

3) Růst a vývoj

d) Iniciace a regulace vývojových drah

e) Analýza růstu rostlin

f) Senescence a programová smrt buňky (PCD)

d) Iniclace a regulace vývojových drah

Projekt sekvenování genomu *Arabidopsis* (+ kukuřice, rajče, rýže, tabák, petunie)

Studium mutantů => identifikace funkce jednotlivých genů

Molekulárně-genetické studie + klonování + fyziologické a biochemické studie

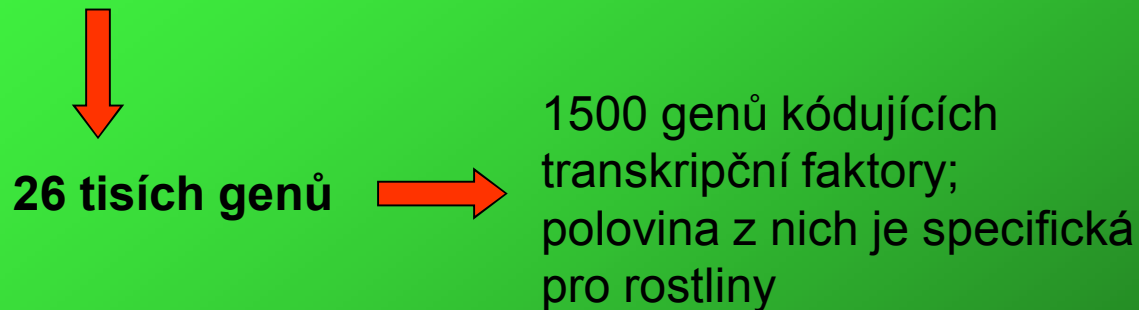
Principy vývoje rostlin:

- 1) **Expese genů, kódujících transkripční faktory, determinuje identitu buňky, pletiva a orgánu**
- 2) **Osud buňky je determinován její polohou**
- 3) **Vývojové dráhy jsou kontrolovány interakcí genů**
- 4) **Vývoj je regulován přenosem signálu z buňky do buňky**



1) Exprese genů, kódujících transkripční faktory, determinuje identitu buňky, pletiva a orgánu

Sekvenování *Arabidopsis* genomu (2000) (viz KFZR1)



Transkripční faktor = protein, který má afinitu k DNA; zapíná a vypíná expresi genů tím, že se váže ke specifické sekvenci DNA (viz KFZR 2a-c)

Funkce řady transkripčních faktorů není dosud známa

Functional Genomic Project: 2001 – 2010; jdi na <http://www.arabidopsis.org> nebo přímo na

http://tair.stanford.edu/info/2010_projects/MascReport2ndEdition.pdf



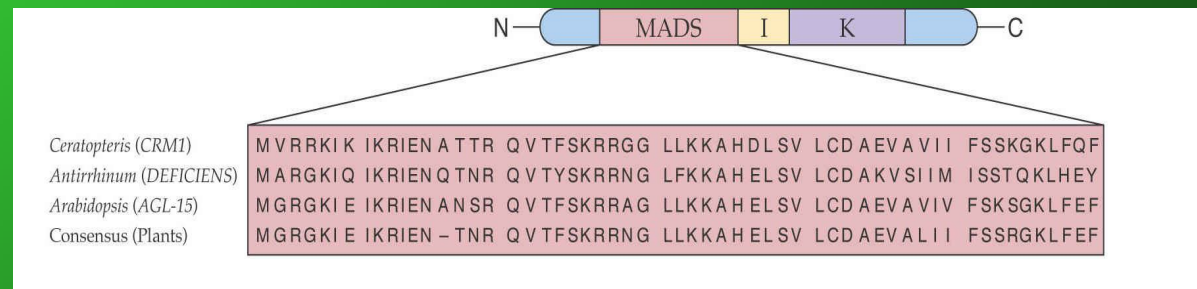
Dvě skupiny transkripčních faktorů kódovaných:

- MADS box geny
- Homeobox geny

MADS box geny - hrají klíčovou roli v biologických funkcích rostlin, zvířat a hub.
(**MADS** = podle prvních 4 objevených genů: **MCM1**, **AGAMOUS**, **DEFICIENS**, **SRF**)

Skupina zhruba 30 genů, které kontrolují aspekty vývoje. Specifické MADS box geny jsou důležité pro vývojové kroky v kořeni, listu, květu, vajíčku a plodu. Každý z těchto genů obsahuje konzervovanou DNA-binding doménu nazývanou MADS.

MADS box



Homeobox geny - obsahují homeobox = krátký konzervovaný úsek DNA (~180 bp) kódující proteinový motiv (homeodoména) schopný vázat se k DNA. Regulují specifické vývojové kroky a kontrolují expresi specifických genů.

Dominantní mutace ***kn1*** (gain-of-function) - exprese ***KN1*** ↑

Dominantní mutant *kn1* má tumorovité uzlíky v listové žilnatině = abnormální dělení ve vodivých pletivech. Uzlíky jsou podobné meristémům s nediferencovanými buňkami



Gen ***KNOTTED1 (KN1)*** – udržuje nedeterminovanost stonkového apikálního meristému.

KNOX – skupina podobných homeobox genů:

- *KNAT1*
- *KNAT2*
- *STM (SHOOTMERISTEMLEES1)* - (viz KFZR 3a-c)

UPDATE 2010

Hay A, Tsiantis M (2010) Development 137: 3153-3165

Review shrnující funkci genů *KNOX* ve vývoji rostlin



kn1 (gain-of-function)

Aktivita transkripčních faktorů (a jiných enzymů) v signálních drahách je regulována **fosforylací**.

Fosforylace = připojení fosfátové skupiny k amikokyselinovému zbytku nějakého proteinu

Protein kináza = ATP-závislý enzym, který připojuje fosfátovou skupinu k proteinu. Protein se stává fosforylovaným a tím aktivním.

Sekvenování *Arabidopsis* genomu (2000)



26 tisíc genů → 1200 genů kódujících protein kinázy

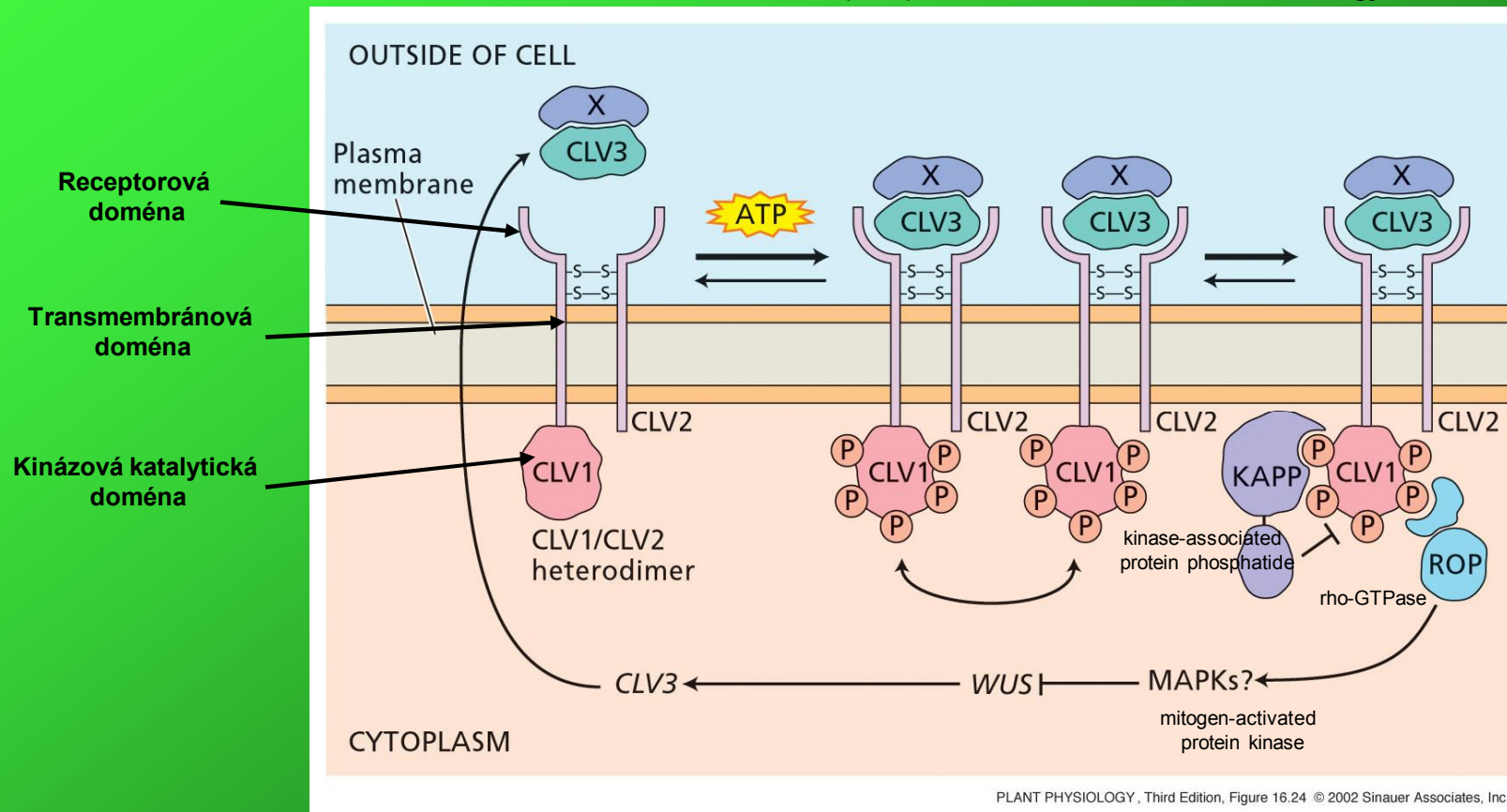


600 genů kódujících **receptor protein kinázy**

Receptor protein kináza = integrální membránový protein

Model CLV1/CLV2 receptor-kinázové signální dráhy regulující vývoj stonkového apikálního meristému

Clark SE (2001) Nature Reviews Molecular Cell Biology 2:276-284



2) Osud buňky je determinován umístěním buňky v těle rostliny

Buněčná diferenciace (osud buňky) **nezávisí** na tom, k jaké funkci je svým původem buňka předurčena, ale na tom, kde je v těle rostliny umístěna (na její poloze v rostlině) během jejího vývoje.

Scheres B (2001) Plant Physiology 125: 112-114

<http://www.plantphysiol.org/>



Kmenové buňky z vrstvy L2 apikálního meristému břečťanu obsahují mutaci v genu řídící tvorbu chloroplastů => mutace způsobuje albinismus.

Z buněk vrstvy L2 se vytváří mesofyl obsahující chloroplasty => bílé oblasti listu

Kmenové buňky vrstvy L1 a L3 obsahují neporušenou kopii genu.

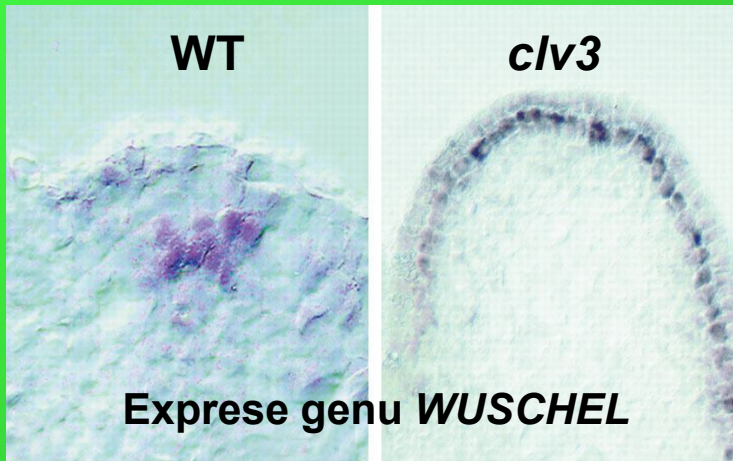
Kmenové buňky z vrstvy L1 a L3 mohou náhodně změnit rovinu dělení a mohou dát základ klonům buněk, které se diferencují v mezofylové buňky. Protože jsou tyto mezofylové buňky však odvozeny z vrstev L1 a L3, kde buňky obsahují neporušenou kopii genu, budou se v nich chloroplasty normálně vyvíjet => zelené oblasti listu.



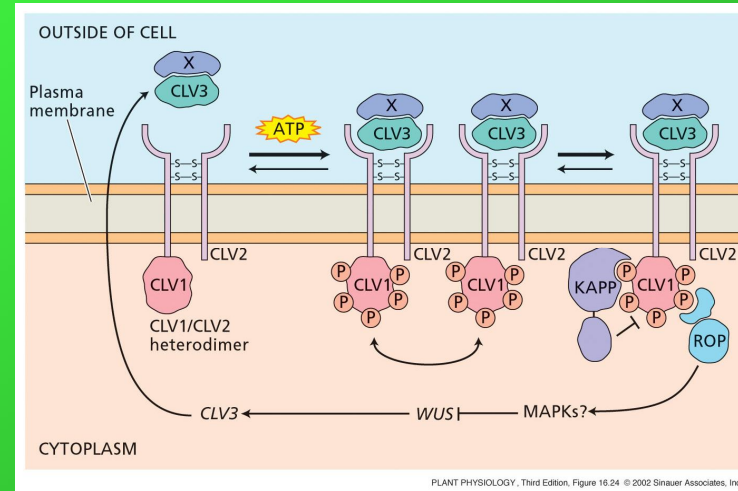
Důkaz, že diferenciace buněk není závislá na původu buňky, ale že osud buňky během vývoje je určen její polohou v těle rostliny.

WUSCHEL – kóduje transkripční faktor; udržuje kmenové buňky v nedeterminovaném stavu

CLV geny regulují vývoj stonkového apikálního meristému



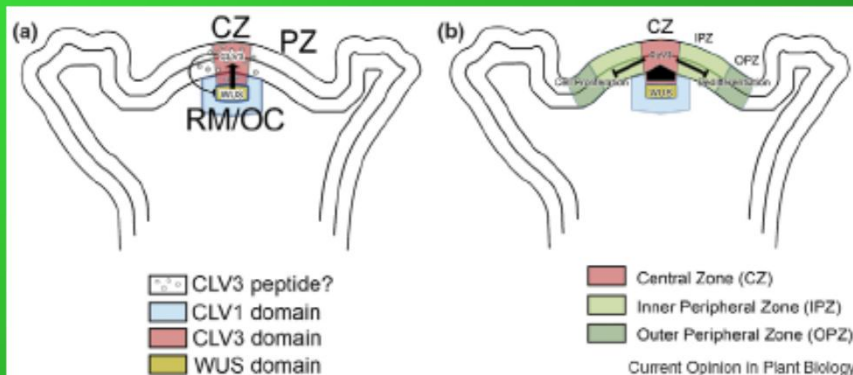
Expresse genu **WUSCHEL**



Interakce mezi geny **CLV1**, **CLV3** a genem **WUSCHEL**: **CLV3** a **CLV1** blokují **WUSCHEL**



Expresse **WUSCHEL** je silná v *clv1* a *clv3* mutantech



UPDATE 2008

Reddy GV (2008) Current Opinion in Plant Biology 11: 88-93

WUS – stimuluje expresi **CLV3** => udržování meristému (blokování diferenciace)

CLV3 – zpětnovazebně blokuje **WUS** => diferenciace meristému

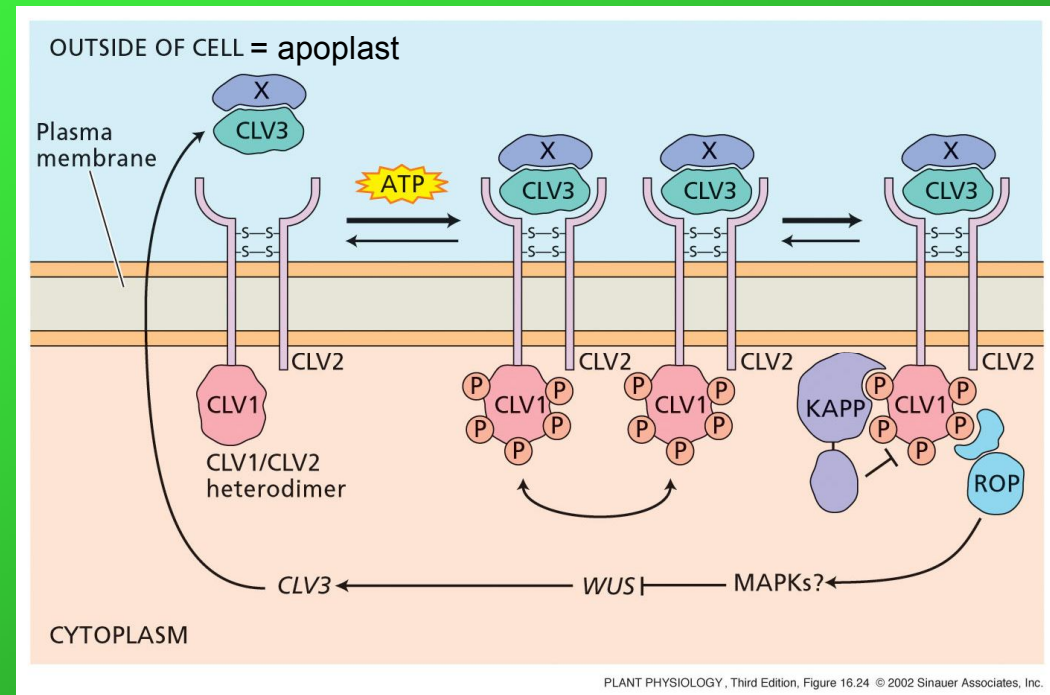
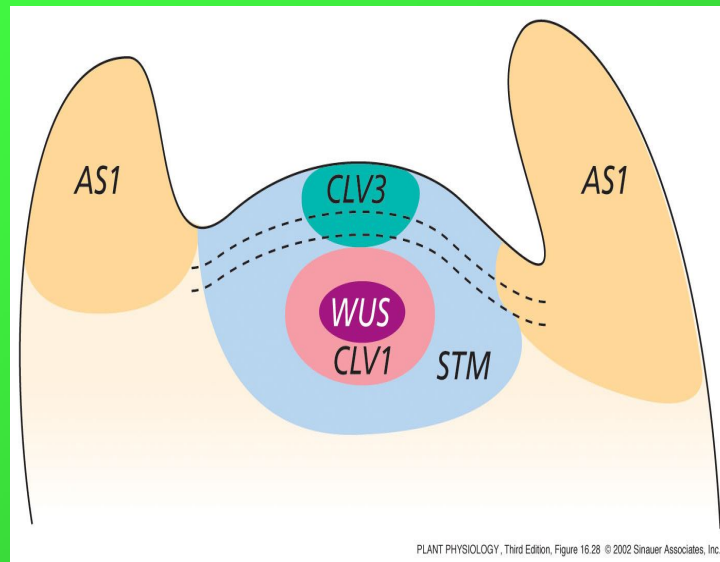
4) Vývoj je regulován přenosem signálu z buňky do buňky

Osud buňky je určen jejím umístěním v rostlině (polohou v orgánu). Buňka monitoruje svou polohu díky komunikaci s buňkami sousedními.

Mechanismy komunikace:

- a) Signál indukovaný ligandem
- b) Hormonální signál
- c) Signál pomocí přenosu mRNA či proteinu

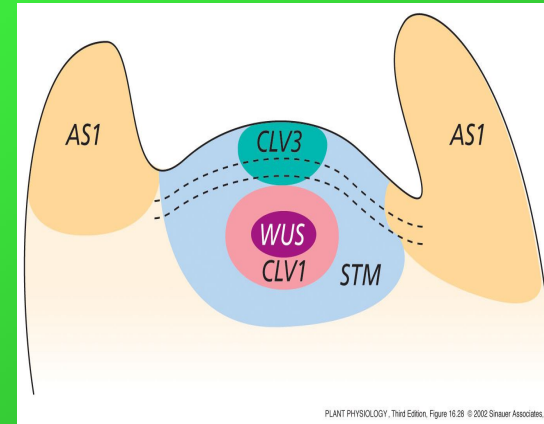
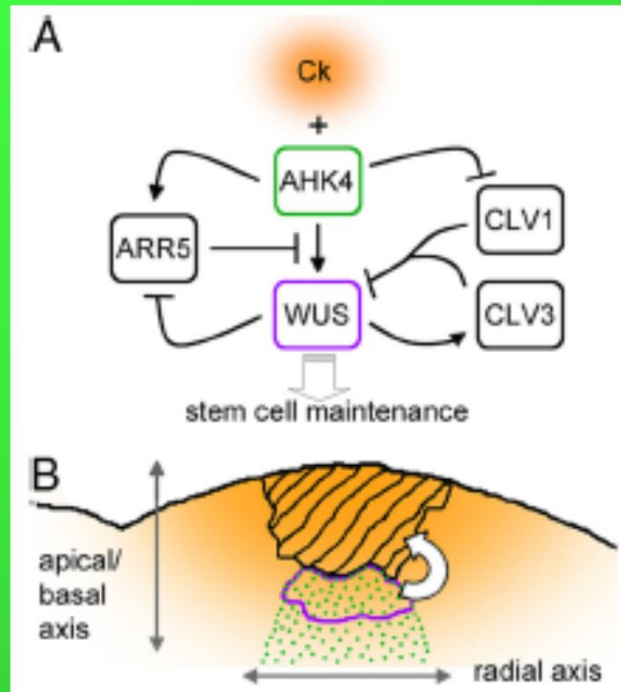
a) Signál indukovaný ligandem



CLV3 jako ligand difunduje apoplastem z L1 do L3. V L3 aktivuje CLV1. CLV1 iniciuje signál, který potlačuje transkripci *WUS*.

UPDATE 2009

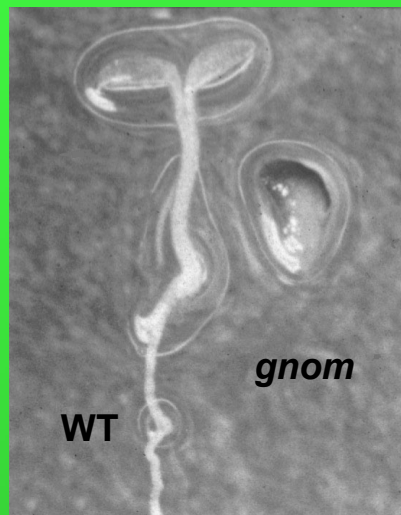
Sablowski R (2009) PNAS 106: 16016-16017

**Dráha WUSCHEL-CLV:**CKs => stimulace WUS => **udržování kmenových buněk**CKs => stimulace ARR5 => blokáce signální dráhy CKs na WUS => nízká exprese WUS => **diferenciace kmenových buněk** => nízká exprese CLV3 => **diferenciace meristému**WUS blokuje ARR5 => stimulace signalizace CKs => => exprese WUS => **udržování nediferencovaných kmenových buněk** => exprese CLV3 => **udržování nediferencovaného meristému***ARR5 = Arabidopsis response regulator5; feedback repressor***Dráha STM:***STM* stimuluje produkci cytokininů v meristému => udržování **nediferencovaného meristému**

b) Hormonální signál

Auxin hraje roli v axiální polaritě rostlin a ve vývoji vaskulárního systému. Geny **GNOM** a **MP** (viz KFZR 3a-c) hrají roli v signálních dráhách auxinů.

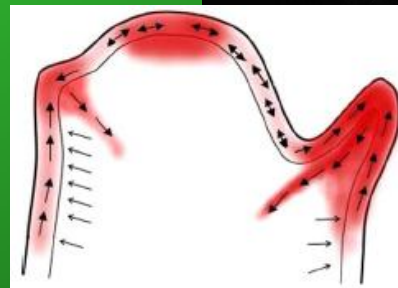
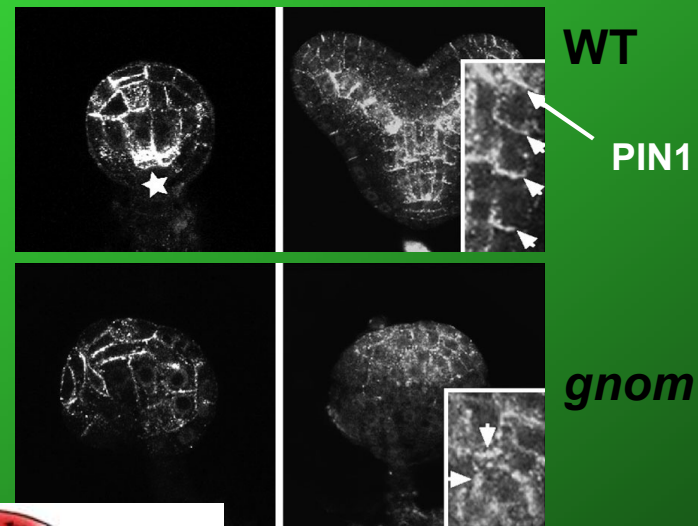
GNOM



Mutant **gnom** nevytváří dělohy a kořen = chybí axiální polarita

GNOM kontroluje apikálně-bazální polaritu

GNOM je nutný pro správnou lokalizaci proteinu **PIN1** v bazálních částech buňky, který slouží k transportu auxinu.

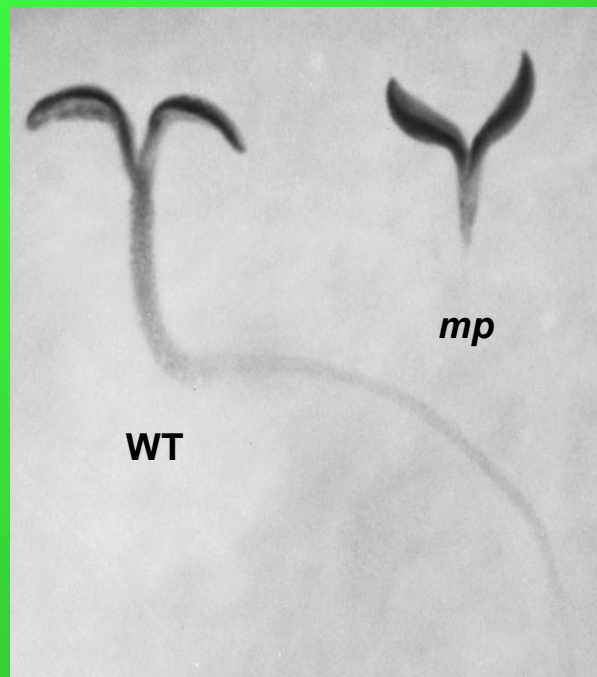


UPDATE 2009

Veit B (2009) Plant Mol Biol 69: 397-408

Distribuce PIN1 proteinů v apikálním meristému

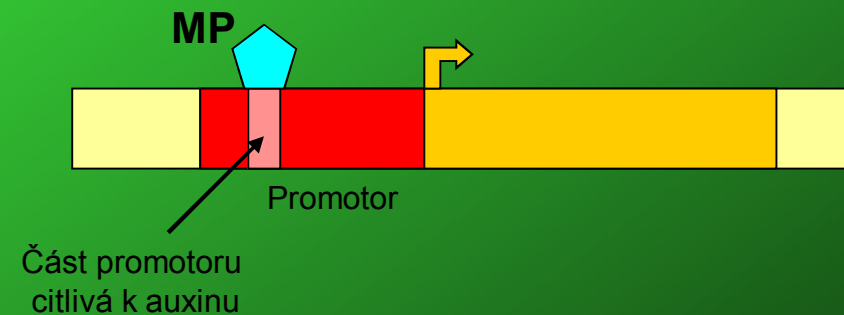
MONOPTEROS (MP) – kóduje protein podobný transkripčnímu faktoru ARF (**A**uxin-**R**esponse **F**aktor). MP se váže k části promotoru, která je citlivá k auxinu, a to u genů, jejichž exprese je auxinem indukována.



WT

mp

Gen exprimovaný auxinem



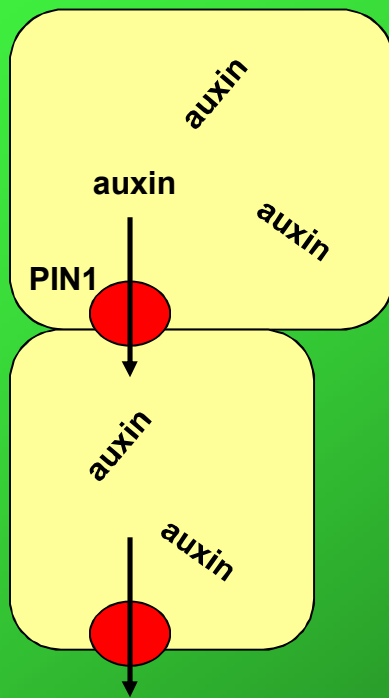
Mutant *monopteros* (*mp*) nevytváří kořen.

MP je nutný k formování embryonálního kořene

Auxin hraje roli ve vývoji laterálních orgánů.

PIN1 protein - lokalizovaný v bazálních částech buňky; transportuje auxin z buňky do buňky – distribuce auxinu.

Auxin je distribuován do míst iniciace laterálních orgánů



Mutant *pin1* – auxin není distribuován do míst iniciace laterálních orgánů => netvoří primordia laterálních orgánů

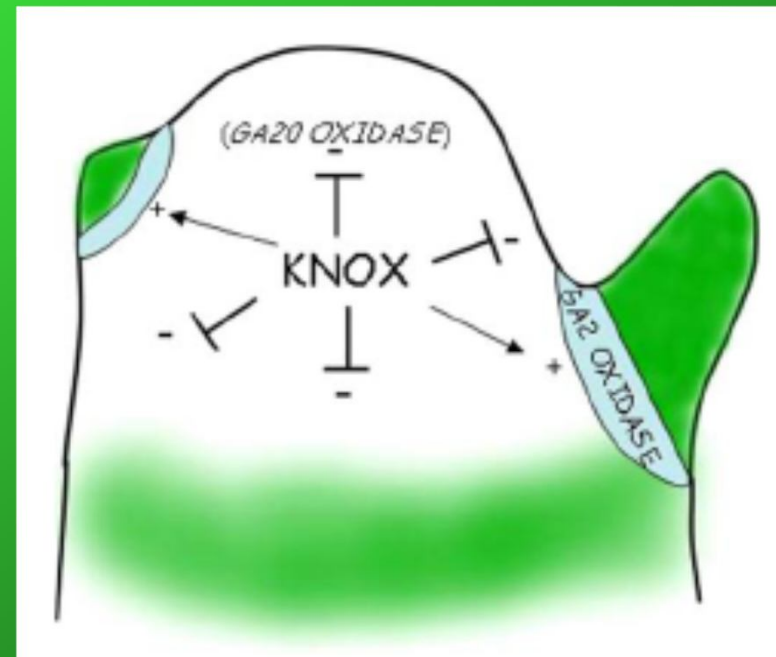
UPDATE 2009

Veit B (2009) Plant Mol Biol 69: 397-408

Expresse KNOX řídí syntézu a metabolismus giberelinů

Expresse KNOX => blokace biosyntézy GAs (GA20 oxidáza) v centrální části meristému

Expresse KNOX => stimulace konverze neaktivních GAs na aktivní GAs (GA2 oxidáza) v místech iniciace listů

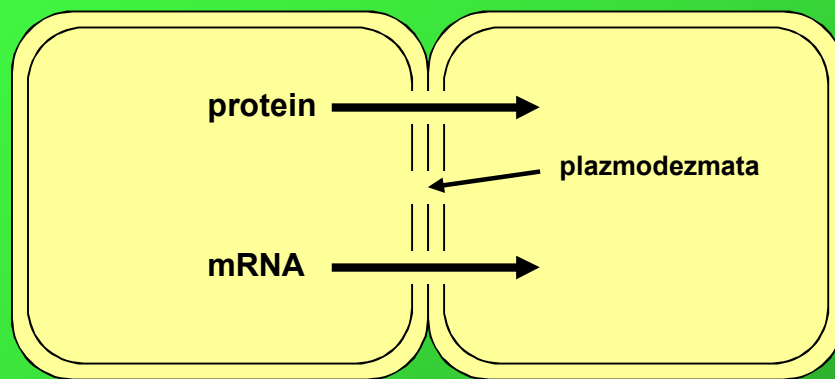


Vysoká hladina cytokininů – udržování nediferencovaného meristému

Vysoká hladina auxinů a giberelinů – iniciace laterálních orgánů

c) Signál pomocí přenosu mRNA či proteinu

Symplastická komunikace mezi buňkami = pomocí **plazmodezmat**



KN1 je exprimován pouze v L2 apikálního meristému.

KN1 mRNA nebyla nikdy detekována v L1

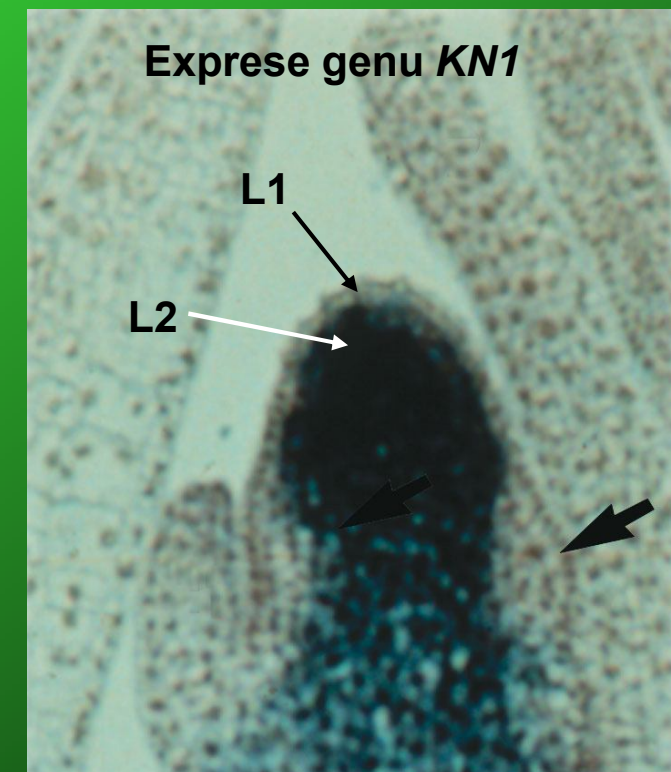


KN1 protein byl transportován do L1

KN1 protein byl detekován v L1



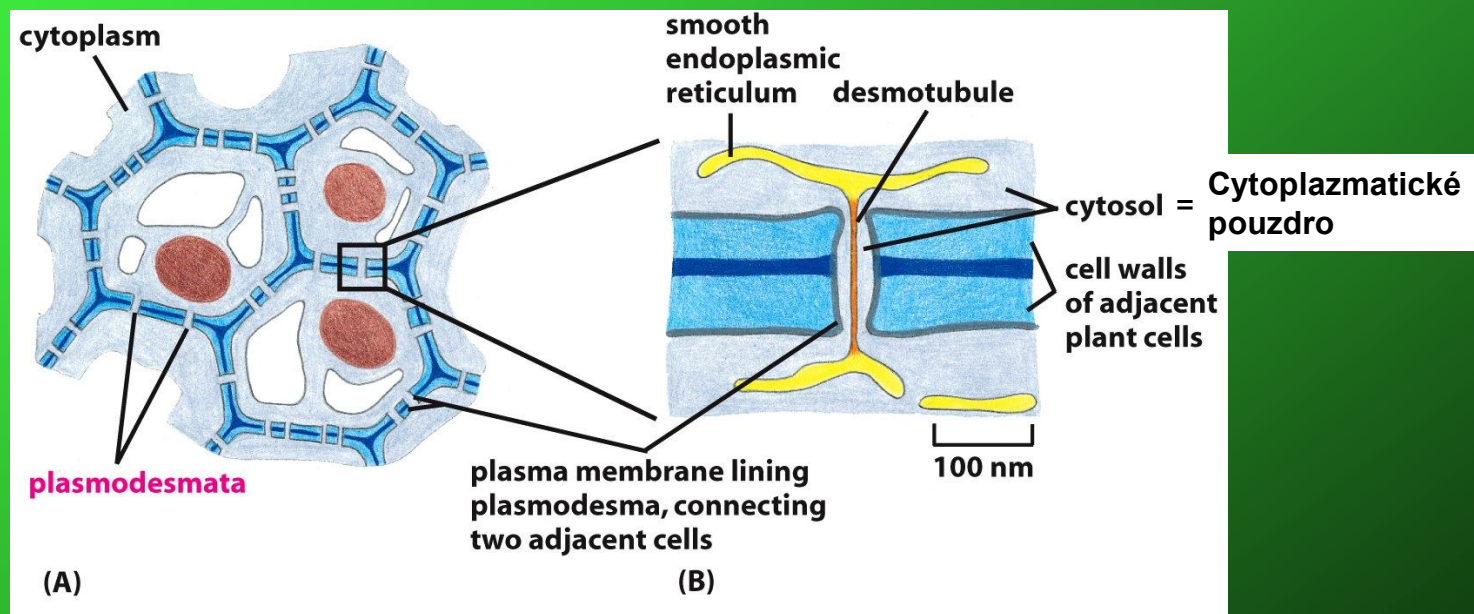
Oparka K (2005) *Plasmodesmata*. Blackwell Publishing.



Plazmodezmata – spojují cytoplazmy dvou buněk otvorem v buněčné stěně

Velké molekuly (proteiny, např. KN1; virové proteiny) – aktivní transport dezmotubulem z ER do ER; schopnost aktivního rozšíření průsvitu kanálu (dezmotubulu)

Menší molekuly (RNA, malé proteiny) – pasivní transport plazmodezmatem kolem dezmotubulu (cytoplazmatickým pouzdrem)



e) Analýza růstu rostlin

Jak rostliny rostou? Otázka stará 150 let.

Buňky tvořící se v apikálním meristému zvětšují svůj objem až 100x

Růst pletiv **není** uniformní ani náhodný. Buňky odvozené z meristému se zvětšují předem daným způsobem závislým na lokalizaci buňky.

Růst = \sum lokálních expanzí

Měření růstu

Růst je **ireverzibilní** zvětšování objemu = **expanze**. Buněčná expanze je řízená tlakem turgoru.

Čerstvá váha (**FW** = fresh weight) = váha živých pletiv, během určité periody; zahrnuje i vodu

Suchá váha (**DW** = dry weight) = množství nově vytvořené hmoty

Počet buněk = buněčné dělení; buňky se však mohou dělit i bez zvětšování objemu

Rychlost vzdalování nově vytvořených buněk od apexu

Pro meristemický růst lze použít model **kinematiky**. Kinematika studuje pohyb vody ve vodopádech či fontánách (studuje dynamiku pohybu - akceleraci a rychlost bez zájmu o sílu, která k pohybu vede)



Aplikace kinematiky na meristemický růst

Při růstu meristému či pletiva dochází k tomu, že forma, kterou vidíme zůstává stejná, i když komponenty této hmoty jsou pohybující se a měnící se částice (buňky pletiva = kapky vody).



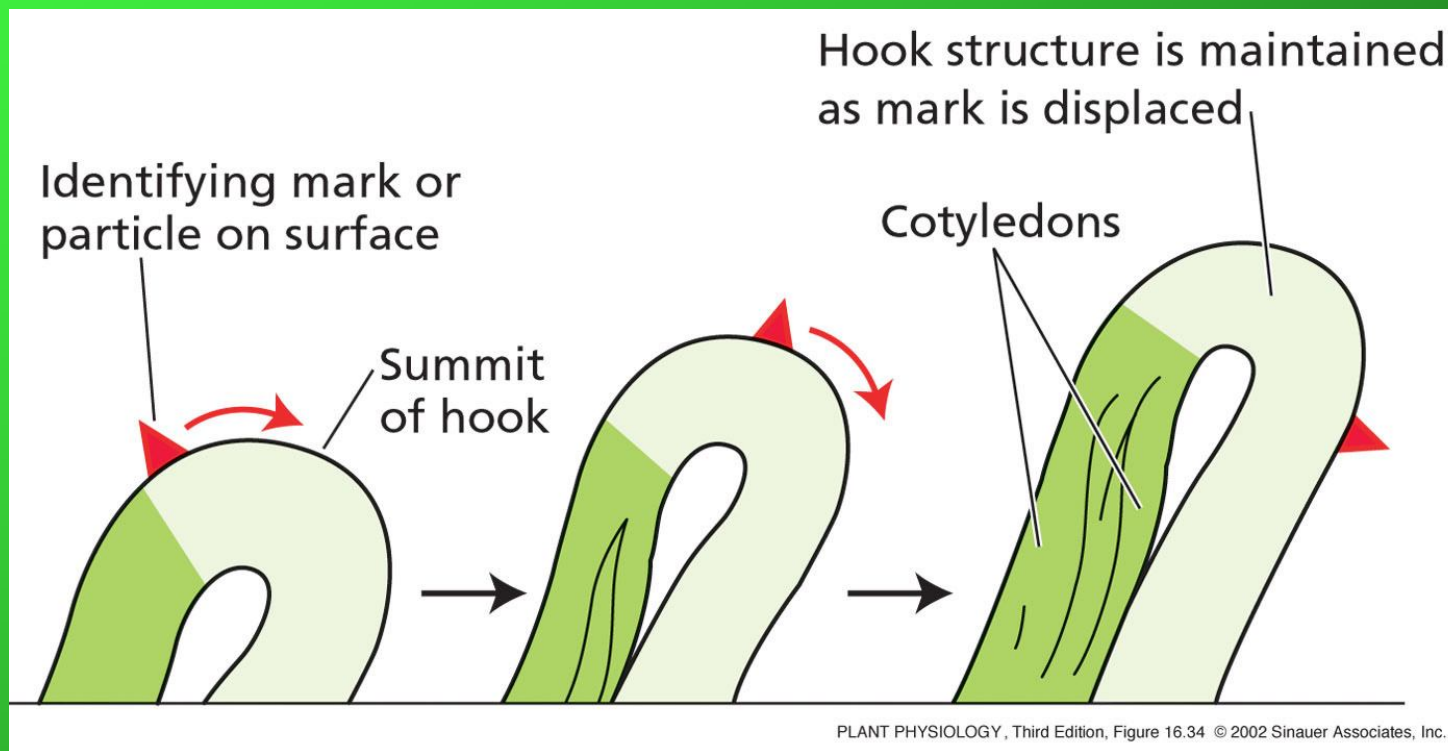
UPDATE 2007

Basu P et al. (2007) Plant Physiol 145: 305 - 316

Image-analysis program **KineRoot** – prostorově-časová analýza růstu a zakřivování kořene

**Růst kořene či stonku je lokalizován ve špičce tohoto orgánu
– v růstové zóně**

**S časem se meristém pohybuje dál od báze orgánu díky růstu buněk
v růstové zóně. Značka se pohybuje od špičky orgánu a rychlost
pohybu značky záleží na tom, kde značka je.**



f) Senescence (stárnutí) a programová smrt

Senescence (stárnutí) = přirozený, na energii závislý, proces kontrolován vlastním genetickým programem rostliny. Např. listy jsou geneticky naprogramovány zemřít, ale stárnutí může být iniciováno i vnějšími faktory (délka dne, teplota)

Senescence ≠ nekróza

Nekróza (necrosis) = smrt vyvolaná fyzickým poraněním, chemickým poraněním, atd.

Procesy probíhající během senescence:

- Ztráta schopnosti fotosyntézy
- Štěpení proteinů, karbohydrátů, nukleových kyselin hydrolytickými enzymy a floémový transport látek z listů do těla rostliny
- Abscise (oddělení) mnohých orgánů od těla rostliny

Typy senescence

Monokarpická = senescence celé rostliny po proběhnutém jednoletém reprodukčním cyklu; začíná žloutnutím, rostlina hyne a nechává po sobě potomstvo (pšenice, kukuřice, sója)

Sezónní listová senescence

Sekvenční listová senescence – stárnutí listů po dosažení určitého věku (jehlice)

Senescence plodů - zrání plodů

Senescence speciálních typů buněk
(trichomy, tracheidy, cévy)



Monokarpická senescence

Senescence děloh a květních orgánů



Povíjnice (*Ipomoea tricolor*)

Senescence je série cytologických a biochemických událostí

Senescence je geneticky zakódovaná => sleduje předem dané cytologické procesy: odstranění některých organel – chloroplasty; rozpadají se tylakoidní proteiny, stromatální enzymy; **jádro zůstává nejdéle**

Katabolické procesy vyžadují *de novo* syntézu hydrolytických enzymů: proteázy, nukleázy, lipázy, chloroplast-degradující enzymy

Požadavek aktivace specifických genů



Senescence down-regulated genes (SDGs) – geny, jejichž exprese se snižuje během senescence: geny kódující proteiny zapojené ve fotosyntéze

Senescence-associated genes (SAGs) – geny, jejichž exprese je indukována během senescence: geny kódující hydrolytické enzymy -enzymy biosyntézy etylénu ACC syntáza a ACC oxidáza

Programová buněčná smrt (PCD – Programmed Cell Death)

Programová buněčná smrt – specifický typ senescence

PCD = proces, kdy individuální buňky aktivují senescenční program

PCD je aktivována specifickými signály:

- Chyby v DNA replikaci během dělení
- Exprese charakteristických genů

Programová buněčná smrt – více známa u živočichů

U živočichů je PCD doprovázena změnami morfologickými a biochemickými = **apoptózou**

Během apoptózy jádro kondenzuje a jaderná DNA se fragmentuje specifickým stylem, způsobeným degradací DNA.

Funkce PCD: ochrana proti patogenním organismům

