

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin



**Štúdium vybraných podjednotiek komplexu exocyst a ich interaktorov v
autofagickej dráhe v rastlinách**

Bc. Denisa Rácová

Školiteľ: doc. RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Diplomová práca

Praha 2015

Táto diplomová práca bola vypracovaná v rokoch 2013 - 2015 na Katedre experimentálnej biológie rastlín Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej v Prahe pod vedením školiteľa doc. RNDr. Viktora Žárského, CSc. a Mgr. Ivana Kulicha, PhD ako konzultanta.

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru.

13.8. 2015 v Prahe

Denisa Rácová

Práca bola hrazená z grantového projektu GAČR 15-14886S a MŠMT NPUILO1417

Pod'akovanie

Ďakujem svojmu školiteľovi doc. RNDr. Viktorovi Žárskemu, CSc. za odbornú pomoc, podporu a pochopenie a svojmu konzultantovi Mgr. Ivanovi Kulichovi PhD za spoluprácu, priateľstvo a veľkú podporu. Tiež ďakujem ľuďom z laborok 202, 210 a z ÚEB-u, ktorí vytvárali priateľské prostredie, radili mi pri práci a ďakujem im aj za ich psychickú podporu.

OBSAH

ZOZNAM SKRATIEK.....	9
ABSTRAKT	11
ABSTRACT	12
TEORETICKÝ ÚVOD	13
1.1 Úloha komplexu exocyst vo vezikulárnom transporte.....	13
1.1.1 Komplex exocyst	14
1.1.2 Závislosť funkcie exocystu na aktíne.....	14
1.1.3 Mechanizmus pripojenia Sec3 a Exo70 k plazmatickej membráne	15
1.1.4 Recyklácia plazmatickej membrány cez endozómy	15
1.2 EXOCYST U RASTLÍN.....	16
1.3 AUTOFÁGIA.....	17
1.3.1 Typy autofágie.....	17
1.3.2 Makroautofágia.....	18
1.3.4 Mikroautofágia.....	18
4.3.5 Úloha SNARE v autofágii	19
1.3.6 Fosfoinositid 3 - kináza (PI3K) a jej inhibítor 3MA	19
1.4 VAKUOLA	20
1.4.1 Akvaporíny α -TIP, γ -TIP, Δ -TIP.....	20
1.4.2 Antokyány	20
4.4.3 Vakuolárne invaginácie	21
2. CIELE	22
3. Metódy.....	23
3.1 PESTOVANIE RASTLÍN A BAKTÉRIÍ	23
3.1.1 Sterilná kultivácia <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
3.1.2 Nesterilná kultivácia <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
3.1.3 Médiá	23
3.1.4 Príprava kompetentných buniek <i>Escherichia coli</i> , kmeň DH5 α (E.coli)	24
3.1.5 Kríženie <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
3.2 PRÁCA S DNA	25
3.2.1 Izolácia genómickej DNA.....	25
3.2.2 Genotypovanie.....	26

3.2.3 Klonovanie konštruktov	26
3.2.4 Agarózová elektroforéza	27
3.2.5 Polymerázová reťazová reakcia	28
3.2.6 Štiepenie DNA	30
3.2.7 Ligácia fragmentov DNA.....	31
3.2.8 Elektroporácia <i>Escherichia coli</i> , kmeň <i>DH5α (E.coli)</i>	31
3.2.9 Izolácia plazmidovej DNA.....	32
3.2.10 Sekvenovanie	32
3.3 DVOJHYBRIDNÝ KVASINKOVÝ TEST	33
3.3.1 Transformácia kvasiniek.....	33
3.3.2 Vykvapkávací experiment	34
3.4 MIKROSKOPOVANIE	34
3.4.1. Zoznam a vysvetlenie účinku aplikovaných chemikálií.....	34
3.4.2 Aplikácia chemikálií na rastliny	35
3.4.3 Kvantifikácia povrchu tonoplastu	35
5. VÝSLEDKY.....	37
5.1 TESTOVANIE MOŽNEJ INTERAKCIE VYBRANÝCH PODJEDNOTIEK KOMPLEXU EXOCYST S GTPázou RabG3B	37
5.1.2 Kvasinkový dvojhybridný test interakcie medzi N - terminálnym fragmentom RabB1b ako kontrolou vzdialene príbuznej bielkoviny k RabG3b a Exo70B1, Exo70B2, C - terminálnym fragmentom Exo84b a N - terminálnym fragmentom Exo84b podjednotkami exocystu	40
5.2 SLEDOVANIE MORFOLÓGIE TONOPLASTU PRI INDUKCII A INHIBÍCII AUTOFÁGIE.....	42
5.2.1 Správanie tonoplastu pri kontrolnej vzorke.....	43
5.2.2 Správanie tonoplastu pri indukcii autofágie	43
5.2.3 Správanie tonoplastu pri inhibícia autofágie použitím 3MA	44
5.2.4 Správanie tonoplastu pri indukcii tvorby a ukladania antokyánov.....	45
5.2.5 Správanie tonoplastu pri použití CDNB.....	45
5.2.6 Vyhodnotenie pomeru vnútornej membrány vakuoly k BS	46
5.2.7 Lokalizácia endoplazmatického retikula vo vakuole	48
6. DISKUSIA.....	50
6.1 Testovanie možnej interakcie vybraných podjednotiek komplexu exocyst s GTPázou RabG3b.....	50

6.2	Sledovanie morfológie tonoplastu pri indukcii a inhibícii autofágie.....	51
7.	ZÁVERY	53
8.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	55

ZOZNAM SKRATIEK

3MA	3-metyladenín
35S	Silný promótor izolovaný z vírusu CaMV
AD	Activation domain
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AVI	Antokyánové vakuolárne inklúzie
BD	Binding domain
BS	Bunková stena
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzén
CGS	Glukozilkeramid syntáza
DELTA - TIP	Akvaporín vo vakuole
DMSO	Dimetylsulfoxyd
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	Ditiotreitol
ER	Endoplazmatické retikulum
FL RabG3b	Celá forma RabG3b
FRET	Försterov rezonančný prenos energie
GFP	Zelený fluorescenčný proteín
GTPaza	guanozintrifosfatáza
HDEL	Tetrapeptid (hstidín, aspartát, glutamát, leucín) na C konci proteínov, ktoré smerujú do ER
MPA	Mäsopeponový agar
MPB	Mäsopeptonový bujón
MS	Murashige a Skoog (1962)
NAR	Naringenín
PI-3K	Fosfatidylinozitol-3-kináza
PI	Ffosfatidylinositol
PtdIns3K	Ffosfatidylinositol 3-kináza
PCD	Programovaná bunková smrť

PDMP	D-L-threo-1-phenyl-2-decanoyl amino-3-morpholino-1-propanol
RFP	Červený fluorescenčný proteín
RNA	Ribonukleová kyselina
PCR	Polymerase chain reaction
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
UPR	Unfolded protein response
WT	Wild type – divoký typ
γ -TIP	tonoplastový vnútorný proteín

ABSTRAKT

Exocyst je pútaací proteínový komplex, ktorý je evolučne konzervovaný v živočíšnych, kvasinkových, ale aj rastlinných bunkách. Má dôležitú úlohu v riadení bunkovej morfogénézy a polarity. Funkciou tohto pútaacieho komplexu je naviazať sekrečnú vezikulu na správne miesto v plazmatickej membráne v predposlednom kroku exocytózy. Tento proces je pre fungovanie a prežitie bunky esenciálny. Ďalším dôležitým procesom prebiehajúcim v bunke, na ktorom sa podieľa exocyst je autofágia. V rastlinách má podstatnú úlohu v odpovedi na hladovanie, stárnutie, abiotický a biotický stres a dôležitú úlohu tu hrá podjednotka exocystu v *Arabidopsis thaliana* Exo70B1. RabG3b je malá GTPáza, ktorá má pozitívnu úlohu v iniciácii autofágie v *Arabidopsis*. Preto sa v tejto práci zaoberám interakciou tejto aj niektorých ďalších RabGTPáz s podjednotkami komplexu exocyst Exo70B1, Exo70B2 a Exo84b. Ďalej som sa v tejto práci venovala zmenám morfológie topolastu pri indukcii a inhibícii autofágie a pri indukcii tvorby a ukladania antokyánov v *Arabidopsis thaliana*.

Kľúčové slová: exocyst, autofágia, Rab GTPáza, interakcie proteínov, dvojhybridný kvasinkový test, *Arabidopsis thaliana*, vakuola, vakuolárne invaginácie

ABSTRACT

Exocyst is a binding protein complex, which is evolutionary conserved in yeast, animal and in plant cells. It has crucial role in regulation of cell morphogenesis and cell polarity. The function of the exocyst complex is binding of secretory vesicle to the proper side on plasma membrane in penultimate step of exocytosis. This process is essential for function and survival of cell. Another process crucial for the cell is autophagy. In plants autophagy plays important role in the responses to nutrient starvation, senescence, abiotic and biotic stress. RabG3b are small GTPases, which have positive role in autophagy. In this work I described the interaction between RabG3b and some of subunits of exocyst complex: Exo70B1, Exo70B2 and Exo84b. I also studied changes in morphogenesis of tonoplast by induction and inhibition of autophagy and induction of anthocyanin synthesis in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: exocyst, autophagy, Rab GTPase, interactions of proteins, yeast doublehybrid screen, *Arabidopsis thaliana*, vacuole, vacuolar invaginations

TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Úloha komplexu exocyst vo vezikulárnom transporte

Transport vezikúl je proces, ktorý je životne dôležitý pre všetky eukaryotné organizmy. Zahŕňa špecifický transport a fúziu makromolekúl membránových kompartmentov v rámci bunky, ale aj pri transporte von z bunky. Procesy ako sú splývanie vezikúl, ale aj transport z donorovej membrány na cieľné miesto a nakoniec aj samotná fúzia membrán, musia byť presne regulované. Kľúčovú úlohu v tejto regulácii majú malé proteíny Rab GTPázy a ich efektorové proteíny. Napríklad Rab GTPázy lokalizované na povrchu vezikúl špecificky interagujú s pútačím komplexom, ktorý sa nachádza na cieľnej membráne. Táto interakcia umožňuje pripútanie vezikuly k membráne a ich fúziu cez pútačím komplex *N-ethylmaleimide - sensitive factor attachment proteine receptor* (SNARE) (Carter et al., 2004; Jurgens, 2004; Sutter et al., 2006).

Ďalší komplex, ktorý je zahrnutý v pútaní sekrečtorických vezikúl odvodených z Golgiho aparátu, je oktamtrický komplex exocyst. (obrazok review The exocyst complex in polarized exocytosis)

Exocyst interaguje s pútačím komplexom SNARE a má vplyv na jeho správne zostavenie: cicavčí exocyst nachádzajúci sa v mozgu ko-imunoprecipituje s neuronálnym syntaxínom Sec1, ktorý sa viaže na SNARE a stimuluje fúziu membrán (Hsu et al., 1996; Wiederkehr et al., 2004). V kvasinkách sa *in vitro* ukázala interakcia kvasinkovej podjednotky exocyst Sec6 s podjednotkou komplexu t-SNARE Sec9. Práve táto interakcia môže spôsobovať inhibíciu interakcie Sec9 s ďalším t-SNARE proteínom Sso1. Ďalšia podjednotka komplexu exocyst Exo84 interaguje s kvasinkovým homológom Sro7/77, ktorý sa viaže na Sec9 a aktivuje ho. Sro7/77 je downsteam-ový efektor Rab GTPázy Sec4, ktorá reguluje úroveň post-Golgi v exocytóze (Grosshans et al., 2006; Lehman et al., 1999; Sivaram et al., 2005; Zhang et al., 2005b).

V bunkách cicavcov, podjednotka komplexu exocyst Exo70 interaguje s t-SNARE viažucim proteínom Snapin (Bao et al., 2008).

1.1.1 Komplex exocyst

Je to oktametrický pútač komplex, ktorý pozostáva z 8 proteínových podjednotiek: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 a Exo84 (Hsu et al., 1996; TerBush and Novick, 1995; TerBush et al., 1996).

Pôvodne boli prvé tri podjednotky komplexu exocyst objavené v modelovom organizme *Saccharomyces cerevisiae*: Sec6, Sec8 a Sec15 (TerBush and Novick, 1995). O rok neskôr boli objavené ďalšie štyri podjednotky: Sec3, Sec5, Sec10 a Exo70, takisto v kvasinkách (TerBush et al., 1996). Cicavčí komplex exocyst pozostáva z homológov všetkých týchto proteínov (Hsu et al., 1996; Kee et al., 1997).

Tento pútač komplex bol popísaný na nerastlinnom eukaryotickom modeli (patria tam organizmy ako napríklad kvasinky, *Drosophila melanogaster*, myš, potkan, človek...), kde napomáha cielenému pútaníu sekrétorických vezikúl k plazmatickej membráne. Vďaka tejto jeho funkcii je zahrnutý v rôznych fyziologických procesoch, vrátane polarizovanej exocytózy: dokazujú to exocystický mutanti, ktorí majú zablokovanú sekréciu a sekrétorické vezikuly akumulujú vo vnútri (Guo et al., 2001; He et al., 2007; Novick et al., 1980; Zhang et al., 2005a)

Pútač komplex exocyst je zahrnutý v rôznych procesoch bunky ako je cytokenéza, pohyby bunky, vznik tumoru, ciliogenéza. Má dôležitú úlohu v rade vývojových procesov ako napríklad založenie, alebo zmena epiteliárnej polarizácie, determinácia embrya, vývoj oka, oogenéza. V rastlinách je dôležitý pre polarizovaný rast buniek, napríklad v peľových vrecúškach, alebo predlžovací rast hypokotylu. Je dôležité si uvedomiť, že komplex exocyst má funkciu nielen na tkanivovej (pletivovej) úrovni, ale aj na orgánovej úrovni (He and Guo, 2009).

1.1.2 Závislosť funkcie exocystu na aktíne

Závislosť na aktíne nie je úplne jednoznačná. Závisí hlavne na funkcii danej podjednotky exocystu. V kvasinkách je Sec3 lokalizovaný na špičke púčika nezávisle od aktínových vlákien (pozdĺž nich sa transportujú vezikuly), ale polarizácia Exo70 sa zdá byť čiastočne závislá od aktínu. Ostatné podjednotky komplexu exocyst sú asociované s exocystickými vezikulami a sú závislé od aktínových filamentov, aby mohli

byť prenesené k miestam exocytózy (Boyd et al., 2004; Finger et al., 1998; Zajac et al., 2005; Zhang et al., 2005b).

1.1.3 Mechanizmus pripojenia Sec3 a Exo70 k plazmatickej membráne

Fosfoinozítidy môžu mať funkciu zhromažďovania pútacích proteínov k špecifickým membránovým kompartmentom, ktoré pútajú vezikuly (Guo et al., 2001; Zhang et al., 2001).

Štúdie odhalili, že obe podjednotky komplexu exocyst sa viažu na fosfatidylinozitol 4,5-bisfosfát (PI(4,5)P₂), ktorý je lokalizovaný na vnútornej strane plazmatickej membrány. Dokázali to experimenty s mutantnými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré mali znížené množstvo PI(4,5)P₂ v plazmatickej membráne, v dôsledku čoho sa komplex exocyst nemohol naviazať na plazmatickú membránu. Narušenie interakcie PI(4,5)P₂ s proteínmi Sec3 a Exo70 spôsobilo blokovanie asociácie plazmatickej membrány s komplexom exocyst, čo zapríčinilo narušenie celkovej sekrécie, rastu bunky a dokonca až bunkovú smrť.

Sec3 interaguje s PI(4,5)P₂ cez polybázické oblasti na N-terminálnej doméne. Exo70 interaguje s PI(4,5)P₂ skrz množstvo bázických oblastí na C-terminálnej doméne. Tieto oblasti sú konzervované a popísané boli jednak v *Saccharomyces sp.*, ale aj v cicavčích bunkách (He et al., 2007; Liu et al., 2007; Zhang et al., 2008). Tieto bázické oblasti sú málo distribuované v primárnej sekvencii, sú uložené v klastroch a tvoria pozitívne nabitý povrch na C-terminálnom konci Exo70 (Dong et al., 2005; Hamburger et al., 2006; Moore et al., 2007).

1.1.4 Recyklácia plazmatickej membrány cez endozómy

V živočíšnych bunkách sa exocyst zúčastňuje recyklácie membrán cez endozómy a veľmi pravdepodobne aj v rastlinách. Typ nákladu v recyklujúcich vezikulách je určený rôznym typom buniek. Von sa náklad dostane exocytózou a do vnútra bunky sa náklad dostane vďaka internalizácii (často cez receptory) plazmatickej membrány klatrínovou či klatrín-nezávislou endocytózou. *Loss off function* komplexu exocyst spôsobuje blokovanie recyklácie a hromadenie nákladu v recyklujúcich endozómoch.

V živočíšnych bunkách je exocyst lokalizovaný jednak na plazmatickej membráne, ale aj na perinukleárných membránových kompartmentoch. Môže to umožniť rôznorodosť funkcií komplexu exocyst v rôznych úrovniach vezikulárneho transportu. Narušenie špecifického púlu komplexu exocyst vedie k defektom vezikulárneho transportu (Oztan et al., 2007; Prigent et al., 2003; Yeaman et al., 2001; Zhang et al., 2004).

1.2 EXOCYST U RASTLÍN

V rastlinách boli exocystu podobné štruktúry objavené v roku 2004 elektrónovou topografickou analýzou, ktorou sledovali formovanie plazmatickej platničky počas cytokynézy v *A. thaliana*. Vedci si všimli prítomnosť štruktúr o dĺžke 24 nm, ktoré pútajú vezikuly. Tieto štruktúry sa veľmi podobali pútiacemu komplexu exocyst v bunkách cicavcov a v bunkách kvasiniek, v ktorých boli pozorované elektrónovou mikroskopiou (Hsu et al., 1998).

Hlavným rozdielom medzi rastlinným a nerastlinným exocystom je ten, že v rastlinných bunkách sa väčšina génov komplexu exocyst nachádza v mnohopočetných kópiách (Elias et al., 2003; Synek et al., 2006). Rastlina tak získa vyššiu plasticitu pri vyrovnávaní sa so stresovými podmienkami, a tiež to značí, že exocyst je pre rastlinu skutočne dôležitý.

Komplex exocyst má podstatnú úlohu v morfogénzii rastlín. Potvrdili to viaceré experimenty a mutácie v podjednotkách exocystu: v kukurici (*Zea mays*) to bola transpozónová inzercia do homológu SEC3, ktorá spôsobila mutáciu *roothairless1*, a tá spôsobila zlyhanie predlžovacieho rastu koreňových vláskov, poškodený rast buniek a znížené množstvo buniek (Tsui-Jung Wen, 1994; Wen et al., 2005). V *Arabidopsis thaliana* mutácia *exo70A1* vykazovala podobný fenotyp ako mutácia v kukurici *roothairless1*. Mutanti mali poškodený rast buniek (predlžovací rast etiolovaného hypokotylu, predlžovanie stigamtických papíl) a znížené množstvo buniek (Synek et al., 2006). *A. thaliana sec8* mutant mal poškodené klíčenie a rast špičky peľového vrecúška (Cole et al., 2005)

V roku 2007 Lavy a spol. demonštrovali interakcie medzi rastlinným komplexom exocyst a malými GTPázami. Ako modelový organizmus použili *A. thaliana* a pomocou metódy dvojhybridného kvasinkového testu objavili interakciu

medzi ICR1 adaptorom a aktívnou Rop GTPázou a tiež SEC3 podjednotkou exocystu. Zdá sa, že na rozdiel od priamych interakcií exocysta s aktivovanými Rho GTPázami u živočíchov a kvasiniek, interakcie u rastlín môžu byť sprostredkované adaptorovými bielkovinami.

Na základe týchto štúdií môžeme povedať, že exocyst je zapojený v polarizovanom raste buniek. Ale je rastlinný exocyst funkčný komplex? Hypotéza existencie exocystu ako komplexu v rastlinách bola navrhnutá na základe objavených ortológnych génov, ktoré kódujú 8 podjednotiek exocystu v bunkách kvasiniek a cicavcov. Nakoniec sa potvrdila ich prítomnosť aj v rastlinnom genome. V roku 2008 Michal Hála a ďalší z nášho laboratória spracovali množstvo dát z analýz v oblasti genetiky, bunkovej biológie a biochémie a zistili, že podjednotky rastlinného exocystu naozaj pracujú ako funkčný komplex, a je potrebný pre polarizovaný rast buniek jednak v sporofyte, ale aj v gametofyte.

Ďalšie ich dáta odhalili, že schopnosť podjednotiek pracovať ako komplex je potrebný pre udržanie, a zároveň zvyšuje efektivitu funkcie exocystu v mechanizmoch rastu v peľových vrecúškach - samčom gametofyte (Hála et al., 2008; Hsu et al., 1998; Lavy et al., 2007; Otegui and Staehelin, 2003; Seguí-Simarro et al., 2004).

1.3 *AUTOFÁGIA*

Rastliny si vyvinuli sofistikované mechanizmy, ktoré im umožňujú prežiť v nepriaznivom prostredí, dokonca aj s nevýhodou ich sesilného spôsobu života. Jedným takým mechanizmom je autofágia, proces degradácie makromolekúl, ktoré recyklujú poškodený, alebo nepotrebný bunkový materiál. Ale rastliny nie sú jediné organizmy, ktoré tento mechanizmus využívajú. Základné procesy autofágie sú konzervované v eukaryotických organizmoch od kvasiniek cez živočíchov, až k rastlinám (Bassham, 2007; Mehrpour et al., 2010; Yang and Klionsky, 2009). Obrázok autofágie

1.3.1 Typy autofágie

Autofágia je zložitý mechanizmus a zahŕňa viacero typov odvodených od funkcie alebo cielenia autofágie. Zatiaľ boli popísané len typy, ktoré a zahrňujú mikroautofágiu

(Mijaljica et al., 2011), makroautofágiu (Klionsky, 2005), autofágiu sprostredkovanú cez chaperony (Orenstein and Cuervo, 2010) a autofágiu zameranú na organely (Reumann et al., 2010). V rastlinách bola najčastejšie pozorovaná mikroautofágia a makroautofágia (Bassham et al., 2006). Mikroautofágia zahŕňa formovanie malých intravakuolárnych vezikúl nazývaných autofagické telieska, ktoré vznikajú invagináciami do tonoplastu. Makroautofágia zahŕňa cytoplazmatické autofagozomy, ktorých obsah je predurčený k degradácii (Bassham et al., 2006).

1.3.2 Makroautofágia

Princípom makroautofágie je tvorba autofagozomov (štruktúr s dvojitou membránou), ktoré vznikajú pri indukcii autofágie. Autofagozóm sa začne formovať okolo bunkového materiálu predurčeného k degradácii a následne je doručení k vakuole. Vonkajšia membrána po pripútaní k vakuole splýva s tonoplastom a náklad vo vnútri autofagozomu je rozložený vakuolárnymi hydrolázami aj spolu s vnútornou membránou.

1.3.4 Mikroautofágia

Je menej známa a funguje na princípe vchlipovania membrány lyzozómu (v živočíšnych bunkách), alebo vakuoly (v rastlinných bunkách a v hubách). Membrána začne tvoriť invaginácie tvarované do autofagického tunela, ktorý je vyplnený cytoplazmou (De Duve and Wattiaux, 1966)

Mikroautofágiu delíme na neselektívnu (v živočíšnych bunkách) a selektívnu (v kvasinkách). Neselektívna zahŕňa rozpustné vnútrobunkové substráty v tunelových invagináciách. Na druhej strane selektívna autofágia oddeľuje špecifické organely s pahýľovitými výbežkami. Tá sa ďalej člení na: mikropexofágia (degradácia peroxyzomov), postupná mikroautofágia jadra (PMN), mikromitofágia (degradácia mitochondrií) (Li et al., 2012).

Aj napriek tomu že vedci študujú autofágiu už dlhé roky, tak o jej molekulárnych mechanizmoch zatiaľ vieme len veľmi málo - a to práve u rastlín. Zatiaľ sa podarilo odhaliť niekoľko funkčných génov popísaných hlavne na kvasinkách.

Vedci identifikovali viac ako 30 génov: kinázový komplex Atg1 - Atg13, Atg9 a asociované proteíny ako sú komplex fosfatidylinositol 3-kináza (PtdIns3K) a dva systémy podobné ubiquitínovým modifikáciám (Yang and Klionsky, 2010).

1.3.5 Úloha SNARE v autofágii

Aby sa autofagozóm dostal do vakuoly, musí jeho vonkajšia membrána splynúť s vakuolárnou membránou. Tento mechanizmus sprostredkuje komplex SNARE, ktorý som spomínala aj v kapitole literárneho prehľadu o komplexe exocyst. V mechanizme autofágie v kvasinkách je zodpovedný za procesy fúzie a expanzie autofagozómu do vakuoly cez reguláciu organizácie Atg9 (Nair et al., 2011; Yang and Klionsky, 2009)

1.3.6 Fosfoinositid 3 - kináza (PI3K) a jej inhibítor 3MA

PI3K je lipidická kináza, ktorá fosforiluje fosfatidylinositol (PI). Je dôležitým regulátorom rastu buniek, metabolizmu a podieľa sa na samotnom prežití bunky (Knight and Shokat, 2007). Je aktivovaná receptorovou tyrozín - kinázou a inými receptormi nachádzajúcimi sa na povrchu bunky. PI3K syntetizujú PI3P, PI(3,4,5)P3 (membránové lipidy (Vanhaesebroeck et al., 2001).

V živočíšnych bunkách sa vyskytujú 3 druhy PI3K: I PI3K fosforyluje hlavne PI 4,5-bisfosfát, pričom vznikne fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát (PI(3,4,5)P3), zatiaľ čo III PI3K/hVps34 fosforyluje iba PI za vzniku fosfatidylinositol 3-fosfát (PI3P). Skupina II PI3K katalyzuje PI3P a PI3,4-bisfosfát (Backer, 2008; Engelman et al., 2006).

III PI3K/hVps34 je pozitívny regulátor autofágie, konkrétne má funkciu vo vezikulárnom transporte a v endozomálnom alebo lyzozomálnom procese. Pri indukcii autofágie, Vps34 sa zaktivuje a zo skorého endosomálneho kompartmentu prejde na novo vznikajúcu autofagickú membránu (Backer, 2008; Chang et al., 2009)

3-metyladenín (3MA) je látka, ktorá sa používa ako bežný inhibítor autofágie, pretože inhibuje práve aktivitu III PI3K (Wu et al., 2010).

1.4 VAKUOLA

Vakuola je organela, ktorá je nevyhnutne potrebná pre sesilný spôsob života rastlín. Vykonáva veľa funkcií: udržiava turgor, protoplazmickú homeostázu, ukládanie metabolických produktov, pohlcuje xenobiotiká, trávenie zložiek cytoplazmy.

Materiál vo vnútri rastlinnej vakuoly pochádza z dvoch dráh a to z intracelulárnej biosyntetickej dráhy a koordinovanej endocytickej dráhy. Biosyntetická dráha zahŕňa triedenie proteínov určených vakuole od tých, ktoré majú byť transportované na povrch bunky. Druhá zahŕňa endocytózu materiálov z plazmatickej membrány, autofagickú dráhu formovania vakuoly a samotný transport materiálu do vakuoly (Battey et al., 1999; Marty, 1999; Sanderfoot and Raikhel, 1999)

1.4.1 Akvaporíny α -TIP, γ -TIP, Δ -TIP

V jednej bunke sa môže nachádzať viacero vakuol s odlišnou funkciou. Táto diverzita je definovaná prítomnosťou odlišných akvaporínov na tonoplaste: α -TIP (tonoplastový vnútorný proteín) a Δ -TIP sa nachádzajú na tonoplaste zásobnej vakuoly a γ -TIP na tonoplaste lytickej vakuoly (Jauh et al., 1999). Vďaka ich početnosti sa používajú ako značky pre vizualizáciu tonoplastu. Vizualizované sú buď imunofluorescenciou (Jauh et al., 1998, 1999), alebo stabilnou prípadne tranzientnou expresiou fluorescenčnej proteínovej fúzie (Mitsubishi et al., 2001; Oufattole et al., 2005).

1.4.2 Antokyány

Spolu s betalínmi a karotenoidmi tvoria najväčšiu skupinu rastlinných pigmentov a vykonávajú rôznorodé funkcie v oblasti ekofyziológie (Grotewold, 2006). Syntetizujú sa fenylypropanoidovým metabolizmom v kooperácii medzi plastidmi a v endoplazmatickom retikule (ER). Akumulujú sa v centrálnej vakuole, kde vykonávajú antioxidantné funkcie (Hrazdina and Wagner, 1985). Aby mohli vykonávať funkciu pigmentu, potrebujú kyslé vakuolárne pH (Yoshida et al., 1995). Preto je dôležité aby sa antokyánové prekurzory dostali z ER do vakuoly. Antokyány môžu vstupovať do vakuoly dvomi cestami. Jedna cesta je sprostredkovaná cez GST-ligandínové transportéry. U *Arabidopsis* je to TT19 (Sun et al., 2012). Zablockovaním importu

antokyánov do vakuoly inhibíciou GST-ligandínových transportérov napríklad 1-Chlóro-2-4-dinitrobenzénom sa nezabránilo akumulácii antokyánov vo vakuole, ale narástol počet AVIs (Poustka et al., 2007). To znamená, že pre transport a akumuláciu antokyánov existuje ďalšia alternatívna cesta, ktorá zahŕňa autofágiu. Takže antokyány môžu do vakuoly vstupovať priamo z ER a nejdú cez Golgi dráhu (Poustka et al., 2007)

1.4.3 Vakuolárne invaginácie

Vakuola tvorí vchlípeniny (invaginácie), ktoré boli popísané v kvasinkách (Müller et al., 2000). V rastlinách sú zrejme výsledkom akumuláčného mechanizmu vnosu nákladu, v priebehu ktorého sa tvoria invaginácie. Väčšinou sú rozvetvené. V zúžených miestach sú zložené skôr z proteínov a naopak v špičkách, ktoré majú schopnosť pučať sú bohaté na lipidy (Müller et al., 2000). Zaujímavé je, že sa o týchto vchlípeninách veľa nevie, vlastne iba to, že existujú. Sú práce, ktoré naznačujú, že sú mikroautofágneho charakteru (Conn et al., 2010) Cez vakuolárne invaginácie sa môžu transportovať do vakuoly antokyány, vakuolárne ATPázy, ale možno sa takto transportujú aj iné látky s fenypropanoidovým metabolizmom podobné antokyánom (Kulich and Žárský, 2014; Poustka et al., 2007; Viotti et al., 2013).

2. CIELE

V rámci úsilia o pochopenie mechanizmov účasti komplexu exocyst v regulácii autofágie:

- 1.** Charakterizovať možnú interakciu autofagickej Rab GTPázy RABG3b pomocou dvojhybridného systému v kvasinke s vybranými podjednotkami exocystu.
- 2.** Sledovať dynamiku tonoplastu a endoplazmatického retikula po farmakologickej indukcii či inhibícii autofágie vo WT *Arabidopsis thaliana*.

3. METÓDY

3.1 PESTOVANIE RASTLÍN A BAKTÉRIÍ

3.1.1 Sterilná kultivácia *Arabidopsis thaliana*

Semená *Arabidopsis* som 20 minút nechala trepať v sterilizačnom roztoku, ktorý bol zložený z 1,5 ml 20 % SAVA a 1 µl detergentu JAR. Po uplynutí sterilizačnej doby som semená za sterilných podmienok vo flow-boxe ALPINA trikrát premyla sterilnou destilovanou vodou a následne preniesla do chladničky, kde 2 dni prebiehala ich vernalizácia pri 4 °C. Potom som semená vysiala pomocou mikropipety na polovičné MS médium (Murashige and Skoog, 1962) v štvorcových Petriho miskách, ktoré som následne umiestnila v zvislej polohe do kultivačnej miestnosti, kde sa udržiavalo konštantné prostredie: 20 °C, vlhkosť 40 %, 16 hod. svetlo/8 hod. tma, ožiarenie 100 µmol/m²/s.

3.1.2 Nesterilná kultivácia *Arabidopsis thaliana*

Nesterilnú kultiváciu som využila pre zber semien. Semená *Arabidopsis* som vysiala po 5 ks na rašelinové pelety (Jiffy) a na dva dni uložila do chladovej miestnosti pri 4 °C. Následne som ich preniesla do kultivačnej miestnosti, kde sa udržiavalo konštantné prostredie: 20 °C, vlhkosť 40%, 16 hod. svetlo/8 hod. tma, ožiarenie 100µmol/m²/s.

3.1.3 Médiá

½ MS médium (Murashige and Skoog, 1962):

Zmiešala som 1,1 g MS média + B5 vitamín (Duchefa M0231), 8 g rastlinného agaru, 5 g sacharózy, doplnila destilovanou vodou do 500 ml a pH som upravila na hodnotu 5,4. Pre niektoré experimenty som použila ½ MS médium bez sacharózy.

YEPD médium:

Zmiešala som 2,75 g kvasinkového extraktu, 5,5 g peptónu a 5,5 mg adenínu, doplnila destilovanou vodou do 250 ml, po autoklávovaní (121°C, 0,144 MPa, 20 min. v autokláve Omega™Media alebo v autokláve SYSTEC) som pridala sterilnú 50 % glukózu (10ml).

SD médium:

Zmiešala som 2,68 g yeast nitrogen base bez aminokyselín, 8 g rastlinného agaru, vhodný drop out, doplnila do 400 ml destilovanou vodou, po autoklávovaní som pridala 16 ml 50% sterilnej glukózy.

MPB médium (Ames et al., 1999; Postgate, 1963):

Zmiešala som 25g živného bujónu č. 2 s destilovanou vodou, ktorú som doplnila do 1 l a nakoniec som upravila pH na hodnotu 7,5.

MPA médium:

Zmiešala som 23 g živného agaru a 10 g NaCl a doplnila destilovanou vodou do 1 l.

3.1.4 Príprava kompetentných buniek *Escherichia coli*, kmeň DH5α (*E.coli*)

Najskôr som zaočkovala Petriho miskú s MPB médiom kompetentnými bunkami *E.coli* z laboratórnych zbierok. Cez noc som ju nechala inkubovať v 37 °C v termostate Q-CELL. Následujúci deň som za sterilných podmienok vo flow-boxe ALPINA odobrala jednu kolóniu pomocou sterilného špáradla (v autokláve Omega™Media, alebo v autokláve SYSTEC pri 121°C, 0,144 MPa, 20 min.) a preniesla ju do 10 ml sterilného MPB média. Za stáleho miešania (210 rcf) som ju nechala inkubovať cez noc v 37 °C v trepačke (GFL 3005). Na druhý deň som celý objem narastenej kultúry premiestnila do 1 l MPB média a nechala ju kultivovať v 37 °C v trepačke (GFL 3005) pri 210 rcf po dobu, kedy OD₆₀₀ dosiahlo hodnotu 0,5 až 0,8. Narastenú kultúru so správnym OD₆₀₀ som následne rozdelila do 50 ml skúmaviek a nechala ju oddychovať 15 min na ľade. Potom som ju centrifugovala pri 4 °C ďalších 15 min pri 3 600 rcf. Pelet som rozpustila v 1 l destilovanej vody a nechala som to centrifugovať 15 min pri 4 °C. Tento

prečistený pelet som rozpustila v 0,5 l destilovanej vody a znovu som to centrifugovala 15 min pri 4 °C pri 3 600 rcf. Druhýkrát prečistený pelet som rozsuspendovala v 20 ml 10% glycerolu. Zmerala som OD₆₀₀, na základe ktorého som neskôr určila konečné množstvo glycerolu tak, aby výsledná koncentrácia buniek *E.coli* bola vyššia ako 3 x 10¹⁰ buniek (pokiaľ 108 buniek má hodnotu OD₆₀₀ 0,1) Bunky v glycerole som centrifugovala pri 4 600 rcf v 4 °C a pelet som rozsuspendovala v rozmedzí 2 až 3 ml 10 % glycerolu na základe zmeranej hodnoty OD₆₀₀. Takto nariadené bunky som po 50 µl rozdelila do mikrocentrifugačných skúmaviek a zmrazila tekutým dusíkom. Potom som ich skladovala v chladiacom boxe pri -80 °C.

3.1.5 Kríženie *Arabidopsis thaliana*

Pre kríženie *Arabidopsis thaliana* som použila rastliny, ktoré boli staré približne 3 - 4 týždne. Materskej rastline som odstránila všetky kvetné púčiky okrem 3 - 5 väčších okrajových kvetných púčikov, ktorým som následne pomocou ostrej pinzety odstránila všetky kvetné lístky, lupienky a tyčinky tak, aby zostala len neopelená blizna piestiku. Z druhej rastliny som odobrala zrelú tyčinku, alebo celý kvet, ktorým som opelila obnaženú bliznu. Po opelení všetkých 3 - 5 blizien z ponechaných púčikov som vrchol rastliny zabalila do potravinovej fólie a priviazala na špajľu. Zabránila som tak vyschnutiu, alebo napadnutiu škodcami. Fóliu som po dvoch dňoch odstránila a nechala *Arabidopsis* rásť a zrieť. Po vyschnutí šesulí som zožala semená, z ktorých som vypestovala heterozygótnu generáciu *Arabidopsis*. Z druhej generácie som pomocou metódy genotypovania vybrala rastliny majúce rodičovský mutantný genotyp. Z ich semien som vypestovala tretiu generáciu.

3.2 PRÁCA S DNA

3.2.1 Izolácia genómickej DNA

Z *Arabidopsis thaliana* som odobrala mladý lístok s priemerom približne 1 cm a v mikroskúmavke som ho pomocou homogenizačnej tyčinky rozmlela. Následne som

pridala 400 µl extrakčného pufru (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) a o chvíľu som pridala 300 µl chloroformu. Zmes som vortexovala pár minút a potom som ju centrifugovala 3 min pri 16 000 rcf. Hornú fázu som opatrne (nesmelo dôjsť k premiešaniu fáz) preniesla do novej mikroskúmavky a pridala 300 µl izopropanolu. DNA som nechala 10 min zrážať na ľade. Po uplynutí doby zrážania som zmes centrifugovala 5 min pri 6 000 rcf. Supernatant som vyliala a skúmavky som nechala max 10 min schnúť otočené dnom hore na čistom papierovom obrúsku, aby sa odparili posledné pozostatky izopropanolu. Potom som pelet rozpustila v 100 µl 4 mM Tris pH 8,0.

3.2.2 Genotypovanie

Genomickú DNA, ktorú som vyizolovala z listov *Arabidopsis*, som použila ako templát pre PCR. V tejto reakcii som použila DreamTaq polymerázu a univerzálne primery zo zbierok.

Primery zo zbierok použité pri genotypovaní:

EXO70B1-2 LP	CGTGGCAGGAGTTAGAAGATG
EXO70B1-2 RP	TTGTCTGCGTTTTTCCCTATG
Gabi LB 08409	ATATTGACCATCATACTCATTGC
Exo70A1-2 LP	TCCATGGACACAAATTTTCATG
Exo70A1-2 RP	TCTACTGGCATTTCCTCAATG
Salk Lbb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC

3.2.3 Klonovanie konštruktov

Klonovanie pozostávalo z viacerých krokov. Najskôr som si PCR produkt namnožila (reamplifikovala) pomocou vybranej dvojice správnych primerov a správneho programu pre PCR reakciu. Namnožený PCR produkt som vizualizovala pomocou agarózového

gélú, z ktorého som vyrezala prúžok požadovanej veľkosti a následne som vyizolovala DNA z gélu.

Ďalším krokom bola restrikcia vektoru, ale aj inzertu rovnakými restriktázami, aby mohla prebehnúť ligácia inzertu a vektoru. Nasledovala elektroporácia do *E.coli* a narastenie bakteriálnych kolónií na selektívnych Petriho miskách s MPA médiom so správnym selekčným antibiotikom.

3.2.4 Agarózová elektroforéza

Túto metódu som použila k separácii, vizualizácii a purifikácii DNA fragmentov. V TBE pufry (10 mM Tris, 20 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA, pH 8,0) som rozpustila práškovú agarózu v koncentrácii 0,1 g/ml a povarila som ju v mikrovlnnej rúre, kým sa agaróza úplne rozpustila v TBE. Počkala som 2 - 3 min, kým sa gél trochu ochladí a následne som pridala fluorescenčnú farbičku GelRed (Biotium, 10 000x v destilovanej vode) vo finálnej koncentrácii 1 µl GelRed na 10 ml gélu. Potom som gél naliala do utesnenej vaničky s hrebeňom vhodnej veľkosti a hrúbky a nechala gél tuhnúť približne 20 - 25 min. Potom som hrebeň vybrala a gél spolu s vaničkou som premiestnila do elektroforéznej nádržky s TBE pufrom. Vzorky som zmiešala v pomere 1 : 5 so 6x Loading Dye (Fermentas) a naniesla do jamiek v gély. Aby som mohla vzorky analyzovať, tak som do prvej jamky dala 1 - 2 µl (0,5 µg/µl) markru GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Elektroforéza prebiehala pri 90 V. Na vizualizáciu DNA a vyhodnotenie výsledkov som použila digitálny zobrazovací systém G:BOX (Syngene) a program GeneSnap (Syngene).

Aby som mohla vyizolovať DNA fragmenty z agarózového gélu, najskôr som musela gél umiestniť pod UV lampu v temnej miestnosti, a až potom z vizualizovaných prúžkov vybrať fragment požadovanej veľkosti. Sterilným skalpelom som ho vyrezala a umiestnila do 2 ml dopredu odváženej mikroskúmavky. DNA som izolovala pomocou kitu MinElute Gel Extraction Kit (250) Cat. No. 28606 (Quiagen). Výsledkom bol 10 µl eluát v eluačnom pufry.

3.2.5 Polymerázová reťazová reakcia

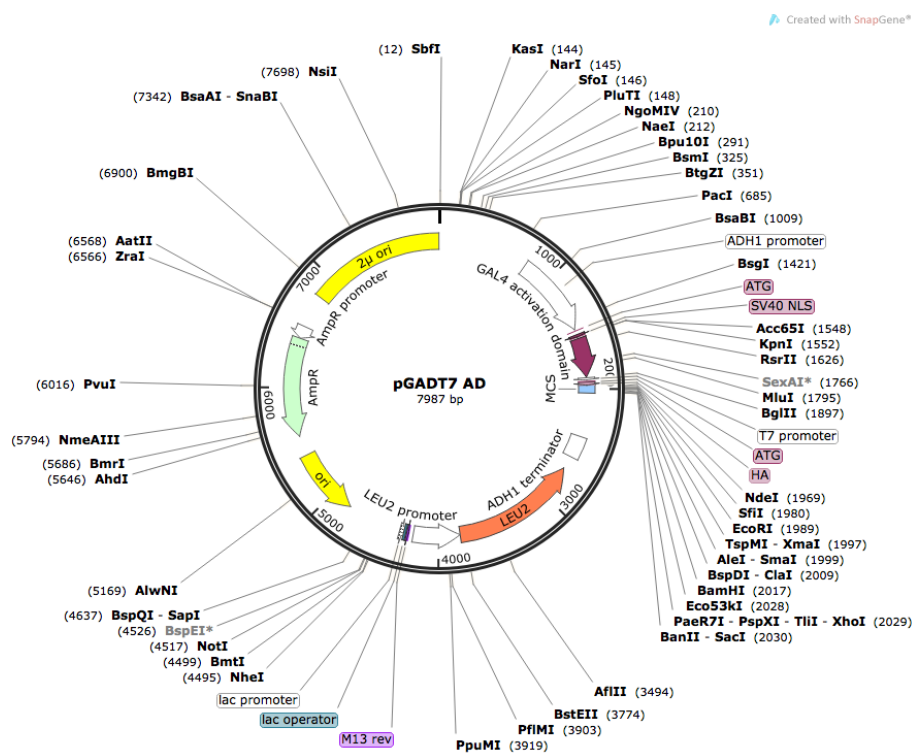
Polymerázová reťazová reakcia (PCR) prebiehala v 200 μ l mikroskúmavkách v termocyklery TPersonal (Biometra) alebo v gradientovom cyklery TGradient (Biometra). Keď som použila polymerázu DreamTaq (Fermentas), tak som do reakčnej zmesi s objemom 20 μ l pridala 0,04 μ l DreamTaq DNA polymerázy (5 U/ μ l), 2 μ l 10x DreamTaq pufru, 0,25 μ l dNTP (každý 2,5 mM), 0,2 μ l ľavého primeru (100 μ M), 0,2 μ l pravého primeru (100 μ M), 1 μ l templátovej DNA a 16,3 μ l destilovanej vody. Reakcia prebiehala v tomto teplotnom programe: 96 °C 30 s, 57 - 63 °C (T_m -2) 30 s, 72 °C 1 min/ 1 kbp, 72 °C 10 min, krok 2 - 4 sa opakoval 28x. Pokiaľ som použila Phusion High-Fidelity (Finnzymes), tak som do reakčnej zmesi s objemom 20 μ l pridala 0,2 μ l Phusion DNA polymerázy (2 U/ μ l), 4 μ l 5x Phusion HF pufru, 0,4 μ l dNTP (každý 2,5 mM), 0,5 μ l ľavého primeru (100 μ M), 0,5 μ l pravého primeru (100 μ M), 1 μ l tempátovej DNA a 13,4 μ l destilovanej vody. Reakcia prebiehala v tomto teplotnom programe: 96 °C 30 s, 98 °C 10 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s/1 kbp, 72 °C 10 min, kroky číslo 2 - 4 sa opakovali 30x.

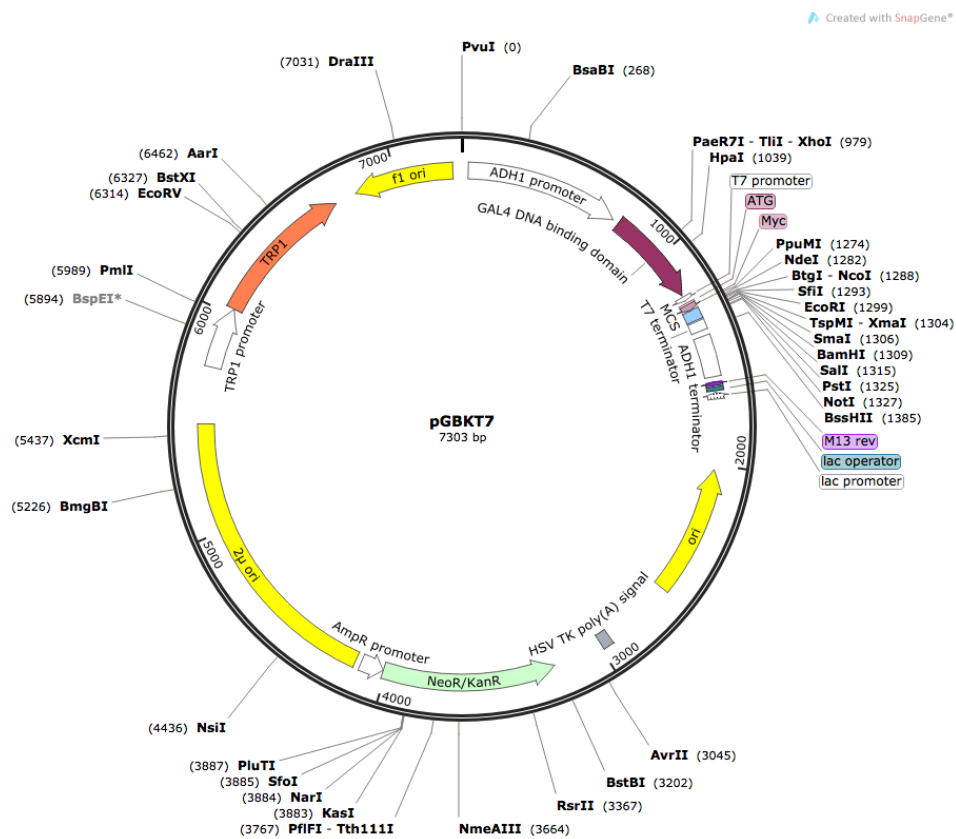
Produkty PCR reakcií som vizualizovala metódou elektroforézy, ktorú som popísala vyššie. Na vizualizáciu DNA a vyhodnotenie výsledkov som použila digitálny zobrazovací systém G:BOX (Syngene) a program GeneSnap (Syngene).

Moje primery použité pri PCR:

RabG3f_XHO_REV	TTAGCTCGAGAACCCTGTAGACCTCTGTTGATTG
RabG3f_Bam_FOR	GATGGATCCCGATGCCGTCCTCCGTAGACGTAC
RabB1b_Xma_FOR	AAACCCGGGAATGTCTTACGATTATCTCTTCAAG
RabB1b_Sal_REV	TTTGTCGACCCTCTGTAGTATGATCTGGT
RabG3B BAM FOR	CTCGGATCCACATGTTCGACGCGAAGACG
RabG3B XHO REV	CAGCTCGAGAAACCTCCTCTTTGCTCAGG

Použité vektory





Zdroj obrázkov:

http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/yeast_plasmids/pGBKT7/

http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/yeast_plasmids/pGADT7_AD/

3.2.6 Štiepenie DNA

Kontrolé štiepenie

Kontrolné štiepenie som využila k tomu, aby som zistila, či sa dominantne negatívna a konštitutívne aktívna forma RabG3b zaklonovala správne. Použila som k tomu umelo vnesené miesto štiepenia v primery, aby bolo možné cez tieto miesta inzerť poštiepiť. 20 μ l reakcia obsahovala 2 μ l DNA, 2 μ l správneho puftru podľa použitej restriktázy a 0.2 μ l správnej restriktázy a 15,8 μ l destilovanej vody.

Štiepenie pred ligáciou

Použila som do jednej reakcie buď plazmidovú DNA 5 μ l, alebo PCR produkt 12 μ l a zmiešala spolu s 2 μ l optimálneho restričného pufru. Potom som pridala 0,5 μ l (5 U) restričného enzýmu, ktorý štiepi špecifické miesto na jednom konci inzertu a vo vektore, 0,5 μ l (10 U) restričného enzýmu, ktorý štiepi na druhom konci inzertu a vo vektore. Reakciu som doplnila destilovanou vodou do objemu 20 μ l. Potom som reakčnú zmes nechala inkubovať v 37 °C cez noc v termostate (Q-CELL).

Výsledok som analyzovala pomocou metódy agarózovej gélovej elektroforézy, ktorú som popísala vyššie.

3.2.7 Ligácia fragmentov DNA

Ligačná zmes obsahovala: 5 μ l plazmidovej DNA, 12 μ l inzerčnej DNA, 0,5 μ l T4 DNA ligázy (Fermentas), 2 μ l 10x T4 ligačného pufru (Fermentas). Po jej namiešaní som ju nechala hodinu inkubovať pri 21 °C a potom pri 16 °C cez noc. Na druhý deň som ligázu inaktivovala zahriatím ligačnej zmesi v termobloku (BioSan CH-100) zahriatím na 65 °C po dobu 10 min.

3.2.8 Elektroporácia *Escherichia coli*, kmeň DH5 α (*E.coli*)

K ešte zmrazeným kompetentným baktériám *E.coli* v mikrocentrifugačnej skúmavke som pridala 1,5 – 2 μ l plazmidovej DNA, ktorou som chcela bunky transformovať a preniesla do vychladenej elektroporačnej kyvety. Celý proces som robila na ľade, aby boli baktérie *E.coli* stále v chlade. Následne som ich elektropórovala pomocou elektroporátoru Gene Pulser Xcell (BIORAD), alebo Eporator (Eppendorf) pri 2 500 V. Týmto procesom sa DNA vniesla do *E.coli*. Po elektrickom pulze som do kyvety s baktériami pridala 500 μ l MPB média a nechala som ich hodinu kultivovať pri 37 °C v termostate Q-CELL. Po uplynutí kultivačnej doby som natransformované baktérie za sterilných podmienok laminárneho flowboxu ALPINA vyliala na misky s MPA médiom s pridanými vhodnými selekčnými antibiotikami. Potom som ich nechala cez noc kultivovať pri 37 °C v termostate Q-CELL.

3.2.9 Izolácia plazmidovej DNA

Sterilným špáradlom som preniesla jednu kolóniu natransformovaných baktérií *E.coli* z petriho misky do skúmavky s 2 ml MPB s pridanými antibiotikami podľa plazmidu v koncentrácii 15-100µg/ml (podľa antibiotika). Nechala som toto inokulum kultivovať cez noc pri 37 °C za stáleho miešania v trepačke (GFL 3005) pri 180 ot./min.. Na druhý deň som narastenú bakteriálnu kultúru 1 minútu centrifugovala pri 6 000 x g. K izolácii plazmidovej DNA z baktérií som použila High Pure Plasmid Isolation Kit (250) Cat. no. 11 754 785 001 (Roche). Vyizolovanú plazmidovú DNA z kitu som mala v 100 µl elučného pufru (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Vyizolovanú DNA som overila kontrolnou restrikciou a sekvenovaním.

3.2.10 Sekvenovanie

Najskôr som vyhodnotila koncentráciu DNA vzorku, ktorý som chcela osekvenovať pomocou spektrofotometru (NanoDrop 2000). Potom som namiešala sekvenačnú zmes, ktorá obsahovala: 5 pM sekvenačného primeru, plazmidovú DNA 4 ng/100 bp a doplnila som to destilovanou vodou do celkového objemu 8 µl. Vlastné sekvenovanie urobila sekvenačné laboratórium Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej. Výsledky zo sekvenovania som vyhodnotila v programe Geneious.

Primery použité pri skvenovaní:

pGADT7 For Seq	TACGACGTACCAGATTACGC
pGBKT7 For Seq	CGCCGGAATTTGTAATACGA

3.3 *DVOJHYBRIDNÝ KVASINKOVÝ TEST*

3.3.1 Transformácia kvasiniek

K transformácii som použila kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kmeň AH109.

Za sterilných podmienok vo flow-boxe ALPINA som obodbrala 2 - 3 kolónie kvasiniek do 50 ml YEPD média a rozsuspendovala som ich. Nechala som ich cez noc inkubovať na 30 °C v trepačke GFL 3005 pri 250 ot./min, aby dosiahli stacionárnu fázu. Na druhý deň som z inokula odobrala 30 ml a preliala do 300 ml nového YEPD média. Kvasinky som inkubovala pri 30 °C v trepačke na 250 ot./min približne 4 hodiny, pokiaľ nedosiahli OD₆₀₀ 0,4 - 0,6. Kvasinkovú kultúru so správnym OD₆₀₀ som rozdelila do 50 ml centrifugačných skúmaviek a nechala ich centrifugovať 5 min pri 21 °C pri 1 000 x g. Médium som vyliala a kvasinkový pelet som rozsuspendovala v 50 ml destilovanej vody a opäť som ich nechala centrifugovať pri izbovej teplote 5 min pri 1 000 x g. Supernatant som vyliala a do kvasinkového peletu som pridala 1,5 ml čerstvo pripraveného sterilného roztoku TE/LiAc. Medzičasom som si pripravila v mikroskúmavke zmes zloženej z 3 µl DNA vo vektore pGADT7 (obsahuje aktivačnú doménu AD a reportérový gén LEU2, ktorý umožňuje kvasinkám rásť na médiu bez leucínu) a 3 µl plazmidovej DNA vo vektore pGBKT7 (obsahuje väzobnú doménu BD a reportérový gén TRP1, ktorý umožňuje rásť kvasinkám na médiu bez tryptofánu) + herring testes carrier DNA (na 20 min zohriaty v 96 °C, potom sa chladil 2 min na ľade) a nakoniec som pridala 100 µl pripravených kvasiniek v TE/LiAc. Jemne som mikroskúmavku párkrát pretrepala a pridala 600 µl sterilného roztoku PEG/LiAc a nechala vortexovať 10 s na maximálnej rýchlosti. Potom som túto zmes nechala inkubovať 30 min za stáleho miešania 200 ot/min. Po uplynutí inkubačnej doby som pridala 70 µl DMSO a indukovala tepelný stres 42 °C po dobu 15 min. vo vodnom kúpeli a po následne som nechala kvasinky max 2 min na ľade. Nakoniec som zmes centrifugovala 5s (max 6000 x g) a supernatant som vyliala. Do kvasinkového peletu som pridala 200 µl TE pufru a celý objem som vyliala na Petriho misky s SD médiom so selekciou -LEU -TRP. Petriho misky som nechala inkubovať 2 - 4 dni v 30 °C v termostate Q-CELL.

3.3.2 Vykvapkávací experiment

Odobrala som 2 - 3 kolónie z narastených kvasiniek na selekčnom SD médiu -LEU, -TRP a zmiešala som ich s 500 μ l sterilnej destilovanej vody v mikroskúmvke. Zmerala som OD₆₀₀ a nariedila vzorky tak, aby každá mala OD₆₀₀ 0,1. Z tohto roztoku som potom pripravila koncentračný gradient OD₆₀₀ 0,1, 0,01, a 0,001. Z každého riedenia som odobrala 10 μ l a nakvapkala na selekčné SD médium v Petriho miske so selekciou -ADE, -HIS, -LEU, -TRP a nechala som ich kultivovať 3 - 7 dní v 30 °C.

3.4 **MIKROSKOPOVANIE**

Pozorovania som robila na spinning disc mikroskope NikonTE200E s Yokogawa Andor spinning disc jednotkou a kamerou iXON emCCD ultra897. Použila som lasery: 488 (zelené) pre vizualizáciu GFP značených DELTA-TIP akvaporínov (tonoplast), 561(červené) pre vizualizáciu RFP značeného HDEL (endoplazmatické retikulum), 640 (dlhovlnné červené) pre sledovanie autofluorescencie plastidov. Použila som objektív 63x s vodnou imerziou NA 1,2. Sledovala som etiolovaný hypokotyl *Arabidopsis thaliana* v časti, kde sa začínajú tvoriť kľúčne listy. Dokumentáciu som robila v čase a to s 3 sekundovým intervalom a snímala som 10 - 2 minúty v závislosti od dynamiky sledovaného systému.

3.4.1. Zoznam a vysvetlenie účinku aplikovaných chemikálií

DTT (*1,4-dithio-DL-threitol*) (2 mM) (Schröder, 2007) - redukuje disulfidové mostíky a interferuje s oxidatívnym skladaním proteínov v endoplazmatickom retikule. Spôsobuje tak reakciu bunky na zle poskladané proteíny v endoplazmatickom retikule (UPR - *unfolded protein response*) a tým indukciu autofágie.

CDNB (*1-chloro-2,4-dinitrobenzene*) (0,1 mM) (Poustka et al., 2007) - je to GST substrát, ktorý saturuje enzýmy, čím inhibuje vakuolárne transportéry GST-ligandínu. Zvyšuje akumuláciu antokyánov a tvorbu inklúzií vo vakuole.

3MA (*3-methyladenine*) (5 mM) (Wu et al., 2010) - inhibuje autofágiu blokovaním formácie autofagozómov tým, že inhibuje typ PI-3K (*III Phosphatidylinositol*), ktorý je potrebný pre nukleáciu preautofagických štruktúr.

Naringenín (100 μ M) (Poustka et al., 2007) – medziprodukt sekundárneho metabolizmu prekursor antokyánov a produkt chalkon izomerázy. Jeho pridaním sa indukuje tvorba antokyánov.

3.4.2 Aplikácia chemikálií na rastliny

Etiolované semenáče *Arabidopsis thaliana* som kultivovala 3 dni v tme v tekutom 1/2 MS médiu bez sacharózy. Deň pred sledovaním na konfokálnom mikroskope som ich ošetrila príslušnými drogami (ošetrené rastliny som roztriedila do kategórií v závislosti od použitej drogy), pričom jednu kategóriu som nechala len ako kontrolu bez ošetrenia. Pre vyvolanie autofágie som použila DTT (2 mM) a nechala inkubovať cez noc, pre indukciu antokyánov som použila naringenín (0,1 mM), ktorý som tiež nechala inkubovať cez noc. CDNB som použila 1 h pred pridaním naringenínu, semenáče *Arabidopsis* som nechala inkubovať v tejto droge 1 h, potom som médium s drogou odsala a pridala čerstvé tekuté 1/2 MS médium bez sacharózy s pridaným naringenínom a nechala inkubovať cez noc. 3MA som pridala 1 h pred pozorovaním na konfokálnom mikroskope.

3.4.3 Kvantifikácia povrchu tonoplastu

Meranie som uskutočnila v programe Fiji. Získané hodnoty som zaznamenávala do tabuľky v programe Microsoft Office Excel 2007, kde som dáta ďalej spracovala do pomeru a aritmetického priemeru a následne do grafu.

Na optických rezoch som merala obvod tonoplastu a obvod bunkovej steny (BS) a následne som vypočítala ich pomer, ktorý vypovedá o pomere plôch tonoplastu a bunkovej steny a teda o komplexite vakuolárneho povrchu.

4. VÝSLEDKY

4.1 TESTOVANIE MOŽNEJ INTERAKCIE VYBRANÝCH PODJEDNOTIEK KOMPLEXU EXOCYST S GTPázou RabG3B

Malú GTPázu RabG3b ako možného interaktora exocystu v *Arabidopsis* som si vybrala z viacerých dôvodov. V prvom rade je to pozitívny regulátor vývoja xylému a cez autofágiu reguluje diferenciáciu cievných zväzkov. Jeho nadmerná expresia spôsobila zvýšenie expresie génov pre programovú bunkovú smrť (PCD), pre autofágiu, a tiež spôsobila zvýšenie expresie génov pre biosyntézu komponentov sekundárnej bunkovej steny. Rastliny s nadmernou expresiou RabG3b mali zvýšený rast stonky a posilnený xylém (Chua et al., 2011; Kwon et al., 2010).

Ďalším dôvodom, prečo som si vybrala RabG3b bol predbežný výsledkok kvasinkového dvojhybridného testu (v spolupráci s Mgr. Ivanom Kulichom PhD), v ktorom N - terminálna časť RabG3b (Obr. Č 1) interagovala s niektorými podjednotkami komplexu exocyst: Exo70B1, Exo70B2, N - terminálna časť Exo84b (Obr.4).

Cieľom prvej časti mojej práce bolo overiť interakcie vybraných podjednotiek exocystu s N - terminálnou časťou a celou formou bielkoviny RabG3b (FL RabG3b) a to dvojhybridným kvasinkovým testom. Pokiaľ by vyšiel pozitívne, tak by nasledovalo overenie interakcií aj Försterovým rezonančným prenosom energie (FRET) a metódou *pull-down assay*.

Ďalej som sledovala ako kontrolu interakcie medzi podjednotkami exocyst Exo70B1, Exo70B2, Exo84b a N - terminálnym fragmentom RabB1b. RabB1b je malá GTPáza z proteínovej rodiny Rab2 v podskupine Rab-B v *Arabidopsis*. Je to vzdialená a funkčne odlišná GTPáza od RabG3b. Jej funkcia je dôležitá pri skorých štádiách biosyntetického transportu nákladu z ER do Golgi (Rutherford and Moore, 2002).

4.1.1 Kvasinkový dvojhybridný test interakcií bielkovín medzi N - terminálnou či FL RabG3b a Exo70B1, Exo70B2, C - terminálnym fragmentom Exo84b a N - terminálnym fragmentom Exo84b

FL RabG3b som zaklonovala do dvoch rôznych vektorov pre dvojhybridný kvasinkový test: pGADT7 AD (obsahuje GAL4 aktivačnú doménu TF), pGBKT7 (obsahuje GAL4 DNA väzobnú doménu TF). Plazmidy s *EXO70B1* a *EXO70B2* som použila z laboratórnych zbierok, kde boli zaklonované iba do vektoru pGBKT7. N - terminálny fragment Exo84b a C - terminálny fragment Exo84b, ktorý je zaklonovaný v oboch vektoroch, ako aj ďalšie konštrukty sú dostupné v laboratórnych zbierkach. Pozitívna kontrola so silnou interakciou bola tiež z laboratórnych zbierok: interakcia Exo70H4 zaklonovaná v pGADT7 s C - terminálnym fragmentom Exo84b zaklonovaný v pGBKT7.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmeň AH109 som transformovala pripravenou DNA. Transformované kvasinky som nechala rásť na selekčnom SD médiu bez leucínu a tryptofánu. Dvojhybridný kvasinkový test som robila na selekčnom SD médiu bez adenínu, histidínu, leucínu a tryptofánu, pričom som kvasinky nechala rásť pri 30 °C. a každý deň som kontrolovala kvasinkové kolónie. Prvé drobné kolónie sa objavili až o 8 - 9 dní, zatiaľ čo pozitívna kontrola z laboratórnych zbierok (interakcia Exo70H4 zaklonovaná v pGADT7 s C - terminálnym fragmentom Exo84b zaklonovaný v pGBKT7) narástla už na tretí deň, pričom za pozitívne interakcie sa obecné považujú kvasinky, ktoré vytvoria viditeľné kolónie do 5 dní od transformácie. Narastené kolónie transformovaných kvasiniek po siedmich dňoch boli aj na negatívnej kontrole, čo značilo buď kontamináciu, alebo rast pozadia. Transformáciu kvasiniek a dvojhybridný test som zopakovala 4x a zakaždým mi vyšiel rovnaký výsledok, kde narástla aj negatívna kontrola. Na základe tvaru kvasiniek pod mikroskopom nešlo o kontamináciu. RabG3b s podjednotkami komplexu exocyst neinteragoval (Orázok č.3).

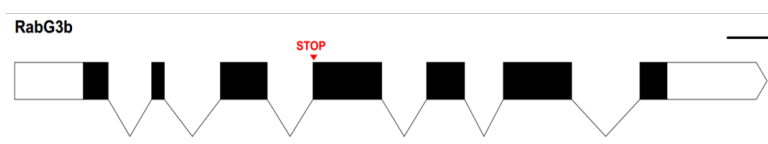
Test som sa pokúsila zopakovať s odlišným selekčným SD médiom bez histidínu, leucínu a tryptofánu a s pridaným inhibítorom histidínového metabolizmu 3-aminotriazolom (10 mM). Na tejto selekcii mi nerástla dobre ani pozitívna kontrola v porovnaní s kolóniami na selekčnom SD médiu bez adenínu, histidínu, leucínu a tryptofánu.

Test som následne zopakovala na veľmi slabom selekčnom SD médiu bez histidínu, leucínu a tryptofánu. Na tomto SD médiu vyrástli všetky transformované kvasinky vo veľmi vysokej koncentrácii vrátane pozitívnej a aj negatívnej kontroly.

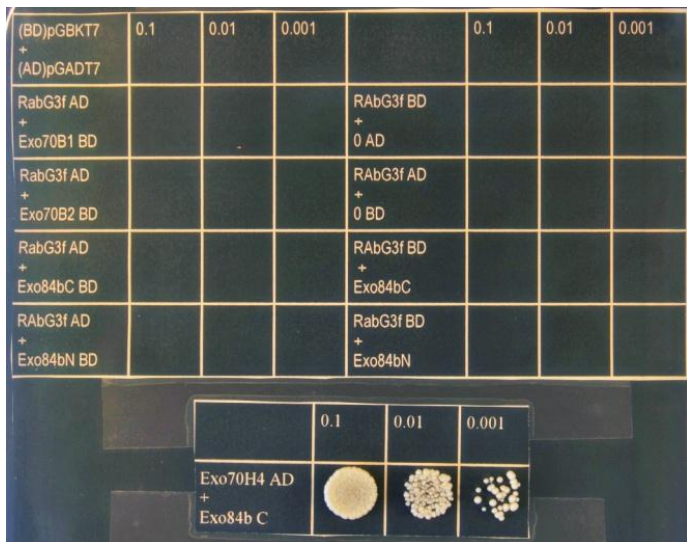
Kvasinkový dvojhybridný test som robila aj s konštruktom RabG3f za rovnakých podmienok ako RabG3b. RabG3f takisto neinteragoval s vybranými podjednotkami exocystu (Obr. Č 2).

Žiadna z testovaných GTPáz vo FL forme teda nevykazovala pomocou kvasinkového dvojhybridného testu interakciu s podjednotkami exocystu. Tieto pozorovania však nevylučujú slabšiu interakciu malých GTPáz a a niektorou z podjednotiek exocystu *in situ* v rastlinnej bunke.

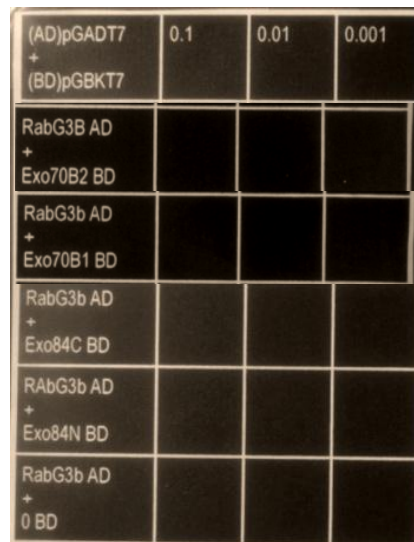
Možnú slabú interakciu som sa pokúsila overiť s pomocou Mgr. Martiny Ružičkovej metódou *pull-down assay*, avšak sa mi nepodarilo úspešne ukončiť expresiu rekombinantnej bielkoviny v baktériách E.coli kmeň BL21(DE3)RIPL a kmeň DH5 α . Test sme robili pri dvoch rôznych teplotách 28 °C a 37 °C s 0,1 mM IPTG, alebo 1 mM IPTG ako induktorom a kultivovali sme ich buď 4 h alebo 8 h. Po konzultácii so školiteľom som nakoniec ukončila túto časť experimentov, pretože príprava rekombinantnej bielkoviny môže naraziť na ťažko prekonateľné problémy a výsledky z kvasinkového dvojhybridného testu neboli povzbudzujúce.



Obrázok č. 1: N - terminálny fragment RabG3b



Obrázok č. 2: FL RabG3f neinteraguje s vybranými podjednotkami exocystu



Obrázok č. 3: FL RabG3b neinteraguje s vybranými podjednotkami exocystu

4.1.2 Kvasinkový dvojhybridný test interakcie medzi N - terminálnym fragmentom RabB1b ako kontrolou vzdialene príbuznej bielkoviny k RabG3b a Exo70B1, Exo70B2, C - terminálnym fragmentom Exo84b a N - terminálnym fragmentom Exo84b podjednotkami exocystu

Keďže N-koniec RabG3b vykazoval interkáciu s podjednotkami exocystu na rozdiel od FL verzie, bolo zaujímavé zistiť, či je táto interakcia všeobecná a spoločná s inými Rab. GTPázami, alebo špecifická pre RabG3B. Overila som preto interakciu medzi podjednotkami exocystu a evolučne vziadeným RabB1b (Obr. č.4).

Postupovala som rovnako ako pri predošlom dvojhybridnom teste. N - terminálny fragment RabB1b som zaklonovala do dvoch rôznych vektorov pre dvojhybridný kvasinkový test: pGADT7 (obsahuje aktivačnú doménu), pGBKT7 (obsahuje väzobnú doménu). Exo70B1, Exo70B2, C - terminálny a N - terminálny

fragment Exo84b som použila z laboratórnych zbierok. Transformované kvasinky som vykvapkala na selekčné SD médium bez adenínu, histidínu, leucínu a tryptofánu a nechala kultivovať pri 30 °C. Po troch dňoch narástli kolónie rovnako veľké ako pozitívna kontrola, zatiaľ čo negatívna kontrola nenarástla.

Moje výsledky indikujú, že N - terminálna časť Rab GTPáz má pravdepodobne všeobecnú schopnosť interagovať s niektorými podjednotkami exocystu a nejedná sa teda o vlastnosť špecifickú pre RabB1B.

(BD)pGBKT7 + (AD)pGADT7	0.1	0.01	0.001	N-terminal fragment	0.1	0.01	0.001
RabB1b AD + Exo70B1 BD				RabG3b AD + Exo70B1 BD			
RabB1bAD + Exo70B2 BD				RabG3b AD + Exo70B2 BD			
RabB1b AD + Exo84bC BD				RAbG3b AD + Exo84bC BD			
RAbB1bAD + Exo84bN BD				RAbG3b AD + 0 BD			
RAbG3f AD + 0 BD				Exo70H4 AD + 84bC BD			

Obrázok č.4: *Nal'avo: N-terminálny fragment RabB1b interaguje s Exo70B1, Exo70B2 a s Exo84b C-terminálnym koncom; Napravo: N-terminálny fragment RabG3b*

4.2 ***SLEDOVANIE MORFOLÓGIE TONOPLASTU PRI INDUKCII A INHIBÍCII AUTOFÁGIE***

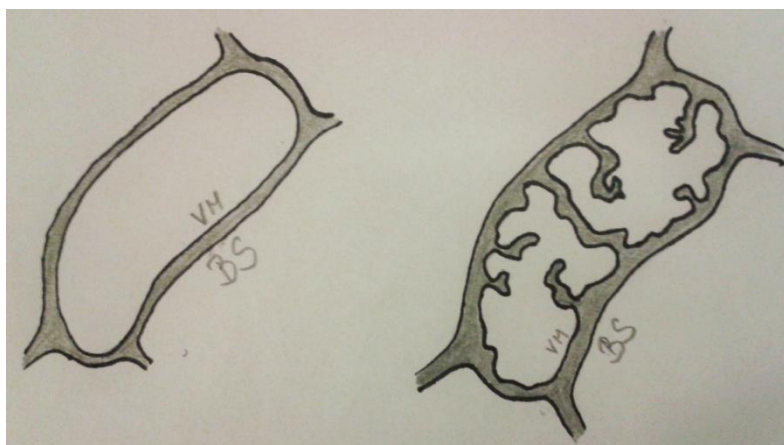
Experimenty a pozorovanie som robila na 3 - 4-denných semenáčoch *Arabidopsis thaliana*. Semená *Arabidopsis* som nechala rásť v tme v tekutom 1/2 MS médiu bez sacharózy po dobu 2 - troch dní (v závislosti od ošetrenia). Vyrástli tak etiolované semenáče, na ktorých som sledovala bunky hypokotylu v časti, kde hypokotyl prechádza do klíčnych listov.

Sledovala som množstvo invaginácií (vchlípenín) do vakuoly, ktorú som vizualizovala vakuolovou značkou: akvaporín Δ - TIP - GFP pod promótorom 35S, ktorý sa nachádza na tonoplaste.

Spolu s tonoplastom som sledovala aj endoplazmatické retikulum (ER). Vizualizovala som ho naviazaním RFP značky na tetrapeptid HDEL (retenčný signál pre ER lokalizáciu) pod silným 35S promótorom.

Tonoplast a jeho prípadné invaginácie som sledovala pri použití rôznych drog a ošetrení ovplyvňujúcich autofágiu: DTT (indukuje autofágiu), 3MA (inhibuje autofágiu), NAR (indukuje tvorbu antokyánov), CDNB (blokuje GST enzimatickú aktivitu). Výsledky som vyhodnotila do jednoduchého grafu, ktorý vyjadruje aritmetický priemer pomeru obvodu vnútornej membrány vakuoly (invaginácie) k obvodu bunkovej stene (BS) (Obrázok č.5)

Graf a štatistiku som robila v programe Microsoft Office Excel a *One - way Anova with post - hoc Tukey HSD Calculator* (<http://statistica.mooc.com>).



Obrázok č.5 : VM - vnútorná membrána, BS - bunková stena; napravo bunka bez invaginácií, napravo bunka s vakuolárnymi invagináciami.

4.2.1 Správanie tonoplastu pri kontrolnej vzorke

Vakuola v kontrolných semenáčoch mala vo väčšine buniek len niekoľko, až žiadne invaginácie, ale v málo bunkách boli početné. Vakuola je veľmi dynamická a v čase sa veľmi mení (tvar a množstvo invaginácií). Snímala som časové série po dobu 2 - 10 min v závislosti od dynamiky sledovaného systému. V niektorých prípadoch sa v sledovanom časovom úseku počet invaginácií rapídne zvýšil, alebo naopak rapídne znížil. Z tohto dôvodu som do štatistiky rákala 3 - 4 snímky jednej bunky v rôznom čase. Niekedy bol systém menej dynamický a počet invaginácií, ani ich tvar sa príliš nemenil. Kompletnú tabuľku s podrobnými výsledkami všetkých buniek (kontrolných, aj ošetrovaných buniek) som priložila v prílohe. Aritmetický priemer výsledkov buniek hypokotylu kontrolných semenáčov vyšiel 1,24 (Graf č. 1).

4.2.2 Správanie tonoplastu pri indukcii autofágie

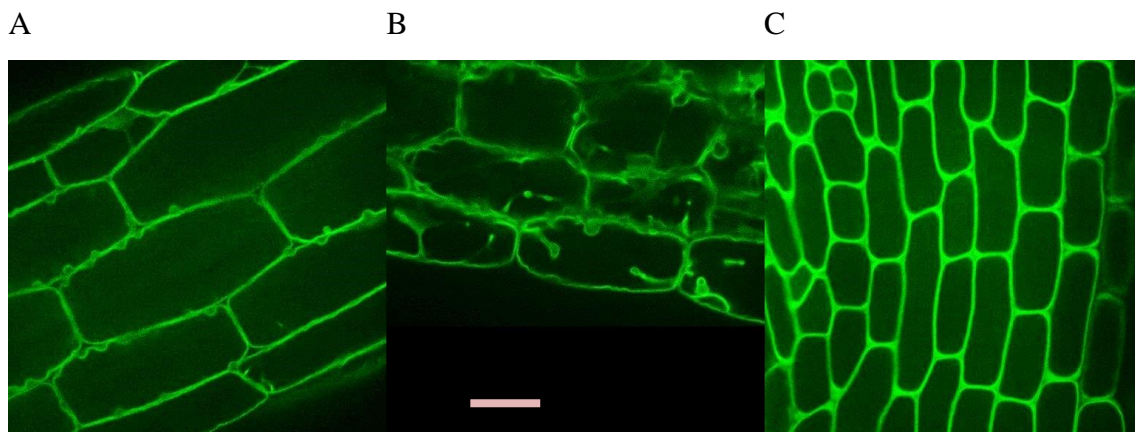
Večer pred pozorovaním (približne 12 h) som do tekutého 1/2 MS média so semenáčmi *Arabidopsis* pridala redukčné činidlo DTT (1,4-dithio-DL-threitol) (2 mM), ktorá spôsobuje indukciu autofágie tak, že redukuje disulfidové mostíky a interferuje s oxidatívnym skladaním proteínov v endoplazmatickom retikule. Spôsobuje tak reakciu

bunky na zle konformačne poskladané proteíny v endoplazmatickom retikule (UPR - *unfolded protein response*) (Schröder, 2007).

Dynamika (množstvo invaginácií a ich schopnosť meniť sa v čase) vakuoly bola na rovnakej úrovni ako pri kontrolných bunkách hypokotyly. Niektoré bunky mali väčší počet invaginácií ako iné, pričom sa celý systém menil v čase. Opäť som bunky hypokotyly snímala v čase po dobu 2 - 10 min v závislosti od dynamiky vakuoly. Do štatistiky som počítala pomer vnútornej membrány (vchlípenín) k BS z 3 - 4 snímok jednej bunky v rôznom čase. Na rozdiel od kontrolných buniek, bunky s indukovanou autofágiou pomocou DTT mali väčší pomer vnútornej membrány vakuoly k BS. Aritmetický priemer hodnôt pomerov membrány vakuoly k BS má hodnotu 1,8 (Graf č. 1).

4.2.3 Správanie tonoplastu pri inhibícii autofágie použitím 3MA

Ďalšie ošetrenie súviselo s inhibíciou autofágie pomocou drogy 3MA, ktorá inhibuje autofágiu blokovaním formácie autofagozómov tým, že inhibuje typ PI-3K (*III Phosphatidylinositol*) (Wu et al., 2010). Túto drogu som pridala do média v koncentrácii 5 mM a nechala pôsobiť 1 h pred pozorovaním na konfokálnom mikroskope. Dynamika tonoplastu sa zmenila a vakuola sa stala takmer nehybnou a bez invaginácií. Vyjadruje to aj aritmetický priemer nameraných hodnôt pomeru vnútornej membrány vakuoly k BS, ktorého hodnota bola 1,0 (Graf č1).



Obrázok č. 6: Bunky hypokotylu značené mákrom 35S::GFP-DELTA-TIP, A - kontrola; B - 2 mM DTT; C - 2mM DTT + 5 mM 3MA; mierka 20 μ m

4.2.4 Správanie tonoplastu pri indukcii tvorby a ukladania antokyánov

Večer pred pozorovaním (približne 12 h) som do 1/2 MS média so semenáčmi *Arabidopsis* pridala drogu NAR (100 μ M) (naringenín) (Poustka et al., 2007). Táto droga spôsobuje indukciu antokyánov, pričom som sledovala zmeny v morfológii tonoplastu v závislosti od ich indukcie. Aj pri tomto ošetrení bola vakuola veľmi dynamická, a preto som snímala bunky hypokotylu v čase po dobu 2 - 10 min. Opäť som do štatistiky rátala pomer vnútornej membrány vakuoly k BS a aritmetický priemer týchto hodnôt (3 - 4 snímky z každej vhodnej bunky) zodpovedá hodnote 1,77 - teda podobne ako pri indukcii autofágie (Graf č 1).

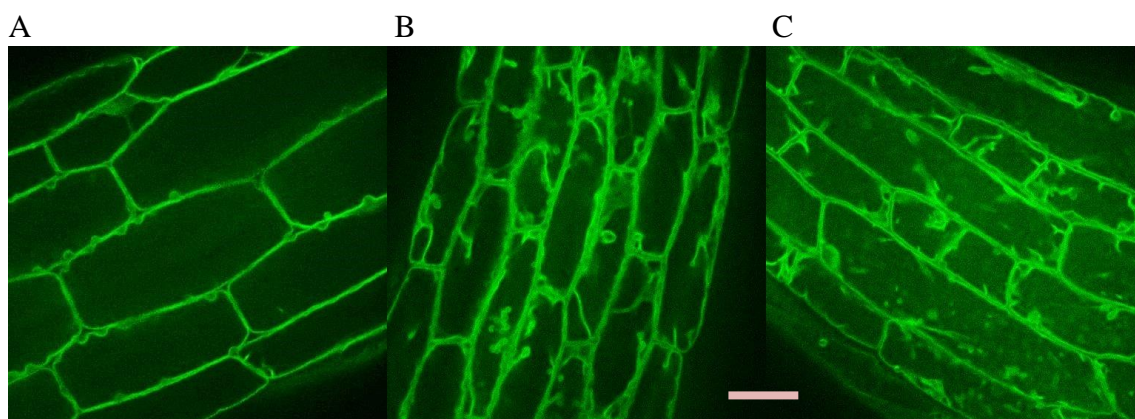
4.2.5 Správanie tonoplastu pri použití CDBN

CDBN (*1-chloro-2,4-dinitrobenzene*) inhibuje vakuolárne transportéry GST-ligandínu. Zvyšuje akumuláciu antokyánov a tvorbu inklúzií vo vakuole (Poustka et al., 2007).

CDNB sa používa ako "pretreatment", takže som 2 - dňové semenáče *Arabidopsis* inkubovala najskôr 1 h v CDBN (0,1 mM), ten som po uplynutí doby odstránila aj spolu

s tekutým 1/2 MS médiom bez sacharózy a k ošetreným semenáčom *Arabidopsis* som pridala nové tekuté 1/2 MS médium bez sacharózy.

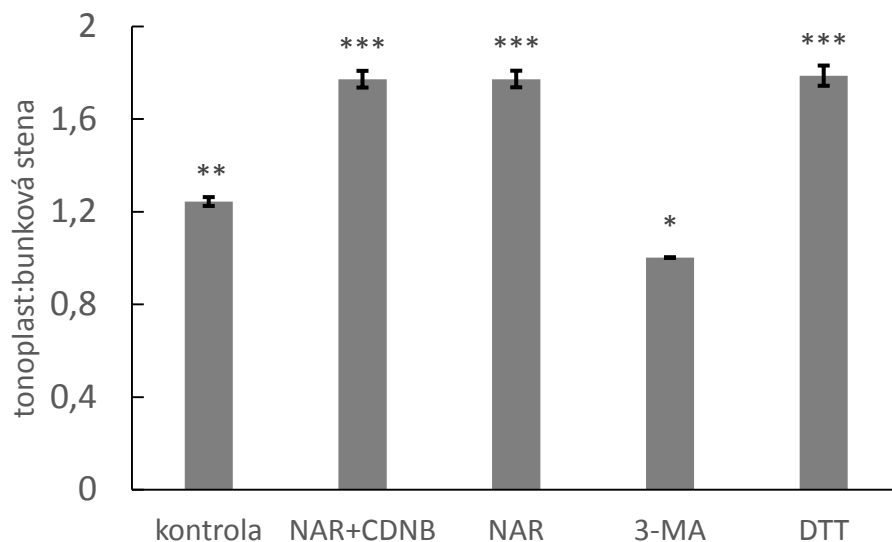
Dynamika vakuoly zodpovedala kontrole a ostatným ošetreniam okrem 3MA. Aritmetický priemer pomerov vnútorných membrán vakuol k BS meraných buniek hypokotylu dosahuje hodnotu 1,77 (graf č 1).



Obrázok č 7: A - kontrola; B- 0,1 mM CDNB; C - 100 μ M NAR. Mierka 20 μ m

4.2.6 Vyhodnotenie pomeru vnútornej membrány vakuoly k BS

Hodnota pomeru membrány vakuoly k BS je v kontrolných bunkách nižšia ako pri indukcii tvorby antokyánov (NAR), alebo autofagozómov (DTT), ale vyššia ako pri ošetrení inhibítorom autofágie 3MA. Značí to, že vakuolárne invaginácie sú ovplyvnené autofágiou a zablokovaním PI-3K (*III Phosphatidylinositol*) vakuola nie je schopná tvoriť vchlípeniny.



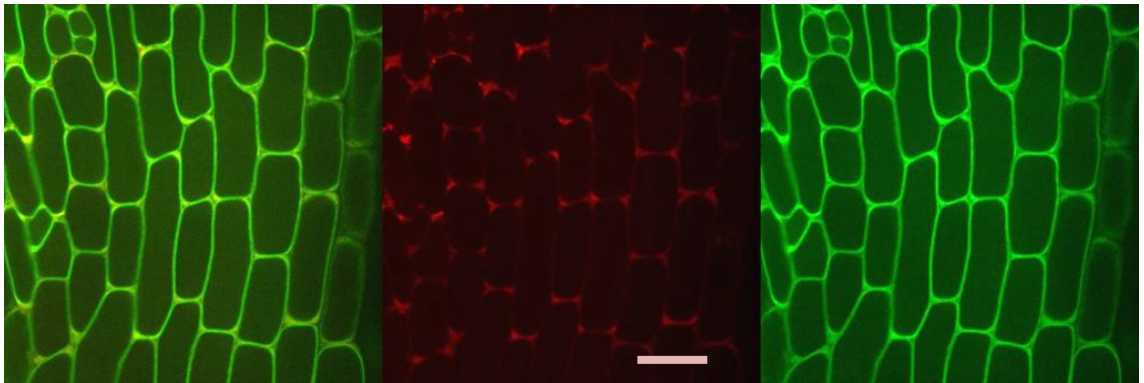
Graf 1 : osa X : pomernútornej membrány vakuoly k bunkovej stene; osa Y: ošetrenie.

Ošetrenie	Najvyššia hodnota	Najnižšia hodnota	Aritmetický priemer
Kontrola	1,74	1,01	1,24
DTT	3,45	1,01	1,8
DTT + 3MA	1,01	0,99	1,00
NAR	2,65	1,24	1,77
CDNB	2,48	1,21	1,77

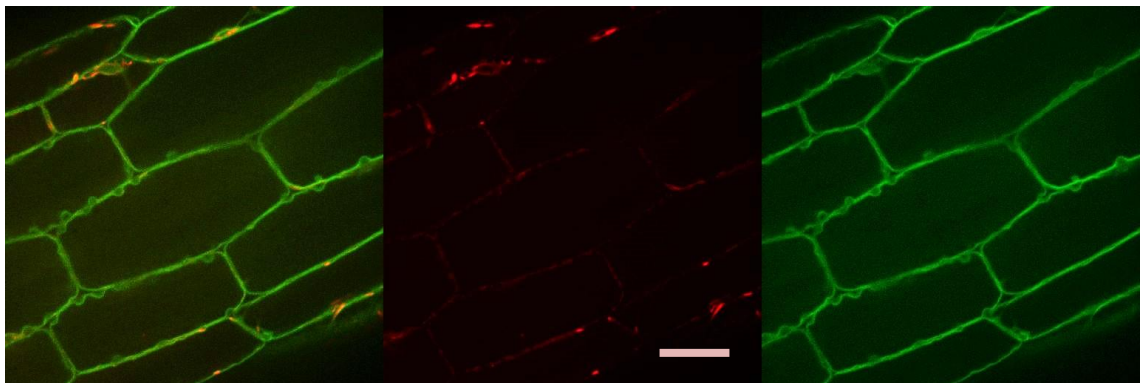
Tabuľka č. 1:: čísla znázorňujú hodnoty pomeru vnútornej membrány vakuoly k bunkovej stene a to najvyššiu hodnotu, najnižšiu hodnotu a aritmetický priemer všetkých hodnôt nameraných v bunkách hypokotylu. Touto tabuľkou chcem poukázať na veľkú dynamiku invaginácií vo vakuole.

4.2.7 Lokalizácia endoplazmatického retikula vo vakuole

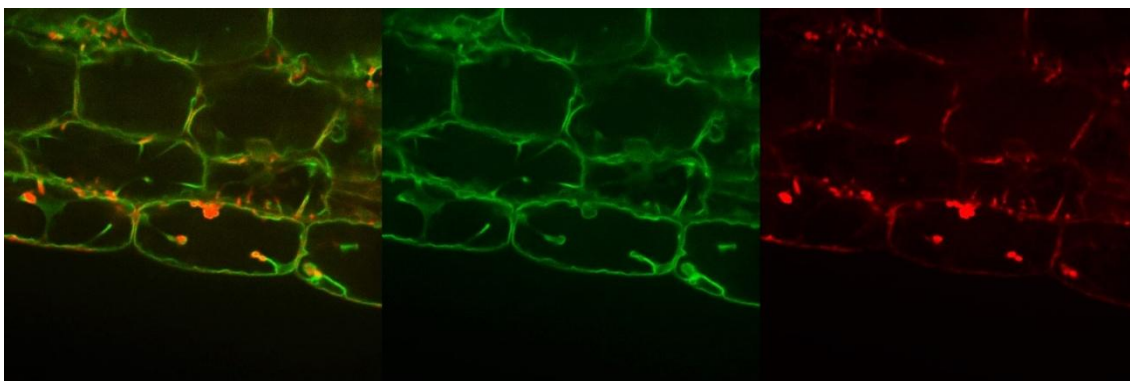
Spolu s tonoplastom som sledovala aj lokalizáciu ER pomocou RFP značky 35S::*RFP-HDEL*. Vo väčšine vakuolárnych invaginácií sa nachádzajú aj dilatované ER cisterny (Obr. 8 - 11). Pri ošetrení 3MA (inhibítora autofágie), sa ER nachádzalo len v cytoplazme po okrajoch bunky, keďže vo vakuole neboli žiadne vchlípeniny (obrázok č.8)



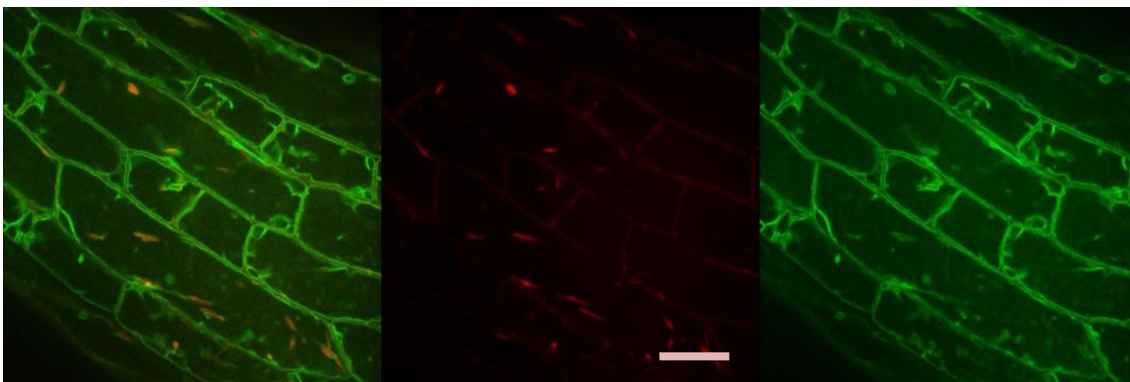
*Obrázok č 8.: ošetrenie 3MA spôsobilo, že sa netvorila invaginácie a dilatované ER sa nachádza v cytoplazme po okraji buniek. Značenie: červená 35S::*RFP-HDEL*, zelená 35S::*GFP-DELTA-TIP*. Mierka 20 μ m*



*Obrázok č 9: Neošetrené kontrolné bunky etiolovaného hypokotylu 3 - dňových semenáčov Arabidopsis. Vakuola je mierne členitá a ER sa nachádza prevažne v cytoplazme. Značenie: červená 35S::*RFP-HDEL*, zelená 35S::*GFP-DELTA-TIP*. Mierka 20 μ m*



Obrázok č. 10 : *Indukcia autofágie pomocou DTT. Bunky etiolovaného hypokotylu 3 - dňových semenáčov Arabidopsis tvoria invaginácie do vakuoly. ER sa nachádza jednak v cytoplazme, ale aj vo vchlípeninách vo vakuole. Značenie: červená 35S::RFP-HDEL, zelená 35S::GFP-DELTA-TIP. Mierka 20 μ m*



Obrázok č. 11 : *Indukcia tvorby antokyánov ošetrením naringenínom. Bunky etiolovaného hypokotylu obsahujú veľké množstvo invaginácií. V niektorých invagináciách sa nachádza ER. Značenie: červená 35S::RFP-HDEL, zelená 35S::GFP-DELTA-TIP. Mierka 20 μ m*

5. DISKUSIA

5.1 *Testovanie možnej interakcie vybraných podjednotiek komplexu exocyst s GTPázou RabG3b*

Prvá časť tejto práce bola venovaná interakciám medzi podjednotkami exocystu a malými GTPázami, ktoré by mohli súvisieť s úlohou exocystu v autofagickej dráhe. Preto som sa zamerala na sledovanie interakcie vybraných podjednotiek komplexu exocyst s RabG3f a RabG3b GTPázou, ktorá skrz autofágiu reguluje diferenciáciu cievných zväzkov (Kwon et al., 2010). Úloha komplexu exocyst v autofágii bola objavená v živočíšnych (Bodemann et al., 2011), ale aj v rastlinných bunkách. U rastlín Exo70B1 kolokalizuje s ATG8, a pri indukcii autofágie pomocou tunikamycínu sa zvýšil počet autofagických teliesok vo vakuole a v mutantovi *exo70B1* sa naopak výrazne znížil (Kulich et al. 2013). V kvasinkách sú známe interakcie medzi niektorými podjednotkami exocystu a GTPázami: Rab GTPáza Sec4p interaguje so Sec15, Rho1 GTPáza interaguje s podjednotkou SEC3 a Rho3 GTPáza s Exo70 (Munson and Novick, 2006).

Napriek tomu, že N - terminálna časť RabG3b vykazovala v kvasinkovom dvojhybridnom systéme interakciu s viacerými podjednotkami komplexu exocyst (obr.č), kompletný proteín RabG3b zbavený prenylačného motívu túto interakciu nevykazoval so žiadnou z testovaných podjednotiek exocystu. Správna geranylgeranylácia malých GTPáz môže pri tom mať významný vplyv na ich schopnosť interagovať s ostatnými proteínmi (Chung et al., 1991). Nasledovné experimenty odhalili, že nie len N - terminálny koniec RabG3b, ale aj N - terminálny koniec iných Rab GTPáz vykazujú podobnú interakciu s podjednotkami exocystu. Biologická relevancia týchto interakcií tak ostáva nepreukázanou.

5.2 *Sledovanie morfológie tonoplastu pri indukcii a inhibícii autofágie*

V predošlých štúdiách sledovali dilatované cisterny ER, ktoré sa nachádzajú v invagináciách v súvislosti s globulárnymi, ale aj fibrilárnymi štruktúrami antokyanových vakuolárnymi inklúzií (AVI) (Poustka et al., 2007). Antokyaníny môžu vstupovať do vakuoly dvomi cestami - špecifickými transportérmi, alebo vo vezikulách (priamo z ER nezávisle od Golgi) (Poustka et al., 2007). V nedávnej dobe bol preukázaný autofagický pôvod vakuoly. Vakuolárna biogenéza a transport dvoch protónových púmp (V-ATPáza a V-PPáza), proteínov a lipidov do tonoplastu v meristematických bunkách koreňa *Arabidopsis thaliana*. Sú exportované z ER cez complex II (COPII) a priamo doručené do vakuoly. Deje sa to nezávisle od Golgi a post-Golgi transportu (Viotti et al., 2013). V oboch prípadoch vakuola tvorila vchlípeniny, v ktorých sa nachádzali aj tubulárne elementy ER. V mojej práci som tiež sledovala dilatované ER vo väčšine vchlípenín (obr.č 8 - 11) vrátane globulárnymi a fibrilárnymi štruktúrami.

Pri sledovaní AVI v autofagických mutantoch, klesol počet, veľkosť a variácia AVI. Zaujímavé bolo aj zistenie, že membrána, ktorá obaluje AVI, má podobné lipidické zloženie ako tonoplast, čo naznačuje že sa môže jednať o mikroautofágiu, ktorá zodpovedá za formovanie týchto vakuolárnymi kompartmentov (Conn et al., 2010; Kulich and Žárský, 2014). O mikroautofágii sa vie len málo, a preto sa prikláňam k názoru, že o mikroautofágiu môže ísť, ale aj nemusí, a že by sa tejto hypotéze mohlo venovať viac pozornosti a overiť ju ďalšími metódami.

Dilatované ER sa nachádza aj v invagináciách, ktorých počet narástol indukciou autofágie skrz UPR. ER sa nachádzalo vo vnútri autofagických teliesok. Tieto pozorovania naznačujú prítomnosť mechanizmu, ktorý spojuje autofagické štruktúry a ER. Nebolo jasné, či je makroautofágia jediným mechanizmom zodpovedným za degradáciu ER. V ich práci nebolo priamo skúmané či autofagické invaginácie prispievajú k degradácii ER (Liu et al., 2012). Neskôr sa zistilo, že bunkový materiál určený na degradáciu sa recykluje aj selektívnou autofágiou cez špecifické kompartmenty obsahujúce AT11 (ATG8-interacting protein 1) protilátky a po ich

naviazaní je materiál dopravený autofagickou dráhou do vakuoly. ATI1 boli sledované na ER, ale aj na plastidoch (Michaeli et al., 2014).

Podobné invaginácie do vakuoly, ktoré som sledovala, boli pozorované aj Krügerom a jeho skupinou. Použili látku PDMP (D-L-threo-1-phenyl-2-decanoyl amino-3-morpholino-1-propanol). Je to inhibítor glukozilceramid syntázy (GCS), ktorá je kľúčovým enzýmom v biosyntéze sfingolipidov v bunkách cicavcov, v ktorých PDMP indukuje makroautofágiu (Futerman and Riezman, 2005; Vunnam and Radin, 1980). Pre overenie, či PDMP spôsobuje makroautofágiu aj v rastlinách, robili pokusy na koreňoch makroautofagických mutantntov *Arabidopsis thaliana atg2-1* (Inoue et al., 2006), *atg5-1* (Thompson and Vierstra, 2005) a *atg7-2* (Hofius et al., 2009). Prekvapivo po aplikácii PDMP sa vo všetkých troch typoch mutantných buniek objavili vakuolárne invaginácie, z čoho vyplýva, mechanizmus vzniku vakuolárných invaginácií je nezávislý na konvenčnej autofagickej dráhe (Krüger et al., 2013). Na druhej strane, makroautofágia nie je jediným druhom autofágie a moje výsledky naznačujú, že vakuolárne invaginácie sú autofagického charakteru. Vo svojich pokusoch som však nepoužila PDMP, ale 3-MA.

3-MA je účinný inhibítor autofágie v živočíšnych (Seglen and Gordon, 1982) aj v rastlinných (Takatsuka et al., 2004) bunkách. 3-MA inhibuje enzým PI3K produkujúci PI3P, membránový lipid, ktorý je nevyhnutný pre nukleáciu a biogénu preautofagických štruktúr (Thompson and Vierstra, 2005). Nemá však vplyv na množstvo AVI ani zmenu úrovne tvorby antokyánov, takže sa klasická autofágia nezúčastňuje na formovaní AVI (Poustka et al., 2007). V mojej práci 3-MA zabránil tvorbe invaginácií aj napriek indukcii autofágie pomocou DTT. Bunky nemali žiadne invaginácie a ER sa nachádzalo v cytoplazme po okrajoch bunky. 3-MA sa tak aj v mojich experimentoch osvedčil ako účinný inhibítor autofágie. Naopak, pri ošetrení DTT bez 3-MA, ktorý spúšťa UPR (DuRose et al., 2006) a tým indukuje autofágiu, sa počet invaginácií zvýšil. Z toho môže vyplývať, že invaginácie sú autofagického charakteru. Otázkou naďalej zostáva či sa jedná o makroautofágiu, alebo o mikroautofágiu.

6. ZÁVERY

A - Prvým mojím cieľom bolo overiť interakciu medzi vybranými podjednotkami komplexu exocyst a malou GTPázou RabG3b.

A.1 - Interakcie som overovala pomocou dvojhybridného kvasinkového testu. Výsledky vyšli negatívne, interakcia sa nepotvrdila ani s Exo70B1, Exo70B2, ani s fragmentmi Exo84b.

A.2 - Pre porovnanie som urobila ďalšie dvojhybridné kvasinkové testy s príbuznou malou GTPázou RabG3f, ktorá takisto neinteragovala s vybranými podjednotkami komplexu exocyst: Exo70B1, Exo70B2, C a N - terminálny fragment Exo84b.

A.3 Test vyšiel pozitívne pri N - terminálnom fragmente, ale nie pri celej forme proteínu.

A.4 - Urobila som dvojhybridný kvasinkový test s iným členom rodiny Rab GTPáz, vzdialeným od RabG3b, a to s N - terminálnou formou RabB1b. Test vyšiel pozitívne.

B - Druhým cieľom mojej práce bolo sledovať morfológiu a dynamiku vakuoly pri indukcii a inhibícii autofágie.

Vakuoly som sledovala pomocou označenia tonoplastového akvaporínu DELTA - TIP GFP márkorm pod silným 35S promótorom.

B.1 - Pri kontrolných rastlinách bola vakuola pomerne dynamická s miernym množstvom invaginácií.

B.2 - Pri indukcii tvorby antokyánov pomocou drogy naringenín a pri použití drogy CDNB sa zvýšila dynamika vakuoly a počet invaginácií v nej. Pri farmakologickej indukcii autofágie pomocou drogy DTT, sa tiež dynamika vakuoly zvýšila a takisto sa zvýšil počet invaginácií. Nameraný pomer vnútornej membrány vakuoly ku bunkovej stene (BS) dosiahol pri indukcii autofágie (1,79) aj pri indukcii tvorby antokyánov (1,77) takmer rovnakú hodnotu. Kontrolné bunky mali túto hodnotu pomeru nižšiu: 1,24.

B.3 - Naopak pri ošetrení drohou 3MA sa spolu s autofágiou výrazne znížila aj dynamika vakuoly a zmizli všetky invaginácie sledované počas normálneho stavu

bunky, ale aj pri indukcii autofágie, alebo tvorby antokyánov. Pomer dosiahol hodnotu 1,001 (žiadne invaginácie).

Iba na základe dvojhybridného testu nemôžem definitívne povedať, že RabG3b vôbec neinteraguje s nejakými podjednotkami komplexu exocyst. Stále však existuje možnosť slabej interakcie. Túto interakciu je potrebné overiť ešte inými metódami ako sú napríklad *pull-down assay* a Försterov rezonančný prenos energie (FRET), ktorými som sa vo svojej práci nevenovala. Avšak na základe vykonaných dvojhybridných kvasinkových testov sa dá vyvodiť, že N - terminálny fragment malých Rab GTPáz je konzervovaný a interaguje aj u vzdialených členov Rab GTPáz.

Výsledky inhibície tvorby invaginácií môžu naznačovať, že invaginácie viditeľné vo vakuole môžu byť autofágneho charakteru, pretože 3MA je inhibítor autofágie. Po jeho aplikácii vymizli invaginácie z vakuoly, ktorá sa následne stala veľmi málo dynamickou až nehybnou.

Popri pozorovaní invaginácií som sledovala aj dilatované cisterny endoplazmatického retikula (ER), ktoré boli značené RFP značkou a ER retenčným signálom HDEL pod silným 35S promótorom.

V súvislosti s týmito výsledkami môžem skonštatovať, že vo väčšine invaginácií sa dilatované cisterny ER nachádzali vo všetkých druhoch ošetrovania okrem 3MA. Pri ošetrovaní 3MA, bunky nemali invaginácie a ER bolo lokalizované iba v cytoplazme po okraji bunky.

Moje výsledky sumárne naznačujú možnú úlohu vchlipovania endoplazmatického retikula do invaginácií tonoplastu pri autofagickom transporte do vakuoly.

7. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Backer, J.M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* *410*, 1–17.

Bao, Y., Lopez, J.A., James, D.E., and Hunziker, W. (2008). Snapin interacts with the Exo70 subunit of the exocyst and modulates GLUT4 trafficking. *J. Biol. Chem.* *283*, 324–331.

Bassham, D.C. (2007). Plant autophagy--more than a starvation response. *Curr. Opin. Plant Biol.* *10*, 587–593.

Bassham, D.C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L.J., and Yoshimoto, K. (2006). Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* *2*, 2–11.

Bathey, N.H., James, N.C., Greenland, A.J., and Brownlee, C. (1999). Exocytosis and Endocytosis. *Plant Cell* *11*, 643–659.

Bodemann, B.O., Orvedahl, A., Cheng, T., Ram, R.R., Ou, Y.-H., Formstecher, E., Maiti, M., Hazelett, C.C., Wauson, E.M., Balakireva, M., et al. (2011). RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell* *144*, 253–267.

Boyd, C., Hughes, T., Pypaert, M., and Novick, P. (2004). Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J. Cell Biol.* *167*, 889–901.

Carter, C.J., Bednarek, S.Y., and Raikhel, N.V. (2004). Membrane trafficking in plants: new discoveries and approaches. *Curr. Opin. Plant Biol.* *7*, 701–707.

Chang, Y.-Y., Juhász, G., Goraksha-Hicks, P., Arsham, A.M., Mallin, D.R., Muller, L.K., and Neufeld, T.P. (2009). Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 232–236.

Chua, C.E.L., Gan, B.Q., and Tang, B.L. (2011). Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 3349–3358.

Chung, D.L., Brandt-Rauf, P., Murphy, R.B., Nishimura, S., Yamaizumi, Z., Weinstein, I.B., and Pincus, M.R. (1991). A peptide from the GAP-binding domain of the ras-p21 protein as well as azatyrosine block ras-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *181*, 1378–1384.

Cole, R.A., Synek, L., Zarsky, V., and Fowler, J.E. (2005). SEC8, a Subunit of the Putative Arabidopsis Exocyst Complex, Facilitates Pollen Germination and Competitive Pollen Tube Growth. *Plant Physiol.* *138*, 2005–2018.

- Conn, S., Franco, C., and Zhang, W. (2010). Characterization of anthocyanic vacuolar inclusions in *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures. *Planta* 231, 1343–1360.
- Dong, G., Hutagalung, A.H., Fu, C., Novick, P., and Reinisch, K.M. (2005). The structures of exocyst subunit Exo70p and the Exo84p C-terminal domains reveal a common motif. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1094–1100.
- DuRose, J.B., Tam, A.B., and Niwa, M. (2006). Intrinsic Capacities of Molecular Sensors of the Unfolded Protein Response to Sense Alternate Forms of Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Biol. Cell* 17, 3095–3107.
- De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435–492.
- Elias, M., Drdova, E., Ziak, D., Bavlínka, B., Hala, M., Cvrckova, F., Soukupova, H., and Zarsky, V. (2003). The exocyst complex in plants. *Cell Biol. Int.* 27, 199–201.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–619.
- Finger, F.P., Hughes, T.E., and Novick, P. (1998). Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* 92, 559–571.
- Futerman, A.H., and Riezman, H. (2005). The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 15, 312–318.
- Grosshans, B.L., Andreeva, A., Gangar, A., Niessen, S., Yates, J.R., Brennwald, P., and Novick, P. (2006). The yeast Igl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. *J. Cell Biol.* 172, 55–66.
- Grotewold, E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 761–780.
- Guo, W., Tamanoi, F., and Novick, P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.* 3, 353–360.
- Hála, M., Cole, R., Synek, L., Drdová, E., Pecenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J.E., et al. (2008). An exocyst complex functions in plant cell growth in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* 20, 1330–1345.
- Hamburger, Z.A., Hamburger, A.E., West, A.P., and Weis, W.I. (2006). Crystal structure of the *S.cerevisiae* exocyst component Exo70p. *J. Mol. Biol.* 356, 9–21.
- He, B., and Guo, W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 537–542.

- He, B., Xi, F., Zhang, J., TerBush, D., Zhang, X., and Guo, W. (2007). Exo70p mediates the secretion of specific exocytic vesicles at early stages of the cell cycle for polarized cell growth. *J. Cell Biol.* *176*, 771–777.
- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D.I., Petersen, N.H.T., Mattsson, O., Jørgensen, L.B., Jones, J.D.G., Mundy, J., and Petersen, M. (2009). Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in Arabidopsis. *Cell* *137*, 773–783.
- Hrazdina, G., and Wagner, G.J. (1985). Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* *237*, 88–100.
- Hsu, S.C., Ting, A.E., Hazuka, C.D., Davanger, S., Kenny, J.W., Kee, Y., and Scheller, R.H. (1996). The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron* *17*, 1209–1219.
- Hsu, S.C., Hazuka, C.D., Roth, R., Foletti, D.L., Heuser, J., and Scheller, R.H. (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* *20*, 1111–1122.
- Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., and Moriyasu, Y. (2006). AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells. *Plant Cell Physiol.* *47*, 1641–1652.
- Jauh, G.-Y., Fischer, A.M., Grimes, H.D., Ryan, C.A., and Rogers, J.C. (1998). δ -Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 12995–12999.
- Jauh, null, Phillips, null, and Rogers, null (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* *11*, 1867–1882.
- Jurgens, G. (2004). Membrane trafficking in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 481–504.
- Kee, Y., Yoo, J.-S., Hazuka, C.D., Peterson, K.E., Hsu, S.-C., and Scheller, R.H. (1997). Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 14438–14443.
- Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* *118*, 7–18.
- Knight, Z.A., and Shokat, K.M. (2007). Chemically targeting the PI3K family. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 245–249.
- Krüger, F., Krebs, M., Viotti, C., Langhans, M., Schumacher, K., and Robinson, D.G. (2013). PDMP induces rapid changes in vacuole morphology in Arabidopsis root cells. *J. Exp. Bot.* *64*, 529–540.

Kulich, I., and Žárský, V. (2014). Autophagy-Related Direct Membrane Import from ER/Cytoplasm into the Vacuole or Apoplast: A Hidden Gateway also for Secondary Metabolites and Phytohormones? *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 7462–7474.

Kwon, S.I., Cho, H.J., and Park, O.K. (2010). Role of Arabidopsis RabG3b and autophagy in tracheary element differentiation. *Autophagy* *6*, 1187–1189.

Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H., and Yalovsky, S. (2007). A Novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr. Biol. CB* *17*, 947–952.

Lehman, K., Rossi, G., Adamo, J.E., and Brennwald, P. (1999). Yeast Homologues of Tomosyn and lethal giant larvae Function in Exocytosis and Are Associated with the Plasma Membrane Snare, Sec9. *J. Cell Biol.* *146*, 125–140.

Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 1125–1136.

Liu, J., Zuo, X., Yue, P., and Guo, W. (2007). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Mediates the Targeting of the Exocyst to the Plasma Membrane for Exocytosis in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4483–4492.

Liu, Y., Burgos, J.S., Deng, Y., Srivastava, R., Howell, S.H., and Bassham, D.C. (2012). Degradation of the Endoplasmic Reticulum by Autophagy during Endoplasmic Reticulum Stress in Arabidopsis. *Plant Cell* *24*, 4635–4651.

Marty, F. (1999). Plant Vacuoles. *Plant Cell* *11*, 587–599.

Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., and Codogno, P. (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* *20*, 748–762.

Michaeli, S., Honig, A., Levanony, H., Peled-Zehavi, H., and Galili, G. (2014). Arabidopsis ATG8-INTERACTING PROTEIN1 Is Involved in Autophagy-Dependent Vesicular Trafficking of Plastid Proteins to the Vacuole. *Plant Cell* *26*, 4084–4101.

Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* *7*, 673–682.

Mitsuhashi, N., Hayashi, Y., Koumoto, Y., Shimada, T., Fukasawa-Akada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2001). A novel membrane protein that is transported to protein storage vacuoles via precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* *13*, 2361–2372.

Moore, B.A., Robinson, H.H., and Xu, Z. (2007). The crystal structure of mouse Exo70 reveals unique features of the mammalian exocyst. *J. Mol. Biol.* *371*, 410–421.

- Müller, O., Sattler, T., Flötenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H., and Mayer, A. (2000). Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *J. Cell Biol.* *151*, 519–528.
- Munson, M., and Novick, P. (2006). The exocyst defrocked, a framework of rods revealed. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 577–581.
- Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.-L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., et al. (2011). SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell* *146*, 290–302.
- Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* *21*, 205–215.
- Orenstein, S.J., and Cuervo, A.M. (2010). Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 719–726.
- Otegui, M.S., and Staehelin, L.A. (2003). Electron tomographic analysis of post-meiotic cytokinesis during pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* *218*, 501–515.
- Oufattole, M., Park, J.H., Poxleitner, M., Jiang, L., and Rogers, J.C. (2005). Selective Membrane Protein Internalization Accompanies Movement from the Endoplasmic Reticulum to the Protein Storage Vacuole Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *17*, 3066–3080.
- Oztan, A., Silvis, M., Weisz, O.A., Bradbury, N.A., Hsu, S.-C., Goldenring, J.R., Yeaman, C., and Apodaca, G. (2007). Exocyst requirement for endocytic traffic directed toward the apical and basolateral poles of polarized MDCK cells. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3978–3992.
- Poustka, F., Irani, N.G., Feller, A., Lu, Y., Pourcel, L., Frame, K., and Grotewold, E. (2007). A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in *Arabidopsis* and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant Physiol.* *145*, 1323–1335.
- Prigent, M., Dubois, T., Raposo, G., Derrien, V., Tenza, D., Rossé, C., Camonis, J., and Chavrier, P. (2003). ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J. Cell Biol.* *163*, 1111–1121.
- Reumann, S., Voitsekhovskaja, O., and Lillo, C. (2010). From signal transduction to autophagy of plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma* *247*, 233–256.
- Rutherford, S., and Moore, I. (2002). The *Arabidopsis* Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 518–528.

- Sanderfoot, A.A., and Raikhel, N.V. (1999). The Specificity of Vesicle Trafficking: Coat Proteins and SNAREs. *Plant Cell* *11*, 629–641.
- Schröder, P.J.H. (2007). Cartel Stability and Economic Integration. *Rev. Int. Econ.* *15*, 313–320.
- Seglen, P.O., and Gordon, P.B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 1889–1892.
- Seguí-Simarro, J.M., Austin, J.R., White, E.A., and Staehelin, L.A. (2004). Electron Tomographic Analysis of Somatic Cell Plate Formation in Meristematic Cells of Arabidopsis Preserved by High-Pressure Freezing. *Plant Cell* *16*, 836–856.
- Sivaram, M.V.S., Saporita, J.A., Furgason, M.L.M., Boettcher, A.J., and Munson, M. (2005). Dimerization of the exocyst protein Sec6p and its interaction with the t-SNARE Sec9p. *Biochemistry (Mosc.)* *44*, 6302–6311.
- Sun, Y., Li, H., and Huang, J.-R. (2012). Arabidopsis TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Mol. Plant* *5*, 387–400.
- Sutter, J.-U., Campanoni, P., Blatt, M.R., and Paneque, M. (2006). Setting SNAREs in a different wood. *Traffic Cph. Den.* *7*, 627–638.
- Synek, L., Schlager, N., Eliás, M., Quentin, M., Hauser, M.-T., and Zárský, V. (2006). AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *48*, 54–72.
- Takatsuka, C., Inoue, Y., Matsuoka, K., and Moriyasu, Y. (2004). 3-methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. *Plant Cell Physiol.* *45*, 265–274.
- TerBush, D.R., and Novick, P. (1995). Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *130*, 299–312.
- TerBush, D.R., Maurice, T., Roth, D., and Novick, P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *15*, 6483–6494.
- Thompson, A.R., and Vierstra, R.D. (2005). Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *8*, 165–173.
- Tsui-Jung Wen, P.S.S. (1994). Analyses of Mutants of Three Genes that Influence Root Hair Development in *Zea mays* (Gramineae) Suggest that Root Hairs are Dispensable. *Am. J. Bot. - AMER J BOT* *81*.

- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., and Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 535–602.
- Viotti, C., Krüger, F., Krebs, M., Neubert, C., Fink, F., Lupanga, U., Scheuring, D., Boutté, Y., Frescatada-Rosa, M., Wolfenstetter, S., et al. (2013). The Endoplasmic Reticulum Is the Main Membrane Source for Biogenesis of the Lytic Vacuole in Arabidopsis[W]. *Plant Cell* 25, 3434–3449.
- Vunnam, R.R., and Radin, N.S. (1980). Analogs of ceramide that inhibit glucocerebrosidase in mouse brain. *Chem. Phys. Lipids* 26, 265–278.
- Wen, T.-J., Hochholdinger, F., Sauer, M., Bruce, W., and Schnable, P.S. (2005). The roothairless1 gene of maize encodes a homolog of sec3, which is involved in polar exocytosis. *Plant Physiol.* 138, 1637–1643.
- Wiederkehr, A., De Craene, J.-O., Ferro-Novick, S., and Novick, P. (2004). Functional specialization within a vesicle tethering complex: bypass of a subset of exocyst deletion mutants by Sec1p or Sec4p. *J. Cell Biol.* 167, 875–887.
- Wu, Y.-T., Tan, H.-L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M.R., Ong, C.-N., Codogno, P., and Shen, H.-M. (2010). Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 10850–10861.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335, 1–32.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12, 814–822.
- Yeaman, C., Grindstaff, K.K., Wright, J.R., and Nelson, W.J. (2001). Sec6/8 complexes on trans-Golgi network and plasma membrane regulate late stages of exocytosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 155, 593–604.
- Yoshida, K., Kondo, T., Okazaki, Y., and Katou, K. (1995). Cause of blue petal colour. *Nature* 373, 291–291.
- Zajac, A., Sun, X., Zhang, J., and Guo, W. (2005). Cyclical regulation of the exocyst and cell polarity determinants for polarized cell growth. *Mol. Biol. Cell* 16, 1500–1512.
- Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K.G., Lipschutz, J.H., and Guo, W. (2001). Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J. Biol. Chem.* 276, 46745–46750.
- Zhang, X., Zajac, A., Zhang, J., Wang, P., Li, M., Murray, J., TerBush, D., and Guo, W. (2005b). The critical role of Exo84p in the organization and polarized localization of the exocyst complex. *J. Biol. Chem.* 280, 20356–20364.

Zhang, X., Wang, P., Gangar, A., Zhang, J., Brennwald, P., TerBush, D., and Guo, W. (2005a). Lethal giant larvae proteins interact with the exocyst complex and are involved in polarized exocytosis. *J. Cell Biol.* *170*, 273–283.

Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A., and Guo, W. (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J. Cell Biol.* *180*, 145–158.

Zhang, X.-M., Ellis, S., Sriratana, A., Mitchell, C.A., and Rowe, T. (2004). Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 43027–43034.