



UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Biologii

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej

**„Analiza funkcjonalna wybranych białek oddziałujących z
lipidami błon w systemie błon wewnętrznych komórek
Arabidopsis thaliana”**

Magdalena Wierzchowiecka

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Przemysława Wojtaszka

Poznań 2013

Serdecznie dziękuję:

Prof. dr hab. Przemysławowi Wojtaszkowi

Za możliwość wykonywania pracy doktorskiej w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej oraz pomoc i wskazówki naukowe

Dr Michalinie Smolarkiewicz oraz **dr Danielowi Kierzkowskiemu** za wprowadzenie w tajniki pracy laboratoryjnej

Dr Annie Kasprowicz-Maluśki, Michałowi Michałakowi, Tomkowi Skrzypczakowi, dr Michałowi Rurkowi, dr Krzysztofowi Leśniewiczowi, dr Pawłowi Zawadzkiemu oraz Grzegorzowi Pietkiewiczowi

za cenne porady i atmosferę w pracy

Dr Teun Munnikowi

Za możliwość wykonania badań w ośrodku SILS w Amsterdamie oraz za inspirację i opiekę naukową

Szczególne chciałam podziękować

Mojemu **Najwspanialszemu Tacie**

oraz **Rodzeństwu**

za wielkie wsparcie i pomoc w trakcie trwania całego doktoratu.

Praca została wykonana w ramach następujących projektów:

Grant MNiSW Nr N303 360735; grant własny; Kierownik projektu: prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek; tytuł: Analiza funkcjonalna potencjalnych białek łącznikowych w obrębie kontinuum ściana komórkowa-błona komórkowa-cytoszkielelet w komórkach roślinnych.

Grant promotorski MNiSW Nr N301 599740; Kierownik projektu: prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek; tytuł: Interakcje białko-białko oraz białko-lipid z udziałem wybranych białek *Arabidopsis thaliana* potencjalnie związanych z procesem endocytozy.

Stypendium wyjazdowe FEBS Summer Fellowship do Swammerdam Institute for Life Sciences (SILS) University of Amsterdam 2010.

Spis treści

1.	Wstęp	11
1.1	System błon wewnętrznych w komórce roślinnej	12
1.1.1	Szlak anterogadowy-sekrecyjny	13
1.1.1.1	Egzocytoza.....	14
1.1.2	Szlak retrogradowy	15
1.1.2.1	Szlak endocytotyczny	15
1.2	Transport pęcherzykowy	18
1.2.1	Wybrane białka uczestniczące w mechanizmie transportu pęcherzykowego u roślin.....	19
1.2.1.1	Klatryna	19
1.2.1.2	Rodzina białek Rab.....	19
1.2.1.3	Kompleks SNARE.....	21
1.2.2	Udział cytoszkieletu aktynowego w transporcie pęcherzykowym	23
1.3	Fosfatydyloinozytyle – lipidy uczestniczące w przepływie błon w komórce.....	24
1.3.1	Wybrane domeny białkowe wiążące fosfatydyloinozytyle	28
1.3.1.1	Domena FYVE	29
1.3.1.2	Domena PH.....	30
1.3.1.3	Domena PX.....	30
1.3.1.4	Domena ENTH	31
1.3.2	Rodzina białek PRAF	32
2.	Cel	35
3.	Materiały	36
3.1	Materiał roślinny	36
3.2	Szczepy bakteryjne	36
3.3	Kwasy nukleinowe	37
3.3.1	Kolekcja cDNA	37
3.3.2	Startery.....	37
3.3.3	Wektory	39
3.3.3.1	Wektor wejściowy pDONR 207 (Invitrogen).....	40
3.3.3.2	Wektory docelowe pSITE-2NB oraz pSITE -2CA.....	40
3.3.3.3	35S:p19.....	41
3.3.3.4	pGEX-4T-1	42
3.4	Odczynniki	43
3.4.1	Podstawowe odczynniki	43
3.4.2	Enzymy	44

3.4.3	Antybiotyki	45
3.4.4	Markery mas DNA	45
3.4.5	Markery białkowe.....	45
3.4.5	Odczynniki używane do analizy Fat blot.....	45
3.4.6	Gotowe zestawy.....	46
4.	Metody	47
4.1	Analiza bioinformatyczna	47
4.2	Praca z materiałem roślinnym.....	47
4.2.1	Sterylizacja nasion	47
4.2.2	Hodowla roślin	48
4.2.3	Izolacja protoplastów z komórek mezofilu <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
4.2.4	Transformacja protoplastów	49
4.2.5	Transformacja liści tytoniu <i>Nicotiana tabacum</i>	50
4.3.	Praca z bakteriami.....	51
4.3.1	Transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i> DH5α	51
4.3.2	Selekcja transformowanych kolonii bakteryjnych	51
4.3.3	Transformacja bakterii <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	52
4.3.4	Izolacja DNA plazmidowego	52
4.3.5	Nadekspresja białek w systemie bakteryjnym z wykorzystaniem szczepu BL21 codon plus	53
4.4	Praca z kwasami nukleinowymi	54
4.4.1	Reakcja PCR.....	54
4.4.2	Rozdział produktów PCR na żelu agarozowym	55
4.4.3	Oczyszczenie produktów PCR	55
4.4.3.1	Oczyszczenie produktów PCR za pomocą elucji z żelu	55
4.4.3.2	Oczyszczenie produktów PCR za pomocą metody clean-up.....	55
4.4.4	Sekwencjonowanie DNA.....	56
4.4.5	Przygotowanie konstrukcji genetycznych w systemie klonowania Gateway	56
4.4.5.1	Przygotowanie insertów gotowych do wklonowania do wektora wejściowego.....	56
4.4.5.2	Wklonowanie insertu do wektora „wejściowego”-I reakcja rekombinacji typu GatewayBP56	
4.4.5.3	Wklonowanie insertu do wektora „docelowego” II reakcja rekombinacji typu GatewayLR57	
4.4.6	Przygotowanie konstrukcji genetycznych do nadekspresji białka, z wykorzystaniem wektora pGEX-4T-1.....	58
4.4.6.1	Przygotowanie insertów gotowych do wklonowania do wektora pGEX-4T-1	58
4.4.6.1.1	Reakcja trawienia DNA.....	58
4.4.6.2	Wprowadzenie insertu do wektora pGEX-4T-1	59
4.4.6.2.1	Reakcja ligacji	59

4.5	Praca z białkami	60
4.5.1	Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących	60
4.5.2	Wizualizacja białek po elektroforezie.....	61
4.5.3	Izolacja i oczyszczanie białek rekombinowanych	61
4.5.3.1	Izolacja białek.....	61
4.5.3.2	Oczyszczanie białek.....	62
4.5.4	Analiza Fat blot	62
4.5.4.1	Przygotowanie podłoża do analizy	62
4.5.4.2	Analiza Fat blot	64
4.6	Metody mikroskopowe	66
4.6.1	Obserwacje mikroskopowe.....	66
4.6.2	Barwienie liści <i>Nicotiana tabacum</i> barwnikiem FM4-64.....	67
5.	Wyniki.....	68
5.1	Analiza bioinformatyczna	68
5.1.1	Wytypowanie białek do badań.....	68
5.1.1.1	Wybór białek niosących domenę PX.....	68
5.1.1.1.1	Białko PXS(At4g32160).....	69
5.1.1.1.2	Białko PXC(At3g15920)	70
5.1.1.1.3	Białko PXX(At1g15240).....	71
5.1.1.2	Wybór białka niosącego domenę ENTH	72
5.1.1.2.1	Białko SlaA (At4g02650).....	72
5.1.1.3	Wybór białka niosącego domeny PH, FYVE	73
5.1.1.3.1	Białko PRAF4 (At1g76950).....	73
5.1.2	Ocena obecności aminokwasów konserwatywnych w domenach PX, ENTH, PH, FYVE, odpowiedzialnych za wiązanie fosfatydyloinozytoli	75
5.1.2.1	Ocena obecności elementów konserwatywnych w domenach PX	75
5.1.2.2	Ocena obecności elementów konserwatywnych w domenie ENTH	77
5.1.2.3	Ocena obecności elementów konserwatywnych w domenie PH.....	79
5.1.2.4	Ocena obecności elementów konserwatywnych w domenie FYVE	80
5.2	Badanie powinowactwa domen analizowanych białek do fosfatydyloinozytoli	82
5.2.1	Wybór analizy Fat blot oraz domen do badań	82
5.2.2	Nadekspresja domen białkowych w fuzji z GST	83
5.2.2.1	Przygotowanie konstrukcji genetycznych do nadekspresji białek.....	84
5.2.2.2	Nadekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych	85
5.2.3	Analiza Fat blot	88
5.2.3.1	Próby kontrolne	89

5.2.3.2	Analiza powinowactwa domen: PX, ENTH, PH i FYVE analizowanych białek do fosfatydylinozytoli	89
5.3	Lokalizacja subkomórkowa analizowanych białek	96
5.3.1	Przygotowanie konstrukcji genetycznych do analizy	97
5.3.1.1	Dobór wektorów pSITE do analizy	97
5.3.1.2	Wprowadzenie genów analizowanych białek do wektorów typu pDONR, a następnie docelowych pSITE-2NB oraz pSITE-2CA	98
5.3.2	Analiza lokalizacji subkomórkowej białek w protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
5.3.2.1	Analiza lokalizacji subkomórkowej białek w protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> -kontrola pozytywna	100
5.3.2.2	Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXC w protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i>	100
5.3.2.3	Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXX w protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i>	101
5.3.2.4	Analiza lokalizacji subkomórkowej białka SlaA w protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i>	102
5.3.2.5	Podsumowanie analizy lokalizacji subkomórkowej białek w protoplastach <i>Arabidopsis thaliana</i>	104
5.3.3	Analiza lokalizacji subkomórkowej białek w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i>	104
5.3.3.1	Analiza lokalizacji subkomórkowej białek w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i> -kontrola pozytywna	105
5.3.3.2	Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXC w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i>	105
5.3.3.3	Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXX w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i>	106
5.3.3.4	Analiza lokalizacji subkomórkowej białka SlaA w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i>	107
5.3.3.5	Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PRAF4 w orientacji eGFP::PRAF4 w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i>	109
5.3.3.6	Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PRAF4 w orientacji PRAF4::eGFP w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i>	110
5.3.3.7	Podsumowanie analizy lokalizacji subkomórkowej białek w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i>	111
5.3.4	Porównanie lokalizacji subkomórkowej wybranych białek z przedziałami wybarwionymi przez barwnik FM4-64	111
5.3.4.1	Analiza kolokalizacji subkomórkowej białka PXC w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i> z barwnikiem FM4-64	112
5.3.4.2	Analiza kolokalizacji subkomórkowej białka PXX w komórkach epidermy <i>Nicotiana tabacum</i> z barwnikiem FM4-64	113

5.3.4.3	Podsumowanie analizy kolokalizacji subkomórkowej wybranych białek z barwnikiem FM4-64	113
6.	Dyskusja	114
6.1	Powinowactwo domen do fosfatydyloinozytoli.....	115
6.2	Lokalizacja subkomórkowa białek oraz jej analiza w kontekście oddziaływań z fosfatydyloinozytolami.....	117
6.3	Wnioski.....	120
6.4	Podsumowanie i dalsze perspektywy badawcze.....	120
7.	Streszczenie	122
8.	Abstract.....	123
9.	Literatura	124
	Załącznik nr 1	139

Wykaz ważniejszych skrótów

ANTH - domena ANTH (ang. **AP180 N-terminal homology**)

BRX - domena BRX (**BRX**, ang. **Brevis radix-like domain**)

CCP - dołek opłaszczony klatryną (ang. **clathrin-coated pit**)

CCV - pęcherzyk opłaszczony klatryną (ang. **clathrin-coated vesicle**)

CV - wakuole centralna (ang. **central vacuole**)

eGFP - białko wzmocnionej zielonej fluorescencji (ang. **enhanced Green Flurescent Protein**)

ENTH - domena ENTH (ang. **epsin N-terminal homology**)

ER - reticulum endoplazmatyczne (ang. **endoplasmic reticulum**)

FERM - domena FERM (ang. **4,1-ezrin-radixin-moesin**)

FYVE - domena FYVE (**Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1**)

GFP - białko zielonej fluorescencji (ang. **Green Flurescent Protein**)

GST - S-transferaza glutationu (**GST**; ang. **Glutathione S-Transferase**)

LV - wakuola lityczna (ang. **lytic vacuole**)

MVBs - ciała wielopęcherzykowe (ang. **multi-vesicular bodies**)

PCR - częściowo okryte retikulum (ang. **partially coated reticulum**)

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. **polymerase chain reaction**)

PH - domena PH (ang. **Pleckstrin homology**)

PRAF - rodzina białek PRAF (ang. **PH domain, Regulation of Chromatin Condensation, FYVE**)

PtdIns - fosfatydyloinozytol

PtdIns(3)P - fosfatydyloinozytolo-3-fosforan

PtdIns(4)P - fosfatydyloinozytolo-4-fosforan

PtdIns(5)P - fosfatydyloinozytolo-5-fosforan

PtdIns(3,4)P₂ - fosfatydyloinozytolo-3,4-difosforan

PtdIns(3,5)P₂ - fosfatydyloinozytolo-3,5-difosforan

PtdIns(4,5)P₂ - fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan

PtdIns(3,4,5)P₃ - fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan

PtdIns3K - kinaza-3-fosfatydyloinozytolu

PtdIns4K - kinaza-4-fosfatydyloinozytolu

PtdIns5K - kinaza-5-fosfatydyloinozytolu

PSV - wakuola gromadzająca białka zapasowe (ang. **protein storage vacuole**)

PVC - przedział przedwakuolarny (ang. **pre-vacuolar compartment**)

PX - domena PX (ang. **Phox** **h**omology)

PXA - domena PXA (ang. **PXA**, ang. **Phox-associated domain**)

RCC1 - domena RCC1 (ang. **R**egulator of **C**hromatin **C**ondensation)

SNAP - białka SNAP (ang. **S**oluble **NSF** **a**ttachment **p**rotein)

SNARE - białka SNARE (ang. **S**oluble **N**-ethylmaleimide-sensitive-factor-**a**ttachment protein **r**eceptor)

SPEC - domena SPEC (**SPEC**, ang. **S**pectrin-like repeat)

TGN - sieć *trans* Golgiego (ang. **t**rans-**G**olgi **n**etwork)

WMC - kontinuum ściana komórkowa-błona komórkowa-cytoszkielec (ang. **c**ell **w**all-**p**lasma **m**embrane-**c**ytoskeleton **c**ontinuum)

VSRs - receptory skierowujące cargo do wakuoli (ang. **v**acuolar **s**orting **r**eceptors)

1. Wstęp

Komórka stanowi najmniejszą jednostkę biologiczną zdolną do samodzielnego przejawiania wszystkich cech życia. Komórka może nie tylko przetrwać, lecz także rozwijać się, syntetyzując nowe składniki. Procesy zachodzące w trakcie cyklu życiowego komórki wymagają zarówno oddzielenia reakcji przemiany materii od środowiska, jak i wymiany materii, energii i informacji z otoczeniem. U roślin zadania te spełnia między innymi funkcjonalne i strukturalne kontinuum przenikające całą komórkę i łączące ją z bezpośrednim otoczeniem, składające się ze ściany komórkowej, błony komórkowej oraz cytoszkieletu (WMC; ang. *cell wall-plasma membrane-cytoskeleton*; Baluška i wsp. 2003)

Istnienie kontinuum WMC u roślin zostało ujawnione stosunkowo niedawno (Wyatt i Carpita 1993). Podstawą tej propozycji były dane dotyczące komórek zwierzęcych i ich oddziaływań z matriks zewnątrzkomórkową (ECM; ang. *extracellular matrix*). Wskazują one, że oddziaływania między ECM a cytoszkieletem, odgrywają niezwykle istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek zwierzęcych. Dotychczasowe badania komórek roślinnych sugerują, że również w ich przypadku istnieje sieć zależności między elementami kontinuum WMC, wpływająca na właściwy przebieg komunikacji z otoczeniem oraz organizację funkcjonalną protoplastu.

Ważnym, lecz ciągle słabo poznanym przedziałem kontinuum jest jego część wewnątrzkomórkowa. W części tej błona komórkowa wraz z takimi strukturami jak m.in. aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne, endosomy, współtworzy system błon wewnętrznych, który połączony bezpośrednio lub komunikujący się na drodze transportu pęcherzykowego, warunkuje prawidłową organizację protoplastu. Jest to system bardzo elastyczny, podlegający dynamicznym zmianom w odpowiedzi na zmienne warunki środowiska. Uważa się, że funkcję organizatora systemu wewnątrzłonowego spełnia w dużej mierze cytoszkielet. Regulacja objętości protoplastu, ruch cytoplazmy, selektywne przemieszczanie organelli, transport pęcherzykowy, czy też umiejscowienie jądra komórkowego są bowiem w dużej mierze zależne od oddziaływań cytoszkieletu z domenami błon biologicznych (Lloyd 2001; Šamaj i wsp. 2006; Boutté i wsp. 2007; Galletta i Cooper 2009).

Ważnym przejawem organizacji komórki roślinnej jest jej wewnętrzna kompartmentacja. Zjawisko takie zachodzi dzięki istnieniu wspomnianego złożonego systemu błon wewnętrznych. Z jednej strony warunkuje to uporządkowany system kontroli nad wszystkimi

procesami w komórce, z drugiej jednak stanowi pewne bariery, które uniemożliwiają chociażby szybką komunikację między poszczególnymi organellami. Kompartmentacja komórki przyczyniła się więc do rozwinięcia sprawnych mechanizmów transportowych, o których mowa będzie w kolejnych rozdziałach.

1.1 System błon wewnętrznych w komórce roślinnej

Definicja systemu błon wewnętrznych określa zespół organelli błonowych komórki, biorących udział w szlakach transportu pęcherzykowego. U roślin zalicza się do nich błonę komórkową, retikulum endoplazmatyczne (**ER**; ang. *endoplasmic reticulum*), aparat Golgiego z siecią *trans*-Golgiego (**TGN**; ang. *trans-Golgi network*), endosomy, wakuole oraz otoczkę jądrową (Surpin i Raikhel 2004). Większość elementów systemu to struktury bardzo dynamiczne, które zmieniają swoją lokalizację, dzięki oddziaływaniom z cytoszkieletem aktynowym. Przykładowo, obserwacje z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego ukazały, że depolimeryzacja filamentów aktynowych spowodowała deorganizację aparatu Golgiego, powodując skupienie jego stosów w małych agregatach w komórce (Satiat-Jeunemaitre i wsp. 1996).

Przyjmuje się, że komórki roślinne mogą mieć przynajmniej dwa odrębne przedziały endosomów: endosomy wczesne (nazywane też częściowo okrytym retikulum- **PCR**; ang. *Partially coated reticulum*) oraz endosomy późne, do których należą przedziały przedwakuolarne (**PVCs**; ang. *Pre-vacuolar compartments*) oraz ciała wielopęcherzykowe (**MVBs**; ang. *Multi-vesicular bodies*). Wyróżnia się ponadto endosomy recyklingowe. Są to struktury, które w sposób cykliczny podlegają recyklingowi, zostając włączane do cytoplazmy, a następnie transportowane z powrotem do błony komórkowej (Šamaj i wsp. 2005). Za pośrednictwem endosomów recyklingowych, transportowi ulegają m.in. białka PIN, odpowiedzialne za wypływ auksyny (Boutté i wsp. 2007).

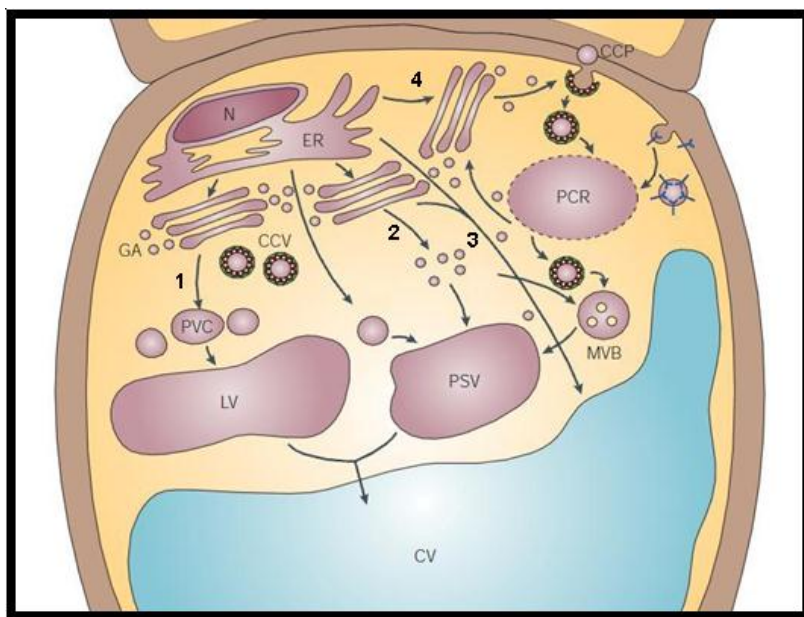
System błon wewnętrznych odpowiada w komórce za wiele ważnych procesów. Jego morfologia i dynamika jest zależna od funkcji komórki, jej stanu fizjologicznego oraz wydzielanych związków (Boutté i wsp. 2007). Za sprawą oddziaływań między elementami systemu dochodzi do biosyntezy i transportu składników ściany komórkowej, sygnalizacji z udziałem hormonów, takich jak ABA, czy auksyny, a także reakcji obronnych przed patogenami. Pod kontrolą sprawnie działającego systemu błon wewnętrznych znajdują się m.in. wzrost asymetryczny komórki oraz podziały komórkowe. Procesy te są możliwe dzięki

dwojakiemu ukierunkowaniu szlaków transportowych: szlaku anterogradowego – na zewnątrz komórki oraz retrogradowego – do jej wnętrza. Ciągła komunikacja między przedziałami błon wewnętrznych, możliwa jest dzięki transportowi pęcherzykowemu (opis w rozdziale 1.2). Transport taki warunkuje „przepływ błon” w komórce, który pozwala na zachowanie indywidualnego charakteru każdego z jej kompartmentów oraz utrzymanie właściwej dystrybucji lipidów i białek między błoną komórkową i błonami pozostałych organelli. Dodatkowo dzięki obustronnemu przepływowi błon w systemie i antero- i retrogradowym zapewniona jest ich stała recykliczacja (Surpin i Raikhel 2004; Geldner 2004).

1.1.1 Szlak anterogradowy – sekrecyjny

Szlak ten rozpoczyna się w retikulum endoplazmatycznym, dalej przechodząc przez struktury aparatu Golgiego, zostaje tam rozgałęziony w zależności od przeznaczenia przenoszonego materiału (cargo). Transportowi ulegają nowopowstałe makrocząsteczki - glikoproteiny, polisacharydy i lipidy, które nie zostają zatrzymane w błonie ani świetle ER lub aparatu Golgiego (Surpin i Raikhel 2004). Częsteczki w aparacie Golgiego, podlegają następnie sortowaniu do wakuoli gromadzącej białka zapasowe (**PSV**; ang. **Protein storage vacuole**, Ryc.1.1; szlak 2), do wakuoli litycznej (**LV**; ang. **Lytic vacuole**, Ryc.1.1; szlak 1), które mogą ostatecznie scalać się tworząc wakuole centralną (**CV**; ang. **Central vacuole**) lub do błony komórkowej (Ryc.1.1; szlak 4). Ponadto istnieje możliwość transportu bezpośredniego z ER do wakuoli centralnej (Ryc.1.1; szlak 3).

Do segregacji (w przypadku szlaków nr 1,2,4) dochodzi w sieci *trans*-Golgiego, w której to na podstawie rozpoznania odpowiednich receptorów, cargo zostaje załadowane do określonych pęcherzyków zwykle opłaszczonych białkiem klatryną (**CCVs**; ang. **clathrin-coated vesicles**). Jeśli niesiony ładunek ma być zdeponowany w którejś z wakuol, najczęściej wpierw dostaje się do przedziału przedwakuolarnego (**PVC**; ang. **Pre-vacuolar compartment**). Ponieważ w strukturach MVB, należących do przedziału późnych endosomów, odkryto receptory skierowujące cargo do wakuoli (**VSRs**, ang. **vacuolar sorting receptors**), sugeruje się obecnie, że pełnią one również rolę przedziału PVC (Chung i wsp. 2004).



Ryc.1.1. System błon wewnętrznych w komórce roślinnej. CCP- dołek opłaszczony klatryną, CCV- pęcherzyk opłaszczony klatryną, CV - centralna wakuola, ER - retikulum endoplazmatyczne, GA - aparat Golgiego, LV - wakuola lityczna, MVB - ciało wielopęcherzykowe, N - jądro, PCR - częściowo okryte retikulum, PSV - wakuola gromadząca białka zapasowe, PVC - przedział przedwakuolarny. (Źródło: Surpin i Raikhel 2004, zmienione).

1. Szlak sekrecyjny z ER –przez aparat Golgiego -do wakuoli litycznej-LV
2. Szlak sekrecyjny z ER- przez aparat Golgiego- do wakuoli magazynującej białka-PSV
3. Szlak sekrecyjny z ER –bezpośrednio do wakuoli centralnej –CV
4. Szlak sekrecyjny z ER- przez aparat Golgiego- do błony komórkowej, zakończony egzocytozą

Sztandarowym przykładem procesu zachodzącego na szlaku sekrecyjnym jest egzocytoza.

1.1.1.1 Egzocytoza

Egzocytoza to etap końcowy na ścieżce sekrecyjnej polegającej na wydaleniu niesionego cargo poprzez transport pęcherzyka do błony komórkowej (Ryc.1.1; szlak 4). Proces ten polega na fuzji pęcherzyka egzocytotycznego z błoną komórkową, co skutkuje wydaleniem niesionego cargo do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Thiel i Battey 1998). Ciągłe wiadomo stosunkowo niewiele na temat przebiegu tego procesu w komórce roślinnej. Badania wskazują, że miejscowe modyfikacje składu lipidowego błon, warunkują proces ukształtowania pęcherzyka przeznaczonego do wydalenia. Do takich modyfikacji należy m.in. lokalna produkcja diacyloglicerolu lub rekrutacja przez białko RabA4b kinazy-4-fosfatydyloinozytolu (PtdIns4K), co generuje powstanie fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu (Zarsky i wsp. 2009). Przedział TGN jest prawdopodobnie najczęściej obserwowanym

źródłem powstawania pęcherzyków egzocytotycznych, jednak nie jest to jedyne możliwe miejsce ich tworzenia. Często odnotowuje się również udział przedziału MVB na szlakach egzocytotycznych. Pęcherzyk, który dotarł do błony docelowej, najpierw dokuje do błony komórkowej, następnie błona pęcherzyka łączy się z błoną komórkową co nazywamy fuzją. Za przebieg tego procesu oraz za wyznaczanie miejsc egzocytozy odpowiedzialny jest kompleks egzocystu. Jest to kompleks zbudowany z ośmiu podjednostek, zlokalizowanych w błonie komórkowej i pełniących rolę w wiązaniu i wspomaganiu fuzji pęcherzyka z błoną docelową. Białka składowe egzocystu to: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84 (Hála i wsp. 2008). Podjednostki Exo70 i Sec3 wyznaczają miejsce wiązania egzocystu na błonie, natomiast pozostałe składowe zostają dostarczone już z pęcherzykiem, po czym wszystkie asocjują w gotowy kompleks (Zarsky i wsp. 2009).

1.1.2 Szlak retrogradowy

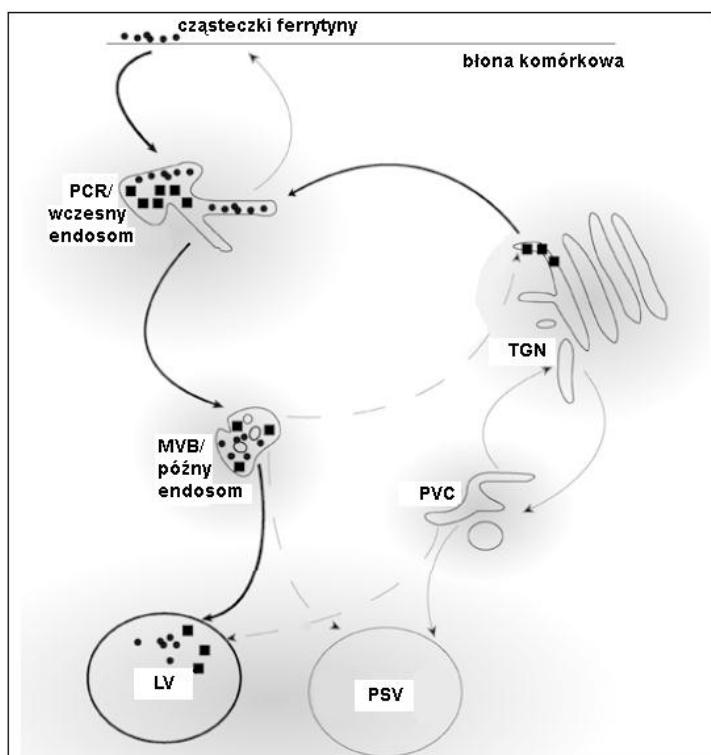
Przeciwnym do szlaku anterogradowego jest szlak retrogradowy (zwrotny, wsteczny). To niezwykle dynamiczny szlak, który obejmuje zarówno transport pęcherzyków z błony komórkowej, zapewniając pobór cząsteczek i związków zewnątrzkomórkowych, jak i transport nowo zsyntetyzowanych cząsteczek w komórce, skierowując je do wakuoli (Surpin i Raikhel 2004; Geldner 2004; Šamaj i wsp. 2005). Pobrany z udziałem błony komórkowej materiał może być skierowany na drogę degradacji- poprzez system endosomów wczesnych, następnie późnych, aż do wakuoli, lub też może ulec recyklicacji z powrotem do błony komórkowej za pomocą endosomów recyklingowych (Geldner 2004). Sztandarowym przykładem procesu zachodzącego na szlaku retrogradowym jest endocytoza, zwana też szlakiem endocytotycznym.

1.1.2.1 Szlak endocytotyczny

Endocytozą określa się proces invaginacji błony komórkowej i wydzielenia pęcherzyków do wnętrza komórki. Transport może obejmować zarówno substancje znajdujące się w błonie, jak i poza błoną, wewnątrz pęcherzyka. Mogą do nich należeć białka i lipidy błony komórkowej, a także cukry, polipeptydy, płyny i cząsteczki zewnątrzkomórkowe jak również wirusy i bakterie. W zależności od transportowanego cargo jak i mechanizmu powstawania

pęcherzyków u roślin, wyróżnia się cztery rodzaje endocytozy: zależną od klatryny, zależną od traw lipidowych, pinocytozę i fagocytozę (Šamaj i wsp. 2004).

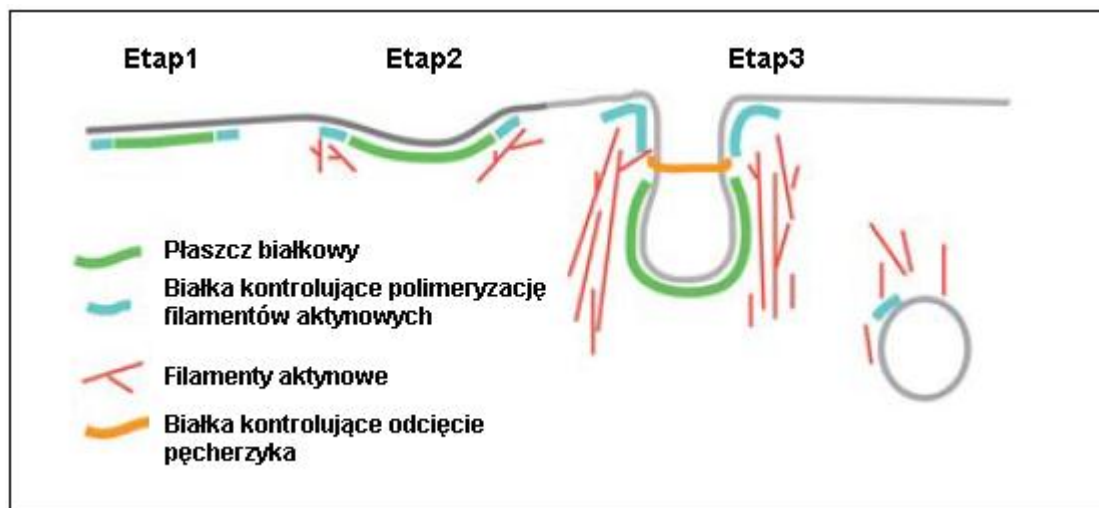
Przyczyną pojawienia się takiej zdolności podczas ewolucji komórek, była niemożność pobierania cząstek dużych lub polarnych na drodze dyfuzji przez hydrofobowe środowisko błony komórkowej. Istnienie tego procesu w komórkach roślinnych było przez wiele lat kwestionowane. Podstawą takiej opinii była obecność ściany komórkowej oraz zjawisko turgoru, który miał hamować kosztowny energetycznie proces wpuklania błony (Cram 1980; Oparka i wsp. 1993). Obecność ściany w komórce roślinnej nie tylko pierwotnie była powodem, dla którego wykluczano występowanie endocytozy u roślin, co więcej była i nadal jest przyczyną istotnego utrudnienia w poznawaniu tego procesu. Ostateczne potwierdzenie istnienia endocytozy w komórkach roślinnych stało się możliwe dzięki zastosowaniu rozwiniętego systemu markerów molekularnych oraz barwników wiążących błony, takich jak FM1-43 i FM4-64 oraz nieprzenikającego przez błony biologiczne barwnika Lucifer Yellow (Šamaj i wsp. 2004; Müller i wsp. 2007). Jednym z dowodów na istnienie endocytozy w komórkach roślinnych była obserwacja poboru ferrytyny przeprowadzona przez Robinson i Hillmer w 1990 roku (Robertson i Hillmer 1990). Podczas eksperymentu odnotowano pobór związku przez wpuklenia w błonę komórkowej, które tworzyły pęcherzyki. Obecność ferrytyny była następnie obserwowana w strukturach wczesnych endosomów, przedziale MVB i wakuoli. Dodatkowo, obecność ferrytyny widoczna była również w strukturach aparatu Golgiego/TGN (Ryc.1.2).



Ryc.1.2. Szlak endocytotyczny oraz lokalizacja ferrytyny, pobranej na drodze endocytozy. Czarne kwadraty- cząsteczki ferrytyny, PCR- wczesny endosom, MVB- późny endosom, TGN- sieć *trans*-Golgiego, PVC-przedział przedwakuolarny PSV-wakuola gromadząca białka zapasowe. (Źródło: Geldner 2004, zmienione).

Obecnie sądzi się, że po internalizacji pęcherzyk podąża do przedziału endosomów wczesnych/PCR. Następnie jeśli niesione cargo nie ma zostać zawrócone do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, podąża za pomocą transportu pęcherzykowego do przedziału endosomów późnych/MVB, skąd może zostać przeniesione do przedziału TGN lub do odpowiedniej wakuoli (Ryc.1.2; Geldner 2004). Na podstawie badań na drożdżach zaproponowano podział procesu endocytozy na 3 główne etapy, które prawdopodobnie można wyróżnić również w komórce roślinnej (Ryc.1.3; Galletta i wsp. 2008; Galletta i Cooper 2009; Robertson i wsp. 2009):

1. W pierwszym etapie, w miejscu w którym dojdzie do internalizacji pęcherzyka, powstaje płaszcz białkowy, poprzez asocjację odpowiednich białek do błony komórkowej m.in. klatryny (białko to zostało omówione w rozdziale 1.2.1.1). U drożdży za zakotwiczenie kompleksu białkowego w błonie odpowiadają białka Ent1 i Sla2. Zawierają one domeny ENTH lub ANTH. Domeny te odpowiadają za inicjowanie składania klatryny i wiązanie odpowiednich fosfatydyloinozytoli błonowych, istotnych na wszystkich etapach endocytozy (temat ten został szerzej omówiony w rozdziale 1.3), (Robertson i wsp. 2009).



Ryc1.3.Trzy etapy endocytozy u drożdży. (Źródło: Robertson i wsp. 2009, zmodyfikowane).

2. W drugim etapie endocytozy dochodzi do wpuklenia błony do wnętrza komórki, w miejscu wyznaczonym przez płaszcz białkowy - tzw. proces „inwaginacji”. Etap ten jest zależny od udziału cytoszkieletu aktynowego. Aktyna polimeryzując tworzy „rusztowanie”

dla wpuklającego się pęcherzyka. Pozwala to na inwaginację błony wbrew wysokiemu ciśnieniu turgorowemu komórki.

3. Trzeci etap endocytozy obejmuje odcięcie, odpłaszczenie i przemieszczanie się pęcherzyka w głąb komórki. Najprawdopodobniej bezpośrednio po odłączeniu pęcherzyka następuje jego „odpłaszczenie”, czyli proces odłączenia białek płaszcza białkowego. Jest to proces niezbędny do zajścia fuzji pęcherzyka z docelowym przedziałem błonowym. Odpłaszczenie następuje za pośrednictwem kinaz, które fosforylując odpowiednie białka płaszcza, powodują ich odłączenie od pęcherzyka (Watson i wsp. 2001). Odpłaszczenie może być jednak również uwarunkowane aktywnością określonych fosfataz, które defosforylując fosfatydyloinozitol $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ do $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ na błonie pęcherzyka, powodują odłączenie pozostałych białek płaszcza, specyficznie łączących $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, np. białka Sla (Stefan i wsp. 2005).

1.2 Transport pęcherzykowy

System błon wewnętrznych wykazuje ciągłą komunikację między swoimi przedziałami, poprzez nieustający przepływ błon na szlakach antero- i retrogradowych. Mechanizmem umożliwiającym transport między składowymi systemu jest transport za pośrednictwem pęcherzyków. Powstający z błony organelli pełniącej funkcję donora pęcherzyk jest wyposażony w odpowiednie cargo. W trakcie transportu pęcherzykowego ważną funkcję spełniają tzw. cząsteczki adaptorowe, które odpowiadają za komunikację między białkami płaszcza na pęcherzyku, a cargo. To właśnie ich wzajemne oddziaływanie, na błonie przeznaczonej do wytworzenia pęcherzyka wspomagają proces jego ukształtowania. Materiał, po dotarciu do przedziału docelowego - organelli pełniącej funkcję akceptora, zostaje wyładowany. Dodatkowo poza zawartością pęcherzyka, do organelli docelowej, przekazywane są również lipidy i białka błonowe zawarte w błonie pęcherzyka, warunkując tym samym wspomniany już przepływ błon. Transport pęcherzykowy odbywa się na drodze prostej dyfuzji, gdy odległość jest mała lub przez białka motoryczne, które poruszają się wzdłuż włókienek cytoszkieletu. Właściwy przebieg transportu pęcherzykowego jest zależny od aktywności licznych białek, kilka z nich zostało opisanych poniżej.

1.2.1 Wybrane białka uczestniczące w mechanizmie transportu pęcherzykowego u roślin

1.2.1.1 Klatryna

Klatryna to białko znane m.in. z tworzenia płaszcza klatrynowego na pęcherzykach CCVs, które odchodzą od błony komórkowej w procesie endocytozy zależnej od klatryny lub od dalszych przedziałów systemu błon wewnętrznych np. struktur aparatu Golgiego. Klatryna to białko złożone, składające się z trzech łańcuchów ciężkich i trzech łańcuchów lekkich. Dzięki swojej regularnej budowie przestrzennej, może tworzyć wokół powstającego pęcherzyka strukturę podobną do kosza, ograniczającą jego rozmiary i umożliwiającą jego późniejsze odłączenie od błony (Pearse 1976).

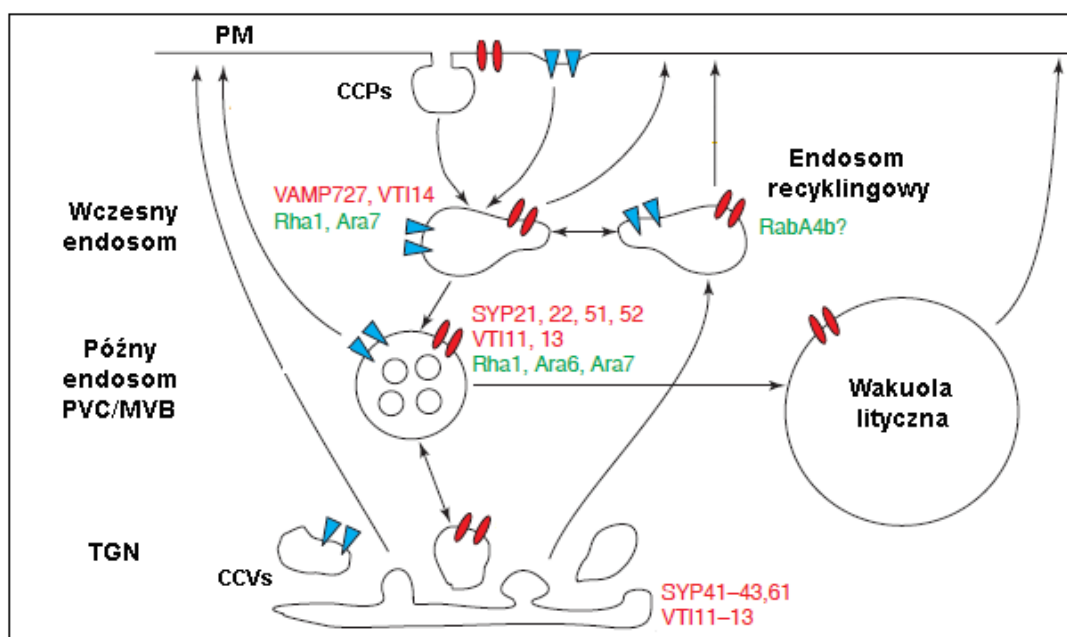
Funkcja i występowanie klatryny zostały dobrze poznane u zwierząt. Pierwsze pęcherzyki pokryte klatryną u roślin wyizolowano w 1991 roku z komórek hipokotyli ogórka i cukini (Depta i wsp. 1991). W przypadku roślin zidentyfikowano do tej pory w ich komórkach zarówno łańcuchy lekkie oraz ciężkie klatryny jak i większość białek, potrzebnych do przeprowadzenia endocytozy zależnej od klatryny. Należą do nich białka adaptorowe: AP180 oraz dwie adaptyny, uczestniczące wraz z klatryną w tworzeniu płaszcza klatrynowego (Šamaj i wsp. 2005). Płaszcz klatrynowy pełni ważną funkcję m.in. w I etapie endocytozy, kiedy to jest „inicjatorem” poboru odpowiednich białek do błony komórkowej, co determinuje miejsce zapoczątkowania procesu wpuklenia błony. Pełni on wówczas cztery ważne funkcje: ogranicza fragment błony, który będzie brał udział w formowaniu pęcherzyka, odpowiada za pobranie materiału przenoszonego przez pęcherzyk, powoduje powstanie zagłębienia w błonie (co w kolejnych etapach ułatwi wpuklenie), oraz rekrutuje białka, które odpowiadają za wiązanie i polimeryzację aktyny (Robertson i wsp. 2009). Co ciekawe, u roślin, pęcherzyki okryte klatryną mają zaledwie 70-90nm, przy czym ich odpowiedniki w komórkach zwierzęcych mają średnią wielkość 120nm (Conner i Schmid 2003). Może to być konsekwencją wysokiego ciśnienia turgorowego w komórkach roślinnych.

1.2.1.2 Rodzina białek Rab

Rodzina białek Rab, należąca do super-rodziny małych GTPaz Ras, wydaje się być centralnym graczem w formowaniu i segregacji domen błon endosomalnych (Nielsen 2005;

Zarsky i wsp. 2009; Źárský i Potocký 2009). Sugeruje się, że białka Rab grają kluczową rolę na wielu etapach ruchu pęcherzyków, w tym w procesie ich formowania, transportu za pośrednictwem cytoszkieletu oraz zakotwiczenia do błony docelowej (Zerial i McBride 2001; Źárský i Potocký 2009).

U *Arabidopsis thaliana* rodzina Rab składa się z ponad 50 białek, z czego prawdopodobnie większość jest zaangażowana w procesie endocytozy (Geldner 2004). Można wyróżnić 8 podrodzin: Rab1, Rab2, Rab5, Rab6, Rab7, Rab8, Rab11 oraz Rab18 z czego wszystkie lokalizują po cytozolowej stronie wybranych przedziałów w systemie błon wewnętrznych (Agarwal i wsp. 2009). Już w 2001 roku potwierdzono, że białka należące do rodziny Rab: Ara 6 oraz Ara7 kolokalizują z barwnikiem endocytotycznym FM4-64 w małych ruchliwych pęcherzykach, co zasugerowało ich udział w procesie endocytozy (Ueda i wsp. 2001). Poza udziałem w ruchu pęcherzyków, wykazano ponadto, że białka Rab mogą również przyczyniać się do ruchu całych organelli poprzez rekrutację białek motorycznych do odpowiednich przedziałów błonowych (Nielsen 2005; Agarwal i wsp. 2009). Ponieważ białka Rab są GTPazami, ich aktywacja następuje poprzez wymianę przyłączonego nukleotydu GDP na GTP. Zaktywowane białka Rab, oddziałują z białkowymi efektorami, rekrutując je do odpowiednich błon, co często zapoczątkowuje mechanizm ruchu pęcherzyka lub organelli (Ebine i Ueda 2009). Niektóre z efektorów mogą oddziaływać ze sobą, inne powodują lokalną produkcję lipidów, które z kolei odpowiadają za rekrutację kolejnych białek, do tego samego miejsca. W taki sposób, w przypadku komórek zwierzęcych, występujące na endosomach wczesnych białka Rab 5, odpowiadają za wiązanie kinazy-3-fosfatydyloinozytolu (PtdIns-3-K) (Le Roy i Wrana 2005). Proces ten generuje powstanie w błonie fosfatydyloinozytolo-3-fosforanów, które następnie specyficznie wiążą białka odpowiedzialne np. za ruch tychże endosomów (Zerial i McBride 2001). Tą drogą mogą być rekrutowane również aktywatory samych białek Rab (Geldner 2004).



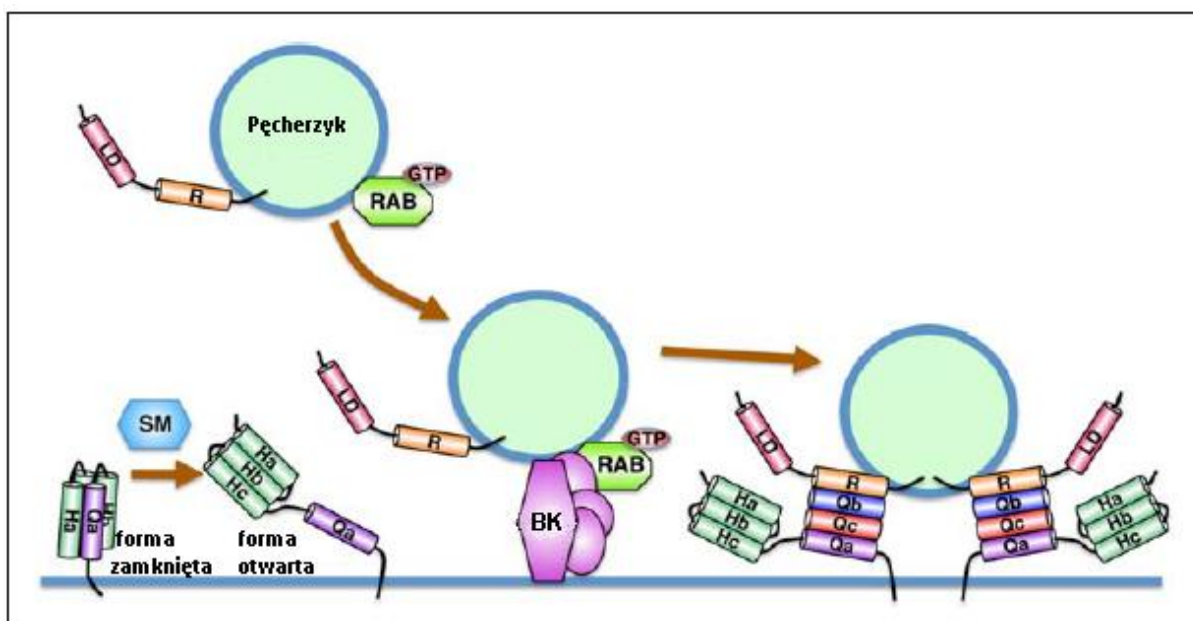
Ryc.1.4. System błon wewnętrznych komórki roślinnej z wybranymi markerami przedziałów błonowych: białka Rab (na zielono): Rha1, Ara7 (wyznakowują wczesny oraz późny endosom), Ara 6 (wyznakowuje późny endosom); białka SNARE (na czerwono): VAMP 727, VTI14 (wyznakowują wczesny endosom), SYP21, 22, 51, 52, VTI11, 12 (wyznakowują późny endosom), SYP41-43,61, VTI11-13 (wyznakowują TGN); CCPs- dolki opłaszczone klatryną. (Źródło: Šamaj i wsp. 2005, zmienione).

Ze względu na specyficzną lokalizację wybranych białek należących do rodziny Rab, niektóre z nich są uznanymi markerami znakującymi wybrane struktury na szlaku endocytotycznym (Ryc.1.4; Geldner 2004; Šamaj i wsp. 2004). Przykładowo endosomy wczesne charakteryzują się obecnością w ich błonie m.in. białek Ara7 i Rha1, z czego te pierwsze są bliskimi homologami zwierzęcych białek Rab5 (Šamaj i wsp. 2005). Endosomy późne, poza białkami Ara7 i Rha1, charakteryzują się obecnością m.in. białka Ara6, natomiast endosomy recyklingowe prawdopodobnie są wyposażone w białka RabA4b (Ryc1.4). Uznaje się obecnie, że spełnianie roli łącznika między błoną a białkami w procesie transportu pęcherzykowego jest cechą konserwatywną wśród białek Rab (Ebina i Ueda 2009).

1.2.1.3 Kompleks SNARE

Po procesie zakotwiczenia pęcherzyka do błony docelowej, co w dużej mierze jest zależne od związania białek Rab przez białka efektorowe, rozpoczyna się etap fuzji, za który odpowiada kompleks SNARE (Ryc.1.5; Ebina i Ueda 2009). Białka SNARE (**SNARE**; ang. *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment protein receptor*) to receptory

rozpuszczalnych białek wiążących NSF, czyli SNAP (SNAP; ang. *Soluble NSF attachment protein*). Białka należące do tego kompleksu wykazują dużą konserwatywność u wszystkich organizmów eukariotycznych. W kompleksie wyróżniamy cztery rodzaje białek: białko R-SNARE- obecne na błonie pęcherzyka oraz trzy białka Q-SNARE- Qa-, Qb- oraz Qc-SNARE- znajdujące się na błonie struktury docelowej (Antonin i wsp. 2002). Przed rozpoczęciem procesu fuzji pęcherzyka z błoną docelową dochodzi do rozplecenia ścisłej struktury stworzonej przez białka Qa-, Qb- oraz Qc-SNARE na błonie, co nazywamy przejściem z formy „zamkniętej” do „otwartej” (Burgoyne i Morgan 2007). Podczas procesu fuzji, znajdujące się na błonie pęcherzyka białko R-SNARE „spina się” z dwoma lub trzema białkami Q-SNARE na błonie docelowej, tworząc kompleks SNARE. Ważną funkcję pełnią tu białka Rab znajdujące się na pęcherzyku, które odpowiadają za jego zakotwiczenie w błonie docelowej poprzez oddziaływanie z białkami efektorowymi (białka kotwiczące – Ryc.1.5).



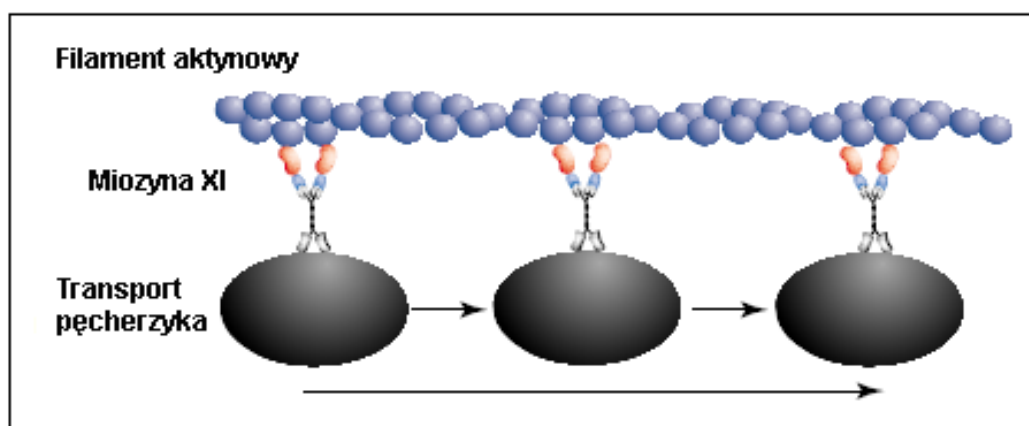
Ryc.1.5. Model zakotwiczenia oraz fuzji pęcherzyka z błoną docelową. Elementy kompleksu SNARE: R-SNARE (na błonie pęcherzyka), Qa-, Qb-, Qc-SNARE (na błonie docelowej); BK- białka kotwiczące, SM-białka odpowiedzialne za rozplecenie kompleksu SNARE do formy „otwartej”. (Źródło: Ebine i Ueda 2009, zmienione).

Należy zaznaczyć, że w różnych szlakach transportu biorą udział różne kompleksy SNARE, a genom *Arabidopsis thaliana* koduje ponad 50 różnych białek SNARE. Na Ryc.1.4 przedstawiono różną specyficzność występowania kilku białek należących do rodziny SNARE w komórkach roślinnych.

1.2.2 Udział cytoszkieletu aktynowego w transporcie pęcherzykowym

W przeciwieństwie do komórek zwierzęcych, gdzie główną rolę transportową pełnią mikrotubule, u roślin funkcję taką spełniają mikrofilamenty aktynowe (Baluška i wsp. 2002; Šamaj i wsp. 2005; Voigt i wsp. 2005; Boutte i wsp. 2007). Mikrofilamenty jako struktury niezwykle dynamiczne, skupione dość często w postaci grubych wiązek, ukierunkowują przepływ cytoplazmy oraz stanowią drogę, wzdłuż której odbywa się ruch organelli, takich jak np. mitochondriów czy chloroplastów. Cytoszkielet aktynowy jest odpowiedzialny również za ruch pęcherzykowy w komórce roślinnej. Jest to możliwe zarówno dzięki strukturze mikrofilamentów, które przenikając cały protoplast tworzą rozbudowaną sieć transportową jak i ze względu na dynamiczną naturę jego białek.

Dowodzono, że w przypadku endocytozy, udział aktyny jest niezbędny już w początkowych etapach formowania pęcherzyka. Sugeruje się, że aktyna oddziałując z białkami płaszcza klatrynowego, podczas polimeryzacji, generuje siłę potrzebną do wpuklenia pęcherzyka do światła komórki, wbrew dużej sile turgoru (Merrifield i wsp. 2002; Merrifield i wsp. 2005; Yazar i wsp. 2005). Zauważono również, że ruch endosomów np. w rosnących szczytowo włośnikach wymaga niezakłóconej, ciągłej polimeryzacji aktyny (Voigt i wsp. 2005). Inne badania ujawniły, że depolimeryzacja aktyny powoduje zatrzymanie właściwej dystrybucji pęcherzyków sekrecyjnych pochodzących z GA, co skutkuje w ich akumulacji przy stosach Golgiego (Boutté i wsp. 2007). Bardzo możliwe że białkiem motorycznym odpowiedzialnym za ruch pęcherzyków po mikrofilamentach jest miozyna (Ryc.1.6; Reichelt i wsp. 1999; Baluška i wsp. 2001; Shimmen i Yokota 2004). Jest to białko składające się z trzech domen, w tym z motorycznej na N-końcu, która oddziałuje z aktyną i hydrolazą ATP oraz motywu superhelisy, odpowiadającego za dimeryzację białka. U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 17 genów kodujących miozyny (Higaki i wsp. 2007). Sugeruje się, że jedynie miozyna XI oraz miozyny klasy VIII biorą udział w transporcie organelli, w tym być może endosomów (Shimmen i Yokota 2004; Holweg i Nick 2004; Reichelt i wsp. 1999). W niektórych przypadkach mutacja miozyny należącej do klasy XI zakłócała przemieszczanie pęcherzyków i transport polarny auksyny (Holweg i Nick 2004).



Ryc.1.6. Transport pęcherzyka za pośrednictwem miozyny XI oraz cytoszkieletu. (Źródło: Shimmen i Yokota 2004, zmienione)

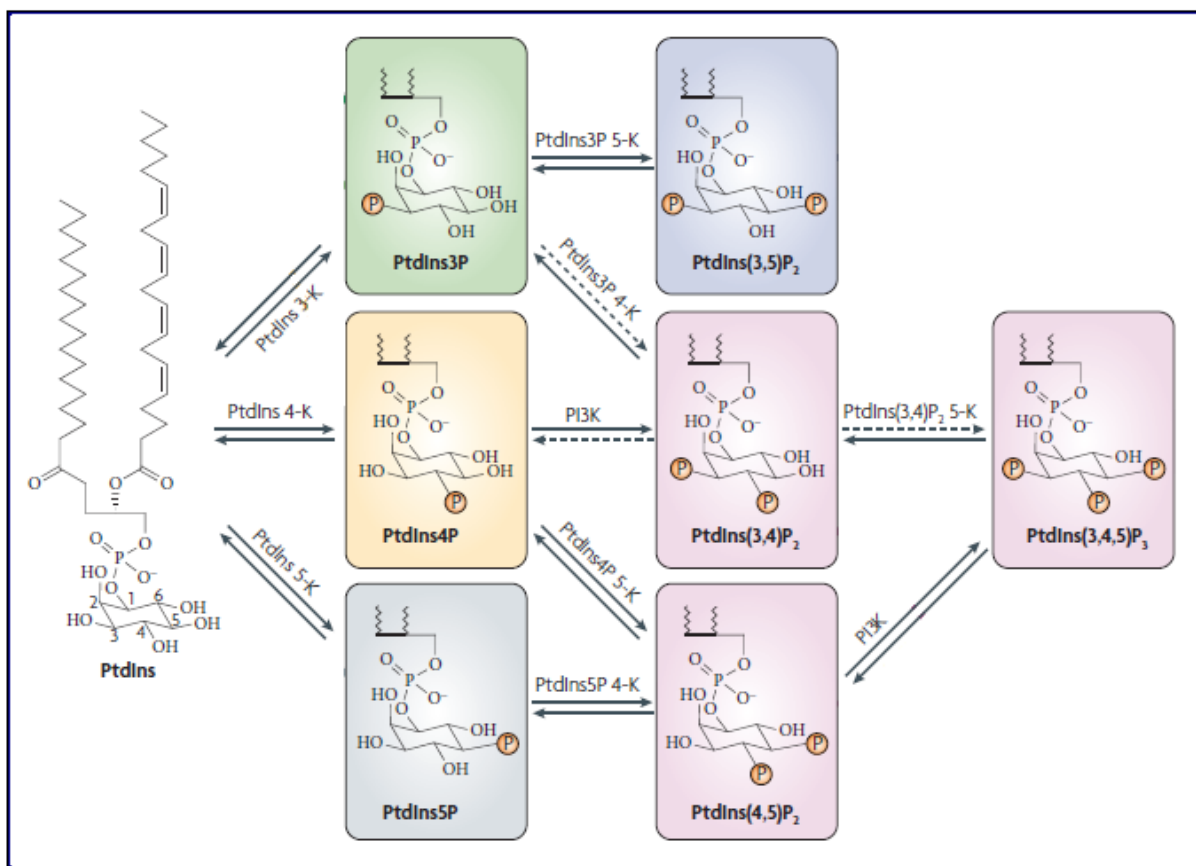
Wielu istotnych informacji na temat udziału mikrofilamentów w przebiegu endocytozy u roślin dostarczyły badania z zastosowaniem inhibitora blokującego wydłużanie końców kolczastych mikrofilamentów aktynowych (cytochalazyna D), lub badania mutantów pozbawionych genu kodującego aktynę (Grebe i wsp. 2003; Boutté i wsp. 2007). Do tej pory dowiedziono, że filamenty aktynowe biorą udział m.in. w procesie powrotu do błony pęcherzyków recyklingowych (Baluška i wsp. 2002; Šamaj i wsp. 2005), w procesie pinocytozy (Baluška i wsp. 2004) oraz w obustronnym ruchu pęcherzyków do i z błony podczas wzrostu polarnego komórek rosnących szczytowo u włośników czy pyłku (Camacho i Malhó 2003; Ovečka i wsp. 2005). Udział filamentów aktynowych odpowiada więc za ruch pęcherzyków nie tylko w procesie endocytozy ale także egzocytozy. Wzajemne zależności między organizacją cytoszkieletu aktynowego a ruchem pęcherzyków są jednak u roślin ciągle słabo poznane. Sądzi się, że pełnienie funkcji organizatora układu wewnątrz błonowego przez cytoszkielet aktynowy jest możliwe dzięki oddziaływaniom białko-białko, oraz najprawdopodobniej białko-lipid. Należy jednakże podkreślić, że jak dotąd charakter zakotwiczenia w większości przypadków pozostaje nieznany.

1.3 Fosfatydyloinozytole – lipidy uczestniczące w przepływie błon w komórce

Fosfatydyloinozytole to fosfolipidy należące do glikofosfolipidów oraz stanowiące jedynie ok. 1% wszystkich lipidów błonowych (van Leeuwen i wsp. 2004). Cząsteczki te występują w 7 głównych formach, zależnych od stopnia ufosforylowania ich pierścienia

inozytowego (Ryc. 1.7; Lemmon 2008). Można wyróżnić: fosfatydyloinozytolo-3-fosforan (PtdIns(3)P), fosfatydyloinozytolo-4-fosforan (PtdIns(4)P), fosfatydyloinozytolo-5-fosforan (PtdIns(5)P), fosfatydyloinozytolo-3,4-difosforan (PtdIns(3,4)P₂), fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan (PtdIns(4,5)P₂), fosfatydyloinozytolo-3,5-difosforan (PtdIns(3,5)P₂) oraz fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (PtdIns(3,4,5)P₃) (Dróbak i Heras 2002; Meijer i Munnik 2003).

Wykazano, że zagęszczenie oraz rozmieszczenie fosfatydyloinozytoli w błonach wewnątrz komórki jest zmienne w zależności od występujących warunków stresowych. Co ciekawe, w wyniku pojawienia się stresu n.p. suszy, temperatury czy stresu osmotycznego, ich synteza lub hydroliza gwałtownie wzrasta w przeciągu kilku minut (Meijer i wsp. 1999; Meijer i wsp. 2001; Meijer i Munnik 2003). Zmiany te są zależne od aktywności określonych fosfataz oraz kinaz białkowych.



Ryc.1.7 Siedem wariantów fosfatydyloinozytoli zależnych od ufosforylowania pierścienia inozytowego, poprzez różne faszfatazy i kinazy. (Źródło: Lemmon 2008, zmienione).

Za dwie główne funkcje fosfatydyloinozytoli uważa się udział w procesach sygnalizacyjnych w komórce oraz kontrolę ogólnie pojętego przepływu błon (Simonsen i

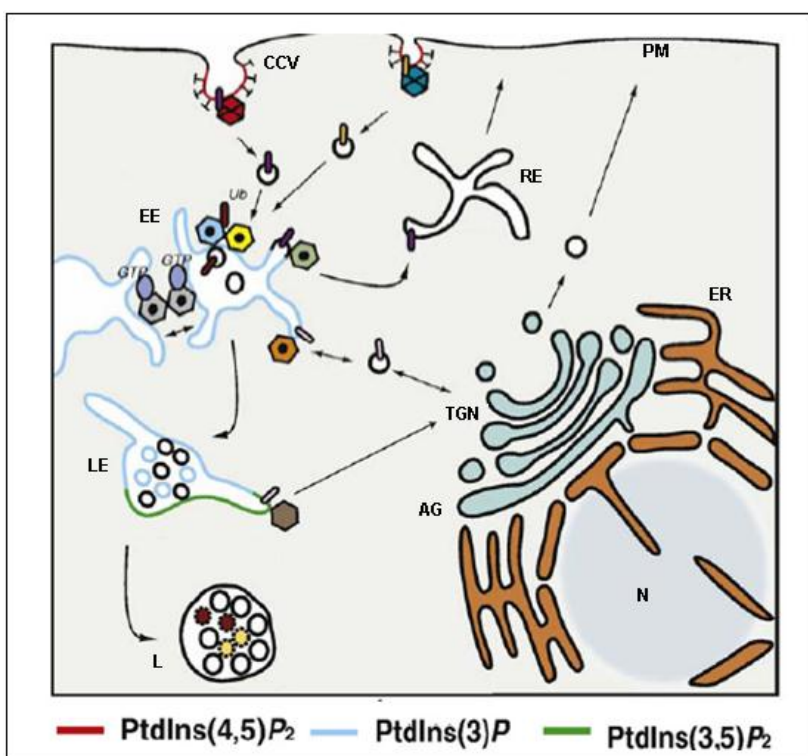
wsp. 2001; Di Paolo i De Camilli 2006; Krauss i Haucke 2007). W przypadku pierwszej z funkcji najbardziej znanym i najlepiej poznanym fosfatydyloinozytolem jest PtdIns(4,5)P₂. Ten fosfolipid zlokalizowany w błonie komórkowej, w odpowiedzi na określony sygnał, podlega hydrolizie przez fosfolipazy, będąc prekursorem wtórnych cząsteczek sygnałnych, takich jak diacyloglicerol (DAG), oraz inozytolo1,4,5-trifosforan (InsP₃) (Kost i wsp. 1999; Meijer i Munnik 2003; van Leeuwen i wsp. 2007). Cząsteczki te pełnią istotną rolę w przekaznictwie sygnałów z zewnątrz jak i wewnątrz komórki. Rola fosfatydyloinozytoli w procesach przepływu błon jest natomiast realizowana poprzez rekrutację określonych białek do odpowiednich błon. Jest to możliwe poprzez specyficzne wiązanie, przez różne fosfatydyloinozytole, białek niosących określone domeny białkowe takie jak np. FYVE, PH, PX, czy ENTH (temat ten będzie szerzej omówiony w podrozdziale 1.3.1) (Simonsen i wsp. 2001; Mayinger 2012). Ponieważ poszczególne kompartmenty komórkowe są wyposażone w różne typy fosfatydyloinozytoli, przyłączane białka są tym samym rekrutowane do ściśle określonych przedziałów błonowych – tam gdzie ich obecność w danym procesie jest wymagana. W ten sposób fosfatydyloinozytole mogą oddziaływać z białkami zmieniając ich lokalizację subkomórkową i/lub aktywność, co więcej mogą też wpływać na możliwości interakcji tych białek z innymi białkami (van Leeuwen i wsp. 2004). Na takiej zasadzie fosfatydyloinozytole stanowią główny łącznik wielu białek z błonami biologicznymi a tym samym kontrolują wiele szlaków transportowych, w tym m.in. proces endocytozy (Simonsen i wsp. 2001).

Od kilku lat sugeruje się, że w komórkach zwierzęcych formowanie oraz transport pęcherzyków endosomalnych są ściśle regulowane przez cząsteczki kaskady sygnałnej (Roth 2007). Przykładowo, podczas fagocytozy, jednego z typów endocytozy, fosfatydyloinozytole przekazują pobudzenie od receptorów błonowych do cytoszkieletu aktynowego, który odpowiada za transport pęcherzyków fagocytotycznych (May i Machesky 2001). Badania funkcjonowania neksyny SNX9 wskazały na przykład, że po przyłączeniu odpowiedniego fosfatydyloinozytoli, białko to wpływało na polimeryzację aktyny, co z kolei inicjowało transport pęcherzyków endosomalnych (Yarar i wsp. 2007). Co ciekawe przez ostatnie lata wykazano niejednokrotnie, że wybrane fosfatydyloinozytole oddziałują z białkami z rodziny Rab w procesie przepływu błon. W przypadku zwierząt wykazano, że często występujące na tych samych endosomach białka Rab5 oraz fosfatydyloinozytole PtdIns(3)P, oddziałują z tym samym białkiem efektorowym, wymaganym dla ruchu pęcherzyka (Mayinger 2012). Co ciekawe, białko Rab5 odpowiada w tym przypadku również za wiązanie kompleksu kinaz Vps34/Vps15 potrzebnych do powstania PtdIns(3)P (Christoforidis i wsp. 1999; Murray i

wsp. 2002). Z drugiej strony niejednokrotnie również wykazywano, że fosfatydyloinozytole wiążą białka pełniące funkcje aktywatorów białek Rab. Wskazuje to, że fosfatydyloinozytole jak i białka Rab nie tylko mogą rekrutować te same białka, ale też wzajemnie się aktywować (Zhang i McCormick 2010).

Jak wcześniej wspomniano, różne rodzaje fosfatydyloinozytoli, zależnie od stopnia ufosforylowania, są zlokalizowane w określonych przedziałach błonowych. Do tej pory w przypadku komórek zwierzęcych, stwierdzono następującą lokalizację poszczególnych ich typów: PtdIns(3)P oraz PtdIns(3,4)P₂ - występują w błonie wczesnych endosomów, PtdIns(4)P - w błonie aparatu Golgiego oraz przedziale TGN, PtdIns(4,5)P₂ i PtdIns(3,4,5)P₃ - w błonie komórkowej, PtdIns(3,5)P₂ - w błonie późnych endosomów, lokalizacja fosfatydyloinozytoli PtdIns(5)P ciągle pozostaje niejasna (Ryc.1.8; Di Paolo i De Camilli 2006).

W przypadku komórek roślinnych odnotowano do tej pory występowanie wszystkich typów fosfatydyloinozytoli, z wyłączeniem PtdIns(3,4,5)P₃, co świadczy, że u roślin istnieje ich sześć wariantów (Żarski i Potocki 2009). W Instytucie SILS (**SILS**, ang. **Swammerdam Institute for Life Sciences**) w Amsterdamie, korzystając z technik mikroskopii fluorescencyjnej udowodniono, że w przypadku komórek roślinnych, podobnie jak w komórkach zwierzęcych, PtdIns(3)P są obecne m.in. w błonie endosomów, PtdIns(4,5)P₂ w błonie komórkowej, natomiast PtdIns(4)P w błonie komórkowej i aparacie Golgiego (Vermeer i wsp. 2006; van Leeuwen i wsp. 2007; Vermeer i wsp. 2009). Określenie lokalizacji pozostałych fosfatydyloinozytoli wciąż wymagają dalszych eksperymentów.



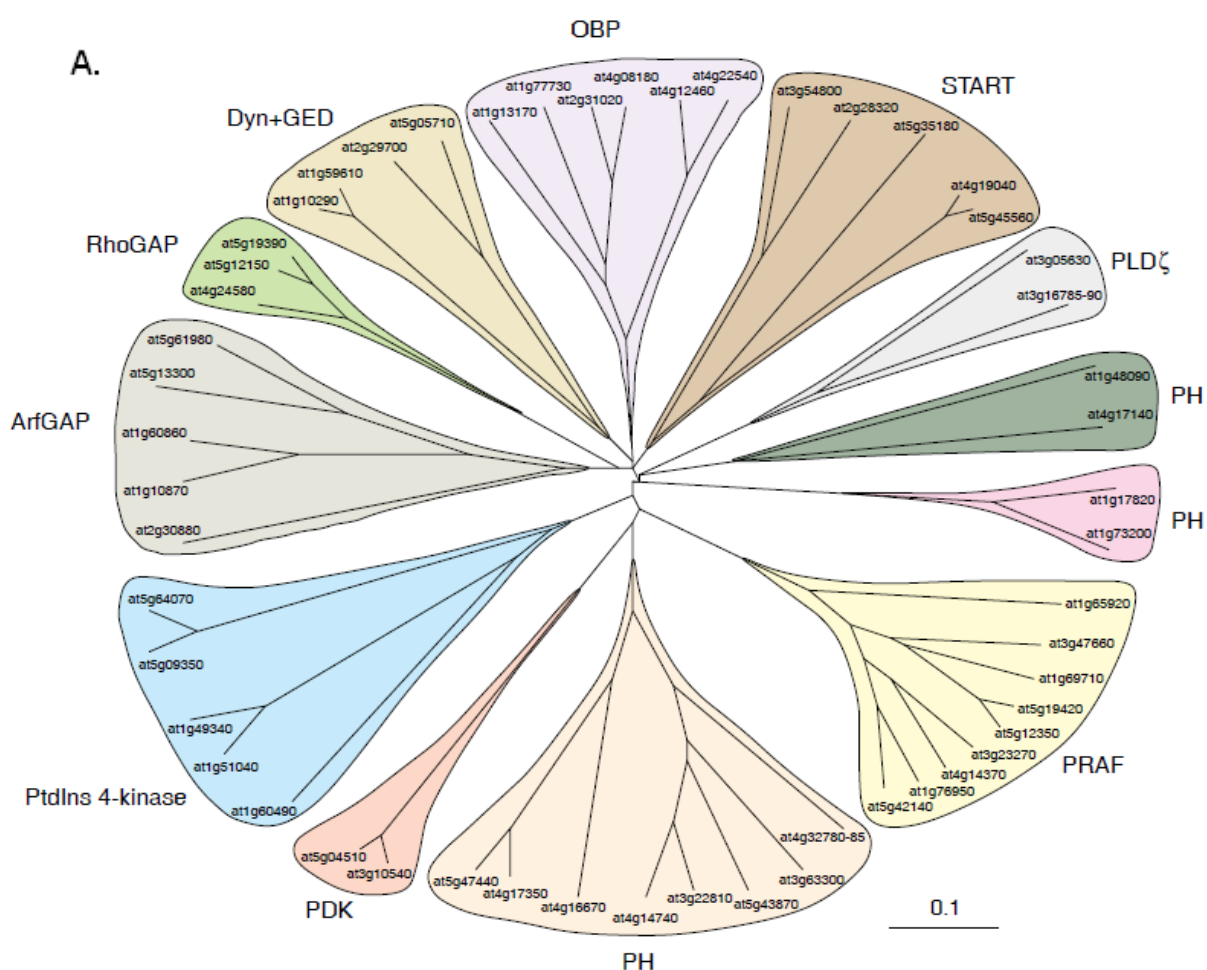
Ryc.1.8

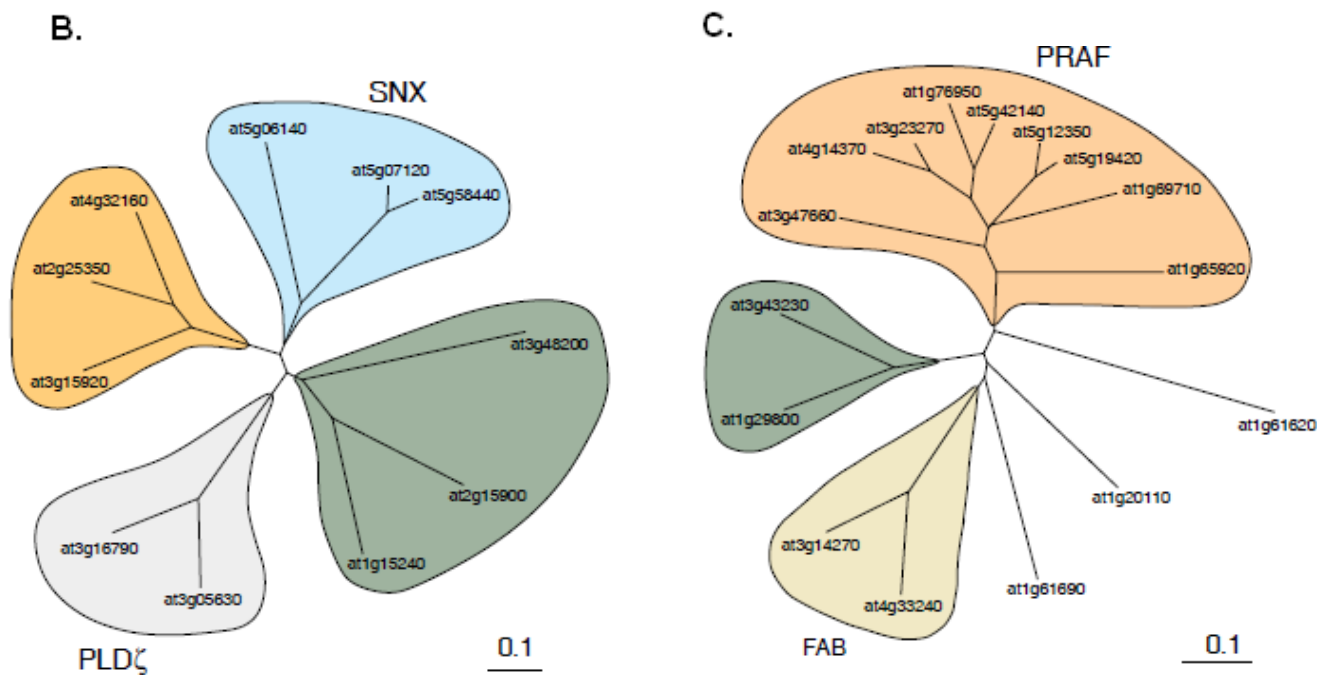
Rozmieszczenie trzech głównych typów fosfatydyloinozytoli w komórce zwierzęcej. AG-aparat Golgiego, CCV-pęcherzyk okryty klatryną, EE- wczesny endosom, ER- retikulum endoplazmatyczne, L-lizosom, LE- późny endosom, N- jądro komórkowe, PM- błona komórkowa, RE- endosom recyklingowy, TGN-sieć trans Golgiego. (Źródło: Clague i wsp. 2009, zmienione).

Reasumując, na podstawie dotychczasowych obserwacji dokonanych w komórkach zwierzęcych oraz roślinnych, sugeruje się obecnie, że fosfatydyloinozytole PtdIns(3)P mogą brać udział w kontroli ruchu wczesnych endosomów, PtdIns(4,5)P₂ kontrolują wybrane procesy zachodzące przy błonie komórkowej, PtdIns(3,5)P₂ mogą odpowiadać za dynamikę późnych endosomów, a PtdIns(4)P za dynamikę i morfologię aparatu Golgiego (Mayinger 2012).

1.3.1 Wybrane domeny białkowe wiążące fosfatydyloinozytole

Fosfatydyloinozytole, jak wspomniano w poprzednim rozdziale, wiążą określone białka, dzięki specyficznym oddziaływaniom z ich domenami. Do najlepiej poznanych, dotąd zidentyfikowanych domen, oddziałujących z fosfatydyloinozytolami należą: FYVE, PH, PX. W genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano do tej pory ok. 70 białek wyposażonych w jedną lub więcej z wymienionych domen (Ryc. 1.9; van Leeuwen i wsp. 2004).

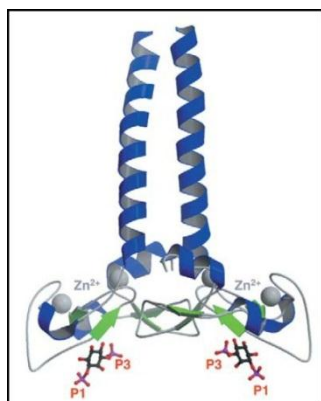




Ryc.1.9 Drzewa filogenetyczne białek wyposażonych w domeny: A: PH, B: PX, C: FYVE, u *Arabidopsis thaliana*. Różnokolorowe gałęzie odzwierciedlają różne rodziny białek, niosące domeny wiążące fosfatydyloinozytole. (Źródło: (van Leeuwen i wsp. 2004, zmienione).

1.3.1.1 Domena Fyve

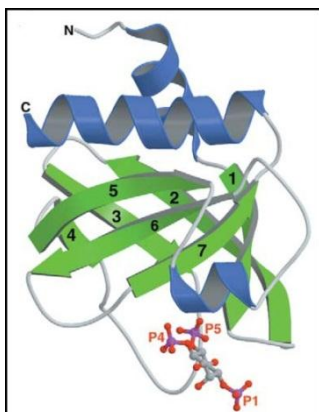
Domena FYVE, zawdzięcza swoją nazwę 4 białkom, u których w 1996 roku po raz pierwszy zauważono jej obecność: **Fab1p**, **YOTB**, **Vac1p** i **EEA1** (Stenmark i wsp. 1996). Domena ta zbudowana z ok. 60-80 aminokwasów, tworzy strukturę palca cynkowego składającego się z dwóch struktur β oraz C-terminalnej α -helisy połączonych ze sobą za pomocą Zn^{2+} (Ryc.1.10, Misra i Hurley 1999). W genomie *Arabidopsis thaliana* występuje 16 białek niosących tę domenę, z czego możemy wyróżnić 3 podgrupy (Ryc.1.9, C; van Leeuwen i wsp. 2004). Domena FYVE jest odpowiedzialna za specyficzne wiązanie fosfatydyloinozytolu $\text{PtdIns}(3)\text{P}$, obecnego m.in na endosomach (Gaullier i wsp. 1998).



Ryc.1.10 Model struktury krystalicznej domeny FYVE w postaci homodimeru, ze związanym fosfatydyloinozytolo-3-fosforanem. (Źródło: van Leeuwen i wsp. 2004, zmienione).

1.3.1.2 Domena PH

Domena PH (**PH**; ang. **Pleckstrin homology**) została po raz pierwszy zidentyfikowana w 1993 roku w plekstrynie (Haslam i wsp. 1993; Mayer i wsp. 1993). W roku 1994 natomiast po raz pierwszy udokumentowano jej oddziaływanie z fosfatydyloinozytolami - PtdIns(4,5)P₂ (Harlan i wsp. 1994). Domena PH składa się z ok. 100-120 aminokwasów zebranych w dwie antyrównoległe β -harmonijki i umieszczoną na C-końcu α -helisę (Ryc. 1.11; Ferguson i wsp. 1994). Genom *Arabidopsis thaliana* koduje ponad 50 białek wyposażonych w tę domenę, z czego możemy wyróżnić 12 podgrup (Ryc. 1.9, A; van Leeuwen i wsp. 2004). Główną funkcją domeny PH jest wiązanie fosfatydyloinozytolu PtdIns(4,5)P₂, który występuje w błonie komórkowej oraz PtdIns(4)P obecnego u zwierząt w strukturach aparatu Golgiego (Dowler i wsp. 2000). W niektórych przypadkach zdarza się jednak, że domena ta nie wiąże żadnych fosfatydyloinozytoli (Yu i wsp. 2004). Białka roślinne niosące tę domenę (Ryc.1.9), są związane z takimi procesami jak procesy sygnalizacyjne (n.p. fosfolipazy D), czy szeroko pojęta kontrola przepływu błon (kinazy białkowe, regulatory małych GTPaz, regulatory cytoszkieletu) (Kam i wsp. 2000; Halet 2005).

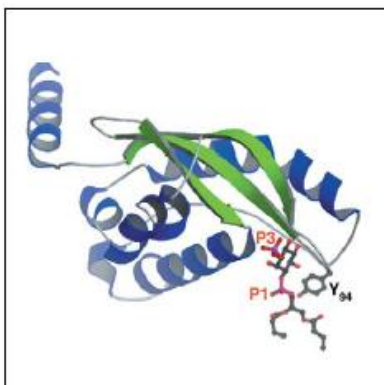


Ryc.1.11 Model struktury krystalicznej domeny PH wiążącej fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan. (Źródło: van Leeuwen i wsp. 2004, zmienione).

1.3.1.3 Domena PX

Domena PX (**PX**; ang. **Phox homology**) była po raz pierwszy zidentyfikowana w 1996 roku w białku zwierzęcym, dokładnie w podjednostkach oksydazy NADPH - p40^{phox} oraz p47^{phox} (Ponting 1996). Domena PX składa się z 100-120 aminokwasów, tworzących β -harmonijkę oraz 4 α -helisy (Ryc.1.12; van Leeuwen i wsp. 2004). Genom *Arabidopsis thaliana* koduje 11 białek wyposażonych w tę domenę, z czego możemy wyróżnić 4

podgrupy (Ryc.1.9, B; van Leeuwen i wsp. 2004). Domena PX preferencyjnie wiąże fosfatydyloinozytol PtdIns(3)P, jednak może także wiązać PtdIns(3,4)P₂ oraz sporadycznie PtdIns(4,5)P₂ (Ellson i wsp. 2002; Kanai i wsp. 2001; Song i wsp. 2001). Białka roślinne wyposażone w tę domenę były do tej pory wiązane z takimi procesami jak ruch pęcherzyków endocytotycznych (neksyny sortujące), czy procesy sygnalizacyjne (fosfolipazy D) (Xu i wsp. 2001; van Leeuwen i wsp. 2004).



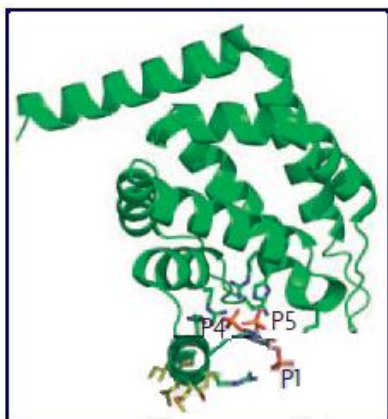
Ryc.1.12 Model struktury krystalicznej domeny PX wiążącej fosfatydyloinozytolo-3-fosforan (Źródło: van Leeuwen i wsp. 2004, zmienione).

Poza wymienionymi domenami wiążącymi fosfatydyloinozytole, występują również inne, mniej poznane, takie jak np. ENTH (**ENTH**; ang. *epsin N-terminal homology*), ANTH (**ANTH**; ang. *AP180 N-terminal homology*), FERM (**FERM**; ang. *4,1-ezrin-radixin-moesin*) i inne, które również mają udokumentowane oddziaływania z fosfatydyloinozytolami (Lemmon 2003; Meijer i Munnik 2003; van Leeuwen i wsp. 2004).

1.3.1.4 Domena ENTH

Nazwa domeny ENTH pochodzi od regionu epsyny, typowego dla białek wiążących klatrynę (Lemmon 2008). Domena ta składa się z ok. 150 aminokwasów oraz ma strukturę superhelikalnego solenoidu złożonego z 9 α -helis (Ryc. 1.13). Spośród 7 występujących typów fosfatydyloinozytoli preferencyjnie wiąże fosfatydyloinozytol PtdIns(4,5)P₂ (Itoh i wsp. 2001; Ford i wsp. 2001; Ford i wsp. 2002). Znajdująca się na N-końcu domeny helisa, tworzy głęboki „rowek” stanowiący kieszeń wiążącą dla fosfatydyloinozytoli (Stahelin i wsp. 2003; Itoh i De Camilli 2006). Białka niosące tę domenę lokalizują zwykle w błonie komórkowej, co jest również rezultatem oddziaływania z wymienionym fosfatydyloinozytolem oraz klatryną (Lemmon 2008). Uważa się ponadto, że N-końcowa helisa ENTH „wnikając” pomiędzy dwuwarstwę lipidową błony komórkowej, inicjuje jej

„wygięcie” do światła komórki, tym samym obniżając koszt energetyczny potrzebny do powstania pęcherzyka endocytotycznego (Itoh i De Camilli 2006).



Ryc.1.13 Model struktury krystalicznej domeny ENTH wiążącej fosfatidyloinozytolo-4,5-difosforan (Źródło: Lemmon 2008, zmienione).

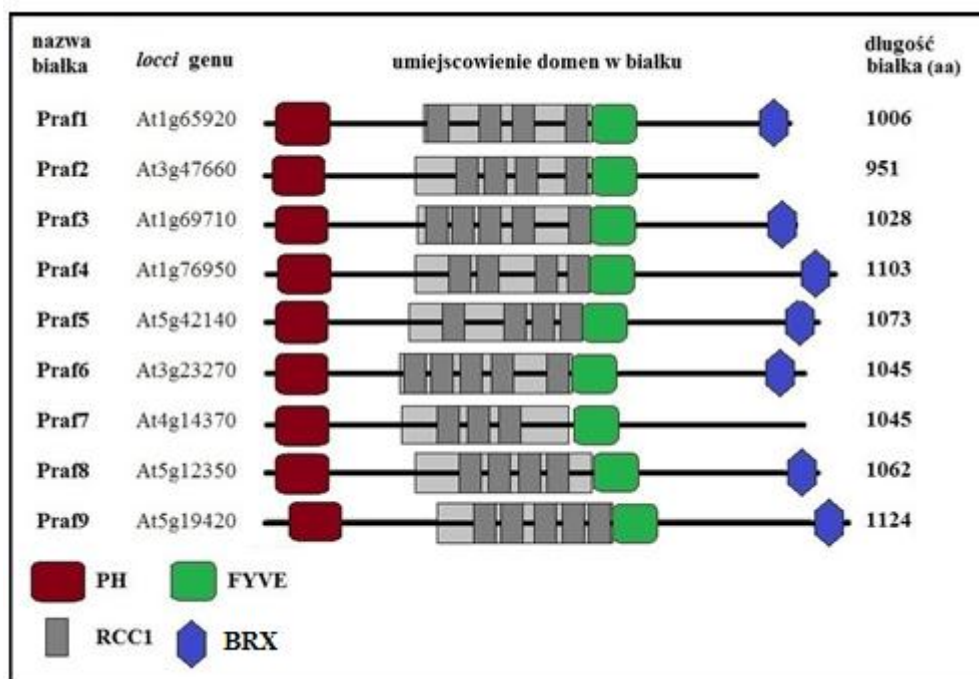
Tabela 1.1 Powinowactwo wybranych domen białkowych, do fosfatidyloinozytoli błonowych.

Domena	Fosfatidyloinozytol-wiązany preferencyjnie	Fosfatidyloinozytol-wiązany sporadycznie
	PtdIns3P	
	PtdIns(4,5)P ₂	PtdIns(4)P
	PtdIns(3)P	PtdIns(3,4)P ₂ , PtdIns(4,5)P ₂
	PtdIns(4,5)P ₂	

1.3.2 Rodzina białek PRAF

Rodzina PRAF (**PRAF**; ang. **PH domain**, **Regulator of Chromatin Condensation**, **FYVE**) należy zarówno do grupy białek wyposażonych w domenę PH jak i FYVE (Ryc. 1.9 A,C; van Leeuwen i wsp. 2004). W skład tej rodziny wchodzi 9 białek o zbliżonej budowie (Ryc.1.14). Poza obecnością domen FYVE oraz PH, na podstawie analiz bioinformatycznych prognozuje się istnienie w ich sekwencji również takich domen tak: RCC1 (**RCC1**; ang. **Regulator of**

Chromatin Condensation), BRX (**BRX**, ang. *Brevis radix-like domain*), znanej również jako DZC, oraz motywu superhelisy (ang. coiled-coil) (van Leeuwen i wsp. 2004).



Ryc.1.14 Rodzina białek PRAF. (Źródło: Wywiał i Singh 2009, zmienione).

Jak wcześniej wspomniano domeny PH oraz FYVE są odpowiedzialne za procesy związane z przepływem błon w tym m.in. z oddziaływaniem z błoną komórkową oraz pęcherzykami endocytotycznymi. Domena RCC1 była do tej pory natomiast najczęściej wiązana z procesem katalizowania wymiany nukleotydu GDP na GTP na GTP-azach Ran w jądrze komórkowym (Drøbak i Heras 2002). Od kilku lat wiadomo natomiast, że jedną z grup GTP-az z którymi oddziałuje domena RCC1 są białka Rab obecne na endosomach (Jensen i wsp. 2001). Domena ta jest więc kolejnym potencjalnie ważnym łącznikiem tych białek z systemem błon wewnętrznych i organizatorem procesów przepływu błon. Białka PRAF zawierają ponadto w domenę BRX, prawdopodobnie odpowiedzialną za oddziaływania między białkami oraz w motyw superhelisy.

Uważa się, że białka PRAF, typowe są jedynie dla komórki roślinnej, ponieważ do tej pory nie zidentyfikowano białek homologicznych u zwierząt (van Leeuwen i wsp. 2004). Pierwsze białko z rodziny PRAF zostało wyizolowane w roku 2001 z *Arabidopsis thaliana* i było to pierwsze zidentyfikowane białko eukariotyczne, które zawiera zarówno domeny PH i FYVE, jak i RCC1 (Begona i Drøbak 2002). Do tej pory funkcja i mechanizm działania

białek z rodziny PRAF, nie zostały jeszcze prawie w ogóle zweryfikowane eksperymentalnie. Dysponujemy jedynie nieznaczną wiedzą na temat pewnych aspektów funkcjonalności białka PRAF1. W 2001 roku wykazano bowiem, że domena PH białka PRAF4 preferencyjnie wiąże fosfatydyloinozitol $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, natomiast domena FYVE – $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ (Jensen i wsp. 2001). Dodatkowo wykazano, że domena RCC1 białka PRAF1 ma potencjalną zdolność do pełnienia funkcji czynnika wymiany nukleotydów guaninowych, na małych GTPazach Rab na endosomach (Jensen i wsp. 2001). Pozostałe białka z rodziny PRAF, nie zostały do tej pory poddane głębszej analizie eksperymentalnej.

2. Cel

Przepływ błon w systemie błon wewnętrznych komórki roślinnej oraz związany z nim transport pęcherzykowy są uwarunkowane ciągiem następujących po sobie oddziaływań między określonymi białkami, przedziałami błon biologicznych w tym ich lipidami oraz cytoszkieletem, odpowiednio zorganizowanymi w czasie i przestrzeni. Ciągłe jest jednak więcej hipotez niż faktycznie zidentyfikowanych organizatorów tych procesów w komórce roślinnej.

Nadrzędnym celem niniejszej pracy doktorskiej było zidentyfikowanie oraz możliwie jak najpełniejsze poznanie funkcji wybranych, dotąd nie charakteryzowanych białek *Arabidopsis thaliana*, oddziałujących z lipidami błon, potencjalnie uczestniczącymi w organizacji układu wewnątrz błonowego komórki m.in. w aspekcie transportu pęcherzykowego.

Wyznaczono następujące cele częściowe:

1. Na podstawie **analiz bioinformatycznych, wytypowanie grupy białek *Arabidopsis thaliana***, których przewidywana funkcja może sugerować ich istotne znaczenie w procesach przepływu błon.
2. **Określenie lokalizacji subkomórkowej wytypowanych białek.**
3. **Zbadanie oddziaływań białko-lipid wytypowanych białka**, w celu określenia do których fosfatydyloinozytoli, domeny białek wykazują największe powinowactwo.

3. Materiały

3.1 Materiał roślinny

❖ *Arabidopsis thaliana* (Rzodkiewnik pospolity)

Do badań wykorzystano rośliny *Arabidopsis thaliana* z ekotypu Columbia-0. Linie roślin dzikich zamówiono w bazie ABRC (ABRC; ang. *Arabidopsis Biological Resource Center*).

❖ *Nicotiana tabacum* (Tytoń szlachetny)

3.2 Szczepy bakteryjne

❖ *Escherichia coli* szczep **DH5 α** : *supE44 Δ lacU 169 (Φ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*. Jest to szczep powszechnie wykorzystywany w technikach rekombinacji DNA, ze względu na: 1) mutacja endA1- powodująca inaktywację endonukleaz, odpowiedzialnych za degradowanie plazmidowego DNA; pozwala uzyskać większą ilość plazmidowego DNA, 2) mutacja recA1- umożliwia rekombinację homologiczną, co wpływa na wzrost stabilizacji plazmidu w komórce, 3) wyłączony gen β -galaktozydazy; pozwala na identyfikację transformantów w teście α -komplementacji.

❖ *Escherichia coli* szczep **DB3.1**: *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*. Jest to szczep umożliwiający replikację plazmidów zawierających kasetę ccdB (wektory w systemie Gateway).

❖ *Escherichia coli* szczep **BL21(DE3)** *pLysS codonplus F- ompT hsdS (r_B^- m_B^-) dcm+ Tetr gal (DE3) endA Hte [argU proL Camr]*. Jest to szczep umożliwiający wysokowydajną ekspresję białek w komórce, przez co powszechnie stosowany w procesie nadekspresji białek rekombinowanych. Zawiera gen polimerazy RNA T7 połączony z promotorem indukowanym przez IPTG. Szczep ten wykazuje oporność na chloramfenikol (34 μ g/ml).

❖ *Agrobacterium tumefaciens* szczep **GV3101**: jest to szczep wyprowadzony z C58C1, charakteryzujący się opornością na antybiotyk rifampicynę (50 μ g/ml) oraz gentamycynę (20 μ g/ml). Szczep ten wymaga aktywacji acetosyringonem, co umożliwia transformację roślin wektorami binarnymi, wprowadzonymi wcześniej do jego komórki.

Wszystkie szczepy bakteryjne pochodziły z kolekcji Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM.

3.3 Kwasy nukleinowe

3.3.1 Kolekcja cDNA

cDNA, czyli produkty odwrotnej transkrypcji uzyskane z matrycy mRNA, zamówiono z bazy BioResource Center RIKEN. Zamówiono następujące klony:

	cDNA
• At4g32160 (PXS)	pda 20847
• At3g15920 (PXC)	pda 14373
• At1g15240 (PXX)	pda 14858
• At1g76950 (PRAF4)	pda 06464
• At1g65920 (PRAF1)	pda 20147
• At4g02650 (SlaA)	pda 11469

Zamówione cDNA otrzymano w formie liofilizowanej. Częsteczki zawieszano w 50 µl sterylnej wody i wykorzystywano jako matryce do reakcji PCR.

3.3.2 Startery

Startery zastosowane w niniejszej pracy, zostały zaprojektowane w programie OligoAnalyzer oraz zsyntetyzowane w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Instytutu Biochemii i Biofizyki (IBB) PAN. Bazowe roztwory oligonukleotydów przygotowywano w stężeniu 100µM. Z nich przygotowywano robocze rozcieńczenia o stężeniu 2,5µM, które wykorzystywano bezpośrednio w reakcjach PCR.

Tabela 3.1 Startery użyte do reakcji PCR. Kolorami oznaczono następujące fragmenty: dodane nukleotydy- czerwony, kodon start – żółte tło, kodon stop – czerwone tło, sekwencja rozpoznawane przez enzym- niebieskie tło.

Nazwa	Gen/białko	Sekwencja
Startery adaptorowe (Gateway-PCR I)		
SGPf	At4g32160/PXS	5' AAAAAGCAGGCTC ATG ATGCAGAGACGGAG3'

SGCPr (do fuzji na końcu N)	At4g32160/PXS	5'AGAAAGCTGGGTGCTCTTCAATGTTTC3'
CGPf	At3g15920/ PXC	5'AAAAAGCAGGCTTCATGAATCTATACGCGCAC3'
CGCPr (do fuzji na końcu N)	At3g15920/PXC	5'AGAAAGCTGGGTGTTTCTCAAGGATCTT3'
XGPf	At1g15240/PXX	5'AAAAAGCAGGCTTCATGAGCACCCAGAAGCA3'
XGNPr (do fuzji na końcu C)	At1g15240/PXX	5'AGAAAGCTGGGTGTAAAAACAAGAGACATG3'
SlaGPf	At4g02650/SlaA	5'AAAAAGCAGGCTTCATGGGTTCAAGTAAG3
SlaGCPR (do fuzji na końcu N)	At4g02650/SlaA	5'AGAAAGCTGGGTGATAGCGAGGCGTGTA3'
P1GPf	At1g76950/PRAF4	5'AAAAAGCAGGCTTCATGGCAGATCTTGTGACC3'
P1GCPR: (do fuzji na końcu N)	At1g76950/PRAF4	5'AGAAAGCTGGGTGGTGAGGAATGTCTTC3'
P1GNPR: (do fuzji na końcu C)	At1g76950/PRAF4	5'AGAAAGCTGGGTGctagTGAGGAATGTCT3'
Startery Uni (Gateway-PCR II)		
Uni F	Wszystkie analizowane geny	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC3'
Uni R	Wszystkie analizowane geny	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG3'
Startery do sekwencjonowania		
PXSsek1:	At4g32160 /PXS	5'CAAGATGTAGATCAGAATGC3'
PXSsek2:	At4g32160/PXS	5'TGTATCGCTTGGAAGTGGG3'
PXCsek1:	At3g15920/ PXC	5'GTGCTCTCTGGAAGATTGG3'
PXCsek2:	At3g15920/PXC	5'GTATTTAGTCTGAGGAGCG3'
PXCsek3:	At3g15920/PXC	5'TACCGTAACCAGAGGGGGC3'
PXXsek1	At1g15240/PXX	5'TTGGGGAACTTTCACGGCGG3'
PXXsek2	At1g15240/PXX	5'GCAGTTGAAAAATGAACAGC3'
PXXsek3	At1g15240/PXX	5'TAGTCATTCTTATACATCCG3'
SLAsek1	At4g02650/SlaA	5'GTGGTGGTGGTGGTGGCGG3'
SLAsek2	At4g02650/SlaA	5'ATCTGAGGAGGAGGAGAGC3'
PrafSek1	At1g76950/PRAF4	5'AAGAGTGCTGAGCCTGAGG3'
PrafSek2	At1g76950/PRAF4	5'AGTAAGTTGTGGACCCTGGC3'
PrafSek3	At1g76950/PRAF4	5'GGGGTAAAGGAGCCAATGGG3'
PrafSek4	At1g76950/PRAF4	5'ACACTTTTCACTCGGTGCG3'

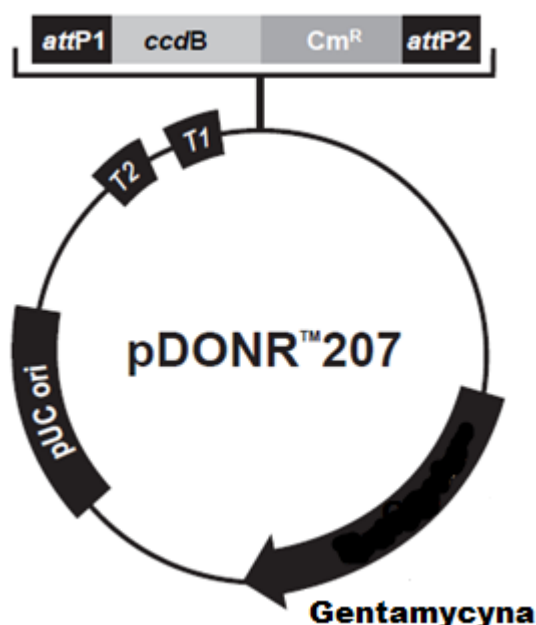
PrafSek5	At1g76950/PRAF4	5'ACGGATTAGACCAGAATGG3'
Startery do sekwencjonowania wektora pENTR		
FGATE	Wszystkie analizowane geny	5'GTAACATCAGAGATTTTGAGACAG3'
RGATE	Wszystkie analizowane geny	5'TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC3'
Startery do amplifikacji GFP		
GFPPF	Wszystkie analizowane geny	5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3'
GFPPR	Wszystkie analizowane geny	5'CTTGACAGCTCGTCCATGCCG3'
Startery do nadekspresji		
SnPXPf1	At4g32160 /PXS Domena PX (+BamHI)	5'GGGGATCCAATGGTAGAGATACTGTTTGG3'
SnPXPR	At4g32160 /PXS Domena PX (+EcoRI)	5'GGGAATTCGCTACTTCTATCATTATTGG3'
CnPXPf1	At3g15920/ PXC Domena PX (+BamHI)	5'GGGGATCCGAAGGAAGGGACACGGTTTGG3'
CnPXPR1	At3g15920/PXC Domena PX (+EcoRI)	5'GGGAATTCGGTGGTAGGTAGAAGTGACGG3'
XnPXPf	At1g15240/PXX Domena PX (+BamHI)	5'GGGGATCCAGTGATGATTCTGAAGATGG3'
XnPXPR	At1g15240/PXX Domena PX (+EcoRI)	5'GGGAATTC TAAAAACAAGAGACATGGC3'
SnENPF1	At4g02650/SlaA Domena ENTH (+BamHI)	5'GGGGATCCTTAACGGAACCTCGAAATAGCTGTCG TGAAAGC3'
SnENPR1	At4g02650/SlaA Domena ENTH(+EcoRI)	5'GGGAATTC TTTCTCTGTTTTCATCTCTGC3'
P1nPHPF	At1g76950/PRAF4 Domena PH (+BamHI)	5'GGGGATCCATGGCAGATCTTGTGACCTA3'
P1nPHPR	At1g76950/PRAF4 Domena PH (+EcoRI)	5'GGGAATTCGCTGGCATCAACTGAAAGG3'
P1nFYPF	At1g76950/PRAF4 Domena FYVE(+BamHI)	5'GGGGATCCAAATACATTGCTTGCGGATCG3'
P1nFYPR	At1g76950/PRAF4 Domena FYVE(+EcoRI)	5'GGGAATTCATTCTCCCCTGAAAGACGAGG3'
P2nFYPF	At1g65920/PRAF1 Domena PH(+BamHI)	5'GGGGATCCAATGGACAACCTGGTTTAGG3'
P2nFYPR	At1g65920/PRAF1 Domena PH(+EcoRI)	5'GGGAATTCATTGTTTTCTGTCAAATCC3'

3.3.3 Wektory

Wszystkie poniżej opisane wektory należą do zasobów Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM.

3.3.3.1 Wektor wejściowy pDONR 207 (Invitrogen)

Jest to wektor „wejściowy” stosowany do wklonowywania insertów za pomocą technologii klonowania typu Gateway. Wektor ten o wielkości 5585nt, zawiera dwa miejsca rekombinacji: attP1 oraz attP2, są one komplementarne do miejsc attB1 i attB2, które flankują insert gotowy do wklonowania. Istotną w budowie wektora jest kaseta ccdB, która zapewnia selekcję pozytywnych klonów. Po reakcji rekombinacji kaseta ta zastępowana jest przez insert, wówczas powstaje klon wejściowy pENTR. W praktyce pENTR jest wykorzystywany jako wektor przejściowy, umożliwiające przeklonowywanie kaset z wklonowanym genem do dalszych wektorów docelowych (rozdział 3.3.3.2). Pusty wektor pDONR 207 namnaża się w szczepie bakteryjnym *E.coli* DB3.1, pełny wektor – pENTR, umożliwia namnażanie plazmidu w szczepie DH5 α . Wektor ten niesie oporność na gentamycynę (w niniejszej pracy korzystano ze stężenia 20 μ g/ml) oraz chloramfenikol (Cm^R).



Ryc.3.1 Budowa wektora pDONR 207. (Źródło:www.invitrogen.com, zmienione).

3.3.3.2 Wektory docelowe pSITE-2NB oraz pSITE-2CA

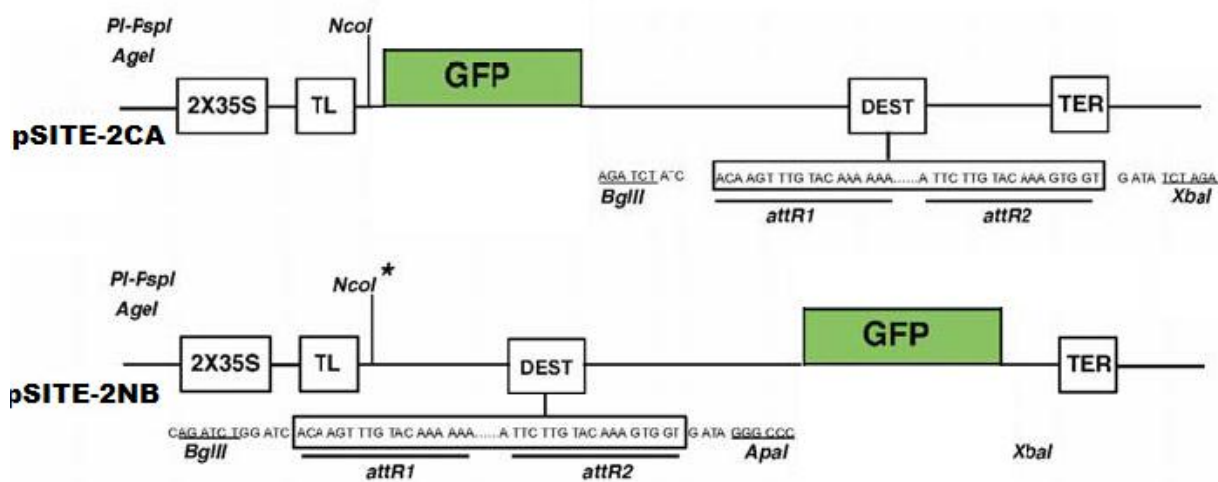
Są to binarne wektory ekspresyjne, należące do wektorów docelowych z rodziny pSITE, stosowanych w technologii klonowania typu Gateway. Wektory te zawierają m.in. w silny, podwójny promotor CaMV35S. Wprowadzenie insertu jest możliwe dzięki sekwencjom attR1

i attR2 flankującym rejon DEST, który podlega wymianie na insert podczas reakcji rekombinacji. Bakterie zawierające wektor docelowy z poprawnie wprowadzonym insertem wykazują oporność na spektynomycynę (50µg/ml) (Chakrabarty i wsp. 2007; Tzfira i wsp. 2005).

Ekspresja tych wektorów umożliwia tworzenie fuzji białka fluorescencyjnego eGFP (eGFP; ang. **enhanced Green Flurescent Protein**) z białkiem badanym w dwóch orientacjach:

Wektor pSITE-2NB – umożliwia fuzję na końcu N białka eGFP: białko badane :: eGFP

Wektor pSITE-2CA – umożliwia fuzję na końcu C białka eGFP: eGFP :: białko badane



Ryc.3.2 Uproszczony schemat wektorów pSITE-2NB, oraz pSITE-2CA, z możliwością wklonowania badanego genu po obu stronach genu białka fluorescencyjnego. (Źródło: Chakrabarty i wsp. 2007, zmienione).

3.3.3.3 35S:p19

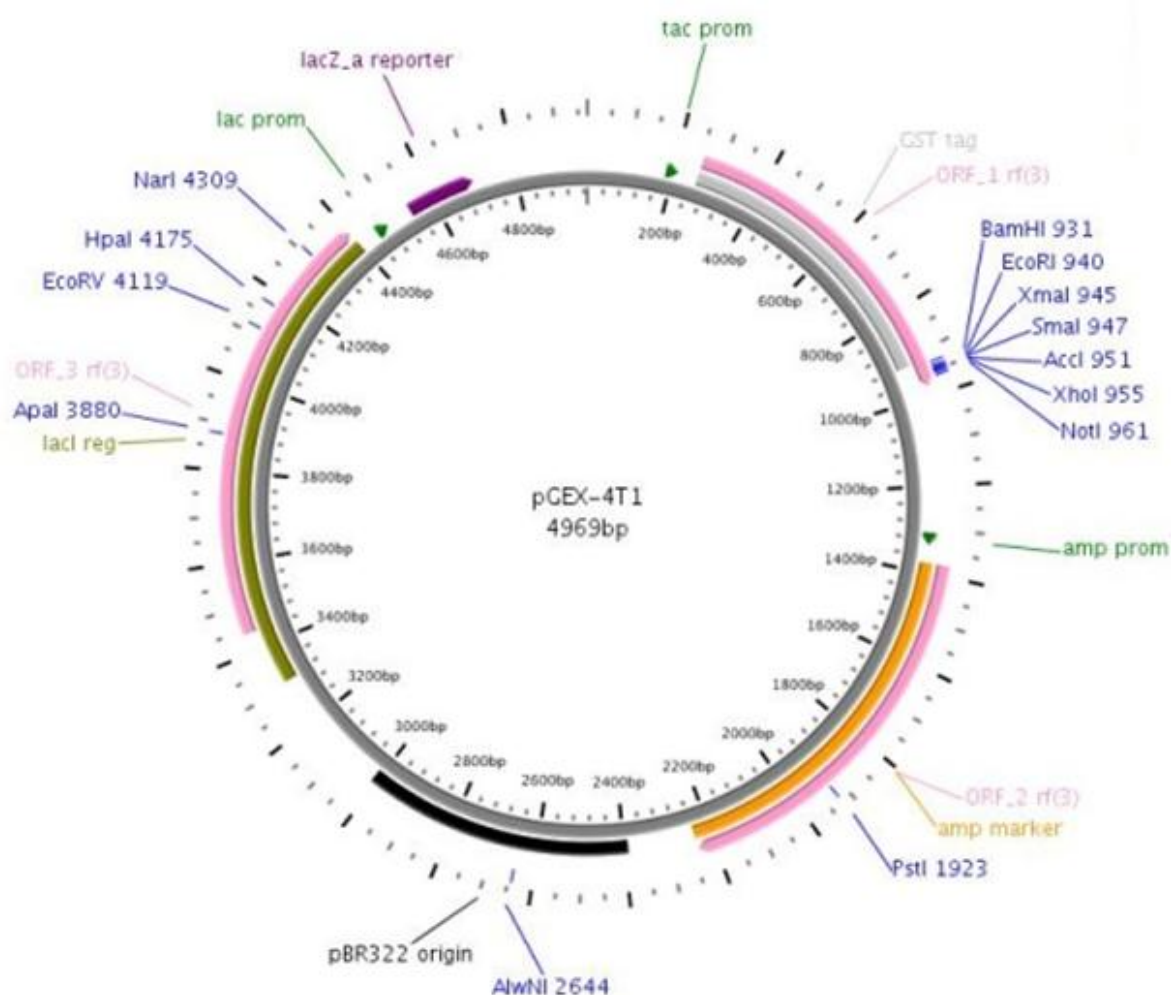
Jest to wektor binarny, który powstał przez wklonowanie zamplifikowanego fragmentu genu białka p19 do wektora pBin61. Funkcję białka p19 określa się mianem supresora potranskrypcyjnego wyciszania genów. Oznacza to, że białko to, pochodzące z wirusa TBSV (ang. **Tomato bushy stunt virus**), znacząco wpływa na efektywność ekspresji białek w roślinach, transformowanych szczepem bakteryjnym *Agrobacterium tumefaciens*. Bakterie zawierające 35S:p19 wykazują oporność na kanamycynę (50 µg/ml) (Voinnet i wsp. 2003).



Ryc.3.3 Schematyczny model wektora 35S:p19. 35S - promotor CaMV, nos - terminator syntazy nopalinowej. (Źródło: Voinnet i wsp. 2003, zmienione).

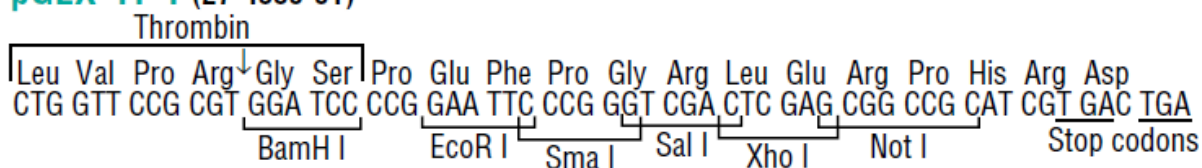
3.3.3.4 pGEX-4T-1

Wektor pGEX-4T-1 należy do grupy wektorów pGEX-4T, które są powszechnie stosowanymi w praktyce laboratoryjnej wektorami do nadekspresji białek. Wektor ten jest wyposażony w gen kodujący S-transferazę glutationu (**GST**; ang. **Glutathione S-Transferase**), dzięki czemu każdy wklonowany insert podlega ekspresji w fuzji z tym białkiem. Pozwala to na łatwe oczyszczenie białek oraz dalsze analizy. W tych wektorach o wielkości ok. 4.9 kbp, ekspresja zachodzi pod kontrolą promotora *tac* indukowanego IPTG. Miejsce MCS (ang. **m**ultiple **c**loning **s**ite) znajduje się tuż za białkiem GST i umożliwia klonowanie ukierunkowane. Istnieją trzy rodzaje wektora pGEX4T: pGEX-4T-1, pGEX-4T-2 i pGEX-4T-3 pozwalające na wstawianie insertów w trzech różnych ramkach odczytu. Do badań w niniejszej pracy wybrano wektor pGEX-4T-1. Wektor ten niesie oporność na ampicylinę, którą w pracy zastąpiono antybiotykiem - karbenicyliną (100µg/ml).



Ryc.3.4 Schemat wektora pGEX-4T-1 (Źródło: <http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/File:PGEX-4T1.jpg>)

pGEX-4T-1 (27-4580-01)



Ryc.3.5 Fragment wektora pGEX -4T-1, ze wskazanymi miejscami restrykcyjnymi. (Źródło: <http://www.synthesisgene.com/vector/pGEX-4T-1.pdf>).

3.4 Odczynniki

3.4.1 Podstawowe odczynniki

	Producenci
ACE	Procter&Gamble
Acetosyringon	Sigma
Agaroza	Sigma
Akrylamid	Sigma
Albumina z surowicy wołowej (BSA)	Sigma-Aldrich
Amistar 250SC	Syngenta
APS	Sigma
Bis-akrylamid	Sigma
Błękit bromofenolowy	Sigma
Bromek etydyny	BioRad
CaCl ₂ x H ₂ O	Sigma
Ca(NO ₃) ₂	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck
dNTP	Allegro
EDTA	POCH Gliwice
Ekstrakt drożdżowy	Lab Empire
Etanol	POCH Gliwice
FM4-64 (SynaptoRedTMC2)	Merck
Glicerol	POCH Gliwice
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare

IPTG (izopropylo-D-tio galaktozyd)	Gibco
Inhibitory proteaz (Protease inhibitor cocktail tablets)	Roche
KCl	Sigma
KH ₂ PO ₄	Sigma
KNO ₃	Sigma
Ksylencjanol	Sigma
Kwas octowy	POCH Gliwice
Lizozym	A&A Biotechnology
Mannitol	Sigma
MES	Sigma MgCl ₂ Sigma
Metanol	POCH Gliwice
Merkaptoetanol	Merck
MgSO ₄	POCH Gliwice
NaCl	POCH Gliwice
PBS	Roche
PEG	Merck
SDS	Sigma
TEMED	Merck
Tween-20	Sigma
Tris	Bioshop
Triton X-100	Lab empire
Mikroelementy (H ₃ BO ₃ , MnCl ₂ , CuSO ₄ , ZnSO ₄ , NaMoO ₄ , CoCl ₂)	POCH Gliwice
Roztwór RIII: FeSO ₄ x 7 H ₂ O, Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	POCH Gliwice

3.4.2 Enzymy

Do izolacji protoplastów

Cellulaza R10	Serva
Macerozyme R10	Serva

Do reakcji PCR

Polimeraza Taq	Allegro
Polimeraza Pfu	Stratagene

Do reakcji rekombinacji Gateway

Klonaza BP	Invitrogen
Klonaza LR	Invitrogen
Proteinaza K	Invitrogen

Enzymy restrykcyjne

Bam H1	Fermentas
EcoR1	Fermentas

Do reakcji ligacji

T4 DNA Ligaza	Fermentas
---------------	-----------

3.4.3 Antybiotyki

Rifampicyna	Bioshop
Gentamycyna	Bioshop
Spektynomycyna	Bioshop
Kanamycyna	Bioshop
Karbenicylina	Bioshop
Chloramfenikol	Bioshop

3.4.4 Markery mas DNA

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 100 bp DNA	Fermentas

3.4.5 Markery białkowe

Precision Plus Protein™ Standards	Bio-Rad
Multicolor High Range Protein Ladder	Fermentas

3.4.5 Odczynniki używane do analizy Fat blot

Albumina z surowicy wołowej bez zawartości kwasów tłuszczowych (free fatty acid BSA)	Sigma-Aldrich
Kwas fosfatydowy (PA)	Avanti

Fosfatydyloinozytyle:

PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,5)P₂,

PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4)P₂

Nitroceluloza Hybond-C Extra – RPN203E

Ponceau S

Przeciwciało anty-GST

Przeciwciało II-rzędowe (anty-mysie)

Tween-20

Avanti

Amersham

Sigma-Aldrich

Santa Cruz Biotechnology

Santa Cruz Biotechnology

Sigma-Aldrich

3.4.6 Gotowe zestawy

Clean-up

Gel Extraction Kit

Plasmid Mini prep Kit

A&A Biotechnology

Qiagen

Qiagen

4. Metody

Czynności opisane w rozdziałach 4.5.3 i 4.5.4 zostały wykonane w Instytucie Swammerdam Institute for Life Sciences (SILS), pod kierunkiem dr Teun Munnik, na Uniwersytecie w Amsterdamie, w trakcie pobytu w ramach stypendium FEBS Summer Fellowship.

Analiza lokalizacji subkomórkowej wybranych białek, została wykonana we współpracy z mgr Maciejem Boruckim, nad którym sprawowałam opiekę w trakcie wykonywania jego pracy magisterskiej. Część prac z zakresu analizy bioinformatycznej została wykonana wspólnie z Damianem Jakowczykiem, nad którym sprawowałam opiekę w trakcie Jego studiów licencjackich.

4.1 Analiza bioinformatyczna

Korzystano z następujących narzędzi bioinformatycznych:

Sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe pobierano z bazy danych GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Oceny obecności domen niesionych przez białka dokonywano z wykorzystaniem narzędzia SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) oraz w celu dokładniejszej oceny umiejscowienia domen z narzędzia InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>).

Przewidywaną masę białek obliczano korzystając z kalkulatora mas: <http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>

Do porównania sekwencji aminokwasowych domen białek w celu sprawdzenia obecności aminokwasów zachowanych wiążących fosfatydyloinozytole zastosowano program ClustalX.

4.2 Praca z materiałem roślinnym

4.2.1 Sterylizacja nasion

Przed wysianiem nasiona przesypywano do probówek typu Eppendorf, dodawano roztworu ACE oraz inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie za pomocą pipety ostrożnie usuwano roztwór. Próby przepłukiwano etanolem, następnie sterylną

wodą. Płukanie powtarzano kilkakrotnie do czasu, gdy woń chloru przestawała być wyczuwalna.

Roztwóry do sterylizacji nasion:

250µl 30% ACE, H₂O

70% etanol, H₂O

4.2.2 Hodowla roślin

W pierwszej kolejności przygotowywano kuwetę z podłożami torfowymi oraz **pożywkę mineralną do hodowli roślin**. Zalane pożywką podłoża torfowe (Jiffy Products International AS), umieszczano na 20 min pod lampą UV w celu sterylizacji. Po tym czasie podłoża były spryskiwane preparatem grzybobójczym **Amistar**. Następnie za pomocą wykałaczek umieszczano na podłożach po 2-3 uprzednio wysterylizowane nasiona. Po wysianiu nasion, kuwety z podłożami owijano folią aluminiową i przenoszono na ok. 48 godzin do lodówki (4°C) w celu jaryzacji. Po tym czasie przenoszono kuwety do fitotronów (Versatile Environmental Test Chamber, typ MLR-350H firmy Sanyo), gdzie kontynuowano hodowlę w warunkach standardowych: fotoperiod 16h światła / 8h ciemności, wilgotność 70%, temperatura 22°C. Po około 6 tygodniach rośliny umieszczano w osłonkach typu Arasystem, w celu uniknięcia przekrzyżowań. Tę samą procedurę stosowano zarówno dla hodowli *Arabidopsis thaliana* jak i *Nicotiana tabacum*.

Pożywka mineralna do hodowli roślin:

5 mM KNO₃; 2,5 mM KH₂PO₄ pH 5,6; 2 mM MgSO₄; 2 mM Ca(NO₃)₂; 3 mM FeEDTA;

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

Amistar 250 S.C (1:200)

4.2.3 Izolacja protoplastów z komórek mezofilu *Arabidopsis thaliana*

Izolację protoplastów prowadzono według protokołu Wu i współpracowników (Wu i wsp. 2009), zmodyfikowanego przez dr K. Leśniewicza i dr M. Smolarkiewicz z Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM.

Przed rozpoczęciem właściwej izolacji przygotowywano roztwór **enzymów trawiących ścianę komórkową** (ok. 20 ml na 1 szalkę Petriego), który ogrzewano przez 10 minut w temperaturze 55°C, po czym schładzano i przefiltrowywano. Do izolacji protoplastów wykorzystywano 3-tygodniowe rośliny *A. thaliana*. Liście pozbawiano epidermy poprzez przyklejenie a następnie oderwanie przyklejonej do epidermy liścia taśmy klejącej. Tak spreparowane liście umieszczano w szlakach Petriego z roztworem enzymów trawiących ścianę komórkową i wytrząsano przy 60 rpm, w 25°C przez 1 godzinę. Następnie usuwano resztki taśmy klejącej, a świeżo uwolnione z liści komórki pozostawiano na kolejne 30 minut z wytrząsaniem w roztworze enzymów. Protoplasty zbierano delikatnie do próbówki typu Falcon o pojemności 50ml i zwirowywano przy 150 g przez 3 minuty (Eppendorf Centrifuge 5804R, rotor wychylny). Supernatant usuwano, a do osadu dodawano 15 ml roztworu **W5** po czym ponownie zwirowywano zawiesinę przy 150 g przez 3 minuty. Czynność tę powtarzano dwukrotnie. Po trzykrotnym wirowaniu protoplasty zawieszano w 1ml roztworu **MMg**. Tak przygotowane protoplasty transformowano następnie przygotowanymi wcześniej plazmidami.

Roztwór enzymów trawiących: 1,2% Celulaza R10; 0,4% Macerozyme R10; 0,4 M mannitol; 20 mM KCl; 20 mM MES pH 5,7

Roztwór W5: 154 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 2 mM MES pH 5,7

Roztwór MMg: 0,4 M mannitol; 15 mM MgCl₂; 4 mM MES pH 5,7

4.2.4 Transformacja protoplastów

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2ml z zaokrąglonym dnem dodawano kolejno: 10µg DNA plazmidowego (wektor), 100µl protoplastów oraz 110µl roztworu **PEG-4000**, po czym mieszaninę delikatnie mieszano. Następnie inkubowano w 25°C przez 30 minut. Dodano 450µl roztworu **W5** i wirowano przy 300 g przez 3 minuty. Supernatant dokładnie usuwano a protoplasty zawieszano w 500µl roztworu **W1**. Prowadzono inkubację przez noc w 25°C. Po 16 godzinach inkubacji zawiesinę wirowano przy 300 g przez 3 minuty, a następnie zawieszano w 200µl W1. Tak przygotowane protoplasty służyły do obserwacji mikroskopowej przy użyciu mikroskopu konfokalnego.

PEG-4000: 40% PEG-4000; 200 mM mannitol; 100 mM CaCl₂

Roztwór W1: 0,5 M mannitol; 20 mM KCl; 4 mM MES pH 5,7

Roztwór W5: 154 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 2 mM MES pH 5,7

4.2.5 Transformacja liści tytoniu *Nicotiana tabacum*

W dzień poprzedzający transformację, 3-tygodniową hodowlę tytoniu, podlewano obficie **pożywką do hodowli roślin**. Zaszczepiano również po 5 ml **pożywki LB** koloniami *A. tumefaciens* zawierającymi wybrane do analizy wektory binarne. Hodowlę bakteryjną prowadzono z antybiotykami (**rifampicyną, gentamycyną oraz spektynomycyną**) i wytrząsano 24 godziny w 28°C (180 rpm). Do osobnej probówki z pożywką LB i antybiotykami (**rifampicyną i kanamycyną**) dodawano plazmidu 35S::p19 i również wytrząsano w takich samych warunkach do dnia następnego. Plazmid 35S::p19 dodaje się w celu zabezpieczenia konstrukcji genetycznych przed wyciszeniem nadekspresji genów badanych białek.

Namnożone w probówkach bakterie zwirowywano w probówkach typu Falcon przez 15 minut w 4°C, przy 4500 rpm. Następnie supernatant usuwano, a otrzymany osad zawieszano w 2ml **buforu do transformacji**. Mierzono OD₆₀₀ poszczególnych prób i przygotowywano odpowiednie rozcieńczenia bakterii, tak by OD₆₀₀ mieszaniny do transformacji nie przekraczało 0,3. Mieszaninę inkubowano około 3 godzin w temperaturze pokojowej, z lekkim wytrząsaniem (70 rpm). Po tym czasie około 1 ml zawiesiny wstrzykiwano przy pomocy małej strzykawki (5 ml) w spodnią stronę liścia. Kuwety z roślinami pozostawiano w warunkach pokojowych. Obserwacje prowadzono po 2 dniach od transformacji.

Pożywka do hodowli roślin- opis w rozdziale 4.2.2

Pożywka LB:

Bacto trypton 1%; Ekstrakt drożdżowy 0,5%; NaCl 1%; pH 7,2.

Antybiotyki:

Rifampicyna (50µg/ml)/DMSO, gentamycyna (20µg/ml)/ H₂O oraz spektynomycyna (50µg/ml)/ H₂O,
Rifampicyna (50µg/ml)/DMSO i kanamycyna (50µg/ml)/ H₂O

Bufor do transformacji: 100 mM MES pH 5,7; 100 mM MgCl₂; 150 µM Acetosyringon; H₂O

4.3. Praca z bakteriami

4.3.1 Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* DH5α

W pracy korzystano z komórek kompetentnych szczepu DH5α, przygotowywanymi w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM.

Probówki z komórkami kompetentnymi (100μl) i z przygotowanymi wcześniej wektorami genetycznymi (plazmidy) umieszczano w lodzie na 15 minut, w celu rozmrożenia. Następnie, do probówek z komórkami kompetentnymi dodawano po ok. 2-20ng DNA plazmidowego. Po 30 minutowej inkubacji w lodzie, przeprowadzano szok cieplny, umieszczając probówki na 1,5 minuty w 42°C. Próby umieszczano z powrotem w lodzie i inkubowano 10 minut. Po tym czasie w celu podhodowania bakterii, dodawano do każdej z probówek po 500 μl **pożywki LB** bez antybiotyku i umieszczano na 40 minut w 37°C, z lekkim wytrząsaniem (120 rpm). Bakteriami zaszczepiano pożywkę stałą z odpowiednim antybiotykiem, który zapewniał selekcję kolonii stransformowanych. Bakterie hodowano przez 16 h w 37 °C.

Pożywka LB - opis w rozdziale 4.2.5

4.3.2 Selekcja stransformowanych kolonii bakteryjnych

Kolonie bakteryjne namnożone na **pożywce stałej**, przepasażowywano na oznaczone fragmenty pożywki na osobnej szalce Petriego w celu wyodrębnienia namnożonych kolonii i umieszczano ponownie w 37°C na 16h. Po tym czasie przeprowadzano selekcję kolonii „pełnych”, czyli wyposażonych w poprawnie skonstruowany wektor. Dokonywano tego „metodą rozbijającą”. Polegała ona na pobraniu wykałaczką próbek bakteryjnych i umieszczaniu ich w probówkach z 10 μl wody sterylnej, które następnie poddawano inkubacji w 95°C przez 3 minuty. Po inkubacji próby były wykorzystywane jako matryce do reakcji PCR weryfikującej obecność genu kodującego GFP lub analizowane białko w wektorze.

Pożywka LB - stała:

Bacto trypton 1%; Ekstrakt drożdżowy 0,5%; NaCl 1%; pH 7,2.

Zestalono 1% agarom

4.3.3 Transformacja bakterii *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Dzień przed transformacją, 25ml **pożywki LB z antybiotykami (gentamycyna, rifampicyna)**, zaszczipiano świeżo wyhodowanymi na pożywce stałej bakteriami *A.tumefaciens*, szczep GV3101. Po całonocnym wytrząsaniu (ok. 180 rpm), hodowle przelewano do probówki typu Falcon 50ml, którą zwirowywano w 4°C przy 4500 rpm przez 15 minut. Supernatant usuwano, a osadzone bakterie zawieszano w **1ml CaCl₂**. Uzyskaną zawiesinę rozpipetowywano po 100µl do osobnych probówek typu Eppendorf 1ml. Do każdej z nich dodawano po 1µg plazmidu. Probówki umieszczano w zbiorniku z ciekłym azotem na ok. 10 sekund, po czym natychmiast umieszczano w cieplarni i inkubowano w 37°C przez 5 minut. Po tym czasie do każdej z probówek dodawano po 900 µl pożywki LB i wytrząsano przy 180 rpm w 28°C przez 3 godziny. Namnożone bakterie zwirowywano przez 5 minut przy 4500 rpm. Supernatanty usuwano, a uzyskane osady bakteryjne zawieszano w 200 µl pożywki LB. Tak przygotowane zawiesiny bakteryjne rozlewano na **pożywki stałe z antybiotykami (gentamycyna, rifampicyna, spectynomycyna)**. Hodowle prowadzono w 28°C przez 3 dni. Po tym czasie namnożone bakterie przepasażowywano na osobną szalkę z pożywką stałą i tymi samymi antybiotykami oraz przeprowadzano selekcję pełnych kolonii (rozdział 4.3.2).

Pożywka LB z antybiotykami (gentamycyna, rifampicyna)

Pożywka LB - opis w rozdziale 4.2.5; Rifampicyna (50µg/ml)/DMSO, gentamycyna (20µg/ml)/ H₂O

Pożywka stała LB z antybiotykami (gentamycyna, rifampicyna, spectynomycyna)

Pożywka LB - stała- opis w rozdziale 4.3.2; Rifampicyna (50µg/ml)/DMSO, gentamycyna (20µg/ml)/ H₂O, spektynomycyna (50µg/ml)/ H₂O

Odczynniki:

1ml CaCl₂ (20 mM)

4.3.4 Izolacja DNA plazmidowego

Wysokiej jakości DNA plazmidowy izolowano z bakterii za pomocą zestawu Mini prep Kit (Qiagen), zgodnie z procedurą producenta. DNA z kolumny eluowano wodą dejonizowaną.

4.3.5 Nadekspresja białek w systemie bakteryjnym z wykorzystaniem szczepu BL21 codon plus

W dzień poprzedzający nadekspresję, komórki kompetentne szczepu BL21 codon plus transformowano przygotowanymi wcześniej wektorami pGEX-4T-1, zgodnie z opisem w rozdziale 4.3.1. W celu selekcji, zawiesinę komórek bakteryjnych wysiewano na **pożywkę stałą z chloramfenikolem** (gen oporności w komórkach bakteryjnych) oraz **karbenicyliną** (gen oporności w wektorze). Hodowlę prowadzono przez 16 h w 37 °C. Na następny dzień kolonie bakteryjne zbierano eż do kolbek z 100 ml pożywki bakteryjnej LB, z tymi samymi antybiotykami. Kolbki umieszczano w temperaturze 37 °C i wytrząsano przy 240 rpm (wytrząsarka IKA RS 10 Control). Po osiągnięciu $OD_{600}=0,6$ (po ok. 1 godziny), do pożywki dodawano induktor nadekspresji **IPTG**. Od tego momentu bakterie wytrząsano jeszcze przez 4 godziny, jednak tym razem w temperaturze 18 °C, przy tej samej prędkości. Zastosowane temperatury były zoptymalizowane na drodze eksperymentalnej, w celu uzyskania najwyższej wydajności reakcji. Po 5 godzinnej hodowli, bakterie zwirowywano w probówkach typu Falcon 50 ml, przy 5000g przez 20 min w 4 °C (wirówka typu Hereus). Po dokładnym usunięciu pożywki, osady zamrażano w ciekłym azocie, a następnie próby umieszczano w -80 °C.

Chcąc zweryfikować powodzenie nadekspresji w trakcie procedury pobierano po 350 µl zawiesiny bakteryjnej:

- 1) tuż przed dodaniem induktora IPTG;
- 2) po 4 godzinnej hodowli od momentu dodania induktora IPTG.

Pobrane próby zwirowywano w celu usunięcia pożywki a następnie do osadów dodawano po 50 µl roztworu **2xSB** i zamrażano w -20 °C. Próby te po zagotowaniu i zwirowaniu rozdzielano na żelu poliakrylamidowym (rozdział 4.5.1).

Pożywka stałą z chloramfenikolem i karbenicyliną

Pożywka LB - stała- opis w rozdziale 4.3.2; Chloramfenikol (34µg/ml)/etanol; karbenicylina (100µg/ml)/ H₂O

Roztwór 2xSB: 60 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % glicerol; 5% β-merkaptioetanol; 0,015 % błękit bromofenolowy

Odczynnik:

1mM IPTG (izopropylo-b-D-tiogalaktozyd)

4.4 Praca z kwasami nukleinowymi

4.4.1 Reakcja PCR

Amplifikację wybranych fragmentów DNA poprzez reakcję PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), przeprowadzano w celu:

- 1) dodania do analizowanych genów sekwencji flankujących przed wklonowaniem do odpowiednich wektorów
- 2) sprawdzenia obecności genu analizowanego lub genu GFP w kolonii bakteryjnej lub bezpośrednio w wektorze.

W celu przeprowadzenia reakcji PCR konieczne było przygotowanie mieszaniny reakcyjnej.

Mieszanina reakcyjna w przeliczeniu na jedną próbę:

Matryca: 2 μ l; **10x Bufor polimerazy Taq:** 2 μ l; **dNTP (10 mM):** 1 μ l; **Starter F (2,5 μ M):** 2 μ l; **Starter R (2,5 μ M):** 2 μ l; **Polimeraza Taq/pfu:** 0,4 μ l; **H₂O:** do 20 μ l

Po przygotowaniu mieszaniny reakcyjnej, próby rozpipetowywano do probówek typu Eppendorf 0,2 ml wraz z matrycą i umieszczano w termocyklerze (Eppendorf). Reakcję PCR przeprowadzano w warunkach opisanych poniżej (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Etapy reakcji PCR

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania [s]	
Denaturacja wstępna	98 – 94	30-300	
Denaturacja	98 – 94	10-30	30 cykli
Hybrydyzacja	45 – 65	30-40	
Elongacja	72	60/ 1000pz	
Terminacja	72	300 (5 min)	

4.4.2 Rozdział produktów PCR na żelu agarozowym

W celu oceny otrzymanych produktów amplifikacji prowadzono rozdział elektroforetyczny w **żelu agarozowym z bromkiem etydyny**. Do prób zawierających DNA dodawano na każde 10 μ l po 2 μ l **buforu obciążającego – 2xHSE**. Rozdział prowadzono przez około pół godziny przy napięciu 4 V/cm w buforze 1x **TAE** i przy natężeniu prądu 40 mA. Jako wzorca używano markera mas GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder oraz GeneRuler™ 100 bp DNA. Żele po rozdziale oglądano w świetle UV (Transluminator T1 firmy Biometra).

Żel agarozowy 1% agaroz/ bufor TAE (50x)

Roztwór bromku etydyny: 50 ng/ml

Bufor TAE 50x: 2 M Tris-HCl (pH 8.0), 1 M kwas octowy, 50 mM EDTA

Bufor obciążający 2xHSE: 4 M mocznik, 50 % sacharoza, 50 mM EDTA, 0.1% błękit bromofenolowy, 0.1 ksylencjanol, H₂O

4.4.3 Oczyszczenie produktów PCR

4.4.3.1 Oczyszczenie produktów PCR za pomocą elucji z żelu

Metodę tą stosowano gdy istotne było odseparowanie DNA o określonej długości, od pozostałości DNA wykorzystanego jako matrycy do reakcji PCR, lub gdy w reakcji PCR powstawały DNA o różnej długości. W tym celu uwidocznione przy pomocy transluminatora DNA prążki na żelu odpowiadające DNA określonej długości, wycinano sterylnym skalpelem (ok 100mg na próbę), a następnie oczyszczano korzystając z gotowego zestawu Gel Extraction Kit, firmy Qiagen.

4.4.3.2 Oczyszczenie produktów PCR za pomocą metody clean-up

W celu oczyszczenia DNA po reakcjach enzymatycznych stosowano gotowy zestaw odczynników Clean-Up, zgodnie z instrukcją producenta.

Stężenie DNA oceniano spektrofotometrycznie (NanoDrop-1000) firmy Thermoscientific.

4.4.4 Sekwencjonowanie DNA

Jeśli było to wskazane, oczyszczone kwasy nukleinowe poddawano sekwencjonowaniu, przekazując przygotowaną próbę wraz z wcześniej zaprojektowanymi starterami do sekwencjonowania (rozdział 3.3.2), do Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii UAM. Wyniki analizowane były w programie Chromas Lite.

4.4.5 Przygotowanie konstrukcji genetycznych w systemie klonowania Gateway

4.4.5.1 Przygotowanie insertów gotowych do wklonowania do wektora wejściowego

Poprzez dwie reakcje PCR, cDNA przeznaczone do wklonowania do wektora, należało wzbogacić o sekwencje flankujące attB1 oraz attB2. W tym celu w I reakcji PCR zastosowano tzw. startery adaptorowe (rozdział 3.3.2), których część jest komplementarna do genu. Po tej reakcji zamplifikowane fragmenty DNA wycinano z żelu (4.4.3.1) oraz poddawano II reakcji PCR ze starterami uniwersalnymi Uni (rozdział 3.3.2). Prowadziło to do uzupełnienia fragmentów flankujących gen (attB1 oraz attB2), które były już gotowe do wklonowania do wektora.

4.4.5.2 Wklonowanie insertu do wektora „wejściowego”- I reakcja rekombinacji typu Gateway- BP

W I reakcji rekombinacji typu Gateway (reakcja BP), dzięki obecności odcinków flankujących cDNA (attB1 oraz attB2), w obecności enzymu klonazy BP, dochodziło do wymiany odcinka znajdującego się w wektorze pDONR, wyznaczonego przez sekwencje attP1 oraz attP2 z dodanym cDNA. W rezultacie powstawał klon wejściowy pENTR, zawierający miejsca rekombinacji attL1 oraz attL2. Reakcję prowadzono przez 16 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, dodawano proteinazę K, w celu inaktywacji enzymu klonazy BP. Mieszaniną transformowano komórki kompetentne DH5α (4.3.1), a następnie przeprowadzano selekcję bakterii z wklonowanym wektorem poprzez hodowle na pożywce

stałej z antybiotykiem. Ponieważ wektor pENTR, niesie oporność na gentamycynę, namnażanie plazmidów przeprowadzono w obecności tego antybiotyku.

Mieszanina reakcyjna reakcji rekombinacji BP (na jedną próbę):

DNA (60 ng/μl)	1μl
Wektor pDONR (75 ng/μl)	1μl
Klonaza BP	1μl
Bufor Klonazy BP	2 μl
Proteinaza K	1 μl

Pożywka LB - stała- opis w rozdziale 4.3.2; Gentamycyna (20 μg/ml)/H₂O

4.4.5.3. Wklonowanie insertu do wektora „docelowego” - II reakcja rekombinacji typu Gateway – LR

W II reakcji rekombinacji typu Gateway (reakcja LR), dzięki obecności odcinków flankujących cDNA (attL1 oraz attL2) w wektorze wejściowym pENTR oraz (attR1 i attR2) w wektorze docelowym pSITE, w obecności enzymu klonazy LR, dochodziło do wymiany fragmentu wektora znajdującego się między wymienionymi odcinkami. W rezultacie powstawał wektor ekspresyjny, zawierającego żądany insert w odpowiedniej ramce odczytu. Reakcję prowadzono przez 16 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, dodawano proteinazę K, w celu inaktywacji klonazy LR. Mieszaniną transformowano komórki kompetentne DH5α (4.3.1), a następnie przeprowadzano selekcję bakterii z wklonowanym wektorem poprzez hodowle na pożywce stałej z antybiotykiem. Ponieważ wektory pSITE, niosą oporność na spektynomycynę, namnażanie plazmidów przeprowadzono w obecności tego antybiotyku.

Mieszanina reakcyjna reakcji rekombinacji LR (na jedną próbę):

pENTR (100 ng/μl)	1μl
pDEST (100 ng/μl)	1μl
Enzym Klonaza LR	1μl
Bufor Klonazy LR	2μl
Proteinaza K	1μl

Pożywka LB - stała- opis w rozdziale 4.3.2; Spektynomycyna (50μg/ml)/ H₂O

4.4.6 Przygotowanie konstrukcji genetycznych do nadekspresji białka z wykorzystaniem wektora pGEX-4T-1

4.4.6.1 Przygotowanie insertów gotowych do wklonowania do wektora pGEX-4T-1

W celu przygotowania insertów gotowych do wklonowania, najpierw dokonano wyboru enzymów restrykcyjnych, które w procesie trawienia rozpoznawały sekwencje restrykcyjne na odcinku MCS wektora. Następnie, do sekwencji DNA przeznaczonych do wklonowania, za pomocą reakcji PCR, dodawano sekwencje flankujące, również rozpoznawane przez wybrane enzymy, tak aby po reakcji trawienia, mogły ulec ligacji z wektorem. Do reakcji PCR (rozdział 4.4.1) korzystano z matrycy w postaci cDNA (rozdział 3.3.1), starterów do nadekspresji (rozdział 3.3.2), oraz polimerazy Pfu. Następnie, zamplifikowane produkty rozdzielano na żelu agarozowym (rozdział 4.4.2), a odpowiednie prążki eluowano z żelu (rozdział 4.4.3.1). Po oczyszczeniu fragmentów DNA z żelu, sprawdzano spektrofotometrycznie stężenie DNA w roztworze. Uzyskane zamplifikowane fragmenty DNA, oflankowane sekwencjami restrykcyjnymi, wraz z wektorem pGEX-4T-1, poddawano następnie trawieniu.

4.4.6.1.1 Reakcja trawienia DNA

Do wszystkich reakcji trawienia w niniejszej pracy używano enzymów BamH1 oraz EcoR1. Standardowo reakcję prowadzono w objętości 20 μ l przy stężeniu DNA 100 ng/ μ l z 6 jednostkami enzymu (U, ang. *Unit*) na 1 μ g DNA. Reakcje prowadzono przez 1,5 h w 37°C.

Mieszanina używana do reakcji trawienia wektora pGEX-4T-1 (na jedną reakcję):

pGEX-4T-1 (100 ng/ μ l)	14 μ l
Enzym BamH1 (8U)	0,8 μ l
Enzym EcoR1 (8U)	0,8 μ l
Bufor 2xTango	4 μ l

Mieszanina używana do reakcji trawienia produktów PCR (na jedną reakcję):

Produkt PCR (100 ng/ μ l)	14 μ l
Enzym BamH1 (8U)	0,8 μ l
Enzym EcoR1 (8U)	0,8 μ l
Bufor 2xTango	4 μ l

Po reakcji trawienia, roztwory rozdzielano na żelu agarozowym (rozdział 4.4.2), prążki ze strawionym DNA oczyszczano metodą gel-out (rozdział 4.4.3.1), oraz sprawdzano stężenie DNA po elucji. Gotowe inserty mogły być następnie wprowadzane do wektora.

4.4.6.2 Wprowadzenie insertu do wektora pGEX-4T-1

Po procesie trawienia dysponowano insertami w postaci fragmentów DNA wraz z lepкими końcami po obu stronach oraz „otwartym” wektorem, który po trawieniu zawierał te same lepкие końce. Do wprowadzenia insertu w miejsce, gdzie wektor został potrawiony, dochodzi na drodze reakcji ligacji.

4.4.6.2.1 Reakcja ligacji

Reakcję ligacji prowadzono w objętości 10 μ l przez 16 h w 4°C. Reakcję nastawiano zachowując proporcje minimum 3:1 liczby cząsteczek insertu do liczby cząsteczek wektora, w obecności 6U T4 ligazy DNA.

Mieszanina używana do reakcji ligacji (na jedną reakcję):

Wektor pGEX-4T-1 (30 ng/ μ l)	1 μ l
Produkt reakcji PCR (60-100 ng/ μ l)	1 μ l
T4 DNA Ligaza (8U)	0,8 μ l
Bufor T4 DNA Ligazy	1 μ l
H ₂ O	do 10 μ l

Następnie mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentnych DH5 α (rozdział 4.3.1). Komórki bakteryjne poddawano selekcji wysiewając je na pożywkę stałą z antybiotykiem **karbenicyliną** (gen oporności obecny w wektorze pGEX-4T-1). Wyrosłe kolonie poddawano dodatkowej selekcji na obecność insertu, poprzez reakcję PCR, korzystając ze starterów do nadekspresji (rozdział 4.4.1, 3.3.2). W celu sprawdzenia poprawności wklonowania insertu do wektora, po namnożeniu wybranych kolonii bakteryjnych i izolacji ich plazmidów (rozdział 4.3.4), poddawano je sekwencjonowaniu (rozdział 4.4.4).

Pożywka LB - stała- opis w rozdziale 4.3.2; Karbenicylina (100 μ g/ml)/etanol

4.5 Praca z białkami

4.5.1 Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących

Jednokierunkową elektroforezę białek prowadzono w **żelu poliakryloamidowym** z SDS (SDS-PAGE). W części rozdzielającej żelu użyto 12 lub 18% (w/v) akryloamidu, natomiast w części zagęszczającej 5% (w/v). Grubość żelu wynosiła 1 mm, a długość żelu rozdzielającego około 7-18 cm. Preparaty białkowe po dodaniu roztworu **2xSB** denaturowano 5 min. w temp. 95°C, a następnie wirowano przy 4500 rpm przez 5 min. Na żel nakładano 10-20 µl preparatu. Elektroforezę prowadzono przy natężeniu 20 mA w temp. pokojowej w **buforze elektrodowym** aż do momentu, kiedy błękit bromofenolowy nie zaczął wypływać z żelu (Laemmli 1970).

Roztwór 2xSB: 60 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % glicerol; 5% β-merkaptotanol; 0,015 % błękit bromofenolowy

Bufor elektrodowy: 25 mM Tris-HCl; 192 mM glicyna; 0,1% SDS

Tabela.3.3 Skład żelu poliakrylamidowego

Żel rozdzielający (12%/18%)		12%	18%
	woda	5ml	2ml
	1,5M Tris-HCL pH 8,7	3,75ml	3,75ml
	30% akrylamid/bis-akrylamid (1%)	6ml	9ml
	10% SDS	130 µl	130 µl
	10% APS	60 µl	60 µl
	TEMED	20 µl	20 µl
Żel zagęszczający (5%)	Woda	3,3ml	
	1M Tris-HCL pH 6,8	0,65ml	
	30% akrylamid (29%)/bis-akrylamid (1%)	1ml	
	10% SDS	50 µl	
	10% APS	30 µl	
	TEMED	10 µl	

4.5.2 Wizualizacja białek po elektroforezie

Po elektroforezie, żel zdejmowano z płyt szklanych, umieszczając w naczyniu z **roztworem utrwalającym** i płukano przez godzinę. Następnie żel umieszczano na całą noc w **roztworze barwiącym**, z delikatnym kołysaniem (40 rpm). Żel odbarwiano poprzez umieszczenie go na 20 min w wodzie, po upływie tego czasu zmieniano wodę i pozostawiano na kolejne 20 min. Czynność powtarzano aż do odbarwienia żelu.

Roztwór utrwalający: 10% kwas octowy; 50% etanol

Roztwór barwiący żel: 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250; 45% metanol

4.5.3 Izolacja i oczyszczanie białek rekombinowanych

4.5.3.1 Izolacja białek

W pierwszym etapie izolacji białek z osadów bakteryjnych, należało uwolnić je do roztworu. Proces ten wykonywano z dużą ostrożnością m.in. utrzymując roztwory w niskiej temperaturze (na lodzie), aby nie doprowadzić do degradacji białek. Po rozmrożeniu osadów bakteryjnych zawieszano je w zbuforowanym roztworze soli o pH 6,9 (**PBS**, ang. **Phosphate buffered saline**) wraz z **inhibitorem proteaz** (Complete protease inhibitor cocktail), poprzez worteksowanie. W następnej kolejności dodawano **lizozymu** i inkubowano przez 30-50 min w lodzie. Po tym etapie przeprowadzano sonikację, czyli metodę polegającą na fragmentacji m.in DNA komórki za pomocą ultradźwięków oraz uwolnieniu jej zawartości do roztworu. Sonikację przeprowadzano trzy razy po 1 minucie, z przerwami po 30 sekund, chroniąc próby przed zbytnim ich podgrzaniem. Następnie dodawano **Tritonu**, próby mieszano oraz zwirowywano przy 4500 rpm przez 30 min w 4°C. Delikatnie zbierano supernatant, w którym obecne były białka w formie rozpuszczalnej.

Odczynniki (na jedną próbę):

4ml PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄ x 12H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2

Inhibitor proteaz: 1tabletk Complete protease inhibitor cocktail/10prób

100 µl Lizozym (50mg/ml)

250 µl Triton 10%

4.5.3.2 Oczyszczanie białek

Ponieważ nadeksprymowane białka znajdowały się w fuzji z S-transferazą glutationu (GST), oczyszczenie ich polegało na użyciu złoża z immobilizowanym glutationem (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare). Oczyszczanie przeprowadzano wg wskazówek producenta.

4.5.4 Analiza Fat blot

Przeprowadzona w pracy analiza Fat blot (Dowler i wsp. 2002), została zmodyfikowana przez dr Teuna Munnika z Instytutu SILS w Amsterdamie oraz Magdalenę Wierchowicką. Metoda ta pozwala na zweryfikowanie właściwości wiązania określonych fosfatydyloinozytoli przez analizowane białka. Polega na unieruchomieniu wybranych lipidów na podłożu nitrocelulozowym, a następnie przyłączeniu do nich białek podczas inkubacji. Ponieważ analizowane białka znajdują się w fuzji z GST, ich obecność na podłożu wizualizuje się na drodze immunodetekcji za pomocą reakcji chemiluminescencji ECL (ECL; ang. *enhanced chemiluminescence*).

4.5.4.1 Przygotowanie podłoża do analizy

Liofilizowane fosfatydyloinozytyle: PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,5)P₂ oraz, w celach kontrolnych, kwas fosfatydowy (**PA**; ang. *Phosphatic acid*) zawieszano w buforze **Resuspension buffer**, uzyskując roztwory wyjściowe o stężeniu 1mM. Następnie wykonywano serię rozcieńczeń, korzystając z buforu **Spotting Buffer**, w celu uzyskania malejących stężeń lipidów: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 pmol/μl.

Przygotowywano fragmenty nitrocelulozy o wielkości ~3.70 x 2.75 cm do ~5.30 x 2.75 cm. Serię roztworów o malejących stężeniach lipidów nakraplano w ilości 1 μl na każdy zaznaczony ołówkiem punkt na kawałkach nitrocelulozy. Punkty znajdowały się w odległości 0,4 cm od siebie. Do analiz zastosowano dwa typy podłoży (Ryc.4.1).

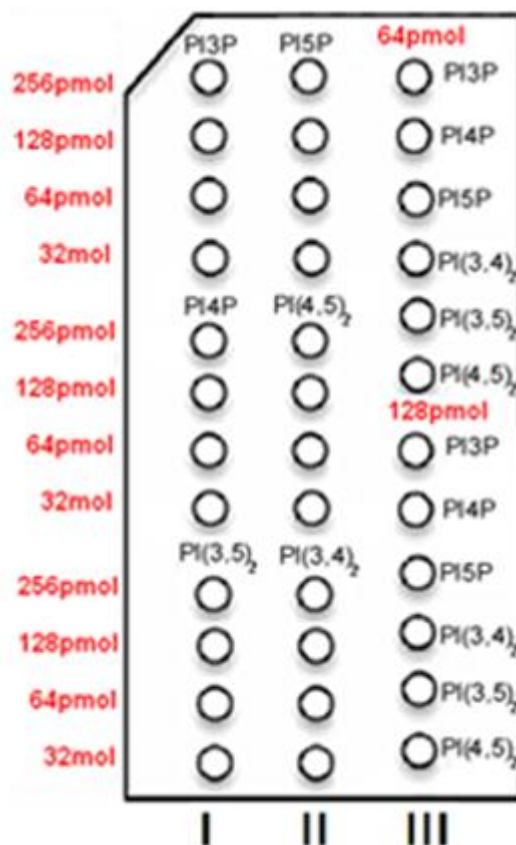
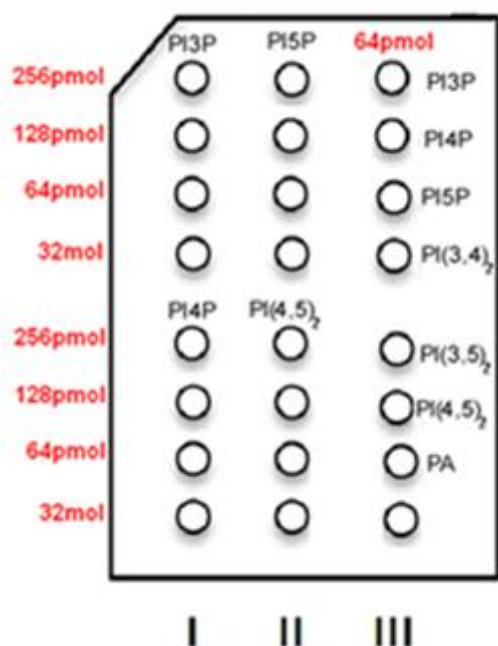
Typ I W rzędzie I, od góry nakraplano fosfatydyloinozytol PtdIns(3)P, a następnie PtdIns(4)P, oba po kolei w malejących stężeniach 256-32 pmol/μl. W rzędzie II w ten sam sposób co w rzędzie I nakraplano fosfatydyloinozytyle: PtdIns(5)P, a następnie PtdIns(4,5)P₂. W rzędzie III nakraplano po kolei wszystkie analizowane lipidy o tym samym stężeniu 64 pmol/μl.

Typ II W rzędzie I, od góry nakraplano po kolei fosfatydyloinozytyle: PtdIns(3)P, PtdIns(4)P oraz PtdIns(3,5)P₂, wszystkie trzy po kolei w malejących stężeniach 256-32 pmol/μl. W rzędzie II w ten sam sposób co w rzędzie I nakraplano fosfatydyloinozytyle: PtdIns(5)P, a następnie PtdIns(4,5)P₂ oraz PtdIns(3,4)P₂. W rzędzie III nakraplano po kolei wszystkie analizowane lipidy o tym samym stężeniu 64 pmol/μl, a następnie 128 pmol/μl.

Tak przygotowane podłoża suszono w ciemności przez 1 godzinę, a następnie przechowywano zawinięte w foli aluminiowej w 4°C.

Typ I

Typ II



Ryc. 4.1 Dwa rodzaje podłoży wykorzystywanych do analizy Fat blot.

Resuspension Buffer : dla fosfatydyloinozytoli: CHCl₃/MeOH/H₂O = 20:9:1

dla kwasu fosfatydowego: CHCl₃

Spotting Buffer: CHCl₃/MeOH/50 mM HCl/Ponceau S = 250:500:200:2

Roztwór czerwieni Ponceau S: 0,1% Ponceau S; 5% kwas octowy

4.5.4.2 Analiza Fat blot

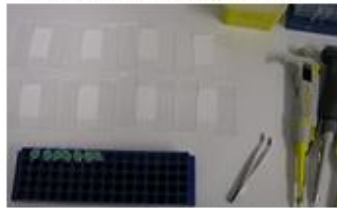
Przygotowane wcześniej podłoża z fosfatydyloinozytolami, umieszczano w prostokątnych kuwetkach o wielkości 28x67mm (4 well Rectangular, Nalge Nunc International) (Ryc.4.2).

Przed rozpoczęciem inkubacji z białkami, niespecyficzne miejsca wiązania na podłożach (blotach), blokowano 5 ml buforu **BB1**, powoli wytrząsając przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie zlewano bufor i zastępowano go 2 ml roztworu z analizowanym białkiem w fuzji z GST w ilości 0.5 µg/ml w buforze **BB3**. Wytrząsano delikatnie przez noc w 4°C, w tym czasie białka specyficznie wiązały lipidy unieruchomione na blotach (Ryc.4.2). Roztwór zlewano i rozpoczynano przemywanie blotów poprzez 3-krotną wymianę buforu płuczącego **FB3** w ilości 5 ml, za każdym razem na 5 minut z delikatnym wytrząsaniem. Po dokładnym przemyciu podłoży i usunięciu białek, które nie związały się z żadnym lipidem dodawano 2.5 µl **przeciwciał anty-GST** w 5ml buforu **BB2** i wytrząsano delikatnie w temperaturze pokojowej przez 1-2 godzin. Roztwór zlewano i rozpoczynano ponowne przemywanie blotów, poprzez 3-krotną wymianę buforu płuczącego **FB3** w ilości 5 ml, za każdym razem na 5 minut z delikatnym wytrząsaniem. Następnie dodawano roztwór przeciwciał II-rzędowych (przeciwciała anty-mysie, związane z peroksydazą chrzanową), w ilości 1.5-2 µl w 5 ml **BB2** i wytrząsano delikatnie w temperaturze pokojowej przez 1-1,5 godzin. Roztwór zlewano i rozpoczynano ponowne przemywanie blotów, poprzez tym razem 4-krotną wymianę buforu płuczącego **FB3** w ilości 8 ml, za każdym razem na 5 minut z delikatnym wytrząsaniem.

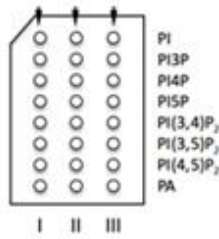
Białka rozpoznane przez przeciwciała wizualizowano z użyciem systemu chemiluminescencji ECL Plus1 (Amersham) na kliszy rentgenowskiej (Kodak, X-Omat S), w czasie ekspozycji 30-50 min.

Powinowactwo białek do określonych fosfatydyloinozytoli, określano na podstawie obecności oraz siły sygnału w postaci ciemnych prążków na kliszach – w miejscach gdzie nakraplano określone lipidy. Klisze następnie skanowano a uzyskane obrazy przygotowano do pracy w programie Adobe Photoshop (Adobe Systems).

**Nakraplanie fosfoinozytoli
na błoty nitrocelulozowe**

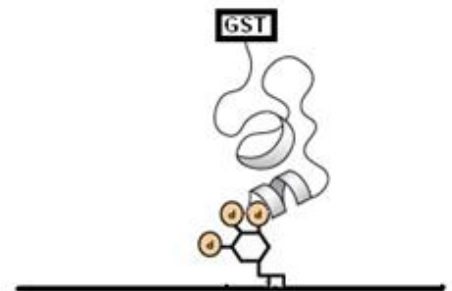
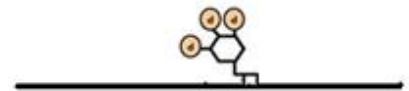
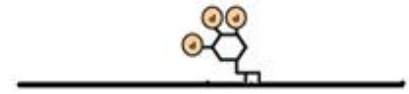


Suszenie 21°C 1h

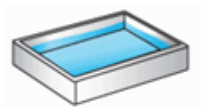


Blokowanie
1h 21°C

Inkubacja z
białkiem
16h 4°C



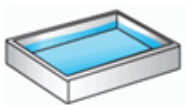
Przemycie x 3



Przeciwciało
anty-GST



Przemycie x 3



Przeciwciało
II-rzędowe



Przemycie x 4

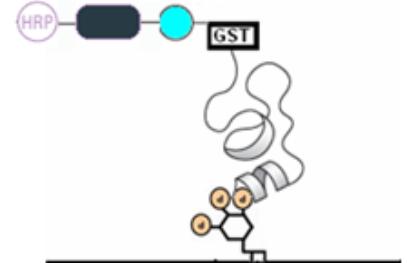


ECL

Czas ekspozycji: 50 min



HRP-przeciwciało
II-rzędowe



Ryc.4.2 Analiza Fat blot

Skład buforów i roztworów:

1. Fat Blot buffer-1(**FB1**): 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl.
2. Fat Blot buffer-2(**FB2**): 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.06 % Tween-20.
3. Fat Blot buffer-3(**FB3**): 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20.
4. Blocking buffer-1(**BB1**): 3% albumina bydlęca, bez zawartości kwasów tłuszczowych, zawieszona w buforze Fat Blot buffer-1.
5. Blocking buffer-2(**BB2**): 3% BSA (bez kwasów tłuszczowych) w buforze Fat Blot buffer-2.
6. Blocking buffer-3(**BB3**): 3% BSA (bez kwasów tłuszczowych) w buforze Fat Blot buffer-3.
7. Roztwór białek z GST: 0.5 µg/ml w buforze FB3
8. Roztwór przeciwciał anti-GST (1:2000) 2.5 µl/ 5 ml BB2
9. Roztwór przeciwciał II-rzędowych: przeciwciało anti-mysie, z peroksydazą chrzanową (1:3300) 1.5-2 µl/5 ml BB2

4.6 Metody mikroskopowe

4.6.1 Obserwacje mikroskopowe

Prace mikroskopowe, wykonywane były w Pracowni Mikroskopowej Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM. Obserwacje prowadzono korzystając z mikroskopu konfokalnego A1R-SI firmy Nikon.

Stosowano następujące ustawienia:

- 1) białko eGFP - wzbudzenie: laser 488 nm (Argon), lustro dichroiczne 405/488 nm, filtr dla emisji: 500-550 nm
- 2) barwnik FM4-64 - wzbudzenie: laser 488 nm (Argon), lustro dichroiczne 405/488/561 nm, filtr dla emisji: 570-620 nm

Do obserwacji protoplastów *Arabidopsis thaliana* stosowano obiektyw o powiększeniu 100x z imersją olejową (Plan Apo VC 100x Oil DIC N2), natomiast do obserwacji komórek epidermy *Nicotiana tabacum* stosowano wstępnie obiektyw o powiększeniu 20x (Plan Apo VC 20x DIC N2), a docelowo, wykorzystywano obiektyw o powiększeniu 40x z imersją wodną (Apo 40x WI S DIC N2).

W każdym z eksperymentów obserwowano ponad 100 transformowanych protoplastów *A. thaliana* oraz co najmniej 3 fragmenty transformowanych liści *N. tabacum*.

Wstępną analizę uzyskanych obrazów przeprowadzano w programie NIS Elements Viewer (Nikon Image Software), natomiast docelowo korzystano z programu ImageJ lub NIS Elements AR (Nikon Image Software). Ostatecznie obrazy zostały przygotowane w programie Adobe Photoshop (Adobe Systems).

Sekwencje czasowe zostały zapisane w formie pliku avi., za pomocą programu NIS Elements AR (Nikon Image Software). Pliki video zostały zapisane na płycie DVD i dołączone do niniejszej pracy.

4.6.2 Barwienie liści *Nicotiana tabacum* barwnikiem FM4-64

FM4-64 to związek który barwi błonę komórkową, a następnie, wraz z upływem czasu, kolejne przedziały błonowe (Bolte i wsp. 2004).

W celu jego zastosowania przygotowano 200 µl roztworu 150 µM FM4-64. Roztwór barwnika podawano na spodnią stronę liścia. Inkubowano przez 30 minut na lodzie, tak aby zahamować proces endocytozy. Następnie barwnik odmywano sterylną wodą. Tak przygotowane liście obserwowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego w odstępach czasowych co 15 minut.

5 Wyniki

5.1 Analiza bioinformatyczna

Pierwszą część analizy bioinformatycznej przeprowadzono w celu wyboru białek do badań oraz oceny domen jakie one niosą. Ponieważ wybrane białka potencjalnie wiążą błony w komórce, w drugiej części analizy skupiono się na oddziaływaniach tych białek z fosfatydyloinozytolami. Chcąc ocenić ich potencjalną zdolność do wiązania tych lipidów, sprawdzono, czy zawierając one aminokwasy odpowiedzialne za takie interakcje.

5.1.1 Wytypowanie białek do badań

Powstała w ostatnich latach idea istnienia w komórce roślinnej funkcjonalnego i strukturalnego kontinuum WMC, sugeruje, że komunikacja między elementami systemu błon wewnętrznych, jest w dużej mierze zależna od białek pełniących funkcję łącznikową, zdolnych do wiązania lipidów błonowych czy cytoszkieletu. W celu zidentyfikowania nowych, dotąd nie charakteryzowanych białek roślinnych, potencjalnie pełniących wspomnianą funkcję łącznikową, dokonano przeglądu protein kodowanych przez genom *Arabidopsis thaliana*. Wybór tej rośliny do badań był poparty faktem, że należy ona do organizmów modelowych, co więcej była do tej pory szeroko analizowana w Zakładzie w którym wykonywano prace.

Do analizy wykorzystano narzędzie SMART, umożliwiające przewidywanie obecności domen funkcjonalnych w białkach. Podczas przeglądu protein *Arabidopsis thaliana* zwrócono uwagę na te niosące domeny takie jak: PX, ENTH, PH oraz FYVE, znane z ich oddziaływań z fosfatydyloinozytolami (rozdział 1.3.1). Dodatkowym argumentem przy wyborze białek, była obecność w ich strukturze innych konserwatywnych motywów strukturalnych n.p. odpowiedzialnych za oddziaływanie z cytoszkieletem lub innymi białkami.

5.1.1.1 Wybór białek niosących domenę PX

Jedną z dotąd najlepiej poznanych domen oddziałujących fosfatydyloinozytolami jest domena PX (rozdział 1.3.1.3). Narzędzie SMART ujawniło, że genom *Arabidopsis* koduje 11

białek wyposażonych w tę domenę. Do dalszych analiz, wybrano trzy białka, dotąd nie charakteryzowane, niosące poza domeną PX, dodatkowo takie konserwatywne motywy strukturalne, jak: domenę SPEC (**SPEC.** ang. **Spectrin-like repeat**), motyw superhelisy (ang. coiled-coil) (opis funkcjonalny motywów w rozdziałach 5.1.1.1.1 oraz 5.1.1.1.2) oraz helisę transbłonową. Obecność takich elementów w wybranych białkach sugerowała udział tych protein w procesach przepływu błon w komórce. Białka te na potrzeby niniejszej pracy określono skrótami: PXS (At4g32160), PXC (At3g15920), PXX (At1g15240). Brak do tej pory jakichkolwiek danych literaturowych na ich temat. Poniżej dokonano opisu wybranych białek na podstawie dokonanej analizy bioinformatycznej oraz wysunięto hipotezę funkcji jaką mogą one pełnić w komórce.

5.1.1.1.1 Białko PXS (At4g32160)

Sekwencja genu białka PXS, oznaczona w bazie Gene Bank numerem GI:42567324, składa się z 2169 nukleotydów i koduje białko o długości 723 aminokwasów i przewidywanej masie 81,82 kDa. Sekwencja aminokwasowa białka PXS zawiera dwa konserwatywne motywy strukturalne takie jak domena PX oraz SPEC (Ryc.5.1).



(Ryc.5.1) Schematyczna budowa białka PXS (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

Domena PX: występuje między 50 - 161 aminokwasem białka PXS. Opis funkcjonalny domeny jest zawarty w rozdziale 1.3.1.3. (Sekwencja nukleotydowa została dołączona w postaci załącznika nr 1).

Domena SPEC: występuje między 462 - 589 aminokwasem białka PXS. Do tej pory wielokrotnie odnotowano udział tej domeny w oddziaływaniach z cytoszkieletem, np. w przypadku spektryny, alfa-aktyniny lub dystrofin (Djinović-Carugo i wsp. 1999; Park i wsp. 2003; Kusunoki i wsp. 2004). Domena ta składa się z 3 helis, druga z nich jest przerwana prolina. W sekwencji helis występują charakterystyczne powtórzenia kodujące: tryptofan na pozycji 17 aminokwasu w helisie A oraz leucynę na pozycji 2 aminokwasu od końca karboksylowego helisy C.

Hipoteza funkcji:

Obecność domeny PX wskazuje na możliwość interakcji białka PXS z fosfatydyloinozitolami błon. Dotychczas większość odnotowanych przypadków wiązania tych lipidów przez domenę PX dotyczyła fosfatydyloinozitolu PtdIns(3)P, obecnego w błonie endosomów (Ellson i wsp. 2002). Dodatkowo domena SPEC dysponuje potencjalną możliwością do oddziaływań z cytoszkieletem, który pełni w komórce ważną rolę w procesach transportowych. Taka struktura białka sugeruje możliwość jego udziału w procesach przepływu błon np. transportu pęcherzykowego.

5.1.1.1.2 Białko PXC (At3g15920)

Sekwencja genu białka PXC, została oznaczona w bazie Gene Bank pod numerem GI:186510127. Gen ten składa się z 2265 nukleotydów i koduje białko o długości 755 aminokwasów i przewidywanej masie 85,64kDa. Sekwencja aminokwasowa białka PXC zawiera dwa konserwatywne motywy strukturalne: domenę PX oraz motyw superhelisy (Ryc.5.2).



(Ryc.5.2) Schematyczna budowa białka PXC (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

Domena PX: występuje między 115 - 220 aminokwasem białka PXC. (Sekwencja nukleotydowa została dołączona w postaci załącznika nr 1).

Motyw superhelisy (ang. coiled-coil): występuje między 413-474 oraz 497-630 aminokwasem białka PXC. Biologiczne znaczenie tej domeny jest słabo poznane. Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że białka wyposażone w ten motyw mogą brać udział m.in. w regulacji ekspresji genów (czynniki transkrypcyjne). Motyw ten niosą jednak także białka należące do kompleksu SNARE, tropomiozyny i filamenty pośrednie (Mason i Arndt 2004). Domena ta składa się z 2-7 helis alfa, zwiniętych wokół siebie w strukturze przypominającej sznur (Liu i wsp. 2006).

Hipoteza funkcji:

Obecność domeny PX, podobnie jak w białku PXS wskazuje na możliwość interakcji z fosfatydyloinozitolami błon, w szczególności endosomów. Brak jasnych przesłanek co do udziału motywu superhelisy w szlakach transportowych w komórce, co więcej funkcja tego motywu u roślin jest ciągle niejasna. Jednakże hipotetycznie założono możliwość udziału białka PXC w procesie przepływu błon, podobnie jak w przypadku białka PXS.

5.1.1.1.3 Białko PXX (At1g15240)

Sekwencja genu białka PXX, występuje w bazie Gene Bank pod numerem GI:30684253 oraz składa się z 2118 nukleotydów. Gen ten koduje białko o długości 706 aminokwasów i przewidywanej masie 80,08kDa. W strukturze białka występują trzy konserwatywne motywy strukturalne: helisa transbłonową oraz domeny PXA i PX (Ryc.5.3).



(Ryc.5.3) Schematyczna budowa białka PXX (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

Helisa transbłonowa: występuje między 21-43 aminokwasem białka PXX.

Domena PXA (PXA, ang. *Phox-associated domain*): występuje między 106-290 aminokwasem białka PXX. Jest to domena występująca często w sąsiedztwie domeny PX, natomiast jej funkcja jest do tej pory niejasna.

Domena PX: występuje między 608-705 aminokwasem białka PXX. (Sekwencja nukleotydowa została dołączona w postaci załącznika nr 1).

Hipoteza funkcji:

Obecność domeny PX wskazuje podobnie jak w przypadku białka PXS oraz PXC, możliwe oddziaływanie białka PXX z organellami obłonionymi takimi jak endosomy. Dodatkowo obecność helisy transbłonowej sugeruje, że białko to może mieć potencjalną zdolność do uczestniczenia w procesach przepływu błon w komórce.

5.1.1.2 Wybór białka niosącego domenę ENTH

Ze względu na obecność ściany komórkowej sugeruje się duży stopień homologii procesu endocytozy zachodzącego w komórkach roślinnych i drożdżowych (Aghamohammadzadeh i Ayscough 2009). Jednym z organizatorów procesu endocytozy u drożdży jest białko Sla2 (Robertson i wsp. 2009). Białko to niesie domenę ENTH oraz odpowiada za zakotwiczenie kompleksu białkowego w błonie podczas wpuklania pęcherzyka endocytotycznego. Dodatkowo pełni ważną funkcję w procesie wiązania klatryny oraz podczas polimeryzacji filamentów aktynowych, co wspomaga proces formowania pęcherzyka. Funkcję wiązania błon jak i klatryny, przypisuje się domenie ENTH, która wykazuje powinowactwo do fosfatydyloinozytolu $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Ford i wsp. 2002). Uważa się ponadto, że helisa na końcu N domeny ENTH „wnikając” pomiędzy dwie warstwy błony komórkowej, inicjuje jej „wygięcie” do światła komórki, tym samym obniżając koszt energetyczny potrzebny do powstania pęcherzyka endocytotycznego (Itoh i De Camilli 2006).

Narzędzie SMART ujawniło, że genom *Arabidopsis thaliana* koduje 13 białek niosących domenę ENTH. Spośród nich, dwa białka poza domenę ENTH niosą dodatkowy element funkcjonalny: białko At2g25430 – domenę ANTH, natomiast białko At4g02650 – motyw superhelisy. Obydwa białka nie były dotąd charakteryzowane. Do dalszych analiz, wybrano białko At4g02650, które skrótowo na potrzeby pracy nazwano SlaA.

5.1.1.2.1 Białko SlaA (At4g02650)

Sekwencja genu białka SlaA, jest oznaczony w bazie Gene Bank pod numerem GI:30679231, składa się z 1833 nukleotydów i koduje białko o długości 611 aminokwasów i przewidywanej masie 68,25 kDa. Schematyczna budowa białka wraz z domenami przedstawiona poniżej (Ryc.5.4).



(Ryc.5.4) Schematyczna budowa białka SlaA(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

Domena ENTH: występuje między 32-162 aminokwasem białka SlaA. Opis funkcjonalny domeny zawarty w rozdziale 1.3.1.4. (Sekwencja nukleotydowa została dołączona w postaci załącznika nr 1).

Motyw superhelisy: występuje między 375-402 aminokwasem białka SlaA. Opis motywu zawarty przy opisie białka PXC.

Hipoteza funkcji:

Przewidywania co do funkcji pełnionej przez białko SlaA oparto m.in. na znanej funkcji jego drożdżowego odpowiednika - białka Sla2. Na podstawie obecności domeny ENTH niesionej przez białko SlaA, założono, że podobnie jak w przypadku drożdżowego białka Sla2, białko to będzie zdolne za jej pośrednictwem do interakcji z fosfatydyloinozytolem błony komórkowej - PtdIns(4,5)P₂. Założono możliwość uczestniczenia tego białka w procesie formowania pęcherzyka endocytotycznego, przy błonie komórkowej.

5.1.1.3 Wybór białka niosącego domeny PH, FYVE

Zarówno domena PH oraz FYVE, są znanymi, do tej pory wielokrotnie opisywanymi domenami oddziałującymi z fosfatydyloinozytolami (rozdziały 1.3.1.1 oraz 1.3.1.2).

Narzędzie SMART ujawniło, że genom *Arabidopsis thaliana* koduje ok. 50 białek niosących domenę PH oraz 16 białek niosących domenę FYVE. Spośród nich można wyróżnić grupę 9 białek należących do rodziny PRAF. Jako jedyne, białka należące do tej rodziny, są wyposażone równocześnie w domenę PH oraz FYVE. Dodatkowo niosą one region RCC1, motyw superhelisy oraz domenę BRX. Poza białkiem PRAF1 (At1g65920) białka te nie były do tej pory jeszcze w ogóle badane (Jensen i wsp. 2001). Spośród 9 białek PRAF, do analiz wytypowano białko PRAF4 (At1g76950).

5.1.1.3.1 Białko PRAF4 (At1g76950)

Sekwencja genu białka PRAF4, jest oznaczona w bazie Gene Bank numerem GI:30699216 oraz składa się z 3309 nukleotydów. Gen ten koduje białko o długości 1103 aminokwasów. Przewidywana masa tego białka to 120,41 kDa. Jego schematyczna budowa wraz z domenami została przedstawiona poniżej (Ryc.5.5).



(Ryc.5.5) Schematyczna budowa białka PRAF4 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

Domena PH: występuje między 14-128 aminokwasem białka PRAF4. Opis funkcjonalny domeny zawarty w rozdziale 1.3.1.2. (Sekwencja nukleotydowa została dołączona w postaci załącznika nr 1).

Region RCC1: występuje między 238-299 aminokwasem białka PRAF4. Nazwa regionu pochodzi od jego funkcji w regulacji kondensacji chromatyny. Do tej pory opisywany był zwykle jako czynnik wymiany nukleotydu GDP na GTP na małych GTPazach Ran w jądrze komórkowym (Dasso 1993; Hao i Macara 2008). Stosunkowo niedawno udowodniono jednak także oddziaływanie regionu RCC1 z innymi GTPazami, w tym z rodziny Rab, obecnymi na endosomach (Jensen i wsp. 2001).

Domena FYVE: występuje w zakresie między 628-694 aminokwasem białka PRAF4. Opis funkcjonalny domeny zawarty w rozdziale 1.3.1.1. (Sekwencja nukleotydowa została dołączona w postaci załącznika nr 1).

Motyw superhelisy: występuje między 826-905 aminokwasem białka PRAF4. Opis funkcjonalny motywu zawarty przy opisie białka PXC.

Domena BRX: występuje między 1020-1078 aminokwasem białka PRAF4. Jest to krótka domena składająca się zwykle z ok. 35 aminokwasów, znajdująca się na końcu C białka. Do tej pory funkcję białek niosących tą domenę wiązano z procesami wzrostu komórek, lub regulacją kondensacji chromatyny (Briggs i wsp. 2006).

Hipoteza funkcji:

Białko PRAF4 jest wyposażone w dwie domeny potencjalnie zdolne do wiązania fosfatydyloinozytoli: PH i FYVE. Dotychczasowe badania wskazują, że domena PH ma zdolność wiązania m.in. $\text{PtdIns}(4,5)_2$ w błonie komórkowej, lub $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ również w błonie komórkowej lub w strukturach aparatu Golgiego. Domena FYVE z kolei znana jest z oddziaływań z fosfatydyloinozytolem $\text{PtdIns}(3)\text{P}$, obecnym na endosomach (rozdział 1.3.1). Specyficzność wiązania fosfatydyloinozytoli przez domeny białka PRAF4 nie jest znana. Można jednak przypuszczać, że obność dwóch istotnych domen, o do tej pory szeroko udokumentowanych oddziaływaniach z fosfatydyloinozytolami, świadczy o możliwym zaangażowaniu tego białka w procesach przepływu błon w komórce. Poza domeną FYVE, innym potencjalnym łącznikiem białka PRAF4 z endosomami jest region RCC1, znany z wiązania GTPaz, również należących do rodziny Rab (Jensen i wsp. 2001). Część białek Rab występuje na endosomach (rozdział 1.2.1.2). Założono więc, że istnieje prawdopodobieństwo oddziaływania białka PRAF4 z endosomami oraz uczestniczenia w ich transporcie.

Ostatecznie więc wyselekcjonowano do badań pięć dotąd nie badanych białek *Arabidopsis thaliana*: PXS (At4g32160), PXC (At3g15920), PXX (At1g15240), SlaA (At4g02650), PRAF4 (At1g76950).

5.1.2 Ocena obecności aminokwasów konserwatywnych w domenach PX, ENTH, PH, FYVE, odpowiedzialnych za wiązanie fosfatydyloinozytoli

Chcąc ocenić potencjalną zdolność domen wytypowanych białek do wiązania fosfatydyloinozytoli, dokonano wnikliwej analizy ich sekwencji aminokwasowych. Na podstawie dostępnych danych literaturowych określono aminokwasy konserwatywne w białkach wcześniej zbadanych, odpowiedzialne za wiązanie fosfatydyloinozytoli. Następnie, w celu zweryfikowania obecności tych elementów w analizowanych domenach dokonano przyrównania ich sekwencji, korzystając z programu ClustalX.

5.1.2.1 Ocena obecności aminokwasów konserwatywnych w domenach PX

Do tej pory domena PX została skrzystalizowana m.in. w przypadku takich białek jak: podjednostki oksydazy NADPH - p40^{phox} oraz p47^{phox}, kinazy-3-fosfatydyloinozytoli klasy II, niektórych neksyn sortujących, czy wybranych białek kompleksu SNARE np. białka Vam7. We wszystkich wymienionych białkach, rozpoznano sekwencje konserwatywne odpowiedzialne za wiązanie fosfatydyloinozytoli (Bravo i wsp. 2001; Karathanassis i wsp. 2002; Xing i wsp. 2004; Honbou i wsp. 2007; Ryc. 5.6, A):

Motyw RRY lub RRF: Najistotniejszy w motywie jest aminokwas środkowy – arginina (R), który jest odpowiedzialny za wiązanie 3-fosforanu. Eksperymenty wykazały że jego brak uniemożliwia związanie PtdIns(3)P (Bravo i wsp. 2001). Równie konserwatywna jest pierwsza arginina. Pomimo braku bezpośrednich interakcji z 3-fosforanem, odpowiada za tworzenie wiązań wodorowych utrzymujących zwartą strukturę kieszeni wiążącej fosfatydyloinozytol. Główną funkcją ostatniego aminokwasu - tyrozyny (Y) lub fenyloalaniny (F), jest stabilizacja oddziaływań argininy z 3-fosforanem. Motyw ten nie występuje w domenach PX wiążących PtdIns(4,5)P₂ (Bravo i wsp. 2001).

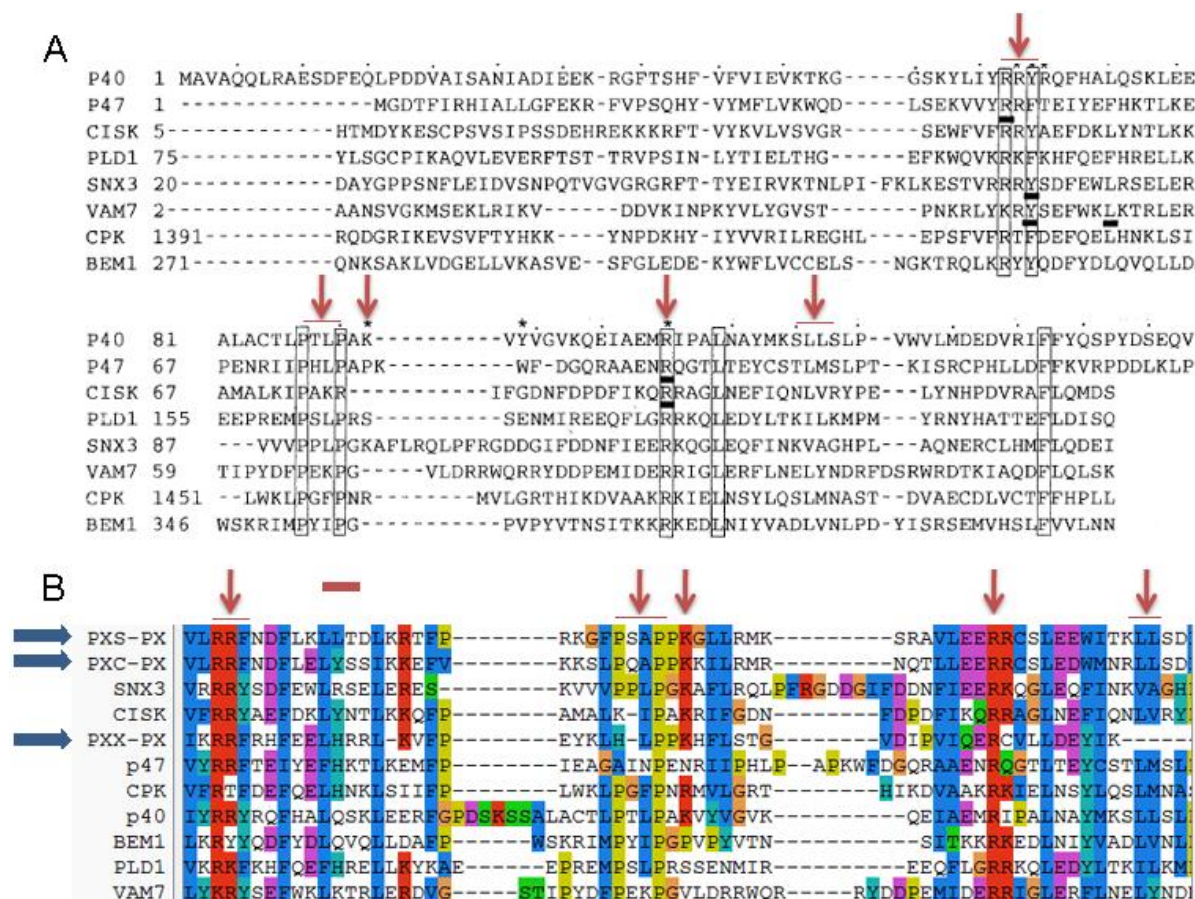
Motyw bogaty w prolinę PXXP: odpowiedzialny za tworzenie pętli, współtworzącej kieszeń wiążącą fosfatydyloinozytol.

Aminokwas K (lizyna): aminokwas odpowiedzialny za wiązanie 1-fosforanu

Aminokwas R (arginina): aminokwas wiążący grupy hydroksylowe fosfatydylinozytoli

Kotwica hydrofobowa: składa się z dwóch aminokwasów hydrofobowych, najczęściej z dwóch leucyn (LL), na odcinku bogatym w prolinę. Obecność dwóch aminokwasów hydrofobowych w bezpośrednim sąsiedztwie wzmacnia wiązanie błon, co ułatwia ich penetrację.

Oceniono obecność elementów wiążących fosfatydylinozytol w domenach PX analizowanych białek (Ryc.5.6, B):



Ryc.5.6. A. Porównanie sekwencji domen PX białek skryalizowanych: p40^{phox} (*Homo Sapiens*), p47^{phox} (*Homo Sapiens*), CISK (*Cytokine - independent survival kinase*) (*Mus musculus*), PLD1 (*Phospholipase D 1*) (*Homo sapiens*), SNX3 (*Sorting nexin 3*) (*Homo Sapiens*), VAM7 (*Vacuolar morphogenesis protein 7*) (*Saccharomyces cerevisiae*), CPK-C2alpha (*Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing*) (*Homo Sapiens*), BEM1 (*Bud emergence protein 1*) (*Saccharomyces cerevisiae*). Strzałką zaznaczono aminokwasy konserwatywne odpowiedzialne za wiązanie fosfatydylinozytoli. (Źródło: Bravo i wsp. 2001, zmienione). B. Porównanie sekwencji domen PX białek p40^{phox}, p47^{phox}, CISK, PLD1, SNX3, VAM7, CPK-C2alpha, BEM1, wraz z domenami PXS-PX, PXC-PX i PXX-PX (niebieska strzałka). Czerwoną strzałką zaznaczono aminokwasy konserwatywne odpowiedzialne za wiązanie fosfatydylinozytoli.

Analiza ClustalX wykazała, że zarówno w przypadku domeny PX białka PXS jak i PXC, obecne są wszystkie ważne elementy konserwatywne (RRF, PXXP, K, R, LL)

odpowiedzialne za oddziaływania z fosfatydyloinozylami (Ryc.5.6, B). Jedynie w przypadku domeny PX białka PXX nie zidentyfikowano: motywu PXXP oraz kotwicy hydrofobowej (LL) (Ryc.5.6, B). Wyniki te wskazują na potencjalne oddziaływania domen PX białek PXS oraz PXC z fosfatydyloinozylami, prawdopodobnie z PtdIns(3)P, ze względu na obecność motywu RRF. W przypadku domeny PX białka PXX, brak wskazania dla oddziaływań z wybranym fosfatydyloinozytalem.

5.1.2.2 Ocena obecności elementów konserwatywnych w domenie ENTH

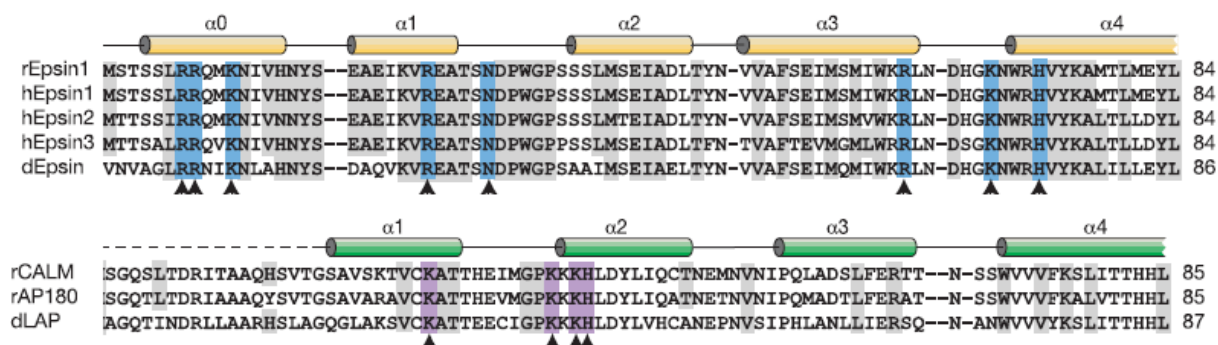
Zarówno białka z rodziny epsyn jak i białka adaptorowe AP180 (*Adaptor protein 180*), należą do dobrze poznanych organizatorów procesu endocytozy zależnej od klatryny (Ford i wsp 2001; Ford i wsp. 2002). Białka te pełnią kluczową rolę w procesie formowania pęcherzyka endocytotycznego „wnikając” domeną znajdującą się na końcu N białka pomiędzy dwie warstwy błony komórkowej, inicjując jej „wygięcie” do światła komórki (Itoh i De Camilli 2006). W przypadku białek AP180 jest to domena ANTH, która jest homologiczna do domeny ENTH, występującej u epsyn. Obie domeny mają zdolność do wiązania fosfatydyloinozytalu PtdIns(4,5)P₂, oraz klatryny.

Poznana struktura przestrzenna niektórych z białek AP180 oraz epsyn pozwoliła zidentyfikować aminokwasy odpowiedzialne za wiązanie PtdIns(4,5)P₂. W przypadku skrzystalizowanej epsyny-1, kluczową rolę w wiązaniu fosfatydyloinozytalu pełnią trzy aminokwasy hydrofobowe (L6, M10, I13), które wnika pomiędzy dwie warstwy błony komórkowej. Takie same aminokwasy zidentyfikowano w innych białkach z rodziny epsyn (Ford i wsp. 2002). Poza tym określono następujące aminokwasy odpowiedzialne za wiązanie fosfatydyloinozytoli (Ryc.5.7):

Aminokwasy: argininy (R7, R8), histydyna (H73), asparagina (N30), decydują o wiązaniu 4-fosforanu fosfatydyloinozytalu.

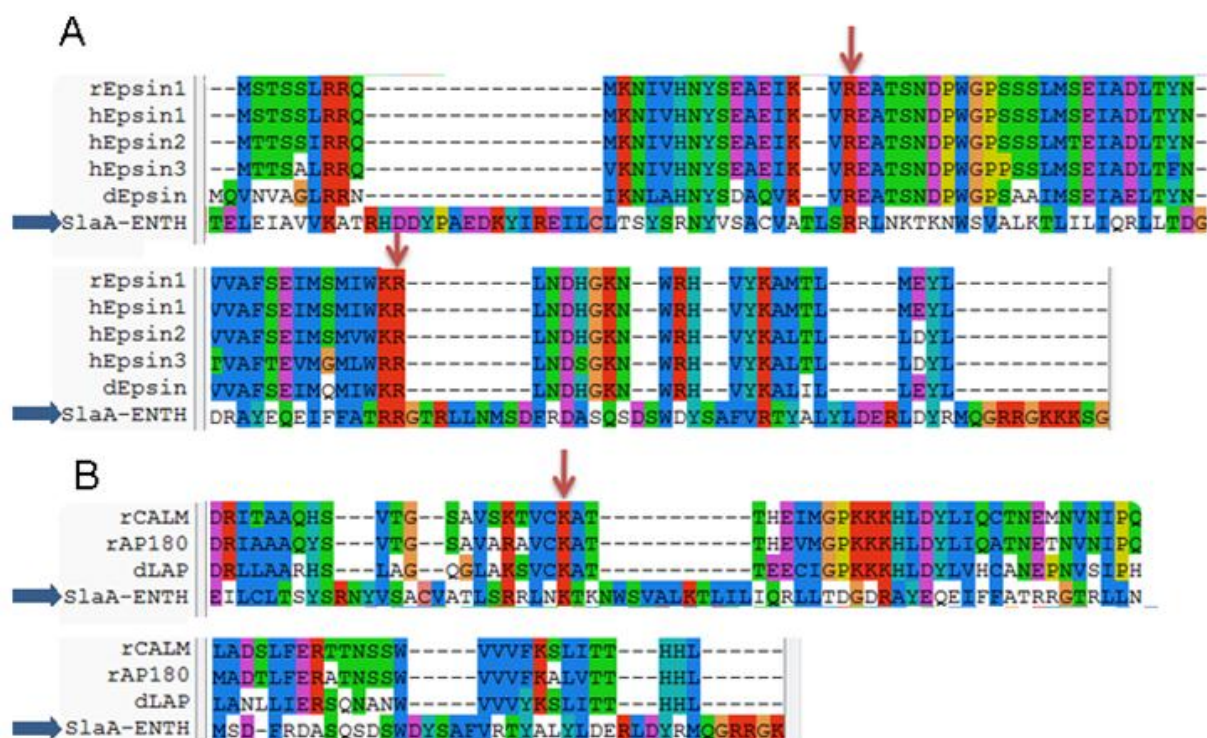
Aminokwasy: lizyna (K11), arginina (R25), arginina (R63), decydują o wiązaniu 5-fosforanu fosfatydyloinozytalu.

Te występujące w przypadku białek z rodziny epsyn aminokwasy nie są jednak zachowane w białkach z rodziny AP180, gdzie domena ANTH zawiera inne elementy konserwatywne wiążące PtdIns(4,5)P₂ (Ryc.5.7).



Ryc.5.7 Porównanie sekwencji domen ENTH białek: Epsyna-1 (*Rattus norvegicus*), Epsyna-1 (*Homo Sapiens*), Epsyna-2 (*Homo Sapiens*), Epsyna-3 (*Homo Sapiens*), Epsyna (*Drosophila melanogaster*) (aminokwasy konserwatywne zaznaczono na niebiesko) oraz sekwencji domen ANTH białek: CALM (*Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia*) (*Rattus norvegicus*), AP180 (*Rattus norvegicus*), LAP (*Leukemia associated protein*) (*Drosophila melanogaster*) (aminokwasy konserwatywne zaznaczono na fioletowo). (Źródło: Ford i wsp. 2002, zmienione).

Oceniono obecność elementów wiążących fosfatydyloinozytol w domenie ENTH białka SlaA:



Ryc.5.8 A. Porównanie sekwencji domeny ENTH białka SlaA (niebieska strzałka) z domenami ENTH białek: Epsyna-1 (*Rattus norvegicus*), Epsyna-1 (*Homo Sapiens*), Epsyna-2 (*Homo Sapiens*), Epsyna-3 (*Homo Sapiens*), Epsyna (*Drosophila melanogaster*) B. Porównanie sekwencji domeny ENTH białka SlaA (niebieska strzałka) z domenami ANTH białek: CALM (*Rattus norvegicus*), AP180 (*Rattus norvegicus*), LAP (*Drosophila melanogaster*). Czerwoną strzałką zaznaczono aminokwasy konserwatywne odpowiedzialne za wiązanie fosfatydyloinozytoli.

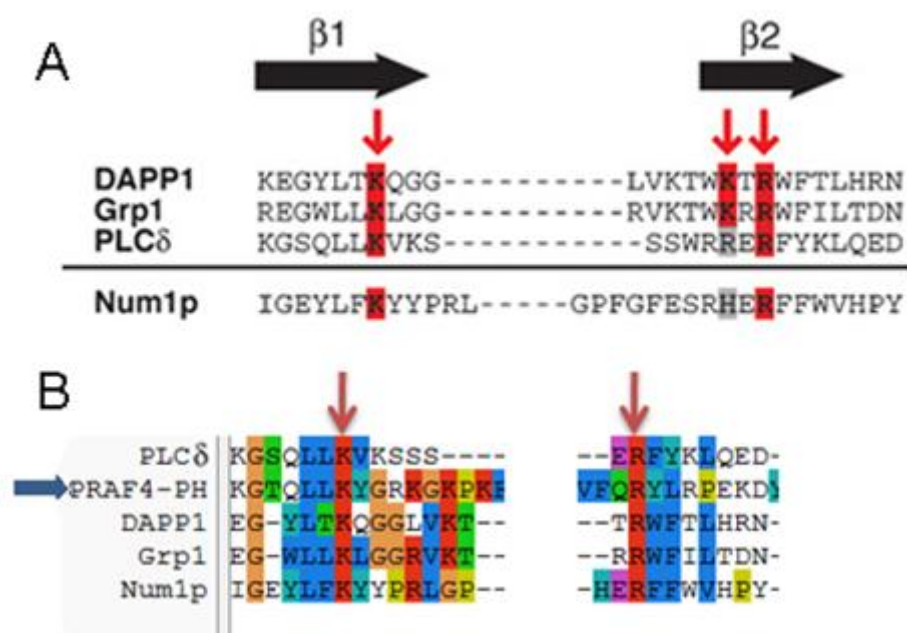
Podczas analizy porównawczej sekwencji domeny ENTH białka SlaA z sekwencjami domen ENTH wybranych białek, zidentyfikowano jedynie dwa zachowane aminokwasy - argininy (Ryc. 5.8, A, czerwona strzałka). Nie udało się zidentyfikować pozostałych elementów odpowiedzialnych za wiązanie fosfatydyloinozytoli. Dokonano więc porównania sekwencji analizowanej domeny z sekwencjami domen ANTH wybranych białek (Ryc. 5.8, B). Poza obecnością konserwatywnej lizyny (Ryc.5.8, B, czerwona strzałka) nie odnotowano innych elementów typowych dla domeny ANTH, odpowiedzialnych za wiązanie PtdIns(4,5)P₂.

5.1.2.3 Ocena obecności elementów konserwatywnych w domenie PH

Znanych jest ponad 100 białek zawierających domenę PH (rozdział 1.3.1.2), z czego wiele zostało skrzystalizowanych m.in. niektóre białka należące do fosfolipaz C (PLC, ang. **Phospholipase C**), wakuolarnych białek sortujących (VPSs, ang. **vacuolar protein sortings**), białek o alternatywnej ramce odczytu-ARFs (ARFs, ang. **alternative reading frame proteins**) i innych. Domena PH wykazuje największe powinowactwo do fosfatydyloinozytoli PtdIns(4,5)P₂ (Dowler i wsp. 2000). Jednakże z innych badań wynika, że domena PH obecna w różnych białkach, może wykazywać odmienną swoistość wiązania fosfatydyloinozytoli. Co więcej, niekiedy domeny PH nie wiążą żadnych fosfatydyloinozytoli. Na przykład z 33 białek drożdżowych zawierających domenę PH, tylko jedno białko - Num1p (**Nuclear migration protein**), wiąże fosfatydyloinozytol - PtdIns(4,5)P₂ (Ferguson i wsp. 1995).

Stwierdzono, że w białkach niosących domenę PH, które wiążą fosfatydyloinozytyle PtdIns(3,4,5)P₃ lub PtdIns(4,5)P₂, domena ta zawiera 3 zachowane aminokwasy odpowiedzialne za wiązanie tych lipidów. W przypadku białka Grp1 (**Gla-rich protein**) należą do nich: lizyny (K273), (K282) oraz arginina (R284) (Lemmon 2004). Te same aminokwasy zidentyfikowano również w innych domenach oddziałujących z fosfatydyloinozytolami (Ryc.5.9, A). Co prawda w przypadku drożdżowego białka Num1p, zamiast lizyny w β2 obecny jest inny aminokwas hydrofilowy - histydyna (H). Nie zakłóca to jednak wiązania PtdIns(4,5)P₂. Podobnie w przypadku fosfolipazy C, lizyna jest zastąpiona arginina (R) (Lemmon 2004, Ryc.5.9, A).

Oceniono obecność elementów wiążących fosfatydyloinozytol w domenie PH białka PRAF4:



Ryc.5.9 A. Porównanie sekwencji domen PH białek: DAPP1 (**D**ual **a**dapter for **p**hosphotyrosine and 3-**p**hosphotyrosine and 3-phosphoinositide) (*Homo sapiens*), Grp1 (*Mus musculus*), PLCδ (*Rattus norvegicus*), Num1p (*Saccharomyces cerevisiae*). Strzałką zaznaczono aminokwasy konserwatywne odpowiedzialne za wiązanie fosfotydyloinozytoli. (Źródło: Lemmon 2004, zmienione). B. Porównanie sekwencji domen PH białek: DAPP1 (*Homo sapiens*), Grp1 (*Mus musculus*), PLCδ (*Rattus norvegicus*), Num1p (*Saccharomyces cerevisiae*), wraz z domeną PH białka PRA4 (*Arabidopsis thaliana*) (strzałka niebieska). Czerwoną strzałką zaznaczono aminokwasy konserwatywne odpowiedzialne za wiązanie fosfotydyloinozytoli.

Analiza ClustalX wykazała, że w sekwencji domeny PH białka PRA4 obecne są dwa aminokwasy zachowane: lizyna (K, β1), arginina (R, β2), odpowiedzialne za wiązanie fosfotydyloinozytoli (Ryc.5.9, B). Trudno określić wpływ braku aminokwasu lizyny (K, β2), na interakcje z fosfotydyloinozylami, który jest zastąpiony aminokwasem hydrofobowym - fenyloalaniną (F) (Ryc.5.9, B).

5.1.2.4 Ocena obecności elementów konserwatywnych w domenie FYVE

W odróżnieniu od innych domen wiążących fosfotydyloinozyle, FYVE wykazuje duży stopień swoistości w wiązaniu jednego z nich: PtdIns(3)P. Przyjęto, że domena FYVE o „typowej” strukturze zawiera następujące aminokwasy zachowane, odpowiedzialnych za wiązanie fosfotydyloinozytoli PtdIns(3)P (Begona i Dróbak 2002; Ryc.5.10, A):

Aminokwasy RK lub RR – odpowiedzialne za wiązane 1-fosforanu

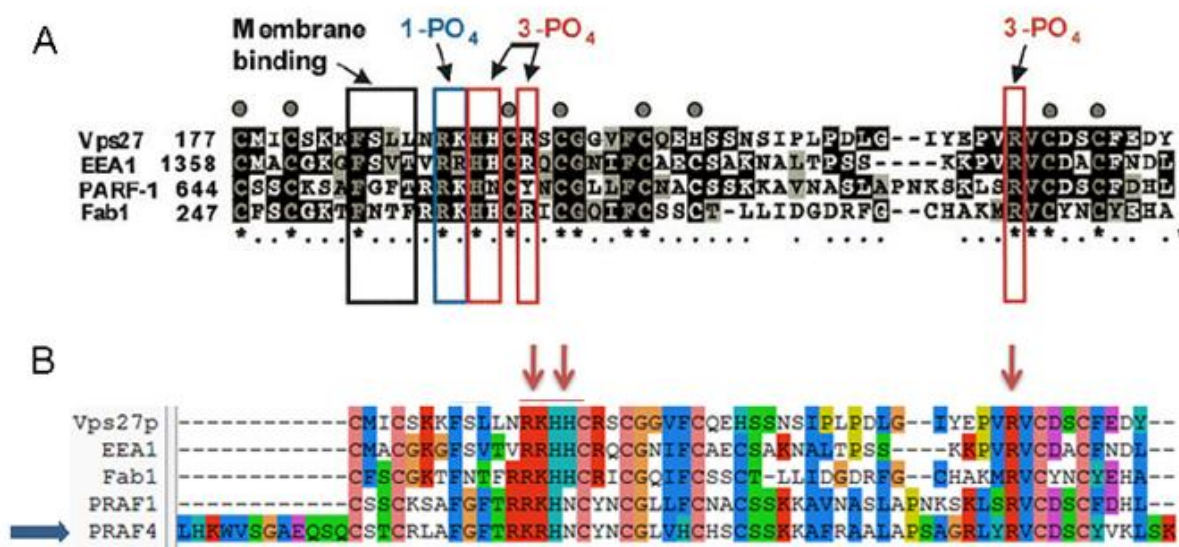
Aminokwasy HH-R- odpowiedzialne za wiązanie 3-fosforanu

Aminokwasy RVC – gdzie aminokwas arginina (R) odpowiada za wiązanie 3-fosforanu

Obecność takich aminokwasów konserwatywnych dostrzegalna jest m.in. w białkach takich jak Vps27 (**V**acuolar **p**rotein **s**orting-associated protein 27), EEA1 (**E**arly **e**ndosome **a**ntigen 1), czy Fab1 (**1**-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase) (Ryc.5.10, A).

Na Ryc.5.10 widać, że sekwencja domeny FYVE białka PARF-1 (obecna nazwa PRAF1), odbiega od typowego układu aminokwasów. Różnica dotyczy motywu HH-R, gdzie zamiast drugiej histydyny (H) występuje asparagina (N), a zamiast argininy (R) tyrozyna (Y). Ponieważ jest to sekwencja kluczowa do wiązania PtdIns(3)P (Begona i Dróbak 2002), uważa się, że białko PRAF-1 niesie domenę FYVE o „nie-typowej” strukturze, przez co nazywamy ją „wariantem” domeny FYVE. Można się również spodziewać, że domena FYVE zawierająca inny zestaw aminokwasów od tych wymienionych powyżej, będzie wiązała inny fosfatydyloinozytol niż PtdIns(3)P.

Oceniono obecność elementów wiążących fosfatydyloinozytol w tej domenie białka PRAF4:



Ryc.5.10 A. Porównanie sekwencji domen FYVE białek: Vps27p (*Saccharomyces cerevisiae*), EEA1 (*Homo Sapiens*), Fab1 (*Saccharomyces cerevisiae*), PARF-1 (*Arabidopsis thaliana*). Czerwonymi ramkami zaznaczono aminokwasy konserwatywne wiążące PtdIns(3)P. (Źródło: Begona i Dróbak 2002, zmienione). B. Porównanie sekwencji domen FYVE białek: Vps27p (*Saccharomyces cerevisiae*), EEA1 (*Homo Sapiens*), Fab1 (*Saccharomyces cerevisiae*), PRAF-1 (*Arabidopsis thaliana*), wraz z domeną FYVE białka PRAF4 (*Arabidopsis thaliana*) (strzałka niebieska). Czerwoną strzałką zaznaczono aminokwasy konserwatywne odpowiedzialne za wiązanie fosfatydyloinozytolu PtdIns(3)P.

Analiza ClustalX wykazała, że w sekwencji domeny FYVE białka PRAF4, podobnie jak w przypadku białka PRAF1, występuje inny zestaw aminokwasów od „typowego”. W obu przypadkach w sekwencji motywu HH-R zamiast drugiej histydyny (H) występuje asparagina (N), a zamiast argininy (R) tyrozyna (Y). Dodatkowo, w przypadku białka PRAF4 aminokwasy w elemencie RK, występują w odwrotnej kolejności – KR (Ryc.5.10, B).

Wyniki te wskazują na duże podobieństwo pomiędzy domenami FYVE białek PRAF1 i PRAF4 oraz, że stanowią one „wariant” domeny FYVE. Analiza ta daje przypuszczenia, że domeny te będą wykazywały inną swoistość wiązania fosfatydyloinozytoli od typowej.

5.2 Badanie powinowactwa domen analizowanych białek do fosfatydyloinozytoli

5.2.1 Wybór analizy Fat blot oraz domen do badań

Jak wcześniej opisano (rozdział 1.3), fosfatydyloinozytole, zlokalizowane w różnych przedziałach błonowych, są wiązane przez określone domeny białkowe. Analiza bioinformatyczna wykazała, że wszystkie analizowane w tej pracy białka zawierają domeny potencjalnie oddziałujące z fosfatydyloinozytolami (rozdział 5.1.1). Dokonano również oceny obecności aminokwasów konserwatywnych odpowiedzialnych za wiązanie tych lipidów (rozdział 5.1.2).

Dane literaturowe wskazują, że poszczególne fosfatydyloinozytole występują w określonych przedziałach błonowych (rozdział 1.3). Z tego powodu zbadanie powinowactwa domen do określonych fosfatydyloinozytoli, może dać pewne przypuszczenia z którymi przedziałami błonowymi mogą one oddziaływać.

W celu określenia zdolności domen białkowych do wiązania fosfatydyloinozytoli stosuje się różnorodne metody biochemiczne. Mimo, że w ostatnich latach pojawiły się możliwości takich obserwacji *in vivo*, to uzyskiwane wyniki są często niejednoznaczne (Várnai i Balla 2008).

W niniejszej pracy w celu sprawdzenia czy wytypowane białka wiążą fosfatydyloinozytole, ich domeny odpowiedzialne za takie interakcje (PX, ENTH, PH, FYVE) zostały poddane analizie Fat blot.

Analiza Fat blot (rozdział 4.5.5) to metoda relatywnie nieskomplikowana oraz niezbyt kosztowna. Jej dużą zaletą jest wymagana niewielka ilość badanych białek (1 µg białka/analizę) oraz możliwość porównania ich powinowactwa do wszystkich typów fosfatydyloinozytoli w jednym badaniu.

Analiza Fat blot dotyczy obserwacji *in vitro*, dlatego materiał badawczy - domeny, musiały być wcześniej poddane nadekspresji, wyizolowane i oczyszczone.

Do analiz wybrano następujące domeny:

- Białko PXS (At4g32160) - domena PX_{PXS}
- Białko PXC (At3g15920) - domena PX_{PXC}
- Białko PXX (At1g15240) - domena PX_{PXX}
- Białko SlaA (At4g02650) - domena $ENTH_{SlaA}$
- Białko PRAF4 (At1g76950) - domena $FYVE_{PRAF4}$
- Białko PRAF4 (At1g76950) - domena PH_{PRAF4}
- Białko PRAF1 (At1g65920) - domena $FYVE_{PRAF1}$

Ponieważ w Institute of Molecular Biology w Kopenhadze, dokonano wcześniej analizy Fat blot dla domen PH (najwyższe powinowactwo dla $PtdIns(4,5)P_2$) oraz FYVE (najwyższe powinowactwo dla $PtdIns(3)P$) białka PRAF1 (Jensen i wsp. 2001), zdecydowano o użyciu również tego białka w celu porównania wyników. Z powodu mutacji w obrębie sekwencji kodującej domenę PH w dostępnym cDNA białka PRAF1, do analizy użyto jedynie domenę $FYVE_{PRAF1}$.

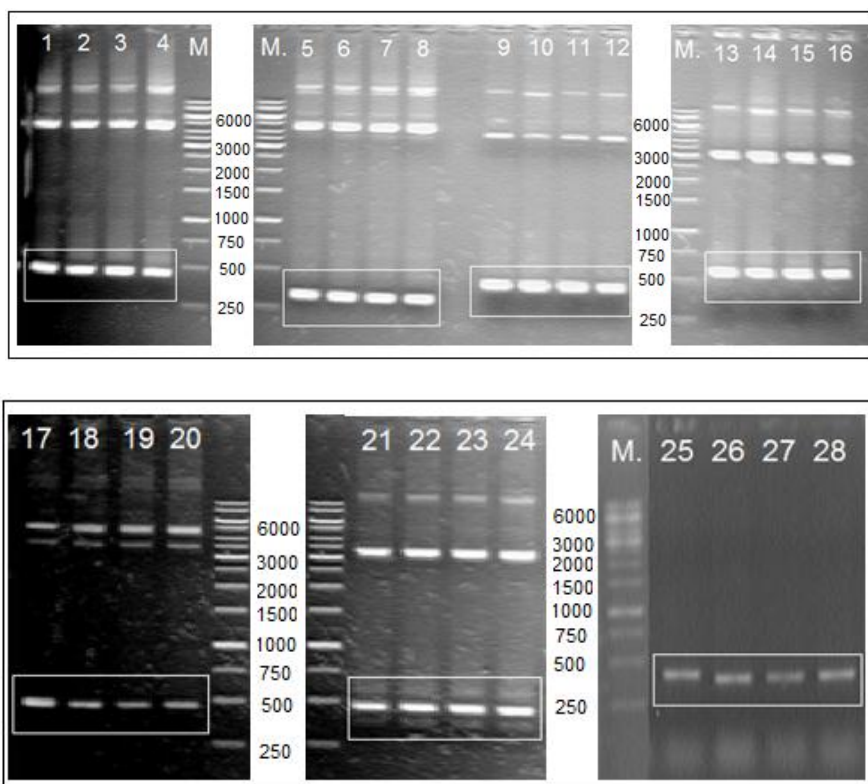
5.2.2 Nadekspresja domen białkowych w fuzji z GST

Nadekspresja wybranych do analizy domen miała na celu nie tylko uzyskanie znacznych ilości wyizolowanych i oczyszczonych domen białkowych, ale również otrzymanie ich w fuzji z S-transferazą glutationu (GST). Fuzja z białkiem GST pozwala na oczyszczenie białka po jego nadekspresji, na drodze chromatografii powinowactwa. Zredukowany glutation jest naturalnym substratem dla S-transferazy glutationowej, którą wiąże z dużym powinowactwem w zakresie pH od 6,5 do 9,5. Związane ze złożem białka wymywa się nadmiarem glutationu. Fuzja z białkiem GST pozwala w następnej kolejności na detekcję immunologiczną białek podczas analizy Fat blot.

5.2.2.1 Przygotowanie konstrukcji genetycznych do nadekspresji białek

W celu wykonania konstrukcji genetycznych do nadekspresji białek, zdecydowano o użyciu wektora pGEX-4T-1 (rozdział 3.3.3.4). Korzystając z bazy danych REBASE dokonano wyboru enzymów restrykcyjnych: BamH1 oraz Eco R1, które miały być dalej użyte w procesie trawienia wektora i insertów przed procesem ligacji. Wybór tych enzymów spowodowany był brakiem miejsc restrykcyjnych przez nie rozpoznawanych w sekwencjach analizowanych domen przeznaczonych do wklonowania.

Pierwszym krokiem procedury było wykonanie reakcji PCR, w których do sekwencji analizowanych domen białkowych dodawane były miejsca restrykcyjne, rozpoznawane przez enzymy BamH1 i EcoR1 (amplifikowane sekwencje w załączniku nr 1). Reakcje prowadzono z wykorzystaniem matrycy w postaci zamówionego cDNA analizowanych białek (rozdział 3.3.1), starterów do nadekspresji (rozdział 3.3.2) oraz polimarezy typu pfu. Temperatury hybrydyzacji starterów dopasowano zgodnie z zaleceniami producenta, natomiast czas trwania elongacji ustalano wg prędkości syntezy 1000nt/60sek. Produkty reakcji PCR rozdzielono w 1% żelu agarozowym (Ryc.5.11).



Ryc.5.11. Produkty reakcji amplifikacji sekwencji kodujących domeny białkowe oflankowane miejscami restrykcyjnymi rozdzielone w 1 % żelu agarozowym z bromkiem etydy. Oznaczenia ścieżek: M.GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. Pożądane produkty PCR oznaczono prostokątami w sposób następujący: 1-4 produkty reakcji PCR dla domeny PH_{PRAF4} 440nt; 5-8 produkty reakcji PCR dla domeny FYVE_{PRAF4} 317nt; 9-12 produkty reakcji PCR dla domeny FYVE_{PRAF1} 427nt;

13-16 produkty reakcji PCR dla domeny ENTH_{SlaA} 531nt; 17-20 produkty reakcji PCR dla domeny PX_{PXS} 459nt; 21-24 produkty reakcji PCR dla domeny PX_{PXC} 474nt; 25-28 produkty reakcji PCR dla domeny PX_{PXX} 426nt.

Po elucji z żelu odpowiednich prążków oraz oczyszczeniu DNA, sekwencje były trawione enzymami restrykcyjnymi BamH1 oraz Eco R1 a następnie poddawane ligacji z wektorem pGEX-4T-1 (rozdziały 4.4.3.1, 4.4.7.1.1, 4.4.7.2.1). Pełnymi wektorami transformowano następnie bakterie *E.coli*, po czym wysiewając je na pożywkę z karbenicyliną (gen oporności obecny w wektorze pGEX-4T-1), przeprowadzano selekcję stransformowanych kolonii bakteryjnych. Z namnożonych w pożywce płynnej bakterii, izolowano pełne wektory, po czym sekwencjonowano je w celu sprawdzenia poprawności wklonowania insertów. W taki sposób otrzymano następujące konstrukcje genetyczne wyposażone w sekwencje analizowanych domen białkowych:

- pGEX-4T-1_ PX_{PXS}
- pGEX-4T-1_ PX_{PXC}
- pGEX-4T-1_ PX_{PXX}
- pGEX-4T-1_ ENTH_{SlaA}
- pGEX-4T-1_ FYVE_{PRAF4}
- pGEX-4T-1_ PH_{PRAF4}
- pGEX-4T-1_ FYVE_{PRAF1}

Dokładny opis procedury znajduje się w rozdziale 4.4.7.

5.2.2.2 Nadekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych

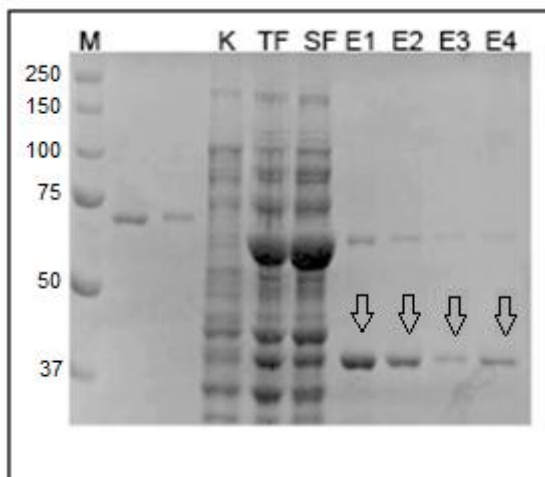
Przygotowanymi wektorami transformowano bakterie szczepu BL21, po czym przeprowadzano nadekspresję białek wg procedury opisanej w rozdziale 4.3.5.

W celu uzyskania wydajnej nadekspresji, dopasowano następujące parametry:

- temperatura, w jakiej prowadzono nadekspresję przed dodaniem induktora IPTG: 37°C
- zagęszczenie kolonii bakteryjnej w momencie dodania induktora: OD = 0,6
- ilość dodanego induktora: IPTG = 1mM
- temperatura, w jakiej prowadzono nadekspresję po dodaniu induktora: 18°C
- czas trwania nadekspresji: 4 h po dodaniu induktora

Zastosowanie takich warunków pozwoliło na uzyskanie dużych ilości nadeksprymowanych białek, które następnie poddano izolacji oraz oczyszczaniu (rozdział 4.5.3).

Uzyskane oczyszczone białka wraz z próbami pobranymi na różnych etapach ich izolacji rozdzielono w 12% żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE (Ryc.5.12 – 5.18).



Ryc.5.12 Elektroforeza białek bakteryjnych w 12% żelu poliakryloamidowym.

Wyniki nadekspresji rekombinowanej domeny **PX_{PXS}:GST**;

ścieżki:

M – marker mas cząsteczkowych Precision Plus Protein™ Standards

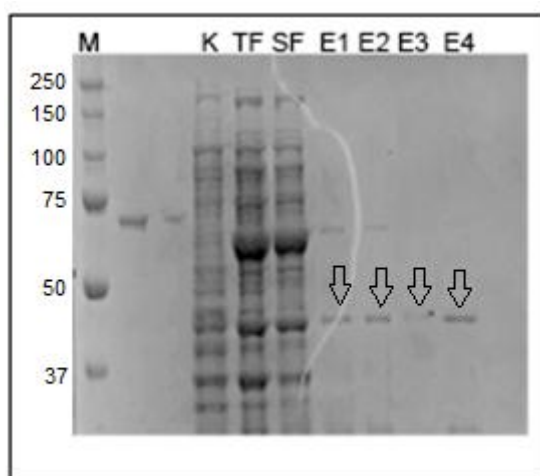
K- pula białek bakteryjnych bez nadekspresji

Białka po nadekspresji:

TF-pula białek w zawiesinie bakteryjnej po sonikacji w trakcie izolacji

SF-pula białek rozpuszczalnych

E1-E4 białka oczyszczone o masie 41kDa



Ryc.5.13 Elektroforeza białek bakteryjnych w 12% żelu poliakryloamidowym.

Wyniki nadekspresji rekombinowanej domeny **PX_{PXC}:GST**;

ścieżki:

M – marker mas cząsteczkowych Precision Plus Protein™ Standards

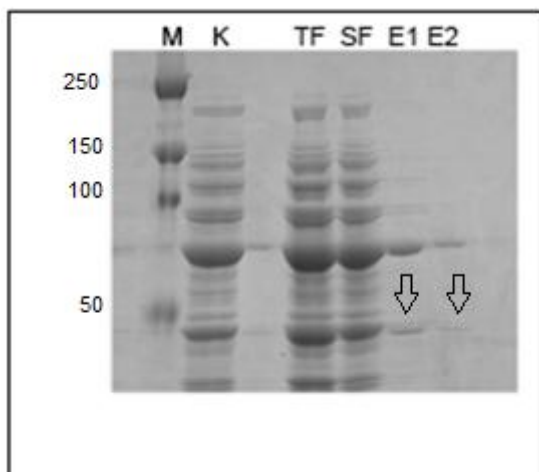
K- pula białek bakteryjnych bez nadekspresji

Białka po nadekspresji:

TF-pula białek w zawiesinie bakteryjnej po sonikacji w trakcie izolacji

SF-pula białek rozpuszczalnych

E1-E4 białka oczyszczone o masie 42 kDa



Ryc.5.14 Elektroforeza białek bakteryjnych w 12% żelu poliakryloamidowym.

Wyniki nadekspresji rekombinowanej domeny **PX_{PXX}:GST**;

ścieżki:

M – marker mas cząsteczkowych Multicolor High Range Protein Ladder

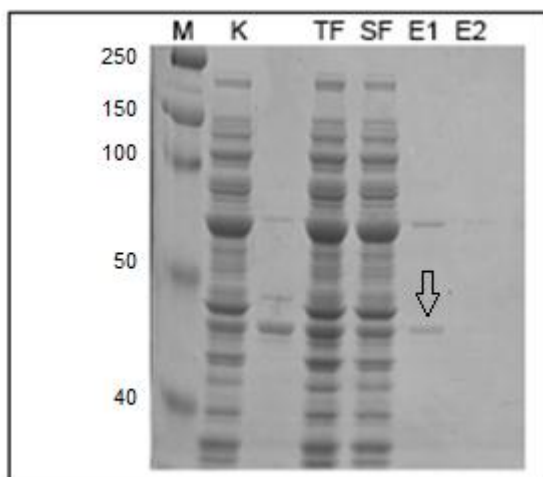
K- pula białek bakteryjnych bez nadekspresji

Białka po nadekspresji:

TF-pula białek w zawiesinie bakteryjnej po sonikacji w trakcie izolacji

SF-pula białek rozpuszczalnych

E1-E2 białka oczyszczone o masie 42 kDa



Ryc.5.15 Elektroforeza białek bakteryjnych w 12% żelu poliakryloamidowym.

Wyniki nadekspresji rekombinowanej domeny **ENTH_{SlaA}:GST**;

ścieżki:

M – marker mas cząsteczkowych Multicolor High Range Protein Ladder

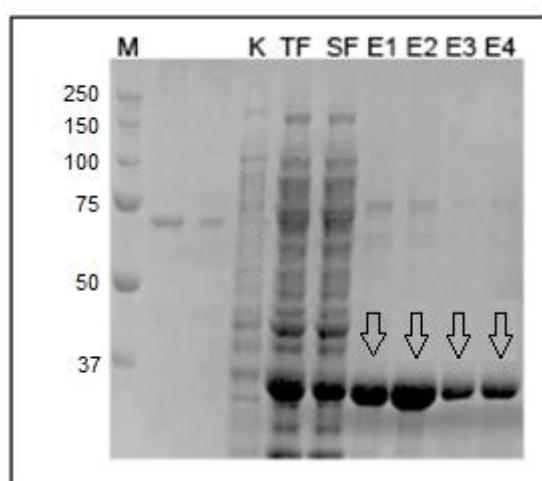
K- pula białek bakteryjnych bez nadekspresji

Białka po nadekspresji:

TF-pula białek w zawiesinie bakteryjnej po sonikacji w trakcie izolacji

SF-pula białek rozpuszczalnych

E1-E4 białka oczyszczone o masie 43 kDa



Ryc.5.16 Elektroforeza białek bakteryjnych w 12% żelu poliakryloamidowym.

Wyniki nadekspresji rekombinowanej domeny **FYVE_{PRAF4}:GST**;

ścieżki:

M – marker mas cząsteczkowych Precision Plus ProteinTM Standards

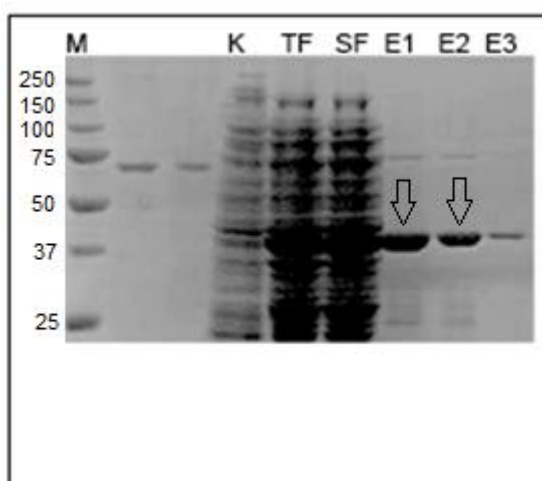
K- pula białek bakteryjnych bez nadekspresji

Białka po nadekspresji:

TF-pula białek w zawiesinie bakteryjnej po sonikacji w trakcie izolacji

SF-pula białek rozpuszczalnych

E1-E4 białka oczyszczone o masie 40kDa



Ryc.5.17 Elektroforeza białek bakteryjnych w 12% żelu poliakryloamidowym.

Wyniki nadekspresji rekombinowanej domeny **PH_{PRAF4}:GST**;

ścieżki:

M – marker mas cząsteczkowych Precision Plus ProteinTM Standards

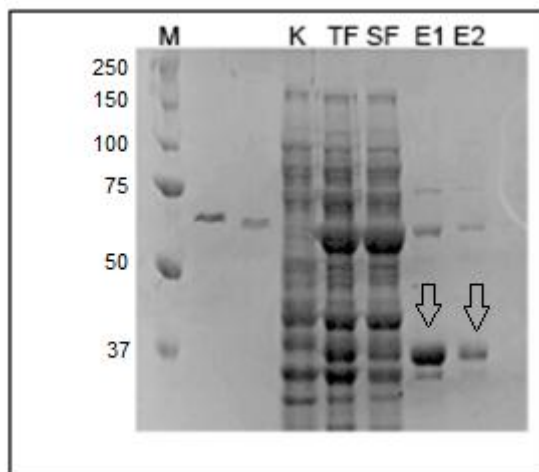
K- pula białek bakteryjnych bez nadekspresji

Białka po nadekspresji:

TF-pula białek w zawiesinie bakteryjnej po sonikacji w trakcie izolacji

SF-pula białek rozpuszczalnych

E1-E4 białka oczyszczone o masie 37kDa



Ryc.5.18 Elektroforeza białek bakteryjnych w 12% żelu poliakryloamidowym.
Wyniki nadekspresji rekombinowanej domeny **FYVE_{PRAF1}:GST**;
ścieżki:
M – marker mas cząsteczkowych Precision Plus Protein™ Standards
K- pula białek bakteryjnych bez nadekspresji
Białka po nadekspresji:
TF-pula białek w zawiesinie bakteryjnej po sonikacji w trakcie izolacji
SF-pula białek rozpuszczalnych
E1-E4 białka oczyszczone o masie 40kDa

Oszacowano przybliżoną ilość oczyszczonych białek na 1μl roztworu (Bradford 1976):

- PX_{PXS}:GST~300ng/μl
- PX_{PXC}:GST~70ng/μl
- PX_{PXX}:GST~100 ng/μl
- ENTH_{SlA}:GST~85ng/μl
- FYVE_{PRAF4}:GST~2000ng/μl
- PH_{PRAF4}:GST~600ng/μl
- FYVE_{PRAF1}:GST~200ng/μl

5.2.3 Analiza Fat blot

Przystępując do analizy Fat blot przygotowano zestaw blotów z nakroplonymi fosfatydyloinozylami o stężeniu 32-256 pmol/μl. W analizie zastosowano dwa ich typy. W pierwszej kolejności stosowano blot typu I, a następnie jeśli analiza wymagała uszczegółowienia, korzystano z blotu typu II (rozdział 4.5.5.1).

Przed rozpoczęciem właściwej analizy Fat blot wpierw należało zoptymalizować warunki dla oddziaływań białko-lipid. Testom poddano: skład buforów, czasy inkubacji, pH roztworów, temperatury inkubacji parametry techniczne, jak i parametry techniczne: wielkość blotów oraz naczynia do inkubacji. Ostatecznie dopasowane warunki analizy zostały opisane w rozdziale 4.5.5. Pozwoliły one na uzyskanie wysokiej efektywności wiązania lipidów przez domeny. Dla każdej domeny przeprowadzono przynajmniej 8 powtórzeń analizy z zastosowaniem różnych blotów. W pracy przedstawiono po jednym reprezentatywnym blocie dla każdej domeny. W niektórych przypadkach dokonano wyboru dwóch reprezentatywnych blotów.

5.2.3.1 Próby kontrolne

Jako kontrolę pozytywną zastosowano dimer domeny FYVE - 2xFYVE, pochodzącej z mysiego białka HRS (HRS; ang. *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), ponieważ powinowactwo tej domeny do fosfatydyloinozytoli zostało już wcześniej potwierdzone eksperymentalnie (Vermeer i wsp. 2006). Natomiast jako kontrolę negatywną zastosowano wolne białko GST. Oba białka zostały użyte do analiz przez dr Teuna Munnika z Instytutu SILS w Amsterdamie.

Według oczekiwań domena **2xFYVE** wykazała zdecydowanie największe powinowactwo do fosfatydyloinozytoli PtdIns(3)P. Z kolei **wolne GST** nie wiązało żadnego fosfatydyloinozytoli (Ryc.5.19).

5.2.3.2 Analiza powinowactwa domen: PX, ENTH, PH i FYVE analizowanych białek do fosfatydyloinozytoli

Podczas analizy Fat blot wszystkie z analizowanych domen wiązały fosfatydyloinozytoli, zaobserwowano następującą swoistość ich wiązania:

Domena **PX** białka **PXS**, wykazała zdecydowanie największe powinowactwo do fosfatydyloinozytoli PtdIns(3)P (Ryc.5.20).

Domena **PX** białka **PXC** wykazała największe powinowactwo do dwóch fosfatydyloinozytoli: PtdIns(3)P oraz PtdIns(4)P (Ryc.5.21).

Domena **PX** białka **PXX** oddziaływała z różnymi fosfatydyloinozytolami, brak jednak widocznie dominującej swoistości wiązania któregoś z nich (Ryc.5.22).

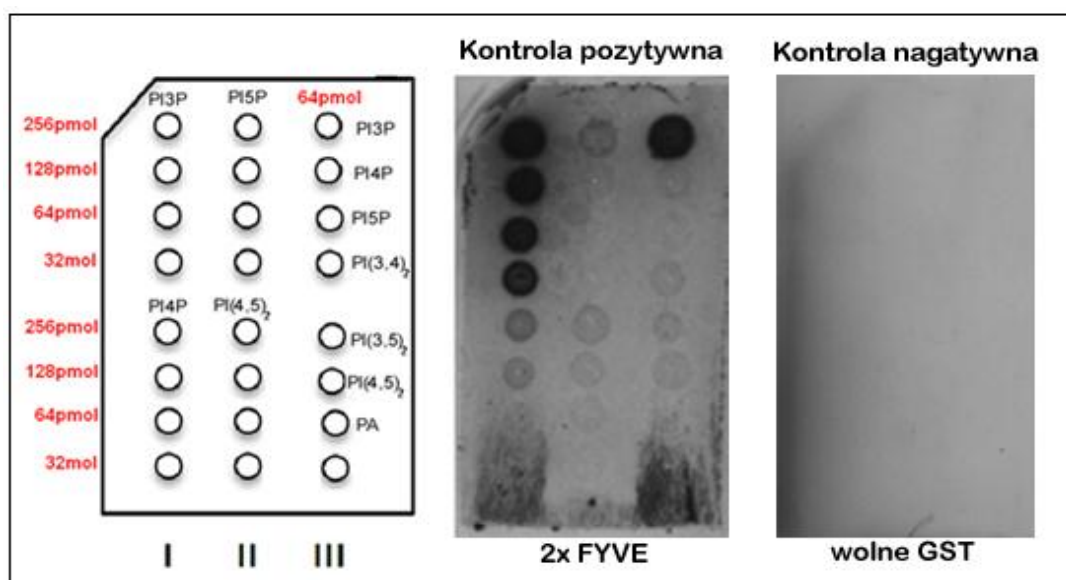
Domena **ENTH** białka **SlA** preferencyjnie wiązała fosfatydyloinozytol PtdIns(4)P. Poza tym zaobserwowano również silny sygnał dla fosfatydyloinozytoli: PtdIns(5)P oraz PtdIns(3,5)P₂ (Ryc.5.23, Ryc.5.24).

Domena **FYVE** białka **PRAF4** wykazała zdecydowanie największe powinowactwo do fosfatydyloinozytoli PtdIns(4)P. Poza tym zaobserwowano średnio silny sygnał dla fosfatydyloinozytoli: PtdIns(5)P oraz PtdIns(3)P (Ryc.5.25, Ryc.5.26).

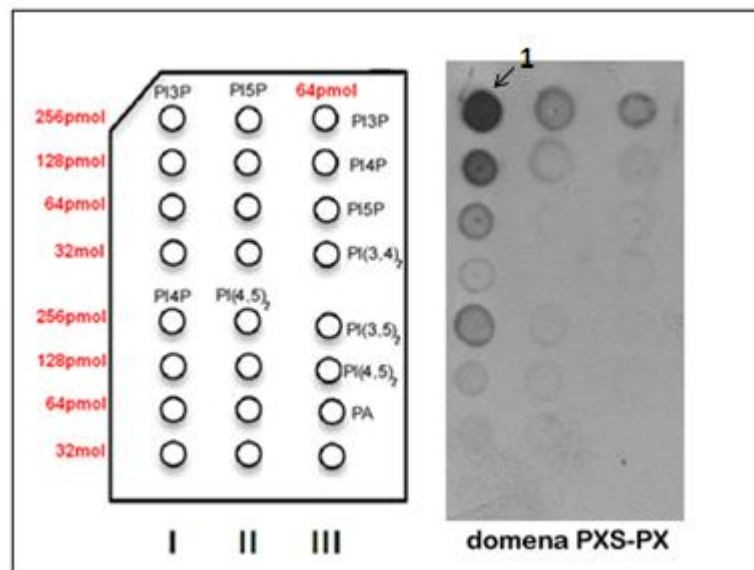
Domeny **PH** białka **PRAF4** preferencyjnie wiązała fosfatydyloinozytol PtdIns(3,5)P₂ oraz PtdIns(4)P. Poza tym odnotowano średnio silny sygnał dla fosfatydyloinozytoli: PtdIns(5)P oraz PtdIns(3)P (Ryc.5.27, Ryc.5.28).

Domena **FYVE** białka **PRAF1** wykazała najwyższą swoistość wiązania fosfatydyloinozytoli PtdIns(4)P. Poza tym zaobserwowano średnio silny sygnał dla fosfatydyloinozytoli: PtdIns(5)P oraz PtdIns(3)P (Ryc.5.29, Ryc.5.30).

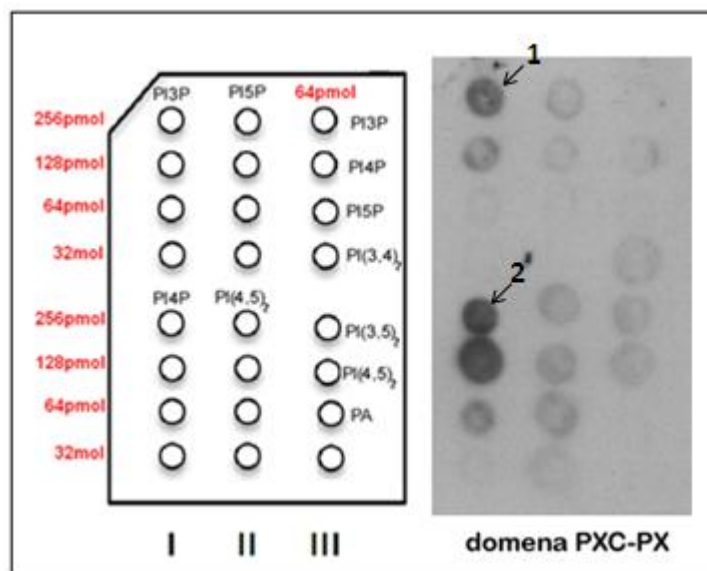
Ryciny:



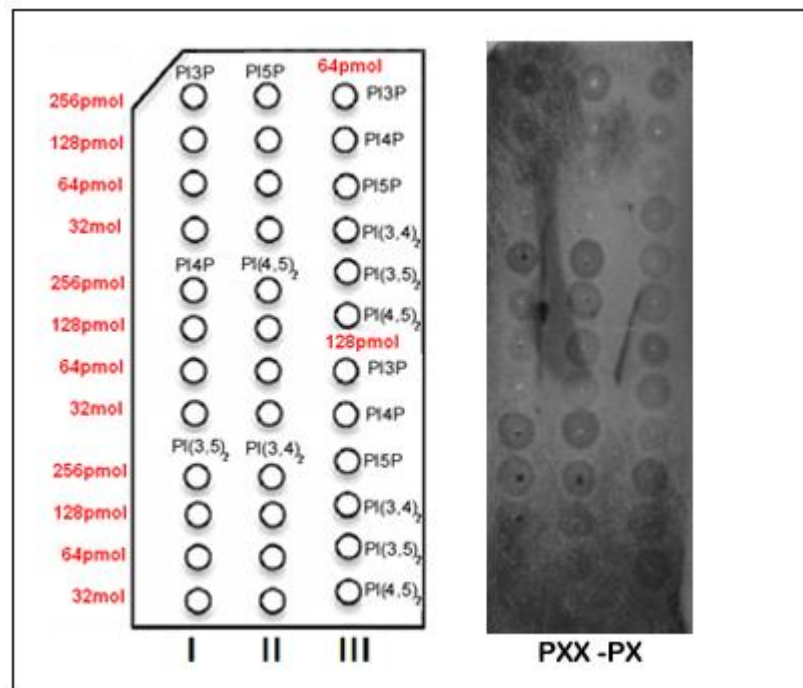
Ryc.5.19 Analiza oddziaływań domeny 2xFYVE oraz wolnego białka GST z fosfatydyloinozytolami.



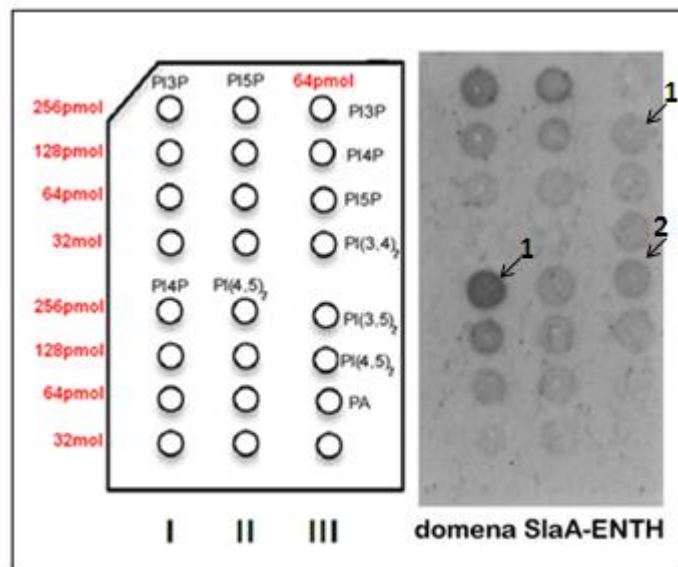
Ryc.5.20 Analiza oddziaływań domeny PX białka PXS z fosfatydyloinozytolami, z zastosowaniem blotu typu I. 1- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(3)P.



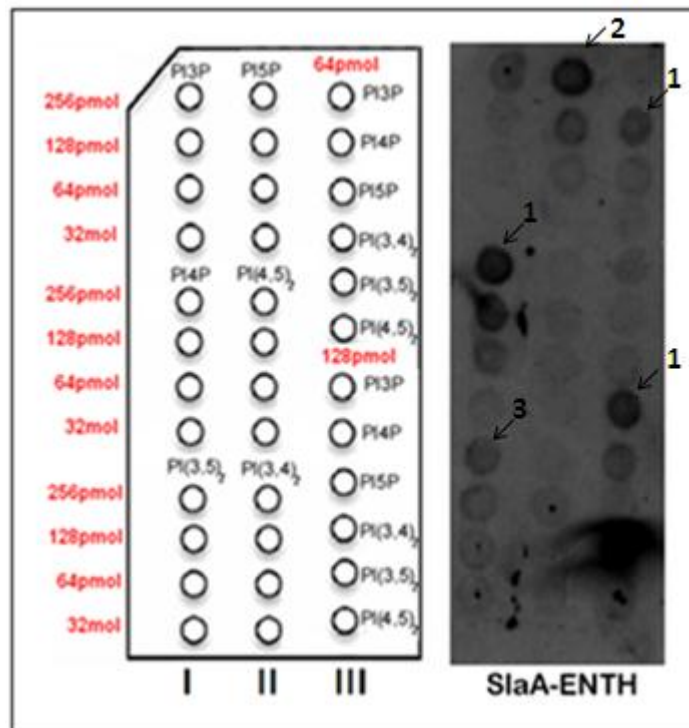
Ryc.5.21 Analiza oddziaływań domeny PX białka PXC z fosfatydyloinozytolami z zastosowaniem blotu typu I. 1- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(3)P, 2- sygnał dla PtdIns(4)P.



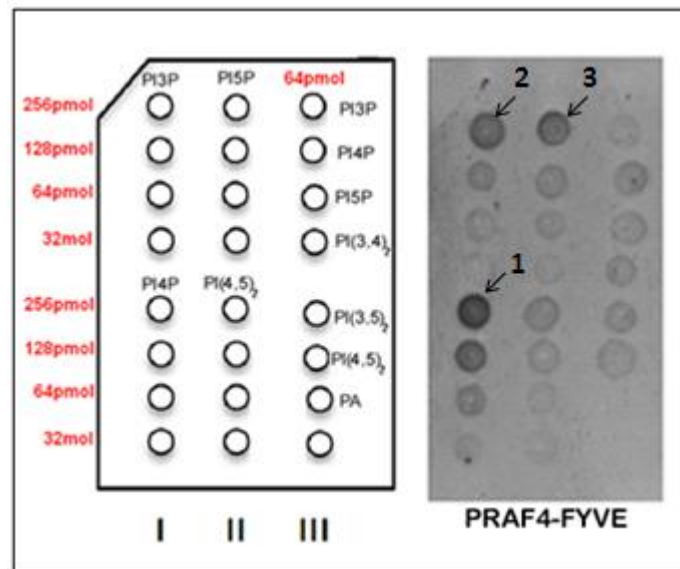
Ryc. 5.22 Analiza oddziaływań domeny PX białka PXX z fosfatydyloinozylami, z zastosowaniem blotu typu II. Brak widocznej dominacji w powinowactwie do któregoś z fosfatydyloinozytoli.



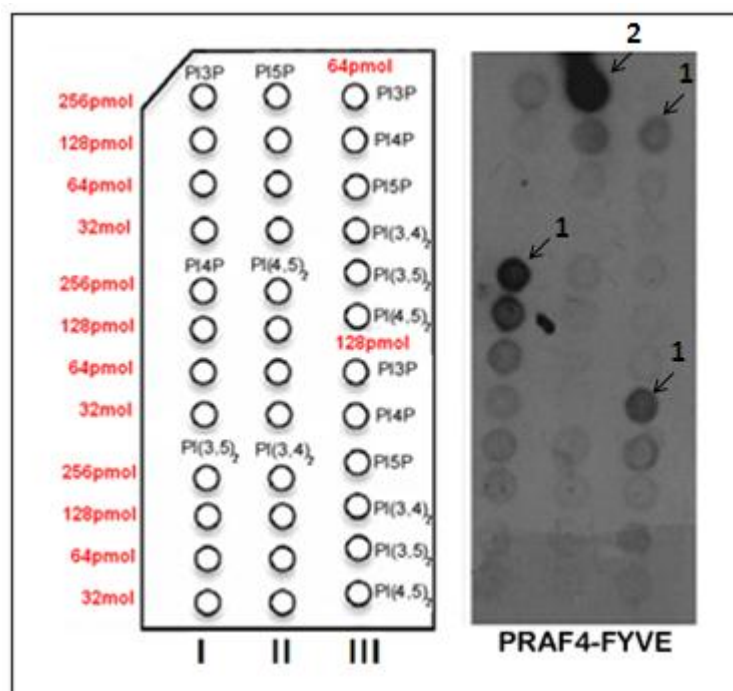
Ryc.5.23 Analiza oddziaływań domeny ENTH białka SlA z fosfatydyloinozylami, z zastosowaniem blotu typu I. 1- sygnał dla fosfatydyloinozytoli PtdIns(4)P, 2- sygnał dla PtdIns(3,5)P₂.



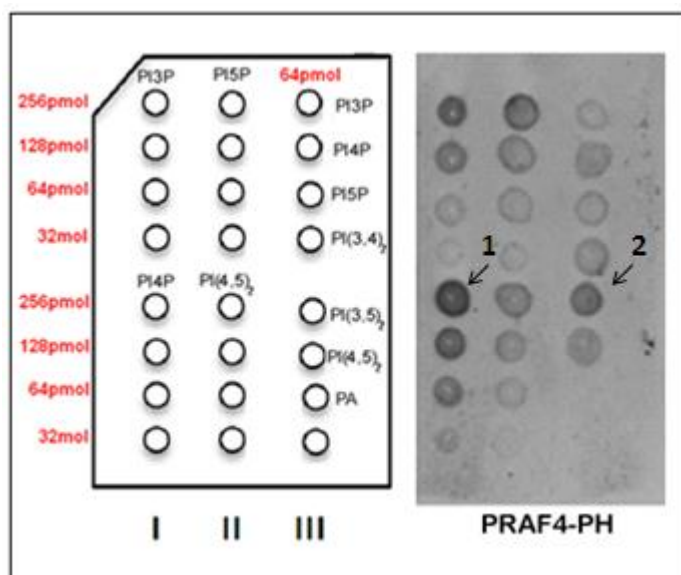
Ryc.5.24 Analiza oddziaływań domeny ENTH białka SlaA z fosfatydyloinozytolami, z zastosowaniem blotu typu II. 1- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(4)P, 2- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(5)P, 3- sygnał dla PtdIns(3,5)P₂.



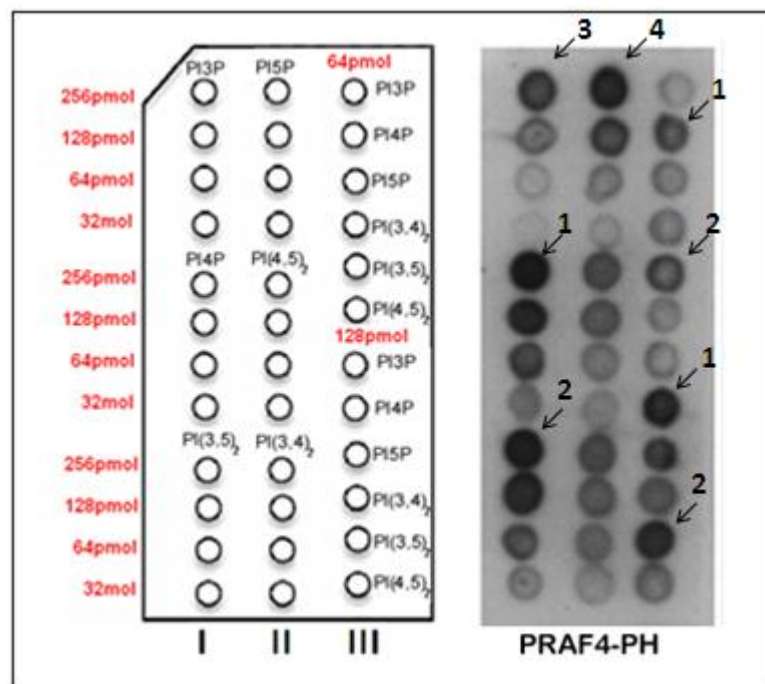
Ryc.5.25 Analiza oddziaływań domeny FYVE białka PRAF4 z fosfatydyloinozytolami, z zastosowaniem blotu typu I. 1- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(4)P, 2- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(3)P, 3- sygnał dla PtdIns(5)P.



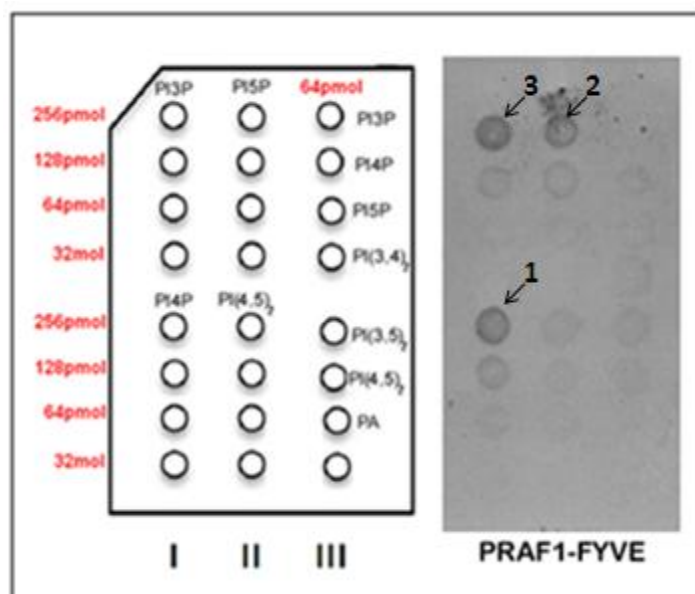
Ryc.5.26 Analiza oddziaływań domeny FYVE białka PRAF4 z fosfatydyloinozytolami, z zastosowaniem blotu typu II. 1- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(4)P, 2- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(5)P.



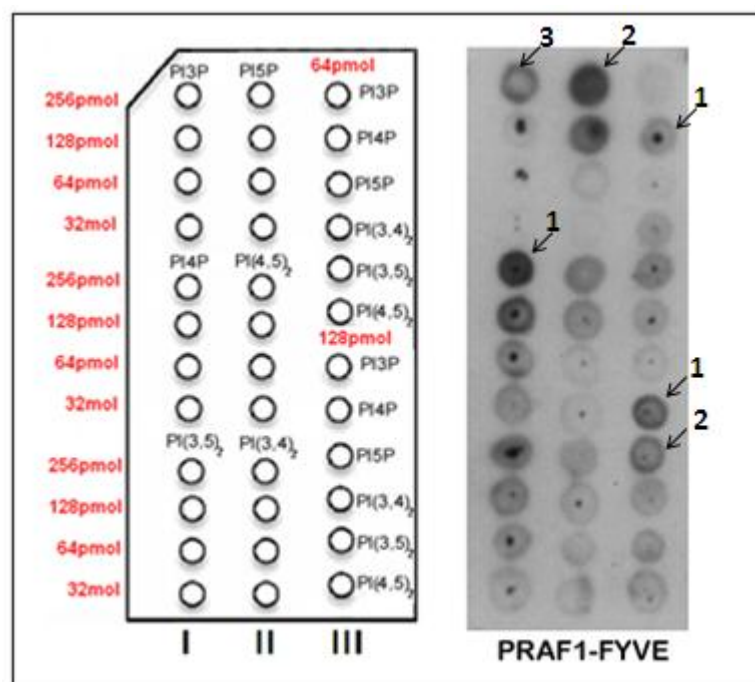
Ryc.5.27 Analiza oddziaływań domeny PH białka PRAF4 z fosfatydyloinozytolami, z zastosowaniem blotu typu I. 1- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(4)P, 2- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(3,5)P₂.



Ryc.5.28 Analiza oddziaływań domeny PH białka PRA4 z fosfatydyloinozytolami, z zastosowaniem blotu typu II. 1- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(4)P, 2- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(3,5)P₂, 3- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(3)P, 4- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(5)P.



Ryc.5.29 Analiza oddziaływań domeny FYVE białka PRA1 z fosfatydyloinozytolami, z zastosowaniem blotu typu I. 1- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(4)P, 2- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(3)P, 3- sygnał dla fosfatydyloinozytolu PtdIns(5)P.



Ryc.5.30 Analiza oddziaływań domeny FYVE białka PRAF1 z fosfatydylinozytolami, z zastosowaniem blotu typu II. 1- sygnał dla fosfatydylinozytolu PtdIns(4)P, 2- sygnał dla fosfatydylinozytolu PtdIns(5)P, 3- sygnał dla fosfatydylinozytolu PtdIns(3)P.

5.3 Lokalizacja subkomórkowa analizowanych białek

Ponieważ brak jakichkolwiek danych literaturowych dotyczących wytypowane do badań białek, nie znana jest również do tej pory ich lokalizacja w komórce roślinnej.

W niniejszej pracy, na podstawie analizy bioinformatycznej oceniono, że wszystkie analizowane białka niosą domeny funkcjonalne potencjalnie oddziałujące z fosfatydylinozytolami (rozdział 5.1). Następnie za pomocą analizy Fat blot zbadano do których fosfatydylinozytoli wykazują one największe powinowactwo (rozdział 5.2). W związku z uzyskanymi danymi, wskazującymi na potencjalne oddziaływania wytypowanych białek z lipidami błon komórkowych, zdecydowano o zbadaniu ich lokalizacji subkomórkowej. Miała ona m.in. na celu określenie czy białka te są zlokalizowane w przedziałach układu wewnątrz błonowego, a jeśli tak, to w jakich i czy ich lokalizacja może wskazywać na udział w procesach transportowych np. czy są zlokalizowane w pęcherzykach.

W pracy podjęto próbę lokalizacji *in vivo* wybranych białek w dwóch układach modelowych:

- 1) w protoplastach uzyskanych z komórek mezofilu liści *Arabidopsis thaliana* (rozdział 5.3.2);
- 2) w komórkach epidermy liści tytoniu *Nicotiana tabacum* (rozdział 5.3.3).

Po określeniu lokalizacji subkomórkowej, podjęto próbę kolokalizacji białek z barwnikiem FM4-64 (rozdział 5.3.4), który w pierwszej kolejności barwi błonę komórkową a z upływem czasu kolejne przedziały endocytotyczne (Bolte i wsp. 2004). Analiza ta miała na celu sprawdzenie, czy lokalizacja poszczególnych białek pokrywa się z przedziałami wybarwionymi przez użyty barwnik.

W celu przeprowadzenia analizy, najpierw należało wykonać odpowiednie konstrukcje genetyczne niosące geny analizowanych białek w fuzji z genem białka zielonej fluorescencji. Następnie konstrukcjami transformowano protoplasty, lub bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, które pośredniczyły we wprowadzeniu konstrukcji do komórek liści tytoniu. Otrzymane transformanty poddawano obserwacjom mikroskopowym przy użyciu mikroskopu konfokalnego NIKON A1R-Si. Obserwacje prowadzono wg parametrów podanych w rozdziale 4.6.1.

5.3.1 Przygotowanie konstrukcji genetycznych do analizy

5.3.1.1 Dobór wektorów pSITE do analizy

Do badań wybrano system wektorów pSITE (rozdział 3.3.3.2), pozwalający na ekspresję genów analizowanych białek m.in. w fuzji z białkiem wzmocnionej zielonej fluorescencji (eGFP). W zależności od pożądanej fuzji analizowanego białka z eGFP, użyto następujące typy wektorów pSITE:

-pSITE-2NB – do fuzji na końcu aminowym eGFP

-pSITE-2CA – do fuzji na końcu karboksylowym eGFP

Ponieważ wszystkie z analizowanych białek mają na jednym z końców domenę wiążącą lipidy błon (PX, PH, FYVE, ENTH), konstrukcje genetyczne przygotowano w taki sposób aby białko eGFP łączyło się po stronie przeciwległej do tej domeny. Miało to na celu

uniknięcie zakłócenia naturalnej lokalizacji analizowanych białek, lub odcięcia eGFP wraz z peptydem sygnałnym. W związku z tym, że białko PRAF4 zawiera dwie domeny wiążące fosfatydyloinozytole (PH, FYVE), przygotowano wektory dla fuzji tego białka w obu orientacjach.

Ostatecznie zastosowano następujące wektory dla analizowanych białek:

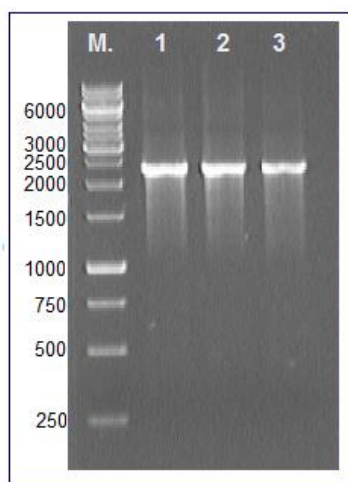
Wektor pSITE-2NB (fuzja N-końcowa z eGFP) – dla białek: PXS, PXC, SlaA, PRAF4

Wektor pSITE-2CA (fuzja C-końcowa z eGFP) – dla białek: PXX, PRAF4.

5.3.1.2 Wprowadzenie genów analizowanych białek do wektorów typu pDONR, a następnie docelowych pSITE-2NB oraz pSITE-2CA

W I reakcji PCR matryce analizowanych genów (rozdział 3.3.1) wyposażano w sekwencje adaptorowe a następnie w II reakcji PCR w drugą część sekwencji flankujących (attB1 oraz attB2), koniecznych do zajścia rekombinacji typu Gateway (rozdział 4.4.5):

I reakcja PCR - do sekwencji analizowanych genów dodano miejsca adaptorowe. Reakcje prowadzono z wykorzystaniem matrycy w postaci zamówionego cDNA, starterów adaptorowych (rozdział 3.3.2) oraz polimerazy typu pfu. Temperatury hybrydyzacji starterów dopasowano zgodnie z zaleceniami producenta, natomiast czas trwania elongacji ustalano wg prędkości syntezy 1000nt/60sek. Produkty reakcji PCR rozdzielono w 1% żelu agarozowym. Odpowiednie prążki wycięto oraz oczyszczono z żelu metodą gel out (rozdział 4.4.3.1), a następnie poddano II reakcji PCR.



Ryc.5.31 Przykładowy żel ukazujący produkty po I reakcji PCR rozdzielone w 1 % żelu agarozowym z bromkiem etydyny. Oznaczenia ścieżek: M. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 1-3 produkty reakcji PCR odpowiadające zamplifikowanemu genowi białka PXC, oflankowanego sekwencjami adaptorowymi – 2494nt.

II reakcja PCR - do uzyskanych sekwencji z odcinkami adaptorowymi dodano sekwencje flankujące – attB1 i attB2. Reakcje prowadzono z wykorzystaniem matrycy w postaci wyciętego i oczyszczonego DNA z poprzedniej reakcji, starterów Uni (rozdział 3.3.2) oraz polimerazy typu pfu. Temperatury hybrydyzacji starterów oraz czas trwania elongacji dopasowano jak w I reakcji PCR. W celu sprawdzenia poprawności zajścia reakcji, po 4µl z każdej mieszaniny reakcyjnej rozdzielano w żelu agarozowym, resztę poddano oczyszczeniu metodą clean-up (rozdział 4.4.3.2). W ten sposób otrzymano fragmenty DNA, oflankowane odcinkami attB1 i attB2, gotowe do wkłoniowania do wektora:

- | | |
|-------------------|-----------------------|
| • attB1-PXS-attB2 | • attB1-SlaA-attB2 |
| • attB1-PXC-attB2 | • attB1-PRAF4-C-attB2 |
| • attB1-PXX-attB2 | • attB1-PRAF4-N-attB2 |

W I reakcji rekombinacji typu Gateway (rozdział 4.4.5.2) otrzymano 6 wektorów typu pENTR:

- | | |
|-------------|-----------------|
| • pENTR_PXS | • pENTR_SlaA |
| • pENTR_PXC | • pENTR_PRAF4-N |
| • pENTR_PXX | • pENTR_PRAF4-C |

W II reakcji rekombinacji Gateway (rozdział 4.4.5.3) otrzymano następujące konstrukcje genetyczne:

- | | |
|-----------------------------|---------------------------------|
| • pSITE-2NB_PXS (PXS::eGFP) | • pSITE-2NB_SlaA (SlaA::eGFP) |
| • pSITE-2NB_PXC (PXC::eGFP) | • pSITE-2NB_PRAF4 (PRAF4::eGFP) |
| • pSITE-2CA_PXX (eGFP:PXX) | • pSITE-2CA_PRAF4 (eGFP::PRAF4) |

5.3.2 Analiza lokalizacji subkomórkowej białek w protoplastach *Arabidopsis thaliana*

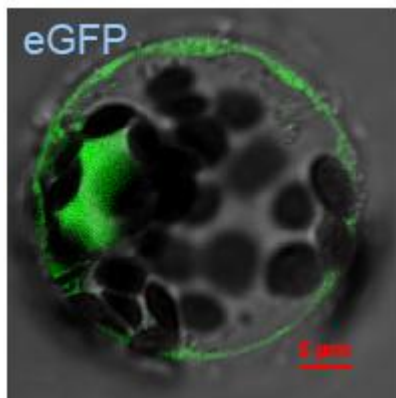
Do przeprowadzenia analizy lokalizacji subkomórkowej białek w protoplastach korzystano z komórek mezofilu liści 3-tygodniowych roślin *A.thaliana*. Wyizolowane protoplasty (rozdział 4.2.3) transformowano konstrukcjami genetycznymi (rozdział 4.2.4):

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| • pSITE-2NB_PXS (PXS::eGFP) | • pSITE-2CA_PXX (eGFP:PXX) |
| • pSITE-2NB_PXC (PXC::eGFP) | • pSITE-2NB_SlaA (SlaA::eGFP) |

Stransformowane protoplasty poddawano obserwacjom mikroskopowym (rozdział 4.6.1). Dla każdego z analizowanych białek dokonywano przynajmniej 3 powtórzeń izolacji i transformacji protoplastów. Do obserwacji wybierano protoplasty, które charakteryzowały się ogólnie prawidłowym wyglądem (sferyczny kształt, równomierny rozkład chloroplastów). W pracy, dla każdego białka, zaprezentowano obrazy 3 protoplastów najlepiej odzwierciedlających ich wygląd.

5.3.2.1 Analiza lokalizacji subkomórkowej białek w protoplastach *Arabidopsis thaliana* - kontrola pozytywna

Właściwą analizę lokalizacji subkomórkowej białek w protoplastach *Arabidopsis thaliana* poprzedzono eksperymentem kontrolnym, obejmującym nadekspresję niezwiązanego białka fluorescencyjnego - eGFP. W tym celu protoplasty transformowano pustym wektorem pSITE-2CA. Uzyskane obrazy (Ryc.5.32) wskazywały na rozkład sygnału fluorescencyjnego w obrębie cytoplazmy oraz jądra komórkowego, co jest zgodne z dotychczas opisywaną lokalizacją tego białka (Hanson i Köhler 2001).

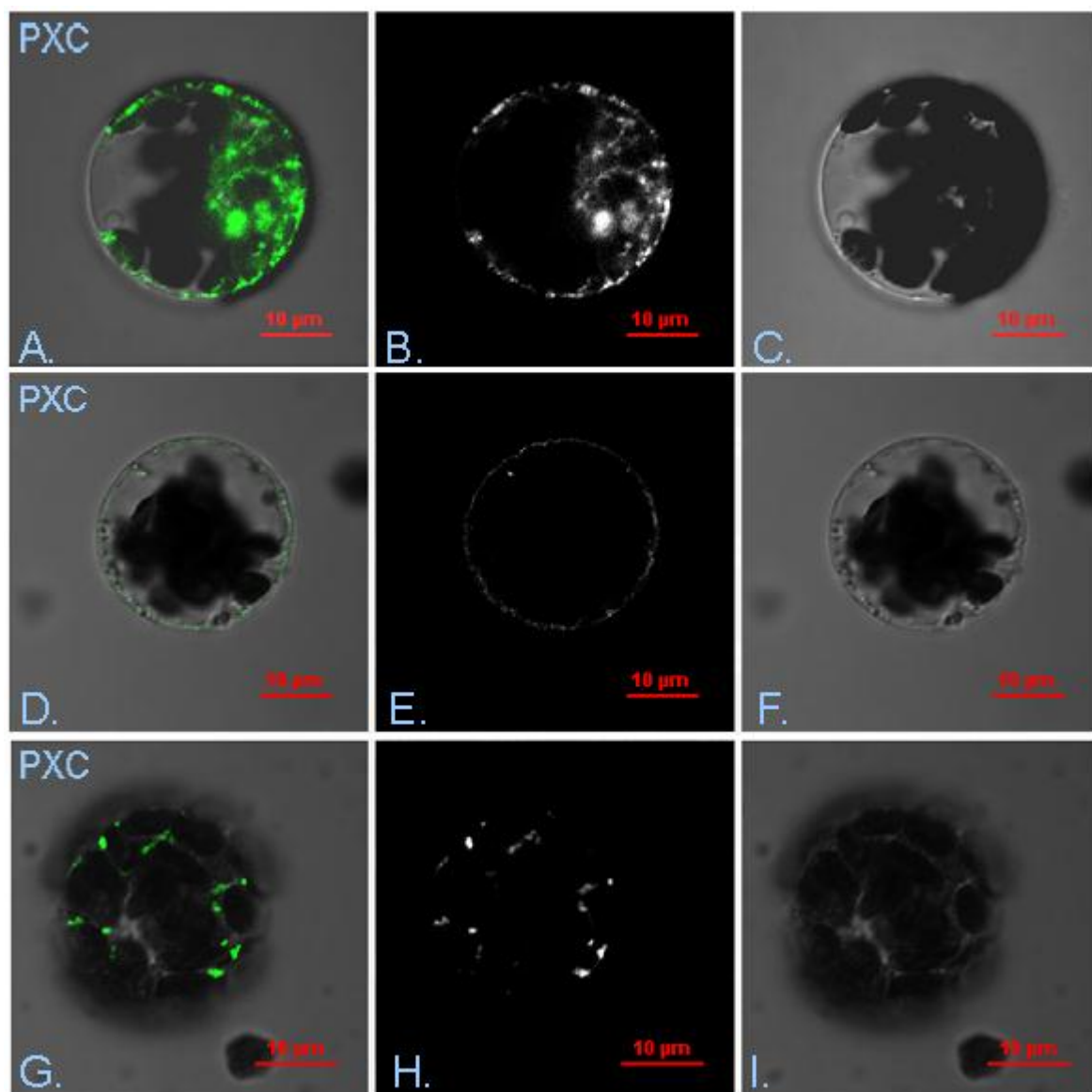


Ryc. 5.32 Analiza lokalizacji subkomórkowej niezwiązanego białka eGFP w protoplastach *A.thaliana*, transformowanych pustym wektorem pSITE-2CA. Sygnał fluorescencyjny wskazuje na lokalizację cytoplazmatyczną oraz w jądrze komórkowym Nikon A1R-Si. Skala: 5μm

5.3.2.2 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXC w protoplastach *Arabidopsis thaliana*

Podczas analizy lokalizacji subkomórkowej białka PXC::eGFP w protoplastach *A.thaliana*, obserwowano intensywny sygnał w okolicy błony komórkowej (Ryc.5.33 A, B;

D, E), jak również w obszarze cytoplazmatycznym (Ryc.5.33 A, B; G, H), głównie w postaci ziarnistości oraz większych pęcherzyków.



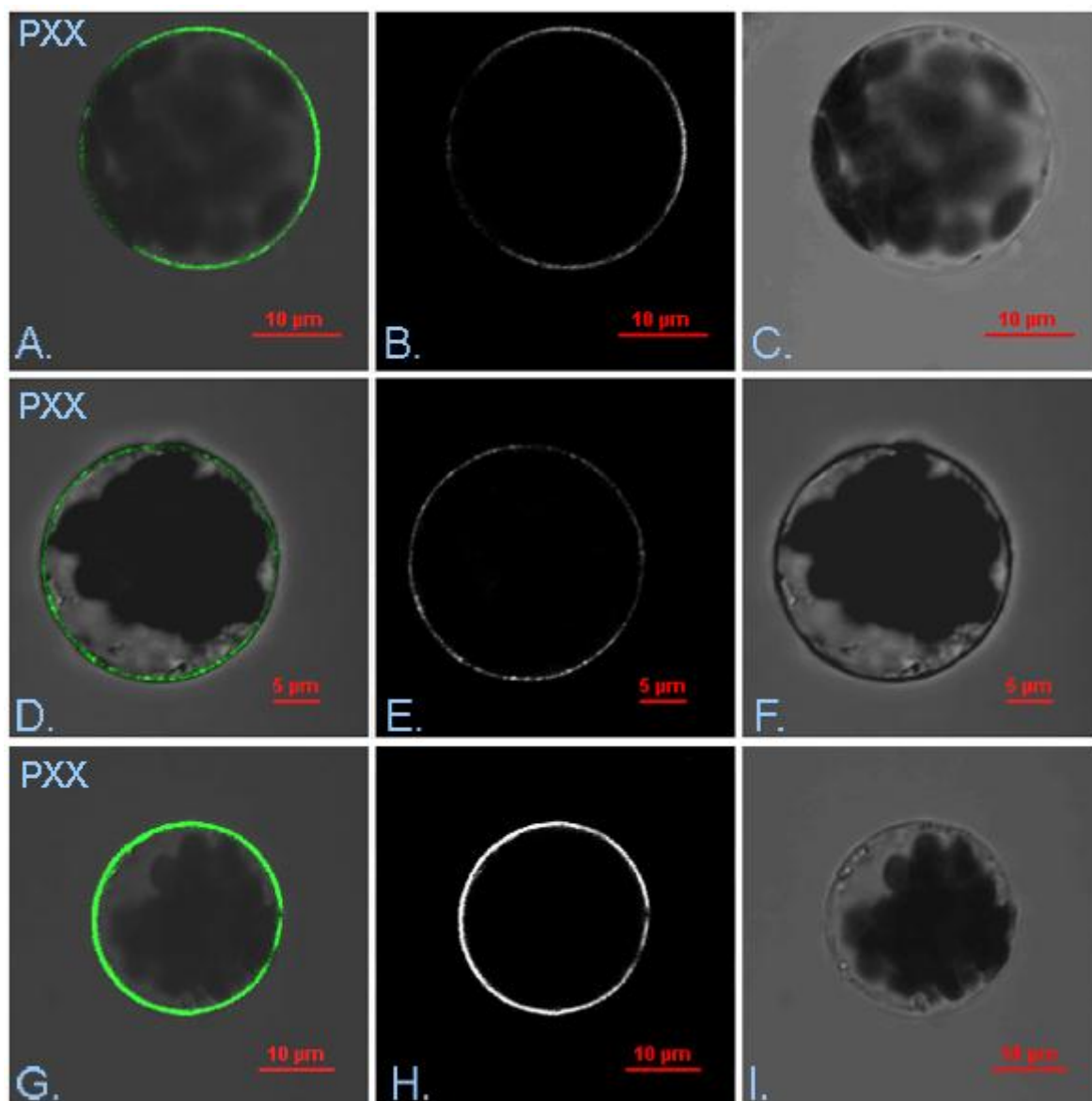
Ryc.5.33 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXC::eGFP. w protoplastach *A.thaliana*.

A,B; D,E: sygnał fluorescencyjny zlokalizowany m.in. w okolicy błony komórkowej w postaci ziarnistości, A,B; G,H: sygnał fluorescencyjny w postaci pęcherzyków w obszarze cytoplazmatycznym. A,D,G: obraz całościowy. B,E,H: obraz kanału fluorescencyjnego, C,F,I: obraz uzyskany w świetle przechodzącym. Wszystkie obrazy pochodzą z jednej płaszczyzny. Nikon A1R-Si. Skala: 10µm

5.3.2.3 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXX w protoplastach *Arabidopsis thaliana*

Analiza lokalizacji subkomórkowej białka eGFP::PXX w protoplastach *A.thaliana*, wskazała jednoznacznie, że sygnał fluorescencyjny jest lokalizowany na obwodzie

protoplastów (Ryc. 5.34 A, B; D, E; G, H). Świadczy to przypuszczalnie o lokalizacji białka PXX w błonie komórkowej. Na niektórych obrazach sygnał pochodzący z błony komórkowej widoczny był w postaci drobnych ziarnistości (Ryc. 5.34 D,E).



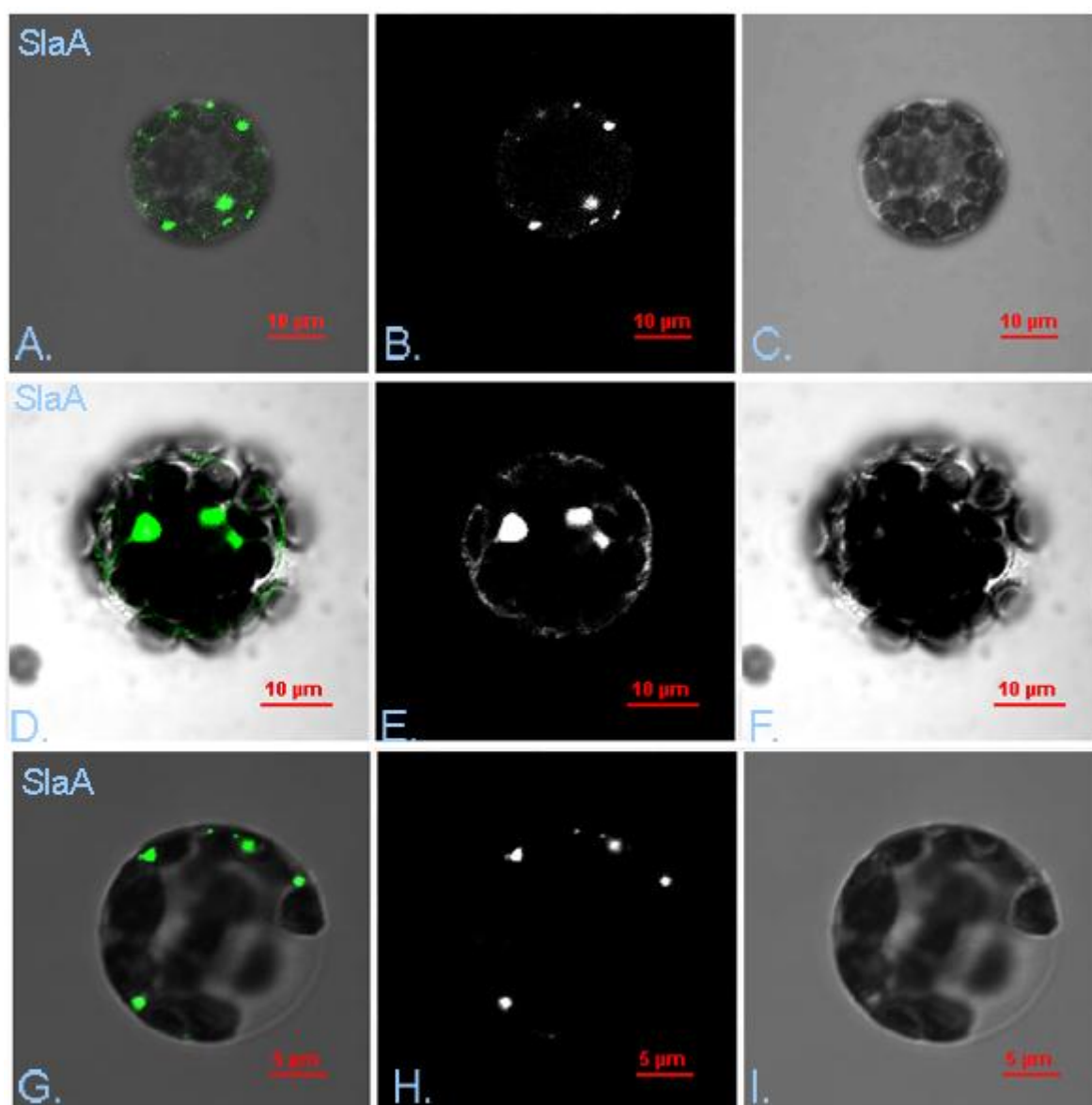
Ryc. 5.34 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka eGFP::PXX w protoplastach *A.thaliana*.

A,B; D,E; G,H: sygnał fluorescencyjny zlokalizowany na obwodzie protoplastów. A,D,G: obraz całościowy. B,E,H: obraz kanału fluorescencyjnego, C,F,I: obraz uzyskany w świetle przechodzącym. Wszystkie obrazy pochodzą z jednej płaszczyzny. Nikon A1R-Si. Skala: 5µm, 10µm.

5.3.2.4 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka SlaA w protoplastach *Arabidopsis thaliana*

Podczas analizy lokalizacji subkomórkowej białka SlaA::eGFP w protoplastach *A.thaliana* obserwowano sygnał, głównie w obrębie pęcherzyków, które znajdowały się w

okolicy błony komórkowej (Ryc.5.35 G, H), jak również w obszarze cytoplazmatycznym (Ryc.5.35 A, B). Poza większymi pęcherzykami obserwowano również niewielkie pęcherzyki, które znajdowały się głównie w okolicy błony komórkowej (Ryc.5.35 D, E). Na niektórych obrazach odnotowano agregaty białka fluorescencyjnego (Ryc.5.35 D, E). Mogły być one wynikiem zaburzonego procesu jego fałdowania lub transportu do przedziałów docelowych.



Ryc.5.35 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka SlaA::eGFP. w protoplastach *A.thaliana*.

A,B: sygnał fluorescencyjny widoczny w obrębie pęcherzyków w obszarze cytoplazmatycznym; D,E: sygnał fluorescencyjny widoczny w obrębie drobnych pęcherzyków przy błonie komórkowej oraz w postaci agregatów białka; G,H: sygnał fluorescencyjny w obrębie większych pęcherzyków w okolicy błony komórkowej; A,D,G: obraz całościowy; B,E,H: obraz kanału fluorescencyjnego; C,F,I: obraz uzyskany w świetle przechodzącym. Wszystkie obrazy pochodzą z jednej płaszczyzny. Nikon A1R-Si. Skala: 5μm, 10μm.

5.3.2.5 Podsumowanie analizy lokalizacji subkomórkowej białek w protoplastach *Arabidopsis thaliana*

Analiza lokalizacji subkomórkowej z zastosowaniem protoplastów *A.thaliana* pozwoliła na uzyskanie wyników dla trzech białek: PXC, PXX oraz SlaA. Mimo wielokrotnych powtórzeń eksperymentu, nie udało się uzyskać wyników dla białka PXS.

Przeprowadzone obserwacje okazały się najowocniejsze w przypadku analizy dla białka PXX, którego lokalizacja dość jednoznacznie wskazuje na błonę komórkową. W przypadku białek PXC oraz SlaA analiza wskazała na ich przypuszczalną lokalizację w obrębie struktur pęcherzykowych.

Ponieważ protoplasty są pozbawione ściany komórkowej, a co się z tym wiąże mają utracony naturalny kształt komórki, uzyskiwany obraz był często trudny w interpretacji. Z tego powodu zdecydowano o kontynuacji analizy z wykorzystaniem komórek epidermy *Nicotiana tabacum*.

5.3.3 Analiza lokalizacji subkomórkowej białek w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum*

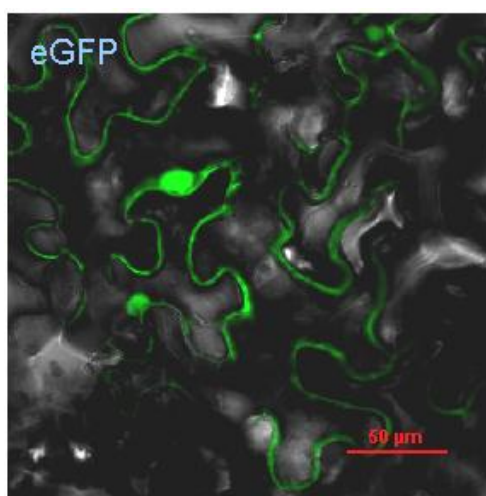
W celu przeprowadzenia analizy lokalizacji subkomórkowej białek w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum*, w pierwszej kolejności przeprowadzono transformację bakterii *Agrobacterium tumefaciens* (rozdział 4.3.3) następującymi konstrukcjami genetycznymi:

- | | |
|-----------------------------|---------------------------------|
| • pSITE-2NB_PXS (PXS::eGFP) | • pSITE-2NB_SlaA (SlaA::eGFP) |
| • pSITE-2NB_PXC (PXC::eGFP) | • pSITE-2NB_PRAF4 (PRAF4::eGFP) |
| • pSITE-2CA_PXX (eGFP:PXX) | • pSITE-2CA_PRAF4 (eGFP::PRAF4) |

„Pełnymi” bakteriami *Agrobacterium tumefaciens* transformowano liście 3-tygodniowego tytoniu *Nicotiana tabacum* (rozdział 4.2.5), które po 2 dniach od transformacji poddawano obserwacjom mikroskopowym (rozdział 4.6.1). Dla każdego z analizowanych białek dokonywano przynajmniej 3 powtórzeń transformacji komórek tytoniu. W pracy, dla każdego białka, zaprezentowano obrazy 3 komórek epidermy, które najlepiej odzwierciedlały ich wygląd.

5.3.3.1 Analiza lokalizacji subkomórkowej białek w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum* - kontrola pozytywna

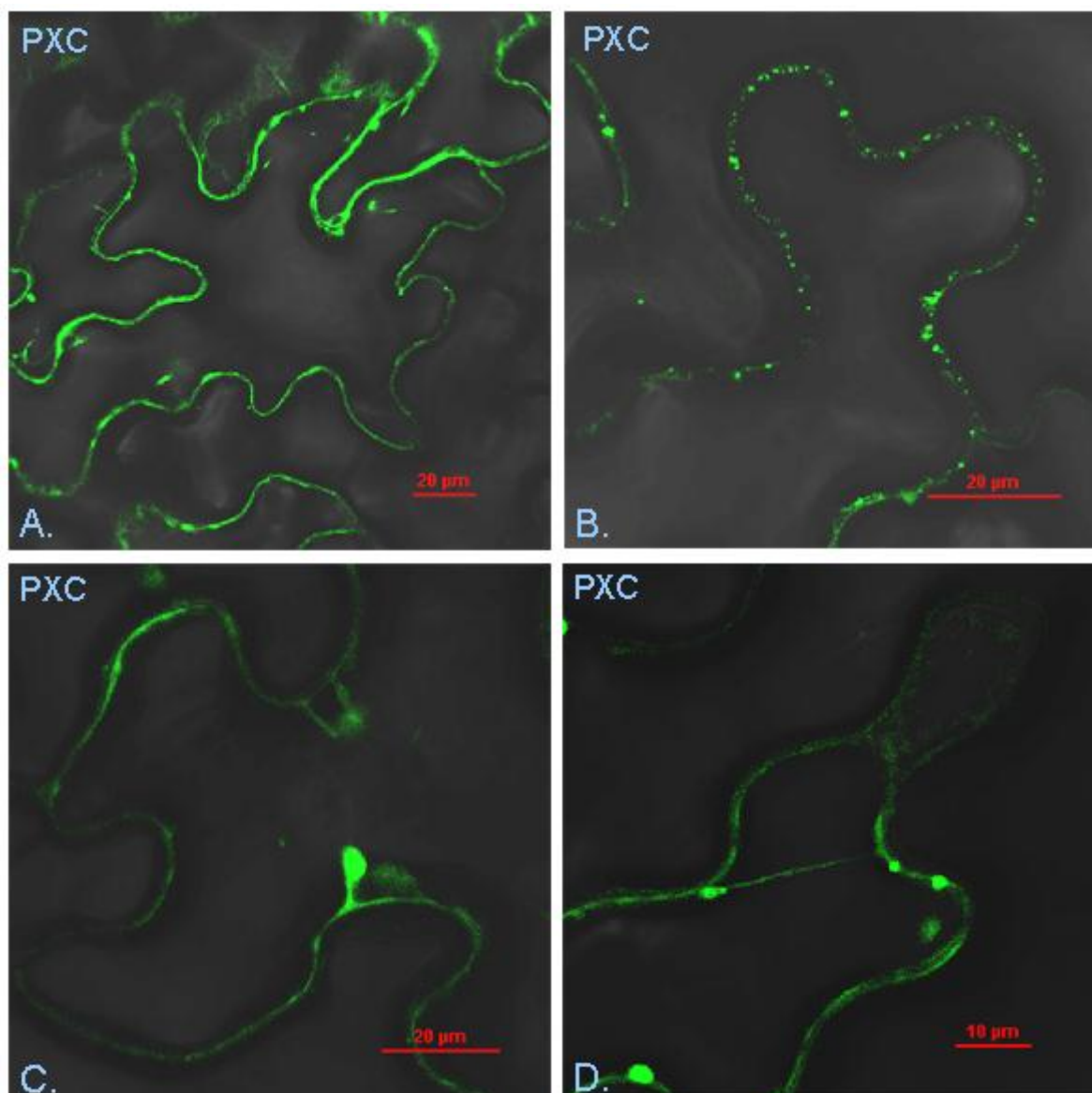
Właściwą analizę lokalizacji subkomórkowej białek w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum*, poprzedzono eksperymentem kontrolnym, obejmującym nadekspresję niezwiązanego białka fluorescencyjnego - eGFP w tych komórkach. W tym celu do liści tytoniu wprowadzono za pośrednictwem bakterii *A. tumefaciens* pusty wektor pSITE-2CA. Uzyskane obrazy wskazywały na rozkład sygnału fluorescencyjnego w obrębie cytoplazmy oraz jądra komórkowego, co jest zgodne z dotychczas opisywaną lokalizacją tego białka (Hanson i Köhler 2001). Przykładowy obraz przedstawiony poniżej (Ryc.5.36).



Ryc.5.36 Analiza lokalizacji subkomórkowej niezwiązanego białka eGFP w liściach *N. tabacum*, transformowanych pustym wektorem pSITE-2CA. Sygnał fluorescencyjny wskazuje na lokalizację cytoplazmatyczną oraz w jądrze komórkowym. Nikon A1R-Si. Skala: 50μm.

5.3.3.2 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXC w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum*

Podczas analizy lokalizacji subkomórkowej białka PXC::eGFP w komórkach *N. tabacum*, obserwowano sygnał w obrębie średnich i drobnych pęcherzyków (Ryc.5.37 B, C, D). Zlokalizowane one były w bliskiej odległości od błony komórkowej. Filmy (film 5.1, 5.2) ukazują, że pęcherzyki te poruszały się wzdłuż błony, niekiedy przesuając się w głąb komórki. Kilka z obserwowanych pęcherzyków po odłączeniu od błony komórkowej, z powrotem do niej wróciło. Wyniki te w dużej mierze pokrywają się z wynikami uzyskanymi podczas obserwacji lokalizacji tego białka w protoplastach, z tą różnicą, że obraz komórek tytoniu pozwolił na dokładniejsze określenie lokalizacji obserwowanych pęcherzyków.

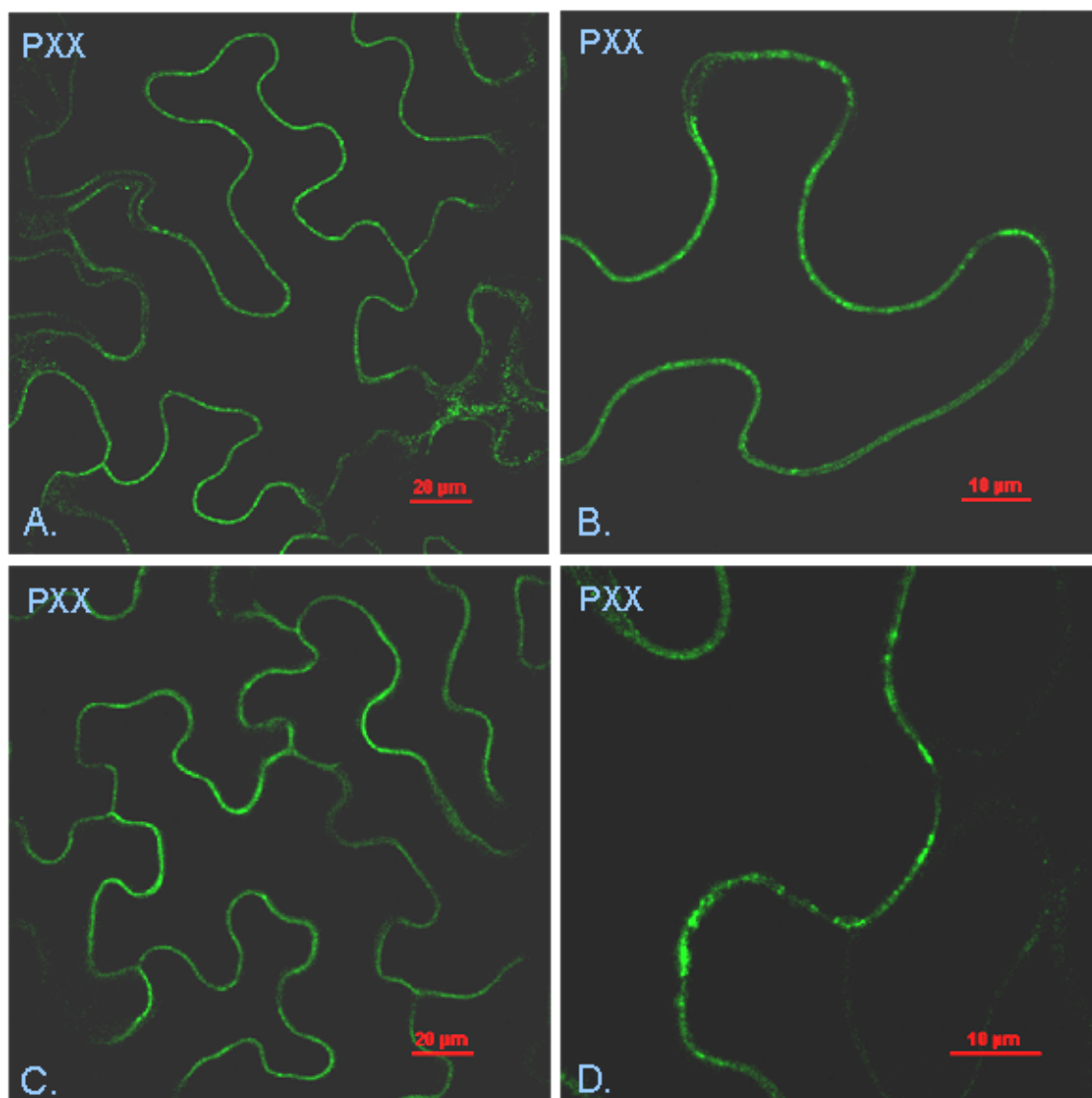


Ryc.5.37 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXC::eGFP w liściach *N. tabacum*; A: obraz całej komórki, sygnał fluorescencyjny w okolicy błonowej, również w postaci pęcherzyków, B: fragment komórki, sygnał fluorescencyjny głównie w postaci drobnych pęcherzyków w okolicy błony komórkowej, C,D: fragment komórki, sygnał fluorescencyjny w postaci średniej wielkości pęcherzyków w okolicy błony komórkowej. A,B,C,D: złożenie dwóch obrazów: uzyskanego w świetle przechodzącym oraz z użyciem kanału fluorescencyjnego. Nikon A1R-Si. Skala: 10μm, 20μm.

5.3.3.3 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PXX w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum*

Podczas analizy lokalizacji subkomórkowej białka eGFP::PXX w komórkach *N. tabacum*, obserwowano sygnał pochodzący z błony komórkowej (Ryc.5.38 A, B, C, D). W niektórych miejscach sygnał widoczny był w postaci drobnych ziarnistości (Ryc.5.38 B, D).

Analiza ta pokrywa się z danymi uzyskanymi z obserwacji w protoplastach.



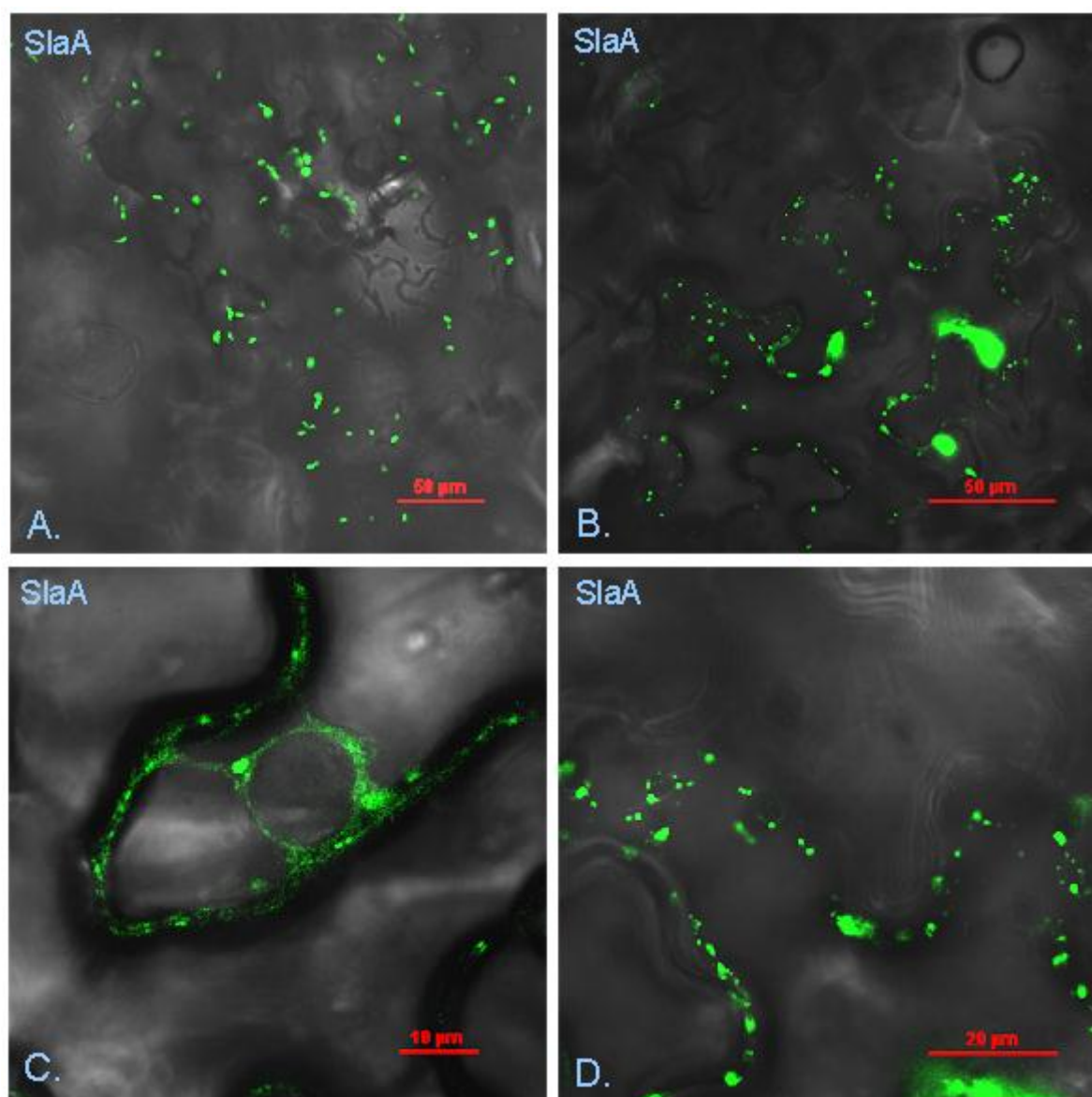
Ryc.5.38 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka eGFP::PXX w liściach *N. tabacum*; A,C: obraz całej komórki, sygnał fluorescencyjny w błonie komórkowej, B,D: fragmenty komórki, sygnał fluorescencyjny w błonie komórkowej oraz w postaci drobnych ziarnistości. A,B,C,D: złożenie dwóch obrazów: uzyskanego w świetle przechodzącym oraz z użyciem kanału fluorescencyjnego. Nikon A1R-Si. Skala: 10µm, 20µm.

5.3.3.4 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka SlaA w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum*

Podczas analizy lokalizacji subkomórkowej białka SlaA::eGFP w komórkach *N. tabacum*, obserwowano sygnał fluorescencyjny głównie w obrębie dwóch rodzajów pęcherzyków. Pierwsze z nich – drobne pęcherzyki, były widoczne w bezpośredniej okolicy błony komórkowej (Ryc.5.39 C, D). Film nr 5.3 ukazuje ich ruch, głównie wzdłuż błony

komórkowej. Druga populacja pęcherzyków była większa oraz nie wykazywała ruchu. Obserwowano ją również w okolicy błony komórkowej, jednak nie w jej bezpośrednim sąsiedztwie (Ryc.5.39 A, B). Co ciekawe na jednym z obrazów (Ryc.5.39 C), sygnał fluorescencyjny widoczny jest wokół jądra komórkowego, co może sugerować lokalizację w strukturach retikulum endoplazmatycznego. Niekiedy, widoczne były agregaty białka fluorescencyjnego (Ryc.5.39 B), co może wskazywać na zaburzony proces jego fałdowania lub transportu do przedziałów docelowych.

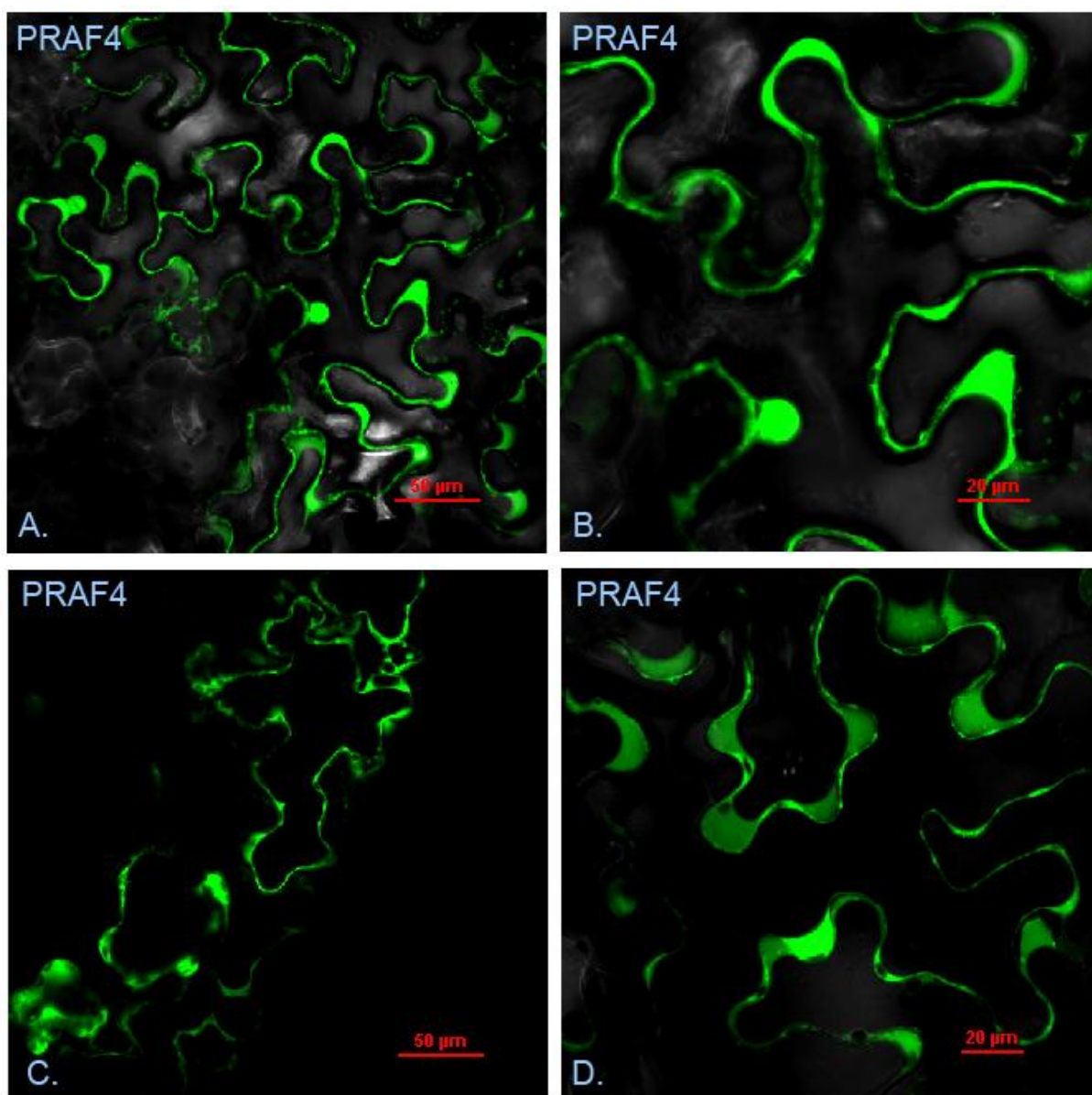
Uzyskane wyniki powtarzają się w większości z wynikami uzyskanymi podczas obserwacji protoplastów.



Ryc.5.39 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka SlaA::eGFP w liściach *N. tabacum*; A,B: obraz całej komórki, sygnał fluorescencyjny w pęcherzykach, C,D: fragmenty komórki, sygnał fluorescencyjny w pęcherzykach w okolicy błony komórkowej. A,B,C,D: złożenie dwóch obrazów: uzyskanego w świetle przechodzącym oraz z użyciem kanału fluorescencyjnego. Nikon A1R-Si. Skala: 10µm, 20µm, 50µm.

5.3.3.5 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PRAF4 w orientacji eGFP::PRAF4 w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum*

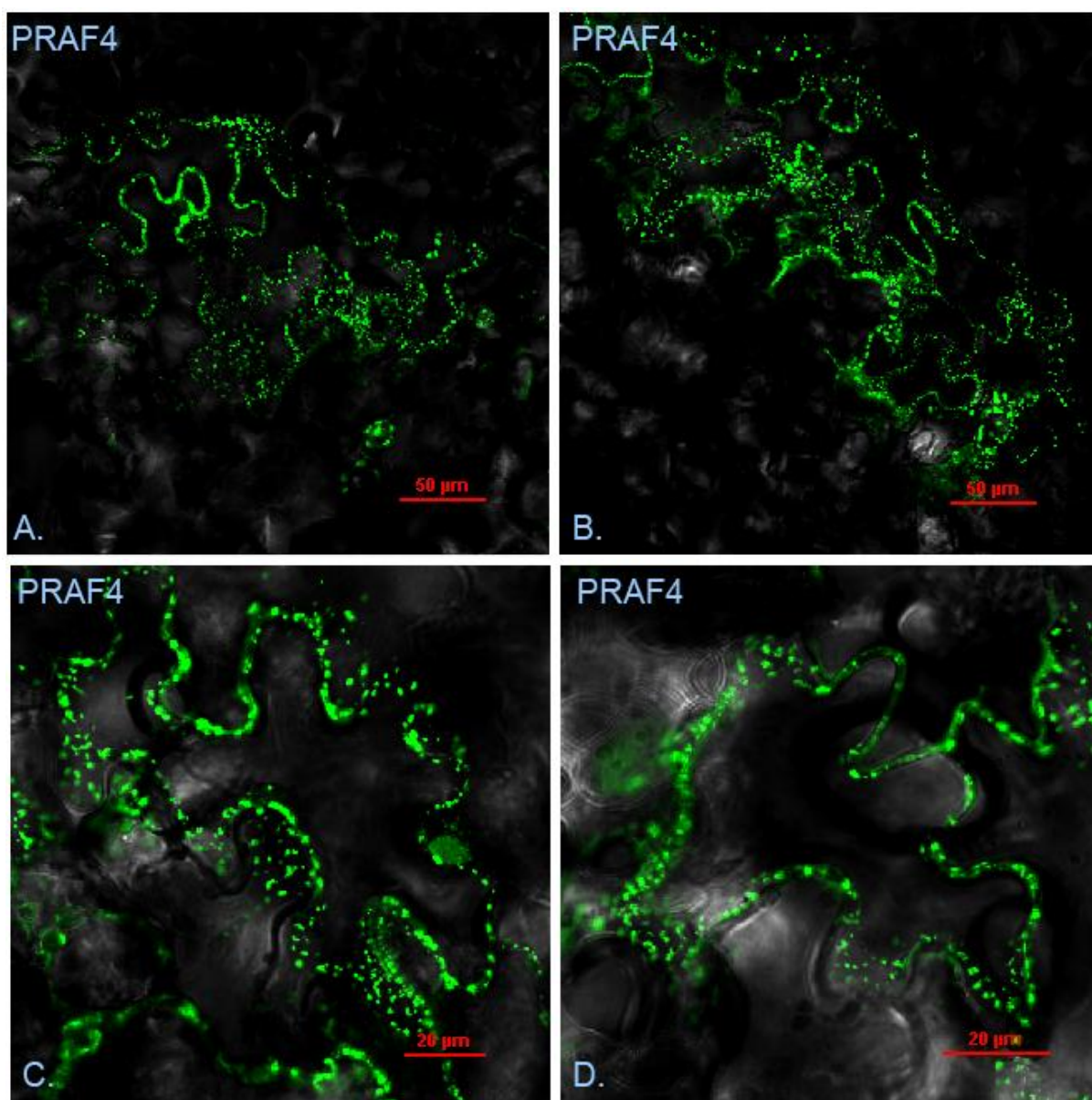
Obrazy uzyskane w trakcie obserwacji lokalizacji subkomórkowej białka eGFP::PRAF4 w liściach *N. tabacum* (Ryc.5.40), wskazują na rozkład sygnału fluorescencyjnego w obrębie cytoplazmy oraz jądra komórkowego. Wynik taki jest porównywalny z obrazem fluorescencji niezwiązanego białka eGFP (rozdział 5.3.3.1). Wskazuje to na prawdopodobne odcięcie białka fluorescencyjnego podczas obróbki kompleksu.



Ryc.5.40 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka eGFP::PRAF4 w liściach *N. tabacum*; A,B: sygnał fluorescencyjny w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym, B - powiększenie obrazu A; C,D: sygnał fluorescencyjny w cytoplazmie. A,B,C,D: złożenie dwóch obrazów: uzyskanego w świetle przechodzącym oraz z użyciem kanału fluorescencyjnego. Nikon A1R-Si. Skala: 20μm, 50μm.

5.3.3.6 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PRAF4 w orientacji PRAF4::eGFP w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum*

Podczas analizy lokalizacji subkomórkowej białka PRAF4::eGFP w komórkach *N. tabacum*, obserwowano sygnał fluorescencyjny w równomiernie rozmieszczonych, bardzo licznych, głównie zlokalizowanych w bliskiej okolicy błony komórkowej pęcherzykach. Struktury te nie wykazywały ruchu.



Ryc. 5.41 Analiza lokalizacji subkomórkowej białka PRAF4::eGFP w liściach *N. tabacum*; A,B,C,D: sygnał fluorescencyjny obserwowany w licznych, głównie przybłonowych pęcherzykach; A,B,C,D: złożenie dwóch obrazów: uzyskanego w świetle przechodzącym oraz z użyciem kanału fluorescencyjnego. Nikon A1R-Si. Skala: 20µm, 50µm.

5.3.3.7 Podsumowanie analizy lokalizacji subkomórkowej białek w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum*

Analiza lokalizacji subkomórkowej białek w komórkach epidermy tytoniu, pozwoliła na uzyskanie wyników dla następujących białek: PXC, PXX, SlaA oraz PRAF4. Mimo wielu powtórzeń analizy, nie udało się uzyskać wyników dla białka PXS, tak samo jak w przypadku obserwacji protoplastów.

W większości przypadków uzyskane wyniki pokryły się z tymi uzyskanymi podczas obserwacji protoplastów. Dla białek PXC, SlaA oraz PRAF4 lokalizacja wskazywała struktury pęcherzykowe, głównie w okolicy przybłonowej. Niekiedy obserwowano również pęcherzyki znajdujące się w dalszej odległości od błony i większe (w przypadku białka SlaA lub PXC). Lokalizacja białka PXX wskazywała jednoznacznie na błonę komórkową.

5.3.4 Porównanie lokalizacji subkomórkowej wybranych białek z przedziałami wybarwionymi przez barwnik FM4-64

Ze względu na uzyskanie w poprzednich obserwacjach wyników wskazujących na przypuszczalną lokalizację analizowanych białek w systemie błon wewnętrznych, zdecydowano o podjęciu próby kolokalizacji tych białek z barwnikiem FM4-64.

Barwnik FM4-64 internalizowany przez komórkę, najpierw wybarwia błonę komórkową, następnie pojawia się w obrębie różnych populacji endosomów (po okresie 30-60 minutach), aż dociera do endosomów późnych (po ok. 3 godzinach). W ostateczności wyznakowana jest także błona wakuoli – tonoplast (po 3 do 10 godzinach). FM4-64 nie znakuje błon retikulum endoplazmatycznego ani struktur aparatu Golgiego (Šamaj i wsp. 2006).

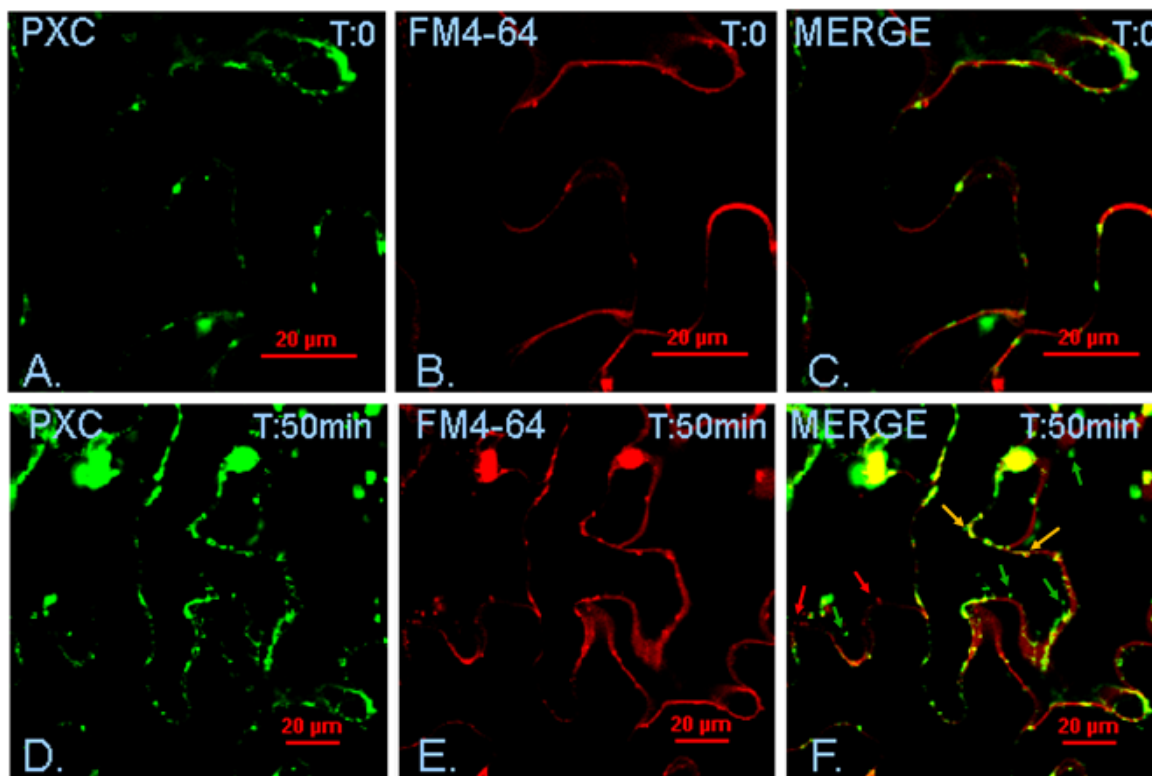
Do analizy wybrano dwa białka o odmiennej lokalizacji: białko PXC, którego analiza wskazała na lokalizację pęcherzykową (rozdział 5.3.3.2) oraz białko PXX, które obserwowano w błonie komórkowej (rozdział 5.3.3.3).

W celu przeprowadzenia analizy w pierwszej kolejności bakterie *Agrobacterium tumefaciens* transformowano konstrukcjami genetycznymi pSITE - 2NB_PXC oraz pSITE – 2CA_PXX (rozdział 4.3.3). Następnie „pełnymi” bakteriami *Agrobacterium tumefaciens* transformowano liście 3-tygodniowego tytoniu *Nicotiana tabacum* (rozdział 4.2.5). Bezpośrednio przed obserwacjami mikroskopowymi, stransformowane wcześniej liście tytoniu, inkubowano z barwnikiem w celu jego wprowadzenia do komórek (rozdział 4.6.2).

Tak przygotowane liście obserwowano, przy pomocy mikroskopu konfokalnego, w odstępach czasowych co 10 minut, dostrzegalne różnice były jednak widoczne dopiero po upływie 50 minut. Dla każdego z białek wykonywano przynajmniej 3 powtórzenia natomiast w pracy zaprezentowano po 1 typowym obrazie komórek dla czasu T:0 oraz T:50 min.

5.3.4.1 Analiza kolokalizacji subkomórkowej białka PXC w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum* z barwnikiem FM4-64

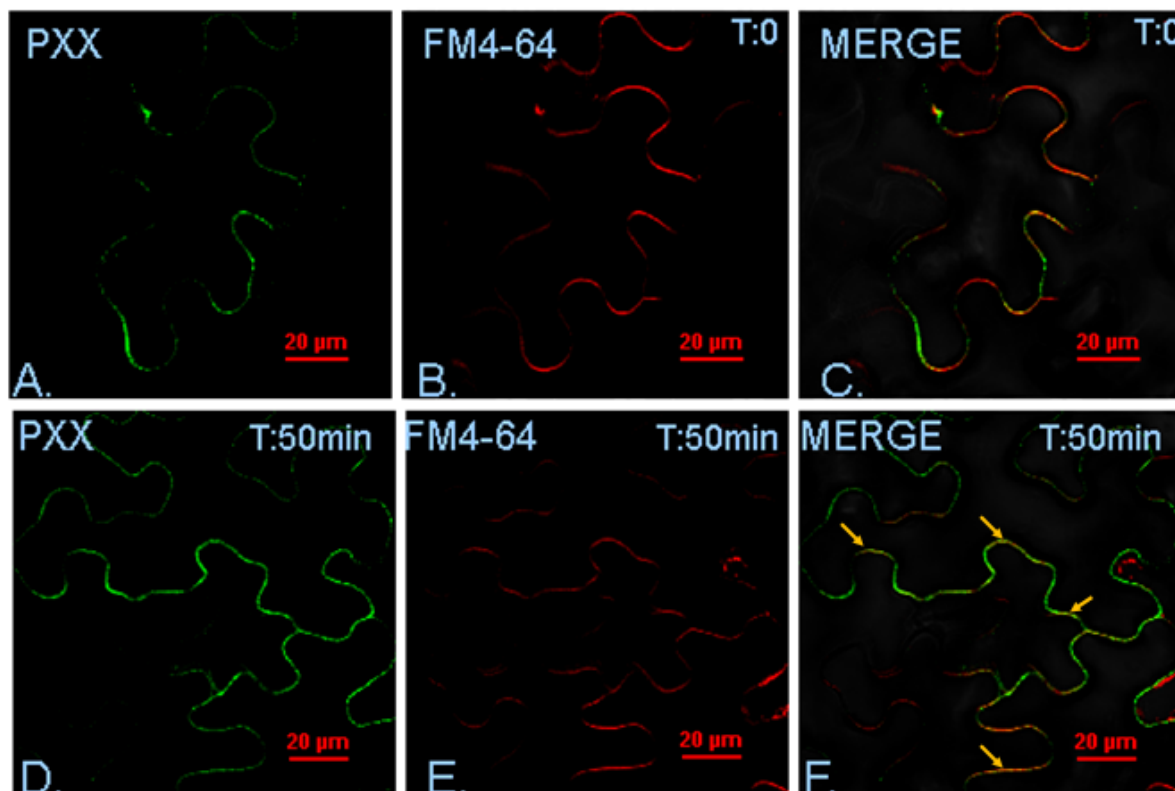
Analiza kolokalizacji subkomórkowej białka PXC z barwnikiem FM4-64 wskazywała, odmienną lokalizację dla barwnika FM4-64 (lokalizacja błonowa) i dla białka PXC (lokalizacja przybłonowa, pęcherzykowa). Po czasie 50 minut, nadal obserwowano błonową lokalizację barwnika, ale również w postaci małych przybłonowych pęcherzyków (Ryc.5.42 F, strzałki czerwone). Lokalizacja taka tylko miejscami pokrywała się z lokalizacją pęcherzykową białka PXC (Ryc.5.42 F, strzałki żółte), ponieważ większość wyznakowanych przez to białko pęcherzyków (Ryc.5.42 F, strzałki zielone), nie pokrywała się z tymi wybarwionymi odczynnikiem FM4-64. Co ciekawe kolokalizacja obserwowana była również w strukturach, które mogły wskazywać na otoczkę jądra komórkowego.



Ryc.5.42 Analiza kolokalizacji białka PXC::eGFP z barwnikiem FM4-64 w liściach *N. tabacum*; A,D: lokalizacja białka PXC; B,E: lokalizacja barwnika FM4-64; C: obraz złożony z A i B, F: obraz złożony z D i E. Nikon A1R-Si. Skala: 20μm.

5.3.4.2 Analiza kolokalizacji subkomórkowej białka PXX w komórkach epidermy *Nicotiana tabacum* z barwnikiem FM4-64

Analiza kolokalizacji subkomórkowej białka PXX z barwnikiem FM4-64 w komórkach epidermy *N. tabacum*, wskazywała na podobną, częściowo pokrywającą się lokalizację błonową dla białka PXX oraz barwnika. Po czasie 50 minut, lokalizacja nadal w większości się pokrywała (Ryc.5.43 F, strzałki żółte).



Ryc. 5.43 Analiza kolokalizacji białka eGFP::PXX z barwnikiem FM4-64 w liściach *N. tabacum*; A,D: lokalizacja białka PXX; B,E: lokalizacja barwnika FM4-64; C: obraz złożony z A i B, F: obraz złożony z D i E. Nikon A1R-Si. Skala: 20µm.

5.3.4.3 Podsumowanie analizy kolokalizacji subkomórkowej wybranych białek z barwnikiem FM4-64

Wykonano analizę kolokalizacji subkomórkowej barwnika FM4-64 z białkami: PXC oraz PXX. W przypadku białka PXC kolokalizacja była prawie niezauważalna, bowiem lokalizacja większości pęcherzyków - wyznakowanych białkiem fluorescencyjnym oraz tych wybarwionych odczynnikiem FM4-64, nie pokrywała się. W przypadku białka PXX, obserwowano kolokalizację z barwnikiem w błonie komórkowej.

6. Dyskusja

U wszystkich eukariontów system błon wewnętrznych odgrywa w komórce kluczową rolę zarówno w syntezie jak też sortowaniu, transporcie i degradacji jej cząsteczek. Wiedza na temat białek odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie systemu błon w komórce roślinnej jest wciąż daleka od satysfakcjonującej. Dlatego celem nadrzędnym niniejszej pracy było zidentyfikowanie oraz możliwie najpełniejsze poznanie funkcji kilku, dotąd w ogóle nie badanych białek roślinnych, potencjalnie zaangażowanych w organizację systemu błon w komórce, w tym m.in. w transport pęcherzykowy.

Niezwykle przydatną metodą, pomocną nie tylko przy wyborze cząsteczek do analiz, ale również przy odpowiednim doborze technik badawczych są obecnie analizy bioinformatyczne. Stanowią one narzędzie coraz powszechniej wykorzystywane oraz umożliwiające coraz szerszy wachlarz analiz, które pozwalają precyzyjnie zaprojektować badania laboratoryjne i w rezultacie skrócić ich czas.

Analiza bioinformatyczna posłużyła w pracy do wyselekcjonowania białek potencjalnie zaangażowanych w przepływie błon w komórce roślinnej. Przy ich wyborze, za punkt wyjścia uznano obecność w strukturze białek domen potencjalnie oddziałujących z fosfatydyloinozytolami błon biologicznych. W tym celu wykorzystano narzędzie SMART, które ujawniło białka *Arabidopsis thaliana* zawierające takie domeny, jak: PX, PH, FYVE, czy ENTH. Biorąc pod uwagę obecność również innych konserwatywnych motywów strukturalnych potencjalnie odpowiedzialnych za oddziaływanie z cytoszkieletem lub innymi białkami, ostatecznie wyselekcjonowano do badań pięć dotąd nie charakteryzowanych białek, którym przyporządkowano następujące skróty: PXS (At4g32160), PXC (At3g15920), PXX (At1g15240), SlaA (At4g02650), PRAF4 (At1g76950) (rozdział 5.1.1). Brak do tej pory jakichkolwiek danych eksperymentalnych dotyczących tych białek. Dysponujemy jedynie kilkoma publikacjami na temat rodziny białek PRAF (Jensen i wsp. 2001; Begona i Drøbak 2002; Wywiał i Singh 2009).

Hipotetyczna funkcja wybranych do analiz białek wskazywała na ich potencjalny udział w przepływie błon m.in. za pośrednictwem oddziaływań domena – fosfatydyloinozytol (rozdział 5.1.1). Analiza sekwencji tych domen wskazała obecność pewnych konserwatywnych elementów odpowiedzialnych za wiązanie fosfatydyloinozytoli (rozdział 5.1.2). Należy jednak zwrócić uwagę, że oparta na analizach bioinformatycznych ocena

zdolności domen do wiązania lipidów, jest prognozowana i zawsze wymaga potwierdzenia eksperymentalnego.

6.1 Powinowactwo domen do fosfatydyloinozytoli

Wiedza o fosfatydyloinozytolach rozwija się obecnie w szybkim tempie. Jest to m.in. spowodowane ich stosunkowo późnym odkryciem. W przypadku roślin, dopiero w połowie lat 80 po raz pierwszy stwierdzono, że istnieją różne ich formy, zależne od stopnia ufosforylowania pierścienia inozytolowego, jak również zaproponowano ich udział w procesach sygnalizacyjnych (Boss i Massel 1985; Dröbak i Ferguson 1985; Irvine i wsp. 1989). Z tego powodu, fosfatydyloinozytole oraz białka efektorowe, które się z nimi wiążą, stanowią obecnie jeden z ważniejszych punktów zainteresowań biologów komórki. Dużym utrudnieniem eksperymentalnym poza lokalizacją błonową, jest dynamiczny charakter tych lipidów, które podlegając ciągłym procesom fosforylacji i defosforylacji mogą występować w 7 różnych izoformach w komórce (Simonsen i wsp. 2001).

W celu określenia zdolności domen białkowych do wiązania fosfatydyloinozytoli błon stosuje się różnorodne metody biochemiczne. W ostatnich latach pojawiły się możliwości takich obserwacji *in vivo*. Między innymi ośrodek SILS w Amsterdamie jest w trakcie opracowywania biosensorów tych lipidów w postaci znanych już domen wybranych białek, wykazujących duży stopień specyficzności w wiązaniu określonych fosfatydyloinozytoli. Do tej pory przeprowadzono taką analizę, wykorzystując fuzję z białkiem fluorescencyjnym YFP m.in. dla domen: 2xFYVE_{HRS}, YFP-PH_{FAPP1}, PH_{PLC1}, jednakże uzyskiwane wyniki są często niejednoznaczne (Vermeer i wsp. 2006; van Leeuwen i wsp. 2007; Vermeer i wsp. 2009).

Metoda Fat blot jest analizą pozwalającą na zbadanie wiązania fosfatydyloinozytoli przez domeny białkowe w warunkach *in vitro*. Co wygodne, technika ta umożliwia ocenę powinowactwa określonej domeny do fosfatydyloinozytoli w jednej analizie oraz dobór użytych do analizy lipidów, jak i ich stężeń, w zależności od potrzeb (opis procedury w rozdziale 4.5.5). Minusem tej metody jest sztuczne środowisko, w jakim następuje oddziaływanie, które jest dalekie od warunków obecnych w komórce. Z tego też powodu analiza ta wymaga wcześniejszego opracowania warunków buforowych, temperaturowych i innych w celu ich zoptymalizowania.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki analizy Fat blot (rozdział 5.2), wskazują, że metoda ta jest skuteczną techniką pozwalającą na wizualizację oddziaływań białko-lipid. W pracy

udowodniono, że wszystkie poddane analizom domeny: PX_{PXS} , PX_{PXC} , PX_{PXX} , $ENTH_{SlA}$, $FYVE_{PRAF4}$, PH_{PRAF4} , $FYVE_{PRAF1}$ wiążą fosfatydyloinozytyle. Można więc przypuszczać, że mają również zdolność oddziaływania z błonami komórek roślinnych. Domeny wykazały największą specyficzność wiązania zwykle jednego z użytych fosfatydyloinozytoli i mniejszą, kilku dodatkowych. Większość z domen wykazała dominujące powinowactwo do fosfatydyloinozytoli $PtdIns(4)P$, który w komórkach zwierzęcych występuje w przedziałach błonowych aparatu Golgiego oraz TGN (Di Paolo i De Camilli 2006). U roślin $PtdIns(4)P$ najczęściej wykrywa się w błonie komórkowej oraz w strukturach aparatu Golgiego (Vermeer i wsp. 2009). Taką specyficzność wiązania tego lipidu wykazały domeny: $ENTH_{SlA}$, $FYVE_{PRAF4}$, PH_{PRAF4} , $FYVE_{PRAF1}$. Fosfatydyloinozytol $PtdIns(4)P$ jest substratem do wygenerowania $PtdIns(4,5)P_2$, do którego, według dostępnych danych literaturowych, największe powinowactwo wykazują domeny PH oraz ENTH (Harlan i wsp. 1994; Itoh i wsp. 2001). W związku z tym wynik wiązania przez domeny $ENTH_{SlA}$ oraz PH_{PRAF4} fosfatydyloinozytoli $PtdIns(4)P$, nie odbiega znacząco od spodziewanego. Brak powinowactwa do fosfatydyloinozytoli $PtdIns(4,5)P_2$ był również wcześniej przewidywany z analizy bioinformatycznej tych domen, na podstawie której stwierdzono brak niektórych aminokwasów odpowiedzialnych za wiązanie tego fosfatydyloinozytoli (rozdział 5.1.2.2, 5.1.2.3). Wiązanie fosfatydyloinozytoli $PtdIns(4)P$ przez domeny FYVE zarówno w przypadku białka PRAF4 jak też PRAF1 jest jednak zaskakujące. Głównie ze względu na szeroko dotychczas udokumentowaną specyficzność wiązania lipidu $PtdIns(3)P$ przez domenę FYVE, co również potwierdza eksperyment kontrolny (rozdział 5.2.3.1) (Gaullier i wsp. 1998; Misra i Hurley 1999; Kutateladze i wsp. 1999; Gaullier i wsp. 2000; Stenmark i wsp. 2002; Stahelin i wsp. 2002; Kutateladze 2006; Kutateladze 2007). Otrzymany w pracy wynik dla domeny $FYVE_{PRAF1}$ jest również odmienny od tego uzyskanego w 2001 roku w laboratorium Karen Skriver, gdzie wykazano największe powinowactwo tej domeny do $PtdIns(3)P$ (Jensen i wsp. 2001). Należy jednak zwrócić uwagę, że w analizie wykonanej przez dr Karen Skriver nie użyto $PtdIns(4)P$, co więcej sprawdzono powinowactwo domeny FYVE jedynie w stosunku do fosfatydyloinozytoli: $PtdIns(3)P$, $PtdIns(3,4)P_2$ oraz $PtdIns(3,4,5)P_3$. Wiadomo jednak, że z tych trzech użytych fosfatydyloinozytoli, u roślin występują tylko dwa, ponieważ $PtdIns(3,4,5)P_3$ nie został do tej pory zidentyfikowany w ich komórkach (Žárský i Potocký 2009).

Uzyskany w niniejszej pracy wynik wiązania przez domeny $FYVE_{PRAF4}$ oraz $FYVE_{PRAF1}$ fosfatydyloinozytoli $PtdIns(4)P$, sugeruje, że mogą one stanowić „wariant” domeny FYVE. Przesłanki takie pojawiły się już podczas analizy ich sekwencji, gdzie zaobserwowano brak

kilku aminokwasów, kluczowych dla wiązania PtdIns(3)P (rozdział 5.1.2.4). Wynik taki sugeruje, że poza „typowymi” domenami FYVE, które wiążą specyficznie PtdIns(3)P, występują również ich „warianty”, o innej swoistości wiązania fosfatydyloinozytoli, co może wynikać z ich sekwencji aminokwasowej.

Co ciekawe domenę PH_{PRAF4} wiązała z dużym powinowactwem fosfatydyloinozytol PtdIns(3,5)P₂. Jest to pierwsze udokumentowane oddziaływanie domeny białka roślinnego z tym fosfatydyloinozytolem.

W przypadku białek PXS oraz PXC domena PX wykazała z kolei największą specyficzność wiązania do PtdIns(3)P, którego lokalizację przypisuje się błonie endosomów zarówno u roślin jak i zwierząt (Di paolo i De Camilli 2006; Vermeer i wsp. 2006). Lokalizacja taka potwierdziłaby częściowo hipotezę uczestniczenia tych białek w procesie transportu pęcherzykowego (rozdział 5.1.1.1.1, 5.1.1.1.2). Wyniki te są zgodne z dotychczas najczęściej odnotowywaną specyficznością wiązania fosfatydyloinozytoli przez domenę PX (Bravo i wsp. 2001; Xu i wsp. 2001; Kanai i wsp. 2001; Kutateladze 2007). Potwierdziły one również przewidywania bioinformatyczne, gdzie stwierdzono obecność wszystkich aminokwasów zachowanych, odpowiedzialnych za wiązanie PtdIns(3)P w obu domenach PX_{PXS} oraz PX_{PXC} (rozdział 5.1.2.1). W przypadku domeny PX_{PXX} podczas analizy Fat blot, wykazano z kolei brak dominującego powinowactwa w wiązaniu określonego fosfatydyloinozytolu (rozdział 5.2.3.4). Potwierdziło to częściowo przewidywania bioinformatyczne gdzie stwierdzono brak kilku aminokwasów odpowiedzialnych za wiązanie charakterystycznego dla domen PX fosfatydyloinozytolu PtdIns(3)P (rozdział 5.1.2.1).

6.2 Lokalizacja subkomórkowa białek oraz jej analiza w kontekście oddziaływań z fosfatydyloinozytolami

Chcąc zbadać lokalizację subkomórkową wybranych białek, zdecydowano się wykorzystać dwa układy modelowe. Początkowych obserwacji dokonano w układzie homologicznym, używając protoplastów *Arabidopsis thaliana*. Ponieważ jednak brak ściany komórkowej powodował zmianę naturalnego kształtu komórki, a przez to trudności podczas interpretacji uzyskiwanych obrazów, zdecydowano o zastosowaniu do dalszych badań komórek epidermy liści tytoniu. Z kolei w trakcie przygotowywania konstrukcji do transformacji, w przypadku obecności domeny wiążącej fosfatydyloinozytol po jednej ze stron białka, stosowano fuzję z białkiem fluorescencyjnym po stronie przeciwległej.

Poprawność wyboru orientacji białka eGFP w stosunku do badanych białek oraz doboru układu doświadczalnego potwierdziły uzyskane wyniki.

Wyniki wskazują, że większość analizowanych białek (białka PXC, SlaA, PRAF4) jest zlokalizowanych w strukturach pęcherzykowych (rozdziały 5.3.2.2, 5.3.2.4, 5.3.3.2, 5.3.3.4, 5.3.3.6). W większości znajdowały się one w bezpośrednim sąsiedztwie błony komórkowej, często poruszając się wzdłuż tej błony. Niektóre filmy pozwoliły zaobserwować, że poszczególne pęcherzyki odrywały się od błony w głąb komórki. Trudno jednoznacznie określić, do jakiej populacji pęcherzyków należy przyporządkować obserwowane struktury. Biorąc jednak pod uwagę domeny, jakie niosą analizowane białka, ich oddziaływania z fosfatydyloinozitolami oraz ich występowanie w okolicy błony komórkowej, można przypuszczać, że uczestniczą one w szlakach retrogradowych. Wiadomo, że składowe systemu błon, które uczestniczą w szlakach retrogradowych, przechodząc przez zestaw różnych przedziałów endosomów, sortują pobrane cząsteczki, niekiedy kierując je z powrotem do błony na drodze recyklicacji. Niejednokrotnie zaobserwowano również dużą płynność przechodzenia endosomów wczesnych w struktury tubularne, które tworzą endosomy recyklingowe (Geldner 2004). Można więc przypuszczać, że obserwowane pęcherzyki należały do jednych z wymienionych struktur.

W przypadku białka **PXC**, na korzyść hipotezy dotyczącej obserwacji endosomów recyklingowych, świadczy jeden z filmów (film 5.1), na którym obserwowano ruch drobnych pęcherzyków, które po oderwaniu od błony komórkowej, z powrotem do niej wracały. Jest również możliwe, że były to endosomy wczesne. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w wyniku analizy Fat blot, gdzie domena PX białka PXC wiązała PtdIns(3)P, który jest fosfatydyloinozytolem obecnym na błonie endosomów (rozdział 5.2.3.3) (Vermeer i wsp. 2006). Ruch obserwowanych struktur zwraca także uwagę na rolę motywu superhelisy w białku PXC. Można bowiem przypuszczać, że podczas gdy domena PX odpowiada za wiązanie z błoną, drugi element funkcjonalny w białku – motyw superhelisy, odpowiada za jego ruch wzdłuż filamentów aktynowych.

Podobne pęcherzyki jak w przypadku białka PXC, obserwowano podczas analizy białka **SlaA**. Drobne pęcherzyki poruszały się wzdłuż błony komórkowej (film 5.3). Można więc również w tym przypadku przypuszczać, że były to struktury odpowiadające endosomom wczesnym lub recyklingowym. Wiadomo, że drożdżowe białko Sla2, do którego badane białko SlaA wykazuje podobieństwo strukturalne, uczestniczy w I etapie formowania pęcherzyka endocytotycznego w błonie komórkowej (Robertson i wsp. 2009). Można więc przypuszczać, że i u roślin białka te pełnią podobną rolę w procesie endocytozy. Domena

ENTH drożdżowego białka Sla2 wiąże specyficznie fosfatydyloinozytol $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ w błonie komórkowej. Domena ENTH białka SlaA wykazała jednak dominujące powinowactwo do $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ (rozdział 5.2.3.5). Być może wskazuje to na nieco odmienną rolę tego białka, np. w dalszych etapach formowania pęcherzyka endocytotycznego. Wiadomo bowiem, że w przypadku komórek drożdżowych, po odcięciu pęcherzyka od błony komórkowej, dochodzi do defosforylacji fosfatydyloinozytolu $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ do $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ na błonie endosomu (Robertson i wsp. 2009). Lokalizacja $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ nie jest jednak jeszcze dokładnie udokumentowana u roślin, a dotychczasowe rezultaty badań potwierdzają jego obecność jedynie w błonie komórkowej oraz diktiosomach aparatu Golgiego (Vermeer i wsp. 2009). Należy również zwrócić uwagę na obserwowany ruch białka SlaA. W przypadku drożdżowego białka Sla2 ruch odbywa się wzdłuż filamentów aktynowych, przy czym swój udział zaznacza domena ILWEQ, uczestnicząca w polimeryzacji tych filamentów (McCann i Craig 1997). Istnieje więc przypuszczenie, że analogiczną funkcję pełni motyw superhelisy białka SlaA, a w związku z tym uczestniczy w ruchu tego białka. Potwierdzenie takiej hipotezy dostarczyłoby istotnej wiedzy na temat ciągle słabo poznanego motywu superhelisy.

Lokalizację pęcherzykową wykazało również białko **PRAF4**, należące do rodziny białek PRAF. Uzyskany wynik odróżniał się jednak od lokalizacji białka PXC oraz SlaA, znacznie większym zagęszczeniem pęcherzyków (rozdział 5.3.3.6). Były one zlokalizowane w bliskiej okolicy błony komórkowej. Struktury te jednak nie wykazywały ruchu. Białko to hipotetycznie powinno mieć zdolność oddziaływania z endosomami za pośrednictwem aż dwóch elementów – domeny FYVE oraz RCC1 (rozdział 5.1.1). Zaskakujące okazały się jednak wyniki analizy Fat blot, gdzie domena FYVE, zamiast spodziewanego oddziaływania z fosfatydyloinozytolem $\text{PtdIns}(3)\text{P}$, wiązała ze zdecydowanie największym powinowactwem $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ (rozdział 5.2.3.6). Co ciekawe, także dużą specyficzność wiązania fosfatydyloinozytolu $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ wykazała domena PH (rozdział 5.2.3.7). Można więc zadać pytanie, za jakie oddziaływania jest w takim razie odpowiedzialny region RCC1, skoro analiza Fat blot zakwestionowała oddziaływanie domeny FYVE z fosfatydyloinozytolami endosomów. Mimo otrzymania niespodziewanych wyników analizy Fat blot, należy jednak podkreślić, że białko to niepodważalnie jest zlokalizowane w strukturach pęcherzykowych.

W przeciwieństwie do wyżej omówionych białek, białko **PXX** zarówno podczas analizy z użyciem protoplastów jak i komórek epidermy liści tytoniu, wykazało lokalizację w błonie komórkowej (rozdział 5.3.2.3, 5.3.3.3). Wynik ten nie znajduje jednak odzwierciedlenia w analizie Fat blot, podczas której nie wykazano zauważalnej specyficzności wiązania

określonego fosfatydyloinozytolu przez domenę PX (rozdział 5.2.3.4). Lokalizację taką należy więc przypisać obecności helisy transbłonowej na końcu N białka (rozdział 5.1.1).

6.3 Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników i ich analizy można wypunktować następujące główne wnioski:

- 1) Wszystkie z analizowanych białek mają zdolność oddziaływania z fosfatydyloinozytolami, w większości z PtdIns(4)P
- 2) Białka te są zlokalizowane w przedziałach systemu błon wewnętrznych, zwykle w przedziałach pęcherzykowych.

6.4 Podsumowanie i dalsze perspektywy badawcze

W niniejszej pracy podjęto próbę bliższego scharakteryzowania kilku, dotąd nie badanych białek - potencjalnych organizatorów systemu błon w komórce roślinnej. W tym celu analizie poddano 5 białek *Arabidopsis thaliana*: PXS (At4g32160), PXC (At3g15920), PXX (At1g15240), SlaA (At4g02650), PRAF4 (At1g76950).

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić dwa istotne fakty: po pierwsze wszystkie wytypowane białka wiążą fosfatydyloinozytole, po drugie są zlokalizowane w przedziałach systemu błon wewnętrznych m.in. w strukturach pęcherzykowych. Informacje te stanowią przesłankę o ich potencjalnym udziale w procesach transportowych w komórce, m.in. w transporcie pęcherzykowym.

Wykazana zdolność do wiązania fosfatydyloinozytoli, jest tym istotniejsza, iż w ostatnich latach wskazuje się na kluczową rolę tych lipidów w organizacji systemu błon oraz transporcie między jego przedziałami (Di Paolo i De Camilli 2006; Krauss i Haucke 2007; Clague i wsp. 2009; Mayinger 2012). Niniejsza praca wnosi ponadto nowe informacje o oddziaływaniach domen białek roślinnych z fosfatydyloinozytolami.

Ponieważ uzyskane wyniki świadczą o potencjalnym udziale wybranych białek w procesach transportowych w komórce, warto byłoby sprecyzować, w jakich dokładnie szlakach pełnią swoją funkcję. W tym celu wartościowe byłyby analizy z użyciem inhibitorów, takich jak np. wortmanniny, która hamuje produkcję PtdIns(3)P, a co się z tym wiąże wstrzymuje procesy endocytotyczne. Warto byłoby również zbadać wpływ Brefeldyny

A, która hamuje powrót cząsteczek do błony po ich pobraniu na drodze endocytozy (Contento i Bassham 2012). W celu dokładnego sprecyzowania charakteru struktur, które obserwowano, warto byłoby powtórzyć obserwacje z zastosowaniem odpowiednich markerów określonych przedziałów błonowych. Należałoby również zwrócić większą uwagę na białka z rodziny PRAF, m.in. ze względu na unikatowy zestaw domen w ich strukturze. Ciekawym eksperymentem byłoby zweryfikowanie zdolności regionu RCC1 białka PRAF4, do pełnienia funkcji czynnika wymiany nukleotydów guaninowych, na małych GTPazach Rab na endosomach, tak jak to uczyniono w przypadku białka PRAF1 (Jensen i wsp. 2001). Skoro nie stwierdzono dotąd występowania homologicznych białek w komórkach zwierzęcych ani drożdżowych, warto byłoby ocenić czy białka należące do rodziny PRAF, są zaangażowane w mechanizmy swoiste tylko dla komórki roślinnej.

7. Streszczenie

Ważnym, lecz ciągle słabo poznanym elementem kontinuum ściana komórkowa - błona komórkowa - cytoszkielet (WMC) w komórce roślinnej jest jego część wewnątrzkomórkowa. Jego elementem jest złożony system błon wewnętrznych, który odpowiada m.in. za kompartmentację komórki roślinnej. Elementy systemu komunikują się między sobą głównie za pomocą transportu pęcherzykowego. Transport pęcherzykowy oraz związany z nim przepływ błon, są uwarunkowane ciągiem następujących po sobie oddziaływań między różnymi białkami oraz między białkami a fosfatydyloinozytolami - lipidami błon biologicznych, odpowiednio zorganizowanymi w czasie i przestrzeni.

W pracy podjęto próbę poznania nowych, dotąd nie charakteryzowanych białek *Arabidopsis thaliana*, oddziałujących z lipidami błon, potencjalnie uczestniczących w procesach transportowych w komórce m.in. w transporcie pęcherzykowym. W tym celu do badań wytypowano 5 białek *Arabidopsis thaliana*, które określono skrótami: PXS (At4g32160), PXC (At3g15920), PXX (At1g15240), SlaA (At4g02650), PRAF4 (At1g76950).

Korzystając z narzędzi bioinformatycznych oceniono obecność aminokwasów zachowanych w domenach wytypowanych białek, odpowiedzialnych za wiązanie fosfatydyloinozytoli. Przeprowadzona analiza Fat blot pozwoliła stwierdzić, że wszystkie analizowane domeny białek wiążą fosfatydyloinozytole w warunkach *in vitro*. Wiązały one z największym powinowactwem PtdIns(4)P oraz z mniejszym PtdIns(3)P, PtdIns(3,5)P₂ oraz PtdIns(5)P. Analiza lokalizacji subkomórkowej białek pokazała, że wszystkie są zlokalizowane w przedziałach systemu błon wewnętrznych, w większości w strukturach pęcherzykowych. Pęcherzyki wyznakowane przez analizowane białka często wykazywały dynamicznych ruch wzdłuż błony komórkowej. Jedno z białek (PXX) było zlokalizowane w błonie komórkowej.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, można przypuszczać, że wybrane białka są w istocie zaangażowane w procesach transportowych w komórce roślinnej.

8. Abstract

An essential, although still poorly understood, element of the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton (WMC) continuum in plant cells is its internal part. There exist a complex system of internal membranes sub-dividing the cell into a number of membrane-bounded, discontinuous compartments. Exchange of material between them is thought to be achieved by vesicular transport. There exist the anterograde and retrograde trafficking pathways. Many of these events are regulated by the cooperative actions of distinct proteins and interactions between proteins and phosphoinositides, which are membrane lipids.

The goal of the work was to identify and assess the function of several yet unidentified *Arabidopsis thaliana* proteins which are potentially implicated in plant cell membrane trafficking. For this purposes five proteins have finally been chosen to further exploration, which were called: PXS (At4g32160), PXC (At3g15920), PXX (At1g15240), SlaA (At4g02650), PRAF4 (At1g76950).

With a series of bioinformatics analyses the existence of some conservative amino acids responsible for phosphoinositides binding, in domains of selected proteins, have been checked. Following bioinformatics analyses, phosphoinositides-binding properties have been tested *in vitro*, using Fat blot procedure. It was revealed that all of tested domains bound different phosphoinositides. Most of them preferently bound PtdIns(4)P and with the less affinity PtdIns(3)P, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(5)P. On the other hand subcellular localization of the proteins have been explored. Obtained results indicated that these proteins localize to some compartments of plant endomembrane system, mostly to some vesicles. The dynamic of these vesicles was often observed. One of the proteins (PXX) localized to plasma membrane.

9. Literatura

Agarwal P., Reddy M.K., Sopory S.K., Agarwal P.K. (2009) Plant Rabs: Characterization, Functional Diversity, and Role in Stress Tolerance. *Plant Mol Biol Rep* 27: 417-430.

Aghamohammadzadeh S., Ayscough K.R. (2009) Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nat Cell Biol.* 11(8): 1039-42.

Antonin W., Fasshauer D., Becker S., Jahn R., Schneider T.R. (2002) Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Biol.* 9(2): 107-11.

Baluška F., Cvrčková F., Kendrick-Jones J., Volkmann D. (2001) Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant physiol.* 126: 39-46.

Baluška F., Hlavacka A., Šamaj J., Palme K., Robinson D.G., Matoh T., McCurdy D.W., Menzel D., Volkmann D. (2002) F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insight from Brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiol* 130: 422-431.

Baluška F., Šamaj J., Wojtaszek P., Volkmann D., Menzel D. (2003) Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall Continuum in Plants. Emerging Links Revisited. *Plant Physiol.* 133(2): 482–491.

Begona H., Drøbak B.K. (2002) PARF-1: an *Arabidopsis thaliana* FYVE-domain protein displaying a novel eukaryotic domain structure and phosphoinositide affinity. *J. Exp. Bot.* 53 (368): 565-567.

Bolte S., Talbot C., Boutte Y., Catrice O., Read N.D., Satiat-Jeunemaitre B. (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc* 214: 159–173.

Boss W.F., Massel M.O. (1985) Polyphosphoinositides are present in plant tissue culture cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 132(3): 1018-23.

Boutté Y., Vernhettes S., Satiat-Jeunemaitre B. (2007) Involvement of the cytoskeleton in the secretory pathway and plasma membrane organization of higher plant cells. *Cell Biol Int* 13: 649-654.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Bravo J., Karathanassis D., Pacold C.M., Pacold M.E., Ellson C.D., Anderson K.E., Butler P.J., Lavenir I., Perisic O., Hawkins P.T., Stephens L., Williams R.L. (2001) The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol Cell.* 8(4): 829-839.

Briggs G.C. , Mouchel C.F. , Hardtke C.S. (2006) Characterization of the plant-specific BREVIS RADIX gene family reveals limited genetic redundancy despite high sequence conservation. *Plant Physiol* 140(4): 1306-16.

Burgoyne R.D., Morgan A. (2007) Membrane trafficking: three steps to fusion. *Curr Biol.* 17(7): 255-8.

Camacho L., Malhó R. (2003) Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca^{2+} and GTPases. *J.Exp. Bot.* 54: 83-92.

Chakrabarty R., Banerjee R., Chung S.M., Farman M., Citovsky V., Hogenhout S.A., Tzfira T., Goodin M. (2007) PSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing *Nicotiana benthamiana*-virus interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 207: 740-50.

- Christoforidis S., Miaczynska M., Ashman K., Wilm M., Zhao L., Yip S.C., Waterfield M.D., Backer J.M., Zerial M. (1999) Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol.* 1(4): 249-52.
- Chung Tse Y., Mo B., Hillmer S., Zhao M., Wan Lo S., Robinson D.G. Jiang L. (2004) Identification of Multivesicular Bodies as Prevacuolar Compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells. *The Plant Cell* 16: 672-693.
- Clague M.J., Urbé S., de Lartigue J. (2009) Phosphoinositides and the endocytic pathway. *Exp Cell Res.* 315(9): 1627-31.
- Conner S.D., Schmid S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44.
- Contento A.L., Bassham D.C. (2012) Structure and function of endosomes in plant cells. *J Cell Sci.* 125: 3511-8.
- Cram W.J. (1980) Pinocytosis in plants. *New Phytol* 84: 1-17.
- Dasso M. (1993) RCC1 in the cell cycle: the regulator of chromosome condensation takes on new roles. *Trends Biochem. Sci.* 18(3): 96-101.
- Depta H., Robinson D.G., Holstein S.E.H., Lützelshwab M., Michalke W. (1991) Membrane markers in highly purified clathrin-coated vesicles from *Cucurbita hypocotyls*. *Planta* 183: 434–442.
- Di Paolo G., De Camilli P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443: 651 – 657.
- Djinović-Carugo K., Young P., Gautel M., Saraste M. (1999) Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell.* 98(4): 537-46.

Dowler S., Currie R.A., Campbell D.G., Deak M., Kular G., Downes C.P., Alessi D.R. (2000) Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem J.* 351: 19–31.

Dowler, S., G. Kular, and D. R. Alessi. 2002. Protein lipid overlay assay. *Sci. STKE* 2002(129)PL6.

Drøbak B.K., Ferguson I.B. (1985) Release of Ca^{2+} from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 130(3): 1241-6.

Drøbak B.K., Heras B. (2002) Nuclear phosphoinositides could bring FYVE alive. *Trends Plant Sci.* 3: 132-8.

Ebine K., Ueda T. (2009) Unique mechanism of plant endocytic/vacuolar transport pathways. *J Plant Res.* 122: 21-30.

Ellson C.D., Andrews S., Stephens L.R., Hawkins P.T. (2002) The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J Cell Sci* 115: 1099-1105.

Ferguson K.M., Lemmon M.A., Schlessinger J., Sigler P.B. (1994) Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell.* 79: 199-209.

Ferguson K.M., Lemmon M.A., Schlessinger J., Sigler P.B. (1995) Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 83:1037–1046.

Ford M.G., Pearse B.M., Higgins M.K., Vallis Y., Owen D.J., Gibson A., Hopkins C.R., Evans P.R., McMahon H.T. (2001) Simultaneous binding of $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291(5506): 1051-5.

Ford M. G. Mills I.G., Peter B.J., Vallis Y., Praefcke G.J., Evans P.R., McMahon H.T. (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419: 361–366.

- Galletta BJ, Chuang DY, Cooper JA (2008) Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis. *PLoS Biol* 6:72–85
- Galletta B., Cooper J.A. (2009) Actin and Endocytosis: mechanism and phylogeny. *Curr Opin Plant Biol* 11: 1-8.
- Gaullier J.M., Simonsen A., D'Arrigo A., Bremnes B., Stenmark H., Aasland R. (1998) FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*. 394: 432-3.
- Gaullier J.M., Ronning E., Gillooly D.J., Stenmark H. (2000) Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues. *J Biol Chem*. 275(32): 24595-600.
- Geldner N (2004) The plant endosomal system—its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta* 219: 547–560.
- Grebe M., Xu J., Mobius W., Ueda T., Nakano A., Geuez H.J. Rook M.B., Scheres B. (2003) Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* 13: 1378-1387.
- Halet G. (2005) Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains. *Biol Cell*. 97(7): 501-18.
- Hanson M.R., Köhler R.H. (2001) GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J Exp Bot* 52: 529-539.
- Harlan J.E., Hajduk P.J., Yoon H.S., Fesik S.W. (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*. 371(6493): 168-70.
- Haslam R.J., Koide H.B. Hemmings B.A. (1993) *Nature* 363: 309–310. Pleckstrin domain homology. *Nature*. 363(6427): 309-10.

Hála M., Cole R., Synek L., Drdová E., Pecenková T., Nordheim A., Lamkemeyer T., Madlung J., Hochholdinger F., Fowler J.E., Zárský V. (2008) An exocyst complex functions in plant cell growth in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*. 20(5): 1330-45.

Hao Y., Macara I.G. (2008) Regulation of chromatin binding by a conformational switch in the tail of the Ran exchange factor RCC1. *J Cell Biol*. 182(5): 827-36.

Higaki T., Sano T., Hasezawa S. (2007) Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 549-556.

Holweg C., Nick P. (2004) *Arabidopsis* myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 10488-10493.

Honbou K., Minakami R., Yuzawa S., Takeya R., Suzuki N.N., Kamakura S., Sumimoto H., Inagaki F. (2007) Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J*. 26(4): 1176-86.

Irvine R.F., Letcher A.J., Lander D.J., Drøbak B.K., Dawson A.P., Musgrave A. (1989) Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate and Phosphatidylinositol(4)phosphate in Plant Tissues. *Plant Physiol*. 89(3): 888–892.

Itoh, T., Koshiha S., Kigawa T., Kikuchi A., Yokoyama S., Takenawa T. (2001) Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 291: 1047–1051.

Itoh T., De Camilli P. (2006) BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 897–912.

Jensen R.B., La Cour T., Albrethsen J., Nielsen M., Skriver K. (2001) FYVE zinc-finger proteins in the plant model *Arabidopsis thaliana*: identification of PtdIns3P-binding residues by comparison of classic and variant FYVE domains. *Biochem J.* 359: 165-73.

Kam J.L., Miura K., Jackson T.R., Gruschus J., Roller P., Stauffer S., Clark J., Aneja R., Randazzo P.A. (2000) Phosphoinositide-dependent activation of the ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein ASAP1. Evidence for the pleckstrin homology domain functioning as an allosteric site. *J Biol Chem.* 275: 9653-63.

Kanai F., Liu H., Field S.J., Akbary H., Matsuo T., Brown G.E., Cantley L.C., Yaffe M.B. (2001) The PX domains of p47^{phox} and p40^{phox} bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol.* 3: 675-8.

Karathanassis D., Stahelin R.V., Bravo J., Perisic O., Pacold C.M., Cho W., Williams R.L. (2002) Binding of the PX domain of p47^{phox} to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J.* 21(19): 5057–5068.

Kost B., Lemichez E., Spielhofer P., Hong Y., Tolias K., Carpenter C., Chua N.H. (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J Cell Biol* 145: 317 – 330.

Krauss M., Haucke V. (2007) Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signaling. *EMBO* 8: 241 – 246.

Kusunoki H., MacDonald R.I., Mondragón A. (2004) Structural insights into the stability and flexibility of unusual erythroid spectrin repeats. *Structure.* 12(4): 645-56.

Kutateladze T.G., Ogburn K.D., Watson W.T., de Beer T., Emr S.D., Burd C.G., Overduin M. (1999) Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain. *Mol Cell.* 3(6): 805-11.

Kutateladze T.G. (2006) Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain. *Biochim Biophys Acta*. 1761(8): 868–877.

Kutateladze T.G. (2007) Mechanistic similarities in docking of the FYVE and PX domains to phosphatidylinositol 3-phosphate containing membranes. *Prog Lipid Res*. 46(6): 315-27.

Le Roy C., Wrana J.L. (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 112-126.

Lemmon M.A. (2003) Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 4: 201-13.

Lemmon M.A. (2004) Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans*. 32: 707-711.

Lemmon M.A. (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 99–111.

Liu J., Zheng Q., Deng Y., Cheng C.S., Kallenbach N.R., Lu M. (2006) A seven-helix coiled coil. *PNAS* 103 (42): 15457–15462.

Lloyd C.W. (2001) Plant cytoskeleton. *Encyclopedia of Life Science* 1-7.

Mason J.B., Arndt K.M. (2004) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* 5 (2): 170–176.

May R.C., Machesky L.M. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114: 1061-1077.

Mayer B.J., Ren R., Clark K.L., Baltimore D. (1993) A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73: 629–630.

Mayinger P. (2012) Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*. 1821(8): 1104-13.

McCann RO, Craig SW (1997) The I/LWEQ module: a conserved sequence that signifies F-actin binding in functionally diverse proteins from yeast to mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5679-84.

Meijer H.J.G., Divecha N., van den Ende H., Musgrave A., Munnik T. (1999) Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidyl-D-inositol 3,5-bisphosphate in plant cells. *Planta* 208 (2): 294-298.

Meijer H.J.G., Berrie C.P., Iurisci C., Divecha N., Musgrave A., Munnik T. (2001) Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *Biochem. J.* 360: 491–498.

Meijer H.J., Munnik T. (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 265-306.

Merrifield C.J., Feldman M.E., Wan L., Almers W. (2002) Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nature Cell Biol.* 4: 691–698.

Merrifield C.J., Perrais D., Zenisek D., (2005) Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell* 121: 593–606.

Misra S., Hurley J.H. (1999) Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell*. 97: 657-66.

Murray J.T., Panaretou C., Stenmark H., Miaczynska M., Backer J.M. (2002) Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic*. 3(6): 416-27.

- Müller J., Mettbach U., Menzel D., Šamaj J. (2007) Molecular dissection of endosomal compartments in plants. *Plant Physiol* 145: 293–304.
- Nielsen E. (2005) Rab GTPases in Plant Endocytosis. w: Šamaj J., Baluška F., Menzel D. *Plant Endocytosis*. Springer-Verlag. 177-196.
- Oparka K.J., Wright K.M., Murrant E.A., Allan E.J. (1993) Fluid-phase endocytosis: do plants need it? *J Exp Bot* 44: 247–255.
- Ovečka M., Lang I., Baluška F., Ismail A., Illeš P., Lichtscheidl I.K. (2005) Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. 226: 39-54.
- Park S., Caffrey M.S., Johnson M.E., Fung L.W. (2003) Solution structural studies on human erythrocyte alpha-spectrin tetramerization site. *J Biol Chem*. 278(24): 21837-44.
- Pearse B.M. (1976) Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (4): 1255–9.
- Ponting, C.P. (1996) Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci*. 5: 2353–2357.
- Reichelt S., Knight A.E., Hodge T.P., Baluska F., Samaj J., Volkmann D., Kendrick-Jones J. (1999) Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *Plant J*. 19: 555-569.
- Robertson A.S., Smythe E., Ayscough K.R. (2009) Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol. Life Sci*. 66: 2049–2065.
- Robinson D.G., Hillmer S. (1990) Endocytosis in plants. *Physiol Plant* 79: 96–104.
- Roth M.G. (2007) Integrating actin assembly and endocytosis. *Dev Cell* 13: 3-4.

Šamaj J., Baluška F., Voigt B., Schlicht M., Volkmann D., Menzel D. (2004) Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* 135: 1150-1161.

Šamaj J., Read N.D., Volkmann D., Menzel D., Baluska F. (2005) The endocytic network in plants. *Trends Cell Biol.* 15(8): 425-33.

Šamaj J., Müller J., Beck M., Böhm N., Menzel D. (2006) Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci.* 11(12): 594-600.

Satiat-Jeunemaitre B., Steele C., Hawes C. (1996). Golgi-membrane dynamics are cytoskeleton dependent: A study on Golgi stack movement induced by brefeldin A. *Protoplasma* 1-2: 21-33.

Shimmen T., Yokota E. (2004) Cytoplasmic streaming in plants. *Curr Opin Cell Biol.* 16(1): 68-72.

Simonsen A., Wurmser A.E., Emr S.D., Stenmark H. (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 13(4): 485-92.

Song X, Xu W., Zhang A., Huang G., Liang X., Virbasius J.V., Czech M.P., Zhou G.W. (2001) Phox homology domains specifically bind phosphatidylinositol phosphates. *Biochemistry* 40: 8940–8944.

Stahelin R.V., Long F., Diraviyam K., Bruzik K.S., Murray D., Cho W. (2002) Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J Biol Chem.* 277(29): 26379-88.

Stahelin, R. V. Long F., Peter B.J., Murray D., De Camilli P., McMahon H.T., Cho W. (2003) Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal homology (ANTH) and epsin N-terminal homology (ENTH) domains. *J. Biol. Chem.* 278: 28993–28999.

Stefan C.J., Padilla S.M., Audhya A., Emr S.D. (2005) The phosphoinositide phosphatase Sjl2 is recruited to cortical actin patches in the control of vesicle formation and fission during endocytosis. *Mol Cell Biol* 25: 2910–2923.

Stenmark H., Aasland R., Toh B.H., D'Arrigo A. (1996) Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem*. 271: 24048-54.

Stenmark H., Aasland R., Driscoll P.C. (2002) The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS Lett*. 513(1): 77-84.

Surpin M., Raikhel N. (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 100-9.

Thiel G., Battey N. (1998) Exocytosis in plants. *Plant Mol Biol*. 38(1-2): 111-125.

Tzfira T., Tian G.W., Lacroix B., Vyas S., Li J., Leitner-Dagan Y., Krichevsky A., Taylor T., Vainstein A., 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.

Ueda T, Yamaguchi M, Uchimiya H, Nakano A (2001) Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 20: 4730–4741.

van Leeuwen W., Okr  sz L., B  gre L., Munnik T. (2004) Learning the lipid language of plant signaling. *Trends Plant Sci*. 9(8): 378-84.

van Leeuwen W., Vermeer J.E.M., Gadella T.W.J., Munnik T. (2007) Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 52: 1014 – 1026.

Várnai P., Balla T. (2008) Live cell imaging of phosphoinositides with expressed inositide binding protein domains. *Methods*. 46(3): 167-76.

Vermeer J.E., van Leeuwen W., Tobeña-Santamaria R., Laxalt A.M., Jones D.R., Divecha N., Gadella T.W., Munnik T. (2006) Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells. *Plant J*. 47(5): 687-700.

Vermeer J.E., Thole J.M., Goedhart J., Nielsen E., Munnik T., Gadella T.W. (2009) Imaging phosphatidylinositol 4-phosphate dynamics in living plant cells. *Plant J*. 57(2): 356-72.

Voigt B., Timmers A.C.J., Šamaj J., Hlavacka A., Ueda T., Preuss M., Nielsen E., Mathur J., Emans N., Stenmark H., Nakano A., Baluška F., Menzel D. (2005) Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs. *Eur. J. Cell Biol*. 84: 609-621.

Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*. 2003 33(5): 949-56.

Watson H.A., Cope M., Groen A.C., Drubin D.G., Wendland B. (2001) In vivo role for actin-regulating kinases in endocytosis and yeast epsin phosphorylation. *Mol Biol Cell* 12: 3668–3679.

Wu F.H., Shen S.C., Lee L.Y., Lee S.H., Chan M.T., Lin C.S. (2009) Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods* 24: 16.

Wyatt S.E., Carpita N.C. (1993) The plant cytoskeleton-cell wall continuum. *Trends Cell Biol* 3: 413-417.

Wywiał E., Singh S. M. (2009) Computational analysis of the membrane targeting domains of plant-specific PRAF proteins. *Engineering and Technology* 54: 383-389.

Wywiał E., Singh S.M., (2009) Computational Analysis of the Membrane Targeting Domains of Plant-specific PRAF Proteins. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 54: 383-390.

Yarar D., Waterman-Storer C.M., Schmid S.L., (2005) A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 16: 964–975.

Yarar D., Waterman-Storer C.M., Schmid S.L. (2007) SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev Cell* 13: 43-56.

Yu J.W., Mendrola J.M., Audhya A., Singh S., Keleti D., DeWald D.B., Murray D., Emr S.D., Lemmon M.A. (2004) Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol Cell*.13: 677-88.

Xing Y., Liu D., Zhang R., Joachimiak A., Songyang Z., Xu W. (2004) Structural basis of membrane targeting by the Phox homology domain of cytokine-independent survival kinase (CISK-PX). *J Biol Chem*. 279(29): 30662-9.

Xu Y., Hortsman H., Seet L., Wong S.H., Hong W. (2001) SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol*. 3: 658-66.

Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 107–117.

Zhang Y., McCormick S. (2010) The regulation of vesicle trafficking by small GTPases and phospholipids during pollen tube growth. *Sex Plant Reprod*. 23(2): 87-93.

Žárský V., Cvrckova F., PotockyM., Hala M. (2009) Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *New Phytol* 183(2): 255-72.

Žárský V., Potocký M. (2009) Signaling in Vesicle Traffic: Protein-Lipid Interface in Regulation of Plant Endomembrane Dynamics w: Baluška F., Mancuso S. *Signaling in Plants*. Springer-Verlag 107-133.

Załącznik nr 1

Sekwencje nukleotydowe domen zostały oznaczone kolorem żółty, startery je flankujące kolorem niebieskim.

PXS-PX -459nt

CAGGCATGACGGAACATCGCCGCTTCCATTAGGAATGGATTGGAGTCCTCCACCGCGCAAATGG**AATGGT**
AGAGATACTGTTTGGCCTCATGACCCTCGAACTGGATGGATTATTGCGTTACAATACCCTCGTGGATTG
 TCCTTCCAAAATCAAGAAATTCAGATCCTGTTGTGTTTTACAGGGTTCAGGTAAGTGTGCAATCCCCTGA
 AGGTATTACCACAATGCGAGGAGTGTTGAGACGATTTAATGATTTTCTAAAGCTATTAACGGATCTTAAA
 AGAACATTTCTTAGAAAAGGTTTTCCCATCAGCTCCCCCAAAGGGCTGTTGCGTATGAAAAGCAGAGCAG
 TGTTAGAAGAGAGAAGGTGCTCTCTTGAGGAGTGGATAACAAAGCTATTATCTGATATAGAATTGGCAAG
 AAGTGTGCTAGTTGCATCCTTTCTTGAAGCTAGAAGCTGCTGCTAGGTCTGCATGCCAAGATGTAGATCAG
 AATGCTTCTGATT**CCAATAATGATAGAAGTAGC**ACAAGTTTCGTCGCCTATGGTTCCACCAAGTTTGAGCT

PXC-PX -474nt

CGTTACCTCTGGGAATGGATTGGAGTTCTCCTCCTCGTCATTTG**GAAAGGAAGGGACACGGTTTGG**CCACA
TGATCATCGAACTGGTTGGAGTTACTGTGTCACTGTCCCTTCTTGGGTTGACCTTCCCAAGTCAAGCGTT
TCAGATCCTGCCGTGTTTTATAGAGTGCAAGTAGCGATACAATCTCCTGAGGGAATCACCTTCTGCTAGGC
TGGTACTTAGGAGGTTCAATGATTTCTTGGAGTTATATTTCGTCTATTAAAAAGGAGTTTGTGAAGAAAAG
CTTACCCCAGGCACCACCAAAGAAGATTCTGAGGATGAGAAAACCAGACACTTTTGAAGAGAGGAGGTGC
TCTCTGGAAGATTGGATGAATAGACTTTTGTGAGATATTGATATATCCAGAAGCGCTCTTATAGCTACAT
TTCTTGAGCTTGAAGCTGCTGTCAGGTCTTATTTTAATGATGAATATCAAGAACTGAAGATACCTCTGG
GGACATT**CCGTCACCTTCTACCTACCACC**ATCTCTGATGTCCCTGGTAGTTCATCAGTTACCATAGATCAT

PXX-PX -426nt

TAGACGATGATGATAGTGTATGATTCTGAAGATGGTTCTTTGACTAGATCATACAGTGGAATGTCTGCAAC
GTCATCTACATCATACGTTTCAGCGGCAGAAAGTGACCTTCCCAATGCCCTAAAAGTTCTTTGTTGGTT
GATTCTTTTGCAGAGTTGAGATGTGAGGTTCTGGGTGCCAATATTGTGAAGGGTAGTTCTAAGATGTTTG
CTGTGTATTTCAGTTGCAGTCAAGATGAAAGTAATCATAGCTGGTCTATCAAAAGAAGATTCGACATTT
TGAGGAGCTTCACCGACGGCTAAAAGTGTTTCTTGAGTACAAACTTCATTTACCGCCAAAGCATTTCCTA
TCAACAGGCGTGGACATACCTGTTATCCAAGAGCGATGTGTACTACTTGACGAGTATATCAAGGTCAAAC
GCCATGTCCTCTTGTGTTTTTAACATCTGTTTCATGCTTTACATGGTGTATTGTATATGGAGTATGTTTTATT

SlaA-ENTH - 531nt

GTAGGATTAGCCAAAGTCGGTGGTCTGAAGCAGTTCTTTAACGGAAGCTCGAAATAGCTGTCGTGAAAGCGA
CGCGACATGATGACTATCCAGCGGAGGACAAGTACATTAGAGAGATTTTATGCCTAAGCTTCTTACTCACG
CAATTACGTAAGCGCTTGTGTGGCAACTCTCTCGCGACGGCTCAACAAGACCAAGAACTGGTCGGTTTGCT
CTCAAAACCTTGATTTTTGATCCAACGGTTGCTAACAGATGGAGATAGAGCCTACGAGCAAGAGATCTTCT
TCGCGACGAGACGAGGAACGAGATTGCTTAACATGTCTGATTTAGAGATGCGAGTCAGTCTGATTCGTG
GGATTACTCTGCTTTTGTTCGGACTTATGCTTTGTATTTGGATGAACGCTCTTGATTACCGGATGCAAGGA
AGACGAGGGGAAAAAAAAAAGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGATGGTGATTCCGGCGAGGAAGATGATCATC
GAGGGACAAGCAACGATATTCGGTCGAAAGCTATTGTGGTTAAATCTAAACCAAGTCGCAGAGATGAAAAC
AGAGAAATCTTCAACAGAGTACAACATTTACAACAGCTTCTTGATCGGTTCTTGGCTTGTGCTCCAAC

Praef4-PH 440nt

CACATGGAATG**GCAGATCTTGTGACCTA**>TAGTAATGCCGACCACAACCTTGAACAGGCATTGATTACAT
TGAAGAAGGGTACTCAACTTTTGAAATATGGTCGCAAAGGGAAGCCCAAGTTTTATCCTTTCAGACTGTC
TAGTGATGAAAAATCTTTGATCTGGATATCAAGTAGTGGTGAAAAGCGACTGAAGTTAGCATCTGTATCT
AAAATTGTACCTGGGCAGAGAACTGCTGTTTTCCAGCGTTATCTTCGCCCAGAGAAAGATTACTTATCCT
TTTCTCTCTTATACAACGGAAAAAAGAAGTCTCTTGACTTGATTTGTAAGGACAAGGTTGAGGCTGAGAT
TTGGATTGGAGGCCTGAAAACATTAATATCCACTGGGCAAGGCGGGCGCTCAAAAAT**CGAT**GAGCTGGAGT
GGCGGAGG<**CCTTTCAGTTGATGCCAGC**AGAGAATTGACATCAAGCAGTCCAAGTAGCAGTTCTGCCAGT

Praef4-FYVE-317nt

GCTTTGAAGGATAGACACGTAAAATACATTGCTTGC GGATCG>AATTACACTGCAGCCATATGTCTTCA
 AAATGGGTGTCTGGTGCTGAGCAGTCTCAGTGTTCAACCTGTAGACTGGCTTTTGGGTTTACACGGAAAA
 GACATAACTGTTACAATTGCTGGACTTGTGCACCTGTCACTTCATGCAGTTCAAAAAAGCATTTCCGAGCTGC
 ACTAGCCCCAAGCGCGGGAAGACTATATCGTGTCTGCGATTCTTGTTATGTTAAGCTACGCAAAAGTGCTC
 GAGATAAACGATACATAACAGAAGGAACAGTGCTGTG<CCTCGTCTTTTCAGGGGAGAATAGAGACAGATT

Prafl-Fyve-427nt

TAACTTCATTTGGAAATGTTTATACTTGGGGAAAAGGCATGAATGGACAACCTGGTTTAGGTGACGTTAG
AGATAGAAACTCTCCTGTTCTTGTTGAGCCTTTAGGTGATAGGTTGGTAGAAAGTATAGCTTGCGGGTTG
AATTTGACGGCTGCGATCTGTTTACACAAAGAGATCTCTTTGAATGATCAAACCGCTTGTAGTTCTTGCA
AATCAGCTTTTGGATTCACAAGGAGAAAAGCATAACTGTTACAACGTGGTCTATTGTTTTGCAATGCATG
TAGTAGCAAGAAAGCGGTAAATGCTTCGTTAGCACCGAATAAAAGCAAGCTTTCGCGGTTTGCGATTCT
TGCTTTGATCATCTATGGAGTATAACAGAGTTTTCAAGAAATGTTAAGATGGATAATCACACTCCGAGGA
TGCAGATGGTTACACGAAGAGTATCTGAGGATTTGACAGAAAAACAATCAGAGAATGAGATGCAGAATCT