

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIOLOGIE ROSTLIN

INTERAKCIE PODJEDNOTIEK
EXOCYSTU EXO70 *ARABIDOPSIS*
THALIANA

Diplomová práce

Ivan Kulich

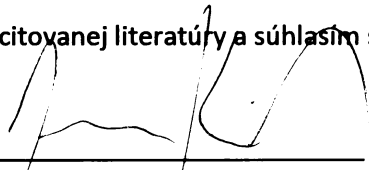


Praha 2007

Táto diplomová práca bola vypracovaná v rokoch 2005-2007 na Katedre fyziológie rastlín
Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej v Prahe pod vedením RNDr. Viktora Žárskeho, CSc.

Prehlasujem, že som túto prácu vypracoval samostatne s použitím citovanej literatúry a súhlasím s jej
zapožičaním k študijným účelom.

1.5.2007 v Prahe



Ivan Kulich

Na tomto mieste by som sa rád poďakoval predovšetkým svojmu školiteľovi RNDr. Viktorovi Žárskému CSc. a konzultantke Doc.RNDr. Fatime Cvrčkovej, Dr.rer.nat., za ochotu, pomoc, cenné odborné rady a námety pri vypracovaní tejto práce. Ďalej by som chcel poďakovať Marte Čadyovej za nadštandardnú technickú podporu. Veľká vďaka patrí i kolegom z našej pracovnej skupiny, Mgr. Lukášovi Synkovi, Phd., Mgr. Michalovi Hálovi, Phd. a Mgr. Radkovi Bezvodovi za pomoc pri riešení mnohých experimentálnych problémov. Vďaka patrí i celému tímu Johna Fowlera z Oregon State University za pomoc s konkrétnymi časťami práce.

V neposlednej rade by som sa chcel poďakovať mojim rodičom a priateľom, ktorí ma podporovali v priebehu celého štúdia.

Práca bola finančne krytá z prostriedkov grantov IAA 60 38 410, MŠM 002 16 20858 a MŠMT ME841.

OBSAH

Zoznam použitých skratiek	4
1. Literárny prehľad	5
1.1. Polarizovaný rast, vysvetlenie pojmu	5
1.2. Polarizovaný rast a exocyst, evolučný náhľad	6
2. Interakcie exocystu s malými GTPázami v kvasinke	7
2.1. Sec15p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> interaguje so Sec4p	8
2.2. Rho3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> interaguje s Exo70 a Myo2	10
2.3. Rho1 a Cdc42 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> interagujú so Sec3.	11
2.3.1. Interakcia s Rho1	11
2.3.2 Interakcia s Cdc42	13
3. Interakcie exocystu s malými GTPázami v ľudských bunkách	14
3.1. Interakcia Exo70 s TC10	15
3.2. Interakcia Sec5 a Exo84 s Ral1 GTPázou v človeku	16
3.2.1. Interakcia so Sec5	16
3.2.2 Interakcia s Exo84	17
3.3. Interakcia Sec15 s Rab11	18
3.4. Interakcia Sec10 s Arf6	19
3.5. Vzťah exocystu so skorými fázami exocytózy	19
4. Exo70 - Charakteristika a zhrnutie poznatkov o proteíne	20
4.1. Štruktúra Exo70	20
4.2. Exo70 interaguje s Arp2/3 komplexom v cicavcoch	21
4.3. Interakcia Exo70 s BIG2 a funkčné prepojenie s mikrotubulmi v cicavcoch a kvasinke	22
4.4. Exocyst a jeho podjednotka Exo70 inhibujú nukleáciu mikrotubulov v cicavcoch	22

4.5. Lokalizácia exocystu ako dôsledok polarizácie post-Golgi transportu a nie jeho príčina	23
4.6. Exo70 v rastlinách	24
4.7. Porovnanie interagujúcich domén exocystu u rôznych organizmov	26
5. 2-hybridná metóda	28
5.1. Vznik a princíp metódy	28
5.2. Výhody a obmedzenia 2-hybridnej metódy	29
5.3. Používanie metódy v praxi	30
5.4. Split-ubiquitin 2-hybridná metóda	31
6. Metodika práce	33
6.1. Výber vhodného materiálu a postupov	33
6.1.1. Výber génov Exo70	33
6.1.2. Výber potenciálnych interaktorov a cDNA knižníc	33
6.2. Príprava DNA konštruktov a cDNA knižníc	34
6.2.1. Použité vektory	34
6.3. Práca s cDNA knižnicami	35
6.3.1. Amplifikácia c-DNA knižnice	35
6.3.2. Vystrihnutie plazmidu z fágovej knižnice	35
6.4. Transformácia kvasiniek A SCREENING	36
6.4.1. Transformácia pre screen	36
6.4.2. Overovanie interakcií a vylučovanie falošných pozitívov	38
6.5. Extrakcia celkovej DNA z kvasiniek	38
6.6. Elektroporácia	39
6.7. Príprava kompetentných buniek pre elektroporáciu	39
6.8. Extrakcia plazmidovej DNA z baktérií alkalickou lýzou	40
6.9. Agarózová gélová elektroforéza	41
6.10. Analýza interakčných proteínov in-silico	42

6.11. Farbenie a meranie veľkosti semenného obalu	42
6.12. Primery pre sekvenovanie a genotypovanie	43
7. Výsledky práce	45
7.1. Klonovanie Exo70A1 do vektora pGBT	45
7.2. Rop1 neinteraguje s Exo70	46
7.3. Screen pre interaktory Exo70A1 a ich identifikácia	46
7.4. At5g64850 interaguje s Exo70A1 a G1, ale nie s Exo70C1	47
7.4.1. Bioinformatická charakteristika At5g64850	48
7.4.2. Fenotyp inzerčného mutanta	49
7.5. At4g22160 interaguje s Exo70A1, G1 a C1	53
7.5.1. Bioinformatická analýza At4g22160	54
7.6. Glutamyl-tRNA Ligáza (At5g26710) interaguje s Exo70A1, G1 a C1	55
7.7. ELP1 interaguje s Exo70C	57
8. Diskusia	58
8.1. ELP1 a Exo70	58
8.1.1. Charakteristika ELP1	58
8.1.2. tRNA ligáza a Elp1 – falošné pozitívy, alebo ďalšia funkcia exocystu?	60
8.2. At4g22160 Ako ďalej postupovať pri charakteristike?	61
8.3. At5g64850 by sa mohol podieľať na regulácii exocytózy	61
8.4. Za interakcie medzi GTPázami a Exocystom by mohli byť zodpovedné scaffold proteíny	62
9. Záver	63
10. Literatúra	64

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

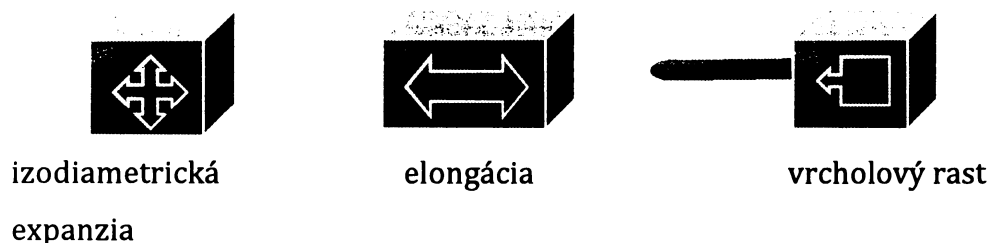
A, B	modeloví interakční partneri
AD	aktivačná doména transkripčného faktora (activation domain)
AG	arabinogalaktany
BD	DNA-väzobná doména (DNA-binding domain)
BS	bunková stena
ePUB	publikované len elektronicky
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GAP	GTPase-activating protein
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDI	Guanine nucleotide exchange inhibitor
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GS-GOGAT	Glutamin syntetáza-glutamát syntáza
OD	Optická hustota (densita)
PI(3,4,5)P3	fosfatidylinozitol 3,4,5-trisfosfát
PI(4,5)P2	fosfatidylinozitol 4,5-bisfosfát
TF	transkripčný faktor
TGN	Trans-Golgi network
UAS	upstream activation sequence
UBP	ubiquitin-špecifické proteázy (ubiquitin-specific proteases)

wt	wild type
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranozid
β -GAL	beta-galaktozidázový

1. LITERÁRNY PREHĽAD

1.1. POLARIZOVANÝ RAST, VYSVETLENIE POJMU

Pre správnu interpretáciu nasledujúcich kapitol je dôležité tento proces čo najlepšie definovať a ohraničiť. Pod polarizovaným rastom bunky rozumieme akýkoľvek rast, ktorý nie je izodiametrický.



Obr.1. izodiametrický rast a príklady polarizovaného rastu.

Za polarizovaný sa dá považovať aj anizotropný rast definovaný limitujúcim prostredím, okolitými bunkami, bunkovou stenou a mechanickými prekážkami. Pri kladení otázok a hypotéz je predmetom rast, ktorého anizotropia nebola zapríčinená vonkajšími činiteľmi, ale bola iniciovaná bunkou, resp. organizmom, ktorého je súčasťou. Polarizovaná exocytóza je jedným z predpokladov polarizovaného rastu, avšak v prípade organizmov s bunkovou stenou nie je limitujúcim faktorom polarizovaného rastu. Napríklad pri elongácii buniek v predĺžovacej zóne koreňa predpokladáme model,

pri ktorom exocytóza prebieha relatívne izodiametricky a výsledný smer rastu je definovaný štruktúrou bunkovej steny.

1.2. POLARIZOVANÝ RAST A EXOCYST, EVOLUČNÝ NÁHĽAD

Polarizovaný rast je jedným zo základných mechanizmov bunkovej morfogénézy. Jeho pochopenie otvára dvere k pochopeniu nielen procesov, ako pučanie kvasinky, rast nervových vlákien, koreňových vláskov, alebo peľového vrecúška, ale aj vývoja črevného epitelu, fibroblastov, hubových vlákien a pod. Polarizovaný rast, je možné pozorovať u drvivej väčšiny eukaryotických buniek, nehovoriac o prokaryotických. Je nevyhnutný pre množstvo procesov, najmä pre funkčnú špecializáciu buniek mnohobunkových organizmov, ale aj pre pučanie a sexuálnu reprodukciu kvasiniek. Od takýchto procesov je možné očakávať významný podiel evolučnej konvergencie a teda mnohonásobného vzniku v evolúcii. Taktiež je však možné oponovať, že selekčné tlaky na polarizovaný tlak sú tu odpradáva a teda takýto druh rastu iste ovládal aj eukaryotický prapredok.

Dnes máme k dispozícii osekvenované genómy niekoľkých rôznych organizmov a celkom slušný náhľad na problematiku polarizovaného rastu. Ukazuje sa, že polarizovaný rast je úzko prepojený s navádzaním post-Golgi vezikúl k plazmatickej membráne a to aj v organizmoch s bunkovou stenou, ktorá rast bunky limituje. Taktiež je dôležitý koncept identity membrán a označenia miesta vrcholového rastu. Faktorov regulujúcich polarizovaný rast je viacero a mnohé z nich sú konzervované vo všetkých modelových organizmoch. Patria medzi ne membránové SNARE bielkoviny, malé GTPázy, cytoskelet a s cytoskeletom asociované proteíny (napr. fosfolipázy), alebo exocyst – dynamický proteínový komplex sprostredkujúci navádzanie vezikúl do vhodného miesta na PM.

Exocyst v rastlinách patrí medzi hlavné témy štúdia našej pracovnej skupiny. Pre lepšie pochopenie polarizovaného rastu je rovnako dôležité pochopiť ako exocyst pracuje, ako aj porozumeniť jeho regulácii. Exocyst kvasiniek, ako aj cicavcov je regulovaný prevažne malými GTPázami. Okrem malých GTPáz exocyst interaguje

a spolupracuje s množstvom iných proteínov, vrátane aktívneho cytoskeletu, GEF proteínov, či dokonca Arp2/3 komplexom.

V rastlinnej bunke môžeme taktiež predpokladať množstvo regulátorov a interaktorov exocystu. Môžeme očakávať interakcie s malými GTPázami, ktoré sa čiastočne prelínajú u kvasiniek a človeka. Tento predpoklad sa ale vôbec nemusí naplniť vzhľadom na to, že najvariabilnejší prvok evolúcie nie je štruktúra a funkcia proteínov, ale vzťahy, využitie a interakcie medzi nimi a medzi ich skupinami.

2. INTERAKCIE EXOCYSTU S MALÝMI GTPÁZAMI V KVASINKE

Tematika polarizovaného rastu a polarizovanej sekrécie patrí medzi deje, ktorým je možné prisúdiť vysoký význam pri poznávaní dejov bunkovej morfogénny v najrôznejších bunkových typoch (kap. 1.2). Na všetkých týchto dejoch v evolučne vzdialených organizmoch sa podieľa proteínový oktamerický komplex - exocyst. Exocyst je oktamerický proteínový komplex pozostávajúci z podjednotiek Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 a Exo84. Všetky podjednotky sú polárne a interagujú medzi sebou. Sec podjednotky boli opísané pomocou sekrétorických mutantov, dodatočne boli opísané aj podjednotky Exo70 a Exo84 (Terbush, Novick a kol., 1996).

Exocyst sa podieľa na sprostredkovaní polarizovanej exocytózy vezikúl z TGN a zrejme sa zúčastňuje krokov potrebných pre priblíženie vezikúl k plazmatickej membráne, kde ďalšie kroky prevezme mechanizmus SNARE proteínov. Napriek tomu, že úloha exocystu sa zdá byť pomerne jasná, donedávna sa vedelo len veľmi málo o tom, ako je jeho funkcia riadená. Dnes sa ukazuje, že funkcia exocystu je regulovaná malými GTPázami, ktoré interagujú z rôznymi podjednotkami exocystu a regulujú tak jeho funkciu.

Malé GTPázy sú zhruba 20-30KDa proteíny príbuzné Ras protoonkogénu. Tvoria nadrodinu signálnych proteínov Ras, ktorú možno rozdeliť minimálne do piatich rodín: Ras, Rho, Rab, Arf a Ran. Funkcii malých GTPáz asistuje niekoľko skupín proteínov. Guanine nucleotide exchange factor (GEF) mení GDP väzobnú formu GTPázy na GTP väzobnú. GEF funguje len pre GTPázy asociované s membránou. Guanine dissociation inhibitor (GDI) je má antagonistickú funkciu ku GEF. Relokalizovaním GTPázy do

cytoplazmy zabráni funkcii GEF a pôsobí tak ako inhibítor. Pre efektívnu hydrolýzu GTP potrebujú GTPázy tzv. GTPase-activating protein (GAP). Najlepšie preskúmané sú interakcie exocystu v kvasinke a v poslednej dobe bolo opísaných viacero interakcií v cicavčích bunkách. V rastlinných bunkách je úloha malých GTPáz pri regulovaní funkcie exocystu dosiaľ nezodpovedanou otázkou (študované v Cvrčková a kol. 2001), vzťah medzi GTPázami a exocystom však existuje (Lavy, M. a kol, 2007).

Ako bolo spomenuté v kapitole 1.1., v kvasinke každý proteín interaguje priemerne s tromi ďalšími proteínmi. Preto informácia o interagujúcej doméne veľmi zvyšuje hodnotu poznatku. Takáto informácia okrem toho často umožňuje predvídať interakčných partnerov na základe sekvenčnej podobnosti, známa je napr. PH doména (Moskalenko a kol. 2003). Veľmi zaujímavou otázkou je, či sú si interagujúce domény podjednotiek exocystu aspoň v náznačkovom podobe aj medzi rôznymi organizmami. Ich porovnanie by teoreticky mohlo napovedať o interakčných doménach v iných organizmoch. Takéto porovnanie je predmetom kapitoly 4.7.

2.1. SEC15P *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* INTERAGUJE SO SEC4P

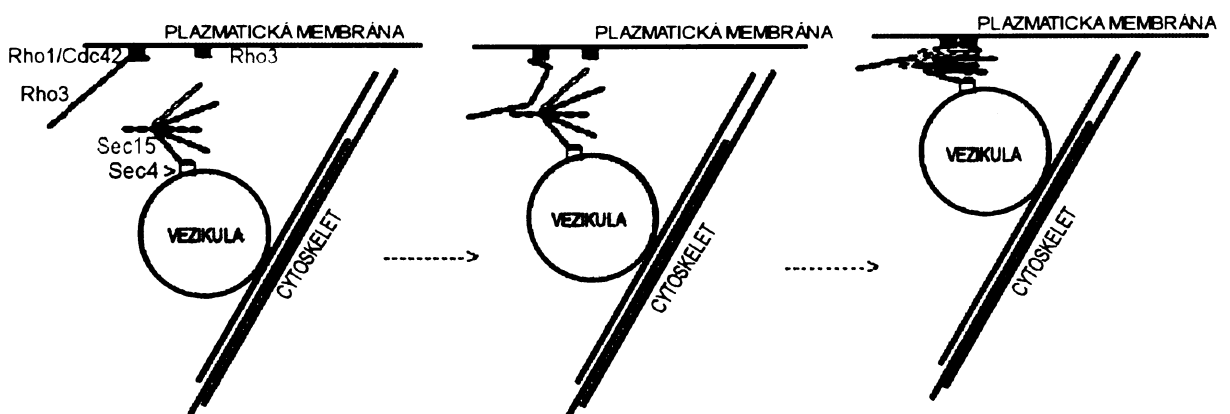
Interakcia exocystu so Sec4p je vôbec prvá objavená interakcia exocystu s GTPázou. Sec4 patrí do rodiny Rab GTPáz. Autori najprv urobili frakcionáciu kvasiniek a následne western-blotting s protilátkami proti Sec15p, Sec4p a Snc2p. Bola takto odhalená ko-migrácia Sec15p, Sec4p a Snc2p (použitý ako marker sekrétorických vezikul), z ktorej vyplýva priama či nepriama asociácia Sec15p a Sec4p so sekrétorickými vezikulami.

Taktiež bola urobená ko-imunoprecipitácia Sec4p a Sec15p pre preskúmanie ich vzájomnej interakcie. Najprv boli použité polyklonálne protilátky proti Sec15p a neskôr na vylúčenie interferencie s Ypt1p (ktorý sa rovnako ako Sec4p viaže na ľahký reťazec imunoglobulínu) bola použitá polyklonálna protilátka proti Sec4p a ako negatívna kontrola protilátka proti Ypt1p.

Pre potvrdenie interakcie bola urobená 2-hybridná skúška (s vektormi pACT2, pAS-CYH2), ktorá výsledok potvrdila. Bola odskúšaná interakcia celých proteínov ako aj ich častí, čo prinieslo ďalšie, podrobnejšie výsledky. Sec4wt a Sec4L79 (forma nedostatočná v štiepení GTP, t.j. v GTP konformácii) naďalej interagovali so Sec15, ako

aj Sec4 Δ C (bez koncovej membránovej domény). Naopak, Sec4V29 (GDP-väzobná konformácia) a Sec4I33 (forma neviažúca nukleotidy) neinteragovali so sec15p. To naznačuje, že Sec15p sa viaže na Sec4p s naviazaným nukleotidom. Čo viac, Sec4V29 nadobúda iba GDP konformáciu, indikujúc, že Sec15p interaguje len so Sec4p-GTP väzobnou formou. Ďalšie 2-hybridné interakcie odhalili, že efektorová doména Sec4p je nepostrádateľná pre interakciu so Sec15p (W.Guo a kol., 1999a).

Z pozorovania interakcií vo vnútri exocystu a frakcionačných štúdií vyplýva, že Sec10p a Sec15p nie sú lokalizované len na plazmatickej membráne spolu s ostatnými podjednotkami. Sec15p asociuje so sekrétorickou vezikulou a frakcia Sec10p a Sec15p sa dá nájsť aj v komplexe exocystu so sedimentačným koeficientom 19,5S (tzv 19,5S komplex). Sec4 mutant síce nemá poruchu v lokalizácii Sec3p, v týchto bunkách je však komplex nekompletný (a ko-imunoprecipitát so Sec8 menší). Je preto pravdepodobný model, pri ktorom sa Sec4, Sec15 a pravdepodobne aj neskôr objavené Exo84 (interakcie Exo84p so Sec5p a Sec15p sú príliš slabé na to, aby sa dal problém jednoznačne posúdiť, rôzni autori preto prezentujú rôzne interpretácie - Guo a kol., 1999b, Moskalenko a kol., 2003) spolu nachádzajú na sekrétorickej vezikule, pričom konformácia Sec4 by mohla ovplyvňovať konformáciu ostatných podjednotiek exocystu na vezikule a tým ich schopnosť viazať sa s časťou komplexu na plazmatickej membráne (obr.4). Zo štúdie (Gua a kolektívu,1999) je možno usúdiť, že exocyst je dynamický komplex, ktorého skladanie je regulované malými GTPázami. Najnovší model lokalizácie exocystu (obr. 2.)



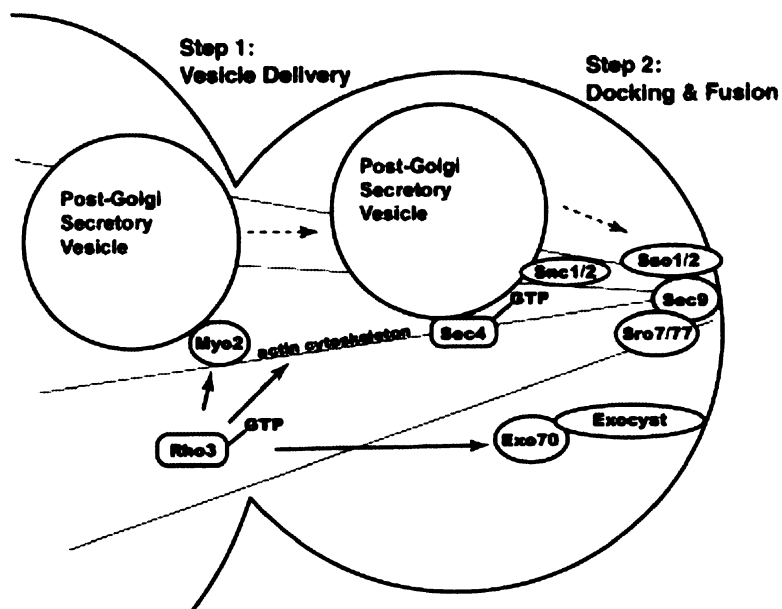
Obrázok 2: Predpokladaný model účasti Sec4 na zostavovaní exocystu. Modelov je viac a líšia sa hlavne v lokalizácii Exo84p, Sec15p a Sec10p. Obrázok zachytáva najnovší model skladania exocystu, kde všetky podjednotky exocystu okrem Exo70 a Sec3 sú lokalizované na vezikule (Novick, P. a kol, 2006).

Rodina malých GTPáz Rho sa zúčastňuje rady bunkových pochodov, vrátane organizácie cytoskeletu, polarizácie bunky, membránového transportu a génovej expresie. S exocystom interaguje niekoľko týchto GTPáz. Venujú sa im ďalšie kapitoly (3. a 4.). Ako prvá bola opísaná interakcia exocystu s Rho3. Rho3 je GTPáza, ktorá má dôležitú úlohu pri lokalizovanej sekrécii *Saccharomyces cerevisiae*. *Rho3* mutant má fenotyp pomaly rastúcej bunky, ktorá má aberantný aktínový cytoskelet (zhluky aktínu sú pri nestresujúcej teplote delokalizované) (Imai a kol., 1996). Dokonca, dvojité mutant *rho3* a *rho4* lyzuje už v štádiu malého puku (Matsui a kol., 1992).

Myo2 je zvláštny typ myozínu, o ktorom sa predpokladá, že navádza vezikuly do miesta polarizovaného rastu a je pre bunku esenciálny a lokalizovaný na post-Golgi sekretorických vezikulách. Teplotný mutant *myo2-66* má pri reštriktívnej teplote (36°C) fenotyp podobný fenotypu *rho3*, rovnako v ňom je aktínový cytoskelet aberantný, tvoriaci malé zhluky, zatiaľ čo vo wt je aktínový cytoskelet orientovaný do miesta polarizovanej sekrécie. Bunky má veľké, nedeliace sa (Johntson a kol., 1991, Li R. a kol., 1995).

Robinson a kolektív v máji 1999 objavili a opísali interakciu Rho3 s Myo2 a Exo70, podjednotkou exocystu. Jedná sa teda o druhú objavenú interakciu malej GTPázy s komplexom exocyst. Už fenotyp mutantu *rho3* naznačuje, že Rho3 bude zrejme zohrávať dôležitú úlohu v signalizácii potrebnej pri polarizovanej sekrécii, čo indikuje možnosť interakcie s exocystom. Exo70 a Myo2 boli ako interagujúce členy opísané pri 2-hybridnom screeningu cDNA knižnice *Saccharomyces cerevisiae* s Rho3. Pre overenie boli urobené *in vitro* väzobné experimenty s fragmentami Myo2 a Exo70. Pri týchto experimentoch bola preukázaná pomerné vysoká špecifickosť väzby Exo70 s GTP väzobnou formou Rho3 a to porovnaním interakcií za prítomnosti GDP β S a GTP γ S (syntetické a bunkou neštiepateľné ekvivalenty GDP a GTP), pričom aj pri pokuse s GDP väzobnou formou Rho3 bol pozorovaný interakčný signál, avšak podstatne slabší. Väzba Rho3 na Myo2 je taktiež špecifická pre GTP formu Rho3. Keďže Exo70 je efektorom Rho3, Rho3 by mohol byť zodpovedný za lokalizáciu Exo70, čo potvrdzujú lokalizačné experimenty, vykazujúce kolokalizáciu Rho3 a Exo70 (Robinson a kol., 1999). Neskôr bolo zistené, že za interakciu s Rho3 je zodpovedná C koncová doména proteínu (Dong a kol., 2005)

Z dvoch opísaných interakcií je možné indukovať, že Rho3 zohráva kľúčovú úlohu pri skladaní exocystu a pri polarizovanom raste. Funkčne spája 2 zreteľne odlišné deje a vzniká tak ucelenejšia predstava o fungovaní lokalizovanej sekrécie. Robinson a kol. a neskôr Adamo a kol. (1999) predpokladajú model, pri ktorom Rho3 lokalizuje Myo2 na vezikulu, kde je zodpovedný za transport vezikuly do miesta sekrécie. Keď sa do neho dostanú, začnú zohrávať úlohu proteíny zodpovedné za exocytózu, Sec4 a exocyst. Rho3 by tu mohlo indukovať zloženie exocystu interakciou s Exo70. Tento model zobrazuje obr.3.



Obrázok 3: Model funkcie Rho3 poukazujúci na 2 úlohy Rho3 - pri transporte vezikuly ako aj pri samotnej exocytóze (prevzaté od Adamo a kol., 1999).

2.3. RHO1 A CDC42 *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* INTERAGUJÚ SO SEC3.

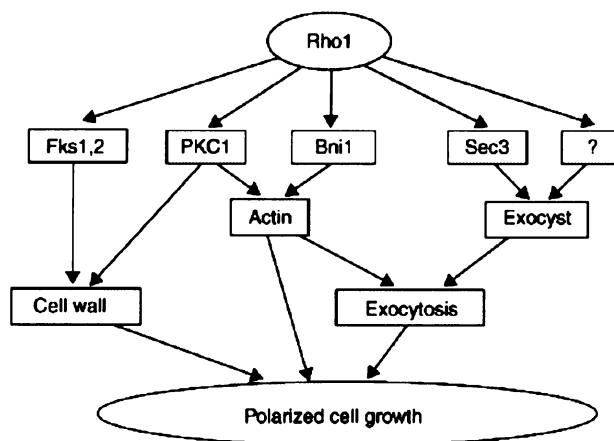
2.3.1. INTERAKCIA S RHO1

Z hľadiska funkcie exocystu sa rodina malých GTPáz Rho ukazuje ako veľmi významná. Spomenutá už bola funkcia Rho3, funkcia Rho1 sa javí ako rovnako dôležitá. Predošlé publikácie o Rho1 hovoria ako o GTPáze, ktorej hlavná funkcia spočíva v organizácii aktínového cytoskeletu a regulácii rastu bunkovej steny prostredníctvom interakcií s Pkc1 – aktivátorom mapkinázovej dráhy vedúcej k aktivácii syntézy

bunkovej steny (BS), Bni1 – formínom, ktorý má úlohu v organizácii aktínového cytoskeletu a s glukán-syntázami Fks1 a 2, účastníkmi sa syntézy BS (revidoval Hall, 1998).

Guo a kol. v roku 2001 skúmali lokalizáciu rôznych komponentov exocystu (fluoresenčnou mikroskopiou, pomocou GFP fúzie) u mutantov defektných v rôznych fázach polarizovanej sekrécie (výber miesta pre pučanie a jeho rast, polarizácia bunky, organizácia aktínu, regulácia bunkového cyklu a zoskupovanie septínu). Zistili, že niektoré mutantné alely *rho1* (*rho1-5* a *rho1-104*) majú za reštriktívnej teploty delokalizované podjednotky exocystu (Sec3, -5, -8, -10, Exo70 a -84). Delokalizovaný bol aj Sec3-GFP (transformant Sec3-GFP je zhodný s fenotypom wt), ktorého lokalizácia je zrejme na aktíne nezávislá, z čoho sa dá usúdiť, že Rho1 bude vykazovať aj inú interakciu s exocystom ako organizáciou aktínového cytoskeletu. Následne 2-hybridným pokusom demonštrovali interakciu s Rho1, pri ktorom bol odstránený C-koncový cysteínový motív Rho1, slúžiaci ako väzba k membráne. Túto interakciu autori hlbšie skúmali s rôznymi úsekmi Sec3 a zistili, že väzobná doména pre Rho1 sa nachádza na C konci. Po jej odstránení stratil Sec3-GFP schopnosť lokalizovať sa v mieste aktívneho rastu a bol lokalizovaný v celej cytoplazme. Taktiež bola preukázaná špecifickosť väzby na GTP väzobnú formu Rho1 (pomocou GDPβS a GTPγS, podobne ako v predchádzajúcej kapitole).

Keďže Exo70 je lokalizované nezávisle na Sec3 (aj *sec3* má správne lokalizovaný Exo70 (Finger a kol., 1998)), ale u mutantu *rho1* nie je Exo70 polarizovaný, musí pravdepodobne existovať ešte ďalšia interakcia Rho1 s exocystom, ktorá má vplyv na lokalizáciu Exo70 (Guo a kol., 2001). Nasledujúca schéma (obr.3) zobrazuje zhrnutie pôsobenia Rho1:

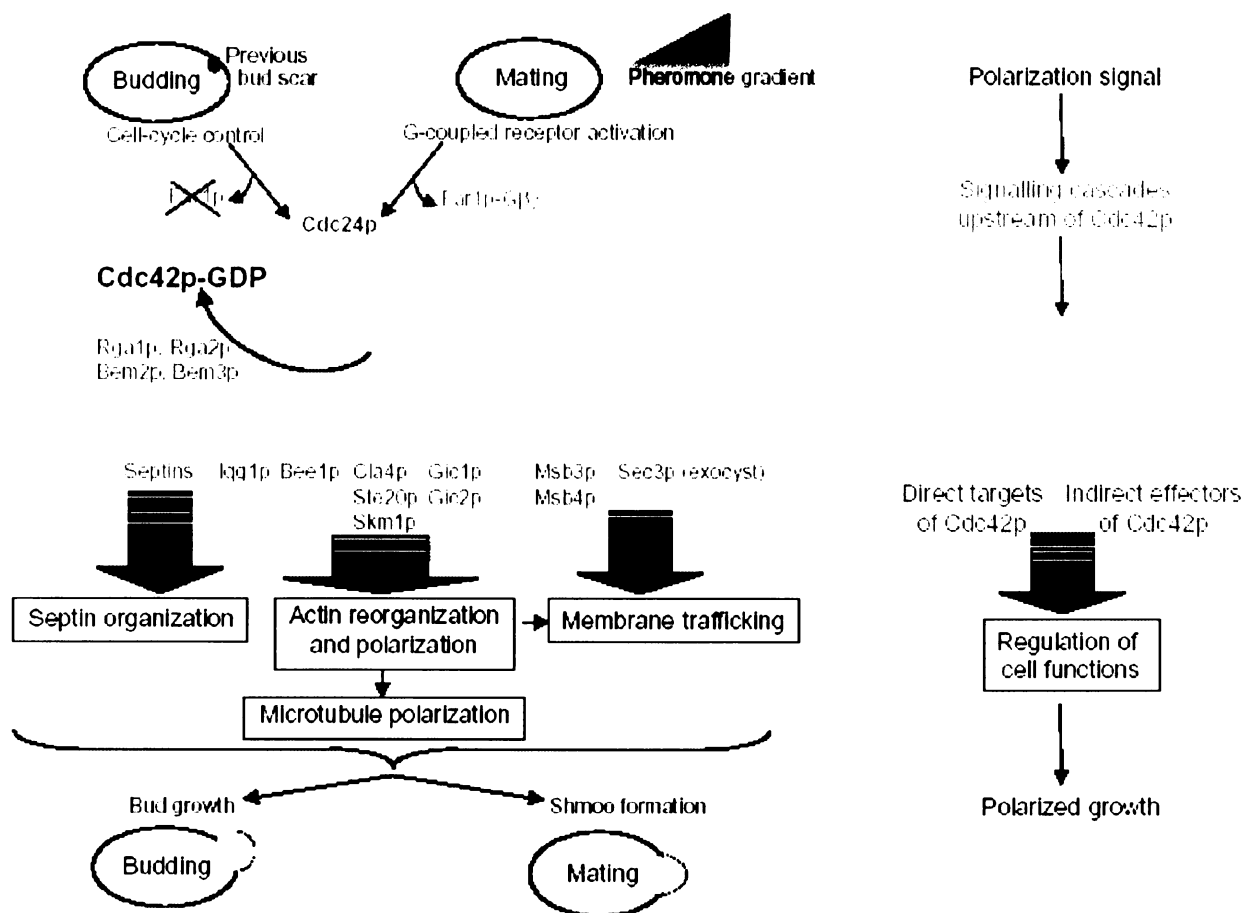


Obrázok 3: zhrnutie pôsobenia interakcií Rho1 (prevzaté od Guo a kol., 2001)

2.3.2 INTERAKCIA S CDC42

Cdc42 je taktiež členom rodiny Rho. Vyznačuje sa množstvom „downstream“ efektorov, pomocou ktorých koordinuje množstvo signálov vo včasných fázach signálnych dráh, vedúcich k iniciácii polarizácie bunky a regulujúcich polarizovaný rast, sekréciu, distribúciu proteínov a organizáciu aktínového cytoskeletu (obr.7). Jeho aktivita je regulovaná najmä prostredníctvom proteínu Cdc24 (Cdc24 je tzv. guanine nucleotide exchange factor pre Cdc42) ako odpoveď na zmeny v bunkovom cykle a pri pohlavnom rozmnožovaní (Chant a kol., 1995, študované v Etienne-Manneville, 2004).

Pozorovania GFP-značených podjednotiek exocystu u rôznych mutantov odhalili, že mutant *cdc42* stráca schopnosť správne lokalizovať exocyst, konkrétne podjednotky Sec3 a Sec5. Rovnaký fenotyp má aj mutant *cdc24*. Keďže lokalizácia exocystu je závislá na lokalizácii Sec3, autori urobili *in vitro* väzobnú skúšku Cdc42 so Sec3 (MYC-Sec3, GST-Cdc42). Táto odhalila interakciu a nasledovné *in vitro* skúšky odhalili, že rovnako ako Rho1, aj Cdc42 interaguje s N-koncom Sec3 vo svojej GTP-väzobnej forme. Okrem vplyvu na polarizovaný rast prostredníctvom aktínového cytoskeletu a organizácie septínu sa teda objavil ďalší spôsob, ktorým Cdc42 ovplyvňuje polarizovaný rast a to prostredníctvom exocystu. Doterajšie poznatky o funkcii Cdc42 zhrňuje obrázok 4.



Obrázok 4.: Zhrnutie pôsobenia signálnych kaskád, na ktorých sa podieľa Cdc42 (prevzaté z Etienne-Manneville, 2004).

3. INTERAKCIE EXOCYSTU S MALÝMI GTPÁZAMI V ĽUDSKÝCH BUNKÁCH

Napriek tomu, že mechanizmy exocytózy sú pomerne konzervované, medzi takými vzdialenými eukaryotmi ako je kvasinka a ľudská bunka existujú isté rozdiely v signálnych dráhach. Jeden z najdôležitejších rozdielov je absencia väzobných domén na N-konci Sec3, z čoho vyplýva, že so Sec3 u cicavcov neinteraguje Rho1 ani Cdc42. Alternatívne spôsoby „upstream“ regulácie Sec3 u človeka sú zatiaľ neznáme. V ľudskej bunke však existujú interakcie, ktoré v kvasinke neboli zistené a to interakcie Sec15 s Rab11, Exo70 s TC10 (Rho GTPáza) a interakcia Sec10 s ARF6 (ADP-ribosylation factor). Dôležité sú aj interakcie RalA so Sec5 a novo objavená interakcia s Exo84. Na rozdiel od kvasinky, u človeka priamy podiel GTPáz na zostavovaní a aktivite exocystu

bol preukázaný len veľmi nedávno (Moskalenko a kol., 2002 a 2003, Rongsheng a kol., 2005).

3.1. INTERAKCIA EXO70 S TC10

Táto interakcia bola objavená pri skúmaní transportu Glut4 – membránového prenášača glukózy, ktorého exocytózu indukuje inzulín. Exo70 bola objavená ako interakčný partner TC10 pri 2-hybridnom screeningu s cDNA knižnicou 3T3L1 adipocytov. Exo70 bola nasledovne ko-imunoprecipitovaná spolu s TC10. Ďalej sa preukázala špecifickosť väzby na GTP-formu TC10 (pomocou pull-down metódy za prítomnosti GDP β S a GTP γ S). Pre zistenie oblasti Exo70 zodpovednej za väzbu k TC10 autori sledovali väzbu rôznych delečných mutantov a zistili, že za väzbu je zodpovedný celý úsek 1-384, pričom rozdelené úseky 1-99 a 100-384 sa viazali len slabo (Inoue a kol., 2003).

V ďalších krokoch autori skúmali regulačnú úlohu inzulínu a TC10 pri lokalizácii Exo70 pomocou imunohistochemických metód. Myc-značené Exo70 bolo v intracelulárnych priestoroch rovnomerne distribuované. Ko-expressia TC10, ako aj ko-expressia TC10 inaktívneho mutantu nemala na lokalizáciu overexprimovaného myc-Exo70 zreteľný vplyv. Naopak, pri ko-expressii s konštitutívne aktivovaným TC10 bolo myc-Exo70 lokalizované na plazmatickej membráne. Aktivované TC10 má teda vplyv na translokáciu Exo70. Pri opakovaní pokusu s Exo70 postrádajúcim N-koncovú doménu sa Exo70 pri ko-expressii aktivovaného TC10 netranslokovalo napriek tomu však *in vitro* interakcia TC10 s Exo70 ostala zachovaná. C-koncová doména je pravdepodobne potrebná pre translokáciu Exo70 v adipocytoch. Je taktiež možné, že je to väzobná doména k inému proteínu. Pre vyšetrenie vplyvu inzulínu na lokalizáciu Exo70 sa porovnala lokalizácia myc-Exo70 v bunkách s aktívnym, neaktívnym a wt. TC10. Kým pri neaktívnom TC10 nebol pozorovaný žiadny vplyv inzulínu (myc-Exo70 bola v cytosole), u TC10 wt. a aktivovanej TC10 bola myc-Exo70 lokalizovaná na membráne, čo dokazuje vplyv inzulínu na lokalizáciu Exo70 (Inoue a kol., 2003).

Po odhalení vplyvu TC10 a inzulínu na lokalizáciu Exo70 sa naskytla dôležitá otázka lokalizácie ostatných podjednotiek. Sec6 a 8 tvoria komplex s Exo70, pri lokalizácii Exo70 na membránu by sa teda mali na ňu lokalizovať aj tieto podjednotky exocystu. Obdobným pokusom ako s myc-Exo70 bola táto hypotéza potvrdená. Ďalej sa

autori zaoberali vplyvom Exo70 na lokalizáciu Glut4. Prekvapivo, overexpresia wtExo70 a Exo70 N-koncovej domény nemala vplyv na inzulínom stimulovanú translokáciu Glut4. Z týchto pozorovaní je možné usúdiť, že exocyst nezohráva úlohu pri translokácii Glut4 vezikúl, ale pri ich kotvení v membráne (obr. 8). Je pravdepodobné, že cicavčí ekvivalent Sec4, Rab4 sa priamo podieľa na lokalizácii Glut4 vezikúl, na ktorých je lokalizovaný (Inoue a kol., 2003). Exo70 pritom nie je jediným efektorom TC10. TC10 interaguje aj s CIP4, potrebným pre translokáciu Glut4. Exocyst je teda len jedným z prvkov molekulárnej mašínérie, ktorá zabezpečuje exocytózu Glut4 vezikúl.

3.2. INTERAKCIA SEC5 A EXO84 S RAL1 GTPÁZOU V ČLOVEKU

3.2.1. INTERAKCIA SO SEC5

Ral (Ras-like) GTPázy sa ako skoro všetky rodiny GTPáz z nadrodiny Ras účastnia množstva regulačných procesov počnúc onkogenickou transformáciou až po reguláciu endocytózy a organizáciu aktínového cytoskeletu. Neboli nájdené v kvasinke, ale v cicavcoch (myš, potkan, človek) (Moskalenko a kol., 2002 a 2003). Sú nespojito lokalizované v plazmatickej membráne a v membránach sekrétorických a synaptických vezikúl, z časti ako výsledok ich C-koncovej geranylácie (Feig a kol., 1996). Bol preukázaný ich súvis s aktiváciou fosfolipázy D1, Src kinázy a TF NF- κ B (študované v Moskalenko a kol., 2002). Priama interakcia RalA-GTP bola najprv objavená s filaminom a RalBP1/RLIP76 (GTPase activation protein pre Cdc42), čo naznačilo, že má súvis s tvorbou filopódií (Ohta a kol., 1999). Súvis s exocystom naznačilo až pozorovanie (Moskalenko a kol. v roku 2002), ktoré odhalilo, že expresia konštitutívne aktivovaného, ako aj inhibovaného Ral narušuje bazolaterárnu polarizáciu v epiteliálnych bunkách. Nasledoval 2-hybridný screen, v ktorom bol použitý dvojité mutant Ral23V49NA (ktorý stráca schopnosť viazať RalBP1, ale ďalšie biologické aktivity ostávajú nezmenené) aby sa predišlo ovplyvneniu screeningu. Ako druhý interakčný partner sa použila cDNA knižnica z myšieho embrya. V tomto screeningu bolo identifikovaných 5 prekrývajúcich sa fragmentov obsahujúcich sekvenciu myšieho homológu Sec5. Následne kompletný Sec5 sa ukázal ako rovnako špecifický interaktor. Všetky fragmenty mali spoločnú časť – 1 až 122 aminokyselín, z čoho autor usúdil, že práve tam sa nachádza RalA väzobná doména. Sec5 viaže RalA vo svojej GTP-väzobnej forme (Moskalenko a kol. 2003).

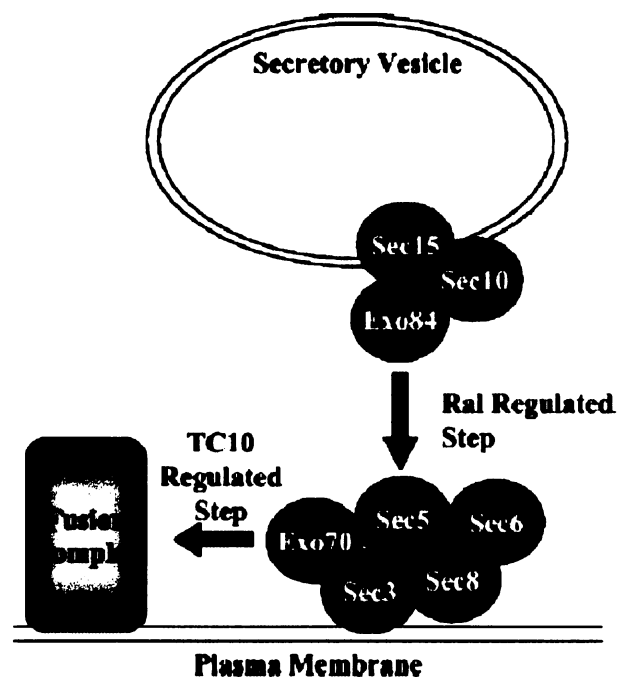
3.2.2 INTERAKCIA S EXO84

Pri 2-hybridnom screeningu Moskalenka a kol. z roku 2002 vyplynul okrem Sec5 aj ďalší kandidát na interakčného partnera – Exo84. Opakovaný 2-hybridný pokus potvrdil interakciu medzi RalA a Exo84. Taktiež sa vylúčili interakcie s niektorými inými GTPázami a pomocou analýzy *per-partes* bola zistená Ral väzobná doména medzi aminokyselinami 122 a 133, neprekrýva sa teda s väzobnou doménou Sec5 (Moskalenko a kol., 2002). *In vitro* väzobné skúšky potvrdili špecifickosť väzby na GTP-formu Ral. Keďže Sec5 väzobná doména na Exo84 sa nachádza vedľa Ral väzobnej domény a navzájom sa neprekrývajú, zdá sa, že sa na Exo84 viažu nezávisle. Pri overexpresii aktivovaného RalA sa množstvo komplexu Exo84/Sec5 neznížilo (overované imunoprecipitačne). Z toho možno usúdiť, že Ral neinhibuje tvorbu tohoto komplexu. Naopak, zdá sa, že napomáha jeho vzniku.

Ral BD na Exo84 sa síce neprekrýva so Sec5 BD, avšak počítačovými algoritmami bola predpovedaná PH (pleckstrin homology) doména uprostred Ral BD. Jej prítomnosť sa potvrdila, keď sa na GST-Exo84 ko-imunoprecipitáciou naviazali rádioznačené lipozómy obsahujúce PI(4,5)P2 (fosfatidylinozitol 4,5-bisfosfát) a PI(3,4,5)P3 (fosfatidylinozitol 3,4,5-trisfosfát). Zo skutočnosti, že sa väzobné domény celkom prekrývajú vyplynula otázka, či existuje vzájomná kompetícia PI(4,5)P2 a PI(3,4,5)P3 s Ral. Toto potvrdili ko-imunoprecipitačné pokusy, pri ktorých sa stanovilo množstvo naviazaného Ral a PI(4,5)P2 s PI(3,4,5)P3 na Exo84 saturovaného PI(4,5)P2 a PI(3,4,5)P3 a Ral. Ako tvrdí autor, bola takto preukázaná vôbec prvá asociácia GTPázy s PH doménou a teda by mohla znamenať objav celkom nového spôsobu regulácie interakcií proteín-lipid. Avšak veľmi podobné interakcie s GTPázami a ich aktivátormi už boli dávnejšie opísané (Musacchio a kol., 1993, Yoon a kol., 1994).

Pri formulácii modelu úlohy Ral GTPázy pri zostavovaní exocystu autori vychádzali z už známych kvasinkových modelov, v ktorých sú Sec15, Sec10 a Exo84 asociované v subkomplexe na vezikule a zvyšné podjednotky (Exo70, Sec3, 5, 6, 8) na plazmatickej membráne (v cicavčích bunkách je súčasný model odlišný od kvasinkového) a ich spojenie reguluje Sec4. V človeku (resp. cicavcoch) by túto úlohu mohla zohrávať Ral. Pre potvrdenie tejto hypotézy autori urobili analytickú centrifugáciu. Zistili, že tak ako v kvasinke, aj exocyst cicavcov sa nachádza v dynamických subkomplexoch na

plazmatickej membráne a na vezikule (obr.5). RalA sa pri tom nachádzalo vo frakcii spolu s Exo84 a Sec10 na sekrétorických vezikulách, ako aj vo frakcii so Sec5 a Sec6 na plazmatickej membráne a pomerne rovnomerne bolo distribuované v ďalších frakciách. Autori prezentujú skutočnosť, že RalA interaguje so Sec5 lokalizovaným na membráne, ako aj s Exo84 na vezikule ako jasný náznak jeho regulačnej funkcie pri skladaní exocystu (Moskalenko a kol. 2003)



Obrázok 5: Predpokladaný model regulácie skladania exocystu cicavcov od Moskalenko a kol., 2003.

3.3. INTERAKCIA SEC15 S RAB11

Rab11 je malá GTPáza podieľajúca sa cicavčích bunkách na pochodoch recyklujúcich endozómov. Ko-lokalizuje s transferrínovým receptorom a podieľa sa na recyklovaní transferrínu. Taktiež sa podieľa na transporte z TGN do plazmatickej membrány a boli preukázané interakcie s proteínmi rabphilin-11, Rip11, myozín Vb, Rab11-FIP, Rab11-FIP4 a Rab coupling protein. Tieto majú spoločnú, cca. 20 aminokyselinovú Rab 11 väzobnú doménu, vďaka čomu sú radené do 1 rodiny (Hales a kol., 2001, Lindsay a kol., 2002). Sec15 je prvý interakčný partner Rab11 bez tejto domény. Objaveniu tejto interakcie predchádzali ko-lokalizačné štúdie odhaľujúce ko-

lokalizáciu Sec15, Sec10 a Rab11 a vylučujúce ko-lokalizáciu Sec15 s Rab4, Rab6 a Rab7. Ďalej bola urobená kvantitatívna 2-hybridná skúška, ktorá túto interakciu preukázala. Nasledovne bola potvrdená pull-down metódou, pomocou ktorej bola potvrdená aj špecifickosť väzby na GTP väzobnú formu Rab11. Taktiež boli vylúčené Rab4, 6 a 7 ako interakční partneri Sec15. Autori nevyslovili žiadnu hypotézu, akú funkciu by Rab11 mohol zohrávať pri zostavovaní exocystu, vylúčili však možnosť podobnosti s kvasinkovou Sec4 (Zhang a kol., 2004).

3.4. INTERAKCIA SEC10 S ARF6

Výsledkom bádania posledných rokov je aj zhrňujúci poznatok, že úloha exocystu je rovnako dôležitá pre post-Golgi sekréciu, tak pre recykláciu endozómov. Rýchla recyklácia endozómov sa uplatňuje v rade dôležitých procesov naprieč všetkými eukaryotmi, od odpovede na inzulín cicavcov, alebo recykláciu transferrínových receptorov až po recykláciu rastlinných PIN proteínov (Geldner a kol, 2003, Prigent a kol., 2003). Je možné usúdiť, že dynamika endocytózy a exocytózy v bunke musí byť pri rýchlej recyklácii nejakým spôsobom vyvážená. Doklad o prepojenosti regulácie exocytózy a endocytózy poskytuje prvá objavená interakcia s ARF GTPázou ARF6, ktorá sa podieľa na stimulácii endocytózy regulovaním „plášťotvorných“ (coatomeic, COP) proteínov a na tvorbe výčnelkov membrány a z nich následne vezikúl. Interakcia ARF6 s podjednotkou exocystu SEC10 vrhá nové svetlo na reguláciu pomeru exocytózy a endocytózy pri membránovej recyklácii.

Interakcia bola identifikovaná v 2-hybridnom screene s cDNA knižnicou z ľudskej placenty. Zmazaním 16 N-terminálnych aminokyselín znemožnilo ARF6 interagovať so Sec10 z čoho autori usúdili, že za interakciu je zodpovedná práve táto doména. Interakciu autori potvrdili hneď 2 metódami a to ko-imunoprecipitáciou a kolokalizačnou štúdiou. Taktiež doložili preferenciu interakcie s GTP-formou ARF6. (Prigent a kol., 2003).

3.5. VZŤAH EXOCYSTU SO SKORÝMI FÁZAMI EXOCYTÓZY

Úloha exocystu ako komplexu, ktorý len lokalizuje vezikuly na správne miesto v membráne, sa ukazuje ako málo pravdepodobná. Podložených funkcií exocystu je hneď niekoľko. Koncept regulácie proteosyntézy do drsného ER exocystom sa ukazuje

ako mechanizmus dôležitý pre synchronizáciu dynamiky proteosyntézy s dynamikou exocytózy. Vzťah medzi proteosyntézou a exocystom bol najprv pozorovaný ako komplementácia mutácií v niekoľkých podjednotkách exocystu pri overexpressii SEB1/SBH – súčasti Sec61 – podjednotky translokónu. Následne boli ko-
imunoprecipitáciou zistené interakcie medzi Sec61 a podjednotkami Sec15 a Sec8. Pri overexpressii Sec15. Interakcia SEB/SBH so Sec10 bola doložená ko-
imunoprecipitáciou i 2-hybridným pokusom. Taktiež boli identifikované proteíny s výrazne zvýšenou expresiou (pIgR s bazolaterárnou lokalizáciou), ako aj proteíny s nezmenenou expresiou (CNT1 s apikálnou lokalizáciou). Zatiaľ teda neznámym mechanizmom, ale exocyst zrejme reguluje proteosyntézu do drsného ER a pravdepodobne aj špecificky syntézu niektorých proteínov. Toto pozorovanie zapadá do modelu kontroly proteosyntézy do ER exocystom (Lipschutz J., H. a kol., 2003, Toikkanen J., H., 2003).

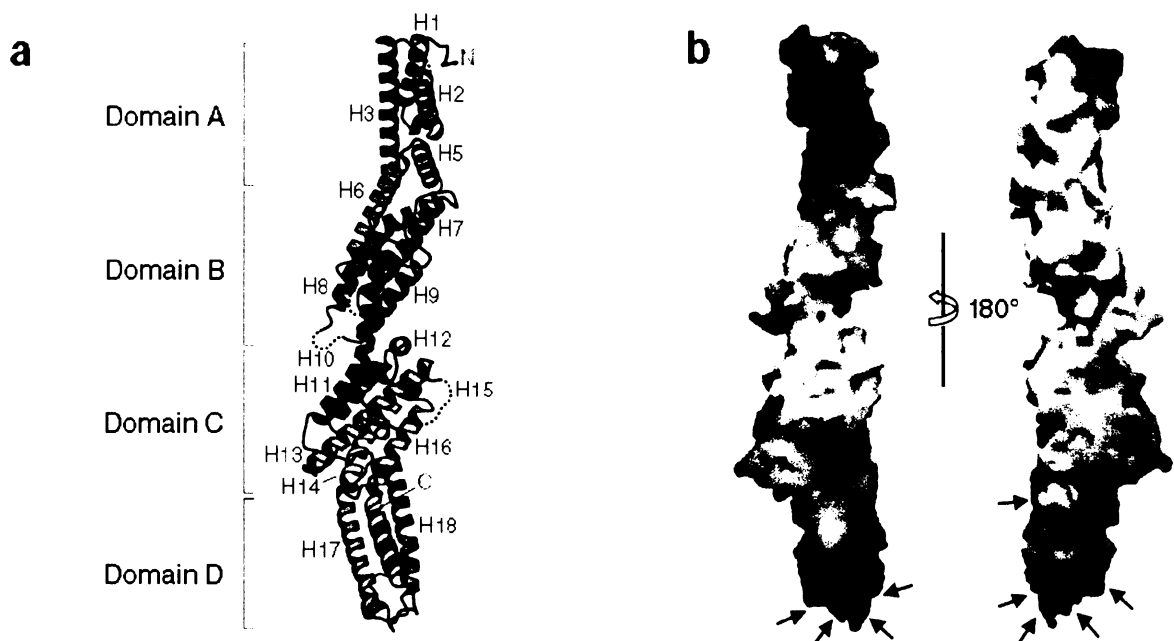
4. EXO70 - CHARAKTERISTIKA A ZHRNUTIE POZNATKOV O PROTEÍNE

Exo70 je podjednotka exocystu, ktorá spolu s Exo84 nebola identifikovaná ako sekrétorický mutant, ale ako interaktor exocystu pri afinitnej purifikácii (Terbush, D. a kol, 1996). So svojou veľkosťou 70 KDa je to najmenšia podjednotka exocystu. Rovnako ako ostatné podjednotky exocystu je konzervovaná u eukaryot. Genóm človeka obsahuje 2 kópie EXO70, kvasinka 1 kópiu, kým *Arabidopsis thaliana* najmenej 22 (Eliáš, M. a kol, 2003).

4.1. ŠTRUKTÚRA EXO70

Exo70 kvasinky je tyčinkovitý proteín s kladne nabitým C koncom a záporne nabitým N koncom (obr.6). Tyčinkovitá štruktúra je pre proteíny exocystu charakteristická. Rozmery proteínu sú 160Å a 30-35 Å. Je pravdepodobné, že kladne nabitý C koniec interaguje s plazmatickou membránou a taktiež existujú doklady, že v cicavčom a kvasničnom exocyste plní podobne ako Sec3 (Guo, W., a kol., 2001) funkciu značky („landmark“) na membráne (Hugo, T. a kol., 2001) . Táto funkcia však nie je prepojená s interakciou s Rho3 (Roumanie, O. a kol., 2005). S ostatnými podjednotkami

exocystu interaguje exo70 ako N koncovými doménami, tak C koncovými. Za interakciu s Rho3p je zodpovedná C koncová doména. Zo sekvenčnej podobnosti je možné usúdiť, že tyčinkovitá, striktne polarizovaná štruktúra Exo70 je zachovaná u cicavcov a aj u rastlín (Dong, G. a kol., 2005).



Obrázok 6: Štruktúra kvasinkovej Exo70. A- doménová štruktúra, farebná škála od N konca (modrá) po C (červená). B- predpokladaný povrch molekuly, červená farba korešponduje s negatívnym nábojom, modrá s pozitívnym (prevzaté z Dong, G. a kol., 2005).

4.2. EXO70 INTERAGUJE S ARP2/3 KOMPLEXOM V CICAVCOCH

Z všeobecného hľadiska je možno predpokladať, že exocyst, navádzací („tethering“) komplex vezikúl k membráne bude aktívne spolupracovať s ostatnými bunkovými mechanizmami podieľajúcimi sa na polarizovanom raste. Aktínové vlákna medzi ne nepochybne patria, rovnako ako tubulínový cytoskelet. Exocyst sa taktiež nachádza, rovnako ako aktínový cytoskelet „downstream“ od malých GTPáz, ktoré regulujú oba systémy (Etienne-Manneville, 2004). Prepojenosť exocystu s aktínovým cytoskeletom pekne demonštruje interakcia Exo70 s Arp2/3 komplexom v potkaních

NRC bunkách a v HeLa bunkách. Interakcia je sprostredkovaná podjednotkou ARP2/3 Arpc1. Autori článku (Zuo, X. a kol., 2006) ju doložili mnohonásobnými kolokalizačnými štúdiami a pull-down metódou. Bunky s potlačenou syntézou Exo70 (pomocou siRNA) strácajú schopnosť tvoriť výčnelky membrány ako filopódiá. Strata tejto schopnosti je sprevádzaná a pravdepodobne spôsobená neschopnosťou organizovať v daných oblastiach aktívny cytoskelet. Overexprimovanie Exo70 spôsobilo nárast počtu filopódií. Mikroinjekcia GST-Cdc42 tvorbu filopódií indukovala. Túto indukciu potlačilo pridanie protilátok anti-Exo70, ktoré sa rovnako ako Arpc1 viažu na C-koncovú doménu Exo70. Z tohoto pozorovania je možné dedukovať, že Exo70 je downstream od Cdc42, čo podporuje pozorovania z kvasinky (Zuo, X. a kol., 2006, Etienne-Manneville, 2004).

4.3. INTERAKCIA EXO70 S BIG2 A FUNKČNÉ PREPOJENIE S MIKROTUBULMI V CICAVCOCH A KVASINKE

Big2 je GEF inhibovateľný brefeldínom (Brefeldin inhibited GEF) pre ARF. ARF GTPázy regulujú tvorbu COP vezikúl interakciou s COP proteínmi. ARF GTPázy boli taktiež charakterizované ako interaktori exocystu (viď kapitola 3.4). Interakcia Exo70 s BIG2 je ďalším dokladom o intímnom prepojení regulácie exocytózy a endocytózy. Interakcia bola opísaná 2-hybridným screenom pre interaktory Big2. Bola overená koimunoprecipitačným experimentom. Za interakciu s Exo70 je zodpovedná N-koncová časť Big2. Funkčná prepojenosť Exo70 a Big2 zatiaľ nie je objasnená. Je však pozoruhodné, že Big2, ako aj Exo70 sú v cicavčích bunkách lokalizované na mikrotubuloch a v MTOC (mikrotubulárne organizačné centrum - microtubule-organizing center, centrozóm). Tieto pozorovania nie sú v rozpore s pozorovaním lokalizácie Exo70 v centre apikálneho rastu, nakoľko Exo70 sa lokalizuje na mikrotubuloch len čiastočne. Taktiež je lokalizovaná v zóne apikálneho rastu a v perinukleárnom priestore (Xu, K., F. a kol., 2005). Tieto pozorovania však vnášajú pohľad na exocyst z perspektívy regulátora tubulínového cytoskeletu.

4.4. EXOCYST A JEHO PODJEDNOTKA EXO70 INHIBUJÚ NUKLEÁCIU MIKROTUBULOV V CICAVCOCH

Okrem toho, že v cicavcoch časť signálu Exo70 ko-lokalizuje s mikrotubulami, sa objavuje pomerne kontraintuitívne prepojenie tubulového cytoskeletu s exocystom. Experimenty s overexpresiou Exo70 ukazujú, že takéto bunky tvoria podstatne menej mikrotubulov a naopak, reprimovanie Exo70 (aplikáciou protilátok, alebo siRNA) spôsobí nárast ich počtu. Komplex exocyst má ako celok schopnosť potláčať polymerizáciu tubulínu, avšak jediná podjednotka schopná samostatne ju inhibovať je Exo70. Overexprimovaná Exo70 taktiež spôsobuje vznik výbežkov v plazmatickej membráne, pravdepodobne zvýšeným transportom post-Golgi vezikúl na plazmatickú membránu.

Tieto experimenty sú doložené aj in-vitro pokusom pri ktorom tubulínová frakcia spolu s MAPS (microtubule-associated proteins) polymerizovala výrazne menej po pridaní Exo70. Ostatné podjednotky exocystu samé o sebe polymerizáciu tubulínu in vitro neinhibujú (Wang, S. a kol., 2004).

4.5. LOKALIZÁCIA EXOCYSTU AKO DÔSLEDOK POLARIZÁCIE POST-GOLGI TRANSPORTU A NIE JEHO PRÍČINA

Úloha exocystu v polarizovanej exocytóze bola zistená na základe pozorovaní mutantov v jeho podjednotkách, ktorí zlyhávajú v polarizovanom raste. Táto interpretácia je doložená lokalizáciou exocystu na plazmatickej membráne a sekreторických vezikulách. V predchádzajúcich kapitolách (2., 3.) sú zhrnuté poznatky o interakciách s malými GTPázami, ktoré sú rovnako dôležité pre polarizovaný rast. Je však potrebné pripustiť, že existuje aj celkom nezávislý model a vysvetlenie týchto pozorovaní, ktoré mení pohľad na funkciu exocystu o 180°. Už Boyd, C. a kol., 2004 zaznamenali lokalizáciu exocystu prevažne na post-Golgi sekreторických vezikulách. Taktiež bola preukázaná lokalizácia exocystu na drsnom ER (Lipschutz J., H. a kol., 2003, Toikkanen J., H. a kol. 2003), na mikrotubuloch (Xu, K., F. a kol., 2005) a na sieti trans-Golgi (Yeaman, Ch. a kol. 2001). Všetky tieto pozorovania síce podporujú dôležitosť exocystu pri polarizovanej sekrécii, ale spochybňujú model, pri ktorom funkcia spočíva v sprostredkovaní interakcie vezikuly SNARE proteínom.

Pochybnosť do existujúceho modelu fungovania exocystu vnáša pozorovanie, že interakcia Exo70 s Rho3 v kvasinke nie je zodpovedná za správnu lokalizáciu vezikúl. Mutant v Rho3, neschopnou viazať Exo70 – rho3-VP1 nemá sekreторický defekt

(Roumanie, O. a kol., 2005). Rovnako sa správa mutant v Sec3 neschopný viazať Rho1 (sec3 Δ N). Pritom Sec3 bez Rho1 väzobnej domény stráca svoju lokalizáciu v mieste apikálneho rastu na plazmatickej membráne a je lokalizovaný v cytoplazme (Guo a kol., 2001, Roumanie, O. a kol., 2005). Dvojité mutant, ktorý ma narušené obe signalizačné dráhy (Rho1-Sec3 a Rho3-Exo70), by mal byť podľa očakávania letálny, neschopný lokalizovať exocyst do správnych miest na plazmatickej membráne. Avšak ani tento dvojité mutant nemá sekrétorický defekt (merané kvantifikovaním sekrécie invertázy a endoglukanázy Bgl1). Dokonca exocystia podjednotka Sec15 v týchto bunkách má typickú lokalizáciu v mieste apikálneho rastu, spolu so Sec4 a Cdc42. FRAP analýza GFP-Sec8 ukázala, že ani dynamika lokalizácie exocystu sa v dvojité mutantovi nezmenila. Navyše séria komplementačných pokusov sekrétorických mutantov rekombinantnými proteínmi v konštitutívnej GTP a GDP konformácii dokázala, že pre sekrétorickú dráhu nie je dôležitá ich schopnosť štiepiť GTP, napriek tomu, že interakcia so Sec3 a Exo70 prebieha v GTP väzobnej forme. Tieto pozorovania vnášajú do funkcie exocystu celkom nový pohľad. Vyplývajú z neho dva nové navzájom sa nevylučujúce modely lokalizácie exocystu. Prvý model-model sťahovania exocystu predpokladá, že za označenie miesta na membráne je zodpovedná Rho GTPáza, ktorá privedie spolu s vezikulou exocyst k plazmatickej membráne. Po fúzii vezikuly exocyst ostane asociovaný so sfúzovanou membránou, teraz už plazmatickou. Tento model teda predpokladá hromadenie exocystu v bode apikálneho rastu ako dôsledok, nie príčinu lokalizovanej sekrécie. V druhom, alosterickom modeli taktiež primárne ako „landmark“ slúži Rho GTPáza, v tomto modeli ale fúzia vezikúl v apexe prináša ďalšie komplexy exocystu, ktoré sa na sekrécii aktívne podieľajú a amplifikujú polarizáciu bunky (Roumanie, O. a kol., 2005).

Celý koncept funkcie exocystu prezentovaný (Roumaniem, O. a kol., 2005) je pomerne logický, avšak celý by bol spochybnený výskytom scaffold proteínu v kvasinke, ktorý by interakcie exocystu v prípade mutácie komplementoval (podobne ako to opísal Lavy, M. a kol., 2007 v rastlinách).

4.6. EXO70 V RASTLINÁCH

O rastlinnom exocyse dnes existuje podstatne menej poznatkov ako o kvasinkovom, či živočíšnom. Všetky podjednotky exocystu majú v rastlinách svoje homológy (Eliáš, M. a kol., 2003). Je taktiež zrejmé, že aj v rastlinných bunkách sú za

reguláciu polarizovaného rastu zodpovedné malé GTPázy. Svedčí o tom pokus, pri ktorom sa po pridaní GDP β S zastavil polarizovaný rast peľového vrecúška a po pridaní GTP γ S sa opäť obnovuje (Cvrčková a kol., 2001). Téma regulácie rastlinného exocystu malými GTPázami je rozvinutá v kap. 4.7., 7.2. a 8.4.

Význam exocystu pre polarizovaný rast v raslinách je evidentný. Pozorovaný môže byť obzvlášť dobre na koreňových vláskoch a peľových vrecúškach, alebo ako dokumentuje moja diplomová práca, na semenných obaloch (kapitola 7.4.2.). Skrátenie koreňových vláskov bolo pozorované u mutantov *exo70a1* (Synek, L. a kol., 2006), *atsec8* (Cole, R. a kol., 2005) a u mutantu kukuričného homológa *Sec3 - roothairless1* (Wen, T., S. a kol., 2005). Pozorovanie defektu rastu peľového vrecúška bolo taktiež zaznamenané u mutantov *atsec8* (Cole, R. a kol., 2005). Naše nepublikované výsledky naznačujú, že aj mutácie v ďalších podjednotkách exocystu *A.thaliana* sa prejavujú na poruche rastu peľových vrecúšok.

Ako už bolo spomenuté, rodina génov EXO70 je prítomná naprieč širokou škálou eukaryotov. V *Arabidopsis thaliana* nájdeme až 23 homológov (Eliáš, M. a kol., 2003). Z nich EXO70A1 vykazuje najväčšiu homológiu s kvasinkovou Exo70. Je to taktiež zatiaľ jediný rastlinný gén EXO70, ktorého mutácia sa prejaví fenotypom silne odlišným od wt. Rastlina je nápadne menšia (trpaslík), má menej väčších buniek a má signifikantne kratšie koreňové vlásky ako wt. Homozygot *exo70a1* produkuje sterilný peľ, čo znemožňuje pozorovať fenotypový prejav mutácie na semennom obale a naznačuje, že v rastlinách je Exo70 esenciálna pre správnu tvorbu peľových zŕn a ich klíčenie (Synek, L. a kol., 2006).

U ostatných podjednotiek Exo70 nebol pozorovaný žiadny mutantný fenotyp. Je to pravdepodobne spôsobené ich vzájomnou komplementáciou v rastline. Je teda pozoruhodné, že Exo70A1 nie je komplementovaná ostatnými homológmi Exo70. Z toho vyplýva, že Exo70A1 má v rastline o funkciu viac ako ostatné Exo70.

4.7. POROVNANIE INTERAGUJÚCICH DOMÉN EXOCYSTU U RÔZNYCH ORGANIZMOV

Jeden z prístupov, ako určiť vhodný postup pri hľadaní interaktorov rastlinného exocystu je hľadanie konzervovaných interagujúcich domén proteínov. Existuje mnoho prác, ktoré opísali jav v danom organizme na základe poznatkov z iných organizmov. Hľadaním podobností s ostatnými organizmami som nechcel hľadať nové poznatky, ale skôr nájsť vhodné, dobre testovateľné hypotézy.

Nie každý autor článku popisujúceho interakciu k nej hľadal aj zodpovednú interagujúcu doménu. Preto porovnávať tieto domény s ekvivalentami iných organizmov bolo možné iba pri niektorých podjednotkách exocystu a to:

- Exo84 – 122-133
- Sec5 – 1-122
- Exo70 – 1-384
- Exo70 - 360-623

Podobnosť sekvencií bola posudzovaná pomocou programu BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) pri použití matrix Blosum62 a Blosum45. Jediná sekvencia vykazujúca významnú podobu medzi ľudskou, kvasinkovou a rastlinnou sekvenciou bol úsek Exo70 – 360 - 623, ktorý obsahuje väzobnú doménu pre Rho3 (obrázok 7).

```
Exo70SC: VRQVTQSLRRAIDRIRIKKANSISTIPSSNGTEAVDTMSRLRKFS--EYIN--GCLGAMDNITR
Exo70MM: METIGAKALEFADNENIPDKEYNMPKTTTEESNAILLQQLL--DFEAGAMLASQVLGD
Exo70A1: LAQTAQETGFEFAEKATKTAVL--TTPSYVINVKFLF--DYTLKQLFLEFGNGD
Exo70G1: IIDGAAEIHWLLVQTEIQKQTPPPS--GPRVVSFVTD CNKLIQDKYS LTQVLLIHKSWR
Exo70C1: LGAAAVTIGLEKSKSNGRTPVP--SAAPRYTMNLLKYAC--EYELDQVFQHYEANO
```

```
Exo70SC: ENWLSNYKEKEYTLQNEALNWEDHNVLSCFISDCIDTAVGERIAIALMPNQEDIANPNSS
Exo70MM: TYNILDPRETSSSATSYSSEFSKR--LSTYICKVLGNQLSLSV----EDPAIS----
Exo70A1: DHSN-----S--QASVTMRIMQALQNDGSSQ----KDAIT--
Exo70G1: -----FQDN--QMVVLRIRIKAEQDVMVA-----PQDTA-----
Exo70C1: TDNKLEPETKPRQQQREDDEEYKVS--AFARQIRVMELDAEISL-----RDESR-----
```

```
Exo70SC: KNKHKQRIGFIILMLTLVEQIVEK--LNLMAEGHS
Exo70MM: -----AILHLYNIIKLSLEK--L-IQVAVTQK
Exo70A1: -----HILMIIIMVRSVRR--A-KDLDDIV
Exo70G1: -----HFGMHWLYKNLKG--NI-GDHLDSIL
Exo70C1: -----FIIIMGRILQIKGI--I-RDMSQST
```

Obrázok 7. Alignment sekvencií úseku Exo70 360-623 rôznych organizmov:

Exo70SC: Exo70 *Saccharomyces cerevisiae*, GI 1008254

Exo70MM: Exo70 *Mus Musculus*, GI 2352998

Exo70A1: *Arabidopsis thaliana*, At5g03540

Exo70G1: *Arabidopsis thaliana*, At4g31540

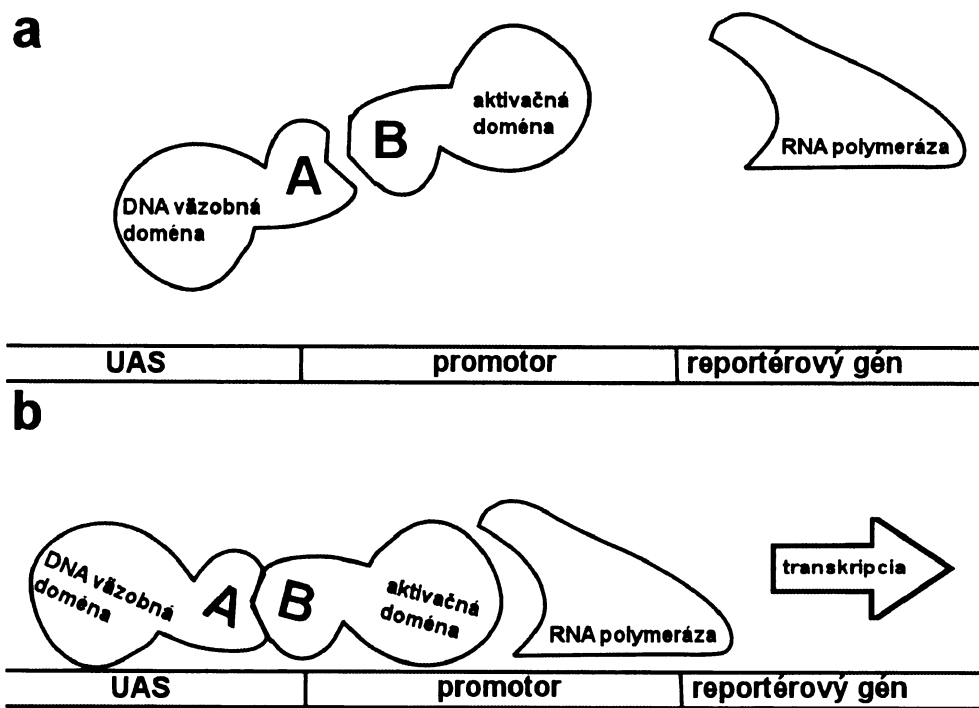
Exo70C1: *Arabidopsis thaliana*, At5g13150

Z týchto meraní jasne nevyplýva, či aj rastlinné Exo70 budú interagovať s homológom Rho3, avšak je možné na základe tohoto pozorovania položiť hypotézu, že Exo70 interaguje s Rop1 (Rho of plants) rastlinným homológom Rho3. Takáto hypotéza sa dá pomerne ľahko testovať 2-hybridnou metódou a o výsledku takéhoto experimentu je referované v experimentálnej časti.

5. 2-HYBRIDNÁ METÓDA

5.1. VZNIK A PRINCÍP METÓDY

2 hybridný systém detekcie interakcií je metóda vyvíjaná koncom 80-tych rokov a prvýkrát publikovaná autormi článku Fields, S. a Song, O-K., ktorí ju opísali v roku 1989. Metóda je založená na poznatku, že transkripčný faktor vo všeobecnosti obsahuje DNA-väzobnú (BD) doménu a aktivačnú doménu (AD), ktoré sú esenciálne pre funkciu transkripčného faktora (TF). Tieto sa väčšinou vyskytujú na 1 proteíne, čo však pre funkciu TF esenciálne nie je. TF môže fungovať aj vtedy, ak sa jeho časti AD a BD vyskytujú na rôznych proteínoch. Podmienkou funkčnosti je však interakcia medzi proteínmi, ktorých časťami sú AD a BD. Tento poznatok otvoril v roku 1986 možnosť nového prístupu k štúdiu proteín-proteínových interakcií. Pri zvolení vhodného reportérového génu a jeho transkripčného faktora je možné urobiť translačnú (génovú) fúziu skúmaných génov (resp. kódujúcich sekvencií génov skúmaných proteínov, alebo ich cDNA) so sekvenciami AD a BD za kvasinkovým promotorom (napr. ADH1). Po dvojitej transformácii kvasinky vzniknutými konštruktami kvasinka produkuje oba hybridné proteíny. To, či spolu skúmané proteíny interagujú sa dá následne zistiť detekciou expresie reportérového génu (znázornené na obrázku 8). Najčastejšie používaný reportérový gén je lacZ kódujúci β -galaktozidázu (pod minimálnym promotorom) a jeho TF Gal4, interagujúci s UAS (upstream activation sequence), nachádzajúcou sa pred (upstream) promotorom. Pre detekciu expresie β -galaktozidázy sa potom ako substrát používa tzv. X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranozid), ktorého glykozidickú väzbu β -galaktozidáza hydrolyzuje za vzniku modrej zrazeniny. Táto je detekovateľná jednoducho vizuálne zmodrením (či nezmodrením) lyzátu kvasiniek na nitrocelulóznom papieri, alebo sa jej množstvo vyhodnotí kvantitatívne spektrofotometricky (napr. pri vylučovaní nešpecifických interakcií a posudzovaní čiastočne modrajúcich lyzátoz po zámene aminokyseliny v proteíne za účelom hľadania interagujúcej domény).



Obrázok 8: Princíp fungovania 2-hybridnej metódy. Časť A – AD a BD fúzne proteíny spolu neinteragujú. Časť B – AD a BD fúzne proteíny spolu interagujú a začína sa syntéza z reportérového génu.

5.2. VÝHODY A OBMEDZENIA 2-HYBRIDNEJ METÓDY

Ako každá, aj 2-hybridná metóda má svoje výhody a limity. Azda najväčšou výhodou jej používania je jej vysoká citlivosť, ktorá umožnila opísať interakcie, ktoré sa pomocou ko-imunoprecipitácie nedali detekovať (až do disociačných konštánt okolo $70 \cdot 10^{-6} \text{M}$, Yang a kol., 1995). S tým však súvisí problém častých falošných pozitívnych výsledkov (viď. nasledujúca podkapitola). Ďalšou veľkou výhodou je práca a identifikácia proteínov pomocou cDNA, čo je podstatne menej pracné a nákladné ako identifikácia proteínov proteínovým sekvenovaním. Ďalšou výhodou je pozorovanie interakcie *in vivo*, proteíny pravdepodobne teda budú vo svojej správnej konformácii. Pri hľadaní aminokyselinových sekvencií zodpovedných za väzbu k interakčnému partnerovi poskytuje metóda možnosť vytvorenia bodovej mutácie v cDNA, buď cielene, alebo celkom náhodne. Sledovaním zmien v interakcii je potom možné bližšie špecifikovať väzobnú doménu, ako aj potvrdiť špecifickosť interakcie. Takéto metódy sa súhrnne nazývajú reverzné 2-hybridné metódy (Bennett M. A. a kol., 2004). Taktiež je možné hľadať väzobnú doménu štiepením cDNA a jej expresiou *per partes*.

Hlavnou nevýhodou 2-hybridnej metódy je podmienka, že interagujúce proteíny musia byť voľné, lokalizované v jadre, čo automaticky vylučuje možnosť skúmať interakcie proteínov lokalizovaných v bunkových membránach. V takomto prípade je potrebné vyštiepiť z cDNA len úsek kódujúci hydrofilnú časť proteínu, alebo napr. použiť tzv. split-ubiquitin 2-hybridný systém (opísaný v nasledovnej podkapitole) Ďalšie problémy súvisia s už spomínanými falošnými pozitívnymi výsledkami. Tieto môžu byť spôsobené viacerými príčinami. Medzi častý problém napr. patrí priama interakcia AD s fúznym proteínom obsahujúcim BD. Iné proteíny, najmä neurotransmittery a iónové kanály môžu zas priamo pôsobiť ako AD, nakoľko sú pomerne acidické. Tento problém bol načrtnutý už pri vzniku vlastnej metódy (Ma a Ptashne, 1987). Niektoré proteíny sú špecificky posttranslačne modifikované. Fakt, že modifikácia v kvasinke môže prebehnúť inak ako v človeku, resp. inom organizme, poukazuje na ďalší nedostatok metódy a jej zlyhanie pri niektorých konkrétnych interakciách. Tieto problémy čiastočne vykompenzoval vznik 2-hybridnej metódy v ľudských bunkách (Fearon a kol., 1992). Bolo by taktiež možné urobiť zámenu serínových a threonínových aminokyselín vo fosforylačných konsenzus sekvenciách za aspartát, alebo glutamát (Huang a Erikson, 1994). Takto upravená metóda je však veľmi náročná a v praxi nie je používaná. Ďalší nedostatok 2-hybridnej metódy bol zistený pri overovaní interakcií kináz a ich substrátov. Tieto interakcie z neznámeho dôvodu doteraz neboli štandardným postupom detekovateľné. Ak sa potvrdí, že metóda pri takýchto interakciách zlyháva, bude to znamenať veľké obmedzenie jej možností. Veľký problém pre metódu predstavujú aj proteíny, ktoré sú pre kvasinku toxické, interferujú s jej vlastnými signálnymi kaskádami a pod. V takomto prípade sa však nedá pokus úspešne dokončiť, preto nespôsobuje falošné výsledky.

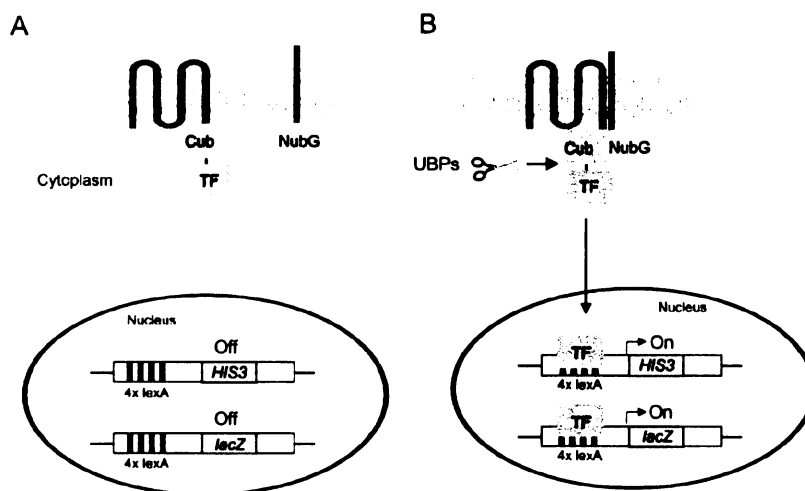
5.3. POUŽÍVANIE METÓDY V PRAXI

Prvá interakcia takto overená bola interakcia transkripčných faktorov SNF1 a SNF4 (Fields a Song, 1989), ktorá bola už predtým opísaná pomocou ko-immunoprecipitácie. Od vzniku metódy bolo pomocou nej objavených množstvo nových interakcií, metóda sa stala dostupnou a komerčne podporovanou. Bolo vyvinutých množstvo jej variantov. Kým pôvodná metóda poslúžila len pre overenie interakcie proteínov už známych, izolovaných génov, jej rozšírenie s použitím cDNA knižnice umožnilo vyhľadávanie celkom neznámych interakčných partnerov k danému proteínu.

Pri tejto metóde sa z cDNA knižnice vytvorí knižnica vektorov obsahujúcich ADH1::AD:cDNA, ktoré sa použijú na výrobu dvojitych transformantov rovnako ako v pôvodnom prevedení metódy. Keďže však identita interakčného partnera po „vyfarbení“ X-Gal nie je známa, metóda vyžaduje navyiac vyizolovanie plazmidovej DNA z modrajúcich transformantov a následne jej osekvenovanie. Aby sa zvýšila istota špecificity interakcie, vznikol tlak na vývoj ďalších metód detekujúcich interakciu ešte pred farbením X-Gal. Najznámejšou z nich je rast kvasinkových línií s His3 génom (esenciálnym pre syntézu histidínu) za minimálnym promotorom a Gal4-UAS na histidín-deficientných selektívnych médiách. Pre potlačenie pozadia expresie His3 a zvýraznenie segregácie sa používa 3-amino-1,2,4-triazol, kompetitívny inhibítor His3 proteínu. Okrem tejto metódy však dnešný trh ponúka množstvo alternatív. Pri opisovaní interakčných partnerov sa často používajú termíny „fish“ a „bait“ (ryba a návnada). Je v podstate jedno, ktorý proteín bude sfúzovaný s BD a ktorý s AD, termín fish bait sa vzťahuje na proteín, ku ktorému hľadáme interakčného partnera pomocou cDNA knižnice (fish) (CLONTECH MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manual).

5.4. SPLIT-UBIQUITIN 2-HYBRIDNÁ METÓDA

Pre výskum interakcií membránových proteínov bola vyvinutá alternatíva - split-ubiquitin 2-hybridná metóda. Princíp tejto metódy sa značne líši od pôvodnej metódy. Ubiquitin-špecifické proteázy (UBP) odštiepia proteín na C-koncovom motíve ubiquitínu (2xGly-Gly-X). Rovnako ako TF, aj sekvencia ubiquitínu sa dá rozdeliť na C-koncovú časť a N-koncovú časť, ktoré sú obe esenciálne pre funkciu UBP. Taktiež sa teda pri pokuse vytvorí 2 fúzne proteíny, jeden s N-koncom ubiquitínu a druhý s C-koncom ubiquitínu, ktorý má k tomu z C-strany ďalší proteín – špecifický TF (ADH1::skúmaný proteín:C-koncová časť ubiquitínu:špec.TF). Ak spolu fúzne proteíny interagujú, vznikne kompletný ubiquitin – signál pre UBP, ktorá odštiepi TF. Tento je voľný a môže sa premiestniť do jadra a aktivovať syntézu reportérového génu (Johnson a Varshavsky, 1994). Proces schematicky znázorňuje obr. 9.



Obrázok 9: Schematické znázornenie funkcie split-ubiquitin (prevzaté z <http://stke.sciencemag.org>)

Je treba poznamenať, že okrem 2-hybridnej metódy existuje aj 1-hybridná a 3-hybridná metóda. Napriek ich spoločnému názvu, tieto nie sú používané pre zisťovanie proteín-proteínových interakcií a preto o nich v práci nediskutujem.

6. METODIKA PRÁCE

6.1. VÝBER VHODNÉHO MATERIÁLU A POSTUPOV

6.1.1. VÝBER GÉNOV EXO70

Ako už bolo spomenuté v kapitole 5.0, rastlinný genóm disponuje, na rozdiel od ostatných skupín organizmov, nezvyčajne vysokým počtom génov kódujúcich homológy Exo70 (22 homológov). Preto je prvým predpokladom získania zaujímavých výsledkov výber vhodných kandidátov. Z širokej ponuky možností bola ako prvou voľbou Exo70A1. Jasným dôvodom je najmä poznatok, že práve Exo70A1 je najbližší príbuzný kvasinkovej Exo70 a je to jediná Exo70, na ktorej bol dodnes pozorovaný mutantný fenotyp (Synek, L., 2006, vid' kapitola 5.0.). Ďalšími kandidátmi sa stali Exo70C1, ktorej expresia je výrazne exprimovaná v kvetných meristémoch a Exo70G1, na ktorej výskume taktiež pracuje naša vedecká skupina.

6.1.2. VÝBER POTENCIÁLNYCH INTERAKTOROV A CDNA KNIŽNÍC

V závere kapitoly 5.1. som načrtnol hypotézu, že nakoľko väzobné miesto kvasinkovej Rho3 na Exo70 je signifikantne podobné s paralogickým miestom na rastlinných Exo70, v rastlinných Exo70 by mohla podobne interagovať ROP1, rastlinný homológ Rho. Ako prvá teda bola testovaná táto. Konštrukt konštitutívne aktivovanej ROP1 vo vektore pAS1-CYH2 som získal z našich laboratórnych zbierok.

Ďalšie pokusy som robil s rastlinnými cDNA knižnicami. Tieto boli získané objednaním z www.arabidopsis.org, pod označením CD 4-10, CD 4-22 a CD 4-30. Tabuľka 1 zhŕňa ich základné parametre.

knižnica	vektor	príprava	zdroj materiálu	komplexita
CD 4-10	pACT	Amplif. Fága *	Random-primed	?
CD 4-22	pACT	Amplif. Fága *	Etiolované semenáčky	?
CD 4-30	pAD	Extrakcia z baktérií *	Kvetné pletivá	?

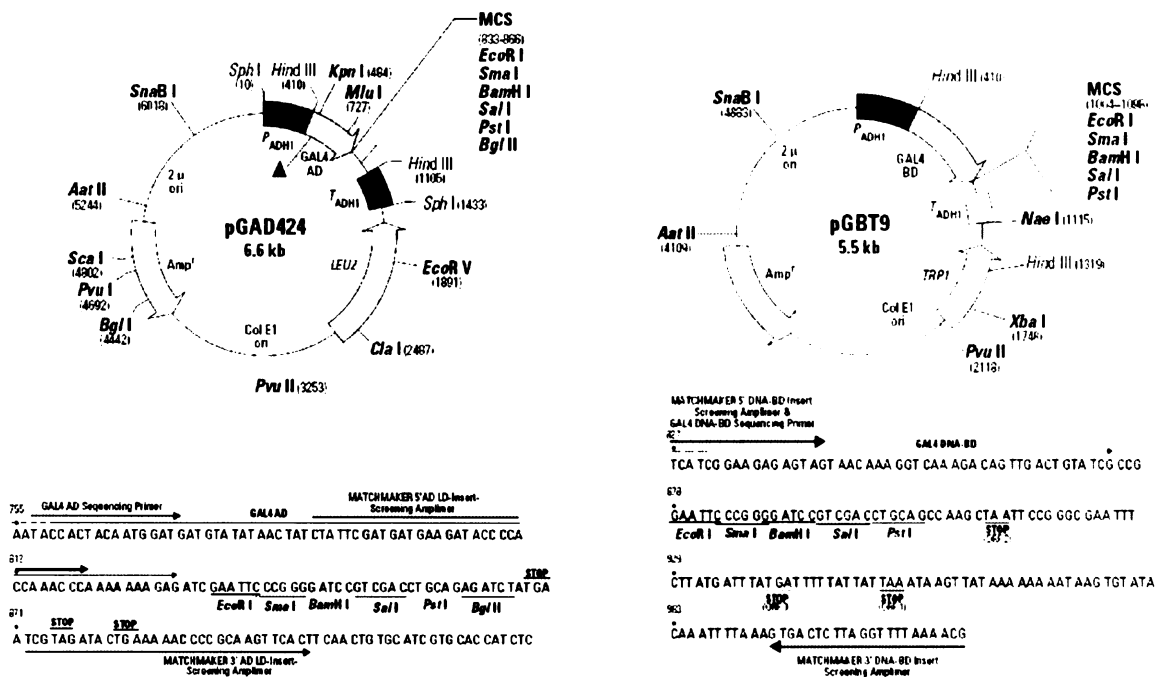
* Postup prípravy podrobnejšie uvádza metodická kapitola 6.3

6.2. PRÍPRAVA DNA KONSTRUKTOV A CDNA KNIŽNÍC

6.2.1. POUŽITÉ VEKTORY

Pre prácu s kvasinkami som si zvolil niekoľko vektorov navrhnutých pre 2-hybridnú metódu. Tieto som získal z našich laboratórnych zbierok, alebo objednaním z www.arabidopsis.org. Ďalej som použil bakteriálne expresné vektory pre overenie interakcie metódou pull-down. Prehľad použitých vektorov uvádza tabuľka 2:

pGAD	2-hybridný vektor s AD	lab. zbierky	kvasinkový a bakteriálny
pGBT	2-hybridný vektor s BD	lab. zbierky	kvasinkový a bakteriálny
pAS-CYH2	2-hybridný vektor s BD	arabidopsis.org	kvasinkový a bakteriálny
pACT	2-hybridný vektor s AD	arabidopsis.org	kvasinkový a bakteriálny
pAD	2-hybridný vektor s AD	arabidopsis.org	kvasinkový a bakteriálny
pGEX	bakteriálny expresný vektor s GST značkou	lab. zbierky	bakteriálny



Obrázok 10: Schéma vektorov pGAD424 a pGBT9 ktoré som použil pri 2-hybridných pokusoch

6.3. PRÁCA S CDNA KNIŽNICAMI

6.3.1. AMPLIFIKÁCIA C-DNA KNIŽNICE

Pri Amplifikácii cDNA knižníc som postupoval podľa Fan a kol., 1997.

- Kmeň buniek *E.coli* LE392 som nechal narásť cez noc v 37°C do 20ml LB média s prídavkom 0,2% maltózy.
- Druhý deň som bunky centrifugoval 10 minút preťažením 2500g. Sediment som resuspendoval v 10ml 10mM MgSO₄.
- Po 300μl vzniknutej suspenzie som premiestnil do do predhriatych (na 37°C) 5ml skúmaviek (v našom prípade 10). Do každej skúmavky som pridal množstvo fága zodpovedajúce zhruba 30 000 fágom a inkubovali 15 minút pri 37°C.
- Bunky som zalial 6.0 ml 0,5% agarom vychladeným zhruba na 50°C.
- Vzniknutou zmesou som rovnomerne očkoval 10 veľkých (Ø 16cm) Petriho misiek s 2% LB agarom.
- Misky som inkuboval 8 hodín. Potom som misky vychladil do 4°C a pridal pufor SM. Takto som misky inkuboval cez noc v 4°C.
- Vrchný agar som oškrabal do 45ml skúmaviek a centrifugoval.
- Supernatant som použil pre ďalšiu prácu a uložil pre neskoršie použitie.

Tabuľka 3: pufor SM (suspension medium), objem 1l:

NaCl	5,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 g
Tris-Cl, pH 7,5	50 ml
H ₂ O	do 1 litra
želatína	0,01% (hmot./obj.)

6.3.2 VYSTRIHNUTIE PLAZMIDU Z FÁGOVEJ KNIŽNICE

Podobne ako pri amplifikácii, aj pri vystrihnutí plazmidu som postupoval podľa Fan a kol., 1997.

- 5×10^8 * fágov som inkuboval s 2ml logaritmicky rastúcej kultúry buniek *E.coli* BNN132 v 10mM $MgCl_2$ pri 30°C.
- Pridal som 2ml LB média a inkuboval v trepačke hodinu pri 30°C.
- 200µl suspenzie som vysial na 10 Petriho misiek (\varnothing 16cm) s LB agarom, 50µg/ml ampicilínom a 0,2% glukózou a inkuboval cez noc pri 37°C.
- Na druhý deň som na misky nalial zhruba po 10ml MPB média** a bakteriálny nárast resuspendoval. Takto získané MPB médium som použil ako inokulum tekutého média, z ktorého som po 8 hodinách extrahoval plazmidovú DNA.

* - použil som väčšie inokulum ako v pôvodnom postupe (Fan a kol., 1997 použil 10^8).

** - v pôvodnom postupe bolo použité LB médium

6.4. TRANSFORMÁCIA KVASINIEK A SCREENING

6.4.1. TRANSFORMÁCIA PRE SCREEN

Pre transformácie kvasiniek som vybral kmeň Y190 s genotypom :

MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-112

URA3::GAL-->lacZ, LYS2::GAL(UAS)-->HIS3cyh,

ktorý je svojimi vlastnosťami primárne určený pre 2-hybridné pokusy. Tento je odporúčaný väčšinou výrobcov nástrojov pre 2-hybridný screen. Použil som fungujúci Y190 z našich laboratórnych zbierok, nakoľko novo objednaný z arabidopsis.org sa nesprával štandardne (nemodrali ani dvojití transformanti s pozitívnou kontrolou).

Transformáciu kvasiniek som robil podľa nasledovného transformačného protokolu:

1. zaočkoval som 1ml kvasinkového YPD média niekoľkými kolóniami kvasiniek Y190. Pre dvojitú transformáciu som namiesto netransformovanej Y190 použil jednoduchého transformanta zo selektívneho média.

2. Médium s kvasinkami som resuspendoval a inokuloval ním 30-50 ml tekutého YPD média. Toto som inkuboval cez noc (16-18 hodín) pri 30°C a miešaní pri 200ot./min. do stacionárnej fázy.
3. Vzniknutou kultúrou som zaočkoval potrebné množstvo média v pomere 1:10 (na 1 transformáciu spotrebujeme 20ml kultúry) a inkuboval pri 30°C a 200-220 ot./min. 3-4,5 hodín do OD₆₀₀ okolo 1,0 (túto hodnotu som získal empiricky, v originálnom postupe sa uvádza výsledná OD₆₀₀ od 0,4 do 0,6).
4. Kvasinkovú kultúru som premiestnil do 50ml centrifugačných skúmaviek a centrifugoval pri 1000g a laboratórnej teplote 5 minút.
5. Médium (supernatant) som vylial a sediment kvasiniek resuspendoval v 10-30ml vody (ak som pracoval s väčším objemom, v tomto kroku som všetky resuspendované kvasinky preniesol do 1 spoločnej centrifugačnej skúmavky). Centrifugoval som rovnako ako v kroku 4.
6. Odstránil som supernatant a sediment resuspendoval do 1,5 ml sterilného TE/LiAc roztoku.
7. 0,1µg plazmidovej DNA pre transformáciu som zmiešal s 10µl herring testes carrier o koncentrácii 10mg/ml, teda 0,1mg na 1 transformáciu. Pri pokusoch, kde efektivita transformácie nezohrávala úlohu, som použil polovičnú dávku herring testes carrier. Herring testes carrier som vždy pred pokusom denaturoval 20 min. pri 100°C a nasledovne spôsobil teplotný šok premiestnením do ľadu. Pri transformácii pre screening som použil 10µl DNA.
8. Do skúmaviek s mixom herring testes carrier a plazmidovej DNA som pridal 100µl suspenzie kompetentných kvasiniek Y190 v TE/LiAc z kroku 6 a dobre premiešal.
9. Pridal som 600µl sterilného PEG/LiAC roztoku a vortexoval pri maximálnych otáčkach 10 sekúnd. Vzorky som inkuboval pri 220 otáčkach a 30°C pol hodiny.
10. Pridal som 70µl DMSO a spôsobil kvasinkám teplotný šok 15 minútovým inkubovaním v 42°C.
11. Vzorky som ochladil v ľade počas 2 minút a centrifugoval veľmi krátkymi impulzmi na centrifuge do 5 sekúnd a 5000g.
12. Supernatant som odstránil a sediment resuspendoval v 100µl pufru TE, preniesol na Petriho misky s vhodnou selekciou a inkuboval, kým nenarástli dostatočne veľké kolónie pre ďalší postup (v originálnom postupe sa používa až 500µl TE

pufri, avšak v našich podmienkach to spôsobovalo roztečenie kolónií po miske počas inkubovania).

(CLONTECH MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manual), ktorý som upravil pre dosiahnutie čo najvyššej účinnosti v našich podmienkach zvýšením OD₆₀₀ výslednej kvasinkovej kultúry zo 0,4-0,6 na 0,8-1. Účinnosť takto vykonanej transformácie sa pohybovala v rozmedzí 1000-20 000 transformantov na mikrogram DNA .

Po transformácii s cDNA knižnicou som vysial kvasinky na Petriho misky s SD médiom vytvoreným podľa už spomínaného protokolu CLONTECH MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manual s obsahom 1,2,4-3-aminotriazolu o koncentráciách 30 a 50mM.

Po 5 dňoch inkubácie pri 30°C som začal vyberať najväčšie pozitívne kolónie a očkovať ich na základné misky. Získané pozitívne transformanty som ďalej testoval β -galaktozidázovým (β -GAL) testom a to nasledovne:

- na filtračný papier som naniesol malé vzorky kolónií
- filtračný papier som vymrazil v tekutom dusíku
- po vytiahnutí z dusíka som umiestnil filtračný papier do pufri Z s 3,5 μ l/ml merkaptetanolom a s 25mg/ml X-GAL.
- po hodinovej inkubácii v 37°C som vyhodnotil sfarbenie kolónií

6.4.2. OVEROVANIE INTERAKCIÍ A VYLUČOVANIE FALOŠNÝCH POZITÍVOV

Pre overenie interakcie a uistenie sa, že ide o skutočný pozitívny výsledok som vytvoril dvojité transformanty každého z interaktorov s prázdny vektorom druhého interakčného partnera. Interakciu som považoval za dostatočne overenú 2-hybridnou skúškou vtedy, keď každý z takýchto transformantov bol pozitívny v β -GAL teste, pričom dvojitý transformant s konštruktami interaktorov bol pozitívny. Získané konštrukty som po takomto teste považoval za vhodné na sekvenovanie a overovanie inými metódami.

6.5. EXTRAKCIA CELKOVEJ DNA Z KVASINIEK

Extrakciu DNA z kvasiniek som robil podľa nasledovného postupu:

Kvasinky som nechal narásť na Petriho miske s požadovaným selektívnym médiom a to po celom povrchu tak, aby vzniklo dostatočné množstvo substrátu pre extrakciu. Z Petriho misiek som kvasinky zozbieral bakteriologickou kľučkou a resuspendoval v 1,5ml sterilnej destilovanej vody, premyl a centrifugoval pri maximálnych otáčkach 1 minútu. Sediment som rozpustil v 300 μ l 1xTE s 0,2% SDS. Pridal som zhruba 150 μ l sklenených guľčiek (Ballotina, priemer do 0,05 mm) a trepal v homogenzátore pri maximálnom výkone 20 minút. Pridal som 300 μ l fenolu, zamiešal a centrifugoval 5 minút pri 16 000g.

Supernatant som premiestnil do novej mikrocentrifugačnej skúmavky a pridal zhruba 1/10 objemu 3M NaOAc a trojnásobný objem 96% etanolu (takže na 10 μ l supernatantu som použil 1 μ l NaOAc a 30 μ l etanolu). DNA som zrážal pri -20°C 15 minút a rozpustil v TE pufre (30 μ l). Takto získanú DNA som elektroporoval do baktérií

6.6. ELEKTROPORÁCIA

Elektroporáciu som robil na elektroporátore Bio-Rad Gene Pulser s nastavením 2,5kV, 25 μ F a 200 Ω . Do alikvotu 50 μ l kompetentných buniek (*E.coli* DH5 α) som preniesol 1 μ l DNA, zamiešal a preniesol do nevychladenej sterilnej elektroporačnej kyvety (sterilizovaná UV pre rozklad DNA). Bunky som vystavil elektrickému impulzu 12kV/cm². Takýto impulz pri optimálnych podmienkach trval 4,3-4,5 ms. Po výboji som bunky preniesol do 1ml MPB média a kultivoval pri 37°C a pri miešaní 150-200ot./min. Počas tejto doby by transformované baktérie mali začať s expresiou génov nesúcich rezistenciu k antibiotiku. Následne som bunky vysial na selektívne misky a inkuboval cez noc pri 37°C.

6.7. PRÍPRAVA KOMPETENTNÝCH BUNIEK PRE ELEKTROPORÁCIU

Vychádzal som z kompetentných buniek uložených v našej laboratórnej zbierke, ktorými som zaočkoval Petriho misku s MPA médiom a inkuboval cez noc pri 37°C. Jednou z kolónii som zaočkoval 10ml tekutého MPB média a kultivovali cez noc pri 37°C a 150 otáčkach. Pripravenou suspenznou kultúrou som zaočkoval 1000ml tekutého MPB média v dvoch 2l Erlmeyerových bankách. Kultúru som kultivoval podobne ako v predošlom kroku

do OD₆₀₀ (optickej hustoty, resp. density pri vlnovej dĺžke 600nm) oproti čistému MPB 0,5-0,8 (používal som ThermoSpectronic BioMate5). Po dosiahnutí optimálnej OD₆₀₀ som suspenziu preliat do 50ml centrifugačných skúmaviek a vychladil na ľade počas 15 minút. Nasledovala centrifugácia pri 3600g počas 15 minút (Multifuge 3 S-R, Heraeus) pri 4°C. Sediment som resuspendoval v 1l vody a centrifugáciu opakoval. Prečistený sediment som opäť premyl, ale v polovičnom množstve vody (500ml) a centrifugoval ako v 2 predchádzajúcich krokoch. Sediment som rozpustil v 20ml 10% glycerolu. Odobral som vzorku, zriedil 20x a odmeral jej OD₆₀₀ proti vode. Ostatok buniek som centrifugoval 15 minút pri 4600g a sediment resuspendoval v množstve 10% glycerolu, ktoré som určil podľa OD₆₀₀ tak, aby výsledná koncentrácia buniek presiahla 3×10^{10} buniek, pričom som predpokladal, že OD₆₀₀ 0,1 zodpovedá 10^8 buniek. Z takto pripravenej suspenzie som vytvoril alikvoty v mikrocentrifugačných skúmavkách po 50μl a zmrazil v tekutom dusíku. Potom som bunky bez rozmrazenia premiestnil do mraziaceho boxu s -80°C.

6.8. EXTRAKCIA PLAZMIDOVEJ DNA Z BAKTÉRIÍ ALKALICKOU LÝZOU

Bakteriálnou kolóniou zo selektívnej misky som zaočkoval 2ml rovnako selektívneho média a inkuboval cez noc pri 37°C. Suspenziu som previedol do mikrocentrifugačných skúmaviek a centrifugoval 1 minútu pri 16 000g (Biofuge Pico, Heraeus). Sediment som resuspendoval v 90μl GTE (50mM glukóza, 25mM TRIS-HCl s pH 8, 10mM EDTA). Pridal som 180μl NaOH/SDS (20mM NaOH, 1% SDS) a nechal som stáť pri izbovej teplote 2-4 min. Následne som pridal 135μl KOAc/HOAc (3M octan draselný, 2M kyselina octová), premiešal a po 5 minútach centrifugoval pri 10 000g po dobu 5 minút. Supernatant som premiestnil do novej čistej mikrocentrifugačnej skúmavky a pridal 1ml 97% etanolu, ktorý vyzrážal DNA. Vzorky som centrifugoval pri 16 000g počas 5 minút a vylial supernatant. Pre odstránenie všetkého etanolu som dbal na opätovné vysatie zvyšku etanolu z dna skúmavky a skúmavky som 5 minút sušil otvorené na sterilnej gáze, alebo savom papieri. Pre overovacie reakcie, transformáciu kvasiniek a ďalšie procedúry, ktoré si nevyžadovali vysokú čistotu DNA, som sediment DNA rozpustil v 20-50μl pufru TE, alebo v sterilnej destilovanej vode. Pre vyššiu čistotu DNA som DNA rozpustenú v TE zmiešal s 5M LiCl v pomere 1:1 a inkuboval pri -20°C 15 minút. Centrifugoval som pri 16 000g 5 minút a supernatant som preniesol do čistej mikrocentrifugačnej skúmavky. Opäť som DNA vyzrážal 1ml etanolom, centrifugoval

a rozpustil v 20-50 μ l TE, alebo sterilnej destilovanej vody obdobne ako pri získavaní nečistenej plazmidovej DNA.

6.9. AGARÓZOVÁ GÉLOVÁ ELEKTROFORÉZA

Agarózová gélová elektroforéza je metóda slúžiaca hlavne pre oddelenie fragmentov DNA rôznej veľkosti. Agarózový gél som pripravil povarením 1g agarózy v 100ml 1xTBE pufre v mikrovlnnej rúre. Takto pripravený gél som nalial do elektroforetickej nádoby a vložil hrebeň. Pri izbovej teplote som nechal gél stuhnúť. Po stuhnutí som odstránil hrebeň, pripravený gél premiestnil do elektroforetickej nádoby (Gibco 250Ex) a do jamiek v géli (po hrebeni) som vliat vzorky zmiešané so vzorkovacím pufrom a DNA farbičkou SYBR GREEN. Elektroforézu som vystavil elektrickému poľu s napätím 80-100 po vhodný čas (30-60 minút podľa veľkosti vzorky). Výsledok som fotografoval pod širokospektrálnym UV svetlom fotoaparátom z rady Olympus Cammedia.

Tabuľka 4: 10TBE pufor:

Tris-báza	108g
H3BO3	55g
0,5 M EDTA pH 8,0	40ml
H2O	1l

Tabuľka 5: Vzorkový pufor

glycerol	50% (hmot./hmot.)
-----------------	--------------------------

EDTA pH 8,3 0,2 M

bromfenolová modrá 0,05% (obj./hmot.)

6.10. ANALÝZA INTERAKČNÝCH PROTEÍNOV IN-SILICO

Po získaní sekvencií interakčných partnerov som identifikoval príslušné gény pomocou programu BLAST na NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Pomocou tohoto programu som vyhľadával aj proteíny homológne k interakčným partnerom a konzervované domény. Pre hľadanie konzervovaných motívov som použil PSI-BLAST.

„Multiple Alignment“ som tvoril pomocou programov BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) a KALIGN (<http://msa.cgb.ki.se/cgi-bin/msa.cgi>).

6.11. FARBENIE A MERANIE VEĽKOSTI SEMENNÉHO OBALU

Semená som hydratoval v destilovanej vode po dobu 30 minút. Potom som ich premiestnil do 0,01% roztoku (hmotnosť/objem) rutheniovej červenej a vyfotografoval na vykalibrovanom mikroskope tak, aby som vedel presne koľkým nanometrom zodpovedá 1 pixel obrázku. Výslednú veľkosť som získal zistením počtu pixelov a prevodom v programe WCIF ImageJ (www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/imagej). Zisťoval som longitudiálnu a transverzálnu dĺžku semena so semenným obalom a bez (viď obr. 11). Z týchto údajov som potom vypočítal priemernú hrúbku semenného obalu. Pre 1 genotyp som vyhodnotil minimálne 30 meraní a to po 10 z 3 rôznych generácií.



Obrázok 11: Postup pri meraní veľkosti semenného obalu.

6.12. PRIMERY PRE SEKVENOVANIE A GENOTYPOVANIE

Pre sekvenovanie z knižnice CD4-10 vo vektore pACT a z knižnice CD4-22 vo vektore pAD som použil primery uvedené v tabuľke 6:

pACT forward:	CTA TCT ATT CGA TGA TGA AG
pACT reverse:	ACA GTT GAA GTG AAC TTG CG
pADfor.seq:	CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC
pADrev.seq:	AAT ACG ACT CAC TAT AG

Pre sekvenovanie z knižnice CD4-22 vo vektore pAD som použil súpravu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit od spoločnosti Applera.

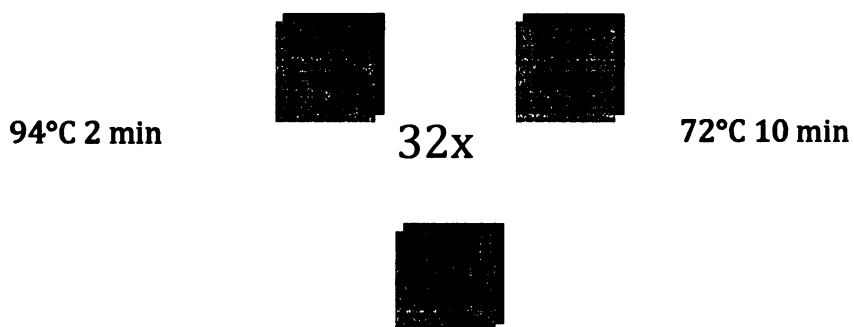
Pre genotypovanie mutantov z databázy SALK som použil primery uvedené v tabuľke 7:

T-DNA inzercia v	Salk ID	Ľavý/ pravý	Sekvencia v smere 3'5'
<i>at4g22160</i>	S013759	LP	TCA AGA TTA GGC CAA AAA GGC
		RP	TGC CTA GAT CCA AAA GCA ATG
	S131711	LP	TTT TAT TTT CTG AGG TTT TGC
		RP	GAC AGC ATA ACG TGT CAA TCA G
<i>at5g64850</i>	S025346	LP	TTG AGA CAT GAA ATC GAT CTG G
		RP	TGG ATT CTT TCT TTC AAT CTG AG
	S024766	LP	TGA ATT TGT ATT AGC TCC TGC
		RP	ATT TTA ATT GTG ATG CAG CCG
<i>atexo70a1</i>		LP	CTA GAC GTT TGC AGC ATC CTA T

RP ATA TGT GTA ATG CAT TGG AGA AGC

Spolu s genotypovacími primermi som použil univerzálny primer komplementárny k T-DNA inzercii LBb1 so sekvenciou: GCG TGG ACC GCT TGC TCG AAC T.

Pre genotypováciu PCR som použil tento program:

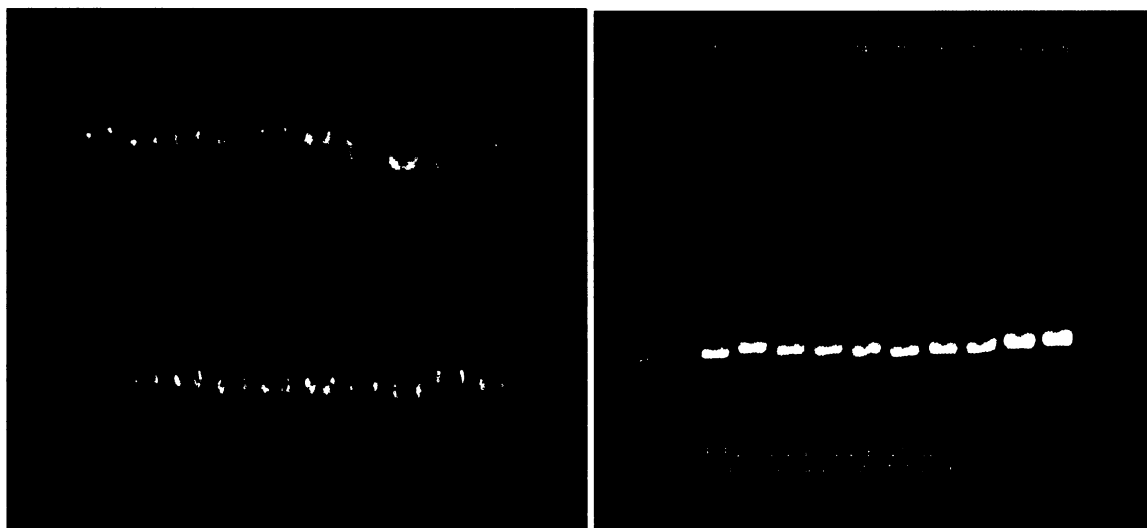


Obrázok 12: schéma genotypovania použitá pre genotypovanie *at5g64850*, *atexo70a1* a *at4g22160* mutantov.

7. VÝSLEDKY PRÁCE

7.1. KLONOVANIE EXO70A1 DO VEKTORA PGBT

Požadovaný konštrukt Exo70A1 som získal ligáciou pGBT otvoreného na miestach BamH1 a Sal1 v polylinkeri vektora s Exo70A1 vyštiepením z konštraktu v pEN3C, ktorý bol vyrobený našou výskumnou skupinou. Pred ligáciou som konce otvoreného vektora defosforyloval fosfatázou. Inzert Exo70A1 som vyštiepil restriktázami EcoR1-Xho1. Nakoľko som spájal kompatibilné miesta Xho1 a Sal1, každé z týchto miest po ligácii zaniklo a pre overenie som použil kombináciu EcoR1-Pst1. Ligoval som cez noc pri 14°C s použitím Fermentas DNA ligázy. Po ligácii som vzniknutú zmes elektroporoval do baktérií, následne amplifikoval a extrahoval plazmid. Správne konštrukty som vybral pomocou overovacieho restriktčného štiepenia a potvrdil PCR-reakciou testujúcou prítomnosť Exo70A1 (obr. 13). Nakoľko zdrojový konštrukt bol už sekvenovaný a DNA neprešla PCR amplifikáciou, nepovažoval som za nutné produkty sekvenovať.



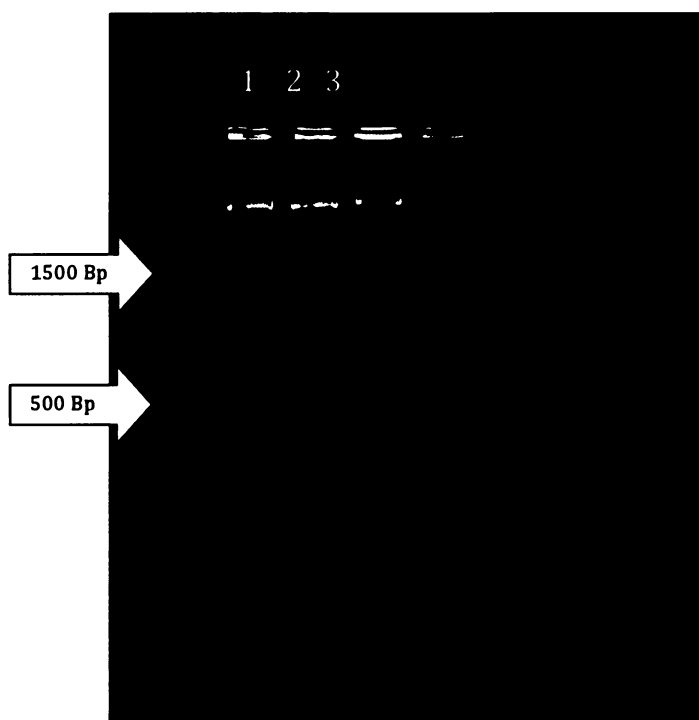
Obrázok 13: Vľavo -overovacie štiepe po klonovaní. Štiepenie EcoR1-PST1. Vzorky s vyštiepeným fragmentom veľkosti 1,5KB som ďalej analyzoval PCR (vpravo), pri ktorej som očakával 500kB prúžok.

7.2. ROP1 NEINTERAGUJE S EXO70

V kapitole 4.7 som prezentoval porovnanie Rho3 interagujúcich domén s paralogickým miestom na AtExo70. Na základe homológie v tomto mieste vyplynula hypotéza, že homológ Rho3 Rop1 interaguje s atExo70. Túto interakciu som testoval v 2 hybridnom pokuse s Exo70C1 a Exo70G1 za použitia konštitutívne aktívnej a neprenylovanej ROP1, ako aj pôvodnej wt ROP1. V oboch prípadoch boli výsledky negatívne. Negatívne výsledky interakcií Exo70 a Sec3 s viacerými Rop boli neskôr odpublikované (Lavy, M. a kol, 2007).

7.3. SCREEN PRE INTERAKTORY EXO70A1 A ICH IDENTIFIKÁCIA

Transformáciu som robil v 2 krokoch, najprv som vytvoril jednoduchého transformanta s konštruktom GBT-Exo70A1 a následne som pritransformoval knižnicu. Screen som robil s knižnicou CD4-10 (kap. 6.1.2.). Účinnosť transformácie presiahla 20 000 transformantov na mikrogram DNA. Celkovo som použil 60 mikrogramov DNA a získal približne $1,2 \times 10^6$ transformantov. Na transformáciu pre 1 Petriho misku som použil 3 μ g cDNA knižnice. Ako prvú selekciu som použil 30mM 3-AT. Na tejto vyrástlo množstvo kolónií, z ktorých som najväčších 800 preočkoval na misky s 50mM 3-AT. Tieto kolónie som všetky podrobil β -GAL testu. Získal som pozitívnych 7 kolónií, ktoré taktiež rástli na 80 μ M 3-AT. Z týchto kolónií som extrahoval DNA a elektroporoval do baktérií. Identifikoval som celkom 4 rôzne plazmidy, z ktorých 3 si zachovali schopnosť modrať a prešli kontrolami. 1 stratil schopnosť aktivovať reportérový gén a vyradil som ho. Celkovo som teda sekvenoval 3 vzorky (Obr.14)



Obrázok. 14: Vyštiepenie inzertu z identifikovaných plazmidov restriktázou XHO. 1- At4g22160, 2-glutamyl-tRNA ligáza, 3-At5g64850.

7.4. AT5G64850 INTERAGUJE S EXO70A1 A G1, ALE NIE S EXO70C1

At5g64850 bol identifikovaný zo screeningu Exo70A1 s cDNA knižnicou CD4-22. Identifikoval som ho nezávisle v 2 kolóniách. Následne som túto interakciu zopakoval s Exo70G1 a C1. Test interakcie s Exo70C1 bol negatívny. Je pomerne prekvapujúce, že nie všetky homológy Exo70 interagujú rovnako. Interakcie demonštrujem na obrázku 15. Tento pokus naznačuje, že rastlinné Exo70 nie sú len redundantné kópie pôvodnej Exo70, ale že by sa mohli aktívne podieľať na rôznych dejoch, resp. byť regulované nezávisle.

-TRP-HIS-LEU +50mM 3-AT					-TRP-LEU						
vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70C1+ At5g64850						Exo70C1+ At5g64850					
Exo70C1+ pGAD						Exo70C1+ pGAD					
At5g64850 +pGBT						At5g64850 +pGBT					

vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70A1+ At5g64850						Exo70A1+ At5g64850					
Exo70A1+ pGAD						Exo70A1 +pGAD					
At5g64850+ pGBT						At5g64850 +pGBT					

vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70G1+ At5g64850						Exo70G1+ At5g64850					
Exo70G1+ pGAD						Exo70G1 +pGAD					
At5g64850+ pGBT						At5g64850 +pGBT					

Obrázok 15: Doklad interakcií medzi podjednotkami Exo70 a proteínom At5g64850. pGAD a pGBT = kontrolná kotransformácia s prázdnyimi vektormi pGAD424 a pGBT9.

7.4.1. BIOINFORMATICKÁ CHARAKTERISTIKA AT5G64850

At5g64850 je krátky proteín (114 AA). Nemá konzervovanú žiadnu známu doménu, ani signál (Letunic, I., 2006) so signifikantnou podobnosťou. K tomuto proteínu existuje niekoľko homológov (obr. 16), pričom len jeden je z *Arabidopsis* a ostatné pochádzajú z iných rastlín, dvojkľúčolistových, ako aj jednokľúčolistových (*Oryza sativa*), nie však z nahosemenných. Izoelektrický bod AtE70int. je pomerne vysoký a to 9.364 (arabidopsis.org).

```

Atexo70int MEDRKENKNSP-----WLSVPQF DWDQK --- SIDYSMDFSKIREMRKLNKRDASRASL NEEELINFFHDQPF-
ATUP1 MEDDRKEKNTF-----WLSVPQF DWDQK- TMPDYSDFTKIREMRKQNKRDPSRASL NEEELIKPPE-----
BRUP1 MEEDRKEKNSP-----WLSVPQF DWDHKS AMPDYSDFTKIREMRKQNKRDPSLASF NEEELIKPPE-----S
BRUP2 MEDQKENKNSP-----WLSVPQF DWDQK-- PVPDYSDFSKIREMRKQHKRDPSRASL NEQDFINPFHNQPTSV
CIUP IMDQKKEKNAP-----WLSVPQF EWDQK--- PLPDYSLDFSKIREMRKQNKNTNTSRASL NEEELN-----
ORUP MESRKEEQH AV WMTVPAF EWDMK--N AVPDYSMDFSKIREMRKQNKRELSRASL DDDLLAAQQH-----

```

```

VDTAK KKLTTVHSDNNNRN-EFSHHHFSRRIIFSCFNCCVKA
SATSTAELTTVQSENQREFSP-SHHHQPHSPSTRRSMFSCFNCCVKA
SA VAKLTTVHSENKQHFSP-DHHHQPHSPSARRSIFSCFNCCVKA
DKTKT--KLTTVHSDNNITMNEFPFHQRHPPSVRS--LASF-----
MAS:KNNISTDHNERQHFH----YHQTNSTTRRSFLSYFNCCVKA
KAAA Q ANASAAAADHRRF-LHAAHDDSPT RKKFLSYFQCCIRA

```

Obrázok 16: porovnanie sekvencie At5g64850 s jeho homológmi z iných organizmov:

ATE70INT	At5G64850 – <i>A.thaliana</i> neopísaný proteín interagujúci s Exo70A1
ATUP1	At5G09960 – <i>A.thaliana</i> , neopísaný proteín
BRUP1	GI 72384402 – <i>Brassica rapa</i> , neopísaný proteín (nekompletný)
BRUP2	GI:871834736– <i>Brassica rapa</i> , neopísaný proteín
CIUP1	GI:6469125 – <i>Cicer arietinum</i> , hypotetický proteín
ORUP1	115481930 – <i>Oryza sativa</i> , neopísaný proteín

7.4.2. FENOTYP INZERČNÉHO MUTANTA

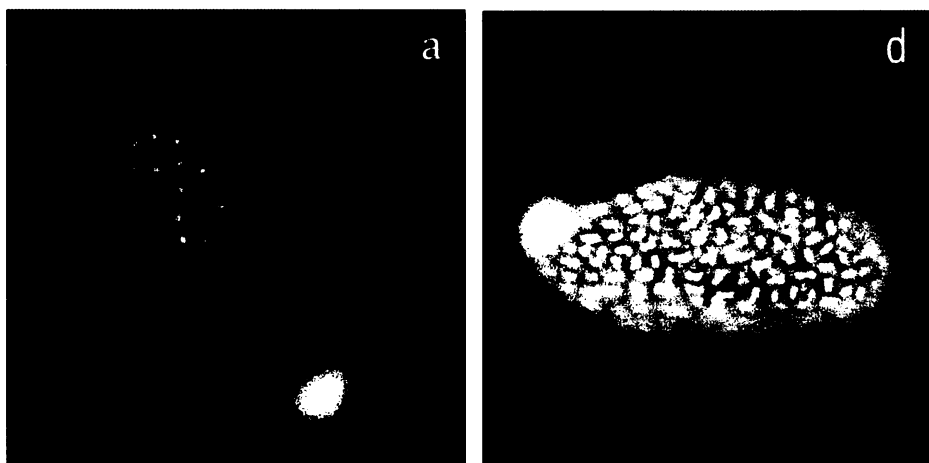
Z databázy inzerčných mutantov SALK som vybral mutanta s označením SALK_024766 s T-DNA inzerciou v mieste 25940258 - 25940478 bp. na 5. chromozóme. Výskyt druhej inzercie som overil selekciou na KAN+ MS médiu, na ktorom nevyrástla ani jedna rastlina bez mutácie v AT5G64850. Tieto pozorovania však budem musieť upresniť a overiť kvôli malej vzorke a problémom s genotypovaním. Podľa mojich pozorovaní, recesívny homozygot v tomto géne vykazuje fenotyp odlišný od WT. Jedným zatial' pozorovaným fenotypom absencie tohoto génu bol menej usporiadaný semenný obal s atypicky stavanými tzv. sopkovými bunkami (z angl. volcano cells, vid' obr. 14 a 15).

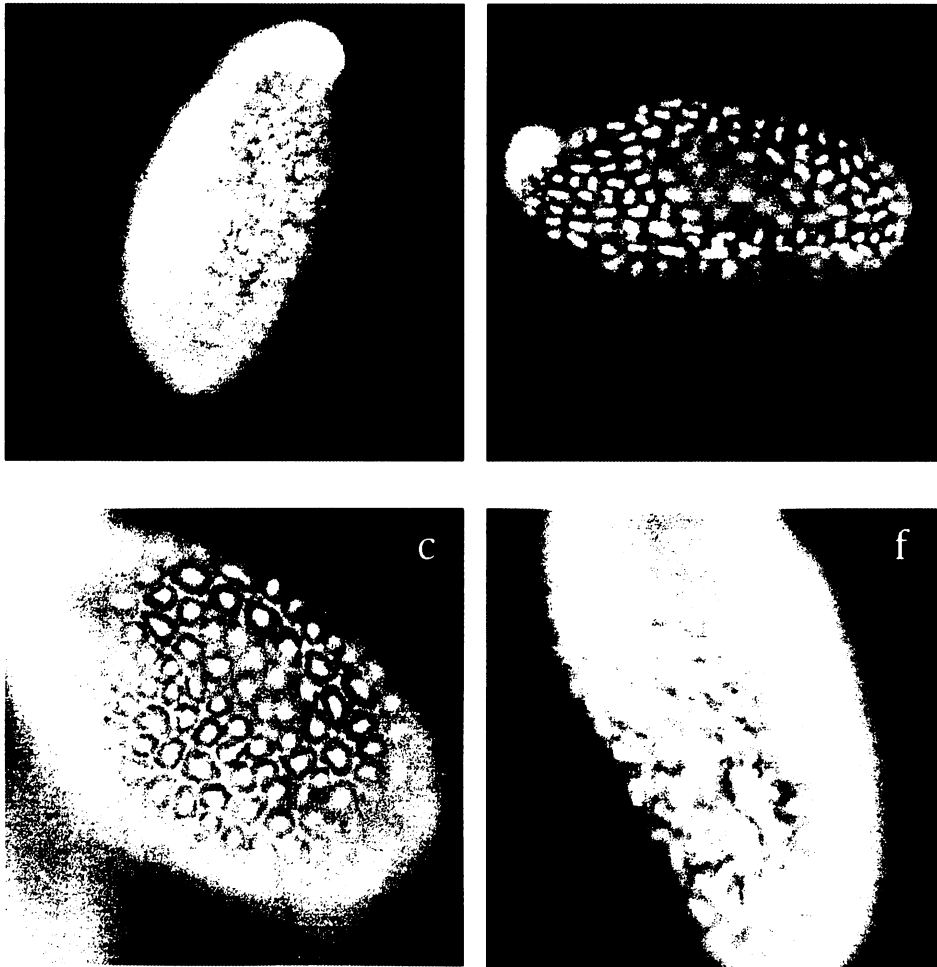
Tieto bunky majú pod primárnou stenou zásobu slizu tvoreného prevažne pektínmi. Pre pripomenutie, pektíny RGI, ako aj RGII sa dostávajú pod bunkovú stenu post-Golgi sekréciou a v tomto prípade ide o sekréciu nápadne polarizovanú. Nielenže sa musia pektíny dostať na vonkajšiu stenu semenného obalu, ale musia sa nazhromaždiť

na okrajoch obalových buniek ktorých bunková stena je po hydratácii roztrhnutá a sliz vymrštený do okolia.

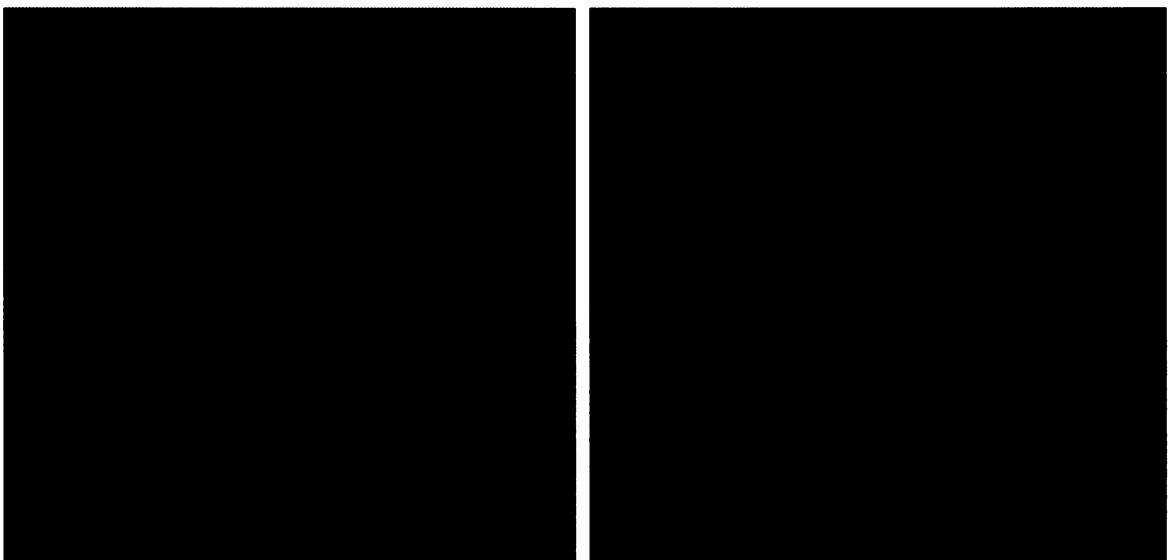
Okrem atypického vzhľadu „sopečných“ buniek taktiež možno pozorovať, najmä na menších semenách, prasknutie, alebo úplné odtrhnutie semenného obalu po hydratácii, čo naznačuje, že pektíny sa v tomto prípade mohli dostať aj na vnútornú stranu semenného obalu. Na obrázkoch 17 a 18 je možné vidieť rozdiel práve v miestach, pod ktorými by mal byť uložený pektín.

Ak má mutant inteaktora s Exo70A1 poruchu v tvorbe semenného obalu, vzniká otázka, ako sa správajú samotní mutanti *exo70a1*. Bohužiaľ, mutantný homozygot *exo70a1* je sterilný, čo znemožňuje uskutočniť takéto pozorovanie. Keď však Exo70A1 funguje ako súčasť exocystu, je možné predpokladať, že aj porucha v iných podjednotkách by mala mať vplyv na semenný obal. Skutočne, zmenu v semennom obale som nameral na mutantoch *sec8* a to v prípade úplného potlačenia *sec8* úplné vymiznutie semenného obalu a jeho signifikantné zmenšenie pri čiastočných deléciách (obr. 19).

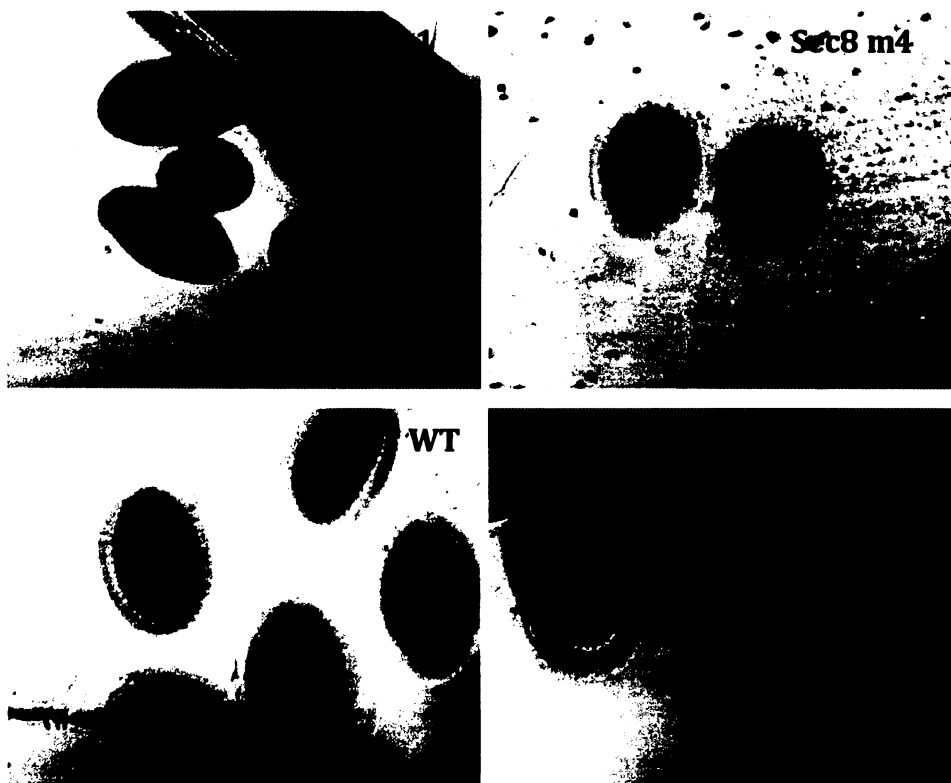




Obrázok 17: Porovnanie semenného obalu homozygotov *at5g64850* (d,e,f) s heterozygótmi z tej istej materskej rastliny(a,b,c). Pre snímanie som použil autofluorescenciu semien. Obrázky a,b,d,e boli vyfotené pri zväčšení 100x, c a f pri zväčšení 200x.



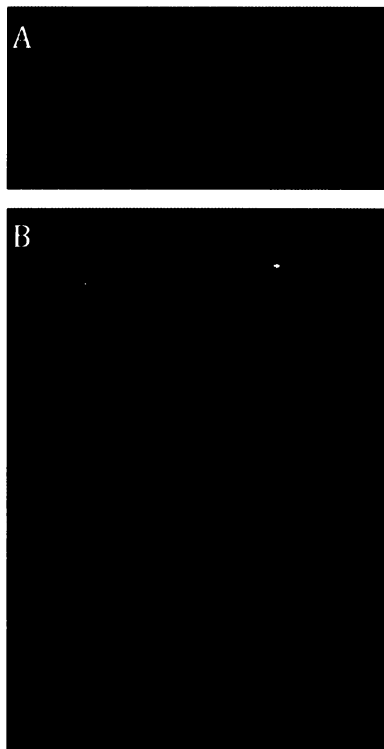
Obrázok 18: Porovnanie semenného obalu homozygotov *at5g64850* (vpravo) s heterozygótmi z tej istej materskej rastliny (vľavo). Pre snímanie som použil autofluorescenciu semien. Obrázok z laserového konfokálneho mikroskopu po 3D rekonštrukcii.



Obrázok 19: Fenotyp na semene 2 mutantov podjednotky Sec8. Sec8 m1 obsahuje jedinú funkčnú kópiu AtSec8 pod peľovo špecifickým promotorom. Sec8 m4 obsahuje čiastočne deletovaný Sec8 (opísané v Cole, R. a kol., 2005).

Veľkosť hydratovaného semenného obalu mutantu *At5g64850* som kvantifikoval len predbežne kvôli malej vzorke a nedostatočnému počtu vypestovaných generácií. Z predbežného pozorovania vyplýva, že narušené je len usporiadanie a nie veľkosť obalu. Zmenšenie semenného obalu mutantov exocystu a jeho menej organizovaný vzhľad na druhej strane naznačujú, že Exo70 a *At5g64850* by mohli byť funkčne prepojené a že interakcia medzi nimi by mohla mať signálnu, alebo inú biologickú funkciu.

Ďalšie prejavy mutácie som nestihol presne vyhodnotiť, predbežne možno konštatovať, že je zmenšená veľkosť koreňa a znížená klíčivosť. Celkovo má rastlina *At5g64850* menší vzrast (obr.20)



Obrázok 20:
 Porovnanie 7
 sedemdňových
 rastlín *at5g64850*
 (A) s wt (B)

7.5. AT4G22160 INTERAGUJE S EXO70A1, G1 A C1

Podobne ako *At5g64850* bol identifikovaný zo screenu *Exo70A1* s cDNA knižnicou CD4-22. Zo screenu som ho identifikoval nezávisle trikrát. Taktiež sa jedná o malý, zatiaľ necharakterizovaný (unknown) proteín. Opakovanie interakcie s ďalšími podjednotkami *Exo70G1* a *C1* ukázalo interakciu so všetkými z nich. Doklad o interakcii je na obrázku 21.

-TRP-HIS-LEU +50mM 3-AT

-TRP-LEU

vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70A1+ At4g22160						Exo70A1+ At4g22160					
Exo70A1+ pGAD						Exo70A1 +pGAD					
At4g22160 +pGBT						At4g22160 +pGBT					

vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70G1+ At4g22160						Exo70G1+ At4g22160					
Exo70G1+ pGAD						Exo70G1+ pGAD					
At4g22160 +pGBT						At4g22160 +pGBT					

vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70C1+ At4g22160						Exo70C1+ At4g22160					
Exo70C1+ pGAD						Exo70C1+ pGAD					
At4g22160 +pGBT						At4g22160 +pGBT					

Obrázok 21: Doklad interakcií medzi podjednotkami Exo70 a neznámym proteínom At4g22160. PGAD a pGBT = kontrolná kotransformácia s prázdny vektormi pGAD424 a pGBT9.

7.5.1. BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA AT4G22160

Jedná sa opäť o malý proteín (163 AA) so skráteným splicingovým variantom o 117 AA. Z výsledkov sekvenovania vyplýva, že s proteínmi Exo70 interaguje neskrátená forma. At4G22160 nemá žiadne silné homológy v *Arabidopsis*, ani v iných rastlinách. V jeho strede od 69. do 108. aminokyseliny (neskrátenej formy) obsahuje coiled-coil motív. Tento motív je homológny s coiled-coil doménami MYB TF. Nejde však priamo o MYB doménu, ale o iný konzervovaný motív v C-koncovej časti všetkých uvedených TF (obr. 22). Pravdepodobne nejde o DNA-väzobnú doménu. Výskyt takejto domény (mohlo by ísť napr. o aktivačnú doménu TF) v 2-hybridnom experimente by mohol zvýšiť šancu, že pôjde o falošný pozitívny výsledok. Pokus však mám patrične doložený kontrolami, ktoré túto možnosť nepodporili (vid' obr. 21). Izoelektrický bod tohoto proteínu je 5.3723 (arabidopsis.org, 2007).

```

ATE70INT1 : SPENVLLGK SSDDPY---SDSE-----T SNSSSGTESNMS SDSTTSAG SAMRV S S
ATTF1      : IANKNPLET SSTPALYSE DEQR-----S KRRMRTENNNNKROKKEIMG AESRW AV
MTMYB      : SNPRAGRGIGAGSSY---GARVVRI PEGGG RGREMMKTE-EDDNDPMVE ASA KLG T
ATTF2      : PEKDAEMDT SSTPVV---TKVR-----G KVK-----RRYKEEKEE AGSRW AV
MTMADF     : NNSSEGSRI GGTRLV---ERVVL-----G RERERDVERE-R-ERDPIGE VNA KVRIG

```

```

LLITLAELMI ARAAALAKLLEVDLTOM LQTHLQAM
VVSSTRTLKVAAG EIKRTEI ANTOLEIA
VMSAR TMRAAAG DLKRTI ANTOLEIA
LVSTRMTA M T M T ILESQOR VEAFKSL
FVMMKMA T M M M T ILESQOR VEAFKAI

```

Obrázok 22: porovnanie coiled-coil domény At4g22160 s homológnyimi skvenciami raslinných TF.

- EXO70int1 : interakčný partner Exo70 z *A.thaliana* AT4G22160
- ATTF1 : TF z *A. thaliana* AT2G44730
- MTMYB : MYB TF z *Medicago truncatula* GI:92898924
- ATTF2 : TF z *A.thaliana* AT3G54390
- MTMADF :MADF TF z *Medicago truncatula* GI 124359490

7.6. GLUTAMYL-TRNA LIGÁZA (AT5G26710) INTERAGUJE S EXO70A1, G1 A C1

Interakcia s Exo70 proteínmi je v tomto prípade silnejšia ako dve predchádzajúce interakcie. Za interakciu je zodpovedná N-koncová časť proteínu, konkrétne prvých 183 aminokyselín. Práve tento fragment bol identifikovaný sekvenovaním z cDNA. Naša proteomická analýza komplexu exocyst ukázala ďalších 7 tRNA ligáz, ktoré by mohli byť asociované s komplexom (nepublikované údaje).

tRNA ligáza vykazuje interakciu so všetkými testovanými Exo70, A1, C1 a G1. Pokus je podložený negatívnymi kontrolami. Tieto pozorovania dokladajú obrázky (obr.23).

tRNA ligázy patria medzi veľmi dobre preštudované proteíny a je málo pravdepodobné, že sa jedná o funkčnú interakciu, skôr je možné očakávať vznik artefaktu zapríčineného veľkým výskytom tRNA ligáz a ich možnou afinitou k tyčinkovitým proteínom ako sú podjednotky exocystu. Nakoľko sme však pri proteomickej analýze exocystu našej pracovnej skupiny identifikovali niekoľko ďalších tRNA ligáz, pravdepodobne nejde o artefakt spôsobený 2-hybridnou metódou. Toto

pozorovanie taktiež demonštruje, že metóda v našich podmienkach riadne funguje. Je možné aj to, že interakcia má biologický význam. Tieto možnosti sa podrobnejšie uvádzajú v diskusii.

-TRP-HIS-LEU +50mM 3-AT

-TRP-LEU

vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70A1+ At5g26710						Exo70A1+ At5g26710					
Exo70A1 +pGBT						Exo70A1 +pGAD					
At5g26710 +pGAD						At5g26710 +pGBT					

vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70G1+ At5g26710						Exo70G1+ At5g26710					
Exo70G1+ pGAD						Exo70G1+ pGAD					
At5g26710 +pGBT						At5g26710 +pGBT					

vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70C1+ At5g26710						Exo70C1+ At5g26710					
Exo70C1 +pGAD						Exo70C1 +pGAD					
At5g26710 +pGBT						At5g26710 +pGBT					

Obrázok 23: Doklad interakcií medzi podjednotkami Exo70 a glutamyl-tRNA ligázou (At5g26710). PGAD a pGBT = kontrolná kotransformácia s prázdny vektormi pGAD424 a pGBT9.

7.7. ELP1 INTERAGUJE S EXO70C

Z pohľadu exocystu a interakcie s Exo70C1 je znepokojujúce, že Elp1p obsahuje predpokladaný endomembránový signál. Táto predikcia je v miernom rozpore so skutočnosťou, že Elp1 som identifikoval v screene pre interaktorov s Exo70C1 a to v 4 nezávislých transformantoch, pretože endomembránové proteíny nepatria medzi proteíny identifikovateľné 2-hybridnou metódou. Nakoľko však ide o chitinázového homológa, ktorý preukázateľne nadobudol inú funkciu a pravdepodobne pri tom stratil pôvodnú (Kwon, Y., a kol., 2006), prichádza do úvahy aj zmena lokalizácie v bunke. Pravdepodobnejšia je však interakcia s exocystom na translokóne o ktorá bude rozobraná v diskusii. Obr. 24 dokumentuje interakciu.

-TRP-HIS-LEU +50mM 3-AT

-TRP-LEU

vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}	vzorka ↓	OD →	5×10^{-2}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
Exo70C1 +ELP1						Exo70C1+ ELP1					
Exo70C1+ pGAD						Exo70C1 +pGAD					
ELP1+ pGBT						ELP1+ pGBT					

Obrázok 24: Doklad interakcií medzi podjednotkami Exo70 a glutamyl-tRNA ligázou (At5g26710). PGAD a pGBT = kontrolná kotransformácia s prázdny vektormi pGAD424 a pGBT9.

8. DISKUSIA

V 2-hybridných screenoch som zachytil 3 proteíny vykazujúce pozitívnu interakciu s podjednotkou exocystu Exo70A1. 2 z týchto proteínov interagujú pozitívne i s podjednotkami Exo70C1 a G1. Pri screene pre Exo70C1 som identifikoval štvrtý proteín – ELP1. Tieto interakcie podkladám kontrolnými transformáciami, avšak nie nezávislou metódou, preto je možné pochybovať o relevantnosti týchto výsledkov pre podmienky *in vivo*. Na overení výsledkov pracujem. Ďalšou dôležitou otázkou je interpretácia získaných poznatkov.

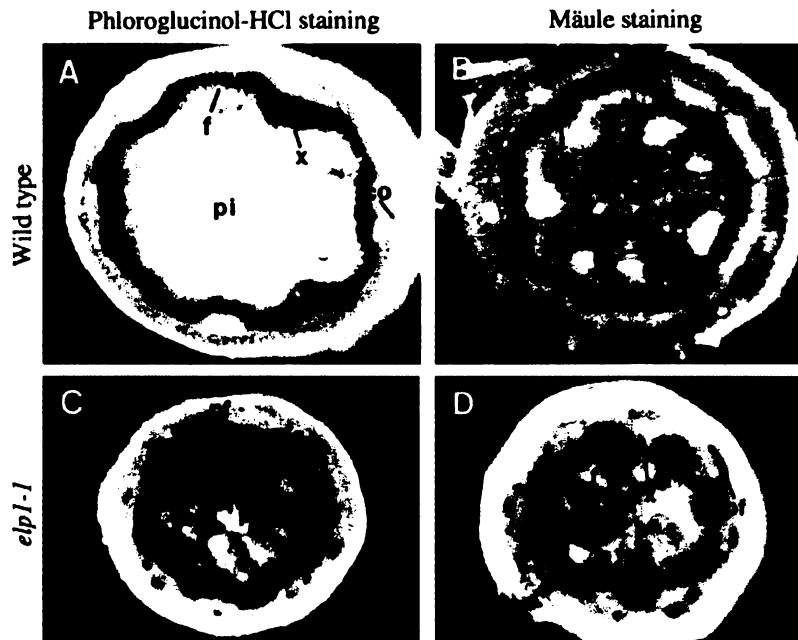
Ani jeden z týchto interaktorov nebol v koncepte exocystu očakávaný. Za očakávané považujem malé GTPázy v GTP väzobnej forme a ostatné podjednotky exocystu. Príčin môže byť niekoľko. Nakoľko nepoznám komplexitu cDNA knižníc s ktorými som pracoval, nie je možné vyhodnotiť, či boli screeny úplné. Moje výsledky tomu nenasvedčujú. Nakoľko všetky proteíny ktoré som identifikoval sú relatívne malé, je možné, že cDNA knižnice obsahujú len tieto (v cDNA knižniciach často prevládajú malé cDNA inzerty, čo je spôsobené ich rýchlejšou reverznou transkripciou). V súčasnosti už disponujem ďalšími cDNA knižnicami so známou komplexitou a intenzívne pracujem na screene Exo70A1.

8.1. ELP1 A EXO70

8.1.1. CHARAKTERISTIKA ELP1

ELP1 (Ectopic Lignin deposition in Piths) je proteín podieľajúci sa na správnej lokalizácii lignínovej zložky bunkovej steny. Ako prvá bola opísaná jeho mutácia v screene pre mutantov s neprirodzenou lokalizáciou lignínu (Zhong a kol., 2000). Lignínové značenie tohoto mutantu poukazuje na lokalizáciu lignínu do drene stonky, kde sa normálne (u *Arabidopsis*) nenachádza (obr. 25). Pre úplnosť je vhodné spomenúť, že lignín je zosieťovaný polymér zložený prevažne z fenyylpropánových monomérov (p-coumaryl alkohol, sinapyl alkohol a coniferyl alkohol). Pre pochopenie kontextu

s exocystom je dôležitý poznatok, že tieto monoméry sa von do bunkovej steny dostávajú post-Golgi sekréciou.



Obrázok 25. : značenie lignínu divého typu a mutanta *elp1-1*. x-xylém, pi-dreň, f-interfascikulárny lúč, co-cortex, pf-floém. Prevzaté zo Zhong a kol., 2000

Elp1 bol neskôr úspešne naklonovaný (Zhong a kol., 2002). Ukázalo sa, že ide o enzým štruktúrne homologický s chitinázou. Ide teda o prvú známu chitinázu, ktorej úloha je iná ako úloha chitinázy (obrana pred patogénmi) a jej substrát nie je chitín. Gén pre *Elp1* bol taktiež opísaný a naklonovaný ako mutant *hot2*, hypersenzitívny na zmeny teploty a salinity, resp. koncentrácie Na^+ (Kwon, Y., a kol., 2006) Pre spomínaný proteín sa používa aj tretí názov, *AtCTL1* (chitinase-like), odvodený zo sekvenčnej podobnosti s chitinázami.

Funkcia takéhoto proteínu zatiaľ ostáva nejasná, existuje však niekoľko hypotéz o funkcii *Elp1p*. Keďže inhibítory etylénu (Ag^+) redukovávajú mutantný fenotyp *elp1*, je možné, že *Elp1* je prepojený s etylénovou signalizáciou. Takýto poznatok je však pomerne málopravný, nakoľko s etylénovou signalizáciou súvisí priveľké množstvo procesov. Užitočnejšie však je, že substrátom *Elp1* by mohli byť arabinogalaktany (AG), ktorým sa dnes prisudzuje čoraz väčšia signalizačná úloha. Toto tvrdenie vzniklo na základe pozorovania, že produkty štiepenia AG miernia mutantný fenotyp *EP3*,

chitinázového homológa z mrkvy (Passarinho P.,A. a kol., 2001). Presná funkcia proteínu však zatiaľ ostáva hádankou.

8.1.2. TRNA LIGÁZA A ELP1 – FALOŠNÉ POZITÍVY, ALEBO ĎALŠIA FUNKCIA EXOCYSTU?

V prípade Elp1 je veľmi pravdepodobné, že ide o falošný pozitív, nakoľko je ťažké predstaviť si biologický zmysel interakcie proteínov, ktoré sú topologicky na opačných stranách membrány. Do úvahy prichádza len 1 miesto, kde by sa tieto proteíny mohli stretnúť a ním je translokón. Translokón, ako som opísal v kap. 3.5., interaguje s exocystom a táto interakcia je dôležitá pre kontrolu pomeru exocytózy a proteosyntézy viazanej na ER. Taktiež boli doložené kolokalizácie Sec10 s niektorými ER membránovými proteínmi na ER. Nie je teda vylúčené, že aj v prípade Elp1 ide o funkčnú interakciu, avšak je to málo pravdepodobné. Je treba vziať do úvahy i možnosť, že predpokladaný sekrétorický signál Elp1 nie je funkčný. Bunková lokalizácia Elp1 zatiaľ nie je inak doložená.

Je otázne, či interakcia s tRNA ligázou je skutočná, alebo ide o falošný pozitív. Rozhodne však nejde o artefakt iba 2-hybridného pokusu. Usudzujem tak na základe proteomického screenu urobeného našou pracovnou skupinou, v ktorom sme identifikovali ďalších niekoľko tRNA ligáz a to pre TYR, PHE, HIS, ASP, LYS. Spolu teda 6 tRNA ligáz a je pravdepodobné, že ich počet nie je konečný. Naviac fragment proteínu zachytený 2-hybridnou metódou nie je súčasťou katalytickej domény tRNA ligázy. Ak teda nejde o artefakt 2-hybridnej metódy, je možné uvažovať o náhodnej interakcii, založenej na náboji a štruktúre proteínov (proteíny exocystu sú prevažne coiled-coil a polárne, kap. 4.1.), alebo o interakciu s funkčným biologickým zmyslom.

Funkčný biologický zmysel interakcie medzi exocystom a tRNA ligázami by mohol spočívať práve v skorých fázach exocytózy a taktiež v proteosyntéze. Ak je exocyst lokalizovaný aj na translokóne (kap. 3.5.) a interaguje s tRNA ligázami, potom sa tRNA ligázy dostávajú do blízkosti ribozómu pripojenom na translokóne. Kolokalizácia ribozómu ako „sinku“ (spotrebiteľa) nabitých tRNA s tRNA ligázami by mohla mať výrazný vplyv na intenzitu proteosyntézy do ER. Toto by mohla byť súčasť zatiaľ neznámeho mechanizmu, ktorým exocyst reguluje rýchlosť proteosyntézy o ktorom som pojednal v kap. 3.5. Tento model je taktiež v súlade s pozorovaním, že indukcia proteosyntézy nastala pri rovnakej hladine mRNA pozorovaných proteínov.

Pravdepodobne však tento mechanizmus nebude jediný a je možné očakávať ďalšie, špecifickejšie spôsoby stimulácie proteosyntézy. Overiť hypotézu o stimulácii proteosyntézy tRNA ligázami bude zrejme veľmi komplikované a bude si vyžadovať množstvo porovnávacích štúdií a konštrukcie fúzných proteínov translokónu s podjednotkami exocystu.

Je možná taktiež hypotéza, že niektoré z podjednotiek exocystu sa podieľajú na regulácii dusíkového metabolizmu zatiaľ neznámym vzťahom ku glutamátu (Brian G-Forde, nepublikované údaje). Táto hypotéza je pomerne ľahko overiteľná pestovaním mutantných rastlín na gradiente koncentrácií glutamátu v MS médiu a ich porovnaním s *wt Arabidopsis*. Tento pokus plánujeme uskutočniť pri ďalšom štúdiu exocystu. Interakcia s glutamyl-tRNA ligázou by mohla byť práve spôsobom, ako takúto reguláciu sprostredkovať, napr. intenzívnym zabudovaním glutamátu do sekrétorických proteínov a jeho odobratie z reverzibilného systému GS-GOGAT (systém regulácie glutamínu ako zdroja dusíku).

8.2. AT4G22160 AKO ĎALEJ POSTUPOVAŤ PRI CHARAKTERISTIKE?

Nakoľko sa jedná o necharakterizovaný proteín, je obtiažne a špekulatívne povedať čokoľvek o jeho funkcii. Taktiež neobsahuje žiadnu známu konzervovanú doménu. Toto bol dôvod, prečo som si u neopísaných proteínov objednal mutantné línie z databázy SALK. Z časových dôvodov som však ešte neskončil charakteristiku inzerčných mutantov. Zatiaľ je možné vysloviť len to, že inzercia v danom géne nespôsobila drastickú zmenu fenotypu a mutanti nie sú letálni. Pozorovanie homológie so zatiaľ necharakterizovanou doménou coiled-coil u MYB TF naznačuje, že by sa mohlo jednáť o proteín špecializovaný na proteín-proteínové interakcie. *A.thaliana* nemá proteín homológny s At4g22160, preto je možné, že pri detailnejšom pohľade na fenotyp mutantu zistíme rozdiel oproti *wt*.

8.3. AT5G64850 BY SA MOHOL PODIEĽAŤ NA REGULÁCII EXOCYTÓZY

Na rozdiel od At4g22160, pri tomto proteíne som pozoroval zaujímavý fenotyp mutantu na semennom obale, ako aj na celkovom vzhľade rastliny, čo môže veľmi pomôcť pri jeho charakterizácii. Je však potrebné dodať, že výsledky stále nie sú definitívne a vďaka problémom spojeným s genotypovaním máme malú vzorku

odpozorovaných mutantov. Títo majú pravdepodobne i iné poruchy, majú menší vzrast a zníženú klíčivosť. Funkcia takéhoto malého proteínu by mohla spočívať napr. v sprostredkovaní interakcie medzi podjednotkami exocystu, alebo s malými GTPázami. Rastlinný exocyst má pri afinitnej purifikácii väčšiu veľkosť ako exocyst kvasinky a človeka. Je možné, že sa na jeho funkcii podieľajú i ďalšie, dosiaľ neznáme proteíny.

8.4. ZA INTERAKCIE MEDZI GTPÁZAMI A EXOCYSTOM BY MOHLI BYŤ ZODPOVEDNÉ SCAFFOLD PROTEÍNY

Doklad o tom, že ROP1, ani iné ROP neinteragujú s podjednotkami exocystu neznamená, že tieto nie sú GTPázami regulované. Prekvapivo sa ukazuje, že interakcie s GTPázami v rastline sú nepriame, sprostredkované tzv. scaffold proteínami. Takéto proteíny boli recentne objavené v 2-hybridnom screene s konštitutívne aktívnymi Rop1 a 2.

Icr1 a 2 sú 343 a 584 AA dlhé proteíny, takmer úplne pozostávajúce s coiled-coil motívov. Icr1 interaguje so Sec3 a rovnako s konštitutívne aktívnymi ropázami, konkrétne Rop1, Rop2, Rop6, Rop10 a Rop11. Sec3 ani Exo70 s týmito GTPázami neinteragujú. Ektopická expresia ICR1 kopíruje fenotyp overexpresie aktivovaných Rop. Mutant *icr1* má pretiahnuté listy s pozmeneným tvarom buniek adaxiálnej epidermis, kým bunky abaxiálnej epidermis neboli mutáciou ovplyvnené. Taktiež, primárny koreň mutanta je veľmi krátky, ale vetviaci sa. Icr1 je teda dôležitý pre udržovanie apikálneho meristému, nie však pre jeho iniciáciu (Lavy, M. a kol., 2007). Veľmi podobné prejavy, konkrétne veľmi skrátene korene som sledoval pri mutantovi *at5g64850* (vid'. obr.20).

Sprostredkovaná interakcia medzi exocystom a ROPázami je veľmi pravdepodobný model regulácie exocystu u rastlín. Prítomnosť týchto proteínov dobre vysvetľuje pozorovania našej pracovnej skupiny, že komplex exocyst je väčší u rastlín ako u iných eukaryot, taktiež vysvetľuje, prečo moje pokusy interakcie exocystu s GTPázami nepotvrdili. Je možné, že i niektoré z proteínov, ktoré som identifikoval, plnia podobnú funkciu u Exo70 ako Icr1 u Sec3.

9. ZÁVER

V mojej práci som sa zaoberal hľadaním nových interaktorov podjednotiek rastlinného exocystu Exo70. K tomuto zámeru som využil 2-hybridnú metódu. Taktiež som priamo testoval interakcie medzi Exo70G1 a C1 s ROP1 GTPázou.

- Vytvoril som konštrukt Exo70A1 v pGBT, naamplifikoval a vystrihol knižnice. V screene pre Exo70A1 som identifikoval celkom 3 proteíny, At4g22160, At5g64850 a glutamyl-tRNA ligázu. U jednej z týchto interakcií (s At5g64850) demonštrujem jej biologický význam pri vývoji semenného obalu.
- Defekt semenného obalu mutantu *at5g64850* dávam so súvislosti s defektom pri tvorbe semenného obalu mutantov *sec8m1* a *sec8m4*. Pozorovanie zmenšenia semenného obalu mutantov *sec8* je taktiež novým fenotypom sekretorického defektu týchto rastlín a semenný obal je teda možné použiť ako marker sekretorických defektov.
- V screene pre interaktorov Exo70C1 som identifikoval ako interaktora Elp1- proteín zodpovedný za správnu lokalizáciu lignínu v stonke *A.thaliana*.
- V 2-hybridných pokusoch s aktivovanou a divokou ROP1 som nezaznamenal interakciu s rastlinnými Exo70. Toto pozorovanie bolo potvrdené (Lavy, M. a kol., 2007). Interakcia s ROP1 síce existuje, je však sprostredkovaná scaffold proteínom IRC1 a teda nepriama.

10. LITERATÚRA

- Adamo, J. E., Rossi, G. a Brennwald, P.: The Rho GTPase Rho3 Has a Direct Role in Exocytosis That Is Distinct from Its Role in Actin Polarity. - *Mol Biol Cell*. 10(12): 4121–4133, 1999.
- Bennett, M. A., Shern, J. F., Kahn, R. A.: Reverse two-hybrid techniques in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. - *Methods Mol Biol*. 261: 313-326, 2004.
- Boyd, C., Hughes, T., Pypaert, M. a Novick, P.: Vesicles Carry Most Exocyst Subunits to Exocytosis Sites Marked by the Remaining Two Subunits, Sec3p and Exo70p. - *J. Cell Biol*. 167: 889-901, 2004.
- Boyd, Ch., Hughes, T., Pypaert, M. a Novick, P.: Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the two remaining subunits, Sec3p and Exo70p. - *JCB* 167: 889-901, 2004.
- CLONTECH MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manual:
<http://www.clontech.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT3247-1.pdf>
- Cole, R., A., Synek, L., Zarsky, V. a Fowler, J., E.: SEC8, a Subunit of the Putative Arabidopsis Exocyst Complex, Facilitates Pollen Germination and Competitive Pollen Tube Growth. - *Plant Physiol*. 135: 2005–2018, 2005.
- Cvrčková, F., Eliáš, M., Hála, M., Obermeyer, G. a Žárský, V.: Small GTPases and Conserved Signalling Pathways in Plant Cell Morphogenesis: From Exocytosis to the Exocyst. *Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth*, IOS Press, 2001.
- Dong, G., Hutagalung, A., H., Fu, C., Novick, P. a Reinisch, K., M.: The structures of exocyst subunit Exo70p and the Exo84p C-terminal domains reveal a common motif. - *Nat Struct. Mol. Biol* 12: 1094-1100, 2005.
- Einhauer, A. a Jungbauer, A.: The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins.: *J. of Biochem. and Biophys. Methods* 49: 455-465, 2001.
- Eliáš, M., Drdová, E., Žiak, D., Bavlínka, B., Hála, M., Soukupová, H. a Žárský, V.: The exocyst complex in plants.-*Cell Biol. Int*. 27: 199-201, 2003.

- Etienne-Manneville, S.: Cdc42 – the centre of polarity (štúdia). –J. Cell Sci. 117: 1291-1300, 2004.
- Fan, H., Y., Y. Hu M. Tudor a H. Ma: Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family od DNA binding proteins. – Plant Journal 12: 999-1010, 1997.
- Fearon, E.R., Finkel, T., Gillison, M., L., Kennedy, S., P., Casella, J., F., Tomaselli, G., F., Morrow, J., S., a Dang, C.,V.: Karyoplasmic interaction selection strategy: a general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 7958–7962, 1992.
- Feig, L., A., Urano, T. a Cantor, S.: Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. - Trends Biochem. Sci. 21: 438–441, 1996.
- Fields, S. a Song, O. K.: A novel genetic system to detect protein–protein interactions Nature 340: 245 – 246, 1989.
- Finger, F.P., Thomas E. Hughes, T.E. a Novick, P.: Sec3p Is a Spatial Landmark for Polarized Secretion in Budding Yeast. – Cell 92: 559-571, 1998.
- Fu, Haiyan: Protein–Protein Interactions Methods and Applications - Humanapress, 2004.
- Fu, Haiyan: Protein–Protein Interactions Methods and Applications. - ISBN: 1-59259-762-9, Humanapress, Atlanta, 2004.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. a Jurgens G.: The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. – Cell 112(2): 219-230, 2003.
- Greenfield, N. J.: Circular Dichroism Analysis for Protein–Protein Interactions (štúdia). - Methods in Mol. Biol. 261: 55-78, 2004.
- Guo, W., Grant, A. a Novick, P.: Exo84p Is an Exocyst Protein Essential for Secretion. - J. Biol. Chem. 274: 23558–23564, 1999.
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C. a Novick, P.: The Exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. -EMBO J. 18: 1071-1080, 1999.
- Guo, W., Sacher, M., Barrowman, J., Ferro-Novick, S. a Novick, P.: Protein complexes in transport vesicle targeting. – Trends in cell biol. 10: 251-255, 2000

- Guo, W., Tamanoi, F. a Novick, P.: Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. –Nature Cell Biol. 3: 353-360, 2001.
- Hales, Ch., M., Griner, R., Hobdy-Henderson, K., C., Dorn, M., C., Hardy, D., Kumar, R., Navarre, J., Chan, E., K., L., Lapierre, L., A. a Goldenring, J., R.: Identification and Characterization of a Family of Rab11-interacting Proteins. – JBC 278: 39067-39075, 2001.
- Hall, A.: Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton (štúdia). – Science 279: 509-514, 1998.
- <http://stke.sciencemag.org>:
<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/vol2003/issue213/images/large/2132003pe56F2.jpeg>
- Huang, W. a Erikson, R., L.: Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8960–8963, 1994.
- Hugo T., M., Yeaman, Ch., James, W., N. a Scheller H., R.: The Sec6/8 complex in mammalian cells: Characterization of mammalian Sec3, subunit interactions, and expression of subunits in polarized cells. –PNAS 17, 9648-9653, 2001.
- Imai, J., Toh-e, A. a Matusi, Y.: Genetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* Rho3 gene, encoding a Rho-type small GTPase, provides evidence for a role in bud formation. –Genetics 142: 359-369, 1996.
- ImmunoPure® (A/G) IgG Purification Kit:
<http://www.piercenet.com/files/0190as4.pdf>
- Inoue, M., Chang, L., Hwang, J., Chiang, S.H. a Saltiel, A.,R.: The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. – Nature 422: 629-633, 2003. 2003.
- Jameson, D. M. a Sawyer, W. H.: Fluorescence anisotropy applied to biomolecular interactions. - Methods Enzymol. 246, 283–300, 1995.
- Johnson, N., Varshavsky, A.: Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. – Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.: 10340-10344, 1994.
- Johnston, G. C., Prendergast J. A., Singer R. A.: The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. -J Cell Biol. 113: 539–551, 1991.

- Kwon, Y., R., Kim, S., H., Jung, M., S., Kim, M., S., Oh, J., E., Ju, H., W., Kim, K., Vierling, E., Lee, H., a Hong, S., W.: Arabidopsis hot2 encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses – Plant Journal: epub, 2006.
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., P., Sorek, N., L., Sternberg, H. a Yalovsky, S: A novel ROP/RAC effector links cellpolarity root meristem maintenance and vesicle trafficking – Current Biology, submitted 2007.
- Li R., Zheng Y., Drubin DG.: Regulation of cortical actin cytoskeleton assembly during polarized cell growth in budding yeast. -J Cell Biol. 128(4):599-615, 1995.
- Lindsay, J., A. a McCaffrey, M., W.: Rab11-FIP2 Functions in Transferrin Recycling and Associates with Endosomal Membranes via Its COOH-terminal Domain. – JBC 277: 27193-27199, 2002.
- Lipschutz, J., H., Lingappa, V., R. a Mostov, K., E.: The exocyst affects protein synthesis by acting on the translocation machinery of the endoplasmic reticulum. – J. Biol. Chem. 278: 20954-20960, 2003.
- Ma, J. a Ptashne, M.: A new class of yeast transcriptional activators. - Cell 51: 113-119, 1987.
- Matsui Y., Toh-e A.: Yeast RHO3 and RHO4 ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes CDC42 and BEM1. -Mol Cell Biol 12: 5690–5699, 1992.
- Menze, M. A., Hellmann, N., Decker, H. a Grieshaber, M., K.: Binding of urate and caffeine to haemocyanin analysed by isothermal titration calorimetry. -J. Exp. Biol. 204, 1033–1038, 2001.
- Moskalenko, S., Henry, D. O., Rosse, C., Mirey, G., Camonis, J. H. a White, M., A.: The exocyst is a Ral effector complex. -Nature Cell Biol. 4: 66-72, 2002.
- Moskalenko, S., Tong, Ch., Rosse, C., Mirey, G., Formstecher, E., Daviet, L., Camonis, J., a White, M. A.: Ral GTPases Regulate Exocyst Assembly through Dual Subunit Interactions. - J. Biol. Chem. 278: 51743–51748, 2003.
- Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J., Saraste, M.: The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. - Trends Biochem Sci.18: 343-348, 1993.

- Nishimune, A., Nash, S. R., Nakanishi, S. a Henley, J. M.: Detection of protein–protein interactions in the nervous system using the two-hybrid system (štúdia). –Trends neurosci. 19: 261-266, 1996.
- Novick, P., Medkova, M., Dong, G., Hutagalung, A., Reinisch, K. a Grosshans, B.: Interactions between Rabs, tethers, SNAREs and their regulators in exocytosis. –Bioch. Society Transactions 34: 683-689, 2006.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J., H. a Stossel, T., P.: The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2122–2128, 1999.
- Park, S., H. a Raines, R., T.: Green fluorescent protein as a signal for protein–protein interactions. - Protein Sci. 6: 2344–2349, 1997.
- Park, S., H. a Raines, R., T.: Green fluorescent protein chimeras to probe protein–protein interactions. - Methods Enzymol. 328: 251–261, 2000.
- Passarinho P.,A., Van Hengel A., J., Fransz P., F., a de Vries S.,C.: Expression pattern of the Arabidopsis thaliana AtEP3/AtchitIV endochitinase gene – Planta 212(4): 556-567, 2001.
- Prigent, M., Dubois, T., Raposo, G., Derrien, V., Tenza, D., Rossé, C., Camonis, J. a Chavrier, P.: ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector – Journal of Cell Biology 163 (5): 1111-1121, 2003.
- <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=CAD5D96F-FBD3-4247-90E7-C1065B9D5630>
- Purification of GST-Fusion Proteins by Magnetic Resin-Based MagneGST™ Particles : http://www.promega.com/pnotes/86/11217_06/11217_06.pdf
- Rohngsheng, J., Junutula, J., Matern, H. T., Ervin, K. E., Scheller, R. H. a Brunger, A. T.: Exo84 and Sec5 are competitive regulatory Sec6/8 effectors to the RalA GTPase. – EMBO J. 24: 2064-2074, 2005 .
- Roumanie, O., Wu, H., Molk, J., N., Rossi, G., Bloom, K. a Brennwald, P.: Rho GTPase regulation of exocytosis in yeast is independent of GTP hydrolysis and polarization of the exocyst complex. – Journal of Cell Biol. 170: 583-594, 2005.
- Selvin, P.,R.: The renaissance of fluorescence resonance energy transfer (štúdia). – Nature Am. 7: 730-734, 2000.

- Sheng, W., Liu, Y., Adamson, C., L., Valdez, G., Guo, W. a Hsu C.,S.:The Mammalian Exocyst, a Complex Required for Exocytosis, Inhibits Tubulin Polymerization. - J. Biol. Chem. 279: 35958-35966, 2004.
- Simonetti, J.: Dynamic Light Scattering (DLS) Overview for Protein Research (editoriál). Scientex (www.scientex.com), 2005.
- Stayton, P.,S, Freitag, S., Klumb, L. A., Chilkoti, A., Chu, V., Penzotti, J., E., To, R., Hyre, D., Le Trong, I., Lybrand, T. P. a Stenkamp, R.E.: Streptavidin-biotin binding energetics (štúdia). -Biomol Eng. 16: 39-44, 1999.
- Synek, L., Schlager, N., Eliáš, M., Quentin, M., Hauser, M., T. a Žárský, V.: 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. 48: 54-72, 2006.
- Terbush, D., R., Novick, P., Maurice, T. a Roth, D.: The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 15: 6483-6494, 1996.
- Toikkanen, J., H., Miller, K., J., Soderlund, H., Jantti, J. a Keranen, S.: The beta subunit of the Sec61p endoplasmic reticulum translocon interacts with the exocyst complex in *Saccharomyces cerevisiae*. – J. Biol. Chem. 278: 20946-20953, 2003.
- Wang, S., Liu, Y., Adamson, C., L., Valdez, G., Guo, W. a Hsu, S., C.: The Mammalian Exocyst, a Complex Required for Exocytosis, Inhibits Tubulin Polymerization – J. Biol.Chem. 279: 35958-35966, 2004.
- Wen, T., J., Hochholdinger, F., Sauer, M., Bruce, W. a Schnable, P.: The roothairless1 Gene of Maize Encodes a Homolog of sec3, Which Is Involved in Polar Exocytosis. – Plant Physiol. 138: 1637-1643, 2005.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. a Lin, L. N.: Rapid measurement of binding constants and heats of binding by using a new titration calorimeter. - Analyt. Biochem. 179: 131–137, 1989.
- Xu, K., F., Shen, X., Li, H., Rodriguez, G., P., Moss, J. a Vaughan, M.: Interaction of BIG2, a brefeldinA-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, with exocyst protein Exo70 – PNAS 102: 2784-2789, 2005.
- Yang, M., Wu, Z. a Fields, S.: Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. - Nucleic Acids Res. 23: 1152–1156, 1995.

- Yang, Z.: Small GTPases: Versatile Signalising Switches in Plants (štúdia). – Plant Cell: 375-388, 2002.
- Yeaman, Ch., Grindstaff, K., K., Wright, J., R. a Nelson, J.: Sec6/8 complexes on trans-Golgi network and plasma membrane regulate late stages of exocytosis in mammalian cells. – Journal of Cell Biol. 155: 593-604, 2001.
- Yoon, H. S., Hajduk, J. P., Petros, A. M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P. a Fesik, S. W.: Solution structure of a pleckstrin-homology domain. - Nature 369: 672 – 675, 1994.
- Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K. G., Lipschutz, J. H. a Guo, W.: Cdc42 Interacts with the Exocyst and Regulates Polarized Secretion. –J. Biol. Chem.: 46745-46750, 2001.
- Zhang, X., M., Eliis, S., Sriratana, Mitchell, Ch., A. a Rowe, T.: Sec15 is an Effector for the Rab11 GTPase in Mammalian Cells. –JBC 279: 43027-43034, 2004.
- Zhong, R., Kays, S., J., Schroeder, B., P. a Ye, Z., H.:Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. - Plant Cell 14(1): 165-179, 2002.
- Zhong, R., Ripperger, A. a Ye, Z.H.: Ectopic deposition of lignin in the pith of stems of two Arabidopsis mutants. - Plant Physiol. 123(1): 59-70, 2000.
- Zuo, X., Zhang, J., Zhang, Y., Hsu, S-C., Zhou, D a Guo, W.: Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration – Nat. Cell. Biol. 8: 1383-1392, 2006.

Abstract

Exocyst, a large protein complex of 8 subunits, has been shown to be required for proper post-Golgi vesicle targeting at the plasma membrane. Its orthologs can be found in most of eukaryotes. It was shown, that in most eukaryotes, exocyst is regulated by direct interactions with small GTPases. In *viridiplantae*, exocyst also plays most likely role in vesicle tethering, however, no direct interactions with GTPases were shown. In my study, I focused on Exo70 subunit, which is believed to be a landmark of polarized exocytosis. Using method of 2 hybrid screening, I inspected interactions of Exo70 subunits in plants. Totaly 4 interactors were verified and in one I was able to show its importance for seed coat development. Together with exocyst *sec8* mutants, which also show seed coat phenotype, I conclude, that this interaction could have exocyst relevant biological function. None of these proteins was small GTPase.

Testing interactions between Exo70p and wild/active ROP1 GTPase was negative. Based on these experiments and new literature, new concept of indirect interactions via scaffold proteins in plants is rising. Whether proteins I described here are scaffold proteins is yet to be investigated.