

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN



Translace mRNA a její regulace u rostlin

Bakalářská práce

Filip Linhart

Školitel: doc. RNDr. David Honys, Ph.D.

Praha 2015

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Davidu Honysovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a ochotnou spolupráci během vyhotovení této práce a vyhledávání odborné literatury.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vyhotovil samostatně s použitím všech uvedených literárních pramenů a souhlasím s jejím zveřejněním.

V Praze, dne 31. července 2015



Filip Linhart

ABSTRAKT

Translace mRNA je po transkripci další důležitou etapou genové exprese, a na její regulaci závisí skutečné množství syntézy jednotlivých proteinů a následné fyziologické, ontogenické a fenotypické jevy. U rostlin nabývá regulace translace značného významu během progamické fáze, oplození a biologie semen, kdy jsou s různou mírou selektivity translatovány již skladované molekuly mRNA. Dále se regulace translace uplatní díky své rychlosti a flexibilitě i v reakci na abiotické krizové situace, což má velký význam pro schopnost přežití a adaptace rostlin jakožto přisedlých organismů. Globální regulaci doprovází selektivní regulace exprese jednotlivých transkriptů, což moduluje translační odpověď. Nakonec je mechanismus translace, tak jako u jiných organismů, terčem virových napadení, a to často za pozoruhodných okolností a strategií ze strany patogena i hostitele.

Cílem této rešerše je podat širší obraz současných znalostí regulačních cest translačního aparátu u rostlin, nejnovějších objevů a perspektiv. Molekulární a fyziologická úroveň ve vztahu k makroskopické realitě průběhu života a okolním podmínkám otevírají nové obzory k pochopení základů životní strategie rostlin a buněčných a molekulárních procesů vůbec.

Klíčová slova

Translace, regulace translace, rostliny, regulace genové exprese, mRNA, ribozóm, fosforylace, pyl, klíčení, ontogeneze, abiotický stres, virové napadení

ABSTRACT

After transcription, mRNA translation represents further important step in gene expression pathway. Translational regulation controls the abundance of synthesized proteins and the subsequent physiological, ontogenic and phenotypical consequences. In plants, the translational regulation takes on an even higher importance during the progamic phase, fertilization and seeds biology, when the already stocked mRNA transcripts are being translated with varying degrees of selectivity. Furthermore, translational regulation, which allows for a quick reaction and a notable flexibility, a vital function during abiotic stress, is essential for the adaptation and survival of sessile organisms like plants. Global regulation is associated with selective regulation of the expression of individual transcripts, which allows modulation of the response. Finally, similarly for all other organisms, the translation mechanism of plants is a target of viral infections, which initiates interesting responses from both the pathogen and the host.

This review presents the summary of our current knowledge of the regulatory means of the mRNA translation system in plants, including the latest discoveries and perspectives. The relation between the molecular and physiological level on one side, and the macroscopic reality of life within the environmental conditions on the other side open up new horizons in our understanding of fundamentals of plants' survival strategies and, more generally, of cellular and molecular processes.

Keywords

Translation, translational regulation, plants, gene expression regulation, mRNA, ribosome, phosphorylation, pollen, germination, ontogenesis, abiotic stress, viral infection

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
ÚVOD	6
LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
1. Translace v eukaryotické buňce	7
Zrání a export molekuly mRNA	7
Molekula tRNA	8
Popis ribozómu	9
Iniciace translace	10
Elongace a terminace translace	11
2. Specificita translace a její regulace u rostlin	14
Izoformy iniciačních faktorů eIF4E a eIF4G u rostlinné buňky	14
Fosforylace a její význam v obecné regulaci translace	14
3. Význam translace a její regulace v gametofytu a během ontogeneze	17
Pohlavní rozmnožování (kryto)semenných rostlin obecně	17
Samčí gametofyt, význam a podstata translační regulace	18
Klíčení semen, význam a podstata translační regulace	21
4. Regulace translace u rostlin reakcí na vliv klimatických faktorů	25
Podstata problematiky	25
Regulace translace v kontextu osvětlení a fotosyntézy	25
Reakce rostlinného organismu na změny teploty	26
Reakce rostlinného organismu na variace dostupnosti vody	28
5. Regulace translace u rostlin v situaci virové infekce	32
Obecně o virové infekci	32
Virové infekce u rostlin a jejich strategie využití translačního aparátu hostitele	32
Umlčení mRNA jako obranný mechanismus rostlin	34
ZÁVĚR	35
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	36

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA: kyselina abscisová, abscisic acid

ATP: adenosintrifosfát

CRT: kalretikulin

DNA: desoxyribonukleová kyselina

dsRNA: dvouřetězová – double strand RNA

eEF: eukaryotický elongační faktor, eukaryotic elongation factor

eIF: eukaryotický iniciační faktor, eukaryotic initiation factor

ER: endoplasmatické retikulum

eRF: eukaryotický uvolňovací faktor, eukaryotic release factor

GTP: guanosintrifosfát

HSP: protein tepelného stresu – heat shock protein

mRNA: mediátorová ribonukleová kyselina

ORF: otevřený čtecí rámec, open reading frame

PABP: polyA binding protein

RISC: RNA-indukovaný umlčovací komplex – RNA-induced silencing complex

RNA: ribonukleová kyselina

rRNA: ribozomální ribonukleová kyselina

S: Svedberg

siRNA: malá interferenční RNA – small interfering RNA

TMV: virus tabákové mozaiky – tobacco mosaic virus

tRNA: transportní ribonukleová kyselina

UTR: nepřekládaná oblast, untranslated region

vsRNA: malá interferenční RNA odvozená z viru – virus-derived small interfering RNA

ÚVOD

V každé buňce živého organismu kódují molekuly DNA (deoxyribonukleová kyselina) mimo jiné strukturu proteinů zajišťujících naprostou většinu buněčných funkcí. Sekvence párů bází molekuly DNA kódující pořadí aminokyselin tvořících příslušný polypeptid se nazývá gen. Při procesu transkripce strukturního genu je sekvence jednoho z dvou komplementárních vláken DNA přepsána pomocí enzymu DNA-dependentní RNA polymerázy II v jednovláknovou molekulu mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina), jež po dodatečných úpravách slouží jako templát k syntéze polypeptidu. Syntéza polypeptidu, který se posléze stane funkčním proteinem, se nazývá translace. Důsledkem kompartmentace jsou v eukaryotické buňce procesy transkripce a translace odděleny místně i časově: DNA se nachází v buněčném jádře, kde je také přepisována, avšak translace zralé mRNA, která opustí jádro, se následně odehrává v cytoplasmě buňky. Molekuly RNA mohou mít nejen informační, ale i katalytickou funkci. Translace je zajištěna komplexem složeným z rRNA (ribosomální RNA) a proteinů zvaným ribozóm, který postupuje po molekule mRNA a dle jejího templátu polymerizuje aminokyseliny, přicházející ve vazbě s tRNA (transferová RNA). Vzniká tak polypeptidový řetězec, který dozraje ve funkční protein.

Transkripce genů je přísně regulovaným procesem, aktivace a inhibice exprese jednotlivých genů v buňkách hraje klíčovou roli pro vývoj a život mnohobuněčného organismu. Regulace transkripce je proto předmětem mnoha výzkumů. Syntéza a zpracování mRNA je však energeticky a časově náročným procesem, a není tedy divu, že existuje řada regulačních možností i v cytoplasmě, tedy co se týče hospodaření s mRNA, frekvence a průběhu její translace obecně, či selektivně. Tato regulační úroveň nabývá značné role zejména v průběhu embryogeneze, kde hraje klíčovou roli již nasyntetizovaná rezerva mRNA, pak v situacích vyžadujících rychlou specifickou reakci na konkrétní externí podmínky, ať se jedná o běžné změny podmínek, či o akutní reakci na ohrožení a poškození pletiv.

Zaměříme se na situaci usedlých organismů, kterými jsou rostliny. Mezi obecné charakteristiky těchto organismů patří zaprvé autotrofie, zadruhé vazba na substrát, tedy nemožnost pohybu. Zdálo by se, že jsou rostliny značně znevýhodněné oproti živočichům, kteří jsou schopni migrace, aktivní fyzické reakce na podnět a centralizované kontroly. Tato představa je však mylná: rostlinné organismy jsou často v migraci úspěšnější díky schopnosti šíření spor či semen a dlouhé životnosti a odolnosti tohoto stádia. Přisedlý způsob života při vegetativní a generativní fázi jde spolu s odolností a značnou schopností adaptace: kontinuální vegetativní růst a významná schopnost reakce na změnu lokálních podmínek a krizové situace. Společně s vždy nezbytnými faktory regulace transkripce DNA, regulace translace mRNA nabývá tedy mimořádné důležitosti v otázce regulace genové exprese u rostlin. Předmětem této práce je popis procesu translace mRNA a jeho regulace se zaměřením na rostlinné organismy, výzkum regulačních mechanismů tohoto procesu u rostlin v kontextu ontogeneze, abiotických a biotických faktorů.

KAPITOLA PRVNÍ

Translace v eukaryotické buňce

Je obecně známo, že rostliny jsou mnohobuněčné eukaryotické organismy; začneme tedy z tohoto obecného hlediska. V první kapitole popíšeme procesy předcházející vlastní translaci a proces translace mRNA v eukaryotické buňce. Tyto informace obecně platí pro všechny rostlinné buňky, jimž se budeme věnovat v dalších kapitolách.

❖ Zrání a export molekuly mRNA

V eukaryotické buňce podléhá molekula pre-mRNA řadě posttranskripčních úprav, a to ještě dříve, než opustí buněčné jádro. Jedná se o významný rozdíl oproti situaci prokaryotických buněk a buněčných organel prokaryotického původu, u nichž mRNA neprochází výraznějšími posttranskripčními úpravami a translace je dokonce často zahájena ještě před ukončením transkripce. Není tedy divu, že u eukaryotických organismů je repertoár posttranskripčních regulací výrazně bohatší.

Zrání čerstvě nasyntetizované molekuly pre-mRNA zahrnuje zejména několik dějů, z nichž dva mají víceméně obecnou platnost: jedná se o zajištění stability molekuly, jejíž životnost by se v opačném případě počítala v řádu minut, a také o sestřih v podobě odstranění nekódujících částí genů, zvaných introny (Bentley, 2014). První zásadní krok spočívá v připojení čepičky na 5' konec molekuly pre-mRNA. Tento proces se nazývá čepičkování (angl. capping) a uskutečňuje se pomocí tří enzymů. Tato první posttranskripční modifikace nastává ještě před dokončením transkripce a jedná se zároveň o klíčový kontrolní bod (Galland et al., 2014). Čepička je tvořena nukleosidem 7-methylguanosinem, jež je navázán na první nukleotid molekuly mRNA s interpozicí třech fosfátových skupin neobvyklou vazbou 5'-5' (Bentley, 2014). Funkcí čepičky je mimo ochrany molekuly RNA před degradací aktivitou exonukleáz a kontrolou jejího exportu do cytoplasmy i zajištění iniciace translace (Bentley, 2014).

Další posttranskripční modifikací je tzv. polyadenylace, při níž je na 3' konec molekuly mRNA připojen poly(A) řetězec. Zatímco transkripce stále probíhá, enzymatický komplex poly(A)ozómu odstřihne funkční pre-mRNA od zbytku primárního transkriptu (Bentley, 2014). Tentýž enzymatický komplex obsahuje enzym poly(A) polymerázu, který připojí řetězec 40 až 250 adeninových nukleotidů k 3' konci nově syntetizované pre-mRNA (King, 2015). Rovněž poly(A) řetězec hraje roli v ochraně molekuly mRNA před degradací a

umožňuje její transport z jádra do cytoplazmy a má význam v iniciaci translace (M.W.King, 2015).

Další úpravou vedoucí ke zralé molekule mRNA je sestřih (angl. splicing). Sekvence bází tvořící gen obsahuje totiž jednak dále využitelné úseky, exony, přerušované intervenujícími sekvencemi, introny, které jsou během úpravy odstraněny a nehrají tedy při translaci a její regulaci roli. Samotný sestřih je katalyzován enzymatickým komplexem zvaným spliceozóm, který zajišťuje vystřížení intronů a následné spojení příslušných exonů, reakčním mechanismem transesterifikace (Cui et al., 2014). Alternativní sestřih zvyšuje variabilitu zralých mRNA, čímž umožňuje další úroveň posttranskripčních regulací a tím dramaticky zvyšuje rozmanitost genové exprese. Uvádí se, že u rostlin podstupuje více než polovina genů alternativní sestřih, což je méně, než například u savců, nicméně tento fenomén stále hraje důležitou roli v regulaci vývojových procesů (Cui et al., 2014).

Výsledkem postranskripčních úprav je tedy molekula mRNA (též zvaná transkript) připravená k přechodu do cytoplazmy s pomocí specifických vazebných proteinů (Muench et al., 2012) a následně k translaci. Určitá frakce mRNA je však často skladována v cytoplasmě a translace se dočká až později. Například za stresových podmínek vede nutnost reakce a šetření energie ke značnému omezení většiny obecných translačních procesů probíhajících v buňce (Ueda et al., 2012), a to ve prospěch syntézy stresových proteinů, o čemž budeme ještě mluvit (viz jednotlivé případy popsané v kapitole 4). Značná část dotčených molekul mRNA není bezprostředně degradována, nýbrž setrvává skladována v cytoplasmě pro následnou intenzivní translaci po návratu do normálních podmínek (Stuger et al., 1999).

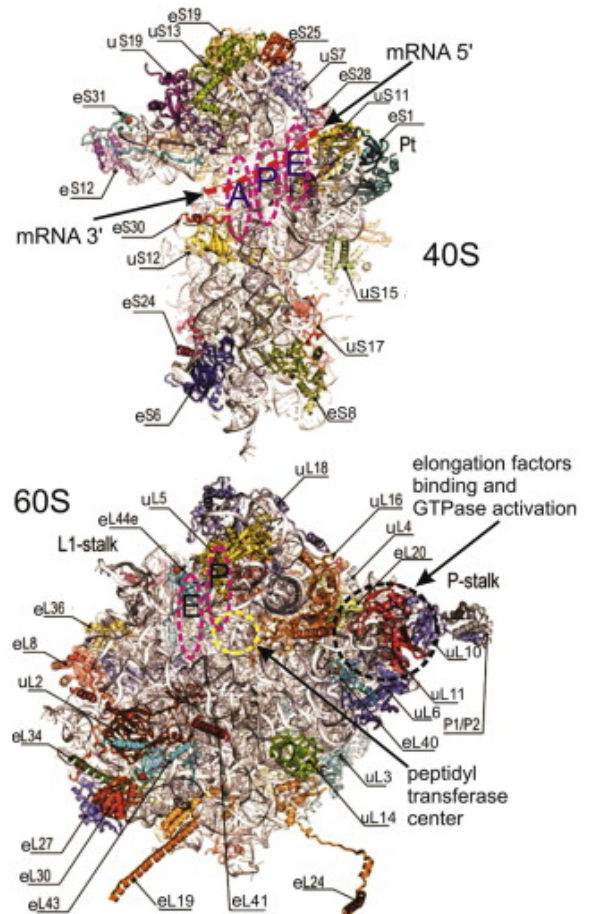
❖ Molekula tRNA

Molekula tRNA, jejíž roli jsme již zmínili dříve, je dlouhá v průměru 70 až 85 nukleotidů a rovněž prochází řadou posttranskripčních úprav, konkrétně podstupuje sestřih 5' a 3' konců a chemickou modifikaci řady bází. Následně zaujímá komplexní sekundární strukturu umožněnou vzájemnými interakcemi jednotlivých částí molekuly a konečně terciární strukturu, která jí dává její charakteristické trojrozměrné uspořádání (Betat et al., 2014). V cytoplasmě je k čerstvě nasyntetizované, či recyklované molekule tRNA připojena esterickou vazbou odpovídající aminokyselina pomocí extrémně specifického enzymu aminoacyl tRNA syntetázy. Proces aktivace tRNA se odehrává ve dvou etapách: nejprve je aminokyselina aktivována adenylací za štěpení ATP, poté je katalyzován vznik její vazby k 3'

konci tRNA (Lu et al., 2014). Vzniklý komplex aminoacyl-tRNA pak vstupuje do translace. Proces aktivace tRNA aminokyselinami je přísně kontrolován, navázání nesprávné aminokyseliny vede k degradaci celého komplexu (Lu et al., 2014). Jistá zajímavost spočívá ve faktu, že počet variant tRNA je podstatně vyšší, než počet aminokyselin (20, u rostlin 18, či 19), a to nejen kvůli degeneraci genetického kódu, kdy jednu aminokyselinu může kódovat několik tripletů (Cognat et al., 2013).

❖ Popis ribozómu

Ribozóm je katalytickým komplexem zajišťujícím vlastní translaci za účasti již popsaných dalších aktérů - aminoacyl-tRNA a zralé mRNA. Většinu ribozómů najdeme na povrchu endoplazmatického retikula, jež hraje roli v následujících úpravách polypeptidu, ovšem mohou být v cytoplazmě i volně či vázány na cytoskelet (Krupinska et al., 2003). Ribozóm je obrovský ribonukleoproteinový komplex, skládá se z proteinů a ze specializovaných molekul RNA, zvaných rRNA, jež tvoří vlastní katalytické jádro ribozómu a zastávají tak katalytickou funkci při vzniku peptidové vazby (Graifer and Karpova, 2015). Proteinové komponenty hrají spíše roli strukturní a regulační (Graifer and Karpova, 2015). Eukaryotický ribozóm se skládá s dvou podjednotek, o velikostech 40S a 60S (obr. 1), dle sedimentačního koeficientu Svedberg, které se při iniciaci translace spojí a tvoří jednotku zajišťující katalýzu procesu. 40S podjednotka váže molekulu mRNA a komplementární antikodon tRNA, zatímco 60S podjednotka obsahuje tři místa zajišťující vazbu komplexu aminoacyl-tRNA (aminoacyl site), katalýzu polymerace (peptidyl site) a uvolnění tRNA (exit site) (Graifer and Karpova, 2015).

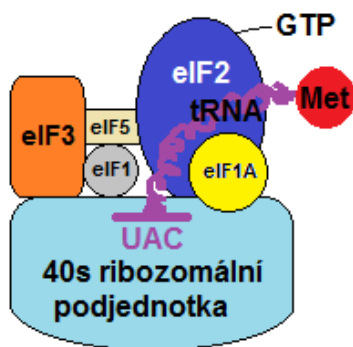


Obrázek 1: Struktura 40S a 60S podjednotek eukaryotického ribozómu z jejich styčné strany s vyznačením jednotlivých ribonukleoproteinů a jejich hlavních funkcí v procesech, které dále popíšeme. (Zdroj obrázku: Graifer and Karpova, 2015).

Velká 60S ribozomální podjednotka obsahuje tři molekuly rRNA o velikostech 25S, 5,8S a 5S, zatímco malá 40S podjednotka obsahuje pouze jedinou molekulu 18S rRNA (Ben-Shem et al., 2011). Proteiny sice nemají přímou katalytickou účast na translaci, avšak zastávají různé funkce. Jsou výrazně zastoupeny, neboť 60S podjednotka jich obsahuje 46, 40S podjednotka 33 (Ben-Shem et al., 2011). Přibližně polovina vazeb mezi oběma podjednotkami je zajištěno právě prostřednictvím proteinů (Graifer and Karpova, 2015).

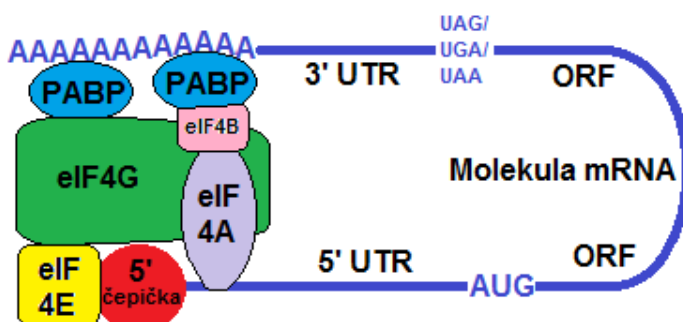
❖ Iniciace translace

V eukaryotických buňkách se iniciace translace účastní mnoho proteinů zvaných eukaryotické iniciační faktory (eIF, angl. eukaryotic initiation factors). S iniciační Met-tRNA se spojí faktor eIF2 v komplexu s molekulou GTP, zatímco k 40S ribozomální podjednotce se váží faktory eIF1, eIF1A a eIF3 (M.W.King, 2015). Jejich spojením vznikne takzvaný 43S pre-iniciační komplex (obr. 2).



Obrázek 2: Funkční konfigurace 43S pre-iniciačního komplexu. Faktory eIF1 a eIF3 brání spojení s velkou 60S ribozomální podjednotkou. Iniciační faktor eIF5 se následně naváže k 43S komplexu a hraje roli v asociaci s velkou podjednotkou (Luna et al., 2012) podobně jako přítomnost iniciační met-tRNA „přednabitě“ GTP neseným eIF2 (Hinnebusch, 2014).

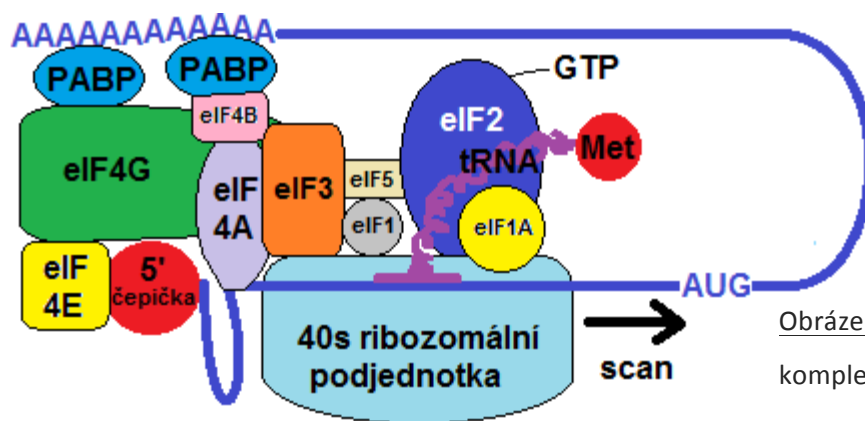
Další účastník translační iniciace, molekula mRNA, se ocitne ve vazbě se skupinou iniciačních faktorů eIF4, jež ve spolupráci s poly(A)-binding proteinem (PABP) propojuje 5' a 3' konce mRNA, konkrétně čepičku a poly(A) řetězec (Kropiwnicka et al., 2015). Tyto dva zmíněné faktory vzájemně propojí eIF4G (obr. 3), což znamená, že je molekula mRNA je cirkularizována, což usnadňuje proces translace, konkrétně její (re)iniciaci (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002). Molekula mRNA, spojená s faktory eIF4E a eIF4G, je ještě asociována s faktory eIF4A a eIF4B, vázané na eIF4G v zóně propojení čepičky a poly(A) konce (Kropiwnicka et al., 2015).



Obrázek 3: Komplex mRNA a iniciačních faktorů, připraven k asociaci s 43S pre-iniciačním komplexem. Jak uvidíme, vazba bude zajištěna faktorem eIF4G.

Poznámka: trojice eIF4E, eIF4G a eIF4A je často nazývána eIF4F.

Popsaný komplex faktorů umožní vazbu k 43S komplexu spojeného s iniciační tRNA, přičemž faktor eIF4G je vázán s již zmíněným faktorem eIF3 asociovaným s malou podjednotkou (M.W.King, 2015) a vidíme vznik 48S pre-iniciačního komplexu (Obr. 4). V tuto chvíli skenuje podjednotka molekulu mRNA ve směru 5'→3', dokud nenarazí na start kodon AUG, související s koncem tzv. 5' nepřekládané oblasti (5'UTR) a se začátkem otevřeného čtecího rámce (ORF, angl. open reading frame), tedy skutečně translatované sekvence (Hinnebusch, 2014). Zmíněný sken by byl nemožný bez helikázové aktivity faktoru, lépe řečeno helikázy, eIF4A působící na molekulu mRNA a odstraňující sekundární struktury 5'UTR (Martinez-Silva et al., 2012).



Obrázek 4: 48S preiniciační komplex a sken mRNA.

Iniciační faktory jsou posléze uvolněny, k malé podjednotce se připojí velká 60S podjednotka, a tak za účasti faktoru eIF5 vznikne kompletní ribozóm (Luna et al., 2012). Iniciační tRNA s methioninem je v tuto chvíli lokalizována na P místě 60S podjednotky a elongace může začít (Hinnebusch, 2014).

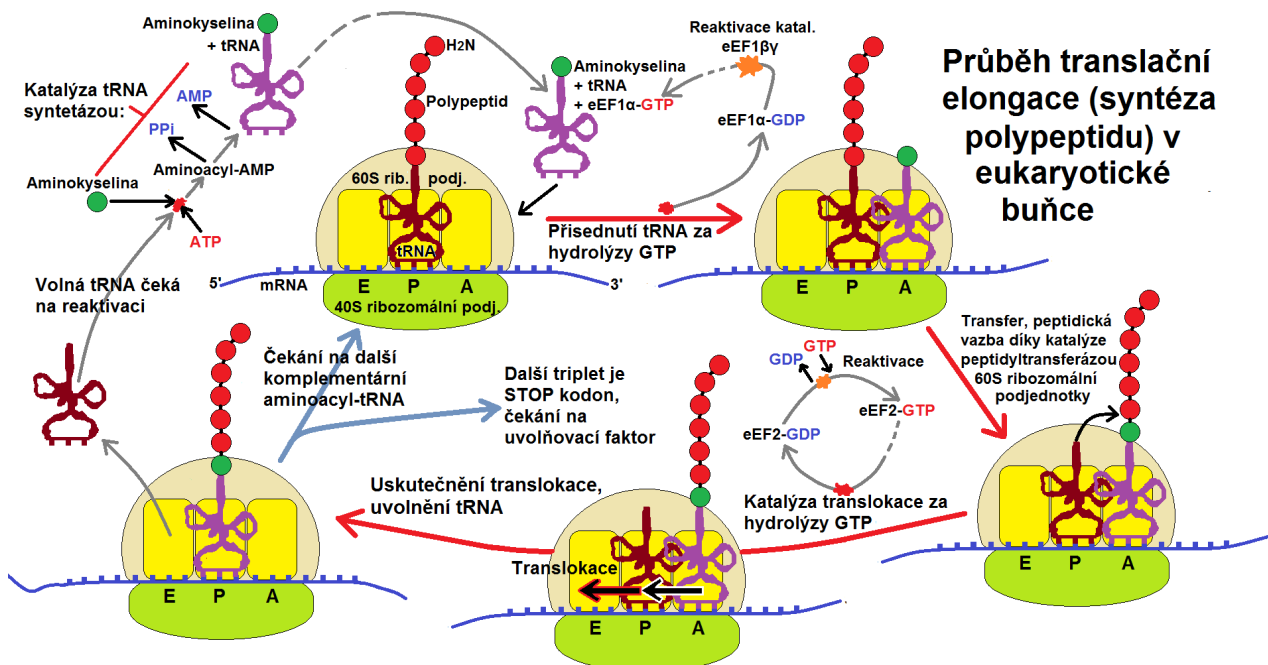
Zejména u rostlin, na které se v této práci zaměříme, hraje proces iniciace translace větší regulační roli, i když elongace může také podléhat regulaci. Důležitost regulace transkripce tím není úplně zastíňována, ovšem je možno říci, že počet syntetizovaných polypeptidů již nemůže být přímým indikátorem účinnosti transkripce příslušného genu (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002).

❖ Elongace a terminace translace

Elongace je proces syntézy polypeptidu následující iniciaci translace. Informace tripletů bází otevřeného čtecího rámce (ORF) mRNA slouží jako předloha k sekvenci aminokyselin. Katalyzační funkci polymerizace hraje velká 60S ribozomální podjednotka (M.W.King, 2015). Tento proces však vyžaduje také účast neribozomálních proteinů, tzv. elongačních faktorů.

Iniciační aminoacyl-tRNA komplex obsazuje P místo a druhý komplex odpovídající druhému tripletu ORF nasedne na A místo ribozómu. Je k tomuto účelu použit komplex eEF1 α -GTP, kdy GTP podlehyne hydrolýze, výsledný komplex eEF1 α -GDP se odštěpí (Sasikumar et al., 2012) a peptidyltransferáza 60S podjednotky (ribozym) katalyzuje tvorbu peptidové vazby mezi methioninem a druhou aminokyselinou prostřednictvím své peptidyltransferázové aktivity (M.W.King, 2015). Methionin je od své tRNA uvolněn. Dodejme, že opětne nabití eEF1 α je zajištěno komplexem eEF1 $\beta\gamma$ (Sasikumar et al., 2012).

Následuje translokace, kdy se obě tRNA posunou, první z místa P na místo E a druhý (spojen se syntetizovaným polypeptidem) z místa A na místo P. Jinak řečeno se celý ribozomální komplex posune směrem 3' o jeden triplet vůči mRNA. Translokace vyžaduje elongační faktor eEF2, opět za hydrolýzy GTP (Sasikumar et al., 2012). Místo A je nyní volné k vazbě nového komplexu aminoacyl-tRNA a celý proces se opakuje - dvojice prvních aminokyselin se váže k aminokyselině tohoto nového komplexu, první tRNA je při následující translokaci vypuzena z místa E (M.W.King, 2015). Tímto způsobem pokračuje proces translace mRNA a elongace polypeptidového řetězce. Následující schéma (Obr. 5) shrnuje veškeré procesy, o kterých jsme nyní hovořili (včetně nabití aminoacyl-tRNA popsánem na samém začátku této kapitoly).



Obrázek 5: Schématické shrnutí procesu translační elongace.

Otevřený čtecí rámec končí tripletem zvaným STOP kodon (existují 3 různé), za nímž následuje 3'UTR. Tomuto kodonu neodpovídá žádná molekula tRNA, nýbrž ho rozpoznává

tzv. uvolňovací faktor (eRF, angl. release factor), který nasedne na místo A (M.W.King, 2015). Tento faktor váže GTP a způsobí katalýzu transferu polypeptidu z P místa k molekule H₂O při hydrolýze GTP (M.W.King, 2015). Následuje uvolnění peptidu, poslední tRNA, komplexu eRF-GDP a konečně rozpad samotného ribozómu na obě podjednotky (M.W.King, 2015). Ještě je nutno dodat, že každá molekula mRNA může mnohokrát opakovaně sloužit k translaci, ale také může být předmětem několika simultánních translačních procesů. Komplex mRNA s několika nasedlými ribozomálními jednotkami se nazývá polyzóm.

Závěrečné slovo

Popsali jsme si význam, podstatu a mechanismus translace mRNA, jednoho z pilířů genové exprese. Zaměřili jsme se na eukaryotické buňky a nyní svou pozornost obrátíme k rostlinným organismům a k regulačním možnostem, které charakterizují proces translace. Začneme souhrnem rostlinných specifík a obecných regulačních mechanismů a poté se zaměříme na konkrétní situace.

KAPITOLA DRUHÁ

Specificita translace a její regulace u rostlin

Proces translace u rostlin je do jisté míry totožný s procesem translace ostatních eukaryotických buněk. Jsou mu ovšem vlastní jisté specifické charakteristiky, které, jak později uvidíme, mohou hrát roli v regulaci translace (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002). Zmíníme zde charakteristickou existenci izoform iniciačních faktorů translace a dále význam fosforylace na globální regulaci.

❖ Izoformy iniciačních faktorů eIF4E a eIF4G u rostlinné buňky

Začněme charakteristickým faktem: u rostlin mají faktory eIF4E, vážící se na čepičku mRNA, a eIF4G, propojující 4E a PABP, dvě možné formy, známé navíc pod názvem eIFiso4E a eIFiso4G (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002). I přes totožnou funkci je rozdíl mezi nimi dosti významný, jelikož eIFiso4E jeví 50-55% odlišnost v sekvenci aminokyselin oproti eIF4E. eIFiso4G dosahuje dokonce až 65% rozdílnosti primární struktury oproti svému homologu (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002) a je neobyčejně malé velikosti a atypické sekundární a terciární struktury (Cheng and Gallie, 2010). Iniciační faktory eIF4E a eIF4G tvoří podjednotky iniciačního faktoru eIF4F, faktory eIFiso4E a eIFiso4G se asociují ve formě iniciačního faktoru eIFiso4F (Muench et al., 2012) spolu s helikázou eIF4A (Cheng and Gallie, 2010). Rozdíly disponibility těchto forem hrají roli v regulaci četnosti iniciace, stejně jako závislost afinity komplexu eIF4F a eIF4isoF na sekundární struktuře 5'UTR molekuly mRNA (Muench et al., 2012), jak ještě uvidíme.

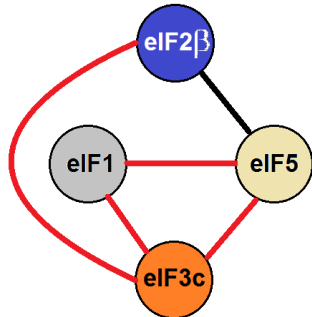
❖ Fosforylace a její význam v obecné regulaci translace

Fosforylace a defosforylace proteinů spočívá v kovalentním připojení/odštěpení fosfátové skupiny pomocí enzymů, kterými jsou protein kinázy a protein fosfatázy. Jedná se o jeden z fundamentálních procesů hrajících roli v aktivaci a deaktivaci vazebných míst proteinů, tedy v regulaci jejich interakční a katalytické aktivity. Probereme si tedy tuto roli v rámci translačního procesu v rostlinné buňce.

➤ Fosforylace iniciačních (a elongačních) translačních faktorů

V mnoha případech zesiluje fosforylace interakční schopnosti iniciačních faktorů translace, což je zejména případ u interakcí mezi jednotkami eIF1, eIF5 a podjednotkou eIF3C, dále

mezi podjednotkami eIF3C a eIF2 β , a to pomocí fosforylace protein kinázou CK2 (Muench et al., 2012). Zejména faktor eIF3C je vícečetnou fosforylací podpořen ve vazbě s ostatními proteinovými faktory (Mulekar and Huq, 2014). Následující schéma zobrazuje tyto interakce a ilustruje význam fosforylace (Obr. 6).



Obrázek 6: Znárodnění interakcí iniciačních faktorů eIF1, eIF2 β , eIF3c a eIF5, dle pokusů *in vitro*, při absenci 40S ribozomální subjednotky. Spojovací čáry vyznačují interakce mezi proteiny, červené čáry vyznačují ty interakce, které jsou posíleny fosforylací enzymem CK2, což poukazuje na významnou roli fosforylace a zmíněného enzymu při formování translačního iniciačního komplexu (Muench et al., 2012).

Faktory eIF4 obsahují také četná fosforylační místa. Na funkci těchto faktorů a její efektivitě, spolu s výše popsanými faktory 43S komplexu, je často závislá celková frekvence translačních procesů, a proto se celkově dá říci, že formování iniciačního komplexu malé ribozomální podjednotky a mRNA je často nejpomalejší etapou celé translace (Gingras et al., 1999). Jako příklad negativní regulace můžeme uvést helikázu eIF4A a podjednotku eIF4G, jejichž aktivita je regulována v režii represivních fosforylačních míst, jejichž defosforylace je podmíněna různými faktory (Boex-Fontvieille et al., 2013). Molekulární mechanismus není ještě zcela probádaný, ovšem jsou známa fosforylační místa specifická pro tyto proteiny u rostlin (Boex-Fontvieille et al., 2013).

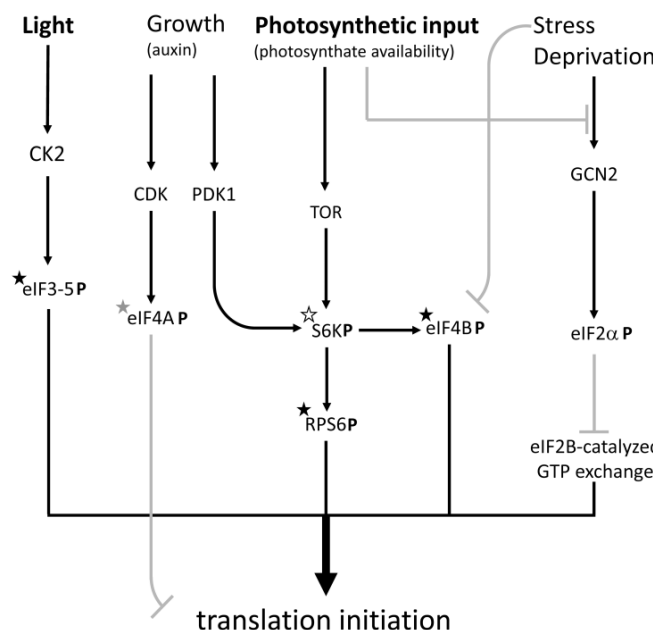
Fosforylace se účastní regulace translace i na úrovni elongačních faktorů. Faktor eEF2, zodpovědný za translokaci, je u rostlin negativně regulován fosforylací; při stresových podmínkách navíc dochází k obecné represi elongace (Szick-Miranda et al., 2003).

➤ Fosforylace ribozomálních proteinů

Proteiny tvořící spolu s rRNA ribozomální podjednotky také podléhají regulaci. Ribozomální protein S6 (RPS6) zde hraje klíčovou roli, úroveň jeho fosforylace má vliv na úroveň translace a tvorbu polyzómů (Boex-Fontvieille et al., 2013). Ve hře je protein kináza S6K, jež je sama pod kontrolou dalších protein kináz (Boex-Fontvieille et al., 2013). Intenzivní fosforylace C-konce RPS6 pod kontrolou signálních kaskád umožňuje zejména v kontextu abiotického stresu regulovat translační iniciaci, vesměs se zde jedná o pozitivní typ regulace (Muench et al., 2012). Další regulační fosforylace podmíněná environmentálními faktory se nachází na ribozomálním proteinu S14 (Boex-Fontvieille et al., 2013).

➤ Nejdůležitější protein kinázy v regulaci translace a významné regulační dráhy

U všech eukaryotických buněk najdeme protein kinázu CK2, jejíž funkce při transkripci, translaci a jiných buněčných procesech je předmětem mnoha výzkumů, zejména v rámci ontogeneze, adaptace a reakce na stres u rostlinného organismu (Mulekar and Huq, 2014). Výzkumy u *Triticum* (pšenice) a *Arabidopsis thaliana* ukázaly, že následující proteiny mohou být substrátem protein kinázy CK2: eIF2 α a eIF2 β , eIF3c, eIF4B a eIF5 (Dennis and Browning, 2009), a to zejména v důsledku pozitivní regulace reakcí na světlo (Muench et al., 2012). V rámci rostlinné cytologie se dále mimo jiné setkáváme s protein kinázou GCN2, která má funkci při globální represi translace v reakci na environmentální stres (Muench et al., 2012) a na xenobiotika (Faus et al., 2015). Další z rodiny protein kináz je enzym S6K. U rostlin hraje významnou roli v signální dráze TOR s účastí TOR kinázy modulující translační aktivitu dle intenzity fotosyntézy (Muench et al., 2012). Jako shrnutí mechanismů fosforylace popsaných v této kapitole uvedeme následující schéma znázorňující důležité dráhy obecné regulace translační iniciace v závislosti na environmentálních faktorech (Obr. 7).



Obrázek 7: Souhrn aktivačních (černě) a represivních (šedě) drah související s fosforylací během různých abiotických situací se znázorněním zodpovědných protein kináz. Fosforylované proteiny jsou označeny P. Černá hvězdička naznačuje souvislost fosforylace s fotosyntézou, šedá ukazuje na souvislost defosforylace s fotosyntézou a bílá na nezávislost stupně fosforylace na úrovni fotosyntézy (Zdroj obrázku: Boex-Fontvieille et al., 2013).

Závěrečné slovo

Popsali jsme si vlastnosti translace u rostlin a hlavní regulační mechanismy, které však samy o sobě nesvědčí o specifitějších regulačních mechanismech tvořících neuvěřitelný svět k probádání. Organismus není stroj, je výsledkem dlouhodobé evoluce, kde se četné procesy překrývají, doplňují, účastní, či neúčastní dle řady faktorů, a odpověď na makroskopické úrovni je toho globálním výsledkem. Proto se v následujících kapitolách zaměříme na rostlinu z hlediska jejího života a situací, které ji potkávají, a na výzkumy odhalující tajemství, jež se skrývají za makroskopicky pozorovatelnou ranou ontogenezí, reakcemi a přežitím rostliny.

KAPITOLA TŘETÍ

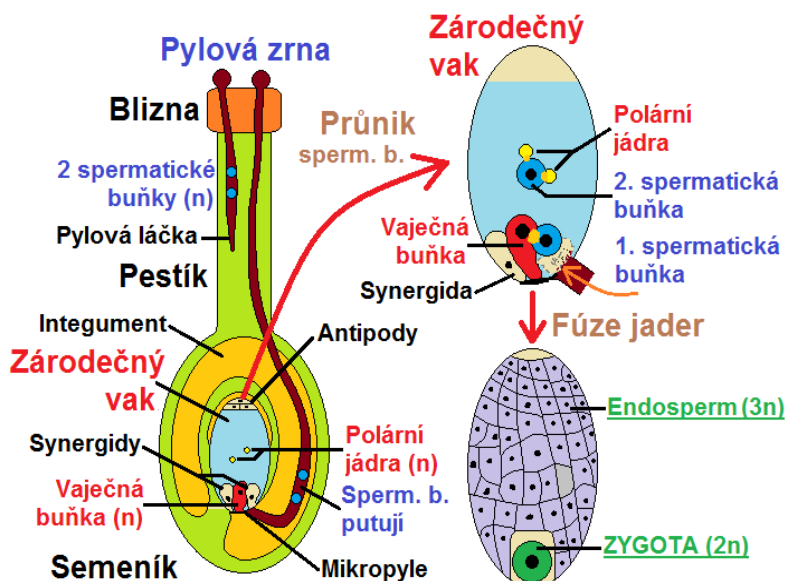
Význam translace a její regulace v gametofytu a během ontogeneze

Proces translace hraje variabilní, avšak důležitou roli v procesu rostlinné ontogeneze. Mezi důležité fáze životního cyklu rostlinného organismu patří gametogeneze, oplodnění, embryogeneze, tvorba semene a jeho klíčení. Tyto procesy jsou z hlediska hospodaření s mRNA a translace velice pestré, proto se jim budeme podrobněji věnovat, a to se zaměřením na rostliny krytosemenné, jež jsou z tohoto hlediska nejlépe prozkoumány. V této kapitole se podíváme na stávající znalosti týkající se progamické fáze, embryogeneze, klíčení a začátku vegetativního růstu.

❖ Pohlavní rozmnožování (kryto)semenných rostlin obecně

Úvodem si zopakujme princip evolučně úspěšného systému rozmnožování krytosemenných rostlin. Podívejme se na průběh oplození samičího gametofytu (zárodečného vaku) svým samčím kolegou (pylovým zrnem) včetně charakteristického dvojitého oplození.

Gametofyt je haploidním stádiem životního cyklu rostlin, jež vzniká klíčením spor, produktu redukčního dělení, a je zodpovědný za zformování gamet. Sporofyt je naproti tomu diploidním stádiem tvořícím veškeré vegetativní a generativní orgány rostliny (vyjma vlastních gametofytů). Pylová zrna vznikají v prašnicích na tyčinkách květů a po svém uvolnění je jejich úkolem opylit vlastní či častěji jinou rostlinu (přenos větrem, opylovači...). Opylení je následováno progamickou fází, růstem pylové láčky, jež končí dvojitým oplozením. Jeho důsledkem je vznik zygoty jako zárodka budoucí sporofytické generace a endospermu zodpovědného za výživu embrya ve zrajícím semeni (Obr. 8).



Obrázek 8: Obecné schéma opylení a dvojitého oplození krytosemenných rostlin. Pylové zrno dosedne na bliznu a vyklíčí, jeho spermatické buňky (vzniklé druhou pylovou mitózou) jsou nesené pylovou láčkou, která je ve svém růstu chemicky vedena pletivou pestíku a následně synergidami k otvoru klovnému (mikropyle). Pylová láčka se přes mikropyle dostane k zárodečnému vaku, jedna synergida degeneruje, což umožní puknutí pylové láčky, druhá poté chemicky odpuzuje další láčky, případně slouží jako rezerva pro druhý pokus o oplození,

pokud první selže (Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013). Při vstupu do mikropyle a proniknutí pylové láčky do synergidy pozorujeme účast několika proteinových receptorů, ligandů a iontových kanálů, zprostředkujících interakci obou gametofytů (Kessler and Grossniklaus, 2011). Jedna ze spermatických buněk fúzuje se samičí vaječnou buňkou a vznikne diploidní zygota, druhá fúzuje s dvěma polárními jádry, což vede ke vzniku triploidního endospermu, jehož rolí bude výživa rostoucího embrya vzniklého ze zygoty.

❖ Samčí gametofyt, význam a podstata translační regulace

V naší práci se zaměříme se zejména na samčí gametofyt, jelikož při obecném nedostatku znalostí je z hlediska translační regulace prozkoumán stále ještě podstatně důkladněji, nežli gametofyt samičí. Pylové zrno je pozoruhodnou strukturou. Spolu se semenem se jedná o jedno ze dvou stádií procházejících dehydratací, metabolicky téměř neaktivním stavem, což souvisí se specifiky adaptace rostlin k suchozemskému životu. Prostorová a časová diskontinuita vlhkého prostředí znemožňuje přežití, aktivní pohyb a samostatné párování hydratovaných brvitých/bičíkatých gamet, jak tomu je u řas, mechorostů a výtrusných, na vlhku závislých rostlin. Existence nepříznivých období a neschopnost aktivního pohybu si vynucuje existenci stádií, jež slouží jako odolní poslové při generativním rozmnožování a šíření potomstva, a to i na velkou vzdálenost (Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013).

➤ Pylové zrno, jeho klíčení a růst pylové láčky, obecné informace

Čím prošlo pylové zrno, než nasedlo na bliznu? Po redukčním dělení na samém počátku projde pylové zrno fází vývoje a zrání v prašníku, během níž pozorujeme zejména výrazně asymetrické dělení, první pylovou mitózu (PMI), jež dá vzniknout vegetativní a generativní buňce, jež mají výrazně odlišné osudy. Zatímco generativní buňka ještě proliferuje a projde ještě jedním buněčným cyklem (PMII, druhá pylová mitóza), na jehož konci jsou samčí gamety, spermatické buňky, vegetativní buňka buněčný cyklus opustí a připravuje se na svou funkci, tvorbu a intenzivní růst pylové láčky. Mezi důležité faktory patří syntéza rezerv (Bedinger, 1992). Poslední fází dozrávání pylu je jeho dehydratace, na jejímž konci je zralé zrno připraveno prašník opustit (Bedinger, 1992). Po dosednutí na bliznu následuje rehydratace pylu, klíčení a růst pylové láčky a oplození, jak ukázal obrázek 8. Pylové zrno v rámci metabolických rezerv obsahuje i skladované dlouhodobé molekuly mRNA, transkribované již během svého zrání, což souvisí s nutností rychlého spuštění metabolismu při zmíněné rehydrataci, kdy by byl celý proces genové exprese od DNA k proteinu, zdouhavý (Honys et al., 2000). Syntéza proteinů během klíčení pylového zrna a následného růstu pylové láčky jsou tedy z velké míry postaveny na posttranskripčních dějích (Honys a Twell 2004).

Růst pylové láčky je příkladem apikálního růstu závislého na aktinovém cytoskeletu (Cheung et al., 2008) a na gradientu vápníkových (a jiných) iontů, což jde ruku v ruce s mechanismem skladování Ca^{2+} iontů v endoplasmatickém retikulu (Holdaway-Clarke and Hepler, 2003). Jako příklad proteinu, v jehož syntéze, různé dle lokalizace a času, hraje translační regulace podstatnou roli, si uvedeme kalretikulin. Ten váže vápníkové ionty v lumen endoplasmatického retikula a tím moduluje koncentraci iontů Ca^{2+} , nezbytných v procesech růstu pylové láčky, při interakcích se samičími orgány a při oplození (Lenartowska et al., 2009; Lenartowski et al., 2014).

➤ Syntéza kalretikulinu aneb prostorová lokalizace translace

Již zmíněný protein kalretikulin (CRT) nám umožní popsat případ lokalizace translační aktivity spuštěné po opylení. Jeho translace se odehrává na ribozómech asociovaných s hrubým endoplasmatickým retikulem (Lenartowska et al., 2009), jak je tomu často u proteinů spojených se signalizací (Suwinska et al., 2015). Tabulka 1 znázorňuje distribuci CRT mRNA, proteinu CRT a 18S rRNA v pylu petunie během klíčení a růstu pylové láčky.

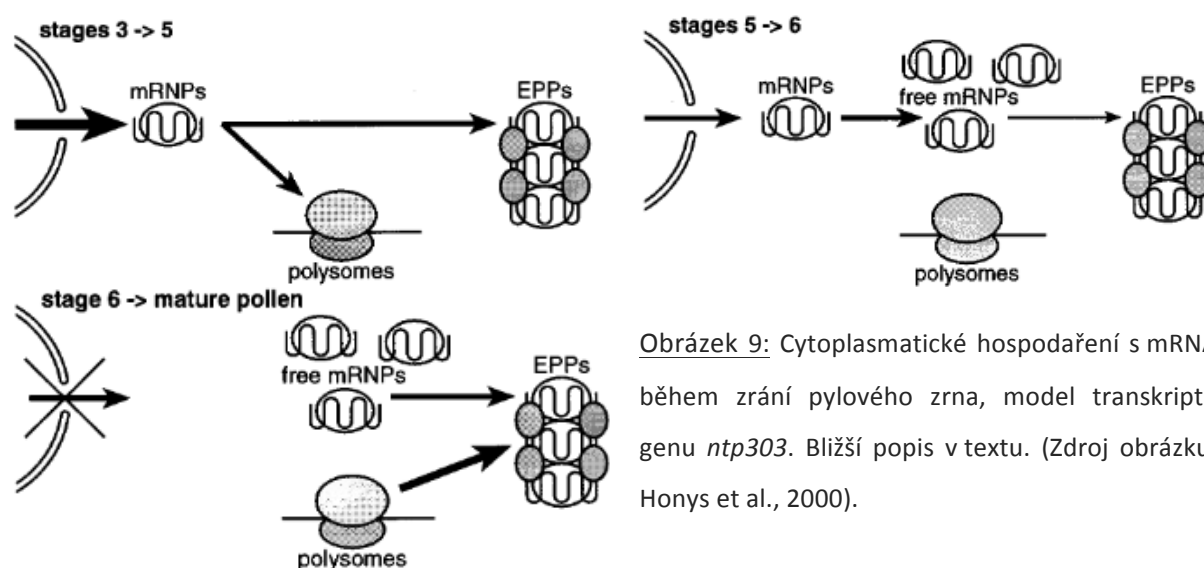
Molecule	Germinating pollen		Outgrowing pollen tube			Elongating pollen tube				
	<i>ga</i>	<i>a</i>	<i>ga</i>	<i>a</i>	<i>br</i>	<i>a</i>	<i>br</i>	<i>psh</i>	<i>dsh</i>	<i>saz</i>
<i>CRT</i> mRNA	+	±	+	±	+	+	+	+	+	+
CRT	+	±	+	±	+	+	+	±	+	+
<i>18S</i> rRNA	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+

Tabulka 1: Lokalizace CRT mRNA, proteinu CRT a 18S rRNA v pylu petunie při klíčení, vyrašení a růstu pylové láčky na několika místech, vždy zleva doprava od vlastního zrna (*ga*), přes místo rašení láčky (*a*), báze láčky (*br*), proximální, distální a subapikální zóny láčky (*psh*, *dsh*, *saz*), což ukazuje organizaci lokalizace mRNA a translace. Jak jsme uvedli, CRT moduluje koncentraci Ca^{2+} , je zde tedy patrná přímá korelace s kontrolou růstu (Zdroj tabulky: Suwinska et al., 2015).

Lokalizace translace na endoplasmatickém retikulu (dále ER) souvisí s existencí N-terminální signální sekvence u proteinu CRT, jež je rozpoznána signální rozpoznávací částicí (SRP), což vede krátce po začátku translace k vazbě na specifický receptor na ER. Po translaci je protein transportován do lumen ER (Lenartowski et al., 2014). Byl pozorován další zajímavý efekt, neboť i samotná CRT mRNA se může ocitnout ve vazbě s ER za účasti specifického proteinu vázaného s membránou ER (Suwinska et al., 2015). Apikálně-bazální distribuci, kterou ukazuje předchozí tabulka, je pak možno částečně připsat i typické cytoplasmatické cirkulaci, která pak může být sama mimo jiné regulována i působením CRT na organizaci aktinu prostřednictvím Ca^{2+} iontů, i když konkrétní mechanismus není dosud přesně objasněn (Suwinska et al., 2015).

➤ Selektivní časování translace a skladování mRNA

Nyní se na příkladu genu *ntp303* u tabáku podíváme na dočasné umlčení translace specifických transkriptů během zrání pylového zrna a její opětovné spuštění po rehydrataci. (Honys et al., 2000). Na rozdíl například od transkriptu *lat52*, jež je aktivně translatován během zrání pylu navíc s účastí translačně zesilovací funkce sekvence 5'UTR (Bate et al., 1996), pozorujeme u transkriptu genu *ntp303* absenci translace doprovázenou jeho výraznou akumulací ve velkých ribonukleových komplexech (EPP) obsahujících také rRNA a ribozomální podjednotky, což zajišťuje možnost skladování mRNA ve stabilních podmínkách a jeho následnou rychlou aktivaci po rehydrataci (Honys et al., 2009). Funkčně tvoří EPP komplexy analogy zárodečných/germinálních granulí živočichů, jejich složení je však pravděpodobně komplexnější (Hafidh et al., 2011). Tvorba komplexů EPP začíná v raném stádiu vývoje pylu, kdy je transkripce skladovaných transkriptů nejsilnější a kdy jsou některé transkripty asociovány s EPP a jiné jsou translatovány na polyzómech (Honys et al., 2000). Později již polyzómů nepřibývá, nové transkripty se hromadí v transportní formě ribonukleoproteinů (mRNP) a v konečné fázi dozrávání jsou transkripty, volné, či polyzomální, masivně asociovány s EPP (Honys et al., 2000).



Obrázek 9: Cytoplasmatické hospodaření s mRNA během zrání pylového zrna, model transkriptu genu *ntp303*. Bližší popis v textu. (Zdroj obrázku: Honys et al., 2000).

Role komplexů EPP nespočívá jen v uskladnění transkriptů, ale po rehydrataci také značně usnadňuje transport mRNA a translačního materiálu do potřebných míst, zejména do apikální části rostoucí pylové láčky (Honys et al., 2009). Při spuštění translace se uplatňují i 5'UTR translační zesilovače, jak bylo prokázáno v případě modelového skladovaného transkriptu *ntp303* (Hulzink et al., 2002). Specifické sekvence 5'UTR mohou vést ke tvorbě sekundárních struktur, které mimo vlastní úlohy při regulaci translace hrají také roli při stabilizaci mRNA. Na rozdíl od translačních zesilovačů konstitutivních transkriptu (viz *lat52*, Bate et al., 1996)

umožňuje zmíněná sekundární struktura 5'UTR transkriptu *ntp303* zesílení translace až po rehydrataci, nikoli však během zrání, což naznačuje existenci specifického vazebného proteinu uplatňujícího se až po opylení (Hulzink et al., 2002).

Během růstu pylové láčky pozorujeme četnost přítomnosti a translace transkriptů několika stovek genů (Lin et al., 2014). Některé mají specifickou funkci výhradně v tomto stádiu a asi 150 je víceméně specificky silně translatováno v *in vivo* rostoucí pylové láčce (Lin et al., 2014). Pozorujeme rozdíl v případě klíčení *in vitro*, kdy očividně chybí účast samičích signalizačních mechanismů na posttranskripční genovou expresi (Lin et al., 2014). Budoucí výzkumy na fyziologické a molekulární úrovni mohou dále objasnit podstatu ještě neprobádaných mechanismů.

❖ **Klíčení semen, význam a podstata translační regulace**

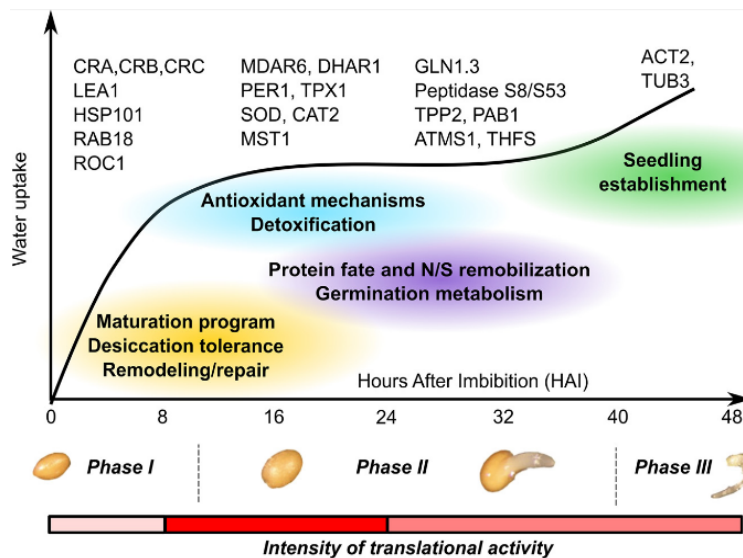
Semeno je, obdobně jako pylové zrno, dehydratované stádium s omezeným metabolismem. Díky své relativní dlouhověkosti a značné odolnosti má dvojí roli, jednak zajistit přežití nevhodného období (u efemérních a jednoletých bylin toto stádium zajišťuje přežití do další vegetační sezony) a jednak sloužit jako vektor pro postembryonální vývoj nového jedince. Jakmile je jednou rehydratací spuštěno, klíčení je nenávratným procesem.

➤ Podstata mechanismu klíčení

Proces klíčení je zahájen, když se setkají vhodné podmínky a semeno se již nenachází v dormantním stádiu (Finkelstein et al., 2008). Z hlediska genové exprese můžeme říci, že podobně, jako je tomu u pylového zrna, většina transkripčních a maturačních procesů mRNA důležitých pro klíčení proběhla během zrání semene a po vyklíčení převezme žezlo regulovaná translace skladovaných molekul mRNA (Galland et al., 2014).

Transkripce a její regulace hrají roli při udržování a ukončení dormance semen; zde můžeme připomenout dobře popsanou roli kyseliny abscisové (ABA) a giberelinů (Finkelstein et al., 2008). První fytohormon indukuje dormanci a zabraňuje klíčení, druhý má opačný efekt, stimuluje mobilizaci rezerv v semeni a klíčení (Finkelstein et al., 2008). Avšak transkripční regulační mechanismy, mající v tomto stádiu relativizovanou roli, nevysvětlují vše ostatní (Layat et al., 2014). Během klíčení semeno kontrolovaně přechází do metabolicky vysoce aktivního režimu iniciovaného nasáváním vody a pokračujícího přípravnými specifickými procesy, jež vyústí ve vlastní vyklíčení semene emergencí radikuly, vše za intenzivní translace skladovaných molekul mRNA (Galland et al., 2014). Byla popsána

variabilita translace různých transkriptů v různých orgánech, nikoli nepřekvapivě, například platí, že transkripty kódující proteiny hlavních metabolických drah jsou přednostně překládány v dělohách (Ge et al., 2013). Polyzómy byly pozorovány již krátký čas po začátku rehydratace suchého semene (Bewley and Pramanik, 1997) a tento dynamický proces dále pokračuje v několika etapách (Obr. 10).



Obrázek 10: Fáze klíčení a proteosyntéza u *Arabidopsis thaliana*. Nejprve vidíme syntézu proteinů odpovídajícím pozdnímu vývojovému stádiu semene, například cruciferin (CRA), které jsou následně degradované v druhé fázi, zatímco nastává intenzivní translace enzymů zajišťující právě tuto degradaci, a také důležitých remodelačních a opravných proteinů, jako antioxidantů, například monodehydroascorbate reductáza (MDAR6) a detoxifikačních enzymů, např. mercaptopyruvate sulfurtransferáza 1 (MST1). Následuje nástup třetí fáze, který je charakterizován translací genů kódujících pro cytoskeletární proteiny, což logicky zapadá do navazujícího klíčení a růstu. (Zdroj obrázku: Galland et al., 2014).

Jak je vidět, u nedormantních semen probíhá exprese existujících (a nově přepisovaných) transkriptů dle organizovaného scénáře, přičemž transkripty prioritně redistribuované do polyzómů kódují zejména proteiny účastníci se buněčného transportu, regulace transkripce a modifikace buněčné stěny (Layat et al., 2014). Do popsaného schématu dobře zapadá příklad exprese aktinu, neboť aktinový cytoskelet se aktivně účastní mobilizace rezerv v prvních fázích následujících po rehydrataci, tedy na počátku vegetativního růstu, (Diaz-Camino et al., 2005). Dokud je semeno suché, aktin je vzácný a nehraje významnou roli během vlastní rehydratace, ovšem záhy dochází k masivní translaci aktinových mRNA, jež jsou již přítomny v embryu, nicméně jsou také de novo transkribovány; v neposlední řadě byla pozorována i časová a místní posttranskripční regulace exprese různých izoform aktinu (Diaz-Camino et al., 2005). U *Arabidopsis thaliana* je tak v raném stádiu nejvíce exprimován aktin 7 (ACT7), jehož exprese je pod kontrolou fytohormonů, zejména auxinu (McDowell et al., 1996). Popsaný systém tak představuje konkrétní příklad translační kvantitativní a kvalitativní regulace dle časové a místní lokalizace jednotlivých transkriptů během morfogeneze mladého klíčku (Diaz-Camino et al., 2005).

➤ Mechanismy selektivity translace během imbibice, v dormanci a rané ontogenezi

Nyní si rozebereme aktuálních znalosti mechanismů selektivní translace dle vývojových stádií semene a klíčku. Rozdíl mezi dormantním a nedormantním stádiem během bobtnání semen je zde zajímavým faktorem. V obou případech pozorujeme výraznou míru asociace mRNA s polyzomy, avšak jejich distribuce se v obou případech liší dle jednotlivých transkriptů, jak to ukazují experimenty u *Helianthus annuus* (Layat et al., 2014) a *Arabidopsis thaliana* (Basbouss-Serhal et al., 2015). Délka 5'UTR nehraje roli v regulaci distribuce transkriptů mezi oběma stavy - translatovaným a netranslatovaným, pozorujeme však korelaci s frekvencí bází G a C v této regulační sekvenci. V dormantním stádiu byly mRNA s nízkým obsahem G a C v 5'UTR výrazně častěji pozorovány ve vazbě na polyzomy (Basbouss-Serhal et al., 2015). Některé transkripty obsahují krátké ORF v 5'UTR (uORF, angl. upstream ORF), jejich přítomnost a délka mají u rostlin represivní účinek na účinnost translace. uORF totiž musejí být preiniciačním komplexem během skenování překonány, často za cenu reiniciace, jíž se pravděpodobně účastní eIF3 (von Arnim et al., 2014). U dormantních semen je zastoupení mRNA obsahujících uORF vyšší než u nedormantních, u nichž naproti tomu pozorujeme diskriminaci četnosti translace a asociace do polyzómů dle délky uORF, pokud jsou přítomné, což, spolu s obsahem G a C, hraje roli v selektivnosti translace. Přesný mechanismus není však zcela prozkoumán (Basbouss-Serhal et al., 2015).

To, zda byla jistá mRNA syntetizována *de novo* po vyklíčení, či byla skladována v suchém semeni, má také svůj význam. Zrání pre-mRNA souvisí s účastí proteinů vázajících se k čepičce v jádře a hrajících roli v regulaci odpovědi na kyselinu abscisovou - ABA (Hugouvieux et al., 2001). Některé transkripty jsou ve své expresi negativně regulovány právě úrovní ABA (Hugouvieux et al., 2001). ABA, snížení jejíž koncentrace indukuje konec dormance a indukuje schopnost klíčení, má také prokazatelný účinek na aktivitu volných, k membráně a k cytoskeletu vázaných polyzómů s tím, každá kategorie přednostně translatuje různé funkční kategorie transkriptů (Szypulska and Weidner, 2011). Také byla experimentálně prokázána přednostní translace skladované mRNA jsou za účasti jedné z izoforem eIF4E, konkrétně eIFiso4E (Dinkova et al., 2011).

Funkční rozdílnost translačních iniciačních faktorů eIF4E a eIFiso4E se však neomezuje jen na předchozí příklad, dále byly pozorovány různé fenotypové projevy v případě menšího, či většího zastoupení jedné z obou izoforem (Martinez-Silva et al., 2012). Klíč k této variabilitě leží v 5'UTR, neboť eIF4E se přednostně váže k transkriptům, jejichž 5'UTR je delší a obsahuje stabilní sekundární struktury (Martinez-Silva et al., 2012). Podobně byla

pozorována rozdílná lokalizace a aktivita obou translačních iniciačních faktorů pozorována i v pozdějších fázích ontogeneze, neboť eIFiso4E je více lokalizován v oblasti mladého kořene, což se projevuje například selektivní expresí určitých transkriptů v závislosti na nutričním stavu (Martinez-Silva et al., 2012).

Konečně zmíníme regulační propojení procesů transkripce a translace, konkrétně zpětné spojení regulace translace s mechanismem transkripce ve formě pozitivní a negativní regulace prostřednictvím selektivní translace mRNA genů kódujících transkripční faktory (Basbouss-Serhal et al., 2015). Takto zprostředkovaná transkripční regulace se často týká signalizace spojené s fytohormony, tedy fyziologických procesů následujících po vyklíčení dormantních a nedormantních semen (Basbouss-Serhal et al., 2015).

Závěrečné slovo

Jedinečnost rostlinné reprodukce si vyžaduje specifická bádání, neboť tvoří v mnoha faktorech paralelní a méně známý svět vedle mnohem více probádané gametogeneze, embryogeneze a rané ontogeneze živočichů. Výzkum není vždy snadný, zejména co se týče *in vivo* klíčení pylového zrna, a mnoho objevů vede spíše k popsání k dalších záhad, novým regulačním procesům zasluhujícím probádání. Nyní pokročíme ve sledování dalších fází ontogeneze rostliny, kdy po zahájení svého vegetačního růstu bude muset čelit rychlým změnám podmínek, ne vždy příjemným, a často vyžadujícím okamžitou reakci.

KAPITOLA ČTVRTÁ

Regulace translace u rostlin reakcí na vliv klimatických faktorů

Nyní se podívejme na význam translačních regulací pro rostlinu během vegetativní a generativní fáze. Jelikož rostlina nemá ve většině případů možnost rychlé fyzické reakce na změnu vlivu prostředí, spíše využívá rychlé adaptace růstových a biosyntetických procesů k přizpůsobení se a k překonání změny.

❖ Podstata problematiky

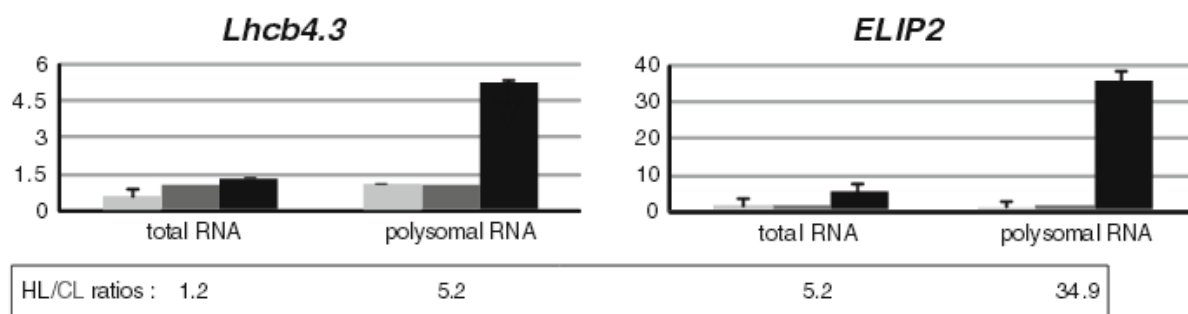
Zatímco je většina dlouhodobých morfologických a fyziologických adaptací předmětem transkripční regulace, krátkodobé faktory vyžadující okamžitou odpověď spadají často do domény translace, což bude tématem následující části. Stresové situace obecně vedou k celkové represi translace, k rychlému přechodu aktivně translatovaných mRNA k sekvistrované vazbě v útvaru stresových granulí, tvořených zejména za účasti eIF4E a specifických mRNA-vazebných proteinů (Weber et al., 2008), avšak rezistence a přežití si vyžadují naopak selektivní zvýšené zastoupení specifických proteinů a příslušné regulační mechanismy jsou na posttranskripční úrovni četné a různorodé. Jelikož se jedná o extrémně polymorfní mechanismus, který zdaleka není plně prozkoumán, učiníme zde rozbor některých významných příkladů náležitě několika typickým stresovým situacím, jež byly experimentálně prokázány.

❖ Regulace translace v kontextu osvětlení a fotosyntézy

Autotrofie rostlin souvisí s nutností rychlých regulací stavu fotosyntetického aparátu ve fotosyntetizujících pletivech. Tyto regulace implikují zejména reakce na intenzitu osvětlení a na fotosyntetický režim chloroplastů (Floris et al., 2013). Intenzita světla a množství CO₂ obecně ovlivňují řadu fosforylačních míst ribozomálních proteinů a translačních iniciačních faktorů (Boex-Fontvieille et al., 2013). Konkrétně u *Arabidopsis thaliana* byl prokázán vliv osvětlení nebo fotosyntetické aktivity (tedy množství CO₂) nebo obojího na (de)fosforylaci devíti fosforylačních míst u ribozomálních proteinů a třinácti těchto míst u translačních iniciačních faktorů (Boex-Fontvieille et al., 2013) – viz také kapitola druhá, Obr. 7.

Nyní se podívejme na konkrétní adaptační situaci, zejména za souvislých stresových podmínek. Světlosběrný komplex LHC, který absorbuje dopadající světlo, potřebuje zejména možnost rychlé adaptace na přesvětlení, což se promítá do intenzity translace některých

transkriptů kódujících proteiny tohoto komplexu. Příslušné proteiny jsou kódovány jadernými geny, což translační regulaci umožňuje (Floris et al., 2013).



Obrázek 11: Celkové množství mRNA a množství mRNA v polyzomální frakci, znázorněno při slabém osvětlení (světle šedá), běžném osvětlení (středně šedá) a silném osvětlení (tmavě šedá). (Zdroj obrázku: Floris et al., 2013).

Při nadbytku světla je značně nápadné zvýšení translační úrovně genů Lhcb4.3 a ELIP2 (Obr. 11, Floris et al., 2013). Není se čemu divit, neboť protein ELIP2 se účastní mechanismu fotoprotekce díky své funkci transientního pigmentového přenašeče (Adamska, 1997) a v disipaci škodlivého přebytku energie. Protein Lhcb4.3 má také silný, byť méně prozkoumaný vliv na vlastnosti LHC v této situaci (Klimmek et al., 2006). Rychlá modulace genové exprese právě na posttranskripční úrovni se zde tedy jeví jako nezbytná. Byla prokázána existence signální dráhy ze strany chloroplastu, působící na regulaci translace jednotlivých mRNA, avšak ještě zbývá konkrétně objasnit její mechanismus (Floris et al., 2013).

❖ Reakce rostlinného organismu na změny teploty

Na počasí a klimatu záleží nejen osvětlenost, ale také teplota a dostupnost vody. Teplota a její rychlé či pomalé změny představují v přírodě jeden z klíčových faktorů ovlivňujících schopnost přežití a adaptační strategie živých organismů včetně rostlin. Odpovědi na rychlé a/nebo extrémní teplotní variace jsou předmětem četných výzkumů. Z hlediska translace mRNA se budeme zajímat spíše o krátkodobější krizové situace.

➤ Reakce a obranné mechanismy rostlin za vysokých teplot

Jak je typické pro stresové situace, celková translační úroveň se při tepelném stresu snižuje (Ueda et al., 2012). Typický globální inhibiční mechanismus translace spočívající ve fosforylaci iniciačního faktoru eIF2 α při tepelném stresu neplatí (Browning, 2004) a rovněž obě izoformy eIF4E jsou nepostížené (Bailey-Serres, 1999). Naopak byla pozorována globální fosforylace faktoru eIF4A a defosforylace faktoru eIF4B (Bailey-Serres, 1999).

eIF4A obsahuje represivní fosforylační místa inhibující vazební potenciál s iniciačním komplexem (Boex-Fontvieille et al., 2013; Szick-Miranda et al., 2003). Naproti tomu defosforylace eIF4B snižuje jeho interakci s PABP, což je v neprospěch translační reiniciace (Boex-Fontvieille et al., 2013). Konečně byla prokázána defosforylace ribozomálního proteinu S6 (Bailey-Serres, 1999), což opět hraje roli v translační represi (Beltran-Pena et al., 2002). Translace řady transkriptů je tedy snížena ve prospěch úspory energie, kterou by spotřebovala syntéza proteinů, jež nejsou krátkodobě nezbytné, a proto se inhibice týká četných metabolických funkcí včetně například syntézy ribozomálních proteinů (Ueda et al., 2012). Transkripty jsou v případě tepelného stresu víceméně (dle vazebných míst transkriptu) mRNA) skladovány za tvorby agregátů specifických stresových granulí, obsahující mimo jiné tzv. proteiny tepelného stresu (angl. heat shock protein – HSP) z rodiny HSP20 a HSP70 (Weber et al., 2008).

Tvorba polyzómů asociovaných s konkrétními mRNA je naopak zvýšena, a to ve prospěch selektivní syntézy specifických proteinů, které usnadní odolnost a přežití organismu (Ueda et al., 2012). Část vysvětlení selektivní translace spočívá v charakteristikách vlastních molekul mRNA. Na rozdíl od normálních teplot, je za zvýšené teploty u rostlin faktorem přednostní translace délka kódující části mRNA s potenciální rolí v usnadnění cirkularizace transkriptu během iniciace (Yanguéz et al., 2013). Co se týče 5'UTR sekvence mRNA, zde byly pozorovány faktory podmiňující prioritní translaci za stresových podmínek, zejména nižší obsah bází G a C (Yanguéz et al., 2013). Vysoký obsah G a C bází naopak znesnadňuje iniciaci díky snazší tvorbě sekundárních struktur (Kozak, 2005). Dále, konkrétní 5'UTR sekvence specifických transkriptů kódujících proteiny tepelného stresu umožňují silnou selektivní translaci, jak je tomu např. u HSP81 (Matsuura et al., 2008). Nejedná se o alternativní formu translační iniciace, nýbrž o selektivní podporu jinak umlčené iniciace za vysoké teploty (Matsuura et al., 2008).

➤ Reakce a obranné mechanismy rostlin za nízkých teplot

Druhá situace, se kterou se seznámíme, bude vliv nízkých teplot, jež nastává nejen v zimním období, ale i krátkodobě při ranních mrazech, apod. Podíváme se na procesy související s aklimatizačními procesy a s krátkodobými adaptačními mechanismy, které náleží k našemu tématu.

Za nízkých teplot byla prokázána významná role specifických proteinů, které se váží k mRNA a zajišťují regulaci její translace. U rostlin bylo popsáno několik RNA vazebných proteinů, spojených s krizovou situací nízkých teplot (Juntawong et al., 2013), vysoce

konzervovaných mezi rostlinnými druhy (Karlson et al., 2009). Příkladem jsou proteiny CSP1 až 4 u *Arabidopsis thaliana*, jejichž koncentrace stoupá za chladu s různou rychlostí, např. Pomalejší akumulace CSP2 je očividně více spojena s dlouhodobější aklimatizací (Juntawong et al., 2013; Kim et al., 2009; Sasaki et al., 2007). Byla pozorována jejich cílená vazba ke specifickým molekulám mRNA asociovaným s polyzómou (Juntawong et al., 2013); například protein CSP1 se přednostně váže s transkripty, kódující proteiny účastníci se zejména energetického metabolismu a geneze ribozómů (Juntawong et al., 2013). Všechny zmíněné proteiny vykazují vůči transkriptům chaperonovou aktivitu se schopností eliminovat sekundární struktury mRNA vzniklé v důsledku chladu (Juntawong et al., 2013; Kim et al., 2009; Sasaki et al., 2007). Selektivnost vazby je podmíněna zejména motivy v 5'UTR mRNA, podmiňujícími také schopnost tvorby sekundárních struktur (Juntawong et al., 2013). Dokonce se spekuluje o tom, zda existuje korelace s procesem transportu mRNA z jádra interakcí s mRNA helikázami, což by mohlo hrát roli v kontextu konformačních změn postihujících metabolismus mRNA za nízkých teplot (Kim et al., 2009).

❖ Reakce rostlinného organismu na variace dostupnosti vody

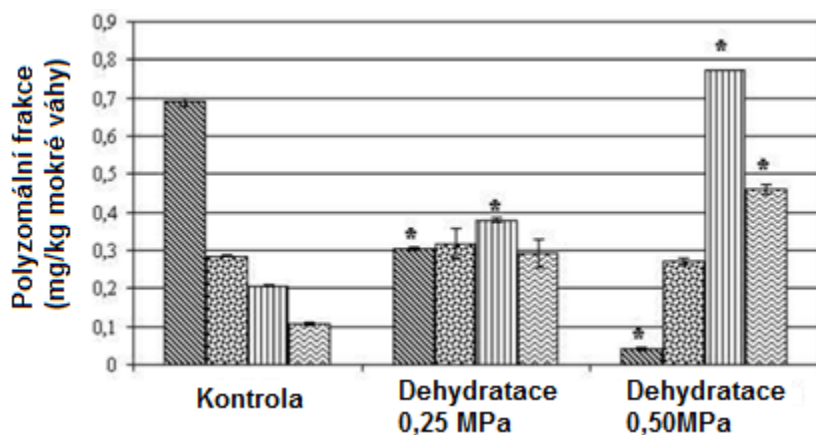
Druhý nepředvídatelný a z hlediska rostlin často rozhodující faktor, kterým je četnost a distribuce srážek, jejich nerovnoměrnost, střídání období sucha a záplav, je víceméně spojen s tím prvním, v dobrém i ve zlém. Sucho a zaplavení ovlivňují v přírodě život mnoha rostlin a jsou důležitými faktory ovlivňujícími zemědělství, ale také přežití pokojových rostlin.

➤ Reakce a obranné mechanismy rostlin v situaci dehydratace

Když jsme se věnovali o vysokým teplotám, jistě nás napadne také problém sucha, i když obojí nemusí být nutně spojeno. Dehydratace znamenající osmotický stres je jednou z největších hrozeb pro suchozemské rostliny. Vyšší rostliny, i sukulentní a adaptované na dlouhá období sucha, nemohou fyzické vyschnutí svých pletiv přežít, jsou takzvaně homoiohydriky (Heber et al., 2006); mají však časovou rezervu danou schopností plazmolytické reakce a regulačních prostředků na molekulární úrovni umožňujících déle přetrvat v naději, že zaprší (či, že budou zality). Osmotický stres může vzniknout i v jiných situacích, významná je například zvýšená salinita.

Abiotické stresy doprovázejí veškeré fáze života rostliny, a to již v raném období, o kterém jsme v minulé kapitole hovořili. Dehydratace bývá v tomto stádiu častým problémem, následující fakta je ovšem do jisté míry možno zobecnit na další stresové situace (Swigonska

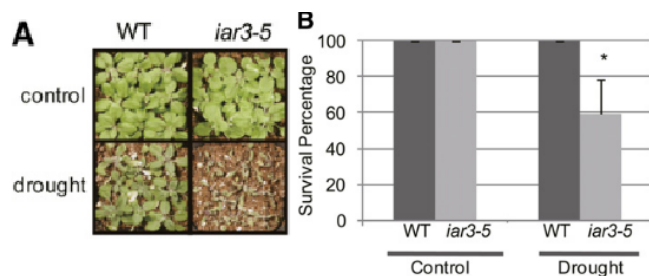
et al., 2014). Předně má tento abiotický stres jako následek obecné snížení translace následované přednostní translací určitých transkriptů (Kosowska et al., 2004). Další výzkum ukázal podíl volných a vázaných polyzómů, což nepředstavuje pouhou obecnou reorganizaci translační mašinerie, nýbrž to svědčí o selektivitě translace specifických mRNA (Obr. 12), jelikož jednotlivé typy polyzómů do jisté míry korelují s funkcí syntetizovaného proteinu (Krupinska et al., 2003).



Obrázek 12: U klíčících semen *Triticale caryopses* byl indukován osmotický dehydratační stres. Zleva doprava vždy: volné polyzomy, polyzomy vázané s membránou, s cytoskeletem a s obojím. Z těchto experimentálních dat jasně vyplývá redistribuce translační četnosti mRNA a selektivní aktivace translace specifických stresových genových kategorií Zdroj obrázku: Kosowska et al., 2004).

Zde vidíme navození preference pro polyzomy vázané na membránu a cytoskelet, jejichž existence byla u rostlin prokázána (Klyachko et al., 2000), což ukazuje na možnou roli proteinů vázaných s těmito strukturami v promoci translační aktivity (Swigonska et al., 2014). Dále byla experimentálně zjištěna zvýšená stabilita polyzómů selektivně vytvořených za abiotického stresu (Swigonska et al., 2014), což jde ruku v ruce s logikou situace, nejstabilnějšími jsou právě polyzomy asociované s membránou a cytoskeletem (Brosowska-Arendt and Weidner, 2011).

V kontextu stresové situace nemůžeme vynechat regulační mechanismus spočívající v interakci transkriptů s molekulami malých interferenčních (angl. small interfering) RNA. Tyto siRNA fungují mimo jiné jako translační inhibitory, ve vazbě s proteinem ARGONAUTE se váží ke komplementární mRNA, což vede k represi či k rozštěpení mRNA (Chen, 2009).



Obrázek 13: vliv proteinu IAR3 na toleranci k vyschnutí: mutace genu *iar3* vede ke značně snížené toleranci a nižšímu procentu přežití po dvou týdnech působení vodního stresu (zdroj obrázku: Kinoshita et al., 2012).

Gen *IAR3* má u četných rostlin nezbytnou funkci při zvýšení tolerance k vyschnutí (Kinoshita et al., 2012), jak ukazuje následující pokus (Obr. 13). Protein IAR3 hraje roli zejména

v morfologických modifikacích nastávajících za osmotického stresu a translace příslušného transkriptu je za normálních podmínek reprimovaná interakcí s molekulou siRNA zvanou miR167a, což vede k rozštěpení transkriptu. Vyšší zastoupení miR167a tedy koreluje s nižším zastoupením transkriptu *IAR3* a naopak (Kinoshita et al., 2012). Závěr je jasný: regulačním mechanismem je snížení tvorby a koncentrace miR167a, což bylo experimentálně prokázáno za osmotického stresu a nastávající během dehydratační krize (Kinoshita et al., 2012). Snížení úrovně miR167a umožňuje zvýšení exprese genu *IAR3*, ve prospěch adaptace rostliny, zvyšující šanci na přežití (Kinoshita et al., 2012). Viděli jsme tedy pěkný příklad experimentálního důkazu účasti siRNA v translační regulaci v odpovědi na abiotický stres.

➤ Reakce a obranné mechanismy rostlin v situaci zaplavení a následné hypoxie

Hospodaření s vodou a schopnost přizpůsobení se suchu tvoří komplexní problém. Podívejme se nyní na opačnou situaci, je-li přebytek vody v substrátu a následně i v pletivech kořene a prýtu. Tato situace je běžná při silných srážkách, záplavách, klasickém scénáři přelévání pokojových rostlin a existuje dlouhodoběji v některých ekosystémech. Způsobuje jednak porušení homeostáze a jednak anoxii s možným vážnými následky pro metabolismus rostliny (Lin et al., 2015) nemluvě o zvýšeném riziku biologického napadení. Znemožnění oxidativní fosforylace v podmínkách anoxie také zásadně omezuje dostupnost ATP (Shingaki-Wells et al., 2014), což nás zajímá při průzkumu translační regulace, která se v podobných limitních případech uplatní. Rostliny s adaptací na často zaplavené a málo provzdušněné půdy nejsou nutně tolerantnější k anoxii, spíše se u nich vyvinula schopnost transportu kyslíku na větší vzdálenost (Vartapetian, 2006).

Procesy anaerobní glykolýzy a etanolové fermentace nastávající v situace hypoxie a anoxie vyžadují preferenční výskyt specifických enzymů (Vartapetian, 2006). I když globálně má anoxie za následek redukcí počtu polyzómů a tím redukcí úrovně translace, pozorujeme přesný opak v případě transkriptů kódujících zmíněné specifické enzymy patřící mezi takzvané stresové proteiny (Szick-Miranda et al., 2003). Například u kukuřice, je tímto způsobem zesílena exprese genů kódujících alkohol dehydrogenázu 1 a 2, sacharóza syntázu 1 a 2, aldolázu a enolázu (Szick-Miranda et al., 2003).

Nyní se podívejme na molekulární podstatu translačních regulací. Faktor eIF4B a ribozomální protein S6 jsou za anoxie defosforylovány (Szick-Miranda et al., 2003), což obojí vede k represí translace (Beltrán-Peña et al., 2002; Boex-Fontvieille et al., 2013), jak jsme již uvedli v případě tepelného stresu. Podobně helikáza eIF4A, která je za podmínek anoxie také do 60ti minut fosforylována (Fennoy and Bailey-Serres, 1995), a PABP mají v těchto

podmínkách sníženou schopnost vazby s translačním iniciačním komplexem a i obecně je jeho stabilita snížena (Boex-Fontvieille et al., 2013; Szick-Miranda et al., 2003). Anoxie rovněž způsobuje snížení účinnosti interakce faktorů eIF4A a PABP s faktorem eIF4G či eIF4isoG (Szick-Miranda et al., 2003). Ještě zbývá zmínit fosforylaci iniciačního faktoru eIF2 α , jež zabraňuje jeho reaktivaci výměnou GDP za GTP (Muench et al., 2012) a kterou v situaci anoxie pozorujeme (Li et al., 2011). Podobně je tomu i v případě fosforylace elongačního faktoru eEF2 (Li et al., 2011).

Viděli jsme tedy příčiny celkového umlčení translační aktivity, nyní se budeme věnovat schopnosti selektivní iniciace translace transkriptů kódujících stresové proteiny. Molekuly mRNA stresových proteinů mohou jevit vyšší stabilitu, což je zvýhodňuje v konkurenceschopnosti při iniciaci translace ve zmíněných podmínkách (Fennoy and Baileyserrres, 1995). To však nevysvětluje vše, neboť větší roli hraje sekvence nukleotidů mimo ORF, například v závislosti na izoformách faktorů eIF4F a eIF4isoF. Forma eIF4isoF (skládající se z eIF4isoE a eIF4isoG) neumožňuje, na rozdíl od své kolegyně, translaci transkriptů obsahujících výrazné sekundární strukturní motivy v 5'UTR (Gallie and Browning, 2001). Při anoxii, přesněji řečeno v důsledku sníženého pH charakteristického pro tento stav, je hyperfosforylován faktor eIF4E, nikoliv však jeho izoforma eIF4isoE, jejíž stav se nemění (Szick-Miranda et al., 2003). Fosforylace mění vazebnou afinitu faktorů (Khan and Goss, 2004), čímž jsou selektivně více ovlivněny transkripty vyžadující komplex eIF4F.

Co se týče 5'UTR sekvence, u některých transkriptů pozorujeme také případ silného translačního aktivátoru, o to účinnějšího, čím blíže start kodonu se vyskytuje. Transkript genu kódující pro alkohol dehydrogenázu obsahuje specifickou sekvenci poblíž start kodonu, která je vysoce účinná (Sato et al., 2004). Tato sekvence neovlivňuje stabilitu, tedy akumulaci transkriptů (Sato et al., 2004) a nemá zvláštní význam za aerobních podmínek (Mardanova et al., 2007), avšak umožňuje vyhnout se globálnímu translačnímu umlčení a tedy efektivní translaci za situace hypoxie (Mardanova et al., 2007).

Závěrečné slovo

Jak jsme viděli, rostliny využívají k přežití a adaptaci abiotickým stresům panoplii regulačních možností, které translační mašinerie nabízí: vlastní struktura molekuly mRNA tvořící transkript, regulace transkripčních faktorů, jiné interagující molekuly. Můžeme se jen těšit, až nám budoucí výzkumy popíší konkrétní mechanismy s ještě bohatšími detaily a odhalí další tajemství. V další kapitole se znovu setkáme s podobnými jevy, tentokrát v kontextu jejich zneužití virovým patogenem a sebeobranou hostitele.

KAPITOLA PÁTÁ

Regulace translace u rostlin v situaci virové infekce

Nepříznivé abiotické podmínky nejsou jedinou hrozbou, které musí rostlina čelit. Virové infekce, ať spontánní či oportunistické, jsou pro rostliny potenciálním vážným ohrožením. Podstata virové infekce je známá. Virus se vyznačuje závislostí na transkripčním a translačním aparátu hostitelské buňky pro syntézu vlastních proteinů.

❖ Obecně o virové infekci

Virus postrádá vlastní translační mechanismus a pronikne do hostitelské buňky za účelem vlastního rozmnožování, replikace svého genomu (různými mechanismy, jejichž podrobná charakteristika sahá nad rámec této práce) a syntézy vlastních proteinů, většinou v omezené míře a s významnými specifickými funkcemi (Csorba et al., 2015), mezi něž patří zásahy do signálních a regulačních drah hostitelské buňky, čímž je dále oslaben obranný systém hostitele (Walsh and Mohr, 2011). Viriony se také mohou snadno rozšířit do okolních buněk až do celého organismu, u rostlin z buňky do buňky prostřednictvím plasmodesmů a na velkou vzdálenost přes floém (Csorba et al., 2015). V rámci koevoluce virů a rostlin se vyvinulo, jak je tomu často u interakcí patogenů a hostitelů, množství útočných a obranných mechanismů (Csorba et al., 2015).

❖ Virové infekce u rostlin a jejich strategie využití translačního aparátu hostitele

Nyní se budeme věnovat zneužití translace ze strany virů, obvykle intenzivnímu vzhledem k rychlému replikačnímu cyklu viru (Gao et al., 2014). Uvedme několik známých vektorů a jejich strategií, které se liší zejména dle typů virových patogenů a specificitou k rostlinnému hostiteli (Csorba et al., 2015). Zaměříme se na pozitivní jednořetězové RNA viry tvořící nejvýznamnější skupinu rostlinných patogenů (Ghoshal and Sanfacon, 2015).

➤ 5' Omega faktor: známý příklad translačního zesilovače u rostlinného viru

Virus tabákové mozaiky (TMV) je pozitivní RNA virus, jehož molekula RNA obsahuje v 5'UTR oblasti specifickou sekvenci, známou pod názvem Omega (Ω) leader (Gallie, 2002). Molekula RNA tohoto viru obsahuje 5' čepičku, avšak postrádá poly(A) řetězec, nicméně i přesto nebo právě proto je efektivně translatována (Gallie, 2002). Ω leader umožňuje zahájení translace doprovázené rozpadem proteinů virionu spojených s molekulou RNA v řádu minut

po vniknutí do hostitelské buňky a následovně i translaci volných virových RNA v cytoplasmě hostitele (Gallie, 2002). V TMV RNA pozorujeme nejen absenci sekundární struktury 5'UTR, ale také specifickou poly(CAA) sekvenci, kde Ω leader rekrutuje hostitelský protein HSP101 (Wells et al., 1998). Následně jsou vázány faktory eIF4G a eIF3, což umožní vazbu 40S ribozomální podjednotky bez nutnosti účasti dalších podjednotek, například helikázy eIF4A (Wells et al., 1998). Specifická sekundární struktura na 3' konci TMV RNA, jež mimikuje strukturu tRNA hraje roli v translační iniciaci, neboť takto umožňuje interakci s 5' koncem a přítomnými faktory (Dreher and Miller, 2006). Za zmínku stojí, že 3'UTR TMV RNA se neúčastní prvního kola translace po průniku viru do buňky (Gallie, 2002).

➤ 3' translační aktivátory nezávislé na čepičce

Viry si v mnoha případech přivlastňují translaci svých molekul mRNA využitím komplexu eIF4F nezávisle na čepičce, jež jejich mRNA často postrádá (Simon and Miller, 2013). Rovněž může chybět poly(A) řetězec na 3' konci a 3'UTR může obsahovat aktivační sekvenci, což je častou strategií u rostlinných virů, zejména pozitivních jednořetězcových RNA virů (Nicholson and White, 2011), z nichž můžeme zmínit významnou rodinu virů *Tombusviridae* (Gao et al., 2013). Prokázal to pokus se satelitní mRNA viru nekrózy tabáku ze zmíněné rodiny, kde odstranění 120 nukleotidů v 3'UTR téměř znemožnilo translaci (Simon and Miller, 2013). To je rozdíl oproti živočišným virům, kdy u nečepičkovaných molekul mRNA bývá pro iniciaci translace významná spíše 5'UTR sekvence (Gao et al., 2013).

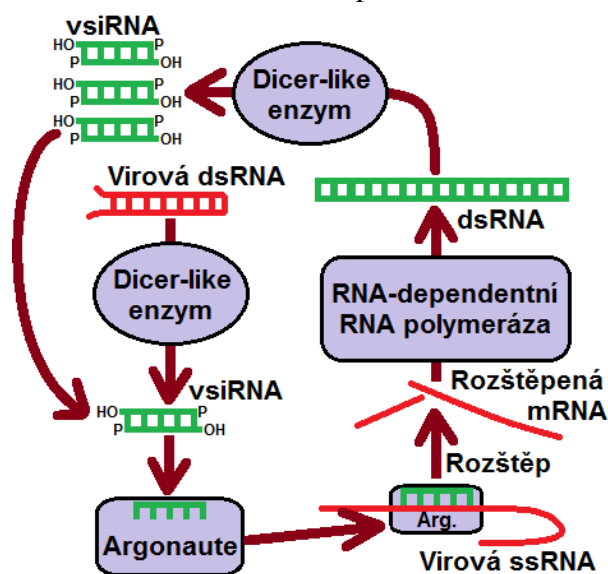
Zmíněné sekvence se vyznačují schopností tvořit sekundární struktury v mRNA (krátkými spoji komplementárních úseků), kdy 3'UTR sekvence tvoří smyčku, jež interaguje s apikální vlásenkovou strukturou na 5' konci (Simon and Miller, 2013) poté, co tato navázala translační iniciační faktory nebo přímo ribozomální subjednotky (Gao et al., 2014). Iniciaci translace na 5' konci je tedy zprostředkována funkcí 3'UTR translačního zesilovače (angl. enhanceru), který rekrutuje iniciační faktory, ve většině případů eIF4E a eIF4G, a předá je na správné místo, což je mechanismus víceméně specifický pro rostlinné viry (Gao et al., 2014). Tímto mechanismem translační iniciace nezávislé na čepičce mohou jednořetězcové pozitivní RNA viry zajistit syntézu vlastních proteinů na úkor proteosyntézy hostitele (Nicholson and White, 2011).

❖ Umlčení mRNA jako obranný mechanismus rostlin

Poté, co jsme viděli v minulé kapitole, je zřejmé, že umlčení mRNA je užitečným mechanismem negativní regulace genové exprese i na posttranskripčních úrovních, například u rostlinných pozitivních jednořetězových RNA virů (Ghoshal and Sanfacon, 2015).

První fází je využití virových dvouřetězových RNA objevujících se u jednořetězových RNA virů během replikace (Zhu and Guo, 2012) či v případech sekundárních struktur (Ding and Voinnet, 2007), které nejsou u těchto RNA vzácným jevem. Po rozpoznání DICER-like enzymy je virová dsRNA rozštěpena na malé interferenční RNA, zvané vsiRNA (virus-derived small interfering RNA) (Ma et al., 2015).

V další fázi umlčování vstupují do hry proteiny ARGONAUTE, dosti konzervované u eukaryotických organismů (Mallory and Vaucheret, 2010). Tento protein se ve spojení s dalšími proteiny váže k vsiRNA molekule a vytvoří komplex RISC, jehož cílem je virová RNA (Mallory and Vaucheret, 2010). Funkcí komplexu RISC je umlčení cílové virové molekuly RNA díky komplementaritě specifických sekvencí (Zhu and Guo, 2012). Virová RNA je následně rozštěpena, fragmenty mohou sekundárně sloužit amplifikaci, tedy k tvorbě dalších molekul vsiRNA prostřednictvím rostlinné RNA-dependentní RNA polymerázy a



DICER-like enzymu (Zhu and Guo, 2012). Rozštěpení mRNA není jediným mechanismem umlčení, je však důležitým, jelikož vede k tomuto amplifikačnímu cyklu obranného mechanismu umlčení (Mallory and Vaucheret, 2010).

Obrázek 14: Obecné schéma umlčení virové mRNA jejím rozštěpením komplexem RISC tvořeným vsiRNA a proteinem ARGONAUTE. Bližší popis v textu.

Závěrečné slovo

Znalosti a poznatky o reakci rostlin na napadení virovými patogeny by si zasloužily samostatnou práci, zde jsme se z prostorových důvodů omezili jen na omezené množství výše popsaných případů. Mechanismy, se kterými jsme se zde setkali, však odhalují další krok k poznání četnosti významů procesu translace mRNA pro rostliny a úctyhodného bohatství a zajímavosti translačního mechanismu vůbec. Z praktického hlediska se mechanismy interakcí virů s hostitelem navíc dají čteně využívat k různým experimentům.

ZÁVĚR

Předložená rešerše nás provedla pestrým světem translace mRNA v rostlinné buňce, takto významného regulačního aparátu syntézy proteinů doplňujícího selektivní aktivaci a represi transkripce jednotlivých genů. Na úrovni ontogeneze je tato regulační hladina často zastíňována nezbytnou a dominantní regulací transkripční, avšak některé vývojové fáze a procesy, například oplození a klíčení semen včetně rané ontogeneze, jsou na využití již transkribované a dále skladované mRNA vysoce závislé. Dále jsme probrali reakci rostlin na abiotický stres, při kterém rostlina bez možnosti pohybu z místa na místo získává tímto typem regulace značnou výhodu rychlé reakce na nastalou situaci. Společně s modulárním způsobem růstu je právě schopnost rychlé reakce pro rostlinu nezbytná. Konečně jsme stručně zmínili i reakci rostlinného organismu na napadení patogenem, zejména virovou infekci, kdy se uplatňují specifické a velice zajímavé molekulární mechanismy jako výsledek dlouhých společných závodů ve zbrojení patogenů a hostitelů.

Studium hospodaření s mRNA a regulace translace dává nikoli úplnou, avšak velice obsáhlou představu o komplexitě a zajímavosti vývojových a regulačních procesů rostlin na fyziologické a molekulární úrovni. Z četných výzkumů a získaných znalostí můžeme usuzovat na podstatu věci. Současné rostliny jsou výsledkem dlouhodobého nezávislého vývoje, jejichž společným předkem, který je spojuje i s živočichy, byl před stovkami milionů let jednobuněčný organismus. Výzkum dnešních mechanismů regulace a ontogeneze však nemůže než vykazovat značnou divergenci vyplývající z odlišné organizace mnohobuněčného těla i z rozdílných životních strategií. Avšak vzdálený společný původ a obdobnost některých podnětů, jakými jsou například virová napadení a abiotické stresové situace, vysvětluje nezanedbatelné podoby pozorovaných mechanismů u rostlin s ostatními vývojovými liniemi. Četná podoba spojená s kvalitativními a kvantitativními rozdíly svědčí o logice věci. Je velice zajímavé pozorovat procesy regulace genové exprese na posttranskripčních úrovních, jež jsou výsledkem dlouhého pragmatického i náhodného účinku evoluce, která umožnila obrovský úspěch rostlin jako přisedlých autotrofních organismů.

Výzkum fyziologie a cytologie rostlin má před sebou širokou perspektivu. Z čistě vědeckého hlediska zbývá ještě hodně objevit a pochopit k objasnění tajemství podstaty života a jeho vývoje. Bez rostlin bychom tu nebyli, a to nejen proto, že produkují kyslík, ale i proto, že jsou i primárními producenty potravního řetězce, a tak je pro nás jejich výzkum neméně důležitý než výzkum v oblasti biologie člověka a humánní medicíny. A to nejen z ekonomického hlediska. Pochopení rostlin a jejich biologie bude dříve či později stát na jednom z předních míst, co se týče zajištění budoucnosti lidstva a naší planety, naší výživy, ochrany přírody, pestrého a bohatého prostředí, kdy původně vědecký zájem v sobě spojí užitečné a příjemné. Nikdo sice neví, co přinese budoucnost a kterým směrem se výzkum bude ubírat, avšak s touto perspektivou má experimentální biologie rostlin budoucnost před sebou a máme se tedy opravdu na co těšit.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamska, I., 1997, ELIPs - Light-induced stress proteins: *Physiologia Plantarum*, v. 100, p. 794-805.
- Bailey-Serres, J., 1999, Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants: *Trends in Plant Science*, v. 4, p. 142-148.
- Basbouss-Serhal, Soubigou-Taconnat, Bailly, and Leymarie, 2015, Germination Potential of Dormant and Nondormant Arabidopsis Seeds Is Driven by Distinct Recruitment of Messenger RNAs to Polysomes.
- Bate, N., C. Spurr, G. D. Foster, and D. Twell, 1996, Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'-UTR of a late pollen transcript: *Plant Journal*, v. 10, p. 613-623.
- Bedinger, P., 1992, THE REMARKABLE BIOLOGY OF POLLEN: *Plant Cell*, v. 4, p. 879-887.
- Beltran-Pena, E., R. Aguilar, A. Ortiz-Lopez, T. D. Dinkova, and E. S. de Jimenez, 2002, Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation: *Physiologia Plantarum*, v. 115, p. 291-297.
- Ben-Shem, A., N. G. de Loubresse, S. Melnikov, L. Jenner, G. Yusupova, and M. Yusupov, 2011, The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 angstrom Resolution: *Science*, v. 334, p. 1524-1529.
- Bentley, D. L., 2014, Coupling mRNA processing with transcription in time and space: *Nature Reviews Genetics*, v. 15, p. 163-175.
- Betat, H., Y. Long, J. E. Jackman, and M. Morl, 2014, From End to End: tRNA Editing at 5' - and 3' - Terminal Positions: *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, p. 23975-23998.
- Bewley, J. D., and S. K. Pramanik, 1997, Post-transcriptional regulation of storage protein synthesis during early embryogenesis: *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*, v. 30, p. 53-61.
- Boex-Fontvieille, E., M. Davenport, M. Jossier, M. Zivy, M. Hodges, and G. Tcherkez, 2013, Photosynthetic Control of Arabidopsis Leaf Cytoplasmic Translation Initiation by Protein Phosphorylation: *Plos One*, v. 8, p. 12.
- Brosowska-Arendt, W., and S. Weidner, 2011, Effect of osmotic stress on the formation of a population of polysomes and their stability in pea (*Pisum sativum* L.) seeds: *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 33, p. 1475-1482.
- Browning, K. S., 2004, Plant translation initiation factors: it is not easy to be green: *Biochemical Society Transactions*, v. 32, p. 589-591.
- Chen, X. M., 2009, Small RNAs and Their Roles in Plant Development, *Annual Review of Cell and Developmental Biology: Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 25: Palo Alto, Annual Reviews, p. 21-44.
- Cheng, S. J., and D. R. Gallie, 2010, Competitive and Noncompetitive Binding of eIF4B, eIF4A, and the Poly(A) Binding Protein to Wheat Translation Initiation Factor eIFiso4G: *Biochemistry*, v. 49, p. 8251-8265.
- Cheung, A. Y., Q. H. Duan, S. S. Costa, B. H. J. de Graaf, V. S. Di Stilio, J. Feijo, and H. M. Wu, 2008, The dynamic pollen tube cytoskeleton: Live cell studies using actin-binding and microtubule-binding reporter proteins: *Molecular Plant*, v. 1, p. 686-702.
- Cognat, V., G. Pawlak, A. M. Duchene, M. Daujat, A. Gigant, T. Salinas, M. Michaud, B. Gutmann, P. Giege, A. Gobert, and L. Marechal-Drouard, 2013, PlantRNA, a database for tRNAs of photosynthetic eukaryotes: *Nucleic Acids Research*, v. 41, p. D273-D279.
- Csorba, T., L. Kontra, and J. Burgyan, 2015, viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence: *Virology*, v. 479, p. 85-103.
- Cui, Z. B., Q. Xu, and X. X. Wang, 2014, Regulation of the circadian clock through pre-mRNA splicing in Arabidopsis: *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 1973-1980.
- Dennis, M. D., and K. S. Browning, 2009, Differential Phosphorylation of Plant Translation Initiation Factors by Arabidopsis thaliana CK2 Holoenzymes: *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 20602-20614.

- Diaz-Camino, C., R. Conde, N. Ovsenek, and M. A. Villanueva, 2005, Actin expression is induced and three isoforms are differentially expressed during germination in *Zea mays*: *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 557-565.
- Ding, S. W., and O. Voinnet, 2007, Antiviral immunity directed by small RNAs: *Cell*, v. 130, p. 413-426.
- Dinkova, T. D., N. A. Marquez-Velazquez, R. Aguilar, P. E. Lazaro-Mixteco, and E. S. de Jimenez, 2011, Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination: *Seed Science Research*, v. 21, p. 85-93.
- Dreher, T. W., and W. A. Miller, 2006, Translational control in positive strand RNA plant viruses: *Virology*, v. 344, p. 185-197.
- Dresselhaus, T., and N. Franklin-Tong, 2013, MaleFemale Crosstalk during Pollen Germination, Tube Growth and Guidance, and Double Fertilization: *Molecular Plant*, v. 6, p. 1018-1036.
- Faus, I., A. Zabalza, J. Santiago, S. G. Nebauer, M. Royuela, R. Serrano, and J. Gadea, 2015, Protein kinase GCN2 mediates responses to glyphosate in *Arabidopsis*: *Bmc Plant Biology*, v. 15, p. 12.
- Fennoy, S. L., and J. Baileyserres, 1995, POSTTRANSCRIPTIONAL REGULATION OF GENE-EXPRESSION IN OXYGEN-DEPRIVED ROOTS OF MAIZE: *Plant Journal*, v. 7, p. 287-295.
- Finkelstein, R., W. Reeves, T. Ariizumi, and C. Steber, 2008, Molecular aspects of seed dormancy, *Annual Review of Plant Biology: Annual Review of Plant Biology*, v. 59: Palo Alto, Annual Reviews, p. 387-415.
- Floris, M., R. Bassi, C. Robaglia, A. Alboresi, and E. Lanet, 2013, Post-transcriptional control of light-harvesting genes expression under light stress: *Plant Molecular Biology*, v. 82, p. 147-154.
- Galland, M., R. Huguet, E. Arc, G. Cuff, D. Job, and L. Rajjou, 2014, Dynamic Proteomics Emphasizes the Importance of Selective mRNA Translation and Protein Turnover during *Arabidopsis* Seed Germination: *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 13, p. 252-268.
- Gallie, D. R., 2002, The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F: *Nucleic Acids Research*, v. 30, p. 3401-3411.
- Gallie, D. R., and K. S. Browning, 2001, eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs: *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 36951-36960.
- Gao, F., S. P. Gulay, W. Kasprzak, J. D. Dinman, B. A. Shapiro, and A. E. Simon, 2013, The Kissing-Loop T-Shaped Structure Translational Enhancer of Pea Enation Mosaic Virus Can Bind Simultaneously to Ribosomes and a 5' Proximal Hairpin: *Journal of Virology*, v. 87, p. 11987-12002.
- Gao, F., W. K. Kasprzak, C. Szarko, B. A. Shapiro, and A. E. Simon, 2014, The 3' Untranslated Region of Pea Enation Mosaic Virus Contains Two T-Shaped, Ribosome-Binding, Cap-Independent Translation Enhancers: *Journal of Virology*, v. 88, p. 11696-11712.
- Ge, F. W., Y. Hu, and J. B. Wang, 2013, Spatial and temporal gene expression during seed germination of *Brassica napus*: *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 35, p. 2939-2950.
- Ghoshal, B., and H. Sanfacon, 2015, Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms: *Virology*, v. 479, p. 167-179.
- Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg, 1999, eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation: *Annual Review of Biochemistry*, v. 68, p. 913-963.
- Graifer, D., and G. Karpova, 2015, Roles of ribosomal proteins in the functioning of translational machinery of eukaryotes: *Biochimie*, v. 109C, p. 1-17.
- Hafidh, S., V. Capkova, and D. Honys, 2011, SAFE KEEPING THE MESSAGE: mRNP Complexes Tweaking after Transcription, *in* L. J. Collins, ed., *Rna Infrastructure and Networks: Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 722: Berlin, Springer-Verlag Berlin, p. 118-136.
- Heber, U., O. L. Lange, and V. A. Shuvalov, 2006, Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs: *Journal of Experimental Botany*, v. 57, p. 1211-1223.

- Hinnebusch, A. G., 2014, The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation, *in* R. D. Kornberg, ed., Annual Review of Biochemistry, Vol 83: Annual Review of Biochemistry, v. 83: Palo Alto, Annual Reviews, p. 779-812.
- Holdaway-Clarke, T. L., and P. K. Hepler, 2003, Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes: *New Phytologist*, v. 159, p. 539-563.
- Honys, D., J. P. Combe, D. Twell, and V. Capkova, 2000, The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation: *Sexual Plant Reproduction*, v. 13, p. 135-144.
- Honys, D., D. Renak, J. Fecikova, P. L. Jedelsky, J. Nebesarova, P. Dobrev, and V. Capkova, 2009, Cytoskeleton-Associated Large RNP Complexes in Tobacco Male Gametophyte (EPPs) Are Associated with Ribosomes and Are Involved in Protein Synthesis, Processing, and Localization: *Journal of Proteome Research*, v. 8, p. 2015-2031.
- Hugouvieux, V., J. M. Kwak, and J. I. Schroeder, 2001, An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis: *Cell*, v. 106, p. 477-487.
- Hulzink, R. J. M., P. F. M. de Groot, A. F. Croes, W. Quaedvlieg, D. Twell, G. J. Wullems, and M. M. A. van Herpen, 2002, The 5'-untranslated region of the ntp303 gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation: *Plant Physiology*, v. 129, p. 342-353.
- Juntawong, P., R. Sorenson, and J. Bailey-Serres, 2013, Cold shock protein1 chaperones mRNAs during translation in Arabidopsis thaliana: *Plant Journal*, v. 74, p. 1016-1028.
- Karlson, D., K. Nakaminami, K. Thompson, Y. Yang, V. Chaikam, and P. Mulinti, 2009, Plant Cold-shock Domain Proteins: on the Tip of an Iceberg: *Plant Cold Hardiness: from the Laboratory to the Field*, p. 43-54.
- Kawaguchi, R., and J. Bailey-Serres, 2002, Regulation of translational initiation in plants: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, p. 460-465.
- Kessler, S. A., and U. Grossniklaus, 2011, She's the boss: signaling in pollen tube reception: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 622-627.
- Khan, M. A., and D. J. Goss, 2004, Phosphorylation states of translational initiation factors affect mRNA cap binding in wheat: *Biochemistry*, v. 43, p. 9092-9097.
- Kim, M. H., K. Sasaki, and R. Imai, 2009, Cold Shock Domain Protein 3 Regulates Freezing Tolerance in Arabidopsis thaliana: *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 23454-23460.
- Kinoshita, N., H. Wang, H. Kasahara, J. Liu, C. MacPherson, Y. Machida, Y. Kamiya, M. A. Hannah, and N. H. Chua, 2012, IAA-Ala Resistant3, an Evolutionarily Conserved Target of miR167, Mediates Arabidopsis Root Architecture Changes during High Osmotic Stress: *Plant Cell*, v. 24, p. 3590-3602.
- Klimmek, F., A. Sjodin, C. Noutsos, D. Leister, and S. Jansson, 2006, Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants: *Plant Physiology*, v. 140, p. 793-804.
- Klyachko, N., L. Aksenova, M. Dunaeva, and A. Kulikova, 2000, Interaction of plant polysomes with the actin cytoskeleton: *Cell Biology International*, v. 24, p. 351-358.
- Kosowska, M., E. Fraczek, R. Amarowicz, M. Karamac, S. Abe, and S. Weidner, 2004, Water-deficit-induced changes in cytoskeleton-bound and other polysomal populations in embryonic tissue during triticale caryopsis germination: *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 26, p. 67-74.
- Kozak, M., 2005, Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes: *Gene*, v. 361, p. 13-37.
- Kropiwnicka, A., K. Kuchta, M. Lukaszewicz, J. Kowalska, J. Jemielity, K. Ginalski, E. Darzynkiewicz, and J. Zuberek, 2015, Five eIF4E isoforms from Arabidopsis thaliana are characterized by distinct features of cap analogs binding: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 456, p. 47-52.
- Krupinska, S., S. Weidner, E. Fraczek, and R. Amarowicz, 2003, Polysome formation and stability in pea stem and root tissue: *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 25, p. 135-141.

- Layat, E., J. Leymarie, H. El-Maarouf-Bouteau, J. Caius, N. Langlade, and C. Bailly, 2014, Translatome profiling in dormant and nondormant sunflower (*Helianthus annuus*) seeds highlights post-transcriptional regulation of germination: *New Phytologist*, v. 204, p. 864-872.
- Lenartowska, M., R. Lenartowski, D. J. Smolinski, B. Wrobel, J. Niedojadlo, K. Jaworski, and E. Bednarska, 2009, Calreticulin expression and localization in plant cells during pollen-pistil interactions: *Planta*, v. 231, p. 67-77.
- Lenartowski, R., A. Suwinska, J. Prusinska, K. Gumowski, and M. Lenartowska, 2014, Molecular cloning and transcriptional activity of a new *Petunia* calreticulin gene involved in pistil transmitting tract maturation, progamic phase, and double fertilization: *Planta*, v. 239, p. 437-454.
- Li, J., F. Mahdi, L. Du, S. Datta, D. G. Nagle, and Y. D. Zhou, 2011, Mitochondrial Respiration Inhibitors Suppress Protein Translation and Hypoxic Signaling via the Hyperphosphorylation and Inactivation of Translation Initiation Factor eIF2 alpha and Elongation Factor eEF2: *Journal of Natural Products*, v. 74, p. 1894-1901.
- Lin, K. H., L. F. O. Chen, S. D. Li, and H. F. Lo, 2015, Comparative proteomic analysis of cauliflower under high temperature and flooding stresses: *Scientia Horticulturae*, v. 183, p. 118-129.
- Lin, S. Y., P. W. Chen, M. H. Chuang, P. Juntawong, J. Bailey-Serres, and G. Y. Jauh, 2014, Profiling of Translatomes of in Vivo-Grown Pollen Tubes Reveals Genes with Roles in Micropylar Guidance during Pollination in *Arabidopsis*: *Plant Cell*, v. 26, p. 602-618.
- Lu, J. M., M. Bergert, A. Walther, and B. Suter, 2014, Double-sieving-defective aminoacyl-tRNA synthetase causes protein mistranslation and affects cellular physiology and development: *Nature Communications*, v. 5, p. 13.
- Luna, R. E., H. Arthanari, H. Hiraishi, J. Nanda, P. Martin-Marcos, M. A. Markus, B. Akabayov, A. G. Milbradt, L. E. Luna, H. C. Seo, S. G. Hyberts, A. Fahmy, M. Reibarkh, D. Miles, P. R. Hagner, E. M. O'Day, T. F. Yi, A. Marintchev, A. G. Hinnebusch, J. R. Lorsch, K. Asano, and G. Wagner, 2012, The C-Terminal Domain of Eukaryotic Initiation Factor 5 Promotes Start Codon Recognition by Its Dynamic Interplay with eIF1 and eIF2 beta: *Cell Reports*, v. 1, p. 689-702.
- M.W.King, 2015, Translation of Proteins, <http://themedicalbiochemistrypage.org>.
- Ma, X. F., M. C. Nicole, L. V. Meteignier, N. Hong, G. P. Wang, and P. Moffett, 2015, Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants: *Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 919-932.
- Mallory, A., and H. Vaucheret, 2010, Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins: *Plant Cell*, v. 22, p. 3879-3889.
- Mardanova, E. S., L. A. Zamchuk, and N. V. Ravin, 2007, The 5'-untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene provides efficient translation of mRNA in plants under stress conditions: *Molecular Biology*, v. 41, p. 914-919.
- Martinez-Silva, A. V., C. Aguirre-Martinez, C. E. Flores-Tinoco, N. D. Alejandri-Ramirez, and T. D. Dinkova, 2012, Translation Initiation Factor AtelF(iso) 4E Is Involved in Selective mRNA Translation in *Arabidopsis Thaliana* Seedlings: *Plos One*, v. 7, p. 12.
- Matsuura, H., A. Shinmyo, and K. Kato, 2008, Preferential translation mediated by Hsp81-3 5'-UTR during heat shock involves ribosome entry at the 5'-end rather than an internal site in *Arabidopsis* suspension cells: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 105, p. 39-47.
- McDowell, J. M., Y. Q. An, S. R. Huang, E. C. McKinney, and R. B. Meagher, 1996, The *Arabidopsis* ACT7 actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli: *Plant Physiology*, v. 111, p. 699-711.
- Montane, M. H., and K. Kloppstech, 2000, The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function?: *Gene*, v. 258, p. 1-8.
- Muench, D. G., C. Zhang, and M. Dahodwala, 2012, Control of cytoplasmic translation in plants: *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna*, v. 3, p. 178-194.
- Mulekar, J. J., and E. Huq, 2014, Expanding roles of protein kinase CK2 in regulating plant growth and development: *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 2883-2893.

- Nicholson, B. L., and K. A. White, 2011, 3' Cap-independent translation enhancers of positive-strand RNA plant viruses: *Current Opinion in Virology*, v. 1, p. 373-380.
- Sasaki, K., M. H. Kim, and R. Imai, 2007, Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN2 is a RNA chaperone that is regulated by cold and developmental signals: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 364, p. 633-638.
- Sasikumar, A. N., W. B. Perez, and T. G. Kinzy, 2012, The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex: *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna*, v. 3, p. 543-555.
- Satoh, J., K. Kato, and A. Shinmyo, 2004, The 5'-untranslated region of the tobacco Alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 98, p. 1-8.
- Shingaki-Wells, R., A. H. Millar, J. Whelan, and R. Narsai, 2014, What happens to plant mitochondria under low oxygen? An omics review of the responses to low oxygen and reoxygenation: *Plant Cell and Environment*, v. 37, p. 2260-2277.
- Simon, A. E., and W. A. Miller, 2013, 3' Cap-Independent Translation Enhancers of Plant Viruses, in S. Gottesman, ed., *Annual Review of Microbiology*, Vol 67: *Annual Review of Microbiology*, v. 67: Palo Alto, Annual Reviews, p. 21-42.
- Stuger, R., S. Ranostaj, T. Materna, and C. Forreiter, 1999, Messenger RNA-binding properties of nonpolysomal ribonucleoproteins from heat-stressed tomato cells: *Plant Physiology*, v. 120, p. 23-31.
- Suwinska, A., R. Lenartowski, D. J. Smolinski, and M. Lenartowska, 2015, Molecular evidence that rough endoplasmic reticulum is the site of calreticulin translation in *Petunia* pollen tubes growing in vitro: *Plant Cell Reports*, v. 34, p. 1189-1199.
- Swigonska, S., A. Badowiec, A. Mostek, A. Krol, and S. Weidner, 2014, Formation and stability of polysomes and polysomal populations in roots of germinating seeds of soybean (*Glycine max* L.) under cold, osmotic and combined cold and osmotic stress conditions: *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 36, p. 651-662.
- Szick-Miranda, K., S. Jayachandran, A. Tam, J. Werner-Fraczek, A. J. Williams, and J. Bailey-Serres, 2003, Evaluation of translational control mechanisms in response to oxygen deprivation in maize: *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 50, p. 774-786.
- Szypulska, E., and S. Weidner, 2011, Importance of cytomatrix-bound polysomes to synthesis of lysine-containing proteins in triticale germs under ABA treatment: *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 33, p. 1461-1465.
- Ueda, K., H. Matsuura, M. Yamaguchi, T. Demura, and K. Kato, 2012, Genome-Wide Analyses of Changes in Translation State Caused by Elevated Temperature in *Oryza sativa*: *Plant and Cell Physiology*, v. 53, p. 1481-1491.
- Vartapetian, B. B., 2006, Plant anaerobic stress as a novel trend in ecological physiology, biochemistry, and molecular biology: 2. Further development of the problem: *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 53, p. 711-738.
- von Arnim, A. G., Q. D. Jia, and J. N. Vaughn, 2014, Regulation of plant translation by upstream open reading frames: *Plant Science*, v. 214, p. 1-12.
- Walsh, D., and I. Mohr, 2011, Viral subversion of the host protein synthesis machinery: *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, p. 860-875.
- Weber, C., L. Nover, and M. Fauth, 2008, Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules: *Plant Journal*, v. 56, p. 517-530.
- Wells, D. R., R. L. Tanguay, H. Le, and D. R. Gallie, 1998, HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status: *Genes & Development*, v. 12, p. 3236-3251.
- Yanguez, E., A. B. Castro-Sanz, N. Fernandez-Bautista, J. C. Oliveros, and M. M. Castellano, 2013, Analysis of Genome-Wide Changes in the Translatome of *Arabidopsis* Seedlings Subjected to Heat Stress: *Plos One*, v. 8, p. 16.
- Zhu, H., and H. S. Guo, 2012, The role of virus-derived small interfering RNAs in RNA silencing in plants: *Science China-Life Sciences*, v. 55, p. 119-125.