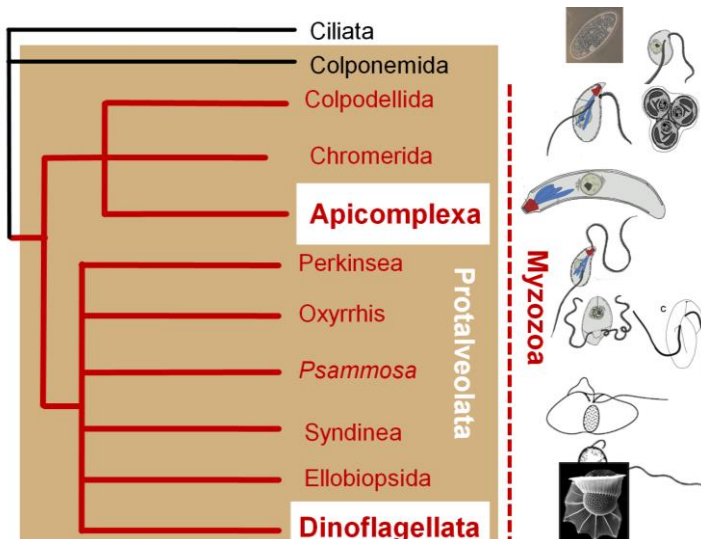


MYZOZOA – PROTISTOLOGIE 2019

Tento text obsahuje veškeré informace potřebné ke zvládnutí otázek týkajících se myzozoi na zkoušce z protistologie. Při zkoušce nebude kladen důraz na znalost přesných hodnot – počet druhů, velikosti genomů atd. – ale na pochopení problematiky jako celku. Poznámky pod čarou a drobný text slouží k doplnění hlavního textu a nebudou u zkoušky vyžadovány.

Dnešní přednáška se týká především skupiny Myzozoa, jejíž název a složení brzy objasním. Nejprve se však v krátkosti podíváme na drobnou, ale evolučně velmi zajímavou, skupinu **Colponemida**, která se fylogeneticky větví mezi nálevníky (minulá přednáška) a myzozoi. Colponemy pravděpodobně představují morfotyp předka všech alveolát. Jedná se o dvoubičíkaté drobné predátory. Pod povrchem mají alveoly. Fagocytují kořist v celku, na rozdíl od mnoha myzozoi a neobsahují plastidy. V současnosti známe dva rody *Colponema* a *Acavomonas*.

Všechny další organizmy popisované v tomto textu náležejí do skupiny Myzozoa navržené Cavalierem-Smithem. Název myzozoa je odvozen od **myzocytózy**, což je modifikovaná fagocytóza, při které predátor naruší povrch buňky a vysává cytoplazmu kořisti. Používá k tomu mikrotubuly podpořený „sosák“, který se nazývá konoid nebo u obrněnek pedunkl. Do tohoto sosáku většinou ústí exkretční orgány jako jsou mikronemy nebo rhoptrie. Většina dnešních myzozoi se myzocytózou neživí, to platí především o zástupcích nediverzifikovanějších skupin – apikomplexa a obrněnky. Protože se však myzocytóza vyskytuje ve všech hlavních skupinách (byť jen u menšiny jejich zástupců), soudí se, že se jedná o původní způsob obživy předka všech myzozoi. Myzozoa patří mezi Alveolata a jako taková mají pod povrchem přítomny **alveoly**. Ty mohou být buď prázdné, nebo vyplněny celulózními pláty, jako v případě některých obrněnek. Většina skupin má alveolů několik, apikomplexa mají jeden velký plochý alveol téměř pod celým povrchem buňky. Myzozoa jsou součástí skupiny Chromista a jako správná Chromista mají často plastidy. Nejnápadnější jsou plastidy dinoflagelátů. Nefotosyntetické pozůstatky plastidů se ovšem našly i u dalších skupin – apikomplexa („apikoplast“), *Perkinsus*. Většinou se jedná o **komplexní** (raději neuvádím, zda sekundární či vyššího řádu) **červený plastid**, jak předpokládá chromalveolární hypotéza. Nejvýznamnějšími a druhově nejbohatšími skupinami myzozoi jsou apikomplexa a obrněnky. Kromě těchto velkých skupin tam však najdeme ještě řadu menších linií, které jsou z evolučního pohledu velmi zajímavé, protože tvoří morfologické přechody mezi zmíněnými velkými skupinami. Jak uvidíme, slůvko menší linie možná není u



některých z nich na místě, protože jejich diverzita je možná poměrně veliká, jen se jedná o nenápadné a ne příliš známe organizmy. Příbuzenské vztahy mezi apikomplexy, obrněnkami a těmito ostatními liniemi není zatím dobře vyřešen. Didakticky si můžeme zmíněné ostatní linie shrnout do skupiny **Protalveolata** (vše v hnědém poli na obrázku). Tato skupina zahrnuje jednak bakteriovorní a eukaryovorní predátory (*Colpodellida*, *Oxyrrhis* a *Psammosa*), parazity (*Perkinsea*, *Syndinea* a *Ellobiopsida*) a také fototrofní symbionty (*Chromerida*). Musíme si však být vědomi toho, že se

nejedná o přirozenou (monofyletickou skupinu).

První skupinou protalveolát, které ještě neřadíme mezi myzozoa, jsou colponemidi. Jedná se o fagotrofní bičíkovce požírající jak prokaryota, tak eukaryota. Někteří z nich mají vyvinutou břišní rýhu. Pod cytoplazmatickou membránou mají alveoly. Colponemidi vytváří několik větví umístěných mezi nálevníky a myzozoi. Nejedná se tedy o monofyletickou skupinu. Představujeme si, že morfologie colponemidů je podobná morfologii prvních alveolát.

Dále se zaměříme na linii spadající již do myzozoi a větvící se na části stromu vedoucí k apikomplexům. Nejvíce prozkoumaným zástupcem skupiny Colpodellida je rod **Colpodella**, myzocytický predátor, který napadá nejčastěji nálevníky (například *Colpoda* – odtud název) nebo řasy (zelené řasy, skrytěnky). Má otevřený konoid, rhoptrie a dva bičíky, přední má na povrchu vlášení. Po nasátí *Colpodella* pokračuje ve svém životním cyklu v sedimentu, kde vytváří stádium cysty. V kulovité cystě se bezbičíkatá buňka postupně dělí na čtveřici buněk, ze kterých opět vznikají bičíkovci, kteří opouštějí cystu. Colpodelly, které byly detailněji studovány, nemají plastid, existují však pozorování něčeho, co připomíná colpodellu s funkčním plastidem.

Skupina **Chromerida** sestává ze dvou poměrně nedávno objevených druhů, *Chromera velia* a *Vitrella brassicaformis*. Jedná se o fotosyntetické endosymbionty korálů, kteří na první pohled připomínají dinoflagelátí symbiodinia (viz níže). Sekvence však ukázaly, že se jedná o blízké příbuzné apikomplex a colpodelidů¹. Kulovité stadium *Chromera* z korálů je téměř celé vyplněno plastidem, jádrem a kompartmentem, který byl dříve považován, za mitochondrii, ale jedná se o tzv. chromerosom (viz obr. vlevo dole na snímku). *Chromera* vytváří i volně plovoucí bičíkatá stadia připomínající colpodellu². Kulovitá (kokoidní) stadia často vytváří cysty, ve kterých jsou 4 buňky obalené tenkou stěnou. Za určitých okolností buňka vytváří uvnitř chromerosomu tyčovitou strukturu tvořenou fibrilami a neznámé funkce. Může se jednat o obrovský ejektosom a při zblžném pohledu to připomíná píston obrněnek (viz níže). Také *Vitrella* se po většinu svého života vyskytuje ve formě kulovitých buněk. Vegetativní kulovitá buňka roste a obalí se tlustou průhlednou stěnou. Uvnitř této stěny pak z vegetativní buňky mohou vzniknout dva typy sporangií. Buď se rozpadne na menší kulovité buňky (zelené autosporangium) nebo na mnoho bičíkatých buněk (oranžové zoosporangium). Bičíkovci opět připomínají colpodellu nebo bičíkaté stádium chromery. Na objevu a studiu chromery a vitrelly se zásadní měrou podíleli vědci z Jihočeské university. O plastidech chromery a vitrelly se ještě zmíníme v souvislosti s nefotosyntetickým plastidem apikomplex a plastidem obrněnek.

Studie založené na environmentálním sekvenování³ ukazují, že diverzita větve colpodelidů a chromeridů je mnohem větší než popsané druhy. Kromě zmíněné colpodelly a chromeridů do této větve spadají další popsané druhy **Alphamonas** a **Voromonas** ale navíc ještě množství linií, ze kterých v současnosti známe jen sekvence některých genů (rRNA, plastidové geny). Příbuzenské vztahy v rámci větve chromeridů a colpodel nejsou jasné (viz. kruhový strom na snímku č. 9).

¹ Ve skutečnosti *Chromera* a *Vitrella* tvoří společnou větev, ale parafylum (postupně se odvětvují) na bázi colpodel.

² Tvorbu těchto stádií lze indukovat v laboratoři změnou světelného režimu.

³ Environmentální sekvenování se provádí následovně. Nejprve se ze vzorku z přírody vyizoluje celková DNA. Vzorkem z přírody byly v případě zmiňované studie filtry z mořského planktonu. Z celkové DNA se pak metodou PCR pomocí univerzálních primerů namnoží gen pro rRNA. Výsledné produkty jsou tedy směsí molekul rRNA pocházejících z různých organismů přítomných ve vzorku. Tato směs se poté hromadně zaklonuje do bakteriálních plazmidů. Vznikne tak environmentální knihovna. Z té se potom sekvenují jednotlivé namnožené klony. Ty obsahují vždy jeden typ molekuly rRNA namožený do mnoha kopií. Získané sekvence se potom přidávají do fylogenetického stromu. Často některé získané sekvence jsou identické nebo velmi podobné známým organismům a je tedy zřejmé, že pochází z nich.

Fotosyntetických zástupců, žije v mořích také mnohem větší množství, jak ukazuje strom plastidových rRNA (snímek 14). Kromě linií, ve kterých sedí nám známá *Chromera* a *Vitrella*, se tam nachází 6 dalších linií (AL VI – ALV VIII). Některé z nich jsou blíže apikomplexům než *Chromera*. Jejich studium bude zajímavé z pohledu vzniku parazitického způsobu života apikomplex a z pohledu reduktivní evoluce plastidu apikomplex. Ke všemu se ukázalo, že parazitický způsob života (připomínající apikomplexa) se na této evoluční větvi vyvinul opakovaně u organismů *Pyridium sociabile* a *Platyproteum* sp.⁴

APIKOMPLEXA – VÝTRUSOVCI

Asi 5000 výhradně parazitických druhů, s jedinou výjimkou rodu *Nephromyces*. Název pochází od apikálního komplexu – struktury na přední části buňky, která slouží myzocytóze nebo (u většiny) k průniku do buněk hostitele. **Apikální komplex** se skládá z uzavřeného konoidu a polárního prstence z mikrotubulů a dále z mikronem a rhoptrií. Z konoidu vybíhají dále do buňky kortikální mikrotubuly, které zpevňují povrch buňky. Pod cytoplasmatickou membránou apikomplex je jeden velký alveolus, který je přerušen na dvou místech – apikální komplex a mikropor (místo pro fagocytózu). Většina apikomplex proniká částečně nebo zcela do buňky hostitele. Neleží však přímo v cytoplasmě, ale ve speciálním váčku zvaném parazitoformní vakuola.

Průnik jedince apikomplex do hostitelské buňky je složitý proces, který je u významných parazitů velmi podrobně studován. Průnik malarického plasmodia do červené krvinky probíhá následovně:

- (1) Uchycení bokem na povrch hostitelské buňky
- (2) Orientace buňky apikálním komplexem k povrchu buňky a zahájení rozrušování povrchu
- (3) Průnik do buňky, materiál z rhoptrií a mikronem se vylévá, část se inkorporuje do membrány vznikající vakuoly
- (4) Pokračující průnik, odhození antigenního povrchu typického pro volně v krvi plovoucí stádium
- (5) Definitivní dotvoření parazitoformní vakuoly, pohlcování obsahu buňky (tj. hlavně hemoglobinu).

V cytoplasmě většiny apikomplex se nachází nefotosyntetický plastid, tzv. **apikoplast**. Má 3-4 obalové membrány (záleží na druhu), leží poblíž mitochondrie a je pro buňku nepostradatelný. Při zablokování jeho funkce buňka hyne. Apikoplast má svůj genom (*Plasmodium*: 35 kb, cirkulární, *Toxoplasma*: delší lineární molekuly s opakujícím se 35 kb dlouhým motivem). Genom je podobný plastidovému, ale je redukovaný. V apikoplastu probíhají některé děje typické pro plastid - metabolismus lipidů, izoprenoidů aj. Tyto dráhy a metabolismus DNA v apikoplastu představují vhodné cíle léčby chorob způsobovaných apikomplexy, protože jsou inhibovatelné antibiotiky⁵ a herbicidy. Původ apikoplastu byl dlouhou dobu sporný. Převažující názor předpokládal jeho původ v chromalveolárním plastidu vzniklým pohlčením ruduchy. Tuto hypotézu však nebylo možné jednoznačně doložit, protože v genomu apikoplastu chybí geny pro fotosyntetický aparát a tento genom tak není možné porovnat s genomem peridiniového plastidu obrněnek. Protože genom peridiniového plastidu je také značně redukovaný (ale jiným směrem) neexistuje mezi těmito genomy dostatečný překryv. Až sekvenace plastidového genomu chromery a vitrelly umožnila takové srovnání, protože jejich plastidové genomy se ukázaly mnohem méně redukované a zřejmě se genovou skladbou podobají plastidu společného předka apikomplex a obrněnek. Srovnání genového složení a genových sekvencí apikoplastu, peridiniového plastidu obrněnek a plastidů chromery a vitrelly jasně ukázalo na příbuznost apikoplastu s peridiniového plastidu a je nejsilnějším důkazem, že apikoplast je ruduchového původu jak předpokládal většinový názor.

⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31422883>

⁵ Např. clindamycin

Typický pro apikomplexa je tzv. **klouzavý pohyb**. Jeho mechanismus byl objasněn v nedávné době. Je hodně studován u gregarin. Původně se předpokládalo, že může být způsobem vlněním povrchových záhybů, které se často nachází na povrchu gregarin (ale nejsou přítomny na površích jiných apikomplex). Ukázalo se však, že je za něj zodpovědný protein TRAP a aktino-myosinový systém. TRAP je uložen v cytoplasmatické membráně a je napojen na aktin, který se za hydrolyzy ATP posouvá po myozinech ukotvených na mikrotubulech vedoucích pod alveolem. Dalším typickým znakem apikomplex je tvorba odolných stádií – **oocyst**, které se uvolňují do prostředí a jsou infekční pro další hostitele. Oocysty vznikají ze zygoty a jsou v nich uloženy stadia apikomplex, kterým se v tomto případě říká sporozoity. Apikomplexa prodělávají často složité (i vícehostitelské) životní cykly. Během nich se vyskytuje několik fází množení. **Sporogonie** je meióza následující po vzniku zygoty, dochází k ní v oocystě a vznikají sprotozoity. **Merogonie** je množení v cytoplazmě hostitelské buňky infikované sporozoitem nebo merozoitem. Merogonií vznikají merozoity a může probíhat v několika cyklech. **Gamogonie** je tvorba mikro- a makrogamet. Ty potom splývají v zygotu. Zygota je jediné diploidní stadium životního cyklu. Životní cykly se skupina od skupiny a druh od druhu liší, ne všechna stadia jsou vždy přítomna nebo se mohou objevit nějaká další stadia. Přítomnost a nepřítomnost některých stádií je typická pro nadskupiny apikomplex. Apikomplexa mají výrazně redukovaný mitochondriální genom, který kóduje jen 3 proteiny dýchacího řetězce - cytochrom B a cytochrom oxidázu 1 a 3.

Apikomplexa se tradičně dělí na 3 velké skupiny – **Gregarinae** (hromadinky), **Coccidea** (kokcidie) a **Hematozoa** (krvinkovky). Samostatnou linii, která je zřejmě v příbuzenském vztahu s gregarinami představuje **Cryptosporidium** a **Nephromyces**. Fylogeneze apikomplex ovšem dosud není vyjasněná.

Gregariny

Poměrně velké (až 10 mm), mají velké jádro a velký genom a chromozomy. Druhově nejbohatší, morfologicky velmi rozmanitá, ale hospodářsky nejméně významná skupina apikomplex. Na povrchu buněk jsou více či méně vyvinuté cytoplasmatické záhyby. Žijí ve střevě nebo tělních dutinách bezobratlých (členovci, kroužkovci, měkkýši, druhoústí). V typickém případě jsou **částečně zanořené** do hostitelských buněk přední částí buňky, někdy jsou celé intracelulární. Nebyl u nich nalezen apikoplast. Tradičně se dělí na **archigregariny**, **eugregariny** a **neogregariny**. Toto dělení však zcela jistě neodpovídá fylogenezi. Fylogeneze zatím není velmi objasněná, ale je zřejmé, že eugregariny jsou minimálně parafyletické, protože neogregariny tvoří jejich vnitřní skupinu. Archigregariny jsou zřejmě na bázi stromu gregarin a pravděpodobně se rozpadnou na několik samostatných linií⁶. V životním cyklu typické gregariny chybí merogonie v hostiteli. Sporozoit uvolněný z oocysty se zanoří do hostitelské buňky a naroste do velkého stadia zvaného trofozoit. Ten se nemnoží. Po nějaké době se uvolní a vznikne z něj gamont. Dva gamonti se spojí do útvaru zvaného syzygie, obalí se a vznikne z nich gametocysta (zygocysta). V zygocystě vznikne z gamontů mnoho gamet, které splývají, a vznikne mnoho zygot, které se přemění na oocysty se sporozoity. To vše je stále obaleno v zygocystě. U některých druhů se oocysty uvolňují ze zygocysty speciálními kanálky.

Archigregarinida

Nejpůvodnější gregariny a asi i apikomplexa. Nemají schopnost klouzavého pohybu, pohybují se spíš vrtěním nebo vlněním jako červi (viz. video). Některé se živí myzocytózou a žijí extracelulárně

⁶ Studium fylogeneze gregarin komplikuje malý počet dostupných sekvencí gregarin, které jsou ještě k tomu dost divergentní (prodělaly rychlou evoluci).

(*Selenidium*), jiné pronikají do buněk a často mají merogonii v hostitelských buňkách. Parazitují v mořských bezobratlých.

Eugregarinida (+ Neogregarinida)

Mají nápadné povrchové záhyby, schopnost klouzavého pohybu⁷. Velký trofozoit se živí především pinocytózou střevního obsahu a je přichycen v buňkách výběžkem (epimerit nebo mukron). Některé eugregariny mají buňku rozdělenou septem na dvě části. Kromě neogregarin nemají merogonii a množení probíhá pouze v zygocystě. Paraziti mořských, sladkovodních i suchozemských bezobratlých (typické pro neogregariny).

Cryptosporidium

Zřejmě aberantní gregarina nebo sesterská skupina gregarin napadá obratlovce i člověka. Sporozoit se uhnízdí mezi klky střevního epitelu, které jej obrostou a vytvoří něco na způsob parazitoforní vakuoly uložené mimo buňku. V měchýřku dojde k merogonii a merozoity napadají další buňky. Po několika cyklech merogonie dojde ke gamogonii a vzniku oocyst, které se uvolňují do prostředí. Kryptosporidíóza působí úporné průjmy podobné jako *Giardia*, často ve vyspělých zemích (USA). U zdravého člověka nemoc sama odezní. Velmi závažné je toto onemocnění u pacientů s AIDS. Zoit kryptosporidia je poměrně redukován, má malý genom, anaerobní typ mitochondrie bez genomu a nemá apikoplast.

Kokcidie

Na rozdíl od gregarin se u kokcií makrogamet (samičí gamont) nedělí a dá vznik jedné makrogametě. Mikrogamet se dělí a mikrogamety jsou v typickém případě drobní trojbičkovci, u nichž je velká část tělíčka vyplněna mitochondrii. Kokcidie mají merogonii. Během merogonie se buňka kokcidie (v závislosti na druhu) může dělit několika (někdy dost podivnými) způsoby. Na snímku uvádím jako příklad endopolygenii, což je vlastně mnohonásobná mitóza, kdy se jádro parazita bohatě rozvětví, chromozomální sady se nahloučí do jednotlivých růžků, nad kterými se začnou formovat nové konoidy. Posléze se jádro rozpadne na mnoho dceřiných jader, dotvoří se membrána mladých merozoitů, které opustí mateřskou buňku a po nějaké době i zdevastovanou hostitelskou buňku. Dalším typickým znakem kokcií je, že oocysta neobsahuje holé sporozoity, ale ty jsou obaleny ještě v dalším obalu – sporocystě⁸. Kokcidie se dělí na dvě skupiny.

Adeleida

U adeleid dochází k syzygii mezi makro a mikrogametem před gamogonií. Vytváří se malý počet mikrogamet a jen jedna makrogameta. Adeleida typicky parazitují u bezobratlých, výjimečně v obratlovcích – želva, myš. Některé druhy napadají krevní buňky.

Eimeriida

Na rozdíl od adeleid nemají syzygii. Makro a mikrogamety vznikají odděleně uvnitř zcela jiných buněk hostitele. Makrogameta sedí a čeká, kdežto velký počet bičíkatých mikrogamet se uvolňuje ven z buněk a hledá makrogametu. Eimeriida je hospodářsky i medicínsky významná skupina. Různé druhy rodu *Eimeria* parazitují ve střevním epitelu slepic a králíků a působí značné škody ve velkochovech. Hostitel se nakazí pozřením oocysty. Z té se uvolní sporozoity, které napadají buňky

⁷ Podivná skupina Urosporida (Pterospora) parazitující v coleomu mnohoštětinatců se pohybuje zvláštním pulzováním těla (viz. video).

⁸ Počet sporocyst v oocystě a sporozoitů ve sporocystách je rodově specifický – např. rod *Eimeria* má v oocystě 4 sporocysty a v každém z nich 2 sporozoity.

střevního epitelu. Tam probíhá merogonie a merozoiti druhé generace napadají další buňky. Po 2-3 cyklech merogonie dojde ke gamogonii, uvolněné mikrogamety naleznou makrogamet a vznikne zygota, která se obalí ve sporocystu a uvolňuje se do obsahu střeva a s ním do vnějšího prostředí. Po nějaké době sporocysta vysporuluje, tj. dojde k meióze a vznikne celkem 8 sporozoitů (po dvou ve 4 sporocystách). Vysporulované oocysty jsou infekční pro další slepici. *Eimeria* je tedy jednohostitelská kokcidie. Příkladem dvouhostitelké kokcidie je ***Toxoplasma***. V případě toxoplazmy probíhá merogonie a pohlavní fáze cyklu podobně jako u *Eimerie*, ale hostitelem je kočka. Oocysty uvolněné z kočky ovšem nejsou infekční pro další kočku, ale pro meziphostitele. V meziphostiteli vytvoří uvolněné sporozoity tkáňové cysty, nejčastěji v mozku, ale i ve svalech. Definitivní hostitel (kočka) se nakazí pozřením meziphostitele s tkáňovými cystami. Meziphostitelem je v našich podmínkách nejčastěji myš, ale může jím být téměř cokoli včetně člověka.

Hematozoa

Nemají konoid a i další součásti apikálního komplexu jsou redukovány. Redukovaný je také jaderný genom. V oocystě jsou holé sporozoity (nejsou obaleny ve sporocystě). Zygota je pohyblivá. Mají dvouhostitelský cyklus. Definitivním hostitelem, ve kterém dochází k pohlavní fázi cyklu, je členovec, meziphostitelem je obratlovec, kde se množí zejména v krevních buňkách, ale i v jiných tkáních. Nejvýznamnějšími zástupci jsou malarická plazmodia, která jsou přenášena komáry rodu *Anopheles* a působí horečnaté onemocnění – malárii. Člověka napadají v drtivé většině případů 4 druhy rodu ***Plasmodium***, jeden z nich je smrtelný – *P. falciparum*. Napadeny jsou stovky miliónů lidí a ročně umírá asi milión lidí. Vývojový cyklus plazmodií je následující. Člověk se nakazí sáním komára a do krve se mu dostanou sporozoity. Ty se krevním řečištěm dostanou do jater, napadají jaterní buňky, kde probíhá první cyklus merogonie. Merozoity první generace se uvolňují z jaterních buněk a napadají červené krvinky. V nich dochází k druhému a dalším cyklům merogonie, které jsou vždy zakončeny rozpadem červené krvinky a uvolněním merozoitů do krve. Rozpad červených krvinek je synchronizován a působí horečnatý záchvat. Po několika cyklech merogonie vzniknou gametocyty. Pokud na hostiteli sají komár, nasaje gametocyty, ve střevě komára, z nich vzniknou gamety, které splývají v zygotu, jež je pohyblivá (ookinet) a připomíná normální zoit. Zygota se zavrtá do střevní stěny komára a vznikne z ní oocysta plná sporozoitů. Ty se uvolňují a migrují do slinných žláz, kde jsou připraveny infikovat dalšího meziphostitele.

Nephromyces

Zatím jediný popsáný rod protist, který spadá mezi apikomplexa a přitom se neživí parazitickým způsobem života. Jedná se zřejmě o komezála nebo mutualistu žijícího u pláštěnců (sumek rodů *Molgula* a *Botrichobranchnus*) v útvech, kde tyto živočichové shromažďují kyselinu močovou ("renal sacs"). Je možné, že se podílí na jejím odbourávání. Původně byly řazeny mezi chytridiomycety a až molekulární fylogenetika ukázala jejich příslušnost k apikomplexům.

Nyní se vydáme po linii myzozoi vedoucí k dinoflagelátům. Některé ze skupin proalveolátů, které si představíme v tomto odstavci, bývají nebo bývaly v některých systémech řazeny k dinoflagelátům (např. *Syndinea*, *Ellobiopsida*). Příbuzenské vztahy skupin na bázi dinoflagelátů jsou však zatím nevyjasněné.

Ze skupiny ***Perkinsea*** je popsáno několik druhů rodu ***Perkinsus***, vnitrobuněční paraziti mlžů. Napadají například ústřice a působí velké škody na jejich chovu. Životní cyklus perkinsa není ještě zcela objasněn. Infekční formou je kokální stádium, které se pasivně vznáší ve vodě a které uvízne na žábřácích mlže. Odtud se dostane do tkáně žáber, trávicí žlázy nebo svaloviny a podobně jako

apikomplexa se tam merogonicky množí⁹. Podobná kokální stádia, jakými se mlž nakazil, se poté uvolňují z mlže do prostředí rektem. Ve vnějším prostředí prodělává *Perkinsus* vývoj, při kterém se kokální buňky obalí do hypnosporu, ve které se množí a nakonec vzniká množství bičíkovců, které opouštějí hypnosporu speciálním otvorem. Biflageláti připomínající colpodellu, vybaveni otevřeným konoidem a rhoptriemi. Ve vnějším prostředí se bičíkovci přemění na infekční kokální stadia. *Perkinsus* zřejmě má podobně jako apikomplexa pozůstatek nefotosyntetického plastidu. Tento plastid ovšem již zřejmě nemá genom. Studie založené na environmentálním sekvenování³ opět ukazují, že diverzita skupiny Perkinsea je velká. Jedinými dalšími morfologicky popsány zástupci jsou druhy rodu *Parvilucifera*. Ten parazituje na obrněnkách (*Dinophysis*), ve kterých se merogonicky množí, vakuola s parazity zaplní postupně téměř celou buňku a z ní se do prostředí uvolňují bičíkovci.

Oxyrrhis marina je volně žijící bičíkovec, který obývá přílivové zóny moří. Je to významný fagotrof – predátor. V jádře má poměrně malé množství histonů, což pravděpodobně představuje předstupeň k dinokaryonu pravých obrněnek (viz dále). Pravděpodobně má stejně jako *Perkinsus* pozůstatek plastidu, zatím však byly nalezeny pouze jaderné geny kódující proteiny fungující v plastidu.

Psammosa je mořský eukaryovorní bičíkovec. Jako správný alveolát má pod povrchem buňky alveolární měchýřky. Na předním pólu buňky ústí něco na způsob apikálního komplexu.

Environmentální sekvenování ukázalo, že v mořském planktonu žijí ještě další poměrně různorodé a bohatě zastoupené skupiny alveolátů, které se označují „**Marine Alveolate Group I**“ a „**Marine Alveolate Group II**“. Obě jsou příbuzné dinoflagelátům a dnes se obě skupiny považují za **Syndinea**. Všichni morfologicky popsaní zástupci syndineí jsou paraziti. Parazitují jak na korýších (např. *Syndinea*) a jiných bezobratlých, obrněnkách (*Amoebophrya*), tintinnidních nálevnicích (Dubosquella), či ve žlutkovém vaku rybího plůdku (*Perkinsoide*) a pravděpodobně působí značné ztráty v populaci sardinek. Ukazuje se, že velká diverzita této skupiny se nachází v mřížovcích. Parazitické stádium u lépe popsaných syndineí je mnohojaderné, plasmodiální, pohyblivé stadium je připomíná uspořádáním bičíků obrněnky.

Elobiopsida jsou paraziti korýšů. Dlouho se nevědělo, kam patří, a byly řazeny mezi houby. V životním cyklu mají stadium připomínající dinokont. Až sekvence prozradili, že se jedná o příbuzné obrněnek. Možná dokonce spadají dovnitř „pravých“ obrněnek, což ovšem se zatím pomocí sekvencí zatím nepodařilo určit, protože Elobiopsida vytváří na fylogenetických stromech velmi dlouhé větve, jejichž pozici je obtížné určit.

DINOFILAGELÁTI - OBRNĚNKY

Skupina zahrnuje asi 4500 druhů z toho 2500 fosilních, 1700 žije v moři. Typickým biotopem dinoflagelátů jsou pobřežní vody, u kterých nedochází k velkému mísení mezi vrstvami z různých hloubek. Mnoho dinoflagelátů žije také v bentosu. Typická buňka dinoflagelátů je znázorněna na snímku č. 55. Povrch buňky se nazývá **amfiesma** a obsahuje podpovrchové alveoly, které jsou buď prázdné u nahých (athékátních) obrněnek nebo obsahují pláty celulózy. Povrchu s celulózami pláty se říká **théka**. Pod alveolami jsou obvykle přítomny mikrotubuly a někdy vrstva celulózy. V buňce se nachází jádro, které má u většiny druhů zvláštní strukturu (tzv. dinokaryon, viz dále), mitochondrie, často plastid (může být několika typů) a Golgiho komplex. Značnou část objemu buňky mohou vyplňovat zvláštní vakuoly s vývody na bázi bičíků – **pusuly** – které se pravděpodobně účastní příjmu a exkrece látek, nikoli však fagocytózy velkých soust, jak bychom si mohli myslet. Pod povrchem

⁹ Za rozsev parazitů po těle mlže mohou hemocyty (buňky imunitního systému), které parazita pohltní, ale nejsou schopny jej zlikvidovat a roznesou ho do tkání.

buňky mohou být přítomny **extruzómy** několika typů – trichocysty, mukocysty nebo nematocysty. Extruzomy slouží k exkreci látek do prostředí za účelem obrany či útoku. Dinoflageláti mají typické uspořádání bičíků – **dinokont**. Sestává z dvou typů bičíků: příčného, který je obvykle uložen v příčné rýze (cingulum) a podélného, který je obvykle uložen v podélné rýze (sulcus). Oba bičíky jsou opatřeny vlášením. Hlavním orgánem pohybu je příčný bičík. Ten je přichycen ve žlábku membránou na fibrilu (SS na obrázku) a vlní se v jakési spirále (vlna se šíří směrem od báze bičíku). Vlášení na straně spirály odvrácené od buňky žene vodu směrem vzad a buňka se tak pohybuje vpřed a rotuje. Podélný bičík slouží spíše jako kormidlo. Dinoflageláti jsou velmi dobří plavci. Drtivá většina dinoflagelátů je jednobuněčná, výjimku tvoří např. *Polykrikos* nebo *Haplozoon*. Typický **životní cyklus** dinoflagelátů sestává z pohyblivých dinokontních stádií, které se normálně mitoticky dělí a jsou haploidní. Dojde-li ke stimulaci pohlavního cyklu, vzniknou gamety vypadající jako normální bičíkovci, které splynou v pohyblivou diploidní zygotu – planozygotu. Ta záhy projde meiózou a vzniknou opět normální dinokontní stadia. Někdy může ze zygoty vzniknout dormantní stadium – cysta. V takovém případě dochází k meióze buď před encystací, nebo po excitaci. Cyklus může být různě modifikován zejména u parazitických skupin.

Jak jsem již zmínil, mezi obrněnky jsou někdy řazeny některé ze skupin, které jsme probrali v odstavci před touto kapitolou (Syndinea, *Oxyrrhis*, Ellobiopsida). Všechny obrněnky, o kterých pojednává tato kapitola, se označují také **Dinoflagellata** podle zvláště uspořádaného jádra – **dinokaryonu**. V dinokaryonu jsou chromozomy kondenzované i v interfázi a viditelné ve světelném mikroskopu. Nemají nukleozomy tvořené histony a genomy jsou obrovské (až 215000 Mbp, člověk 2900 Mbp). Velikost genomů je způsobena zřejmě především množstvím genů do stovek až tisíců kopií. Při dělení dinokaryonu zůstává zachovaná jaderná membrána, dělicí vřetenko je uloženo mimo jádro, kinetochorové mikrotubuly prochází do jádra skrze kanály a chromozomy se vážou na jadernou membránu.

Studium molekulární genetiky dinoflagelátů přináší v poslední době mnohá překvapení. O některých jsem se již zmiňoval. **Dinokaryon** obsahuje kondenzované chromozomy, DNA není namotaná na histony, zvláštní typy báze (5-hydroxymethyluracil) často nahrazuje thymin, geny v mnoha kopiích (1000 kopií luciferinu), po transkripci se na 5' mRNA připojuje krátká sekvence tzv. „splice leader“ (asi 20 nt) nutný pro translaci (něco podobného se děje u trypanozom). Dinokaryon se dělí uzavřenou mitózou. Genomy dinoflagelátů jsou obrovské. **Peridinový plastid** obsahuje relativně malý počet genů, které jsou umístěny na kroužcích. Genom **mitochondrie** obsahuje jen 3 protein-kódující geny (cox1, cb, cox3), stejné jako v případě apikomplex. Na rozdíl od apikomplex je však genom poměrně velký (desítky kb) protože geny jsou přítomny v mnoha kopiích a jsou mezi nimi delší nekódující oblasti. Geny na mitochondriálním genomu jsou fragmentovány a RNA vzniká transplicingem – spojováním úseků kódovaných v různých částech genomu. mRNA v mitochondrii je oligoadenilována na 3' konci, což u jiných mitochondrií není. Častý je také editing, tj. oprava sekvence mRNA. Nejčastějšími opravami jsou substituce A → G a U → C. Mechanismus editingu není znám. Geny v mitochondriálním genomu používají alternativní start kodony (ATT, ATA). U mnoha transkriptů se nevyskytují kanonické STOP kodony a není jasné, jak se terminuje translace¹⁰.

Primitivní (bazální skupinou) dinokaryot jsou **Noctilucea**, která mají dinokaryon přítomen jen v haploidní krátké haploidní fázi životního cyklu. Hlavní stádium životního cyklu je u noctiluceí diploidní buňka velkých rozměrů až 2 mm. Většinu objemu ovšem vyplňují vakuoly. Buňka má dva bičíky a nápadné kontraktilní tykadlo. Jsou schopni bioluminiscence. Luminiscence je iniciována mechanickým podrážděním – ve vlnách nebo když v nich plavete. Vyskytují se v pobřežních povrchových vodách v subtropích i mírném pásu, mohou narůstat do velkých počtů a vytvářet „red tides“ (dinoflagelátní vodní květy). Typické obrněnky (většina druhů) spadají do skupiny

¹⁰ U některých transkriptů vznikne stop kodon až po oligoadenilaci **TAAAAAAAAA**, u jiných prostě není a překládá se i polyA ocásek jak **LysLysLys...**, což zřejmě nevadí.

Dinophyceae. Mají dinokaryon a jsou haploidní po většinu životního cyklu, většina má théku. Uspořádání thékálních plátů je důležité pro systematiku a třídí se podle toho do podskupin. Např. prorocentroidní obrněnky mají krátké bičíky, které nejsou uloženy ve žlábcích, dinophysoidní obrněnky mají cingulum blízko horního konce buňky atd. I některá Peridinea jsou schopna bioluminiscence.

Příkladem je druh *Pyrocystis fusiformis*. I u něj je luminiscence vyvolána mechanickým podrážděním. K luminiscenci dochází ve speciálních kompartmentech tzv. scintilonech. Ty obsahují jednak organickou molekulu luciferinu (luciferin obrněnek je odvozený od tetrapyrolového cyklu) a enzym luciferáza. Po mechanickém stimulu dochází k poklesu pH ve scintilonu na 5-6, čímž se aktivuje luciferáza. Ta oxiduje luciferin a oxidovaný luciferin vyzáří foton. Význam luminiscence může spočívat v obraně před predátory nebo slouží jako obrana před toxickým působením kyslíku.

Asi polovina Dinophyceae je fotosyntetických. I fotosyntetické druhy však většinou fagocytují potravu a jsou tedy mixotrofní. Původním typem plastidu přítomným u většiny obrněnek je **peridiniový** plastid. Je to komplexní plastid se třemi obalovými membránami. Obsahuje chlorofyl a, c2 a karotenoid peridinin. Je velmi pravděpodobně odvozený od původního plastidu chromist. Genom plastidu je uspořádán do malých kroužků, na každém kroužku je obvykle jeden gen. Mnoho obrněnek plastid ztratilo a některé získaly **jiný komplexní plastid** pohlcením haptophyta (*Karenia*), skrytěnky (*Dinophysis*), rozsivky (*Kryptoperidinium*), dictyochy (*Podolampas*) nebo pelagophyta (*Amphisolenia*), **sekundární plastid** pohlcením zelené řasy (*Lepidodinium*) nebo dokonce možná zažívají **novou primární endosymbiózu** s pohlcenými sinicemi (*Sinophysis*). Některé obrněnky nemají plastidy trvale etablované v buňce. Po nějaké době se jim ztratí a musí si je znovu ukrást – **kleptoplastidy**. Podivuhodným organizmem je např. *Kryptopteridium*. Má ve své buňce jako trvalého endosymbionta celou rozsivku i s jádrem, plastidy a mitochondriemi¹¹. K tomu má ještě vlastní mitochondrie a světločivnou skvrnu, která je zřejmě pozůstatkem původního plastidu obrněnky. V buňce kryptopteridia se tedy nachází 5-6 genomů (nevíme, jestli světločivná skvrna má genom). U dinoflagelátů známe celkem 4 typy světločivných skvrn, které se liší svým uspořádáním. Jedna skupina si dokonce vytvořila něco, co nápadně připomíná komorové oko obratlovců – **oceloid**. Tato struktura sestává z čočky, která je dokonce schopna akomodace, oční komory a sítnice tvořené tylakoidem chloroplastu.

Celkově vzato se dinoflageláti mohou živit několika různými způsoby a jednotlivé druhy využívají jen některé z nich. (1) **fotosynteticky** – platí pro druhy s plastidem, (2) **myzocytózou** – vysávání kořisti pomocí útvaru zvaného **pedunkl**, který je homologický s konoidem apikomplex. Myzocytózy jsou schopny jak thékátní tak athékátní obrněnky. (3) **Fagocytózou**, athékátní druhy jsou schopny pohltit větší kořist než jsou ony samy. Thékátní druhy se nemohou roztahovat, ale umí vychlípit část cytoplazmy mimo buňku (tzv. **pallium**), kterým obalí kořist, třeba i dlouhá vlákna rozsivek, a stráví je mimo théku. Některé obrněnky si pro loh kořisti, či naopak obranu před predátory vyvinuly velmi sofistikovaně stavěné zbraně (extruzómy)¹².

Ekologický **význam** dinoflagelátů spočívá především v příspěvku k **primární produkci** oceánů, ale také v jejich roli jako významných **predátorů** v planktonu. Dinoflageláti tvoří často **vodní květy** přezdívané „red tides“. Některé jsou nebezpečné pro ryby a další obyvatele moří (např. květ *Karenia brevis*¹³, *Pfisteria*). Dinoflageláti totiž vylučují velmi silné toxiny. Konzumace ryb, korýšů nebo mlžů ze

¹¹ Oba typy mitochondrií jsou funkční a exprimují geny pro proteiny dýchacího řetězce.

¹² Krásné video o těchto strukturách lze najít zde: <http://www.sciencemag.org/news/2017/03/watch-these-microbes-hunt-their-prey-microscopic-gatling-guns>

¹³ Častá na pobřeží Floridy. Za normálních podmínek se vyskytují v koncentracích 10 buněk na litr. Když koncentrace dosáhnou 5,000 buněk na litr, začne se jejich toxin hromadit v mlžích v nebezpečné koncentraci pro lidi. Při koncentraci 500,000 buněk na litr začíná toxin zabíjet ryby ve vodě.

zamořených lokalit může vést otravám lidí¹⁴. **Symbiotické zooxantely** (např. *Symbiodinium*) mají obrovský význam pro korálové útesy. Až 90% živin získává korál ze zooxantel. Kromě korálů i jiní symbionti: měkkýši, dírkonošci a další. Odumírání zooxantel díky klimatickým změnám, či znečišťování moří vyvolává jev „coral bleaching“ který ohrožuje životaschopnost korálových útesů. Parazitické dinoflageláty nalezneme třeba ve střevech mnohoštětinatců (*Haplozoon*), kde napichují střevní buňky pedunklem. *Blastodinium* vyplňuje značnou část těla buchaneč. Významným parazitem ryb je *Pfisteria*, jednak vylučuje toxin a jednak je schopná napadat ryby (i lidi) myzocytozou. V minulosti byl navržen velmi složitý životní cyklus Pfisterie, který obsahuje mnoho stádií připomínajících améby, slunivky a několik druhů cyst. Je to však nesmysl, protože když tyto stadia někdo osekvenoval, zjistilo se, že se skutečně jedná o améby a slunivky a ne o stadia cyklu pfisterie.

Některé obrněnky vytvářejí odolné hypnozygoty. Ty známe i z **fosilního záznamu**. První fosilie (akritarchy), které by mohly, ale nemusely, patřit obrněnkám jsou staré 1.8 miliard let (na obrázku). Nejstarší téměř jisté obrněnky jsou staré asi 400 milionů let. Velký rozvoj obrněnek nastal v pozdním triasu asi před 200 mil. let, od té doby je obrněnek ve fosilním záznamu velké množství. Protože obrněnky jsou citlivé na změny v prostředí – teplotu, salinitu a množství živin – lze z druhového složení obrněnek v sedimentu usuzovat na podmínky, které panovaly, když sediment vznikl.

¹⁴ Choroby PSP (“paralytic shellfish poisoning”), NSP („neurolytic shellfish poisoning“), DSP („diarheic shellfish poisoning“)