

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Rekonstrukce metabolických drah bakterií *Legionella polyplacis* a *Candidatus Riesia pediculischaeffi*, symbiontů
vší**

Bakalářská práce

Zuzana Zadinová

Školitel: prof. RNDr. Václav Hypša, CSc.

Školitel specialista: prof. RNDr. František Vácha, Ph.D.

České Budějovice 2021

Zadinová, Z., 2021: Rekonstrukce metabolických drah bakterií *Legionella polyplacis* a *Candidatus Riesia pediculischaeffi*, symbiontů vší [Reconstruction of metabolic pathways of *Legionella polyplacis* and *Candidatus Riesia pediculischaeffi*, lice symbionts. Bc. Thesis, in Czech.] – 69 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: The genomes of two bacteria, *Legionella polyplacis* and *Candidatus Riesia pediculischaeffi*, lice endosymbionts, were examined and compared. Preserved genes were identified, assigned to appropriate metabolic pathways, and listed in an electronic attachment table. Completeness and functionality were assessed for individual metabolic pathways. Based on the results, metabolic maps were created for both bacteria

Key words: insect symbionts, *Legionella polyplacis*, *Candidatus Riesia pediculischaeffi*, sucking lice, endosymbiosis, genome degradation, GC content, metabolism, B vitamins, amino acids, glycolysis, citrate cycle, pentose phosphate pathway, purines, pyrimidines, oxidative phosphorylation.

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

V Českých Budějovicích,

dne

Podpis studenta

Děkuji především prof. RNDr. Václavu Hypšovi, CSc. za všestrannou pomoc a neuvěřitelnou trpělivost během vypracování bakalářské práce. Také děkuji prof. RNDr. Františku Váchovi, Ph.D. za neocenitelnou pomoc a rady ohledně metabolických drah. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a příteli za jejich úžasnou podporu.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Primární a sekundární endosymbionti	1
1.2 Hmyz a endosymbiotické bakterie	2
1.3 Bakteriocyty.....	3
1.4 Vliv na genom endosymbionta.....	4
1.5 Muller's ratchet a vliv na genom endosymbionta.....	5
1.6 Vši a endosymbiotické bakterie	6
1.7 <i>Legionella</i>	7
1.8 <i>Riesia</i>	7
2 Materiály a metody	9
3 Výsledky.....	10
3.1 <i>Legionella polyplacis</i>	10
3.1.1 Aminokyseliny	10
3.1.2 B-Vitamíny	12
3.1.3 Mastné kyseliny.....	17
3.1.4 Glykolýza	18
3.1.5 Pentózofosfátový cyklus.....	21
3.1.6 Citrátový cyklus	22
3.1.7 Puriny	23
3.1.8 Pyrimidiny.....	26
3.1.9 Oxidativní fosforylace.....	28
3.2 <i>Candidatus Riesia pediculischaeffi</i>	30
3.2.1 Aminokyseliny	30
3.2.2 B-Vitamíny	31
3.2.3 Mastné kyseliny.....	37
3.2.4 Glykolýza	38
3.2.5 Pentózofosfátový cyklus.....	41
3.2.6 Citrátový cyklus	42
3.2.7 Puriny	43
3.2.8 Pyrimidiny.....	46
3.2.9 Oxidativní fosforylace.....	48
4 Diskuze	50
5 Závěr	58
Seznam literatury	59

Knihy a vědecké články.....	59
Internetové zdroje.....	69

1 Úvod

Některé skupiny hmyzu se evolučně přizpůsobily na specifické zdroje potravy, jako je například šťáva z rostlinných pletiv nebo krev. Protože je však tento způsob výživy nedostatečný a hmyz ze své potravy nezískává všechny výživové látky, které potřebuje, vybudoval si během milionů let evoluce spolupráci s endosymbiotickými bakteriemi, které dokáží chybějící látky syntetizovat a předávat hostiteli (Blochmann, 1892; Buchner, 1965).

Tyto bakterie se díky dlouhé době soužití s hostitelem přizpůsobily endosymbiotickému vztahu tím, že se naučily žít ve speciálních buňkách hostitele, zvaných bakteriocyty, umí se vertikálně přenášet na potomky hostitele a zaměřují se na syntézu látek vyžadovaných hostitelem. Všechna tato přizpůsobení měla také za následek změny týkající se množství genetické informace endosymbionta. Délka genomu endosymbiotických bakterií je mezi prokaryotickými organismy jedna z nejkratších. K tomuto zkrácení genomu došlo kvůli odstranění genů, které se staly nepodstatnými kvůli přizpůsobení bakterie na život uvnitř specifických buněk hostitele (Gil *et al.*, 2002; Wernegreen, 2002). Častokrát se stává, že kvůli mutaci bakterie ztratí schopnost syntetizovat určitou látku a je pak odkázána na hostitele. Bakterie si tedy ponechávají geny esenciální, tj. nezbytné pro život a rozmnožování, a také geny potřebné pro syntézu látek vyžadovaných hostitelem (Zientz *et al.*, 2004).

1.1 Primární a sekundární endosymbionti

Hmyzí hostitel většinou hostí více různých endosymbiontů, ti hlavní se označují jako primární symbionti a dají se rozeznat díky několika typickým rysům. Najdeme je ve všech jedincích daného druhu a zpravidla se vyskytují ve specializovaných buňkách zvaných bakteriocyty (Baumann, 2005), jejich genomy jsou výrazně redukované a obsahují mnohem více A + T (Moran, 1996). Dalším rysem je společná fylogeneze s hostitelem a tedy vzájemně ovlivněné evoluční změny (Chen *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2000). Pokud se primární symbionti vyskytují pouze u některých linií hostitelů, naznačuje to, že se jedná o nedávno získané symbionty či o zbytky starého symbionta, který se u jiných hostitelských linií ztratil (Bennett and Moran, 2013).

V mnoha případech lze najít ještě sekundární symbionty, které je možné kultivovat *in vitro* (Baumann, 2005). Vyskytují se také ve střevech hostitele, jsou evolučně mladší a jejich funkce jsou hlavně fakultativně prospěšné (Salcedo-Porras *et al.*, 2020). Předpokládá se, že sekundární symbionti mohou sloužit také jako zdroj pro náhradu primárních symbiontů,

u kterých časem hrozí přílišná degradace (Feldhaar and Gross, 2009, Sloan and Moran, 2012; Bennett and Moran, 2015). Sekundární symbionti mohou být důkazem toho, že občas dochází i k horizontálnímu přenosu mezi hostitelskými druhy (Oliver *et al.*, 2010).

1.2 Hmyz a endosymbiotické bakterie

Odhaduje se, že až dvacet procent veškerých druhů hmyzu využívá ke svému životu pomoc vnitrobuněčných endosymbiotických bakterií. Dá se předpokládat, že oboustranně prospěšný vztah s těmito bakteriemi významně napomohl jejich evolučnímu úspěchu. U hmyzu sajícího mízu a hmyzu sajícího krev byla už při použití světelného mikroskopu dokázána přítomnost specializovaných buněk, nazývaných bakteriocyty (původně mycetocyty), ve kterých se endosymbiotické bakterie vyskytují (Blochmann, 1892; Buchner, 1965). Pomocí experimentů, během nichž došlo k odstranění endosymbiotické bakteri z těla hostitele, se ukázalo, že u některých druhů hmyzu je konkrétní endosymbiont v organismu nezbytný. Po jeho odstranění měl hostitel problémy se správným vývojem, plodností, a docházelo k významnému zkrácení života (Douglas, 1998; Baumann, 2005; Zientz *et al.*, 2006). U bakterie *Wigglesworthia*, která slouží jako endosymbiotická bakterie much rodu *Glossina*, byly odhaleny funkce sloužící pro biosyntézu kofaktorů a vitamínů, avšak nenašly se žádné funkce sloužící k biosyntéze esenciálních aminokyselin pro hostitele (McCutcheon and Moran, 2007). Z toho vyplývá, že hostitel využívá tyto bakterie hlavně pro doplnění látek, které se v jeho typické potravě vyskytují buď málo, nebo vůbec, ale k životu a úspěšnému vývoji je potřebuje (Baumann, 2005; López-Sánchez *et al.*, 2009; Manzano-Marín *et al.*, 2015). Proto se endosymbiotické bakterie vyskytují převážně u těch druhů hmyzu, které jsou přizpůsobeny na příjem specifické potravy (Blochmann, 1892; Buchner, 1965; Feldhaar and Gross, 2009;). Někdy je k tvorbě konkrétních látek zapotřebí spolupráce endosymbionta i hostitele. Například syntéza vitamínu B5 u hostitele *Acyrtosiphon pisum* a jeho primárního endosymbionta *Buchnera aphidicola*. Hostitel dokáže vytvořit potřebné prekurzory a ty pak transportovat do těla bakterie, která díky nim následně dokončí syntézu vitamínu B5, jehož část si ponechá a část dodá zpět hostiteli. Tomuto procesu se říká metabolická komplementace (Wilson and Duncan, 2015).

Díky dlouhé koevoluci hostitele a endosymbionta lze předpokládat, že došlo k vyrovnání bakteriální virulence a současně také k snížení imunitní obrany hostitele vůči endosymbiontovi, ve snaze vytvořit vztah pro oba co nejvýhodnější. Hostitel tedy může

do jisté míry regulovat množství bakterií ve svých buňkách, ale jeho imunitní systém je přizpůsoben tak, aby bakterie nikdy zcela nevyhubil. Samotní endosymbionté mají možnost buď aktivně hostitele ovlivnit a potlačit tak jeho imunitní odpověď, nebo mohou pozměnit vlastní „viditelnost“ pro imunitní systém hostitele změnou molekulárního složení buněčné stěny (Feldhaar and Gross, 2009).

1.3 Bakteriocyty

Obligátní endosymbionti se naučili žít ve speciálních hostitelských buňkách, které se nazývají bakteriocyty. Jedná se o specifický typ hostitelských buněk, které jsou charakteristické svou morfologií a umístěním. Často také tvoří větší struktury, kterým říkáme bakteriomy. Ty můžeme najít buď mezi buňkami střední části střev, například u mravenců rodu *Camponotus*, nebo mohou ve střevech tvořit útvary, které svým vzhledem připomínají orgány, které se nachází například u mšic nebo švábů (Sauer *et al.*, 2002; Baumann, 2005). Všechny bakteriocyty u různých druhů hmyzu, mají dva společné znaky, a to velikost až 100 μ m, a fakt, že obsahují endosymbiotické bakterie nezbytné pro hostitele (Douglas, 1989). Bakterie se pak mohou vyskytovat buď volně v cytosolu, nebo uzavřené ve vakuolách bakteriocytů (Sauer *et al.*, 2002; Baumann, 2005). Mezi hostitelem a endosymbiontem dochází k výměnám esenciálních látek. Bakterie žijící v bakteriocytech hostitelského organismu často ztrácejí většinu genů, které se podílejí na správné tvorbě buněčných obalů. To naznačuje, že prostředí hostitelského bakteriocytu může nahradit původní funkce bakteriálních buněčných obalů (Nakabachi *et al.*, 2005; Moran *et al.*, 2008). Pokud má hostitel větší počet různých endosymbiontů, mohou se vyskytovat oděleně v bakteriocytech, které se liší svojí morfologií, ale není to pravidlem. U některých druhů hmyzu také dochází k oddělování endosymbiontů pomocí tzv. perisymbiotické membrány (Douglas, 1989).

Mimo bakteriocyty můžeme najít endosymbiotické bakterie také v reprodukční tkáni a vajíčcích hostitele. Primární i sekundární endosymbiotické bakterie jsou předávány vertikálně pomocí transovariálního přenosu čímž zajišťují dlouhotrvající koevoluci hostitel-endosymbiotická bakterie. (Baumann *et al.*, 1995; Schröder *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2000).

1.4 Vliv na genom endosymbionta

Ke správnému a stabilnímu začlenění symbiotické bakterie do hostitelské eukaryotické buňky je třeba, aby ona bakterie přizpůsobila svůj metabolismus. Toto modifikování způsobilo, že metabolismus symbiotické bakterie je natolik pozměněn od té volně žijící, že je většinou nemožná kultivace *in vitro* (Moran, 2001). Přizpůsobení se na vztah hostitel-endosymbiont vyvolalo drastické zmenšení genomu u endosymbiotické bakterie vlivem tzv. Muller's ratchet (viz níže). Na rozdíl od volně žijících bakterií, jejichž genomy mají obvykle velikost přibližně mezi 2 až 12 Mbp, endosymbiotické bakterie mají genomy mnohem menší, v extrémních případech až 160 kbp, a tomu také odpovídá malá kapacita kódování (Gil *et al.*, 2002; Wernegreen, 2002; Douglas and Raven, 2003; Baumann, 2005 Lynch *et al.*, 2006). Velikost genomů endosymbiotických bakterií častokrát hraničí s minimálním genomem, tedy sadou genů, které stačí konkrétnímu organismu pro život v příznivých podmínkách. V reálných podmínkách je počet genů lehce vyšší kvůli reálným ekologickým vlivům na organismus (Mushegian and Koonin, 1996; Curnow *et al.*, 1997; McCutcheon and Moran, 2012).

U endosymbiontů tedy došlo k selektivnímu snížení metabolické kapacity bakterie a eliminaci biosyntetických drah, které v konkrétním prostředí uvnitř hostitele neměly uplatnění. Metabolické dráhy, které nejsou klíčové pro přežití bakterie nebo správné fungování životních funkcí, byly odstraněny, aniž by došlo k poškození endosymbiotické bakterie, produkci toxických metabolitů, nebo negativní reakci hostitelského organismu na přítomnost bakterie. Schopnost uskutečňovat anabolické a katabolické reakce je u endosymbiontů silně redukována, dochází u nich ke značné až úplné ztrátě regulačních faktorů a systémů přenosu signálů, a kvůli vysokému tlaku kyslíku v okolí endosymbionta došlo ke zpřísnění respiračního a energetického metabolismu (Zientz *et al.*, 2004).

Někdy však dochází ke ztrátě genů nebo biosyntetických drah, které jsou pro život bakterie potřebné, endosymbiont je pak odkázán na pomoc hostitelského organismu (Moran and Plague, 2004). Hostitel je v tom případě schopen pomocí svých genů vytvářet a následně doručit látky potřebné pro správnou funkci bakterie (McCutcheon and von Dohlen, 2011; Koga *et al.*, 2013). Z tohoto vyplývá, že jednou z nejdůležitějších vlastností vztahu hostitel-endosymbiont je vzájemná závislost jejich metabolismů a kombinace jejich metabolických drah, pokud mají společný meziprodukt. Některé látky musí být dodávány bakterii hostitelem,

jsou poté využívány endosymbiontem pro vlastní potřeby zajišťující přežití, nebo jsou nadále využívány k syntéze metabolitů vyžadovaných hostitelem (Zientz *et al.*, 2004). Endosymbiotické buňky si tedy ponechávají převážně geny podílející se na replikaci, transkripci, translaci a syntéze metabolitů nezbytných pro hostitele (Zientz *et al.*, 2004; McCutcheon, 2010). Fakt, že endosymbiotické bakterie jsou ve vhodných podmínkách uvnitř hostitele schopné redukovat mnoho svých genů, naznačuje, že podobné mechanismy úpravy genomu se dají aplikovat na většinu bakterií (Zientz *et al.*, 2004).

1.5 Muller's ratchet a vliv na genom endosymbionta

U většiny organismů se můžeme setkat s poměrně vysokou pravděpodobností a rychlostí výskytu škodlivých mutací (Crow and Simmons, 1983; Bell and Graham, 1988; Kondrashov, 1988; Charlesworth *et al.*, 1990; Hoekstra, 1991; Houle *et al.*, 1992; Moran, 1996). Pokud bereme v potaz pouze množství mutací, pak logicky ta populace, která nese nejvyšší počet nashromážděných mutací, má největší šanci na vyhnutí. Na tento fakt u malých nepohlavních populací poukázal genetik Hermann Joseph Muller roku 1964 (Muller, 1964). Pokud předpokládáme počet zpětných mutací téměř nebo úplně nulový, a zároveň kvůli nepohlavnímu rozmnožování u těchto populací nedochází k rekombinaci, dojdeme k závěru, že takovýto organismus nemůže zplodit potomka, který by měl menší počet mutací, než jaké má on sám. U jednotlivců s nejvyšším počtem mutací může dojít k neschopnosti se dále reprodukovat a tato populace tedy vyhyne. U jedinců s menším počtem mutací dochází k hromadění malých mutací až do bodu, kdy také nejsou schopni reprodukce. Tento jev, který byl roku 1974 Joe Felsensteinem pojmenován jako Muller's ratchet (Felsenstein, 1974), se opakuje stále dokola (Haigh, 1978; Smith, 1978; Pamilo *et al.*, 1987; Bell and Graham, 1988; Birky and Walsh, 1988; Charlesworth, 1990; Lynch and Gabriel, 1990; Melzer and Koeslag, 1991; Gabriel *et al.*, 1993; Moran, 1996).

Čím menší populace, tím větší roli hraje náhoda (tj. stochastické procesy), více se zde vyskytují škodlivé mutace, které se následně hromadí a způsobují rychlejší pokles populace a fitness jedinců, což označujeme jako mutační zhroucení. Hromaděné mutace, které mají na život populace vliv, mohou způsobovat pouze mírně negativní účinky, jelikož na silně negativní mutace působí selekce a organismus buď nepřežije, anebo není schopen předat své geny do další generace (Gabriel *et al.*, 1993).

Vedle významného zkrácení bakteriálního genomu je dalším charakteristickým znakem pro vztah hostitel-endosymbiont mnohem větší četnost adeninu (A) a thyminu (T), a zároveň tedy pokles obsahu guaninu (G) a cytosinu (C) zhruba na 16 – 33%, zatímco u volně žijících bakterií je to kolem 50% (Moran *et al.*, 2008; Feldhaar and Gross, 2009). V genomech několika členů stejného rodu endosymbiontů se objevují podobné prvky, i když se v průběhu milionů let vyvíjeli nezávisle (Tamas *et al.*, 2002; Degnan *et al.*, 2005).

Genomy u endosymbiotických bakterií závislých na hostiteli jsou mnohem více ovlivněny efektem Muller's ratchet a tedy účinkem náhody na frekvenci alel. Rychleji fixující se škodlivé mutace mění aminokyseliny, stabilitu proteinů a inaktivují nebo mažou neesenciální geny. Geny sloužící pro opravu DNA jsou tak ztraceny, a dochází tak k fixování mutací, které upřednostňují A + T (Moran, 2006). Tyto skutečnosti byly objeveny dříve, než došlo k úplnému dekódování genomů daných bakterií (Moran, 1996). Z výše zmíněných faktů vyplývá, že procentuální obsah A + T, respektive G + C, ukazuje, jak moc je bakteriální genom degenerovaný a do jaké míry ztratil endosymbiont schopnost opravy vlastní DNA. Vysokou frekvenci A + T můžeme najít hlavně v místech neutrálních nebo téměř neutrálních co se týče selekčního výběru. Například tedy v tichých místech na kodonech (Moran, 1996; Degnan *et al.*, 2005).

1.6 Vši a endosymbiotické bakterie

Vzhledem k charakteru potravy, kterou vši přijímají, dochází k absenci specifických látek potřebných pro jejich přežití. Tyto látky si vši jednak neumí obstarat z krve hostitele, jednak si je neumí ani syntetizovat (Baumann, 2005; López-Sánchez *et al.*, 2009; Manzano-Marín *et al.*, 2015). Vši patří mezi obligátní parazity žijící se výhradně krví savců. Jedná se též o hostitelské organismy pro endosymbiotické bakterie, které se přenášejí vertiikálně od matky k potomkům. Dva významní symbionti krevsajících vší jsou *Legionella polyplacis* (dále jen *L. polyplacis*; u vší rodu *Polyplax*) a *Candidatus Riesia pediculischaeffi* (dále jen *R. pediculischaeffi*; u vší rodu *Pediculus schaeffi*) (Bright and Bulgheresi 2010; Říhová *et al.*, 2017; Boyd *et al.*, 2017). Nejdůležitějšími látkami, které bakterie hostiteli dodávají, jsou vitamíny B, hlavně vitamín B7, potřebný pro správnou syntézu mastných kyselin. Dále také vitamín B5, který slouží jako prekurzor koenzymu A (Vallari and Rock, 1985; Duron and Gottlieb, 2020).

Zajímavostí je, že u bakterií rodu *Riesia* jsou geny potřebné k syntéze vitamínu B5 kódovány na plazmidu (Kirkness *et al.*, 2010; Boyd *et al.*, 2014) Tato anomálie však může přinášet nevýhody, jako třeba nutnost více kroků při dělení buňky, z důvodu zajištění přenosu genetické informace do všech dceřiných buněk (Boyd *et al.*, 2017).

Symbióza u různých druhů vší není důkazem vzniku ze společného předka, ale spíše se vyvinula u různých druhů několikrát nezávisle na sobě (Buchner, 1965; Hypša and Křížek, 2007; Allen *et al.*, 2009, 2016; Boyd and Reed, 2012; Boyd *et al.*, 2016).

1.7 *Legionella*

Bakterie rodu *Legionella* patří mezi gramnegativní kokobacily, které měří 0,3 až 0,9 µm na šířku a 2 až 20 µm na délku. Pokud jsou pěstovány na kultivačních médiích, pak tvoří prodloužené vláknité formy (Diederer, 2008). Jedná se o známé lidské patogeny způsobující těžkou plicní infekci pod názvem Legionářská nemoc (Diederer, 2008; Joseph *et al.*, 2016), která je často doprovázena silným kašlem, horečkou a bolestí hlavy (Stout and Yu, 1997). Nejčastěji se tyto bakterie vyskytují v biofilmech spojených s amébami, na kterých parazitují (Fields, 1996; Joseph *et al.*, 2016), tedy hlavně v přírodních vodních prostředích, kterými jsou například potoky, řeky, jezera, rybníky, vlhá půda a bahno. Přežívají chloraci a mohou se tedy dostat do vodovodních systémů a množit se například na sprchových hlavicích či vodovodních bakteriích (Diederer, 2008). Nepatří k typickým endosymbiotickým bakteriím, jelikož jediný případ symbiózy byl nalezen u vší rodu *Polyplax*. V té době však ještě nebyla známa identita nalezených symbiontů (Aschner, 1934). Vší rodu *Polyplax* patří mezi typický příklad obligátních hematofágů a jsou tedy zcela závislé na symbiotických bakteriích, které pro ně syntetizují potřebné látky. Bakterie u těchto vší byla na základě 16S rDNA sekvenování určena jako člen rodu *Legionella*, přičemž se zjistilo, že tvoří nezávislé fylogeneticky vzdálené linie (Hypša and Křížek, 2007). Kompletní genom této bakterie je již znám (Říhová *et al.*, 2017).

1.8 *Riesia*

Bakterie rodu *Riesia* jsou mladými primárními symbionty vší u lidí, šimpanzů a goril (Sasaki-Fukutsu *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2007, 2009; Hypša and Křížek, 2007; Nováková *et al.*, 2009). Vyskytují se v bakteriocytech ve střevech těchto vší. Po dovršení sexuální dospělosti migrují tyto bakterie do rozmnožovacích orgánů hostitele a vertikálním přenosem tak zajišťují přenos genů do další generace hostitele (Ries, 1931; Buchner, 1965; Eberle and

McLean 1982; Sasaki-Fukatsu *et al.*, 2006; Perotti *et al.*, 2007; Bright and Bulgheresi, 2010). Na základě experimentů, kde byly endosymbionti z hostitele odstraněni, byl vysloven předpoklad, že hlavním účelem bakterií *Riesia* je syntéza sedmi různých vitamínů B, které si hostitel sám vytvořit nedokáže (Puchta, 1955). Jedním z nich také vitamín B5, neboli kyselina pantothenová, sloužící k syntéze koenzymu A, bez které veš nepřežije (Perotti *et al.*, 2008).

Tato bakalářská práce je součástí komplexnějšího výzkumu symbiotických bakterií krevsajícího hmyzu, probíhajícího dlouhodobě v naší laboratoři na katedře parazitologie. Významnou složkou tohoto výzkumu je studium genomické a metabolické kapacity různých symbiontů u různých hostitelů a v různých fázích symbiogeneze. Taková analýza vyžaduje podrobné zmapování metabolických drah a schopností jednotlivých symbiontů. V dostupné literatuře jsou však taková srovnání obvykle založena na poměrně jednoduchých kritériích (přítomnost/nepřítomnost všech potřebných genů), popřípadě nejsou kritéria hodnocení jasně výjádřena. V této bakalářské práci se proto věnuji vytvoření podrobného porovnání dvou endosymbiotických bakterií vší vzniklých z odlišných skupin bakterií, *L. polyplacis* a *R. pediculischaeffi*. Jednotlivými kroky této analýzy jsou:

- Identifikace genů, které zůstaly u těchto bakterií zachovány
- Přiřazení genů k příslušným metabolickým drahám
- Posouzení kompletnosti a funkčnosti jednotlivých metabolických drah
- Porovnání shod a rozdílů ve stavbě genomů těchto bakterií
- Vytvoření přehledných metabolických map pro obě bakterie

2 Materiály a metody

Kompletní genomy bakterií *L. polyplacis* a *R. pediculischaeffi* byly dodány profesorem Václavem Hypšou RNDr. CSc. S pomocí programu Geneious Prime 2020.2.4 (Kearse *et al.*, 2012) byly vyexportovány ve formátu fasta. Následně byla provedena anotace pomocí internetové platformy RAST (Aziz *et al.*, 2008) k anotaci metodou Classic RAST s automatickou opravou chyb. Hotové anotované genomy byly otevřeny znovu v programu Geneious Prime, geny byly jednotlivě vyexportovány a pomocí funkce Translate převedeny na sekvenci aminokyselin. V sekci Annotations byly geny seřazeny vzestupně podle sloupce Minimum, tedy podle umístění první aminokyseliny v genomy a vyexportovány jako tabulka do programu Microsoft Excel 2016 16.0.4266.1001 pro pozdější využití (tabulka dostupná jako elektronická příloha).

Stejným způsobem seřazené geny společně se sekvencemi byly jako jiná tabulka vyexportovány do programu Microsoft Excel 2016, kde bylo přidáno číslování genů a symboly <. Tabulka byla poté vložena jako prostý text do programu Microsoft Word 2016 16.0.4266.1001 a upravena na formát fasta.

Za účelem případné identifikace genů označených severem RAST jako „hypothetical proteins“ byly sekvence aminokyselin nahrávány do platformy BLAST (Camacho *et al.*, 2009) s využitím funkce Protein BLAST. Z hledání byly vždy vyloučeny bakterie, kterým geny patřily, tedy buď *L. polyplacis* nebo *R. pediculischaeffi*. V sekci Algorithm parameters byl Expect threshold změněn z 0,05 na 10, jelikož při zachování původní hodnoty často docházelo k nenalezení informací u spousty zkoumaných genů. Po dokončení byl vždy vybrán výsledek s nejvyšší podobností a jeho kód byl zanesen do tabulky (viz elektronická příloha).

Subor všech proteinů (určených pomocí serveru RAST, viz výše) byl nahrán do platformy BlastKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016), jednotlivým genům tak byla ve výsledném souboru přiřazena KEGG čísla, která byla opět zanesena do tabulky. Tento soubor byl poté nahrán do KEGG Mapper (Kanehisa *et al.*, 2020), kde byly geny zařazeny do příslušných metabolických drah.

Jednotlivé metabolické dráhy byly následně prostudovány a vyhodnoceny jako funkční, spíše funkční či nefunkční. Na základě výsledků z KEGG Mapperu byla poté pomocí programu Adobe Illustrator CC 2019 v23.0.1 vytvořena jednoduchá schémata znázorňující aktivitu metabolických drah u obou bakterií.

3 Výsledky

Následující podrobné rozборы jednotlivých metabolických drah bakterií *L. polyplacis* a *R. pediculischaeffi* pomocí přiřazených KEGG čísel ukazují, které enzymy jsou **přítomny**, a které naopak **chybí**. Stejná KEGG čísla jsou uvedena v tabulce přiložené jako elektronická příloha. Na obrázcích 1-25 jsou poté přítomné enzymy vyznačeny zeleně.

3.1 *Legionella polyplacis*

Genom bakterie *L. polyplacis* je dlouhý 529 784 bp. Anotace pomocí programu RAST rozpoznala celkem 523 genů. Obsah GC tvoří 23% genomu, což napovídá značné degradaci a velmi dlouhému vztahu hostitel-endosymbiotická bakterie. Celkem 31 z 523 genů byly označeny jako „hypothetical protein“. Jejich sekvence tedy naznačují přítomnost genů, jsou však degradované do takové míry, že je RAST nedokáže rozpoznat, nebo nejsou známy jejich homology a není podle čeho je určit. Díky programu BLAST našlo 23 z nich sobě podobné proteiny u jiných bakterií a dá se tedy předpokládat, že u bakterie *L. polyplacis* kódují stejné proteiny. Naprostá většina ostatních genů, u kterých došlo k rozpoznání, je podobná genům u jiných druhů rodu *Legionella*, což zvýšilo jejich šanci na identifikaci (viz tabulka v elektronické příloze).

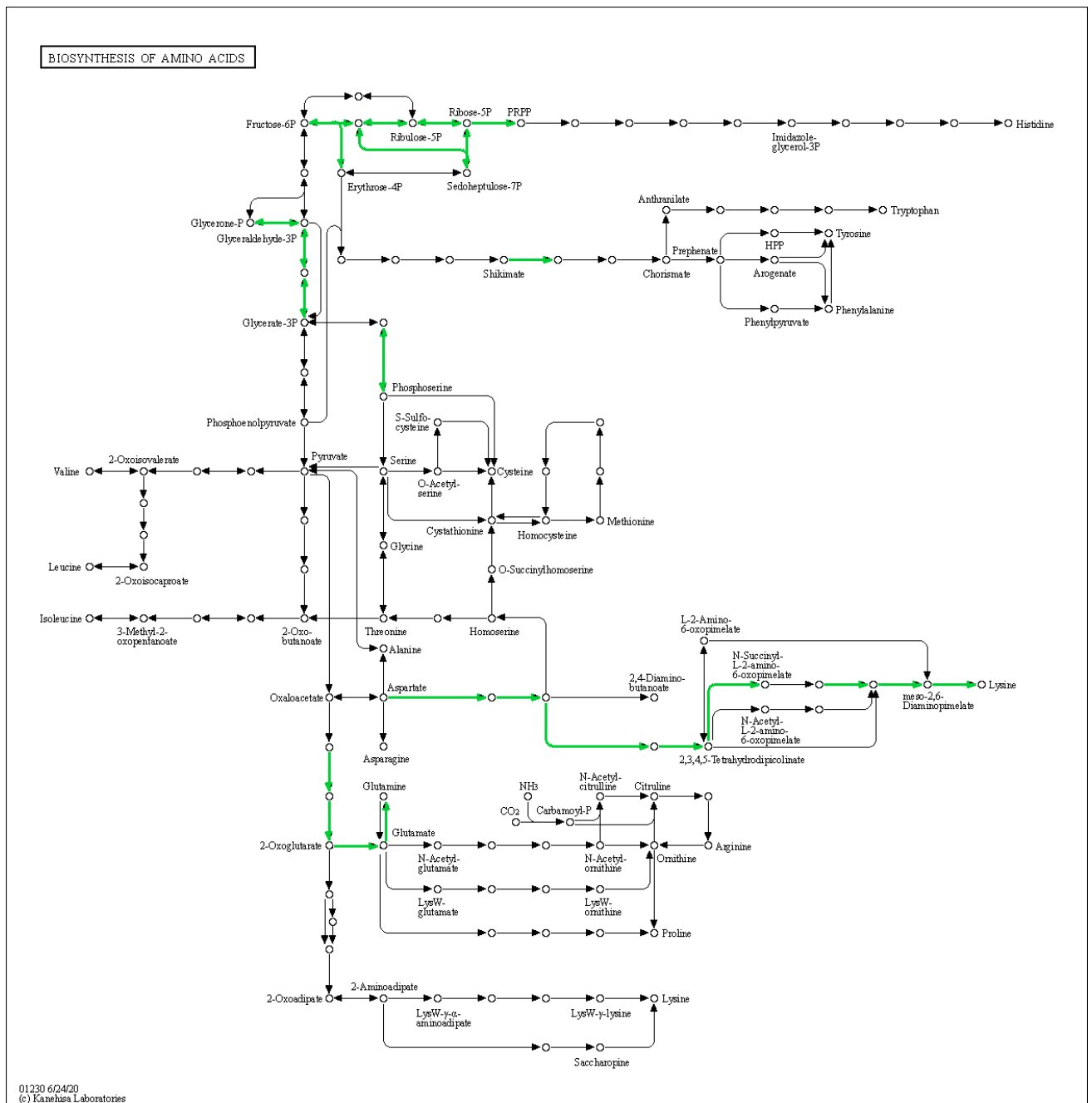
3.1.1 Aminokyseliny

Rekonstrukce pomocí KEGG Mapperu ukázala, že bakterie *L. polyplacis* není schopna syntetizovat značnou většinu aminokyselin. Těmi jsou alanin (A), arginin (R), asparagin (N), cystein (C), glycin (G), histidin (H), izoleucin (I), leucin (L), metionin (M), fenylalanin (F), prolin (P), serin (S), treonin (T), tryptofan (W), tyrosin (Y) a valin (V). Bakterie dokáže syntetizovat enzym **K01424** (L-asparaginase I), díky kterému může z L-asparaginu vytvořit L-kyselinu asparagovou (obr. 1), avšak jelikož ta sama je potřebná k tvorbě L-asparaginu, je tento protein vlastně nepotřebný. Jedná se pravděpodobně o pozůstatek, který ještě nestihl plně degradovat.

Bakterie je pravděpodobně schopna syntetizovat kyselinu glutamovou (E). Kóduje enzym **K01681** (Aconitate hydratase), díky kterému vytvoří z citrátu isocitrát, z něj pomocí **K00031** (Isocitrate dehydrogenase [NADP]) 2-oxoglutarát, a z něj pomocí **K15371** (NAD-specific glutamate dehydrogenase, large form) L-kyselinu glutamovou (obr. 1). Problémem je, že si bakterie sama nedokáže citrát vytvořit. Pokud k syntéze kyseliny glutamové dochází,

pak je bakterie schopna vytvořit i glutamin (Q) díky enzymu **K01915** (Glutamine synthetase type I).

L. polyplacis má řadu potřebných enzymů pro syntézu lysinu (K) (obr. 1). Z kyseliny asparagové pomocí **K12526** (Aspartokinase/Homoserine dehydrogenase), **K00133** (Aspartate-semialdehyde dehydrogenase), **K01714** (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase), **K00215** (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase) a **K00674** (2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase) postupně vytvoří N-succinyl-L-2-amino-6-oxopimelate, avšak chybí jí enzym **K00821** (N-succinyldiaminopimelate aminotransferase) a metabolická dráha je tak přerušena. Další potřebné enzymy **K01439** (N-succinyl-L,L-diaminopimelate desuccinylase), **K01778** (Diaminopimelate epimerase) a **K12526** (Aspartokinase/Homoserine dehydrogenase) k dokončení lysinu obsahuje (obr. 1). Vzhledem k chybějícímu enzymu uprostřed dráhy a k faktu, že bakterie není schopná vytvořit již počáteční kyselinu asparagovou, je pravděpodobné, že tato metabolická dráha je pozůstatek, který začíná degradovat.



Obrázek 1: Biosyntéza aminokyselin (*Legionella polyplacis*).

3.1.2 B-Vitamíny

Výsledky KEGG Mapperu ukázaly, že metabolické dráhy pro syntézu tiaminu (B1), niacinu (B3), kyseliny pantotenové (B5), pyridoxinu (B6) a kobalaminu (B12) zcela chybí.

Syntéza riboflavinu (B2) se zdá být téměř kompletní (obr. 2). Bakterie totiž dokáže z guanosintrifosfátu (GTP) pomocí **K14652** (3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate

synthase/GTP

cyclohydrolase

II)

a

K11752

(Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine

deaminase/5-amino-6-(5-

phosphoribosylamino)uracil reductase) vytvořit 5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil.

Absence **K22912** (5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil phosphatase) však zabraňuje

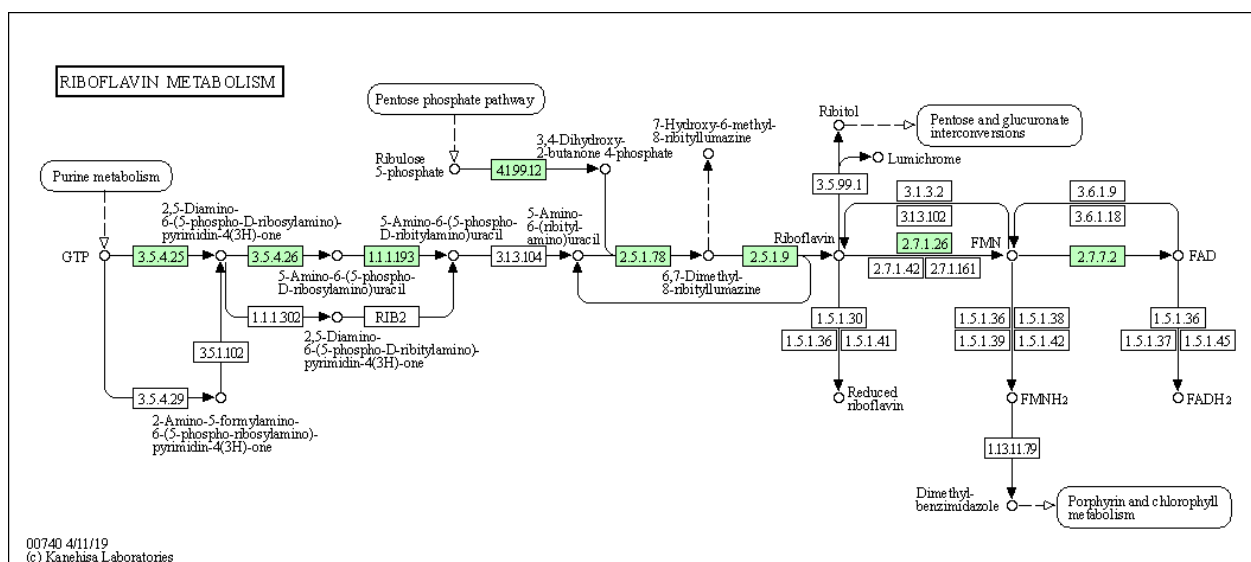
syntéze 5-amino-6-(ribitylamino)uracilu. Tato látka společně s 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-

phosphatem, syntetizovaným z ribulózy-5-fosfátu díky **K14652** (3,4-dihydroxy-2-butanone 4-

phosphate synthase / GTP cyclohydrolase II), jsou potřeba k dalšímu kroku biosyntézy

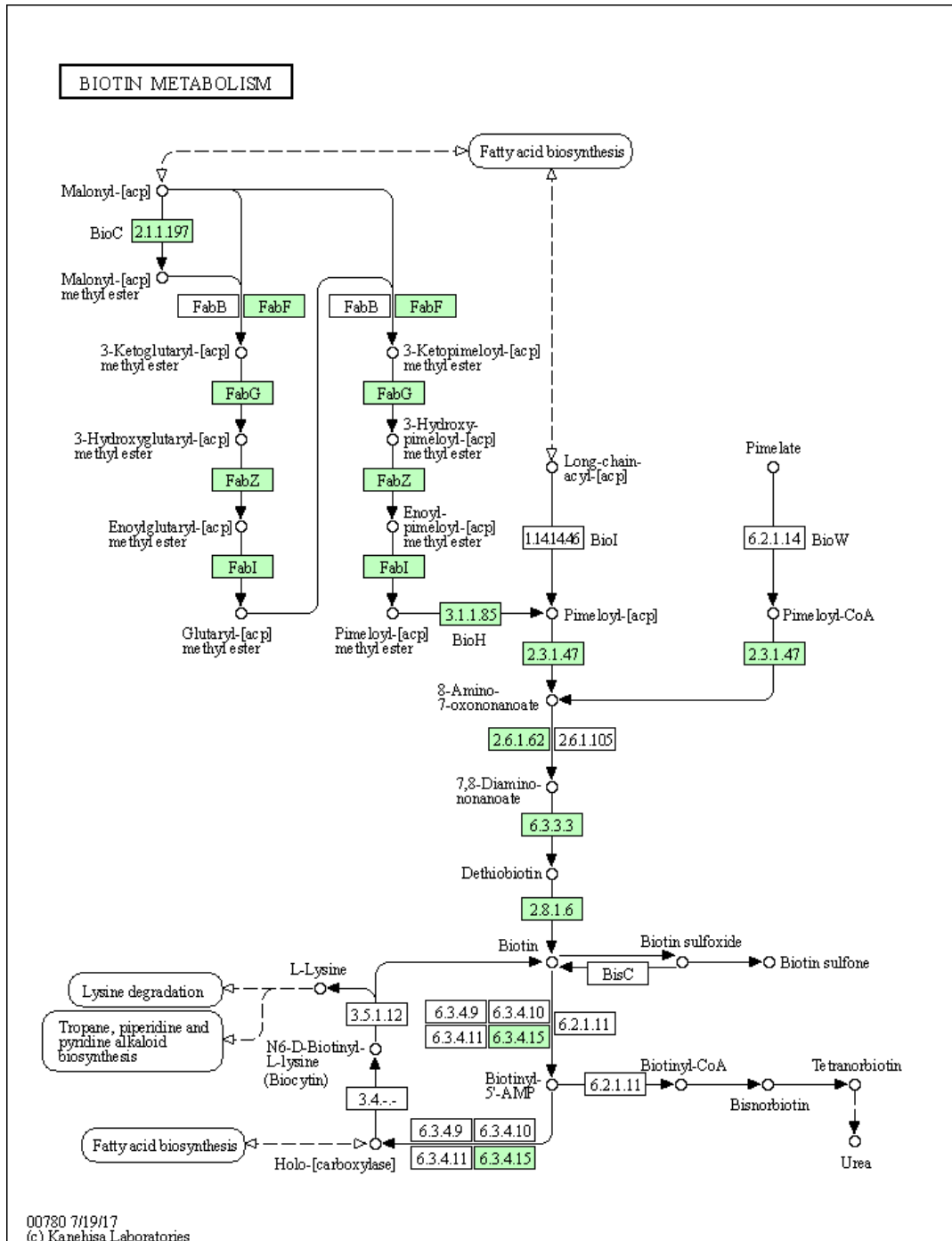
riboflavinu. Poslední dva enzymy **K00794** (6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase) a**K00793** (Riboflavin synthase eubacterial/eukaryotic) jsou již k dispozici, dokáže také vytvořit

počáteční GTP, takže v celé délce metabolické dráhy chybí pouze jeden jediný enzym.

Obrázek 2: Metabolismus riboflavinu (*Legionella polyplacis*).

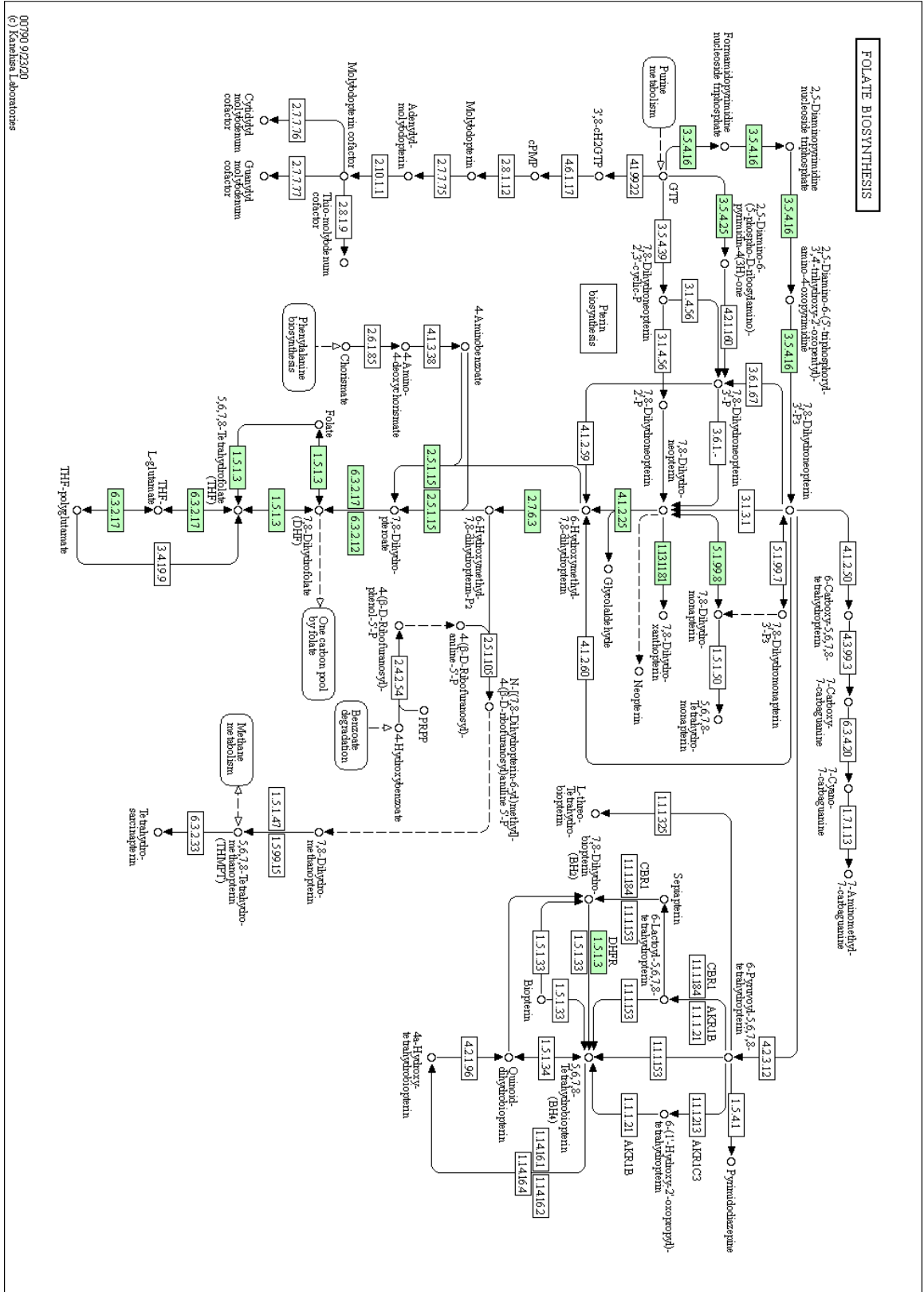
Prerekvizitou syntézy biotinu (B7) je dodání pyruvátu hostitelem, tuto látku totiž sama nedokáže vytvořit. Dále však již má potřebné enzymy **K00163** (Pyruvate dehydrogenase E1 component) a **K00627** (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex) k syntéze acetyl-CoA, z něj pomocí **K01962** (Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase alpha chain), **K02160** (Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase), **K01961** (Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase), **K01963** (Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase beta chain) a **K00645** (Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase) vytváří malonyl-[acp]. Následně za pomoci enzymů **K02169** (Biotin synthesis protein BioC), **K09458** (3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII), **K00059** (3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase), **K02372** (3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein]

dehydratase, FabZ form), **K00208** (Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]), **K02170** (Biotin synthesis protein BioH), **K00652** (8-amino-7-oxononanoate synthase), **K00833** (Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase), **K01935** (Dethiobiotin synthetase) a **K01012** (Biotin synthase) vytváří biotin (obr. 3).



Obrázek 3: Metabolismus biotinu (*Legionella polyplacis*).

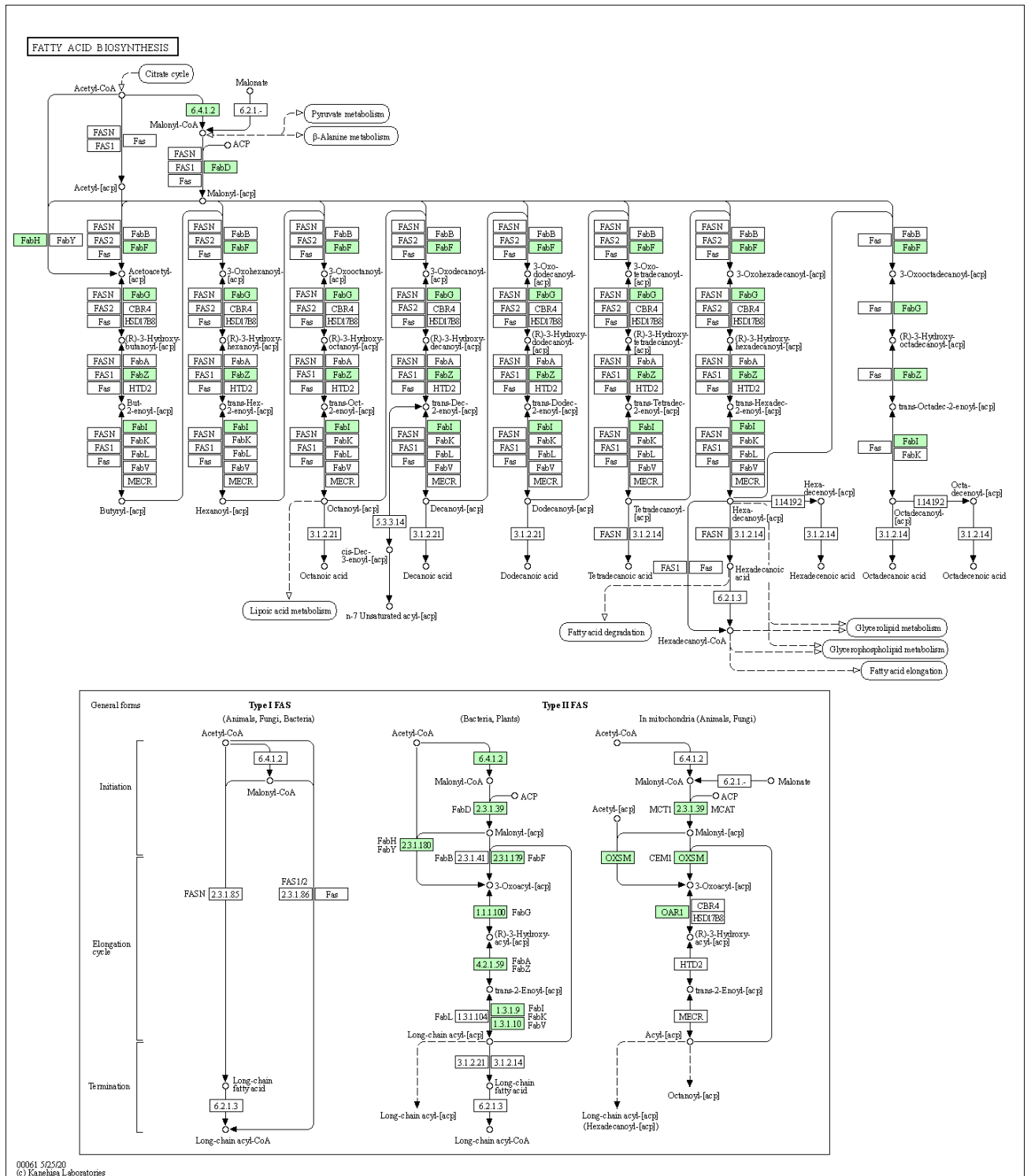
První pohled na obr. 4 může naznačovat, že metabolická dráha pro syntézu kyseliny listové (B9) je skoro kompletní, jelikož zde absentuje pouze **K01077** (Alkaline phosphatase). Ostatní enzymy jako **K01495** (GTP cyclohydrolase I type 1), **K01633** (Dihydroneopterin aldolase), **K00950** (2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine pyrophosphokinase), **K00796** (Dihydropteroate synthase), **K11754** (Dihydrofolate synthase, Folylpolyglutamate synthase) a **K00287** (Dihydrofolate reductase), díky kterým je schopna postupně z GTP vytvořit kyselinu listovou, jsou již zajištěny. Problém nastává v tom, že v jednom z finálních kroků, kde dochází k syntéze 7,8-dihydropteroátu, je nutný 4-aminobenzoát, tvořící se ve vedlejší metabolické dráze. Bakterie však nemá žádný z potřebných enzymů k syntéze této látky, tudíž syntéza kyseliny listové není možná.



Obrázek 4: Biosyntéza kyseliny listové (*Legionella polyplacis*).

3.1.3 Mastné kyseliny

Syntéza mastných kyselin vykazuje známky celistvosti (obr. 5). Bakterie dokáže z acetyl-CoA pomocí **K01962** (Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase alpha chain), **K02160** (Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase), **K01961** (Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase), **K01963** (Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase beta chain) a **K00645** (Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase) vytvořit malonyl-[acp]. Dále obsahuje potřebné enzymy **K00648** (3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASIII), **K09458** (3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII), **K00059** (3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase), **K02372** (3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase, FabZ form) a **K00208** (Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]) k tvorbě mastných kyselin navázaných na acp. Acp slouží jako univerzální nosič meziproductů během syntézy mastných kyselin. U bakterií jsou to monomerní proteiny, sloužící jako donory acylových skupin pro syntézu různých látek (Kresge *et al.*, 2005; Byers and Gong, 2007). K tvorbě celých mastných kyselin jí chybí enzymy **K01071** (Medium-chain acyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase) a **K10781** (Fatty acyl-ACP thioesterase B). Degradace mastných kyselin není bakterie schopna.

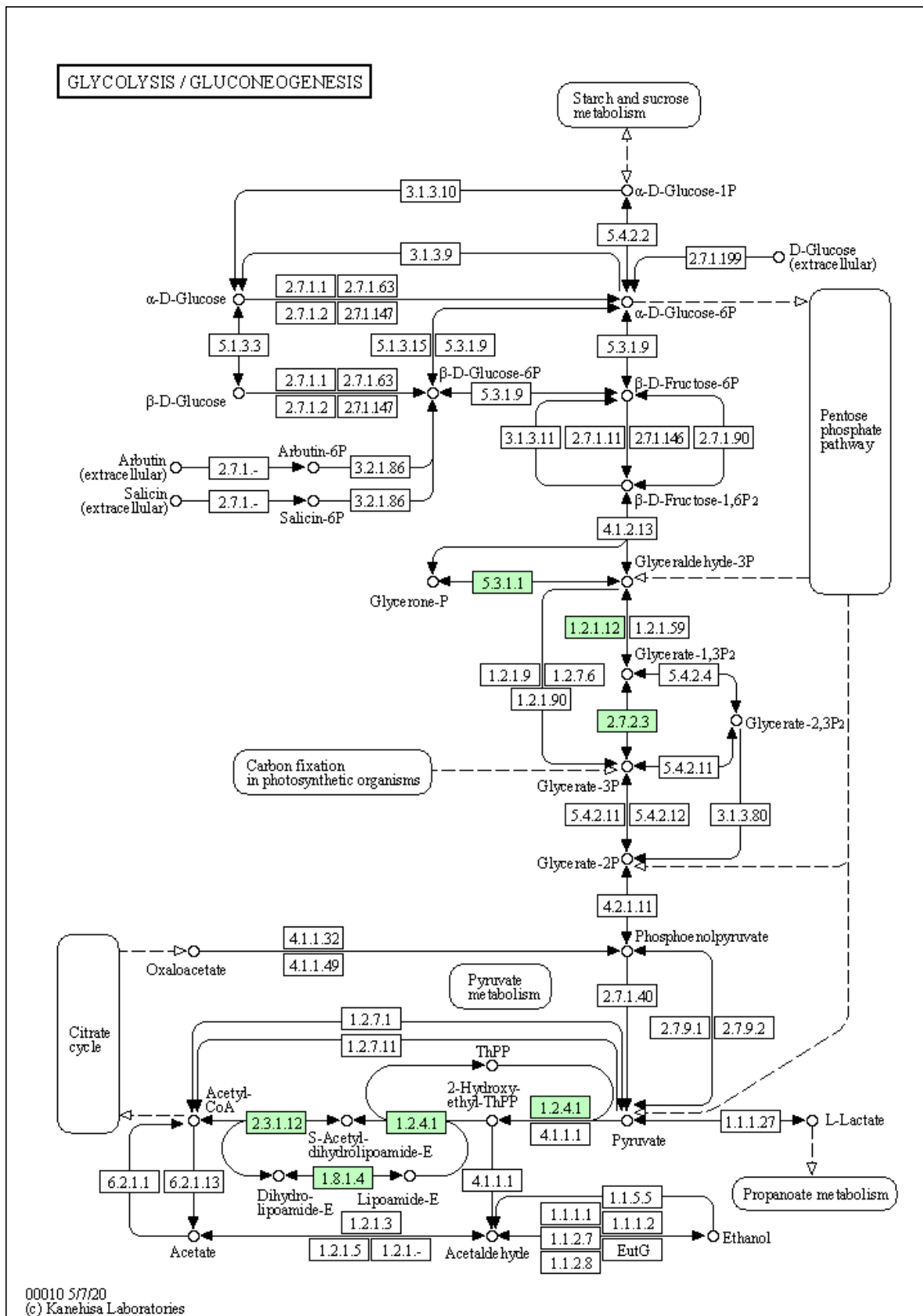


Obrázek 5: Biosyntéza mastných kyselin (*Legionella polyplacis*).

3.1.4 Glykolýza

Co se týče přípravné fáze glykolýzy, *L. polyplacis* nemá žádný z potřebných enzymů k postupné syntéze glyceralddehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu z glukózy. Ve výplatní

fázi, zaměřené na postupnou syntézu pyruvátu z glycerinaldehyd-3-fosfátu z přípravné fáze, má dva enzymy, a to **K00134** (NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) a **K00927** (Phosphoglycerate kinase). Díky těm by teoreticky z glycerinaldehyd-3-fosfátu mohla vytvořit glycerát-3-fosfát. Nedá se však říci, že by jejich přítomnost implikovala funkčnost výplatní fáze glykolýzy. Glukoneogenezi, při které dochází k syntéze glukózy z pyruvátu, bakterie rovněž nedokáže uskutečnit (obr. 6).

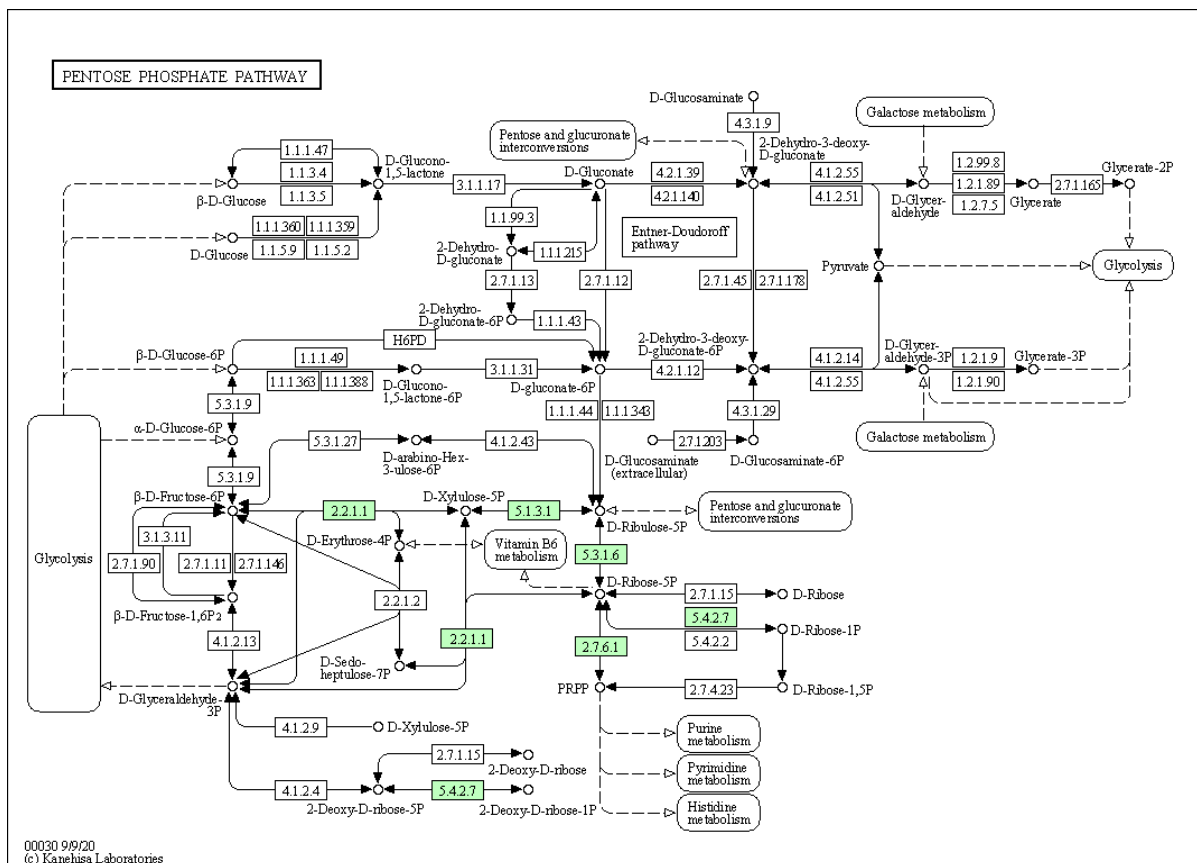


Obrázek 6: Glykolýza a glukoneogeneze (*Legionella polyplacis*).

3.1.5 Pentózofosfátový cyklus

Pro oxidativní fázi pentózofosfátového cyklu, během které se z glukózy-6-fosfátu stává ribulóza-5-fosfát, má bakterie pouze 2 enzymy: **K00615** (Transketolase) a **K01783** (Ribulose-phosphate 3-epimerase), díky kterým je možno z β -D-Fruktózy-6-fosfátu vytvořit D-ribulóza-5-fosfát. Chybí jí však gen **K01810** (Glucose-6-phosphate isomerase) důležitý pro přeměnu glukózy-6-fosfátu na β -D-fruktózu-6-fosfát, dá se tedy říct, že tato metabolická dráha je nefunkční (obr. 7).

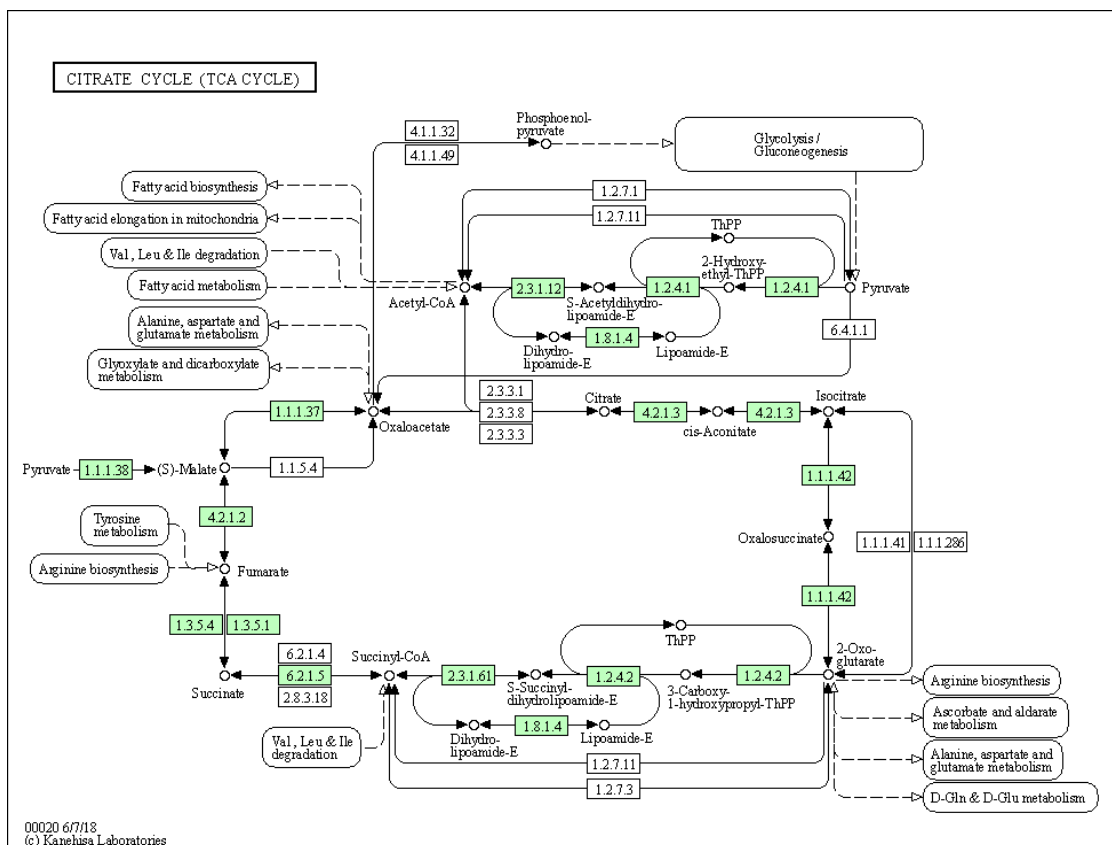
Pro regenerativní fázi může využít dva dříve zmíněné geny (K00615, K01783), díky kterým však dokáže zpětně vytvořit znovu jen β -D-fruktózu-6-fosfát. Alternativu skýtá využití druhé cesty díky enzymům **K01807** (Ribose 5-phosphate isomerase A) a **K00615** (Transketolase). V tomto případě se bakterie dostane pouze k D-sedoheptulóze-7-fosfátu, dále jí chybí **K00616** (Transaldolase), aby mohla vytyčenou cestou pokračovat (obr. 7).



Obrázek 7: Pentózofosfátový cyklus (*Legionella polyplacis*).

3.1.6 Citrátový cyklus

Metabolická dráha citrátového cyklu se zdá být u bakterie *L. polyplacis* téměř kompletní (obr. 8). Při dodání pyruvátu od hostitele, je schopna jej pomocí **K00163** (Pyruvate dehydrogenase E1 component) a **K00627** (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex) přeměnit na acetyl-CoA. Nedisponuje enzymem **K01648** (ATP citrate (pro-S)-lyase), díky kterému by z pyruvátu mohla vytvořit citrát, avšak dále má geny **K01681** (Aconitate hydratase), **K00031** (Isocitrate dehydrogenase [NADP]), **K00164** (2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component), **K00382** (Dihydrolipoamide dehydrogenase of pyruvate dehydrogenase complex), **K00658** (Dihydrolipoamide succinyltransferase component (E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex), **K01903** (Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] beta chain), **K00239** (Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit), **K01679** (Fumarate hydratase class II) a **K00024** (Malate dehydrogenase). Díky těmto enzymům může bakterie z citrátu postupně vytvořit isocitrát, oxalsukcinát, 2-oxoglutarát, sukcinyl-CoA, sukcinát, fumarát, malát a oxalacetát. Je také schopná díky **K00027** (NAD-dependent malic enzyme) syntetizovat z pyruvátu malát a tvořit jednotlivé meziproducty opačným směrem. Ovšem pouze k sukcinyl-CoA (resp. 3-Carboxy-1-hydroxypropyl-ThPP), jelikož na tvorbu 2-oxoglutarátu jí chybí **K00174** (2-oxoglutarate/2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase subunit alpha). Celkově však citrátový cyklus vykazuje za pomoci hostitele znaky funkčnosti.



Obrázek 8: Citrátový cyklus (*Legionella polyplacis*).

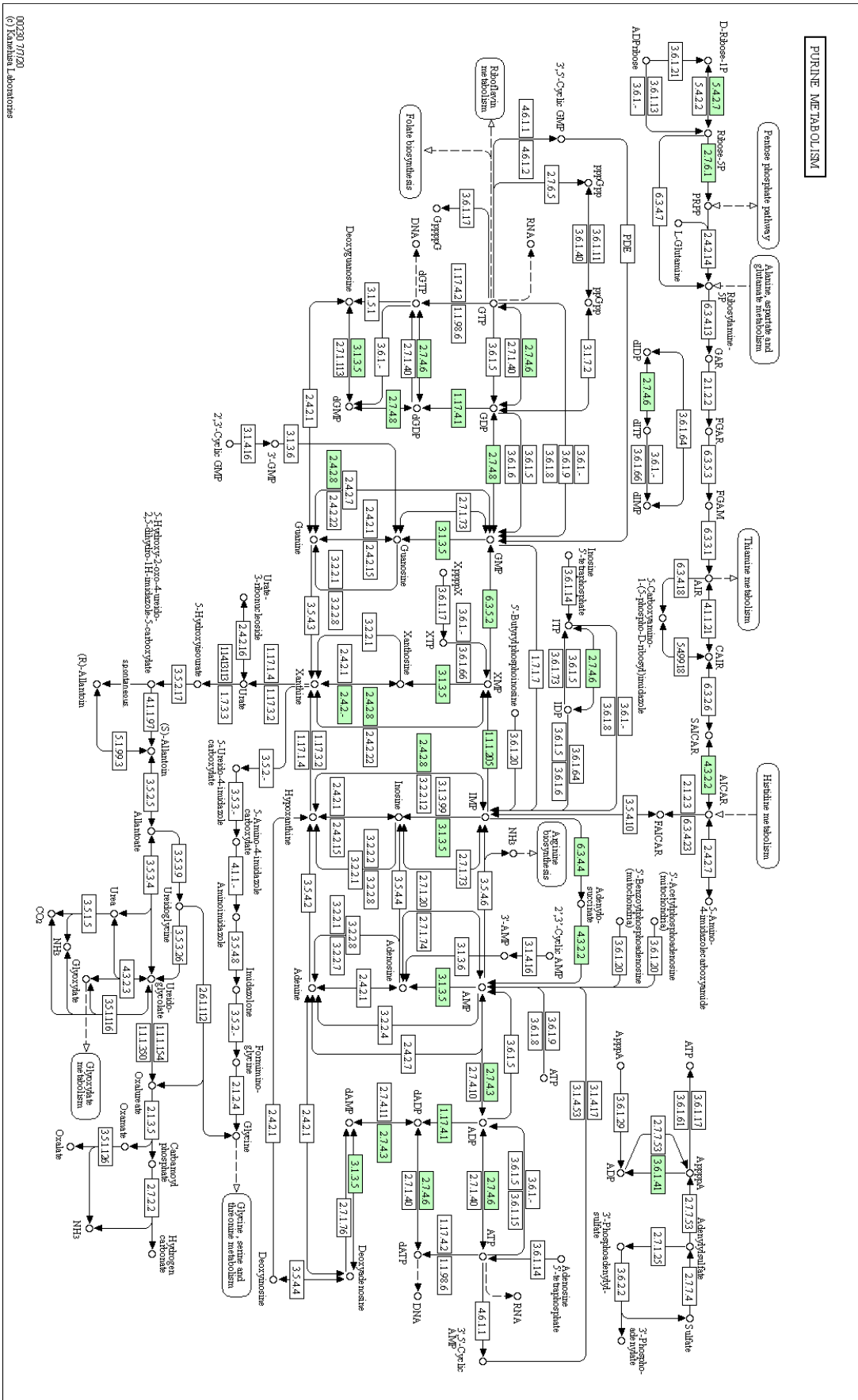
3.1.7 Puriny

L. polyplacis má v této metabolické dráze velké množství genů (obr. 9), a to primárně od části, kde dochází k přeměně inosin 5'-monofosfátu (IMP). Ten si však sama nedokáže syntetizovat a pravděpodobně jej získává od hostitele.

Za účasti enzymů **K01939** (Adenylosuccinate synthetase) a **K01756** (Adenylosuccinate lyase) dokáže vytvořit adenosin 5'-monofosfát (AMP) a díky **K03787** (5-nucleotidase SurE) jej přeměnit na adenosin, nemá však k dispozici žádné geny k syntéze adeninu. Z AMP je schopna syntetizovat adenosindifosfát (ADP) a adenosintrifosfát (ATP), díky enzymům **K00939** (Adenylate kinase) a **K00940** (Nucleoside diphosphate kinase). Pomocí enzymů **K00526** (Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), beta subunit), **K00939** a **K00940** může syntetizovat dADP, dATP a dAMP, který následně díky **K03787** dokáže přeměnit na deoxyadenosin.

Enzym **K00088** (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase) slouží k syntéze xantosin 5'-fosfátu (XMP), **K01951** (GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]) k syntéze guanosin 5'-monofosfátu (GMP). **K00942** (Guanylate kinase) používá bakterie k syntéze guanosindifosfátu (GDP) a za pomoci **K00940** jej mění na guanosintrifosfát (GTP). S využitím enzymů **K00526**, **K00940** a **K00942** umí následně syntetizovat dGDP, dGTP a dGMP, který díky **K03787** mění na deoxyguanosin.

Bakterie je schopná použitím **K03787** přeměnit GMP na guanosin, nebo díky **K00760** (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) na guanin. Díky výše zmíněným enzymům může z XMP vytvořit xantosin a xantin, a z IMP inosin a hypoxantin (obr. 9).



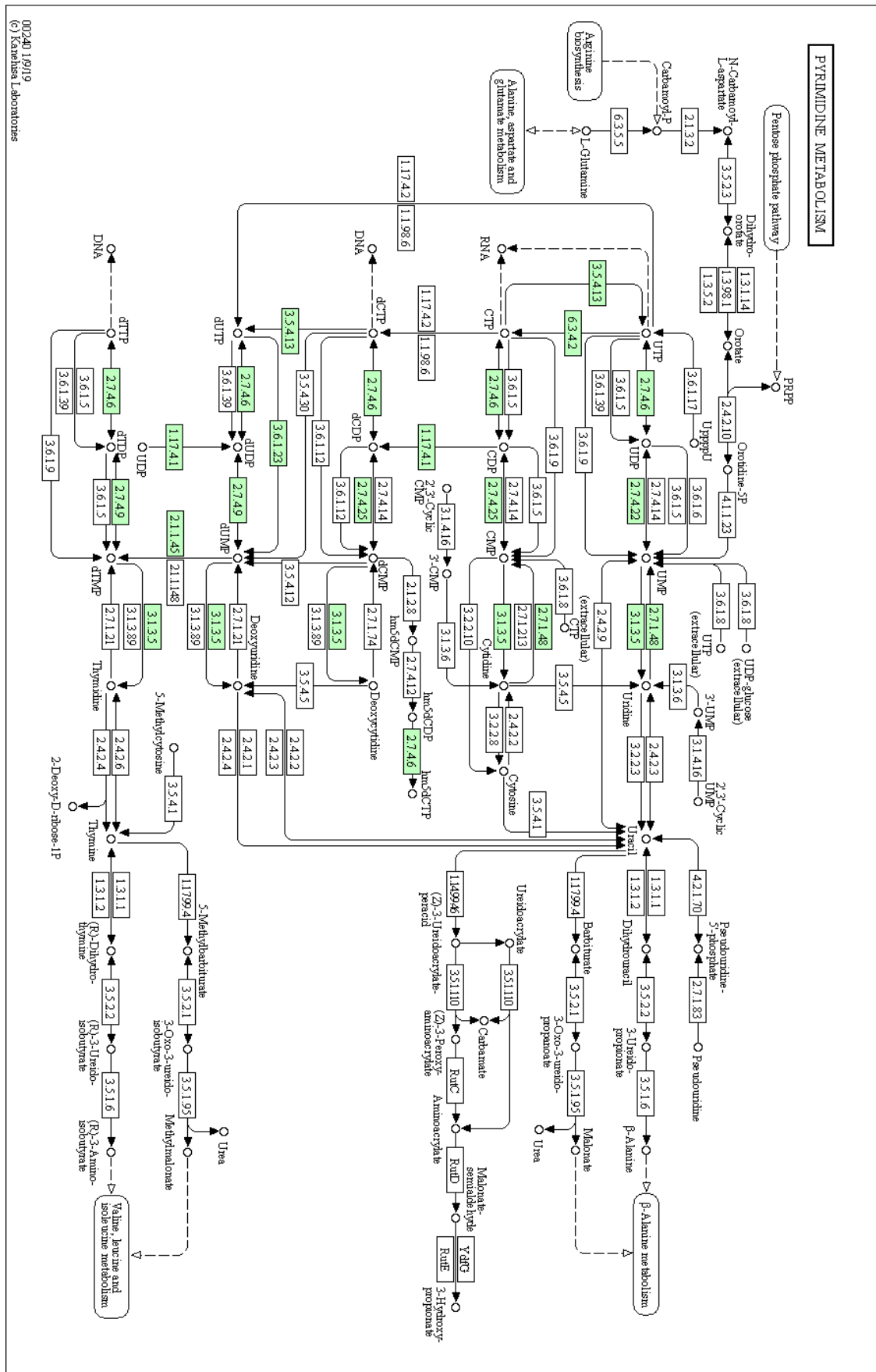
Obrázek 9: Metabolismus purinů (*Legionella polyplacis*).

3.1.8 Pyrimidiny

Stejně jako u purinů se i zde se objevují geny až od určité části dráhy (obr. 10). Výchozí látkou je zde uridin 5'-monofosfát (UMP), který se vlivem **K03787** (5-nucleotidase SurE) přeměňuje na uridin, nemá však další potřebné geny na syntézu uracilu. Díky enzymům **K09903** (Uridine monophosphate kinase) a **K00940** (Nucleoside diphosphate kinase) syntetizuje uridin 5'-difosfát (UDP) a uridin 5'-trifosfát (UTP).

UTP se následně enzymem **K01937** (CTP synthase) přeměňuje na cytidin 5'-trifosfát (CTP), enzymem **K00940** na cytidin 5'-difosfát (CDP) a enzymem **K00945** (Cytidylate kinase) na cytidin 5'-monofosfát (CMP). CMP může být enzymem **K03787** přetvořeno na cytidin, ale opět nesplňuje požadavky pro tvorbu cytosinu z důvodu absence genů.

CDP je vlivem **K00526** (Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), beta subunit) přeměněno na dCDP, který se může změnit na dCMP. Následně je umožněn přechod na deoxycytidin díky enzymům **K00945** a **K03787**, nebo syntéza dCTP pomocí **K00940**. Z něj vzniká dUTP vlivem **K01494** (Deoxycytidine triphosphate deaminase). Enzym **K00940** (či **K00526**, pokud vychází z UDP) syntetizuje dUDP. **K00943** (Thymidylate kinase) následně syntetizuje dUMP, z kterého buď vlivem **K03787** vzniká deoxyuridin, nebo pomocí **K00560** (Thymidylate synthase) syntetizuje dTMP, který se enzymem **K03787** mění na thymidine. Enzymy **K00943** a **K00940** transformují dTMP na dTDP a dTTP.



Obrázek 10: Metabolismus pyrimidinů (*Legionella polyplacis*).

3.1.9 Oxidativní fosforylace

Většina komplexů je funkčních či pravděpodobně funkčních (obr. 11). Mitochondriální komplex I, tedy NADH dehydrogenáza má všechny bakteriální proteinové podjednotky **K00330** (NADH ubiquinone oxidoreductase chain A), **K00331** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain B), **K00332** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain C), **K00333** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain D), **K00334** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain E), **K00335** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain F), **K00336** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain G), **K00337** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain H), **K00338** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain I), **K00339** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain J), **K00340** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain K), **K00341** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain L), **K00342** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain M) a **K00343** (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain N).

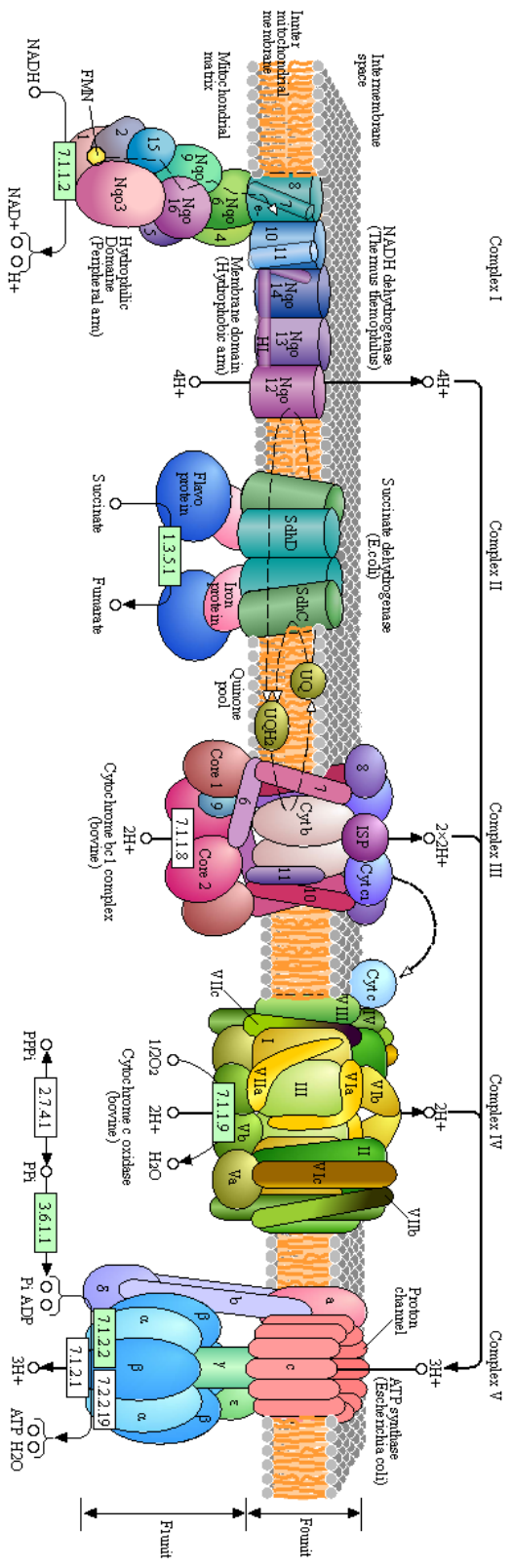
Mitochondriální komplex II, sukcinátdehydrogenáza, má také všechny podjednotky **K00241** (Succinate dehydrogenase cytochrome b-556 subunit), **K00242** (Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein), **K00239** (Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit) a **K00240** (Succinate dehydrogenase iron-sulfur protein), a je tedy plně funkční.

Komplex III, cytochrom bc1 komplex je nefunkční, jelikož mu chybí všechny potřebné enzymy.

Cytochromu c oxidáze, tedy komplexu IV, chybí enzymy **K02257** (Heme o synthase) a **K02277** (Cytochrome c oxidase subunit IV). Ostatní enzymy **K02276** (Cytochrome c oxidase polypeptide III), **K02274** (Cytochrome c oxidase polypeptide I) a **K02275** (Cytochrome c oxidase polypeptide II) však má a komplex tedy může být funkční s pomocí hostitele.

F-type bakteriální ATP syntáza má všechny potřebné proteinové podjednotky **K02111** (ATP synthase alpha chain), **K02112** (ATP synthase beta chain), **K02113** (ATP synthase delta chain), **K02114** (ATP synthase epsilon chain), **K02115** (ATP synthase gamma chain), **K02108** (ATP synthase F₀ sector subunit a), **K02109** (ATP synthase F₀ sector subunit b) a **K02110** (ATP synthase F₀ sector subunit c) a je tedy plně funkční.

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION



NADH dehydrogenase

E	ND1	ND2	ND3	ND4	ND4L	ND5	ND6
---	-----	-----	-----	-----	------	-----	-----

E	Nduf1	Nduf2	Nduf3	Nduf4	Nduf5	Nduf7	Nduf2	Nduf3
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

B/A	NuoA	NuoB	NuoC	NuoD	NuoE	NuoF	NuoG	NuoH	NuoI	NuoJ	NuoK	NuoL	NuoM	NuoN
-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

B/A	NdAC	NdAK	NdAJ	NdAH	NdAA	NdAI	NdAG	NdAE	NdAF	NdAD	NdAB	NdAL	NdAM	NdAN	HoxE	HoxF	HoxU
-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

E	Nduf1	Nduf2	Nduf3	Nduf4	Nduf5	Nduf6	Nduf7	Nduf8	Nduf9	Nduf10	Nduf11	Nduf12	Nduf13
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------

E	Nduo1	Nduo2	Nduo3	Nduo4	Nduo5	Nduo6	Nduo7	Nduo8	Nduo9	Nduo10	Nduo11	Nduo2
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	-------

Succinate dehydrogenase / Fumarate reductase

E	SDHC	SDHD	SDHA	SDHB
---	------	------	------	------

B/A	SdhC	SdhD	SdhA	SdhB
-----	------	------	------	------

FrdA	FrdB	FrdC	FrdD
------	------	------	------

Cytochrome c oxidase

E	COXI10	COX3	COX1	COX2	COX4	COX5A	COX5B	COX5A	COX5B	COX5C	COX7A	COX7B	COX7C	COX8	E/B/A	COXI1	COXI5
---	--------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	-------

B/A	CybE	CybD	CyxC	CyxB	CyxA	COXD	COXC	COXA	COXB	COXA	COXB	SOXD	SOXC	SOXB	SOXA
-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Cytochrome c oxidase, ob33-type

B	I	II	IV	III
---	---	----	----	-----

Cytochrome bd complex

B/A	CydA	CydB	CyMX
-----	------	------	------

F-type ATPase (Bacteria)

alpha	beta	gamma	delta	epsilon
a	b	c		

F-type ATPase (Eukaryotes)

alpha	beta	gamma	delta	epsilon
OSCP	a	b	c	d
f	g	fb/a	j	k
				g

V/A-type ATPase (Bacteria, Archaea)

A	B	C	D	E	F	G/H
I						

V-type ATPase (Eukaryotes)

A	B	C	D	E	F	G	H
a	b	c	d	e			

Obrázek 11: Oxidativní fosforylace (*Legionella polyplacis*).

3.2 Candidatus Riesia pediculischaeffii

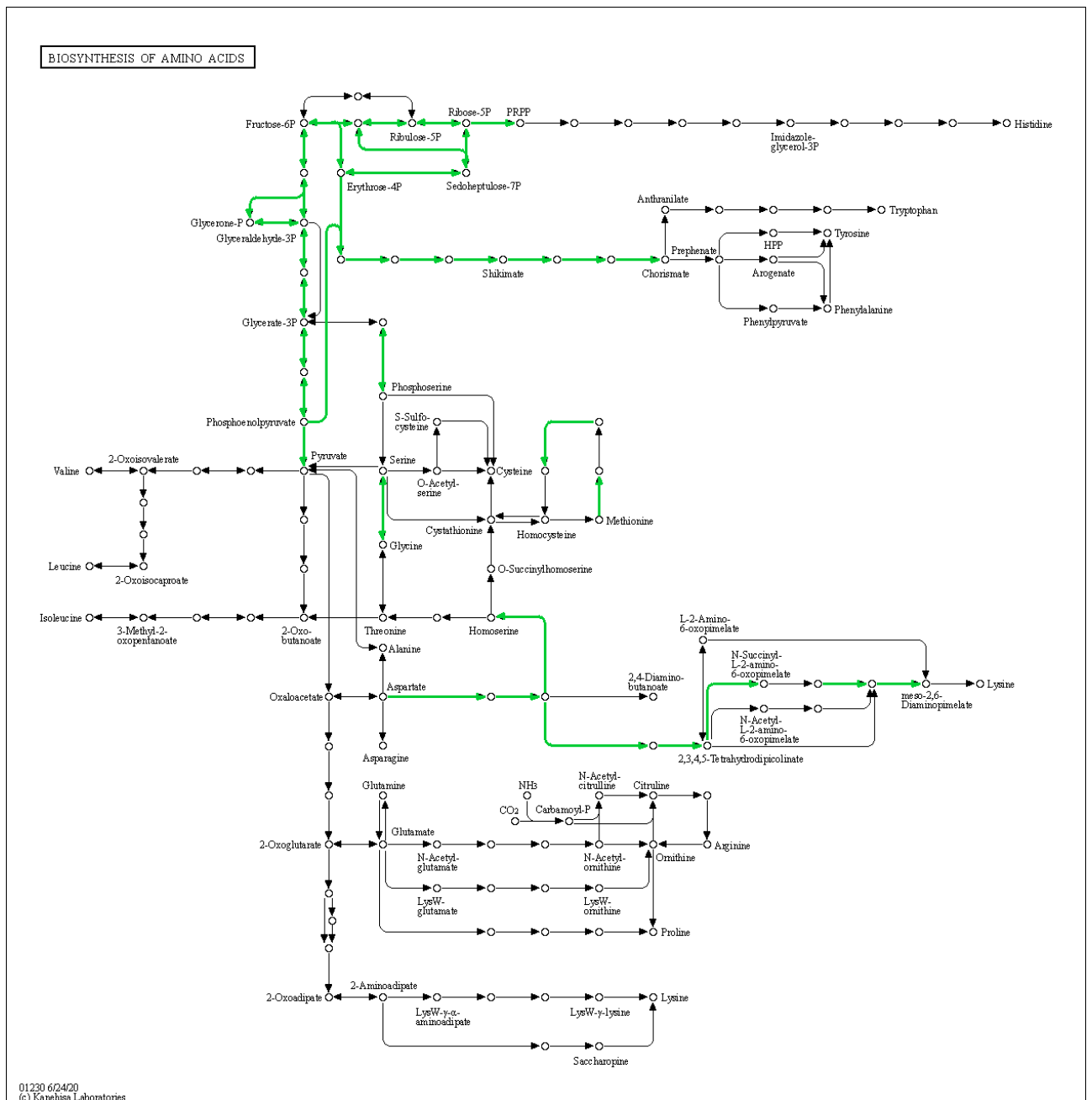
Genom bakterie *R. pediculischaeffii* má délku 566 667 bp a kóduje 634 genů. Zastoupení GC v genomu činí 31,6%. Proteinů označených jako „hypothetical protein“ bylo 129, naprostá většina z nich však přes BLAST nenašla podobný gen u jiných organismů. Rozpoznané geny našly nejvíce shody s bakterií *Candidatus Riesia pediculicola*, což se zdá v pořádku.

3.2.1 Aminokyseliny

Bakterie naprosto postrádá jakékoli geny, které by vedly k syntéze aminokyselin, kterými jsou alanin (A), arginin (R), asparagin (N), kyselina asparagová (D), cystein (C), kyselina glutamová (E), glutamin (Q), histidin (H), isoleucin (I), leucin (L), fenylalanin (F), prolin (P), threonin (T), tryptofan (W), tyrosin (Y) a valin (V) (obr. 12).

Je přítomen enzym **K00600** (Serine hydroxymethyltransferase), díky kterému může ze serinu (S) vytvořit glycin (G) nebo obráceně, ale postrádá jakékoli enzymy, které by dokázaly k těmto dvěma aminokyselinám jakkoli dojít, a proto je lze považovat za nefunkční. Také má enzym **K00789** (S-adenosylmethionine synthetase), díky kterému může methionin (M) přeměnit na S-adenosyl-L-methionin, avšak samotnou tvorbu methioninu neumí (obr. 12).

Jedinou aminokyselinou, jejíž metabolická dráha byla alespoň částečně zachována, je lysin (K). Část metabolické dráhy od kyseliny asparagové k N-succinyl-L-2-amino-6-oxopimelátu je funkční díky enzymům **K12524** (Aspartokinase/Homoserine dehydrogenase), **K00133** (Aspartate-semialdehyde dehydrogenase), **K01714** (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase), **K00215** (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase) a **K00674** (2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase). Následně jí však chybí **K00821** (Acetylornithine/N-succinyldiaminopimelate aminotransferase), čímž se celá dráha přeruší, a poslední dva přítomné enzymy **K01439** (N-succinyl-L,L-diaminopimelate desuccinylase) a **K01778** (Diaminopimelate epimerase) ztrácejí funkci. Konečný enzym **K01586** (Diaminopimelate decarboxylase), který zajišťuje syntézu lysinu, také chybí a počáteční kyselinu asparagovou neumí vytvořit (obr. 12). Metabolická dráha lysinu je tedy neaktivní a přítomné enzymy jsou pouze pozůstatky po dříve funkční dráze.



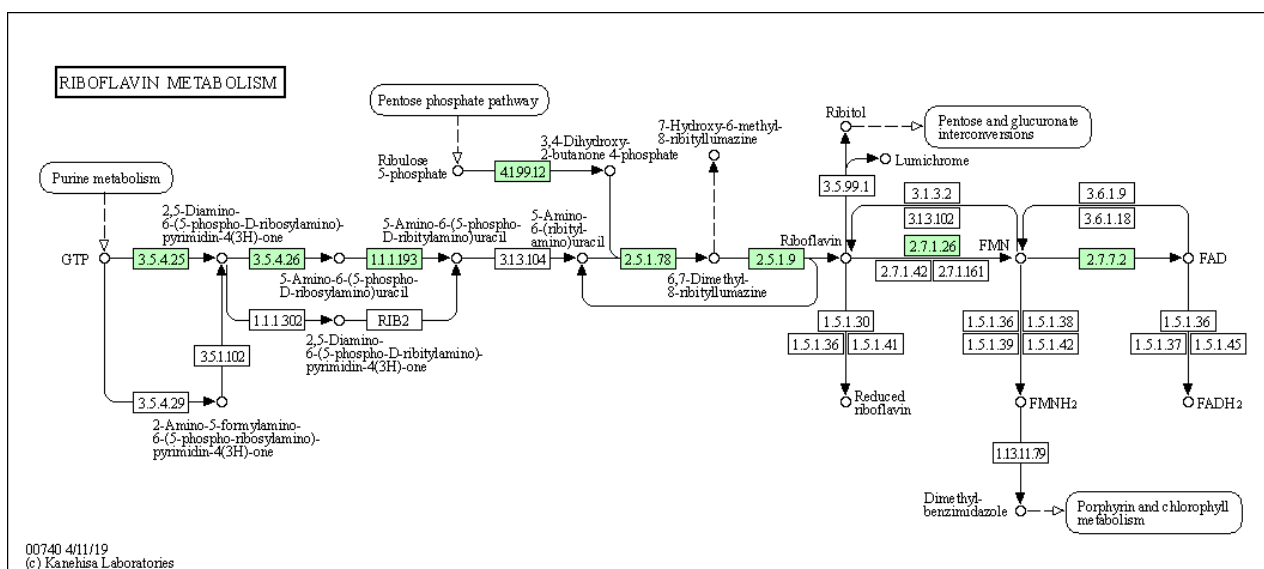
Obrázek 12: Biosyntéza aminokyselin (*Candidatus Riesia pediculuschaeffii*).

3.2.2 B-Vitamíny

K syntéze tiaminu (B1), niacinu (B3), pantotenátu (B5) a kobalaminu (B12) zcela chybí jakékoli geny.

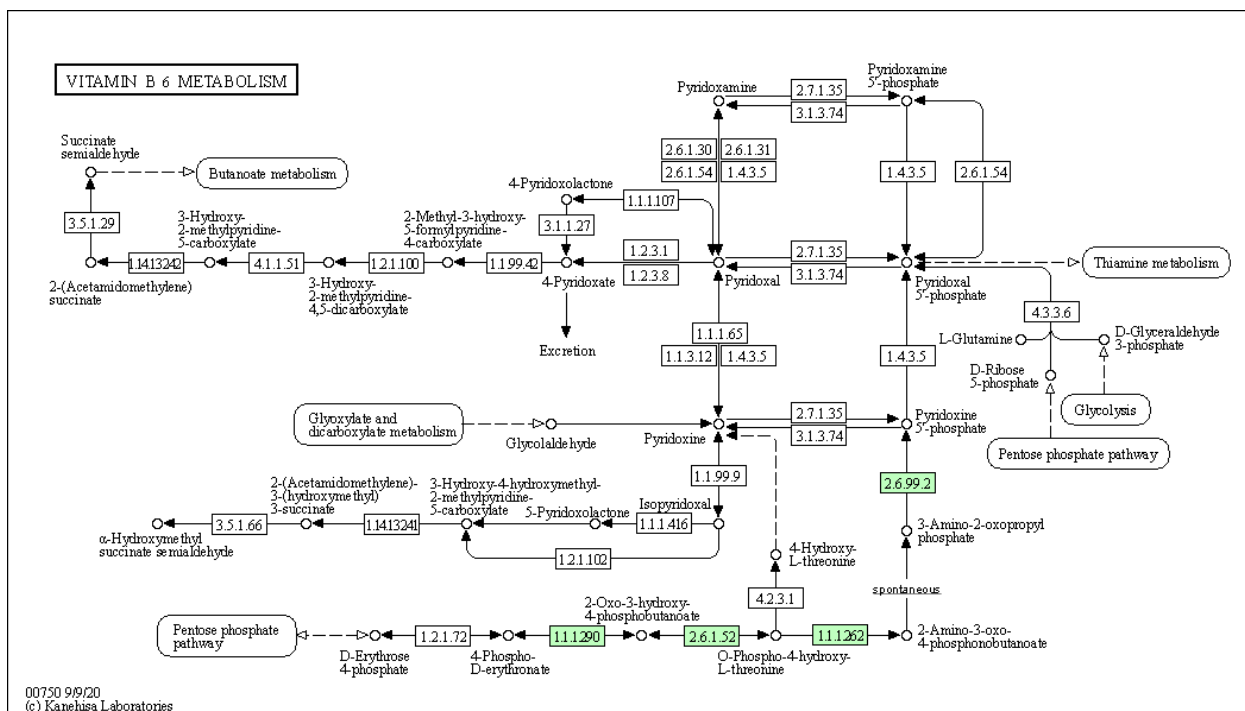
Metabolická dráha syntézy riboflavinu (B2) je téměř kompletní (obr. 13). Chybí pouze jediný enzym **K22912** (5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil phosphatase), jinak

má dráha všechny potřebné enzymy **K01497** (GTP cyclohydrolase II), **K11752** (Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase/5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase), **K00794** (6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase), **K00793** (Riboflavin synthase eubacterial/eukaryotic) a **K02858** (3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase). Bakterie je schopna vytvořit počáteční GTP, pokud by tedy byl chybějící enzym dodán hostitelem nebo jinak nahrazen, dráha by byla zcela funkční.



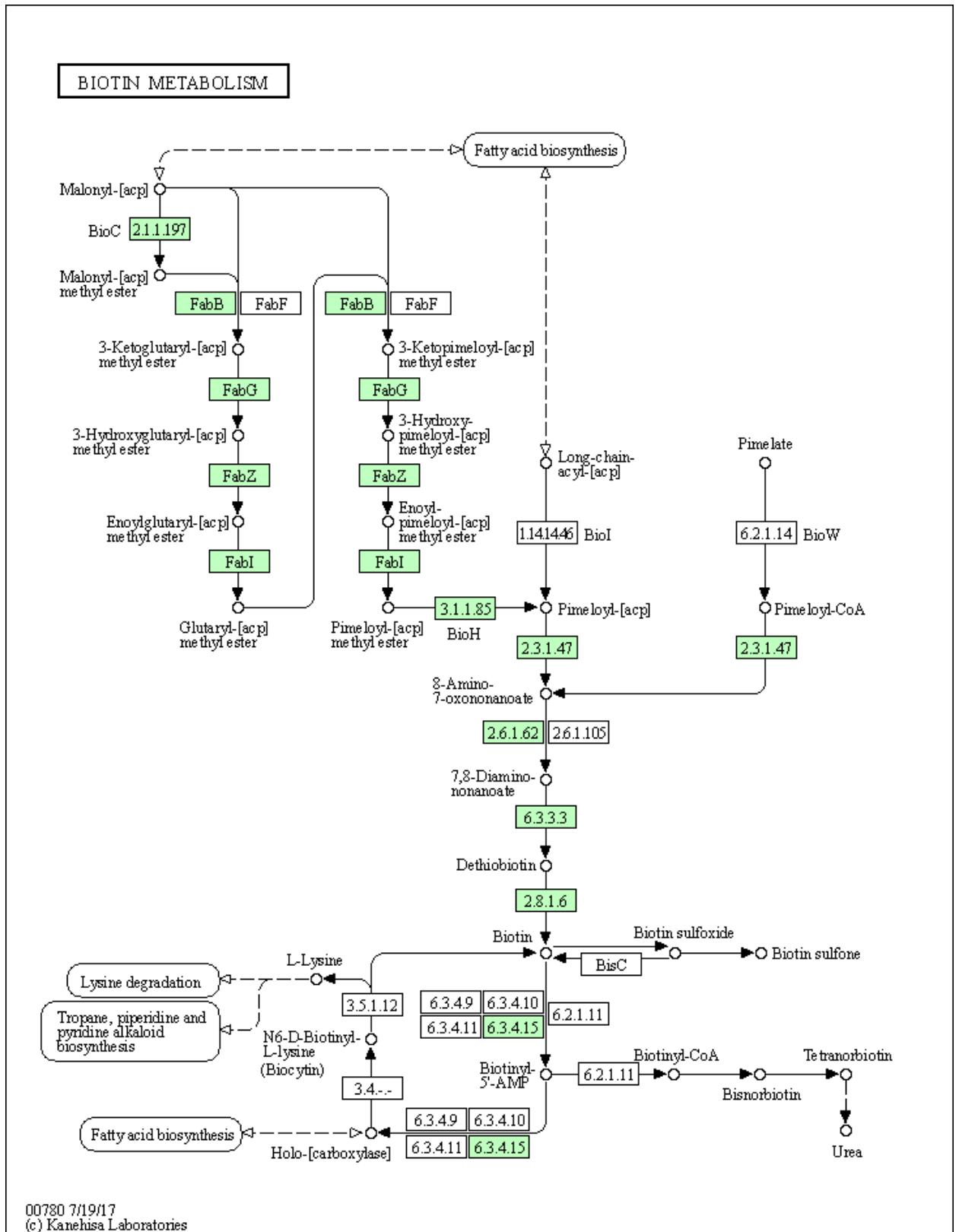
Obrázek 13: Metabolismus riboflavinu (*Candidatus Riesia pediculischaefii*).

K syntéze pyridoxinu (B6) má bakterie zachovaných několik enzymů (obr. 14): **K03473** (Erythronate-4-phosphate dehydrogenase), **K00831** (Phosphoserine aminotransferase), **K00097** (4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase) a **K03474** (Pyridoxine 5'-phosphate synthase), které vycházejí z 4-phospho-D-erythronate. Tuto látku však neumí sama syntetizovat, chybí jí **K07758** (Pyridoxal phosphatase). Jeden z genů bakterie byl programem RAST rozpoznán jako „HMP-PP hydrolase (pyridoxal phosphatase) Cof, detected in genetic screen for thiamin metabolic genes (PMID:15292217)“ (viz tabulka v elektronické příloze), avšak nebylo mu přiděleno KEGG číslo. Je tedy možné, že tento gen umožňuje syntézu vitamínu B6 a bakterie by pak jen potřebovala počáteční látku od hostitele.



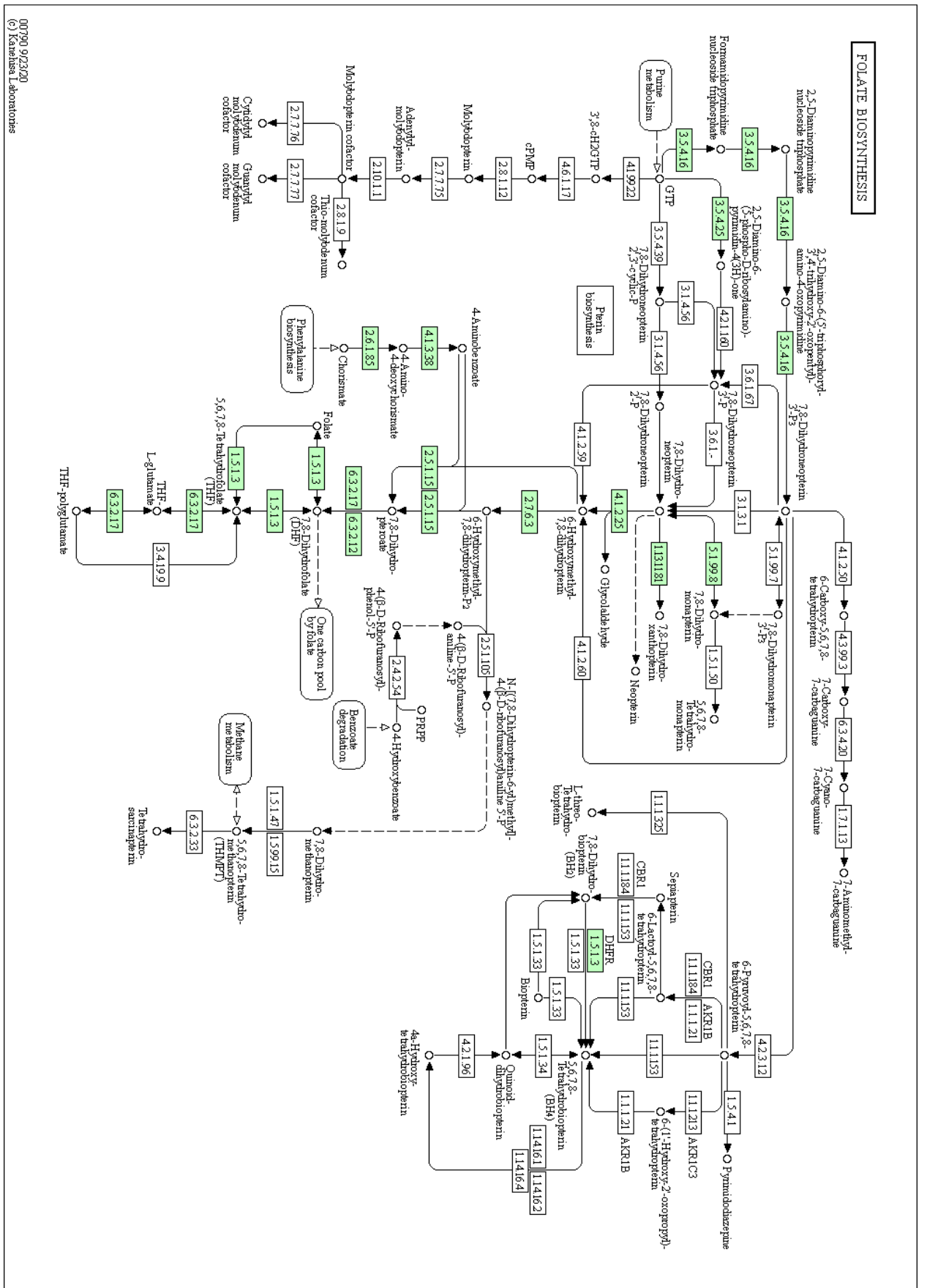
Obrázek 14: Metabolismus vitamínu B6 (*Candidatus Riesia pediculischaefii*).

Jedinou zcela kompletní metabolickou dráhou pro B-vitamíny má biotin (B7), jelikož bakterie je schopna z glukózy-6-fosfátu vytvořit pyruvát, z něj acetyl-CoA a poté malonyl-[acp]. Následně jsou přítomny všechny potřebné enzymy, pro syntézu vitamínu B7: **K02169** (Biotin synthesis protein BioC), **K00647** (3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASI), **K00059** (3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase), **K02372** (3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase, FabZ form), **K00208** (Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]), **K02170** (Biotin synthesis protein BioH), **K00652** (8-amino-7-oxononanoate synthase), **K00833** (Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase), **K01935** (Dethiobiotin synthetase), **K01012** (Biotin synthase) (obr. 15).



Obrázek 15: *Metabolismus biotinu (Candidatus Riesia pediculischaeffii).*

Také metabolická dráha kyseliny listové (B9) se zdá být pravděpodobně funkční (obr. 16). Chybí jí pouze jediný enzym **K01077** (Alkaline phosphatase). Ostatní enzymy, umožňující postupnou syntézu vitamínu B9 z GTP a chorismátu jsou přítomné. Má tedy enzymy **K01495** (GTP cyclohydrolase I type 1), **K01633** (Dihydroneopterin aldolase), **K00950** (2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine pyrophosphokinase), **K00796** (Dihydropteroate synthase), **K11754** (Dihydrofolate synthase, Folylpolyglutamate synthase), **K00287** (Dihydrofolate reductase), **K01665** (Para-aminobenzoate synthase, aminase component), **K01664** (Para-aminobenzoate synthase, amidotransferase component) a **K02619** (Aminodeoxychorismate lyase). Bakterie dokáže sama vytvořit i počáteční GTP a chorismát, pokud tedy od hostitele jakýmkoli způsobem získává chybějící enzym, je plně schopna kyselinu listovou syntetizovat.

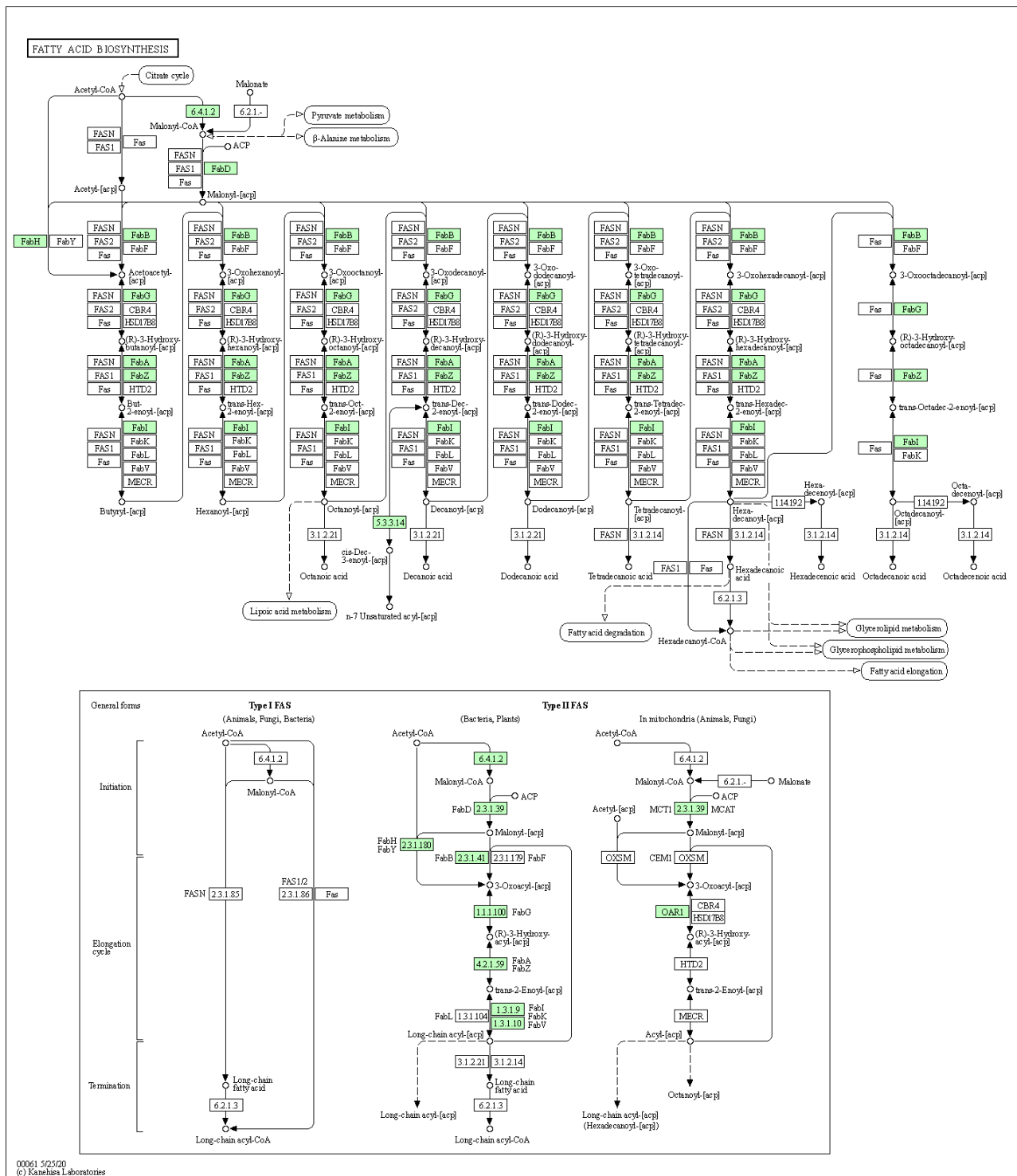


Obrázek 16: Biosyntéza kyseliny listové (*Candidatus Riesia pediculischaeffii*).

3.2.3 Mastné kyseliny

Syntéza mastných kyselin pro bakterii *R. pediculischaefii* není problém. Počáteční látkou je acetyl-CoA, který je schopna syntetizovat z pyruvátu. Z acetyl-CoA vytvoří malonyl-[acp], pomocí enzymů **K01962** (Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase alpha chain) a **K00645** (Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase) (obr. 17).

Ostatní přítomné enzymy **K00648** (3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASIII), **K00647** (3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASI), **K00059** (3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase), **K01716** (3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase, FabA form), **K02372** (3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase, FabZ form) a **K00208** (Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]) umožňují syntézu mastných kyselin navázaných na acp. Stejně jako u bakterie *L. polyplacis* zde chybí enzymy **K01071** (Medium-chain acyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase) a **K10781** (Fatty acyl-ACP thioesterase B) k syntéze samotných mastných kyselin (obr. 17). Jejich degradace také není aktivní.



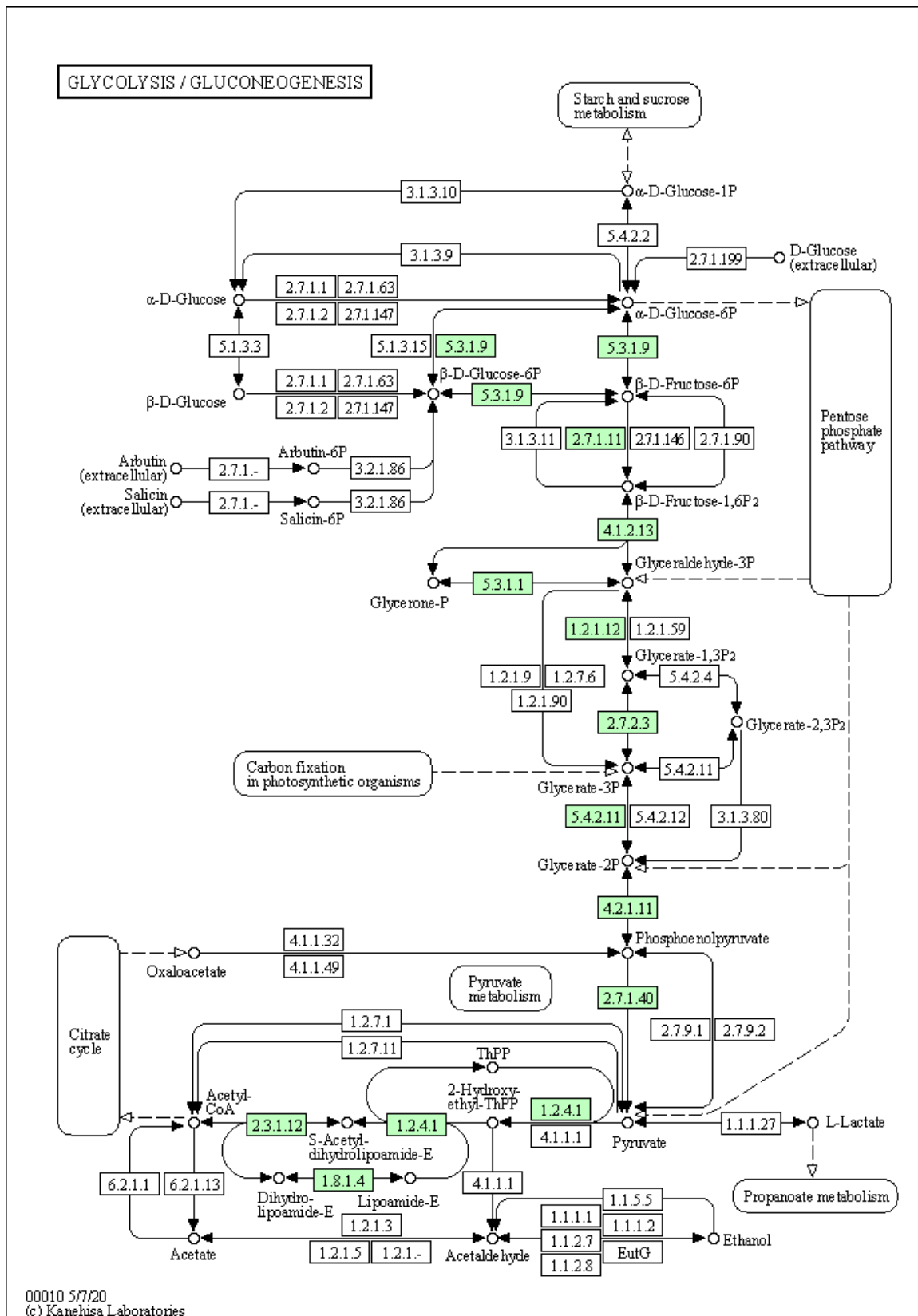
Obrázek 17: Biosyntéza mastných kyselin (*Candidatus Riesia pediculischaefii*).

3.2.4 Glykolýza

Přípravná i výpltní fáze glykolýzy jsou plně funkční (obr. 18). Bakterie je pomocí enzymů **K01810** (Glucose-6-phosphate isomerase), **K00850** (6-phosphofruktokinase),

K01624 (Fructose-bisphosphate aldolase class II), **K01803** (Triosephosphate isomerase), **K00134** (NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), **K00927** (Phosphoglycerate kinase), **K01834** (Phosphoglycerate mutase), **K01689** (Enolase) a **K00873** (Pyruvate kinase) schopna přeměny glukózy-6-fosfátu na pyruvát.

Glukoneogenezi chybí k úplnosti několik enzymů. Nemá **K01006** (Pyruvate, orthophosphate dikinase) či **K01007** (Pyruvate, water dikinase) ke zpětné přeměně pyruvátu na fosfoenolpyruvát. Nejsou také přítomny enzymy **K03841** (Fructose-1,6-bisphosphatase I) a **K00895** (Diphosphate-dependent phosphofructokinase), jejichž účelem je přeměnit β -D-fruktózu-1,6-bifosfát na glukózu-6-fosfát (obr. 18). Glukoneogeneze je vzhledem k chybějícím enzymům tedy spíše nefunkční.

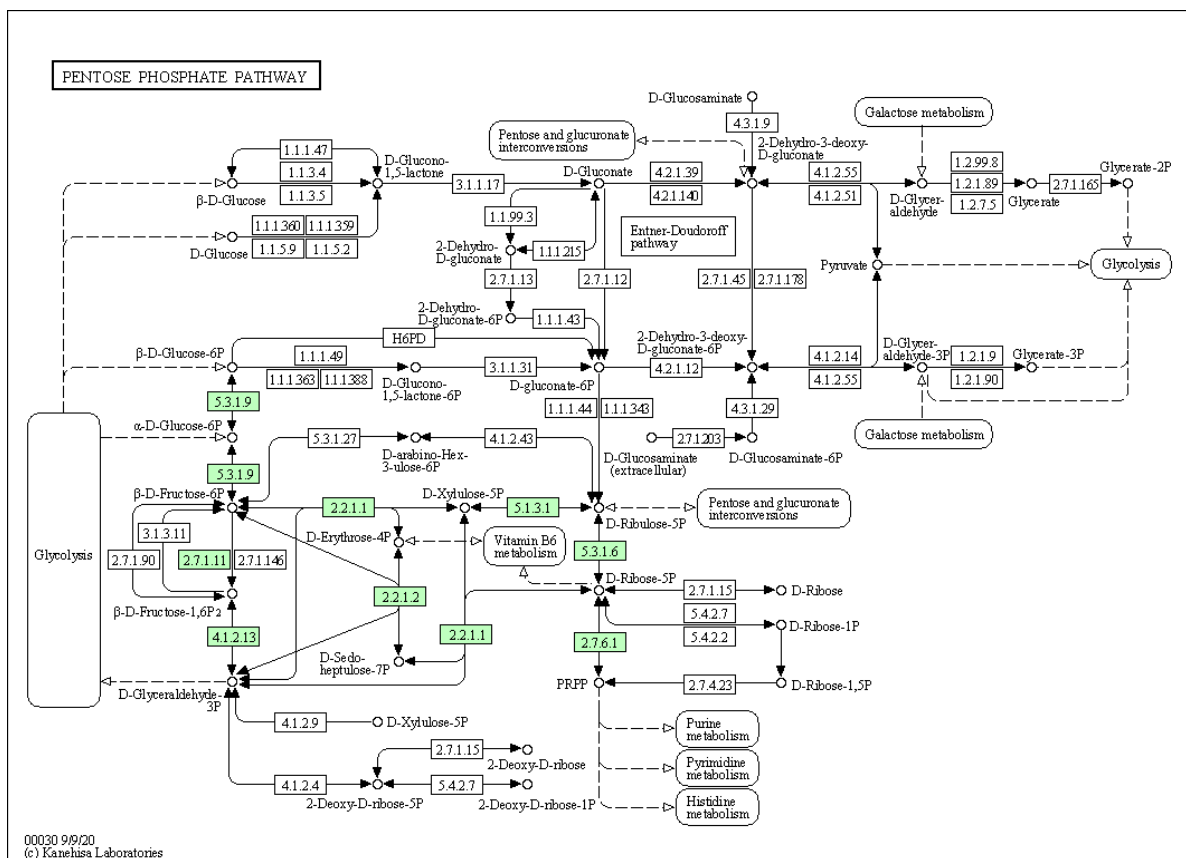


Obrázek 18: Glykolyza a glukoneogeneze (*Candidatus Riesia pediculischaefii*).

3.2.5 Pentózofosfátový cyklus

Metabolická dráha pro oxidativní i regenerativní fázi pentózofosfátový cyklu se zdá být kompletní (obr. 19). Přítomné enzymy **K01810** (Glucose-6-phosphate isomerase), **K00615** (Transketolase), **K01783** (Ribulose-phosphate 3-epimerase) umožňují syntézu D-ribulózy-5-fosfátu z D-glukózy-6-fosfátu. Alternativní cestu představují enzymy **K01810**, **K00850** (6-phosphofruktokinase) a **K01624** (Fructose-bisphosphate aldolase class II). Ty slouží k syntéze glycerinaldehyd-3-fosfátu z D-glukózy-6-fosfátu. Následně mohou být znovu uplatněny enzymy **K00615** a **K01783** k tvorbě D-ribulózy-5-fosfátu přes D-xylulózu-5-fosfát. Poslední možností je využití enzymů **K00615** a **K01807** (Ribose 5-phosphate isomerase A). Ty umožňují z glycerinaldehyd-3-fosfátu nejprve vytvořit D-ribózu-5-fosfát a z ní následně D-ribulózu-5 fosfát.

Regenerativní cesta může být uskutečněna dříve zmíněnými enzymy **K01783**, **K00615** a **K01810**. Náhradní možností je volba enzymů **K01783** či **K01807**, a poté **K00615**. Tato cesta vede k tvorbě D-sedoheptulózy-7-fosfátu, jenž může být enzymem **K00616** (Transaldolase) přeměněn na β -D-fruktózu-6-fosfát. Enzym **K01810** poté dokončí syntézu glukózy-6-fosfátu (obr. 19).



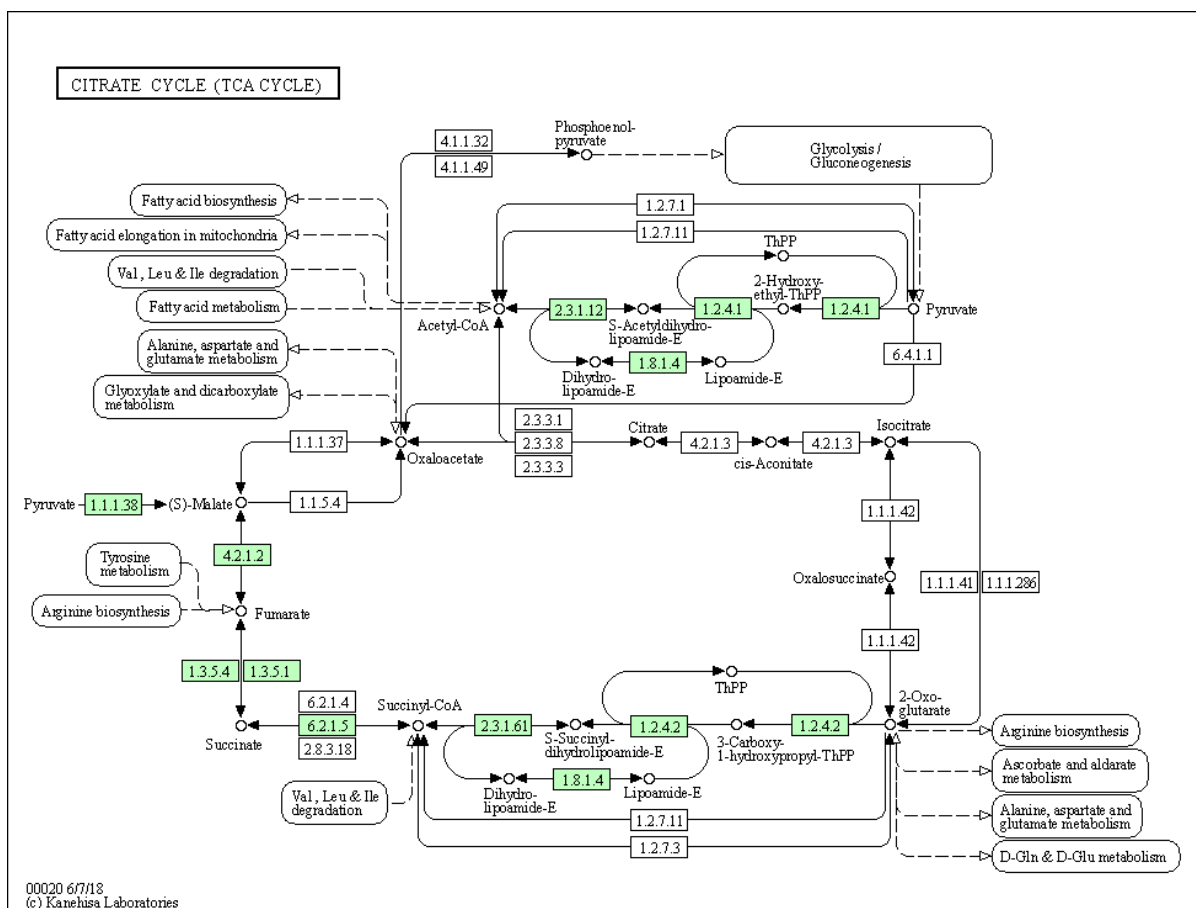
Obrázek 19: Pentózofosfátový cyklus (*Candidatus RIESIA pediculischaefii*).

3.2.6 Citrátový cyklus

Citrátový cyklus bakterie *R. pediculischaefii* není funkční, jelikož některé z meziproductů nedokáže vytvořit (obr. 20). S využitím enzymů **K00163** (Pyruvate dehydrogenase E1 component) a **K00627** (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex) je schopna z pyruvátu vytvořit acetyl-CoA. Enzymy umožňující úpravu této látky však nejsou přítomny. Chybí enzym **K01958** (Pyruvate carboxylase) k přeměně pyruvátu na oxalacetát. Enzymy **K01647** (Citrate synthase), **K01648** (ATP citrate (pro-S)-lyase) a **K05942** (Citrate (Re)-synthase) syntetizující citrát také nejsou přítomné. Kvůli absenci enzymů **K01681** (Aconitate hydratase) a **K00031** (Isocitrate dehydrogenase [NADP]) není umožněna syntéza isocitrátu, oxalsukcinátu a 2-oxoglutarátu.

Jedinou funkční částí je využití enzymů **K00027** (NAD-dependent malic enzyme), **K01679** (Fumarate hydratase class II), **K00239** (Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit), **K01902** (Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] alpha chain), **K00658** (Dihydrolipoamide succinyltransferase component (E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase

complex), **K00382** (Dihydrolipoamide dehydrogenase of pyruvate dehydrogenase complex) a **K00164** (2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component). Tyto enzymy umožňují přeměnu pyruvátu na malát, a následně postupnou syntézu fumarátu, sukcinátu, sukcinyl-CoA (resp. S-sukcinyldihydrolipoamidu-E a 3-carboxy-1-hydroxypropyl-thiamindifosfátu) (obr. 20).



Obrázek 20: Citrátový cyklus (*Candidatus Riesia pediculischaefii*).

3.2.7 Puriny

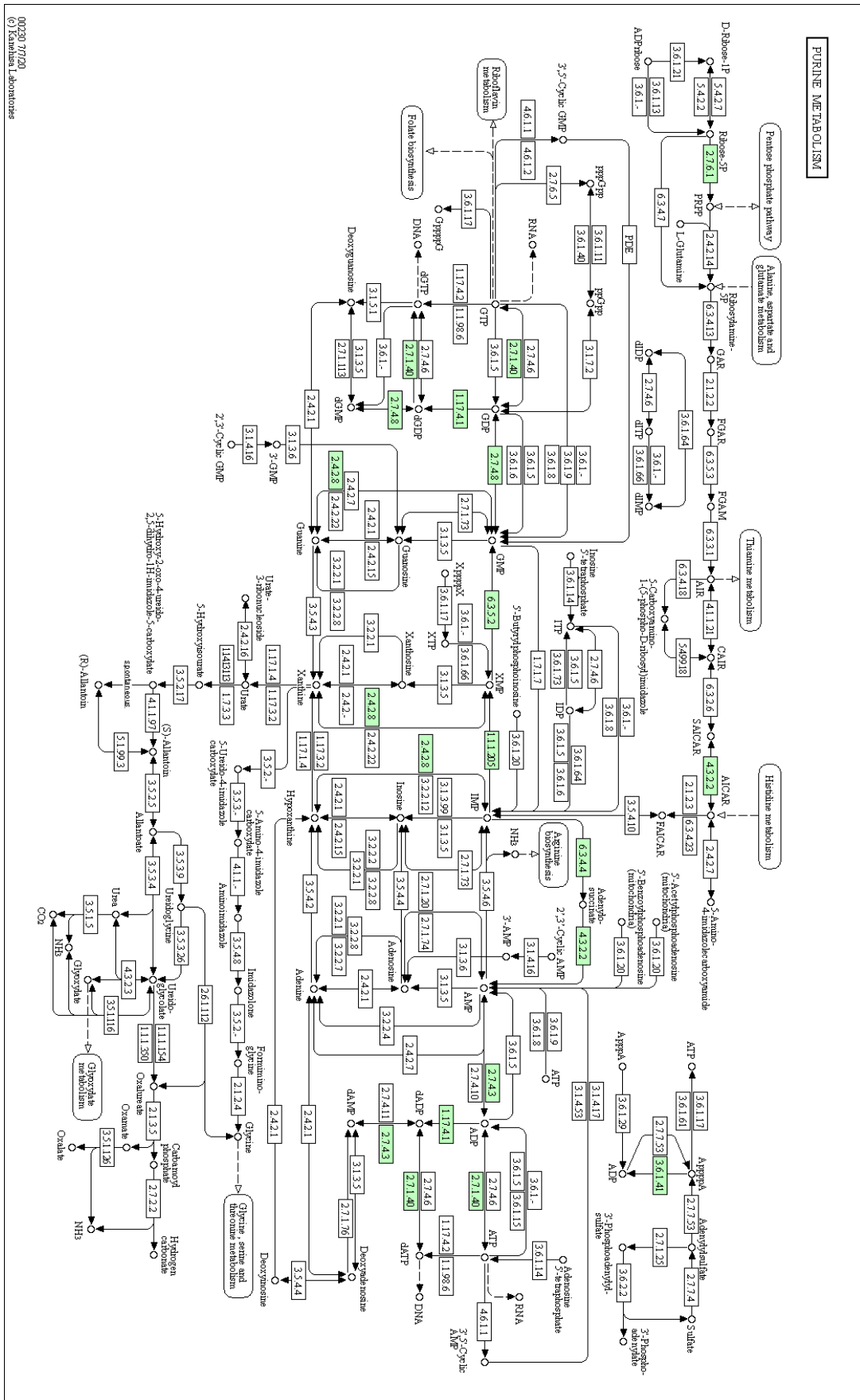
Podmínku pro syntézu purinů představuje obstarání inosinmonofosfátu (IMP) od hostitele (obr. 21).

Enzymy **K01939** (Adenylosuccinate synthetase) a **K01756** (Adenylosuccinate lyase) dokáží z IMP vytvořit adenosin 5'-monofosfát (AMP). Chybí však **K03787** (5-nucleotidase SurE) k přeměně na adenosin. Bakteri nemá k dispozici ani žádné geny k syntéze adeninu. Zachovala si geny pro syntézu adenosindifosfátu (ADP) a adenosintrifosfátu (ATP) z AMP. To je umožněno díky enzymům **K00939** (Adenylate kinase) a **K00873** (Pyruvate kinase).

Pomocí enzymů **K00526** (Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), beta subunit), **K00939** a **K00873** může syntetizovat dADP, dATP a dAMP. Kvůli chybějícímu enzymu však není jisté, zda je tato část metabolické dráhy využívána.

Bakterie má dále enzymy **K00088** (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase), sloužící k syntéze xantosin 5'-fosfátu (XMP) a **K01951** (GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]), využívaný pro tvorbu guanosin 5'-monofosfátu (GMP). Z GMP lze následně využít enzym **K00942** (Guanylate kinase) k syntéze guanosindifosfátu (GDP). Za pomoci **K00873** jej mění na guanosintrifosfát (GTP). Enzymy **K00526**, **K00873** a **K00942** umí poté syntetizovat dGDP, dGTP a dGMP.

Enzym **K00760** umožňuje bakterii vytvořit z GMP guanin, z XMP xantine a z IMP hypoxantine (obr. 21).

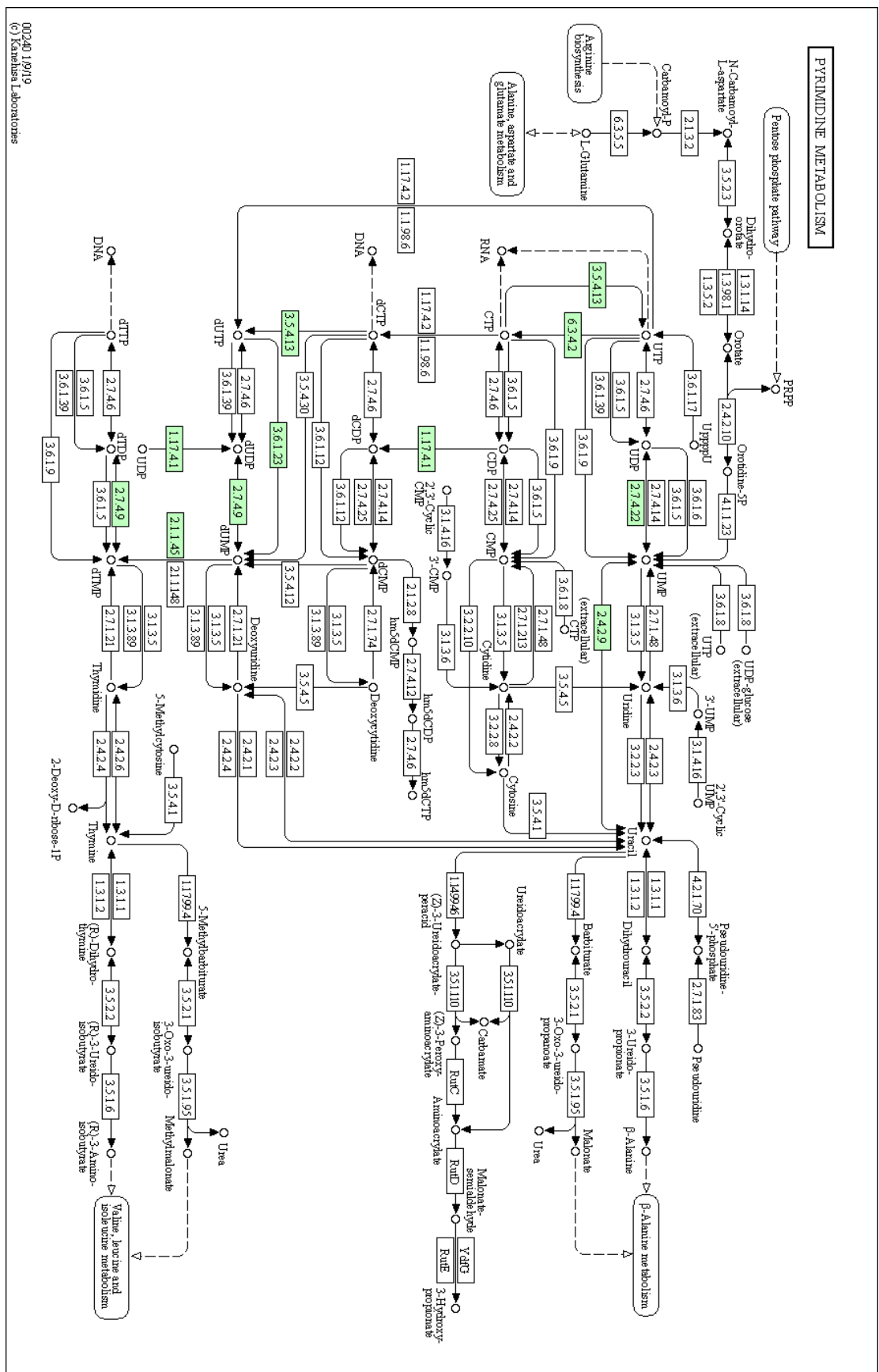


Obrázek 21: Metabolismus purinů (*Candidatus Riesa pediculischaefii*).

3.2.8 Pyrimidiny

Metabolická dráha pyrimidinů je z velké části nekompletní (obr. 22). Bakterie je závislá na dodání uridinmonofosfátu (UMP) od hostitele. Z něj je schopna pomocí enzymu **K00761** (Uracil phosphoribosyltransferase) syntetizovat uracil. Díky enzymu **K09903** (Uridine monophosphate kinase) má možnost tvořit uridin 5'-difosfát (UDP). Chybí zde **K00940** (Nucleoside diphosphate kinase) k syntéze uridin 5'-trifosfát (UTP).

Enzymy **K00525** (Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), alpha subunit) a **K00526** (Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), beta subunit) umí z UDP vytvořit dUDP. **K00943** (Thymidylate kinase) následně vytvoří dUMP a z něj dUTP pomocí **K01520** (Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase). Alternativní možností je využití enzymu **K00560** (Thymidylate synthase) k tvorbě dTMP a následně použití enzymu **K00943** pro syntézu dTDP (obr. 22).



Obrázek 22: Metabolismus pyrimidinů (*Candidatus Riesa pediculischaefii*).

3.2.9 Oxidativní fosforylace

Oxidativní fosforylace bakterie *R. pediculischaefii* se zdá být z velké části nefunkční (obr. 23). Mitochondriální komplex I, tedy NADH dehydrogenáza, nemá žádné podjednotky a je tedy zcela neaktivní.

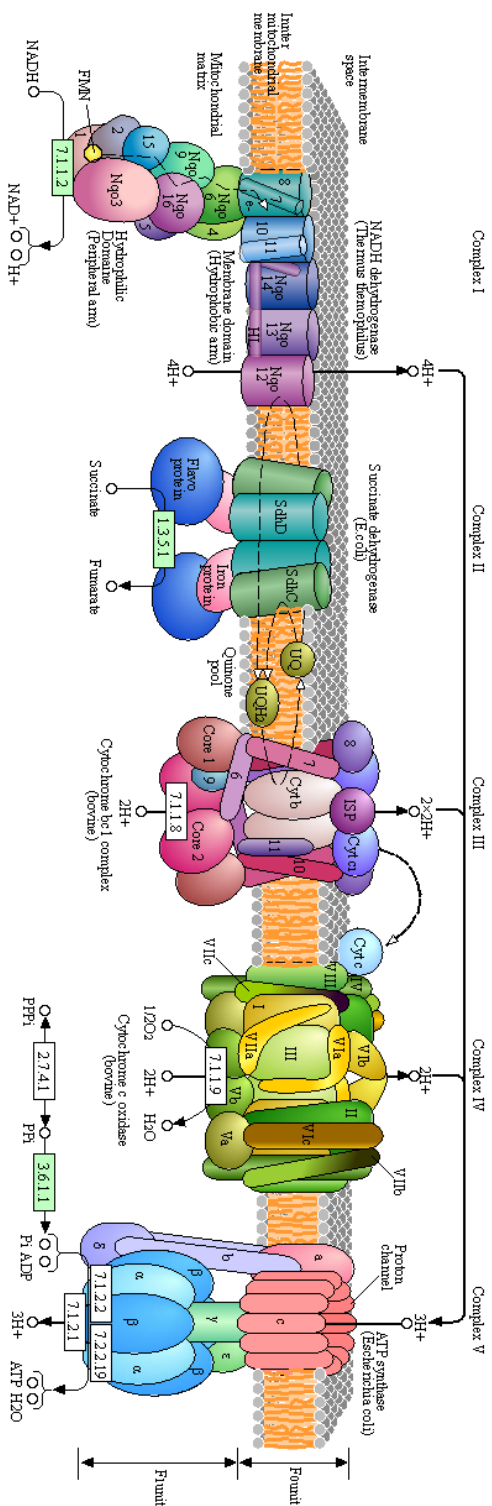
Mitochondriální komplex II, sukcinátdehydrogenáza, má pouze dvě podjednotky **K00239** (Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit) a **K00240** (Succinate dehydrogenase iron-sulfur protein). Není pravděpodobné, že by tento komplex byl funkční.

Komplex III, cytochrom bc1 komplex, nemá ani jeden z potřebných enzymů, proto je celý komplex nefunkční.

Komplexu IV, cytochrom c oxidáze, chybí pouze jediný enzym **K02300** (Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV). Jsou přítomny enzymy **K02257** (Heme O synthase, protoheme IX farnesyltransferase COX10-CtaB), **K02299** (Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit III), **K02298** (Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit I) a **K02297** (Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit II). S pomocí hostitele by tedy tento komplex mohl být funkční.

F-type bakteriální ATP syntáza také nemá žádný z potřebných enzymů.

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION



NADH dehydrogenase

E	ND1	ND2	ND3	ND3	ND4	ND4L	ND5	ND6
E	Ndntf1	Ndntf2	Ndntf3	Ndntf4	Ndntf5	Ndntf6	Ndntf7	Ndntf8
B/A	NuoA	NuoB	NuoC	NuoD	NuoE	NuoF	NuoG	NuoH
B/A	NdkC	NdkK	NdhJ	NdhH	NdhA	NdhF	NdhG	NdhI
E	Ndnta1	Ndnta2	Ndnta3	Ndnta4	Ndnta5	Ndnta6	Ndnta7	Ndnta8
E	Ndntb1	Ndntb2	Ndntb3	Ndntb4	Ndntb5	Ndntb6	Ndntb7	Ndntb8
							Ndntb9	Ndntb10
							Ndntb11	Ndntb12

Succinate dehydrogenase / Fumarate reductase

E	SDHC	SDHD	SDHA	SDHB	SDHB	SDHC	SDHE	SDHE
B/A	SdhC	SdhD	SdhA	SdhB	SdhB	SdhC	SdhE	SdhE
			FrdA	FrdB	FrdC	FrdD		

Cytochrome c oxidase

E	COX10	COX3	COXI	COX2	COX4	COX5A	COX5B	COX6A	COX6B	COX6C	COX7A	COX7B	COX7C	COX8	COX11	COX15
B/A	Cytc	CytcD	CytcC	CytcB	CytcA	CoxC	CoxA	CoxB	CoxA	CoxB	CoxC	CoxB	CoxA	CoxA	CoxC	CoxB

Cytochrome b

E	ISP	Cytb	CytI
B	I	II	IV

F-type ATPase (Bacteria)

alpha	beta	gamma	delta	epsilon
a	b	c		

F-type ATPase (Eukaryotes)

alpha	beta	gamma	delta	epsilon
a	b	c	d	e
f	g	fgH	j	g

V/A-type ATPase (Bacteria, Archaea)

A	B	C	D	E	F	G/H
I	K					

V-type ATPase (Eukaryotes)

A	B	C	D	E	F	G	H
a	b	c	d	e			

Obrázek 23: Oxidativní fosforylace (*Candidatus Riesia pediculischaeffii*).

4 Diskuze

Při porovnání procentuálních obsahů GC v genomech obou bakterií vychází najevo, že *L. polyplacis* se nachází v pokročilejší fázi degradace. Vytvořená tabulka s anotovanými geny, ke kterým jsou přiřazena KEGG čísla a příslušné metabolické dráhy, je uvedena jako elektronická příloha. Tato tabulka ukazuje, že *R. pediculischaeffi* má znatelně větší počet degradovaných genů. Výskyt většího množství těchto pseudogenů může poukazovat na probíhající zmenšování genomu a jeho degeneraci. Počet těchto genů klesá v pozdějších fázích symbiózy, jelikož z genomu úplně zmizí a zůstávají pouze potřebné geny.

Aminokyseliny jsou nezbytnými stavebními kameny proteinů a nacházejí se mimo jiné v krevní plazmě, kde pomáhají udržet homeostázu (Bröer and Bröer, 2017). Krevsající veš, jakožto hostitel symbiotických bakterií, tedy nemá problémy si tyto látky obstarat. Degradace metabolických drah, vedoucích k syntéze esenciálních L-aminokyselin, je u obou bakterií zcela pochopitelná. *L. polyplacis* ani *R. pediculischaeffi* nemají zachovanou ani jednu kompletní metabolickou dráhu, která by začínala přeměnou základní glukózy-6-fosfátu (obr. 1 a 12). Jak *L. polyplacis* tak *R. pediculischaeffi* mají nejvíce enzymů v dráze vedoucí k syntéze lysinu. Možným vysvětlením tohoto jevu je fakt, že biotin (B7), který obě bakterie umí syntetizovat (obr. 3 a 15), potřebuje být navázán na lysinový zbytek, aby mohl v organismu správně fungovat (Lennarz and Lane, 2013; Tong, 2013). *L. polyplacis* by měla umět syntézu kyseliny glutamové a glutaminu (Říhová *et al.*, 2019). Výsledky anotace a mapování v této bakalářské práci ukazují nejen, že *L. polyplacis* nemá potřebné enzymy k syntéze těchto aminokyselin z glykolýzy-6-fosfátu (obr. 1), ale také je neschopna tyto aminokyseliny syntetizovat bez pomoci hostitele. Muselo by docházet k dodávkám citrátu, který by poté *L. polyplacis* dokázala na zmíněné aminokyseliny přetvořit. Zachovávat si tyto zbytky po metabolických drahách je však nejspíše velmi zbytečné. Pokud si hostitel (veš) dokáže z potravy obstarat dostatek aminokyselin, je velmi pravděpodobné, že ty samé aminokyseliny dodává i endosymbiontům. Zbytky po těchto metabolických drahách tedy pravděpodobně v budoucnu úplně zmizí.

Syntéza B-vitaminů je jistě nejzkomplexnější funkcí endosymbiotických bakterií u krevsajícího hmyzu. Jak *L. polyplacis* tak *R. pediculischaeffi* mají kompletně zachované metabolické dráhy pro syntézu biotinu (B7) (obr. 3 a 15), který je u endosymbiotických bakterií nejvíce udržován selekcí. U *L. polyplacis* je ve skutečnosti celý operon horizontálně přenesen (Říhová *et al.*, 2019). Vitamin B7 funguje jako kofaktor enzymů, které katalyzují

reakce jako je glukoneogeneze, metabolismus aminokyselin a syntéza mastných kyselin (Vallari and Rock, 1985; Sweetman and Nyhan, 1986; Knowles, 1989; Jitrapakdee *et al.*, 2008; Duron a Gottlieb, 2020). Jedná se tedy o nezbytný vitamín pro krevsající hmyz, který potřebuje využít aminokyseliny z potravy. Funkčnost této metabolické dráhy tedy není u těchto bakterií překvapivá.

Práce Duron and Gottlieb (2020) ukazuje, že *L. polyplacis* neumí syntetizovat vitamín B2. Výsledky této bakalářské práce však ukazují, že jak *L. polyplacis* tak *R. pediculischaeffi* jsou pravděpodobně schopny syntézy tohoto vitamínu (obr. 2 a 13). Riboflavin je důležitým prekurzorem pro nosiče vodíku FMN a FAD (Massey, 2000; Bornemann, 2002). Oběma bakteriím schází stejný enzym. Je možné, že jej získávají od svých hostitelů a to jim umožňuje syntetizovat tuto látku. Práce Duron and Gottlieb (2020) také ukazuje, že *L. polyplacis* by měla být pravděpodobně schopna syntézy vitamínů B1, B3 a B9. Geny kódující proteiny potřebné pro syntézu tiaminu a nacinu však ve výsledcích bakalářské práce nebyly nalezeny. Po bližším prozkoumání metabolické dráhy syntézy kyseliny listové pro *L. polyplacis* (obr. 4), je vidět, že bakterie nedokáže syntetizovat 4-Aminobenzoate, který je pro následnou tvorbu kyseliny listové nezbytný. Počet přítomných genů však vyvolává otázku, proč by si bakterie zachovávala skoro kompletní metabolickou dráhu přeměny GTP na kyselinu listovou, pokud by tato dráha vlastně nebyla funkční. Odpovědí by mohl být dodávání chybějícího 4-aminobenzoátu od hostitele. Pokud by hostitelský organismus dokázal bakterii poskytnout tuto látku zároveň s enzymem, chybějícím v jednom z předchozích kroků syntézy, bylo by možné vitamín B9 syntetizovat. K potvrzení této teorie by muselo dojít k detailnějšímu prozkoumání transportu látek mezi hostitelem a symbiontem.

R. pediculischaeffi si oproti *L. polyplacis* ponechala takřka celou metabolickou dráhu pro syntézu kyseliny listové (obr. 16). Tento vitamín je důležitý hlavně pro zprostředkování metabolických drah, které vedou k metylaci DNA, RNA a proteinů (McKay and Mathers, 2011). Je zde také malá šance, že *R. pediculischaeffi* dokáže syntetizovat vitamín B6 (obr. 14). Pyridoxin je důležitý pro metabolismus bílkovin a sacharidů (Ahmad *et al.*, 2013). Co se tedy týče dodávání B-vitamínů hostiteli, *R. pediculischaeffi* je schopna syntetizovat více látek než *L. polyplacis*.

Degradace metabolické dráhy pro syntézu mastných kyselin je u obou bakterií ve stejné fázi (obr. 5 a 17). Předpokládaným faktem je, že obě bakterie jsou schopné plně syntetizovat mastné kyseliny (Říhová *et al.*, 2019). *R. pediculischaeffi* si zachovala více genů pro syntézu

potřebných enzymů, avšak obě bakterie jsou schopné syntetizovat tyto mastné kyseliny navázané na acp. Enzymy, které slouží k uvolnění mastných kyselin z tohoto enzymatického komplexu, však chybí. Je vysoce pravděpodobné, že bakterie disponuje potřebnou metodou, díky které mastné kyseliny uvolňuje, avšak zatím o ní nevíme.

Dá se předpokládat, že *L. polyplacis* je závislá na dodání pyruvátu od všeho hostitele. *R. pediculischaeffi* je na druhou stranu plně schopna přeměnit glukózu-6-fosfát na pyruvát a ten dále využít podle potřeby. Tento fakt potvrzuje, že *R. pediculischaeffi* je méně závislá na svém hostiteli. *L. polyplacis* i *R. pediculischaeffi* nejsou schopné funkční glukoneogeneze (obr. 6 a 18). *L. polyplacis* neumí tvořit skoro žádné enzymy pro tuto metabolickou dráhu, *R. pediculischaeffi* jich má více, avšak dva potřebné chybí.

Také pentózofosfátový cyklus je pro *R. pediculischaeffi* úspěšnější. Domněnka, že oxidativní fáze je nefunkční (Říhová *et al.*, 2019), je zde zcela vyvrácena. *R. pediculischaeffi* dokáže bez problému vytvořit ribulózu-5-fosfát a zároveň dokáže pomocí dvou lehce odlišných cest zpětně syntetizovat glukózu-6-fosfát (obr. 19). *L. polyplacis* má oproti tomu obě tyto fáze zcela neaktivní již díky nefunkční glykolýze. Není schopna syntetizovat potřebnou fruktózu-6-fosfát pro další kroky oxidativní fáze. Absence enzymů také zamezuje zpětné syntéze glukózy-6-fosfátu (obr. 7).

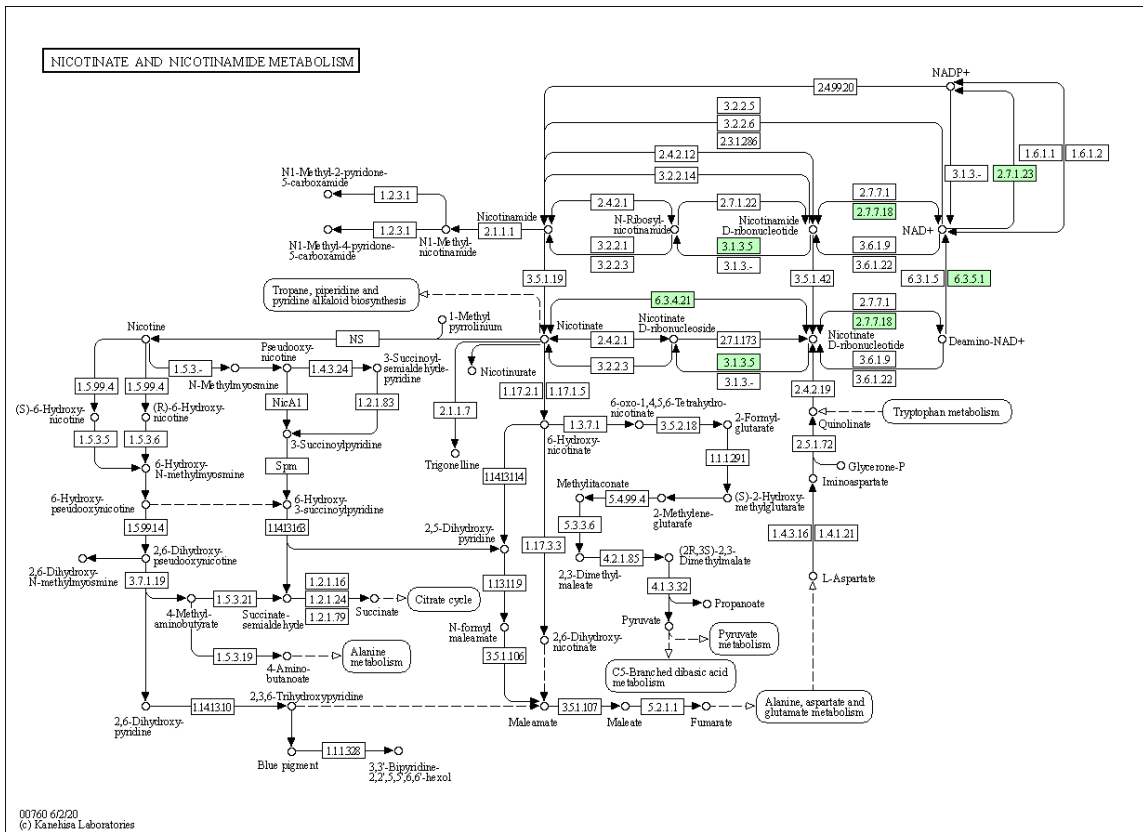
Citrátový cyklus je více zachován u bakterie *L. polyplacis*, nemá však zachovány všechny potřebné enzymy (obr. 8). Problémem zde je neschopnost syntetizovat pyruvát a absence enzymů přeměňující acetyl-CoA na citrát. Avšak při dodání citrátu je dále schopná syntetizovat všechny meziprodukty této metabolické dráhy. Pokud také od hostitele získává pyruvát, je schopna z něj syntetizovat malát a dále oxalacetát. Alternativní cestou je obrácená syntéza meziproduktů z malátu. Tato možnost je však omezena, jelikož enzym pro syntézu 2-oxoglutarátu ze sukcinyl-CoA chybí a tvorba meziproduktů v opačném směru tak není kompletní. *R. pediculischaeffi* má citrátový cyklus nefunkční (obr. 20). V podstatě dokáže pouze využít alternativní cestu tvorby meziproduktů v opačném směru. Díky funkční glykolýze má tato bakterie možnost vytvořit pyruvát a z něj poté malát. Stejně jako u bakterie *L. polyplacis* i tady je syntéza meziproduktů omezena jelikož enzymy pro tvorbu 2-oxoglutarátu chybí, tentokrát z obou směrů.

Syntéza purinů a pyrimidinů u obou bakterií není dokonalá (obr. 9, 10, 21 a 22). *L. polyplacis* i *R. pediculischaeffi* jsou odkázány na pomoc hostitele. Potřebují dodat

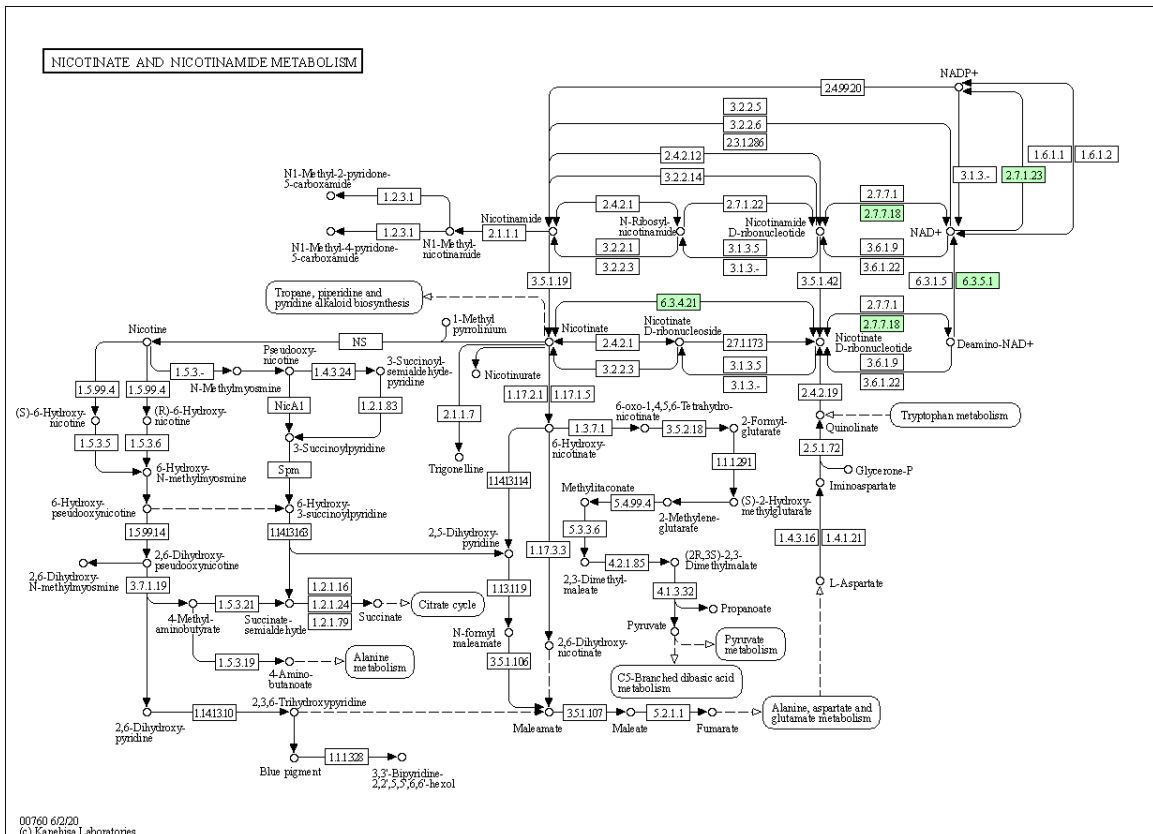
inosinmonofosfát, potřebný pro tvorbu purinů. Obě jsou schopné postupnými reakcemi vytvořit ATP i GTP. *L. polyplacis* je však schopna vytvořit mnohem více produktů této metabolické dráhy. K tvorbě pyrimidinů potřebují od hostitele získat uridinmonofosfát. Genom *L. polyplacis* sice obsahuje více genů, uplatňujících se v těchto metabolických drahách, a je tak schopna vytvořit mnohem více produktů, avšak není schopna syntetizovat cytosin, uracil ani thymin. *R. pediculischaeffi* nedokáže vytvořit zdaleka tolik produktů, jako *L. polyplacis*, avšak ponechala si gen kódující syntézu enzymu potřebného pro tvorbu uracilu.

Oxidativní fosforylace je u *R. pediculischaeffi* jednoznačně nefunkční (obr. 23). Z pěti potřebných podjednotek je pouze jedna částečně funkční. Jelikož hlavní mechanismus tvorby ATP je u této bakterie nefunkční, musí se spoléhat na jiné možnosti. Díky funkční glykolýze je schopna získat ATP při syntéze 3-fosfoglycerátu a pyruvátu. Alternativní možností je přeměna GTP na ATP. Bakterie je schopna GTP vytvořit buď postupnou syntézou z IMP, nebo ve funkční části citrátového cyklu, kde se sukcinyl-CoA mění na sukcinát. *L. polyplacis* je na tom podstatně lépe. Tři z pěti podjednotek má plně funkční. Komplexu IV chybí dva enzymy ke správné funkčnosti a komplex III je zcela nefunkční (obr. 11). Některé bakterie však umí komplex III obejít, či mají alternativní mechanismy, kterými dokáží ubichinol oxidovat (Lennarz and Lane, 2013). Je zde tedy možnost, že *L. polyplacis* má nějaký z těchto mechanismů. Jediné, co by ji poté omezovalo, jsou chybějící enzymy v komplexu IV. Pokud tyto enzymy však dokáže nahradit či je získává od hostitele, dala by se syntéza ATP považovat za kompletní.

Jelikož nemá *L. polyplacis* funkční oxidativní fázi pentózofosfátového cyklu (obr. 7), není schopna produkovat NADPH, který poskytuje elektrony v anabolických procesech biosyntézy (Chen *et al.*, 2019). Protože se však přeměny isocitrátu a oxalosukcinátu účastní enzym **K00031** (Isocitrate dehydrogenase [NADP]), vzniká v citrátovém cyklu *L. polyplacis* NADPH (obr. 8). *L. polyplacis* také disponuje mechanismem přeměny NAD⁺ na NADP⁺ (obr. 24). Ten samý mechanismus má i *R. pediculischaeffi* (obr. 25), ta má však zároveň funkční i oxidativní fázi pentózofosfátového cyklu (obr. 19). Konkrétní fázi citrátového cyklu, ve které dochází k tvorbě NADPH, však aktivní nemá (obr. 20). Je zajímavé, že *L. polyplacis* i *R. pediculischaeffi* ztratily některé geny potřebné k syntéze tohoto dárce elektronů, ale dokázaly si zachovat alespoň dva náhradní mechanismy.

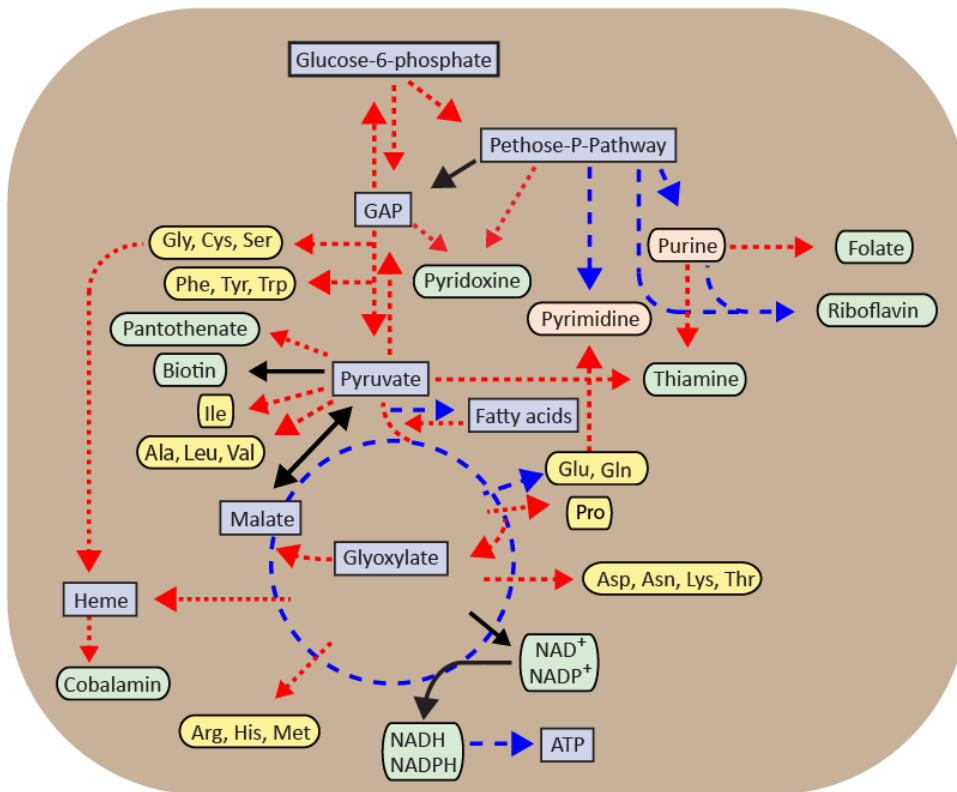


Obrázek 24: *Metabolismus nikotinu a nikotinamidu (Legionella polyplacis).*



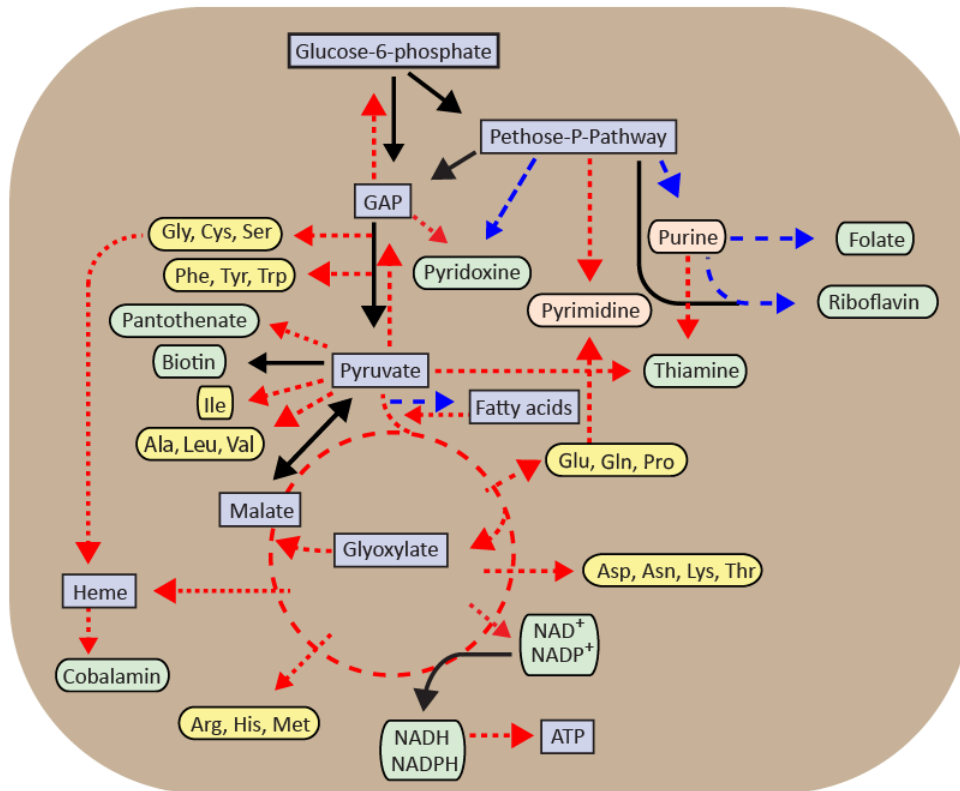
Obrázek 25: *Metabolismus nikotinu a nikotinamidu (Candidatus Riesia pediculischaeffii).*

Z výše uvedených výsledků byla vytvořena obecná schémata metabolismů bakterií *L. polyplacis* a *R. pediculischaeffi* (obr. 26 a 27). I když obě pochází z rozdílných skupin, staly se obě endosymbionty vši. Toto mělo za následek vznik podobných znaků, jako je znatelné zkrácení genomu, nízký obsah GC, zachování metabolických drah, důležitých pro syntézu látek vyžadovaných hostitelem, a ztráta drah, které v důsledku endosymbiózy pozbyly svůj význam. *L. polyplacis* a *R. pediculischaeffi* však mezi sebou mají i důležité rozdíly ve funkčnosti některých metabolických drah, jako je citrátový cyklus, oxidativní fosforylace či glykolýza. Tyto rozdíly mohou odrážet odlišný fylogenetický původ obou endosymbiontů, různou míru přizpůsobení symbiotickému životu, či hypoteticky možná i rozdílné nároky jejich hostitelů.



- Common metabolites
- Amino acids (*essential)
- Vitamins B
- Nucleotides
- Functional pathway
- - - Likely functional
- ⋯ Degraded pathway
- GAP - glyceraldehyde-3-phosphate

Obrázek 26: Metabolismus (*Legionella polyplacis*).



- Common metabolites
- Amino acids (*essential)
- Vitamins B
- Nucleotides
- Functional pathway
- - - Likely functional
- ⋯ Degraded pathway
- GAP - glyceraldehyde-3-phosphate

Obrázek 27: Metabolismus (*Candidatus Riesia pediculischaefii*).

5 Závěr

Díky anotaci genomů bakterií *L. polyplacis* a *R. pediculischaeffi* se ukázalo, že kvůli přizpůsobení se symbiotickému životu, mají obě výrazně zkrácené genomy a snížený obsah GC. Genom *R. pediculischaeffi* je degradován o něco méně. Počet proteinů označených jako „hypothetical“ byl u *R. pediculischaeffi* překvapivý, avšak sám o sobě neukázal nic konkrétního.

Bohužel pomocí analýzy prostřednictvím funkce Protein BLAST, se nepodařilo identifikovat tyto nerozpoznané geny a odhalit významnou podobnost s jinými geny u odlišných organismů. Účelem bylo najít nerozpoznané proteiny, které by se shodovaly s proteiny chybějícími v pozorovaných metabolických drahách. Tato metoda však nepřinesla žádné významné výsledky.

Ukázalo se, že i když jsou obě bakterie endosymbionty vší, velmi zásadně se liší v mnoha metabolických drahách. Pomocí programů BlastKOALA a KEGG Mapper byly některé z drah, které byly považovány za funkční, identifikovány jako nefunkční nebo spíše funkční, například syntéza některých aminokyselin u *L. polyplacis*. Avšak jiné dráhy naopak překvapily svojí funkčností. K takovým patří třeba oxidativní fáze pentózofosfátového cyklu bakterie *R. pediculischaeffi*.

Zda je dýchací řetězec bakterie *L. polyplacis* celkově nefunkční, není jisté. Jelikož existuje šance, že *L. polyplacis* nějakým způsobem obchází nefunkční mitochondriální komplex III, představuje tato problematika možné téma k budoucímu zkoumání. To samé se týká i syntézy mastných kyselin. Metoda, kterou bakterie *L. polyplacis* a *R. pediculischaeffi* izolují samostatné mastné kyseliny od enzymatických komplexů acp, není známa, proto by se mohla stát předmětem bližšího zkoumání. Další perspektivní rozvinutí tohoto tématu představuje rozšíření souboru porovnávaných genomů o ostatní známé symbiotické bakterie vší, včetně velmi málo redukováného zástupce rodu *Sodalis* (Boyd *et al.*, 2016).

Seznam literatury

Knihy a vědecké články

Ahmad, I., Mirza, T., Qadeer, K., Nazim, U., Vaid, F. H. (2013): Vitamin B 6: Deficiency diseases and methods of analysis. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 26(5), 1057- 1069.

Allen, J. M., Burleigh, J. G., Light, J. E., Reed, D. L. (2016): Effects of 16S rDNA sampling on estimates of the number of endosymbiont lineages in sucking lice. *PeerJ*, 4, e2187.

Allen, J. M., Light, J. E., Perotti, M. A., Braig, H. R., Reed, D. L. (2009): Mutational meltdown in primary endosymbionts: selection limits Muller's ratchet. *PLoS One*, 4(3), e4969.

Allen, J. M., Reed, D. L., Perotti, M. A., Braig, H. R. (2007): Evolutionary relationships of “*Candidatus Riesia spp.*” endosymbiotic Enterobacteriaceae living within hematophagous primate lice. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1659-1664.

Aschner, M. (1934): Studies on the symbiosis of the body louse: I. Elimination of the symbionts by centrifugalisation of the eggs. *Parasitology*, 26(3), 309-314.

Azhar, A., Booker, G., Polyak, S. (2015). Mechanisms of biotin transport. *Biochem Anal Biochem*, 4(4): 210.

Baumann, P. (2005): Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 155-189.

Baumann, P., Baumann, L., Lai, C. Y., Rouhbakhsh, D., Moran, N. A., Clark, M. A. (1995): Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annual review of microbiology*, 49(1), 55-94.

Bell, G., Graham, B. (1988): Sex and death in Protozoa: the history of obsession. Cambridge University Press.

Bennett, G. M., Moran, N. A. (2013): Small, smaller, smallest: the origins and evolution of ancient dual symbioses in a phloem-feeding insect. *Genome biology and evolution*, 5(9), 1675-1688.

Bennett, G. M., Moran, N. A. (2015): Heritable symbiosis: the advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10169-10176.

Birky, C. W., Walsh, J. B. (1988): Effects of linkage on rates of molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(17), 6414-6418.

Blochmann, F. (1892): Über das Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. *Zentbl. Bakteriologie*, 11, 234–240.

Bornemann, S. (2002): Flavoenzymes that catalyse reactions with no net redox change. *Natural product reports*, 19(6), 761-772.

Boyd, B. M., Allen, J. M., de Crécy-Lagard, V., Reed, D. L. (2014): Genome sequence of *Candidatus Riesia pediculischaeffi*, endosymbiont of chimpanzee lice, and genomic comparison of recently acquired endosymbionts from human and chimpanzee lice. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(11), 2189-2195.

Boyd, B. M., Allen J. M., Koga R., Fukatsu T., Sweet A. D., Johnson K. P., Reed D. L., Goodrich-Blair H. (2016): Two bacterial genera, *Sodalis* and *Rickettsia*, associated with the seal louse *Proechinophthirus fluctus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(11), 3185-3197

Boyd, B. M., Allen, J. M., Nguyen, N. P., Vachaspati, P., Quicksall, Z. S., Warnow, T., ... Reed, D. L. (2017): Primates, lice and bacteria: speciation and genome evolution in the symbionts of hominid lice. *Molecular biology and evolution*, 34(7), 1743-1757.

Boyd, B. M., Reed, D. L. (2012): Taxonomy of lice and their endosymbiotic bacteria in the post-genomic era. *Clinical microbiology and infection*, 18(4), 324-331.

Bright, M., Bulgheresi, S. (2010): A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 218-230.

Bröer, S., Bröer, A. (2017): Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochemical Journal*, 474(12), 1935-1963.

Buchner, P. (1965): *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Interscience Publishers, New York.

Byers, D. M., Gong, H. (2007): Acyl carrier protein: structure–function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochemistry and Cell Biology*, 85(6), 649-662.

Clark, M. A., Moran, N. A., Baumann, P., Wernegreen, J. J. (2000): Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. *Evolution*, 54(2), 517-525.

Curnow, A. W., Hong, K. W., Yuan, R., Kim, S. I., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T. M., Söll, D. (1997): Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11819-11826.

Crow, J. F., Simmons, M. J. (1983): *The mutation load in Drosophila*. edited by M. Ashburner, H. L. Carson and J. N. Thompson, Jr. Academic Press, London. *The Genetics and Biology of Drosophila*, 3c, 1-35.

de Crecy-Lagard, V., Marck, C., Grosjean, H. (2012): Decoding in *Candidatus Riesia pediculicola*, close to a minimal tRNA modification set?. *Trends Cell Mol Biol*, 7, 11-34.

Degnan, P. H., Lazarus, A. B., Wernegreen, J. J. (2005): Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome research*, 15(8), 1023-1033.

Diederer, B. M. W. (2008): *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of infection*, 56(1), 1-12.

Douglas, A. E. (1989): Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews*, 64(4), 409-434.

Douglas, A. E. (1998): Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual review of entomology*, 43(1), 17-37.

Douglas, A. E., Raven, J. A. (2003): Genomes at the interface between bacteria and organelles. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1429), 5-18.

Duron, O., Gottlieb, Y. (2020): Convergence of nutritional symbioses in obligate blood feeders. *Trends in Parasitology*.

Eberle, M. W., McLean, D. L. (1982): Initiation and orientation of the symbiote migration in the human body louse *Pediculus humanus* L. *Journal of insect physiology*, 28(5), 417-422.

Feldhaar, H., Gross, R. (2009): Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(1), 1-8.

Felsenstein J. (1974): The evolutionary advantage of recombination. *Genetics*, 78(2), 737–756.

Fields, B. S. (1996): The molecular ecology of legionellae. *Trends in microbiology*, 4(7), 286-290.

Gabriel, W., Lynch, M., Bürger, R. (1993): Muller's ratchet and mutational meltdowns. *Evolution*, 47(6), 1744-1757.

Gil, R., Sabater-Muñoz, B., Latorre, A., Silva, F. J., Moya, A. (2002): Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: toward the minimal genome needed for symbiotic life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4454-4458.

Haigh, J. (1978): The accumulation of deleterious genes in a population—Muller's ratchet. *Theoretical population biology*, 14(2), 251-267.

Hoekstra, R. (1991): Bell, G. 1988. *Sex and Death in Protozoa. The History of an Obsession*. Cambridge University Press, Cambridge. *Journal of Evolutionary Biology*, 4(4), 690-692.

Hotopp, J. C. D., Clark, M. E., Oliveira, D. C., Foster, J. M., Fischer, P., Torres, M. C. M., ... Werren, J. H. (2007): Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science*, 317(5845), 1753-1756.

Houle, D., Hoffmaster, D. K., Assimacopoulos, S., Charlesworth, B. (1992): The genomic mutation rate for fitness in *Drosophila*. *Nature*, 359(6390), 58-60.

Husnik, F., Nikoh, N., Koga, R., Ross, L., Duncan, R. P., Fujie, M., ... McCutcheon, J. P. (2013): Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell*, 153(7), 1567-1578.

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.

Charlesworth, B. (1990): Mutation-selection balance and the evolutionary advantage of sex and recombination. *Genetics Research*, 55(3), 199-221.

Charlesworth, D., Morgan, M. T., Charlesworth, B. (1990): Inbreeding depression, genetic load, and the evolution of outcrossing rates in a multilocus system with no linkage. *Evolution*, 44(6), 1469-1489.

Chen, L., Zhang, Z., Hoshino, A., Zheng, H. D., Morley, M., Arany, Z., Rabinowitz, J. D. (2019): NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. *Nature metabolism*, 1(3), 404-415.

Chen, X., Li, S., Aksoy, S. (1999): Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *Journal of molecular evolution*, 48(1), 49-58.

Jitrapakdee, S., St Maurice, M., Rayment, I., Cleland, W. W., Wallace, J. C., & Attwood, P. V. (2008). Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochemical journal*, 413(3), 369-387.

Joseph, S. J., Cox, D., Wolff, B., Morrison, S. S., Kozak-Muiznieks, N. A., Frace, M., ... Dean, D. (2016): Dynamics of genome change among *Legionella* species. *Scientific reports*, 6(1), 1-14.

Kirkness, E. F., Haas, B. J., Sun, W., Braig, H. R., Perotti, M. A., Clark, J. M., ... Pittendrigh, B. R. (2010): Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12168-12173.

Knowles, J. R. (1989): The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 195-221.

Koga, R., Nikoh, N., Matsuura, Y., Meng, X. Y., Fukatsu, T. (2013): Mealybugs with distinct endosymbiotic systems living on the same host plant. *FEMS microbiology ecology*, 83(1), 93-100.

Kok, D. E., Steegenga, W. T., McKay, J. A. (2018): Folate and epigenetics: why we should not forget bacterial biosynthesis. *Epigenomics*, 10(9), 1147-1150.

Kondrashov, A. S. (1988): Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*, 336(6198), 435-440.

Kresge, N., Simoni, R. D., Hill, R. L. (2005): The role of the acyl carrier protein in fatty acid synthesis: the work of P. Roy Vagelos. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), e32-e32.

Kuo, C. H., Moran, N. A., Ochman, H. (2009): The consequences of genetic drift for bacterial genome complexity. *Genome research*, 19(8), 1450-1454.

Kuo, C. H., Ochman, H. (2009): Deletional bias across the three domains of life. *Genome biology and evolution*, 1, 145-152.

Lennarz, W. J., Lane, M. D. (2013): *Encyclopedia of biological chemistry*. Academic Press.

Lin, Z., Xu, Z., Li, Y., Wang, Z., Chen, T., Zhao, X. (2014): Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of riboflavin. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-12.

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 Genet*, 5(11), e1000721.

Lynch, M., Gabriel, W. (1990): Mutation load and the survival of small populations. *Evolution*, 44(7), 1725-1737.

Lynch, M., Koskella, B., Schaack, S. (2006): Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science*, 311(5768), 1727-1730.

Malke, H. (1967): Paul Buchner, Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 7(2), 168-168.

Manzano-Marín, A., Ocegüera-Figueroa, A., Latorre, A., Jiménez-García, L. F., Moya, A. (2015): Solving a bloody mess: B-vitamin independent metabolic convergence among

gammaproteobacterial obligate endosymbionts from blood-feeding arthropods and the leech *Haementeria officinalis*. *Genome biology and evolution*, 7(10), 2871-2884.

Massey, V. (2000): The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions*, 28(4), 283-296.

McCutcheon, J. P. (2010): The bacterial essence of tiny symbiont genomes. *Current opinion in microbiology*, 13(1), 73-78.

McCutcheon, J. P., Moran, N. A. (2007): Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19392-19397.

McCutcheon, J. P., Moran, N. A. (2012): Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 13-26.

McCutcheon, J. P., Von Dohlen, C. D. (2011): An interdependent metabolic patchwork in the nested symbiosis of mealybugs. *Current biology*, 21(16), 1366-1372.

McKay, J. A., Mathers, J. C. (2011): Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta physiologica*, 202(2), 103-118.

Melzer, A. L., & Koeslag, J. H. (1991). Mutations do not accumulate in asexual isolates capable of growth and extinction-Muller's ratchet re-examined. *Evolution*, 45(3), 649-655.

Mira, A., Ochman, H., Moran, N. A. (2001): Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends in Genetics*, 17(10), 589-596.

Moran, N. A. (1996): Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(7), 2873-2878.

Moran, N. A. (2001): Bacterial menageries inside insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1338-1340.

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., Plague, G. R. (2004): Genomic changes following host restriction in bacteria. *Current opinion in genetics & development*, 14(6), 627-633.

Muller, H. J. (1964): The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1(1), 2-9.

Mushegian, A. R., Koonin, E. V. (1996): A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), 10268-10273.

Nakabachi, A., Shigenobu, S., Sakazume, N., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., ... Fukatsu, T. (2005): Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, *Buchnera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(15), 5477-5482.

Nikoh, N., McCutcheon, J. P., Kudo, T., Miyagishima, S. Y., Moran, N. A., Nakabachi, A. (2010): Bacterial genes in the aphid genome: absence of functional gene transfer from *Buchnera* to its host. *PLoS Genet*, 6(2), e1000827.

Nikoh, N., Nakabachi, A. (2009): Aphids acquired symbiotic genes via lateral gene transfer. *BMC biology*, 7(1), 1-13.

Nilsson, A. I., Koskiniemi, S., Eriksson, S., Kugelberg, E., Hinton, J. C. D., Andersson, D. I. (2005): Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(34), 12112-12116.

Nováková, E., Hypša, V., Moran, N. A. (2009): *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC microbiology*, 9(1), 1-14.

Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R., Moran, N. A. (2010): Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual review of entomology*, 55, 247-266.

Pamilo, P., Nei, M., Li, W. H. (1987): Accumulation of mutations in sexual and asexual populations. *Genetics Research*, 49(2), 135-146.

Perotti, M. A., Allen, J. M., Reed, D. L., Braig, H. R. (2007): Host-symbiont interactions of the primary endosymbiont of human head and body lice. *The FASEB Journal*, 21(4), 1058-1066.

Perotti, M. A., Kirkness, E. F., Reed, D. L., Braig, H. R., Bourtzis, K., Miller, T. A. (2008): Endosymbionts of lice. *Insect symbiosis*, 3, 205-220.

Puchta, O. (1955): Experimental studies on the significance of symbiosis in the clothes louse *Pediculus vestimenti* Burm. *Zeitschrift für Parasitenkunde* (Berlin, Germany), 17(1), 1-40.

Ries, E. (1931): Die symbiose der läuse und federlinge. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 20(2-3), 233-367.

Říhová, J., Batani, G., Rodríguez-Ruano, S. M., Martinů, J., Nováková, E., Hypša, V. (2019): A new symbiotic lineage related to *Neisseria* and *Snodgrassella* arises from the dynamic and diverse microbiomes in sucking lice. *bioRxiv*, 867275.

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.

Salcedo-Porras, N., Umaña-Díaz, C., Bitencourt, R. D. O. B., Lowenberger, C. (2020): The Role of Bacterial Symbionts in Triatomines: An Evolutionary Perspective. *Microorganisms*, 8(9), 1438.

Sasaki-Fukatsu, K., Koga, R., Nikoh, N., Yoshizawa, K., Kasai, S., Mihara, M., ... Fukatsu, T. (2006): Symbiotic bacteria associated with stomach discs of human lice. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7349-7352.

Sauer, C., Dudaczek, D., Hölldobler, B., Gross, R. (2002): Tissue localization of the endosymbiotic bacterium "*Candidatus Blochmannia floridanus*" in adults and larvae of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4187-4193.

Sauer, C., Stackebrandt, E., Gadau, J., Hölldobler, B., Gross, R. (2000): Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(5), 1877-1886.

Schröder, D., Deppisch, H., Obermayer, M., Krohne, G., Stackebrandt, E., Hölldobler, B., ... Gross, R. (1996): Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Molecular microbiology*, 21(3), 479-489.

Sloan, D. B., Moran, N. A. (2012): Genome reduction and co-evolution between the primary and secondary bacterial symbionts of psyllids. *Molecular biology and evolution*, 29(12), 3781-3792.

Smith, J. M. (1978): *The evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge.

Stout, J. E., Yu, V. L. (1997): Legionellosis. *New England Journal of Medicine*, 337(10), 682-687.

Sweetman, L., Nyhan, W. L. (1986): Inheritable biotin-treatable disorders and associated phenomena. *Annual review of nutrition*, 6(1), 317-343.

Tamas, I., Klasson, L., Canbäck, B., Näslund, A. K., Eriksson, A. S., Wernegreen, J. J., ... Andersson, S. G. (2002): 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*, 296(5577), 2376-2379.

Tong, L. (2013): Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(5), 863-891.

Vallari, D. S., Rock, C. O. (1985): Pantothenate transport in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 162(3), 1156-1161.

Wallace, D. C., Morowitz, H. J. (1972): Genome size and evolution. *Chromosoma*, 40(2), 121-126.

Wernegreen, J. J. (2002): Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), 850-861.

Wilson, A. C., Duncan, R. P. (2015): Signatures of host/symbiont genome coevolution in insect nutritional endosymbioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10255-10261.

Zientz, E., Beyaert, I., Gross, R., Feldhaar, H. (2006): Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6027-6033.

Zientz, E., Dandekar, T., Gross, R. (2004): Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 745-770.

Internetové zdroje

Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008): The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T. L. (2009): BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421.

Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K. (2016): BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 428, 726-731.

Kanehisa, M. Sato, Y. (2020): KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Sci.* 29, 28-35.

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., Meintjes, 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.