



CEITEC

Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC



Zelený mimozemšťan - krása a význam molekulární biologie rostlin

Jan Hejátko

Research Group Leader

Brno, Nov 22, 2021



EUROPEAN UNION
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND
INVESTING IN YOUR FUTURE



OP Research and
Development for Innovation

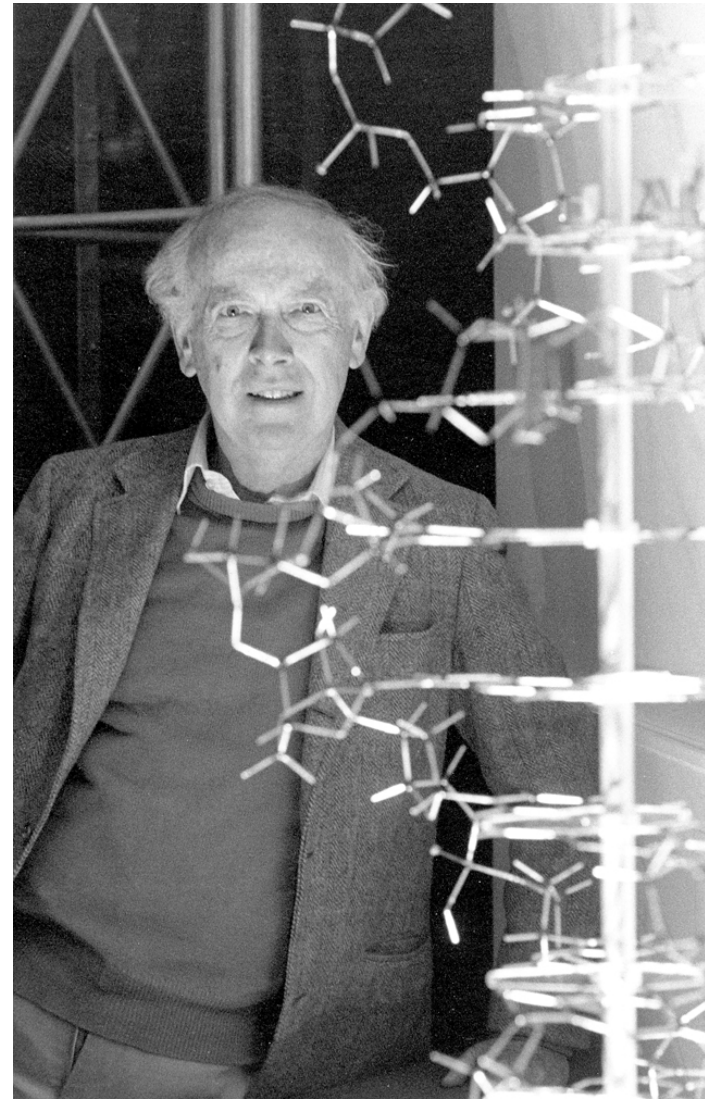


Osnova

- 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

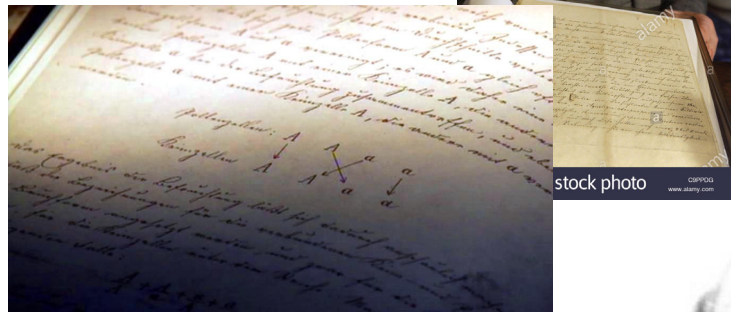
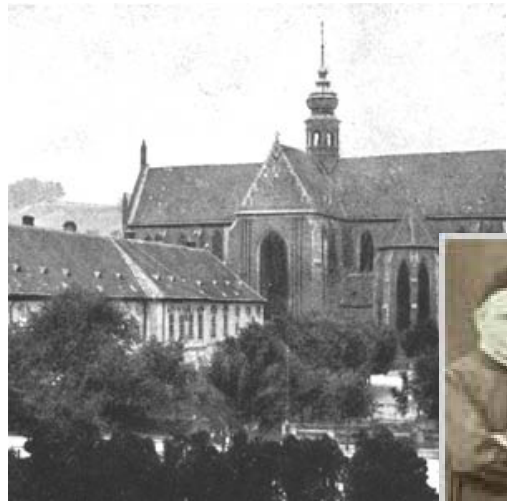


Osnova

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

Klíčové objevy Zákony dědičnosti

■ 1865, Brno



Cyril F. Napp

Ora et Labora

Mendel's legacy
150 years
of the genius of genetics



Klíčové objevy

Objev DNA

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



Johannes Friedrich Miescher

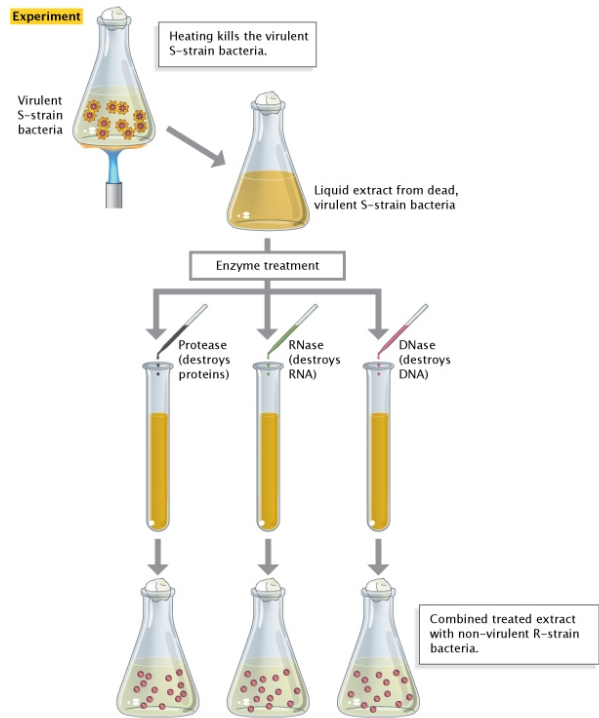


Klíčové objevy

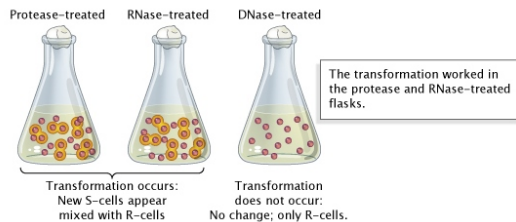
DNA jako nositelka dědičnosti

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

Experiment



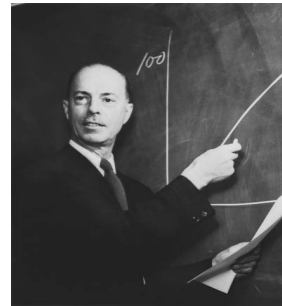
Results



Conclusion DNA is the molecule responsible for transformation.



Oswald Avery

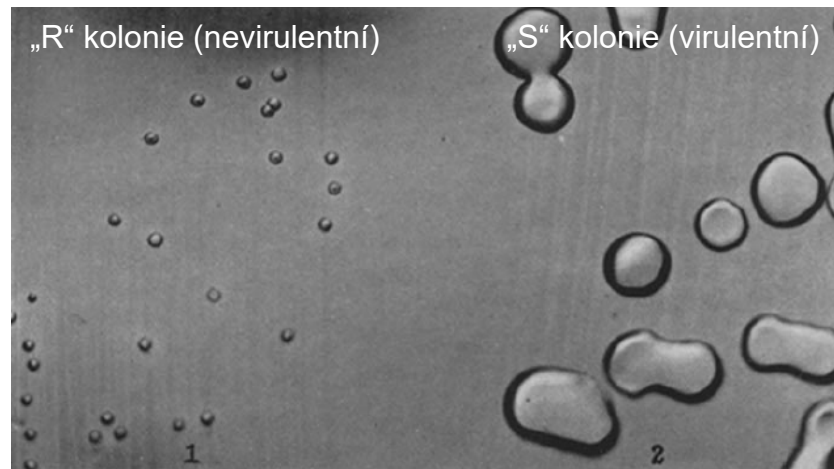


Colin MacLeod



Maclyn McCarty

- 1944, New York



Klíčové objevy

Struktura DNA a genetický kód

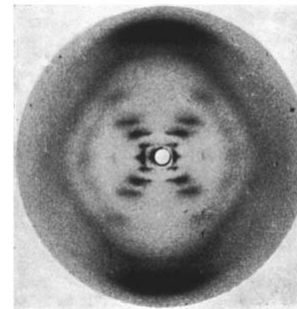
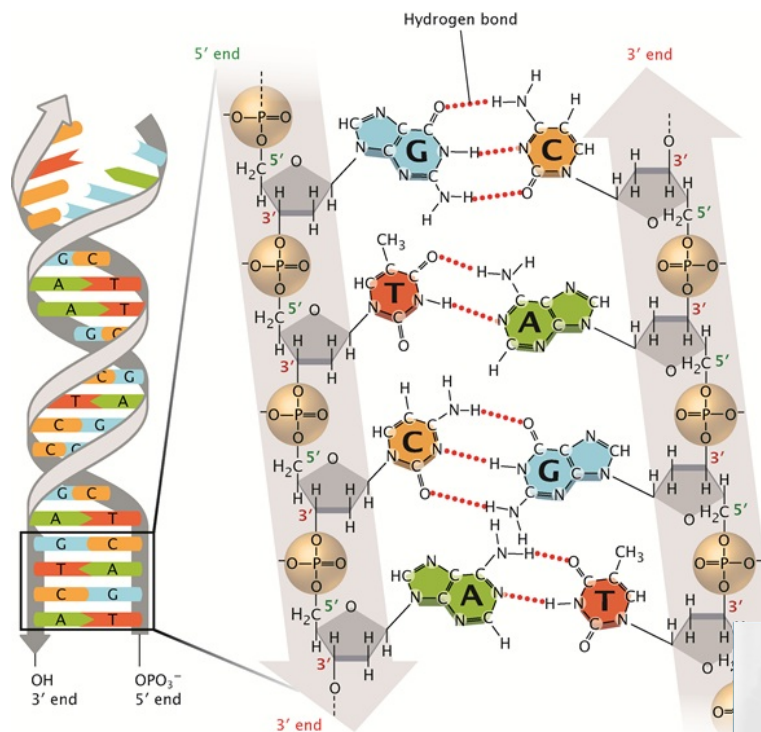
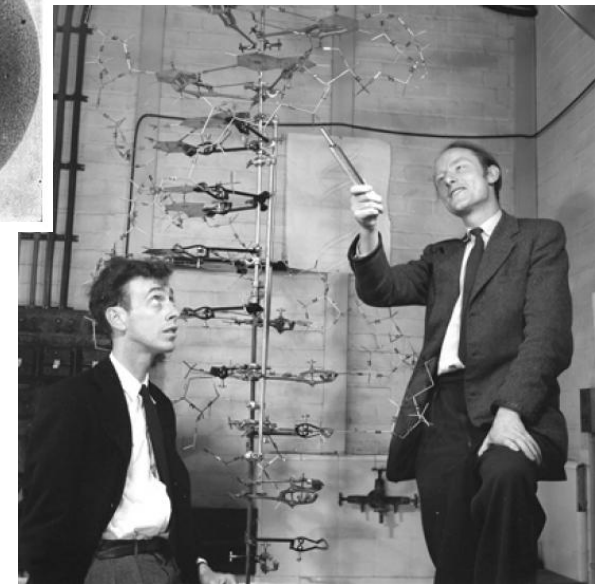
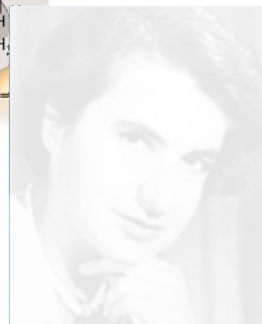


Photo 51



- 1953, Cambridge/London



Rosalind Franklin



James Watson



Francis Crick



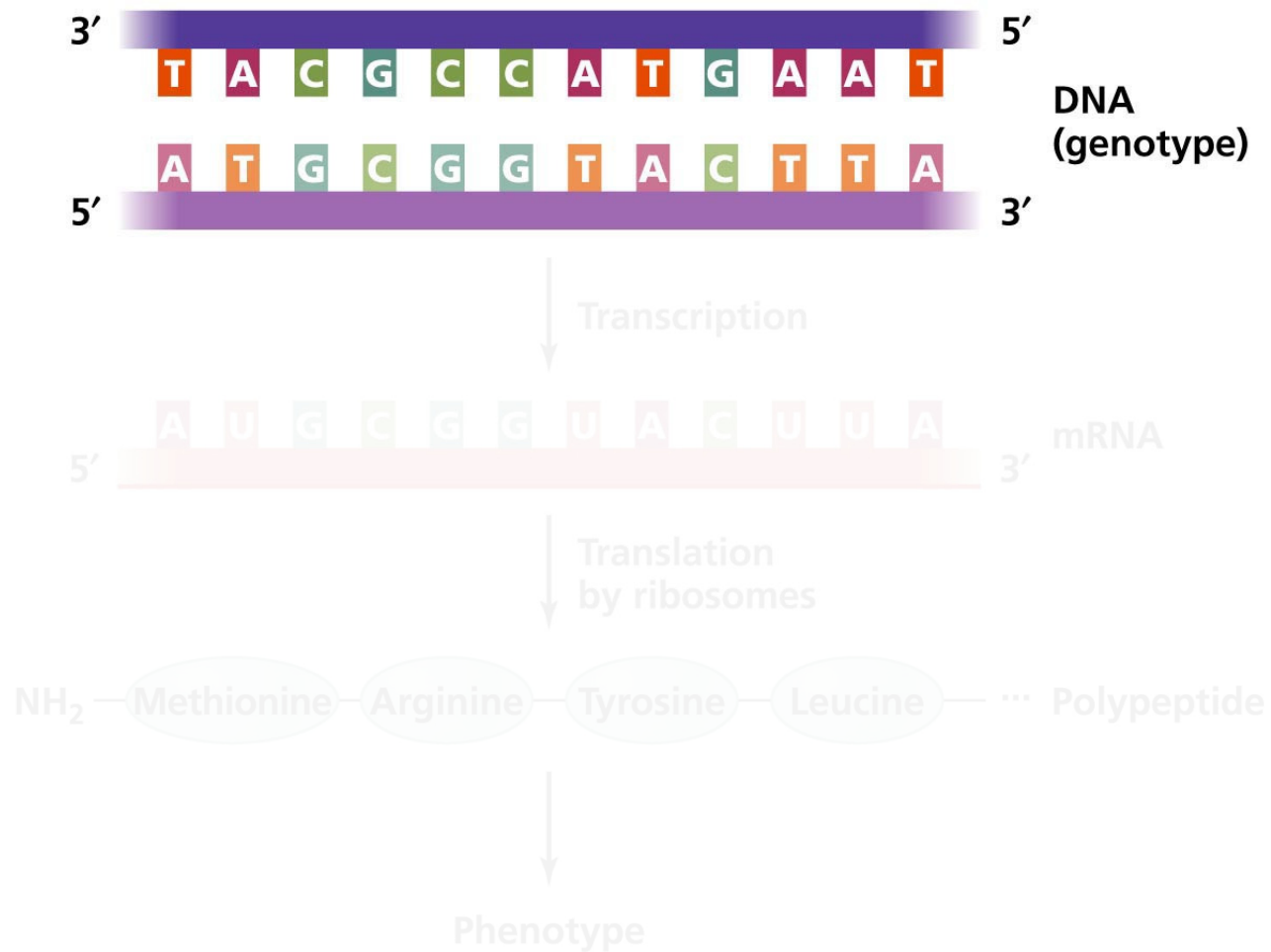
Maurice Wilkins

Osnova

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

Základní pojmy

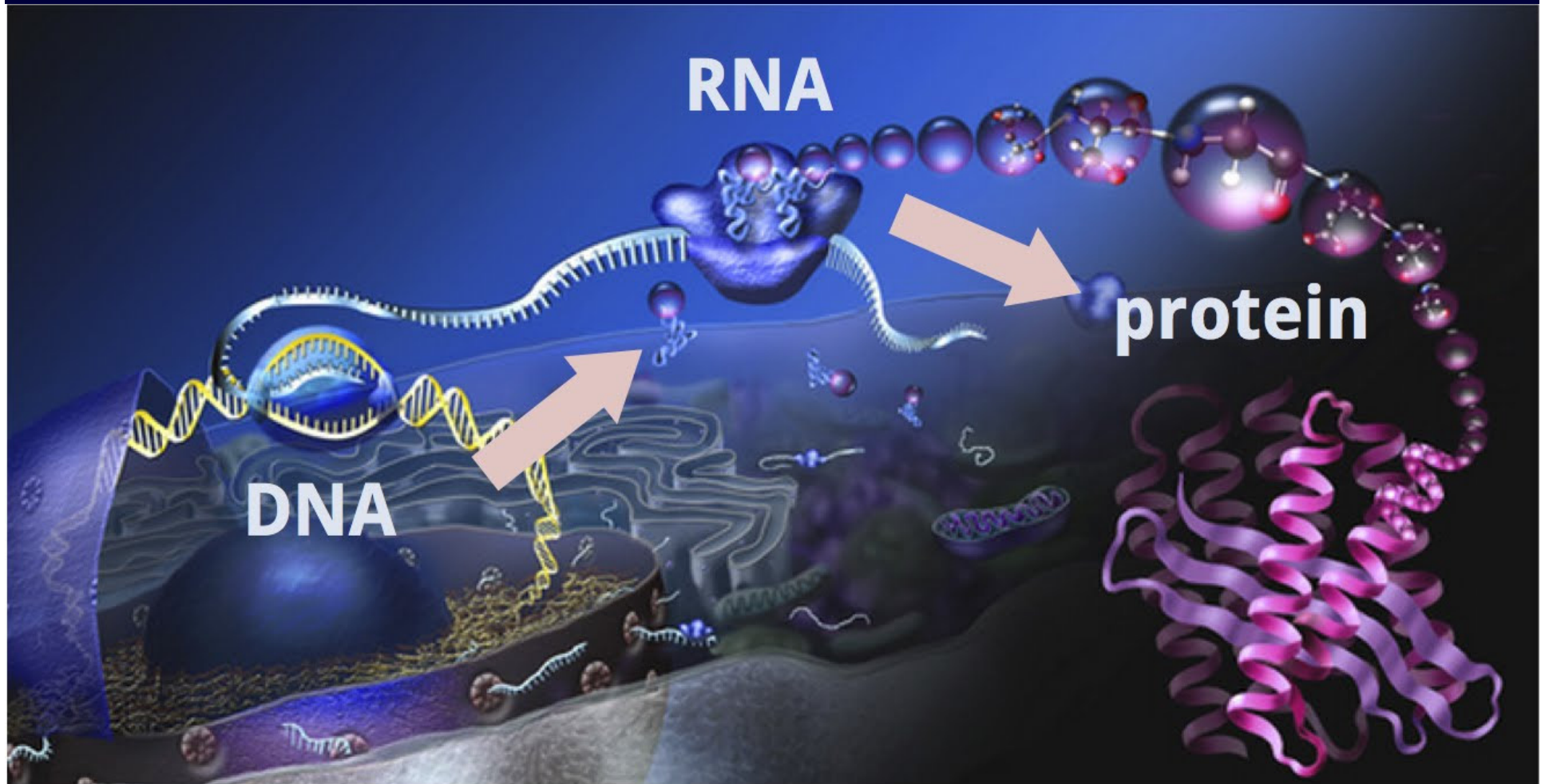
Centrální dogma molekulární biologie



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

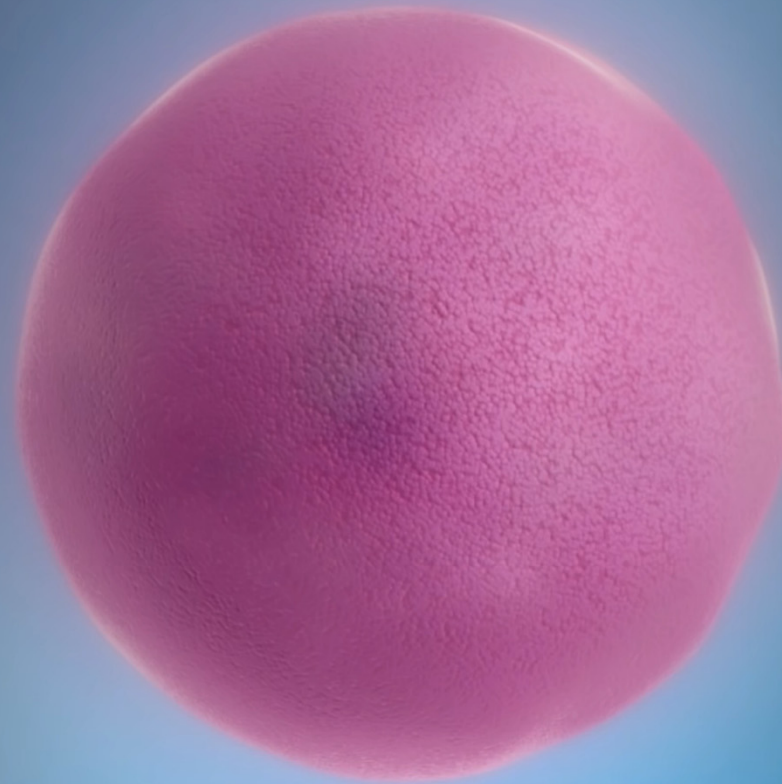
Základní pojmy

Centrální dogma molekulární biologie



Základní pojmy

Centrální dogma molekulární biologie

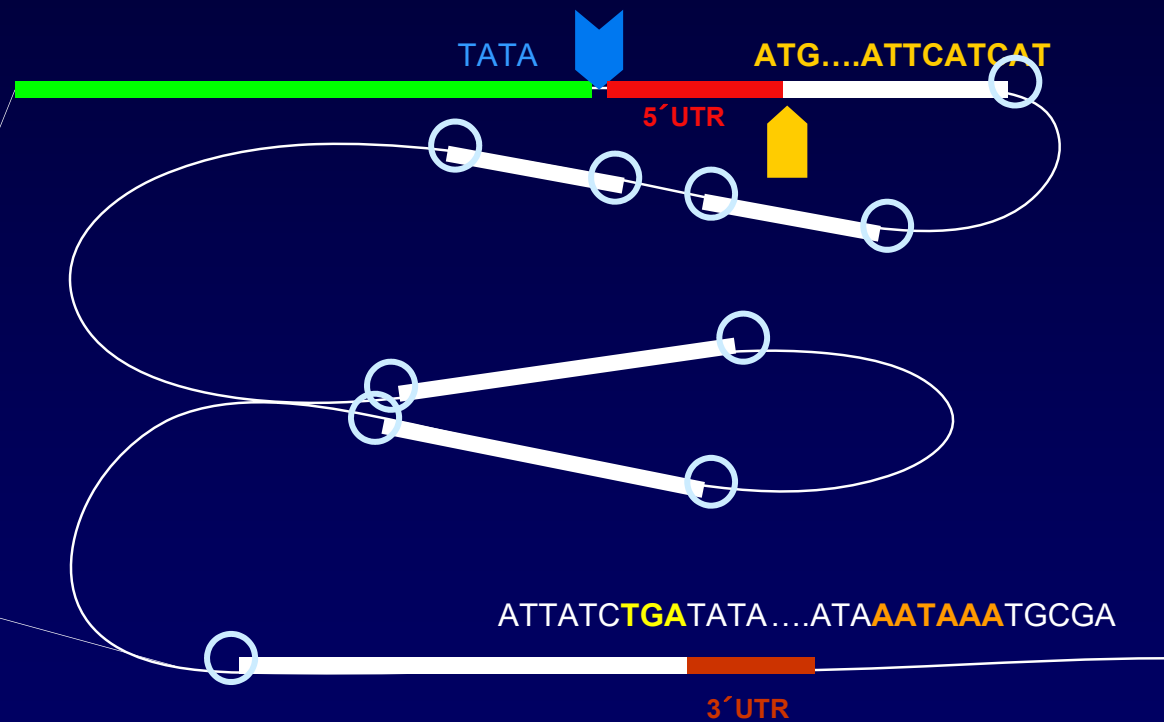


Osnova

- 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

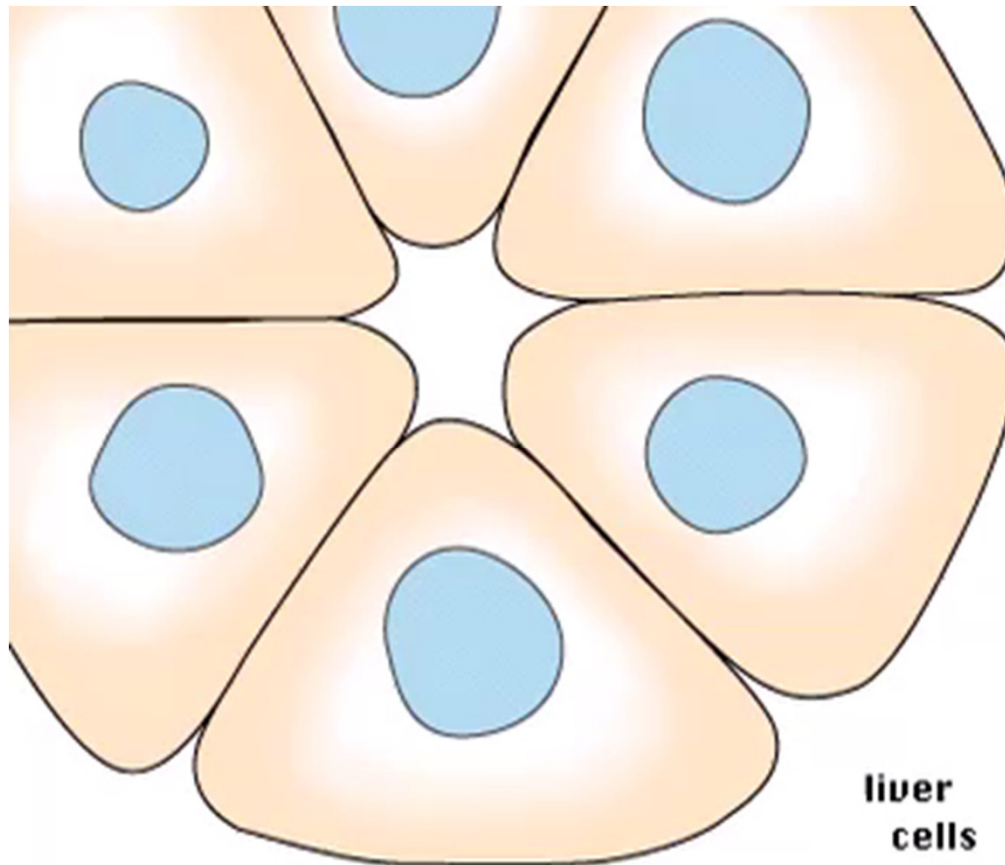
- promotor
- počátek transkripce
- 5' UTR
- počátek translace
- místa sestřihu
- stop kodon
- 3' UTR
- polyadenylační signál



Základní přístupy

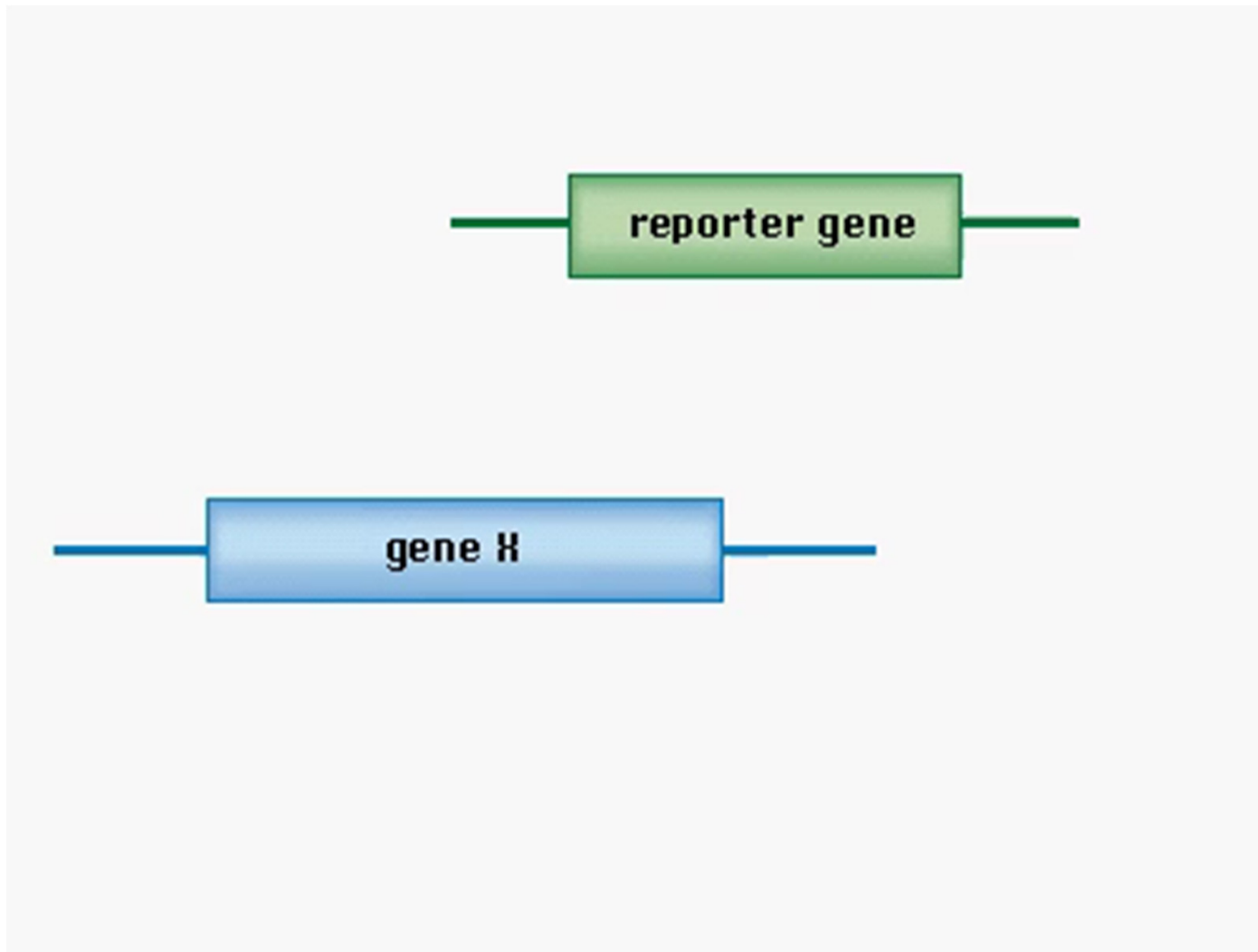
Tkáňově specifická genová exprese

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



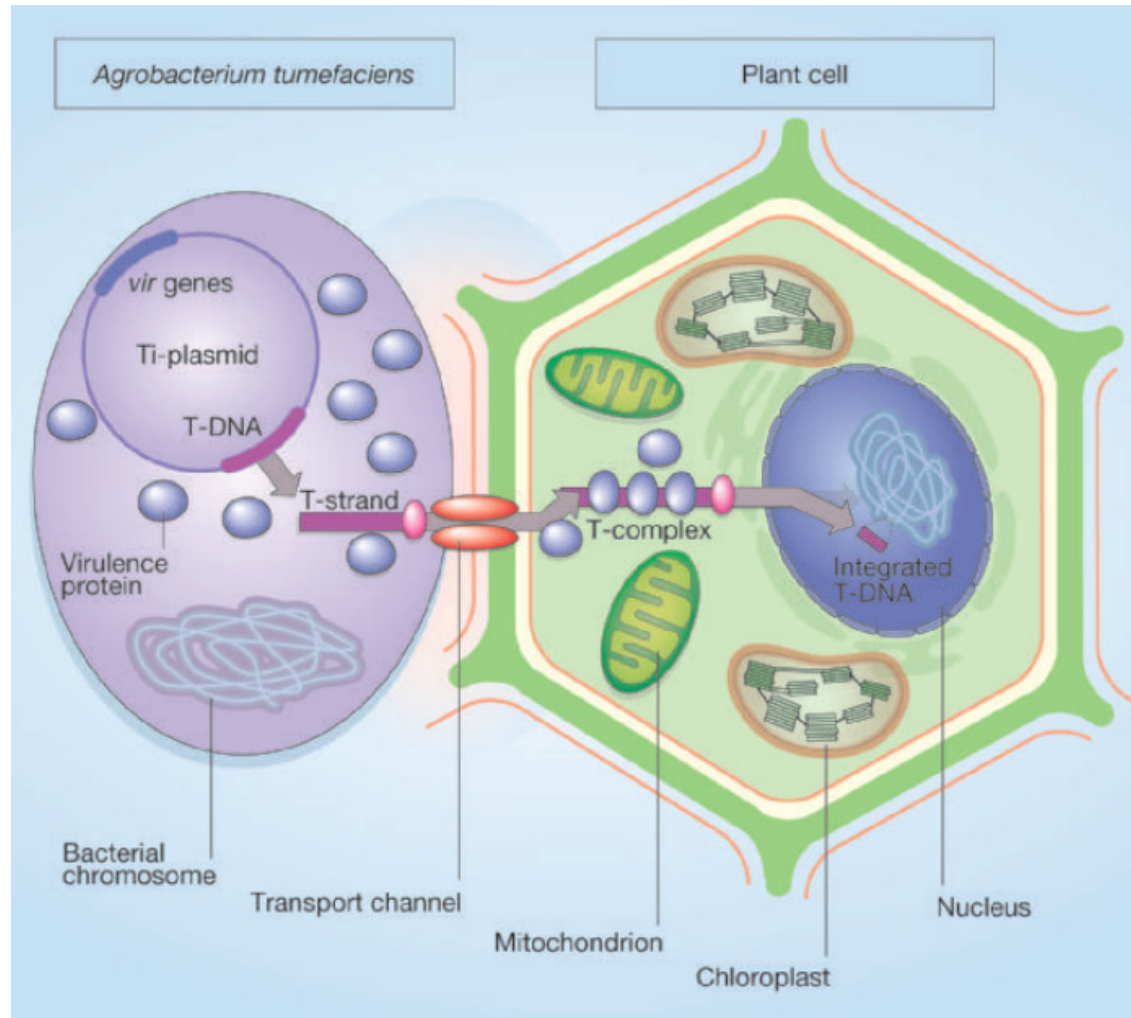
Základní přístupy

Příprava rekombinantní DNA



Základní přístupy

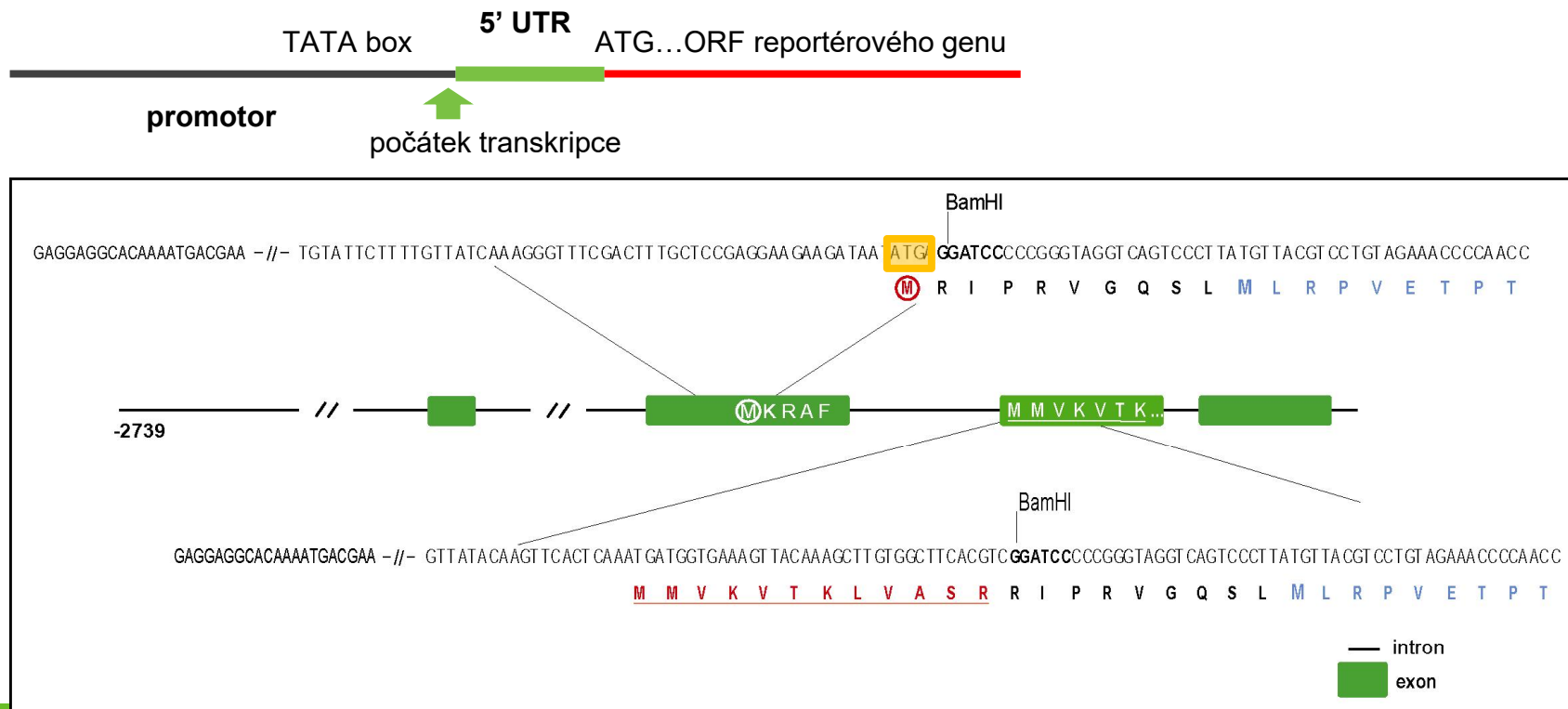
Příprava transgenních rostlin



Gelvin, *Nature*, 2005

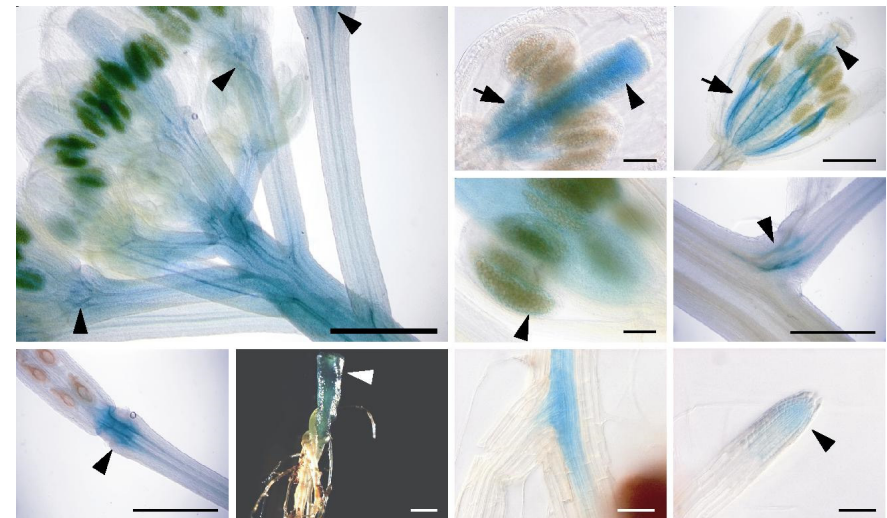
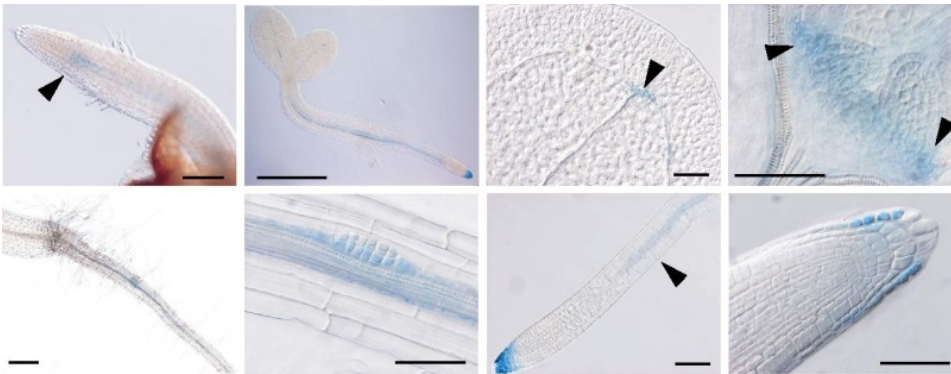
Transkripční fúze

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

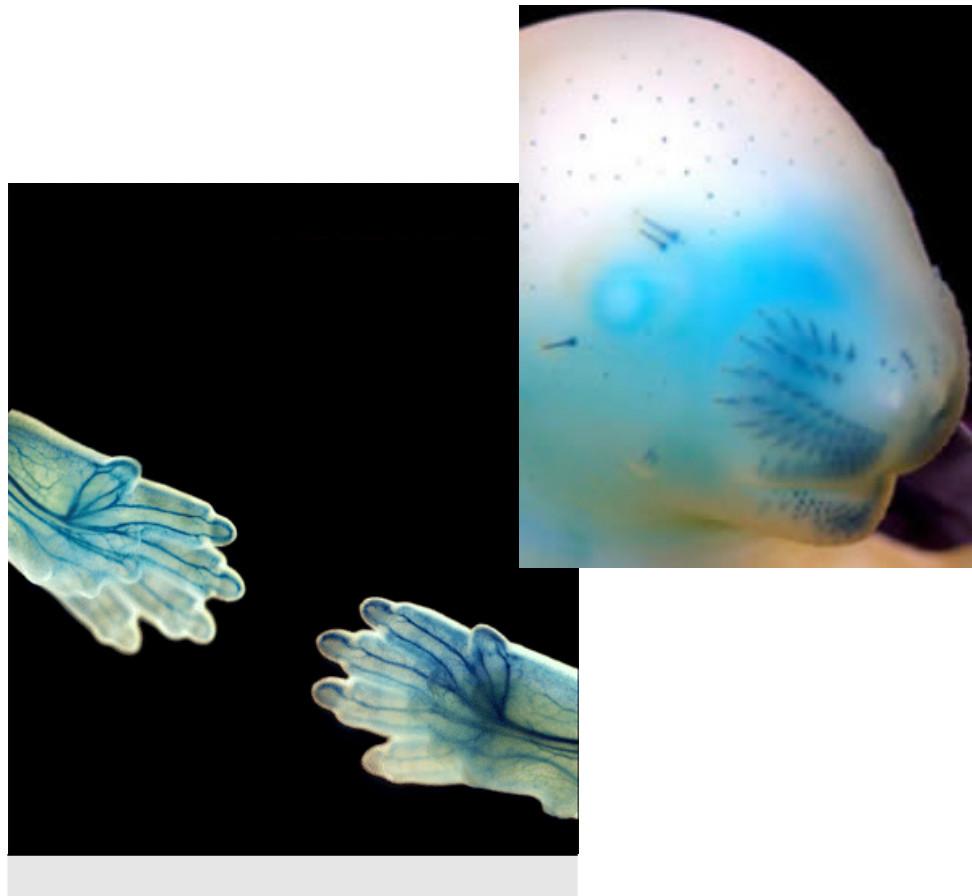


Transkripční fúze

- **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

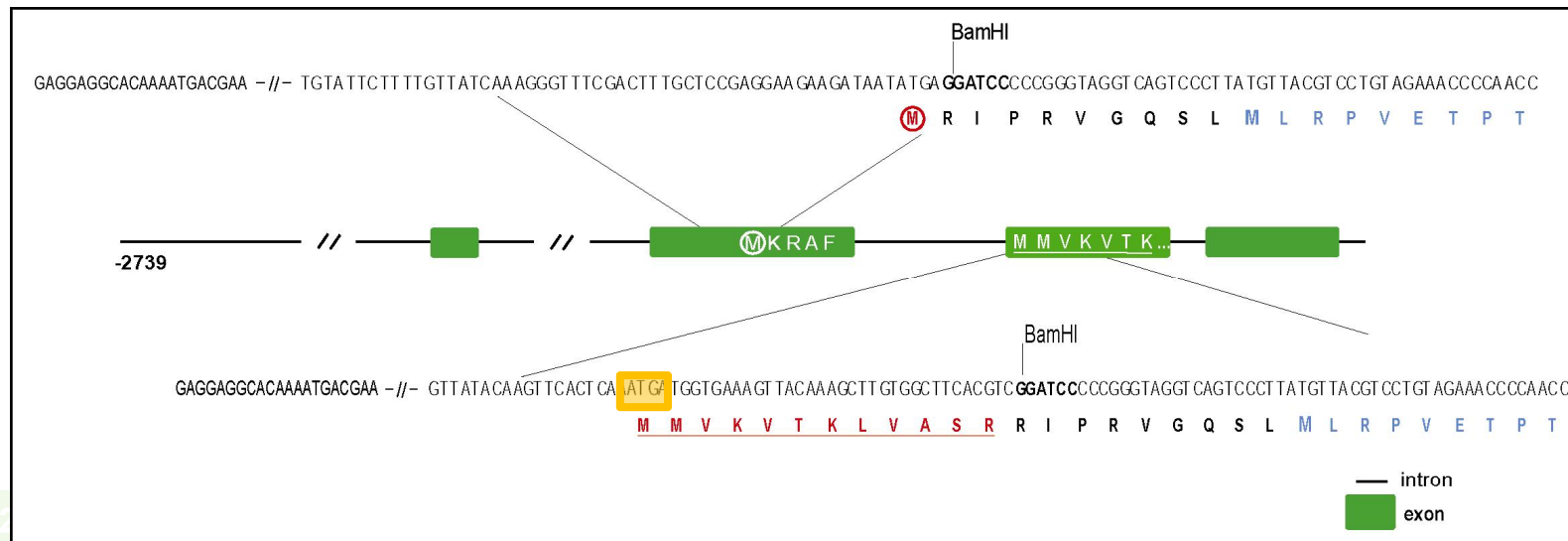
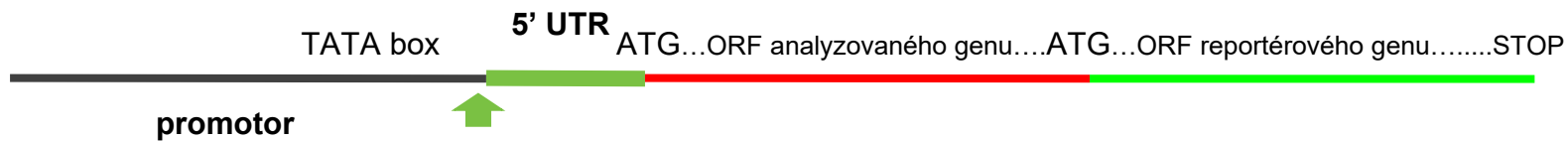


GUS reporter in mouse embryos



Translační fúze

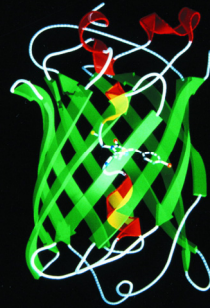
- **Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reportérovým genem**
 - Identifikace a klonování **promotorové** a **kódující** oblasti analyzovaného genu
 - příprava **rekombinantní DNA** nesoucí **promotor** a **kódující sekvenci** studovaného genu ve fúzi s **reportérovým genem** (uidA,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



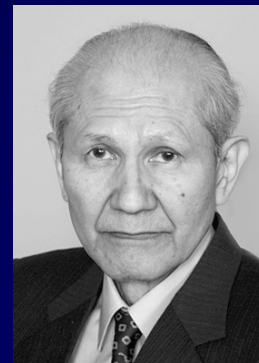
Základní přístupy

Zobrazení rekombinantních proteinů in vivo

Green Fluorescent Protein (GFP)



Nobelova cena za chemii, 2008



Osamu Shimomura



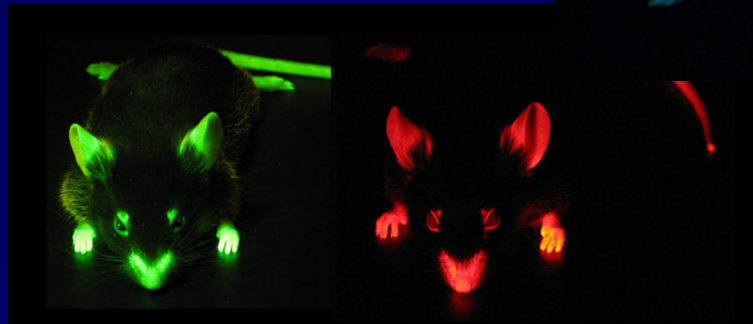
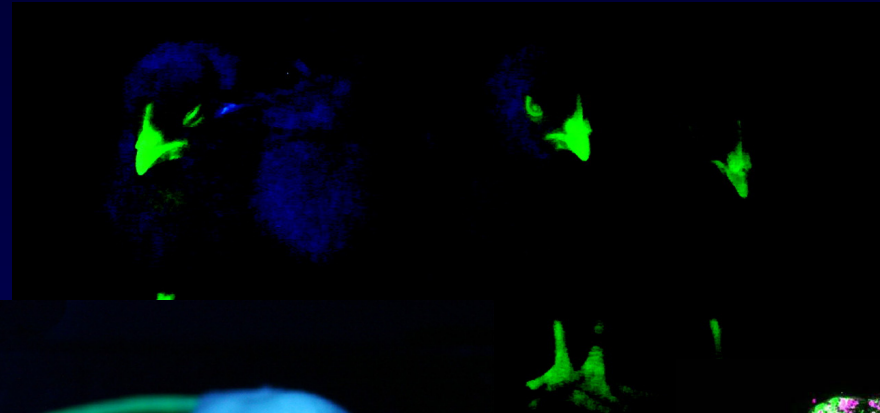
Martin Chalfie



Roger Y. Tsien

Základní přístupy

Zobrazení rekombinantních proteinů in vivo



Základní přístupy

Zobrazení rekombinantních proteinů in vivo

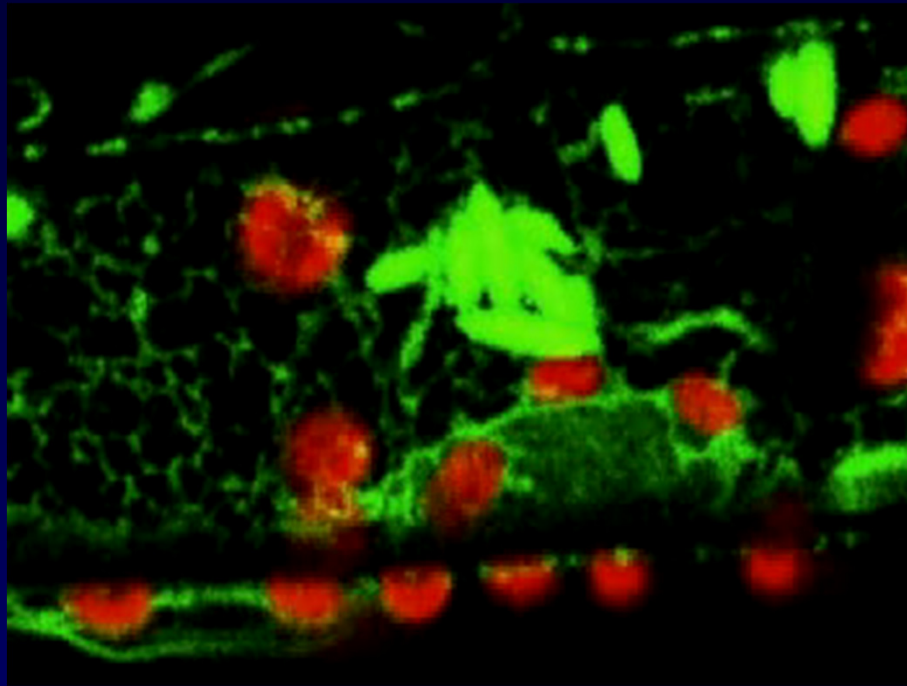
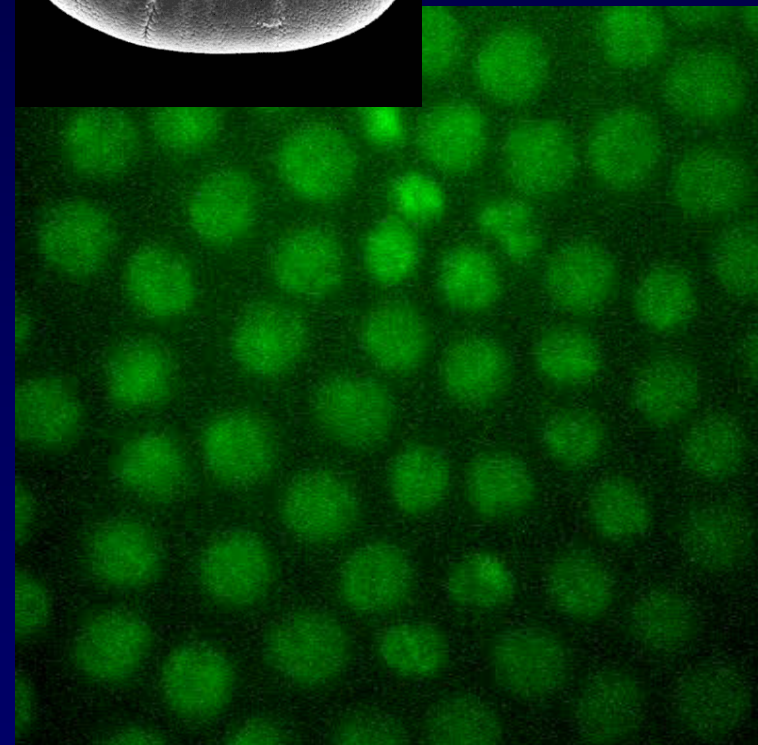
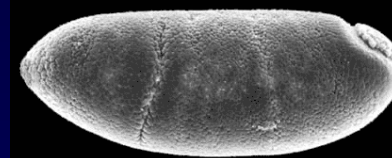
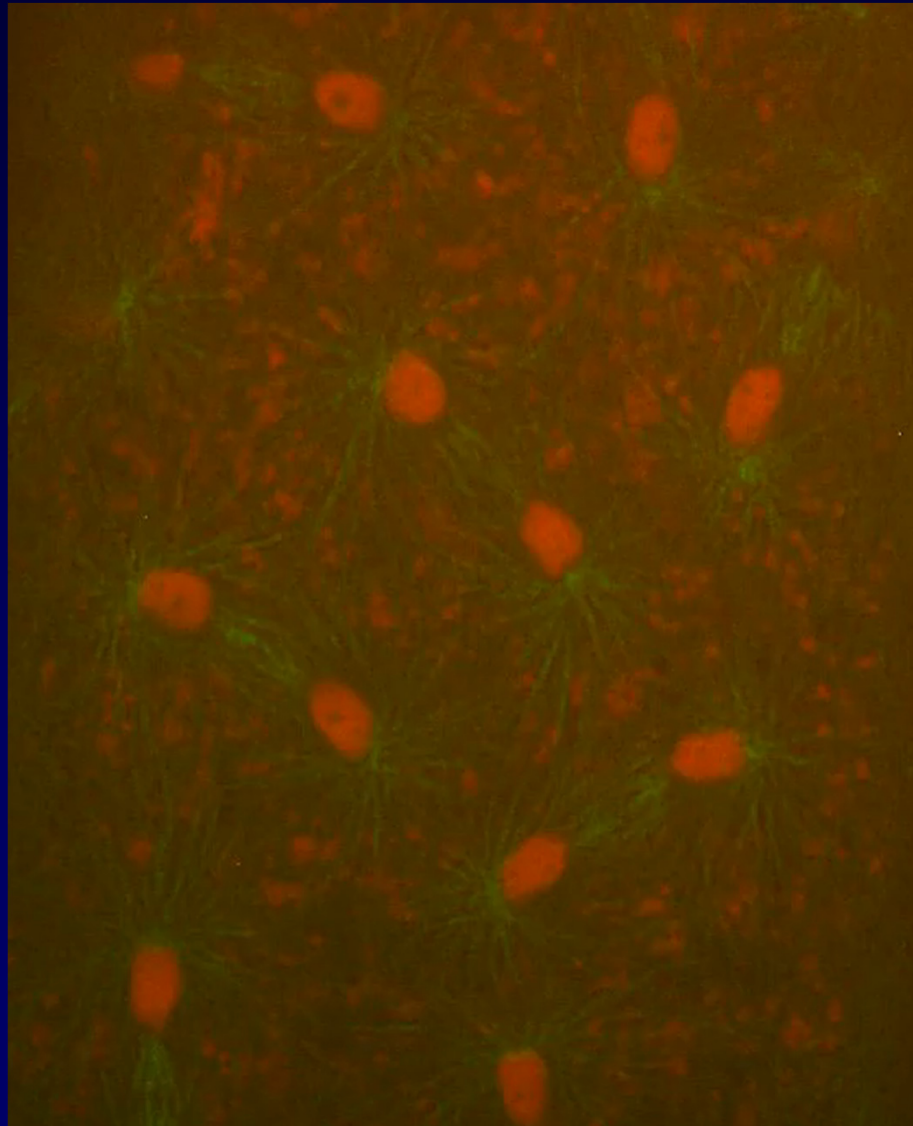


Photo by Alex Wild



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



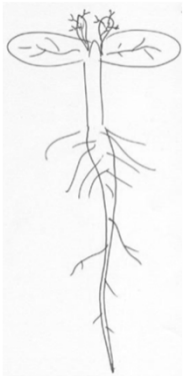
Arabidopsis thaliana, embryo at the torpedo stage

Mus musculus, embryo, longitudinal section

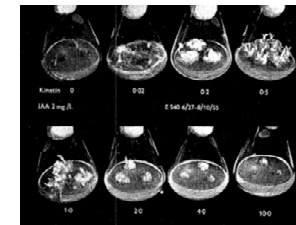
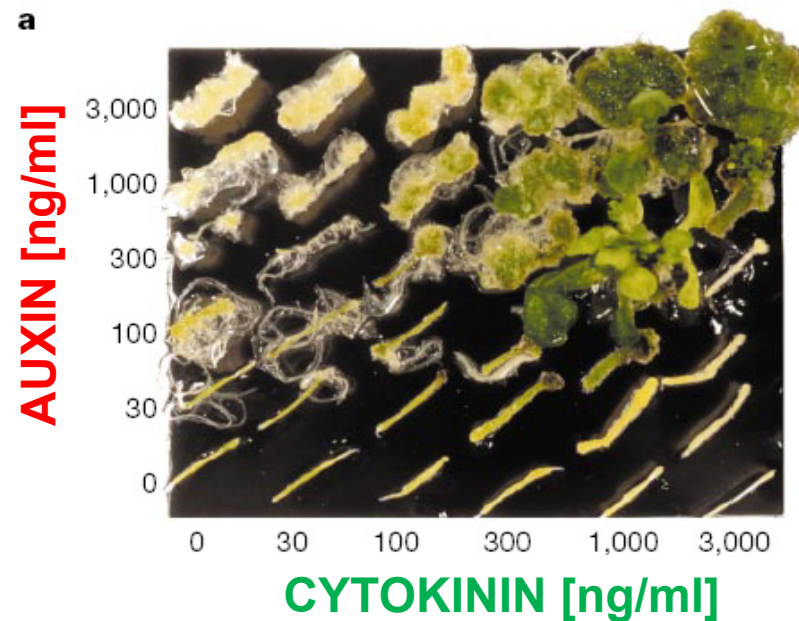
Co je **zásadním rozdílem** mezi **živočichy** a **rostlinami**?

- 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



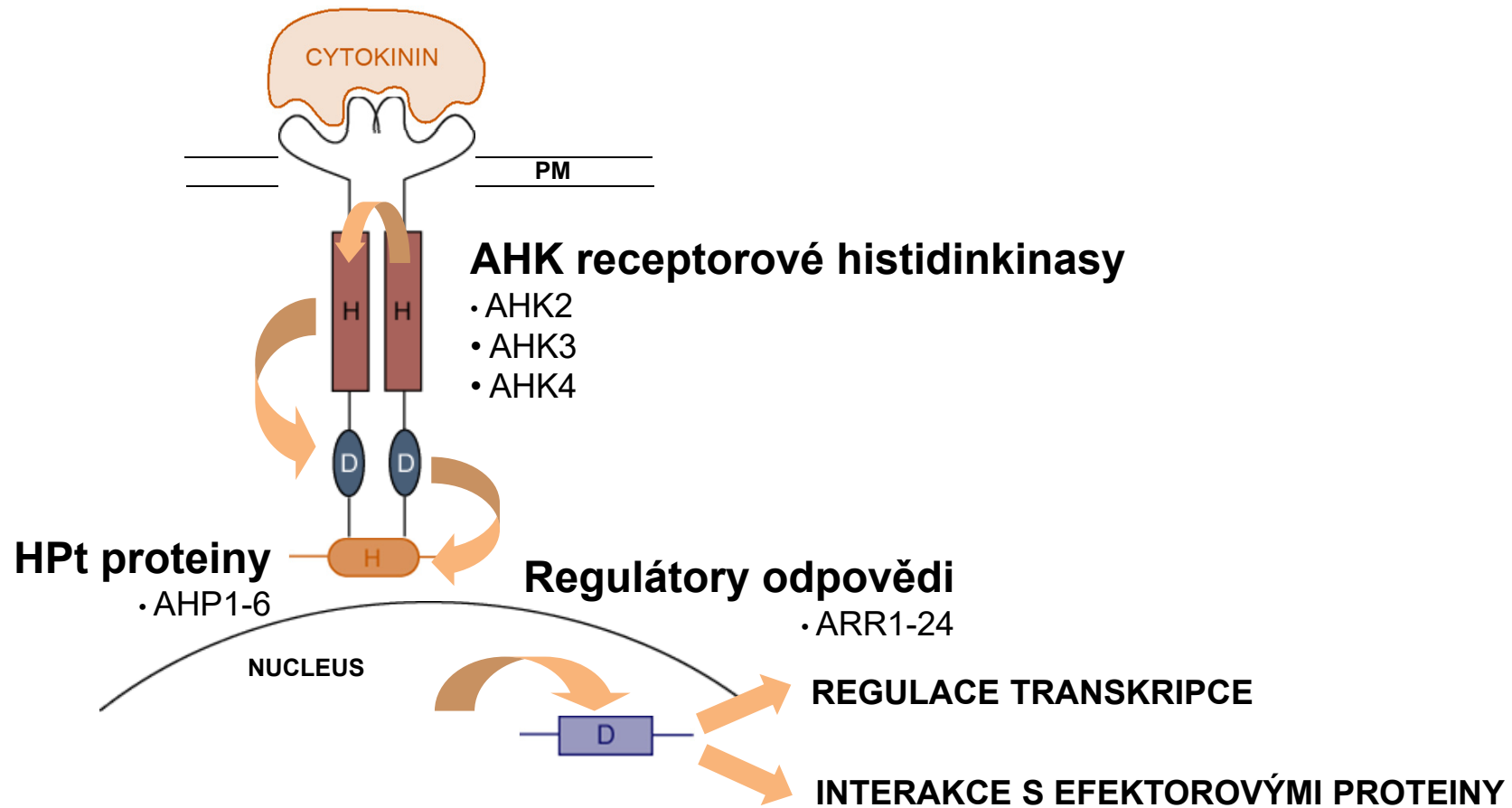
Skoog and Miller, Symp Soc Exp Biol (1957)

AUXIN:**CYTOKININS** – kořeny

AUXIN:**CYTOKININ** –prýt

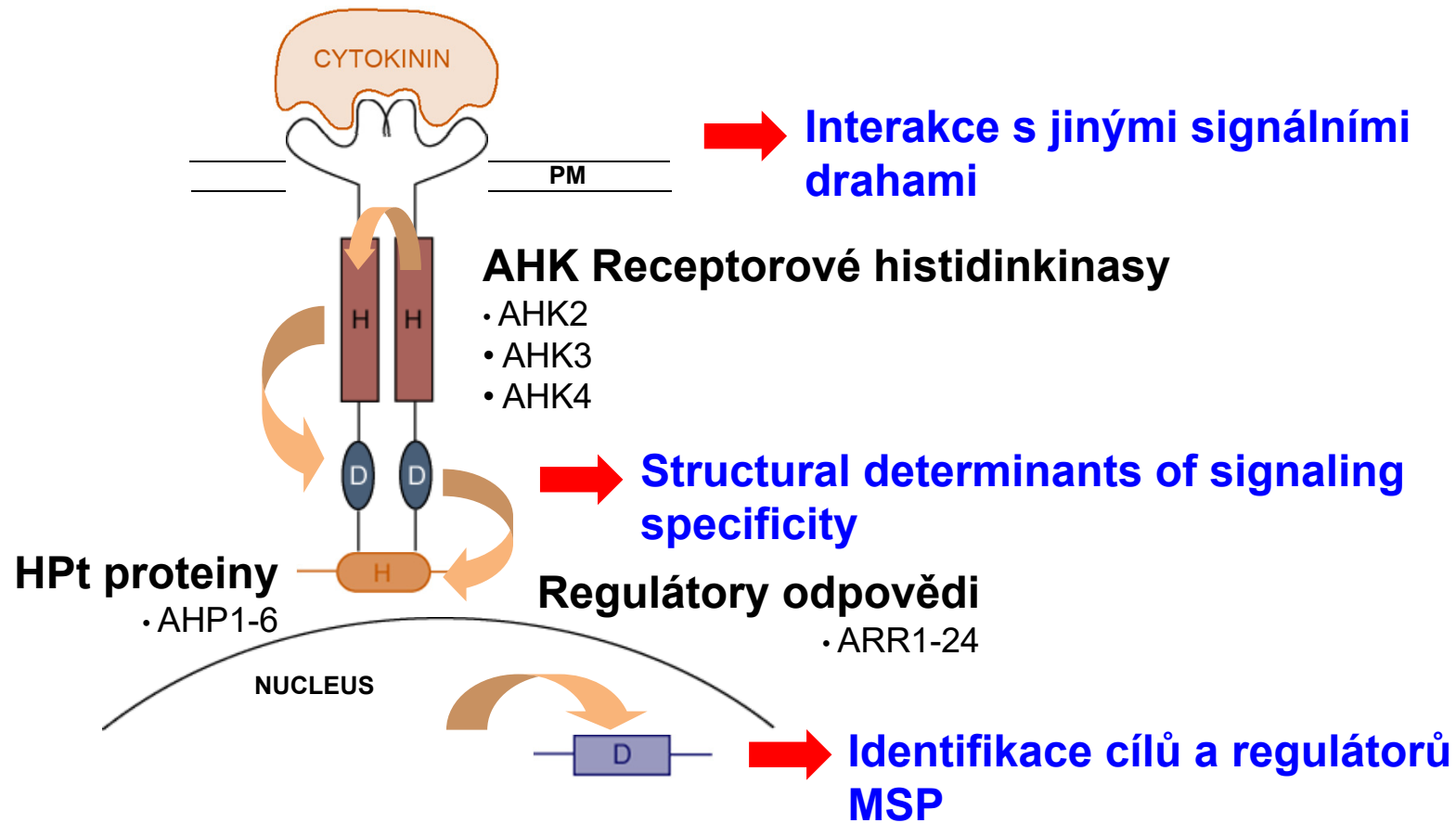
Přenos signálu prostřednictvím MSP

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



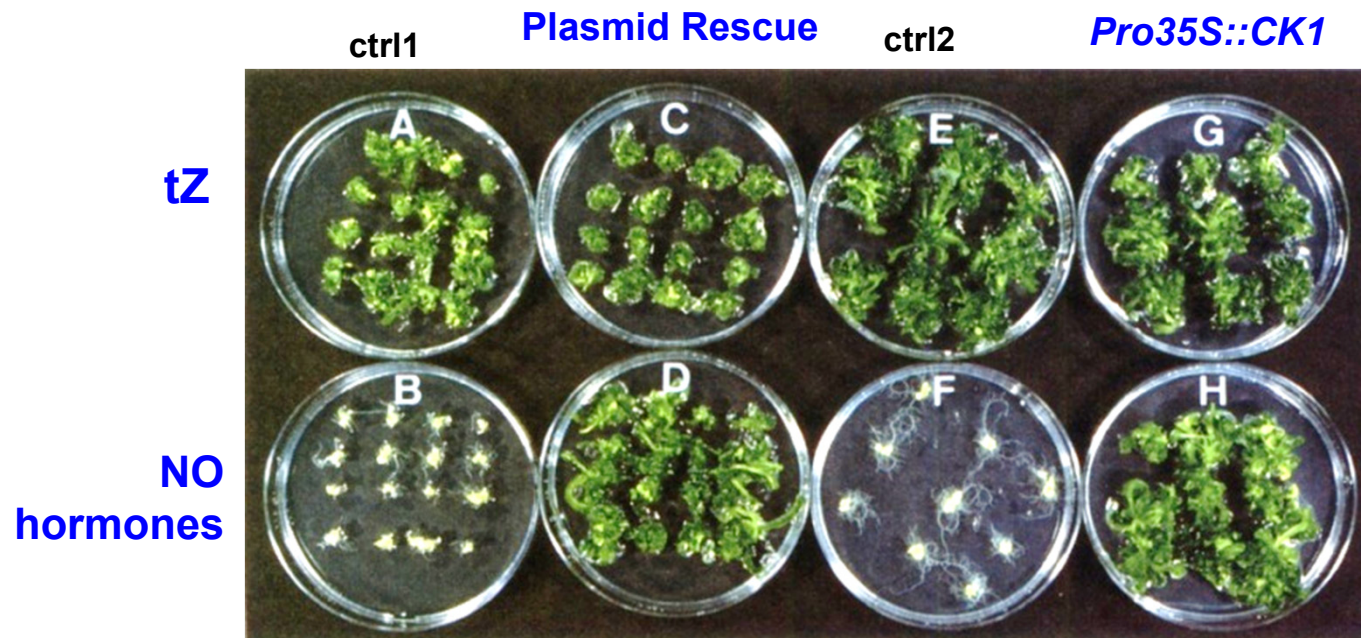
Signal Transduction via MSP

Co nás **zajímá**?



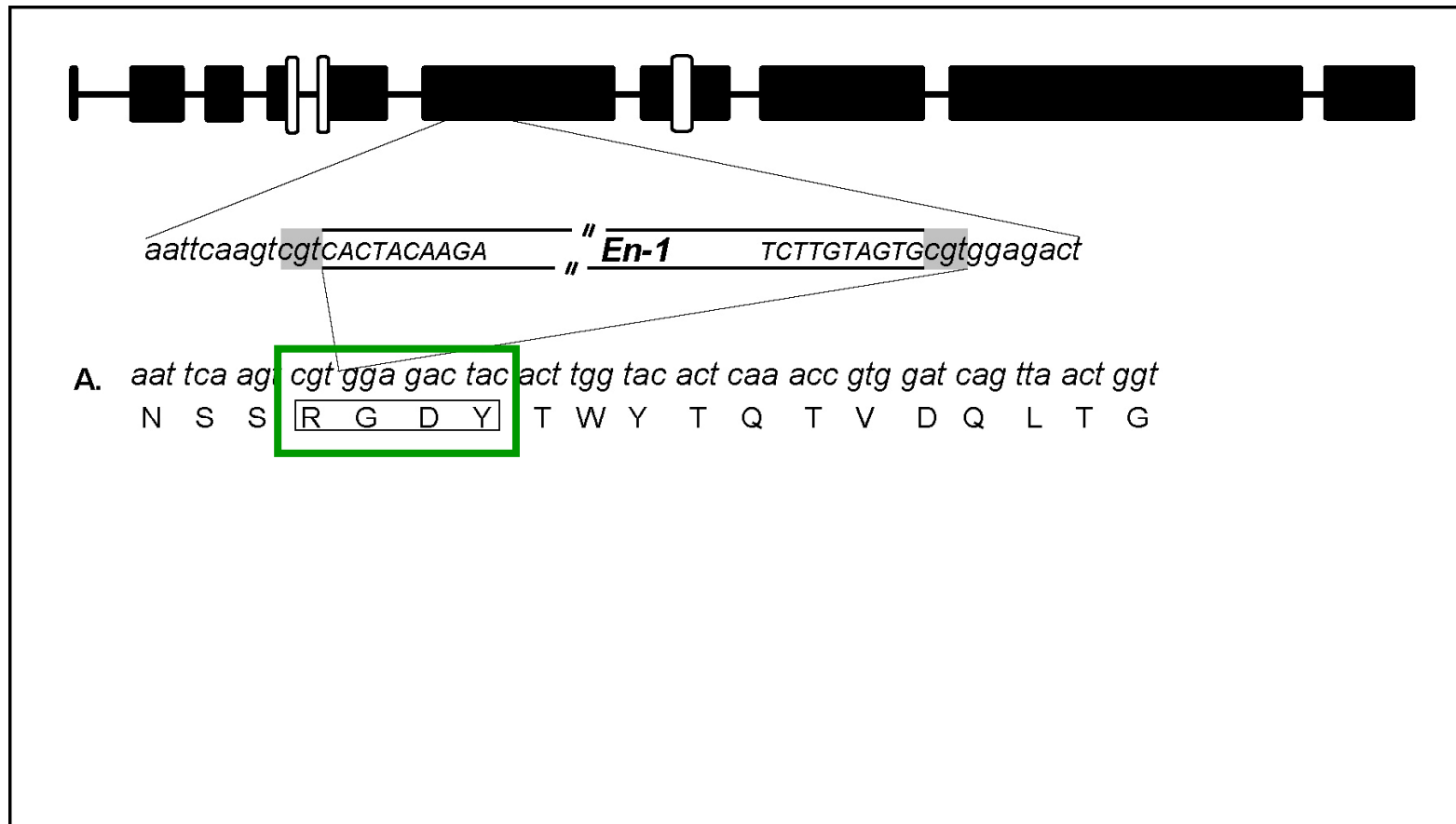
Identifikace *CK1* aktivační mutagenezí

- *CK1* overexpression mimics cytokinin response



Kakimoto, *Science*, 1996

Identification of insertional *cki1* mutant allele

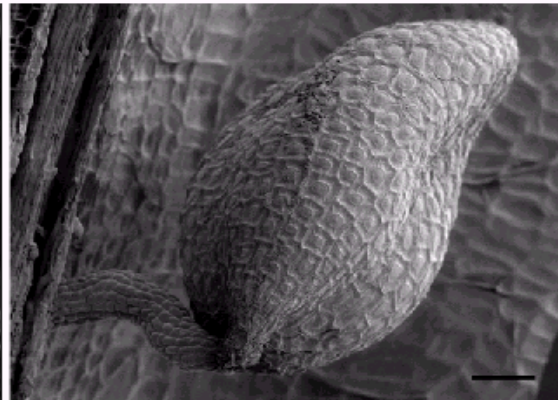
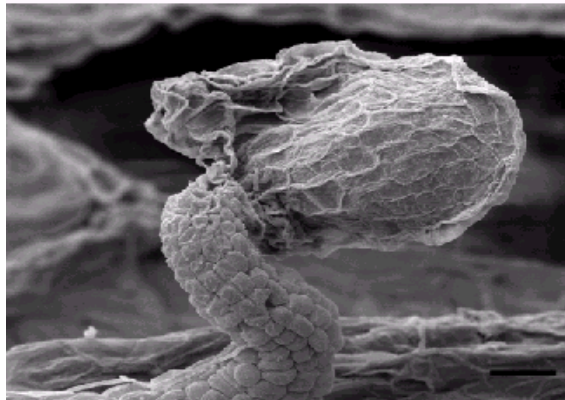


CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

CKI1/cki1-i



CKI1/CKI1



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

cki1-i reveals non-Mendelian inheritance

P: *CKI1/cki1-i*

F1:

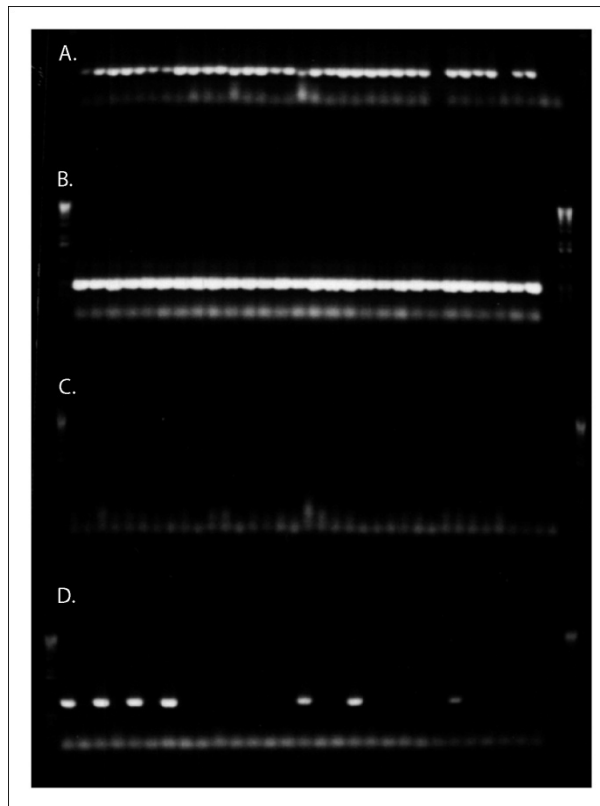
1 *CKI1* : **2** *CKI1/cki1-i* : **1** *cki1-i* (anticipated)

1 *CKI1* : **1** *CKI1/cki1-i* (observed)

	♂	
♀	<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>	<i>cki1-i/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*

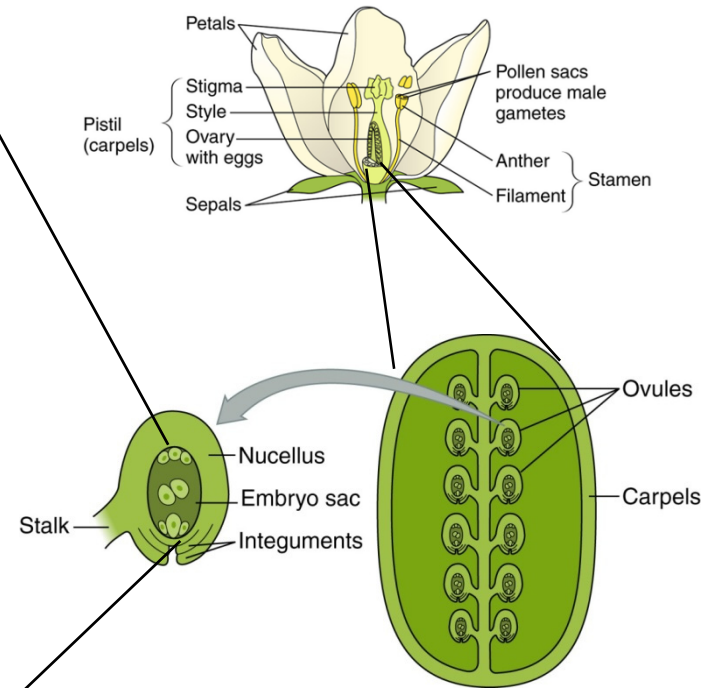
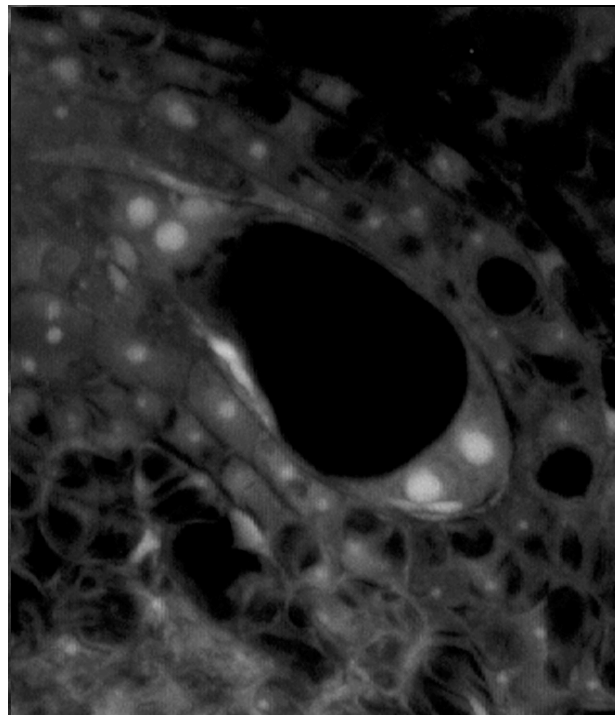


cki1-i specific primers

D. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ wt

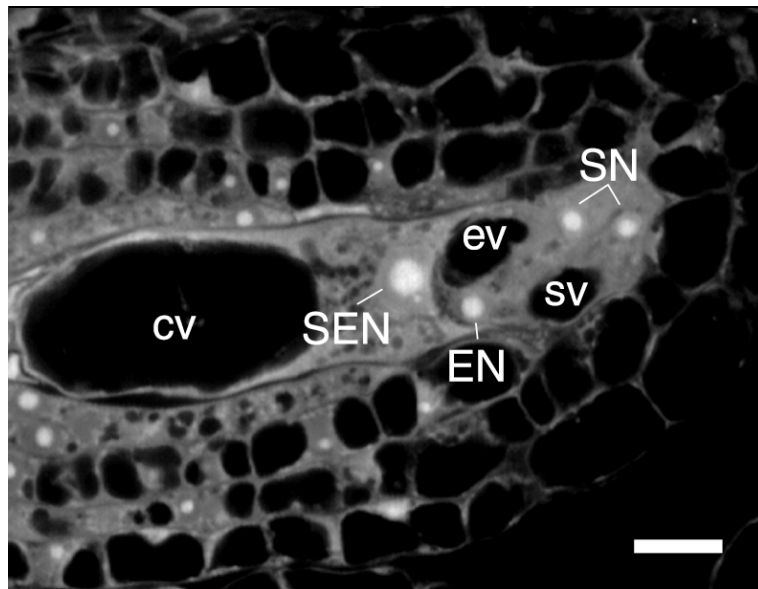
CKI1 and Megagametogenesis

FG 1

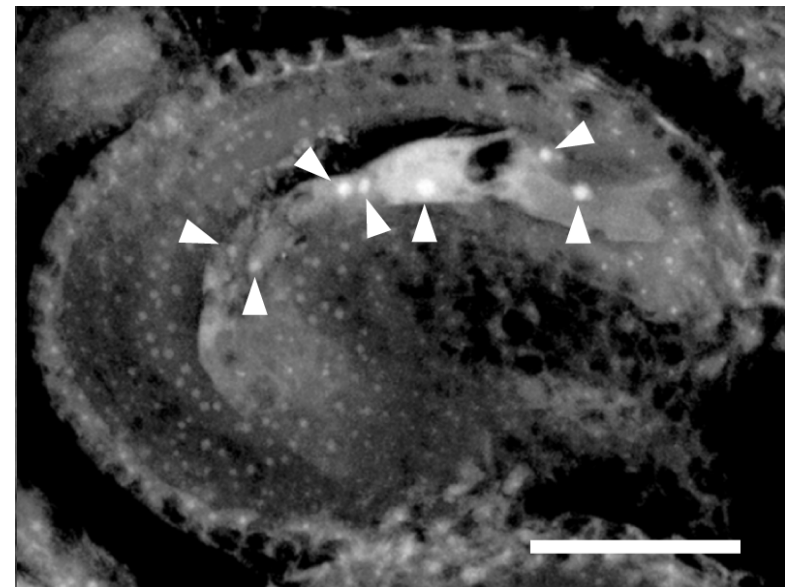


CKI1 and Megagametogenesis

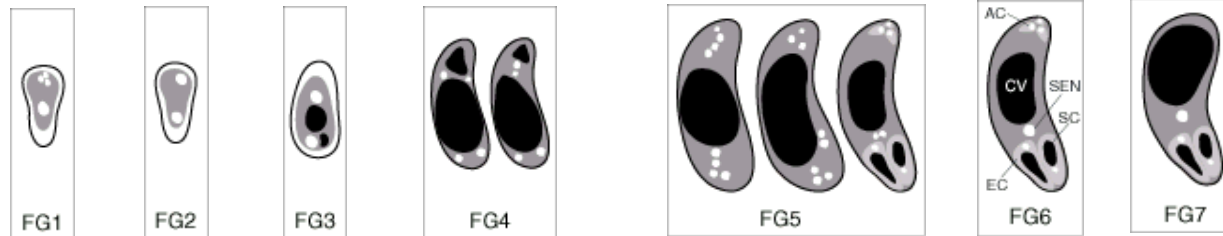
CKI1 FG4 FG5



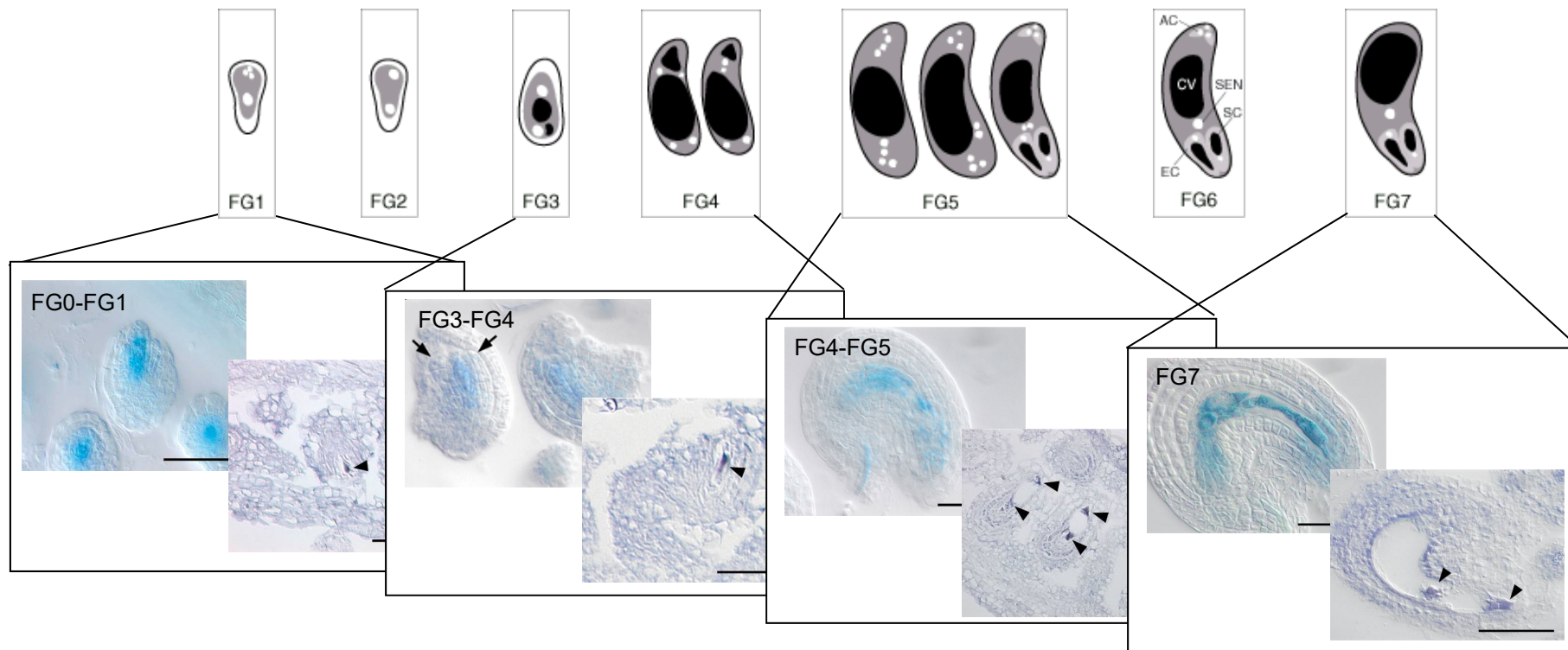
cki1-i 28 HAE



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



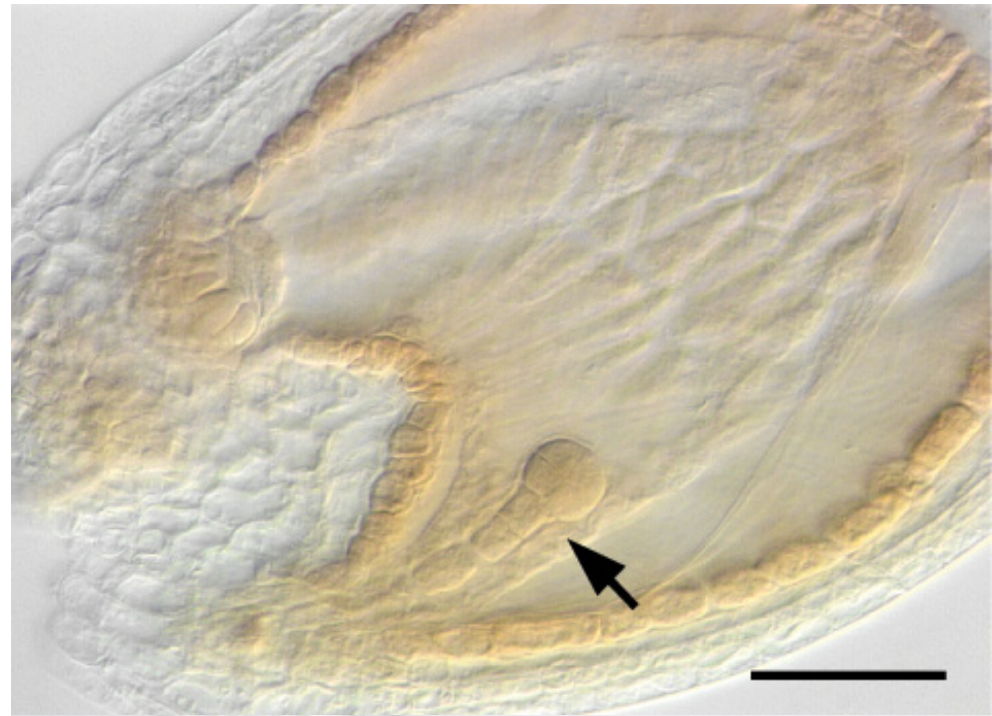
CKI1 is Expressed During Megagametogenesis



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

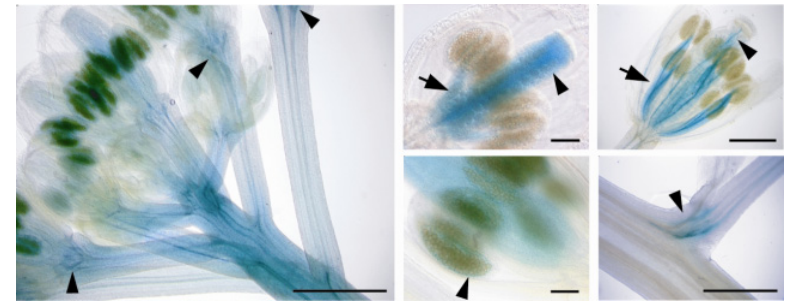
♀ wt x ♂ Pro*CKI1*:*GUS*

22 HAP
(hours
after
pollination)

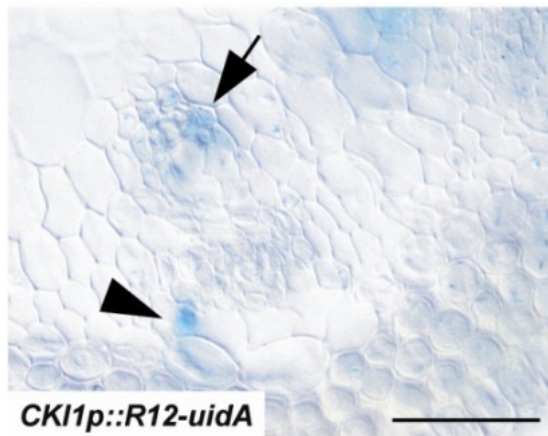


Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

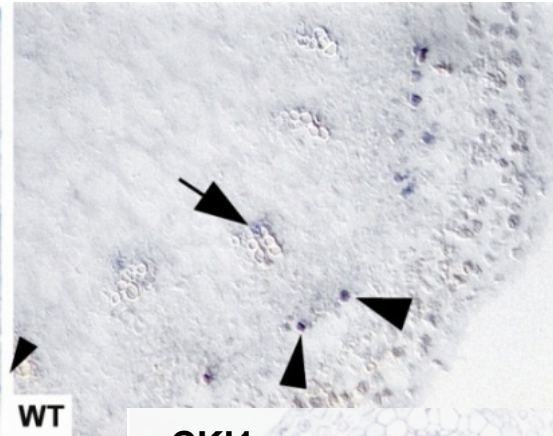
CKI1 is Active in *Arabidopsis* Gametophyte and Sporophyte



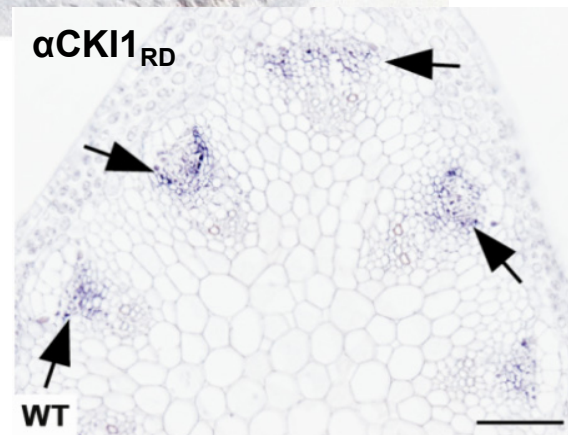
Hejátko et al., *Plant Cell* (2009)



CKI1p::R12-uidA

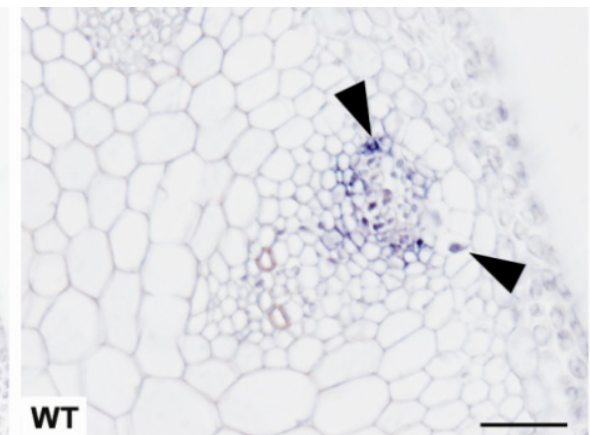


WT



αCKI1_{RD}

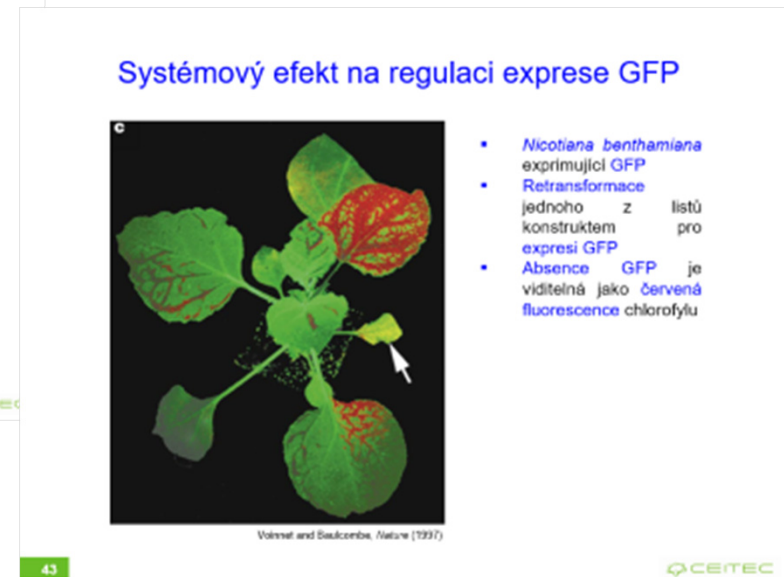
WT



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



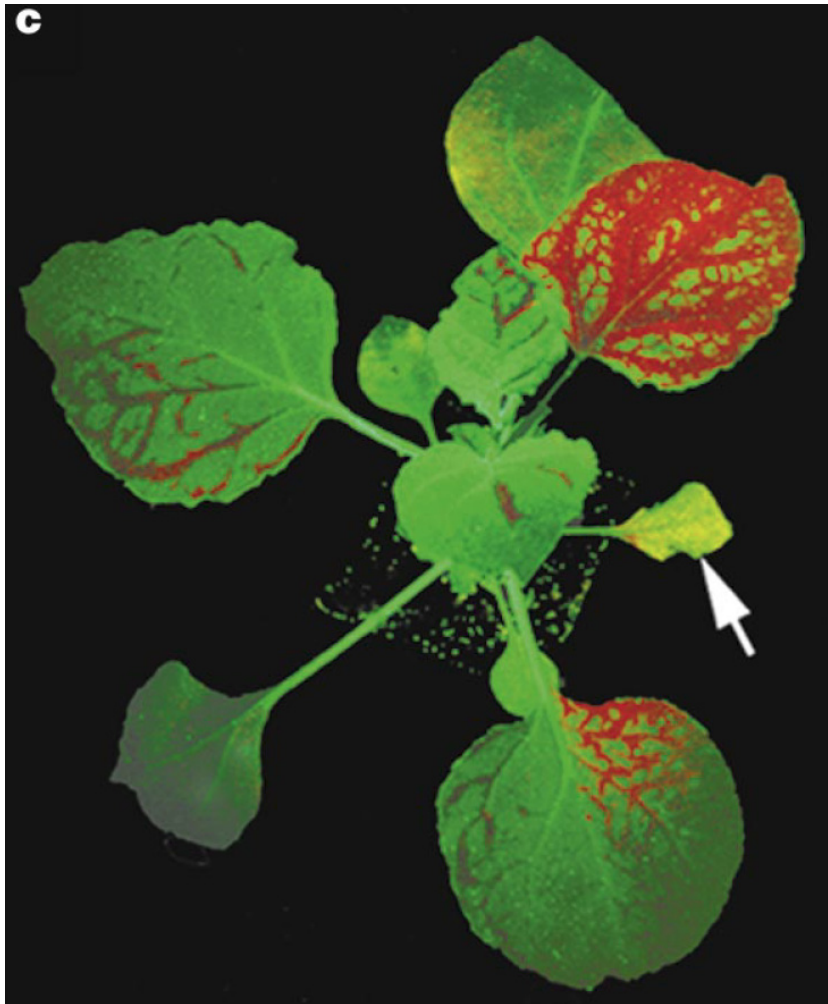
Umlčování exprese vnesením další kopie genu pro biosyntézu flavonoidů

p35S::DFR



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

Systemový efekt na regulaci exprese GFP

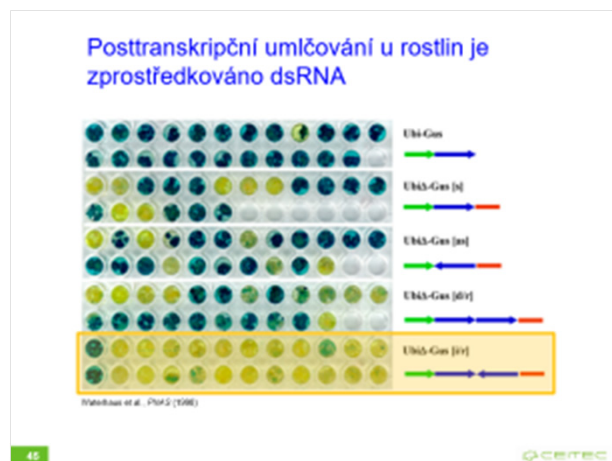


Voinnet and Baulcombe, *Nature* (1997)

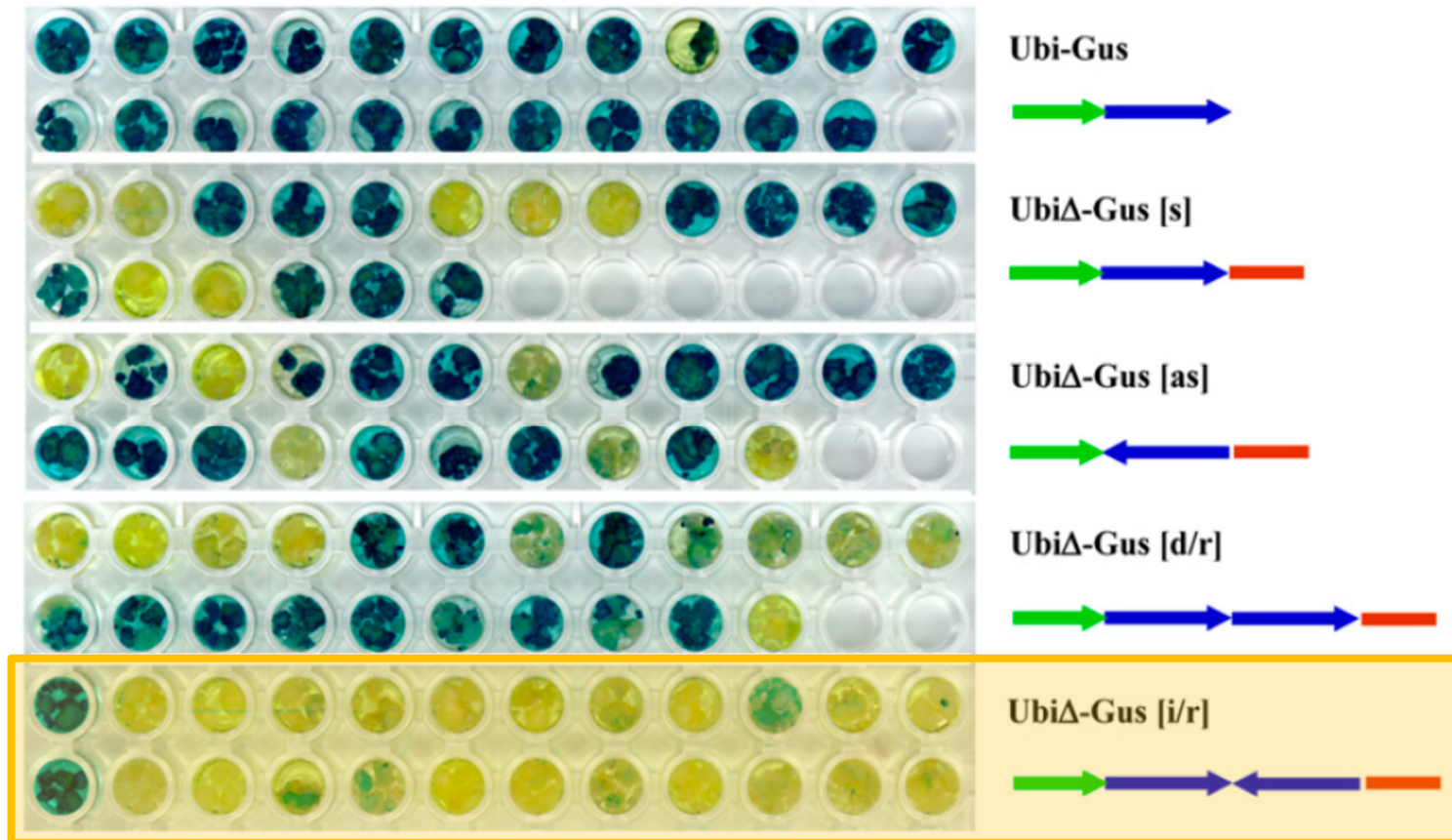
- *Nicotiana benthamiana* exprimující GFP
- Retransformace jednoho z listů konstruktem pro expresi GFP
- Absence GFP je viditelná jako červená fluorescence chlorofylu

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 zprostředkovááno 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 Medicine¹.

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).

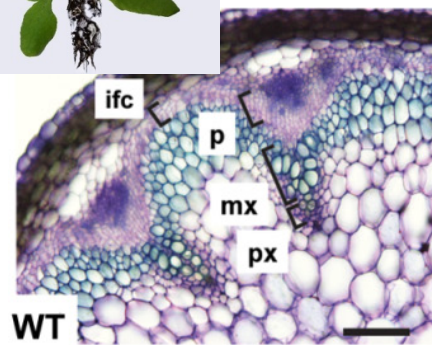
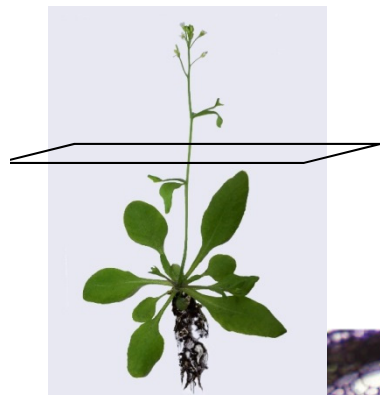
will not do so in the future. We believe that Iranian scientists can and will respond appropriately to the country's needs.

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

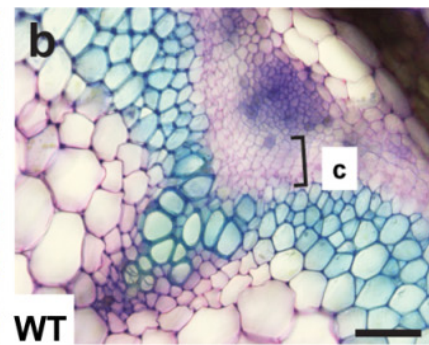
Iran: productivity is not simple to evaluate

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

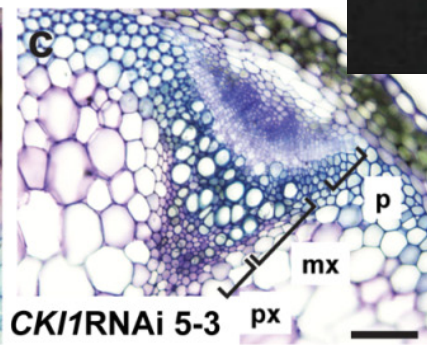
Hormonální Signály Řídí Množství Biomasy



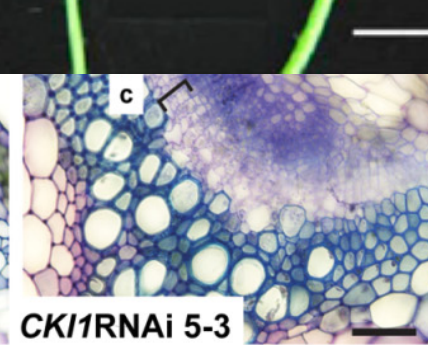
WT



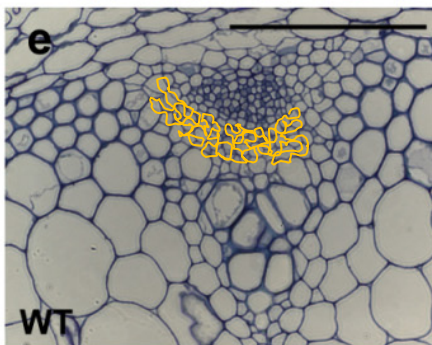
WT



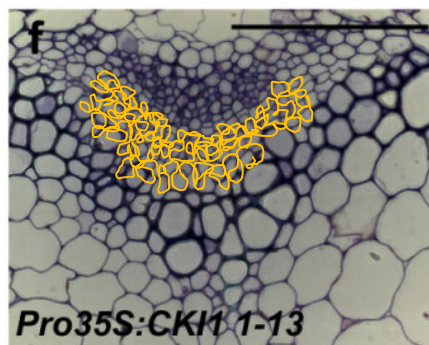
CKI1RNAi 5-3



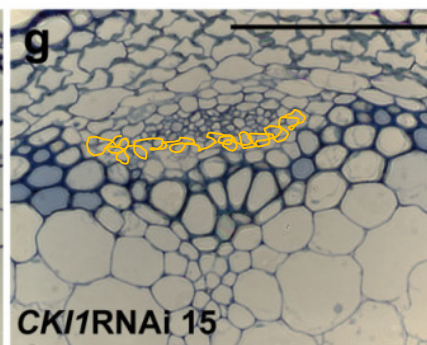
CKI1RNAi 5-3



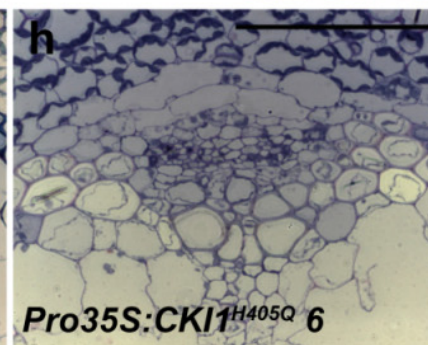
WT



Pro35S:CKI1 1-13



CKI1RNAi 15

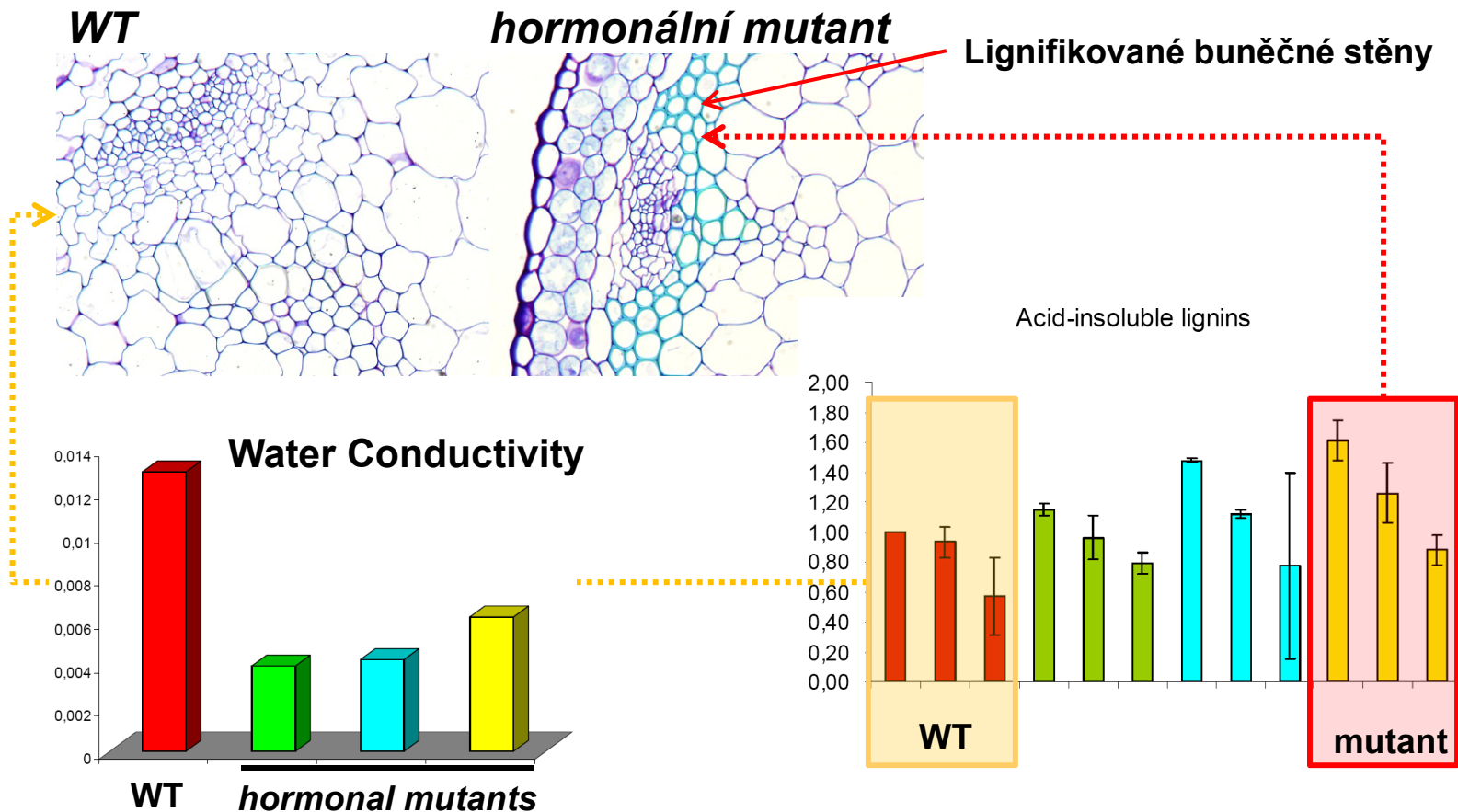


Pro35S:CKI1^{H405Q} 6

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**



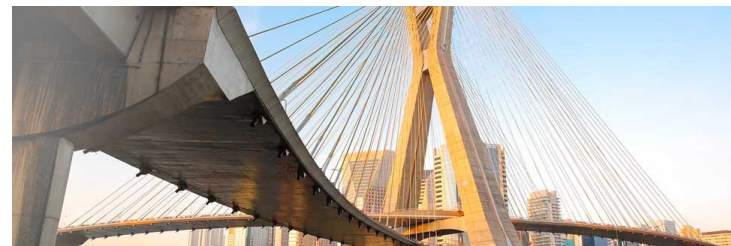
- **Disperzanty**



- **Vanilin**



- Příměsi do **stavebních hmot**



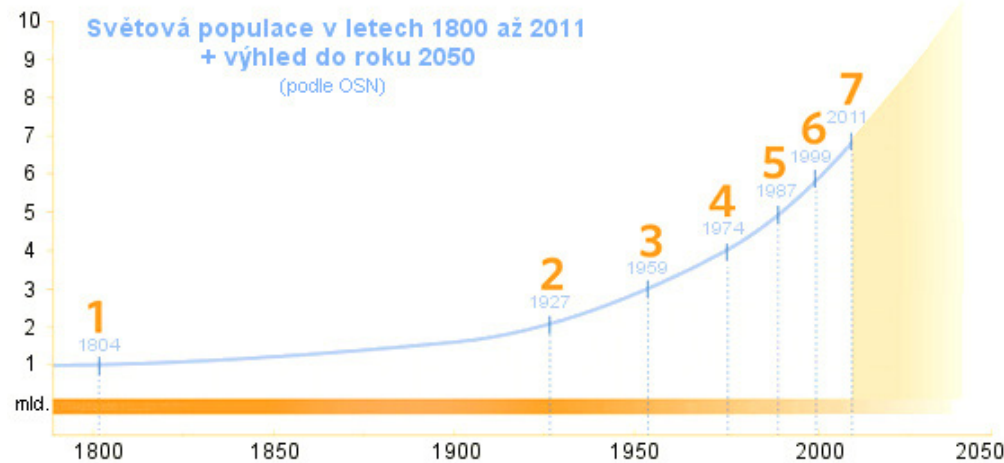
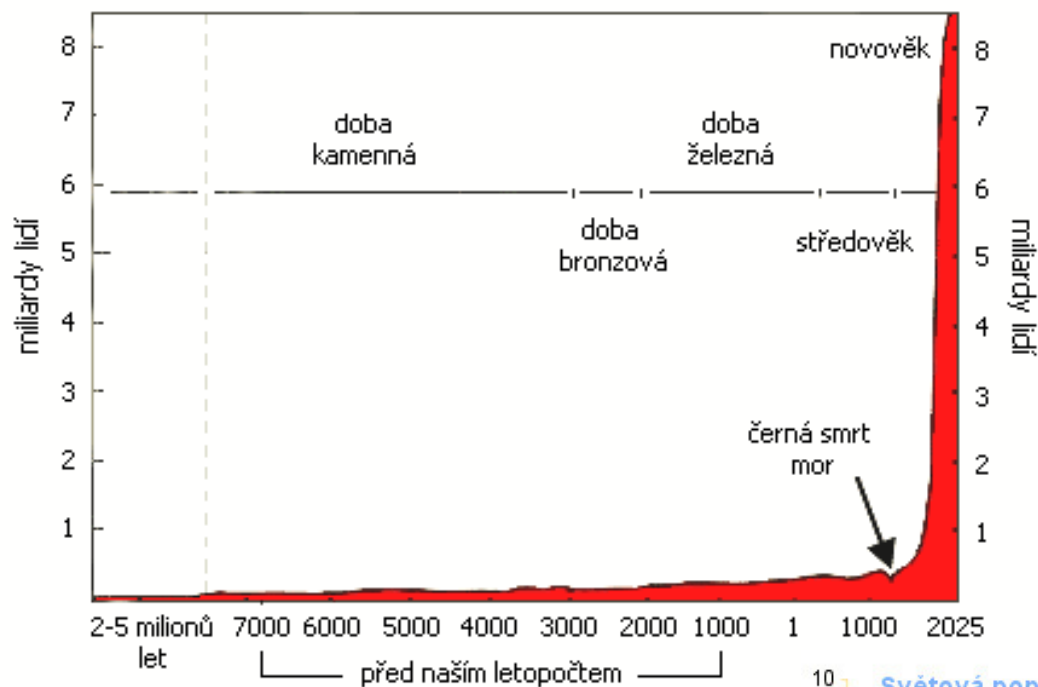
-

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

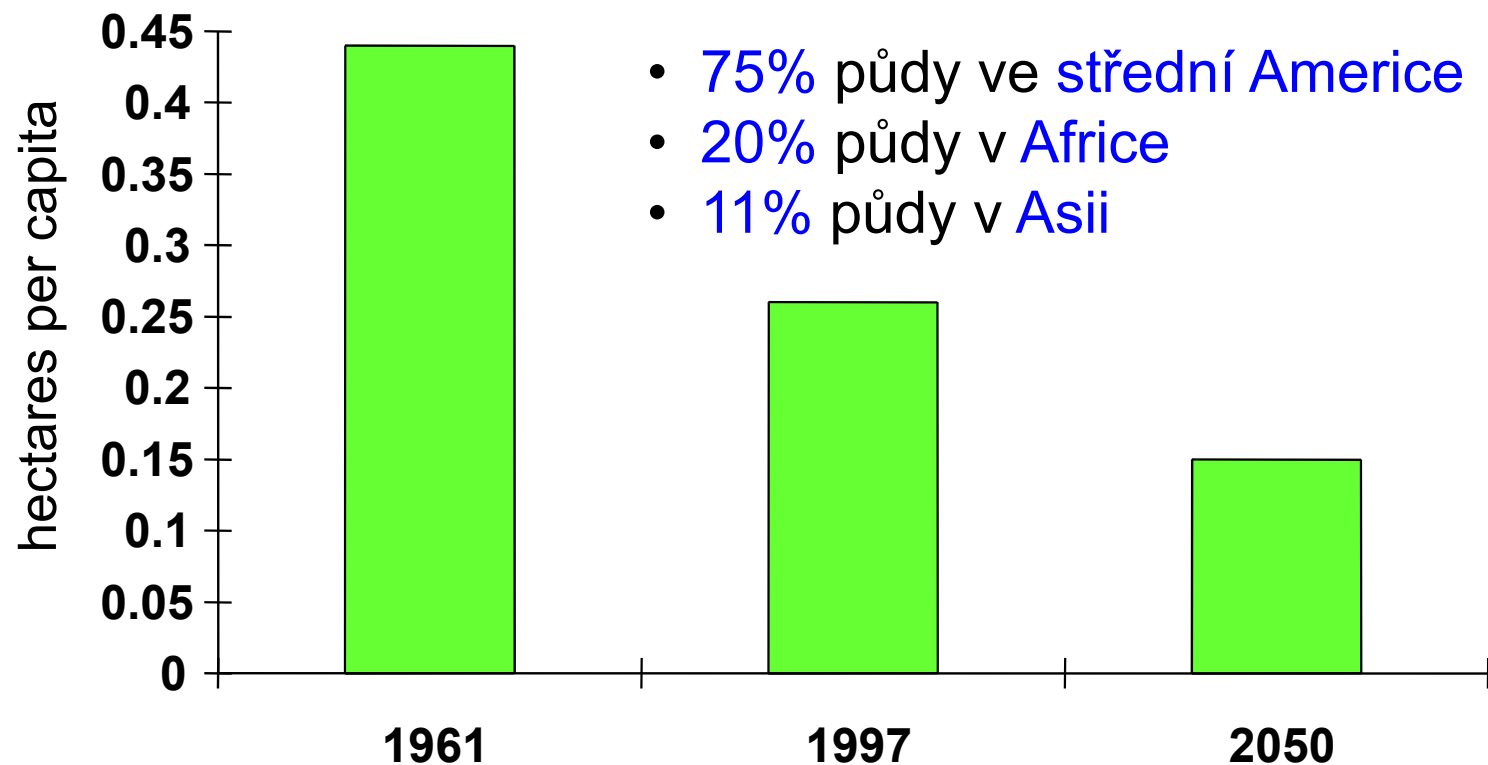
Růst lidské populace v průběhu historie



UNFPA, 2011

Množství orné půdy na Zemi je omezené

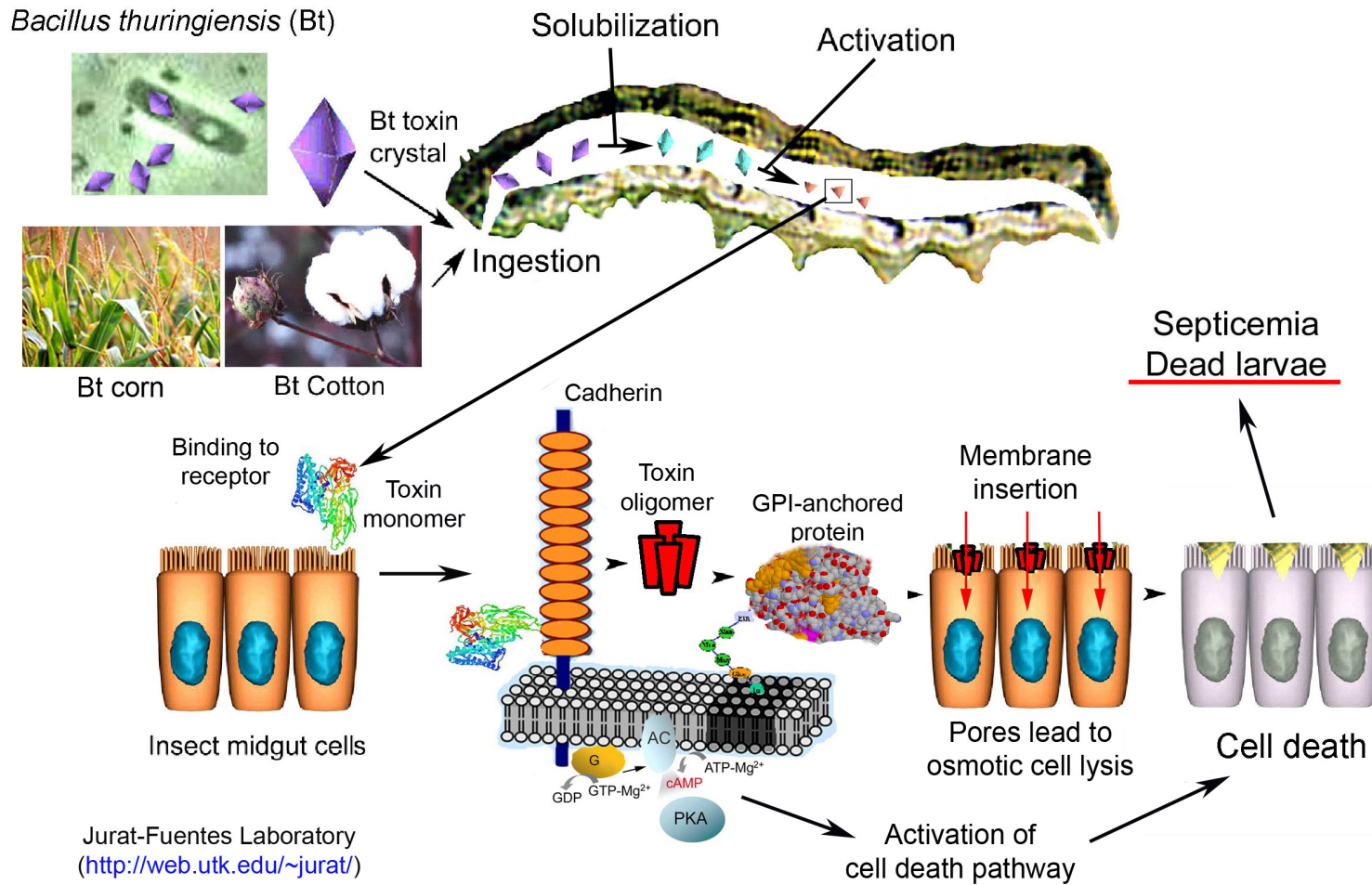
40% orné půdy na Zemi je vážně poškozeno nebo zcela neúrodné:



Zdroj: UN Millennium Ecosystem Assessment

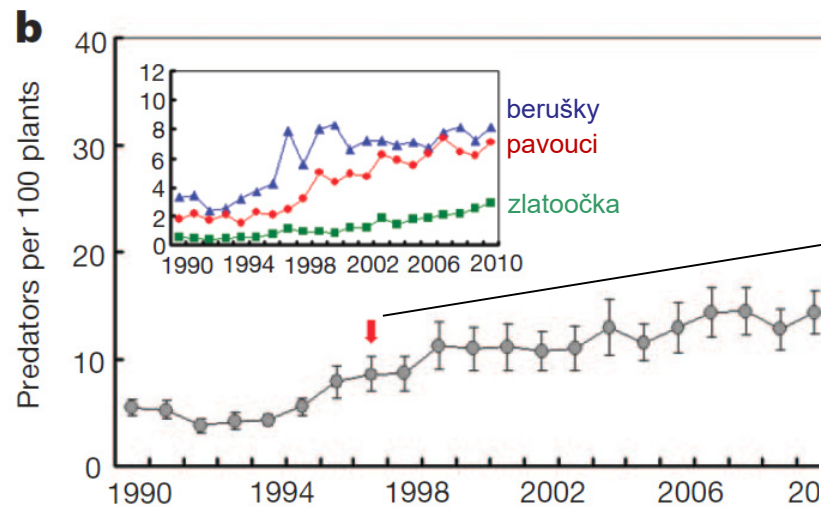
Rezistence k patogenům

Bt plodiny

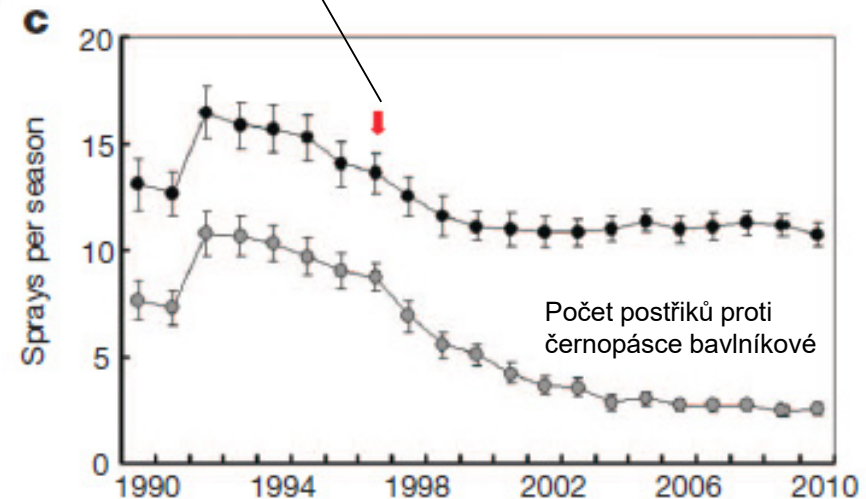


Bt plodiny a ekologické dopady jejich pěstování

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

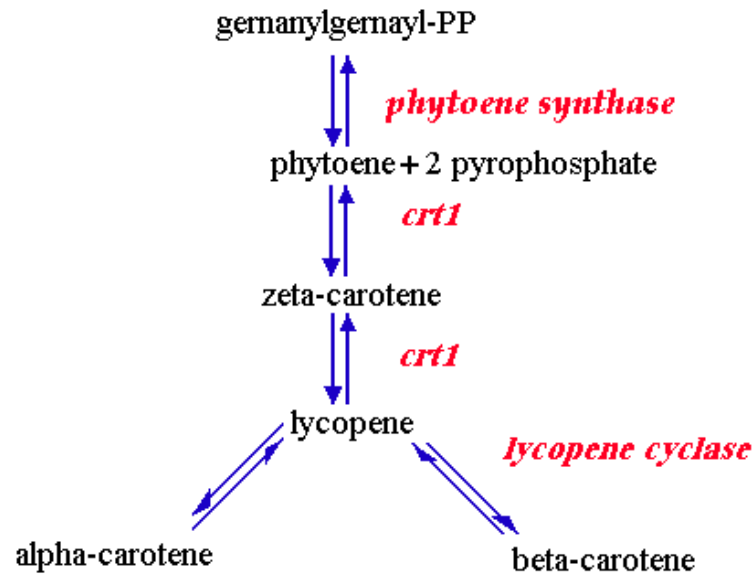


Počátek pěstování Bt bavlny

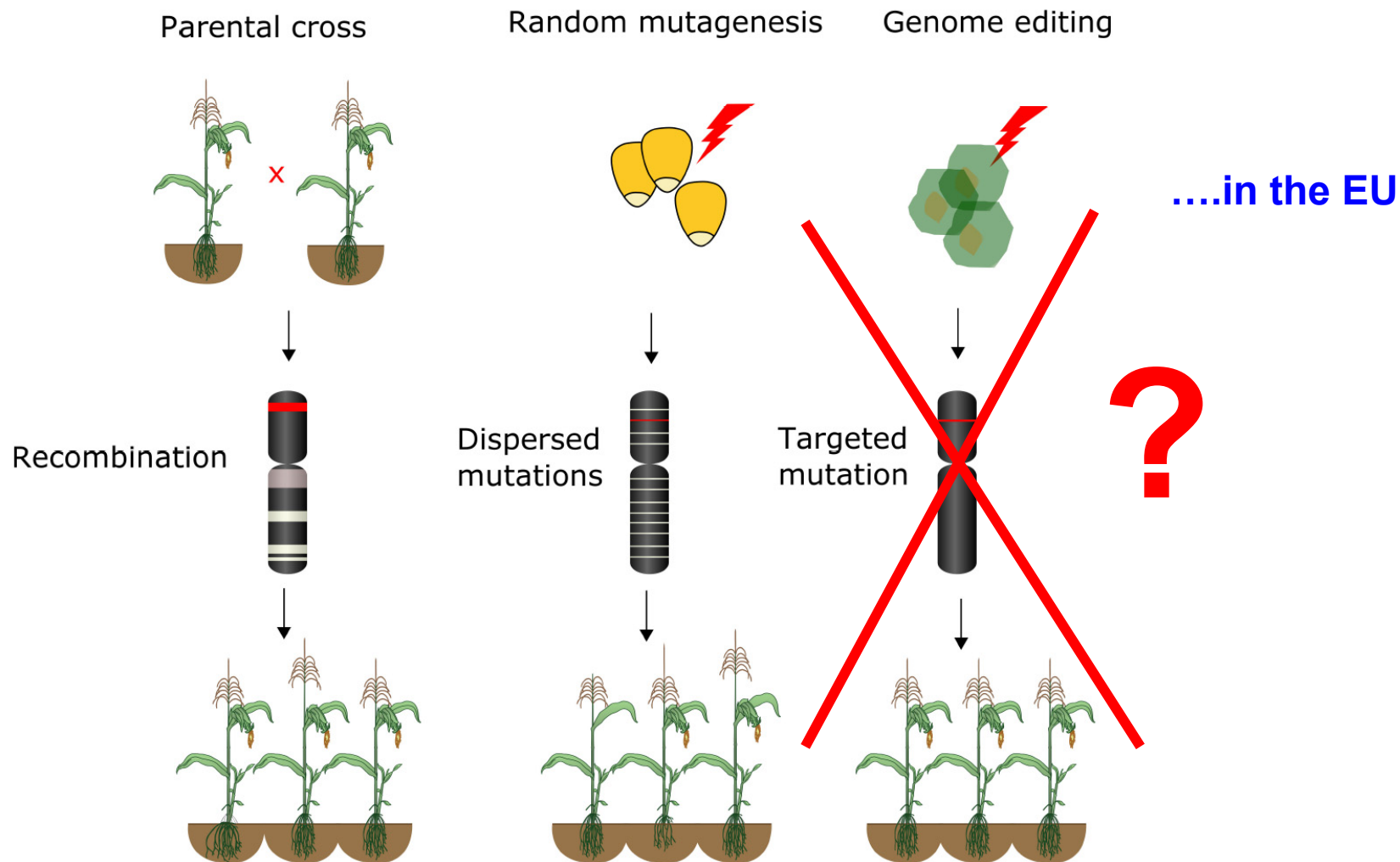


Zvýšení nutriční hodnoty Zlatá rýže

Biosyntetická dráha β -karotenu



Náhodná mutageneze vs. editace genomu



Závěry

- Výzkum života s využitím moderních přístupů genetiky a molekulární biologie je úžasné dobrodružství 😊
- Genové manipulace nám dávají možnost porozumět základní 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

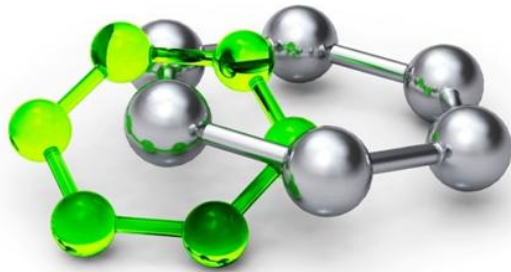
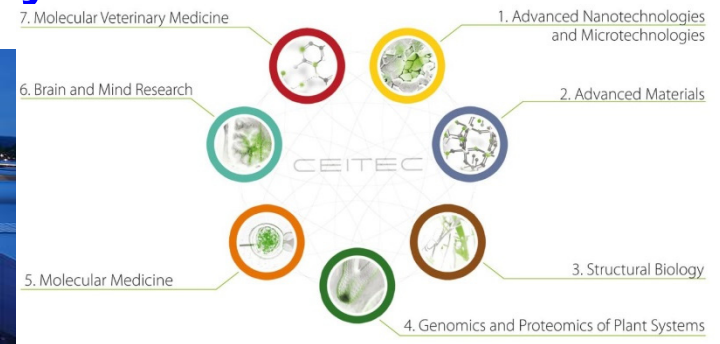
Mendel's legacy
150 years
of the genius of genetics

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 | info@ceitec.muni.cz

