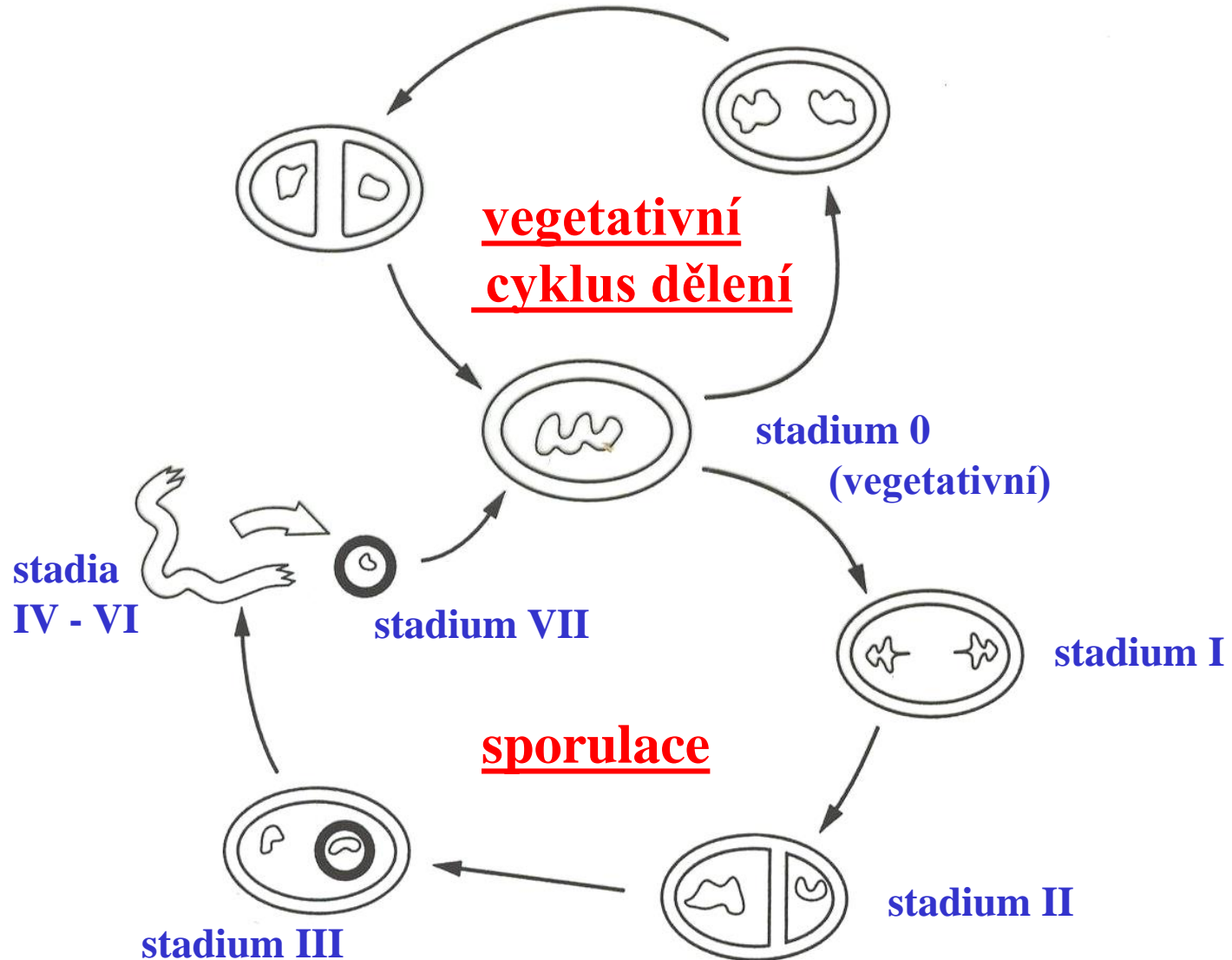


... v hlavní roli :

bakterie ?!

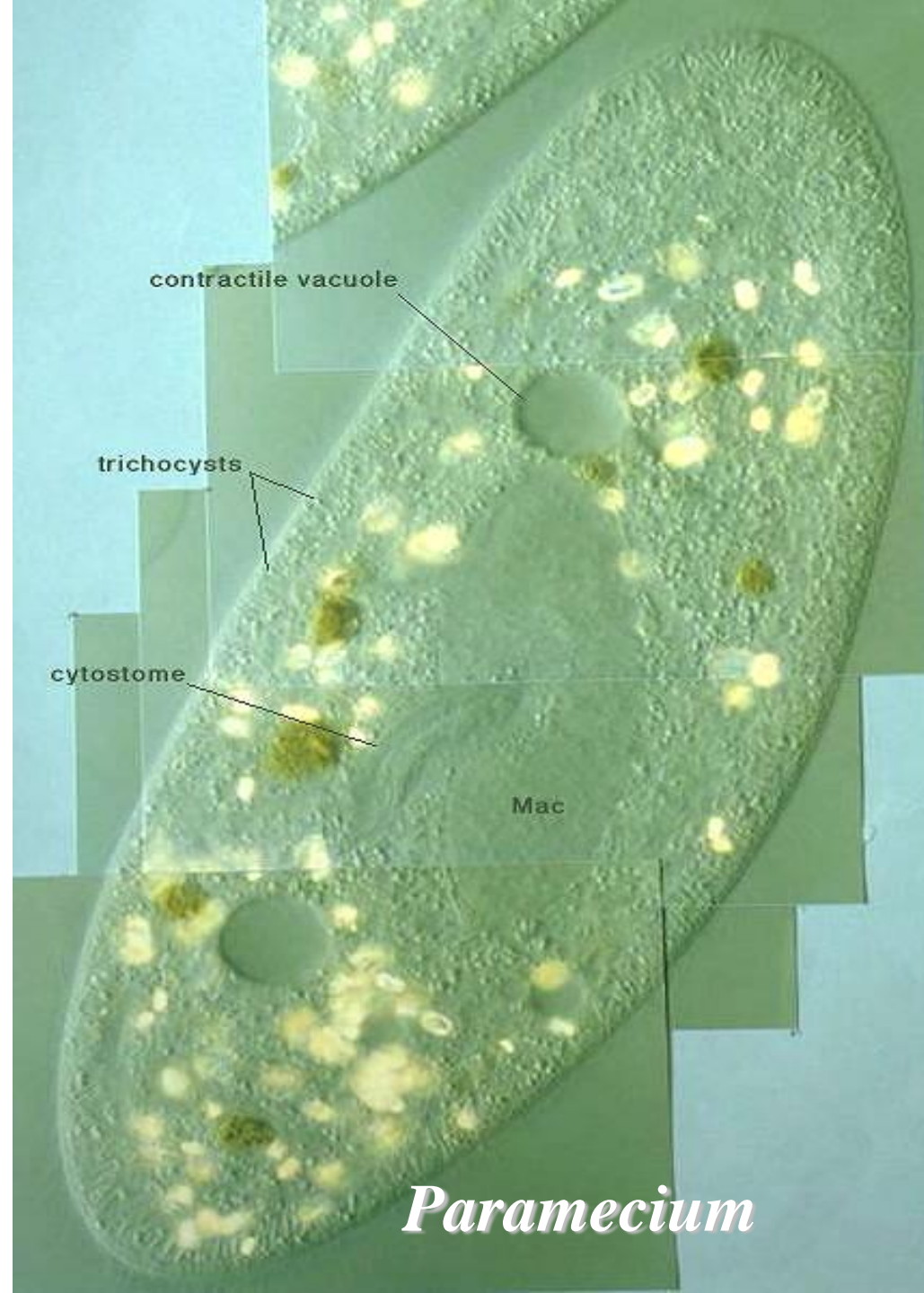
Jednoduchý model diferenciace : sporulace *Bacillus subtilis*



- ♣ sporulace je reakcí na signály z prostředí (hladovění, stres) a zahrnuje signální kaskádu, která vrcholí kinázovou fosforylací transkripčního regulátoru Spo0A, který interaguje se sigma-faktory “vegetativní” RNA polymerázy a mění její aktivitu, což vede k expresi nové sady “sporulačně-specifických” genů *SpoI-VII* (analogie s indukcí u eukaryot)
- ♣ sporulace zahrnuje sekvenční aktivaci odlišných skupin transkripčních regulátorů (analogie s genetickou kaskádou vývoje u drosofily)
- ♣ sporulace ústí ve tvorbě dvou odlišných buněčných typů asymetrickým dělením: mateřská a presporická buňka mají stejný genom, ale exprimují odlišné geny a mají odlišné fenotypy (jednoduchá forma diferenciacce)
- ♣ sporulace zahrnuje reorganizaci buněčné stěny (analogie s pylovým zrnem, *cell within the cell*)
- ♣ když se spóra uvolňuje, mateřská buňka se podrobuje lýze : součástí vývojového programu je buněčná smrt (analogie s apoptózou)

... v hlavní roli :

prvoci



kontrakční
vakuola

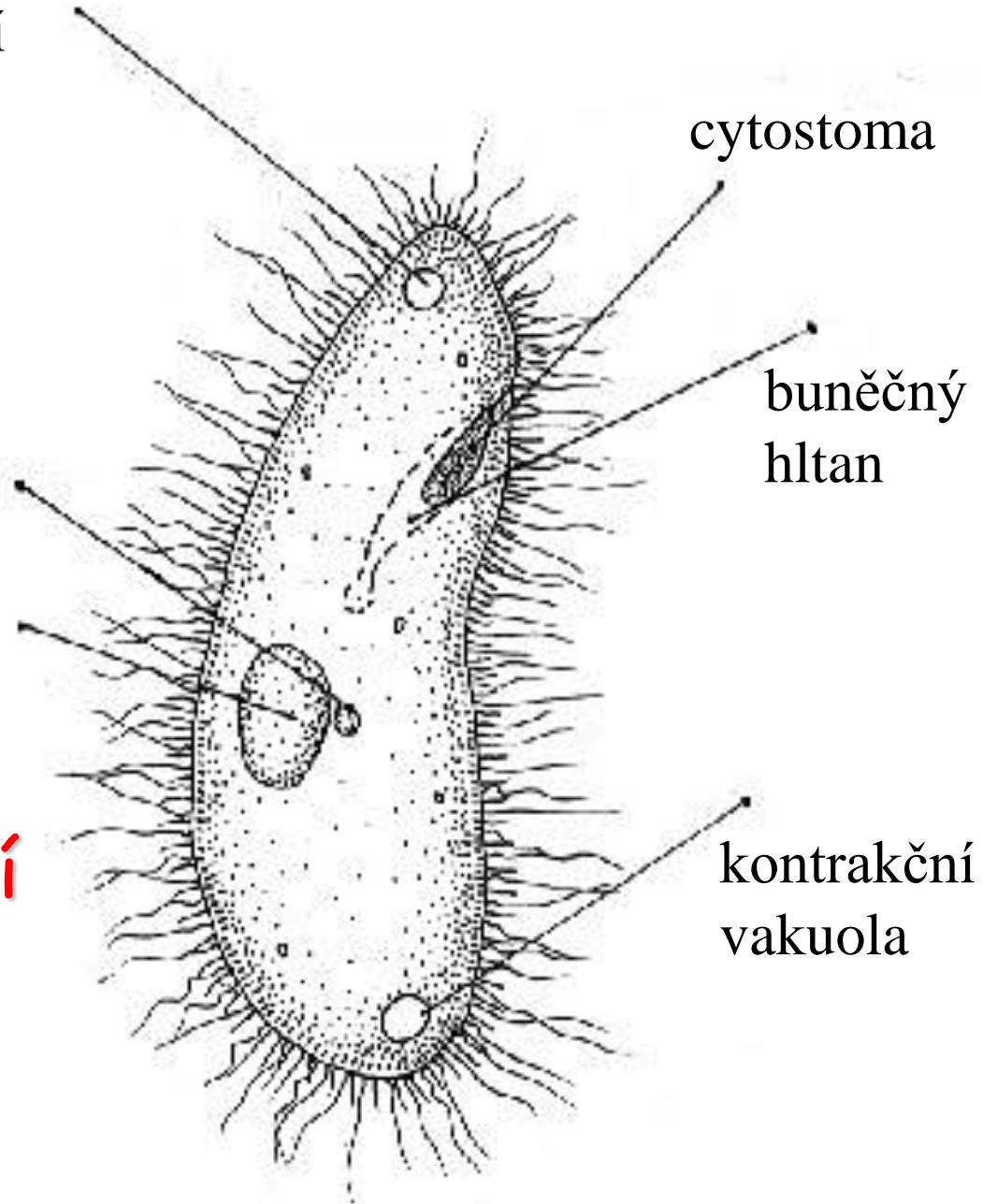
cytostoma

mikronukleus

buněčný
hltan

makronukleus

kontrakční
vakuola



Buněčné ústrojky
trepky představují
mikrosvět
budoucích tkání,
orgánů a tvarů

generativní jádro
- mikronukleus
transkripčně inaktivní,
kondenzovaný chromatin,
„zárodečná“ dráha



vegetativní jádro
- makronukleus
transkripčně aktivní,
rozvolněný chromatin,
chemické modifikace histonů,
degenerace „somatické“ dráhy

Nepohlavní množení trepky – příčné pučení

Vlastnosti jednobuněčných eukaryot - prvoků - jako modelů vývojové biologie - mikrokosmos

- zákonité uspořádání těla na úrovni jediné buňky
- fyziologické funkce zajišťují „ústrojky“ (cyclostoma, vakuoly, myonemy, neurophany, trichocysty)
- buněčný pohyb vnitřní (cyklóza) i lokomoční (brvy, bičíky)
- zárodečná (mikro-) a somatická (makronukleus) jaderná linie
- model asymetrické mitózy a epigenetické diferenciaci jader
- rozmnožování vegetativní (pučení) a pohlavní (konjugace)
- meióza (rekombinace) a výměna jader (kombinace gamet)
- model restrukturalizace genomu (*Tetrahymena*, *Euplotes*)
- studium programované buněčné smrti (makronukleus)
- encystace (zapouzďení) v nepříznivém životním prostředí
- symbióza s autotrofními mikroorganismy vede k rostlinám

NESTANDARDNÍ BIOLOGIE PRVOKŮ

- odlišné prostředí (parentální cytoplazma) řídí expresi alternativních znaků (př. pohlavních typů) z identických molekul DNA
- zárodečná dráha (mikronukleus) je ovlivňována strukturou a funkcí vegetativní dráhy (makronukleus)
- model strukturní dědičnosti: za strukturní variabilitu nejsou odpovědné geny ale preexistující buněčné struktury

NESTANDARDNÍ BIOLOGIE PRVOKŮ

(1) ŽIVOTNÍ CYKLUS, ZÁRODEČNÁ
DRÁHA, APOPTÓZA,
HETEROGAMIE, AUTOGAMIE
(Paramecium)



The Nobel Prize in Chemistry 1989

"for their discovery of catalytic properties of RNA"



Sidney Altman

🏆 1/2 of the prize

Canada and USA

Yale University
New Haven, CT, USA

b. 1939



Thomas R. Cech

🏆 1/2 of the prize

USA

University of Colorado
Boulder, CO, USA

b. 1947

The Maupas Medal : Nodes on the Ciliatology Net

Home | Frontier Connections | Maupas | Jennings | **Sonneborn** | Nanney | Ricci | Orias |

Tracy Morton Sonneborn (1905-1981)

From Anomaly to Unification: Tracy Sonneborn and the Species Problem in Protozoa.

1954--1957 by Judy Johns Schloegel



Sonneborn's personal and intellectual gifts were always disciplined and kept in check by a ruthless dedication to the Truth. He had schooled himself to mistrust the easy answer, the expected solution. He would not allow himself to find in the laboratory what he had discovered in the air or in his own mind.

He was fascinated by, riveted upon, Nature, unwilling to project upon Her his own constructs or to use Her for base purposes. For this reason he was a harsh critic, both of himself and of others. But for this reason he was also a source of confidence and inspiration to those with whom he shared his rigor....D.L. Nanney

↑
„velký otec unikátní trepky“

(1) Vegetativní buňky se množí binárním štěpením (*vegetative fission*).

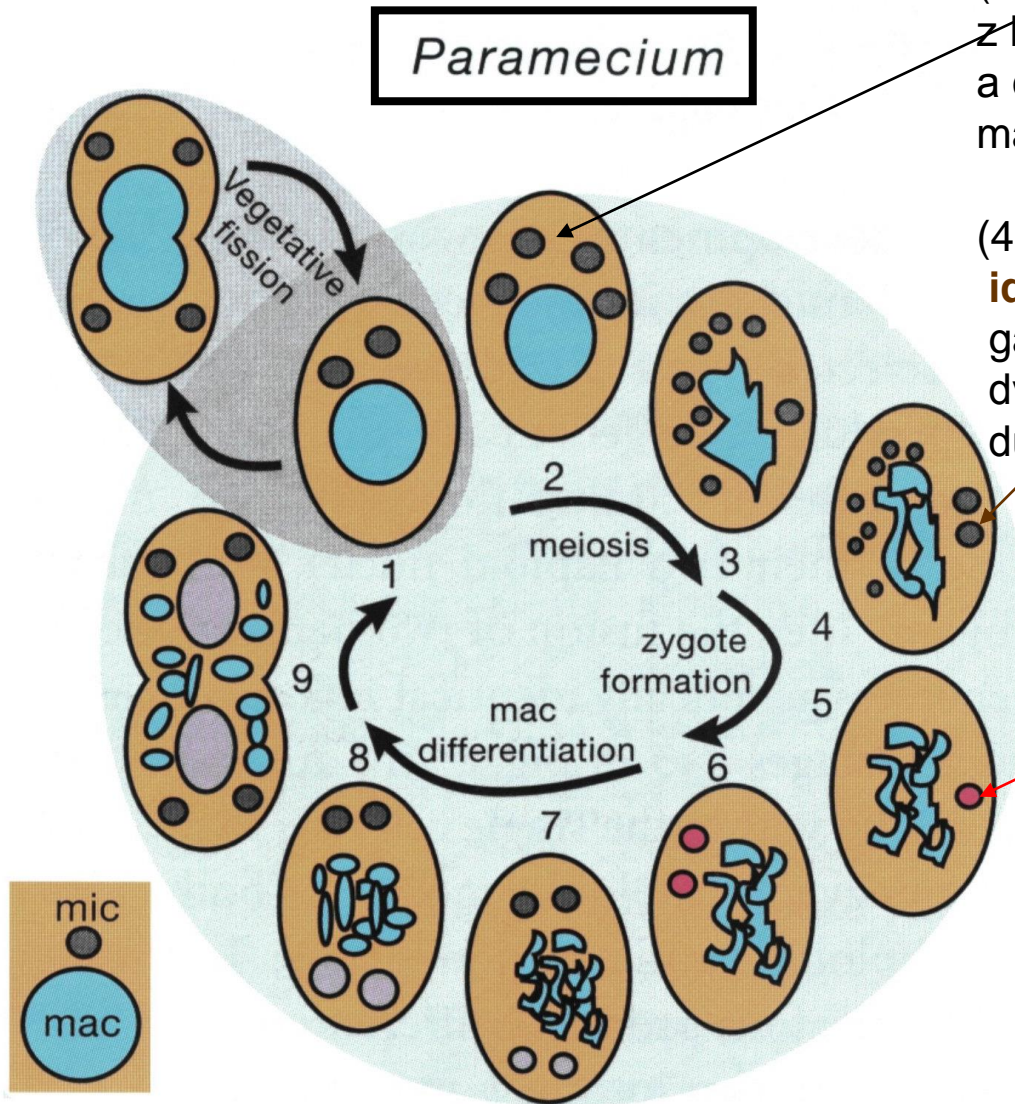
(2-3) **Meioza mikrojádra** končí selekcí jednoho z haploidních produktů jako gametického jádra a degenerací zbyvajících, začíná zánik makronukleu.

(4-5) Další dělení vybraného jádra vytvoří **dvě identická haploidní jádra**, v průběhu konjugace si dvě buňky jádra vymění (při autogamii dvě identická gametická jádra fúzí) a následuje karyogamie za vzniku diploidní **zygoty**.

(6-7) Dvě přídatná postzygotická dělení tvoří nediferencovaná mikro- a makrojádra.

(7-8) Diferenciace makro- a mikrojadra, fragmentace maternálního makronukleu.

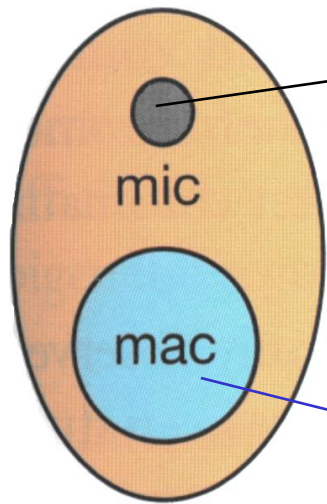
(9) Karyonidální dělení: nová makrojádra jsou distribuována do dceřinných buněk bez dělení, zatímco mikrojádra segregují do potomstva mitózou.



NESTANDARDNÍ BIOLOGIE PRVOKŮ

(2) VEGETATIVNÍ MAKRONUKLEUS a
GENERATIVNÍ MIKRONUKLEUS,
histonové varianty, acetylace, metylace
a fosforylace histonů

Odlišná charakteristika histonů makrojádra a mikrojádra u Paramecium

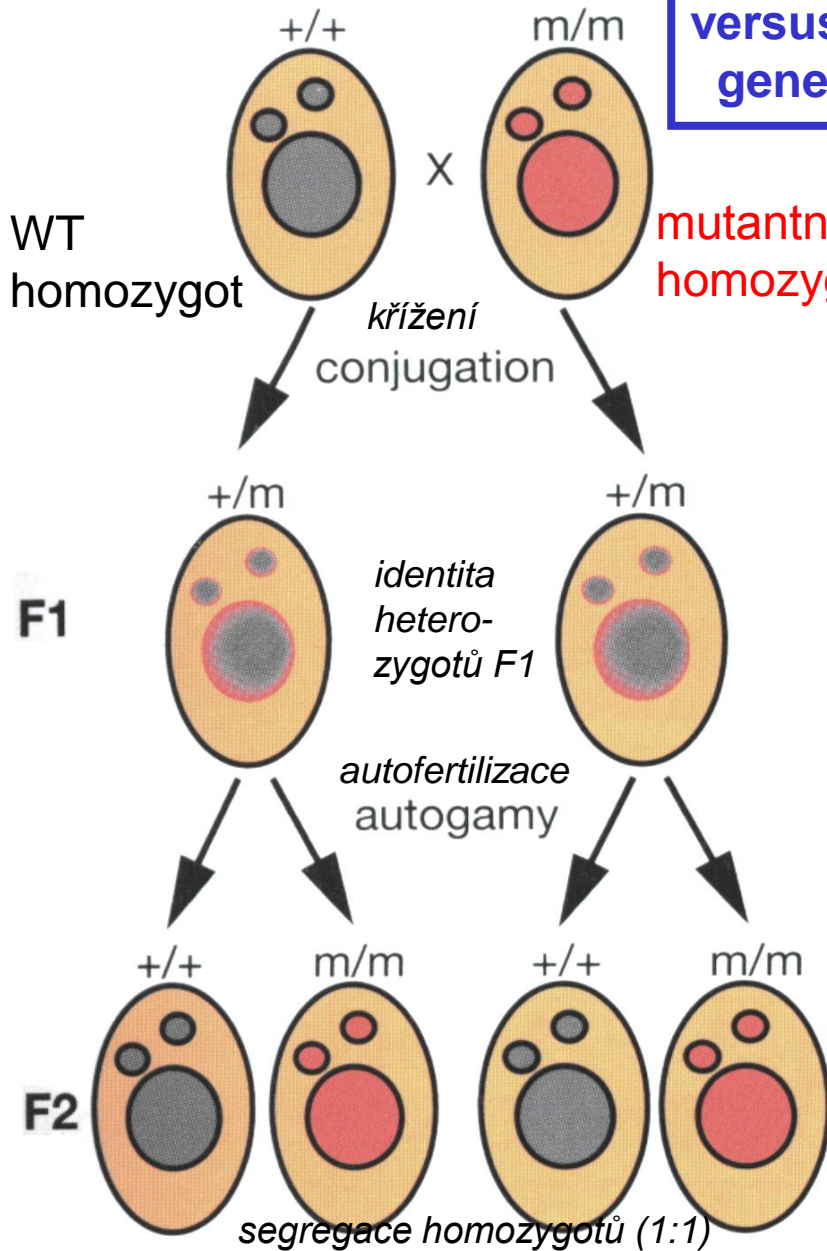


<u>properties</u>	<u>histone composition</u>	<u>chromatin modifications</u>
<ul style="list-style-type: none"> - silent - diploid - chromosome condensation 	<ul style="list-style-type: none"> - H2A, H2B, H3, H4 - micH1 	<ul style="list-style-type: none"> - H3S10ph - micH1ph
<ul style="list-style-type: none"> - active - polyploid 	<ul style="list-style-type: none"> - H2A, H2B, H3, H4 - mach1 - variants <ul style="list-style-type: none"> hv1 (H2A.Z) hv2 (H3.3) 	<p><u>developing mac</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - H3K4me - H3K9me, H3K27me - (H2A, H2B, H3, H4)ac
		<ul style="list-style-type: none"> - H3K4me - (H2A, H2B, H3, H4)ac - (H2A, mach1)ph

NESTANDARDNÍ BIOLOGIE PRVOKŮ

(3) PARENTÁLNÍ =
CYTOPLAZMATICKÁ DĚDIČNOST
zahrnuje siRNA i symbionty

a. Mendelian segregation
of a pair of alleles

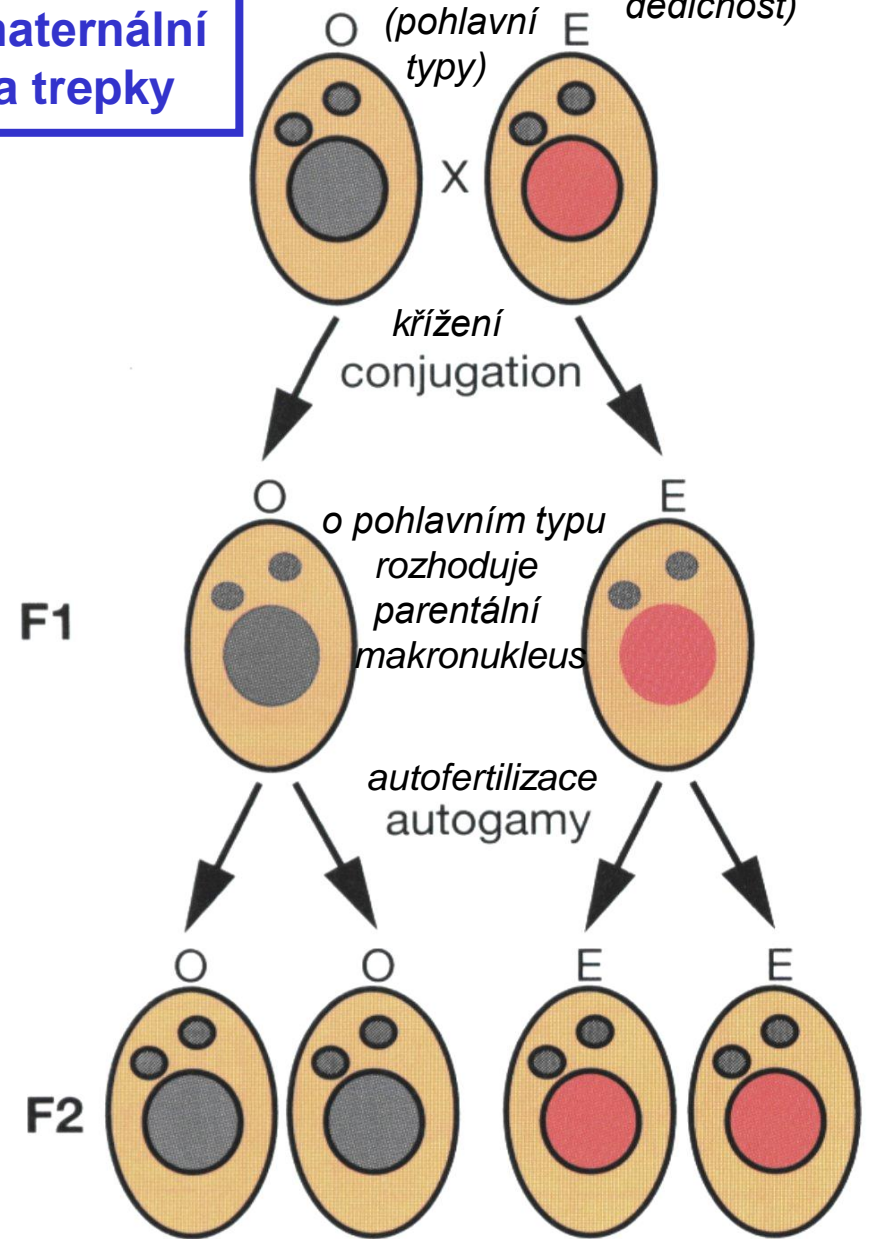


**Mendelovská
versus maternální
genetika trepky**

mutantní
homozygot

b. Maternal inheritance
of mating types

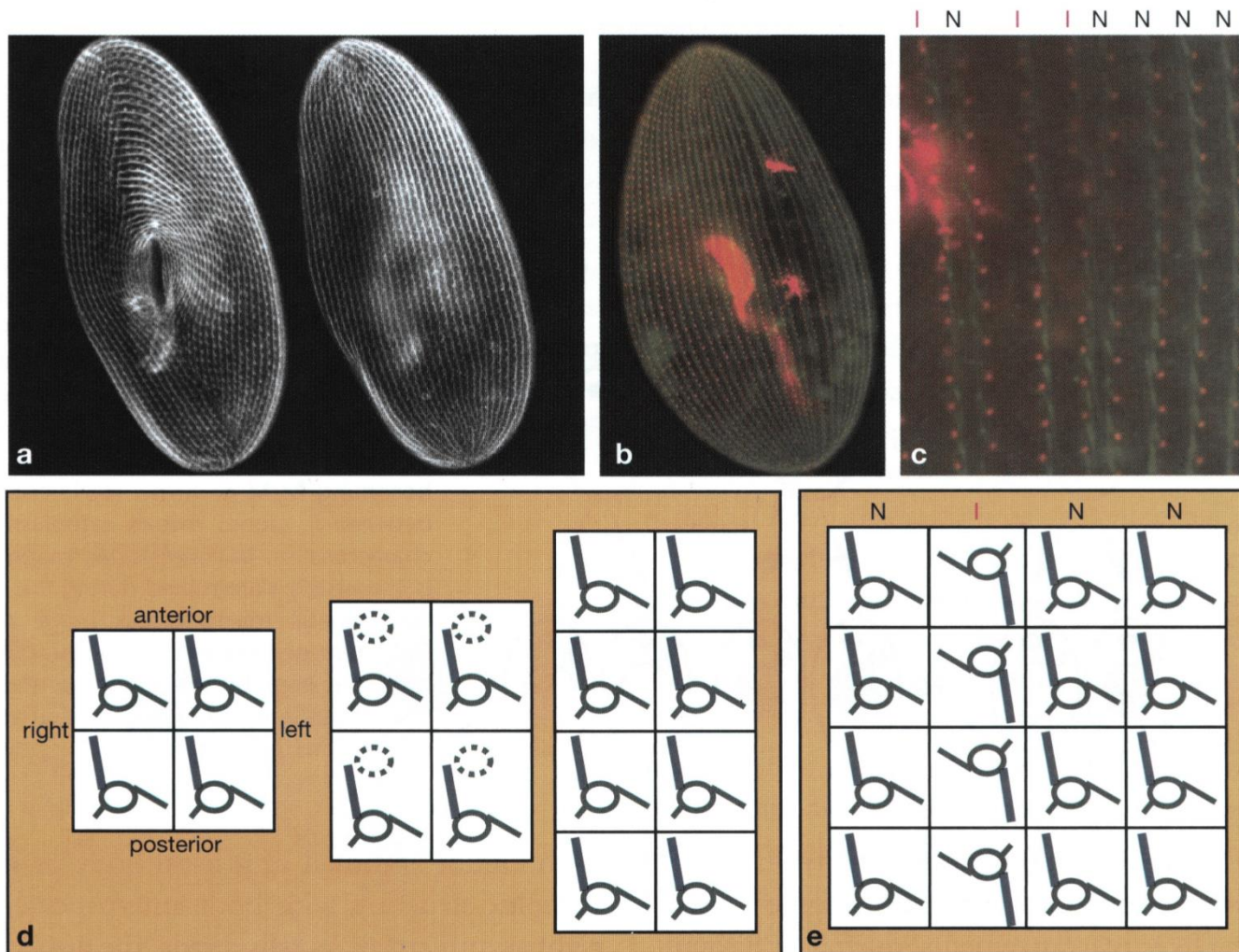
(cytoplazmatická dědičnost)



NESTANDARDNÍ BIOLOGIE PRVOKŮ



(4) Strukturní dědičnost kortexu bičíků (transplantace části kortexu vedou ke změně orientace, která je vegetativně i pohlavně-parentálně dědičná), potvrzení buněčné teorie Virchowa (19. st.), epigenetická strukturní dědičnost je klíčem mechanismu života (podobně replikace DNA, priony, centrioly či centromery)



Structural Inheritance of Cortical Unit Polarity in *Paramecium*

(a) Immunolabeling of basal bodies and ciliary rootlets highlights the regular organization of parallel cortical rows of wild-type cells. Shown are ventral (*left*) and dorsal (*right*) views. (b) Dorsal view of a cell exhibiting disruption of the regular organization due to the reversed antero-posterior polarity of a few rows of cortical units. Basal bodies immunolabeled in red, and ciliary rootlets in green. (c) Enlargement of a patch of cortex shows the reversed orientation of ciliary rootlets in inverted rows (I) relative to normal rows (N). (d) Schematic of basal bodies (*green circles*) duplication during growth; each is shown flanked on its right side by an anteriorly oriented ciliary rootlet (*purple*) and two microtubular ribbons. Duplication occurs with a fixed geometry: Each new basal body is positioned anterior of its parent, ensuring identical polarity. (e) The repeated duplication of basal bodies within each row maintains homogeneous orientation indefinitely.

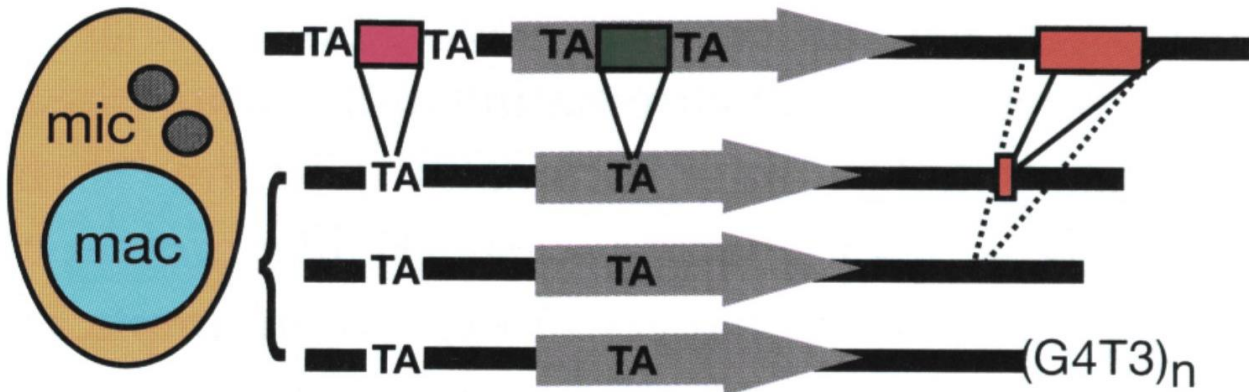
NESTANDARDNÍ BIOLOGIE PRVOKŮ

(5) Umlčování genů prostřednictvím RNAi principu, injekce do mikrojádra či krmení dsRNA *E. coli* vede k nedědičnému umlčování (ke stabilizaci chybí H3K9 metylace)

NESTANDARDNÍ BIOLOGIE PRVOKŮ

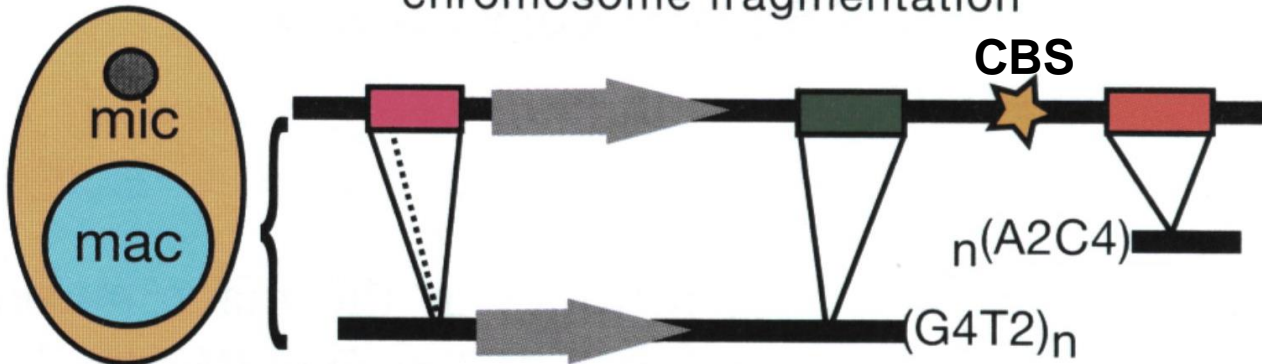
(6) EPIGENETICKÁ RESTRUKTURALIZACE
MAKROJÁDRA – přesné intragenové delece
a nepřesné fragmentace chromozomů
(obrana genomu – delece transpozonů a
repeticí), úloha siRNA

Paramecium: precise and imprecise deletions



- v průběhu vývoje nového makrojádra trepky dochází k přesným delecím 5'-TA-3' vázaných IES (internal eliminated sequences – krátké unikátní úseky DNA v genových a negenových oblastech) plus nepřesné delece – výsledkem je částečná fragmentace genomu ($G4T3$)

Tetrahymena: imprecise deletions and chromosome fragmentation

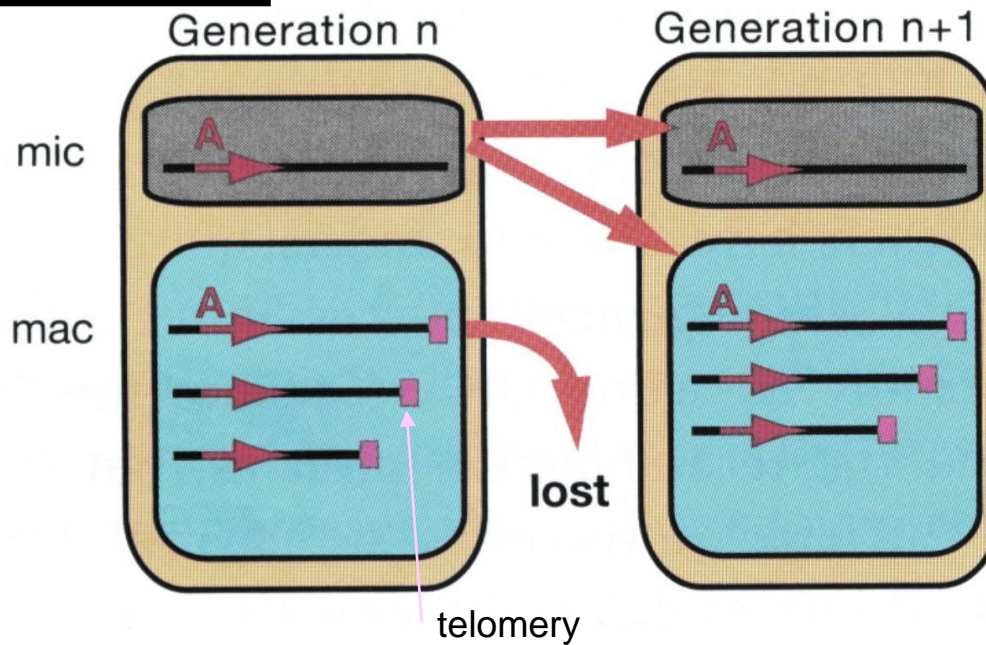


-v průběhu vývoje nového makrojádra hruštičky dochází k nepřesným delecím IES asi v 6 tisících lokusech, fragmentace chromozomů je specifikována konzervativní 15 pb sekvencí = CBS = chromosome breakage sequence)

NESTANDARDNÍ BIOLOGIE PRVOKŮ

(7) PARADIGMA d48: aberantní dědičná delece genu A (povrchového antigenu) v makrojadře nemá podstatu v DNA mikrojadra, cytoplazmatická dědičnost při křížení s WT, rescue přes injekci genu A do makrojadra, nahrazení mikrojadra nemá vliv

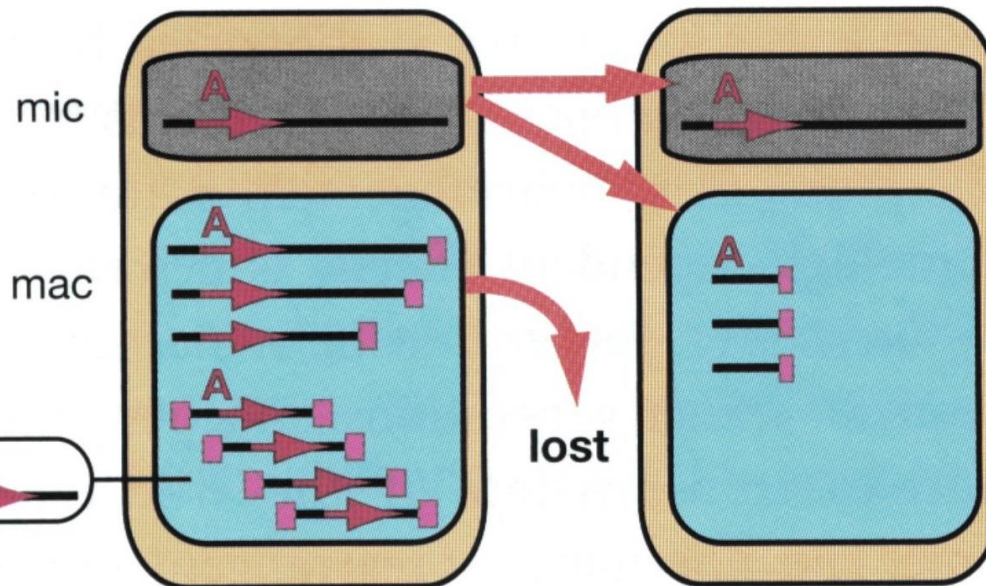
a. Wild type autogamy



Epigenetika transgenem indukovaných delecí u trepky

(a) Reprodukovatelné
(= dědičné)
restrukturalizace
mikronukleárního genu A
v makronukleu

b. Transgene-induced deletion upon autogamy

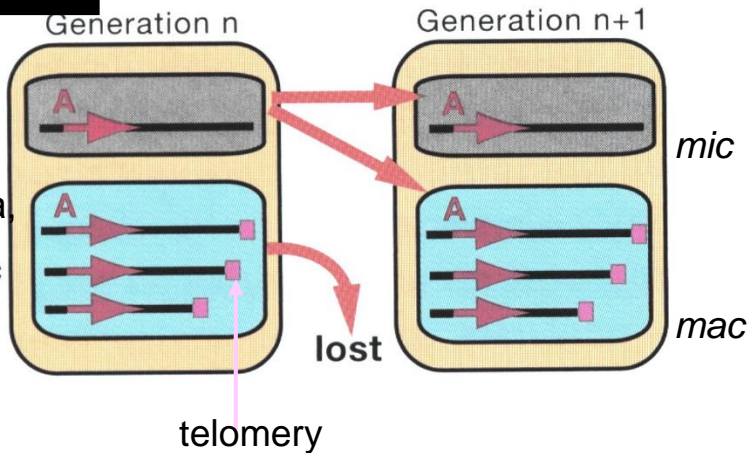


(b) Introdukce kopií transgenu
A do maternálního
makrojádra indukuje
úplnou delecí endogenního
genu A v pohlavním
potomstvu, když se nový
makronukleus vyvíjí
z WT-zárodečné dráhy.

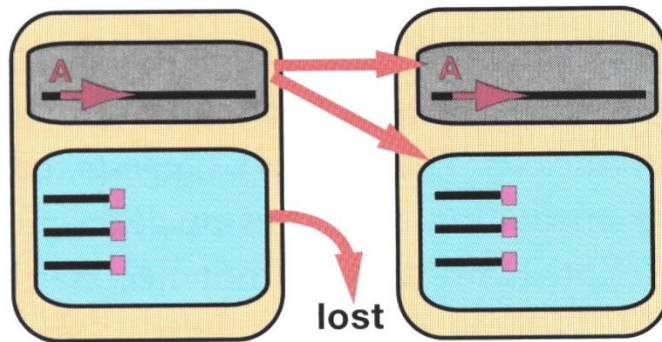
Makronukleární telomery
blokuji gen A.

a. Wild type

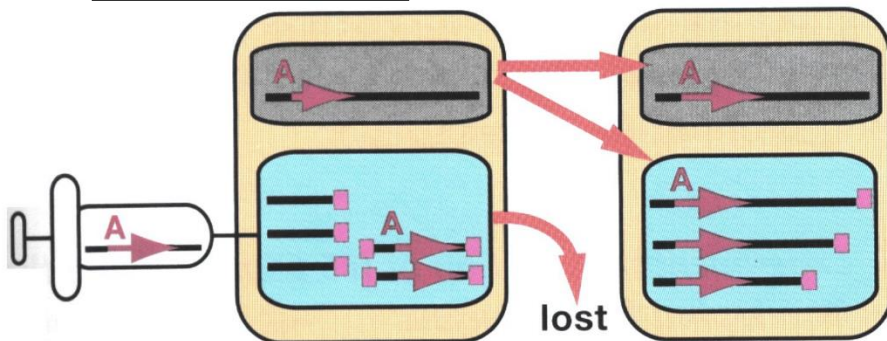
Gen A leží poblíž heterogenního konce chromozomu makrojádra uspořádání se přesně dědí přes mikrojádro



b. d48



c. Rescued d48



Epigenetická dědičnost mutace d48 a její záchrana

(a) Standardní typ

(b) Mutace d48 postrádá gen A v makrojádře, ale má jej v mikro-jádře (to je tedy WT). Gen A je reprodukovatelně deletován v průběhu vývoje makrojádra v každé generaci.

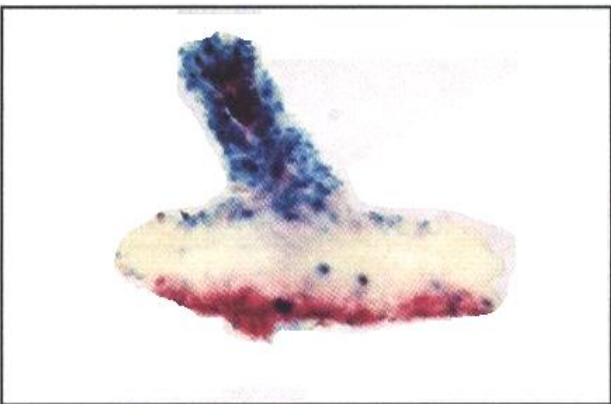
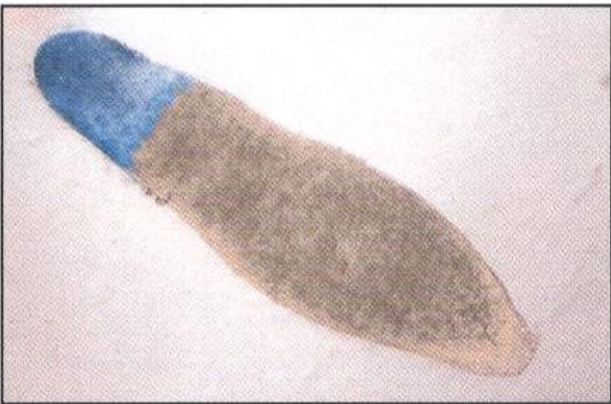
(c) Transformace makrojádra DNA sekvencí genu A specificky restauruje amplifikaci genu A ve vyvíjejícím se makrojádře pohlavního potomstva.

HOUBY (FUNGI)

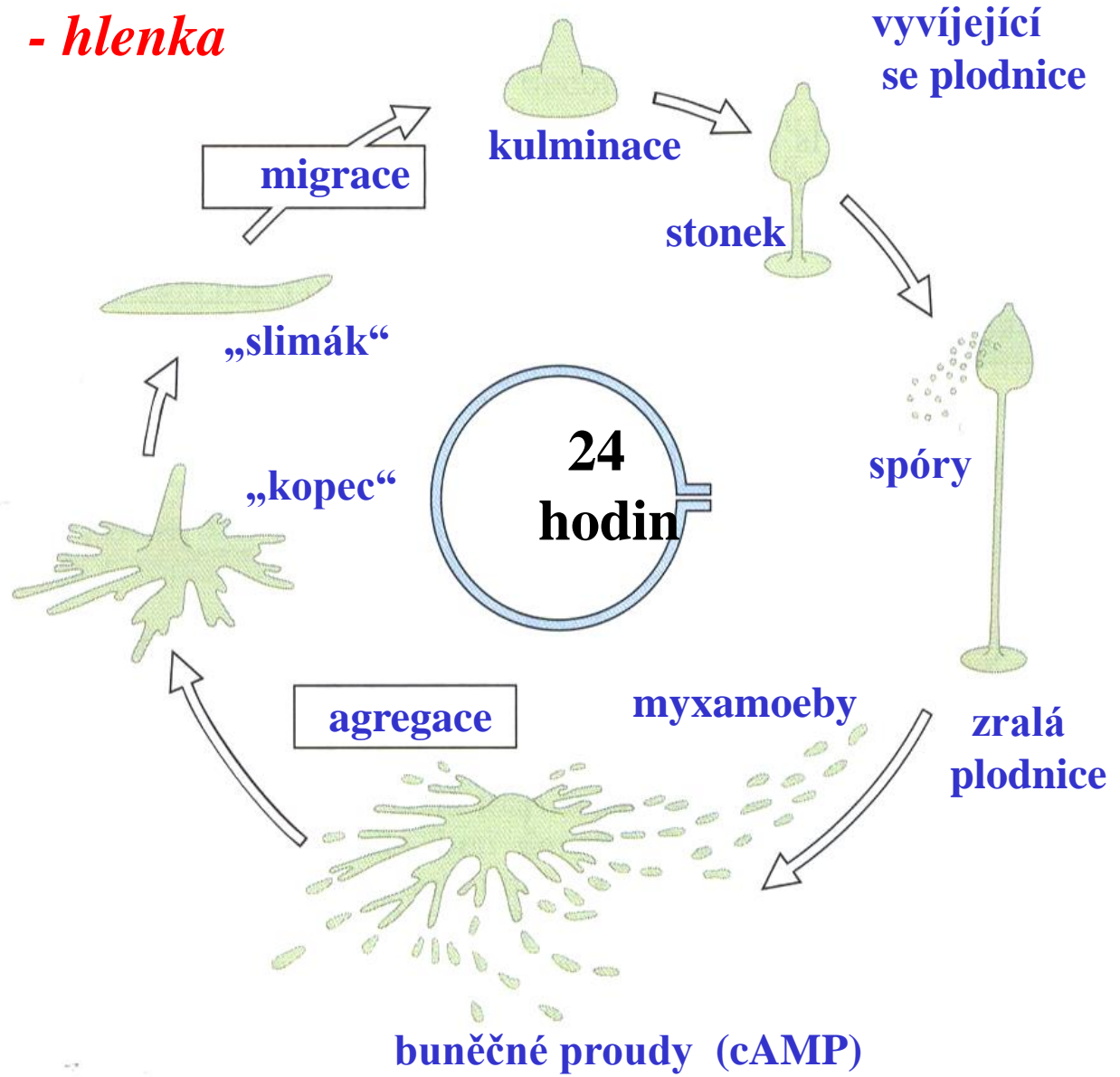
- HLENKY (*Dictyostellium discoideum*)
- OOMYCETY (*Phytophthora infestans*)
- ENDOMYCETY (sněť *Ustilago*)
- ASKOMYCETY – vřeckovýtrusé houby
 - (*Saccharomyces cerevisiae*, kvasinka pивní;
Schizosaccharomyces pombe, kvasinka půdní –
Hartwel, Hunt a Nurse NC2001;
Neurospora crassa, chlebová vláknitá plíseň –
Beadle a Tatum NC1958)

... v hlavní roli :

hlenka

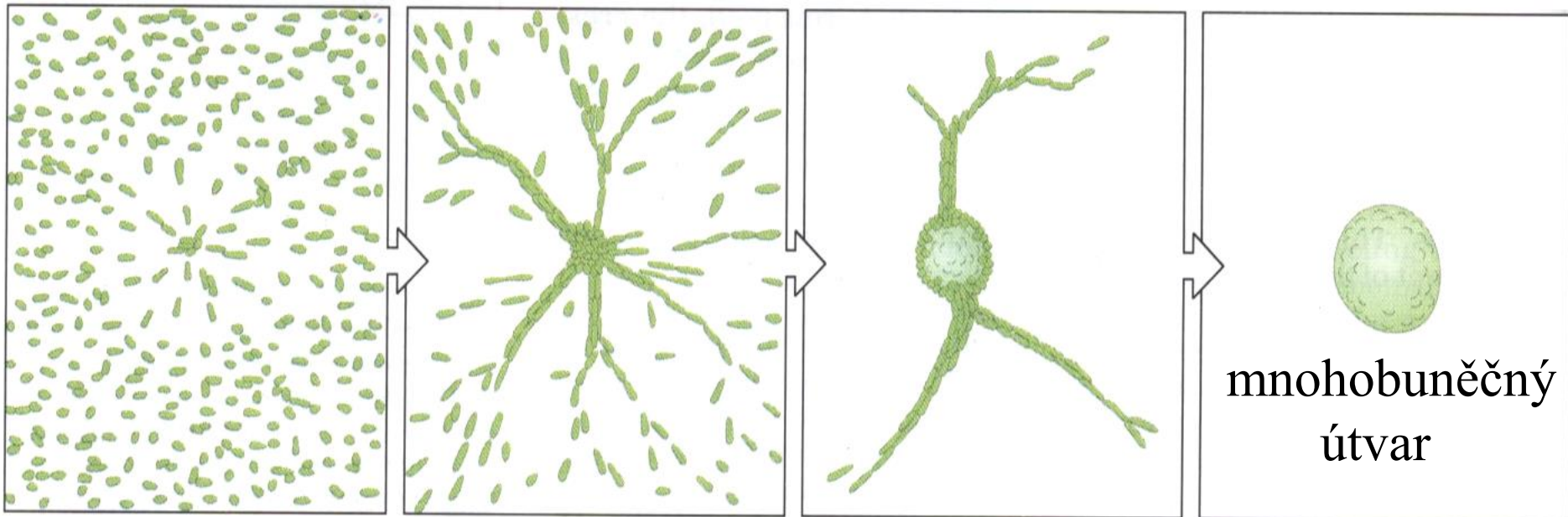


Dictyostelium discoideum - hlenka



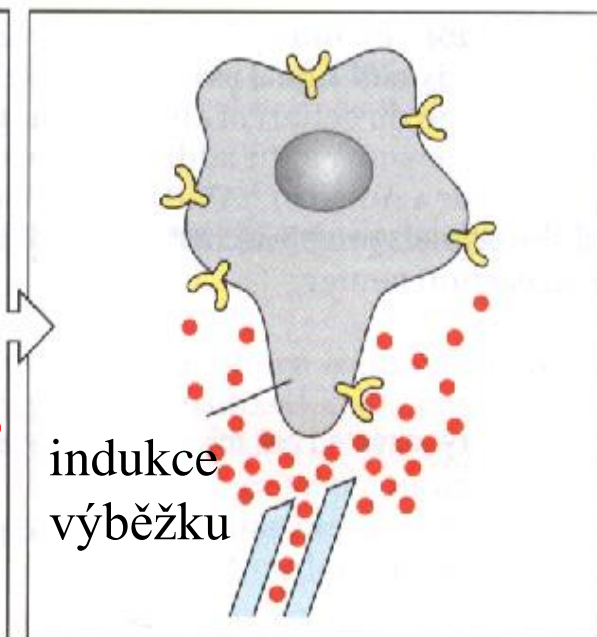
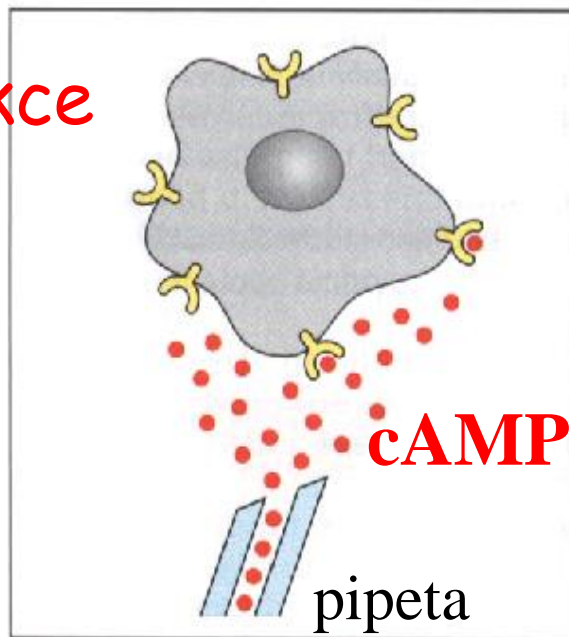
Agregace myxaméb hlenky :

améby „proudí“ směrem k ohnisku, kde vytvářejí nejdříve kulovitý mnohobuněčný útvar, který postupně diferencuje v plodnici



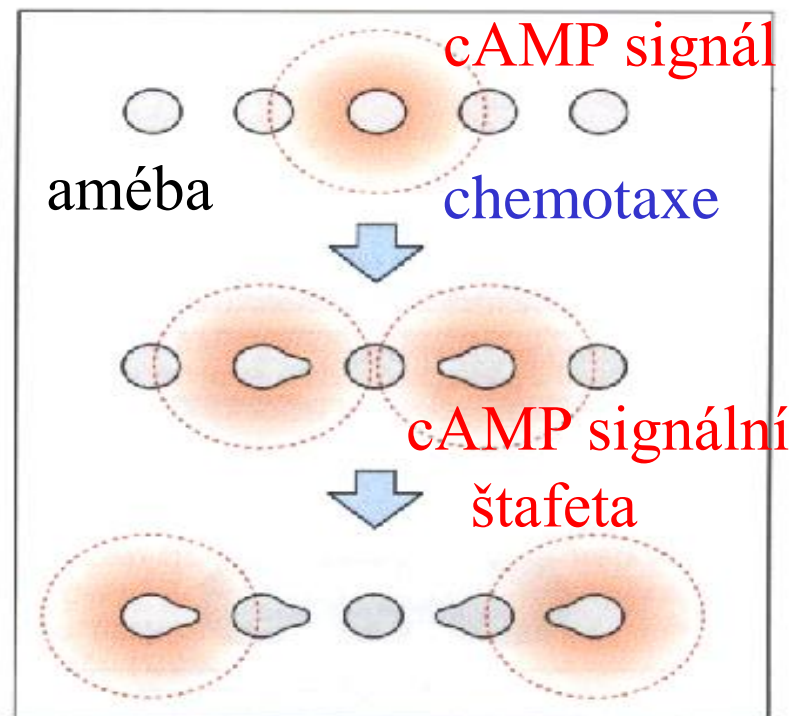
Chemotaktická reakce amébových buněk :

pohyb ke gradientu cyklického AMP, vazba na membránové receptory, tvorba pseudopodií



Šíření cAMP signálu a chemotaxe améb :

buňka vysílá puls cAMP, ten indukuje chemotaxi okolních buněk, které poté samy tvoří cAMP signály (střídání pulsů „citlivosti a hluchoty“)



Tvorba plodnice hlenky :

migrující pre-stonkové
buňky vynášejí pre-spórové
buňky k vrcholu plodnice

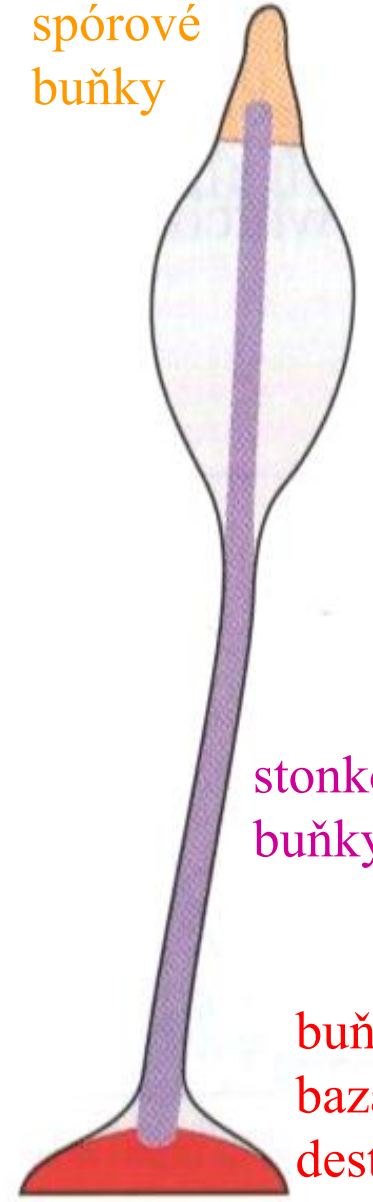
pre-stonkové
buňky vpředu



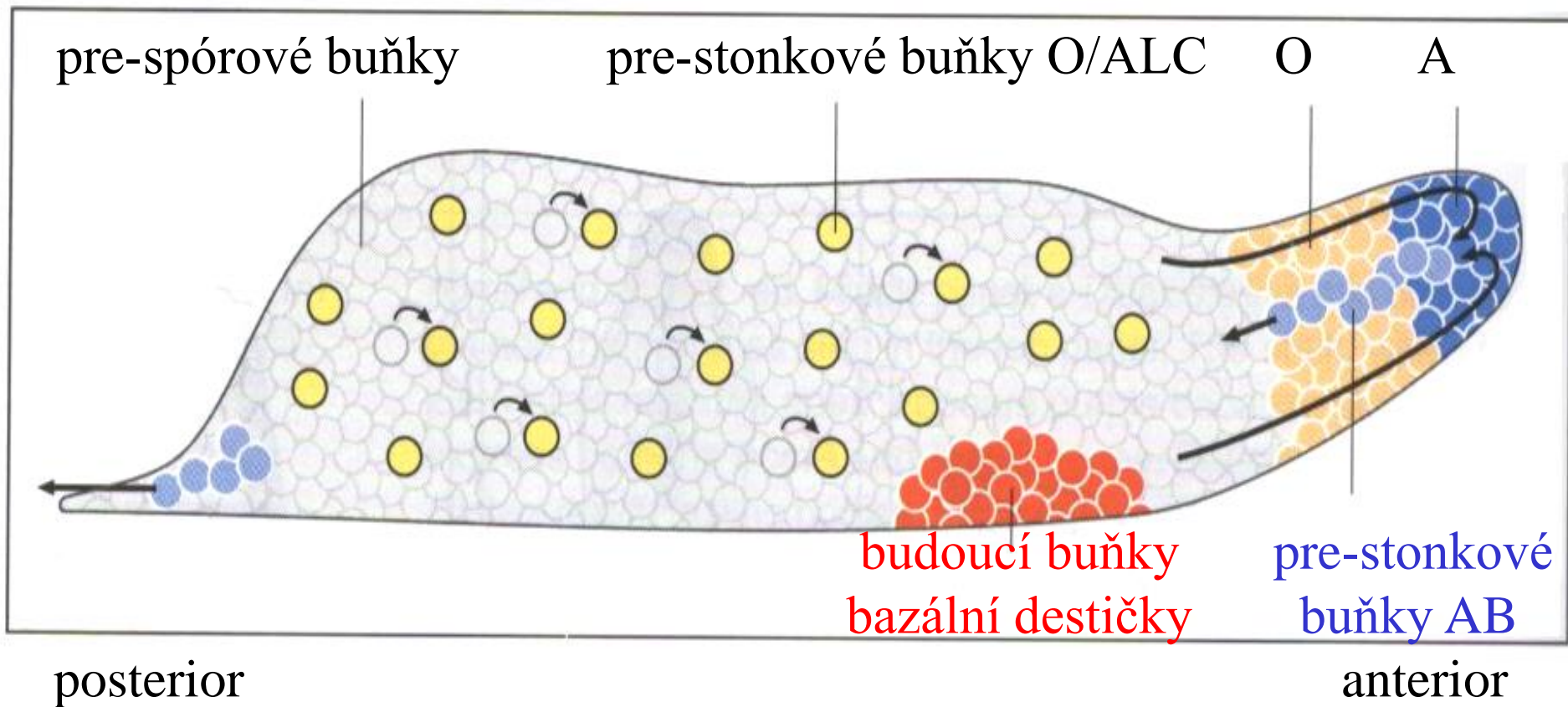
spórové
buňky

stonkové
buňky

buňky
bazální
destičky



Lokomoční stádium „slimáka“ má specifické uspořádání buněk: pre-stonkové buňky AB se přemísťují dozadu a jsou nahrazovány deriváty předspórových buněk



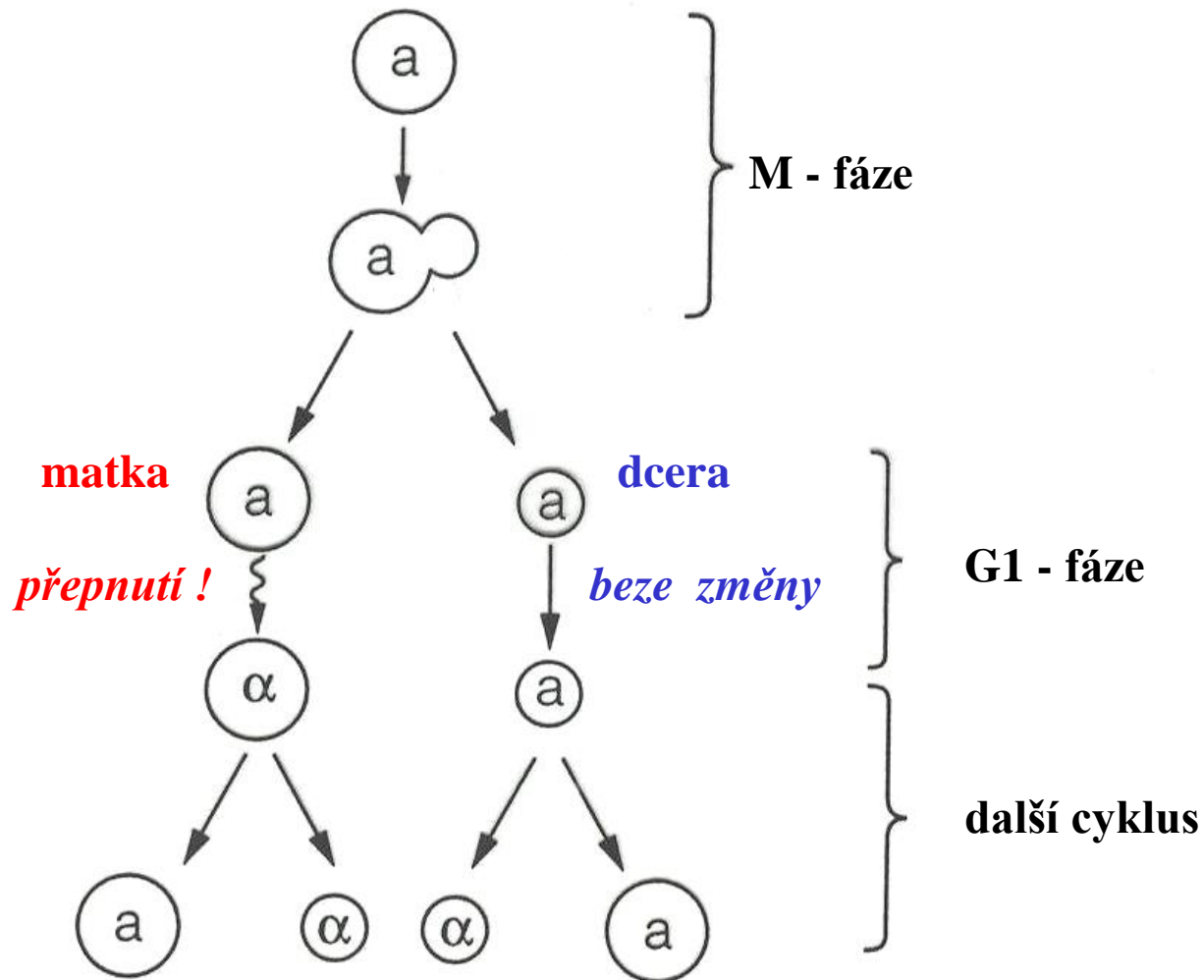
Charakteristika modelu hlenky :

- jednobuněčný „živočich“ se v průběhu života stává mnohobuněčným
- vznik sociální komunity jako reakce na vnější prostředí
- studium periodické emise signálů, chemotaxe, tvorby tvarů
- „štafetový“ či „kurýrní“ systém přenosu cAMP signálu
- diferenciaci améb v odlišné typy buněk :
hypotézy poziční informace či roztrídění buněk
- ablace určitých buněk slimáka způsobí změnu původního vývojového určení buněk
- buňky se stávají předurčenými ke tvorbě stonku při vyšší koncentraci cAMP a diferenčního indukčního faktoru (DIF, chlorovaný aromat)
- dalším morfogenem je amoniak
- hlenky žijí obvykle jen vegetativním životem
- při pohlavním množení se vyskytuje konjugace i kanibalismus

... v hlavní roli :

kvasinky

Přepínání konjugačních typů u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (MATing type switching)



- ♣ **množení kvasinek pučením haploidních či diploidních buněk**
- ♣ **haploidní buňky mají konjugační typ a nebo α (alely MATa či MAT α lokusu MAT), tyto fúzují za tvorby diploidních buněk**
- ♣ **alternativní alely MAT kódují odlišné transkripční regulátory, které aktivují expresi konjugačně-specifických genů**
- ♣ **haploidní buňky přepínají konjugační typ každou generaci (genová konverze mezi aktivním lokusem MAT a jedním nebo dvěma lokusy na stejném chromozomu**
- ♣ **buněčné dělení haploida dává vznik jedné buňce stejného typu a druhé buňce (mateřské) druhého typu (analogie s kmenovými buňkami živočichů)**
- ♣ **přepínání konjugačních typů zajišťuje rovnováhu v populaci**
- ♣ **přepínání konjugačních typů zahrnuje tvorbu nových transkripčních faktorů s následnou změnou fenotypu (jednoduchý model diferenciace)**
- ♣ **MAT-kódující transkripční faktory obsahují homeodoménu (analogie se živočichy a rostlinami)**
- ♣ **lokusy HML α a HMRA jsou inaktivní, protože jsou součástí reprimovaného chromatinu (analogie s epigenetickými procesy u živočichů a rostlin)**

SACCHAROMYCES CEREVISIAE Hansen

„pivní kvasinka“ = budding yeast

Taxonomické zařazení: *Ascomycetes*

Čeleď: *Saccharomycetaceae*

Druhy, které vytvářejí kulovité hladkostěnné askospóry a jejich asky přetrvávají, rozdělujeme na dva rody:

1. *Zygosaccharomyces*- buňky jsou ve vegetativní fázi haploidní a než se vytvoří askus, musí se spájet nezávislé buňky nebo musí dojít k somatogamní autogamii.
2. *Saccharomyces*- buňky jsou ve vegetativní fázi diploidní a tyto diploidní buňky se přímo mění na asky. Spóry se spájí nebo nejprve klíčí a potom se spájí na diploidní spóry, které klíčí na diploidní buňky.

Její genom (14Mbp) je složen z 16 miniaturních chromozomů – proto se u ní studuje telomerický efekt.

Synonyma:

S.cerevisiae Hansen *subsp. cerevisiae*

Saccharomyces ellipsoideus

Saccharomyces cerevisiae var. *ellipsoideus*

Saccharomyces ilicis

Saccharomyces vini-*munz*

Saccharomyces vordermanni

Saccharomyces bayanus

Saccharomyces willianus

Saccharomyces sake

Saccharomyces cratericus

Saccharomyces cerevisiae var. *cratericus*

Saccharomyces intermedius

Saccharomyces pastorianus

Saccharomyces turbidans

Saccharomyces cerevisiae var. *turbidans*

Saccharomyces validus

Saccharomyces brasiliensis

Saccharomyces batatae

Saccharomyces multisporus

Saccharomyces tokyo

Saccharomyces yedo

Saccharomyces coreanus

Saccharomyces anamensis

Saccharomyces marschalianus

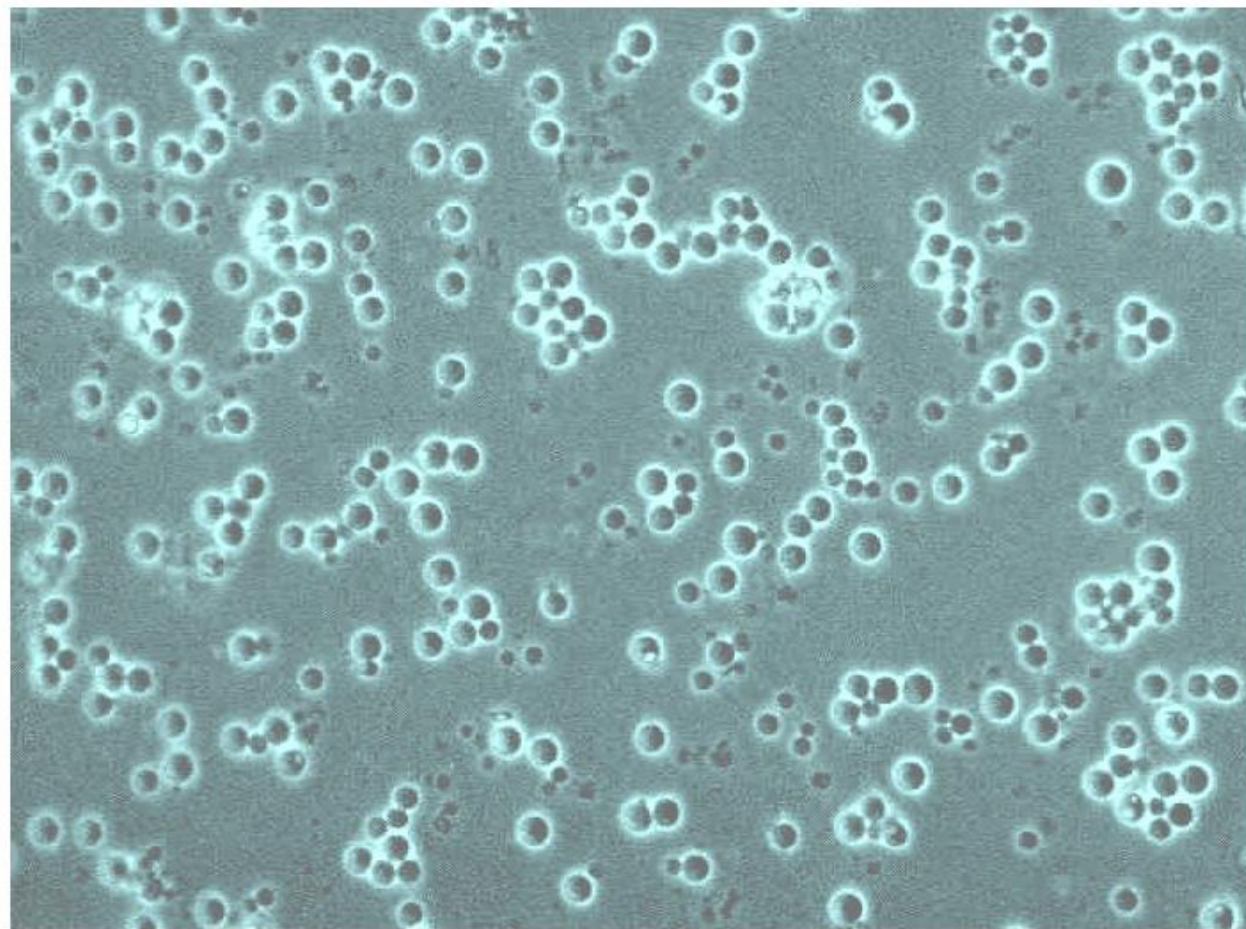
Saccharomyces globus

Saccharomyces tubiformis

Saccharomyces cerevisiae var. *tetraspora*

Saccharomyces intermedius var. *turicensis*

Saccharomyces festinans



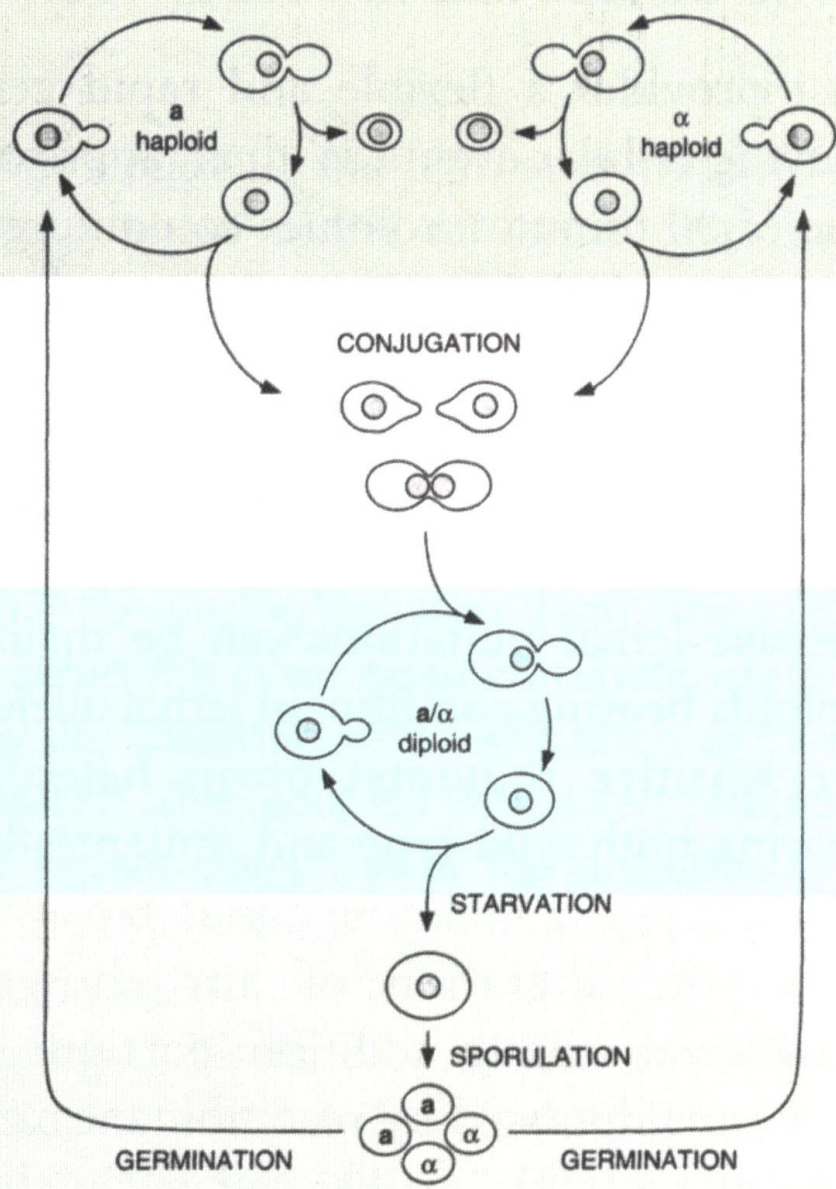
ŽIVOTNÍ CYKLUS KVASINKY SACCHAROMYCES

Mitosis (haploid)

Conjugation

Mitosis (diploid)

Meiosis



Kvasinky se dělí mitotickým dělením jak v haploidním, tak i v diploidním stavu.

Křížení (mating) se odehrává spontánně v blízkosti haploidních buněk odlišného pohlavního typu.

Existují dva pohlavní typy – a, α, vytváření odlišné feromony a receptory.

Sekrece feromonu zastavuje buněčný cyklus opačného sexu v G1 a dochází k indukci křížení.

Diploidní stav potlačuje proces matingu.

Meioza a sporulace jsou indukovány hladověním, jen v diploidním stavu.

TELOMEROVÝ POZIČNÍ EFEKT U SACCHAROMYCES

TPE of *URA3* expression in *S.cerevisiae*



Ura3 protein konvertuje 5-FOA (=fluorooroditová kyselina) na 5-FU (fluorouracil), inhibitor DNA syntézy vedoucí ke smrti.

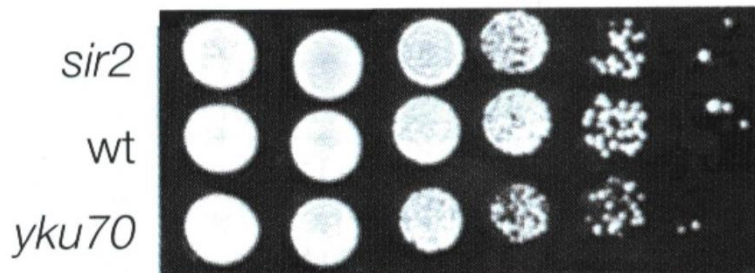
Integrace genu *URA3* do heterochromatinu vede k represi genu *URA3* v některých buňkách kolonií.

Postupné ředění buněk umožňuje kvantifikaci represe.

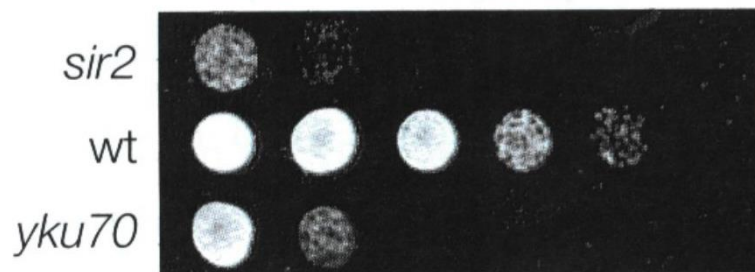
Mutanty *sir2* a *yku70* netvoří telomerický heterochromatin, tedy konstitutivně exprimují gen *URA3* a za přítomnosti 5-FOA umírají.

Chr VIII :: *URA3*-Tel

No. of cells: 10⁶ 10⁵ 10⁴ 10³ 10² 10



YPD
= normální
médium

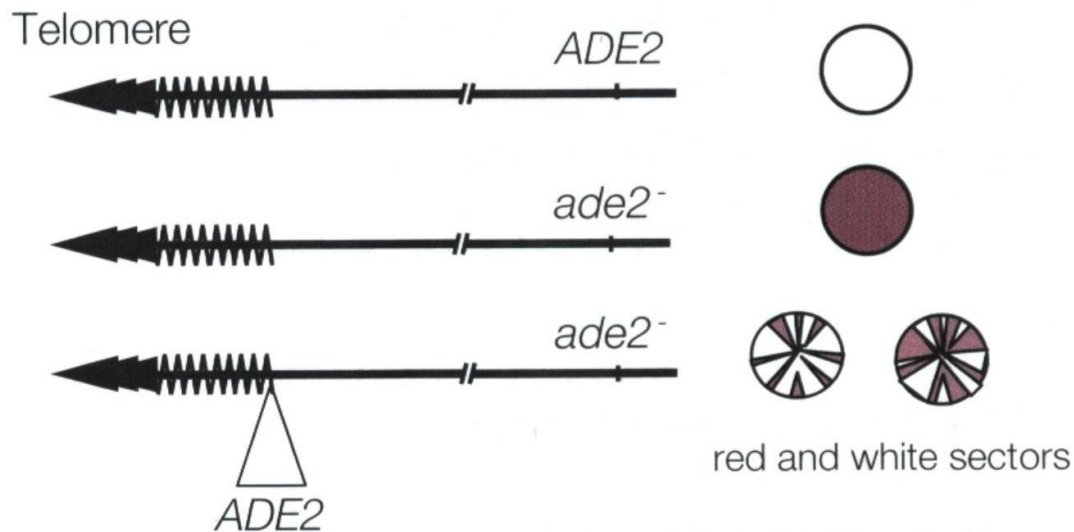


+ 5-FOA
= potenciálně
toxický substrát

TELOMEROVÝ POZIČNÍ EFEKT U SACCHAROMYCES

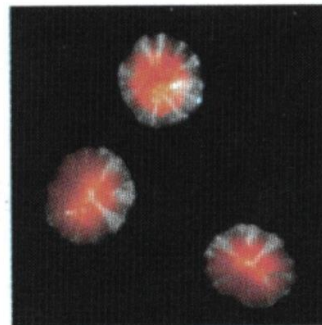
reportérový gen *ADE2* – tvoří bílé kolonie, zatímco mutant *ade2* vytváří červené (díky akumulaci červeného intermediátu v biosyntéze adeninu)

TPE of *ADE2* expression in *S.cerevisiae*



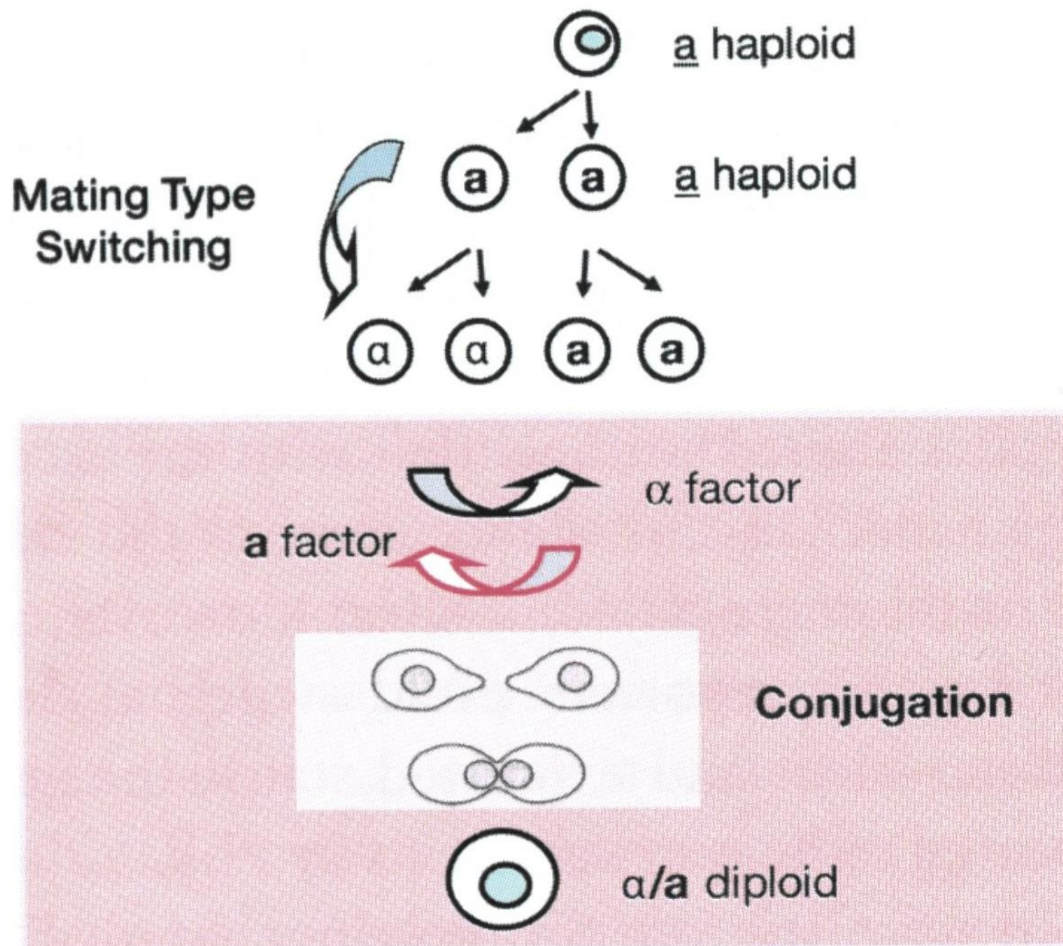
ade2⁻; ADE2-TelVR

variegated
repression



- integrace genu *ADE2* do blízkosti telomery může vést k epigenetickému umlčování
- epigenetická povaha *ADE2* represe je viditelná uvnitř kolonií jako barevné sektory
- stav aktivity/umlčení je monitorován tímto barevným testem a ukazuje míru lability/dědičnosti represe
- jev více než podobný pozičnímu efektu u drosophily (oko)

POHLAVNÍ TYPY KVASINKY SACCHAROMYCES



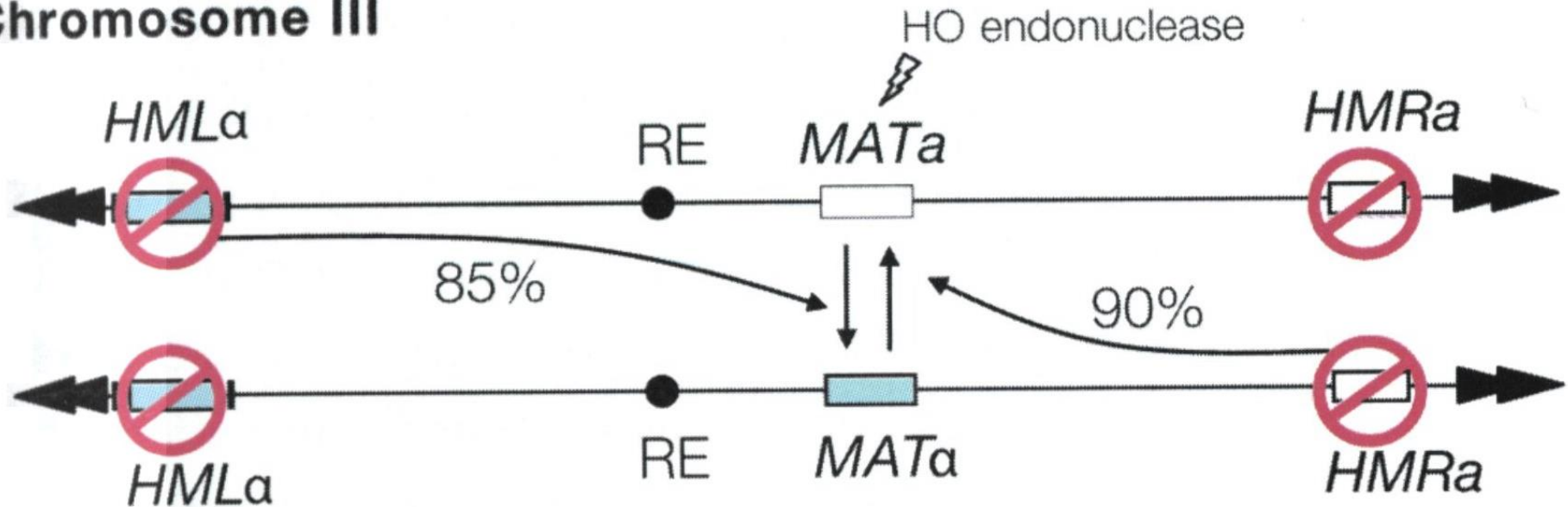
V přírodních podmínkách jsou kvasinky schopny přepínat pohlavní typ po každém buněčném cyklu.

Typ změny je zahájen endonukleázovou aktivitou (HO), která indukuje site-specific ds-break v lokusu *MAT*.

Mechanismem genové konverze je pak transponována informace o opačném mating-typu z konstitutivně umlčeného donorového lokusu ($HML\alpha$ nebo $HMRa$) do aktivního lokusu *MAT*.

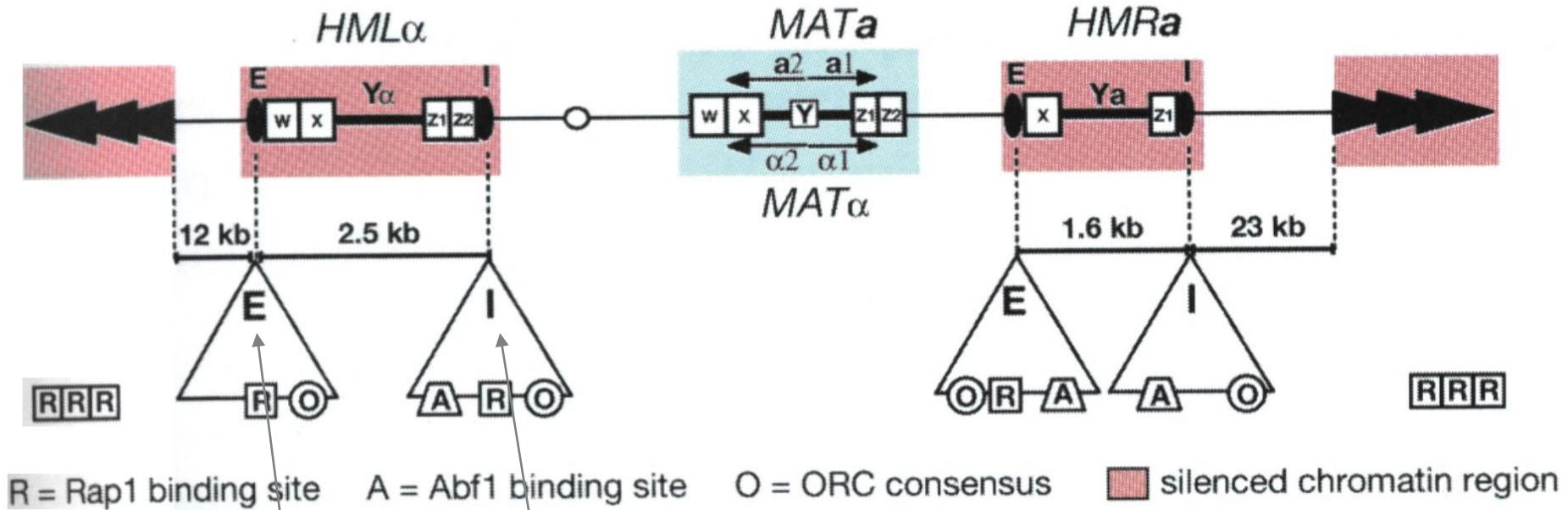
POZICE UMLČENÝCH A EXPRIMOVANÝCH MATING-TYPŮ NA CHR. III

Chromosome III



- Aktivní lokus MAT je schopen přepínat genovou konverzí jednou za buněčný cyklus prostřednictvím ds-zlomu indukovaném HO endonukleázou.
- Procenta ukazují frekvenci, se kterou nastává genová konverze, která nahrazuje MAT lokus opačným typem.
- Směr přepnutí je řízen zesilovačem rekombinace (RE).
- Pouze HM, která je kopírována a integrována do aktivního MAT lokusu, je schopna transkripce.

Transcriptionally silent domains and silencer elements



- Represe umlčených mating-typů *HMRa* a *HMLα* je zprostředkována dvěma umlčovacími DNA elementy, které se nacházejí na okrajích umlčených genů. Tyto silencers se nazývají E (essential) a I (important) a poskytují vazebná místa pro umlčovací proteiny Rap1 (R), Abf1 (A) a ORC (O).
- Telomerický heterochromatin je umlčován nezávisle na lokusech HM (i když jsou umístěny subtelomericky), iniciován u telomer prostřednictvím mnoha vazebných míst pro protein Rap1 (R).

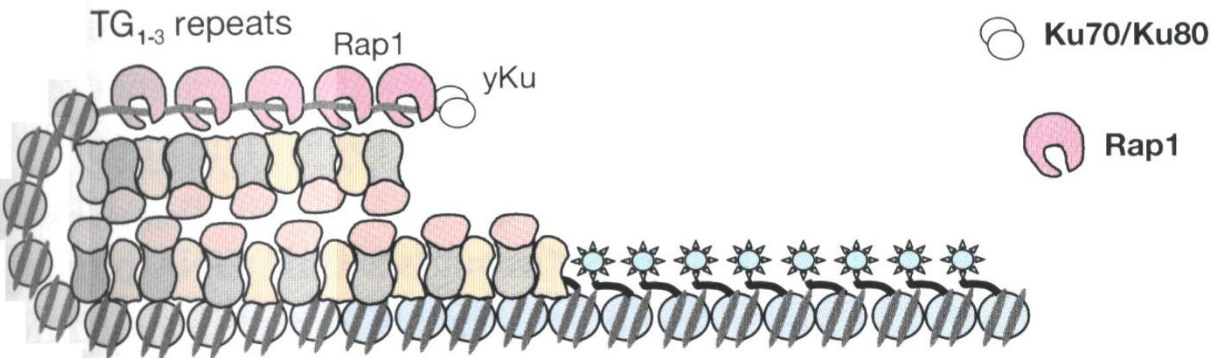
Silent Information Regulatory PROTEINS (SIR1, SIR2, SIR3 a SIR4)

- Zajišťují represi umlčených HM lokusů, mutace sir2, sir3 a sir4, mutace vedou ke ztrátě konjugace (současná exprese a, α) a sterilitě
- Mutace sir1 způsobuje, že pouze frakce MATa buněk není schopna vzhledem ke ztrátě HM represe konjugovat:
tyto alternativní stavy (mating a non-mating) jsou při buněčných děleních dědičné – příklad epigeneticky řízené represe
- Proteiny SIR1, 3 a 4 jsou přítomny jen u *Saccharomyces* (kvasinek)
- **SIR2 patří do rodiny NAD (nikotinamid) - dependentních histon deacetyláz, vysoce konzervativních umlčovacích proteinů od bakterií až ke člověku**

MODELY KVASINKOVÉHO HETEROCHROMATINU

Oba typy umlčovacích mechanismů využívají SIR komplexy (Rap1, Sir2, Sir3 a Sir4): telomery navíc využívají proteiny Ku, HM lokus faktory ORC, Abf1 a Sir1

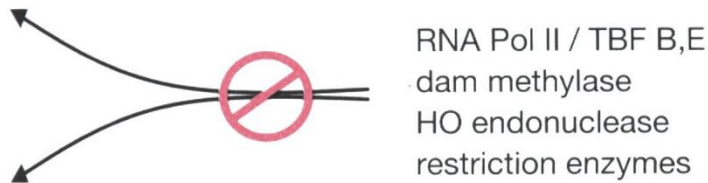
Telomeric heterochromatin



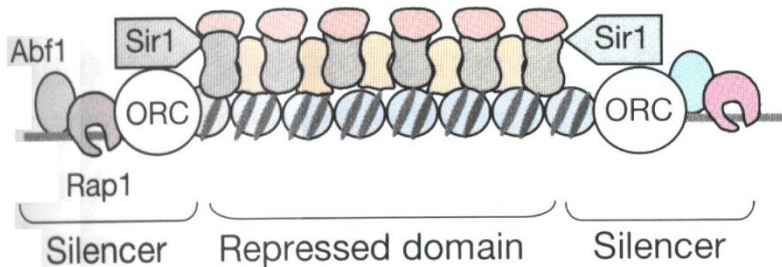
Ku70/Ku80

Rap1

-**Telomerický heterochromatin** se ohýbá a tvoří čepičku, která brání telomeru před degradací a která kondenzuje a umlčuje přilehlé geny.



RNA Pol II / TBF B,E
dam methylase
HO endonuclease
restriction enzymes



SIR complex

Sir3 Sir2
Sir4

acetyl group

nucleosome

- **HM heterochromatinová** doména mezi umlčovacími elementy sestává z komprimovaných nukleosomů

Jak telomerické, tak HM oblasti jsou nedostupné pro transkripci i degradující enzymy.

HM heterochromatin

SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE Lindner

Taxonomické zařazení: Ascomycetes

Čeleď: Schizosaccharomycetaceae

Synonyma:

Schizosaccharomyces vordermani
Schizosaccharomyces mellacei
Schizosaccharomyces formosensis
Schizosaccharomyces formosensis var. akoensis
Schizosaccharomyces formosensis var. tapaniensis
Schizosaccharomyces santawensis
Schizosaccharomyces saitoi
Schizosaccharomyces liguefaciens
Schizosaccharomycas acidodevoratum
Schizosaccharomyces pombe var. acidodevoratum
Schizosaccharomyces malidevorans

„půdní kvasinka“ = fission yeast



Morfologické znaky:

Tvar a velikost vegetativních buněk [μm]: Vytváří kulovité, elipsoidní i krátké válečkovité buňky. Velikost buněk je (3-5)x(5-15) Někdy narůstají do délky až 20 Pseudomycelium se nevytváří, jen k

Vzhled a konzistence kolonií: Kolonie a nátěr jsou krémové až světle hnědé, měkké, hladké nebo slabě zvrásněné. Okraj je celistvý. Kolonie rostou poměrně pomalu, průměrně 2,18 mm/100 h.

Charakter nárůstu v kapalném mediu: V kapalném živném prostředí při teplotě 20° C se na povrchu kapaliny vytváří po týdnu prsteneček.

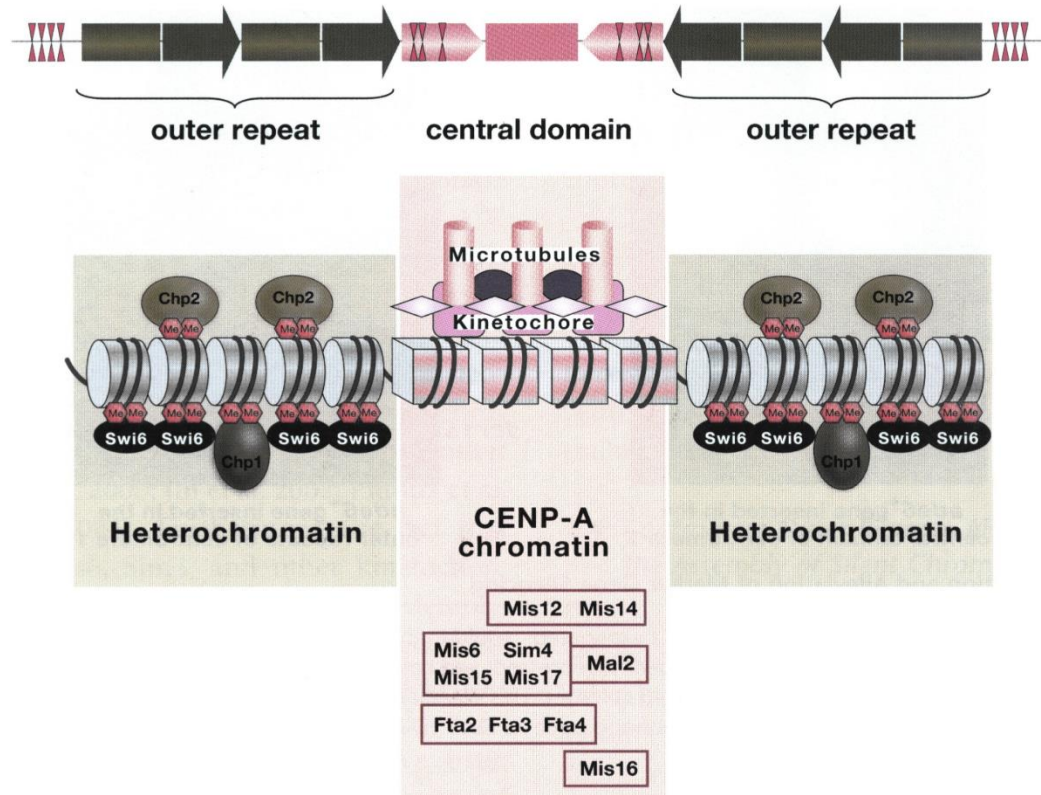
Způsob rozmnožování:

Vegetativní rozmnožování - Vegetativně se rozmnožuje dělením přehrádkami.

Pohlavní rozmnožování - Tvorbě asků předchází izogamní konjugace. V homothalických kmenech se vytváří spóry na [sladinovém agaru](#) už asi za týden. Spóry se v zralosti uvolňují z asků tak, že stěží zpravidla 4 spóry, ale může jich tam být méně. Spóry jsou kulovité nebo elipsoidní a barví se Lugolovým roztokem na modrofialovo. Spóry uvolněné z asků se zhlukují.

Její genom (14Mbp) je složen z pouhých tří velkých chromozomů – proto se u ní studuje centromerický poziční efekt.

Model heterochromatinizace centromery u *S. pombe*



Chromatinové umlčování je odlišné od *S. cerevisiae* (SIR proteiny):

u *S. pombe* je to kombinace jiné modifikace histonů (zejména H3K9 metylace) a RNAi.

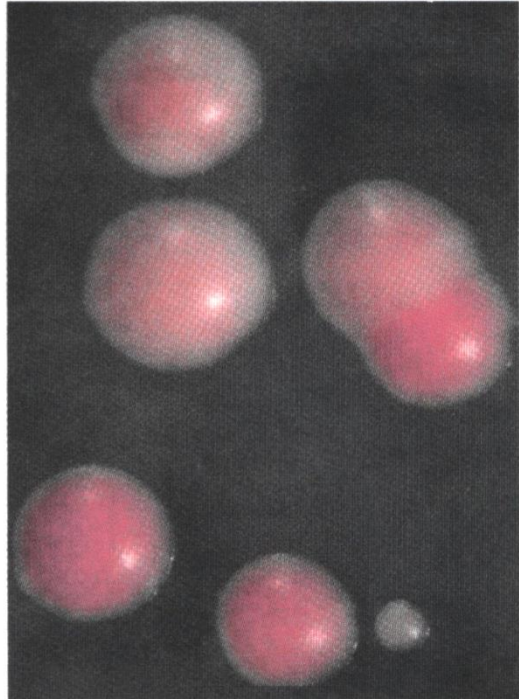
Na rozdíl od *N. crassa* a vyšších eukaryot nejsou metylace cytosinu.

Stejně jako u vyšších eukaryot se umlčují i centromery (a u nich umístěné geny).

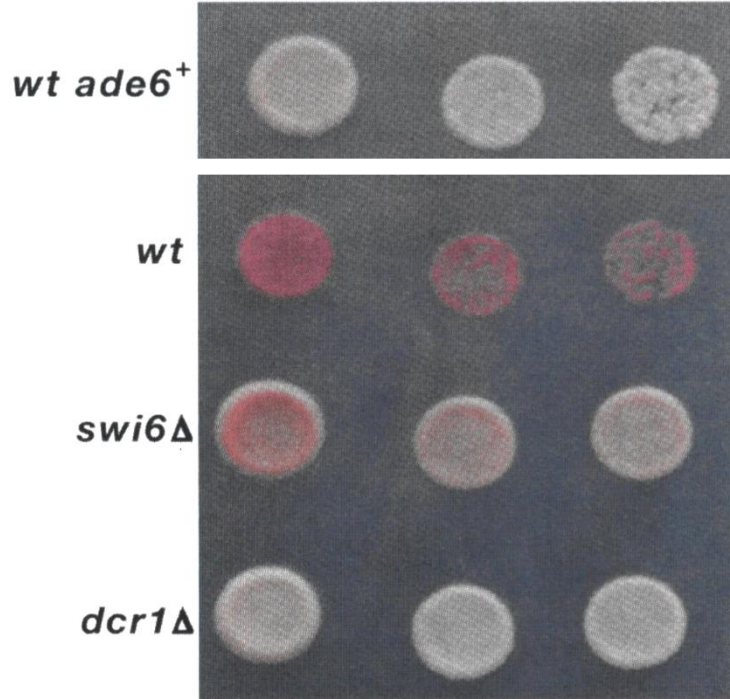
VARIEGACE CENTROMERICKY LOKALIZOVANÉHO MARKEROVÉHO GENU *ade6*⁺ u *Schizosaccharomyces pombe*

variabilní
exprese
ade6⁺,

buňky
s funkčním
genem
jsou bílé



ade6⁺ gene inserted in the central domain of centromere 1



ade6⁺ gene inserted in the outer repeats of centromere 1

kontrola v
jiné lokaci

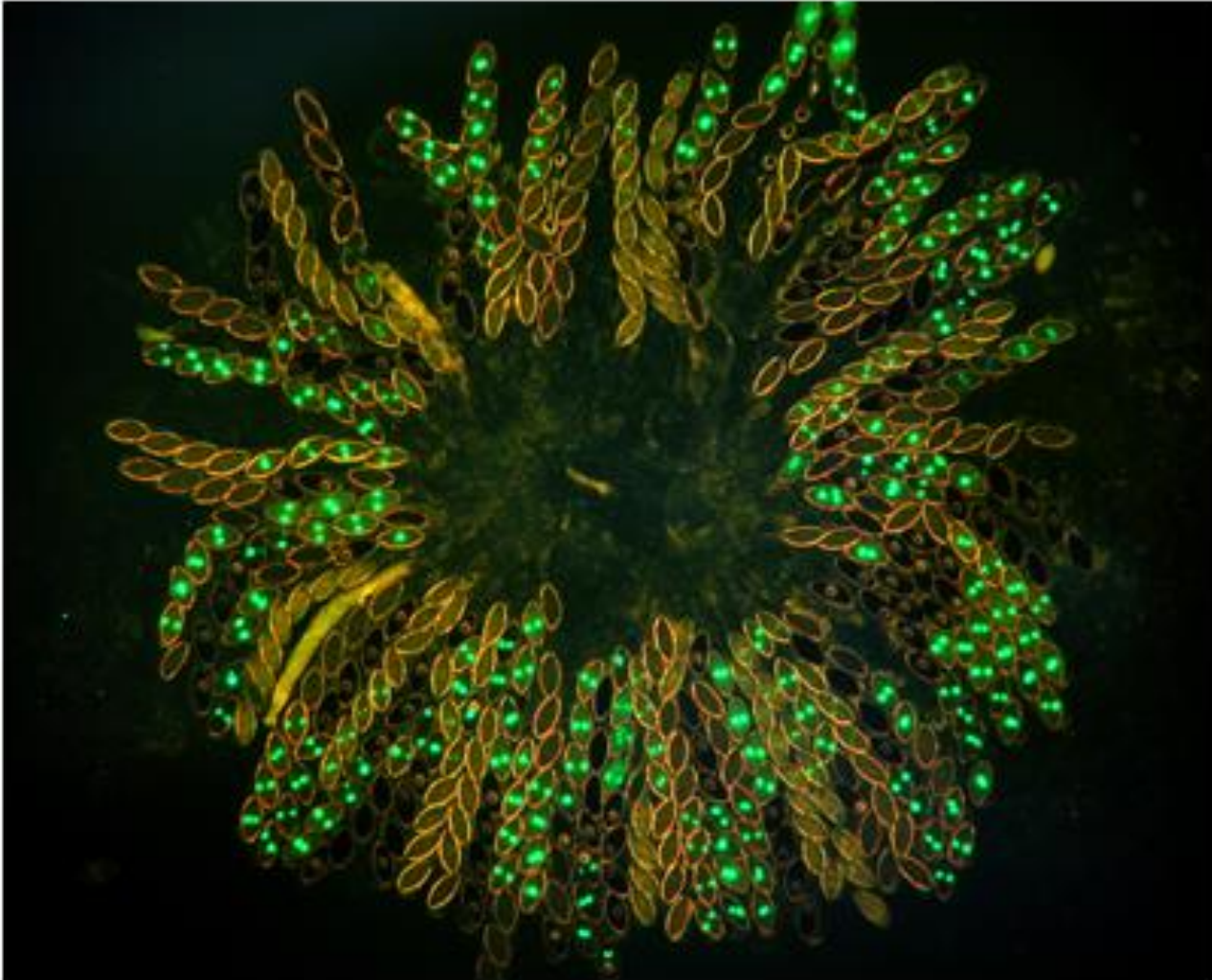
rozsáhlé
umlčování

mutace v
metylacii
H3K9

mutace
diceru
(RNAi)

reportérový gen *ade6*⁺ – tvoří bílé kolonie, zatímco mutant či umlčený gen tvoří červené kolonie či sektory (díky akumulaci červeného intermediátu v biosyntéze adeninu)

Neurospora crassa – **PLÍSEŇ** chlebová - Ascomycetes

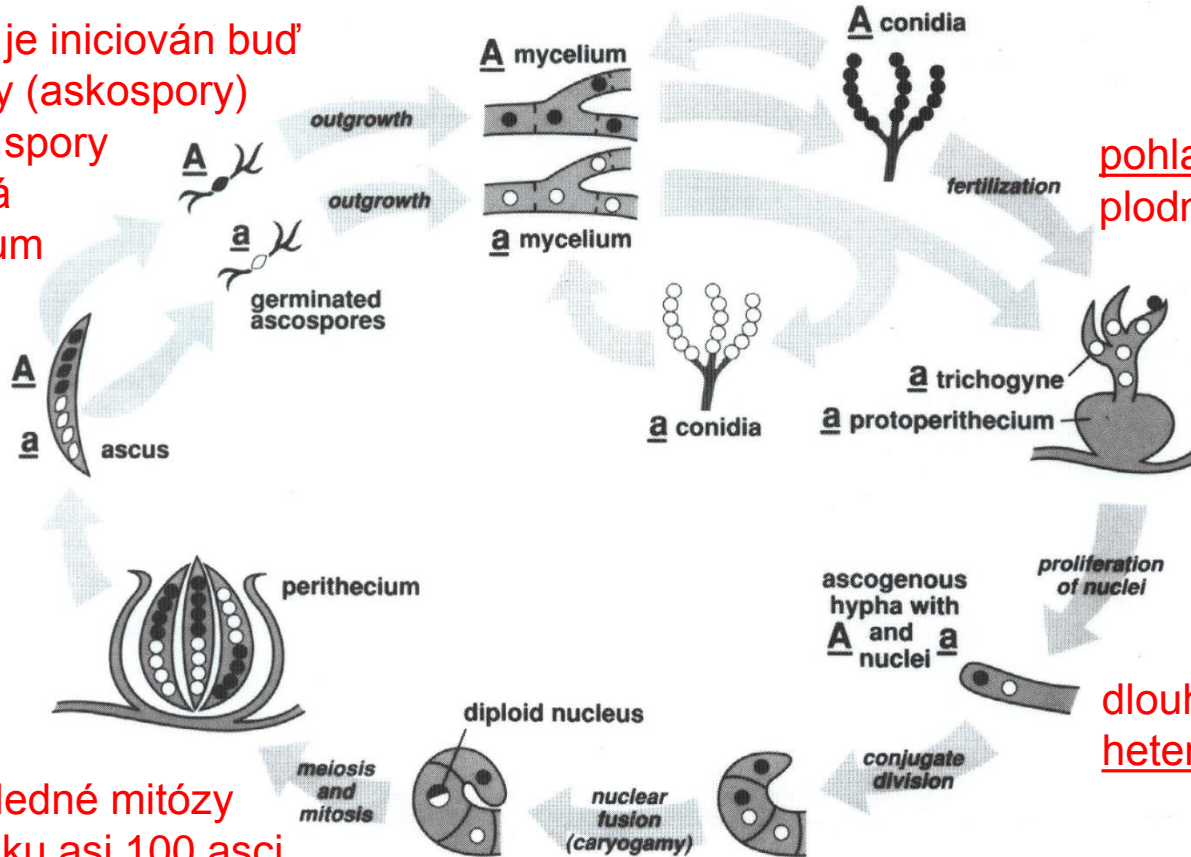


ŽIVOTNÍ CYKLUS VLÁKNITÉ PLÍSNĚ *NEUROSPORA CRASSA*

tvorba oranžových konidií s 1-více jádry
vede k novým vegetativním kulturám
nebo plodným křížením

haploidní

vegetativní růst je iniciován buď
z pohlavní spory (askospory)
nebo asexuální spory
(conidia), vzniká
větvené mycelium
(hyfy),
pohlavní typy
A, a jsou
morfologicky
neodlišené



pohlavní fáze tvoří
plodnice (protoperithecia),
hyfa trichogyne
uloví jádro opačného
sex-typu

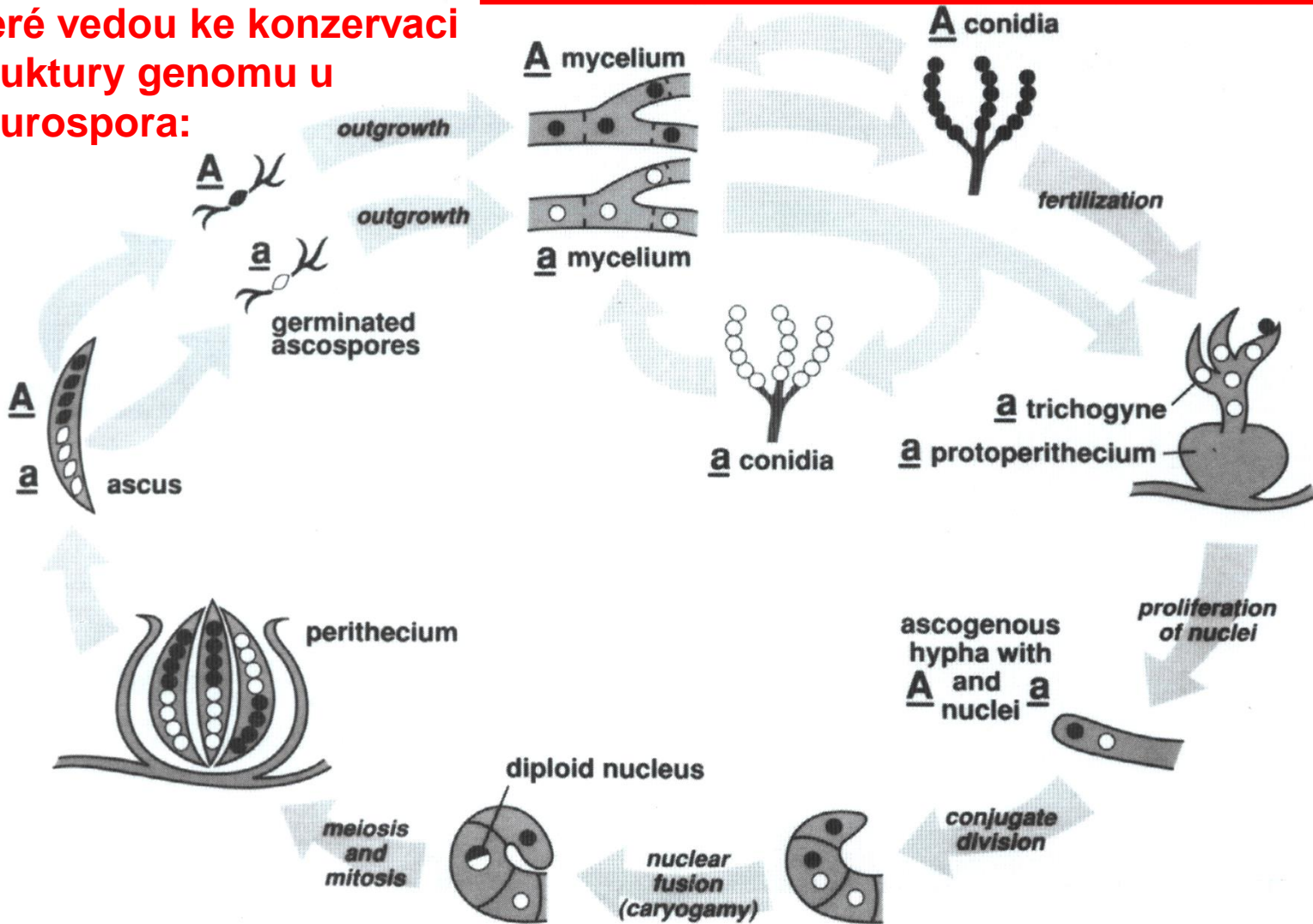
dlouhá
heterokaryotická fáze

meioza a následné mitózy
vedou ke vzniku asi 100 asci
(vřecek) odvozených
z maternálního
či paternálního jádra

karyogamie (fúze
jader, diploidie)

TŘI epigenetické procesy, které vedou ke konzervaci struktury genomu u Neurospora:

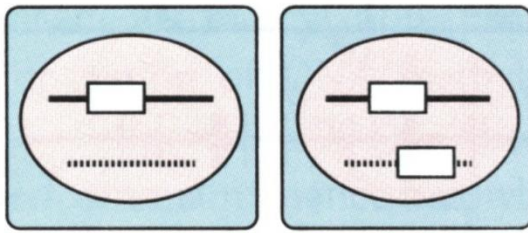
DNA Methylation; Quelling = potlačení genové exprese



MSUD = meiotic silencing by unpaired DNA

RIP = repeat-induced point mutation

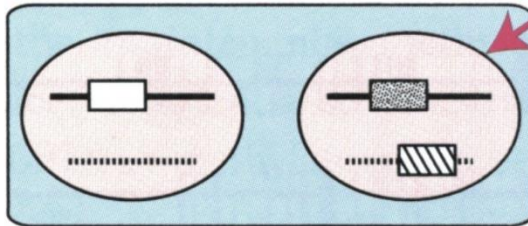
haploidní
spóry



duplikovaný
gen (na dvou
chromosomech)

fertilization

hetero-
karyon

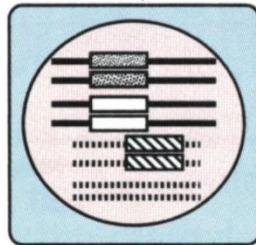


metylační
umlčování
(= RIP)

premeiotic DNA synthesis

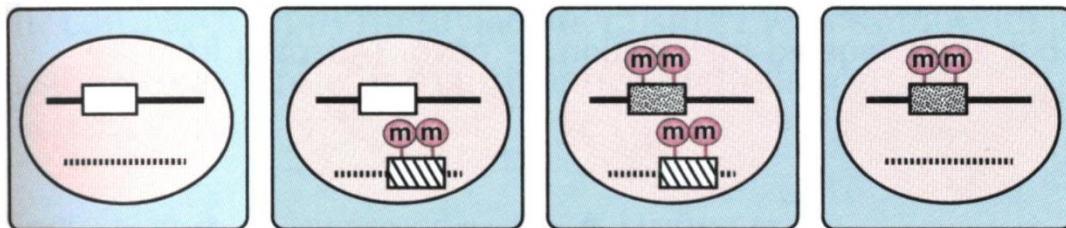
karyogamy

RIP



čtyři možné kombinace
chromozomů
v potomstvu
(— C-T tranzice,
m = metylace DNA)

meiosis



Eric Selker (U of Oregon, 1990)

Repeat-Induced Point Mutation

Obranný systém genomu,
jakákoli duplicitní vnesená či
přirozená sekvence DNA
indukuje metylaci *de novo*.

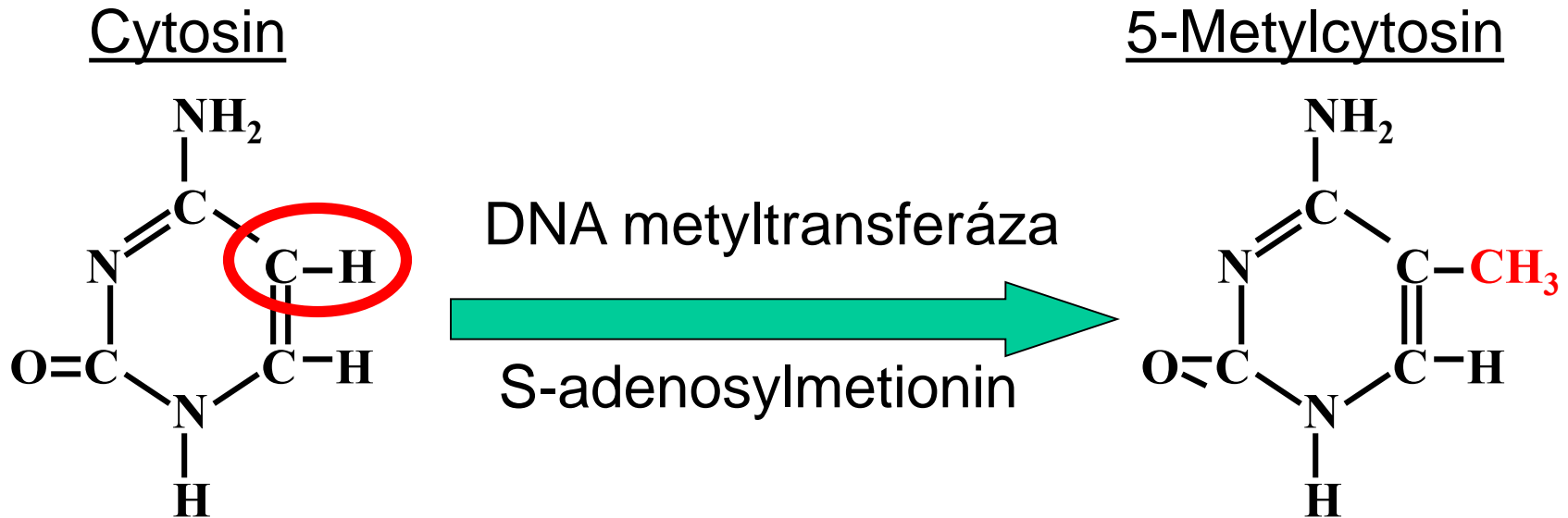
Metylcytosin je četně při replikaci
DNA deaminován za vzniku
tyminu (bodové mutace).

RIP omezen na sexuální fázi,
souvisí s metylací a acetylací
histonů, likvidace repeticí má u *N.
crassa* značný dopad pro evoluci
genomu.

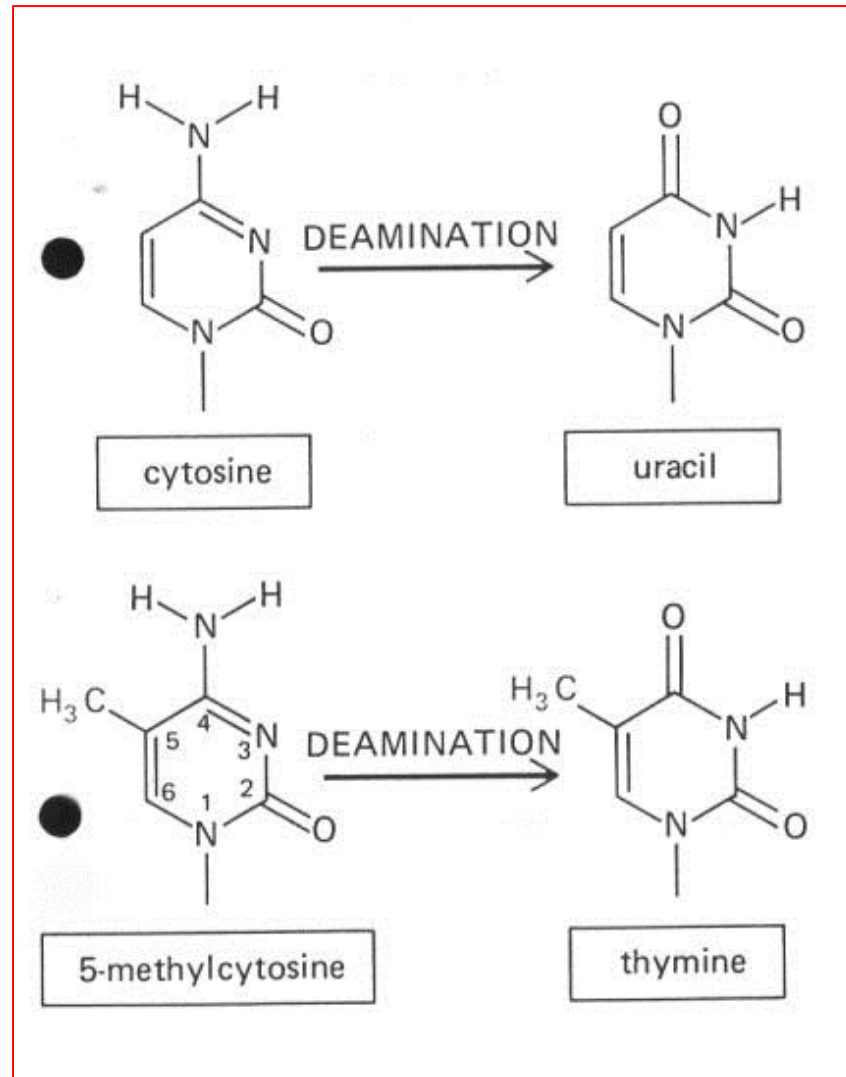
Metylace DNA

Adice metylové skupiny (CH₃) na 5. uhlík cytosinu

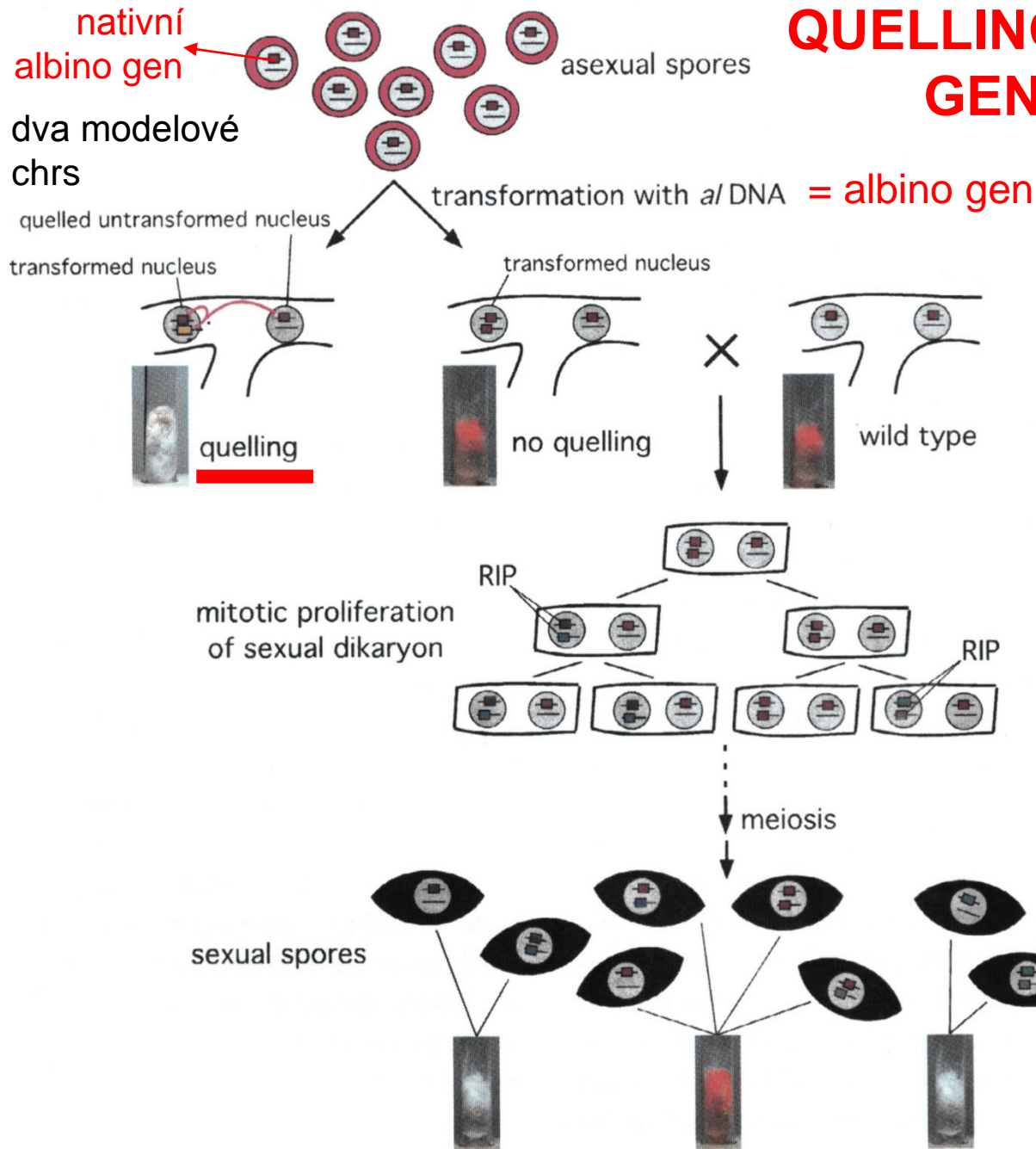
- Obvykle probíhá pouze na cytosinech 5' vůči guanosinu (CpG)



Mutace 5'-metylcytosinu nemohou být identifikovány a reparovány



QUELLING aneb POTLAČOVÁNÍ GENOVÉ EXPRESE



Transformace nativním genem (albino) vede k potlačování exprese transgenů nebo homologního genu *N. crassa*.

Probíhá během vegetativního vývoje a projevuje se nejen v transformovaných jádrech mycelia, ale je i neznámým způsobem vyjádřeno v jádrech netransformovaných.

Srovnává se s post-transkripčním genovým umlčováním (ko-suprese u rostlin), souvisí výhradně s RNAi mašinerií vedoucí k degradaci homologních RNA.

MEIOTICKÉ UMLČOVÁNÍ NEPÁROVANÉ DNA (MSUD, 1996)

	Meiotic Prophase	Expression?
paired wt alleles		Yes
deletion allele		No
ectopic allele		No
paired null allele		Yes
paired ectopic alleles		Yes
methylated allele		No
unmethylated heavily RIP'd allele		No
extra ectopic allele		No

Sekvence DNA, které postrádají svého párujícího partnera v meiotické profázi, mohou způsobovat meiotické umlčování identických sekvencí DNA.

Pozorováno u delečního mutantu *Asm-1*, funkčně dominantní.

Jev souvisí s quellingem a RNAi mašinerií.

... v hlavní roli :

nezmar,

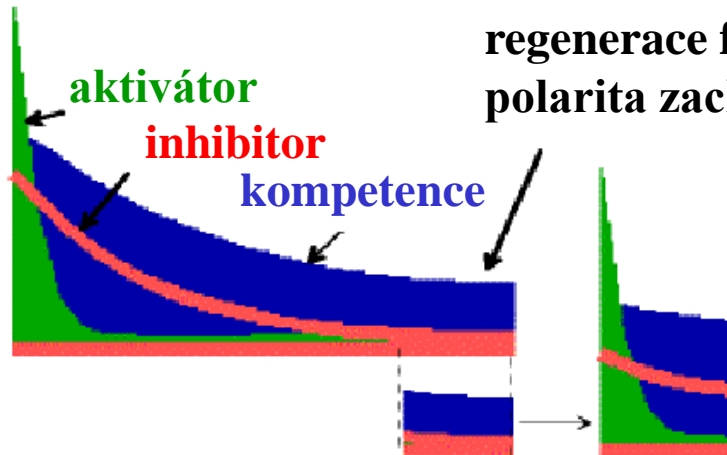
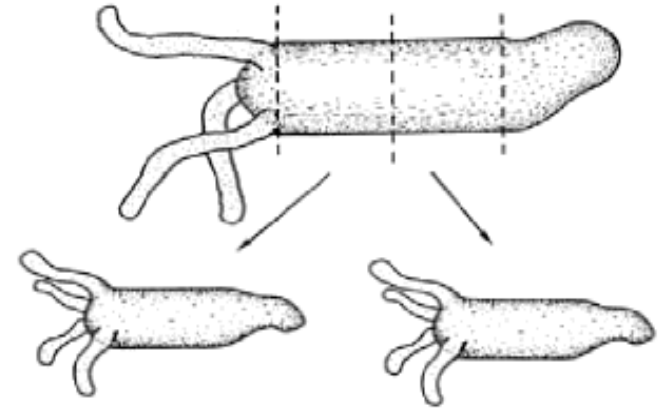
*první opravdové zvíře,
či "jenom" rostlina !?*





Abraham Trembley
(1710-1784)

HYDRA : model lineárních gradientů morfogenů s rysy živočicha i rostliny

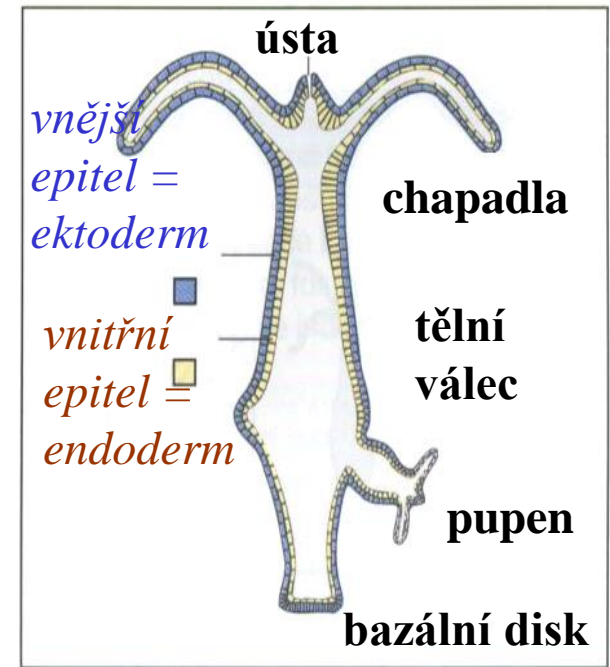
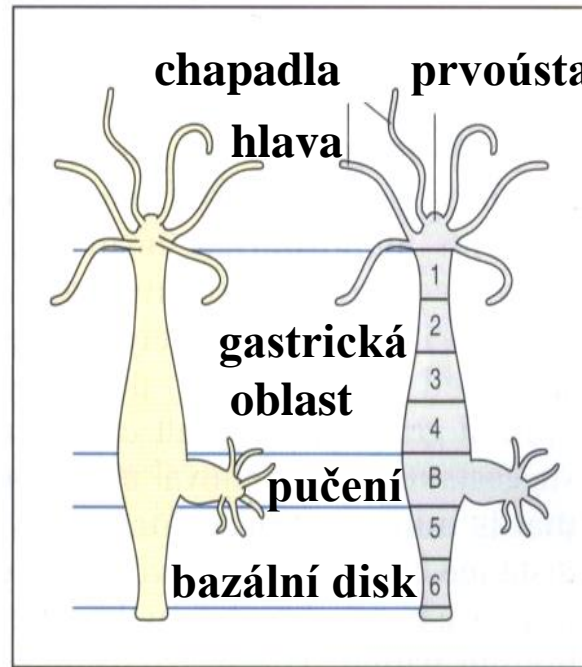
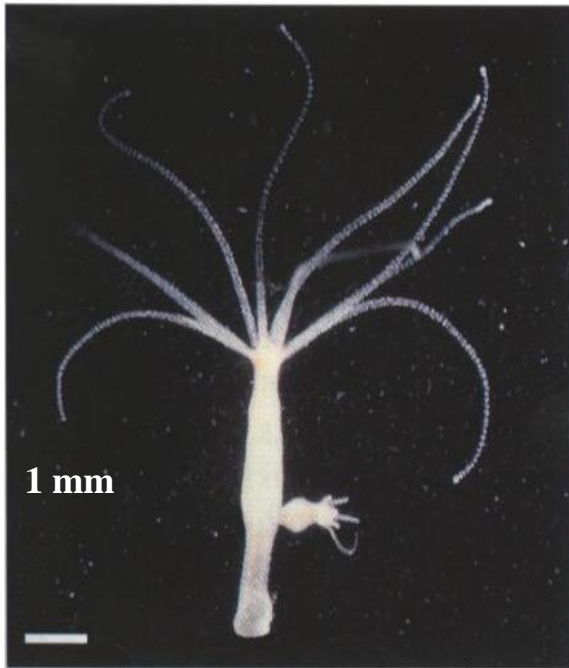


Model regenerace:

Hydra – nezmar –

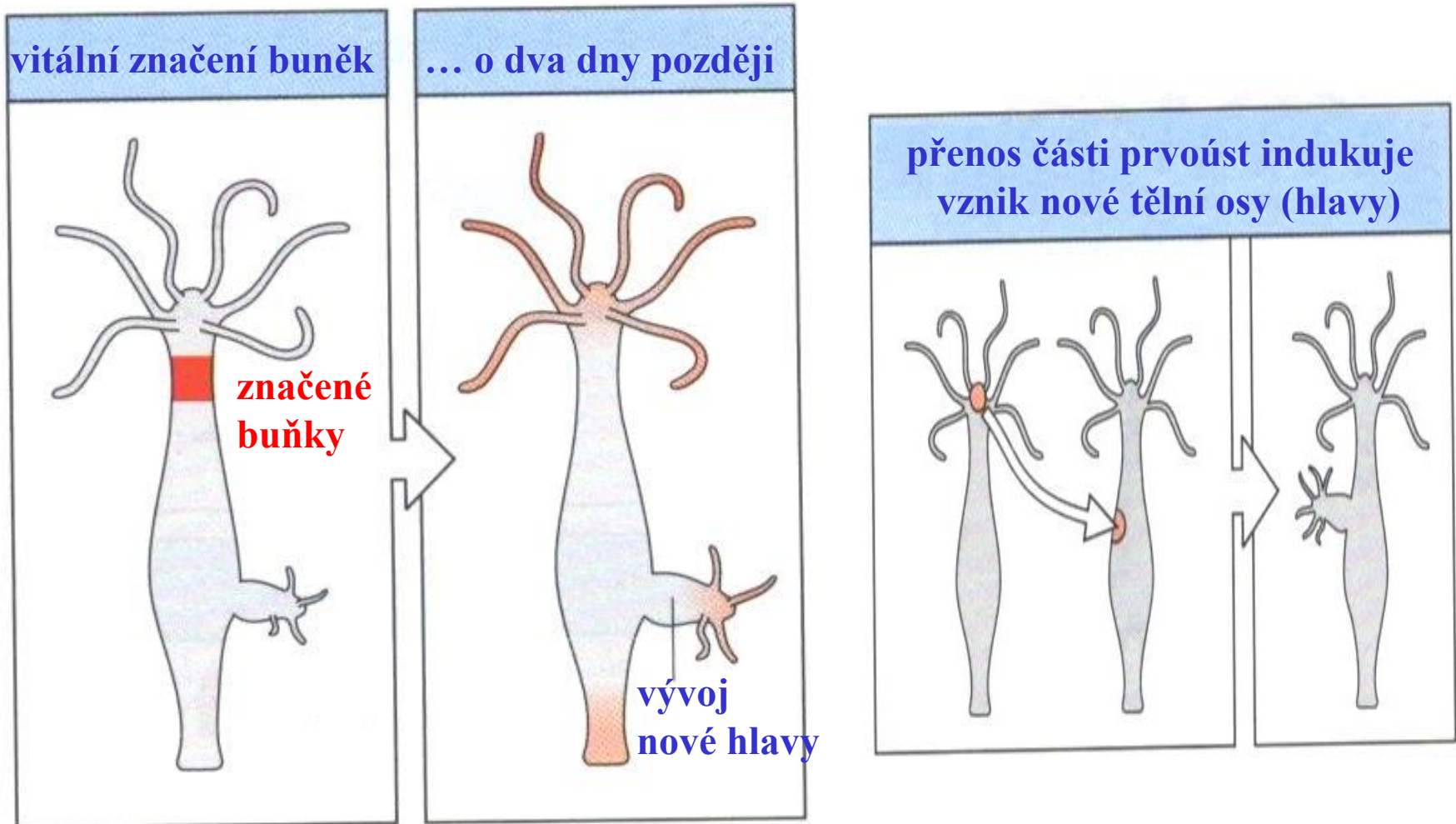
primitivní (dvoulistý prvoústý vodní) živočich

model (ne)stárnutí díky aktivitě intersticiálních buněk



Charakteristika modelu Hydra :

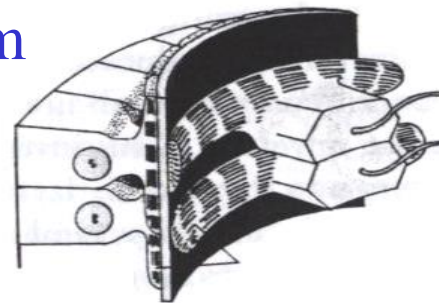
- buňky tělního válce se stále dělí a přeskupují
- buňky okolí prvoúst indukují novou tělní osu v gastrické oblasti jiného nezmarara



Základní typy tkání a buněk nezmara :

ektoderm

endoderm



buňky intersticiální

kmenové buňky

buňky žláznaté

nervové buňky

buňky zárodečné

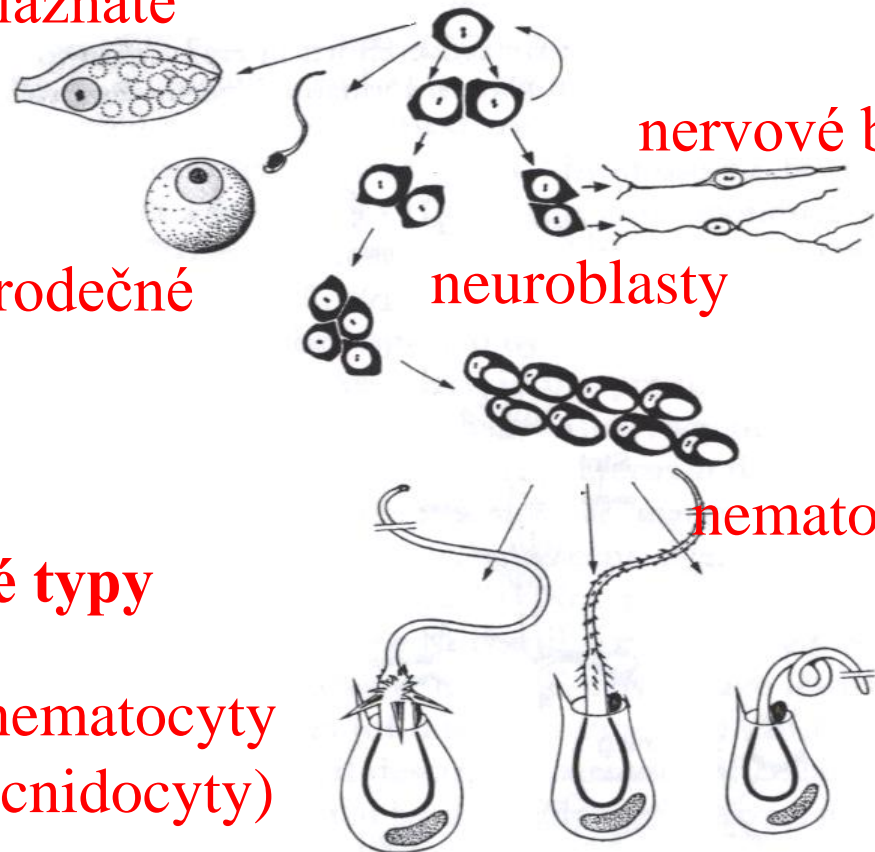
neuroblasty

nematoblasty

nematocyty
(cnidocyty)

(i) architekturu těla
určuje vnější
a vnitřní epitel

(ii) intersticiální buňky
zahrnují buňky kmenové
a z nich odvozené buněčné typy



Základní typy regenerace :

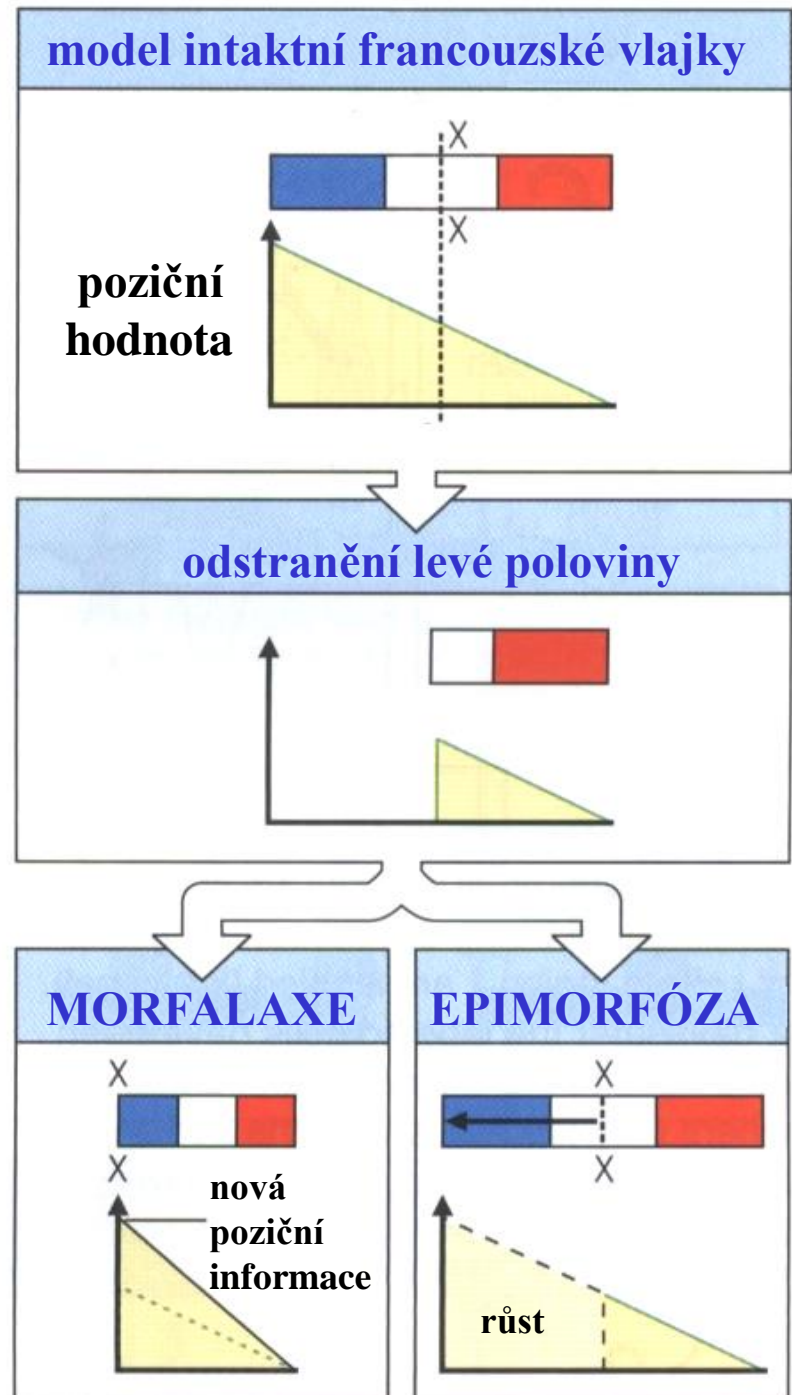
MORFALAXE

*probíhá „přestrukturováním“
existujících tkání a založením
nových „rozhraní“
(př. nezmar)*

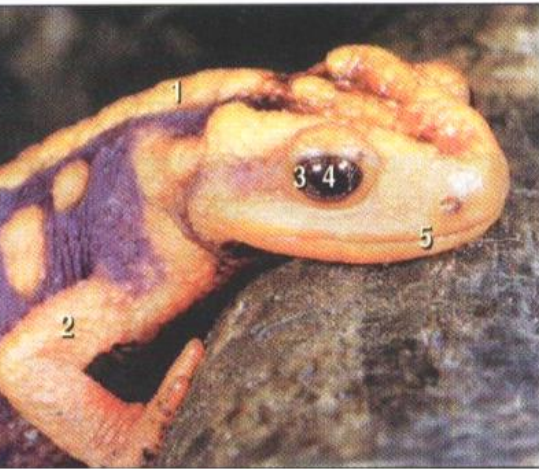
versus

EPIMORFÓZA

*závisí na růstu nových, správně
uspořádaných struktur
(př. noha čolka)*

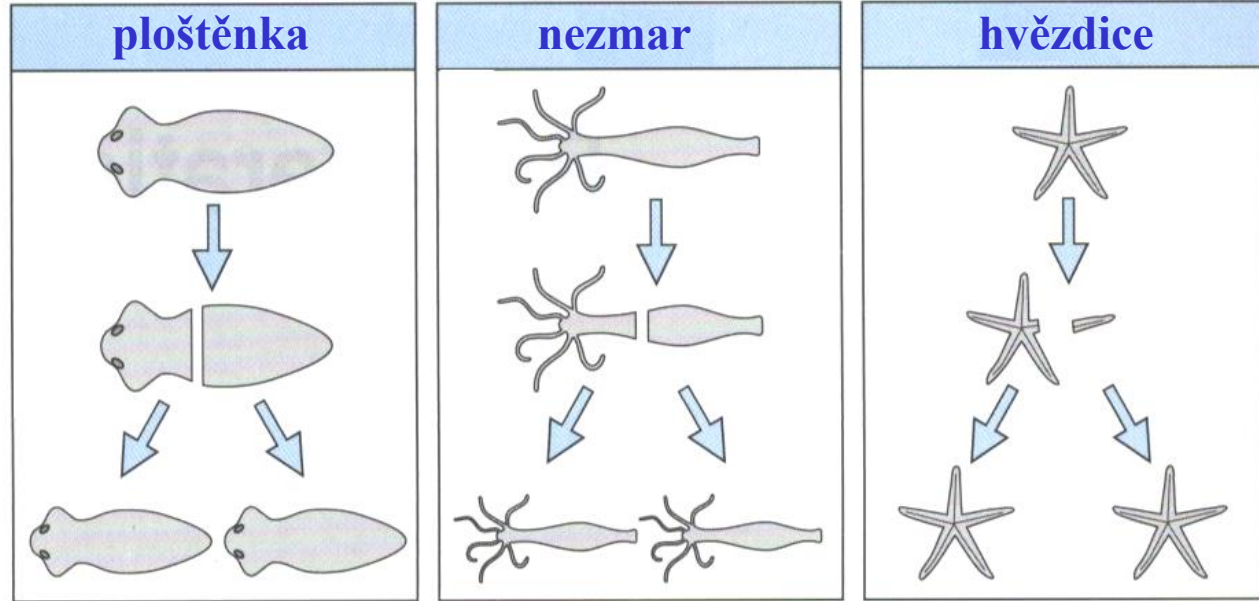


MLOK : může regenerovat svou dorsální rýhu (1), končetiny (2), sítnici (3), čočku (4), čelist (5) a ocas

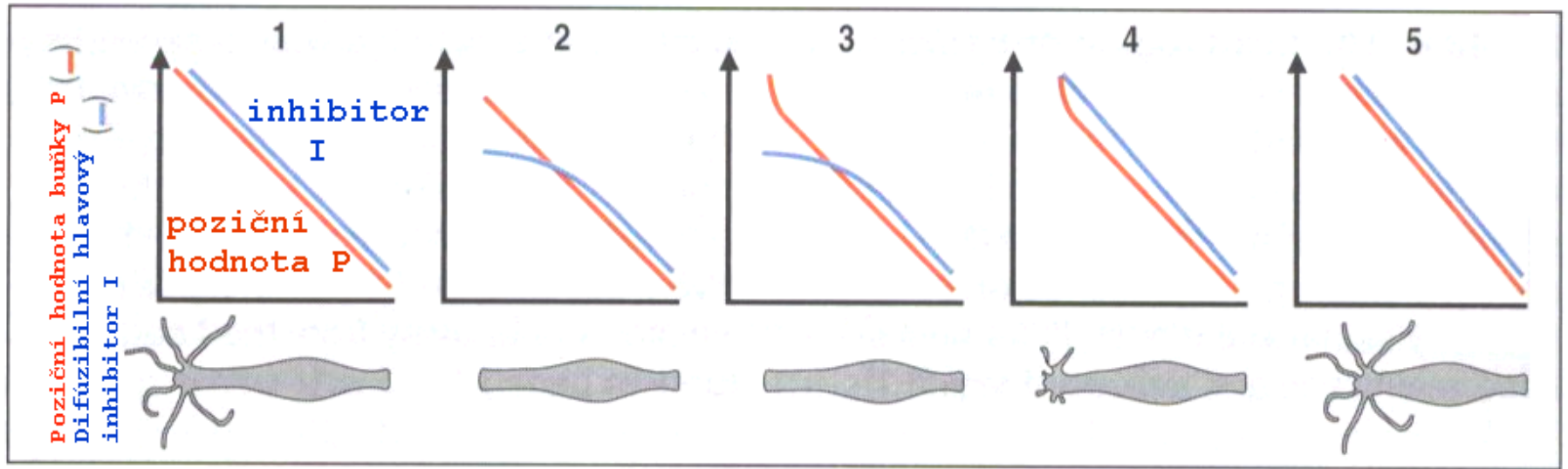


Regenerace oční čočky u MLOKA :

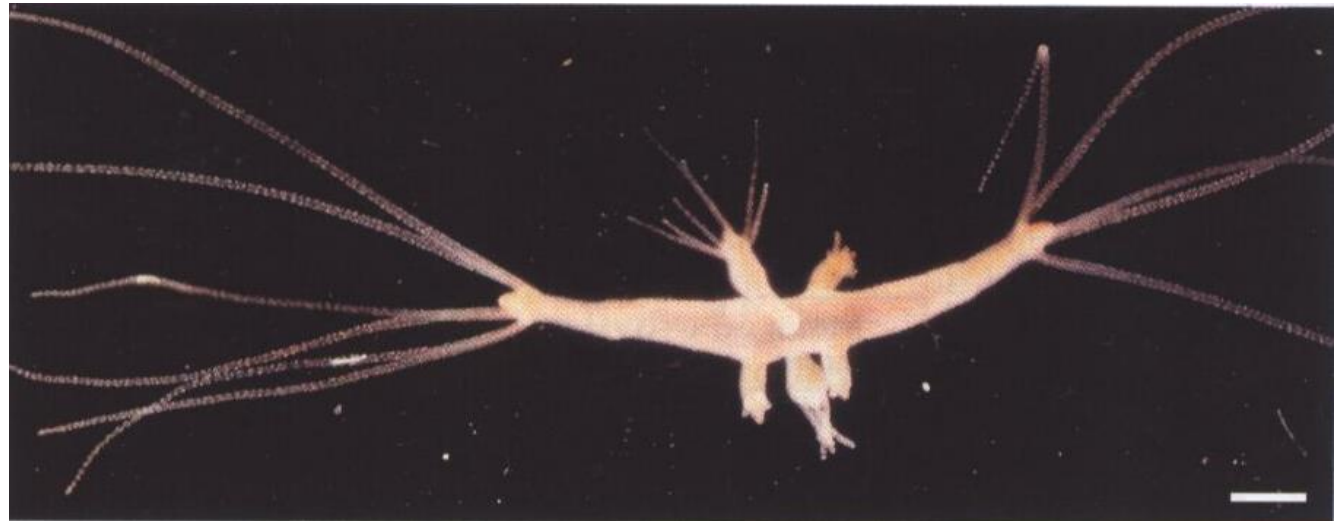
Systémy regenerace u některých BEZOBRATLÝCH :



Model regenerace hlavy u nezmara



fenokopie indukovaná diacylglycerolem : DAG je sekundární messenger, který zvyšuje poziční hodnotu buněk a vyvolává ektopickou „mnohohlavost“



Charakteristika modelu nezmara :

- jednoduchý mnohobuněčný živočich, 15 typů / 100 tisíc buněk
- rozmnožování převážně vegetativní
- hermafrodit, nemá zárodečnou linii
- diblastický živočich s intersticiálními buňkami
- hlavové morfogeny – aktivátor a inhibitor
- model biologické zpětné vazby (inhibice a aktivace)
- regenerační schopnost typu morfalaxe
- model poziční informace – francouzská vlajka (magnet)
- součástí růstu a diferenciaci je buněčná migrace
- první nervová soustava (rozptýlená)
- intersticiální buňky směřují k ireverzibilní diferenciaci
- řada znaků vývoje podobná s rostlinami