

Mimojaderné genetické elementy

Genom plastidů a mitochondrií

Transformace plastidů

Genom plastidů a mitochondrií

2

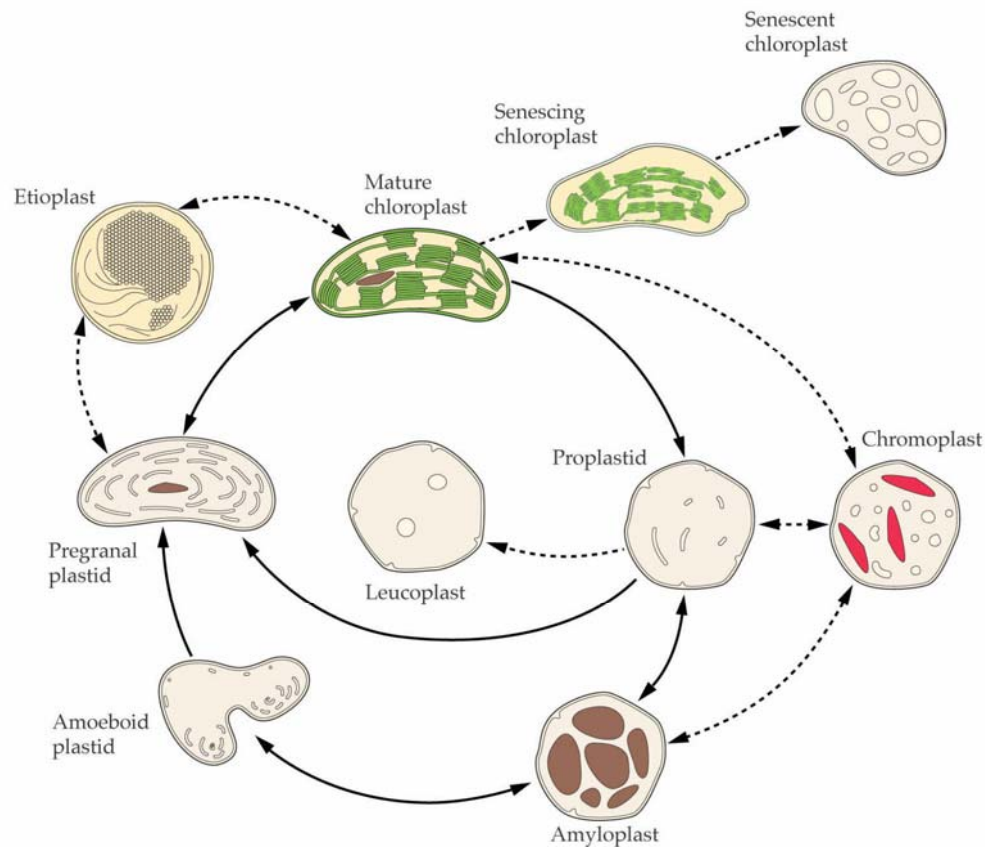
- původ plastidů a mitochondrií a jejich funkce
- struktura, replikace a exprese genomu organel
- introny v rostlinném genomu
- vztah mezi jádrem a organelami

Formy plastidů

3

1. **Proplastidy** - precursory všech plastidů, v mladých meristémech
2. **Amyloplasty** - obsahují škrobová zrna, bez pigmentu
3. **Leukoplasty** - bezbarvé, produkce monoterpenů
3. **Etioplasty** - vznik ve tmě, v bílých nebo nažloutlých etiolovaných listech, kořenech
4. **Chloroplasty** - v zelených pletivech, obsahují chlorofyl, fotosynéza
5. **Chromoplasty** - obsahují karoteny a xantofyly, ve zralém ovoci a zelenině, květech

Vývojový cyklus plastidů 4



New
England

October
2003



5

Funkce plastidů

6

fotosyntéza

syntéza škrobu

syntéza mastných kyselin

syntéza aminokyselin

syntéza pigmentu

syntéza nukleotidů

syntéza nukleových kyselin, proteinů

asimilace sulfátů a nitrátů

Reprodukce plastidů dělením

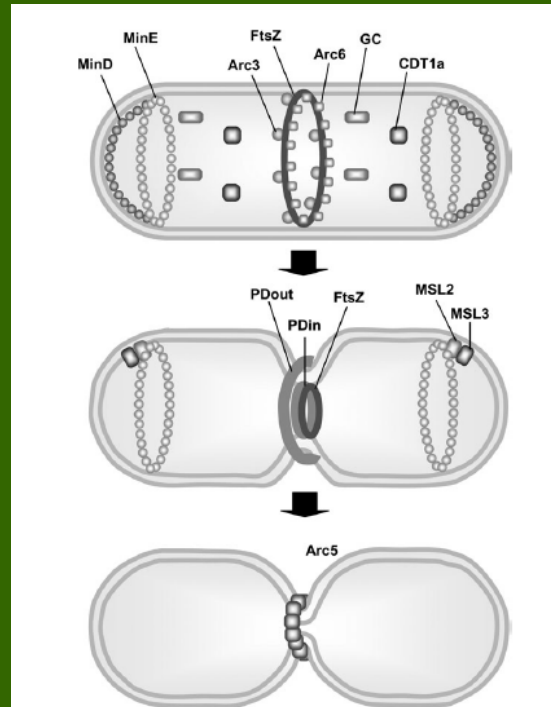
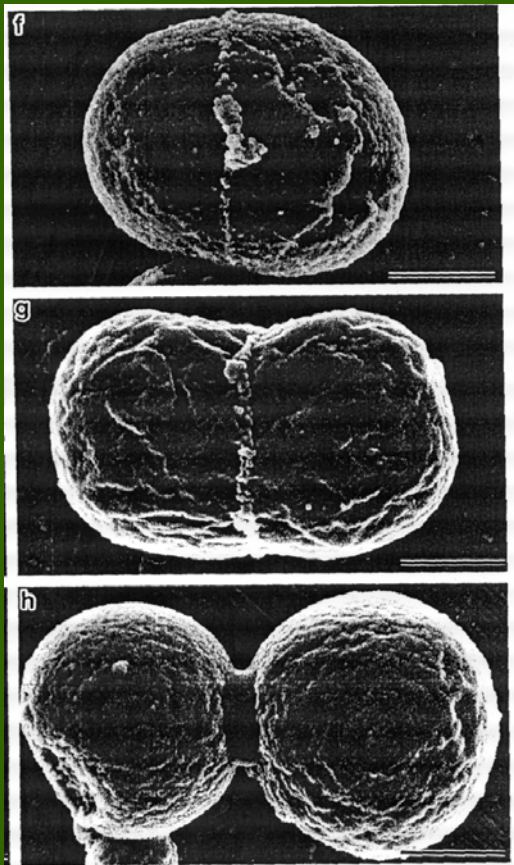


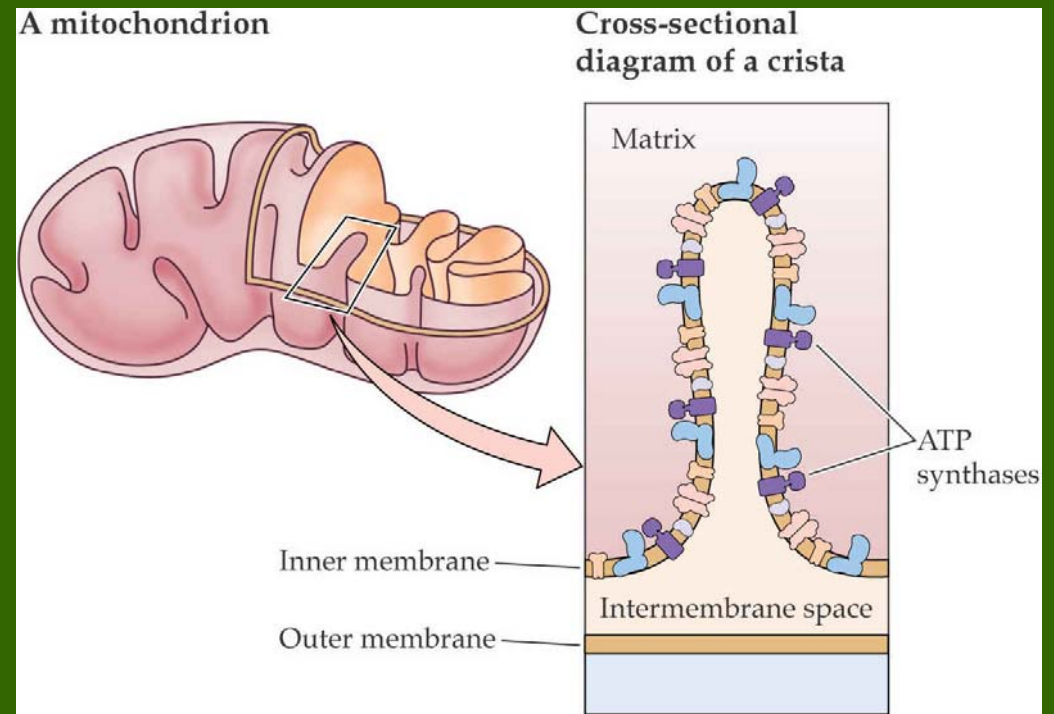
Fig. 2. Plastid division components. Components currently known to play a role in the plastid division process. MinD and MinE play a role in the location of the plastid division apparatus. FtsZ and the plastid division (PD) outer and inner rings physically carry out the constriction. Arc3 and Arc6 help assemble the FtsZ ring. GC plays a poorly-understood role. CDT1a may help co-ordinate plastid and nuclear division. MSL2 and MSL3 probably helps release ionic/hydrostatic pressure generated by the division. Arc5 carries out the final envelope separation. Adapted from López-Juez and Pyke (2005) and reprinted by kind permission of UBC press, Vancouver.

Lopez-Juez E., 2007

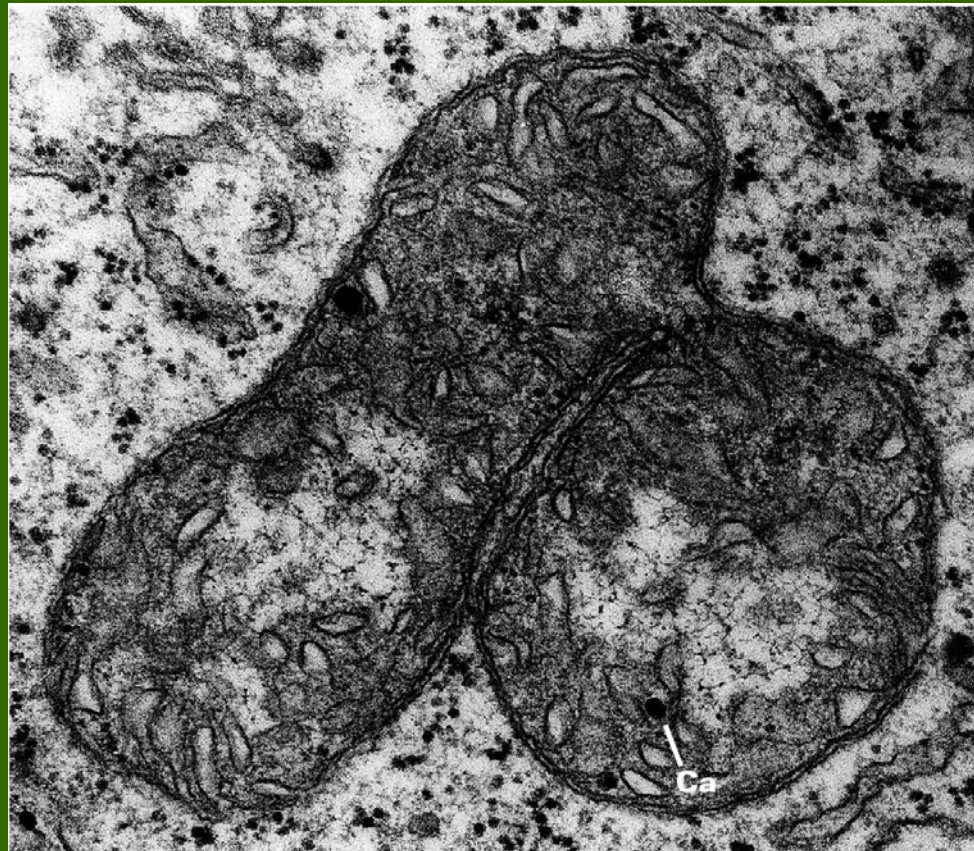
Mitochondrie

vnitřní membrána -
přepážky (zvětšení
povrchu), obsahuje
složky dýchacího
řetězce a enzymy
tvorby ATP

akumulace energie do
energeticky
bohatých
fosfátových vazeb



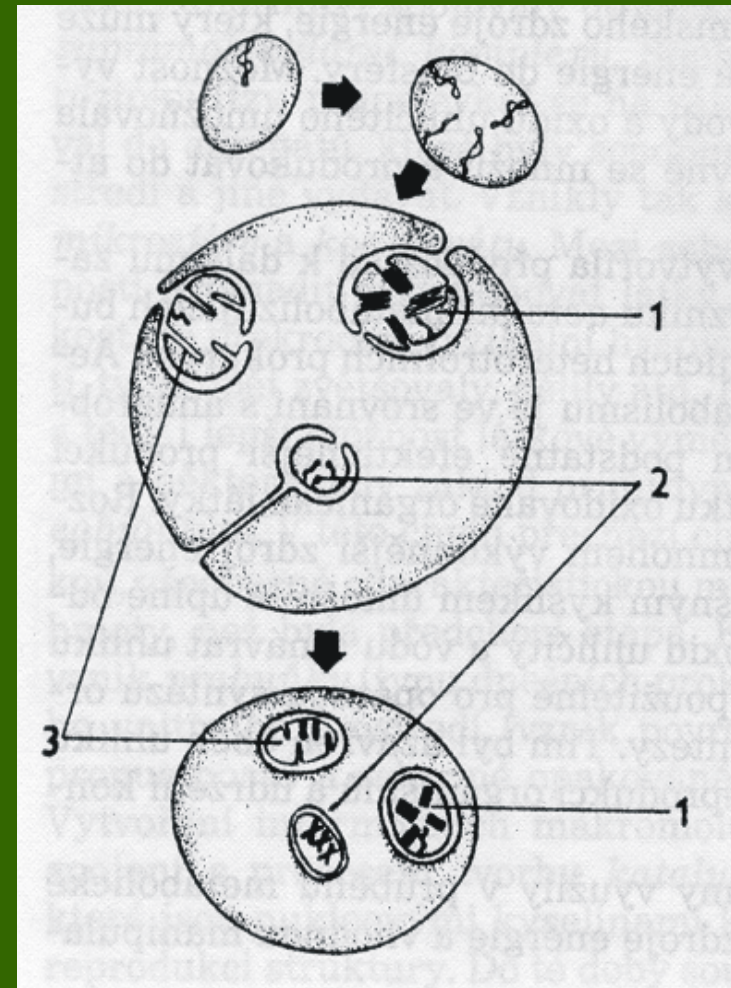
Reprodukce mitochondrií dělením



Vlastnosti organel

- ohraničení dvouvrstevnou membránou
- značně autonomní - množení dělením, vlastní DNA a ribozomy
- syntéza vlastních proteinů
- stěhování genů do jádra a jejich postupné zanikání v genomu organel
- stromula plastidů (tubulární výběžky) fúzí, výměna genetického materiálu

Endosymbiotická teorie vzniku organel



3/ Znázornění jedné z představ o evoluci eukaryotické buňky na základě postupného vchlípnutí biomembrány, členění vnitřního prostoru, zmnožování genetické výbavy a splývání buněk — 1 chloroplast, 2 jádro, 3 mitochondrie

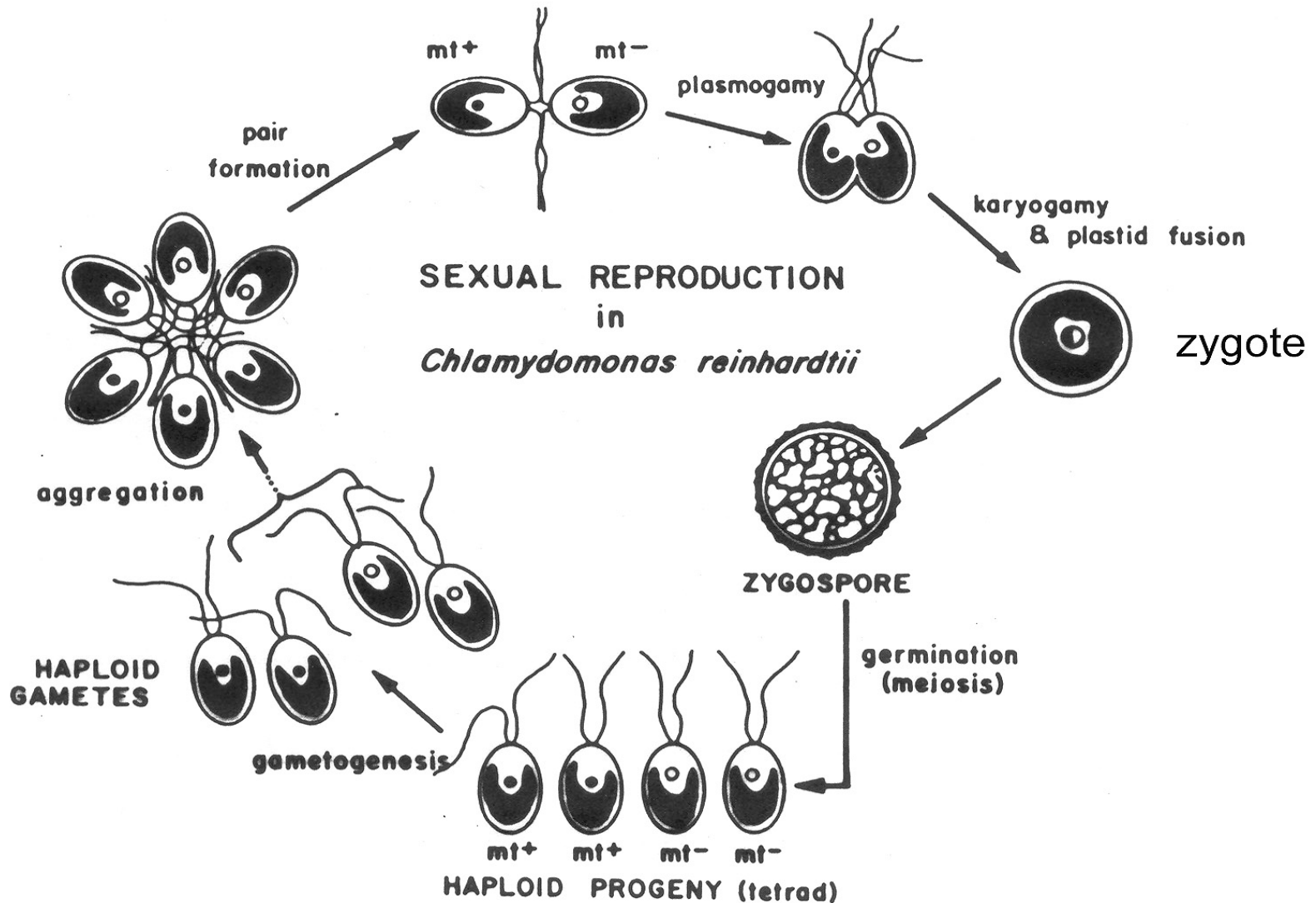
Genetika chloroplastů

1. Dědičnost zpravidla uniparentální (většinou z mateřské buňky)
několik mechanismů, nejasné:
 - *Chlamydomonas*, otcovská cpDNA zničena
 - některé vyšší rostliny - otcovské plastidy při oplodnění eliminovány
2. Plastidy mají stejnou DNA v celém organismu
3. Genom uniformní v průběhu diferenciac

Dvě výjimky k bodům 2. a 3.

Životní cyklus *Chlamydomonas*

13

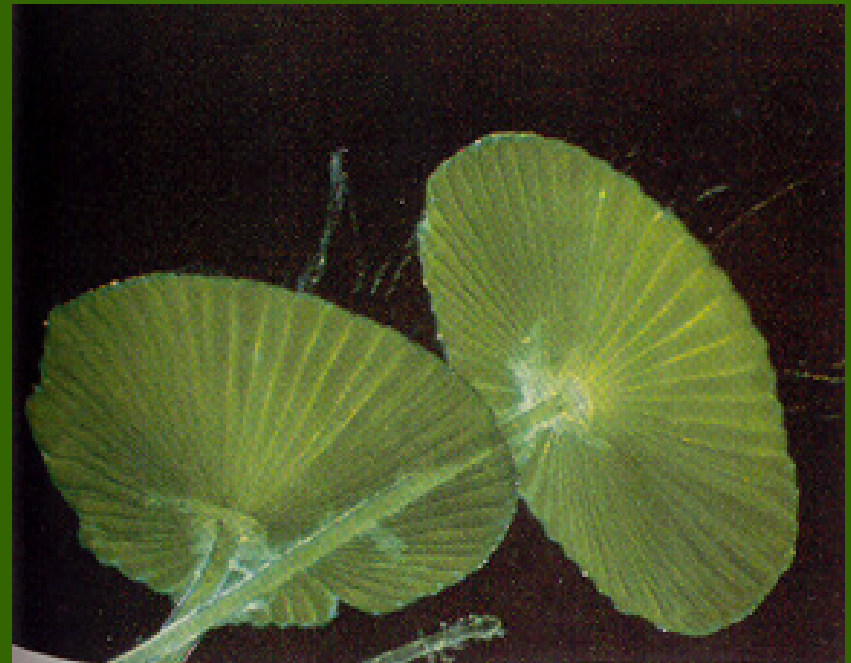


Acetabularia

zelená řasa, jednobuněčná, známý fosilie,
délka stélky 5-10 cm, 1 jádro, 10^6
chloroplastů, možná regenerace z rhizoidu
ve vegetativním stadiu až 30% chloroplastů
neobsahuje DNA



jádro



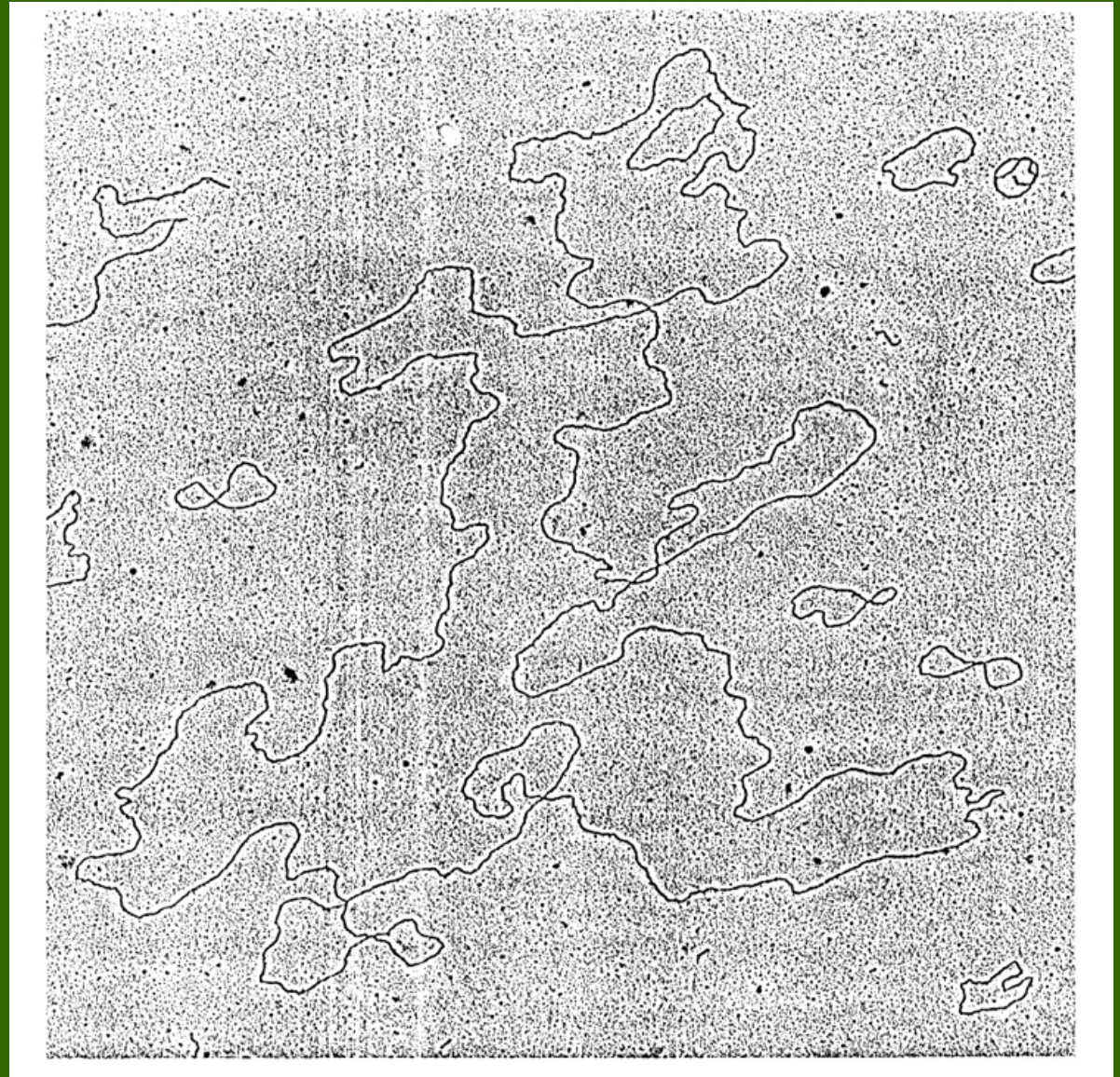
Chloroplastová DNA (cpDNA)

Obecné vlastnosti:

1. dsDNA, cirkulární
2. obsah G-C zpravidla nižší než v jádře
3. velké množství kopií (~30-100) na plastid
4. 20-40 organel/genom
5. bez histonů, navázány proteiny (*Hu*), organizace do nucleoidů
6. tvoří 10-20% celkové DNA v listech

Chloroplastová DNA (cpDNA) 16

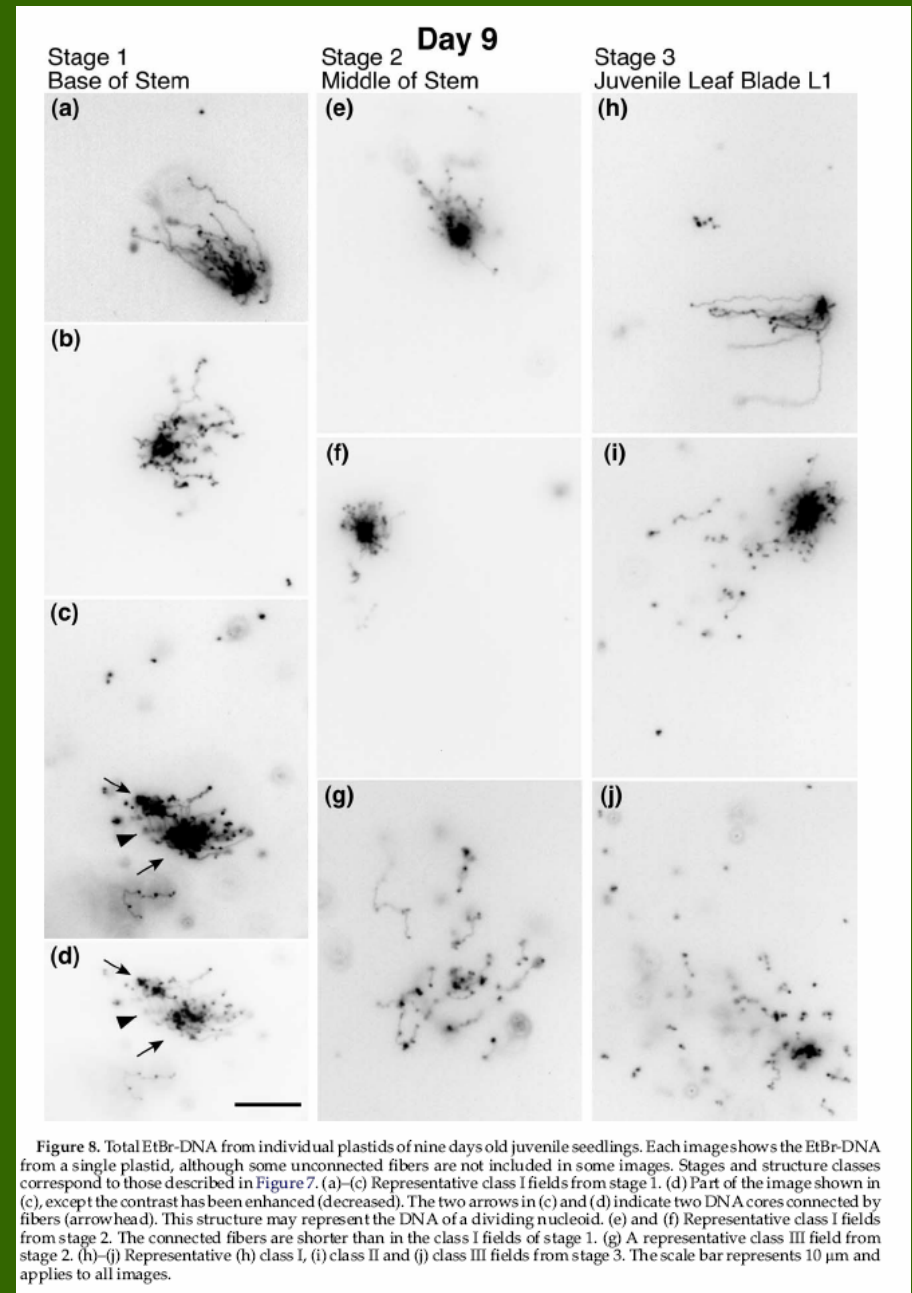
Relaxovaná
cpDNA



17

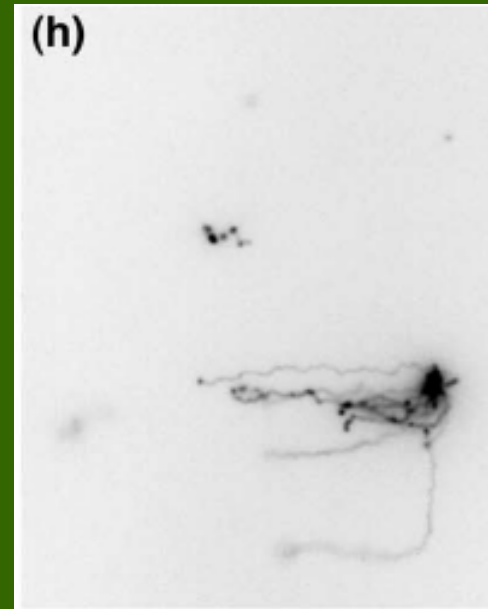
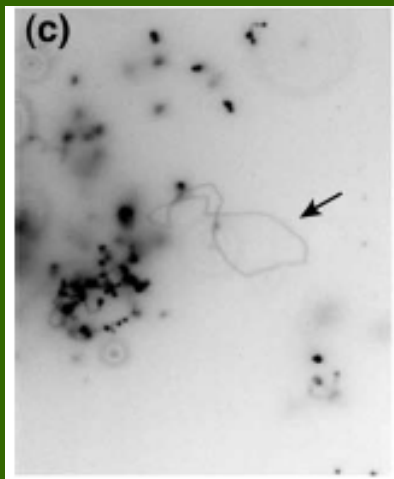
Chloroplastová DNA - co v učebnici není

Oldenburg D.J. and Bendich A.J., 2004



18

Chloroplastová DNA - co v učebnici není



Oldenburg D.J. and Bendich A.J., 2004

Velikost chloroplastového genomu

70 - 200kb

vyšší
rostliny
140 kb

nižší
eukaryota
do 200 kb

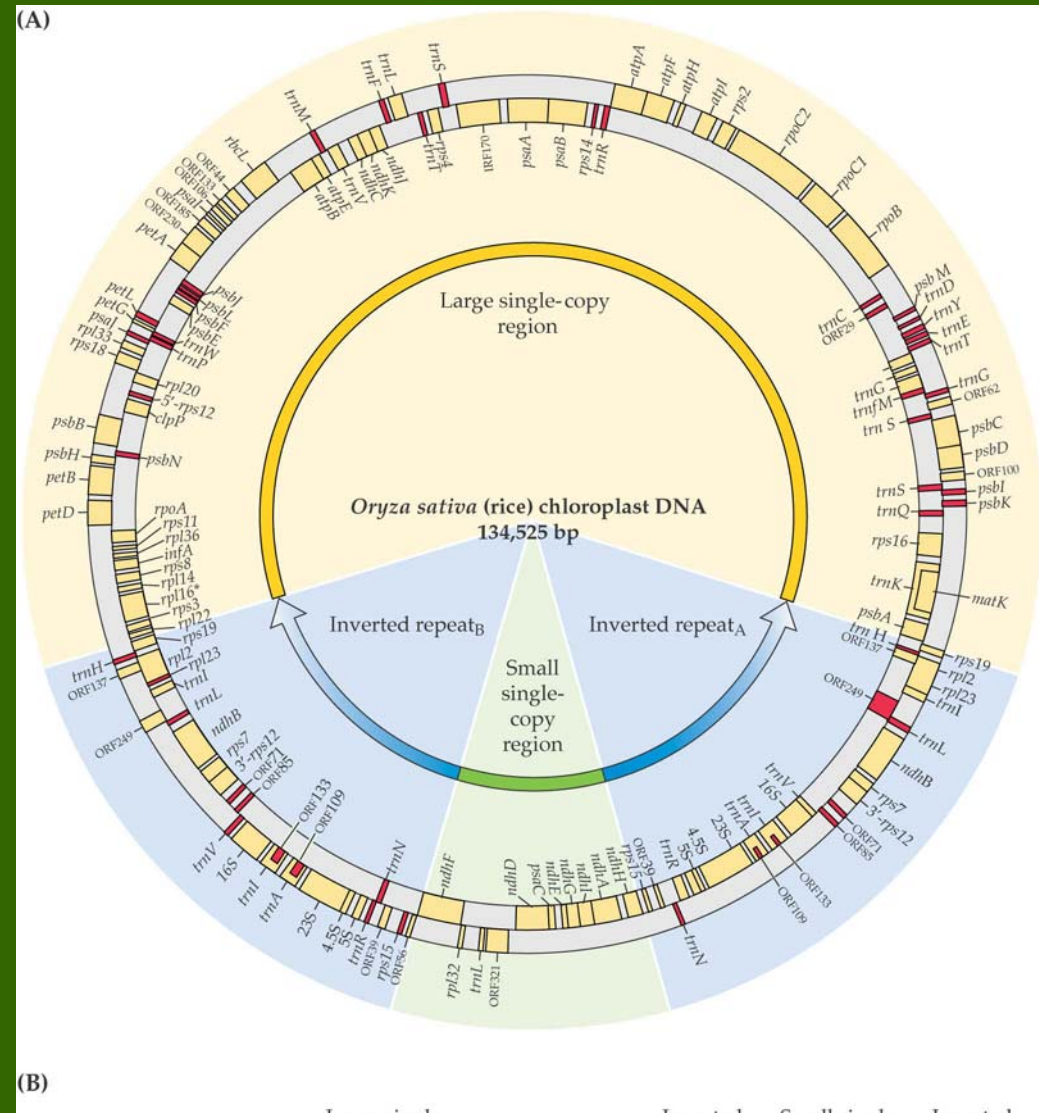
Taxa	Genome size (In kb)	Inverse duplication (In kb)
Angiospermae		
<i>Nicotiana tabacum</i>	156	25
<i>Spinacia oleracea</i>	150	24
<i>Pelargonium hortorum</i>	217	76
<i>Pisum sativum</i>	120	Not present
<i>Epifragus virginiana</i>	70	22
<i>Oryza sativa</i>	134	21
Gymnospermae		
<i>Pinus</i>	120	Not present
<i>Ginkgo biloba</i>	158	17
Pteridophyta		
<i>Osmunda cinnamomea</i>	144	10
Bryophyta		
<i>Marchantia polymorpha</i>	121	10
Chlorophyta		
<i>Codium fragile</i>	85	Not present
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	195	22
<i>Chlamydomonas moewusii</i>	292	41
Rhodophyta		
<i>Cyanophora paradoxa</i>	127	10
Chromophyta		
<i>Dictyota dichotoma</i>	123	5

Typický cp genom

kruhová molekula DNA
rozdělena na „long“ a
„short“ oblasti (LSC A
SSC) jedinečných kopií,
odděleny IR

rRNA (*rrn*) geny
(uspořádání v clusterech
připomíná uspořádání v *E. coli*)

rekombinace mezi
repeticem (oddělují LSC a
SSC) vede k převrácení
SSC



kódují asi 100 proteinů

cp geny:

1. Geny genetického aparátu (replikace, transcripce, translace)
2. Geny fotosyntézy
3. Geny kódující komplexy tylakoidních membrán

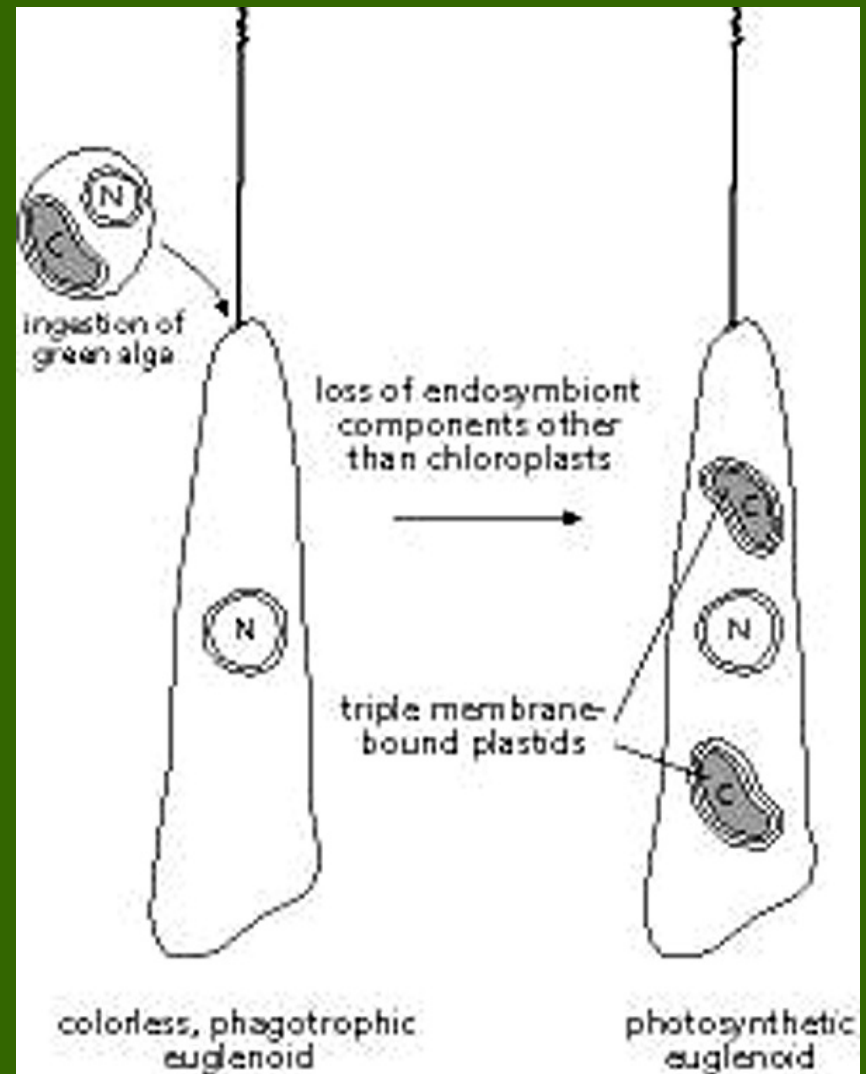
Znovu endosymbiotická teorie (a stěhování genů)

- plastidový genom vysoce konzervován
- většina genů endosymbionta vymizela nebo se staly součástí jaderného genomu
- Rubisco
- 2 typy intronů - vznik chloroplastů předtím než prokaryota ztratila introny

Znovu endosymbiotická teorie

některé chloroplasty
získány
sekundárně:
Chromophyta,
Dinoflagellata a
Euglenoida mají 3
nebo 4 membrány
kolem chloroplastu
(vnější, vnitřní, cp)

? endosymbióza
eukaryonta



Mořský slimák *Elysia chlorotica*

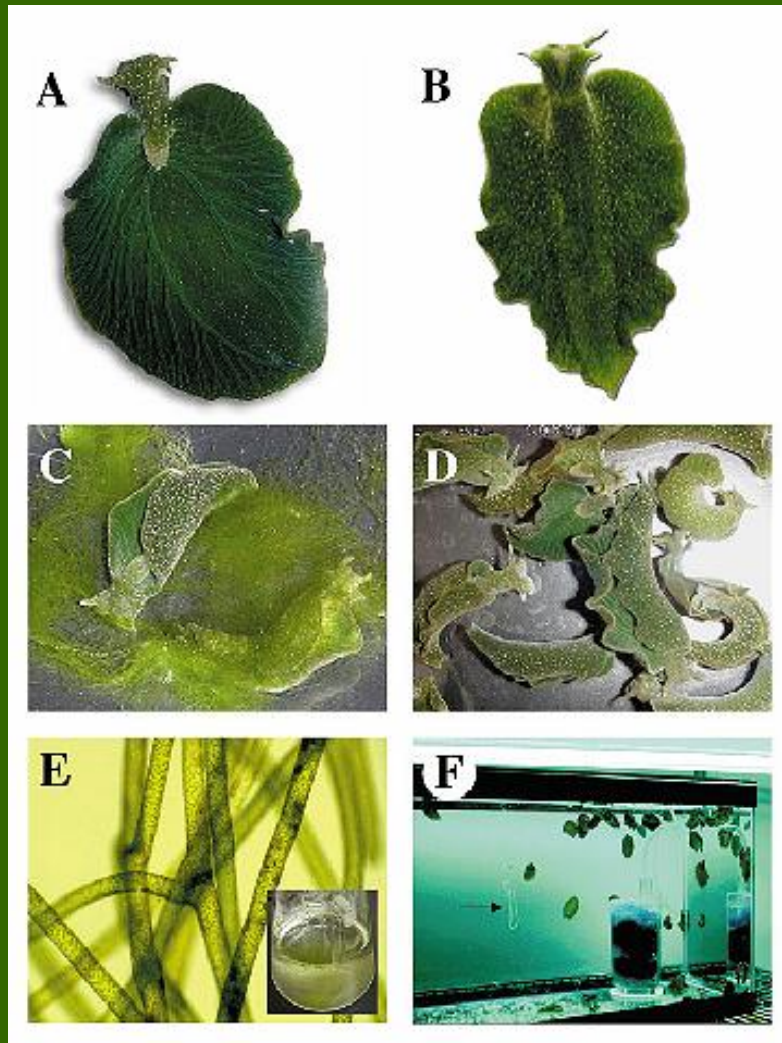
Elysia s aktivními
chloroplasty řasy
Vaucheria

Chloroplasty
zůstávají aktivní
po dobu 8 měsíců

courtesy of Dr. Mary Rumpho



Mořský slimák *Elysia chlorotica*



Elysia chlorotica and *Vaucheria litorea*. A) Dorsal view of *E. chlorotica*. Animals are typically found in nature as small as 1 or 2 cm to as large as 6 cm, as shown here. B) Ventral view of *E. chlorotica*. C) Two camouflaged *E. chlorotica* specimens feeding on *V. litorea*. D) Several specimens of *E. chlorotica* showing the variation in size and body forms. E) *V. litorea* filaments (about 1 to 2 mm diameter). F) Sea slugs are easily cultured in aquaria containing full-strength artificial sea water and overhead lighting at 10°C. Non-pigmented eggs are produced in a mucus mass on the aquaria walls (see arrow). The eggs serve as a source of pure animal DNA since no plastids are found in the eggs.

Rumpho M. et al., 2000

Caulerpa taxifolia



DNA mitochondrií (mt DNA)

- většinou kruhová
- bez histonů
- malý počet kopií na organelu
- dědičnost většinou uniparentální
 - konifery: od obou rodičů
 - Angiosperms : mateřská (stejně jako cpDNA)
 - *Chlamydomonas. minus* (-) (cpDNA děděna od rodičovské buňky +)

Velikost genomu mitochondrií

- *S. cerevisiae* 84 kb
- savci 16 kb
- produkty podobné
- ekonomizace v průběhu evoluce?
- řasy x vyšší rostliny

Genom mitochondrií

Mitochondrial DNA from different organisms

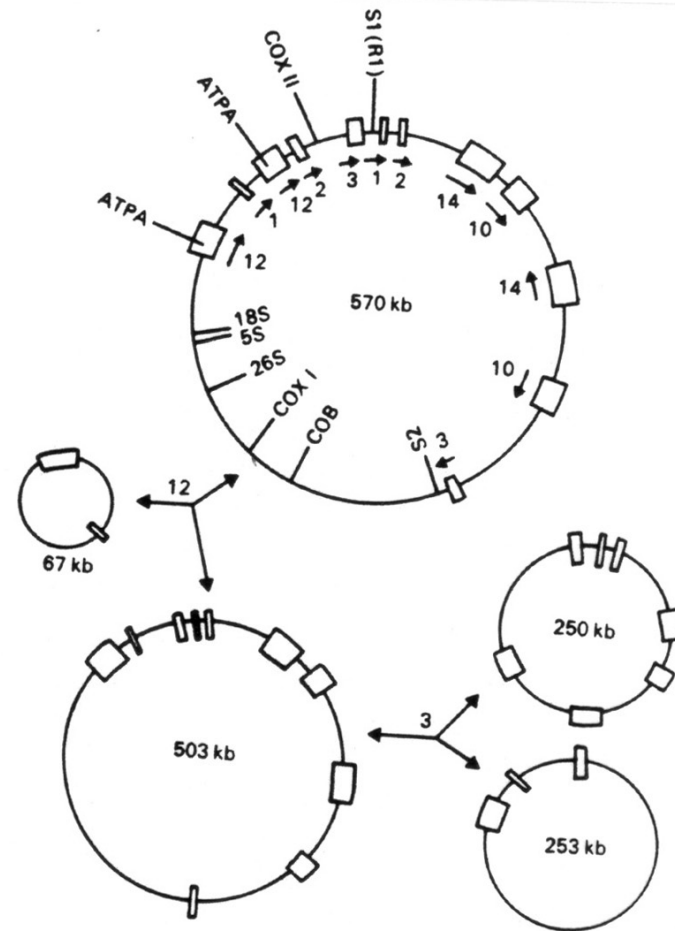
	Number of base-pairs	Number of different molecules per organelle
HIGHER PLANTS		
<i>Brassica</i> ssp.	218 000	3 (circular) 218kb, 135kb, 83kb
Maize	570 000 plus a variable number of plasmid-like DNAs from 1 400–6 000 bp	7 (circular) from 570kb-47kb, up to 4 (circular or linear)
Muskmelon	2 400 000	?
ALGAE		
<i>Chlamydomonas</i>	16 000 linear	1
FUNGI		
<i>Podospora anserina</i>	juvenile 95 000 senescent 30 000 + 2 400	1 (circular) 2 (circular)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80 000	1 (circular)
OTHERS		
Cow and man	16 600	1 (circular)

Genom mitochondrií

kukuřice (*Zea mays*):
několik kruhových
molekul:

„master“ molekula 570
kb a subgenomické
kruhové molekuly
odvozené od „master“

subgenomické kruhové
molekuly odvozené od
„master“ vznikají
rekombinací v oblasti
přímých repetitiv



The location and orientation of six repeated DNA sequences (the 1, 2, 3, 10, 13 and 14 kilobase repeats) are shown, together with the positions of the integrated S1 (sometimes called R1) and S2 DNA sequences. Subgenomic molecules are generated from the master circle of 570 kilobase-pairs by recombination across the repeated sequences. Examples shown are for recombination across the 12- and 3-kilobase repeats. After Bailey-Serres (1987).

Exprese chloroplastového genomu

většinou uspořádání do operonů - kotranskripce

plastidy vyšších rostlin asi 30 transkripčních jednotek (vymezeny promotorem a terminátorem)

subgenomické kruhové molekuly odvozené od „master“ vznikají rekombinací v oblasti přímých repetit

promotory - podobné bakteriálním (sekvence -10 a -35, důležitá jejich vzdálenost)

mRNA není modifikována čepičkou ani polyadenylována

Exprese mitochondriálního genomu

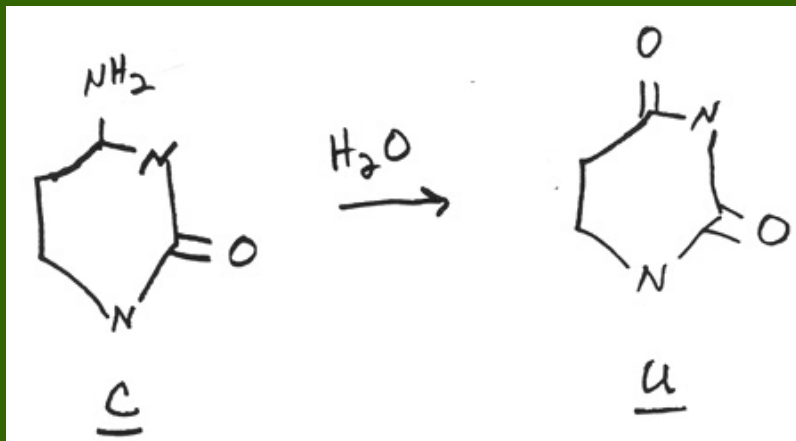
mRNA není modifikována čepičkou ani polyadenylována
transkripty „editovány“

• RNA Editing

- Objeven u mitochondrií Trypanozomy
- Častý u rostlinných mitochondrií, také u některých chloroplastových genů vyšších rostlin
- **Definice:** jakýkoli proces (kromě sestřihu), který způsobí změnu RNA odlišnou od komplementární sekvence DNA

Exprese mitochondriálního genomu

1. Většina transkriptů editována
2. Přeměna zejména C na U
3. Preferenční editace kódujících oblastí
4. Některé transkripty editovány nekompletně



přeměna C na U

cytosin deamináza
nebo výměna
(odstranění)
nukleotidové báze

Introny organel

- Stejný gen v různých organismech může mít různé introny ve stejné pozici
- Stejně nebo podobné introny nacházeny v nepříbuzných genech a organismech.
- Neobvyklá distribuce a fylogenetická analýza potvrzují, že byly získávány a ztráceny v celém průběhu evoluce

Introny I

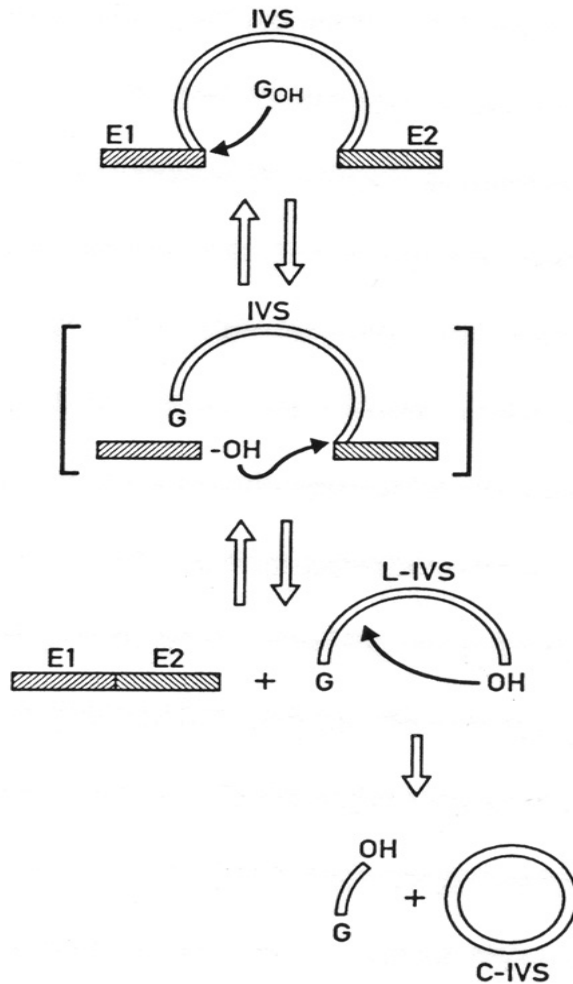
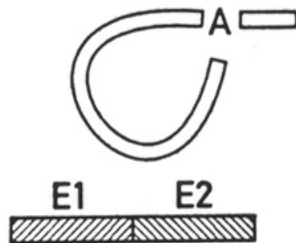
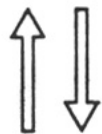
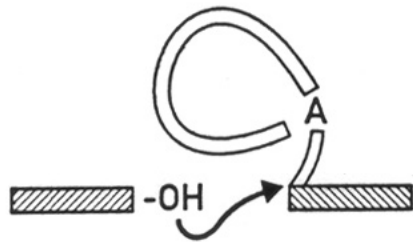
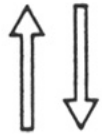
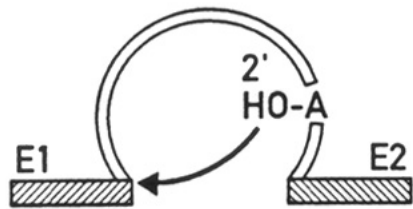
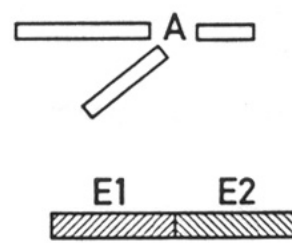
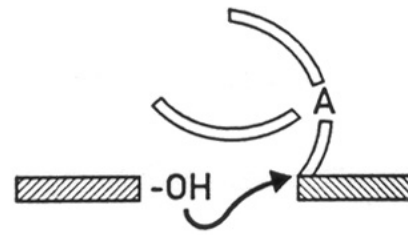
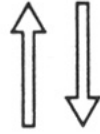
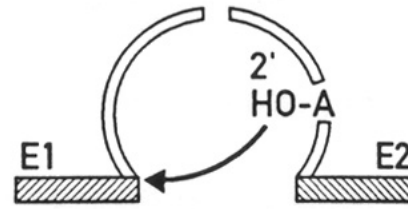


Fig. 1. Mechanism of splicing by Group I introns. The brackets indicate intermediates, which are held together non-covalently. The reader is referred to the text for further details. E1, E2, exons; IVS intervening sequence or intron; G_{OH} , guanosine nucleotide; L-IVS, linear free intron; C-IVS, cyclized intron lacking one or more nucleotides at the 5' end.

A cis-splicing



B trans-splicing



Introny II

Fig. 4. Mechanisms of splicing by group II introns in vitro. The first step of group II autocatalytic splicing involves a nucleophilic attack on the exon 1 - intron junction by the 2' OH of the A nucleotide at the branch site (*trans*-esterification). The second reaction proceeds by the nucleophilic attack on the intron - exon 2 junction by the free 3' OH at the end of exon 1, yielding the ligated exons and the free intron. In *cis*-splicing (panel A) the intron product is a lariat, but in the case of *trans*-splicing (split intron, panel B), the intron is excised as a branched, Y-shaped molecule. Hatched bars (E1, E2): exons; white ribbon: intron.

Trans - splicing

Některé cp RNA vznikají pomocí *trans*-splicing:

- spojení odlišných molekul RNA
- zachování organizace intron-exon
- introny II

Transkripční regulace exprese u chloroplastů

1. celková

- i.e., exprese většiny genů se zvyšuje / snižuje ve stejném okamžiku
- např.: celková míra transkripce se zvětšuje při „zelenání“, snižuje při přeměně chloroplast --> chromoplast

2. genově specifická regulace

- *psbD/psbC* promotor reaguje na světlo

Jaderná kontrola exprese chloroplastové DNA

Genetické studie potvrdily potenciál pro
jadernou kontrolu chloroplastových genů

Mendelovské (jaderné) mutanty defektní ve
vývoji či funkci plastidů neexprimují
specifické cp - kódované geny

Retrograde signaling pathways

signály od plastidu směrem k jádru „zasahují“
promotorové elementy, které se účastní odpovědi na světlo

nezbytné pro odpověď rostliny na měnící se a často stresové vnější prostředí (jaderné geny pro proteiny fotosyntézy exprimovány slabě při špatném vývoji nebo poškození plastidů)

signál?

- prekurzor biosyntézy chlorofylu
- funkční plastidová genová exprese (při přechodu z heterotrofie na autotrofii)
- komponenty elektronového transportu fotosyntézy

Transformace plastidového genomu

Comparison of the nuclear and plastid genomes of angiosperms

	Nuclear genome	Plastid genome
Chromosomes	Two copies of each of many chromosomes; the number of chromosomes per diploid cell is species-specific	~ 60 copies of a single circular chromosome per plastid ~ 50–60 chloroplasts per cell
Genes per chromosome	Could be thousands	~ 120–150
Arrangement and transcription of genes	Each gene is separate and is transcribed individually	Many genes are in operons and are transcribed together

Transformace plastidového genomu

Introducing genes into nuclear and plastid genomes

	Nuclear genome	Plastid genome
Insertion of foreign DNA into genome	Undirected; multiple insertions are common.	Directed to a specific site by homologous recombination.
Transcription of introduced genes	Affected by the promoter, the type of cell and the site of insertion of the gene into the genome. Each introduced gene is expressed individually.	Affected by the promoter, the type of plastid and the type of cell. The location on the chromosome is not known to affect transcription. A set of genes could be introduced as an operon or as individual transcription units.
Current limitations	<p>The level of expression of an introduced gene is unpredictable.</p> <p>Each gene in a set required for a new multigenic trait or biosynthetic pathway may have to be introduced separately and sequentially. The level of expression of each separately introduced gene is unpredictable.</p>	<p>Obtaining homoplasmic transformed strains can be difficult: the development of easier new methods will be important. Alternatively methods are needed to retain transgene(s) in the presence of untransformed plastid chromosomes.</p> <p>To date, tobacco is the only crop in which fertile plants with plastid transgenes have been described. Reports on other crops are promising.</p>

Priony a šílené krávy

Table 1. The prion diseases.

{PRIVATE}	Mechanism of pathogenesis
Disease	Mechanism of pathogenesis
<i>Human diseases</i>	
Kuru (Fore people)	Infection through ritualistic cannibalism
Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease	Infection from prion-contaminated HGH, dura mater grafts, and so forth
Variant Creutzfeldt-Jakob disease	Infection from bovine prions?
Familial Creutzfeldt-Jakob disease	Germline mutations in PrP gene
Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease	Germline mutations in PrP gene
Fatal familial insomnia	Germline mutation in PrP gene (D178N and M129)
Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease	Somatic mutation or spontaneous conversion of PrP ^C into PrP ^{Sc} ?
<i>Animal diseases</i>	
Scrapie (sheep)	Infection in genetically susceptible sheep
Bovine spongiform encephalopathy (cattle)	Infection with prion-contaminated MBM
Transmissible mink encephalopathy (mink)	Infection with prions from sheep or cattle
Chronic wasting disease (mule deer, elk)	Unknown
Feline spongiform encephalopathy (cats)	Infection with prion-contaminated MBM
Exotic ungulate encephalopathy (greater kudu, nyala, oryx)	Infection with prion-contaminated MBM

scrapie a BSE

Konverze normálního buněčného (cellular) proteinu Pr^{PC} na Pr^{PSc} (izoforma způsobující onemocnění „scrapie“)

- ☞ snížení obsahu α -helixů a zvýšení β -sheet
- ☞ infekční agens („špatný“ prion) neindukuje tvorbu protilátky proti prionovému proteinu - pravděpodobně proto, že má stejné složení jako normální protein
- ☞ změna solubility (Pr^{PC} rozpustný v nedenaturačních detergentech x Pr^{PSc})
- ☞ změna degradovatelnosti proteázami (Pr^{PC} degradován, Pr^{PSc} jen částečně)

45

Priony a spongiformní encefalopatie

Prion: „proteinaceous infectious particle“

Prusiner S., 1997

