

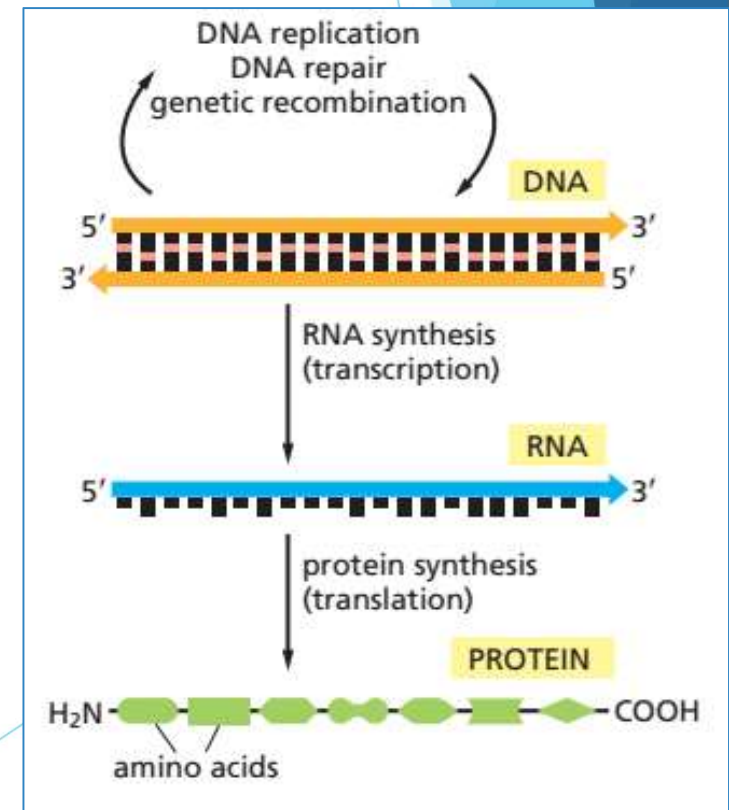
Biologie rostlinné buňky



**Oddělení
experimentální
biologie rostlin**

2. Buněčné jádro

- ▶ Objev jádra a jeho role v dědičnosti
- ▶ Objev DNA a její struktury
- ▶ Izolace jader
- ▶ Struktura jádra
- ▶ Jaderný obal, LINC a jaderné nukleární komplexy
- ▶ Jaderná lokalizace (import) a export proteinů
- ▶ Morfologie chromatinu a chromozomů
- ▶ Jadérko a tvorba ribozomů
- ▶ Objev syntézy bílkovin
- ▶ Produkce proteinů v eukaryotických buňkách
- ▶ Genová exprese u eukaryot



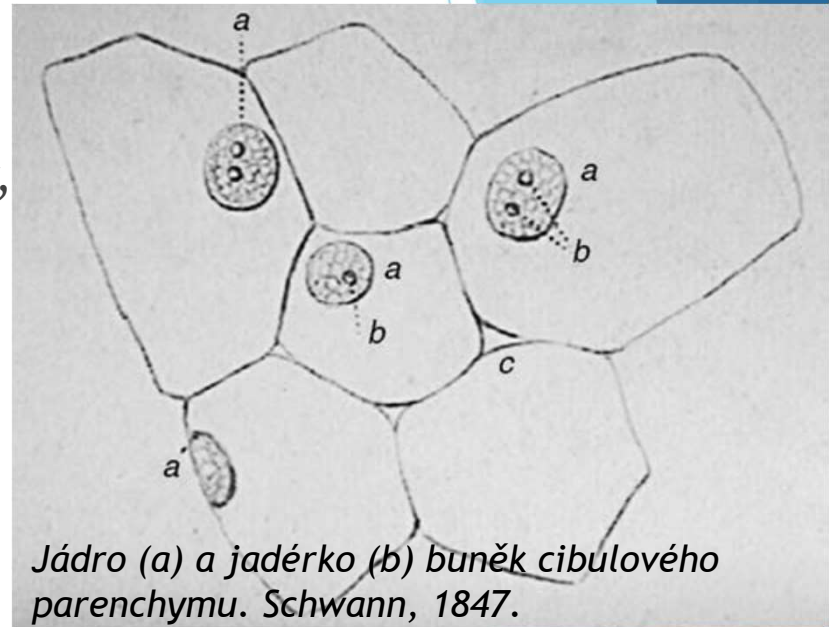
Objev jádra a jeho role v dědičnosti

- ▶ **Robert Brown (1831)** poprvé popsal strukturu jádra v orchidejích
 - ▶ as a “single circular areola, somewhat more opaque than the membrane of the cell...”

- ▶ **Matthias Schleiden (1838)** nazval jádro *cytoblast*, důležité pro tvorbu buněk.

- ▶ **Theodor Schwann** buňky a jejich struktury, byly stejně důležité pro určování vývoje a morfologie u živočichů jako u rostlin.

- ▶ **Rudolf Virchow (1860)** protože jádro může být v živé buňce obtížně viditelné, teprve po obarvení jádra alkalickým roztokem karmínu se ukázalo, že je **v každé živočišné a rostlinné buňce**.

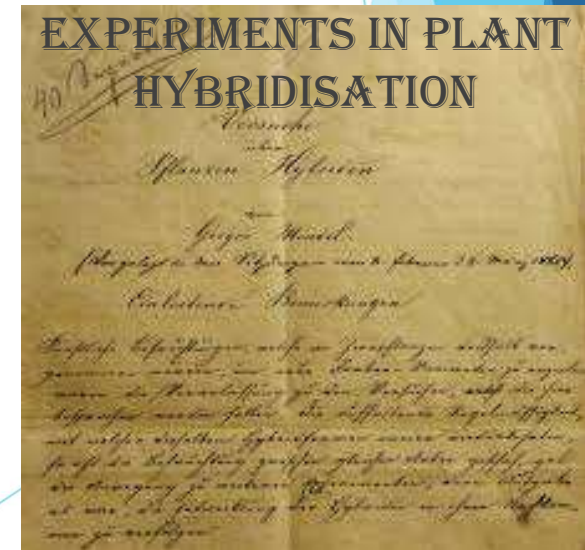
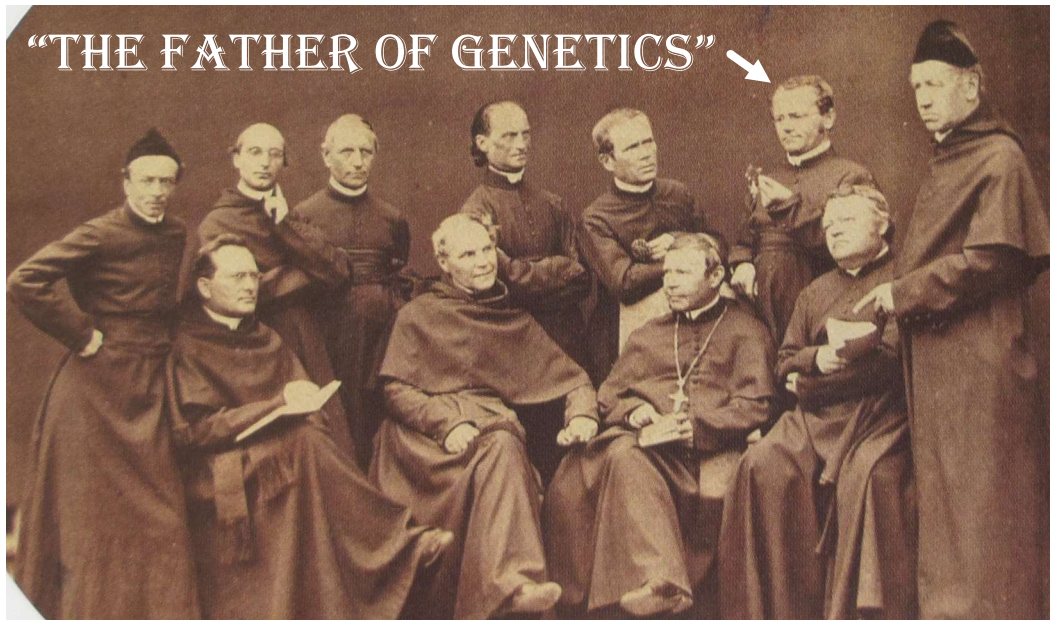


Jádro (a) a jadérko (b) buněk cibulového parenchymu. Schwann, 1847.

- ▶ Věřilo se, že jádro a jeho kyseliny, obsahuje *podstatu života* ~ *bioplasmu*.
- ▶ **Walther Flemming (1882)** protože jádro bylo snadno obarveno barvivy, jeho obsah dostal název *chromatin* což znamená „barevná látka“. Fragmenty, na které se chromatin dělil, dostaly název chromatické prvky a *chromozomy*, což znamená „barevná tělíška“.

Objev jádra a jeho role v dědičnosti

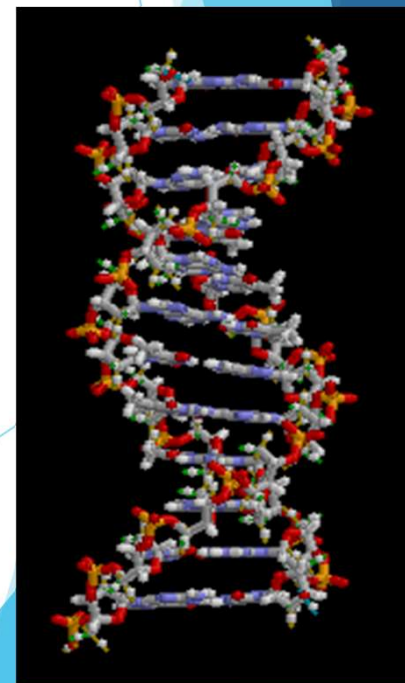
- ▶ **Walther Flemming** (1880) popsal chromozomy epiteliálních buněk mloka jako vláknité struktury a jejich dělení dal název *mitóza*.
- ▶ Jádro prošlo složitým procesem dělení chromozomů a každá somatická buňka měla nejen **stejný počet chromozomů**, ale také **identické kopie chromozomů** (Wilson, 1895).
- ▶ To vedlo k myšlence, že chromozomy obsahují *sebezvěčňující* se informace (Roux, 1883), které byly nezbytné pro stavbu organismu, **dědičnost**.
- ▶ **Hugo de Vries** (1889) věřil, že chromozomy nesou dědičné faktory, které nazval „*pangeny*“. Znovuobjevil Mendelovo dílo (1865)....



“MY TIME WILL COME . . .”

Objev DNA a její struktury

- ▶ Friedrich Miescher (1868) zkoumal chemické složení *nukleinu* z jader, která obsahují *protamin*, později nazývaný *histon*, a *nukleové kyseliny*.
- ▶ Pozdější organičtí chemici (Fischer, 1902) hydrolyzovali nukleové kyseliny na *puriny*, adenin (A) a guanin (G), stejně jako novou třídu sloučenin *pyrimidiny*, obsahující thymin (5-methyluracil) (T), cytosin (C) a uracil (U).
 - ▶ Zapomněli na skutečnost, že mateřskou molekulou byla makromolekula...
 - ▶ Jednoduché izolační postupy vedly k tomu, že nukleové kyseliny rostlin se zdály být složeny z ribonukleosidů, zatímco nukleové kyseliny živočichů byly složeny z deoxyribonukleosidů **(v 50. letech se připustilo, že rostliny mají DNA!)**
- ▶ Rentgenové difrakční snímky DNA prokázaly, že čtyři nukleotidy jsou distribuovány náhodně, a proto DNA funguje jako *genetický materiál*.
- ▶ Rosalind Franklin (snímky z rentgenové krystalografie), James Watson a Francis Crick popsali v roce 1953 molekulární strukturu DNA jako dvojitou šroubovici.
 - ▶ Watson pomohl v roce 2003 zahájit projekt *Human Genome Project*, rozsáhlou iniciativu zabývající se sekvenováním celého lidského genomu za účelem zlepšení lidského stavu.

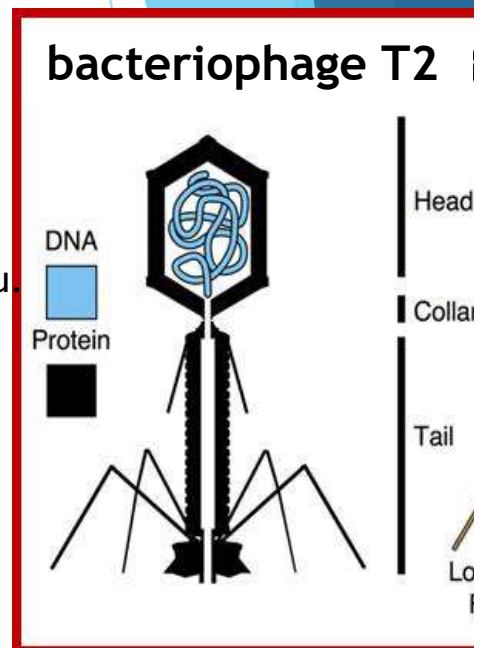


Je genetickým materiálem protein nebo DNA?

- ▶ Přesto si mnoho vědců, včetně Williama Astburyho, který zavedl termín **molekulární biologie**, stále myslelo, že protein se podílí na dědičnosti možná ve formě *nukleoproteinu*.
- ▶ V roce 1952 provedli Alfred Hershey a Martha Chase experiment, který potvrdil, že **genetickým materiálem je DNA**.
 - ▶ DNA bakteriofága T2 označili ^{32}P a v druhém experimentu označili jeho protein ^{35}S .
 - ▶ Poté, co měl označený bakteriofág dost času vstříknout do bakterií svůj genetický materiál, oddělili bakterie od fága tím, že je hodili do mixéru.
 - ▶ Zjistili, že potomstvo T2 bylo značeno ^{32}P , ale ne ^{35}S , což ukazuje, že genetickým materiálem byla DNA, nikoli protein.

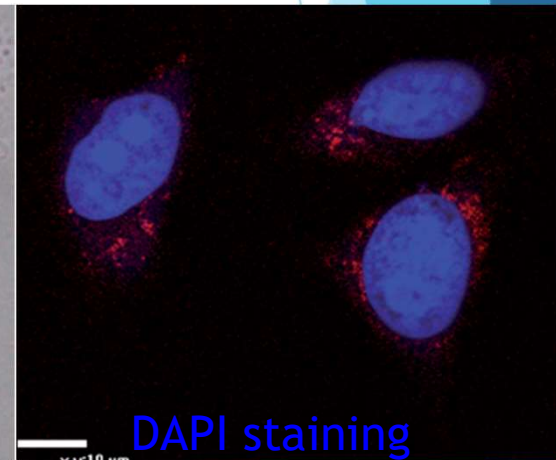
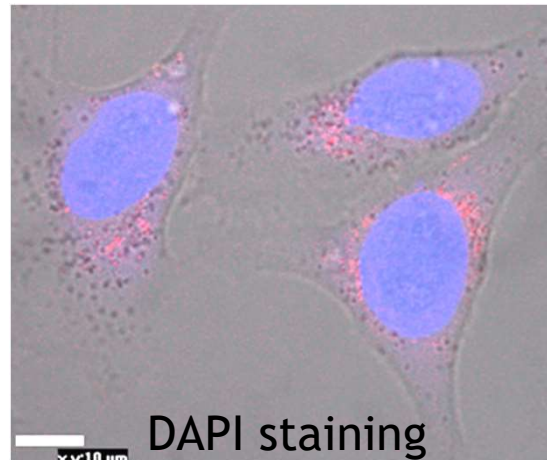


Je třeba mít na paměti, že zatímco některé vlastnosti závisí výhradně na sekvenci jediného genu, většina vlastností závisí na mnoha faktorech, kromě genetického pozadí, ve kterém je gen exprimován, také na prostředí!!!



Izolace jader

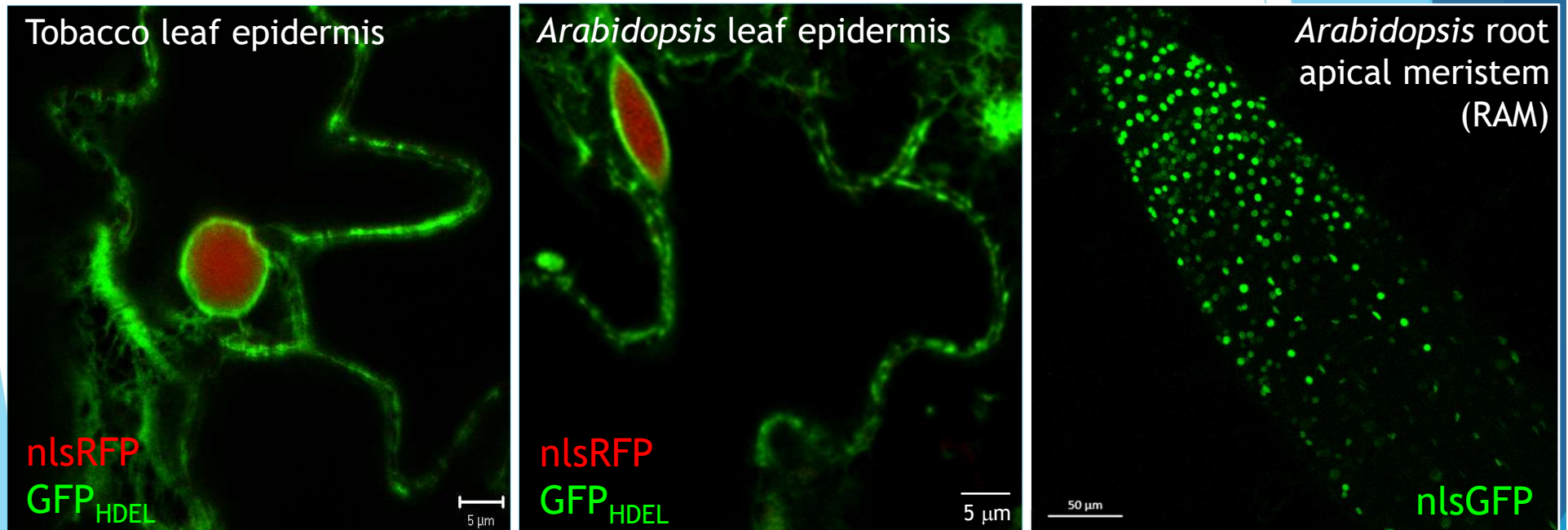
- ▶ Jádra byla poprvé izolována z buněk hnisu a spermií na konci 19. století.
- ▶ V současné době se jádra izolují **homogenizací tkáně**, následuje **filtrace** a **centrifugace** homogenátu (1900 g / 10 min), aby se jádra peletovala.
 - ▶ Pelet se resuspenduje, navrství se na **Percollový gradient** a podrobí se centrifugaci s gradientem hustoty (7800 g / 30 min).
 - ▶ Při posledním odstředění se Percoll odstraní.
- ▶ Čistota a neporušenost se ověří barvením jader *Feulgenovým činidlem* nebo **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole) a testováním aktivity DNA nebo RNA polymerázy.



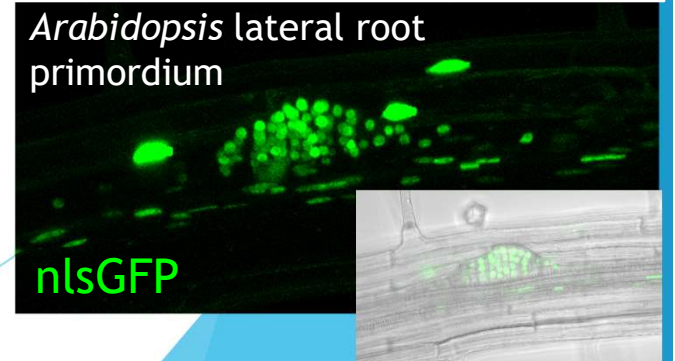
- ▶ *Proteomické a bioinformatické studie charakterizovaly proteiny, které jsou v jádře a komplexu jaderných pórů.*

Struktura jádra

- ▶ Jádro je velká organela o průměru asi 10 μm v rostlinných buňkách.
- ▶ V meristematických buňkách je typicky kulovité, v diferencovaných buňkách může být zploštělé a elipsoidní - morfologie závisí na jeho aktivitě a druhu!

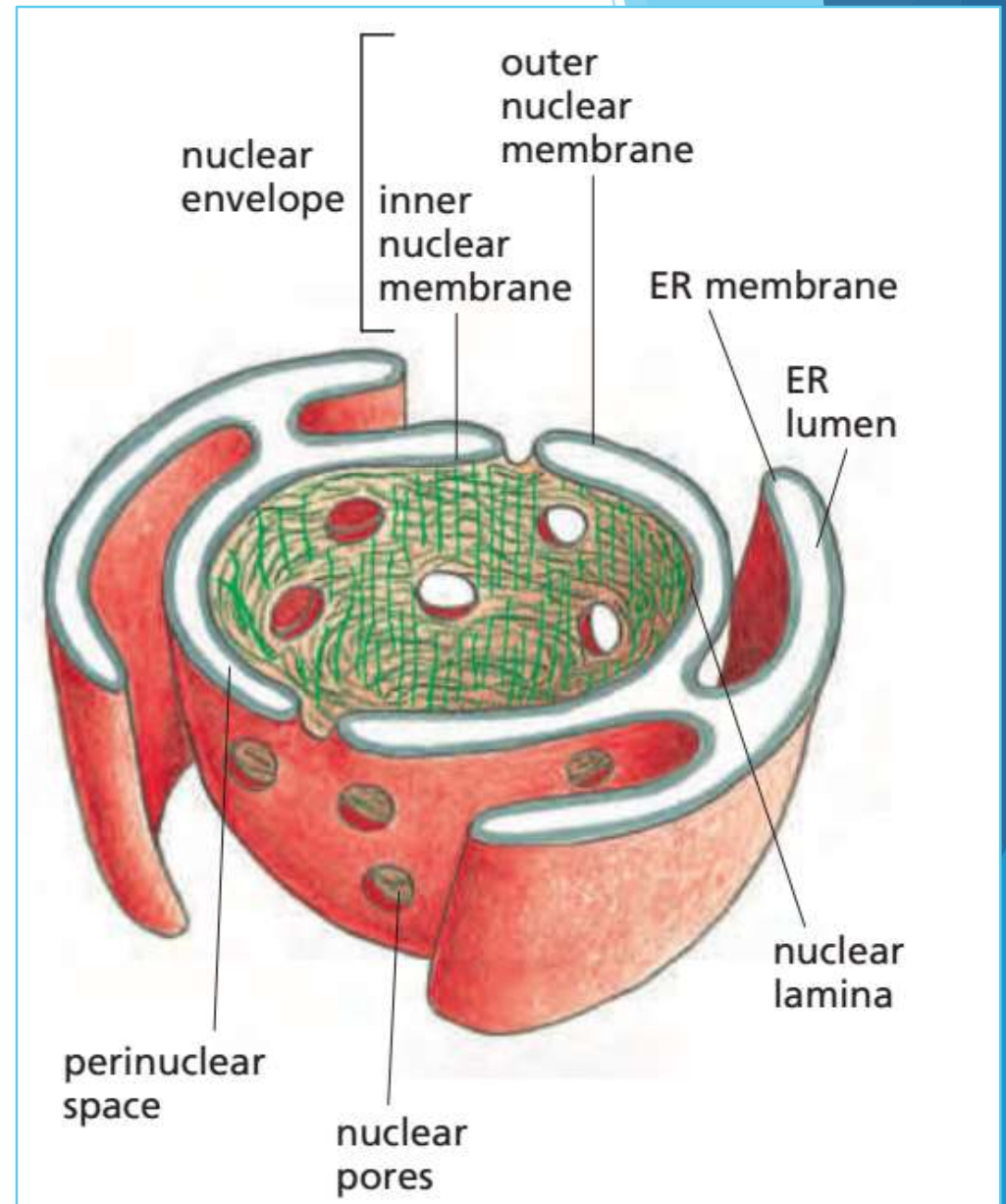


- ▶ *nls* = *nukleárně lokalizační signál*, u proteinů, které jsou translokovány do jádra
- ▶ Vnější jaderná membrána je přímo *napojená na ER*, ER lumen obsahuje proteiny s karboxy-terminální sekvencí H/KDEL.



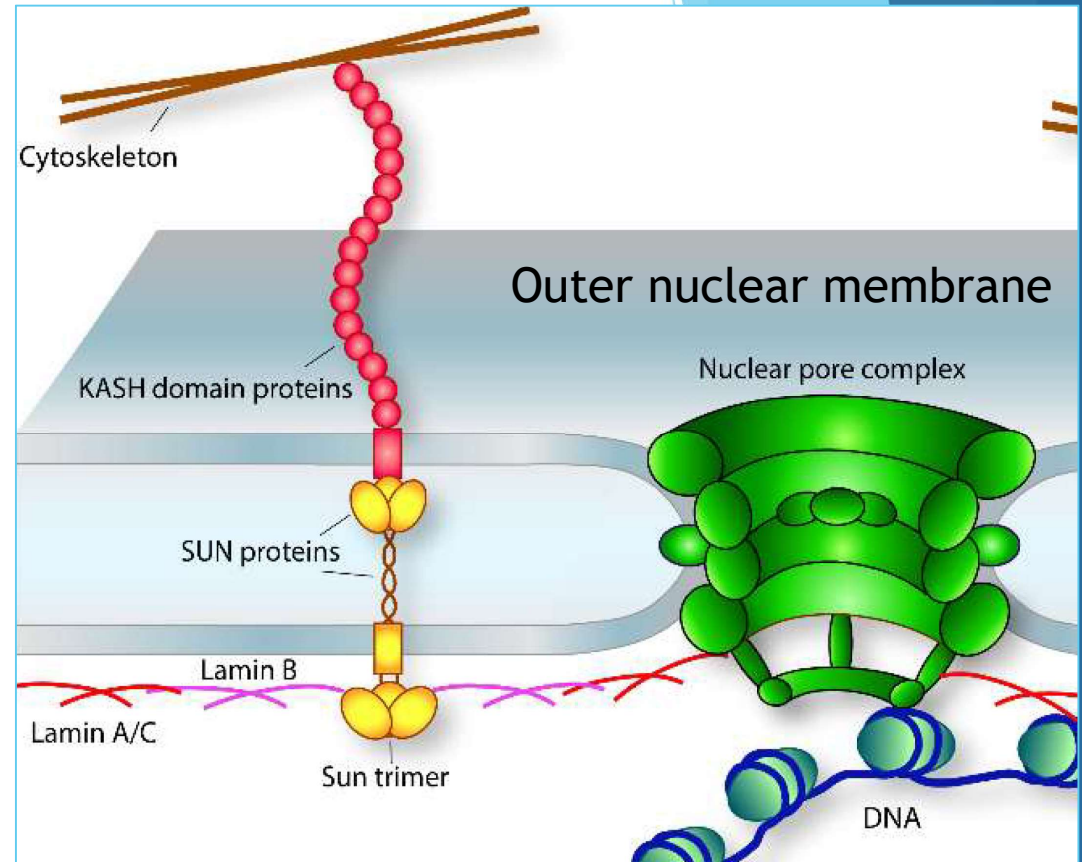
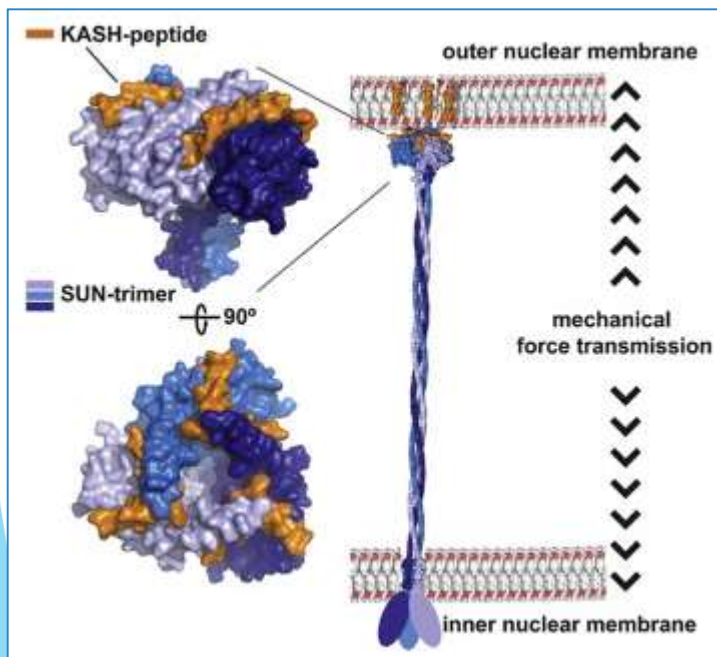
Jaderný obal (*the nuclear envelope*)

- ▶ Jaderný obal uzavírá DNA a definuje jaderný kompartment.
- ▶ Skládá ze dvou soustředných membrán prostoupených *jadernými pórovými komplexy (NPC)*.
- ▶ Vnější membrána je napojena na ER.
- ▶ Vnitřní jaderná membrána obsahuje proteiny, které působí jako vazebná místa pro chromozomy a pro *jadernou laminu*.
 - ▶ Jaderná lamina je proteinová síťovina, která poskytuje strukturální podporu obalu a vazebná místa (kotvu) pro chromozomy a cytoplazmatický cytoskelet.
- ▶ Uvnitř jádra je **jaderné matrice**
 - ▶ Je zde zabudován chromatin, avšak k matrici se připojují pouze specifické oblasti DNA.
- ▶ Podílí se na regulaci replikace DNA, transkripce a transportu RNA.



LINC komplex (*linker of nucleo- and cyto- skeletons*)

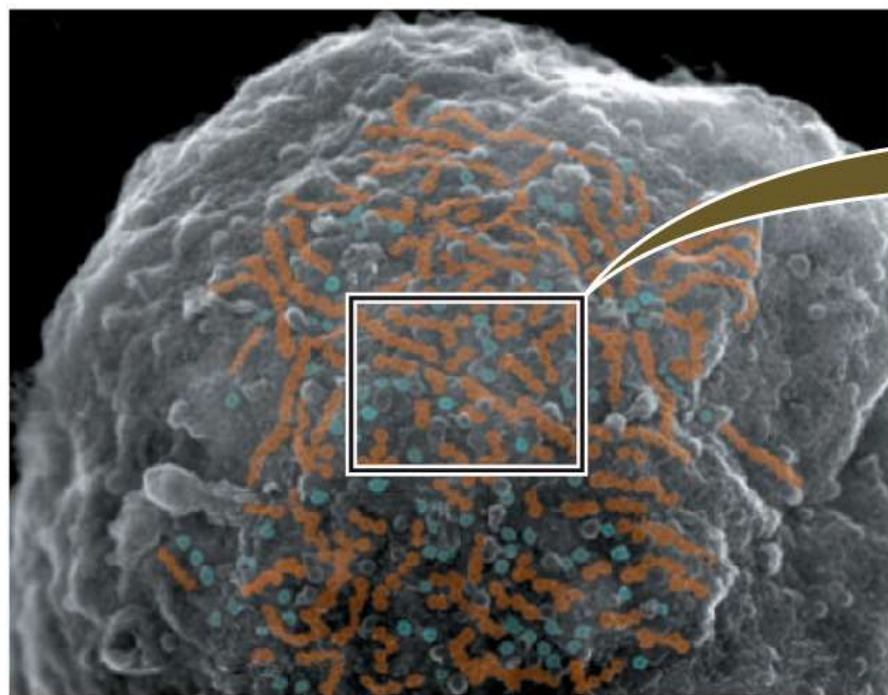
- ▶ Proteinový komplex spojený s oběma membránami jádra.
- ▶ Obsahuje integrální membránové proteiny KASH a SUN:
 - ▶ KASH spojuje vnější membránu s cytoskeletem na cytosolové straně obalu
 - ▶ SUN ve vnitřní membráně interaguje s jadernou laminou a nukleoskeletem na vnitřní straně



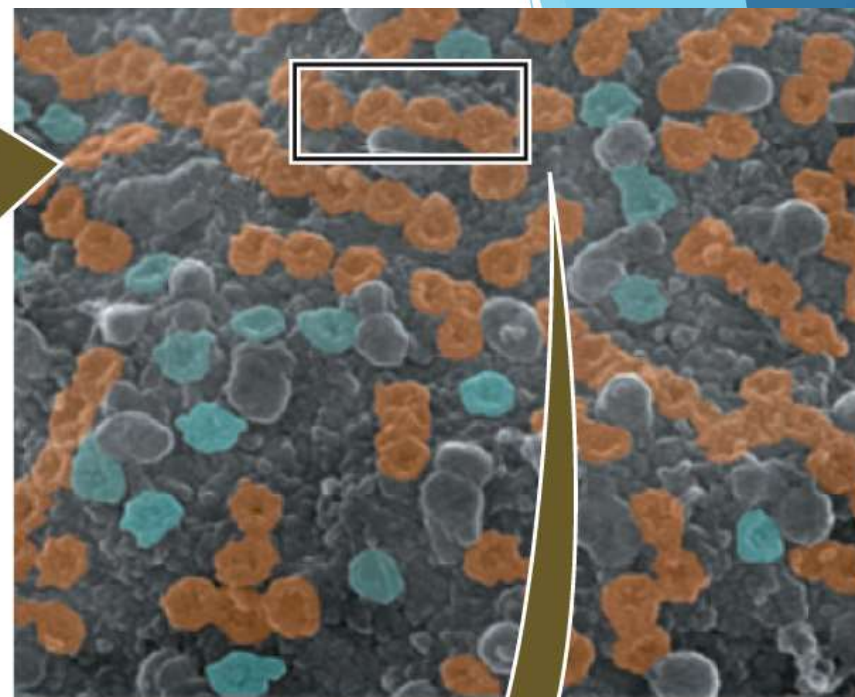
▶ Funkce komplexu KASH-SUN

- ▶ mechanická komunikace mezi cytoskeletem a jadernou maticí
- ▶ ovlivňuje pohyb a tvar jádra (vliv na expresi genů)
- ▶ a mnoho buněčných aktivit (buněčný cyklus, NPCs)

Jaderné porové komplexy (Nuclear pore complexes NPCs)

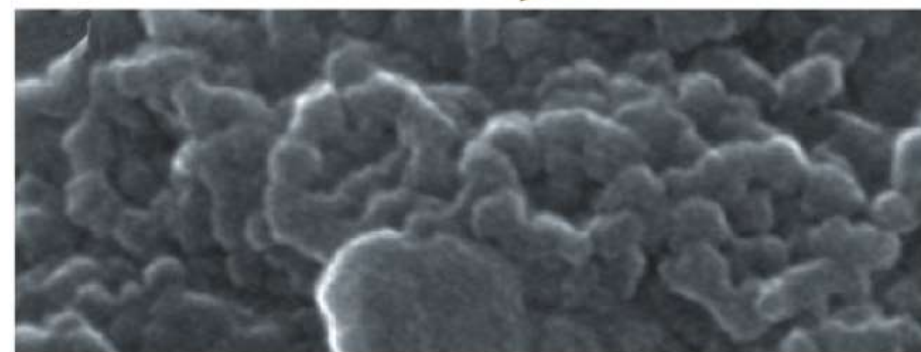


1 μm



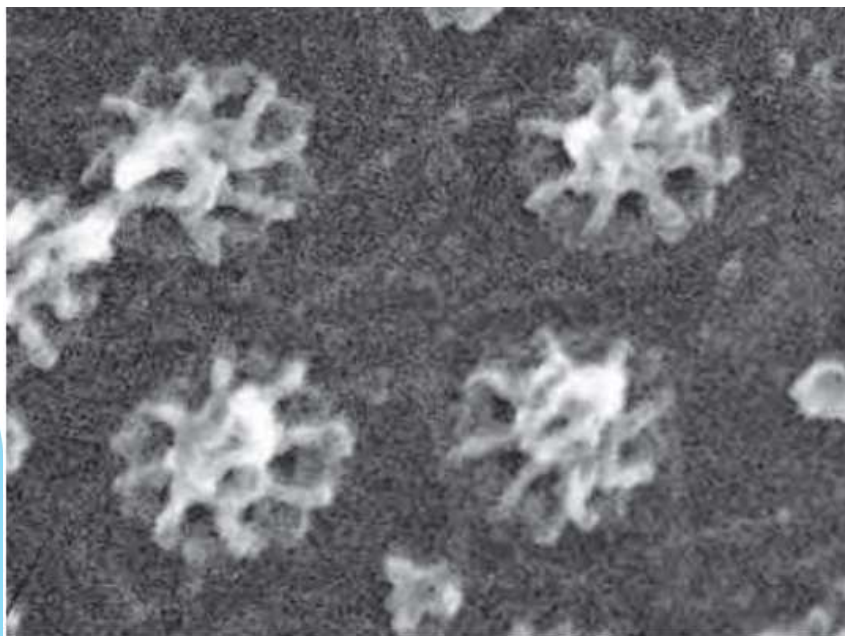
100 nm

- ▶ *TEM (transmisní elektronová mikroskopie) mikrografy: buňky tabáku zobrazující jaderný obal a organizaci komplexů jaderných pórů*



Jaderné porové komplexy (*Nuclear pore complexes NPCs*)

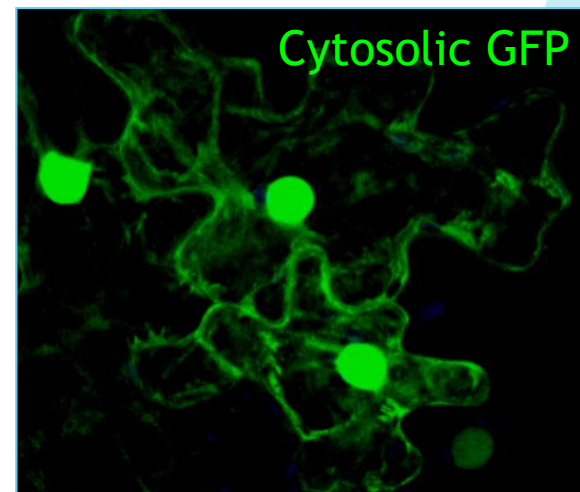
- ▶ Perforovaný jaderný obal u všech eukaryot, usnadňuje obousměrný nukleo-cytoplazmatický transport:
 - ▶ Enzymy a proteiny syntetizovány v cytoplazmě, ale fungující v jádře (DNA a RNA polymerázy a histony).
 - ▶ Messenger RNA (mRNA), přenosová RNA (tRNA) a ribozomální RNA (rRNA) spojené se syntézou proteinů musí opustit jádro a vstoupit do cytoplazmy.
- ▶ Jaderné póry se v průběhu času mění, typicky je jich asi 11 pórů na μm^2 (v rozmezí 5 až 60), mohou být rozmístěny pravidelně nebo nepravidelně.



(B)

0.1 μm

- ▶ Průměr 100-150 nm, tloušťka 50-70 nm.
- ▶ Uprostřed NPC je **vodný pór**, kterým mohou pasivně difundovat malé ve vodě rozpustné molekuly a proteiny (GFP).



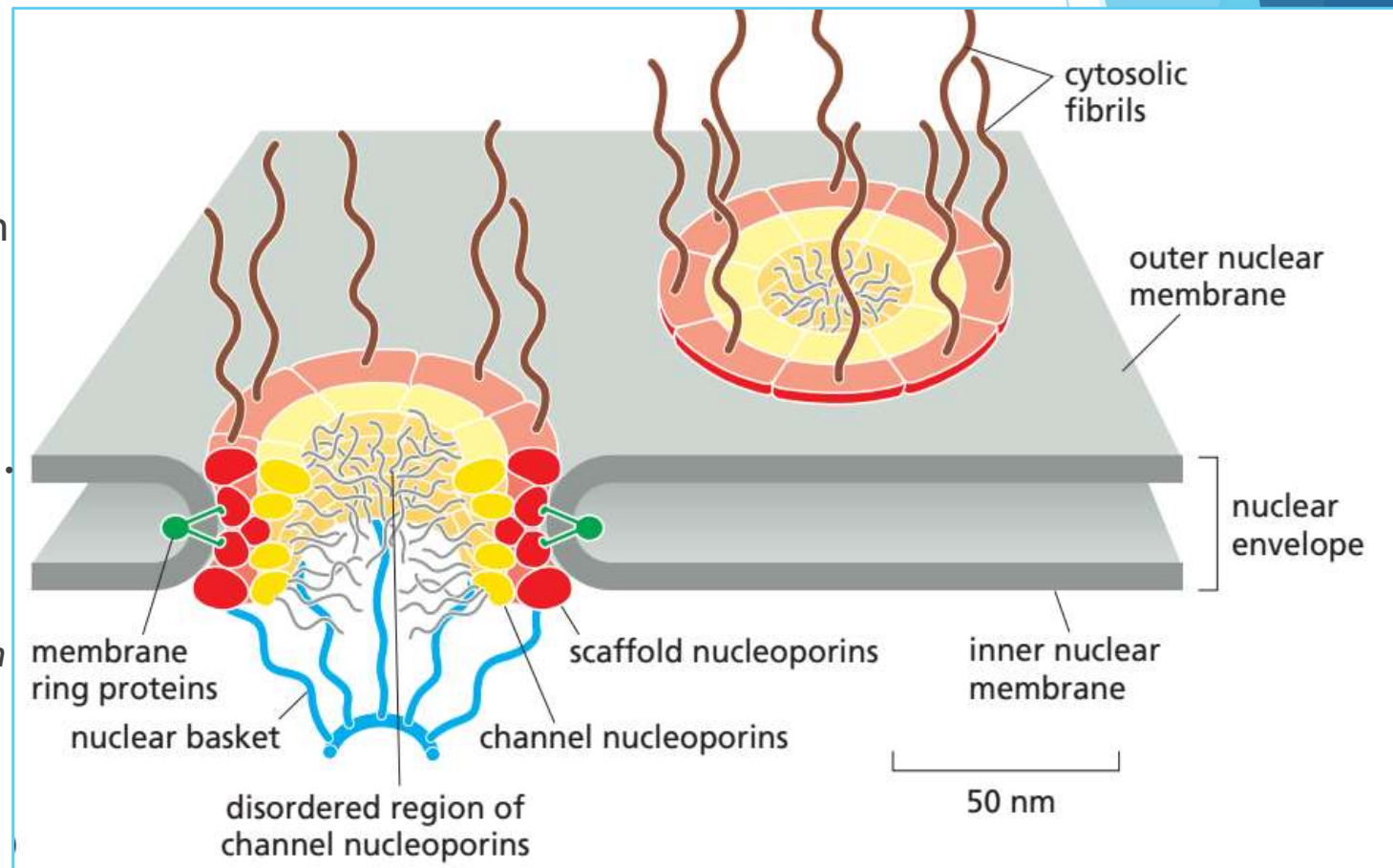
Jaderné porové komplexy (*Nuclear pore complexes NPCs*)

- ▶ Každý NPC se skládá ze sady cca 30 různých proteinů nebo *nukleoporinů*
 - ▶ 8x rotační a 2x příčná symetrii, 500-1000 proteinů v plně sestaveném stavu.
- ▶ **Nukleoporiny:** rodina glykoproteinů, obsahují O-vázaný N-acetylglukosamin, vytvářeny na cytoplazmatických ribozomech a glykosylovány v cytoplazmě.

- ▶ **Importiny:** napomáhají translokaci prostřednictvím NPC do jádra.

- ▶ **Exportiny:** usnadnění exportu z jádra.

- ▶ *Důkaz jejich významu u rostlin vyplývá ze studií mutantů, např. vývojové vady.*

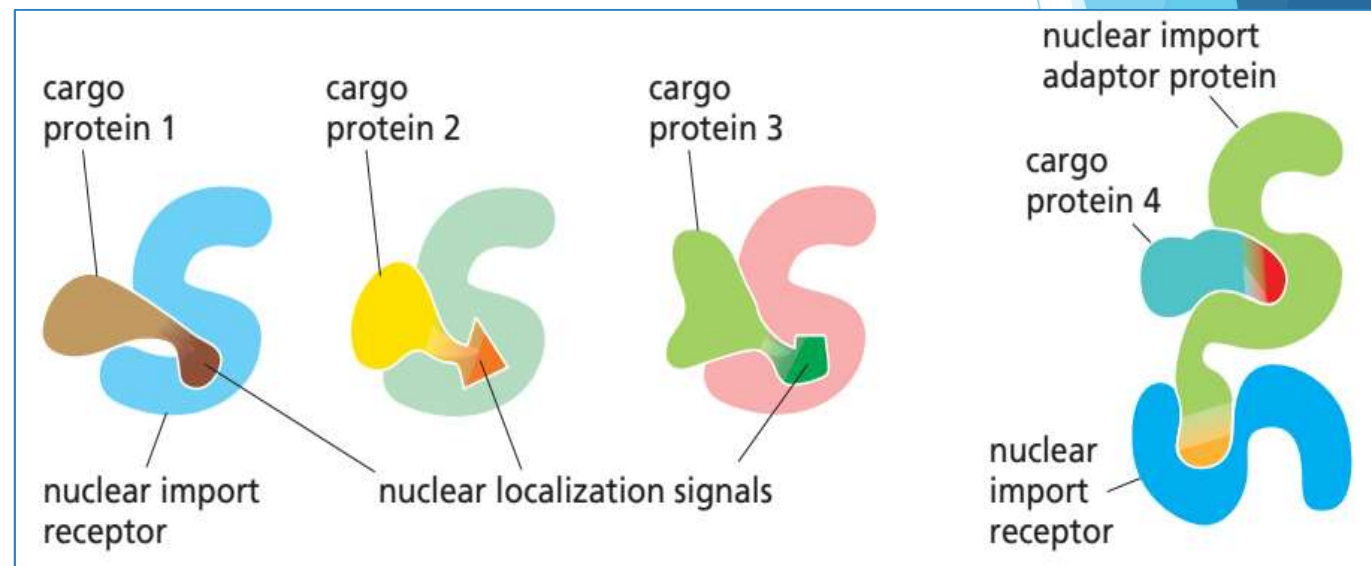


Jaderná lokalizace proteinů

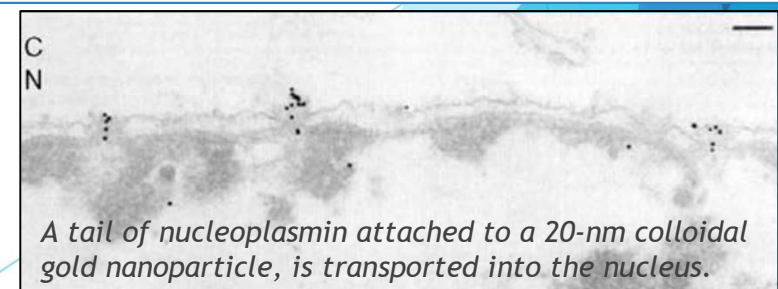
- ▶ Proteiny, které jsou translokovány do jádra, mají speciální nukleární importní signál nebo **nukleární lokalizační signál** (*nls*, *nuclear localisation signal*).
- ▶ V mnoha jaderných proteinech se signály skládají z 1 nebo 2 krátkých sekvencí, které jsou bohaté na kladně nabitě aminokyseliny (aa) *lysin* a *arginin*. Nejkratší sekvencí, která fungovala při jaderném zacílení, měla 8 aa.
- ▶ *nls* byl poprvé identifikován v proteinu *T-antigenu* kódovaného virem *SV40*.

- ▶ Pro zahájení importu musí být většina nls rozpoznána jadernými importními receptory: **importiny**

- ▶ kódovány rodinou příbuzných genů.
- ▶ Různé importiny se váží na různé nls a tím i různé cargo proteiny.

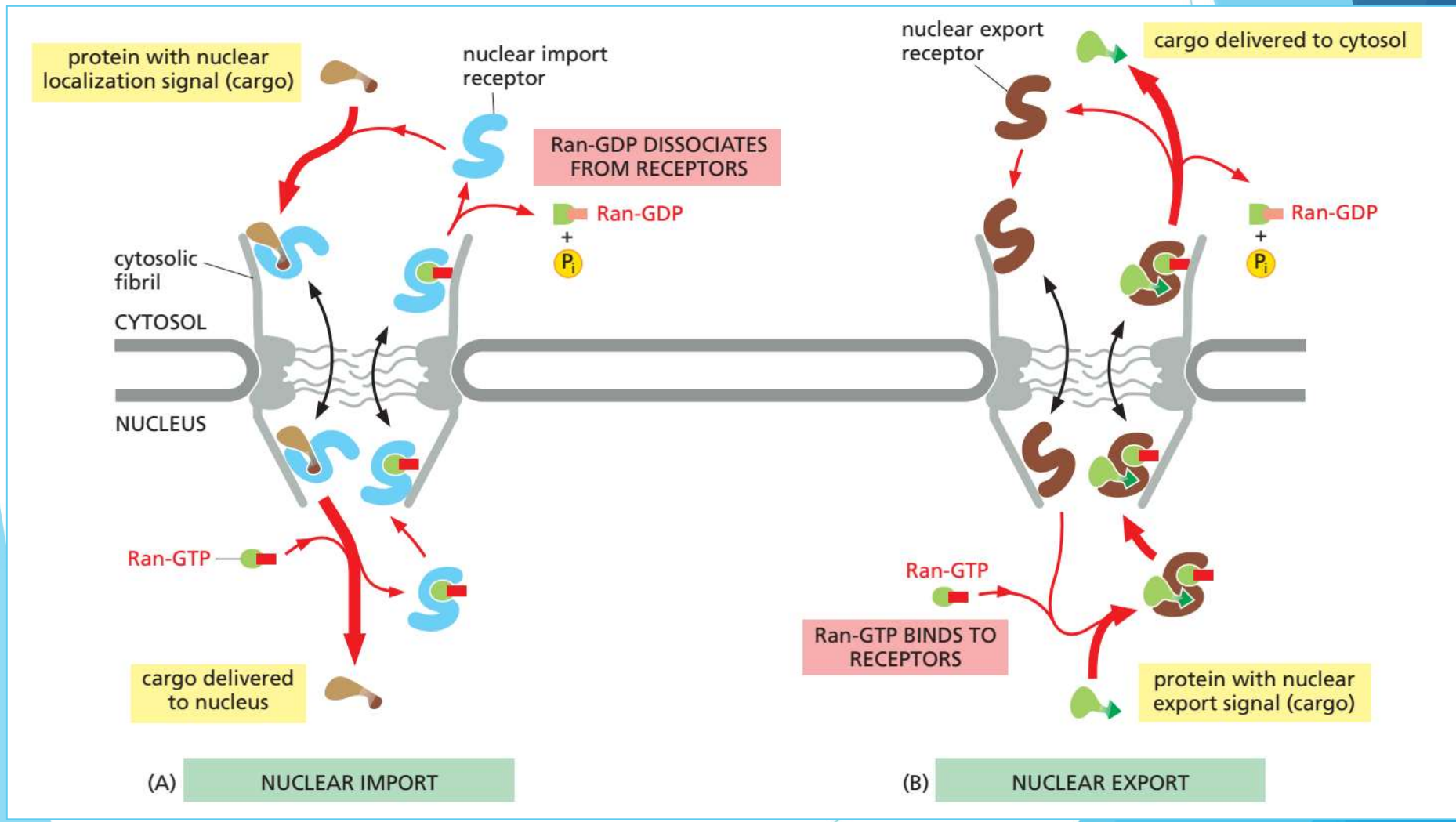


- ▶ Import proteinů do jádra lze **regulovat fosforylací** aa v targetové sekvenci. Fosforylace může ovlivnit schopnost nls rozpoznat svůj receptor.
- ▶ Pokud je protein transkripčním faktorem (TF), může to mít přímý vliv na genovou expresi.



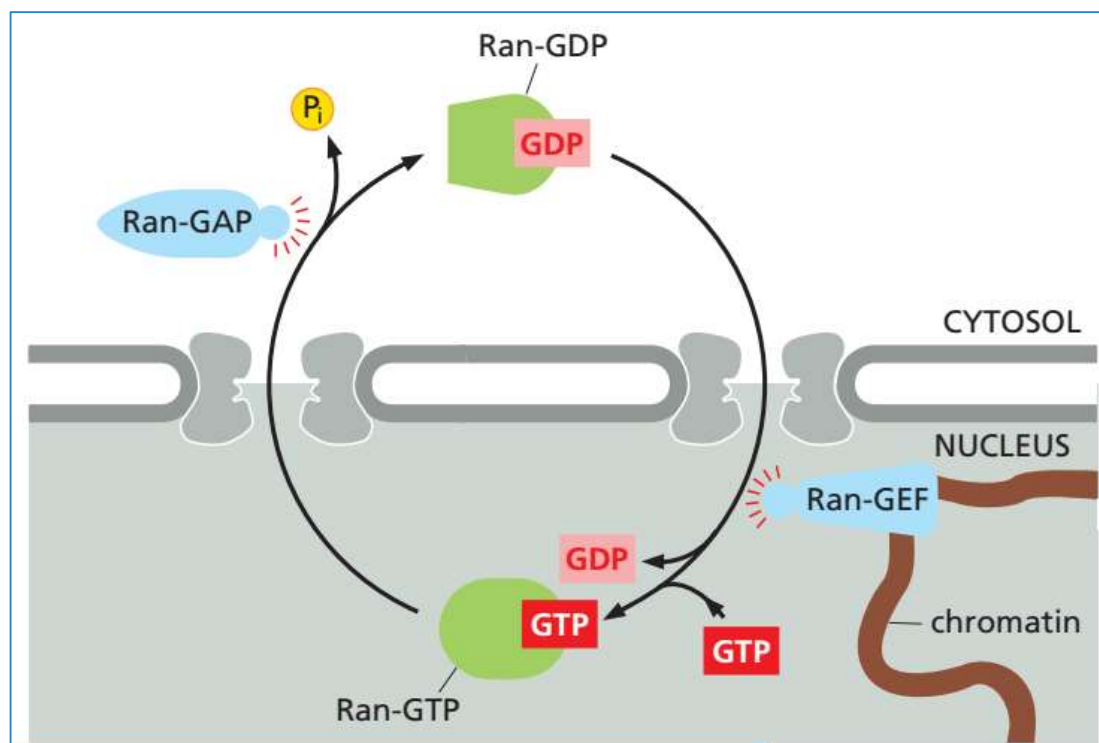
Jaderný export funguje jako import, ale obráceně

- ▶ Důležité **jaderné exportní signály** na proteinech a jaderné exportní receptory neboli **exportiny**.
 - ▶ Exportiny se váží jak na exportní signál, tak i na proteiny, a směřují cargo skrz NPC do cytosolu.
 - ▶ Strukturálně příbuzné s importiny, kódovány stejnou genovou rodinou **jaderných transportních receptorů**.



Ran GTPáza určuje směr transportu skrz NPC

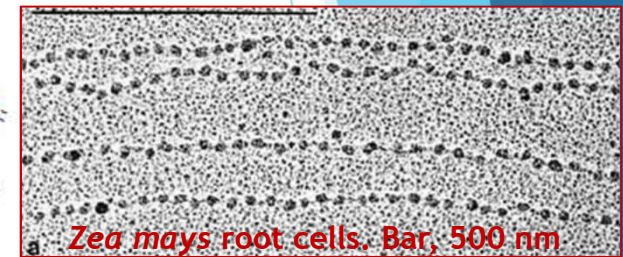
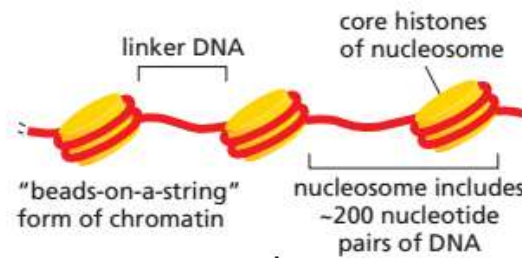
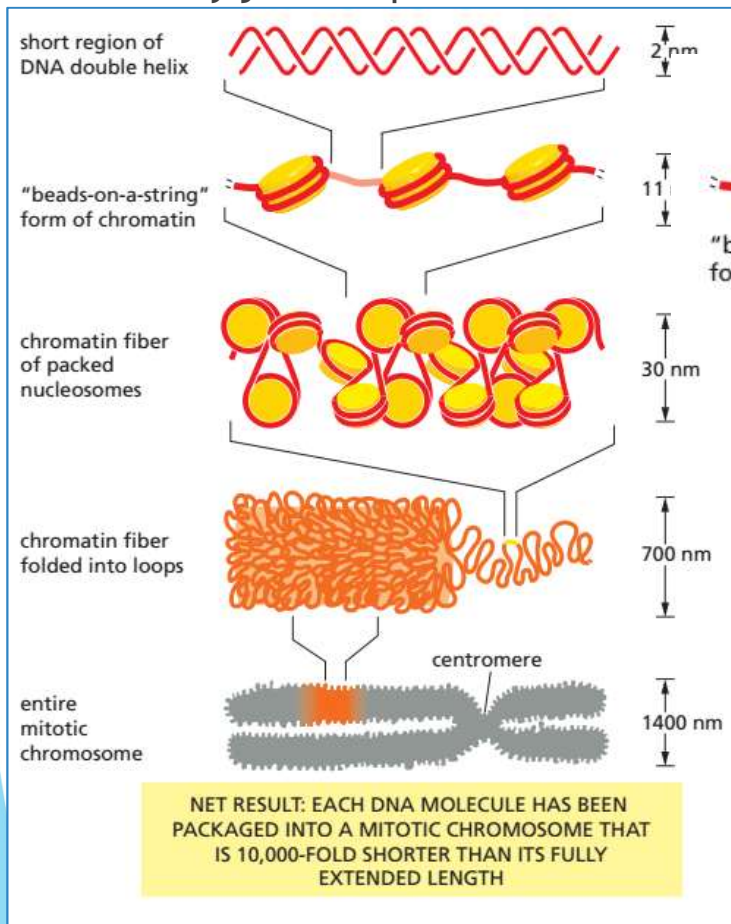
- ▶ Jaderný import i export proteinů prostřednictvím NPC vyžaduje energii uloženou v koncentračním gradientu GTP-vázané formy monomerní GTPázy Ran.
- ▶ Ran (GTPáza) je molekulární přepínač (*molecular switch*), který může existovat ve dvou konformačních stavech: **GTP nebo GDP vázaný**
- ▶ Dva regulační proteiny specifické pro Ran spouštějí konverzi mezi dvěma stavy:
 - ▶ **GTPase activating protein (GAP)** spouští hydrolyzu GTP
 - ▶ **guanine exchange factor (GEF)** podporuje výměnu GDP za GTP



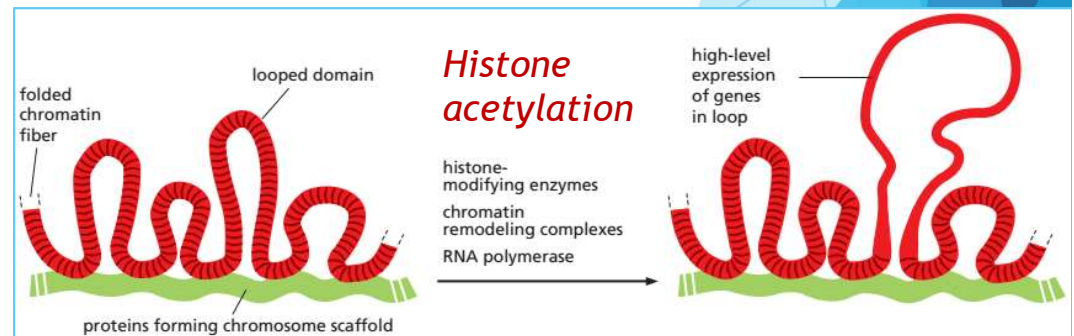
- ▶ **Ran-GAP** se nachází v cytosolu a je importován do jádra vlastním receptorem
- ▶ **Ran-GEF** se nachází v jádře, kde je ukotven ke chromatinu

Morfologie chromatinu

- ▶ Molekuly DNA jsou vysoce kondenzované v **chromozomech**.
- ▶ **Chromatin** je komplex proteinů a nukleární DNA, v eukaryotických buňkách.
- ▶ Proteiny, které se váží na DNA za vzniku chromozomů, se dělí do dvou tříd: **histony a nehistonové proteiny** (např. replikace DNA, oprava DNA, genová exprese).
- ▶ Histony jsou zodpovědné za základní jednotku balení chromozomů = **nukleozom**.

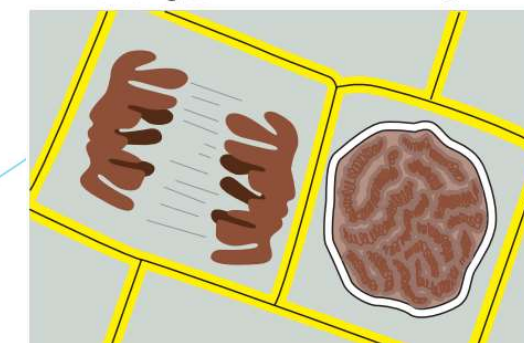
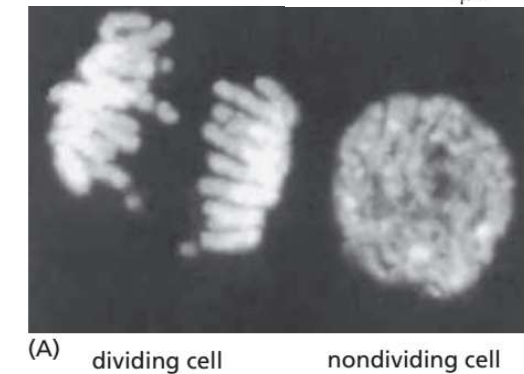
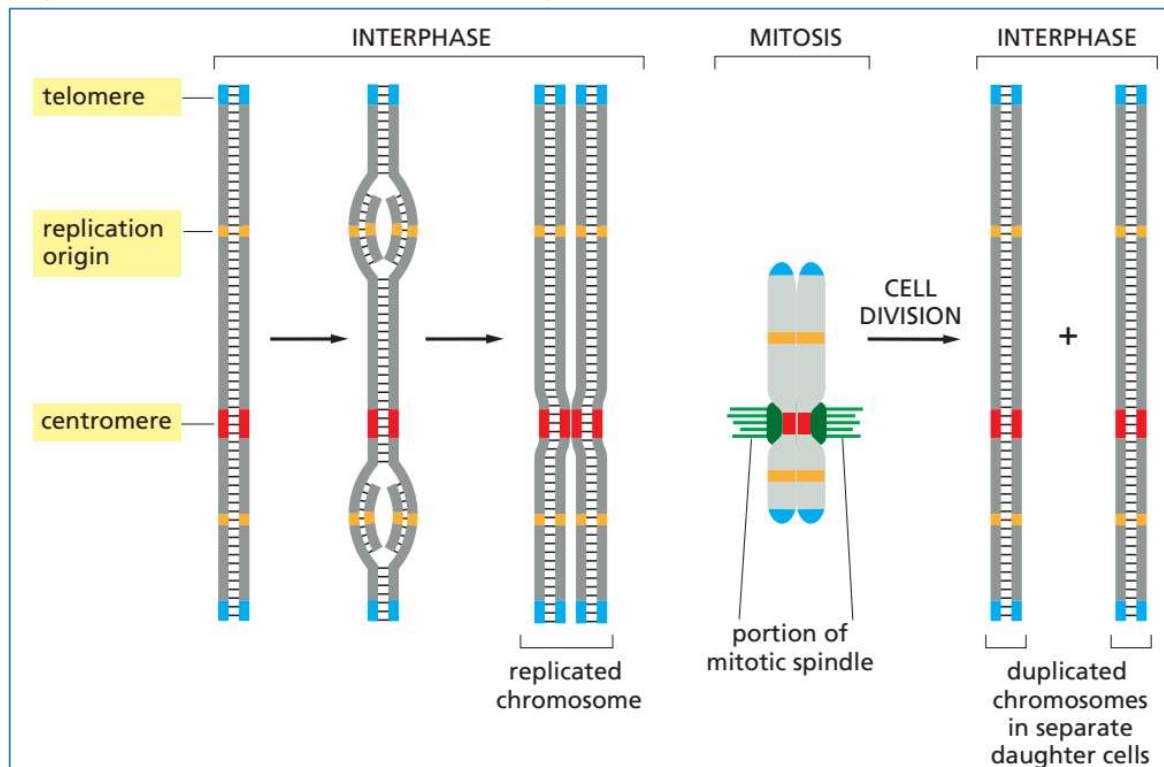
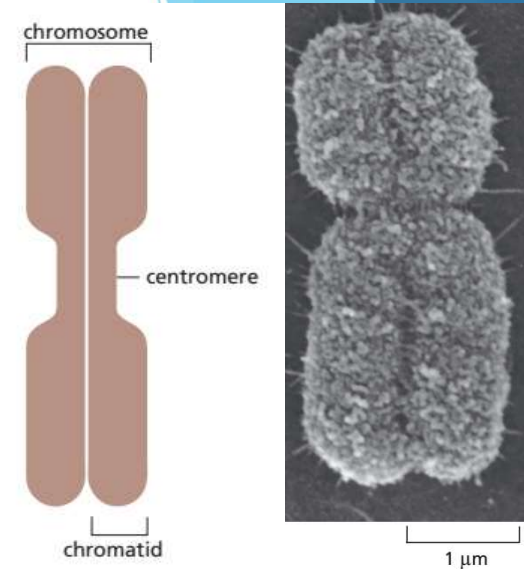


- ▶ Morfologie chromatinu se v průběhu buněčného cyklu mění. V interfazi je chromatin buď
 - ▶ vysoce kondenzovaný = **heterochromatin**,
 - ▶ méně kondenzovaný zbytek je **euchromatin**.



Eukaryotická DNA je zbalena do chromozomů

- ▶ Každý chromozom v eukaryotické buňce se skládá z **jediné**, enormně dlouhé lineární molekuly DNA a proteinů.
- ▶ Chromozomy nesou geny (kódující sekvence = exony; introny).
- ▶ Každý lineární chromozom má **centromeru** a **dvě telomery**.
- ▶ Během interfáze se chromozomy replikují, přičemž dvě repliky zůstávají pohromadě jako pár **sesterských chromatid**.
- ▶ Vysoce kondenzované chromozomy v dělicí se buňce jsou známé jako **mitotické chromozomy**.



Během mitózy se jaderný obal rozpadá

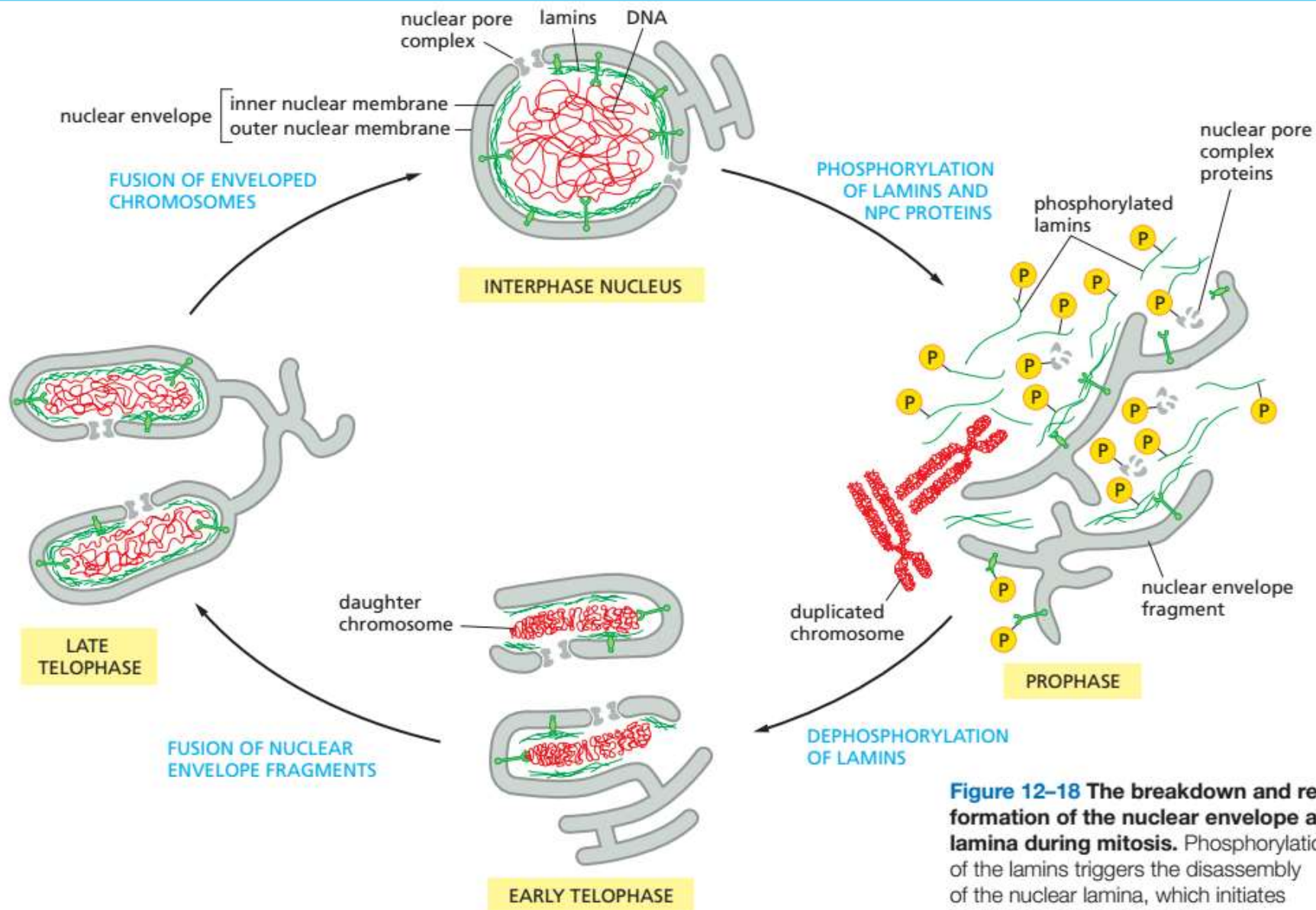
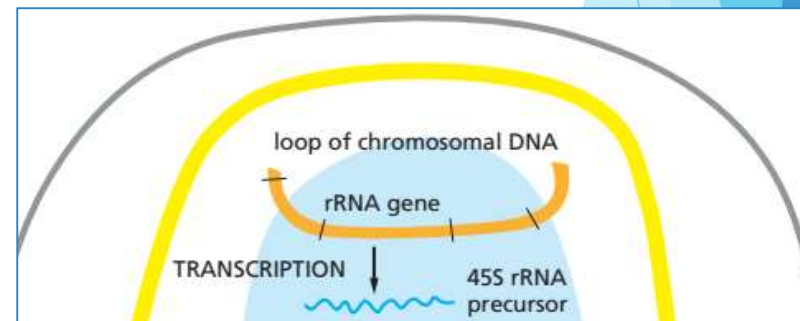
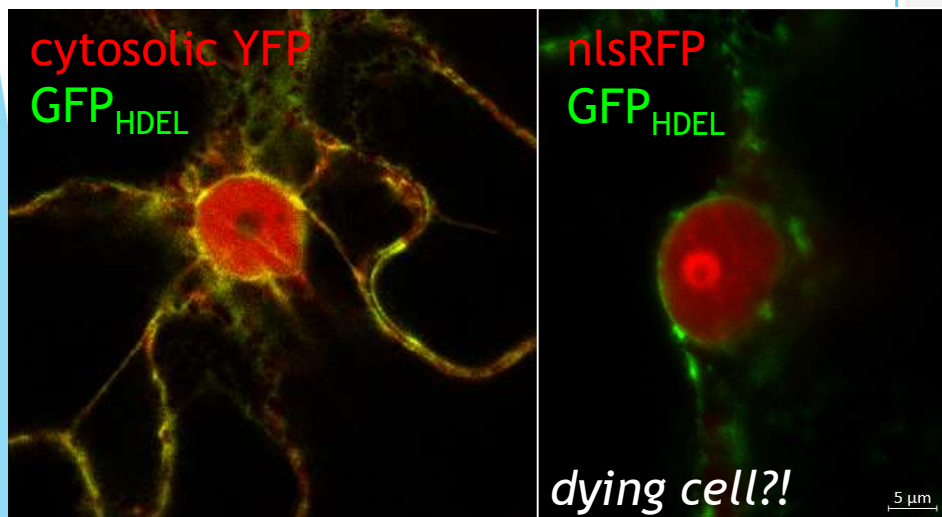
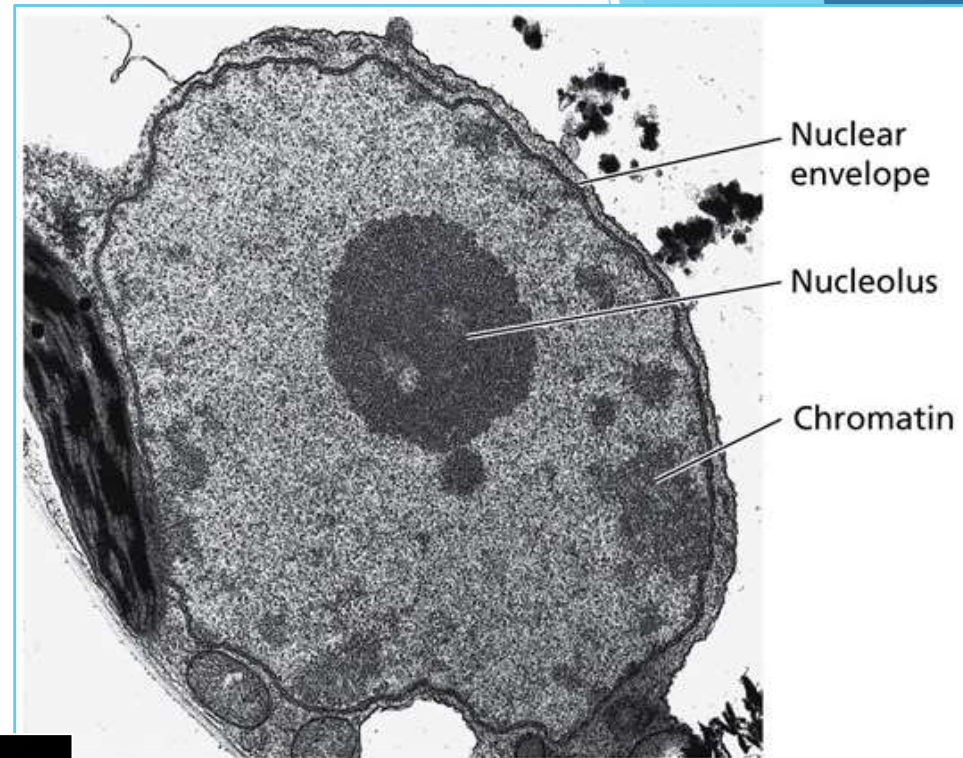


Figure 12-18 The breakdown and re-formation of the nuclear envelope and lamina during mitosis. Phosphorylation of the lamins triggers the disassembly of the nuclear lamina, which initiates the nuclear envelope to break up.

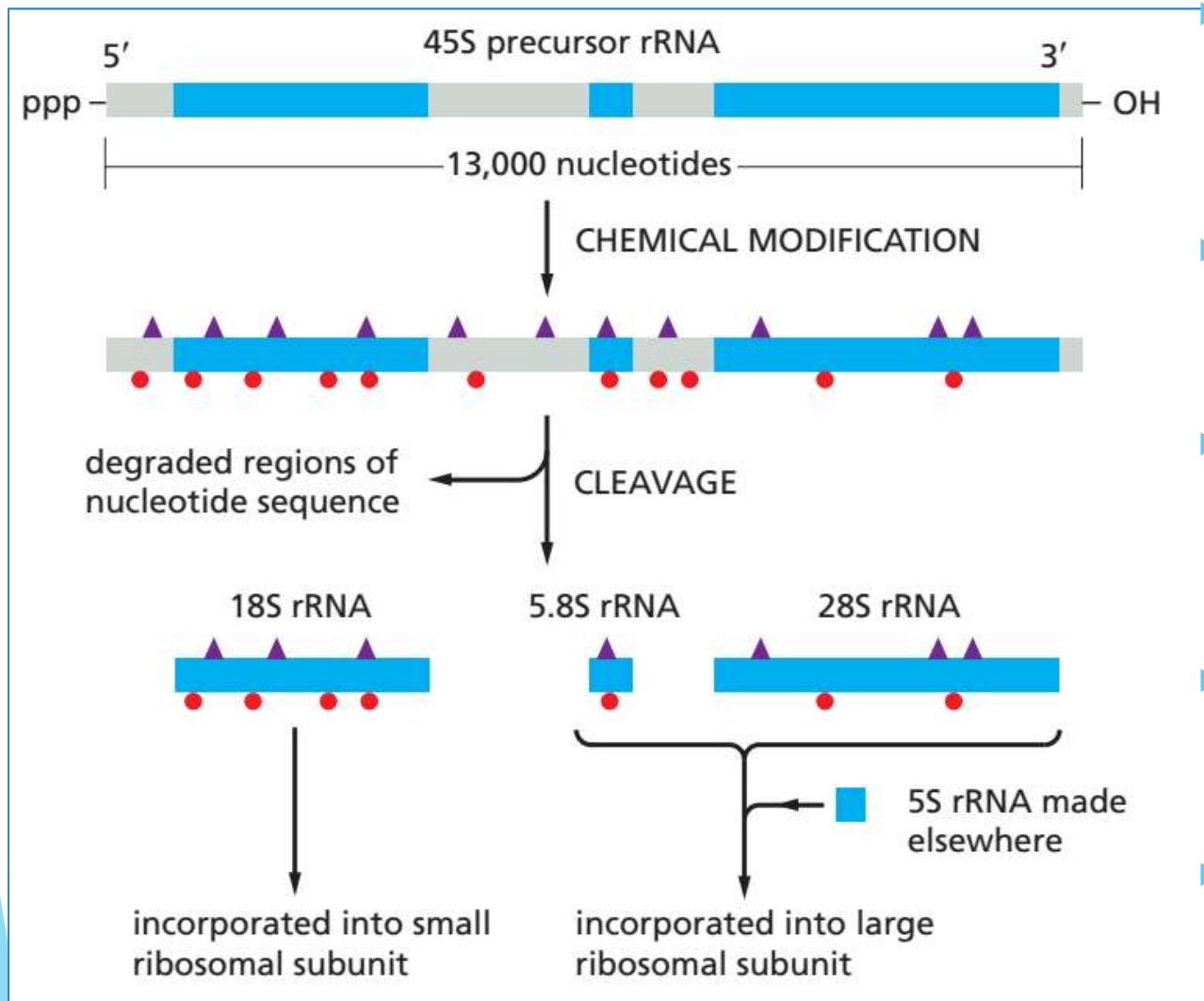
Jadérko je továrna na ribozomy

- ▶ Jadérko je místo pro zpracování rRNA molekul a jejich seskupení spolu s polypeptidy, které pocházejí z cytoplazmy, do ribozomů.
- ▶ **Ribozom** je velký komplex složený ze dvou třetin RNA a jedné třetiny proteinu. *rRNAs jsou zodpovědné za celkovou strukturu ribozomu!*
- ▶ Jadérko není obklopeno membránou.
- ▶ Jadérko se vytváří na konci mitózy a v profázi opět mizí.



- ▶ Mnoho kopií ribozomálních genů (geny rRNA) sídlí v shluku chromozomální DNA, známém jako **organizátor jadérka**.

Zpracování 45S rRNA prekurzoru na tři samostatné rRNA



Každý gen rRNA produkuje stejný primární transkript, **prekurzor 45S rRNA**, jeho štěpením se získá 1 kopie každé rRNA: 28S, 18S a 5,8S.

Tvorba ribozomů vyžaduje čtvrtou rRNA, 5S rRNA, transkribovanou mimo jádérko a importovanou.

Transkripty 28S, 5.8S a 5S se kombinují s asi 50 polypeptidy za vzniku **velké ribozomální podjednotky 60S**.

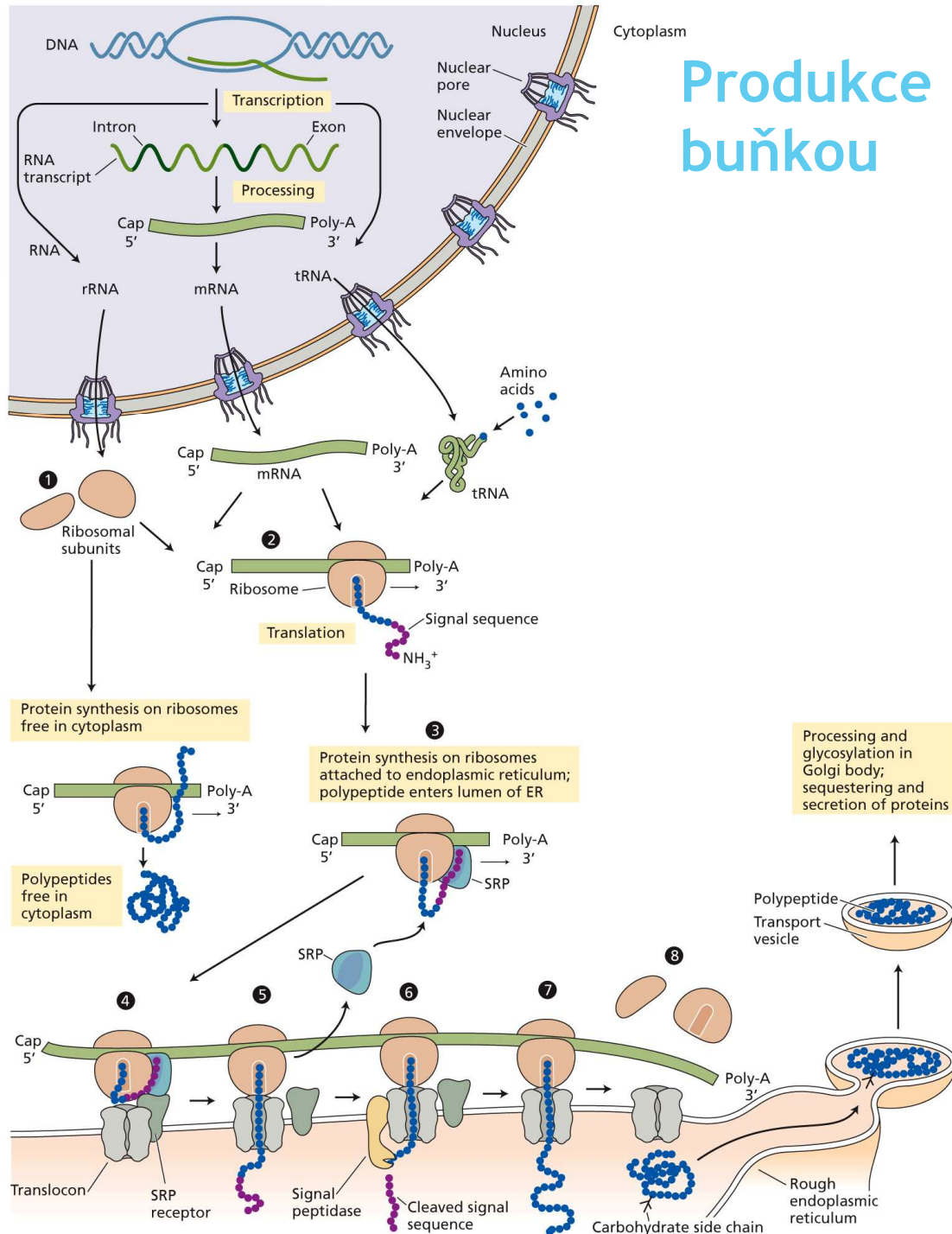
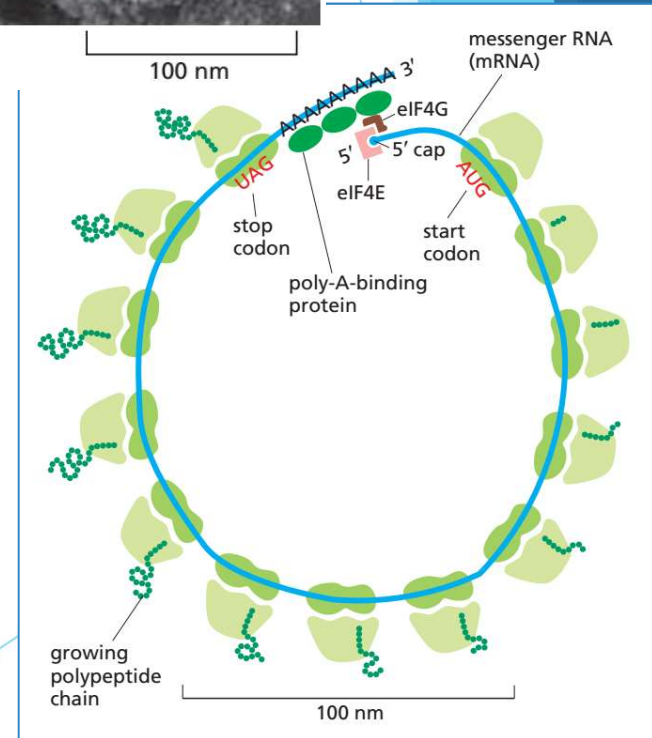
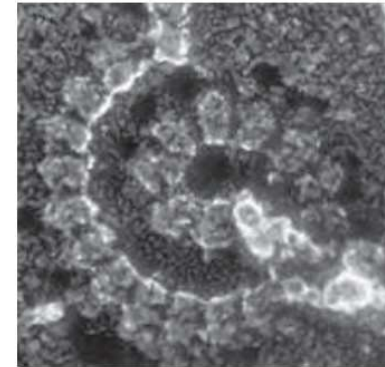
Transkript 18S se spojí s asi 30 polypeptidy za vzniku **malé ribozomální podjednotky 40S**.

60S a 40S jsou transportovány z jádra. Poslední krok, který dokončuje **ribozom 80S**, se odehrává v cytoplazmě.

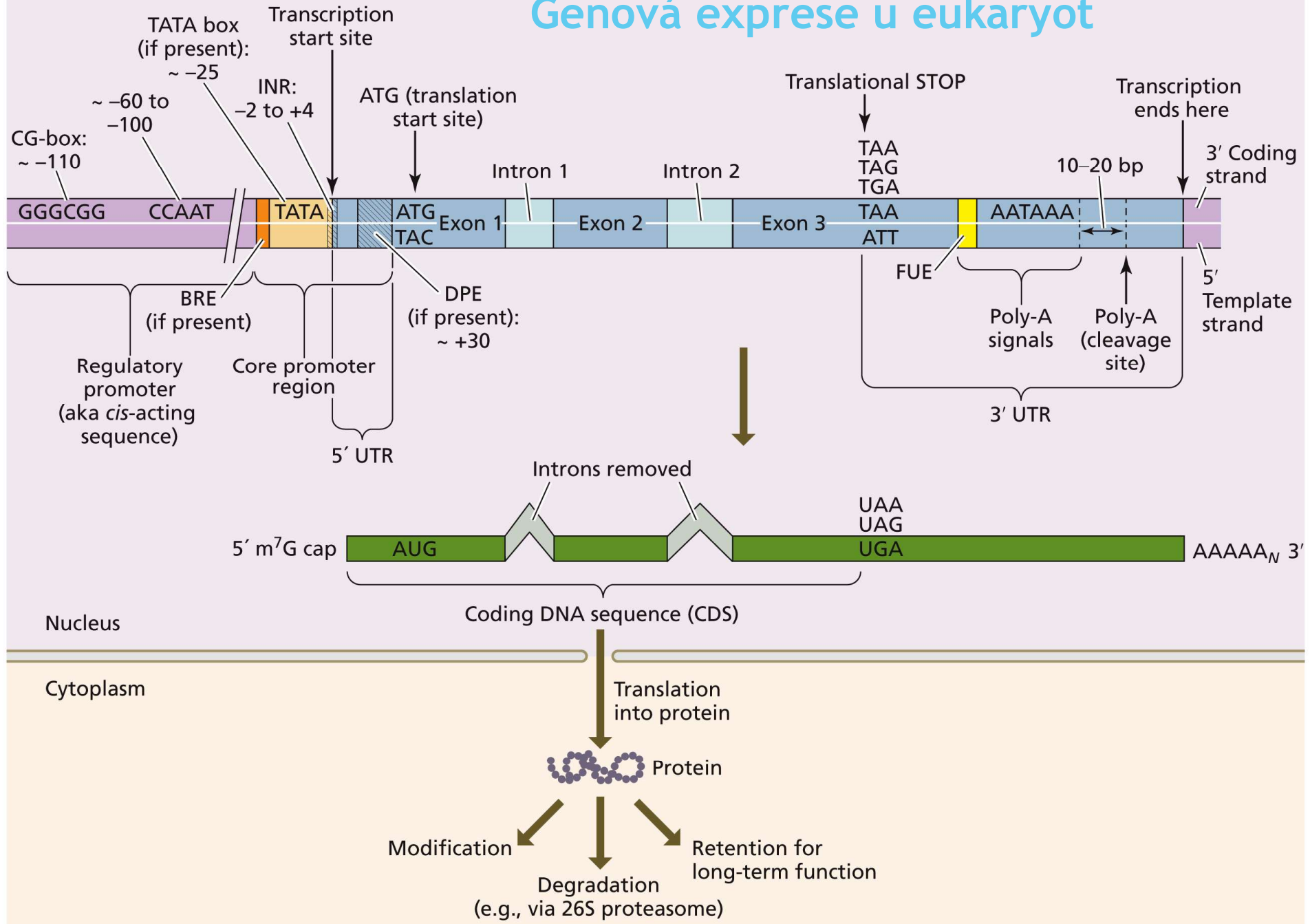
Eukaryotická buňka musí syntetizovat asi 10 milionů kopií každé molekuly rRNA, aby vytvořila 10 milionů ribozomů, které bude během svého života potřebovat.

Produkce proteinů eukaryotickou buňkou

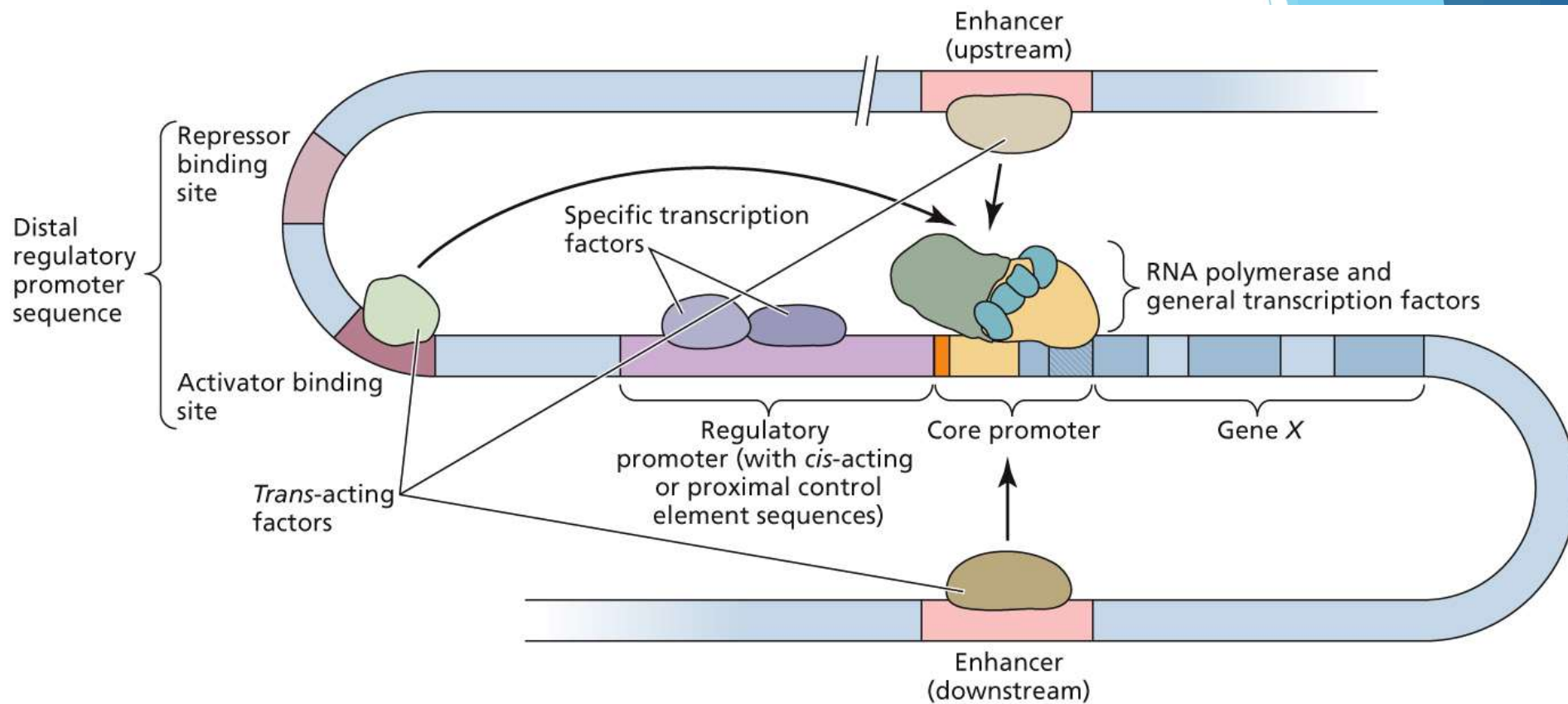
- **Polyribozom:** série ribozomů, které simultánně překládají stejnou eukaryotickou molekulu mRNA vysoce exprimovaných genů.



Genová exprese u eukaryot

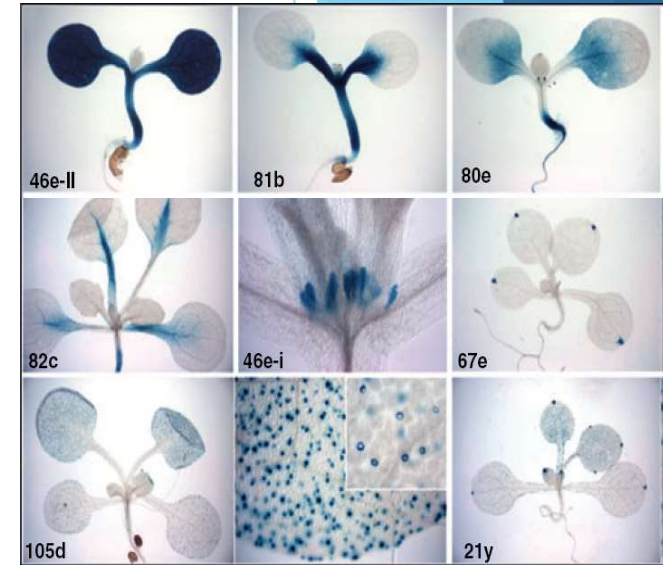
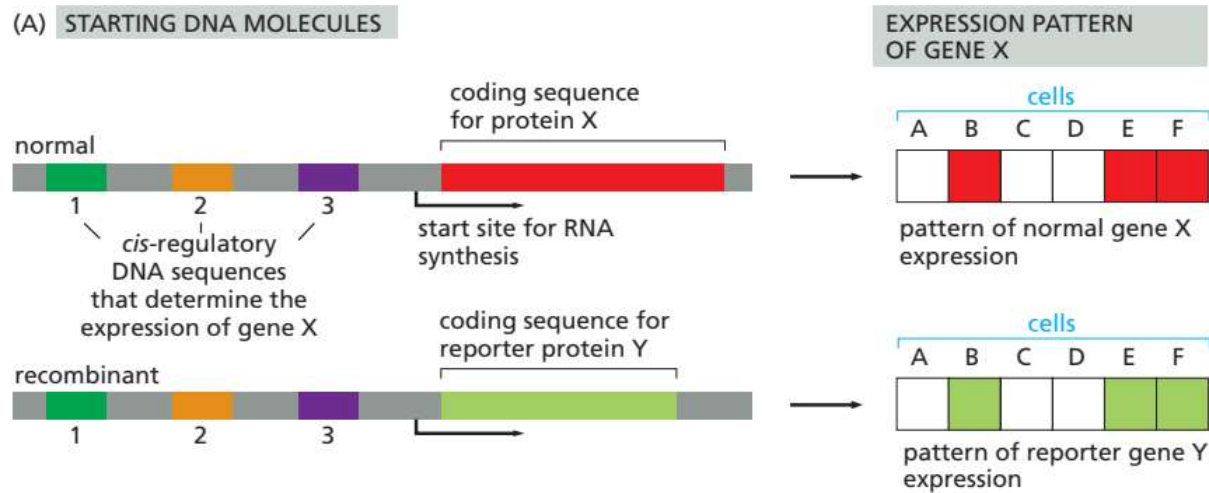


Regulace transkripce regulačními promotorovými sekvencemi, enhancery a *trans*-regulačními faktory



Reportérové geny odhalují, KDY a KDE je gen exprimován a to je dáno promotorem

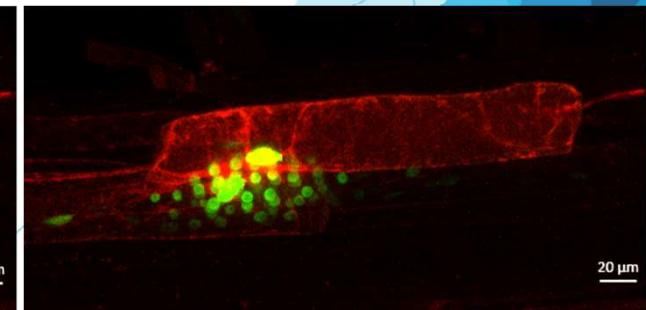
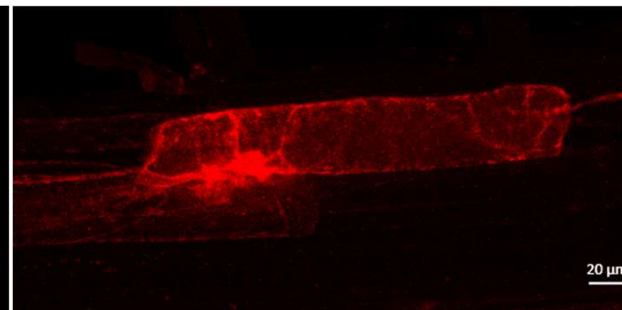
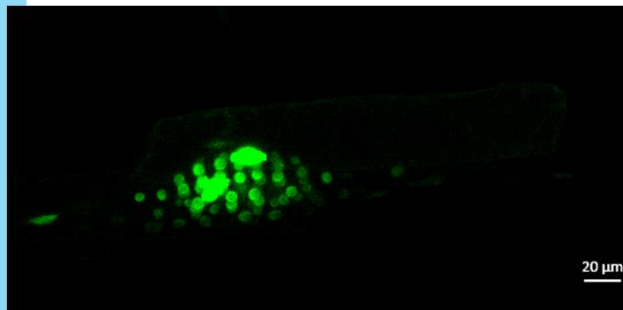
- ▶ Fluorescenční proteiny (např. GFP, RFP), GUS (β -glucuronidase, *uidA*)



- ▶ Transcripční vs translační fúze s FP

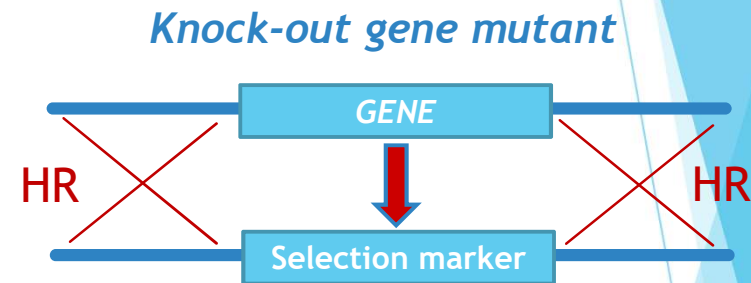
- ▶ Promotor + FP

- ▶ Promotor + *GENE* + FP



Homologní rekombinace jako nástroj pro studium genů

- ▶ Homologní rekombinace, integrace T-DNA molekuly do homologní sekvence genomové DNA, má mnoho možných aplikací pro manipulaci genů
 - ▶ Nevyskytuje se u krytosemenných rostlin.... (náhodná interace T-DNA do genomu!)
 - ▶ Popsána u mechu *Physcomitrella patens* (genetický model), kvasinek, hub, bakterií

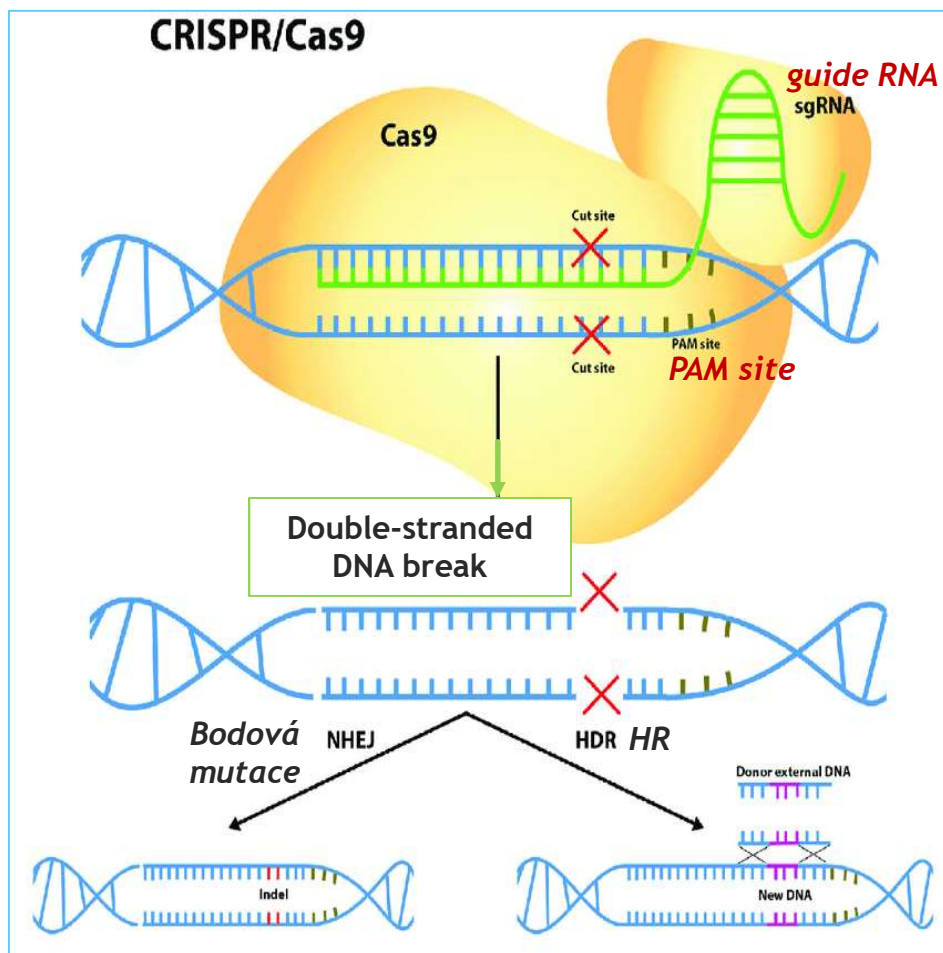


Δku70 ~ lacks gene (Ku70) involved in the non-homologous DNA end-joining pathway NHEJ

- ▶ V rostlinách se mohou exprimovat hybridní nukleázy, které generují místně-specifické stěpení obou řetzců genomové DNA (*site-directed mutagenesis*)
 - ▶ Výměna cílové sekvence DNA ~ *knock-in mutant*
 - ▶ Narušení čtecího rámce (open reading frame, ORF) ~ *knock-out mutant*
- ▶ Používají se specifické enzymy, např. ZNF (zinc-finger nuclease), TALEN (transcriptional activator-like effector nuclease)

Bakteriální systém CRISPR/Cas9 byl přizpůsoben k editaci genomu různých druhů ~ *genetické nůžky*

- ▶ Schopnost Cas9 (nukleáza) zacílit specifické místo genomové DNA
 - ▶ 2020 Nobelova cena za chemii udělena E. Charpentier a J. Doudna



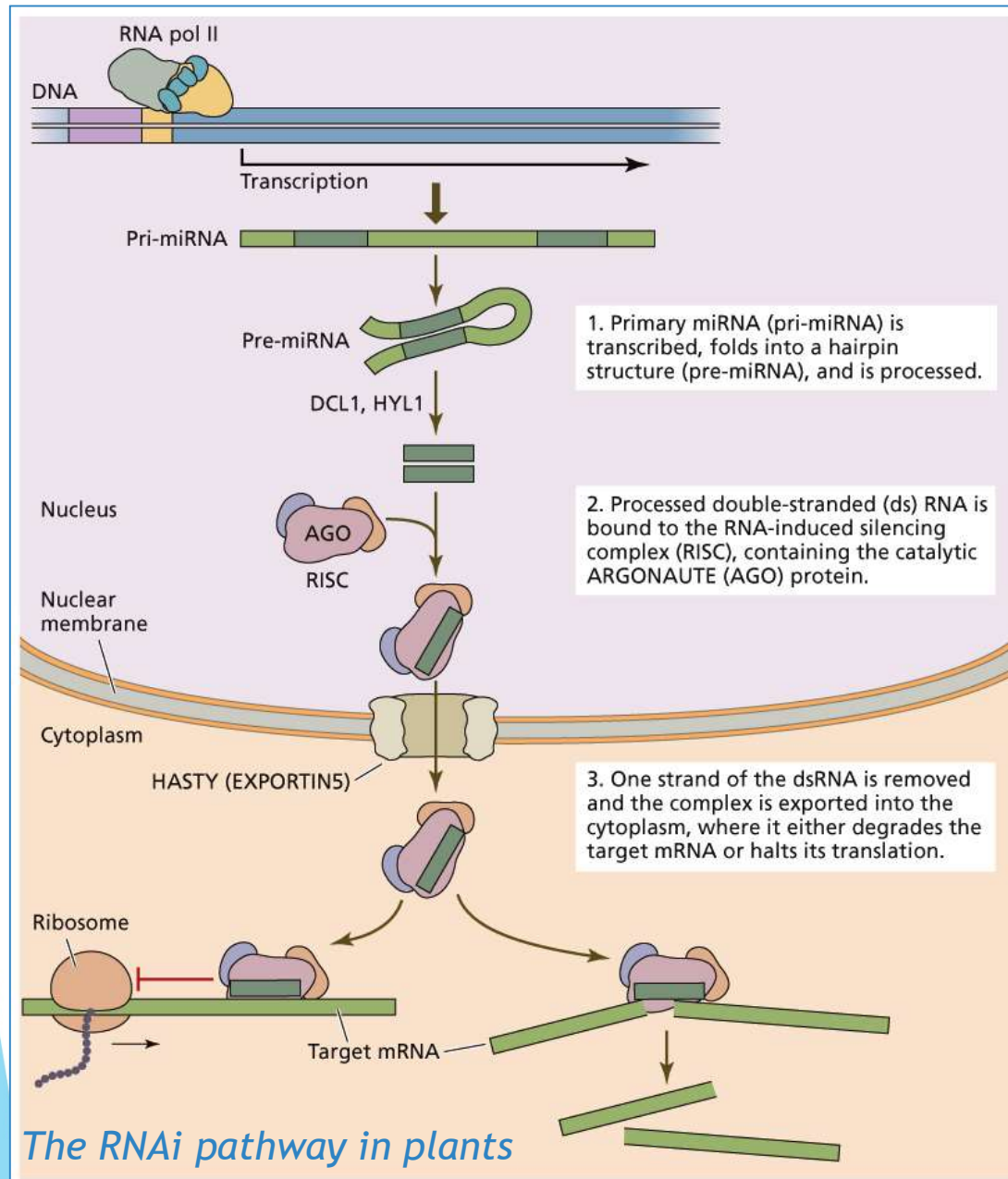
- ▶ Příklad použití CRISPR/Cas9
 - ▶ narušení ORF a vytvoření KO „knock-out“ mutanta



CRISPR:
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

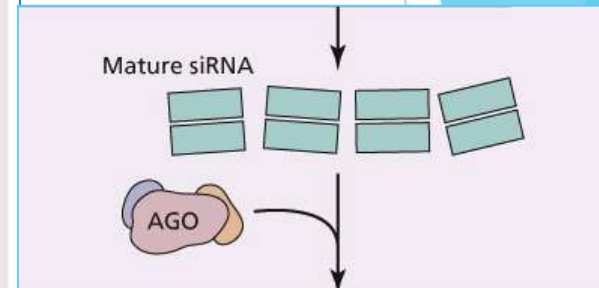
https://www.youtube.com/watch?v=4YKFw2KZA5o&ab_channel=naturevideo

RNA interference (RNAi) se používá k umlčování genů



„knock-down“ mutanti

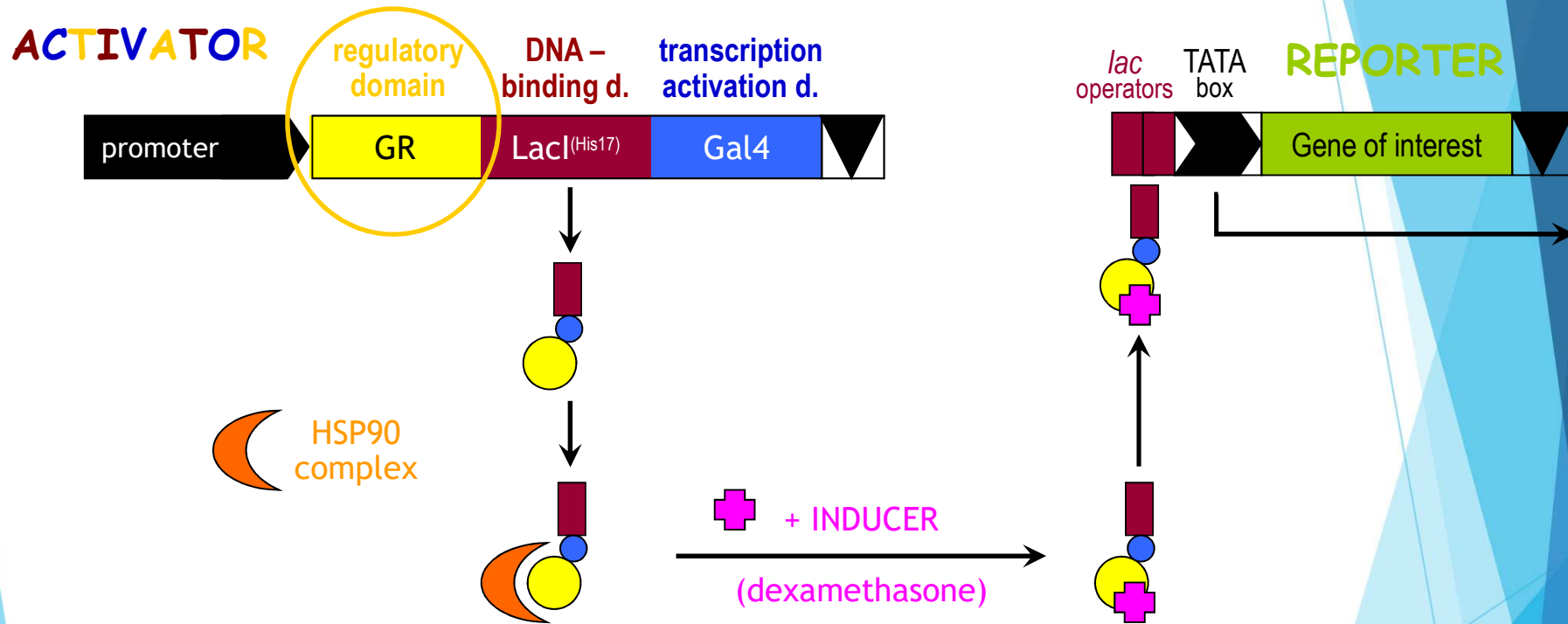
- ▶ short interfering (siRNA) RNAs - exogenous ds RNA



- ▶ micro-RNA (miRNA) - single-stranded RNA
 - ▶ endogenní, z nekódující oblasti RNA
 - ▶ blokuje translaci genu
 - ▶ destabilizuje mRNA
- ▶ artificial micro-RNA (amiRNA)

Chemicky indukovatelná genová exprese

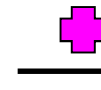
- ▶ Regulovaná genová exprese genu v určitém vývojovém stádiu a po určité době, pomocí chemických induktorů, např. pOp6/LhGR systém



▶ Tkáňově specifické promotory aktivátoru!



X



X

