

CYTOLOGIE – BUNĚČNÉ JÁDRO

- jádro obsahuje genetickou informaci, jejímž nositelem je DNA – základní poznatek objeven především díky Mendelovi (již 19. století)
- M. Schleiden X R. Virchow spor o vznik buňky „*de novo*“

METODY VÝZKUMU

- analogie toho, jak by mimozemšťané zkoumali př. orchestr
- statická fotografie – nemáme ale ponětí, jak to doopravdy funguje; video; extrakce; zvýranění objektů

TEM a SEM (transmisní a skenovací elektronová mikroskopie)

- TEM je vždy 2D projekce vs. SEM je 3D
- vše probíhá ve vakuu, takže dehydratace vzorku je nezbytná
- mít na paměti, že preparát před pozorováním prochází mnoha změnami, a je zde možnost vzniku artefaktů

IMUNOZNAČENÍ - IMMUNOGOLD LABELLING

- černá místa značí protilátku
- viz. obr. jaderná obálka kvasinky, jaderný pór, černé skvrny jsou ribosomy
- viz. obr (dole) – jaderná membr. s póry

FISH

- detekce polohy konkrétní sekvence uvnitř jádra, např. při sledování přestavby chromosomů, zlomy chromosomů

ChIP

- zafixujeme – rozštěpíme DNA, vazbou specifické protilátky selektivně vyizolujeme protein s navázanou konkrétní sekvencí DNA, sekvenc zjistíme pomocí PCR či NGS, *mapa interakcí DNA-protein
- rozlišení elektronového mikroskopu cca 1 nm – v rámci přednášky se nebudeme zabývat úrovní pod tímto rozlišením

PROCESY INTERFÁZNÍCH JADER

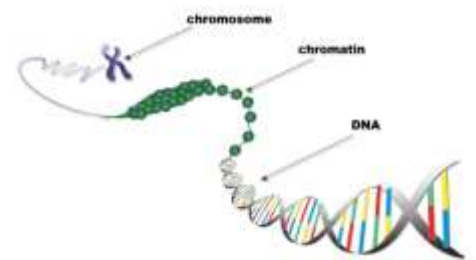
→ C-value (kompletní množství DNA v haploidním genomu) a C-paradox

ORGANIZACE

- gen - kompletní sekvence nukleové kys. která je nutná k syntéze funkčního produktu – zahrnuje i regulační sekvence, enhancerové, atd.; lineární molekula DNA; 100x delší než buňka
- naprosto nezbytné sbalování DNA, aby se do jádra vešla
- tmavší místa na snímcích u jádra značí více DNA X rozvolněný chromatin je světlejší; heterochromatin (konstitutivní a fakultativní)
- **chromatin: DNA + protein v poměru 1:1**
- silencing – utišování oblastí chromatinu → *heterochromatin
- ohraničeno obálkou – ta tvořena 2 membránami

CHROMATIN, CHROMOSOMY

- **nukleosomy 10 – 11 nm** velké; viděny pod elektron. mikroskopem
- chromatin tvořen linker DNA a nukleosomy
- H1 je linker histon
- **N-konce histonů** – hodně bazické, kladně nabitě
- snadno podléhají sekundárním modifikacím – metylace, acetylace, fosforylace
- acetylace – často vede k transkripci



- obecně je velmi důležité místo modifikace a histon, kde probíhá
- př. histon deacetyláza – deacetyluje histony a histon metyltransferáza metyluje konce
- **proteiny s chromodoménou**, kterou se vážou na histony a **chromoshadow doménou**, kterou se vážou k sobě a reprimují genovou expresi
- tyto proteiny mohou vázat histon deacetylázu a místo represe se tak může šířit
- **30 nm vlákno** – při použití pufru s nižší koncentrací solí extrakcí získáme tuto strukturu
- „cik cak“ model šroubovice nebo uspořádání SOLENOID – upravená šroubovice

NUKLEOSOM = bazické (množství AMK př. s lyzinem); základní strukturální jednotkou chromatinu;
+ histony = rodina malých bazických proteinů (H1, H2....oktamer)

- vyšší struktury chromatinu – podíl nehistonových proteinů – mohou tvořit „lešení“
- samotná struktura DNA pomáhá při vytvoření těchto struktur
- SARs a MARs mohou od sebe izolovat jednotlivé transkripčně aktivní úseky
- SMC proteiny – podíl na sbalování DNA

CHROMOSOM

- 2 chromatidy spojené centromerou
- centromera, telomery a origin jsou nezbytné struktury pro replikaci
- chromosomální teritoria
- většinou jsou CH obsahující mnoho genů uvnitř jádra, genově chudé na periferii
- z teritorií mohou do meziprostoru vybíhat smyčky – neví se, zda jde o artefakty
- úseky DNA, které mají být transkribovány se posouvají směrem ke středu jádra v rámci teritoria
- **nenáhodné rozložení chromosomů v jádře**, každý chromozom v jádře zaujímá konkrétní polohu (CT = chromosomal territories)
- *Arabidopsis thaliana* – nízký počet transpozonů + malý genom z ní dělá ideální modelový organismus
- viz. obr. – červená barva značí vysokou genovou hustotu; v oblasti centromery modrá barva – skoro žádné geny
- obrovské genomy zemědělsky významných rostlin – př. pšenice (tetraploid 4n)

JADERNÉ KOMPARTMENTY

JADÉRKO = továrna na ribozomy

- tvořeno 700 proteiny; kolem 150 small nuclear RNAs (=sno), 2 RNP (ribonukleoproteiny)
- hustý fibrilární kompartment (DFC) – hromadění transkriptů a úprava
- granulární komp. (GC) – další processing proteinů
- fibrilární komp. (FC) – pravděpodobně přepis rDNA
- u rostlin nejsou fibrilární kompartmenty tak velké
- viz. BY2 tabákové buňky – tvorba řetízků; obrovská jádérka – uvnitř kavity (C) – neví se proč, pravděpodobně místo pro sklad transkriptů
- další tělíska málo prozkoumaná; zelené písmo značí větší míru prozkoumanosti
- jsou aktivní, fúzíjí, podílí se na důležitých procesech, i když se přesně neví jak

CAJAL BODIES

- pravděpodobný podíl na sestřihu RNA

JADERNÁ PERIFERIE

- vnější membrána napojena na membrány ER
- vnitřní má jiné proteinové i jiné lipidové složení
- obálka proděravěná póry

- periferní mikrodomény
- s laminem a jad. periférií asociují dlouhé úseky DNA, které jsou genově chudé (zkoumáno přes LADs, viz. obr) - genové úseky proto, že jsou zde přítomné proteiny zajišťující ztišení genů
- **mj. funguje jako komunikační místo mezi jádrem a cytoplasmou**
- jaderná obálka přemostěna do cytoplasmy – **obsah proteinů s KASH doménou: 30 amk**, vždy následuje transmembr. doménu, protože je vždy uvnitř jádra – **spolu se SUN doménou proteinů tvoří LINC přes obálku nejen pomocí pórů – viz. obr.**

JADERNÁ LAMINA

- typicky živočišná struktura

- u rostlin důkazy o existenci jaderné laminy nepotvrzené
- laminy u rostlin nenalezeny – pomocí imunolokalizace pouze lamin-like proteiny
- laminy typu B, A
- funkce laminy = interakce, kotvení telomery, kotvení proteinů INM a ONM, organizace chromatinu, regulace transkripce, organizace cytoskeletu, kotvení jaderných pórů

LAMIN-LIKE PROTEINY

- *NMCP1* neboli *LINC* = little nuclei u *Arabidopsis*
- mutanty mají poškozená i tvarově jádra, a jsou zakrslé
- viz. obr. – PLAMINA – vzhledem k tomu, že kandidátní proteiny vypadají jinak než u ŽB je šance, že budou tvořit vzhledově jinou strukturu než typická lamina u ŽB

JADERNÉ PÓRY

- 1 z modelů: centrální část + směrem do jádra směřuje jaderný košíček a do cytoplasmy cytoplasm. Filamenty

FUNKČNÍ MODEL

- tvořen pouze proteiny – **nukleoporiny (Nups)** → tvorba obrovské protein. komplexu
- jednotlivé fční proteinové skupiny – kotví v membráně, ...
- **FG-Nups obsahují FG domény** – obsah domén bohatých na Phe a Gly
- tyto domény bez sekundární struktury, jsou rozvolněné a tvoří náhodnou strukturu
- nicméně domény mají dosah i stran póru a skrze ně probíhá transport
- skrze póry probíhá regulovaný a velmi rychlý transport

TRANSPORT DO A Z JÁDRA

- podílí se proteiny **karyoferiny** – na ně se váže nějaké **cargo s NLS(nuclear localization signal) /NES (nuclear exit signal)**
- jaderná obálka volně propustná pro proteiny do velikosti 40 kDa – zhruba na hranici aktinu, který se tam již nedostane; př. tubulin neprojde
- cyklus RanGTPáz:
- mezi cytoplasmou a jádrem je **gradient RanGTP**
- **v jádře je RanGEF** – převod RanGDP na RanGTP, zatímco **v cytoplasmě je RanGAP**, který převádí RanGTP na RanGDP
- mechanismus:
- 1. hydrogel, síto – přichází protein postupně rozvolní strukturu póru a projde
- 2. „brush-like“ model – náklad se signálem se naváže k doméně a na základě konform. změn protein přesune do/z jádra
- důkazy pro oba

JADERNÉ PÓRY U ROSTLIN

- **mají Nups = nukleoporiny**

- RanGAP kotvena pomocí WPP domény přímo k jaderné obálce
- mutanty v Nups:
- většinou zakrslé, další morfologické změny, ale rostliny přežívají
- ovlivnění resistance k patogenům
- spojeno s auxinem – projevy jako u mutant v tvorbě a transportu auxinu
- př. BY2 tabák (SEM) – jádro poseto póry – osmičetná struktura, buňka velmi aktivní
- viz. obr. – póry organizovány do řad – oranžově značeno; u stacionárních buněk
-

JADERNÉ DĚLENÍ

- profáze – spiralizace CH
- metafáze – CH v ekvatoriální rovině, MT astrální, kinetochorové, chromatidové
- u vyšších Ž vše funguje a drží pohromadě – a v další fázi se vše kontrolovaně rozpadne
- ne všechny organismy mají otevřenou mitózu jako Ž
- **uzavřená, semiuzavřená mitóza (nižší eukaryota a nižší rostliny)** – tubulin pro dělicí vřeténko dostanou do jádra jindy během cyklu; rozštípe jaderné póry a těmi projde tubulin (semiuzavřená)

Rozpad jaderné membrány

- **signál** pro rozpad je rozsáhlá **fosforylace Nups** – rozpad, kdy do oblasti jádra se dostává tubulin
- nejkompaktnější DNA je na začátku anafáze

Sestavení jaderné membrány

- na začátku telofáze chromatidy v nejméně kondenzovaném stavu – pojištění, ať vše zůstane vevnitř
- **RanGAP** přítomen – které **značí, že kde je GTP tam se udělá obálka**, protože kde je GDP již oblast jádra není a tak to buňka pozná

Poruchy, defekty a vývojové vady

- poškozená laminy = *Laminopathie* (svalová poškození, nervové buňky, stárnoucí komplexy)