



**Kerfislíffræði sambýlislífveru:
Efnaskiptalíkan fyrir himnuskóf
(*Peltigera membranacea*)**

Jón Pétur Gunnarsson



**Líf- og umhverfisvísindadeild
Háskóli Íslands
2014**

**Kerfislíffræði sambýlislífveru:
Efnaskiptalíkan fyrir himnuskóf
(*Peltigera membranacea*)**

Jón Pétur Gunnarsson

10 eininga ritgerð sem er hluti af
Baccalaureus Scientiarum gráðu í Lífefnafræði og sameindalíffræði

Leiðbeinandi
Ólafur Sigmar Andrésen

Líf- og umhverfisvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið

Háskóli Íslands
Reykjavík, Maí 2014

Kerfislíffræði sambýlislífveru: Efnaskiptalíkan fyrir himnuskóf (*Peltigera membranacea*).
Leit að ensímum í erfðamengi fléttu (*Peltigera membranacea*)
10 eininga ritgerð sem er hluti af *Baccalaureus Scientiarum* gráðu í Lífefnafræði og
sameindalíffræði

Höfundarréttur © 2014 Jón Pétur Gunnarsson
Öll réttindi áskilin

Líf- og umhverfisvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
VR-II
Hjarðarhaga 2-6
107 Reykjavík

Sími: 525 4700

Skráningarupplýsingar:

Jón Pétur Gunnarsson, 2014, *Kerfislíffræði sambýlislífveru: Efnaskiptalíkan fyrir himnuskóf*
(*Peltigera membranacea*), BS ritgerð, Líf- og umhverfisvísindadeild, Háskóli Íslands, 25 bls.

Útdráttur

Raðgreint erfðamengi himnuskófs (*Peltigera membrancea*) er tekið fyrir í þessu verkefni. Reynt var að bera kennsla á sem flest ensím úr contig (sjá kassa 1) safni sem fengið var frá leiðbeinanda. Himnuskóf er sambýlis lífvera, sambýli svepps og ljóstillífandi veru. Þessar lífverur lifa saman í viðvarandi samhjálpi (e. mutualism) og er þetta samband nauðþurfta (e. obligate). Þ.e lífverur eru háðar hvorri annari til að lifa af. Í verkefniú náðist að finna um 600 ensím sem tilheyra ýmsum efnaskiptaferlum. Þetta var framkvæmt með því að bera saman RNA raðir fyrir ensím úr viðmiðunar lífverum og dna raðir úr contig safni sem fengið var frá leiðbeinanda. Niðurstöður sína að mikið er af ferlum sem eiga ekki við eða lítið sem ekkert fannst. Það gæti t.d verið út af því að gagnagrunnar innihalda ekki nægar upplýsingar. Þ.e.a.s KEGG gagnagrunnur.

Efnisyfirlit

Myndir	7
Töflur	8
Kassar	8
Þakkir	10
1 Fléttur	11
1.1 Skilgreining á fléttum.....	11
1.1.1 Peltigera ættin.....	11
2 Uppsetning excel skjals	12
3 Aðferðir og gögn	14
4 Niðurstöður	15
4.1.1 Niðurstöður ferla.....	16
4.1.2 Dæmi um ferla sem náðist að klára.....	17
4.1.3 Hvað vantar.....	18
4.1.4 Nitur efnaskipti.....	20
4.1.5 Hugsanlega ofaukið.....	21
5 Samantekt og umræður	21
Heimildir	22

Myndir

Mynd 1. Fitursýru efnaskiptaferillinn (e. Fatty acid metabolism) Lituð EC númer standa fyrir fundnum ensímum. *Appelsínugult* eru ensím sem fundin voru í þessu verkefni. Aðrir litir standa fyrir ensím sem fundin voru í Blast2Go í yfirferð leiðbeinanda. Mismundi litir standa fyrir mismunandi tegundum ensíma.....17

Mynd 2. Ein kolefnis myndun úr folati (e. one carbon pool by folate). Lituð EC númer standa fyrir fundnum ensímum. *Appelsínugult* eru ensím sem fundin voru í þessu verkefni. Aðrir litir standa fyrir ensím sem fundin voru í Blast2Go í yfirferð leiðbeinanda. Mismundi litir standa fyrir mismunandi tegundum ensíma.....18

Mynd 3 Glýserólípíð efnaskiptaferillinn (e. Glycerolipid metabolism) Lituð EC númer standa fyrir fundnum ensímum. *Appelsínugult* eru ensím sem fundin voru í þessu verkefni. Aðrir litir standa fyrir ensím sem fundin voru í Blast2Go í yfirferð leiðbeinanda. Mismundi litir standa fyrir mismunandi tegundum ensíma.....19

Mynd 4. Efniferill niturs (e. Nitrogen metabolism) Lituð EC númer standa fyrir fundnum ensímum. *Appelsínugult* eru ensím sem fundin voru í þessu verkefni. Aðrir litir standa fyrir ensím sem fundin voru í Blast2Go í yfirferð leiðbeinanda. Mismundi litir standa fyrir mismunandi tegundum ensíma..20

Töflur

Tafla 1.1 Inniheldur allar upplýsingar tengdar ensímum sem fundin voru í þessu verkefni... 12

Kassar

Kassi 1. Contig.....	16
Kassi 2. KEGG gagnagrunnurinn.....	16
Kassi 3. TBLASTN.....	19

Þakkir

Ég vil þakka Ólafi S. Andrésarsyni fyrir að leggja til verkefnið og leiðbeina. Einnig vil ég þakka Einari Árnasyni fyrir aðgang að gagnagrunni (Hrafninn). Zophoníasi Oddi Jónssyni vil ég þakka fyrir tæknilega aðstoð með að tengjast gagnagrunni o.fl..

Ég vil þakka samnemendum mínum fyrir alla þá hjálp og stuðning sem þau gáfu mér.

Og að lokum vil ég þakka Ólöfu Láru Halldórsdóttir fyrir allt.

1 Fléttur

1.1 Skilgreining á fléttum

Flétta er sambýlis lífvera sem saman stendur af sveppi (e. mycobiont) og þörungum og/eða blágrænni bakteríu (ljósbylingur, e. photobiont). Þetta sambýli gengur út á það að ljóstillífaði lífveran myndar sykrur (næringu) fyrir sveppinn sem aftur veitir ljóstillífaði líverunni skjól til að vaxa og dafna. (O'Brien et al. 2005). Flétta er gott dæmi um farsælt sambýli (e. mutualism) sem getur lifað og fjölgað sér á mjög margvíslegum stöðum. (Stenroos et al. 2006)

Gerð fléttu:

- Meginhluti fléttunnar er sveppurinn. Hann sér um byggingu lífverunnar og er aðal undirstaðan. Einnig sér hann um að útbúa mikið af aukaefnum eins og t.d pulvinik sýru og alifatískar sýrur. (Fahselt 1994)
- Þörungur og/eða blágræna bakterían eru ljóstillífaði lífverur fléttunar. Staðsetning þeirra er yfirleitt rétt undir yfirborðinu, en þær geta þó fundist á fleirri stöðum í sumum fléttum. Hlutverk ljóstillífaði lífverunnar er að binda og afoxa koltvísýring úr andrúmslofti, sem hægt er að nota í orkubúskap fléttunnar (O'Brien et al. 2005).

Fléttum er gjarnan skipt eftir a) formi og b) samsetningu.

- a) Fléttur hafa verið flokkaðar í þrjá flokka eftir formi: Hróðurfléttur (e. crustose), blaðfléttur (e. foliose) og runnfléttur (e. fruticose) fléttur.
- b) Samsetningu fléttna má skipta í tvennt þ.e fléttur með eina ljóstillífaði lífveru og fléttur með tvær (Paulsrud 2001).

1.1.1 Peltigera ættin

Fléttur eru asksveppir af ætt Peltigeraceae og ættkvísl *Peltigera*.

Inngangur og markmið

Þegar kemur að efnaskipta kortum sambýlis lífvera er ekki margt til. Margt er óvitað um samskipti lífveranna sem fléttan byggist upp af. En það hefur sýnt sig að þetta er farsælt sambýli, þar sem fléttur finnast víðsvegar. Markmið verkefnis var að skilgreina betur erfðamengi fléttunar Himnuskófs. Til þess þurftir að finna hvaða hlutar erfðamengisins kóða fyrir hvað.

2 Uppsetning excel skjals

Unnið var með raðgreiningargögn, 454allcontig DNA, sem borin voru saman við prótein raðir úr öðrum tegundum. Notast var við TBLASTN (sjá kassa 3) algrímminn (e. algorithm) til að athuga samsvörun milli tegunda. Tafla 1.1 er tengd við excel skjalið með hiberlink, ef skjalið er í sömu möppu og þetta word skjal er einfaldlega hægt að tvíklíkka á töfluna hér að neðan og þá opnast taflan. Einnig er tengill hér að neðan sem heitir BS-verkheild.ods það er beinn tengill á skjalið. Ef lesandi vill nálgast þessar upplýsingar er hægt, með leyfi leibeinanda, að fá þær sendar í tölvupósti. að senda email á jonpetur1@gmail.com með fyrirspurn um aðgang [BS-verkheild.ods](#)

Tafla 1.1 Inniheldur allar upplýsingar tengdar ensímum sem fundin voru í þessu verkefni.

Pathway	Enzyme	Path/RN	Blast2go	EC nr.	Contig	Identities %	Positives %	gb	Organism	out_bast
Glycolysis/Gluconeogenesis	aldose 1-epimerase	R01602	alpha-D-glucose = beta-D-glucose	5.1.3.3	17792	51/142 (35%)	73/142 (51%)	CBF8	A. nidulan	aldose1ep
Glycolysis/Gluconeogenesis	glucose-6-phosphatase	R00303	glucose 6-phosphat D-glyceraldehyde-3-phosphat	3.1.3.9	4461	201/509 (39%)	280/509 (55%)	EDP5	A. fumigat	PAP2A.fur
Glycolysis/Gluconeogenesis	glyceraldehyde-3-phosphat L-lactate dehydrogenase	R07159	D-glyceraldehyde-3-phosphat (S)-lactate + NAD+ = acetyl-CoA +	1.2.7.6	25260	172/228 (75%)	199/228 (87%)	EAW1	A. clavatu	glycer3pdc
Glycolysis/Gluconeogenesis	enase	R00703	lactate + NAD+ = acetyl-CoA +	1.1.1.27	18832	181/363 (49%)	229/363 (63%)	XP_7	A. fumigat	oxidoreduc
Glycolysis/Gluconeogenesis	dihydrolipic pyruvate dehydrogenase	R02569	enzyme pyruvate +	2.3.1.12	33911	241/374 (64%)	276/374 (73%)	EAU3	A. terreus	dihydrolipc
Glycolysis/Gluconeogenesis	enase	R01699	[dihydrolipic pyruvate + NADP+ = oxalosuccinate = 2-oxoglutar D-gluconolactonase	1.2.4.1	97632	254/346 (73%)	292/346 (84%)	CBF8	A. nidulan	1.2.4.1A.n
TCA cycle	isocitrate dehydrogenase	R01899	= oxalosuccinate = 2-oxoglutar D-gluconolactonase	1.1.1.42	44369	291/422 (68%)	335/422 (79%)	EAL9	A. fumigat	isocitrated
TCA cycle	isocitrate dehydrogenase	R00268	oxoglutar D-gluconolactonase	1.1.1.43	44370	292/422 (68%)	336/422 (79%)	EAL9	A. fumigat	isocitrated
Pentose Phosphate pathway	gluconolactonase	R01519	1,5-gluconolactonase	3.1.1.17	16967	117/269 (43%)	162/269 (60%)	AN89	A. nidulans	3.1.1.17A.

3 Aðferðir og gögn

Líkanagerð byggir á mörgum aðferðum og er líkanið sjálf í raun bara myndræn framsetning og tenging á öllum gögnum sem safnað hefur verið saman. Til að byrja með þarf að raðgreina erfðamengi sem og umritunarmengi lífverunnar. Þessar upplýsingar þarf að skilgreina nánar þ.e flokka þarf mengin niður og finna út hvaða hlutir þess skrá fyrir hverju. Notast má við basic local alignment search tool eða BLAST. (Program & Guide 2008, Altschul, S. F. 2005) Þá er hægt að sjá hvaða ensím geta mögulega verið til staðar og hvaða efnaskiptaferlar eiga sér líklega stað og auðvitað hvað vantar.

Í þessu verkefni var notast við raðgreiningargögn, 454allcontig DNA gögn, frá leiðbeinanda. Gögn voru geymd í gagnagrunni á Hrafninum, sem er tölvuþjónn líffræðistofu í Öskju. Unnið var með gögn í linux, þar sem mesta vinnan var framkvæmd. TBLASTN (sjá kassa 3) var notað til að blasta prótein röðum frá nokkrum tegundum af sveppum, aðalega úr *Aspergillus nidulans*, sem fundnar voru í KEGG gagnagrunninum (sjá kassa 2). Þessar raðir fundust með því að bera saman hvað hafði verið fundið áður hjá leiðbeinanda og hvað var nýtt inn á KEGG, myndrænt þ.e.a.s. notaðar voru myndir, líkt þeim sem gefnar eru í þessari ritgerð. Þegar nýtt prótein fannst var það einfaldlega valið og þá komu upp allar þær upplýsingar sem KEGG gagnagrunnurinn bjó yfir. Því næst var upplýsingum safnað í excel skjal sem hélt utan um öll efnaskiptaferli sem fundust (sjá Töflu.1) Þetta skjal er því samansafn upplýsinga um hvert ensím sem fundið var. Upplýsingar á borð við hvaða ferli (e. pathway) ensímið tilheyrir, RN númer sem er hvarfnúmer hvers ensíms, EC númer e (e. Enzyme Commission number) sem er númer hvers ensíms í samræmdu kerfi sem byggir á eðli efnahvarfanna. Einnig er hægt að finna upplýsingar um hvaða Contig (sjá kassa 1) fannst í blastinu og upplýsingar um mestu samsvörun. Upplýsingar um tegund og nafn blast skrár eru einnig að finna í þessu skjali.

BLAST skrár eru hýstar á Hrafninum. Nafn skrár samanstendur af EC númeri, nafni tegundar og tölu, ef til eru fleiri en eitt mRNA umrit á KEGG gagnagrunninum. Til að taka dæmi er skráin „OutBlast3.6.1.13A.nidulans“ blast skrá fyrir ensímið ADP-ríbós pírophosphatasa sem er í þessum efnaskiptaferlinu og úr *Aspergillus nidulans*.

Til að taka saman aðferðir verkefnis þá var notast við myndræna útgáfu á gögn frá leiðbeinanda sem sýndu hvað var þegar fundið af próteinum í hverjum efnaskiptaferli fyrir sig. Því næst var hver ferill tekinn fyrir og borinn saman við ferla inn á KEGG. Þegar eitthvað fannst var tekinn prótein röðin og BLASTað á gagnagrunn leiðbeinanda. BLAST niðurstöður voru metnar og ef góð samsvörun kom fram var það skráð í excel skalið og myndræn gögn uppfærð.

Skilgreining vísindamanna á sambýli hefur verið umdeild í mörg ár (Martin & Schwab 2012b). Sumir vísindamenn segja að orðið sambýli eigi aðeins við um lífverur sem eru í viðvarandi samhjálp (e. mutualism), þar sem báðir aðilar græða á samvistinni og geta jafnvel ekki lifað án hvers annars. Aðrir telja að það eigi að standa fyrir hvaða langvarandi lífræn samskipti sem er, hvort sem það er samhjálp, gisitlíf eða sníkjulíf (Edwards 2011). Eftir langar rökraður í vísindaheiminum er, í dag, síðari skilgreiningin, oft kennd við de Bary, ofan á (Martin & Schwab 2012a). Einnig má flokka sambýli sem eins konar líkamlegan samruna

lífvera þ.e.a.s önnur lífveranna lifir inn í hinni (e. endosymbiosis) t.d bakteríur í meltingarvegi dýra, eða á hinni (e. ectosymbiosis) t.d bakteríur á húð.

4 Niðurstöður

Í þessu verkefni var eingöngu skoðað erfða- og umritunarmengi svepps hluta fléttunar. Í framhaldi mætti skoða erfða- og umritunarmengi blágrænubakteríunnar sem tilliti til þeirra niðurstaðna sem fengust í þessu verkefni. Þá væri mögulega hægt að skilgreina betur hvaða ensím koma að samskiptum svepps við blágrænubakteríu.

Sambýli er einkennandi hugtak fyrir þetta verkefni þar sem leitast er við að skilgreina efnaskiptakjarna í erfðamengi sambýlislífverunnar *Peltigera membranacea* eða himnuskóf. Himnuskóf er flétta sem er sambýli svepps og ljóstillífandi lífveru, sem í þessu tilfelli er blágrænþörungurinn *Nostoc*. *Nostoc* nýtir jafnframt nitur úr andrúmslofti til að búa til næringarefni fyrir sveppinn. Á móti má búast við að sveppurinn veiti bakteríunni skjól og næringarefni. Fléttur eru dæmi um fornt og lífeðlisfræðilega mjög vel samþætt sambýli, sem gæti teygt rætur sínar allt að 600 milljón árum aftur í þróunarsögunni (Yuan et al. 2005). Almenn flokkast fléttur sem nauðþurfta (e. obligate) sambýli þar sem báðar lífverur eru háðar hvorri annari, þ.e.a.s hvorug þeirra gæti lifað án hinnar. Tiltölulega lítið er vitað um sambýlislífverur og samskipti þeirra á milli. Því eru rannsóknir á þeim mjög nauðsynlegar og mikilvægar fyrir framgang í þekkingu okkar á samskiptum lífvera í kringum okkur. Almennt búa lífverur í nánun sambýli og geta jafnvel ekki lifað af sér á báti. Þetta á til að mynda við um sambýli mannsins og baktería, bæði í meltingarvegi og á húð. Sambýli byggist á því að báðir aðilar græða, til þess þurfa að eiga sér stað hagstæð samskipti, og oft eru það efnaskiptin sem skipta mestu máli.

Til að fá góða sýn á hvernig sambýli gengur upp þarf að skoða og skilgreina efnaskiptaferla sem eiga sér stað í lífverunum. Þetta felur í sér flokkun á því hvað hvor lífvera fyrir sig gerir í þessu tiltekna sambýli.

Fyrst þarf að raðgreina erfðamengi(DNA) og umritunarmengi(RNA) lífveranna til að getað skilgreint hvað hver lífvera getur framleitt af efnum. Mikilvægt er að hafa í huga að lífverur nota sjálfar mikið af framleiðslu eigin lífhvata, þess vegna getur verið erfitt að sjá hvað það er sem fer á milli. Þá þarf að skoða hvað lífverurnar geta ekki framleitt sjálfar en þurfa þó á að halda.

Til að getað séð fyrir sér efnaskiptaferla lífvera er gott að útbúa efnaskiptalíkön. Þessi líkön koma sér vel þegar lítið er til heildar myndarinnar. Hægt er að skilgreina allt sem flæðir inn í kerfið og allt sem flæðir út, og það sem situr eftir. Sífellt betri og dýpri vitneskja er að myndast um virkni lífvera og lífkerfa í heild með líkönum. Hægt er að skoða allt frá því sem gerist innan hvernar frumu, jafnvel frumulíffæris, til þess að skoða virkni heillar lífveru, lífkerfis og jafnvel efnahringrásar lífs.

Aðferð kerfislíffræðinnar við að ná botni í þessu öllu saman byggist á að nota stærðfræðilega og verkfræðilega nálgun til að leysa þetta gríðarlega verkefni. Þannig er hægt að öðlast þann skilning og þá sýn sem þarf til að skilja hvernig ferlin eiga sér stað og virka. Það sem kemur

næst er svo mögulega skilningur á hvernig sjúkdómar virka og hvernig hægt er að berjast við þá með sérhæfðum lyfjagjöfum og jafnvel komast hjá aukaverkunum lyfja sem gefin eru í dag. Einnig geta komið upp á sjónarsviði nýjar tegundi efna sem nýtast mögulega sem lyf gegn ýmsum sjúkdómum.

Til eru ýmis misflókin efnaskiptalíkon fyrir helstu, ef ekki allar tilrauna lífverurnar og einnig fyrir manninn. Líkon fyrir sambýlislífverur eru ekki komin fram á sjónarsviðið og því er nauðsynlegt að útbúa slíkt líkan. Þ.e.a.s líkan sem lýsir sambýlislífverum eða í þessu tilfelli fléttum. Þetta líkan er hugsað sem grunnur eða leiðarljós fyrir frekar vinnu í þessum fræðum og fyrir áframhaldandi þekkingaröflun á þessu sviði.

Kassi 1. Contig

Contig er skilgreint sem samansafn af raðgreindum DNA bútum sem skarast og mynda eina samfelda heild. Notast er við „Bottom-up“ aðferð til að raða þessum bútum í rétta röð. Þ.e DNA er bútað niður í litla búta (300-1000 núkleótíð), raðgreint, raðað saman í contig og að lokum í allt erfðamengi viðkomandi lífveru. Eftir raðgreiningu er sköruðu bútonum raðað saman með þar til gerðum tölvuforritum (Gregory 2005).

Kassi 2. KEGG gagnagrunnurinn

Eins og tekið var fram hér áður var aðallega notast við gögn úr Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes eða KEGG gagnagrunninum. Þetta er gagnagrunnur sem er opin öllum (e. open access). Gagnagrunnurinn samþættar gögn um erfðafni, erfðamengi, efnaskipti og kerfislíffræðilegar upplýsingar og þá sérstaklega upplýsingar um gen frá vel raðgreindum og glósuðum (e. annotated) erfðamengjum sem og nokkrum sérvöldum ókláruðum erfðamengjum. Þessar upplýsingar eru því næst tengdar við vel skilgreind efnaskiptaferli, sem gerir vísindamönnum kleyft að bera saman erfðaupplýsingar mismundi tilraunalífvera. Einnig er hægt að fá nánari upplýsingar um hvert gen, mRNA og ensím eða prótein úr þessum gagnagrunni. Allt er þetta tengt saman í efnaskiptaferla sem gerir vísindamönnum auðveldara fyrir. Mikið hefur verið lagt upp úr því að geta borið saman tegundir og notast er KEGG samsvörunar kerfið (e. KEGG orthology system). Þessi gagnagrunnur er uppfærður daglega og þar af leiðandi er hann býsna áreiðanlegur. KEGG gagnagrunnurinn er mikið tilvitnaður af rannsakendum vegna þess hve yfirgripsmikill hann er. Til að auka notagildi KEGG stefna stjórnendur á að bæta við hagnýtum forritum tengdum sjúkdómum í mönnum, lyfjum og öðrum heilsutengdum eignum. Notast var við umritunargagnagrunn (e. Transcriptome database) KEGG. Hægt er að fylgja þessari slóð : http://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?query=00500&htext=br08901.keg&option=-a til að skoða ferla og leita að upplýsingum (Ogata et al. 1999; Kanehisa et al. 2014).

4.1.1 Niðurstöður ferla

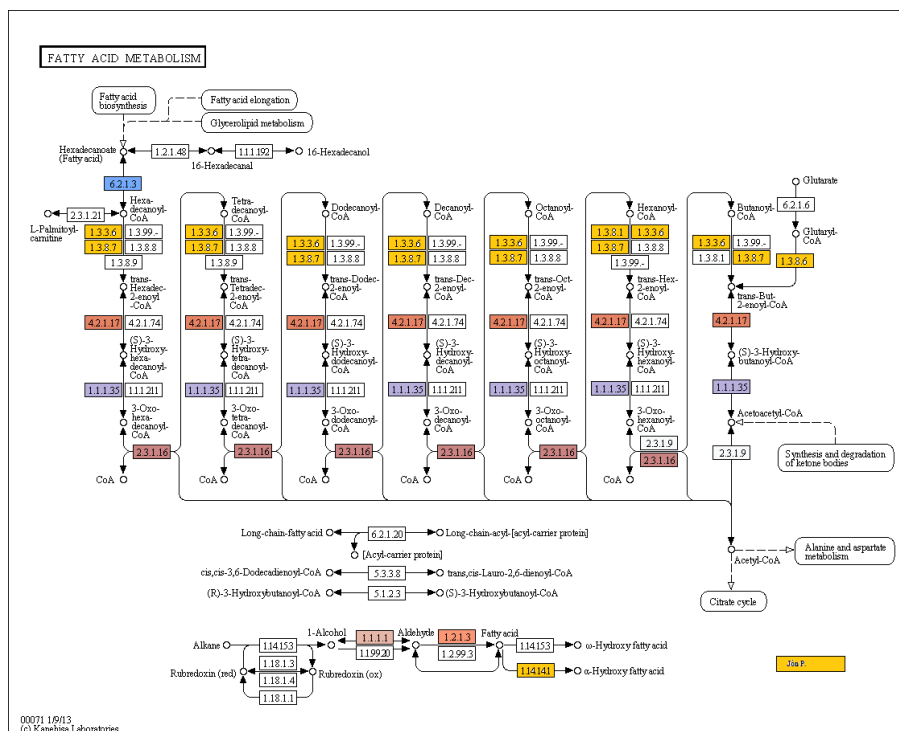
Eftir að farið var yfir 104 ferla, þar af um 40 ferla sem mjög lítið eða ekkert fannst um, sigtað út hvaða ferlar eiga við og hvaða ferlar ekki, hefur tekist að stoppa í mörg göt. Um 600 ný prótín hafa fundist, þó með misgóðri samsvörun. (sjá töflu 1.) Reynt var að hafa samlíkingu 60% eða meiri, þó oft hafi hún verið mun meiri sem og stundum lægri. Margir ferlar hafa

verið kláraðir, þó svo að ekki hafi tekist að fylla upp í nokkra. Auðvelt var að stoppa í ferla sem koma að grunnstarfsemi lífvera. Þ.e.a.s ferlar á borð við sítrónsýruhringur (e. Citric acid cycle), úrea hringinn (e. Urea cycle) og glýkólísuna (e. Glycolysis). Aftur voru ferlar sem snúa meira sérhæft að fléttunni, meira mál. Þ.e.a.s ferlar eins og efnaferill niturs (e. Nitrogen metabolism)

Hægt er að sjá í töflu 1, sem og nánar í excel skjali, hvaða ferlar og hvaða ensím innan þeirra fundust í þessu verkefni.

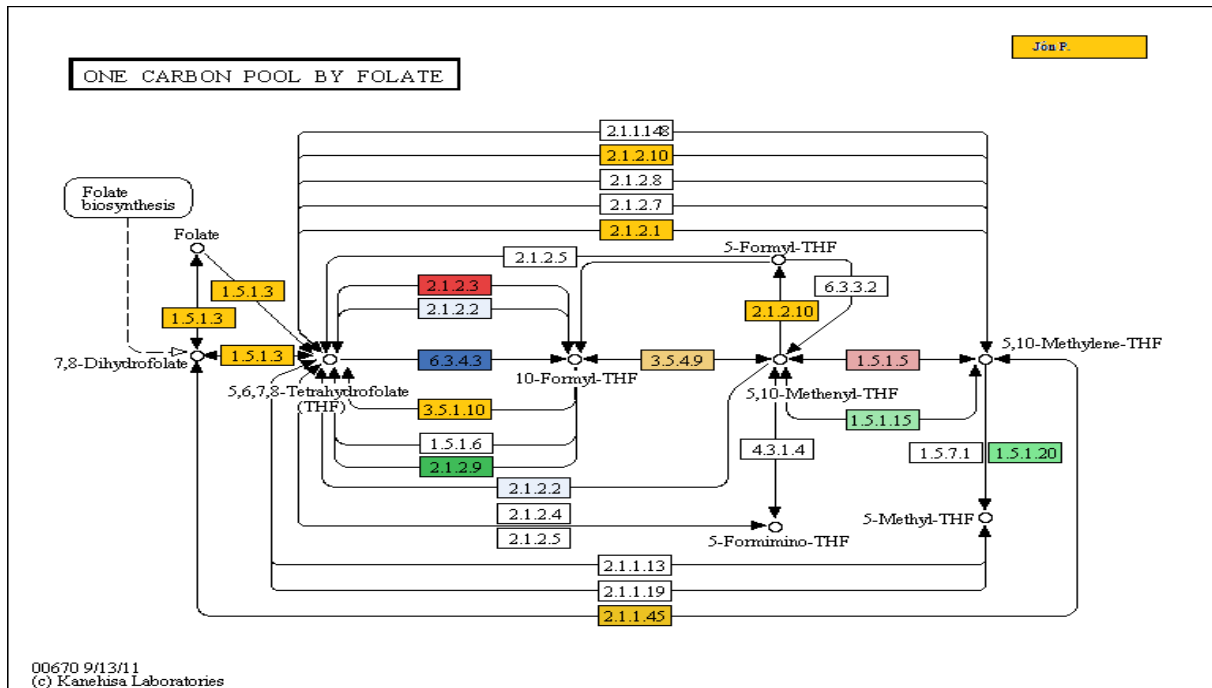
4.1.2 Dæmi um ferla sem náðist að klára

Sem dæmi um ferla sem tókst að „klára“ er fitusýru efnaskipti (e. Fatty acid metabolism) sjá mynd 1.1. Tókst að finna ensím sem vantaði, acyl-CoA oxidase (EC.n. 1.3.3.6, lína 495 í excel skjali), þetta ensím breytir t.d hexadecanoyl-CoA í trans-hexadec-2-enoyl-CoA. Þetta ensím var í raun það eina sem vantaði í ferlið svo það gengi upp.



Mynd 1. Fitusýru efnaskiptaferillinn(e.Fatty acid metabolism) Lituð EC númer standa fyrir fundnum ensímum. Appelsínugult eru ensím sem fundin voru í þessu verkefni. Aðrir litir standa fyrir ensím sem fundin voru í Blast2Go í yfirferð leiðbeinanda. Mismundi litir standa fyrir mismunandi tegundum ensíma.

Annað dæmi er eins kolefnis myndun úr folati (e. one carbon pool by folate) sjá mynd 1.2. Þar er aftur aðallega eitt ensím sem vantar eða dhýdrofólat redúktasi (e.dihydrofolate reductase) EC.n. 1.5.1.3, lína 518 í excel skjali). Þetta ensím breytir 7,8-Dihýdrófólati í 5,6,7,8-Tetrahýdrófólat.

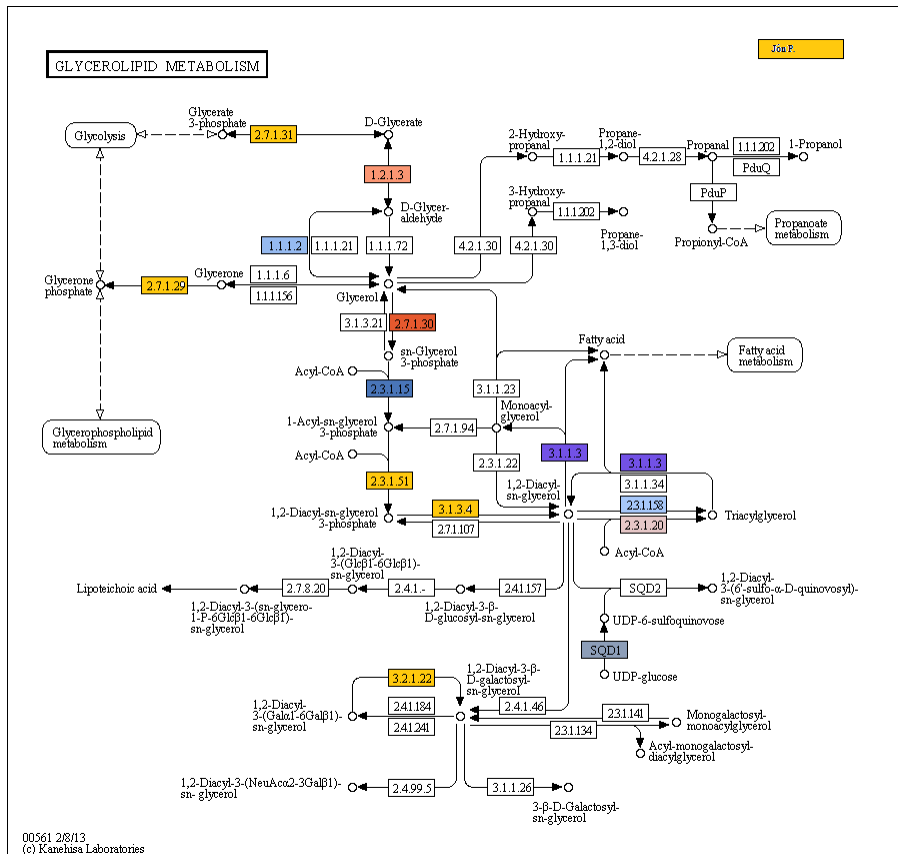


Mynd 2. Ein kolefnis myndun úr folati (e. one carbon pool by folate). Lituð EC númer standa fyrir fundnum ensímum. **Appelsínugult** eru ensím sem fundin voru í þessu verkefni. **Aðrir litir** standa fyrir ensím sem fundin voru í Blast2Go í yfirferð leiðbeinanda. **Mismundi litir** standa fyrir mismunandi tegundum ensíma.

4.1.3 Hvað vantar?

Það er heilmikið sem vantar, til að mynda eru ferlar sem lítið sem ekkert fannst um t.d fenýlalanín efnaskiptaferillinn (e. phenylalanine metabolism) þar fannst eitthvað en mjög mikið vantar til að mynda einhverja tengingu. Svo má vel vera að það sem fannst sé það eina sem lífveran þarf á að halda, þ.e mögulegt er að lífveran nýti aðeins hluta ýmissa ferla. Lífveran getur verið í þannig umhverfi að efni sem venjulega væru búin til með efnaskiptum komi að utan, eða frá annari lífveru og þarf þessi tiltekna lífvera ekki að framleiða þetta efni sjálf. Þar af leiðandi eru þessi/r ferlar ekki virkir.

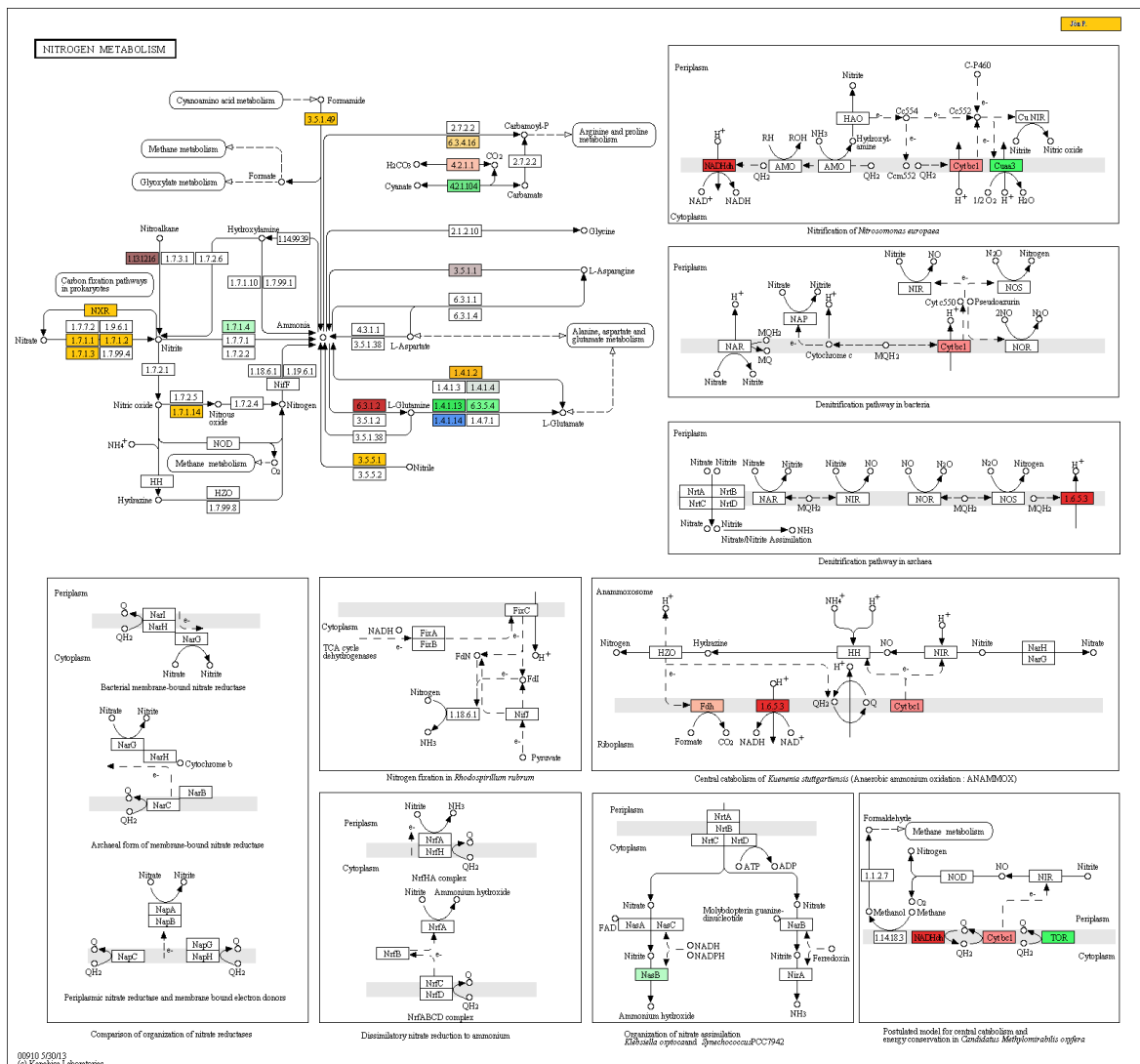
Svo eru það dæmi um ferla sem eru hálfkláraðir þ.e ferlar þar sem nokkur ensím fundust og hægt er að tengja eitthvað saman. Glýserólípíð efnaskiptaferillinn (e. glycerolipid metabolism) er dæmi um þetta, sjá mynd 1.3. Þar fundust 5 ensím, umfram þau sem fyrir voru, sem gerir það að verkum að einhver tenging næst t.d úr glýkólýsu yfir í fitusýru efnaskiptaferil.



Mynd 3 Glýserólípíð efnaskiptaferillinn (e. Glycerolipid metabolism) Lítuð EC númer standa fyrir fundnum ensínum. **Appelsínugult** eru ensím sem fundin voru í þessu verkefni. Aðrir litir standa fyrir ensím sem fundin voru í Blast2Go í yfirferð leiðbeinanda. Mismundi litir standa fyrir mismunandi tegundum ensíma.

Kassi 3. TBLASTN

Líkt og nefnt var hér að ofan var notast við BLAST forritið til að skilgreina gögnin úr raðgreiningar ferlinu. En BLAST er forrit eða algóriðmi sem notaður er til að bera saman erfðaupplýsingar lífvera og athuga hvað lífverur eiga sameiginlegt. Nánar til tekið var notast við afbrigðið TBLASTN sem er 6-ramma prótein núkleótíð þýðing. Það er að segja forritið ber saman prótein fyrirspurn (e. query) við gagnagrunn allra sex les ramma núkleótíð raðar. Þetta gerir okkur kleyft að komast fram hjá þögglum stökkbreytingum og í raun bera bara saman virk form próteina. Sem er auðvitað það sem er viðhaldið í lífverum (Program & Guide 2008; Gertz et al. 2006)



Mynd 4. Efnaferrill niturs (e. Nitrogen metabolism) Lituð EC númer standa fyrir fundnum ensínum. Appelsínugult eru ensím sem fundin voru í þessu verkefni. Aðrir litir standa fyrir ensím sem fundin voru í Blast2Go í yfirferð leiðbeinanda. Mismundi litir standa fyrir mismunandi tegundum ensíma.

4.1.4 Nitur efnaskipti

Nitur efnaskipti (e. nitrogen metabolism) (sjá mynd 4) voru sérstaklega skoðuð í þessu verkefni, með það til hliðsjónar að ljóstíllifandi lífvera fléttunnar bindur nitur úr andrúmslofti og nýtir til efnaskipta, sem og seytir til svepps sem getur þar af leiðandi nýtt sér þessa næringu líka. Alls voru fundin 6 ensím sem, að öllum líkindum, koma sterklega til greina í þessu ferli. En þetta eru ensím sem koma að innflutningi á nitrati og efnaskiptum þess yfir í nitrít sem áfram er breytt í ammóníak sem fléttan getur nýtt í efnaskipti, t.d. við nýmyndun amínósýra og niturbasa. Eins og sjá má á mynd 4. eru þetta ensímin EC: 1.7.1.1, 1.7.1.2, 1.7.1.3 o.fl. Sem koma beint að við innflutning og hvörf niturs yfir í ammóníak.

4.1.5 Hugsanlega ofaukið

Hugsanlega er einhverju ofaukið. t.d. vegna oftúlkunar á niðurstöðum úr TBLASTN. Einnig ef skoðað er excel skjalið má sjá að notast var við fjarskyldar tegundir í sumum tilfellum til að reyna að tengja saman í ferlum þar sem lítið sem ekkert fannst í sveppum. Taka skal öllum slíkum niðurstöðum með varúð. Allar slíkar niðurstöður hafa verið merktar sérstaklega með litum í excel skjalinu. Reynt var að forðast notkun á fjarskyldum tegundum eftir bestu getu og aðallega notast við *Aspergillus nidulans* og ef ekkert fannst þar var reynt að nota aðra *Aspergillus* tegundir svo sem *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.clavatus*, *A.flavus*, *A.oryzae* og *A.kawachii*. Einnig vour aðrar sveppa tegundir athugaðar þegar lítið fannst og eða til að athuga hvort betri samsvörun væri til staðar t.d *Sordaria* og *Neurospora*. Benda skal á að *A.nidulans* gaf yfirleitt lang bestu samsvörunina.

5 Samantekt og umræður

Eins og áður sagði voru 104 ferlar skoðaðir, þar sem um 40 ferlar innihéldu eitt eða færri ný ensím. Um 600 ný ensím fundust í samanburðinum. Hægt var að tengja mikið af ferlum saman og klára efnaskiptaferla sem standa einir. Mikil áhersla var lögð á nitur efnaskiptaferilinn vegna þess að hann kemur að efnaskiptum sem eiga sér væntanlega stað milli lífveranna í þessu sambýli. Mikilvægustu ensímin voru sennilega þau sem koma að innflutningi nitrats og efnaskiptum þess yfir í nítrít og svo ammóníak (Paulsrud 2001; Fahselt 1994). (sjá 3.4 Nitur efnaskipti)

Enn vantar inn í marga ferla. Athyglisvert væri að sjá hversu mörg prótein fyndust ef verkefnið væri endurtekið eða uppfært eftir um það bil ár. Því eins og nefnt var í kassa 2. Þá er KEGG gagnagrunnurinn í stöðugri uppfærslu. Þar sem tilraunir og samanburðar verkefni eru væntanlega í gangi víðsvegar um heiminn. Jafnvel í þessum töluðu orðum.

Í framhaldi af þessu verkefni væri einnig hægt að skilgreina erfða- og umritunarmengi blágrænubakteríunnar og búa til samstillt og gagnvirkt efnaskipta módel. Þar gæti mögulega komið fram hvaða leiðir eru farnar í samkiptum á milli lífveranna. Slíkt módel væri frábær viðbót við þekkingargrunn tengt sambýli og myndi jafnvel nýtast við skoðun og samanburð annarra sambýla. T.d manns og bakteríuflóru í görnum.

Heimildir

- Altschul, S. F. (2005). BLAST Algorithm. In *Encyclopedia of Life Sciences*.
doi:10.1038/npg.els.0005253
- Edwards, D.P., 2011. The Symbiotic Habit. *Animal Behaviour*, 81, pp.357–358.
- Fahselt, D., 1994. Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis*, 16, pp.117–165. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4121489>.
- Gertz, E.M. et al., 2006. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. *BMC biology*, 4, p.41.
- Gregory, S.G., 2005. Contig Assembly. *Encyclopedia of Life Sciences*, pp.1–4.
- Kanehisa, M. et al., 2014. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic acids research*, 42, pp.D199–205. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24214961>.
- Martin, B.D. & Schwab, E., 2012a. Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *International Journal of Biology*, 5(1), pp.32–45. Available at: <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/ijb/article/view/21139> [Accessed March 26, 2014].
- Martin, B.D. & Schwab, E., 2012b. Symbiosis : “ Living Together ” in Chaos.
- O’Brien, H.E., Miadlikowska, J. & Lutzoni, F., 2005. Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. *European Journal of Phycology*, 40, pp.363–378. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670260500342647>.
- Ogata, H. et al., 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic acids research*, 27, pp.29–34.
- Paulsrud, P., 2001. *The Nostoc Symbiont of Lichens*.
- Program, B. & Guide, S., 2008. BLAST Basic Local Alignment Search Tool. *Distribution*, 215, pp.1–20. Available at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Stenroos, S. et al., 2006. High selectivity in symbiotic associations of lichenized ascomycetes and cyanobacteria. *Plant biology*, 22, pp.230–238.
- Yuan, X., Xiao, S. & Taylor, T.N., 2005. Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science (New York, N.Y.)*, 308, pp.1017–1020.