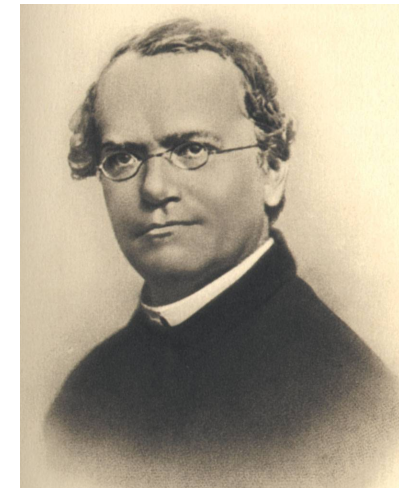
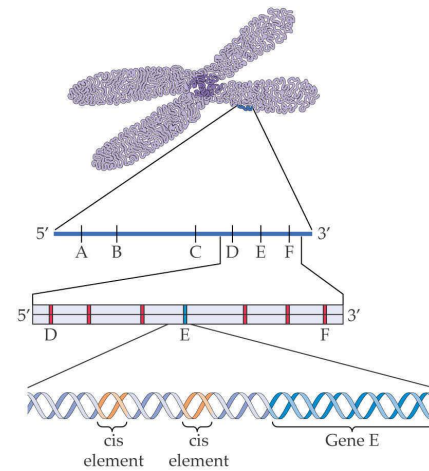
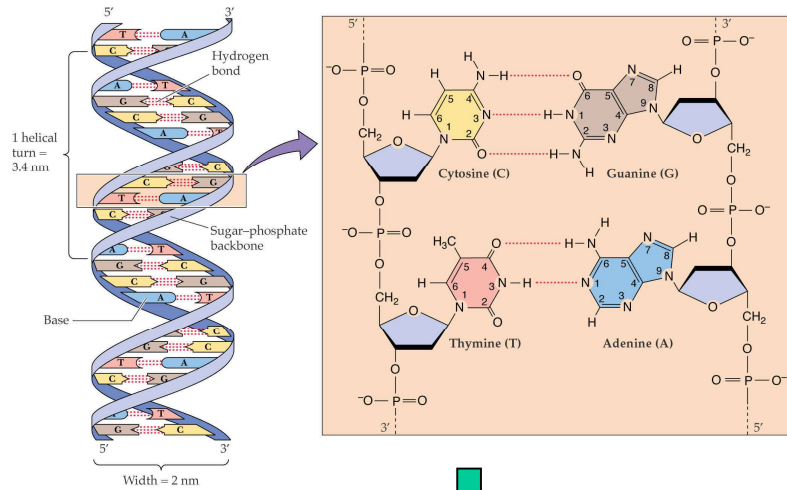


## **2) Exprese genů a přenos signálu**

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

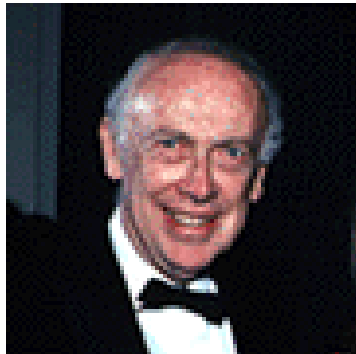
Živá buňka obsahuje instrukce pro vybudování celého organismu = GENY

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

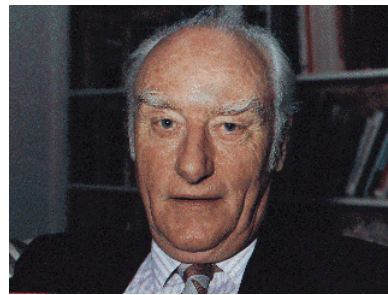


Prof. Gregor Johann Mendel (20.7. 1822 – 6.1. 1884)

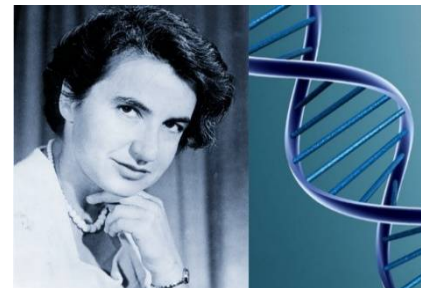
1953 - struktura DNA (Nobel Price in Medicine 1962)



Prof. James Watson (USA)



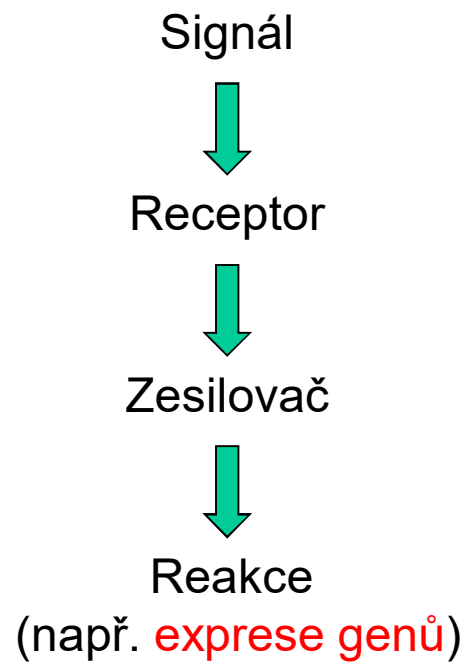
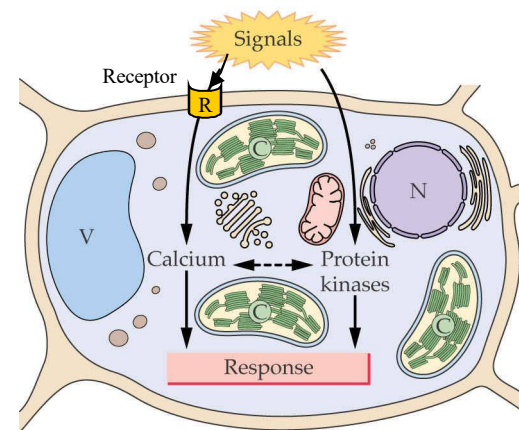
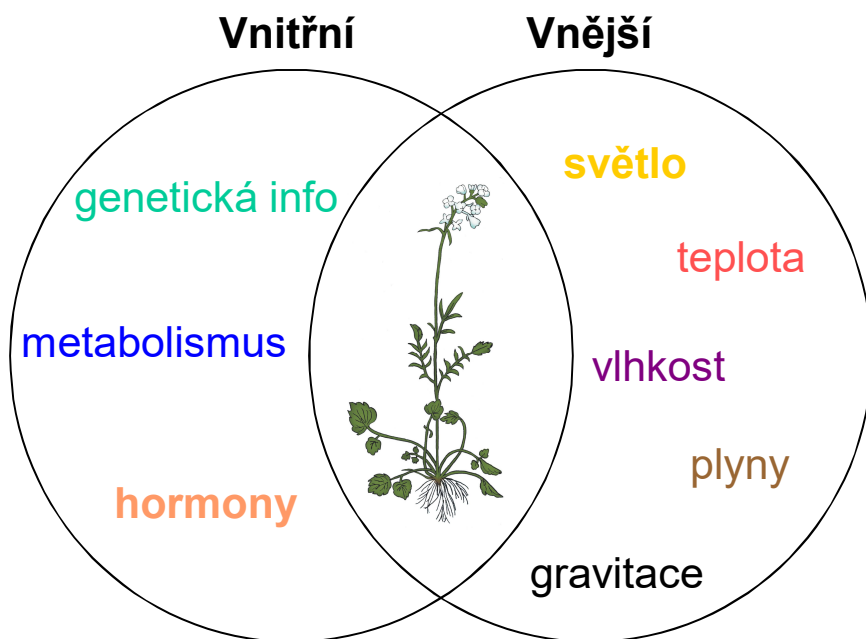
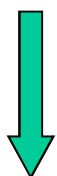
Prof. Francis Crick (UK) († 29.7. 2004)



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)



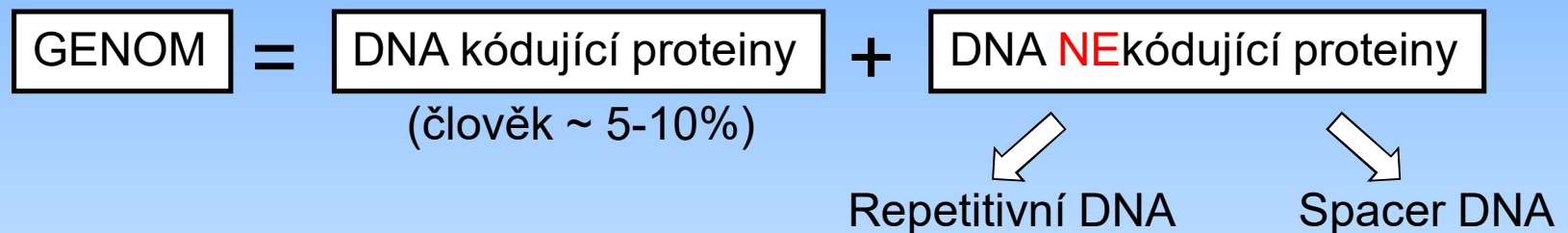
Změna v sestavách enzymů a strukturálních proteinů



Růst, vývoj, reakce organismu

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

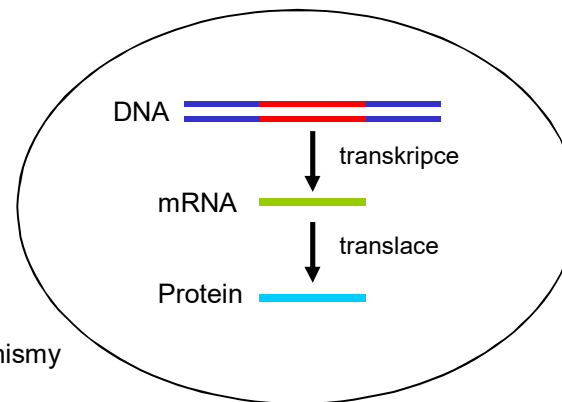
Člověk: *UBQ*, *EMC7* (ER membrane protein complex subunit 7)



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

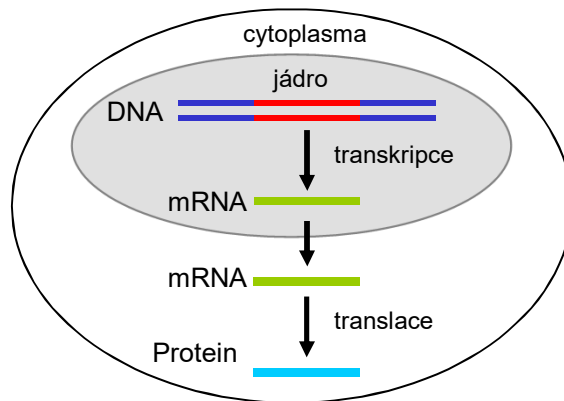
## b) Exprese genů v rostlinách

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



Prokaryotní organismy  
nemají jádro

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

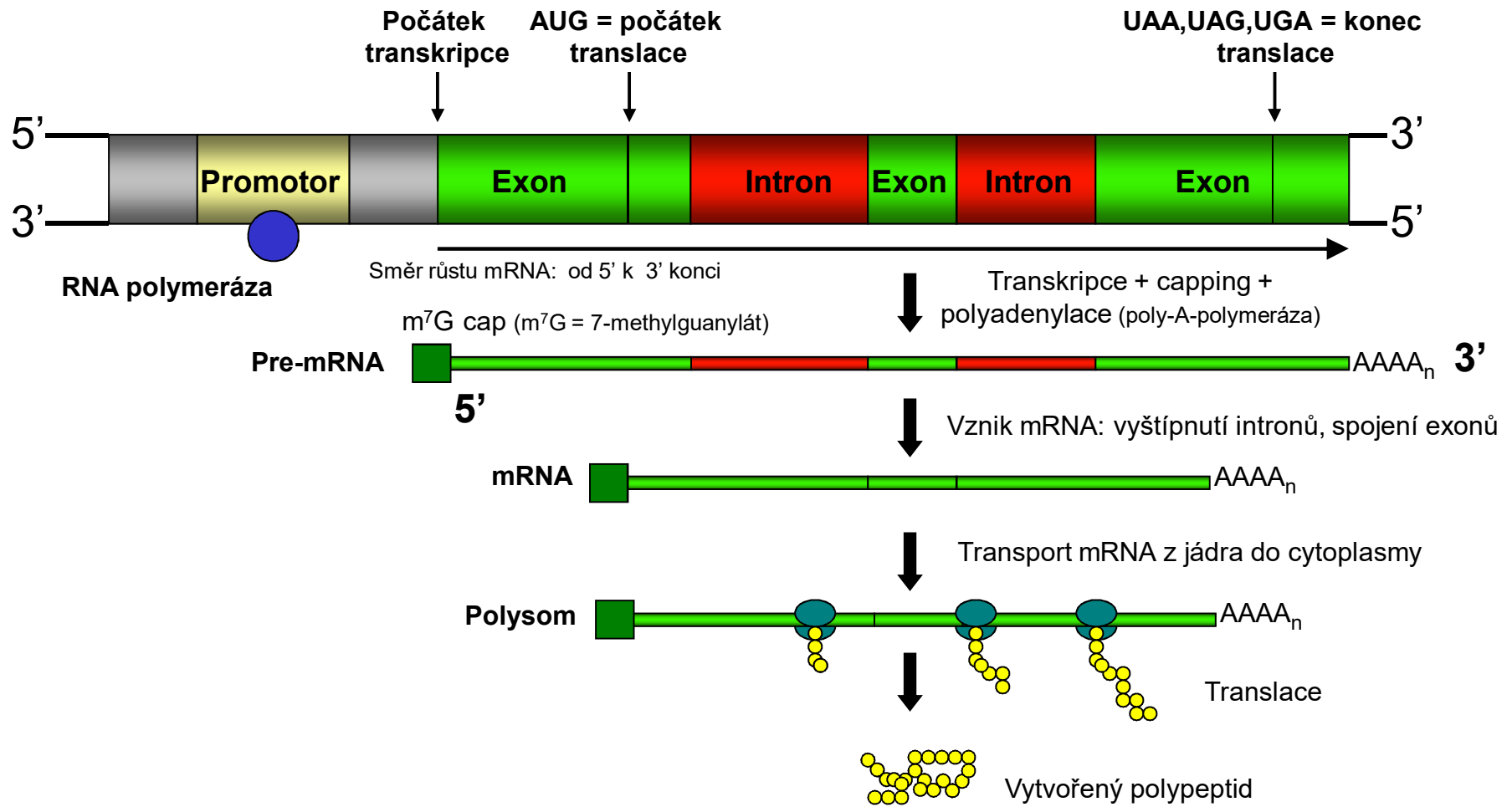


**Potřeba dalších kontrolních  
regulačních mechanismů**

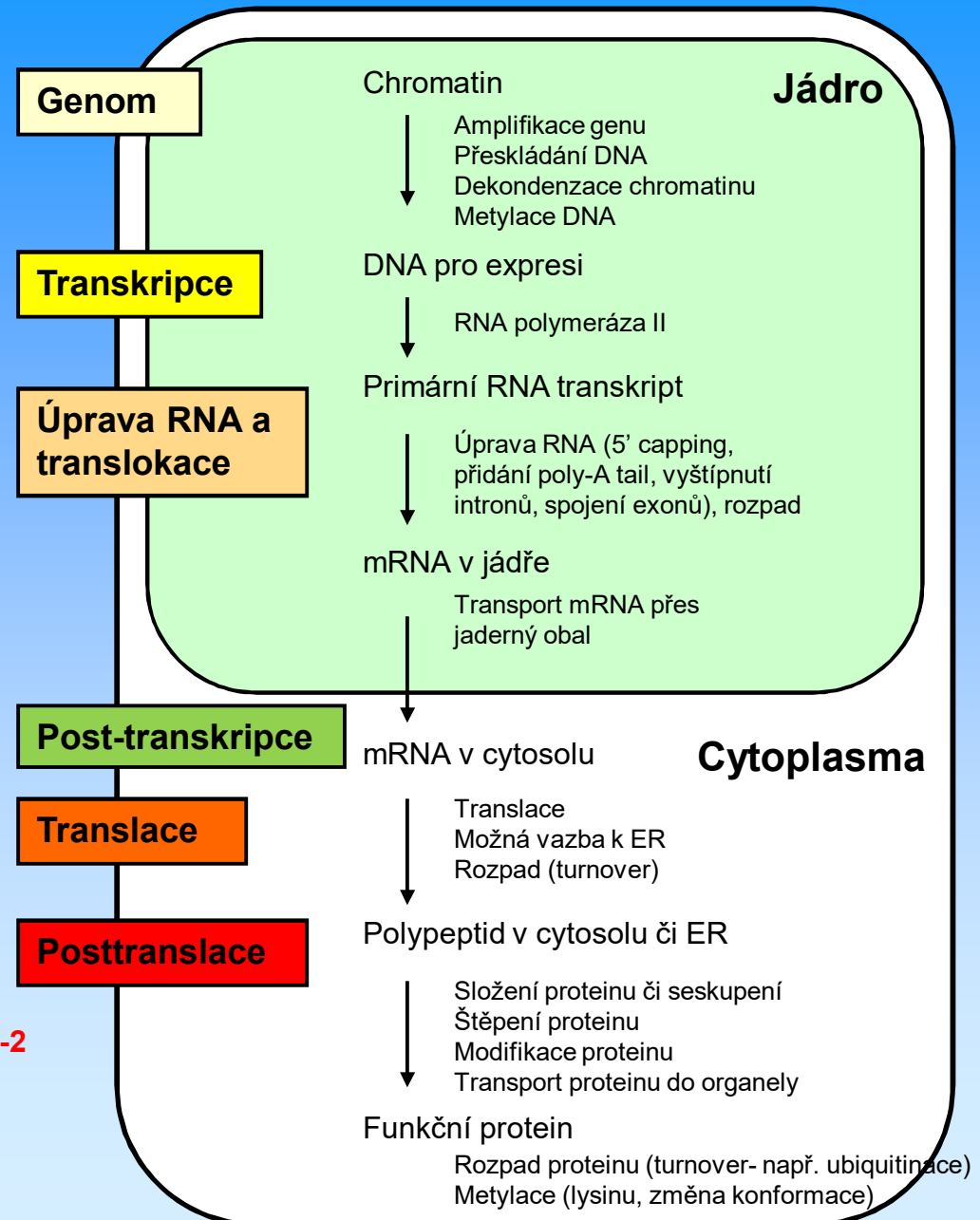


### Organizace genomu u eukaryontních organismů:

- 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

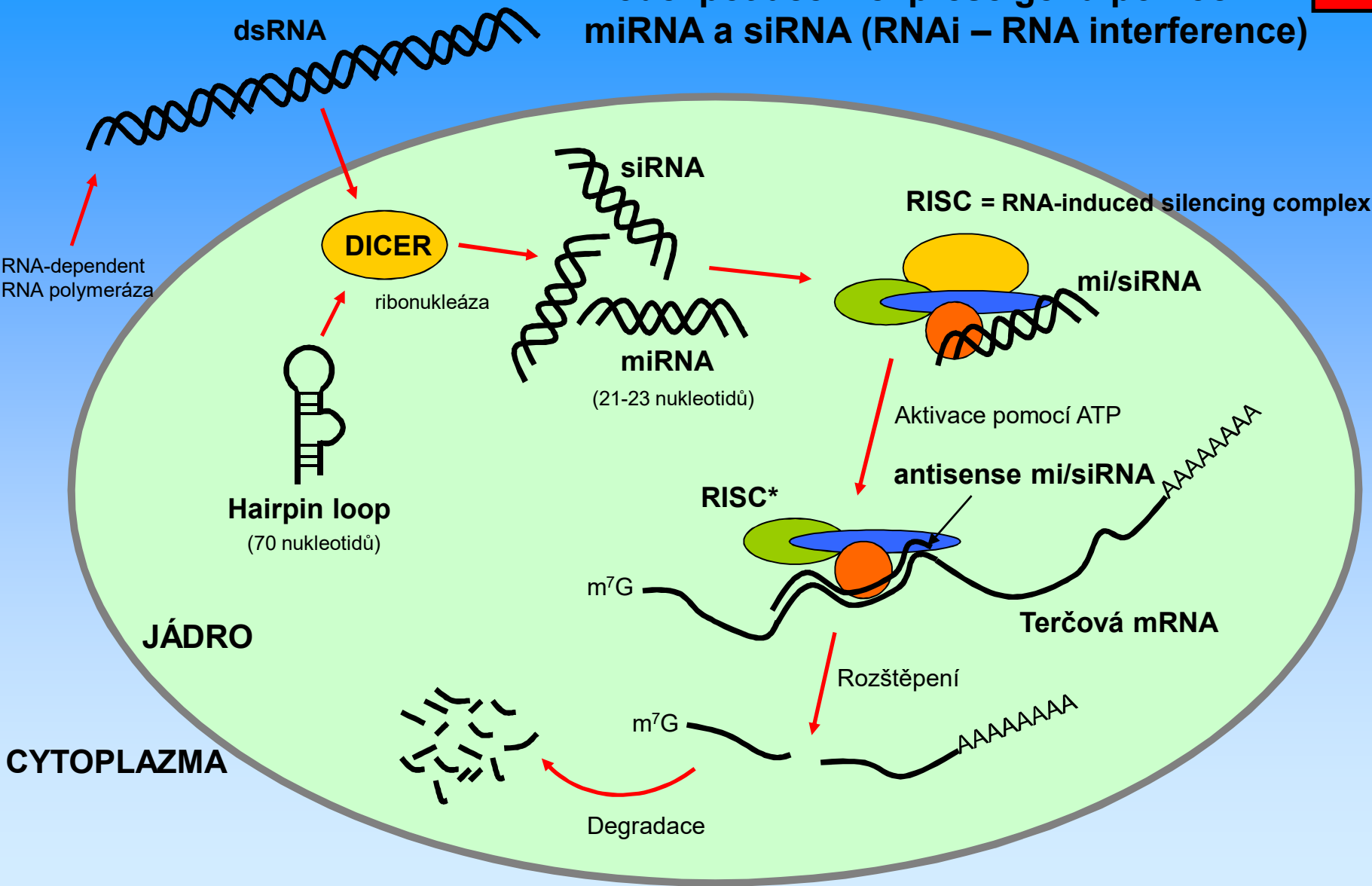
**1) Stabilita (turnover rate) mRNA – závisí na pletivu a fyziologických podmínkách rostliny**

**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**

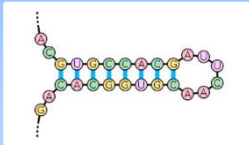
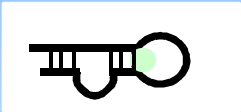
# Model potlačení exprese genu pomocí miRNA a siRNA (RNAi – RNA interference)



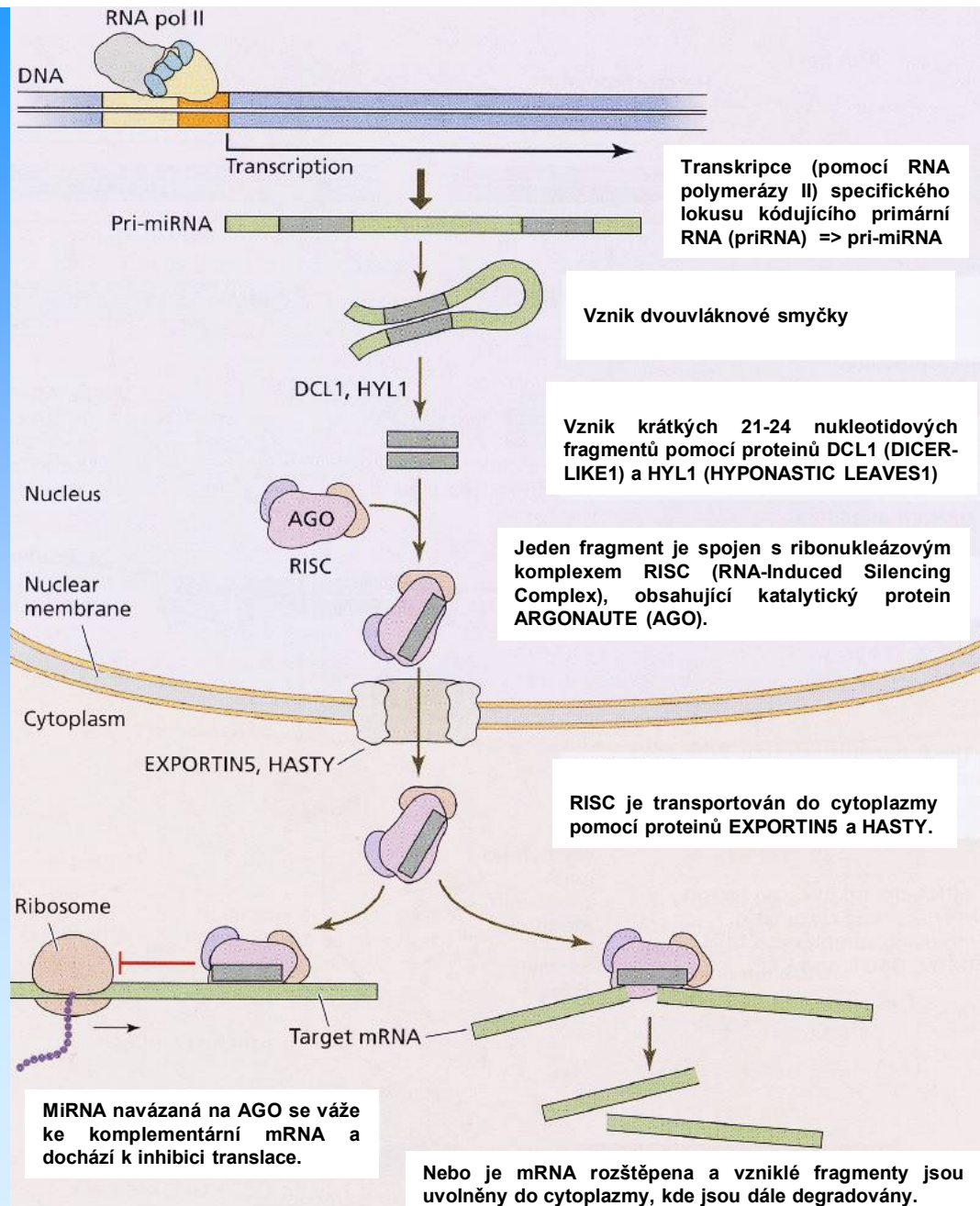
Podle Taiz L and Zeiger E (2006) Plant Physiology, 4th ed.

**miRNA** - microRNA  
**siRNA** - short interfering RNA nebo silencing RNA

## Srovnání miRNA a siRNA

	<b>miRNA</b>	<b>siRNA</b>
<b>Původ</b>	Konkrétní lokusy v genomu Kódované vlastními geny	Kódované transpozony, viry, heterochromatinem
<b>Prekurzor (biogeneze)</b>	Jedna molekula RNA obsahující sec. strukturu stem-loop 	Dlouhé dvouvláknové molekuly RNA nebo rozšířené hairpiny 
<b>Evoluční konzervovanost</b>	Téměř vždy konzervované v příbuzných organizmech	Vzácně konzervované v příbuzných organizmech
<b>Cíle regulace</b>	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

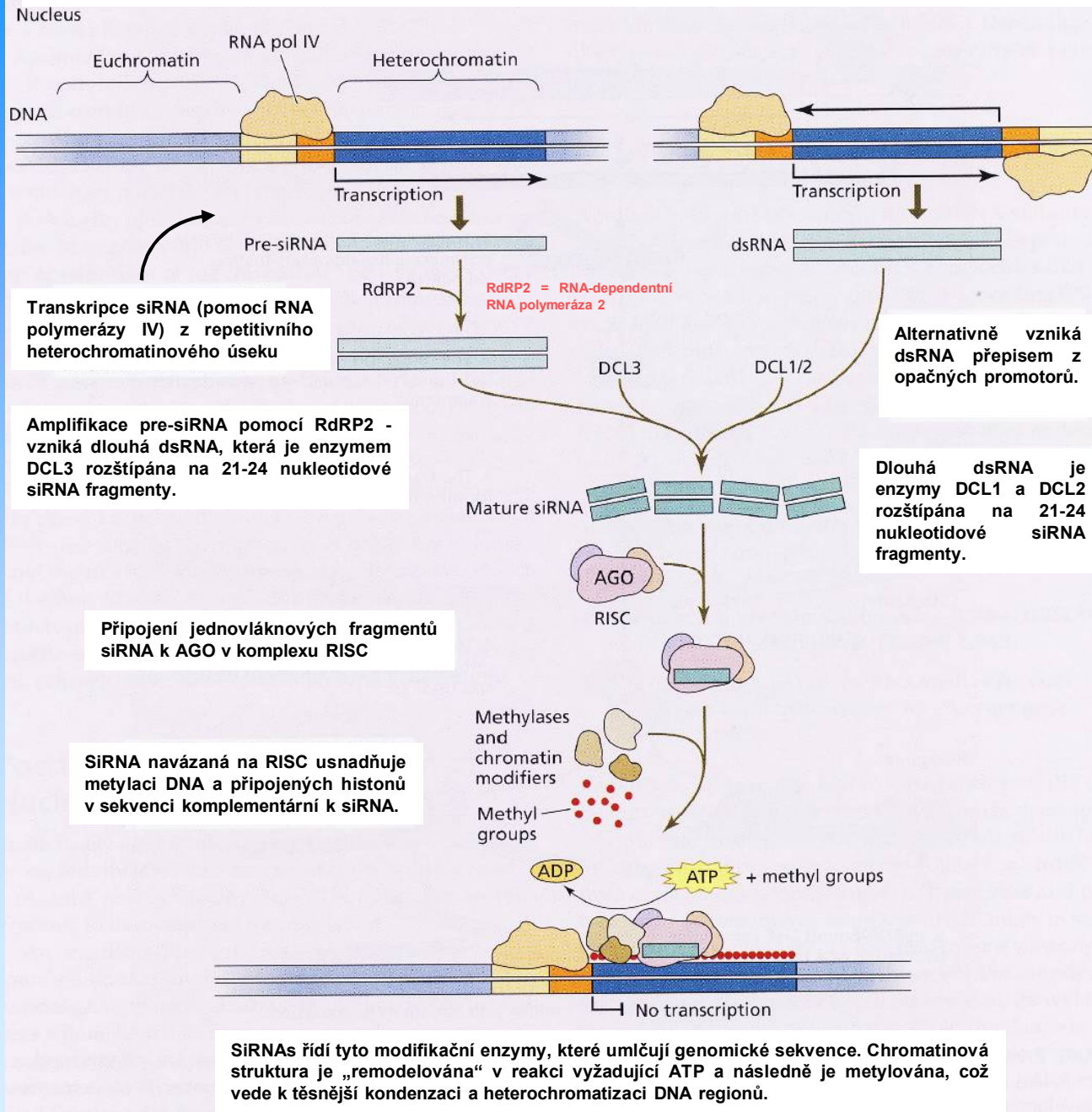
Některé pri-miRNAs mohou kódovat krátké peptidy zvané mikropeptidy (miPEPs) – pozitivně regulují akumulaci jim odpovídajících miRNA.



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

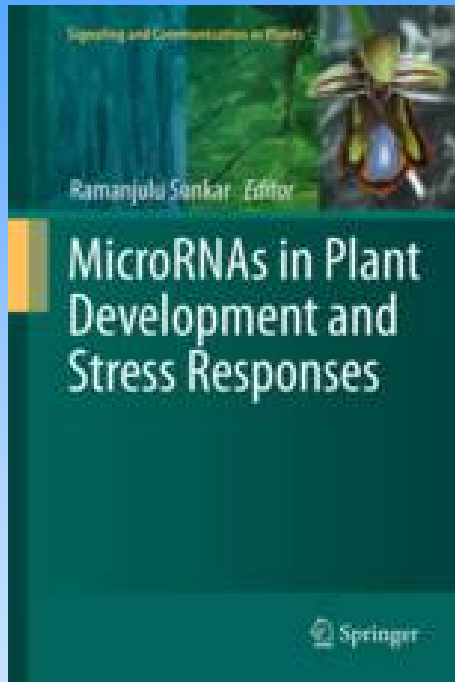
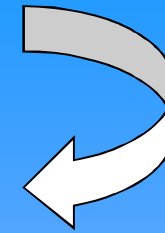
Cui Y et al. (2016)  
 Plant Cell 28: 2576-2585

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.

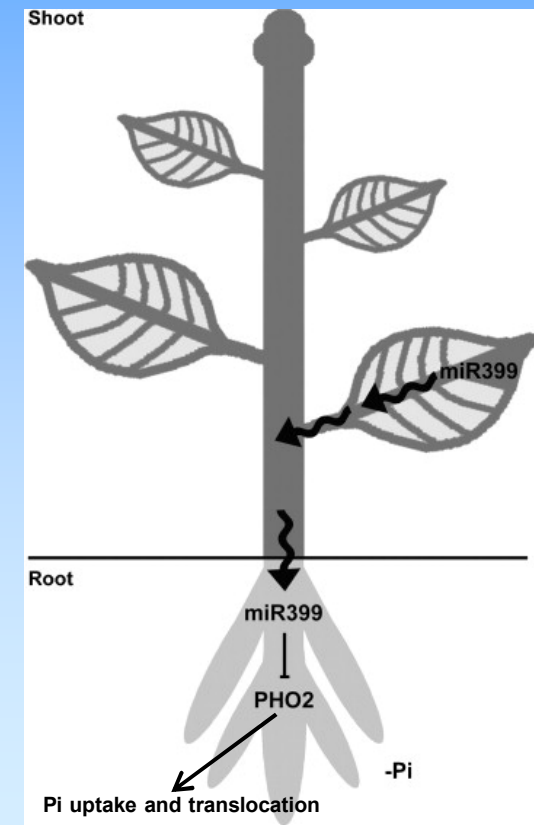
miRNA a siRNA regulují expresi genů

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

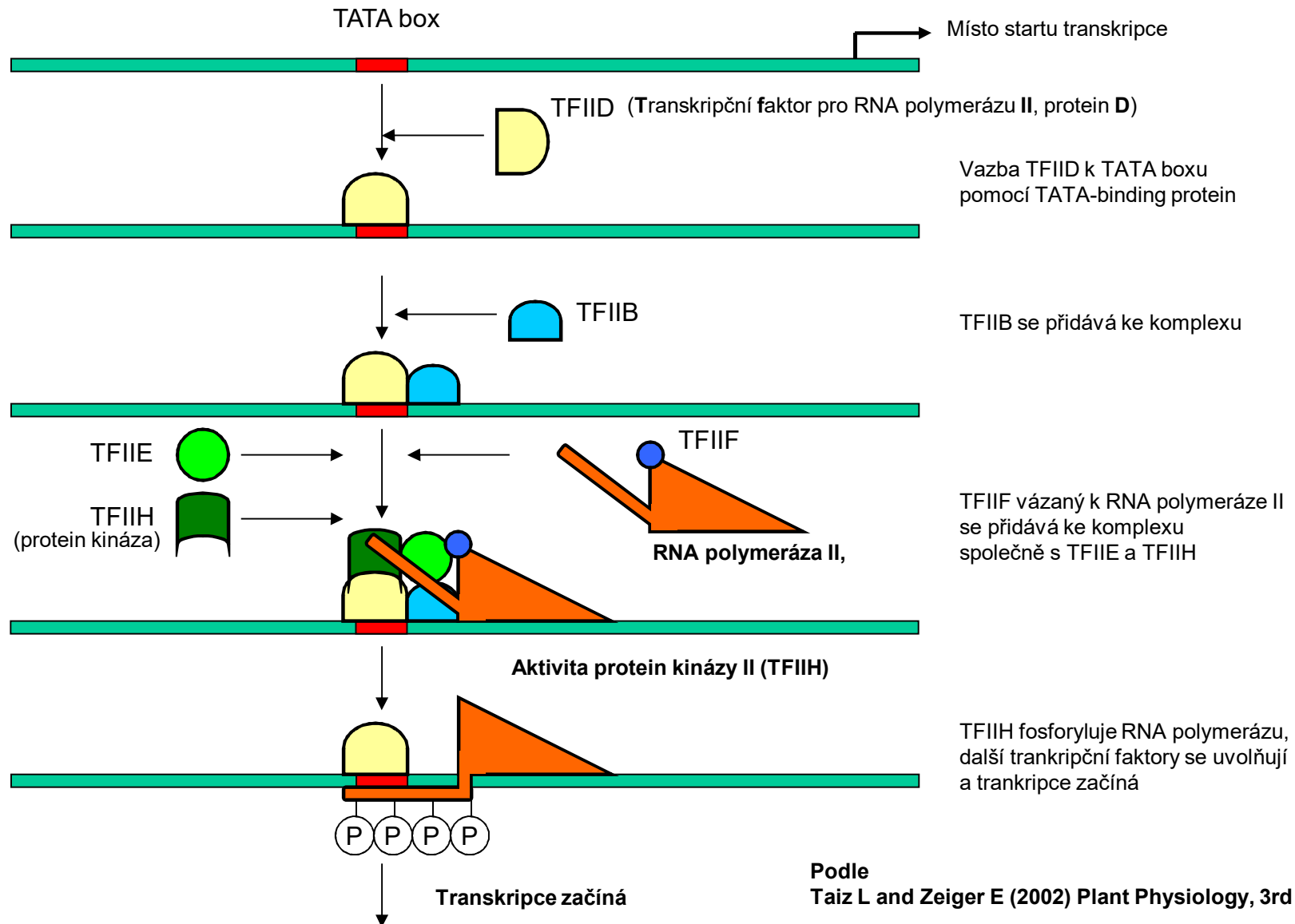
Trankripce u eukaryontů je mnohem složitější než u prokaryontů. Tři základní rozdíly v traskripci mezi eu- a prokaryonty:

- 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:**

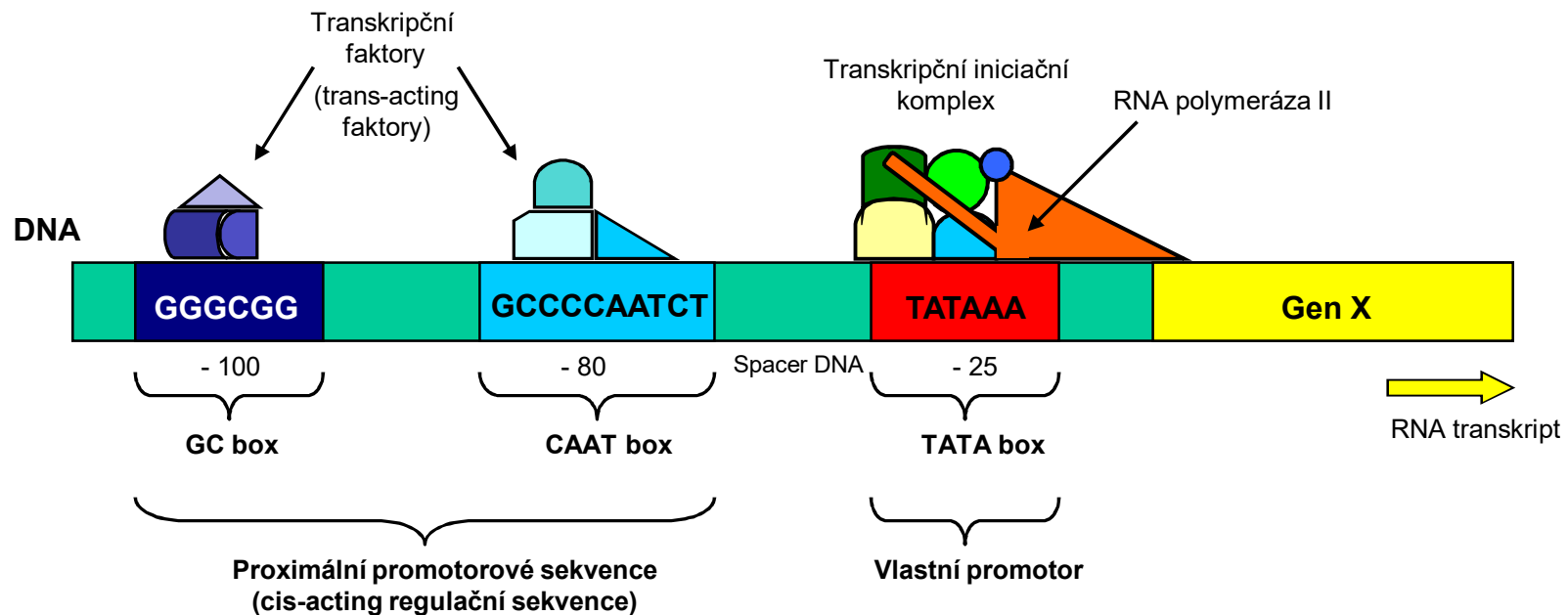
- core (minimální promotor) = minimální sekvence potřebná pro expresi
- regulační sekvence = sekvence kontrolující aktivitu minimálního promotoru

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

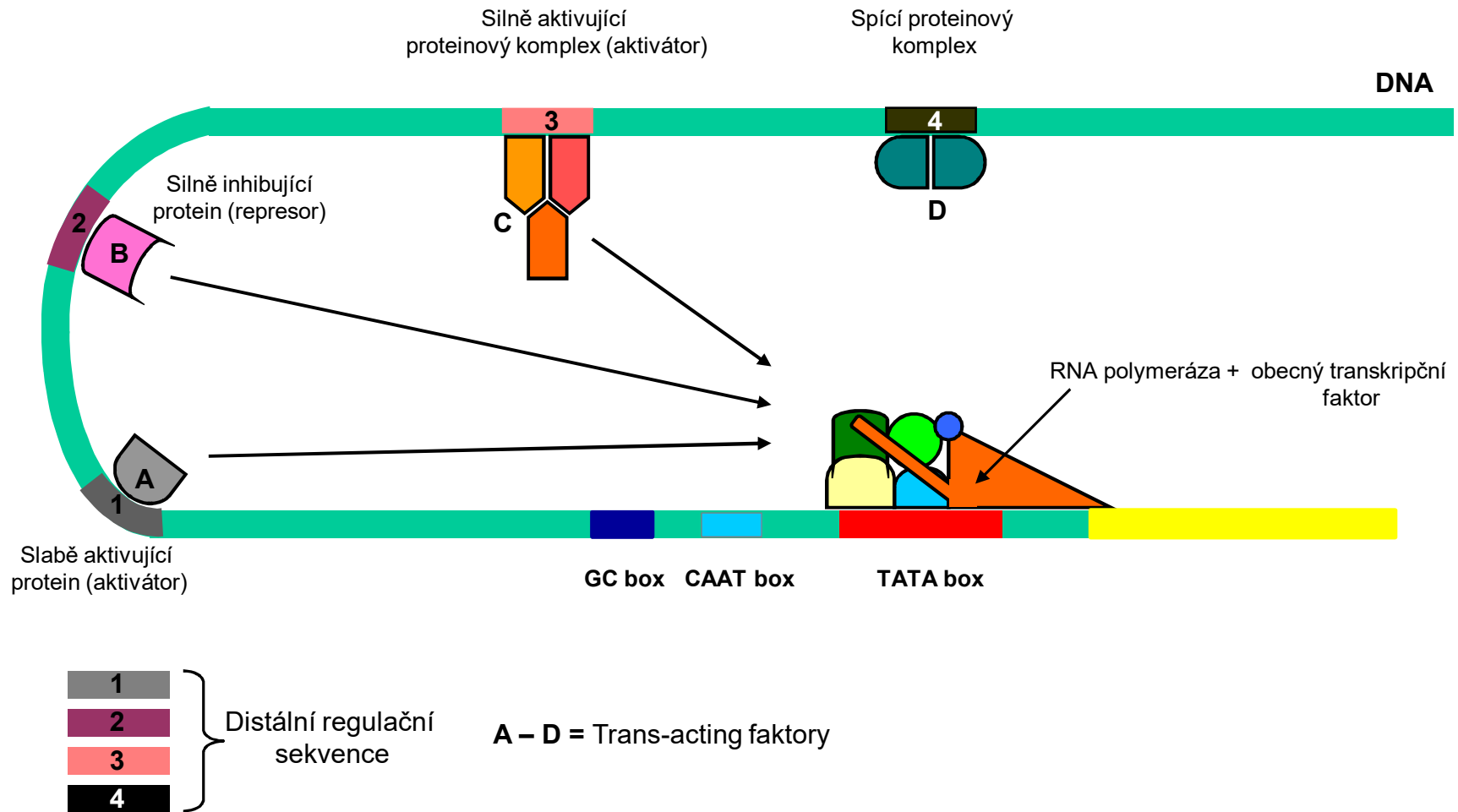
**Typický promotor pro RNA polymerázu II**



## 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

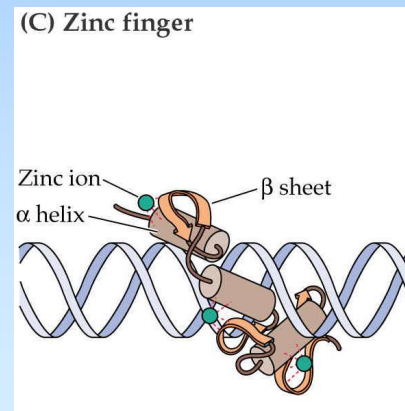
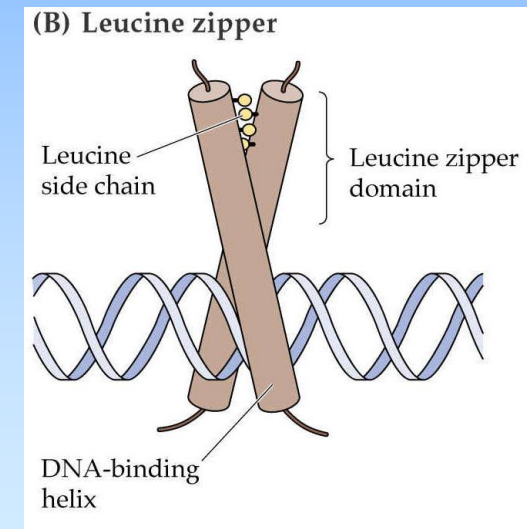
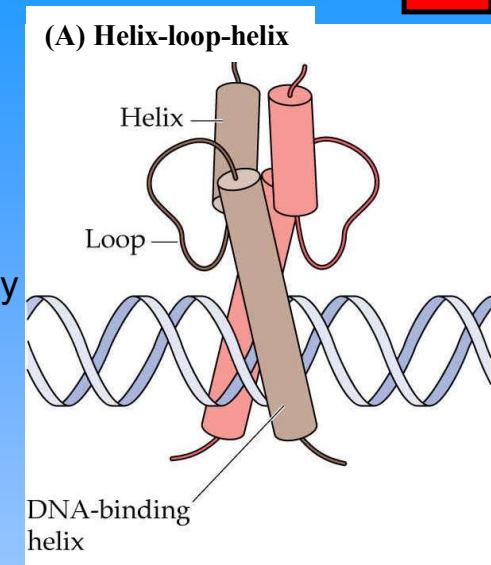
**Helix-loop-helix** 2  $\alpha$  helixy odděleny smyčkou polypeptidového řetězce; funguje jako dimer; často kódovaný homeotickými geny

**Leucine zipper**  $\alpha$  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)



**Update 2024**

Gao F and Dubos C(2024) Trends in Plant Science 29: 668-680  
(review o transkripčních faktorech helix-loop-helix)

## 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

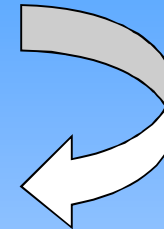
Cortijo S and Locke JCW (2020) Trends in Plant Science, May 25;  
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.017>



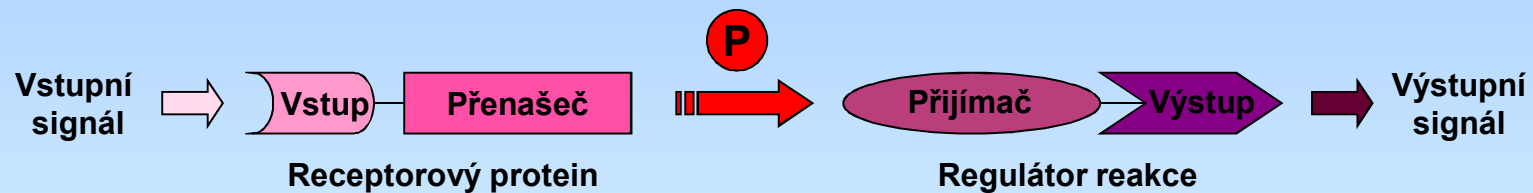
## c) Přenos signálu v rostlinách

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.

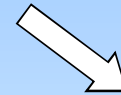
Multibuněčné organismy → Nutnost koordinace vývojových reakcí a reakcí k vnějším podnětům



Potřeba nových signálních mechanismů složitějších než dvoustupňový systém

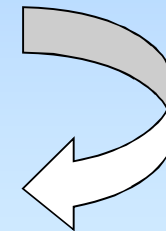


Rostliny se nepohybují

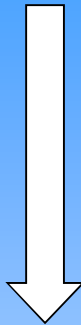


Není nervový systém

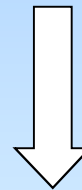
Potřeba nových signálních mechanismů = chemičtí poslové – secondary messengers



## Pochopení základních mechanismů signálních drah u živočichů

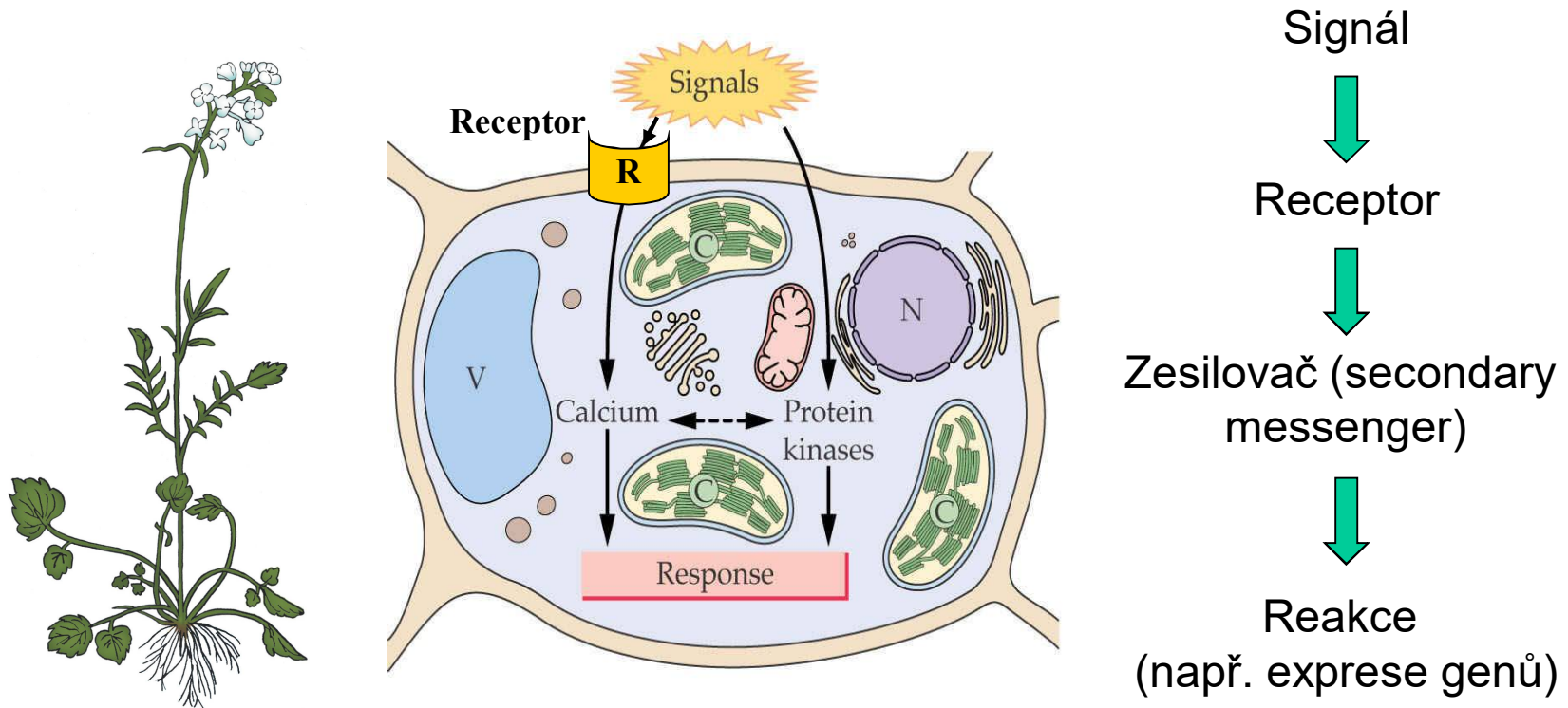


Nalezeny paralely u rostlin (např. brassino**steroidy**)



Pochopeny podobné signální mechanismy u rostlin

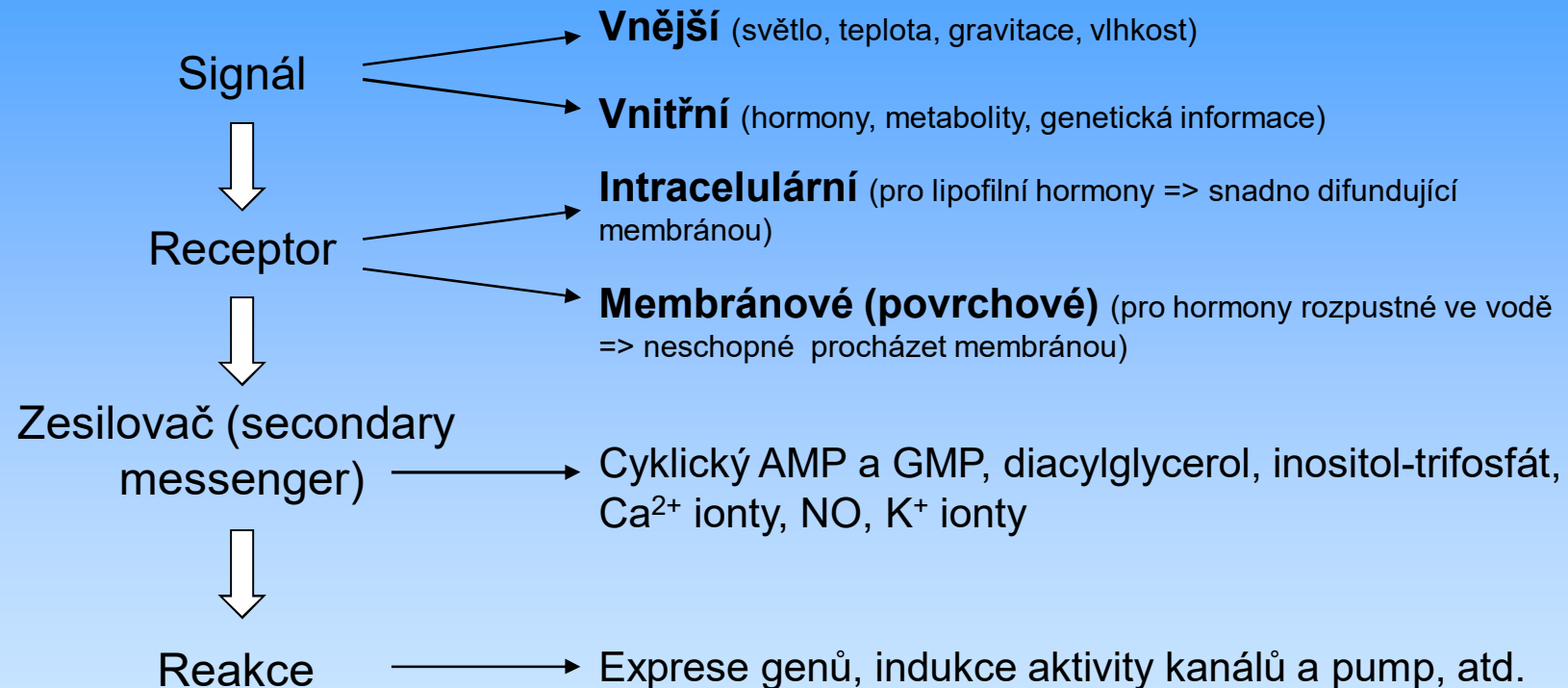
# Schéma přenosu signálu u rostlin



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



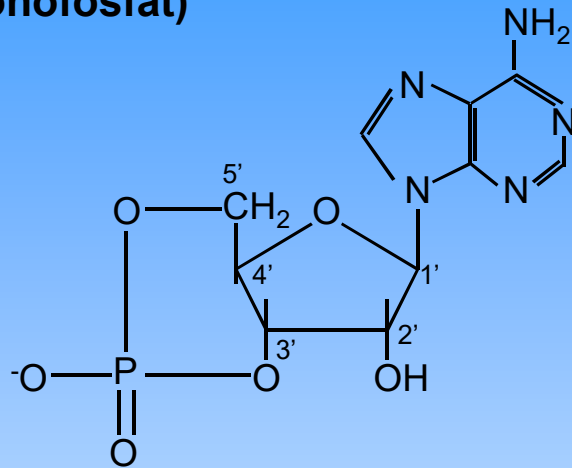
### Update 2017

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)**

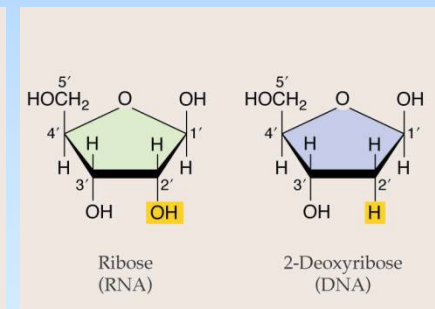
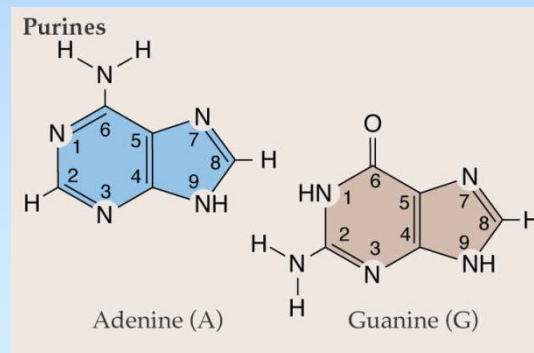
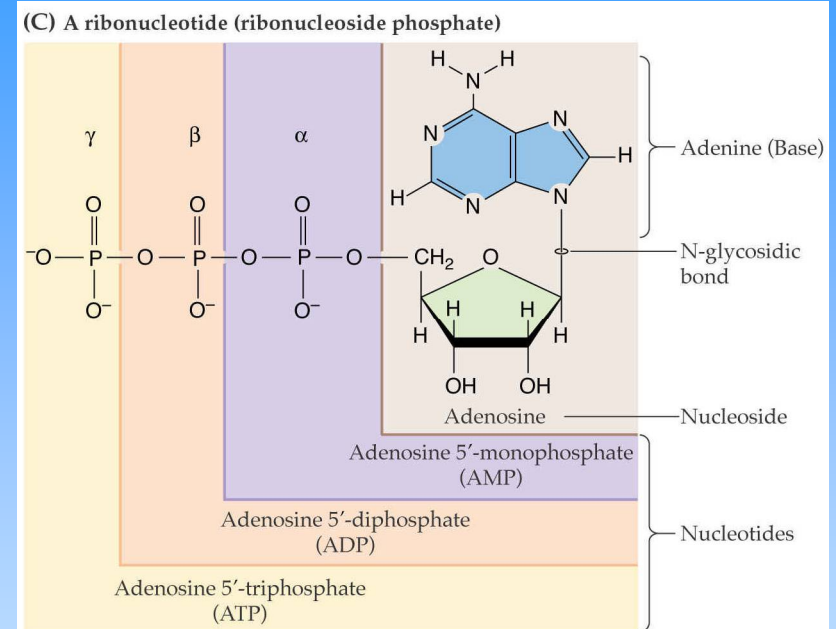
**1,2-Diacylglycerol (DAG)**

**Inositol-1,4,5-trifosfát (IP<sub>3</sub>)**

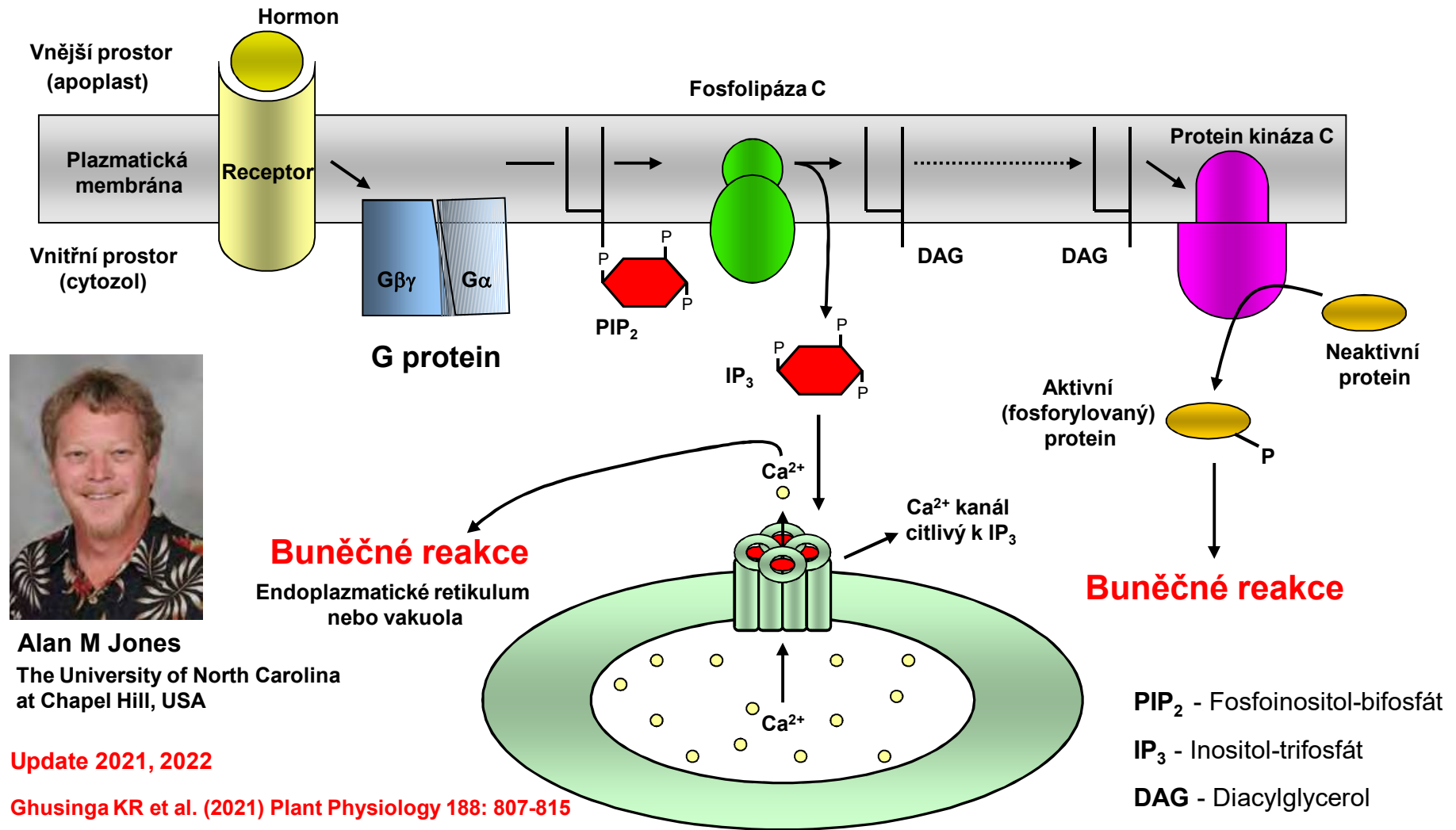
**Ca<sup>2+</sup> ionty: cytosol a jádro**

**Oxid dusnatý NO**

**K<sup>+</sup> ionty – transport z buňky = přepínač mezi metabolickými a obrannými reakcemi při stresu**



# Obecné schéma inositol-lipidové signální dráhy



**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.

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

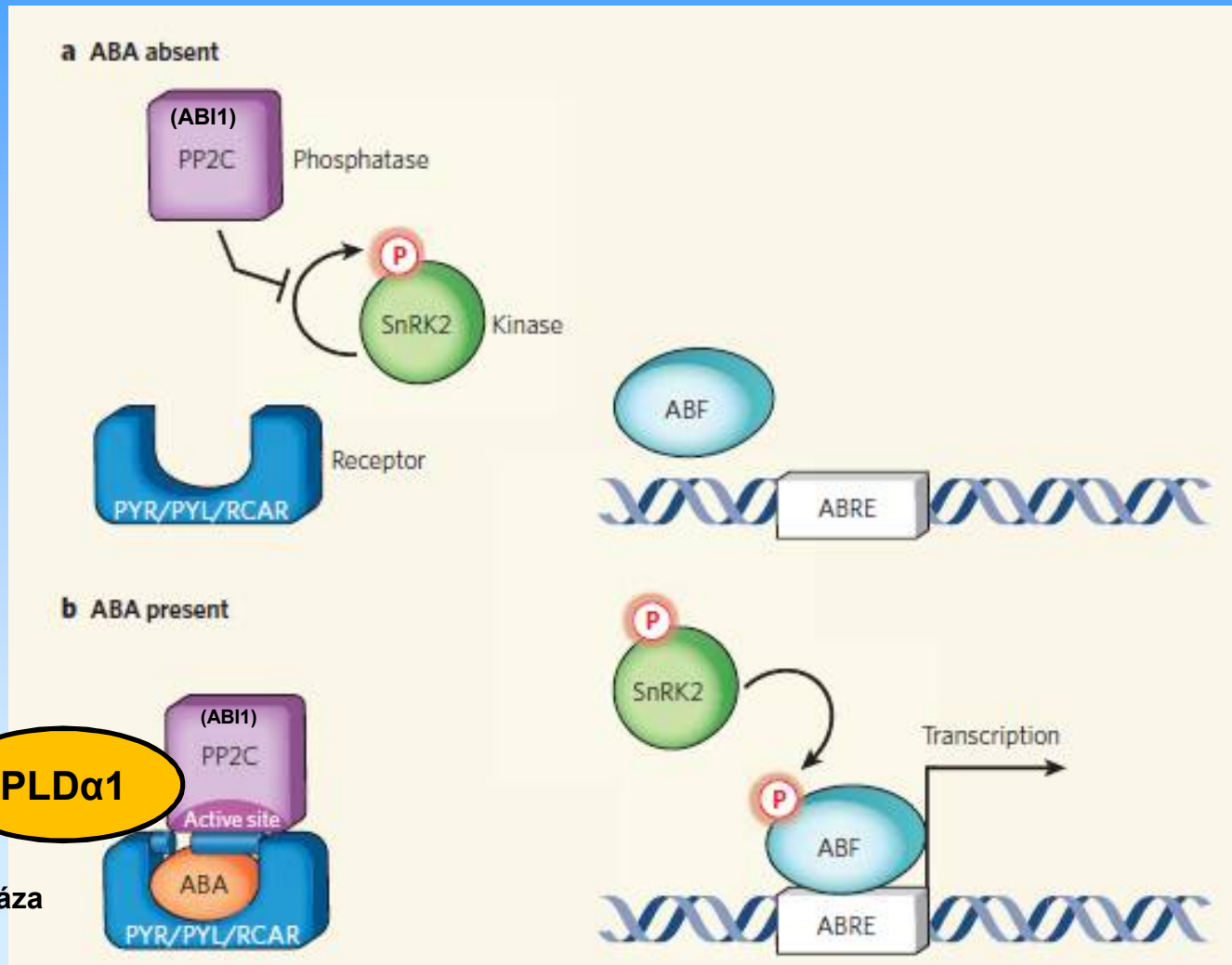
# Zapojení lipidů v signalizaci

## ABA signalizace během stresu (sucho, osmotický stres)

Update 2020

Hoffmann-Benning S (2020)

Molecular Plant 13: 952-954



PLD $\alpha$ 1 - fosfolipáza

kyselina  
fosfolipido-fosfatidová



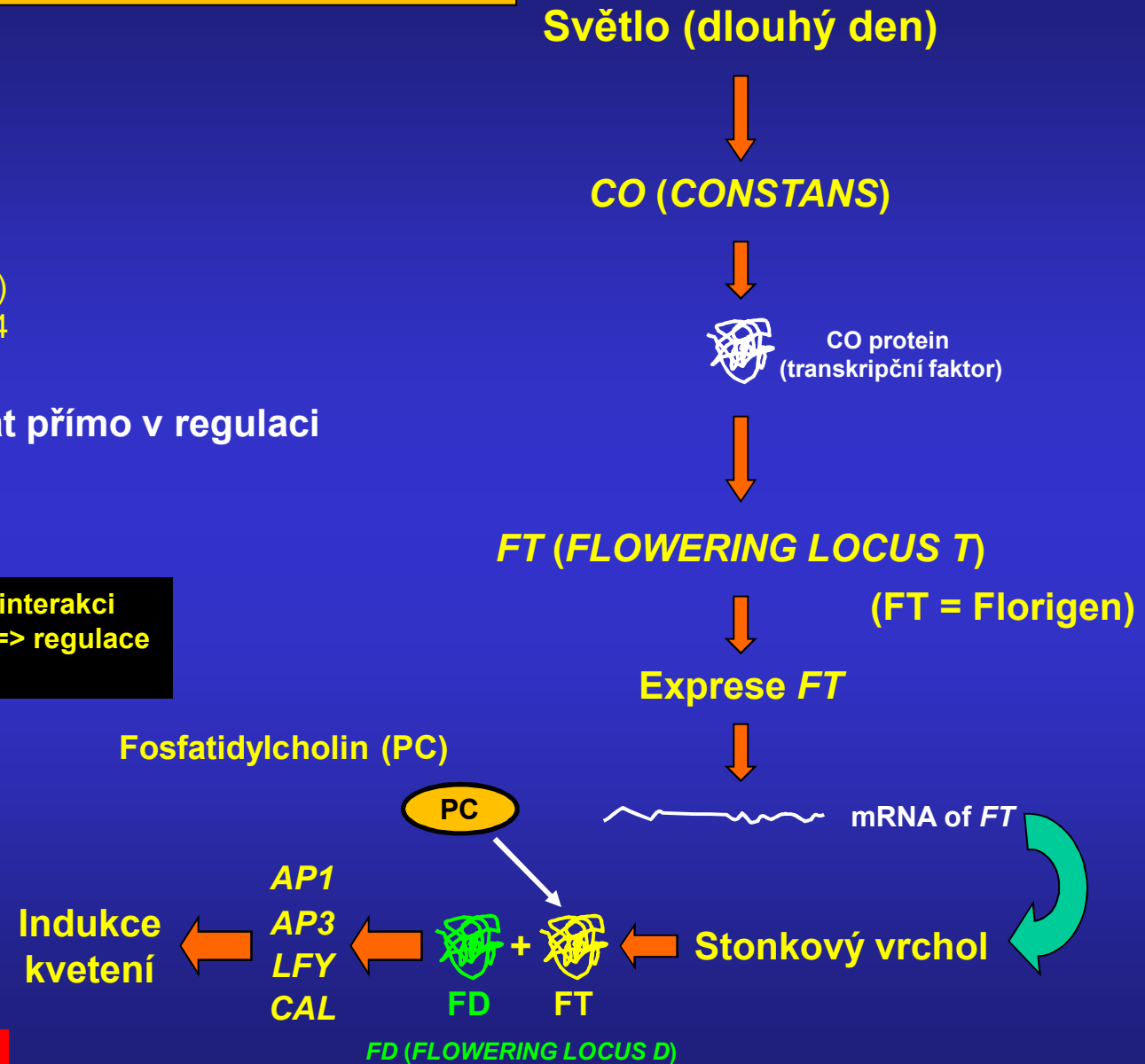
## Lipidová signalizace během indukce kvetení

### 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.

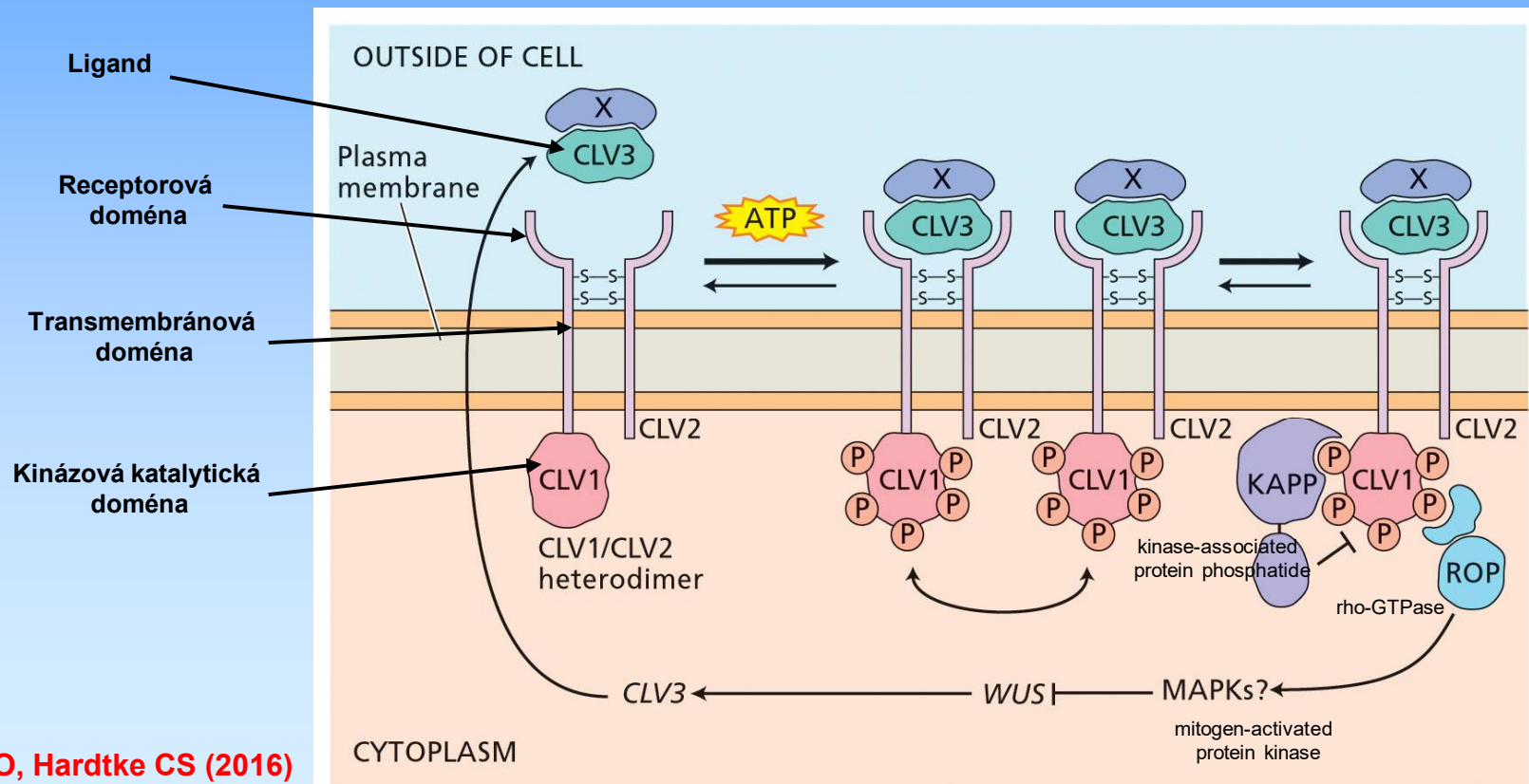
### **Mechanismy komunikace:**

- 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



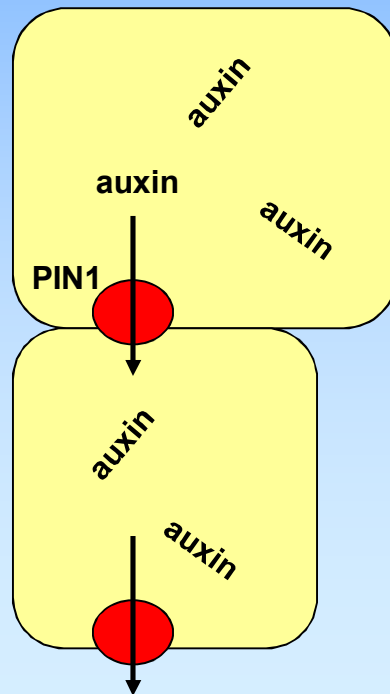
Haza O, Hardtke CS (2016)  
J Exp Bot 67: 4827-4833

## b) Hormonální signál

**Auxin** – nejvýznamnější rostlinný hormon

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

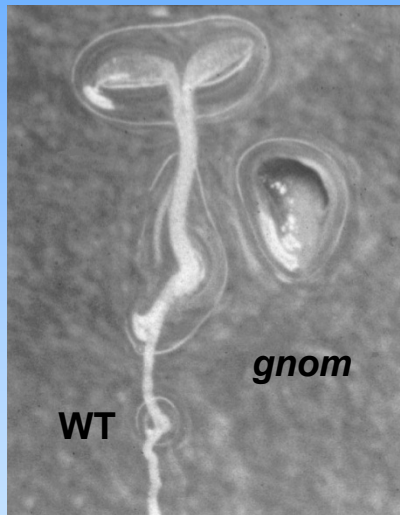
Auxin je distribuován do míst iniciace laterálních orgánů



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.

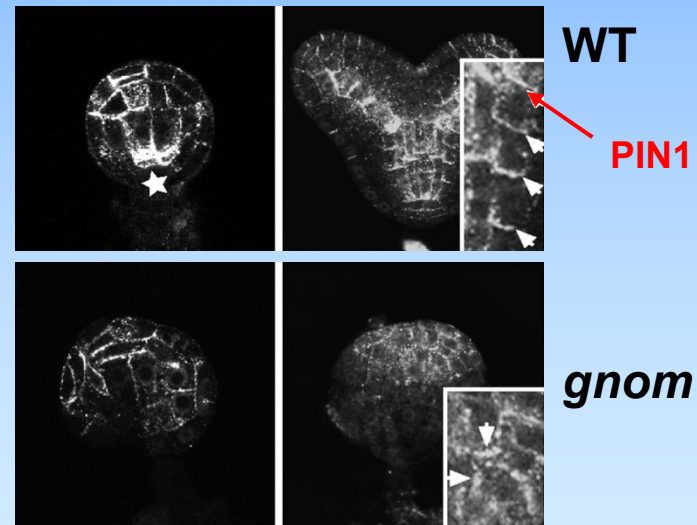
### **GNOM**



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

**GNOM** kontroluje apikálně-bazální polaritu

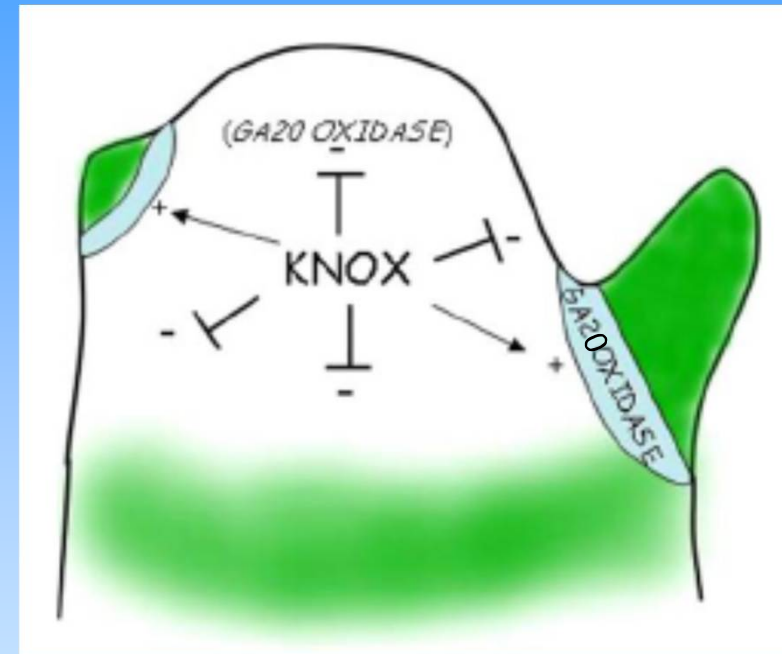
**GNOM** je nutný pro správnou lokalizaci proteinu **PIN1** v bazálních částech buňky, který slouží k transportu auxinu.



## Exprese KNOX řídí syntézu a metabolismus giberelinů – zapojen v iniciaci listů

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

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



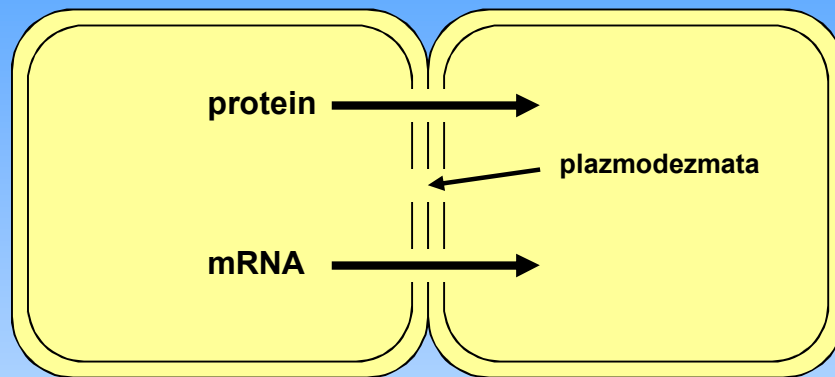
Veit B (2009) Plant Mol Biol 69: 397-408

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**

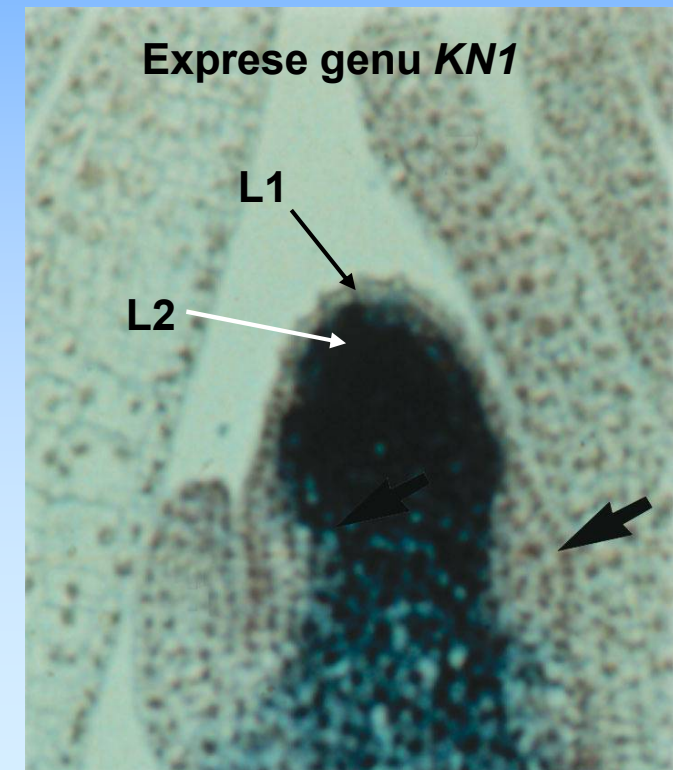
***KN1* protein byl detekován v L1**



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



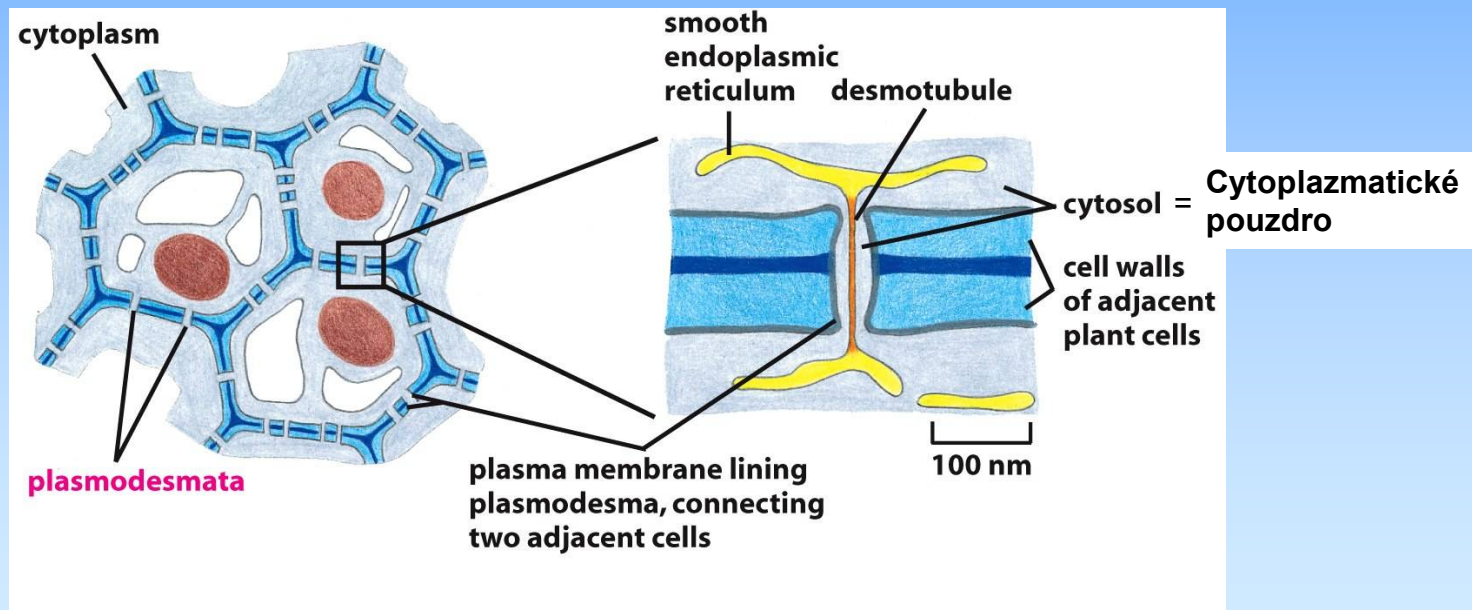
Oparka K (2005) *Plasmodesmata*. Blackwell Publishing.



**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 pouzdrům). Selektivní transport miRNA (Luo et al. 2018)



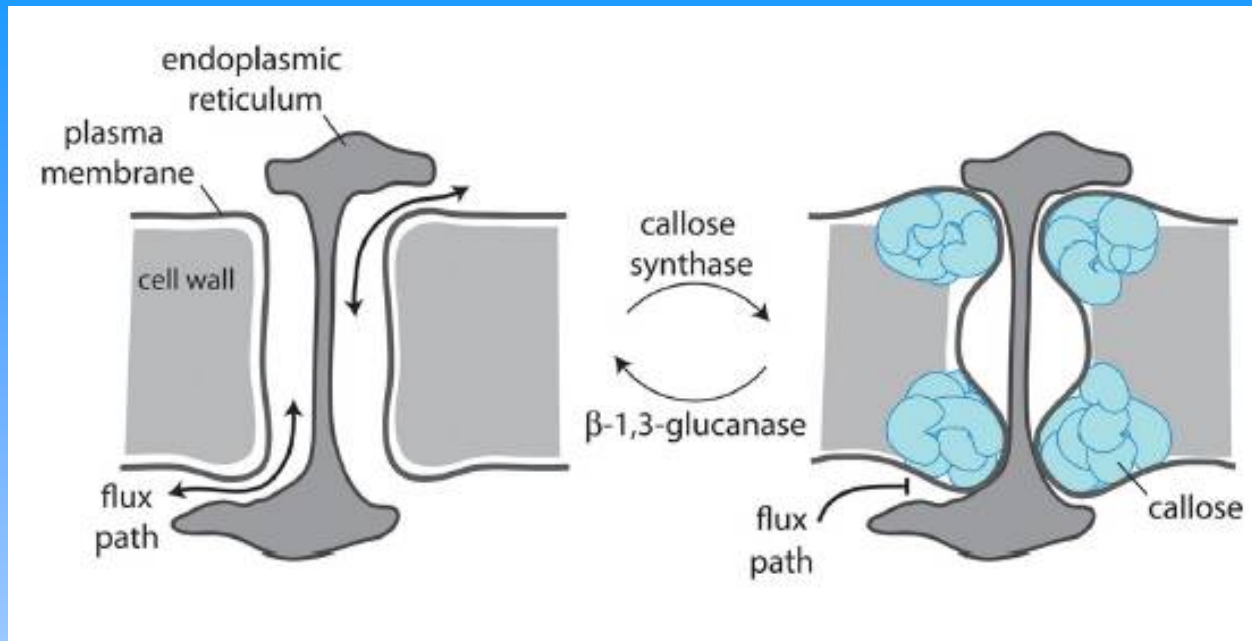
**Update 2022**

**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

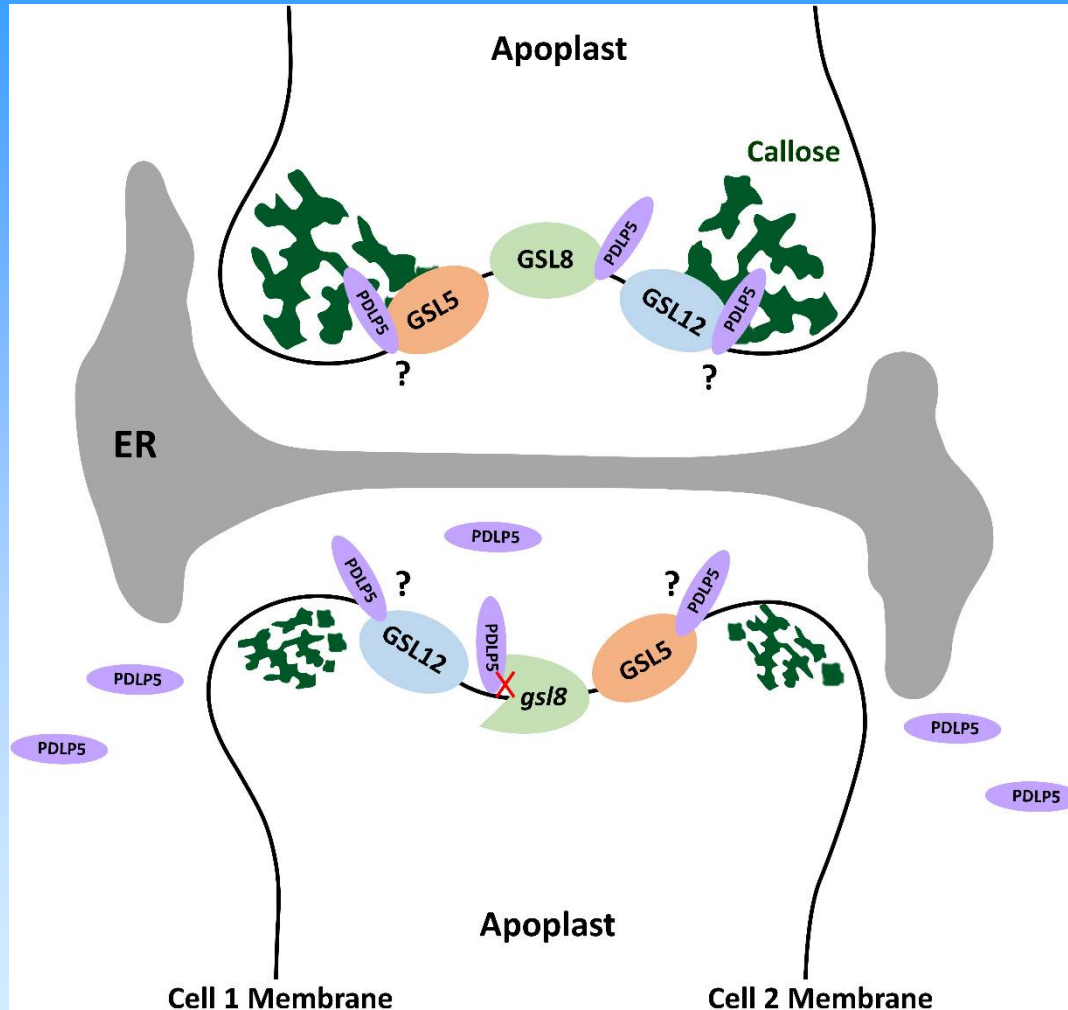
### Update 2016

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 prostupnosti PD, overexprese PDLP5 – zmenšení prostupnosti PD

## Mechanismu regulace velikosti póru plazmodezmat vlivem PDLP5.



Protein PDLP5 reguluje ukládání kalózy v PD i propustnost plazmodezmat prostřednictvím tvorby funkčního proteinového komplexu s proteiny GSL8/CALS10 (GSL = glucan synthase-like, = kalóza syntáza).

Mutant *gsl8/cals10* - interakce PDLP5 a GSL8 nefunguje => částečné chybná lokalizace PDLP5 => lokalizace PDLP5 je závislá na GSL8.

Protein PDLP5 interaguje i s jinými kalóza syntázami, např. GSL5/CALS12 a GSL12/CALS3 – není známý vliv na velikost póru a lokalizaci PDLP5 => analýza mutantů *gs15* a *gs12*.

**Update 2023**

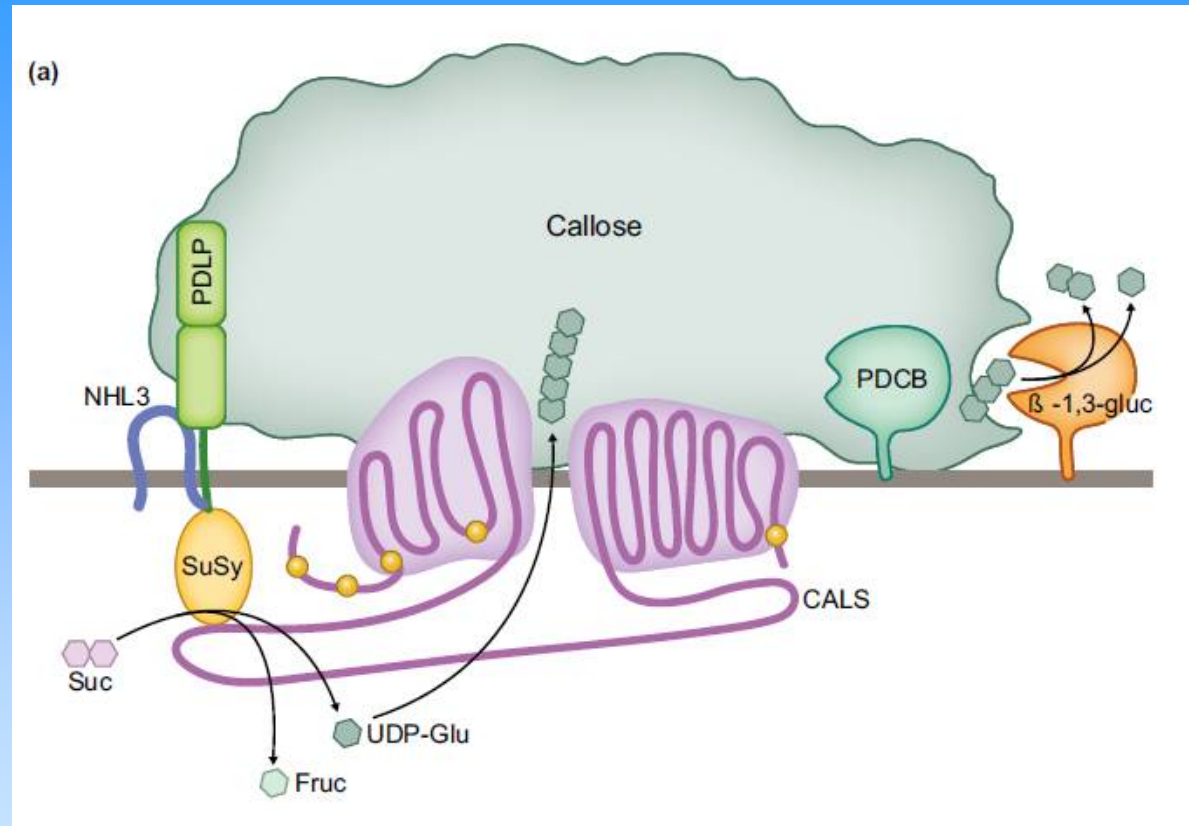
Saatian B et al. (2023) *Plant Signaling & Behavior* 18: e2164670

## Mechanismus syntézy kalózy, regulace velikosti otvoru plasmodezmat

Kalóza syntázy (**CALS**) jsou membránově ukotvené proteiny - přeměňují uridin difosfát glukózu (**UDP-Glu**) na  $\beta$ -1,3-glukan kalózu (**kalóza**). Enzymy sacharóza syntázy (**SuSy**) přeměňují sacharózu (**Suc**) na UDP-Glu a fruktózu (**Fruc**) => UDP-Glu slouží jako substrát pro kalóza syntázu.

SuSy interagují s cytoplazmatickou smyčkou kalóza syntázy a s proteiny (PDLP). N- a C-konce kalóza syntáz mají klíčové zbytky, které se podílejí na enzymatické aktivitě (●).

Kalóza se hromadí v apoplastickém prostoru – interaguje s **PDLP** a dalšími proteiny => zúžení póru plasmodezmata.



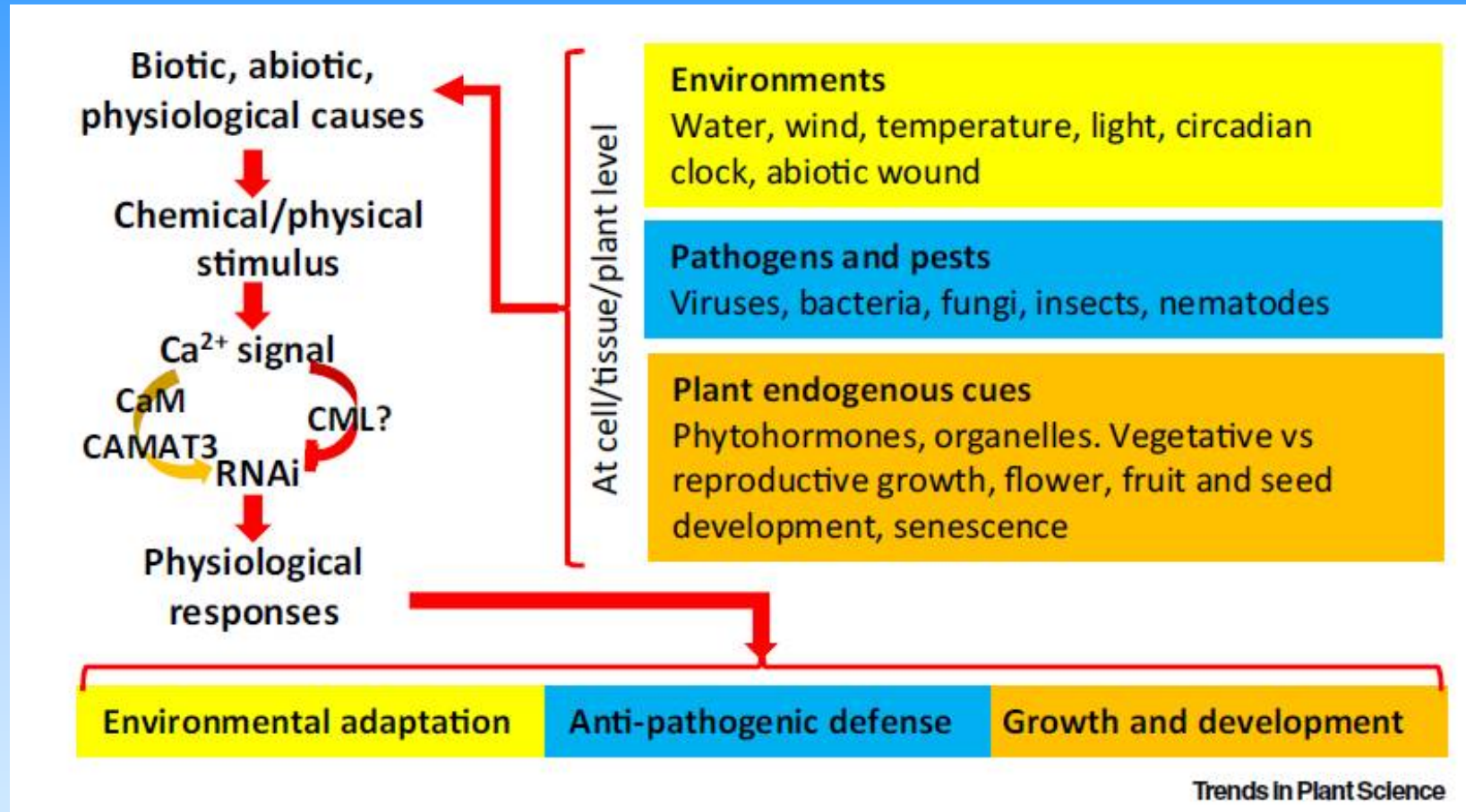
Kalóza je degradována pomocí enzymů  **$\beta$ -1,3-glukanáz** => snížení množství kalózy na plasmodezmatu => rozšíření póru plasmodezmata.

**Update 2024**

Tee EE and Faulkner C (2024) *New Phytologist* 243: 32-47

## Update 2022

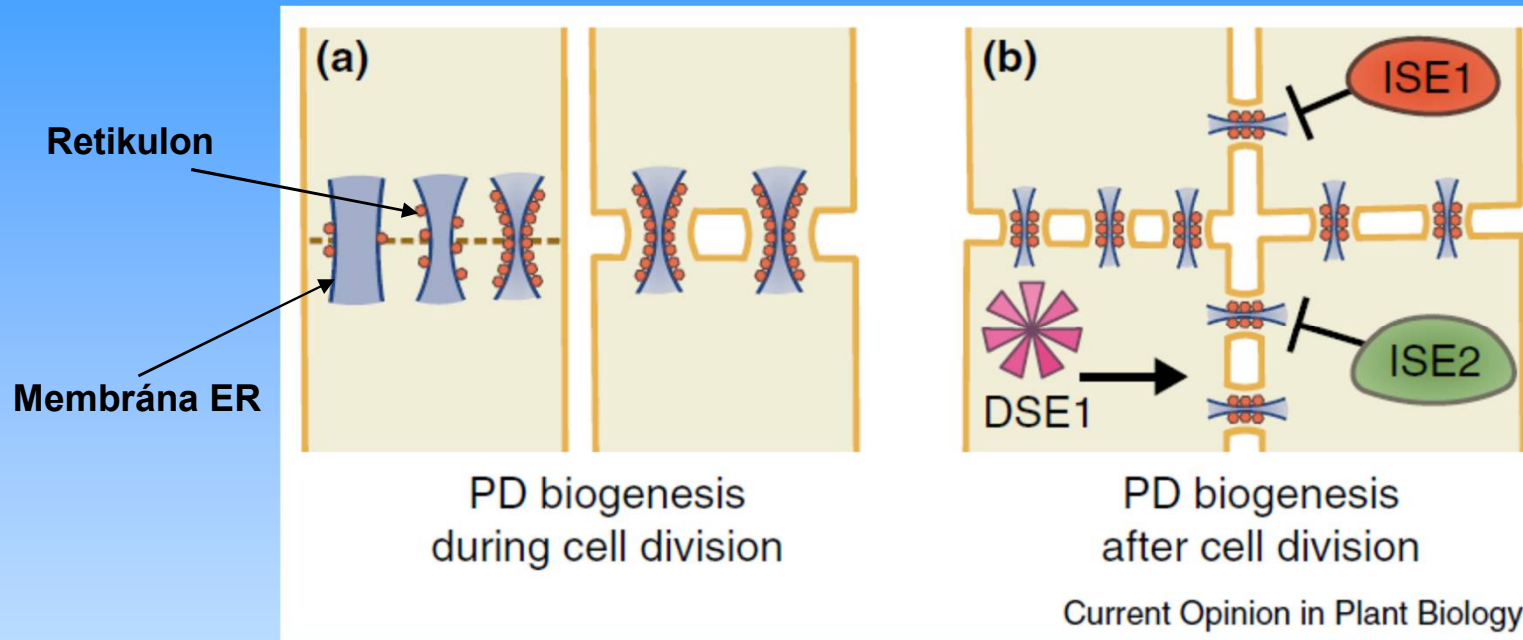
Wang Y et al. (2022) TIPS 27: 328-330



Změna signalizace cytoplazmatického Ca<sup>2+</sup> 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



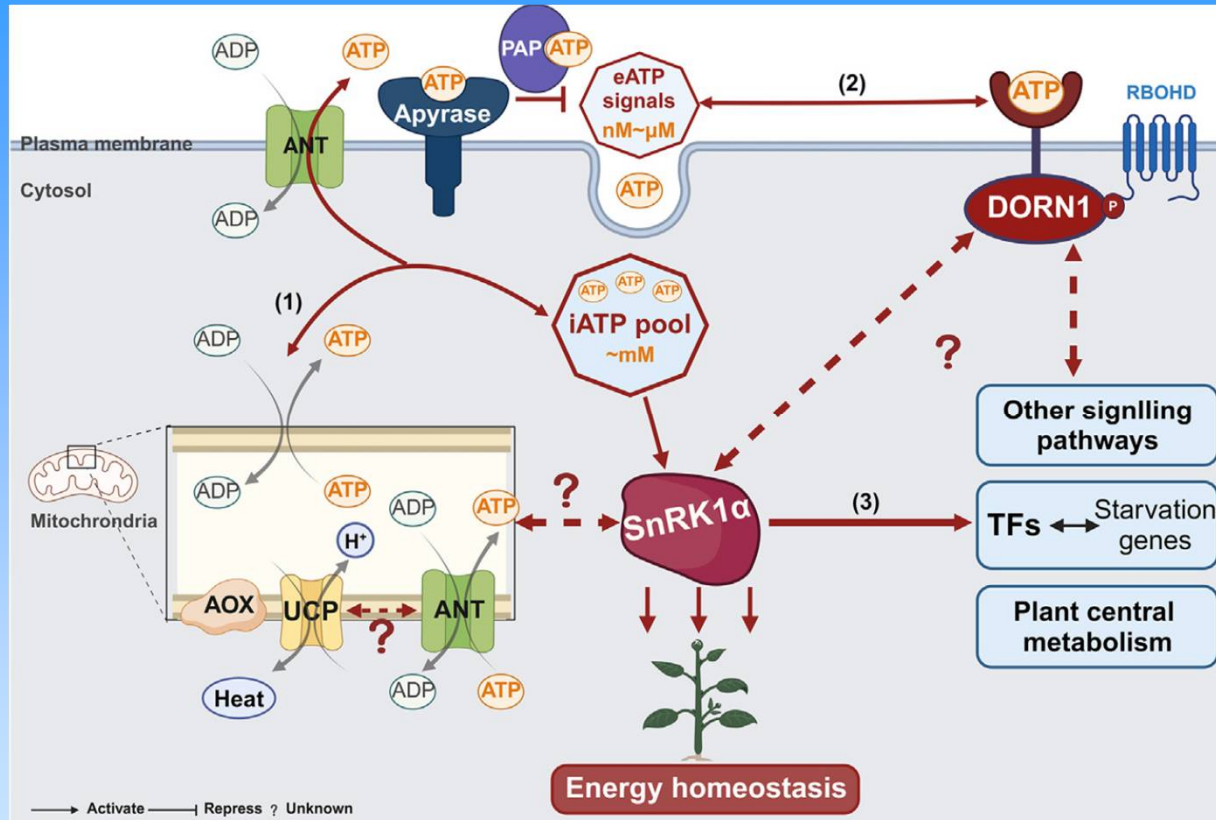
### Tvorba primárních plazmodezmat

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).

## Regulace homeostázy buněčné zásoby ATP u rostlin - signalizace ATP



3) Centrální senzor energetického deficitu **SnRK1 $\alpha$**  reaguje přímo na výkyvy v zásobě ATP a obnovuje energetickou homeostázu prostřednictvím aktivace dalších signálních drah.

1) Změny v zásobě **iATP** => regulace interakce mezi ANT a UCP => existence interakce mezi využitím substrátu a hladinou ATP

2) **eATP** = signální molekula - vnímána receptorem **DORN1** prostřednictvím extracelulární lektinové domény a intracelulární serin/threonin kinázové domény a aktivována => série odpovědí prostřednictvím fosforylace následných elementů signální dráhy. APY hydrolyzuje molekuly ATP => udržování příznivé hladiny buněčného ATP

**Update 2024**

Xiao J et al. (2024) *Plant Communication* 5, art. No: 100834

