-transkripční úprava, která reguluje stabilitu mRNA a zakrývá tak rozdílnou transkripci během dne (Millar a Kay, 1991). Zcela opačná situace byla pozorována na stejné rostlině v případě enzymu nitrátové reduktázy. Hladina její mRNA sice cykluje zcela pravidelně, ale transkripce probíhá ve stejné míře během celého dne. I zde evidentně hrají roli post-transkripční úpravy, které v tomto případě zprostředkovávají oscilaci mRNA (Pilgrim a kol, 1993). Oba tyto výsledky jasně dokazují, že řízená transkripce není ani v případě rostlin jediným regulačním mechanismem.

Pro rozmnožování rostlin je kriticky důležité vědět, v jaké části roku se nacházejí. Délka dne je mnohem spolehlivějším faktorem, než proměnlivé klimatické podmínky, I zde hraje klíčovou roli vnitřní oscilátor, který reguluje transkripci genu *co* (CONSTANS). Ten je pravidelně exprimován brzy navečer, ale bez přítomnosti světla je nestabilní a je záhy degradován. Pokud je však v době exprese CO proteinu stále ještě světlo, znamená to, že je dlouhý den a léto, což je pro *A. thaliana* vhodná doba pro kvetení. Fotoreceptory PhyA (phytochrome A) a CRY2 zabrání degradaci a protein CO může interagovat s promotérem genu *ft* (Flowering locus T), který vyvolá kvetení (shrnutí Lagercrantz, 2009).

Teplota ovšem hraje pro cirkadiální rytmus rostliny rovněž klíčovou úlohu. U *A. thaliana* bylo objeveno 22 043 genů reagujících na snížení teploty, přičemž se jejich reakce lišila podle denní doby, kdy byly odebírány vzorky (Hannah a kol., 2005). U většiny biochemických dějů platí, že čím je nižší teplota, tím běží reakce pomaleji. Oscilátor, jehož rychlost by byla závislá na teplotě, by byl k ničemu, a proto musí být vliv teploty nějak kompenzován (shrnutí McWatters a Devlin, 2011). Jak bylo prokázáno u *A. thaliana*, není ale schopnost udržet hodiny běžící konstantní rychlostí za různých teplot neomezená. Při teplotě 4°C jsou vnitřní rytmy rostliny závislé jen na vnějších vodítkách, protože za konstantního světla při této teplotě veškeré sledované cykly zmizely (Beieniawska a kol., 2008).

Často opomíjeným faktorem pro ovlivňování cirkadiálního rytmu rostlin je proměnlivá hladina cukru během dne. Tato přirozená oscilace je během výzkumu narušována cukry přidávanými do média (např. články Anderson a kol., 1994; Millar a Kay, 1991), které usnadňují pěstování rostlin a umožňují je pěstovat i v podmínkách konstantní tmy. Vzhledem k tomu, že mění se hladiny cukru ovlivňují expresi až poloviny hodinami řízených genů,

klesá vypovídající hodnota takových experimentů. Porovnání „divokého“ kmene Colorado-0 a bezškrobnatého mutanta *pgm* (phosphoglucosyltransferase) umožnilo zhodnotit, jak velký dopad má změněná hladina cukru a odlišit odpovědi na změněnou hladinu cukrů od odpovědi na jiné faktory. Ukázalo se, že vliv hladiny cukrů na expresi je dokonce vyšší než dopad koncentrace dusíkatých látek, dostatek vody nebo dokonce i dostatek světla. Větší dopad na rostlinu a její transkripci má ovšem nedostatek cukru než jeho nadbytek (Bläsing a kol., 2005).

2. 1. 3. Cirkadiánní rytmy u řas

Prvním jednobuněčným organismem a zároveň první řasou, u které se potvrdila přítomnost cirkadiánního oscilátoru, byla *Euglena gracilis* (Excavata: Euglenozoa) již v roce 1948 (Pohl, 1948). Ačkoli jsou cirkadiánní rytmy u řas již dlouho studovaným tématem, doposud je o molekulárním mechanismu řízení jejich denního cyklu známo jen velmi málo. Jednou z řas, u níž byla problematika cirkadiánních rytmů velmi podrobně studována je *Chlamydomonas reinhardtii* (Archaeplastida: Chlorophyta). Úspěšná izolace mutanta vykazujícího nepravidelnosti v cirkadiánním rytmu byla provedena již v roce 1972 (Bruce, 1972), nicméně k pokrokům v této problematice dochází až v poslední době, díky stále se zdokonalujícím metodám molekulární biologie. *C. reinhardtii* by se, stejně jako v případě rostlin *A. thaliana* a v případě živočichů *D. melanogaster*, mohla stát modelovým organismem řas pro studium cirkadiánních rytmů (Matsuo a kol., 2009).

Klíčovým pro studium cirkadiánních rytmů u řas v reálném čase bylo vytvoření mutanta s vloženým genem pro luciferázu, optimalizovaným pro chloroplastový genom. Porovnání rytmů bioluminiscence u takto upravených kmenů *C. reinhardtii* s vloženým jaderným genem pro dlouhou periodu a kmenem bez tohoto genu přineslo jasný důkaz o jaderném oscilátoru, řídícím délku chloroplastových rytmů a umožnilo studium komponent cirkadiánních rytmů (Matsuo a kol., 2006).

Velkou revolucí ve výzkumu cirkadiánních rytmů u *C. reinhardtii*, a potažmo pro výzkum tohoto fenoménu u řas, byla identifikace 30 genů, způsobující poruchy cirkadiánního rytmu a zejména osekvenování šesti z nich. Ukázalo se, že některé identifikované geny mají homology i v tak vzdálených organismech jakým je *A. thaliana* či dokonce *D. melanogaster* (Matsuo a kol., 2009). Částečně to potvrdily už dřívější pokusy, kdy byly v genomu *C. reinhardtii* hledány vytipované kandidátské geny z *A. thaliana*. Byly nalezeny homologické sekvence ke genům *lux* (Lux arrhythmo), *cca1* a *lhy*, které jsou klíčové pro oscilátor cirkadiánních hodin. Velké překvapení ale bylo nalezení dvou zcela odlišných kryptochromů, z nichž jeden vykazoval podobnost ke kryptochromům *D. melanogaster*, zatímco druhý byl

podobný těm, nalezeným v *A. thaliana*. Mohlo by to znamenat, že *Chlamydomonas* používá velice starý mechanismus cirkadiálních hodin, které vznikly, ještě před oddělením větví rostlin a živočichů (shrnutí Breton a Kay, 2006).

Cirkadiální rytmy se rovněž dlouhodobě studují u obrněnek (Chromalveolata: Dinophyta), které patří do stejné skupiny Alveolata, jako je náš model - *Chromera velia*. Významným modelovým organismem cirkadiálních rytmů se obrněnky staly zejména proto, že byly jedním z prvních čtyř eukaryotických organismů, u nichž byla zkoumána schopnost luminiscence, která byla dobře pozorovatelná hlavně během subjektivní noci, kdy byla 40 - 60 krát silnější než ve dne. Teprve o více jak dvacet let později byla ovšem definitivně vyvrácena možnost, že by se aktivita enzymu luciferázy během dne sama měnila. Vzhledem k potvrzené skutečnosti, že dinoflagelát *L. polyedrum* udrží cirkadiální rytmus luminiscence i za konstantních tepelných i světelných podmínek, se nabízí jen jediné vysvětlení. Zdá se evidentní, že vnitřní mechanismus cirkadiálních hodin musí řídit míru syntézy nebo naopak míru degradace tohoto enzymu (Hastings a Sweeney, 1957; 1958a; Dunlap a Hastings 1981).

Luminiscence u *L. polyedrum* se dá rozdělit do dvou typů. Prvním je blikání, které probíhá po většinu subjektivní noci. Druhým typem je kontinuální záření, které plynule nahrazuje blikání ke konci noci. Dalším fyziologickým, cirkadiálně řízeným jevem je shlukování buněk během subjektivního dne. Těchto dvou výrazných, pravidelně cyklujících jevů bylo využito při studii, která se snažila zodpovědět otázku, zda mohou být dva jevy řízeny dvěma samostatnými oscilátory. Tím, že se nakonec podařilo zkrátit periodu agregace, zatímco bioluminiscenční perioda zůstala nezměněna, se přesvědčivě prokázalo, že tyto dva rytmy musí být řízeny alespoň částečně nezávisle na sobě. Zároveň je ale ze studie zřejmé, že se rytmy navzájem ovlivňují, přičemž shlukování je více ovlivněno luminiscencí než je tomu naopak (Roenneberg a Morse, 1993).

Paralelně s výzkumem luminiscence se podařilo u *L. polyedrum*, jako u prvního jednobuněčného organismu, prokázat cirkadiálně řízené buněčné dělení, které se v naprosté většině odehrává ke konci dne a na začátku noci. Teprve později bylo potvrzeno i u *C. reinhardtii* a dalších druhů (Sweeney a Hastings, 1958b)

Stejně jako pro většinu organismů, je i pro *L. polyedrum* rozhodujícím faktorem pro resetování cirkadiálních hodin světlo. Jak ovšem potvrdily pokusy s červeným, modrým a bílým světlem v kombinaci s allopurinolem, inhibujícím receptory modrého světla, je při resetování denního rytmu rozhodující nejen délka dne, ale i světelné spektrum působící na řasu. Vzhledem k rozdílným posunům cirkadiálního rytmu u řas vystavených červenému a modrému světlu a také u řas vystavených účinku allopurinolu, se zdá pravděpodobné, že *L.*

polyedrum má dvě dráhy pro resetování svých cirkadiánních hodin. Jedna dráha reaguje na modré světlo a druhá dráha přijímá červené i modré světlo (Deng a Roenneberg, 1997).

Neméně zajímavá oblast výzkumu ovšem probíhala i na samotném principu cirkadiánní oscilace - na regulaci exprese cirkadiánně řízených proteinů. Jak už bylo výše zmíněno, exprese je řízená obvykle na transkripční úrovni, kdy osciluje mRNA během dne. Nicméně byly studovány i případy regulace řízené translačně (shrnutí Suzuki a Johnson, 2001). Nejlépe byla translační regulace prozkoumána právě u *L. polyedrum*. Celý bioluminiscenční aparát této řasy, enzym luciferáza, substrát luciferin i LBP (luciferin binding protein), je uložen ve speciálních organelách scintilonech, jejich počet během noci narůstá asi desetkrát. Kromě samotného narůstání počtu scintilonů kolísá pravidelně během dne vnitrobuněčná koncentrace všech komponent (luciferin, luciferáza, LBP). Přestože hladina LBP kolísá, množství *lbp* mRNA je konstantní během celého dne. Kdy a kolik mRNA bude translatováno je řízeno cirkadiánně. Dokonce byl objeven protein, o kterém se soudilo, že by mohl být translačním represorem LBP syntézy. K tomuto proteinu CCRT (circadian-controlled translational regulator) byl později objeven funkční homolog u *C. reinhardtii* pojmenován CHLAMY 1. Oba proteiny by se měli specificky vázat na netranslatované UG repetice (shrnutí Suzuki a Johnson, 2001). Nedávné výzkumy ale tyto závěry zpochybňují. Původním záměrem bylo charakterizovat nově objevený protein CCRT. Ačkoli ale byl použit stejný postup a za použití stejných materiálů, výsledky se lišily. Ani jedna z mnoha použitých metod nedokázala izolovat protein CCTR, který by se specificky vázal na 3' netranslatovanou oblast v *lbp* mRNA. Existuje samozřejmě i možnost, že rozhodující roli hrála rozdílnost kmenů. Pro tento výzkum byl použitý nověji izolovaný kmen a nebyla ani zcela vyloučena možnost ovlivnění výsledků následkem posttranslační modifikce. Každopádně bude potřeba se problematikou regulace syntézy LBP ještě dále zabývat (Lapointe a Morse, 2008).

Existenci CHLAMY 1 doposud ovšem nikdo nezpochybnil a výzkumy na tomto zajímavém proteinu stále pokračují. Bylo zjištěno, že CHLAMY 1 se skládá ze dvou proteinových podjednotek C1 a C3, o velikosti 51 706 Da a 44 979 Da. C3 podjednotka patří do velice konzervované skupiny CELF (CUG-binding protein and ETR-3 like factors) proteinů. Obě podjednotky jsou zřejmě zahrnuty do řízení cirkadiánního režimu řasy. U mutantů vykazujících nižší expresi C1 byly pozorovány následné nepravidelnosti až arytmie v cirkadiánním cyklu. Naopak při nadměrné expresi C3 podjednotky se délka subjektivního dne posunula asi o hodinu ve srovnání s kontrolou (Iliev a kol., 2006).

Překvapivé výsledky přinesl teprve nedávno publikovaný výzkum další ze zelených řas, *Ostreococcus tauri*. Již dříve bylo zjištěno, že se této řasy dá dobře použít pro studium

cirkadiálních rytmů u vyšších rostlin, protože obsahuje shodný základní mechanismus negativně zpětnovazebné smyčky založené na střídavé expresi CCA1 a TOC1. S vyvinutím mutantního kmene, schopného bioluminiscence, její možnosti využití při studiu cirkadiálních rytmů ještě vzrostla. Mikroskopickým pozorováním byla přítomnost cirkadiálních hodin rovněž potvrzena. Řasa si dokázala udržet cyklus i za konstantního světla. Během kultivace za konstantní tmy však, podle očekávání, veškerá exprese genů ustala. Po přenesení na světlo však *O. tauri* nenastavila svůj vnitřní rytmus podle hodiny začátku svícení, ale pokračovala dále ve svém předchozím cirkadiálním cyklu. Tyto výsledky zcela jasně naznačují, že si je *O. tauri* schopná udržet funkční časovač i při absenci jakékoli transkripce. Vzhledem k tomu, že genom *O. tauri* obsahuje nejméně jeden z již výše zmiňovaných peroxiredoxinů, bylo možné pomocí protilátek stanovit, jak klesala oxidace peroxiredoxinu během dne. Pravidelné cyklování oxidace se udrželo i v konstantní tmě za použití inhibitoru RNA syntézy a cytosolické translace. Na druhou stranu, pozorované změny oxidace peroxiredoxinů u mutantních kmenů, které měly dlouhou periodu vůči kontrolním kmenům, naznačují, že tato oscilace je nějak napojena na transkripční či translační cykly (O'Neill a kol., 2011)

2. 3. Kryptochromy

Kryptochromy patří do velké rodiny receptorů a enzymů s rozličnými funkcemi v buňce. Předpokládaným předkem kryptochromů je flavoproteinová skupina fotolýáz, která reaguje na modré světlo tak, že začne opravovat poškození DNA odstraňováním pyrimidinových dimerů. Naproti tomu kryptochromy jsou převážně proteiny přímo spojené s cirkadiálními hodinami buďto jako jejich složka nebo jako fotoreceptor umožňující resetování cirkadiálního rytmu. Zatímco v *D. melanogaster* hrají roli hlavního fotoreceptoru, v savčím organismu se podílejí na synchronizaci buněk s vnějšími světelnými podmínkami také rodopsin, konopsin a melanopsin. Na molekulární úrovni se dá ovšem pro hmyzí i savčí kryptochromy shodně říci, že regulují transkripci. U rostlin jsou kryptochromy zásadní pro optimální vývoj. Inhibují prodlužování stonku, stimulují nasazení listů, regulují dobu kvetení a kontrolují cirkadiální hodiny (shrnutí Cashmore a kol., 1999; Lin a Todo, 2005).

Dlouholetá teze, že všechny druhy kryptochromu postrádají fotolýázovou aktivitu, už byla ovšem několikrát vyvrácena. Nejprve byly nalezeny zvláštní proteiny s regulační i fotolýázovou aktivitou u několika druhů hub. První důkaz o schopnosti vykonávat funkci obou členů kryptochrom-fotolýázové rodiny byl poskytnut v případě půdní houby *Trichoderma atroviride*. U její fotolýázy PHR1 bylo pomocí delece tohoto genu prokázáno, že je nezbytnou součástí DNA opravného mechanismu, ale zároveň, že se podílí na regulaci

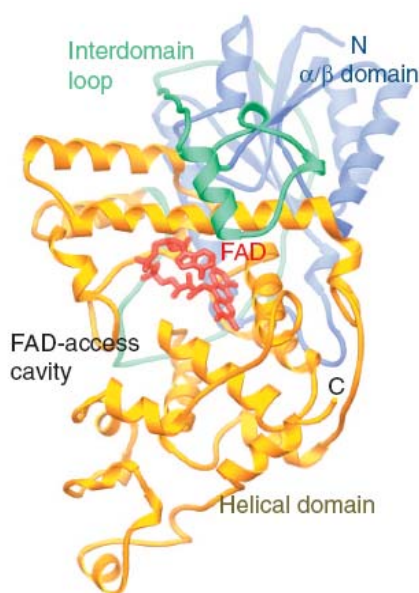
některých genů (Berrocal-Tito a kol., 2007). Podobné objevy následovaly u dalších dvou hub, vláknité *Aspergillus nidulans* (Bayram, 2008) a u rostlinného patogena *Cercospora zeae-maydis* (Bluhm a Dunkle, 2008). Duální funkce některých členů kryptochrom-fotolyázové rodiny se nakonec neomezila jen na houby. V roce 2009 se k těmto proteinům připojil i PtCPF1 (*Phaeodactylum tricornutum*, Cryptochrome/photolyase family) z rozsivky *P. tricornutum*. Tento jaderný protein dokáže absorbovat modré světlo a dokonce byla prokázána 6-4 fotolyázová aktivita na dvouvláknové DNA *in vitro*. Co se týče výzkumu živých buněk, bylo zjištěno, že exprese tohoto PtCPF1 zvyšuje množství přeživších buněk vystavených UV zářením, což nepřímo dokazuje schopnost opravy DNA tímto enzymem. Zároveň ovšem byl zjištěn i zásadní vliv na expresi genů v buňce v závislosti na modrém světle, což odpovídá kryptochromové aktivitě (Coesel a kol., 2009).

Podobně dopadla charakterizace kryptochromů ze dvou řas rodu *Ostreococcus*. Izolované proteiny aktivně opravují DNA *in vitro* a, stejně jako v případě PtCPF1 u *P. tricornutum*, umí zastavit CLOCK:BMAL1 aktivovanou transkripci v COS buňkách (tato schopnost byla prokázána u mnoha kryptochromů obratlovců). Navíc se ale podařilo prokázat cirkadiánní expresi jednoho z kryptochromů OtCPF1 (*O. tauri* CPF1), která byla potvrzena cyklickými výkyvy v množství proteinu i za absence enviromentálních vodítek (Heijde a kol., 2010).

Předpokládá se, že první buňky žijící na naší planetě zprvu ještě bez ozónové vrstvy byly vystavené velmi vysokým dávkám UV záření. Pro evolučně úspěšné organismy muselo být životně důležité si s neustálým poškozováním DNA vlivem škodlivého záření poradit. DNA fotolyáza mohla být prvním enzymem schopným opravit DNA, kterým disponovaly. Fylogenetická analýza napovídá, že později, nicméně však ještě před rozlišením eukaryot a prokaryot, byla nejméně čtyřikrát duplikována. Jedna z kopií byla Cpd prokaryotická fotolyáza, která byla přenesena do eukaryot, kde se později vyvinula ve zvířecí a rostlinný kryptochrom, již se zcela jinou funkcí (shrnul Todo, 1999).

Kryptochromy byly dlouho známy pouze u eukaryot a až v posledních letech se množí objevy kryptochromů také u bakterií a dokonce i u archebakterií; seznam bakterií a archebakterií, u kterých byly objeveny kryptochromy uvádí např. Goosen a Moolenaar, (2007). Nutno ovšem říci, že u většiny těchto kryptochromů nebyla doposud zjištěna funkce. Vzhledem k velice neuspořádanému výskytu u jednotlivých fylogenetických skupin bakterií a archebakterií, se dá předpokládat, že byl kryptochrom mezi prokaryoty šířen laterálním genovým transferem. Prvním bakteriálním kryptochromem, kde byl kromě fotolyázové aktivity i jasně prokázán vliv na expresi proteinů v buňce, byl CRY B u α -proteobakterie *Rhodobacter sphaeroides* (Hendrischk a kol., 2009).

Dosavadní fylogenetické analýzy rozčlenily kryptochromy na živočišné a rostlinné (shrnutí Lin a Todo, 2005). Rostlinné se dále dělí na CRY 1 a CRY 2, zejména funkčně, na základě různých odpovědí na různé intenzity světla. Stejně tak u živočichů můžeme nalézt nejméně dvě dobře rozlišitelné skupiny, které se exprimují v různých tkáních a jsou targetovány do různých organel (shrnutí Todo, 1999).



Obrázek 4. Terciální struktura CRY-DASH proteinu v bakterii *Synechocystis* sp. (Lin a Todo, 2005)

S objevem kryptochromu v bakterii *Synechocystis* (Obr. 4), přibyla ještě nová skupina CRY - DASH (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Homo*), která je na základě fylogenetických analýz výrazně vyčleněná z předchozích dvou skupin. Tato skupina také prolomila dlouho uznávané přesvědčení, že se kryptochromy vyskytují pouze u eukaryot a posunula předpokládaný vznik tohoto proteinu do dob, kdy ještě nebyla rozlišena prokaryota a eukaryota. CRY - DASH se odlišuje od ostatních rovněž strukturně. Na rozdíl od většiny kryptochromů, které mají dvě oblasti - aminokoncovou PHR oblast, na kterou se váží chromofory, a pak karboxylovou doménu různých velikostí, protein CRY - DASH tuto druhou doménu postrádá. Právě tato doména je klíčová pro interakci s dalšími komponenty cirkadiálních rytmů u octomilky, zatímco u drápatky je zde kódovaná lokalizace do jádra. O přesném mechanismu funkce kryptochromů se však zatím můžeme jen dohadovat na základě objasněného principu opravné fotolyázové reakce (shrnutí Lin a Todo, 2005; Coesel a kol., 2009).

2. 4. *Chromera velia*

C. velia, spolu s příbuznou řasou *Vitrella brasiccaformis*, jsou jedinými doposud známými zástupci nově vzniklého kmene Chromerida (Moore a kol., 2008; Oborník a kol., 2011b). Spolu s kmeny Ciliophora, Dinophyta a Apicomplexa tvoří nadkmen Alveolata. Společným rysem celé skupiny jsou ploché měchýřky pod cytoplasmatickou membránou, nazvané kortikální alveoli. Jinak ale jde o skupinu velice pestrou, zahrnující jak parazitické, tak volně žijící organismy s různými způsoby výživy (Patterson, 1999).

Název *Chromera* je složenina dvou anglických slov „chromophore“ a „meront“. Slovo *velia* pochází z italštiny a znamená utajená (Moore a kol., 2008). *C. velia* byla nalezena v sydneyjském přístavu při hledání vnitrobuněčných symbiontů korálu *Plesiastrea versipora* (*Faviidae*) a všeobecně se předpokládá, že jde o jeho symbionta, ačkoli to ještě nebylo potvrzeno (Oborník a kol., 2011a). Na kultivaci je nenáročná, vyžaduje pouze jednoduché médium na bázi mořské vody (f/2) a dostatek světla (viz. Materiály a metody). Daří se jí při teplotách 22-31°C, ale přežívá i 10°C chlad (Oborník a kol., 2011a) a i déle než rok trvajících absolutní tmu (Oborník, osobní sdělení).

Dobře rozlišitelná jsou tři životní stádia, všechny jsou pravděpodobně vegetativní: kokoidní, bičíkaté a cystické. O dominantním stádiu v kultuře rozhoduje především její stáří a podmínky pěstování. Po inokulaci nové kultury převládá za dobrých podmínek v kultuře kokovitá podoba chromery, buňky o velikosti 5,1 – 9,5 µm, které se množí dělením. Po několika dnech se v kultuře objevují vysoce pohyblivé bičíkovci (zoospory), jejichž množství vrcholí při kultivační teplotě 26°C, obvykle 5. – 7. den, podle intenzity světla. Transformace do bičíkatého stádia začíná pomalým otáčením jinak nepohyblivé kokoidní buňky. Samotná proměna trvá jen několik minut. Bičíkovci mají protáhlý tvar s délkou 4,9 – 7,3 µm a šířkou 2,7 – 4,8 µm. Jsou opatřeni dvěma nestejně dlouhými bičíky, jejichž bazální tělíska jsou vůči sobě v úhlu cca 90°. Ve světelném mikroskopu je obvykle mnohdy dobře vidět pouze větší z obou bičíků, díky elektronové mikroskopii ale známe podobu i menšího z bičíků, který je navíc na bázi opatřen prstovitým výběžkem. Toto stádium slouží pravděpodobně k rozšiřování kolonie na nová území, i když je zde také teorie, založená na pozorování kultur, že bičík umožňuje buňce uniknout z příliš silného světla (Oborník a kol., 2011a).

Ve stacionární fázi kultury nebo při nepříznivých podmínkách nejčastěji narazíme na cystické stádium. Toto stádium vzniká opakovaným dělením kokovitých buněk, jehož výsledkem je váček obsahující čtyři buňky, obalené společnou membránou a uspořádané do čtyřstěnu, takže je možné najednou vidět vždy jen tři buňky. Tento útvar má zpravidla 7,9 – 12,1 µm v průměru (Oborník a kol., 2011a).

Nejzajímavější strukturou na chromeře je plastid. To, že byl získán sekundární nebo terciární endosymbiózou, naznačuje už samotná přítomnost čtyř obalujících membrán. Obsahuje tylakoidy řazené po třech. Jako jediná z alveolát, kam fylogeneticky patří, má plastid pigmentovaný chlorofylem *a*, ale nikoli *c*. Další přítomné pigmenty jsou violaxantin, běžný β,β -karoten a i doposud neznámý druh karotenoidu, identifikovaný jako nový izomer isofukoxantinu. Velikost plastidového genomu je 121,2 kb, nicméně doposud není jasné, zda jde stejně jako v případě příbuzné, nedávno popsané, chromeridní řasy *Vitrella brasicaformis*, o kruhovou molekulu, nebo zda je DNA uložena v lineární podobě. Dalším zajímavým morfologickým rysem chromery je neobvyklé kódování tryptofanu v chloroplastu. Místo běžného UGG používá kodon UGA, kanonicky značící stop kodon. Pozoruhodné je, že stejné kódování tryptofanu používají i kokcidie ve svém apikoplastu, což je ve shodě s teorií o společném fotosyntetizujícím předkovi dnes výhradně heterotrofních výtrusovců (Apicomplexa) a autotrofních chromerid. Příbuznost fotosyntetizující chromery s parazitickými výtrusovci potvrzuje i podobné uspořádání ribozomálního superoperonu, který je sice v případě chromery rozlámaný, ale konzervované pořadí shodných genů je snadno porovnatelné (Moore a kol., 2008; Janouškovec a kol., 2010; Oborník a kol. 2011a, b).

2. 5. Proč právě *Chromera velia*?

Až do roku 1991 se věřilo, že pouze rostliny a řasy mohou mít tři různé genomy – jaderný, mitochondriální a plastidový. K naprostému překvapení odborné veřejnosti nebyla z krevničky (*Plasmodium* sp.), způsobující velice závažné lidské onemocnění, malárii, izolována pouze lineární mitochondriální DNA, ale ještě jedna kruhová DNA, neznámého původu (Wilson a kol., 1991). Ještě tentýž rok stejný tým publikoval zjištění, že neznámá DNA kóduje RNA polymerázu velice podobnou té, kterou používají prokaryota, a která je kódována i v genomu chloroplastů (Gardner a kol., 1991). Rovněž uspořádání genů připomínalo chloroplast. O rok později fylogenetická analýza naznačila, že by mohlo jít skutečně o plastidovou DNA nového typu nefotosyntetického plastidu, který se vyvinul z plastidu fotosyntetického předka (Howe, 1992). Konečně, výzkumné skupiny vedené Davidem Roosem (University of Pennsylvania) a Geoffreyem McFaddenem (University of Melbourne) nezávisle na sobě lokalizovaly kruhovou plastidovou DNA v multimembránové struktuře v buňce krevničky a spolu s další fylogenetickou studií definitivně zařadily novou organelu mezi plastidy (McFadden a kol., 1996; Köhler a kol., 1997). Tento veliký objev dal nový směr vývinu léků proti malárii. Vzhledem k tomu, že savčí buňky žádnou podobnou organelu nemají, mohlo by se jednat o ideální cíl budoucích léčiv (Ralph a kol., 2001).

Překvapující u tohoto nového plastidu, pojmenovaného jako apikoplast, je zejména velikost jeho genomu. Délka pouhých 35 kb, kódující jen asi 25 genů, byla zprvu vysvětlována ztrátou schopnosti fotosyntézy. Jenomže i v porovnání s velikostí plastomů jiných organismů, které sekundárně ztratily schopnost fotosyntézy, jako např. *Astasia longa* (73 kb, 50 genů) nebo *Epifagus virginiana* (70 kb, 42 genů), je genom apikoplastu velice malý. Na druhou stranu příbuzné obrněnky obsahují ještě mnohem menší plastom (kóduje jen 12-14 genů, každý gen na jedné kruhové molekule), ačkoli jsou tyto organismy fotosyntetizující. V blastomu obrněnek jsou kódované jen fotosystémové proteiny, které byly u krevničky zredukovány kvůli chybějící fotosyntéze. Z tohoto důvodu bylo dlouho nemožné fylogeneticky porovnat tyto dva druhy plastomů (Wolfe a kol., 1992; Gockel a kol., 1994; Wilson a kol., 1996; Janouškovec a kol., 2010). Zlom přinesl až jedinečný mezičlánek mezi dinoflageláty a výtrusovci, nově izolovaná *C. velia* (Moore a kol., 2008).

Prvotní fylogenetickou analýzu dvou jaderných genů (malá a velká podjednotka rDNA) a dvou plastidových genů (PSB A a malá plastidová podjednotka), rychle následovaná další, podrobnější, založená na dalších osmi jaderných genech. Tyto studie přesvědčivě prokázaly společný původ apikoplastu, plastidu dinoflagelát a obou chromeridů. Na základě publikovaných výsledků byl jediný společný předek obou plastidů pravděpodobně získán sekundární endosymbiózou z červené řasy, čímž byl podán další důkaz o evolučním vztahu plastidů zmiňovaných organismů (Moore a kol., 2008; Janouškovec a kol., 2010). Jedinečným fylogenetickým postavením však výjimečnost této řasy nekončí. Nedávno byla publikována studie zabývající se tetrapyrrolovou dráhou chromery. Její ojedinělá dráha mezi všemi fotosyntetickými organismy se nejvíce podobá právě té, kterou používají pro syntézu hemu parazitičtí výtrusovci. Vzhledem ke své fotosyntetické aktivitě navíc chromera stejnou dráhu používá i pro syntézu chlorofylu a je tak jediným známým fotoautotrofem, který syntetizuje chlorofyl z glycinu a succinylu-CoA (Kořený a kol., 2011).

S objevem bičíkatého stádia chromery byla brzy zjištěna i periodická přeměna kokoidních stádií na bičíkatá, jejichž počet vrcholí šest hodin po rozsvícení, ale klesá až téměř k nule ještě před zhasnutím (Oborník a kol., 2011a). Toto rytmické chování, vyvolalo další otázky ohledně tohoto organismu, jež má pro nás přichystaná jistě ještě mnohá překvapení. Je možné, aby chromera měla cirkadiánní hodiny? Výzkumy dinoflagelátů dospěly k rozporuplným výsledkům (viz kapitola 2. 1. 3. Cirkadiánní rytmy u řas), studie podobného chování u výtrusovců téměř chybí (Dolnik a kol., 2011). Identifikace genů cirkadiánních hodin a jejich fylogenetické zařazení by navíc mohlo upřesnit nejasné postavení chromery na samé hraně definic rostlin a živočichů.

3. Cíle práce

- Nalézt v genomu *C. velia* homology ke známým genům, které kódují proteiny podílející se na cirkadiálním řízení organismu.
- Zjistit cyklické chování u *C. velia* a ověřit, zda je skutečně řízené cirkadiálními rytmy a nikoli faktory prostředí.

4. Materiály a metody

4. 1. Kultivace *C. velia*

Byla použita kultura *C. velia* CCMP2878 (Provasoli-Guillard National for Marine Algae and Microbiota, Maine, USA). Chromera byla pěstována v plastových kultivačních nádobách na tkáňové kultury (300cm², Techno Plastic Products) v umělé mořské vodě, pH 8 [35 g sůl „Tropic Marine“ (Wartenberg, Německo), 1 ml NaNO₃, 1 ml Na₂HPO₄ · H₂O, 1 ml NaSiO₃ · 9H₂O a 20 ml Guillard's (f/2) marine water enrichment solution 50x (Sigma-Aldrich) doplněno do 1 l destilované vody a následně zfiltrováno na 22µm milipore filtru]. Kultivace probíhala v termostatech [TS 606/2 Var (WTW); I30BLL (Percival Scientific)] při teplotě 26°C. Světelné podmínky byly upravovány podle účelu pěstování (viz 4. 2. Pozorování bičíkatých stádií v průběhu dne a 4. 10. Odběr vzorků a příprava cDNA pro PCR v reálném čase). Pro měření intenzity osvětlení byly využívány fotometry Traceable® (Fisher Scientific) a HD 2102.1 (Delta OHM). Pro odběry vzorků byly použity dva až tři týdny staré kultury ve fázi růstu, kde se dala předpokládat vydatná exprese genů.

4. 2. Pozorování bičíkatých stádií v průběhu dne

Kultivace proběhla v malých kultivačních lahvích (25cm², Techno Plastic Products) v objemu 15 ml a v denním režimu 12:12 při teplotě 26°C a osvětlení v rozmezí 16-22 µmol.m⁻².s⁻¹ (Photosynthetically Active Radiation, PAR) a 1100-1600 Lux (celkové množství světla). U týden starých kultur se objevila bičíkatá stádia. Dvě lahve byly ponechány v těchto světelných podmínkách, pět jich bylo přeneseno ještě před rozsvícením do konstantní tmy a pět jich bylo přeneseno před zhasnutím do konstantního světla. Pozorování probíhalo tři dny, vždy od času rozsvícení, každou hodinu, celkem 12 pozorování každý den (Obr. 5). Všech deset lahví bylo pravidelně střídáno kvůli zabránění přílišného vlivu osvětlení z mikroskopu. Pro pozorování byl použit optický reverzní mikroskop (CARLZEISS) při zvětšení 40x. Kultura byla pozorována v jediném náhodně vybraném poli po dobu dvou minut, kdy byli sčítáni všichni bičíkovci, kteří se dostali do pole mikroskopu.

	PONDĚLÍ		ÚTERÝ
LD			
odběr:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
			K K K K K K K K K K
DD			
odběr:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
			D1 D2 D3 D4 D5 D1 D2 D3 D4 D5 D1
LL			
odběr:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

	STŘEDA		ČTVRTEK
LD			
odběr:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
			K K K K K K K K K K K K
DD			
odběr:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
			D1 D2 D3 D4 D5 D1 D2 D3 D4 D5 D1
LL			
odběr:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
			L1 L2 L3 L4 L5 L1 L2 L3 L4 L5 L1

Vysvětlivky:		
Tma:		
Světlo:		
Odběr:	K	obě kontroly
	D1-D5	konstantní tma
	L1-L5	konstantní světlo
Podmínky:	LL = Light/light	
	DD = Dark/dark	
	LD = Light/dark	

Obrázek 5. Schematické znázornění časů pozorování

4. 3. Izolace cDNA

Za účelem získání cDNA pro PCR – RACE byly chromery pěstovány ve světelném režimu 12 : 12. Kvůli neznalosti doby exprese hledaných genů byly vzorky odebírány v čase rozsvícení, čtyři hodiny po rozsvícení, čtyři hodiny před zhasnutím a v čase zhasnutí. Kultura chromery byla uvolněna ze stěn kultivační nádoby a silně protřepána. Bylo odebráno 15 ml a vzorek byl následně centrifugován (10 min, 4°C, 6000 rpm) kvůli převedení kultury do menšího objemu. Posléze byl pelet rozsuspendován v 1 ml supernatantu a opět centrifugován 1 min při 10 000 rpm a pokojové teplotě. Aby mohli být vzorky zpracovány najednou, byly uchovávány při -80°C. Pelet byl poté rychle zmrazen v tekutém dusíku a roztržěn pomocí plastového homogenizátoru. Do každého vzorku bylo poté přidáno 400 µl vody ošetřené proti nukleázám a 50 µl BAN (MRC). Po promíchání byl vzorek 5 minut inkubován při pokojové teplotě a následně byl centrifugován (4°C, 15 minut, 14 000 rpm). Opatrně byl odebrán supernatant a přidáno 400 µl ledově vychlazeného 75% etanolu. Po jemném promíchání byl opět ponechán 5 min. srážet při pokojové teplotě a opět byl za stejných podmínek vzorek centrifugován. Pelet byl rozsuspendován v 500 µl ledového 75%

etanolu, opět centrifugován a celé pomytí ještě jednou zopakováno. Kvůli dokonalému odstranění etanolu byl po druhém promytí samotný pelet ještě jednou centrifugován a odstraněny i malé zbytky etanolu. Promytý, suchý pelet byl následně rozpuštěn v 10 µl vody zbavené nukleáz.

Koncentrace získané RNA byla spektrofotometricky změřena na přístroji Nanodrop 1000 (Thermo scientific) a poté byla RNA okamžitě přepsána na cDNA nebo byla skladována při -80°C. cDNA byla následně získána za použití reverzní transkriptázy Super Script® III, nukleotidů DTP mix (Top Bio), náhodných DNA hexanukleotidů (Generi Biotech) a inhibitoru nukleáz RNAsin (Promega). Protože se ukázalo, že hledané geny jsou přítomné ve všech čtyřech vzorcích, byly jednotlivé vzorky cDNA pro potřeby 3'RACE smíchány ve stejném poměru a na 5'RACE byla připravována cDNA jen z jediného denního odběru chromery. V tomto případě byl použit kit FirstChoice® RLM-RACE (Ambion) dle pokynů výrobce pro standardní reakci.

4. 4. Kandidátské geny, BLAST a návržení primerů

Jako kandidátské geny byly vybírány sekvence kódující klíčové proteiny cirkadiálních oscilátorů rostlin i zvířat. Z modelové rostliny *A. thaliana* byly hledány homology ke genům *lux*, *toc*, *ztl* (Zeitlupe), *cca1*, *lhy* a kryptochromům 1 a 2. Jako kandidátské geny zvířecích cirkadiálních proteinů byly vybrány *tim*, *per*, *cry* z *D. melanogaster* a *cry1* a *cry2* z korálu *Acropora millepora*. Homology byly rovněž hledány v případě fytochromů (*phy*), kde byl zkoumán fytochrom ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a fytochrom z bakterie *Stackebrandtia nassauensis* (Actinobacteria).

Vybrané sekvence byly následně porovnány v programu BLAST s částečnou, doposud nepublikovanou, sekvencí genomu *C. velia* získanou 454 sekvenováním. Byly vybrány homologní sekvence s vysokou shodou a nalezen jejich příslušný kontig ve 454 sekvenci. V případě kryptochromů se opakovaly shodné kontigy a proto byly všechny dále zpracovávány dohromady, jako homology nespecifikovaného kryptochromu. Podobná situace nastala i v případě příbuzných genů *cca1* a *lhy* u *A. thaliana*. Některé kontigy kryptochromů se následně podařilo složit v programu SeqMan II (DNASTAR). Následně byl vybrán nejlepší čtecí rámec v programu EditSeq (DNASTAR) a ve stejném programu byla sekvence přepsána na aminokyseliny. Následně byly tyto sekvence porovnány se všemi sekvencemi dostupnými v elektronické databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a byla odhadnuta pozice exonu. Z tohoto exonu byly následně navrhovány primery, vždy tři pro 3'RACE a tři pro 5'RACE.

Tabulka 1. Přehled primerů použitých pro PCR-RACE

Primery pro PCR-RACE		
Gen	Název	Sekvence 5' - 3'
CCA1/LHY	F1	GAGCACAAGCGCTTCCTTGAAGC
	F2	GCAGCTTTACGGAAAGAACTGGAC
	F3	CACGTACAGCCACGCAGGTTC
	R1	CTGCATGGCTTCAAGGAAGCG
	R2	GCACCATCGTCCAGTTCTTTCC
	R3	CACTGTGCCCTTCTGCATACTC
	CRY-DASH 1	F1BM
F2BM		CGTCTTTCTTGGCGTTGGACTGTC
F3BM		CGCCGACTGGTTTGAGCATC
F1DB		CCAAGCAGACAAAGACTTACGACCC
F2DB		GGTGTCCAGAATTGAAGCGAGTGC
F3DB		CGTGCAGGAGATTTACAGTGTCG
CRY-DASH 2		F1cl
	F2cl	CGAGAGGACAGGCGTTTCAATATC
	F3cl	CAGAGGGCAAGTTCGTGAAGC
	R1cl	CAATTGGGACTCAAACCACTCAGC
	R2cl	CAATCCCGGTGGCGTAATTC
	R3cl	GACACCAGAGCTTACGAACTTGC
	F1DNU	GAAGAGCGCGTGTGCGAATGACTC
	F2DNU	CCTACTGGCTCGTGTTTGAATTGC
	F3DNU	GATTTGTGGTGGGAGAAGCCAGAC
	CRY-DASH-like	F1Con2
F2Con2		CGTCTGTGTGTGAGCGCGAATC
F3Con2		CAGTTTGAAGTCAGCAGTGTCTTTGC
R1Con2		CTCGCACAGCCTCTATCTGAAAC
R2Con2		CAGATTCGCGCTCACACACAGAC
R3Con2		CGCAAAGACACTGCTGACTTCAAAC

4. 5. PCR-RACE (Polymerase Chain Reaction - Rapid Amplification of cDNA Ends)

Pro amplifikaci zbývajících úseků DNA sekvence byla použita PCR-RACE za použití techniky nested PCR. Pro zvýšení pravděpodobnosti zachycení specifické reakce byly namísto obvyklých vnějších a vnitřních primerů použity celkem tři specifické primery (Tab. 1.) a dva nespecifické primery (Tab. 2) od výrobce z kit FirstChoice® RLM-RACE (Ambion®). Reakční směsi pro 3'RACE byly namíchány podle následujícího rozpisu:

Vnější reakce: R1 – Primer F1 + 3'RACE Outer Primer (Ambion®) + cDNA
R2 – Primer F2 + 3'RACE Outer Primer (Ambion®) + cDNA

Vnitřní reakce: R3 – Primer F2 + 3'RACE Inner Primer (Ambion®) + R1
R4 – Primer F3 + 3'RACE Inner Primer (Ambion®) + R1
R5 – Primer F3 + 3'RACE Inner Primer (Ambion®) + R2

Pro reakci 5'RACE byly pouze vyměněny nespecifické primery pro 3' RACE za příslušné pro 5'RACE - 5'RACE Inner/Outer Primer (Ambion®). V případě specifických primerů byly nahrazeny F1-3 primery za R1-3, s tím, že jsou číslovány v opačném pořadí (tzn. F1→ R3).

Tabulka 2. Nespecifické primery z FirstChoice® RLM-RACE kitu (Ambion)

Nespecifické primery	
Název	Sekvence 5' - 3'
5' RACE Outer Primer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5' RACE Inner Primer	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
3' RACE Outer Primer	GCGAGCACAGAATTAATACGACT
3' RACE Inner Primer	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG

Reakční směs pro vnější reakci obsahovala (1 reakce, 25 µl):

10x PCR Buffer (Takara)	2,5 µl
ddH ₂ O	19,05 µl
dNTP mix (Takara)	2 µl
Specif. Primer (25pmol)	0,5 µl
3'RACE Outer Primer (25pmol)	0,5 µl
cDNA	0,3 µl
Taq HS polymeráza (Takara)	0,15 µl

Do vnitřní reakce byly změněny primery (viz. rozpis reakčních směsí výše) a namísto cDNA bylo přidáno 1,5 µl vnější reakce. Množství ddH₂O bylo také upraveno na doplnění do 25 µl reakční směsi.

PCR program začínal vždy shodně počáteční denaturací na 95°C po dobu 1 min. následovalo 30 cyklů denaturace 95°C, 30 s. Nasedací teplota primeru byla u vnějších reakcí shodně 55°C. Vnitřní reakce probíhala za postupně se snižující teploty (touchdown PCR) při 65°C – 55°C podobu 30 s, 20 cyklů snižování teploty po 0,5°C při každém cyklu a následně probíhalo 10 cyklů při 55°C. Následně byla směs ohřátá na 72°C, kdy byly prodlužovány pomocí polymerázy úseky DNA. Čas byl závislý na délce očekávaného fragmentu, byla počítána 1 min na 1 kb DNA. Program byl ukončen jedním cyklem závěrečného prodlužování fragmentů po dobu 10 min. Specifické použité primery jsou v tabulce 1.

4. 6. Elektroforéza na agarózovém gelu

Produkty smíchané s „loading buffer 10x“ (Takara) byly elektroforeticky rozděleny na 1% agarózovém gelu obsahujícím 1x Gel Red (Biotio). Jako elektroforetický pufr byl použit 1x TAE (40mM Tris-acetát, 1mM EDTA; Sambrook and Russel, 2001). K určení velikosti fragmentů byly použity molekulární markery Marker 2-Log DNA ladder (New England BioLabs®, Inc.), GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) nebo MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas). Produkty byly detekovány na UV transiluminátoru (TFX-35.M Vilber Lourmat). Výsledný gel byl vyfotografován digitální kamerou (Kodak) a zpracované softwarem Kodak Digital science 1D verze 3.0.2. PCR produkty očekávané velikosti byly z gelu vyříznuty a přečištěny pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), podle návodu výrobce.

4. 7. Molekulární klonování, izolace plasmidu, testování přítomnosti inzertu

Vyčištěný fragment DNA byl vložen do plasmidového vektoru za použití pGEM®-T-Easy Vector Systém (Promega) a T4 DNA ligázy (Promega) dle návodu výrobce. K vektoru jsem přidala 5-20 ng vyčištěné cDNA. Ligace proběhla za pokojové teploty po dobu 1 hodiny. K takto připraveným plasmidům bylo přidáno 50 µl kompetentních buněk *Escherichia coli*, kmen XL1 blue a vzorek byl ponechán 30 minut na ledu. Plasmidy byly vloženy do kompetentních buněk pomocí tepelného šoku vložením na 45 sekund do vodní lázně (42°C) a následným ochlazením na ledu, nejméně 2 minuty. K buňkám bylo poté přidáno médium SOC, pH 7 (2% Bacto-Tryptone, 0,5% bakteriálně-kvasnicový extrakt, 0,05% NaCl, 2,5mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukóza) a následně byly kultivovány při třepání (200 rpm) a 37°C. 100 µl takto připraveného buněčného roztoku bylo naneseno na vytemperované agarové misky (LB – Agar, Roth; 50 µg Ampicilinu) ošetřené 40 µl X-galu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) a 4 µl IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside) kvůli modro-bílé selekci (Sambrook and Russel, 2001). Misky byly inkubovány při 37°C přes noc. Z narostlých kolonií buněk byly vybrány bílé, které byly dále kultivovány na nových miskách a u nichž byla testována přítomnost inzertu pomocí PCR. Reakční směs se v tomto případě skládala pouze z PPP Master mixu (Top Bio) 1x, (25 pmol) M13 primerů (Tab. 3) a buněk z vybrané kolonie. Byl použit již výše zmiňovaný PCR program, ovšem s nasedací teplotou 53°C. PCR fragmenty byly vyhodnoceny po rozdělení na 1% agarovém gelu (viz 4. 6. Elektroforéza na agarózovém gelu). Kolonie, kde byla přítomnost inzertu potvrzena kontrolní PCR, byly přeneseny do tekutého LB média s 50 µg Ampicilinu (Roth) a kultivovány při třepání (200 rpm) a 37°C přes noc. Kulturny byly

následně zhomogenizovány a plasmidová DNA byly vyizolována pomocí QIAprep®Spin Miniprep Kit (QUIAGEN) podle návodu výrobce.

Tabulka 3.

Plasmidové primery	
M13F	GTAAAACGACGGCCAG
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC

4. 8. Sekvenování

Plasmidová DNA o celkové hmotnosti cca 150 ng na vzorek (7 µl), byla sekvenována v Laboratoři genomiky (BC AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin). Sekvenační reakce byla provedena v přístroji ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Získané osekvenované fragmenty genu byly postupně asemblovány spolu s původním úsekem exonu do jediné konsenzuální sekvence pomocí programu SeqMan a výsledná sekvence byla identifikována za použití internetové databáze NCBI. Pro potvrzení existence takové sekvence v *C. velia* byla udělána závěrečná kontrolní PCR, kdy byly navrženy primery cca 100-150 bází od obou konců známého úseku (Tab. 4) a použit byl již výše zmiňovaný program (viz. 4. 4 PCR-RACE) s nasedací teplotou primerů 55°C. Následně byl produkt elektroforeticky rozdělen na 1% agarózovém gelu (viz. 4. 6. Elektroforéza na agarózovém gelu) a velikost produktu byla porovnána s očekávanou velikostí.

Tabulka 4. Primery pro amplifikaci celých známých úseků kryptochromů

Kontrolní primery		
Cca1/Lhy	F1	GCGTTTTGAAGTTGTCAGAGGTG
	R1	GTTCGGGCGTAACTGTAGGTC
CRY DASH 1	F1	GTCGATGCCTGTATGCGAGAGC
	R1	GATGGTGTGTCAGTACTGGTTC
	R2	GATGCGACACTGTGAAATCTCC
CRY DASH 2	F1	GAGCTAGAGAGAACGCACGGATC
	R1	GCCTGTTCCATCAGACATCAGC
CRY DASH-like	F1	GATGCAGAACGCAAGGAAGC
	R1	GTCTCCTCAGAGCCTCCGTTTC

4. 9. Fylogenetické analýzy

Základ datasetu byl laskavě poskytnut Dr. Richardem Pokorným (fylogenetická analýza na základě tohoto datasetu publikována – Chavez a kol., 2011). Tento dataset byl

dále rozšiřován sekvencemi převážně ze skupiny chromalveolát přístupných v databázích NCBI a JGI (<http://www.jgi.doe.gov>). Vybrané sekvence genů kryptochromo-fotolyázové rodiny byly alignovány pomocí programu MUSCLE (Edgar, 2004). Nejednoznačně seřazené úseky byly pro další analýzy vyřazeny pomocí SeaView 4 (Gouy a kol., 2010). Fylogenetická příslušnost fotolyáz z *C. velia* byla analyzována metodou maximální věrohodnosti (maximum likelihood, dále jen ML) v programu RAxML 7.2.8 (Stamatakis, 2006) za použití LG substituční matice. Výsledná topologie byla programem vybrána z 50 nezávislých opakování. Důvěryhodnost větvení byla určena pomocí neparametrické bootstrap analýzy (RAxML, 500 opakování) a bayesiánských posterior probability hodnot. Ty byly získány za použití programu Phylobayes 3.2 (Lartillot a kol., 2009). Pro bayesiánskou analýzu byla použita tzv. CAT admixture model (Lartillot a Philippe, 2004), respektive jeho empirická varianta, v níž je počet kategorií omezen na 40, v kombinaci s LG substituční maticí. Výsledné hodnoty byly vypočteny porovnáním dvou nezávislých markovových řetězců, které běžely souběžně, dokud jejich maximální rozdíl neklesl pod 0.2 a efektivní vzorek odhadovaných parametrů nepřesáhl 100.

4. 10. Odběr vzorků a příprava cDNA pro PCR v reálném čase (RT-PCR)

Pro přípravu vzorků na RT-PCR byla použita *C. velia* kultivovaná ve velkých plastových kultivačních nádobách na tkáňové kultury (300 cm², Techno Plastic Products) 11 dní při intenzitě světla 60-70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (4200-4700 Lux). Poté byla kultura homogenizována a rozdělena do 45 malých kultivačních nádobách (25 cm², Techno Plastic Products) po 15 ml, kde byly ponechány následující 2 dny při režimu 12 : 12 a stejné intenzitě světla.

Sada 15-ti lahviček byla ponechána jako kontrola při stejném světelném režimu a při stejné intenzitě světla i následující dny. Odběry vzorků probíhaly souběžně s odběry vzorků kultivovaných v konstantní tmě (Obr. 6).

15 lahviček bylo 3. den, krátce po zhasnutí světla, v termostatu zabaleno do hliníkové fólie a přeneseno do neosvětleného termoboxu a následně kultivováno při stále stejné teplotě. Odběry byly zahájeny hned následující den (Obr. 6).

Posledních 15 vzorků bylo krátce po rozsvícení světla v termostatu přeneseno do jiného, s konstantním osvětlením o intenzitě 32-39 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (2400 – 2900 Lux). Odběry byly zahájeny ten samý den večer, s dvanáctihodinovým posunem vůči předchozím dvěma vzorkům (Obr. 6).

	PONDĚLÍ																								ÚTERÝ																								STŘEDA																							
LD	[Dark]																								[Dark]																								[Dark]																							
odběr:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8																
	[Dark]																								[Dark]																								[Dark]																							
DD	[Dark]																								[Dark]																								[Dark]																							
odběr:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8																
	[Dark]																								[Dark]																								[Dark]																							
LL	[Light]																								[Light]																								[Light]																							
odběr:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	[Light]																								[Light]																								[Light]																							

Vysvětlivky:	[Dark]	[Light]
Tma:	[Dark]	[Light]
Světlo:	[Light]	[Dark]
Odběr:	↑	
Podmínky:	LL = Light/light	
	DD = Dark/dark	
	LD = Light/dark	

Obrázek 6. Schematické znázornění odběrů

Pro izolaci RNA byla vždy v daný čas odebrána jedna lahvička, centrifugací byl převeden vzorek do menšího objemu a vytvořen suchý pelet dle výše zmiňovaného postupu (viz. 4. 3. Izolace cDNA). Pelet byl následně zmražen při -80°C . Izolace RNA byla následně prováděna u vzorků shromážděných za celý den najednou za použití RNeasy® Plant Mini Kit 50 (QUIAGEN) dle návodu výrobce pro rostlinné buňky. Kvůli citlivosti RT-PCR i na malá množství genomové DNA byla RNA vyčištěna pomocí RNase Free DNA setu (QUIAGEN). Následná syntéza cDNA proběhla stejným způsobem jako v případě syntézy cDNA pro 3' PCR – RACE (viz 4. 3. Izolace cDNA).

4. 11. RT-PCR

Pro zjištění kolísání množství transkriptů sledovaných genů v průběhu dne byla použita metoda PCR v reálném čase (RT-PCR). Reakce probíhaly v 96-ti jamkové mikrodestičce (Bio-Rad Hard-Shell®), každá reakce obsahovala 6 μl IQTM SYBR® Green Supermix 2x (Bio-Rad), 2,5 μl ddH₂O, 0,5 μl (25 pmolární) směsi obou primerů F1 + R1 (Tab.5) a 3 μl 15x zředěné cDNA (dle pokynů výrobce Bio-Rad). Byla vždy použita i negativní kontrola reakční směsi bez přidané cDNA, pouze doplněná příslušným množstvím ddH₂O. PCR probíhala na přístroji C 1000TM Thermal Cycler (Bio Rad). Program začínal počáteční denaturací (94°C , 3 min) následovalo 39 cyklů opakující se denaturace (94°C , 30 s), nasedání primerů (58°C , 35 s), prodlužování primerů (72°C , 40 s) a zakončen byl 40 sekundami závěrečného prodlužování produktů. Fluorescence byla měřena na konci každého cyklu při teplotě 72°C . Následně byla provedena melting analýza v teplotním rozmezí 65 -

95°C s měřením fluorescence po každém 0,5°C. Data byla vyhodnocena v programu CFX Manager™ Data Analysis Quick Guide, který vypočítal treshold v exponenciální fázi růstu křivek, a cyklus (Cp), kdy byl tento treshold překonán, byl použit jako výchozí hodnota pro další výpočty. Získaná data byla následně zpracována v Microsoft Office Excel metodou tzv. relativní kvantifikace, kdy je porovnávána změna genové exprese sledovaného genu oproti tzv. housekeeping genu neboli genu, jehož exprese se během dne nemění. V případě *C. velia* byl zvolen jako housekeeping gen β -tubulin. Výpočet probíhal podle následujícího vzorce:

$$R = E_{\text{ref}}^{\text{Cp Tub}} / E_{\text{target}}^{\text{Cp CRY}}$$

R...relativní změna exprese

E...efektivita reakce, našem případě vždy rovno 2

Cp...cyklus kdy byl překročen stanovený treshold

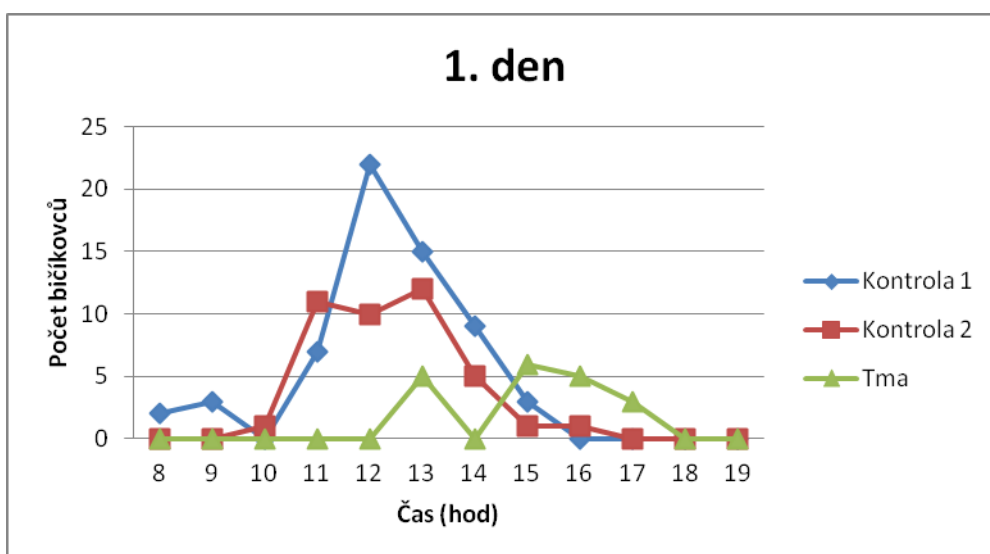
Tabulka 5. Seznam primérů pro sledované geny kryptochromů a referenční gen β -tubulin

Primery pro RT-PCR		
β -TUBULIN	F1	CAGACACGGACGCTACTTGA
	R1	GGGGGAATATCGCAGACA
CRY DASH 1	F1	CAACATTCCCAAGCAGACAAA
	R1	TCCTCCGGCATCAACCA
CRY DASH 2	F1	CAACAGAGGGAGGCAGAATG
	R1	CAATCCCGGTGGCGTAAT

5. Výsledky

5. 1. Pozorování cirkadiánní rytmicity bičíkatých stádií

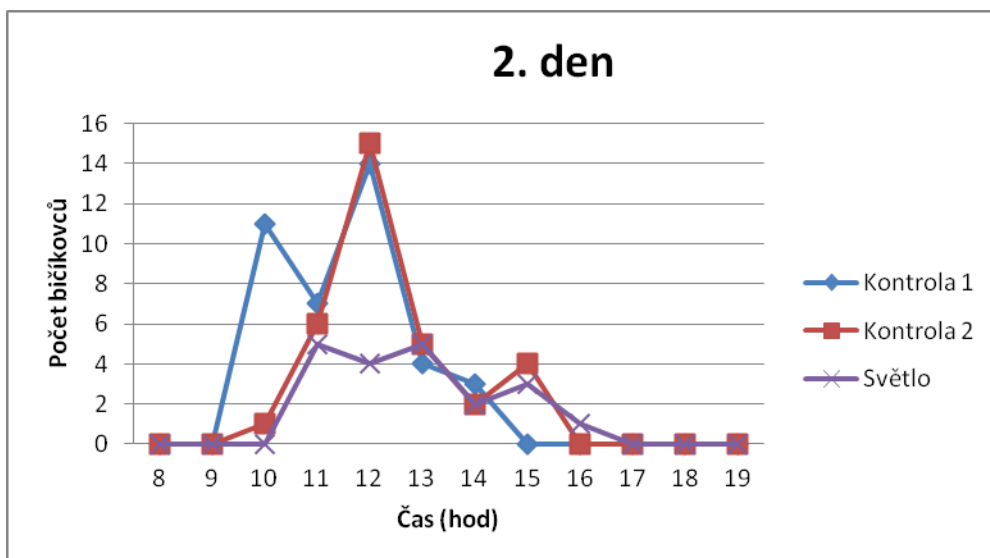
Na základě předchozích pozorování (Oborník a kol., 2011a) jsme chtěli ověřit teorii, zda jsou rytmicky se objevující bičíkovci indukováni pouze světleným režimem, nebo zda vznikají na pokyn vnitřních hodin. Všem kulturám byl nejprve nastaven režim v cyklu 12:12, kdy se svítilo od 8:00 – 20:00 a poté byly (vyjma dvou kontrolních vzorků) přeneseny do podmínek konstantního světla nebo tmy. První den byla pozorována bičíkatá stádia pouze u chromer kultivovaných v konstantní tmě během subjektivního dne (Obr. 7). U kontrolních kultur se výrazný nárůst bičíkovců objevil dvě hodiny po rozsvícení. V podmínkách konstantní tmy se bičíkovci začali objevovat až pátou hodinu subjektivního dne. Pokles následující hodinu (14:00) je pravděpodobně způsoben nepřesností v měření, nebo vadným vzorkem, protože následující hodiny počet bičíkovců rovnoměrně klesal a dvě hodiny před koncem subjektivního dne již nebyli pozorováni žádní bičíkovci. Cyklus je dobře patrný i v konstantních podmínkách tmy, pouze je ve srovnání s kontrolou o dvě až tři hodiny posunutý.



Obrázek 7. Množství pozorovaných bičíkovců během dne u *C. velia*, 1. den pozorování

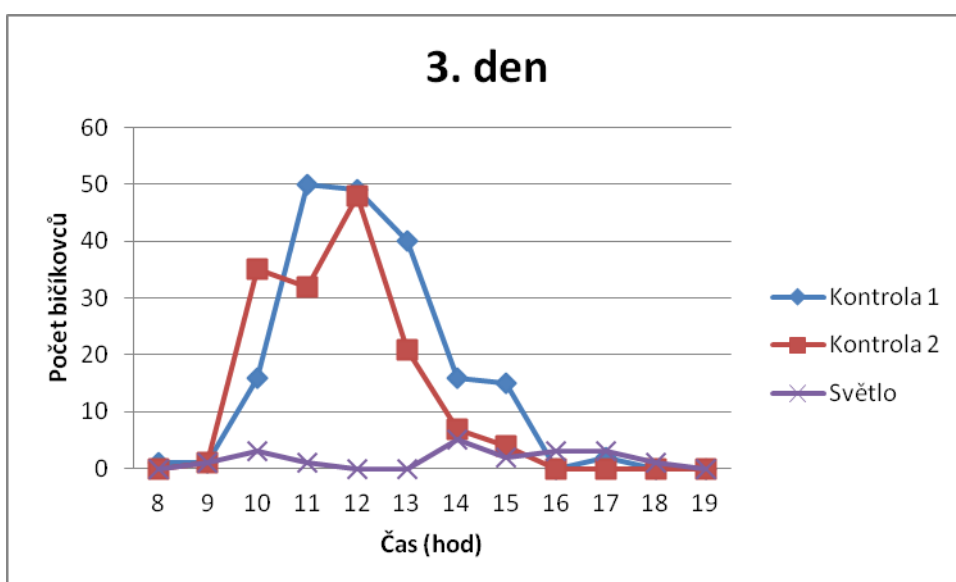
Druhý den byly pozorovány kultury pěstované jak v konstantní tmě, tak v konstantním světle (Obr.8). Vzhledem k nepříznivým podmínkám pro fotosyntetizující organismus v konstantní tmě *C. velia* přežívala nejspíše v pouze v nepohyblivých stádiích a po celý den nebyli bičíkovci vůbec pozorováni. Kultura rostoucí v podmínkách konstantního světla však vykazovala podobné časové rozpětí, kdy se v kultuře objevovali bičíkovci, jako v kontrolních kulturách. Maximální počet bičíkovců byl u kultury v konstantních

podmínkách nižší než u kontrolních kultur, pravděpodobně kvůli nepříliš optimálním světelným podmínkám (podmínky konstantního světla), na které bičíkovci vždy výrazně reagují.



Obrázek 8. Množství pozorovaných bičíkovců během dne u *C. velia*, 2. den pozorování

Třetí den se již objevovali bičíkovci sporadicky i u kultury držené v konstantním světle (Obr. 9). Z tak malého množství bičíkovců nebylo možné spolehlivě určit časové ohraničení výskytu bičíkovců v kultuře.



Obrázek 9. Množství pozorovaných bičíkovců během dne u *C. velia*, 3. den pozorování

5. 2 Hledání homologů kandidátských genů u *C. velia*

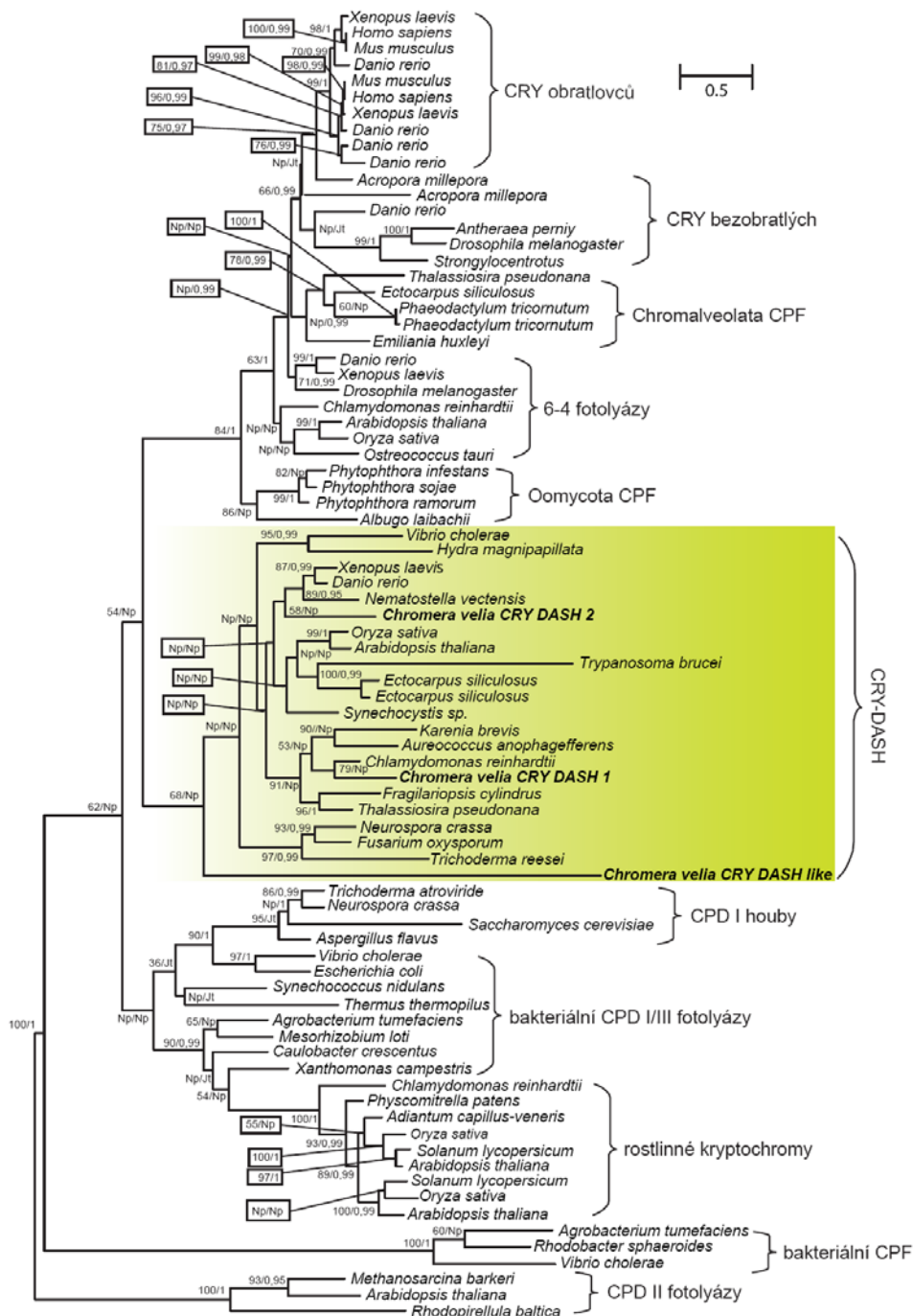
Ze všech zkoumaných kandidátských genů (*lux*, *toc*, *ztl*, *cca1*, *lhy*, *cry1*, *cry2*, *tim*, *per*, *phy*; podrobněji viz kapitola 4. 4. Kandidátské geny, BLAST a navržení primerů) byly nalezeny signifikantní výsledky jen pro homology kryptochromů a jeden společný kontig pro blízce příbuzné geny *cca1* a *lhy*. Po poskládání překrývajících se sekvencí a odstranění intronů bylo získáno šest krátkých sekvencí (174-240 bazí) homologních ke kryptochromům a jedna sekvence homologní s geny *cca1* a *lhy* (115 bazí). Sekvenci podobnou CCA1/LHY se podařilo pomocí 3' a 5' PCR-RACE prodloužit na 1799 bazí. Kontrolní PCR s primery navrženými u obou konců, ale žádný transkript podobné velikosti neukázala ani po použití postupně snižované nasedací teploty primerů (Touchdown PCR). TblastX v internetové databázi NCBI potvrdil podobnost s různými geny CCA1 a LHY pouze v oblasti odpovídající původní krátké sekvenci. Sekvence proto nebyla dále použita pro fylogenetickou analýzu.

Ze čtyř krátkých sekvencí se podařilo prodloužením pomocí PCR-RACE a skládáním v programu SeqMan vytvořit tři částečné sekvence kryptochromů nazvané CRY-DASH 1, o délce 757 bazí přepisovaných na 176 kódujících aminokyselin a CRY DASH 2 o délce 1750 bazí kódující 560 aminokyselin. CRY-DASH-like bylo prodlouženo na 1187 bazí, z nichž ale byla získána pouze 211 aminokyselin dlouhá proteinová sekvence. Existence těchto sekvencí v cDNA chromery byla potvrzena kontrolní PCR, kdy byly výsledné reakce vizualizovány elektroforézou na agarózovém gelu. Na rozdíl od stejné reakce s primery pro CCA1 byly v tomto případě skutečně amplifikovány úseky odpovídajících velikostí.

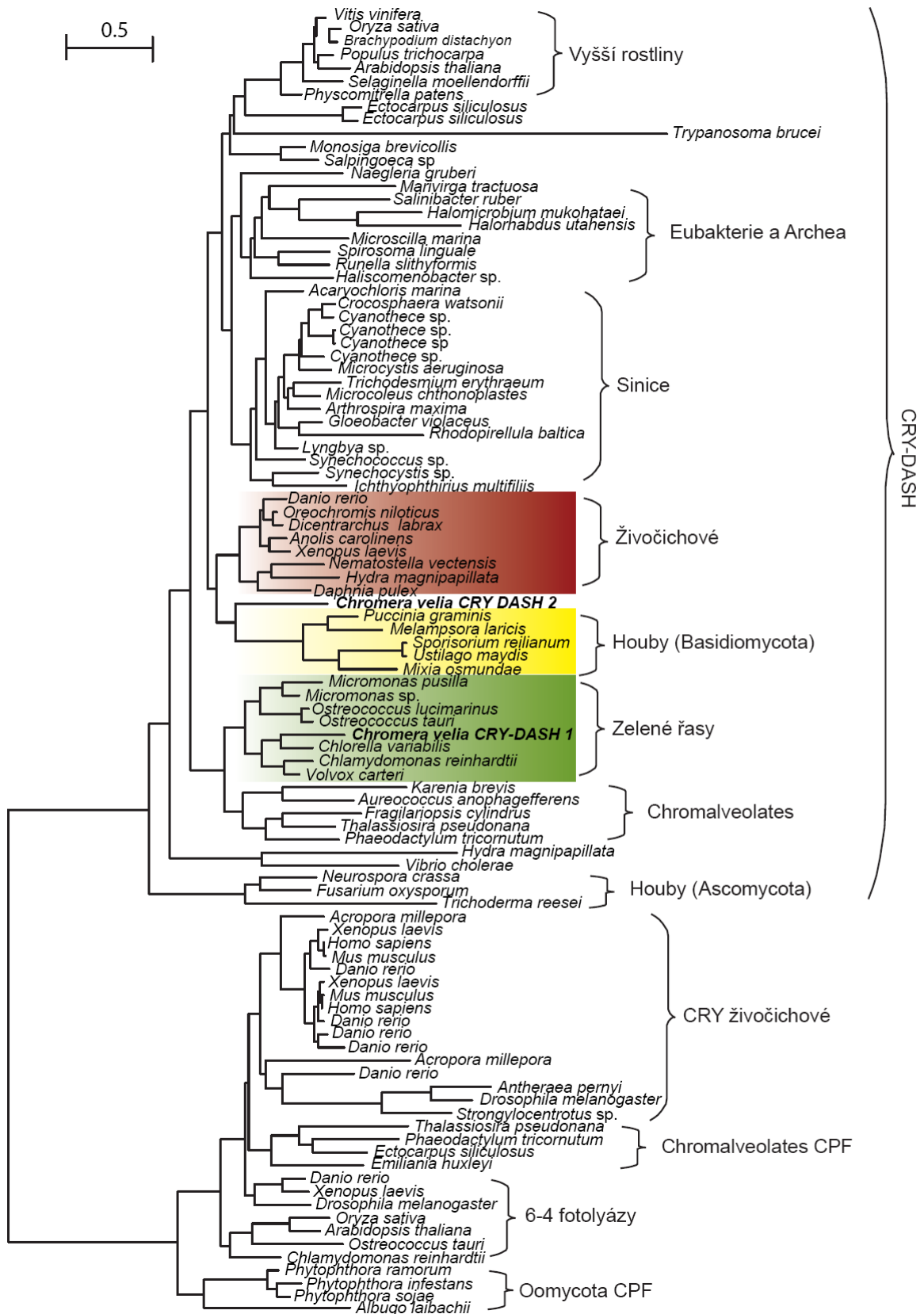
5. 3. Fylogenetické postavení homologů CRY u *C. velia*

Všechny analyzované kryptochromy byly zařazeny do skupiny CRY-DASH. Podpora všech bazálních větví skupiny CRY-DASH je však slabá. CRY-DASH 1 byl vyhodnocen jako blízce příbuzný CRY-DASH v *C. reinhardtii*, tedy překvapivě blíže k zeleným řasám (Obr. 10). Z tohoto důvodu byla udělána další fylogenetická analýza s velmi zredukovaným datasetem ostatních skupin kryptochromo-fotolýázové rodiny a naopak rozšířeným datasetem o členy skupiny CRY-DASH, včetně dalších sekvencí zelených řas (Obr. 10). Tato nová analýza skutečně prokázala, že CRY-DASH 1 je mnohem blíže příbuzný homologům ze zelených řas než CRY-DASH proteinům chromalveolát. CRY-DASH 2 byl naopak nejprve fylogeneticky přiřazen na bázi skupiny živočišných CRY-DASH genů (Obr.10). V podrobnějším fylogenetickém stromě bylo toto postavení upřesněno a podle

těchto výsledků (Obr. 11) se CRY-DASH 2 nachází na samém pomezí kryptochromů basidiomycot a živočichů. CRY-DASH-like byl fylogeneticky přiřazen na bázi celého CRY-DASH kládu, ale po přidání dalších sekvencí do datasetu se jeho pozice změnila a byl přesunut ještě více na bázi celého fylogenetického stromu. Vzhledem k tomu, že tedy není jisté, zda tento protein skutečně patří do CRY-DASH skupiny, byl z druhé analýzy vyřazen.



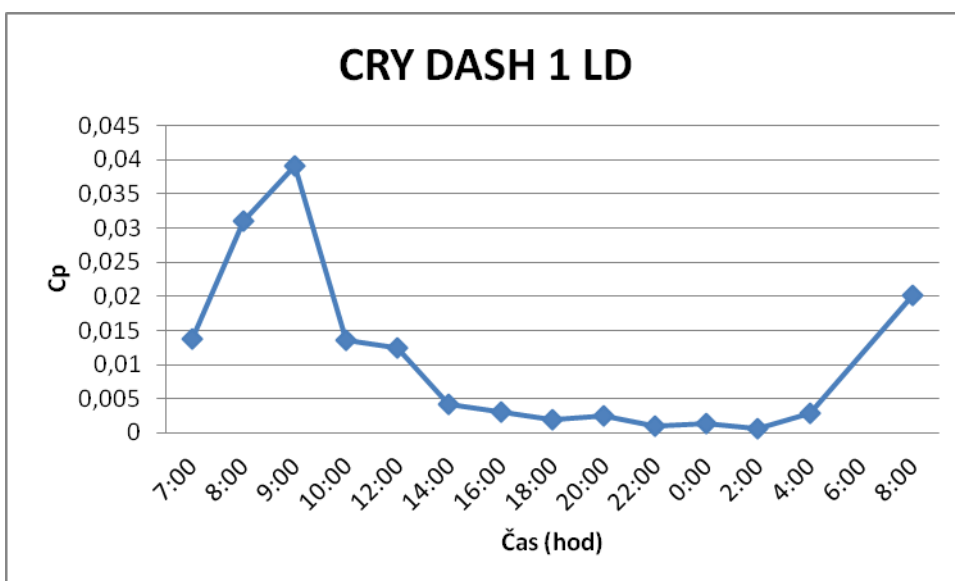
Obrázek 10. Fylogenetická analýza CRY-DASH 1, 2 a CRY-DASH-like v rámci zástupců celé kryptochromo-fotolyázové rodiny. Fylogeneze vypočítána na základě 320 aminokyselin. Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: bootstrapová analýza/posteriori probabilita. Vypsány pouze bootstrapové analýzy ≥ 50 a posteriori probabilita $\geq 0,90$ (jinak Np = Není podpora). Pokud se topologie v případě bayesiánské analýzy a ML lišily je uzel označen Jt = Jiná topologie. CPD = Cryptochrome-photolyase family.



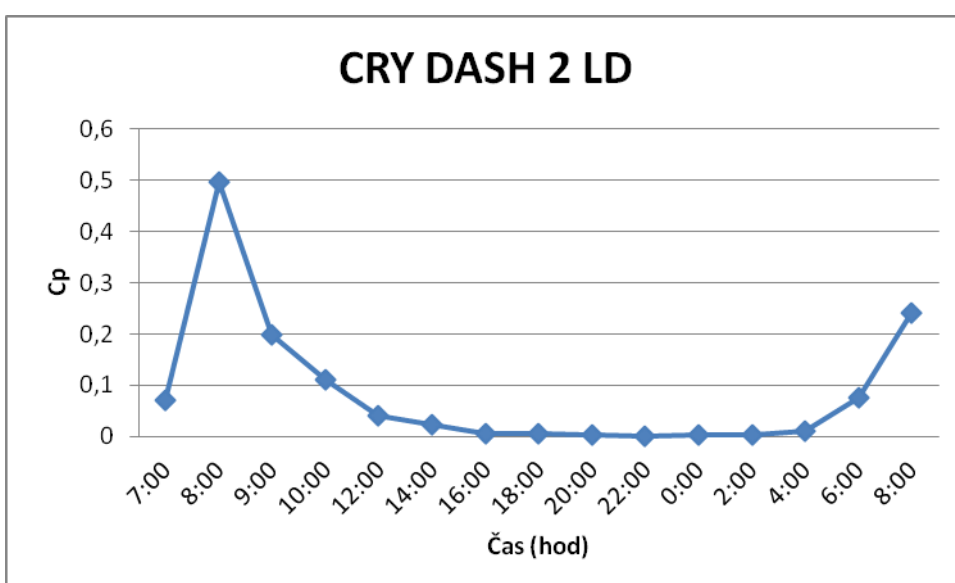
Obrázek 11. Fylogenetická analýza CRY-DASH 1 a 2 v rámci rozšířeného datasetu zástupců CRY-DASH skupiny. Fylogeneze vypočítána na základě 320 aminokyselin. Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: bootstrapová analýza/posteriori probabilita. Vypsány pouze bootstrapové analýzy ≥ 50 a posteriori probabilita $\geq 0,90$ (jinak Np = Není podpora). Pokud se topologie v případě bayesiánské analýzy a ML lišily je uzel označen Jt = Jiná topologie. CPF = Cryptochrome-photolyase family.

5. 4. Rytmická exprese kryptochromů u *C. velia* v přirozeném denním režimu (LD 12:12)

Všechny kultury *C. velia* byly opět pěstovány v podmínkách 12:12 (světlo o 8:00 do 20:00) a pomocí PCR v reálném čase bylo sledováno relativní zvyšování množství transkriptů ve vzorcích. Z grafů (Obr. 12, 13) je patrné, že ke zvyšování exprese docházelo nejméně dvě hodiny před rozsvícením a v čase rozsvícení byla hladina RNA obou kryptochromů nejvyšší. Ve 14 hodin už byl tento gen exprimován jen velice málo a v 16 klesla exprese téměř na nulu. Z toho je patrné, že počátek exprese nebyl iniciován rozsvícením, ale pravděpodobně vnitřním oscilátorem.



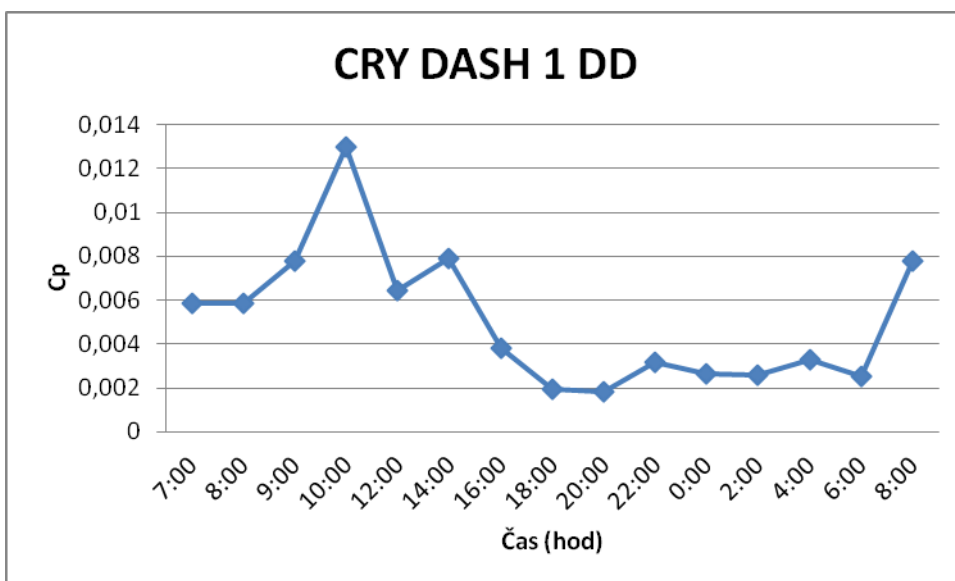
Obrázek 12. Expresse CRY-DASH 1 během dne v kultuře pěstované v podmínkách 12:12



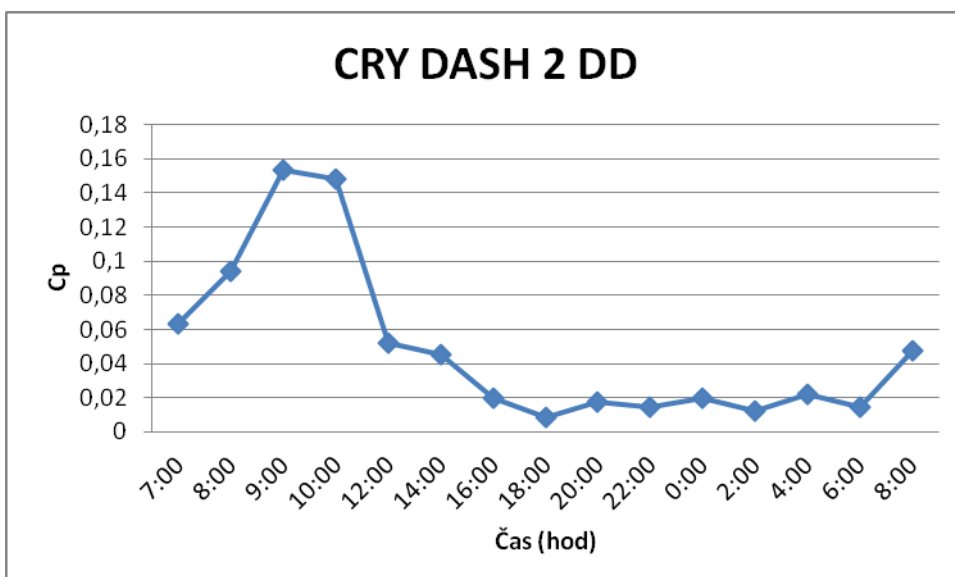
Obrázek 13. Expresse CRY-DASH 2 během dne v kultuře pěstované v podmínkách 12:12

5. 5. Rytmicita exprese kryptochromů u *C. velia* v konstantních podmínkách

Aby byla vyloučena přímá indukce exprese kryptochromů pouze světlem, byl tentokrát sledován průběh exprese na kulturách pěstovaných v konstantních podmínkách – konstantním světle a konstantní tmě. V případě vzorků kultivovaných v konstantní tmě (Obr. 14, 15) je patrné zvýšení exprese ještě před začátkem subjektivního dne, ale vrchol exprese nastává později, druhou až třetí hodinu subjektivního dne.



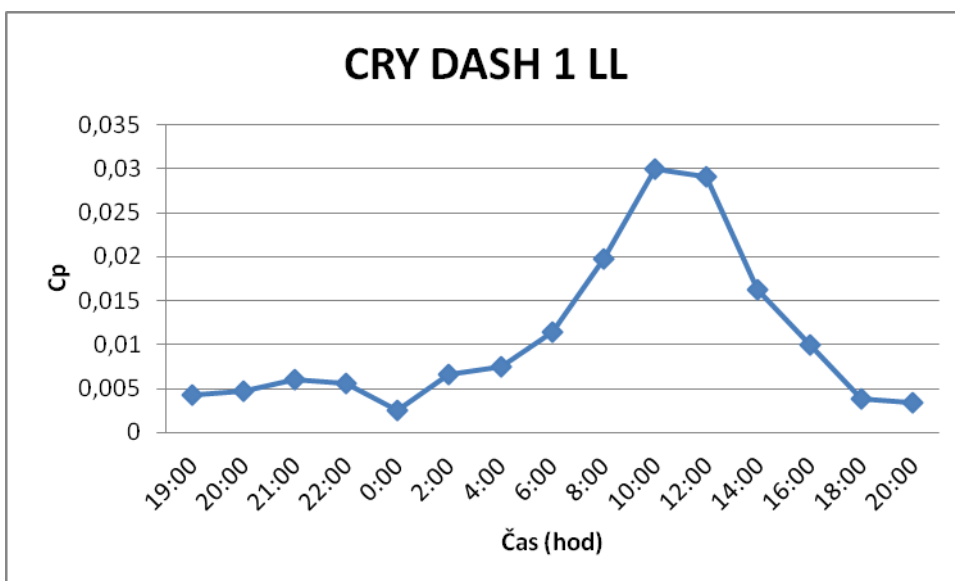
Obrázek 14. Expresse CRY-DASH 1 během dne v kultuře pěstované v podmínkách konstantní tmy



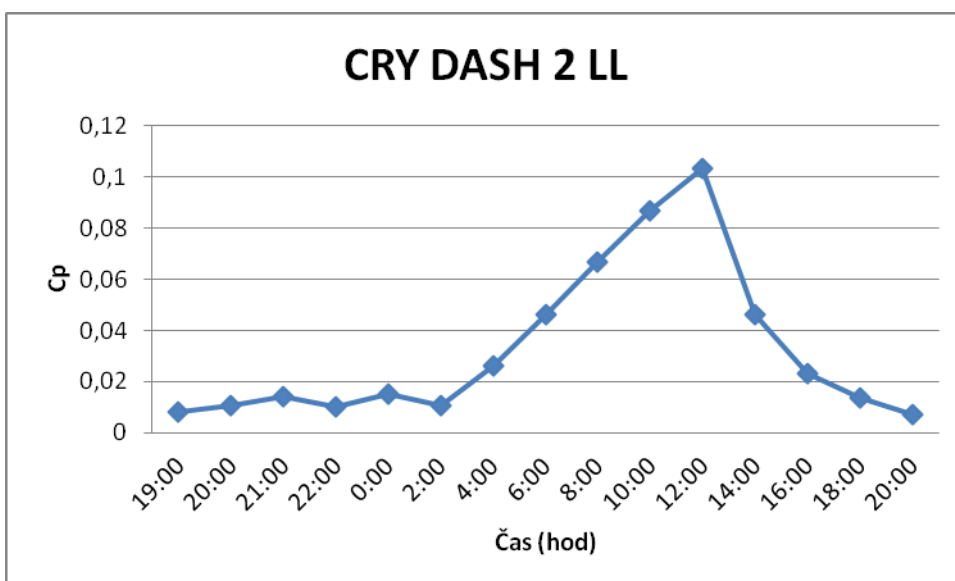
Obrázek 15. Expresse CRY-DASH 2 během dne v kultuře pěstované v podmínkách konstantní tmy

Podobný trend lze pozorovat i v případě vzorků kultivovaných na konstantním světle (Obr. 16, 17). Nárůst exprese je patrný už ve čtyři hodiny, výrazně pak stoupá v šest hodin.

Vrchol exprese nastává opět později, kolem desáté až dvanácté hodiny s pozvolným poklesem po celý subjektivní den.



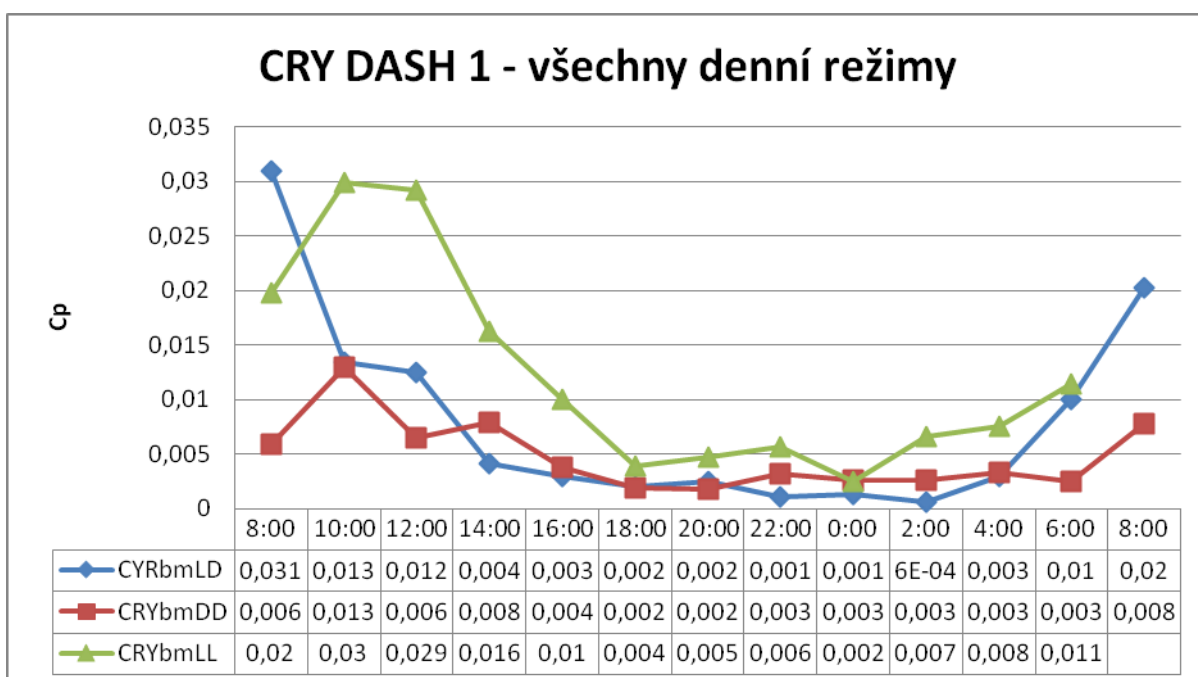
Obrázek 16. Expresse CRY-DASH 1 během dne v kultuře pěstované v podmínkách konstantního světla



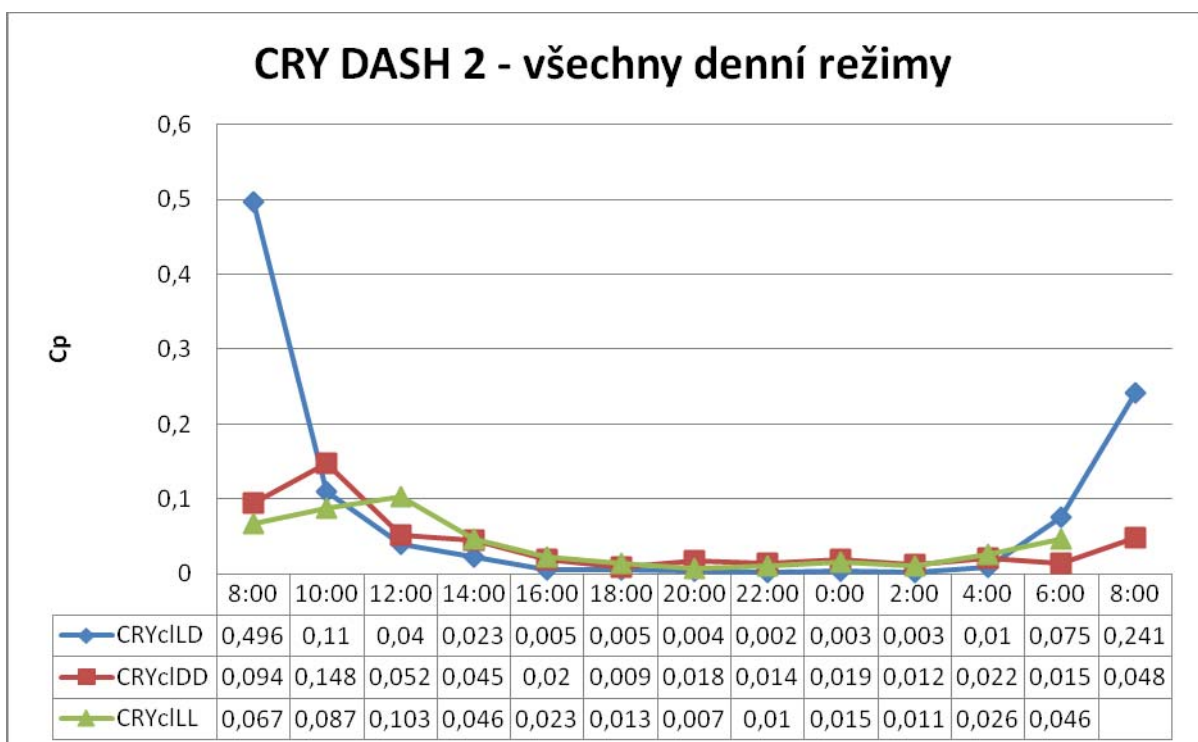
Obrázek 17. Expresse CRY-DASH 2 během dne v kultuře pěstované v podmínkách konstantního světla

Vzhledem k tomu, že všechny reakce pro průběh exprese jednoho genu ve všech světelných podmínkách byly dělány ze stejného výchozího roztoku reagentů („Master mixu“), je možné je navzájem porovnat (Obr. 18, 19). U CRY-DASH 2 je patrné, že exprese v přirozených podmínkách je vysoká a indukce světlem je pro normální průběh exprese důležitá. Bez vnějších vodítek hladina transkriptu výrazně klesá, i když křivka exprese má velice podobný časový průběh. U CRY-DASH 1 je rozdíl mezi oběma vzorky, kterým se

dostávalo světlo velice malý, i když exprese v konstantních podmínkách je mírně posunutá. Úplná absence světla, ale výrazně expresi tohoto proteinu snižuje.



Obrázek 18. Porovnání exprese genu CRY-DASH 1 ve všech světlených podmínkách včetně hodnot relativní změny exprese vůči „housekeeping“ genu β -TUB.



Obrázek 19. Porovnání exprese genu CRY-DASH 2 ve všech světlených podmínkách včetně hodnot relativní změny exprese vůči „housekeeping“ genu β -TUB.

6. Diskuze

6. 1. Cirkadiánně řízené chování u řas

Při studiu cirkadiánního chování u *C. velia* byly v této práci zvoleny dva odlišné přístupy. Jako první přístup bylo zvoleno pozorování projevů životního cyklu *C. velia* (abundance bičíkatých stádií v kultuře), za pomoci optické techniky. Nemnoho řas nám dává příležitost sledovat rytmicitu tak výrazného fenotypového projevu. Rytmičká a snadno pozorovatelná fluorescence např. u řasy *L. polyedrum* byla základem pro jedny z prvních studií cirkadiánního chování u obrněnek (Hastings a Sweeney, 1957; 1958). Bičíkatá stadia chromery (zoospory) jsou dobře rozpoznatelná nejen díky vysoké pohyblivosti, ale i díky menší velikosti, protáhlému tvaru a i díky většímu ze dvou bičíků, který je i v optickém mikroskopu dobře viditelný. Bičíkatá stadia tak lze rozpoznat i ve fixované kultuře. Toho bylo využito v nedávné studii naší laboratoře (Oborník a kol. 2011a), kdy byly pravidelně odebírané vzorky kultury pěstované v podmínkách 12:12. Odběry s přítomnými bičíkovci byly fixovány formaldehydem a bičíkovci následně spočítáni v Bürkerově komůrce. Výsledný graf ukázal, že nárůst bičíkovců nastal velmi náhle, šest hodin po rozsvícení, kdy také zároveň jejich množství vrcholilo. V následujících čtyřech hodinách jejich počet opět rychle klesal a v čase zhasnutí již opět bičíkovci nebyli pozorováni (Oborník a kol. 2011a; D. Lai, osobní sdělení). Tato křivka výskytu bičíkatých stádií se příliš neshoduje s časovým rozpětím, kdy se objevovala tato pohyblivá stadia při mém pozorování (Obr. 7-9), kde byl zaznamenán nárůst jejich počtu již dvě hodiny po rozsvícení a poslední pozorovací den jejich počet výrazně stoupl již po jedné hodině na světle. Celkově byly mnou sledované kultury, pěstované v podmínkách 12:12 posunuté více směrem k začátku světelné části dne, co se týče výskytu bičíkatých stádií, oproti výše zmiňované studii. Určité rozdíly mohla zapříčinit rozdílná metodika určování počtu bičíkovců v kultuře, ale také například častější měření v případě mé práce. Zásadní vliv ale zřejmě budou mít rozdílné světelné podmínky, které objevování se bičíkovců velmi ovlivňují. Doposud nikdy ovšem nebylo sledováno chování bičíkovců v podmínkách konstantního světla nebo tmy. I když bičíkatá stadia z kultury při konstantních světelných podmínkách rychle mizí, je ze získaných výsledků v prvních dvou dnech měření zřejmé, že se v tomto případě nejedná o chování indukované světlem, ale že musí být řízeno vnitřním oscilátorem, který udrží rytmus i bez vnějších vodítek.

Podobná studie cirkadiánních rytmů proběhla i s řasou *Symbiodinium* sp. ze skupiny obrněnek. Stejně jako *C. velia* žije symbiotickým způsobem života s určitými druhy korálů (např. *Heteroxenia fuscenscens*, ze kterého byla izolována). U této řasy byla taktéž

pozorována pravidelná přeměna některých jedinců v bičíkovce, která trvala jen asi osm hodin a ještě před zhasnutím ustala. Při změně světelného režimu se zdálo, že případné cirkadiánní hodiny se zcela přesně resetovaly a opět nastolily pravidelný režim. Přítomnost jakéhokoli oscilátoru ovšem vyvrátilo chování řasy bez enviromentálních vodítek. Ve dvacetičtyřhodinové tmě nebo světle náhle cyklování ustalo. Je tedy jasné, že *Symbiodinium*, na rozdíl od *C. velia*, má přeměnu v bičíkatá stádia řízenou pouze podle světla. Pokusy v přítomnosti kousku korálu rovněž vyvrátily možnost, že by bičíkatá stádia mohla být ovlivňována svým hostitelem (Yacobovitch a kol., 2004).

Druhým zvoleným přístupem byla molekulární analýza vnitřních cyklů vybraných genů za pomoci RT-PCR. Doposud nikdy nebyl studován denní průběh exprese kryptochromů DASH u řas. Vyhodnocení relativní exprese CRY-DASH 1 a 2 ukázalo, že exprese obou kryptochromů má jediný vrchol a to za úsvitu, na rozdíl např. od exprese CRY-DASH v lilku rajčeti (*Solanum lycopersicum*). Měření exprese *cry-dash* genu v této vyšší rostlině za podmínek šestnáctihodinového dne a osmihodinové noci odhalilo dva vrcholy exprese, a to za soumraku a za úsvitu (Facella a kol., 2006), což může naznačovat rozdílné funkce proteinu CRY-DASH v mechanismu cirkadiánních hodin u řas a u vyšších rostlin. Nové poznatky způsobu zapojení CRY-DASH proteinů do soukolí cirkadiánního oscilátoru vneslo porovnání několika rostlin *S. lycopersicum* se změněnou expresí CRY1 a CRY2 vůči divokému typu. Byla zjištěna změněná exprese genu *cry-dash*, čímž se zdá, že tyto dva příbuzné proteiny mají pravděpodobně regulační úlohu vůči kryptochromu DASH (Facella a kol., 2006). Bohužel nebyla studována exprese divokého typu při konstantních světelných podmínkách. Z mých výsledků v případě *C. velia* ovšem vyplývá, že oba studované kryptochromy v *C. velia* jsou napojené na cirkadiánní hodiny a jejich exprese není indukovaná pouze světlem. Přesto je v případě CRY-DASH 2 znatelné, že maximální hladina transkriptu je dosažena pouze při střídání světelných podmínek dne a noci, i když časové rozpětí exprese je v kulturách pěstovaných v konstantních podmínkách bez významné změny.

6. 2. Fylogenetická analýza skupiny proteinů CRY-DASH

Většina fylogenetických studií (např. Brudlera a kol., 2003; Bayram a kol., 2008; Heijde a kol., 2010) člení kryptochromo-fotolyázovou rodinu na pět skupin. Fotolyázy jsou rozdělené na CPD I, CPD II skupinu a 6-4 fotolyázy. Posledně zmiňovaná skupina fotolyáz je překvapivě součástí větve zvířecích kryptochromů, takže bývá ve fylogenetických stromech zařazována spolu s nimi do jediné skupiny. V tomto případě je rozlišení na

krytochormy a fotolyázy možné pouze podle jejich funkce v organismu. Jako blíže příbuzná CPD I fotolyázám je zpravila uváděná skupina rostlinných kryptochromů. Nejnověji objevenou skupinou jsou kryptochromy DASH (Brudler a kol., 2003), které byly doposud objeveny u celé řady eukaryot, ale i u prokaryot.

Toto základní rozdělení do pěti hlavních kládů potvrzuje i moje fylogenetická analýza, kam byly navíc, kvůli blízké příbuznosti s *C. velia* (Janouškovec a kol., 2010), zařazeny četné sekvence kryptochromů z rozsivek, včetně nedávno studovaného PtCPF1 rozsivky *P. tricornutum*, která se zdá být funkčně na pomezí mezi 6-4 fotolyázami a kryptochromy (Coesel a kol., 2009). Že by se mohlo jednat o chybějící mezičlánek mezi funkčně odlišenými fotolyázami a kryptochromy dokazuje nejen studie autorů článku, ale i mnohem komplexnější fylogenetická analýza v této práci (Obr. 10). 6-4 fotolyázy se zde ukazují spíše jako evolučně starší skupina vůči odvozenějším zvířecím kryptochromům a skupině CPF některých chromalveolátů. Ani jeden z objevených kryptochromů u *C. velia* se nicméně nezdá být příbuzný k této větvi kryptochromo-fotolyázové rodiny. Všechny tři sekvence byly fylogeneticky přiřazeny ke kládu CRY-DASH (Obr. 10).

Na základě doposud poměrně krátké aminokyselinové sekvence byl ke CRY-DASH 1 z chromery přiřazen jako nejpříbuznější z použitých sekvencí CRY-DASH z *C. reinhardtii*, což bylo nečekané, vzhledem k doposud uváděnému fylogenetickému postavení chromery vůči známým řasám (Moore a kol., 2008). Proto byla udělána druhá fylogenetická analýza (Obr. 10) blíže zaměřená na fylogenezi CRY-DASH. Přidané sekvence zelených řas potvrdily výsledky prvního fylogenetického stromu (Obr. 10), navíc podpořené bootstrapy. K této topologii se nabízí několik možných vysvětlení. Zdá se pravděpodobné, že původně existovaly v hnědých i v zelených řasách dva duplikáty tohoto *cry-dash* genu ze společného předka. V průběhu evoluce byla jedna kopie u obou skupin ztracena. U *C. velia* by v tomto případě mohlo dojít ke ztrátě stejného duplikátu jako u zelených řas. Jako vysvětlení by samozřejmě připadal v úvahu i laterální přenos tohoto genu přímo ze zelených řas.

Teorii ztraceného duplikátu podporuje i blízké postavení chromalveolát, které jsou sesterskou skupinou vůči kládu zelených řas. V této skupině chromalveolát je několik doposud blíže necharakterizovaných členů kryptochromo-fotolyázové rodiny z dalších řas a také gen CRY-DASH z obrněnky *Karenia brevis*. Tento zajímavý protein se stal vůbec prvním charakterizovaným receptorem modrého světla u obrněnek a zdá se, že se jedná o jediný přítomný fotoreceptor této řasy. O jeho přesném zapojení v cirkadiálním řízení organismu se můžeme ale jen dohadovat. Imunolokalizace ukázala, že v případě *K. brevis* je protein lokalizovaný do chloroplastu (Brunelle a kol., 2007). Stejná lokalizace byla

prokázána i v případě CRY-DASH vyšší rostliny *A. thaliana*, kde byla navíc zjištěna i lokalizace do mitochondrie. U CRY-DASH z *A. thaliana* i z *Synechocystis* byla navíc zjištěna schopnost vázat DNA a prokázána schopnost potlačovat transkripci některých genů (Brudler a kol., 2003; Kleine a kol., 2003).

Jak moc je skupina kryptochromů DASH zároveň odlišná od již dříve známých rostlinných a živočišných kryptochromů, prokázala studie, kde byla ověřována schopnost fotolyázové aktivity. U proteinů CRY-DASH byla objevena světlem indukovaná schopnost opravovat pyrimidinové dimery na jednovláknové DNA (Selby a Sancar, 2006).

Nesmírně zajímavé je i postavení dalšího z objevených kryptochromů, CRY-DASH 2, v rámci této skupiny. Fylogeneticky byl zařazen na bázi živočišné větve v první fylogenetické analýze (Obr. 10), ale díky rozšířenému datasetu se ukázalo, že se CRY-DASH 2 nachází spíše mezi houbami (Basidiomycota) a živočichy (Obr. 11). Oba výsledky je možné vysvětlit evolučním původem *C. velia*, která vznikla, stejně jako příbuzné obrněnky, nejspíše sekundární endosymbiózou heterotrofního organismu a eukaryotického autotrofa. Některé geny tak mohou být díky heterotrofním předkovi blíže k homologům hub a živočichů (Armbrust a kol., 2004; Moore a kol. 2008; Janouškovec a kol., 2010; Allen a kol., 2011).

Poslední, z částečně osekvenovaných kryptochromů, je nazvaný CRY-DASH-like, právě proto, že byl fylogeneticky zařazen na samou bázi celého CRY-DASH kládu (Obr. 10). Během rozšiřování datasetu se jeho postavení přesunulo a byl topologicky zařazen na bázi celého kládu živočišných kryptochromů, 6-4 fotolyáz a CRY-DASH genů. Pokud se nejedná o artefakt, způsobený příliš krátkou testovanou sekvencí, mohlo by to znamenat, že CRY-DASH like protein z *C. velia* je spojnicí mezi touto skupinou a ostatními členy kryptochromo-fotolyázové rodiny. Vzhledem k tomu, že se zatím nedá určit, zda se skutečně jedná o CRY-DASH protein, byl z druhé fylogenetické analýzy vyřazen.

7. Závěr

V této práci se podařilo prokázat, že u *C. velia* není rytmický výskyt bičíkoveců indukován světlem a je zřejmě řízen vnitřním oscilátorem. Přítomnost vnitřních cirkadiánních hodin dále naznačuje exprese nejméně tří různých kryptochromů, které byly fylogeneticky zařazeny do skupiny CRY-DASH. Přesnou funkci těchto kryptochromů v *C. velia* nicméně bude potřeba dále studovat. Přítomnost jiných fotoreceptorů se nepodařilo prokázat, ačkoli byly hledané homology bakteriálních a rostlinných fytochromů. U dvou nalezených kryptochromů DASH byla sledována relativní exprese během dne a byla zjištěna stejná rytmicita i v případě cDNA izolované z chromer kultivovaných v podmínkách konstantního světla i tmy. Je tedy zřejmé, že rytmus exprese není závislý na střídání podmínek světla a tmy. Toto je první studie cirkadiánního rytmu u *C. velia*.

8. Použitá literatura

Allen, A. E., C. L. Dupont, M. Oborník, A. Horák, A. Nunes-Nesi, J. P. McCrow, H. Zheng, D. A. Johnson, H. Hu, A. R. Fernie, C. Bowler, 2011: Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature* 473: 203

Anderson, S. L., G. R. Teakle, S. J. Martino-Catt, S. A. Kay, 1994: Circadian clock-regulated and phytochrome-regulated transcription is conferred by a 78 bp cis-acting domain of the *Arabidopsis* CAB2 promoter. *Plant Journal* 6: 457-470

Armbrust, E.V., J. A. Berges, C. Bowler, B.R. Green, D. Martinez, N. H. Putnam, S. Zhou, A. E. Allen, K. E. Apt, M. Bechner, M. A. Brzezinski, B. K. Chaal, A. Chiovitti, A. K. Davis, M. S. Demarest, J. C. Detter, T. Glavina, D. Goodstein, M. Z. Hadi, U. Hellsten, M. Hildebrand, B. D. Jenkins, J. Jurka, V. V. Kapitonov, N. Kröger, W. W. Y. Lau, T. W. Lane, F. W. Larimer, J. C. Lippmeier, S. Lucas, M. Medina, A. Montsant, M. Oborník, M. S. Parker, B. Palenik, G. J. Pazour, P. M. Richardson, T. A. Ryneerson, M. A. Saito, D. C. Schwartz, K. Thamatrakoln, K. Valentin, A. Vardi, P. F. Wilkerson, D. S. Rokhsar, 2004: The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306: 79-86

Bass, J., J. S. Takahashi, 2011: Redox redux. *Nature* 469: 476-477

Bayram, Ö., C. Biesemann, S. Krappmann, P. Galland, G. H. Braus, 2008: More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular Biology of the Cell* 19: 3254-3262

Berrocal-Tito, G. M., E. U. Esquivel-Naranjo, B. A. Horwitz, A. Herrera-Estrella, 2007: *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eucaryotic Cell* 6: 1682-1692

Bieniawska Z., Espinoza C., Schlereth A., 2008: Disruption of the *Arabidopsis* circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive transcriptome. *Plant Physiology* 147: 263-279

Bläsing O. E., Y. Gibon, M. Günther, M. Höhne, R. Morcuende, D. Osuna, O. Thimm, B. Usadel, W.-R. Scheible, M. Stitt, 2005: Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 3257-3281

Berson, D. M., F. A. Dunn, M. Takao, 2002: Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295: 1070-1073

Bluhm, B. H., L. D. Dunkle, 2008: PHL1 of *Cercospora zea-maydis* encodes a member of the photolyase/cryptochrome family involved in UV protection and fungal development. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1364-1372

Boivin, D. B., J. F. Duffy, R. E. Kronauer, C. A. Czeisler, 1996: Dose-response relationship for resetting of human circadian clock by light. *Nature* 379: 540-542

- Brandes C., J. D. Plautz, R. Stanewsky, 1996: Novel features of *Drosophila period* transcription revealed by real-time luciferase reporting. *Neuron* 16: 687-692
- Breton, G., S. T. Kay, 2006: Circadian rhythms lit up in *Chlamydomonas*. *Genome Biology* 7: 215
- Bruce, V.G., 1972: Mutants of the biological clock in *Chlamydomonas reinhardi*. *Genetics* 70: 537-548
- Brudler, R., K. Hitorni, H. Daiyasu, H. Toh, K. Kucho, M. Ishiura, M. Kanehisa, V. A. Roberts, T. Todo, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, 2003: Identification of a new cryptochrome class: Structure, function and evolution. *Molecular cell* 11: 59-67
- Brunelle, S. A., E. S. Hazard, E. E Sotka, F. M. Van Dalah, 2007: Characterization of Dinoflagellate cryptochrome blue-light receptor with a possible role in circadian control of the cell cycle. *Journal of Phycology* 43: 509-518
- Bünning, E., 1973: The physiological clock: circadian rhythms and biological chronometry, English University Press
- Cashmore, A. R., J. A. Jarillo, Y.-J. Wu, D. Liu, 1999: Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760-765
- Coesel, S., M. Mangogna, T. Ishikawa, M. Heijde, A. Rogato, G. Finazzi, T. Todo, C. Bowler, A. Falciatore, 2009: Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity. *EMBO Reports* 10: 655-661
- Deng, T., T. Roenneberg, 1997: Photobiology of the *Gonyaulax* circadian system II. Allopurinol inhibits blue-light effects. *Planta* 202: 502-509
- Dolnik, O. V., B. J. Metzger, M. J. J. E. Loonen, 2011: Keeping the clock set under the midnight sun: diurnal periodicity and synchrony of avian *Isospora* parasites cycle in the High Arctic. *Parasitology* 138: 1077-1081
- Dubruille, R., P. Emery, 2008: A plastic clock: How circadian rhythms responds to enviromental cues in *Drosophila*. *Molecular Neurobiology* 38: 129-145
- Dunlap, J. C., J. W. Hastings, 1981: The biological clock in *Gonyaulax* controls luciferase activity by regulating turnover. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 10509-10518
- Edgar, R. C., 2004: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797
- Eelderink-Chen, Z., G. Mazzotta, M. Sturre, J. Bosman, T. Roenneberg, M. Merrow, 2010: A circadian clock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 107: 2043-2047
- Emery, I. F., J. M. Noveral, C. F. Jamison, K. K. Siwicki, 1997: Rhythms of *Drosophila period* gene expression in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 94: 4092-4096

- Emery, P., S. M. Reppert, 2004: A rhythmic ror. *Neuron* 43: 443-446
- Facella, P., L. Lopez, A. Chiappeta, M. B. Bitonti, G. Guiliano, G. Perrotta, 2006: CRY-DASH gene expression is under the control of the circadian clock machinery in tomato. *FEBS LETTERS* 580: 4618-4624
- Gardner, M. J., D. H. Williamson, R. J. M. Wilson, 1991: A circular DNA in malaria parasites encode an RNA – polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts. *Molecular and Biochemical Parasitology* 44: 115-123
- Gockel, G., W. Hachtel, S. Baier, C. Fliss, M. Henke, 1994: Genes for components of the chloroplast translational apparatus are conserved in the reduced 73-kb plastid DNA of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Current Genetics* 26: 256-262.
- Goosen, N., G. F. Moolenaar, 2007: Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair*. 7: 353-379
- Gouy, M., S. Guindon, O. Gascuel., 2010: SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221-224
- Hannah, M. A., A. G. Heyer, D. K. Hinch, 2005: A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics* 1: 179-196
- Hastings, J. W., B. M. Sweeney, 1957: The luminescent reaction in extracts of the marine dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 49: 209-225
- Hastings, J. W., B. M. Sweeney, 1958: A Persistent Diurnal Rhythm of Luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *Biological Bulletin*. 115: 440-458
- Heijde, M., G. Zabulon, F. Corellou, T. Ishikawa, J. Brazard, A. Usman, F. Sanchez, P. Plaza, M. Martin, A. Falciatore, T. Todo, F.-Y. Bouget, C. Bowler, 2010: Characterisation of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes. *Plant, Cell and Environment* 33: 1614- 1626
- Hendrischk, A.-K., S. W. Fruchwirth, J. Moldt, R. Pokorny, S. Metz, G. Kaiser, A. Jäger, A. Batschauer, G. Klug, 2009: A cryptochrome-like protein is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular Microbiology* 74: 990-1003
- Hofstra, W. A., A. W. De Weert, 2008: How to assess circadian rhythm in humans: A review of literature. *Epilepsy & Behavior* 13: 438-444
- Howe, C. J., 1992: Plastid origin of an extrachromosomal DNA molecule from *Plasmodium*, the causative agent of malaria. *Journal of Theoretical Biology* 158: 199-205
- Huang, T. C., S. T. Wang, N. Grobbelaar, 1993: Circadian-rhythm mutants of the prokaryotic *Synechococcus* RF-1. *Current Microbiology* 27: 249-254

- Chaves, I., R. Pokorný, M. Byrdin., N. Hoang., T. Ritz, K. Brettel, L. Essen, G. T. J van der Horst, A. Batschauer, M. Ahmad, 2011: The cryptochromes: Blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology* 62: 335-364
- Iliev, D., Olga Voytsekh, E. M. Schmidt, M. Fiedler, A. Nykytenko, M. Mittag, 2006: A heteromeric RNA-binding protein is involved in maintaining acrophase and period of the circadian clock. *Plant Physiology* 142: 797-806
- Janouškovec J., A. Horák, M. Oborník, J. Lukeš, P.J. Keeling, 2010: A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 107: 10949-10954
- Kleine, T., P. Lockhart, A. Batschauer, 2003: An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *The Plant Journal* 35: 93-103
- Konopka, R.J., S. Benzer, 1971: Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 68: 2112-2116
- Kořený, L., R. Sobotka, J. Janouškovec, P. J. Keeling, M. Oborník, 2011: Tetrapyrrole synthesis of photosynthetic chromerids is likely homologous to the unusual pathway of apicomplexan parasites. *Plant Cell* 23: 3454-3462
- Köhler, S., C. F. Delwiche, P. W. Denny, L. G. Tilney, P. Webster, R. J. Wilson, J. D. Palmer, D. S. Roos, 1997: A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* 275: 1485-1489
- Lagercrantz, U., 2009: At the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiod responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 60: 2501-2515
- Lapointe, M., D. Morse, 2008: Reassessing the role of 3'-UTR-binding translational inhibitor in regulation of circadian bioluminescence rhythm in the dinoflagellate *Gonyaulax*. *Biological Chemistry* 389: 13-9
- Lartillot N., T. Lepage, S. Blanquart. 2009: PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. *Bioinformatics* 25:2286-2288
- Lartillot, N., H. Philippe, 2004: A Bayesian mixture model for across-site heterogeneities in the amino-acid replacement process. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1095-1109
- Lavebratt, C., L. K. Sjöholm, P. Soronen, T. Paunio, M. P. Vawter, W. E. Bunney, R. Adolfsson, Y. Forsell, J. C. Wu, J. R. Kelsoe, T. Partonen, M. Schalling, 2010: CRY2 is associated with depression *Plos One*. 5: e9407
- Lin, C., T. Todo, 2005: The cryptochromes. *Genome Biology* 6: 220
- Mansour, H. A., J. Wood, T. Logue, K. V. Chowdari, M. Dayal, D. J. Kupfer, T. H. Monk, B. Devlin, V. L. Nimgaonkar, 2006: Association study of eight circadian genes with bipolar I. disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. *Genes, Brain and Behavior* 5: 150-157

- Matsuo, T., K. Onai, K. Okamoto, J. Minagawa, M. Ishiura, 2006: Real-Time Monitoring of Chloroplast Gene Expression by a Luciferase Reporter: Evidence for Nuclear Regulation of Chloroplast Circadian Period. *Molecular and Cellular Biology* 26: 863-870
- Matsuo, T., K. Okamoto, K. Onai, Y. Niwa, K. Shimogawara, M. Ishiura, 2009: A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes & Development* 22: 918-930
- McClung, C. A., 2011: Circadian rhythms and mood regulation: Insights from pre-clinical models. *European Neuropsychopharmacology* 21: S683-S693
- McFadden, G. I., M. E. Reith, J. Munholland, N. Lang-Unnasch, 1996: Plastid in Human Parasites. *Nature* 381: 482
- McWatters, H. G., P. F. Devlin, 2011: Timing in plants – a rhythmic arrangement. *FEBS Letters* 585: 1474-1484
- Millar, A. J., S. A. Kay, 1991: Circadian control of cab gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 3: 541-550.
- Mittag M., 1998: Molecular mechanisms of clock-controlled proteins in phytoflagellates. *Protist* 149: 101-107
- Moore, R. B., M. Oborník, J. Janouškovec, T. Chrudimský, M. Vancová, D. H. Green, S. W. Wright, N. W. Davies, C. J. S. Bolch, K. Heimann, J. Šlapeta, O. Hoegh-Guldberg, J. M. Logsdon Jr, D. A. Carter, 2008: A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* 451: 959-963
- Oborník M., D. Modrý, M. Lukeš, E. Černotíková-Stříbrná, J. Cihlář, M. Tesařová, E. Kotabová, M. Vancová, O. Prášil, J. Lukeš, 2011a: Morphology, ultrastructure and life cycle of *Vitrella brassicaformis* n. sp., n. gen., a novel chromerid from the Great Barrier Reef. *Protist* accepted
- Oborník, M., M. Vancová, D. - H. Lai, J. Janouškovec, P. J. Keeling, J. Lukeš, 2011b: Morphology and ultrastructure of multiple life cycle stages of the photosynthetic relative of Apicomplexa, *Chromera velia*. *Protist* 162: 115-130.
- O'Neil, J. S., A. B. Reddy, 2011: Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 469: 498-503
- O'Neil, J. S., G. van Ooijen, L. E. Dixon, C. Troein, F. Corellou, F. Y. Bouget, A. B. Reddy, A. J. Millar, 2011: Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 469: 554-558
- Patterson, D. J., 1999: The diversity of eukaryotes. *The American Naturalist* 65: 96-124
- Pilgrim, M. L., T. Caspar, P. H. Quail, C. R. McClung, 1993: Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. *Plant molecular Biology* 23: 349-364

- Plautz, J. D., M. Kaneko, J. C. Hall, S. A. Kay, 1997: Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278: 1632-1635
- Pohl, R., 1948: Tagesrhythmus im phototaktischen Verhalten von *Euglena gracilis*. *Zeitschrift für Naturforschung* 3B: 367-74
- Ralph, S. A., M. C. D’Ombrain, G. I. McFadden, 2001: The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resistance Updates* 4: 145-151
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, 2002: Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935-941
- Roenneberg, T., D. Morse, 1993: Two circadian oscillators in one cell. *Nature* 362: 362-364
- Sambrook, J., D. W. Russel, 2001: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Selby, C. P., A. Sancar, 2006: A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *PNAS* 103: 17696-17700
- Sharma, V. K., 2003: A simple computer-aided device for monitoring activity of small mammals and insect. *Biological Rhythm Research* 34: 3-12
- Stamatakis, A. 2006: RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690
- Suzuki, L., C. H. Johnson, 2001: Algae know the time of day: Circadian and photoperiodic programs. *Journal of Phycology* 37: 933-942
- Sweeney, B. M., W. Hastings, 1958a: A persistent diurnal rhythm of bioluminescence in *Gonyaulax polyedra*. *Biological Bulletin* 115: 440-458
- Sweeney, B. M., W. Hastings, 1958b: Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra*. *Journal of Protozoology* 5: 217-224
- Štorchová H., 2008: Molekulární genetika rozluštila záhadu florigenu, faktoru navozujícího kvetení. *Živa* 3: 100-102
- Todo, T., 1999: Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutation research – DNA repair* 434: 89-97
- Turek F. W., C. Joshu, A. Kohsaka, E. Lin, G. Ivanova, E. McDearmon, A. Laposky, S. Losee-Olson, A. Easton, D. R. Jensen, R. H. Eckel, J. S. Takahashi, J. Bass, 2005: Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science* 308: 1043-1045
- Wilson, R. J. M., M. J. Gardner, J. E. Feagin, D. H. Williamson, 1991: Have malaria parasites three genomes? *Parasitology Today* 7: 134-136.
- Wilson, R. J. M., P. W. Denny, P. R. Preiser, K. Rangachari, K. Roberts, A. Roy, A. Whyte, M. Strath, D. J. Moore, P. W. Moore, D. H. Williamson, 1996: Complete gene map of the

plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Molecular Biology* 261: 155-172

Wolfe, K. H., C. W., Morden, J. D. Palmer, 1992: Function and evolution of a minimal plastid genome from a non-photosynthetic parasitic plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 89: 10648-10652.

Yacobovitch, T., Y. Benayahu, V. M. Weis, 2004: Motility of zooxanthellae isolated from the Red Sea soft coral *Heteroxenia fuscescens* (*Cnidaria*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 298: 35-48