

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:  
Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:  
Speciální chemicko-biologické obory



**Pavλίna Mikláńková**

Role cytoskeletu v morfogenezi rostlinných buňek

Role of cytoskeleton in plant cell morphogenesis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:  
RNDr. Kateřina Schwarzzerová, PhD.

Praha, 2013

# **Obsah**

Abstrakt

Zoznam použitých skratiek

1. Úvod .....	6
2. Aktín .....	7
2.1. Usporiadanie aktínu v rastlinných bunkách .....	7
2.2. Nukleácia aktínu .....	8
2.2.1. Arp2/3 komplex .....	9
2.2.2. Formíny .....	11
2.3. Aktín a vrcholový rast .....	12
2.4. Aktín a difúzny rast .....	12
3. Mikrotubuly .....	13
3.1. Nukleácia mikrotubulov .....	14
3.2. Delenie bunky a preprofázový prstenec .....	16
3.3. Kortikálne mikrotubuly a bunečná stena .....	17
4. Endoreduplikácia .....	20
5. Trichómy .....	21
5.1. Expanzia a tvorba tubulárneho výrastku .....	23
5.2. Iniciácia vetvenia .....	23
5.3. Predlžovanie vetví .....	24
5.4. Dospievanie bunky .....	25
6. Epidermálne a mezofylové bunky .....	25
6.1. Mezofylové bunky .....	25
6.2. Pokožkové bunky .....	26
6.2.1. Regulácia morfogénzy pokožkových buniek .....	29
7. Záver .....	32
Použitá literatúra .....	33

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne s použitím citovanej literatúry pod vedením RNDr. Kateřiny Schwarzerovej, PhD. a súhlasím s jej zverejnením.

V Prahe dňa 8.5.2013

Pavλίna Mikláňková

Na úvod by som rada poďakovala svojej školiteľke RNDr. Kateřine Schwarzerovej, PhD. za ochotnú pomoc a cenné rady pri vypracovaní bakalárskej práce.

## **Abstrakt**

Bunky sú schopné nadobúdať nepreberné množstvo tvarov, v čom hrá dôležitú úlohu cytoskelet. Ovpľyňuje depozíciu materiálov bunečnej steny, reguluje pohyb váčkov po bunke, podieľa sa na exocytóze a endocytóze. Kortikálne mikrotubuly ovplyvňujú ukladanie celulózy do bunečnej steny a tým udávajú smer bunečnej expanzie, hoci presný súvis medzi mikrotubulami a celulózou zostáva nevyjasnený. Aktín podporuje rast a prispieva k jeho priestorovej regulácii vo vrcholovo aj difúzne rastúcich bunkách. Je dôležitý pri sekrécii v expandujúcich bunkách, ale jeho presné funkcie pri riadení bunečného rastu nie sú ešte celkom vysvetlené. Pre lepšie pochopenie, ako spolu súvisia aktínový a mikrotubulárny cytoskelet v morfogéneze rastlinných buniek, sa používajú analýzy mutantov, spektroskopické metódy, cytoskeletárne jedy, fluorescenčné proteíny a ďalšie metódy. Dobrým modelom pre výskum sú epidermálne a trichómové bunky *Arabidopsis thaliana*, na ktorých prebieha väčšina štúdií.

**Kľúčové slová:** mikrotubuly, aktín, trichómy, epidermálne bunky, celulóza, bunečná stena, morfogéneza, cytoskelet, rastlinná bunka

## **Abstract**

The cells are able to acquire variety of shapes, in which cytoskeleton plays an important role. Cytoskeleton influences deposition of cell wall materials, regulates vesicle movement in cell, participates in exocytosis and endocytosis. Cortical microtubules affect cellulose accumulation in cell wall and determine direction of cell expansion, although the exact connection between microtubules and cellulose remains unclear. Actin promotes growth and contributes to its spatial regulation in both tip and diffuse growing cells. Actin is important for secretion in expanding cells but its exact functions in cell growth regulation are not explained yet. Analysis of mutants, spectroscopic methods, cytoskeletal drugs, fluorescence proteins and other methods are used to better understand how actin and microtubule cytoskeleton are integrated during plant cell morphogenesis. Epidermal and trichome cells of *Arabidopsis thaliana* are a good model of research and they are used for most studies.

**Key words:** microtubules, actin, epidermal cells, cellulose, cell wall, morphogenesis, cytoskeleton, plant cell

## **Zoznam použitých skratiek**

ABP – actin.binding protein

ADF – actin-depolymerizing factor

ARP2/3 – actin-replated protein 2/3

AtFH1 – Formin 1 of Arabidopsis thaliana

ATP – adenzíntrifosfát

CESA – Celulose synthase complex

CESA6 – Celulose synthase A catalytic subunit 6

CMF – cortical microtubules

CRIB – Cdc42/ Rac interactive binding

CSC – Celulose synthase complex

CSII – cellulose synthases interacting protein

DNA – deoxyribonucleid acid

F-aktín – filamentárny aktín

FH1 – Formin homology 1 domain

FH2 – Formin homology 2 domain

G2 fáza – pre-mitotická fáza

G-aktín – globulárny aktín

MT – mikrotubuly

MTOC – microtubule-organizing centre

p60 – 60kDa veľká pojednotka katanínu

p80 – 80kDa veľká pojednotka katanínu

PPB – preprophase band

Rho GEF – structural domain of guanine nucleotide exchange factors for Rho/Rac/Cdc42-like GTPases

Rho GTPáza – Ras homology gene family guanosine triphosphate hydrolase

RIC – ROP - interactive CRIB motif-containing proteins

RIC1-GFP - ROP-interactive CRIB motif-containing protein 1 fused with green fluorescence protein

ROP – Rho of plants

ROP GTPáza – Rho of plants guanosine triphosphate hydrolase

S fáza – fáza syntézy

SCAR/WAVE - Suppressor of cyclic AMP receptor / Wiskott-Aldrich syndrome protein family Verprolin-homologous protein)

Spc97 – Spindle pole body component 97

Spc98 – Spindle pole body component 98

STI - stichel

*tan - tangled*

## **1. Úvod**

Rastlinné bunky sa všeobecne vyznačujú tým, že nie sú schopné pohybovať sa. Sú obklopené bunečnou stenou, ktorá znemožňuje ich pohyb. Bunky sú teda uzatvorené v pletivách a ich morfogénéza je daná tým, ako rastú a ktorým smerom sa delia. Z tohto dôvodu musia byť tieto procesy veľmi dobre regulované a na tejto regulácii sa vo veľkej miere podieľa cytoskelet, ktorý určuje smer rastu aj delenia. Bunky proliferujú hlavne vďaka symetrickému deleniu, asymetrické delenie je spojené s novými vývojovými bunečnými typmi. Symetrické delenie podstupujú napríklad bunky v pletivách, kde sú zoradené za sebou, asymetricky sa delia pokožkové bunky pri vzniku prieduchov alebo embryo pri prvom delení. Po delení nasleduje rast – izotropný, ktorým rastie väčšina rastlinných buniek, alebo vrcholový, ktorý sa odohráva v špecializovaných bunkách a zahŕňa ďalšie úrovne regulácie, napríklad aj lokálne rozvoľnenie bunečnej steny. Aj v procesoch rastu sa významnou mierou uplatňuje cytoskelet.

Výsledky prvých výskumov v 60. rokoch minulého storočia priniesli základné poznatky o procesoch prebiehajúcich v rastúcej bunke a o spôsoboch, ktorými sú bunky schopné nadobudnúť mnoho odlišných tvarov. V posledných rokoch je týmto témam venovaných stále viac výskumov a informácii ohľadom bunečnej morfogénézy pribúda. V tejto práci som sa zamerala hlavne na cytoskelet a jeho úlohu v regulácii morfogénézy rastlinnej bunky.

## **2. Aktín**

Aktínový cytoskelet je komplexná dynamická štruktúra prítomná vo všetkých eukaryotických bunkách. Základnými štruktúrnymi jednotkami sú monoméroy G-aktínu (globular), ktoré polymerujú na plus konci a vytvárajú vlákna F-aktínu (filamentous).

Aktín má mnoho rôznych funkcií – slúži ako kostra bunky, účastní sa vo veľkom počte fyziologických procesov vrátane delenia bunky, expanzie, pohybu, dopravy organel, endo- a exocytózy ako aj signálnej transdukcie.

### **2.1. Usporiadanie aktínu v rastlinných bunkách**

V bunke je zostavovanie a rozpadanie vlákien aktínu podporované množstvom proteínov, ktoré sa viažu k aktínu (actin-binding proteins - ABPs). Zahŕňa to priestorovú reguláciu pomocou nukleačných a depolymerizačných proteínov, proteínov ktoré stabilizujú F-aktín, oddeľujú G-aktín, regulujú rozpad a tvorbu čiapočky (Dos Remedios et al., 2003). Medzi proteínmi, ktoré regulujú dynamiku aktínu, hrajú nepochybne dôležitú úlohu formíny a ARP2/3 komplex, ktoré riadia iniciáciu nových vetvených aj nevetvených vlákien (Li et al., 2003; Martiniere et al., 2011). Medzi ďalšie dôležité proteíny patria napríklad proteíny rodiny aktín-depolymerizujúcich faktorov (ADF)/cofilín, ktoré zvyšujú obrat aktínových vlákien (Van Troys et al., 2008), alebo proteíny rodiny profilínov. Tie sa pripájajú na monoméry aktínu, čím vytvárajú komplex profilín-aktín, ktorý oddeľuje aktínové monoméry a zabraňuje ich polymerizácii. Profilín však tiež katalyzuje výmenu ATP za ADP na recyklovanom aktínovom monoméri. ATP-aktín má nižšiu kritickú koncentráciu, takže to podporuje polymerizáciu aktínu (Huang et al., 1996). Ďalší významný proteín je capping protein – čiapočkujúci proteín, ktorý sa pripája na rastúci koniec F-aktínu a stabilizuje ho, pretože stéricky bráni pridávaniu a disociácii G-aktínu z konca (Wang et al., 2012).

Ďalšia úroveň regulácie je zoradenie aktínových filament do štruktúr vyššieho rádu ako kolmé (ortogonálne) siete alebo rovnobežné zväzky vďaka špecializovaným ABPs, ktoré sú schopné prepojiť susediace vlákna bivalentným spojením aktínu (Kovar et al., 2001; Huang et al., 2005). Ide napríklad o fimbrín a vilín, ktoré spájajú aktín a tvoria zväzky, vilín je schopný ich aj oddeľovať.

V živočíšnych bunkách sú aktínové zväzky hlavné zložky mnohých špecializovaných bunčných štruktúr vrátane mikrovíl, stresových vlákien, filopódií a rastových vrcholov. Nedávne údaje ohľadom základných mechanizmov pre tvorbu zväzkov naznačujú, že živočíšne bunky používajú rozdielne kombinácie a sekvencie proteínov prepájajúcich aktín na

usporiadanie zväzkov s jednotnými vlastnosťami charakteristickými pre ich bunečné funkcie (Bartles, 2000).

Zatiaľ čo o aktíne v živočíšnych bunkách je pomerne dosť informácií, oveľa menej vieme o zväzkoch aktínu v rastlinných bunkách a ich asociovaných zväzkujúcich proteínov. Navyše sa tieto zväzky javia menej rozmanité vo veľkosti a tvare v porovnaní s ich analógmi v živočíšnych bunkách. Rastlinám tiež chýba množstvo zväzkujúcich proteínov vrátane forked, fascínu, espínu a quail (Hussey et al., 2002). Na druhej strane, boli identifikované minimálne 3 rodiny rastlinných aktín-zväzkujúcich proteínov – vilíny (Huang et al., 2005), fimbríny (Kovar et al., 2001) a elongačný faktor 1alfa (Gungabissoon et al., 2001), čo viedlo k názoru, že rastliny tiež vytvárajú aktínové zväzky s rozličnými vlastnosťami a funkciami.

V rastúcich rastlinných bunkách sú pozorovateľné silne zviazané aktínové vlákna rozmiestnené cez celú cytoplazmu a aj ako transvakuolárne povrazy. Poskytujú kostru, ktorá určuje pozíciu endoplazmatického retikula a sú zodpovedné za udržiavanie dráh pre transport organel na dlhé vzdialenosti. Na aktínových zväzkoch závisí transport chloroplastov (Sheahan et al., 2004), peroxizómov (Collings et al., 2003) a Golgiho aparátu (Nebenfuhr et al., 1999). Vo vakuolizovaných bunkách transport organel môže riadiť schopnosť buniek zdediť organely (Sheahan et al., 2004) alebo môže uspokojiť metabolické požiadavky bunky v určitom mieste.

Aktínové vlákna sprostredkujú krátkodobú recykláciu endozomálnych kompartmentov. Rastlinné bunky obsahujú aj kortikálne aktínové filamenta v blízkosti plazmatickej membrány. V mnohých bunečných typoch oblasti aktívnej expanzie bunky súvisia s prítomnosťou jemnej siete aktínových filament, ale organizácia aktínu in-vivo a funkcia kortikálneho aktínu zostáva záhadou.

## **2.2. Nukleácia aktínu**

Nukleácia aktínu je dôležitá pre všetky bunky, ale u rôznych typov buniek slúži na odlišné účely.

Nukleácia je vytvorenie nového aktínového vlákna z G-aktínu. Je regulovaná špecializovaným proteínmi a väčšinou neprebíha spontánne. Polymerizácia aktínu, rôzne procesy, ktoré ju zahŕňajú, a jej rozdielna kontrola u živočíšnych a rastlinných buniek prináša náhľad na to, ako cytoskelet prispieva k bunečnému osudu a okrem iného aj k nadobúdaniu tvaru.



Pre živočíšne bunky je podstatný pohyb, keďže sú obalené iba plazmatickou membránou a sú schopné udržať si plasticitu (Small et al., 2002). Ale keď je bunka uzavretá v bunečnej stene, ako je to v mnohých rastlinných bunkách, stráca tvarovú flexibilitu aj schopnosť pohybu. Bunky obalené bunečnou stenou sú teda schopné iba rásť. Pohyb živočíšnych buniek a expanzia rastlinných buniek rastom sú teda veľmi odlišné procesy.

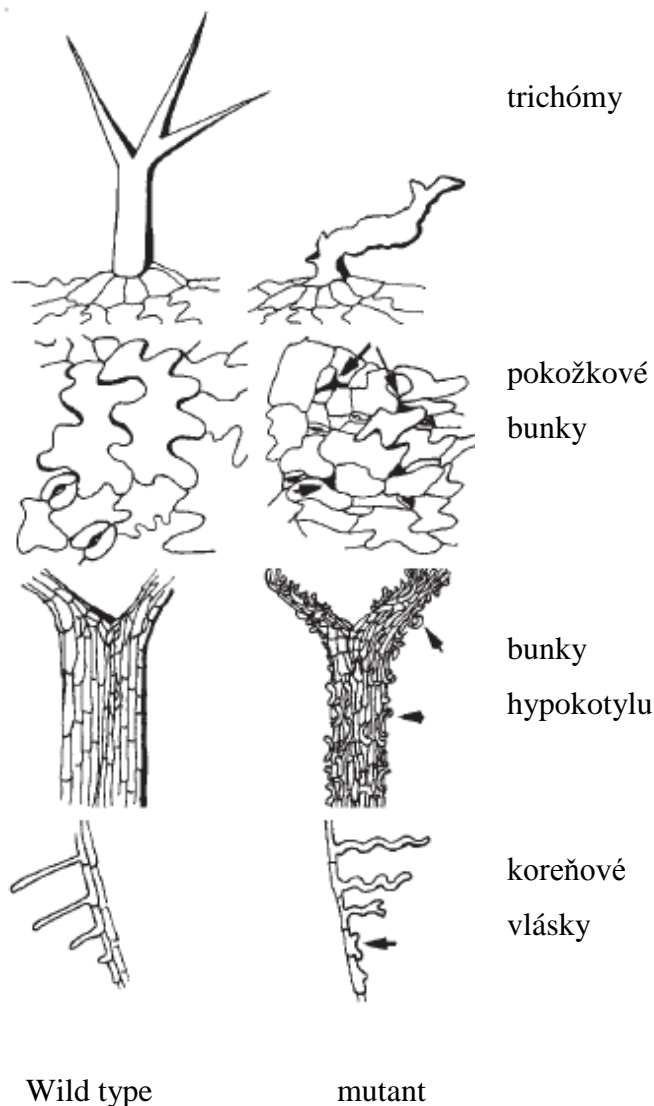
### **2.2.1. ARP2/3 komplex**

Pohyb živočíšnych buniek závisí na lokalizovaných výbežkoch membrány a je úzko spojený s dynamikou cytoskeletu (Small et al., 2002). Vyčnievanie membrány je snád spojené so základným typom pohybu založeným na polymerizácii aktínu, ktorý sa dá pozorovať u niektorých mikroorganizmov (Cossart et al., 2000). K pohybu dochádza napríklad vďaka filopódiám – dlhým výstupkom membrány, vytvorených z dlhých nevetvených paralelných aktínových zväzkov, často spojených s tropomyozínom a fascínom; alebo lamelipódiám - širokým plochým výčnelkom, ktoré obsahujú rozvetvenú sieť tenkých krátkych aktínových filament (Small et al., 2002). Nedávne štúdie odhalili, že určité znaky na molekulárnej úrovni v expandujúcich nepohyblivých rastlinných bunkách sú veľmi podobné tým v pohyblivých živočíšnych bunkách (Smith & Li, 2004). Ukázalo sa, že jedna takáto molekulárna súčasť, ARP2/3 komplex (actin related protein 2/3), ktorá sa až doposiaľ týkala hlavne pohybu (Cossart, 2000), hrá kľúčovú úlohu pri determinácii tvaru bunky u vyšších rastlín (Mathur et al., 2003). Hoci ARP2/3 komplex nebol izolovaný a biochemicky charakterizovaný a stále je nejasné, či sú jeho zloženie a funkcia rovnaké ako u iných organizmov, komplementácia sekvenčných homológov mutantov *Arabidopsis* príslušnými živočíšnymi homológmi (Mathur et al., 2003) a aj nahradenie kvasinkových mutantov rastlinnými homológmi (El-Din El-Assal et al., 2004) nasvedčuje vysokému stupňu funkčnej konzervovanosti tohto komplexu v rastlinách.

ARP2/3 komplex pozostáva zo 7 podjednotiek (Mullins et al., 1998), bol prvýkrát objavený v *Acanthamoeba castellanii* (Machesky et al., 1994) a dodnes bol identifikovaný u rôznych organizmov (Vartiainen & Machesky, 2004). Podporuje nukleáciu a polymerizáciu aktínu a iniciuje vytváranie dynamického dendritického zoskupenia F-aktínu tým, že sa pripojí na už existujúce aktínové vlákno charakteristicky pod uhlom 70° (Mullins, et al., 1998).

Zlyhanie funkcie komplexu vedie k množstvu bunečných porúch v rozličných organizmoch, v niektorých prípadoch aj k bunkám neschopným života (Morrell et al., 1999).

V genóme *Arabidopsis* sú zakódované homológy každej podjednotky (Li et al, 2003). Mutácie v štyroch podjednotkách, ktoré sú kódované skupinou génov „distorted“, spôsobujú fenotypy rovnakej závažnosti v klíčiach rastlín (Mathur et al., 2003). Dĺžka etiolovaných hypokotylov a veľkosť epidermálnych buniek v týchto mutantoch sú pomerne značne redukované v porovnaní s wild type (Mathur et al., 2003). V hypokotyloch (Mathur et al., 2003) a v pokožke klíčnych listov (El-Din El-Assal et al., 2004) sú jasne rozoznateľné medzery medzi priľahlými bunkami týchto mutantov (obr.1). Bola navrhnutá hypotéza, že neschopnosť buniek adherovať môže byť spôsobená neschopnosťou mutantov transportovať proteíny asociované s organelami, ktoré regulujú adhezívne vlastnosti bunečnej steny (Mathur et al., 2003).



Obr. 1:  
Diagramatické znázornenie štyroch modelových bunečných typov z wild-type *Arabidopsis* a štyroch identifikovaných ARP mutantov ukazuje typické poruchy tvaru buniek, ktoré vznikajú v mutantoch. Mutantné trichómy sú zdeformované, zatiaľčo pokožkové bunky a bunky hypokotylu strácajú kontakt so susediacimi bunkami a majú medzi sebou medzery (vyznačené šípkami). Expanzia a pokrútenie hypokotylu (šípky) ako aj poruchy ohýbania a elongácie koreňových vlásokov môžu byť umocnené zmenou rastových podmienok mutantov. Niekedy môže byť v mutantných trichoblastoch (iniciálach koreňových vlásokov) viditeľný viac ako jeden bod vrcholového rastu (šípka).  
Prevzaté z Mathur, 2005

V živočíšnych bunkách je ARP2/3 komplex regulovaný mnohými proteínmi a proteínovými komplexami (Stradal et al., 2004). V rastlinách však bola nájdená iba jediná aktivačná dráha. Ide o regulačný komplex, ktorý zahŕňa aktivačné SCAR (Suppressor of cAMP receptor from Dictyostelium) / WAVE (Wiskott - Aldrich syndrome protein family Verprolin-homologous protein) proteíny (Eden et al., 2002). Tieto proteíny sú charakterizované VCA oblasťou (verproline homology connecting acidic domain), ktorá sa napája na ARP2/3 komplex a indukuje vetvenie aktínových filament (Millard et al., 2004).

Aktivácia ARP2/3 komplexu prostredníctvom SCAR/WAVE je iniciovaná spustením molekulárnych spínačov ako Rho-GTPázy (Millard et al., 2004). V živočíšnych systémoch sú Rho proteíny aktivované špecifickými GTPázovými aktivátormi (ako Rho GEFs - Guanine nucleotide Exchange Factors). Rastliny majú len jednu rodinu Rho GTPáz, ROP (Rho of Plants), ktoré majú analogickú funkciu ako Rho u živočíšnych buniek (Fu et al., 2002).

### **2.2.2. Formíny**

Formíny predstavujú druhú hlavnú skupinu nukleátorov aktínu, ktoré stimulujú de novo nukleáciu a predlžovanie na plus konci. Živočíšne formíny čiastočne prikrývajú rastúci plus koniec (Kovar et al., 2003), ale v niektorých prípadoch môžu zrýchliť inkorporáciu monomérov do vlákna aktínu (Romero et al., 2004).

V rastlinných bunkách sú rozličné rodiny formínov, táto rozmanitosť vznikla v skorej evolúcii suchozemských rastlín (Grunt et al., 2008). Napríklad *Arabidopsis thaliana* obsahuje viac ako 20 formínových izoforiem. Tie sú rozdelené podľa sekvenčnej podobnosti a doménovej štruktúry do dvoch skupín – I a II. Podobne ako ich homológy u húb a živočíchov, homológne domény 1 a 2 (FH1 a FH2) formínov skupiny I modifikujú aktínovú dynamiku. In vitro boli skúmané aktivity niekoľkých izoforiem – výsledkom bolo zistenie, že sú zodpovedné za nukleáciu F-aktínu, zväzkovanie, uvoľňovanie a pridávanie koncovej čiapočky (Yi et al., 2005). FH1-FH2 jednotka ustanovuje polymerizáciu vlákien ale neasociuje s plus koncom dlhodobo, má totižto schopnosť podporiť zväzkovanie F-aktínu prostredníctvom procesu „zipsovania“ (Michelot et al., 2006). FH1-FH2 jednotka je schopná zároveň nukleovať a zväzkovať vlákna in vitro a vytvárať tak aktínové káble.

V *Arabidopsis* je hlavným housekeepingovým formínom – exprimovaným vo všetkých bunkách a potrebným pre ich základné funkcie – zo skupiny I AtFH1 (Michelot et al., 2006). Má typickú štruktúru skupiny I, asociuje s membránami (Cheung & Wu, 2004) a jeho extracelulárna doména môže kotviť aktínový cytoskelet naprieč plazmatickou

membránou do bunecnej steny (Martiniere et al., 2011). AtFH1 nukleuje a zväzkuje aktín, (Michelot et al., 2006) a nebol opísaný žiadny rozpoznateľný fenotyp v mutantoch bez AtFH1 (Cheung & Wu, 2004).

### **2.3. Aktín a vrcholový rast**

Funkcie F-aktínu v bunecnom raste sú dávno známe a boli objasnené skôr než úloha aktínu v difúznom raste, preto by stálo za to sa o ňom zmieniť.

Vrcholový rast je forma polarizovaného rastu buniek, výsledkom ktorého je predĺžená cylindrická bunka s okrúhlym vrcholom, kde prebieha rast a expanzia. U rastlín sú typickým príkladom pre vrcholový rast peľové bunky a koreňové vlásky. Vrcholový rast je riadený hlavne F-aktínom. Štruktúra F-aktínu v apikálnej oblasti bunky môže byť rôzna – od hustej sieťoviny po rozptýlené jemné vlákna (Kropf et al., 1998). Funkcie aktínu v rastúcej oblasti bunky sú tiež rozličné - napríklad riadenie pohybu vačkov, ktoré dopravujú materiál pre výstavbu plazmatickej membrány a bunecnej steny do vrcholu. To prebieha cytoplazmatickým prúdením vačkov vďaka molekulárnym motorom myozínom (Hepler et al., 2001).

Závislosť bunecného rastu na F-aktíne bola prvýkrát pozorovaná práve vo vrcholovo rastúcich bunkách (Baluška et al., 2001). Štúdie vrcholového rastu prebiehali pomocou cytoskeletárnych jedov – po aplikácii aktín depolymerizujúcich drôg, cytochalasínov a latrunkulínov došlo k zastaveniu rastu.

Gibbon a Vidali a spol. zistili, že po aplikácii nízkych koncentrácií aktín depolymerizujúcich drôg môže byť inhibovaný rast (napríklad u peľových zrn a koreňových vláskov) bez zastavenia cytoplazmatického prúdenia. Jemný subapikálny aktínový limec bol degradovaný, ale pozdĺžne aktínové povrazce neboli narušené. Oblasť cytoplazmy bohatá na vačky, ktorá sa za normálnych okolností nachádza v apexe, bola narušená. Citlivosť subapikálnych aktínových filament na cytoskeletárne jedy nasvedčuje tomu, že sú viac dynamické ako pozdĺžne F-aktínové povrazce (Gibbon et al., 1999; Vidali et al., 2001)

### **2.4. Aktín a difúzny rast**

Až donedávna sa štúdie na rolu F-aktínu v bunecnom raste sústredili hlavne na vrcholový rast.

Vrcholový a difúzny rast boli brané do úvahy ako dva odlišné mechanistické procesy rastu, ale dnes je jasné, že majú veľa spoločného s prihliadnutím na reguláciu dynamiky F-

aktínu a tiež na funkciu F-aktínu v podporovaní rastu. F-aktín teda hrá významnú úlohu aj v difúznom raste, ktorý je pozorovaný u väčšiny buniek.

Difúzny rast bunky je typ rastu, pri ktorom bunka expanduje rovnomerne po celom svojom povrchu. Inkorporácia nového materiálu do bunečnej steny a jej rozširovanie je tiež celoplošné. Týmto rastom rastie väčšina rastlinných buniek.

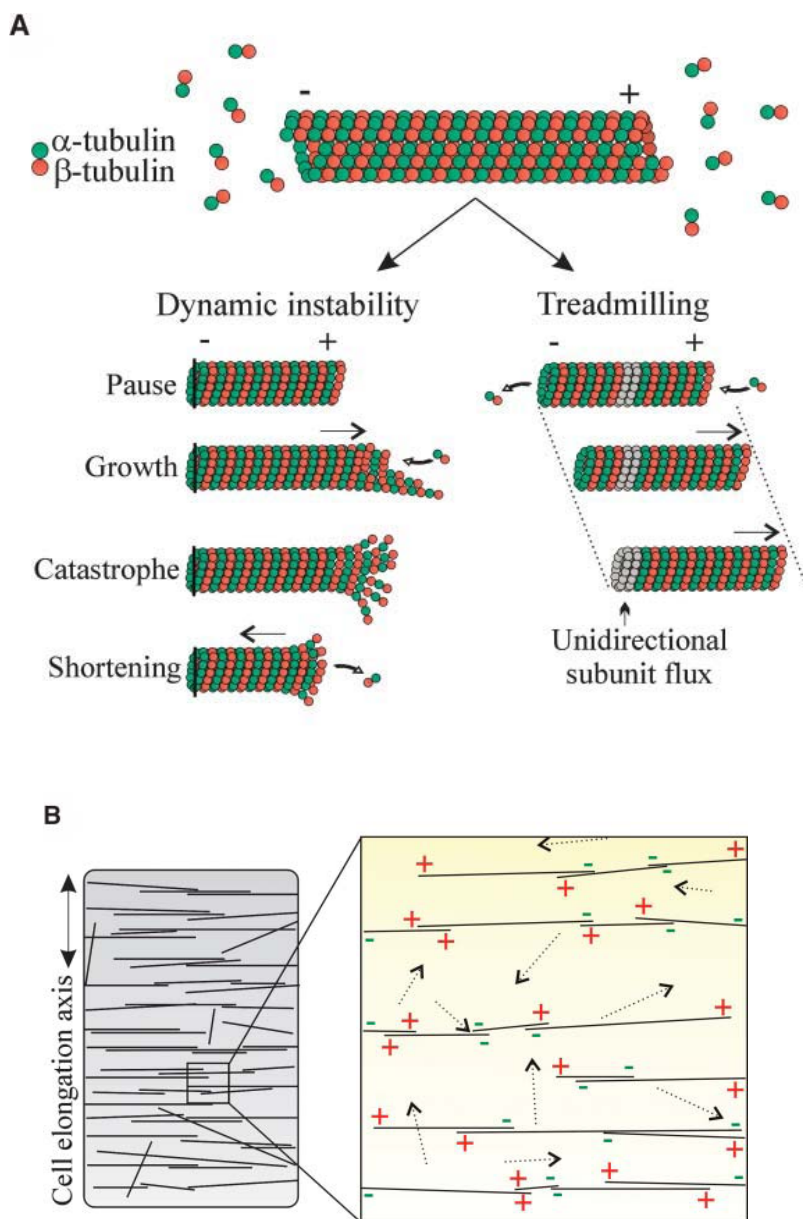
V difúzne rastúcich bunkách aktínové povrazce prenikajú cez cytoplazmu a napomáhajú cytoplazmatickému prúdeniu podobne, ako vo vrcholovo rastúcich bunkách a riadia pohyb rozličných organel. Niektorí autori navrhli, že cytoplazmatický aktín je dôležitý pre správne zacielenie vačkov od Golgi do bunečnej steny difúzne rastúcich buniek, tak ako je to u vrcholového rastu (Baskin & Bivens 1995, Dong et al. 2001). Po aplikácii aktín depolymerizujúcich jedov totiž došlo k zastaveniu difúzneho rastu, výsledkom čoho bol celkový zakrslý vzrast rastliny (Baluška et al., 2001).

Mnoho proteínov, ktoré sa pripájajú na aktín, má podobnú úlohu v difúznej expanzii bunky a vo vrcholovom raste *in vivo*. Napríklad nadmerná expresia aktín-depolymerizujúceho faktoru (ADF) narušuje cytoplazmatické aktínové povrazce a obmedzuje expanziu difúzne rastúcich buniek a koreňových vlásokov, zatiaľ čo výsledkom antisense inhibície ADF je zvýšená hustota cytoplazmatického aktínu a nadmerná expanzia oboch typov buniek (Dong et al. 2001).

### **3. Mikrotubuly**

Mikrotubuly sú polárne štruktúry – polarita je daná usporiadaním alfa a beta podjednotiek počas polymerizácie. Na plus konci dochádza k rýchlej polymerizácii, mínus koniec rastie pomaly. Dynamika zostavovania mikrotubulov je charakterizovaná periódami polymerizácie (predlžovanie MT) a depolymerizácie (skracovanie MT). Ak sú mikrotubulárne mínus konce zakotvené v nukleačných miestach, iba nechránené plus konce vykazujú dynamickú nestabilitu. Ak nie sú zakotvené, je polymerizačná dynamika pozorovaná aj u nich (Dixit & Cyr, 2004).

Regulácia dynamickej nestability na koncoch neukotvených mikrotubulov môže viesť k špeciálnemu prípadu, nazývanému microtubule treadmilling. Vtedy mikrotubuly typicky vykazujú sieťovú polymerizáciu na ich plus koncoch a sieťovú depolymerizáciu na mínus koncoch. Výsledkom toho je tok podjednotiek z plus konca k mínus koncu mikrotubulov a smerovaná repozícia mikrotubulov v čase (Margolis & Wilson, 1981) (obr.2).



Obr.2:

(A) Mikrotubuly sú zložené z  $\alpha$  a  $\beta$  tubulínových heterodimérov, ktoré po usporiadaní vytvoria mikrotubulus tak, že na jednom jeho konci sú  $\alpha$  podjednotky a na druhom  $\beta$ . Mikrotubulus obsahuje 13 protofilament a má priemer 25 nm.  $\beta$ -tubulínový koniec je plus koniec, je dynamickejší a rastie rýchlejšie. V podmienkach, keď sú mínus konce zakotvené, iba plus konce sú dynamické a vykazujú periódy rastu a skracovania. Ak sú oba konce voľne prístupné solubilným tubulínovým podjednotkám, môže dochádzať k javu zvanému microtubule treadmilling, ktorý vedie k zjavnému premiestneniu polyméru v čase

(B) Rastlinné CMTs vytvárajú zväzky podľa rôznych vzorov. V elongujúcej bunke sú orientované kolmo na smer rastu. Jednotlivé CMTs sú relatívne krátke. CMTs v elongujúcej bunke sa usporiadávajú náhodne (zobrazené bodkovanými šípkami), ale táto nesúhlasná orientácia nevydrží dlho. Okrem toho paralelné usporiadanie CMTs nie je založené na jednosmernej orientácii plus koncov. Preto nukleácia a organizácia CMT nie sú v rastlinných bunkách úzko prepojené.  
Prevzaté z Dixit & Cyr, 2004.

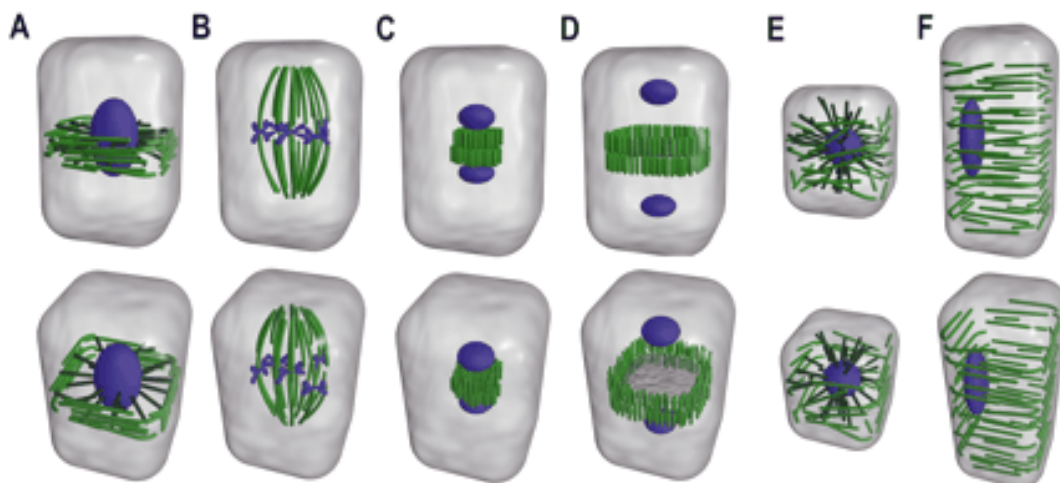
### 3.1. Nukleácia mikrotubulov

V živočíšnych bunkách začína nukleácia mikrotubulov typicky z centrozómu. Je to hlavné centrum pre organizáciu mikrotubulov (MTOC) zložené z dvoch kolmo usporiadaných centriol, ktoré pozostávajú z tripletov mikrotubulov. Sú v ňom ukotvené mínus koncami a vychádzajú z neho radiálne plus koncami smerom k periférii bunky. Preto je v týchto bunkách nukleácia mikrotubulov úzko spojená s ich organizáciou. Podstatnou súčasťou nukleácie mikrotubulov v MTOCs je  $\gamma$ -tubulín, tretí proteín rodiny tubulínov (Job et al., 2003). Okrem zásoby  $\gamma$ -tubulínu v centrozóme je väčšina solubilného cytoplazmatického  $\gamma$ -

tubulínu súčasťou veľkých komplexov nazývaných prstencové  $\gamma$ -tubulínové komplexy, ktoré obsahujú 10-13 molekúl  $\gamma$ -tubulínu v každom komplexe a minimálne 8 ďalších proteínov. Boli objavené aj menšie komplexy - malé  $\gamma$ -tubulínové komplexy, ktoré sú súčasťou veľkého prstencového komplexu. U *Saccharomyces cerevisiae* pozostávajú z dvoch  $\gamma$ -tubulínových molekúl a dvoch príbuzných proteínov Spc97 a Spc98 (Kollman et al., 2010).

Rastlinné bunky však nemajú centrozóm. Mikrotubuly sa organizujú na povrchu jadra a v rôznych oblastiach bunecného kortexu. Aj nukleácia rastlinných mikrotubulov je však závislá na  $\gamma$ -tubulíne.

U rastlín je úloha  $\gamma$ -tubulínu stále nie celkom vyjasnenou otázkou. Rastlinný  $\gamma$ -tubulín je prítomný v proteínových komplexoch rôznych veľkostí napríklad v kukurici (*Zea mays*), alebo vo veľkých komplexoch u *Arabidopsis*, ktoré majú nukleačnú aktivitu (Drykova et al., 2003). Štúdia zameraná na subcelulárnu lokalizáciu rastlinného homológu Spc98 priniesla dôkaz o účasti  $\gamma$ -tubulínu na nukleácii mikrotubulov u rastlín. Spc98 homológ je vyžadovaný pre nukleáciu mikrotubulov na izolovanom jadre rastlinnej bunky a je umiestnený na rovnakom mieste jadrového obalu, ako  $\gamma$ -tubulín (Erhardt et al., 2002), čo by mohlo indikovať podobnú funkciu.  $\gamma$ -tubulín však okrem toho, že sa vyskytuje v určených nukleačných miestach asociuje so všetkými zoskupeniami mikrotubulov a nie je obmedzený len na mínus konce mikrotubulov, čo by sa dalo očakávať od proteínu zahrnutého v nukleácii (Panteris et al., 2000). Murata et al. (2005) demonštrovali na bezbunecnom systéme, že táto neobvyklá lokalizácia  $\gamma$ -tubulínu na CMTs predstavuje miesta nukleácie po stranách existujúcich mikrotubulov, výsledkom čoho sú rozvetvené štruktúry. Hoci v takomto nebunecnom systéme sa môže mnoho parametrov značne líšiť od podmienok in vivo (napríklad lokálne koncentrácie tubulínu), tieto výsledky poskytujú priamy dôkaz toho, že  $\gamma$ -tubulín je zahrnutý do nukleácie CMTs.



Obr. 3: Schématické znázornenie zväzkov mikrotubulov počas bunecného cyklu.

A – PPB pripojený k jadru mikrotubulami vyznačuje budúcu rovinu delenia

B – Metafázové mitotické vretienko

C – V telofáze sa vytvára fragmoplast ako koncentrovaný valček mikrotubulov medzi dcérskymi jadrami

D – Fragmoplast centrifugálne expanduje a vedie bunecnú dosku k miestam pripojenia, kde bol predtým PPB.

E – Po dokončení cytokinézy sa mikrotubuly rozširujú od jadra smerom k bunecnému kortexu a objavujú sa mikrotubuly asociované s cytoplazmatickou membránou.

F – CMT usporiadané v paralelných zväzkoch počas elongácie v terminálne diferencujúcich bunkách. Orientujú sa prevažne kolmo k osi expanzie.

Prevzaté z Wasteneys, 2002

### 3.2. Delenie bunky a PPB

Ako už bolo spomenuté, v rastlinách sú bunky ohraničené bunecnou stenou a teda nie sú schopné migrácie. Konečné umiestnenie buniek je dané už pri cytokinéze, keď vznikajú dcérske bunky. Správna orientácia rovín delenia je preto rozhodujúca pri organizácii buniek do rastlinných pletív. Na rozdiel od väčšiny ostatných eukaryotických buniek sú roviny delenia rastlinných buniek ustanovené ešte pred mitózou. Počas S alebo G2 fázy bunecného cyklu tvorí väčšina rastlinných buniek kortikálny kruh z mikrotubulov a F-aktínu nazývaný preprofázový prstenec (PPB), ktorý typicky obklopuje jadro a určuje miesto rozdelenia bunky (Mineyuki, 1999). PPB pretrváva počas profázy ale je degradovaný pri rozpade jadrového obalu, keď sa vytvára mitotické vretienko (Dixit & Cyr, 2002). Počas cytokinézy sa začína vytvárať nová bunecná stena (bunecná doska) vďaka činnosti fragmoplastu – ďalšej štruktúre založenej na F-aktíne a mikrotubuloch. Fragmoplast je diskovitého tvaru, je umiestnený medzi dcérskymi jadrami a expanduje laterálne až do ukončenia cytokinézy. Sprevádza pripojenie bunecnej dosky k miestu, kde bol predtým PPB (Gunning, 1982) (obr.3).

Pozorovania, že PPBs presne predpovedajú umiestnenie budúcej bunecnej dosky v rozličných rastlinných bunecných typoch, nasvedčujú tomu, že PPB hrá kľúčovú úlohu



v ustanovení roviny delenia (Smith, 2001). Táto idea je podporená skutočnosťou, že laboratórne navodené poruchy PPB donútili bunky deliť sa v abnormálnych smeroch. Mnoho pozorovaní indikovalo, že na mieste, kde bol predtým PPB, je prítomný nejaký podnet a ten usmerňuje expanziu fragmoplastu do tejto oblasti (Smith, 2001). Napríklad ak je mitotické vretienko mechanicky odstránené z roviny definovanej PPB, fragmoplast často migruje späť do miesta, kde bol predtým PPB (Gunning and Wick, 1985). Navyše v niektorých bunčných typoch vretienka typicky rotujú do šikmého smeru počas mitózy. Keď k tomu dôjde, fragmoplast je spočiatku orientovaný šikmo, ale ako cytokinéza pokračuje, otočí sa tak, že bunčná doska sa pripojí na miesto, kde bol predtým PPB (Cleary & Smith, 1998). Preto sa dlho predpokladalo, že PPB počas profázy ustanovuje miesto kortikálneho delenia, ktoré vedie expandujúci fragmoplast počas cytokinézy (Smith, 2001)

Nedávne štúdie odhalili, že v priestorovej regulácii cytokinézy hrá dôležitú úlohu gén *tangled (tan)* (Smith et al., 2001). U *tan* mutantov kukurice sa bunky vo všetkých pletivách delili v abnormálnych smeroch kvôli tomu, že fragmoplast často nebol schopný doputovať k miestam, kde bol predtým PPB (Cleary & Smith, 1998). Proteín TAN u kukurice je veľmi bázičný a pripája sa k mikrotubulom in vitro, ale nie je príbuzný iným proteínom známej funkcie (Smith et al., 2001).

Po preskúmaní TANGLED homológu u *Arabidopsis* (AtTAN) vyšlo najavo, že tento proteín je transportovaný pomocou mikrotubulov a kinezínu do miesta kortikálneho delenia, kde je lokalizovaný spolu s PPB a pretrváva v mieste rozdeľovania aj po degradácii PPB. Okrem iného hrá rolu v usmerňovaní fragmoplastu. AtTAN je teda súčasťou kortikálneho podnetu, ktorý uchováva stopu PPB počas mitózy a cytokinézy (Walker et al., 2007).

### **3.3. Kortikálne mikrotubuly a bunčná stena**

Pre normálnu morfogézu rastlinných buniek sú dôležité kortikálne mikrotubuly (CMT). Sú to mikrotubuly, ktoré sa nachádzajú pod cytoplazmatickou membránou a vystužujú bunčný kortex – vrstvu cytoplazmy, ktorá slúži ako mechanická podpora pre plazmatickú membránu. Ovpływujú osi elongácie buniek a určujú roviny bunčného delenia. Ich funkcia je úzko spätá s ich organizačným stavom. Dynamika zostavovania CMT determinuje kedy, kde a ako sa mikrotubuly objavia v bunčnom kortexe a regulácia týchto dejov ovpływuje ich organizáciu. Napríklad počas interfázy sú CMT v rýchlo elongujúcej bunke usporiadané priečne k osi predlžovania. Keď sa rast bunky spomalí, CMT sa reorientujú prevažne šikmo alebo pozdĺžne vzhľadom k osi elongácie (Granger & Cyr, 2001).

Pokusy na CMT u *Arabidopsis* dokázali dynamickú nestabilitu: mínus konce CMT sú nechránené a vykazujú pomalú depolymerizáciu prerušovanú fázami inaktivity, na plus koncoch je pozorovaná dynamická nestabilita ovplyvnená polymerizáciou (Shaw et al., 2003).

Toto pozorovanie je dôkazom toho, že rastlinné CMT nie sú ukotvené svojimi mínus koncami, ale že dochádza k ich uvoľneniu z nukleačných miest (Shaw et al., 2003), pravdepodobne vďaka mikrotubuly-uvolňujúcemu proteínu katanínu. Jeho aktivita môže tiež zvyšovať hustotu mikrotubulov vytváraním počiatkov pre rast nových mikrotubulov.

Katanín je enzým, ktorý pozostáva z katalytickej podjednotky p60 a regulačnej podjednotky p80 a využíva energiu z ATP na uvoľňovanie mikrotubulov. Podjednotka p60 z *Arabidopsis* je schopná uvoľňovať mikrotubuly in vitro (Stoppin-Mellet et al., 2002). Nadmerná expresia p60 in vivo vedie k početným krátkym mikrotubulom vo zväzkoch, čo je pravdepodobne výsledok zvýšeného uvoľňovania mikrotubulov (Stoppin-Mellet et al., 2006). Pri absencii p60 mali mutanty abnormálne dlhé mikrotubuly ďaleko od seba, smerujúce radiálne z jadra a ich organizácia v kortexe bola narušená (Bouquin et al., 2003). Pre tvorbu neukotvených CMT s voľnými mínus koncami je teda potrebné uvoľnenie mikrotubulov.

Jedným z dôsledkov prítomnosti voľných mínus koncov je, že tieto mikrotubuly nezanechávajú pozičnú informáciu po úplnej depolymerizácii. Preto orientácia nasledujúcej generácie CMT nezávisí na predchádzajúcich mikrotubuloch a táto vlastnosť je pravdepodobne dôležitá pre tvorbu zoskupení CMT (Dixit & Cyr, 2004).

Regulované usporiadanie mikrotubulov do zväzkov prispieva k priestorovej organizácii CMT a k ich stabilite. Dixit a Cyr (2004) pozorovali, že keď sa polymerizujúci mikrotubulus blíži k existujúcemu mikrotubulu, výsledok interakcie závisí na uhle približovania. Ak sa jeden mikrotubulus blíži k druhému pod uhlom menším ako  $40^\circ$ , náhle zmení smer a je pripojený k zväzku CMT. Pri menších uhloch ako  $20^\circ$  sa mikrotubuly usporiadali do zväzkov na 100% - zväzkovanie teda nie je citlivé k polarite existujúcich mikrotubulov.

Najčastejšie citovaná funkcia zoskupení CMT je však regulácia usporiadania novo syntetizovaných celulóзовých mikrofibríl. Sieť celulóзовých mikrofibríl v bunečnej stene je totiž dôležitý faktor pri anizotropickej expanzii bunky, preto je ich orientácia a distribúcia v bunke prísne regulovaná. Celulóza je nevetvený neelastický polymér, ktorý odoláva značným tlakom. Orientácia celulózy v bunečnej stene teda určuje, akým smerom bunka porastie. Prvé experimenty odhalili, že usporiadanie celulóзовých mikrofibríl je závislé na kolchicíne (Green, 1962), čo viedlo k hypotéze, že cytoplazmatické vlákna určujú

usporiadanie týchto mikrofibríl. Z dodatočných elektrónmikroskopických snímok bolo zreteľné, že celulóзовé vlákna sa usporiadávajú rovnako ako mikrotubuly (Ledbetter & Porter, 1963). Tým bol podporený názor, že mikrotubuly môžu určovať smer biosyntézy celulózy.

Kombinované použitie pokročilej genetiky a zobrazovania živých buniek urýchlilo túto oblasť výskumu. Napríklad štúdiami na *Arabidopsis* boli identifikované gény, ktoré kódujú katalytické podjednotky CSC (celulose synthase complex) (Arioli et al., 1998; Scheible et al., 2001). Prielom nastal vytvorením fluorescenčných proteínov pripojených na podjednotku celulózasyntázy CESA6 a na tubulín s cieľom súčasne vizualizovať pohyblivé časti odpovedajúce CSCs a dynamickým CMTs (Paredes et al., 2006). Trajektórie pohybu CESA6 boli zhodné s umiestnením CMT a mikrotubulárnych zväzkov. Obojsmerný pohyb CSC po zväzkoch mikrotubulov a preferenčná lokalizácia komplexu rozptýlených mikrotubulov v bunkách, do ktorých bol aplikovaný oryzalín, nasvedčovala tomu, že CSCs sú nejakým spôsobom fyzicky prepojené s mikrotubulami. Tento návrh je podporovaný viacerými skutočnosťami - napríklad, že zložky, ktoré blokujú syntézu celulózy, narušujú zväzky mikrotubulov (Fisher & Cyr, 1998), alebo že mutácie v CSC rozrušujú mikrotubulárny cytoskelet a spôsobujú hypersenzitivitu k inhibítom polymerizácie mikrotubulov (Paredes et al., 2008). Naozaj, nedávno bol objavený proteín CSI1, ktorý ovplyvňuje organizáciu mikrotubulov a ich interakciu s komplexami CESA – pripája sa priamo na CESA podjednotky a mikrotubuly, asociuje s plazmatickou membránou a je dôležitý pre usporiadanie CESA komplexov (Li et al., 2012).

Presné molekulárne mechanizmy a podrobnosti a funkciu tohto proteínu však nie sú ešte celkom známe.

Proces riadenej syntézy celulóзовých mikrofibríl je však komplexný a zahŕňa mnoho úrovní regulácie. V bunkách s ťažko narušeným alebo nevytvoreným mikrotubulárnym cytoskeletom bola pozorovaná usporiadaná sieť celulóзовých mikrofibríl, čo viedlo k návrhu, že ich tvorba je nezávislá na mikrotubuloch (Himmelspach et al., 2003). Okrem iného sa môžu CSCs usporiadane pohybovať aj bez prítomnosti mikrotubulov (Paredes et al., 2006).

V prípade, kedy odstránenie mikrotubulov neovplyvňuje celkovú pohyblivosť CESA komplexov, je úloha CSI1 sporná. Ak by CSI1 iba viedol CESA komplexy pozdĺž mikrotubulov, dalo by sa očakávať, že rýchlosť pohybu komplexov sa nezmení po odstránení CSI1. Ale v mutantoch *csi1* je pohyb CESA spomalený na tretinu v porovnaní s wild type (Gu et al., 2010). Ak je hnacia sila tohto pohybu vytváraná vďaka aktivite komplexov, je

nepravdepodobné že nedostatok spojenia s mikrotubulami by mal dopad na ich rýchlosť. Avšak pri poškodení CSI1 alebo mikrotubulov boli pozorované zmeny v priestorovej organizácii a odchýlky od lineárnych trajektórií CESA komplexov (Paredes et al., 2006). Preto môže byť CSI1 dôležitý pre aktivitu aj vedenie CESA komplexov pozdĺž mikrotubulov.

Analýza CSI1 môže tiež poskytnúť náhľad na to, ako je cytoskelet zodpovedný za mechanickú anizotropiu bunecnej steny. Ako bolo už spomenuté, lineárna štruktúra celulózových mikrofibríl a ich paralelné usporiadanie je dané orientáciou mikrotubulov, ktorá reguluje rast bunky do rôznych smerov. Ale rastová anizotropia môže byť navodená aj inými faktormi. Napríklad hraničné oblasti dvoch izotropne rastúcich skupín buniek budú prinútené k anizotropickému rastu, pretože susediace bunky sa začnú elasticky deformovať (Kwiatkowska & Dumais, 2003). V pletivách pravdepodobne CMTs zabezpečujú priamu reguláciu lokálneho anizotropického rastu bunky (Williamson, 1990). Napríklad lalokovitý tvar pokožkových buniek súvisí s mikrotubulami, ktoré vystužujú oblasti bunecnej steny medzi jednotlivými lalokmi (Fu et al., 2005).

Relatívne slabé fenotypové defekty v *csi1* mutantoch však naznačujú, že aj iné mechanizmy sú zapojené, napríklad samousporiadanie mikrofibríl z CESA komplexov. Hlavná úloha CESA komplexu nie je teda iba regulácia orientácie celulózy v bunecnej stene ale aj zabezpečenie rýchlej reorientácie rastu v odpovedi na signály (Wasteneys, 2004).

#### **4. Endoreduplikácia**

Rastlinné bunky dokážu zväčšiť svoj objem až tisíckrát počas postmitotického vývoja (Sugimoto-Shirasu & Roberts, 2003). Takúto veľkosť dosahujú vďaka zväčšeniu ploštie endoreduplikáciou. Tento proces nastáva, keď je jadrový genóm duplikovaný bez mitotického rozdelenia cytoplazmy a často koreluje so zväčšením objemu jadra a veľkosti bunky. (Sugimoto-Shirasu & Roberts, 2003). Prechod z bunecného cyklu do endoreduplikácie je konečný stav regulovaný dobre identifikovanými genetickými mechanizmami (Nieuwland et al., 2009). Endoreduplikácia je pre rastliny užitočná, je rozšírená vo vyšších rastlinách, ale jej presná úloha vo vývoji orgánu je stále neznáma.

Vzhľadom na metabolické nároky veľkých buniek, rastliny zrejme používajú tento mechanizmus na zabezpečenie dostatku genetického materiálu pre zvýšené požiadavky na syntézu proteínov. Je teda možné, že endomitotický cyklus vznikol ako alternatíva k mitotickému cyklu, čo je výhoda pre rýchlo rastúce rastliny (Melaragno et al., 1993).

Bunky, u ktorých dochádza k endocyklom, nemôžu prejsť späť do mitózy, preto sú endoreduplikácia a delenie bunky brané ako alternatívne procesy, ktoré koexistujú v pletive, výsledkom čoho je veľké rozmedzie veľkostí buniek (Roeder et al., 2010). Ale odchýlky v endoreduplikácii nie vždy odpovedajú odchýlkam vo veľkosti a počte buniek (Lee et al., 2009). V dôsledku toho bolo veľa štúdií venovaných porozumeniu vzťahov medzi endoreduplikáciou, bunečným delením a rastom buniek alebo pletív v rôznych mnohobunečných organizmoch, ako *Drosophila* (Pierce et al., 2004), *Caenorhabditis elegans* (Lozano et al., 2006) a v rastlinných orgánoch (Kondorosi et al., 2000). Výsledkom však nie je jednoznačný záver o funkčných súvislostiach medzi bunečnými procesmi a veľkosťou orgánov. Či bunečné procesy riadia rast orgánov, alebo je to naopak, je stále predmetom debaty.

U *Arabidopsis* bola tiež veľká snaha vyriešiť túto otázku. V 9 z 10 prípadov bola pozorovaná súvislosť medzi endoreduplikáciou a zväčšením buniek (Fujikura et al., 2007). Ale medzi štúdiami sa tieto súvislosti odlišujú.

Najnovšia štúdia na listoch *Arabidopsis* od C. Massonnet a spol. (2010) priniesla experimentálny dôkaz nebunečnej regulácie rastu. Vyšlo najavo, že pre rôzne genotypy *Arabidopsis* platí spoločné – endoreduplikácia, expanzia a delenie buniek môžu byť regulované celkovým rastom listu. Delenie a expanzia buniek zároveň vplyvajú na list. Hypotéza pre vysvetlenie funkčných vzťahov medzi týmito dejmi je, že rýchla expanzia veľkých listov kladie vysoké požiadavky na produkciu bunky – to je možné až do určitého momentu. Potom bunku začnú limitovať molekulárne, biochemické a energetické obmedzenia a vtedy nastupuje endoreduplikácia (Kondorosi et al., 2000).

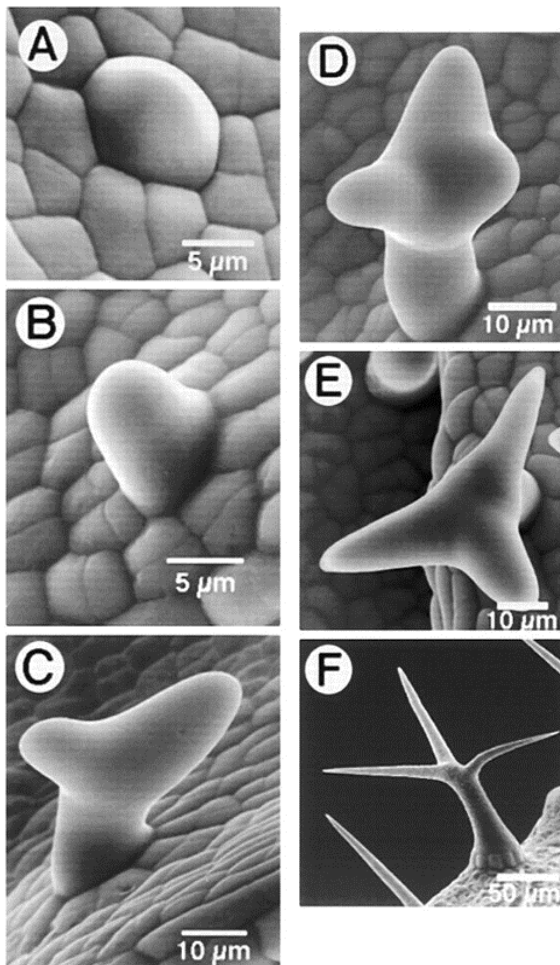
## **5. Trichómy**

Trichómy sú dlhé výčnelky na pokožke rastlín, ktoré vznikajú z pokožkových buniek. Môžu byť tvorené jednou alebo aj viacerými bunkami.

Rastlinné trichómy majú mnoho funkcií a s tým je spätá ich charakteristická morfológia. Listové trichómy *Arabidopsis* sú rozvetvené do dvoch, troch alebo štyroch rovnako dlhých častí symetricky usporiadaných na vrchole stopky. Ich vývoj začína tvorbou vypukliny z povrchu listu. Potom dochádza k expanzii difúznym rastom (Hulskamp, 2000) a trichóm zväčšuje svoj priemer z 20-30  $\mu\text{m}$  na 300-500  $\mu\text{m}$ . 6-10 hodín po iniciácii bunka vyrastie do tubulárneho tvaru a sú vymedzené subapikálne domény, ktoré slúžia ako iniciačné body vetvenia. Dve alebo tri vetvy rýchlo elongujú difúznym rastom v smeroch, ktoré sú

presne geneticky určené a ktoré úzko súvisia s hlavnou osou expanzie listu (Folkers et al. 1997) (obr. 4).

Vďaka svojej veľkosti, charakteristickému tvaru a skutočnosti, že sa rastlina bez neho zaobíde, je trichóm ideálny pre štúdium mutácii bunečnej morfogénézy. Bolo identifikovaných minimálne 20 génov, ktoré regulujú rozvetvovanie trichómov a najmenej 20 ďalších, ktoré regulujú zväčšovanie/fázu predlžovania častí trichómov v ich vývoji (Mathur, 2004).



Obr. 4:  
Fázy vývoja trichómových buniek Arabidopsis:  
(A) Trichómová iniciála sa objavuje ako vypuklina na povrchu pokožky.  
(B) Tubulárny trichómový výrastok sa rozširuje kolmo od pokožky listu.  
(C) Apikálne rozdelenie bunky a tvorba trichómu v tvare Y s dvomi vetvami.  
(D) Tvorba troch vetví po počiatocnom apikálnom rozdelení.  
(E) Typická hviezdicovitá morfológia vetvených trichómov na listoch wild-type Arabidopsis  
(F) Dospelý trichóm.  
Prevzaté z Mathur & Chua, 2000.

Genetické a molekulárne analýzy podporujú názor, že mutácie v génoch kódujúcich proteíny súvisiace s mikrotubulami ovplyvňujú počet vetví a mutácie v génoch kódujúcich polymerizáciu aktínu majú vplyv na predlžovanie a rast (Mathur, 2004). Ale spoločné účinky týchto mutácií naznačujú, že do oboch procesov sú zahrnuté aj produkty rovnakých génov (Zhang et al., 2005). Navyše sa objavil návrh, že obe zložky cytoskeletu počas morfogénézy trichómu spolupracujú.

Kvôli lepším možnostiam štúdia je morfogénéza trichómov rozdelená do niekoľkých fáz.

## **5.1. Expanzia bunky a tvorba tubulárneho výrastku**

V tejto fázi začína tvorba prekursorov trichómov ako radiálne expandovaných buniek v epidermis. Bunky sa postupne rozrastajú, až dosiahnu určitú hranicu nad povrch bunky. Potom sa vypučný prekursor rozširuje do takmer kolmého tubulárneho útvaru. Vakuolárny kompartment je nápadnejší a jadrová DNA sa zdvojuje endoreduplikáciou (Hulskamp et al, 1994).

Rôzne pozorovania naznačujú tomu, že tubulárna fáza morfogénzy trichómov nezahŕňa vrcholový rast ale celkový rast smerovaný do bokov rastúcej bunky (Schwab et al., 2003).

Ďalej sa ukázalo, že mikrotubulárny cytoskelet počas tejto fázy morfogénzy trichómov tiež hrá rolu. Zmeny v dynamike mikrotubulov indukované genetickým poškodením alebo aplikáciou jedov vyústili do plných zaoblených buniek (Mathur & Chua, 2000). Poškodenie aktínového cytoskeletu naproti tomu produkuje krátke ale stále tubulárne bunky

## **5.2. Iniciácia vetvenia**

Bunka rozdeľuje svoju os rastu a znovu začína rásť do viacerých smerov. Regulácia smeru rastu bunky v tejto fáze bola študovaná prostredníctvom narušenia mikrotubulov cytoskeletárnymi jedmi (Mathur & Chua, 2000). Zmeny dynamiky mikrotubulov indukované jedmi spôsobili, že u tubulárnych trichómových buniek, ktoré pôvodne rastú anizotropicky – len jedným smerom – došlo k strate polarity a expandovali izotropicky. Výsledkom bolo zistenie, že pri iniciácii vetvenia dochádza k dočasnému lokálnemu izotropickému rastu trichómov. Na základe tohto mohli byť nevetviace trichómy mutantu *stichel* experimentálne donútené k iniciácii vetvenia – aplikáciou mikrotubuly-stabilizujúceho jedu a následnou fázou regenerácie, kedy došlo k vetveniu. Tieto pozorovania nasvedčujú tomu, že nukleačné miesta potrebné pre reorientáciu mikrotubulov a následné vetvenie sú zabezpečované prechodne sa vyskytujúcimi stabilnými subpopuláciami mikrotubulov (Mathur & Chua, 2000).

STI kóduje neobvyklý proteín, ktorý obsahuje doménu sekvenčne podobnú  $\gamma$ -podjednotke eubakteriálnej DNA polymerázy III. STI je regulátor počtu vetví. – u silných alel mutantu *sti* dochádzalo k tvorbe kužeľovitých ostrých nevetvených trichómov, zatiaľ čo slabé *sti* alely vykazovali iniciály vetvenia (Ilgenfritz et al. 2003) .

Táto fáza diferenciácie trichómov jednoznačne zahŕňa selektívnu stabilizáciu mikrotubulov na plazmatickej membráne (napríklad prostredníctvom aktivity proteínov

asociovaných s mikrotubulami), lokálnu stimuláciu proteínov, ktoré oddeľujú mikrotubuly (ako katanín) a motorové proteíny so schopnosťou interakcie s organelami a organizácie mikrotubulov (Oppenheimer et al, 1997).

### **5.3. Predlžovanie vetví**

Trichómová bunka nadobúda charakteristický pravidelný tvar, keď sa vetvy rozširujú smerom von (obr. 5). Preto aj najmenšie zmeny v rozširovaní vetví a vedú k narušeniu tvaru trichómu. Zásah do aktínu, ale nie do mikrotubulárneho cytoskeletu, pomocou jedov vytvára náhodné oblasti lokálnej expanzie vo vetvách trichómov a tým značne mení tvar trichómu (Mathur et al. 1999). Po aplikácii aktínových jedov vznikli fenokópie *Arabidopsis* mutantov s pokrivenými trichómami, a osem génov zodpovedných za tento fenotyp bolo zaradených do skupiny génov „distorted“ (Hulskamp et al., 1994).

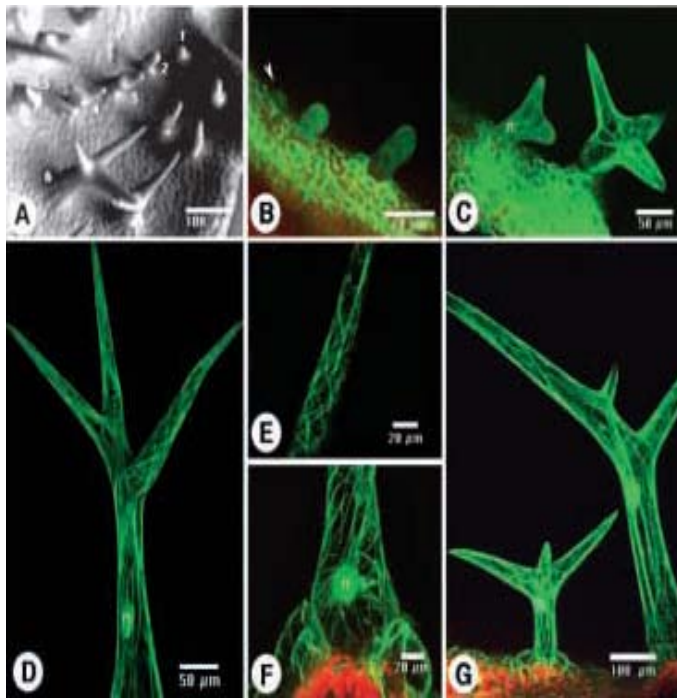
Tieto gény sú potrebné pre správnu expanziu trichómov *Arabidopsis* (Schwab et al., 2003). Kódujú podjednotky a regulačné proteíny ARP2/3 komplexu a rastlinné homológy SCAR/WAVE (Mathur et al., 2003; El-Din El-Assal et al., 2004).

Trichómy rôznych mutantov zo skupiny génov distorted vykazujú odlišný stupeň porušenia organizácie aktínu. Často obsahujú zhluky abnormálne organizovaného F-aktínu v porovnaní s charakteristickou súvislou sieťou jemného kortikálneho aktínu pozorovateľného vo wild-type trichómoch (Mathur et al, 1999). Toto štádium morfogénzy trichómov zahŕňa rýchle predĺženie vetví, je zrejme, že abnormálna organizácia F-aktínu nejakým spôsobom interferuje s rastom. Z pozorovania neobvyklého nahromadenia zväzkov F-aktínu v neexpandujúcich častiach mutantných buniek v porovnaní s jemným sieťovým aktínom v správne expandovaných oblastiach vyplýva, že aktínový cytoskelet môže pôsobiť ako fyzická bariéra regulujúca cytoplazmatický pohyb v bunke a interakciu organel (Mathur et al., 2003). V mutantných trichómoch je skutočne pohyb malých organel, ako mitochondrie, peroxizómy a Golgiho telieska, redukovaný (Mathur et al., 2003). Pohyb včiek, ktoré nesú materiál pre renováciu plazmatickej membrány a bunečnej steny počas rýchleho rastu môže byť tiež nedostatočný. Zdá sa, že aktín tiež ovplyvňuje lokálnu dynamiku mikrotubulov (Zhang et al. 2005) a tým je zrejme zodpovedný za fenotyp trichómov distorted, ktorý zahŕňa značné zmeny v smere rastu trichómových vetví.



## 5.4. Dospievania bunky

Znak toho, že morfogéza trichómu sa blíži ku koncu, je tvorba sekundárnych papilárnych zhrubnutí bunkovej steny. V súčasnosti nie je podrobne známe, ako fungujú riadiace mechanizmy tohto procesu, hoci bolo identifikovaných päť mutantov, ktoré mali suprimované alebo takmer žiadne ornamenty na povrchu trichómov. Sú zaradené do skupiny „glassy trichome“ a gény zodpovedné za tieto fenotypy zrejme kódujú komponenty bunkovej steny (Gilding & Marks, 2010). Ale dozrievanie bunkovej steny zahŕňa aj aktínový cytoskelet, lebo po aplikácii nízkych koncentrácií inhibítorov polymerizácie aktínu došlo k vytvoreniu trichómov s náhodne rozmiestnenými hladkými oblasťami.



Obr. 5:

Vývoj trichómov *Arabidopsis* v rôznych fázach rastu.

(A) Fázy 1-5 na WT liste.

(B) WT trichómy a ich difúzny aktín vo fázach 1 a 2. Šípky ukazujú na vznikajúci trichóm vyrastajúci z pokožky listu.

(C) Iniciácia vetvenia a predlžovanie vetví. Zväzky F-aktínu sa rozširujú pozdĺžne, stávajú sa viditeľnými a následne dochádza k sekundárnemu vetveniu

(D) Vlákna subkortikálneho F-aktínu sú rozprestrené rovnobežne s osou predlžovania trichómu. Jadro je umiestnené v stopke.

(E) Filamenta kortikálneho F-aktínu obklopujú vrchol vetvy.

(F) Subkortikálne aktínové vlákna v nevetvenej trichómovej bunke s bazálne umiestneným jadrom

(G) Obecná organizácia aktínu v dospelom WT trichóme (fáza 5). Vlákna F-aktínu sú pravidelne pozdĺžne usporiadané a vytvárajú jemnú kortikálnu sieť.

Prevzaté z Mathur et. al, 1999

## 6. Epidermálne a mezofylové bunky

### 6.1. Mezofylové bunky

Morfogéza mezofylových buniek zahŕňa vytvorenie cylindrických buniek palisádového parenchýmu a lalokovitých buniek špongiózneho parenchýmu. Mezofyl sa podieľa na fotosyntéze, takže ustavovanie tvaru bunky je prispôbené vytváraniu veľkého retikula intercelulárnych priestorov, ktoré umožňujú výmenu plynov.

Mechanizmus morfogénézy laločnatých buniek bol prvýkrát študovaný na bunkách hydátód v listoch *Pilea cadieriei* (Galatis, 1988). CMT vytvárali prstencovité zväzky, ktoré sa vzájomne prepájali a vytvorili retikulárnu kostru mikrotubulárnych zväzkov. Celulózové mikrofibrily v zhrubnutiach bunečnej steny boli paralelné s MT ležiacimi pod nimi. Tieto komplikované vystuženia bunečnej steny obklopujú protoplast v podobe pásov, ktoré určujú oblasti, kde je lokálne zabránené bunečnému rastu. Výsledkom sú vykľutenia v oblastiach medzi lokálnymi zhrubnutiami bunečnej steny a dochádza k tvorbe lalokov. Pretože väčšinou sú zväzky MT a zhrubnutia bunečnej steny opačne usporiadané medzi susediacimi bunkami, v miestach zúženia buniek sa počas rastu buniek vytvárajú medzibunečné priestory.

V lístkoch *A. capillus-veneris*, kde je mezofyl skôr aerenchymatické pletivo, dochádza k druhej fáze rastu, keď sa niektoré laloky začnú predlžovať a vytvárať laterálne vetvy, ktoré ďalej rozširujú medzibunečné priestory v mezofyle (Panteris et al., 1993a). Počas tejto fáze sa na bázi lalokov organizuje prstenec tranzverzných CMTs sprevádzaný depozíciou rovnakého prstenca celulózových mikrofilament v bunečnej stene, čo ustanovuje nové osi rastu bunky. (Panteris et al., 1993a). Zároveň zhľuky aktínových filament vedú pozdĺž výbežkov elongujúcich lalokov.

U niektorých rastlín narušenie mikrotubulárneho cytoskeletu kolchicínom (Panteris et al., 1993a) silne narušilo morfogénézu, čím bola znova dokázaná úloha organizácie CMTs pri morfogenetických procesoch. Mezofylové bunky nevytvárali laloky a medzibunečné priestory boli značne zmenšené.

Zväzky CMTs sú teda hlavný a veľmi účinný nástroj pri morfogénéze mezofylových buniek - podieľajú sa na vystužení bunečnej steny, regulujú lokálny rast bunky, vytváranie lalokov a zúžení a majú rozhodujúcu úlohu pri určovaní orientácie celulózových mikrofibríl.

## **6.2. Pokožkové bunky**

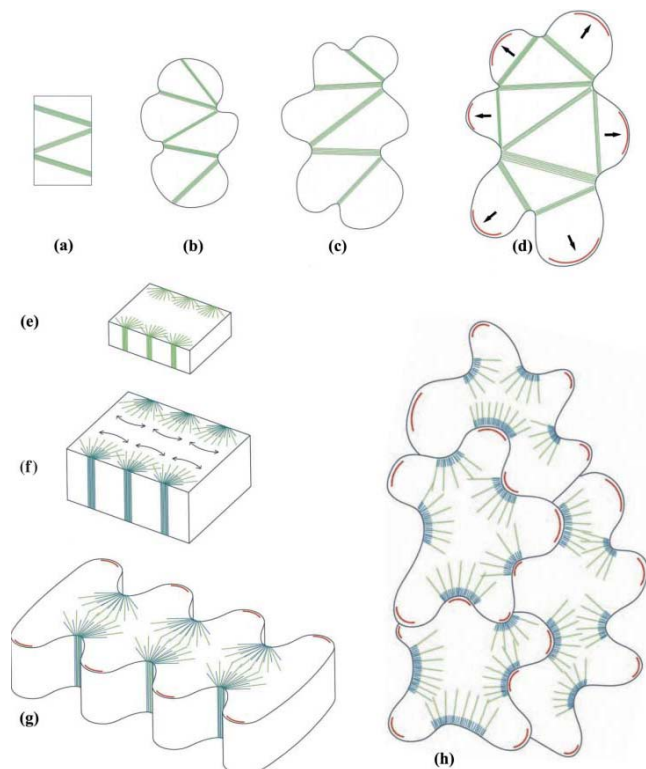
Normálne pokožkové bunky, tiež nazývané dlaždicové, majú u niektorých rastlinných druhov zvlnené obrysy antiklinálnych stien. Tieto bunky vznikajú z obdĺžnikových alebo polygonálnych protodermálnych buniek a na základe regulovaného sledu morfogenetických krokov, v ktorých je zahrnutý aj cytoskelet, nadobúdajú počas rastu a diferenciácie vlnitý tvar. Hoci výčnelky epidermálnych buniek nie sú presne rovnaké ako laloky mezofylových buniek, pre zjednodušenie sa aj u nich používa termín „lalok“.

CMTs boli považované za cytoskeletárny komponent, ktorý iniciuje morfogenetický mechanizmus vlnitých epidermálnych buniek. Ich úloha v tejto súvislosti bola prvýkrát

opísaná do detailu u listu *Vigna sinensis* (Panteris et al., 1993b). Zatiaľ čo antiklinálne bunečné steny mladých buniek sú stále rovné, CMTs sa pod nimi organizujú do antiklinálnych zväzkov. V každej bunke sa antiklinálne zväzky CMT prepájajú so zväzkami mikrotubúl, ktoré lemujú vnútornú periklinálnu bunečnú stenu. Navyše každý antiklinálny zväzok mikrotubulov končí tam, kde sa spája antiklinálna bunečná stena s externou periklinálnou. V tomto mieste vytvárajú mikrotubuly radiálne zoskupenia, ktoré sú vejárovite rozmiestnené pod externou periklinálnou bunečnou stenou. Výsledkom takejto organizácie mikrotubulov je vystuženie bunečnej steny lokálnymi zhrubnutiami, pričom celulózové mikrofibrily (CMFs) sú opäť paralelne s CMTs, teda radiálne usporiadané. Keď sa skupiny CMFs každej bunky navzájom laterálne prepoja, je determinované vystuženie bunečnej steny na periklinálnej strane. To sa potom rozšíri prostredníctvom antiklinálnych CMF a obklopí celú perifériu bunky (obr. 6).

Nastáva podobná situácia ako v mezofylových bunkách – lokálne zhrubnutia v antiklinálnej bunečnej stene zabraňujú v tých miestach rastu bunky, začnú sa teda tvoriť laloky a zúženia. Radiálne usporiadané CMFs na spojnici antiklinálnej a periklinálnej bunečnej steny lokálne určujú oblúkovité tangenciálne rozšírenia periklinálnej steny (Galatis & Apostolakos, 2004). Kombinácia presne regulovaného rastu na rôznych miestach bunečnej steny nakoniec vyústí do tvorby vlnitých epidermálnych buniek. Ich laloky rastú väčšinou v rovine pokožky. Organizácia CMT a príslušné zhrubnutia bunečnej steny sa vždy striedajú medzi susediacimi bunkami. Výsledkom sú bunky usporiadané do tvaru puzzle pri pohľade zvrchu. Každý lalok bunky je zanorený do zúženia susediacej bunky, preto sa medzi bunkami nevytvárajú medzibunečné priestory. Vo všeobecnosti to vyzerá, že tvorbe medzibunečných priestorov medzi epidermálnymi bunkami je zabránené vďaka striedavo zoradeným radiálnym zoskupeniam mikrotubulov medzi susediacimi bunkami (Galatis & Apostolakos, 2004).

Nedávne štúdie na wild type rastlinách, ako aj na mutantoch, odhalili, že pre normálne vytvorenie lalokov v pokožkových bunkách sú potrebné zhluky kortikálneho F-aktínu vo vrcholoch rastúcich lalokov, to však neplatilo o mezofylových bunkách (Frank et al., 2003).



Obr. 6: Fázy morfogénézy mezofylových (a-d) a pokožkových (e-h) buniek. Mikrotubuly (MTs) sú zelené, celulózové mikrofibrily (CMFs) modré a aktínové filamta (AF) červené.

V (a-d) nie sú ukázane zhrubnutia bunečnej steny.

(a) Mladá mezofylová bunka; CMTs vyvárajú navzájom spojené zväzky prstencovitého tvaru.

(b) Ako mezofylové bunky rastú, vytvárajú sa laloky, zaškrtenia a nové zväzky MTs.

(c) Ďalší rast mezofylových buniek vedie k tvorbe dodatočných lalokov.

(d) Na bázi rastúcich lalokov mezofylových buniek sa tvoria mikrotubulárne prstence, zatiaľ čo zhluky AF sa zhromažďujú vo vypuknutých častiach. Ustavujú sa nové osi bunečného rastu (šípky).

(e) CMTs vytvárajú zväzky, ktoré lemujú antiklinálne steny a zoskupenia radiálnych MTs v mieste spojení periklinálnej a antiklinálnej bunečnej steny v mladých epidermálnych bunkách.

(f) Neskoršie morfogenetické štádium. Dochádza k depozícii lokálnych zhrubnutí bunečnej steny s CMTs usporiadanými paralelne s MTs. Na externej periklinálnej strane prebieha oblúková tangenciálna expanzia (šípky).

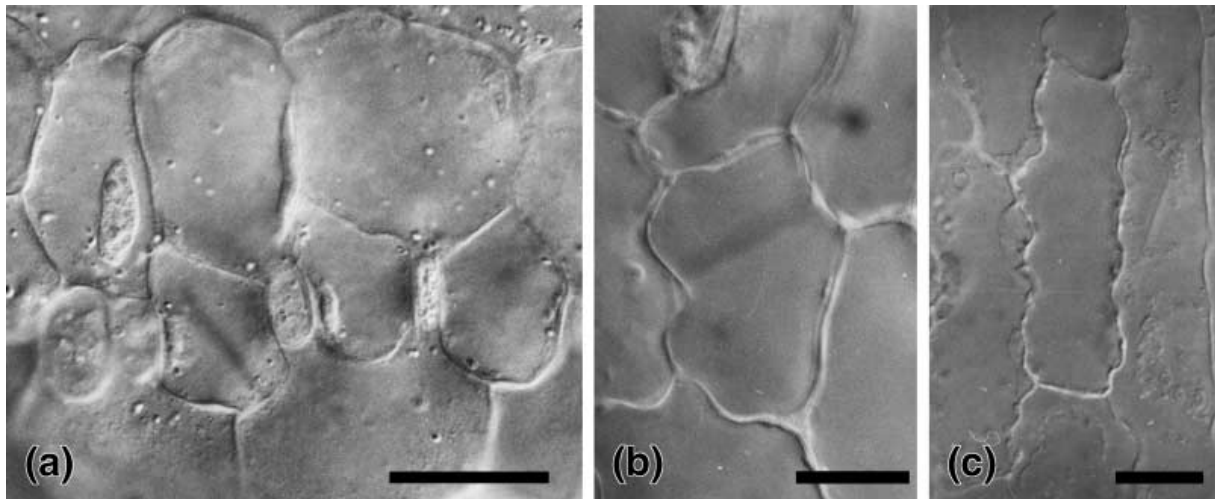
(g) Iniciácia tvorby lalokov a zaškrtení, zhluky AF sa zhromažďujú vo výklenkoch rastúcich lalokov.

(h) Pohľad zvrchu na epidermálnu oblasť počas tvorby lalokov a expanzie. CMTs, zhrubnutia bunečnej steny a zhluky AF sa striedajú medzi susediacimi bunkami, výsledkom čoho je vzájomne prepletená sieť lalokov bez medzibunečných priestorov.

Prevzaté z Panteris & Galatis, 2005

Podľa získaných údajov z mutantov, u ktorých sa takýto aktín netvoril, morfogénéza epidermálnych buniek je výsledkom hlavne organizácie aktínových filament a nie CMTs (Wasteneys and Galway, 2003). Ale vo všetkých týchto prípadoch sa zhluky aktínu objavili vo vrcholoch lalokov wild type buniek až po iniciácii morfogénézy. Navyše predĺžovanie pozdĺž antiklinálnej bunečnej steny nemôže byť prisudzované zhlukom aktínu. Tie sa zhromažďujú v mieste spojenia periklinálnej a antiklinálnej bunečnej steny, kde je maximálne zvlnenie. Porovnanie organizácie CMTs a výskytu zhlukov aktínu vedie k záveru, že CMTs sú zodpovedné za počiatkové vytvorenie vlnitého vzoru, zatiaľ čo aktín sa účastní neskoršieho rastu a extenzie lalokov.

Po zhrnutí doterajších dát, ak nie sú prítomné agregáty F-aktínu vo vrcholoch lalokov, prejaví sa u buniek menej vlnitý tvar. Keď nie sú prítomné radiálne zväzky mikrotubulov, alebo nie sú správne organizované, bunky nie sú vôbec vlnité – nedochádza k lokálnym zhrubnutiam bunečnej steny a bunky rastú takmer rovnomerne bez výčnelkov alebo zúžení (Panteris et al., 1993b) (obr.7).



Obr. 7: Obrázky pokožkových buniek pomocou diferenciálneho interferenčného kontrastu.

(a) Pokožkové bunky *Zea mays* po pôsobení 0,08% kolchicínu (inhibítor polymerizácie mikrotubulov) 72 hodín. Nie je pozorovaná žiadna vlnitosť, bunky sú náhodne vyduté. Bunky *Vigna sinensis* (b) a *Zea mays* (c) po aplikácii 20  $\mu\text{m}$  cytochalasínu (inhibítor polyzerizácie aktínu) na 72 hodín. Vlnitý tvar nie je až taký výrazný ako v kontrolnom materiáli. Mierka 20  $\mu\text{m}$  (a), 20  $\mu\text{m}$  (b), 40  $\mu\text{m}$  (c). Prevzaté z Panteris & Galatis, 2005.

Morfogenéza epidermálnych buniek teda zahŕňa tri kroky. Najprv sa CMTs organizujú do zväzkov a radiálnych zoskupení a vytvárajú tak kostru pre lokálnu depozíciu bunečnej steny. Potom dochádza k lokálnym zhrubnutiam bunečnej steny podľa vzoru CMTs a vďaka tomu k tvorbe zvlneného tvaru antiklinálnej steny. Nakoniec sa usporiadajú zhľuky aktínu vo vrcholoch vznikajúcich lalokov, čo koreluje s nasledovnou elongáciou lalokov a celkovou expanziou bunky do konečného vlnitého tvaru.

### **6.2.1. Regulácia morfogénzy pokožkových buniek**

K tvorbe lalokov pokožkových buniek čiastočne prispievajú aj dva príbuzné proteíny rodiny ROP GTPáz, ROP2 a ROP4, tým, že stimulujú lokálne zhromažďovanie F-aktínu. ROP2-GFP je umiestnený v cytoplazmatickej membráne a je sústredený v miestach tvorby lalokov. Lokalizované nahromadenie kortikálneho F-aktínu a tvorba lalokov sú redukované u rastlín s narušenou funkciou ROP2 a ROP4, hoci hustota a organizácia cytoplazmatického

F-aktínu je normálna (Fu et al., 2002; Fu et al., 2005). Naopak expresia konštitutívne aktívnej varianty ROP2 vyúsťuje do delokalizácie kortikálneho F-aktínu a spôsobuje rovnomerne rozložený rast bunky, teda stratu polaritu rastu.

ROP2 a ROP4 majú však vplyv aj na iné procesy pri morfogénéze pokožkových buniek, ako len na polymerizáciu F-aktínu. U rastlín so zníženou funkciou ROP2 a ROP4 génov dochádza k tomu, že paralelné zväzky priečne usporiadaných mikrotubulov sú rozmiestnené naširoko po celom kortexe bunky (Fu et al., 2005). Naopak expresia konštitutívne aktívneho ROP2 zabraňuje vytvoreniu správne zoradených zoskupení CMTs (Fu et al., 2002).

ROP2 a ROP4 teda majú zrejme dvojité úlohu pri raste lalokov – lokálne aktivujú polymerizáciu F-aktínu v miestach rastu lalokov a zároveň potláčajú tvorbu zhlukov CMTs v týchto oblastiach.

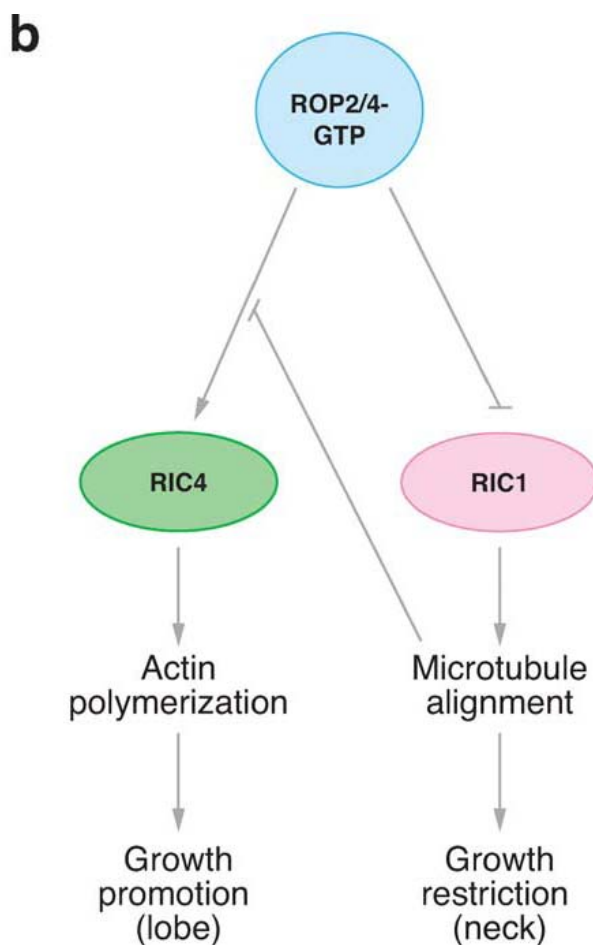
Ďalšiu podstatnú rolu v regulácii hrajú RIC proteíny (ROP-interactive CRIB motif-containing proteins), ktoré obsahujú CRIB (Cdc42/Rac-interactive binding) motív, ktorý slúži na špecifickú interakciu s ROP1-GTP (Wu et al., 2001).

Napríklad RIC1 proteín sa účastní na ROP2/4 sprostriedkovanom potlačení tvorby správne usporiadaných zväzkov CMTs (Fu et al., 2005). Nadmerná expresia RIC1 zase spôsobuje, že priečne mikrotubulárne zväzky sa usporiadajú pozdĺž celej dĺžky expandujúcich pokožkových buniek a že rast lalokov je redukovaný. Naopak v mutantoch straty funkcie *ric1* je menej CMTs, sú menej zväzkované a nie sú tak dobre usporiadané ako v zaškrteniach wild type pokožkových buniek, dochádza k nadmernej expanzii týchto pôvodne zúžených oblastí. RIC1-GFP je lokalizovaný spolu s CMTs; toto umiestnenie je inhibované expresiou konštitutívne aktívneho ROP2, ale je zvýšené u mutantov s redukovanou funkciou ROP2/4. RIC1 teda zrejme sprostriedkuje tvorbu usporiadaných zhlukov priečných CMTs tým, že priamo asociuje s mikrotubulami a aktivita ROP2/4 inhibuje túto funkciu RIC1. RIC1 navyše potláča akumuláciu kortikálneho F-aktínu inhibovaním interakcie medzi ROP2 a RIC4. Tento účinok RIC je pravdepodobne sprostriedkovaný samotnými mikrotubulami, pretože depolymerizácia mikrotubulov po aplikácii oryzalínu zvyšuje akumuláciu kortikálneho F-aktínu (Fu et al., 2005).

Tieto pozorovania dokopy podporujú nasledujúci model, ktorý vysvetľuje morfogénézu pokožkových buniek prostredníctvom ROP-dependentných aktivít proteínov RIC1 a RIC4. Lokálne zosilnenie aktivity ROP2/4 v miestach vzniku lalokov podporuje RIC4-dependentnú aktiváciu zhromažďovania kortikálneho F-aktínu a zároveň potláča RIC1-

dependentné vytvorenie správne zoradených zväzkov CMTs v týchto oblastiach. Tieto efekty ROP2/4 spoločne podporujú tvorbu lalokov. Medzi miestami tvorby lalokov, kde sú ROP2/4 a RIC4 menej hojné, sa môže uskutočňovať RIC1-dependentná tvorba priečných zväzkov CMTs. Podpora usporiadania CMTs prostredníctvom RIC1 vyústi do tvorby zoskupení mikrotubulov a tie inhibujú interakciu ROP2/4, čím ďalej redukujú inhibíciu aktivity RIC1 v zaškrtených oblastiach. RIC1-dependentné zoskupenia CMTs obmedzujú expanziu bunky medzi lalokmi a zosilujú tým rozdiely medzi rýchlosťami rastu medzi oblasťami s lalokmi a so zaškrteniami (obr.8).

Tento model celkom dobre vysvetľuje reguláciu ustavovania tvaru epidermálnych buniek, ale otázkou zostáva, čo determinuje miesta, kde bude zvýšená koncentrácia ROP2/4. Pretože rast prilahlých buniek musí byť koordinovaný, počiatočná lokalizácia miest so zvýšeným výskytom ROP2/4 pravdepodobne závisí na nejakom druhu medzibunečnej interakcie.



Obr. 8:  
Regulácia morfogénzy epidermálnych buniek. model schématicky znázorňuje reguláciu polymerizácie aktínu a organizácie mikrotubulov v expandujúcich pokožkových bunkách prostredníctvom ROPs a dvoch RIC proteínov, ktoré interagujú s ROP. Prezaté z Fu et al., 2005

## **7. Záver**

Pri ustavovaní tvaru buniek rastliny využívajú mnoho regulačných dráh, ktoré sa týkajú cytoskeletu. V posledných rokoch boli zaznamenané veľké pokroky v porozumení týchto mechanizmov vďaka štúdiám s využitím genomiky, genetiky, molekulárnej biológie, bunečnej biológie a biochémie. Cieľom tejto bakalárskej práce bolo popísať niektoré z nich a reprodukovať poznatky, ktoré viedli k osvetleniu tejto problematiky.

Mnoho záležitostí však zostáva nejasných, napríklad interakcie medzi aktínom, mikrotubulami a ich regulačnými proteínmi, presný súvis medzi CESA, CMT a CSI1, vzťahy medzi ROP a RIC a konečný efekt na morfogézu buniek.



## **Použitá literatura:**

- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Höfte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., Williamson, R.E., 1998. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. *Science* 279, 717–720.
- Baluska, F., Jasik, J., Edelmann, H.G., Salajová, T., Volkmann, D., 2001. Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Dev. Biol.* 231, 113–124.
- Bartles, J.R., 2000. Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 72–78.
- Baskin, T.I., Bivens, N.J., 1995. Stimulation of radial expansion in arabidopsis roots by inhibitors of actomyosin and vesicle secretion but not by various inhibitors of metabolism. *Planta* 197, 514–521.
- Bouquin, T., Mattsson, O., Naested, H., Foster, R., Mundy, J., 2003. The Arabidopsis lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *J. Cell. Sci.* 116, 791–801.
- Cleary, A.L., Smith, L.G., 1998. The Tangled1 gene is required for spatial control of cytoskeletal arrays associated with cell division during maize leaf development. *Plant Cell* 10, 1875–1888.
- Collings, D.A., Harper, J.D.I., Vaughn, K.C., 2003. The association of peroxisomes with the developing cell plate in dividing onion root cells depends on actin microfilaments and myosin. *Planta* 218, 204–216.
- Cossart, P., 2000. Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell. Microbiol.* 2, 195–205.
- Dixit, R., Cyr, R., 2004. Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell* 16, 3274–3284.
- Dixit, R., Cyr, R.J., 2002. Spatio-temporal relationship between nuclear-envelope breakdown and preprophase band disappearance in cultured tobacco cells. *Protoplasma* 219, 116–121.
- Dixit, R., Cyr, R., 2004. The Cortical Microtubule Array: From Dynamics to Organization. *Plant Cell* 16, 2546–2552.
- Dong, C.H., Xia, G.X., Hong, Y., Ramachandran, S., Kost, B., Chua, N.H., 2001. ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1333–1346.
- Dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J., 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83, 433–473.
- Dryková, D., Cenklová, V., Sulimenko, V., Volc, J., Dráber, P., Binarová, P., 2003. Plant gamma-tubulin interacts with alphabeta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell* 15, 465–480.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., Kirschner, M.W., 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418, 790–793.
- El-Din El-Assal, S., Le, J., Basu, D., Mallery, E.L., Szymanski, D.B., 2004. DISTORTED2 encodes an ARPC2 subunit of the putative Arabidopsis ARP2/3 complex. *Plant J.* 38, 526–538.
- Erhardt, M., Stoppin-Mellet, V., Campagne, S., Canaday, J., Mutterer, J., Fabian, T., Sauter, M., Muller, T., Peter, C., Lambert, A.-M., Schmit, A.-C., 2002. The plant Spc98p homologue colocalizes with gamma-tubulin at microtubule nucleation sites and is

- required for microtubule nucleation. *J. Cell. Sci.* 115, 2423–2431.
- Fisher, Cyr, 1998. Extending the Microtubule/Microfibril paradigm. Cellulose synthesis is required for normal cortical microtubule alignment in elongating cells. *Plant Physiol.* 116, 1043–1051.
- Folkers, U., Berger, J., Hülskamp, M., 1997. Cell morphogenesis of trichomes in *Arabidopsis*: differential control of primary and secondary branching by branch initiation regulators and cell growth. *Development* 124, 3779–3786.
- Frank, M.J., Cartwright, H.N., Smith, L.G., 2003. Three Brick genes have distinct functions in a common pathway promoting polarized cell division and cell morphogenesis in the maize leaf epidermis. *Development* 130, 753–762.
- Fu, Y., Gu, Y., Zheng, Z., Wasteneys, G., Yang, Z., 2005a. *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 120, 687–700.
- Fu, Y., Gu, Y., Zheng, Z., Wasteneys, G., Yang, Z., 2005b. *Arabidopsis* Interdigitating Cell Growth Requires Two Antagonistic Pathways with Opposing Action on Cell Morphogenesis. *Cell* 120, 687–700.
- Fu, Y., Li, H., Yang, Z., 2002. The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during *Arabidopsis* organogenesis. *Plant Cell* 14, 777–794.
- Fujikura, U., Horiguchi, G., Tsukaya, H., 2007. Dissection of enhanced cell expansion processes in leaves triggered by a defect in cell proliferation, with reference to roles of endoreduplication. *Plant Cell Physiol.* 48, 278–286.
- Galatis, B., 1988. Microtubules and epithem-cell morphogenesis in hydathodes of *Pilea cadierei*. *Planta* 176, 287–297.
- Galatis, B., Apostolakos, P., 2004. The role of the cytoskeleton in the morphogenesis and function of stomatal complexes. *New Phytologist* 161, 613–639.
- Gibbon, B.C., Kovar, D.R., Staiger, C.J., 1999. Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell* 11, 2349–2363.
- Gilding, E.K., Marks, M.D., 2010. Analysis of purified *glabra3*-shapeshifter trichomes reveals a role for NOECK in regulating early trichome morphogenic events. *Plant J.* 64, 304–317.
- Granger, C.L., Cyr, R.J., 2001. Spatiotemporal relationships between growth and microtubule orientation as revealed in living root cells of *Arabidopsis thaliana* transformed with green-fluorescent-protein gene construct GFP-MBD. *Protoplasma* 216, 201–214.
- Green, P.B., 1962. Mechanism for Plant Cellular Morphogenesis. *Science* 138, 1404–1405.
- Grunt, M., Zárský, V., Cvrcková, F., 2008. Roots of angiosperm formins: the evolutionary history of plant FH2 domain-containing proteins. *BMC Evol. Biol.* 8, 115.
- Gu, Y., Kaplinsky, N., Bringmann, M., Cobb, A., Carroll, A., Sampathkumar, A., Baskin, T.I., Persson, S., Somerville, C.R., 2010. Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12866–12871.
- Gungabissoon, R.A., Khan, S., Hussey, P.J., Maciver, S.K., 2001. Interaction of elongation factor 1alpha from *Zea mays* (ZmEF-1alpha) with F-actin and interplay with the maize actin severing protein, ZmADF3. *Cell Motil. Cytoskeleton* 49, 104–111.
- Gunning, B. E. S. in *The Cytoskeleton in Plant Growth and Development*, 1982. (ed. Lloyd, C. W.) Academic. Press, London, 229–292.
- Gunning, B.E., Wick, S.M., 1985. Preprophase bands, phragmoplasts, and spatial control of cytokinesis. *J. Cell Sci. Suppl.* 2, 157–179.
- Hepler, P.K., Vidali, L., Cheung, A.Y., 2001. Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 159–187.

- Himmelspach, R., Williamson, R.E., Wasteneys, G.O., 2003. Cellulose microfibril alignment recovers from DCB-induced disruption despite microtubule disorganization. *Plant J.* 36, 565–575.
- Huang, S., McDowell, J.M., Weise, M.J., Meagher, R.B., 1996. The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiol.* 111, 115–126.
- Huang, S., Robinson, R.C., Gao, L.Y., Matsumoto, T., Brunet, A., Blanchoin, L., Staiger, C.J., 2005. Arabidopsis VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization. *Plant Cell* 17, 486–501.
- Hülkamp, M., 2000. How plants split hairs. *Curr. Biol.* 10, R308–310.
- Hülkamp, M., Misfa, S., Jürgens, G., 1994. Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. *Cell* 76, 555–566.
- Hussey, P.J., Allwood, E.G., Smertenko, A.P., 2002. Actin-binding proteins in the Arabidopsis genome database: properties of functionally distinct plant actin-depolymerizing factors/cofilins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 357, 791–798.
- Cheung, A.Y., Wu, H., 2004. Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell* 16, 257–269.
- Ilgenfritz, H., Bouyer, D., Schnittger, A., Mathur, J., Kirik, V., Schwab, B., Chua, N.-H., Jürgens, G., Hülkamp, M., 2003. The Arabidopsis STICHEL Gene Is a Regulator of Trichome Branch Number and Encodes a Novel Protein. *Plant Physiol* 131, 643–655.
- Job, D., Valiron, O., Oakley, B., 2003. Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 111–117.
- Kollman, J.M., Polka, J.K., Zelter, A., Davis, T.N., Agard, D.A., 2010. Microtubule nucleating gamma-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature* 466, 879–882.
- Kondorosi, E., Roudier, F., Gendreau, E., 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 488–492.
- Kovar, D.R., Gibbon, B.C., McCurdy, D.W., Staiger, C.J., 2001. Fluorescently-labeled fimbrin decorates a dynamic actin filament network in live plant cells. *Planta* 213, 390–395.
- Kovar, D.R., Kuhn, J.R., Tichy, A.L., Pollard, T.D., 2003. The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J. Cell Biol.* 161, 875–887.
- Kropf, D.L., Bisgrove, S.R., Hable, W.E., 1998. Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 117–122.
- Kwiatkowska, D., Dumais, J., 2003. Growth and morphogenesis at the vegetative shoot apex of *Anagallis arvensis* L. *J. Exp. Bot.* 54, 1585–1595.
- Ledbetter, M.C., Porter, K.R., 1963. A “MICROTUBULE” IN PLANT CELL FINE STRUCTURE. *J. Cell Biol.* 19, 239–250.
- Lee, H.O., Davidson, J.M., Duronio, R.J., 2009. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev.* 23, 2461–2477.
- Li, S., Blanchoin, L., Yang, Z., Lord, E.M., 2003. The putative Arabidopsis arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant Physiol.* 132, 2034–2044.
- Li, S., Lei, L., Somerville, C.R., Gu, Y., 2012. Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 185–190.
- Lozano, E., Sáez, A.G., Flemming, A.J., Cunha, A., Leroi, A.M., 2006. Regulation of growth by ploidy in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 16, 493–498.

- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Pollard, T.D., 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* 127, 107–115.
- Margolis, R.L., Wilson, L., 1981. Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature* 293, 705–711.
- Martinière, A., Gayral, P., Hawes, C., Runions, J., 2011. Building bridges: formin1 of *Arabidopsis* forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton. *Plant J.* 66, 354–365.
- Massonnet, C., Vile, D., Fabre, J., Hannah, M.A., Caldana, C., Lisec, J., Beemster, G.T.S., Meyer, R.C., Messerli, G., Gronlund, J.T., Perkovic, J., Wigmore, E., May, S., Bevan, M.W., Meyer, C., Rubio-Díaz, S., Weigel, D., Micol, J.L., Buchanan-Wollaston, V., Fiorani, F., Walsh, S., Rinn, B., Gruissem, W., Hilson, P., Hennig, L., Willmitzer, L., Granier, C., 2010. Probing the reproducibility of leaf growth and molecular phenotypes: a comparison of three *Arabidopsis* accessions cultivated in ten laboratories. *Plant Physiol.* 152, 2142–2157.
- Mathur, J., 2004. Cell shape development in plants. *Trends Plant Sci.* 9, 583–590.
- Mathur, J., 2005. The ARP2/3 complex: giving plant cells a leading edge. *Bioessays* 27, 377–387.
- Mathur, J., Chua, N.H., 2000. Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes. *Plant Cell* 12, 465–477.
- Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., Hülskamp, M., 2003a. Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1632–1645.
- Mathur, J., Mathur, N., Kirik, V., Kernebeck, B., Srinivas, B.P., Hülskamp, M., 2003b. *Arabidopsis* CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development* 130, 3137–3146.
- Mathur, J., Spielhofer, P., Kost, B., Chua, N., 1999. The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 126, 5559–5568.
- Melaragno, J.E., Mehrotra, B., Coleman, A.W., 1993. Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5, 1661–1668.
- Michelot, A., Derivery, E., Paterski-Boujema, R., Guérin, C., Huang, S., Parcy, F., Staiger, C.J., Blanchoin, L., 2006. A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr. Biol.* 16, 1924–1930.
- Millard, T.H., Sharp, S.J., Machesky, L.M., 2004. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem. J.* 380, 1–17.
- Mineyuki, Y., 1999. The Preprophase Band of Microtubules: Its Function as a Cytokinetic Apparatus in Higher Plants, in: Kwang W. Jeon (Ed.), *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 1–49.
- Morrell, J.L., Morphew, M., Gould, K.L., 1999. A mutant of Arp2p causes partial disassembly of the Arp2/3 complex and loss of cortical actin function in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 10, 4201–4215.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., Pollard, T.D., 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6181–6186.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., Hasebe, M., 2005. Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of

- gamma-tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.* 7, 961–968.
- Nebenführ, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., Staehelin, L.A., 1999. Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* 121, 1127–1142.
- Nieuwland, J., Scofield, S., Murray, J.A.H., 2009. Control of division and differentiation of plant stem cells and their derivatives. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 1134–1142.
- Oppenheimer, D.G., Pollock, M.A., Vacik, J., Szymanski, D.B., Ericson, B., Feldmann, K., Marks, M.D., 1997. Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6261–6266.
- Panteris, E., Apostolakos, P., Galatis, B., 1993a. Microtubule organization, mesophyll cell morphogenesis, and intercellular space formation in *Adiantum capillus veneris* leaflets. *Protoplasma* 172, 97–110.
- Panteris, E., Apostolakos, P., Galatis, B., 1993b. Microtubules and morphogenesis in ordinary epidermal cells of *Vigna sinensis* leaves. *Protoplasma* 174, 91–100.
- Panteris, E., Apostolakos, P., Gräf, R., Galatis, B., 2000. Gamma-tubulin colocalizes with microtubule arrays and tubulin paracrystals in dividing vegetative cells of higher plants. *Protoplasma* 210, 179–187.
- Panteris, E., Galatis, B., 2005. The morphogenesis of lobed plant cells in the mesophyll and epidermis: organization and distinct roles of cortical microtubules and actin filaments. *New Phytol.* 167, 721–732.
- Paredez, A.R., Persson, S., Ehrhardt, D.W., Somerville, C.R., 2008. Genetic evidence that cellulose synthase activity influences microtubule cortical array organization. *Plant Physiol.* 147, 1723–1734.
- Paredez, A.R., Somerville, C.R., Ehrhardt, D.W., 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312, 1491–1495.
- Pierce, S.B., Yost, C., Britton, J.S., Loo, L.W.M., Flynn, E.M., Edgar, B.A., Eisenman, R.N., 2004. dMyc is required for larval growth and endoreplication in *Drosophila*. *Development* 131, 2317–2327.
- Roeder, A.H.K., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B.S., Meyerowitz, E.M., 2010. Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* 8, e1000367.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., Carlier, M.-F., 2004. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* 119, 419–429.
- Shaw, S.L., Kamyar, R., Ehrhardt, D.W., 2003a. Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* 300, 1715–1718.
- Shaw, S.L., Kamyar, R., Ehrhardt, D.W., 2003b. Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* 300, 1715–1718.
- Sheahan, M.B., Rose, R.J., McCurdy, D.W., 2004. Organelle inheritance in plant cell division: the actin cytoskeleton is required for unbiased inheritance of chloroplasts, mitochondria and endoplasmic reticulum in dividing protoplasts. *Plant J.* 37, 379–390.
- Scheible, W.R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., Somerville, C., 2001. Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* *Ixr1* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10079–10084.
- Schwab, B., Mathur, J., Saedler, R., Schwarz, H., Frey, B., Scheidegger, C., Hülskamp, M., 2003. Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in *Arabidopsis thaliana*: actin controls the spatial organization of microtubules. *Mol. Genet. Genomics* 269, 350–360.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E., Rottner, K., 2002. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12, 112–120.

- Smith, L.G., 2001. Plant cell division: building walls in the right places. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 33–39.
- Smith, L.G., Gerttula, S.M., Han, S., Levy, J., 2001. Tangled1: a microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *J. Cell Biol.* 152, 231–236.
- Smith, L.G., Li, R., 2004. Actin polymerization: riding the wave. *Curr. Biol.* 14, R109–111.
- Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J., Vantard, M., 2002. Functional evidence for in vitro microtubule severing by the plant katanin homologue. *Biochem. J.* 365, 337–342.
- Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J., Vantard, M., 2006. Katanin's severing activity favors bundling of cortical microtubules in plants. *Plant J.* 46, 1009–1017.
- Stradal, T.E.B., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., Scita, G., 2004. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14, 303–311.
- Sugimoto-Shirasu, K., Roberts, K., 2003. “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 544–553.
- Szymanski, D.B., Marks, M.D., Wick, S.M., 1999. Organized F-actin is essential for normal trichome morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 11, 2331–2347.
- Thomas, C., Tholl, S., Moes, D., Dieterle, M., Papuga, J., Moreau, F., Steinmetz, A., 2009. Actin bundling in plants. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66, 940–957.
- Van Troys, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerckhove, J., Ampe, C., 2008. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 649–667.
- Vartiainen, M.K., Machesky, L.M., 2004. The WASP-Arp2/3 pathway: genetic insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 174–181.
- Vidali, L., McKenna, S.T., Hepler, P.K., 2001. Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Mol. Biol. Cell* 12, 2534–2545.
- Walker, K.L., Müller, S., Moss, D., Ehrhardt, D.W., Smith, L.G., 2007. Arabidopsis TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Curr. Biol.* 17, 1827–1836.
- Wang, J., Qian, D., Fan, T., Jia, H., An, L., Xiang, Y., 2012. Arabidopsis actin capping protein (AtCP) subunits have different expression patterns, and downregulation of AtCPB confers increased thermotolerance of Arabidopsis after heat shock stress. *Plant Sci.* 193–194, 110–119.
- Wasteneys, G.O., 2002. Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell. Sci.* 115, 1345–1354.
- Wasteneys, G.O., 2004. Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 651–660.
- Wasteneys, G.O., Galway, M.E., 2003. Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annu Rev Plant Biol* 54, 691–722.
- Williamson, R., 1990. Alignment of Cortical Microtubules by Anisotropic Wall Stresses. *Functional Plant Biol.* 17, 601–613.
- Wu, G., Gu, Y., Li, S., Yang, Z., 2001. A Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Rop-Interactive CRIB Motif-Containing Proteins That Act as Rop GTPase Targets. *Plant Cell* 13, 2841–2856.
- Yi, K., Guo, C., Chen, D., Zhao, B., Yang, B., Ren, H., 2005. Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138, 1071–1082.
- Zhang, X., Dyachok, J., Krishnakumar, S., Smith, L.G., Oppenheimer, D.G., 2005. IRREGULAR TRICHOME BRANCH1 in Arabidopsis encodes a plant homolog of the actin-related protein2/3 complex activator Scar/WAVE that regulates actin and microtubule organization. *Plant Cell* 17, 2314–2326.