

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Ověření souvislosti genů *enol-1* a *astacinu* s evoluční adaptací na parazitismus u druhu *Heterorhabditis bacteriophora*.**

Diplomová práce

**Bc. Jan Hartmann**

Školitelka: PaedDr. Martina Žurovcová Ph.D.

Školitel-specialista: Mgr. Vladimír Půža, Ph.D.

České Budějovice 2020

Hartmann, J. 2020: Ověření souvislosti genů *enol-1* a *astacinu* s evoluční adaptací na parazitismus u druhu *Heterorhabditis bacteriophora*.

[Verification of connection of the *enol-1* and *astacin metalloprotease* genes with evolutionary adaptation to parasitism of *Heterorhabditis bacteriophora*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 73 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis was focused on the verification whether the two candidate genes, *enol-1* and *astacin metalloprotease*, are linked to the parasitic adaptation of *Heterorhabditis bacteriophora*. While the expression analysis and knock-down of those genes by RNAi did not corroborate the hypothesis (most likely due to unsuccessful method of RNAi “soaking”), biostatistical evolutionary analysis of orthologs from 25 nematode species across clades III, IV and V found several footprints of episodic selection. However, none of this was strictly linked to the parasitic species. Since the prevailing detected selection was purifying, both candidate genes are more likely conserved and not directly shaped by adaptation to parasitism.

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

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

V Českých Budějovicích dne 22.5.2020 .....

Bc. Jan Hartmann

Tímto bych chtěl poděkovat své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, velkou dávku trpělivosti a nesmírné množství dobrých rad. Děkuji svému školiteli specialistovi Vladimíru Půžovi za poskytnutí testovacího materiálu, a hlavně za jeho specifický humor a ochotu poradit. Nemały dík patří Michalu Žurovcovi za přívětivost a poskytnutí místa a možnosti pro rozšíření mých vědomostí a schopností. Také chci poděkovat Lucii Kučerové za bezbřehý zájem poradit a pomoci. Nesmírný dík patří mé rodině, protože bez její podpory bych nebyl člověkem, kterým dnes jsem.

# Obsah

1. Úvod	1
1.1 Parazitismus v rámci Nematoda	1
1.2 Vliv parazitismu na genom	2
1.3 Srovnávací genomika	3
1.4 RNA interference	3
1.5 Entomopatogenní hlístice <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	4
1.6 RNA interference u EPN	4
1.7 Kandidátní geny pro parazitismus <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	5
1.7.1 Astaciny	6
1.7.2 Enoláza	8
1.8 Detekce vlivu adaptivní evoluce na molekulární úrovni	8
2. Cíle	10
3. Materiál a metody	11
3.1 Entomopatogenní hlístice	11
3.2 Chov hlístic	12
3.3 Izolace nukleových kyselin	12
3.3.1 Izolace DNA	12
3.3.2 Izolace RNA za užití kitu Hybrid-RTM (GeneAll)	12
3.4 PCR amplifikace a DNA sekvenace kandidátních genů	13
3.4.1 Použité primery	13
3.4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	13
3.4.3 Gelová elektroforéza	14
3.4.4 Sekvenace	14
3.5 Analýza genové exprese	15
3.5.1 Indukce infekčního stádia hlístovek	15
3.5.2 Relativní exprese	16
3.5.3 RNA interference	16
3.6 Testy virulence	17
3.7 Evoluční statistická analýza	17
3.7.1 Vnitrodruhová analýza	18
3.7.2 Mezidruhová analýza	19
3.7.2.1 Seleční analýza za užití fylogenetických stromů – Datamonkey	19
3.7.2.2 Analýza na úrovni aminokyselin – TreeSAAP	20

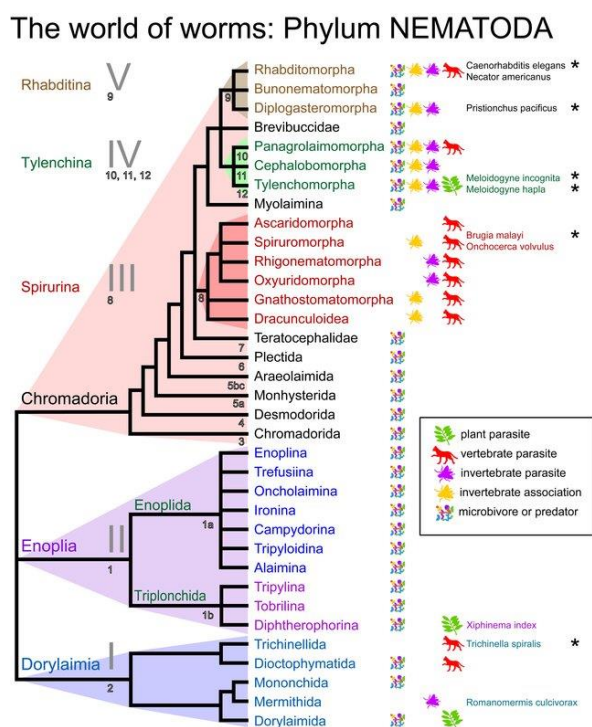
3.7.2.3 Predikce sekundární struktury – I-TASSER.....	20
4. Výsledky.....	21
4.1 PCR a sekvenování astacinu a ITS.....	21
4.2 Analýza genové exprese.....	21
4.3 RNA interference.....	23
4.4 Testy virulence.....	24
4.5 Evoluční statistická analýza.....	25
4.5.1 Vnitrodruhová variabilita, divergence a testy neutrality.....	27
4.5.2 Detekce selekce pomocí mezidruhové genetické variability.....	30
4.5.2.1 Seleční analýza za užití fylogenetických stromů – Datamonkey.....	30
4.5.2.2 Analýza na úrovni aminokyselin – TreeSAAP.....	33
4.5.2.3 Predikce sekundární struktury – I-TASSER.....	39
5. Diskuze.....	41
5.1 Optimalizace metod a analýza genové exprese.....	41
5.2 RNA interference.....	41
5.3 Evoluční statistická analýza.....	42
6. Závěr.....	45
7. Literatura.....	46
8. Přílohy.....	57

# 1. Úvod

Kmen hlístice (Nematoda) je rozsáhlou skupinou mnohobuněčných živočichů s pestrými škálami životních stylů od plovoucích volně žijících zástupců, půdních živočichů až po různě specializované parazity, ať už obligátní nebo fakultativní. Jsou charakterističtí svým většinou drobným tělem červovitého tvaru bez segmentace, pokrytým silnou obrannou kutikulou, s jednoduchou orgánovou stavbou, a výskytem s vysokou abundancí. Jejich početnost, všudypřítomnost a rozšířený parazitismus z této skupiny dělá atraktivní cíl pro studium evoluce, parazitismu a symbiózy (Sommer a Streit, 2011)

## 1.1 Parazitismus v rámci kmene Nematoda

Parazitismus v rámci Nematoda vznikl nejméně 18krát (Blaxter 2014, Weinstein 2018), a to v podstatě ve všech pěti hlavních kladech (viz obrázek 1, Blaxter 2011)



**Obr. 1:** Fylogeneze kmene Nematoda s vyznačením parazitizmu (převzato z Blaxter, 2011).

Bazální skupina Enoplida, jejíž postavení v rámci fylogeneze bylo prokázáno nedávno (Smythe et al. 2019), je však složena především z volně žijících hlístic. Proto je všeobecně

přijímáno, že parazité se vyvíjí z volně žijícího předka s komenzálním, či saprofytickými vztahy s ostatními živočichy (Sudhaus 2008).

Hlístice žijí velice často ve spojení s dalšími organismy a nemusí se jednat jen o vztah parazit-hostitel. Tato spojení popsali a rozdělili do 4 skupin Dillman et al. (2012): *foreze* – hlístice používají hmyz jako vektor do nových stanovišť, *nekromenie* – hlístice je v klidovém stádiu na živém hmyzu a až po jeho úmrtí se živí bakteriemi na jeho mrtvole, a *parazitimus fakultativní* či *obligátní* podle stupně přizpůsobení se tomuto způsobu života.

Tyto kategorie nejsou vždy pevně dané. Příkladem je druh *Pristionchus pacificus*, jehož způsob života je označován jako nekromenický (Herrmann et al. 2006, Herrmann et al. 2007). Ovšem tento druh lze také najít bez problému žijící i v substrátu bez asociace s hmyzem (Félix et al. 2018). Pro vývoj parazitismu je asociace klíčová, i když vztah s hmyzem nutně neznamená, že se z hlístice vyvine parazit. Na tento vývoj poukazuje i fakt, že u většiny parazitických hlístic je stádium larev přecházející z volně žijících stádií do parazitických shodné se stádii volně žijících hlístic s foretickými vztahy (Blaxter et al. 2014).

## 1.2 Vliv parazitismu na genom

Přechod do parazitického způsobu života provází mnoho změn jak na morfologické, fyziologické, tak i genetické úrovni. Genomy v celé skupině nematod vykazují značnou míru získávání a ztrát genů (Sommer a Streit 2011, Rödelsperger et al. 2013).

Významným procesem, který přispívá k získávání nových genů je horizontální genový transfer (HGT). Jedná se o předávání genetické informace mezi jedinci stejné generace, a nikoliv z rodiče na potomka (Keeling et al. 2008). Tento jev je hojný zejména u hlístic parazitujících na rostlinách. Geny získané tímto způsobem u rostlinných parazitů pocházejí z bakterií a hub (Kikuchi et al. 2004, Paganini et al. 2012). Jedná se většinou o geny kódující enzymy degradující rostlinnou buněčnou stěnu, zpracování živin či potlačující obranné mechanismy hostitele (Bird et al. 2015, Palomares-Rius et al. 2014, Danchin et al. 2016).

U parazitických hlístic, ať už rostlin, nebo živočichů, lze pozorovat také značné expanze genových rodin specifických podle typu parazita. Tyto duplikace a expanze jsou považovány za klíčové pro tvorbu nových funkcí (Treangen a Rocha 2011). Expandované geny hrají roli v pronikání do hostitele (astacinové proteázy), ochranou před zhoubnými molekulami hostitele (superoxid dismutázy, flavin monooxygenázy), či k potlačování imunního systému jako celku (Baskaran et al. 2017, Zhang et al. 2020, Zarlenga et al. 2016, Xu et al. 2019).

### 1.3 Srovnávací genomika

Klíčové pro pochopení podstaty parazitismu a jeho evoluce v rámci nematod je identifikace genů a genových rodin, které jsou s ním spojeny. Výchozím předpokladem je evoluce parazitických hlístic z volně žijícího předka. Na základě tohoto principu jsou porovnávány genomy volně žijících zástupců s parazitickými a odlišné geny jsou považovány za produkt evolučního tlaku spojeného s parazitismem. Důležitou podmínkou je porovnávat druhy ve stejném fylogenetickém kladu, protože genomové rozdíly mezi hlísticemi z různých kladů nemusejí nutně být výsledkem rozdílného způsobu života, ale odlišné evoluční historie (Viney 2017).

Na podobném předpokladu je založen i specifitější přístup, což je porovnávání exprese genů ve volně žijícím stádiu se stádiem parazitickým. Zde je však také možnost, že změny mohou souviset nejen se životní strategií, ale také s životním stádiem, které nejsou stejná ani u druhů se stejným životním stylem natož pak u druhů se stylem odlišným (Viney 2018).

### 1.4 RNA interference.

RNA interference je užitečná metoda pro tzv. „reverse genetics“, kdy se testuje, jaký účinek má vypnutí, nebo utlumení genové exprese, na fenotyp testovaného zvířete. Tato metoda je ideální pro ověření spojitosti kandidátních genů s parazitismem. Její podstatou je využití přirozeného procesu, kdy je cizorodá dvouvláknová RNA štěpena nukleázou Dicer, čímž tvoří siRNA (Ketting et al. 2001). Tyto siRNA se pak váží na komplementární mRNA a navazují komplex RISC (RNA interfering specificity complex), který po navázání degraduje mRNA (Viney a Thompson 2007).

Základní metodou pro vpravení dsRNA do těla organismu je mikroinjikace do gonád nebo tělní dutiny, která je používána u řady organismů, např. u modelů hlístice *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 1998), mouchy *Drosophila melanogaster* (Dzitoyeva et al. 2001), ale i myši *Mus musculus* (Svoboda et al. 2000).

Pro modelový druh *C. elegans* byly vyvinuty další dva procesy, využívající jejich základní biologie (Maine 2008). První metoda se nazývá „feeding“ neboli krmení. Pro tento přístup je potřeba výroba rekombinantních bakterií, které exprimují cílený gen. Hlístice pozře bakterii i s dsRNA a dochází ke spuštění celé kaskády reakcí pro umlčení exprese genu. Nutno podotknout, že tato metoda je proveditelná pouze u bakteriofágních hlístic jako jsou volně žijící *C. elegans*. Třetím přístupem je tzv. „soaking“, kdy jsou hlístice ponořeny ve fyziologickém roztoku s dsRNA, kterou polykají (Fortunato a Fraser 2005).



Obecně je RNA interference variabilní v účinnosti u jednotlivých druhů a zejména u parazitických hlístic zvířat. Nízká úspěšnost ale není dána pouze odlišným stylem života, jelikož na *C. elegans* úspěšně aplikované metody nefungovaly u druhu *Pristionchus pacificus*, který je svým životním stylem podobný *C. elegans* a je proto vedle něj používán pro studie jako další příklad volně žijící hlístice (Félix 2008).

### **1.5 Entomopatogenní hlístice *Heterorhabditis bacteriophora***

Skupinu entomopatogenních hlístic (EPN) tvoří druhy z kladu IV (rod *Steinernema*) a kladu V (rod *Heterorhabditis*). Ačkoliv se nejedná o příbuzné druhy, tak u obou rodů vznikl podobný způsob života (Blaxter et al. 1998). Podstatou jejich entomopatogenicity je symbióza s bakterií, kterou si uchovávají ve střevní dutině. V tomto vztahu je hlístice zodpovědná za průnik do hostitele, zatímco bakterie se do značné míry podílí na usmrcení oběti a dále slouží jako potrava pro hlístici (Nermuť et al. 2012).

Životní cyklus *H. bacteriophora* se dá rozdělit do dvou fází. Ve fázi volně žijící se infekční larva (nese kutikulu předchozího instaru, uzavřený ústní otvor a nepřijímá potravu) pohybuje v půdě a hledá hostitele detekcí molekul zanechaných po hostiteli jako např. amoniak pomocí hlavových sensorických papil (Hallem et al. 2011, Dillman et al. 2012). Ve fázi parazitické dojde k proniknutí hlístice do hostitele přes ústní či řitní otvor, nebo mezičlánkovou membránu, a následuje postupná regurgitace symbiotických bakterií. Na začátku regurgitace jsou hlístem vylučovány proteiny potlačující hostitelovu imunitní odpověď hostitele (Kenney et al. 2019). Po dosažení kritického počtu bakterií hostitel umírá na základě otravy bakteriemi sekretovanými látkami do cca 24 - 48 hodin (Nermuť et al. 2012). Po proniknutí do hostitele pokračují infekční larvy ve vývoji do hermafroditických dospělců, kteří dají vzniknout potomkům s odděleným pohlavím. Hlístice se množí zhruba po 2-3 generace. Touto dobou dojde většinou ke spotřebování živin. V tomto okamžiku se začnou produkovat nová infekční stádia, která opouští hostitele, a celý cyklus se opakuje.

Hostitelské spektrum *H. bacteriophora* je široké v rámci hmyzu vázaného na půdu. (Peters 1996, Stefanovska et al. 2008) Díky tomu je tento druh hojně používán v biologické ochraně rostlin proti škůdcům.

### **1.6 RNA interference u EPN**

Výzkum pomocí RNAi je u entomopatogenních hlístovek stále na počátku a zatím jsou spíše testovány různé protokoly. Mikroinjekci jako možnou metodu potvrdil Ratnappan et al. (2016). Metoda „feeding“ je teoreticky možná, ale doposud nebyla úspěšně použita. Důvodem je pravděpodobně problematická příprava rekombinantní bakterie, neboť jsou tyto

hlístovky v úzké vazbě na své symbionty a nelze použít *E. coli* jako u *C. elegans* (Půža, pers. communication).

Ověření účinnosti metody „soaking“ na *H. bacteriophora* bylo provedeno v práci Ciche a Sternberg (2007), kteří aplikovali roztok dsRNA na vajíčka těchto hlístic. Vylíhnuté hlístice vykazovaly sníženou expresi cílených genů. Podle autorů je však zásadním nedostatkem skutečnost, že se z takto ošetřených vajíček líhnou dospělci, a ne infekční larvy, nejspíš kvůli dostatku potravy u rodičů. Na infekčních larvách označili „soaking“ za problematický, jelikož mají uzavřený ústní otvor.

Tuto překážku se však podařilo překonat týmu Morris et al. (2017), který úspěšně potlačil expresi genu *flp-21* u infekčního stádia (IJ) entomopatogenní hlístice *Steinernema carpocapsae*. Jejich metoda „soaking“ se lišila v tom, že infekční stádia koupali v roztoku s dsRNA s přidáním serotoninu pro stimulaci polykacího reflexu. Výsledkem bylo 81% snížení exprese po 48 hodinách.

Ačkoliv jsou hlístovky rodu *Steinernema* a mnou zkoumaná *H. bacteriophora* z rozdílných kladů, jejich životní styl je velmi podobný. Z tohoto důvodu jsem se rozhodl metodu „soaking“ otestovat u IJ a použít pro studium parazitismu u *H. bacteriophora*.

### **1.7 Kandidátní geny pro parazitismus *Heterorhabditis bacteriophora***

U hlístice *H. bacteriophora* byla nedávno provedena transkripční analýza pro zjišťování kandidátních genů spojených s parazitismem. Porovnáním *H. bacteriophora* a dalších 4 parazitických druhů z kladu V s *C. elegans* bylo nalezeno 75 genů společných pro testované parazitické hlístice, z nichž bylo 17 silně konzervovaných pro parazity kladu V. Konzervované geny kódovaly hlavně sekretované peptidázy spojované s průnikem do hostitele (Vadnal et al. 2017).

Podrobnější studium genů souvisejících s parazitismem však bylo zahájeno již dříve týmem Hao et al. (2008), který u druhu *S. carpocapsae* sestavil knihovny cDNA z několika životních stádií, a porovnáním míry exprese pomocí Real-Time PCR určil několik genů s možným spojením s parazitismem. Stejný postup provedli o dva roky později u entomopatogenní hlístice *H. bacteriophora* (Hao et al. 2012). V práci použili dvě různě virulentní linie z Azorských ostrovů, vybrané na základě předcházejících testů virulence (Rosa a Simoes, 2003). Z indukovaného parazitického stádia sestavili knihovnu sekvencí, z nichž se 48 shodovalo s proteiny o známé funkci. Výběr pro další zkoumání zúžili na 5 genů, které by mohly být spojené s parazitismem: lectin, SSA (SurfaceAssociated antigen), chitináza, enoláza a astacin. Spojitost těchto genů s parazitismem bylo ověřeno pomocí

indukce v hemolymfě v časové posloupnosti, která měla simulovat průnik hlístice do hostitele. Z indukovaných hlístic byla izolována RNA a určena míra exprese pomocí Real-time PCR. Autoři předpokládali, že pokud geny nemají spojitost s parazitismem, pak bude míra jejich exprese shodná jak u méně virulentní linie Az36, tak u více virulentní linie Az29. Míra exprese se nejen lišila v jednotlivých časových bodech, ale pro geny pro enolázu a zinkovou proteázu nebyla u méně virulentní linie zaznamenána vůbec žádná exprese (Hao et al. 2012).

Gen pro enolázu byl už zkoumán v naší laboratoři v rámci bakalářské práce M. Flegrové, která porovnávala jeho vnitrodruhovou variabilitu u *H. bacteriophora* a *S. feltiae* s jejich virulencí. I když se nepodařilo prokázat žádnou selekci, míra genetické variability enolázy byla u těchto druhů odlišná. *H. bacteriophora* totiž vykazovala polymorfismus v minimální míře, a to pouze v jednom intronu. Různé geografické linie se však ve virulenci signifikantně lišily.

Na základě těchto prací jsem si zvolil pro svou analýzu geny pro enolázu a pro astacin, které u virulentnější linie vykazovaly největší nárůst exprese v parazitické fázi.

### 1.7.1 Astaciny

Astaciny jsou genovou rodinou zinkových metaloproteáz, které mají své zástupce v živočišných a bakteriích (Bond a Beynon 1995). Nedávná studie Yew et al. (2016) poukazuje na možnou existenci těchto enzymů i v houbách. Dodnes nebyly žádné nalezeny v rostlinách. Astaciny začínají na N-terminálním konci pre-prosekvencí sloužící jako signální peptid pro transport do endoplazmatického retikula, a prosekvencí, která je enzymaticky štěpena při aktivaci celého proteinu. Následuje zhruba 200 aminokyselin dlouhá katalytická doména, kterou končí nejjednodušší proteázy. Valná většina pokračuje na C-terminálním konci dalšími doménami o různé struktuře, délce a počtu opakování. Mezi typické patří EGF (Epidermal growth factor)-like a CUB (C1r/C1s, embryonic sea urchin protein Uegf, and BMP-1) domény, jejichž funkce pravděpodobně spočívá v určování specifity enzymu k substrátu, či interakcím s dalšími proteiny (Bond a Beynon 1995). Vedle těchto se mohou vyskytovat domény specifické pro jednotlivé rodiny kupříkladu doména MAM (meprin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu) zodpovědná za přilnutí k buňkám a protein-protein interakce u meprinů, či domény TSP1 (Thrombospondin-like 1) a SXC nalezených u *C. elegans* (Möhrlen et al. 2003, Sterchi et al. 2008). Jejich široké zastoupení napříč druhy se promítá také do šíře jejich funkcí. Jako významné příklady lze uvést indukce tvorbu kostní a chrupavkovité tkáně štěpením prokolagenu 1–3 lidskou proteázou BMP-1 (Bone Morphogenetic Protein 1) či určování dorzo-ventrálního uspořádání ektodermální

tkáně u *Drosophila melanogaster* proteinázou tolloid (Shimell et al. 1991). Na rozdíl od předešlých příkladů jsou astaciny popsány v práci Trevisan-Silva et al. (2010) mnohem zákeřnější povahy. Tyto astaciny jsou obsaženy v jedových žlázách pavouků koutníků z rodu *Loxosceles*. Zajímavostí je, že při mezidruhovém srovnání byly tyto astaciny podobnější astacinům nematod než pavoukoviců, což poukazuje na zajímavou evoluci, která nemusí nutně kopírovat vývoj druhů (Trevisan-Silva et al. 2010).

Počty astacinů u různých druhů se liší. Zatímco u lidí se vyskytuje pouze 6 zástupců těchto proteáz, tak u *C. elegans* bylo nalezeno celkem 40 astacinů (včetně jednoho pseudogenu) rozdělených do 6 skupin na základě jejich doménové struktury (Möhrlen et al. 2003). Role těchto astacinů je spojena s tkáněmi, ve kterých jsou exprimovány. Značná část u *C. elegans* se nachází ve střevě, kde jim je přisuzována trávicí funkce. Hlavní funkcí je ale štěpení kutikulárních substrátů. S tím je spojen jejich vliv na líhnutí, obměnu kutikuly, růst hlístice, ale také na vývoj jícnového „zoubku“ potřebného k drcení potravy, jak naznačují defekty v mutantních jedincích pro astacin nas-6 a nas-7 (Park et al. 2010).

Sekvence identifikovaná v práci Hao et al. (2012) odpovídá genu *hba\_20530*, což je ortolog genu *dpy-31* u *C. elegans*. Tento protein patří podle rozdělení astacinů v práci Park et al. (2010) do skupiny V. Struktura tohoto proteinu (viz obrázek 2) je od N-terminálního konce: Signální peptid, prosekvenční a doména katalytická, EGF, CUB a TSP1 (Möhrlen et al. 2003).



**Obr. 2: Schéma domén u genu astacin metaloproteáza.** fialová – presekvenční, šedá – prosekvenční, červená – astacinová katalytická doména, žlutá – EGF, modrá – CUB, oranžová – TSP1

Pro tento astacin je jako u jednoho z mála astacinových proteáz známý substrát, kterým je pro tvorbu kutikuly nutný kolagen SQT-3 (Novelli et al. 2004). *Dpy-31* štěpí SQT-3 na C-terminálním konci, čímž se podílí na jeho maturaci (Page et al. 2014). Mutantní fenotypy pro tuto proteázu vykazují embryonální letalitu a defekty v tvorbě kutikuly, která se projevuje zmenšenou velikostí těla. Ve dvou studiích, které používaly záchranné expresní konstrukty z druhů *Haemonchus contortus* a *Teladorsa giacircumcincta* došlo k obnovení standardního fenotypu u *C. elegans* mutantních pro geny *dpy-31*. Stejný pokus se nezdařil u

vzdálenějšího druhu *Brugia malayii*, což může poukazovat na konzervovanost tohoto genu pouze v kladu číslo V. Avšak enzymatické testy *dpy-31* z těchto druhů vykazovaly stejnou katalytickou funkci na substrátu SQT-3, což poukazuje na funkční konzervaci napříč klady (Stepek et al. 2015, Stepek et al. 2009).

### 1.7.2 Enoláza

Enol-1 je ortologem pro lidské geny ENO1, 2 a 3, které kódují enzym enolázu. Jedná se o hydro-lyázu s hořečnatým iontem jako kofaktorem, jejíž funkce spočívá v přeměně 2-fosfo-d-glycerátu na fosfoenolpyruvát za vzniku vody jako vedlejšího produktu. Tato reakce je předposlední reakcí v metabolickém procesu zpracování cukrů glykolýzy a probíhá i opačným směrem v procesu glukoneogeneze za vzniku glukózy. Proteinová sekvence se dá rozdělit na kratší N-terminální a delší C-terminální domény (viz obrázek 3).



**Obr. 3: Schéma genu pro enolázu.** modrá – N-terminální doména, zelená – C-terminální doména.

Ačkoliv jsou sekvence enoláz mezi druhy odlišné do takové míry, že similarita se pohybuje v rozmezí 40–90%, tak se stále jedná o velice konzervované enzymy (Pancholi 2001). Enoláza není považována za „housekeeping“ gen kvůli kolísavé míře exprese v závislosti na stáří buňky či chorobných stavech. Enoláza neslouží pouze v glykolytickém řetězci. U parazitických prvoků *Leishmania mexicana* a *Plasmodium falciparum*, hlístice *Onchocerca volvulus* či tasemnice *Taenia solium* bylo prokázáno, že enoláza slouží jako receptor a aktivátor plasminogenu na plasmin, který slouží k udržování homeostáze štěpením fibrinu a extracelulární matrix. Předpokládá se, že vazbou a aktivací plasminu na povrchu těchto parazitů dochází k snadnějšímu pronikání do hostitele (Ayón-Núñez et al. 2018).

### 1.8 Detekce vlivu adaptivní evoluce na molekulární úrovni

Porozumění procesu adaptace, tedy procesu jakým se organismy přizpůsobují změnám prostředí, je hlavním problémem evoluční biologie (Jensen et al. 2007).

Rozvoj molekulárních metod přinesl obrovské množství dat, jejichž zpracování a vyhodnocování vedlo k vývoji řady statistických metod a modelů. Tyto jsou zaměřeny na různé formy selekce (přírodního výběru), za použití buď polymorfismů (variabilita

vnitrodruhová), divergencí (variabilita mezidruhová), nebo jejich kombinace. Ve všech případech jsou použity DNA sekvence ortologních genů. Základním předpokladem pak je postulát neutrální teorie (Kimura 1983), že většina evolučních změn na molekulární úrovni je výsledkem náhodného genetického driftu mutantních alel, které jsou selektivně neutrální.

Modely založené na polymorfismu jsou zaměřené na detekování selekce v populacích daného druhu, tedy selekci relativně recentní. Jejich nevýhodou je, že selekci působící v rámci druhu je někdy těžké odlišit od demografických vlivů. Tomu lze předejít jednak výběrem vzorků pro testování (nikoliv z jedné populace, ale jako soubor linií z různých populací), jednak porovnáním více genů, neboť demografie by se na rozdíl od specifické selekce měla projevit u všech lokusů stejně (Hartl a Clark 1997)

Modely používající divergenci jsou téměř výhradně používány pro kódující sekvence a často je brána v potaz i informace o souvisejících druhových fylogenetických vztazích (Jensen et al. 2007). Základním parametrem je výpočet poměru nesynonymních (aminokyselinových) ( $Ka$ ) a synonymních mutací ( $Ks$ ), neboli  $\omega = Ka/Ks$  (Nei a Gojobori, 1986). Vychází se přitom z předpokladu, že pokud pozitivní selekce významně ovlivnila protein kódující DNA sekvenci, pak je  $\omega = Ka/Ks > 1$ , zatímco negativní selekce se projeví opačně, tedy  $\omega = Ka/Ks < 1$ . Tyto modely se zaměřují na selekci, která probíhala v průběhu evoluce druhů, resp. vyšších taxonomických jednotek. Vzhledem ke stále narůstajícím databázím genomů a transkriptomů je tento postup používán u stále většího množství organismů i evolučních hypotéz.

## 2. Cíle

Geny hlístice *Heterorhabditis bacteriophora* kódující enolázu a astacinovou metaloproteázu byly vytipovány jako geny s potenciálním významem pro parazitický způsob života u tohoto organismu. Cílem této práce je ověřit možnosti použití metod reverzní a evoluční genetiky pro podrobnou charakterizaci těchto genů. Konkrétně se zaměříme na:

- 1) Prověření možnosti provádět experimentální umlčování genů v infekční fázi larev *Heterorhabditis bacteriophora* na modelových genech pro enolázu a astacinovou metaloproteázu.
- 2) Hledání projevů selekce v genech, jež by mohly souviset s parazitickým způsobem života v rámci skupiny Nematoda. Geny pro enolázu a astacinovou metaloproteázu podrobit detailní biostatistické evoluční analýze na vnitrodruhové i mezidruhové úrovni.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Entomopatogenní hlístice

Ve svém projektu jsem navazoval na výsledky bakalářské práce M. Flegrové (Flegrová 2015), a proto jsem pracoval se stejnými liniemi hlístic rodu *H. bacteriophora* (viz tabulka 1). Všechny linie byly zahrnuty v selekční statistické analýze DNA sekvencí. Pro analýzu genové exprese a RNA interferenci jsem vybral na základě testů virulence provedených v uvedené bakalářské práci pět linií, a to nejméně virulentní linii HB HEPAL, nejvíce virulentní linii HB 09-48 a dvě linie HB 221 a HB USA s průměrnou virulencí. V experimentech s genovou expresí byla také použita pro srovnání standardní linie TT01. Linie byly dodány RNDr. Vladimírem Půžou Ph.D. z laboratorních sbírek. Linie TT01 byla darována a poslána doc. RNDr. Pavlem Hyršlem Ph.D.

**Tab. 1: Seznam použitých linií hlístic *Heterorhabditis bacteriophora*.**

Linie	Místo sběru	Původ/Sběratel
HB 09-43	Turecko	Hazir S.
NIG	Nigérie	Mengistu T. M.
CAL 3C	Kalifornie, USA	Nermuť J.
MG 618	Švýcarsko	Campos-Herrera R.
HB HEPAL*	Palestina	Ehlers R. U.
HB 221*	Pouzdřany, ČR	Mráček Z.
HB USA*	Virginia, USA	Kaya H.
HB 09-48*	Turecko	Hazir S.
TT01*	Tobago a Trinidad	Ciche, T.A.

Pozn.: \* Linie vybrané pro analýzu genové exprese a RNAi.



## 3.2 Chov hlístic

Metodika nakažování housenek hlísticemi principiálně vycházela z práce Bedding a Akhurst (1975). Larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella* byly nakaženy v Petriho miskách o průměru 9 cm s filtračním papírem na dně. Nejdříve byl změřen průměrný počet hlístic v zásobním roztoku. Třikrát bylo odebráno 20 $\mu$ l zásobního roztoku s hlísticemi a počet jedinců stanoven pod mikroskopem. Počet hlístic byl zprůměrován a na infekci byl použit objem s 50 hlísticemi na jednu housenku. Dále byla pipetou přidána sterilní H<sub>2</sub>O tak, aby celkový objem tekutin dosahoval 600 $\mu$ l na misku. Takto nakažené larvy byly ponechány v temnu po dobu 5 dnů. Pro potřebu izolace nukleových kyselin byli po 5 dnech z housenek vypitváni hermafroditičtí dospělci.

Infekční larvy (IJ) byly kultivovány metodou „Whitetráp“ (Kaya a Stock 1997). Kultivace probíhala tak, že nakažené housenky byly po pěti dnech poskládány na obrácenou 9 cm Petriho misku s filtračním papírem na vrchu. Tato miska byla následně vložena do Petriho misky s průměrem 15 cm a na dno dolita voda tak, aby se dotýkal filtrační papír hladiny. Zhruba po 12 dnech od prvního nakažení housenek začala infekční stádia hlístic opouštět tělo hostitele a přesunula se do připravené vody, ze které byli pak odebráni a zpracováni.

## 3.3 Izolace nukleových kyselin

### 3.3.1 Izolace DNA

Izolace byla prováděna z dospělců za použití 20  $\mu$ l lyzačního pufru na jedince (17,7 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 2 $\mu$ l 10 $\times$  PCR pufr TopBio, 0,2 $\mu$ l 1% Tween, 0,1 $\mu$ l Proteináza K o koncentraci 20mg/ml). Hlístice v lyzačním pufru byly zvortexovány, zcentrifugovány a po dobu 20 minut nechány v -20°C. Následovala inkubace při 65°C a nakonec inaktivace enzymu při 95°C po dobu 8 minut. Výsledná směs byla použita jako templát do PCR reakce.

### 3.3.2 Izolace RNA za užití kituHybrid-R™ (GeneAll)

Veškeré nástroje pro homogenizaci byly ošetřeny 0,1% DEPC H<sub>2</sub>O po dobu 12 hodin pro inaktivaci RNáz. Inaktivace DEPC byla provedena autoklávováním při 121 °C po dobu 2 hodin. Homogenizace vzorků byla provedena jejich zmražením tekutým dusíkem a následným drcením v hmoždíři. Výsledná drť byla přenesena do 1,5ml RNAse-free zkumavky. Dále bylo postupováno podle návodu výrobce. Výtěžek a čistota RNA byla spektrofotometricky určena na přístroji Nanodrop 2000/2000c (ThermoFisherScientific). Kvantifikovaná RNA byla 5 $\times$  naředěna pro použití v Real-Time PCR a uskladněna pro pozdější užití do -80°C.

### 3.4 PCR amplifikace a DNA sekvenování kandidátních genů

Pro evoluční analýzu bylo nutné získat sekvence kandidátních genů a referenčního markeru ITS (Internal Transcribed Spacer) z jednotlivých linií. Sekvence pro enolázu byly převzaty z práce M. Flegrové, ale sekvence pro astacin a pro ITS byly získány „*de novo*“ standardním postupem, tedy amplifikací polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a následným přímým sekvenováním získaných amplikonů.

#### 3.4.1 Použité primery

Pro ITS byly použity primery 18S (forward) a 28S (reverse) podle práce Vrain et al. (1992). Primery pro astacin byly nově navrženy. Jednalo se celkem o párů 8 primerů. Páry Zn1 a Zn4 byly posazeny na exonovou a intronovou část genu, zatímco páry Zn2 a Zn3 byly posazeny pouze na exony. Přehled primerů je uveden v tabulce 2.

**Tab. 2: Přehled použitých primerů pro PCR amplifikaci atacinu a SSU.**

Název	Orientace	5' -> 3' sekvence	Autor
Zn1	F	ATCGCCATATTTTTCTGTTTG	J. Hartmann
	R	CGGGTCTTTTTATCGTCTATGAGT	J. Hartmann
Zn2	F	GCGCTCCCCTGCCTTGTTCTAA	J. Hartmann
	R	TCGCTGGCCTATTGTCTTTTGGTA	J. Hartmann
Zn3	F	TCTTGGGTTTTGGCATGAGCAGTC	J. Hartmann
	R	CACCGCGTAGAAGGGAAAGAAATC	J. Hartmann
Zn4	F	CAGGAGGAGCTTGCGCGTCAGTAT	J. Hartmann
	R	GCATTCTCACAGGGCTCCATC	J. Hartmann
18S	F	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	Vrain et al. 1992
28S	R	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG	Vrain et al. 1992

Pozn.: F – forward, ve směru transkripce, R – reverz, proti směru transkripce.

#### 3.4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Reakce byla míchána do 0,2 ml zkumavek na ledu. Na všechny reakce byla použita polymeráza TAKARA Ex Taq. Celkový objem reakce bez DNA templátu byl 11,55 µl. Reakce se byla složena z 7,75 µl ddH<sub>2</sub>O, 1,25 µl 10x reakčního pufru (TAKARA), 1 µl dNTPs mix (TAKARA), 0,75 µl „forward“ a 0,75 µl „reverse“ primeru (5 µM), 0,05µl Ex Taq polymerázy (TAKARA). K takto namíchané reakci byly přidány 2 µl templátové DNA. Reakce probíhala v přístroji Tprofessional TRIO PCR Thermocycler (Biometra). Profily se

skládaly z klasických kroků: predenaturace, několikanásobnému opakování trojcyklu denaturace, nasedání primerů (annealing), elongace a poté závěrečné postelongace. PCR byly prováděny pro amplifikaci genu pro astacin, ITS a pro výrobu DNA templátů pro in vitro transkripci. Jednotlivé profily jsou vypsány v Příloze 1-3.

### **3.4.3 Gelová elektroforéza**

Pro verifikaci úspěšnosti a velikosti produktů amplifikačních reakcí byla využita elektroforetická gelová separace. Produkty byly separovány na 2% agarózovém gelu. Gel byl připraven rozehrátím 4 g agarózy ve 200ml 1× TAE pufru (naředěn ze zásobního 50× TAE: 2M Tris, 1M kyselina octová, 0,05M EDTA) v mikrovlnné troubě po dobu 2–4 minut. Rozehřátý gel byl ochlazen pod proudem vody na cca 45 °C, kdy bylo do směsi přidáno 12μl ethidium bromidu o koncentraci 0,5 μg/μl. Tato směs byla dále ochlazená a nalita do připravené plastové formy s hřebínky. Forma s gelem byla ponechána na ztuhnutí po dobu 45 minut ve tmě.

Do jamek gelu byly vždy nanášeny 3μl vzorku s 1,5μl nanášecího pufru (69,5% ddH<sub>2</sub>O, 30% glycerol, 0,5% bromfenolová modř). Délka fragmentu byla určena podle velikostního markeru ze štěpení plazmidu pBR322 restrikční endonukleázou MspI. Po separaci byl gel vizualizován na UV transiluminátoru.

### **3.4.4 Sekvenace**

Produkty PCR reakcí byly před sekvenací enzymaticky přečištěny. Do 10 μl vzorku bylo přidáno 0,5 μl Exonukleázy I (20 U/μl, ThermoFisherScientific) a 1μl FastAP (1 U/μl, ThermoFisherScientific). Vzorek byl v termobloku inkubován po dobu 30 minut při 37 °C a následně po 15 minut při 80°C. Sekvenační reakce byly připraveny do 1,5 ml zkumavky přidáním 5 μl přečištěného vzorku, 5 μl primeru použitého při PCR a následně byla reakce poslána do firmy GATC Biotech na sekvenaci.

### 3.5. Analýza genové exprese

#### 3.5.1 Indukce infekčního stádia hlístovek

Hemolymfa byla odebrána z 3–4 týdnů starých larev *Galleria mellonella*. Po odstřížení panožky prvního páru končetin larvy byla hemolymfa vymačkána do 1,5 ml zkumavky na ledu. Významnou složkou koagulační kaskády hemolymfy jsou hemocyty, a to přesněji granulocyty (Rowley a Ratcliffe 1976). Pro inhibici koagulace byly hemocyty ze získané hemolymfy precipitovány centrifugací při 6000 g po dobu 5 minut v 4°C. Hemolymfa zbavena hemocytů byla odebrána do nové 1,5 ml zkumavky a uskladněna do -80 °C pro pozdější využití. Pro potřeby indukce bylo potřeba udržet hemolymfu v nesraženém stavu po delší časový úsek (až 24h). Z tohoto důvodu byly otestovány tři způsoby inhibice koagulace hemolymfy:

a) kyselinou askorbovou (AA), jenž inhibuje srážení od koncentrace 10mM (Beard 1950). Pro naše účely byl testován roztok hemolymfy a askorbové kyseliny o finální koncentraci 5mM, 10mM a 25mM.

b) fenylthiomočovinou (PTU), která je široce užívaným inhibitorem enzymu fenoloxidázy. Ten je spojen s koagulační kaskádou (Li et al. 2002, Ryazanova et al. 2012). Pro naše účely byl testován roztok hemolymfy a fenylthiomočoviny o finální koncentraci 33mM podle práce Vadnal et al. (2017).

c) pomocí antikoagulačního roztoku (AC – NaCl 62mM, 100mM glukóza, 10mM EDTA, 30mM citronan sodný, 26mM kyselina citronová). Princip spočívá v chelataci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů potřebných pro funkci transglutamináz. Na rozdíl od ostatních složek srážecích reakcí obratlovců a bezobratlých jsou u obou skupin transglutaminázy podobné jak strukturou, tak funkcí, která spočívá v příčném spojování strukturních proteinů sraženiny (Theopold et al. 2002).

Infekční larvy byly sterilizovány v 0,1% roztoku benzetoniumchloridu (Biochemica) po dobu 10 minut. Hlístice byly zcentrifugovány při 5000 g po dobu 1 minuty a 5x promyty sterilním Ringerovým roztokem (153 mM NaCl, 5mM KCl, 4mM  $\text{CaCl}_2$ , 2,3mM  $\text{NaH}_2\text{CO}_3$ ). Přibližně 20 000 invazních larev bylo předáno do Petriho misky s 8ml 25% roztoku hemolymfy s modifikovaným Tyrodovým roztokem (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 2,1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,42mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 12mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5,5mM Glukóza) a antikoagulantem (AC). Petriho misky s hlísticemi a indukčním roztokem byly uzavřeny do Petriho misky o průměru 20 cm s navlhčeným filtračním papírem na dně. Misky byly míchány na třepače po dobu 6, 12, 18 a 24 hodin. Po uplynutí stanovené doby byly hlístice dvakrát promyty Ringerovým roztokem a přefiltrovány přes síto o velikosti otvorů 42 $\mu\text{m}$ .

### 3.5.2 Relativní exprese

Z indukovaných hlístic byla izolována RNA pomocí kitu Hybrid-R (viz výše). Míra genové exprese byla analyzována pomocí Real-time PCR. Prvním krokem byla příprava cDNA z RNA pomocí kitu Revert Aid „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (ThermoFisherScientific). Do reakce bylo přidáno vstupní množství 1µg RNA. Další příprava reakce probíhala podle návodu výrobce za použití primeru Oligo(dT)<sub>18</sub>. Výsledná cDNA byla naředěna ddH<sub>2</sub>O v poměru 1:5 a rovnou použita nebo uložena v -20°C.

Míra relativní exprese genů pro enolázu a astacin v jednotlivých časových úsecích (0h, 6h, 12h, 18h, 24h) byla analyzována za použití Real-Time PCR. Jakožto endogenní kontrola byly využity mnou navržené primery pro geny *rack1* a *rpl-32*. Sekvence všech použitých primerů pro Real-time PCR jsou v Příloze 5. Reakce byla namíchána do 48 jamkového platíčka. Jedna reakce byla složena z 9,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 4µl HOT FIREPolEvaGreenqPCR Mix Plus (SolisBiodyne), 0,75µl forward a reverse primeru (4µM), 5µl cDNA o celkovém objemu 20µl. Plato s reakčními roztoky bylo dáno do přístroje Eco Real-Time PCR System (Illumina). Profil se skládal z následujících kroků: aktivace polymerázy za 95°C po 15 minut, 45 opakování cyklu o třech krocích: denaturace 95°C po 15 sekund, nasedání primerů 60°C po 30 sekund, elongace 72°C po 15 sekund. Pro všechny primery byla vypočítána efektivita PCR standardní křivkou. Data byla analyzována v programu Microsoft Excel metodou  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak a Schmittgen 2001).

### 3.5.3 RNA interference

Metodika umlčování genů byla inspirována protokolem pro „soaking“ podle práce Morris et al. (2017), konkrétně použitím serotoninu pro stimulaci polykacího reflexu. Nejdříve proběhla optimalizace množství a roztoků použitých v „soakingu“. Byla testována mortalita 1000 a 2000 jedinců v roztocích PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Ringerově roztoku a Schneiderově roztoku (36mM NaCl, 5,4mM CaCl<sub>2</sub>, 15mM MgSO<sub>4</sub>, 21mM KCl, 3,3mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,76mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,94mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11,1mM glukóza, 12,3mM L-Glutamin) po 48 hodinách. Do každého testovaného roztoku byl přidán serotonin kreatinin sulfát (SCS) (SigmaAldrich) o konečné koncentraci 50mM.

K syntéze dvouvláknové RNA byl využit kit MEGAScript T7 TranscriptionKit (Invitrogen). Nejdříve byly vyrobeny templáty s připojenými T7 promotory pro správné nasedání RNA polymerázy. Templáty byly vyrobeny polymerázovou řetězovou reakcí za užití primerů pro vytipované geny s T7 promotory na 5' konci (viz Příloha 4). Profil PCR se lišil od standartního amplifikačního profilu 7 cykly, kdy byla snížena annealingová teplota pro správné nasedání genových částí primeru. Po těchto cyklech byla annealingová teplota

zvýšena pro správné nasedání celého primeru s T7 konci. Použité profily jsou vypsány v Příloze 3. Správná velikost DNA templátu byla ověřena elektroforeticky.

Transkripce a přečištění dsRNA bylo provedeno podle návodu výrobce. Výsledná RNA byla uskladněna v  $-80^{\circ}\text{C}$ . 1000 infekčních larev z linií HB HEPAL, HB 09-48 a TT01 bylo přidáno do 50 $\mu\text{l}$  roztoku dsRNA, Ringerova roztoku a serotonin kreatinin sulfátu (50mM) po dobu 48h. Koncentrace dsRNA v jedné reakci dosahovala 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pro každou linii byly připraveny 3 biologické replikáty s dsRNA, 3 biologické replikáty bez dsRNA pro vyloučení vlivu serotoninu na genovou expresi a 3 kontrolní replikáty pouze v čisté vodě. Po 48 hodinách byli hlístice třikrát promyté Ringerovým roztokem. Následovala izolace RNA, Reverzní transkripce a Real-Time PCR pro stanovení míry exprese. Signifikance změn v expresi byla ověřena t-testem v programu Microsoft Excel.

### 3.6. Testy virulence

Tento test byl proveden k ověření vlivu RNA interference na schopnost hlístic napadat hostitele. Hodnoty původní virulence populací HB HEPAL a HB 09–48 byly převzaty z práce M. Flegrové (Flegrová 2015). Pro populaci TT01 byla stanovena virulence v této práci, stejně jako virulence linií po RNA interferenci. Pro každou linii ošetřenou pro enolázu či astacin byla připravena tři opakování. Do Petriho misky o průměru 9 cm s filtračním papírem na dně bylo vloženo 10 housenek *Galeria melonella*. Do připravených misek byl ze zásobní lahve s hlísticemi přidán objem směsi s 50 infekčními larvami. Pro zajištění vhodných podmínek pro hlístice byla do každé misky dodána voda tak, aby celkový objem kapalin na misku dosahoval 600 $\mu\text{l}$ . Misky byly uloženy do temna a po 48 hodinách byly odečteny počty usmrcených housenek. Pro určení signifikance rozdílů mezi ošetřenými a neošetřenými liniemi byl použit Tukeyho-Kramerův test.

### 3.7 Evoluční statistická analýza

Vliv možné selekce působící na zájmové geny (resp. jejich kódující sekvence) je možné statisticky vyhodnotit na základě několika modelů, a to pomocí analýzy genetické variability vnitrodruhové (mezi vybranými liniemi či populacemi) a mezidruhové (mezi ortology z různých druhů). Analýzy selekčních tlaků byly provedeny na sekvencích genů pro enolázu a astacin. Byly použity pouze kódující sekvence kandidátních genů a u astacinu byly využity pouze známé domény (Astacin, CUB, TSP1), protože okolní sekvence byly hypervariabilní, nebo u některých druhů chyběly a jejich alignment by tedy nebyl spolehlivý.

Pro obě možnosti byly ze získaných sekvencí a ze sekvencí referenčních genů (malá ribozomální jednotka – SSU, ITS) vytvořeny fylogenetické stromy pomocí webového

serveru IQ-Tree (Nguyen et al. 2015). Pro vyhledání nejvhodnějšího distančního modelu byl použit ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al. 2017). Dendrogramy byly sestaveny metodou Maximum likelihood, za použití UFBoot „Ultrafast“ bootstrapu (Hoang et al. 2017) s 1000 opakováními.

Porovnání souběžnosti druhové fylogeneze s genealogií jednotlivých genů bylo provedeno v programovém prostředí R (RStudio Team, 2015), pomocí balíčků dendextend (Galili 2015), ape (Paradis a Schliep, 2018) a phylogram (Wilkinson a Davy, 2018). Kromě diagramu znázorňujícího souběh fylogramů (tanglegram) byly vypočteny koeficienty „entanglement“ (entg) a kofenetické korelace (ccf). Entg vyjadřuje kvalitu souběžnosti dvou fylogramů (1 – zcela nesouběžné, 0 – zcela souběžné). Hodnota koeficientu ccf se pohybuje v rozmezí od -1 do 1 a hodnoty kolem 0 znamenají, že porovnávané fylogramy si nejsou statisticky podobné.

### 3.7.1. Vnitrodruhová analýza

Sekvence ITS, genů pro enolázu a astacin všech studovaných populací byly upraveny a seřazeny v programu MEGA X (Kumar et al. 2018). K „alignmentu“ byl použit algoritmus MUSCLE. Pro analýzu vnitrodruhové variability byl využit program DnaSP v6 (Rozas et al. 2017). Pomocí tohoto programu byly vypočítány následující parametry:

**Nukleotidová diverzita  $\pi$**  – průměrný počet rozdílných nukleotidů mezi dvěma náhodně vybranými sekvencemi z populace (Nei 1987),

**Nukleotidový polymorfismus  $\theta$**  – očekávaný počet segregujících míst v populaci (Nei 1987),

**Nukleotidová divergence  $K$**  – průměrné číslo odlišných nukleotidů mezi druhy (Nei 1987),

**Počet haplotypů  $h$**  (Nei 1987) – počet unikátních sekvencí v daném souboru,

Ke grafickému znázornění rozložení nukleotidového polymorfismu a divergence byla použita metoda „klouzavého okénka“ (sliding-window).

**Haplotypová diverzita (Nei 1987)  $Hd$**  – tato hodnota vyjadřuje odlišnost haplotypů. Nízké hodnoty poukazují na purifikační selekci, zatímco vysoké hodnoty poukazují na selekci balancovanou.

**Fu a Liho  $D^*$**  (Fu a Li 1993) - tento test testuje nulovou hypotézu, že všechny vyskytující se mutace jsou selekčně neutrální. Srovnává výskyt ojedinělých mutací s celkovým počtem mutací. Kladné hodnoty jsou znakem balancované selekce, záporné selekčního „smetení“ (sweep).

**Tajimovo D** (Tajima 1989) – výpočet tohoto testu pracuje s rozdíly v počtu segregujících míst ( $\Theta$ ) a průměrným počtem rozdílných nukleotidů ( $\pi$ ). Pokud jsou si obě hodnoty rovny, pak se výsledná hodnota D rovná nule a sekvence jsou selekčně neutrální. Hodnoty  $D > 0$  svědčí pro balancovanou selekci,  $D < 0$  pro selekci direktivní.

**Test podle Hudsona, Kreitmana a Aguadé (HKA, Hudson et al. 1987)** – za použití nejméně dvou lokusů kontrastuje vnitrodruhový polymorfismus a mezidruhovou divergenci (ta umožňuje odhadnout množství očekávaného polymorfismu). Výrazně odlišné množství polymorfismu od předpokládaných hodnot pak poukazuje na možnou selekci balancovanou (polymorfismů je více) nebo selekčního „smetení“ (polymorfismů je méně).

### 3.7.2. Mezidruhová analýza

Nejdříve jsem vyhledal sekvence ortologních genů za pomoci databází OrthoDB v10.1 (<https://www.orthodb.org/>), WormBase (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) a Parasite (<https://www.arb-silva.de/>) a sekvence SSU z databáze SILVA (<https://www.arb-silva.de/>) a to tak, abych měl ve výsledném souboru zástupce jak druhů parazitických, tak i volně žijících, a to ze všech fylogenetických kladů. Kritéria výběru pro ortology kandidátních genů byla sekvenční similarita minimálně 85% a také alespoň 80% pokrytí délky sekvence. Seznam použitých druhů s databázemi a jejich přístupovými kódy jsou v Příloze 6.

#### 3.7.2.1 Selekční analýza za užití fylogenetických stromů - Datamonkey

Testování různých selekčních hypotéz pomocí fylogramů jsem provedl ve webovém serveru Datamonkey (<https://www.datamonkey.org/>). Metody jsou založeny na poměru nesynonymních ( $K_s$ ) a synonymních ( $K_a$ ) substitucí v alignmentu sekvencí neboli na hodnotě selekčního koeficientu  $\omega = K_a/K_s$  (Weaver et al. 2018). Soubor implementovaných modelů umožňuje testovat selekční hypotézy buď na celém fylogenetickém stromu, nebo na vybraných větvích, přičemž některé také rozlišují selekci epizodní (působící jen krátkodobě) nebo pervazivní (působící dlouhodobě). Pro svou práci jsem využil tyto modely:

**BUSTED (Branch-Site Unrestricted Statistical Test for Episodic Diversification)**- tento test detekuje pozitivní selekci na celém genu, nebo zda došlo k pozitivní selekci alespoň na jednom kodonu na jedné větvi fylogenetického stromu. Jde o test velmi obecný a pro přesnou analýzu je potřeba použít dalších metod (Murrell et al. 2015).

**MEME (Mixed Effects Model of Evolution)** – metoda zjišťuje, jestli jsou jednotlivé kodony pod epizodickou pozitivní nebo diverzifikační selekcí (Murrell et al. 2012).



**FEL (Fixed Effects Likelihood)** – tato metoda testuje, zda jsou jednotlivé kodony pod vlivem pervasivní pozitivní nebo diversifikační selekce (Kosakovsky Pond a Frost 2005).

**aBSREL (adaptiveBranch-Site Random Effects Likelihood)** – model testuje, které jednotlivé větve fylogenetického stromu jsou pod pozitivní nebo purifikační selekcí (Smith et al. 2015).

### **3.7.2.2 Analýza na úrovni aminokyselin – TreeSAAP**

Na rozdíl od metod selekce pomocí vnitro-a mezidruhové selekce zaměřených na projevy selekce jako takové, metody implementované do programu TreeSAAP poměřují vliv selekce na 31 strukturálních a biochemických vlastnostech aminokyselin na základě genealogie kódujících sekvencí daného lokusu. Přitom vyhodnocuje významnost aminokyselinových změn vedoucích na určitých nodech k zásadním změnám v uvedených fyzikálně-chemických vlastnostech odpovídajícího proteinu.

Pro oba kandidátní geny bylo dle návodu autorů provedeno dvoustupňové testování. V prvním je vyhodnocen vliv selekce na všech 31 aminokyselinových sekvencích. Ty, které jsou nejvýznamněji ovlivněny, jsou pak podrobeny druhému, detailnějšímu testu, který umožní nejen odhadnout míru selekce na jednotlivých kodonech (způsobující změnu ve struktuře proteinu), ale i „namapovat“ na genealogii, kde k těmto změnám došlo.

### **3.7.2.3 Predikce sekundární struktury – I-TASSER**

Pro úplnou analýzu proteinů byla predikována sekundární struktura programem I-TASSER. Tento program předpoví trojrozměrnou strukturu proteinu na základě její aminokyselinové sekvence. Tato struktura je pak porovnávána s databází proteinů s již známou trojrozměrnou strukturou a na základě podobnosti odvodí funkci domén, vazebná místa pro ligandy, či aktivní místo enzymu (Roy et al. 2010).

## 4. Výsledky

### 4.1 PCR a sekvenování astacinu a ITS

Po optimalizaci PCR reakce se podařilo získat sekvence pro astacin a ITS ze všech laboratorních linií, které byly dále použity pro biostatistickou analýzu vnitrodruhové genetické variability.

Sekvence genu pro astacin byla sestavena ze čtyř vzájemně se přesahujících sekvencí v programu MEGA X (Kumar et al. 2018). Tyto čtyři sekvence byly namnoženy z cDNA. Výsledná sekvence tedy obsahovala pouze kódující oblasti. Sekvence ITS byla získána jako jeden amplikon.

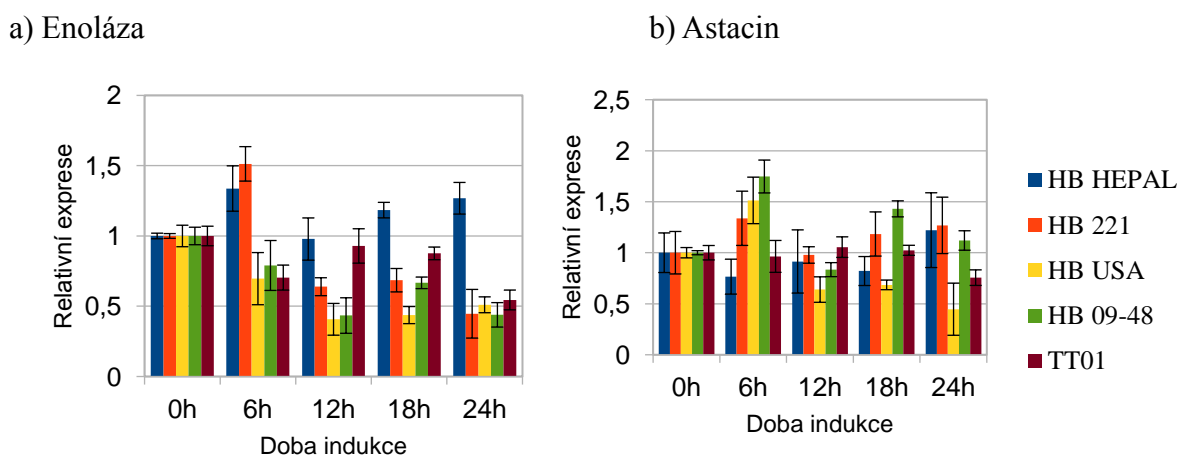
### 4.2 Analýza genové exprese

V první fázi bylo potřeba optimalizovat proces indukce, tedy zajistit vhodné prostředí po celou dobu. Není totiž zcela jasné, zda potřebují hlístice k vývoji z infekční larvy v dospělce pouze krátkodobé vystavení hemolymfě (např. pouze 2 hodiny) nebo delší časový interval. Během této doby nesmí dojít k zatuhnutí (koagulaci) hemolymfy, protože ze sražené hemolymfy byl problém indukované hlístice oddělit. Byly testovány 3 antikoagulační přístupy. V prvním byla narušena srážecí kaskáda, a to inhibicí účinku fenoloxidázy fenylothiomočovinou (PTU) podle práce Vadnal et al. (2017). Experimenty udržely hemolymfu sraženou po maximální dobu 3 hodin, a protože PTU je toxická látka, tak jsem nezvyšoval finální koncentraci. Druhý postup s kyselinou askorbovou sice bránil srážení se stejným účinkem jako PTU, ale při vyšších koncentracích (25mM) docházelo ke zrosolovatění hemolymfy. Jedinci z tohoto roztoku zkontrolovaní pod mikroskopem vykazovali známky pokračujícího vývoje jako svlékání kutikuly, ale nebyly zaznamenány žádné bakterie *Photorhabdus luminescens*. Jako třetí a dále používaný přístup jsem použil antikoagulační roztok z práce Soderhall a Smith (1983). Při tomto přístupu byla hemolymfa nesražená po nejdelší interval (24 hodin) a hlístice vykazovaly známky pokračujícího vývoje v dospělce jako svlékání kutikuly a regurgitace symbiotických bakterií. Hemolymfa by mohla zanést cizorodou RNA do vzorku a tím znehodnotit následující reakce. Proto byly hlístice po indukci mnohonásobně promyty Ringerovým roztokem.

Před analýzou exprese indukovaných hlístic byla stanovena efektivita Real-Time PCR pro jednotlivé primery metodou standardní křivky. Pro všechny použité primery se efektivita pohybovala v rozmezí 95%-104%.

Pro osvětlení míry exprese genů *enol-1* a *astacinu* po proniknutí do hostitele byla provedena indukce infekčních stádií po dobu 6, 12, 18 a 24 hodin a z izolované RNA byla stanovena míra exprese pomocí Real-Time PCR. Výsledné grafy jsou uvedeny na obrázku 4.

Expresse genu *enol-1* jednotlivých linií (Obr. 4a) není jednotná. Ve srovnání se stádiem infekční larvy se exprese zvyšuje s časem pouze u populace HB HEPAL. U HB 221 vrcholí exprese po 6 hodinách, ale dále klesá pod původní úroveň exprese v infekčním stádiu. Zbylé tři populace vykazují kolísavou, ale nižší míru exprese s postupujícím časem ve srovnání s původní expresí v infekčním stádiu. Transkripční profil pro gen *astacinu* je o něco odlišný (Obr. 4b). Podobný trend exprese je pouze u linií HB 09-48 a HB221. Nejvíce se vymyká populace HB USA, jejíž exprese genu po vyvrcholení po 6 hodinách v dalších časových bodech značně klesá. Rozdíly v expresi mezi časovými úseky u populace HB HEPAL a TT01 jsou velmi malé, až na bod 24h, kdy Expresse u TT01 klesá, zatímco u HB HEPAL se naopak zvyšuje.



**Obr. 4: Míry exprese genů *enol-1* a *astacinu*:** a) transkripční profil genu *enol-1* u pěti linií *H. bacteriophora*, b) transkripční profil genu *astacinu* u pěti linií *H. bacteriophora*.

### 4.3 RNA interference

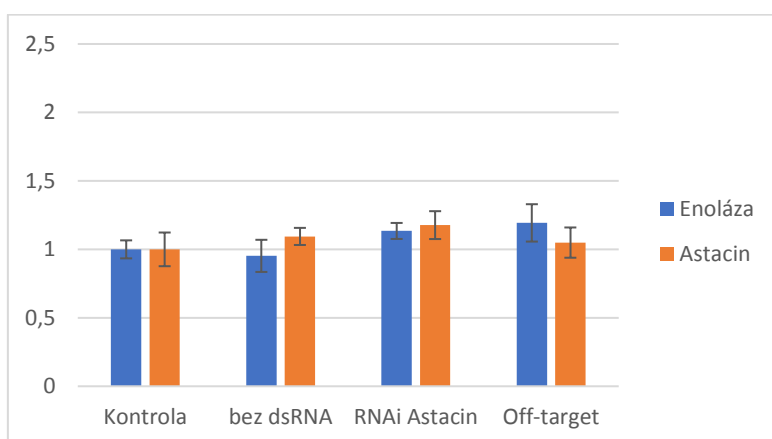
Optimalizačními testy jsem zvolil jako nejvhodnější médium pro RNA interferenci Ringerův roztok o 1000 invazních larvách. Při této konfiguraci dosahovala úmrtnost po 48 hodinách pod 5%.

„Knock-down“ kandidátních genů byl proveden na populacích HB HEPAL (nejméně virulentní), HB 09-48 (nejvíce virulentní) a TT01 (srovnávací standard). Ověření umlčení genu bylo provedeno pomocí Real-Time PCR. Expresse byla změřena i pro gen, který nebyl v hlísticích umlčován, aby se zjistilo, jestli nedochází k umlčování genů mimo zacílenou sekvenci neboli tzv. „off-target“ efektu. Zda je změna exprese pouhým dílem náhody, nebo důsledkem procedury bylo ověřováno nepárovým t-testem. Výsledné hodnoty t-testu a hladiny signifikance jsou zaznamenány v tabulce 3.

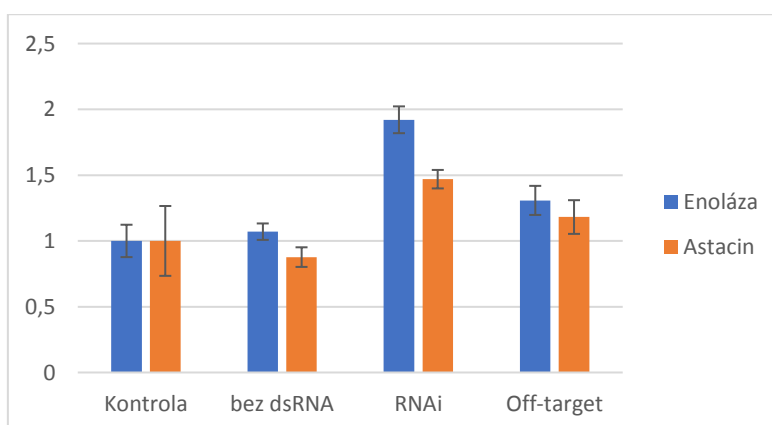
**Tab. 3: Výsledky t-testu a hladiny signifikance pro RNAi.**

Linie	Umlčovaný gen	t hodnota	p-hodnota
HB 09-48	<i>Enol-1</i>	1,47951	0,1895
HB 09-48	<i>Astacin</i>	-0,05904	0,9546
HB HEPAL	<i>Enol-1</i>	1,381217	0,2097
HB HEPAL	<i>Astacin</i>	-1,29446	0,2366
TT01	<i>Enol-1</i>	1,5519	0,1956
TT01	<i>Astacin</i>	-0,11272	0,9157

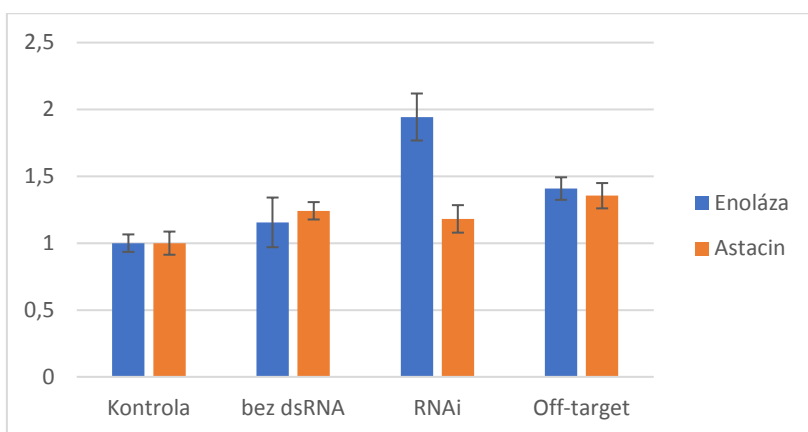
Grafy relativní exprese po RNA interferenci u jednotlivých linií jsou na obrázku 5 (HB 09-48), obrázku 6 (HB HEPAL) a obrázku 7 (TT01). U linie HB 09-48 exprese obou genů po proceduře zůstala s malými odchylkami nezměněna. U linií TT01 a HB HEPAL nedošlo k signifikantnímu potlačení exprese, naopak došlo k nesignifikantnímu zvýšení exprese. Metoda podle těchto výsledků nefungovala.



**Obr. 5: Výsledek RNA interference u populace HB 09-48.** Kontrola – srovnávací vzorek, chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru.



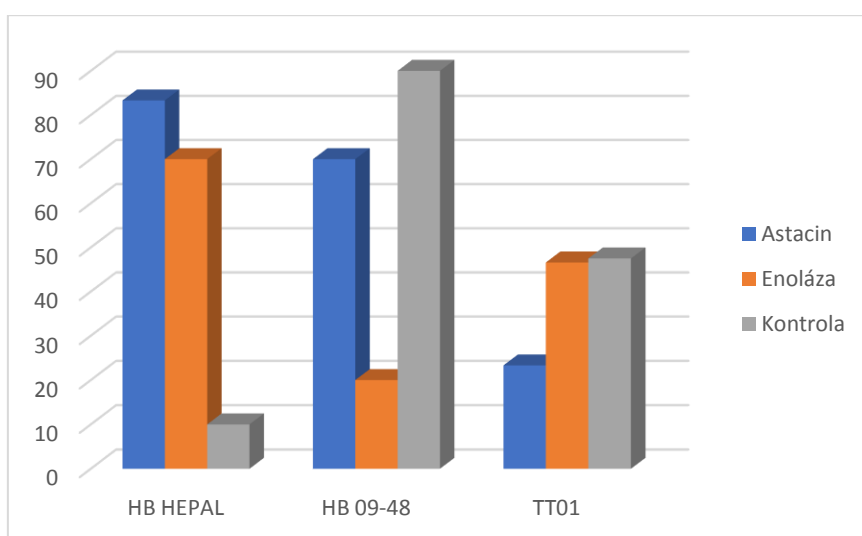
**Obr. 6: Výsledek RNA interference pro linii HB HEPAL.** Kontrola – srovnávací vzorek, chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru.



**Obr. 7: Výsledek RNA interference pro linii TT01.** Kontrola – srovnávací vzorek, chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru.

#### 4.4 Testy virulence

Testy virulence jsem použil k otestování účinků procesu RNA interference na zkoumané linii. Procentuální úmrtnost housenek podle použité linie a ošetření je zaznamenána graficky na obrázku 8. Nejdrastičtější změna proběhla hlavně u linie HB HEPAL, která je obvyklejně nejméně virulentní, zatímco po RNAi astacinu a enolázy vykazovaly tyto hlístice virulenci téměř srovnatelnou s linií HB 09-48 za normálních podmínek. Virulence linie HB 09-48 klesla výrazně po RNAi enolázy, zatímco linie TT01 byla oproti normálním podmínkám lehce virulentnější. Výsledky exprese po RNAi nenaznačují, že by došlo k potlačení exprese. Roli ve změnách virulence možná hrál použitý serotonin.



**Obr. 8: Procentuální úmrtnost housenek *Galleria melonella* v testech virulence.**

Výsledky testů jsem otestoval dvoucestnou Anovou s opakováním. Výsledná hodnota statistiky pro porovnávání linií je  $F = 9,559$  ( $p = 0,0015$ ), neboli byl zaznamenán rozdíl ve virulencích jednotlivých linií. Srovnání virulencí linií po RNAi a kontrolních skupin bez ošetření vyšlo opět signifikantní s  $F = 3,647$  ( $p = 0,047$ ).

Na porovnání rozdílů mezi jednotlivými liniemi posloužil Tukey-Kramerův test. Výsledky tohoto testu jsou znázorněny v tabulce 5. Při srovnání byl tímto testem zjištěn rozdíl pouze na úrovni linií.

**Tab. 5: Výsledky Tukey-Kramerova testu pro testované linie.** (\*) signifikantní rozdíl, (-) nesignifikantní rozdíl.

	HB 09-48	HB HEPAL	TT01
HB 09-48			
HB HEPAL	-		
TT01	*	*	

Tukey-Kramerův test srovnávající kombinace kontrolních vzorků se vzorky, které prošly RNAi neprokázal signifikantní odchylky.

#### 4.5 Evoluční statistická analýza

Podstatou evoluční statistické analýzy je na základě genetické variability odhalit, jakým způsobem probíhala evoluce na vybraném úseku genomu, tedy zda byla ovlivněna selekcí (případně jakou), či nikoliv.

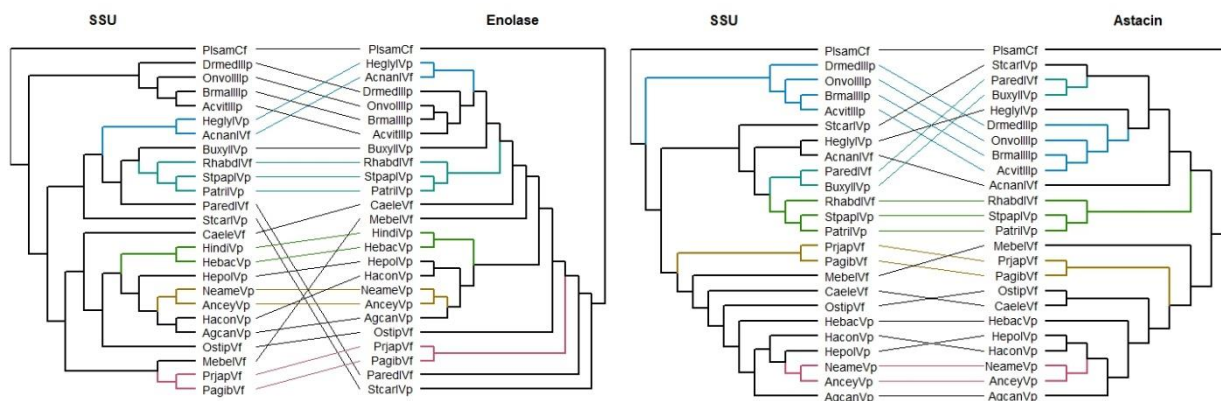
Ke konstrukci fylogenetických stromů bylo nutné nejdříve vytvořit soubory obsahující „alignment“, tedy podle čtecího rámce seřazené DNA sekvence ortologních genů, které pak byly použity i při další analýze. V databázích byly vyhledány sekvence pro geny pro enolázu, astacin a malou ribozomální podjednotku (SSU). Sekvence pocházely z druhů napříč klady V, IV, III. K těm byla přidána ještě jedna sekvence druhu *Plectus sambesii*, která sloužila jako „outgroup“. U kladů II a I se nepodařilo získat ortologické sekvence v dostatečné délce, a proto jsem je nemohl do analýz zahrnout. Pro enolázu bylo použito dohromady 25 druhů, zatímco pro astacin pouze 24 z důvodu absence anotovaného genomu pro *Heterorhabditis indica* a nedostupnosti této laboratorní linie. Druhy, ze kterých byly získány sekvence, jsou vypsány společně s databázemi a přístupovými kódy v Příloze 6.

Základní charakteristiky sekvencí a zvolené distanční modely na základě skóre BIC (Bayesian Information Criterion) jsou vypsány v tabulce 7. Pro SSU byly sestaveny dva dendrogramy, neboť některé analýzy pracující s topologií dendrogramů potřebují identický počet sekvencí k porovnávání. Fylogenetické stromy jednotlivých genů jsou v Příloze 7-10.

**Tab. 7. Charakteristika sekvencí a zvolené modely pro konstrukci fylogenetických stromů.** KP – počet konstantních pozic, S – počet singletonů, PI – počet parsimoniálně informativních pozic. Model byl vybrán podle skóre BIC.

Gen	Délka v bp	KP	S	PI	Model
EnoIDH	1362	621	81	660	SYM+I+G4
SSUDH	1892	856	288	748	GTR+F+R4
AZiMD	1362	483	105	786	SYM+R4
SSUD	1881	846	285	750	GTR+F+I+G4

Pro porovnání souběžnosti evoluce druhů a kandidátních genů jsem použil ML fylogramy bez uvedených hodnoty bootstrapu. Hodnoty koeficientu souběžnosti byly entg = 0.387 pro Astacin, entg = 0.477 pro enolázu; obě hodnoty jsou zhruba v polovině škály, takže souběžnost není ideální, i když u enolázy je zjevně horší. Hodnoty korelačního kofenetického koeficientu ccf = 0.715 pro astacin a ccf= 0.380 pro enolázu obdobně nasvědčují, že zatímco evoluce astacinu se od druhové odchyluje méně, u enolázy je rozpor daleko větší. Tyto vlastnosti jsou zachyceny v optimalizovaném tanglegramu (Obrázek 9). V tomto diagramu je patrné, jak jsou jednotlivé klastry přesunuté – pokud by evoluce druhů a kandidátních genů byly souběžné, pak by topologie byly naprosto shodné. U obou genů byly druhy z kladu V a III shloučeny k sobě. U astacinu došlo k vytvoření dvou skupin, kdy jedna sestávala výhradně z kladu V a druhá z kombinace kladu III a IV. V případě enolázy došlo k rozdrobení kladu IV, kdy některé druhy zaujaly bazálnější pozici, zatímco klad III byl v odvozenějším postavení než skupina s kladem V. Už z tohoto výsledku je patrné, že vývoj genů je různorodý, a to zejména co se týče kladu IV.



**Obr. 9** Optimalizované tanglegramy pro enolázu a astacin. SSU – druhový fylogram. Barvy označují kofenetické klastry (spojené asociačními čarami téže barvy). Použité zkratky viz Tabulka druhů (Příloha 6); římské číslice – číslo kladu, F – volně žijící druh, P – parazitický druh. AcnanIVf- *A. nanus*, AcvitIIIp - *A. viteae*, AgcanVp - *A. cantonensis*, AnceyVp - *A. ceylanicum*, BrmalIIIp - *B. malayi*, BuxylIVp - *B. xylophilus*, CaeleVf - *C. elegans*, DrmedIIIp - *D. medinensis*, HaconVp - *H. contortus*, HebacVp - *H. bacteriophora*, HindiVp - *H. indica*, HeglyIVp - *H. glycines*, HepolVp - *H. polygyrus*, MebelIVf - *M. belari*, NeameVp - *N. americanus*, OnvollIIIp - *O. volvulus*, OstipVf - *O. tipulae*, PagibVf - *P. giblindavis*, ParedIVf - *P. redivivus*, PatriIVp - *P. trichosuri*, PlsamCf - *P. sambesii*, PrjapVf - *P. japonicus*, RhabdIVf - *Rhabditophanes spp.*, StcarIVp - *S. carpocapsae*, StpapIVp - *S. papillosus*.

#### 4.5.1 Vnitrodruhová variabilita, divergence a testy neutrality

Pro analýzy byly použity sekvence *enol-1* z bakalářské práce M. Flegrové (Flegrová 2015) a originální sekvence ITS a *astacinu* z týchž laboratorních linií. Jako outgroup byla použita sekvence ITS z *H. indica* (NCBI GenBank). Vzhledem k tomu, že se nepodařilo najít sekvenci *Astacinu* ani v databázích, ani získat tuto linii pro sekvenování, byly provedeny jen analýzy bez outgroupu.

Charakteristiky nukleotidové variability všech tří genů jsou uvedeny v tabulce 8. Je zřejmé, že kódující oblast *enol-1* je výjimečně monomorfní, zatímco variabilita *astacinu* je ve srovnání s ITS mírně zvýšená u všech parametrů.



**Tab. 8: Charakteristiky vnitrodruhové variability ITS, *enol-1* a *astacinu*.**  $P$  – počet polymorfismů,  $\pi$  – nukleotidová diverzita,  $\Theta$  – nukleotidový polymorfismus,  $h$  – počet haplotypů,  $K$  – nukleotidová divergence.

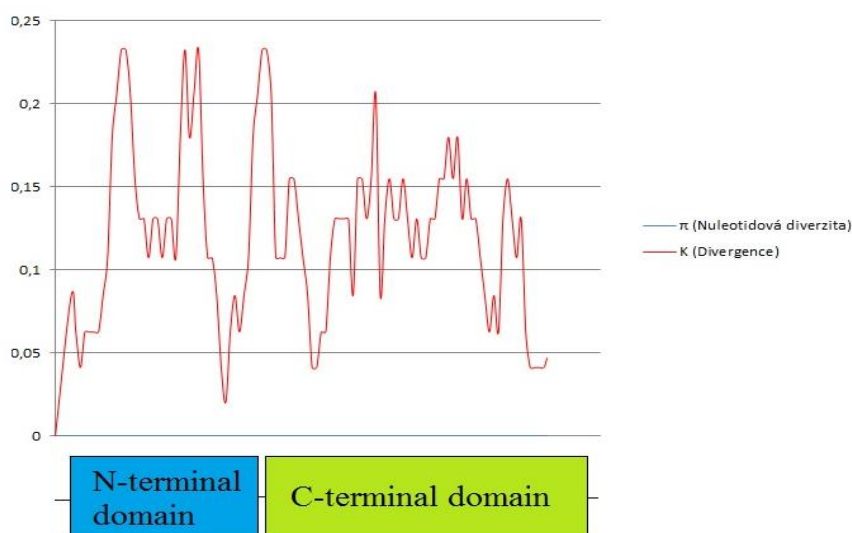
	Délka lokusu (bp)	$P$	$\pi$	$\Theta$	$h$	$K$
ITS	1031	9	0.00297	0.00334	6	0.1321
<i>enol-1</i>	1104	0	0	0	1	0.1105
<i>Astacin</i>	1758	18	0.00302	0.00388	8	x

U genu pro *astacin* bylo celkem nalezeno 18 polymorfních míst, z toho 14 bylo lokalizováno na konci sekvence mimo jakoukoliv doménu, 3 byly umístěny mezi *astacinovou* katalytickou doménou a doménou CUB a 1 bylo umístěno uvnitř *astacinové* domény. Celkem došlo k 15 změnám aminokyselin napříč všemi populacemi. Jediná aminokyselinová substituce uvnitř domény byla na kodonu 77 v *astacinové* katalytické doméně. Zaměněné aminokyseliny a jejich přesné pozice jsou vypsány v tabulce 9.

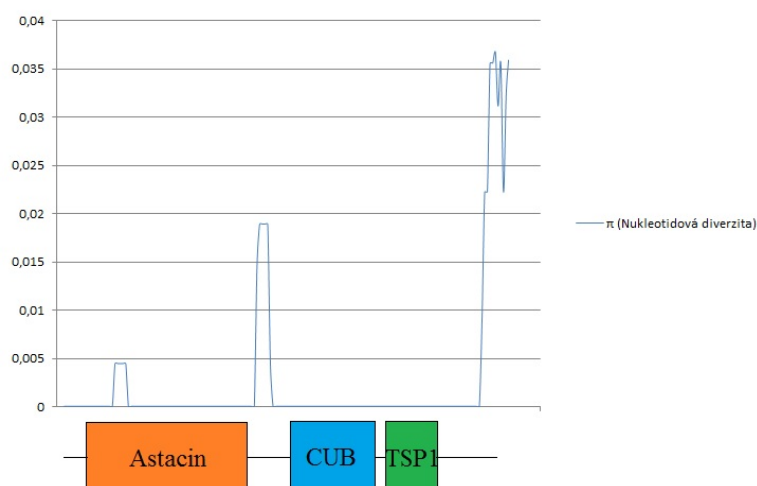
**Tab. 9: Substitované aminokyseliny v rámci testovaných linií.**

Kodon	MG618	HB 09-48	HB 09-43	HB USA	HB HEPAL	NIG
77			Gly->Lys			
537	Cys-> Ala					
538	Ala->Leu					
546	Val->Tyr					
553	Asn->Asp	Asn->Asp		Asn->Asp		
556					Cys-> Arg	Cys-> Arg
558				Gly-> Arg		
567	Asn->Asp	Asn->Asp		Asn-> Asp		
569			Phe-> Ser			Phe-> Ser

Metodou „klouzavého okénka“ (window size = 20, step = 1) jsem sestavil grafy distribuce nukleotidové diverzity  $\pi$  a divergence  $K$  pro gen *enolázy* (Obrázek 7) a gen pro *astacin* (Obrázek 8). U *astacinu* je nukleotidová diverzita převážně nahromaděna mimo jednotlivé domény, s výjimkou krátkého úseku v *astacinové* katalytické doméně. U *enolázy* bylo možné vyhodnotit jen rozložení variability mezidruhové vztahované na outgroup *H. indica*. V tomto případě je variabilita rozprostřena víceméně rovnoměrně po celé délce kódující sekvence.



**Obr. 7:** Rozložení nukleotidové diverzity a divergence napříč genem pro *enolázu* u *Heterorhabditis bacteriophora*.



**Obr. 8:** Rozložení nukleotidové diverzity napříč genem pro *astacin* u *Heterorhabditis bacteriophora*.

Oba kandidátní geny byly podrobeny několika testům neutrality, z nichž každý je založen na jiném modelu, a proto reagují na různé typy selekce s různou citlivostí (Tabulka 10). U *astacinu* jsou hodnoty srovnatelné s referenčním genem ITS, což znamená, že vliv selekce zde není prokazatelný. Jako jediný poukazuje na přítomnost selekce test HKA u genu pro enolázu, který svědčí o možné nedávné pozitivní selekci typu „sweep“, kdy je nejvýhodnější haplotyp rychle rozšířen a zafixován a převládne preferovaný haplotyp. Výsledky všech provedených testů neutrality jsou v tabulce 10.

**Tab. 10: Testy neutrality pro *enol-1*, *astacin* a ITS.** Hd – haplotypová diverzita, ns – nesignifikantní výsledek, x -nemožný výpočet.

	Hd	Fu a Li D	Tajimovo D	HKA
ITS	0.917	-1.01869 ns	-0.92984 ns	x
enol-1	0	x	x	0.0316*
Astacin	0.972	-1.15884 ns	-1.07263 ns	x

#### 4.5.2 Detekce selekce pomocí mezidruhové genetické variability

Všechny testy byly pro oba geny prováděny na celých fylogenetických stromech jednotlivých kandidátních genů (genealogiích) vytvořených ve výše uvedeném programu IQtree metodou Maximum Likelihood (ML).

##### 4.5.2.1 Selekční analýza pomocí fylogenetických stromů - Datamonkey

###### a) BUSTED

Pro oba geny vyšel výsledek signifikantní (LRT,  $p\text{-value} \leq 0,05$ ). Z toho se lze usuzovat, že alespoň jeden kodon na jedné větvi stromu byl ovlivněn pozitivní selekcí.

###### b) MEME a FEL

U obou genů byla nalezena epizodická pozitivní nebo diverzifikační selekce na neznámých větvích. Naproti tomu se nepotvrdila pozitivní selekce pervazivní; tímto způsobem je však ovlivněna většina kódujících sekvencí negativně. Stručné shrnutí je obsaženo v tabulce 11, podrobnější data jsou pak v Příloze 11–18.

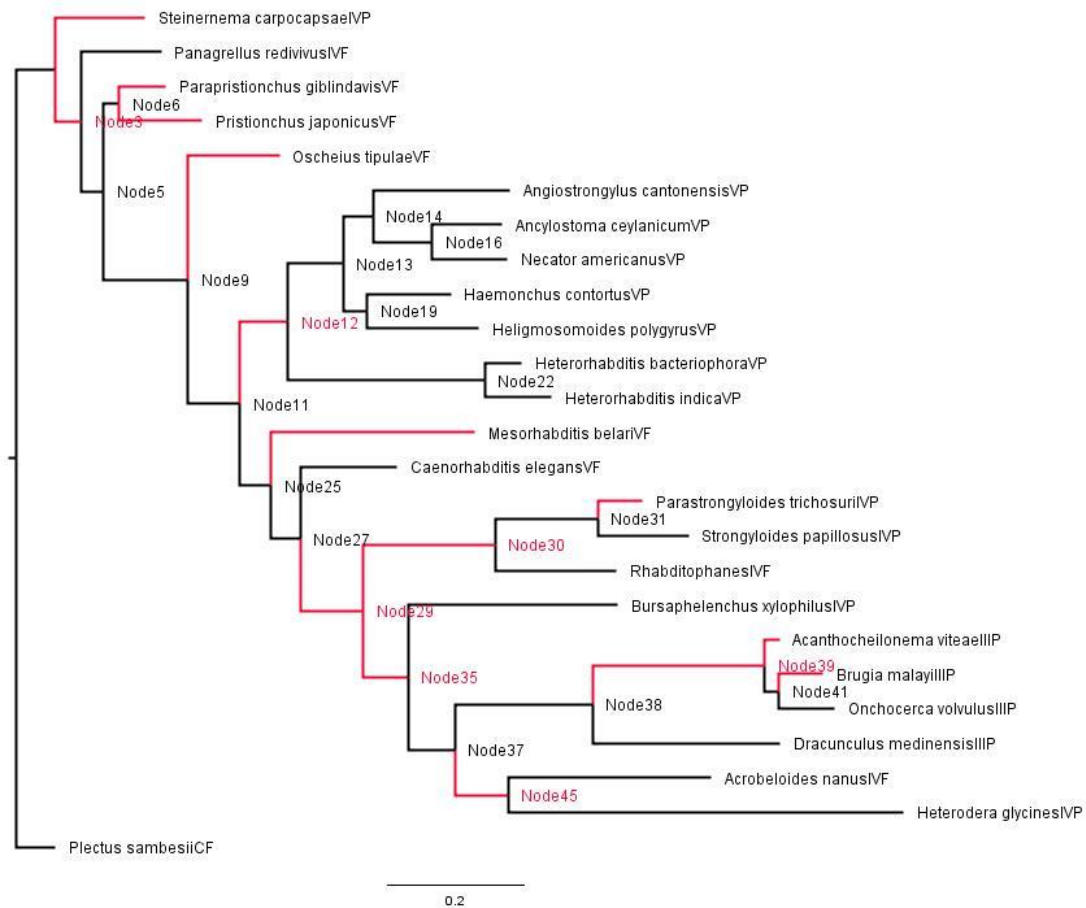
**Tab. 11: Shrnutí analýz MEME a FEL pro genealogie genů pro astacin a enolázu. Čísla uvádějí počet selektovaných kodonů na třech úrovních signifikance ( $p < 0.1$  /  $p < 0.05$  /  $p < 0.01$ ).**

<b>Gen</b>	<b>MEME– episodická pozitivní/diverzifikační</b>	<b>FEL -pervazivní negativní/purifikační</b>
Enoláza	41/33/19	404/390/366
Astacin	18/13/5	420/414/383

c) aBSREL

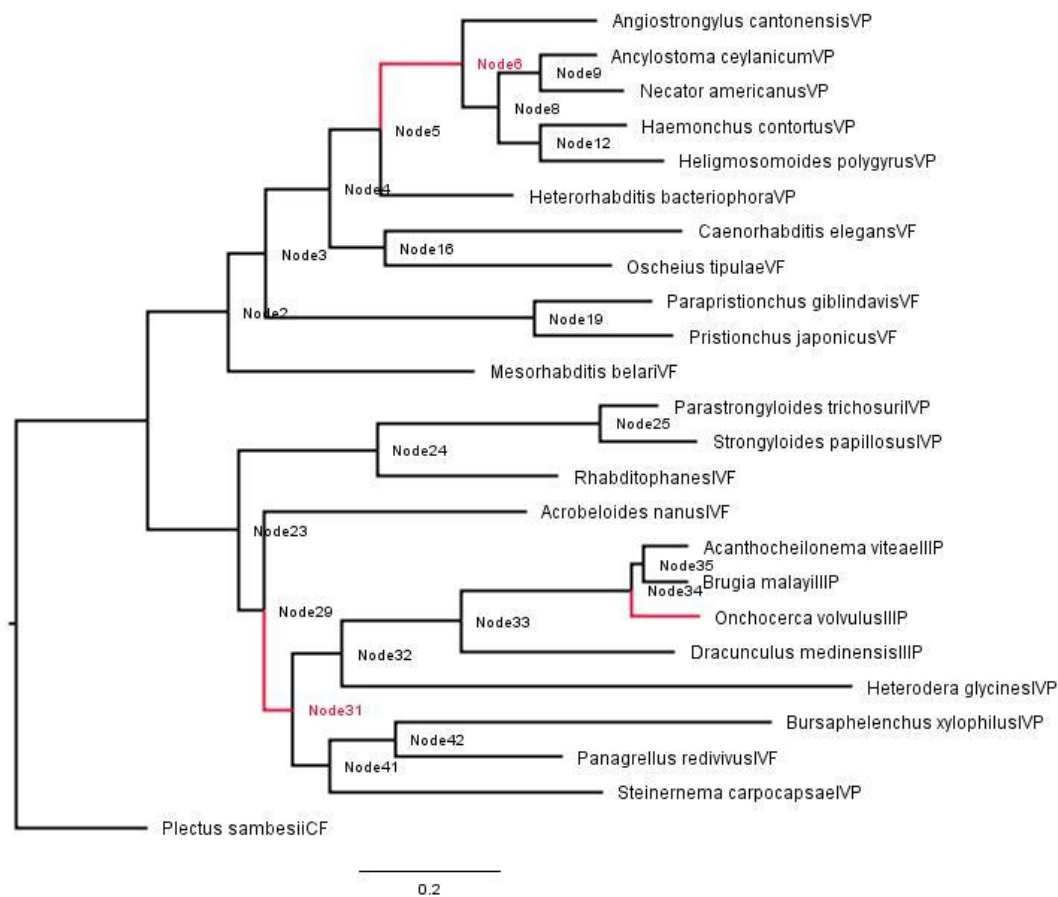
Při explorativním použití této metody byl nalezen vliv epizodické pozitivní selekce u obou genealogií. Signifikance byla vyhodnocena po korekci pro mnohonásobné testování pomocí LRT (Likelihood Ratio Test) s hraniční hladinou signifikance  $p \leq 0,05$ .

Signifikantní výsledek pro pozitivní epizodickou selekci u genu *enol-1* vyšel u 15 ze 47 větví. Na těchto větvích je  $\omega > 1$  rozloženo na 1%-11% kodonech na větví (detailní tabulka viz Příloha 19). Na dendrogramu v obrázku 9 vidíme zvýrazněné větve a nody po pozitivní selekci. Epizodní selekce zjevně neovlivnila některý klad výrazně, ani nepůsobila jen na parazitické či jen na volně žijící druhy.



**Obr. 9: Výsledky testů aBSREL pro enolázu.** Barevné označení větví nebo nodů znamená detekovanou epizodní pozitivní selekci, zakořeněno *Plectus sambesii*.

U genu *astacinu* vyšel test signifikantní pro 3 větve ze 45. Rozložení  $\omega > 1$  napříč kodony na signifikantních větvích dosahovalo 2% - 10% větví (detaily viz Příloha 20) Stejně jako v předchozím případě jsou zvýrazněné větve a nody po pozitivní selekci na dendrogramu (Obrázek 10).



**Obr. 10: Výsledky testů aBSREL pro *astacin*.** Barevné označení větví nebo nodů znamená detekovanou epizodní pozitivní selekci, zakořeněno *Plectus sambesii*.

#### 4.5.2.2 Analýza na úrovni aminokyselin – TreeSAAP

V prvním testu, ve kterém bylo vyšetřeno všech 31 možných fyzikálně-chemických proteinových vlastností, byly jako nejvíce ovlivněné selekcí u *astacinu* 4 ( *$\alpha$ -helical tendencies*, *Equilibrium constant (ionisation of COOH)*, *Hydropathy*, *Power to be at the C-terminal*) a u enolázy 3 vlastnosti (*Equilibrium constant (ionisation of COOH)*, *Hydropathy*, *Turn tendencies*). Tyto vlastnosti pak byly dále prozkoumány ve druhém testování. Celkový seznam vlastností je vypsán s jejich zkratkami v tabulce 12. Vlastnosti  *$\alpha$ -helical tendencies* a *turn tendency* mají vliv na sekundární strukturu proteinu, a to zejména na šroubovicové útvary. Například u struktury  $\alpha$ -helix může docházet k rozvolňování šroubovice, čímž se mohou otevírat aktivní místa pro interakci s dalšími proteiny, nebo se mohou naopak stahovat, čímž se tato místa znepřístupní. *Power to be at C-terminal* je vlastností ovlivňující kvartérní strukturu proteinu a ovlivňuje schopnost interakce s dalšími proteiny, či podjednotkami. *Hydropathy* popisuje změny ve schopnostech proteinů se přilnout

k hydrofobním strukturám jako jsou vnitřní části fosfolipidové membrány. *Equilibrium constant (ionisation of COOH)* popisuje schopnost proteinu reagovat s volnými radikály.

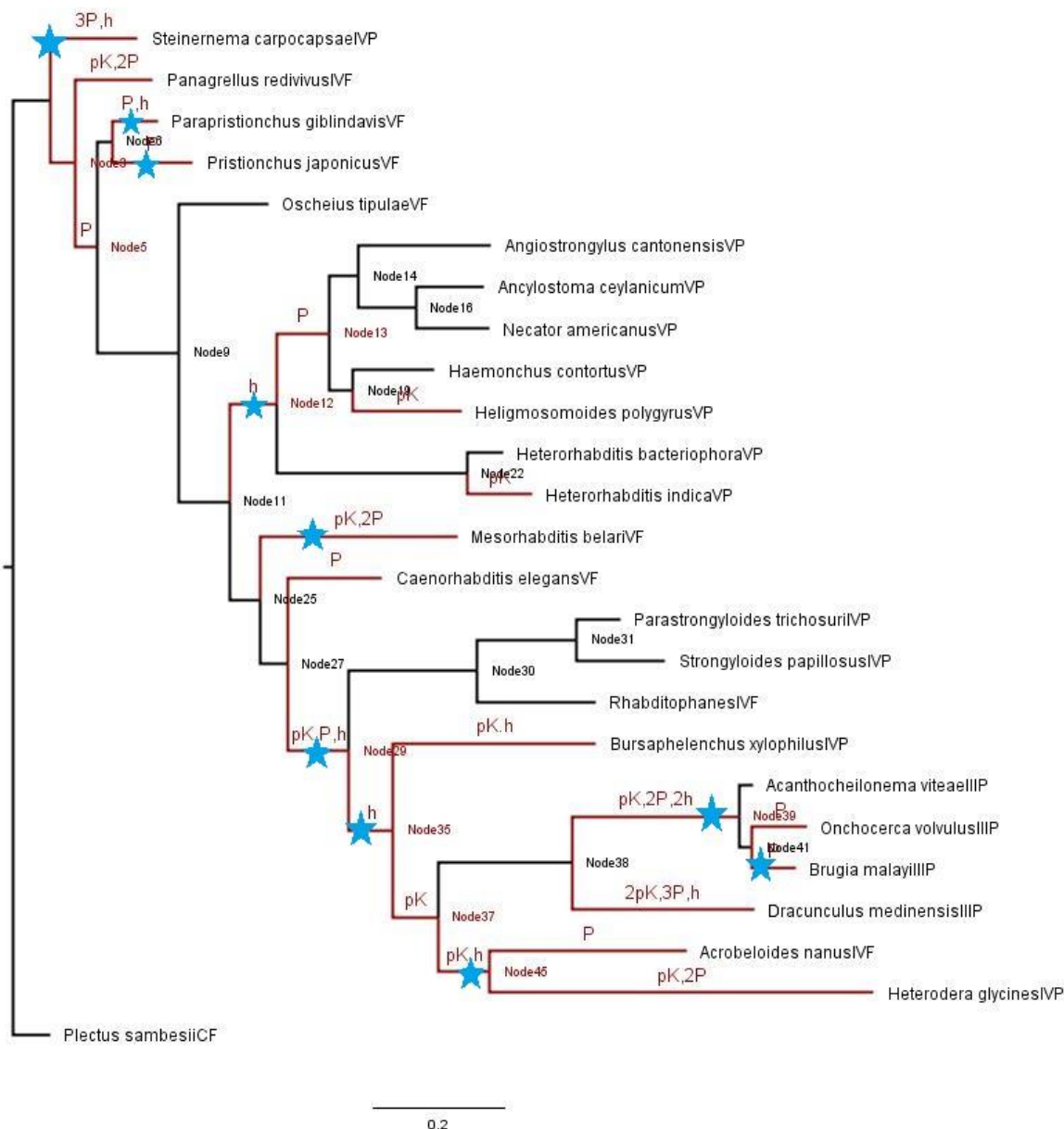
**Tab. 12: Tabulka aminokyselinových vlastností testovaných v programu TreeSAAP.**

Všechny pozitivně selektované vlastnosti jsou tučně zvýrazněny. \* - selektované vlastnosti pro astacin. + - selektované vlastnosti pro enolázu.

Vlastnost	Zkratka	Vlastnost	Zkratka
<b><i><math>\alpha</math>-helical tendencies</i></b> *	<i>Pa</i>	<i>Molecular weight</i>	<i>Mw</i>
<i>Average # surrounding residues</i>	<i>Ns</i>	<i>Normal. consensus hydrophob.</i>	<i>Hnc</i>
<i><math>\beta</math>-structure tendencies</i>	<i>P<math>\beta</math></i>	<i>Partial specific volume</i>	<i>VO</i>
<i>Bulkiness</i>	<i>Bl</i>	<i>Polar requirement</i>	<i>Pr</i>
<i>Buriedness</i>	<i>Br</i>	<i>Polarity</i>	<i>p</i>
<i>Chromatographic index</i>	<i>RF</i>	<b><i>Power to be – C-term., <math>\alpha</math>-helix</i></b> *	<i>ac</i>
<i>Coil tendencies</i>	<i>Pc</i>	<i>Power to be – middle, <math>\alpha</math>-helix</i>	<i>am</i>
<i>Composition</i>	<i>c</i>	<i>Power to be – N-term., <math>\alpha</math>-helix</i>	<i>an</i>
<i>Compressibility</i>	<i>K0</i>	<i>Refractive index</i>	$\mu$
<b><i>Equilibrium Constant – ionization of COOH</i></b> * +	<i>pK</i>	<i>Sh.- &amp; med.-rangen. b. energy</i>	<i>Esm</i>
<i>Helical contact energy</i>	<i>Ca</i>	<i>Solvent accessible reduct. ratio</i>	<i>Ra</i>
<b><i>Hydropathy</i></b> * +	<i>h</i>	<i>Surrounding hydrophobicity</i>	<i>Hp</i>
<i>Isoelectric point</i>	<i>pHi</i>	<i>Thermodyn. transfer hydrophob.</i>	<i>Ht</i>
<i>Long-rangen. b. energy</i>	<i>El</i>	<i>Total n. b. energy</i>	<i>Et</i>
<i>Mean r. m. s. fluctuat. displace.</i>	<i>F</i>	<b><i>Turn tendencies</i></b> +	<i>P</i>
<i>Molecular volume</i>	<i>Mv</i>		

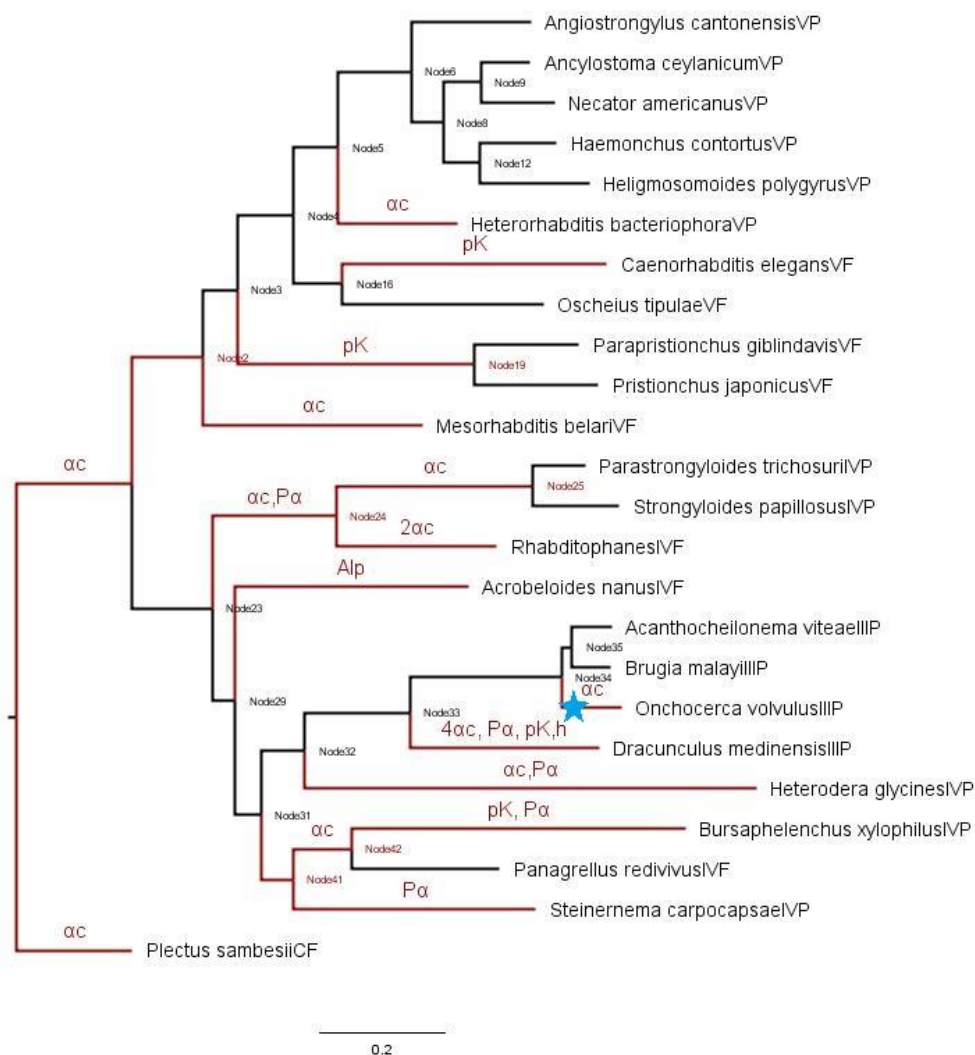
Výsledky testování vytipovaných proteinových vlastností byly porovnány s předešlou metodou MEME. Průnik těchto metod je znázorněn na genealogických stromech pro enolázu (Obrázek 11) a astacin (Obrázek 12). Pozitivně selektované vlastnosti na kodonech společných pro výsledky z testování v TreeSAAP a MEME jsou zvýrazněny na větvích a nodech genealogie genů pro enolázu a astacin. Nad větvemi jsou vypsány přesné vlastnosti, které byly na těchto větvích pod vlivem pozitivní selekce. Vlastnosti jsou značeny podle zkratk v tabulce 12. Počet stejných vlastností na více kodonech na jedné větvi je zaznamenán vždy číslem před zkratkou. Větve, u kterých vyšla pozitivní selekce jak u aBSRELu, tak u TreeSAAPu jsou v Obrázcích 11 a 12 znázorněny hvězdičkou. Přesný výčet

aminokyselinových vlastností s jejich umístěním na kodonu a místě v dendrogramu je pro *enolázu* v Příloze 21 a pro *astacin* v Příloze 22. U *enolázy* byla selekce potvrzena v devíti případech, a to na větvích ve všech kladech, u parazitických i volně žijících druhů. Pro *astacin* došlo k potvrzení jen jedné větve, a to vedoucí k parazitickému druhu *O. volvulus* z kladu III.



**Obr. 11: Pozitivně selektované vlastnosti umístěné na dendrogramu *enolázy*.** *h* – *Hydropathy*, *pK* – *Equilibrium Constant–ionization of COOH*, *P* – *Turn tendencies*, Shoda s aBSREL – modrá hvězda. Číslice za jménem – klad, P – parazit, F – volně žijící, zakořeněno *Plectus sambesii*.





**Obr. 12: Pozitivně selektované vlastnosti umístěné na dendrogramu genu pro astacin.**

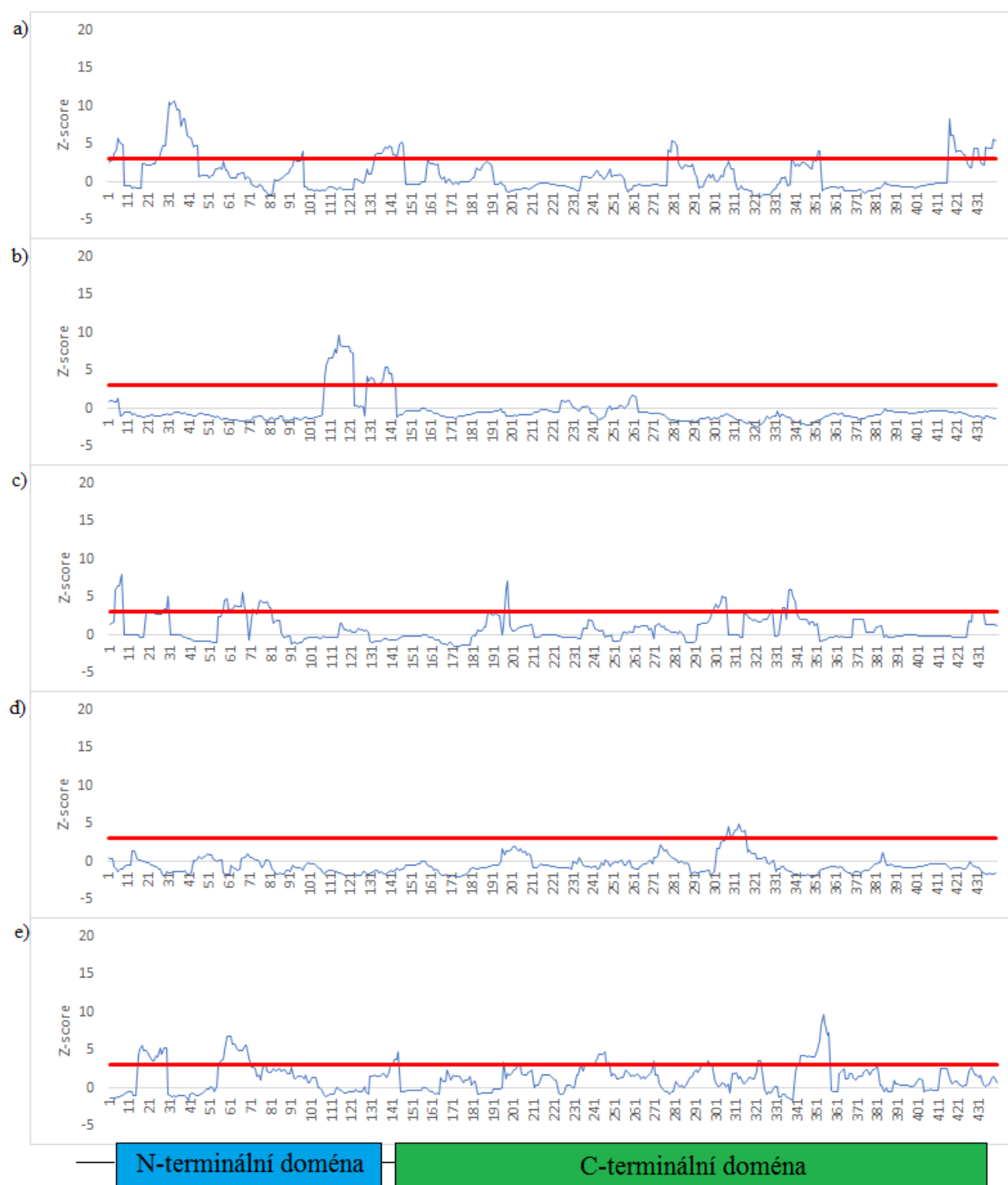
*Pa* –  $\alpha$ -helical tendencies, *h* – Hydrophaty, *pK* – Equilibrium Constant–ionization of COOH, *ac* - Power to be – C-term.,  $\alpha$ -helix, Shoda s aBSREL – modrá hvězda. Číslice za jménem – klad, P – parazit, F – volně žijící, zakořeněno *Plectus sambesii*.

Metodou „klouzavého okénka“ (velikost okénka = 15, krok = 1) bylo znázorněno, které oblasti proteinové sekvence byly pozitivně selektovány pro danou vlastnost. Intenzita pozitivní selekce je vyjádřena kategoriemi 6, 7 a 8, která určuje nejradikálnější selekci.

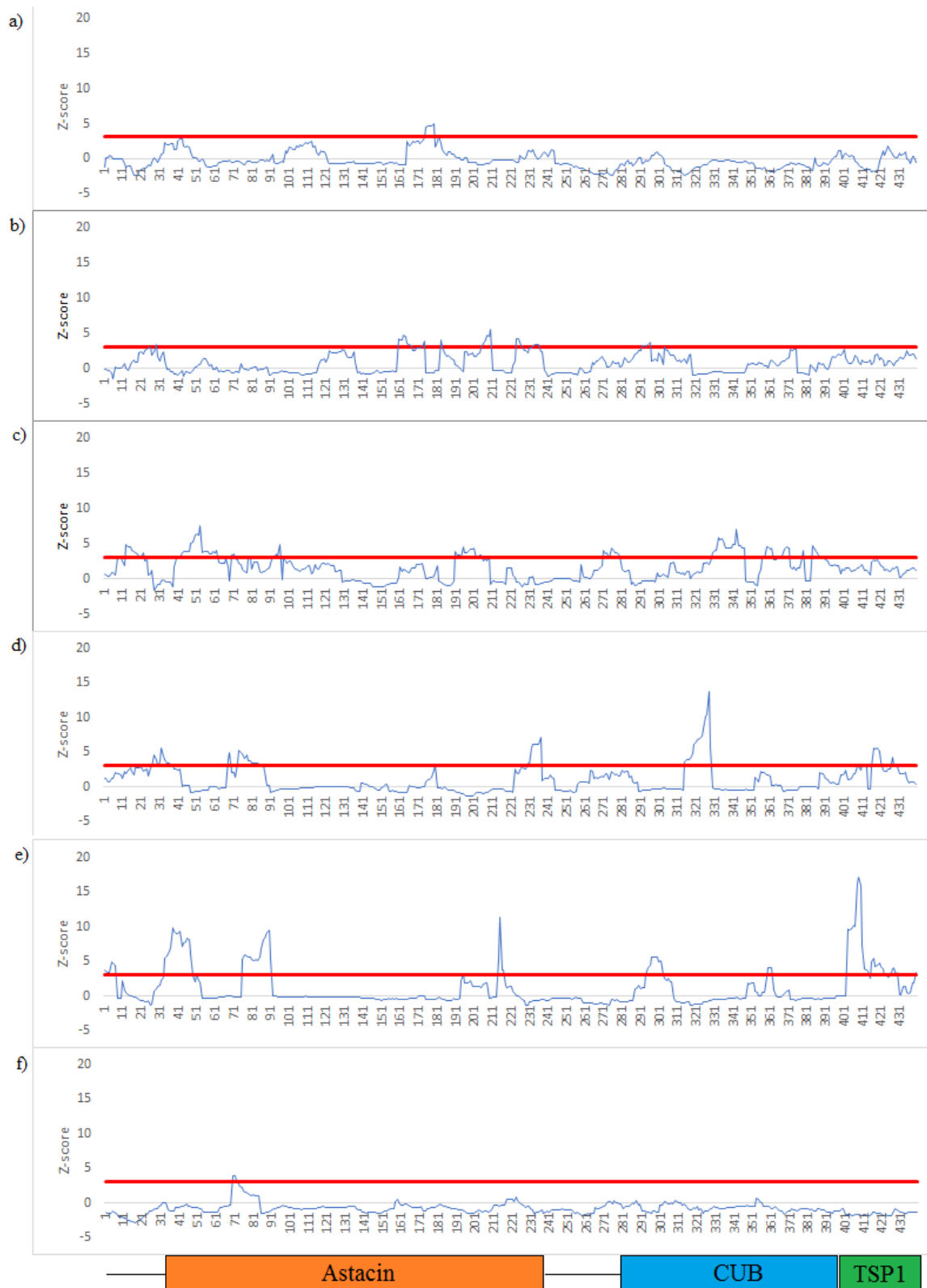
Na obrázku 13 je možno vidět které oblasti jsou pozitivně selektovány pro jednotlivé vlastnosti u enolázy. Všechny vlastnosti jsou rozděleny napříč oběma doménami tohoto enzymu. Ani jedna vlastnost se nevyskytuje výlučně v jedné doméně.

Obrázek 14 zobrazuje oblasti pozitivně selektované pro jednotlivé vlastnosti na proteinové sekvenci astacinu. Všechny vlastnosti jsou zde rozmístěny ve všech třech doménách s výjimkou vlastnosti  $\alpha$ -helical tendencies, které se vyskytují u tohoto proteinu v astacinové katalytické doméně, a to v té části bližší C-terminálnímu konci. Červená linka

znázorňuje hladinu významnosti  $p < 0.01$ , která je rovna hodnotě z-score 3.09. Pod osou x jsou ukázány domény astacinu a enolázy.



**Obr. 13:** Umístění pozitivně selektovaných kodonů pro jednotlivé vlastnosti na proteinové sekvenci enolázy. a) – *Equil. const. (ionisation of COOH)* kat. 8; b) – *Equil. const. (ionisation of COOH)* kat.7; c) – *-Hydropathy* kat. 7; d) – *Turn tendencies* kat. 7; e) *Turn tendencies* kat. 6.

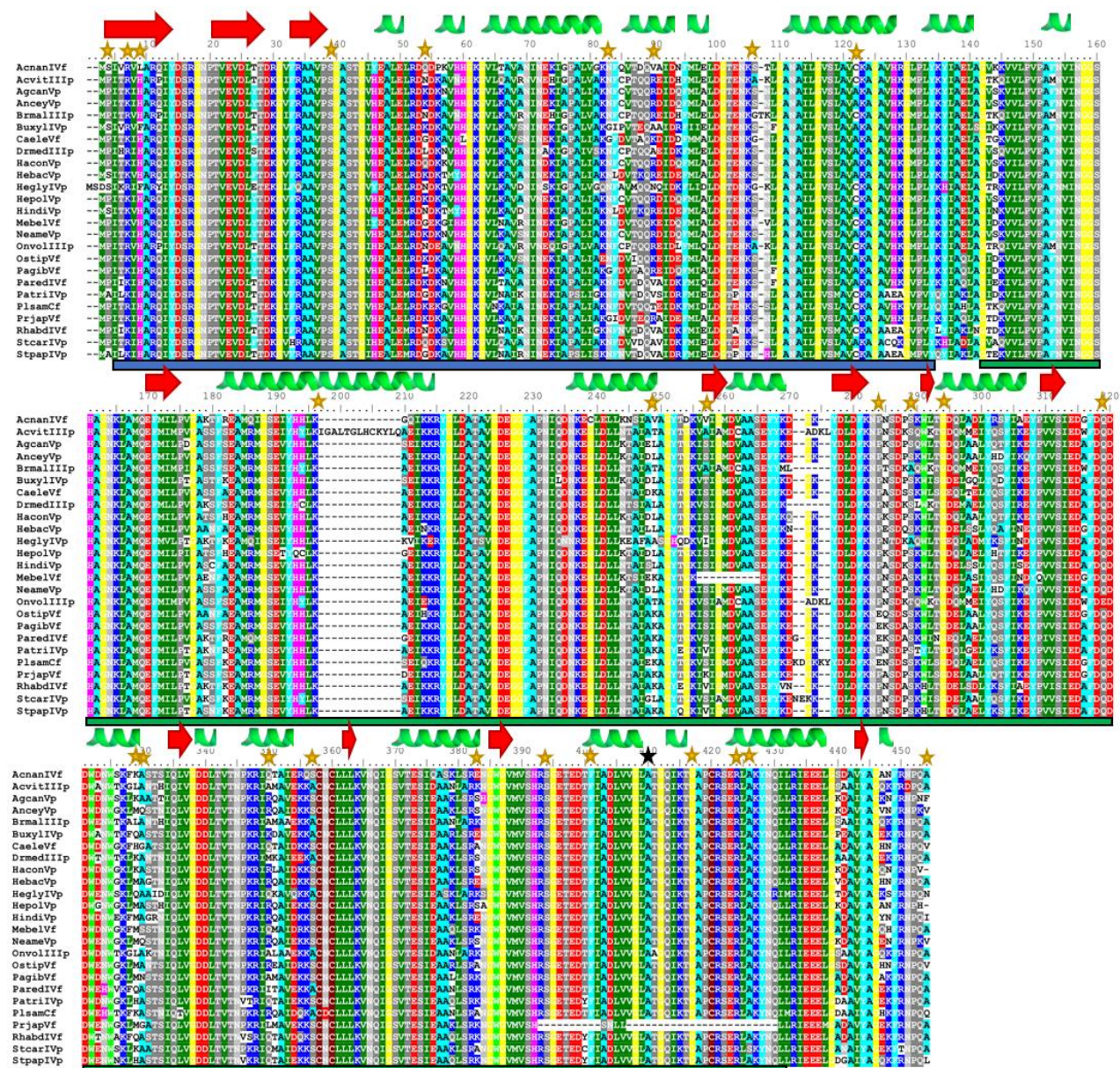


**Obr. 14:** Lokalizace pozitivně selektovaných kodonů pro vlastnosti na proteinové sekvenci astacinu. a)  $-\alpha$ -helical *tend.kat.* 8; b)  $-\alpha$ -helical *tend.kat.* 6; c) – *Equil. cont.* (ionisation of COOH) *kat.* 8; d) – *Power to be at the C-term.* *kat.* 6; e) – *Hydropathy* *kat.* 6; f) – *Hydropathy* *kat.* 7.



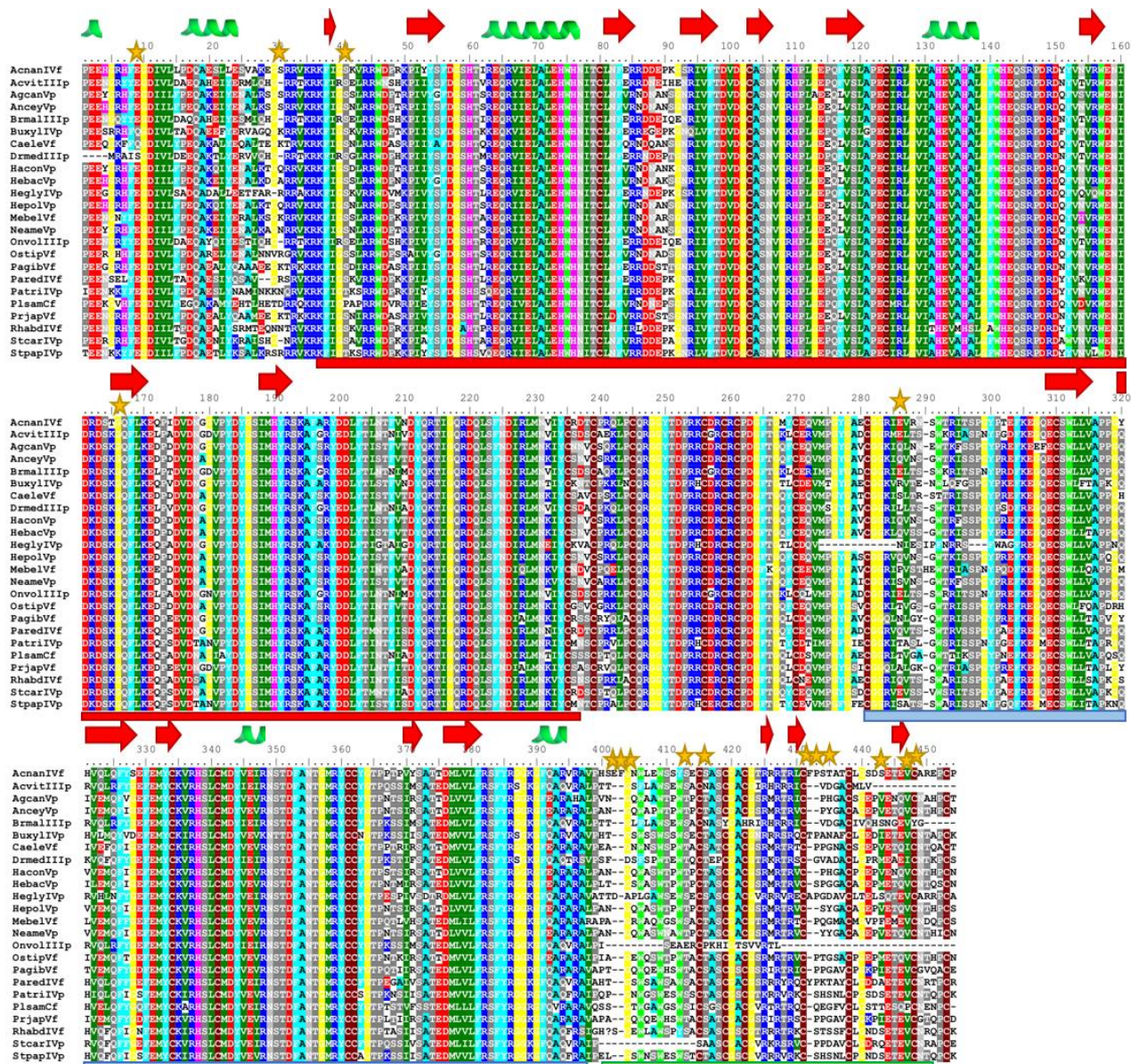
### 4.5.2.3 Predikce sekundární struktury – I-TASSER

Positivně selektované kodony shodné pro obě metody jsem lokalizoval na hypotetickou sekundární strukturu obou kandidátních genů (Enoláza – obrázek 15, Astacin – obrázek 16). U enolázy se většina pozitivně selektovaných kodonů nachází v C-terminální doméně, zatímco u astacinu se valná většina pozitivně selektovaných kodonů nachází v koncové doméně TSP1. Jeden kodon se nachází v doméně CUB. Tyto kodony neleží na místech, jejichž změna by měla za následek změnu ve funkci proteinu, s výjimkou kodonu 410 u enolázy v C-terminální doméně. Toto místo je pravděpodobně zodpovědné za vazbu peptidových a hořčičných ligandů. V obrázku 15 je jeho pozice vyznačena černou hvězdou.



**Obr. 15: Predikovaná sekundární struktura enolázy.** zelená šroubovice –  $\alpha$ -helix, červená šipka –  $\beta$ -vlákno, modrý pás pod „alignmentem“ – N-terminální doména, zelený pás pod „alignmentem“ – C-terminální doména, černá hvězda – pozitivně selektovaná pozice shodná s předešlými testy, žlutá hvězda – pozitivně selektované kodony (MEME).





**Obr. 16:** Předpovězená sekundární struktura kandidátního astacinu. zelená šroubovice –  $\alpha$ -helix, červená šipka –  $\beta$ -vlákno. červený pás pod „alignmentem“ – astacinová katalytická doména, modrý pás pod „alignmentem“ – CUB doména, zelený pás pod „alignmentem“ – TSP1 doména, žlutá hvězda – pozitivně selektované pozice (MEME).

## 5. Diskuse

### 5.1 Optimalizace metod a analýza genové exprese

V prvních krocích jsem se potýkal s vysokou úmrtností jedinců v indukčním roztoku hemolymfy. Tuto úmrtnost bych připsal vydýchání kyslíku z roztoku a následnému hromadnému úmrtí. Jakmile byl celkový objem roztoku zvýšen z 1 ml na 8 ml, tak úmrtnost klesla řádově z tisíců na jednotky mrtvých jedinců. Při testování složení antikoagulačního roztoku se dva ze tří postupů uváděných v literatuře neosvědčily. I v případě třetího protokolu podle práce Vadnal et al. (2017) jsem provedl vlastní úpravy, a to nahrazení fenylthiomocoviny (PTU) antikoagulačním roztokem podle Soderhall a Smith (1983).

Výsledky exprese obou genů jsou v mé práci a práci Hao et al. (2012) rozdílné. Hlavním rozdílem je exprese obou genů v infekčním stádiu. Zatímco v mém projektu probíhala exprese ve všech stádiích, Hao et al. (2012) naměřil expresi u infekčního stadia nulovou. Rozdíly byly také v testování exprese u různě virulentních linií. Hao et al. (2012) zdokumentoval expresi korelující s virulencí u obou kandidátních genů (linie s vysokou virulencí měla i vysokou expresi, linie s nízkou virulencí měla expresi minimální). V mé práci míra exprese s virulencí nekorelovala, naopak největší expresi jsem detekoval v genu pro astacin u málo virulentní linie HB HEPAL. U ostatních linií byly exprese genů spíše kolísavé. V tomto ohledu tedy není zcela zřejmé, zda kandidátní geny s parazitismem souvisejí tak výrazně, jak jsem předpokládal. Nelze ovšem vyloučit vliv původu linií, neboť Hao et al. (2012) pracovali jen s liniemi izolovanými z Azorských ostrovů, zatímco mnou vybrané linie pocházely z širší geografické oblasti.

### 5.2 RNA interference

Vzhledem k tomu, že byla metoda RNA interference v naší laboratoři mnou teprve zaváděna, bylo nutno optimalizovat celý proces. Postup byl inspirován prací Morris et al. (2017), ale v prvních fázích jsem se setkal opět s vysokou úmrtností hlístic v roztoku PBS. Testováním tří různých roztoků a počtu hlístic jsem zjistil, že jak množství, tak typ roztoku mají vliv na úmrtnost jedinců. Vliv typu roztoku spočívá nejspíš v rozdílných osmotických tlacích vyvíjených na hlístice v nich. Kupříkladu v destilované vodě dochází po delší době k praskání z důvodu odlišných koncentrací částic (V. Půža personal comm.). Toto by odpovídalo i mému případu, kdy se Ringerův roztok prokázal jako nejvhodnější.

Po provedené interferenci se exprese genů *enolázy* a *astacinu* u linií HB HEPAL, HB 09-48 a TT01 signifikantně nelišily. Zejména exprese u linie HB 09-48 téměř stejná, jak u

kontrolního vzorku, tak u testovaných genů. Nesignifikantní odchylky od kontrolního vzorku směřovaly spíše ke zvýšené expresi než k předpokládané expresi snížené. Není ovšem jasné, co bylo příčinou. S největší pravděpodobností by metoda potřebovala delší optimalizaci. Protože v práci Morris et al. (2017) nebyla přesně stanovená chemikálie, ale pouze serotonin, použil jsem ke stimulaci polykacího reflexu serotonin kreatinin sulfát, u kterého byly zjištěny stejné výsledky u *C. elegans* (Song et al. 2012). Dalším možným důvodem je rozdíl ve studovaných organismech. V práci, ze které jsem vycházel, byla metoda aplikována na entomopatogenní hlístici *S. carpocapsae*. Způsoby života jsou si u *H. bacteriophora* a *S. carpocapsae* velmi podobné, ale stejně se jedná o dva vzájemně nepříbuzné druhy (Blaxter et al. 1998). Je tedy možné, že tento přístup je druhově specifický a nelze jej použít u *H. bacteriophora*, jak je zmíněno v práci (Ciche a Sternberg 2007). Zvýšená exprese po RNAi by mohla být způsobena odlišným mechanismem potlačování projevu genů. Podobně jako u miRNA dochází k potlačení fenotypů genu navázáním na mRNA a zabráněním ribozomům v translaci (Fabian et al. 2010). Nedostatek proteinu by spustil zpětnou vazbu, kdy by se gen exprimoval více a tím by se zvýšila celková exprese mRNA. Protiargumentem pro tuto teorii je, že dosud nebyla v RNAi ani u entomopatogenních hlístic po potlačení fenotypu pozorována zvýšená exprese.

Výsledky virulentních testů rovněž potvrzují, že k interferenci pravděpodobně nedošlo ani u jednoho z kandidátních genů.

### 5.3 Evoluční statistická analýza

Evoluční analýzu jsem provedl na „alignmentu“ 25 a 24 druhů z kladů III, IV a V. Mým původním cílem bylo zahrnout druhy napříč všemi 5 klady a s různými styly života. Jak se však ukázalo, i přes značný počet publikovaných genomů a transkriptomů nešlo tuto podmínku dodržet. Prvním důvodem je to, že genomová analýza je zaměřena především na ekonomicky nebo medicínsky zajímavé druhy, zatímco počet analyzovaných volně žijících druhů je pro smysluplné porovnání málo (Viney 2017). Vyvážený poměr parazitů a volně žijících hlístic se mi podařilo dohledat jen pro klady IV a V. V kladu III jsou pouze parazitické druhy. Přes absenci volně žijících druhů v tomto kladu jsem je zahrnul do analýzy pro úplnější rekonstrukci fylogenetických vztahů s tím, že jako „outgroup“ jsem zvolil volně žijící druh *Plectus sambesii* ze specifického kladu C, stojící vzhledem k vybraným kladům na bazální pozici.

Vybrané sekvence byly vyhledávány za přísných kritérií 85 % similarity. U nižších hodnot by mohlo dojít k záměně s jiným paralogem nebo pseudogenem; např. u *C. elegans* se vyskytuje až 40 astacinů (Möhrlen et al. 2003). Toto kritérium však splňovalo méně

ortologů, než jsem očekával – jednak pro výše uvedenou absenci osekvenovaných genomů, ale také některé genomy či transkripty nejsou veřejně přístupné, neúplně sestavené či neanotované. Zcela kuriózní situace nastala u genu pro astacin, kterou jsem původně přejal z publikovaného transkriptomu *H. indica*. Při analýzách se však tato sekvence řadila ke kladu III. Podezření z kontaminace se mi potvrdilo díky práci Smythe et al. (2019). V této fylogenetické studii byly porovnávány celé transkripty a autoři došli k závěru, že publikovaný transcriptom *H. indica* je směsí několika jiných druhů. Bohužel se mi nepodařilo získat laboratorní linii, ze které bych sekvenci izoloval, a musel jsem proto finální analýzy provést znovu bez tohoto druhu.

Sestavený fylogenetický strom podle SSU spolehlivě odpovídá současné fylogenetice (Smythe et al. 2019). Genealogie pro astacin a enolázu byly od tohoto druhového stromu odlišné, což svědčí o rozdílné evoluční historii. Zajímavé je, že parazitické druhy kladu III byly vždy ve stejném klastru, i když se jeho pozice změnila jak u astacinu, tak i enolázy (přesun ke kladu IV). Stejně se chovaly i parazitické druhy kladu V, na rozdíl od výrazného fragmentování kladu IV. Parazitické druhy v kladech III a V jsou ovšem v druhovém stromu ve stejných klastrech, zatímco v kladu IV jsou vybrané druhy parazitické ve stejném klastru s volně žijícími. Je tedy možné, že genealogie může být ovlivněna i touto skutečností.

Evoluce genů na vnitrodruhové úrovni víceméně potvrdila závěry M. Flegrové, tedy vliv selekčního „sweepu“ působícího na enolázu. Selektce u astacinu detekována nebyla.

Zkoumání selektce na mezidruhové úrovni však zjištění o působení selektce přineslo. U obou kandidátních genů byla zjištěna selektce epizodická, a to na celých genech, na některých kodonech i na některých větvích genealogií. To je v souladu s výše uvedeným pozorováním změn pozic na fylogenetických stromech. Zatímco u astacinu se selektce projevovala více na větvích vedoucích k parazitickým druhům, u enolázy to nebylo tak jednoznačné. To znamená, že tyto geny souvisí s parazitizmem v různé míře.

Zajímavé je i promítnutí selektovaných kodonů do vlastností proteinů a jejich hypotetické struktury a funkce. Jednotlivé pozitivně selektované kodony se nacházejí u astacinu hlavně na TSP1 doméně, jejíž funkce není úplně jasná. Ačkoliv byla nalezena místa, kde byla zaznamenána epizodická pozitivní selektce v katalytické doméně, tato místa byla prokázána pod velmi volnou hladinou významnosti. Jejich pozice je navíc mimo vazebné místo, takže jejich vliv na funkci katalytickou je minimální. Při přísnějších kritériích se prokazuje, že astacinová doména je konzervovaná. Zajímavá pozitivní selektce proběhla v doméně CUB, která se připisuje zodpovědnost za specificitu k substrátu celého enzymu (Gaboriaud et al. 2011). Co se týče rozložení na genealogii, pak došlo k pozitivní selekci pouze na nodu s parazitickými hlísticemi z V kladu, což by odpovídalo jejich shlukování ve



fylogramech. Pozitivně selektované kodony u enolázy jsou naopak rozmístěny napříč doménami bez zjevného účinku.

Rozložení pozitivní selekce na genealogickém stromu enolázy by se mohla vysvětlit jevem zvaným proteinový „moonlighting“, kdy jeden protein má více funkcí (Tracy et al. 2000). Tato druhá funkce je provozována jedním proteinem a ne paralogem. U enolázy to je případ u hlístice kladu III *Onchocerca volvulus*, u které má enoláza funkci vazby a aktivace plasminogenu, čímž si pomáhá při putování tělem hostitele (Ayón-Núñez et al. 2018). Při tomto jevu dochází k víceru selekčním tlakům na protein, což by mohlo vysvětlovat roztroušenost selekce napříč genealogickým stromem.

Promítnutí proteinových vlastností s detekovanou pozitivní selekcí na hypotetickou sekundární strukturu ukázalo také zajímavé aspekty. U enolázy se nejvýrazněji projevila *Turn tendencies*, jejíž účinek je lokalizován do oblastí bohatých na helixy, což může poukazovat na tlak na jejich rozvolnění. Nejvýraznější vlastností u astacinu pak byla *Power to be at the C-terminal*, ale tato vlastnost vykazuje při stanovování vysokou chybovost (McClellan et al. 2010).

Výsledky mé práce jsou sice v kontrastu k práci Hao et al. (2012), zjištění biostatistické evoluční analýzy však jsou do jisté míry v souladu se závěry studie Vadnal et al. (2017), v níž byla provedena identifikace kandidátních genů pro parazitismus na základě porovnání transkriptomů pěti druhů z kladu V a to, 4 parazitických (*H. bacteriophora*, *A. ceylanicum*, *N. americanus* a *H. contortus*) a volně žijícího *C. elegans*. V jejich širším výběru genů se ani enoláza, ani astacin neobjevily, proto se dá předpokládat, že jejich význam pro parazitismus není prvotní, stejně jako to naznačuje jejich evoluci dominující purifikační selekce, a jen epizodicky se projevující selekce pozitivní.

## 6. Závěr

Cílem této práce bylo ověřit možnosti použití metod reverzní a evoluční genetiky pro podrobnou charakterizaci dvou kandidátních genů pro parazitismus.

1. Byla prověřena možnost provádět experimentální umlčování genů pomocí metody RNA interference na infekčních larvách entomopatogenní hlístice *Heterorhabditis bacteriophora* přístupem tzv. „soaking“, který dosud nebyl na tomto stádiu u tohoto druhu použit. RNA interferenci jsem provedl na liniích s odlišnými schopnostmi infikovat hostitele. Bohužel tato metoda se neprojevila jako použitelná na tomto stádiu hlístice nejspíše z druhově specifických důvodů.

2. Dalším cílem této práce bylo hledat projevy selekce na evolučním vývoji dvou parazitických kandidátních genů pro enolázu a astacin. Evoluční analýzu jsem provedl na vnitrodruhovém souboru 9 linií a na větším mezidruhovém souboru o 24 druzích ze tří fylogenetických kladů. Vnitrodruhová analýza poukázala na možný selekční „sweep“ u genu pro enolázu na rozdíl od genu pro astacin, u něhož vliv selekce nebyl zjištěn.

Mezidruhová analýza odhalila epizodickou diverzifikační selekci lokalizovanou na různá místa v genech i na různých větvích u obou genalogií, ale i když došlo ke změnám některých aminokyselinových vlastností, ve funkci proteinů se pravděpodobně změny neprojevují. Převážná většina kodonů obou genů je dlouhodobě ovlivněna selekcí purifikační. To naznačuje, že tyto geny jsou spíše konzervované a nehrají až tak významnou roli v adaptaci na parazitický způsob života, jak se předpokládalo.

Budoucí výzkum aplikace RNA interference by se měl zaměřit na překonání bariéry transportu dsRNA do těla infekční larvy. Studie zabývající se evolucí parazitismu by se měly v budoucnu zaměřit na další kandidátní geny.

## 7. Literatura

Ayón-Núñez D. A., Fragoso G., Bobes R. J., Laclette J. P. (2018). Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. *Bioscience Reports*. 38 (5).

Baskaran P., Jaleta T. G., Streit A., Rödelsperger C. (2017). Duplications and Positive Selection Drive the Evolution of Parasitism-Associated Gene Families in the Nematode *Strongyloides papillosum*. *Genome Biology and Evolution*. 9 (3). 790-801.

Beard R., L. (1950). Experimental observations on coagulation of insect hemolymph. *Physiological Zoology*. 23. 7-57.

Bedding R. A., Akhurst R. J. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*. 21(1). 109-110.

Bird D. M., Jones J. T., Operman C. H., Kikuchi T., Danchin E. G. J. (2015). Signatures of adaptations to plant parasitism in nematode genomes. *Parasitology*. 142. S71-S84.

Blaxter M. (2011). Nematodes: The Worm and Its Relatives. *PLoS Biology*. 9 (4). e1001050.

Blaxter M., De Ley P., Garrey J. R., Liu L. X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J. R., Mackey L. Y., Dorris M., Frisse L. M., Vida J. T., Thomas W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*. 392. 71-75.

Blaxter M., Koutsovoulos G. (2014). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*. 142. 26-39.

Bond J. S., Beynon R. J. (1995). The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Science*. 4. 1247-1261.

Burkart A. D., Xiong B., Baibakov B., Jiménez-Movilla M., Dean J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zoonapellucida to prevent polyspermy. *The Journal of Cell Biology*. 197(1). 37-44.

- Ciche T. A., Sternberg P. W. (2007). Postembryonic RNAi in *Heterorhabditis bacteriophora*: a nematode insect parasite and host for insect pathogenic symbionts. *BMC Developmental Biology*. 7. 101.
- Danchin E. G. J., Guzeeva E. A., Mantelin S., Berepiki A., Jones J. T. (2016). Horizontal Gene Transfer from Bacteria Has Enabled the Plant-Parasitic Nematode *Globodera pallida* to Feed on Host-Derived Sucrose. *Molecular Biology and Evolution*. 33 (6). 1571-1579.
- Dillman A. R., Chaston J. M., Adams B. J., Ciche T. A., Goodrich-Blair H., Stock S. P., Sternberg P. W. (2012). An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name. *PLOS Pathogens*. 8 (3). e1002527.
- Dzitoyeva S., Dimitrijevic N., Manev H. (2001). Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Molecular Psychiatry*. 6 (6). 665-670.
- Fabian M. R., Sonenberg N., Filipowicz W. (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs". *Annual Review of Biochemistry*. 79. 351–79.
- Félix M.-A. (2008). RNA interference in nematodes and the chance that favored Sydney Brenner. *Journal of Biology*. 7 (9). 34.
- Félix M.-A., Ailion M., HSU J.-C., Richaud A., Wang J. (2018). *Pristionchus* Nematodes Occur Frequently in Diverse Rotting Vegetal Substrates and Are Not Exclusively Necromenic, While *Panagrellus redivivoides* Is Found Specifically in Rotting Fruits. *PLoS One*. 13(8). e0200851.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669). 806-811.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391. 806-811.

Flegrová M. (2015). Nukleotidová variabilita genu enol-1 u entomopatogenních hlístic *Heterorhabditis bacteriophora* a *Steinernema feltiae*.

Fortunato A., Fraser A. G. (2005). Uncover Genetic Interactions in *Caenorhabditis elegans* by RNA Interference. *Bioscience Reports*. 25 (5-6). 299-307.

Fu Y.-X., Li W.-H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133. 693-709.

Gaboriaud C., Gregory-Pauron L., Teillet F., Thielens N. M., Bally I., Arlaud G. J. (2011). Structure and properties of the Ca<sup>2+</sup> - binding CUB domain, a widespread ligand-recognition unit involved in major biological functions. *The Biochemical Journal*. 439 (2). 185-193.

Galili T. (2015). dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 31 (22). 3718-3720.

Hallam E. A., Dillman A. R., Hong A. V., Zhang Y., Yano J. M., DeMarco S. F., Sternberg P. W. (2011). A Sensory Code for Host Seeking in Parasitic Nematodes. *Current Biology*. 21 (5). 377-383.

Hao Y., Montiel R., Lucena M. A., Costa M., Simoes N. (2012) Genetic diversity and comparative analysis of gene expression between *Heterorhabditis bacteriophora* Az29 and Az36 isolates: Uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. *Experimental Parasitology*. 130, 116-125.

Hao Y.-J., Montiel R., Nascimento G., Toubarro D., Simoes N. (2008). Identification, Characterization of Functional Candidate Genes for Host-Parasite Interactions in Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* by Suppressive Subtractive Hybridization. *Parasitology Research*. 103 (3). 671-683.

Hartl D. L., Clark A. G. (1997). Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.

Herrmann M., Mayer W. E., Hong R. L., Kienle S., Minasaki R., Sommer R. J. (2007). The Nematode *Pristionchu pacificus* (Nematoda: Diplogasteridae) Is Associated with the Oriental Beetle *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae) in Japan. *Zoological Science*. 24. 883-889.

- Herrmann M., Mayer W. E., Sommer R. J. (2006). Nematodes of the genus *Pristionchus* are closely associated with scarab beetles and the Colorado potato beetle in Western Europe. *Zoology*. 109. 96-108.
- Hoang D. T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B. Q., Vinh L. S. (2017). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*. In press.
- Hudson R. R., Kreitman M., Aguade M. (1987). A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. *Genetics*. 116. 153-159.
- Jensen, J. D., Wong, A., Aquadro, C. F. (2007). Approaches for identifying targets of positive selection. *Trends in Genetics*, 23 (11). 568-577.
- Ji H., Wang J., Guo J., Li Y., Lian S., Guo W., Yang H., Kong F., Zhen L., Guo L., Liu Y. (2016). Progress in the biological function of alpha-enolase. *Animal Nutrition*. 2. 12-17.
- Kalyaanamoorthy S., Minh B. Q., Wong T. K. F., von Haeseler A., Jermiin L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14. 587-589.
- Kaya H. K., Stock S. P. (1997). Techniques in insect nematology. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. 281-324.
- Keeling P. J., Palmer J. D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*. 9(8). 605-618.
- Kenney E., Hawdon J. M., O'Halloran D., Eleftherianos I. (2019). *Heterorhabditis bacteriophora* Excreted-Secreted Products Enable Infection by *Photorhabdus luminescens* Through Suppression of the Imd Pathway. *Frontiers in Immunology*. 10. 2372.
- Ketting R. F., Fisher S. E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G. J., Plasterk R. H. (2001). Dicer Functions in RNA Interference and Synthesis of Small RNA Involved in Developmental Timing in *C. Elegans*. *Genes & Development*. 15 (20). 2654-2659.

Kikuchi T., Jones J. T., Aikawa T., Kosaka H., Ogura N. (2004). A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *FEBS Letters*. 572. 201-205.

Kimura M. (1983). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press.

Kosakovsky Pond S. L., Frost S. D. W. (2005). Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution*. 22(5). 1208-1222.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyz C., Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35. 1547–1549.

Li D., Scherfer C., Korayem A. M., Zhao Z., Schmidt O., Theopold U. (2002). Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32(8). 919–928.

Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 25 (4). 402–408.

Maine E. M. (2008). Studying gene function in *Caenorhabditis elegans* using RNA-mediated interference. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 7 (3). 184-194.

McClellan D. A., Ellison D. D. (2010). Assessing and Improving the Accuracy of Detecting Protein Adaptation With the TreeSAAP Analytical Software. *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*. 6 (2). 120-133.

Möhrlen F., Hutter H., Zwilig R. (2003). The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Biochemistry* .270. 4909-4920.

Morris R., Wilson L., Sturrock M., Warnock N. D., Carrizo D., Cox D., Maule A. G., Dalzell J. J. (2017). A neuropeptide modulate sensory perception in the entomopathogenic nematode *Steinernemacarpocapsae*. *PLOS Pathogens*. 13(3).

Morris R., Wilson L., Sturrock M., Warnock N. D., Carrizo D., Cox D., Maule A. G., Dalzell J. J. (2017). A neuropeptide modulates sensory perception in the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *PLoS Pathogens* 13 (3). e1006185.

Murrell B., Weaver S., Smith M. D., Wertheim J. O., Murrell S., Aylward A., Eren K., Pollner T., Martin D. P., Smith D. M., Scheffler K., Kosakovsky Pond S. L. (2015). Gene-Wide Identification of Episodic Selection. *Molecular Biology and Evolution*. 32(5). 1365–1371.

Murrell B., Wertheim J. O., Moola S., Weighill T., Scheffler K., Kosakovsky Pond S. L. (2012). Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. *PLOS Genetics*. 8(7).

Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University. Press. New York.

Nei M., Gojobori T., (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions., *Molecular Biology and Evolution*. 3 (5). 418–426.

Nermut J., Půža V., Mráček Z. (2012). Entomopathogenic and molluscoparasitic nematodes – the Invisible Soil Killers. *Živa* 1/2012. 10-13.

Nguyen L.-T., Schmidt H. A., von Haeseler A., Minh B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 32 (1). 268-274.

Novelli J., Ahmed S., Hodgkin J. (2004). Gene Interactions in *Caenorhabditis elegans* Define DPY-31 as a Candidate Procollagen C-Proteinase and SQT-3/ROL-4 as Its Predicted Major Target. *Genetics*. 168 (3). 1259-1273.

Paganini J., Campan-Fournier A., Rocha M. D., Gouret P., Pontarotti P., Wajnberg E., Abad P., Danchin E. G. J. (2012). Contribution of Lateral Gene Transfers to the Genome Composition and Parasitic Ability of Root-Knot Nematodes. *PLoS ONE*. 7(11). e50875.



- Page A. P., Stepek G., Winter A. D., Pertab D. (2014). Enzymology of the nematode cuticle: A potential drugtarget? *International Journalfor Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 4. 1333-141.
- Palomares-Rius J., E., Hirooka Y., Tsai I., J., Masuya H., Hino A., Kanzaki N., Jones J. T., Kikuchi T. (2014). Distribution and evolution of glycoside hydrolase family 45 cellulases in nematodes and fungi. *BMC Evolutionary Biology* 14.
- Pancholi V. (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58. 902-920.
- Paradis E., Schliep K. (2018). Ape 5.0: an Environment for Modern Phylogenetics and Evolutionary Analyses in R. *Bioinformatics* 35 (3). 526-528.
- Park J.-O., Pan J., Möhrle F., Schup M.-O., Johnsen R., Bailie D. L., Zapf R., Moerman D. G., Hutter H. (2010). Characterization of the astacin family of metalloproteases in *C. elegans*. *BMC Developmental Biology*. 10:14.
- Peters A. (1996). The Natural Host Range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. And Their Impact on Insect Populations. *Biocontrol Science and Technology*. 6 (3). 389-402.
- Ratnappan R., Vadnal J., Keaney M., Eleftherianos I., O'Halloran D., Hawdon J. M. (2016). RNAi-mediated gene knockdown by microinjection in the model entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Parasites & Vectors*. 9. 160.
- Rödelsperger C., Streit A., Sommer R., J. (2013). Structure, Function and Evolution of The Nematode Genome. eLS.
- Rosa J. S., Simoes N. (2003). Evaluation of twenty-eight strains of *Heterorhabditis bacteriophora* isolated in Azores for bio control of armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*. 29. 409-417.
- Rowley A. F., Ratcliffe N. A. (1976). The granular cells of *Galleria mellonella* during clotting and phagocytic reactions in vitro. *Tissue and cell*. 8(3). 437-446.

- Roy A., Kucukural Y., Zhang Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*. 5 (4). 725–738.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P. Ramos-Onsins S. E., Sánchez-Gracia A. (2017). DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 34. 3299-3302.
- RStudio Team (2016). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc. Boston. MA.
- Ryazanova A. D., Alekseev A. A., Slepneva I. A. (2012). The phenylthiourea is a competitive inhibitor of the enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*. 27. 78-83.
- Shimell M. J., Ferguson E. L., Childs S. R., O'Connor M. B. (1991). The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene *tolloid* is related to human bone morphogenetic protein 1. *Cell*. 67. 469-481.
- Smith J., Haigh J. (1974). The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetical Research*. 23(1), 23-35.
- Smith M. D., Wertheim J. O., Weaver S., Murrell B., Scheffler K., Kosakovsky Pond S. L. (2015). Less Is More: An Adaptive Branch-Site Random Effects Model for Efficient Detection of Episodic Diversifying Selection. *Molecular Biology and Evolution*. 32. 1342–1353.
- Smythe A. B., Holovachov O., Kocot K. M. (2019). Improved phylogenomic sampling of free-living nematodes enhances resolution of higher-level nematode phylogeny. *BMC Evolutionary Biology*. 19.
- Soderhall K., Smith V. J. (1993). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology*. 7. 229-239.
- Sommerr., Streit A., (2011). Comparative Genetics and Genomics of Nematodes: Genome Structure, Development and Lifestyle. *Annual Review of Genetics*. 45. 1-20.

- Song B., Avery L. (2012). Serotonin activates overall feeding by activating two separate neural pathways in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*. 32 (6). 1920-1931.
- Stefanovska T., Pidlishyuk V., Kaya H. (2008). Host range and infectivity of *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae) from Ukraine. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 73 (4). 693-698.
- Steppek G., McCormack G., Page A., P. (2009). Collagen processing and cuticle formation is catalysed by the astacin metalloprotease DPY-31 in free-living and parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology*. 40. 533-542.
- Steppek G., McCormack G., Winter A. D., Page A. P. (2015). A highly conserved, inhibitable astacin metalloprotease from *Teladorsagia circumcincta* is required for cuticle formation and nematode development. *International Journal for Parasitology*. 45. 345-35.
- Sterchi E. E., Stöcker W., Bond J. S. (2008). Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*. 29 (5). 309-328.
- Sudhaus W. (2008). Evolution of Insect Parasitism in Rhabditid and Diplogastrid Nematodes. *Advances in Arachnology and developmental biology*. 12. 143–161.
- Svoboda P., Stein P., Hayashi H., Schultz R. M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*. 127. 4147-4156.
- Svoboda P., Stein P., Hayashi H., Schultz R. M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127 (19). 4147-4156.
- Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123. 585–595.
- Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O. (2002). The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59 (2).363-372.

- Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O. (2002). The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59. 363-372.
- Tracy M. R., Hedges S. B. (2000). Evolutionary history of the enolase gene family. *Gene* 259. 129-138.
- Treangen T. J., Rocha E. P. C. (2011). Horizontal Transfer, Not Duplication, Drives the Expansion of Protein Families in Prokaryotes. *PLoS Genetics*. 7 (1). e1001284.
- Trevisan-Silva D., Gremski L. H., Chaim O. M., da Silveira R. B., Meissner G. O., Mangili O. C., Barbaro K. C., Gremski W., Veiga S. S., Senff-Ribeiro A. (2010). Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie*. 92. 21-32.
- Vadnal J., Ratnappan R. Melissa K., Kenney E., Eleftherianos I., O'Halloran D., Hawdon J. M. (2017). Identification of candidate infection genes from the model entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *BMC Genomics*. 18(1).
- Vadon-LeGoff S., Hulmes D. J. S., Moali C. (2015). BMP-1/tolloid- like proteinases synchronise matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling. *Matrix Biology*. 44-46. 14-23.
- Viney M. (2017). How Can We Understand the Genomic Basis of Nematode Parasitism? *Trends in Parasitology*. 33 (6). 444-452.
- Viney M. (2018). The genomic basis of nematode parasitism. *Briefings in Functional Genomics*. 17 (1). 8-14.
- Viney M. E., Thompson F. J. (2008). Two hypotheses to explain why RNA interference does not work in animal parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology*. 38. 43-47.
- Vrain T. C., Wakarchuk D. A., Levesque A. C., Hamilton R. I. (1992). Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*. 15. 563-573.

- Weaver S., Shank S. D., Spielman S. J., Li M., Muse S. V., Pond S. L. K., (2018). Datamonkey 2.0 A Modern Web Application for Characterising Selective and Other Evolutionary Processes. *Molecular Biology and Evolution*. 35 (3). 773–777.
- Weinstein S. B., Kuris A. M. (2016). Independent origins of parasitism in Animalia. *Biology Letters*. 12.
- Wilkinson S. P., Davy S. K. (2018). Phylogram: an R package for phylogenetic analysis with nested lists. *Journal of Open Source Software* 3.790.
- Xu L., Xu M., Sun X., Xu J., Zen X., Shan D., Yuan D., He P., He W., Yang Y., Luo S., Wei J., Wu X., Lu Z., Xu X., Dong Z., Song L., Zhang B., Yu Z., Wang L., Zhang C., Fang X., Gao Q., Lv Z., Wu Z. (2019). The genetic basis of adaptive evolution in parasitic environment from the *Angiostrongylus cantonensis* genome. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 13(11).
- Yew S. M., Chan C. L., Kuan C. S., Toh Y. F., Ngeow Y. F., Na S. L., Lee K. W., Hoh C.-C., Yee W.-Y. Ng K. P. (2016). The genome of newly classified *Ochroconismirabilis*: Insights into fungal adaption to different living conditions. *BMC Genomics*. 17 (91).
- Zarlenga D., Wang Z., Mitreva M. (2016). *Trichinella spiralis*: Adaptation and parasitism. *Veterinary Parasitology*. 231. 8-21.
- Zhang W., Yu H., Lv Y., Bushley K. E., Wicklam J. D., Gao S., Hu S., Zhao L., Sun J. (2020). Gene family expansion of pinewood nematode to detoxify its host defence chemicals. *Molecular Ecology*. 29 (5).

## 8. Přílohy

### Příloha 1: PCR profily pro primery Zn1, Zn2 a Zn3.

	Zn1		Zn2		Zn3	
	Teplota (°C)	Čas(s)	Teplota (°C)	Čas(s)	Teplota (°C)	Čas(s)
1. predenaturace	94	120	94	120	94	120
2. denaturace	94	30	94	30	94	30
3. annealing	48	45	58	45	56	45
4. elongace	72	60	72	60	72	60
5. závěrečná elongace	72	120	72	120	72	120
6. uchování	4	∞	4	∞	4	∞
opakování kroků 2-4	34		34		34	

### Příloha 2: PCR profily pro primery Zn4 a ITS

	Zn4		ITS	
	Teplota (°C)	Čas(s)	Teplota (°C)	Čas(s)
1. predenaturace	94	120	94	120
2. denaturace	94	30	94	30
3. annealing	64	45	50	45
4. elongace	72	60	72	60
5. závěrečná elongace	72	120	72	120
6. uchování	4	∞	4	∞
opakování kroků 2-4	34		34	

### Příloha 3: PCR profily pro syntézu DNA templátů s T7 promotory do reakce *in vitro* transkripce.

	EnolT7		AstacinT7	
	Teplota (°C)	Čas(s)	Teplota (°C)	Čas(s)
1. predenaturace	94	120	94	120
2. denaturace	94	30	94	30
3. annealing	57	45	56	45
4. elongace	72	60	72	60
5. denaturace	94	30	94	30
6. annealing	64	45	64	45
7. elongace	72	60	72	60
8. závěrečná elongace	72	180	72	180
9. uchování	4	∞	4	∞
opakování kroků 2-4	7		7	
opakování kroků 5-7	32		32	

**Příloha 4: Primery použité pro syntézu DNA templátu do reakce in vitro transkripce.**

Název	Orientace	5' -> 3' sekvence
Eno1T7	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCTTCCTGTTCCCTG CCTTCAATGT
	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTCCCAGTTATCCC AGTCGTCTT
AstacinT7	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAAGACAATAG GCCAGCGAGAT
	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAAGAGCGGAAGA GTACGACGAGA

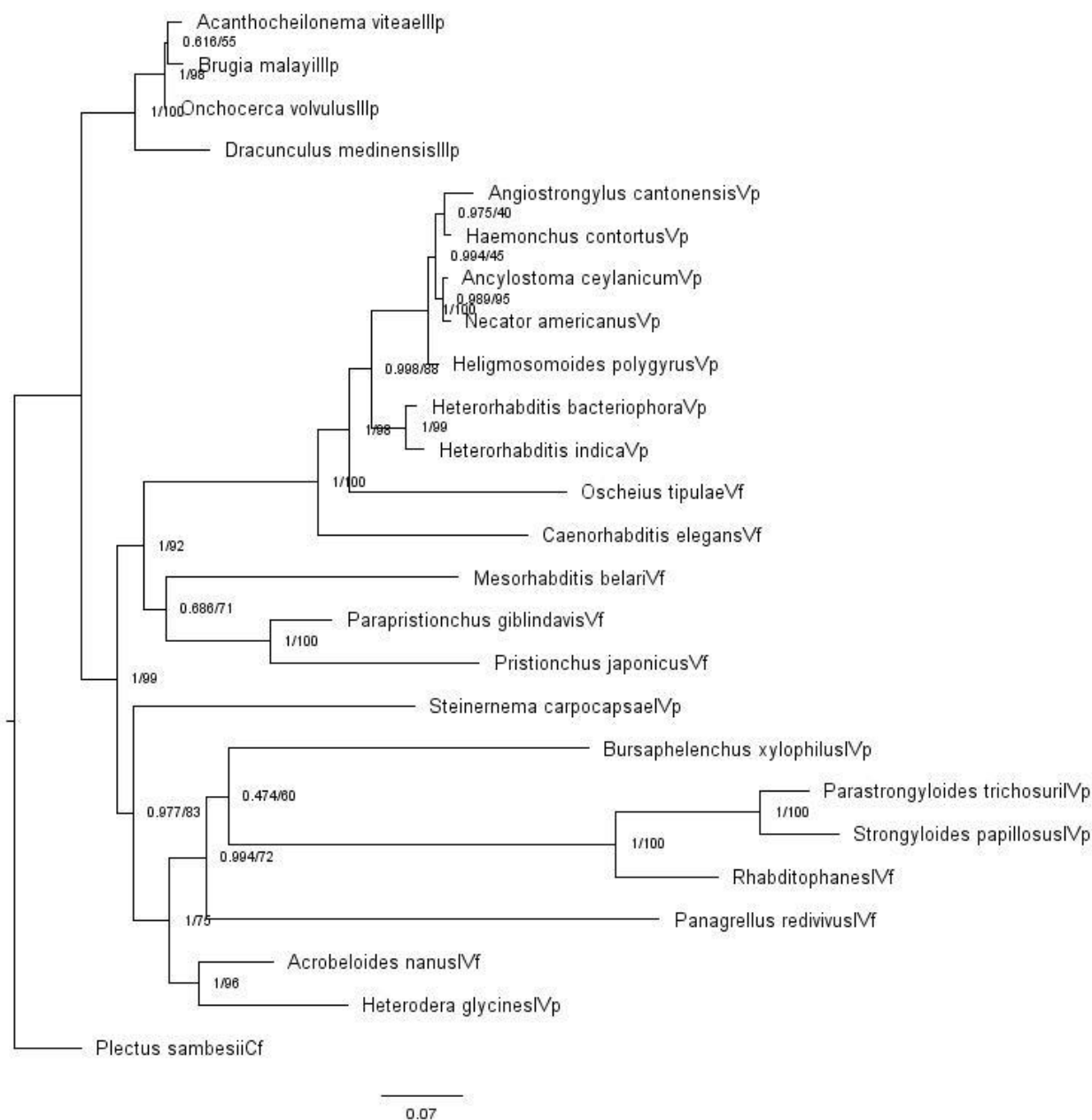
**Příloha 5: seznam použitých primerů v Real-time PCR.**

Název	Orientace	5' -> 3' sekvence
enolRT	F	TTGGGGACGATTTGACTGTG
	R	CATAACTCCCCATCCATTTTCTC
astaRT	F	AGAGCCGATGGAAACACAGG
	R	ACCGCGTAGAAGGGAAAGAA
Rpl-32	F	GTTCCGTGGTATGCGTGCTAT
	R	GTGACTTGGCGGAGACTGTGT
Rack1	F	TGCAGCAGTTGGACCAGTTA
	R	CAGACACCTGCCATACACGA

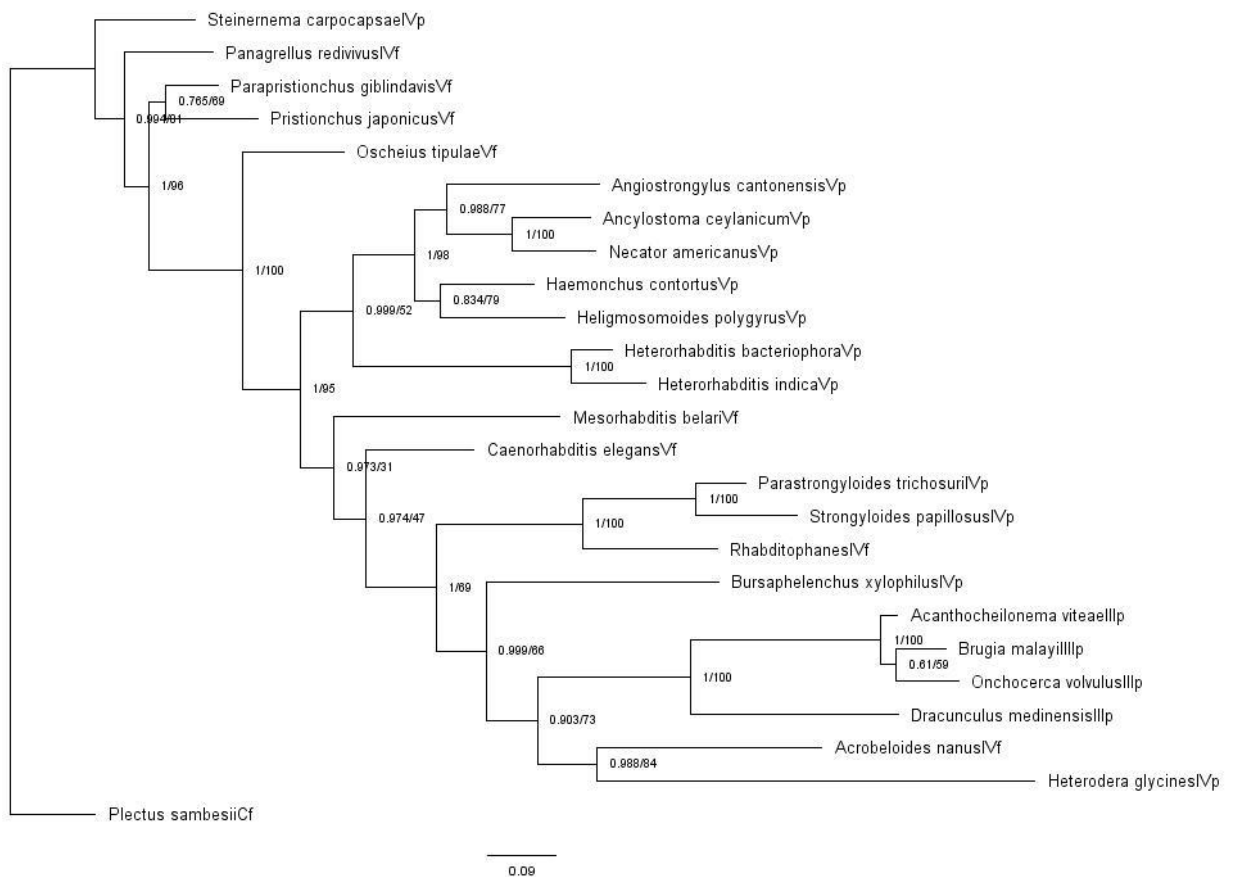
**Příloha 6: Seznam použitých druhů, jejich příslušnost do kladů a přístupové kódy k sekvencím pro enolázu, astacin a SSU. F – volně žijící, P – parazit, Sekvence pro SSU byly získány z databáze SILVA (<https://www.arb-silva.de/>), Sekvence pro enolázu a astacin byly získány z databáze Wormbase Parasite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>).**

	Zkratka		Klad	životní strategie	SSU	Enoláza	Astacin
1	AcnanFIV	<i>Acrobelloides nanus</i>	IV	F	DQ102707	ACRNAN_scaff old5074.g6694.t	ACRNAN_Path_11 89.g4624
2	AcvitPIII	<i>Acanthocheilonema viteae</i>	III	P	DQ094171	nAv.1.0.1.t0145	nAv.1.0.1.g00211
3	AgcanPV	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	V	P	AY295804	ACAC_0000104	ACAC_0000066201
4	AnceyPV	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	V	P	LC036567	Acey_s0389.g53	Acey_s0098.g3066
5	BrmalPIII	<i>Brugia malayi</i>	III	P	AF036588	Bm13965	Bm5432
6	BuxylPpIV	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	IV	P	GU206792	BXY_1599500	BXY_1550400
7	CaeleFV	<i>Caenorhabditis elegans</i>	V	F	MN519140	T21B10.2 enol-	dpy-31
8	DrmedPIII	<i>Dracunculus medinensis</i>	III	P	KF770019	DME_00010265	DME_0000313901
9	HaconPV	<i>Haemonchus contortus</i>	V	P	LS997564	HCON_0005815	HCON_00094450
10	HebacPV	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	V	P	AF036593	Hba_15591	Hba_20530
11	HindiVp	<i>Heterorhabditis indica</i>	V	P	MF197882	"de novo"	
12	HeglyPpIV	<i>Heterodera glycines</i>	IV	P	KJ934138	Hetgly.G000016 581	Hetgly.G00001657 7
13	HepolPV	<i>Heligmosomoides polygurus</i>	V	P	AJ920355	HPOL_00000393	HPOL_0000011701
14	MebelFV	<i>Mesorhabditis belari</i>	V	F	MH983024	mbelari.g8669	mbelari.g7105
15	NeamePV	<i>Necator americanus</i>	V	P	AJ920348	NECAME_09088	NECAME_12931
16	OnvolPIII	<i>Onchocerca volvulus</i>	III	P	ADBW0100 3330	OVOC9778	Ovo-dpy-31
17	OstipFV	<i>Oscheius tipulae</i>	V	F	KP756939	OTIPU.nOt.2.0. 1.g08715	OTIPU.nOt.2.0.1.g 03761
18	PagibFV	<i>Parapristionchus giblindavis</i>	V	F	JX163981	Parapristionch us-mkr-S_190- 0.0	Parapristionchus- mkr-S_242-0.45- mRNA-1
19	ParedFIV	<i>Panagrellus redivivus</i>	IV	F	AF083007	Pan_g7535	Pan_g22449
20	PatriIVp	<i>Parastrongyloides trichosuri</i>	IV	P	LM523351	PTRK_00011651	PTRK_0000724300
21	PlsamFC	<i>Plectus sambesii</i>	C	F	NIUQ01002 534	PSAMB.scaffol d814size40928.	PSAMB.scaffold14 7size72779.g2603
22	PrjapFV	<i>Pristionchus japonicus</i>	V	F	KT188850	japonicus-mkr- S11-7.0-mRNA-	japonicus-mkr-S49- 1.53-mRNA-1
23	RhabdFIV	<i>Rhabditophanes spp.</i>	IV	F	LK995728	RSKR_00008642	RSKR_0000104000
24	StcarPIV	<i>Steinernema carpocapsae</i>	IV	P	AF036604	L596_012181	L596_030590
25	StpapPIV	<i>Strongyloides papillosus</i>	IV	P	AB923886	SPAL_00007508	SPAL_0000285600

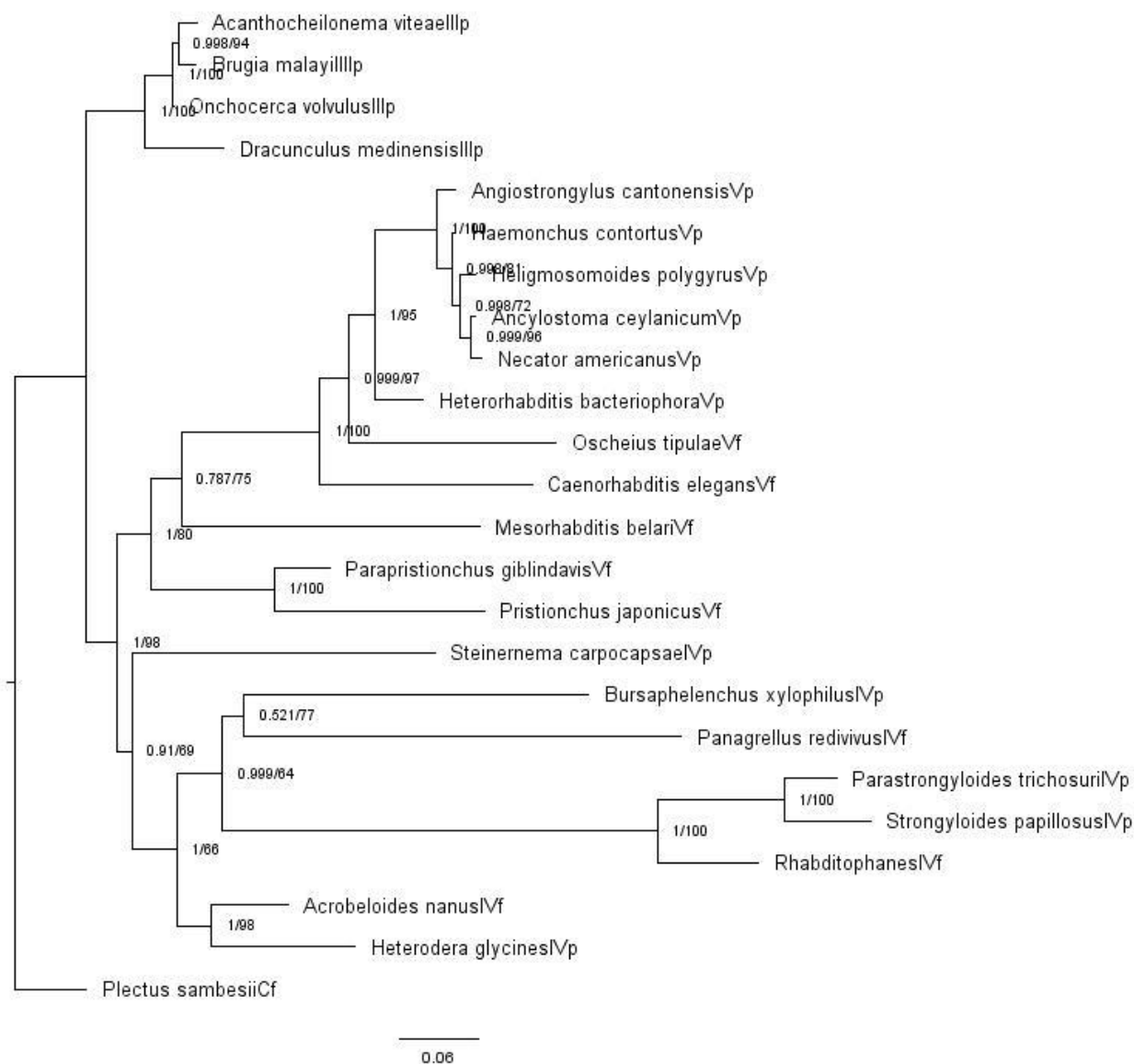




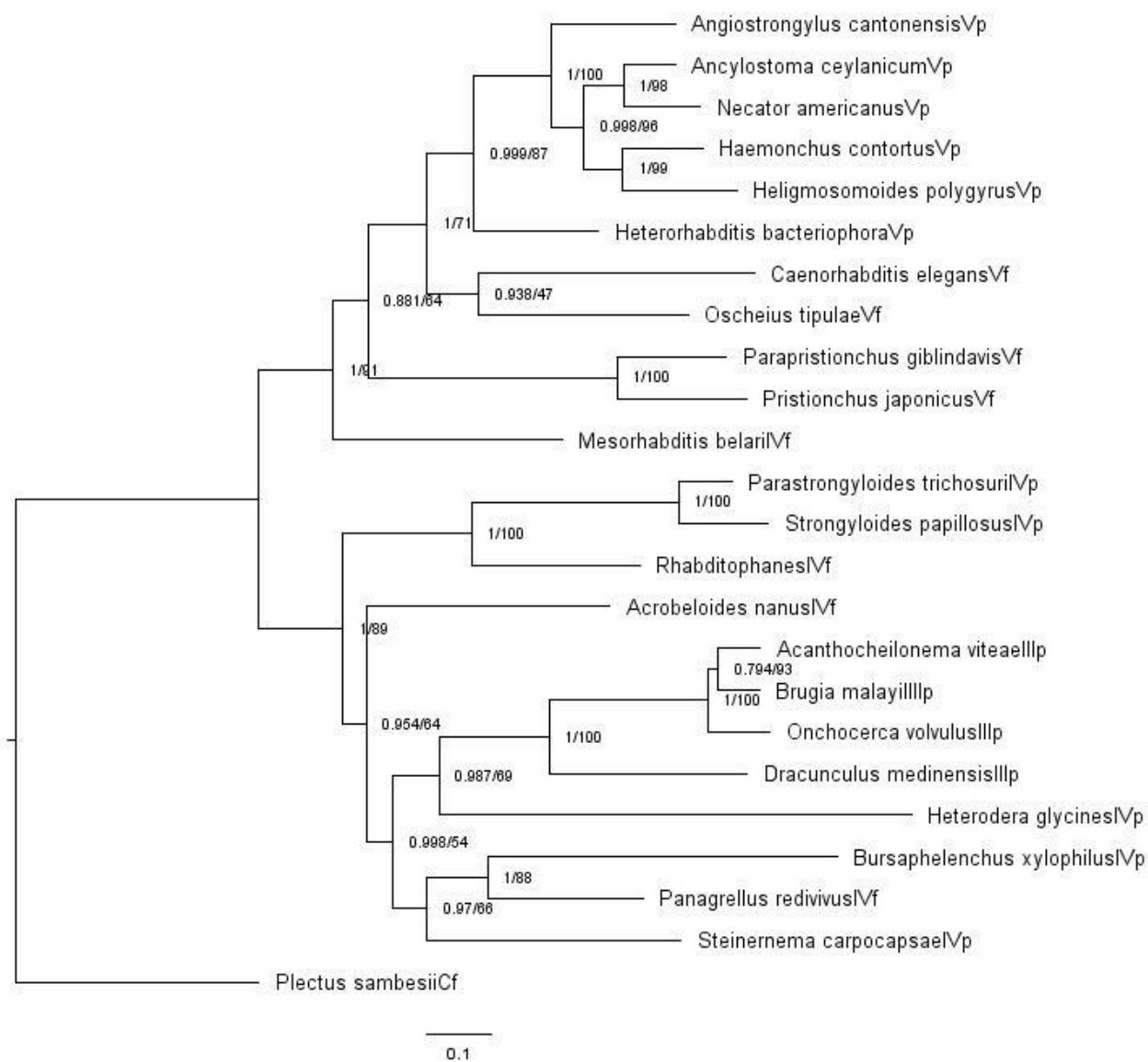
**Příloha 7: Rekonstrukce fylogenetických vztahů mezi druhy hlístic pomocí SSU.** Maximum-Likelihood, ultrafast bootstrap 1000, hodnoty nodů – aBayes support / ultrafastbootstrap, číslice za jménem – příslusnot ke kladu, P- parazit, F – volně žijící druh, zakořeněno *Plectus sambesii*.



**Příloha 8: Genealogie genu pro *enolázu*.** Maximum-Likelihood, ultrafast bootstrap 1000, hodnoty nodů - aBayes support / ultrafastbootstrap, číslice za jménem – příslusnot ke kladu, P- parazit, F – volně žijící druh, zakořeněno *Plectus sambesii*.



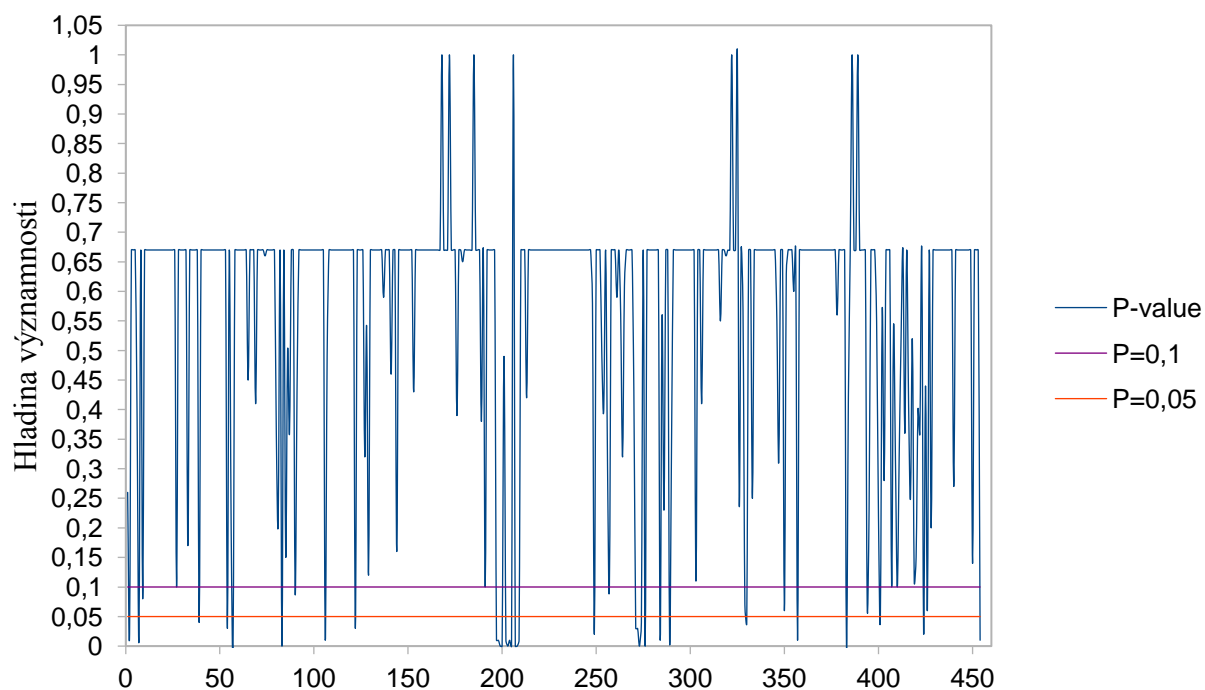
**Příloha 9: Rekonstrukce fylogenetických vztahů mezi druhy hlístic pomocí SSU pro 24 druhů.** Maximum-Likelihood, ultrafast bootstrap 1000, hodnoty nodů - aBayes support / ultrafastbootstrap, číslice za jménem – příslušnost ke kladu, P- parazit, F – volně žijící druh, zakořeněno *Plectus sambesii*.



**Příloha 10: Genealogie genu pro *astacinu*.** Maximum-Likelihood, ultrafast bootstrap 1000, hodnoty nodů - aBayes support / ultrafastbootstrap, číslice za jménem – příslušnot ke kladu, P- parazit, F – volně žijící druh, zakořeněno *Plectus sambesii*

**Příloha 11: Seznam kodonů s detekovanou pozitivní epizodickou selekcí na genu *enol-1* metodou MEME.**

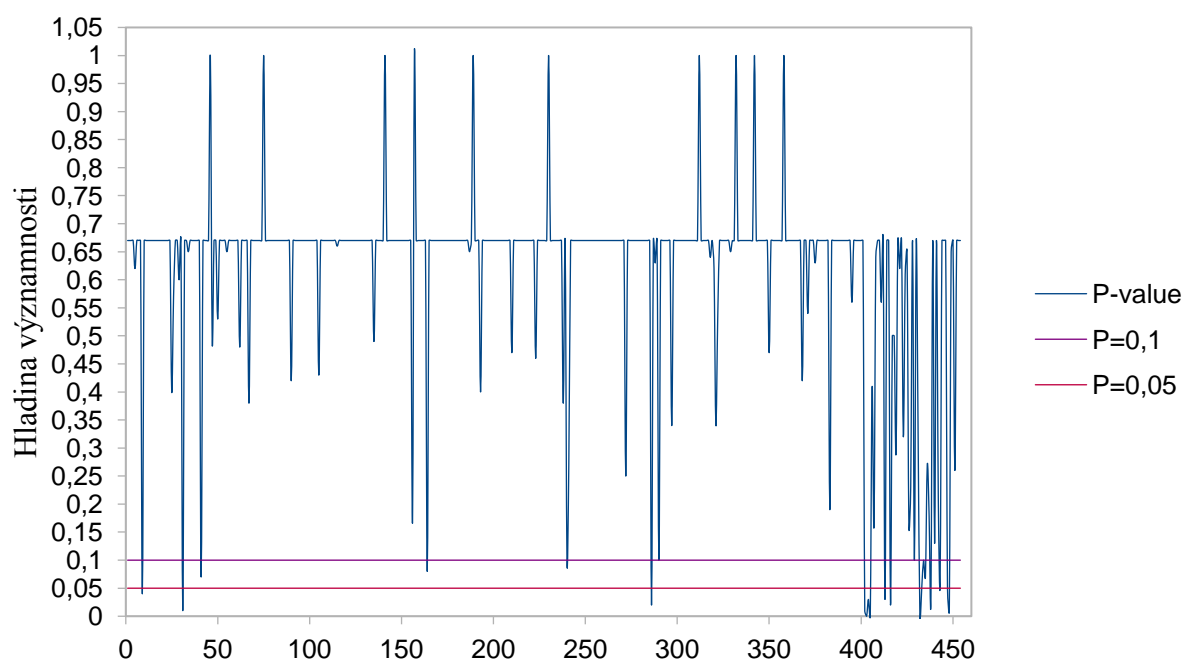
Hladina signifikance	C-terminální doména	N-terminální doména	Bez domény
$P \leq 0,1$	7, 9, 39, 54, 57, 83, 90, 106, 122	197, 198, 199, 200, 202, 203, 204, 205, 207, 208, 209, 249, 257, 271, 272, 273, 274, 276, 284, 289, 329, 330, 350, 357, 383, 394, 401, 407, 410, 424, 426,	2,454
$P \leq 0,05$	7,39,54,57,83,106,122	197, 198,199, 200, 202, 203, 204, 205,207,208, 209, 249, 271, 272, 273, 274, 276, 284, 289, 330, 357, 383, 401, 424	2, 454
$p \leq 0,01$	7, 57, 83, 106,	197, 198, 199, 200, 202, 203, 204, 205. 207, 208, 209, 273, 276, 284, 289, 357, 383,	454



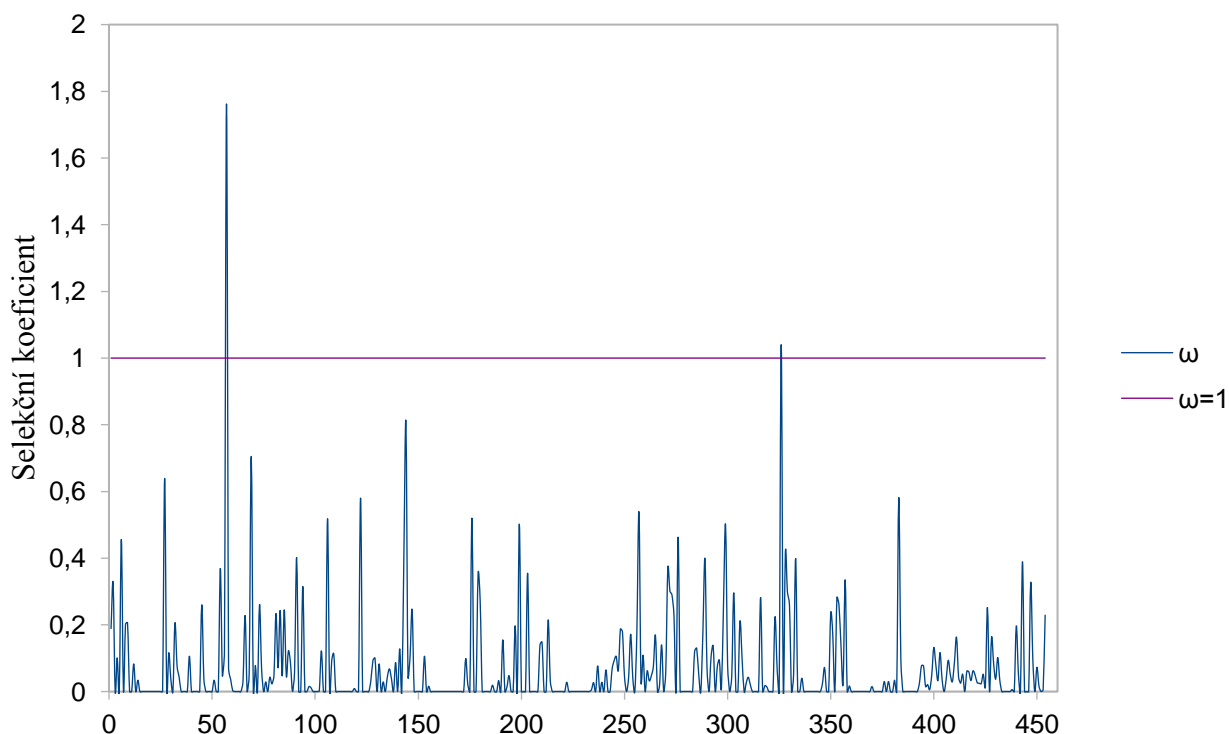
**Příloha 12: Grafické znázornění pozitivně selektovaných míst na proteinové sekvenci *enolázy*.** Modré linie – hladina významnosti pozitivní selekce na kodonu, fialová linie – hladina významnosti 0,1; červená linie – hladina významnosti 0,5.

**Příloha 13: Seznam kodonů s detekovanou epizodickou pozitivní selekcí na genu pro *astacin* metodou MEME.**

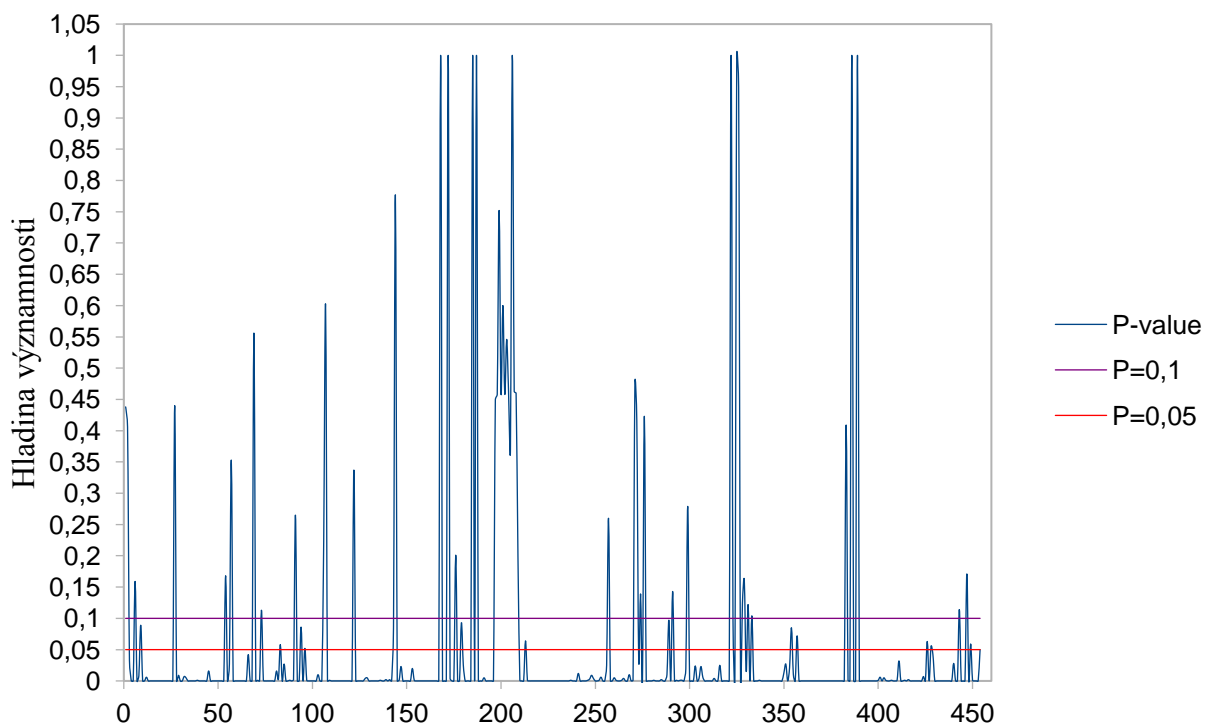
Hladina významnosti	Astacin doména	CUB doména	TSP1 doména	Bez domény
$P \leq 0,1$	41,164	286	402, 403, 404, 405, 413, 416, 432, 433, 435, 438, 443, 447, 448	9, 31
$P \leq 0,05$		286	402, 403, 404, 405, 413, 416, 432, 433, 438, 447, 448	9,31
$P \leq 0,01$			402, 403, 405, 432, 448	31



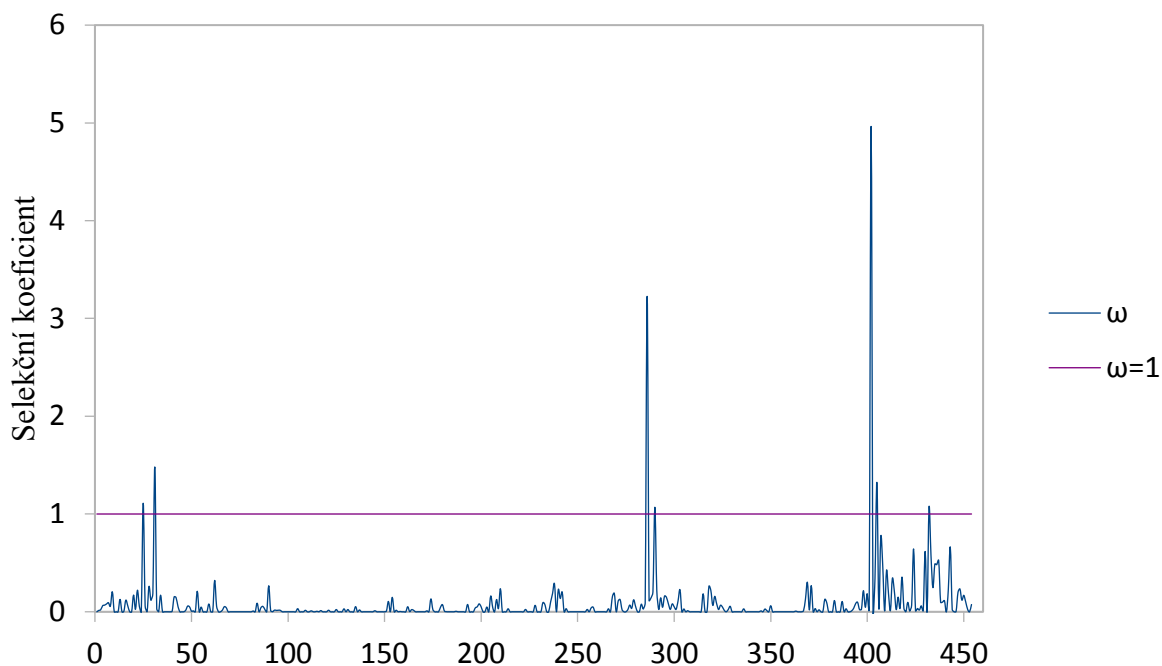
**Příloha 14: Grafické znázornění pozitivně selektovaných míst na proteinové sekvenci *astacinu* metodou MEME. Modré linie – hladina významnosti pozitivní selekce na kodonu, fialová linie – hladina významnosti 0,1; červená linie – hladina významnosti 0,05.**



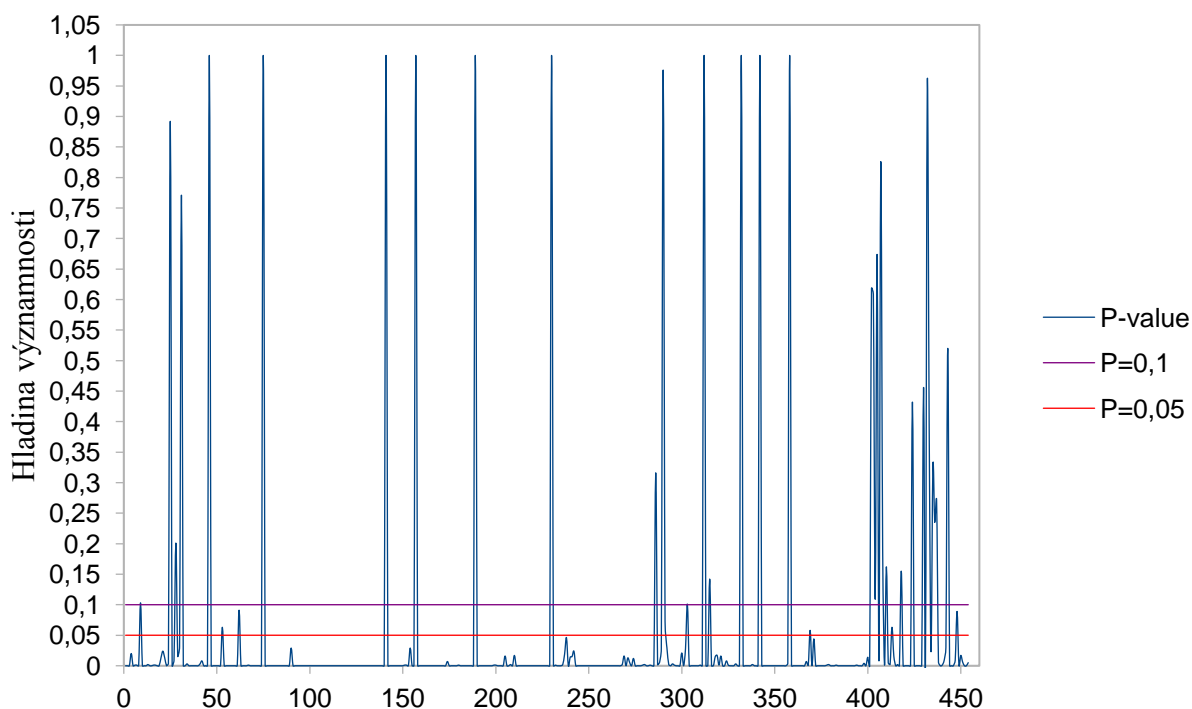
**Příloha 15: Grafické znázornění výsledků metody FEL pro gen *enolázy*.** Modrá linie – hodnoty selekčních koeficientů na jednotlivých kodonech, fialová linie - hraniční hodnota selekčního koeficientu,  $\omega < 1$  negativní selekce,  $\omega > 1$  pozitivní selekce,  $\omega = 1$  neutrální evoluce.



**Příloha 16: Grafické znázornění výsledných hladin významnosti pro přítomnost pervazivní negativní selekce na jednotlivých kodonech genu *enolázy* stanovených metodou FEL.** Modrá linie – hladiny významnosti na jednotlivých kodonech, fialová linie – hladina významnosti 0,1; červená linie – hladina významnosti 0,05.



**Příloha 17: Grafické znázornění výsledků metody FEL pro gen *astacinu*.** Modrá linie – hodnoty selekčních koeficientů na jednotlivých kodonech, fialová linie - hraniční hodnota selekčního koeficientu,  $\omega < 1$  negativní selekce,  $\omega > 1$  pozitivní selekce,  $\omega = 1$  neutrální evoluce.



**Příloha 18: Grafické znázornění výsledných hladin významnosti pro přítomnost pervazivní negativní selekce na jednotlivých kodonech genu *enolázy* stanovených metodou FEL.** Modrá linie – hladiny významnosti na jednotlivých kodonech, fialová linie – hladina významnosti 0,1; červená linie – hladina významnosti 0,05.



**Příloha 19: Detailní výsledky metody aBSREL pro enolázu.** B – optimalizovaná délka větve, LRT – Likelihood Ratio Test,  $\omega < 1$  negativní selekce,  $\omega > 1$  pozitivní selekce,  $\omega = 1$  neutrální evoluce.

Název	B	LRT	p-value	Uncorrected p-value	Distribuce $\omega$ napříč kodony
AcanthocheilonemaviteaeIIIP	0,02	51,15	0	0	$\omega_1 = 0.00$ (96%) $\omega_2 = 44.8$ (3.6%)
MesorhabditisbelariVF	0,3	79,16	0	0	$\omega_1 = 0.0226$ (93%) $\omega_2 = 9.33$ (7.1%)
ParastrongyloidestrichosuriIVP	0,07	74,95	0	0	$\omega_1 = 0.0117$ (99%) $\omega_2 = 7.08$ (1.4%)
PristionchusjaponicusVF	0,12	161,8	0	0	$\omega_1 = 0.0312$ (89%) $\omega_2 = 69.7$ (11%)
Node29	0,09	80,38	0	0	$\omega_1 = 0.00701$ (97%) $\omega_2 = 508$ (2.6%)
Node3	0,04	28,76	0	0	$\omega_1 = 1.00$ (98%) $\omega_2 = 2510$ (2.1%)
Node30	0,19	84	0	0	$\omega_1 = 0.0400$ (95%) $\omega_2 = \infty$ (4.9%)
Node39	0,25	77,15	0	0	$\omega_1 = 0.00$

					(89%) $\omega_2 = 3.69$ (11%)
Node45	0,08	72,03	0	0	$\omega_1 =$ 10000000000 (100%)
Node35	0,07	22,34	0,0002	0	$\omega_1 = 1.00$ (97%) $\omega_2 = \infty$ (3.2%)
Node12	0,07	17,22	0,0023	0,0001	$\omega_1 = 0.00$ (99%) $\omega_2 = 1720$ (1.1%)
OscheiustipulaeVF	0,14	16,12	0,0038	0,0001	$\omega_1 =$ 0.000124 (94%) $\omega_2 = 5.91$ (5.5%)
SteinernemacarpocapsaeIVP	0,13	15,52	0,005	0,0001	$\omega_1 = 0.0298$ (93%) $\omega_2 = 6.32$ (6.9%)
ParapristionchusgibindavisVF	0,07	12,9	0,0184	0,0005	$\omega_1 = 0.0137$ (98%) $\omega_2 = 40.5$ (1.6%)
BrugiamalayiiIIP	0,07	12,12	0,0264	0,0008	$\omega_1 = 0.0313$ (98%) $\omega_2 = \infty$ (1.9%)

**Příloha 20: Detailní výsledky metody aBSREL pro *astacin*.** B – optimalizovaná délka větve, LRT – Likelihood Ratio Test,  $\omega < 1$  negativní selekce,  $\omega > 1$  pozitivní selekce,  $\omega = 1$  neutrální evoluce.

Název	B	LRT	p-value	Uncorrected p-value	Distribuce $\omega$ napříč kodony
OnchocercavolvulusIIP	0.0960	88.5105	0.0000	0.0000	$\omega_1 = 1.00$ (91%) $\omega_2 = \infty$ (9.1%)
Node6	0.1168	13.7645	0.0154	0.0003	$\omega_1 = 0.294$ (98%) $\omega_2 = \infty$ (2.5%)
Node31	0.0417	12.5698	0.0274	0.0006	$\omega_1 = 0.00$ (96%) $\omega_2 = 256$ (3.5%)

**Příloha 21: Výsledky selekční analýzy metodou TreeSAAP pro enolázu.** Pozice vypsaných vlastností jsou shodné s metodou MEME. Číslce udávají intenzitu diverzifikační selekce – 6 mírná, 8 – vysoká,  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*).

Kodon	Větev	Equilibrium constant (ionization of COOH)	Turn tendencies	Hydropathy
9	Node35 -->eBuxylIVp			6**
9	Node37 --> node49			6**
54	Node6 -->ePagibVf			7**
54	Node38 -->eDrmedIIIp		8**	7**
57	Node1 --> node2		7*	
57	Node2 -->eStcarIVp		6**	
57	Node3 -->eParedIVf		7*	
57	Node25 -->eMebelVf		7*	
57	Node38 -->eDrmedIIIp		7*	
90	Node3 --> node29		7*	
90	Node27 --> node41			8**
90	Node38 --> node47			6**
90	Node45 -->eHeglyIVp		8**	7**
106	Node38 --> node47		6**	
106	Node41 -->eBrmallIIIp		7*	
122	Node1 --> node2	6*		
122	Node19 -->eHepolVp	6*		
122	Node25 -->eMebelVf	6*		
122	Node27 --> node41	6*		
122	Node35 -->eBuxylIVp	6*		
122	Node38 -->eDrmedIIIp	6*		
249	Node2 -->eStcarIVp			7**
249	Node11 --> node12			7**
249	Node29 --> node35			6**
249	Node35 --> node37	8**		

249	Node38 --> node39	6*		
249	Node38 -->eDrmedIIIp	8**		
249	Node37 --> node45	8**		
257	Node27 --> node29		6**	
257	Node41 -->eOnvollIIP		6**	
257	Node38 -->eDrmedIIIp		6**	
257	Node45 -->eHeglyIVp	8**		
272	Node1 --> node2		6**	
273	Node38 --> node39		7*	
284	Node2 -->eStcarIVp		6**	
284	Node6 -->ePrjapVf		6**	
284	Node9 --> node11		6**	
329	Node3 --> node5			6**
329	Node14 -->eAgcanVp			6**
329	Node19 -->eHaconVp			6**
329	Node38 --> node39			6**
330	Node6 -->ePagibVf		7*	
330	Node6 -->ePrjapVf		7*	
330	Node25 -->eMebelVf		6**	
330	Node27 -->eCaeleVf		7*	
350	Node2 --> node3			6**
350	node28 -->eParedIVf	8**		
350	Node5 --> node9			8**
357	Node1 --> node2		6**	
357	Node3 -->eParedIVf		6**	
357	Node29 --> node35		6**	
357	Node45 -->eAcnanIVf		6**	
383	Node40 --> node28			6**
383	Node12 --> node34		6**	
426	Node2 -->eStcarIVp		6**	
454	node38 -->eHindiVp	8**		
454	Node45 -->eHeglyIVp		7*	

**Příloha 22: Výsledky selekční analýzy metodou TreeSAAP pro *astacin*.** Pozice vypsaných vlastností jsou shodné s metodou MEME. Číslice udávají intenzitu diverzifikační selekce – 6 mírná, 8 – vysoká,  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*).

Codon	Větev	Power to be at the C-terminal	Alpha-helical tendencies	Equilibrium constant (ionisation of COOH)	Hydropathy
9	Node33 -->mDrmedIIIp	6**			
31	node25 --> node26	7**			
41	node25 -->mPlsamCf	7**			
286	Node2 -->mMebelVf	6**			
286	Node33 -->mDrmedIIIp	7**			7**
402	Node23 --> node24	6**			
404	Node33 -->mDrmedIIIp	7**			
405	Node24 -->mRhabdIVf	7**			
405	Node32 -->mHeglyIVp	7**			
413	Node34 -->mOnvolIIIp	6**			
416	Node41 -->mStcarIVp		6**		
432	Node32 -->mHeglyIVp		6**		
433	Node5 -->mHebacVp	7**			
433	Node24 --> node25	7**			
433	Node24 -->mRhabdIVf	7**			
433	Node33 -->mDrmedIIIp	7**			
435	Node23 --> node24		6**		
435	Node29 -->mAcnanIVf		6**		
435	Node41 --> node42	6**			
443	Node3 --> node19			8**	
443	Node33 -->mDrmedIIIp		6**		
443	Node41 --> node42		6**		
443	Node42 -->mBuxylIVp			8**	
447	Node16 -->mCaeleVf			8**	
447	Node33 -->mDrmedIIIp			8**	
447	Node1 -->mPlsamCf	7**			6**