

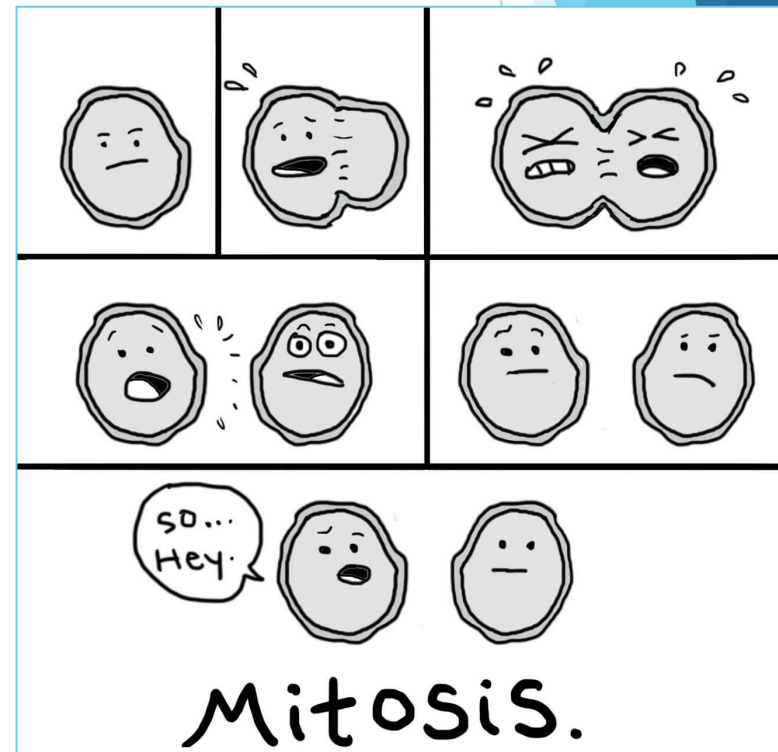


Plant Cell Biology

Department of Experimental Biology, MU

10. Buněčné dělení a ontogeneze rostlin

- ▶ Buněčný cyklus (*The cell cycle*)
 - ▶ Regulace buněčného cyklu
- ▶ Mitóza
 - ▶ (pre-)profáze, (pro-)metafáze, anafáze, telofáze
 - ▶ Zvláštnosti cytokineze buněk vyšších rostlin
- ▶ Meióza (redukční dělení)
- ▶ Vývoj mnohobuněčných organizmů
- ▶ Stavba těla dvouděložných rostlin
- ▶ Embryogeneze: původ polarity
 - ▶ Apikálně-bazální polarita
 - ▶ Radiální symetrie
- ▶ *Root apical meristem (RAM)*
- ▶ *Shoot apical meristem (SAM)*
- ▶ Polární transport auxinů



Rostlinné formy pocházející z nepředurčených (*indeterminate*) růstových procesů

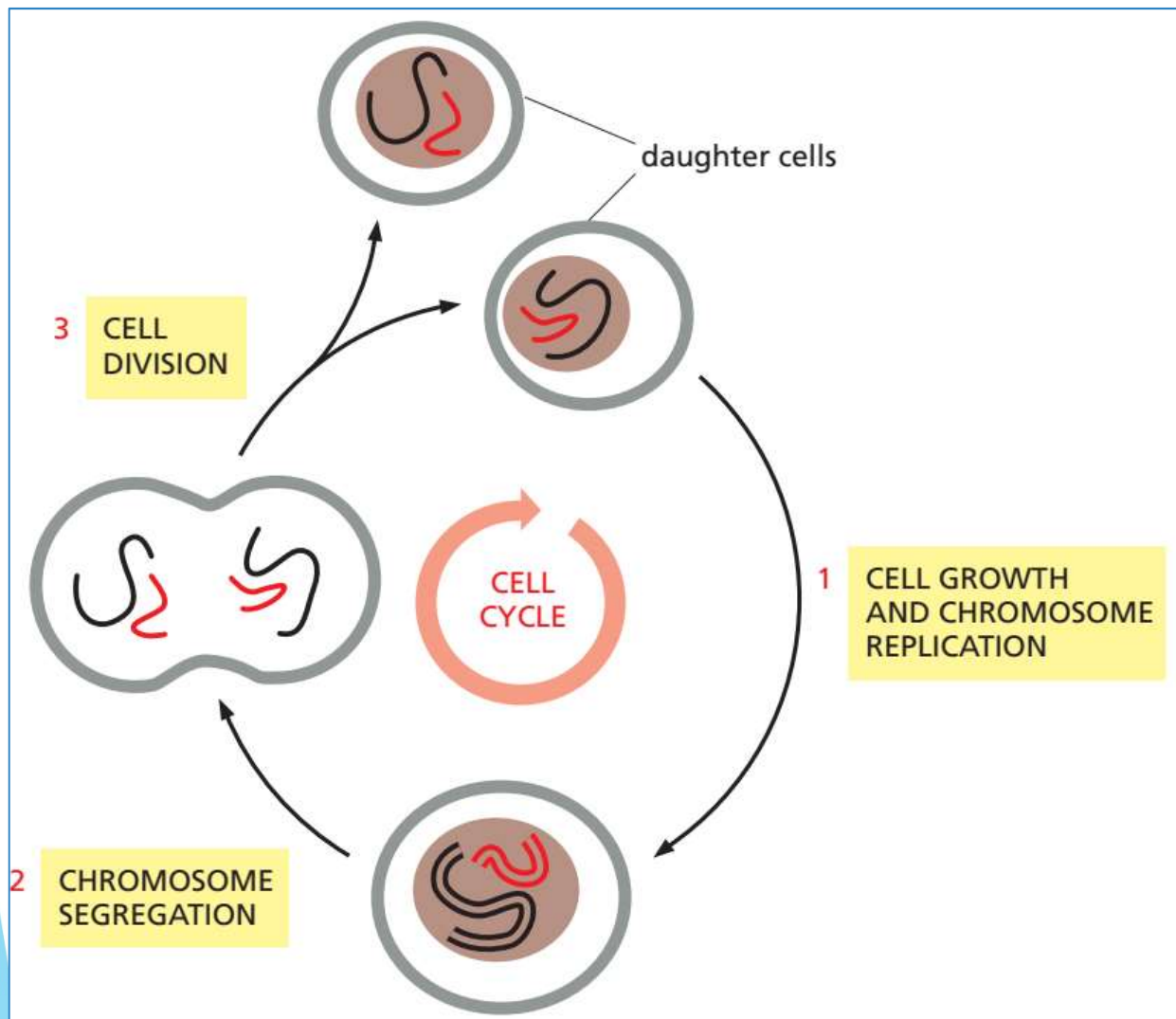
- ▶ Vývoj rostlin na rozdíl od živočichů odráží strategie přežití:
 - ▶ Rostlina neschopná pohybu vs. živočišné mechanismy mobility.
 - ▶ Rostliny fotosyntetické vs. živočichové heterotrofní.
 - ▶ Rostliny se spoléhají na flexibilní vzorce růstu, které jim umožňují přizpůsobit se životu na místě.
- ▶ Vegetativní růst rostlin není typicky předem určený a je vystaven změnám bez daných konečných bodů.
- ▶ **Rostlinné buňky jsou totipotentní!**



- ▶ Strom sekvoje starý 2500 let vs *Arabidopsis* (životní cyklus dokončen za několik měsíců)

Buněčný cyklus (*the cell cycle*)

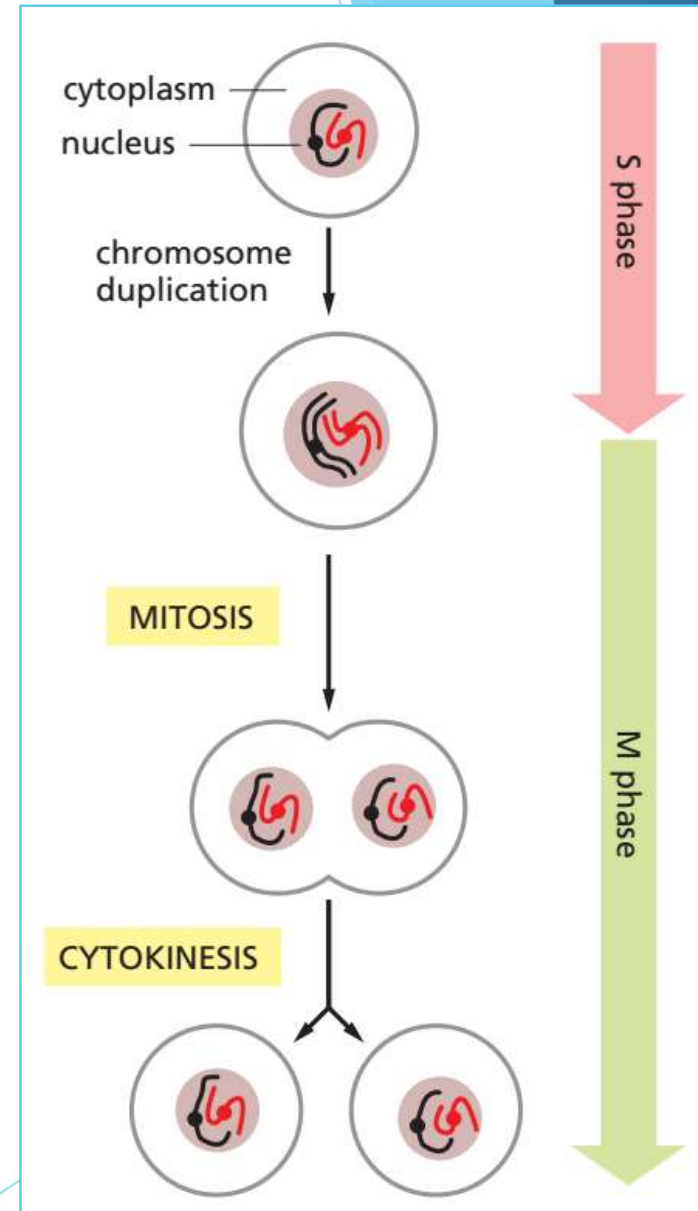
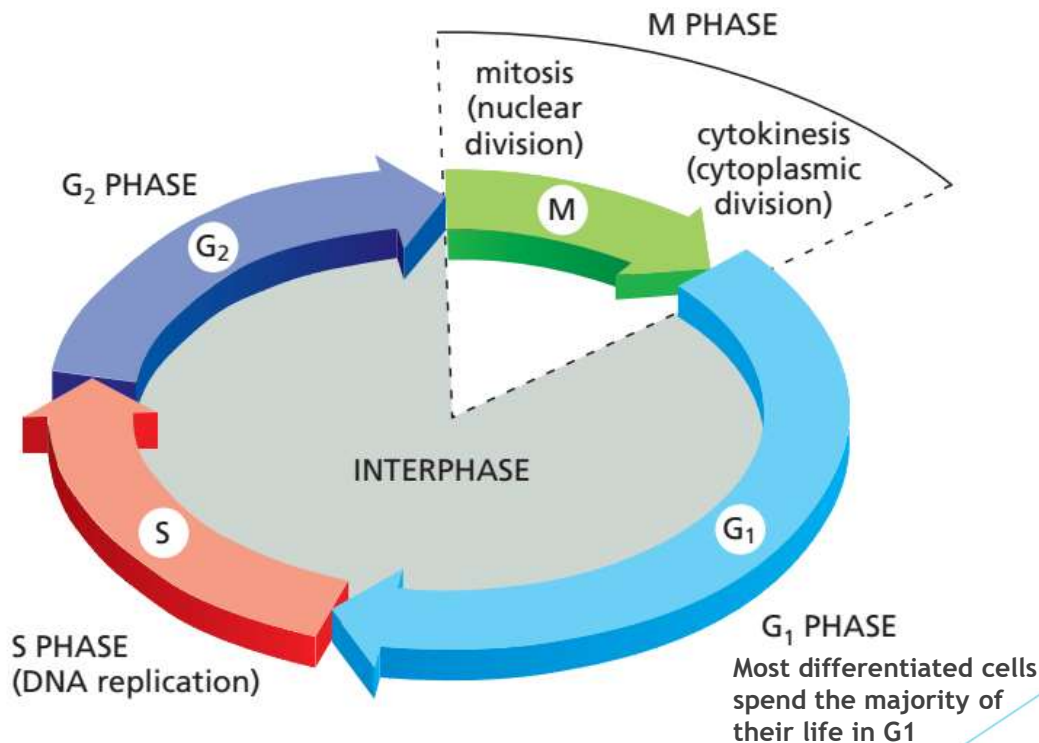
- ▶ Jediný způsob, jak vytvořit novou buňku, je duplikovat buňku, která již existuje. (všechny živé organismy, od jednobuněčných bakterií po mnohobuněčné savce).



- ▶ Buněčný cyklus popisuje změny, ke kterým dochází v průběhu životního cyklu buňky.
- ▶ Je ovlivněn podmínkami prostředí (vnitřní a vnější signály) a také cirkadiánními rytmy (střídáním dne a noci).

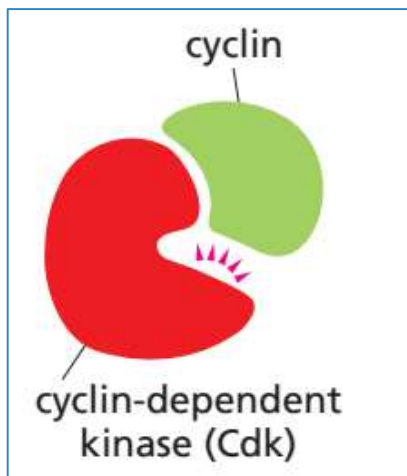
Buněčný cyklus eukaryot se skládá ze 4 fází

- ▶ G1, S, G2 (společně nazývané interfáze) a M fáze
- ▶ **S fáze** - dochází k hlavním chromozomálním událostem, chromozomy jsou duplikovány.
- ▶ **M fáze** - duplikované chromozomy jsou segregovány do páru dceřiných jader (v *mitóze*), načež se samotná buňka rozdělí na dvě (*cytokineze*).
- ▶ **Fáze G1 a G2** (*gap*) - poskytují buňkám čas k růstu a zdvojnásobení množství jejich proteinů a organel.

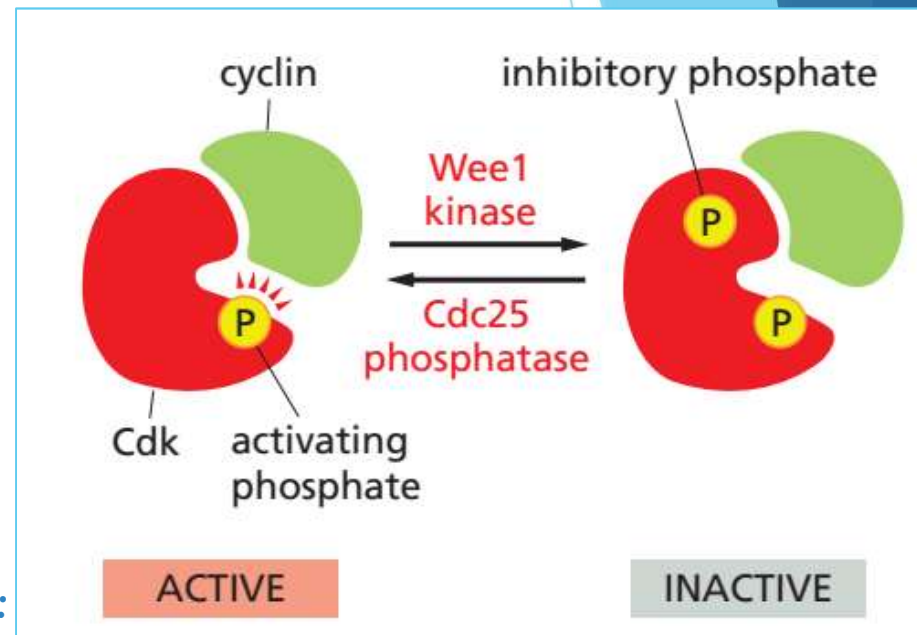


Kontrolní systém buněčného cyklu

- ▶ Spouští a koordinuje buněčný cyklus, reaguje na různé intracelulární a extracelulární signály a v případě potřeby jej může zastavit.
- ▶ Centrální složkou jsou **cyklin-dependentní kinázy (Cdks)** a **cykliny**.



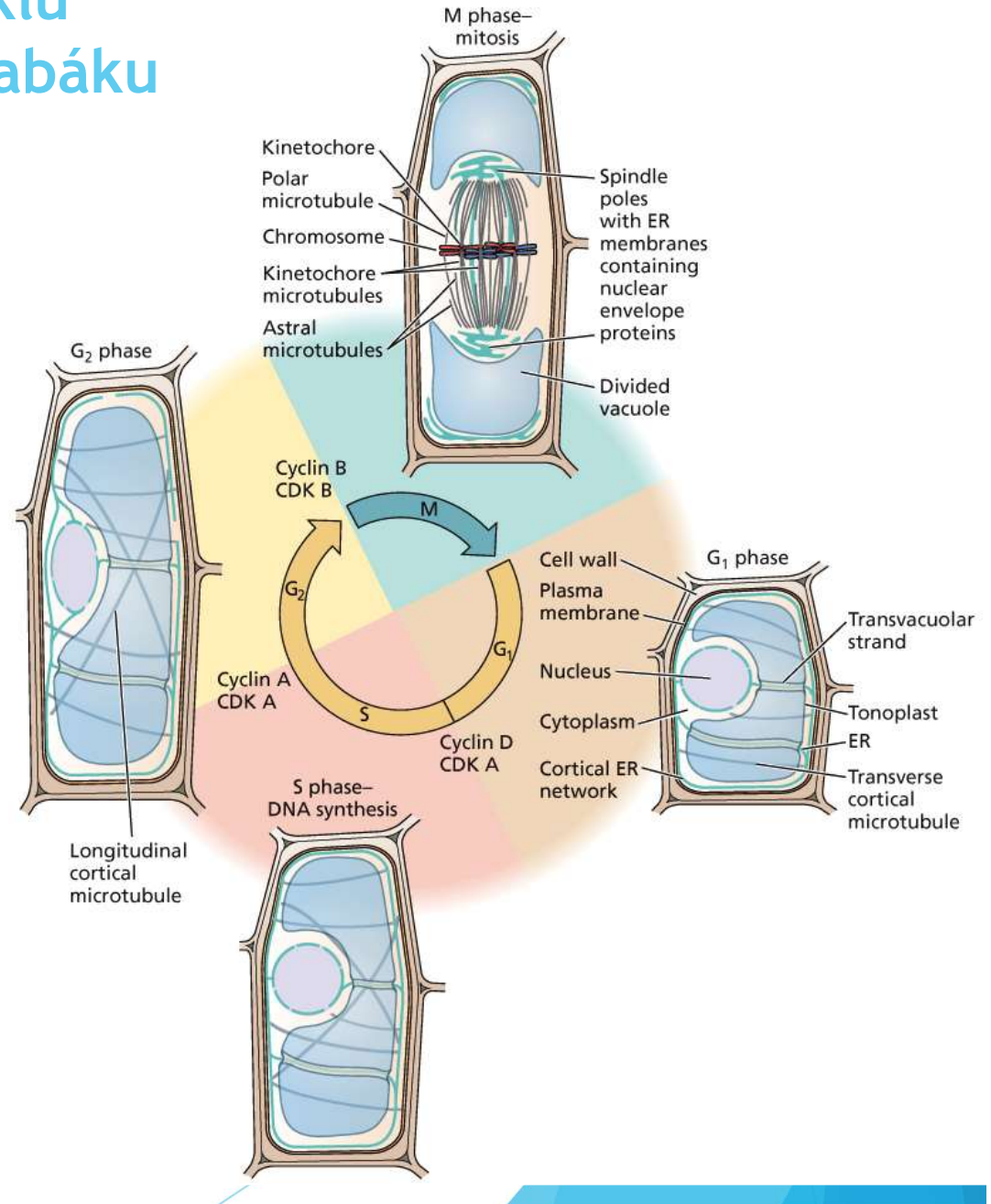
▶ *Cyklin tvoří komplex s Cdk, která se aktivuje (fosforylací), bez cyklinu je Cdk neaktivní.*



- ▶ *Regulace aktivity Cdk inhibiční fosforylací:*
- ▶ Další mechanismy řídící aktivity komplexů cyklin-Cdk:
 - ▶ Fosforylace a defosforylace klíčových aa v Cdk proteinech.
 - ▶ Syntéza a degradace cyklinů (v každém buněčném cyklu, zato hladina Cdks je konstantní).
 - ▶ Změny v transkripci genů kódujících regulátory Cdk.
 - ▶ Vazba Cdk inhibitorových proteinů (CKI), ubiquitylace a poté destrukce regulačních proteinů.

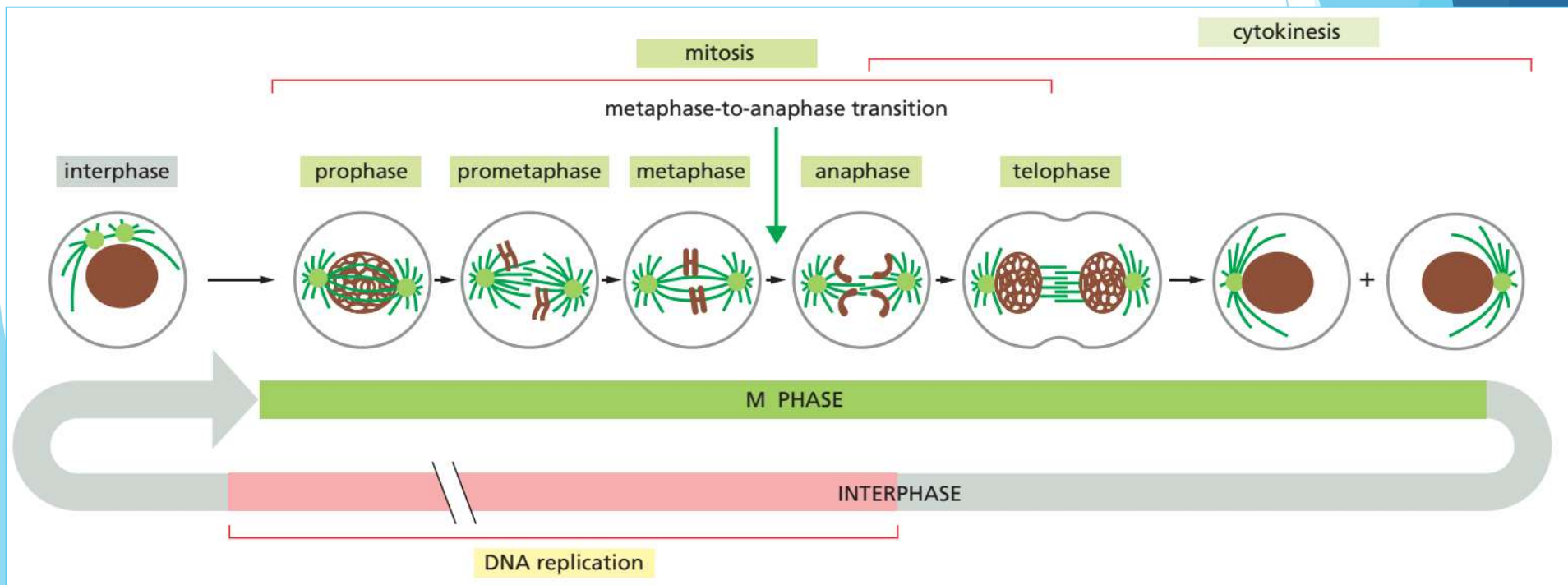
Regulace buněčného cyklu u vakulovaných buněk tabáku

- ▶ **Cyklin-dependentní kinázy** jsou klíčové enzymy, které řídí přechody mezi fázemi b. cyklu.
 - ▶ proteinkinázy fosforylující proteiny pomocí ATP
- ▶ Cdk závisí na regulačních proteinech **cyklinech**
 - ▶ 3 základní cykliny:
- ▶ **Cykliny G1/S (Cyklin D)** aktivní pozdě v G1.
- ▶ **Cykliny typu S (Cyklin A)** aktivní v pozdní S fázi.
- ▶ **Cykliny typu M (Cyklin B)** spouští mitotickou fázi.



Mitóza

- ▶ Proces jaderného dělení následovaný dělením buněk (*cytokineze*).
- ▶ Vyskytuje se pouze u eukaryot. U prokaryot jsou genomy segregovány růstem plazmatické membrány mezi body připojení dvou replikovaných molekul DNA.
- ▶ Základní fáze: (pre-)profáze, (pro-)metafáze, anafáze, telofáze.

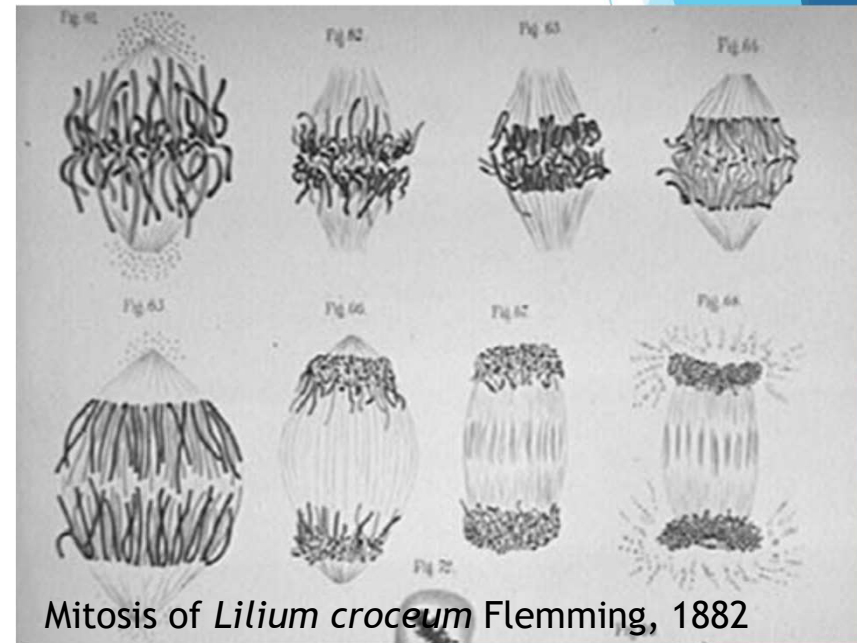
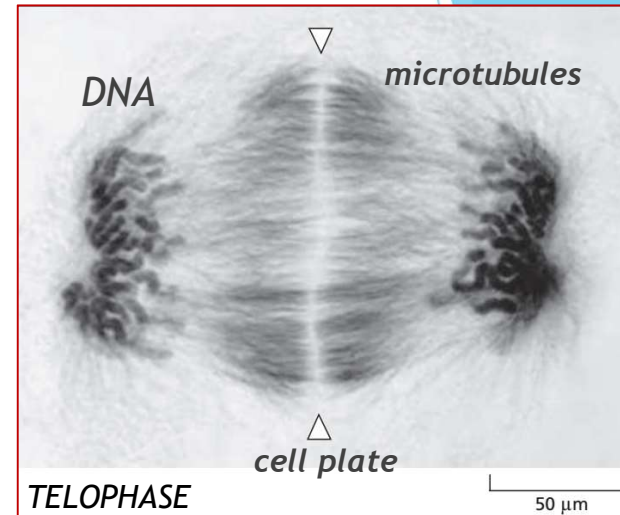


- ▶ *Mitotický index je procento buněk podstupujících mitózu ve stejnou dobu (~10 %).*

Mitóza

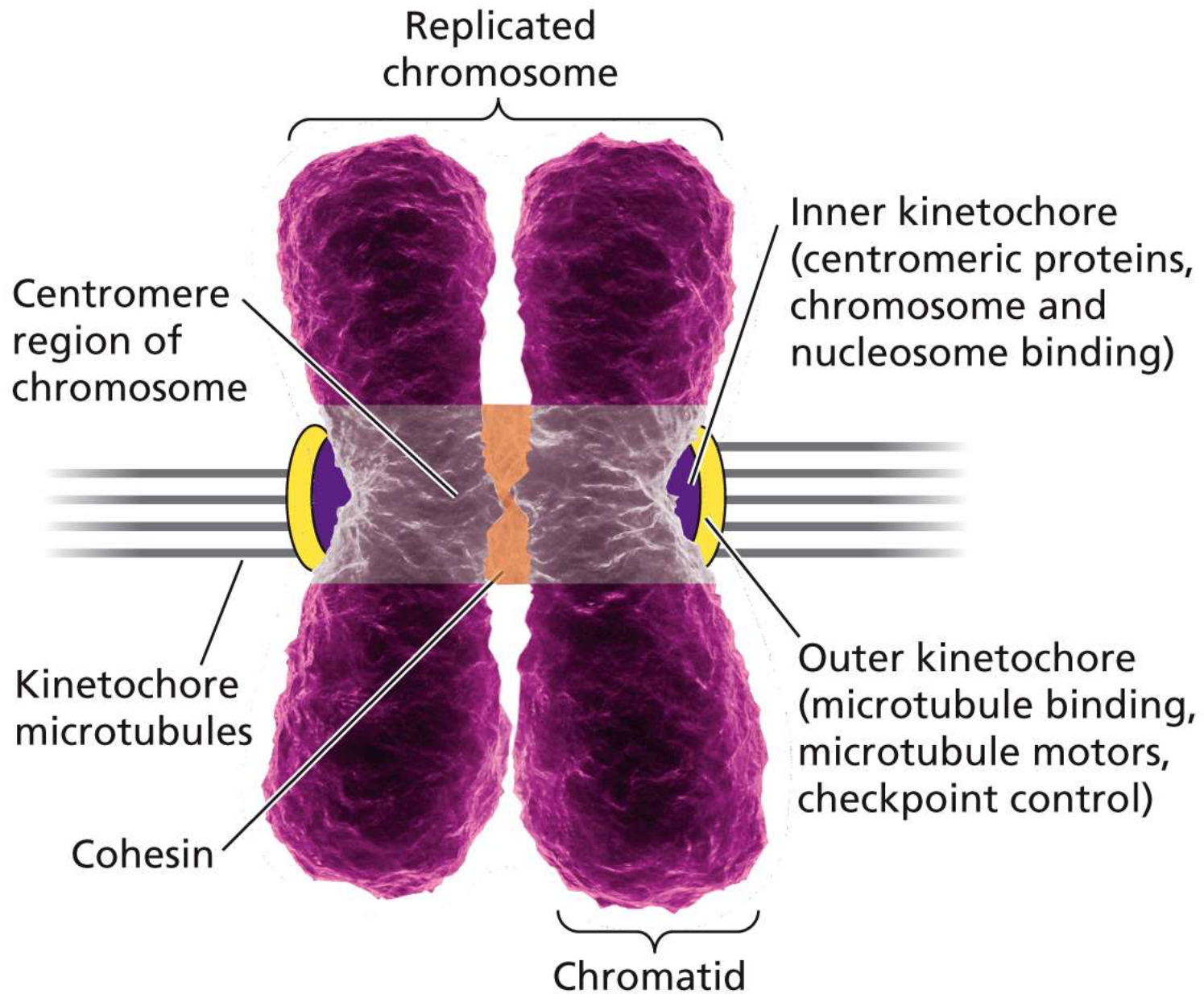
- ▶ Přestože vyšší rostliny **nemají** pár kolmých **centriol**, dělicí rovina je vytvořena pásem mikrotubulů a aktinových filament (*preprophase band*) a vzniká **mitotické vřeténko**.
- ▶ **Profáze** začíná kondenzací chromatinu do chromozomů, které se snadněji pohybují cytoplazmou.
- ▶ Nástup **prometafáze** se vyznačuje rozpadem jaderného obalu
 - ▶ Vlákna vřeténka (mikrotubuly) se připojují k viditelně zúžené oblasti chromozomů známé jako primární zúžení, kinetochor nebo centromera.
- ▶ **Metafáze** začíná, když se chromozomy seřadí v rovině uprostřed mezi dvěma póly.
- ▶ **Anafáze** začíná náhle, když se spárované kinetochory každého chromozomu rozdělí.
- ▶ **Telofáze** začíná, když dekonduující dceřiné chromatidy dorazí k pólům, kinetochorové mikrotubuly zmizí a jaderný obal se zreformuje kolem dekonduujících chromozomů a vytvoří dvě dceřiná jádra.

Higher plants do NOT have centriols!



Mitosis of *Lilium croceum* Flemming, 1882

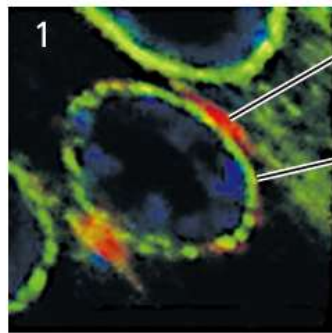
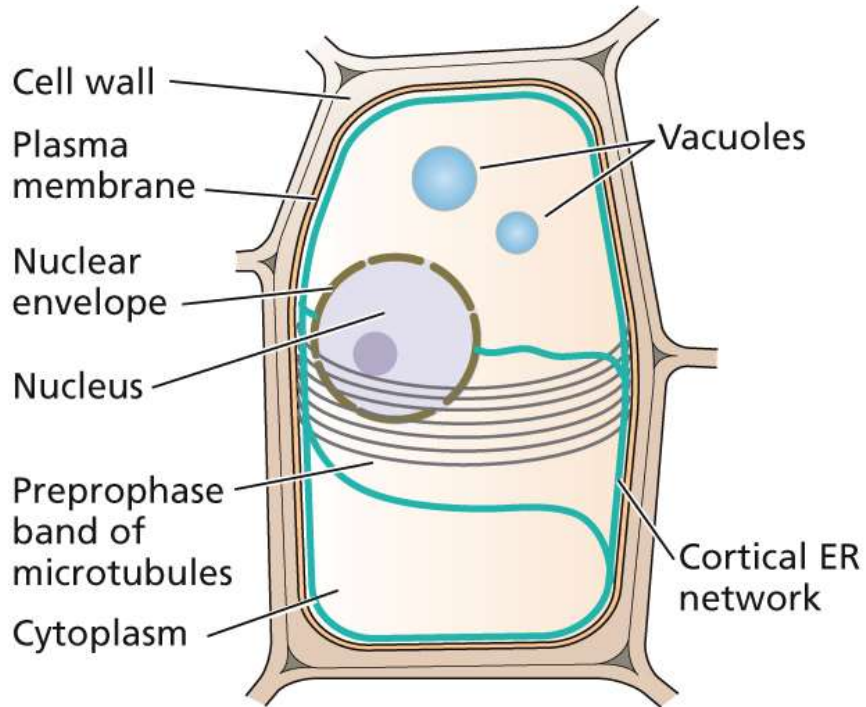
Structure of a metaphase chromosome



Fáze mitózy v meristemické rostlinné buňce

Preprophase

Determination of future plane of division by the preprophase band

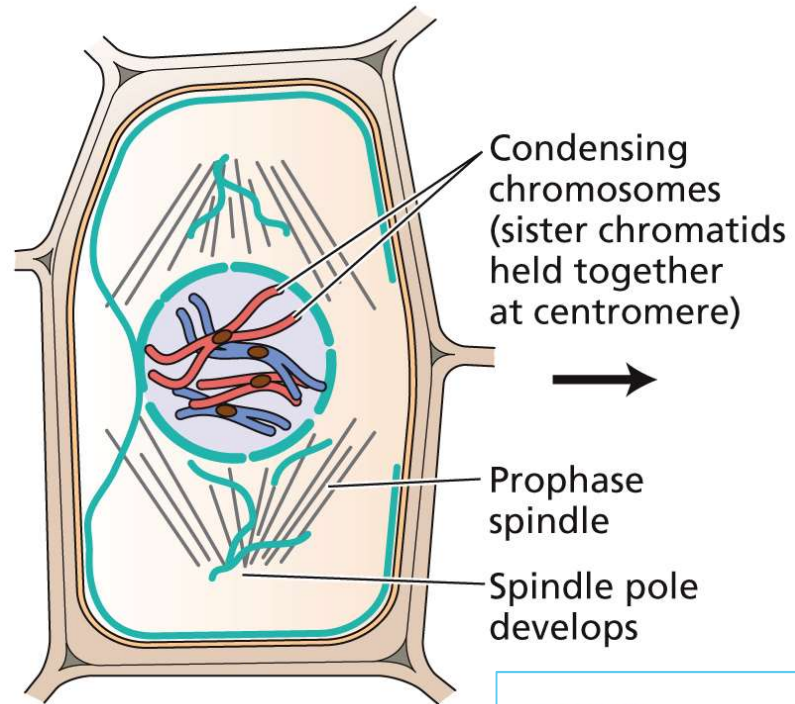


Preprophase band

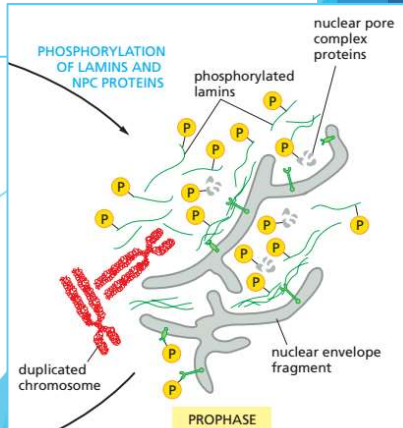
Nuclear envelope

Prophase

Disappearance of preprophase band, condensation of chromosomes



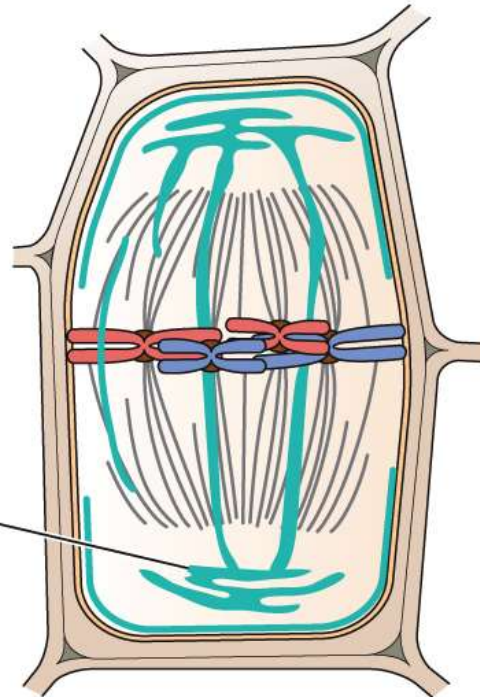
Jaderný obal se rozpadá!



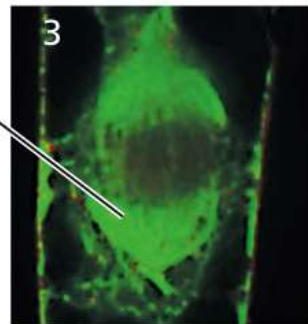
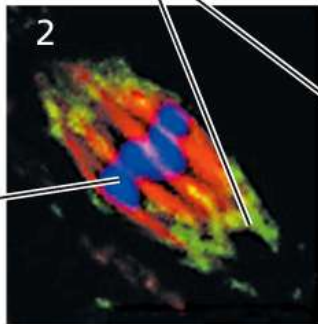
Fáze mitózy v meristemické rostlinné buňce

Metaphase

Alignment of chromosomes at metaphase plate

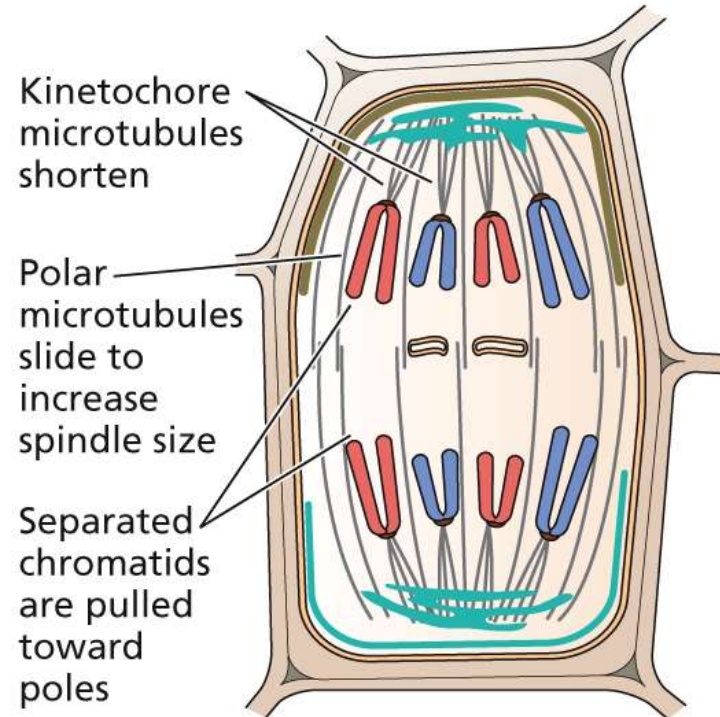


Nuclear envelope resorbed into a polar ER network



Anaphase

Chromosome segregation, spindle elongation

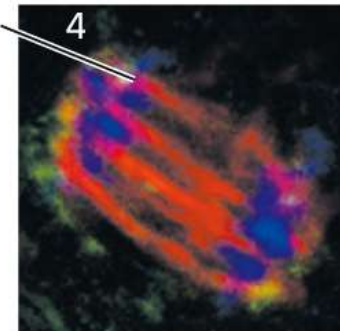


Kinetochores microtubules shorten

Polar microtubules slide to increase spindle size

Separated chromatids are pulled toward poles

Polar microtubules



Fáze mitózy v meristemické rostlinné buňce

Telophase

Phragmoplast formation

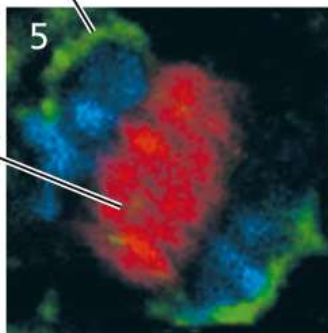
Chromosomes start decondensing

Nuclear envelope re-forms

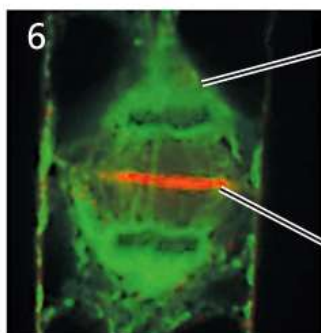
Endoplasmic reticulum

Nuclear envelope re-forms

Phragmoplast (network of microtubules, ER, and membrane vesicles)



Phragmoplast microtubules



ER

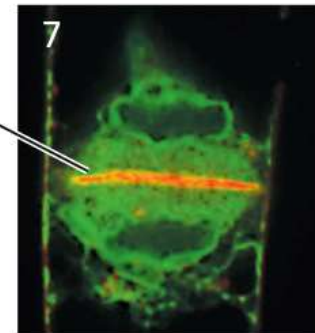
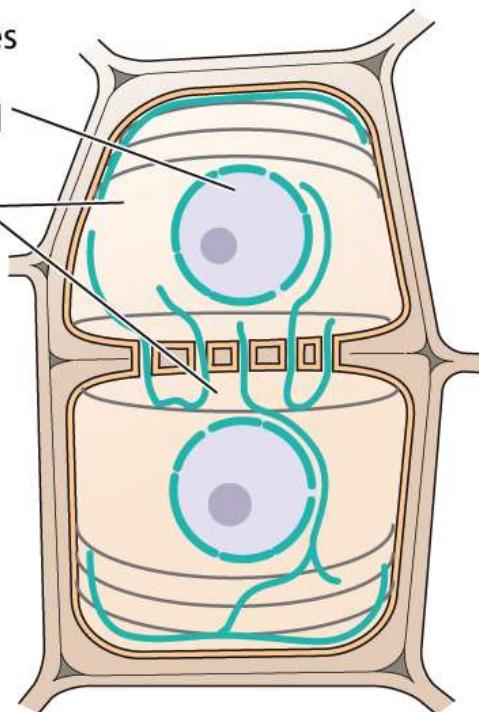
Membrane vesicles

Cytokinesis

Cell plate formation

Chromosomes completely decondensed

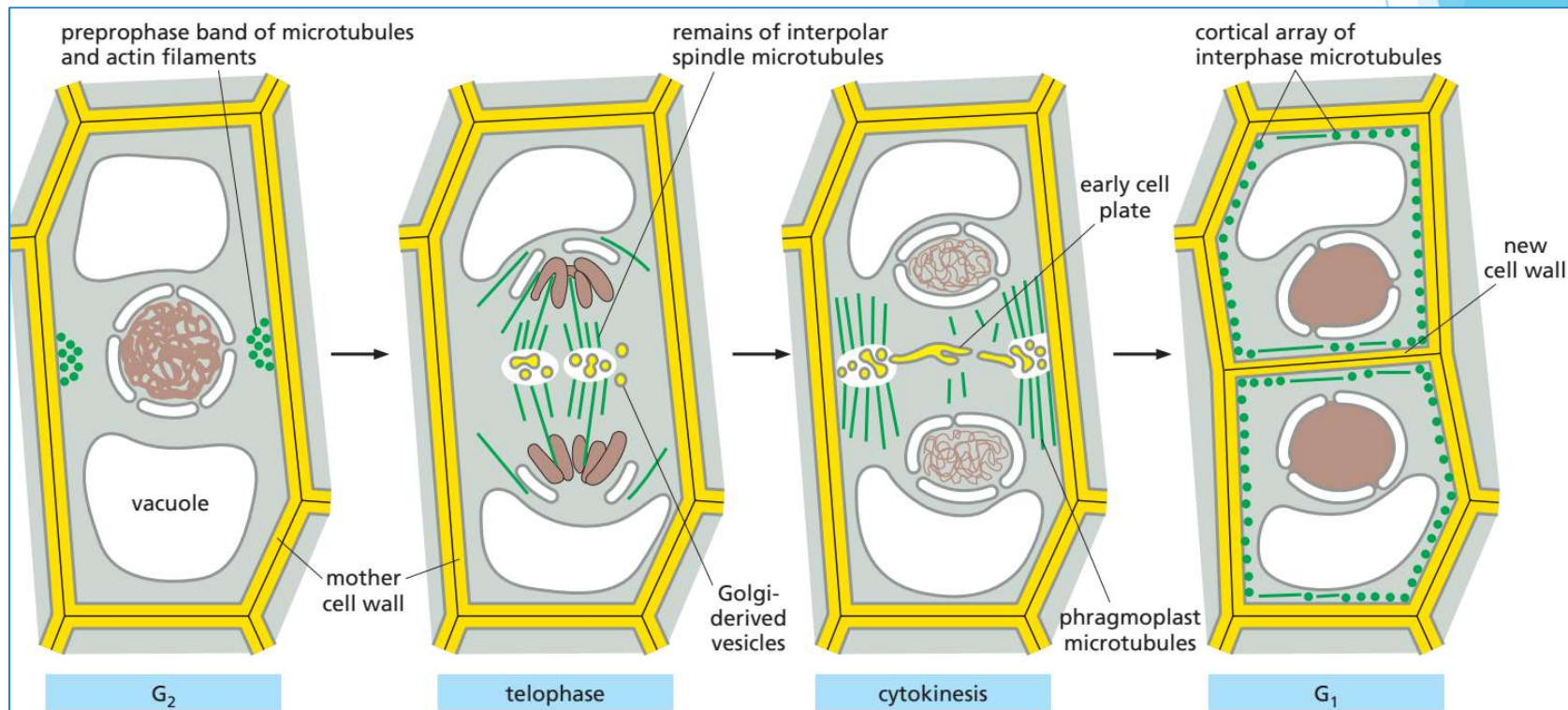
Two cells formed



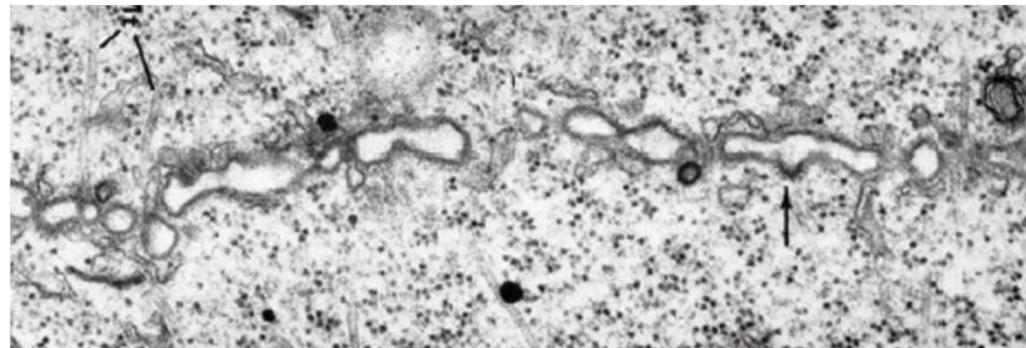
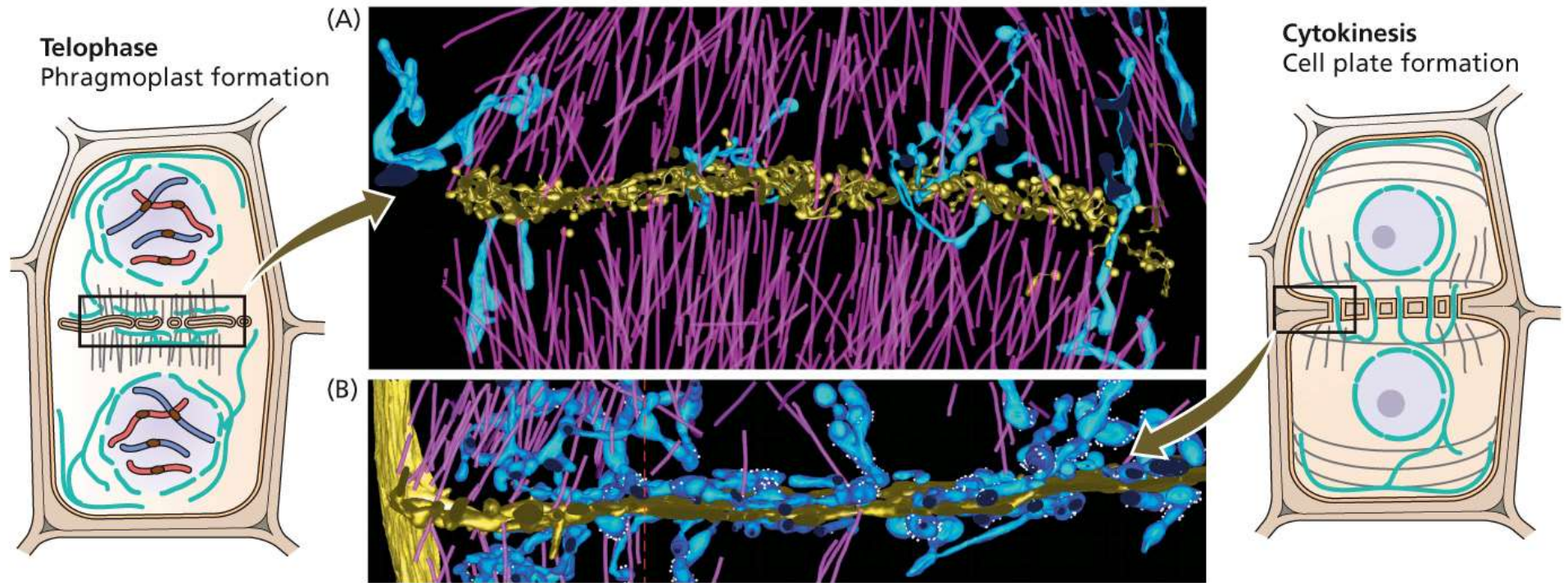
Cell plate

Zvláštnosti cytokineze buněk vyšších rostlin

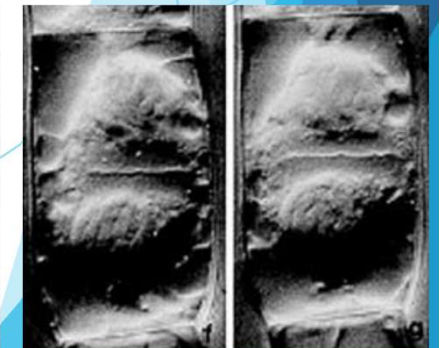
- ▶ Dělicí rovina je vytvořena **preprofázím pruhem** (z mikrotubulů a aktinových filament) v M fázi.
- ▶ V telofázi, po segregaci chromozomů, se uvnitř buňky na *rovníku* starého vřetenka začne ukládat nová buněčná stěna (BS).
- ▶ Interpolární mikrotubuly mitotického vřetenka začínají tvořit **fragmoplast** uprostřed buňky.
- ▶ Vezikuly odvozené z Golgi naplněné materiálem pro BS jsou transportovány podél těchto mikrotubulů a spojují se za vzniku nové BS, která roste směrem od středu, aby dosáhla PM a původní BS. PM a membrána obklopující novou BS se spojí a oddělí dvě dceřiné buňky.
- ▶ Orientace buněčné destičky je také závislá na cytoskeletu a buněčné dělení je důležité pro buněčnou diferenciaci a vývoj rostlinných orgánů.



Tvorba buněčné destičky z fragmoplastu a ER



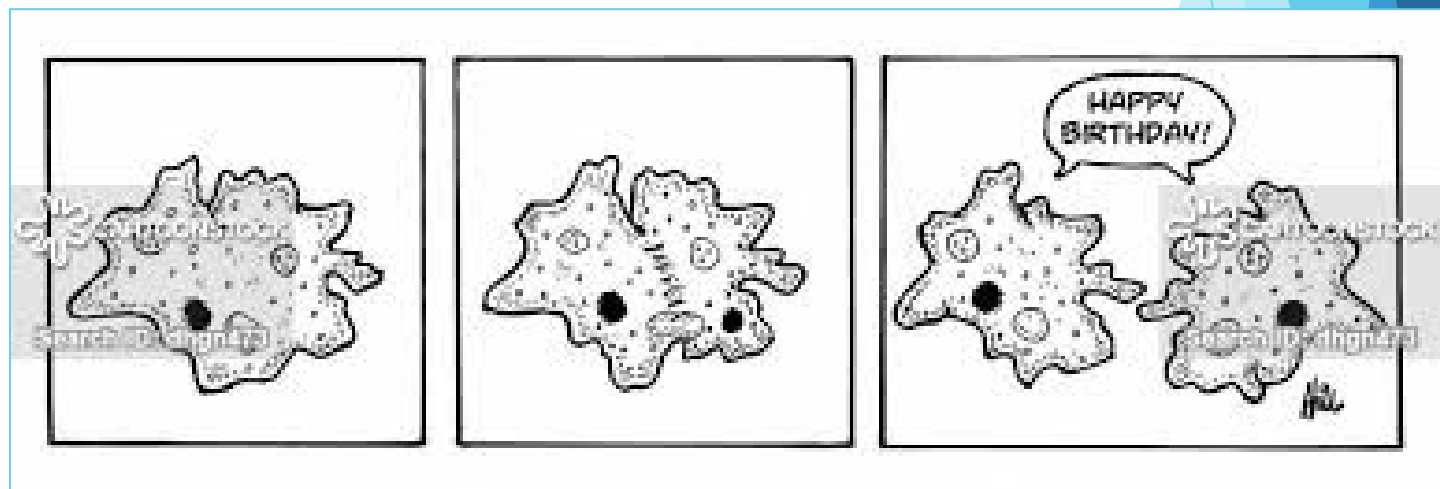
Mid-stage of cell plate formation in *Phaseolus vulgaris*.



Tradescantia (~ 30min)

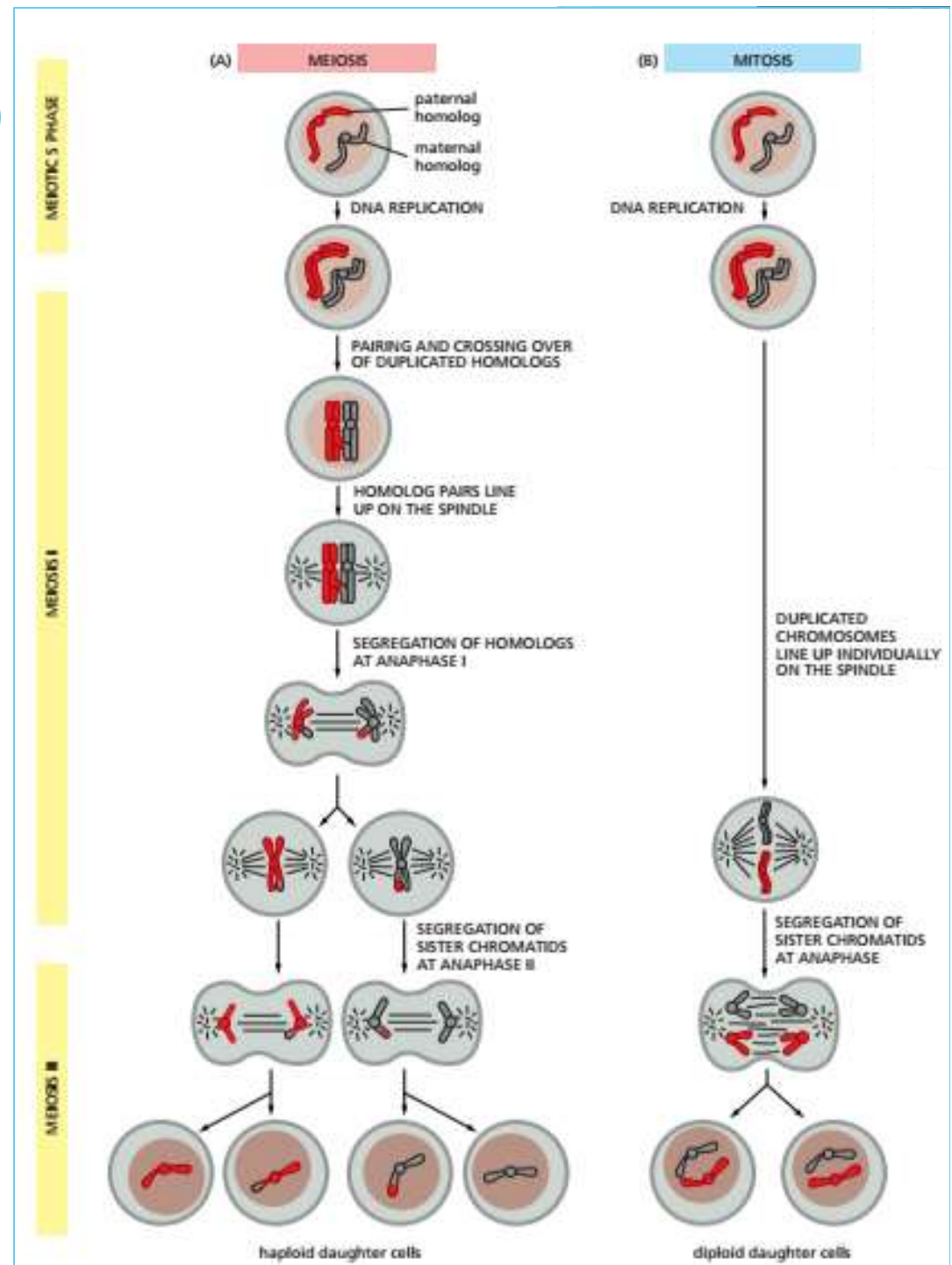
Dělení organel

- ▶ Plastidy, mitochondrie a pravděpodobně ER jsou **semiautonomní organely**, jejichž ztráta během dělení by byla fatální.
- ▶ Naproti tomu Golgiho aparát, plazmatická membrána, endosomální a vakuolární kompartmenty jsou **odvozené organely** a mohou být regenerovány z ER.
- ▶ Všechny organely jsou typicky distribuovány do dceřiných buněk.
- ▶ Aktin a další pohyblivé proteiny zprostředkovávají dělení plastidů a mitochondrií, další organely nejsou známy...



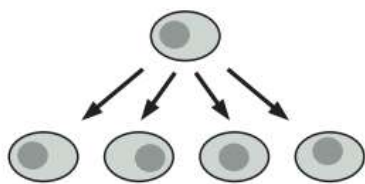
Meióza (redukční dělení)

- ▶ Forma jaderného dělení:
 - ▶ jedna duplikaci chromozomů
 - ▶ poté dvě segregace chromozomů
 - ▶ počet chromozomů snížen na polovinu
- ▶ Dochází ke genetické rekombinaci (*cross-over*).
- ▶ Organismy jsou obecně **diploidní**:
 - ▶ obsahují dvě mírně odlišné kopie (homology) každého chromozomu
- ▶ Pohlavní rozmnožování závisí na meióze, kdy se produkují **haploidní** buňky nesoucí pouze jednu kopii každého chromozomu.
- ▶ V mnoha organismech se haploidní buňky diferencují na specializované reprodukční buňky zvané **gamety** (u většiny druhů vajíčka a spermie).

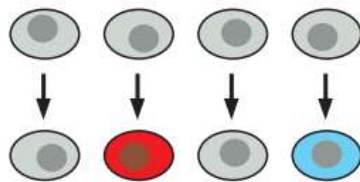


Vývoj mnohobuněčných organismů

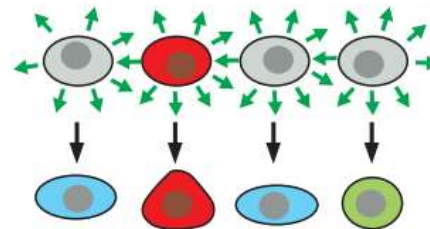
- ▶ Živočichové i rostliny začínají svůj život jako jediná buňka - oplodněné vajíčko nebo zygota.
- ▶ Během vývoje se tato buňka opakovaně dělí, tyto buňky rostou a množí se a organizují do stále složitějších struktur.
- ▶ Pro vývoj jsou zásadní tyto procesy:
 - ▶ 1) **buněčná proliferace**, která produkuje mnoho buněk z jedné
 - ▶ 2) **buněčná specializace nebo diferenciace**, která vytváří buňky s různými vlastnostmi na různých pozicích
 - ▶ 3) **interakce buňka-buňka**, které koordinují chování každé buňky s chováním jejích sousedů
 - ▶ 4) **pohyb buněk**, který přeskupuje buňky tak, aby vytvořily strukturované tkáně a orgány ~ pouze u živočichů! **Rostlinné buňky nejsou schopny migrovat nebo se pohybovat nezávisle po embryu!**



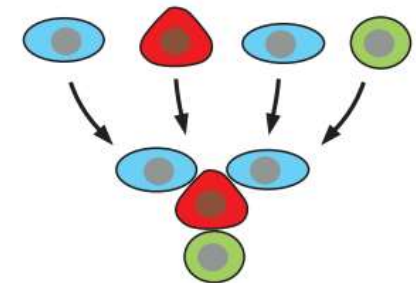
CELL PROLIFERATION



CELL SPECIALIZATION



CELL INTERACTION



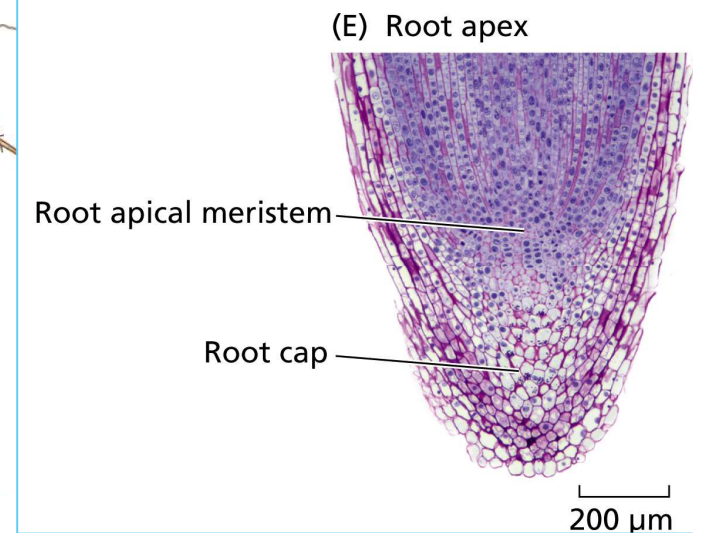
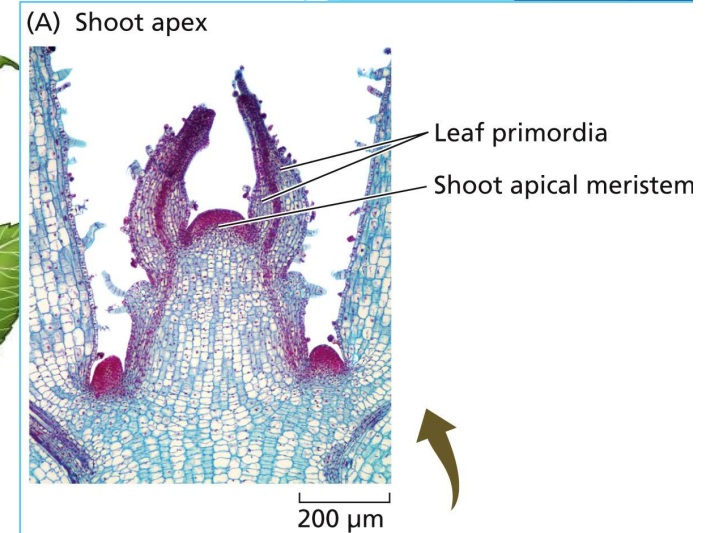
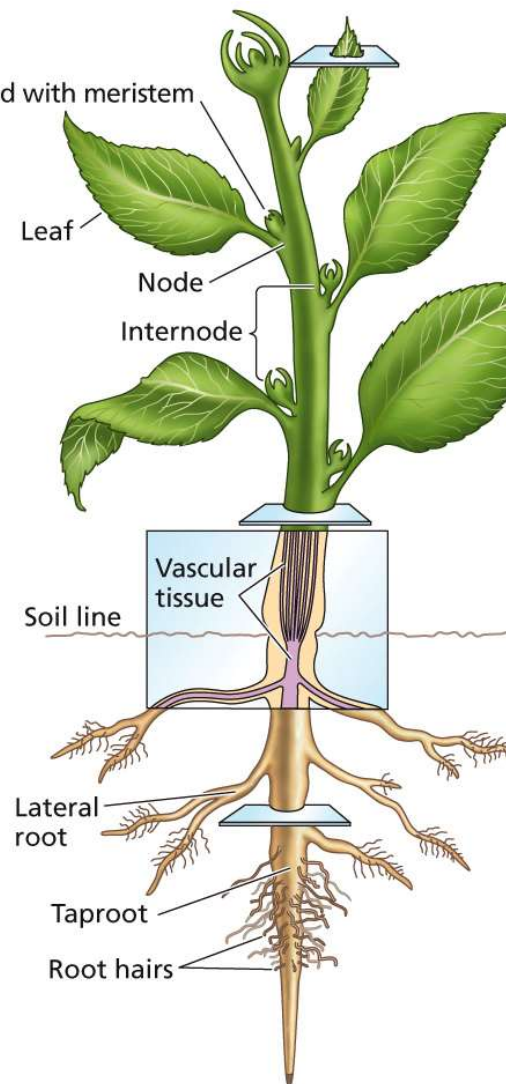
CELL MOVEMENT

Figure 21-1 The four essential cell processes that allow a multicellular organism to be made.

ONLY animals!

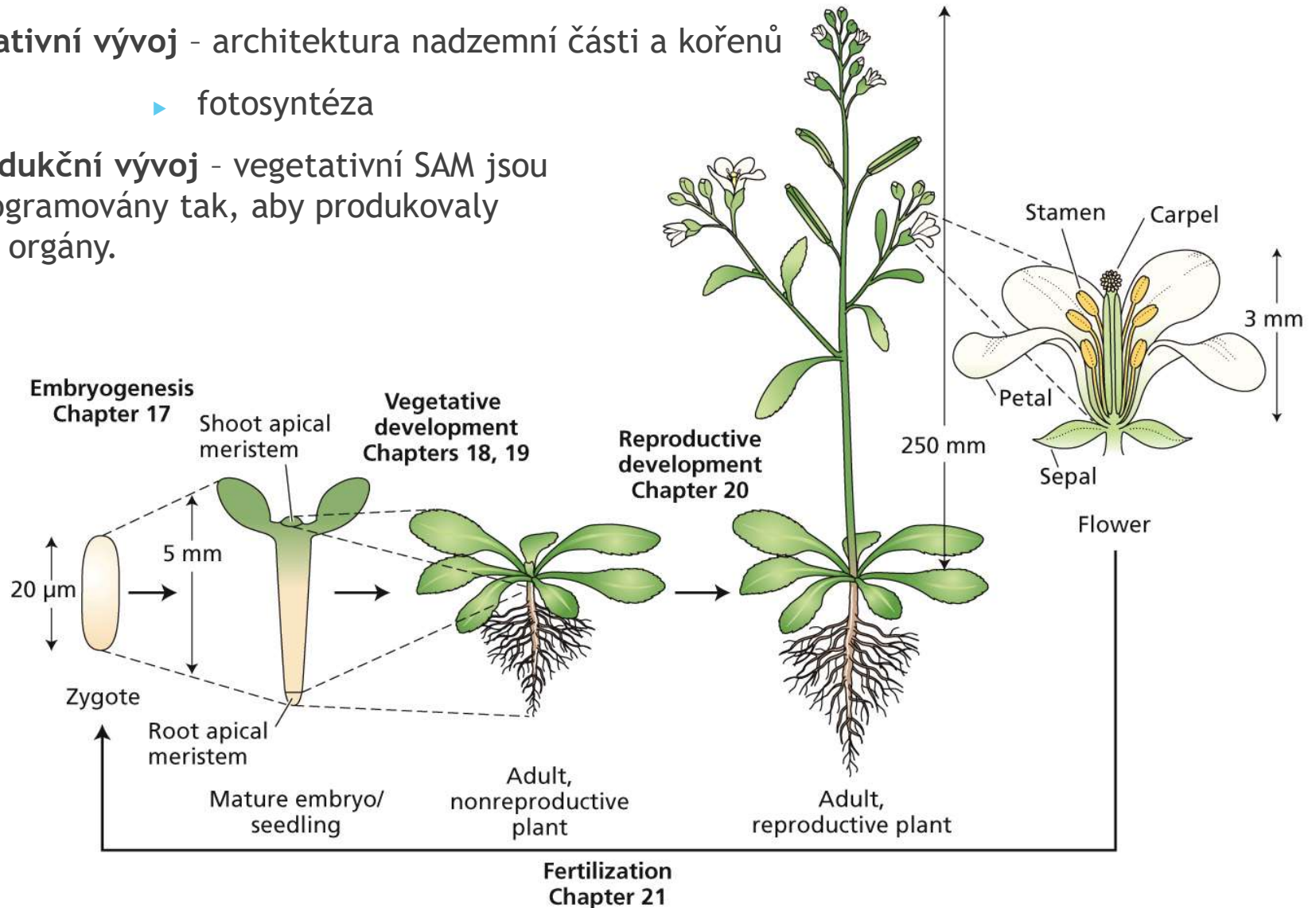
Stavba těla typické dvouděložné rostliny (*eudicot*)

- ▶ Meristémy jsou klíčovými prvky pro adaptivní růst.
- ▶ Meristémy obsahují rezervoáry buněk, jejichž vývoj není předurčen.
- ▶ Prostřednictvím regulované **proliferace a diferenciace** těchto buněk jsou rostliny schopny produkovat různé komplexní formy přizpůsobené místnímu prostředí.
- ▶ Apikální meristémy
 - ▶ *Shoot apical meristem* (SAM)
 - ▶ *Root apical meristem* (RAM)
- ▶ Vývoj postranních orgánů umožňuje propracovanou architekturu rostlin.



Hlavní fáze vývoje sporofytů

- ▶ **Embryogeneze** = proces, při kterém se jedna buňka (zygota) přemění na základní, ale polární organizaci, která obsahuje blíže neurčené buňky v SAM a RAM.
- ▶ **Vegetativní vývoj** - architektura nadzemní části a kořenů
 - ▶ fotosyntéza
- ▶ **Reprodukční vývoj** - vegetativní SAM jsou přeprogramovány tak, aby produkovaly květní orgány.

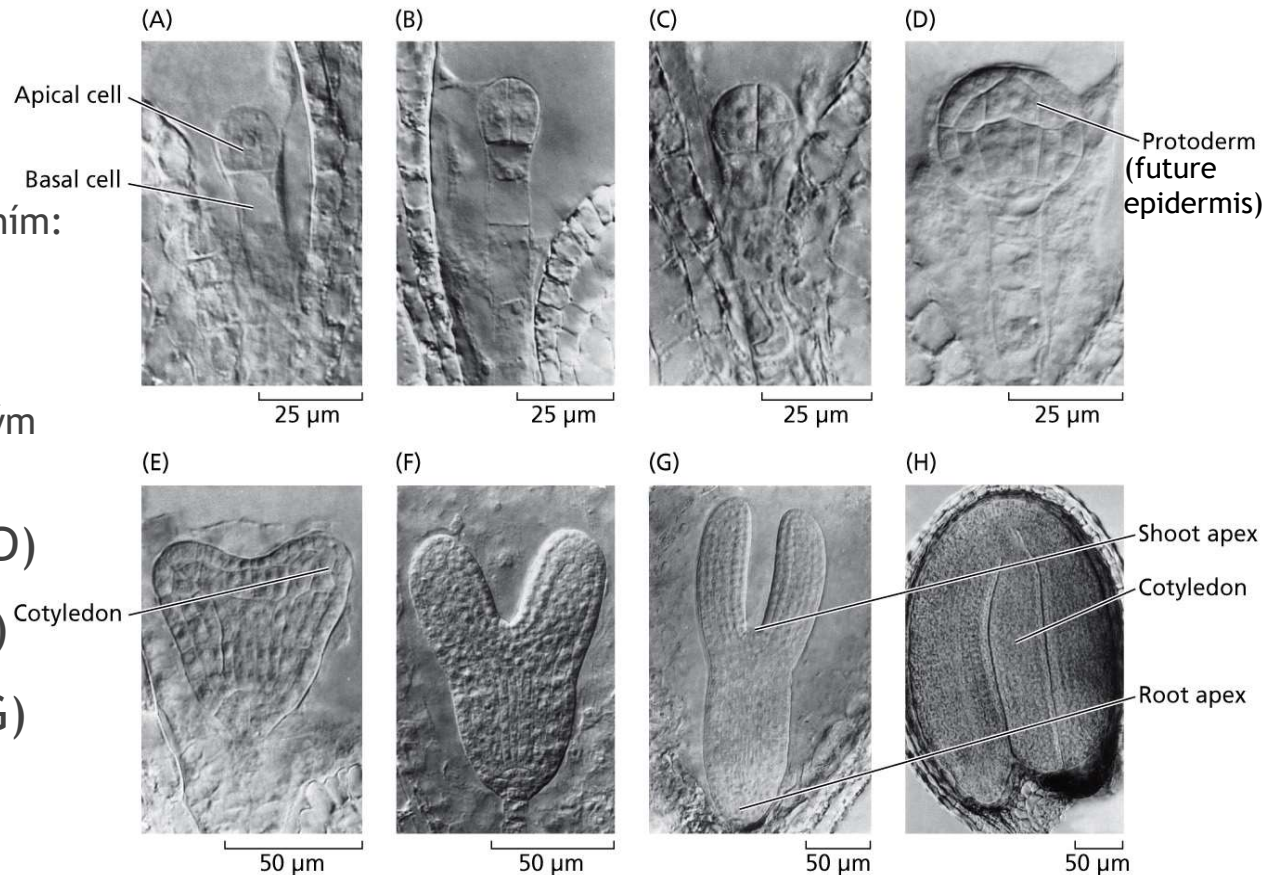


Embryogeneze: Původ polarity

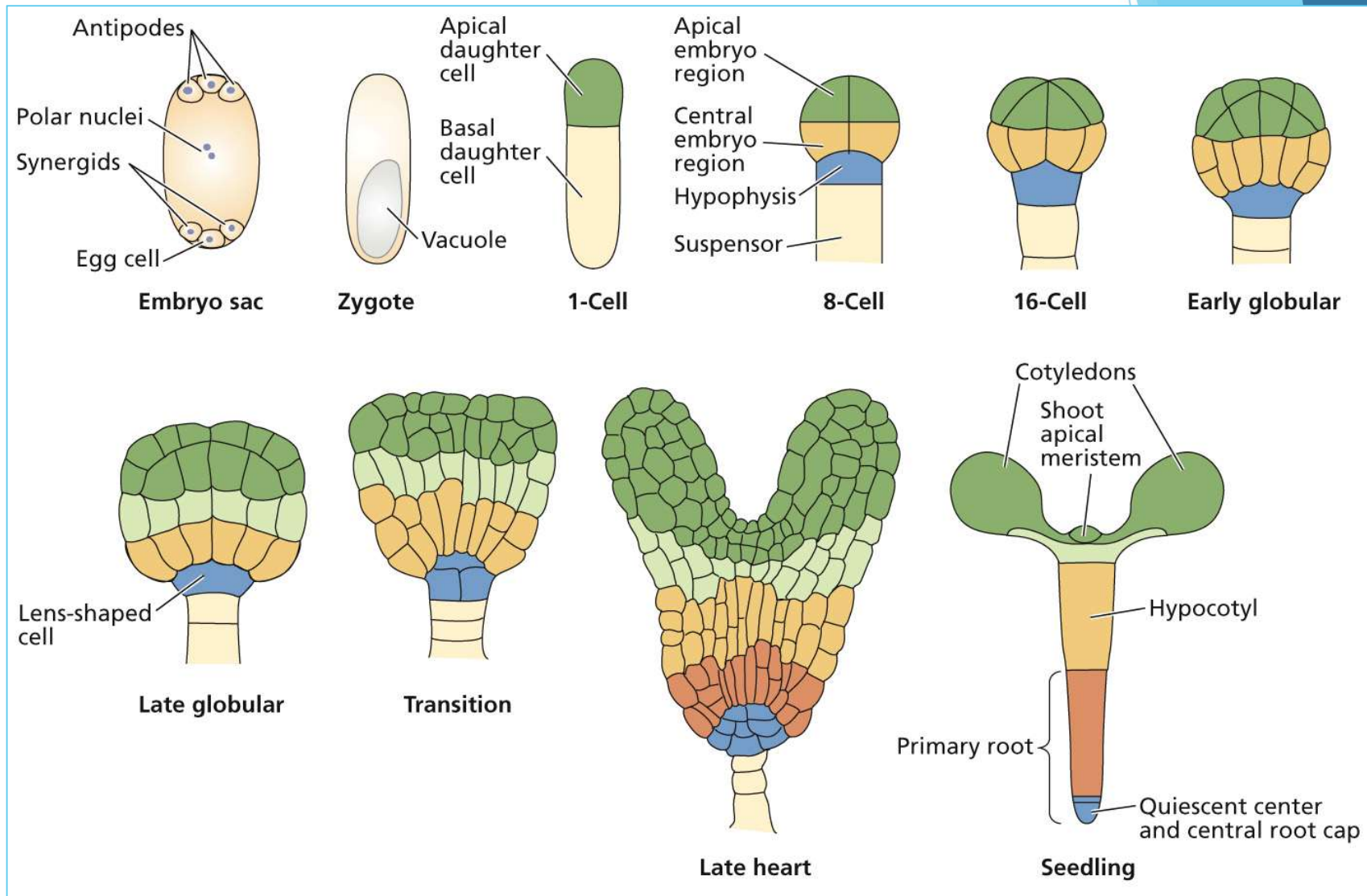
- ▶ Vývojové procesy během embryogeneze
 - ▶ morfogeneze (vypracování forem)
 - ▶ organogeneze (tvorba funkčně organizovaných struktur)
 - ▶ a diferenciace buněk vytváří anatomicky a funkčně odlišné pletiva (histogeneze).
- ▶ Období prodloužené nečinnosti embrya (*dormance*) je ukončeno klíčením, po zachycení environmentálních signálů, a dochází k obnovení růstu rostlin.

▶ Etapy embryogeneze *Arabidopsis*

- ▶ charakterizované přesným buněčným dělením:
- ▶ Zygotické stadium (A)
 - ▶ Polarizovaný růst zygoty následovaný asymetrickým příčným dělením
- ▶ Globulární stadium (B-D)
- ▶ Srdcovité stadium (E-F)
- ▶ Torpédovité stadium (G)
- ▶ Zralé stadium (H)



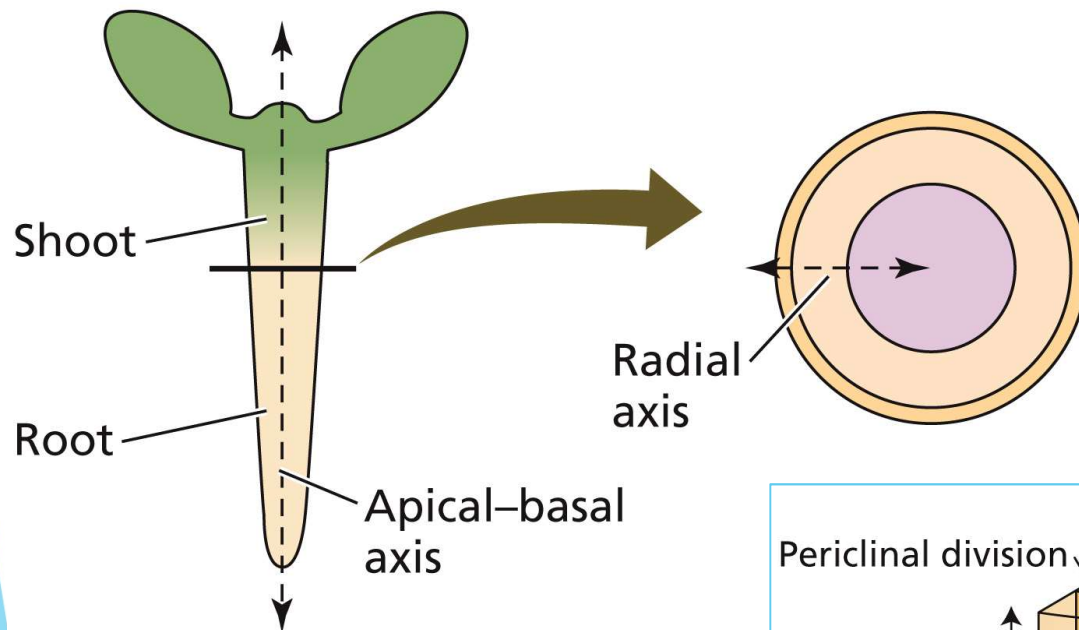
Pattern formation během embryogeneze *Arabidopsis*



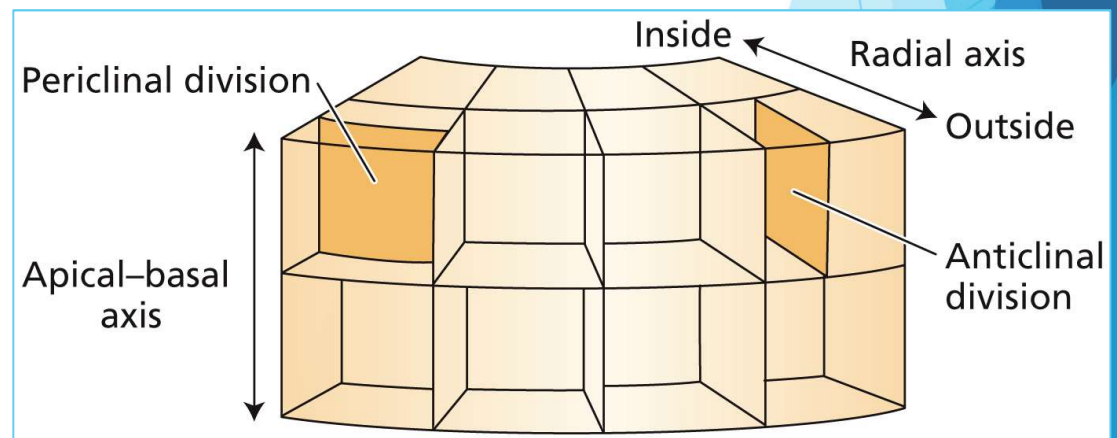
- ▶ Klonálně příbuzné skupiny buněk (lze vysledovat až ke společnému progenitorovi) jsou označeny odlišnými barvami, např. *hypophysis - initials* (stem cells) v QC

Apikálně-bazální polarita je určena v raném embryu

- ▶ Jednobuněčná zygota se asymetricky dělí a vzniká krátká cytoplazmatická apikální buňka (*embryo*) a delší vakuolizovaná bazální buňka (*suspensor*).
- ▶ Embryo se postupně více polarizuje podél dvou os: **apikálně-bazální osy** (probíhá mezi špičkami vyhonku a kořene) a **radiální osy** (od středu ven), kolmé k apikálně-bazální ose.



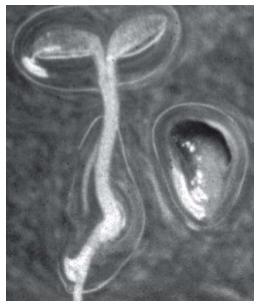
- ▶ **Periklinální** buněčné dělení (nové BS se tvoří paralelně s povrchem).
- ▶ **Antiklinální** buněčné dělení (nové BS se tvoří kolmo k povrchu tkáně).



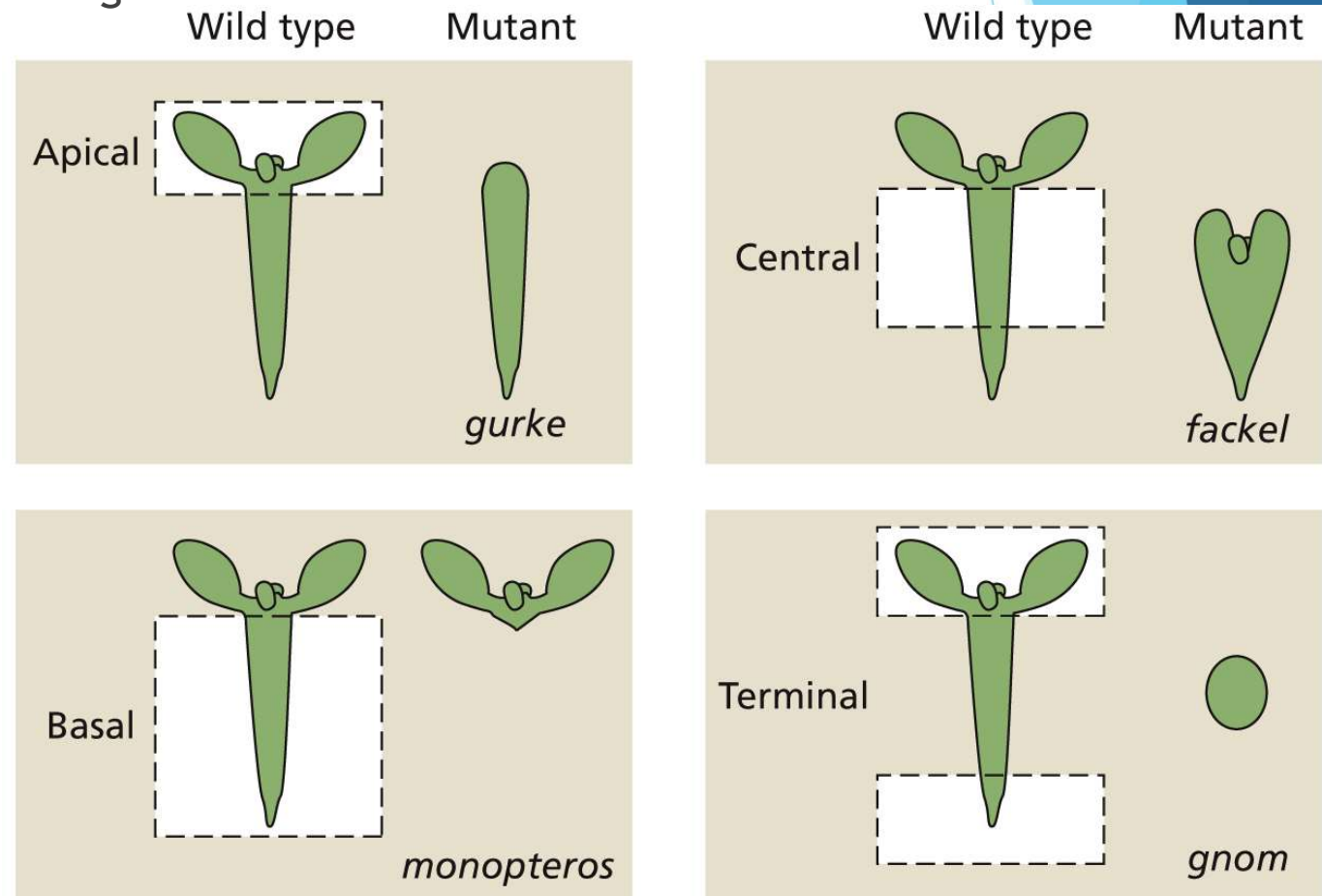
Mezibuněčná signalizace hraje roli v embryogenezi

- ▶ V morfogenezi embrya určují buněčný osud (*cell fate*) mechanismy závislé na poloze v embryu (*position-dependent mechanisms*).
- ▶ Komunikace mezi buňkami embrya se často odehrává přes plasmodesmata.
- ▶ Analýza mutantů identifikuje geny pro signální procesy nezbytné pro normální apikálně-bazální morfologii.

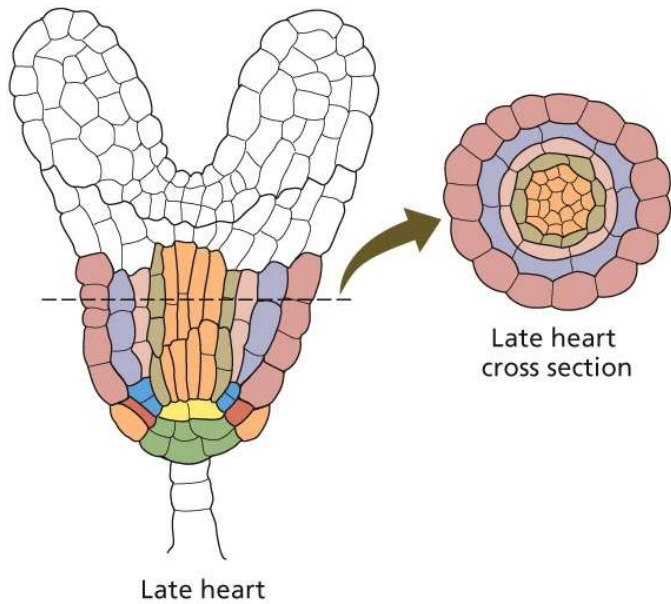
- ▶ např. GNOM kóduje faktor GEF, který umožňuje směrový transport auxinu polární distribucí PINů



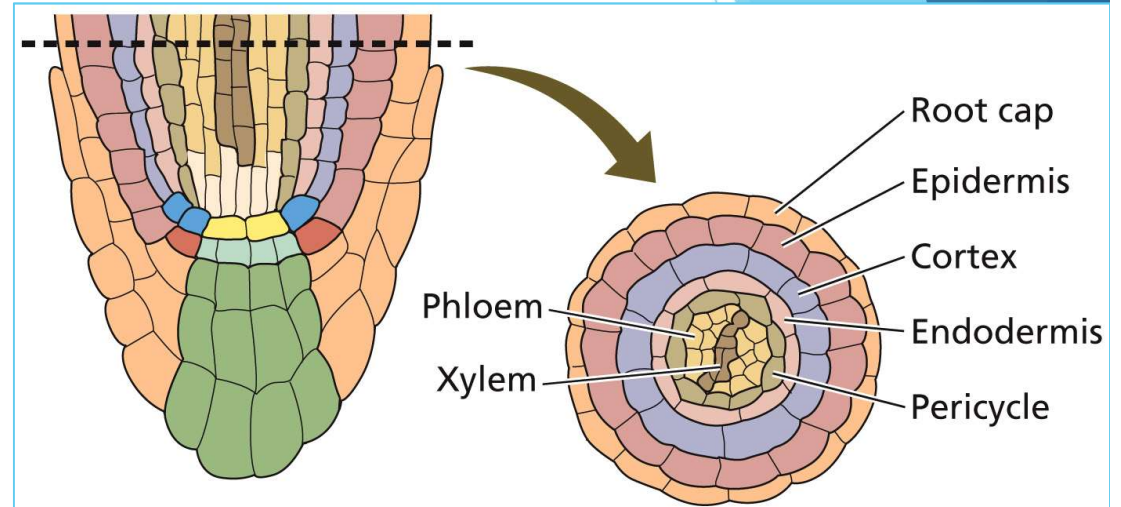
Auxin funguje jako mobilní chemický signál během morfogeneze (*morphogen*).



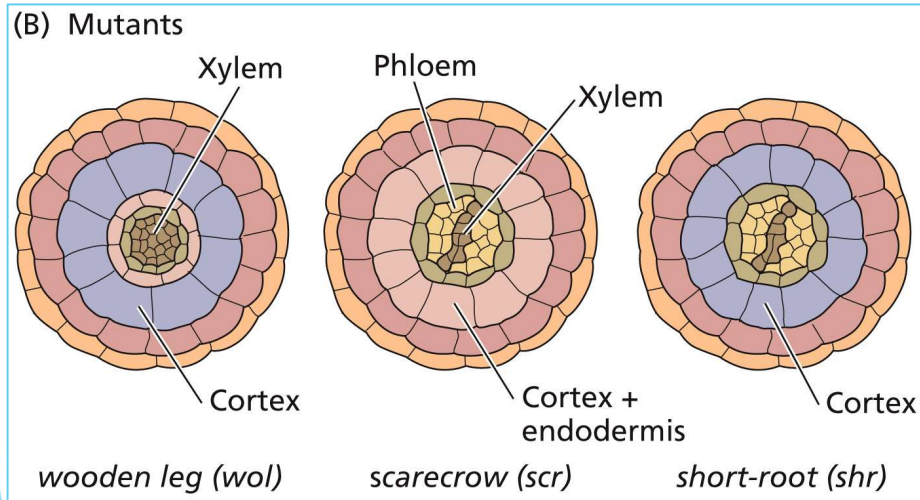
Radial patterning řídí tvorbu pletiv



► Radiální kořenový vzor



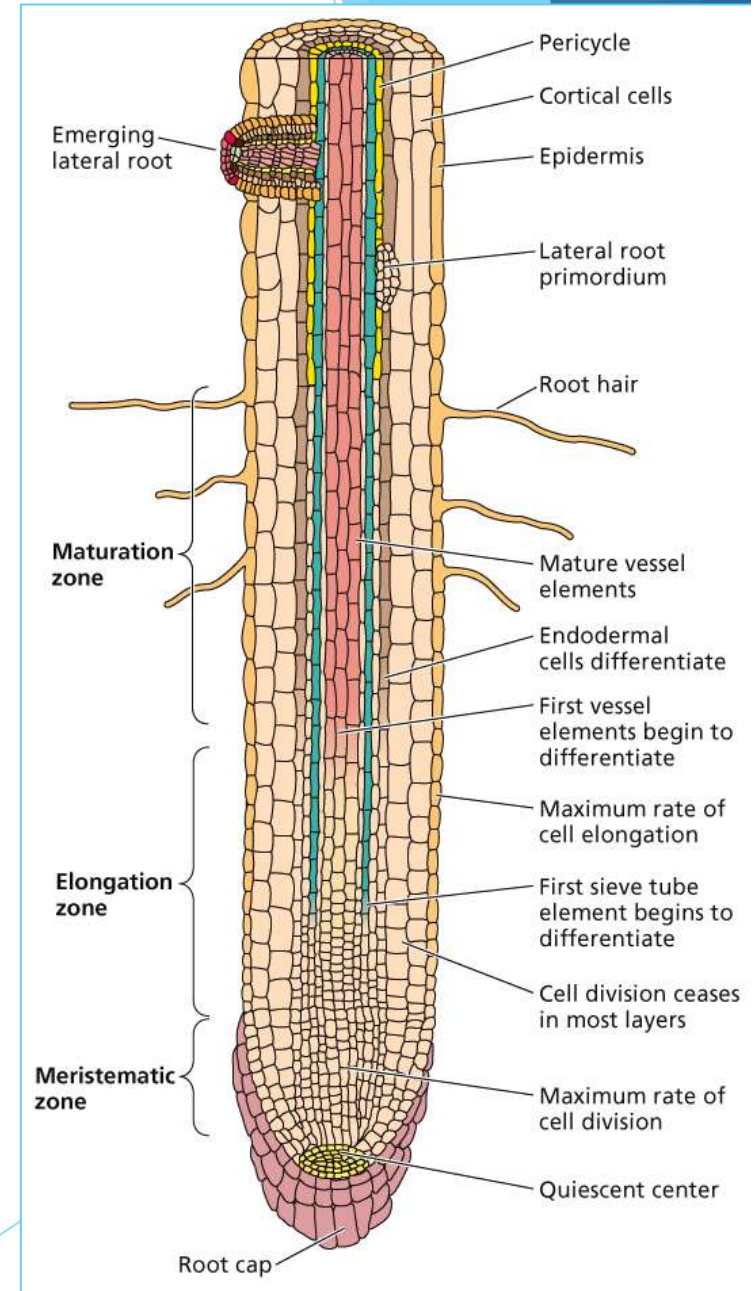
► Prokambiální prekurzory pro cévní pletiva leží ve středu radiální osy (*stéle*)



- Mutanti ukazují prostorově definované funkce specifických genů.
- Např. *WOODEN LEG (WOL)* ~ encodes cytokinin receptor.

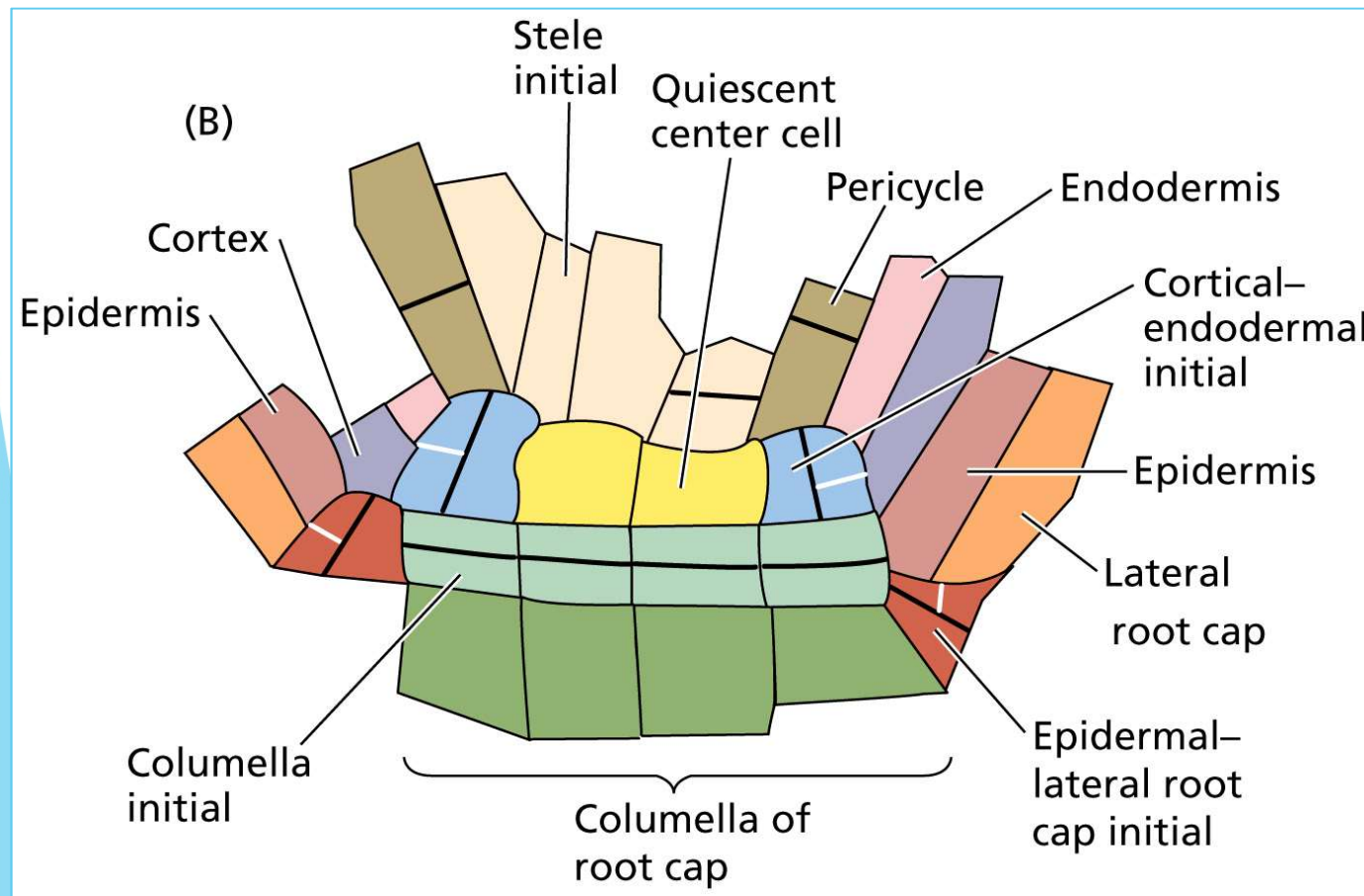
Kořenová špička má čtyři vývojové zóny

- ▶ **Kořenová čepička (*root cap*)**
 - ▶ Nejvzdálenější část kořene.
 - ▶ Chrání RAM před mechanickým poškozením.
 - ▶ Vnímání gravitace k umožnění gravitropismu.
 - ▶ Vylučování sloučenin, které pomáhají kořínku pronikat do půdy.
- ▶ **Meristematická zóna (*meristematic zone*)**
 - ▶ Obsahuje iniciály a okolní buňky, které se rychle dělí s charakteristickou polaritou, expandují a diferencují se do různých pletiv.
- ▶ **Zóna prodlužovací (*elongation zone*)**
 - ▶ Rychlé a rozsáhlé prodlužování buněk.
 - ▶ Rychlost dělení klesá k nule.
- ▶ **Zóna zrání, diference (diferenciace (*differentiation zone*))**
 - ▶ Buňky získávají své rozmanité vlastnosti.
 - ▶ Začíná kořenovými vlásky, vznikají zde laterální kořeny.



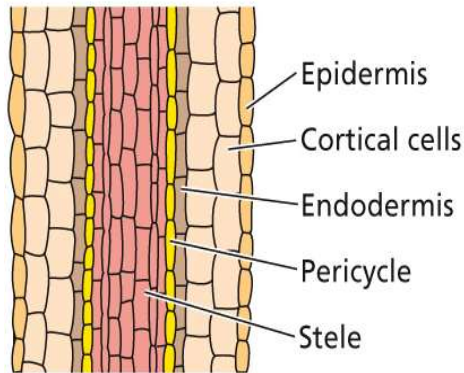
Původ různých kořenových pletiv lze vysledovat ke konkrétním počátečním buňkám (iniciálám)

- ▶ Všechny pletiva v kořeni *Arabidopsis* jsou odvozeny z malého počtu iniciál v kořenovém apikálním meristému (RAM):
- ▶ columella, epidermal-LRC, cortical-endodermal, stele initials
 - ▶ *QC ~ low rate of cell division*



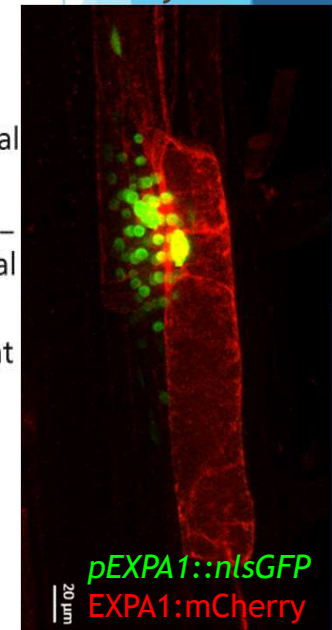
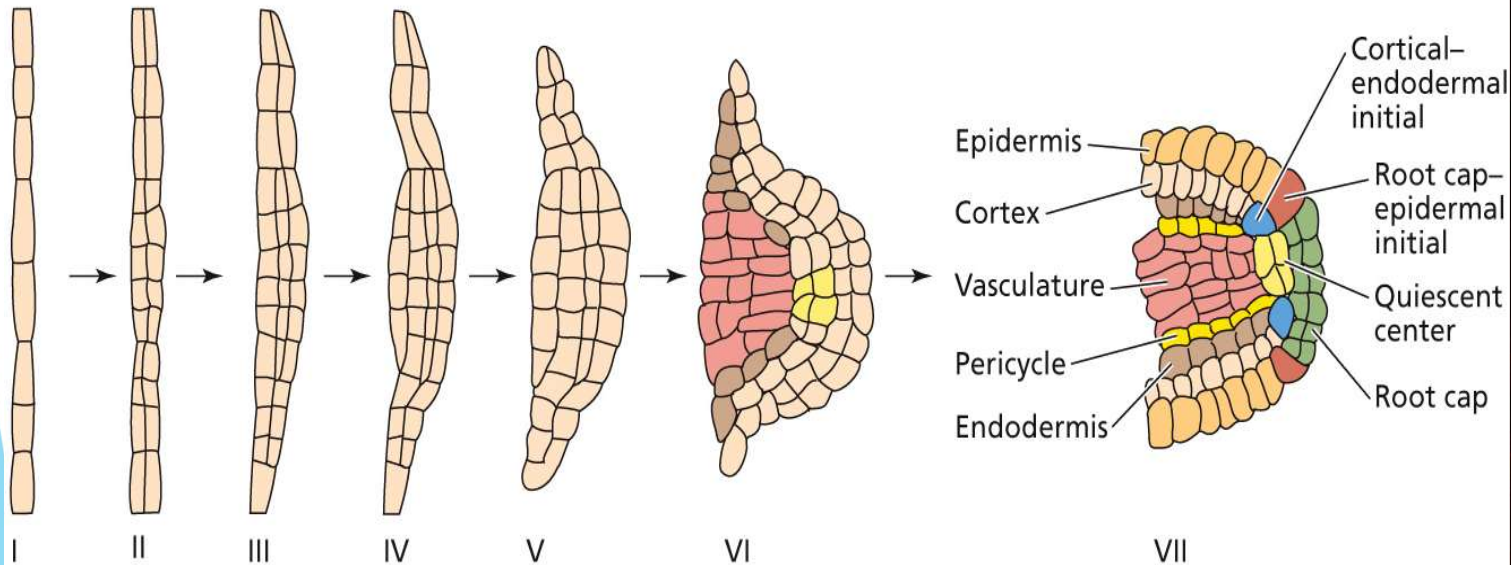
Tvorba a vývoj laterálních kořenů

- ▶ Závisí na endogenních a exogenních signálech
- ▶ Laterální kořenové primordia (*lateral root primordia*, LRP) jsou iniciovány v pericyklu



- ▶ Antiklinální dělení v buňkách pericyklu předchází periklinálnímu dělení.
- ▶ LRP pokračuje v dělení a expanzi buněk, dokud se neobjeví nový laterální kořen skrz kortikální a epidermální buněčné vrstvy.

- ▶ Oblasti vzniku laterálních kořenů odpovídají oblastem maxima auxinu, často místa ohybu.

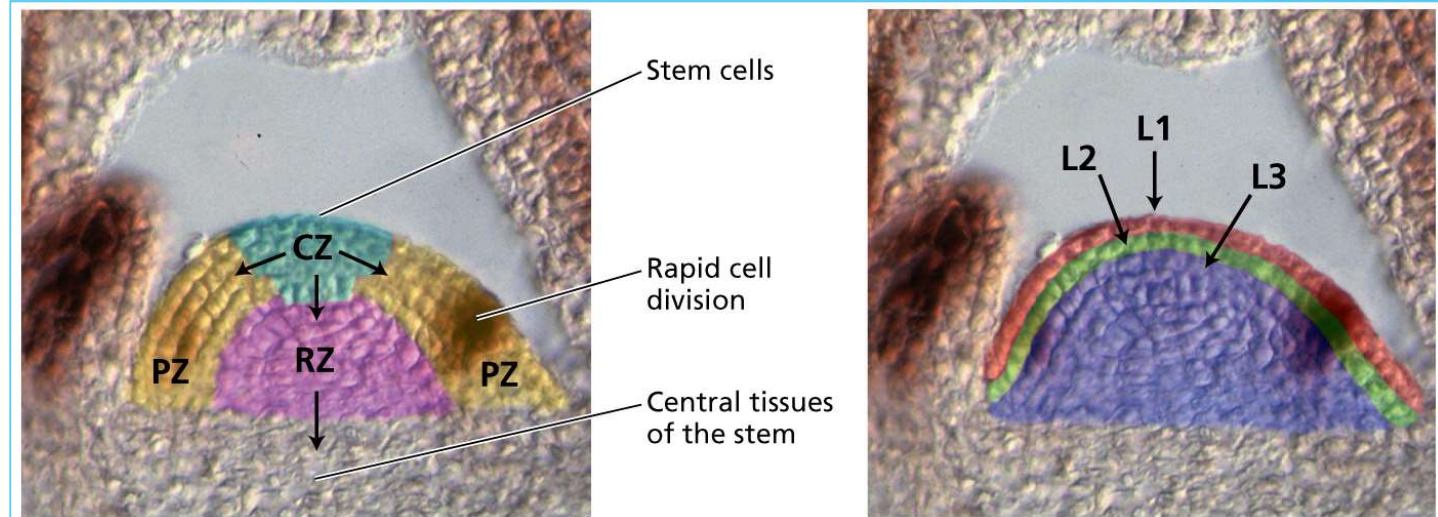


Arabidopsis shoot apical meristem (SAM)

- ▶ lze jej analyzovat z hlediska cytologických zón nebo buněčných vrstev:

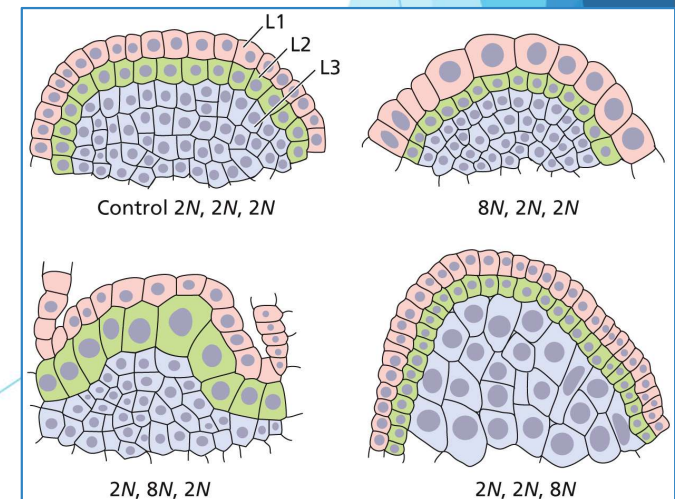
CZ~ central zone
(podobná *root QC*)
PZ~ peripheral zone
(laterální orgány)
RZ~ rib zone
(vnitřní pletiva)

L1 (epidermis) &
L2~ antichlinální dělení
L3~ náhodné dělení

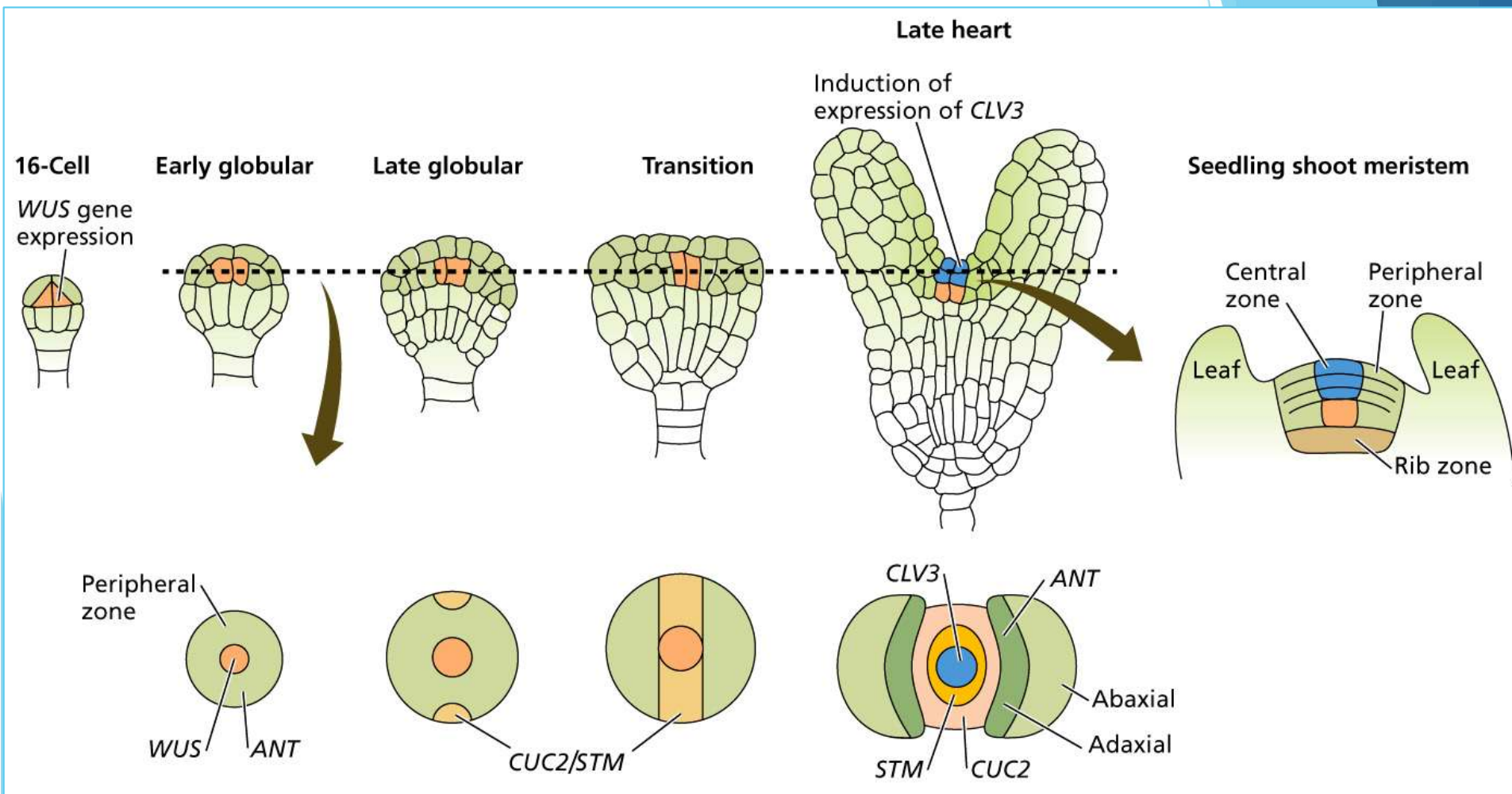


- ▶ SAM ~ se vztahuje konkrétně na iniciály a deriváty vs *shoot apex*~ zahrnuje vrchol
- ▶ Pletiva prýtů/ výhonků jsou odvozeny z několika samostatných sad apikálních iniciál, jejich identity jsou určeny mechanismy závislémi na poloze (např. pokud se buňka L2 dostane do L1, přijme epidermální identitu).

- ▶ Ve vrcholech výhonků ošetřených kolchicinem obsahuje jedna z buněčných vrstev zvětšená polyploidní (8N) jádra, což dokazuje přítomnost klonálně odlišných vrstev v apikálním meristému výhonku.



Tvorba apikální oblasti zahrnuje definovanou sekvenci genové exprese



► Homeostatic regulation (keeps the size of SAM!)

Feedback loop udržující iniciály v SAMu

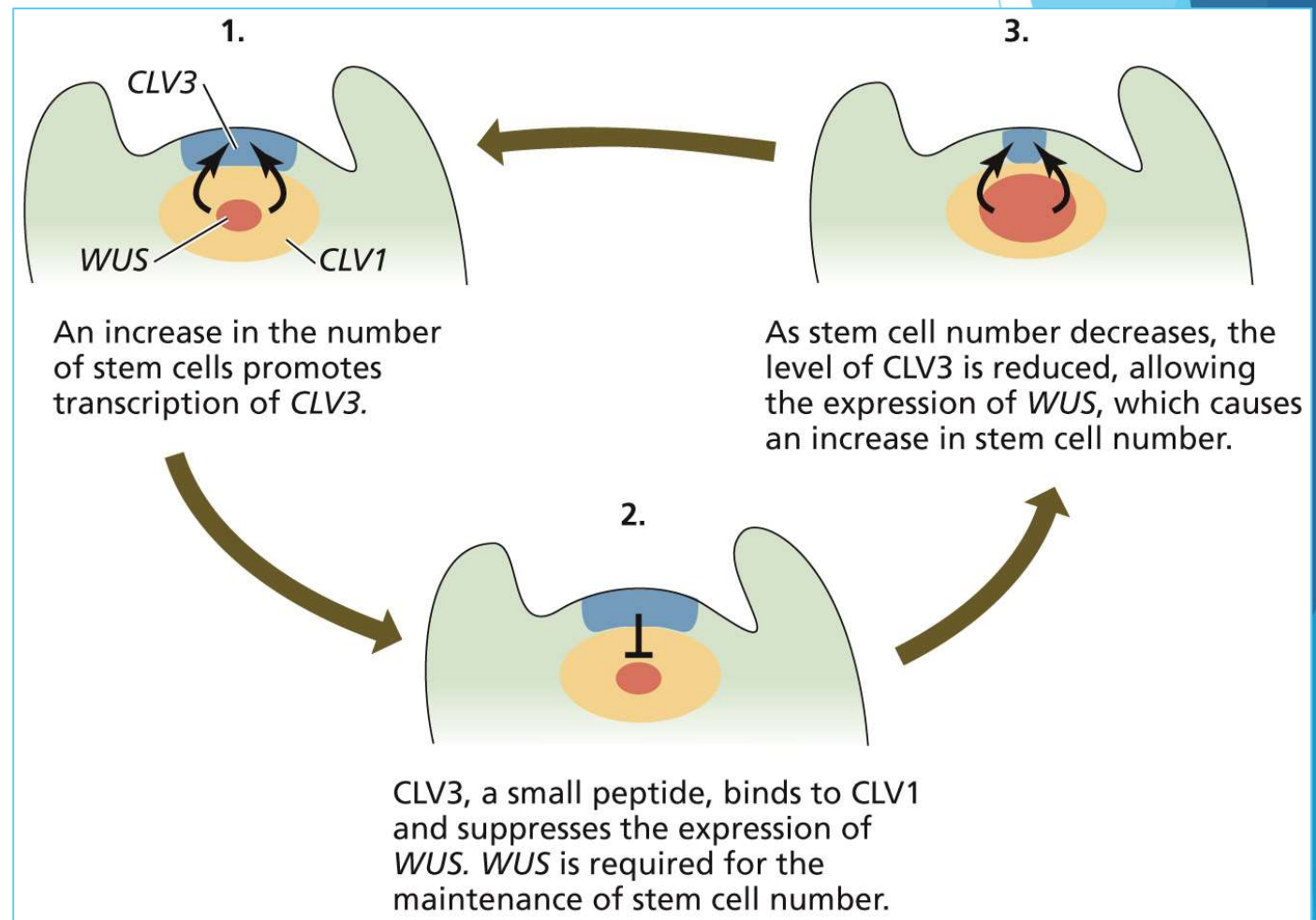
- ▶ *WUS* udržuje identitu apikálních iniciál a podporuje jejich aktivitu, u mutantů vede k diferenciaci apikálních iniciál.
- ▶ Geny *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV2*, *CLV3*) omezují apikální počáteční aktivitu, jejich mutanty výrazně zvětšily SAM.

- ▶ *WUSCHEL* (*WUS*) homeobox TF

- ▶ *CLV1* kóduje leucin-rich repeat (LRRK) receptorovou kinázu signální kaskády.

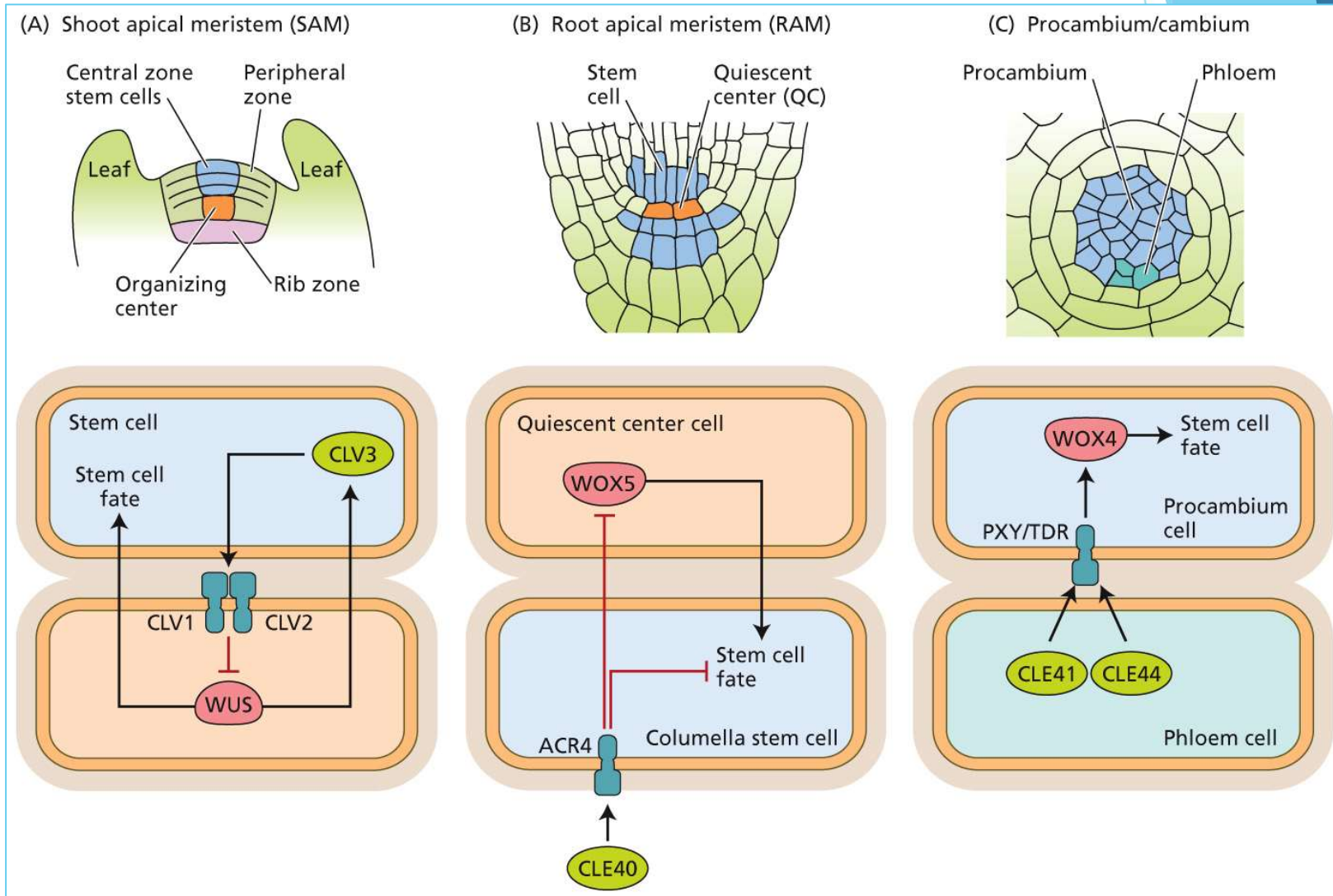
- ▶ *CLV3*~ faktor regulace signálu

- ▶ Homeostatic regulation (keeps the size of RAM!)



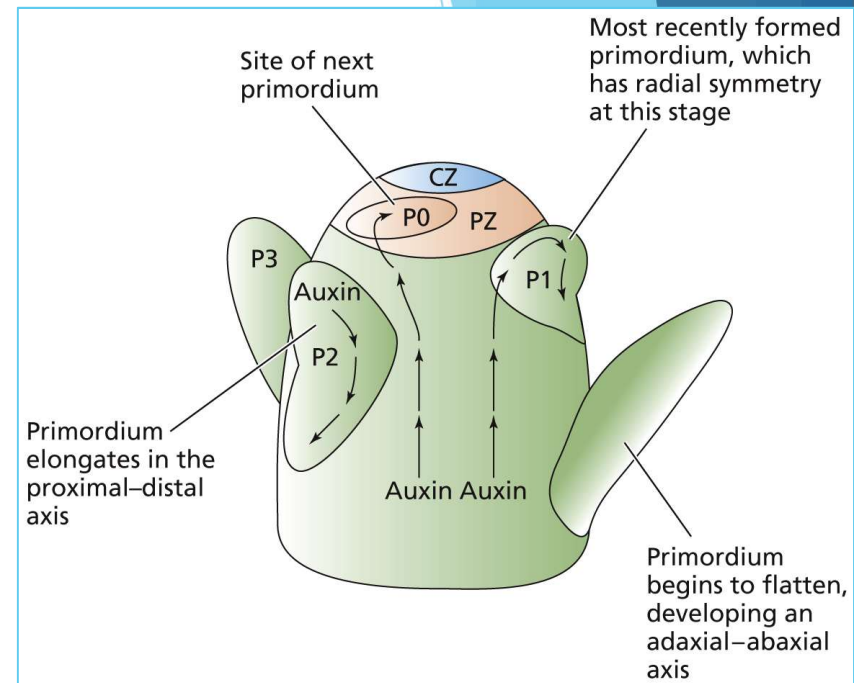
Regulační interakce mezi malými peptidy a WOX transkripčními faktory

- ▶ **WOX** geny (for *WUSCHEL homeobox*) TFs hlavní role v SAM, RAM, cambiu.

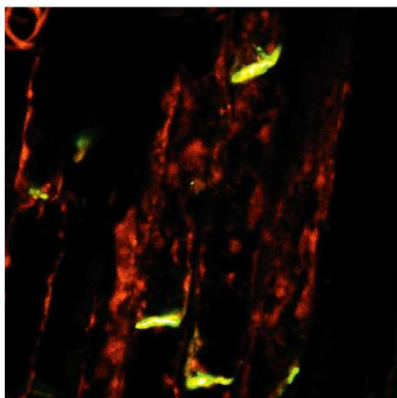


Místa tvorby listů souvisí se vzory polárního transportu auxinu

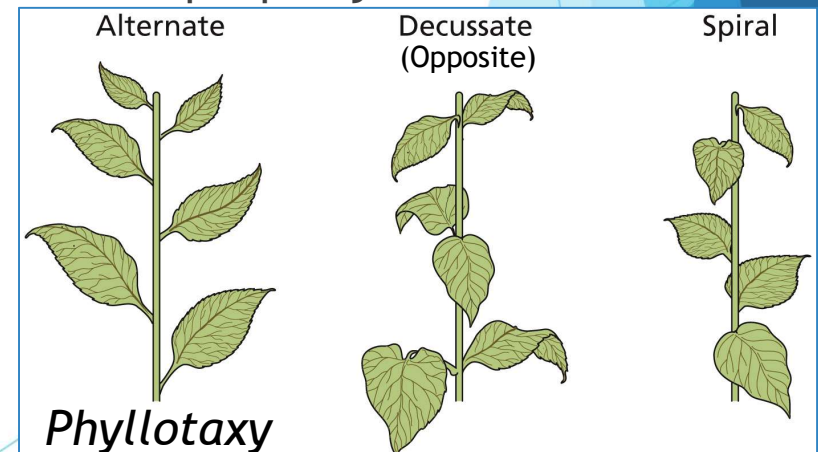
- ▶ **PIN** (*auxin efflux carrier proteins*) přenašečové proteiny auxinového efluxu, polárně lokalizovány ~ nachází se na PM pouze na jednom konci buňky.
- ▶ Rodina proteinů PIN je pojmenována podle špendlíkovitého květenství mutantu *pin1*



Lokalizace PIN1 na bazálním konci vodivých buněk stonku *Arabidopsis*

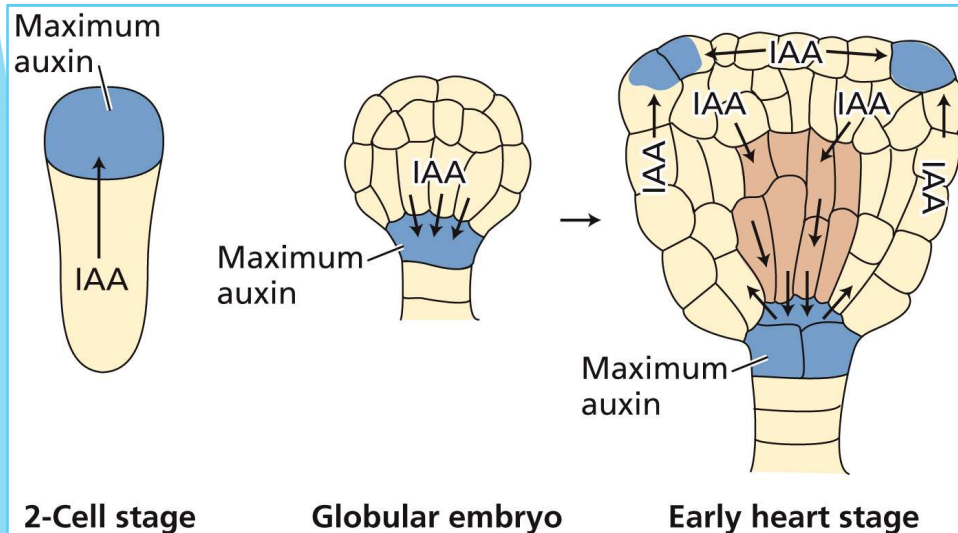
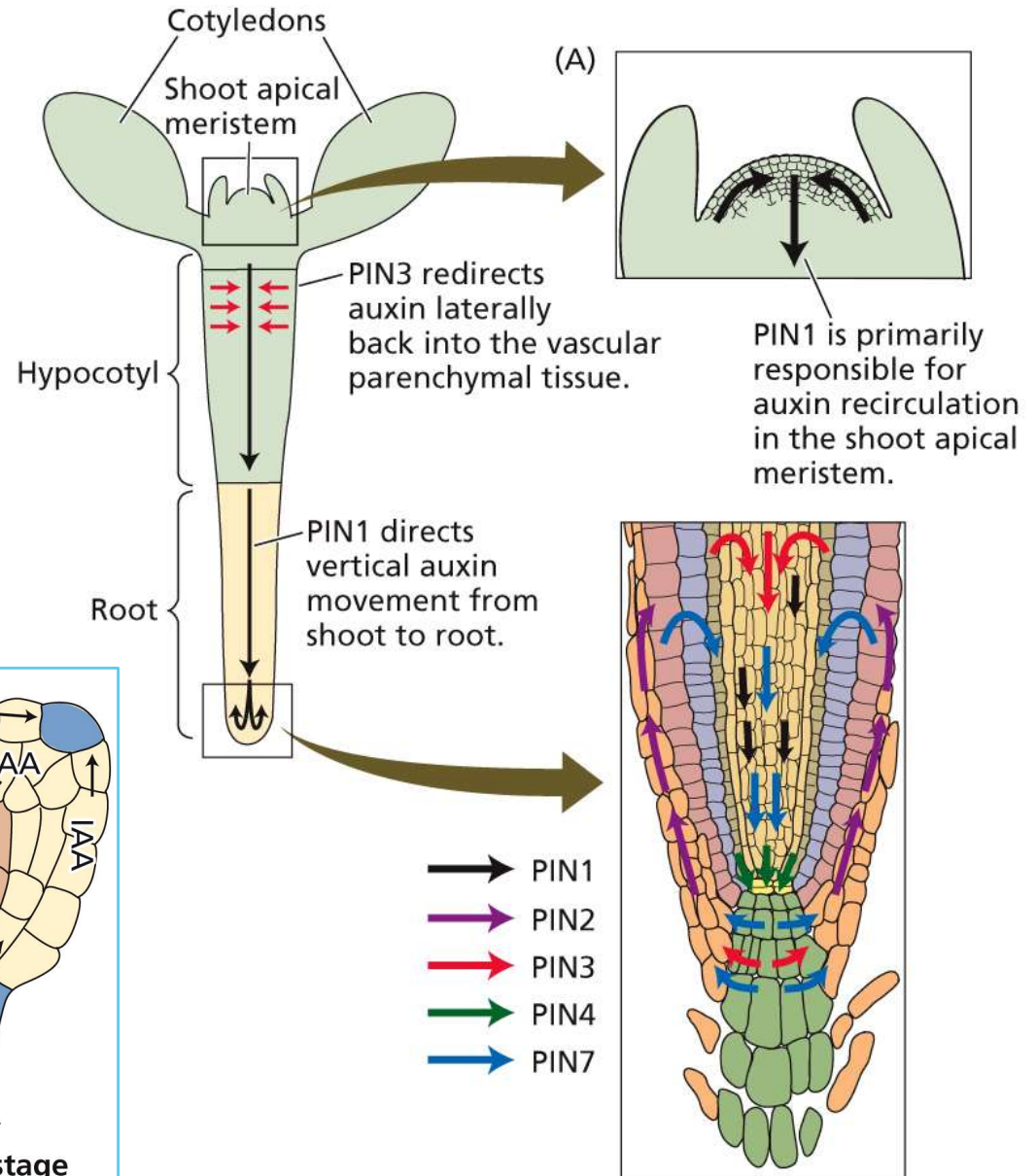


- ▶ Lokalizované zóny akumulace auxinu podporují iniciaci listů.



Polarita rostlin je udržována polárním tokem auxinu

- ▶ Transportní proteiny PIN (a ABCB) řídí auxinovou efluxní složku polárního transportu auxinů v *Arabidopsis*.
 - ▶ Směr pohybu auxinu je spojen s pletivově specifickou distribucí PINů (*efflux carriers*).
- ▶ Pohyb auxinu (IAA) je závislý na PIN1 během raných fází embryogeneze.

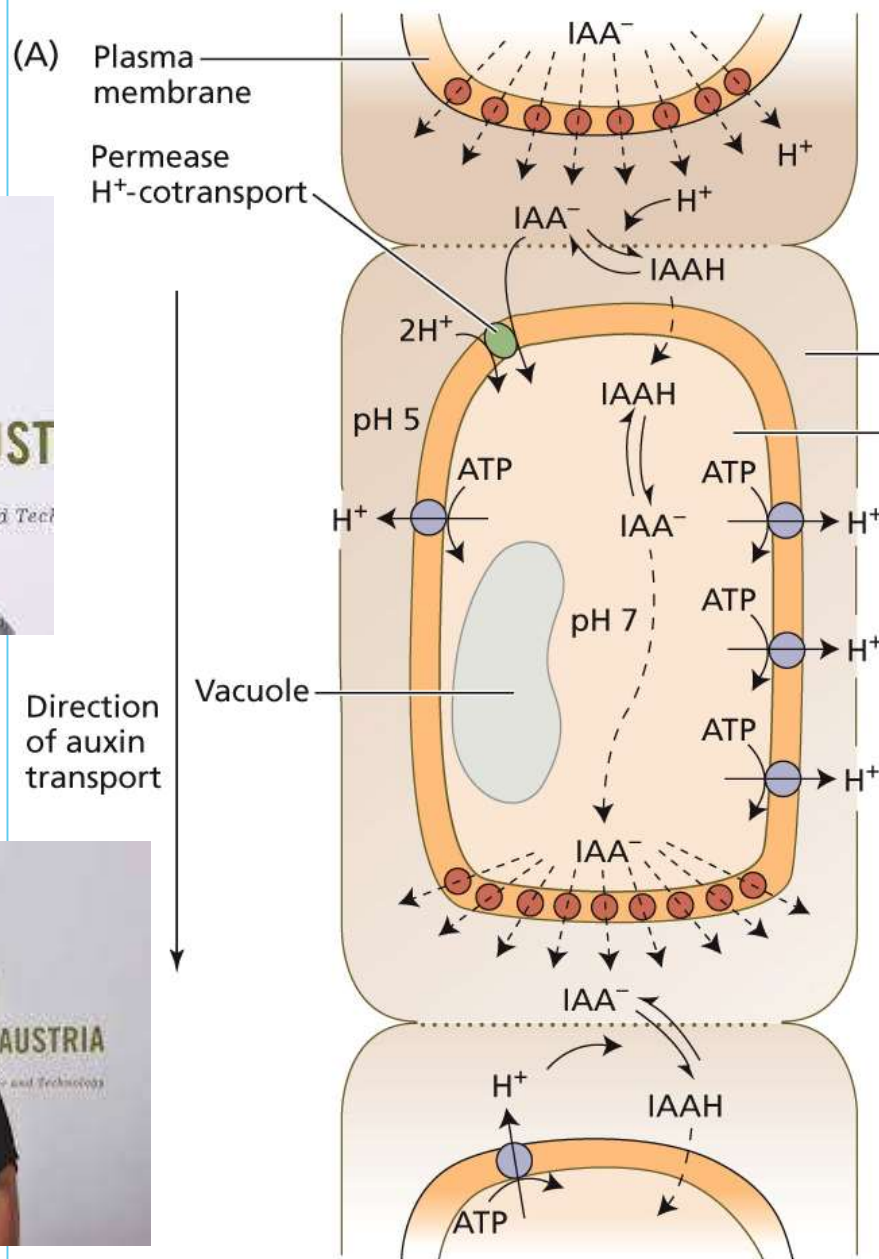


Auxin transport: PIN proteiny

Prof. Jiří Friml



Prof. Eva Benková



1. IAA enters the cell either passively in the undissociated form (IAAH) or by secondary active cotransport in the anionic form (IAA⁻).

2. The cell wall is maintained at an acidic pH by the activity of the plasma membrane H⁺-ATPase.

3. In the cytosol, which has a neutral pH, the anionic form (IAA⁻) predominates.

4. The anions exit the cell via auxin anion efflux carriers that are concentrated at the basal ends of each cell in the longitudinal pathway.

Auxin transport: ABCB proteiny

1. The plasma membrane H⁺-ATPase (purple) pumps protons into the apoplast. The acidity of apoplast affects the rate of auxin transport by altering the ratio of IAAH and IAA⁻ present in the apoplast.

2. IAAH can enter the cell via proton symporters such as AUX1 (blue) or diffusion (dashed arrows). Once inside the cytosol, IAA is an anion, and may only exit the cell via active transport.

3. ABCB proteins are localized (red) nonpolarly on the plasma membrane and can drive active (ATP-dependent) auxin efflux.

4. Synergistically enhanced active polar transport occurs when polarly localized PIN proteins (brown) associate with ABCB proteins, overcoming the effects of back-diffusion.

