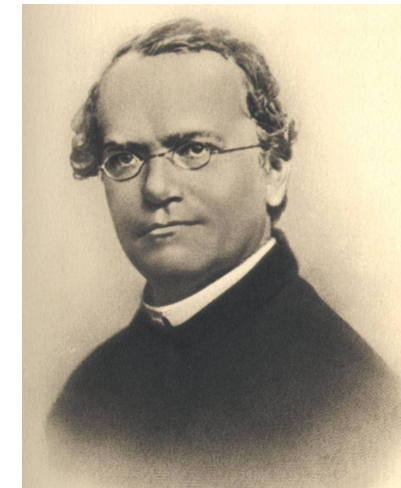
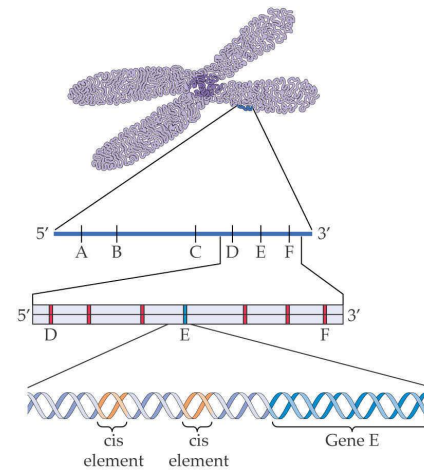
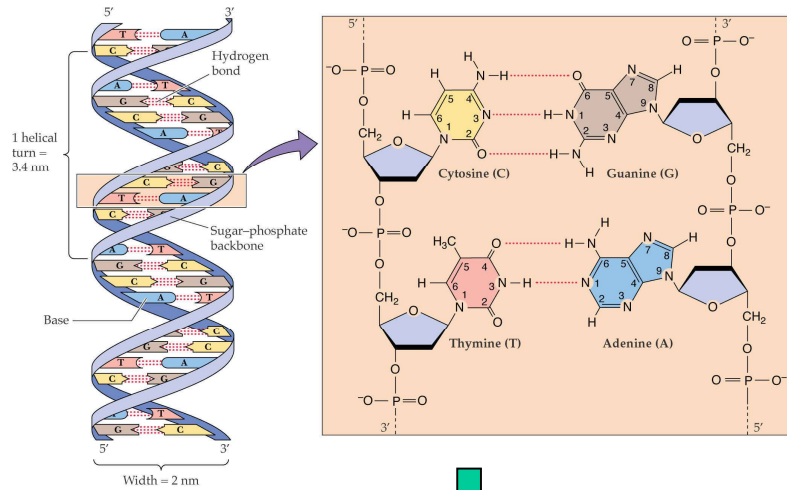


2) Exprese genů a přenos signálu

- a) Velikost a organizace rostlinného genomu**
- b) Exprese genů v rostlinách**
- c) Přenos signálu v rostlinách**

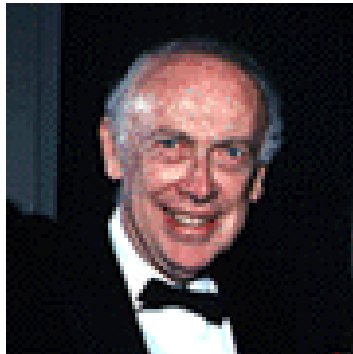
Živá buňka obsahuje instrukce pro vybudování celého organismu = GENY

Lineárně poskládané GENY tvoří chromozóm (J. G. Mendel 1865)

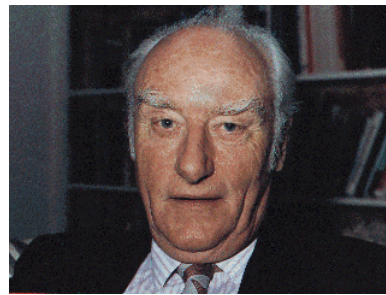


Prof. Gregor Johann Mendel
(20.7. 1822 – 6.1. 1884)

1953 - struktura DNA (Nobel Price in Medicine 1962)



Prof. James Watson (USA)



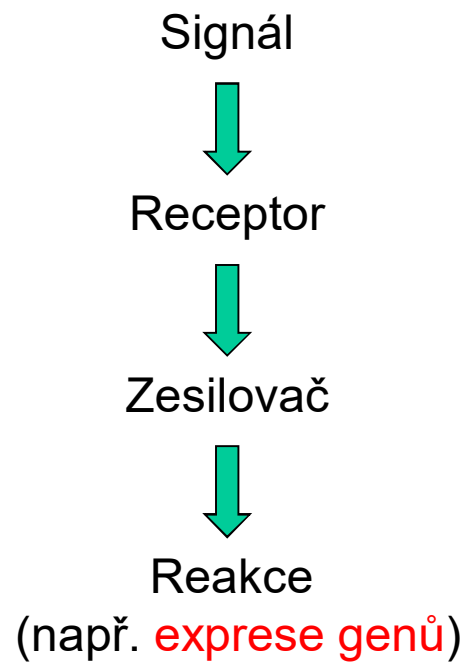
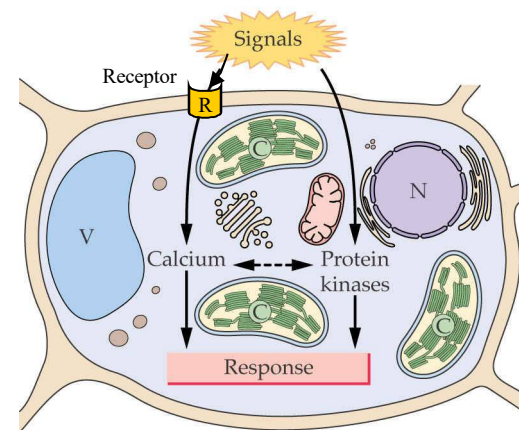
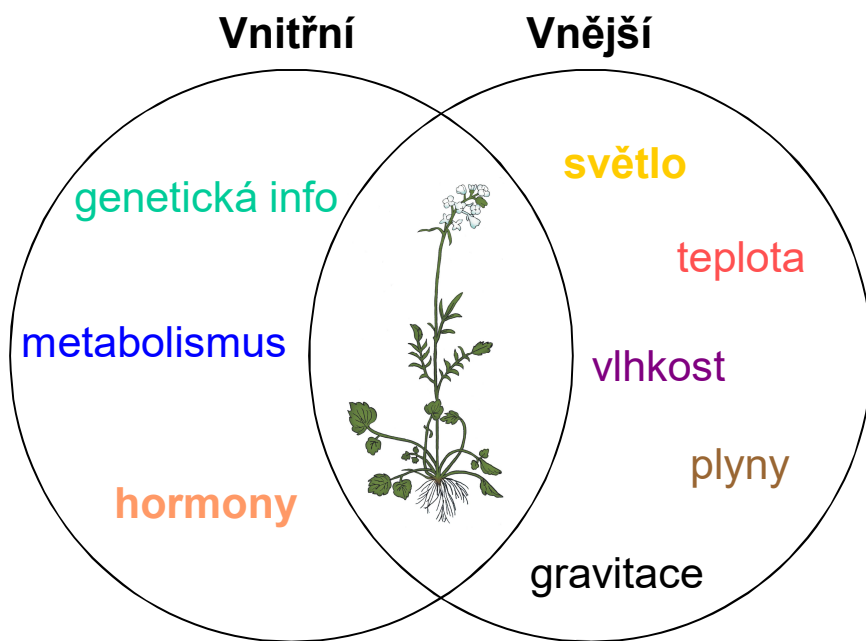
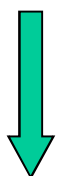
Prof. Francis Crick (UK) († 29.7. 2004)



Rosalind Franklin (UK) († 16.4. 1958)

→ Vývoj
molekulární
biologie

Vývoj organismu regulují signály (faktory)



a) Velikost a organizace rostlinného genomu

GEN = sekvence DNA, která kóduje molekuly RNA přímo zapojené ve tvorbě enzymu či strukturálního proteinu buňky (pojem gen poprvé použil v roce 1909 Wilhelm L. Johannsen)

Geny na chromozómu tvoří vazebné skupiny = dědí se společně

GENOM = celkové množství DNA (tj. genetické informace) v buňce (tj. jádře + organelách)

Růst, vývoj a reakce organismu k prostředí je naprogramované zapínání a vypínání genů (tj. naprogramovaná exprese)



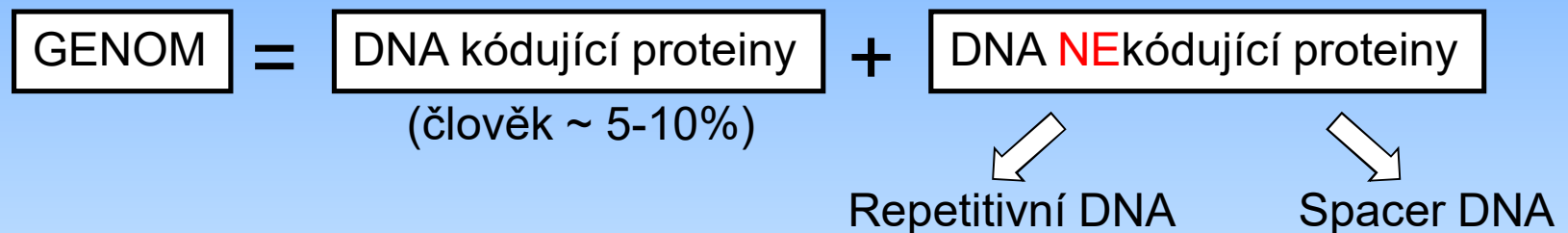
Změna v sestavách enzymů a strukturálních proteinů



Růst, vývoj, reakce organismu

Haploidní sestavy: *E. coli* = $4,7 \times 10^6$ bp
Drosophila = 2×10^8 bp
 Člověk = 3×10^9 bp

Velikost eukaryontního genomu neurčuje složitost organismu, protože ne všechna DNA kóduje geny:



Velikost rostlinného genomu je velice proměnlivá:

Arabidopsis = $1,46 \times 10^8$ bp

Trillium = 10^{11} bp

Druhy rodu *Vicia* se liší i 20x velikostí svého genomu



Trillium grandiflorum

Odlišnost velikosti genomů je dána odlišným množstvím repetitivní a spacer DNA

Arabidopsis = nejmenší genom ze všech rostlin, protože jen 10% DNA je repetitivní => *Arabidopsis* - modelová rostlina



Genomické sekvenční projekty => znám genom mnoha organismů

Bakterie = 500 genů – 8 tisíc genů

Kvasinky = 6 tisíc genů

***Drosophila* = 12 tisíc genů**

***Arabidopsis* = 26 tisíc genů (1 gen = ~ 5 kb)**



Většina haploidních genomů rostlin obsahuje průměrně 20 – 30 tisíc genů

Dnešní představa - 12 tisíc genů stačí k formování eukaryontního organismu



Housekeeping (provozní) geny = konstitutivní (neustálá) exprese genu (geny kódující proteiny, které mají důležitou funkci v mnoha typech buněk)

Rostliny: *UBQ* (pro protein ubiquitin), *ACT* (pro protein aktin)

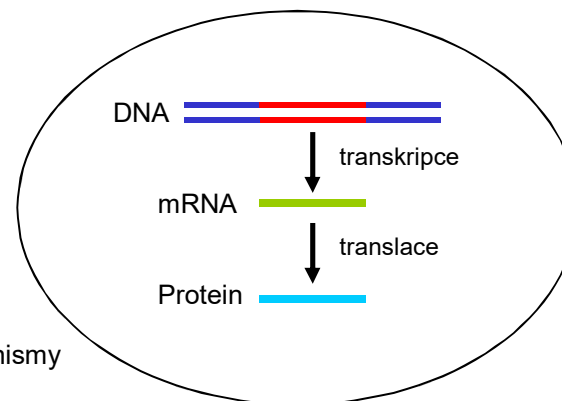
Člověk: *UBQ*, *EMC7* (ER membrane protein complex subunit 7)



Regulované geny = geny se zapínají a vypínají podle potřeb nebo jako reakce na specifické podněty

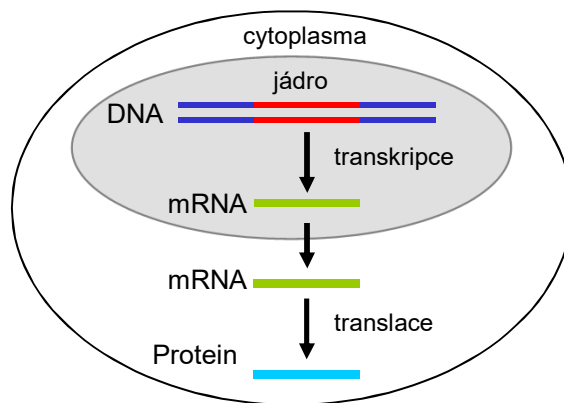
b) Exprese genů v rostlinách

Prokaryontní organismy: transkripce a translace jsou časově i prostorově spojeny = syntéza proteinů začíná ještě před koncem syntézy mRNA; transkripce i translace probíhají v cytoplasmě



Prokaryontní organismy
nemají jádro

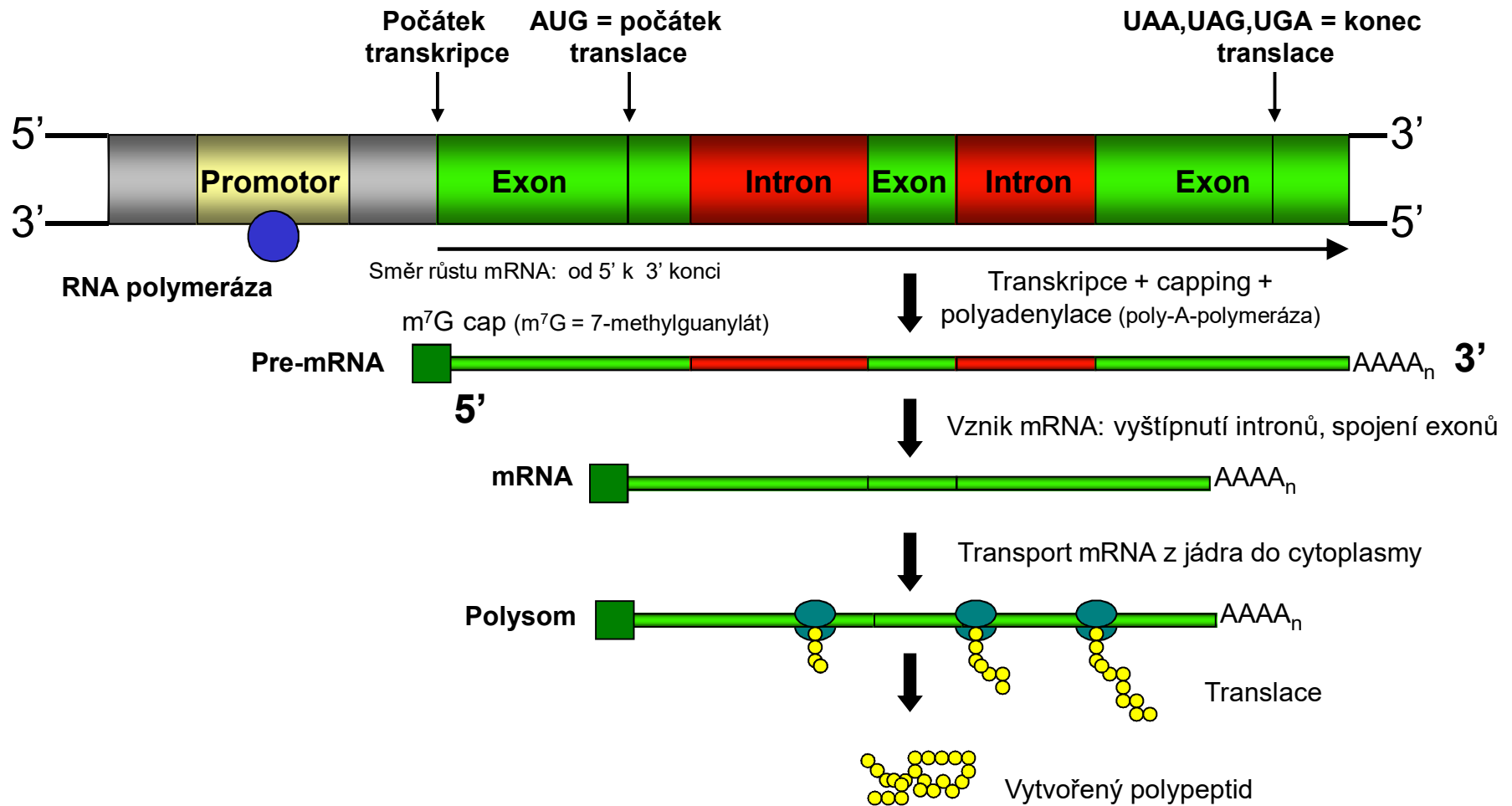
Eukaryontní organismy: transkripce a translace jsou časově i prostorově odděleny = mRNA je transportována do cytoplasmy, kde probíhá syntéza proteinů.



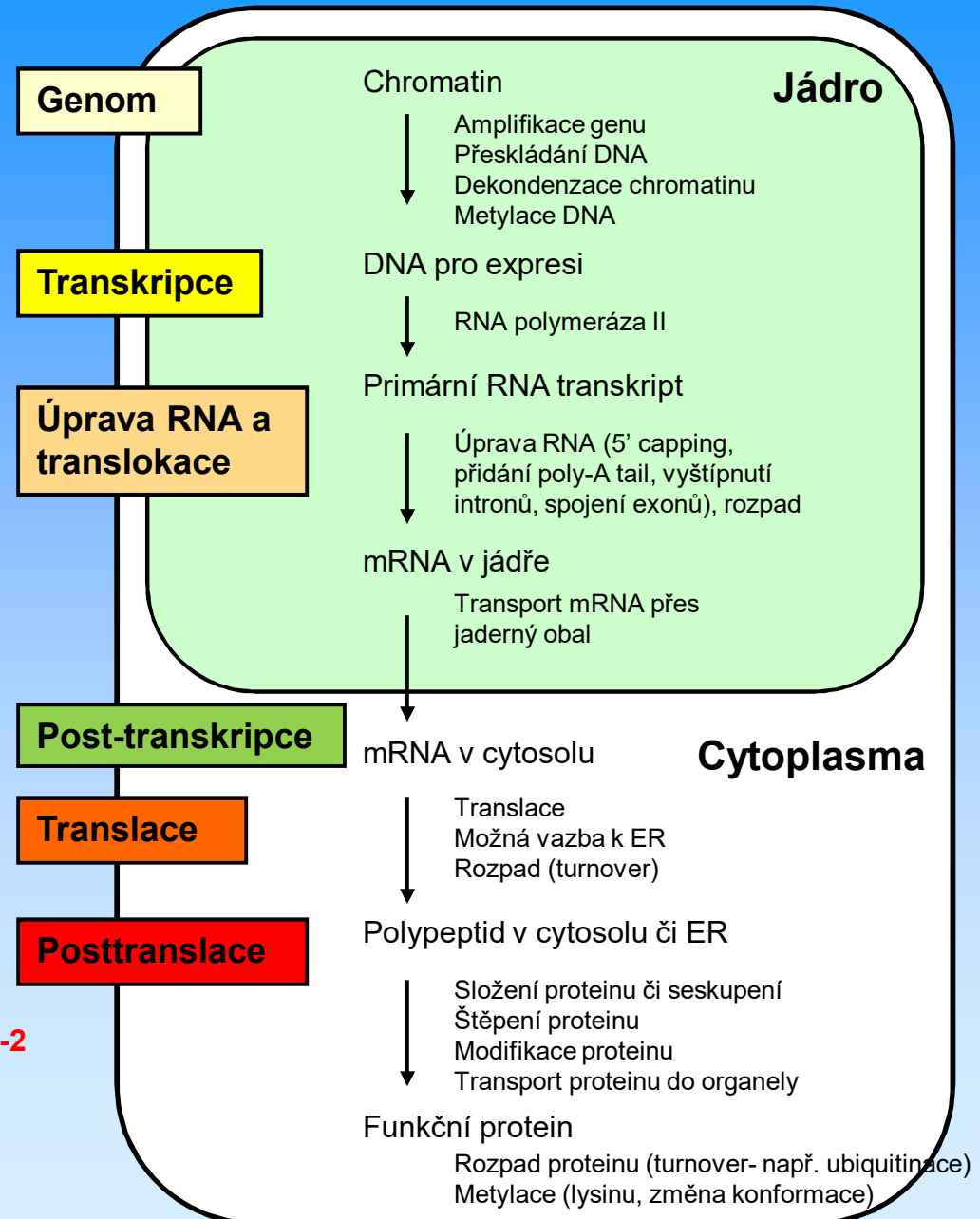
**Potřeba dalších kontrolních
regulačních mechanismů**

Organizace genomu u eukaryontních organismů:

- jeden gen kóduje jeden polypeptid
- jaderný genom neobsahuje operony
- místo operonů jsou exony a nekódující oblasti DNA se nazývají introny



Různé úrovně regulace exprese eukaryotického genu



Update 2016

Schneeberger K (2016) *Nature Plants* 2: 1-2
Evoluce a význam DNA metylace

Post-transkripční regulační mechanismy

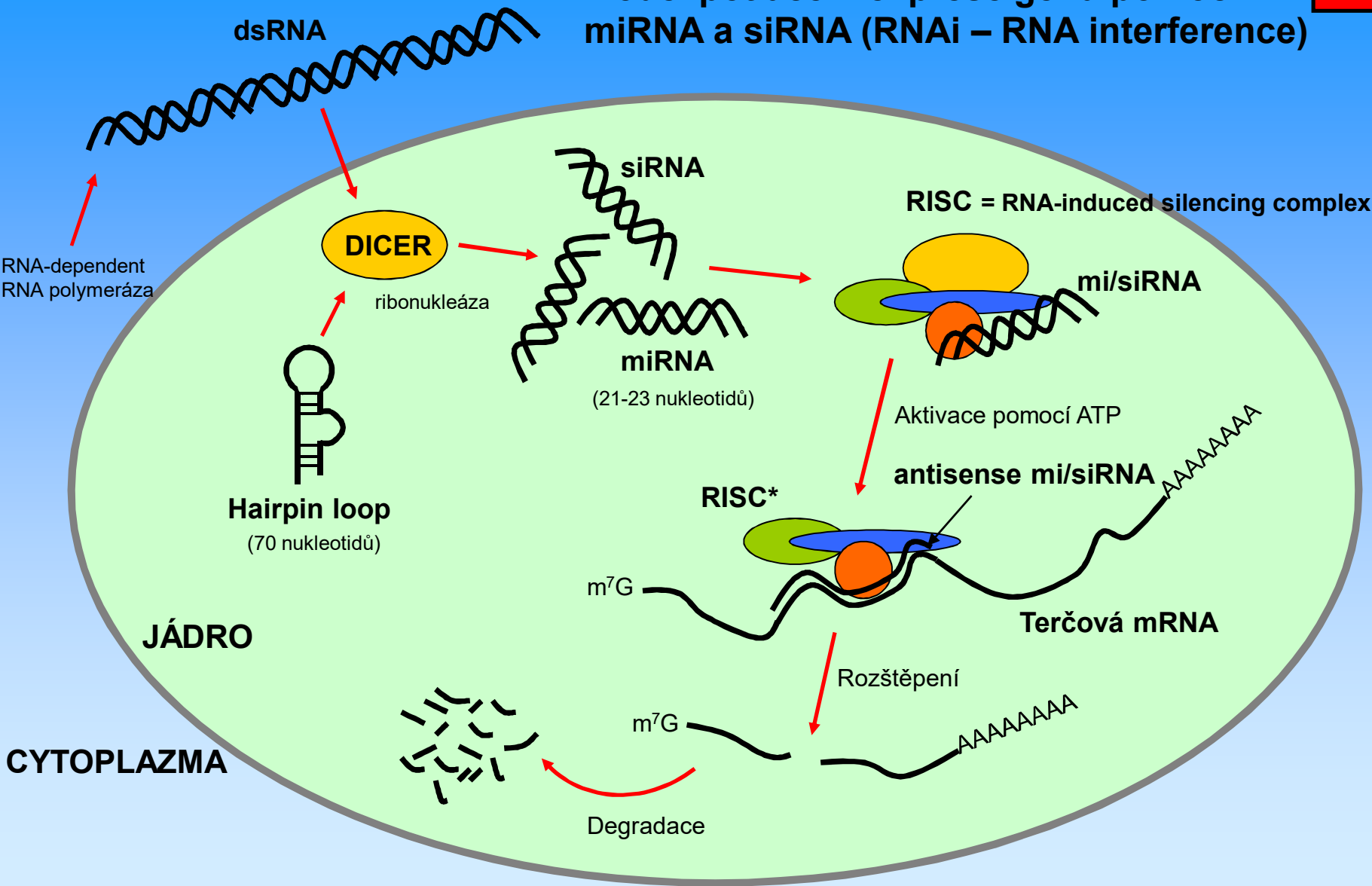
1) Stabilita (turnover rate) mRNA – závisí na pletivu a fyziologických podmínkách rostliny

2) Translatabilita molekuly mRNA = schopnost mRNA být přeložena do molekuly proteinu

Faktory ovlivňující translatabilitu:

- **Sekundární a terciální struktura RNA – přístupnost AUG k ribozómu**
- **Predispozice kodónu (codon bias) – množství vzácných kodónů**
- **Buněčná lokalizace translace – volné polyzomy či polyzomy vázané na ER**


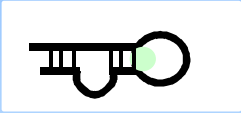
Model potlačení exprese genu pomocí miRNA a siRNA (RNAi – RNA interference)



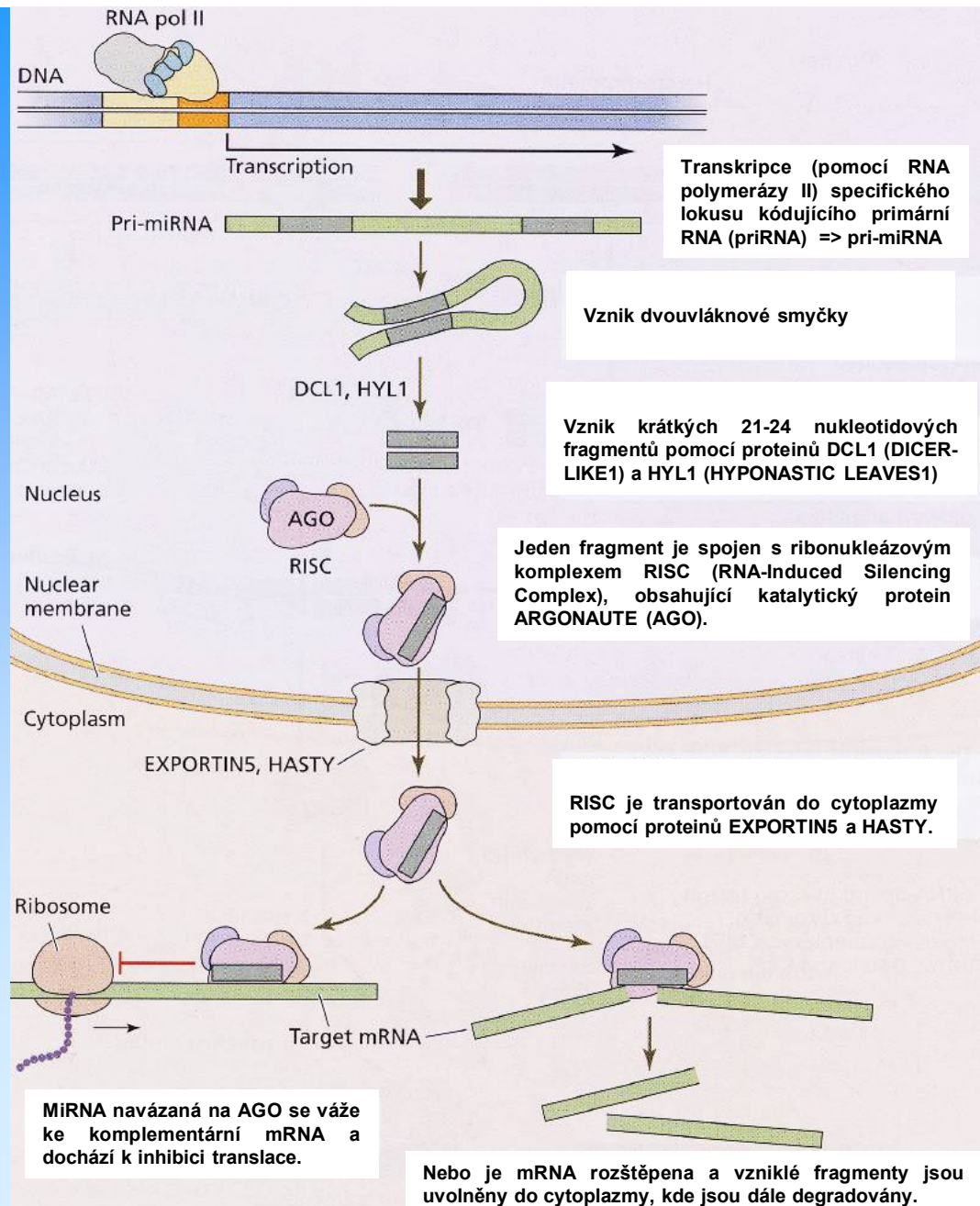
Podle Taiz L and Zeiger E (2006) Plant Physiology, 4th ed.

miRNA - microRNA
siRNA - short interfering RNA nebo silencing RNA

Srovnání miRNA a siRNA

	miRNA	siRNA
Původ	Konkrétní lokusy v genomu Kódované vlastními geny	Kódované transpozony, viry, heterochromatinem
Prekurzor (biogeneze)	Jedna molekula RNA obsahující sec. strukturu stem-loop 	Dlouhé dvouvláknové molekuly RNA nebo rozšířené hairpiny 
Evoluční konzervovanost	Téměř vždy konzervované v příbuzných organizmech	Vzácně konzervované v příbuzných organizmech
Cíle regulace	Regulují expresi různých genů	Zprostředkují vypnutí genů, ze kterých sami pochází (nebo velmi podobných genů)

Regulace exprese prostřednictvím microRNA (miRNA)



Update 2015

Laressergues D et al. (2015)
Nature 520, 90–93

MicroRNA se vytváří z pri-miRNA, která byla až doposud považovaná za nekódující – tedy, že nekóduje žádný protein. Bylo zjištěno, že některé pri-miRNA kódují peptidy, které zvyšují produkci jejich miRNA.

Update 2021

Prasad A et al. (2021)
Trends in Plant Science 26, 204-206

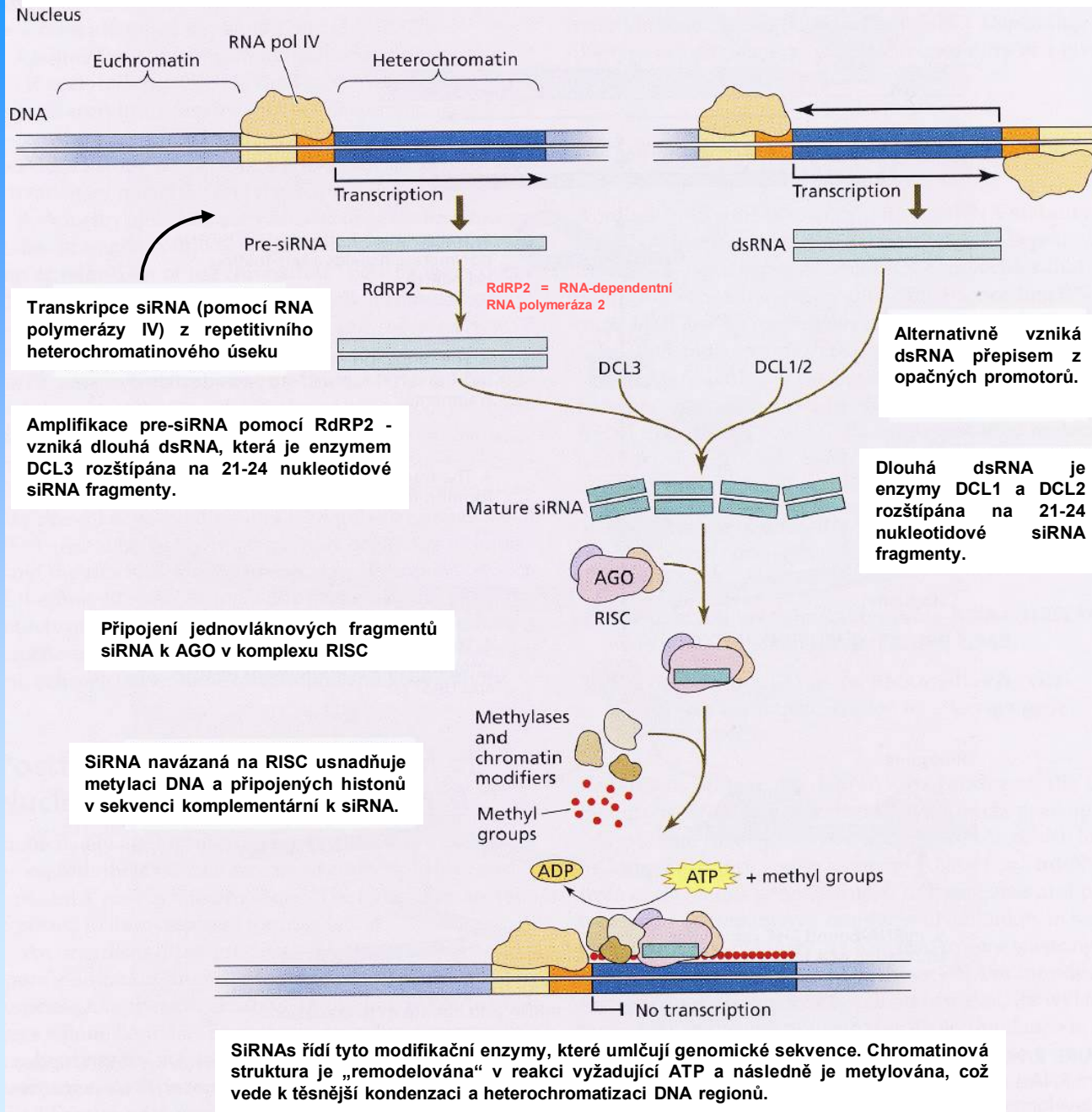
Některé pri-miRNAs mohou kódovat krátké peptidy zvané mikropeptidy (miPEPs) – pozitivně regulují akumulaci jim odpovídajících miRNA.



Možnosti použití miPEPs v zemědělství při zvýšení výhodných vlastností plodin.

Podle
Taiz L and Zeiger E (2010)
Plant Physiology, 5th ed.

Regulace exprese prostřednictvím short interfering RNA (siRNA)



Update 2016

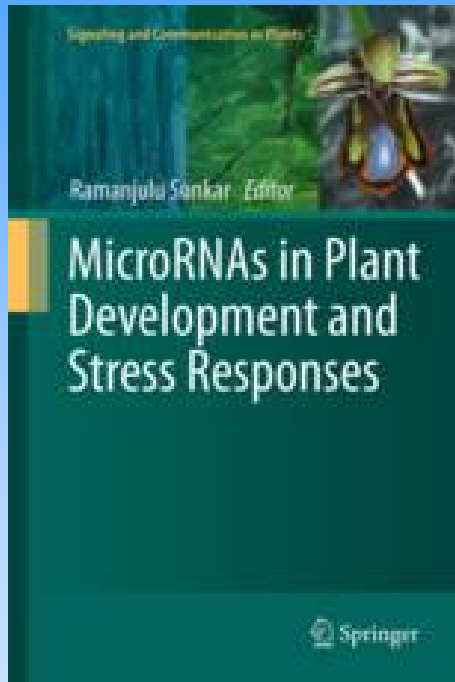
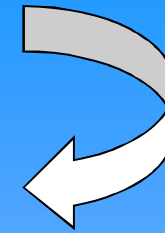
Cui Y et al. (2016)
Plant Cell 28: 2576-2585

V procesu připojování miRNA k AGO1 hraje důležitou úlohu protein TRANSPORTIN1 (TRN1). Defekt v TRN1 nemění distribuci miRNA a AGO1 mezi cytoplazmou a jádrem, ale redukuje množství miRNA spojující se s AGO1.

Podle
Taiz L and Zeiger E (2010)
Plant Physiology, 5th ed.

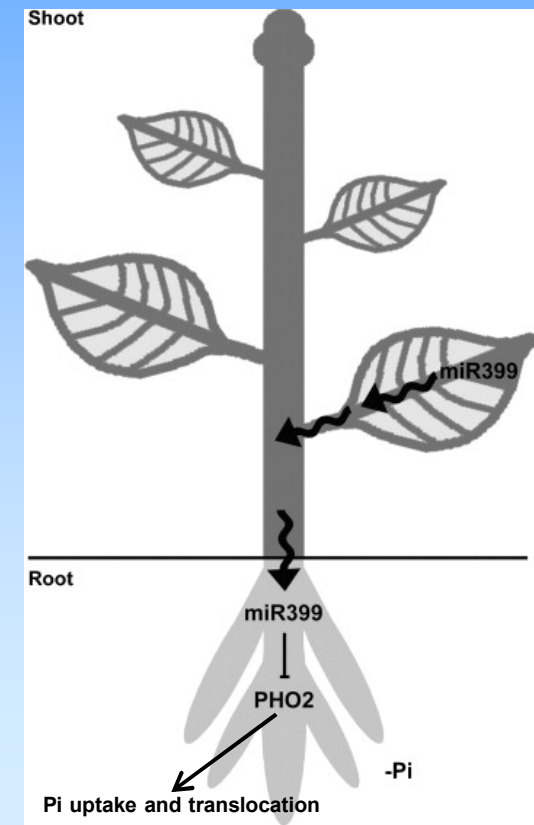
miRNA a siRNA regulují expresi genů

Důležitá úloha v signalizaci růstu a vývoje rostlin



Sunkar R (2012) *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses*. Springer

Marín-González E et al. (2012) *Plant Science* 196: 18-30
miRNA jsou transportovány na dlouhé vzdálenosti



Update 2019

Fang X et al. (2019) *Developmental Cell* 48: 371-382

Práce ukazuje existenci signálního mechanismu mezi chloroplasty a jádrem, který je zapojen v biogenezi miRNA při abiotických stresech. Tokoferoly (vitamin E), syntetizované z tyrozinu v chloroplastech, pozitivně regulují vznik miRNA.

Regulace genové exprese na úrovni transkripce

Trankripce u eukaryontů je mnohem složitější než u prokaryontů. Tři základní rozdíly v traskripci mezi eu- a prokaryonty:

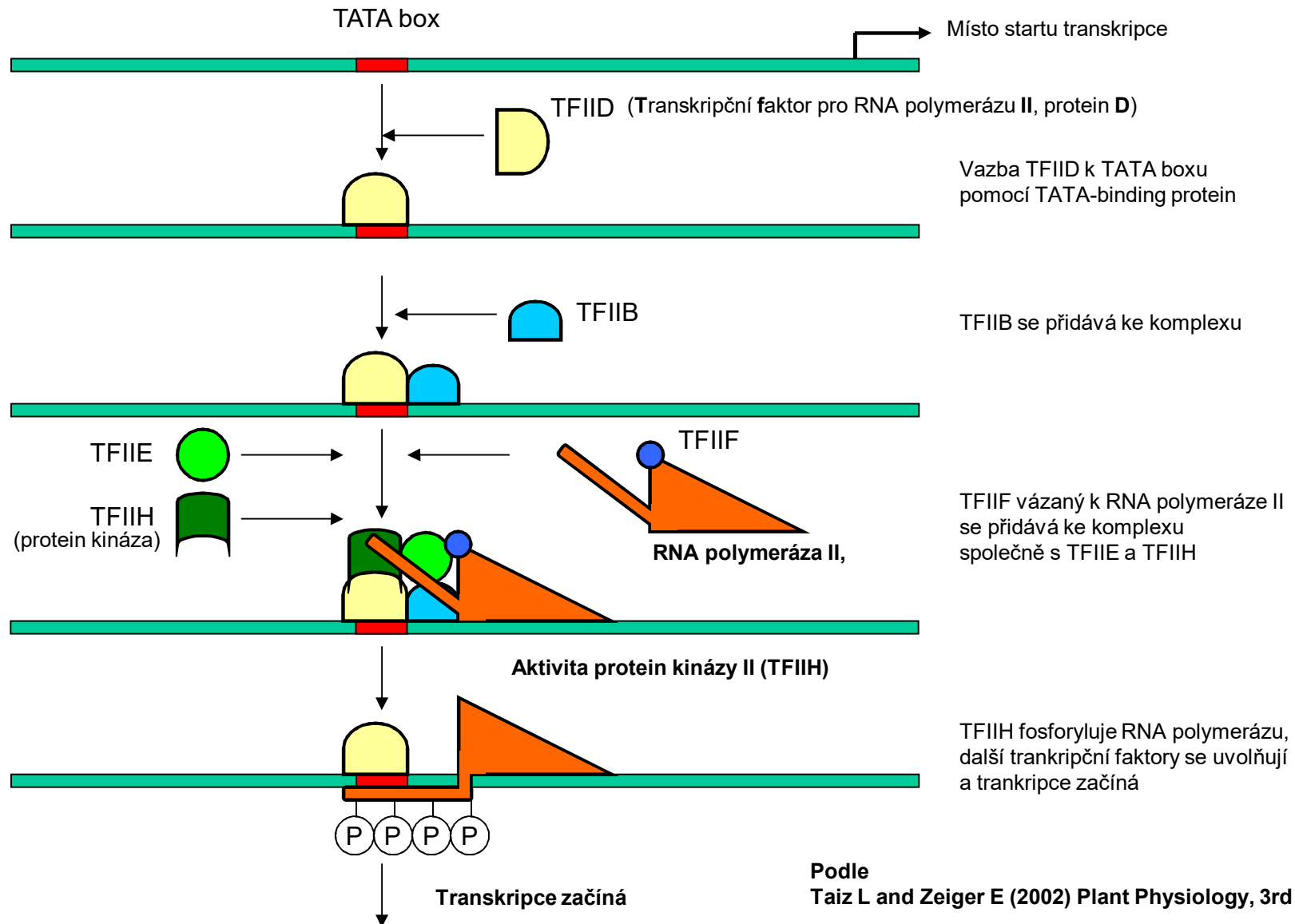
- 1) **Eukaryonti využívají nejméně 3 různé RNA polymerázy: I, II a III**
 - I - lokalizovaná v jadérku, role v syntéze ribozomální RNA
 - II - lokalizována v nukleoplazmě, role v syntéze **pre-mRNA**
 - III - lokalizována v nukleoplazmě, role v syntéze tRNA či 5S RNA

- 2) **Eukaryontní RNA polymerázy vyžadují další proteiny- tzv. obecné transkripční faktory** - zajišťují správnou pozici RNA polymerázy ve startovacím místě; transkripční faktory tvoří složité komplexy

TF a miRNA sdílí obecnou regulační logiku:

- a) TF i miRNA jsou vymezeny pro individuální typy buněk
- b) TF i miRNA kontrolují desítky či stovky terčových genů
- c) Většina genů je regulována kombinací TFs nebo miRNAs

Komplex transkripčních faktorů regulujících transkripci



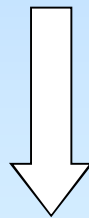
3) **Eukaryontní promotory (= sekvence před iniciačním místem) jsou složité**

Struktura eukaryontního promotoru:

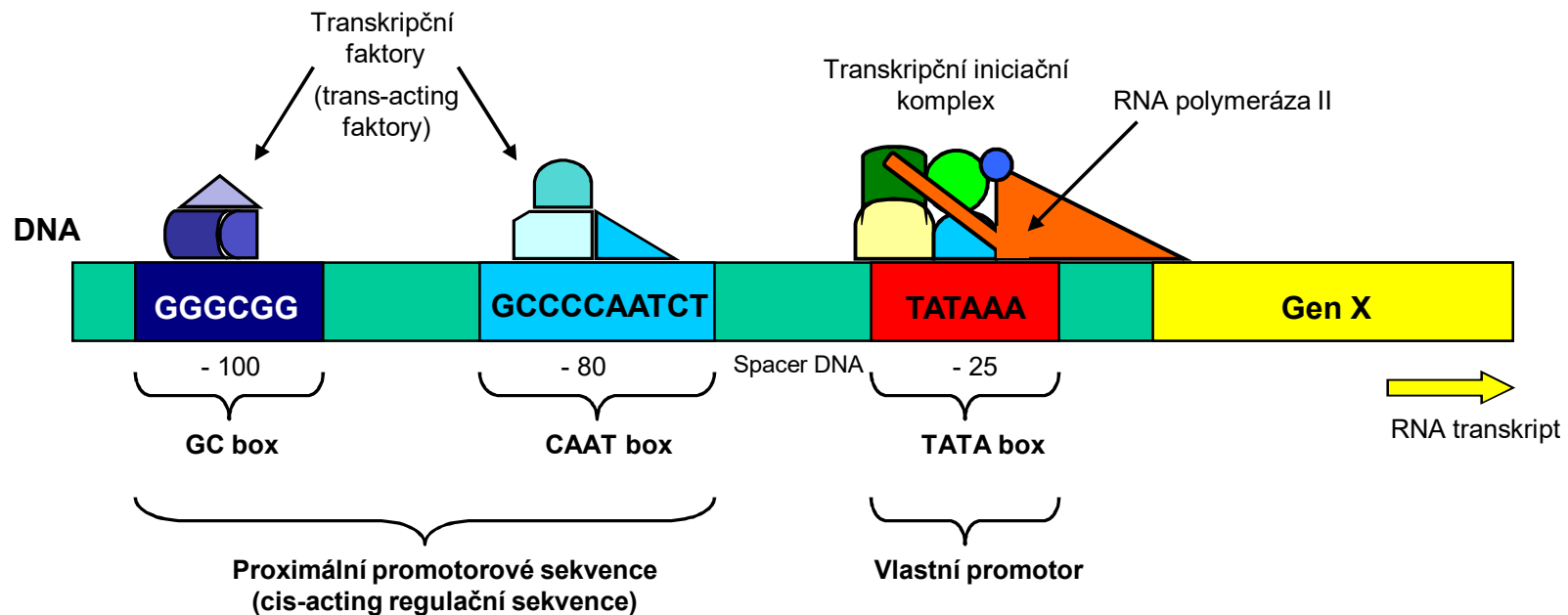
- core (minimální promotor) = minimální sekvence potřebná pro expresi
- regulační sekvence = sekvence kontrolující aktivitu minimálního promotoru

Každá z polymeráz I, II a III vyhledává odlišný typ promotoru.

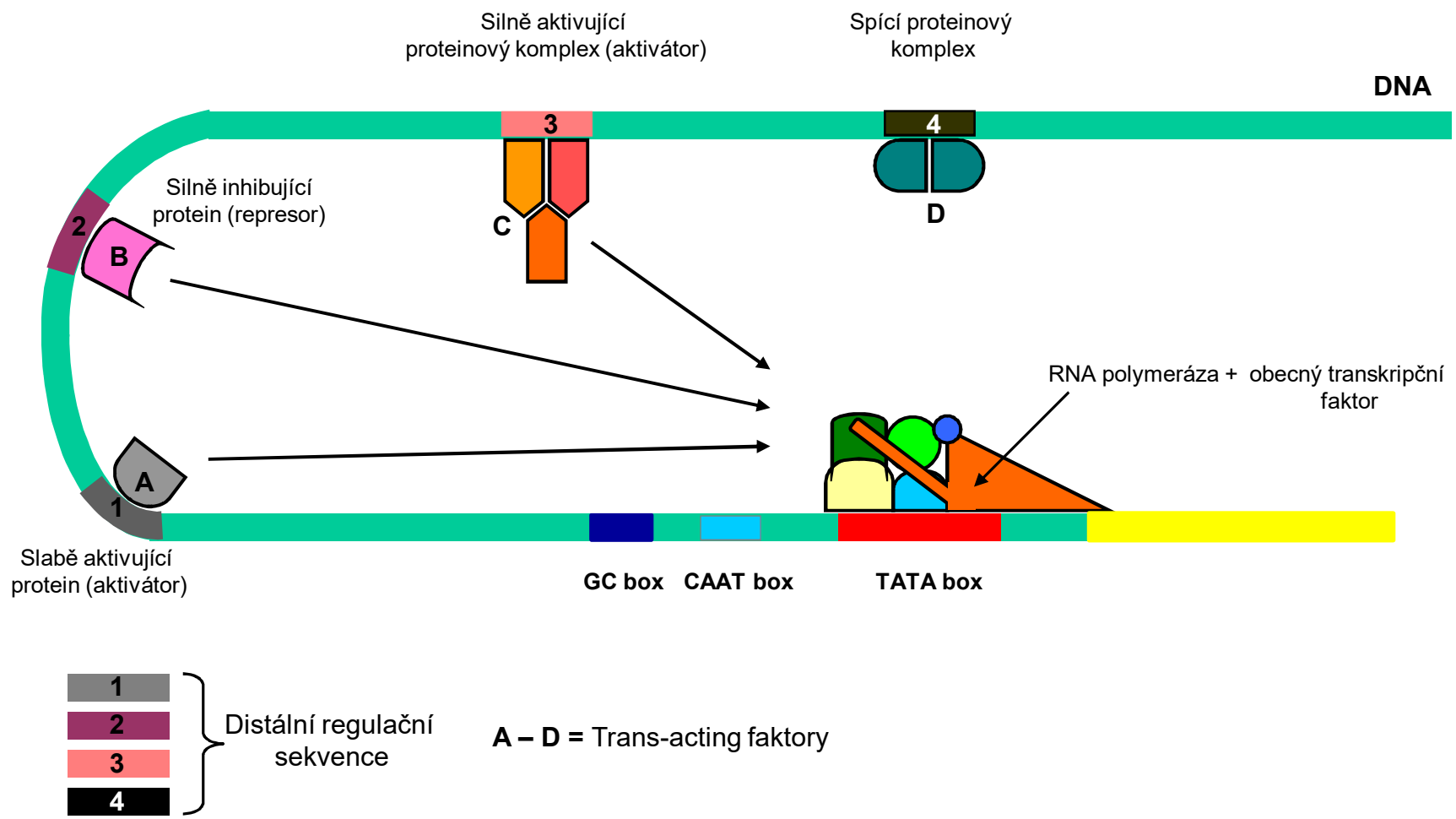
Typický promotor pro RNA polymerázu II



Organizace a regulace typického eukaryotického minimálního promotoru (core promotoru) pro **RNA polymerázu II**



Regulace transkripce distálními regulačními sekvencemi



Strukturální motivy transkripčních faktorů

Transkripční faktory se skládají ze 3 strukturálních částí

- DNA-binding (vázající) doména
- Transkripci-aktivující doména
- Ligand-binding doména

Aby se DNA-binding doména transkripčního faktoru mohla vázat k DNA, musí intenzívně interagovat s double helix DNA tvorbou vodíkových můstků, iontových a hydrofobních vazeb.



DNA-binding motivy

Wehner N et al. (2011) *Frontiers in Plant Science* 2(68): 1-7

Review of metodách studia transkripčních faktorů

DNA-binding motivy

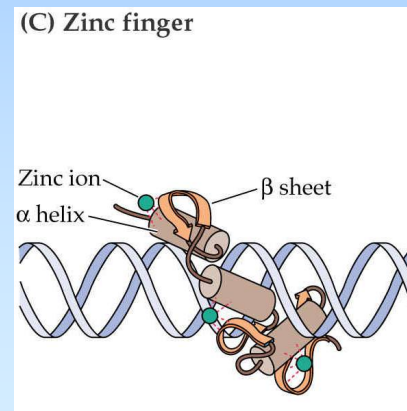
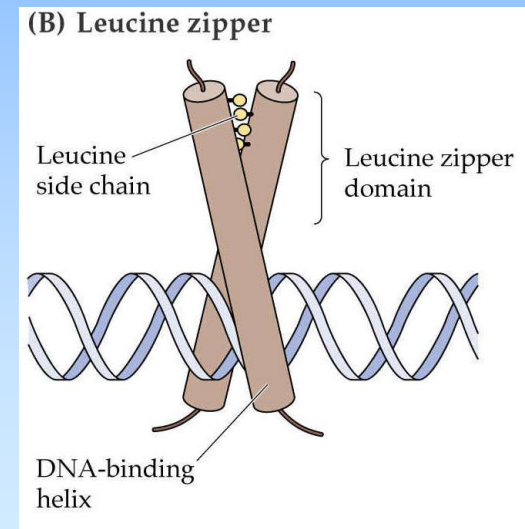
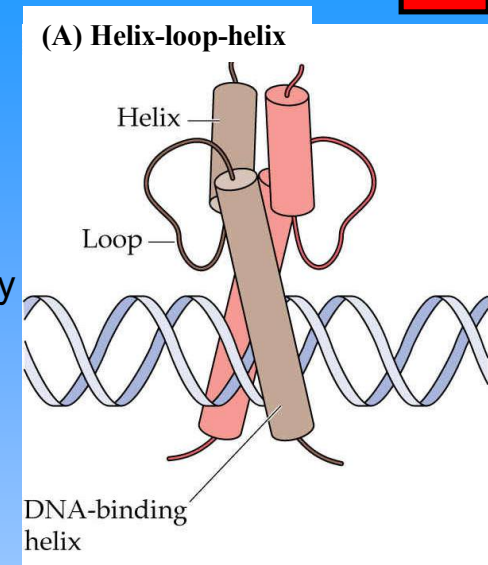
Helix-loop-helix 2 α helixy odděleny smyčkou polypeptidového řetězce; funguje jako dimer; často kódovaný homeotickými geny

Leucine zipper α helix asi 30 aminokyselin, každá sedmá aminokyselina je leucin; funguje jako dimer

Zinc finger Různorodé struktury, kde Zn hraje důležitou roli; k DNA se váže jako monomer či dimer; *COP1*-hraje roli ve fotomorfogenezi

Basic zipper (bZip) (např. vazba k ABA-response elementu)

Helix-turn-helix (např. exprese genů regulovaných fytochromy)



Gene expression noise – Šum genetické exprese

Geneticky identické buňky rostoucí v identických podmínkách mohou ukazovat významně odlišnou úroveň exprese genů = **ŠUM**

Jednobuněčné organismy - dovoluje určité části jednobuněčné populace připravit se na environmentální stres.

Mnohobuněčné organismy – úloha šumu nejasná; zatímco plasticita dovoluje rostlině reagovat dynamicky ke změnám prostředí a epigenetická dědičnost dovoluje rostlinám získat určitou paměť k předchozím stresům, šum genové exprese může rostlině dovolit tzv. vsadit na ochranu proti neznámému prostředí.

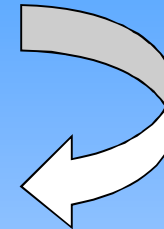
Update 2020

Cortijo S and Locke JCW (2020) Trends in Plant Science, May 25;
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.017>

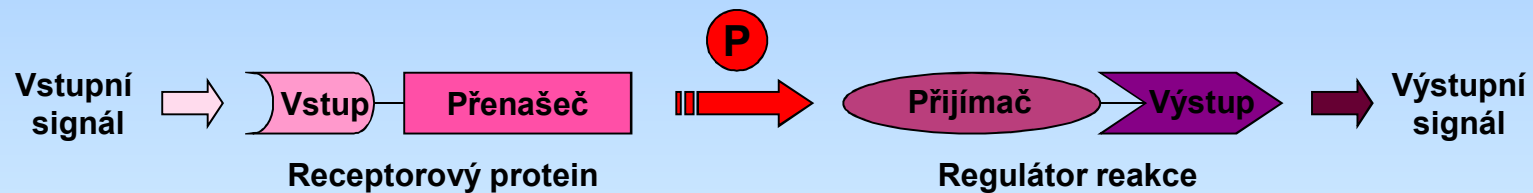
c) Přenos signálu v rostlinách

Signální dráhy koordinují expresi genů s životními podmínkami obklopujícími rostlinu či se změnami v jejich vývoji.

Schopnost rostliny reagovat na vše kolem



Dvoustupňový systém přenosu signálu a regulace exprese:



Podle
Taiz L and Zeiger E (2006) Plant Physiology, 4th ed.

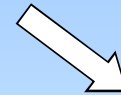
Multibuněčné organismy → Nutnost koordinace vývojových reakcí a reakcí k vnějším podnětům



Potřeba nových signálních mechanismů složitějších než dvoustupňový systém

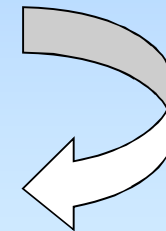


Rostliny se nepohybují



Není nervový systém

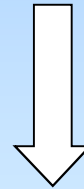
Potřeba nových signálních mechanismů = chemičtí poslové – secondary messengers



Pochopení základních mechanismů signálních drah u živočichů

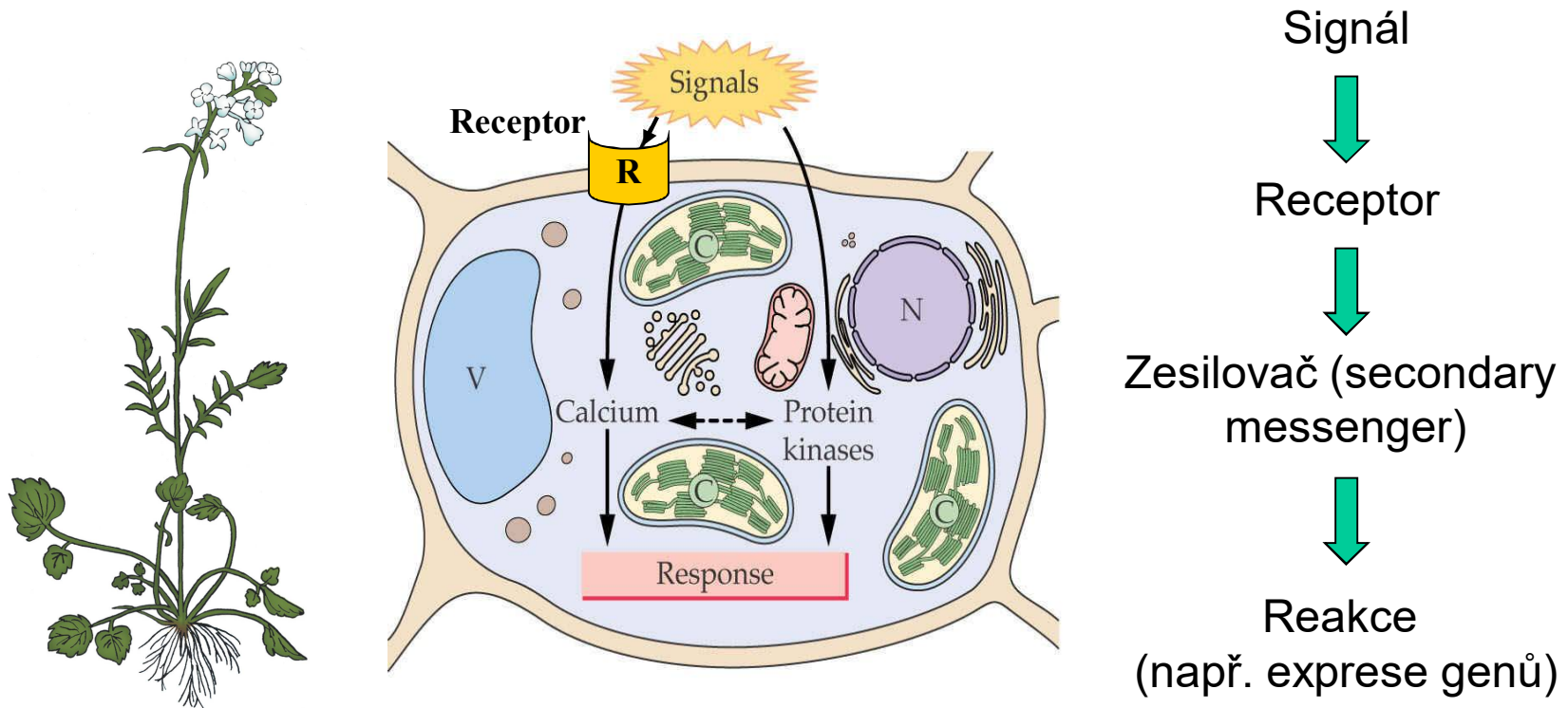


Nalezeny paralely u rostlin (např. brassino**steroidy**)



Pochopeny podobné signální mechanismy u rostlin

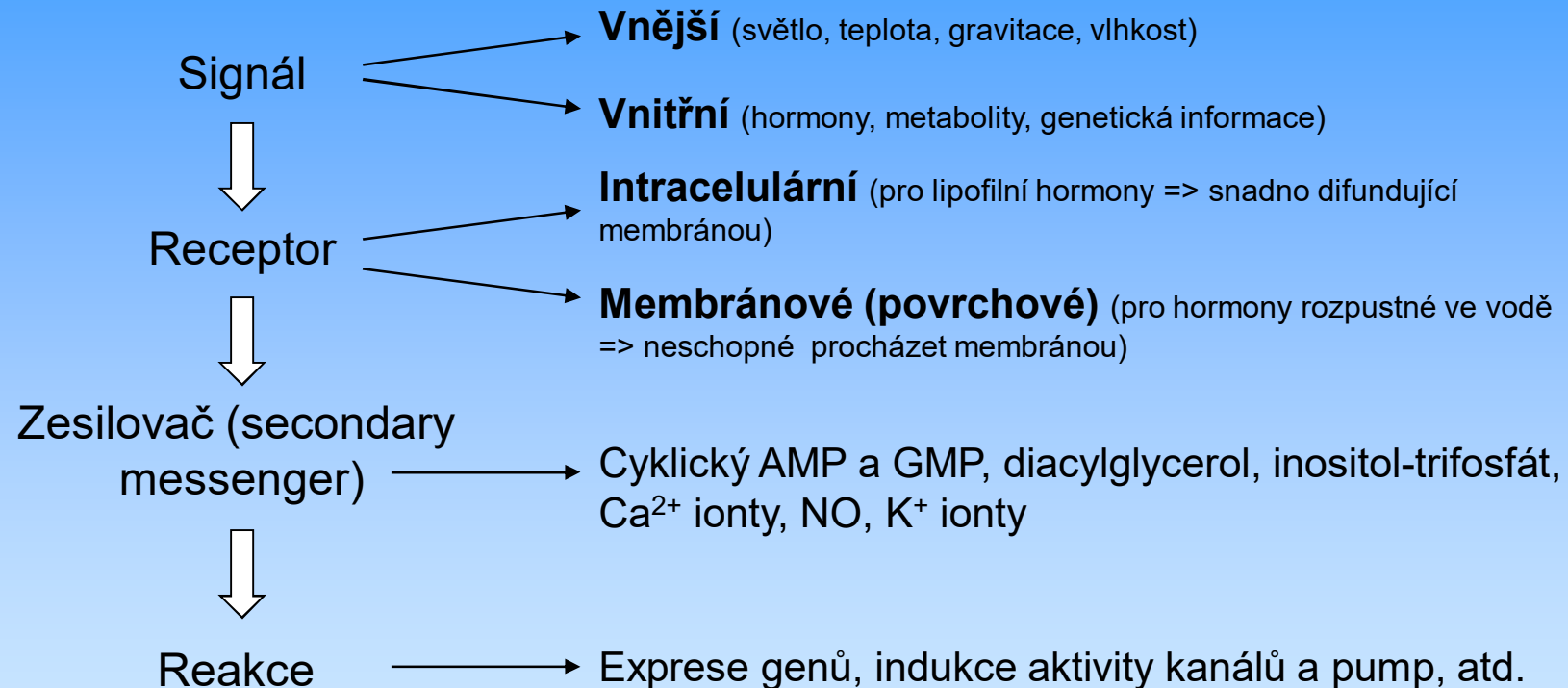
Schéma přenosu signálu u rostlin



López-Bucio et al. (2006) *Current Opinion in Plant Biology* 9: 523 - 529

Nové druhy signálních molekul důležitých pro růst a vývoj rostlin

Schéma přenosu signálu u rostlin



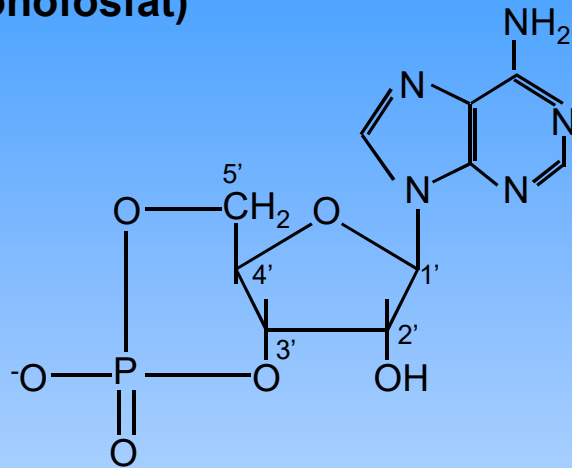
Update 2017

Webb AAR et al. (2017) *Plant Cell Physiol* 58: 1121-1125

Pojednává o syntéze umělých senzorů (receptorů), často spojených s fluorescenčním indikátorem biologické aktivity.

Zesilovače (přenašeče, secondary messengers)

Cyklický AMP (cyklický adenosin monofosfát)



Cyklický GMP (cyklický guanosin monofosfát)

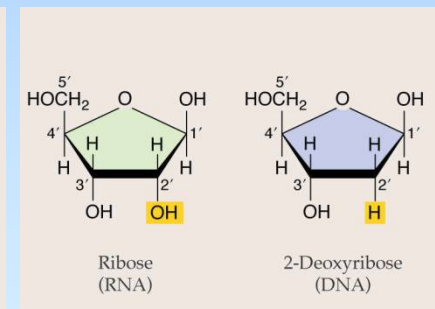
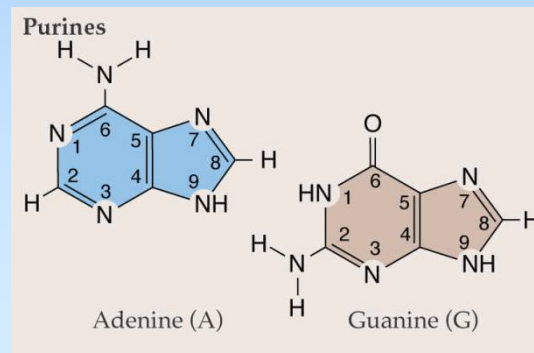
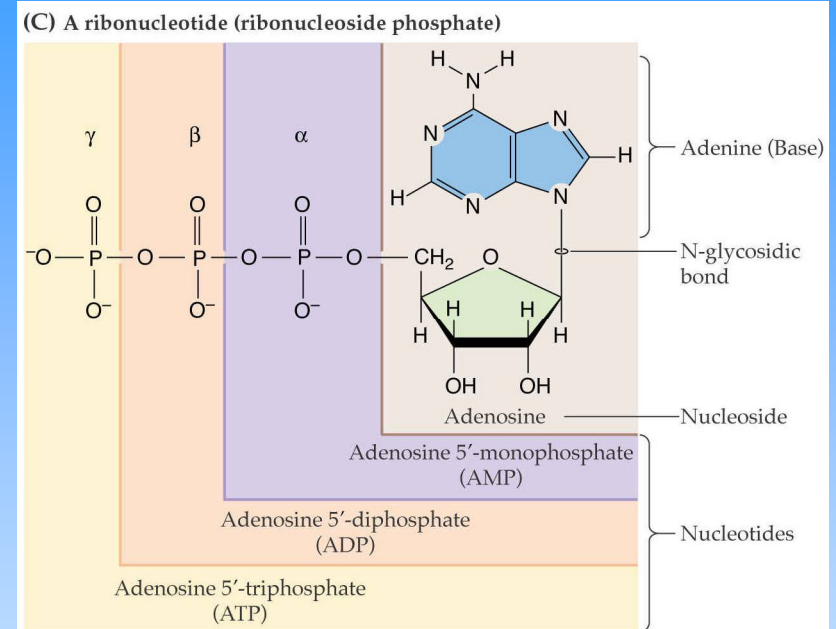
1,2-Diacylglycerol (DAG)

Inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃)

Ca²⁺ ionty: cytosol a jádro

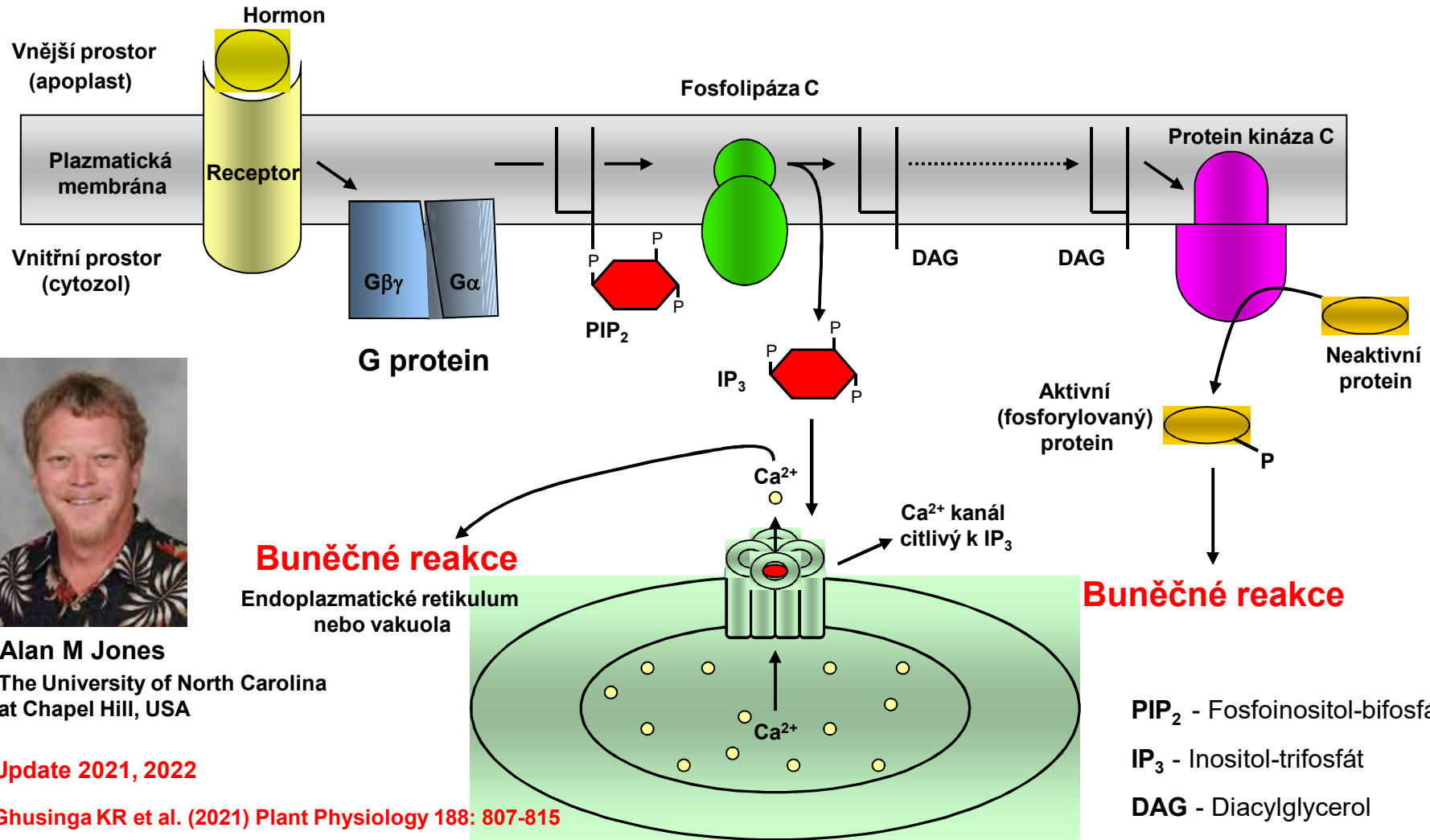
Oxid dusnatý NO

K⁺ ionty – transport z buňky = přepínač mezi metabolickými a obrannými reakcemi při stresu



Obecné schéma inositol-lipidové signální dráhy

31



Alan M Jones
The University of North Carolina
at Chapel Hill, USA

Update 2021, 2022

Ghusinga KR et al. (2021) *Plant Physiology* 188: 807-815

Watkins JM et al. (2021) *Science Signaling* 14: eabe4090

Wu T-Y et al. (2022) *Molecular Plant* 16: 506-508

Nejnovější práce AM Jonse o regulaci signalizace G-proteinu a zapojení G-proteinu v udržování homeostatické kontroly stresové signalizace.

Buněčné reakce

PIP₂ - Fosfoinositol-bifosfát

IP₃ - Inositol-trifosfát

DAG - Diacylglycerol

Podle
Taiz L and Zeiger E (2006) *Plant Physiology*, 4th ed.

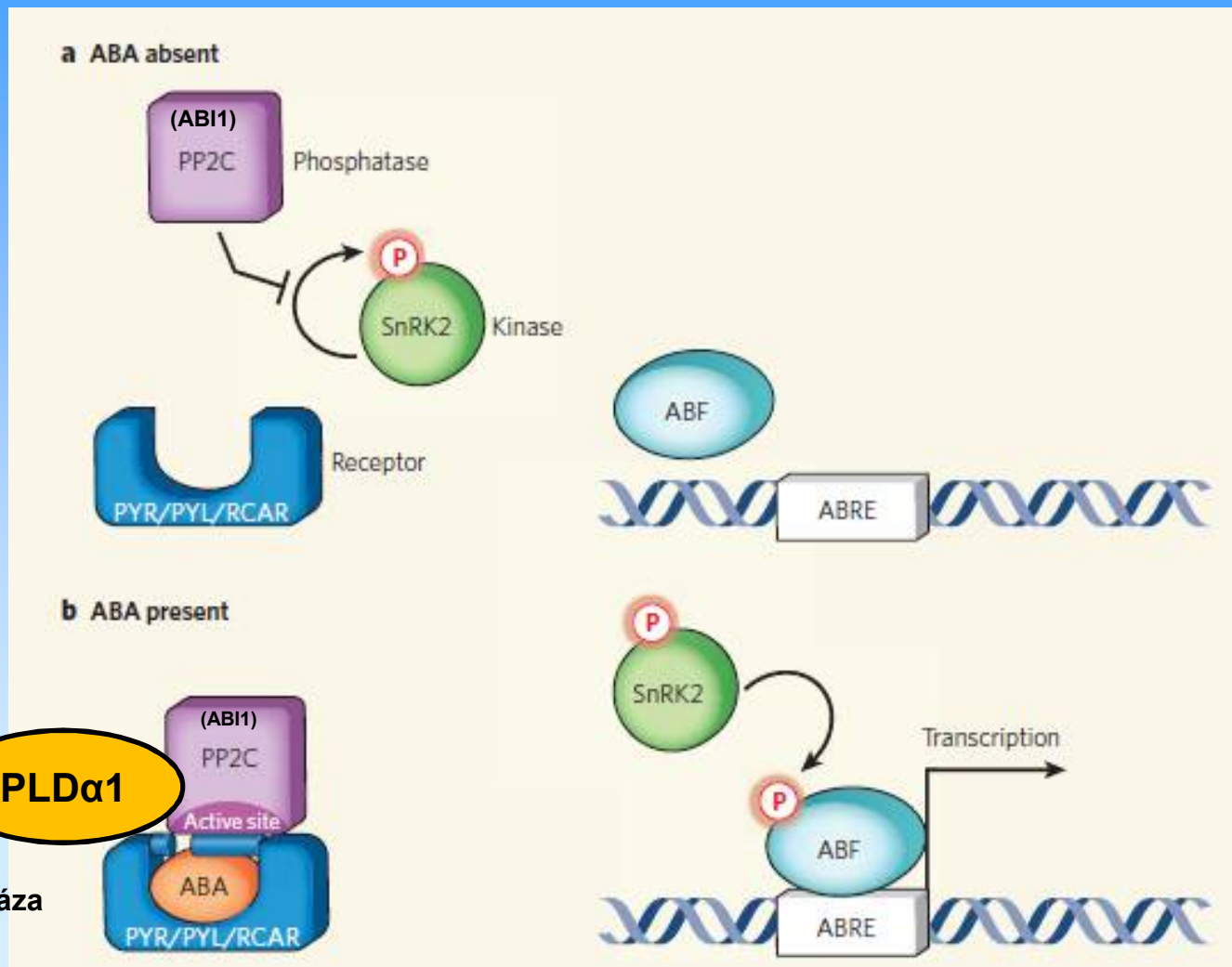
Zapojení lipidů v signalizaci

ABA signalizace během stresu (sucho, osmotický stres)

Update 2020

Hoffmann-Benning S (2020)

Molecular Plant 13: 952-954



PLD α 1 - fosfolipáza

kyselina
fosfolipido-fosfatidová

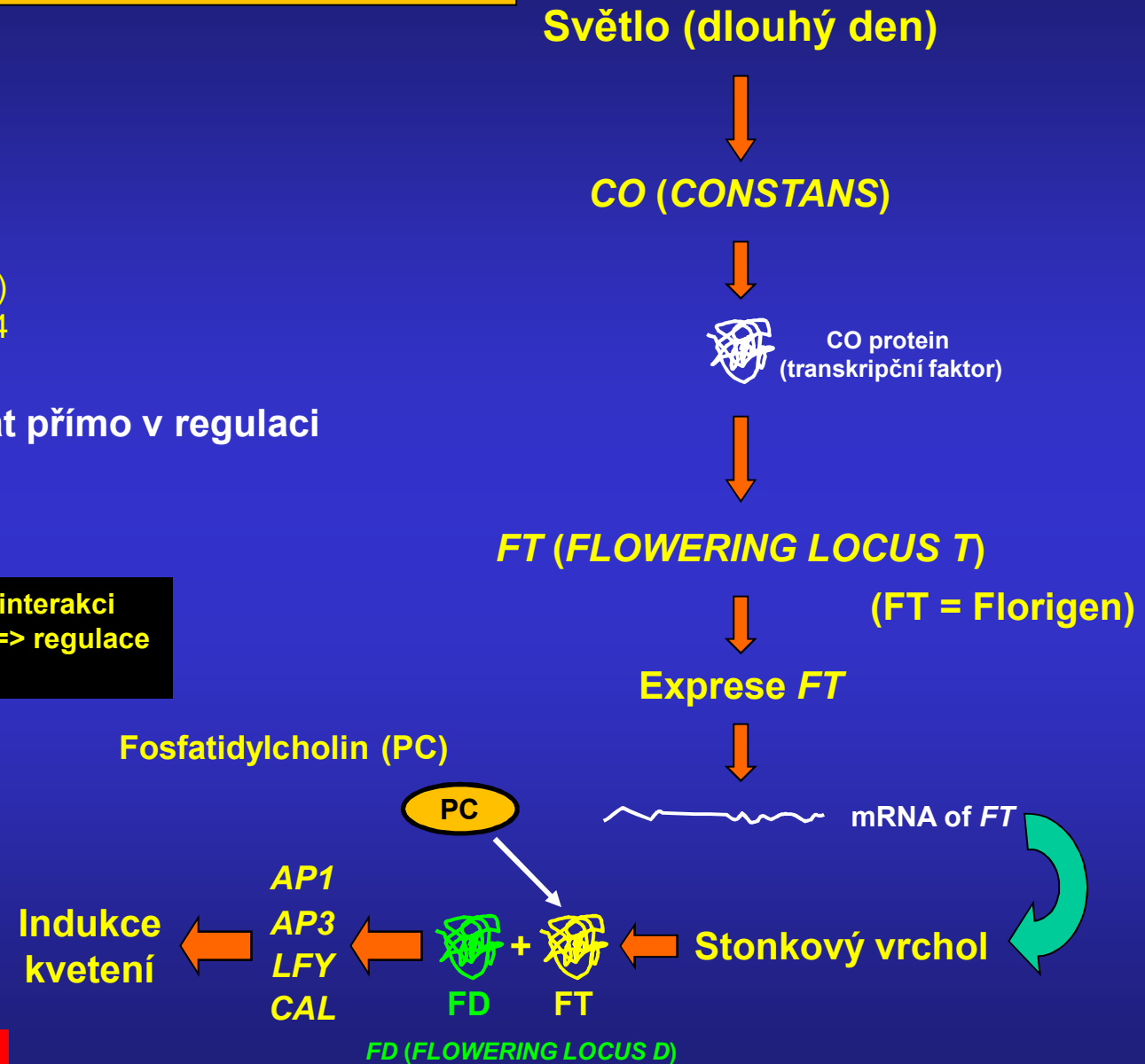
Lipidová signalizace během indukce kvetení

Update 2020

Hoffmann-Benning S (2020)
Molecular Plant 13: 952-954

Lipidy mohou fungovat přímo v regulaci genové exprese.

Vazba PC k FT je klíčová pro interakci komplexu FT+FD+PC s DNA => regulace transkripce.



FT protein = FLORIGEN

Přenos signálu z buňky do buňky reguluje vývoj a růst

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

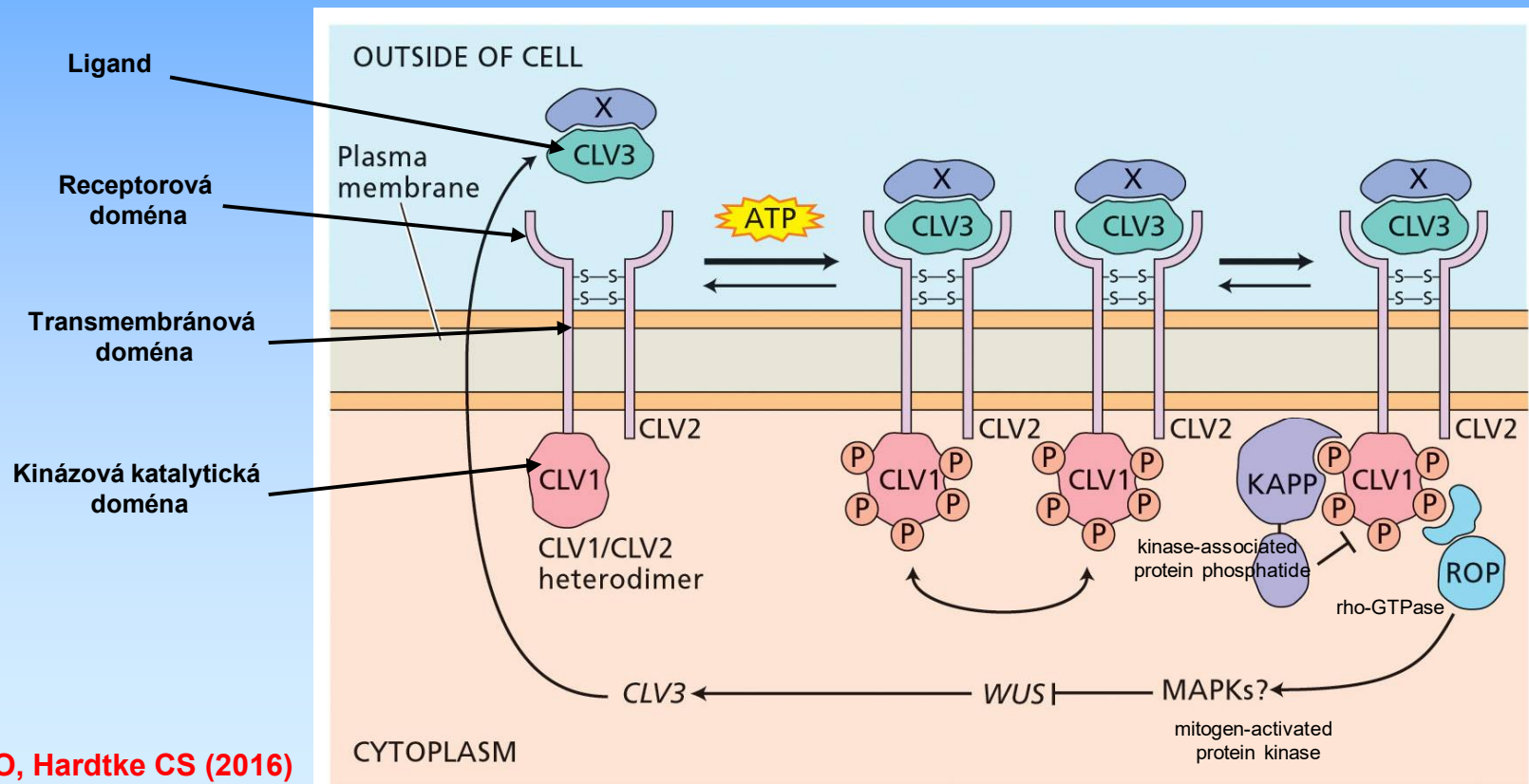
Mechanismy komunikace:

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

a) Signál indukovaný ligandem (peptidová signalizace)

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

CLV1/CLV2 - receptor protein kináza = integrální membránový protein



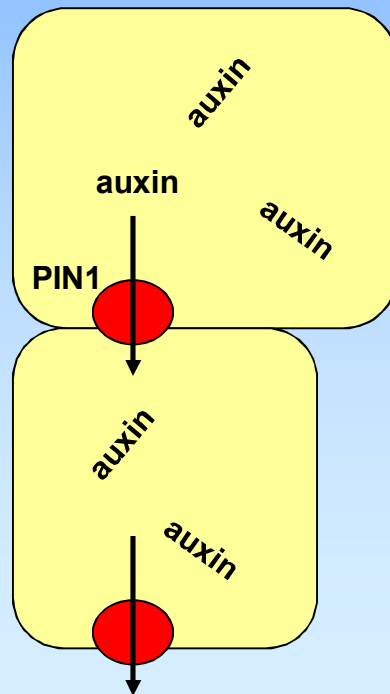
Haza O, Hardtke CS (2016)
J Exp Bot 67: 4827-4833

b) Hormonální signál

Auxin – nejvýznamnější rostlinný hormon

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

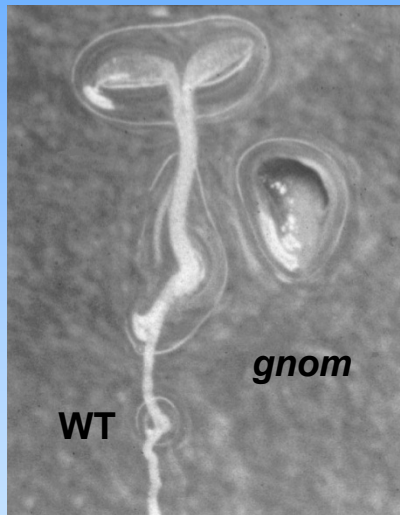
Auxin je distribuován do míst iniciace laterálních orgánů



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

Auxin hraje úlohu v axiální polaritě rostlin a ve vývoji vaskulárního systému.
Gen **GNOM** hraje úlohu v signálních drahách auxinů.

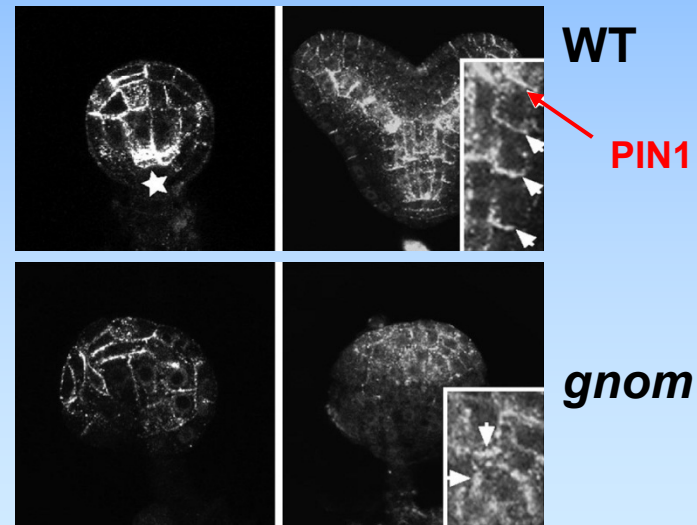
GNOM



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

GNOM kontroluje apikálně-bazální polaritu

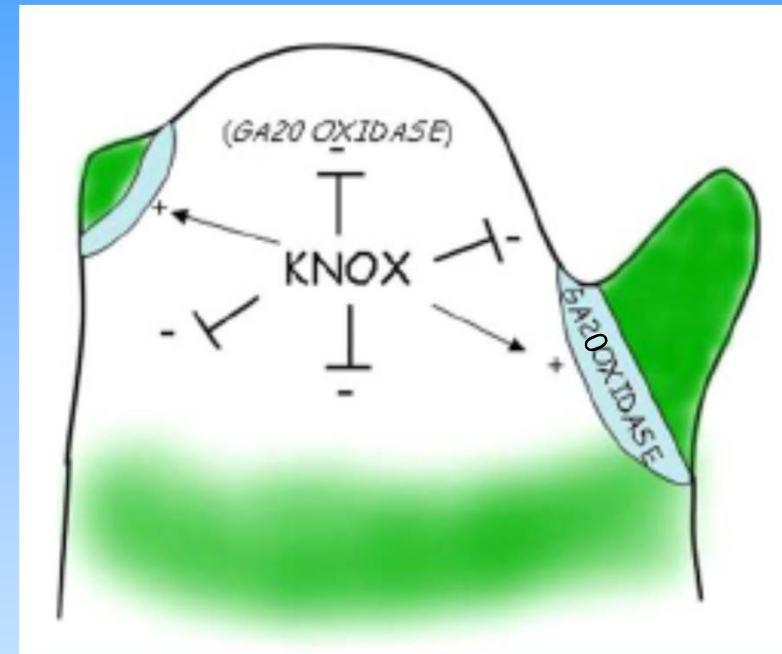
GNOM je nutný pro správnou lokalizaci proteinu **PIN1** v bazálních částech buňky, který slouží k transportu auxinu.



Expres KNOX řídí syntézu a metabolismus giberelinů – zapojen v iniciaci listů

Expres KNOX => blokáce biosyntézy GAs (GA20 oxidáza) v centrální části meristému

Expres KNOX => stimulace konverze neaktivních GAs na aktivní GAs (GA20 oxidáza) v místech iniciace listů



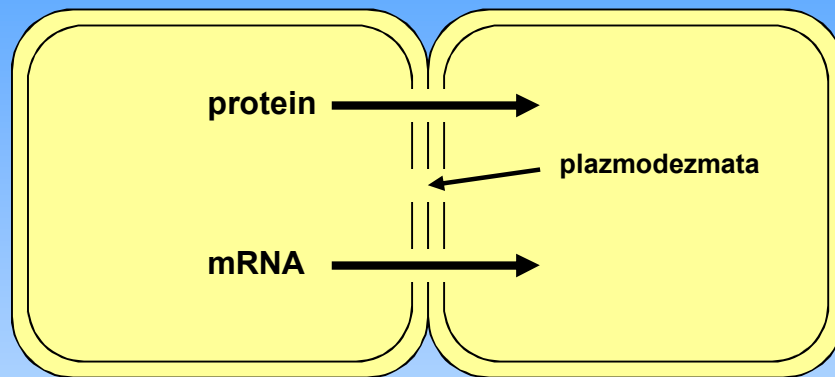
Veit B (2009) Plant Mol Biol 69: 397-408

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**

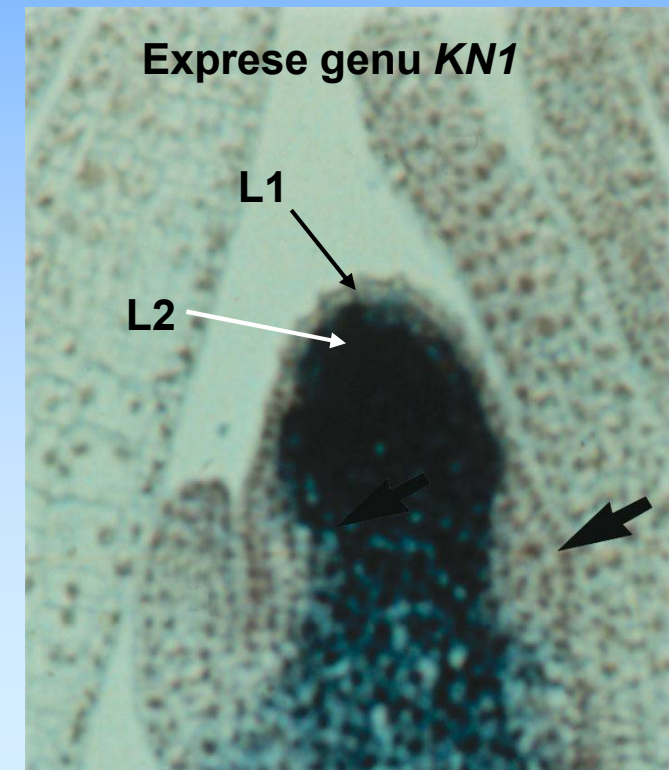
***KN1* protein byl detekován v L1**



***KN1* protein byl transportován do L1**



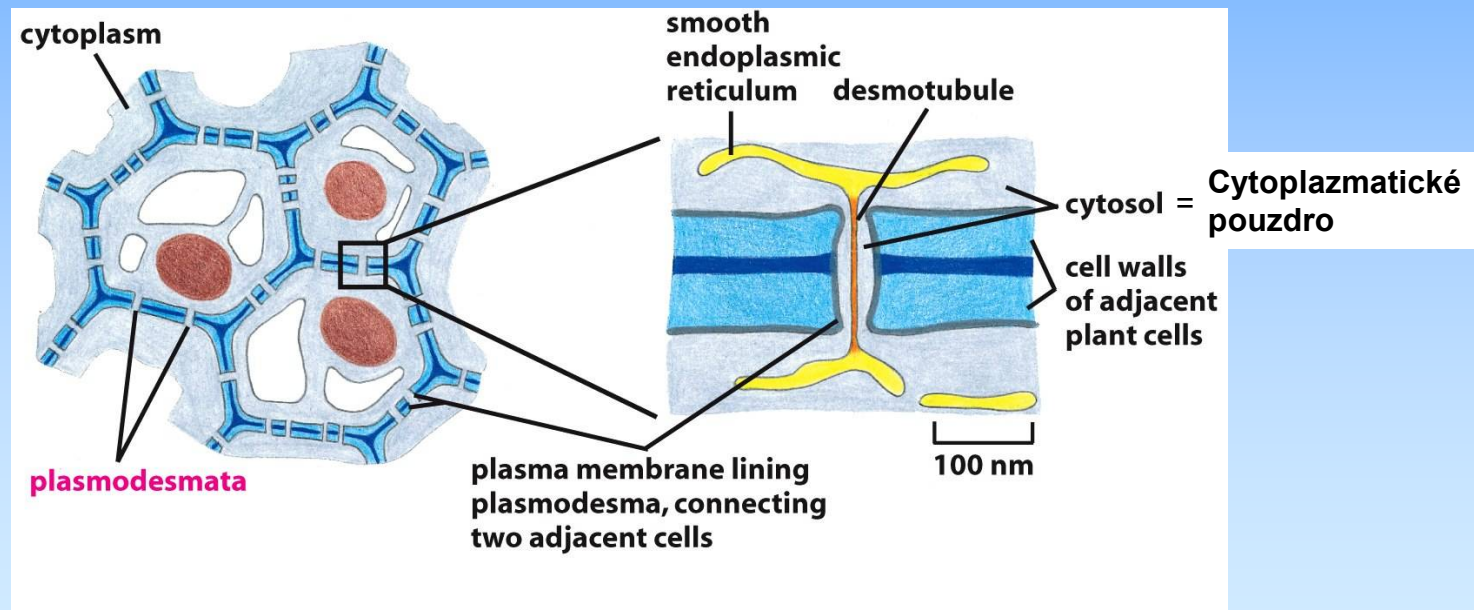
Oparka K (2005) *Plasmodesmata*. Blackwell Publishing.



Plazmodezmata (PD) – 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 pouzdrém). Selektivní transport miRNA (Luo et al. 2018)

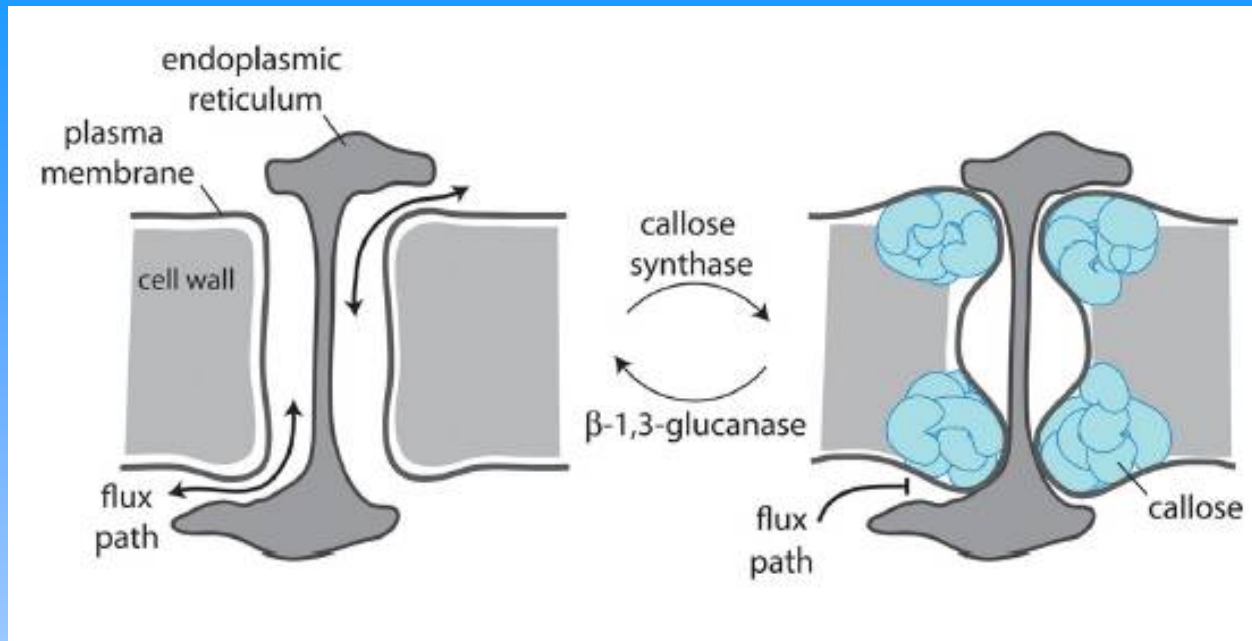


Update 2022

Voinnet O (2021) Nature 23: 163-164

Nejnovější review o principech mobility smallRNA z buňky do buňky.

Alberts B et al. (2008) Molecular Biology of The Cell. Garland Science, str. 1158.



Maule AJ et al. (2012)
Frontiers in Plant Science 3: 1-5

Syntéza kalózy – enzym glykosyl syntáza (kalóza syntáza) (*CalS1, CalS8* – nově objevené geny, 2016)

Degradace kalózy – enzym β -1-3-glukanáza

Signály spouštějící expresi genů zapojených v ukládání či degradaci kalózy:

- stress (viry)
- ROS (reaktivní kyslíkové radikály) – ovlivňují lokální redoxní stav nebo stav buňky

Update 2016

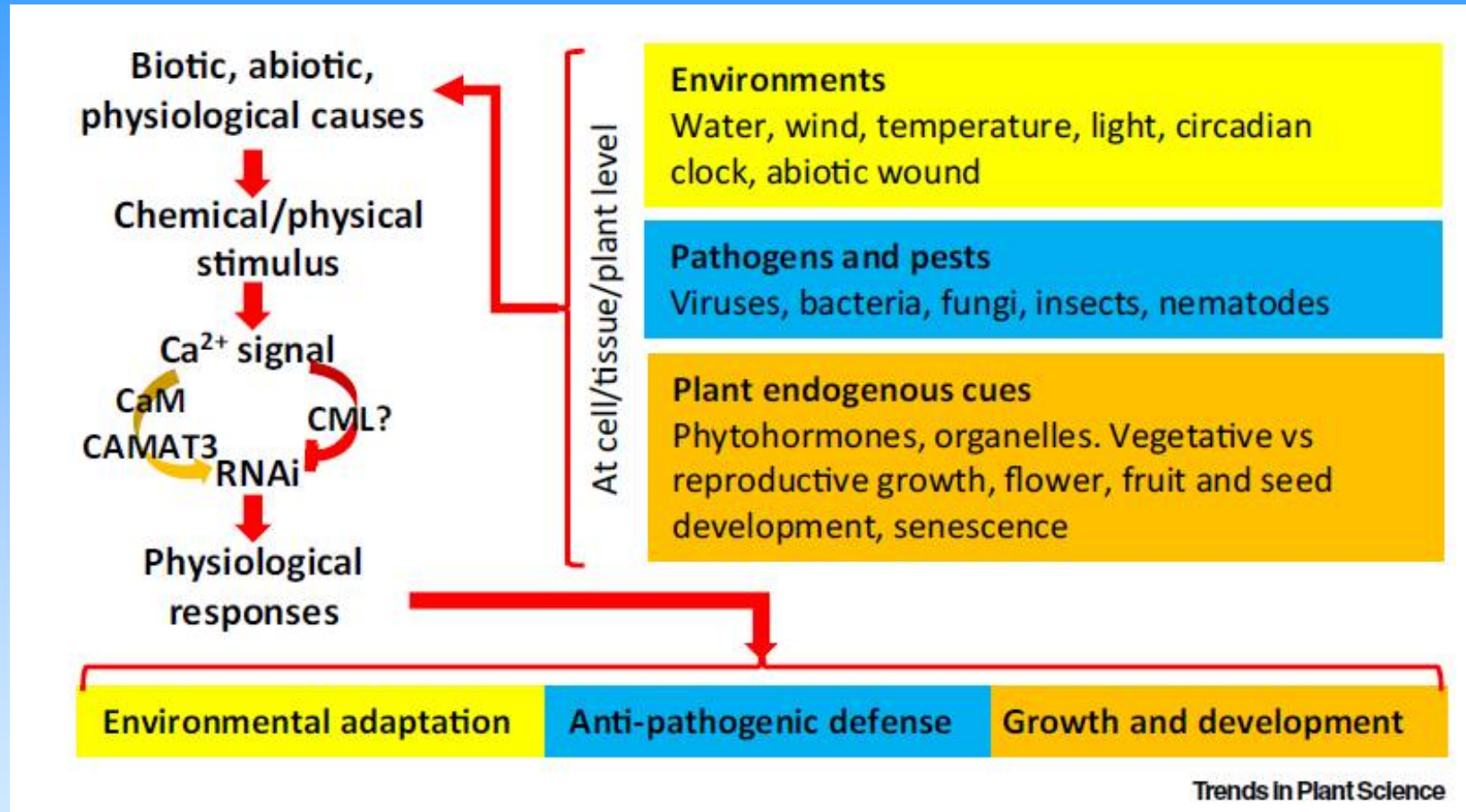
Lim G-H et al. (2016) *Cell Host & Microbe* 19: 541-549

Viry kódují proteiny, které manipulují s PD – zvětšují velikost průchodu PD => usnadňují pohyb virových jednotek z buňky do buňky.

Permeabilita PD je regulována PD-localizing proteins (PDLPs): ztráta funkce PDLP5 – zvětšení propustnosti PD, overexprese PDLP5 – zmenšení propustnosti PD

Update 2022

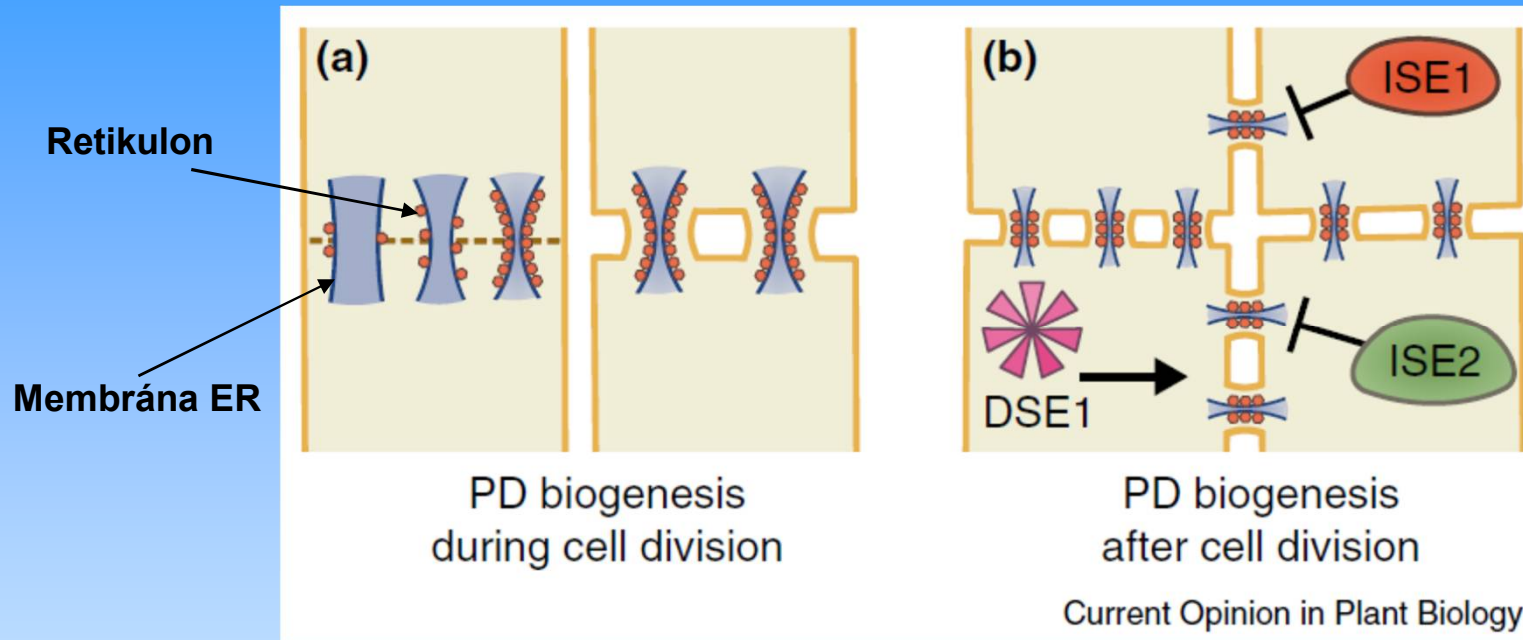
Wang Y et al. (2022) TIPS 27: 328-330



Změna signalizace cytoplazmatického Ca²⁺ vlivem stresových faktorů (abiotických a biotických) vede ke změně signalizace RNAi a tím ke změně fyziologických odpovědí rostliny ke stresu.

Update 2017

Brunkard JO and Zambryski PC (2017) *Current Opinion in Plant Biology* 35: 76-83



Tvorba primárních plazmodezmat

Retikulumy (konzervativní proteiny ER) se podílejí na indukci zakřivení membrány v ER => vznik plazmotubulu primárního plazmodezmata

Tvorba sekundárních plazmodezmat

Pozitivní regulace: WD-40-repeat protein DSE1 a cholinový transportér CHER1 (Choline transporter-like 1),
Negativní regulace: signály kontrolované RNA helikázami ISE1 (mitochondriální) a ISE2 (chloroplastová).

