

Nové poznatky v genetice rostlin

III. Uvnitř jádra problému

Jádem našeho problému je jádro rostlinné buňky. Obecně tato organela tvoří jednu z nejdůležitějších součástí jakékoli eukaryotní buňky. Řídí některé významné buněčné procesy, v jádře je v molekulách DNA uchována genetická informace. Možná si řeknete – ale dědičná informace rostlin (některých), především těch nepostradatelných pro výživu lidstva, je přece už přečtena, nebo se tak stane co nevidět. Avšak přečtena neznamená, že jí i rozumíme. Znalost sekvence DNA sama o sobě nemůže vysvětlit funkci jaderného genomu a tím i to, jak geny a další sekvence regulují růst a vývoj rostlin. Jaderná DNA tvoří komplexy s proteiny a RNA za vzniku chromatinu – tato organizace je rozhodující pro uspořádání DNA v jádře a má přímý vliv i na genovou expresi. Jaderný genom není statický – prochází dynamickými změnami v průběhu mitotického a meiotického dělení, produkce gamet, fertilizace a tvorby zygoty. Buněčné jádro musí obsahovat všechny komponenty potřebné k udržování, přepisu a replikaci genetického materiálu. Ze všech jeho součástí mají nejhojnější zastoupení proteiny, a proto nabývá charakterizace jaderného proteomu (souboru všech proteinů v jádře) zásadního významu pro pochopení funkce jaderného genomu. V tomto příspěvku přiblížíme postupy používané k analýze jaderného proteomu rostlin. Některé z uvedených metod budou také podrobněji představeny v příštím čísle *Živy* v rámci seriálu určeného k výuce.

Víme, že vcelku nic nevíme (o rostlinných jaderných proteinech)

Buněčné jádro se skládá ze dvou hlavních strukturních částí – nukleoplazmy (neboli karyoplazmy či karyolymfy) a jaderné membrány (obálky). Nukleoplazma obsahuje chromatin chromozomů, jadérko a další jaderné útvary, např. Cajalova tělíska a jaderná tělíska/tečky (nuclear speckles, např. Lanctót a kol. 2007). V nukleoplazmě se dále vyskytuje řada enzymů a jiných molekul, které se účastní asociace DNA se specifickými proteiny – histony (vytvářejí se nukleozomy, základní podjednotky chromatinu), replikace, transkripce a oprava DNA, včetně produktů těchto procesů.

Navzdory větší podobnosti buněčných jader ve všech eukaryotních organismech je zřejmé, že existují značné rozdíly mezi cévnatými rostlinami a např. savci. A i když se

zdá, že organizaci genomu rostlin na úrovni DNA máme už dobře prozkoumanou, pouze málo se ví o organizaci genomu v jádře rostlinných buněk (v textu budeme dále užívat zkrácené označení rostlinné jádro nebo jen jádro) a jaderných kompartmentech.

Víc hlav, víc rozumu

Aby výzkum v této oblasti postupoval co nejefektivněji, laboratoře zabývající se jádrem rostlinných buněk vytvořily Mezinárodní konsorcium pro výzkum rostlinného jádra (International Plant Nucleus Consortium, IPNC – blíže viz <http://bms.brookes.ac.uk/ipnc>). Součástí této skupiny vědců z celého světa je i Ústav experimentální botaniky (ÚEB) Akademie věd ČR, v. v. i., v Olomouci. Zatím jsme však stále na začátku naší snahy pochopit organizaci a způ-

sob fungování jaderného genomu rostlin jako celku. Znalost struktury a funkce jaderného proteomu, který představuje důležitou součást rostlinných buněčných jader, pomůže objasnit, jak je genetická informace v jádře uložena, zmnožena a exprimována (tedy jak se navenek projevuje).

Kolik má rostlinné jádro proteinů?

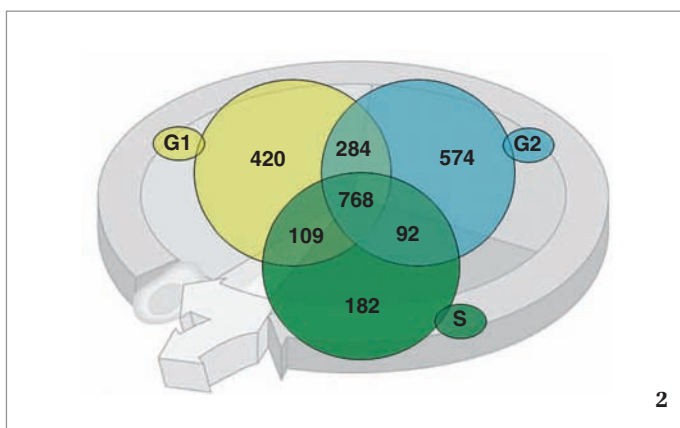
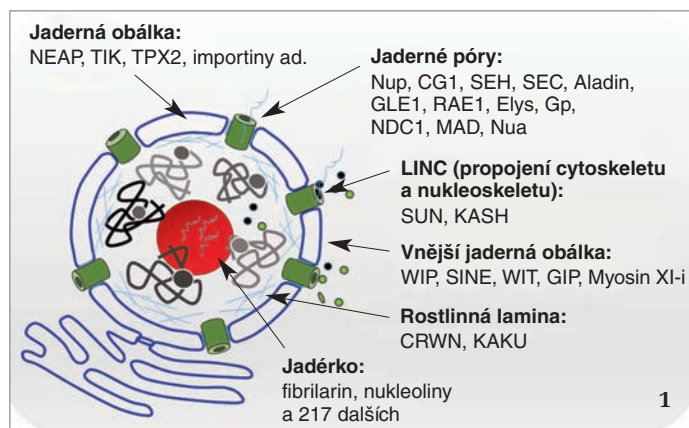
Jaderný proteom daného organismu představuje soubor všech proteinů jader různých typů pletiv/buněk, který se mění v čase – proto není jednoznačná odpověď snadná. V zásadě existují dvě možnosti, jak charakterizovat jaderný proteom – určit neznámé proteiny na základě analogie s již známými proteiny jiných druhů – tento přístup se běžně používá při výzkumu rostlinného jádra, ale vzhledem k počtu očekávaných jaderných proteinů je pomalý a nepříliš efektivní; nebo přímá extrakce a identifikace neznámých nebo ještě necharakterizovaných proteinů z izolovaných rostlinných jader, což poskytuje možnost identifikovat stovky až tisíce jaderných proteinů v relativně krátkém čase tak jako u jader živočišných buněk.

Výhodou prvního přístupu je, že vybraný protein bude funkčně plně popsán, od samotné lokalizace až po určení jeho funkce, za použití metod molekulární biologie a reverzní genetiky – vytvoření mutantů, RNAi linií (RNAi, RNA interference – proces, jímž je regulována transkripce a vnitrobuněčná exprese genu), nebo editováním genomu pomocí CRISPR-Cas9, a také biochemie (bližší vysvětlení těchto i dalších termínů najdete ve slovníku na webové stránce *Živy*). Nevýhodou je nejen časová náročnost, ale i nejistota, zda charakterizujeme jaderný protein, nebo protein z cytoplazmy či buněčných organel. Několik jaderných proteinů už tímto způsobem zpracováno bylo (obr. 1), a to především u modelové rostliny s malým genomem – huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Ideální stav by byl, kdybychom měli k dispozici seznam jaderných proteinů, z něhož bychom vybrali protein, který budeme následně charakterizovat. A právě takový

1 Přehled rostlinných jaderných proteinů, u nichž byla do začátku r. 2017 dokončena funkční charakteristika.

Bližší o jednotlivých proteinech v tab. I na webové stránce *Živy*

2 Počet identifikovaných jaderných proteinů ječmene setého (*Hordeum vulgare*) v různých fázích interfáze (G1, S, G2; blíže v textu). Všechny orig. B. Petrovská



seznam nám může poskytnout druhý přístup – proteomická analýza celého rostlinného buněčného jádra.

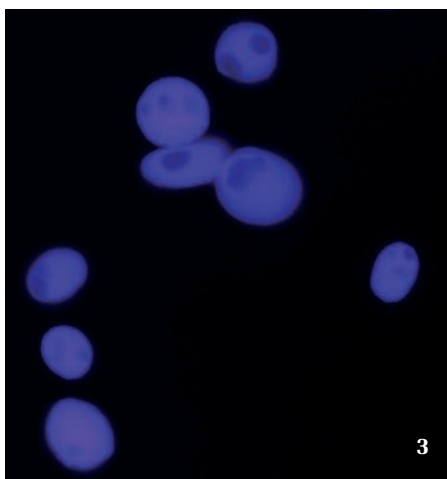
Dnešní proteomika využívá sofistikované přístroje, optimalizované metodiky a spolehlivé strategie pro studium složitých biologických systémů. Díky tomu jsme schopni prozkoumat nejen biologické a biochemické aspekty jednotlivých tkání a buněk (včetně informací o složení proteinu, jeho struktuře, lokalizaci, interakcích, komplexech nebo posttranslačních modifikacích), ale i celkovou „mašinérii“ buněčné signalizace. Proteomika vychází z kombinace separačních metod s vysokým rozlišením, jako jsou dvourozměrná gelová elektroforéza a vysokoúčinná kapalinová chromatografie, a z analytických metod – hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry; fyzikálně-chemická metoda stanovující hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty, blíže viz Friedecký a Lemr 2012). Moderní hmotnostní spektrometry umožňují přesné měření molekulové hmotnosti široké škály látek. Využití MS pro analýzu proteinů bylo umožněno vývojem měkkých ionizačních technik: desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) a ionizace elektrospřemem (ESI, Electrospray Ionization); charakteristika metod viz slovník na webové stránce Živy. Protože proteomika pracuje s enormními objemy dat, hojně využívá také bioinformatické metody.

Existují dvě základní možnosti, jak analyzovat vzorek proteinu – tzv. bottom-up (ve významu zdola nahoru) a top-down (shora dolů) proteomika. V klasické bottom-up proteomice jsou proteiny ve vzorku odděleny a poté enzymaticky rozštěpeny na peptidy, následně charakterizované hmotnostní spektrometrií (na základě molekulové hmotnosti, případně sekvence). Specifickou bottom-up strategií je tzv. shotgun přístup, kde dochází k štěpení celé směsi proteinů ve vzorku bez předchozího oddělení složek, např. chromatografií nebo elektroforézou. Top-down strategie se naopak opírá o fragmentaci izolovaného proteinu přímo v hmotnostní spektrometru, bez enzymatického štěpení. Získání peptidových sekvencí z fragmentačních spekter měřených tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS – dva nebo více hmotnostních analyzátorů, umožňuje strukturální analýzu látek) vede k identifikaci proteinů.

Samotná proteomická analýza začíná obvykle extrakcí proteinů, což je náročný krok vzhledem k přítomnosti jiných biomolekul hojně zastoupených v biologickém materiálu (např. lipidů, nukleových kyselin, sacharidů a různých metabolitů). Proteomika buněk a buněčných organel kromě toho vyžaduje specifické postupy pro jejich izolaci, aby se zabránilo nežádoucím kontaminacím. Ve srovnání s výzkumem u savců je rostlinná proteomika pořád „Popelka“, zejména proto, že práce s rostlinnou tkání je metodicky náročnější, především kvůli přítomnosti robustní extracelulární matrice a tuhých buněčných stěn.

Od izolace jádra po identifikaci proteinů

Dnes se používá několik metodických přístupů zaměřených na izolaci rostlinných jader. Většina protokolů zahrnuje homo-



3 Jádra buněk ječmene setého (obarvená fluorescenčním barvivem DAPI). Velikost jader ca 10 μm . Foto B. Petrovská

genizaci rostlinných tkání, filtraci homogenátu, sedimentaci v centrifuze (peletizaci), odstranění kontaminujících organel a nakonec separaci v hustotním gradientu (jde o změnu hustoty roztoku způsobenou odstředivou silou a podmíněnou vzdáleností od konce centrifugační zkumavky). Proteomické metody uplatňované při identifikaci jaderných proteinů jsou si navzájem hodně podobné (tab. 1). Obecně platí, že se proteiny rozdělí (pomocí dvou- nebo jednorozměrné elektroforézy) a pak se štěpí vhodnými proteázami (např. trypsinem) na peptidy. Na závěr jsou identifikovány buď peptidovým sekvenováním za použití kapalinové chromatografie (často v nanoprůtokovém uspořádání – stovky nanolitřů za minutu; nanoLC) ve spojení s přímo spřaženou (online) ESI-MS a MS/MS, dále peptidovým mapováním (peptide mass fingerprinting) s použitím MALDI-TOF MS (to je však už překonaný přístup), nebo nanoLC-MALDI-TOF/ TOF MS a MS/MS. Zkratka TOF označuje hmotnostní analyzátor doby letu (time-of-flight). Někteří autoři využívají kombinace uvedených přístupů.

I přes zmíněné možnosti proteomických analýz, včetně dostupnosti pokročilé instrumentace, nemáme dosud důkladně charakterizován žádný rostlinný jaderný proteom. První údaje o proteinovém složení rostlinných jader byly získány v modelových organismech s osekvenovanými genomy, jako je huseníček rolní a rýže setá (*Oryza sativa*). Pokud si ale všimneme počtu identifikovaných proteinů u různých rostlinných druhů (tab. 1), zjistíme, že se značně liší. Je tedy možné, že jaderný proteom huseníčku zahrnuje ca 800 proteinů a kukuřice jen 163? Existují opravdu tak velké rozdíly v proteinovém složení jader u různých druhů, nebo pouze nejsme schopni identifikovat celé spektrum jaderných proteinů rostlin? Při porovnání jaderného proteomu cizrný beraní (*Cicer arietinum*), rýže a huseníčku se např. zjistilo, že cizrna a rýže mají společných jen 11 proteinů, rýže a huseníček pouze 6. (Pozn.: rozdíly mohou plynout nejen z odlišnosti zkoumaných druhů, separačních nebo proteomických přístupů, ale také z typu pletiva použitého jako výchozí materiál pro izolaci jader; např. Pandey a kol. 2006.) Další problém nastal při identifikaci jaderných

proteinů sóji luštinaté (*Glycine max*). Jak vidíme v tab. 1, bylo jich určeno téměř 5 000 – mnoho z nich mělo dokonce jaderný lokalizační signál a vykazovalo homologii k transkripčním faktorům a dalším jaderným regulačním proteinům. Bohužel se objevily také bílkoviny obsažené v ostatních buněčných kompartmentech, např. v mitochondriích, cytoplazmě, chloroplastech nebo peroxizomech, což ukazuje na vysokou kontaminaci extraktů proteiny, které nemají jaderný původ. Je proto nezbytné věnovat ještě větší úsilí dalšímu výzkumu.

Nový přístup k analýze jaderného proteomu

V naší laboratoři Centra strukturální a funkční genomiky rostlin ÚEB AV ČR se zabýváme jaderným proteomem ječmene, a navazujeme tak na již několik desetiletí trvající studium genomu této důležité plodiny. Abychom se vyhnuli kontaminaci jaderné frakce proteiny z cytoplazmy a dalších buněčných organel, vyvinuli jsme s kolegy z oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum na Univerzitě Palackého v Olomouci nový protokol analýzy jaderného proteomu ječmene (Petrovská a kol. 2014, Blavet a kol. 2016). Toho jsme dosáhli tím, že jádra jsme neizolovali, jak je obvyklé (sacharózovým gradientem), ale před následnou proteomickou analýzou jsme je vytrídili průtokovou cytometrií (přesná a rychlá metoda separace buněk, organel atd. do dvou nebo více frakcí, na základě specifického rozptylu světla a fluorescenčních vlastností těchto útvarů; např. Živa 2005, 1: 46–48 a 2016, 6: 277–280). Metoda nám umožnila nejen získat dostatečné množství jader zbavených kontaminantů z cytozolu, ale také analyzovat jaderné proteiny v různých fázích interfáze, kdy se buňka nedělí: jde o G1 fázi – buňka roste, S fázi – syntetizuje se DNA, G2 fázi – buňka se připravuje na rozdělení. Protokol kromě čištění jader průtokovou cytometrií zahrnuje extrakci proteinů a jejich oddělení jednorozměrnou elektroforézou, štěpení proteinů na peptidy a jejich identifikaci za použití nanoLC-MS plus MS/MS, nebo nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS spolu s MS/MS. Výsledky prokázaly účinnost této metody, její citlivost a rychlost, aniž by byla ohrožena integrita proteinů. Prvotní analýza G1 jader vedla k určení 803 proteinů (Petrovská a kol. 2014). Bylo tedy potvrzeno, že tento přístup je vhodný pro studium jaderného proteomu v různých fázích buněčného cyklu. Naše další proteomické analýzy G1, S a G2 fáze jader ječmene (Blavet a kol. 2016) odhalily přibližně 1 000 proteinů v každé fázi buněčného cyklu (obr. 2). Z téměř 2 000 identifikovaných jaderných proteinů bylo 38 % nalezeno ve všech fázích. Specifické proteiny byly zastoupeny 11 % pro G1 fázi, 8 % pro G2 a 24 % v S fázi. Nástroje bioinformatiky potvrdily, že většina proteinů souvisela s jádrem a mohly by být charakterizovány na základě existence jejich ortologů (genů společného původu) u jiných rostlin nebo konzerovaných strukturálních domén (stavebních složek proteinu s konkrétní funkcí a vazebnou schopností).

Aby se dal uspořádat a správně využívat tento velký objem dat, bylo nutné vytvořit databázi ječných jaderných proteinů (Blavet a kol. 2016). A tak vznikl UNcLeProt – databázový systém poskytující informace o jaderných proteinech ječmene, které byly identifikovány k dnešnímu dni. Označení UNcLeProt je založeno na přesmyčce zkráceného anglického slova „nucle“ na uncl (strýc) a zkratce slova proteins. Ve výsledku je samovysvětlující: U – univerzální (universal – pokryty všechny tři fáze interfáze), NcLe – jaderná (nuclear) a Prot – proteiny.

UNcLeProt představuje první specializovanou databázi obsahující jaderné proteiny identifikované v jádrech během různých fází interfáze (G1, S a G2, viz dříve v textu). Je volně k dispozici veřejnosti na webové stránce barley.gambrinus.ueb.cas.cz. Věříme, že tato datová sada, která bude trvale udržovaná a doplňovaná, přispěje k pochopení funkce jaderných proteinů. Může se stát důležitým zdrojem pro rostlinné buněčné biologie a přispěje k pochopení jaderné architektury a jejího vztahu k funkci genomu rostlin. Kromě jiných výhod zároveň usnadňuje funkční analýzy dosud necharakterizovaných jaderných proteinů.

Závěry a budoucí směřování

Lepší znalost struktury, funkce a chování jaderných proteinů je nezbytná pro pochopení funkce jaderného genomu. Většina proteomických studií rostlinného buněčného jádra neměla bohužel doposud za cíl charakterizovat kompletní proteinové složení. Hlavně se snažily identifikovat proteiny, jejichž exprese koreluje se stresovými podmínkami (např. chladem, suchem, zářením, virovou infekcí). I tak ale bylo odhaleno široké spektrum jaderných proteinů. Aby se zajistilo, že proteiny jsou skutečně jaderné, je rozhodující experimentální protokol pro oddělení jader od ostatních buněčných komponent. Musíme zabránit kontaminaci, která může ovlivnit kvalitu proteomických dat. A právě třídění jader průtokovou cytometrií před analýzou proteinů se zdá být nejučinnějším přístupem.

Jaderná proteomika sama o sobě neumožňuje odhalit funkční a organizační strukturu rostlinného jádra. Představuje však odrazový můstek pro charakterizaci jaderných proteinů s neznámou funkcí, identifikaci těch, u nichž se nepředpokládala lokalizace v jádře, a také proteinů stále klasifikovaných jako hypotetické. Nadto má spojení jaderné proteomiky s biochemickými, molekulárněbiologickými, imunocytochemic-

kými a morfologickými přístupy analýzy organizace jádra v trojrozměrném prostoru zajímavý potenciál poskytovat informace potřebné k orientaci v organizaci a funkci rostlinného jaderného genomu.

Značná část dosud určených proteinů v jádře buněk rostlin (10–18 %) se nepochybně podobá známým proteinům v jiných organismech, a tak pořád čekají na objasnění své biologické funkce, která může poskytnout vodítko k pochopení rozdílů mezi živočišnými a rostlinnými jádry. Ideální by tedy bylo rozšířit databázi jaderných proteinů o výsledky získané z buněk různých typů rostlinných pletiv (současná databáze se zakládá na údajích z kořenových meristémů). V kombinaci s proteinovou strukturou, funkcí a fyzickou lokalizací v trojrozměrném prostoru jádra tedy pokročíme v našem chápání jaderného proteomu a jeho role v organizaci a funkci rostlinného genomu.

Práce byla podporována Grantovou agenturou ČR (projekt č. 14-28443S) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (Národní program udržitelnosti I č. LO1204).

Použitá literatura, slovník termínů a tab. I uvedeny na webové stránce Živa.

Tab. 1 Počty jaderných proteinů u vybraných druhů rostlin zjištěných různými proteomickými přístupy (blíže v textu a na webu)

Rostlina	Izolace jader	Proteomický přístup	Počet proteinů	Rok
Huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	hustotní gradient	2DE, MALDI-TOF-MS	158	2003
		1DE, 2DE, MALDI-TOF-MS, NanoLC-MS, MS/MS	36	2003
		LC-MS, MS/MS	345	2005
		1DE, NanoLC-MS, MS/MS	879	2014
Rýže setá (<i>Oryza sativa</i>)	hustotní gradient	2DE, MALDI-TOF-MS	190	2004
		2DE, MALDI-TOF/TOF-MS, MS/MS	269	2007
		2DE, LC-MS, MS/MS, MALDI-TOF/TOF-MS, MS/MS	468	2008
		2DE, LC-MS, MS/MS	109	2009
		1DE, NanoLC-MS, MS/MS	657	2009
		2DE, MALDI-TOF/TOF-MS, MS/MS, LC-MS, MS/MS	78	2013
1DE, NanoLC-MS, MS/MS	382	2013		
Paprika setá (<i>Capsicum annuum</i>)	hustotní gradient	2DE, MALDI-TOF-MS	6	2006
Cizrna beraní (<i>Cicer arietinum</i>)	hustotní gradient	2DE, LC-MS, MS/MS	150	2006
		2DE, LC-MS, MS/MS	147	2008
		2DE, LC-MS, MS/MS	75	2013
		1DE, 2DE, MALDI-TOF/TOF-MS, MS/MS, NanoLC-MS, MS/MS	107	2014
<i>Tolice Medicago truncatula</i>	hustotní gradient	1DE, NanoLC-MS, MS/MS	143	2008
Kukuřice setá (<i>Zea mays</i>)	hustotní gradient	2DE, LC-MS, MS/MS	98	2008
		2DE, MALDI-TOF-MS	163	2014
<i>Xerophyta viscosa</i> (jednoděložné, <i>Velloziaceae</i>)	hustotní gradient	2DE, MALDI-TOF-MS	18	2010
		2DE, LC-MS, MS/MS	122	2012
Sója luštinatá (<i>Glycine max</i>)	hustotní gradient	LC-MS, MS/MS	4 975	2011
Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>)	hustotní gradient	1DE, LC-MS, MS/MS	528	2015
Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i>)	třídění průtokovou cytometrií	1DE, NanoLC-MS, MS/MS	803	G1 2014
		NanoLC-MALDI-TOF/TOF MS, MS/MS	2 429	2016
		1DE, NanoLC-MS, MS/MS		
		NanoLC-MALDI-TOF/TOF MS, MS/MS		

1DE – jednorozměrná gelová elektroforéza; 2DE – dvourozměrná gelová elektroforéza; MS – hmotnostní spektrometrie; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie; MALDI – desorpce a ionizace z účasti matrice; TOF – time-of-flight – hmotnostní analyzátor doby letu iontů, v přístroji mohou být i dva, což má význam pro MS/MS analýzu; LC – kapalinová chromatografie, NanoLC – peptidové sekvenování za použití kapalinové chromatografie v nanoprůtokovém uspořádání (stovky nanolitřů za minutu)