

Streszczenie

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

Badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu znalezienie nowych oddziaływań białko-białko na szlakach sygnalizacyjnych związanych z regulacją transportu pęcherzykowego u roślin. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły ustalić, że u *Arabidopsis* nie dochodzi do oddziaływań między podjednostkami kompleksu egzocyst a czynnikami wymiany nukleotydów guaninowych małych GTPaz ARF z grupy BIG. Obserwacje mikroskopowe znakowanych fluorescencyjnie białek nie pokazały ich kolokalizacji, a zatem najprawdopodobniej szlaki sygnalizacji z udziałem małych GTPaz ARF nie są powiązane bezpośrednio z egzocystem. W protoplastach *Arabidopsis* białko ICR1 wiązało się z mikrotubulami, czego nie zauważono we wcześniejszych badaniach. Podobnie, wszystkie białka z rodziny RIP/ICR (RIP2-RIP5) okazały się być białkami zasocjowanymi z mikrotubulami. Taką właściwość przypisano dotąd jedynie białku RIP3. Ustalono, że za wiązanie cytoszkieletu odpowiedzialna jest domena N-końcowa tych białek, natomiast fragment C-końcowy umożliwia łączenie się białek RIP z błoną komórkową. Poza ICR1 białka RIP nie kolokalizowały z badanymi podjednostkami kompleksu egzocyst. Wykorzystując pomiar czasu trwania fluorescencji ustalono natomiast, że oddziaływania białek RIP z małymi GTPazami ROP są powszechne i dochodzi do nich w domenach w błonie komórkowej, współtworzonych przez te białka. Chociaż wszystkie badane RIP oddziaływały ze wszystkimi ROP, to siła wiązania była zróżnicowana. Z drugiej strony, białka RIP kolokalizowały w domenach błonowych z efektorami GTPaz ROP – białkami RIC9 i RIC10, ale nie z pozostałymi białkami RIC. Oznacza to, że białka RIP mogą być

rusztowaniem dla oddziaływań GTPaz ROP także z innymi niż RIC efektorami. Ustalono też, że białko RIC6 oddziałuje z podjednostką egzocystu SEC3A oraz, że kompleksy tych białek poruszają się wzdłuż mikrotubul. By przybliżyć potencjalną fizjologiczną rolę białek RIP, w kontekście uzyskanych wyników analiz mikroskopowych, przeszukano biologiczne bazy danych. Z powodu niewielu zdeponowanych dotychczas informacji o tych białkach oraz specyficznej ekspresji genów ROP, nie udało się ustalić, za co białka te mogą odpowiadać u Arabidopsis.

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