

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin



Isotypové složení aktinu v rostlinné buňce

bakalářská práce

Kateřina Šlajcherová

Školitelka: RNDr. Kateřina Schwarzerová Ph.D.

Praha, 2011

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením RNDr. Kateřiny Schwarzerové Ph.D., a souhlasím se zveřejňováním této práce.

V Praze, dne 3. května 2011

Kateřina Šlajcherová

Děkuji své školitelce, RNDr. Kateřině Schwarzerové Ph.D, za trpělivost, se kterou mi pomáhala vytvářet tento text, a za povzbuzení, kterého se mi vždy dostalo. Děkuji všem, kteří tento text četli a pomáhali ho vylepšit. Děkuji všem svým učitelům v nejširším slova smyslu. A děkuji své mamince, za všechno.

A upozorňuji, že někteří lidé mohou patřit do více kategorií.

Obsah

1	Abstrakt a klíčová slova	3
2	Abstract and keywords	3
3	Seznam zkratek	4
4	Úvod	5
5	Literární přehled	5
5.1	Role aktinu v buňce	5
5.2	Polymerace aktinu	6
5.3	Aktinové isotypy	7
5.3.1	Struktura aktinových genů	8
5.3.1.1	Arabidopsis thaliana aneb osm paralogů	8
5.3.1.2	Jiné rostliny aneb patálie s ortology	10
5.3.1.3	Co z toho vyplývá?	12
5.3.2	Sekvence aktinových genů	13
5.3.2.1	Vegetativní a reprodukční aktin	13
5.3.2.2	Rostlinný aktin je diverzifikovanější než živočišný	13
5.3.2.3	Konzervovanost sekvence aminokyselin versus diversifikovanost nukleotidové sekvence	14
5.3.2.4	Evoluce aktinových genů v čase	15
5.3.2.5	Poloha aktinových genů na chromosomu	18
5.3.2.6	Co z toho vyplývá?	18
5.3.3	Exprese	19
5.3.3.1	Metody zkoumání exprese, jejich omezení a vliv na interpretaci výsledků	19
5.3.3.2	Reprodukční aktiny	20
5.3.3.3	Vegetativní aktiny	21
5.3.3.4	Co z toho vyplývá?	22
5.3.4	Regulace exprese	23
5.3.4.1	Regulační sekvence	23
5.3.4.2	Role intronu v regulaci exprese	25
5.3.4.3	Translační regulace	26
5.3.4.4	Regulace vnějšími vlivy	27
5.3.4.5	Co z toho vyplývá?	28
5.3.5	Funkce	28
5.3.5.1	Vztah funkce a exprese	29
5.3.5.2	Působení kompetice na redundanci aktinových isotypů	29
5.3.5.3	Role ACT2 ve vývoji kořenů a kořenových vlásků	31
5.3.5.4	Overexprese a ektopická exprese	33
5.3.5.5	Jiné rostliny	35
5.3.5.6	Co z toho vyplývá?	36
6	Závěr	37
7	Přehled citované literatury	38

1 Abstrakt a klíčová slova

Práce se zabývá otázkou redundance aktinových isotypů v rostlinných buňkách, zejména v *Arabidopsis thaliana*; předkládány jsou důkazy svědčící pro redundanci i proti ní. Zaměřuje se na podobnosti a odlišnosti na úrovni struktury genů, sekvencí genů i proteinů, exprese, regulace exprese, funkce. Přes některé konzervované vlastnosti (struktura aktinového genu, proteinová sekvence, ortology jsou si podobnější než paralogy) existují mezi isotypy odlišnosti (regulační a nekódující sekvence, expresní profily), doby divergencí jednotlivých isotypů navíc korelují s významnými událostmi v evoluci rostlin. Dále se práce zaměřuje na funkce aktinových isotypů v rostlinách. Práce zároveň vytyčuje vhodné směry budoucího výzkumu.

Klíčová slova: rostlinný aktin, isotyp aktinu, protein vázající aktin, redundance isotypů

2 Abstract and keywords

The thesis deals with a question of redundancy in plant actin isotypes, especially in a case of *Arabidopsis thaliana*. Available proofs both confirm and disprove the redundancy of actin isotypes. Similarities and differences in gene structure are considered, as well as gene and protein sequence, expression, expression regulation and function. Despite conserved features as the gene structure, protein sequence, or higher similarity among orthologues than paralogues, there are differences in actin gene families such as the regulation of genes expression, the structure and function of non-coding sequences, or expression patterns. Moreover, actin isotypes divergetion times correlate with important events in plant evolution history. The thesis also deals with diverse functions of actin isotypes in plants. In addition, directions for future research are provided as well.

Keywords: plant actin, actin isotype, actin-binding protein, isotype redundancy

3 Seznam zkratek

3'UTR = 3' untranslated region, netranslatovaná sekvence na 3 konci

5'UTR = 5' untranslated region, netranslatovaná sekvence na 5 konci

A = báze adenin

ACT1 = aktin 1 huseníčku *Arabidopsis thaliana*

ACT1/3 = aktin 1 a 3 huseníčku *Arabidopsis thaliana*

act1-3 = mutovaný aktin 1 huseníčku *Arabidopsis thaliana*, varianta mutace 3

act2-2D = mutovaný aktin 2 huseníčku *Arabidopsis thaliana*, varianta mutace 2D

ADP = adenosindifosfát

ADF = actin depolymerizing factor, faktor depolymerizující aktin

ATG = triplet A, T, G, zahajující translaci

ATP = adenosintrifosfát

C = báze cytosin

CaMV35S = druh rostlinného promotoru používaný pro expresi ve fúzních konstruktech

CD = conserved domain, konzervovaná doména

der1-1 = zde mutant deformed roots s poškozeným ACT2, varianta 1-1

F-aktin = filamentární aktin, aktin vázaný ve filamentu

G = báze guanin

G-aktin = globulární aktin, volný monomerický aktin

GhACT1 = aktin 1 bavlny *Gossypium hirsutum*

GUS = beta-glukuronidáza

MAb45a = mouse antibody 45a, myší protilátka 45a

MABGE = mouse antibody general eukaryotic, myší protilátka proti eukaryotickým aktinům

MABGP = mouse antibody general plant, myší protilátka proti rostlinným aktinům

mRNA = messenger ribonucleic acid, mediátorová ribonukleová kyselina

NCBI = National center for biotechnology information (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Pa1 = aktin 1 smrku *Picea abies*

PDB = Protein databank, databáze proteinových struktur (www.rcsb.org)

POAc1 = aktin 1 bramboru *Solanum tuberosum*

PtrACT1 = aktin 1 topolu *Populus trichocarpa*

PuPy = sekvence bohatá na purinové sekvence, po nichž následují pyrimidinové sekvence

RUBISCO = ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa

RT-PCR = real time polymerase chain reaction

rot126 = zde mutant act2-2D

SAA1 = aktin 1 strigy *Striga asiatica*

SC-RT-PCR = single cell RT-PCR

T = báze thymín

T-DNA = DNA (deoxyribonukleová kyselina) transpozónu

TATA box = sekvence bohatá na TA repetice, leží před začátkem transkripce

wt = wild type, původní nepoškozená alela

4 Úvod

Aktin je konzervovaným všudypřítomným esenciálním proteinem. Je kódovaný velikými a diverzifikovanými genovými rodinami a je zodpovědný za mnohé buněčné děje. Jeho struktura, sekvence, regulace, exprese i funkce jsou dobře známy. Posledních zhruba patnáct let je ovšem pozornost věnována i významu jeho jednotlivých isotypů. Vzhledem k tomu, že aktinové isotypy se zřejmě v genomu udržují po dlouhou dobu, nejde o plně redundantní geny a proteiny; zřejmě mají specifické role v buňce. Studována je nejen sekvence a struktura genů, exprese a její regulace, nýbrž i funkce aktinových isotypů. Tato práce si klade za cíl odpovědět na otázku, jaký význam má existence různých aktinových isotypů v rostlinné buňce.

V této práci jsou diskutovány pouze rostlinné aktiny, zejména pak aktiny modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Pozornost je věnována struktuře aktinových genů, sekvencím, expresi, regulaci exprese a funkci. Text postupuje od jednoduššího ke složitějšímu a komplexnějšímu, stejně jako tomu bylo v historii při zkoumání aktinových isotypů. Závěr pak obsahuje syntézu získaných poznatků a odpověď na otázku položenou v tomto úvodu – pokud nejsou isotypy aktinu v rostlinné buňce redundantní, jaký je význam existence jednotlivých isotypů?

5 Literární přehled

5.1 **Role aktinu v buňce**

Aktin, jak už napovídá jeho jméno, hraje roli všude tam, kde je potřeba pohyb. Role aktinu v buňce byly jednou z prvních oblastí výzkumu a jsou tedy dobře zpracovány v mnoha přehledných pracích, např. Steiger a Schliwa (1987), Smith a Oppenheimer (2005), McCurdy et al. (2001). Aktin a proteiny vázající aktin hrají úlohu v určování buněčné polaridy, s kterou úzce souvisí apikální růst kořenových vlásků, listových trichomů a pylových láček, které se staly významnými modely pro zkoumání vztahu apikálního růstu a aktinu, případně jeho isoform. Dále se aktin podílí na tvorbě buněčné stěny, pohybu organel (např. cyklóza chloroplastů při osvitě, migrace vegetativního jádra dolů pylovou láčkou) a cytoplazmy, mezibuněčné komunikaci, odpovědi na útok patogenů, xylogenezi, embryogenezi, jaderných procesech, regulaci tvaru a turgoru průduchových buněk a průsvitu plasmodesmat, pomáhá rovněž umisťovat receptory do membrány a distribuuje polysomy. Jednotlivé funkce jsou spolu propojeny, například na růstu buněčné stěny se aktin podílí dopravováním

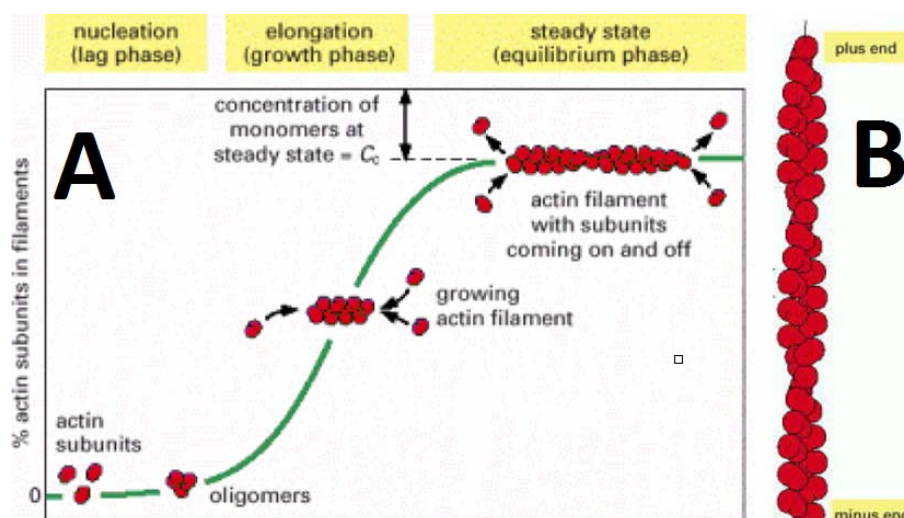
membránových komponent ve váčcích k místu stavby stěny, tvorba gradientu při apikálním růstu se rovněž děje transportem váčků. Spekuluje se o funkci aktinu v buněčném dělení, při kterém kolokalizuje s mikrotubuly a je možné, že s nimi spolupracuje, například dopravou látek k dělicímu vřeténku, určením roviny dělení nebo reorientací vřeténka v anafázi a telofázi.

Z výše zmíněného vyplývá zásadní význam aktinu a jeho všudypřítomnost napříč organismy.

5.2 Polymerace aktinu

Aktin se vykytuje ve dvou formách – monomerický G-aktin a ve filamentech vázaný F-aktin. Polymerací G-aktinu vznikají protofilamenta, která se splétají do pravotočivých helikálních filament, přičemž jedno filamentum je tvořeno dvěma protofilamenty, viz. **obr. 1b**. Aktinové monomery mají tvar kapsy (viz. **obr. 9**), uvnitř které je vazebné místo pro ATP. Monomery vázající ATP jsou připraveny k polymeraci do filamenta, po připojení do filamenta následuje hydrolyza ATP. Protože je polymerace na plus konci rychlejší, monomery nestíhají hydrolyzovat ATP; plus konec je tedy tvořen spíše ATP vázajícími molekulami, minus konec naproti tomu váže především ADP. Po uvolnění z filamenta musí monomer disociovat od ADP a navázat nové ATP, aby se mohl znovu zapojit do filamenta. Monomery se vážou jedním směrem, orientace typu head-to-tail, ATP-vazebná kapsa míří k minus konci (Alberts et al., 2008).

Průběh polymerace lze vyjádřit grafem, viz. **obr. 1a**. Z tvaru aktinových monomerů a způsobu jejich napojování vyplývá, že výsledné vlákno má dva odlišné konce, zvané plus



Obr. 1a Graf vyjadřující průběh polymerace G-aktinu do filament. Během lag-fáze dochází k nukleaci. Jakmile je vytvořen dostatečně velký oligomer, který je schopen odolávat termodynamickému rozbití, nastává růstová fáze. V růstové fázi se prodlužuje polymer připojováním podjednotek. V rovnovážné fázi k prodlužování filamenta už nedochází, neboť koncentrace volných monomerů dosáhla kritické koncentrace, při které se rychlost připojování podjednotek vyrovnala rychlosti jejich odpojování.

Obr. 1b Aktinová filamenta jsou tvořena pravotočivým helixem ze dvou protofilament. Dle Alberts et al (2008).

(barbed end) a mínus (pointed end). Kritické koncentrace (viz. **obr. 1a**) se pro oba konce liší. Lze říci, že k rovnovážnému stavu dochází, když se okolní koncentrace monomerů nachází mezi kritickými koncentracemi pro jeden a druhý konec. Na plus konci pak dochází k růstu vlákna, zatímco na mínus konci k jeho depolymeraci. Délka vlákna se tedy nemění, stav je ale dynamický a vláknem neustále „protékají“ monomery. Tento děj se nazývá treadmilling (Alberts et al., 2008)

F-aktin i G-aktin asociují s mnoha proteiny vázajícími aktin, které mohou měnit jejich schopnost polymerace, svazkovat či propojovat filamenta, bránit monomerům zapojovat se do filament, bránit filamentům disociovat na monomery, stříhat filamenta, podněcovat nukleaci a tak podobně. Pro přehled viz. McCurdy et al. (2001).

Je pravděpodobné, že pro různé isotypy aktinu se liší kritické koncentrace nutné pro polymeraci nebo schopnost asociovat s proteiny vázajícími aktin, různé isotypy by mohly vykazovat různou ochotu k hydrolyze ATP, různou rychlost disociace od ADP a další vlastnosti.

5.3 Aktinové isotypy

Aktinovými isotypy máme na mysli různé varianty aktinu, vyskytující se v jednom organismu. Důležitou otázkou v této práci je, jak se od sebe jednotlivé isotypy aktinu odlišují.

Historické pořadí objevů při zkoumání aktinových isotypů rostlin je vidět z dat prací, věnujících se jednotlivým aspektům aktinových isotypů, a tato práce toto pořadí do značné míry následuje. Nejprve byl zkoumán aktin jako celek a jeho funkce v rostlinné buňce (rev. in Steiger a Schliwa, 1987), zájem o aktinové isotypy se datuje do 90. let 20. století. Nejprve byla zkoumána jejich genová struktura, sekvence a exprese (např. An et al., 1996a, An et al., 1996b, Huang et al., 1997 atd.), poté evoluční vývoj isotypů aktinových genů v historii (např. Gilliland et al., 1998, Vitale et al., 2003 atd.), pak regulace exprese (např., Kandasamy et al., 2001, Vitale et al., 2003, An a Meagher, 2010 atd.) a funkce (např. Ringli et al., 2002, Gilliland et al., 2002, Nishimura et al., 2003 atd.).

Výše zmíněný sled je pochopitelně pouze orientační a udává spíše směr poznávání – od jednoduššího ke komplexnějšímu. O oblastech zkoumaných již dlouho (sekvence, struktura) máme informací poměrně dost, z oblastí, jejichž prozkoumávání začalo teprve nedávno (odlišnosti ve funkci aktinových isotypů) je informací k dispozici méně. S nadsázkou by se dalo říci, že známe strukturu, sekvence a expresi, studujeme regulaci exprese a prozatím spíše spekulujeme o funkci.

Jako nedostatečné by se daly označit naše informace v oblasti fyzikálně-chemických odlišností isotypů, podmíněných jejich primární strukturou. Například v databázi PDB k dispozici není ani jediný model aktinového monomeru jakékoliv rostliny, za nejbližší použitelný model lze považovat strukturu svalového aktinu králíka, viz. **obr. 9**. Za takového stavu vědění je myšlenka detailních modelů aktinových isotypů, z nichž by bylo možné porozumět podstatě jejich rozdílů, zatím nepředstavitelná. Bude zapotřebí biochemických studií, které by vysvětlily, jaký vliv mají drobné odchylky v primární sekvenci na úrovni terciární struktury a jak se tyto odchylky dále odrazí například na dynamice polymerace/depolymerace, stabilitě aktinových filament, či interakcích s dalšími proteiny. Na základě takovýchto fyzikálně-chemických informací by pak případně bylo možno vytvořit matematický model, který by pomohl nahlédnout, co se děje při interakcích různých množství různých isotypů v různých částech rostliny v různých časech a fázích ontogenetického vývoje, zkrátka nahlédnout, jak funguje „aktinový metabolismus“ jako celek. Za jakýsi první pokus nahlédnout do této komplexní oblasti můžeme považovat teorii isotypové flexibility, kterou ve své práci představili Meagher et al. (1999), na odlišné interakce různých isotypů s cytoskeletálními jedy pak upozornili Schwarzerova et al. (2010). Komplexní porozumění je stále velmi daleko, avšak jakákoliv pokročilejší zjištění vždy stojí na poznacích, získaných studiem základů. Proto se v další kapitole podíváme na strukturu genů aktinových isotypů a dále budeme postupovat ke složitějším a komplexnějším tématům.

5.3.1 Struktura aktinových genů

V této kapitole budou představeny shody a odlišnosti ve struktuře genů aktinových isotypů, a to jak v rámci paralogů (různé isotypy aktinu v rámci jednoho organismu), tak v rámci ortologů (odpovídající si aktinové isotypy umístěné v různých organismech).

5.3.1.1 *Arabidopsis thaliana* aneb osm paralogů

Modelovou a dobře prozkoumanou rostlinou je *Arabidopsis*, jež má 10 aktinových genů (viz. **obr. 1**), z nichž 8 je funkčních. Zbylé dva (ACT9, ACT5) jsou pseudogeny s odlišnou strukturou a bez detekovatelné produkce mRNA či proteinu (Huang et al., 1997). Důvodně se předpokládá, že každý isotyp je kódován pouze jednou kopií genu, což bylo prokázáno u ACT1 a ACT3 (An et al., 1996a), ACT11 (Huang et al., 1997), ACT4 a ACT12 (Huang et al., 1996) a ACT7 (McDowell et al., 1996a). Díky značné probádanosti této rostliny lze na jejím příkladu prozkoumat míru konzervovanosti genové struktury paralogů, tedy různých aktinových isotypů v rámci jedné rostliny.



Obr. 2 L = leader exon, Li = leader intron, 1 – 4 = exon 1 – 4, 1i – 4i = intron 1 – 4, šipka = začátek transkripce, ATG = iniciační kodón translace, AATAAA = polyadenylační element, tmavě šedá = translatované části, světle šedá = pouze transkribované části, tučná černá čára = regulační oblasti. Upraveno dle McDowell et al. (1996).

Obecná struktura aktinových genů (viz. **obr. 2**) je velmi konzervativní – 5 exonů (leader exon a exon 1 – 4) a 4 introny (leader intron a intron 1 – 3), pouze ACT2 postrádá intron 1 - má fúzované exony 1 a 2. Některé aktiny, např. ACT2 a ACT8 postrádají konsenzuální polyadenylační element AATAAA a adenylaci řídí jiné sekvence. Častý je výskyt více polyadenylačních míst (An et al., 1996). ACT11 jich má pět, z toho nejčastěji se využívají tři poslední (Huang et al., 1997). An et al. (1996a) uvádějí, že ACT1 má čtyři polyadenylační místa, přičemž buď je jedno z těchto čtyř míst hodně používané, nebo se jedná o artefakt detekční metody a ACT1 má ve skutečnosti pouze tři polyadenylační místa), ACT3 má tři (An et al., 1996a). U ACT7 bylo prokázáno jedno, ale další autoři práce nehledali (McDowell et al., 1996a), ACT4 a ACT12 jich mají také více (Huang et al., 1996).

Začátek transkripce se nachází na začátku leader exonu, obecně u rostlin – a nejinak je tomu u aktinů *Arabidopsis thaliana* – je ovšem obvyklé mít více začátků transkripce. Konkrétně ACT1 má tři, které jsou od sebe vzdáleny 25 bází (An et al., 1996a), ACT7 má dvě (McDowell et al., 1996b).

Ve směru transkripce (downstream) od TATA boxu, tedy v leader intronu a exonu se mohou vyskytovat sekvence bohaté na báze cytosin a thymin, v ACT11 tyto báze tvoří 70% (64%) všech bází v exonech (intronech) (Huang et al., 1997). Autoři dokonce spekulují, že v případě oněch CT bohatých oblastí v leaderu by se mohlo jednat o sdílený regulační element, který byl v ACT11 hledán a nenalezen. V ACT1 a ACT3 byly tyto CT bohaté oblasti také nalezeny, často se v nich opakují CCT, CCTT a TTC repetice (An et al., 1996a). Tyto CT bohaté sekvence v leaderu byly nalezeny i u rýže a u sóji (Huang et al., 1997). Z fylogenetických analýz vyplývá blízkost aktinových genů rýže a ACT11 *Arabidopsis*, zdá se tedy, že sekvenčně má ACT11 blíže k rýži než k ostatním genům *Arabidopsis* (Huang et al., 1997). To je ovšem mezi aktinovými isotypy obecný jev – ortology jsou si navzájem podobnější než paralogy. Bhattacharya et al. (2000) zjistili, že aktinové isotypy krytosemenných lze rozdělit na dvě větve, vegetativní a generativní aktiny, přičemž větev vegetativních aktinů je parafyletická a obsahuje větev reproduktivních aktinů, které tvoří

monofyletickou skupinu. Ve světle této informace jsou sdílené CT bohaté oblasti mezi ACT11 a rýží pochopitelné.

Před transkribovanými sekvencemi se nacházejí regulační sekvence, které mohou obsahovat konzervované regulační elementy známé z jiných genů. Např. u ACT11 takové sekvence nalezeny nebyly (Huang et al., 1997), avšak u ACT7 nalezeny dle McDowell et al. (1996a) byly. Všechny regulační sekvence ACT7 se nacházejí v regulační oblasti těsně před TATA boxem, téměř žádné se nevyskytují v leader exonu nebo intronu, jak se spekuluje u ACT11.

Pro ACT7 se jedná o:

- GARE1 a GARE2 (dvanáctinukleotidové regulační sekvence v promotoru alfa-amylasy ječmene, 9 z těchto 12 nukleotidů ACT7 sdílí);
- GARE3 a GARE4 (nachází se v tomtéž genu);
- auxin-responsivní-element (obvykle se skládá ze dvou dvanáctinukleotidových sekvencí oddělených třemi nukleotidy, ACT7 sdílí 11 z oněch dvanácti nukleotidů. Oddělovací část se skládá sice z 22 nukleotidů, obsahuje ale palindrom, který by se mohl spojit a vytvořit tak vlásenku, která by obě poloviny fyzicky přiblížila);
- Nod1 a Nod2 motivy (v kořenových hlízkách podporují rapidní růst, což by odpovídalo předpokládané roli ACT7 v rostlinném organismu (viz. např. kapitola 5.3.5.2), ACT7 sdílí 7 z 8 jejich nukleotidů);
- ABRE1 – 3 (regulační sekvence, která se účastní dráhy reagující na kyselinu abscisovou, ACT7 obsahuje 10, 10 a 8 nukleotidů z původní jedenácti nukleotidové sekvence, autoři studie spekulují, že tyto ABRE elementy v ACT7 by mohly hrát roli v inhibici ACT7 ve zralých pletivech);
- O2S1 a O2S2 (sekvence nutné pro správnou funkci GARE a ABRE elementů v alfa-amylase ječmene, ACT7 obsahuje 9 z 12 nukleotidů původní sekvence).

ACT7 je díky všem těmto regulačním sekvencím unikátní, protože mu umožňují reagovat na stimuly vnějšího prostředí. Vzhledem k definované expresi všech aktinových genů ale musí všechny aktiny obsahovat nějaké regulační sekvence, které ovšem mohou být unikátní (lze je tedy těžko identifikovat), nebo slabě konzervované (lze je tedy těžko detekovat).

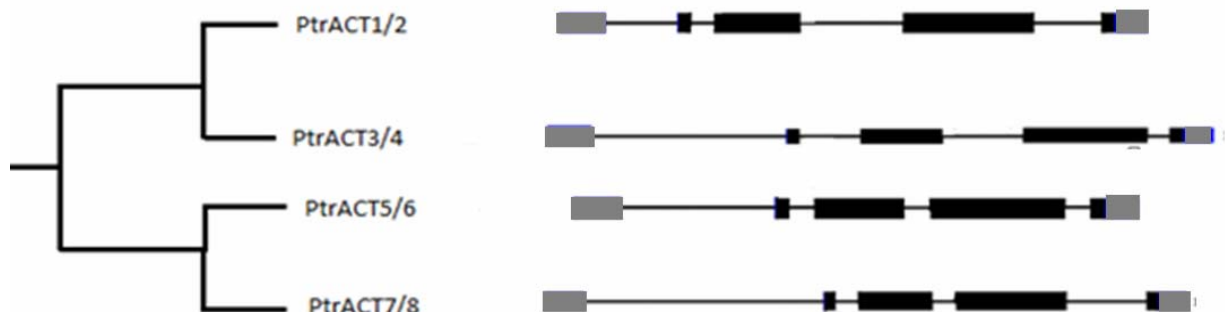
5.3.1.2 Jiné rostliny aneb patálie s ortology

Struktura aktinových genů je alespoň částečně známa u *Arabidopsis thaliana* (Huang et al., 1996, Huang et al., 1997, An et al., 1996ab, McDowell et al., 1996), *Striga asiatica*

(Florea a Timko, 2001), bavlníku *Gossypium hirsutum* (Li et al., 2005), banánovníku *Musa ssp* (Hermann et al., 2001), topolu *Populus* (Zhang et al., 2010), cizrny *Cicer arietinum* (Peng et al., 2009), hrachu *Pisum sativum* (Zhang et al., 2004), lékořice *Glycyrrhiza uralensis* (Wang et al., 2009) a dalších rostlin. Databáze NCBI uvádí k 3.5. 2011 nukleotidové sekvence vztahující se k aktinu pro celkem 287 rostlinných druhů. Pro představu, sekvence živočišných aktinů jsou (dle stejného zdroje) známy pro 584 druhů. Zdálo by se tedy, že přinejmenším základní informace o genech aktinových isotypů máme u značného množství rostlin, ovšem porovnávání ortologů je obtížné. Dostupné znalosti jsou totiž u většiny rostlinných druhů značně neúplné. Často je známo jen několik isotypů, přestože se důvodně předpokládá existence dalších (Schwarzerova et al. (2010) našli čtyři aktinové geny ve smrku, předpokládají jich však více; Florea a Timko (1997) objevili tři aktinové geny v rostlině *Striga asiatica*, předpokládají jich však až patnáct), případně je známa sekvence bez dalších podrobností o genové struktuře, nejkuli dalších informací o expresi atp.

Z těchto důvodů je složité srovnávat geny pro aktinové isotypy mezi rostlinnými druhy, vytvoření celistvého obrazu je však do budoucna pravděpodobně možné, rostlinné aktinové geny jsou totiž dle Zhang et al. (2010) monofyletické. Zatím můžeme poukázat pouze na několik zajímavých případů.

Zkoumána byla struktura aktinových genů v bavlníku *Gossypium hirsutum*. Aktin hraje roli při extrémní elongaci vláken bavlny, která jsou tvořena jedinou buňkou, přičemž tato vlákna mají hospodářské využití. Co se týče struktury aktinových genů, je tato rostlina učebnicově konzervovaná. V bavlně bylo nalezeno 16 aktinových genů (GhACT1-16), všechny s klasickou konzervovanou strukturou i délkou, pouze GhACT8 má 378 aminokyselin, neboť u něj došlo k inzerci Gln151. Dále je (u všech bavlníkových genů) posunuto rozhraní exon1-intron2, v důsledku inzercce tripletu CAG nezačíná intron2 na



Obr. 3 Fylogenetické vztahy jednotlivých aktinových genů topolu a pro ně typická organizace. Znázorněny jsou jen transkribované oblasti, translatované oblasti jsou pak označeny černými boxy (exony 1 – 4). 3'UTR a 5'UTR jsou znázorněny šedými boxy, introny černými čarami. Podle Zhang et al. (2010).

aminokyselině 152, jak je tomu u všech známých aktinových genů, ale na aminokyselině 153. Důvody a důsledky jsou neznámé (Li et al., 2005).

Banánovník *Musa ssp.* má také klasickou strukturu s 377 aminokyselinami a čtyřmi exony. Rozdílem oproti *Arabidopsis* je jediné místo začátku transkripce a jediný polyadenylační element, autoři práce ovšem další nehledali (Hermann et al., 2001).

Topol *Populus* obsahuje 8 aktinových genů klasické organizace, které lze fylogeneticky rozdělit do dvou skupin a ty do dalších dvou podskupin. Z hlediska délky intronů se aktinové geny topolu rozpadají do čtyř podskupin, které přesně odpovídají čtyřem skupinám definovaným fylogeneticky, a potvrzují tak platnost fylogenetického stromu, jehož schematické znázornění je spolu s intron-exonovou organizací charakteristickou pro danou podskupinu na **obr. 3**. Zajímavá je zde výrazná délková variabilita leader intronu, která by mohla mít význam v regulaci exprese. Zkoumány byly i expresní profily jednotlivých isotypů, které, stejně jako u *Arabidopsis* (viz. dále), odpovídaly fylogenetickému stromu (Zhang et al., 2010).

Výjimkou v míře konzervovanosti struktury genů aktinových isotypů je parazitická rostlina *Striga asiatica*. Striga je obligátní parazit napadající kořeny trav, čímž působí škody na hospodářských výnosech. Během diferenciací haustoria se mění rovina buněčného dělení, a tedy zřejmě i aktivita aktinového cytoskeletu. Bylo zjištěno, že striga obsahuje minimálně tři aktinové geny (SAA1 – 3), autoři práce jich však předpokládají až patnáct. Stavba SAA1 je podobná genům v *Arabidopsis*. SAA2 chybí intron 2, který všechny doposud známé aktinové geny mají, s výjimkou POAc99¹. SAA3 má klasickou strukturu aktinových genů po intron 2, po něm následuje unikátní sekvence. Buď se tedy jedná o pseudogen, nebo o protein podobný aktinu (Florea a Timko, 1997).

5.3.1.3 Co z toho vyplývá?

Všechny doposud zkoumané rostliny mají více aktinových isotypů. Ze všech prací vyplývá, že i přes drobné mezidruhové odlišnosti jsou aktinové geny, co se týče své struktury, podivuhodně konzervované, a to jak mezi ortology, tak mezi paralogy. To nasvědčuje působení selekčního tlaku proti jejich změnám a tedy významu všech isotypů pro rostlinu.

Faktem hodným pozornosti jsou regulační sekvence v 5'UTR ACT7 a v leader intronech některých ostatních aktinů, které svojí odlišností poukazují na možnost odlišné regulace jednotlivých isotypů, což je silným argumentem pro neredundanci.

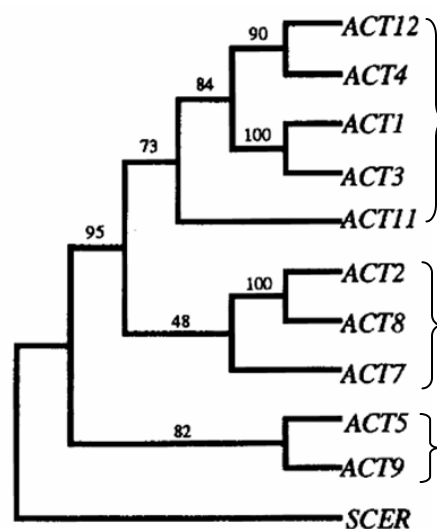
¹ Aktinový pseudogen bramboru obsahující mnoho posunových (frameshiftových) mutací, dva stop kodóny pro terminaci translace přímo v sekvenci a úplně postrádá všechny introny, nejen intron 2

5.3.2 Sekvence aktinových genů

Cílem této kapitoly je opět poukázat na odlišnosti a rozdíly mezi jednotlivými isotypy, zvážit míru jejich konzervovanosti, dále pak prozkoumat jejich evoluční vývoj a polohu na chromosomu.

5.3.2.1 Vegetativní a reprodukční aktin

Aktin je v rostlinách kódován genovými rodinami. Členy těchto rodin lze u *Arabidopsis* rozdělit podle sekvence a expresního profilu na vegetativní a generativní aktiny. V rámci těchto dvou tříd se aktiny dále shlukují do svou expresí a sekvencí si podobných podtříd. V *Arabidopsis* je podtříd pět, tři reprodukční (ACT12/4, ACT1/3, ACT11) a dvě vegetativní (ACT2/8, ACT7), viz. obr. 4. Toto dělení zavedl McDowell et al. (1996b) a další práce ho od té doby dodržují. Reprodukční a vegetativní třídy se od sebe liší dle Kandasamy et al. (1999) o 4 – 6,8% a oddělily se před 350 – 400 mil. let, tedy dávno před divergencí nahosemenných a krytosemenných.



Obr. 4 Fylogenetický strom vztahů aktinových genů v *Arabidopsis thaliana*. SCER označuje outgroup *Saccharomyces cerevisiae*, ACT1 – 12 aktinové geny. Čísla u větví udávají počet substitucí, které se udály během vývoje dotyčného genu. Svorky označují (shora) reprodukční třídu, vegetativní třídu a pseudogeny. Podle McDowell et al. (1996b).

5.3.2.2 Rostlinný aktin je diverzifikovanější než živočišný

Zatímco nejdivezifikovanější živočišné isotypy aktinu (svalový a cytoplazmatický aktin v létacích svalech *Drosophily*) se od sebe liší v 5% aminokyselinové sekvence, rostlinné reprodukční a vegetativní aktiny se od sebe liší v 4 – 7% (v sóje o 6 -9%, Florea a Timko, 1996), tedy stejně či více (An et al., 1996b). Navíc se změny aminokyselin týkají u rostlinného aktinu 2 – 3 krát častěji nabitých aminokyselin, které mají na konformaci proteinu větší vliv (Huang et al., 1997). Např. člověk má šest aktinových isotypů, které se liší aminokyselinovými záměnami na celkem osmi místech. Všechny tyto záměny jsou konzervativní, zatímco mezi osmi aktinovými geny *Arabidopsis* pozorujeme sedm míst s nekonzervativní záměnou, dvě záměny za prolin, což může měnit páteř proteinu, a dále mnoho konzervativních záměn (Kandasamy et al., 1999). Tyto záměny se navíc u rostlin nacházejí častěji na povrchu nativního proteinu než u živočichů (Kandasamy et al., 2007), přestože u aktinu se protein-proteinových interakcí účastní téměř celý povrch proteinu, takže

neexistuje „bezpečné místo“, na němž by záměny aminokyselin neměly vliv na celkové chování proteinu. Izoelektrický bod jednotlivých isotypů rostlinného aktinu se liší až o 0,7 pH, zatímco u živočichů nejvíce o 0,3 pH – to platí pro živočišný svalový a cytoplasmatický aktin oddělený před 500 miliony let (Meagher et al., 1999).

Je zřejmé, že diverzifikovanost rostlinných aktinů se přinejmenším vyrovná diverzifikovanosti živočišných aktinů, u nichž je odlišnost funkce jednotlivých isotypů a tedy jejich neredundance lépe prozkoumána a existuje. Například při záměně svalového a cytoplasmatického aktinu v létacích svalech *Drosophily* vzniká flightless fenotyp, tedy cytoplasmatický aktin zjevně není schopen komplementovat ztrátu svalového – autoři práce spekulují, že hlavním důvodem je neschopnost cytoplasmatického aktinu správně interagovat s proteiny vázajícími aktin (Brault et al., 1999). Dá se proto předpokládat minimálně podobná funkční rozrůzněnost aktinových isotypů v rostlinách jako v živočiších, kde se jednotlivé isotypy liší v polymeraci, ribosylaci, ochotě k tepelné denaturaci, vazbě proteinů vázajících aktin a dalších důležitých vlastnostech.

5.3.2.3 Konzervovanost sekvence aminokyselin versus diversifikovanost nukleotidové sekvence

Nukleotidová a aminokyselinová sekvence aktinových isotypů se liší svou konzervovaností, stejně jako nukleotidová sekvence kódujících a nekódujících úseků. Aminokyselinová sekvence je víceméně podobná, geny však obsahují mnoho tichých substitucí (substituce v kodónu, která však nemění jeho význam) a také jejich nekódující sekvence se liší. Přehledně zpracovali typický příklad diverzity aktinových genů Li et al. (2005) na bavlníku. Jejich 16 aktinových genů má 70-97% identitu na úrovni nukleotidové sekvence kódujících úseků a 93-99% identitu v aminokyselinové sekvenci. Aktinové geny banánovníku se liší v aminokyselinové sekvenci o 0 – 6 %, zatímco v nukleotidové sekvenci identita kódujících oblastí činí pouhých 80 – 96 % (Hermann et al., 2001). Třídy ACT2/8 z *Arabidopsis* se od sebe liší jen v jediné aminokyselině, glu3 -> asp3, což není zásadní změna, náboj aminokyseliny zůstává. Na základě množství jejich tichých substitucí (dle BLASTu sekvenční shoda ACT2 a ACT8 na nukleotidové úrovni činí 87%) a odlišnosti nekódujících sekvencí, které spolu ani nehybridizují (An et al., 1996b), bylo určeno, že se oddělily už před zhruba 30 miliony let (Huang et al., 1997). ACT1/3 (An et al., 1996a) a ACT4/12 (Huang et al., 1996) se liší v aminokyselinové sekvenci také jedinou substitucí (dle databáze NCBI fen226-> tyr226), zatímco v nekódujících sekvencích a v tichých substitucích jsou zcela odlišné, pouze ACT4/12 sdílí několik homologií v 5'UTR. Podle Gilliland et al. (1998) se u

Arabidopsis všechny tři podtřídy obsahující dvojici aktinů oddělily před 30-50 miliony let a jejich proteiny se liší jedinou aminokyselinovou záměnou, což činí 0,2% rozdílu. Přitom v tichých substitucích se liší o 56 – 86%, z čehož Gilliland et al. (1998) usuzují, že aktinové geny jsou pod silnou selekcí.

Nesoulad v rozrůzněnosti mezi konzervovaností kódujících a nekódujících sekvencí a mezi nukleotidovou sekvencí kódujících úseků a výslednou aminokyselinovou sekvencí (tedy množství tichých substitucí) lze vysvětlit časným oddělením jednotlivých isotypů při působení silného selekčního tlaku proti dalším změnám výsledného proteinu. Vznik a udržení nových isoform i za přítomnosti tohoto silného selekčního tlaku naznačuje neredundanci a výhodnost jednotlivých isoform. Tuto teorii podporuje také odlišnost ACT5 a ACT9, které - byvše pseudogeny - nejsou pod selekčním tlakem, a tak divergovaly nejdále.

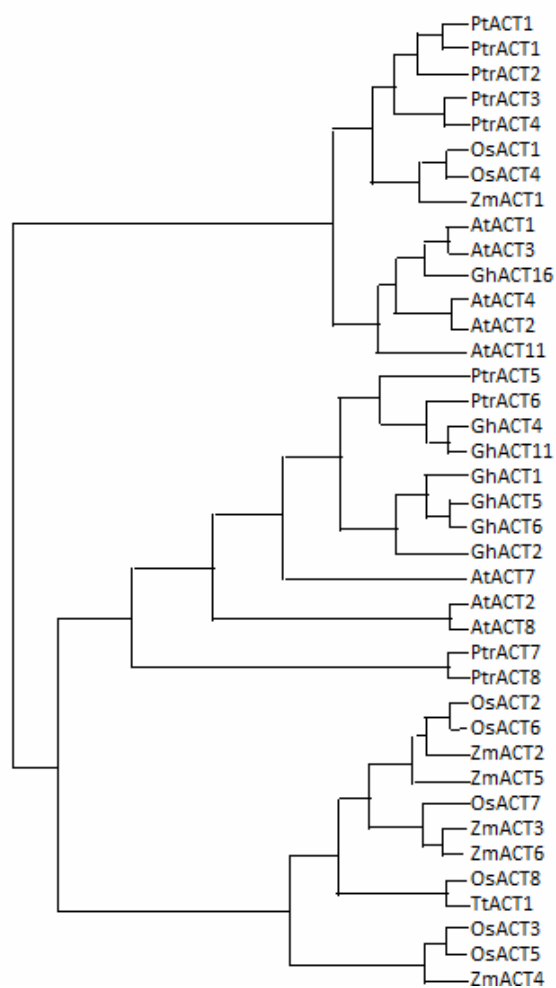
5.3.2.4 Evoluce aktinových genů v čase

Předpokládáme-li nulový selekční tlak na introny (takový předpoklad ovšem může být zrádný – viz. kapitola 5.2.5 o roli intronů v regulaci exprese), je možné odhadnout stáří jednotlivých genů. Aktiny jsou často podobnější svým ortologům (tytéž geny v jiných druzích) než paralogům (jiné, ale příbuzné geny v tomtéž organismu), což lze vidět na **obr. 5**. Lze tedy zjistit, zda se druhy oddělily před či po duplikaci a rozrůznění určitých isotypů, a pokud známe datování této události, lze podle ní přibližně určit dobu oddělení druhů a obráceně. Tento postup aplikovali Zhang et al. (2010) u topolu a zjistili, že PtrACT1/2/3/4 se od PtrACT5/6/7/8 oddělily před rozdělením jednoděložných a dvouděložných rostlin. Byla to první duplikace aktinového genu, a dost možná je to právě ta, která vedla k rozlišení vegetativního a reprodukčního aktinu také u *Arabidopsis*. Je to vidět i na **obr. 5**, na kterém dvě hlavní větve obsahují obě jak jednoděložné, tak dvouděložné rostliny. K dalším duplikacím došlo už po rozdělení rostlin na jednoděložné a dvouděložné, a tak aktiny ve větvích nižších řádů se už vyskytují pouze v rostlinách buď jednoděložných, nebo dvouděložných. Např. PtrACT5/6 se od PtrACT7/8 oddělily před rozdělením *Arabidopsis* a topolu před 100 – 120 miliony let, PtrACT5/6 má tedy blíže ke svým ortologům v *Arabidopsis* než k PtrACT7/8. PtrACT1/2 se od PtrACT3/4 oddělilo až po rozdělení topolu a vrby před 60 – 65 miliony let, PtrACT1/2 má tedy blíže k PtrACT3/4 než ke svým ortologům z vrby (Zhang et al., 2010).

Historický vývoj genů aktinových isotypů u *Arabidopsis* zkoumali McDowell et al. (1996b). Zjistili, že předkové vegetativní a reprodukční třídy *Arabidopsis* se od sebe oddělili před cca 350 – 500 miliony let. Podobný odhad nabízejí Kandasamy et al. (1999), kteří uvádějí dobu divergence před 350 – 400 miliony let. To je doba, do které se umisťuje vystoupení rostlin na souš a vývoj reprodukčních struktur. Při vývoji struktur, potřebných k adaptaci na radikálně odlišný životní styl, sehrála diverzifikace aktinových isotypů jistě nemalou úlohu. Bhattacharya et al. (2000) říkají, že se zvyšující se komplexitou suchozemských rostlin rostl počet jejich genů pro aktinové isotypy. Zpravidla platí, že zelené řasy obsahují pouze jeden aktin, mechy kolem tří, vyšší rostliny kolem deseti. Autoři tvrdí, že zásadní okamžik nastal při vzniku krytosemenných, kdy zřejmě došlo k oddělení vegetativních a generativních isotypů (Bhattacharya et al., 2000).

Jednotlivé podtřídy aktinových isotypů v *Arabidopsis thaliana* se od sebe oddělily později, Gilliland et al. (1998) tvrdí, že k oddělení podtříd obecně došlo před 150 – 300 miliony let. ACT1/3 se od ACT4/12 oddělil před 150 – 450 miliony let (An et al., 1996a), ACT11 od ACT1/3/4/12 před 200 miliony let (Huang et al., 1997). Při pohledu na **obr. 4** je ovšem zřejmé, že ACT11 se ve třídě reprodukčních aktinů musel oddělit jako první, teprve po něm mohlo dojít k divergenci ACT1/3 a ACT4/12. Buď se tedy odhad této divergence pohybuje kolem své spodní hranice 150 milionů let, nebo jsou získaná čísla (případně **obr. 4**) nepřesná. Je zřejmé, že naše znalosti aktinových isotypů stále nejsou dostatečné. Také je ovšem vhodné podotknout, že pokud by byla správná

naše spekulace v dalším odstavci o korelaci mezi divergencí aktinových isotypů a vývojem struktur kvetoucích rostlin, pak by umístění divergence ACT1/3 od ACT4/12 ke spodní



Obr. 5 Fylogenetický strom aktinů různých druhů rostlin. Ptr = *Populus trichocarpa*, Os = *Oryza sativa*, At = *Arabidopsis thaliana*, Zm = *Zea mays*, Gh = *Gossypium hirsutum*. Dle Zhang et al. (2010).

hranici uváděného období bylo žádoucí a logické, neboť by se časově shodovalo se vznikem struktur krytosemenných rostlin před 200 miliony let.

Kandasamy et al. (1999) oddělení ACT11 dále zpřesnili, neboť zjistili, že ACT1/3/4/12 sdílí Asn79, který je podmínkou nutnou pro reakci proteinu se specifickými protilátkami MAb45a,b. ACT11 tento Asn79 nemá, s protilátkou nereaguje. Asn79 je přítomen v aktinových isotypech krytosemenných a pokročilejších nahosemenných (např. chvojník, *Ephedra*), u nižších nahosemenných (jehličnany) se nevyskytuje, pročež se autoři studie domnívají, že oddělení ACT11 je tak staré jako oddělení primitivnějších a pokročilejších nahosemenných, tedy cca 220 mil. let. To je ještě starší datum než uvádí dřívější práce Huang et al. (1997) a takové posunutí lépe koreluje s výsledky An et al. (1996a).

Je zajímavé, že ACT7 má blíže k aktinům z jiných druhů krytosemenných rostlin, jejichž exprese je regulována fytohormony, než k aktinům u *Arabidopsis*, jejichž exprese regulována fytohormony není (McDowell et al., 1996a). Dle Kandasamy et al. (2009), se ACT7 oddělil od ACT2/8 před 200 mil. let. Z výše zmíněného se zdá, že k oddělení většiny podtříd došlo před cca 200 miliony lety.

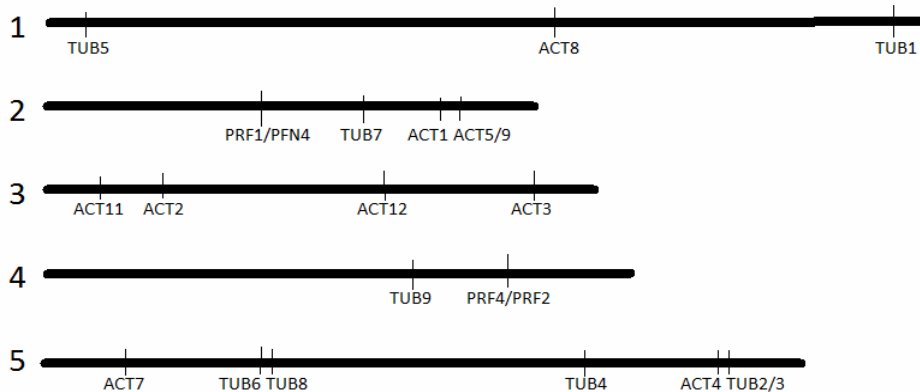
Co se před 200 miliony let stalo? Specht a Bartlett (2009) usuzují dle výskytu trikolpátního pylu ve fosilním záznamu na vznik prvních krytosemenných před 125 – 130 miliony let se, k radiaci mělo dojít o něco později. Smith et al. (2010) ovšem tvrdí, že podle molekulárního datování lze počátky krytosemenných a kvetoucích rostlin datovat až před 217 miliony let a v době před 100 miliony lety došlo pouze k jejich radiaci. Při vzniku struktur, charakteristických pro kvetoucí rostliny, muselo dojít k mohutné přestavbě aktinových isotypů a proto je divergence podtříd právě v tomto období pochopitelná.

K oddělení genů uvnitř podtříd od sebe zřejmě došlo mnohem později, např. ACT2/8 se od sebe rozlišily před 25-30 miliony let (An et al., 2010), což odpovídá době, ve které se oddělila čeleď *Brassicaceae* (An et al., 1996b). To samé se týká ACT1/3, jen doba oddělení se odhaduje na 30 – 60 milionů let (An et al., 1996a).

Při pohledu na předpokládané doby odvětvení jednotlivých tříd, podtříd a genů je možné si představit, že k divergenci nedocházelo náhodně a víceméně uniformně v čase, ale že divergence doprovázela vždy nějakou významnou událost v evoluci rostlin, která kladla nové požadavky na rostlinný cytoskelet, a zavedla tím příčinu k diverzifikaci aktinu. Pokud přijmeme tuto hypotézu, nemůžeme už o isotypech aktinu uvažovat jako o redundantních proteinech náhodného vzniku, nýbrž musíme je pojímat jako proteiny odlišné a rozrůzněné, přestože jejich diverzifikovanost nemusí být na první pohled zřejmá.

5.3.2.5 Poloha aktinových genů na chromosomu

Aktinové geny *Arabidopsis* jsou široce dispergovány v genomu. Nacházejí se na čtyřech (1, 2, 3, 5) z pěti chromosomů, jak lze vidět na **obr. 6**, a ani ty nejbližší příbuzné spolu nejsou ve vazbě. McKinney a Meagher (1998) došli k závěru, že tři nejpříbuznější genové páry vznikly najednou během jediné duplikace, která dost možná doprovázela vznik čeledi *Brassicaceae*, neleží však ani na stejných chromosomech. Nebyla potvrzena ani předpokládaná vazba aktinových genů s geny kódujícími proteiny vázající aktin, se kterými by mohly interagovat (vegetativní aktin s vegetativním profilinem, reprodukční aktin s reprodukčním profilinem, aktin s tubulinem). Velmi zajímavé je, že jediné dvě prokázané vazby (kromě pseudogenů) byly nalezeny vždy mezi reprodukčním a vegetativním proteinem. Může jít o náhodu, ale také nemusí. Dále bylo nalezeno několik slabých vazeb mezi aktiny a tubuliny, autoři ovšem výsledky statisticky nevyhodnotili, takže nevíme, jestli



Obr. 6
Genomová mapa aktinových genů u *Arabidopsis thaliana*. ACT = aktin, PRF = profilin, PFN = pylově specifický gen, TUB = tubulin.. Dle McKinney a Meagher (1998).

jsou průkazné. Předpokládá se, že buď došlo po duplikaci k promíchání genomu, nebo k duplikaci došlo podle modelu nomádských duplikací, kdy duplikace probíhá rovnou na jiné rameno chromosomu (McKinney a Meagher, 1998).

Široká disperze genů po chromosomech vyvrací možnost, že isotopy se uchovávají v genomu díky vzájemné vazbě nebo vazbě na nějaký jiný významný gen. Všechny isotopy se udržely v genomu díky vlastnímu významu, nejsou tedy zřejmě redundantní.

5.3.2.6 Co z toho vyplývá?

Proteinové sekvence aktinů jsou si navzájem podobné, zatímco introny a ostatní nekódující sekvence jsou divergované, navíc geny obsahují mnoho tichých mutací, jsou tedy staré a konzervované. Díky známé poloze genů na chromosomu víme, že se nemohou udržovat v genomu pouhou vazbou, zřejmě tedy nejsou redundantní. Dále se ukázalo, že rostlinné isotopy aktinu jsou přinejmenším stejně, možná i více diverzifikované než jejich živočišné

protějšky, u nichž je neredundance lépe prozkoumána. Studie o evoluci aktinových genů jsou nejednoznačné, protože samo datování starých evolučních událostí je obtížné, ale přesto je možné se domnívat, že data divergence jednotlivých isotypů korelují s daty významných událostí v historii vývoje rostlin a že aktinové isotypy tedy nevznikaly náhodně.

5.3.3 Exprese

Tato kapitola si klade za cíl odpovědět na otázku, zda se aktinové isotypy v rostlinách vyznačují odlišnými expresními profily. Předtím bude analyzována metodika, kterou lze získávat data o expresi aktinů v rostlinách – existují totiž dva základní způsoby se zásadními odlišnostmi.

5.3.3.1 Metody zkoumání exprese, jejich omezení a vliv na interpretaci výsledků

Každý isotyp má zřejmě vlastní jedinečný profil exprese, který se částečně překrývá s profilem jiných isotypů. Expresní profily jsou složité a většina isotypů se alespoň ve stopovém množství nachází ve většině pletiv, expresi tedy nelze chápat jako binární systém, ale jako kontinuum, které se rozepíná od téměř nulové exprese až po velmi silnou. Proto je v podstatě nemožné udělat přehlednou shrnující tabulku. Navíc existuje více metod k určování exprese, takže výsledky by byly těžko porovnatelné.

Základní metody jsou transkripční (GUS) fúze a RT-PCR (metodika popsána např. v Huang et al., 1997) a čipové analýzy transkriptomu. Všechny metody mají svá omezení. GUS-fúze vyžaduje genetickou modifikaci (transgenozu), při které není možné regulovat, kolik konstruktů s fúzním genem bude do genomu vloženo a na jaká místa genomu. Navíc jde o metodu s určitým zpožděním, která nereaguje na změny v rostlinném organismu okamžitě, neboť samotný GUS protein má dlouhý poločas rozpadu. RT-PCR postrádá výše zmíněné nevýhody, ale zkoumá expresi na úrovni RNA, nikoli proteinu, a tím vyřazuje z úvahy možné translační regulace. Za zmínku stojí metoda SC-RT-PCR (Laval et al., 2002), která pro RT-PCR analýzu používá cytoplasmu z pouze jedné jediné buňky, a je tím přesnější a cílenější. Výsledky získané touto metodou se liší (viz. dále).

Dále je možné studovat expresi aktinových isotypů pomocí identifikace jednotlivých isotypů protilátkami. Tato metoda je rychlá a zacílená přímo na protein, nikoli na jeho mRNA. Vhodných protilátek však zatím není vyvinuto mnoho a vzhledem ke stupni konzervovanosti isotypů je obtížné získat zejména protilátky specifické jen pro několik isotypů, případně dokonce pouze jeden isotyp. Protilátky, které jsou schopny rozlišit aktinové

isotypy, existují zejména pro živočišné aktiny. Vzniklé protilátky mohou být specifické pro eukaryotický aktin (MAbGE – Mouse Antibody General Eukaryotic), pouze pro rostlinný aktin (MAbGP - váže ovšem i aktin z *Dictyostelium*), nebo pro konkrétní isotypy, např. MAb45a, MAb45b rozeznávají podtřídu 4 a 5 aktinových isotypů v *Arabidopsis*, tedy ACT1/3/4/12, neboli reproduktivní aktiny kromě ACT11. Možnost získat jak velmi obecné, tak velmi specifické protilátky ukazuje na existenci jak velmi konzervovaných, tak i variabilnějších míst v sekvenci aktinových isotypů (Kandasamy et al., 1999).

5.3.3.2 Reproductivní aktiny

Mezi reproduktivní isotypy aktinu v *Arabidopsis* řadíme ACT1/3, ACT4/12 a ACT11. Vyznačují se expresním profilem, jehož těžiště je v reproduktivních orgánech.

ACT11 z *Arabidopsis* se exprimuje především v primordiích květních orgánů, s jejichž maturací se stahuje do pylu a semeníku, kde přetrvává. Z vegetativních pletiv byl nalezen v elongujících se částech rostlin (etiolované hypokotyly, expandující listy a stonky), slabě i v listech, šesuli a kořeni. Je zřejmě jediným aktinem exprimovaným v endospermu, embryu a vajíčkách (Huang et al., 1997).

Ostatní reproduktivní aktiny se exprimují především v pylu a pylových láčkách. ACT1 z *Arabidopsis* je nejsilněji exprimovaným pylovým genem, nachází se ale i v neoplozeném semeníku a v základech květních orgánů, přesah má i do rostoucích vegetativních struktur, jako jsou mladá vodivá pletiva, kotyledony, kořenová špička (kolumela i meristém), apex prýtu, základy postranních kořenů a stomata, hydatody a trichomy listů. ACT3 má podobný expresní profil jako ACT1, pouze jeho exprese v pylu je slabší a v listech silnější (An et al., 1996a).

ACT4 se exprimuje především v pylu (nejvyšší úroveň exprese je dosaženo v tříjaderném pylu po mitóze) a pylové láčce, dále v tapetu do jeho degenerace po anthesi a v cévních svazcích kořene těsně po jeho vyoření ze semene. S postupem času exprese v kořeni ustává a stahuje se do cévních svazků hypokotyly a kotyledonů. Ve starších kořenech a listech se už nevyskytuje.

ACT12 má podobný expresní profil jako ACT4, jen celková exprese je nižší a vykazuje větší variabilitu mezi pokusnými rostlinami. Vyskytuje se ještě v pericyklu při vývoji laterálního kořene, v primordiích laterálního kořene a v kolumele (Huang et al., 1996).

Kandasamy et al. (1999) vyvinuli protilátku proti všem reproduktivním aktinům s výjimkou ACT11 a ukázali, že tyto aktiny se skutečně vyskytují ve zralém pylu a že během vývoje pylu dochází k přepnutí exprese z převážně vegetativních aktinů v mikrosporách na reproduktivní aktiny ve zralém pylu.

Laval et al. (2002) měření zopakovali metodou SC-RT-PCR, která odebírá vzorky přímo z jednotlivých buněk mikrokapilárou nebo ustříhnutím trichomu, nikoli z drceného homogenátu celého listu, a většinou potvrdili zjištěné výsledky. Rozpory s dříve zjištěnými údaji jsou následující: ACT11 se v listech vyskytuje pouze v trichomech, ne v mezofylu či epidermis. Naopak nebyl nalezen ACT1/3 v trichomech. Kontrola ovšem prokázala, že buňky odebrané z trichomů mohly být kontaminovány mezofylem (v buňkách trichomů byl nalezen enzym RUBISCO, který by se měl vyskytovat pouze v mezofylu, nikoli v trichomech) a buňky odebrané z mezofylu mohly být kontaminovány epidermis, takže interpretace zjištěných výsledků je obtížná. Odlišné výsledky ale mohly být způsobeny také faktem, že v dřívějších studiích byla exprese sledována GUS-fúzí, zatímco Laval et al. (2002) použili RT-PCR, která nezohledňuje případnou translační regulaci. Výsledky analýzy epidermis a mezofylu se shodovaly.

5.3.3.3 Vegetativní aktiny

Mezi vegetativní aktiny *Arabidopsis* patří ACT2/8 a ACT7. Vyznačují se expresí zejména ve vegetativních částech rostliny.

ACT2 se exprimuje silně téměř v celé rostlině od 36 hodin starých semenáčků po 6 týdnů starou rostlinu. Pomocí GUS-fúze byl nalezen v listech, kořenech i stonku, omezeně v květu. Nachází se ve vyvíjejících se trichomech, s jejichž maturací ho ubývá, postupně ubývá také v epidermis a kortexu nejstarších kořenů (ve vodivých pletivech však přetrvává), vyskytuje se tedy hlavně v mladých a vyvíjejících se částech rostliny. V nezralém květu se nachází v gyneceu a kališních lístcích, těsně před rozkvetením a po rozkvetení se pak nachází v blizně a čnělce, v semeníku pouze v suspenzorových buňkách a na mikropylárním konci vajíček. V andreceu se nachází pouze v konektivu. V šešulkách se nalézají jen v perikarpu, brzy ale mizí.

ACT8 se exprimuje obecně slaběji než ACT2 a v podskupině jeho pletiv. Nevyskytuje se vůbec v květenství s výjimkou konektivu, kde je jeho signál ale obzvláště silný. Málo se exprimuje v meristému kořenů, hodně v kolumele a elongační zóně kořenů.

ACT7 se exprimuje v mladých vegetativních tkáních a v meristémech, kde co do síly exprese může předčit i ACT2, ve starších se ale ztrácí a nepřetrvává do dospělosti jako ACT2/8. Nalézají se i v hypokotylu a perikarpu, kde ACT2/8 chybí, příp. se nalézají málo či brzy mizí (An et al., 1996b). Velmi podrobnou studii exprese ACT7 provedli McDowell et al. (1996a). Podle autorů se ACT7 vyskytuje pouze v etiolovaném hypokotylu a autoři práce tedy předpokládají jeho vztah k buněčné elongaci jako u ACT11. Dále byl nalezen ve stvolu

květenství, místy v květenství samém (expandující kališní a korunní lístky, zrající pestík, v andreceu prudký nárůst ve všech částech během dozrávání pylu), kolem stomat a v mladých vyvíjejících se listech (v dospělých chybí). V kořenech byl nalezen v meristému, elongační a diferenciační zóně, ve starších částech chybí, přičemž první mizí z epidermis, pak z kortexu a nakonec z vodivých pletiv. Autoři předpokládají, že důvodem je dlouhý a komplexní vývoj vodivých pletiv, které si musí vytvořit sekundární buněčnou stěnu. Dlouhý vývoj mají ostatně i stomata a trichomy, kde ACT7 také přetrvává dlouho. V dospělých kořenech se nachází pouze v endodermis a objevuje se znovu při vývoji laterálních kořenů. Byl nalezen v perikarpu a v aleuronové vrstvě semen cca 3 dny po germinaci. V semeni těsně po imbibici detekován nebyl, exprese se vrací po přibližně 5 dnech, aby za dalších 5 dní opět zmizela a zůstala pouze v kotyledonech a kořenech. Obzvláště silně se exprimuje po hormonální nebo světelné stimulaci a kolem míst zranění (McDowell et al., 1996a).

Dle kontroly Laval et al. (2002) se ACT7 nevyskytuje v listech jako celku (mezofyl, epidermis), ale pouze v trichomech. Dle dřívějších studií McDowell et al. (1996a) se ovšem ACT7 vyskytuje na mladých listech ve formě skvrn (GUS obarvené „blue patches“), při odběru vzorků na SC-RT-PCR tedy mohly být odebrány vzorky z části, která ACT7 neexprimuje. Zajímavé je jejich zjištění, že zatímco v režimu 14 hod. fotoperiody se ACT8 nacházel v mezofylu u 1 ze 4 zkoumaných rostlin, při 24hodinovém osvětlení byl nalezen u 8 z 10 rostlin. Mohlo by to signalizovat regulaci ACT8 světlem. Bohužel byl počet zkoumaných rostlin příliš malý na statistické vyhodnocení, nevíme tedy, zda jsou výsledky průkazné.

5.3.3.4 Co z toho vyplývá?

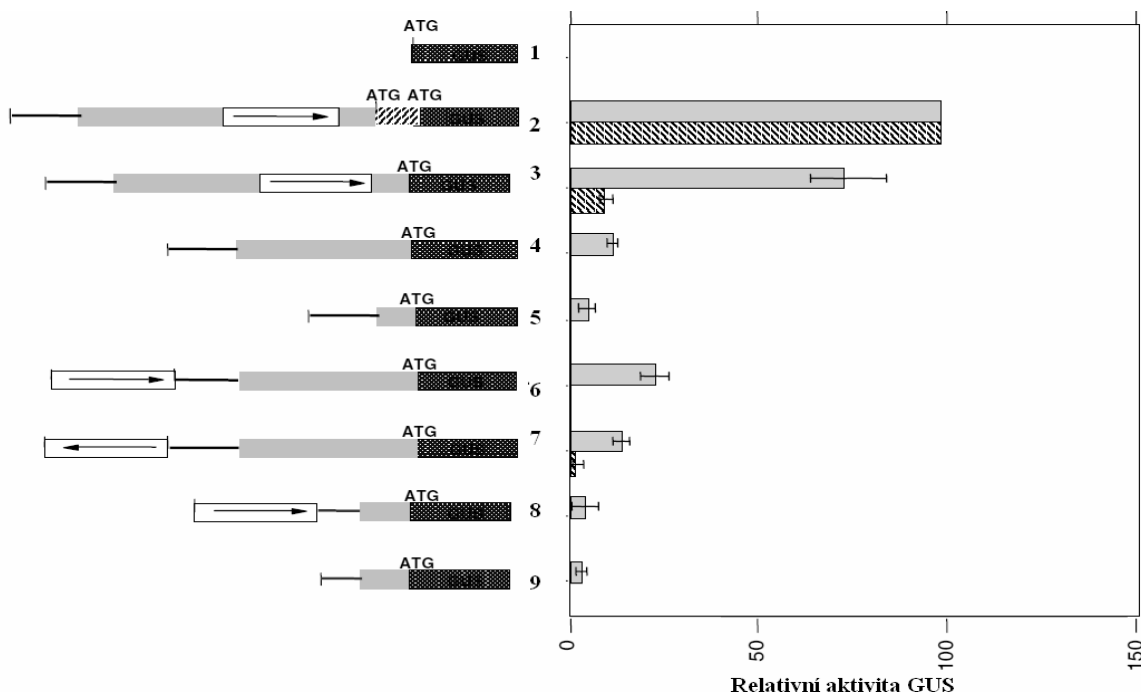
Informace o expresi lze získávat různými způsoby, každý má své výhody i nevýhody. Aktinové isotypy mají odlišné, vzájemně se překrývající profily exprese, které se liší v čase i prostoru. V expresi isotypů jsou odlišnosti vidět i u velmi blízce příbuzných párů aktinů, i když příbuznější aktiny mají podobnější expresi. Je zde vidět rozdělení na reproduktivní a vegetativní aktiny, ale i reproduktivní aktiny se mohou exprimovat ve vegetativních pletivech a naopak. Toto rozdělení je tedy nutno brát spíše jako orientační, neboť odpovídá spíše sekvenční příbuznosti, expresní profily ho stoprocentně nepotvrzují. Pozoruhodné je přepnutí exprese z vegetativních na reproduktivní aktiny při vývoji pylu, které ukazuje na specifickou roli reproduktivních aktinů v pylu a v pylové láčce. Je možné, že překryvy expresních profilů jsou důležité pro vývoj konkrétní struktury, kde tak může spolupracovat více aktinů, každý v jiném množství. Podrobně se touto spoluprací zabývá teorie isovariantní dynamiky, která bude zmíněna v kapitole o funkci.

5.3.4 Regulace exprese

Regulace exprese aktinových isotypů je při úvahách o jejich funkci v rostlinách zásadní. Cílem této kapitoly je představit základní mechanismy v regulaci jejich exprese, opět s poukazem na odlišnosti mezi jednotlivými isotypy. Zdůrazněny budou přesahy regulace exprese do funkce jednotlivých isotypů.

5.3.4.1 Regulační sekvence

Isotypy aktinových genů jsou zřejmě regulovány převážně transkripčně a posttranskripčně, a to jednak regulačními oblastmi před vlastním promotorem (TATA boxem, regulují expresi transkripčně) a jednak 5'UTR (oblast transkriptu mezi čepičkou a iniciačním kodónem, reguluje expresi posttranskripčně), pravděpodobná je též regulační funkce intronů. Naopak 3'UTR pravděpodobně regulační funkci nemá, přestože zcela bez významu zřejmě také není – Gilliland et al. (2002) analyzovali mutanty vzniklé insercí T-DNA do ACT7. Jeden z výsledných mutantů měl T-DNA vloženou až za stop-kodonem (tedy v 3'UTR), přesto exprese jeho proteinu klesla pod 7% původní hodnoty. Transkript ovšem vznikl v hojném množství a byl správně sestříhaný, nejde tedy zřejmě o regulaci transkripce ani sestříhu (Gilliland et al., 2002).



Obr. 7 Postupné snižování exprese GUS při odstraňování regulačních oblastí ACT2. Černá čára označuje promotor ACT2, světlý obdélník oblast s konzervovanými sekvencemi, bílý obdélník se šipkou leader intron, pruhovaný obdélník prvních 19 translatovaných kodónů ACT2, tmavý obdélník GUS označuje kódující sekvenci reportérového genu GUS. Mezi leader intronem a začátkem transkripce se nachází TATA box a většina z 15 konzervovaných elementů. Konstrukty 8 a 9 obsahují CaMV35S promotor, ostatní ACT2 promotor. Šipka vyznačuje orientaci intronu. Dle An a Meagher (2010).

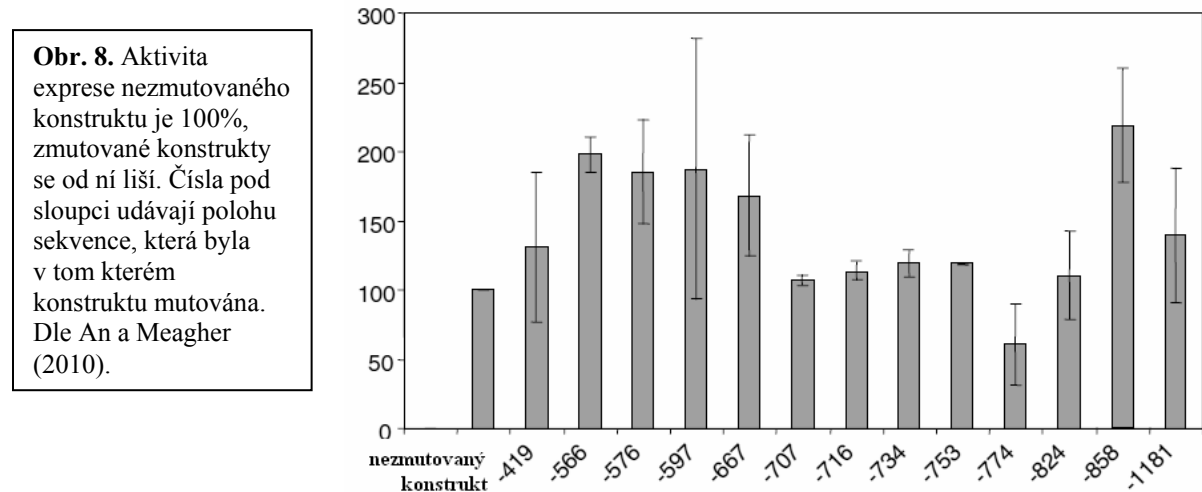
Transkripční regulaci exprese ACT1/3 zkoumali Vitale et al. (2003). Zjistili, že tyto dva isotypy jsou saturované tichými substitucemi a ani jejich regulační promotorové sekvence nevykazují zvláštní podobnosti, s výjimkou 55 bází dlouhé CD (conserved domain) sekvence, která leží bezprostředně před TATA boxem. Vitale et al. (2003) se dále snažili rozsáhlými mutačními a delečními experimenty zjistit, jak velká část 5' regulační sekvence ACT1/3 je nezbytná pro správnou expresi. Postupně byly odstraňovány části 5' regulační sekvence. První snížení exprese bylo zaznamenáno již při poškození sekvence ve vzdálenosti 310 bp upstream od startu transkripce. Protože CD leží bezprostředně před TATA boxem a měří pouhých 55 párů bází, nemohla být v tomto případě zasažena. Při zkracování 5' regulační sekvence dále se exprese postupně snižovala a konstrukt CaMV35S promotor + CD + GUS se neexprimoval vůbec. Zdá se tedy, že pro regulaci exprese ACT1/3 není podstatný pouze konzervovaný regulační CD element, ale i další části 5' regulační sekvence. Je to překvapivé, neboť v těchto částech se ACT1/3 podstatně liší, přestože expresní profil mají v podstatě stejný. Určení role jednotlivých částí 5' regulační sekvence v regulaci exprese ACT1/3 stále čeká na své prozkoumání.

Vitale et al. (2003) se dále snažili o určení jednotlivých částí CD v regulaci exprese, odstraňovali proto postupně jeho úseky a takto vzniklé konstrukty exprimovali v *Arabidopsis*. Ukázalo se, že delece různých 10 bází dlouhých úseků CD má v různých částech rostliny různý vliv na sílu exprese. Např. vyřazení prvních 10 bází snížilo expresi konstruktů v pylu o 93%, zatímco vyřazení jiných 10 bází snížilo expresi v pylu jen trochu, ale exprese v primordiích téměř zmizela. Zdá se tedy, že CD se skládá z mnoha elementů, jejichž vlivy se vzájemně ovlivňují a sčítají, podobně jako je tomu v regulačních elementech promotoru CaMV35S.

Podobnou práci, ovšem na ACT2 místo ACT1/3, předložili An a Meagher (2010). Postupně vytvářeli konstrukty obsahující předpokládané regulační oblasti ACT2 fúzované s genem pro GUS, jenž sloužil k vizualizaci exprese a přibližnému určení její síly. Konstrukt obsahující promotor, 5' regulační oblasti, leader exon, leader intron, ATG kodón, prvních 19 N-koncových aminokyselin a gen pro GUS (konstrukt 2) vykazoval 100% expresi. Zkracování konstruktů vedlo k postupnému utišování exprese, viz. **obr. 7**.

V leader exonu se nachází PuPy sekvence (tato oblast je bohatá na purinové sekvence, následuje oblast bohatá na pyrimidinové sekvence, proto se celé oblasti říká souhrnně PuPy) a spolu s leader intronem a TATA boxem tvoří 5'UTR regulační oblast. V této 5'UTR regulační oblasti, zejména v TATA boxu, se nachází 15 konzervovaných sekvencí o minimální délce 6 nukleotidů, které jsou sdíleny nejen mezi ACT2/8, ale i mezi tak vzdálenými geny, jako je

ACT2 u *Arabidopsis* a aktinový gen *Physcomitrella patens* (An a Meagher, 2010). Při porovnání sekvencí algoritmem Needleman-Wunsch vychází sekvenční identita 5'UTR oblastí ACT2 a ACT8 49%, při porovnání ACT2 z *Arabidopsis* a ACT 5 z *Physcomitrella patens* vychází sekvenční identita 37%. Pokud použijeme program pro hledání lokálního



alignmentu (EMBOSS Matcher, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa>), čísla jsou 62%, respektive 56% (Šlajcherová, nepublikováno). An a Meagher (2010) dále zjistili, že mutací konzervovaných regulačních sekvencí se exprese zvýší či sníží, a to maximálně dvojnásobně, viz. **obr. 8**. Tyto sekvence tedy nepochybně regulační význam mají, je ovšem menší, než bychom vzhledem k míře jejich konzervovanosti předpokládali. Zajímavá je také možnost zvýšení exprese po mutaci těchto sekvencí, jakoby ony sekvence, přinejmenším některé, expresi snižovaly. Tyto konstrukty byly exprimovány i v mechu *Physcomitrella patens*. Výsledky byly velmi podobné jako u *Arabidopsis*, pouze následky zásahů do konstruktů byly drastičtější. Lze předpokládat, že regulační elementy se od doby divergence těchto dvou rostlin tedy příliš nezměnily, přestože k ní došlo před cca 400 mil. let, tedy alespoň se to předpokládá vzhledem k výsledkům exprese ACT2 konstruktů z *Arabidopsis* v *P. patens* (An a Meagher, 2010).

5.3.4.2 Role intronu v regulaci exprese

Introny svou roli v regulaci exprese aktinových isotypů nepochybně mají. Gilliland et al. (2003) analyzovali mutanty ACT7 s vloženou T-DNA. Jeden z mutantů měl T-DNA vloženou do leader intronu, přesto exprese ACT7 klesla na méně než 7% původní hodnoty, což je jako důkaz významu intronů v regulaci exprese aktinových isotypů poměrně působivé.

An a Meagher (2010) ve své práci na modelu regulačních oblastí ACT2 fúzovaných s reportérovým genem GUS zjistili, že po odstranění prvních 19 translatovaných kodónů (konstrukt 3 na **obr. 7**) exprese klesne na 74%, ale teprve po deleci leader intronu (konstrukt 4 tamtéž) dojde k drastickému snížení exprese. Zdá se tedy, že systém je poměrně robustní, ale delece leader intronu mu z neznámých důvodů vadí. Za povšimnutí stojí, že opětovné vložení leader intronu do jiného místa (konstrukty 6 a 7) obnoví expresi pouze částečně, přičemž příliš nezáleží na orientaci intronu. Navíc vložení leader intronu pod CaMV35S promotor (konstrukt 8) zvýší expresi oproti pouhému CaMV35S promotoru (konstrukt 9) pouze nepatrně. Autoři práce se domnívají, že mechanismus vlivu leader intronu na expresi spočívá v roli leader intronu v sestřihu. Pokud je kromě výše zmíněného deletována také PuPy oblast před leader exonem, jak je vidět v konstruktu 5, exprese ještě poklesne. PuPy oblast tedy hraje v regulaci exprese taktéž roli, zřejmě ovšem nikterak významnou. Kontrolní konstrukt 1 bez promotoru se neexprimuje (An a Meagher, 2010).

Podobně jako ACT2 je regulován i ACT1 – exprese ACT1 po odstranění leader intronu drasticky poklesne. Zajímavé ovšem je, že po vložení leader intronu z ACT2 na správné místo se exprese ACT1 obnoví, ale pouze ve vegetativních pletivech, tj. v pletivech, v nichž se exprimuje ACT2 (donor intronu), nikoliv ve zralém pylu, v němž se exprimuje ACT1 (Vitale et al., 2003). Tyto výsledky poukazují nejen na neobyčejnou konzervovanost aktinových genů, ale zejména na zásadní roli leader intronu v regulaci exprese – zřejmě je to on, který určuje pletivovou specificitu exprese jednotlivých isotypů. Na druhou stranu, An et al. (1996b) ukázali, že po vložení leader intronu z rýžového aktinového genu RAc1 do konstruktů obsahujícího promotor Pin2 (indukovatelný zraněním) dojde ke zvýšení exprese. Tento výsledek by naopak ukazoval na roli leader intronů v regulaci intenzity, ne specificity exprese. Vidíme zde další příklad neobyčejné konzervovanosti aktinu. Navíc jde o jasný důkaz, že přinejmenším části 5'UTR jsou pod selekčním tlakem, jinak by velmi rychle mutovaly, a protože o kódující sekvence nejde, je vysvětlení jejich konzervovanosti regulačním významem příhodné (An a Meagher, 2010).

5.3.4.3 Translační regulace

Kromě transkripční regulace je ovšem nutno brát v úvahu i translační regulaci. An et al. (1996b) zjistili, že v pylu je přítomna mRNA ACT2/8, v případě fúzní exprese GUS pod ACT2/8 promotorem i mRNA GUS, GUS sám ale v rostlině nebyl nalezen! Zřejmě tedy dochází k translační regulaci alespoň v některých případech. Roli by mohla hrát PuPy oblast,

neboť podobné sekvence jsou často zodpovědné za translační regulaci u obratlovců². Zajímavé je, že výše zmíněné výsledky se týkaly pouze pylu, zatímco v ostatních částech rostliny, kde se ACT2/8 exprimuje, nebyla translační regulace zaznamenána. Zdá se tedy, že regulace exprese aktinových isotypů v pylu se liší od regulace exprese v ostatních částech rostliny. Z výsledků An et al. (1996b) vyplývá také potřeba hodnotit opatrně výstupy z RT-PCR, které v případě translační regulace rozhodně nemůže sloužit jako metoda k zjišťování exprese až na proteinovou úroveň, protože množství mRNA jasně neodpovídá množství výsledného proteinu.

Gilliland et al. (2002) ve své práci spekulují i o možnosti výskytu translačních enhancerů v 3'UTR u ACT7, neboť jimi vytvořený mutant s inzercí T-DNA v 3'UTR vykazoval normální transkripci, sestřih i stabilitu transkriptů, k tvorbě proteinu však téměř nedocházelo. Je však nutno poznamenat, že získané výsledky mají spoustu alternativních vysvětlení, které bude třeba prostudovat.

5.3.4.4 Regulace vnějšími vlivy

V kapitole o regulaci exprese aktinových isotypů není možné nezmínit ACT7, jenž je dle Kandasamy et al. (2001) regulován vnějšími vlivy. Po aplikaci auxinu dochází v rostlinách *Arabidopsis* k redistribuci ACT7 v kořenech. Mutanti bez ACT7 po působení auxinu nevytvářejí kalus, zatímco mutanti bez ACT2 ho vytvářejí. ACT7 tedy specificky a jako jediný doposud známý isotyp aktinu reaguje na fytohormony. Návodné jsou též identifikované sekvence schopné odpovídat na hormony, nalezené v jeho 5' regulačních oblastech, viz. kapitola 5.3.1.1. Experimenty s měřením aktivity GUS také prokázaly, že při tvorbě kalusu se ACT7 exprimuje velmi silně, silněji než ostatní isotopy, a toto zesílení nastupuje již po hodině od vystavení působení auxinu. Toto zvýšení bylo potvrzeno také pomocí specifických protilátek, které kromě masivního zvýšení množství ACT7 ukázaly také lehké zvýšení ostatních vegetativních aktinů a vůbec aktinu jako celku. V nově vzniklém kalusu pochopitelně převažuje ACT7, zajímavé ovšem je, že co se týče dalších aktinů, převažují ty reproduktivní, nikoli další vegetativní. V dalším vývoji kalusu ale reproduktivních aktinů ubývá, úroveň ACT7 zůstává stejná. Možným vysvětlením je, že pro udržení pletiva ve formě kalusu je nutno stále dodávat auxin, který tedy stále indukuje expresi ACT7, zatímco reproduktivní aktiny jsou indukovány jednorázově při přeměně pletiva na kalus a potom jejich úroveň už jen klesá. ACT7 a ACT2/8 (ostatní vegetativní aktiny) jsou

² Oblasti bohaté na pyrimidin v 5'UTR genu pro ribosomální proteiny obratlovců jsou zodpovědné za translační utišení exprese těchto proteinů v nerostoucích buňkách, Avni et al., 1994

schopny vytvářet heteropolymery (jsou inkorporovány do jednoho filamenta). V buňkách kalusu jsou přítomny zřejmě pouze polymery ACT7 (Kandasamy et al., 2001).

ACT7 je indukován vnějšími vlivy i v dalších rostlinách. Např. v jabloni dochází k indukci ACT7 (resp. jeho slézového homologu ACT1 z *Malva pusilla*, který je ACT7 z *Arabidopsis thaliana* podobný) při interakci rostliny s patogenní houbou (Jin et al., 1999).

V této souvislosti je třeba zmínit také spekulace Laval et al. (2002) o možné regulaci ACT8 světlem, což však musí být podrobeno dalšímu zkoumání.

5.3.4.5 Co z toho vyplývá?

V regulaci exprese aktinových isotypů se uplatňuje jak transkripční, tak translační regulace. Roli hrají regulační oblasti před promotorem, 5'UTR sekvence a introny. Existují konzervované regulační elementy, sdílené několika isotypy, obecně jsou ale regulační sekvence překvapivě divergované. To naznačuje možnost odlišné regulace. Na druhou stranu, vzájemně si podobné regulační sekvence jsou sdíleny někdy i překvapivě vzdálenými ortology. Mohlo by to znamenat, že regulační sekvence jsou ve své nynější podobě již dlouho konzervované, tudíž má jejich konkrétní podoba zásadní význam. Existuje přinejmenším jeden isotyp aktinu regulovaný vnějšími vlivy. Pro doplnění obrazu bude třeba ještě mnoho výzkumu.

5.3.5 Funkce

Mají různé isotypy odlišné funkce? To je zásadní otázka této práce. Vzhledem k velkému množství odlišných funkcí, které musí aktin zastávat, by rozdělení různých rolí mezi jednotlivé isotypy bylo logické. Avšak takovouto úvahu je třeba podpořit konkrétními daty.

Zajímavý náhled na téma spolupráce isotypů poskytuje Meagher et al. (1999). V této práci zavádí teorii isovariantní dynamiky, podle které je systém, obsahující více proteinů s malými odlišnostmi, dynamičtější, pružnější, inherentně robustnější, je lépe schopen reagovat na aktuální požadavky, dokáže pufrovat změny okolního prostředí atd. Takový systém je schopen přesnější autoregulace a dokáže dávat složitější odpovědi. Isovariantní dynamika se může projevat např. v ochotě k polymeraci/depolymeraci, interakcích s proteiny vázajícími aktin, tvorbě heteropolymerů, v nichž možnost namíchání několika isotypů umožňuje velmi přesné nastavení vlastností výsledného filamenta. Takovýto systém přímo vyžaduje překryvy expresních profilů různých isotypů. Nutno ovšem upozornit, že teorie isovariantní dynamiky je stále netestovaná hypotéza.

5.3.5.1 Vztah funkce a exprese

V jednom pletivu se téměř vždy vyskytuje více aktinových isotypů, např. v pylu a ve vodivých pletivech se vyskytují ACT1/3, ACT4/12 a ACT11, Huang et al. (1997). Může to znamenat jejich redundanci, pravděpodobnější vysvětlení ovšem je, že se liší ve fyzikálně-chemických vlastnostech, distribuci v rámci buňky, posttranslačních modifikacích atd., a na vývoji spolupracují. Na funkci jednotlivých isotypů lze usuzovat z jejich expresních profilů, přehled viz. následující tabulka:

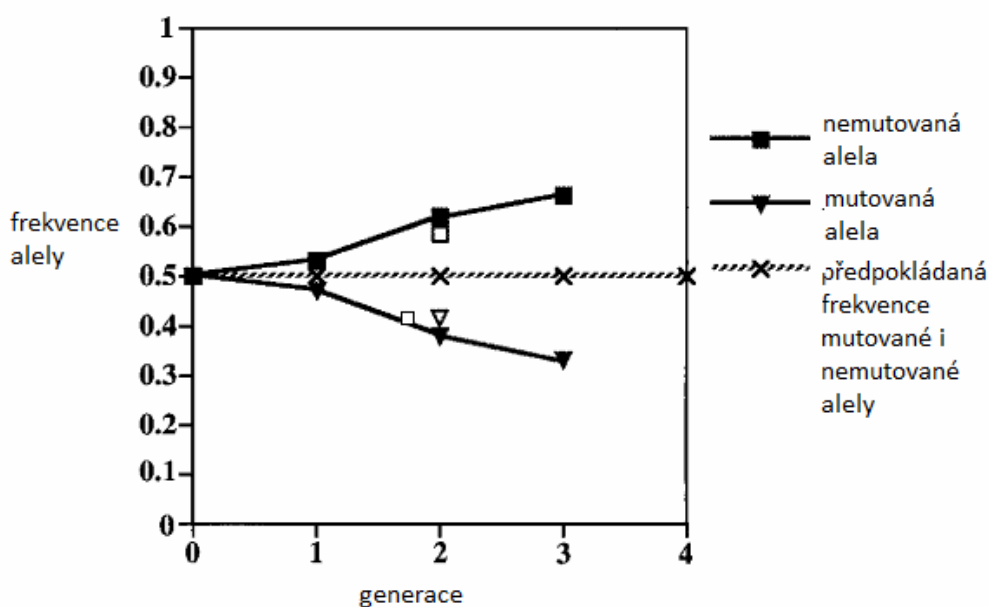
isotyp	exprese	předpokládaná funkce	citace
ACT1/3	meristémy a pylová láčka	určování místa a roviny buněčného dělení, v pylové láčce pomáhat posunovat jádro k apexu	An et al. (1996a)
ACT4/12	vodivá pletiva a kořenové špičky	gravipercepce, depozice sekundární buněčné stěny trachejí, pohybu cytoplasmy v parenchymatických buňkách okolo cévních svazků, které se podílejí na nakládání a vykládání látek z cévního svazku do okolního pletiva	Huang et al. (1996)
ACT2/8	silná a všudypřítomná exprese	základní procesy jako cyklóza cytoplasmy, tvorba architektury buňky, preprofázový prstenec při dělení	An et al. (1996b)
reproduktivní (ACT1/3/4/12/11) obecně	reproduktivní části	sekrece látek do blizny, asymetrické dělení při vývoji megaspor, pohyb cytoplasmy v pylové láčce, migrace vegetativního jádra pylovou láčkou, vypuštění spermatických buněk, prorůstání láčky vodivým pletivem pestíku, zvláštní způsob dělení jader pylu	Huang et al. (1997) Kandasamy et al. (1999)

5.3.5.2 Působení kompetice na redundanci aktinových isotypů

Pro dokázání výše zmíněných hypotéz je zapotřebí provést experimenty, kdy se vyřadí z činnosti jeden či více isotypů (nejčastěji inzercí T-DNA). Problém je v možnosti komplementace konkrétní funkce jiným isotypem, který ji může zastat. Avšak i tehdy, když jiný isotyp funkci zastane, neznamená to redundanci, vliv může mít kompetice mezi rostlinami. Toto zjistili Gilliland et al. (1998), kteří mutovali ACT2, ACT4 nebo ACT7 inzercí T-DNA a zjistili, že rostlina bez jednoho z těchto aktinů vypadá zcela normálně. Přesto, v populaci heterozygotů (jedna alela mutovaná, druhá wt) začala mutovaná alela velmi rychle mizet, frekvence homozygota s mutovanými alelami v F1 generaci neodpovídala 37,5% (jak by měla podle Mendelových zákonů v případě působení neutrální selekce), nýbrž činila 22,1% pro ACT1, 15,5% pro ACT4 a 6,8% pro ACT7 a v dalších generacích se dále

snížovala, viz. **obr. 8**. Gilliland et al. (1998) tvrdí, že do deseti generací by mutovaná alela vymizela zcela, tak silná selekce proti ní působí. Autoři se domnívají, že tyto isotypy mohou být redundantní za ideálních podmínek (proto působí fenotyp rostliny zdravě), jejich význam se ukáže až při kompetici s ostatními rostlinami, se kterými rostou v pokusných podmínkách těsně vedle sebe.

Dalším příkladem mutace, která se jako škodlivá projeví až při kompetici, je studie Gilliland et al. (2002). Autoři této práce vytvořili dva mutanty ACT7, act7-1 (inzerce T-DNA těsně za stop kodónem) a act7-4 (inzerce T-DNA v prvním intronu). Při studiu exprese act7-1 bylo zjištěno, že se transkribuje i stříhá normálně, ba i více než wt ACT7 (140% mRNA), a že transkript je stabilní. K problému dochází až během translace, což se vzhledem k umístění inzerce očekávalo. Autoři spekulují o možných důvodech, proč by vložení T-DNA do 3'UTR



Obr. 8 Proti mutované a nefunkční alele aktinového isotypu ACT2 působí negativní selekce, přestože fenotyp rostliny je zcela normální. Gilliland et al. (1998)

mělo poškodovat translaci. V 3'UTR může být enhancer translace, nebo T-DNA tvoří vláseňku a brání tak nasednutí ribosomu, dále

možná T-DNA brání tvorbě polysomu, nebo se ve 3'UTR vyskytují sekvence určující distribuci

aktinu v buňce. Výskyt sekvencí, určujících distribuci aktinu v buňce, v 3'UTR, byl prokázán u zvířat - v 3'UTR mRNA kuřecího aktinu bylo objeveno několik motivů, které řídí depozici této mRNA na periferii buňky (Kislauskis et al., 1994).

Za povšimnutí stojí, že oba mutanti mají inzerci T-DNA v nekódujících sekvencích, a přesto se exprese proteinu ACT7 obou mutantů snížila na méně než 7% (v případě act7-4 dokonce možná až na 0%), což je další důkaz významu nekódujících sekvencí v aktinových isotypech. Fenotyp act7-1 a act7-4 se zdál býti v pořádku a rostliny prospívaly, teprve při bližším pohledu byly objeveny poruchy. Oba mutanti vykazovali kroucí se kořeny, zpožděný

růst kořenů, *act7-4* také aberantní kořenové špičky s nevyrovnanými řadami buněk. Všechny projevy bylo možno zvrátit komplementací *ACT7*, byly tedy způsobeny pouze jeho nedostatkem. V kompetici s ostatními rostlinami se objevovaly ještě vlnité kořeny (zřejmě kvůli hypersenzitivní thigmostimulaci – tendenci kořene obcházet překážky) a malé listy. Mutantní alely byly vytlačovány (v F1 generaci zplazené heterozygoty se objevilo pouze 15% mutovaných homozygotů místo očekávaných 37,5% v případě nulové selekce), protože měly kromě výše zmíněných poruch také zpožděnou a méně účinnou germinaci, navíc se svými aberantními kořeny nedokázaly obstát v kompetici o živiny - odtud onen malý vzrůst a listy (Gilliland et al. 2002).

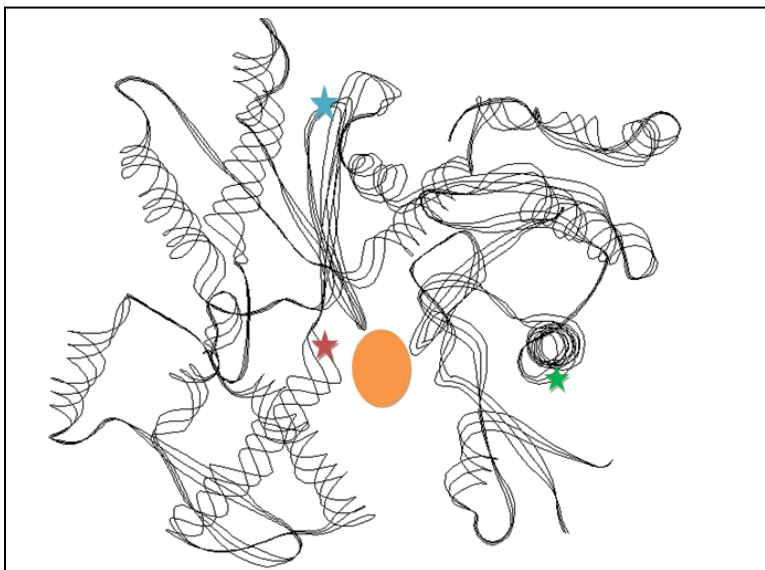
Z výše zmíněného je jasná úloha *ACT7* v kořenech a při klíčení, při buněčném dělení, zajímavá je také možnost propojení s hormonální regulací exprese *ACT7* – klíčení i růst kořenů je regulován hormony (pro shrnutí viz. Baluska et al., 2010), role hormony regulovaného *ACT7* v těchto procesech tedy dává smysl. Navíc *ACT7* je jediným aktinem exprimovaným v aleuronové vrstvě, jeho porucha tudíž musí klíčení zákonitě ovlivnit, navíc se vyskytuje i v osemení, takže je možné, že embryo má problém osemení prorazit (bez *ACT7* může mít osemení např. jinou strukturu, to ale zkoumáno nebylo).

5.3.5.3 Role *ACT2* ve vývoji kořenů a kořenových vlásků

Už z analýzy expresních profilů se zdá, že *ACT2* by mohl mít funkci ve vývoji kořenů. Ale které funkce konkrétně, a jsou některé z nich redundantní a jiné esenciální?

ACT2 má ve vývoji kořenů podstatnou funkci, jak ve své práci ukázali Ringli et al. (2002). Postupy klasické genetiky získaly mnoho mutantů, z nichž u tří genetickým screeningem (segregace s genovými markery, sekvenace vytipovaného úseku) potvrdili missense mutaci v *ACT2*. Tyto linie byly nazvány deformed roots (*der*). *Der1-1* má místo ala183 valin, *der1-2* má místo arg97 histidin, *der1-3* má místo arg97 cystein (viz. **obr. 9**). Jak konkrétně tyto substituce ovlivňují *ACT2* na proteinové úrovni ovšem není známo. Obě mutované aminokyseliny jsou však ve všech genech aktinových isotypů *Arabidopsis* (s výjimkou pseudogenu *ACT9*), jakož i v některých dalších organismech (kvasinka, králíčí sval), konzervované. Každá z těchto tří linií představuje jednu mutovanou alelu s odlišnou silou fenotypových projevů. Křížením bylo zjištěno, že *der* jsou recesivní mutace v jediném lokusu. *Der1-1* rostliny mají pouze slabý fenotyp, báze jejich kořenových vlásků je zvětšená a vlásky jsou kratší. Základ, z něhož vlasek vzniká a obvykle se nachází na distálním konci rhizodermální buňky, se někdy objevuje uprostřed buňky. Vlázky také mohou být různě deformované či zastavovat svůj vývoj. *Der1-2* a *der1-3* mají fenotypové projevy obdobné, jen

častější, a častěji u nich také dochází ke kombinaci více druhů aberací na jediném vlásku. Z výše zmíněného je zřejmá role ACT2 při vzniku vlásku (mutace poškozuje určení místa pro založení vlásku) a růstu kořenových vlásků (mutace poškozuje zřejmě ukládání komponent buněčné stěny, čímž vzniká krátký a boulovitý vlasek, případně vlasek neroste vůbec). Za povšimnutí stojí, že listové trichomy a pylové láčky jsou nepoškozené, ACT2 tedy zřejmě není odpovědný obecně za apikální růst. Tyto mutantní alely ovšem nejsou delece, dle Ringli et al. (2002) je množství mRNA ACT2 stejné jako u wt. Autoři práce už ale nevzali v úvahu možnost translační regulace, porušený sestřih atd. Dále je zajímavé, že mutantní alely nejsou z populace vytlačovány, jako je tomu ve studii Gilliland et al. (1998).



Obr. 9 Aktin z králíčího svalu s vyznačenými místy, v nichž dochází k substituci v mutantních alelách der a act2-2D v ACT2. Všechna místa představují vysoce konzervované aminokyseliny. **ATP (oranžový ovál)** se váže do ATP-vazebné kapsy. **Ala183 (červená hvězda)**, v der1-1 substituovaný valinem, nachází se v alfa helixu v ATP-vazebné kapse poblíž argininu, který má zásadní roli při změně konformace po navázání proteinů vzájemných aktin. **Arg97 (zelená hvězda)**, substituovaný v der1-2 histidinem, v der1-3 cysteinem, nachází se na povrchu proteinu, kde by se mohl účastnit protein-proteinových interakcí. **Arg149 (modrá hvězda)**, substituovaný v act2-2D cysteinem, nachází se na povrchu proteinu poblíž plus konce, kde spolu asociují aktinové monomery při tvorbě F-aktinu. Obrázek je z databáze PDB (ID 3HBT), struktura byla publikována v článku Wang et al., 2010. Zobrazený aktin má 85,7% identitu (a 93,4% podobnost) proteinové sekvence s ACT2 (použit byl Needleman-Wunsch algoritmus).

Ringli et al. (2002) dále tvrdí, že ACT7 a ACT8 nejsou schopny komplementovat poruchy ACT2, jinak by nevznikal der fenotyp. Jde ale zřejmě o prostý fakt, že expresní profily ACT7/8 a ACT2 se liší, ACT7/8 tedy nemůže poškozený ACT2 komplementovat prostě proto, že se nevyskytuje ve stejných pletivech. Pokus komplementovat poškozený ACT2 expresí ACT7/8 pod ACT2 promotorem sice proveden nebyl, Nishimura et al. (2003) ovšem říká, že exprese ACT1 nebo ACT7 pod promotorem ACT2 dokáže komplementovat ztrátovou mutaci ACT2, zřejmě by to tedy šlo.

Substitučního mutantu (záměna na povrchu proteinu,

konzervovaný arg149 byl vystředán cysteinem, viz. **obr. 9**) v ACT2 zvaného act2-2D (rot126) studovali Nishimura et al. (2003). Autoři studie usoudili, že jde o semidominantní mutaci, neboť projevy byly jednak závažnější než u pouhé ztrátové mutace ACT2 (act2-3, act2-4),

kteřá je ze své podstaty recesivní (heterozygot je fenotypově v pořádku, recesivní homozygot má pouze kratší kořenové vlásky), jednak se act2-2D projevovala i v heterozygotním stavu. Projev v heterozygotním stavu se ovšem lišil od projevu v homozygotním stavu, nemohlo tedy jít přímo o dominanci. Homozygotní mutované rostliny měly krátké, kroutící a vlnící se kořeny bez kořenových vlásků. Porouchaná byla již iniciace jejich růstu, dále rostliny vykazovaly nízký počet trichoblastů, které byly navíc malé a některé se zhroutily do sebe. Ke kolapsu zřejmě docházelo právě ve chvíli diferenciaci v trichoblasty. Dále měly rostliny inhibovaný růst prýtu, poškozená aktinová filamenta v epidermis diferenciaci zóny kořene a někdy deformované listové trichomy. Rostliny odumíraly před kvetením.

Heterozygotní mutanti měli krátké a řídké kořenové vlásky (iniciace byla obvykle v pořádku, problém nastával při elongaci), v trichoblastech diferenciaci zóny kořene poškozená aktinová filamenta (tedy nikoli v celé rhizodermis) a zakřslý prýt. ACT2 tedy hraje roli při zakládání a vývoji kořenových vlásků a v rozporu s Ringli et al. (2002) možná také při růstu listových trichomů. Nishimura et al. (2003) se dále domnívá, že každý isotyp je pro některé procesy redundantní a některé unikátní – např. ACT2 je unikátní v kořenových vláscích, v ostatních pletivech, kde se exprimuje, je ovšem redundantní, protože ta při mutaci ACT2 poškozena nebyla.

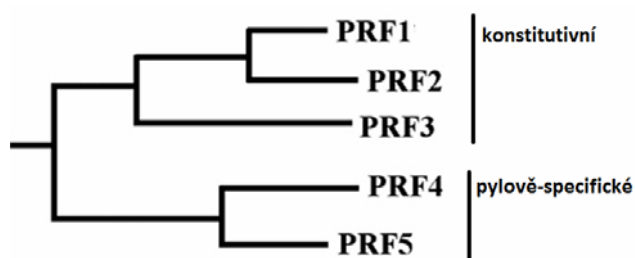
Z výše zmíněného vyplývá, že porovnáním prací Nishimura et al. (2003) (semidominantní mutace ACT2 rot126) a Ringli et al. (2002) (recesivní mutace ACT2 der) by snad mohlo být možné určit esenciální a redundantní funkce ACT2 ve vývoji kořenů a kořenových vlásků. Esenciálními funkcemi by mohlo být zakládání vlásků a snad i depozice komponent do buněčné stěny při elongaci vlásku, redundantními funkcemi by mohla být thigmostimulace, diferenciaci trichoblastu, elongace vlásku a apikální růst jako takový, např. v listových trichomech. Jde však pouze o spekulaci.

5.3.5.4 Overexprese a ektopická exprese

Kandasamy et al. (2002) zjistili, že pokud je ektopicky exprimován ACT1 pod promotorem pro ACT2 (tedy pylový gen ve vegetativních pletivech, hrubě řečeno), výsledný fenotyp jsou trpasličí rostliny s morfologickými defekty, postihujícími zejména reprodukční orgány (pozdější růst květního stvolu, pozdější kvetení, menší květy). Míra postižení korelovala s množstvím ektopicky exprimovaného ACT1 (použitá metoda transgenóze neumožnila kontrolovat množství vloženého ACT1, tudíž se rostliny mezi sebou značně lišily). Při mikroskopickém pozorování byl odhalen také aberantní F-aktin (míra aberace opět korelovala s mírou ektopické exprese). Overexprese ACT2 pod vlastním promotorem má

důsledky daleko jemnější, zakrslý fenotyp se projevil u méně než 5% zkoumaných rostlin. Kandasamy et al. (2002) uzavírají, že některé isotypy mohou mít rozličné funkce, jiné stejné, ale liší se alespoň regulací nebo interakcemi s proteiny vázajícími aktin. Byla vytvořena teorie, že za aberantní fenotyp při overexpresi reprodukčního aktinu ve vegetativních pletivech může neschopnost reprodukčního aktinu správně interagovat s endogenními vegetativními proteiny vázajícími aktin.

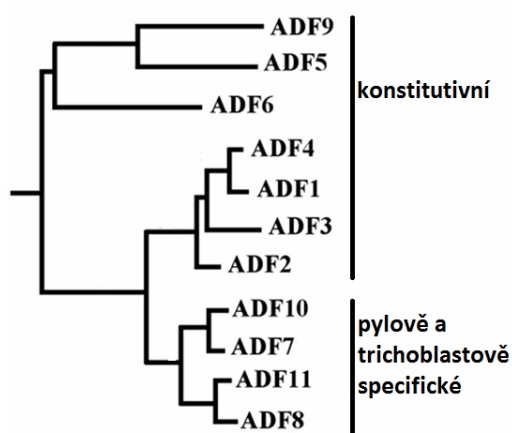
V práci Kandasamy et al. (2007) je výše zmíněné téma dále rozvinuto. Práce se zabývá proteiny vázajícími aktin, konkrétně profilinem a ADF (actin depolymerizing factor). Profilin je protein vázající aktin schopný vyvazovat monomerní G-aktin a regulovat tím jeho



Obr. 10 Fylogenetický strom genové rodiny profilinů v *Arabidopsis thaliana*. Stejně jako aktin je i profilin kódován genovou rodinou o několika členech, které lze rozdělit na vegetativní (konstitutivní) a reprodukční (pylově specifické). (Kandasamy et al., 2007).

polymeraci do F-aktinu; vztahy v jeho genové rodině jsou na obr. 10. ADF je další druh proteinu vázajícího aktin, opět kódovaný genovou rodinou, jejíž členové se opět na základě expresního profilu a fylogenetické příbuznosti dělí do dvou skupin, konstitutivní a pylově/trichoblastově specifické (obr. 11). Bylo zjištěno, že ektopická exprese reprodukčního profilinu PRF4 ve

vegetativních pletivech (PRF4 pod ACT2 promotorem) nevykazuje žádný zvláštní fenotyp. Pokud se ale s ektopicky exprimovaným reprodukčním aktinem (ACT1 pod ACT2 promotorem) zároveň exprimuje ve stejném pletivu i reprodukční profilin (PRF4 pod ACT2 promotorem), fenotyp rostliny je normální (bez koexprimovaného PRF4 by byl aberantní, viz.



Kandasamy et al., 2002). Overexprese vegetativního profilinu (PRF1 pod ACT2 promotorem) takový záchranný účinek nemá. Podobné výsledky byly získány i v případě ADF – ektopická exprese ACT1 pod ACT2 promotorem doprovázená ektopickou expresí ADF7 pod ACT2 promotorem nevykazovala

Obr. 11 Fylogenetický strom genové rodiny ADF v *Arabidopsis thaliana*. Stejně jako aktin je i ADF kódována genovou rodinou o několika členech, které lze rozdělit na vegetativní (konstitutivní) a reprodukční (pylově a trichoblastově specifické). (Kandasamy et al., 2007).

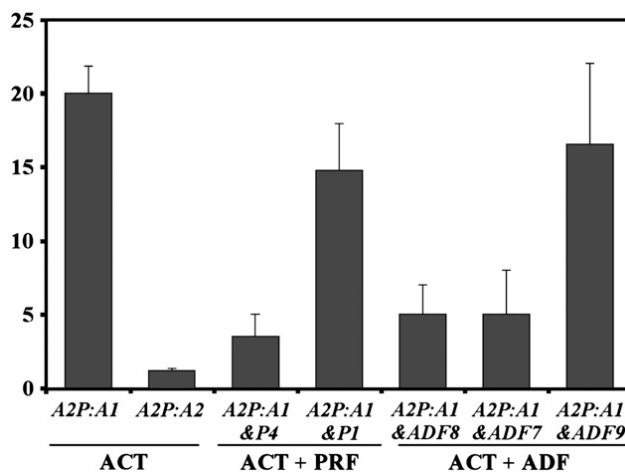
svůj typický zakrslý fenotyp známý z Kandasamy et al. (2002). Stejný efekt dokázala vyvolat ektopická exprese ADF8. Overexprese ADF9 tento efekt vyvolat nedokázala. Ektopická exprese ADF7/8 nebo overexprese ADF9 pod promotorem ACT2 neměla sama o sobě opět žádný efekt, stejně jako u profilinu. Za povšimnutí stojí, že komplementovat ektopickou expresi ACT1 dokázalo jak ADF7, tak ADF8, přestože pokusy s GUS-fúzí bylo ukázáno, že přes svoji značnou sekvenční podobnost (78% na aminokyselinové úrovni) mají naprosto odlišné profily exprese – ADF7 se exprimuje ve zralém pylu, ADF8 v trichoblastech a pylových vláscích (v rámci rodiny ADF jsou isotypy exprimované v kořenových vláscích považované za reprodukční třídu, viz. **obr. 11**). Výsledky jsou shrnuty na **obr. 12**.

Je tedy zřejmé, že v případě ektopické exprese isotypů aktinu vzniká problém kvůli neschopnosti „cizího“ aktinu interagovat s „místními“ proteiny vázajícími aktin. V této souvislosti je vhodné zmínit práci Brault et al. (1999), která zjistila, že cytoplazmatický aktin není schopen komplementovat svalový aktin v *Drosophila*.

I zde autoři předpokládají, že za problémem stojí neschopnost cytoplazmatického aktinu interagovat se svalovými proteiny vázajícími aktin. Molekulární podstata (jaké síly, atomy a interakce mohou za schopnost/neschopnost těchto molekul spolu interagovat) však stále čeká na své objasnění.

5.3.5.5 Jiné rostliny

Funkce aktinových isotypů byly zkoumány i na jiných rostlinách než *Arabidopsis*, konkrétně na bavlně *Gossypium hirsutum*. Pomocí interference proti GhACT1 bylo sníženo množství ACT1 téměř na nulu, tudíž můžeme výsledek považovat za ztrátovou mutaci. Autoři však nezkoumali vliv kompetice na důsledky takovéto mutace (jako Gilliland et al., 1998 a Gilliland et al., 2002), ale jen důsledky jako takové. Bavlna není ani zdaleka tak dobře prozkoumanou rostlinou jako *Arabidopsis*, studium si však zaslouží z praktických důvodů – její vlákna, tvořená jedinou apikálně rostoucí buňkou, jsou využívána v průmyslu. Rostliny



Obr. 12. Grafika shrnující účinky koexprese proteinů vázajících aktin na rostliny s ektopicky exprimovaným reprodukčním aktinem ve vegetativních pletivech, ACT1 pod ACT2 promotorem (A2P:A1). P značí profilin. Na svislé ose je znázorněn podíl rostlin, vykazujících aberantní zakrslý fenotyp. Kandasamy et al. (2007).

bez GhACT1 měly inhibovaný apikální růst vláken (1,5 až 3x pomalejší elongace), F-aktin řídkší a náhodněji orientovaný, část semeníků byla sterilní. Lze tedy odhadovat, že GhACT1 má funkci v elongaci bavlníkových vláken (nikoli v jejich iniciaci, která byla v pořádku). Bohužel, nelze GhACT1 jednoduše homologizovat s některým z aktinových isotypů *Arabidopsis*, proto je těžké dát zjištěné poznatky do souvislosti s dosavadními znalostmi o funkcích aktinových isotypů, známých z *Arabidopsis* (Li et al., 2005)

Funkce aktinových isotypů byla zkoumána také na somatických embryích smrku *Picea abies*. V suspenzoru i embryích samotných je exprimován aktinový isotyp Pa1, suspenzor pak navíc exprimuje ještě isotypy Pa2, Pa3 a Pa4. Bylo zjištěno, že při ošetření kultury se somatickými embryi latrunkulinem B (látka poškozující aktinová filamenta) dojde při velmi nízkých dávkách (100nM) k dezintegraci aktinových filament v suspenzoru, filamenta v embryích jsou ovšem nepoškozena. Důsledkem je zánik všech suspenzorů a následně špatně vyvinutých embryí. Zralá, dobře vyvinutá embrya přežívají i bez suspenzoru. Zřejmě je aktinový isotyp v suspenzorech citlivější k Latrunkulinu B než isotypy v embryích, což bylo ověřeno i experimentálně – při ošetření kultury Latrunkulinem B dojde k drastickému snížení hladiny Pa2, Pa3, Pa4, zatímco množství Pa1 zůstává nezměněno (Schwarzerova et al., 2010).

5.3.5.6 Co z toho vyplývá?

V odpověď na otázku položenou v úvodu této kapitoly lze říci, že experimentální výsledky potvrzují neredundanci aktinových isotypů, přinejmenším v některých podmínkách. Starší data o odlišných expresních profilech skýtají prostor pro domněnky o odlišných rolích jednotlivých isotypů v různých pletivech, novější práce poskytují komplikovanější pohled než jen přidělení odlišných funkcí různým isotypům na základě fyzikálních vlastností jejich (pravděpodobně) odlišných terciálních struktur. Například si nyní uvědomujeme význam zařazení funkce aktinových isotypů do kontextu celé buňky a rostlinného organismu, v úvahu je třeba brát např. přítomnost či nepřítomnost kompetice či interakce s proteiny vázajícími aktin. Zkoumání vlivu dalších faktorů na redundance jednotlivých isotypů bude snad v dalších letech následovat. Dobře prozkoumaným modelovým objektem jsou kořenové vlásky, u nichž výzkum rolí aktinových isotypů pokročil již na poměrně detailní úroveň. Z výzkumu somatických embryí smrku zase vyplývá, že různé isotypy reagují s různými chemickými látkami různě. Cenná je také teorie Richarda Meaghera o isotypové flexibilitě, která čeká na experimentální potvrzení.

6 Závěr

Aktin je všudypřítomným konzervovaným rostlinným proteinem, jenž v rostlinné buňce zastává mnoho funkcí. Je kódován širokými genovými rodinami, počet jejich členů se u vyšších rostlin pohybuje okolo deseti. Aktinové isotypy v rostlinné buňce mají (až na řídké výjimky) shodnou strukturu. V leader exonu a intronu, v intronech obecně, v 5'UTR a možná také v 3'UTR se nacházejí regulační sekvence. Domníváme se, že introny mají výrazný vliv na expresi. Existují isotypy regulované vnějšími vlivy (např. fytohormony), spekuluje se i o translační regulaci.

Sekvence aktinových isotypů je velmi podobná v kódujících oblastech, v nekódujících se liší, aktinové isotypy jsou tedy konzervované a pro rostlinu tedy zřejmě nepostradatelné. V genomu se neudržují vazbou. Odlišnost nekódujících sekvencí poskytuje prostor pro odlišné regulace exprese. Aktinové isotypy se liší expresními profily, na jejichž základě mohou být rozděleny na reproduktivní a vegetativní třídu. Toto rozdělení je podporováno i fylogenetickými vztahy mezi jednotlivými isotypy. Doby divergencí jednotlivých isotypů odpovídají významným událostem v evoluci rostlin.

Podle prozatím dostupných informací je pravděpodobné, že výše zmíněné platí nejen pro modelový organismus *Arabidopsis thaliana*, ale univerzálně pro všechny rostliny.

Oblast funkce jednotlivých isotypů je méně prozkoumaná. Funkční redundance různých isotypů byla experimentálně potvrzována i vyvracena. Zasahovat do aktinových isotypů v rostlině je možné delecí genu, jeho mutací, overexpresí nebo ektopickou expresí. Z experimentů vyplývá, že některé isotypy jsou schopny se navzájem komplementovat, jiné nikoli, fenotypové projevy při různých poškozeních různých isotypů v různých pletivech se také liší. Zdá se, že roli hrají interakce s proteiny vázajícími aktin, působení kompetice, jemné odlišnosti ve struktuře, odlišná regulace exprese atp. Expresní profily aktinových isotypů se obecně překrývají, je tedy možné, že isotypy někde jsou redundantní a jinde nikoliv, případně že spolu v duchu teorie isotypové flexibility spolupracují. Funkce aktinových isotypů v rostlinné buňce si zaslouží další pozornost a výzkum.

7 Přehled citované literatury

- Alberts B, Johnson A, Luis J, Raff M, Roberts K, Walter P** (2008) Molecular biology of the cell, fifth edition, ISBN 978-0-8153-4111-6
- An YQ, Huang SR, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB** (1996a) Conserved expression of the Arabidopsis ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordia and mature pollen; *Plant cell* 8: 15-30
- An YQ, McDowell JM, Huang SR, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB** (1996b) Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues; *Plant journal* 10: 107-121
- An YQ, Meagher RB** (2010) Strong Expression and Conserved Regulation of ACT2 in Arabidopsis thaliana and Physcomitrella patens; *Plant molecular biology reporter* 28: 481-490
- Avni D, Shama S, Loreni F, Meyuhas O** (1994) Vertebrate messenger-RNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells – characterization of the translational cis-regulatory element; *Molecular and cellular biology* 14 : 3822-3833
- Baluska F, Manusco S, Volkmann D, Barlov PW** (2010) Root apex transition zone: a signalling-response nexus in the root; *Trends in plant science* 15 : 402-408
- Bhattacharya D, Aubry J, Twait EC, Jurk S** (2000) Actin gene duplication and evolution of morphological complexity in land plants; *Journal of phycology* 36: 813-820
- Brault V, Reedy MC, Sauder U, Kammerer RA, Aebi U, Schoenenberger CA** (1999) Substitution of flight muscle-specific actin by human beta-cytoplasmic actin in the indirect flight muscle of Drosophila; *Journal of cell science* 112 : 3627-3639
- Florea CS, Timko MP** (1997) Actin genes with unusual organization in the parasitic angiosperm Striga asiatica L (Kuntze); *Gene* 186: 127-133
- Gilliland LU, Kandasamy MK, Pawloski LC, Meagher RB** (2002) Both vegetative and reproductive actin isoforms complement the stunted root hair phenotype of the Arabidopsis act2-1 mutation; *Plant physiology* 130: 2199-2209
- Gilliland LU, Pawloski LC, Kandasamy MK, Meagher RB** (2003) Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth; *Plant journal* 33: 319-328
- Gilliland LU, McKinney EC, Asmussen MA, Meagher RB** (1998) Detection of deleterious genotypes in multigenerational studies. I. Disruptions in individual Arabidopsis actin genes; *Genetics* 149: 717-725
- Hermann SR, Harding RM, Dale JL** (2001) The banana actin 1 promoter drives near-constitutive transgene expression in vegetative tissues of banana (Musa spp.); *Plant cell reports* 20: 525-530
- Huang SR, An YQ, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB** (1996) The Arabidopsis thaliana ACT4/ACT12 actin gene subclass is strongly expressed throughout pollen development; *Plant journal* 10: 189-202
- Huang SR, An YQ, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB** (1997) The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules; *Plant molecular biology* 33: 125-139
- Jin SM, Xu RL, Wei YD, Goodwin PH** (1999) Increased expression of a plant actin gene during a biotrophic interaction between round-leaved mallow, Malva pusilla, and Colletotrichum gloeosporioides f. sp. malvae; *Planta* 209 : 487-494
- Kandasamy MK, Gilliland LU, McKinney EC, Meagher RB** (2001) One plant actin isoform, ACT7, is induced by auxin and required for normal callus formation; *Plant cell* 13: 1541-1554
- Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB** (1999) The late pollen-specific actins in angiosperms; *The plant journal* 18 : 681-691
- Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB** (2002) Functional nonequivalency of actin isoforms in Arabidopsis; *Molecular biology of the cell* 13: 251-261
- Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB** (2009) A single vegetative actin isoform overexpressed under the control of multiple regulatory sequences is sufficient for normal Arabidopsis development; *The plant cell* 21: 701-718
- Kandasamy MK, Burgos-Rivera B, McKinney EC, Ruzicka DR, Meagher RB** (2007) Class-specific interaction of profilin and ADF isoforms with actin in the regulation of plant development; *Plant cell* 19: 3111-3126
- Kislauskis EH, Zhu XC, Singer RH** (1994) Sequences responsible for intracellular-localization of beta actin messenger-RNA also affect cell phenotype; *Journal of cell biology* 127 : 441-451
- Laval V, Koroleva OA, Murphy E, Lu CG, Milner JJ, Hooks MA, Tomos AD** (2002) Distribution of actin gene isoforms in the Arabidopsis leaf measured in microsamples from intact individual cells; *Planta* 215: 287-292
- Li XB, Fan XP, Wang XL, Cai L, Yang WC** (2005) The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in

fibers and participates in fiber elongation; *Plant cell* 17: 859-875

McCurdy DW, Kovar DR, Staiger CJ (2001) Actin and actin-binding proteins in higher plants; *Protoplasma* 215: 89-104

McDowell JM, An YQ, Huang SR, McKinney EC, Meagher RB (1996a) The arabidopsis ACT7 actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli; *Plant physiology* 111: 699-711

McDowell JM, Huang SR, McKinney EC, An YQ, Meagher RB (1996b) Structure and evolution of the actin gene family in Arabidopsis thaliana; *Genetics* 142: 587-602

McKinney EC, Meagher RB (1998) Members of the Arabidopsis actin gene family are widely dispersed in the genome; *Genetics* 149: 663-675

Meagher RB, McKinney EC, Kandasamy MK (1999) Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: The diverse plant actin gene family; *Plant cell* 11: 995-1005

Nishimura T, Yokota E, Wada T, Shimmen T, Okada K (2003) An Arabidopsis ACT2 dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development; *Plant and cell physiology* 44: 1131-1140

Peng H, Cheng HY, Yu XW, Shi QH, Zhang H, Li JG, Ma H (2010) Molecular analysis of an actin gene, CarACT1, from chickpea (*Cicer arietinum* L.); *Molecular biology reports* 37: 1081-1088

Ringli C, Baumberger N, Diet A, Frey B, Keller B (2002) ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of Arabidopsis; *Plant physiology* 129: 1464-1472

Schwarzerova K, Vondrakova Z, Fischer L, Borikova P, Bellinvia E, Eliasova K, Havelkova L, Fiserova J, Vagner M, Opatrny Z (2010) The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce; *BMC plant biology* 10

Smith LG, Oppenheimer DG (2005) Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton; *Annual review of cell and developmental biology* 21: 271-295

Smith SA, Beaulieu JM, Donoghue MJ (2010) An uncorrelated relaxed-clock analysis suggests an earlier origin for flowering plants; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 : 5897-5902

Specht CD, Bartlett EM (2009) Flower Evolution: The Origin and Subsequent Diversification of the Angiosperm Flower; *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40 : 217-243

Staiger CJ, Schliwa M (1987) Actin localization and function in higher-plants; *Protoplasma* 141: 1-12

Vitale A, Wu RJ, Cheng ZQ, Meagher RB (2003) Multiple conserved 5' elements are required for high-level pollen expression of the Arabidopsis reproductive actin ACT1; *Plant molecular biology* 52: 1135-1151

Wang F, Dong L, Yuan JJ (2009) Molecular Cloning and Expression Analysis of an Actin Gene from Chinese Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch); *Chemical research in chinese universities* 25: 357-361

Wang H, Robinson RC, Burtnick RD (2010) The structure of native G-actin; *Cytoskeleton* 67 : 456-465

Zhang DQ, Du QZ, Xu BH, Zhang ZY, Li BL (2010) The actin multigene family in Populus: organization, expression and phylogenetic analysis; *Molecular genetics and genomics* 284: 105-119

Zhang SB, Ren DT, Xu XJ, Liu GQ (2004) Prokaryotic expression and characterization of a pea actin isoform (PEAc1) fused to GFP; *Chinese science bulletin* 49: 915-920