

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Evoluce genomu bakteriálních symbiontů
vši *Polyplax serrata***

Diplomová práce

Bc. Jana Říhová

Školitel: Prof. RNDr. Václav Hypša, CSc.
Konzultantka: RNDr. Eva Nováková, Ph.D.

České Budějovice 2017

Říhová, J., 2017: Evoluce genomu bakteriálních symbiontů vši *Polyplax serrata* (Phthiraptera, Anoplura). [Genome evolution of bacterial symbionts in the louse *Polyplax serrata* (Phthiraptera, Anoplura), Msc. Thesis, in Czech] – 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: Blood-sucking louse *Polyplax serrata* harbor two phylogenetically distinct symbiotic bacteria from the orders Legionellales (Gammaproteobacteria) and Neisseriales (Betaproteobacteria). Based on rigorous phylogenetic analyses, the first bacteria was confirmed as member of genus *Legionella*, and the name *Candidatus Legionella polyplacis*, sp. n. was proposed. Vertical transgenerational transmission was proved by visualisation of the symbiont in host tissues. Improved genome of latter symbiont is considerably larger and possesses more metabolic functions. In the genome, I found horizontally transferred operon, which encode synthesis of enzymes involved in urea cleavage.

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 úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou 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, 13. prosince 2017

Jana Říhová

Poděkování

Především bych ráda poděkovala svému školiteli Václavu Hypšovi za cenné rady, vstřícnost a pomoc při psaní této diplomové práce a publikace. Dále bych chtěla poděkovat Evě Novákové za pomoc při přípravě metody FISH a za spolupráci při psaní publikace. Děkuji také Haně Sehadové za pomoc při úpravě snímků z konfokálního mikroskopu. Zároveň děkuji i všem členům naší laboratoře, především Janě Martinů za poskytnuté vzorky DNA, Anně Mácové za pomoc při sběru vší a Anetě Trefančové za morální podporu. Závěrem patří velký dík mému příteli a mojí rodině, kteří mě vždy podporují i v těch nejtěžších chvílích.

Tato práce byla finančně podpořena grantovými projekty GA ČR P505-12-1620 a SGA 2016.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE	5
3	MATERIÁL A METODIKA.....	6
3.1	L-symbiont: genomika a FISH	6
3.1.1	L-symbiont: genomika.....	6
3.1.2	L-symbiont: specifická detekce symbiontů	7
3.2	N-symbiont: screening a genomika	8
3.2.1	Screening bakterií	8
3.2.2	Vylepšení kvality genomické assembly	10
3.2.3	Rekonstrukce metabolických drah.....	11
3.2.4	Horizontální přenos genů a jejich fylogenetický původ.....	11
4	VÝSLEDKY	13
4.1	L-symbiont: genomika.....	13
4.2	L-symbiont: FISH	26
4.3	N-symbiont	28
4.3.1	Nalezení vhodných markerů.....	28
4.3.2	Vylepšení genomové assembly	28
4.3.3	Porovnání metabolických drah	28
4.3.4	Vyhledání horizontálně přenesených genů.....	29
5	DISKUZE	34
5.1	L-symbiont.....	34
5.1.1	Genomika	34
5.1.2	FISH	34
5.2	N-symbiont	35
5.2.1	Vhodné markery pro screening.....	35

5.2.2	Vylepšení genomové assembly	35
5.2.3	Metabolické dráhy	36
5.2.4	Horizontální přenos genů.....	37
6	ZÁVĚR	39
7	POUŽITÁ LITERATURA	40
8	PŘÍLOHY	47

1 ÚVOD

Symbióza mezi organismy je v přírodě častým jevem, který se významnou měrou podílí na mnoha evolučních a ekologických procesech. První záznamy o studiu symbiózy se datují do druhé poloviny 19. století, kdy v roce 1868 švédský botanik Simon Schwendener formuloval tzv. duální hypotézu vzniku lišejníků, podle které je lišejník organismus vytvořený kooperací houby a řasy (Schwendener, 1868). V následujících letech byla duální hypotéza prokázána a pro pojmenování tohoto vztahu byl roce 1877 poprvé použit termín „symbiotismus“ německým biologem Albertem Bernhardem Frankem. Definoval symbiózu jako koexistenci dvou druhů organismů, kde jeden žije uvnitř nebo na druhém, bez ohledu na povahu jejich vztahu (Frank, 1877). Později byla symbióza spojována se všemi typy asociací mezi organismy a podle druhu interakce byla rozdělena na mutualismus, komenzalismus a parazitismus (de Bary, 1879). Nicméně, hranice mezi těmito vztahy často nelze jasně určit. Typickým příkladem je střevní bakterie *Escherichia coli*, která je běžným komenzálem ve střevě teplokrevných živočichů, ale při příjmu této bakterie z vody či potravy kontaminované fekálním materiálem, může dojít k rozvoji střevních či mimostřevních infekcí (Manning, 2010; Tilden et al., 1996). V současné době se termín symbióza používá nejčastěji ve smyslu společného soužití různých druhů organismů bez ohledu na druh jejich interakce.

Výzkum symbiotických vztahů otevřel nový pohled na studium evoluce organismů. Například se ukázalo, že symbióza byla klíčovou událostí při vzniku eukaryotické buňky, která se vyvinula jako chiméra několika prokaryotických organismů (Gray and Doolittle, 1982; Margulius, 1970). Stabilní symbiotický vztah s prokaryoty se vyvinul mnohokrát nezávisle u odlišných skupin eukaryotických organismů. V roce 1965 se zoolog a buněčný biolog Paul Buchner zabýval studiem morfologie hmyzu a objevil obrovskou diverzitu mikroorganismů žijících v těle hmyzího hostitele. V průběhu svého výzkumu popsal mnoho zástupců hmyzu, kteří udržují mutualistické vztahy se symbiotickými bakteriemi (Buchner, 1965). Bakteriální endosymbiózy vznikaly opakovaně v průběhu evoluce a jsou zásadními faktory ekologické diverzifikace mnoha skupin. Všeobecně se uvádí, že potrava některých ekologických skupin hmyzu, např. fytofágního a hematofágního hmyzu, je chudá na určité složky, především aminokyseliny a vitamíny (Nogge, 1976; Baumann, 2005; Akman et al., 2002; Moran et al., 2008; Moya et al., 2008). Již v předmolekulární době byla prokázána závislost hematofágního hmyzu na doplňování vitamínů skupiny B, které jsou

nedostatečně obsažené v krvi obratlovců (Puchta, 1954; Puchta, 1955). Později se ukázalo, že právě symbiotické bakterie využívají vlastní metabolické dráhy k syntéze těchto esenciálních látek, které poskytují svému hostiteli (Nogge, 1976; Noge, 1981; Hosokowa et al., 2012; Nikoh et al., 2014).

Podle určitých charakteristických rysů rozdělujeme symbionty na obligátní (primární, P-) a fakultativní (sekundární, S-). P-symbionti jsou přenašeni vertikálně do další generace a mají obecně dlouhou koevoluční historii se svými hostiteli, který pro ně často vytváří specializované orgány, tzv. bakteriomy (Douglas, 1989). Dochází u nich zpravidla i k výrazné redukci genomu oproti genomům volně žijících příbuzných (McCutcheon and Moran, 2012). Tento proces se projevuje především nízkým obsahem C+G bazí, ztrátou genů a ekonomizací genomu (Akman et al., 2002). V kontrastu k těmto ztrátám mají některé geny symbionta klíčovou roli v biologii hostitelů, zpravidla spojenou s biosyntézou látek chybějících v potravě hostitele. Funkční závislost vede k mnoha zajímavým molekulárním jevům jako je komplementarita metabolických drah hostitele a symbionta, nebo získávání významných genů prostřednictvím horizontálního přenosu genů (HGT). Příkladem může být vznik nutriční specializace bakterie rodu *Wolbachia* u štěnice *Cimex lectularius* po získání biotinového operonu (Nikoh et al., 2014).

Naopak fakultativní S-symbionti si ponechávají schopnost horizontálního šíření a často proto dochází k přenosům na nepříbuzné hostitele (Hypša and Dale, 1997; Dale and Maudlin, 1999; Dale et al., 2006; Darby et al., 2005; Moran et al., 2008). Tito symbionti mohou přinášet výhody pro hostitele, např. *Hamiltonella defensa* chrání mšici *Acyrtosiphon pisum* proti parazitoidním vosám, nebo mohou být reprodukčními manipulátory jako v případě bakterie *Wolbachia*, která touto strategií snižuje fitness hostitele (Yen and Barr, 1971; Breeuwer and Jacobs, 1996; Stouthamer et al., 1999; Werren et al., 2008). V některých případech se může S-symbiont stát P-symbiontem, který buď nahradí původního P-symbionta, nebo s ním vytvoří mikrobiální společenství, kde si symbionti mohou předávat některé metabolity a společně tak vytvářet esenciální látky pro svého hostitele (Koga et al., 2013; McCutcheon and von Dohlen, 2011; Husník et al., 2013). V současné době se významným pokrokem v oblasti studia symbiontů *in-vivo* staly metody založené na *in-situ* hybridizaci fluorescenčně značených sond (FISH), které poskytují nejen informaci o umístění symbiontů v hostiteli, ale zároveň i specifickou detekci konkrétního druhu bakterie v mikrobiomu (Moter and Göbel, 2000).

Symbiotické bakterie u podřádu Anoplura (krevsajících vší) objevili již v roce 1919 biologové Buchner a Sikora (Sikora, 1919; Buchner, 1919). Podrobná ultrastruktura bakteriomů byla později popsána na tkáňových řezech několika skupin vší (Ries, 1931). Brzy poté se tato skupina hmyzu stala jednou z nejzajímavějších v oblasti studia symbiocy (Puchta, 1954; Puchta, 1955; Kotter, 1955; Bewig and Schwartz, 1956). Ukázalo se, že bakteriomy jsou složeny z jednotlivých buněk, tzv. bakteriocytů, kde symbionti žijí v cytosolu těchto specializovaných buněk. V rámci podřádu Anoplura mají bakteriomy velmi variabilní struktury a vytvářejí se v různých částech těla hostitele. Nejjednodušší známé uspořádání můžeme najít u vší rodu *Haematopinus*, kde jsou symbionti umístěni v bakteriocytech obklopených epitelialními buňkami středního střeva kromě provetricula, specificky pouze pro tento druh. Nejčastěji jsou však symbionti vší umístěni v nepárových oválných či kulatých bakteriomech, tzv. břišních discích (uložených na ventrální straně středního střeva), jako např. u lidské vší *Pediculus humanus* (Buchner, 1965).

V případě rodu *Polyplax* byl popsán detailní vývoj symbiotických struktur ve všech stádiích životního cyklu vší (vajíčko → 3 larvální instary → dospělec) pro druh *P. spinulosa*. Bylo zjištěno, že vývoj symbiontů, bakteriocytů i bakteriomů je závislý na pohlaví hostitele. V prvním instaru u samic jsou bakteriomy situované na ventrální straně středního střeva a obklopuje je bazální membrána zárodečných buněk vejcovodů. S vývojem vejcovodů dochází k inkorporaci bakteriomů k vejcovodům. Zde je bakteriom rozdělen na jednotlivé bakteriocyty. Následně se membrány bakteriocytů rozpouštějí a symbionti jsou uvolněni do cytoplazmy syncytia epitelialních buněk rozšířených částí vejcovodů, tzv. ovariálních ampulí. U dospělých samic se symbionti šíří směrem k oocytu a penetrují do jeho stigma a stopky. Symbionti jsou pak uloženi ve ztenčeném objemu na posteriorním konci oocytu a od žlutkových vaků jsou odděleni žlutkovou membránou. U samců jsou bakteriomy umístěny mezi bazální membránou a epitelem středního střeva. S vývojem nymf se bazální membrána spojuje s epitelialními buňkami pomocí sept, které procházejí mezi bakteriocyty. U dospělých samců poté dochází k rozšiřování sept a následně spojení bakteriomů se stěnou středního střeva. Ultrastruktura larválních bakteriomů je u obou pohlaví podobná, nicméně buňky samotných symbiontů bývají větší u samců (shrnutí článku Volf, 1991).

Po nástupu molekulárních metod a jejich využití pro studium fylogeneze bylo zjištěno, že většina dosud známých symbiontů hmyzu pochází z několika „hot spots“ v rámci systému bakterií, kde se do monofyletických skupin koncentrují symbionti z různých

hostitelů (např. Enterobacteriaceae, Gammaproteobacteria). Poměrně výjimečné fylogenetické postavení má bakteriální symbiont vší rodu *Polyplax*, který spadá do čeledi Legionellaceae (dále L-symbiont; Gammaproteobacteria), blíže k rodu *Legionella* (Hypša and Křížek, 2007), a tvoří tak izolovanou symbiotickou linii v blízkosti známých patogenů. Později se v naší laboratoři podařilo prokázat za pomoci genomických dat, že vzorky ze vší *Polyplax serrata* obsahují další bakterii symbiotické povahy, s předběžným fylogenetickým zařazením do příbuznosti neisserií (dále N-symbiont; Betaproteobacteria).

V této diplomové práci navazuji na svojí bakalářskou práci (Říhová, 2015), která byla věnována základní genomické charakterizaci těchto bakterií. V průběhu bakalářské práce jsem provedla screening několika populací vší rodu *Polyplax* z různých lokalit a upřesnila fylogenetické postavení endosymbiontů na základě genu pro 16S rRNA: monofyletické skupiny tvořené vzorky z různých lokalit ukazují, že se nejedná o lokální kontaminace, ale dlouhodobě předávané symbionty. Oproti L-symbiontovi, jehož nejbližším příbuzným je rod *Legionella*, N-symbiont je pouze vzdáleně příbuzný rodu *Neisseria* (klastruje se do blízkosti rodu *Snodgrassella*, střevních symbiontů včel a čmeláků).

Dále jsem složila genomy obou bakterií do podoby kontigů a skafoldů a z těchto dat jsem odvodila základní genomické charakteristiky, které potvrdily jejich endosymbiotický charakter. Sekvenčně pozměněné duplikáty jak genů, tak celých kontigů v genomu L-symbionta naznačovaly výskyt 2 linií těchto symbiontů. Při průzkumu genomu L-symbionta na možný HGT byl objeven operon kódující biosyntézu biotinu, příbuzný k operonu z *Wolbachie* popsané u štěnice *Cimex lectularius* (Nikoh et al., 2014). Zároveň byly pro další porovnání zrekonstruovány biosyntetické dráhy biotinu u obou bakterií. V poslední fázi jsem provedla přípravu metody FISH na vzorcích vší *Polyplax serrata* s využitím eubakteriálních fluorescenčních sond. Z těchto výsledků vycházelo zadání mé magisterské práce s následujícími cíli.

2 CÍLE

1. Podrobné zpracování genomické informace L-symbionta

- S využitím pokročilých bioinformatických metod uzavřít genom do kruhové molekuly a určit jeho podrobné charakteristiky
- Určit přesnou fylogenetickou pozici endosymbionta v rámci řádu Legionellales
- Sestavit fylogenetické rekonstrukce pro horizontálně přenesené geny
- Rekonstruovat metabolické dráhy biosyntézy esenciálních B-vitaminů

2. Vizualizace L-symbionta a jeho lokalizace uvnitř hostitele

- Navrhnout nové fluorescenční sondy specifické pro L-symbionta a zjistit jeho umístění v hostiteli (*in-vivo*)

3. Nalezení vhodných screeningových markerů a genomická charakterizace N-symbionta

- Nalézt vhodné diagnostické primery pro screening populací na přítomnost N-symbionta
- S využitím pokročilých bioinformatických metod vylepšit kvalitu sestavení genomu N-symbionta a určit jeho základní charakteristiky
- Zrekonstruovat metabolické dráhy N-symbionta a porovnat případnou komplementaritu drah s L-symbiontem
- Prohledat genom N-symbionta na případný horizontální přenos genů a určit jejich fylogenetický původ

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 L-symbiont: genomika a FISH

3.1.1 L-symbiont: genomika

Přehled materiálu a metodiky vztahující se k této sekci je součástí publikace. Zde uvádím pouze stručné shrnutí jednotlivých metodických kroků, které jsem dělala osobně nebo jsem se na nich podílela:

- Vytvoření primární assembly pair-end reads („readů“) z celogenomových dat
- Určení fylogenetické příslušnosti všech kontigů – 112 kontigů přiřazeno do řádu Legionellales
- Extrakce těchto 112 kontigů – referenční kontigy
- Mapování „readů“ z původních dat na referenční kontigy
- Extrakce namapovaných readů
- Vytvoření sekundární assembly namapovaných „readů“ – kompletní kruhový genom L-symbionta
- Anotace genomu a uložení do databáze GenBank
- Charakterizace genomu – základní (velikost, počet genů, atd.) a podrobná (transmembránové proteiny, signální peptidy, CRISP repetice, GC skew)
- Porovnání základních charakteristik genomu
- Vyhledání ortologních sekvencí
- Tvorba alignmentů a výběr modelu pro fylogenetické analýzy
- Zjištění fylogenetického zařazení L-symbionta – analýzy multigenové matice sestavené na základě 64 proteinových sekvencí (v rámci řádu Legionellales)
 - zařazení L-symbionta do rodu *Legionella* (Legionellaceae) – ML a Bayesiánské analýzy (každý gen zvlášť a konkatenovaná matice)
 - pojmenování: *Candidatus Legionella polyplacis*, sp. nov.
- Screening genomu na potenciální horizontální přenos genů – biotinový operon (6 genů)
- Tvorba alignmentů a výběr modelu pro fylogenetické analýzy
- Zjištění fylogenetického původu genů biotinového operonu – ML a Bayesiánské analýzy (každý gen zvlášť a konkatenovaná matice)
- Rekonstrukce metabolických drah a jejich porovnání – B-vitamíny

3.1.2 L-symbiont: specifická detekce symbiontů

Pro detekci obligátního L-symbionta *in-vivo* jsem použila 6 jedinců vší *Polyplax serrata* sebraných v oblasti Litvínova. Při přípravě vzorků jsem postupovala dle protokolu metody FISH, uvedeném v mojí bakalářské práci (Říhová, 2015; viz. Materiál a metodika – viz. kapitola 3.3). Pro vyzkoušení vhodné fixace vzorků jsem 4 vzorky fixovala v acetonu a 2 vzorky ve 4% paraformaldehydu. Zde uvádím pouze stručné shrnutí jednotlivých metodických kroků:

- porušení tkáně a její fixace – aceton, 4% paraformaldehyd
- dehydratace a odbarvení – 6% peroxid vodíku v ethanolu
- rehydratace – ethanolová řada (100%, 95%, 80%, 70%)
- omytí vzorku v hybridizačním pufru
- prehybridizace – vzorek s hybridizačním pufrům
- hybridizace – vzorek v hybridizačním pufru s fluorescenčními sondami
- omytí vzorku v hybridizačním pufru
- umístění na sklíčko spolu s ukotvovacím médiem (Vectashield obsahující DAPI)

Pro tuto analýzu byly použity nově navržené fluorescenčně značené oligonukleotidy komplementární k úseku 16S rRNA L-symbionta spolu s nespecifickou eubakteriální sondou zachycující všechny přítomné eubakterie (Tab. I). Preparát byl prohlížen pomocí konfokálního mikroskopu (Olympus FV1000), kde byl naskenován v několika rovinách a následně složen do jedné fotografie v programu Imaris v. 9.0 (<http://www.bitplane.com>). V tomto programu byl také vytvořen videozáznam agregací symbiontů v několika vrstvách (viz. CD příloha). Výsledné fotografie byly upraveny v programech Adobe Photoshop CC a Adobe Illustrator CC (<http://www.adobe.com>).

Tab. I: Tabulka použitých fluorescenčních sond pro FISH metodu

Označení	Sekvence (5' - 3')	Fluorofor	Gen (Zdroj)
Leg451	TATATTCATCTTCCTTACCA	Flc	16S rRNA (de-novo)
Leg717	CTGATGTTCCCTCCGATA	Flc	16S rRNA (de-novo)
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGA	Cy3	16S rRNA (Amann et al., 1990)

3.2 N-symbiont: screening a genomika

3.2.1 Screening bakterií

Všichni *Polyplax serrata* v počtu 13 jedinců byly sebrány z myšic rodu *Apodemus* a uloženy do 96% ethanolu. Celková DNA (prokaryotní i eukaryotní) byla vyizolována dle standardního protokolu izolačního kitu (QIAamp DNA Micro Kit, QIAGEN). Koncentrace DNA byla změřena na nanofotometru (NanoPhotometer P-Class, IMPLEN) a její kvalita byla ověřena elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Pro výběr vzorků použitých k nalezení vhodných markerů byly využity výsledky amplikonového sekvenování (Žižková, 2017), které odhalily populace s výskytem N-symbionta v okolí Karlových Varů (Stružná). Z této populace bylo vybráno 6 pozitivních vzorků (Tab. II), které byly přidány ke screeningové analýze. Dále byly všechny vzorky zpracovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Reakce probíhala v celkovém objemu 25 μ l. Pro screening N-symbionta byl použit set primerů, kde byly dvě dvojice (Neis 16S F2/R2, Neis 16S F3/R3) navrženy pro řád Neisseriales v různých úsecích genu pro 16S rRNA, dále jedna dvojice (Neis GroEL F2/R2) pro gen kódující chaperonin GroEL řádu Neisseriales. Poslední set primerů (JRF 50/JRR) byl specificky navržen pro screening genu 16S rRNA N-symbionta (Tab. III). Pouze pár primerů Neis 16S F3/R3 dokázal zachytit přítomnost N-symbionta ve vzorku a při gradientové PCR byla teplota jejich nasedání stanovena na 50°C. Program PCR reakce byl nastaven podle postupu uvedeném v bakalářské práci (Říhová, 2015; viz. kapitola 3.2.2). Pro další zpracování PCR produktů byla použita gelová elektroforéza na 1% agarózovém gelu. Smíchány byly 2 μ l PCR produktu s poměrným množstvím loading dye a fluorescenčním barvivem SYBR Green. Pro přibližné určení délky fragmentů byl použit 100kb DNA Ladder (O'GeneRuler 100kb, Thermo Scientific). DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí zařízení UVITEC.

Tab. II: Tabulka analyzovaných vzorků vší *Polyplax serrata*

Označení	Zdroj
Str11	nová izolace
Str12	nová izolace
Str13	nová izolace
Str15	nová izolace
Str20	nová izolace
Str21	nová izolace
Str36	nová izolace
Str39	nová izolace
Str46	nová izolace
Str72	nová izolace
Str16	nová izolace
Str22	nová izolace
Str79	nová izolace
Str4a	pozitivní izolát ve výsledcích amplikonové analýzy
Str7b	pozitivní izolát ve výsledcích amplikonové analýzy
Str15b	pozitivní izolát ve výsledcích amplikonové analýzy
Str20b	pozitivní izolát ve výsledcích amplikonové analýzy
Str20c	pozitivní izolát ve výsledcích amplikonové analýzy
Str21c	pozitivní izolát ve výsledcích amplikonové analýzy

Tab. III: Tabulka používaných markerů při PCR reakci

Označení	Sekvence (5'-3')	Gen
Neis 16S F2	CGAGTAATGGGGGATAAC	16S rRNA (Neisseriales)
Neis 16S R2	CGGTGCTTATTCTTTAGGT	
Neis 16S F3	GAACGTGCCGAGTAATGG	16S rRNA (Neisseriales)
Neis 16S R3	AGCCGGTGCTTATTCTTT	
Neis GroEL F2	AGCTGAAAAACATCGCCAA	GroEL (Neisseriales)
Neis GroEL R2	TTCGGAAATCACTACGCC	
JRF 50	GAAAGCTTGCTTTCTTGTCG	16S rRNA (N-symbiont)
JRR	ACCCAGTCATGAAACATAC	

3.2.2 Vylepšení kvality genomické assembly

Pro účely genomového sekvenování bylo sebráno 25 jedinců vší *Polyplax serrata* z několika populací myšic *Apodemus flavicollis* v oblasti Německa. Tyto vzorky byly uchovány v absolutním ethanolu při -4 °C. Koncentrace DNA byla zjištěna pomocí Qubit High Sensitivity kit (Invitrogen) a na 1% agarózovém gelu. Dále byly vzorky odeslány na celogenomové sekvenování s využitím sekvenátoru na platformě Illumina HiSeq 2000 (GeneCore, Heidelberg; příprava vzorků – Jana Martinů a Filip Husník). Výsledná primární data ve formě „paired-end reads“ jsem zpracovávala ve své bakalářské práci (Říhová, 2015; viz. kapitola 3.2) a získala jsem 23 kontigů s fylogenetickou příslušností k řádu Neisseriales. Pro vylepšení původní assembly jsem tyto získané kontigy dále zpracovávala následujícím způsobem:

- 1) Namapování „readů“ ze vstupních primárních dat na kontigy
- 2) De-novo assembly namapovaných „readů“
- 3) Ověření kvality assembly
- 4) Anotace genů

ad 1) Namapování „readů“ ze vstupních primárních dat na kontigy

Pro mapování „readů“ na kontigy bylo využito programu BBTools s využitím nástroje BBmap, který umožňuje alignování krátkých „readů“ DNA a dokáže rozlišovat oblasti s početnými mutacemi a indely. Alignment získaných „readů“ byl zobrazen v programu Tablet 1.14.10.20 (Milne et al., 2013), kde byla ověřena jejich kvalita. Tento soubor s namapovanými „ready“ na kontigy ve formátu SAM (generovaný nástrojem SAMtools, Li et al., 2009) byl vizualizován v programu Geneious (<http://www.geneious.com>; Kearse et al., 2012), kde byly samotné namapované „ready“ extrahovány.

ad 2) De-novo assembly namapovaných readů

Po kvalitativní kontrole byl set „readů“ assemblován pomocí dvou alternativních assemblerů, SPAdes (Bankevich et al., 2012) a A5 assembly pipeline (Tritt et al., 2012). Výstupem z těchto dvou analýz byly sety kontigů a skafoldů reprezentující genom N-symbionta.

ad 3) Ověření kvality assembly

Kvalita assembly kontigů byla ověřena pomocí softwarového nástroje Pilon v1.20 (Walker et al., 2014), který se využívá k opravě assembly nekompletních genomů a vyhledává sekvenční varianty, včetně inzercí a delecí. Assembly z obou programů byla kvalitativně porovnána a pro další analýzy byl použit výstup pouze druhého assembleru. Genomové charakteristiky byly vygenerovány pomocí programů Geneious a RAST (Aziz et al, 2008).

ad 4) Anotace genů

Anotace kontigů byla provedena v programech RAST a PROKKA (Seemann, 2014), které jsou specificky navrženy na anotaci prokaryotických genomů. Výstupem z těchto programů je set kódujících sekvencí (genů) s jejich predikovanou funkcí v nukleotidové či proteinové formě.

3.2.3 Rekonstrukce metabolických drah

Set proteinových sekvencí byl dále zpracováván pomocí online serveru KEGG (Kanehisa et al., 2014). Nejprve byla ke každé proteinové sekvenci přidělena K čísla (interní anotace přidělující specifická čísla ortologním genům) v programu BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016) a následně byl výstupní soubor odeslán k mapování na předlohy metabolických drah (KEGG pathway maps) pomocí nástroje KEGG Mapper. Zde byla použita volba Reconstruct pathway pro zrekonstruování metabolických drah N-symbionta. Výsledky této analýzy byly použity ke komplexnímu porovnání biosyntetických drah vitamínů skupiny B mezi dvěma symbionty (informace o mapování metabolických drah L-symbionta obsaženy v publikaci). Nepřítomnost chybějících genů v biosyntetických drahách byla ověřena pomocí vyhledání příslušných proteinových sekvencí v genomech bakterií z řádu Neiseriales a následně využití vyhledávacího algoritmu BLASTP (proteinový blast; Gish and States, 1993) v proteinové databázi N-symbionta.

3.2.4 Horizontální přenos genů a jejich fylogenetický původ

Orientační taxonomická příslušnost jednotlivých proteinových sekvencí byla zjištěna pomocí programu PSI-BLAST (specifický proteinový blast; Atschul et al., 1997), který je více citlivý k zachycení i vzdálených evolučních vztahů mezi proteiny. Ke každé proteinové sekvenci bylo vyhledáno 40 nejpodobnějších sekvencí v nr (non-redundant)

databázi. Takto připravený seznam byl převeden do excelové tabulky a ručně prohledán na potenciální horizontální přenos genů.

V rámci tohoto screeningu byl nalezen operon složený ze 4 genů, ve kterém 2 geny kódují enzym amidolyázu a další dva geny kódují asociované enzymy (viz. Výsledky a diskuze), a pro který orientační BLASTP určil nejbližší homology mimo skupinu Neisseriales. Proteinové sekvence těchto genů byly vybrány z datasetu a převedeny do programu Geneious. Pomocí BLASTP search zde bylo pro každou sekvenci vyhledáno 200 nejpodobnějších. Tyto sekvence byly alignovány programem MAFFT Alignment (Kato and Standley, 2013) s využitím E-INS-i algoritmu. Pro orientační zjištění fylogenetické pozice proteinů byla použita analýza maximum-likelihood v programu FastTree (Price et al., 2009). Výsledný alignment byl vytvořen z vybraných sekvencí tak, aby poskytoval dostatečné fylogenetické pokrytí daného řádu bakterií. Dále byl alignment upravován pomocí programu GBLOCKS (Catresana, 2000) s nastavením volné selekce, které eliminuje nepřesně alignované pozice, případně i divergentní úseky. Fylogenetická příslušnost daných proteinů byla určena pomocí maximum-likelihood analýzy (PhyML; Guidon et al., 2010) a Bayesiánskou metodou výpočtu posteriorních pravděpodobností (Mr. Bayes; Ronquist and Huelsenbeck, 2003).

Automatický výběr vhodného modelu byl proveden v programu PhyML pomocí funkce SMS (Smart Model Selection; Lefort et al., 2017) založené na likelihood kritériích (AIC). Jako nejlepší model pro fylogenetické analýzy byl pro všechny datasety vybrán model LG+I+G s rovnoměrným rozložením variabilních pozic a aproximace gamma distribuce evolučních rychlostí pomocí 4 kategorií. PhyML analýzy byly spuštěny s nastavením rekonstrukce primárního stromu na základě distancí metodou BIONJ (Gascuel, 1997). Počet opakování analýz byl nastaven na hodnotu 10. Topologie stromů byly vyhledány metodou SPR (Subtree Pruning and Regrafting). Všechny ostatní parametry byly odhadnuty programem. Tyto analýzy byly provedeny na 100 bootstrapových replikátech. Stejný evoluční model (LG+I+G) byl použit pro analýzy v programu MrBayes. Analýza datasetů probíhala na 2 řetězcích po 10 milionů generací. Konvergence všech analýz byla zkontrolována v programu Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2014) a pomocí hodnot standard deviation split (<0.01) a PSRF (1.0). Burn-in byl nastaven dle výsledků analýzy na hodnotu 25%. Grafické zpracování fylogenetických stromů bylo upraveno ve dvou grafických editorech FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) a Adobe Illustrator 10 CE (<https://www.adobe.com>).

4 VÝSLEDKY

4.1 L-symbiont: genomika

Následující pasáž o rozsahu dvanácti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Říhová, J., Nováková, E., Husník, F., Hypša, V. (2017). *Legionella* becoming a mutualist: adaptive processes shaping the genome of symbiont in the louse *Polyplax serrata*. *Genome Biology and Evolution*, 9 (11), 2946–2957.

Legionella* Becoming a Mutualist: Adaptive Processes Shaping the Genome of Symbiont in the Louse *Polyplax serrata

Jana Říhová¹, Eva Nováková^{1,2}, Filip Husník¹, and Václav Hypša^{1,2,*}

Podíl autorů:

JŘ: ~50%

EN: ~20%

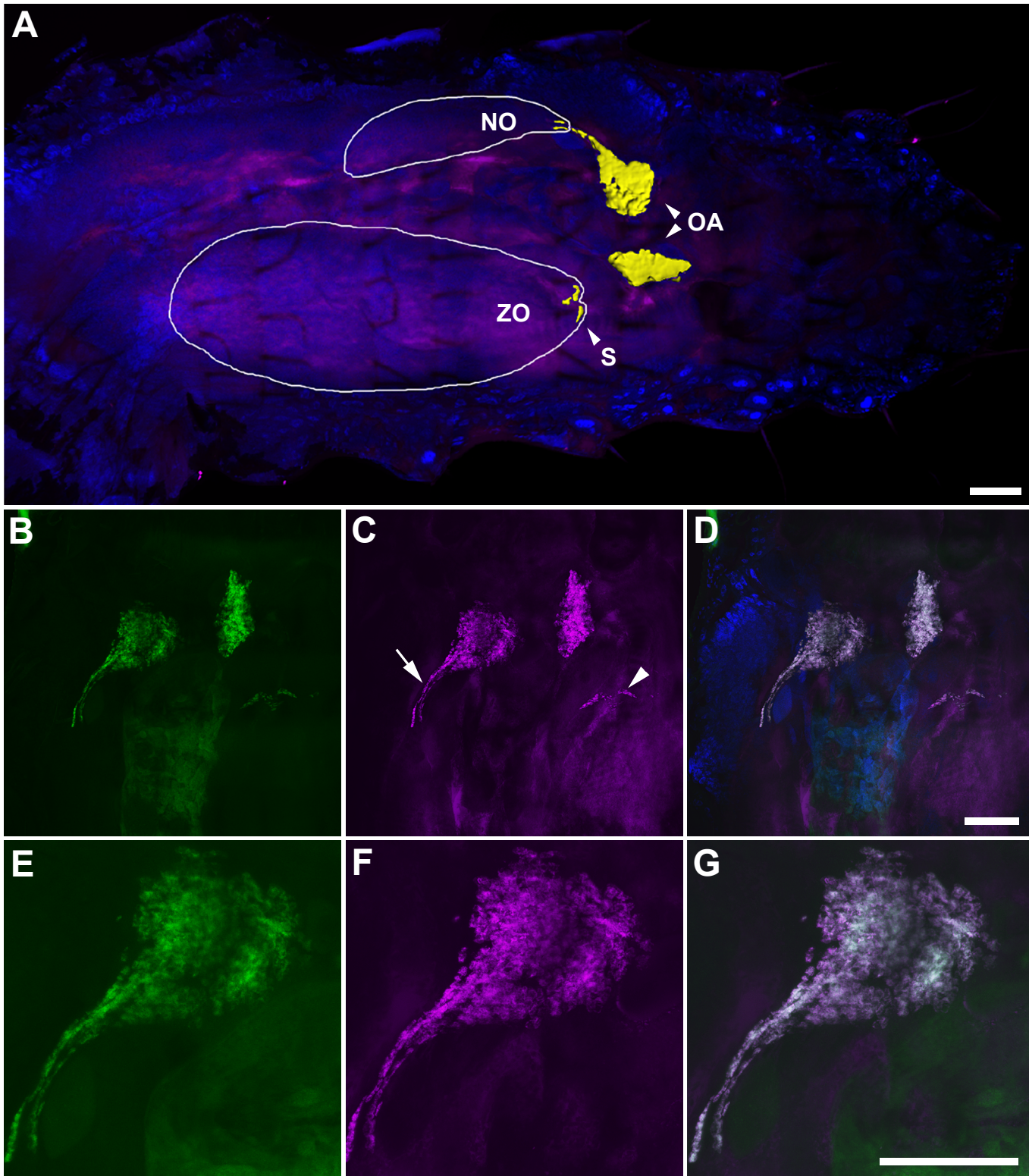
FH: ~5%

VH: ~25%

VH, EN a JŘ naplánovali studii. JŘ se podílela na genomové assembly, připravila porovnání genomických charakteristik a rozbor genomu, vytvořila alignmenty a z nich odvozené fylogenetické rekonstrukce, porovnála metabolické dráhy bakterií, vyhledala HGT a určila jejich fylogenetický původ, a podílela se na psaní manuskriptu. VH vytvořil kompletní genom bakterie, podílel se na rozboru metabolických drah, psaní manuskriptu a zkompletoval celou studii. EN připravila statistické analýzy a distanční porovnání COG kategorií. Podílela se na grafických úpravách a psaní manuskriptu. FH připravil gDNA a podal cenné rady v počátku assembly genomických dat.

4.2 L-symbiont: FISH

S využitím metody FISH se podařilo detekovat L-symbionty v tkáni jedinců vší *Polyplax serrata*. Pro vizualizaci symbiontů byly navrženy specifické sondy s navázaným fluorescenčním barvivem fluoresceinem (Flc), které hybridizují s 16S rRNA detekovaných L-symbiontů. Současně byly použity eubakteriální sondy s navázaným fluorenčním barvivem cyanin 5 (Cy5) pro případ zachycení dalších ko-symbiontů. Při prohlížení na konfokálním mikroskopu jsem u 3 preparátů nezaznamenala žádný bakteriální signál. Dva tyto negativní vzorky byly fixovány v paraformaldehydu a jeden v acetonu, nicméně fixáž pravděpodobně neprostoupila dostatečně do vnitřních tkání hostitele. U dalších tří vzorků byl zachycen eubakteriální i specifický signál, nicméně pouze u jednoho vzorku byly tyto signály dostatečně silné pro možnost zpracování dalšími analýzami. Podle morfologických znaků (koncová část abdomenu, nalezení vajíček v těle) jsem zjistila, že se jedná o dospělou samici. U této samice jsou symbionti umístěni v cytoplazmě syncytia epitelálních buněk ovarálních ampulí (Obr. 1A), odkud se šíří směrem k vajíčku (nezralý oocyt) a následně penetrují do stigma vajíčka, kde se shromažďují ve ztenčeném objemu (zralý oocyt). Tímto mechanismem se symbionti přenáší do další generace vší *Polyplax serrata*. Na obrázku 1 (Obr. 1) je vizualizovaná fáze postupného šíření symbiontů do nezralého oocyta a zároveň zde můžeme rozlišit již zformovaný agregát symbiontů u stigma zralého oocyta. Zvětšenou oblast a agregacemi symbiontů si lze také prohlédnout v jednotlivých skenovaných vrstvách na přiloženém videozáznamu (viz. CD příloha).



Obr. 1: Vizualizace umístění L-symbionta uvnitř tkáně vší pomocí metody RNA FISH.

Použité fitry: modrý - jádra všech buněk (fl. b.: DAPI), zelený - specifická sonda (fl. b.: Flc)

fialový - eubakteriální sonda (fl. b.: Cy5), kombinace všech - Obr. D, G

A - Model seskupení symbiontů v syncytiu epiteliálních buněk ovariálních ampulí vší (OA).

Bílou čarou jsou zvýrazněny tvary zralého (ZO) a nezralého oocyty (NO). Symbionti (S) jsou zde umístěni ve ztenčeném objemu na posteriorním konci (tzv. stigma) oocyty (z: 20x, m: 50 μ m).

B, C, D - Zvětšení oblastí s agregacemi symbionta. Šipka vlevo označuje cestu průchodu symbionta do nezralého oocyty. Šipka vpravo označuje stigma oocystu s vrstvou symbiontů. (z: 40x, m: 50 μ m).

E, F, G - Přiblížení uspořádání buněk symbionta v ovariálních ampulích (z: 40x, m: 50 μ m).

4.3 N-symbiont

4.3.1 Nalezení vhodných markerů

Při screeningu pozitivních vzorků (dle výsledků analýzy amplikonových dat) pouze jeden pár primerů, Neis 16S F3 – Neis 16S R3, spolehlivě zachytil přítomnost N-symbionta v těchto 6 vzorcích. V rámci nové izolace 13 vzorků z populace Stružná byla potvrzena přítomnost N-symbionta v 10 vzorcích (prvních 10 vzorků uvedených v Tab. II) a ostatní 3 vzorky byly negativní pravděpodobně z důvodu špatné kvality izolované DNA.

4.3.2 Vylepšení genomové assembly

Pomocí pokročilých bioinformatických postupů se povedlo zlepšit kvalitu assembly genomu N-symbionta. Genom byl složen do 23 kontigů, které jsou dostatečně dlouhé pro využití v dalších analýzách (nejdelší – 157124 bp, nejkratší – 9285 bp). Velikost genomu v kontizích je 1665380 bp a pomocí anotace bylo vyhledáno 1621 protein-kódujících sekvencí. Pokrytí genomu namapovanými „ready“ (coverage) se pohybuje v rozmezí 30 - 35x a obsah CG nukleotidů je 33,6%. Tyto charakteristiky jsou uvedeny v tabulce IV (Tab. IV), kde byly porovnány charakteristiky nově vzniklé assembly a původní assembly vytvořené v rámci bakalářské práce. Velikost genomu se po nové assembly snížila o 25619 bp spolu s odstraněním 42 genů v důsledku odfiltrování chimérických oblastí z původní assembly. Dále byly porovnány charakteristiky nové assembly genomu N-symbionta s dostupnými genomy fylogeneticky příbuzných bakterií z řádu Neisseriales (Tab. V).

4.3.3 Porovnání metabolických drah

Po namapování genomu N-symbionta na předlohu metabolických drah (databáze KEGG) bylo zjištěno, že N-symb vlastní genetickou výbavu pro biosyntézu vitamínů B2, B3, B4, B6, B7 a kyseliny lipoové (Tab. VI). Oba obligátní symbionti (L-, N-) kódují dráhy pro biosyntézu vitamínů B2, B7 a kyseliny lipoové, N-symbiont navíc kóduje biosyntézu vitamínů B3, B4 a B6. Absence genů v biosyntetických drahách vitamínů B1 a B9 byla ověřena pomocí proteinového blastu (viz. Materiál a metodika). V tabulce V (Tab. V) bylo kódování metabolických drah zároveň porovnáno i v rámci biosyntetických drah krevsajícího hmyzu.

4.3.4 Vyhledání horizontálně přenesených genů

Při manuálním screeningu genomických dat na horizontální přenos genů (HGT) byl objeven operon složený z 2 genů, kódujících enzym urea amidolyázu, označovaných jako DUR1,2 (urea carboxylase, allophanate hydrolase = amidase) a dalších 2 dvou genů kódujících asociované enzymy (urea carbosylase-related aminotransferase 1, 2), které vykazovaly sekvenční příbuznost ke gammaproteobakteriím (Obr. 2). Pro každý operonový gen byl vytvořen alignment s vybranými zástupci gammaproteobakterií a následně byly analyzovány pomocí ML a Bayesiánské analýzy. Tyto rekonstrukce vykazovaly podobnou topologii uspořádání větví. Následně byla vytvořena konkatenovaná matice z alignmentů všech 4 genů, která byla analyzována oběma uvedenými metodami. Fylogenetické rekonstrukce potvrdily příslušnost genů operonu do třídy Gammaproteobacteria s maximální podporou (bootstrap = 100) v případě ML analýzy (Obr. 3) a maximální posteriorní pravděpodobností (pp = 1) v Bayesiánské analýze (Obr. 4). Jako outgroup byly použity sekvence genů bakterií *Noviherbaspirillum denitrificans* (Betaproteobacteria), *Burkholderia cepacia* (Betaproteobacteria) a *Bacillus megaterium* (Firmicutes). Geny jsou v operonu seřazeny v tomto pořadí: urea caboxylase-related aminotransferase 1, urea caboxylase-related aminotransferase 2, urea carboxylase, amidase. V obou analýzách se geny operonu klastrují do monofyletické linie bakterií z řádu Oceanospirillales, kde vykazují nejbližší příbuznost k bakterii *Marinomonas fungiae*. V okolí operonu byly nalezeny 3 geny anotované jako hypothetical protein, amino acid permease a bifunctional biotin operon represor/biotin-protein ligase, které byly pravděpodobně také horizontálně přeneseny (Obr. 2). Homologní sekvence k těmto genům byly přiřazeny pomocí proteinového blastu také v rámci třídy Gammaproteobacteria (Obr. 2).

Tab. IV: Tabulka základní charakteristiky získaných genomových dat a jejich porovnání s původní assembly (výstup z programu Geneious a RAST)

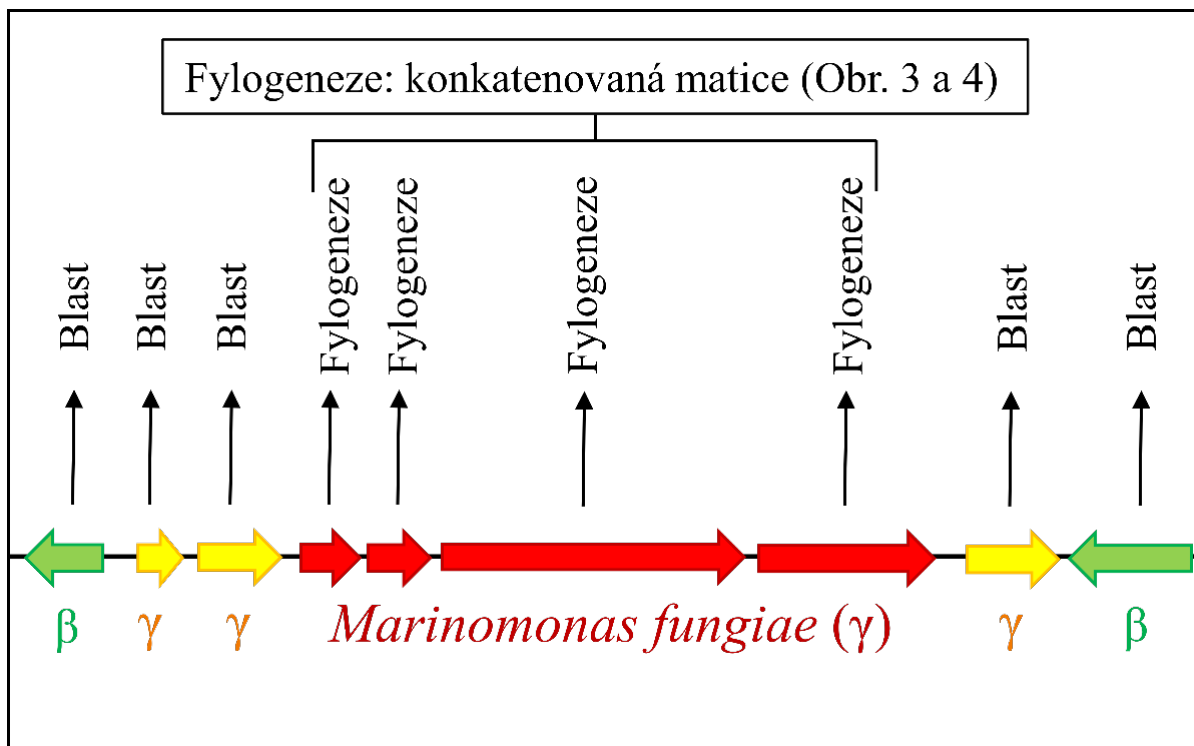
	Původní assembly	Nová assembly
Počet kontigů	23	23
Velikost genomu (bp)	1690999	1665380
Počet genů	1663	1621
CG obsah (%)	33,77	33,6
Coverage	28-32x	30-35x

Tab. V: Tabulka základní genomické charakteristiky zástupců řádu Neisseriales ve srovnání se základní charakterizací genomu N-symbionta

Název bakterie	Přístupový kód (NCBI)	Velikost genomu (Mb)	Počet genů	CG obsah (%)	Výskyt
N-symbiont	–	1,66	1621	33,6	Endosymbiont vši <i>Polyplax serrata</i>
<i>Snodgrassella alvi</i>	CP007446.1	2,53	2370	41,3	Střevo včel/čmeláků
<i>Vitreoscilla stercoraria</i>	NZ_ARNN000000000.1	2,58	2372	43,9	Aerobní bakterie
<i>Kingella kingae</i>	NZ_AFHS000000000.1	1,92	2157	46,8	Patogen člověka
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NC_002946.2	2,15	1975	52,7	Patogen člověka
<i>Neisseria meningitidis</i>	NC_003112.2	2,27	2114	51,5	Patogen člověka
<i>Neisseria elongata</i>	NZ_ADBF000000000.1	2,28	3089	53,5	Patogen člověka
<i>Neisseria lactamica</i>	NC_014752.1	2,22	2137	52,3	Nepatogenní komenzální bakterie člověka
<i>Neisseria mucosa</i>	NZ_ACRG000000000.1	2,16	2084	49,6	Aerobní bakterie a příležitostný patogen člověka
<i>Neisseria flavescens</i>	NZ_ACQV000000000.1	2,2	2417	49,2	Aerobní bakterie a příležitostný patogen člověka
<i>Simonsiella muelleri</i>	NZ_ADCY000000000.2	2,34	2340	41,5	Aerobní bakterie

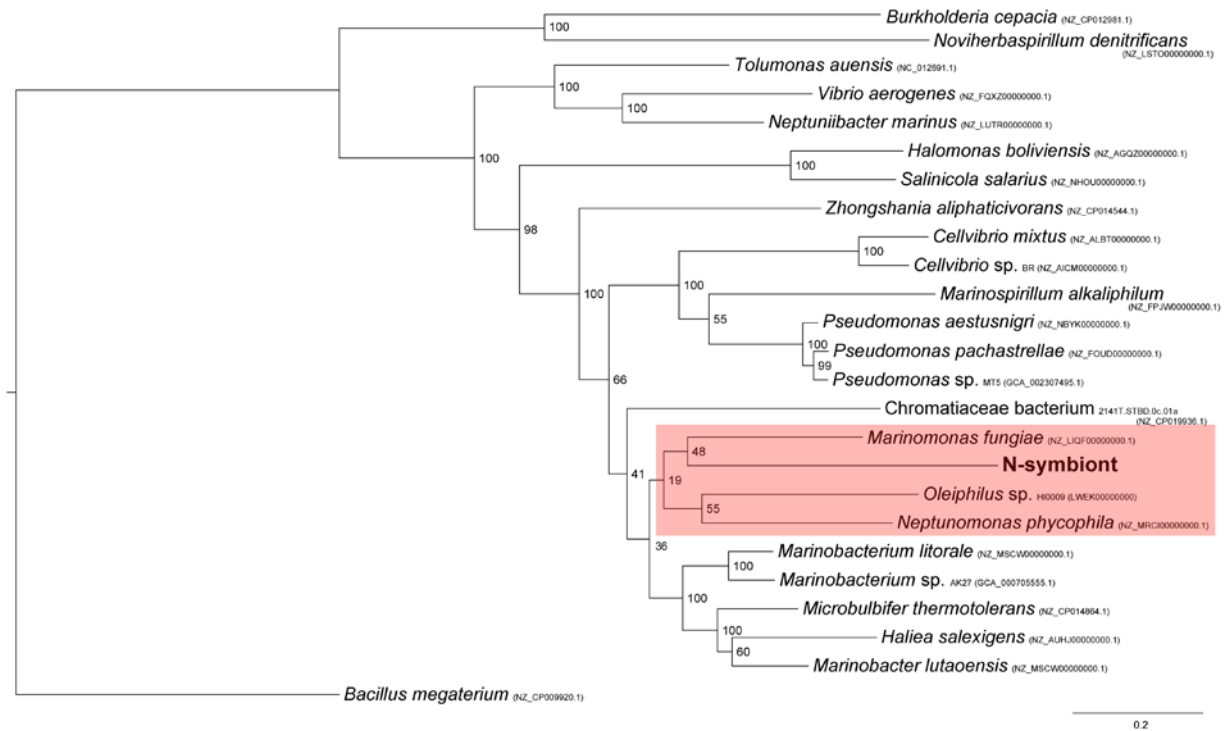
Tab. VI: Přehledová tabulka biosyntetických drah B-vitaminů v rámci endosymbiotických bakterií krevsajícího hmyzu (tmavě modrá: kompletní dráha, bílá: chybí jeden gen, světle modrá: chybí více než 1 gen, -tr: přítomnost ABC transportéru pro thiamin, CoA: biosyntéza koenzymu A).

		thiamin B1	riboflavin B2	niacin B3	k. pantothenová B5+CoA	pyridoxin B6	biotin B7	k. listová B9	k. lipová
<i>Polyplax serrata</i>	N-symbiont	tr						-1	
<i>Polyplax serrata</i>	L-symbiont	tr						-1	
<i>Melophagus ovinus</i>	<i>Arsenophonus melophagi</i>	tr		-1	CoA			-2	
	<i>Sodalis melophagi</i>								
<i>Glossina</i> sp.	<i>Wigglesworthia glossinidia</i>			-1				-2	
	<i>Sodalis glossinidius</i>	tr							
<i>Pediculus humanus</i>	<i>Riesia pediculicola</i>	tr		-1		-2		-2	
<i>Cimex lectularius</i>	<i>Wolbachia Cle</i>	-2						-2	
<i>Haementeria officinalis</i>	<i>Providencia siddallii</i>			-1	-2			-1	

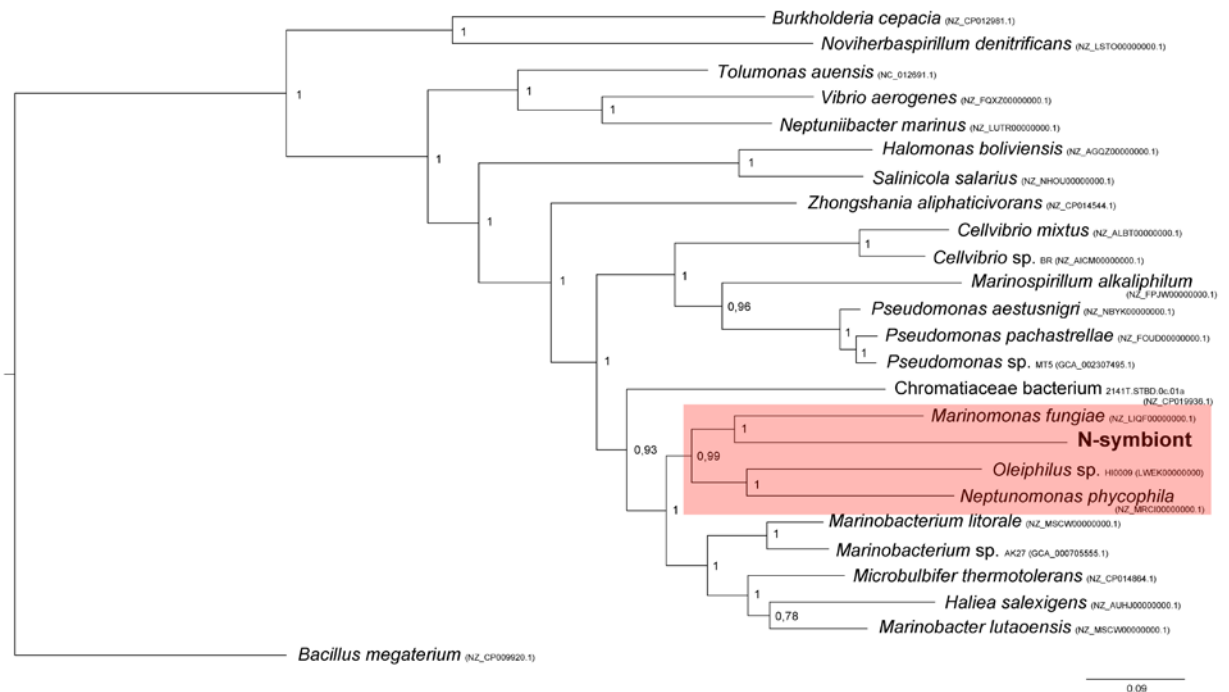


Obr. 2: Metodické schéma ověření horizontálně přeneseného úseku v genomu N-symbionta.

Uprostřed obrázku je červeně označen operon, kódující enzym urea amidolyázu a asociované enzymy, složený ze čtyř genů (zleva: urea carboxylase-related aminotransferase 1, urea carboxylase-related aminotransferase 2, urea carboxylase, amidase - allophanate hydrolase). Podle fylogenetických analýzy konkatenované matice se tento operon klastruje do příbuznosti bakterie *Marinomonas fungiae* (Gammaproteobacteria). Žlutě označené geny v těsné blízkosti operonu (zleva – hypothetical protein, amino acid permease, bifunctional biotin operon represor/biotin-protein ligase) vykazují sekvenční příbuznost též ke gammaproteobakteriím na základě proteinového blastu. Úsek tohoto horizontálně přeneseného klastru genů z obou stran dále obklopují oblasti sekvenčně přiřazené genomu N-symbionta (Betaproteobacteria; označeno zeleně).



Obr. 3: Fylogenetická rekonstrukce konkatenované matice urea amidolýzového operonu v rámci třídy Gammaproteobacteria sestavená na základě ML analýzy s bootstrapovými hodnotami. Červeně je vyznačená monofyletická skupina gammaproteobakterií z řádu Oceanospirillales, do jejichž příbuznosti se klastrují geny operonu N-symbionta.



Obr. 4: Fylogenetická rekonstrukce konkatenované matice urea amidolýzového operonu v rámci třídy Gammaproteobacteria sestavená na základě Bayesiánské analýzy s posteriorními pravděpodobnostmi. Červeně je vyznačená monofyletická skupina gammaproteobakterií z řádu Oceanospirillales, do jejichž příbuznosti se klastrují geny operonu N-symbionta.

5 DISKUZE

5.1 L-symbiont

5.1.1 Genomika

Diskuze k této kapitole je součástí přiložené publikace.

5.1.2 FISH

V dobách Riese bylo možné sledovat biologii bakteriálních symbiontů vší pouze pomocí světelné mikroskopie (Ries, 1931). Následný rozvoj elektronové mikroskopie umožnil podrobné sledování symbiontů vší *Polyplax spinulosa* na ultratenkých tkáňových řezech (Volf, 1991). Nicméně, fylogenetické zařazení těchto symbiontů bylo možné objasnit až s nástupem molekulárních metod jako je PCR (Hypša and Křížek, 2007). Dalším krokem je propojení těchto dvou metodických přístupů, tedy mikroskopického pozorování s molekulární determinací. S využitím metody in-situ hybridizace fluorescenčních sond na specifický úsek 16S rRNA symbionta jsem provedla vizualizaci části životního cyklu L-symbionta vší *Polyplax serrata*. Z výsledků této analýzy lze předpokládat, že způsob šíření symbiontů a jejich umístění v těle vší *Polyplax serrata* se shoduje s pozorováním u vší *Polyplax spinulosa* (Volf, 1991). Toto tvrzení podporují i fylogenetické analýzy, které potvrdily, že se jedná o dva blízce příbuzné symbionty z čeledi Legionellaceae (Hypša and Křížek, 2007; Říhová, 2015). S využitím specifických sond jsem potvrdila, že vizualizovaní P-symbionti jsou rodu *Legionella*. U dospělých samic se vytváří agregace L-symbiontů v syncytiu epiteliálních buněk ovariálních ampulí a odtud se šíří směrem k vajíčku. Zde se koncentrují na posteriorním konci a dochází k transovariálnímu přenosu do další generace. V rámci dalšího výzkumu by bylo vhodné získat vzorky vší z lokality Stružná, kde byl objeven druhý ko-symbiont z řádu Neisseriales (N-symbiont) a detekovat vzájemné umístění těchto dvou druhů symbiontů v tkáních hostitele s využitím této metody. Takové vzorky jsem po několika nezdárných pokusech získala až v nedávné době a budu je analyzovat stejným způsobem s již navrženými specifickými fluorescenčními sondami pro detekci 16S rRNA N-symbiontů.

5.2 N-symbiont

5.2.1 Vhodné markery pro screening

V rámci předchozí bakalářské práce (Říhová, 2015) byl proveden screening N-symbionta ve 3 populacích vší *Polyplax serrata* sebraných v lokalitách Slovensko, Srbsko a Česká republika (Hlinsko). Analýzou těchto populací se mi podařilo získat pouze 1 sekvenci genu pro 16S rRNA N-symbionta ze vzorku S4 (Slovensko). Nepravděpodobnost výskytu pouze jednoho pozitivního jedince (celkově z 8 analyzovaných jedinců z této populace) podpořily současně prezentované výsledky genomických a fylogenetických analýz, které potvrdily obligátně-endosymbiotický charakter této bakterie a její koevoluční historii s hostitelem. Obligátní symbionti jsou nezbytní pro správný vývoj a úspěšnou reprodukci hostitele (Aschner, 1934; Puchta, 1955). Vertikální předávání symbiontů bylo potvrzeno v případě druhého obligátního symbionta (L-symbiont) u všech analyzovaných jedinců vší *Polyplax serrata* (Hypša and Křížek, 2007). Analýza mikrobiomů evropských populací vší *Polyplax serrata* (v rámci ampliconového sekvenování) potvrdila distribuci N-symbionta v populaci vší z oblasti Stružná (Žižková, 2017). Zbylé pozitivní vzorky DNA z ampliconové analýzy byly použity pro optimalizaci podmínek PCR reakce a nalezení vhodných markerů pro budoucí využití při screeningu N-symbionta v populaci hostitele. Pouze jediný pár ze setu analyzovaných primerů potvrdil pozitivitu všech vybraných vzorků. Tyto markery byly navrženy pro amplifikaci úseku genu pro 16S rRNA řádu Neisseriales, nejsou tedy specifické pro N-symbionta. Nicméně, tato širší specifita může být výhodná v případě, že by se ve vzorku vyskytlo více linií (strainů) N-symbionta, které by tak mohly být zachyceny s větší pravděpodobností. Ostatní páry primerů pravděpodobně nenesedají na DNA daného genu a neamplifikují detekovaný úsek, dá se tedy předpokládat, že byly nevhodně navrženy pro screening bakterie.

5.2.2 Vylepšení genomové assembly

V současné době se běžně využívají metody bioinformatického zpracování molekulárních dat pomocí metagenomických analýz, které umožňují přímé studium bakterií bez nutnosti jejich kultivace (Handelsman, 2004; Streit and Schmitz, 2004). Genomy bakterií, které vstupují do endosymbiotických vztahů, jsou zatíženy ztrátou genů, případně i větších úseků DNA vlivem genetického driftu (McCutcheon and Moran, 2012). Často se tak stává, že genomy blízké příbuzných bakterií jsou velmi odlišné v důsledku ztráty genů a

HGT (Feil et al., 2005). Tento rozdíl v genomovém obsahu může limitovat schopnost získat kompletní genomovou sekvenci bakterie s využitím mapování na referenční genomy příbuzných druhů (Salzberg, 2008). Fylogenetické analýzy genu pro 16S rRNA N-symbionta (Říhová, 2015) potvrdily jeho příslušnost k řádu Neisseriales, nicméně nebyla potvrzena jeho přímá příbuznost k některé z analyzovaných bakterií, jejíž genom by mohl být využit jako referenční pro mapování. V rámci této diplomové práce byla sestavena nová assembly s využitím namapování „readů“ na již sestavené „referenční“ kontigy a tímto postupem se podařilo odfiltrovat některé chimerické oblasti oproti původní assembly. Tyto chimerické úseky byly pravděpodobně vytvořeny v důsledku chyby assemblovacích programů při skládání degenerované genomické informace N-symbionta. Při porovnání základních genomických charakteristik v rámci řádu Neisseriales (Tab. IV) je zřejmé, že N-symbiont prochází redukcí genomu, která je typická pro endosymbionty (menší velikost genomu, nižší CG obsah; McCutcheon and Moran, 2012).

5.2.3 Metabolické dráhy

Při metabolické analýze N-symbionta jsem se zaměřila hlavně na dráhy spojené s produkcí vitamínů skupiny B, které jsou základním faktorem symbiózy mezi bakteriemi a krevsajícím hmyzem (Nogge, 1976; Nogge, 1981; Hosokawa et al., 2010; Nikoh et al., 2014). Obecně se předpokládá, že symbionti využívají vlastních metabolických drah k biosyntéze těchto esenciálních vitamínů, které jsou nedostatečně obsaženy v krvi obratlovčího hostitele. Thiamin (vitamín B1) se obvykle řadí mezi tyto významné látky (Akman et al., 2002; Nikoh et al., 2014). Nicméně, biosyntetickou dráhu thiaminu nekóduje ani jeden ze symbiontů (L-, N-) a je tedy pravděpodobné, že tento vitamín je v potravě dostatečně zastoupen. Dokonce se zdá, že si symbionti tento vitamín aktivně transportují do buňky a využívají ho pro vlastní metabolismus. Například u L-symbionta byl představen alternativní způsob transportu thiaminu pomocí putrescinového ABC transportéru (viz. publikace). Stejně tak v genomu N-symbionta byly objeveny geny, které kódují putrescinový ABC transportér, který pravděpodobně může fungovat stejným způsobem. Specifický ABC transportér pro thiamin vlastní například symbiont lidských vší *Riesia pediculicola*. Předpokládá se, že tento vitamín je nutný pro funkci metabolismu symbionta a proto dochází k jeho aktivnímu transportu z krve hostitele (Nováková et al., 2015).

Další důležitou metabolickou dráhou diskutovanou v souvislosti se symbiotickými bakteriemi hmyzu je biosyntéza vitamínu B7 (biotin). V genomu L-symbionta byl nalezen

horizontálně přenesený operon, který doplňuje biosyntetickou dráhu tohoto vitamínu o potřebný počet genů (viz. publikace). Při mapování genomu N-symbionta na předlohu biosyntetické dráhy biotinu byl objeven artefakt způsobený programem KEGG, který nenamapoval gen BioH. Tento gen byl následně dohledán v genomu pomocí proteinového blastu v programu Geneious. V rámci porovnání metabolické kapacity pro syntézu B-vitamínů s ostatními symbionty krevsajícího hmyzu je patrná poměrně vysoká metabolická kapacita genomu N-symbionta. Z dřívějších studií je známo, že v některých bakteriálních asociacích může docházet k výměně metabolitů mezi bakteriemi a tím i ucelení jednotlivých biosyntetických drah (Wu et al., 2006; Pham et al., 2008). Je proto teoreticky možné, že v systému L-symbiont-N-symbiont může docházet ke sdílení některých metabolitů a tím i doplnění již degenerovaných metabolických drah L-symbionta. Tato hypotéza by se dala teoreticky ověřit pomocí transkriptomických analýz, jako v případě sdílení určitých metabolitů mezi endosymbionty *Moranella endobia* a *Tremblaya princeps* u vlnatky *Planococcus citri* (Husník et al., 2013).

5.2.4 Horizontální přenos genů

Nedávné studie odhalily skutečnost, že horizontální přenosy genů mohou přinášet evoluční výhody pro adaptivní ekologické a fyziologické vlastnosti hmyzu v asociaci s jinými organismy (Andersonn et al., 2005; Moran and Jarvik, 2010; Acuña et al., 2012). Například bakterie rodu *Wolbachia* se běžně vyskytují jako fakultativní symbionti hmyzu (Hilgenboecker et al., 2008) a často si vyměňují svůj genetický materiál se svými kósymbionty i hostiteli (Baldo et al., 2005). V genomu N-symbionta byly objeveny dva geny (DUR1,2), kódující enzym urea amidolyáza, které byly podle fylogenetických analýz přeneseny z gammaproteobakterií. Stejný případ horizontálního přenosu těchto genů můžeme najít v genomu symbionta *Moranella endobia* u červce *Planococcus citri* (Husník et al., 2013). Geny DUR1,2 se klastrují do monofyletické skupiny řádu Oceanospirillales, kde nejbližší příbuznost vykazuje symbiotická bakterie *Marinomonas fungiae*, která se vyskytuje v asociaci s korálem *Fungia echinata* (Kumari et al., 2014). Nicméně, přesné umístění operonových genů ve fylogenezi nemusí být zcela relevantní, jelikož mnoho přechodných evolučních článků ještě nebylo objeveno, a chybí proto v genových databázích.

Enzym urea amidolyáza zajišťuje dvoukrokové štěpení močoviny (za přítomnosti ATP, iontů a biotinu) na amoniak a CO₂ (Roon and Levenberg, 1970). Vzniklý amoniak je recyklován např. při tvorbě glutamátu. Glutamát může sloužit jako zdroj dusíku, a pomocí

asociovaných aminotransferáz pak mohou být atomy dusíku inkorporovány do uhlíkových skeletonů aminokyselin tvořených symbiontem (Hansen and Moran, 2011). V genomu L-symbionta nebyly objeveny žádné kompletní metabolické dráhy zajišťující biosyntézu aminokyselin (viz. publikace). Při namapování genů na předlohy biosyntetických drah aminokyselin jsem zjistila, že N-symbiont je pravděpodobně schopný syntetizovat některé aminokyseliny (Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Tyr). Poměrně zajímavou skutečností je, že N-symbiont vlastní i geny pro jednokrokové štěpení močoviny pomocí enzymu ureáza, který je syntetizován například symbionty u švábů a mravenců (Gil et al., 2003; López-Sánchez et al., 2009; Sabree et al., 2009).

V těsné blízkosti operonu se nachází gen anotovaný jako bifunctional biotin operon represor/biotin-protein ligase (BirA), který byl pravděpodobně také přenesen z gammaproteobakterií. Tento gen slouží jako represor, který reguluje transkripci genů zapojených v biosyntéze biotinu a zároveň zajišťuje vázání biotinu na biotin-dependentní enzymy (Satiaputra et al., 2016). Jedním z těchto enzymů je i urea amidolyáza, která v prvním kroku štěpení močoviny vyžaduje přísun biotinu pro katalýzu reakce (Roon et al., 1972). Nicméně ačkoli byl gen BirA a ostatní nalezené geny (hypothetical protein, aminoacid permease) pravděpodobně přeneseny společně s geny DUR1,2, nebylo možné rekonstruovat společnou fylogenetickou analýzu z toho důvodu, že žádná z vyhledaných bakterií nemá operon v kompletním složení jako je v genomu N-symbionta.

6 ZÁVĚR

Bakteriální symbionti krejsajících vší (Anoplura) pocházejí z mnoha taxonomicky odlišných skupin. Věš *Polyplax serrata* v sobě hostí bakteriální symbionty, kteří se řadí do fylogeneticky vzdálených tříd Gammaproteobacteria (Legionellales) a Betaproteobacteria (Neisseriales). S využitím pokročilých bioinformatických postupů byla složena genomická informace L-symbionta do podoby kruhové molekuly. Pomocí multigenových fylogenetických analýz jsem potvrdila zařazení této bakterie do příbuznosti známých patogenů rodu *Legionella*, a navrhla jeho pojmenování *Candidatus Legionella polyplacis*, sp. n. Při komplexním studiu genomu symbionta bylo odvozeno mnoho charakteristik, které potvrzují jeho endosymbiotický charakter a naznačují společnou koevoluční historii s hostitelem. Tyto hypotézy byly ověřeny in-vivo pomocí specifické fluorescenční detekce symbiontů v tkáni hostitele a vizualizace cest jeho šíření do další generace. V rámci screeningu genomu na horizontální přenos genů byl objeven operon kódující biosyntézu biotinu. S využitím fylogenetických analýz byl určen pravděpodobně společný původ operonových genů s operony symbiontů jiného hmyzu. Při rozboru biosyntetických drah B-vitaminů byla zjištěna poměrně nízká metabolická kapacita genomu L-symbionta pro syntézu těchto významných látek. Většina výsledků této části výzkumu byla publikována v impaktovaném časopise.

Kompletní citace: Říhová, J., Nováková, E., Husník, F., Hypša, V. (2017). *Legionella* becoming a mutualist: adaptive processes shaping the genome of symbiont in the louse *Polyplax serrata*. *Genome Biology and Evolution*, 9 (11), 2946–2957.

V další fázi výzkumu jsem se zaměřila na vylepšení screeningových metod pro zachycení N-symbionta v populaci hostitele a na kvalitativní zpracování jeho genomické informace. S využitím vhodných markerů byl potvrzen výskyt N-symbionta v populaci vší sebraných v oblasti Stružná. Pomocí pokročilých bioinformatických analýz byla zlepšena kvalita genomové assembly odfiltrováním chiméricky složených oblastí. Následně byla provedena rekonstrukce biosyntetických drah B-vitaminů, kde byly detekovány některé kompletní dráhy. Při průzkumu genomu na horizontální přenos genů jsem objevila operon, přenesený pravděpodobně z gammaproteobakterií, který kóduje enzymy podílející se na metabolismu štěpení močoviny.

Otázkou dalšího výzkumu je nalézt funkční propojení těchto dvou symbiotických systémů, a zároveň porovnat jejich koevoluční historii v rámci různých hostitelských linií.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Acuña, R., Padilla, B. E., Flórez-Ramos, C. P., Rubio, J. D., Herrera, J. C., Benavides, P., et al. (2012). Adaptive horizontal transfer of a bacterial gene to an invasive insect pest of coffee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11), 4197-4202.
- Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., Aksoy, S. (2002). Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature genetics*, 32(3), 402-407.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Anderson, A. R., Hoffmann, A. A., McKechnie, S. W. (2005). Response to selection for rapid chill-coma recovery in *Drosophila melanogaster*: physiology and life-history traits. *Genetics Research*, 85(1), 15-22.
- Aschner, M. (1934). Studies on the symbiosis of body louse. Elimination of the symbionts by centrifugation of the eggs. *Parasitology*, 26, 309-314.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., et al. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), 75.
- Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. *Ecology and Evolution*. London: Croom Helm Ltd., 1-28.
- Baldo, L., Bordenstein, S., Wernegreen, J. J., Werren, J. H. (2005). Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 437-449.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Pyskin, A. V. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477.
- Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Reviews of Microbiology*, 59, 155-189.
- Bewig, F., Schwartz, W. (1956). Untersuchungen über die symbiose von tieren mit pilzen und bakterien. *Archives of Microbiology*, 24(2), 174-208.
- Breeuwer, J. A. J., Jacobs, G. (1996). *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Experimental and Applied Acarology*, 20(8), 421-434.

- *Buchner, P. (1920). Zur kenntnis der symbiose niederer pflanzlicher organismen mit pedikuliden. *Biol. Zentbl*, 39, 535-540.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17, 540-552.
- Dale, C., Maudlin, I. (1999). *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 267-275 (1999).
- Dale, C., Beeton, M., Harbison, C., Jones, T., Pontes, M. (2006). Isolation, pure culture, and characterization of ‘*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*’, an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscid louse fly *Pseudolynchia canariensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2997-3004 (2006).
- Darby, A. C., Chandler, S. M., Welburn, S. C., Douglas, A. E. (2005). Aphid-symbiotic bacteria cultured in insect cell lines. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4833-4839.
- *de Bary, A. (1879). Die Erscheinung der Symbiose. *Strassburg: Verlag von Karl J. Trubner*, 30s.
- Douglas, A. E., (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews*, 64(4), 409-434.
- Feil, H., Feil, W. S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., et al. (2005). Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11064-11069.
- *Frank, A. B. (1877). Uber die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger krusten flechten. *Beitragezur Biologie der Pflanzen*, 2, 123-200.
- Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular biology and evolution*, 14(7), 685-695.
- Gil, R., Silva, F. J., Zientz, E., Delmotte, F., González-Candelas, F., Latorre, A., et al. (2003). The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9388-9393.
- Gish, W., States, D. J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics*, 3, 266-272.

- Gray, M. W., Doolittle, W. F. (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiological Reviews*, 46(1), 1.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307-321.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), 669-685.
- Hansen, A. K., Moran, N. A. (2011). Aphid genome expression reveals host–symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2849-2854.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., Werren, J. H. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters*, 281(2), 215-220.
- Hosokawa, T., Nikoh, N., Koga, R., Satô, M., Tanahashi, M., Meng, X. Y., Fukatsu, T. (2012). Reductive genome evolution, host–symbiont co-speciation and uterine transmission of endosymbiotic bacteria in bat flies. *The ISME journal*, 6(3), 577-587.
- Husník, F., Nikoh, N., Koga, R., Ross, L., Duncan, R. P., Fujie, M., Von Dohlen, C. D. (2013). Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell*, 153(7), 1567-1578.
- Hypša, V., Dale, C. (1997). In vitro culture and phylogenetic analysis of ‘*Candidatus Arsenophonus triatominarum*’, an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 1140-1144.
- Hypša, V., Křížek, J. (2007). Molecular evidence for polyphyletic origin of the primary symbionts of sucking lice (Phthiraptera, Anoplura). *Microbial ecology*, 54(2), 242-251.
- Kumari, P., Poddar, A., Das, S. K. (2014). *Marinomonas fungiae* sp. nov., isolated from the coral *Fungia echinata* from the Andaman Sea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2), 487-494.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42, 199-205.

- Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Journal of molecular biology*, 428(4), 726-731.
- Katoh, K., Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12), 1647-1649.
- Koga, R., Bennett, G. M., Cryan, J. R., Moran, N. A. (2013). Evolutionary replacement of obligate symbionts in an ancient and diverse insect lineage. *Environmental microbiology*, 15(7), 2073-2081.
- Kotter, L. (1955). Bacteriologic and microchemical observations of a stomach section of *Pediculus vestimenti* Burm. *Archiv für Mikrobiologie*, 23(1), 38.
- Lefort, V., Longueville, J. E., Gascuel, O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, 9(34), 2422-2424.
- Li H. and Durbin R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 25, 1754-60.
- López-Sánchez, M. J., Neef, A., Peretó, J., Patiño-Navarrete, R., Pignatelli, M., Latorre, A., Moya, A. (2009). Evolutionary convergence and nitrogen metabolism in *Blattabacterium* strain Bge, primary endosymbiont of the cockroach *Blattella germanica*. *PLoS genetics*, 5(11), e1000721.
- Manning, S. D. (2010). *Escherichia coli* infections. *Infobase Publishing*.
- Margulis, L. (1970). Origin of eukaryotic cells: Evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant and animal cells on the precambrian Earth. *Yale University Press*.
- McCutcheon, J. P., von Dohlen, C. D. (2011). An interdependent metabolic patchwork in the nested symbiosis of mealybugs. *Current Biology*, 21(16), 1366-1372.
- McCutcheon, J. P., Moran, N. A. (2012). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 13-26.

- Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJA, Pritchard L, Cardle L, Shaw PD and Marshall D. (2013). Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 193-202.
- Moran, N. A., McCutcheon, J. P., Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics*, 42, 165-190.
- Moran, N. A., Jarvik, T. (2010). Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science*, 328(5978), 624-627.
- Moter, A., Göbel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2), 85-112.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., Latorre, A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 218-229.
- Nogge, G. (1976). Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. *Experientia*, 32(8), 995-996.
- Nogge, G. (1981). Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in hematophagous arthropods. *Parasitology*, 82, 101-104.
- Nikoh, N., Hosokawa, T., Moriyama, M., Oshima, K., Hattori, M., Fukatsu, T. (2014). Evolutionary origin of insect – *Wolbachia* nutritional mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10257-10262.
- Nováková, E., Husník, F., Šochová, E., Hypša, V. (2015). *Arsenophonus* and *Sodalis* symbionts in louse flies: an analogy to the *Wigglesworthia* and *Sodalis* system in tsetse flies. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6189-6199.
- Pham, T. K., Wright, P. C. (2008). The proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* in very high glucose conditions with amino acid supplementation. *Journal of proteome research*, 7(11), 4766-4774.
- Price, M. N., Dehal, P. S., Arkin, A. P. (2009) FastTree: computing large minimum-evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 26, 1641-1650.
- *Puchta, O. (1954). Experimentelle untersuchungen über die symbiose der kleiderlaus *Pediculus vestimenti* burm. *Naturwissenschaften*, 41, 71-72.
- *Puchta, O. (1955). Experimentelle untersuchungen über die bedeutung der symbiose der kleiderlaus *Pediculus vestimenti* burm. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 17(1), 1-40.

- Rambaut, A., Suchard, M., Xie, W., Drummond, A. (2014). Tracer v. 1.6. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- *Ries, E. (1931). Die Symbiose der läuse und federlinge. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 20(2-3), 233-367.
- Ronquist, F., Huelsenbeck J. P. (2003). MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Roon, R. J., Levenberg, B. (1970). CO₂ fixation and the involvement of allophanate in the biotin-enzyme-catalyzed cleavage of urea. *Journal of Biological Chemistry*, 245(17), 4593-4595.
- Roon, R. J., Levenberg, B. (1972). Urea amidolyase I. Properties of the enzyme from *Candida utilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 247(13), 4107-4113.
- Říhová, J. (2015). Symbiotické bakterie vši rodu *Polyplax*: základní fylogenetická a genomická charakterizace. Bakalářská práce, České Budějovice: Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, 71 s.
- *Schwendener, S. (1868). Ueber die beziehungen zwischen algen und flechtengonidien. *Botanische Zeitung*, 26, 289-292.
- Sabree, Z. L., Kambhampati, S., Moran, N. A. (2009). Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46), 19521-19526.
- Salzberg, S. L., Sommer, D. D., Schatz, M. C., Phillippy, A. M., Rabinowicz, P. D., Tsuge, S., Madupu, R. (2008). Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC genomics*, 9(1), 204.
- Satiaputra, J., Shearwin, K. E., Booker, G. W., Polyak, S. W. (2016). Mechanisms of biotin-regulated gene expression in microbes. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(1), 17-24.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- *Sikora, H. (1919). Vorläufige mitteilungen über mycetome bei pediculiden. *Biol. Zentr.*, 39, 287-288.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A., Hurst, G. D. (1999). *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 71-102.

- Streit, W. R., Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Current opinion in microbiology*, 7(5), 492-498.
- Tilden, Jr., J., Young, W., McNamara, A. M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., Morris Jr, J. G. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *American journal of public health*, 86, 1142-1145.
- Tritt, A., Eisen, J. A., Facciotti, M. T., Darling, A. E. (2012). An integrated pipeline for de novo assembly of microbial genomes. *PloS one*, 7(9), e42304.
- Volf, P. (1991). Postembryonal development of mycetocytes and symbionts of the spiny rat louse *Polyplax spinulosa*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(1), 143-146.
- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Earl, A. M., et al. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PloS one*, 9(11), e112963.
- Werren, J. H., Baldo, L., Clark, M. E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741-751.
- Wu, G. (2013) Functional amino acids in nutrition and health: *Amino Acids*. 45, 407-411.
- Yen, J. H., Barr, A. R. (1971). New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*, *Nature*, 232(5313), 657-658.
- Žižková, K. (2017). Diverzita a populační struktura bakteriálních symbiontů vší rodu *Polyplax*. Bakalářská práce, České Budějovice: Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, 57 s.

* Označené zdroje jsou citovány podle současné literatury, nikoli na základě četby původní práce.

8 PŘÍLOHY

Elektronická příloha: Videozáznam vizualizace agregací symbiontů v několika skenovaných vrstvách. – CD nosič na zadní straně desek