

BIOLÓGIA BUNKY

Eukaryotická bunka

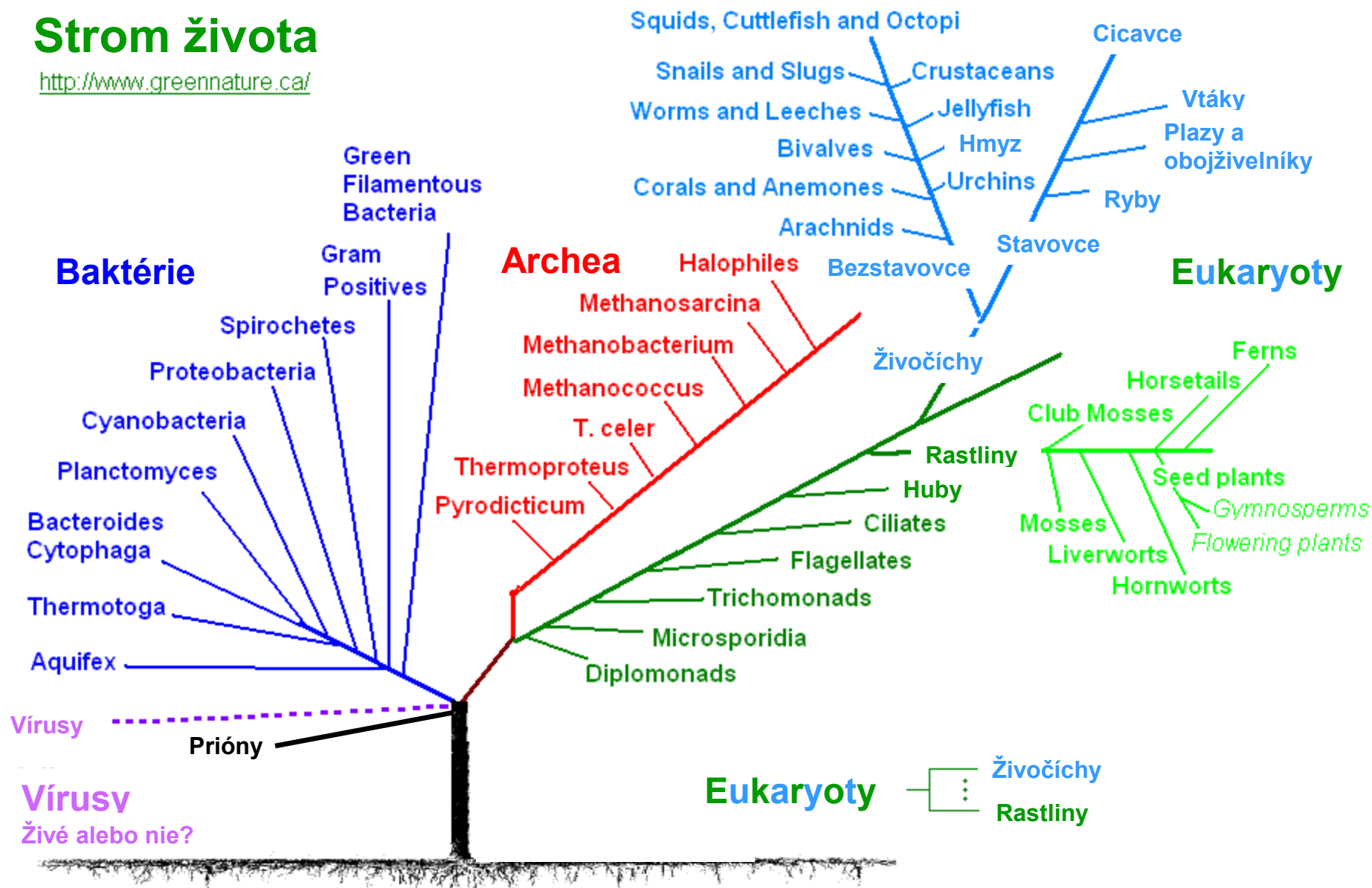
Katedra fyziológie rastlín

Doc. Michal Martinka

B2-128, michal.martinka@uniba.sk

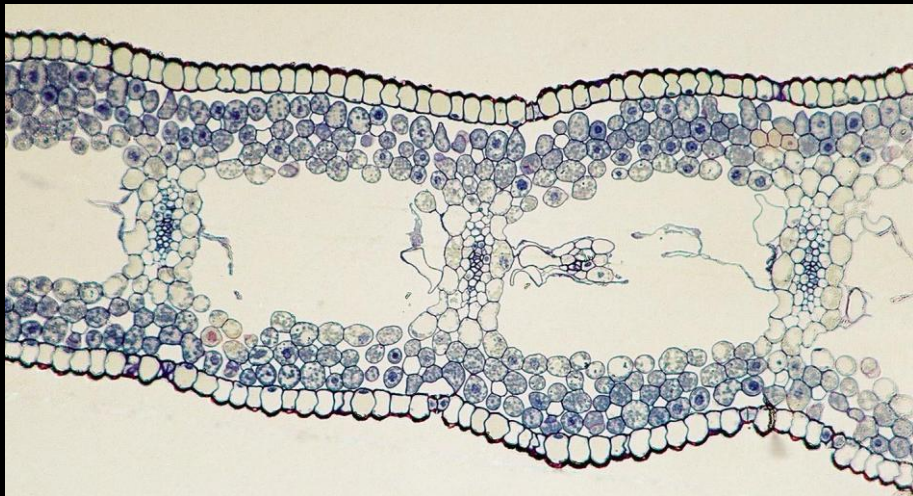
Strom života

<http://www.greennature.ca/>



Mikroskopia

svetelná (LM) - (svetlé pole, ...)



Mikroskopia:

svetelná (LM) - (svetlé pole, tmavé pole, fázový kontrast, diferenciačný interferenčný kontrast = Nomarského kontrast)

polarizačná (PM)

fluorescenčná (FM)

fluorescenčná mikroskopia osvetlenej vrstvy/roviny (LSFM)

ultrafialová (UVM)

konfokálna laserová skenovacia (CLSM)

superrozlišovacia fotónová mikroskopia (SIM) + AI (umelá inteligencia) + DL (deep learning, samoučenie prístrojov)

elektrónová (EM) - (transmisná - TEM, vysokorozlišovacia transmisná - HRTEM, skenovacia - SEM, ...)

atómových síl (AFM)

Tomografia – skenovanie počtosti lúčov (röntgénových, elektrónových,...

Holografická optická pinzeta – premiestnenie vzorky pomocou laserového lúča

Prvková analýza – energiovo-disperzná röntgénová analýza (EDXA), spektrálna analýza straty energie elektrónov (EELS), energiu-filtrujúca transmisná elektrónová

Spektrálne analýzy, separácie, ...

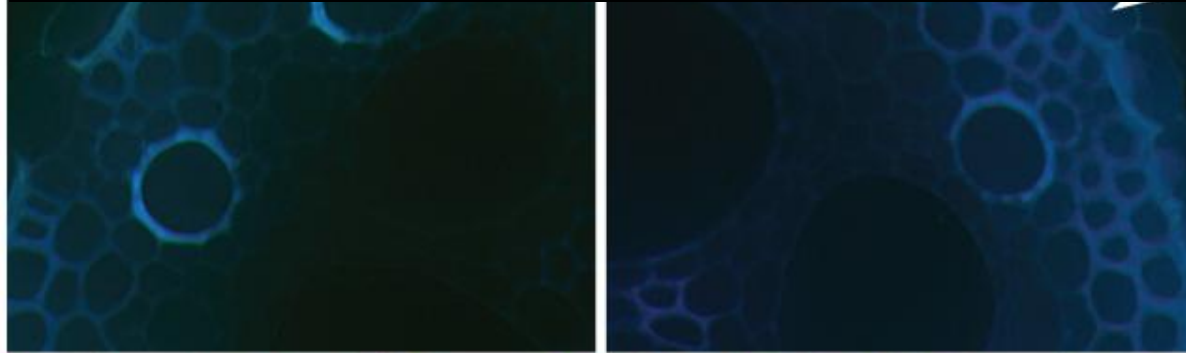
Si 0

Si 2500

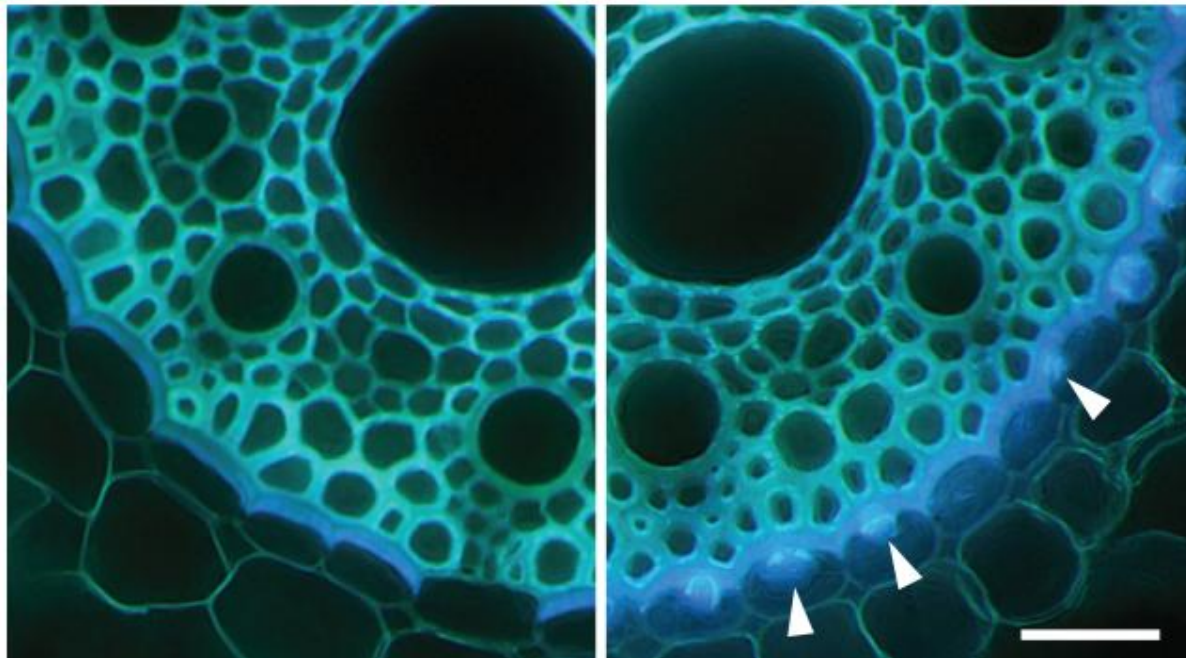
Fluorescenčná mikroskopia

- rezy aj živými vzorkami
- zobrazenie molekúl aj v relatívne malých koncentráciách
- mikroskopovanie v laboratórnych podmienkach

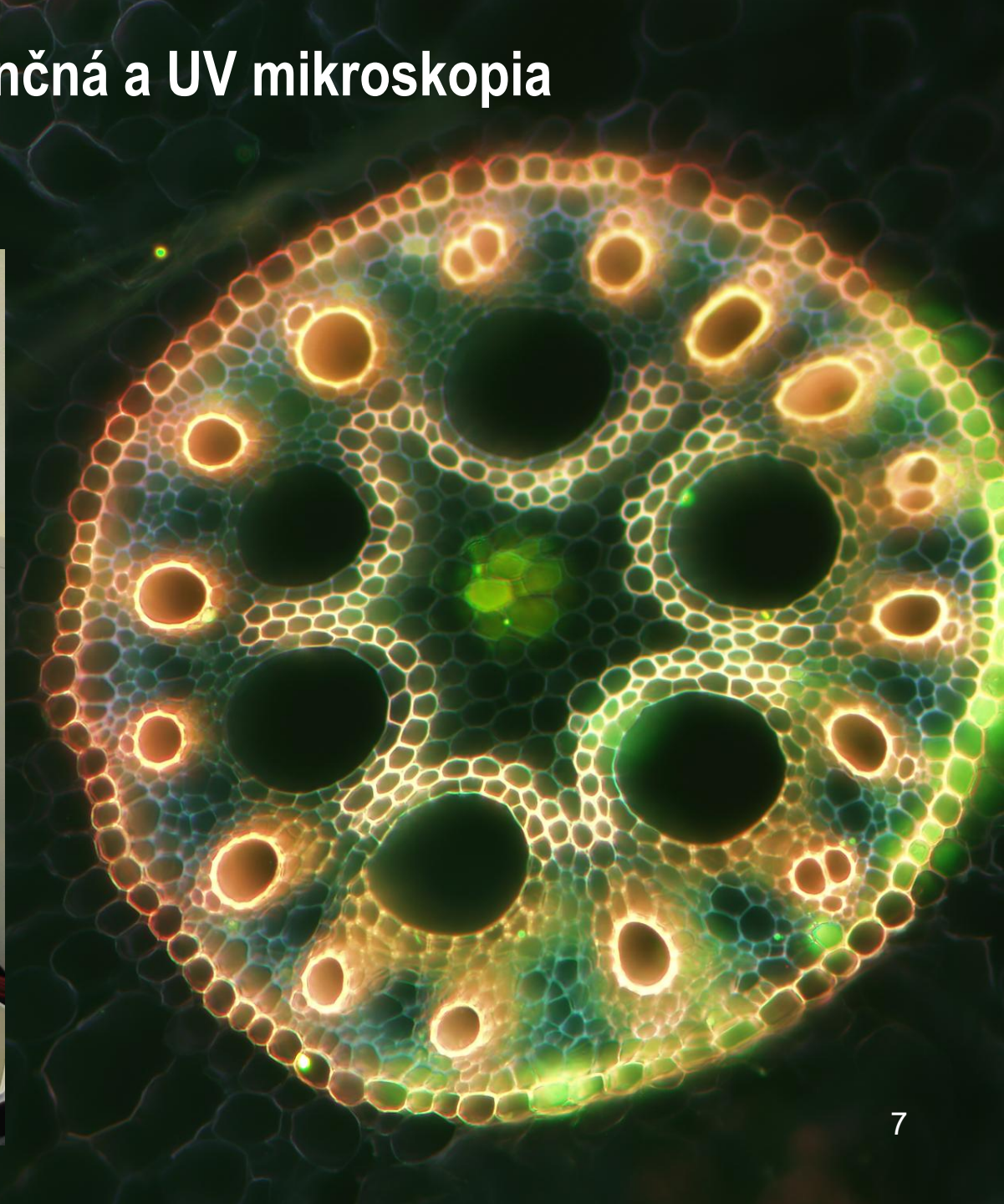
DW



NaOH

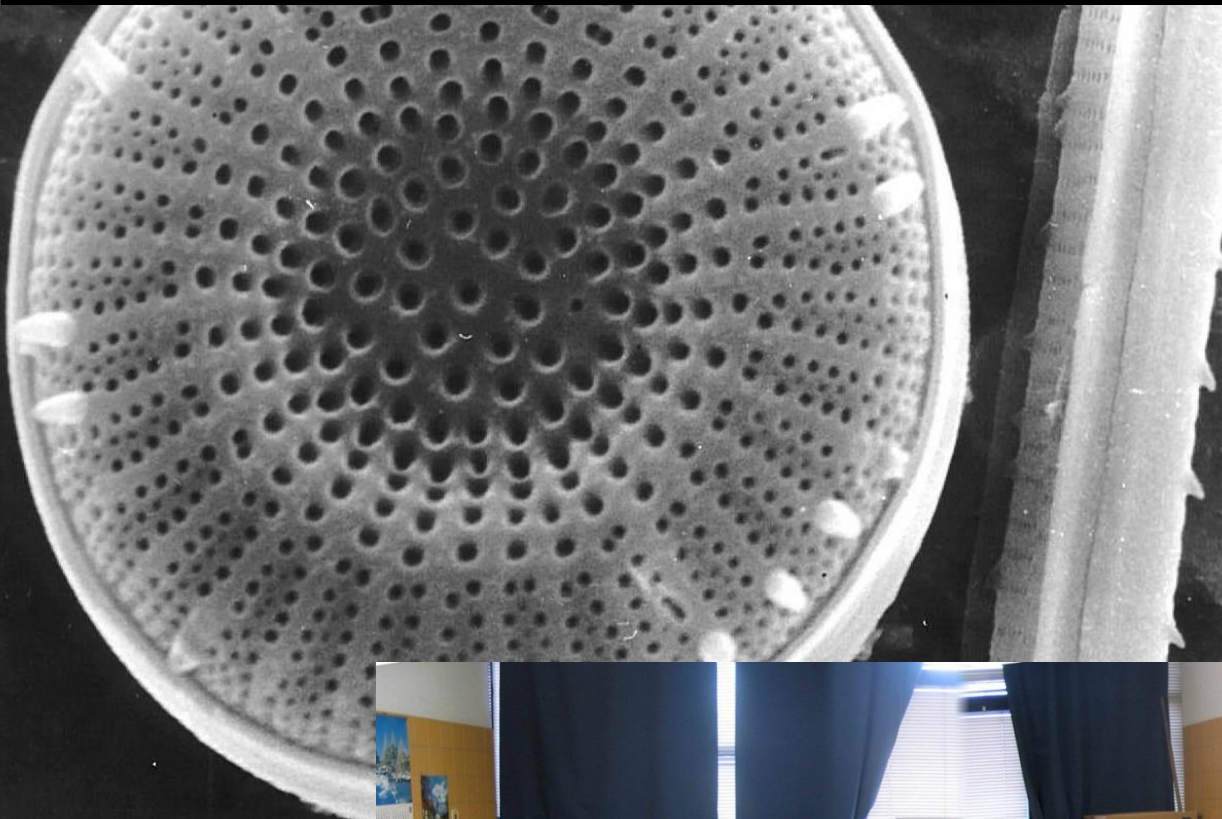


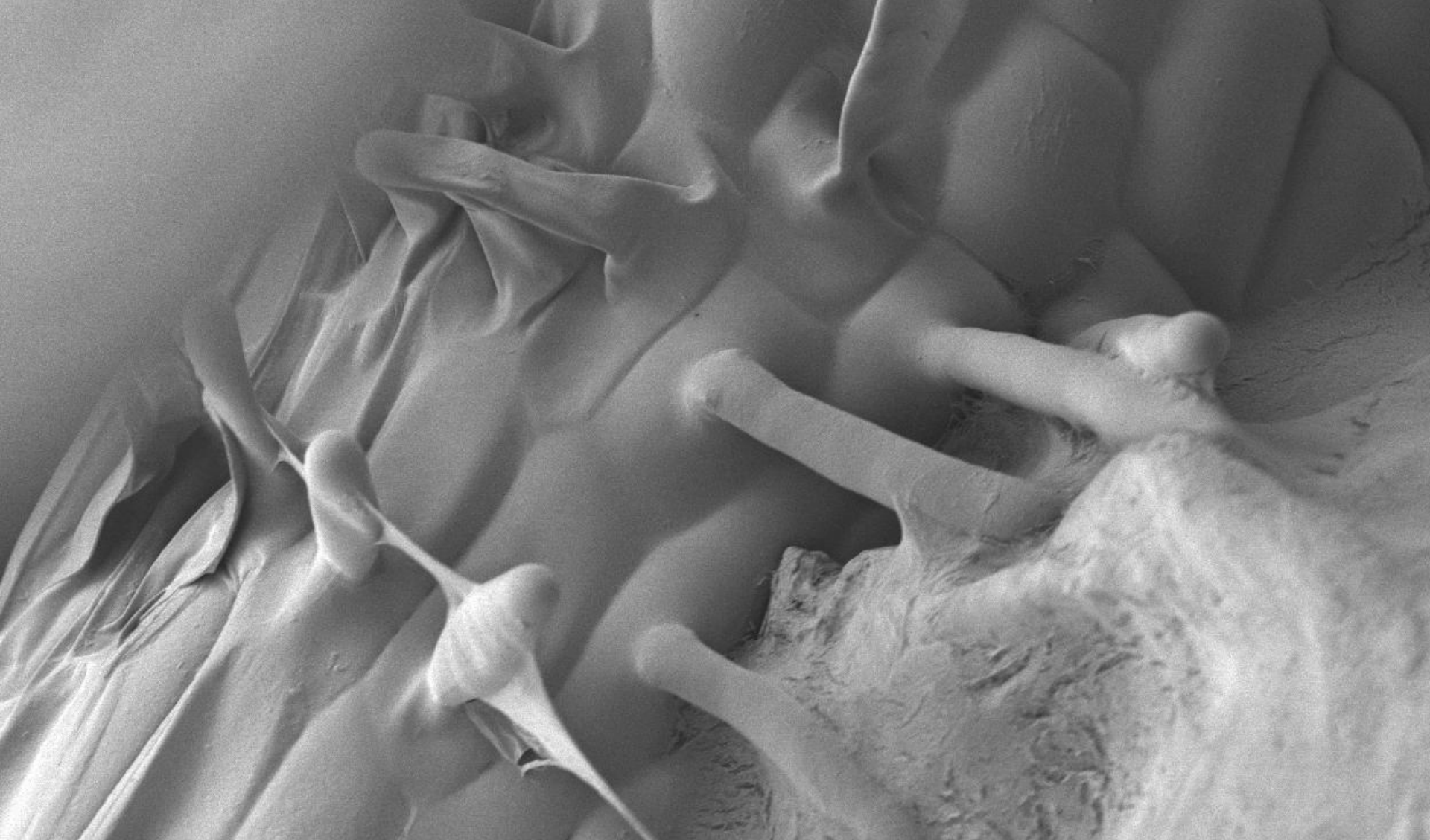
Fluorescenčná a UV mikroskopia



Skenovacia elektrónová mikroskopia - SEM

- povrstvenie vodivým materiálom, napr. zlatom, paládiom, platinou...
- mikroskopovanie vo vysokom vákuu





Kryoskenovacia elektrónová mikroskopia

- zmrazenie pri $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$
- odstránenie prchavých látok pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$
- povrstvenie elektricky vodivým materiálom pri $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$
- mikroskopovanie pri $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$



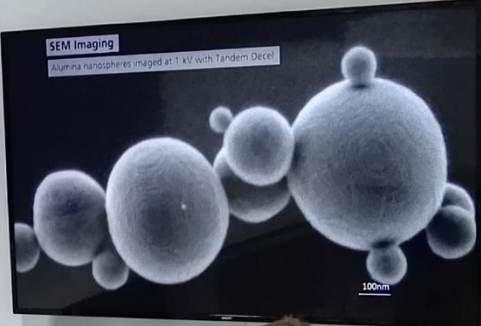
IMC20 CAPE TOWN, SOUTH AFRICA



Gemini 2

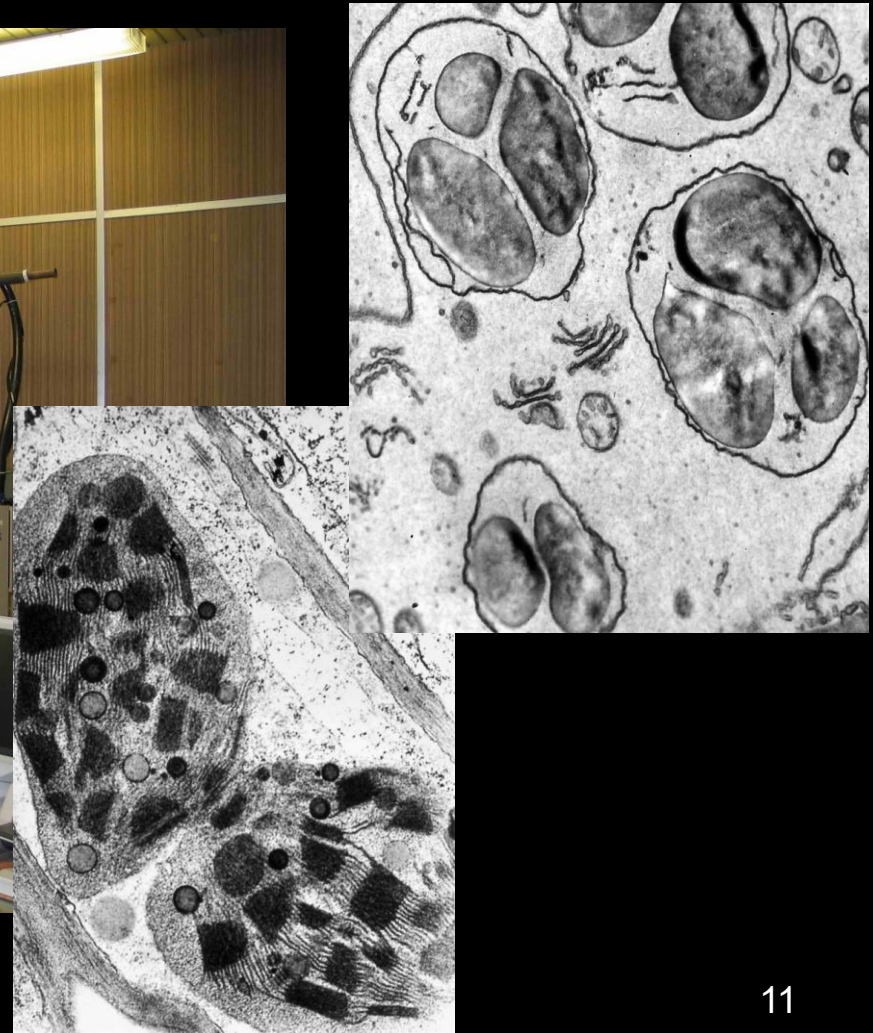
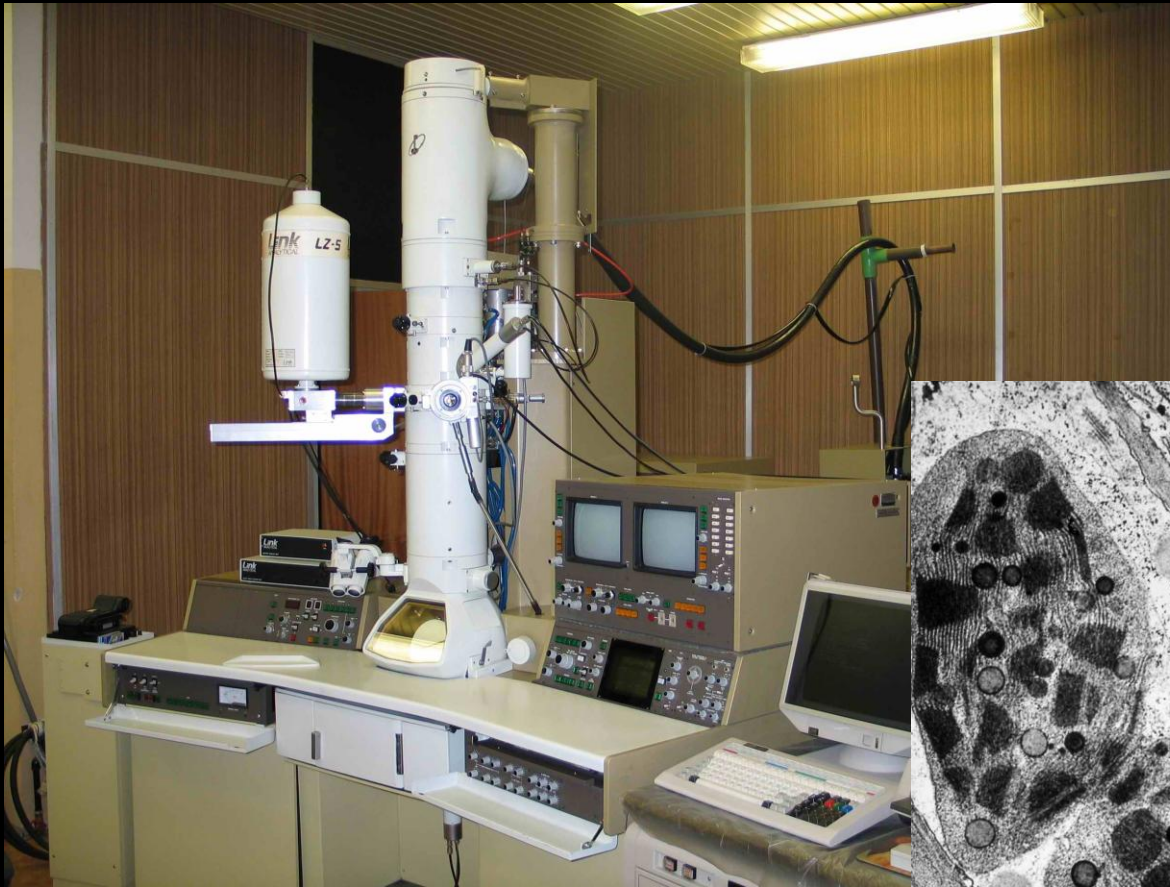
Crossbeam 550

Your FIB-SEM for high throughput
3D analysis and sample preparation



Transmisná elektrónová mikroskopia - TEM

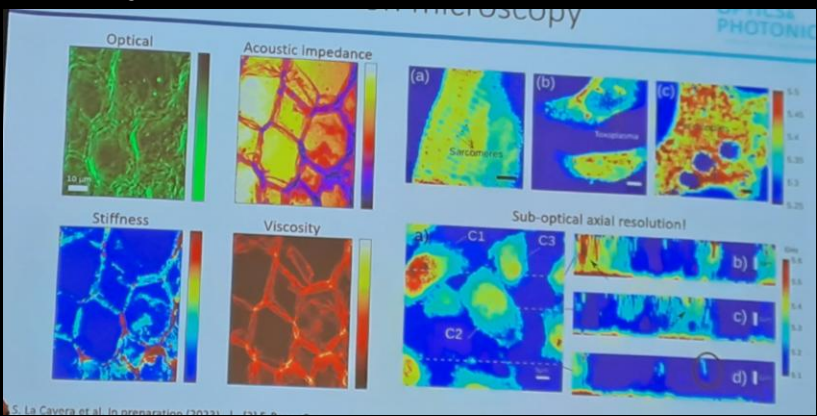
- opracovanie a nasýtenie epoxidom
- rezanie na ultratenké rezy – hrubé pod 100 nm
- kontrastovanie soľami uránu, olova, mangánu
- mikroskopovanie vo vysokom vákuu

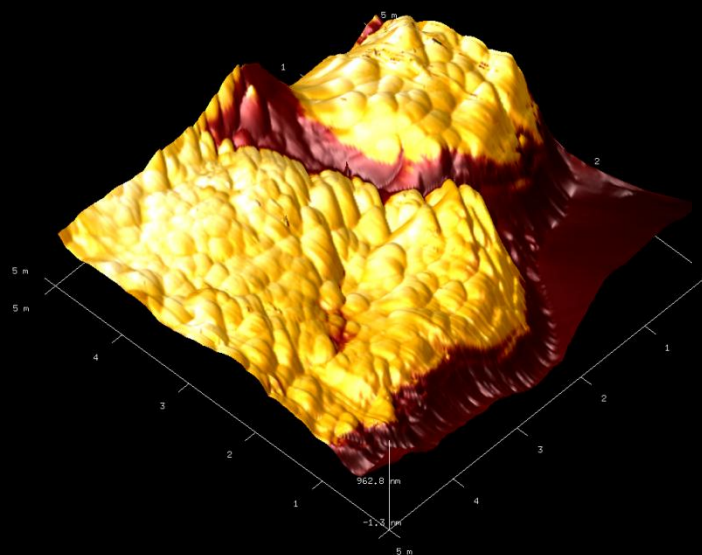
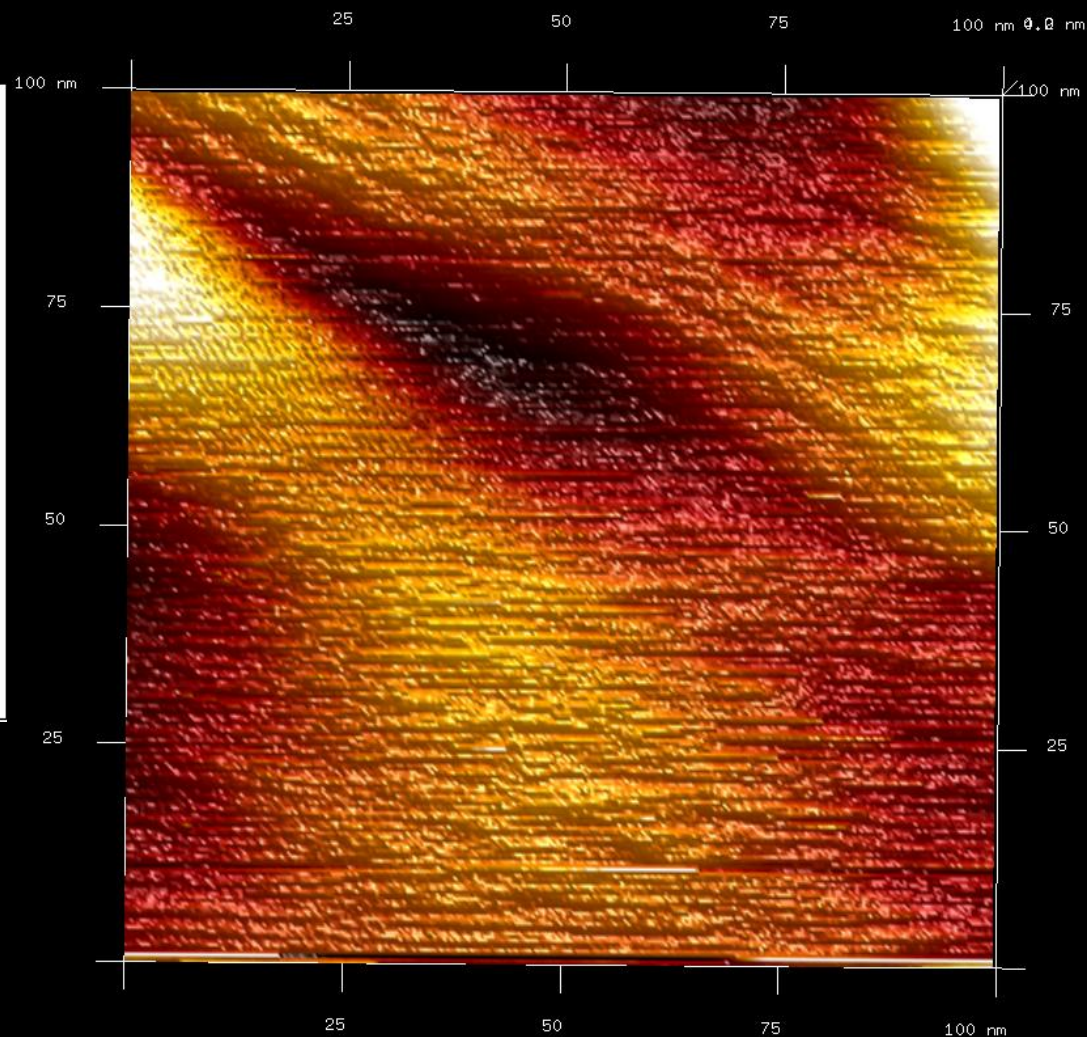
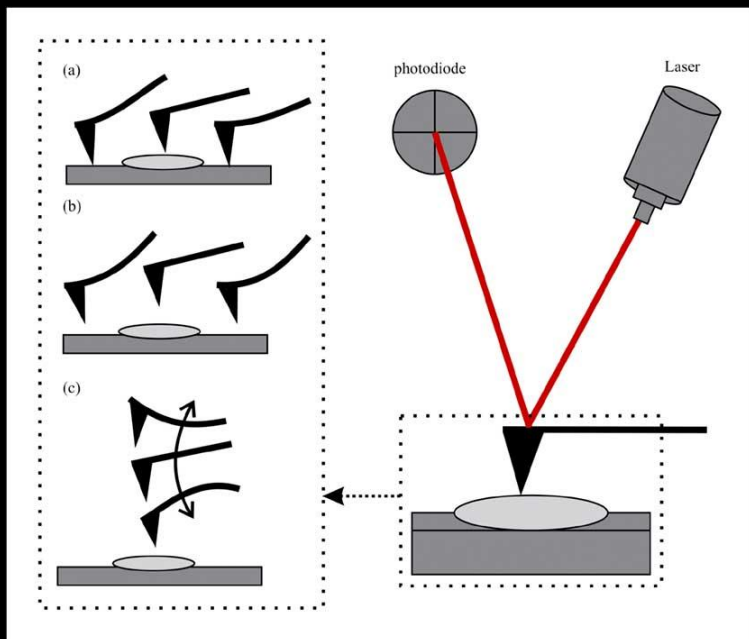




Fonónová mikroskopia – akustická mikroskopia

- Vzorka bez opracovania, ale ponorená na tekutiny
- Vzorka môže mať aj niekoľko mm hrúbku
- Bez kontrastovania/farbenia
- Dokáže zistiť topológiu, mechanické vlastnosti, defekty, a to aj v hĺbke vzorky





Mikroskopia atómových síl =
AFM (atomic force microscopy)
Mikroskopovanie v bezvibračných podmienkach!

Mikroskopia:

svetelná (LM) - (svetlé pole, tmavé pole, fázový kontrast, diferenciačný interferenčný kontrast = Nomarského kontrast)

polarizačná (PM)

fluorescenčná (FM)

fluorescenčná mikroskopia osvetlenej vrstvy/roviny (LSFM)

ultrafialová (UVM)

konfokálna laserová skenovacia (CLSM)

superrozlišovacia fotónová mikroskopia (SIM) + AI (umelá inteligencia) + DL (deep learning, samoučenie prístrojov)

elektrónová (EM) - (transmisná - TEM, vysokorozlišovacia transmisná - HRTEM, skenovacia - SEM, ...)

atómových síl (AFM)

Tomografia – skenovanie počtosti lúčov (röntgénových, elektrónových,...

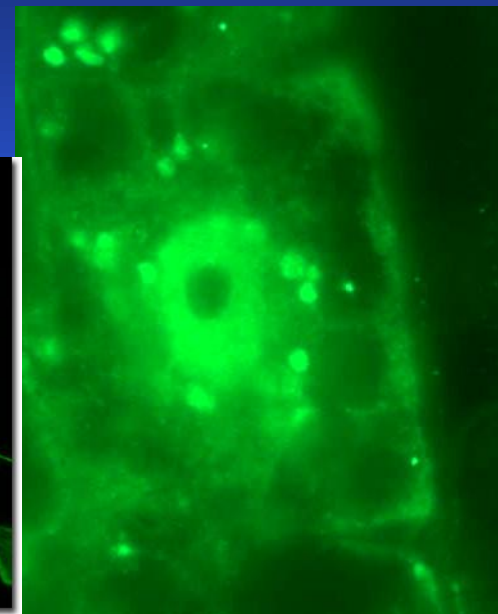
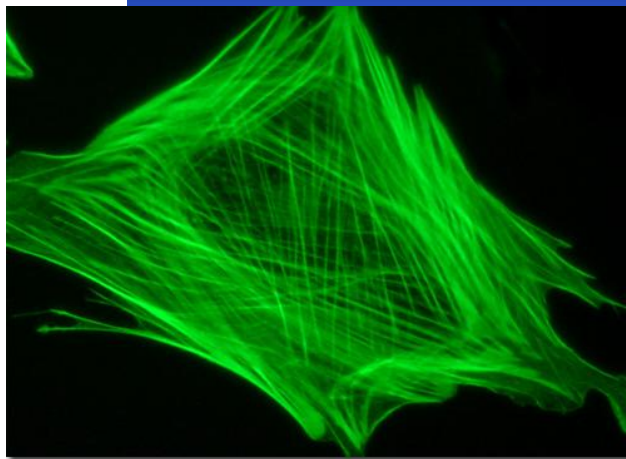
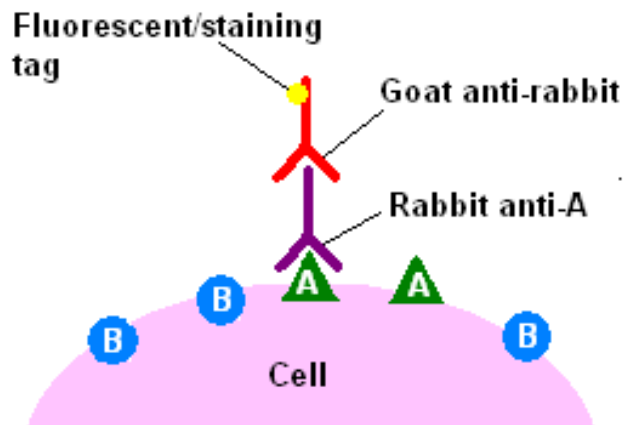
Holografická optická pinzeta – premiestnenie vzorky pomocou laserového lúča

Prvková analýza – energiovo-disperzná röntgénová analýza (EDXA), spektrálna analýza straty energie elektrónov (EELS), energiu-filtrujúca transmisná elektrónová

Spektrálne analýzy, separácie, ...

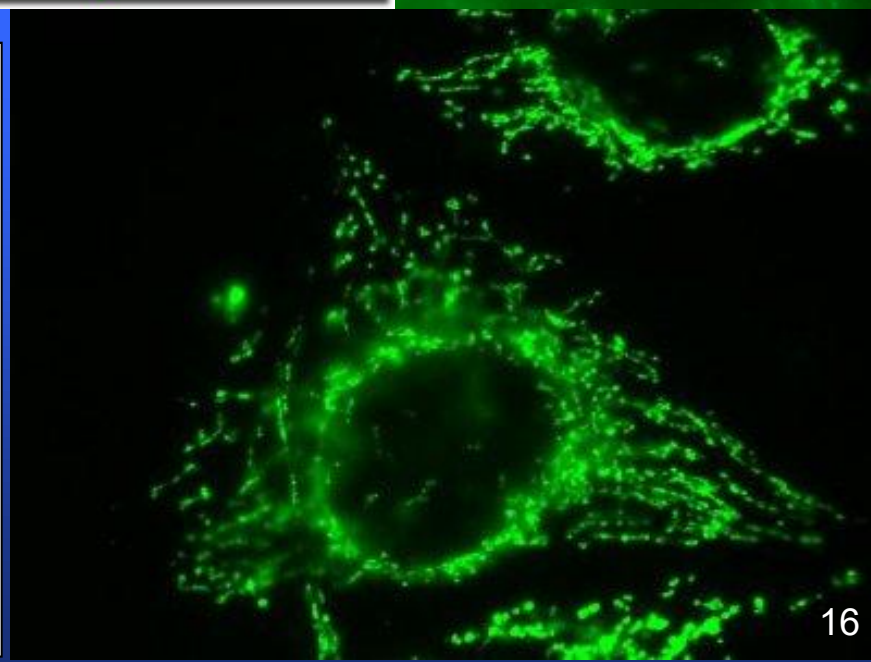
Vizualizácia bunkových štruktúr

Imunofluorescenčná mikroskopia



Konkrétny proteín, resp. jeho špecifický úsek – **epitop**, je rozpoznaný primárnou protilátkou.

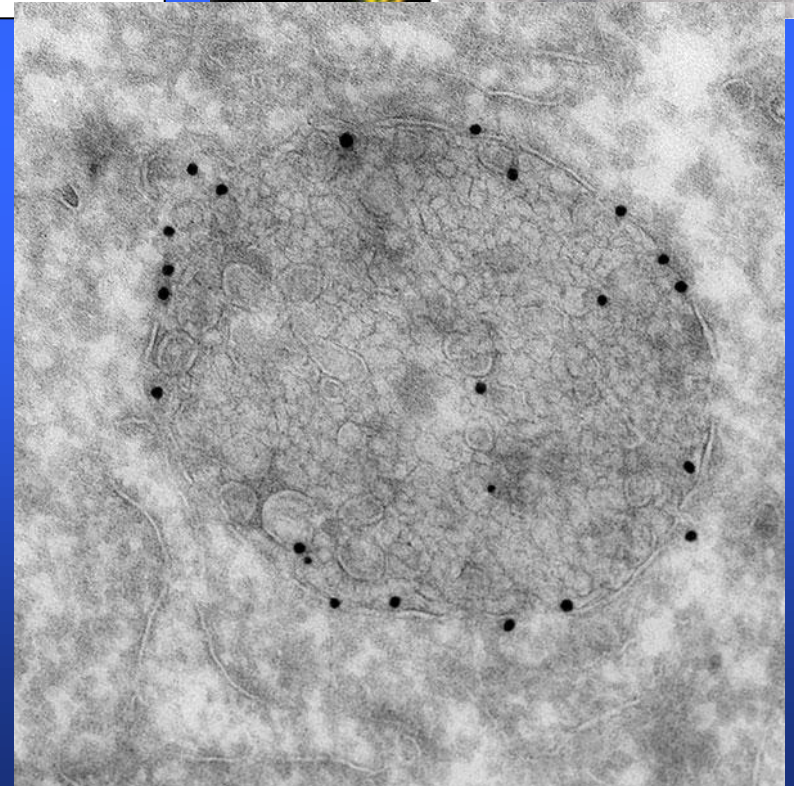
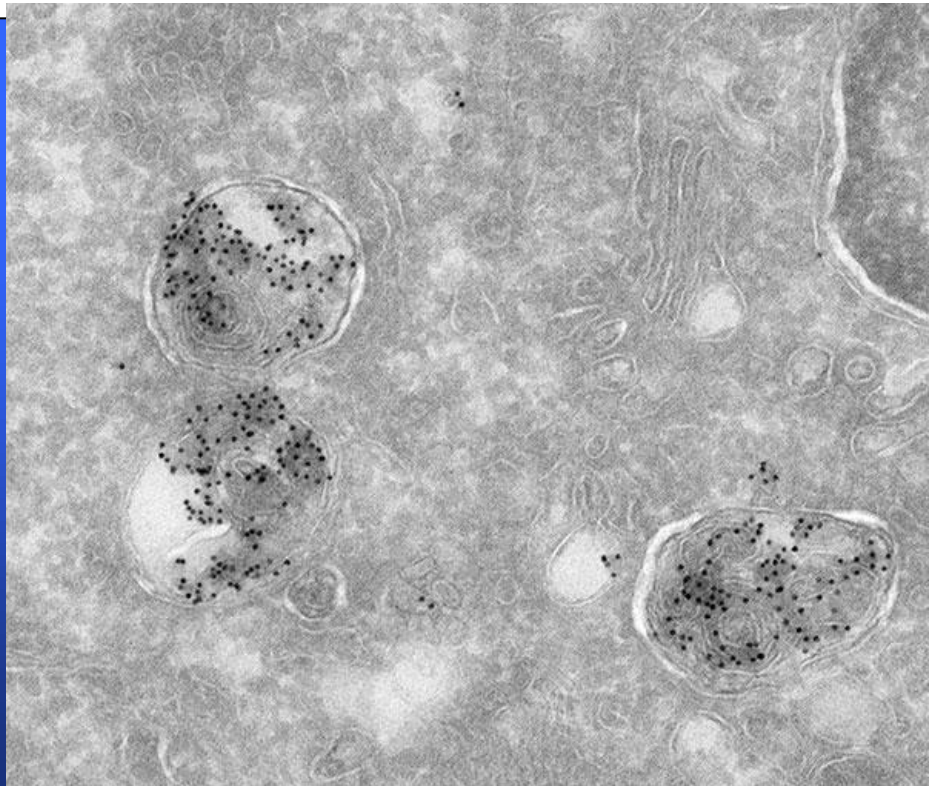
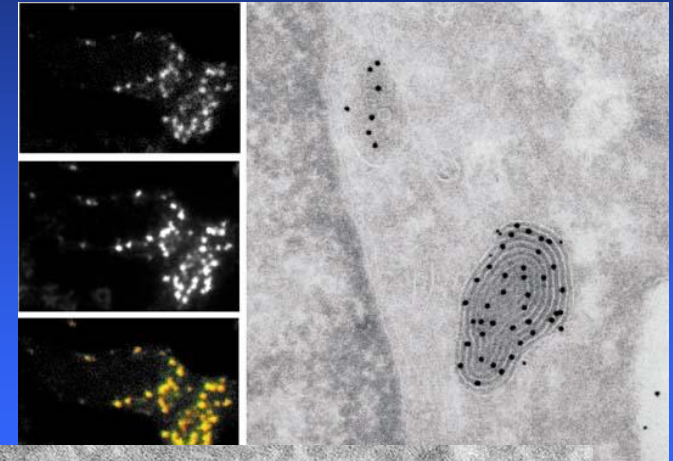
Primárnu protilátku špecificky rozpoznáva sekundárna protilátka, ktorá môže byť konjugovaná s fluorescenčnou značkou – tá emituje vo fluorescenčnom mikroskope signál.



Vizualizácia bunkových štruktúr

„Immunogold“ elektrónová mikroskopia

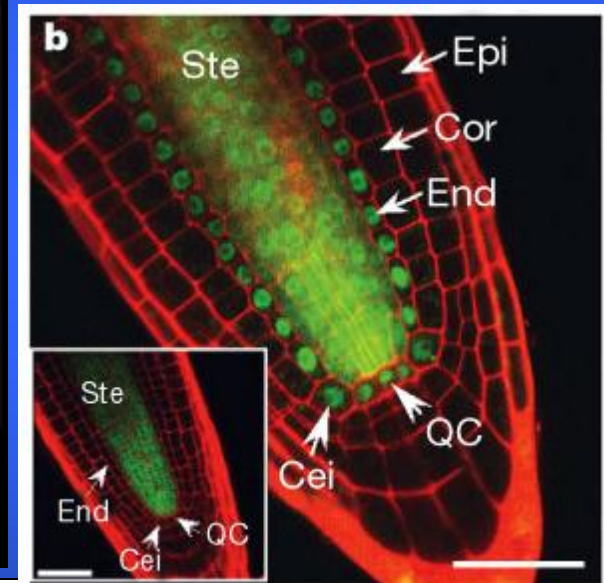
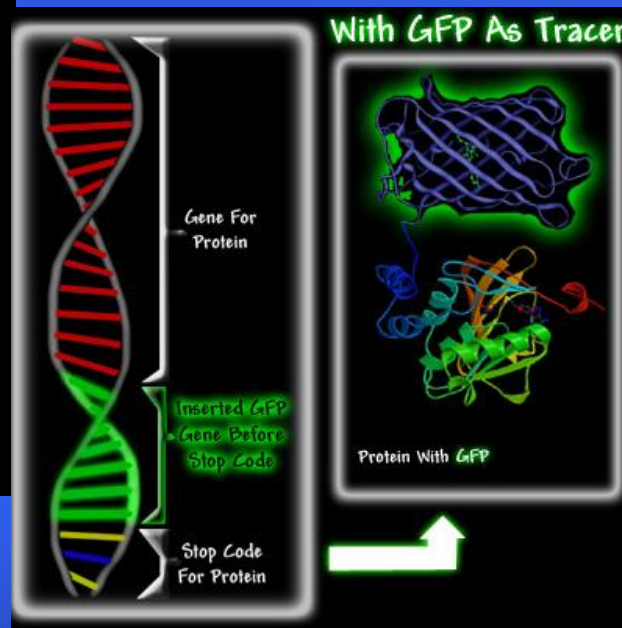
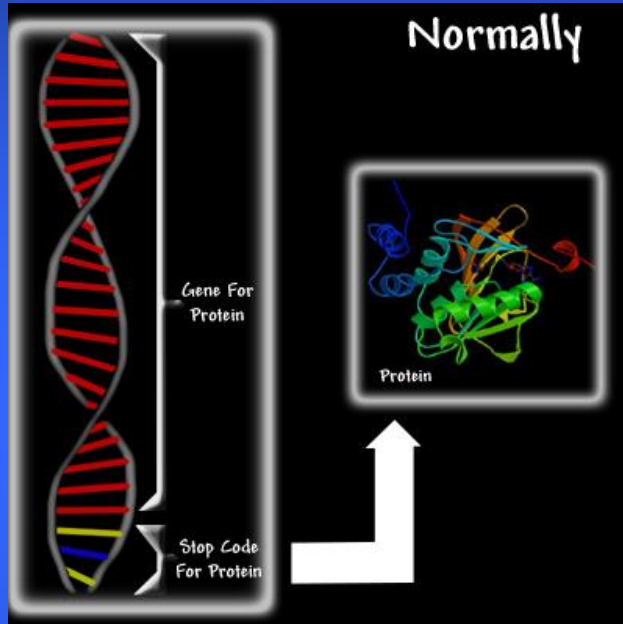
Sekundárne protilátky sú pri ImG-EM **konjugované so zlatými časticami**, ktoré sú pri transmisnej EM výrazne elektrónodenzné. ImG-EM umožňuje sledovať **lokalizáciu** konkrétnych **proteínov na ultraštruktúrnej úrovni**.



Vizualizácia bunkových štruktúr

GFP-fúzie

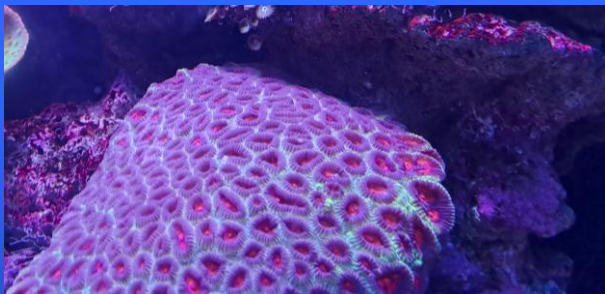
Technika vyžaduje klonovanie DNA a transformáciu daného organizmu – **transgénne organizmy**



GFP = „green fluorescence protein“

Zelený fluorescenčný proteín je vo fúzii so študovaným proteínom, vďaka čomu je možné sledovať jeho lokalizáciu i pohyb v živých bunkách.

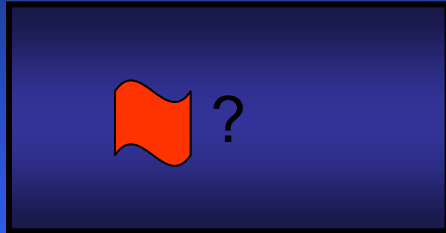
Vizualizácia bunkových štruktúr



FP = fluorescenčný proteín

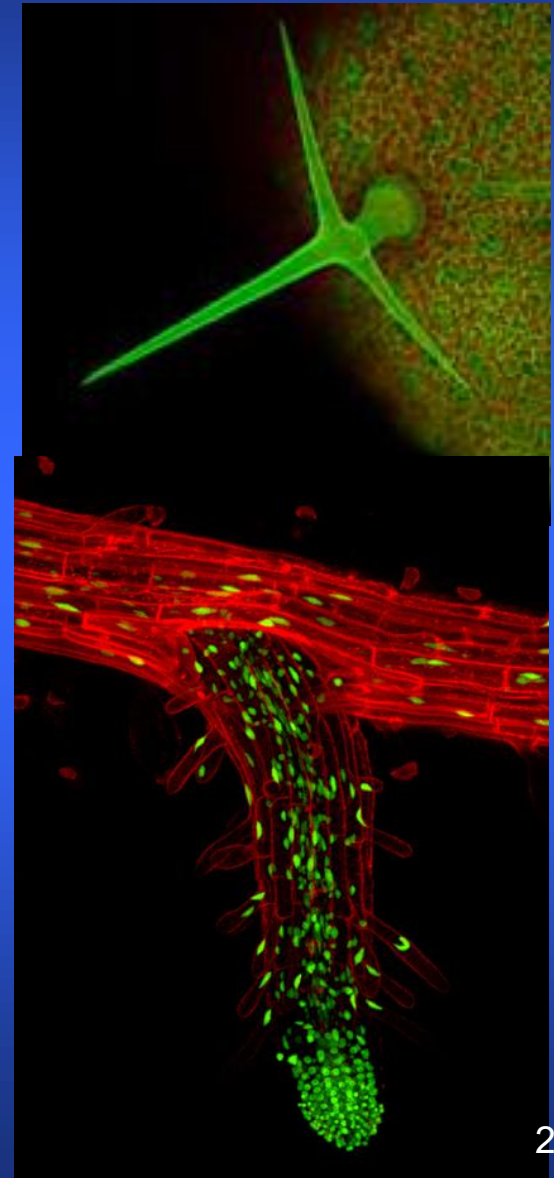
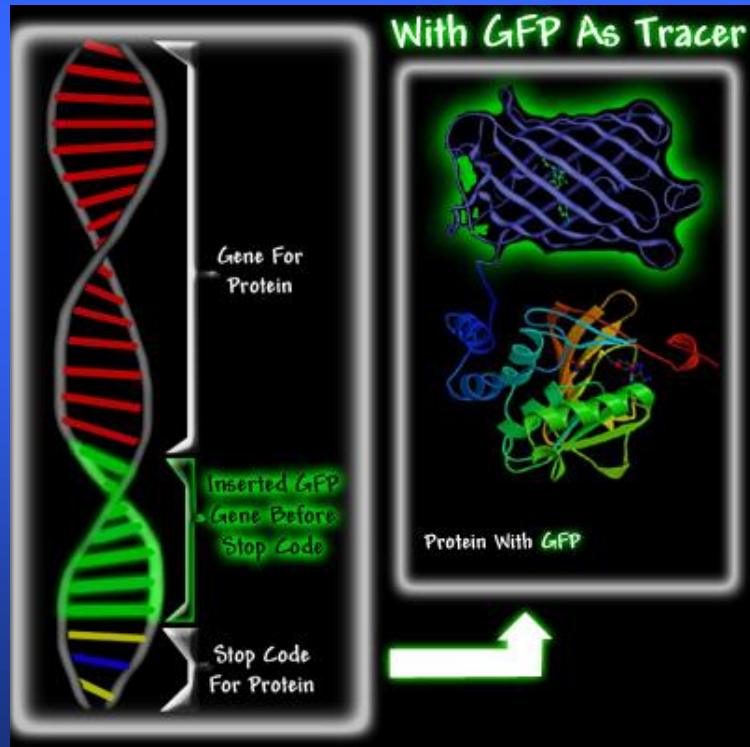
Fluorescenčný proteín na základe svojej štruktúry (pochádzajúci z rôznych organizmov) môže mať aj iné emitujúce farby – rôzne odtiene tej istej, alebo úplne odlišné: červený, fialový, modrý, žltý...

Fúzie s GFP umožňujú sledovať lokalizáciu a pohyb študovaných proteínov (proteínových štruktúr) v živých bunkách



Proteín s neznámou lokalizáciou

Proteín + GFP





Úvod k príprave transgénnych rastlín

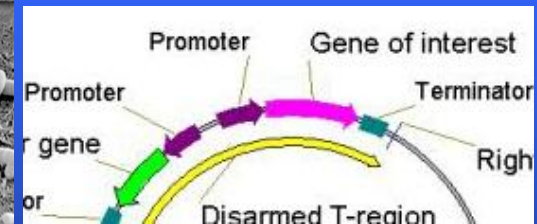
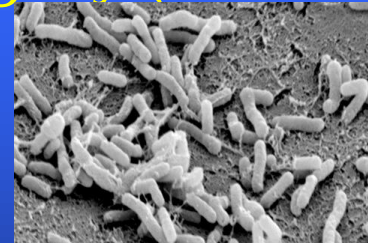
- DNA, gén, genetický kód, expresia génov



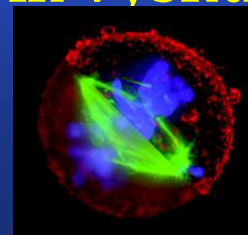
- Totipotencia rastlinných buniek, regenerácia rastlín *in vitro*

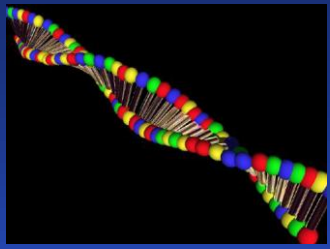


- Ako sa do rastlín vnášajú nové gény (a nové vlastnosti)

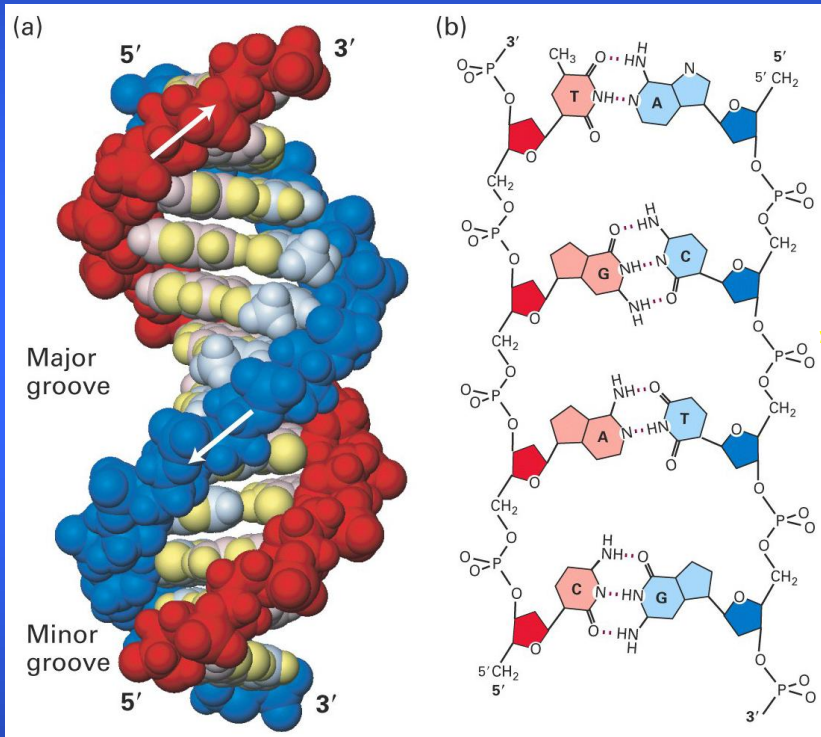
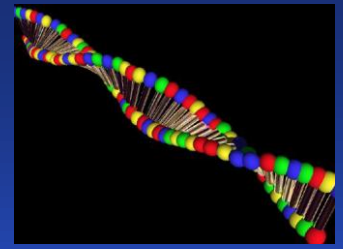


- Transgénne rastliny v základnom výskume a v biotechnológiách





DNA v rastlinných bunkách



DNA v jadre

DNA v plastidoch

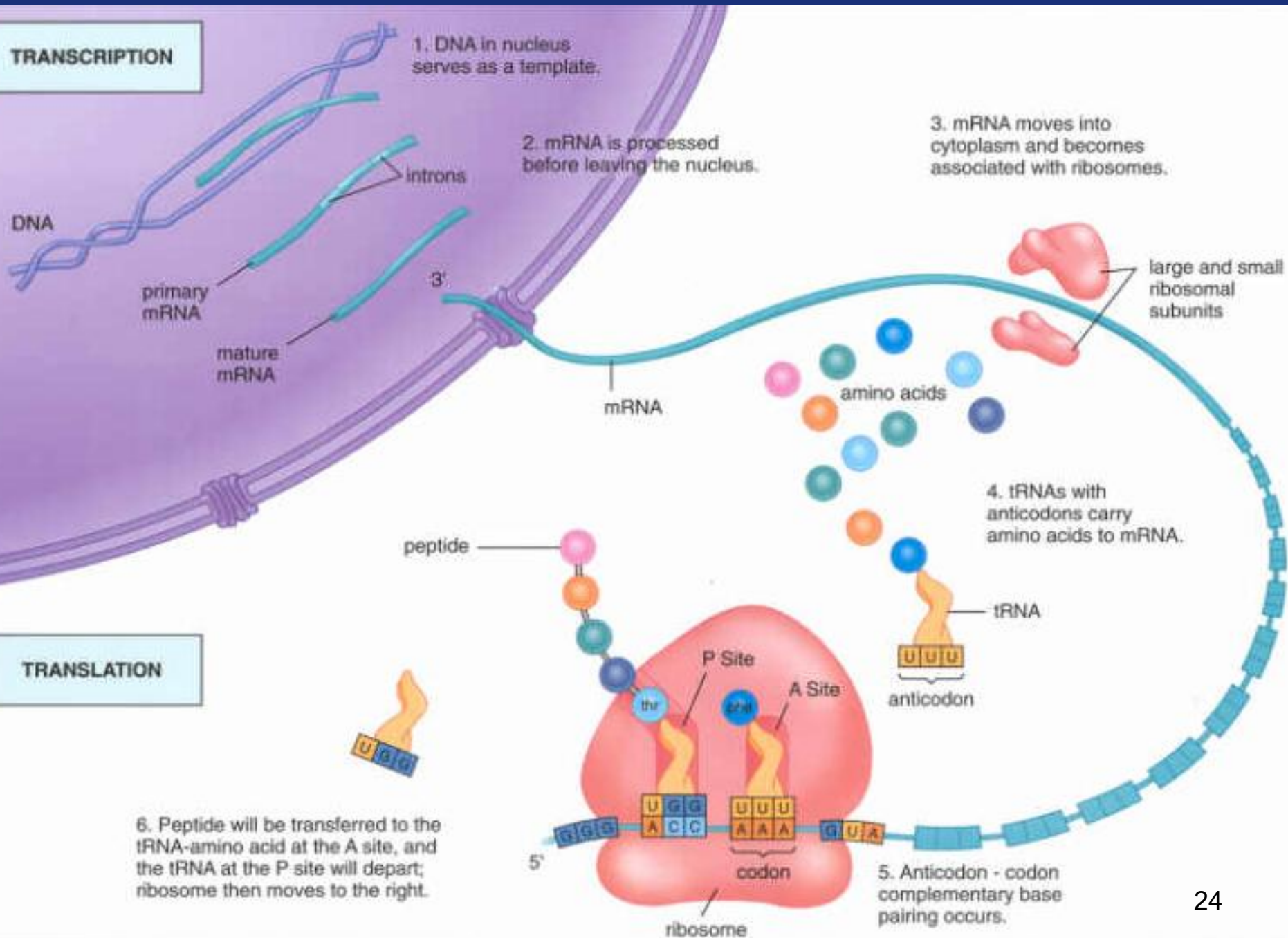
DNA v mitochondriách

(chromozomálna, jadrová DNA)

(plastidová, chloroplastová cpDNA)

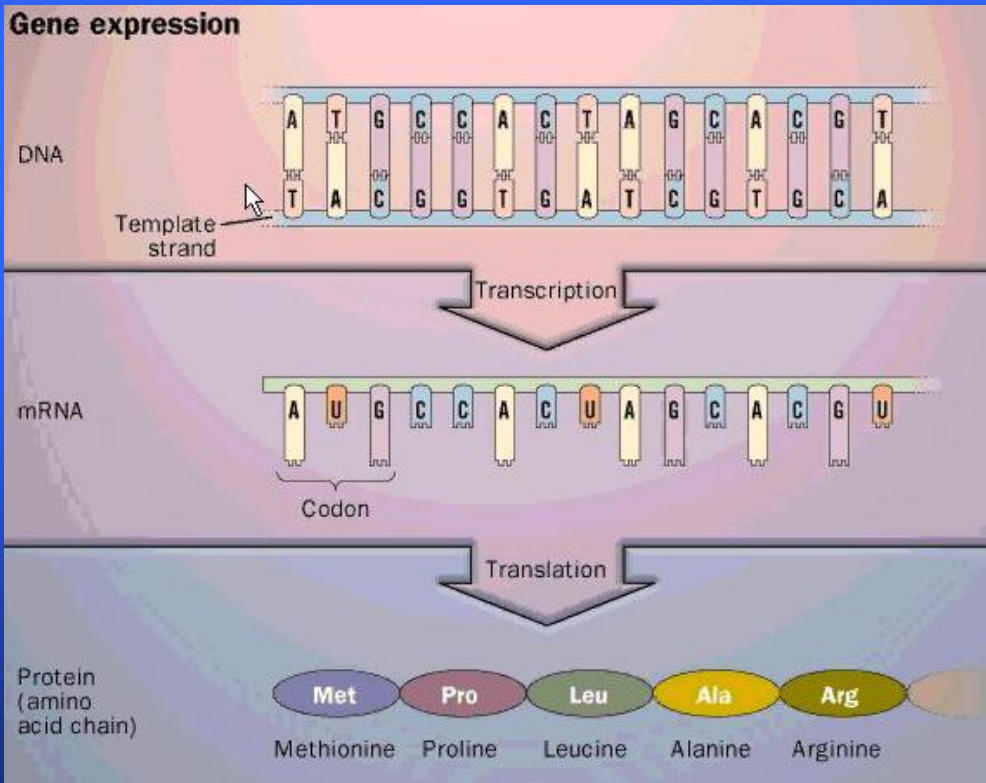
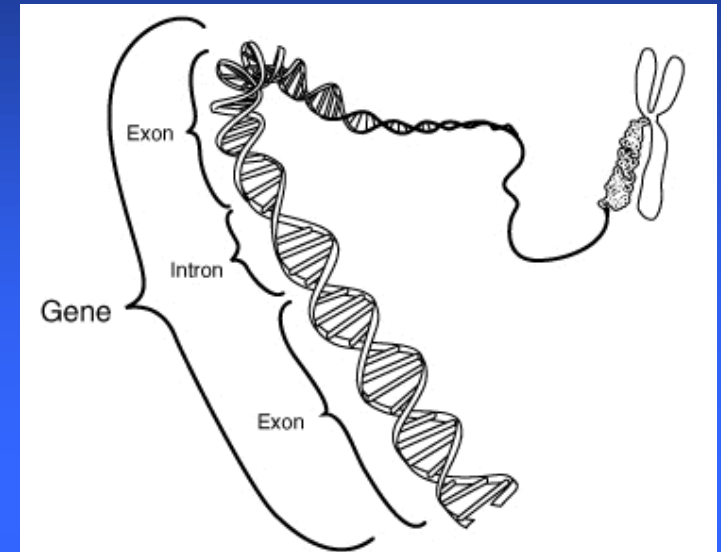
(mitochondriálna mtDNA)

TRANSCRIPTION



Od génov k proteínom ... od proteínov k fenotypu

- Gén je úsek DNA kódující určitý produkt
- Gény môžu kódovať: proteíny
t-RNA
r-RNA, etc...



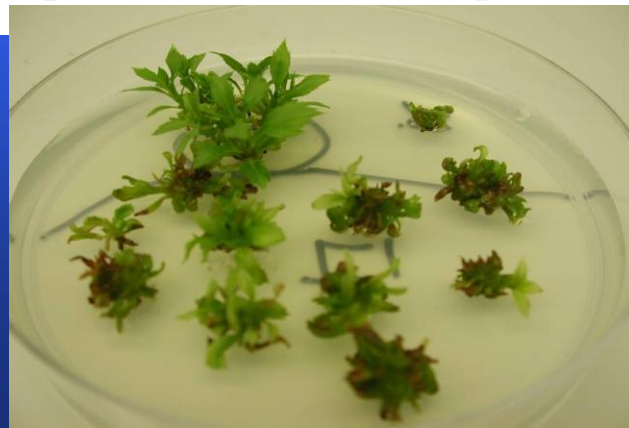
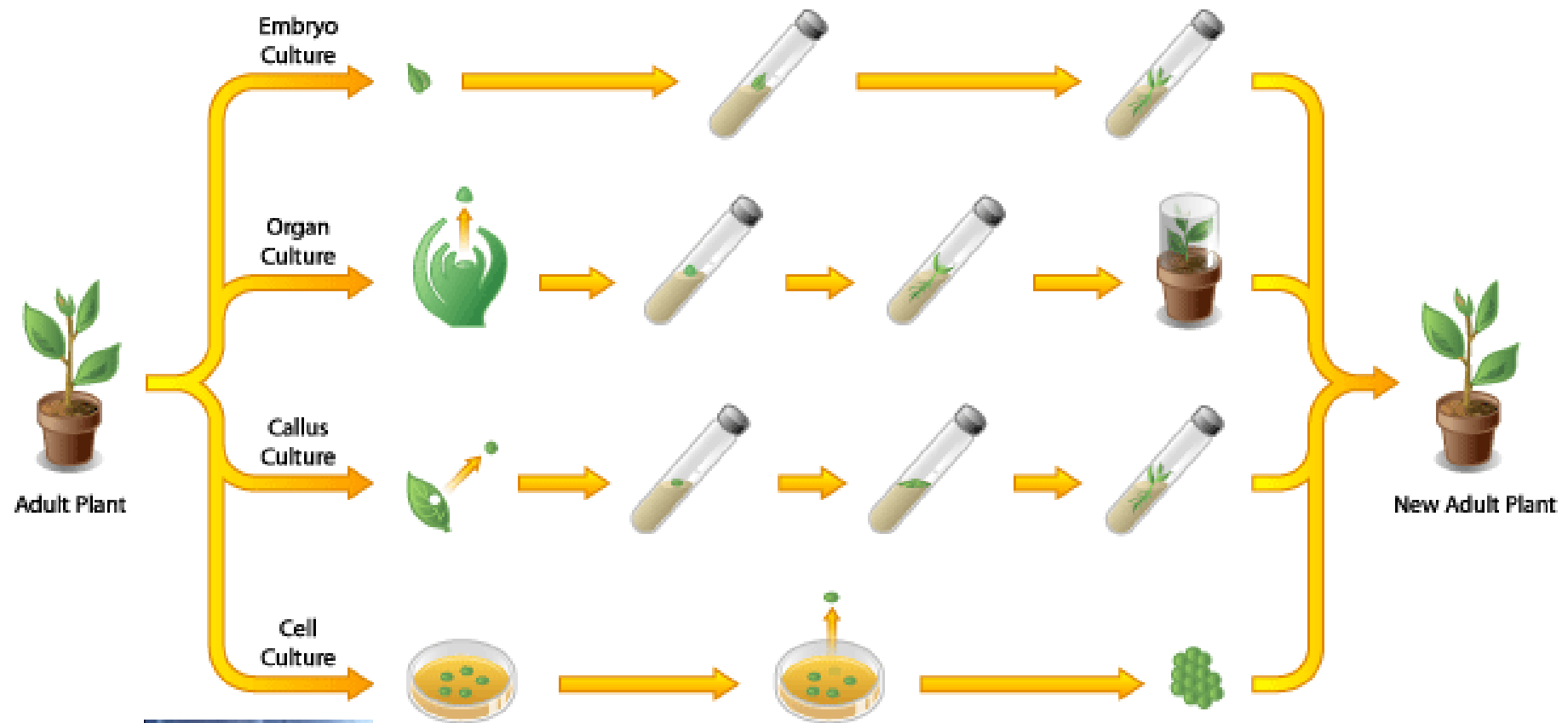
GÉN → **PROTEÍN (enzým)**

ENZÝM → **BIOSYNTÉZA FARBIVA**

GÉN → **FARBA KVETOV**

- Geneticky modifikované rastliny sú tie, ktorým bol cielene pozmenený genóm (dočasne, alebo dlhodobo/trvalo).
- Zmenami v genóme GM-rastliny nadobúdajú nové vlastnosti, alebo strácajú niektoré pôvodné.

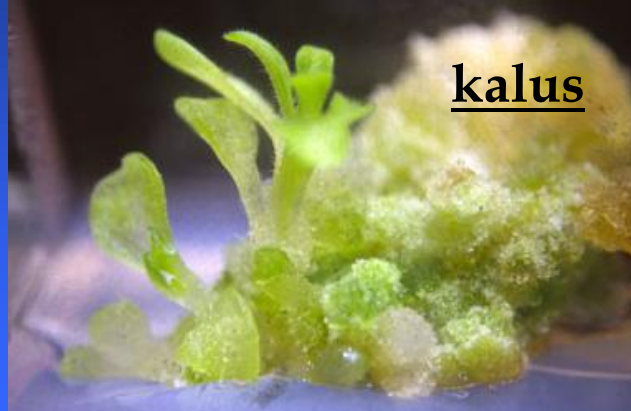
Pletivové kultúry rastlín a *in vitro* regenerácia



Od bunky k celej rastline



odoberaté pletivo
(explantát)



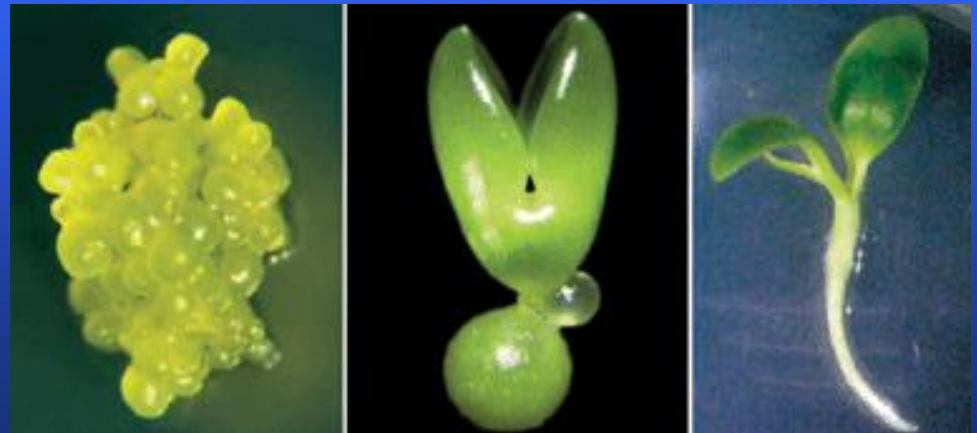
regenerované
rastliny



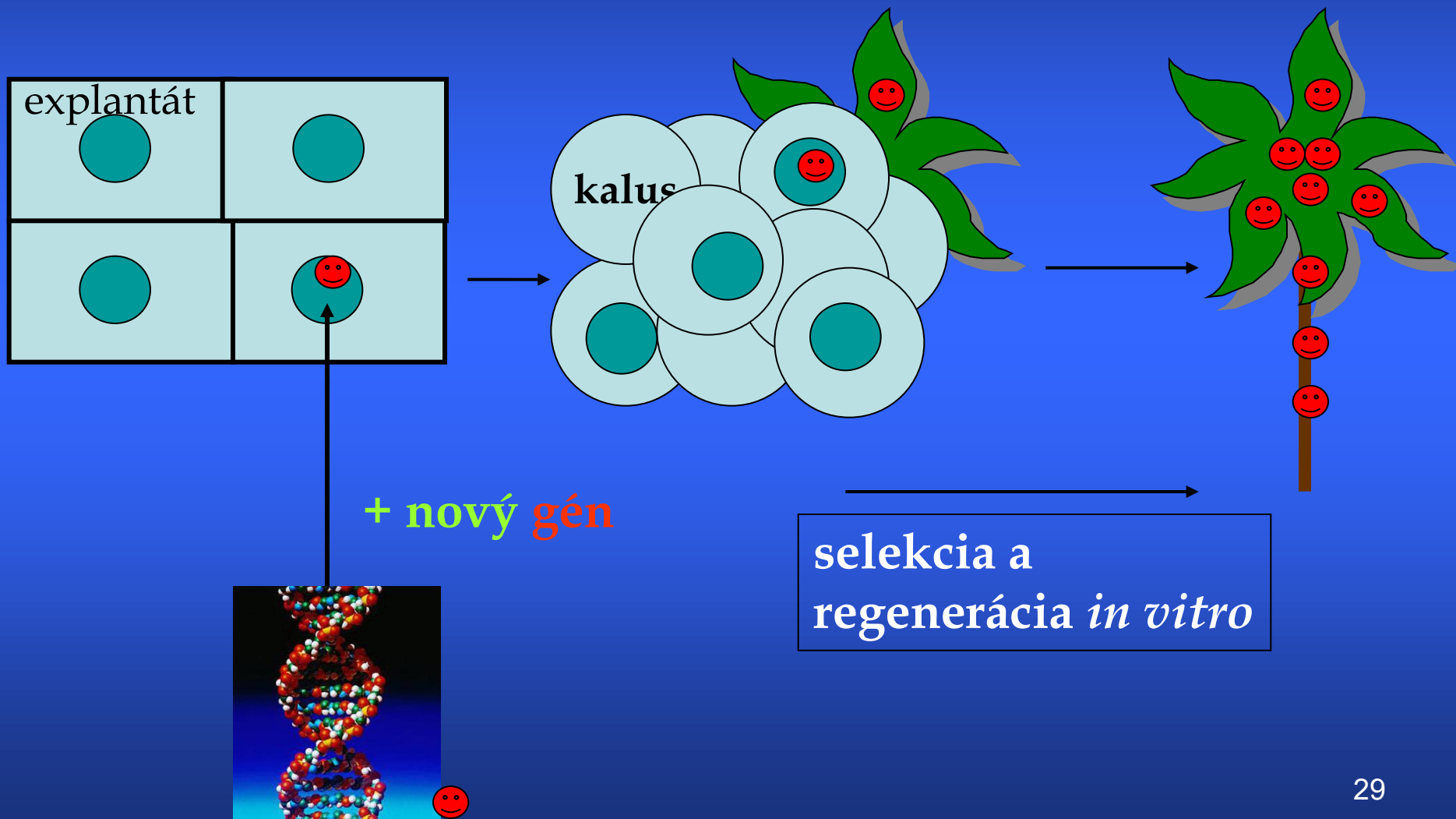
protoplast



somatické embryo



Od transformovanej bunky k transformovanej rastline



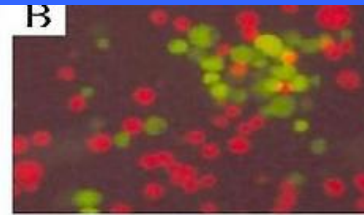
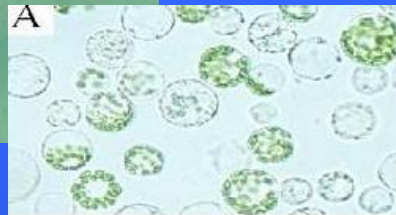
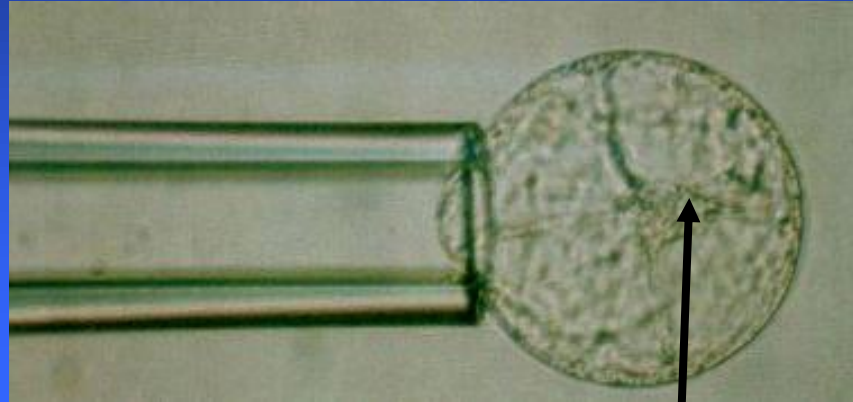
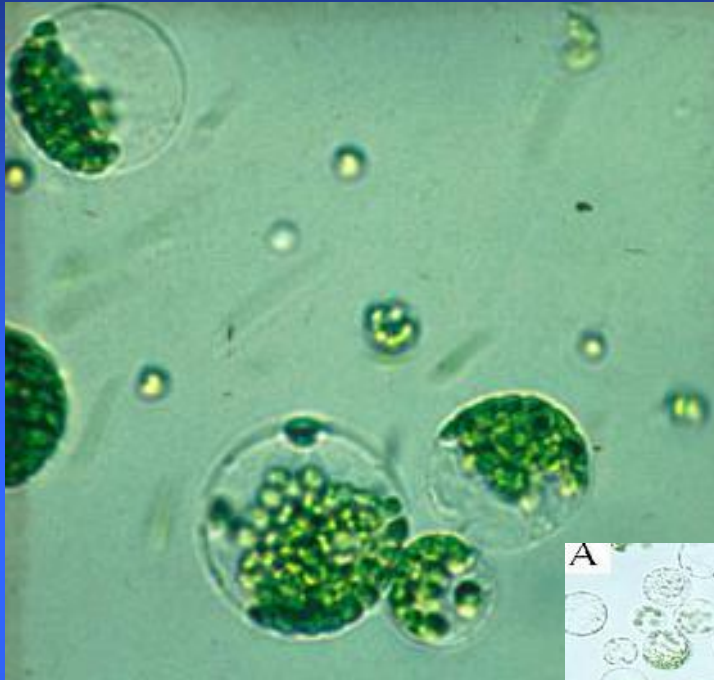
Ako sa do rastlinných buniek vnášajú nové gény?

Priamy transfer DNA do protoplastov
(*PEG-mediated*, transfekcia DNA, injektáž)

Vstreľovanie DNA (biolistika)
(*gene-gun*)

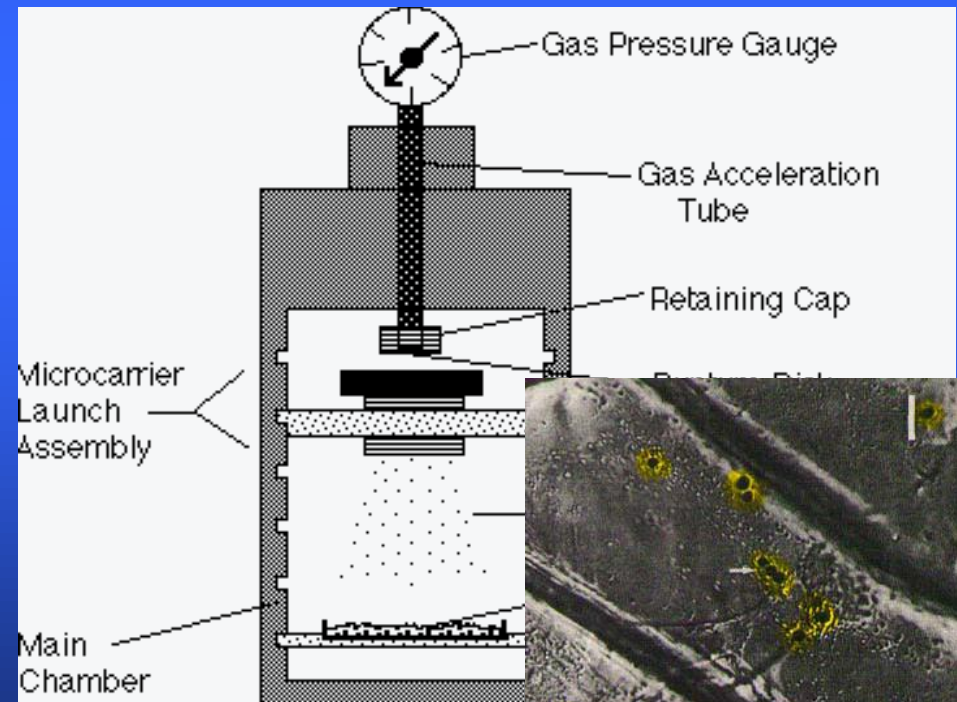
Vnášanie DNA pomocou baktérií
(*Agrobacterium-mediated*)

Priama injektáž DNA do protoplastov

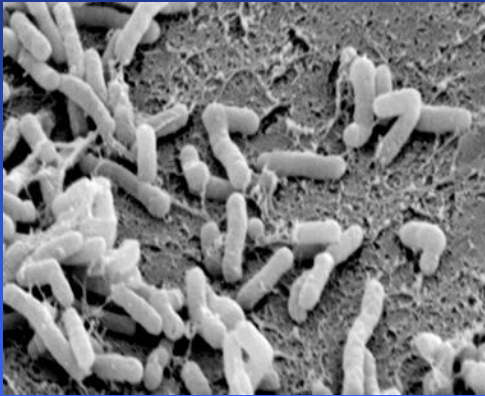


Vstreľovanie génov (biolistika)

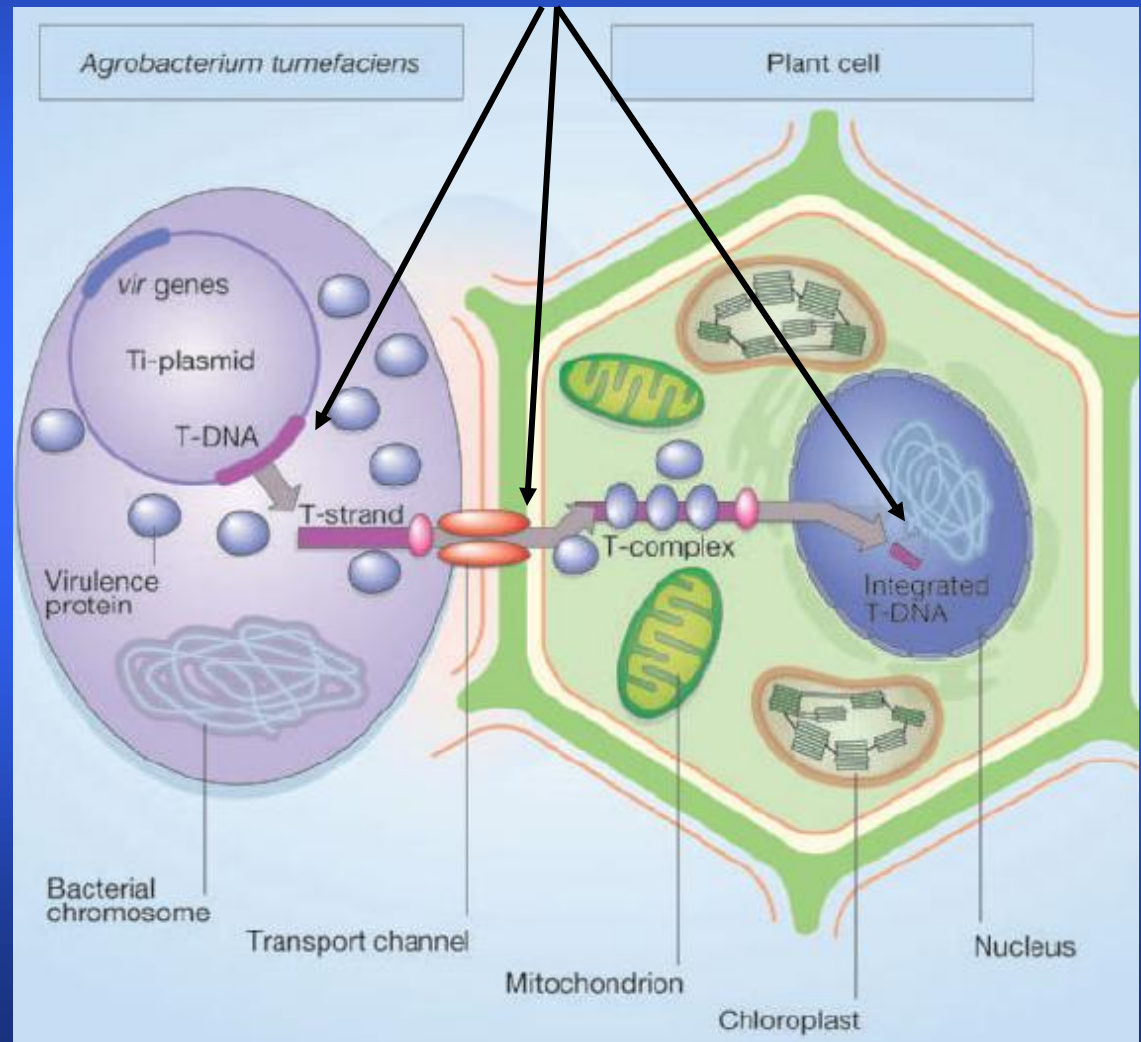
- Vnášaná DNA sa adheruje na mikroprojektily, ktoré sa tlakom hélia vstreli do rastlinného pletiva...



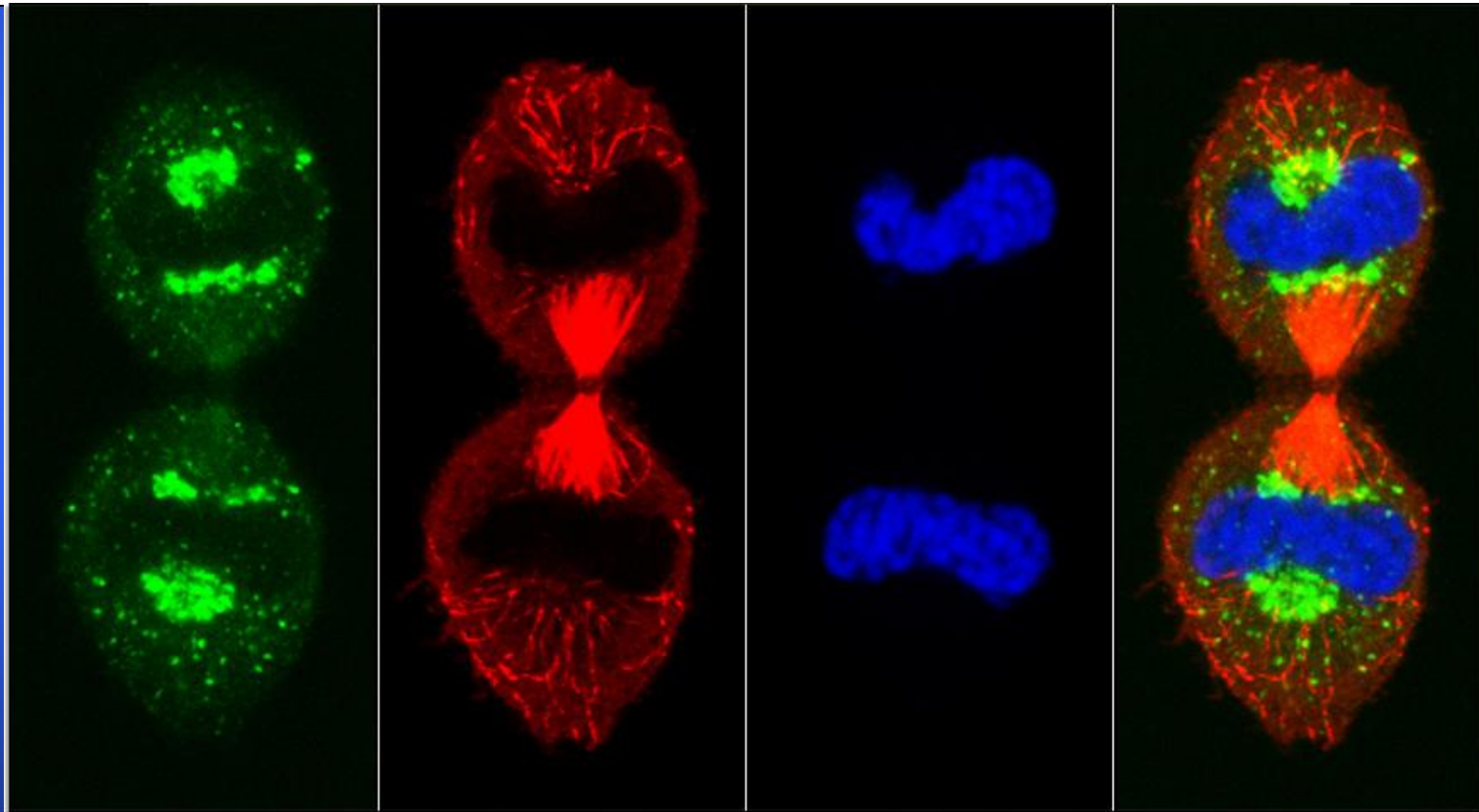
Vnášanie DNA pomocou *Agrobacterium tumefaciens*



- *Agrobacterium* má schopnosť preniesť a integrovať časť svojej vlastnej DNA (T-DNA) do rastlinného genómu



Poznáme množstvo proteínov (molekúl), ktoré sa vyskytujú v konkrétnom bunkovom kompartmente – majú **špecifickú lokalizáciu**. Protilátky k takýmto molekulám (resp. GFP-fúzie s príslušnými proteínmi) môžeme využiť ako značky (markery) daných kompartmentov/bunkových štruktúr. Okrem protilátok a GFP-fúzií je možné ako značku použiť špecifické **fluorescečné farbivá** (napr. DAPI – vytvára väzbu s nukleovými kyselinami).



značka
Golgiho aparátu

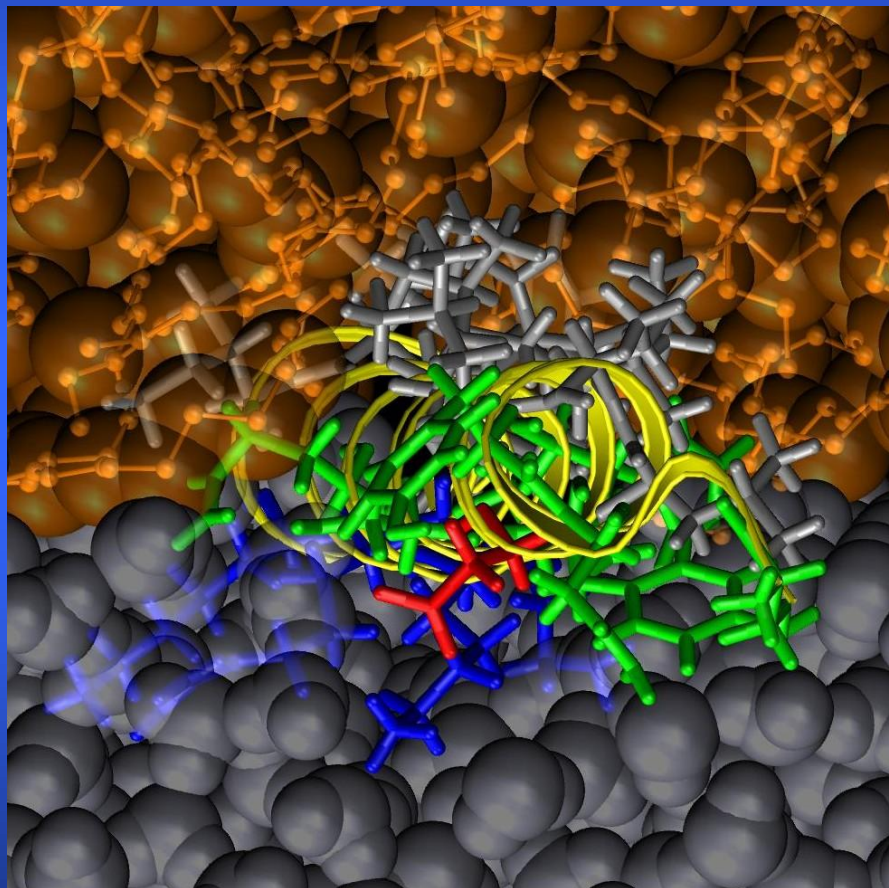
značka
 β -tubulínu

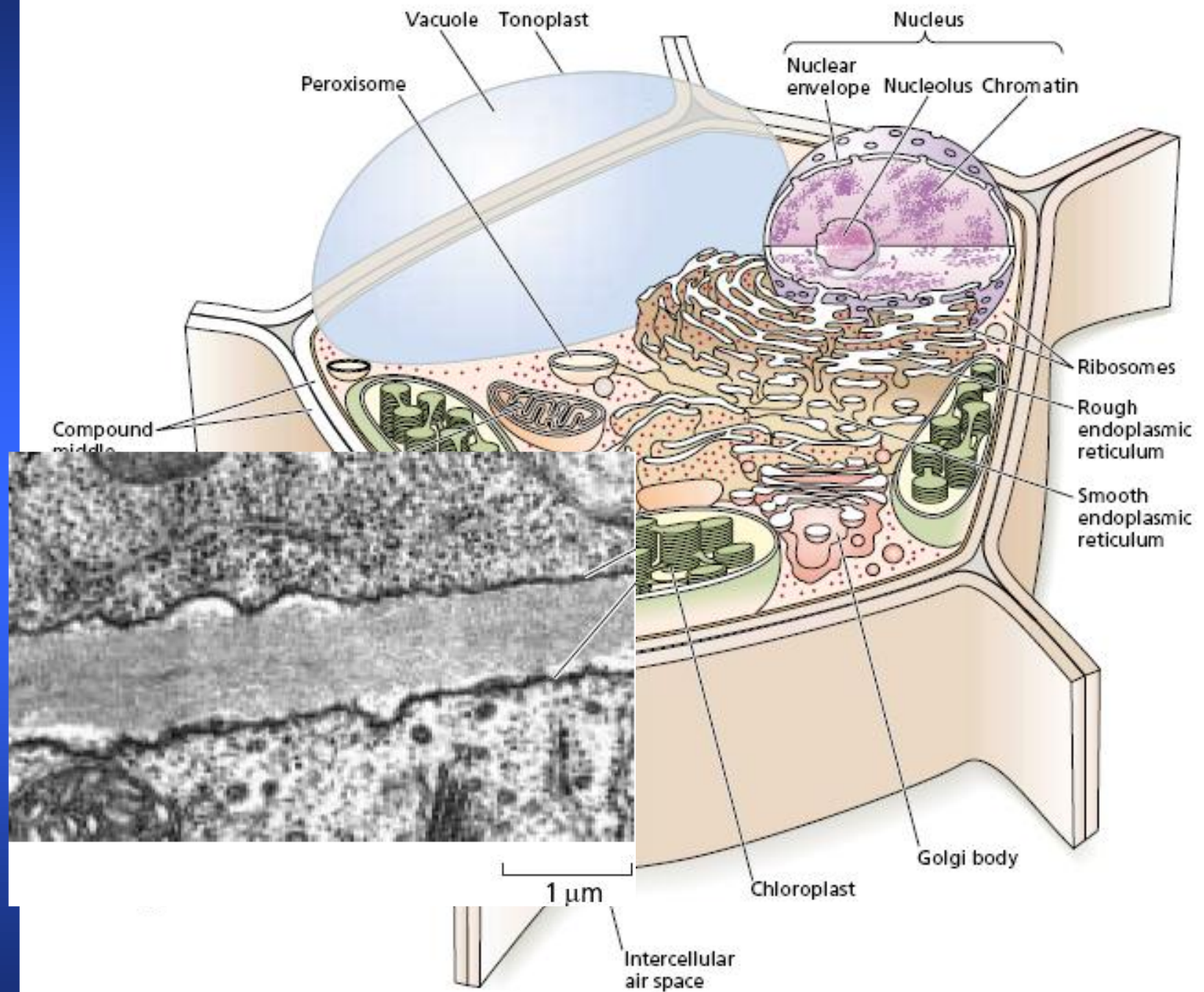
DAPI

Zlúčený signál

<http://www.nanoflight.info/nanoflight2.html>

BIOMEMBRÁNY





Biomembrány sú tvorené dvojvrstvou fosfolipidov. Fosfolipidy sú amfipatické – obsahujú hydrofilnú a hydrofóbnu časť.

(a) Movement of phospholipids

Fluid Viscous

(c) Cholesterol within the membrane

hydrophilic head

hydrophobic tail

choline

phosphate

glycerol

fatty acids

double bond

Human cell Mouse cell

Fusion

Hybrid cell

Human protein Mouse protein

40 minutes of incubation

Freeze-fracture of PM*

Frozen extracellular fluid

Frozen cytoplasm

E face

P face

Transmembrane proteins

Peripheral membrane protein

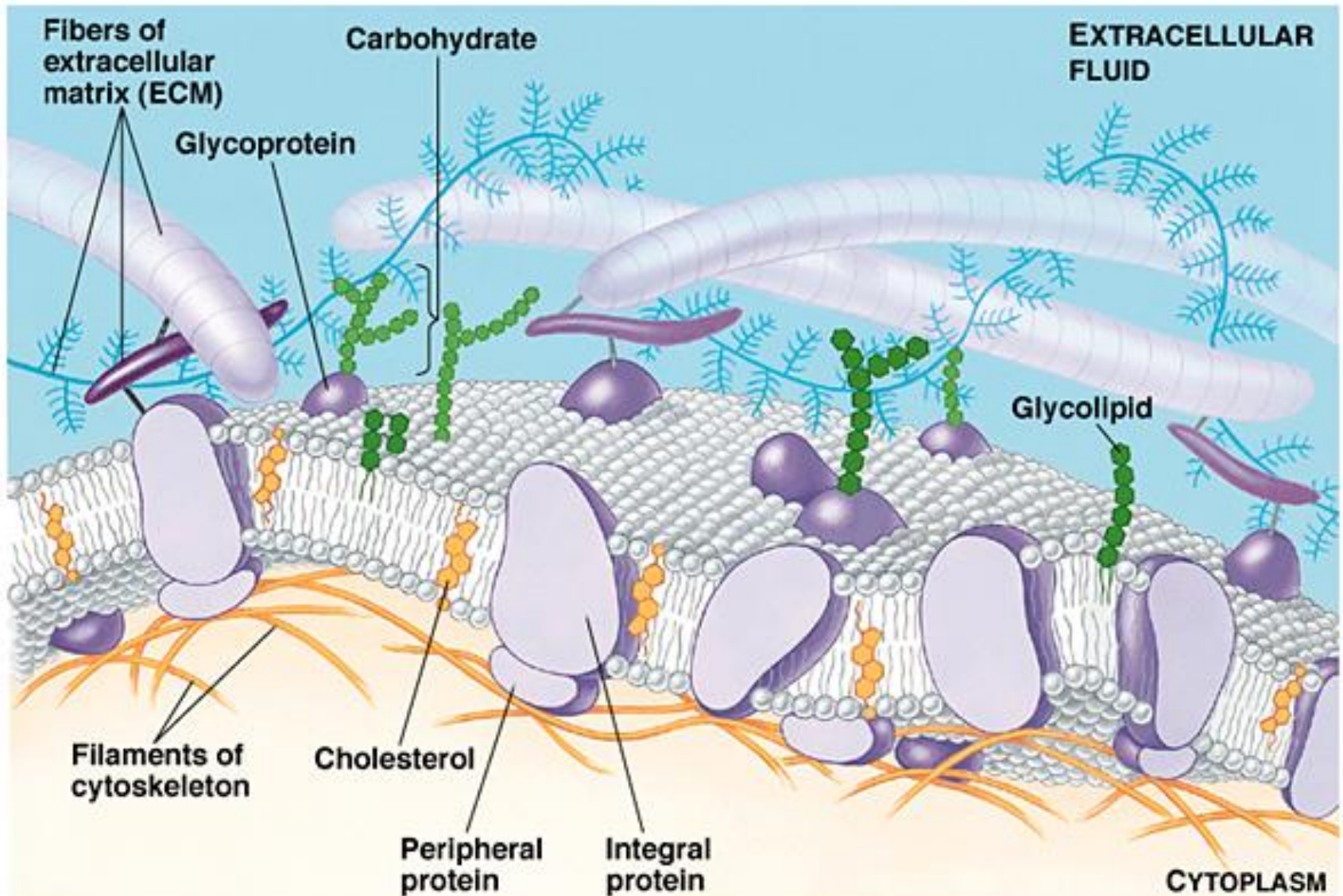
Integral membrane proteins

Phospholipid bilayer

* Final product of FF is visualized as SEM of P/E face platinum shadows.

Súčasný model biologickej membrány

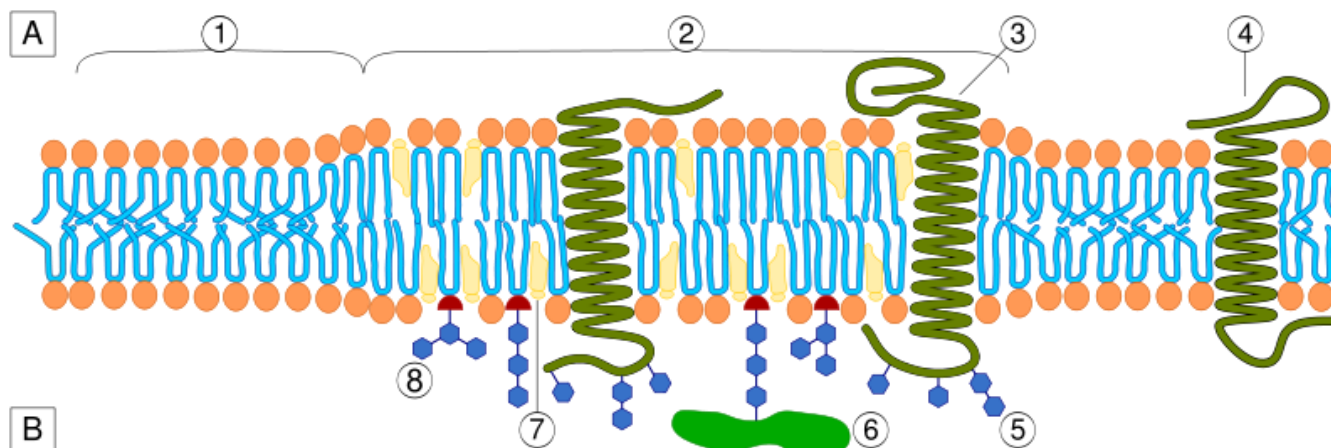
Model fluidnej mozaiky



Základné charakteristiky biologických membrán:

Fluidita membrán závisí od teploty, ale i množstva dvojitéch väzieb v hydrofóbných častiach (mastné kyseliny). Čím je dvojitéch väzieb viac, tým je membrána fluidnejšia.

Fluidita membrán závisí aj od množstva cholesterolu, ktorý sa v membránach nachádza.

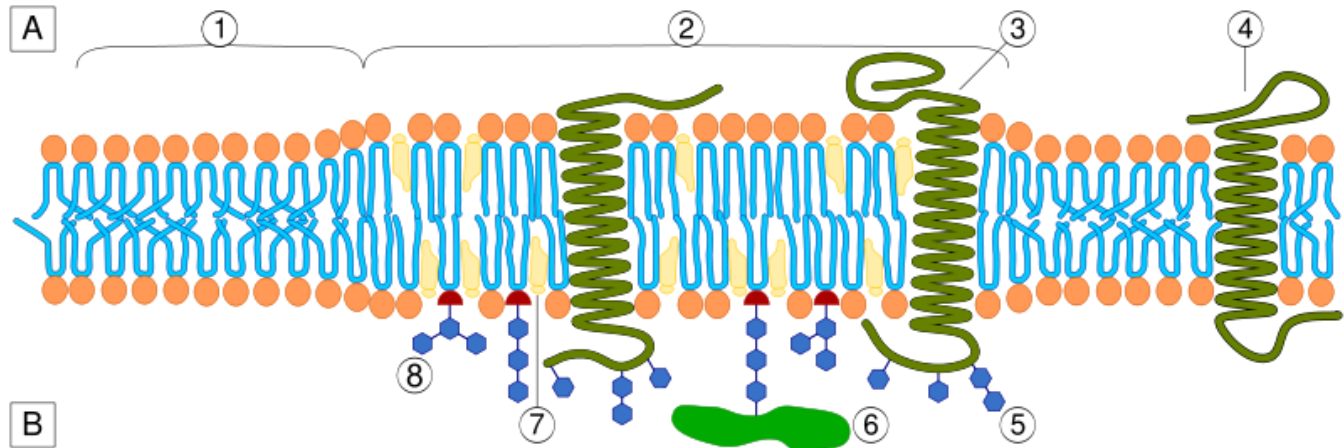


Základné charakteristiky biologických membrán:

Membrány obsahujú **proteíny**: periférne, integrálne (nekovalentne viazané, zasahujú do hydrofóbneho jadra lipidovej dvojvrstvy alebo preklenujú celú lipidovú dvojvrstvu) a naviazané k membráne prostredníctvom inej molekuly kovalentne (anchored proteins).

Glykoproteíny (obsahujú molekuly sacharidov) sa vytvárajú v ER a GA bunky a do membrány sú transportované sekretorickou cestou.

Membránové proteíny plnia v bunke rozličné funkcie: transportéry, kanály, enzýmy, receptory, sprostredkujú kontakt s cytoskeletom, majú signálnu funkciu, zabezpečujú identitu bunky...

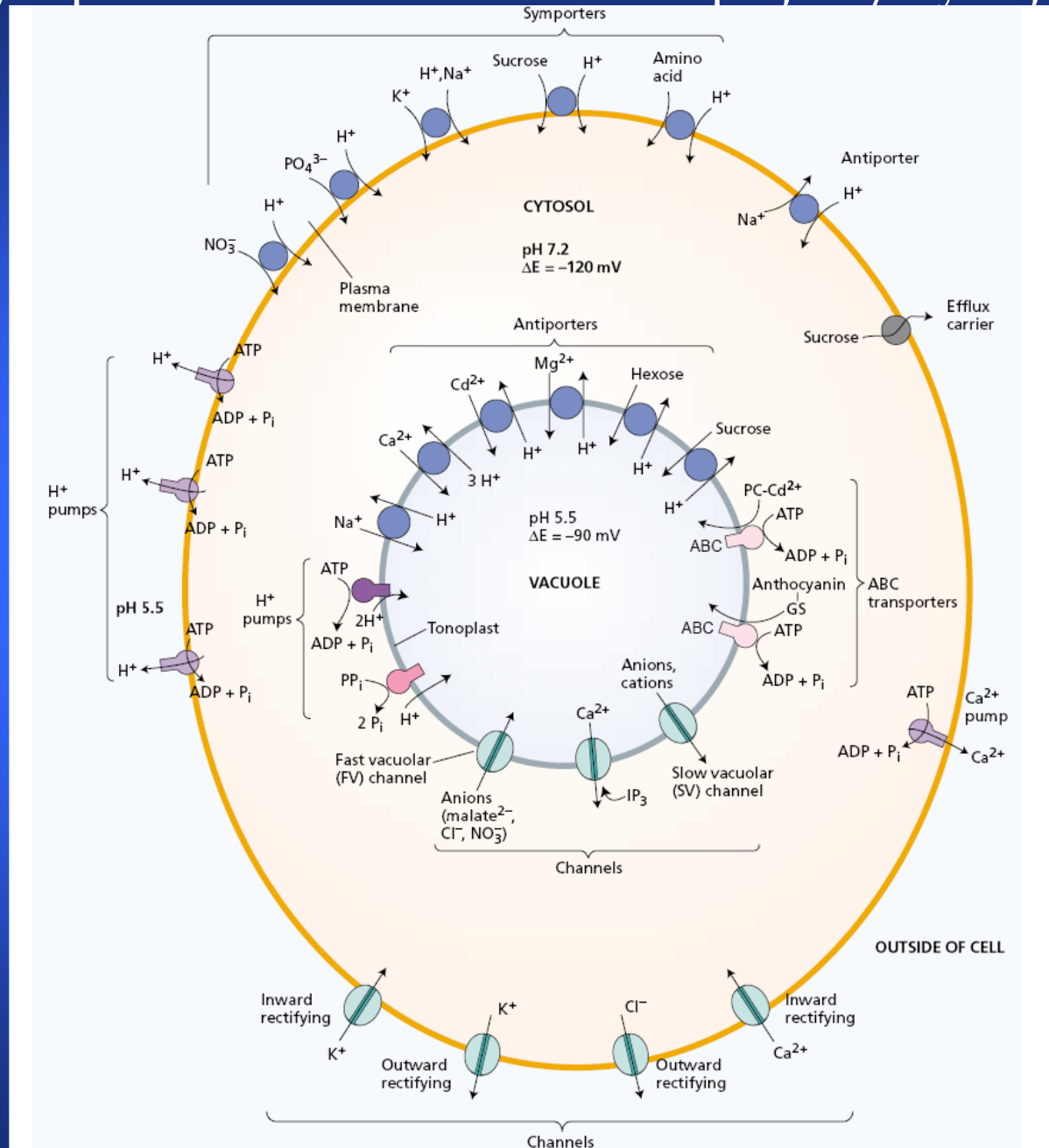


V membránach sa vytvárajú špecifické funkčné oblasti (teória **membránových raftov**).

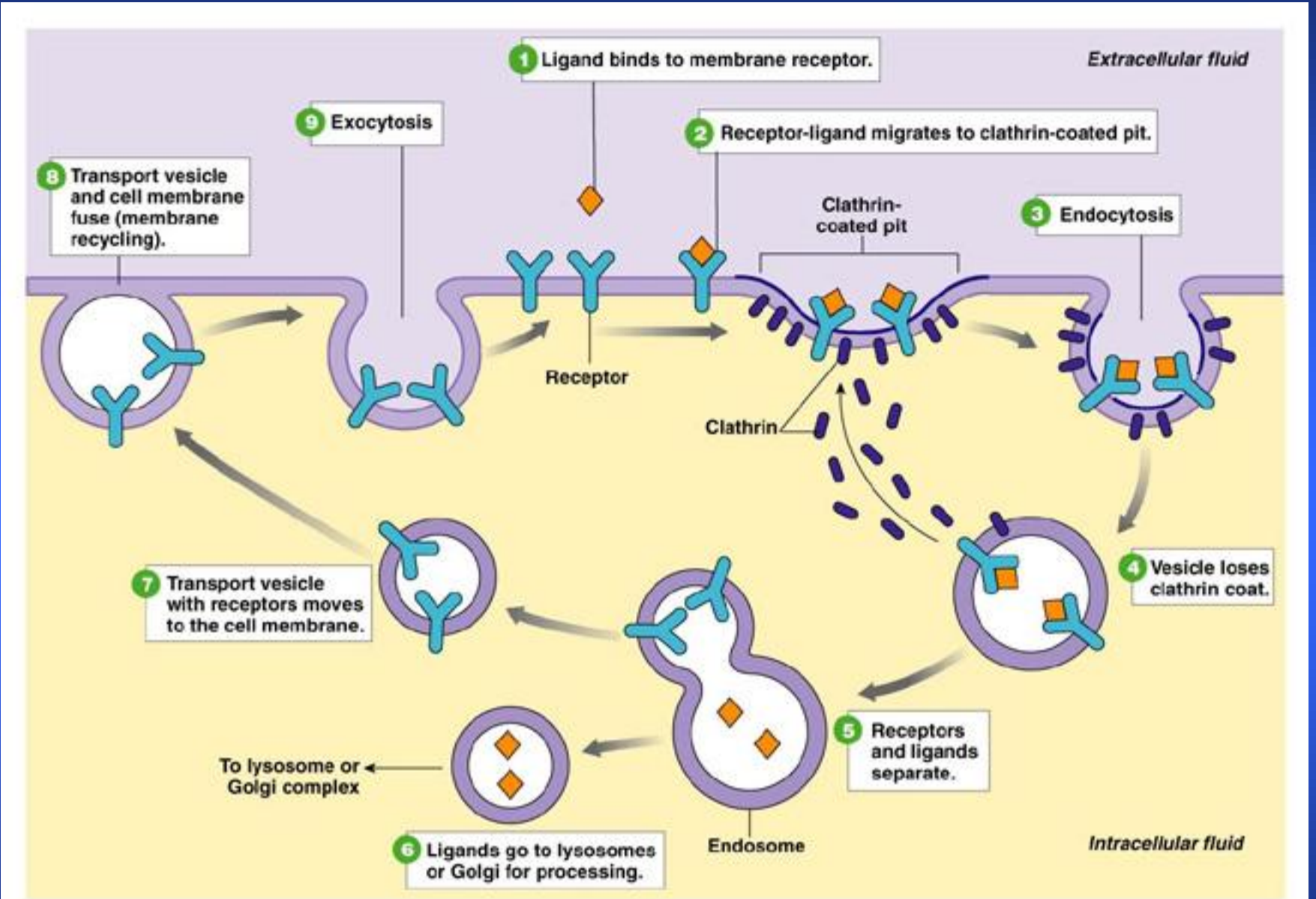
Vlastnosti membrán

- Mechanická opora bunky a jej komponentov
- Výmena látok medzi priestormi oddelenými membránou
- Semipermeabilita – selektívna priepustnosť
- Kompartmentalizácia – topologické hranice
- Zväčšenie povrchu
- Transformácia energie
- Signalizácia
- Komunikácia
- Morfogenéza

Cytoplazmatická membrána a príjem/výdaj látok



Endocytóza – pinocytóza, fagocytóza, receptormi-sprostredkovaná endocytóza



Použité zdroje sú Alberts et al., Cell Biology
Alberts et al., Essential Cell Biology
+ zdroje uvedené v informačnom liste alebo odkazy
priamo v prezentáciách k predmetu