



CEITEC

Central European Institute of Technology  
BRNO | CZECH REPUBLIC



# Zelený mimozemšťan - krása a význam molekulární biologie rostlin

**Jan Hejátko**

Research Group Leader

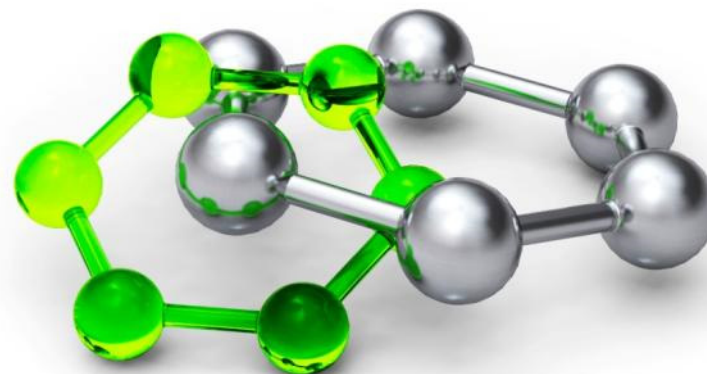
Brno, Sep 12, 2022



EUROPEAN UNION  
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND  
INVESTING IN YOUR FUTURE



OP Research and  
Development for Innovation

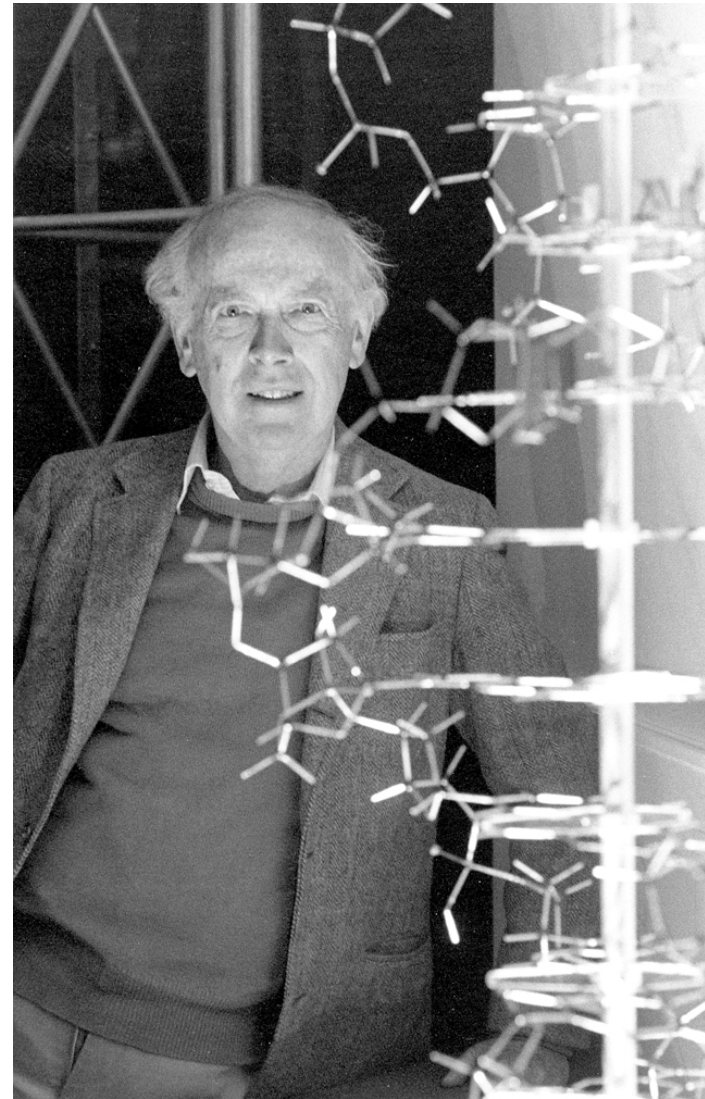


# Osnova

- Klíčové objevy, základní pojmy a přístupy
  - Mezníky genetiky a molekulární biologie
  - Centrální dogma molekulární biologie
  - Metody analýzy genové exprese a lokalizace proteinů in vivo
- Hormonální signály a růst rostlin
- GMO - důvod k obavám nebo optimismu?

“...We used to think our fate was in our stars. Now we know, in large measure, **our fate** is in **our genes**.”

James Dewey Watson, 1989

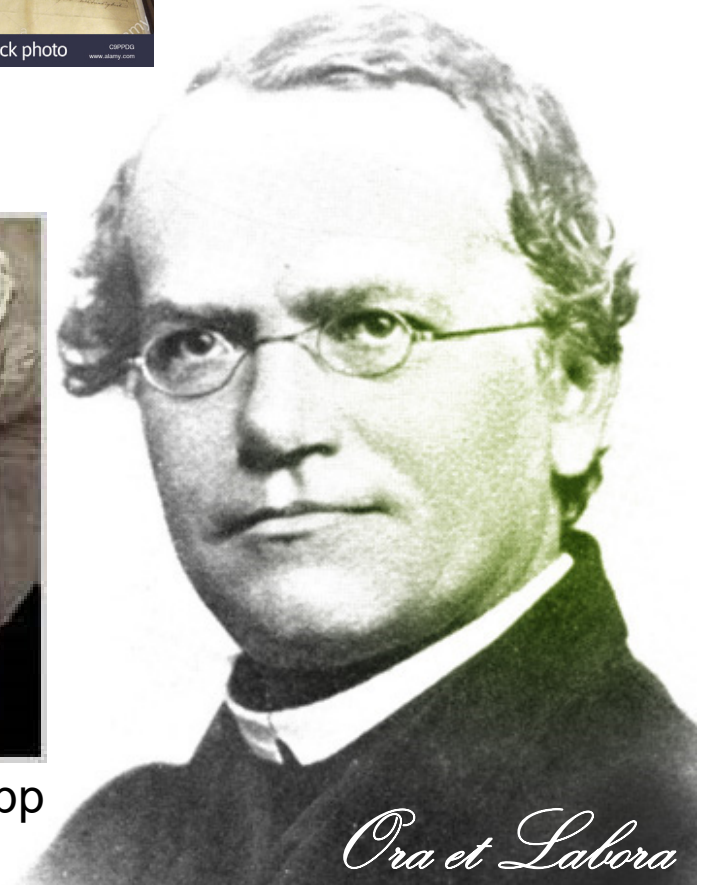
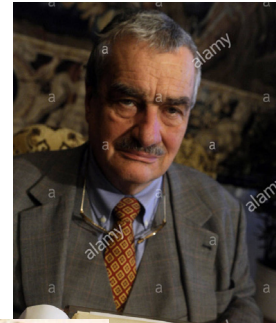
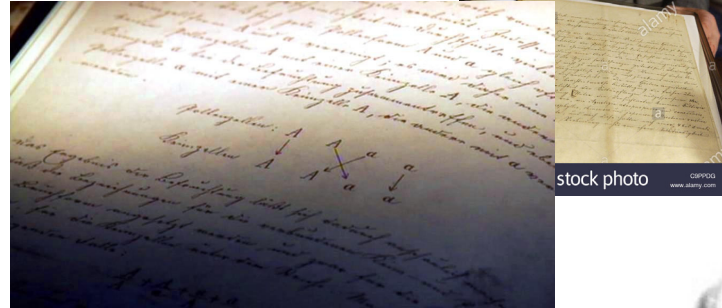


# Osnova

- Klíčové objevy, základní pojmy a přístupy
  - Mezníky genetiky a molekulární biologie

# Klíčové objevy Zákony dědičnosti

- 1865, Brno



Cyril F. Napp

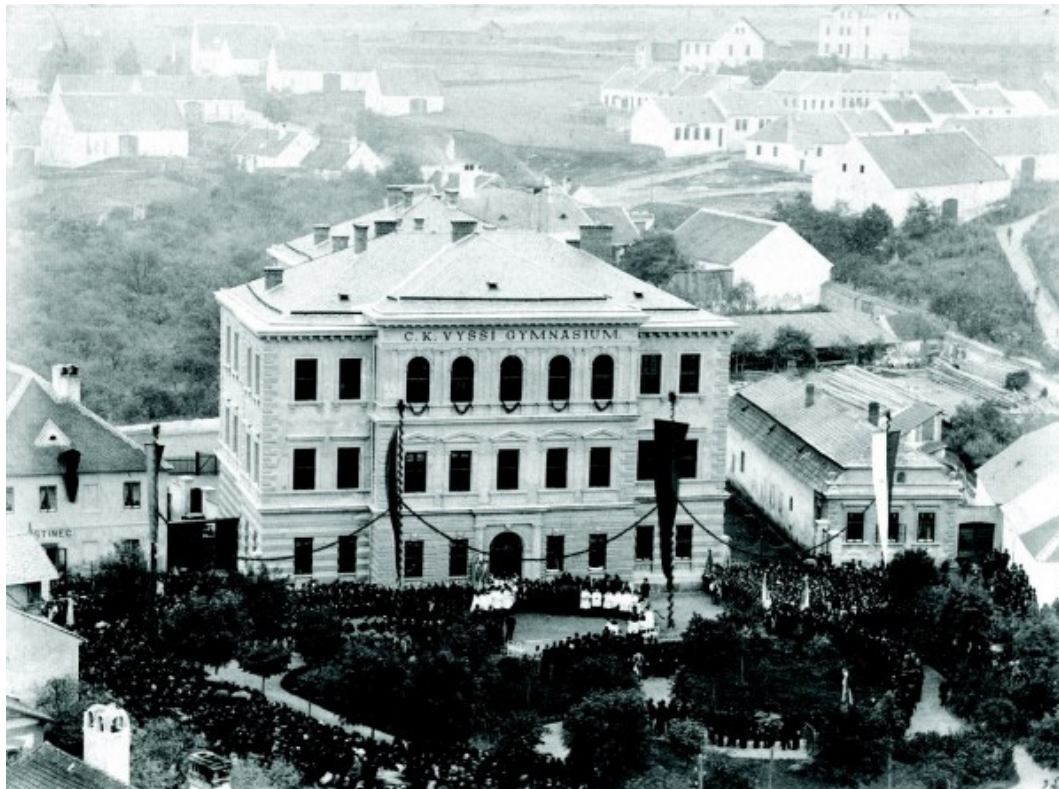
Mendel's legacy  
150 years  
of the genius of genetics

*Ora et Labora*

# Klíčové objevy

## Objev DNA

- **1869**, Tuebingen
- Publikováno **1871**



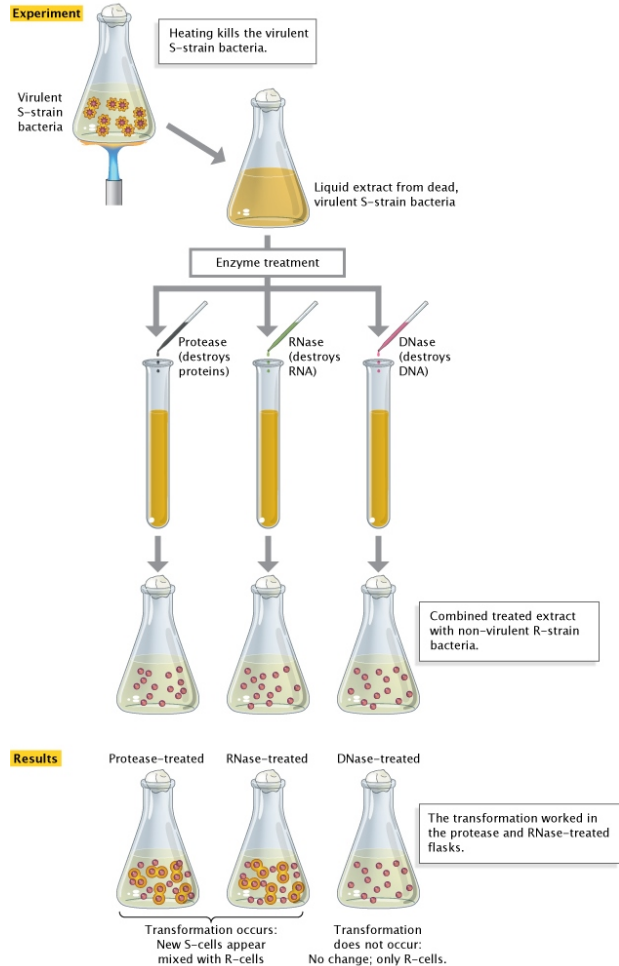
Johannes Friedrich Miescher



# Klíčové objevy

## DNA jako nositelka dědičnosti

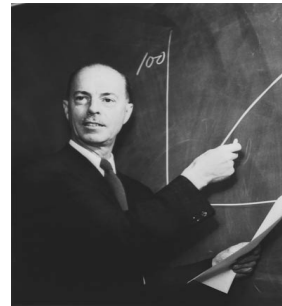
**Question:** What is the material that transforms cells? Is it protein, RNA, or DNA?



**Conclusion** DNA is the molecule responsible for transformation.



Oswald Avery

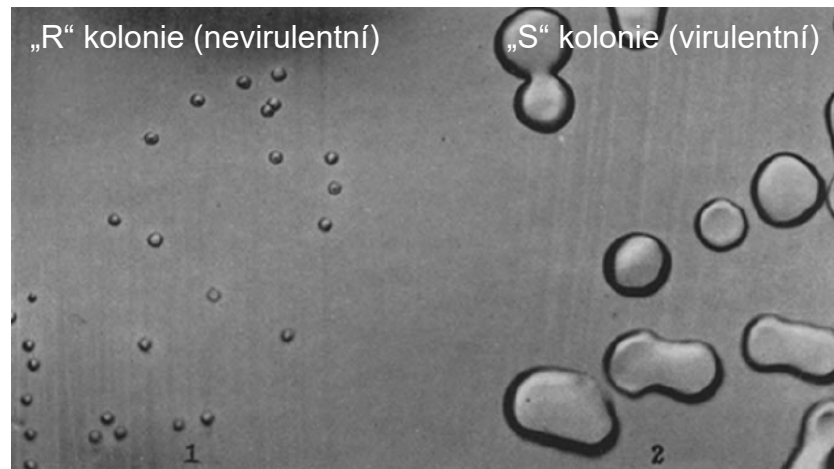


Colin MacLeod



Maclyn McCarty

- 1944, New York



# Klíčové objevy

## Struktura DNA a genetický kód

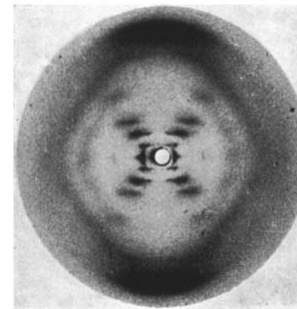
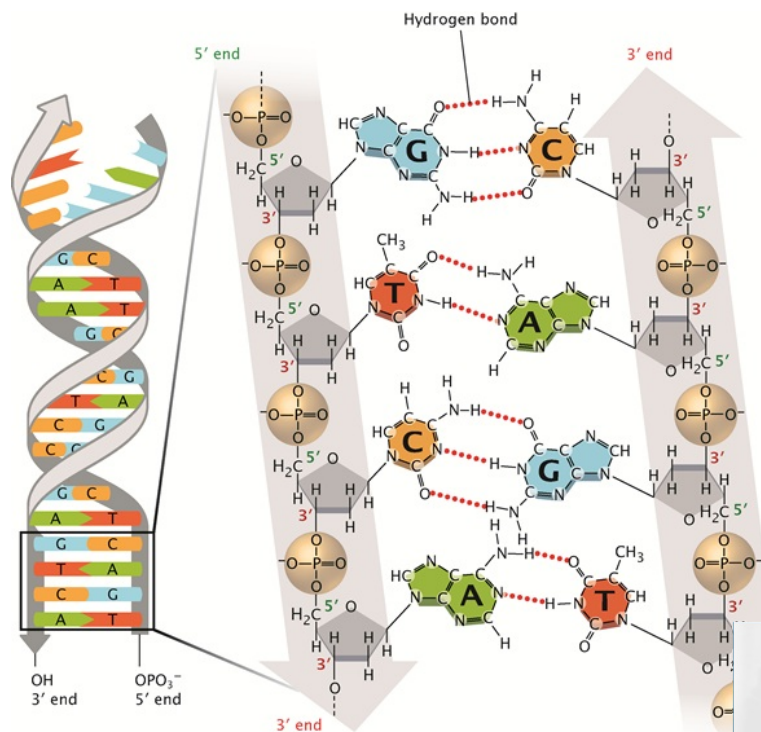
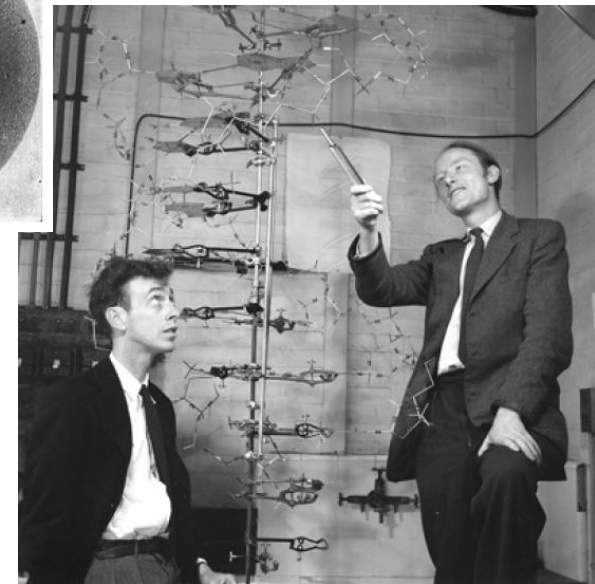
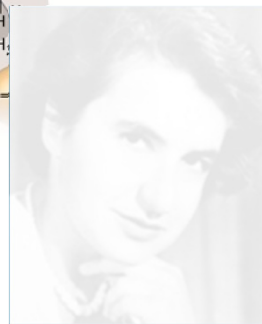


Photo 51



- 1953, Cambridge/London



Rosalind Franklin



James Watson



Francis Crick



Maurice Wilkins

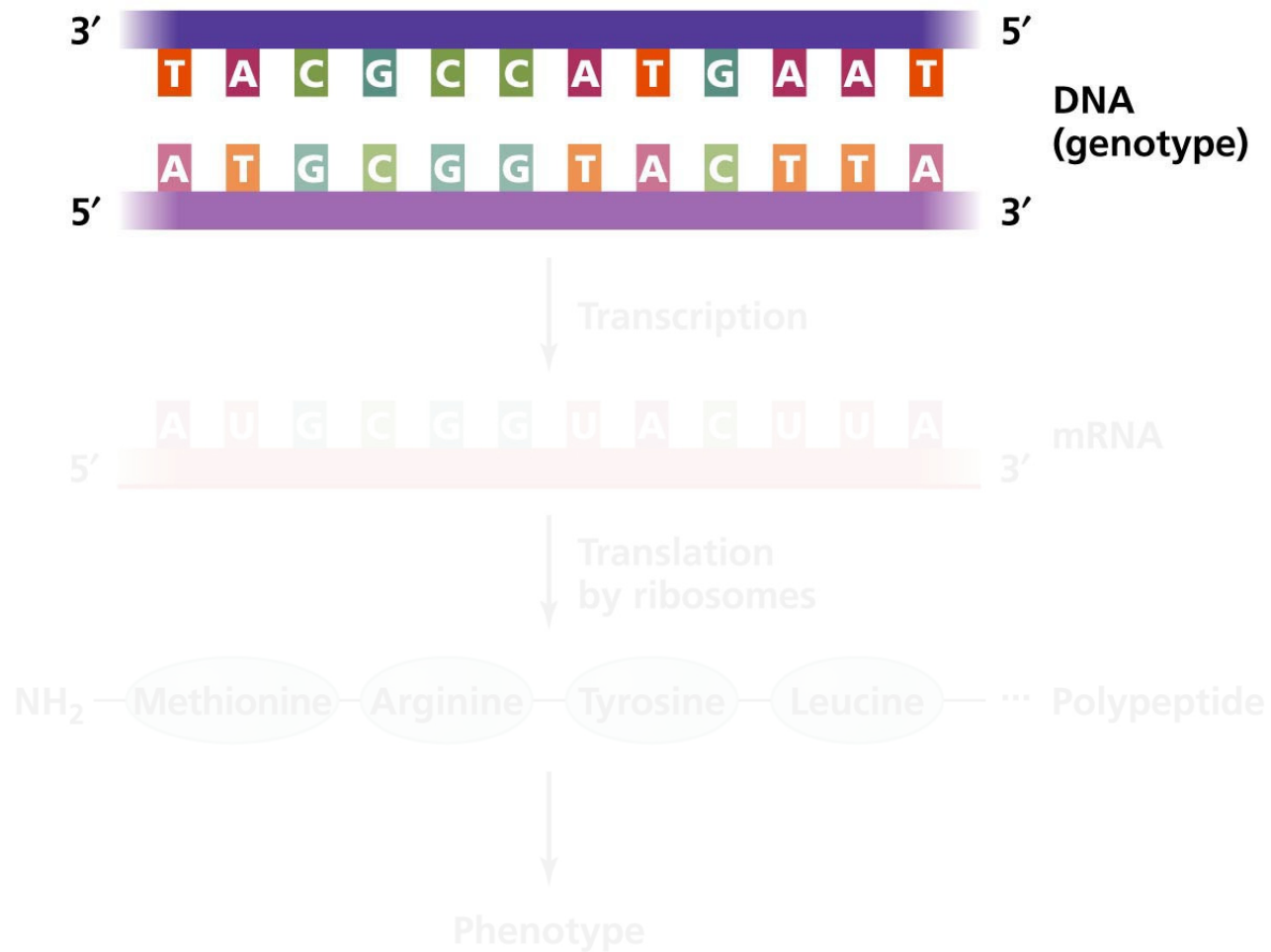


# Osnova

- Klíčové objevy, základní pojmy a přístupy
  - Mezníky genetiky a molekulární biologie
  - **Centrální dogma** molekulární biologie

# Základní pojmy

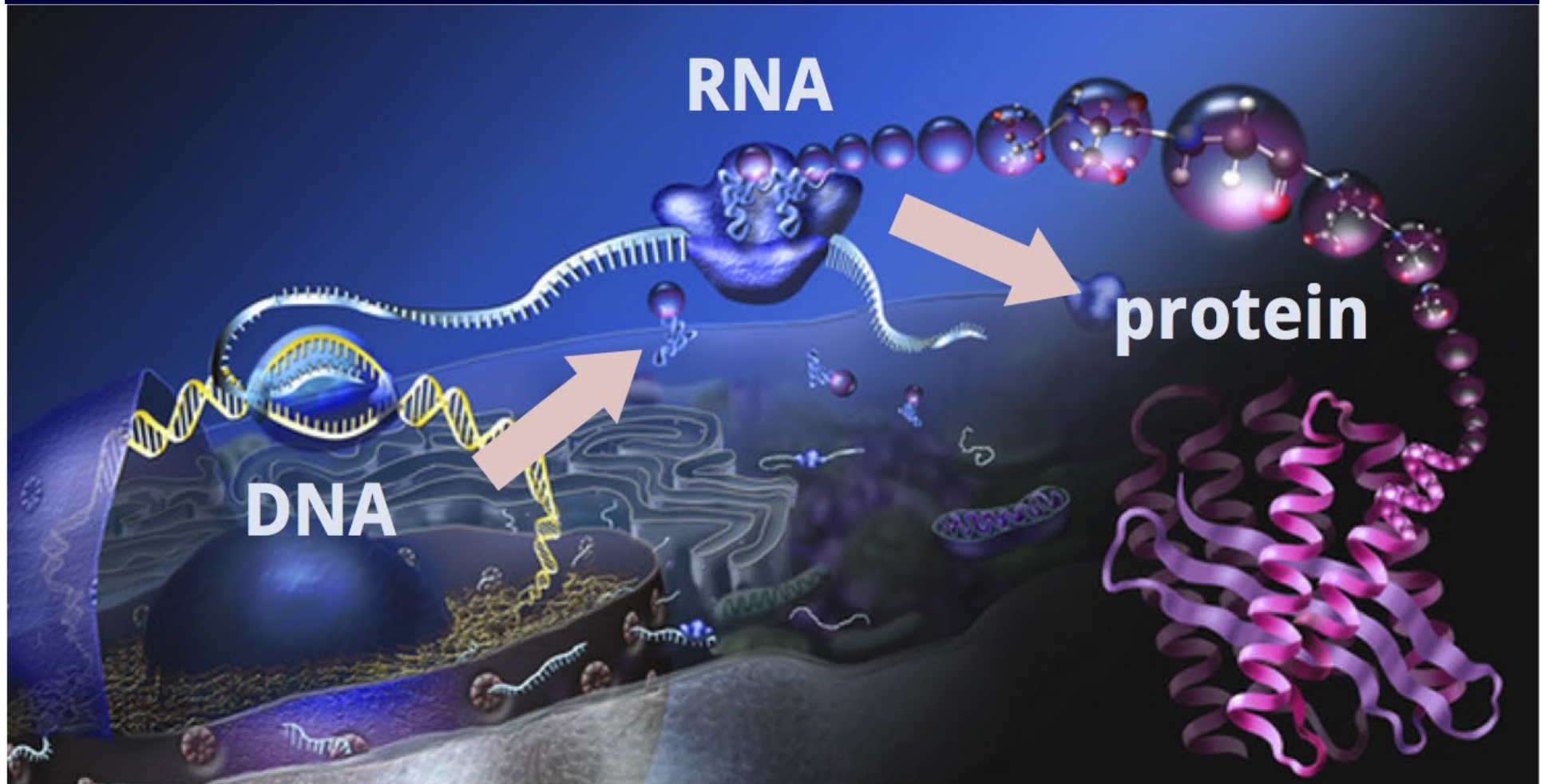
## Centrální dogma molekulární biologie



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

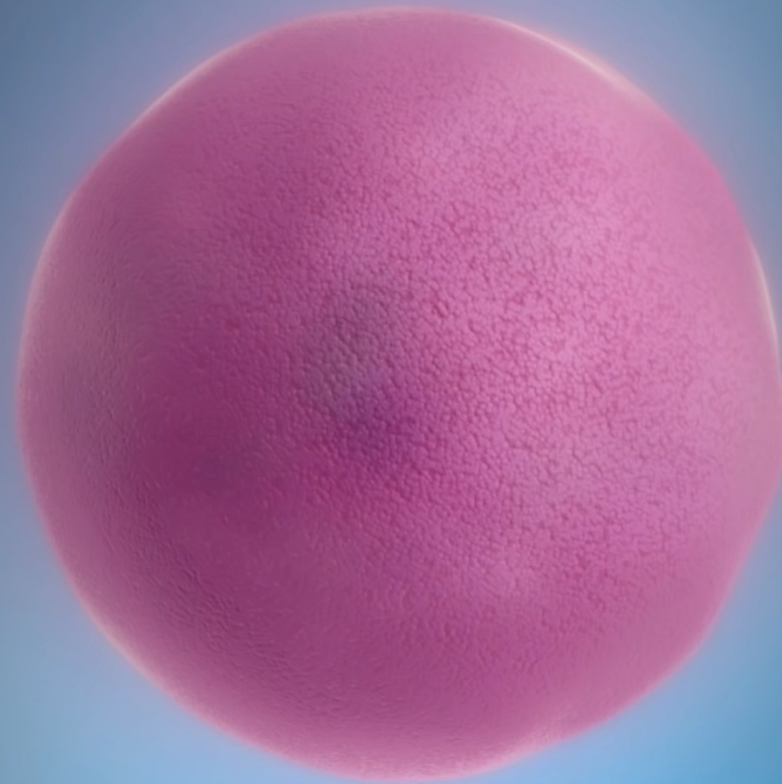
# Základní pojmy

## Centrální dogma molekulární biologie



# Základní pojmy

## Centrální dogma molekulární biologie

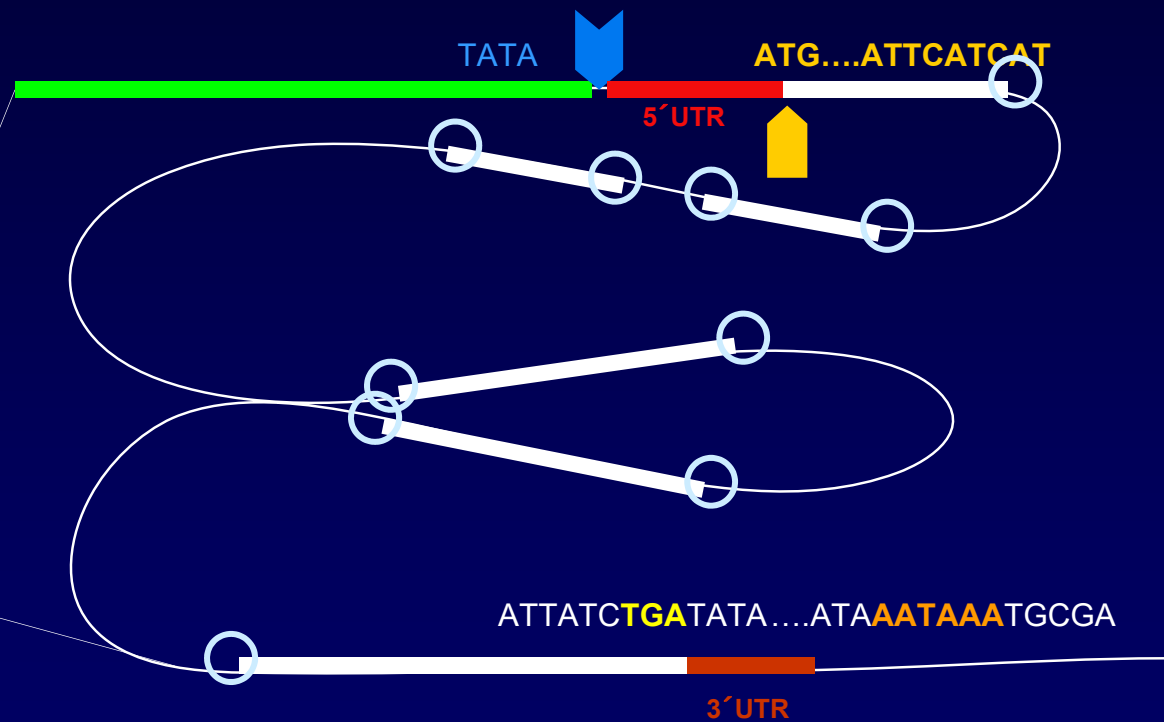


# Osnova

- Klíčové objevy, základní pojmy a přístupy
  - Mezníky genetiky a molekulární biologie
  - Centrální dogma molekulární biologie
- Metody analýzy genové exprese a lokalizace proteinů in vivo

# Struktura genů

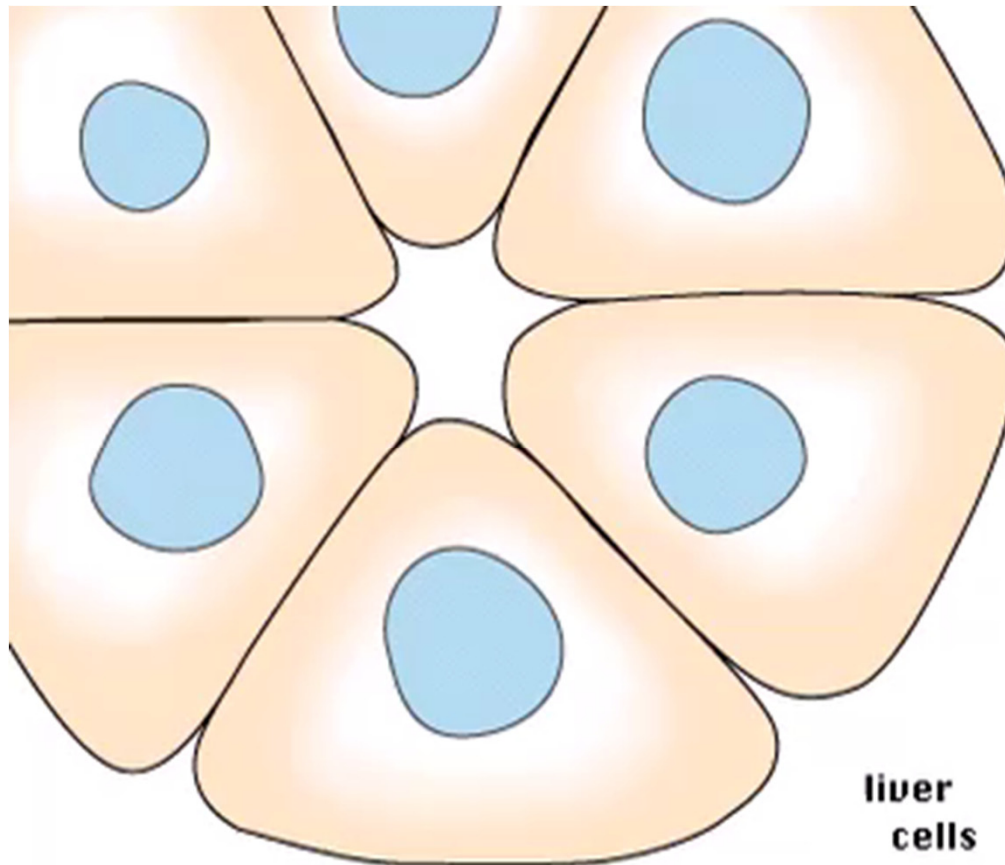
- promotor
- počátek transkripce
- 5' UTR
- počátek translace
- místa sestřihu
- stop kodon
- 3' UTR
- polyadenylační signál



# Základní přístupy

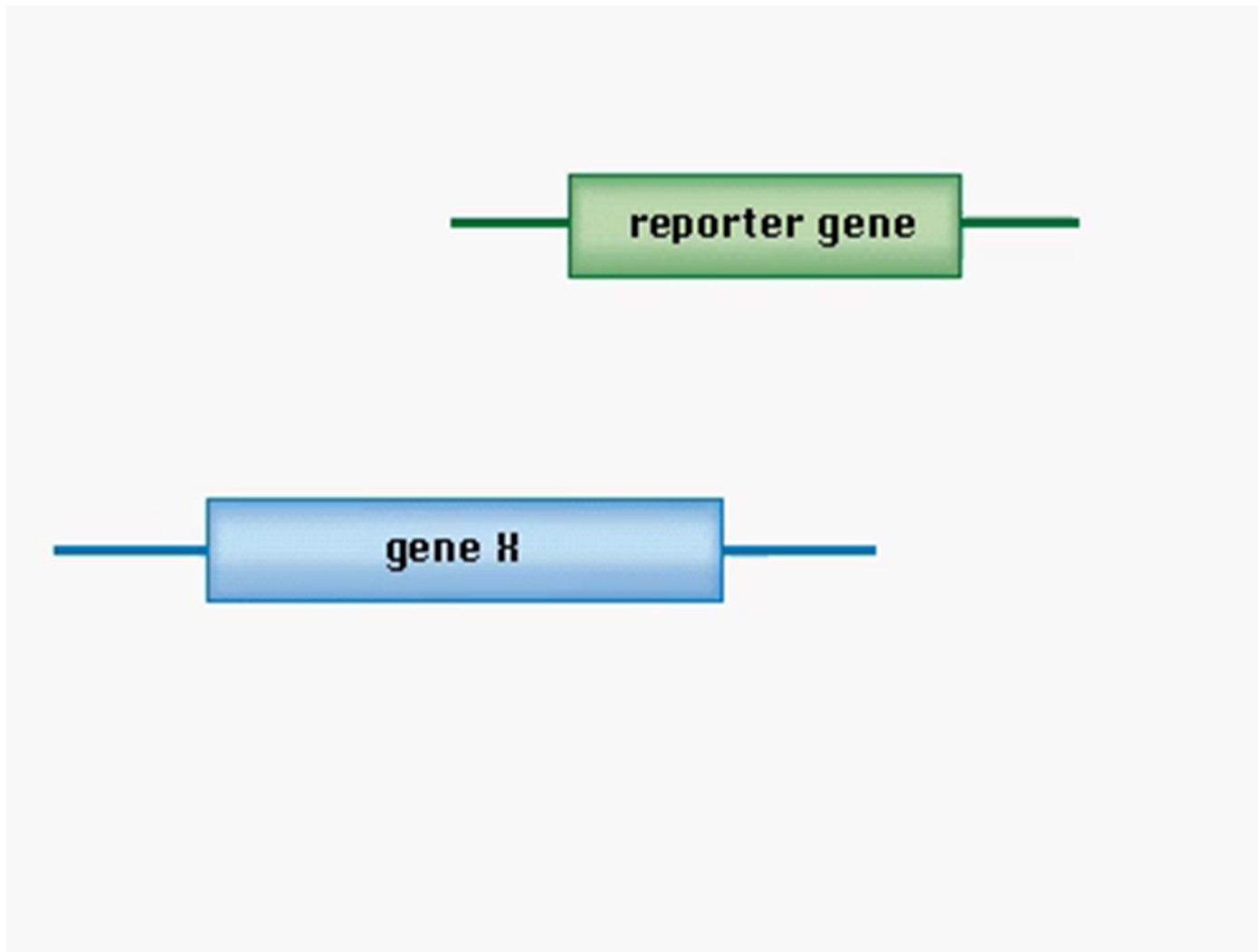
## Tkáňově specifická genová exprese

- Každá buňka obsahuje **totožnou sadu všech genů** daného organismu, ale **jen část z nich** je v daném buněčném typu aktivní



# Základní přístupy

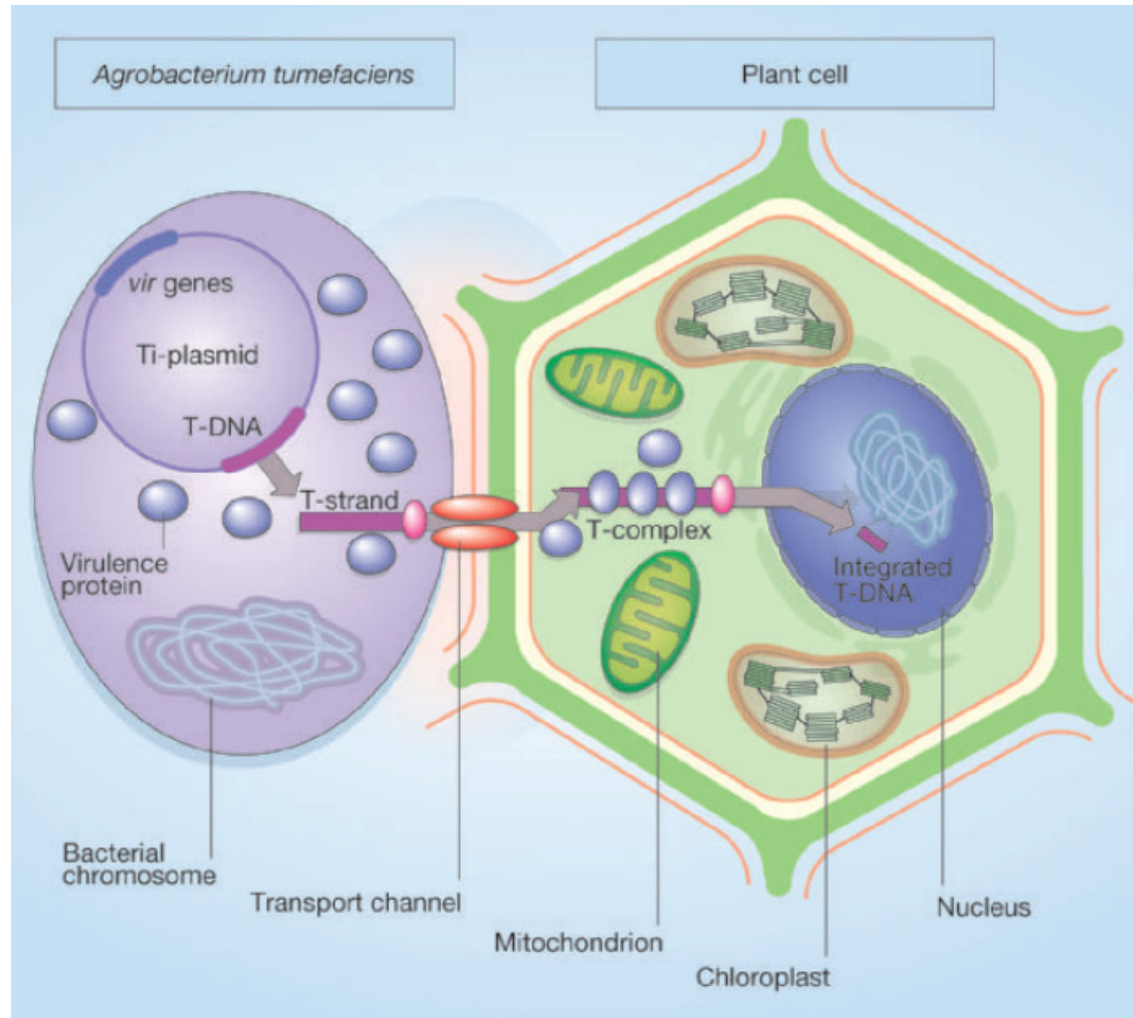
## Příprava rekombinantní DNA





# Základní přístupy

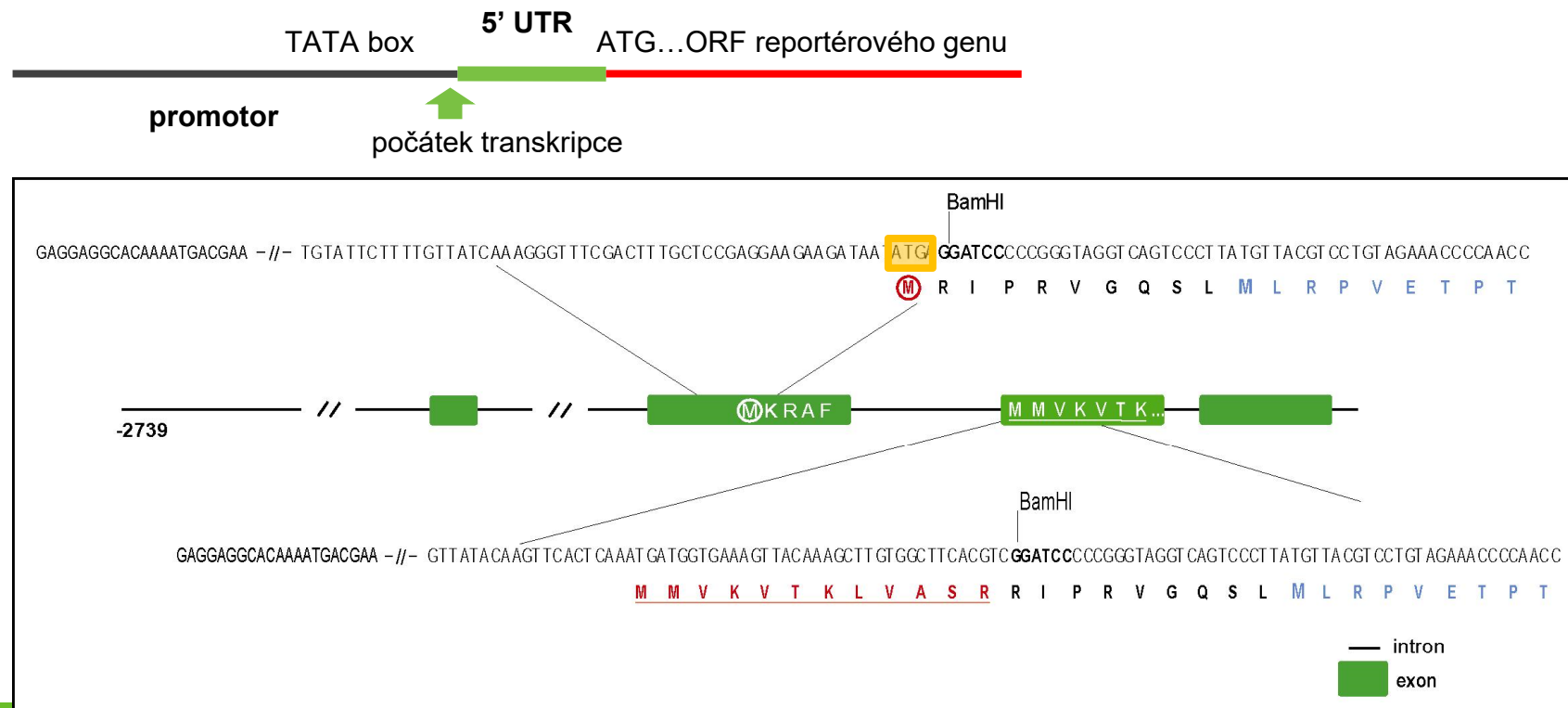
## Příprava transgenních rostlin



Gelvin, *Nature*, 2005

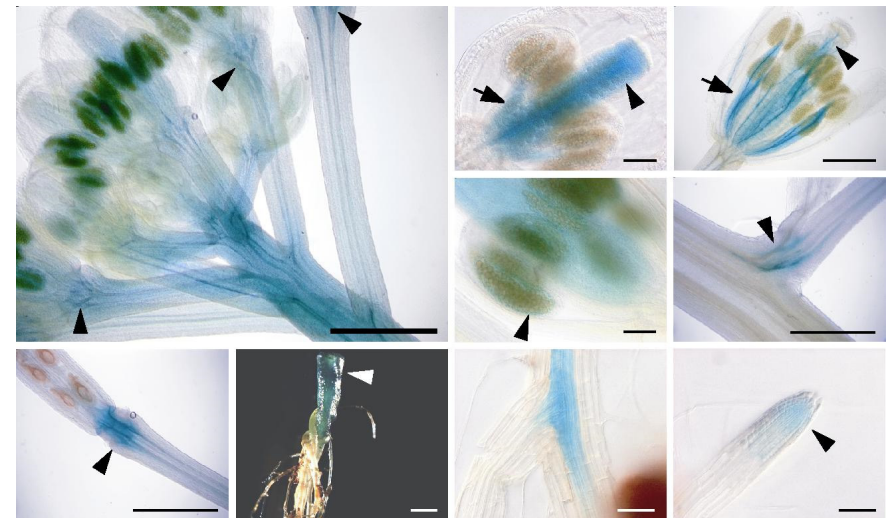
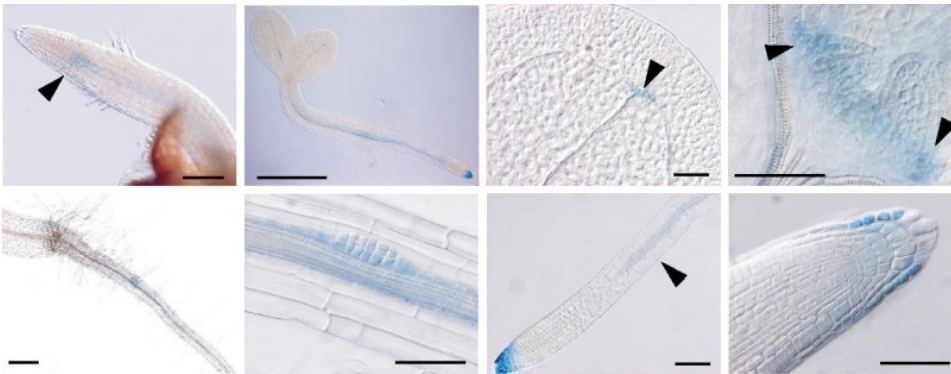
# Transkripční fúze

- **Transkripční fúze s promotorovou oblastí**
  - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
  - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)

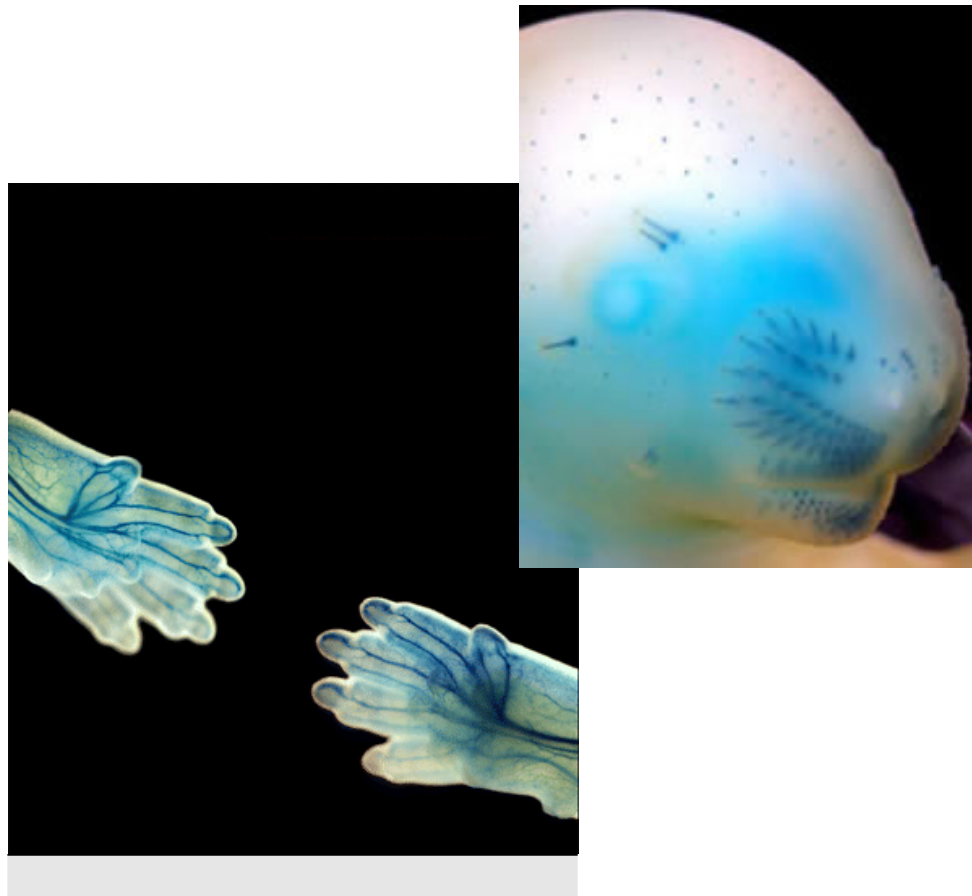


# Transkripční fúze

- **Transkripční fúze s promotorovou oblastí**
  - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
  - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)
  - příprava transgenních organismů nesoucích tuto rekombinantní DNA a jejich histologická analýza

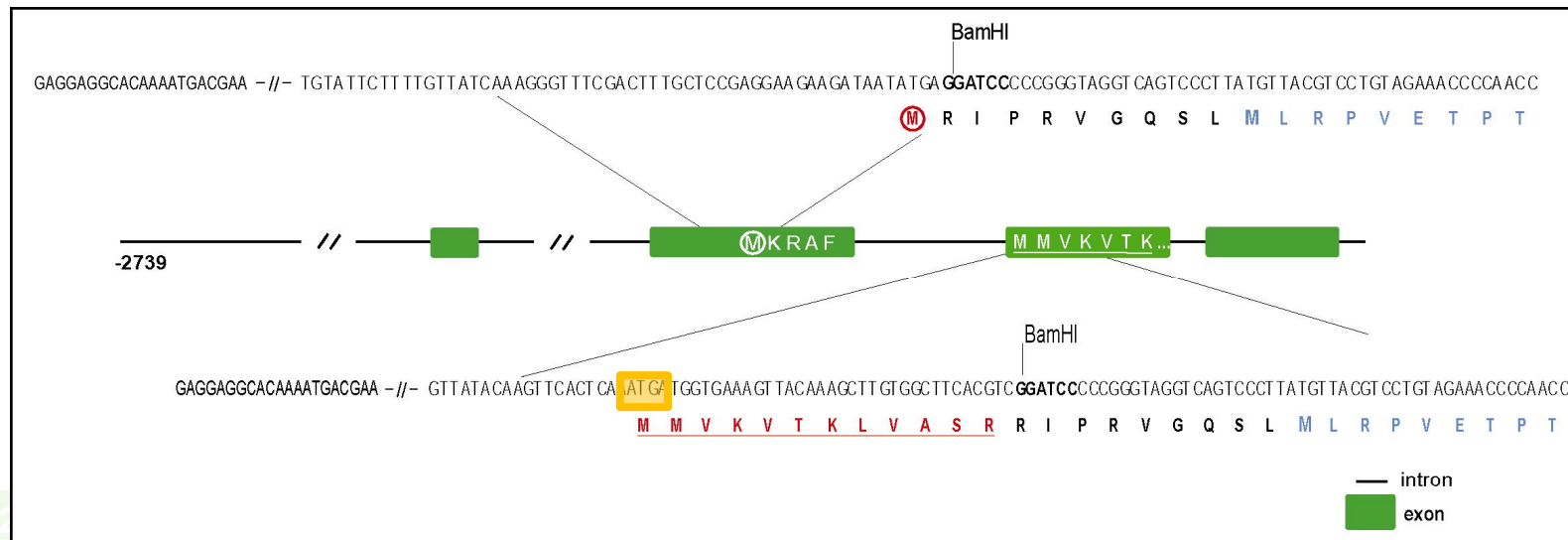
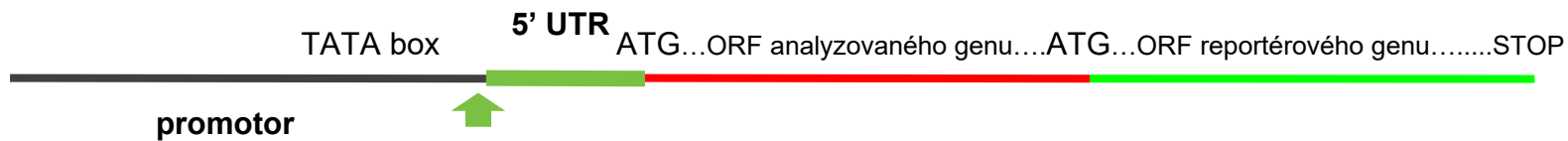


# GUS reporter in mouse embryos



# Translační fúze

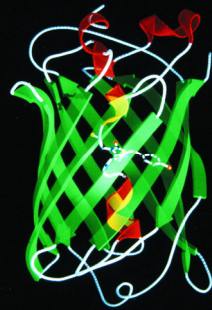
- **Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reportérovým genem**
  - Identifikace a klonování **promotorové** a **kódující** oblasti analyzovaného genu
  - příprava **rekombinantní DNA** nesoucí **promotor** a **kódující** sekvenci studovaného genu ve fúzi s **reportérovým genem** (uidA, GFP)



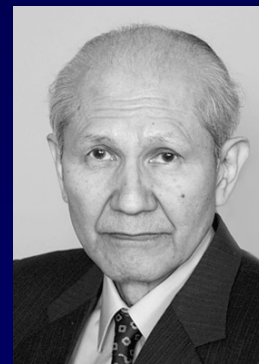
# Základní přístupy

Zobrazení rekombinantních proteinů in vivo

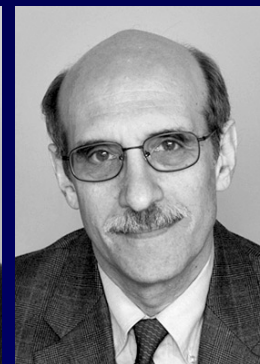
Green Fluorescent Protein (GFP)



Nobelova cena za chemii, 2008



Osamu Shimomura



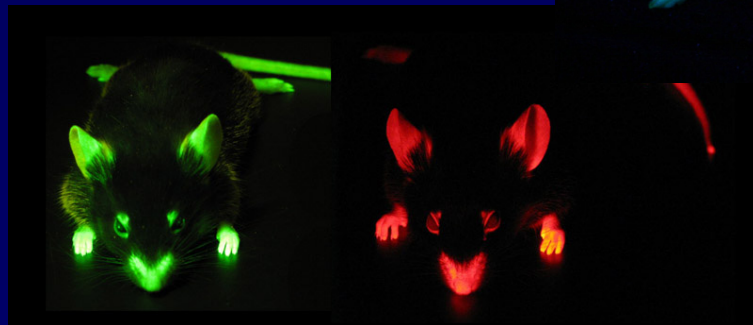
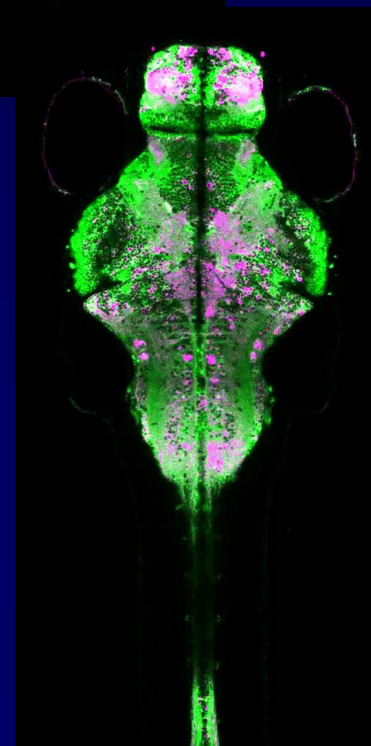
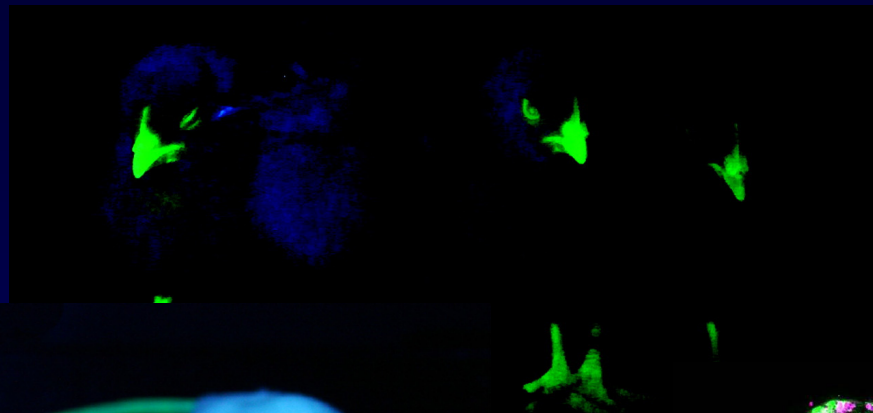
Martin Chalfie



Roger Y. Tsien

# Základní přístupy

Zobrazení rekombinantních proteinů in vivo



# Základní přístupy

Zobrazení rekombinantních proteinů in vivo

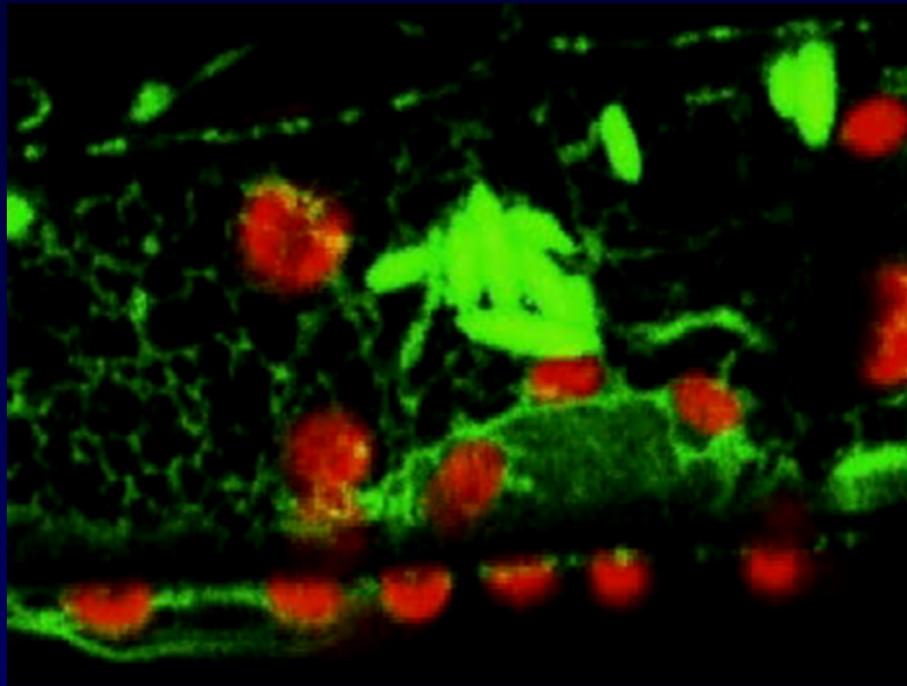
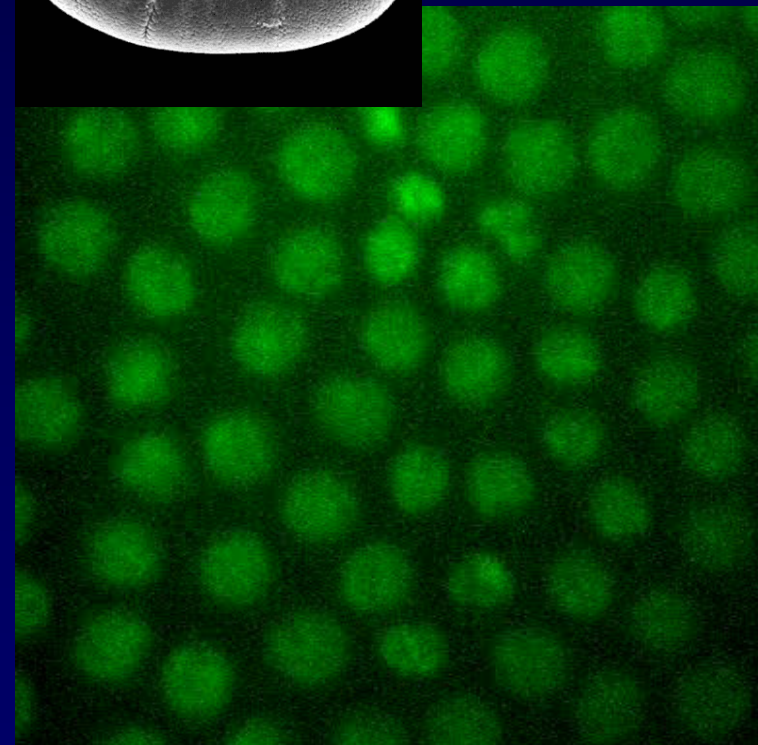


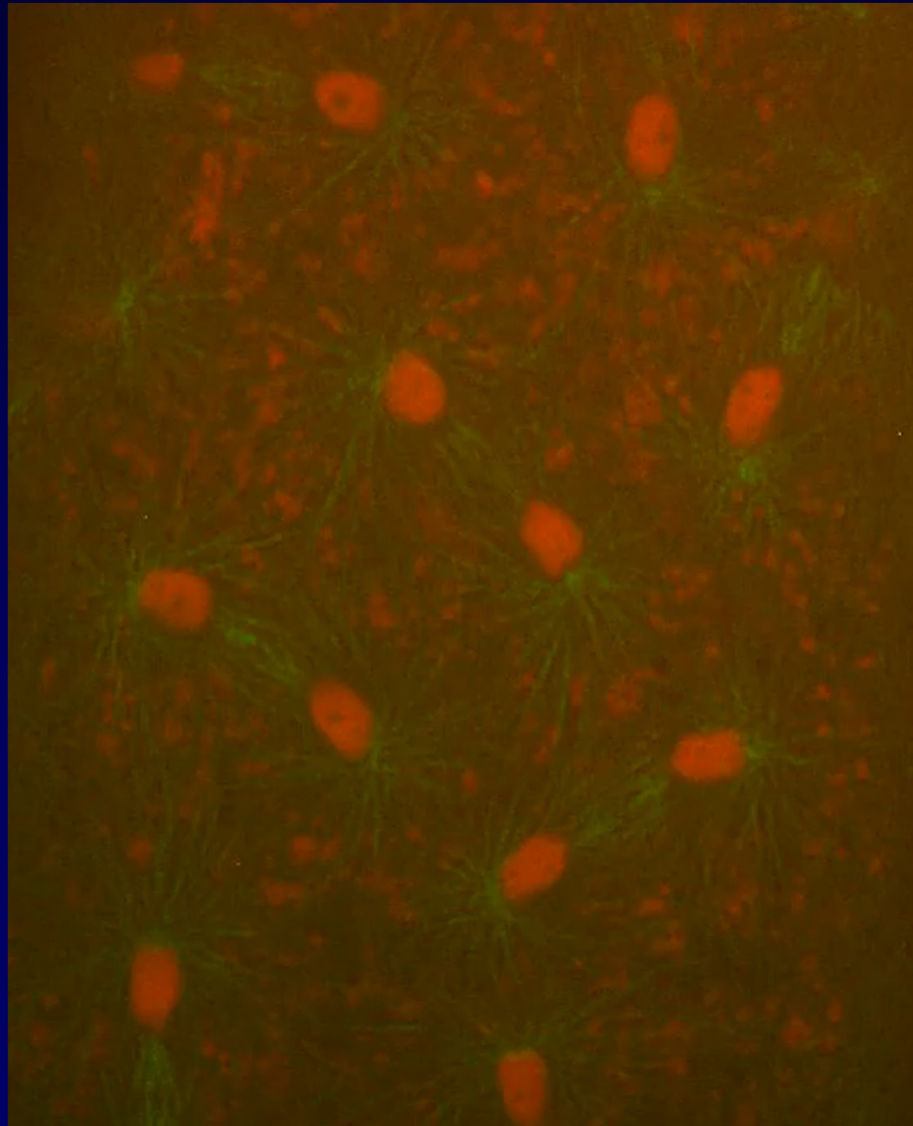
Photo by Alex Wild





# Základní přístupy

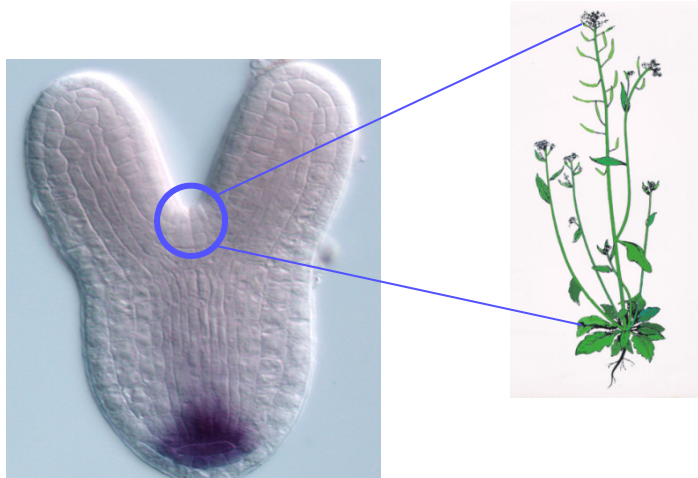
Zobrazení rekombinantních proteinů in vivo



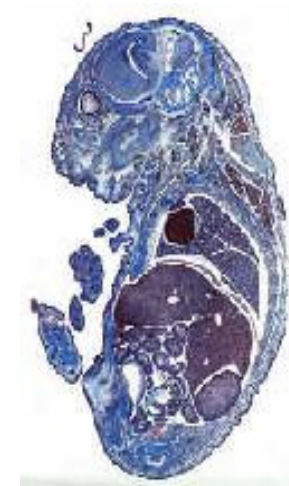
# Osnova

- Klíčové objevy, základní pojmy a přístupy
  - Mezníky genetiky a molekulární biologie
  - Centrální dogma molekulární biologie
  - Metody analýzy genové exprese a lokalizace proteinů in vivo
- **Hormonální signály a růst rostlin**

# Vývojová plasticita rostlin



*Arabidopsis thaliana*, embryo at the torpedo stage

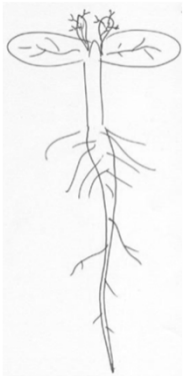


*Mus musculus*, embryo, longitudinal section

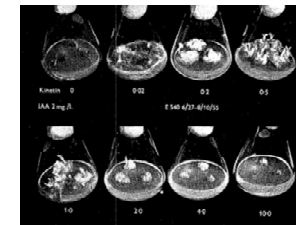
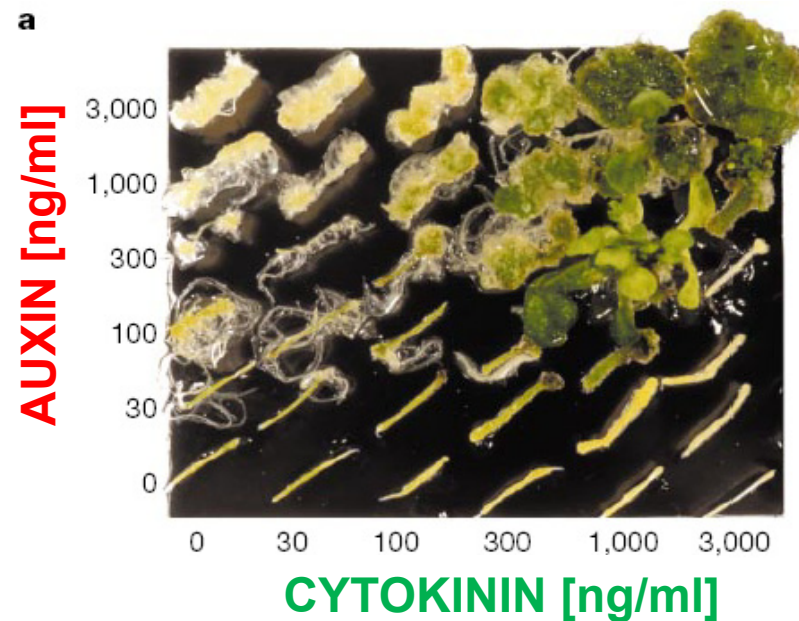
Co je **zásadním rozdílem** mezi **živočichy** a **rostlinami**?

- Schopnost **postembryonální organogeneze de novo** (tedy tvorba bočních kořenů, listů, květů, plodů...)
- Enormní **vývojová plasticita** rostlin – **totipotence diferencovaných rostlinných buněk**
- Tato **vývojová plasticita** umožňuje rostlinám se **přizpůsobit měnícím se podmínkám vnějšího prostředí**

# Hormonální regulace vývoje rostlin



- Dominantní role **cytokininů** a **auxinu** v regulaci **vývojového osudu** rostlinných buněk



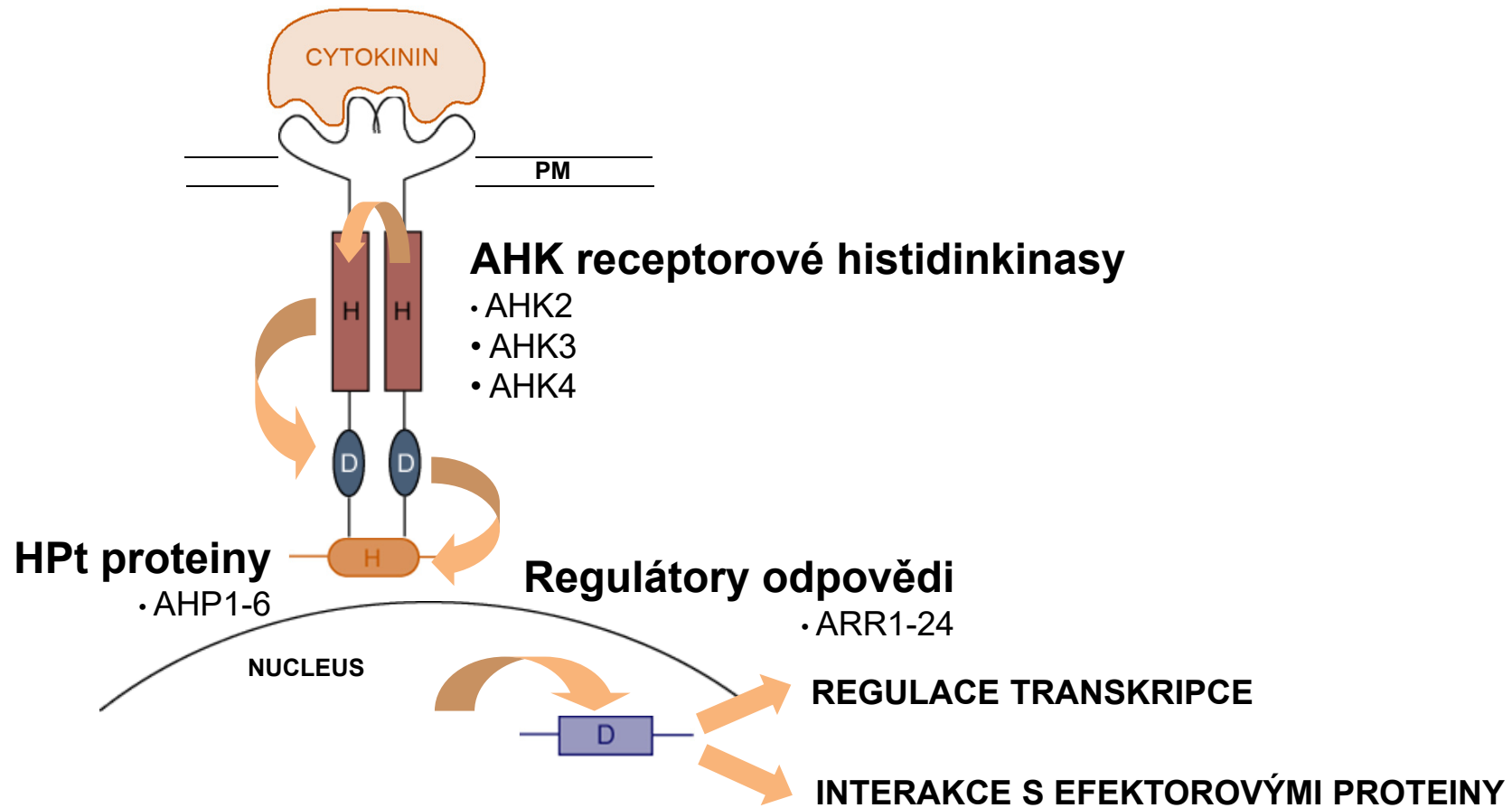
Skoog and Miller, Symp Soc Exp Biol (1957)

**AUXIN**:**CYTOKININS** – kořeny

**AUXIN**:**CYTOKININ** –prýt

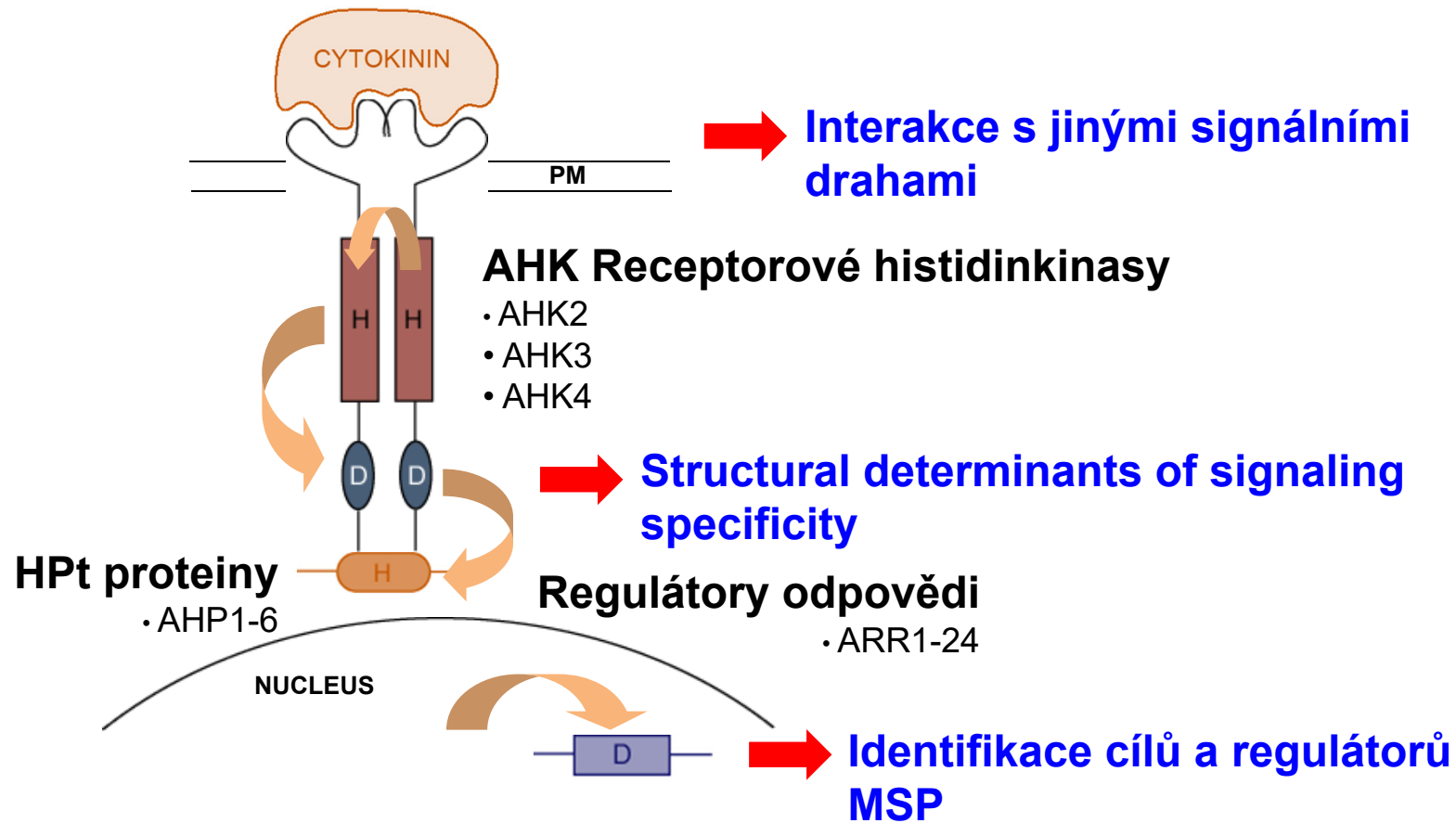
# Přenos signálu prostřednictvím MSP

Současný model přenosu **cytokininového signálu** prostřednictvím **vícekrokového přenosu fosfátu**



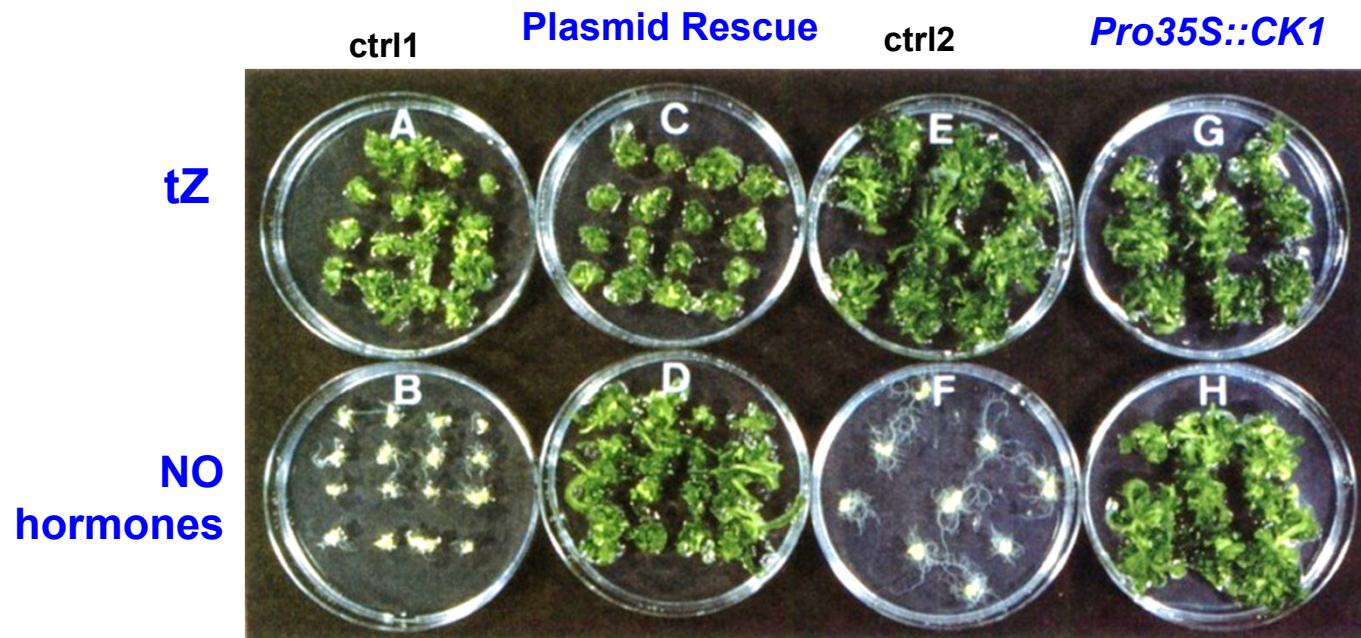
# Signal Transduction via MSP

Co nás **zajímá**?



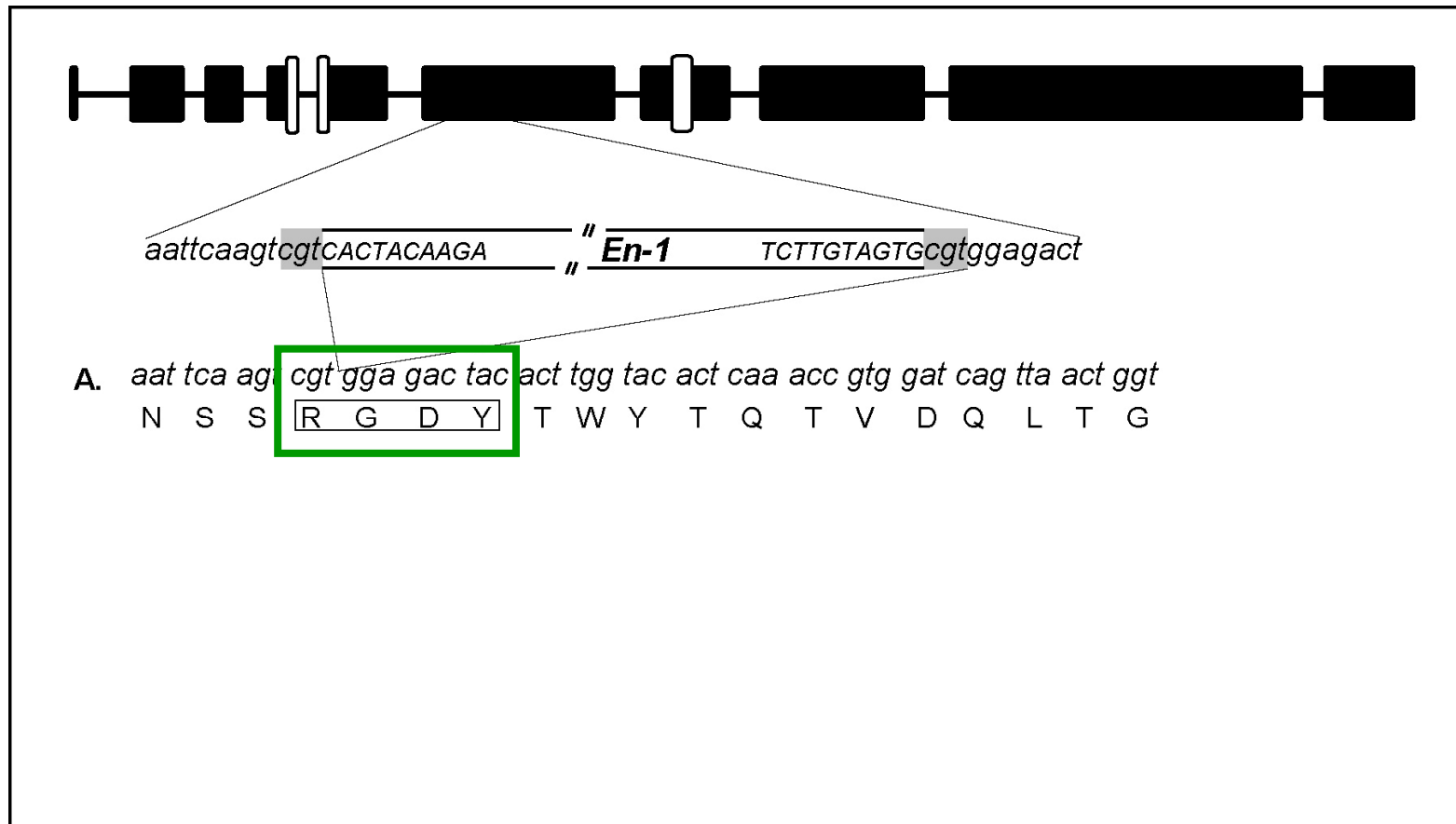
# Identifikace *CK1* aktivační mutagenezí

- *CK1* overexpression mimics cytokinin response



Kakimoto, *Science*, 1996

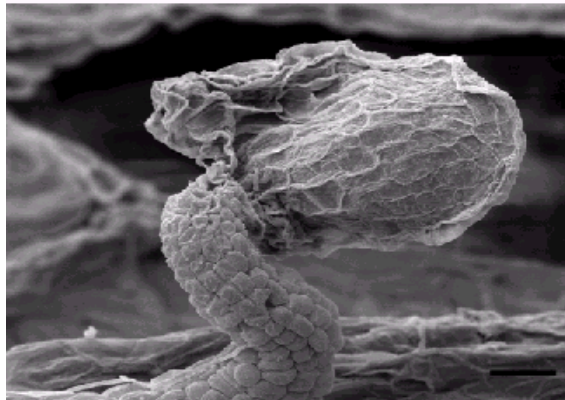
# Identification of insertional *cki1* mutant allele



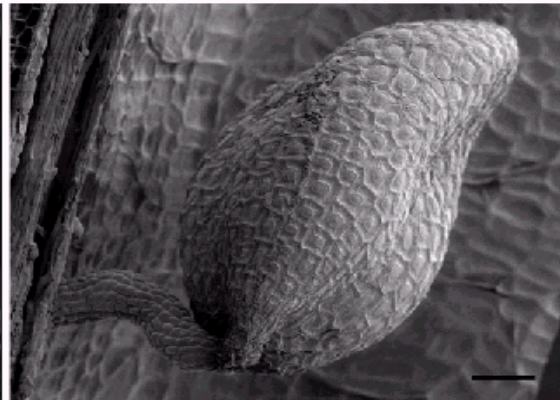


# CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

*CKI1/cki1-i*



*CKI1/CKI1*



Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

# *cki1-i* reveals non-Mendelian inheritance

**P** *CKI1/cki1-i*

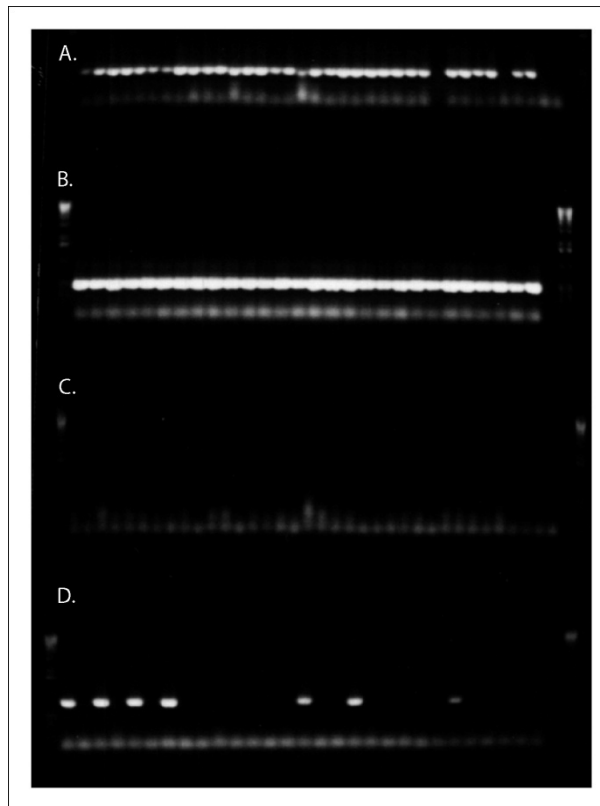
**F1** Anticipated: **1** *CKI1* : **2** *CKI1/cki1-i* : **1** *cki1-i*

Observed: **1** *CKI1* : **1** *CKI1/cki1-i*

	♀	♂
	<i>CKI1</i>	<i>cki1-i</i>
<i>CKI1</i>	<i>CKI1/CKI1</i>	<i>CKI1/cki1-i</i>
<i>cki1-i</i>	<i>CKI1/cki1-i</i>	

# CKI1 and Megagametogenesis

- *cki1-i* is not transmitted through the female gametophyte



A. ♂ wt x ♀ *CKI1/cki1-i*



CKI1 specific primers (PCR positive control)

B. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ wt

C. ♂ wt x ♀ *CKI1/cki1-i*

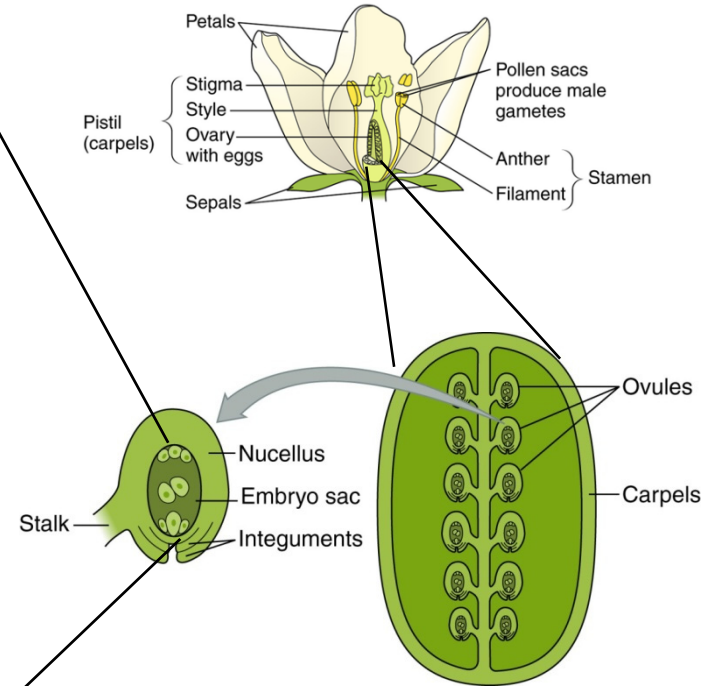
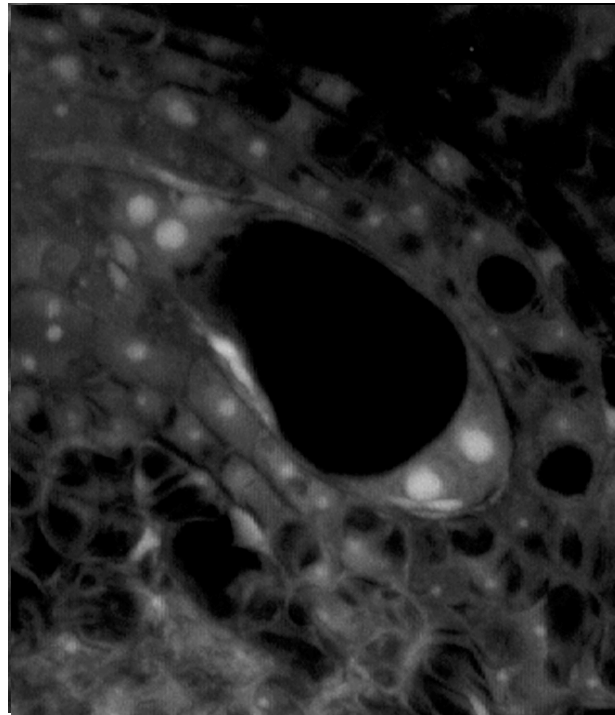


*cki1-i* specific primers

D. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ wt

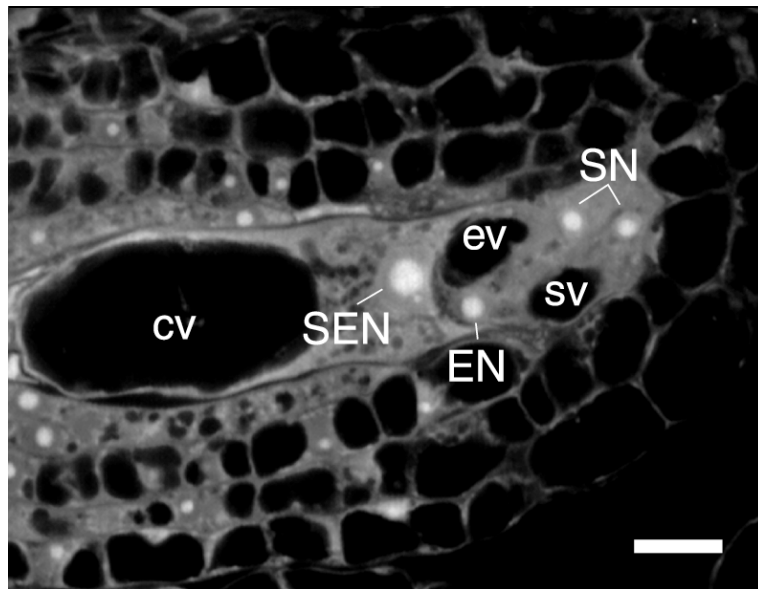
# CKI1 and Megagametogenesis

FG 1

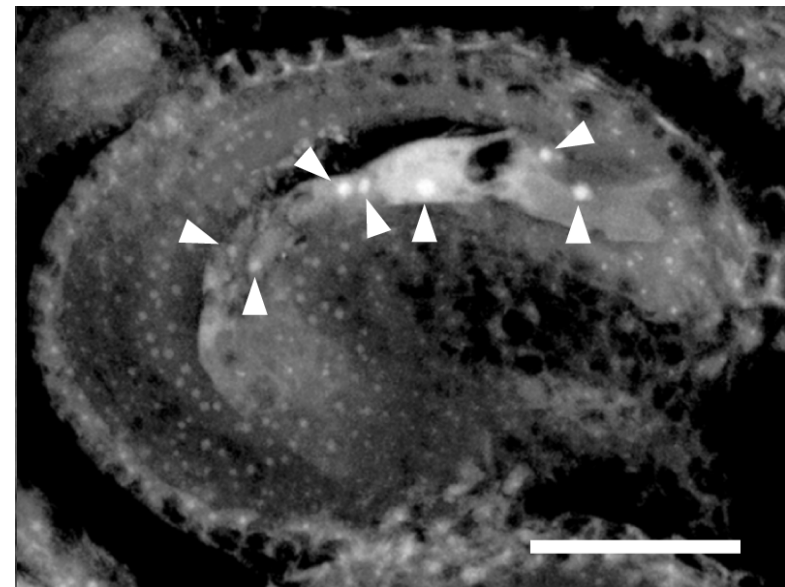


# CKI1 and Megagametogenesis

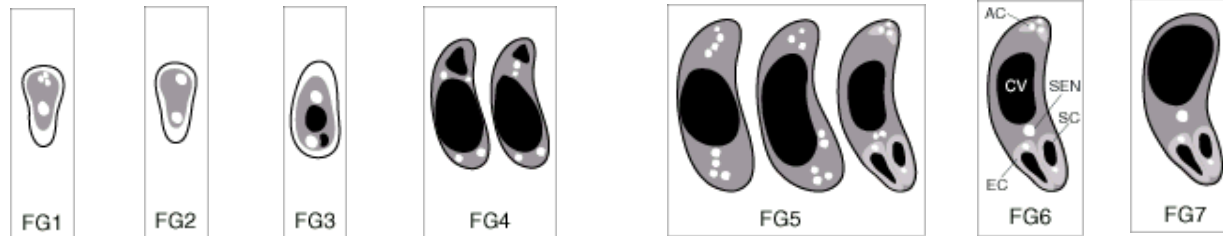
*CKI1* FG4 te FG5



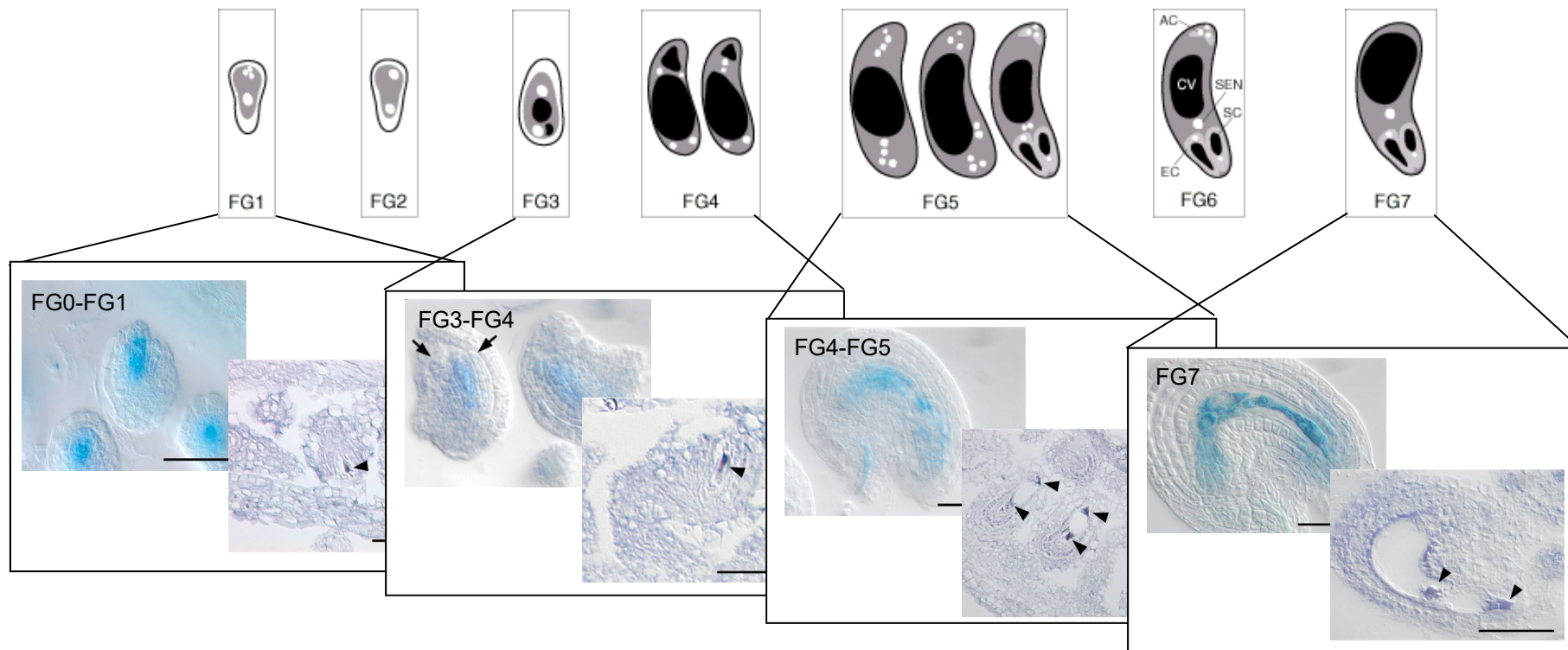
*cki1-i* 28 HAE



Hejatko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)



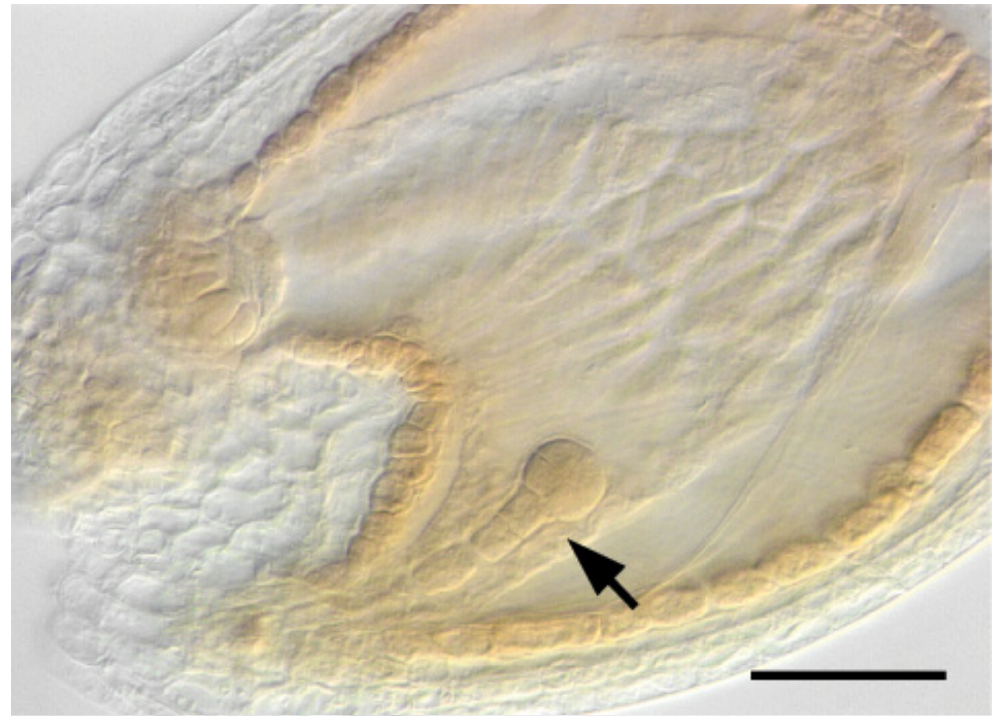
# CKI1 is Expressed During Megagametogenesis



# Paternal *CKI1* is Expressed in the *Arabidopsis* Sporophyte Early after Fertilization

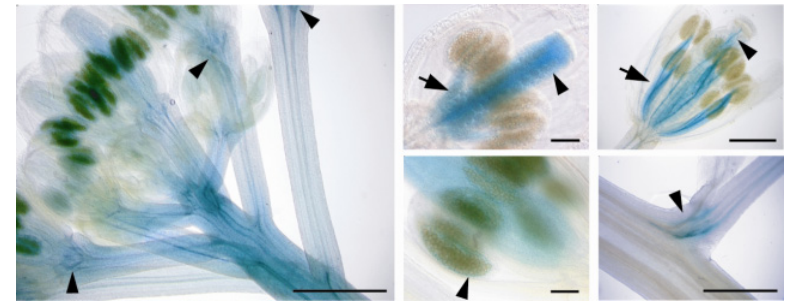
♀ wt x ♂ Pro*CKI1*:*GUS*

**22 HAP**  
(hours  
after  
pollination)

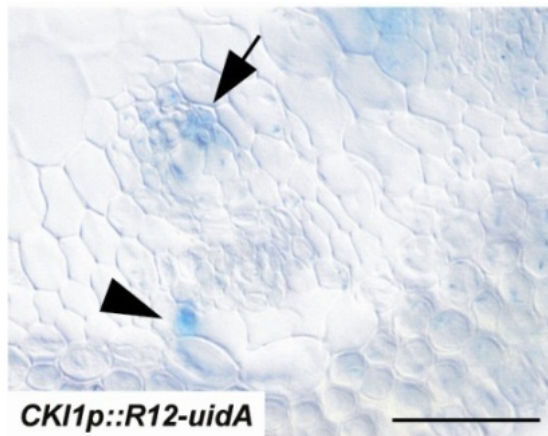


Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

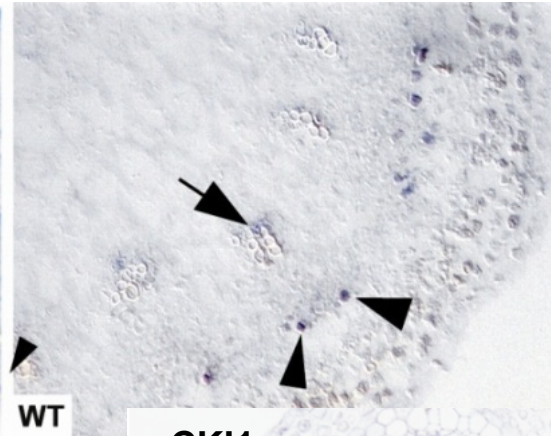
# CKI1 is Active in *Arabidopsis* Gametophyte and Sporophyte



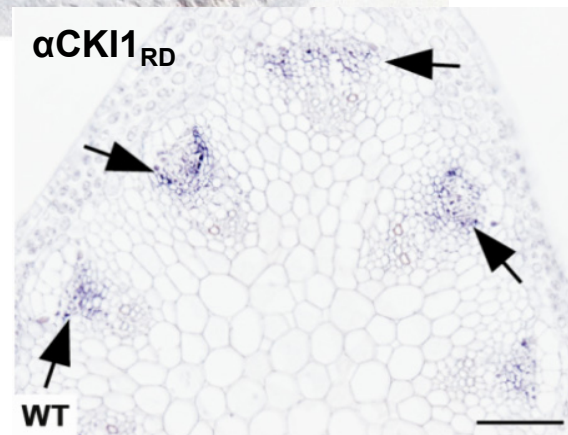
Hejátko et al., *Plant Cell* (2009)



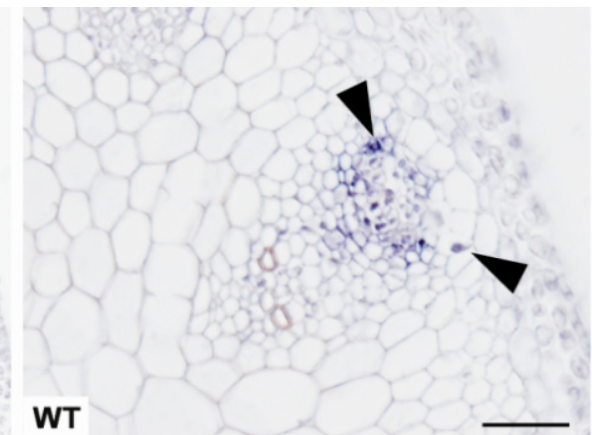
CKI1p::R12-uidA



WT



WT



WT



# RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
  - RNAi objevena u rostlin, později u *Coenorhabditis elegans*
    - U rostlin identifikována jako „sense effect“ v systémové negativní regulaci genové aktivity

Umlčování exprese vnesením další kopie genu pro biosyntézu flavonoidů




van der Krol et al., Plant Cell (1990)

42

CEITEC

Systémový efekt na regulaci exprese GFP



- *Nicotiana benthamiana* exprimující GFP
- Retransformace jednoho z listů konstruktem pro expresi GFP
- Absence GFP je viditelná jako červená fluorescence chlorofylu

Voinnet and Baulcombe, Nature (1997)

43

CEITEC

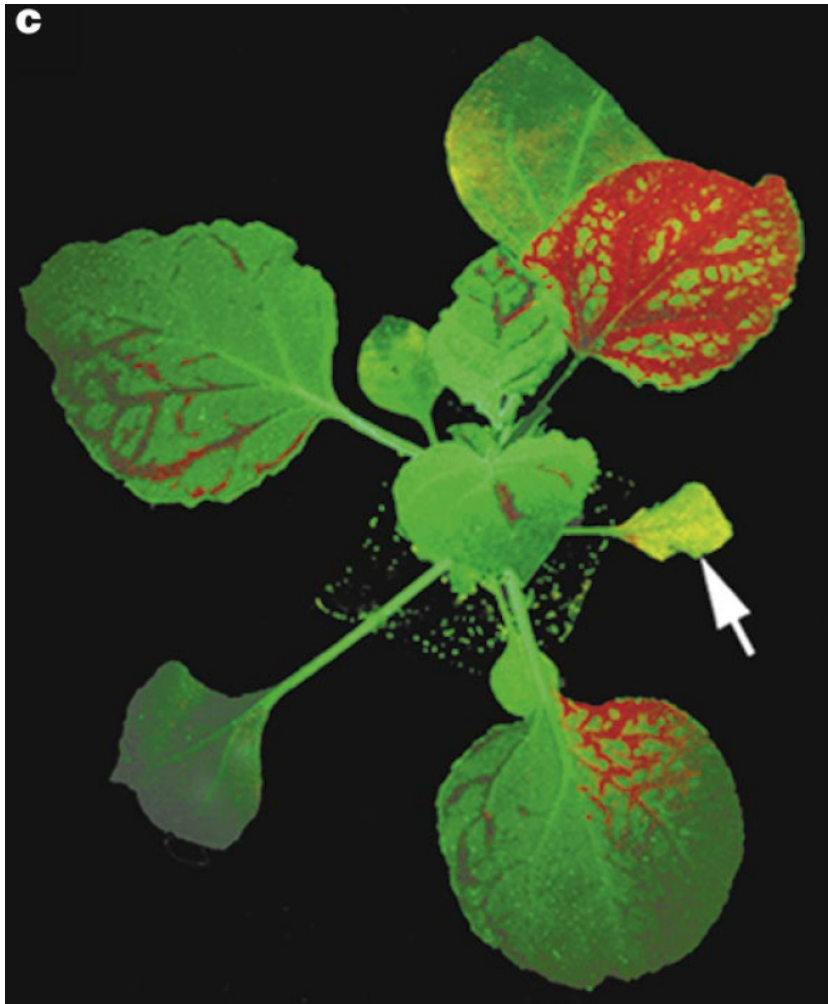
## Umlčování exprese vnesením další kopie genu pro biosyntézu flavonoidů

p35S::DFR



van der Krol et al., *Plant Cell* (1990)

# Systemový efekt na regulaci exprese GFP



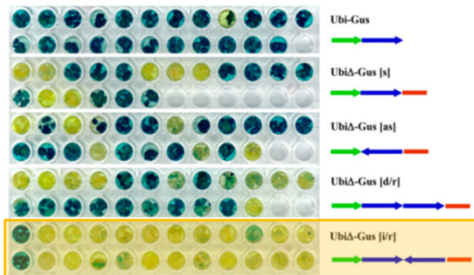
Voinnet and Baulcombe, *Nature* (1997)

- *Nicotiana benthamiana* exprimující GFP
- Retransformace jednoho z listů konstruktem pro expresi GFP
- Absence GFP je viditelná jako červená fluorescence chlorofylu

# RNA interference

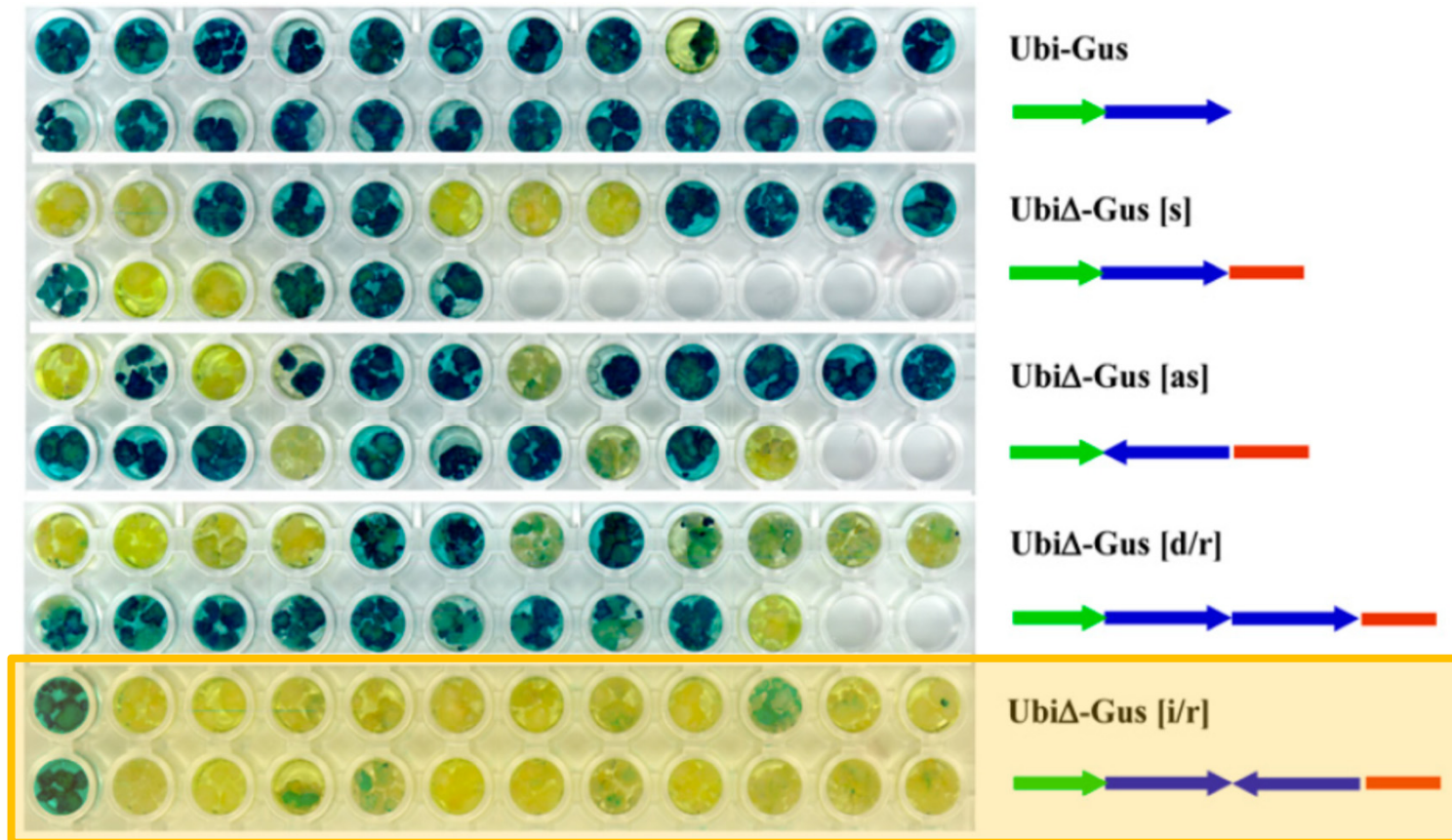
- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**
  - RNAi objevena u rostlin a později u *Coenorhabditis elegans*
    - U rostlin identifikována jako „sense effect“ v **systemové negativní regulaci** genové aktivity
    - umlčování bylo indukováno jak **sense** tak **antisense** RNA
    - **dsRNA** indukovala **umlčování cca 10-100x účinněji**

Posttranskripční umlčování u rostlin je zprostředkováno dsRNA



Waterhaus et al., PNAS (2008)

# Posttranskripční umlčování u rostlin je zprostředkováno dsRNA



Waterhaus et al., *PNAS* (1998)

# The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006



**Andrew Z. Fire**

USA



**Craig C. Mello**

USA



**David Baulcombe**

UK

## CORRESPONDENCE

NATURE|Vol 443|26 October 2006

### RNAi Nobel ignores vital groundwork on plants

SIR — The Nobel prize, by recognizing the individuals behind breakthroughs, inspires all scientists to do great science. The discovery of RNA interference (RNAi) changed the face of gene regulation, a feat deservedly recognized with this year's Nobel Prize in Physiology or Medicine<sup>1</sup>.

As undergraduates, we witnessed with great excitement the discovery of gene silencing. At that time, almost all research in that area was being conducted by plant

values at the centre of the prize and is sending a discouraging message, especially to young researchers.

**Marc Bots\***, **Spencer Maughan†**,  
**Jeroen Nieuwland†**

\*Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology,  
Technologiepark 927, BE-9052 Gent, Belgium

†Institute of Biotechnology, University of  
Cambridge, Cambridge CB2 1QT, UK

1. *Nature* **443**, 488 (2006).
2. Baulcombe, D. C. *Plant Mol. Biol.* **32**, 79–88 (1996).
3. Van der Krol, A. R. et al. *Plant Cell* **2**, 291–299 (1990).
4. Voimmet, O. & Baulcombe, D. C. *Nature* **389**, 553 (1997).
5. Metzlaiff, M., O'Dell, M., Cluster, P. D. & Flavell, R. B. *Cell* **88**, 845–854 (1997).

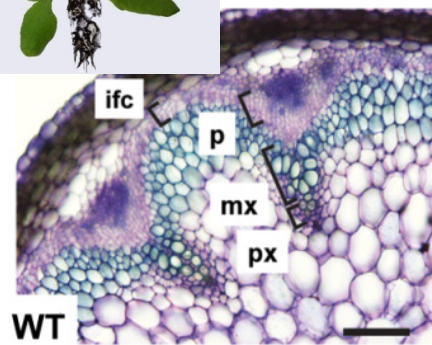
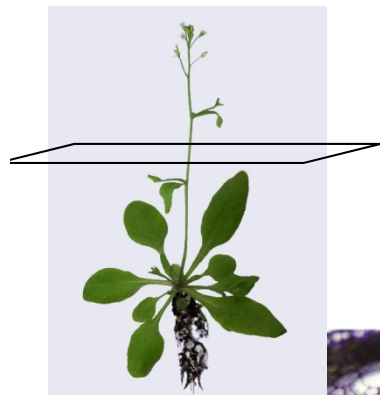
will not do so in the future. We believe that Iranian scientists can and will respond appropriately to the country's needs.

**Kamran B. Lankarani**  
Ministry of Health and Medical Education  
of I. R. Iran, Tehran, I. R. Iran

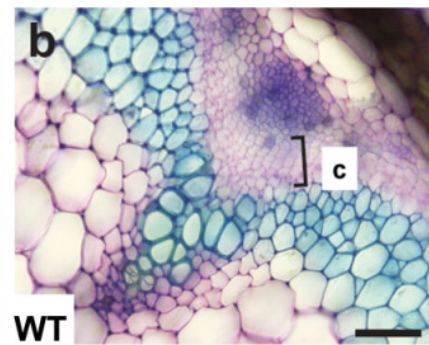
### Iran: productivity is not simple to evaluate

SIR — Eran Meshorer, in Correspondence ("Iran is sixth, not second, in Middle East publication list" *Nature* **443**, 271; 2006), states:

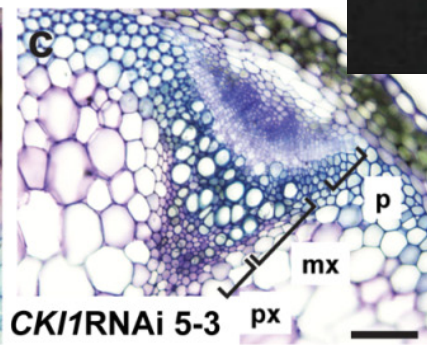
# Hormonální Signály Řídí Množství Biomasy



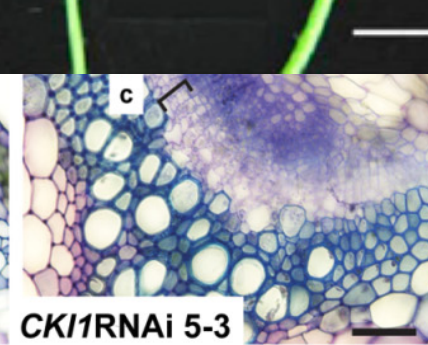
WT



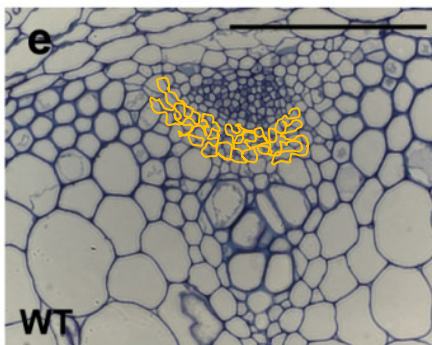
WT



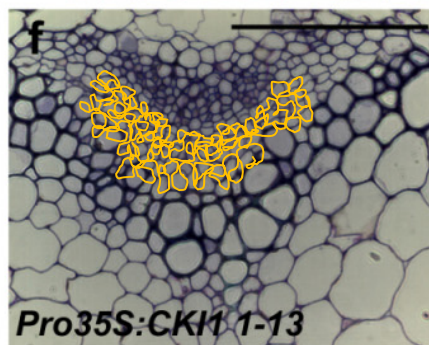
CKI1RNAi 5-3



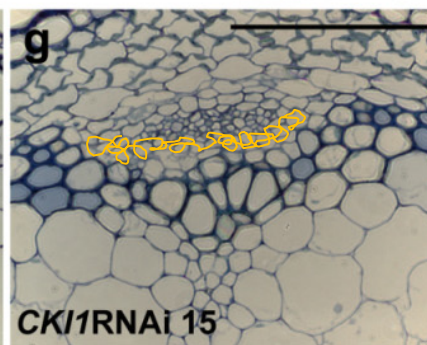
CKI1RNAi 5-3



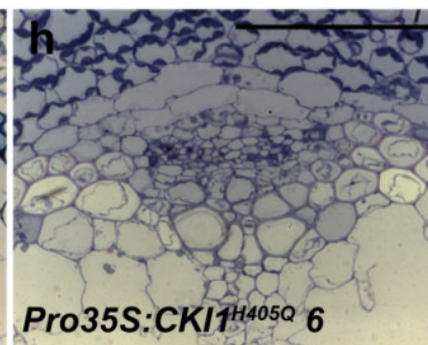
WT



Pro35S:CKI1 1-13



CKI1RNAi 15

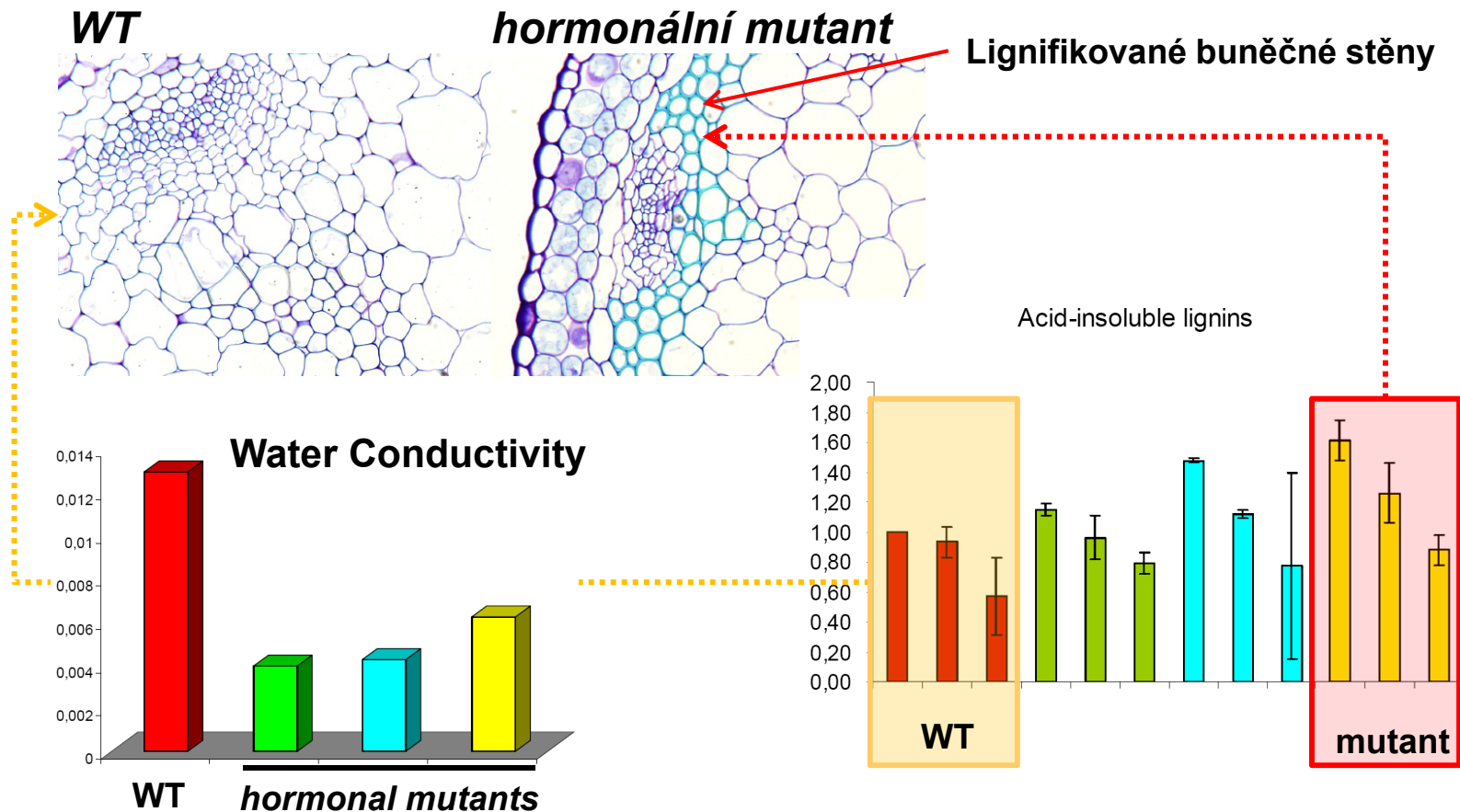


Pro35S:CKI1<sup>H405Q</sup> 6

Hejátko et al., *Plant Cell* (2009)

# Hormonální signály řídí kvalitu biomasy

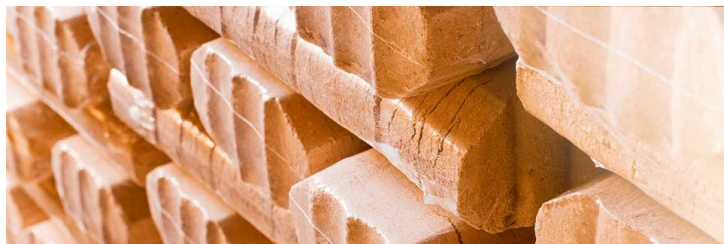
- Rostlinné hormony řídí tvorbu ligninu v rostlinných buněčných stěnách a vodivost cév





# K čemu lze lignin využít?

- Průmyslová **pojiva**



- **Disperzanty**



- **Vanilin**



- Příměsi do **stavebních hmot**

- .....

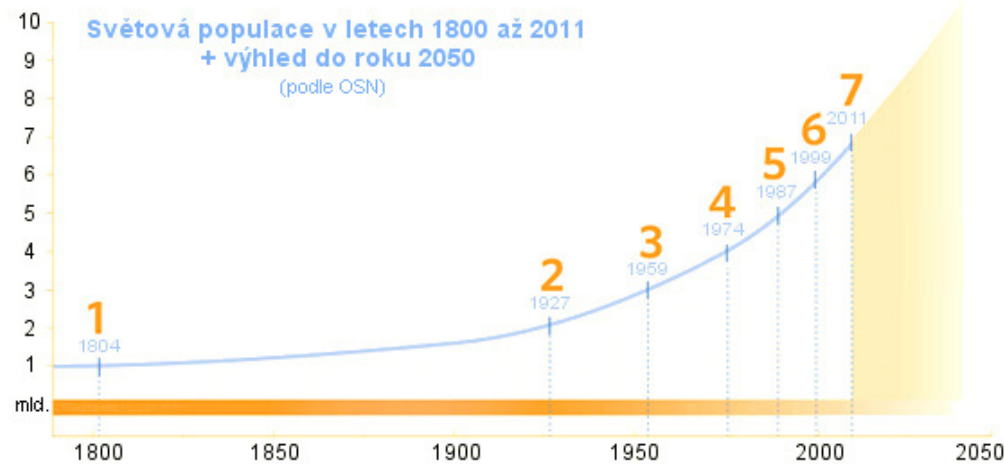
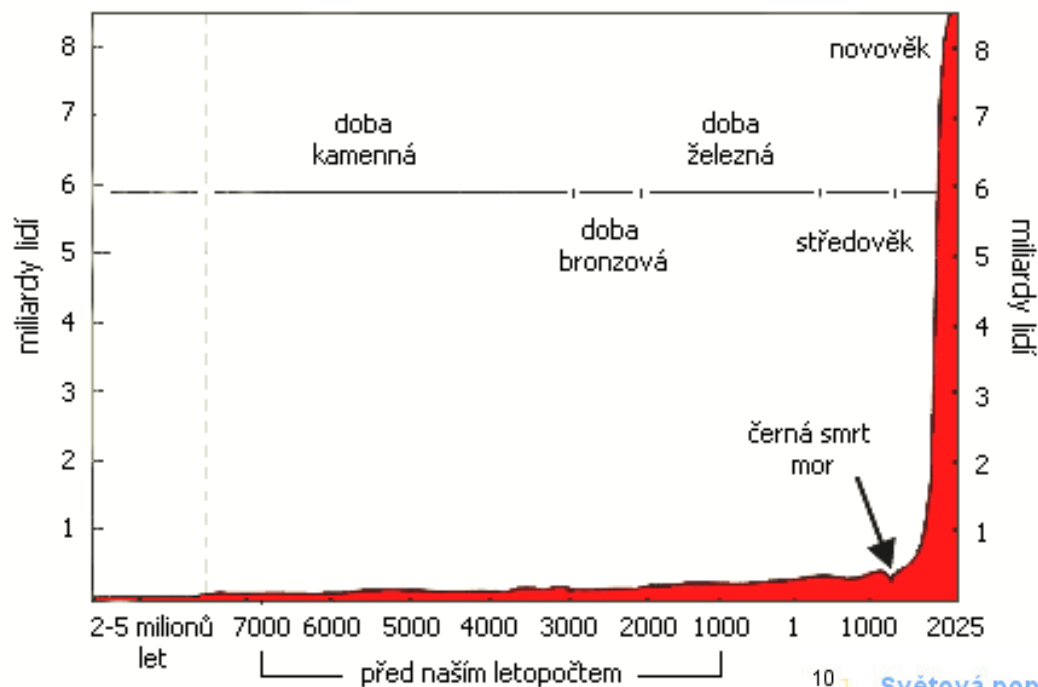


# Osnova

- Klíčové objevy, základní pojmy a přístupy
  - Mezníky genetiky a molekulární biologie
  - Centrální dogma molekulární biologie
  - Metody analýzy genové exprese a lokalizace proteinů in vivo
- Hormonální signály a růst rostlin
- **GMO** - důvod k obavám nebo optimismu?

# Vývoj lidské populace na Zemi

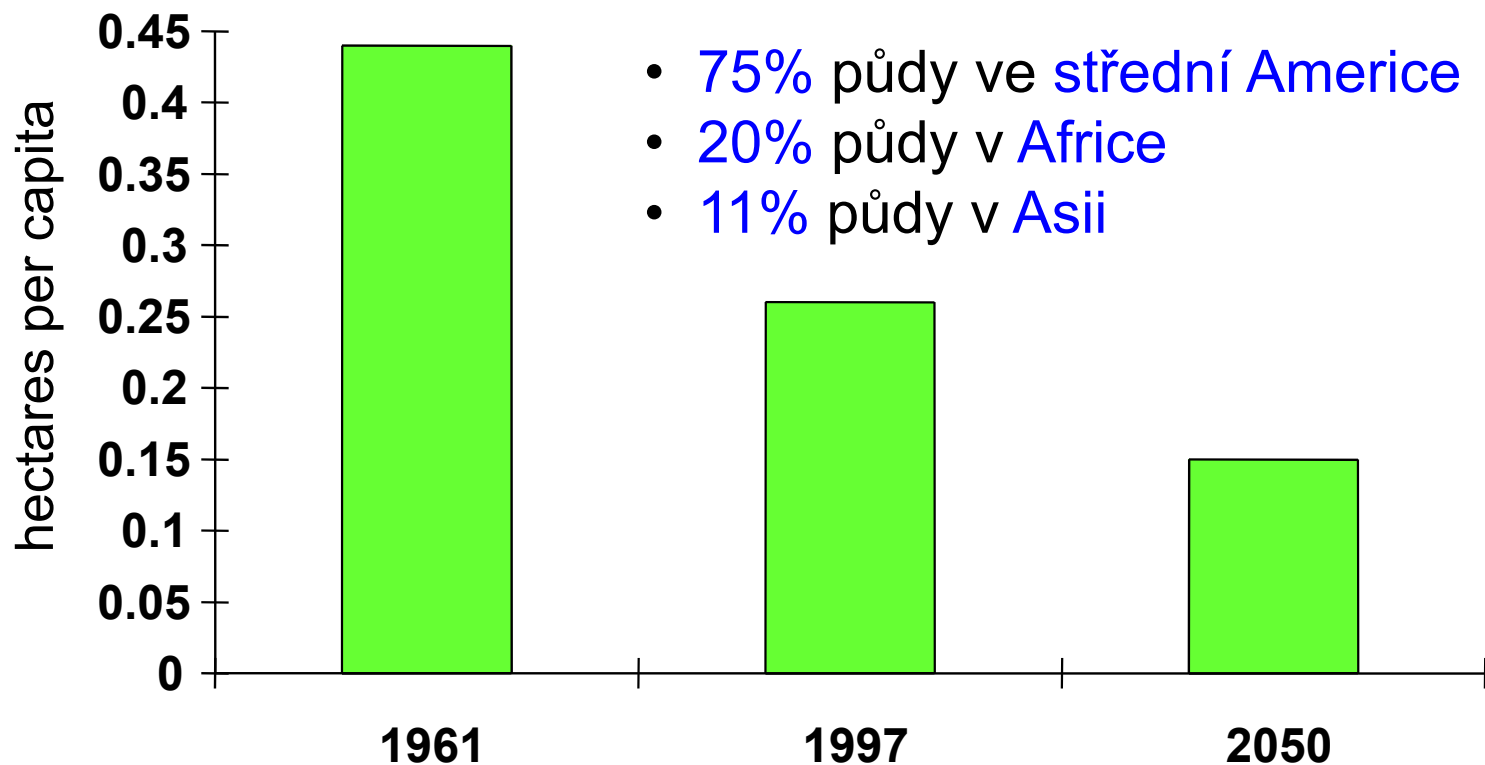
## Růst lidské populace v průběhu historie



UNFPA, 2011

# Množství orné půdy na Zemi je omezené

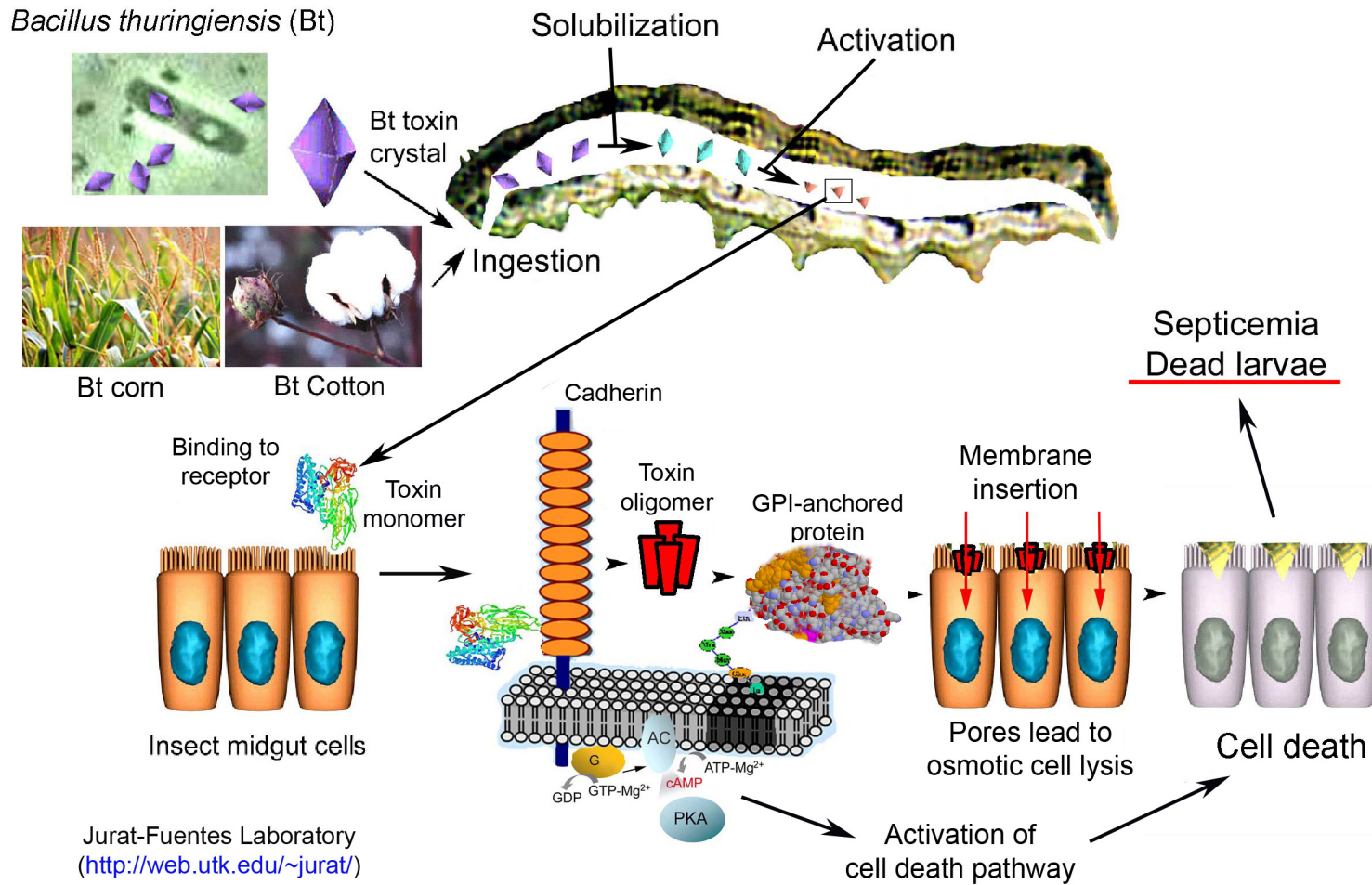
**40%** orné půdy na Zemi je vážně poškozeno nebo zcela neúrodné:



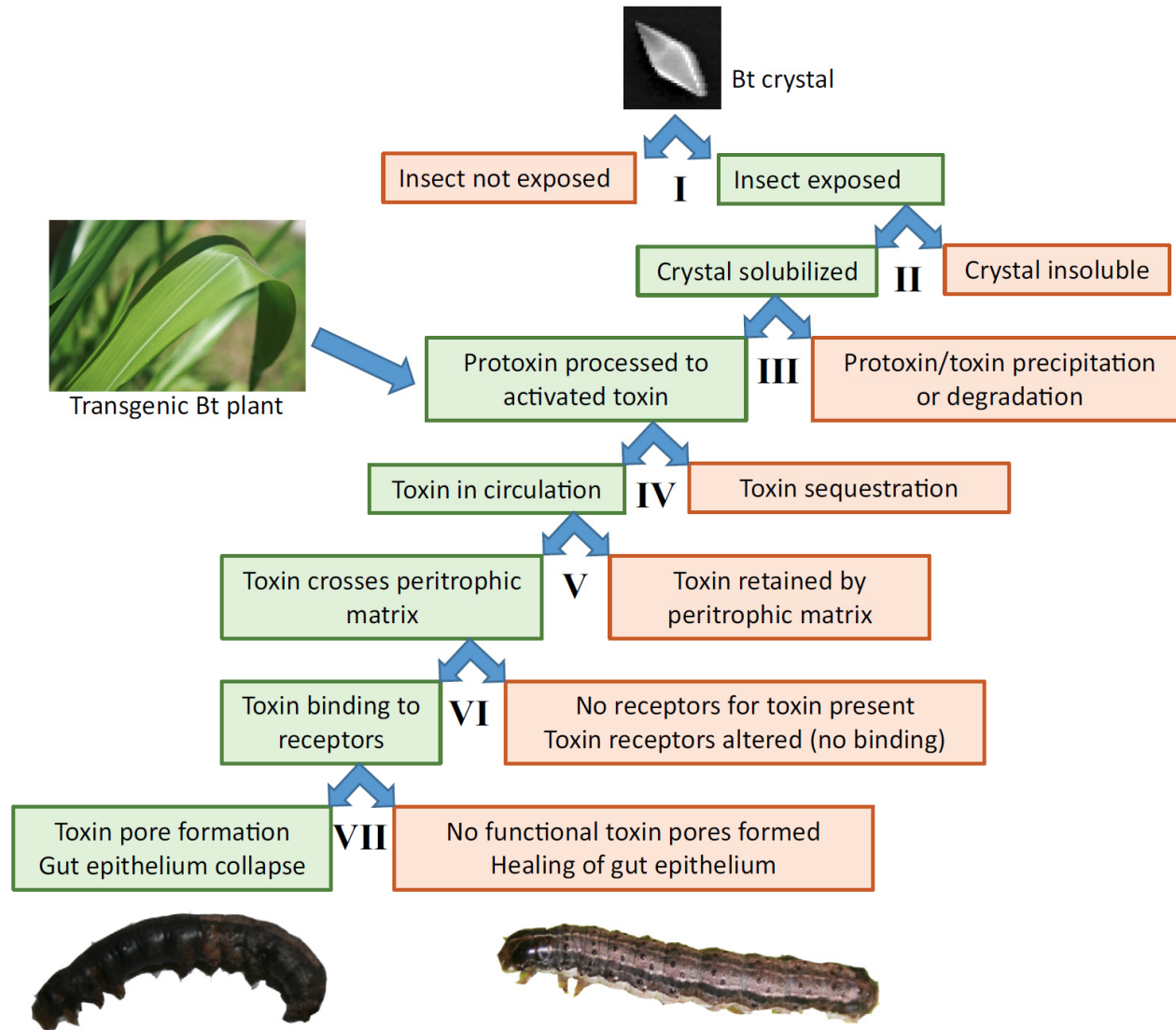
Zdroj: UN Millennium Ecosystem Assessment

# Rezistence k patogenům

## Bt plodiny



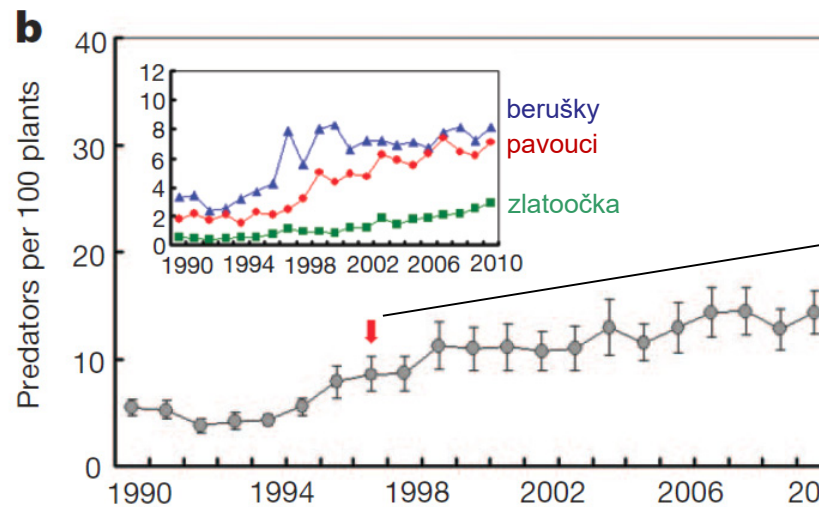
# Specificita CRY proteinů



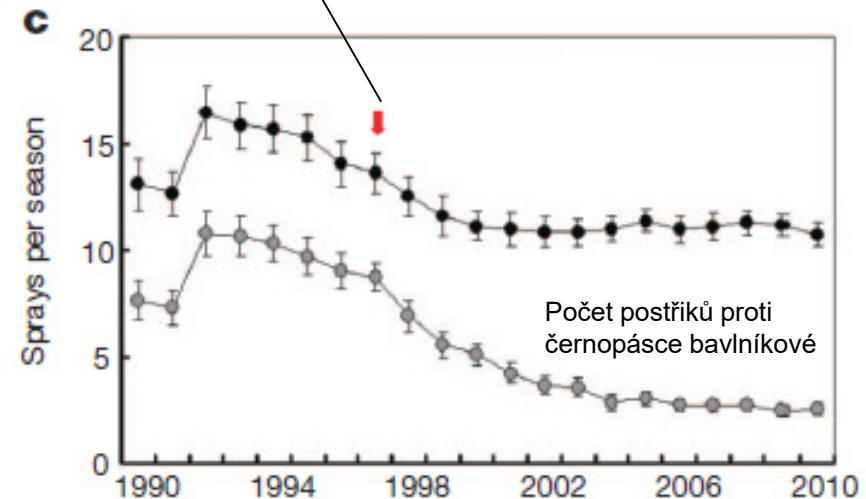
CRY proteins toxic to larvae feeding on crops from insect orders **Lepidoptera**, **Coleoptera**, **Hymenoptera** and **Diptera**.

# Bt plodiny a ekologické dopady jejich pěstování

- Pěstování Bt plodin v Číně zvyšuje množství přirozených nepřátel škůdců a snižuje množství nutných postřiků

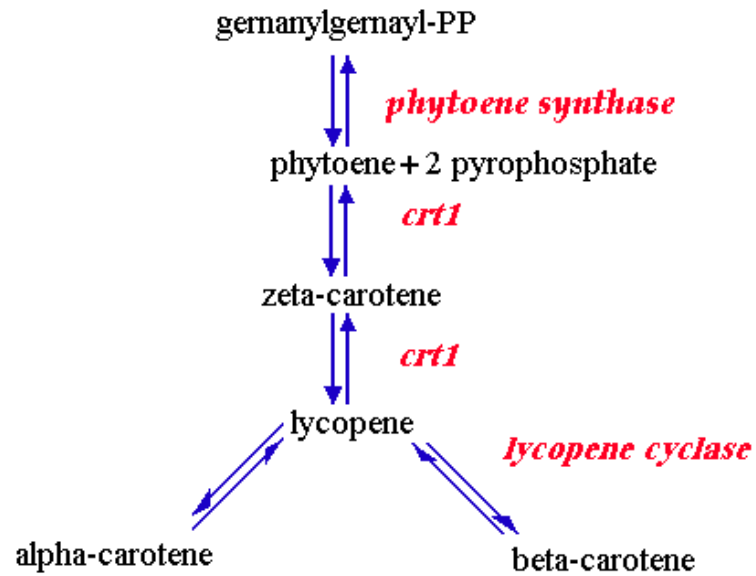


Počátek pěstování Bt bavlny



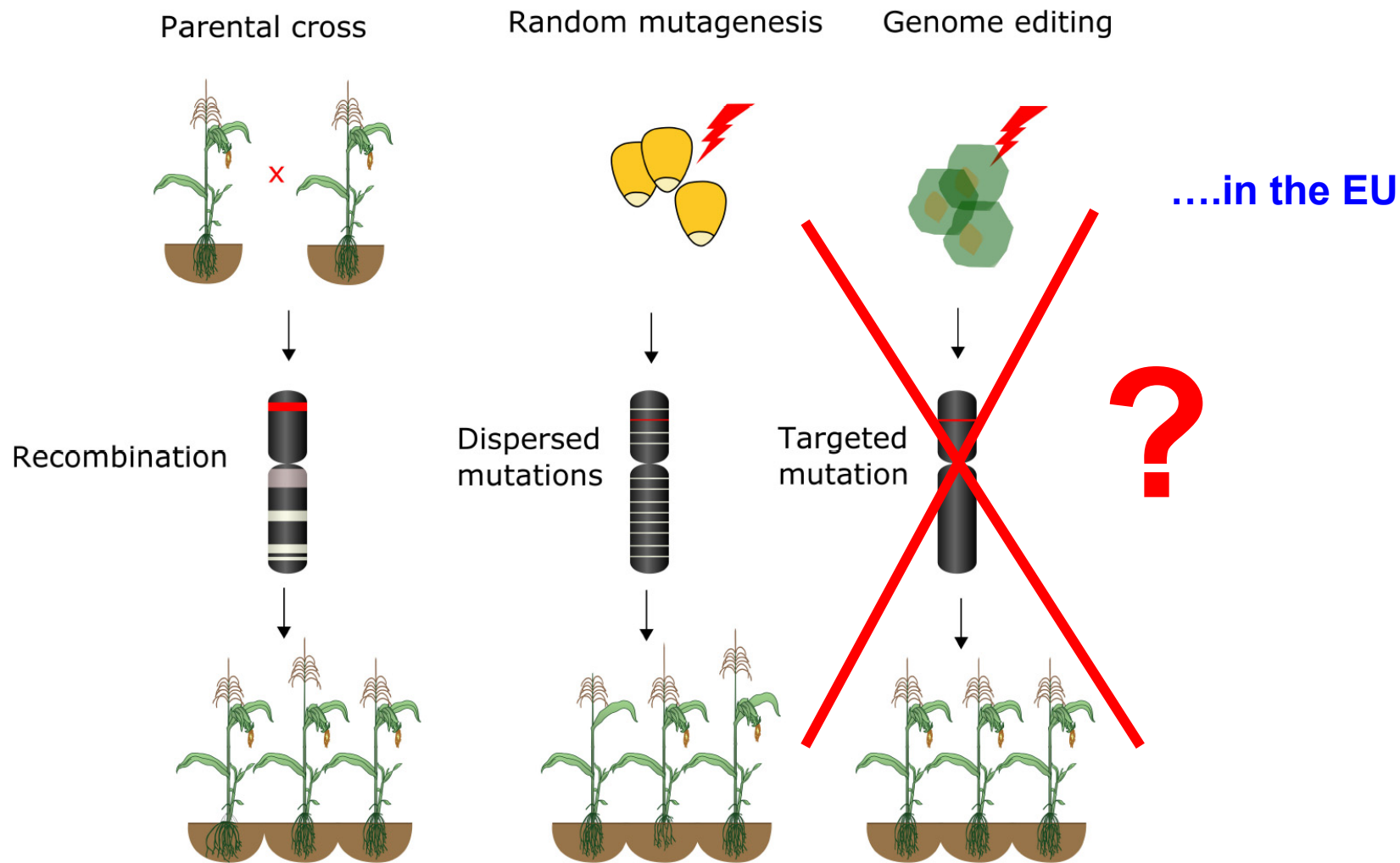
# Zvýšení nutriční hodnoty Zlatá rýže

Biosyntetická dráha  $\beta$ -karotenu

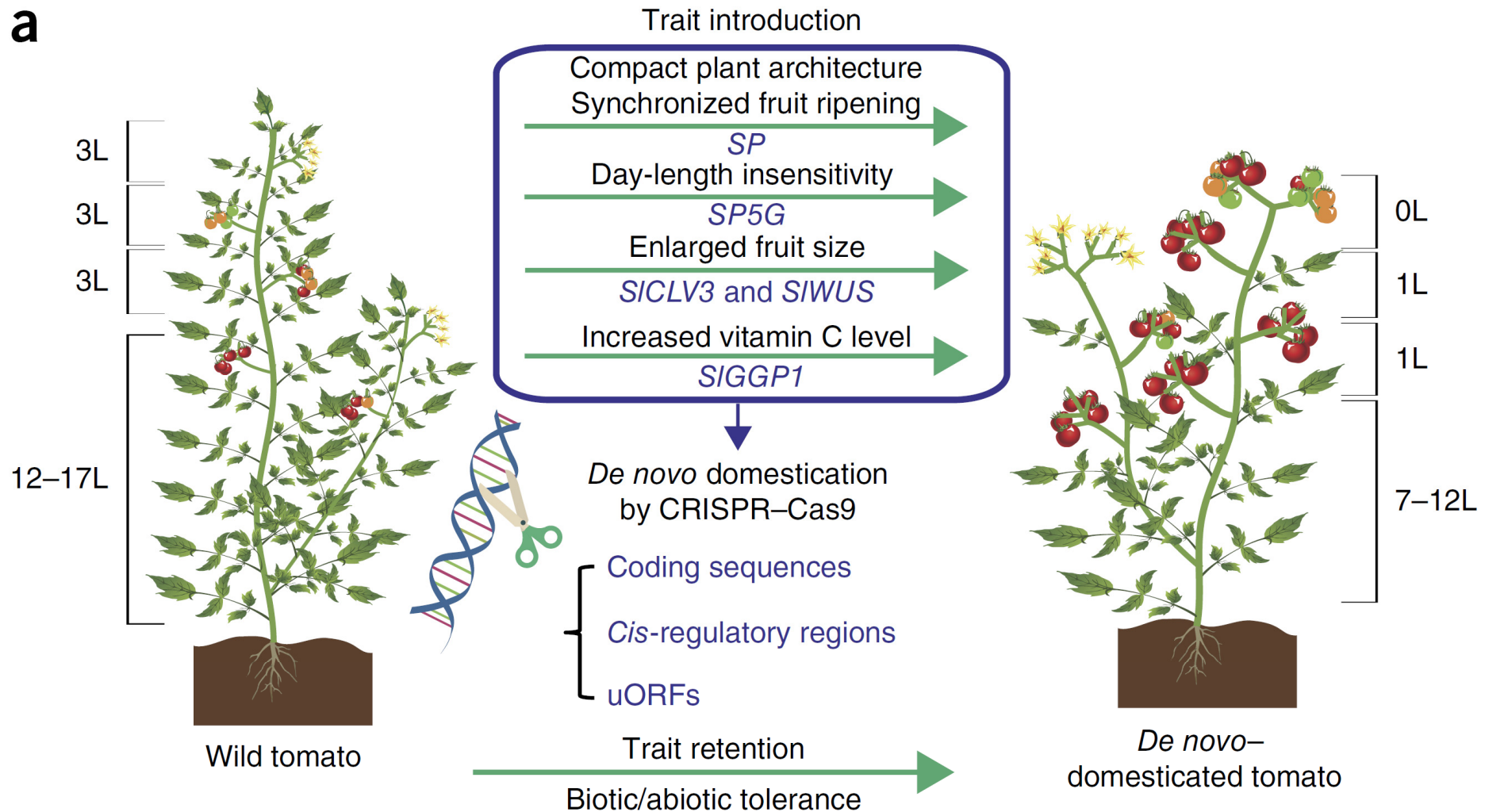




# Náhodná mutageneze vs. editace genomu



# Využití editace genomu v „domestikaci“ rostlin

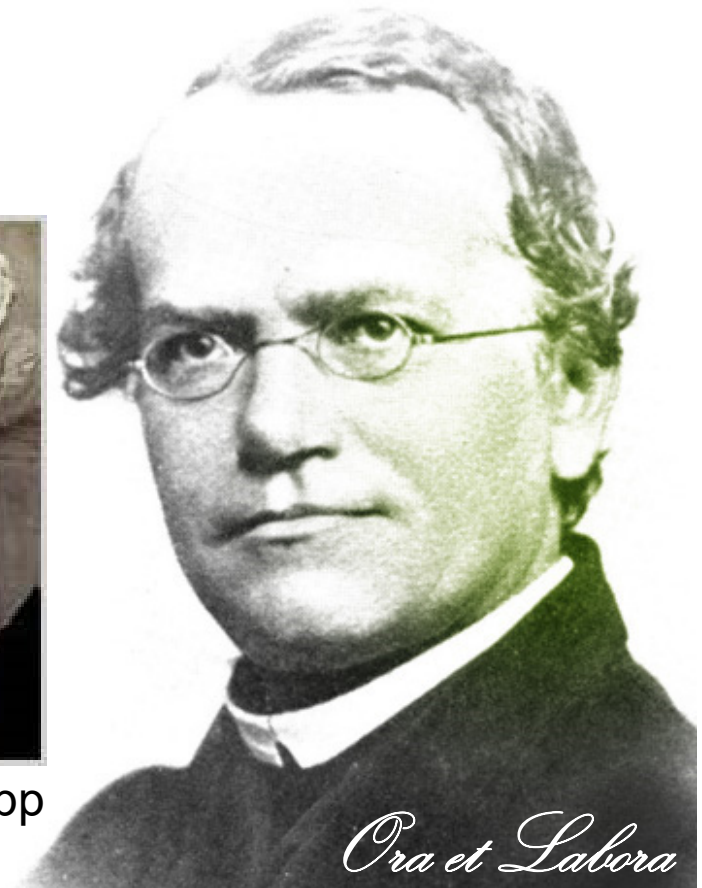


# Závěry

- Výzkum života s využitím moderních přístupů genetiky a molekulární biologie je úžasné dobrodružství 😊
- Genové manipulace nám dávají možnost porozumět základním mechanismům vývoje (nejen) rostlin
- Příprava geneticky modifikovaných organismů je mocný nástroj, který lze zneužít, ale není důvod se ho obávat

# Vítejte v Brně!

- Brno – místo nejen s bohatou historií....



Cyril F. Napp

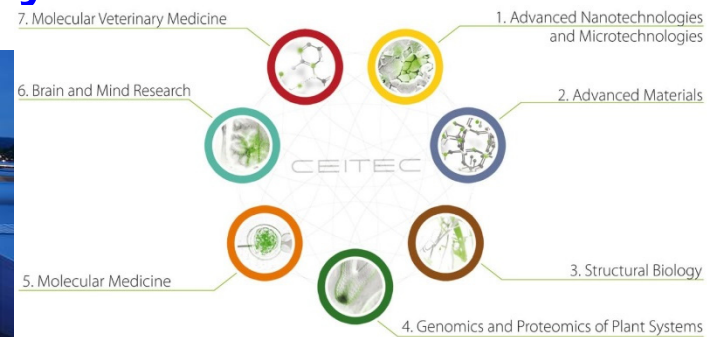
Mendel's legacy  
150 years  
of the genius of genetics

*Ora et Labora*

 CEITEC

# Vítejte v Brně!

- .....ale také **budoucností vědy!**



# Thank you for your attention



Central European Institute of Technology  
Masaryk University  
Kamenice 753/5  
625 00 Brno, Czech Republic

[www.ceitec.muni.cz](http://www.ceitec.muni.cz) | [info@ceitec.muni.cz](mailto:info@ceitec.muni.cz)

