



Dr Alistair C. Darby
Lecturer in Genomics

Institute of Integrative Biology
University of Liverpool
Biosciences Building
Liverpool
L69 7ZB



T +44 151 795 4557

M +44 754 715 6668

E acdarby@liv.ac.uk

<http://www.liv.ac.uk>

<http://www.liv.ac.uk/integrative-biology/>
www.aqi.liv.ac.uk/~acdarby

Sunday, 18 May 2014

RE: Origins of bacterial endosymbionts in arthropods Ph.D. Thesis by Tomáš Chrudimský

FAO: Examination board of the Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice.

The thesis has a broad remit and covers the area of the origins of symbionts in arthropods. It has to be stated that this is a large area for research and an ambitious title.

The thesis contains three papers of a high standard:

1. Husník F, **Chrudimský T**, Hypša V., 2011. Multiple origins of endosymbiosis within the Enterobacteriaceae (γ -Proteobacteria): convergence of complex phylogenetic approaches. BMC Biology Dec 28;9:87. doi: 10.1186/1741-7007-9-87.
2. **Chrudimský T**, Husník F, Nováková E., Hypša V., 2012. Candidatus Sodalis melophagi sp. nov.: Phylogenetically Independent Comparative Model to the Tsetse Fly Symbiont Sodalis glossinidius. PLoS One. 2012;7(7):e40354. doi: 10.1371/journal.pone.0040354. Epub 2012 Jul 17. (IF=3.73)
3. Víchová B., Majláthová V., Nováková M., Stanko M., Hviščová I., Pangráčová L., **Chrudimský T**, Čurlík J., Petko B., 2013. Anaplasma infections in ticks and reservoir hosts from Slovakia, Central Europe. Infection, Genetics and Evolution. In press. (IF=2.768)

Introduction and Results.

The general introduction was a summary of the current knowledge of symbiont diversity and their origins - this is not any easy task and means that not all areas of this large subject can be covered. The section on the "Phylogenetic obstacles in symbiont research" was particularly strong.

Minor issues:

I didn't think that combining "Introduction and results" really worked as the sections where not always logical in their flow.

I didn't find Table 1 (List of insect endosymbionts) very helpful. It lacked references and the formatting was not good.

Section 1.3 Widely distributed and emerging lineages of symbionts is missing modern bacterial taxonomy - this needs to be fixed for example (need not be full): Phylum: Tenericutes, Class: Mollicutes, Order: Entomoplasmatales, Family: Spiroplasmataceae, Genus: Spiroplasma.

Discussion and Conclusions

I enjoyed this section and the science was interesting - however, I would comment that *A. phagocytophilum* and all Rickettsiales are obligate intracellular bacteria so this must be taken into account when thinking about their evolution as bacterial pathogens and symbionts.

It is my opinion that the treatment the symbiont/pathogen dynamic is not complete, so a few of my questions are directed so the student can explain this more fully.

Questions sections 1 and 2 :

1. Where does pathogenicity stop and symbiosis start? Is this a function of host or symbiont?
2. The candidate uses the term ancient - what does he mean by this?
3. The candidate discusses the differences in the number of T3SS copies, he discusses the impact of this on the bacteria's ability to interact with a host. but why does *B. tori* have one T3SS?
4. How does this relate to *B. tori*'s relationship with the hosts?
5. Does *Sodalis HS* have Type 1 fimbriae if not why not? if so why?
6. The idea of Type 1 fimbriae been important in Horizontal transmission is interesting. Assuming this is correct what other insect symbionts should have Type 1 fimbriae?

Paper 1.

Tomáš Chrudimský compiled and analysed the AT/GC reduced matrices.

I think this is a very important contribution to the debate about the origins of symbiotic bacteria. I can not fault this work. This paper cuts right to the heart of the problem and finds a solution that help us understand the problems we face in reconstructing symbiont phylogenies. I wish all symbiont evolution studies where as well done as this one.

This paper shows that symbiotic partners generally have resulted form a similar pattern of evolution.

Question: I often point authors to this paper when reviewing papers with "poor" symbiont phylogenies - what is the safest phylogenetic approach for our "learned" peers to uses when reconstructing symbiont evolution?

Paper 2.

Tomáš Chrudimský annotated, analysed T3SS sequences and participated in writing the paper; phylogenetic analyses, isolation and culturing of the *S. melophagi* and light and electron microscopy.

The *Sodalis* symbiosis are important models of symbiosis and it is not common to be able to describe such and interesting and parallel to tsetse. I love the range of techniques used in this paper, from microscopy (which is excellent) to genome analysis. The culture viable nature of this symbiont makes it important as a comparator to

Sodalis glossinidius. This is a very strong and relevant paper. It strikes me that we still have a lot to learn about this interesting group of bacteria.

Question: What data are we missing for this group to help us understand how many times has Symbiosis/Pathogenicity has evolved in this genus?

Paper 3.

Tomáš Chrudimský performed phylogenetic analyses.

The phylogenetic part of this study was essential to understanding the data. The key finding been that the European rodents do not harbour *A. phagocytophilum* strains with a strong potential to be zoonotic like those from the USA. It is easy to over look that importance of the good phylogenetics, but poor methods can lead to a lot of problems.

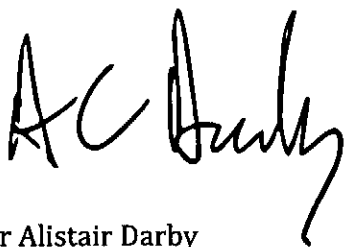
Question: What difference would whole genome data for all strains make to studies like this? Do we need to sequence the full genomes of *A. phagocytophilum* strains in this study and ones like it?

General minor issue

The standard of English in some sections was not as high as I would expect. I have marked up the PDF version of the thesis to show some of the issues. There were a number of issues with plural grammar. It looked to me as if a number of the issues should have been picked up by an English spellchecker.

Final Recommendation:

It is my opinion that these thesis show the candidate Tomáš Chrudimský to be a well rounded scientist. Not only has he demonstrated his ability to preform phylogentic methods to a high standard (MS1,MS2,MS3), but also a good experimental biologist (MS2). He shows the ability to work with a others as a team member (MS1,MS3) and to lead research (MS2). I recommend that this thesis should PASS. The thesis was completed to an good international standard. Allowing for differences in thesis formats between institutions this thesis would pass at my own University with "revision". The "revisions" at the University of Liverpool would be used to give the student the chance to correct the English errors and make small minor adjustments to the thesis structure and content.



Dr Alistair Darby
University of Liverpool

V Praze 8. května 2014

Posudek k disertační práci Tomáše Chrudimského:
ORIGIN OF BACTERIAL ENDOSYMBIONTS OF ARTHROPODS

Dizertační práce Tomáše Chrudimského je založena na třech publikacích. Dvě z nich jsou si tematicky velmi blízké (MS1 a MS2) a zabývají se endosymbionty hmyzu a jejich fylogenezí. Třetí práce představuje v podstatě skřínink rezervoárových hostitelů klíštětem přenosné bakterie *Anaplasma phagocytophilum* a je tematicky mírně odlišná. Tomáš Chrudimský je prvním autorem druhé publikace, na jejímž vzniku měl podle doložených informací zásadní podíl, a na jejímž sepsování se také významně podílel. V textu disertace navíc prezentuje nebo zmiňuje dosud nepublikované výsledky: porovnání sekrečního systému T3SS dalších dvou kmenů *Sodalis*, sekvenace genomů ASPE-3 fágů a identifikace tří endosymbiontů *Triaxagus meybohmi*. Domnívám se, že množství prezentovaných výsledků je dostatečné pro doktorskou práci.

Práce je zpracována kvalitně, jazyková úroveň textu je vysoká a obsahuje minimum překlepů, které zde neuvádím. Moje největší výtky směřuje k obrázkům a jejich legendám. Zejména obrázek 1, ale i obrázek 2 jsou poměrně komplikované a v legendě nedostatečně vysvětlené. Například jsem se nedozvěděl, co znamenají barevné boxy na obrázku 1 a proč na obrázku 2 je znázorněna pouze část genomu mezi 2 a 5 kilo bázemi. V tabulce 2 zase nejsou uvedeny jednotky velikosti genomů (kB, MB).

K práci mám několik dotazů. Začnu těmi konkrétnějšími a postupně přejdu obecnějšími, na které ani nečekám zcela jednoznačnou odpověď, ale kladu je, protože mě zajímá názor autora na některé fenomény spojené se vznikem endosymbióz a organel.

1. Na straně 3 autor zmiňuje metodu „temperature gradient gel electrophoresis“ na separaci fragmentů o stejné velikosti, ale rozdílného GC obsahu. S touto metodou jsem se ještě nesešel. Byl bych rád, kdyby mi autor mohl více přiblížit její princip a technické provedení.
2. Na straně 11 popisuje autor situaci dvou v podstatě identických fágů s téměř shodnými genomovými sekvencemi. Jeden se stabilně vyskytoval v linii mšic, přesněji řečeno v jejich S-symbiontech *Hamiltonella defensa*, zatímco druhý se ze svých hostitelů opakovaně ztrácel. Autor se podivuje, čím je tento rozdíl způsoben. Zajímalo by mě, zda to nemůže být způsobeno odlišností hostitelů? Kolik je známo o odlišnostech mezi dvěma zmiňovanými liniemi mšic, či jejich hamiltonel?
3. V přehledu bakteriálních linií, ze kterých se rekrutují hmyzí endosymbionti, figuruje i rod *Rickettsia*. Mezi rickettsiemi jsou, jak známo, významné lidské a hospodářské patogeny přenášené členovci (*Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*). Zajímalo by mě, jestli jsou tyto patogenní druhy nějak blíže příbuzné S- nebo P-symbiontům svých vektorů?
4. Je znám případ, kdy by se vážně hypotetizovalo o tom, že se bakteriální symbiont zcela „rozpuštěl“ ve svém hostiteli? Například, že by hostitel obsahoval dobře detekovatelnou

sadu bakteriálních genů, které by mu propůjčovaly nové schopnosti, a přitom by již nebyl v jeho cytoplasmě patrný žádný symbiont.

5. Na závěr si neodpustím dotaz, který nekladu poprvé, a který je velmi blízký tématu práce nahlas zamyslet na téma kudy vede hranice mezi symbiontem a organelou? Je vůbec smysluplné rozlišovat mezi endosymbionty a organelami nebo bychom od tohoto rozlišování měli upustit?

Na závěr bych chtěl konstatovat, že podle mého názoru jak vědecká hodnota, tak i zpracování práce vyhovuje požadavkům kladeným na disertační práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.


Vladimír Hampl