



Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej

ODDZIAŁYWANIA BIAŁKO-BIAŁKO W KOMPLEKSACH REGULUJĄCYCH TRANSPORT PĘCHERZYKOWY U ROŚLIN

Michał Michalak

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dra hab. Przemysława Wojtaszka
oraz dr Anny Kasproicz-Maluśki

Poznań 2017

Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki grantem „Charakterystyka mechanizmów regulacji kompleksu egzocystu w komórkach roślinnych” przyznanego na podstawie decyzji DEC-2011/03/N/NZ3/01796, a także przez Dziekana Wydziału Biologii UAM grantem „Analiza oddziaływań białko-białko wybranych podjednostek egzocystu z białkami BIG w komórkach roślinnych” o numerze GDWB-02/2012.

Moją działalność doktorancką wsparł Wojewódzki Urząd Pracy w Poznaniu, przyznając stypendium w ramach projektu „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski” sfinansowanego dzięki projektowi europejskiemu Kapitał Ludzki (POKL 8.2.2/30-330-11/12).

Serdecznie dziękuję

Panu profesorowi Przemysławowi Wojtaszkowi i doktor Ani Kasproicz-Maluški za opiekę nad moją pracą i wprowadzenie mnie w fascynujący świat mikroskopii.

Koleżankom i kolegom z ZBMiK za wspianą atmosferę, pomoc, współpracę i niezliczoną ilość cennych rad.

Moim studentkom Martynie, Oli i Paulinie, które pomogły mi wykonywać eksperymenty.

Wszystkim niesamowitym pracownikom, doktorantom i studentom z IBMiB, dzięki którym Wydział Biologii to takie miłe miejsce.

Największe podziękowania należą się jednak moim Rodzicom i Madzi, których ta praca kosztowała wiele zmartwień...

Dzięki!

Spis treści

Zawartość płyty CD.....	6
Streszczenie.....	7
Summary	8
Wstęp	10
Roślinny system błon wewnętrznych składa się z wielu stale komunikujących się ze sobą przedziałów	11
Dynamika systemu błon wewnętrznych zależy od cytoszkieletu.....	14
Kompleksy wiążące wyznaczają miejsca fuzji pęcherzyków z błoną docelową	15
Czasoprzestrzenną kontrolę nad transportem pęcherzykowym sprawują małe GTPazy.....	18
Czynniki wymiany nukleotydów guaninowych GTPaz ARF kontrolują endocytozę i recykлизację pęcherzyków do błony komórkowej	19
Małe GTPazy ROP kontrolują procesy spolaryzowanego wzrostu i rozwoju komórek roślinnych	20
Białka RIP uczestniczą w sygnalizacji z udziałem małych GTPaz ROP	23
Cel pracy.....	25
Materiały i metody.....	26
1. Uprawa roślin	26
1.1 Uprawa Arabidopsis w glebie.....	26
1.2 Uprawa Arabidopsis na pożywce stałej w warunkach <i>in vitro</i>	26
2. Izolacja i transfekcja protoplastów z mezofilu liści Arabidopsis	27
3. Transformacja genetyczna siewek Arabidopsis	27
4. Hodowla i transformacja genetyczna bakterii	28
4.1 Przygotowanie komórek kompetentnych <i>Escherichia coli</i>	28
4.2 Transformacja komórek kompetentnych <i>Escherichia coli</i>	29
4.3 Transformacja komórek <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
5. Izolacja całkowitego RNA z tkanek Arabidopsis i odwrotna transkrypcja.....	29
5.1 Izolacja RNA całkowitego z tkanek roślinnych	30
5.2 Trawienie DNA genomowego	31
5.3 Odwrotna transkrypcja – synteza DNA komplementarnego do mRNA (cDNA).....	31
6. Przygotowanie konstrukcji genetycznych	31
6.1 Reakcje PCR, elektroforeza i oczyszczanie DNA.....	31
6.2 Klonowanie sekwencji kodujących z genów badanych białek	33
6.3 Konstrukcja wektorów pSAT	41
6.4 Konstrukcja wektorów binarnych pPZP	44

7. Mikroskopia fluorescencyjna	44
7.1 Rejestracja i analiza czasu trwania fluorescencji FLIM (ang. fluorescence lifetime imaging microscopy)	45
Wyniki i dyskusja	47
Białka ARF-GEF BIG2 i BIG5 nie kolokalizują z wybranymi podjednostkami egzocystu w protoplastach Arabidopsis	47
Białko ICR1 wiąże jednocześnie mikrotubule i podjednostkę egzocystu SEC3A.....	50
RIP jest rodziną białek zasocjowanych z mikrotubulami.....	54
Za asocjację z mikrotubulami odpowiada domena N-końcowa białek RIP.....	55
Oddziaływanie ICR1-SEC3A jest możliwe bez domeny N-końcowej ICR1.....	58
Wybrane podjednostki egzocystu nie kolokalizują z białkami RIP, choć asocjują ze znakowanymi przez nie mikrotubulami	58
Białka RIP asocjują z mikrotubulami i jednocześnie tworzą domeny w błonie komórkowej protoplastów Arabidopsis.....	60
Wspólna ekspresja białek RIP z białkami ROP powoduje przejście małych GTPaz do domen błonowych i oddziaływanie z RIP	63
Efektory małych GTPaz ROP kolokalizują z białkami RIP.....	71
Efektor GTPaz ROP, białko RIC6 oddziałuje z podjednostką egzocystu SEC3A	73
Ekspresja genów RIP u Arabidopsis jest specyficzna i nie wskazuje bezpośrednio funkcji ich produktów.....	76
Dyskusja – podsumowanie.....	83
Dalsze perspektywy badawcze.....	88
Literatura.....	89
Wykaz skrótów	95

Zawartość płyty CD

Na płycie umieszczono rozprawę w formacie PDF oraz kilka folderów, które zawierają:

- **Bazy danych** – arkusze Excel wygenerowane przez narzędzie Expression Angler, obrazy w formacie PNG wygenerowane przez Genevestigator (Anatomy – rozkład anatomiczny poziomów ekspresji wszystkich genów RIP; Development_graph – rozkład poziomów ekspresji wszystkich genów RIP podczas rozwoju Arabidopsis; Hierarchical Clustering – klastrowanie genów RIP na podstawie profili ekspresji)
- **Film 1** – zapis poklatkowy dynamiki białek BIG2-EGFP i TagRFP-VTI12
- **Film 2** – zapis poklatkowy dynamiki białek RIP5-EGFP i SEC3-TagRFP
- **Film 3** – zapis poklatkowy dynamiki białek RIP5-EGFP i TagRFP-SEC8
- **Film 4** – zapis poklatkowy dynamiki białek RIP2-GFP_{int} i RIC9-TagRFP
- **Film 5** – zapis poklatkowy dynamiki białek RIC6-mTFP1 i Venus-SEC3A
- **Film 6** – zapis poklatkowy dynamiki białek RIC6-TagRFP i RIP5-GFP_{int}
- **mTFP1** – plik FASTA z sekwencją genu mTFP1 zamówionego w firmie LifeTechnologies
- **Ryciny** – plik PDF ze wszystkimi rycinami (zachęcam do oglądania obrazów mikroskopowych na wyświetlaczu komputera, ponieważ wydruk może nie oddawać wszystkich szczegółów opisywanych w pracy, jest też możliwość powiększania)

Streszczenie

Ściana komórkowa roślin wraz z przylegającą do niej błoną komórkową i przenikającym komórkę cytoszkieletem stanowią swoiste kontinuum. Jest to bardzo dynamiczna struktura wyższego rzędu będąca strefą kontaktu między organizmem roślinnym a środowiskiem. Składniki potrzebne do budowy i reorganizacji ściany komórkowej oraz błony są dostarczane w niewielkich lipidowych pęcherzykach transportujących przy udziale włókien cytoszkieletu. Na szlaku egzocytotycznym pęcherzyk przechodzi przez wiele przedziałów otoczonych błoną, które nieustannie komunikują się i przekształcają, tworząc dynamiczny system błon wewnętrznych komórki. Białka i lipidy przeznaczone do sekrecji są syntetyzowane w retikulum endoplazmatycznym, skąd w pęcherzykach trafiają do aparatu Golgiego, gdzie następuje ich dojrzewanie i obróbka. Kolejnym przedziałem jest sieć *trans* Golgiego (TGN, ang. *trans*-Golgi network), miejsce sortowania, skąd pęcherzyki są wysyłane do błony komórkowej lub wakuol. W TGN szlak egzocytozy przenika się z endocytozą, gdyż przedział ten uważa się także za wczesny endosom. Niekiedy pęcherzyki z TGN trafiają do ciał wielopęcherzykowych stanowiących późny endosom. Pęcherzyki krążą w obrębie systemu w kierunku antero- jak i retrogradowym, różniąc się między sobą kompozycją lipidowo-białkową, a przede wszystkim rodzajem opłaszczenia. Ruch kompartmentów i pęcherzyków jest realizowany przez białka motoryczne wzdłuż włókien cytoszkieletu, głównie mikrofilamentów. Z pozoru chaotyczny i szybki transport pęcherzykowy podlega ścisłej kontroli dzięki ogromnej populacji białek regulatorowych – małych GTPaz. Białka te mają zdolność łatwego przechodzenia pomiędzy stanem aktywnym i nieaktywnym, dzięki czemu wydajnie uruchamiają i zatrzymują różne procesy oddziałując z białkami efektorowymi. Jednym ze znanych efektorów GTPaz jest kompleks egzocyst, uczestniczący w wiązaniu pęcherzyków egzocytotycznych przy błonie komórkowej, przez co umożliwia ich fuzję z błoną przy udziale kolejnych białek. Uważa się, że egzocyst wraz z małymi GTPazami odpowiada za wyznaczenie w błonie miejsc aktywnych egzocytotycznie. U *Arabidopsis thaliana* (nazywanej w całej pracy dla uproszczenia *Arabidopsis*) w oddziaływaniu podjednostki egzocystu SEC3A z małymi GTPazami pośredniczy specyficzne białko ICR1 należące do rodziny RIP.

Badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu znalezienie nowych oddziaływań białko-białko na szlakach sygnalizacyjnych związanych z regulacją transportu pęcherzykowego u roślin. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły ustalić, że u *Arabidopsis* nie dochodzi do oddziaływań między podjednostkami kompleksu egzocyst a czynnikami wymiany nukleotydów guaninowych małych GTPaz ARF z grupy BIG. Obserwacje mikroskopowe znakowanych fluorescencyjnie białek nie pokazały ich kolokalizacji, a zatem najprawdopodobniej szlaki sygnalizacji z udziałem małych GTPaz ARF nie są powiązane bezpośrednio z egzocystem. W protoplastach *Arabidopsis* białko ICR1 wiązało się z mikrotubulami, czego nie zauważono we wcześniejszych badaniach. Podobnie, wszystkie białka z rodziny RIP/ICR (RIP2-RIP5) okazały się być białkami zasocjowanymi z mikrotubulami. Taką właściwość przypisano dotąd jedynie białku RIP3. Ustalono, że za wiązanie cytoszkieletu odpowiedzialna jest domena N-końcowa tych białek, natomiast fragment C-końcowy umożliwia łączenie się białek RIP z błoną komórkową. Poza ICR1 białka RIP nie kolokalizowały z badanymi podjednostkami kompleksu egzocyst. Wykorzystując pomiar czasu trwania fluorescencji ustalono natomiast, że oddziaływania białek RIP z małymi GTPazami ROP są powszechne i dochodzi do nich w domenach w błonie komórkowej, współtworzonych przez

te białka. Chociaż wszystkie badane RIP oddziaływały ze wszystkimi ROP, to siła wiązania była zróżnicowana. Z drugiej strony, białka RIP kolokalizowały w domenach błonowych z efektorami GTPaz ROP – białkami RIC9 i RIC10, ale nie z pozostałymi białkami RIC. Oznacza to, że białka RIP mogą być rusztowaniem dla oddziaływań GTPaz ROP także z innymi niż RIC efektorami. Ustalono też, że białko RIC6 oddziałuje z podjednostką egzocystu SEC3A oraz, że kompleksy tych białek poruszają się wzdłuż mikrotubul. By przybliżyć potencjalną fizjologiczną rolę białek RIP, w kontekście uzyskanych wyników analiz mikroskopowych, przeszukano biologiczne bazy danych. Z powodu niewielu zdeponowanych dotychczas informacji o tych białkach oraz specyficznej ekspresji genów ROP, nie udało się ustalić, za co białka te mogą odpowiadać u *Arabidopsis*.

Białka RIP wiążąc jednocześnie mikrotubule, błonę komórkową i małe GTPazy ROP mogą być potencjalnie istotne dla sygnalizacji regulującej spolaryzowany transport pęcherzykowy u roślin. Prezentowana praca doktorska stanowi dobry wstęp do dalszych analiz, które mogą rozjaśnić zawile aspekty spolaryzowanego wzrostu i rozwoju komórek *Arabidopsis*.

Summary

Cell wall, plasma membrane and cytoskeleton continuum is a highly dynamic superstructure that serves as an interface between a plant organism and its environment. Small lipid vesicles travelling along cytoskeletal fibers are delivering materials for construction and rearrangements of the cell wall and the plasma membrane. During the exocytosis the vesicle is trafficked through the endomembrane system composed of several compartments, which constantly exchange materials and information. Proteins and lipids designated for secretion are synthesized on the endoplasmic reticulum. They are subsequently delivered within vesicles to the Golgi apparatus where maturation and modification occurs. Next, vesicles travel to the *trans* Golgi network (TGN), main endomembrane sorting compartment, from where vesicles are sent to the plasma membrane or vacuoles. TGN serves also as an early endosome so exo- and endocytosis pathways interconnect at this compartment. Some vesicles are also trafficked from TGN through multivesicular bodies, the late endosome. Vesicles shuttle in both anterograde and retrograde directions but they differ in protein and lipid composition and also in coat proteins surrounding them. Motor proteins are responsible for organelles and vesicles movement, mainly along actin filaments. Apparently chaotic and rapid, vesicle trafficking is tightly controlled by specific set of regulatory proteins – small GTPases. These proteins are able to easily switch between active and inactive state so they turn on or off different processes thanks to interactions with effector proteins. The exocyst protein complex is a well-known effector of small GTPases. It is responsible for tethering of secretory vesicles at the vicinity of plasma membrane, which is followed by their fusion managed by other proteins. The exocyst together with small GTPases is thought to mark active sites of exocytosis at the plasma membrane. Moreover, interaction with small GTPases of the *Arabidopsis thaliana* SEC3A exocyst subunit is mediated by a plant specific protein ICR1 from RIP protein family.

Main goal of this work was to find novel protein-protein interactions responsible for the regulation of the vesicle trafficking in plants. Conducted experiments revealed that the exocyst subunits are not interacting with ARF-GEF proteins in *Arabidopsis*. Fluorescently labeled proteins did not co-localized when investigated under a microscope. It is therefore concluded that the exocyst acts independently from ARF GTPases signaling pathways. For the

first time it was shown that ICR1 protein is associated with microtubules in Arabidopsis protoplasts. Also all remaining RIP/ICR family proteins (RIP2-RIP5) are microtubule-associated, what was known only for RIP3. Their N-terminal domain turned out to be responsible for binding to the microtubules, while C-terminal part allowed them to associate with the plasma membrane. Apart from ICR1, RIPs did not co-localize with investigated exocyst subunits. On the other hand RIPs interacted with all small GTPases from ROP family, which was shown by fluorescence lifetime measurements. These interactions took part in specific plasma membrane domains set together by ROP and RIP proteins. Moreover not all measured interactions had the same strength. Unlike common RIP-ROP interactions, RIPs interacted only with selected ROP GTPase effectors – RIC9 and RIC10 from RIC protein family. Taken together, it indicates that RIP proteins act as a scaffold for interactions of ROP GTPases with their effectors, but not all RICs. This research proved also that SEC3A exocyst subunit interacts with RIC6 GTPase effector protein and that these complexes travel along microtubules. Eventually we searched online data on RIP proteins in order to reveal their more general physiology. Databases lack useful information about RIPs and unique expression profiles of their genes makes it hard to define trustworthily any roles played by the proteins within Arabidopsis.

The ability of RIP proteins to simultaneously bind microtubules and associate with the plasma membrane and the ROP small GTPases makes the proteins potentially important for polarized vesicle trafficking regulation. The doctoral thesis is therefore a good introduction for further research, which can help to better understand polarized grow and development of Arabidopsis cells.

Wstęp

Rośliny są niezwykłymi organizmami prowadzącymi osiadły tryb życia. Ich przetrwanie w zmieniającym się środowisku zależy w znacznym stopniu od tworzenia i kontrolowanej przebudowy ściany komórkowej, a także regulacji ciśnienia turgorowego komórek. W tym celu rośliny wykształciły złożony i bardzo dynamiczny system błon wewnętrznych oparty o wymianę pęcherzyków lipidowych pomiędzy wieloma kompartmentami otoczonymi błoną (Zárský i in., 2013). Transport pęcherzykowy jest dla organizmów roślinnych istotą utrzymania homeostazy, wzrostu i rozwoju, sygnalizacji hormonalnej i adaptacji do ciągle zmieniających się warunków zewnętrznych (Mishev i in., 2013). Pomimo kardynalnego znaczenia transportu pęcherzykowego dla rozwoju roślin i wieloletnich badań tego procesu, cały czas wiadomo o nim stosunkowo niewiele.

System błon wewnętrznych jest miejscem syntezy wielu białek (retikulum endoplazmatyczne szorstkie, rER), lipidów (retikulum endoplazmatyczne gładkie, sER), polisacharydów (rER i aparat Golgiego), a także głównym miejscem sortowania (sieć *trans* Golgiego, TGN) i adresowania cząsteczek trafiających ostatecznie do apoplastu, błony komórkowej, czy wakuoli (van de Meene i in., 2016). Przepływ błon w obrębie systemu jest realizowany poprzez pęcherzyki, błonowe struktury rurkowe i bezpośrednie połączenia między kompartmentami. Jest on możliwy w obu kierunkach i obejmuje wymianę zawartości światła organelli (Brandizzi i Wasteneys, 2013). Wydzielane białka mogą odgrywać u roślin rolę podczas formowania ściany komórkowej, jej przebudowy, a także w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny (Drakakaki i Dandekar, 2013).

U roślin można wyróżnić ponad 40 typów komórek o wyspecjalizowanych funkcjach, a zatem o potencjalnie różniących się procesach transportu zachodzących wewnątrz i różnej strukturze ściany komórkowej (van de Meene i in., 2016). Kształtowanie komórek roślinnych jest całkowicie uzależnione od wysoce zorganizowanej celulozowej ściany komórkowej. Budowa ściany ukierunkowuje powiększanie się komórki powodując anizotropowy wzrost w kierunku prostopadłym do przebiegu mikrofibrilli celulozowych (Oda i Fukuda, 2014). Masywna wtórna ściana komórkowa zapewnia sztywność mechaniczną i wytrzymałość elementom ksylemu. Wtórna ściana komórkowa pomaga utrzymać kształt rośliny i usprawnia transport wody (Oda i Fukuda, 2014).

Błona otaczająca komórkę stanowi barierę między ścianą komórkową a wnętrzem komórki. Sama błona nie jest ruchliwa, ale jej skład jest bardzo dynamicznie modyfikowany poprzez włączanie pęcherzyków egzocytotycznych (sekrecyjnych) i pobieranie pęcherzyków endocytotycznych. Zmiana składu błony może być też zlokalizowana i polega wtedy na ruchach bocznych białek integralnych, na przykład budujących ścianę. Przepływ retrogradowy (endocytotyczny) błon i białek jest równoważony anterogradowym (egzocytotycznym) wydzieleniem składników z powrotem do błony. Niekiedy jeden z kierunków transportu może przeważać globalnie lub lokalnie – układ pozostaje jednak w homeostazie i pozwala na sprawną komunikację ze środowiskiem oraz odpowiedź na bodźce docierające do komórki (Brandizzi i Wasteneys, 2013).

Roślinna ściana komórkowa i błona komórkowa stanowią wraz z cytoszkieletem podstawowy mechanizm odczuwania i odpowiedzi na bodźce zewnętrzne (McKenna i in., 2014). Każda cząsteczka wychodząca i wchodząca do komórki przechodzi przez tę barierę, bierze ona także udział w przekazywaniu sygnałów. Rośliny komunikują się ze środowiskiem

właśnie dzięki zachowaniu kontinuum między komórką a powierzchnią organizmu (McKenna i in., 2014).

Badania wykorzystujące białka fluorescencyjne i obserwacje przyżyciowe ukazały nadzwyczaj dynamiczny charakter transportu pęcherzykowego oraz jego udział, wraz z cytoszkieletem, w przebudowie ściany komórkowej. Wykorzystanie mikroskopii elektronowej pomogło opisać ultrastrukturę przedziałów systemu błon wewnętrznych. Badania molekularne i biochemiczne dostarczyły informacji o funkcji wielu białek spotykanych w kompartmentach błonowych, oddziałujących z cytoszkieletem, czy modulujących ścianę komórkową. Pomimo tego, roślinny system transportu pęcherzykowego wciąż stanowi ważny, ale nie do końca zgłębiany temat wielu badań z zakresu molekularnej biologii komórki.

Roślinny system błon wewnętrznych składa się z wielu stale komunikujących się ze sobą przedziałów

System błon wewnętrznych komórek eukariotycznych składa się z błoniastych organelli i małych, opłaszczonych lub pozbawionych płaszcza, pęcherzyków kursujących między nimi w sposób zależny, bądź niezależny od cytoszkieletu (Mischev i in., 2013). Poszczególne kompartmenty są odrębne morfologicznie, ale przenikają się funkcjonalnie. Wykazują także wielopoziomową dynamikę – przedziały przemieszczają się w cytoplazmie, jednocześnie ich błony podlegają ciągłej reorganizacji (Brandizzi i Wasteneys, 2013).

Roślinny szlak sekrecyjny (transport anterogradowy) rozpoczyna się w ER, gdzie zachodzi synteza białek i upakowanie ich do wysyłki w kierunku aparatu Golgiego. W aparacie Golgiego następuje dojrzewanie, sortowanie i modyfikowanie białek (na przykład glikozyłowanie). Ostateczne są one skierowywane do TGN i błony komórkowej lub ciała wielopęcherzykowego (MVB, ang. multivesicular body) i wakuoli (Kim i Brandizzi, 2014). Transport anterogradowy jest równoważony przez zjawiska endocytotyczne (retrogradowe) zapewniające recykлизację błon, a także wrażliwość na bodźce zewnątrzkomórkowe. Ponadto, szlak sekrecyjny i endocytotyczny przenikają się wzajemnie, na przykład TGN stanowi także wczesny endosom, co częstokroć utrudnia jednoznaczne określenie tożsamości i funkcji przedziałów (Drakakaki i Dandekar, 2013).

Retikulum endoplazmatyczne (ER) jest plastycznym organellum tworzącym tubularno-cysternową sieć, której przekształcanie jest zależne zarówno od mikrofilamentów aktynowych, jak i mikrotubul. Przedział ER jest podzielony na domeny, w których zachodzi synteza białek i lipidów (najłatwiej wyróżnić widoczne na mikrografiach elektronowych bogate w rybosomy rER i pozbawione ich sER). Białka przeznaczone do sekrecji są syntetyzowane i zwijane w ER, przechodzą kontrolę jakości i są skierowywane na szlak sekrecyjny (van de Meene i in., 2016).

Pęcherzyki niosące białka i lipidy z ER przechodzą do aparatu Golgiego. U eukariontów transport anterogradowy (ER-Golgi) jest realizowany przez pęcherzyki z białkowym płaszczem COPII (Ryc. 1). Retrogradowy transport powrotny (Golgi-ER) jest realizowany z udziałem białek opłaszczających COPIa (Robinson i in., 2015). Co ciekawe, dotychczas nie udało się rozstrzygnąć, czy połączenie ER-aparatu Golgiego u roślin jest stałe, czy ustalane *ad hoc*, zależnie od chwilowego położenia diktiosomów (van de Meene i in., 2016).

Roślinny aparat Golgiego jest złożonym organellum odpowiedzialnym za transport i glikozylację białek, syntezę i składanie większości polisacharydów niecelulozowych i pektyn czy recykлизację lipidów błony komórkowej (van de Meene i in., 2016). Ponadto bierze on udział w tworzeniu przegrody pierwotnej – w przeciwieństwie do zwierzęcych aparatów Golgiego,

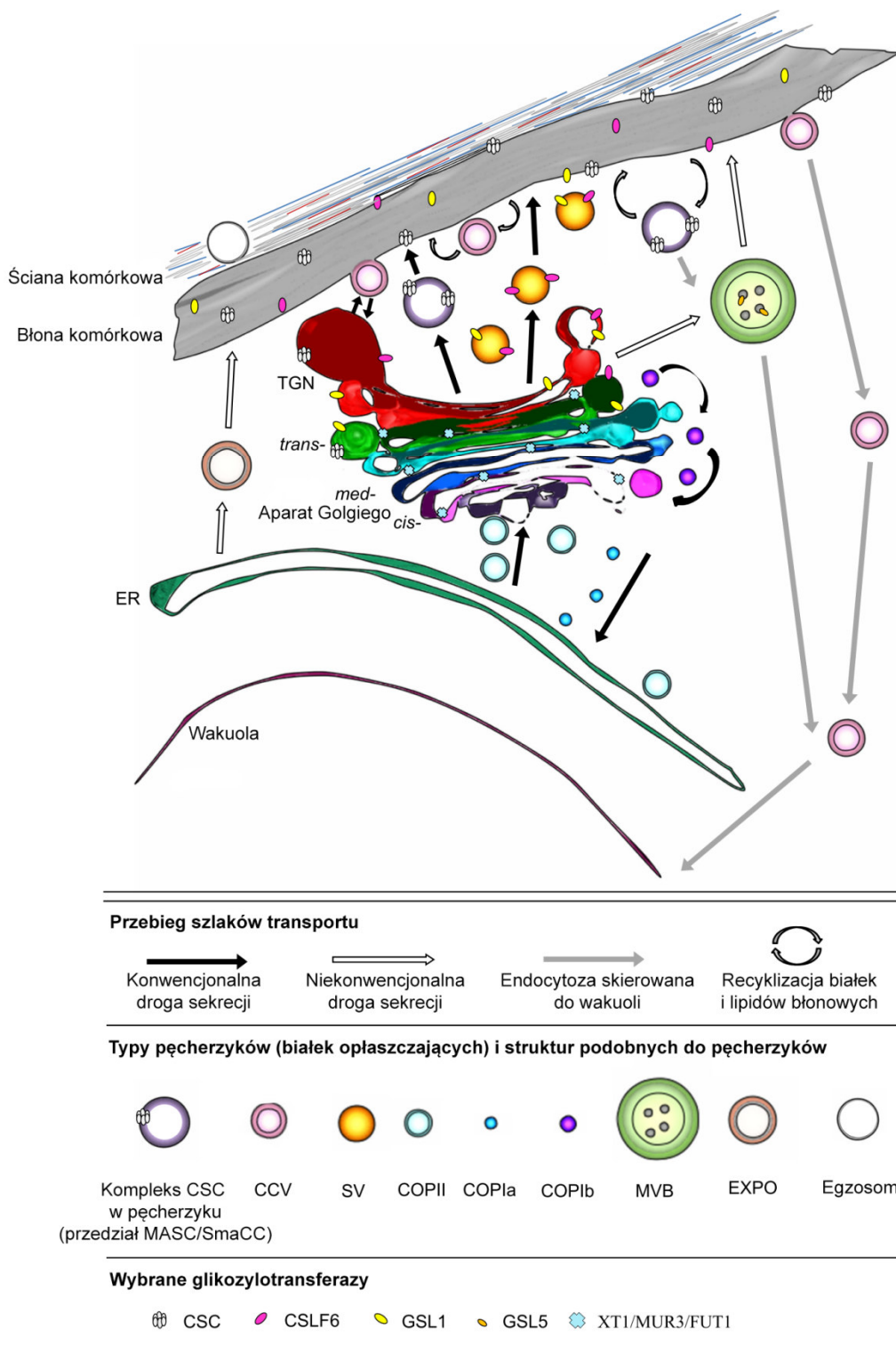
u roślin nie rozpada się on podczas podziału komórki (Seguí-Simarro i in., 2004). Roślinny aparat Golgiego jest zbudowany z diktiosomów składających się z dyskowatych cystern otoczonych wykluczającą rybosomy matriks Golgiego. W pojedynczej komórce mogą występować setki diktiosomów poruszających się dzięki sieci aktyny F (tzw. ruchy stop-and-go), podczas gdy u zwierząt są one statyczne i zlokalizowane w pobliżu jądra komórkowego (Brandizzi i Wasteneys, 2013). Stos cystern jest spolaryzowany – od strony ER można wyróżnić kolejno cysterny *cis*, środkowe i *trans*, które różnią się biochemicznie (Ryc. 1). Błony cysterny *cis* są bogate w białka opłaszczające COPII, nie są elektronowo gęste i uważa się, że brak tam aktywności syntetycznej (Robinson i in., 2015). Część środkową stanowią cysterny bardziej gęste elektronowo, w których zidentyfikowano enzymy odpowiedzialne za glikozylację białek. Strona *trans* jest gęsta elektronowo w wyniku nagromadzenia syntetyzowanych przez diktiosom polisacharydów (van de Meene i in., 2016).

Dotychczas zaproponowano dwa modele tłumaczące dojrzewanie diktiosomów i jednocześnie utrzymywanie przez nie polarności. Pierwszy mówi o progresji i dojrzewaniu cystern w kierunku *cis-trans*, drugi zakłada obieg i wymianę pęcherzyków z zachowaniem pierwotnej tożsamości cystern (van de Meene i in., 2016). Ostatnie badania wskazują, że istotnie cysterny bliższe ER dojrzewają w kolejne, ale i pęcherzyki zawracają retrogradowo enzymy, i składniki do cystern na właściwym im etapie dojrzewania (Donohoe i in., 2013).

Sieć *trans* Golgiego (TGN) spełnia kilka funkcji na drogach endo- i egzocytozy. Tutaj następuje sekrecja pęcherzyków do błony komórkowej, ale też przyjmowanie pęcherzyków endocytotycznych, recyklicacja białek i lipidów do błony lub skierowywanie białek przeznaczonych do degradacji, poprzez MVB, do wakuoli (Gendre i in., 2015). TGN pełni zatem rolę endosomu wczesnego i recyklicującego (Ryc. 1). Uważa się, że TGN powstaje z ostatniej cysterny *trans* diktiosomu. TGN u roślin może być związana z aparatem Golgiego (GA-TGN, ang. Golgi-associated TGN) lub zupełnie niezwiązana (ang. free-TGN) o swoistej strukturze (Donohoe i in., 2013). Przedziały TGN są bardzo mobilne, mogą ulegać fuzji ze sobą i ściśle współpracować z aparatem Golgiego (van de Meene i in., 2016).

Ultrastruktura TGN przypomina tubularno-pęcherzykową zbitkę struktur błonowych o zróżnicowanym rozmiarze i morfologii pęcherzyków. Pęcherzyki docierające do TGN mają różne pochodzenie, natomiast opuszczające ten przedział są różnie adresowane. Prawdopodobnie odmienny jest też ich ładunek (cargo), w zależności od stanu fizjologicznego komórki (Drakakaki i Dandekar, 2013). Pęcherzyki opłaszczone klatryną (CCV, ang. clathrin coated vesicles) mają pochodzenie endocytotyczne i uczestniczą w recyklicacji cargo albo jego transporcie do późnego endosomu (MVB). Natomiast pęcherzyki z płaszczem COPIb zawracają maszynię białkową do aparatu Golgiego (Ryc. 1). Uważa się, że pęcherzyki wydzielnicze pochodzące z TGN są nieopłaszczone lub ich opłaszczenie jest niewidoczne w mikroskopie elektronowym (Gendre i in., 2015).

Transport pęcherzyków w miejsca sekrecji jest zależny od cytoszkieletu. Pęcherzyki z cargo przeznaczonym do wydzielenia po opuszczeniu TGN akumulują w pobliżu błony, na przykład w miejscach intensywnego wzrostu (szczyt łagiewki pyłkowej czy włósnika), we fragmopłacie, w miejscach ekspansji komórek epidermy (Hwang i Robinson, 2009). Przy błonie komórkowej pęcherzyki są rozpoznawane, wiązane i ulegają fuzji z błoną dzięki odpowiednim białkom SNARE (van de Meene i in., 2016).



Rycina 1 Diagram przedstawiający szlaki transportu pęcherzykowego w komórkach roślinnych (model na podstawie tomogramów elektronowych komórek korzenia jęczmienia). Przebieg szlaków opisano w tekście. Objasnienia: CCV – pęcherzyk opłaszczony klatryną, CSC – kompleks syntazy celulozy, COPII/COPIa/COPIb – pęcherzyki opłaszczane przez wymienione białka, CSLF6 – białko podobne do syntazy celulozy, EXPO – organellum wzbogacone w egzocyst, GSL1/GSL5 – białka podobne do syntazy kalozy, MASC/SmaCC – przedział błonowy bogaty w syntazę celulozy połączony z mikrotubulami, MVB – ciało wielopęcherzykowe, SV – pęcherzyk wydzielniczy (nieopłaszczony), XT1/MUR3/FUT1 – xylozylotransferaza/galaktozylotransferaza/fukozylotransferaza. Wg: van de Meene i in. (2016); zmienione.

Białka skierowywane z TGN na drogę lityczną są pakowane w pęcherzyki CCV i trafiają do późnych endosomów, którymi u roślin są ciała wielopęcherzykowe MVB (Mishev i in., 2013). Są to otoczone błoną zespoły niewielkich pęcherzyków. Niewiele wiadomo o biogenezie MVB u roślin, ani o pochodzeniu ich pęcherzyków wewnętrznych ILV (ang. intralumenal vesicle). Wydaje się, że MVB pochodzą z dojrzewających TGN, w co jest zaangażowany kompleks ESCRT (ang. endosomal sorting complexes required for transport). Degradacja białek pochodzących z MVB zachodzi w wakuoli (Robinson i in., 2016).

Opisana powyżej konwencjonalna droga sekrecji wymaga N-końcowego peptydu sygnałowego w polipeptydzie syntetyzowanym na rER. Białka uczestniczące w konwencjonalnej sekrecji są zachowawcze między strunowcami, drożdżami i roślinami (Drakakaki i Dandekar, 2013). Podobnie jak sam zarys szlaku, zachowawcze są białka SNAP i SNARE, odpowiadające za wiązanie i fuzję błon, a także klatryna i białka płaszczka COPI i COPII (van de Meene i in., 2016).

Wiele wskazuje na to, że oprócz standardowej drogi ER-Golgi-post Golgi-błona istnieją też niekonwencjonalne drogi wydzielania zarówno w pęcherzykach, jak i niezależnie od nich (Kim i Brandizzi, 2014). Dehydrogenaza mannitolu (MTD) selera jest białkiem cytoplazmatycznym, pozbawionym peptydu sygnałowego, ale w wyniku ataku patogenu grzybowego trafia do apoplastu (Drakakaki i Dandekar, 2013). Proces wydzielania z pominięciem standardowego szlaku nazwano niekonwencjonalną sekrecją białek UPS (ang. unconventional protein secretion) i w świetle najnowszych badań nie wydaje się on być zjawiskiem sporadycznym (Robinson i in., 2016). Dane dotyczące proteomu apoplastu wskazują na obecność kilkudziesięciu białek wydzielanych, pozbawionych peptydu sygnałowego, określanych jako LSP (ang. leaderless secretory protein). Wiedza na temat sposobu sekrecji tych białek jest jednakże niewielka (van de Meene i in., 2016).

Ciekawą rolę w niekonwencjonalnej sekrecji spełniają kompartmenty otoczone błoną (Ryc. 1). Stres biotyczny indukuje wydzielenie do apoplastu chitynaz, glukanaz, czy peroksydaz. Większość z nich wydostaje się z komórki w MVB, które pełni w tym wypadku specyficzną rolę egzozomu (Ding i in., 2012). Fuzja MVB z błoną skutkuje uwolnieniem pęcherzyków ILV i ich zawartości do apoplastu, co ma spełniać rolę ochronną dla komórki (van de Meene i in., 2016).

Inna droga niekanonicznej sekrecji UPS może prowadzić poprzez EXPO (ang. exocyst positive organelle). Jest to opisane niedawno podwójnie obłonione organellum, w którym zlokalizowano podjednostkę kompleksu egzocyst, białko EXO70E2 (Wang i in., 2010). EXPO jest odrębne od elementów szlaku sekrecyjnego. Nie zidentyfikowano w tej strukturze markerów aparatu Golgiego, TGN, MVB, pęcherzyków wydzielniczych, ani autofagosomu. Co więcej, dynamika EXPO jest niewrażliwa na brefeldynę A (BFA), wortmaninę i konkanamycynę A – znane toksyny hamujące konwencjonalne szlaki transportu pęcherzykowego. Udowodniono, że EXPO może ulegać fuzji z błoną komórkową uwalniając wewnętrzne pęcherzyki do apoplastu (Robinson i in., 2016). W pęcherzykach tych zidentyfikowano cytoplazmatyczne białko SAMS2, pozbawione peptydu sygnałowego, a zaangażowane w metylację lignin w ścianie komórkowej (Drakakaki i Dandekar, 2013).

Dynamika systemu błon wewnętrznych zależy od cytoszkieletu

Ukierunkowana, kontrolowana w czasie i przestrzeni endo- i egzocytoza wraz z mikrofilamentami i mikrotubulami są zaangażowane w utrzymywanie polarność żywych komórek. Chociaż mechanizm tej kontroli różni się w szczegółach u roślin, zwierząt i grzybów, to ogólny zarys jest zachowawczy ewolucyjnie (Yang, 2008). Sieć cytoszkieletu, pomimo

statycznej w brzmieniu nazwy, jest wysoce dynamiczna – aktywna F podlega nieustannym procesom polimeryzacji i depolimeryzacji, łączeniu się w wiązki i ich rozpadowi, co pozostaje pod kontrolą specyficznych białek (Geitmann i Nebenfuhr, 2015).

Przemieszczanie się większości kompartmentów roślinnego szlaku wydzielniczego, a także pozostałych organelli, jest uzależnione od dynamiki mikrofilamentów aktynowych. Chemiczna stabilizacja włókien aktywności F zaburza remodelowanie kanałów ER, ruch diktiosomów i TGN. Indukowany chemicznie rozpad mikrofilamentów zaburza preferencyjnie transport na dalsze odległości (Brandizzi i Wasteneys, 2013).

Sieć mikrotubul bierze udział w podziałach komórek (pasma przedprofazowe i fragmoplast) i ich ekspansji (mikrotubule korytkalne). U roślin niezaburzona dynamika cytoszkieletu tubulinowego jest niezbędna dla prawidłowej morfogenezy i rozwoju. Uorganizowanie i funkcjonowanie sieci mikrotubul jest kontrolowane przez wielorakie białka zasocjowane z mikrotubulami MAP (ang. microtubule-associated protein), często będące efektorami małych GTPaz (Hamada, 2014). Ścisłe kontrolowana dynamika mikrotubul pomaga w utrzymaniu i ustaleniu polarności komórek. Pasma przedprofazowe znakują miejsce podziału komórek, także podziału asymetrycznego. Mikrotubule korytkalne są związane z sygnalizacją polarności przez małe GTPazy typu Rho i pod ich kontrolą ustalają kierunki wzrostu komórek roślinnych (Yang, 2008).

Kierunek przebiegu fibryli celulozowych w ścianie komórkowej jest ściśle związane z mikrotubulami korytkalnymi, które ustalają kierunek przemieszczania się kompleksu syntazy celulozy (CSC, ang. cellulose synthase complex) w błonie. Dotyczy to zarówno ściany pierwotnej, jak i wtórnej (Oda i Fukuda, 2014). Recykliczące podjednostki kompleksu syntazy celulozy (białka CESA) kolokalizują z markerem TGN (V-ATPaza VHA-a1), ale do błony komórkowej docierają w pęcherzykach wydzielniczych o nieustalonej tożsamości. Co ciekawe, miejsce docelowe tych pęcherzyków wyznaczają mikrotubule korytkalne (Oda i Fukuda, 2014). W pobliżu błony komórkowej kompleksy CSC współtworzą przedział błoniasty ściśle oddziałujący z mikrotubulami korytkalnymi, który nazywano SmaCC/MASC (ang. small CESA compartment/microtubule-associated cellulose synthase compartments) (Gutierrez i in., 2009; Crowell i in., 2009). Przedział ten odpowiada za redystrybucję kompleksów CSC po endocytozie i przez to moduluje liczbę aktywnych kompleksów w błonie (Kim i Brandizzi, 2014).

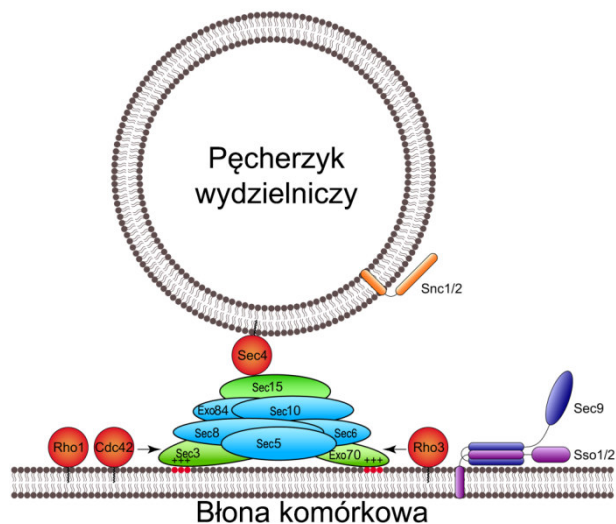
Kompleksy wiążące wyznaczają miejsca fuzji pęcherzyków z błoną docelową

Transport pęcherzykowy w obrębie systemu błon wewnętrznych w komórce wymaga skomplikowanej maszyneryi białkowej, złożonej z białek opłaszczających, adaptorowych, białek adresujących, wiążących, odcinających i wielu innych. Wszystkie one pozostają pod kontrolą małych GTPaz i regulujących je białek. W toku ewolucji rośliny zachowały wiele drożdżowych i zwierzęcych regulatorów transportu, ale ich lokalizacja i funkcja nie są do końca poznane (Heard i in., 2015).

Fuzja błon pęcherzyka transportującego i organelli docelowej, bądź błony komórkowej jest możliwa dzięki właściwej kombinacji białek SNARE (ang. *N*-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptor). W spotkaniu niesionych przez pęcherzyk czynników vSNARE z obecnymi na błonie docelowej tSNARE, pomagają tzw. czynniki wiążące (ang. tethering factors) (Kim i Brandizzi, 2014). Oprócz zapewniania utrzymania pęcherzyka bezpośrednio przy błonie docelowej, mają one także bezpośredni udział w regulacji składania kompleksów SNARE

(razem z białkami wspomagającymi Sec1/Munc18). Jednym z takich kompleksów wiążących jest egzocyst (Robinson i in., 2016).

Egzocyst należy do grupy białkowych kompleksów wiążących, powiązanych ewolucyjnie, o podobnej architekturze (polipeptydowe helisy ułożone w kształt pręta), które nazywa się wspólnie CATCHR (ang. complexes associated with tethering containing helical



Rycina 2 Schemat wiązania przy błonie pęcherzyka wydzielniczego przez kompleks egzocyst u drożdży. Wyróżniono oddziaływania kluczowych podjednostek z małymi GTPazami (Ccd42, Rho1, Rho3 i Sec4). Asocjacje podjednostek Sec3 i Exo70 z fosfatydylo-inozytolami zaznaczono na czerwono. Dodatkowo na schemacie umieszczono białka tSNARE (Sec9 i Sso1/2) i vSNARE (Snc1/2) Wg: He i Guo (2009); zmienione.

rods). Mogą one zawierać różną liczbę podjednostek i działać na szlaku wydzielniczym/biosyntetycznym jak GARP (ang. Golgi-associated retrograde protein) i EARP (ang. endosome-associated retrograde protein) (4 podjednostki), COG (ang. conserved oligomeric Golgi) i egzocyst (8 podjednostek). Pęcherzyki na szlaku endosomalno-wakuolarnolitycznym są wiązane przez kompleksy CORVET (ang. class C core vacuole/endosome tethering) i HOPS (ang. homotypic fusion and protein sorting) o 6 podjednostkach. Kompleksy TRAPP I-III (ang. trafficking protein particle), o zróżnicowanej liczbie podjednostek, działają na szlaku biosyntetycznym, podczas podziałów i autofagii. Geny kodujące wszystkie kompleksy wiążące są zachowane w genomach roślinnych, ale poza kilkoma wyjątkami, słabo poznana jest regulacja

białek będących produktami tych genów i ich oddziaływania z małymi GTPazami (Vukašinić i Žárský, 2016).

Kompleks egzocyst składa się z ośmiu podjednostek (SEC3, SEC5, SEC6, SEC8, SEC10, SEC15, EXO70, EXO84) i pośredniczy w wiązaniu i umiejscowieniu przestrzennym przy błonie pęcherzyków wydzielniczych pochodzących z aparatu Golgiego (Ryc. 2) (Hong i in., 2016). Białka stanowiące podjednostki egzocystu wykazują niewielkie podobieństwo między sobą, za to dzielą wspólną architekturę – przyjmują kształt pręta zbudowanego z tandemowych wiązek helikalnych, złożonych z 3-5 helis α . Czwartorzędowa struktura kompleksu jest prawdopodobnie Y-kształtna i możliwa do zaobserwowania na tomogramach krioelektronowych (Robinson i in., 2016).

Egzocyst ustanawia przestrzenną i czasową kontrolę egzocytozy. Oddziałuje on bezpośrednio i pośrednio z błoną, białkami cytoszkieletu, małymi GTPazami podrodzin Rab, Ral i Rho, a także innymi białkami korowej strefy cytoplazmy (Ryc. 2). Wykazano, że jest niezbędny dla prawidłowego wzrostu spolaryzowanego, morfogenezy komórek, tworzenia inwadiopodiów, lamelipodiów, formowania dendrytów, pączkowania drożdży, cytokinezy, wzrostu włóśników, elongacji komórek hipokotyli, cytokinezy, tworzenia otoczki nasiennej, tworzenia papilli po ataku patogenu (Synek i in., 2014). Choć dane eksperymentalne nie są jeszcze bardzo bogate, wiadomo, że kompleks egzocyst jest u roślin ważny

dla prawidłowego przebiegu procesów wzrostu i rozwoju. Niektóre podjednostki są u roślin kodowane przez powielone rodziny genowe (na przykład dziesiątki paralogów *EXO70* u *Arabidopsis* i ryżu), co jest dla roślin swoiste i wskazuje na dywersyfikację funkcjonalną ostatnich faz drogi sekrecyjnej (Vukašinić i Žárský, 2016).

Podjednostki egzocystu SEC3 i EXO70 wiążą się do błony w miejscach aktywnych egzocytotycznie. Oba białka oddziałują z fosfatydyloinozitolami wewnętrznej warstwy lipidowej (PIP2) poprzez wielozasadowe regiony końca N (SEC3) lub końca C (EXO70) (Robinson i in., 2016). Wyznaczają tym samym miejsca składania całego kompleksu, wraz z pozostałymi sześcioma podjednostkami, które są obecne na błonie pęcherzyka (Ryc. 2). Małe GTPazy Rab Sec4 (u drożdży) i RAB11 (u zwierząt), wraz z białkiem vSNARE Snc2 oddziałują z podjednostkami Sec15 i Sec6, łącząc kompleks z pęcherzykami wydzielniczymi (Vukašinić i Žárský, 2016).

Drożdzowe białka Exo70 i Sec3 bezpośrednio wiążą małe GTPazy z rodziny Rho i definiują lokalizację na błonie, w której działa egzocyst (Liu i Guo, 2012). U roślin nie są znane bezpośrednie oddziaływania aktywnych GTPaz z podjednostkami egzocystu, zauważono jednak, że białka te występują w tych samych lokalizacjach (błona łagiewki pyłkowej, włośniki). Ponadto, fenotypy mutantów podjednostek egzocystu są podobne do fenotypów mutantów małych GTPaz ROP (ang. Rho of plants). Wykazano, że SEC3 oddziałuje z białkiem rusztowania (ang. scaffold protein) ICR1 w łagiewce pyłkowej *Arabidopsis*, co jest wymogiem spolaryzowania komórki, podobnie jak aktywność ROP. Udowodniono w ten sposób, że u roślin egzocyst nie jest bezpośrednio regulowany przez małe GTPazy ROP (Oda i Fukuda, 2014).

Badania nad roślinnym kompleksem egzocyst wykazały, że bierze on udział w procesach wymagających spolaryzowanego, ukierunkowanego transportu pęcherzykowego. Mutant *sec8 Arabidopsis* cechuje się zaburzeniami dojrzewania i wzrostu łagiewki pyłkowej – usunięcie jednej podjednostki kompleksu wywołuje problemy z polarnością (Kim i Brandizzi, 2014). Badania mikroskopowe pozwoliły ustalić, że SEC6, SEC8, EXO70A1 i EXO84B są zlokalizowane w błonie komórkowej i częściowo (przez 20% czasu) kolokalizują z VAMP721, markerem pęcherzyków wydzielniczych (van de Meene i in., 2016). Ponadto egzocyst jest istotnie zaangażowany w proces cytokinezy. Białka SEC3, SEC6, SEC8, SEC15B, EXO70A1 i EXO84B zidentyfikowano jako obecne podczas inicjacji cytokinezy i fuzji pęcherzyków w czasie formowania przegrody pierwotnej. Udowodniono także, że podjednostka SEC6 oddziałuje z SEC1/KEULE – białkiem GEF (ang. guanine nucleotide exchange factor) aktywnym tylko podczas podziału komórki i niezbędnym dla jego prawidłowego przebiegu (Žárský i in., 2013). Ostatnie doniesienia wskazują jednak, że czasoprzestrzenną rolę kontrolną podczas cytokinezy odgrywa u *Arabidopsis* kompleks TRAPP1, natomiast egzocyst odpowiada tylko za wiązanie pęcherzyków systematycznie dokładanych do fragmoplastu. Oba kompleksy prawdopodobnie oddziałują ze sobą podczas podziału komórki roślinnej (Rybak i in., 2014). Podjednostka SEC5 u ziemniaka jest bezpośrednim celem białka AVR1 (ang. avirulence factor 1) *Phytophthora infestans* (zaraza ziemniaka), co dowodzi także związku egzocystu z odpowiedzią na atak patogenu (Vukašinić i Žárský, 2016).

Ciekawe i swoiste dla roślin jest powielenie genów kodujących niektóre podjednostki egzocystu. Najbardziej ekstremalnym przykładem jest EXO70, kodowane u *Arabidopsis* przez 23 geny (Zhang i in., 2010). Badacze tłumaczą tę sytuację większym stopniem skomplikowania transportu pęcherzykowego u roślin (Li i in., 2010), wymogiem obsługi przez egzocyst znacznej

liczby różnorodnych domen błonowych (Žárský i in., 2009), czy istnieniem u roślin dodatkowych, wyspecjalizowanych organelli wydzielniczych, jak EXPO (Wang i in., 2010).

Dotychczas udało się przybliżyć u *Arabidopsis* funkcje wielu białek z grupy EXO70. EXO70B1 odgrywa rolę podczas formowania autofagosomu i związanego z autofagią, a niezależnego od aparatu Golgiego, importu do wakuoli, a także podczas odpowiedzi na stres biotyczny. Ponadto, EXO70B1 bierze udział w otwieraniu szparek wraz z małą GTPazą ROP2 i jej efektem RIC7, które rekrutują podjednostkę egzocystu do błony komórek szparkowych, przez co blokują jej aktywność (Vukašinić i Žárský, 2016). Exo70B2 i Exo70H1 są związane z odpowiedzią na atak patogenu, EXO70C1 pełni istotną rolę we wzroście łagiewki pyłkowej, EXO70E2 jest związana z organellami EXPO, czyli z niekonwencjonalną drogą egzocytozy (Hong i in., 2016), EXO70H4 bierze udział w odkładaniu kalozy do wtórnej ściany komórkowej trichomów (Vukašinić i Žárský, 2016).

Najlepiej dotąd poznaną podjednostką egzocystu jest EXO70A1, aczkolwiek badania nad nią budzą pewne kontrowersje. W szeregu prac wykazano, że EXO70A1 jest najpowszechniejszą podjednostką egzocystu u *Arabidopsis* i bierze udział w wydłużaniu hipokotyli, włośników, oddziaływaniach pyłek-mikropyle (stigma), formowaniu przegrody komórkowej, a nawet w ukierunkowaniu przepływu auksyn, czy odkładaniu pektyn w nasionach. Ponadto, bazy danych i eksperymenty (co ważne, o skali tkankowej) wskazują, że ekspresja EXO70A1 zachodzi w większości organów *Arabidopsis*, poza dojrzałym pyłkiem (Žárský i in., 2013; Vukašinić i Žárský, 2016). Z drugiej strony transgeniczna roślina z ekspresją markera GUS pod kontrolą promotora genu *EXO70A1* wykazuje obecność reportera tylko w rozwijających się członach naczyniowych korzenia, hipokotyli, liścieni, liści, słupków i organów kwiatowych. Ponadto, najsilniejszą ekspresję obserwowano podczas odkładania wtórnej ściany komórkowej, a kompletny zanik ekspresji transgenu w dojrzałych członach naczyniowych (Li i in., 2010). Poważne zmiany fenotypowe u mutantu EXO70A1 wytłumaczono ogólnym zaburzeniem ksylogenezy, w wyniku czego efektywność transportu wody spada do poziomu $\frac{1}{3}$ w porównaniu z rośliną typu dzikiego. Zaproponowano, że podjednostka EXO70G2, o podobnym do EXO70A1 wzorze ekspresji przejmuje część jej aktywności, w wyniku czego zmiany te nie są letalne (Li i in., 2013). Powyższe wytłumaczenie nie zadowoliło wszystkich badaczy i część z nich twierdzi, że udział białka EXO70A1 jedynie w formowaniu wtórnej ściany komórkowej członów naczyniowych jest zbyt wąskim spojrzeniem na jego rolę (Žárský i in., 2013; Vukašinić i Žárský, 2016).

Powyższe kontrowersje w żaden sposób nie zaprzeczają jednak tezie mówiącej, że komórka roślinna jest w stanie formować wiele kompleksów egzocyst o zróżnicowanym składzie podjednostkowym. Z jednej strony świadczy to o stopniu komplikacji roślinnych szlaków sekrecyjnych, z drugiej jednak wskazuje, że rośliny są niezwykle elastyczne i w toku ewolucji potrafiły dostosować maszynę białkową do pełnienia nowych, swoistych zadań.

Czasoprzestrzenną kontrolę nad transportem pęcherzykowym sprawują małe GTPazy

Superrodzina małych GTPaz podobnych do Ras należy do superklasy GTPaz zawierających pętlę P, odpowiedzialną za wiązanie nukleotydów guaninowych (Berken i Wittinghofer, 2008). W skład superrodziny wchodzi 5 podrodzin: Ras, Rho, Arf, Rab i Ran. Są one powszechne u eukariontów, z wyjątkiem podrodziny Ras nieobecnej u roślin (Molendijk i in., 2004). Małe GTPazy działają jako przełączniki molekularne, wykorzystując mechanizm wiązania i hydrolizy GTP. W spełnianiu tej funkcji molekularnej wymagają udziału innych białek,

które pełnią, niejako przy okazji, rolę regulatorów małych GTPaz. Białka czynniki wymiany nukleotydów guaninowych GEF wspomagają uwolnienie GDP i zastąpienie go przez GTP, co aktywuje GTPazę. W stanie aktywnym GTPazy oddziałują z efektorami, hydroliza GTP unieczynnia je. Ten proces jest wspomagany przez białka aktywujące GTPazę GAP (ang. GTPase activating protein) (Anders i Jürgens, 2008). Większość małych GTPaz jest modyfikowana potranslacyjnie poprzez dodanie reszt kwasów tłuszczowych (Ryc. 3), co umożliwia im asocjację z błonami biologicznymi (Molendijk i in., 2004).

Czynniki wymiany nukleotydów guaninowych GTPaz ARF kontrolują endocytozę i recykлизację pęcherzyków do błony komórkowej

Małe GTPazy ARF Arabidopsis są rodziną 12 białek o bardzo wysokim stopniu identyczności i funkcjonalnej redundancji. Udowodniono, że biorą udział w regulacji późnych etapów szlaku sekrecyjnego, recyklicacji pęcherzyków transportujących, a także, że są ważne dla procesu podziałów komórkowych. GTPazy ARF są mirystylowane na końcu aminowym polipeptydu (inaczej niż pozostałe małe GTPazy), co wspomaga ich asocjację z błoną, gdzie przebywają w stanie aktywnym (Anders i Jürgens, 2008). ARF są regulowane przez znaczną liczbę różnorodnych białek typu GAP i GEF, z których niewielką część stanowi rodzina dużych ARF-GEF nazwana BIG (Yorimitsu i in., 2014).

Białka ARF-GEF mają konserwatywną domenę SEC7 odpowiadającą za wiązanie GTPazy i wymianę GDP/GTP w jej miejscu aktywnym. Nazwa SEC7 pochodzi od drożdżowego ortologa Sec7p. Prostego podziału ARF-GEF na małe, średnie i duże dokonuje się na podstawie liczby domen budujących białko. Duże GEF są konserwatywne u wszystkich eukariontów, a u Arabidopsis zidentyfikowano osiem genów kodujących duże ARF-GEF. U glonów zidentyfikowano trzy geny, podobnie jak u drożdży i człowieka (Anders i Jürgens, 2008).

ARF-GEF z rodziny BIG Arabidopsis są ortologami białek ludzkich i drożdżowych. Dzielą się na dwie podrodziny, których przedstawiciele to HsGBF1, ScGea1/2, AtGNOM i AtGNL1/2 oraz HsBIG1/2, ScSec7p, AtBIG1-5 (Anders i Jürgens, 2008). Białka ARF-GEF działają u Arabidopsis w przedziałach systemu błon wewnętrznych. Podczas badania składu proteomów z wybranych kompartmentów komórki Arabidopsis zidentyfikowano cztery ARF-GEF: GNOM, BIG2, BIG3 i BIG5. Białka te były obecne we frakcjach z przedziałów endosomalnych wzbogaconych w swoiste białka ARA5 (marker aparatu Golgiego/pęcherzyków) i ARA7 (marker endosomów/MVB) (Heard i in., 2015). Dotychczas dobrze poznano czynniki GNOM, GNL1 i GNL2, spokrewnione z HsGBF1. Mutant *gnom* Arabidopsis wykazuje poważne zaburzenia rozwojowe, wynikające z nieprawidłowej recyklicacji do błony komórkowej nośników auksyn PIN1, za który to proces białko GNOM jest odpowiedzialne. GNL1 (ang. GNOM-like 1) jest najbliższe GNOM i zlokalizowane w aparacie Golgiego, gdzie pełni funkcję w komunikacji ER-Golgi. Natomiast GNL2 wydaje się działać specyficznie w pyłku, gdyż tylko tam zachodzi jego ekspresja (Anders i Jürgens, 2008). Z podrodziny BIG czynników ARF-GEF Arabidopsis dotychczas najlepiej zbadano białko BIG5, które uczestniczy w odpowiedzi na stres biotyczny (nazywane MIN7) i w transporcie endocytotycznym (nazywane BEN1) (Richter i in., 2014).

W najnowszych badaniach dowiedziono, że BIG4 kolokalizuje z markerem TGN (H^+ -ATPaza VHA-a1) i GTPazą ARF1, ale nie z markerami aparatu Golgiego. Białko BIG3 natomiast bierze udział w transporcie post-Golgi zarówno w kierunku wakuoli jak i błony (u mutantów *big3* białka markerowe nie docierają w miejsca docelowe). Wydaje się zatem,

że eksport pęcherzyków z TGN do błony komórkowej na drodze recyklicacji (zależnej od GNOM) i sekrecja poprzez TGN nowych białek są odrębnymi szlakami (zależnymi od BIG1-4), kontrolowanymi przez różne białka będące rezydentami tych samych przedziałów systemu błon wewnętrznych (Richter i in., 2014).

Małe GTPazy ROP kontrolują procesy spolaryzowanego wzrostu i rozwoju komórek roślinnych

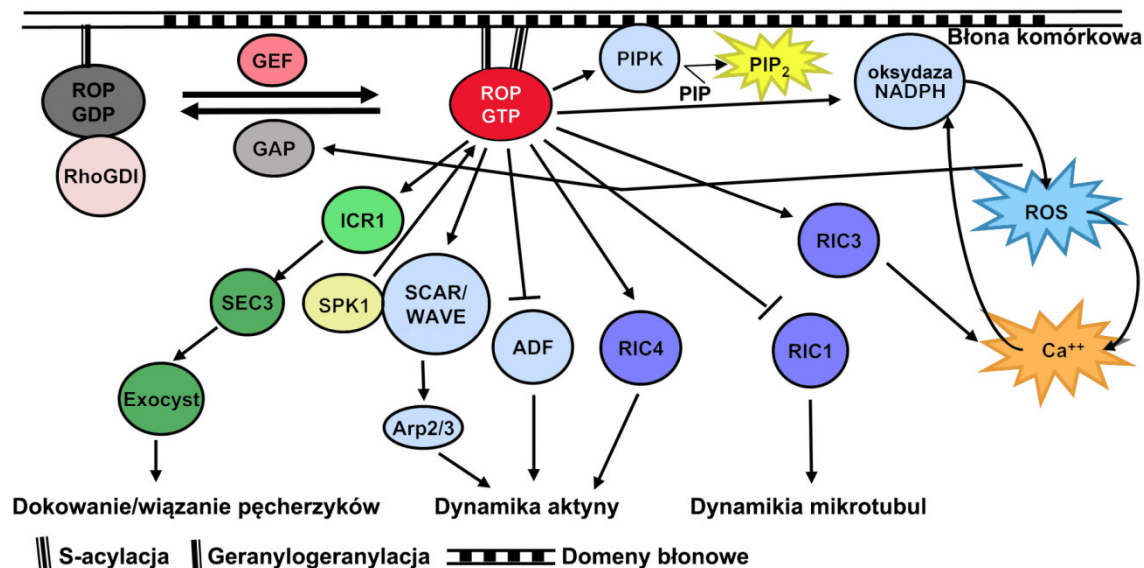
W przeciwieństwie do pozostałych eukariontów, charakteryzujących się rozbudowanymi rodzinami małych GTPaz Rho, rośliny rozwinęły tylko jedną rodzinę Rho – ROP, którą niekiedy nazywa się RAC ze względu na podobieństwo do ludzkich białek z podrodziny Rac (Craddock i in., 2012). Pomimo różnic funkcjonalnych i znacznej specjalizacji roślinnych GTPaz ROP, białka te wyewoluowały od wspólnego przodka białek drożdżowych Rho, Cdc42 i Rac (Nagawa i in., 2010).

W genomie mchu *Physcomitrella patens* zidentyfikowano cztery geny kodujące niemal identyczne ROP, prawdopodobnie nadmiarowe (Craddock i in., 2012). Genom *Arabidopsis* koduje jedenaście białek ROP, powszechnie obecnych w komórkach. Stanowią one uniwersalny przełącznik podczas transdukcji sygnałów. W stanie aktywnym, ze związanym GTP, wiążą się z wieloma różnymi białkami efektorami, z których większość zawiera motyw CRIB (ang. Cdc42/Rac-interactive binding) wiążący GTPazę w sposób zależny od GTP (Wu i in., 2001).

U okrytonasiennych wyróżnia się dwie klasy małych GTPaz ROP: typ I, obecny już na wczesnym etapie ewolucji u mchów i widłaków oraz specyficzny dla roślin wyższych typ II. Sugeruje się powstanie typu II ROP dzięki insercji intronu blisko końca 3' genu przodka ROP, co wskazuje na dywersyfikację funkcjonalną przodków ROP typu I (Yalovsky, 2015). Oba typy ROP różnią się także modyfikacjami potranslacyjnymi, którym podlegają: typ I jest prenylowany na C-końcu, typ II – S-acylowany w obrębie domeny hiperzmiennej. Typ II GTPaz ROP dominuje u traw, natomiast u roślin dwuliściennych obserwuje się przewagę typu I. Najprawdopodobniej duplikacje i podział rodziny ROP nastąpiły niedawno i możliwe, że białka obu typów nie są bardzo odległe funkcjonalnie (Vukašinić i Žárský, 2016).

Polipeptydy ROP typu I kończą się motywem podlegającym prenylacji przez transferazę geranylogeranylową (Craddock i in., 2012). Prenylacja polega na trwałym kowalencyjnym przyłączeniu wiązaniem tioeterowym reszt farnezylowej (C15) lub geranylogeranylowej (C20) do wolnej grupy tiolowej cysteiny. Dodatkowo, w rejonie domeny G, reszty cysteiny podlegają S-acylacji zależnej od aktywacji GTPazy (Ryc. 3), co wiąże ją w domenach błonowych, dawnej nazywanych tratwami lipidowymi lub DRM (ang. detergent resistant membranes). S-acylacja polega na kowalencyjnym przyłączeniu reszty palmitynianu (C16) lub stearynianu (C18) do wolnej grupy tiolowej cysteiny odwracalnym wiązaniem tioestrowym (Yalovsky, 2015). GTPazy ROP typu II są S-acylowane na końcu karboksylowym bogatym w cysteiny i glicyny. Taki region wielozasadowy może też pomagać białku w łączeniu się z błoną poprzez oddziaływanie z fosfatydylofosfoinozytolami (Yalovsky, 2015). Modyfikacje potranslacyjne, przyłączenie reszt kwasów tłuszczowych, pozwalają GTPazom ROP na odwracalne związanie się z błoną komórkową. Mogą one wtedy wpływać na cytoszkielet i kierowanie pęcherzyków do oddzielnych domen błony komórkowej i błon wewnętrznych, co jest warunkiem koniecznym dla ustalenia i utrzymania polarności komórek, a co wydaje się być główną funkcją fizjologiczną białek ROP (Hazak i in., 2010).

U *Arabidopsis* małe GTPazy ROP są regulowane przez białka RopGAP (ang. ROP GTPase activating protein), dezaktywujące GTPazy w błonie poprzez promowanie ich aktywności GTPazowej (Ryc. 3) (Li i in., 2008). Genom *Arabidopsis* koduje 5 białek RopGAP o konserwatywnej domenie GAP-like i N-końcowym motywie CRIB, który wzmacnia wiązanie do ROP w kompleksie z GTP i ułatwia przeprowadzenie dezaktywacji GTPazy. Zidentyfikowano



Rycina 3 Szlaki sygnalizacyjne, w które są zaangażowane małe GTPazy ROP u roślin. W pracy nie wspomniano o kinazach fosfatydyloinozytoli (PIPK) zaangażowanych w sygnalizację z udziałem fosfatydyloinozytoli (PIP), oksydazie NADPH zaangażowanej w tworzenie reaktywnych form tlenu (ROS), czynnikach nukleacji aktyny Arp2/3 i WAVE oraz czynnikach depolimeryzacji aktyny ADF. Funkcje pozostałych białek (szczególnie ROP-ICR1-SEC3 oraz ROP-RIC) badano lub opisano w tekście. Wg: Yalovsky i in. (2008); zmienione.

także inne białka GAP zwane REN, stanowiące trzybiałkową rodzinę. REN1 nie ma domeny CRIB, jest zatem białkiem o innej niż kanoniczna budowie, ale działa jako deaktywator GTPazy ROP1 (Nagawa i in., 2010).

Białka RopGDI (ang. ROP guanine nucleotide disassociation inhibitor) prawdopodobnie sekwestrują ROP w cytoplazmie w stanie nieaktywnym (Ryc. 3) (Li i in., 2008). U *Arabidopsis* występują trzy białka RopGDI, które są podobne do ssaczych RhoGDI. Wykazano, że SCN1/AtRhoGDI1 jest białkowym partnerem GTPazy ROP1/2 (Nagawa i in., 2010).

RopGEF są białkami aktywującymi małe GTPazy ROP (Ryc. 3). Zlokalizowano je na przykład w błonie apikalnej łagiewki pyłkowej (Li i in., 2008). Czternaście białek RopGEF *Arabidopsis* jest wyposażonych w domenę PRONE (ang. plant specific ROP nucleotide exchanger), spotykaną tylko u roślin, o funkcji katalitycznej GEF (Craddock i in., 2012). Białek tych jest więcej niż samych GTPaz ROP, co tłumaczy się tym, że mogły one powstać w odpowiedzi na wykształcenie przez rośliny ponad 400 swoistych kinaz podobnych do receptora RLK (ang. receptor-like kinase) (Nagawa i in., 2010). Oprócz „klasycznych” ROPGEF z domeną katalityczną PRONE, GTPazy ROP mogą być aktywowane przez specyficzne dla roślin, pojedyncze białko SPIKE1 (SPK1) (Ryc. 3), podobne do białek ze zwierzęcej rodziny DOCK (Yalovsky, 2015).

Przełamywanie symetrii błony komórkowej poprzez ustanawianie jej polaryzacji lub formowanie lokalnych domen, jest jednym z fundamentalnych procesów obserwowanych w żywych komórkach (Yang i Lavagi, 2012). U roślin jest to niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesów rozwojowych takich jak ekspansja komórek, podziały asymetryczne,

morfogeneza, odkładanie pierwotnej i kształtowanie wtórnej ściany komórkowej, czy ustalenie tożsamości tkankowej (Craddock i in., 2012). W wiele z tych procesów, jeśli nie we wszystkie, są zaangażowane małe GTPazy ROP. Wykazano, że udział ROP w kontroli rozwoju roślin polega na regulacji dynamiki cytoszkieletu aktynowego, tubulinowego, oraz transportu zarówno endo-, jaki i egzocytotycznego, a także na utrzymaniu gradientów ROS (ang. reactive oxygen species) i Ca^{2+} (Ryc. 3) (Bloch i in., 2008). Podobne funkcje regulacyjne dla cytoszkieletu i transportu pęcherzykowego pełnią małe GTPazy Rho u drożdży i zwierząt, ale większość ich efektorów nie została zachowana u roślin. Nadrzędną sygnalizację dla ROP stanowią auksyny i kwas abscysynowy (Yalovsky, 2015). Większość wiedzy o GTPazach ROP pochodzi z badań komórek o wzroście szczytowym – łagiewki pyłkowej i włośników. Innym przykładem pokazującym zarówno złożoność, jak i elegancję działania ROP jest morfogeneza komórek epidermy liści. Wykazano także udział ROP w zależnych od światła ruchach aparatów szparkowych i odpowiedzi obronnej komórek roślinnych (Nagawa i in., 2010).

Rośliny wykształciły własne efekторы, które podobnie jak same GTPazy ROP, są specyficzne, chociaż generalnie pełnią tę samą funkcję – oddziałują z GTPazami w stanie aktywnym i biorą udział w niezależnych szlakach sygnałowych ROP związanych z dynamiką cytoszkieletu i transportu pęcherzykowego (Craddock i in., 2012). Jak dotąd odkryto dwie osobne i specyficzne rodziny białek związanych z ROP: liczącą 11 białek rodzinę RIC i liczącą 5 członków rodzinę RIP/ICR (ang. ROP interacting partner/interactor of constitutively active ROP) (Wu i in., 2001). Nazwa RIP jest związana bezpośrednio z proponowaną funkcją tych białek – oddziaływaniem z małymi GTPazami ROP (RIP, ang. ROP interacting partners) (Li i in., 2008). Białka te są także nazywane ICR, ponieważ ICR1 jest pierwszym odkrytym i opisanym białkiem z rodziny RIP (Lavy i in., 2007). Dotychczas udowodniono kilka oddziaływań białek RIP z aktywnymi GTPazami ROP, a także ich udział we wspólnym tworzeniu domen błonowych o typowej dla ROP funkcji.

W komórkach epidermy liści *Arabidopsis* podczas rozwoju ustanawiane są naprzemiennie domeny w błonie, odpowiadające wgłębieniom i wypustom, kiedy przyjmą ostateczny kształt puzzla. W jednych domenach mikrofilamenty tworzą gęstą sieć kortykalną, wykluczającą mikrotubule, w drugich to mikrotubule kortykalne układając się równolegle ograniczają sieć aktyny F. Zagęszczenie aktyny F w rejonach wybrzuszeń komórek epidermy powoduje lokalną aktywację ROP2 poprzez działanie jej efektora RIC4 (Yang i Lavagi, 2012). RIC4 jest swoistym dla roślin białkiem z motywem CRIB (ang. ROP interactive CRIB motif containig proteins). Motyw ten jest znany i odpowiada za oddziaływania z aktywnymi GTPazami ROP u roślin, a także ich homologami u zwierząt i drożdży. W białkach RIP motyw CRIB jest dobrze zachowany ewolucyjnie, natomiast otaczają go bardzo zmienne sekwencje (Nagawa i in., 2010).

GTPaza ROP6 jest aktywowana w miejscach wgłębień formujących się komórek epidermy liści *Arabidopsis*, a za równoległe układanie w tych miejscach mikrotubul odpowiada jej efektor RIC1. Z drugiej strony, aktywna GTPaza ROP2 sekwestruje RIC1, hamując tym samym działanie szlaku ROP6-RIC1, ale zwiększona obecność mikrotubul wstrzymuje aktywację ROP2 – oba szlaki sygnalizacyjne wzajemnie się hamują, tworząc naprzemiennie lokalne domeny ROP2-aktyna F i ROP6-mikrotubule. Powoduje to przyjmowanie przez komórki charakterystycznego kształtu przypominającego puzzla (Yang i Lavagi, 2012). Okazało się, że działanie ROP2 i ROP6 podczas morfogenezy komórek liści jest sterowane na poziomie tkankowym przez ukierunkowany przepływ auksyn. Białko ABP1 (ang. actin binding protein 1),

receptor auksyn, aktywuje ROP2 i ROP6 po przeciwległych stronach ściany dwóch komórek, prowadząc do naprzemiennego ustanowienia domen „wgnębiających” i „wybrzusających” komórki (Craddock i in., 2012).

Aktywna GTPaza ROP1 tworzy w wierzchołku łagiewki pyłkowej domenę wzrostu – miejsce intensywnej egzocytozy. Układ pozostaje w stanie dynamicznej równowagi dzięki antagonistycznemu działaniu efektorów ROP1. Białko RIC4 odpowiada za stabilizację wierzchołkowej sieci aktyny F. Stabilizacja mikrofilamentów powoduje wzrost tempa egzocytozy (Craddock i in., 2012). Znaczna ilość pęcherzyków egzocytotycznych ulegających fuzji z błoną może szybko rozcieńczać domenę z aktywną GTPazą ROP1 i utrudnić określenie miejsca oraz kierunku wzrostu łagiewki (Yang i Lavagi, 2012). By temu zapobiec ROP1 indukuje zależne od RIC3 zmiany stężenia jonów Ca^{2+} – wzrost powoduje rozpad mikrofilamentów, ograniczający tempo egzocytozy (Yang, 2008). Ponadto w pęcherzykach wydzielniczych do domeny wzrostu docierają białka o aktywności GAP jak RopGAP1 i REN1. Tym samym ograniczają boczne rozchodzenie się błonowej domeny z aktywną GTPazą, jak również zapobiegają nadmiernej aktywacji ROP1 (Chen i Friml, 2014).

Białka RIP uczestniczą w sygnalizacji z udziałem małych GTPaz ROP

Białka RIP wykazują wysokie wzajemne podobieństwo w obrębie fragmentów z końca N i C polipeptydu. Są złożone niemal całkowicie z domen coiled-coil i pozbawione znanych domen funkcjonalnych (Lavy i in., 2007). Chociaż w ich sekwencji brakuje znanych motywów odpowiedzialnych za oddziaływanie z Rho (ROP), to wykazano, że u dotychczas zbadanych RIP, zachowawcza domena C-końcowa jest odpowiedzialna za wiązanie GTPazami ROP (Nagawa i in., 2010). Co ciekawe, pomimo zachowawczości u roślin wyższych, nie mają one swoich odpowiedników ani u drożdży, ani u zwierząt (Li i in., 2008). Pierwsze opisane białko RIP – ICR1 (At1g17140) oraz RIP3 (At3g53350), znane pod nazwą MIDD1 (ang. microtubule depletion domain 1) są dobrze zbadane, zarówno pod względem funkcjonalnym, jak i molekularnym. Białka RIP2 (At2g37080), RIP4 (At1g78430) i RIP5 (At5g60210) cały czas pozostają niemal zupełnie nieopisane.

ICR1 oddziałuje w komórkach *Arabidopsis* jednocześnie z podjednostką egzocystu SEC3A i z małymi GTPazami ROP (Lavy i in., 2007). SEC3 u roślin i zwierząt nie ma znanego z komórek drożdży motywu oddziałującego bezpośrednio z Cdc42, małą GTPazą Rho. U zwierząt w oddziaływaniu między Rho a SEC3 pośredniczy białko IQGAP1. Podobnie, ICR1/RIP1 działa jako rusztowanie (ang. scaffold) łączące małe GTPazy ROP z egzocystem (Nagawa i in., 2010).

Mutant *icr1* wykazuje zaburzenia w rozwoju embrionalnym, wykształca zdeformowane komórki epidermy liścia o kształcie sześciennym, ale niezmienione trichomy. Zaobserwowano także spadek liczby komórek macierzystych korzenia i zapadnięcie merystemu. Rośliny *icr1* mają skrócony korzeń pierwotny, wykształcają też agrawitropiczne korzenie przybyszowe, które zanikają po osiągnięciu 2-3 cm długości. Takie zmiany wskazują na nieprawidłowo działający merystem korzenia u mutantów *icr1* (Lavy i in., 2007).

Najnowsze doniesienia na temat białka ICR1 wskazują, że za opisywane zmiany fenotypowe odpowiada zaburzony przepływ auksyn, który to białko reguluje. W promotorze *ICR1* jest zlokalizowany element odpowiedzi na auksynę, a czasoprzestrzenny wzór ekspresji genu jest zgodny kierunkiem przepływu auksyn. Co ciekawe, ICR1 zanika w miejscach lokalnego maksimum stężenia auksyn – prawdopodobnie w wyniku supresji potranskrypcyjnej (Hazak i in., 2010). U mutantu *icr1* jest zaburzona rekrutacja nośników auksyn PIN1 i PIN2 do błony

komórkowej, czemu towarzyszy odwrócenie bazalno-apikalne ich lokalizacji. Wyłączenie (knock-out) ICR1 powoduje opóźniony powrót do błony (egzocytozę) PIN2 podczas recyklicacji. W ten sposób zaburzeniu ulega ukierunkowany przepływ auksyn, powodując obserwowane zmiany fenotypowe (Hazak i Yalovsky, 2010). Gen i białko ICR1 uczestniczą prawdopodobnie w sygnałowej pętli zwrotnej regulowanej auksynami (ang. auxin-regulated feedback loop) (Wu i in., 2011).

Drugim białkiem RIP, które zostało dobrze zbadane jest RIP3/MIDD1. Białko to, podobnie do ICR1, oddziałuje z aktywną GTPazą ROP (ROP11). Niezwykle ciekawa jest lokalizacja subkomórkowa RIP3/MIDD1 – jest to białko związane z mikrotubulami. Obecne na włóknach cytoszkieletu białko RIP3/MIDD1 oddziałuje ze specyficzną dla roślin kinezyną 13A (Mucha i in., 2010). W kolejnych pracach pokazano, że RIP3/MIDD1 jest obecne w wydzielonych domenach błony komórkowej, gdzie promuje rozpad mikrotubul korykalnych, tworząc pola pozbawione mikrotubul, odpowiadające jamkom wtórnej ściany komórkowej ksylemu. Wyciszenie *MIDD1* (redukcja poziomu transkryptu do 20%) powoduje odkładanie wtórnej ściany komórkowej bez jamek, a nadekspresja w komórkach nieróżnicujących w ksylem (bez aktywacji VND6) – ogólne przerzedzenie sieci mikrotubul korykalnych (Oda i in., 2010; Oda i Fukuda, 2012).

Podobnie do ICR1, RIP3/MIDD1 składa się z dwóch domen coiled-coil bez rozpoznawalnych motywów katalitycznych i strukturalnych, odpowiedzialnych za wiązanie się białka do cytoszkieletu, błon lub małych GTPaz (Oda i in., 2010). Za oddziaływanie z kinezyną 13A odpowiada domena C-końcowa (Oda i Fukuda, 2013a). Domena N-końcowa wiąże mikrotubule korykalne (Oda i Fukuda, 2013c; Mucha i in., 2010).

Molekularny mechanizm działania RIP3/MIDD1 w komórce ksylemu jest złożony i wymaga zaangażowania wielu dodatkowych białek związanych z sygnalizacją z udziałem małej GTPazy ROP11. W stanie aktywnym ROP11 rekrutuje do błony białko RIP3/MIDD1. Ponieważ samo białko RIP3/MIDD1 nie ma zdolności do depolimeryzacji mikrotubul, oddziałuje ono dodatkowo z kinezyną 13A (Oda i Fukuda, 2013a). Kompleks ROP11-RIP3/MIDD1-kinezyzna 13A jest natomiast obecny w domenach błonowych ograniczanych przestrzennie przez kolejne białka – RopGEF4 i RopGAP3. W tych miejscach dochodzi do zlokalizowanego rozpadu mikrotubul korykalnych. Wraz z depolimeryzującymi mikrotubulami ROP11 jest usuwana z błony, co stanowi samohamujący się system wzajemnej regulacji, prowadzący do powstania wtórnej ściany komórkowej według specyficznego wzoru (Oda i Fukuda, 2012). Domena błonowa powstaje spontanicznie, bez udziału cytoszkieletu, chociaż postuluje się udział w jej ustanawianiu dotąd nieznaną kinazę RPK. Udowodniono także, że w komórkach nie różnicujących w ksylem, obszar domen bogatych w aktywną GTPazę ROP11 jest ograniczony fizycznie przez same mikrotubule (Oda i Fukuda, 2013c).

RIP3/MIDD1 pośredniczące w oddziaływaniu GTPazy ROP11 z kinezyną 13A i mikrotubulami jest kolejnym, po ICR1, białkiem z rodziny RIP, pełniącym funkcję białka rusztowania. Małe GTPazy ROP modulują dynamikę cytoszkieletu, która ma wpływ także na przepływ auksyn. Dotychczas nie ustalono, czy RIP3/MIDD1 ma związek z transportem auksyn, ani też nie udowodniono, że ICR1 posiada zdolność wiązania mikrotubul korykalnych lub ogólnie cytoszkieletu (Wu i in., 2011). Białka rusztowania z rodziny RIP mają zdolność oddziaływania z wieloma partnerami, mogą więc być zaangażowane w wiele procesów komórkowych wymagających koordynacji dynamiki cytoszkieletu, błony komórkowej i ściany komórkowej (Oda i Fukuda, 2013c). Są to zatem swoiste białka roślinne współtworzące kontinuum ściana-błona komórkowa-cytoszkielet, których badanie jest dopiero na wstępnym etapie.

Cel pracy

Celem badań realizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było znalezienie nowych oddziaływań białko-białko na szlakach sygnalizacyjnych regulujących transport pęcherzykowy u roślin. Zakres poszukiwań zawężono do szlaku sekrecyjnego – egzocytozy. Pracę podzielono na następujące zadania cząstkowe:

1. Sprawdzenie, czy wybrane białka-czynniki wymiany nukleotydów guaninowych małych GTPaz ARF (ARF-GEF) oddziałują z podjednostkami kompleksu egzocyst. Takie oddziaływania opisano w komórkach ssaczy, gdzie podjednostka egzocystu Exo70 asocjowała z ortologiem ARF-GEF, białkiem BIG2, w kompleksach poruszających się wzdłuż mikrotubul komórek HepG2 (Xu i in., 2005)
2. Opisanie roli niebadanych dotąd białek RIP, które uważa się za partnerów małych GTPaz ROP odpowiadających głównie za kontrolę spolaryzowanego wzrostu komórek. Dotychczas dowiedziono, że białko ICR1/RIP1 oddziałuje z podjednostką kompleksu egzocyst SEC3A oraz, że bierze udział w kontroli spolaryzowanego przepływu auksyn (Li i in., 2008; Hazak i in., 2014). Ponadto inne białko RIP – MIDD1 jest niezbędne do odkładania wtórnej ściany komórek ksylemu według określonego wzoru (Oda i Fukuda, 2012).
3. Zbadanie, czy białka RIP pośredniczą w spotkaniach małych GTPaz ROP z ich efektorami z rodziny białek RIC oraz, czy same białka RIC mogą pośredniczyć w sygnalizacji GTPaz ROP do egzocystu.

Postawione cele zrealizowano przy pomocy narzędzi inżynierii genetycznej, molekularnej biologii komórki oraz przede wszystkim mikroskopii konfokalnej i mikroskopii czasu trwania fluorescencji.

Materiały i metody

W eksperymentach wykorzystywano wodę ultraczystą z systemu Milli-Q Simplicity 185 (Millipore) oraz odczynniki firm SIGMA lub POCH (jeśli nie wspomniano innego dostawcy). Odczynniki i materiały wymagające sterylizacji autoklawowano przez 22 min w 121°C przy 1,4 bara [Medical Prestige Classic]. Syntezę krótkich oligonukleotydów zlecano firmie SIGMA Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Sekwencjonowanie plazmidów i produktów PCR zlecano Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii UAM. Reakcje trawienia restrykcyjnego wykonywano używając enzymów FastDigest (Thermo Scientific) lub New England Biolabs (postępowano zgodnie z zaleceniami producentów).

1. Uprawa roślin

Do badań wykorzystano roślinę modelową *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity, ekotyp Columbia-0). Nasiona typu dzikiego (WT) otrzymano z kolekcji nasion Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM.

1.1 Uprawa *Arabidopsis* w glebie

Skład pożywki do podlewania roślin rosnących na podłożu torfowym:

KNO ₃	5 mM
KH ₂ PO ₄	2,5 mM
MgSO ₄	2 mM
Ca(NO ₃) ₂	2 mM
Fe-EDTA	3 mM

Mikroelementy (70 μM H₃BO₃; 1 μM ZnSO₄; 1 μM Na₂MoO₄; 0,5 μM CuSO₄; 0,1 μM CoCl₂; 14 μM MnCl₂; 10 μM NaCl)

Krażki torfowe [Jiffy Products] poddawano spęcznieniu w pożywce, następnie sterylizowano je umieszczając na 20 min pod lampą UV. Przed wysiewem opryskiwano roztworem wodnym (1:200 v/v) preparatu grzybobójczego Amistar 250 S.C. [Syngenta]. Nasiona *Arabidopsis* sterylizowano przed wysiewem poprzez płukanie kolejno w 30% roztworze ACE [Procter&Gamble], 70% roztworze etanolu i trzykrotnie w sterylnej wodzie. Nasiona suszono w komorze laminarnej i wysiewano na podłoża sterylną wykałaczką, podlewano pożywką i umieszczano w chłodni (4°C) na 24 h (wernalizacja). Uprawę prowadzono w komorze hodowlanej [Panasonic/Sanyo MLR-350H] przy fotoperiodzie 16 h światła/8 h ciemności, wilgotności 70% i temperaturze 22°C.

W celu uniknięcia krzyżowania roślin, osobniki z wykształconymi zawiązkami kwiatów umieszczano w osłonkach Arasystem.

1.2 Uprawa *Arabidopsis* na pożywce stałej w warunkach *in vitro*

Skład pożywki stałej ½ MS (Moorashige & Skoog):

MS medium (including vitamins) [Duchefa]	2,2 g/l
sacharoza	10 g/l
Phytoagar	8 g/l

Przed dodaniem agaru ustalano pH pożywki do wartości 5,6 przy pomocy KOH. Następnie pożywkę sterylizowano w autoklawie (121°C | 20 min) i wylewano na szalki Petriego w sterylnych warunkach. Nasiona *Arabidopsis* sterylizowano i wysiewano j/w. Szalki

umieszczano w chłodni (4°C) na 24 h (wernalizacja), po czym umieszczano je w fitotronie w pozycji leżącej lub pionowo, w statywach.

2. Izolacja i transfekcja protoplastów z mezofilu liści *Arabidopsis*

Procedurę izolacji protoplastów zoptymalizowano w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM, i opisano w Smolarkiewicz i in., 2014.

Skład buforów użytych do izolacji protoplastów:

ENZ		W5	
Cellulase R10 [SERVA]	1,2% (w/w)	NaCl	154 mM
Macerozyme R10 [SERVA]	0,4% (w/w)	CaCl ₂	125 mM
KCl	20 mM	KCl	5 mM
MES	20 mM	MES	2 mM

MMG		PEG		W1	
mannitol	400 mM	PEG4000	40% (w/w)	mannitol	500 mM
MgCl ₂	15 mM	mannitol	200 mM	KCl	20 mM
MES	4 mM	CaCl ₂	100 mM	MES	4 mM

10 ml buforu ENZ inkubowano 10 min w 55°C w celu zaktywowania enzymów. Przystudzony do temperatury pokojowej (RT) bufor filtrowano przez filtr o porach 0,22 µm [ROTH] na szalkę Petriego. Z 4-6 tygodniowych osobników *Arabidopsis* odrywano liście rozety tuż za końcem blaszki i umieszczano (dokładnie przyklejając) pomiędzy dwoma fragmentami taśmy klejącej Scotch Magic Tape. Taśmy rozdzielano, powodując rozwarstwienie liścia – na jednym fragmencie taśmy pozostawała sama skórka, na drugim skórka wraz z mezofilem. Ten fragment umieszczano na szalce w roztworze ENZ. Każdorazowo trawiono mezofil z 6-8 liści. Szalkę z liśćmi inkubowano 1 h w 30°C z wytrząsaniem 50 rpm. Fragmenty taśmy usuwano, bufor ENZ z protoplastami przenoszono do 50 ml próbówki Falcon umieszczonej w lodzie. Protoplasty osadzano na dnie wirując próbówkę przy 200 g przez 3 min w 4°C [wirówka Eppendorf 5804R; rotor uchylony]. Następnie osad dwukrotnie płukano w 15 ml buforu W5 (dokładnie i delikatnie zawieszając osad), wirowano przy 150 g. Po drugim płukaniu osad zawieszano w 1 ml buforu MMG. Z 20 µl zawiesiny przygotowywano preparat mikroskopowy, aby ocenić jej gęstość i kondycję protoplastów w mikroskopie świetlnym [Zeiss AxioScope 2 Plus] (optymalnie, sferyczne protoplasty w preparacie nie powinny stykać się, zachowując odstęp ok. 1 średnicy komórki).

Transfekcję protoplastów przeprowadzano w 2 ml próbkach o zaokrąglonym dnie. Do 3 µg odpowiedniego plazmidu (lub kilku plazmidów, w przypadku kotransfekcji) dodawano 100 µl zawiesiny protoplastów i 110 µl buforu PEG. Całość mieszaniny dokładnie, ale delikatnie, mieszano i inkubowano 15 min. Następnie dodawano 450 µl buforu W5, mieszano przez obracanie próbówki i osadzano protoplasty wirując przez 3 min przy 300 g w RT. Osad protoplastów zawieszano w 300 µl buforu W1 i inkubowano przynajmniej 4 h w ciemności w RT.

3. Transformacja genetyczna siewek *Arabidopsis*

Transformację czterodniowych siewek przeprowadzono wykorzystując bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Postępowano zgodnie z protokołem metody FAST (Li i in., 2009) bez żadnych modyfikacji.

4. Hodowla i transformacja genetyczna bakterii

W pracy wykorzystano następujące gatunki bakterii z kolekcji Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM:

Escherichia coli, szczep DH5 α o genotypie:

F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(*r_K⁻m_K⁺*), λ ⁻*

Jest to szczep powszechnie wykorzystywany w inżynierii genetycznej. Brak represora DeoR powoduje konstytutywną produkcję deoksyrybozy umożliwiając wydajną propagację dużych plazmidów i szybszy wzrost komórek. Zmutowana endonukleaza 1 zapobiega degradacji izolowanych plazmidów. Podjednostka A gyrazy DNA wrażliwa na toksynę CCdB umożliwia wykorzystywanie szczepu do negatywnej selekcji plazmidów z sekwencją kodującą *ccdB*, na przykład po reakcjach rekombinacji Gateway.

Escherichia coli, szczep DB3.1 o genotypie:

F- *gyrA462 endA1 glnV44 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(*r_B⁻, m_B⁻) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δ leu mtl1**

Szczep zawiera zintegrowany z genomem gen oporności na streptomycynę. Dzięki zmutowanej podjednostce A gyrazy DNA jest możliwa propagacja plazmidów z sekwencją kodującą *ccdB*, na przykład plazmidów DEST systemu Gateway.

Agrobacterium tumefaciens, szczep GV3101 o genotypie C58

Szczep zawiera zintegrowany z genomem gen oporności na rifampicynę. Nopalinowy plazmid Ti został rozbrojony, ale wymaga aktywacji acetosyringonem.

Skład pożywek do hodowli bakterii:

LB (pH 7,0)		YEB	
bacto trypton	1% (w/v)	ekstrakt wołowy	0,5% (w/v)
ekstrakt drożdżowy	0,5% (w/v)	ekstrakt drożdżowy	0,1% (w/v)
NaCl	1% (w/v)	pepton	0,5% (w/v)
		sacharoza	0,5% (w/v)
		MgCl ₂	2,5 mM
agar (dla pożywek zestalonych)			1% (w/v)

4.1 Przygotowanie komórek kompetentnych *Escherichia coli*

Skład buforów służących do przygotowania komórek kompetentnych *E. coli*:

CM1 (pH 5,6)		CM2 (pH5,6)	
octan sodu	10 mM	octan sodu	10 mM
MnCl ₂	50 mM	CaCl ₂	70 mM
RbCl	100 mM	MnCl ₂	5 mM
glicerol	15% (v/v)	NaCl	5 mM
		RbCl	10 mM
		glicerol	15% (v/v)

25 ml pożywki LB inokulowano bakteriami z pożywki stałej i hodowano 24 h w 37°C z wytrząsaniem 90 rpm. Następnie pobrano 4 ml hodowli, inokulowano 100 ml świeżej pożywki LB i hodowano do uzyskania OD₆₀₀ = 0,3. Hodowlę schłodzono w 15 min w lodzie, po czym bakterie osadzano na dnie 50 ml probówki falcon wirując 10 min w 4°C przy 3000 g. Osad zawieszano w 20 ml schłodzonego buforu CM1, inkubowano 20 min na lodzie. Bakterie ponownie wirowano, osad zawieszano w 4 ml buforu CM2 i inkubowano na lodzie 3 h. Bakterie

porcjowano po 100 µl do 1,5 ml probówek typu eppendorf i zamrażano w ciekłym azocie, przechowywano w temp. -80°C.

4.2 Transformacja komórek kompetentnych *Escherichia coli*

100 µl komórek kompetentnych rozmrażano na lodzie. Do każdej próby dodawano 2-50 ng DNA i inkubowano 5 min. Próby przenoszono z lodu do bloku grzejjego na 2 min w 42°C (szok cieplny) i ponownie umieszczano w lodzie na 5 min. Następnie dodawano 500 µl pożywki LB (RT) i inkubowano próby w 37°C przez 45 min wytrząsając 600 rpm (Eppendorf Thermomixer Comfort). Po inkubacji próby służyły do inokulacji pożywki płynnej lub posiewu na pożywkę stałą (próby wirowano 90 s przy 6000 rpm, osad przed posiewem zawieszano w 100 µl pożywki LB) z odpowiednimi antybiotykami selekcyjnymi.

4.3 Transformacja komórek *Agrobacterium tumefaciens*

25 ml pożywki LB inokulowano bakteriami z pożywki stałej i hodowano 24 h w 28°C z wytrząsaniem 200 rpm. Hodowlę schładzano w lodzie przez 15 min i przenoszono do schłodzonej 50 ml probówki falcon. Bakterie osadzano wirując probówkę 6 min w 4°C przy 3000 rpm. Osad zawieszano w 1 ml 20 mM CaCl₂ schłodzonego w lodzie. Do 1,5 ml probówek typu eppendorf przenoszono 100 µl zawiesiny bakteryjnej i dodawano 1 µg odpowiedniego plazmidu. Bakterie zamrażano w ciekłym azocie, przenoszono na 5 min do 37°C i umieszczano w lodzie. Następnie dodawano 1 ml pożywki LB i inkubowano 3 h w 28°C przy 200 rpm. Bakterie posiewano na zestalone pożywki LB z odpowiednimi antybiotykami selekcyjnymi uprzednio wirując próby 30 s przy 10 000 rpm i zawieszając osad w 100 µl pożywki.

4.3.1 Weryfikacja pozytywnych kolonii bakterii

Identyfikację kolonii bakterii zawierających zrekombinowany plazmid przeprowadzano wykorzystując technikę PCR. Domyślnie sprawdzano 15 kolonii (w przypadku wyniku negatywnego sprawdzano kolejne kolonie).

Przygotowywano szalkę z zestaloną pożywką LB z odpowiednimi antybiotykami selekcyjnymi, podzieloną na 15 ponumerowanych pól. Następnie przygotowywano 15 probówek PCR z mieszaniną reakcyjną PCR, zawierającą startery specyficzne dla wstawki dodawanej do plazmidu. Jednorazowymi końcówkami do pipet przesiewano pojedynczo kolonie na kolejne pola na szalce. Końcówki po posiewie umieszczano w odpowiednich probówkach z mieszaniną PCR. Następnie dokładnie zawieszano pozostałości bakterii z końcówek w mieszaninie PCR. Końcówki usuwano, a próbówki przenoszono do termocyklera i przeprowadzano reakcję PCR. Wynik reakcji sprawdzano elektroforetycznie. Szalka z numerowanymi polami służyła, po 24 h inkubacji w 37°C, do rozpoczęcia hodowli płynnej klonów pozytywnie zweryfikowanych techniką PCR.

5. Izolacja całkowitego RNA z tkanek *Arabidopsis* i odwrotna transkrypcja

Całkowity RNA z tkanek roślinnych izolowano zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego – wykorzystano samodzielnie przygotowany (podobnie jak pozostałe bufory) bufor Trizol. Protokół, opracowany w Instytucie Maxa Plancka w Golm, otrzymano dzięki uprzejmości dra Przemysława Nuca. RNA wyizolowano z 1-tygodniowych siewek, liści rozety 5-tygodniowych roślin i rozwiniętych kwiatów *Arabidopsis*.

5.1 Izolacja RNA całkowitego z tkanek roślinnych

W pracy z RNA korzystano z wody Mili-Q z dodatkiem DEPC (do wody dodawano 1% DEPC (v/v) i autoklawowano).

5.1.1 Przygotowanie fenolu nasyconego octanem sodu do ekstrakcji RNA

Do butelki z ciemnego szkła dodawano 100 ml Roti Aqua Phenol [ROTH] i 100 ml 100 mM roztworu octanu sodu. Płyny intensywnie mieszano używając mieszadła magnetycznego i pozostawiano na 4 h w 4°C. Następnie roztwór ogrzewano do RT, usuwano fazę wodną (pozostawiając ok. 5 mm), dodawano 50 µl β-merkaptoetanolu i ponownie mieszano. Fenol przechowywano w ciemnej, szczelnie zamkniętej butelce w 4°C, wykorzystując go według potrzeb.

5.1.2 Przygotowanie fenolu nasyconego Tris o pH 8 do ekstrakcji DNA/cDNA

Do butelki z ciemnego szkła dodawano 100 ml Roti Aqua Phenol [ROTH], 100 ml 500 mM buforu Tris-HCl o pH 8 oraz 100 µl 500 mM EDTA. Płyny intensywnie mieszano przez 30 min używając mieszadła magnetycznego, cały czas utrzymując je w postaci emulsji. Następnie pozwalano fazom na separację i usuwano fazę wodną. Do fenolu dodawano 100 ml 100 mM buforu Tris-HCl i ponownie intensywnie mieszano przez 30 min, po czym usuwano fazę wodną. Płukanie 100 mM Tris-HCl powtarzano jeszcze trzykrotnie. Po ostatnim płukaniu pozostawiano ok. 5 mm fazy wodnej, dodawano 50 µl β-merkaptoetanolu i ponownie mieszano. Fenol przechowywano w ciemnej, szczelnie zamkniętej butelce w 4°C, wykorzystując go według potrzeb.

5.1.3 Przygotowanie buforu octan sodu/chlorek sodu do wytrącania kwasów nukleinowych.

Bufor o stężeniu 0,8 M octan sodu i 1,2 M NaCl przygotowywano rozpuszczając 23,53 g octanu sodu i 7 g chlorku sodu w 100 ml wody. Następnie roztwór filtrowano do sterylnej butelki i autoklawowano.

5.1.4 Skład i przygotowanie buforu Trizol

fenol nasycony 100 mM octanem sodu	38% (v/v)
tiocyjanian guanidyny [ROTH]	800 mM
tiocyjanian amonu [ROTH]	400 mM
octan sodu	100 mM
glicerol	5% (v/v)
EDTA	5 mM
lauroilosarkozynian sodu	0,5 % (v/v)

Do butelki z ciemnego szkła dodawano 38 ml fenolu i 3,34 ml 3M roztworu octanu sodu, mieszano. Następnie rozpuszczano 11,816 g tiocyjanianu guanidyny i 7,612 g tiocyjanianu amonu w 49 ml wody. Roztwór dodawano do fenolu, mieszano, po czym dodawano 10 ml 50% glicerolu i dokładnie mieszano. Do butelki odparowywano ciekły azot z probówki eppendorf i szczelnie ją zamykano. Butelkę przechowywano w 4°C w ciemności.

Bezpośrednio przed izolacją RNA do 15 ml probówki falcon pobierano z butelki 9,6 ml Trizolu, do którego dodawano 100 µl 500 mM roztworu EDTA i 500 µl 10% (w/v) roztworu lauroilosarkozynianu sodu.

5.1.5 Homogenizacja tkanki, liza i ekstrakcja RNA

100 mg tkanki homogenizowano w moździerz używając ciekłego azotu. Sproszkowaną tkankę przenoszono do schłodzonych 2 ml probówek typu eppendorf, które umieszczano

w ciekłym azocie. Probówki wyjmowano z azotu, pozostawiano na 1 min w RT (pozwalając na odparowanie azotu). Do prób dodawano dwukrotnie 750 μ l buforu Trizol, dokładnie zawieszając w nim materiał i pozostawiano na 5 min w RT (w tym czasie kilkakrotnie obracano probówki). Następnie dodawano 300 μ l chloroformu, ekstrahowano przez obracanie probówek i pozostawiono na 3 min w RT. Próby wirowano 8 min w 4°C przy 12 000 g [Eppendorf 5417R]. Ok. 1 ml fazy wodnej przenoszono do nowej probówki i dwukrotnie ekstrahowano (używając mieszadła typu vortex) 400 μ l mieszaniny chloroform/fenol nasycony octanem sodu (stosunek 3:1 (v/v)) – próby wirowano 3 min z maksymalną prędkością, najpierw w 4°C, następnie w RT. Do prób dodawano 400 μ l chloroformu, ekstrahowano i ponownie wirowano 3 min w RT. W trakcie wirowania przygotowywano odpowiednią ilość probówek 2 ml z 500 μ l izopropanolu, do których następnie przenoszono fazę wodną po ekstrakcji i dodawano 500 μ l buforu octan sodu/NaCl. Po wymieszaniu próby inkubowano 5 min w RT i wirowano 15 min w 4°C z maksymalną prędkością. Supernatant usuwano całkowicie, a osad RNA przemywano trzykrotnie 75% etanolem (pierwszy raz 500 μ l, następnie 150 μ l, wirowano 2 min w 4°C z maksymalną prędkością). Przemity osad suszono w RT i zwieszano w 80 μ l wody.

5.2 Trawienie DNA genomowego

Obecny w próbach DNA genomowy usuwano w reakcji trawienia endonukleazą. Używano zestawu odczynników RQ1 RNase-Free DNase [Promega]. Ilość RNA w każdej próbce wynosiła 6 μ g (reakcję prowadzono w 10 μ l). Postępowano zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie próby łączono ze sobą (5-10 prób) i ekstrahowano RNA – postępowano zgodnie z procedurą ekstrakcji chloroformem z kwaśnym fenolem dla homogenizowanej tkanki używając ich w stosunku objętości 1:1. Stężenie i czystość RNA mierzono spektrofotometrycznie [Nanodrop ND1000], a jego jakość oceniano elektroforetycznie. Do prób dodawano 1 μ l inhibitora RNaz RiboLock [Thermo Scientific].

5.3 Odwrotna transkrypcja – synteza DNA komplementarnego do mRNA (cDNA)

Syntezę cDNA przeprowadzono używając gotowego zestawu odczynników SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix [Thermo Scientific] podążając za wskazówkami producenta. Do każdej próby dodawano 3 μ g całkowitego RNA po trawieniu DNazą (całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μ l). Jako starterów używano oligo(dT)₂₀. Po zakończeniu reakcji i inaktywacji enzymu próby przechowywano w -20°C. W reakcjach PCR używano 2 μ l mieszaniny reakcyjnej jako matrycy.

6. Przygotowanie konstrukcji genetycznych

6.1 Reakcje PCR, elektroforeza i oczyszczanie DNA

6.1.1 Amplifikacja DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy PCR

Amplifikacje sekwencji kodujących badanych białek i elementów wektorów wykonywano używając polimerazy Phusion High-Fidelity [Finnzymes/Thermo Scientific]. Do potwierdzania obecności w koloniach bakterii pożądanym plazmidów wykorzystywano polimerazę AllegroTaq [Novazym]. Przygotowywano mieszaniny reakcyjne o składzie:

Bufor reakcyjny	Stężenie 1x	
dNTPs	0,2 mM	
Startery F i R	0,5 μM każdego	
MgCl ₂	2,5 mM (AllegroTaq)	4,5 mM (Phusion)
Polimeraza	0,5 U (AllegroTaq)	0,4 U (Phusion)
Matryca DNA	<ul style="list-style-type: none"> – 2-5 ng oczyszczonego plazmidu – 100 ng oczyszczonego produktu PCR/syntezy DNA – 2 μl mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji – pozostałość po posiewie 1 kolonii bakterii (por.) 	

Reakcje PCR prowadzono w objętości 10 μl. Stosowano, zależnie od pożądanego produktu, trzy profile termiczne reakcji [termocyklery Eppendorf MasterCycler 5331 i Applied Biosystems 2720]:

PCR potwierdzająca obecność pożądanego plazmidu w koloniach bakterii (AllegroTaq)			
Temperatura (°C)	Czas (s)		Uwagi
95	600		Wydłużone wstępne przegrzanie mieszaniny reakcyjnej mającej na celu lizę bakterii
95	10	x15	Stosowano temperatury obliczane przez program SerialCloner
Specyficzna dla pary starterów	15		
72	15/1 kb produktu		
72	180		
4	-		Końcowa inkubacja zabezpieczająca produkty
PCR amplifikująca sekwencje kodujące i fragmenty plazmidów (Phusion)			
98	180		
98	10	x25	Stosowano temperatury obliczane przez program SerialCloner
Specyficzna dla pary starterów	15		
72	30/1 kb produktu		
72	180		
4	-		Końcowa inkubacja zabezpieczająca produkty
Dwustopniowa PCR dodająca do produktu miejsca restrykcyjne (Phusion)			
98	180		
98	10	x5	Temperatura topnienia fragmentu komplementarnego do matrycy (obliczana przez program SerialCloner)
Specyficzna dla pary starterów	15		
72	15/1 kb produktu		
98	10	x25	Temperatura topnienia starterów z dodanymi miejscami restrykcyjnymi wynosiła zawsze ≥ 68°C (obliczana przez program SerialCloner)
68	15		
72	15/1 kb produktu		
72	300		
4	-		Końcowa inkubacja zabezpieczająca produkty

6.1.2 Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Skład buforu TAE do elektroforezy i przygotowywania żeli:

Tris (pH 8,3) 40 mM

Kwas octowy 20 mM

EDTA 1 mM

Skład buforu do nakładania prób na żel (tzw. obciążacz; dodawano go do prób bezpośrednio przed nałożeniem na żel w stosunku 1:3 (v/v)):

Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM

EDTA 60 mM

glicerol 60% (v/v)

bromofenol 0,03 % (w/v)

xylen cyanol FF 0,03% (w/v)

Produkty reakcji PCR, a także trawień restrykcyjnych oraz DNA i RNA po izolacji rozdzielano elektroforetycznie w żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydyny (0,5 µg/ml żelu). Oceniano wielkość cząsteczek i jakość materiału (sprawdzano obecność produktów niespecyficznych i smug powstających w wyniku degradacji materiału). Najczęściej przygotowywano żele o stężeniu 1% agarozy w buforze TAE, a jeśli planowano eluować DNA z żelu, stężenie agarozy zmniejszano do 0,7%. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 7V/cm długości żelu. W zależności od spodziewanej wielkości rozdzielanych cząsteczek używano wzorców Gene Ruler DNA 100 bp lub 1 kb [Thermo Scientific]. Obrazy rozdzielów elektroforetycznych dokumentowano w systemie G:BOX F3 [Syngene].

6.1.3 Oczyszczanie DNA po elektroforezie i reakcjach enzymatycznych

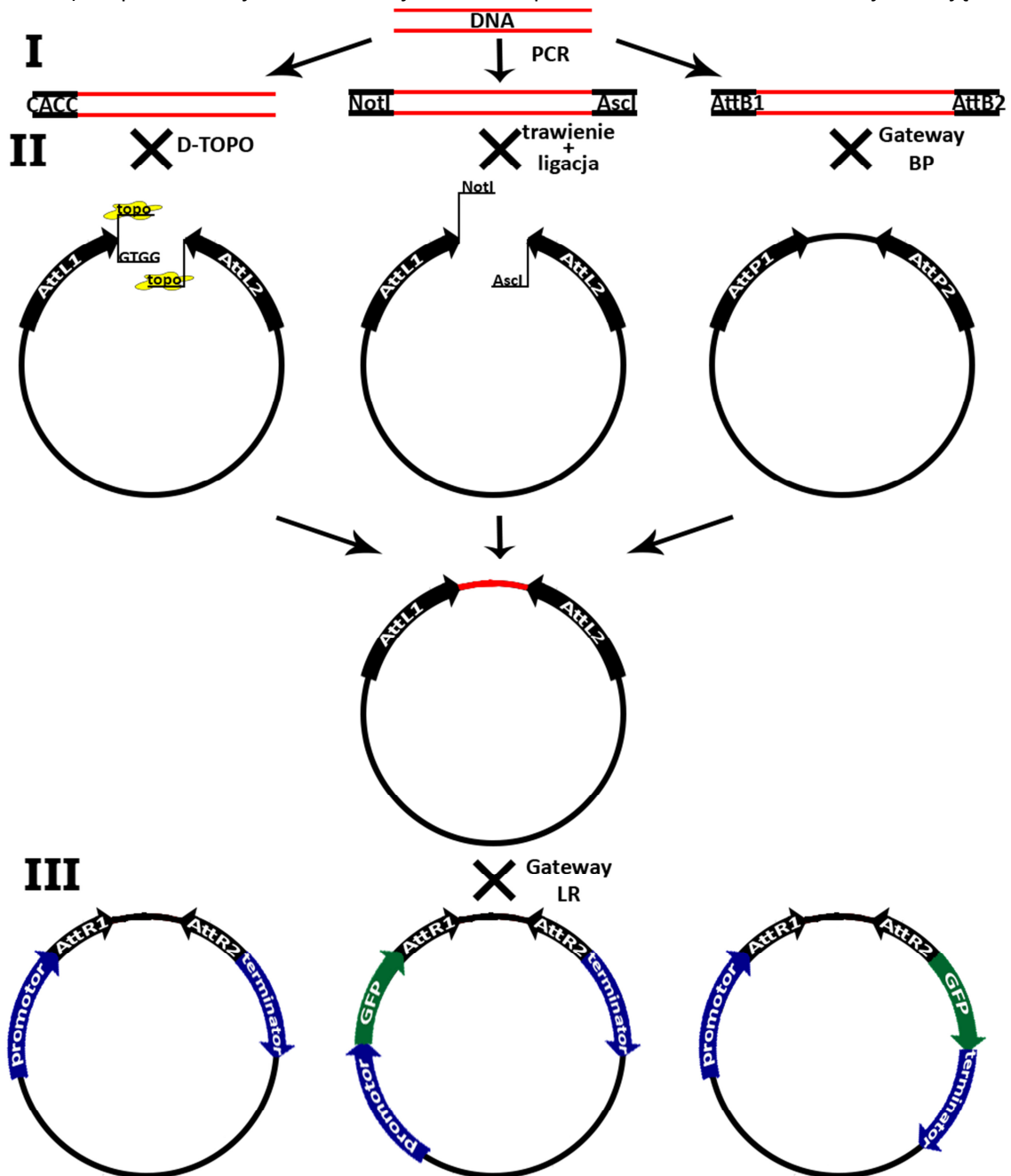
Prążki DNA obecne w żelu na odpowiedniej wysokości wycinano skalpelem. Elucję DNA wykonywano zestawem odczynników GenElute Gel Extraction Kit [SIGMA]. Do oczyszczania produktów reakcji PCR i trawienia restrykcyjnego z pozostałości mieszaniny reakcyjnej używano zestawu GenElute PCR Clean-up Kit [SIGMA]. Obu zestawów używano zgodnie z załączonym przez producenta protokołem. Oczyszczony DNA, zawieszony w buforze 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), wykorzystywano w kolejnych etapach pracy.

6.2 Klonowanie sekwencji kodujących z genów badanych białek

Wykorzystując jako matrycę cDNA z tkanek Arabidopsis zamplifikowano sekwencje kodujące z genów badanych białek. Korzystano z matryc cDNA otrzymanych z tkanek, gdzie wykazano wysoki poziom ekspresji badanych genów (wg baz danych Genevesigator). Produkty PCR wprowadzano do wektora pENTR/D-TOPO metodą wykorzystującą topoizomerazę (system D-TOPO [Thermo Scientific]) lub miejsca restrykcyjne. Sekwencje kodujące wybrane podjednostki kompleksu egzocyst, wprowadzone do wektorów typu pENTR, otrzymano od dr Anny Kasprowicz-Maluśki z ZBMiK.

Wszystkie konstrukcje genetyczne służące do nadekspresji badanych białek w roślinach przygotowano posługując się systemem rekombinacji DNA Gateway [Thermo Scientific/Invitrogen]. Metoda ta zakłada składanie kasety ekspresyjnej w dwóch etapach w oparciu o specyficzne reakcje rekombinacji przeprowadzane przez enzymy fagowe. W pierwszym etapie pożądaný fragment DNA wprowadza się do niewielkiego wektora typu pENTR, tworząc tzw. klon wejściowy (ang. entry clone). Następnie, w wyniku reakcji rekombinacji, fragment DNA jest umieszczany pomiędzy promotorem a terminatorem

większego wektora ekspresyjnego typu pDEST (tzw. wektor przeznaczenia, ang. destination vector). W pobliżu miejsc rekombinacji wektorów pDEST można umieścić sekwencje kodujące



Rycina 4 Schemat tworzenia wektorów ekspresyjnych w systemie Gateway [Thermo]. I – w reakcji PCR na matrycy cDNA sekwencje kodujące badane białka wydłużano o odpowiednie adaptory; II – sekwencje kodujące wprowadzono do wektora wejściowego (pENTR) systemu Gateway; III – sekwencje kodujące przenoszono do wybranych wektorów ekspresyjnych, kompatybilnych z systemem Gateway (pDEST), w reakcji rekombinacji (Gateway LR).

różnorodne markery, na przykład białka fluorescencyjne. Ostatecznym produktem reakcji rekombinacji będą wtedy plazmidy niosące kasetę umożliwiającą ekspresję białek rekombinowanych (fuzyjnych). Ogólny schemat przyjętego systemu tworzenia wektorów ekspresyjnych zawiera Rycina 4.

6.2.1 Klonowanie sekwencji kodujących białka RIP

Sekwencje kodujące z genów *RIP1/ICR1*, *RIP2*, *RIP3*, *RIP4* i *RIP5* zamplifikowano w reakcji PCR na matrycy cDNA (usunięto kodony STOP). Fragmenty DNA przygotowano do wprowadzenia do wektora pENTR metodą D-TOPO (dodano sekwencję 5'-CACC). Wykorzystano następujące pary starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')	T _m (°C)	Źródło cDNA	Długość produktu (nt)	Accession number
ICR_F	CACC ATGCCAAGACCAAGAGTTTCAG	60/68	Kwiat	1036	NM_202119
ICR_R	CTTTTGCCCTTCTTCCTC	55			
RIP2_F	CACC ATGCAGACTCCAAAACCTAG	56/65	Kwiat	1753	NM_129264
RIP2_R	TTTCTGACTTTTCTTCAGTAAC	55			
RIP3_F	CACC ATGCAGACTCCAAAATCAAG	54/64	Kwiat	1192	NM_115195
RIP3_R	CTTATGGTTTTTCTTGAGTAACAC	58			
RIP4_F	CACC ATGCCAAAACCAAGTATTAGAG	56/65	Kwiat	976	NM_106490
RIP4_R	TTTCTGCCCTTCTTCTTCC	56			
RIP5_F	CACC ATGCAGACCCAAAAGGCAA	55/65	Kwiat	1696	NM_001203650
RIP5_R	TTTCTGAGGCTTCTCCAC	55			

Produkt PCR oczyszczono i wykorzystano w reakcji ligacji D-TOPO. Bakterie *E. coli* DH5α transformowano mieszaniną reakcyjną. Obecność wstawki w plazmidzie sprawdzano wykonując reakcję PCR z wykorzystaniem tych samych par starterów. Następnie izolowano wybrany plazmid (zestaw GenElute Plasmid HP mini) i zlecano sekwencjonowanie z użyciem starterów flankujących wstawkę. Plazmidy niosące pożądane sekwencje wykorzystywano w dalszych etapach badań.

6.2.2 Klonowanie sekwencji kodujących domeny N-końcowe białek RIP

Sekwencje kodujące domeny N-końcowe białek z rodziny RIP zamplifikowano w reakcji PCR na matrycy przygotowanych wcześniej plazmidów pENTR. Produkty PCR przygotowano do wprowadzenia do wektora pENTR/D-TOPO wykorzystując miejsca restrykcyjne NotI i AclI. Wykorzystano następujące pary starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')	T _m (°C)	Długość produktu (nt)
ICRnF	TTAgcggccgcT ATGCCAAGACCAAGAGTTTC	56/75	372 [116 aa z końca N białka ICR1]
ICRnR	TTAgcgcgcctTCTCCACTCGAGCCAGCG	60/79	
RIP2nF	TTAgcggccgcT ATGCAGACTCCAAAACCTAG	56/71	387 [121 aa z końca N białka RIP2]
RIP2nR	TTAgcgcgcctT AATCTCCATTAAGTCTGCTTT	56/71	
RIP3nF	TTAgcggccgcTATGCAGACTCCAAAATCAAG	54/74	378 [118 aa z końca N białka RIP3]
RIP3nR	TTAgcgcgcctTGATATCCATTAAGTCTGCTTG	57/74	
RIP4nF	TTAgcggccgcT ATGCCAAAACCAAGTATTAGAG	56/74	366 [114 aa z końca N białka RIP4]
RIP4nR	TTAgcgcgcctT GTTCGGTTTCTTGATTTCTT	56/74	
RIP5nF	TTAgcggccgcT ATGCAGACCCAAAAGGCAA	55/75	375 [117 aa z końca N białka RIP5]
RIP5nR	TTAgcgcgcctT AACTTCTTGAGCTGTTTCC	56/75	

Produkty PCR oczyszczono i poddano trawieniu enzymami NotI i AclI. Następnie fragmenty DNA wprowadzono do wektora pENTR/D-TOPO w reakcji ligacji. Komórki *E. coli* transformowano mieszaniną ligacyjną, kolonie zawierające plazmid z pożądaną wstawką wyselekcjonowano metodą PCR z wykorzystaniem w/w starterów. Poprawność klonowania sprawdzono zlecając sekwencjonowanie wybranych wektorów.

6.2.3 Klonowanie sekwencji kodujących białka RIP pozbawione domeny N-końcowej

W celu przygotowania konstrukcji genetycznych niosących sekwencje kodujące białka z rodziny RIP pozbawionych ich N-końcowej domeny, zlecono syntezę następujących oligonukleotydów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)
ICRtrNotF	TTTGCGGCCGCTATG GAATCTGCAACTGAGGCTG	57/77	3272
RIP2trNotF	TTTGCGGCCGCTATG AACGCCTCTGAGGATTCCA	57/77	3974
RIP3trNotF	TTTGCGGCCGCTATG AATGCCTCGGAAGATTCAAG	56/77	3422
RIP4trNotF	TTTGCGGCCGCTATG ACTCCTGCTCCGGAGAGA	58/79	3218
RIP5trNotF	TTTGCGGCCGCTATG TCTTCTAAGCTTGAGGAGAG	56/76	3929
ENTRuniNotR	TTT GCGGCCGCGGAGCCTGCTTT	70	-

Oligonukleotydy wykorzystano w PCR, jako matrycy użyto plazmidów pENTR niosących pełne sekwencje kodujące odpowiednich białek RIP. Starter „reverse” ENTRuniNotR, zagnieżdżony w plazmidzie pENTR/D-TOPO, użyto w każdej reakcji. Produktami PCR były sekwencje kodujące białka RIP skrócone o domeny z końca N (por. sekcja 6.2.2) wraz z wektorem pENTR/D-TOPO. Na obu końcach cząsteczek DNA dodano miejsce restrykcyjne NotI (starter ENTRuniNotR zachowywał miejsce NotI obecne w wektorze, startery „forward” dodawały to miejsce wraz z kodonem START). Produkty PCR oczyszczono, strawiono enzymem NotI i poddano autoligacji, otrzymując pożądane, skrócone sekwencje kodujące, wprowadzone do plazmidu pENTR/D-TOPO. Mieszaniną ligacyjną transformowano komórki *E. coli*. Kolonie zawierające odpowiednie sekwencje kodujące białek RIP wyselekcjonowano metodą PCR. Następnie wyizolowano poszczególne plazmidy i zlecono ich sekwencjonowanie z użyciem starterów flankujących wstawkę. Plazmidy niosące poprawnie wklonowane i pożądane fragmenty DNA używano w dalszych etapach badań.

6.2.4 Przygotowanie i klonowanie sekwencji kodującej białka RIP z wprowadzonym wewnątrz polipeptydu białkiem GFP

Przygotowanie sekwencji kodujących białka z rodziny RIP z wprowadzonym wewnątrz polipeptydu białkiem EGFP przeprowadzono według metody opisanej przez Tian i in., 2004. Sekwencję kodującą białka EGFP wydłużono o łączniki dodające elastyczne peptydy (Gly)₅Ala na końcu 5' oraz AlaGly(Ala)₃GlyAla na końcu 3'. W PCR użyto jako matrycy plazmidu pSITE-2CA (wektor zakupiono w repozytorium ABRC) oraz starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)
xFP_GlyF	GGAGGTGGAGGTGGAGCT GTGAGCAAGGGCGAGGAG	60/83	753
xFP_AlalR	GGCCCCAGCCGAGCACCAGC CTTGTACAGCTCGTCCATG	57/86	

Produkt reakcji oczyszczono i używano jako matrycy w kolejnych PCR. Następnie zamplifikowano sekwencje kodujące fragmenty N-końcowe polipeptydów białek z rodziny RIP, dodając na ich końcu 5' miejsce restrykcyjne NotI, a na końcu 3' sekwencję kodującą peptyd (Gly)₅Ala. Matrycę PCR stanowiły wektory pENTR z wprowadzonymi pełnymi sekwencjami kodującymi białka RIP; wykorzystano następujące pary starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)
ICRnF	TTAgcggccgcT ATGCCAAGACCAAGAGTTTC	56/75	945 [305 aa z końca N białka ICR1]
ICR_GlyR	AGCTCCACCTCCACCTCC AGCTGACGGGTCAAAGAAC	57/81	
RIP2nF	TTAgcggccgcT ATGCAGACTCCAAAACCTAG	56/71	753 [241 aa z końca N białka RIP2]
RIP2_GlyR	AGCTCCACCTCCACCTCC AGACATCTTCATACCATCTG	54/79	
RIP3nF	TTAgcggccgcTATGCAGACTCCAAAATCAAG	54/74	735 [235 aa z końca N białka RIP3]
RIP3_GlyR	AGCTCCACCTCCACCTCC TGCTTCAACTGCAGATTTCA	54/79	
RIP4nF	TTAgcggccgcT ATGCCAAAACCAAGTATTAGAG	56/74	976 [282 aa z końca N białka RIP4]
RIP4_GlyR	AGCTCCACCTCCACCTCC CTCCATTGACCCACACTG	56/81	
RIP5nF	TTAgcggccgcT ATGCAGACCCAAAAGGCAA	55/75	732 [234 aa z końca N białka RIP5]
RIP5_GlyR	AGCTCCACCTCCACCTCC CTCGTTTCAGCTTCTGATA		

Analogicznie postępowano amplifikując sekwencje kodujące fragmenty C-końcowe białek RIP, wydłużone o sekwencję kodującą peptyd AlaGly(Ala)₃GlyAla na końcu 5' oraz miejsce restrykcyjne *Ascl* na końcu 3'. W PCR wykorzystano pary starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)
ICR_AlaF	GCTGGTGCTGCGGCTGGGGCC GGGTTCATGGATCCACCG	58/87	150 [39 aa z końca C białka ICR1]
ICR_AscR	TTAggcgcgccTCTTTTGCCTTTCTTCTC	55/75	
RIP2_AlaF	GCTGGTGCTGCGGCTGGGGCC GAAGCTTGTAACTCACTAAC	52/83	1059 [342 aa z końca C białka RIP2]
RIP2_AscR	TTAggcgcgccT TTTCTGACTTTTCTTCAGTAAC	55/73	
RIP3_AlaF	GCTGGTGCTGCGGCTGGGGCC GCAGAGACAAGGTATCAAG	55/85	516 [161 aa z końca C białka RIP3]
RIP3_AscR	TTAggcgcgccT CTTATGGTTTTTCTTGAGTAAC	55/73	
RIP4_AlaF	GCTGGTGCTGCGGCTGGGGCC AAGCATTTTGCAGGCAGGTT	56/85	159 [42 aa z końca C białka RIP4]
RIP4_AscR	TTAggcgcgccT TTTCTGCCCTTCTTCTTCC	56/75	
RIP5_AlaF	GCTGGTGCTGCGGCTGGGGCC GCTTAGCCACTGAACTC	55/85	1023 [330 aa z końca C białka RIP5]
RIP5_AscR	TTAggcgcgccT TTTCTGAGGCTTCTCCAC	55/75	

Produkty PCR oczyszczono i wykorzystano jako matrycę w kolejnej PCR. Ostateczne składanie sekwencji kodujących fragmenty N- i C-końcowy białek RIP z sekwencją EGFP pomiędzy nimi, wykonano przygotowując PCR. Matrycę w reakcji stanowiły trzy przygotowane wcześniej fragmenty DNA, których ilość ustalono w stosunku molowym 1:1:1 oraz dodawano nie mniej niż 50 ng najdłuższej matrycy do 1 reakcji. Wykorzystano pary starterów dodające



Rycina 5 Schemat polipeptydów RIP z osadzonym wewnątrz białkiem EGFP. A – elastyczny łącznik o sekwencji (Gly)₅Ala; B – elastyczny łącznik o sekwencji AlaGly(Ala)₃GlyAla.

miejsca restrykcyjne NotI i AscI, specyficzne względem pełnej sekwencji kodującej białek RIP. PCR prowadzono w następujących warunkach:

Temperatura (°C)	Czas (s)		Uwagi
98	180		
98	20	x30	Wydłużony etap denaturacji sprzyjający rozbięciu niespecyficznym multipleksów DNA
45	30		Wydłużony etap hybrydyzacji z obniżoną temperaturą, promujący składanie matrycy z trzech fragmentów DNA
72	180		
72	180		
4	-		Końcowa inkubacja zabezpieczająca produkty

Produkty reakcji o odpowiedniej długości (1809 nt dla *ICR1*, 2526 nt dla *RIP2*, 1965 nt dla *RIP3*, 1749 nt dla *RIP4*, 2469 nt dla *RIP5*) wyeluowano z żelu agarozowego i użyto jako matrycy w ponownej PCR. Zamplifikowany produkt oczyszczono, strawiono enzymami NotI i AscI, i zligowano z wektorem pENTR/D-TOPO trawionym tymi samymi enzymami. Komórki kompetentne *E. coli* transformowano mieszaniną ligacyjną. Kolonie bakterii niosące pożądanych plazmid wyselekcjonowano metodą PCR. Po propagacji wybranych wektorów poddano je sekwencjonowaniu z użyciem starterów flankujących wstawkę. Wektory o sprawdzonej sekwencji używano w dalszych eksperymentach. Na Rycinie 5 pokazano schemat powstających w komórce białek chimerycznych.

6.2.5 Klonowanie sekwencji kodujących białka ROP

Seqwencje kodujące z genów białek *ROP1*, *ROP2*, *ROP3*, *ROP4*, *ROP5*, *ROP6*, *ROP7*, *ROP8*, *ROP9*, *ROP10*, *ROP11* zamplifikowano w reakcji PCR na matrycy cDNA (kodony STOP pozostawiono). Fragmenty DNA przygotowano do trawienia enzymami NotI i AscI. Wykorzystano następujące pary starterów:

Nazwa startera	Seqwencja (5'->3')	Tm (°C)	Źródło cDNA	Długość produktu (nt)	Accession number
ROP1_Not	TTAgcggccgcT ATGAGCGCTTCGAGGTTC	56/76	Kwiat	618	NM_114989
ROP1_Asc	TTAggcgcgccT TCATAGAATGGAGCATGCCTT	57/75			
ROP2_Not	TTAgcggccgcT ATGGCGTCAAGGTTTATAAAG	55/74	Kwiat	612	NM_101863
ROP2_Asc	TTAggcgcgccT TCACAAGAACGCGCAACG	56/76			
ROP3_Not	TTAgcggccgcT ATGAGCGCTTCGAGGTTC	56/76	Kwiat	618	NM_127334
ROP3_Asc	TTAggcgcgccT TTACAAAATGGAGCAGGCTTT	55/74			
ROP4_Not	TTAgcggccgcT ATGAGTGCTTCGAGGTTTATAAAG	60/76	Kwiat	615	NM_106234
ROP4_Asc	TTAggcgcgccT TCACAAGAACACGACGCGGT	60/78			
ROP5_Not	TTAgcggccgcT ATGAGCGCATCAAGGTTTCAT	56/75	Kwiat	618	NM_119762
ROP5_Asc	TTAggcgcgccT TTACAAGATGGAGCAGGCC	57/76			
ROP6_Not	TTAgcggccgcT ATGAGTGCTTCAAGGTTTATCA	57/74	Kwiat	621	NM_119668
ROP6_Asc	TTAggcgcgccT TCAGAGTATAGAACAACCTTTC	57/74			
ROP7_Not	TTAgcggccgcT ATGAGCACAGCAAGATTCATT	55/74	Siewka	630	NM_123965
ROP7_Asc	TTAggcgcgccT TTATAGGAAAAGCATATTCTTG	54/72			
ROP8_Not	TTAgcggccgcT ATGTCAGCTTCAATGGCTGC	58/76	Siewka	654	NM_130033
ROP8_Asc	TTAggcgcgccT TCAAAGAACATGGCATAAACCG	58/75			
ROP9_Not	TTAgcggccgcT ATGAGTGCTTCGAAGTTCATAAAAT	60/75	Siewka	654	NM_119039

ROP9_Asc	TTAgcgcgccT TTAAGCAGCGGTGCAACCTC	60/78			
ROP10_Not	TTAgcgccgcT ATGGCTTCGAGTGCTTCAAAA	57/75	Siewka	651	NM_114673
ROP10_Asc	TTAgcgcgccT TCAATCTTCCACACAGAATG	58/75			
ROP11_Not	TTAgcgccgcT ATGGCTTCAAGTGCTTCAAAG	57/75	Siewka	672	NM_125682
ROP11_Asc	TTAgcgcgccT TCAATGCCGAGTCACTATC	55/75			

Produkt PCR oczyszczono i poddano trawieniu restrykcyjnymu enzymami NotI, i Ascl. DNA ponownie oczyszczono i zligowano z wektorem pENTR/D-TOPO uprzednio trawionym tymi samymi enzymami. Bakterie *E. coli* transformowano mieszaniną ligacyjną. Obecność wstawki w plazmidzie sprawdzano wykonując reakcję PCR z wykorzystaniem tych samych par starterów. Następnie izolowano wybrany plazmid (zestaw GenElute Plasmid HP mini) i zlecano sekwencjonowanie z użyciem starterów flankujących wstawkę. Plazmidy niosące pożądane sekwencje wykorzystywano w dalszych etapach badań.

6.2.6 Klonowanie sekwencji kodujących białka RIC

Sekwencje kodujące z genów białek *RIC1*, *RIC2*, *RIC3*, *RIC4*, *RIC5*, *RIC6*, *RIC7*, *RIC8*, *RIC9*, *RIC10*, *RIC11* zamplifikowano w reakcji PCR na matrycy cDNA (kodony STOP usunięto). Fragmenty DNA przygotowano do trawienia enzymami NotI i Ascl. Wykorzystano następujące pary starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')	Tm (°C)	Źródło cDNA	Długość produktu (nt)	Accession number
RIC1_Not	TTAgcgccgcT ATGGCGACGACAATGAAGG	57/76	Kwiat	696	NM_128906
RIC1_Asc	TTAgcgcgccT GATAATATCGTTACAGTTGTATC	58/74			
RIC2_Not	TTAgcgccgcT ATGGACAGAAACGGTGCTAATATG	62/77	Siewka	357	NM_102500
RIC2_Asc	TTAgcgcgccT GACGACGGTGCCGGTGAG	63/80			
RIC3_Not	TTAgcgccgcT ATGGCGACCGTGAAAGGC	58/77	Kwiat	684	NM_100325
RIC3_Asc	TTAgcgcgccT CTCTTTGTCCTGATATTATTATC	57/73			
RIC4_Not	TTAgcgccgcT ATGAGAGATAGAATGGAGAG	54/74	Kwiat	483	NM_121654
RIC4_Asc	TTAgcgcgccT TAAAGTTGGATGAAGATGAGG	56/74			
RIC5_Not	TTAgcgccgcT ATGACCTCACCTATGAAGGG	58/76	Kwiat	603	NM_113241
RIC5_Asc	TTAgcgcgccT TCTTCTGTAGAACTCCAAG	57/75			
RIC6_Not	TTAgcgccgcT ATGCAACTCACAATGTCAAGC	57/75	Kwiat	660	NM_127602
RIC6_Asc	TTAgcgcgccT AAAATCATCTCTATTGTGCAATTG	56/73			
RIC7_Not	TTAgcgccgcT ATGCAACTGGAATGTCAAGTA	57/74	Kwiat	672	NM_001036663
RIC7_Asc	TTAgcgcgccT AAACCCATTTCTGTCGTCTTC	57/75			
RIC8_Not	TTAgcgccgcT ATGATCAATTTGCATAACGCAG	56/74	Kwiat	555	NM_001035876
RIC8_Asc	TTAgcgcgccT AGTTAGATATCCTGCATCAGA	56/74			
RIC9_Not	TTAgcgccgcT ATGGCTACAAGATTCAAGGG	56/75	Kwiat	408	NM_001084287
RIC9_Asc	TTAgcgcgccT AGCCAGGACCTTGCTTGA	56/76			
RIC10_Not	TTAgcgccgcT ATGTCAATGAAAATGAAGGGC	56/74	Siewka	492	NM_116728
RIC10_Asc	TTAgcgcgccT GATTAATCGTGATACAGTTGATT	57/73			
RIC11_Not	TTAgcgccgcT ATGGCAATGAAGATGAAGGG	56/75	Siewka	492	NM_001084952
RIC11_Asc	TTAgcgcgccT TGCATTAGAGTTAACCGAGA	55/74			

Produkt PCR oczyszczono i poddano trawieniu restrykcyjnymu enzymami NotI, i Ascl. DNA ponownie oczyszczono i zligowano z wektorem pENTR/D-TOPO uprzednio trawionym

tymi samymi enzymami. Bakterie *E. coli* transformowano mieszaniną ligacyjną. Obecność wstawki w plazmidzie sprawdzano wykonując reakcję PCR z wykorzystaniem tych samych par starterów. Następnie izolowano wybrany plazmid (zestaw GenElute Plasmid HP mini) i zlecano sekwencjonowanie z użyciem starterów flankujących wstawkę. Plazmidy niosące pożądane sekwencje wykorzystywano w dalszych etapach badań.

6.2.7 Klonowanie sekwencji kodującej podjednostkę SEC3A kompleksu egzocyst

Sekwencję kodującą białko SEC3A zamplifikowano wykorzystując jako matrycę wektor binarny pSY-SEC3A otrzymany od dr Anny Kasprovicz-Maluśki. Próby wprowadzenia sekwencji do plazmidu pENTR/D-TOPO z wykorzystaniem topoizomerazy oraz trawienia restrykcyjnego i ligacji nie powiodły się. Postanowiono wprowadzić sekwencję SEC3A bezpośrednio do wektora ekspresyjnego, a znaczniki fluorescencyjne dodawać metodą Gateway. Sekwencję SEC3A wprowadzono do wektorów pSAT5U i pSAT3U zamiast znaczników fluorescencyjnych, korzystając z miejsc restrykcyjnych FseI i SpeI. Produkt PCR otrzymano używając starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Źródło cDNA	Długość produktu (nt)	Accession number
SEC3A_Fse	AATGGCCGGCC ATGGCGAAATCAAGCG	48/72	nd	2682	NM_103648
SEC3A_Spe	CCCGACTAG TCATGGAAGCCAGAAGT	48/70			

Miejsce restrykcyjne SpeI występuje w sekwencji SEC3A, dlatego przeprowadzono dwie rundy trawienia i ligacji. Produkt PCR strawiono, fragmenty o długości ok. 600 nt (flankowany lepkimi końcami FseI-SpeI) i 2000 nt (flankowany lepkimi końcami SpeI-SpeI) wyeluowano z żelu agarozowego. Następnie N-końcowy fragment o długości ok. 600 nt zligowano z wektorami pSAT3U i pSAT5U, trawionymi enzymami FseI i SpeI. Mieszaniną ligacyjną transformowano bakterie *E. coli*, wyselekcjonowano kolonie zawierające prawidłowo wklonowaną wstawkę i namnożono pożądany plazmid przejściowy. Następnie tą samą metodą dodano pozostały fragment sekwencji SEC3A do plazmidów przejściowych (wykorzystano jedynie miejsce restrykcyjne SpeI). Poprawność klonowania sprawdzono zlecając sekwencjonowanie wybranych plazmidów z użyciem starterów flankujących wstawkę. Prawidłowe wektory wykorzystywano w dalszych etapach badań.

6.2.8 Klonowanie sekwencji kodujących białka wiążące się z cytoszkieletem

Sekwencję kodującą domenę wiążącą mikrotubule MBD (ang. microtubule binding domain) mysiego białka MAP4 (ang. microtubule-associated protein 4) zamplifikowano w reakcji PCR (Marc i in., 1998). Jako matrycę wykorzystano plazmid otrzymany od dr Anny Kasprovicz-Maluśki oraz parę starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)	Accession number
MAP4_topoF	CACC TCCCGGCAAGAAGAAGC	56/65	1261	M72414
MAP4_R	GGCACCTCCTGCAGGAAA	58		

Produkt PCR oczyszczono i wprowadzono do wektora pENTR/D-TOPO wykorzystując topoizomerazę (metoda Gateway D-TOPO). Bakterie *E. coli* transformowano mieszaniną ligacyjną. Obecność wstawki sprawdzono metodą PCR. Plazmid niosący pożądaną sekwencję wyizolowano i poddano sekwencjonowaniu z wykorzystaniem starterów flankujących wstawkę.

Sekwencję kodującą LifeAct - krótki peptyd wiążący się do F-aktyny (Riedl i in., 2008), otrzymano hybrydując ze sobą dwa odwrotnie komplementarne do siebie oligonukleotydy o sekwencji:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)
LifeAct_F	CACC ATGGGAGTTGCTGATCTTATTAAGAAGTTTGAATCTATTTCTAAGGAAGAA	65
LifeAct_R	TTCTTCCTTAGAAATAGATTCAAACCTCTTAATAAGATCAGCAACTCCCAT GGTG	65

Otrzymany dwuniciowy fragment DNA wprowadzono następnie do wektora pENTR/D-TOPO wykorzystując topoizomerazę (metoda D-TOPO). Bakterie *E. coli* transformowano mieszaniną ligacyjną. Kolonie zawierające plazmid z wstawką wyselekcjonowano metodą PCR. Wektor wyizolowano i zlecono jego sekwencjonowanie z użyciem starterów flankujących wstawkę. Poprawnie zligowane wektory wykorzystywano do dalszych badań.

6.2.9 Klonowanie sekwencji kodujących białka fluorescencyjne

Sekwencje kodujące białek fluorescencyjnych EGFP, Venus i TagRFP zamplifikowano w reakcji PCR używając jako matryc plazmidów pSITE-2CA, pSITEII-4C1 oraz pSITEII-6C1, odpowiednio. Wykorzystano następujące pary starterów (ta sama dla białek EGFP i Venus) :

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)	Accession number
GFP_F	CACC ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	63/70	721	EF212294 (EGFP)
GFP_R	CTTGACAGCTCGTCCATGCCG	66		GU734655 (Venus)
tRFP_topoF	CACC ATGGTGCTAAGGGCGAAG	57/66	718	GU734657 (TagFRP)
tRFP_R	AGTATTAAGTTTGTGCCCCAG	57		

Produkty PCR oczyszczono i zligowano z wektorem pENTR/D-TOPO wykorzystując topoizomerazę (metoda D-TOPO). Bakterie *E. coli* transformowano mieszaniną ligacyjną. Kolonie zawierające plazmid z wstawką wyselekcjonowano metodą PCR. Wektor wyizolowano i zlecono jego sekwencjonowanie z użyciem starterów flankujących wstawkę. Poprawnie zligowane wektory wykorzystywano do dalszych badań.

6.3 Konstrukcja wektorów pSAT

Konstruując wektory pSAT inspirowano się pracami (Tzfira i in., 2005) i starano się zachować nomenklaturę plazmidów zaproponowaną przez autorów. Korzystano z wektorów pSITEII (Chakrabarty i in., 2007; Martin i in., 2009) oraz zestawu plazmidów pomocniczych pAUX i kompatybilnych z nimi plazmidów binarnych pPZPR (Goderis i Bolle, 2002). Wszystkie wykorzystane w pracy wektory pSITE[II] zakupiono w repozytorium ABRC, natomiast zestaw wektorów pAUX-pPZPR zakupiono w repozytorium ATCC.

6.3.1 Przygotowanie wektorów pSAT3U i pSAT6U wykorzystanych do nadekspresji badanych białek w fuzji z końcem karboksylowym białek fluorescencyjnych

Kasetę ekspresyjną z plazmidu pSITEII-6C1 zamplifikowano w reakcji PCR korzystając z pary starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)	Accession number
Kas_F	TAGCTGTTTGCCAACCGGTCAAC	65	3587	GU734655
KasBsp_R2	ATAGGGCCCCGTCCTACTGGATTTGGTT	52/70		

Starter KasBsp_R2 zmienił miejsce restrykcyjne NotI z końca 3' produktu na miejsce rozpoznawane przez izoschizomer NotI – Bsp120I (uniknięto w ten sposób podwójnego trawienia produktu enzymem NotI w kolejnym etapie, ale zachowano jego kompatybilność z miejscem NotI wektora pAUX). Następnie produkt PCR strawiono enzymami AgeI i Bsp120I i wprowadzono do plazmidów pAUX3169 oraz pAUX3133 trawionych enzymami AgeI i NotI. Otrzymano wektory pSAT3-6C i pSAT6-6C, odpowiednio. Promotor ubikwityny 10 (UBQ10) zamplifikowano z plazmidu otrzymanego od dra Łukasza Gałgańskiego z Zakładu Biotechnologii UAM przy pomocy pary starterów dodających miejsca restrykcyjne AgeI i FseI:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)	Accession number
UBQ10_F	AGCACCGGT GTTGGTGCTTCCTTAC	50/70	1508	CP002687 REGION: 2714765..2716012
UBQ10_R	AATGGCCGGCC CTCGAGCTGTTAATCAG	50/73		

UBQ10 wprowadzono w miejsce podwójnego promotora 35S CaMV otrzymanych w poprzednim etapie wektorów pSAT3 i pSAT6 (miejsca AgeI i FseI), uzyskano wektory pSAT3U-6C i pSAT6U-6C. Następnie, wykorzystując miejsca restrykcyjne FseI i SpeI, w miejsce sekwencji kodującej białko fluorescencyjne TagRFP, wprowadzono sekwencje kodujące białka fluorescencyjne: EBP2, mTFP1, EGFP, Venus. Do amplifikacji sekwencji kodujących białka fluorescencyjne wykorzystano następujące pary starterów dodających do produktu miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne FseI i SpeI:

Nazwa startera	Sekwencja (5'->3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)	Accession number
NpolFse_F	ATTGGCCGGCC ATGGTGAGCAAGGGC	49/74	738	EF517318 (EBFP2)
CpolSpe_R	CCCGACTAGT CTTGTACAGCTCGTC	46/70		EF212294 (EGFP)
TFP1_F	AATGGCCGGCCATGGTGTC	61	728	GU734655 (Venus)
TFP1_R	ATTACTAGTCTTGTAAGCTCATCC	60		nd (mTFP1)

Jako matryca w reakcji PCR posłużyły:

- EBFP2 – wektor pBad-EBP2 pozyskany z repozytorium addgene (Plasmid #14891)
- mTFP1 – fragment DNA, którego syntezę zlecono firmie LifeTechnologies (usługa GeneArt Strings) – plik FASTA z sekwencją genu znajduje się na płycie CD
- EGFP – wektor pSITE-2NB
- Venus – wektor pSITEII-4C1

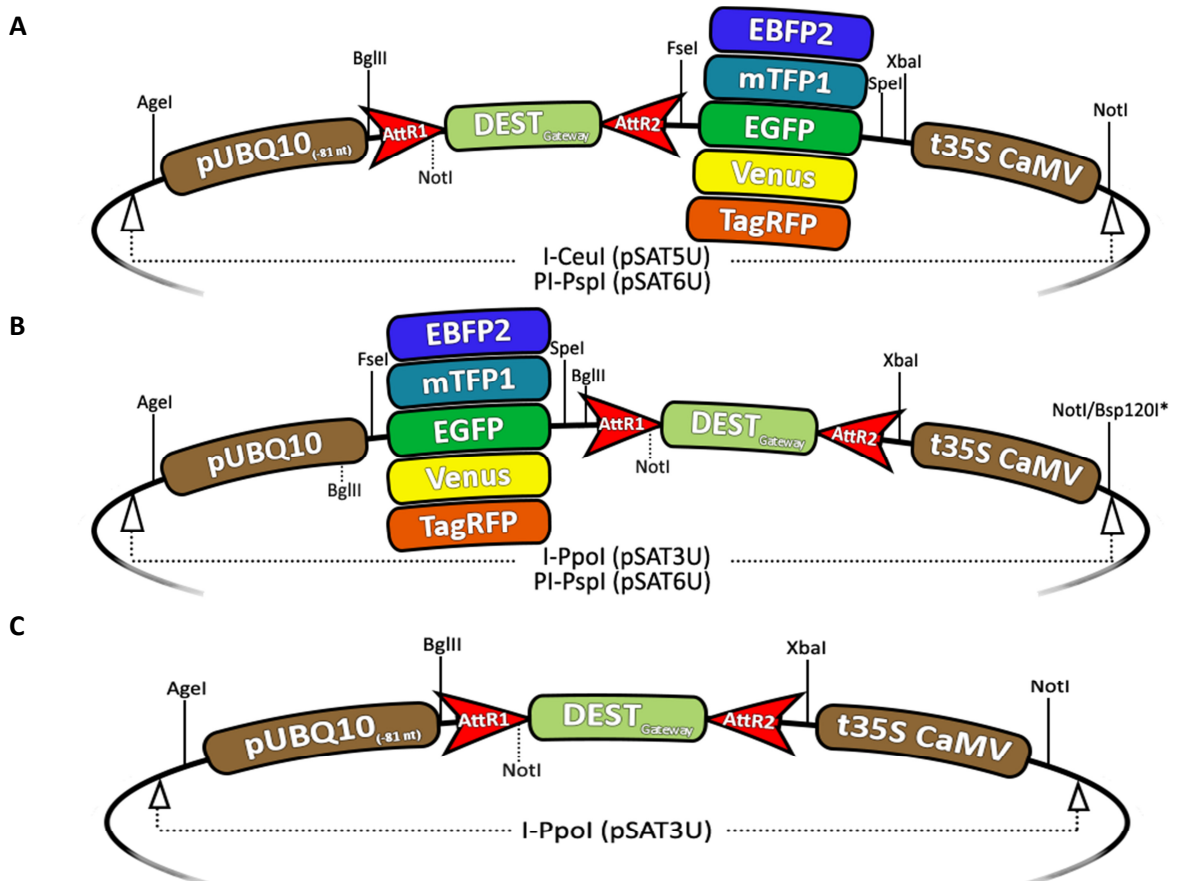
Wprowadzając sekwencje kodujące wybrane białka fluorescencyjne do wektorów pSAT3U i pSAT6U otrzymano ostatecznie kolekcję wektorów: pSAT3U-EBFP2C, pSAT3U-mTFP1C, pSAT3U-3C, pSAT3U-4C, pSAT6U-EBFP2C, pSAT3U-mTFP1C, pSAT6U-3C, pSAT6U-4C, które wraz w wektorami pSAT3U-6C i pSAT6U-6C wykorzystywano do wizualizacji badanych białek w protoplastach Arabidopsis. Poprawność sekwencji plazmidów sprawdzano każdorazowo zlecając ich sekwencjonowanie starterami flankującymi wstawkę.

6.3.2 Przygotowanie wektorów pSAT5U i pSAT6U wykorzystanych do nadekspresji badanych białek w fuzji z końcem aminowym białek fluorescencyjnych

Kasetę ekspresyjną z plazmidu pSITEII-7N1 zamplifikowano w reakcji PCR korzystając z pary starterów:

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')	Tm (°C)	Długość produktu (nt)	Accession number
Kas_F	TAGCTGTTTGCCAACCGGTCAAC	65	3580	GU734650
Kas_R	GTATTATGGGTGCGGCCGCGT	65		

Oczyszczony produkt PCR strawiono enzymami restrykcyjnymi Agel oraz NotI. Otrzymano dwa fragmenty DNA, krótszy o długości 1025 nt, flankowany lepкими końcami Agel-NotI oraz dłuższy (2516 nt) flankowany lepкими końcami NotI. Oba fragmenty wprowadzono w dwóch turach (najpierw wykorzystując miejsca restrykcyjne Agel oraz NotI, następnie tylko NotI) do wektorów pAUX3132 i pAUX3133, otrzymując wektory pSAT5-7N i pSAT6-7N, odpowiednio. Podwójny promotor 35S CaMV otrzymanych wektorów zastąpiono promotorem UBQ10. Wykorzystano jedyne dostępne w wektorach miejsca restrykcyjne Agel i BglIII, co skutkowało skróceniem sekwencji promotora o 81 nt z końca 3' (w toku badań nie zaobserwowano znaczących zmian w poziomie ekspresji białek pod kontrolą skróconego promotora UBQ10). Następnie w miejsce sekwencji kodującej białko fluorescencyjne (błędnie opisanej jako Dendra2), wykorzystując miejsca restrykcyjne FseI i SpeI, wklonowano fragmenty



Rycina 6 Schematy wektorów pSAT wykorzystywanych do wizualizacji badanych białek w fuzji z białkami fluorescencyjnymi na końcu karboksylowym (A), aminowym (B) oraz z wbudowanym białkiem EGFP wewnątrz polipeptydu (C). Opis tworzenia plazmidów w tekście, poniżej rysunków zaznaczono rzadkie miejsca restrykcyjne kompatybilne z wektorem binarnym pPZP-RCS2 (por. sekcja 6.4)

DNA kodujące szereg białek fluorescencyjnych: EBFP2, mTFP1, EGFP, Venus (por. sekcja 6.3.1). Do plazmidów wprowadzono także sekwencję kodującą białko TagRFP wyciętą z wektora pSAT6U-6C.

Wprowadzając sekwencje kodujące wybrane białka fluorescencyjne do wektorów pSAT5U-7N i pSAT6U7N otrzymano ostatecznie kolekcję wektorów: pSAT5U-EBFP2N, pSAT5U-mTFP1N, pSAT5U-3N, pSAT5U-4N, pSAT5U-6N, pSAT6U-EBFP2N, pSAT6U-mTFP1N, pSAT6U-3N, pSAT6U-4N, pSAT6U-6N, które wykorzystywano do wizualizacji badanych białek w protoplastach *Arabidopsis*. Poprawność sekwencji plazmidów sprawdzano każdorazowo zlecając ich sekwencjonowanie starterami flankującymi wstawkę.

6.3.3 Przygotowanie wektora pSAT3U-DEST do nadekspresji białek fuzyjnych z GFP wewnątrz polipeptydu białka badanego

Wektor pSAT3U-DEST otrzymano usuwając fragment 802 nt flankowany miejscami restrykcyjnymi BglII (fragment zawierał 81 nt promotora UBQ10 oraz sekwencję kodującą białko fluorescencyjne) z wektora pSAT3U-3C. Plazmid strawiono, fragment o długości ok. 6 000 nt wycięto z żelu i zligowano bez wstawki. Poprawność sekwencji otrzymanego wektora potwierdzono zlecając jego sekwencjonowanie.

6.4 Konstrukcja wektorów binarnych pPZP

Wprowadzane do siewek *Arabidopsis* wektory binarne niosły dwie kasety ekspresyjne wraz z wstawkami, które przenoszono z wybranych plazmidów pSAT, wykorzystywanych do transfekcji przejściowej protoplastów. Do przygotowania wektorów wykorzystano system modułarny, oparty o plazmid binarny pPZP-RCS2 i plazmidy-satelity pAUX (Goderis i Bolle, 2002). Z plazmidów pAUX otrzymano wektory pSAT poprzez dodanie roślinnej kasety ekspresyjnej (Tzfira i in., 2005), są one zatem kompatybilne z bardzo rzadkimi miejscami restrykcyjnymi z polilinkera plazmidu pPZP-RCS2. Enzymy I-PpoI [Promega], PI-PspI, I-CeuI posłużyły do przenoszenia całych kaset ekspresyjnych i stworzenia wektorów pPZP-ICR1-GFP_{int}-TagRFP-MAP4, pPZP-RIP2-GFP_{int}-TagRFP-MAP4, pPZP-RIP3-GFP_{int}-TagRFP-MAP4, pPZP-RIP4-GFP_{int}-TagRFP-MAP4, pPZP-RIP5-GFP_{int}-TagRFP-MAP4 oraz pPZP-RIC6-TFP1-SEC3A-Venus. Przygotowanymi plazmidami transformowano siewki *Arabidopsis* metodą FAST (Li i in., 2009).

7. Mikroskopia fluorescencyjna

Obserwacje preparatów mikroskopowych i rejestrację obrazów wykonano mikroskopem konfokalnym Nikon A1Rsi z oprogramowaniem NIS Elements AR Confocal ver. 3.2. Używano obiektywów:

Plan Apo 10x/0.45

Plan Apo VC 20x/0.75

Apo λS 40x/1.25 WI

Plan Apo λ 40x/0.95

Plan Apo VC 60x/1.4 Oil

Plan Apo VC 60xA/1.2 WI

Obrazy rejestrowano w rozmiarze 512x512 pikseli utrzymując rozdzielczość w zakresie 0,1-0,25 μm/px. Apertura przysłony wynosiła najczęściej 1-1,2 AU (ang. Airy unit), a wynikającą z niej grubość skrawków optycznych ustalano zazwyczaj 50 nm poniżej wartości sugerowanej przez program sterujący mikroskopem. Czułość detekcji fotopowielaczy, cyfrowe odcięcie

poziomu sygnału fluorescencji, a także moc i czas naświetlania pojedynczego piksela laserem ustalano indywidualnie dla każdego preparatu. Starano się optymalizować stosunek sygnału do szumu, jednocześnie unikając rejestrowania przesyconych pikseli i wzbudzenia efektu fototoksyczności. Dla poszczególnych białek fluorescencyjnych stosowano następujące ustawienia optyki mikroskopu:

Fluorochrom	Wzbudzenie (laser)	Zwierciadło dichroiczne	Zakres detekcji emisji
eBFP2	diodowy 405 nm	405/488/561 nm	450/50 nm
mTFP1	jonowy argonowy linia 457 nm	457/514 nm	482/35 nm
eGFP	jonowy argonowy linia 488 nm	405/488/561 nm	525/50 nm
Venus	jonowy argonowy linia 514 nm	457/514 nm	540/30 nm
TagRFP	pompowany diodą 561 nm	405/488/561 nm	595/50 nm

Przed rejestracją obrazów sprawdzano obecność właściwego barwnika za pomocą detektora spektralnego. Obserwacje kilku fluoroforów jednocześnie wykonywano w trybie skanowania sekwencyjnego, unikając w ten sposób „przeciekania spektralnego”.

Analizę obrazów mikroskopowych i przygotowanie ich do prezentacji wykonano używając programów NIS Elements AR ver. 3.2 oraz Imaris ver. 7.6. Dopuszczano następujące manipulacje, nie zmieniając informatywności zdjęć:

- dostosowanie poziomu jasności i/lub kontrastu kanałów w przypadku, gdy jeden był znacznie jaśniejszy
- wyrównanie skrawków optycznych w osi z w obrazach migrujących w polu widzenia mikroskopu w czasie skanowania (wykorzystano specjalne narzędzie programu NIS)
- usunięcie skrawków optycznych nie zawierających sygnału fluorescencji zarejestrowanych poniżej lub powyżej preparatu
- skadrowanie obrazu tak, by preparat zajmował jego maksymalną powierzchnię
- dodanie belek skali

Jeśli nie zaznaczono inaczej, obrazy są prezentowane w postaci dwuwymiarowej projekcji maksymalnej intensywności MIP (ang. maximum intensity projection) skrawków optycznych. W programach ustawiono maksymalne parametry jakości rekonstrukcji obrazów.

7.1 Rejestracja i analiza czasu trwania fluorescencji FLIM (ang. fluorescence lifetime imaging microscopy)

Badanie oddziaływań białko-białko metodą FRET-FLIM przeprowadzono używając przystawki LSM Upgrade Kit [PicoQuant] do mikroskopu konfokalnego Nikon A1Rsi. Badano jedynie czas trwania fluorescencji białka-donora (metoda jednokanałowa), którym było mTFP1, dla których stosowano następujące ustawienia optyczne systemu:

Fluorochrom	Wzbudzenie (laser pulsacyjny)	Zwierciadło dichroiczne	Zakres detekcji emisji
mTFP1	diodowy 440 nm	457/514 nm	482/35 nm

Fluorescencję białek w preparatach wzbudzano laserami o częstotliwości pulsów 40 MHz. Ilość światła wzbudzającego i czas naświetlania pojedynczego piksela, bezpośrednio przekładające się na intensywność sygnału docierająca do detektora, regulowano tak by nie przekraczała 4 mln zliczeń fotonów na sekundę (cps, ang. counts per second). Aperturę przesłony konfokalnej ustawiano w zakresie 1-1,2 AU. Obrazy rejestrowano z jednego skrawka optycznego w rozmiarach 512x512 lub 256x265 pikseli, o rozdzielczości 0,2-0,25 $\mu\text{m}/\text{px}$.

Obrazowanie prowadzono do czasu, aż średnia ilość zliczeń fotonów dla wszystkich pikseli przekraczała 100.

Analizę danych FLIM przeprowadzono w programie PicoQuant SymPhoTime64 ver. 1.2. Przebieg krzywej spadku czasu trwania fluorescencji przyrównywano do modeli jedno-, dwu- lub trójwykładniczego. Ustalano średni czas trwania fluorescencji dla całego obrazu powyżej poziomu tła (zwykle 300 zliczeń). Następnie wykonywano analizę według parametrów o najlepszym dopasowaniu dla wszystkich pikseli obrazu indywidualnie. Wyniki zapisywano w postaci zdjęć w fałszywym kolorze przedstawiającym czas trwania fluorescencji i wydajność FRET, a także wykresów i arkuszy ze szczegółowymi danymi generowanymi przez program. Dane opracowano następnie w programie Excel [Microsoft]. Istotność różnic sprawdzano parami (kontrola nieoddziałująca-próba badana) testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów z uwzględnieniem istotności z testu t oraz z błędu standardowego średniej.

Wyniki i dyskusja

Prezentowane wyniki uzyskałem pracując wspólnie z Pauliną Mostowską, Aleksandrą Pawelą i Martyną Paruch, moimi studentkami. Część badań została opisana w ich pracach licencjackich i magisterskich. Niektóre eksperymenty wykonywałem wspólnie z pracownikami i doktorantami ZBMiK. Wydaje mi się zatem naturalnym odnosić się do opisywanych poniżej rezultatów w liczbie mnogiej, co gdzieś kiedyś uczyniłem. Filmy i ryciny w wersji elektronicznej (w istotnie lepszej jakości niż na papierze) zawiera dołączona płyta CD.

Białka ARF-GEF BIG2 i BIG5 nie kolokalizują z wybranymi podjednostkami egzocystu w protoplastach Arabidopsis

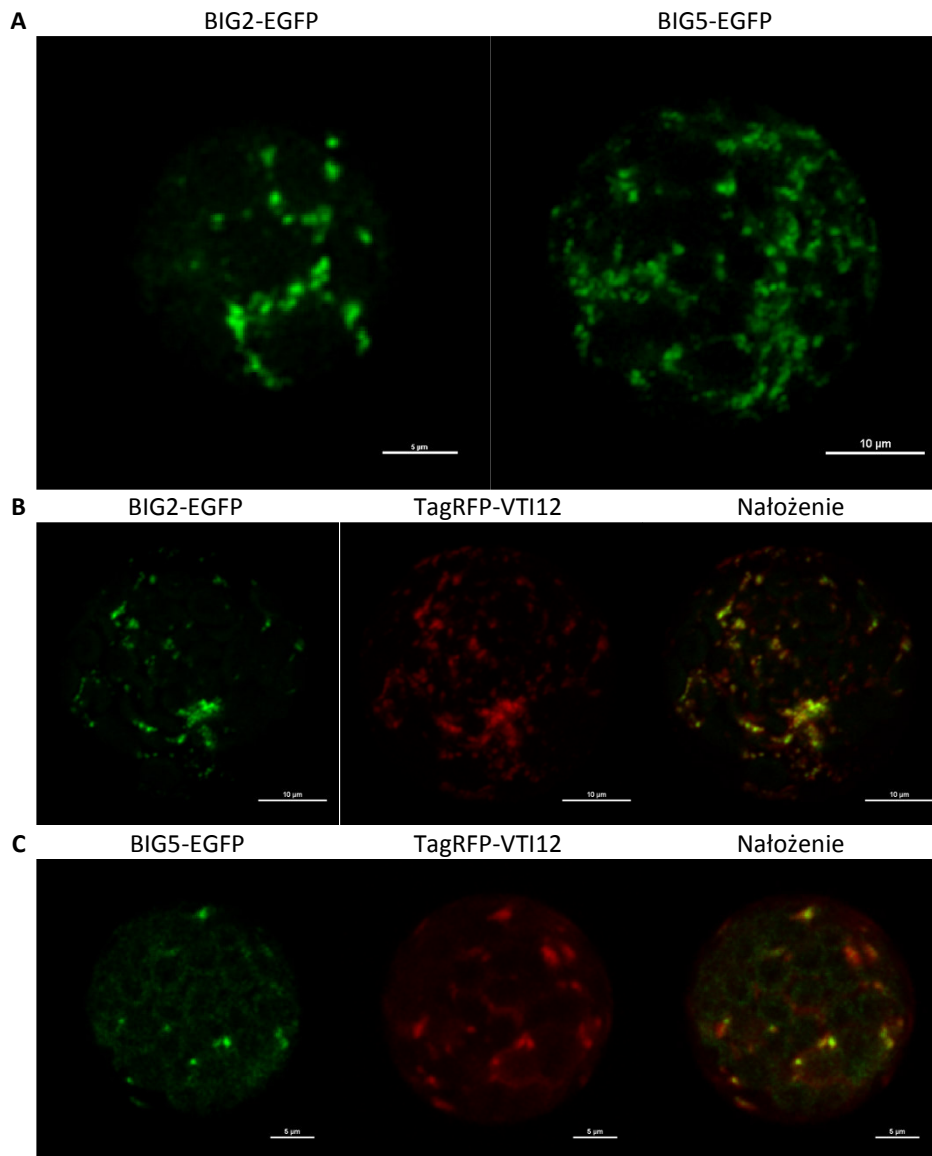
Białka BIG2 i BIG5/BEN1/AtMIN7 Arabidopsis (Hwang i Robinson, 2009) należą do rodziny dużych czynników wymiany nukleotydów guaninowych (GEF) z domeną Sec7. Wiadomo, że ludzki ortolog białek BIG2 i BIG5 oddziałuje z podjednostką egzocystu EXO70 w centrach organizacji mikrotubul komórek wątroby linii HepG2 (Xu i in., 2005). Postanowiono zatem sprawdzić, czy podobne oddziaływania zachowały się u roślin.

Białka BIG2 i BIG5 Arabidopsis połączono z białkiem zielonej fluorescencji i poddano nadekspresji w protoplastach otrzymanych z mezofilu liści. Oba białka były zlokalizowane punktowo lub w postaci plamek w cytozolu (Ryc. 7A). Obserwowane struktury były wysoce mobilne i podlegały dynamicznym przemianom. Wzór lokalizacji białka BIG5 w komórce odpowiada wcześniejszym obserwacjom (Tanaka i in., 2009), natomiast białko BIG2 obserwowano w żywych komórkach Arabidopsis po raz pierwszy. Lokalizacja tego białka w sieci *trans* Golgiego została zaproponowana przez analogię do BIG5 (Richter i in., 2014), ale nie udowodniono tego eksperymentalnie. Postanowiono więc ustalić jego lokalizację subkomórkową. Aby określić, czy przedziały bogate w znakowane białko BIG2 są tożsame z TGN, protoplasty stransfekowano dodatkowo plazmidami kodującymi znakowane białko-marker tego przedziału – VTI12 (Drakakaki i in., 2012). BIG2 niemal całkowicie kolokalizowało z markerem VTI12 (Ryc. 5B), co oznacza, że istotnie jest to jedno z białek sieci *trans* Golgiego. Kontrolnie przeprowadzono nadekspresję znakowanych białek BIG5 i VTI12, gdzie zaobserwowano ich częściową kolokalizację (Ryc. 7C).

Film 1 dokumentuje wspólny ruch w cytoplazmie i dynamikę przedziałów znakowanych przez BIG2 i VTI12. Zarejestrowano zjawiska kontaktów i fuzji tych struktur. Od niektórych przedziałów odpączkują pęcherzyki lub też całe przedziały ulegają podziałom. BIG2 jest zatem białkiem systemu błon wewnętrznych pełniącym swoją funkcję w TGN, z którą podlega dynamicznym przemianom.

W przypadku BIG5-EGFP kolokalizacja z TagRFP-VTI12 nie jest tak wyraźnie zaznaczona, nie we wszystkich przedziałach z VTI12 można było dostrzec BIG5 (Ryc. 7C). Marker VTI12 znakuje przedział TGN tożsamy z wczesnym endosomem (EE, ang. early endosome) (Geldner i in., 2009). We wcześniejszych badaniach dotyczących BIG5, TGN/EE znakowano markerami SYP61 i VHA-a1, a nie VTI12 (Tanaka i in., 2009). Roślinny system błon wewnętrznych jest bardzo dynamiczny. Poszczególne przedziały podlegają ciągłym modyfikacjom. Wykazano na przykład, że endosomy z czasem dojrzewają z wczesnych do późnych zmieniając swój garnitur białkowy (Mishev i in., 2013). Wskazuje to na ciągłe przenikanie się poszczególnych kompartmentów, co oznacza, że białka określane jako ich znaczniki można spotkać także w kolejnych przedziałach na drodze anterogradej, skąd są zawracane (Heard i in., 2015).

Ponadto, zarówno markery jak i białka badane są białkami regulatorowymi i ich nadekspresja może prowadzić do zaburzeń funkcjonalnych. Takie zjawisko zaobserwowano na przykład



Rycina 7 Lokalizacja subkomórkowa wybranych białek BIG. Połączone z EGFP białka BIG2 i BIG5 znakowały plamkowate, ruchliwe struktury w cytoplazmie (A). Kolokalizacja z markerem przedziału TGN (VTI12) wskazuje, że zarówno BIG2 (B), jak i BIG5 (C) są białkami tego przedziału.

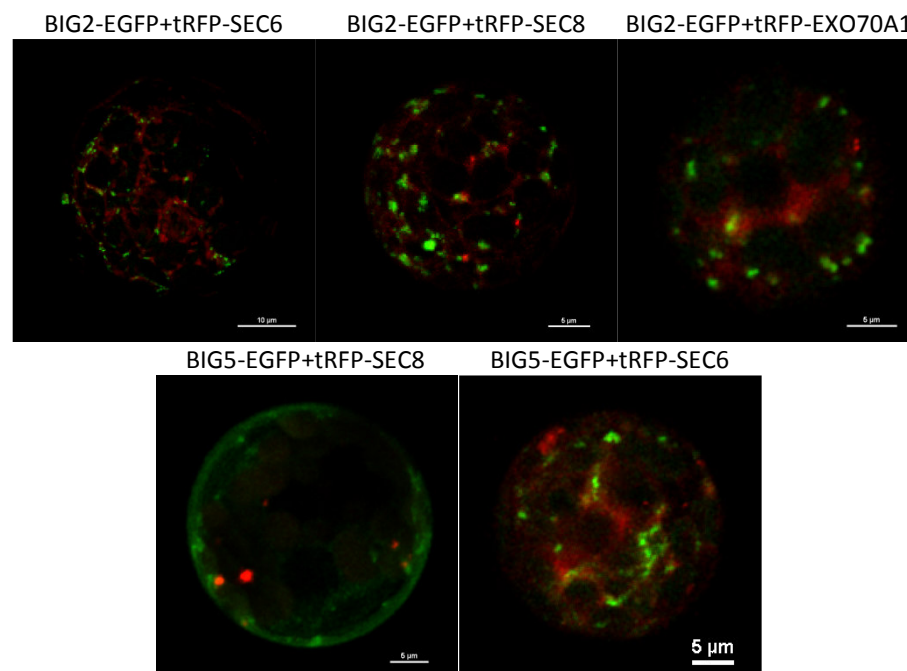
podczas nadekspresji białka AGD7, pełniącego funkcję GAP dla małej GTPazy ARF1 u *Arabidopsis*. Nadekspresja AGD7 prowadziła do relokacji części białek z aparatu Golgiego do ER (Min i in., 2007). Uzyskane wyniki stanowią dodatkowy dowód na to, że wszystkie białka BIG *Arabidopsis* są zlokalizowane w tym samym przedziale, co nie koniecznie oznacza, że wszystkie mają taką samą funkcję (Richter i in., 2014).

W kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić, czy ścieżki sygnalizacji z udziałem białek BIG2 i BIG5 przecinają szlaki transportu angażującego kompleks egzocyst. W tym celu przeprowadzono koekspresję w protoplastach wybranych białek BIG znakowanych fluorescencyjnie, z podjednostkami egzocystu rzodkiewnika SEC6, SEC8 i EXO70A1, z przyłączonym białkiem TagRFP (Ryc. 8).

Plamkowate i punktowe skupienia znakowane przez BIG2-EGFP nie kolokalizowały z badanymi podjednostkami egzocystu w protoplastach *Arabidopsis*. Białka SEC6, SEC8

i EXO70A1 tworzyły niekiedy kilka punktów odrębnych na tle rozproszonego, głównie cytoplazmatycznego rozmieszczenia, ale te skupienia były zawsze odrębne od struktur, w których występowało białko BIG2-EGFP (Ryc. 8). Podobnie, przedziały, w których występowało białko BIG5-EGFP, nie kolokalizowały ze znakowanymi fluorescencyjnie podjednostkami kompleksu egzocyst SEC8 i EXO70A1 (Ryc. 8). Z powyższych obserwacji wynika, że czynniki ARF-GEF zlokalizowane w TGN działają w odrębnych od kompleksu egzocyst szlakach sygnalizacyjnych. Jest także możliwe, że ewentualne spotkania badanych białek są krótkie i przez to trudne do zarejestrowania metodami mikroskopowymi. Ponadto w takich oddziaływaniach mogą brać udział inne białka pośredniczące, których nie badano.

Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że białka BIG2 i BIG5 rezydują w przedziale systemu błon wewnętrznych - sieci *trans* Golgiego oraz, że nie kolokalizują z podjednostkami kompleksu egzocyst SEC6, SEC8 i EXO70A1. Oddziaływanie ludzkiego białka



Rycina 8 Koekspresja białek BIG z podjednostkami egzocystu. Przedziały TGN bogate białka BIG2 i BIG5 nie kolokalizowały z podjednostkami SEC6, SEC8 i Exo70A1.

BIG2 z podjednostką egzocystu Exo70 opisano w liniach komórek wątroby HepG2, gdzie oba białka biorą udział w transporcie wzdłuż mikrotubul (Xu i in., 2005). Małe GTPazy ARF pełnią podobne funkcje u roślin, zwierząt i drożdży (Molendijk i in., 2004). Białka ARF-GEF natomiast zawierają zachowawczą ewolucyjnie domenę Sec7. Mają one też podobny mechanizm działania, manifestujący się m. in. wrażliwością większości z nich na BFA, a także tę samą lokalizację subkomórkową (aparat Golgiego-TGN) (Anders i Jürgens, 2008). A zatem oddziaływanie ARF-GEF z egzocystem również wydawało się prawdopodobne. Z drugiej strony roślinny kompleks egzocyst wydaje się pełnić więcej funkcji niż jego drożdżowe i zwierzęce ortologi. Powielenie genów kodujących większość podjednostek, z 23 genami *EXO70* u *Arabidopsis* na czele, sugeruje możliwość tworzenia kompleksów o zróżnicowanym składzie (Cvrčková i in., 2012). Niewykluczone, że któraś z wersji egzocystu *Arabidopsis* bierze jednak udział w szlakach transportu kontrolowanych przez białka BIG.

Jako białko znacznikowe dla TGN zastosowano VTI12, które tworzy kompleks typu SNARE z syntaksyną SYP61 (van de Meene i in., 2016), także wykorzystywaną jako marker TGN.

We frakcjach białkowych izolowanych z przedziałów bogatych w SYP61 (koimmunoprecypitacja po wzbogaceniu, połączona ze spektrometrią mas) nie wykryto dużych białek ARF-GEF z rodziny BIG Arabidopsis. W tym samym badaniu nie zidentyfikowano także żadnej z podjednostek kompleksu egzocyst (Drakakaki i in., 2012). Z kolei w niedawnej, kompleksowej analizie proteomicznej systemu błon wewnętrznych Arabidopsis, ustalono, że białka BIG2 i BIG5 występują wspólnie z markerami aparatu Golgiego i TGN (ARA5/RABD2a) oraz TGN/EE (ARA7/RABF2b). Zidentyfikowano także kilka podjednostek egzocystu m. in. EXO70A1 tylko we frakcji wzbogaconej w ARA7 oraz SEC8 we wszystkich frakcjach poza izolowaną z tonoplastu (Heard i in., 2015). Dowodzi to rzeczywistej płynności i przenikania się przedziałów systemu błon wewnętrznych u roślin. Poszczególne przedziały zawierają wiele białek, które zidentyfikowane przez badaczy w różnych punktach czasowych i z różną wydajnością prowadzą do otrzymywania niejednoznacznych wyników analiz.

Białka BIG są niezbędne dla prawidłowego transportu nośników auksyn PIN u Arabidopsis (Kleine-Vehn i in., 2008a). Także u mutantów w obrębie genów kodujących podjednostki egzocystu zauważono zaburzenia dynamiki receptorów BRI1 i transporterów PIN w korzeniach, powodujące przemodelowanie przepływu auksyn. Z drugiej strony wykazano niewrażliwość mobilności podjednostek SEC6 i SEC8 na znany inhibitor transportu pęcherzykowego – BFA, która blokuje transport kontrolowany m. in. przez większość czynników BIG (Cole i in., 2014).

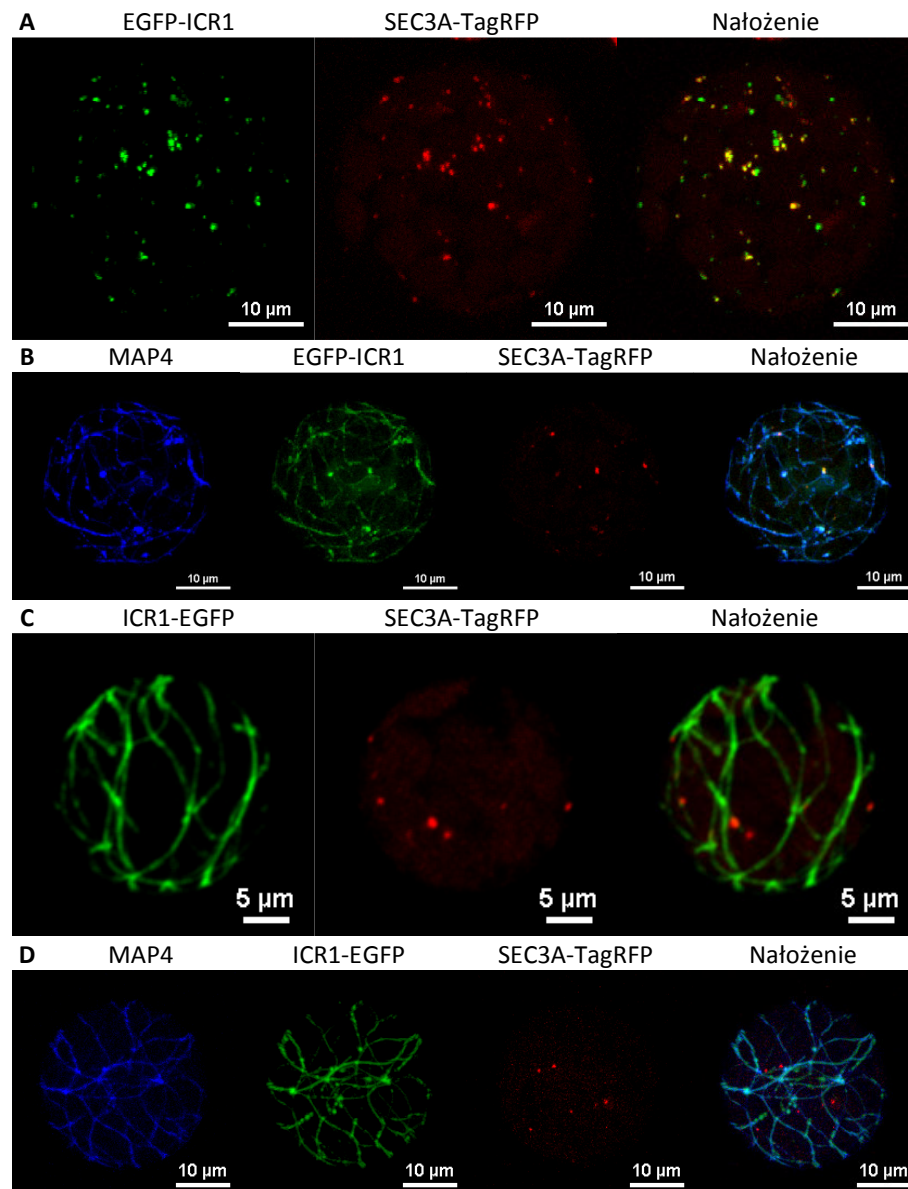
Roślinny i zwierzęcy system transportu wewnątrzkomórkowego różnią się, mimo zachowania kluczowych białek i ogólnej architektury. Odwrotnie niż u zwierząt, to mikrofilamenty aktywne pełnią kluczową rolę podczas przemieszczania się pęcherzyków i organelli błonowych u roślin (Brandizzi i Wasteneys, 2013). Taka różnica wymagała przystosowania systemów komórkowej kontroli transportu i przydzielenia odmiennych zadań ewolucyjnie konserwatywnym grupom białek regulatorowych, a także wykształcenia swoistych rodzin białek roślinnych. Dotychczasowe badania wskazują, że kontrola komórkowa składania i lokalizowania kompleksu egzocyst jest specyficzna u roślin. Co więcej, oddziaływanie BIG2-Exo70 obserwowano w rejonie centrosomów komórek ssaczy, których to struktur brakuje w komórkach roślinnych. Uzyskane wyniki oraz obecny stan wiedzy pozwalają stwierdzić, że ewentualne bezpośrednie oddziaływania dużych białek ARF-GEF z podjednostkami kompleksu egzocyst u roślin wydają się być mało prawdopodobne.

Białko ICR1 wiąże jednocześnie mikrotubule i podjednostkę egzocystu SEC3A

W komórkach drożdży podjednostki kompleksu egzocyst Sec3 i Exo70 są bezpośrednio wiązane przez małe GTPazy z rodziny Rho. Białka regulatorowe Rho1, Rho3, czy Cdc42 ściągają egzocyst w miejsca intensywne wydzielania pęcherzyków na przykład w region szczytowy pączkującej komórki (Ory i Gasman, 2011). Roślinna podjednostka SEC3A, podobnie do zwierzęcej, utraciła w toku ewolucji domenę odpowiedzialną za bezpośrednie oddziaływanie z małymi GTPazami. Okazało się, że w oddziaływaniu GTPaz ROP z SEC3A u Arabidopsis pośredniczy wysoce specyficzne białko rusztowania nazwane ICR1 (Lavy i in., 2007). Postanowiono zbadać, czy ICR1 i pozostałe cztery białka stanowiące wspólnie rodzinę RIP oddziałują z SEC3A i/lub wybranymi podjednostkami egzocystu oraz które małe GTPazy stanowią ich regulatory.

Aby zbadać, czy oddziaływanie białek SEC3A i ICR1 jest zachowane w protoplastach izolowanych z komórek liści Arabidopsis, wprowadzono do nich konstrukcje genetyczne

kodujące badane białka w fuzji ze znacznikami fluorescencyjnymi TagRFP i EGFP, odpowiednio. Na Rycinie 9A jest widoczna kolokalizacja SEC3A i ICR1 (co ważne, z EGFP połączonym z końcem N białka) w niektórych punktach cytoplazmatycznych, z których większość znajduje się w pobliżu błony komórkowej protoplastu. Lokalizacja obu białek w postaci punktowych skupień była obserwowana w około 80% przypadków koekspresji. Komórki obserwowane wcześniej – około 4-6 h po transfekcji, miały EGFP-ICR1 zlokalizowane w przeważnie cytoplazmie z widocznymi punktowymi skupieniami. Obserwacje prowadzone po dłuższym czasie (12-16 h) wskazywały na słabe znakowanie przez EGFP-ICR1 fibrylarnych struktur w cytoplazmie. Widoczne punktowe skupienia, także te, w których ICR1 kolokalizowało z SEC3A układały się wzdłuż i leżały na znakowanych fibrylach (Ryc. 9B).



Rycina 9 Asocjacja białka ICR1 z mikrotubulami i podjednostką egzocystu SEC3A.

Częściowa kolokalizacja SEC3A i ICR1 połączonego z EGFP na końcu aminowym (A), w wyniku której asocjacja ICR1 z mikrotubulami była osłabiona (B). Przeniesienie EGFP na koniec karboksylowy ICR1 zniósło wiązanie z SEC3A (C), ale wzmocniło asocjację z mikrotubulami (D).

Gdy białko EGFP połączono z końcem karboksylowym ICR1 (ICR1-EGFP), obraz badanej kolokalizacji wyglądał niezwykle interesująco i zaskakująco. Okazało się, że badane białko

dekoruje fibrylarne struktury przypominające cytoszkielet i otaczające komórkę tuż pod błoną komórkową (Ryc. 9C). Niekiedy były widoczne punktowe skupienia leżące na włóknach lub nieliczne poza nimi, w pobliżu błony. Zaobserwowano także całkowicie znieśioną kolokalizację SEC3A z ICR1 w takim wariacie fuzji (Ryc. 9C). Punktowe skupienia, w których występowała podjednostka egzocystu były całkowicie niezależne od włóknokształtnych struktur otaczających komórkę, gdzie znajdowało się białko ICR1-EGFP. Dlatego postanowiono przyjrzeć się bliżej różnicom w lokalizacji białek fuzyjnych ICR1-EGFP i EGFP-ICR1 w kontekście ich koekspresji z podjednostką egzocystu SEC3A.

W celu ustalenia, które struktury cytoszkieletu wiąże białko ICR1, przeprowadzono jego koekspresję z markerem mikrotubul, białkiem MAP4 znakowanym przy pomocy białka niebieskiej fluorescencji EBFP2 (Marc i in., 1998). Dodatkowo protoplasty transfekowano plazmidem kodującym białko SEC3A-TagRFP. Okazało się, że struktury delikatnie znakowane przez EGFP-ICR1 całkowicie kolokalizują z markerem MAP4. Są to zatem mikrotubule korykalne (Ryc. 9B). Marker EBFP2-MAP4 był widoczny wyraźniej niż białko badane (pomimo zachowania prawie jednakowych warunków akwizycji obrazu wszystkich kanałów). Mając na uwadze, że jasność białka niebieskiej fluorescencji EBFP2 stanowi połowę jasności EGFP (Day i Davidson, 2009), może to dowodzić słabego powinowactwa białka EGFP-ICR1 do mikrotubul. Pomimo słabego znakowania mikrotubul, ICR1 kolokalizowało z SEC3A w wyraźnie jaśniejszych punktach. Struktury te były ułożone na mikrotubulach znakowanych przez marker MAP4. Zatem jest wysoce prawdopodobne, że białko ICR1 wiążące jednocześnie mikrotubule korykalne i podjednostkę egzocystu SEC3A i może brać udział w wyznaczeniu miejsc formowania się tego kompleksu przy błonie komórkowej.

Białko fuzyjne ICR1-EGFP wyraźnie kolokalizowało z markerem mikrotubul MAP4 w protoplastach *Arabidopsis*. Znacznik fluorescencyjny umieszczony na końcu karboksylowym polipeptydu pozwolił na lepsze znakowanie tych struktur cytoszkieletu. Nie było widoczne tło cytoplazmatyczne, ale zaobserwowano punktowe i plamkowate skupiska ICR1, wspólne z markerem MAP4 (Ryc. 9D). Co ciekawe, białko SEC3A-TagRFP zmieniało wzór lokalizacji. Punktowe skupienia znajdowały się w bezpośredniej bliskości znakowanych mikrotubul, ale nie zaobserwowano kolokalizacji z nimi. Można zatem wnioskować, że w tym wariacie fuzji ICR1 białko fluorescencyjne stanowiło zawadę przestrzenną, przez co ICR1 było niezdolne do rekrutacji SEC3A do cytoszkieletu. Z drugiej strony wolny (bez EGFP) fragment N-końcowy ICR1 znacznie lepiej wiązał się do mikrotubul korykalnych. Najprawdopodobniej N-końcowa domena ICR1 odpowiada za wiązanie się białka do włókien cytoszkieletu. Nie zaobserwowano zmian wzoru lokalizacji białka SEC3A w zależności od położenia w polipeptydzie znacznika fluorescencyjnego. Podsumowując, ICR1 jest białkiem zasocjowanym z cytoszkieletem i oddziałującym z SEC3A, podjednostką kompleksu egzocyst.

Punktowa lokalizacja białka SEC3A przy błonie, z widocznym nieznacznym tłem cytoplazmatycznym, była już obserwowana i uznaje się ją za fizjologiczną. Obserwacje *in vivo* doprowadziły do wyciągnięcia wniosku, iż SEC3A nie łączy się z mikrotubulami korykalnymi w komórkach korzenia *Arabidopsis* (Zhang i in., 2013). Także badania proteomu mikrotubul rzodkiewnika nie wskazują na asocjację którejkolwiek z podjednostek kompleksu egzocyst (Hamada i in., 2013). Natomiast w świetle uzyskanych przez nas wyników można stwierdzić, że SEC3A może występować w komórce w postaci związanej z cytoszkieletem. W wiązaniu pośredniczy białko szkieletowe ICR1, mające zdolność jednoczesnego wiązania mikrotubul i SEC3A. Niecałkowita kolokalizacja tych białek wskazuje, że do oddziaływań dochodzi

w określonej sytuacji, najprawdopodobniej uzależnionej od sygnalizacji z udziałem małych GTPaz ROP. Ponadto jest możliwe, że takie oddziaływania są przejściowe, stąd nie udało się ich dotąd zaobserwować innym badaczom. Niedawno opisano taką możliwość dla innej podjednostki egzocystu – EXO70A1, którą dotąd także uznawano za nie asocjującą z mikrotubulami. Okazało się, że bogate w domeny coiled-coil (podobnie do ICR1) białko pośredniczące nazwane VETH, ściąga EXO70A1 na mikrotubule podczas odkładania wtórnej ściany w komórkach ksylemu (Oda i in., 2015). Ponieważ podjednostki EXO70 i SEC3 uważa się za wyznaczające miejsca składania się całego kompleksu egzocyst, możliwe, że ICR1 działa jak VETH i określa miejsca składania kompleksu poprzez SEC3A.

Po raz pierwszy oddziaływanie SEC3A z białkiem z ICR1 zidentyfikowano przy pomocy drożdżowego testu dwuhybrydowego (Lavy i in., 2007). Oddziaływanie to określono jako specyficzne – podjednostka egzocystu EXO70A1 nie oddziaływała z ICR1. Zidentyfikowane oddziaływanie potwierdzono metodą BiFC (ang. bimolecular fluorescence complementation), obserwowano ICR1 w kompleksie z SEC3A w postaci rozproszonej w cytoplazmie i jądrze komórek epidermy *Arabidopsis* (Lavy i in., 2007). Co ciekawe, w tej samej pracy znakowane fluorescencyjnie ICR1, obserwowane bez koekspresji z innym białkiem, było zlokalizowane w błonie komórkowej. Taki obraz nie odpowiada opublikowanej później lokalizacji białka SEC3A w komórkach *Arabidopsis* (Zhang i in., 2013). Ustalono też, że za oddziaływanie z SEC3A odpowiada domena C-końcowa ICR1 typu coiled-coil i zawarty w niej motyw ²⁶⁵QWRKAA²⁷. GFP-ICR1 obserwowano też w cytoplazmie i błonie komórkowej dojrzałej łagiewki pyłkowej, gdzie białko to trafiło przemieszczając się z jądra (Li i in., 2008).

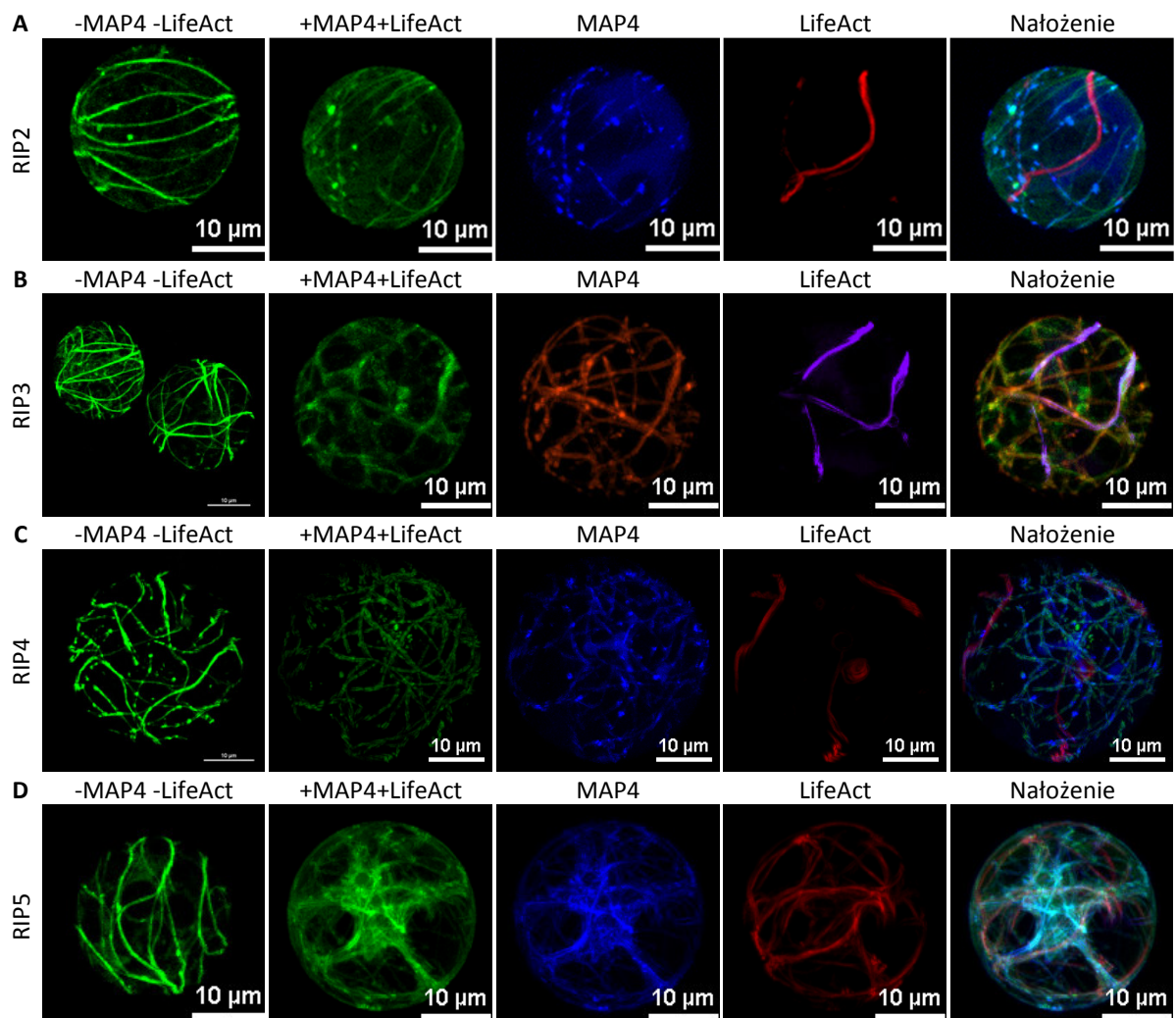
Dotychczas wykazano oddziaływanie ICR1 z małymi GTPazami ROP2 (Bloch i in., 2008), ROP6, ROP10 (Lavy i in., 2007), ROP1 (Li i in., 2008). Dalsze badania nad ICR1 dowiodły, że jest ono wymagane dla właściwego umiejscowienia w błonie nośników auksyn PIN1, co ustala polaryzację merystemu wierzchołkowego korzenia. ICR1 jest zaangażowane w recykliczację białek PIN1 w pęcherzykach, ale nie na etapie endocytozy, a ich ponownego wydzielania (stąd oddziaływanie z SEC3A) (Craddock i in., 2012). Zaproponowany mechanizm wpływu ICR1 na spolaryzowany przepływ auksyn zakłada oddziaływanie wraz z GTPazami ROP na mikrofilamenty aktynowe i w ten sposób modulowanie kierunku i dynamiki zawracania nośników PIN1 do błony (Hazak i Yalovsky, 2010). Najnowsze prace opisują komplementację mutantu *icr1* znakowanym białkiem ICR1 (w obu wariantach fuzji z białkiem fluorescencyjnym) pod kontrolą natywnego promotora. Lokalizację badanego białka określono jako cytoplazmatyczną i błonową (Hazak i in., 2014).

Przeprowadzone przez nas eksperymenty dowodzą, że w protoplastach izolowanych z mezofilu *Arabidopsis* białko ICR1 ma odmienną lokalizację, niż w dotychczas opublikowanych pracach. Brakuje w literaturze informacji o wiązaniu się ICR1 z cytoszkieletem, czy punktowej kolokalizacji z podjednostką SEC3A egzocystu. Taki wzór kolokalizacji bardziej odpowiada fizjologicznemu obrazowi SEC3A i wspiera tezę o umieszczaniu tej podjednostki przy błonie przez ICR1 w miejscach wyznaczanych przez mikrotubule. Pierwsze publikacje wykorzystywały co prawda N-końcowy wariant fuzji z białkiem fluorescencyjnym, słabiej znakujący mikrotubule. Jednakże ostatnia praca pokazuje rozproszoną, cytoplazmatyczną lokalizację także wariantu C-końcowego tej fuzji (Hazak i in., 2014). W niniejszej pracy opisano zniesienie kolokalizacji ICR1 i SEC3A w wyniku umieszczenia EGFP w obrębie C-końcowej domeny białka szkieletowego. Fragment C-końcowy ICR1 odpowiada za oddziaływanie tych białek (Li i in., 2008), które obecność EGFP mogła zaburzyć. Na uwagę zasługują także trzy niezależnie opisane

i różne oddziaływania ICR1 z małymi GTPazami ROP. W kolejnych eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy pozostałe białka z rodziny ICR/RIP są podobne do ICR1, w kontekście wiązania się do cytoszkieletu oraz oddziaływania z małymi GTPazami z rodziny ROP, a także czy biorą udział w szlakach sygnalizacji związanej z kompleksem egzocyst.

RIP jest rodziną białek zasocjowanych z mikrotubulami

ICR1 należy do pięciobiałkowej rodziny RIP partnerów oddziałujących z ROP, z których dotychczas dokładnie zbadano jeszcze RIP3/MIDD1. Opisano wiązanie przez RIP3/MIDD1 mikrotubul i udział w ich rozpadzie, dzięki oddziaływaniu z kinezyną 13A i małą GTPazą ROP11 w stanie aktywnym (Oda i Fukuda, 2013a). Chociaż oddziaływania ICR1 z wybranymi małymi GTPazami opisywano, to pominięto lub nie zaobserwowano związków tego białka z cytoszkieletem. W związku z tym postanowiono bliżej przyjrzeć się wszystkim białkom z rodziny RIP i spróbować przybliżyć ich rolę w komórce metodami mikroskopowymi. W tym celu poddano nadekspresji w protoplastach *Arabidopsis* znakowane przy pomocy EGFP białka RIP2, RIP4, RIP5 oraz RIP3/MIDD1, które traktowano jako próbę odniesienia (Ryc. 10).



Rycina 10 Białka RIP są rodziną białek zasocjowanych z mikrotubulami. Koekspresja z markerami mikrotubul (MAP4) i mikrofilamentów (LifeAct) wykazała kolokalizację włókien bogatych w RIP2 (A), RIP3 (B), RIP4 (C) oraz RIP5 (D) ze znacznikiem mikrotubul, ale nie aktywny F.

Wszystkie białka z rodziny RIP były zlokalizowane w protoplastach podobnie do ICR1-EGFP (Ryc. 10). Obserwowano znakowanie włókienkowatych struktur cytoszkieletu, położone tuż pod błoną komórkową (nie przechodziły protoplastu na wskroś, a otaczały go).

Ponadto w niektórych komórkach były widoczne punktowe lub plamkowe skupienia znakowanych białek ułożone na włóknach cytoszkieletu (szczególnie obecne podczas nadekspresji RIP4 (Ryc. 10C)), także w miejscach ich rozgałęzień. Niekiedy skupienia były niezwiązane z cytoszkieletem, a położone w pobliżu błony komórkowej. Można zatem wyciągnąć wniosek, że wszystkie białka należące do rodziny RIP prezentują w protoplastach *Arabidopsis* wspólny wzór lokalizacji, asocjując do włókien cytoszkieletu.

Połączone z EGFP białka RIP poddano następnie nadekspresji w protoplastach wraz z markerem mikrotubul EBFP2-MAP4 (Marc i in., 1998) oraz mikrofilamentów TagRFP-LifeAct (Riedl i in., 2008) (Ryc. 10A-D). Pozwoliło to jednoznacznie ustalić, czy badane białka wiążą się z aktyną F, czy z mikrotubulami. Wszystkie badane RIP kolokalizowały z markerem MAP4, a nie z markerem LifeAct. Zauważono też, że nadekspresja białek RIP powodowała powstawanie początkowo punktowych, później plamkowatych skupisk wspólnych dla RIP i markera MAP4 (Ryc. 10A), które obserwowano wcześniej podczas koekspresji ICR1 z MAP4. Wyznakowana fluorescencyjnie aktyna F była wyraźnie odrębna, choć niekiedy mikrofilamenty przebiegały wspólnie z mikrotubulami. Oznacza to, że RIP jest rodziną pięciu białek zasocjowanych z mikrotubulami. Podczas obserwacji protoplastów po wydłużonym czasie nadekspresji badanych białek zauważono, że plamkowate struktury w błonie powiększają się tworząc domeny zapoczątkowywane w miejscu przebiegu mikrotubul.

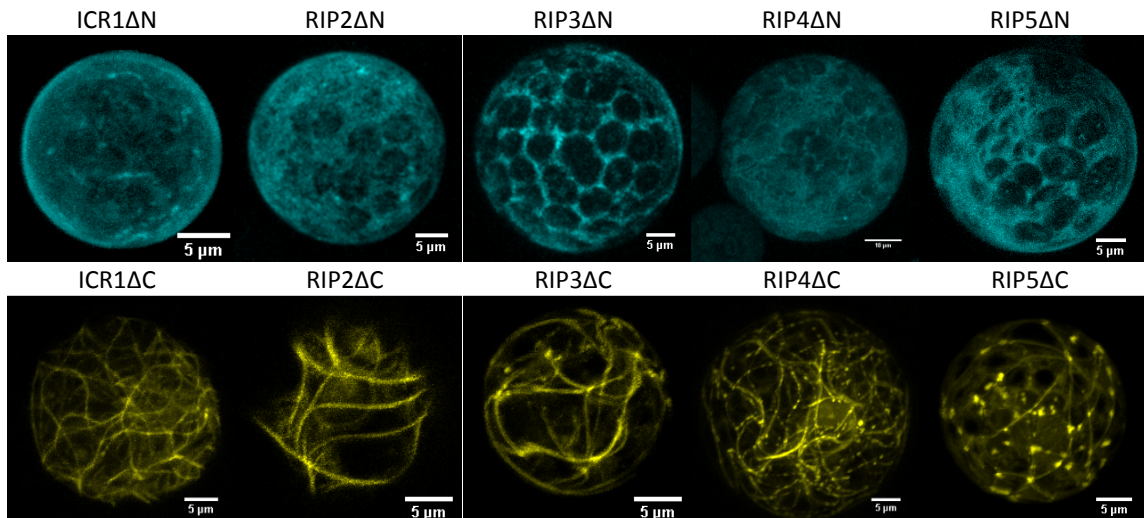
Do tej pory opisano łączenie się z cytoszkieletem jedynie białka RIP3, które nazwano MIDD1 (ang. microtubule depletion domain 1) z powodu jego udziału w zlokalizowanym rozpadzie mikrotubul. Białko to uczestniczy w szlaku sygnalizacyjnym małej GTPazy ROP11 prowadzącym do lokalnej katastrofy mikrotubul kortykalnych i ich zaniku z miejsc powstawania jamek we wtórnej ścianie komórek ksylemu (Oda i Fukuda, 2012). RIP3/MIDD1, podobnie do ICR1, zawiera dwie domeny coiled-coil, dzięki którym asocjuje z cytoszkieletem i błoną komórkową (Oda i Fukuda, 2013b). Ponadto ustalono, że mikrotubule nie odpowiadają bezpośrednio za umieszczanie RIP3/MIDD1 w błonie – użycie taksolu stabilizującego lub oryzaliny depolimeryzującej mikrotubule, nie wpływało na jego pojawianie się w błonie. Za tę funkcję odpowiadała mała GTPaza ROP11 w stanie aktywnym (Oda i in., 2010).

Białka RIP2, RIP4 i RIP5 obserwowano przyżyciowo po raz pierwszy. Chociaż zaobserwowano niewielkie różnice w ich wzorach lokalizacji (Ryc. 8A, 8C, 8D), są one podobne do ICR1, a także RIP3/MIDD1. Warto dodać, że niezwykle trudno było zaobserwować komórki o równomiernym znakowaniu mikrotubul przez marker MAP4 i białka RIP jednocześnie (dotyczy to także opisanych poniżej wizualizacji skróconych wersji białek RIP). Wspólna ekspresja prowadziła niejednokrotnie do znakowania struktur cytoszkieletu tylko przez jedno białko (badane, bądź marker). Często w komórkach powstawały artefakty – złogi, czy plamkowate skupiska obu białek. Można więc przypuszczać, że białka RIP współzawodniczą z markerem o miejsce na mikrotubuli, a zatem ich powinowactwo jest silne, jednakże udowodnienie tego wymaga dalszych prac.

Za asocjację z mikrotubulami odpowiada domena N-końcowa białek RIP

Białko RIP3/MIDD1 wiąże się z mikrotubulami za pomocą domeny N-końcowej (Mucha i in., 2010), natomiast ICR1 oddziałuje z GTPazami ROP, a także podjednostką egzocystu SEC3A poprzez fragment z końca C polipeptydu (Lavy i in., 2007). Przyporównanie sekwencji aminokwasowej wszystkich białek RIP wskazuje, że zarówno region polipeptydu mogący stanowić domenę wiążącą mikrotubule, jak i C-końcowa domena odpowiedzialna

za oddziaływania m. in. z GTPazami ROP, są u nich konserwatywne (Li i in., 2008). Postanowiono sprawdzić, czy konserwatywny fragment N-końcowy białek RIP jest wystarczający dla ich wiązania się z mikrotubulami oraz czy pozbawione tych domen białka RIP zmieniają wzór lokalizacji. Przygotowano plazmidy niosące sekwencje kodujące białka RIP pozbawione 114-121 aminokwasów z końca aminowego polipeptydu. Skrócone białka połączono z białkiem fluorescencyjnym mTFP1 w miejscu brakującej domeny i poddano nadekspresji w protoplastach *Arabidopsis* (Ryc. 9).



Rycina 11 Obraz ekspresji białek RIP pozbawionych domeny N-końcowej (rzęd górny) i samej domeny połączonej z białkiem fluorescencyjnym (rzęd dolny). Opis w tekście.

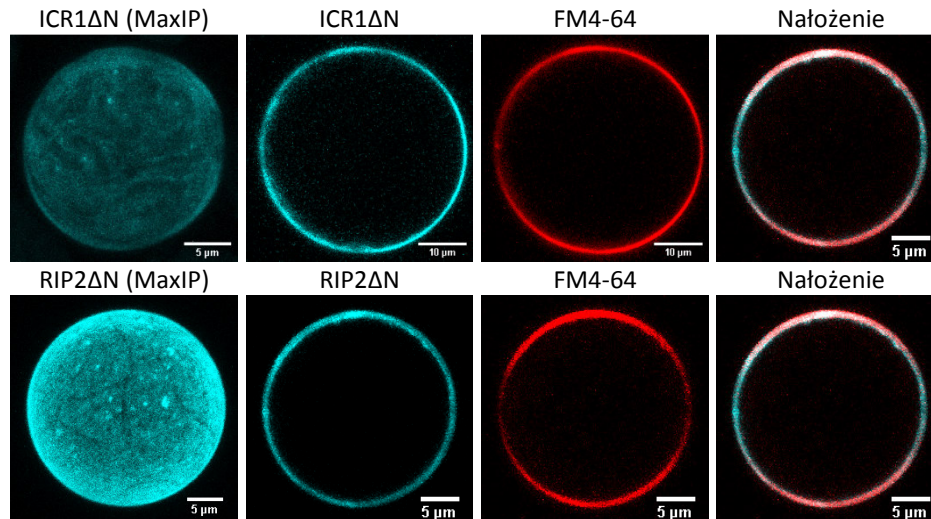
Pozbawienie białka ICR1 116 aminokwasów z końca aminowego spowodowało całkowite zniesienie obserwowanego wcześniej połączenia z mikrotubulami. Białko było widoczne w postaci rozproszonej w cytoplazmie. W większości komórek nie zaobserwowano struktur, czy skupień, a znakowane białko przypominało swobodne białko fluorescencyjne. Usunięcie 121, 118, 114 i 177 aminokwasów z końców aminowych białek RIP2, RIP3/MIDD1, RIP4 i RIP5, odpowiednio, powodowało taki sam efekt (Ryc. 11, rząd górny). Białka RIP straciły powinowactwo do mikrotubul. Dowodzi to, że N-końcowa domena tych białek jest niezbędna dla ich asocjacji z cytoszkieletem. Aby dodatkowo potwierdzić ten wniosek, przeprowadzono eksperyment odwrotny – wyznakowano białkiem fluorescencyjnym same domeny z końca aminowego polipeptydów RIP (Ryc. 11, rząd dolny).

Znakowane przy pomocy białka Venus domeny N-końcowe białek z rodziny RIP poddano nadekspresji w protoplastach komórek rzodkiewnika. Zauważono wyraźnie słabsze powinowactwo do mikrotubul, niż w przypadku polipeptydu pełnej długości. Niemniej, włóknikowate struktury były wyraźnie odrębne od cytoplazmatycznego tła. Znacznie skrócone białka tworzą także plamkowate i punktowe skupienia, szczególnie liczne w przypadku RIP5ΔC (Ryc. 9). Ponadto, białka RIP2ΔC i RIP5ΔC najstabiliej znakowały mikrotubule (Ryc. 9). Te białka są wyraźnie dłuższe od pozostałych RIP (Li i in., 2008), zatem jest możliwe, iż w obrębie usuniętego polipeptydu występuje u nich dodatkowy fragment wzmacniający kontakt z mikrotubulami.

W przypadku $\frac{1}{2}$ (n=10) obserwowanych komórek z nadekspresją mTFP1-ICR1ΔN oraz mTFP1-RIP2ΔN fluorescencja w cytoplazmie była niewidoczna. Wyraźny sygnał pochodził z błony lub przestrzeni kortykalnej komórki (Ryc. 12, MaxIP). Aby potwierdzić obecność badanych białek w błonie, protoplasty poddano barwieniu przy pomocy FM4-64, niespecyficznego markera błon i endocytozy (van Gisbergen i in., 2008). Ustalono,

że znakowaniu ulegała błona komórkowa, o czym świadczy kolokalizacja FM4-64 z badanymi białkami (Ryc. 12). Zatem istotnie, białka RIP mają, oprócz cytoszkieletu, także powinowactwo do błony komórkowej, zapewniane przez fragment C-końcowy polipeptydu.

Jak dotąd wiązanie do mikrotubul jedynie N-końcowej domeny białka RIP opisano dla RIP3/MIDD1. Ustalono, że domena o długości 120 aminokwasów z końca aminowego białka



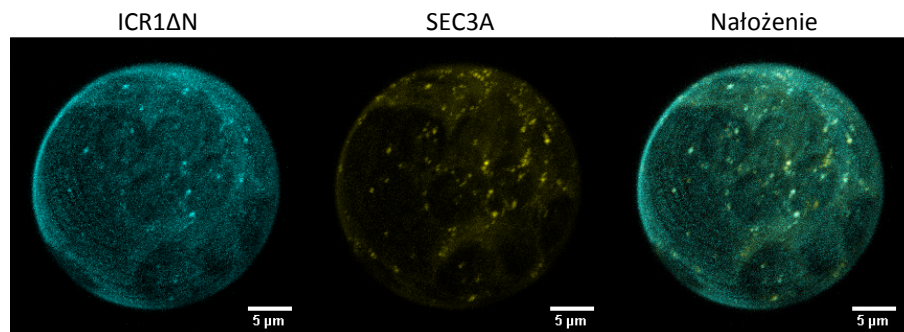
Rycina 12 Asocjacja z błoną komórkową pozbawionych domen N-końcowych białek ICR1 i RIP2. Złożenie skrawków w postaci projekcji maksymalnej intensywności (MaxIP) pokazuje równomierne rozmieszczenie białek w błonie z kilkoma skupieniami. Na przekrojach widoczna kolokalizacja z markerem błony FM4-64.

wystarcza do jego kolokalizacji z mikrotubulami, natomiast jego koniec karboksylowy odpowiada za wzmocnienie asocjacji na końcach + mikrotubul podczas różnicowania się komórek zawiesiny *Arabidopsis* w ksylem (Oda i in., 2010). Pozbawienie RIP3/MIDD1 domeny N-końcowej powodowało zmianę lokalizacji znakowanego białka na cytoplazmatyczną w komórkach epidermy *Arabidopsis* (Mucha i in., 2010). Nie inaczej zachowywało się skrócone RIP3/MIDD1, badane przez nas w protoplastach komórek liści *Arabidopsis*. Mikrotubule były znakowane przez N-końcowy fragment białka o podobnej, do badanej wcześniej, długości – 118 aminokwasów. Identyczne obserwacje poczyniono także badając pozostałe białka RIP. Można zatem wnioskować, że także ich lokalizacja subkomórkowa jest podobna, ponieważ dzielą one wspólny plan budowy. Za lokalizację są u nich odpowiedzialne te same fragmenty polipeptydów. Ponadto widocznie osłabione wiązanie do cytoszkieletu N-końcowych domen wszystkich białek RIP (Ryc. 11) wskazuje, że w asocjacji uczestniczy także fragment bliższy końca karboksylowego. Może on wzmacniać położenie białek RIP na mikrotubuli, tak jak proponuje się to dla białka RIP3/MIDD1.

Wiązanie się białek RIP z błoną komórkową opisano zarówno w przypadku ICR1, jak i RIP3/MIDD1. Wykazano, że za lokalizację błonową ICR1 odpowiada jedynie region C-końcowy. Uważa się, że motyw QWRKAA przy końcu C, a także region bogaty w lizynę są potrzebne do umiejscowienia białka w błonie. Co ciekawe, motyw QWRKAA jest odpowiedzialny także za wiązanie małych GTPaz ROP. (Li i in., 2008). Co więcej, mutacja w obrębie tego motywu znosiła fenotyp powodowany nadekspresją ICR1 w komórkach, a odpowiadający fenotypowi nadekspresji GTPaz ROP w zablokowanym stanie aktywnym (ROP-CA, ang. constitutively active) (Bloch i in., 2008). Białko RIP3/MIDD1 w wersji pozbawionej 120 aminokwasów z końca N nie kolokalizowało z mikrotubulami, ale zachowało asocjację w pobliżu błony, w domenach

odpowiadającym jamkom wtórnej ściany komórkowej. Wykazano ponadto, że za prawidłowe wiązanie się z błoną komórkową tego białka odpowiada aktywna GTPaza ROP11 (Oda i in., 2010). Zatem oba poznane białka z rodziny RIP oddziałują z małymi GTPazami ROP w obrębie fragmentu bliższego końca karboksylowego polipeptydu.

Powyższe obserwacje dowodzą podwójnej roli wszystkich białek z rodziny RIP, którą częściowo już opisano dla ICR1 i znacznie lepiej dla RIP3/MIDD1. Są to białka asocjujące z mikrotubulami, za co odpowiada przede wszystkim N-końcowy fragment o długości około 120 (177 u RIP5) aminokwasów. Stanowią one węzeł dla oddziaływań małych GTPaz i ich efektorów. Mikrotubule w tym przypadku stanowią przestrzenne ograniczenie zasięgu tych oddziaływań, bądź też wyznaczają miejsca tworzenia się błonowych domen sprzyjających takim oddziaływaniom. Specyficzność oddziaływań białek RIP z małymi GTPazami ROP w protoplastach *Arabidopsis* oraz potencjalne współoddziaływania z efektorami ROP postanowiono zbadać w toku dalszych prac. Sprawdzone także, czy inne niż ICR1 (oddziałujące z SEC3A) białka RIP kolokalizują z wybranymi podjednostkami kompleksu egzocyst.



Rycina 13 Częściowa kolokalizacja pozbawionego domeny N-końcowej białka ICR1 z białkiem SEC3A. Opis w tekście.

Oddziaływanie ICR1-SEC3A jest możliwe bez domeny N-końcowej ICR1

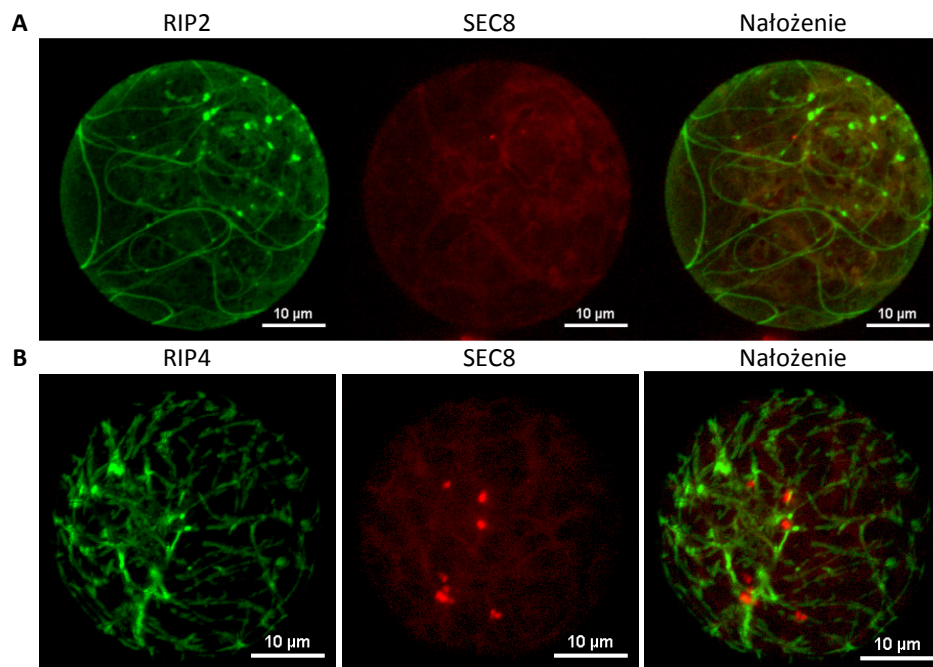
Sprawdzono też, czy usunięcie domeny N-końcowej ICR1 będzie miało wpływ na obserwowaną wcześniej kolokalizację z białkiem SEC3A. Pomimo cytoplazmatyczno-błonowej lokalizacji ICR1ΔN, była widoczna częściowa kolokalizacja z SEC3A w punktach w błonie komórkowej, tak jak w przypadku białka ICR1 o pełnej długości (Ryc. 13). Powyższe obserwacje są zgodne z wcześniejszymi wynikami pochodzącymi z badania tego oddziaływania w drożdżowym systemie dwuhybrydowym (Lavy i in., 2007). Zatem potwierdzono *in vivo*, że za oddziaływanie z SEC3A odpowiada fragment około ⅓ białka z końca karboksylowego ICR1, natomiast fragment/domena N-końcowa umożliwia białku wiązanie mikrotubul. Jeśli do obu oddziaływań dochodzi jednocześnie, to miejsca skupień SEC3A powinny być skorelowane z położeniem mikrotubul, o czym na razie nie ma doniesień literaturowych. Niestety nie udało się tego potwierdzić wykorzystując do wizualizacji marker MAP4.

Wybrane podjednostki egzocystu nie kolokalizują z białkami RIP, choć asocjują ze znakowanymi przez nie mikrotubulami

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, czy poza ICR1 pozostałe białka RIP wpływają na dynamikę wybranych podjednostek egzocystu w komórce. W tym celu przeprowadzono próbę koekspresji znakowanych fluorescencyjnie białek SEC8 i SEC3A ze znakowanymi RIP2, RIP4 i RIP5 w protoplastach izolowanych z liści *Arabidopsis*.

W toku badań zarejestrowano dynamikę mikrotubul znakowanych przez RIP5-EGFP (Film 2). Białko fuzyjne SEC3A-TagRFP było widoczne w postaci punktów na wyznakowanych

przez RIP5-EGFP mikrotubulach lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie. Zauważono, że SEC3A leżące na mikrotubulach przemieszają się wraz z nimi, a dynamika tych struktur jest wspólna. Jedno ze skupień SEC3A poruszało się wzdłuż włókna cytoszkieletu na krótkim dystansie. Oznacza to, że podjednostka kompleksu egzocyst SEC3A była połączona z cytoszkieletem tubulinowym. Nie zaobserwowano zjawisk odłączania się punktów SEC3A od mikrotubul. Ponieważ nie towarzyszą im skupienia białka RIP5, a oba kanały fluorescencji pozostają odrębne, nie uznano obrazu zarejestrowanego na Filmie 2 za kolokalizację. RIP5-EGFP pełniło raczej rolę markera cytoszkieletu, umożliwiając obserwację asocjacji i dynamiki białka SEC3A.



Rycina 14 Koekspresja wybranych białek RIP z podjednostką egzocystu. Białka RIP2 (A) oraz RIP4 (B) nie kolokalizowały z białkiem SEC8, chociaż białko to przejściowo asocjowało do mikrotubul (por. Film 3)

Film 2 ujawnia także, że dynamika mikrotubul była zachowana, gdy wiązało się z nimi białko RIP5-EGFP ulegające nadekspresji. Włókna zmieniały kształt, wykręcały się, a obecne na nich struktury bogate w podjednostkę SEC3A były jakby uwiązane do mikrotubuli, poruszając się razem z nią. Nie zarejestrowano zjawisk katastrof mikrotubul, ani ich rozgałęziania. Asocjacja SEC3A z mikrotubulami korykalnymi, wspólnie z białkiem ICR1 była już obserwowana (Ryc. 8B). Punkty skupiające SEC3A w pobliżu błony były także wysyczone znakowanym ICR1, czego nie obserwowano dla białka RIP5. Białko SEC3A w licznych punktach w pobliżu błony komórkowej było wcześniej obserwowane w komórkach epidermy rzodkiewnika. Badacze uznali, że nie kolokalizuje ono z mikrotubulami korykalnymi, ani z nowo inkorporowanymi do błony kompleksami syntazy celulozy CSC (Zhang i in., 2013). Izolowany protoplast odbudowuje od początku utraconą podczas procedury trawienia ścianę komórkową, jest zatem możliwe, że białko SEC3A bierze udział w syntezie ściany *de novo*, co dodatkowo może potwierdzać fakt silnego skupienia tego białka w szczytowej części komórek o spolaryzowanym wzroście, jak łagiewka pyłkowa (Bloch i in., 2016).

Białka RIP2 i RIP znakowane przy pomocy EGFP są widoczne na Rycinie 14, gdzie jest widoczne ich łączenie się z mikrotubulami korykalnymi oraz tworzenie charakterystycznych mikrodomen błonowych. Podjednostka egzocystu SEC8 była widoczna w cytoplazmie oraz w znacznie jaśniejszych plamkach, niekiedy punktach, nie kolokalizujących z badanymi

białkami RIP. Skupiska bogate w SEC8 były położone blisko struktur znakowanych przez RIP lub łączyły się z nimi. Podczas obserwacji koekspresji białek RIP5 i SEC8 (Film 3) udokumentowano ruch plamkowej struktury znakowanej przez SEC8-TagRFP wzdłuż mikrotubuli znakowanej przez RIP5-EGFP. Struktura przeszła z cytoplazmy na włókno cytoszkieletu, przemieściła się wzdłuż włókna i odłączyła z powrotem do cytoplazmy. Podobnie jak podczas badania pary białek RIP5 z SEC3A, mimo ruchu pęcherzykowej struktury wzdłuż mikrotubuli, fluorescencyjny sygnał EGFP i TagRFP nie kolokalizował. Ponownie włókna tubulinowe znakowane przez RIP5 były dynamiczne – przemieszczały się i wykręcały.

Większość z obserwowanych plamkowatych struktur bogatych w białko SEC8-TagRFP była duża i przypominała znakowany przedział TGN z wcześniejszych etapów badań (por. Ryc. 8). Białko to obserwowano wcześniej w cytoplazmie, a także w postaci punktowych skupień w pobliżu błony komórkowej (Fendrych i in., 2013). Ostatnie doniesienia wskazują, że SEC8 jest najpowszechniej występującą podjednostką egzocystu, związaną z systemem błon wewnętrznych. Wykazano, że białko to wyizolowano wspólnie ze wszystkimi badanymi markerami przedziałów błonowych, poza znacznikiem aparatu Golgiego i tonoplastu (Heard i in., 2015). Wydaje się zatem prawdopodobne, że obserwowane struktury znakowane przez SEC8-TagRFP były którymś z przedziałów systemu błon wewnętrznych. Jednakże bez potwierdzenia tego przy pomocy białek markerowych nie można tego stwierdzić jednoznacznie.

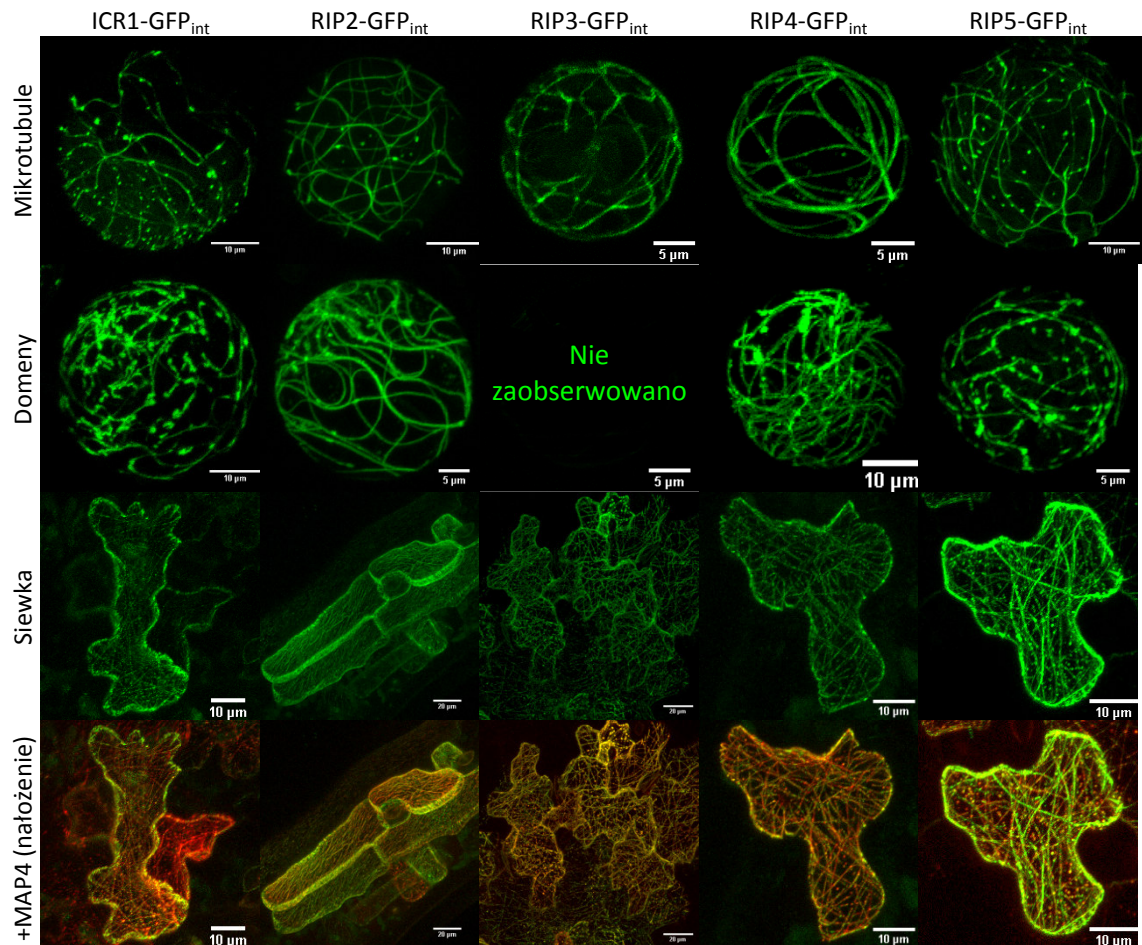
Próbie powiązania białek RIP z kompleksem egzocyst podjęto badając RIP3/MIDD1 przy pomocy drożdżowego systemu dwuhybrydowego. Nie stwierdzono oddziaływań z SEC3A, SEC5A i EXO70A1 (Mucha i in., 2010). Wskazuje to na specyficzność oddziaływań RIP-egzocyst i brak ogólnej tendencji tych białek do asocjacji, jak ma to miejsce na przykład w przypadku oddziaływań RIP-ROP (por. niżej). Odkryte niedawno białka VETH1/2 pośredniczą w oddziaływaniu podjednostki EXO70A1 z kompleksem COG2 i w rekrutacji egzocystu do błony poprzez oddziaływanie z mikrotubulami kortykalnymi. VETH1/2 są zbudowane z pętli coiled-coil (Vukašinović i Žárský, 2016), podobnie jak białka RIP i mechanizm ich działania wydaje się być zbliżony. Wskazuje to na wykształcenie przez rośliny różnych grup białek o podobnym molekularnym mechanizmie działania, a zróżnicowanych pod względem oddziałujących z nimi regulatorów i efektorów. W świetle powyższych obserwacji i najnowszych doniesień oddziaływanie białka ICR1 z podjednostką SEC3A pozostaje wciąż jedynym poznanym łącznikiem sygnalizacji z udziałem GTPaz ROP z kompleksem egzocyst.

Białka RIP asocjują z mikrotubulami i jednocześnie tworzą domeny w błonie komórkowej protoplastów *Arabidopsis*

Dwoista natura białek z rodziny RIP, która manifestuje się wiązaniem do mikrotubul z jednej strony, a z drugiej obecnością w domenach błonowych, może utrudniać ich obserwację w stanie fizjologicznym z przyłączonym znacznikiem fluorescencyjnym na jednym z końców polipeptydu. Dlatego postanowiono przygotować konstrukcje genetyczne, w których znacznik fluorescencyjny EGFP zagnieżdżono w regionach zmiennych białek RIP. Sekwencje kodujące EGFP i fragmentów RIP oddzielono łącznikami o składzie aminokwasowym zapewniającym elastyczność, co zwiększało prawdopodobieństwo poprawnego zwinięcia się białka (por. Materiały 6.2.4).

Umieszczenie markera fluorescencyjnego wewnątrz polipeptydu nie zmieniło obserwowanego wcześniej, ogólnego wzoru lokalizacji białek RIP – znakowane były struktury

cytoszkieletu tubulinowego (Ryc. 15), aczkolwiek znacznie mocniej zaznaczały się punktowe skupienia, czy mikrodomeny RIP, zarówno powstające wzdłuż mikrotubul, jak i odrębne. Plamkowate mikrodomeny obserwowano u ½ komórek z nadekspresją białek ICR1-GFP_{int}, RI2-GFP_{int} i RIP5-GFP_{int} oraz w ⅓ komórek z nadekspresją RIP4-GFP_{int} (n=20). Zdecydowanie częściej, bo w ½ obserwowanych komórek (n=20) białka chimeryczne znajdowały się w błonie komórkowej, formując duże, plamkowate domeny. Co ciekawe, jednocześnie zanikało znakowanie cytoszkieletu, od którego powiększające się domeny brały swój początek. W skrajnych przypadkach domeny te zajmowały niemal całą powierzchnię błony (nie udało się tego udokumentować jedynie dla RIP3-GFP_{int}) (Ryc. 15).



Rycina 15 Znakowane EGFP wewnątrz polipeptydu białka RIP znakowały cytoszkielet i domeny w błonie komórkowej położone ponad mikrotubulami. W siewkach *Arabidopsis* była widoczna jedynie kolokalizacja z markerem mikrotubul.

Wektory wykorzystane do przejściowej ekspresji badanych białek w protoplastach komórek mezofilu liści *Arabidopsis* umożliwiały stosunkowo łatwe przeniesienie kaset ekspresyjnych do wektora binarnego pZP-RCS2 (Goderis i Bolle, 2002; Chung i in., 2005) (por. Materiały 6.4). Przygotowano zestaw wektorów binarnych niosących dwie kasetki ekspresyjne i wprowadzono je do czterodniowych siewek *Arabidopsis* metodą FAST (Li i in., 2009) (por. Materiały 3). Wektory binarne niosły sekwencje kodujące białka RIP znakowane EGFP wewnątrz polipeptydu oraz marker mikrotubul TagRFP-MAP4. Postanowiono sprawdzić, czy obecność ściany komórkowej wpłynie na wzór lokalizacji białek RIP oraz tworzenie domen błonowych. Okazało się, że wszystkie białka RIP kolokalizowały z mikrotubulami korykalnymi, znakowanymi przez MAP4 i otaczającymi całą komórkę epidermy (Ryc. 15). Niestety nie zauważono formowania się rozległych domen błonowych. Badane białka pojawiały

się jedynie w niewielkich, punktowych nanodomenach odrębnych od mikrotubul, ale kolokalizujących z markerem MAP4. Podobny obraz opisano dla nadekspresji znakowanego białka RIP3/MIDD1 (Mucha i in., 2010; Oda i in., 2010). Zatem białka RIP są białkami wiążącymi mikrotubule, ale do ich roli w tworzeniu mikrodomen błonowych należy wciąż podchodzić z rezerwą.

Opublikowane dane dotyczące składu proteomu zasocjowanego z mikrotubulami pochodzą z miniprotoplastów (pozbawionych wakuol komórek) otrzymanych z zawiesiny *Arabidopsis*. Frakcjonowanie, oczyszczanie i analiza LC-MS/MS pozwoliła zidentyfikować 727 białek, w tym wiele znanych i wiele nieopisanych, ale wytypowanych do roli białek MAP. Spośród białek RIP w tym badaniu wykryto RIP3/MIDD1 i RIP5. Białka te były obecne w niewielkiej ilości. RIP1, 2 i 4 nie wykryto nawet w referencyjnej frakcji białek rozpuszczalnych. Późniejsza analiza mikroskopowa wybranych, nowo zidentyfikowanych, białek MAP wykazała, że mogą one łączyć się z mikrotubulami tworząc różne wzory – znakując włókna jednorodnie, punktowo, czy powodować powstawanie grubszych wiązek znakowanych mikrotubul. Co ciekawe, niektóre z wytypowanych białek okazały się nie asocjować z mikrotubulami (Hamada i in., 2013).

Wzbogacanie błony komórkowej w badane białka RIP w postaci powiększających się domen błonowych, które pojawiają się w niewyjaśniony sposób, jest zaskakującą i niemal unikatową właściwością tych białek. Początkowo uznaliśmy to zjawisko za artefakt spowodowany stosowaną nadekspresją białek. Odmienny od uznawanego za dziki fenotyp obserwowano podczas nadekspresji ICR1 pod kontrolą promotora wirusowego (CaMV 35S). Odpowiadał on fenotypowi ciągłej aktywacji ROP (Lavy i in., 2007). Z drugiej strony wiadomo, że błona pojedynczej komórki *Arabidopsis* lub tytoniu jest praktycznie w całości pokryta różnymi mikrodomenami. Mogą one być platformą dla oddziaływań białko-białko i ułatwiać funkcjonowanie białek błonowych i zasocjowanych z błoną (Jarsch i in., 2014). Białka REM i FLOT (remoryny i flotyliny) mogą służyć za kanoniczny przykład i model białek tworzących różne domeny błonowe u roślin. Są one uważane za białka rusztowania i mogą oligomeryzować w struktury wyższego rzędu. Mogą także oddziaływać z szeregiem białek, na przykład RLK. Remoryny, podobnie jak białka RIP, swoją asocjację z błoną zawdzięczają konserwatywnym motywom coiled-coil, są też regulowane w obrębie N-końcowego regionu nieuporządkowanego ID (ang. intrinsically disordered). Domeny tworzone przez te białka są w większości statyczne (zachowują kształt), natomiast białka w obrębie domen ulegają ciągłej wymianie (Konrad i Ott, 2015). Wydaje się, że wykorzystanie przez nas w badaniach protoplastów także nie pozostaje bez znaczenia. Protoplasty, stale odtwarzające ścianę po jej enzymatycznym usunięciu, mają znacząco zmienioną ruchliwość lateralną białek w błonie (Jarsch i in., 2014). W przejściowo transfekowanych siewkach te same białka (RIP) nie tworzyły domen, należy zatem uznać, przynajmniej do czasu pojawienia się wyników badań z transformowanych roślin, że ich tworzenie jest cechą swoistą dla protoplastów. Z drugiej strony badania na protoplastach umożliwiły zaobserwowanie domen w ogóle.

W toku badań uzyskano po raz pierwszy obrazy mikroskopowe komórek siewek *Arabidopsis* z nadekspresją znakowanych fluorescencyjnie białek RIP2, RIP4 i RIP5, a także ICR1 o zmienionej, w stosunku do dotychczas opisywanej, lokalizacji subkomórkowej. Okazało się, że białka te powielają w komórce *Arabidopsis* wzór lokalizacji białka RIP3/MIDD1, znanego wcześniej i opisanego jako nowe białko MAP (Mucha i in., 2010). W kolejnych pracach wykazano, że RIP3/MIDD1 bierze udział w ustanawianiu błonowych domen wykluczających

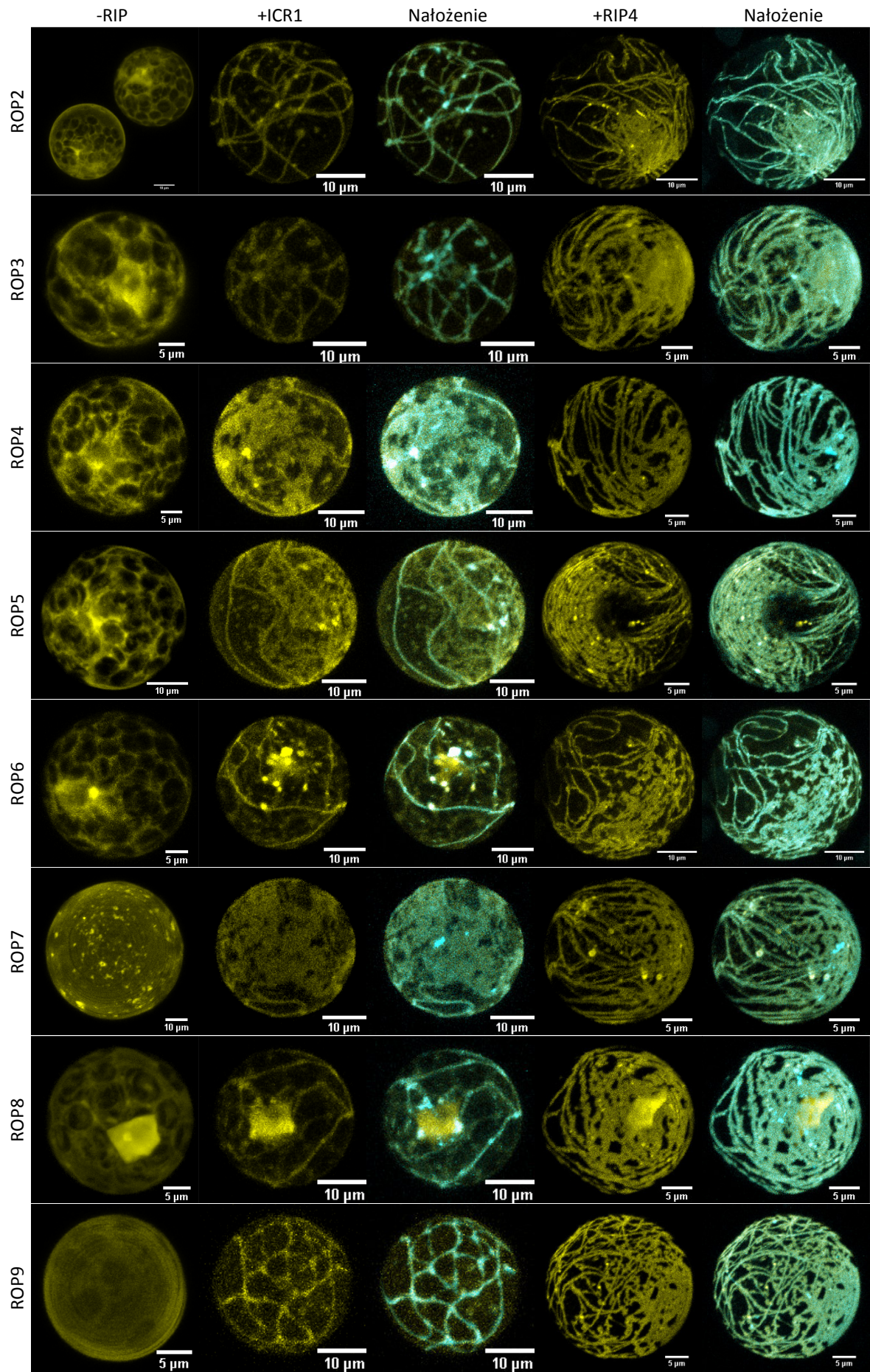
mikrotubule kortykalne. Co ciekawe same włókna cytoszkieletu stanowiły przestrzenne ograniczenie – „płot” – obszaru domen, co pozwala komórkom różnicującym się w ksylem odkładanie wtórnej ściany komórkowej według określonego deseni. Ostatecznie udało się zwizualizować takie domeny, wymagało to jednak koekspresji RIP3/MIDD1 aż z czterema dodatkowymi białkami (Oda i Fukuda, 2012). Wspólny wzór lokalizacji oraz budowa pozostałych białek RIP wskazują, że najprawdopodobniej działają one w zbliżony sposób. RIP jest rodziną białek rusztowania, pozbawionych funkcji katalitycznych. Wykazano, że RIP3/MIDD1 nie wykazuje aktywności depolimeryzującej mikrotubule *in vitro*, natomiast powoduje lokalne zjawiska katastrof w komórce (Oda i Fukuda, 2013a). Oznacza to, że RIP stanowią miejsce spotkań innych czynników białkowych, same nie mając swoistej aktywności. Dokładne określenie ich funkcji będzie zatem wymagało poznania znacznej liczby białek z nimi oddziałujących.

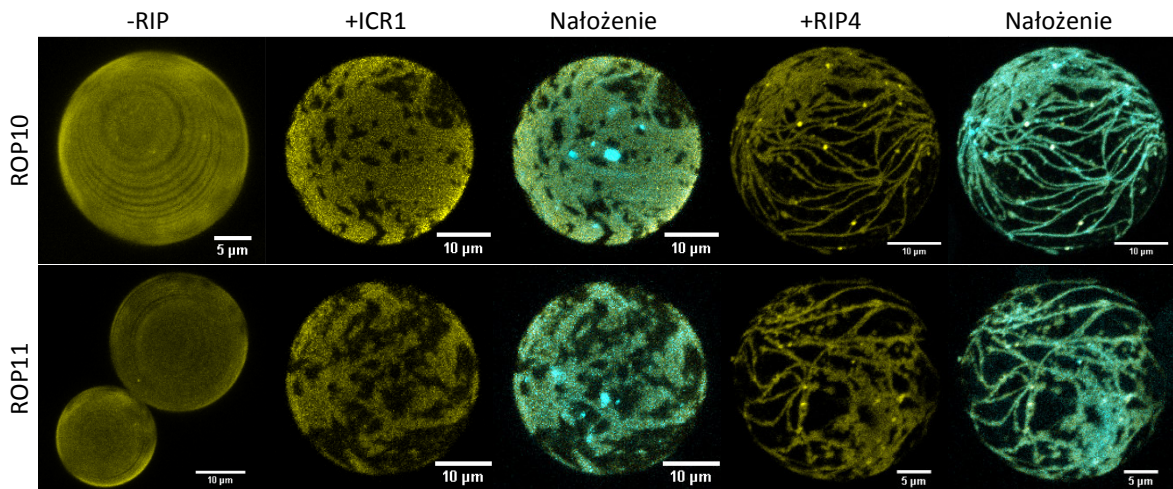
Wspólna ekspresja białek RIP z białkami ROP powoduje przejście małych GTPaz do domen błonowych i oddziaływanie z RIP

W toku badań nie udało się znaleźć dowodów na oddziaływanie innych niż ICR1 białek z rodziny RIP z podjednostkami egzocystu (SEC3A). Dotychczas nie udowodniono także, by to sam egzocyst był kompleksem regulatorowym. Jest on efektem małych GTPaz, ponieważ fenotypy mutantów w niektórych podjednostkach powtarzają obserwacje poczynione u mutantów małych GTPaz (Hála i in., 2008). ICR1 oddziałuje z roślinnymi małymi GTPazami ROP1 i ROP10, najprawdopodobniej przekazując sygnał aktywacji podjednostce egzocystu SEC3A (Bloch i in., 2008). Podobnie białko RIP3/MIDD1 funkcjonuje w komórce ksylemu jako efektor ROP11, doprowadzając do modyfikacji architektury cytoszkieletu tubulinowego (Oda, 2015). Postanowiono ustalić, które małe GTPazy ROP mogą oddziaływać z białkami z rodziny RIP. W tym celu próbie wspólnej ekspresji w protoplastach *Arabidopsis* poddano znakowane fluorescencyjnie białka ICR1, RIP2, RIP4, RIP5 i wszystkie jedenaście małych GTPaz ROP. Ponieważ nie zawsze udawało się uzyskać satysfakcjonujące obrazy nadekspresji białka ROP1, wykluczono je z dalszych analiz. Nie przeprowadzono także poniższych testów dla białka RIP3/MIDD1.

Obserwacja koekspresji białek RIP z małymi GTPazami ROP wykazała niemal całkowitą kolokalizację sygnałów z markerów fluorescencyjnych we wszystkich komórkach. Co więcej, zmienił się komórkowy wzór lokalizacji badanych białek i to z obu rodzin. Zauważono, że kolokalizacja przyjmowała dwa wzory, zależnie od białka RIP poddanego wspólnej nadekspresji z GTPazą ROP (Ryc. 16, 17).

Koekspresja ICR1 i RIP4 ze wszystkimi badanymi ROP powodowała zmianę lokalizacji GTPaz z cytozolowej, jądrowej, i błonowej na tę odpowiadającą białku RIP (Ryc. 16). Małe GTPazy połączone z białkiem Venus przechodziły z cytoplazmy na cytoszkielet (mikrotubule) i mikrodomeny błonowe tworzące się w miejscach przebiegu mikrotubul ze związanymi białkami ICR1-mTFP1 i RIP4-mTFP1. Wzmocniona jądrowa lokalizacja GTPazy ROP8 nie zmieniła się. Natomiast GTPazy ROP9-11 zmieniły wzór lokalizacji z błonowej na kolokalizujący z domenami błonowymi tworzonymi przez badane białka RIP (Ryc. 16). W wyniku wydłużonej ekspresji znakowaniu przez oba białka ulegała błona komórkowa w postaci rozległych domen.





Rycina 16 Koekspresja białek ICR1 i RIP4 z GTPazami ROP. Małe GTPazy ROP poddane nadekspresji były zlokalizowane w cytoplazmie i błonie protoplastów (kolumna -RIP). Natomiast poddane ekspresji wspólnie z ICR1 i RIP4 kolokalizowały z nimi na mikrotubulach i w domenach błonowych.

W przypadku koekspresji małych GTPaz ROP z białkiem RIP2 obraz mikroskopowy był nieco odmienny, niż w przypadku białek ICR1 i RIP4. RIP2-mTFP1 tym razem znacznie słabiej zaznaczało się na mikrotubulach, za to wyraźnie znakowało błonę komórkową (Ryc. 17). Nie zaobserwowano pojawiania się domen, a błona była udekorowana raczej równomiernie kolokalizującymi białkami. W niektórych komórkach można było za to zauważyć niewielkie plamki w błonie pozbawione kolokalizujących białek. Ponadto lokalizacja cytoplazmatyczno-jądrowa ROP nie zmieniała się tak silnie, jak w przypadku koekspresji z ICR1 i RIP4, które wydawały się wymiatać ROP z komórki do swoich domen. Białko ROP8 jednakże, podobnie jak poprzednio, nie opuszczało jądra komórkowego (Ryc. 17).

Białko RIP5 poddane koekspresji z małymi GTPazami ROP zachowywało się podobnie do białka RIP2 (Ryc. 17). Kolokalizacja badanych białek była obserwowana w błonie komórkowej, ale nie miało miejsca całkowite przejście GTPaz ROP w miejsca bogate w RIP5, część GTPaz pozostawała w cytozolu. Znakowanie mikrotubul przez RIP5 było bardzo nieznaczne, podobnie jak delikatne znakowanie cytoszkieletu przez niektóre GTPazy. Wzór kolokalizacji białka z RIP5-mTFP1 z małymi GTPazami ROP można określić jako pośredni pomiędzy RIP2 a ICR1 i RIP4.

Postanowiono wykorzystać metodę FLIM/FRET, by sprawdzić, czy kolokalizujące białka oddziałują ze sobą. W tym celu zbadano czas trwania fluorescencji białka mTFP1 połączonego z badanymi białkami RIP w obecności białka fluorescencyjnego Venus, połączonego z GTPazami ROP. Dokonano także pomiarów kontrolnych dla samego białka mTFP1, dla mTFP1 w koekspresji z Venus oraz dla białka fuzyjnego mTFP1-Venus z dwudziestoaminokwasowym łącznikiem. Wyniki pomiarów FLIM zebrano w Tabeli 1 i zaprezentowano na Wykresach 1-5.

Średni czas zaniku fluorescencji białka mTFP1 (donor FRET) w protoplastach *Arabidopsis* wyniósł $2,71 \pm 0,03$ ns (SD, $n=7$). W obecności akceptora FRET, białka Venus niepołączonego z mTFP1, czas życia donora uległ nieznacznemu skróceniu do $2,61 \pm 0,03$ ns (SD, $n=5$; $p < 0,001$ test t). Uznano zatem $2,61$ ns za czas referencyjny dla badań FLIM z użyciem białek fluorescencyjnych mTFP1 i Venus, ponieważ uwzględnia tło powstałe w wyniku nadekspresji badanych białek, a nie świadczy o ich bezpośredniej bliskości. Pomiar czasu trwania fluorescencji kontrolnego białka mTFP1-Venus wykazał, że uległ on skróceniu do $1,62 \pm 0,09$ ns (SD, $n=5$; $p < 0,001$ test t). Warto zaznaczyć, że w toku badań

nie zarejestrowano krótszego czasu trwania fluorescencji białka mTFP1, zatem wartość 1,62 ns świadczy o maksymalnym zbliżeniu białek badanych.

Badanie oddziaływań białko-białko metodą FLIM/FRET wykazało istotne skrócenie czasu zaniku fluorescencji białka mTFP1, donora transferu energii, we wszystkich badanych próbach. Porównanie parami czasów zaniku uzyskanych dla prób badanych z pomiarem referencyjnym wykazało jednakże, że nie można uznać za istotną różnicę dla badanych par ICR1+ROP2, RIP2+ROP3-4, RIP4+ROP7 (Tab. 1 i Wykresy 1-4). Średni czas zaniku fluorescencji mTFP1 dla pozostałych badanych par białek różni się istotnie od próby referencyjnej ($p < 0,05$; test t).

ICR1 wiązało małe GTPazy ROP naj słabiej. Największa zmiana czasu trwania fluorescencji to jedynie 0,22 ns i została zmierzona dla koekspresji z ROP4 (Wykres 1, Ryc. 18). Jednak różnice pomiędzy pozostałymi pomiarami są niewielkie, czas zaniku donora mTFP1 oscyluje około 2,45 ns. Nie można zatem wskazać GTPazy wiążącej się do ICR1 znacząco mocniej ani też znacząco słabiej. Tak drobna zmiana sugeruje też, że ewentualne oddziaływania białko-białko są słabe lub przejściowe. Nie można także wykluczyć, że białko fluorescencyjne stanowiło przeszkodę dla prawidłowego połączenia się ICR1 z GTPazami ROP (badano białko ICR1-mTFP1). Zmianę wzoru lokalizacji ICR1 zależnie od umieszczenia markera obserwowano wcześniej.

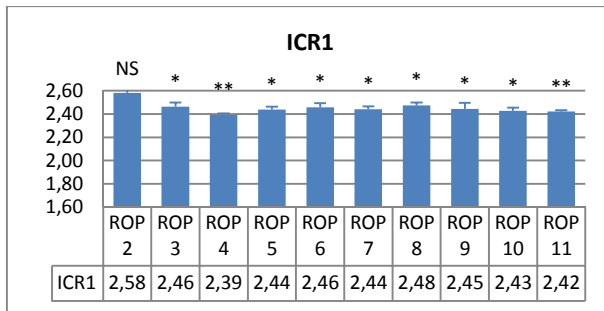
Białko RIP2 wyraźnie mocniej wiązało małe GTPazy ROP2, ROP8 i ROP9 (odpowiednio 2,14 ns; 2,01 ns; 2,19 ns) (Wykres 2). Pozostałe czasy zaniku fluorescencji mTFP1 wyniosły około 2,36 ns, były więc wyraźnie dłuższe. Można zatem wnioskować o preferencji RIP2 do oddziaływania z niektórymi małymi GTPazami ROP.

Białko RIP4 wykazało największe powinowactwo do GTPaz ROP8, ROP10 i ROP11 (2,15 ns; 2,19 ns; 2,14 ns; odpowiednio). Nieco dłuższy czas zaniku fluorescencji (2,24 ns) białka mTFP1 zarejestrowano dla ROP5 i ROP9, pozostałe wyniki wyniosły około 2,36 ns. Na podstawie pomiarów FLIM nie można zatem stwierdzić, że białko RIP4 preferencyjnie wiąże się z którąś z GTPaz ROP (Wykres 3).

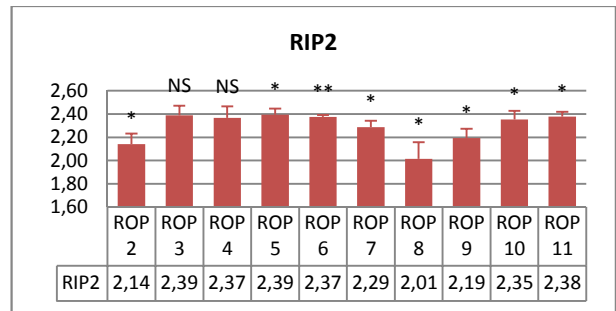
Zdecydowanie najkrótsze czasy życia fluorescencji zarejestrowano podczas badania FLIM białka RIP5-mTFP1 z małymi GTPazami ROP połączonymi z białkiem Venus. 1,75 ns i 1,80 ns dla ROP9 i ROP10 (Wykres 4), odpowiednio, były bardzo blisko wartości minimalnych próby

	ICR1 t (ns)	SD	p	RIP2 t (ns)	SD	p	RIP4 t (ns)	SD	p	RIP5 t (ns)	SD	p
ROP2	2,58	0,07	NS	2,14	0,18	*	2,37	0,11	**	2,09	0,12	*
ROP3	2,46	0,06	*	2,39	0,17	NS	2,36	0,07	*	2,24	0,07	*
ROP4	2,39	0,03	**	2,37	0,20	NS	2,37	0,10	*	2,08	0,11	*
ROP5	2,44	0,05	*	2,39	0,11	*	2,24	0,12	*	2,15	0,10	*
ROP6	2,46	0,06	*	2,37	0,03	**	2,35	0,10	*	2,01	0,02	**
ROP7	2,44	0,05	*	2,29	0,11	*	2,16	0,29	NS	1,91	0,03	**
ROP8	2,48	0,04	*	2,01	0,29	*	2,15	0,13	*	2,00	0,11	*
ROP9	2,45	0,10	*	2,19	0,16	*	2,24	0,12	*	1,75	0,11	*
ROP10	2,43	0,05	*	2,35	0,17	*	2,19	0,16	*	1,80	0,14	*
ROP11	2,42	0,02	**	2,38	0,09	*	2,14	0,07	*	1,94	0,19	*

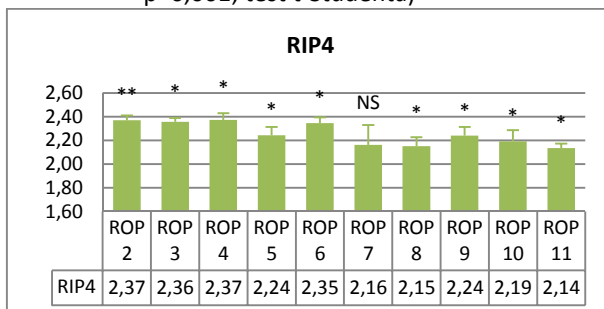
Tabela 1 Zebrane wyniki pomiarów FLIM oddziaływań badanych białek RIP z GTPazami ROP. We wszystkich próbach zarejestrowano skrócenie czasu trwania białka donora, choć nie zawsze wynik okazał się istotny w teście t-Studenta. Opis w tekście. SD – odchylenie standardowe, p – istotność statystyczna (NS – $p > 0,05$; * - $0,001 < p < 0,05$; ** - $p < 0,001$)



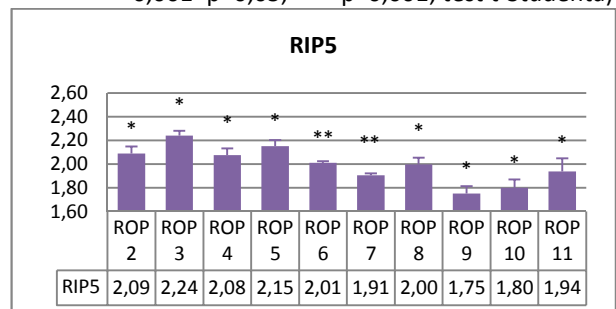
Wykres 1 Pomiar oddziaływań białka ICR1 z GTPazami ROP. Zarejestrowano nieznaczne skrócenie czasu trwania fluorescencji białka donora. Słupki przedstawiają standardowy błąd średniej. (NS – $p > 0,05$; * - $0,001 < p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; test t-Studenta)



Wykres 2 Pomiar oddziaływań białka RIP2 z GTPazami ROP. Zarejestrowano większe skrócenie czasu trwania fluorescencji w koekspresji z ROP2 i ROP8. Słupki przedstawiają standardowy błąd średniej. (NS – $p > 0,05$; * - $0,001 < p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; test t-Studenta)



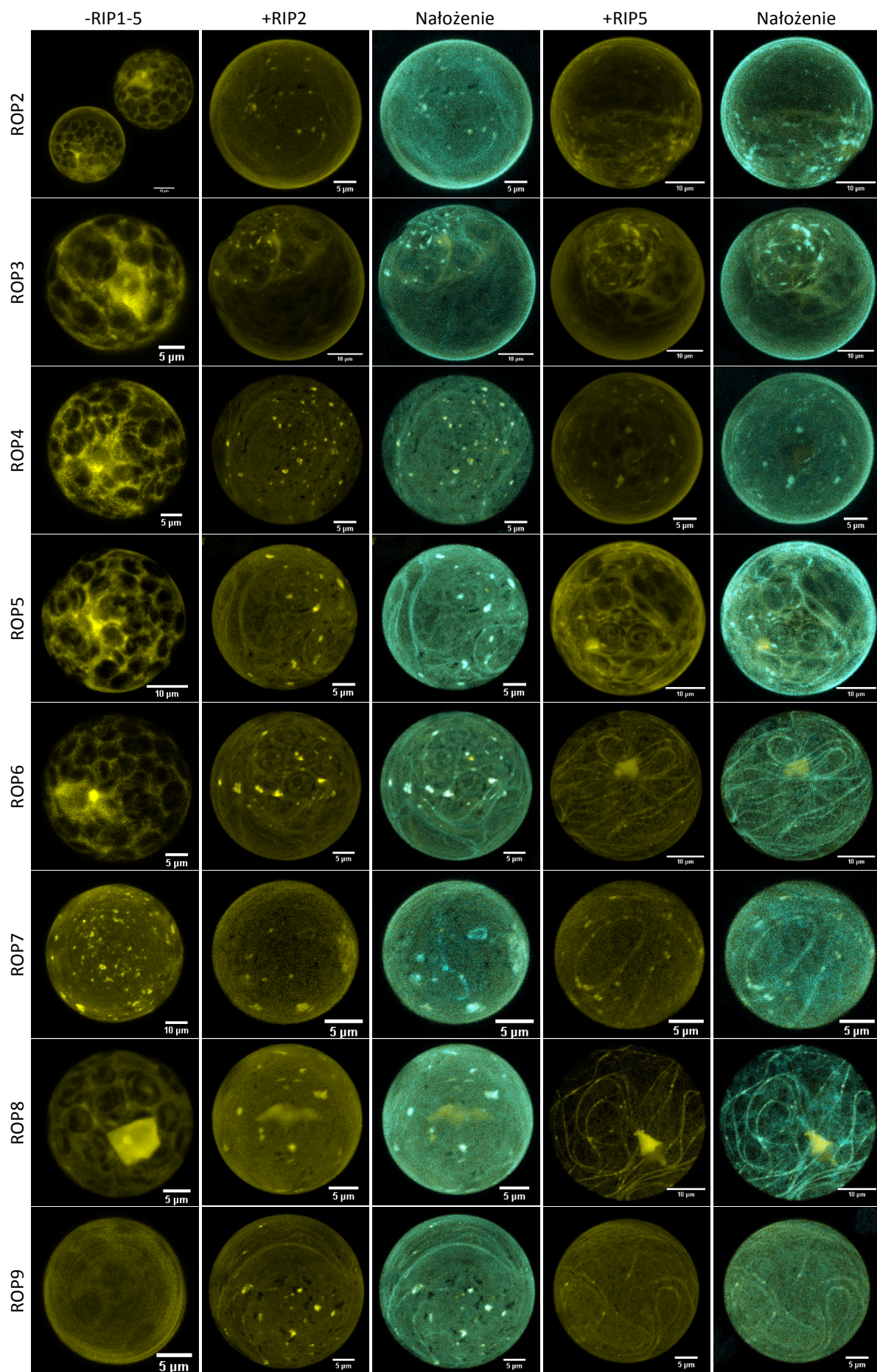
Wykres 3 Pomiar oddziaływań białka RIP4 z GTPazami ROP. Zarejestrowano skrócenie czasu trwania fluorescencji białka donora. Słupki przedstawiają standardowy błąd średniej. (NS – $p > 0,05$; * - $0,001 < p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; test t-Studenta)

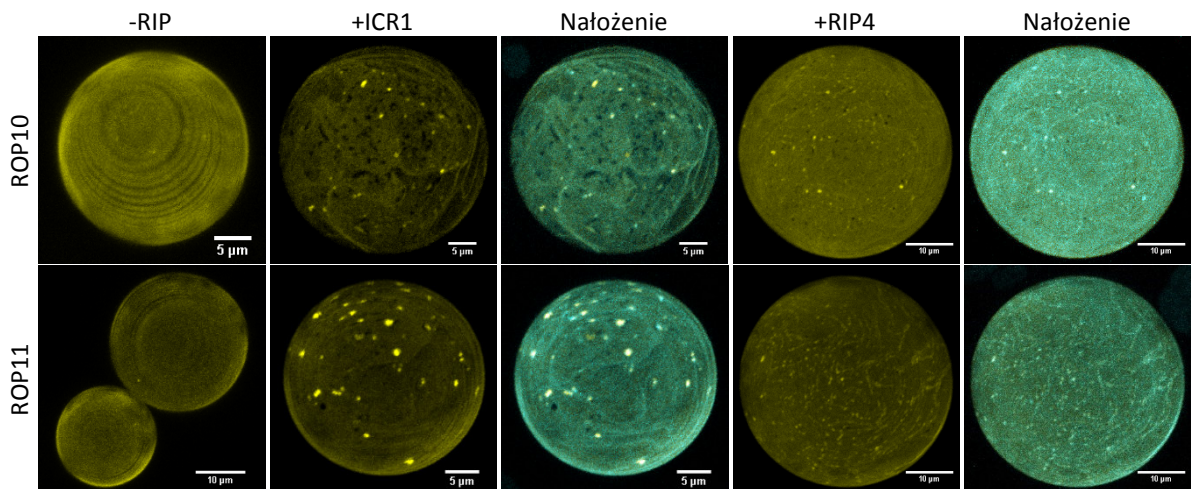


Wykres 4 Pomiar oddziaływań białka RIP5 z GTPazami ROP. Zarejestrowano znaczne skrócenie czasu trwania fluorescencji, szczególnie dla ROP typu II. Słupki przedstawiają standardowy błąd średniej. (NS – $p > 0,05$; * - $0,001 < p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; test t-Studenta)

kontrolnej (1,62 ns). Także pomiary FLIM dla ROP7 i ROP11 wyniosły poniżej 2 ns. Z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że te GTPazy bezpośrednio oddziaływały z białkiem RIP5. Najdłuższy czas zarejestrowany podczas badania pary RIP5 z ROP3 wyniósł 2,24 ns. Wciąż było to najkrótszy czas ze wszystkich pomiarów dla ROP3. Większość czasów trwania fluorescencji podczas eksperymentów z udziałem RIP5 oscylowała około 2 ns. Białko RIP5 okazało się najsilniej wiązać wszystkie badane małe GTPazy ROP.

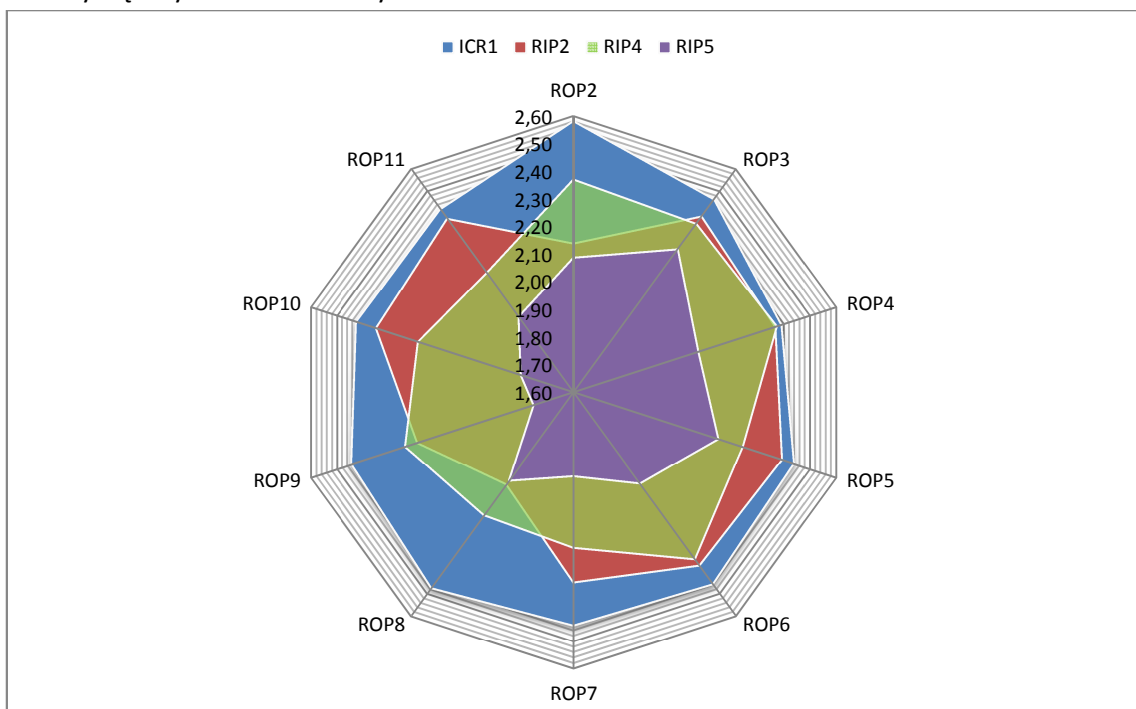
Podczas badań nad ICR1 zauważono zmianę lokalizacji subkomórkowej małych GTPaz ROP w koekspresji z białkiem RIP. Nadekspresja ROP1 z ICR1 promowała rekrutację znacznej ilości ROP1 do błony. Wcześniejsze badania pokazały przemieszczenie się ICR1 z jądra do cytoplazmy podczas kiełkowania pyłku. W podobny sposób zachowuje się białko Cdc24p (będące białkiem GEF dla GTPaz Rho) u drożdży. Ponieważ zmiany polarności obserwowano tylko w przypadku nadekspresji obu białek, uznano, że ICR1 może stabilizować ROP1 w błonie, ale nie wpływa na aktywację GTPazy. A zatem wzajemna relacja tych białek była bardziej złożona, ponieważ ICR1 nie oddziaływało z ROP na zasadzie prostego efektora (Li i in., 2008). ICR1 oddziaływało z ROP6 i ROP10 w formie natywnej (często w badaniach małych GTPaz używa się zmutowanych form konstytutywnie aktywnych CA, bądź nieaktywnych DN). Interakcje te obserwowano z wykorzystaniem metody BiFC w błonie komórkowej. Lokalizacja sygnału BiFC zmieniła się na cytoplazmatyczną kiedy użyto mutantów ROP niewiążących lipidów. Obserwowano także kolokalizację ICR1 z ROP11^{CA} w błonie komórek epidermy liści Arabidopsis (Lavy i in., 2007). Powyższe dane wskazują także, że do oddziaływań ROP-RIP





Rycina 17 Koekspresja białek RIP2 i RIP5 z GTPazami ROP. Małe GTPazy ROP poddane nadekspresji były zlokalizowane w cytoplazmie i błonie protoplastów (kolumna -RIP). Natomiast poddane ekspresji wspólnie z RIP2 i RIP4 kolokalizowały z nimi w domenach błonowych, a także nieznacznie na mikrotubulach.

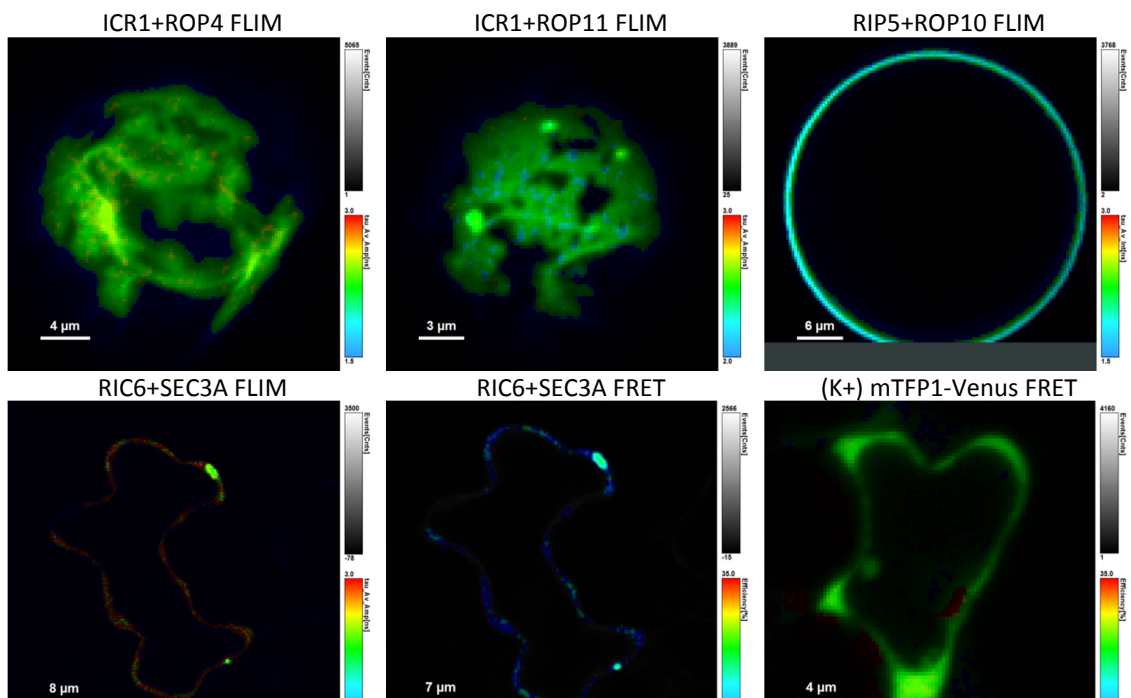
dochodzi w zarówno w cytoplazmie, jak i w błonie komórkowej, ale kompleksy utrzymywane są w błonie dzięki małym GTPazom (Bloch i in., 2008). Do potwierdzenia wyników uzyskanych w drożdżach i koimmunoprecypitacji używano metod mikroskopowych. Do badania interakcji RIP-ROP nie wykorzystano pomiaru czasu trwania fluorescencji. Tym niemniej, sama liczba dowiedzionych dotąd oddziaływań sugeruje, że mogą one być niespecyficzne, w tym sensie, że dotyczą całych rodzin badanych białek.



Wykres 5 Wykres radarowy uwidacznia różną siłę wiązania GTPaz ROP przez badane białka RIP. ICR1 wiązało GTPazy najslabiej, RIP5 najsilniej, ze szczególną preferencją względem ROP typu II.

Oddziaływanie z ROP1^{CA}, ROP2^{CA}, ale nie z ich wariantami DN obserwowano w drożdżach także dla RIP3/MIDD1. Ustalono też, że za oddziaływania odpowiadał ten sam, co w ICR1 motyw z końca C białka (Oda i Fukuda, 2013c). Oprócz małych GTPaz RIP3/MIDD1 wiązało polimery tubuliny i kinezyne 13A, stanowiąc łącznik sygnalizacji z udziałem aktywnych ROP i cytoskieletu (Mucha i in., 2010). ROP11 w stanie aktywnym uważa się za białko

odpowiedzialne za rekrutację RIP3/MIDD1 do błony komórkowej komórek ksylemu. Co ciekawe, w komórkach nieodróżnionych kolokalizację tych białek na mikrotubulach obserwowano tylko w przypadku ich koekspresji, a zatem to MIDD1 rekrutowało ROP11 do mikrotubul (Oda i Fukuda, 2012). RIP3/MIDD1 stanowi zatem centralny punkt, rusztowanie umożliwiające GTPazie ROP ograniczoną przestrzennie rekrutację kinezy 13A do mikrotubul w określonych domenach błonowych (Oda i Fukuda, 2014). System ten jest nadrzędnie kontrolowany przez białka RopGEF i RopGAP, ale bardzo przypomina układ ROP6/10-ICR1-SEC3A. W świetle wyników badań prezentowanych w niniejszej pracy, wydaje się, że w komórce roślinnej może ustanawiać się ogromna liczba podobnych układów angażujących pozostałe białka RIP i wszystkie małe GTPazy ROP.



Rycina 18 Przykładowe obrazy czasu trwania fluorescencji (FLIM) zmierzonego w domenach błonowych dla białek RIP i małych GTPaz ROP (rzęd górny). Oddziaływanie białek RIC6 i SEC3A w plamkowatych strukturach komórki siewki zmierzone metodą FRET-FLIM wraz z obrazem kontroli pozytywnej (rzęd dolny).

Większość komórek zwierzęcych i roślinnych jest spolaryzowana i zawiera odrębne domeny błonowe. Ich tworzenie, utrzymywanie i dostosowywanie jest kluczowym procesem wymagającym ścisłej regulacji i plastyczności. Ustalanie się domen jest możliwe dzięki ukierunkowanemu transportowi białek i lipidów. Jednymi z najważniejszych regulatorów polarności są małe GTPazy z rodziny Rho (Yang i Lavagi, 2012). Białka ROP2 i ROP4 promują wzrost wypustek w komórkach epidermy liści – ich aktywacja zachodzi w wierzchołkach wypustek puzzlowatych komórek, przez co akumuluje się korykalna aktyna F, w sposób zależny od ich efektoru RIC4. Do wzrostu wypustek potrzebne jest też zdeformowanie mikrotubul korykalnych, a zatem sygnalizacja ROP2/4 może wpływać również na rearanżację mikrotubul. Mutant *icr1* ma nieprawidłowo wykształcone komórki skórki, możliwe więc, że białko ICR1 ma związek ze ścieżką ROP2/4 (Yang, 2008). Wydaje się to prawdopodobne, ponieważ skrócenie czasu trwania fluorescencji markera połączonego z ICR1 obserwowane w obecności ROP4 jest istotne i wskazuje na oddziaływanie tych białek.

W niedawnych pracach udowodniono udział ICR1 w sygnalizacji z udziałem auksyn. Udział kompleksów ROP-ICR1 miałby polegać na prawidłowym lokowaniu w błonie nośników

auksyn, białek PIN (Yang, 2008). ICR1 może działać jako zależne od auksyn rusztowanie zapewniające kompartmentalizację aktywności GTPaz ROP i innych białek (jak egzocyst), wymaganych dla asymetrycznego przepływu auksyn (Hazak i Yalovsky, 2010). Zbadanie wpływu pozostałych białek RIP na polarny przepływ auksyn wydaje się być ciekawym i odważnym zadaniem badawczym, szczególnie w kontekście liczby potencjalnych oddziaływań z wieloma GTPazami i białkami towarzyszącymi. Wydaje się, że specyficzność działania białek RIP zależy właśnie od ich regulatorów, m. in. małych GTPaz ROP, z którymi oddziałują. Z drugiej strony możliwe, że taka specyficzność jest zapewniana na poziomie kontroli ekspresji genów. Na przykład geny *ROP1, 3, 5* ulegają ekspresji specyficznemu w łagiewce pyłkowej, gdzie regulują wzrost polarny (Yalovsky, 2015).

Silniejsze oddziaływania zaobserwowane dla RIP5 i ROP9, ROP10 oraz ROP11 wydają się ciekawe, ze względu na udział GTPaz ROP typu II w supresji sygnalizacji ABA. Pokazano, że oddziałują one z ABI2 i ograniczają jego oddziaływanie z receptorami ABA (Yalovsky, 2015). Możliwe, że białka RIP biorą udział także w sygnalizacji z udziałem innych niż auksyny hormonów roślinnych. Co więcej, małe GTPazy ROP typu I i II różnią się lipidowymi modyfikacjami potranslacyjnymi i mogą wiązać się z błonami o różnym składzie (Yalovsky, 2015). W ten sposób oddziaływania różnych GTPaz z białkami RIP i kolejnymi partnerami mogłyby być izolowane dzięki swoistemu składowi lipidowemu domen, w których do tych oddziaływań dochodzi.

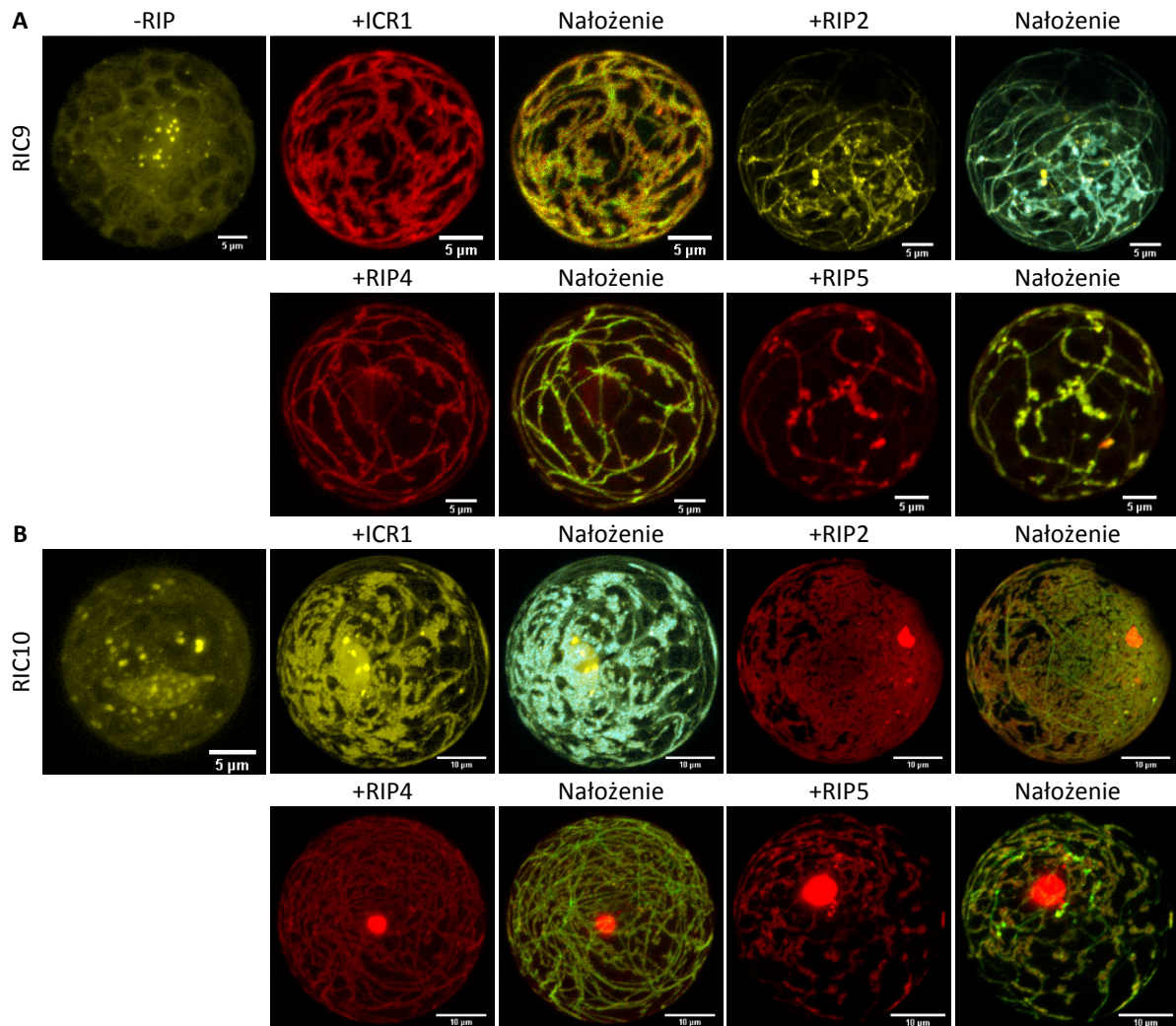
Efektory małych GTPaz ROP kolokalizują z białkami RIP

Genom Arabidopsis koduje 11 genów białek RIC zawierających motyw CRIB odpowiadający za swoiste interakcje z małymi GTPazami ROP związanymi z GTP (Nagawa i in., 2010). Białka te cechują się dużą dywergencją – poza motywem CRIB ich sekwencje bardzo się różnią. Uważa się, że wyewoluowały one w ten sposób w celu pełnienia wielu odmiennych funkcji na ścieżkach sygnalizacji z udziałem małych GTPaz (Wu i in., 2001). Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, czy białka RIP kolokalizują z białkami RIC, co mogło by wskazywać, na to, że RIP pośredniczą w oddziaływaniach małych GTPaz z ich efektorami. Dotychczas takich oddziaływań nie wykazano, a informacje o oddziaływaniach GTPaz ROP z białkami RIC sugerują raczej ich bezpośrednie interakcje. W protoplastach Arabidopsis poddano wspólnej ekspresji dziesięć białek z rodziny RIC (RIC1-RIC10) i białka ICR1, RIP2, RIP4 i RIP5 znakowane fluorescencyjnie. Analiza obrazów mikroskopowych wykazała, iż badane białka RIP kolokalizują z białkami RIC9 i RIC10. Ponadto stwierdzono, że podobnie jak w przypadku koekspresji białek RIP z GTPazami ROP, białka RIC9 i RIC10 zmieniają wzór lokalizacji, gdy w komórce zachodzi także nadekspresja wybranego białka RIP.

Poddane nadekspresji przejściowej w protoplastach Arabidopsis białka RIC9 i RIC10 tworzyły wyraźnie skupienia z widocznym tłem w cytoplazmie. W protoplastach z nadekspresją RIC10-Venus było też dobrze widoczne jądro komórkowe ze skupieniami w obszarze nukleoplazmy. W przypadku RIC9-Venus nukleoplazma była słabiej zaznaczona, ale powstawały liczne skupienia w jej obszarze (Ryc. 19).

Białko ICR1-GFP_{int} kolokalizowało z RIC9-TagRFP na cytoszkielecie oraz w domenach błonowych. Co ciekawe, koekspresja z ICR1 powodowała zmianę lokalizacji jądrowej RIC9, nukleoplazma ze skupieniami białka z czasem przestawała być widoczna (Ryc. 19A). Koekspresja ICR1-mTFP1 i RIC10-Venus powodowała wyznakowanie domen błonowych przez oba białka po dłuższym czasie (ok. 16 h). Początkowo widać było jedynie punktową

kolokalizację, następnie znakowanie cytoszkieletu i ostatecznie domen błonowych. Obecność RIC10 w jądrze w postaci różnej liczby skupień na tle nukleoplazmy pozostawała niezmienną (Ryc. 19B).



Rycina 19 Koekspresja białek RIP z białkami RIC9 i RIC10. Cytoplazmatyczno-jądrowa lokalizacja białka RIC9 zmieniła się na odpowiadającą białku RIP poddanemu wspólnej ekspresji (A). W przypadku RIC10 białko pozostało w jądrze, natomiast cytoplazmatyczna pula zmieniła lokalizację na tę odpowiadającą RIP (B).

Białko RIP2-mTFP1 kolokalizowało z RIC9-Venus na cytoszkielecie. Oba białka obserwowano w postaci punktów położonych na mikrotubulach, ale były także takie, które pozostawały odrębne od cytoszkieletu (Ryc. 19A, Film 4). Na Filmie 4 można zaobserwować przyłączanie się punktowych struktur do mikrotubul i ich wspólną dynamikę. Podobnie jak we wcześniejszych obserwacjach, z czasem oba białka znakowały domeny błonowe. Zauważono także postępujące z czasem zanikanie sygnału znakowanego białka RIC9 w jądrze komórkowym. Koekspresja RIP2-GFP_{int} z RIC10-TagRFP wykazała, że białka te tworzą wspólnie domeny błonowe. Lokalizacja RIC10 częściowo zmieniła się na wspólną z RIP2, nie zmieniło się znakowanie jądra, skupienia w obszarze nukleoplazmy także pozostały widoczne, nawet po długim czasie prowadzenia nadekspresji. Początkowo obserwowano częściową kolokalizację punktową i na mikrotubulach, później badane białka znakowały domeny błonowe, a RIC10 przestawało być widoczne na cytoszkielecie (Ryc. 19B).

Białko RIP4-GFP_{int} kolokalizowało z RIC9-TagRFP w protoplastach Arabidopsis. W preparatach zaobserwowano wspólne znakowanie mikrotubul i domen błonowych, powstających w miejscach przebiegu włókien cytoszkieletu tubulinowego przy błonie (Ryc. 19A). Lokalizacja jądrowa RIC9 zanikała wraz z upływem czasu koekspresji badanych białek. Wspólna ekspresja białek RIP4-GFP_{int} i RIC10-TagRFP nie powodowała zanikania złogów jądrowych białka RIC10. Natomiast cytoplazmatyczne RIC10 było ściągane do struktur znakowanych przez RIP4, mikrotubul (Ryc. 19B). Białka tworzyły wspólnie domeny w błonie. Podobnie jak poprzednio, z czasem zanikało znakowanie cytoszkieletu przez oba białka.

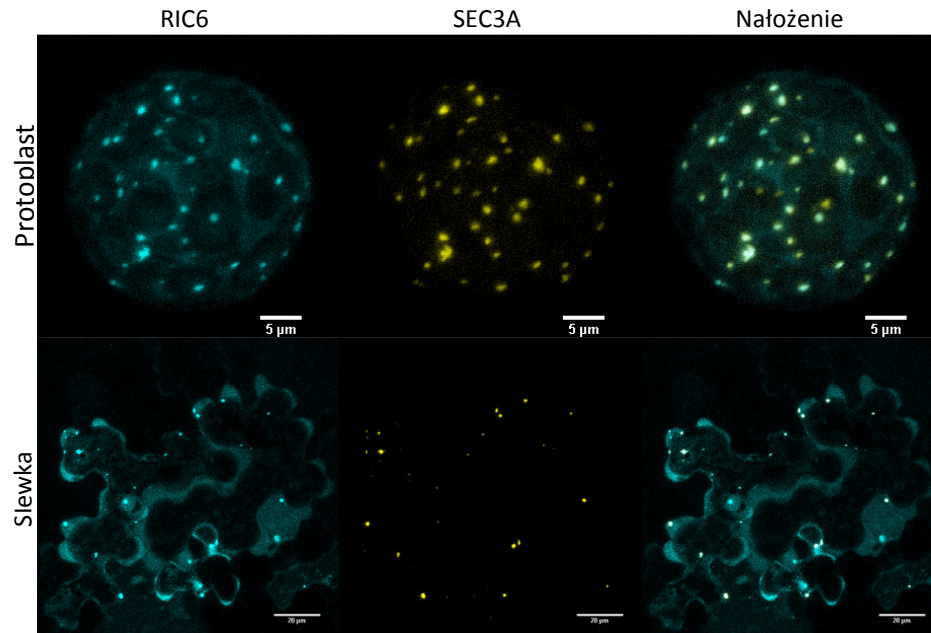
Obraz koekspresji białek RIP5-GFP_{int} i RIC9-TagRFP był taki sam, jak w przypadku pozostałych badanych białek RIP. Podczas ich koekspresji początkowo słabo były znakowane mikrotubule i błona komórkowa protoplastów (Ryc. 19A). Wraz z upływem czasu i tym samym ze wzrostem ilości znakowanego białka można było zauważyć domeny w błonie, gdzie oba białka kolokalizowały. Także w tym przypadku można było zauważyć zmniejszenie się ilości sygnału pochodzącego od znakowanego białka RIC9 w jądrze protoplastów. Obraz koekspresji znakowanych białek RIP5 i RIC10 również nie różnił się od pozostałych badanych par RIP-RIC. Białka przechodziły do domen błonowych, początkowo kolokalizując z cytoszkieletem, a RIC10-TagRFP cały czas silnie znakowało jądro komórkowe w postaci złogów (Ryc. 19B). W przypadku wspólnej ekspresji białka RIP5 z białkami RIC9 i RIC10 przejście z cytoplazmy do cytoszkieletu białek RIC było najlepiej widoczne. Domeny RIP5 powstające w miejscu przebiegu mikrotubul kortykałnych pod błoną nie miały tak dużego obszaru, jak w przypadku pozostałych białek RIP.

Badane efekторы GTPaz ROP RIC9 i RIC10 zmieniają swoją lokalizację poddane koekspresji z wybranymi białkami RIP. Białka te przechodzą z cytoplazmy w miejsca, gdzie były wcześniej obserwowane białka RIP. Zachowanie badanych podczas tych eksperymentów białek jest niemal identyczne z zachowaniem GTPaz ROP opisywanym wcześniej, szczególnie w koekspresji z ICR1 i RIP4. Jedyne informacje o białkach RIC9 i RIC10 pochodzą z publikacji opisującej po raz pierwszy całą rodzinę RIC (Wu i in., 2001). Dokonano w niej ekspresji niemal wszystkich białek RIC (nie udało się sklonować RIC8 i RIC11) w łagiewce pyłkowej, także w kontekście koekspresji z małą GTPazą ROP1. Nadekspresja białka RIC9 hamowała wydłużanie łagiewki pyłkowej, obserwowano je w całej błonie łagiewki. Natomiast RIC10 było zlokalizowane tylko w cytoplazmie i znacznie przyspieszało wzrost (wydłużanie) łagiewki. Koekspresja obu białek z GTPazą ROP1 nie powodowała zmiany ich lokalizacji, ale wykazano oddziaływanie RIC9 ze stale aktywną wersją ROP1^{CA}. Zdecydowanie najciekawsze w kontekście prezentowanych powyżej wyników są obserwowane w tej pracy przeciwstawne fenotypy nadekspresji RIC9 i RIC10. Wykazana zmiana lokalizacji obu białek do domen błonowych ustanawianych przez białka RIP może świadczyć o ich pośredniczeniu w oddziaływaniach z małymi GTPazami. Jeśli spotykają się tam białka działające przeciwstawnie, oznacza to, że RIP są jedynie rusztowaniem biorącym udział w sygnalizacji, niezależnie, czy jest ona pozytywna, czy negatywna. Z drugiej strony obserwowane fenotypy nadekspresji ICR1, powielające fenotyp nadekspresji aktywnych ROP (Bloch i in., 2008), wskazują specyficzność funkcji tego białka.

Efektor GTPaz ROP, białko RIC6 oddziałuje z podjednostką egzocystu SEC3A

Nie wszystkie białka z rodziny RIC są dobrze poznane. Dotychczas dowiedziono, że niektóre oddziałują z małymi GTPazami ROP i biorą udział na przykład w morfogenezie komórek epidermy liści rzodkiewnika (Craddock i in., 2012). Wykazano też, że białko RIC7

oddziałuje z jednym z paralogów podjednostki EXO70 kompleksu egzocyst u *Arabidopsis* (Hong i in., 2016). Postanowiono zatem sprawdzić, czy kontrolowana przez małe GTPazy ROP podjednostka egzocystu SEC3A kolokalizuje i oddziałuje z którymiś z białek RIC. W tym celu do protoplastów *Arabidopsis* wprowadzono plazmidy niosące sekwencje kodujące znakowane fluorescencyjnie białka RIC1-11 oraz białko SEC3A.

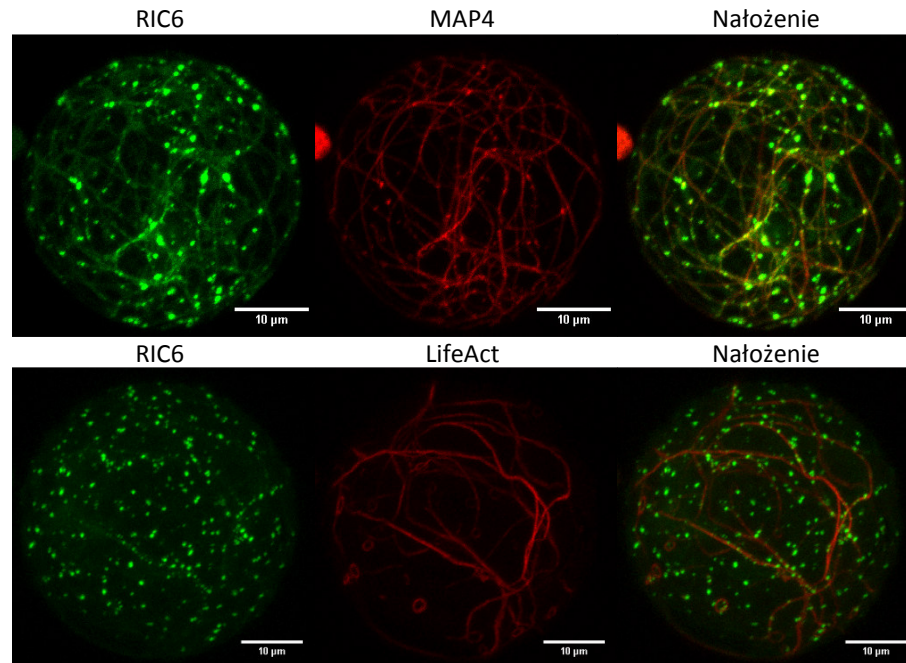


Rycina 20 Kolokalizacja podjednostki egzocystu SEC3 z białkiem RIC6. Badane białka kolokalizowały w plamkowatych strukturach w protoplastach (rzęd górny), jak również w siewkach *Arabidopsis* (rzęd dolny).

Tylko w przypadku badanej pary białek RIC6-mTFP1 i SEC3A-Venus zaobserwowano ich niemal całkowitą kolokalizację punktową (Ryc. 20). Ponadto zarejestrowano ruch silnie fluorescencyjnych skupień wspólnych dla RIC6 i SEC3A w cytoplazmie protoplastów. Przemieszczanie się punktów było skokowe, o kierunku liniowym (Film 5). Białka fuzyjne SEC3A-Venus z RIC6-mTFP1 kolokalizowały także w cytoplazmie transformowanych przejściowo komórek epidermy siewek *Arabidopsis* (Ryc. 20). Były one obserwowane w postaci silnie fluorescencyjnych skupień (choć znaczna część RIC6 pozostawała rozproszona w cytoplazmie), które poruszały się, podobnie jak w protoplastach. Przeprowadzony w protoplastach i siewkach pomiar czasu trwania fluorescencji wykazał, że w skupieniach czas zaniku fluorescencji białka mTFP1 połączonego z RIC6 skrócił się do $2,18 \pm 0,13$ ns (SD, $n=4$). Pomiar FLIM przeprowadzony dla kontroli pozytywnej mTFP1-Venus wyniósł w siewkach $2,02 \pm 0,13$ ns (SD, $n=7$), a więc czas dla kontroli pozytywnej był dłuższy niż w protoplastach (1,62 ns) (Ryc. 18). Wydaje się, że zmiany czasu trwania fluorescencji były w siewkach *Arabidopsis* bardziej dyskretne niż w protoplastach. Biorąc jednak pod uwagę to, że białka RIC6 i SEC3A przemierzają się w wspólnie w komórkach, można stwierdzić, że białka te oddziałują ze sobą.

Udział białek RIC w regulacji związanej z kompleksem egzocyst został opisany niedawno. Zaobserwowano, że RIC7 kolokalizowało z paralogiem EXO70B1, podjednostką egzocystu, a także z konstytutywnie aktywną ROP2^{CA}. Białka były widoczne w postaci punktów w błonie, a także w cytoplazmie i w jądrze komórek szparkowych grochu. Wykazano, że białka te biorą wspólnie udział w pętli sygnałowej, gdzie indukowana światłem aktywacja GTPazy ROP2 zmienia lokalizację RIC7 i dalej EXO70B1. Zaproponowano, że ten mechanizm bierze

udział w otwieraniu i zamykaniu szparek (Hong i in., 2016). Białko RIC6 jest bardzo podobne do RIC7 (66% podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej). Wykazano także, że w łagiewce pyłkowej oba białka są zlokalizowane w błonie szczytowej i cytoplazmie, przy czym RIC7 silniej znakuje błonę, a RIC6 cytoplazmę łagiewki. Obserwowano także wspólny fenotyp ich nadekspresji – zahamowanie wydłużania łagiewki (Wu i in., 2001). Podobną do RIC6 lokalizację w komórkach o wzroście szczytowym (włośnikach) opisano dla białka SEC3A (Zhang i in., 2013). Wydaje się zatem prawdopodobne, że RIC6 jest kolejnym po ICR1 białkiem odpowiedzialnym za lokalizowanie podjednostki egzocystu u *Arabidopsis*, przy udziale sygnalizacji z udziałem małych GTPaz ROP. W procesie tym uczestniczą mikrotubule, gdyż zarówno ICR1 jak i RIC6 łączą się nimi.



Rycina 21 Białko RIC6 jest białkiem zasocjowanym z mikrotubulami. Koekspresja z markerami cytoszkieletu wskazuje na częściową kolokalizację RIC6 z MAP4 (mikrotubule), ale nie z LifeAct (mikrofilamenty).

Ponieważ niekiedy podczas obserwacji białka RIC6 w protoplastach można było zauważyć słabe wiązanie się białka do cytoszkieletu, postanowiono sprawdzić, czy łączy się ono z mikrotubulami, czy z mikrofilamentami. Koekspresja znakowanego fluorescencyjnie białka RIC6 z markerami cytoszkieletu wykazała, że większość skupień bogatych w RIC6 układała się wzdłuż mikrotubul (Ryc. 21). Obraz koekspresji z markerem mikrofilamentów LifeAct może być mylący, ponieważ bardzo często w protoplastach mikrotubule i aktyna F przebiegają wspólnie, przynajmniej znakowane przez MAP4 i LifeAct (obserwacje własne). Na Filmie 6 zarejestrowano ruch kilku punktów bogatych w RIC6 wzdłuż znakowanych białkiem RIP5-GFP_{int} mikrotubul. RIC6-TagRFP w skupieniach poruszało się skokowo, a punktowe struktury niekiedy przeskakiwały między mikrotubulami. Nie zauważono rozpadania się, ani zanikania mikrotubul.

Dotychczas udowodniono, że niektóre białka RIC są niezwykle ważne dla prawidłowego przebiegu procesów rearanżacji cytoszkieletu. Ustalono na przykład, że RIC1 wiązało się z mikrotubulami tylko po aktywacji przez GTPazę ROP6, powodując ich równoległe układanie się w komórce epidermy *Arabidopsis*. Ponadto wykazano, że ścieżka sygnałowa ROP6-RIC1 była uruchamiana przez auksyny i receptor ABP1 (ang. auxin binding protein 1) (Craddock i in., 2012). Z kolei białka RIC3 i RIC4 okazały się być efektorami GTPazy ROP1

i działać w łagiewce pyłkowej. Wraz z GTPazą kontrolowały dynamikę mikrofilamentów w strefie apikalnej w ten sposób, że RIC4 promowało polimeryzację, a RIC3 depolimeryzację poprzez lokalne zmiany stężenia jonów wapnia (Yang, 2008). W ramach niniejszej pracy przeprowadzano wielokrotnie nadekspresję białka RIC6, obserwując tylko niekiedy jego asocjację z mikrotubulami. Sugerowałoby to podobieństwo funkcjonalne do białka RIC1. Nie zauważono jednak, by obserwowany równocześnie cytoszkielet tubulinowy ulegał przebudowaniu lub rozpadowi. Natomiast białko RIC6 oddziaływało z podjednostką egzocystu SEC3A, z którą było też wspólnie transportowane, podobnie jak jego najbliższy ortolog RIC7 jest transportowany z inną podjednostką tego samego kompleksu – EXO70B1. Wydaje się, że bardziej prawdopodobną funkcją RIC6 jest udział w transporcie związanym z egzocytozą i w sygnalizacji ROP prowadzącej do lokalizowania w komórce podjednostki egzocystu SEC3A. Sprawdzenie tego może stanowić cel dalszych badań nad białkami RIC6 i kompleksem egzocystu.

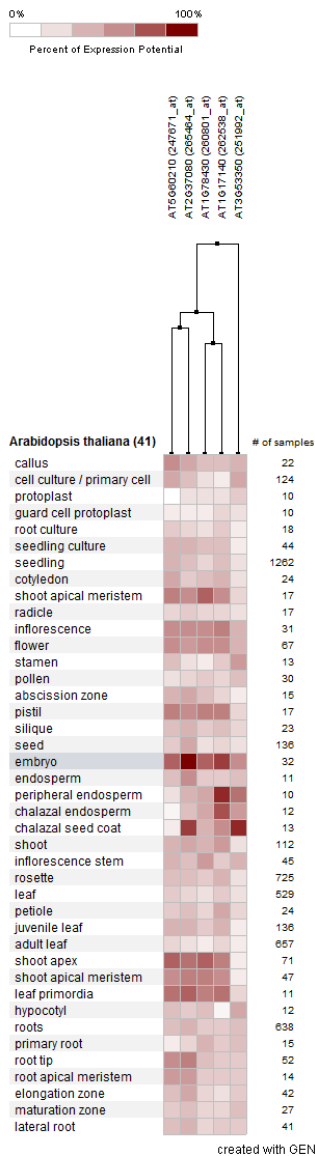
Ekspresja genów RIP u Arabidopsis jest specyficzna i nie wskazuje bezpośrednio funkcji ich produktów

Opisane w pracy eksperymenty nie pozwoliły na ustalenie fizjologicznej roli białek RIP u Arabidopsis. Obserwacje mikroskopowe pomogły określić powiązania molekularne w jakie białka te są zaangażowane, natomiast ich wpływ na fizjologię komórki wciąż pozostaje w sferze hipotez. Aby ukierunkować ewentualne przyszłe badania i spojrzeć na białka RIP w szerszym kontekście genetycznym i anatomicznym, wyekstrahowano dane dotyczące ekspresji genów RIP i oddziaływać białko-białko z największych baz danych biologicznych. „Surowe” wyniki przeszukiwania baz danych umieszczono na płycie CD w folderze „Bazy danych”.

At1g17140 [ICR1]	At2g37080 [RIP2]	At3g53350 [RIP3]	At1g78430 [RIP4]	At5g60210 [RIP5]
MAX				
Perysperma	Zarodek	Chalazalna otoczka nasienna	Zarodek	Zarodek
Zarodek	Chalazalna otoczka nasienna	Perysperma	Wierzchołek pędu	Wierzchołek pędu
Chalazalna endosperma	Zawiązki liści	Zarodek	Merystem wierzchołkowy pędu	Zawiązki liści
Zawiązki liści	Wierzchołek pędu	Pręcik	Słupki	Słupki
Wierzchołek pędu	Wierzchołek korzenia	Chalazalna endosperma	Zawiązki liści	Merystem wierzchołkowy pędu
MIN				
Hipokotyl	Protoplast komórki szparkowej	Młody liść	Protoplast komórki szparkowej	Protoplast
Kultura komórek	Protoplast	Warstwa odcinająca	Dojrzały liść	Chalazalna endosperma
Protoplast	Dojrzały liść	Merystem wierzchołkowy pędu	Pręcik	Protoplast komórki szparkowej
Strefa wydłużania	Pręcik	Kultura komórek korzenia	Liść	Korzeń pierwotny
Radykula	Kultura komórek korzenia	Wierzchołek pędu	Kultura komórek	Chalazalna otoczka nasienna

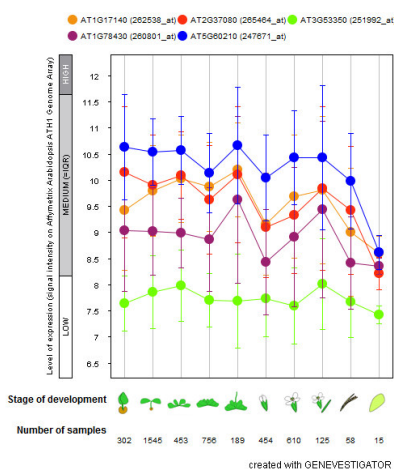
Tabela 2 Pięć tkanek/rodzajów komórek, w których wykryto najwyższą (MAX) i najniższą (MIN) ekspresję genów RIP. Baza danych Genevestigator, kategoria „Anatomy”, ustawiono filtrowanie na wyniki powyżej 10 prób dla zmniejszenia tła. Opracowano na podstawie ryciny „Anatomy” (płyta CD).

Dataset: 41 anatomical parts (sample selection: AT_AFFY_ATH1-3)
5 probes (gene selection: RIPs)



Rycina 22 Klastrowanie hierarchiczne genów RIP. Opis w tekście.

Dataset: 10 developmental stages (sample selection: AT_AFFY_ATH1-3)
5 probes (gene selection: RIPs)



Rycina 23 Profil ekspresji genów RIP podczas rozwoju Arabidopsis. Opis w tekście.

Bazę danych eksperymentów mikromacierzowych Genevestigator (Zimmermann i in., 2004) przeszukano w celu określenia anatomicznego i rozwojowego kontekstu potencjalnej funkcji białek z rodziny RIP. Ustalono, że ekspresja genów RIP jest zróżnicowana podczas rozwoju Arabidopsis, a rozkład anatomiczny transkryptów jest niejednorodny. Tabela 2 zawiera zestawienie pięciu tkanek o najwyższej i najniższej ekspresji każdego z genów rodziny RIP.

Geny RIP ulegają najsilniejszej ekspresji na etapie embrionalnym, w części szczytowej pędów i zawiązkach liści, a także w bielmie i otoczce nasiennej. Wysoka ekspresja genów RIP4 i RIP5 zachodzi swoicie w słupku. Profile ekspresji wskazują na udział RIP we wzroście i rozwoju embrionalnym Arabidopsis, a także w wykształcaniu nasion. Co ciekawe, profil ekspresji genu RIP3/MIDD1, którego produkt jest dobrze opisany, jest nieco odmienny od pozostałych białek RIP. Gen ten ulega silnej ekspresji w pręciku, odwrotne niż geny RIP2 i RIP4. Podobnie wśród pięciu tkanek o najniższej ekspresji RIP3/MIDD1 znalazły się wierzchołki pędu, a w szczególności merystem wierzchołkowy pędu, w których zachodzi silna ekspresja pozostałych RIP. Opiswane części tabeli zawierającej tkanki o najniższej ekspresji RIP są mniej jednorodne. Niski poziom ekspresji RIP wydaje się być bardziej specyficzny tkankowo, ale można zauważyć, że pojawiają się tu protoplasty (poza RIP3/MIDD1), pręciki czy liście.

Zależności między profilami ekspresji w organach/tkankach dobrze pokazuje narzędzie klastrowania hierarchicznego bazy Genevestigator, które grupuje RIP w 3 klastry: pary ICR1 z RIP4 oraz RIP2 z RIP5 zaś RIP3/MIDD1 tworzy najodleglejszy klastrowanie (Ryc. 22). Wynik klastrowania odpowiada podziałowi genów/białek RIP na grupę mniejszych ICR1 i RIP4, większych RIP2 i RIP5 oraz RIP3/MIDD1 pomiędzy nimi (345 aa, 325 aa, 584 aa, 565 aa i 397 aa, odpowiednio). Co ciekawe, taki podział zarysował się także podczas badania oddziaływań białek RIP z małymi GTPazami ROP. Niski poziom ekspresji genów RIP w protoplastach oznacza, że podczas badań z ich wykorzystaniem zawierały one niewiele endogennych białek RIP. Z jednej strony mogło to ułatwić obserwacje

niektórych procesów (jak tworzenie domen błonowych), z drugiej strony świadczy niestety o tym, że wybrany model nie odpowiada warunkom anatomiczno-fizjologicznym, w których funkcjonują białka RIP.

Dane o ekspresji genów RIP na różnych etapach rozwoju *Arabidopsis* zebrane na Rycinie 23 wskazują na najwyższy bezwzględny poziom ekspresji RIP5, a najniższy RIP3/MIDD1 (jako jedyny znajduje się w niskim przedziale wartości). Gen ten jest także raczej stabilnie ekspresjonowany podczas całego cyklu życia *Arabidopsis*. Funkcją białka RIP3/MIDD1 jest współtworzenie deseni wtórnej ściany komórkowej (Oda i in., 2010), więc niska ekspresja tego genu odpowiada wysokiej specjalizacji białka. Dla pozostałych genów RIP są widoczne dwa piki, zgodne z anatomicznymi danymi o ekspresji – podczas rozwoju pędu kwiatowego i podczas rozwijania się kwiatów w łuszczyzny (rozwój embrionalny i tworzenie nasion). Poziom wszystkich transkryptów RIP spada wyraźnie podczas starzenia się *Arabidopsis*.

Analiza wyników eksperymentów mikromacierzowych wskazuje na szczególnie istotne zaangażowanie genów i białek RIP w rozwój embrionalny *Arabidopsis*. Rzeczywiście mutacja *icr1* typu knock-out powodowała widoczne upośledzenie rozwoju embrionalnego *Arabidopsis* (Hazak i in., 2010). Wykazano, że ma to związek z nieprawidłowym rozmieszczeniem białek-nośników auksyn, a przez to ze źle ukierunkowanym przepływem hormonu, niezbędnym dla właściwego zorientowania podziałów komórek (Hazak i in., 2014). Analizy danych z eksperymentów mikromacierzowych wykazują także wzbogacenie w ślady transkryptów RIP merystemów wierzchołkowych pędów. Zmiany fenotypowe mutantu *icr1*, takie jak karłowatość, zaburzona morfogeneza komórek epidermy liści i przede wszystkim zapadające się tkanki merystematyczne (Lavy i in., 2007), dowodzą ważnej roli ICR1 w funkcjonowaniu merystemów *Arabidopsis*. Obserwacji dokonano jednakże w korzeniu, w którym ekspresja ICR1 jest wyraźnie niższa, co nie oznacza, że sytuacja w części szczytowej pędu musi być wyraźnie odmienna. Jak dotąd nie opublikowano prac traktujących o udziale pozostałych RIP w rozwoju embrionalnym rzodkiewnika, ani utrzymaniu prawidłowości podziałów w obrębie tkanek merystematycznych. Oddziaływania z małymi GTPazami ROP udokumentowane powyżej świadczą jednak o ich zaangażowaniu we wszystkie procesy związane ze spolaryzowanym wzrostem komórek.

Podobny profil ekspresji genów RIP może znaczyć, że te białka mają podobne funkcje, albo że występuje redundancja ich funkcji. Można to potwierdzić jedynie metodami genomiki funkcjonalnej. Widoczny fenotyp mutantów *icr1* świadczy o tym, że funkcje pełnione przez białko ICR1 nie są powielane przez pozostałe białka RIP. Podobnie wyciszenie ekspresji RIP3/MIDD1 powodowało widoczne zmiany w deseni wtórnej ściany komórkowej metaksylemu (Oda i in., 2010). Poziom ekspresji genów RIP nigdy też nie spada do zera, więc *Arabidopsis* potrzebuje produktów tych genów przez cały czas swojego rozwoju, aż do zestarzenia. Wydaje się zatem, że specyficzność funkcji fizjologicznej białek RIP jest zapewniana na poziomie potranslacyjnym.

Narzędzie Expression Angler (Toufighi i in., 2005) przeszukuje bazy danych eksperymentów mikromacierzowych, by znaleźć geny *Arabidopsis* o podobnym anatomicznie i rozwojowo profilu ekspresji. Nie dla wszystkich badanych genów RIP znaleziono geny ulegające podobnej ekspresji z wysokim współczynnikiem *r*-value (określa on podobieństwo profilu kwerendy z rekordem bazy danych w oparciu o korelację Pearsona – im bliższy 1, tym ekspresja genów bardziej podobna). Wyniki o najwyższej wartości *r*-value dla poszczególnych genów RIP prezentuje Tabela 3.

Locus	r-value	Anotacja
At1g17140	1.000	ICR1_RIP1__interactor of constitutive active rops 1
At1g52310	0.765	protein kinase family protein / C-type lectin domain-containing protein
At2g24630	0.749	ATCSLC08_ATCSLC8_CSLC08__Glycosyl transferase family 2 protein
At3g05470	0.747	Actin-binding FH2 (formin homology 2) family protein
At3g02110	0.729	scpl25__serine carboxypeptidase-like 25
At1g69420	0.722	DHHC-type zinc finger family protein
At4g39330	0.705	ATCAD9_CAD9__cinnamyl alcohol dehydrogenase 9
At2g28950	0.705	ATEXP6_ATEXPA6_ATHEXP ALPHA 1.8_EXPA6__expansin A6
At5g48460	0.704	Actin binding Calponin homology (CH) domain-containing protein
At5g45670	0.696	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
At3g50890	0.696	AtHB28_HB28_ZHD7__homeobox protein 28
At1g01130	0.694	Uncharacterized protein
At5g52280	0.692	Myosin heavy chain-related protein
At2g37080	1.000	RIP2__ROP interactive partner 3
At2g40660	0.904	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
At4g02390	0.901	APP_PARP2_PP__poly(ADP-ribose) polymerase
At2g24440	0.898	selenium binding
At2g15860	0.894	Uncharacterized protein
At4g39630	0.888	Uncharacterized protein
At5g13680	0.880	ABO1_AtELP1_ELO2__IKI3 family protein
At3g49180	0.876	RID3__Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
At4g29490	0.872	Metallopeptidase M24 family protein
At3g60860	0.869	SEC7-like guanine nucleotide exchange family protein
At5g56730	0.864	Insulinase (Peptidase family M16) protein
At3g18860	0.864	transducin family protein / WD-40 repeat family protein
At3g52610	0.862	Putative uncharacterized protein
At3g53350	1.000	MIDD1_RIP3_RIP4__ROP interactive partner 4
At4g22960	0.731	Protein of unknown function (DUF544)
At1g25470	0.725	CRF12__AP2 domain-containing transcription factor family protein
At1g73700	0.709	MATE efflux family protein
At5g03250	0.698	Phototropic-responsive NPH3 family protein
At1g26610	0.691	C2H2-like zinc finger protein
At1g06450	0.687	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein
At2g18600	0.685	Ubiquitin-conjugating enzyme family protein
At2g19110	0.685	ATHMA4_HMA4__heavy metal atpase 4
At2g37610	0.683	Putative uncharacterized protein
At3g20560	0.679	ATPDI12_ATPDIL5-3_PDI12_PDIL5-3__PDI-like 5-3
At1g54450	0.676	Calcium-binding EF-hand family protein
At5g03620	0.673	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein
At1g78430	1.000	RIP4__ROP interactive partner 2
At1g18370	0.879	ATNACK1_HIK_NACK1__ATP binding microtubule motor family protein
At1g76310	0.879	CYCB2;4__CYCLIN B2;4
At1g02730	0.872	ATCSLD5_SOS6__cellulose synthase-like D5
At3g58650	0.869	TRM7__
At1g50240	0.862	FU__Protein kinase family protein with ARM repeat domain

At4g38430	0.858	ATROPGEF1_ROPGEF1__rho guanyl-nucleotide exchange factor 1
At4g33260	0.858	AtCDC20.2_CDC20.2__Transducin family protein / WD-40 repeat family protein
At4g17000	0.855	Putative uncharacterized protein
At4g23800	0.854	3xHMG-box2__HMG (high mobility group) box protein
At1g59540	0.850	ZCF125__P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
At1g72670	0.850	iqd8__IQ-domain 8
At1g08560	0.850	ATSYP111_KN_SYP111__syntaxin of plants 111
At5g60210	1.000	RIP5__ROP interactive partner 5
At1g17110	0.946	UBP15__ubiquitin-specific protease 15
At3g20260	0.944	Protein of unknown function (DUF1666)
At3g27230	0.937	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
At1g08130	0.934	ATLIG1_LIG1__DNA ligase 1
At5g13290	0.934	CRN_SOL2__Protein kinase superfamily protein
At2g03150	0.930	RSA1_emb1579__ATP/GTP-binding protein family
At3g48190	0.930	ATATM_ATM_PIG1__ataxia-telangiectasia mutated
At5g56580	0.928	ANQ1_ATMCK6_MKK6__MAP kinase kinase 6
At5g14250	0.928	COP13_CSN3_FUS11__Proteasome component (PCI) domain protein
At3g02950	0.926	AtTHO7_THO7__Tho complex subunit 7/Mft1p
At4g17610	0.922	tRNA/rRNA methyltransferase (SpoU) family protein
At1g28350	0.918	Nucleotidyl transferase superfamily protein

Tabela 3 Dwanaście genów o profilu ekspresji najbardziej zbliżonym do poszczególnych genów RIP wq narzędzia Expression Angler. Opis w tekście.

Dwanaście najlepszych wyników dopasowania profili ekspresji dla każdego z genów RIP poddano dalszej analizie, wyszukując informacje o ich znanej, bądź proponowanej funkcji w bazie danych UniProt.

Wyniki pracy narzędzia Expression Angler wskazują, że profil ekspresji genu ICR1 jest zbliżony do kilku genów prawdopodobnie zaangażowanych w syntezę i/lub modyfikację składników ściany (At2g24630 - transferaza glikozylowa, At4g39330 – dehydrogenaza alkoholowa ze szlaku biosyntezy lignin, At2g28950 – ekspansyna A6). Obecne są także geny białek oddziałujących z cytoszkieletem aktynowym (At3g05470 – formina 11, At5g48460 – fimbryna 2, At5g52280 – białko związane z miozyną).

Wśród genów o zbliżonym wzorze ekspresji do RIP2 dominują słabo anotowane rekordy genów, które są dotąd niezbadane. Uwagę zwraca jedynie białko z domeną SEC7 (At3g60860 – BIG2) o znanej lokalizacji (TGN) i roli w krążeniu pęcherzyków. Jego charakterystyka jest częścią niniejszej pracy, jednakże nie sprawdzano związków między białkami BIG i RIP. W wynikach pracy narzędzia Expression Angler brakuje genów związanych z dynamiką cytoszkieletu, za to kilka wskazanych genów jest związanych z przemianami kwasów nukleinowych (At2g40660 – białko wiążące tRNA, At4g02390 – polimeraza PARP2 zaangażowana w naprawę DNA, At5g13680 – podjednostka kompleksu elongatora Pol II RNA).

Profil ekspresji MIDD1 wydaje się być na tyle specyficzny, że w dostępnych danych z eksperymentów mikromacierzowych nie można znaleźć genów dobrze dopasowanych. Wynik analizy zawiera kilka białek potencjalnie związanych z ubikwitynacją (At5g03250 – adapter substratu dla ligazy E3), transportem metali (At2g19110 – transport zależny od ATP kadmu/cynku, At1g73700 – antyporter DTX17) i czynników transkrypcyjnych (At1g06450 – czynnik CAF1-1, At1g25470 – czynnik odpowiedzi na etylen ERF116).

Niezwykle ciekawie i spójnie prezentują się geny o profilu ekspresji zbliżonym do RIP4. Najliczniejszą grupę stanowią geny kodujące białka zaangażowane w różne etapy cytokinezy i procesy związane z podziałem (At1g18370 – kinezyzna7A związana z MT w przegrodzie komórkowej, At1g76310 – cyklina-B2-4, At1g50240 – kinaza TIO zaangażowana w formowanie fragmoplastu i przegrody (wraz z kinezynami 12, będącymi białkami MAP), At4g33260 – białko CDC20-2 będące kofaktorem kompleksu promującego anafazę, At1g08560 – syntaksyna KNOLLE specyficzna dla przegrody komórkowej). Ponadto zestaw wyników zawiera gen kodujący syntazę celulozy specyficzną dla komórek macierzystych CSLD5 (At1g02730), a także gen kodujący białko aktywujące małe GTPazy ROP – ROPGEF1 (At4g38430).

Podobnie, jak w przypadku RIP2, również dla RIP5 wyniki porównania profili ekspresji są ubogie w dobrze anotowane wpisy. Niewielką grupę stanowią geny zaangażowane w podziały komórek i związaną z podziałem naprawę DNA (At1g08130 – ligaza DNA LIG1, At3g48190 – kinaza ATM związana z odpowiedzią na uszkodzenie DNA, At5g56580 – kinaza MKK6 biorąca udział w sygnalizacji związanej z cytokinezą). Wśród wyników znalazło się także białko związane z fotomorfogenezą, odpowiedzią na auksyny i jasmonian CSN3 (At5g14250) oraz kinaza białkowa LRR CORYNE (At5g13290), zaangażowana w utrzymanie tożsamości komórkowej merystemów.

Baza danych STRING (Szklarczyk i in., 2015) skupia informacje o udowodnionych i prawdopodobnych powiązaniach międzybiałkowych w oparciu o dane z eksperymentów wysokoprzepustowych, kontekstu genomowego, koekspresji, automatycznej eksploracji tekstu i rekordów w największych bazach, na przykład BIND (już nieaktywna, wcześniej opracowana sieć oddziaływań białko-białko) i BioGRID, zawierająca opracowane dane o oddziaływaniach białko-białko, genetycznych, czy zależnościach chemicznych. Wpisy dotyczące najlepiej poznanych białek RIP – ICR1 i MIDD1/RIP3 – zawierają informacje o udokumentowanych oddziaływaniach na przykład ICR1-ROP6, ICR1-SEC3A, MIDD1-ROP11, MIDD1-kinezyzna13A. Ponadto algorytm przeszukiwania tekstów publikacji (kategoria „Textmining”) wskazał białka leżące na szlakach sygnałowych, w których uczestniczą ICR1 (RIC1, EXO70A1, EXO84B) i MIDD1 (ROPGAP3, ROPGEF4). Wyszukiwanie tą metodą daje także wyniki fałszywie pozytywne, znajdując nazwy białek w tych samych akapitach tekstów publikacji (także przeglądowych) lub zakładając analogiczne oddziaływania białko-białko dla białek do siebie podobnych. W wyniku tego fałszywie przypisano ICR1 wszystkie oddziaływania MIDD1 i odwrotnie, a także informuje się o oddziaływaniu ICR1-MIDD1.

Wszystkie rekordy białek z rodziny RIP zawierają informację o oddziaływaniu z ROP1, otrzymaną na zasadzie analogii do ICR1. Dla RIP2 opisano tylko jedno dodatkowe oddziaływanie (z białkiem URED), będące wynikiem fałszywie pozytywnym z sekcji „Textmining”. Podobnie, we wpisie dotyczącym białka RIP5, osiem sugerowanych oddziaływań pochodzi z publikacji dotyczącej zmian proteomu pod wpływem fosforylacji u bawełny. Rekord dotyczący białka RIP4 wskazuje na jego koekspresję z syntaksyną KNOLLE (podobnie jak narzędzie Expression Angler) oraz na oddziaływania zidentyfikowane podczas mapowania interaktomu Arabidopsis, na przykład z BRK1 (białko regulujące cytoszkielet aktynowy i tubulinowy). Podsumowując, w bazach danych oddziaływań białko-białko jest za mało informacji źródłowych, aby wiarygodnie opisać zależności między białkami RIP i ich partnerami. Dotychczasowe publikacje niemal milczą na temat białek RIP2, RIP4 i RIP5, stąd też informacje o nich pochodzą z niedoskonałych jeszcze algorytmów. Ustalenie roli pełnionej u Arabidopsis przez te białka będzie wymagało dodatkowych badań.

Wyszukiwanie genów o podobnym do poszczególnych genów RIP profilu ekspresji raczej sugeruje niż dokładnie wskazuje na potencjalną funkcję tych białek. Związków ICR1 z cytoszkieletem jak dotąd nie opisano w literaturze, a wśród wyników przeszukiwania baz danych brakuje transkryptów genów związanych z sygnalizacją auksynami. Z drugiej strony białka biorące udział w organizacji mikrofilamentów, jak formina, mogą poprzez cytoszkielet wpływać na przepływ auksyn, co wielokrotnie dowiedziono (Kleine-Vehn i in., 2008b). Białko MIDD1/RIP3 jest odpowiedzialne za usuwanie mikrotubuli z miejsc przyszłych jamek we wtórnej ścianie ksylemu (Oda i Fukuda, 2013c). Ta doskonale udokumentowana funkcja nie znajduje odzwierciedlenia wśród wyników uzyskanych przy pomocy narzędzia Expression Angler. Prawdopodobnym wytłumaczeniem jest niski ogólny poziom ekspresji MIDD1, a także bardzo wąska specjalizacja tego białka (co znajduje odzwierciedlenie m. in. w braku dobrze dopasowanych profili ekspresji w Expression Angler). Brak opublikowanych danych eksperymentalnych dotyczących bezpośrednio RIP2, RIP4 i RIP5 wpływa zarówno na interpretację wyników analizy Expression Angler, jak i rekordy tych białek w bazach oddziaływań. Dostępne informacje na temat RIP4 są spójne i wydają się pasować do roli tego białka w tkance merystatycznej, w zarodku, podczas podziałów komórkowych – procesach angażujących cytoszkielet tubulinowy. Analogiczne funkcje można przypisać RIP5, jednak związki te są mniej wyraźne. Najbardziej tajemniczym białkiem jest RIP2, dla którego, mimo relatywnie wysokiego poziomu transkrypcji, nie można pokusić się nawet o proponowanie funkcji, a jego wpis w bazie oddziaływań ma tylko 2 pozycje. Nie wszystkie RIP wykryto w proteomie wzbogaconym w mikrotubule, w komórkach zawiesiny *Arabidopsis* zidentyfikowano jedynie niewielkie ilości MIDD1 i RIP5 (Hamada, 2014). Wydaje się, że występowanie i działanie białek z rodziny RIP jest zawężone do wybranych tkanek lub komórek. Możliwe i prawdopodobne jest także to, że białka RIP, podobnie do RIP3, są wysoce wyspecjalizowane i/lub pełnią funkcje w określonym okresie życia *Arabidopsis*.

Dyskusja – podsumowanie

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu znalezienie nowych zależności międzybiałkowych, odpowiedzialnych za regulację przepływu błon w komórkach *Arabidopsis*. W badaniach wykorzystano zaawansowane metody przyżyciowej mikroskopii fluorescencyjnej.

W pierwszym etapie dokonano nadekspresji znakowanych fluorescencyjnie wybranych białek, podjednostek kompleksu egzocyst (odpowiedzialnego za wiązanie pęcherzyków wydzielniczych przy błonie komórkowej) wspólnie z dużymi czynnikami wymiany nukleotydów guaninowych małymi GTPazami ARF (białek aktywujących GTPazy ARF, ARF-GEF). Badane białka obserwowano w protoplastach izolowanych z komórek liści *Arabidopsis*. Nie wykazano, aby obecne w przedziale sieci *trans* Golgiego białka BIG2 i BIG5 (ARF-GEF), kolokalizowały z podjednostkami egzocystu SEC6, SEC8 i EXO70A1. Uważa się, że białka SEC6 i SEC8 są obecne w systemie błon wewnętrznych i docierają do miejsc aktywnych egzocytotycznie na pęcherzykach (Boyd i in., 2004). Niedawno wykazano, że zarówno białka BIG, jak i podjednostki egzocystu precypitują wspólnie z białkami swoistymi dla kilku przedziałów systemu błon wewnętrznych (Heard i in., 2015). Badania te nie stwierdzają bezpośrednich oddziaływań, a jedynie fakt przebywania wskazanych białek w tym samym kompartmentcie błoniastym. Obserwowany przez nas brak kolokalizacji białek BIG i podjednostek egzocystu w obrazach mikroskopowych może oznaczać, że badane białka przebywają w tych samych przedziałach krótko i nie natrafiono na ten moment podczas rejestracji obrazów. Widoczna na Filmie 1 duża dynamika struktur TGN znakowanych przez BIG2-EGFP i TagRFP-VTI12 może na to wskazywać. Według najnowszej wiedzy poszczególne przedziały endo- i egzosomalne przenikają się wzajemnie i dojrzewają w kierunku anterogradowym, a swoiste białka są zawracane w pęcherzykach do właściwego sobie kompartmentu (van de Meene i in., 2016). Możliwe, że w badaniu proteomicznym uchwycono taki moment i podjednostki egzocystu były przez to nadreprezentowane. Niewykluczone też, że egzocyst bierze udział w pęcherzykowym transporcie zwrotnym białek do odpowiednich przedziałów. Niemniej, związek między kompleksem egzocyst a białkami BIG, znany z komórek ssaczych (Xu i in., 2005), nie jest tak ewidentny lub nie zachował się u *Arabidopsis*.

Podjednostki Sec3 i Exo70 wyznaczają miejsca składania pełnego, heterooktamerycznego kompleksu przy błonie komórkowej drożdży, dzięki oddziaływaniom z małymi GTPazami Rho (Boyd i in., 2004). W wyniku utraty domeny odpowiedzialnej za takie oddziaływanie, roślinna podjednostka SEC3A oddziałuje z GTPazami ROP poprzez białko rusztowania ICR1 (Chen i Friml, 2014). To oddziaływanie stało się punktem wyjścia do poszukiwań kolejnych zależności między kompleksem egzocyst, egzocytozą i małymi GTPazami. Okazało się, że białko ICR1 ma ważną, a nieopisaną dotąd właściwość – jest białkiem zasocjowanym z mikrotubulami. ICR1, zwane także RIP1, jest pierwszym poznany białkiem z liczącej pięciu członków rodziny RIP (Li i in., 2008). Wiązanie się z cytoszkieletem tubulinowym jest znane dla jednego z tych białek – RIP3, które nazwano MIDD1 z powodu jego udziału w lokalnym rozpadzie mikrotubul kortykalnych komórek ksylemu (Oda i Fukuda, 2012). Ponieważ białko ICR1 jest uważane za bardzo ważne dla wzrostu i formowania się organizmu *Arabidopsis*, szczególnie w fazie embrionalnej (Hazak i in., 2014), postanowiono bliżej przyjrzeć się wszystkim białkom RIP. Uzyskane wyniki skonfrontowano z publikacjami dotyczącymi ICR1 i RIP3/MIDD1.

Obserwacje białek RIP połączonych z białkami fluorescencyjnymi w protoplastach *Arabidopsis* wykazały, że wszystkie one są zasocjowane z mikrotubulami. Badane białka poddane koekspresji kolokalizowały z markerem mikrotubul MAP4, ale nie z markerem mikrofilamentów LifeAct. Za wiązanie mikrotubul przez białka RIP odpowiadała przede wszystkim ich domena N-końcowa, której usunięcie całkowicie zniósło lub mocno ograniczyło ich asocjację z cytoszkieletem. We wcześniejszych pracach pokazano, że białka RIP są podobne do siebie na N i C końcu. Ponadto nie uzyskano pozytywnego wyniku przyrównania BLAST z sekwencjami białkowymi drożdży i zwierząt (Li i in., 2008). Są to zatem białka specyficzne dla roślin i zapewne mają funkcje swoiste dla roślinnej fizjologii. Drugą obserwowaną własnością białek RIP w protoplastach *Arabidopsis* było tworzenie przez nie domen błonowych. Znakowane fluorescencyjnie wewnątrz polipeptydu RIP pełnej długości tworzyły niewielkie, plamkowate mikrodomeny w miejscach przebiegu mikrotubul. Z czasem mikrodomeny powiększały się tworząc rozległe domeny, ale błona nie była zajmowana przez nie całkowicie. Natomiast pozbawione N-końcowej domeny (odpowiedzialnej za wiązanie mikrotubul) białka ICR1 i RIP2 znakowały błonę niemal jednorodnie. Dostępne dane literaturowe wskazują C-końcową domenę białek ICR1 i RIP3/MIDD1 jako odpowiedzialną za wiązanie się z tych białek z błoną komórkową. Ponadto, to właśnie ten fragment białka odpowiada za oddziaływanie z GTPazami ROP w systemie dwuhybrydowym i koimmunoprecypitacji (Li i in., 2008; Mucha i in., 2010). W uzyskanych przez nas wynikach nie ma obecnego w literaturze rozdziwisku między wynikami eksperymentów z udziałem białek ICR1 i RIP3/MIDD1. Badacze wydają się traktować te białka jako odrębne i nie odnoszą się wzajemnie do uzyskiwanych przez siebie wyników. Tymczasem wszystkie białka RIP w protoplastach *Arabidopsis* miały zbliżony wzór lokalizacji (znakowanie cytoszkieletu i mikrodomen błonowych). Także w komórkach epidermy siewek wszystkie asocjowały z mikrotubulami korykalnymi, choć nie zaobserwowano tworzenia się domen błonowych. Uzyskane wyniki są zatem spójne dla całej rodziny białek RIP i bardziej odpowiadają wcześniejszym obserwacjom dotyczącym białka RIP3/MIDD1, niż białka ICR1. Niezwykle ciekawe było też zanikanie znakowania cytoszkieletu przez białka RIP w miarę rozrastania się domen w błonie protoplastów. Może to oznaczać, że dochodziło do rozpadu mikrotubul spowodowanego nagromadzeniem w błonie aktywnych GTPaz ROP. Byłby to mechanizm zbliżony do lokalnego usuwania mikrotubul korykalnych przez kompleks ROP11-MIDD1 (Oda i Fukuda, 2012). Jednakże bez wyznakowania cytoszkieletu, nie można tego stwierdzić na pewno, tym bardziej, że dane z eksperymentów mikromacierzowych wskazują na odrębność RIP3/MIDD1 od pozostałych białek RIP.

Koekspresja w protoplastach *Arabidopsis* białek RIP z wybranymi podjednostkami kompleksu egzocyst nie przyniosła spodziewanych rezultatów. Nie udało się zarejestrować kolokalizacji badanych białek (poza znaną parą ICR1-SEC3A), choć pewne obserwacje dotyczące podjednostek egzocystu są interesujące. Widoczna w postaci punktowych skupień podjednostka SEC3A była połączona z mikrotubulami znakowanymi przez białko RIP5 i wspólnie z nimi przemieszczała się w protoplaście. Obserwowano też kolokalizację zasocjowanych z mikrotubulami białek ICR1 i SEC3A. Co ciekawe, w przypadku koekspresji SEC3A z ICR1 połączonym z EGFP na końcu aminowym, zauważono przejście podjednostki egzocystu do cytoplazmy. Wcześniej to oddziaływanie opisywano jako cytoplazmatyczne i jądrowe (Lavy i in., 2007). Inna grupa obserwowała znakowane białko SEC3A pod kontrolą natywnego promotora w roślinach transgenicznym ze znakowaną tubuliną. Nie stwierdzono wiązania się SEC3A do mikrotubul (Zhang i in., 2013). Nie opisuje się w literaturze przypadków

łączenia się bezpośrednio podjednostek egzocystu z cytoszkieletem. Wymaga to pośrednictwa innych białek. Być może takim właśnie białkiem dla SEC3A jest ICR1, które, choć nieznakowane, jest obecne w natywnej ilości w protoplastach na Filmie 2. Z drugiej strony także w roślinach badanych przez Zhang i współpracowników (2013) ICR1 było zapewne obecne w natywnej ilości. Możliwe zatem, że białka RIP, jako rusztowanie pośredniczą jedynie w wiązaniu na mikrotubuli nieznanego białka-adaptora utrzymującego tam SEC3A. Oddziaływania takie mogą być wzmacniane przez nadekspresję RIP i dlatego nie zauważono ich w komórkach roślin transgenicznych. Niedawne odkrycie nowych białek pośredniczących w przechodzeniu na mikrotubule kortykalne podjednostki EXO70A1 (Oda i in., 2015) dowodzą, że taka sytuacja jest prawdopodobna. Co więcej, u mutantów w obrębie podjednostek egzocystu nie obserwowano drastycznych zmian położenia nośników auksyn, jak w przypadku mutantów ROP i ICR1 (Cole i in., 2014), co wskazuje, że egzocyst niekoniecznie bierze udział w ich transporcie lub też, że partnerami dla tego kompleksu są inne, jeszcze nieznanne białka.

Ruch w komórce znakowanego białka SEC8 w postaci plamkowatych skupień także nie był dotąd raportowany. Wielkość struktur i podobny charakter dynamiki do znakowanych przedziałów TGN, sugeruje że SEC8 było obecne w przedziałach systemu błon wewnętrznych. Widoczne skupienia są większe niż pęcherzyki transpotujące i istotnie, białko SEC8 wykryto w wielu kompartmentach błoniastych (Heard i in., 2015). Niewyjaśniony pozostaje mechanizm zarejestrowanego ruchu. Białko RIP5-EGFP na Filmie 3 służy jedynie za znacznik mikrotubul kortykalnych. Wiadomo, że u roślin to mikrofilamenty uczestniczą w ruchach organelli, a mikrotubule mogą jedynie spowalniać ten ruch w pobliżu błony (Brandizzi i Wasteneys, 2013). Znakuując cytoszkielet w protoplastach *Arabidopsis* obserwowano, że włókna obu typów cytoszkieletu przebiegały wspólnie. Możliwe więc, że obserwowana struktura przemieszała się wzdłuż niewyznakowanych mikrofilamentów. Z drugiej strony mikrotubule biorą udział w tworzeniu i utrzymywaniu przy błonie specyficznego przedziału nazwanego SmaCC/MASC. Przedział ten zawiera białka charakterystyczne dla TGN, a także błonowe kompleksy syntazy celulozy ulegające z niego recykliczacji do błony (Brandizzi i Wasteneys, 2013; van de Meene i in., 2016). Jest to struktura wciąż nie do końca zbadana, nie wiadomo dokładnie jakie inne białka zawiera i możliwe, że kompleks egzocyst uczestniczy w dostarczaniu jej składników, a mikrotubule stanowią miejsce odkładania się pęcherzyków.

Następnie zbadano, czy białka z rodziny RIP oddziałują specyficznie z wybranymi małymi GTPazami ROP. Taka wybiórczość mogłaby rzucić światło na funkcje fizjologiczne białek RIP, ponieważ część małych GTPaz jest dość dobrze opisana. Okazało się, że białka RIP (poza RIP3/MIDD1, którego nie badano), choć z różną wydajnością, oddziałują ze wszystkimi badanymi (nie badano ROP1) GTPazami ROP. Wykorzystując pomiar czasu trwania fluorescencji ustalono, że ICR1 oddziałuje z białkami ROP najslabiej, a RIP5 najmocniej, a także że oddziaływanie ma miejsce w domenach błonowych tworzonych przez oba białka. Co więcej, obserwacja domen wskazuje na dwojakie zachowanie białek RIP. Obraz koekspresji ICR1 i RIP4 z GTPazami wskazuje na ich rekrutację przez białka RIP do cytoszkieletu i później do błony komórkowej. Z drugiej strony białka RIP2 i RIP5 w koekspresji z badanymi ROP bardzo słabo zaznaczały cytoszkielet, a tworzone wspólnie domeny błonowe były rozleglejsze. Podsumowując, nie udało się zrealizować pierwotnego pomysłu przypisania funkcji białkom RIP, dzięki ich sparowaniu z GTPazami ROP. Niemniej, powszechność oddziaływań RIP-ROP jest bardzo interesująca i najprawdopodobniej oznacza udział tych białek w całej sieci zależności międzybiałkowych skupionych wokół małych GTPaz ROP. Udział różnych białek rusztowania

i ich partnerów w ustanawianiu i utrzymaniu mikrodomen w błonie komórkowej oraz ich organizowanie się w większe domeny jest badany metodami mikroskopowymi od niedawna. Uważa się też, że to mikrotubule kortykalne mogą stanowić fizyczne ograniczenie obszaru (działając jako „plot”) takich domen (Jarsch i in., 2014). W przypadku białka RIP3/MIDD1 wykazano, że tworzy ono wspólnie z GTPazą ROP11 i białkami towarzyszącymi (ROPGEF i ROPGAP) domeny ograniczone właśnie w ten sposób (Oda i Fukuda, 2012). W świetle prezentowanych powyżej wyników i dostępnej wiedzy, wydaje się, że wszystkie białka RIP są fizjologicznie bardzo zbliżone do RIP3/MIDD1. Udział tego białka w zlokalizowanym rozpadzie mikrotubul, poprzez rekrutację kinezy 13A w odpowiedzi na aktywację GTPazy ROP11 (Oda i Fukuda, 2014), może sugerować istnienie podobnych zależności dla pozostałych RIP. Tłumaczyłoby to także, dlaczego podczas nadekspresji RIP z ROP i innymi białkami, z czasem obserwowano zanik znakowania przez RIP mikrotubul kortykalnych. Nie można niestety stwierdzić jednoznacznie, że włókna tubulinowe zanikały, albo że to RIP od nich oddysocjowywały, ponieważ nie wykonano eksperymentów z markerem mikrotubul.

Ostatnim etapem badań było sprawdzenie, czy białka RIP mogą pośredniczyć w spotkaniach małych GTPaz ROP z ich efektorami. Z przeprowadzonej koekspresji znakowanych białek RIP (ponownie, poza RIP3/MIDD1) z białkami RIC (znanymi efektorami ROP), wynika, iż tylko białka RIC9 i RIC10 asocjują z RIP w domenach błonowych i na mikrotubulach. Obraz koekspresji przypominał ten obserwowany dla GTPaz ROP. Okazało się zatem, że istnieje pewna specyficzność białek RIP względem efektorów ROP. Stosunkowo niewiele wiadomo o białkach RIC9 i RIC10. Jedyne dane pochodzą z badań w łagiewce pyłkowej, gdzie wykazano, że RIC9 stanowi wraz z RIC10 parę białek działających przeciwstawnie. Nadekspresja RIC9 pozytywnie wpływała na spolaryzowane wydłużanie łagiewki – nadekspresja RIC10 działała przeciwstawnie (Wu i in., 2001). Współwystępowanie obu tych białek z badanymi RIP świadczy zatem o braku preferencji RIP do udziału w procesach stymulujących, bądź hamujących wzrost spolaryzowany. Kolejny raz należy stwierdzić, że białka RIP są białkami rusztowania służącymi za platformę dla oddziaływań białko-białko. Efekty fenotypowe u mutantów *icr1* są zatem najpewniej spowodowane brakiem oddziaływań między białkami regulatorowymi, a nie wskazują na bezpośrednią funkcję białka ICR1.

Przeprowadzono także eksperymenty mające na celu ustalenie, czy białka RIC – efekторы małych GTPaz ROP oddziałują z podjednostką egzocystu SEC3A. Obserwacje koekspresji znakowanych białek RIC z białkiem SEC3A pozwoliły pokazać, że podjednostka ta kolokalizowała z białkiem RIC6. W protoplastach *Arabidopsis* zaobserwowano oba białka tworzące duże, ruchliwe skupienia. Ruch tych struktur był też obserwowany w transformowanych przejściowo siewkach *Arabidopsis*. Pomiar czasu trwania fluorescencji wykazał, że białka oddziałują ze sobą, a zatem efektor GTPaz ROP asocjuje z podjednostką kompleksu egzocyst. Najprawdopodobniej ruch kompleksów w komórce odbywał się z udziałem mikrotubul, co wykazano znakując cytoszkielec w obecności białka RIC6-EGFP. Jest to zatem kolejny, po Filmie 2, dowód na związek dynamiki podjednostki SEC3A z cytoszkieletem tubulinowym. Tych związków nie zauważono w jedynej poruszającej ten temat publikacji dotyczącej białka SEC3A (Zhang i in., 2013), być może więc obserwacje takie wymagają koekspresji podjednostki z partnerami regulatorowymi. Białko RIC6 jest słabo poznane. Jego nadekspresja w łagiewce pyłkowej hamowała jej wydłużanie (Wu i in., 2001). Może to oznaczać, że RIC6 bierze udział w usuwaniu SEC3A z błony komórkowej, co hamuje inkorporację pęcherzyków egzocytotycznych na drodze zależnej od egzocystu. Wciąż

niewyjaśniony pozostaje udział mikrotubul w takim procesie, chociaż pokazano, że białko RIP3/MIDD1 usuwało z błony GTPazę ROP11 wraz z depolimeryzującym włóknem tubulinowym (Oda i Fukuda, 2013a). Być może podobny mechanizm jest udziałem białek RIC6-SEC3A. Brak obserwowanych związków między białkiem RIC6 a białkami RIP, każe też wykluczyć ich udział w tym procesie.

Podjęta próba wpisania białek RIP w fizjologię Arabidopsis przy wykorzystaniu baz danych poziomów ekspresji genów i oddziaływań międzybiałkowych nie przyniosła spodziewanych rezultatów. Współczesne bazy danych biologicznych zawierają gigantyczną ilość wielowymiarowych informacji. Bioinformatyczne narzędzia metaanalizy danych mają ułatwić określenie funkcji niezbadanych dotąd białek. Niestety, niedostateczna anotacja baz źródłowych i niedoskonałość samych algorytmów wyszukiwania sprawiają, iż wyniki metaanaliz zawierają wiele wyników fałszywie pozytywnych. Ponadto proponowane potencjalne powiązania, czy to na poziomie genów, czy kodowanych przez nie białek, często nie znajdują pokrycia w danych eksperymentalnych. Nie inaczej jest w przypadku rodziny białek RIP.

Dalsze perspektywy badawcze

Rodzina białek RIP, która stała się głównym podmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej, wydaje się być niezwykle ciekawa w perspektywie dalszych badań. Zdolność do wiązania wielu partnerów białkowych, szczególnie regulatorowych GTPaz ROP (niemal wszystkich!) i ich efektorów, może oznaczać udział białek RIP we wszystkich procesach związanych z kontrolą i utrzymaniem polarności komórek Arabidopsis. Być może, natrafiono na niezwykle rozległą sieć międzybiałkowch zależności, której centralnym punktem są białka z rodziny RIP. Dodatkowo, asocjacja tych białek z mikrotubulami oznacza, że i rola cytoszkieletu tubulinowego w kontroli polarności, pozostająca dotychczas w cieniu znaczenia mikrofilamentów, jest większa niż dotąd sądzono. U Arabidopsis droga sekrecji z udziałem mikrotubul jest znana głównie z dostarczania do błony kompleksów syntazy celulozy. Niewiele natomiast wiadomo o wydzielaniu w ten sposób, czy umieszczaniu w błonie innych białek lub przedziałów obłonionych. Obserwowane ścieżki transportu białek SEC8 (prawdopodobnie w przedziale błonowym) oraz SEC3A z RIC6 (Film 3 i Film 5, odpowiednio), wskazują na udział w tym procesie kompleksu egzocyst, zatem wydaje się to być temat warty zgłębienia.

W świetle uzyskanych wyników największą niewiadomą jest fizjologiczna rola białek RIP i udział kompleksów RIP-ROP-mikrotubule we wzroście i rozwoju roślin. W tym celu należałoby skorzystać z bogatego zestawu metod i narzędzi genomiki funkcjonalnej Arabidopsis. Mutanty insercyjne, pozbawione białek RIP, mogłyby ujawnić zmienione fenotypy, wskazać etapy rozwoju, w których te białka biorą udział. Ponieważ RIP3/MIDD1 działa tylko w komórkach ksylemu (choć możemy nie dysponować pełną wiedzą o tym białku), niezbędnym eksperymentem byłaby analiza aktywności promotorów genów RIP. Informacje z baz danych dotyczące ekspresji tych genów nie wskazują na konkretne tkanki i organy, w których miałyby nie dochodzić do ekspresji. Możliwe zatem, że podobnie do opisanego przykładu genu EXO70A1 (wciąż niewyjaśnionego jednoznacznie), transkrypty RIP powstają tylko w określonym typie komórek w obrębie organu. Warto byłoby także sprawdzić, czy podobnie do ICR1, dochodzi do potranskrypcyjnej kontroli syntezy białka z udziałem fitohormonów. Takie badania wymagałby komplementacji mutantów konstrukcjami genetycznymi ze znakowanymi fluorescencyjnie białkami RIP pod kontrolą natywnego promotora.

Niewątpliwie najszerze pole do dalszych badań otwierają prezentowane powyżej oddziaływania białko-białko między GTPazami ROP a białkami RIP. Wymaga rozstrzygnięcia, czy do tych interakcji dochodzi nie tylko w izolowanych protoplastach, a także czy natywnie białka te tworzą domeny błonowe i czy łączą się z mikrotubulami. Umieszczenie obserwowanych oddziaływań w błonie protoplastów wskazuje, że GTPazy są w stanie aktywnym (ze związanym GTP), jednak w niniejszej pracy nie użyto form CA i DN białek ROP. W pierwszych opublikowanych pracach uznano RIP za białka oddziałujące właśnie z aktywowanymi ROP (czy konstytutywnie aktywnymi – CA), później jednak uznano, że jest to „bardziej skomplikowane”. Wydaje się zatem istotnym ustalić, czy białka RIP służą za komórkową platformę dla aktywacji/deaktywacji małych GTPaz, czy jedynie pośredniczą w oddziaływaniach aktywnych GTPaz z ich efektorami. W tym kontekście ciekawe byłoby sprawdzenie, czy RIP oddziałują ze specyficznymi dla roślin białkami aktywującymi i wyłączającymi GTPazy ROP – ROPGEF i ROPGAP.

Podsumowując, prezentowana praca doktorska stanowi jedynie wstęp do poznania potencjalnie ważnej i interesującej rodziny białek swoistych dla roślin.

Literatura

- Anders, N. i Jürgens, G.** (2008). Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**: 3433–45.
- Berken, A. i Wittinghofer, A.** (2008). Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **46**: 380–93.
- Bloch, D., Hazak, O., Lavy, M., i Yalovsky, S.** (2008). A novel ROP/RAC GTPase effector integrates plant cell form and pattern formation. *Plant Signal. Behav.* **3**: 41–43.
- Bloch, D., Pleskot, R., Pejchar, P., Potocký, M., Trpkošová, P., Cwiklik, L., Vukašinić, N., Sternberg, H., Yalovsky, S., i Žárský, V.** (2016). Exocyst SEC3 and phosphoinositides define sites of exocytosis in pollen tube initiation and growth. *Plant Physiol.*: pp.00690.2016.
- Boyd, C., Hughes, T., Pypaert, M., i Novick, P.** (2004). Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J. Cell Biol.* **167**: 889–901.
- Brandizzi, F. i Wasteneys, G.O.** (2013). Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: an emerging role for microtubules. *Plant J.* **75**: 339–349.
- Chakrabarty, R., Banerjee, R., Chung, S.-M., Farman, M., Citovsky, V., Hogenhout, S. a, Tzfira, T., i Goodin, M.** (2007). pSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing *Nicotiana benthamiana*-virus interactions. *Mol. plantmicrobe Interact. MPMI* **20**: 740–750.
- Chen, X. i Friml, J.** (2014). Rho-GTPase-regulated vesicle trafficking in plant cell polarity. *Biochem. Soc. Trans.* **42**: 212–218.
- Chung, S.-M., Frankman, E.L., i Tzfira, T.** (2005). A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* **10**: 357–61.
- Cole, R.A., McNally, S.A., i Fowler, J.E.** (2014). Developmentally distinct activities of the exocyst enable rapid cell elongation and determine meristem size during primary root growth in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **14**: 386.
- Craddock, C., Lavagi, I., i Yang, Z.** (2012). New insights into Rho signaling from plant ROP/Rac GTPases. *Trends Cell Biol.* **22**: 492–501.
- Crowell, E.F., Bischoff, V., Desprez, T., Rolland, A., Stierhof, Y.-D., Schumacher, K., Gonneau, M., Höfte, H., i Vernhettes, S.** (2009). Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 1141–1154.
- Cvrčková, F., Grunt, M., Bezvoda, R., Hála, M., Kulich, I., Rawat, A., i Žárský, V.** (2012). Evolution of the land plant exocyst complexes. *Front. Plant Sci.* **3**: 159.
- Day, R.N. i Davidson, M.W.** (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* **38**: 2887–921.
- Ding, Y., Wang, J., Wang, J., Stierhof, Y.-D., Robinson, D.G., i Jiang, L.** (2012). Unconventional protein secretion. *Trends Plant Sci.* **17**: 606–15.
- Donohoe, B.S., Kang, B.H., Gerl, M.J., Gergely, Z.R., Mcmichael, C.M., Bednarek, S.Y., i Staehelin, L.A.** (2013). Cis-Golgi Cisternal Assembly and Biosynthetic Activation Occur

- Sequentially in Plants and Algae. *Traffic* **14**: 551–567.
- Drakakaki, G. i Dandekar, A.** (2013). Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci.* **203–204**: 74–78.
- Drakakaki, G., van de Ven, W., Pan, S., Miao, Y., Wang, J., Keinath, N.F., Weatherly, B., Jiang, L., Schumacher, K., Hicks, G., i Raikhel, N.** (2012). Isolation and proteomic analysis of the SYP61 compartment reveal its role in exocytic trafficking in Arabidopsis. *Cell Res.* **22**: 413–424.
- Fendrych, M., Synek, L., Pecenková, T., Drdová, E.J., Sekeres, J., Rycke, R. De, Nowack, M.K., i Zárský, V.** (2013). Visualization of the exocyst complex dynamics at the plasma membrane of Arabidopsis thaliana. *Mol. Biol. Cell* **24**: 510–20.
- Geitmann, A. i Nebenfuhr, A.** (2015). Navigating the plant cell: intracellular transport logistics in the green kingdom. *Mol. Biol. Cell* **26**: 3373–3378.
- Geldner, N., Déneraud-Tendon, V., Hyman, D.L., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., i Chory, J.** (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J.* **59**: 169–178.
- Gendre, D., Jonsson, K., Boutt??, Y., i Bhalerao, R.P.** (2015). Journey to the cell surface??the central role of the trans-Golgi network in plants. *Protoplasma* **252**: 385–398.
- van Gisbergen, P.A.C., Esseling-Ozdoba, A., i Vos, J.W.** (2008). Microinjecting FM4-64 validates it as a marker of the endocytic pathway in plants. *J. Microsc.* **231**: 284–90.
- Goderis, I. i Bolle, M. De** (2002). A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units. *Plant Mol. ...* **50**: 17–27.
- Gutierrez, R., Lindeboom, J.J., Paredes, A.R., Emons, A.M.C., i Ehrhardt, D.W.** (2009). Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nat. Cell Biol.* **11**: 797–806.
- Hála, M., Cole, R., Synek, L., Drdová, E., Pecenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J.E., i Zárský, V.** (2008). An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell* **20**: 1330–45.
- Hamada, T.** (2014). Microtubule Organization and Microtubule-Associated Proteins in Plant Cells. W International Review of Cell and Molecular Biology (Elsevier Inc.), ss. 1–52.
- Hamada, T., Nagasaki-Takeuchi, N., Kato, T., Fujiwara, M., Sonobe, S., Fukao, Y., i Hashimoto, T.** (2013). Purification and Characterization of Novel Microtubule-Associated Proteins from Arabidopsis Cell Suspension Cultures. *PLANT Physiol.* **163**: 1804–1816.
- Hazak, O., Bloch, D., Poraty, L., Sternberg, H., Zhang, J., Friml, J., i Yalovsky, S.** (2010). A rho scaffold integrates the secretory system with feedback mechanisms in regulation of auxin distribution. *PLoS Biol.* **8**: e1000282.
- Hazak, O., Obolski, U., Prat, T., Friml, J., Hadany, L., i Yalovsky, S.** (2014). Bimodal regulation of ICR1 levels generates self-organizing auxin distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: E5471–E5479.
- Hazak, O. i Yalovsky, S.** (2010). An auxin regulated positive feedback loop integrates Rho

- modulated cell polarity with pattern formation. *Plant Signal. Behav.* **5**: 709–11.
- He, B. i Guo, W.** (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**: 537–42.
- Heard, W., Sklenář, J., Tomé, D.F.A., Robatzek, S., i Jones, A.M.E.** (2015). Identification of Regulatory and Cargo Proteins of Endosomal and Secretory Pathways in *Arabidopsis thaliana* by Proteomic Dissection. *Mol. Cell. Proteomics* **14**: 1796–813.
- Hong, D., Jeon, B.W., Kim, S.Y., Hwang, J., i Lee, Y.** (2016). The ROP2-RIC7 pathway negatively regulates light-induced stomatal opening by inhibiting exocyst subunit Exo70B1 in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **209**: 624–35.
- Hwang, I. i Robinson, D.G.** (2009). Transport vesicle formation in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 660–9.
- Jarsch, I.K., Konrad, S.S.A., Stratil, T.F., Urbanus, S.L., Szymanski, W., Braun, P., Braun, K.-H., i Ott, T.** (2014). Plasma Membranes Are Subcompartmentalized into a Plethora of Coexisting and Diverse Microdomains in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **26**: 1698–1711.
- Kim, S. i Brandizzi, F.** (2014). The plant secretory pathway: an essential factory for building plant cell walls. *Plant Cell Physiol.*: 1–19.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P.B., Wiśniewska, J., Paciorek, T., Benková, E., i Friml, J.** (2008a). ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **18**: 526–31.
- Kleine-Vehn, J., Langowski, L., Wisniewska, J., Dhonukshe, P., Brewer, P.B., i Friml, J.** (2008b). Cellular and molecular requirements for polar PIN targeting and transcytosis in plants. *Mol. Plant* **1**: 1056–66.
- Konrad, S.S.A. i Ott, T.** (2015). Molecular principles of membrane microdomain targeting in plants. *Trends Plant Sci.* **20**: 351–61.
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H., i Yalovsky, S.** (2007). A Novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr. Biol.* **17**: 947–52.
- Li, J.-F., Park, E., von Arnim, A.G., i Nebenführ, A.** (2009). The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Methods* **5**: 6.
- Li, S., Chen, M., Yu, D., Ren, S., Sun, S., Liu, L., Ketelaar, T., Emons, A.-M.C., i Liu, C.-M.** (2013). EXO70A1-Mediated Vesicle Trafficking Is Critical for Tracheary Element Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: 1–14.
- Li, S., Gu, Y., Yan, A., Lord, E., i Yang, Z.-B.** (2008). RIP1 (ROP Interactive Partner 1)/ICR1 marks pollen germination sites and may act in the ROP1 pathway in the control of polarized pollen growth. *Mol. Plant* **1**: 1021–35.
- Li, S., van Os, G.M.A., Ren, S., Yu, D., Ketelaar, T., Emons, A.M.C., i Liu, C.-M.** (2010). Expression and functional analyses of EXO70 genes in *Arabidopsis* implicate their roles in regulating cell type-specific exocytosis. *Plant Physiol.* **154**: 1819–30.

- Liu, J. i Guo, W.** (2012). The exocyst complex in exocytosis and cell migration. *Protoplasma* **249**: 587–97.
- Marc, J., Granger, C., Brincat, J., Fisher, D., Kao, T., McCubbin, A., i Cyr, R.** (1998). A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell* **10**: 1927–40.
- Martin, K., Kopperud, K., Chakrabarty, R., Banerjee, R., Brooks, R., i Goodin, M.M.** (2009). Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *Plant J.* **59**: 150–62.
- McKenna, J.F., Tolmie, A.F., i Runions, J.** (2014). Across the great divide: the plant cell surface continuum. *Curr. Opin. Plant Biol.* **22**: 132–140.
- van de Meene, A.M.L., Doblin, M.S., i Bacic, A.** (2016). The plant secretory pathway seen through the lens of the cell wall. *Protoplasma*.
- Min, M.K., Kim, S.J., Miao, Y., Shin, J., Jiang, L., i Hwang, I.** (2007). Overexpression of *Arabidopsis* AGD7 causes relocation of Golgi-localized proteins to the endoplasmic reticulum and inhibits protein trafficking in plant cells. *Plant Physiol.* **143**: 1601–14.
- Mishev, K., Dejonghe, W., i Russinova, E.** (2013). Small molecules for dissecting endomembrane trafficking: A cross-systems view. *Chem. Biol.* **20**: 475–486.
- Molendijk, A.J., Ruperti, B., i Palme, K.** (2004). Small GTPases in vesicle trafficking. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 694–700.
- Mucha, E., Hoefle, C., Hückelhoven, R., i Berken, A.** (2010). RIP3 and AtKinesin-13A - a novel interaction linking Rho proteins of plants to microtubules. *Eur. J. Cell Biol.* **89**: 906–16.
- Nagawa, S., Xu, T., i Yang, Z.** (2010). RHO GTPase in plants: Conservation and invention of regulators and effectors. *Small GTPases* **1**: 78–88.
- Oda, Y.** (2015). Cortical microtubule rearrangements and cell wall patterning. *Front. Plant Sci.* **6**: 236.
- Oda, Y. i Fukuda, H.** (2014). Emerging roles of small GTPases in secondary cell wall development. *Front. Plant Sci.* **5**: 1–6.
- Oda, Y. i Fukuda, H.** (2012). Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science* **337**: 1333–6.
- Oda, Y. i Fukuda, H.** (2013a). Rho of Plant GTPase Signaling Regulates the Behavior of *Arabidopsis* Kinesin-13A to Establish Secondary Cell Wall Patterns. *Plant Cell* **25**: 4439–4450.
- Oda, Y. i Fukuda, H.** (2013b). Spatial organization of xylem cell walls by ROP GTPases and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 743–748.
- Oda, Y. i Fukuda, H.** (2013c). The dynamic interplay of plasma membrane domains and cortical microtubules in secondary cell wall patterning. *Front. Plant Sci.* **4**: 511.
- Oda, Y., Iida, Y., Kondo, Y., i Fukuda, H.** (2010). Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel plasma membrane-anchored protein. *Curr. Biol.* **20**: 1197–1202.

- Oda, Y., Iida, Y., Nagashima, Y., Sugiyama, Y., i Fukuda, H.** (2015). Novel Coiled-Coil Proteins Regulate Exocyst Association with Cortical Microtubules in Xylem Cells via the Conserved Oligomeric Golgi-Complex 2 Protein. *Plant Cell Physiol.* **56**: 277–286.
- Ory, S. i Gasman, S.** (2011). Rho GTPases and exocytosis: what are the molecular links? *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**: 27–32.
- Richter, S., Kientz, M., Brumm, S., Nielsen, M.E., Park, M., Gavidia, R., Krause, C., Voss, U., Beckmann, H., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., i Jürgens, G.** (2014). Delivery of endocytosed proteins to the cell-division plane requires change of pathway from recycling to secretion. *Elife* **3**: e02131.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., i Wedlich-Soldner, R.** (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**: 605–607.
- Robinson, D.G., Brandizzi, F., Hawes, C., i Nakano, A.** (2015). Vesicles versus Tubes: Is Endoplasmic Reticulum-Golgi Transport in Plants Fundamentally Different from Other Eukaryotes? *Plant Physiol.* **168**: 393–406.
- Robinson, D.G., Ding, Y., i Jiang, L.** (2016). Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. *Protoplasma* **253**: 31–43.
- Rybak, K., Steiner, A., Synek, L., Klaeger, S., Kulich, I., Facher, E., Wanner, G., Kuster, B., Zarsky, V., Persson, S., i Assaad, F.F.** (2014). Plant cytokinesis is orchestrated by the sequential action of the TRAPP II and exocyst tethering complexes. *Dev. Cell* **29**: 607–620.
- Seguí-Simarro, J.M., Austin, J.R., White, E. a, i Staehelin, L.A.** (2004). Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *Plant Cell* **16**: 836–856.
- Smolarkiewicz, M., Skrzypczak, T., Michalak, M., Leńniewicz, K., Walker, J.R., Ingram, G., i Wojtaszek, P.** (2014). Gamma-secretase subunits associate in intracellular membrane compartments in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **65**: 3015–3027.
- Synek, L., Sekereš, J., i Zárský, V.** (2014). The exocyst at the interface between cytoskeleton and membranes in eukaryotic cells. *Front. Plant Sci.* **4**: 543.
- Szklarczyk, D. i in.** (2015). STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **43**: D447–D452.
- Tanaka, H., Kitakura, S., De Rycke, R., De Groot, R., i Friml, J.** (2009). Fluorescence imaging-based screen identifies ARF GEF component of early endosomal trafficking. *Curr. Biol.* **19**: 391–7.
- Tian, G. i in.** (2004). High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta. *Plant Physiol.* **135**: 25–38.
- Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E., i Provart, N.J.** (2005). The botany array resource: e-Northerns, expression angling, and promoter analyses. *Plant J.* **43**: 153–163.
- Tzfira, T., Tian, G.-W., Lacroix, B., Vyas, S., Li, J., Leitner-Dagan, Y., Krichevsky, A., Taylor, T., Vainstein, A., i Citovsky, V.** (2005). pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Mol. Biol.* **57**: 503–16.

- Vukašinović, N. i Žárský, V.** (2016). Tethering Complexes in the Arabidopsis Endomembrane System. *Front. cell Dev. Biol.* **4**: 46.
- Wang, J., Ding, Y., Wang, J., Hillmer, S., Miao, Y., Lo, S.W., Wang, X., Robinson, D.G., i Jiang, L.** (2010). EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in Arabidopsis and tobacco cells. *Plant Cell* **22**: 4009–30.
- Wu, G., Gu, Y., Li, S., i Yang, Z.** (2001). A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell* **13**: 2841–56.
- Wu, H., Hazak, O., Cheung, A.Y., i Yalovsky, S.** (2011). RAC/ROP GTPases and Auxin Signaling. *Plant Cell* **23**: 1208–1218.
- Xu, K., Shen, X., Li, H., Pacheco-Rodriguez, G., Moss, J., i Vaughan, M.** (2005). Interaction of BIG2, a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, with exocyst protein Exo70. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 2784–2789.
- Yalovsky, S.** (2015). Protein lipid modifications and the regulation of ROP GTPase function. *J. Exp. Bot.* **66**: 1617–1624.
- Yalovsky, S., Bloch, D., Sorek, N., i Kost, B.** (2008). Regulation of membrane trafficking, cytoskeleton dynamics, and cell polarity by ROP/RAC GTPases. *Plant Physiol.* **147**: 1527–43.
- Yang, Z.** (2008). Cell polarity signaling in Arabidopsis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**: 551–75.
- Yang, Z. i Lavagi, I.** (2012). Spatial control of plasma membrane domains: ROP GTPase-based symmetry breaking. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 601–607.
- Yorimitsu, T., Sato, K., i Takeuchi, M.** (2014). Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Front. Plant Sci.* **5**: 411.
- Žárský, V., Cvrcková, F., Potocký, M., i Hála, M.** (2009). Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *New Phytol.* **183**: 255–72.
- Žárský, V., Kulich, I., Fendrych, M., i Pečenková, T.** (2013). Exocyst complexes multiple functions in plant cells secretory pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 726–33.
- Zhang, Y., Immink, R., Liu, C.-M., Emons, A.M., i Ketelaar, T.** (2013). The Arabidopsis exocyst subunit SEC3A is essential for embryo development and accumulates in transient puncta at the plasma membrane. *New Phytol.* **3**: n/a-n/a.
- Zhang, Y., Liu, C.-M., Emons, A.-M.C., i Ketelaar, T.** (2010). The plant exocyst. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 138–46.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., i Grissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**: 2621–2632.

Wykaz skrótów

- ARF-GEF** (ang. ARF guanine nucleotide exchange factor) – białko-czynnik wymiany nukleotydów guaninowych małych GTPaz z rodziny ARF, aktywuje GTPazę
- BFA** (ang. brefeldin A) – brefeldyna A, farmakologiczny bloker transportu pęcherzykowego
- BiFC** (ang. bimolecular fluorescence complementation) – dwucząsteczkowa komplemetacja fluorescencji, metoda badania oddziaływań białko-białko
- CATCHR** (ang. complexes associated with tethering containing helical rods) – kompleksy wiążące o podjednostkach prętowatych
- CCV** (ang. clathrin coated vesicles) – pęcherzyki opłaszczone klatryną
- COG** (ang. conserved oligomeric Golgi) – kompleks wiążący aparatu Golgiego
- CORVET** (ang. class C core vacuole/endosome tethering) – endosomalny kompleks wiążący
- CRIB** (ang. Cdc42/Rac-interactive binding) - wiążący GTPazę motyw efektorów ROP
- CSC** (ang. cellulose synthase complex) – kompleks syntazy celulozy
- EARP** (ang. endosome-associated retrograde protein) – kompleks wiążący wczesnych endosomów
- ER** (ang. endoplasmic reticulum) – siateczka śródplazmatyczna/retikulum endoplazmatyczne, ziarniste (ang. rough, rER) z przyłączonymi rybosomami lub gładkie (ang. smooth, sER) ich pozbawione
- ESCRT** (ang. endosomal sorting complexes required for transport) – kompleks sortujący odpowiedzialny za asocjację błon i tworzenie MVB
- EXPO** (ang. exocyst positive organelle) – organellum wzbogacone w egzocyst, otoczona podwójną błoną struktura specyficzna dla niektórych podjednostek Exo70 egzocystu Arabidopsis
- FLIM** (ang. fluorescence lifetime imaging microscopy) – mikroskopia czasu trwania fluorescencji
- FRET** (ang. Förster Resonance Energy Transfer) – bezpromienisty transfer energii, metoda pomiaru siły oddziaływań białko-białko
- GAP** (ang. GTPase activating protein) - białka aktywujące GTPazę
- GARP** (ang. Golgi-associated retrograde protein) – kompleks wiążący związany z diktiosomami
- GDI** (ang. guanine nucleotide disassociation inhibitor) – białko sekwestrujące GTPazy w cytoplazmie
- GEF** (ang. guanine nucleotide exchange factor) – białko-czynnik wymiany nukleotydów guaninowych małych GTPaz, aktywuje GTPazę

- HOPS** (ang. homotypic fusion and protein sorting) – endosomalny kompleks wiążący
- ICR** (ang. interactor of constitutively active ROPs) – białko oddziałujące z GTPazami ROP w stanie aktywnym
- ILV** (ang. intraluminal vesicle) – pęcherzyki wewnętrzne przedziału MVB
- LSP** (ang. leaderless secretory protein) – białka wydzielane pozbawione peptydu liderowego
- MAP** (ang. microtubule-associated protein) – białko zasocjowane z mikrotubulami
- MVB** (ang. multivesicular body) – ciało wielopęcherzykowe, jeden z przedziałów systemu błon wewnętrznych
- PRONE** (ang. plant specific ROP nucleotide exchanger) – roślinna domena o aktywności GEF
- RIC** (ang. ROP interactive CRIB motif containing protein) – białko efektor ROP z motywem CRIB
- RIP** (ang. ROP interacting partner) – patrz ICR
- RLK** (ang. receptor-like kinase) – kinaza podobna do receptora
- ROP** (ang. Rho of plants) – roślinne małe GTPazy podobne do Rho
- SmaCC/MASC** (ang. small CESA compartment/microtubule-associated cellulose synthase compartments) – przedział błonowy bogaty w syntazę celulozy połączony z mikrotubulami
- SNARE** (ang. *N*-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptor) – białka receptory odpowiedzialne za fuzję pęcherzyka z błoną docelową
- TGN** (ang. *trans*-Golgi network) – sieć *trans* Golgiego, jeden z przedziałów systemu błon wewnętrznych
- TRAPP I-III** (ang. trafficking protein particie) – kompleksy wiążące związane z podziałem
- UPS** (ang. unconventional protein secretion) – niekonwencjonalna droga sekrecji, wydzielanie z pominięciem sekwencji liderowej na polipeptydzie