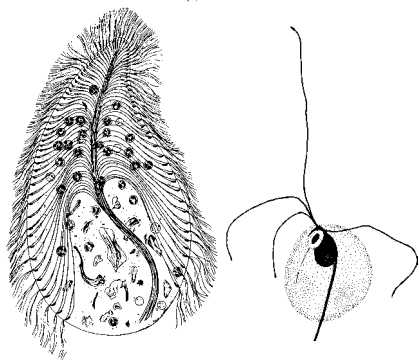
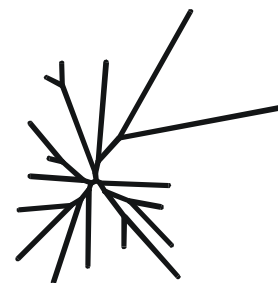




LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ FYLOGENETIKY PROTOZOÍ



TÉMATA MAGISTERSKÝCH A POSTGRADUÁLNÍCH PROJEKTŮ

Příbuzenské vztahy ve skupině Parabasala

Parabasala je velmi diverzifikovaný kmen mikroaerofilních bičíkovců, střevních parazitů a endosymbiontů obratlovců i bezobratlých. Taxonomická klasifikace tohoto kmene, založená převážně na morfologických znacích viditelných ve světelném a elektronovém mikroskopu, vznikla v 60tých a 70tých letech a používá se dodnes. Výsledky analýz založených na sekvencích molekul (zejména 18S rRNA), jasně ukazují, že tento systém neodráží skutečné příbuzenské vztahy mezi skupinami a že bude potřeba jej od základu přestavět. Bohužel dosud nemáme jasnou představu, jak strom této skupiny vypadá. Většina našich znalostí je založena na analýzách 18S rRNA, ve kterých má mnoho větví stromu nízkou statistickou podporu, navíc jsou mohou výsledky těchto analýz zřejmě zapleveleny metodickými artefakty. Možným východiskem z této situace je sekvenovat další geny (např. HSP70, HSP90, GAPDH, RNA polymerázu II), dokud se nenahromadí dostatek dat na konstrukci věrohodného stromu, na jehož základě budeme moci přistoupit k revizi klasifikace.

Hledání kořene stromu skupiny Parabasala pomocí vzácných evolučních událostí

Určit pozici kořene stromu parabasalií pomocí metody „outgroupů“ (sekvencí jiných organismů zařazených do stromu, jejichž pozice by měla označovat místo, kde leží kořen studované skupiny) se ukázalo jako obtížné, protože nejsou známy organismy blízké této skupině a určit polohu vzdálených organismů je problematické. Alternativním přístupem, jak alespoň částečně vymezit polohu kořene stromu, je využití vzácných evolučních událostí u nichž je nepravděpodobná konvergence a reverze – genových duplikací, fúzí a horizontálních přenosů od nepříbuzných organismů. Nalezneme-li pozůstatky po takové události v genomu určité podskupiny parabasalií, je pravděpodobné, že se odehrála u jejich společného předka, který ale nemohl být předkem těch, u kterých nacházíme původní stav tohoto znaku. Protože má tato podskupina výhradního společného předka nemůže se v ní nacházet kořen stromu. U druhu *Trichomonas vaginalis*, nejstudovanějšího organismu kmene Parabasala, bylo dosud nalezeno několik genů, které byly získány horizontálním přenosem z nepříbuzných skupin (alkohol dehydrogenázy, N-acetyl neuraminát lyáza, flp, cytosolický malic enzym). Původ těchto genů u jiných zástupců kmene není znám a tyto informace by mohly podle uvedené logiky naznačit polohu kořene stromu této různorodé skupiny prvoků.

Lov nových a i známých druhů bičíkovců a zjišťování jejich postavení ve fylogenetických stromech

Druhové bohatství parazitických i volně žijících prvoků je obrovské a dosud jen málo prozkoumané. Protože v evoluci eukaryot hrály jednobuněčné organismy zásadní roli, přispívá studium příbuzenských vztahů mezi prvoky k pochopení, jak tato evoluce probíhala. Také v případě jednotlivých dobře definovaných skupin (Parabasala, Eopharyngia, Stramenopila atd.) může získání molekulárních dat jejich dalších zástupců doplnit nebo dokonce i vyřešit jejich vnitřní vztahy. Proto se v našem výzkumu zaměříme na lov

parazitických i volně žijících prvoků, sekvenaci jejich genů a určení jejich postavení na fylogenetických stromech. Z popsaných rodů bychom rádi získali izoláty *Parahistomonas*, *Chilomitus*, *Caviomonas*, *Octomitus*, *Polymastix*, *Trimastix* a další.

Meiotické a mitotické geny diplomonád a enteromonád

Diplomonády jsou anaerobní bičíkovci, pro které je typické zdvojení buněčných struktur včetně jader, takže jejich buňka často vykazuje zrcadlovou souměrnost. Jim blízké příbuzné rody enteromonád, mají buňky jednoduché a je tedy zřejmé, že během evoluce této skupiny doházelo ke zdvojování a zjednodušování buněk. Vývojový mechanismus těchto změn není znám. Určitý vhled do této otázky by mohlo vnést porovnání sekvencí genů ovlivňujících buněčný cyklus a jejich regulačních oblastí mezi zástupci diplomonád a enteromonád.

U těchto prvoků nebylo také dosud pozorováno pohlavní rozmnožování ani meióza. Vzhledem k tomu, že mezi eukaryoty nalezneme jen velmi málo skupin bez sexu, je pravděpodobné, že i u těchto asexuálních organismů sex přítomen je, ovšem v tak malé míře, že jej nelze detekovat. Na existenci pohlavního rozmnožování u diplomonád ukazuje nedávná studie, ve které autoři ukazují přítomnost celé řady meiotických genů v genomu diplomonády *Giardia intestinalis*. Rádi bychom se pokusili nalézt podobné geny u dalších zástupců diplomonád a také u zjednodušených enteromonád. Zároveň bychom chtěli zjistit, zda se jejich exprese měřeno přítomností mRNA, mění v průběhu buněčného cyklu, což by napovědělo, zda a v jaké fázi cyklu k meióze dochází.

Termití trichomonády

Největší diverzita trichomonád (kmen Parabasala) a oxymonád (kmen Oxymonada) je v termitích – vyskytuje se zde asi 300 z celkového počtu 350 dosud popsaných druhů. Do termitů vnikly trichomonády vícekrát nezávisle na sobě (uvažuje se až o 7 liniích). Některé skupiny jsou schopny metabolizovat celulózu a termit bez nich hyne. Nejznámější skupina termitích trichomonád – *Hypermastigotea* (brvitky) – je ve skutečnosti polyfyletická a typická morfologie hypermastigidů (tj. obrovské zmnožení bičíků) vznikla pravděpodobně třikrát nezávisle v řádech *Trichonymphida*, *Spirotrichonymphida* a *Lophomonadida*. Diverzita střevních bičíkovců termitů je dosud známa velmi nedokonale a ačkoli molekulárních dat je k dispozici poměrně dost, většinou není známo, kterému organismu která sekvence ve skutečnosti patří. Cílem práce by bylo molekulárně (tj. sekvenací vybraných genů) charakterizovat jednotlivé linie termitích střevních bičíkovců, především hypermastigidů a vyšších oxymonád. Pro ověření původu sekvencí (tj. komu kterému organismu náleží která sekvence) by se využila metoda hybridizace *in situ*. Ve spolupráci s jinými pracovišti máme k dispozici větší počet druhů termitů.

Vnitro- a mezidruhový polymorfismus v rodu *Trichomitus*

Trichomonády rodu *Trichomitus* se běžně vyskytují ve střevech obojživelníků, plazů, hlodavců a některých bezobratlých. Během práce na rodu *Tetratrichomonas* jsme získali asi 20 izolátů rodu *Trichomitus*. Z našich předběžných výsledků vyplývá, že *Trichomitus batrachorum* z plazů, obojživelníků a pijavek, o kterém se předpokládalo, že se jedná o jeden druh se širokým hostitelským spektrem, je ve skutečnosti velmi složitý komplex několika druhů s výraznou hostitelskou specifikou a možná i s rozdílnou geografickou distribucí. Cílem práce by bylo získat další izoláty rodu *Trichomitus* z přírody, společně s těmi, co již máme, je

molekulárně a morfologicky charakterizovat, popsat jednotlivé druhy komplexu a rozluštit vztahy mezi nimi.

Zjišťování biodiverzity ve vzorcích z extrémních biotopů

V extrémních biotopech, jako jsou hlubinné doly, horké prameny, hlubokomořské průduchy apod., které nejsou z pochopitelných důvodů biologie dobře prostudovány, se může nacházet dosud nepoznaná diverzita organismů všech říší. V současnosti se tyto biotopy studují pomocí enviromentálního sekvenování. Z biotopu se odebere vzorek, ze vzorku se izoluje celková DNA, ze které se metodou PCR amplifikuje vybraný gen. Veškeré produkty reakce se zaklonují do bakteriálního vektoru a jednotlivé klony se sekvenují. Získané sekvenec se pak srovnávají se sekvencemi známých organismů a konstruuje se fylogenetické stromy. Tato metoda již vedla k nalezení sekvencí z několika dosud neznámých eukaryotických linií. Naším cíle je tímto přístupem prozkoumat biodiverzitu v hlubinných dolech v ČR.

Střevní bičíkovci vybrané skupiny hostitelů

Střevní prvoci většiny obratlovců a některých bezobratlých tvoří společenstva s komplexními ekologickými vztahy a jednotlivé příbuzné druhy hostitelů se často liší ve složení střevní mikroflóry. Cílem práce je získat izoláty střevních bičíkovců z velkého počtu divokých druhů modelové skupiny hostitelů (např. žab, ještěřů, hrabavých, hlodavců...) celého světa, charakterizovat je a pokusit se odhadnout míru hostitelské specifiity jednotlivých skupin bičíkovců. Předpokládáme rovněž nález několika nových druhů. Díky našim kontaktům máme přístup k široké škále hostitelských druhů.

Mitochondrie blastocyst a proteromonád

Blastocysty a proteromonády jsou anaerobní endobionti ze skupiny Slopalinida, kteří však mají dobře vyvinutou mitochondrii. O její biochemii a genomu se neví téměř nic. V současnosti běží EST projekt na u *Blastocystis hominis*, z jehož výsledků vyplývá, že by biochemicky její mitochondrie mohla tvořit přechod mezi klasickou mitochondrií a hydrogenosomem, protože se v ní vyskytuje jak pyruvát dehydrogenáza (typický enzym mitochondrie), tak pyruvát ferredoxin oxydoreduktáza (typický hydrogenosomální enzym). V naší laboratoři máme k dispozici axenickou kulturu *Proteromonas lacertae* a mnoho izolátů blastocyst z různých hostitelů. Nabízí se hned několik projektů – biochemická charakterizace těchto mitochondrií, EST projekt na *Proteromonas* nebo na bazálních izolátech blastocyst, snad i sekvenace mitochondriálního genomu *Proteromonas* a Blastocysty.