

Charles University
Faculty of Science
Department of Parasitology



Martin Kostka

Ph.D. thesis

MOLECULAR PHYLOGENY OF SELECTED PROTISTS

(MOLEKULÁRNÍ FYLOGENEZE VYBRANÝCH PRVOKŮ)

Thesis supervisor: Doc. RNDr. Jaroslav Flegr, CSc.

Martin Kostka

CURRICULUM VITAE

ADDRESS: Department of Parasitology
Faculty of Science
Charles University
Viničná 7
120 00 - PRAGUE 2
Czech Republic
TEL.: (#420)221951821
FAX: (#420)224919704
E-MAIL: mkostka@centrum.cz

PERSONAL DATA:

Birth date: August 14, 1981
Birthplace: Humpolec, Czech Republic

EDUCATION:

1999 – 2004: Master degree in Biology, Faculty of Science Charles University, thesis: Phylogeny of opalinids and their relatives.

2004 – Postgraduate study of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, thesis: Molecular phylogeny of selected protists.

Introduction

Although modern phylogenetics enabled us to understand the evolution of many traditionally problematic groups, there are still some gaps and uncertainties in our knowledge of the whole “tree of life” topology. One of the areas where the gaps are relatively abundant is the eukaryote branch. The term “eukaryotes” is used here as the equivalent of “numerous and diverse lineages of protists plus a few multicellular groups”. The fact that our knowledge of protist phylogeny is not as robust as the knowledge of phylogeny of animals or plants, is not very surprising. First, there is a relative lack of interest. Second, unicellular organisms are often not so easily obtained and manipulated, thus the quantity of samples is lower. Third, there are many isolated, very old lineages of protists and the phylogeny-reconstructing methods may have problems with their substitutionally saturated sequences.

The author wants to introduce his and his colleagues' attempts to solve phylogenetic position of several protist taxa in this work. These are mainly parasitic/commensal protists. Opalinids are long known frog commensals. They are large, multiciliated and multinucleated. Nonetheless, the phylogenetic position of these interesting creatures was long uncertain. In 1985, Patterson noticed similarities in the ultrastructure of opalinids and a group of intestinal flagellates, the proteromonadids. He postulated that the two families belong to a common group (Slopalinida) and also that the latter is paraphyletic (i.e., that opalinids evolved from within proteromonadids). There are

molecular data available of *Proteromonas* only. In phylogenetic analyses, its sister group was rather enigmatic protist, *Blastocystis*. It is non-flagellated spherical organism inhabiting intestine of a wide spectrum of hosts. Another interesting protist group with hitherto no molecular data available is *Chilomastix*, a flagellate belonging among Eopharyngia with *Retortamonas* and diplomonads (including enteromonads). *Chilomastix* was believed to be a sister group of *Retortamonas*, but our results are in disagreement with this assumption.

Recently, the author collaborated on the reconstruction phylogeny of aquatic amoebae. They are more tricky than most of other eukaryotes as their identification might be problematic. It is, however, crucial for phylogenetics. There are several examples known of misidentified amoebae a sequence of which was used in phylogenetic analyses. The authors of the two “amoebae papers”, on which the author of this thesis participated, dedicated great effort to determine and morphologically characterise the studied amoebae species.

Another contribution of the author and his colleagues is programming of the program SlowFaster, a tool for slow-fast analysis of sequence datasets. Slow-fast analysis is a method that is able to suppress negative effects of substitution saturation of alignment positions. Although lowering the risk of some artifacts, such as long branch attraction artifact, is very useful, this method can be quite time-consuming when applied manually.

Aims of the thesis

1. Use the methods of molecular phylogenetics to verify Patterson's hypotheses based on morphology:
 - Are slopalinids (Opalinidae + Proteromonadidae) a monophyletic group?
 - Are Proteromonadidae paraphyletic?
 - Do Slopalinids belong among stramenopiles?
2. Elucidate the position of *Blastocystis* with regard to Slopalinida
3. Check the phylogenetic position of *Chilomastix* within Eopharyngia and Fornicata.
4. Obtain and analyse molecular data from morphologically carefully characterised amoebae.
5. Develop a software that will automate the slow-fast analysis that will allow deeper analyses of phylogenetic position of long-branched protists or other organisms.

Results

1. We sequenced SSU rDNA of *Protoopalina intestinalis*, representative of opalinids, and *Karotomorpha*, a proteromonadid with hitherto no molecular data available. Analyses of these data confirmed close affinity of the two families and also the paraphyly of proteromonadids – the resulting topology was (Proteromonas + (Karotomorpha + Protoopalina)). Slopalinids belonged within stramenopiles in our analyses.
2. In our analyses, the genus *Blastocystis*, genetically quite variable, formed a sister group of slopalinids within the group of Stramenopila.
3. We sequenced SSU rDNA of two *Chilomastix* isolates. The sequences differed substantially in length and composition, but formed a monophylum in resulting phylogenetic trees. Surprisingly, *Retortamonas* was not reconstructed as a sister group of *Chilomastix*, but the two genera formed a paraphyletic group from which the diplomonads evolved (with *Retortamonas* closer to diplomonads). This result implies that the ancestor of diplomonads (including enteromonads) was retortamonadid-like.
4. We sequenced and analysed SSU rDNA of two morphologically well defined amoebae, *Mayorella gemmifera* and *Saccamoeba limax*. We have found that another sequence ascribed to *S. limax* and used in some analyses probably originates from a

misidentified organism.

5. We have programmed the program SlowFaster. It is a unique user-friendly tool leading a user step-by-step through the whole process of slow-fast analysis. We believe that this tool will allow other authors to better exploit their datasets.

Acknowledgements

The work was supported by the following grants and projects:

GA ČR:

206/05/0371

GA UK:

269/2004/B-BIO/PrF

MŠMT:

MSM 0021620828

MSM 6007665801

MSM 6007665806

Institute of Parasitology AS CR:

Z60220518

LC522

List of Publications

Papers:

Kostka M, Hampl V, Cepicka I, Flegr J (2004): Phylogenetic position of *Protoopalina intestinalis* based on SSU rRNA gene sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 220-224.

Kostka M, Cepicka I, Hampl V, Flegr J (2007): Phylogenetic position of *Karotomorpha* and paraphyly of Proteromonadidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 1167-1170.

Cepicka I, **Kostka M**, Uzlíková M, Kulda J, Flegr J (2008): Non-monophyly of Retortamonadida and high genetic diversity of the genus *Chilomastix* suggested by analysis of SSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 770-775.

Dyková I, Pecková H, **Kostka M** (2008): Introduction of *Mayorella gemmifera* Schaeffer, 1926 into phylogenetic studies of Amoebozoa. (Sent to *Acta Protozoologica*).

Dyková I, **Kostka M**, Pecková H (2008): SSU rRNA-based phylogenetic position of the genus *Saccamoeba* Frenzel, 1892 (Amoebozoa). (Sent to *Acta Protozoologica*).

Kostka M, Uzlíková M, Čepička I, Flegr J (2008): SlowFaster, a user-friendly program for slow-fast analysis and its application on phylogeny of *Blastocystis*. *BMC Bioinformatics* (accepted).

Selected abstracts:

Kostka M, Hampl V, Čepička I, Flegr J (2005): Phylogenetic position of *Protoopalina intestinalis* based on SSU rDNA sequence. *International Congress of Protozoology 2005*. Guangzhou, China.

Kostka M, Čepička I, Hampl V, Flegr J (2006): Phylogeny of slopalinids. 16th ISEP Meeting, Wroclaw, Poland.

Examination committee:

prof. RNDr. Jaroslav Kulda, C.Sc. (head)

Charles University, Prague

prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Charles University, Prague

prof. RNDr. Petr Volf, Csc.

Charles University, Prague

prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Charles University, Prague

doc. Ing. Miroslav Oborník, Ph.D.

Biology Centre of the ASCR, České Budějovice

RNDr. Eva Nohýnková, Ph.D.

Charles University, Prague

RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Charles University, Prague

Reviewers:

Alastair G.B. Simpson, PhD.

Dalhousie University, Halifax

Doc. Ing. Miroslav Oborník, Ph.D.

Biology Centre of the ASCR, České Budějovice

The thesis will be defended on Monday, 15th September, 2008, 13:00
at the Department of Parasitology, Charles University, Viničná 7,
Prague 2, Czech Republic.

Martin Kostka

ŽIVOTOPIS

Adresa: Katedra parazitologie
Přírodovědecká fakulta
Karlova Univerzita
Viničná 7
120 00 - Praha 2
Česká republika
TEL.: (#420)221951821
FAX: (#420)224919704
E-MAIL: mkostka@centrum.cz

Osobní údaje:

Datum narození: August 14, 1981

Místo narození: Humpolec, Czech Republic

Vzdělání:

1999 – 2004: Magisterské studium biologie na PřF UK. Diplomová práce: Fylogenetické postavení opalin a příbuzných prvoků v systému eukaryot.

2004 – Postgraduální studium v oboru parazitologie na PřF UK. Dizertační práce: Molekulární fylogeneze vybraných prvoků.

Úvod

Ačkoli díky moderní fylogenetice rozumíme evoluci mnoha tradičně problematických skupin, v celkovém obrazu „stromu života“ stále zůstávají bílá místa. Jednou z takových oblastí, kde jsou mezery v našem poznání fylogeneze hojnější, je větvení v rámci eukaryot. Pojem „eukaryota“ je zde použit ve významu „početné a rozmanité linie prvoků plus pár mnohobuněčných skupin“. To, že fylogenezi prvoků nerozumíme tak dobře jako třeba fylogenezi rostlin nebo živočichů, není zcela překvapivé – chybí zde takový zájem o prvoky, navíc jednobuněčné organizmy se často hůře získávají a špatně se s nimi manipuluje, takže není k dispozici takový počet vzorků. V neposlední řadě jsou ale problémy způsobeny také tím, že v rámci prvoků najdeme prastaré, izolované linie, jejichž sekvence mohou být substitučně saturované a působit tak vznik artefaktů při užití molekulárně fylogenetických metod.

Cílem autora je představit v této práci příspěvek týmu (resp. dvou týmů), jehož (jichž) je členem, k vyřešení problematiky fylogenetického postavení několikataxonů prvoků. Jedná se především o parazitické či komenzální prvoky. Opalinky jsou dlouho známí komenzálové žab. Jsou velké, mnohobičíkaté a mnohojaderné. Přesto, že jsou zvláštní a zajímavé, jejich fylogenetická pozice byla dlouho nejasná. Až v r. 1985 si Patterson povšimnul podobností v ulatrastruktuře opalinek a jedné skupiny střevních bičíkovců, proteromonadidů. Zařadil obě čeledi do jedné skupiny, Slopalinida, a

dále vyslovil domněnku, že čeleď Proteromonadidae je parafyletická – že se z ní vyvinuly opalinky. Molekulární data však byla k dispozici pouze z prvoka rodu *Proteromonas*. Ve fylogenetických analýzách se jako její sesterská skupina objevil poněkud záhadný prvek *Blastocystis*. Jedná se o bezbičíkaté sférické organismy žijící ve střevech širokého spektra hostitelů. Jinou zajímavou skupinou prvoků pro něž dosud nebyla k dispozici žádná molekulární data, je *Chilomastix*, bičíkovec patřící mezi Eopharyngia spolu s rodem *Retortamonas* a diplomonádami (včetně enteromonád). Věřilo se, že *Chilomastix* a *Retortamonas* jsou si vzájemně sesterské, naše výsledky však tento předpoklad nepotvrdily.

V poslední době spolupracuje autor na problematice fylogeneze vodních améb. Ty jsou oproti jiným prvokům zrádnější I díky tomu, že jejich přesná determinace může být problematická. Je známo několik případů, kdy byly ve fylogenetických analýzách použity sekvence z nesprávně určených améb. Autoři dvou článků o amébách, na nichž se podílel I autor této práce, věnovali značné úsilí právě determinaci a morfologické charakterizaci studovaných améb.

Dalším příspěvkem autora a jeho spolupracovníků je naprogramování programu SlowFaster, což je nástroj pro slow-fast analýzu datasetů. Slow-fast analýza je metoda potlačující negativní vliv substituční saturace pozic v alignmentech. Ačkoli snížení rizika vzniku artefaktu přitahování dlouhých větví je velmi užitečné, je tato dosti časově náročná, je-li aplikována manuálně.

Cíle práce

1. S využitím molekulárně fylogenetických metod ověřit platnost Pattersonových hypotéz založených na morfologických datech:
 - Jsou slopalinidi (Opalinidae + Proteromonadidae) monofyletickou skupinou?
 - Je čeleď Proteromonadidae parafiletická?
 - Patří Slopalinida mezi Stramenopila?
2. Vyjasnit pozici *Blastocystis* vzhledem k slopalinidům
3. Ověřit fylogenetickou pozici rodu *Chilomastix* v rámci skupin Eopharingia a Fornicata
4. Získat a analyzovat molekulární data morfologicky dobře charakterizovaných améb
5. Vyvinout program pro automatizaci slow-fast analýzy, jež umožní hlubší analýzu fylogenetické pozice prvoků a jiných organismů s dlouhými větvemi

Výsledky

1. Získali jsme sekvenci SSU rDNA z prvoka *Protoopalina intestinalis*, reprezentujícího opalinky, a *Karotomorpha*, což je proteromonadid z něhož zatím nebyla žádná molekulární data k dispozici. Analýzy těchto dat potvrdily blízkou příbuznost obou skupin I parafylii proteromonadidů – výsledná topologie byla (*Proteromonas* + (*Karotomorpha* + *Protoopalina*)). Slopalinidi se v našich analýzách zařadili do skupiny Stramenopila.
2. Blastocystis, geneticky poměrně variabilní rod, se v našich analýzách vyskytoval jako sesterská skupina k řádu Slopalinida v rámci stramenopil.
3. Získali jsme sekvenci SSU rDNA ze dvou izolátů rodu *Chilomastix*. Obě sekvence se od sebe vzájemně dosti lišily délkou i složením, ale přesto ve fylogenetických stromech tvořily dobře podpořenou monofyletickou skupinu. Překvapivě však *Retortamonas* nebyla sesterskou skupinou tohoto rodu, byla bližší diplomonádám – čeleď Retortamonadidae zahrnující oba tyto rody je tedy zřejmě parafyletická. Takový výsledek by znamenal, že prapředek diplomonád (včetně enteromonád) byl retortamonadidního typu.
4. Získali jsme sekvence SSU rDNA dvou morfologicky dobře charakterizovaných améb, *Mayorella gemmifera* a *Saccamoeba limax*. Ukázali jsme, že sekvence připisovaná *S. limax* a používaná v některých fylogenetických analýzách, patří zřejmě

špatně určenému organismu.

5. Vytvořili jsme program SlowFaster. Jde o unikátní jednoduše ovladatelný nástroj, který uživatele provede celým procesem slow-fast analýzy. Věříme, že pomůže dalším autorům lépe využít jejich data.

Grantová podpora

Tato práce byla financována následujícími granty a projekty:

GA ČR:

206/05/0371

GA UK:

269/2004/B-BIO/PrF

MŠMT:

MSM 0021620828

MSM 6007665801

MSM 6007665806

Parazitologický ústav AV ČR:

Z60220518

LC522

Seznam publikací

Články:

Kostka M, Hampl V, Cepicka I, Flegr J (2004): Phylogenetic position of *Protoopalina intestinalis* based on SSU rRNA gene sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 220-224.

Kostka M, Cepicka I, Hampl V, Flegr J (2007): Phylogenetic position of *Karotomorpha* and paraphyly of Proteromonadidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 1167-1170.

Cepicka I, **Kostka M**, Uzlíková M, Kulda J, Flegr J (2008): Non-monophyly of Retortamonadida and high genetic diversity of the genus *Chilomastix* suggested by analysis of SSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 770-775.

Dyková I, Pecková H, **Kostka M** (2008): Introduction of *Mayorella gemmifera* Schaeffer, 1926 into phylogenetic studies of Amoebozoa. (Sent to *Acta Protozoologica*).

Dyková I, **Kostka M**, Pecková H (2008): SSU rRNA-based phylogenetic position of the genus *Saccamoeba* Frenzel, 1892 (Amoebozoa). (Sent to *Acta Protozoologica*).

Kostka M, Uzlíková M, Čepička I, Flegr J (2008): SlowFaster, a user-friendly program for slow-fast analysis and its application on phylogeny of *Blastocystis*. *BMC Bioinformatics* (accepted).

Vybrané konferenční příspěvky (abstrakty):

Kostka M, Hampl V, Čepička I, Flegr J (2005): Phylogenetic position of *Protoopalina intestinalis* based on SSU rDNA sequence. *International Congress of Protozoology 2005*. Guangzhou, China.

Kostka M, Čepička I, Hampl V, Flegr J (2006): Phylogeny of slopalinids. 16th ISEP Meeting, Wroclaw, Poland.

Obhajoba

Komise:

prof. RNDr. Jaroslav Kulda, C.Sc. (předseda)

Karlova univerzita, Praha

prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Karlova univerzita, Praha

prof. RNDr. Petr Volf, Csc.

Karlova univerzita, Praha

prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Karlova univerzita, Praha

doc. Ing. Miroslav Oborník, Ph.D.

Biologické centrum AV ČR, České Budějovice

RNDr. Eva Nohýnková, Ph.D.

Karlova univerzita, Praha

RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Karlova univerzita, Praha

Oponenti:

Alastair G.B. Simpson, PhD.

Dalhousie University, Halifax

Doc. Ing. Miroslav Oborník, Ph.D.

Biologické centrum AV ČR, České Budějovice

Práce bude obhajována v pondělí 15. září 2008 ve 13:00 na katedře parazitologi PřF UK, Viničná 7, Praha 2, ČR.