

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Romana Petermannová

PŘÍPRAVA HEK293 BUNĚČNÉ LINIE EXPRIMUJÍCÍ
TRANSPORTÉR AUXINU PIN7 A TESTOVÁNÍ INHIBITORŮ
PŘENOSU AUXINU

Preparation of HEK293 cell line expressing auxin transporter
PIN7 and testing of inhibitors of auxin transport

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martina Laňková, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. srpna 2015.

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na vypracování mé diplomové práce. Především RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení práce a předání mnohých znalostí. Dále Mgr. Janu Bláhovi za ochotu pomoci a poradit. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Martině Laňkové, Ph.D. a Doc. RNDr. Evě Zažímalové, CSc. za spolupráci a cenné rady při vypracování některých částí diplomové práce v laboratořích Ústavu experimentální botaniky AV ČR. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za podporu během mého studia.

ABSTRAKT

Auxin je jedním z nejvýznamnějších rostlinných hormonů, který zajišťuje vývoj rostliny. Proteiny PIN1 a PIN7 patří do rodiny transportérů PIN, která patří mezi nejdůležitější exportéry auxinu z buňky.

Tato práce se zabývá expresí transportérů *AtPIN1* a *AtPIN7* (z *Arabidopsis thaliana*) v lidských embryonálních ledvinných buňkách 293. Jejich biologická aktivita byla ověřována pomocí akumulace radioaktivně značených auxinů. Dále byly testovány inhibitory přenosu auxinu NPA, CHPAA a BFA.

Klíčová slova:

PIN7, auxin, transport, HEK293 buněčná linie, inhibitor

ABSTRACT

Auxin is one of the most important plant hormones, which provides development of a plant. PIN1 and PIN7 proteins belong to the PIN family of transporters which is among the most important auxin efflux carriers.

This thesis deals with the of *AtPIN1* and *AtPIN7* auxin efflux carriers (from *Arabidopsis thaliana*) in human embryonic kidney 293 cell line. Biological activity of these proteins was tested by using radiolabeled auxins accumulation. Further inhibitors of auxin transport have been tested - NPA, CHPAA and BFA.

Keywords:

PIN7, auxin, transport, HEK293 cell line, inhibitor

OBSAH:

SEZNAM ZKRATEK	- 9 -
1 TEORETICKÝ ÚVOD	- 11 -
1.1 Auxin	- 11 -
1.1.1 Metabolismus auxinu.....	- 12 -
1.1.2 Transport auxinu	- 13 -
1.1.3 Syntetické auxiny	- 15 -
1.1.3.1 Kyselina naftyloctová	- 15 -
1.1.3.2 Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová	- 15 -
1.2 Transportéry auxinu	- 16 -
1.2.1 Rodina transportérů AUX1/LAX	- 16 -
1.2.2 Rodina transportérů ABCB.....	- 16 -
1.2.3 Rodina transportérů PIN.....	- 16 -
1.3 Inhibitory přenosu auxinu	- 20 -
1.3.1 Kyselina 1-naftylftalamová	- 20 -
1.3.2 Kyselina 3-chlor-4-hydroxyfenyloctová.....	- 20 -
1.3.3 Brefeldin A.....	- 21 -
1.4 HEK293 buněčná linie	- 21 -
2 CÍLE PRÁCE.....	- 23 -
3 MATERIÁL	- 24 -
3.1 Pomůcky a přístroje.....	- 24 -
3.2 Chemikálie.....	- 25 -
3.3 Enzymy.....	- 26 -
3.4 Bakteriální kmeny a buněčné linie.....	- 27 -
3.5 Vektory	- 27 -
3.6 Oligonukleotidy pro PCR	- 27 -
3.7 Roztoky a média.....	- 28 -
4 METODY	- 29 -
4.1 Mutace restrikčních míst.....	- 29 -
4.1.1 PCR amplifikace PIN7_FW – PIN7a_REV	- 29 -
4.1.2 PCR amplifikace PIN7a_FW – PIN7b_REV	- 29 -
4.1.3 PCR amplifikace PIN7b_FW – PIN7_REV	- 30 -

4.1.4 Preparativní agarosová elektroforéza úseků PIN7a_FW - PIN7b_REV a .. PIN7b_FW - PIN7_REV.....	- 30 -
4.1.5 Extrakce DNA z agarosového gelu	- 30 -
4.1.6 Spojení úseků PIN7a_FW - PIN7b_REV a PIN7b_FW - PIN7_REV...	- 31 -
4.1.7 Spojení úseků PIN7_FW - PIN7a_REV a PIN7a_FW - PIN7_REV.....	- 31 -
4.1.8 Preparativní elektroforéza a extrakce z agarosového gelu.....	- 32 -
4.2 Práce s DNA.....	- 32 -
4.2.1 PCR úprava inzertu pro ligaci do vektoru pOPINTTGneo	- 32 -
4.2.2 Preparativní elektroforéza a extrakce z agarosového gelu.....	- 32 -
4.2.3 Ligace inzertů do vektoru pOPINTTGneo	- 32 -
4.2.4 Transformace kompetentních bakterií <i>E.coli</i> ZH5a	- 32 -
4.2.5 PCR z kolonií	- 33 -
4.2.6 Příprava plasmidové DNA.....	- 33 -
4.2.7 Sekvenování DNA.....	- 33 -
4.3 Příprava zásobního množství DNA.....	- 34 -
4.3.1 Transformace a kultivace kompetentních bakterií <i>E.coli</i> ZH5a.....	- 34 -
4.3.2 Velkoobjemová příprava plasmidové DNA.....	- 35 -
4.3.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	- 35 -
4.3.4 Kontrola celistvosti plasmidů	- 35 -
4.4 Práce s buněčnými liniemi.....	- 35 -
4.4.1 Rozmrazení buněčné linie HEK293T	- 35 -
4.4.2 Počítání buněčné hustoty.....	- 36 -
4.4.3 Kultivace buněčné linie HEK293T	- 36 -
4.4.4 Stabilní transfekce HEK293T buněčné linie	- 36 -
4.5 Imunofluorescence	- 37 -
4.5.1 Permeabilizované buňky	- 37 -
4.5.2 Nepermeabilizované buňky	- 38 -
4.6 Akumulace auxinů a testování inhibitorů přenosu auxinu.....	- 38 -
4.6.1 Akumulace [³ H]IAA.....	- 38 -
4.6.2 Akumulace [³ H]IAA a NPA	- 39 -
4.6.3 Akumulace [³ H]IAA a [³ H]2,4-D	- 39 -
4.6.4 Akumulace [³ H]NAA	- 39 -
4.6.5 Akumulace [³ H]NAA a NPA.....	- 40 -
4.6.6 Akumulace [³ H]NAA, CHPAA a BFA	- 40 -

5 VÝSLEDKY	- 41 -
5.1 Mutace restrikčních míst v PIN7	- 41 -
5.2 Příprava plasmidové DNA	- 44 -
5.3 Příprava zásobního množství plasmidů	- 45 -
5.4 Příprava stabilně transfekovaných buněčných linií	- 47 -
5.5 Imunofluorescence	- 47 -
5.6 Akumulace auxinů a testování inhibitorů přenosu auxinu	- 54 -
6 DISKUZE	- 58 -
7 ZÁVĚR	- 62 -
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 63 -

SEZNAM ZKRATEK

[³ H]IAA	tritiem značená kyselina indolyl-3-octová („indolyl-3-acetic acid“)
[³ H]NAA	tritiem značená kyselina naftyl-1-octová („naphthalene-1-acetic acid“)
[³ H]2,4-D	tritiem značená kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová („2,4-dichlorphenoxyacetic acid“)
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová („2,4-dichlorphenoxyacetic acid“)
4-Cl-IAA	4-chlorindol-3-octová kyselina („4-chloreindole-3-acetic acid“)
ABCB	rodina přenašečů auxinu („ATP binding cassette subfamily B“)
AMK	aminokyselina
ARF	ADP ribosylační faktor („ADP ribosylation factor“)
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát („adenosin triphosphate“)
AUX1/LAX	rodina přenašečů auxinu („auxin-resistant1/like AUX1“)
BFA	brefeldin A
bp	pár bází („base pair“)
BSA	hovězí sérový albumin („bovine serum albumin“)
BY-2	linie buněk <i>Nicotiana tabacum</i> („bright yellow-2“)
CHPAA	3-chlor-4-hydroxyfenyloctová kyselina („3-chlor-4-hydroxyphenylacetic acid“)
CYP	cytochrom P450
dH ₂ O	deionizovaná voda
D6PK	proteinkinasy D6
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina („deoxyribonucleic acid“)
dNTPs	směs deoxynukleotidtrifosfátů
EBNA1	forma jaderného antigenu 1 viru Epstein-Barrové („Epstein-Barr nuclear antigen 1“)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
FLOOZY	rodina flavin monooxygenas z <i>Petunia hybrida</i>
G418	geneticin
GA	Golgiho aparát
GEF	GDP/GTP výměnný faktor („GDP/GTP exchange factor“)

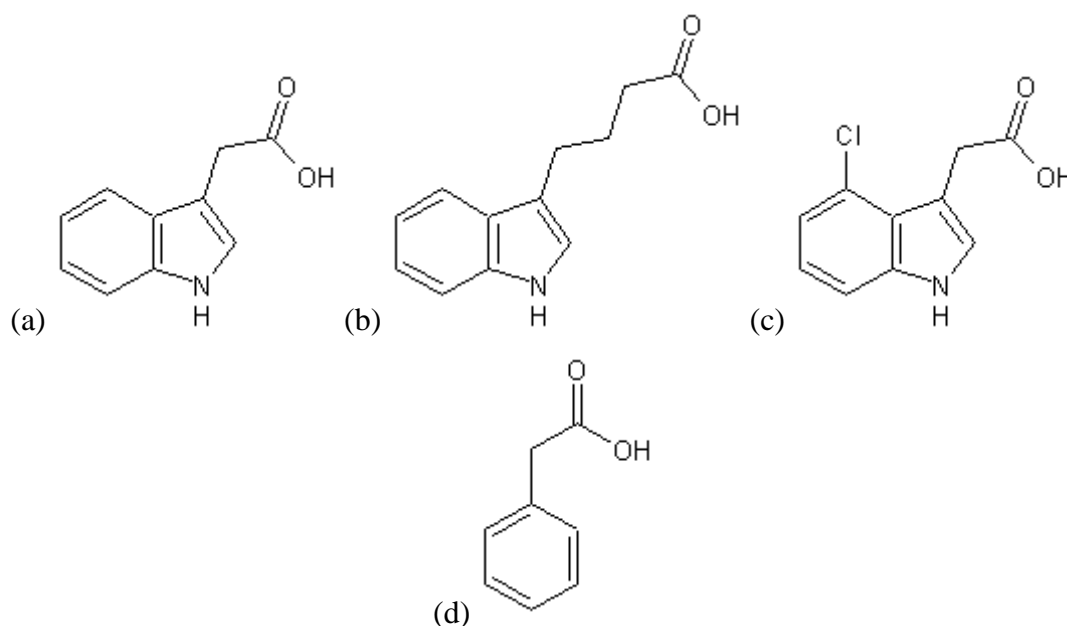
GFP	zelený fluorescenční protein („green fluorescent protein“)
Glu	kyselina glutamová
GnTI	N-acetylglukosaminyltransferasa I
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293 („human embryonic kidney 293“)
HeLa	buněčná linie lidských epitelových buněk („Henrietta Lacks“)
IAA	indolyl-3-octová kyselina („indolyl-3-acetic acid“)
IBA	indol-3-másečná kyselina („indolyl-3-butyric acid“)
LB	Luria Bertani medium
IPEI	lineární polyethylenimin
MDR	transportéry xenobiotik („multidrug resistance“)
NAA	naftylctová kyselina („naphthalene-1-acetic acid“)
NIT	rodina nitrilas
NPA	1-naftylftalamová kyselina („1-naphthylphthalamic acid“)
PAA	fenyloctová kyselina („phenylacetic acid“)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok („phosphate buffered saline“)
PCR	polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
PGP	fosfoglykoprotein („phosphoglycoprotein“)
PID	fosfatasa „PINOID“
PIN	rodina přenašečů auxinu („pin-formed“)
PM	plasmatická membrána
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce se zpětným přepisem („reverse transcription polymerase chain reaction“)
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatasa („secreted alkaline phosphatase“)
SV40	velký T-antigen viru SV40
TAA	tryptofan aminotransferasa
TAE	Tris-acetátový pufr s EDTA
TAR1	protein související s tryptofan aminotransferasou („tryptophan aminotransferase-related protein 1“)
TES	pufr obsahující Tris, EDTA a chlorid sodný
TK	tkáňové kultury
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
WPRE	enhancer exprese („Woodchuck posttranscriptional regulatory element“)
YUCCA	rodina flavin monooxygenas z <i>Arabidopsis thaliana</i>

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Auxin

Auxin (kyselina indolyl-3-octová, IAA) je přírodní rostlinný hormon, který se svou strukturou řadí mezi indolové deriváty (obr. 1a). Tento hormon byl poprvé objeven v lidské moči v roce 1934. Až později byl nalezen také v mikroorganismech a ve vyšších rostlinách [1]. Auxin u rostlin ovlivňuje procesy související s pohybem rostlin vzhledem ke světlu, gravitaci či vodě (fototropismus, gravitropismus a hydrotropismus). Především je zodpovědný za prodlužování rostlinných buněk, tedy za růst celé rostliny. Ve spolupráci s jinými fytohormony se podílí na ovlivnění spousty dalších procesů. Může například určovat, zda bude rostlina tvořit převážně nadzemní či podzemní část a podílet se na kontrole apikální dominance. [2]. Syntéza IAA je soustředěna do meristémů a mladých částí rostliny. Nejvýznamnějším zdrojem IAA dvouděložných rostlin je vzrostný vrchol, embrya a rostoucí listy [1].

Mezi další přírodní auxiny patří kyselina indol-3-másečná (IBA, obr. 1b), kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA, obr.1c) a kyselina fenylactová (PAA, obr. 1d) [3].

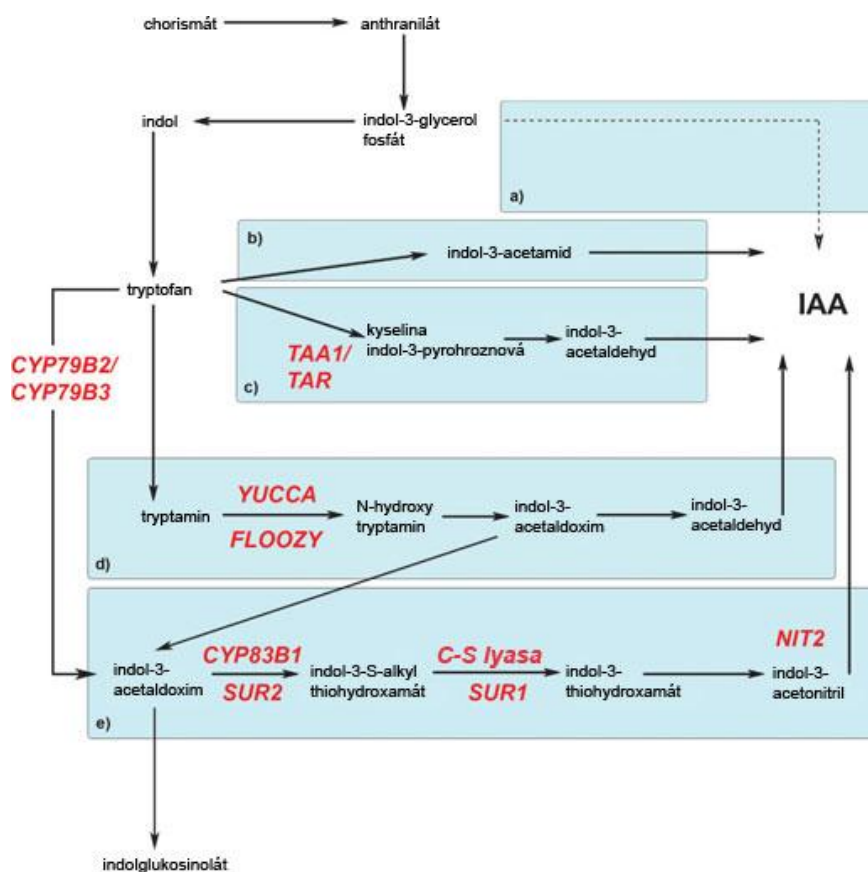


Obr. 1: Struktury přírodních auxinů

(a) kyselina indolyl-3-octová, IAA, (b) kyselina indol-3-másečná, IBA, (c) kyselina 4-chlorindol-3-octová, 4-Cl-IAA, (d) kyselina fenylactová, PAA

1.1.1 Metabolismus auxinu

Syntéza IAA je zajištěna dvěma drahami a to tryptofan dependentní, která je nejčastější, a tryptofan independentní. Tryptofan dependentní dráha je dále dělena na čtyři možné cesty vzniku auxinu. Tyto cesty se mohou různě prolínat a jejich prekurzorem je vždy tryptofan. Meziprodukty těchto cest jsou indolyl-3-acetamid, tryptamin, indolyl-3-acetaldoxim a kyselina indolyl-3-pyrohroznová (obr. 2, str. 13). Jako prekurzor pro tryptofan independentní dráhu slouží indol nebo indolyl-3-glycerol fosfát, který ovšem hraje roli i při syntéze auxinu tryptofan dependentní drahou. V organismu je hladina auxinu regulována jeho konjugací a dekonjugací. Konjugací s peptidy, sacharidy, aminokyselinami a proteiny může dojít k inaktivaci auxinu. Konjugáty IAA s aminokyselinami jako IAA-Ala a IAA-Leu slouží jako zásoba auxinu, jiné konjugáty jako IAA-Asp a IAA-Glu slouží k degradaci auxinu. Při konjugaci se sacharidy musí nejprve dojít k oxidaci indolového kruhu IAA pomocí IAA-oxidas. Teprve tato oxidovaná forma může reagovat s hexosami. Vzniklé konjugáty IAA se sacharidy opět slouží jako zásoba auxinu v organismu nebo auxin inaktivují. Jako další sloučeniny, které mohou sloužit jako zásoba auxinu jsou konjugáty IAA s proteiny. Na rozdíl od ostatních konjugátů nemají vliv na inaktivaci auxinu, ale ovlivňují funkci a stabilitu proteinu, se kterým jsou konjugované. Míra degradace auxinu v organismu je určována jeho množstvím. Je zajištěna dvěma hlavními drahami a to dekarboxylativní a nedekarboxylativní oxidací, které jsou ireverzibilní [4 - 6].



Obr. 2: Biosyntéza auxinu

(a) Tryptofan independentní dráha, (b - e) tryptofan dependentní dráha s meziprodukty (b) indol-3-acetamidem, (c) kyselinou indol-3-pyrohroznovou, (d) tryptaminem a (e) indol-3-acetaldoximem; převzato a upraveno z [6]

1.1.2 Transport auxinu

Pro růst a vývin rostlin a jejich přizpůsobení různým podmínkám je důležité vytvoření auxinových maxim. Ta jsou udržována pomocí transportu auxinu mezi buňkami v těle rostliny (obr. 3, str. 14) [7].

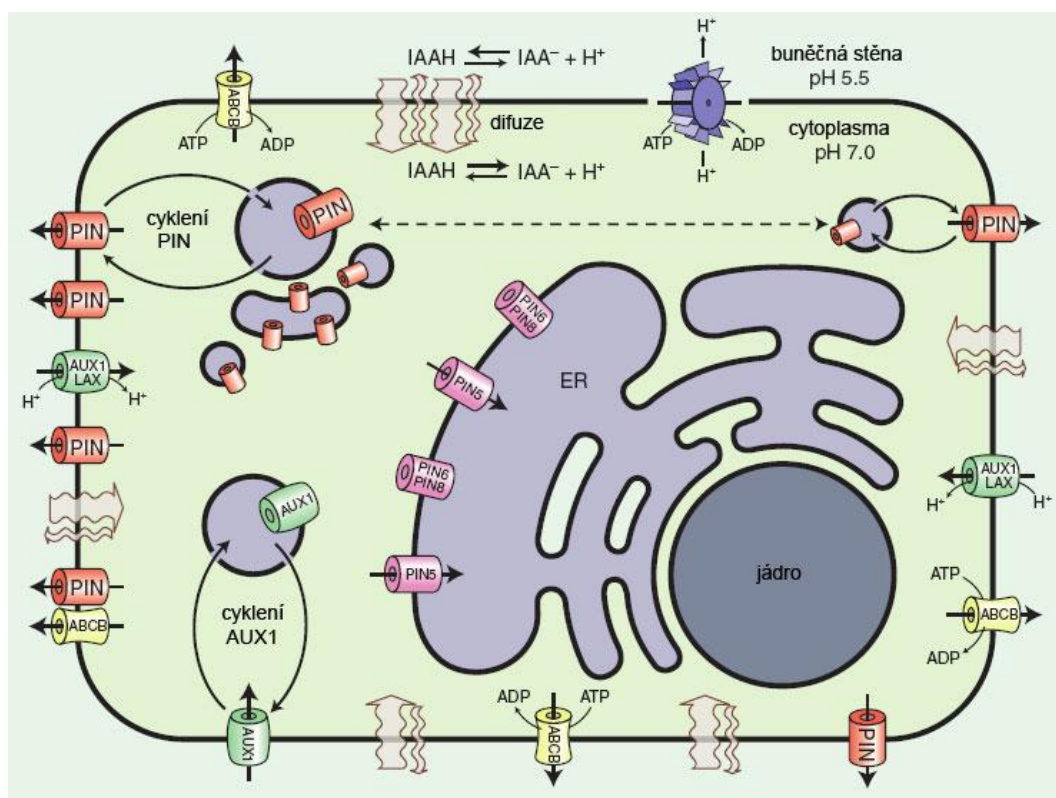
Auxin je polárně (tzn. jedním směrem - od vrcholu stonku ke kořeni) transportován pomocí auxinových transportérů z rodin „auxin resistant1/like AUX1“ (AUX1/LAX) a „pin-formed“ (PIN), „ATP binding cassette subfamily B“ (ABCB) a také difuzí. Tento transport je určen chemiosmotickým gradientem [8, 9].

Auxin je schopen do buňky přecházet částečně difuzí a částečně pomocí přenašečů např. z rodiny AUX1/LAX. K přenosu pomocí difuze dochází v případě, že se IAA ($pK_a = 4,75$) vyskytuje v nedisociované formě. V této formě se při fyziologickém pH 5,5 v apoplastu (systém mezibuněčných prostor a buněčných stěn) nachází pouze ze 17 %. Hlavní díl přenosu tedy zajišťují specifické přenašeče, jelikož při tomto fyziologickém pH se IAA

z 83 % vyskytuje v disociované formě (IAA^-). Uvnitř buňky, kde je pH 7,0 je IAA téměř zcela disociována, nemůže tedy být z buňky vyloučena difúzí a transport je zajištěn přenašeči např. z rodiny PIN nebo ABCB, které jsou asymetricky lokalizovány na plasmatické membráně a tím určují směr toku auxinu. Hodnotu pH určuje ATPasa umístěná v plasmatické membráně, která z buňky vylučuje H^+ a pH v apoplastu je tedy nižší než uvnitř buňky [8, 9].

Pro směr transportu auxinu je důležitá polární subcelulární lokalizace transportérů z rodiny PIN. Změnu směru transportu zajišťuje cyklická výměna PIN proteinů mezi plasmatickou membránou a endosomálními kompartmenty (viz. obr. 3, str. 14) [8, 9]. Toto cyklování je závislé na proteinu GNOM, což je GDP/GTP výměnný faktor (GEF) pro malé G proteiny typu ARF [10].

Činnost mnoha transportérů je regulována fosforylací a defosforylací, což jsou kovalentní posttranslační modifikace zprostředkované proteinkinasami (PINOID, PID) a proteinfofatasami (PP2A)[11, 12]. Bylo prokázáno, že exprese PID pozitivně ovlivňuje transport auxinu z buňky [13].



Obr. 3: Model polárního transportu auxinu

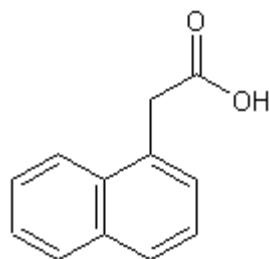
Červené značky - dlouhé PIN přenašeče, růžové značky - krátké PIN přenašeče; fialové útvary - endosomy, ER - endoplasmatické retikulum; přerušovaná šipka - transcytosa; spolupráce PIN s ABCB je naznačena umístěním symbolů blízko sebe; převzato a upraveno z [8]

1.1.3 Syntetické auxiny

Syntetické auxiny jsou mnohem stabilnější než auxiny přírodní, a to pravděpodobně z důvodu menší úrovně zapojení do buněčného metabolismu. Stejně jako přírodní auxiny mohou být inaktivovány konjugací s glukosou. Při vysokých koncentracích jsou toxické především pro jednoděložné rostliny, jako jsou trávy. Díky této vlastnosti byla vyvinuta řada sloučenin s aktivitou podobnou auxinu, které se využívají jako herbicidy. Dále jsou používány jako aktivní látky v zahradnických přípravcích, které podporují tvorbu adventivních kořenů [3].

1.1.3.1 Kyselina naftyloctová

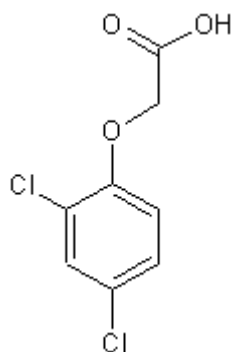
Kyselina naftyloctová (NAA, obr. 4) je do buňky přenášena pouze prostou difuzí, kterou se do buňky dostává v podstatně větší míře než IAA [14]. Pro její přenos tedy není potřeba žádného přenašeče auxinu do buňky [15]. Pro transport z buňky využívá auxinové exportéry například z rodiny PIN nebo ABCB [16].



Obr. 4: Struktura kyselina naftyloctové, NAA

1.1.3.2 Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D, obr. 5) se do buňky se dostává pouze aktivním transportem [16]. Pro exportéry auxinu je špatným substrátem a proto je ke svému přenosu nevyužívá [14, 15]. V současnosti se používá také jako herbicid [17].



Obr. 5: Struktura kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové, 2,4-D

1.2 Transportéry auxinu

1.2.1 Rodina transportérů AUX1/LAX

Tato rodina transportérů se uplatňuje při přenosu auxinu do buňky při nízkém pH (5,5) uvnitř apoplastu [18]. Specifickým přenašečem pro přenos auxinu do buňky je protein AUX1 a jeho homology z této z rodiny (LAX1, LAX2 LAX3). AUX1 byl prvním přenašečem, který byl na molekulární úrovni charakterizován v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Později byla jeho transportní funkce také prokázána. Tento přenašeč je svou strukturou podobný aminokyselinovým permeasám. IAA, jejíž základem je indolový kruh a je tedy strukturou podobná tryptofanu, je pro tento typ přenašečů vhodným substrátem. Transport pomocí AUX1 je transportem aktivním a je doprovázen symportem s protony [19 - 21].

Jako přenašeč auxinu do buňky může také fungovat přenašeč nitrátu NRT1.1, který je lokalizován na plasmatické membráně [22].

1.2.2 Rodina transportérů ABCB

Tato rodina transportérů se řadí mezi fosfoglykoproteiny (PGP) a některé transportují auxin z buňky [23]. ABCB je početná rodina přenašečů, ovšem mezi transportéry auxinu patří pouze ABCB1, ABCB4 a ABCB19. Tyto proteiny jsou v plasmatické membráně umístěny buď polárně nebo nepolárně [24]. Mezi nejprostudovanější patří transportéry ABCB1/PGP1, ABCB4/PGP4 a ABCB19/PGP19. Tyto typy proteinů jsou schopné exportovat auxin v rostlinných i v savčích buňkách [25]. Výjimkou z uvedených exportérů je protein ABCB4/PGP4, který má schopnost přenášet auxin také do buněk. Tato funkce byla prokázána v HeLa buňkách pomocí [³H]IAA [26]. ABCB transportéry se na plasmatické membráně mohou shlukovat s transportéry PIN a interagovat spolu. Jejich spolupráce pravděpodobně zvyšuje jejich substrátovou specifitu k auxinu [25].

1.2.3 Rodina transportérů PIN

Název této rodiny je odvozen od „pin-formed“ fenotypu květenství v mutantu *Arabidopsis thaliana*. Tento mutant postrádá transportér PIN1 (obr. 6, str. 17), který je nejdůležitějším zprostředkovatelem polárního toku auxinu ve vývoji krytosemenných rostlin.

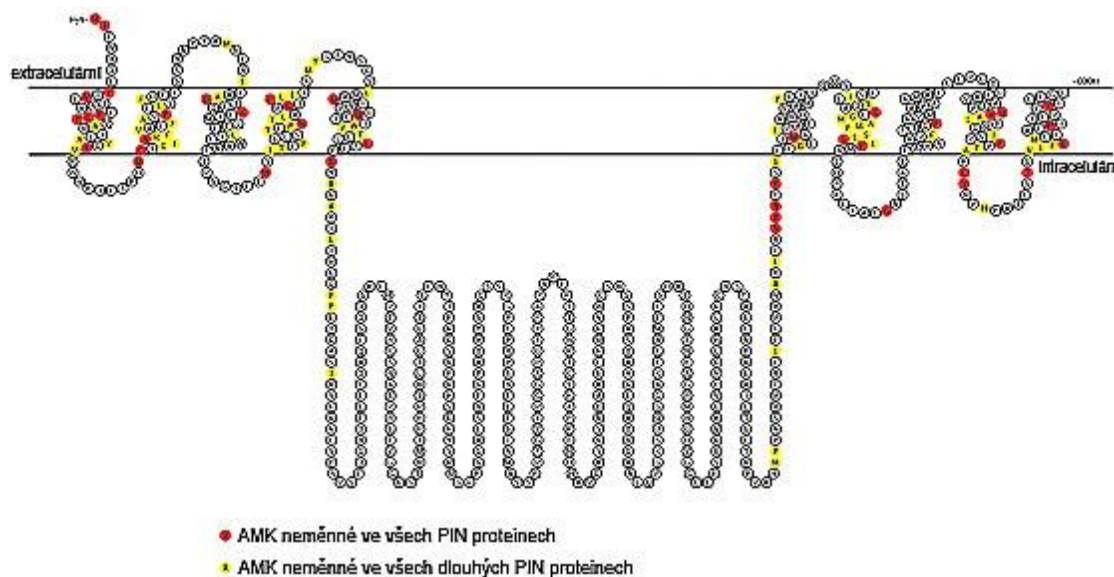


Obr. 6: Exprese přenašeče PIN1 ovlivňuje fenotyp květenství *Arabidopsis thaliana*

Vlevo - přirozený fenotyp; vpravo - „pin formed“ mutant postrádající přenašeč PIN1; převzato a upraveno z [27]

Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje osm genů PIN1-8. Tyto přenašeče se dále rozdělují na krátké (PIN5, 6 a 8) a dlouhé (PIN1, 2, 3, 4 a 7) a to podle délky hydrofilní smyčky v intracelulárním prostředí. Hydrofilní smyčka odděluje dvě transmembránové domény, je velmi variabilní nejen v délce, ale i v sekvenci a je tedy nejvíce odlišnou částí u všech proteinů PIN. Jinak jsou si všechny PIN proteiny velmi podobné. Hydrofobní transmembránové domény obsahují dohromady pět oblastí. Jedná se o vysoce specifické sekvence, kde se nepřipouští žádné inserce či delece. Krátké PIN proteiny tuto hydrofilní smyčku postrádají. Jsou umístěny pouze v membráně endoplasmatického retikula a pravděpodobně slouží k rozdělení auxinu v intracelulárním prostředí [28]. Tuto funkci má především PIN5, který řídí dostupnost volného a aktivního auxinu, a tím reguluje jeho metabolismus [29]. Dlouhé PIN proteiny jsou umístěny na plasmatické membráně (PM) a zajišťují transport auxinu z buňky. Tato funkce byla prokázána ve více heterologních systémech [30]. PIN proteiny pravděpodobně k přenosu auxinu využívají spíše elektrochemický gradient než hydrolyzu ATP. To vychází z předpokládané struktury (obr. 7, str. 18) dlouhých PIN proteinů, která je velmi podobná struktuře sekundárních transportérů [28]. Tyto transportéry nemají v PM stálou polohu. Neustále cyklují mezi PM a endosomálními kompartmenty a také může docházet k jejich přesunu do různých částí buňky. Mechanismus tohoto přesunu je podobný transcytose [8]. Cyklování PIN proteinů mezi PM a endosomálními kompartmenty je důležité z důvodu ustavení polární lokalizace přenašečů v buňce, tím i směřování transportu auxinu a také pro regulaci jejich množství na PM. Například nově syntetizované PIN proteiny jsou pravděpodobně orientovány nepolárně a polární orientaci získávají až tímto cyklováním [31]. Laterální mobilita PIN proteinů

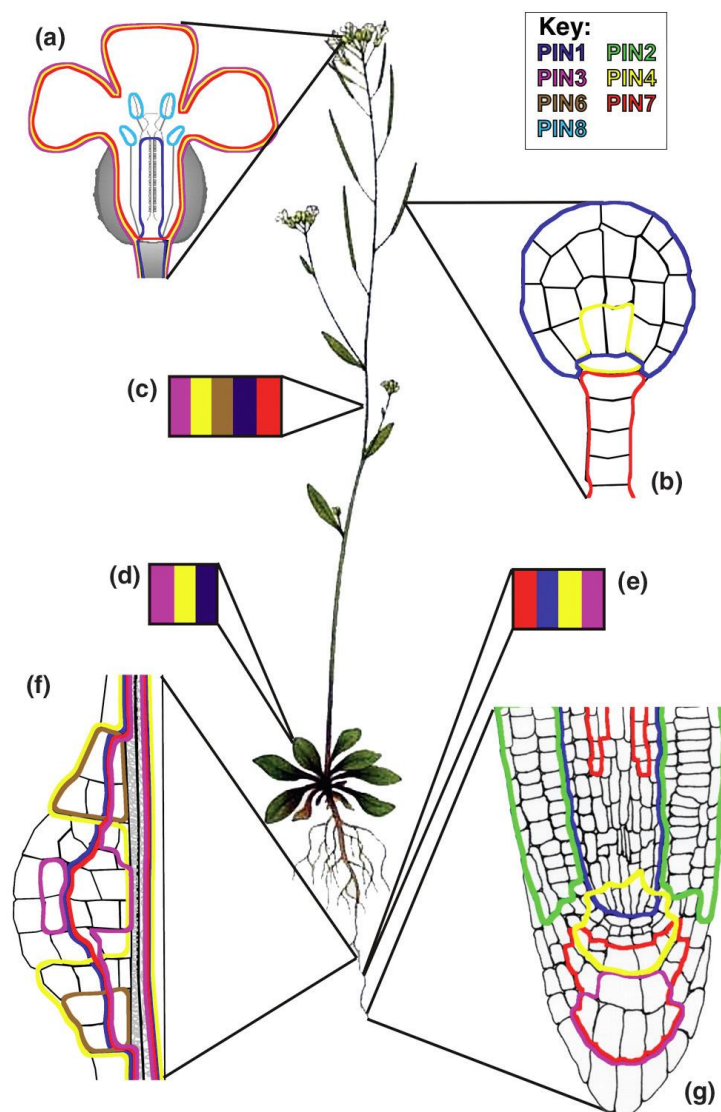
v membráně je velmi omezena. Pomocí konfokální mikroskopie bylo prokázáno, že PIN1 a PIN2 je v membráně soustředěn do shluků [32]. Funkci PIN proteinů mohou také regulovat proteinkinasy PINOID (PID), které fosforylují hydrofilní smyčku a proteinfosfatasy PP2A, které zajišťují její defosforylaci [12, 14, 33]. Tato regulace funkce PIN proteinů je prováděna pomocí kontroly lokalizace transportérů PIN, jelikož jejich polární distribuce v buňce je na fosforylaci závislá [15, 33]. Nedávno byly popsány další kinasy D6 (D6PK), které PIN proteiny také fosforylují [34].



Obr. 7: Předpokládaná struktura PIN proteinů.

Zobrazená sekvence odpovídá transportéru PIN7; červeně jsou znázorněny aminokyseliny v rámci PIN rodiny zcela neproměnné; žlutě pak aminokyseliny neměnné pouze v dlouhých PIN proteinech; převzato a upraveno z [28]

Transportéry mohou být umístěny na laterální (boční), bazální (polární, směrem ke kořenové špičce), nebo apikální (nepolární, směrem k vzrostnému vrcholu) části plasmatické membrány. To závisí na typu proteinu, buňky a předpokládaném vývoji rostliny (obr. 8, str. 19) [7]. Lokalizace proteinů PIN v membráně je různá dle konkrétního transportéru, typu buňky a vnějších podnětů. PIN1 a PIN2 jsou lokalizovány především bazálně. PIN3, PIN4 a PIN7 vykazují bazální i apikální lokalizaci [18]. PIN1 je bazálně orientován v listech a kořenech a ve vodivých pletivech embrya. Také je apikálně orientován v epidermu vrcholu stonku gynecia (soubor plodolistů) a embrya. PIN2 je bazálně orientován ve dřeni kořene a apikálně orientován v kořenové čepičce postranních kořenů a rhizodermu. PIN3 je orientován především laterálně na vnitřní straně endodermu stonku. Ostatní dlouhé PIN, tedy ty lokalizované na PM, jsou bazálně umístěny v různých rostlinných pletivech [7].



Obr. 8: Mapa lokalizace proteinů PIN v rostlinných orgánech

(a) květ, (b) embryo, (c) stonek, (d) list, (e) střední část hlavního kořene, (f) zárodek postranního kořene, (g) kořenová špička; legenda vpravo nahoře zobrazuje barevné kódování exprese jednotlivých PIN přenašečů; převzato z [28]

Při klonování genu PIN1 značeným transpozonom (DNA sekvence schopná přemísťování v rámci genomu) bylo zjištěno, že se skládá z 622 aminokyselin a pravděpodobně z dvanácti transmembránových segmentů. Díky těmto segmentům získávají podobnost s prokaryotickými a eukaryotickými transportéry [35].

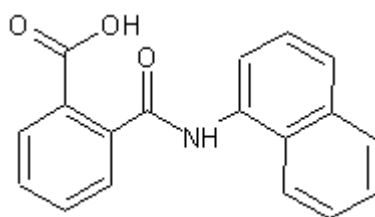
Pět z transportérů PIN je funkčním exportérem auxinu také v HeLa buňkách, kvasinkách a buňkách *Nicotiana tabacum* linie BY-2 [23]. Pro expresi PIN1 byla použita suspenzní buněčná kultura *Arabidopsis thaliana*, do které byla umístěna sekvence PIN1 pod kontrolou promotoru indukovaného estradiolem. Použití estradiolu vedlo k aktivaci exprese

PIN1. Toto bylo prokázáno expresí proteinu PIN1 značeného GFP, dále RT-PCR PIN1 ve výhoncích a kultivovaných buňkách a akumulací [³H]NAA. Další použitou buněčnou kulturou byla kultura *Nicotiana tabacum* linie BY-2, do které byl umístěn PIN7 pod kontrolou dexamethasonem indukovaného systému a na plasmatické membráně byla prokázána zvýšená exprese PIN7. Exprese proteinů PIN byla prokázána také v lidské buněčné kultuře HeLa. Buňky vykazovaly silnou expresi proteinů PIN2 a PIN7. Oproti kontrolním buňkám transfekovaným prázdným vektorem byla exprese dokázána zvýšeným exportem [³H]IAA z buněk. Exprese a také transportní funkce PIN2 a PIN7 byla také ukázána v buňkách kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* [30]. Při aplikaci vysoké koncentrace auxinu bylo prokázáno snížení signálu u PIN7-GFP a PIN2-GFP. Naopak při aplikaci nižší koncentrace se signál zvýšil. To značí dvojí roli auxinu pro transkripci a degradaci PIN proteinů [29].

1.3 Inhibitory přenosu auxinu

1.3.1 Kyselina 1-naftylftalamová

Kyselina 1-naftylftalamová (NPA, obr. 9) patří do skupiny fytotropinů a je nekompetitivním inhibítoem přenosu auxinu [14]. Blokuje především přenos auxinu z buňky, ale není jasné, na který exportér působí [16, 36]. Mechanismus účinku není zcela znám [36]. Na transportéru se pravděpodobně nachází vazebné místo pro NPA tzv. NPA-binding protein, jehož prostřednictvím NPA operuje. Jiné studie ukazují, že se NPA-binding protein vyskytuje na vnitřní straně membrány jako samostatný membránový protein, který se odlišuje od samotného transportéru [11]. NPA-binding protein je vázán na cytoskelet, který je důležitý pro ustavení pozice exportéru v buňce [37].

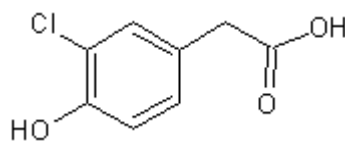


Obr. 9: Struktura kyseliny naftylftalamové, NPA

1.3.2 Kyselina 3-chlor-4-hydroxyfenyloctová

Kyselina 3-chlor-4-hydroxyfenyloctová (CHPAA, obr. 10, str. 21) je inhibítoem přenašečů auxinu do buněk. Je strukturně podobná syntetickému auxinu 2,4-D, substrátu

přenašeče auxinu do buňky, a výrazně tedy snižuje jeho hromadění v buňkách. CHPAA neovlivňuje lokalizaci auxinových přenašečů [14, 36].

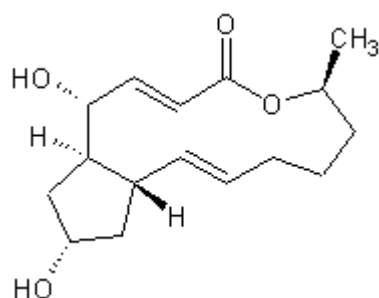


Obr. 10: Struktura kyseliny 3-chlor-4-hydroxyfenyloctové, CHPAA

1.3.3 Brefeldin A

Brefeldin A (BFA, obr. 11) je fungální makrocyclický lakton, který inhibuje cyklování proteinů mezi PM a endosomálními kompartmenty v savčích i rostlinných buňkách. Pravděpodobně zabraňuje návratu proteinů z Golgiho aparátu (GA) na endoplasmatické retikulum (ER). V jedné rostlinné buňce může mít BFA dvojí účinek. Jednak vytváří tzv. BFA kompartmenty a jednak tzv. Golgi-ER hybridy, které vznikají horizontálním rozdělením GA a většina jeho cisteren je pohlcena ER. V savčích buňkách ovlivňuje transport proteinů z ER na GA pomocí post-ER kompartmentu, který se nevyskytuje v rostlinných buňkách [38].

Brefeldin A má vliv i na auxinové transportéry. Doručení PIN proteinů na plasmatickou membránu je závislé na proteinu GNOM, GDP/GTP výměnný faktor (GEF) pro malé G proteiny typu ARF, který je citlivý k BFA (inhibitor ARF-GEFs). BFA snižuje množství PIN proteinů na PM akumulací PIN proteinů do BFA kompartmentů, tento přesun je naopak inhibován působením auxinu [10, 36, 38 - 40]. BFA ovlivňuje lokalizaci na PM také u ABCB transportérů, ne však u proteinů AUX1/LAX. AUX1 proteiny vyskytující se v BFA kompartmentech jsou původem z vnitrobuněčných zdrojů [23,41]



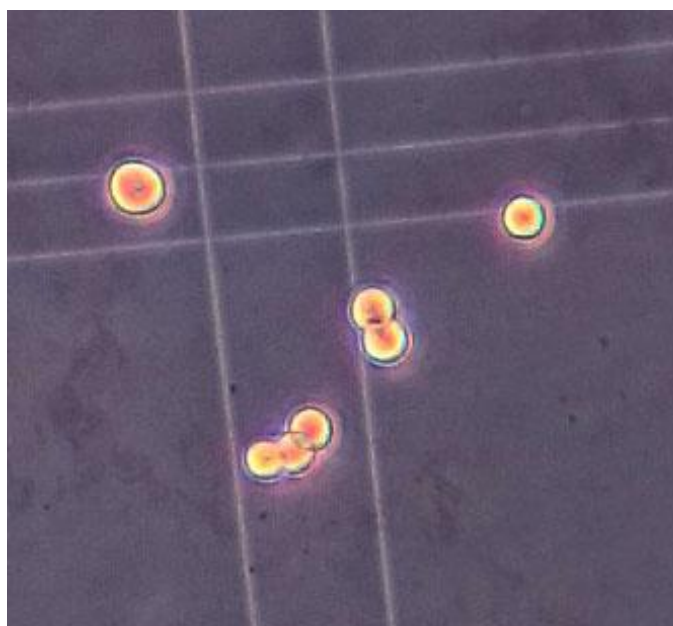
Obr. 11: Struktura brefeldinu A

1.4 HEK293 buněčná linie

Savčí expresní systémy jsou vhodné pro produkci proteinů z hlediska správných posttranslačních modifikací a sbalení proteinů [42]. Lidské embryonální ledvinné buňky 293

(obr. 12) jsou expresním systémem odvozeným z ledvinných buněk potracených embryí. Tuto buněčnou linii vytvořil Alex Van der Eb v roce 1970 na Univerzitě v Leidenu v Nizozemí. Kultura byla transformována DNA z adenoviru 5, což vedlo k začlenění několika kilobází virového genomu do chromosomu HEK buněk. Tato část genomu kóduje proteiny interferující s kontrolními uzly buněčného cyklu a tím zabraňující apoptose. Transformace byla provedena Frankem Grahamem. Tato linie byla vytvořena z 293. pokusu transformace, odtud tedy označení 293 [43, 44].

Transformací primárních HEK293 vznikly další buněčné linie. Příkladem mohou být buněčné linie HEK293E, HEK293T a HEK293S. Linie HEK293E byla transformována genem pro nukleární antigen 1 viru Epstein-Barrové (EBNA1). Linie HEK293T byla transformována velkým T-antigenem viru SV40. Tyto geny umožňují episomální replikaci plasmidů obsahujících virové replikační počátky EBV (HEK293E) a SV40 (HEK293T)[45, 46]. Linie HEK293S postrádá enzym N-acetylglukosamintransferasu I (GnTI) a není tedy schopna syntetizovat komplexní na proteiny N-vázané oligosacharidy [47].



Obr. 12: Buňky HEK293T zobrazené inverzním mikroskopem

2 CÍLE PRÁCE

- Příprava expresních vektorů pOPINTTGneo_PIN1 a pOPINTTGneo_PIN7
- Příprava stabilních linií HEK293 exprimujících auxinové transportéry PIN1 a PIN7
- Prokázání biologické aktivity transportérů
- Testování inhibitorů přenosu auxinu

3 MATERIÁL

3.1 Pomůcky a přístroje

Adhezivní podložka na třepačku Sticky Stuff	<i>Infors HT, Švýcarsko</i>
Automatické pipety Pipetman	<i>Gilson, USA</i>
Blokový termostat LS1	<i>VLM, Německo</i>
Centrifuga 5415 R	<i>Eppendorf, Německo</i>
Centrifuga Allegra X-22R	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga EBA 12R	<i>Hettich, Německo</i>
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	<i>TPP, Švýcarsko</i>
Filtry Millipore Express 0,22 µm	<i>Millipore, USA</i>
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570	<i>SONY, Japonsko</i>
Hemocytometr	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
High-Speed Plasmid Mini Kit	<i>Geneaid, USA</i>
Inkubátor CO ₂ pro tkáňové kultury, 18AIC	<i>Sanyo, Japonsko</i>
Inkubátor IR 1500	<i>LABsystem Praha, ČR</i>
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	<i>Genomed, Německo</i>
Kahan Fuego SCS	<i>VERKON, ČR</i>
Konfokální mikroskop LSM 5 DUO	<i>Zeiss, Německo</i>
Konfokální mikroskop LSM 880	<i>Zeiss, Německo</i>
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	<i>P-LAB, ČR</i>
Laminární box BIO 126	<i>LABOX, ČR</i>
Laminární box Clean Air Technik B.V.	<i>PMV, Nizozemsko</i>
Lednice 225 R (4 °C)	<i>CALEX, ČR</i>
Magnetická míchačka MM 2A	<i>Labor. přístroje Praha, ČR</i>
Mikrocentrifuga MiniStar Silverline	<i>VWR, USA</i>
Mikroskop inverzní AE31	<i>Motic, Německo</i>
Mrazicí box (-20 °C)	<i>Zanussi, Itálie</i>
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	<i>Sanyo, Japonsko</i>
Nucleobond Xtra Maxi	<i>Macherey-Nagel, Německo</i>
pH metr 3310	<i>Jenway, UK</i>
Pipetovací nástavec Midi plus	<i>Biohit, USA</i>
Plastik pro tkáňové kultury	<i>TPP, Švýcarsko</i>

Předvážky KB1200-2	<i>Kern, Německo</i>
Rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110	<i>Savan, USA</i>
Scintilační detektor Packard Tri-Carb 2900TR	<i>Canberra Packard, USA</i>
Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Biokeystone Co, USA</i>
Spektrofotometr NanoVue Plus	<i>GE Healthcare, USA</i>
Spektrofotometr UV/VIS UNICAM	<i>Beckman, USA</i>
Termocykler, 0,5 ml × 20	<i>Techne, UK</i>
Třepačka Celltron	<i>Infors HT, Švýcarsko</i>
Třepačka Multitron Cell	<i>Infors HT, Švýcarsko</i>
Třepačka Orbi-Safe TS NetWise	<i>Schöeller, Německo</i>
UV prosvěcovací lampa (300 nm)	<i>Ultra-Lum, USA</i>
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	<i>UVItec, UK</i>
Varič	<i>ETA, ČR</i>
Vodní lázeň WNE14	<i>Memmert, Německo</i>
Vodní lázeň TW2	<i>Julabo, Německo</i>
Vortexový mixer	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore, USA</i>

3.2 Chemikálie

[³ H]IAA	<i>American Radiolabeled Chemicals, USA</i>
[³ H]NAA	<i>American Radiolabeled Chemicals, USA</i>
[³ H]2,4-D	<i>American Radiolabeled Chemicals, USA</i>
Agar	<i>Oxoid, UK</i>
Agarosa	<i>Sigma, USA</i>
Ampicilin 100 mg/ml	<i>Biotika, SR</i>
BFA	<i>Sigma, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
BSA	<i>New England Biolabs, USA</i>
CHPAA	<i>Sigma, USA</i>
DMSO	<i>Sigma, USA</i>
DNA Quick Load standard 1kb	<i>New England Biolabs, USA</i>

DNA Quick Load standard 100bp	<i>New England Biolabs, USA</i>
dNTPs, 10mM	<i>Top Bio, ČR</i>
EDTA	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
ExCELL293 médium	<i>Sigma, USA</i>
Freestyle F17 médium	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
G418	<i>Life Technologies, USA</i>
Glycerol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
GoodView	<i>Ecoli, Slovensko</i>
High GC Enhancer	<i>New England Biolabs, USA</i>
Isopropanol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Kvasničný extrakt	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
L-glutamin	<i>Sigma, USA</i>
IPEI 25 kDa	<i>Polysciences, USA</i>
MgSO ₄ , 100mM	<i>New England Biolabs, USA</i>
NPA	<i>Sigma, USA</i>
Paraformaldehyd	<i>Serva, USA</i>
Pluronic F68	<i>Sigma, USA</i>
PPP PCR master mix	<i>Top-Bio, ČR</i>
Protilátka „Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG“	<i>Invitrogen, USA</i>
Protilátka „Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG“	<i>Invitrogen, USA</i>
Protilátka „Goat polyclonal IgG anti-PIN1“	<i>Santa Cruz Biotechnol, USA</i>
Protilátka „Rabbit IgG anti-PIN7“	<i>J. Wisniewska</i>
Q5 reakční pufr	<i>New England Biolabs, USA</i>
Scintilační roztok EcoLite Liquid Scintillation Fluid	<i>MP Biomedicals, USA</i>
ThermoPol Reaction Buffer	<i>New England Biolabs, USA</i>
Tris	<i>Roth, Německo</i>
Triton X-100	<i>Serva, USA</i>
Trypanová modř	<i>Sigma, USA</i>
Trypton	<i>Oxoid, UK</i>
Ostatní běžné chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>

3.3 Enzymy

AgeI	<i>New England Biolabs, USA</i>
DeepVent DNA polymerasa	<i>New England Biolabs, USA</i>

InFusion HD Enzyme Premix	<i>Clontech, USA</i>
KpnI	<i>New England Biolabs, USA</i>
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase	<i>New England Biolabs, USA</i>
RNase A	<i>Serva, USA</i>

3.4 Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>Escherichia coli</i> ZH5α	PřF UK
HEK293T	<i>A. Radu Arisescu, Oxford</i>

3.5 Vektory

pJET	<i>Fermentas, Kanada</i>
pTW5	<i>Edita Poláková, PřF UK</i>
pOPINTTGneo	<i>Dr. Ray Owens, Oxford</i>

3.6 Oligonukleotidy pro PCR

PIN1a_FW: 5' AAAAACCGGTATTACGGCGGCGGACTTCTA 3'
PIN1a_REV: 5' TTTTGGTACCTAGACCCAAGAGAATGTAGTAGAG 3'
PIN1b_FW: 5' AAAAACCGGTGAGTACCGTGGAGCTAAGCTTTT 3'
PIN1b_REV: 5' TTTTGGTACCACTGGAGTAAGAGTTGGGATTACG 3'
PIN7_FW: 5' AAAAACCGGTATCACATGGCACGACCTCTACAC 3'
PIN7_REV: 5' TTTTGGTACCTAGCCCGAGTAAAATGTAGTAAACAAGTGT 3'
PIN7a_FW: 5' AGTTTTCTACAGGTAATAAAACAGGTAGTAAAG 3'
PIN7a_REV: 5' CTTTACTACCTGTTTTATTACCTGTAGAAAAC 3'
PIN7b_FW: 5' GGTGAAACTGTACAGGTAACATATGC 3'
PIN7b_REV: 5' GCATATGTTTTACCTGTACAGTTTCACC 3'
pOTWneo_PIN1_FW:
5' TATACCATGGGGATCCAAACCGGTATTACGGCGGCGGA 3'
pOTWneo_PIN7_FW:
5' TATACCATGGGGATCCAAACCGGTATCACATGGCACGACC 3'
pOTWneo_REV: 5' CGAGGTCGGGGGATCCG 3'
pTW5seq_REV: 5' AAGCAGCGTATCCACATAGCG 3'
pTT_FW: 5' TGATATTCACCTGGCCCGATCTG 3'

3.7 Roztoky a média

ExCELL293 médium: před použitím doplněno o 4mM L-glutamin

F17 médium: před použitím doplněno o 4mM L-glutamin a 0,1% Pluronic F-68

LB agar: 1,5% agar v LB médiu

LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4; ampicilin
100 µg/ml

PBS-TK pufr: 10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH₂PO₄, pH 7,0

PBS(5,5) pufr: 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, pH 5,5

Roztok IPEI: 1 mg/ml IPEI, pH 7,0

STOP pufr: 30% glycerol, 1% bromfenolová modř, 70% TE pufr

TAE pufr (1× koncentrovaný): 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA, pH 8,3

TE pufr: 10mM Tris, 0,5mM EDTA, pH 8,0

TES pufr: 10mM Tris, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 8,0

4 METODY

4.1 Mutace restrikčních míst

Pomocí PCR byla provedena mutace tří restrikčních míst pro enzym AgeI, která se nacházela v DNA sekvenci PIN7. Sekvence byla pomocí oligonukleotidů rozdělena na tři části: PIN7_FW - PIN7a_REV, PIN7a_FW - PIN7b_REV, PIN7b_FW - PIN7_REV

4.1.1 PCR amplifikace PIN7_FW - PIN7a_REV

V 0,5ml mikrozkušavce bylo smícháno 10 μ l Q5 reakčního pufru (5 \times konc.), 1 μ l dNTPs (10mM), 5 μ l 5 μ M přímého primeru PIN7_FW, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru PIN7a_REV, 10 μ l High GC Enhanceru (5 \times konc.), 1 μ l templátu pJET_PIN7 (c = 254 ng/ μ l); 0,5 μ l Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerasy (2 U/ml) a 17,5 μ l dH₂O.

PCR amplifikace proběhla v termocykleru při následujícím programu:

- 1) 30 s při 98 °C
- 2) 35 \times : 10 s při 98 °C, 30 s při 60 °C, 30 s při 72 °C
- 3) 2 min při 72 °C

PCR produkt byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1,2% gelu [48]. Gel byl připraven smícháním 65 ml TAE pufru (1 \times konc.) a 0,78 g agarosy. Směs byla zahřívána asi 1,5 min v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí na teplotu asi 50 °C byly přidány 3 μ l GoogView, gel byl nalit do elektroforetické vany a byl do něj vložen hřebínek. Gel byl ponechán ztuhnout a poté byl přelit 200 ml dH₂O, dále bylo k anodě nalito 60 ml TAE pufru (1 \times konc.) a ke katodě bylo nalito 180 ml TAE pufru (1 \times konc.). Do jamek gelu bylo pipetováno 5 μ l 100bp Quick Load DNA standardu a vzorek vzniklý smícháním 5 μ l PCR produktu a 0,5 μ l STOP pufru (10 \times konc.). Elektroforéza probíhala 15 min při 180 V. Fragmenty DNA byly pozorovány pod UV lampou při 312 nm.

4.1.2 PCR amplifikace PIN7a_FW - PIN7b_REV

V 0,5ml mikrozkušavce bylo smícháno 5 μ l reakčního pufru Thermopol Reaction Buffer (10 \times konc.); 1,5 μ l MgSO₄; 1,5 μ l dNTPs (10mM), 5 μ l 5 μ M přímého primeru PIN7a_FW, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru PIN7b_REV; 0,5 μ l templátu pJET_PIN7 (c = 206,5 ng/ μ l); 0,5 μ l DeepVent DNA polymerasy; 1,5 μ l 100% DMSO a 29,5 μ l dH₂O.

PCR amplifikace proběhla v termocykleru při následujícím programu:

- 1) 5 min při 95 °C

- 2) 30×: 30 s při 95 °C, 30 s při 58 °C, 1 min při 72 °C
- 3) 8 min při 72 °C

PCR produkt byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1,2% gelu (viz. 4.1.1).

4.1.3 PCR amplifikace PIN7b_FW - PIN7_REV

V 0,5ml mikrozkušavce bylo smícháno 5 µl reakčního pufru Thermopol Reaction Buffer (10× konc.); 1,5 µl MgSO₄; 1,5 µl dNTPs (10mM), 5 µl 5µM přímého primeru PIN7b_FW, 5 µl 5µM reverzního primeru PIN7_REV; 0,5 µl templátu pJET_PIN7 (c = 206,5 ng/µl); 0,5 µl DeepVent DNA polymerasy a 31 µl dH₂O.

PCR amplifikace proběhla v termocykleru při následujícím programu:

- 1) 5 min při 95 °C
- 2) 30×: 30 s při 95 °C, 30 s při 52 °C, 1 min při 72 °C
- 3) 8 min při 72 °C

PCR produkt byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1,2% gelu (viz. 4.1.1).

4.1.4 Preparativní agarosová elektroforéza úseků PIN7a_FW - PIN7b_REV a PIN7b_FW - PIN7_REV

PCR produkty byly přečištěny pomocí preparativní agarosové elektroforézy v 1,2% gelu. Gel byl připraven smícháním 65 ml TAE pufru (1× konc.) a 0,78 g agarosy. Směs byla zahřívána asi 1,5 min v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí na teplotu asi 50 °C byly přidány 3 µl GoogView, gel byl nalit do elektroforetické vany a byl do něj vložen hřebínek. Gel byl ponechán ztuhnout a poté byl přelit 200 ml dH₂O, dále bylo k anodě nalito 60 ml TAE pufru (1× konc.) a ke katodě bylo nalito 180 ml TAE pufru (1× konc.). Do jamek gelu bylo pipetováno 5 µl 100bp Quick Load DNA standardu a vzorek vzniklý smícháním 45 µl PCR produktu a 4,5 µl STOP roztoku (10× konc.). Elektroforéza probíhala 15 min při 180 V.

4.1.5 Extrakce DNA z agarosového gelu

Pro extrakci byla použita souprava JETQUICK Gel Extraction Spin Kit. Z agarosového gelu byla vyříznuta část obsahující fragmenty o přibližné délce 408 bp (PIN7a_FW - PIN7b_REV) a 528 bp (PIN7b_FW - PIN7_REV). Vyříznuté části byly zváženy. Ke gelu o hmotnosti 0,24 g (PIN7a_FW - PIN7b_REV) bylo přidáno 720 µl roztoku L1, ke gelu o

hmotnosti 0,29 g (PIN7b_FW - PIN7_REV) bylo přidáno 900 μ l roztoku L1. Dále bylo postupováno dle návodu [49]. Vzorky byly na kolonku nanášeny postupně po 600 μ l a eluovány 50 μ l dH₂O přehřáté na 50 °C.

4.1.6 Spojení úseků PIN7a_FW - PIN7b_REV a PIN7b_FW - PIN7_REV

Spojení těchto dvou úseků bylo provedeno pomocí PCR amplifikace. Reakční směs byla připravena v 0,5ml PCR zkumavce smícháním 5 μ l reakčního pufru Thermopol Reaction Buffer (10 \times konc.); 1,5 μ l MgSO₄; 1,5 μ l dNTPs (10mM), 5 μ l 5 μ M přímého primeru PIN7a_FW, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru PIN7_REV, 5 μ l PCR produktu úseku PIN7a_FW - PIN7b_REV (c = 4 ng/ μ l), 5 μ l PCR produktu úseku PIN7b_FW - PIN7_REV (c = 6 ng/ μ l); 0,5 μ l DeepVent DNA polymerasy; 1,5 μ l DMSO a 20 μ l dH₂O.

PCR amplifikace proběhla v termocykleru při následujícím programu:

1. 5 min 95 °C
2. 30 \times : 30s 95 °C, 30s 56 °C, 1 min 72 °C
3. 8 min 72 °C

PCR produkt byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1,2% gelu (viz. 4.1.1).

4.1.7 Spojení úseků PIN7_FW - PIN7a_REV a PIN7a_FW - PIN7_REV

Spojení těchto úseků bylo provedeno pomocí PCR amplifikace. Reakční směs byla připravena v 0,5ml PCR zkumavce smícháním 10 μ l reakčního pufru Q5 (5 \times konc.); 1 μ l dNTPs (10mM), 5 μ l 5 μ M přímého primeru PIN7_FW, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru PIN7_REV, 5 μ l PCR produktu úseku PIN7a_FW - PIN7_REV, 5 μ l PCR produktu úseku PIN7_FW - PIN7a_REV, 10 μ l High GC Enhanceru (5 \times konc.); 0,5 μ l Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerasy a 8,5 μ l dH₂O.

PCR amplifikace proběhla v termocykleru při následujícím programu:

1. 30 s 98 °C
2. 35 \times : 10s 98 °C, 30s 58 °C, 1 min 72 °C
3. 2 min 72 °C

PCR produkt byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1,2% gelu (viz. 4.1.1). Použit byl 1kb Quick Load DNA standard.

4.1.8 Preparativní elektroforéza a extrakce z agarosového gelu

PCR produkt PIN7 byl přečištěn pomocí preparativní agarosové elektroforézy a následně extrahován z agarosového gelu dle odstavců 4.1.4 a 4.1.5.

4.2 Práce s DNA

4.2.1 PCR úprava inzertu pro ligaci do vektoru pOPINTTGneo

Do dvou reakčních směsí bylo smícháno vždy 5 μ l reakčního pufru Thermopol Reaction Buffer (10 \times konc.); 1,5 μ l MgSO₄; 1,5 μ l dNTPs (10mM), 5 μ l 5 μ M přímého primeru pOTWneo_PIN7_FW nebo pOTWneo_PIN1_FW, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru pOTWneo_REV; 0,5 μ l DeepVent DNA polymerasy, 1 μ l templátu pTW5_PIN1 (c = 1200 ng/ μ l) nebo pTW5_PIN7 (c = 45 ng/ μ l) a 31 μ l dH₂O.

PCR reakce proběhla v termocykleru při následujícím programu:

1. 5 min 95 °C
2. 30 \times : 30 s 95 °C, 30 s 58 °C, 2 min 72 °C
3. 8 min 72 °C

PCR produkt byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1,2% gelu (viz. 4.1.1). Použit byl 1kb Quick Load DNA standard.

4.2.2 Preparativní elektroforéza a extrakce z agarosového gelu

PCR produkty byly přečištěny pomocí preparativní agarosové elektroforézy a následně extrahovány z agarosového gelu dle odstavců 4.1.4 a 4.1.5.

4.2.3 Ligace inzertů do vektoru pOPINTTGneo

Byly připraveny dvě ligační směsi. Každá směs obsahovala 2 μ l linearizovaného vektoru pOPINTTGneo (c = 35 ng/ μ l), 1 μ l InFusion HD Enzyme Premix. První směs dále obsahovala 7 μ l inzertu PIN1 (c = 13 ng/ μ l), druhá směs dále obsahovala 3,5 μ l inzertu PIN7 (c = 17 ng/ μ l) a 3,5 μ l dH₂O. Směsi byly inkubovány 30 minut při 50 °C a poté přeneseny na led.

4.2.4 Transformace kompetentních bakterií *E.coli* ZH5 α

Kompetentní bakterie *E.coli* ZH5 α uchovávané v mrazáku při -80 °C byly ponechány rozmraznout na ledu. K ligačním směsím bylo přidáno 50 μ l *E.coli* ZH5 α a směsi byly

inkubovány na ledu při 0 °C po dobu 15 min. Směsi byly nanесeny na Petriho misky s LB agarem a obsahujícím 100 µg/ml ampicilinu, které byly přehřáté na 37 °C, a rozetřeny bakteriologickou kličkou. Petriho misky byly inkubovány 24 h při 37 °C.

4.2.5 PCR z kolonií

Z Petriho misek bylo vybráno vždy šest kolonií. Kolonie byly pomocí pipetovací špičky přeneseny do 6 µl dH₂O v 0,5ml PCR mikrozkušavce a pipetovací špička byla následně propláchnuta ve směsi 5 ml LB media se 100 µg/ml ampicilinu v 50ml zkumavkách s víčkem. Tyto zkumavky byly ponechány třepat při 220 ot./min, 37 °C po dobu přibližně 16 h.

Do PCR zkumavek byly dále přidány 2 µl přímého primeru PTT_FW (5µM), 2 µl reverzního primeru PIN1_REV (5µM) nebo PIN7_REV (5µM) a 10 µl PPP Mastermixu (2× konc.). PCR reakce proběhla v termocycleru při následujícím programu:

1. 10 min 94 °C
2. 30×: 30 s 94 °C, 30 s 54 °C, 2 min 72 °C
3. 10 min 72 °C

PCR produkt byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1,2% gelu (viz. 4.1.1). Použit byl 1kb Quick Load DNA standard.

4.2.6 Příprava plasmidové DNA

Bakteriální kultury ve zkumavkách s víčkem, které dle PCR z kolonií obsahují plasmidy pOPINTTGneo_PIN1 a pOPINTTGneo_PIN7 byly postupně v mikrozkušavkách centrifugovány 2 min při 16000 × g, 25 °C. Dále bylo postupováno dle návodu výrobce soupravy High-Speed Plasmid Mini Kit [50]. DNA byla eluována 50 µl dH₂O přehřáté na 70 °C.

4.2.7 Sekvenování DNA

Byly připraveny vždy čtyři reakční směsi pro každý vzorek - směs pro přímou sekvenaci, směs pro reverzní sekvenaci, směs pro přímou vnitřní sekvenaci a směs pro reverzní vnitřní sekvenaci.

Směs pro přímou sekvenaci vzorku pOPINTTGneo_PIN1 byla připravena do 0,2ml mikrozkušavky a byly smíchány 3 µl plasmidu pOPINTTGneo_PIN1 (c = 45 ng/µl), 1 µl přímého primeru PTT_FW (5µM) a 4 µl dH₂O. Směs pro reverzní sekvenaci vzorku

pOPINTTGneo_PIN1 byla připravena do 0,2ml mikrozkušavky a byly smíchány 3 μ l plasmidu pOPINTTGneo_PIN1 (c = 45 ng/ μ l), 1 μ l reverzního primeru pTW5seq_REV (5 μ M) a 4 μ l dH₂O. Směs pro přímou vnitřní sekvenaci vzorku pOPINTTGneo_PIN1 byla připravena do 0,2ml mikrozkušavky a byly smíchány 3 μ l plasmidu pOPINTTGneo_PIN1 (c = 45 ng/ μ l), 1 μ l přímého primeru PIN1b_FW (5 μ M) a 4 μ l dH₂O. Směs pro reverzní vnitřní sekvenaci vzorku pOPINTTGneo_PIN1 byla připravena do 0,2ml mikrozkušavky a byly smíchány 3 μ l plasmidu pOPINTTGneo_PIN1 (c = 45 ng/ μ l), 1 μ l reverzního primeru PIN1b_REV (5 μ M) a 4 μ l dH₂O.

Směs pro přímou sekvenaci vzorku pOPINTTGneo_PIN7 byla připravena do 0,2ml mikrozkušavky a byly smíchány 3 μ l plasmidu pOPINTTGneo_PIN7 (c = 25 ng/ μ l), 1 μ l přímého primeru PTT_FW (5 μ M) a 4 μ l dH₂O. Směs pro reverzní sekvenaci vzorku pOPINTTGneo_PIN7 byla připravena do 0,2ml mikrozkušavky a byly smíchány 3 μ l plasmidu pOPINTTGneo_PIN7 (c = 25 ng/ μ l), 1 μ l reverzního primeru pTW5seq_REV (5 μ M) a 4 μ l dH₂O. Směs pro přímou vnitřní sekvenaci vzorku pOPINTTGneo_PIN7 byla připravena do 0,2ml mikrozkušavky a byly smíchány 3 μ l plasmidu pOPINTTGneo_PIN7 (c = 25 ng/ μ l), 1 μ l přímého primeru PIN7a_FW (5 μ M) a 4 μ l dH₂O. Směs pro reverzní vnitřní sekvenaci vzorku pOPINTTGneo_PIN7 byla připravena do 0,2ml mikrozkušavky a byly smíchány 3 μ l plasmidu pOPINTTGneo_PIN7 (c = 25 ng/ μ l), 1 μ l reverzního primeru PIN7b_REV (5 μ M) a 4 μ l dH₂O.

4.3 Příprava zásobního množství DNA

4.3.1 Transformace a kultivace kompetentních bakterií *E.coli* ZH5 α

Kompetentní bakterie *E.coli* ZH5 α uchovávané v mrazáku při -80 °C byly ponechány rozmraznout na ledu. Bylo smícháno vždy 40 μ l kompetentních bakterií a 5 μ l plasmidu pOPINTTGneo_PIN1 (c = 45 ng/ μ l) nebo pOPINTTGneo_PIN7 (c = 25 ng/ μ l). Směsi byly ponechány inkubovat 10 min při 0 °C. Poté byly směsi pipetovány na Petriho misky s LB agarem obsahujícím 100 μ g/ml ampicilinu, které byly předehřáty na 37 °C, a rozetřeny bakteriologickou kličkou. Petriho misky byly inkubovány 24 h při 37 °C.

Vzniklé kolonie byly rozetřeny v 5 ml LB media a přeneseny vždy do 500 ml LB media s obsahem 100 μ g/ml ampicilinu předehřátého na 37 °C ve 2l Erlenmeyerově baňce. Média byla inkubována 16 h na orbitální třepačce při 37 °C a 220 ot./min.

4.3.2 Velkoobjemová příprava plasmidové DNA

Byla použita souprava Nucleobond Xtra Maxi Kit. Bakteriální kultury byly rozděleny vždy do dvou 250ml kyvet a centrifugovány 15 min při $6000 \times g$, 4 °C. Pelety byly resuspendovány ve 20 ml TES pufru, přeneseny do 30ml kyvet typu Oak Ridge a centrifugovány 10 min při $14000 \times g$, 4 °C. Dále bylo postupováno dle návodu výrobce [51]. Pelety byly sušeny ve vakuové odparce po dobu 20 min a resuspendovány v 1 ml sterilní dH₂O.

4.3.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky. Plasmidová DNA byla 300× zředěna v dH₂O. Pokud je absorbance DNA při 260 nm rovna jedné, je koncentrace plasmidové DNA rovna přibližně 50 µg/ml. Je-li poměr A_{260}/A_{280} roven 1,8, jedná se o čistou DNA. Je-li tento poměr nižší, jedná se o kontaminaci DNA proteiny. Pokud je poměr vyšší než 2,0, je v roztoku přítomna také RNA.

4.3.4 Kontrola celistvosti plasmidů

Celistvost plasmidů byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy v 1,2% gelu. Gel byl připraven smícháním 65 ml TAE pufru (1× konc.) a 0,78 g agarosy. Směs byla zahřívána asi 1,5 min v mikrovlnné troubě. Po zchlazení na teplotu asi 50 °C byly přidány 3 µl GoogView, gel byl nalit do elektroforetické vany a byl do něj vložen hřebínek. Gel byl ponechán ztuhnout a poté byl přelit 200 ml dH₂O, dále bylo k anodě nalito 60 ml TAE pufru (1× konc.) a ke katodě bylo nalito 180 ml TAE pufru (1× konc.). Do jamek gelu bylo pipetováno 5 µl 1kb Quick Load DNA standardu a vzorky vzniklé smícháním 6,5 µl pOPINTTGneo_PIN7 a 0,65 µl STOP pufru (10× konc.); 11,1 µl pOPINTTGneo_PIN1 a 1,1 µl STOP pufru (10× konc.); 1 µl pOPINTTGneo_PIN7 a 5 µl STOP pufru (10× konc.); 1 µl pOPINTTGneo_PIN1 a 5 µl STOP pufru (10× konc.). Elektroforéza probíhala 15 min při 180 V. Plasmidy byly pozorovány pod UV lampou při 312 nm.

4.4 Práce s buněčnými liniemi

4.4.1 Rozmrazení buněčné linie HEK293T

Alikvot zmrazených buněk byl rozmrazen ve vodní lázni předehřáté na 37 °C a přenesen do 15ml sterilní zkumavky s 10 ml media ExCELL293 předehřátého na 37 °C. Suspenze byla centrifugována 5 min při $100 \times g$, 25 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 10 ml směsi medií F17 a ExCELL293 v poměru 1:1. Buňky byly přeneseny

na 10cm Petriho misku.

4.4.2 Počítání buněčné hustoty

K počítání buněčné hustoty bylo použito hemocytometru. Bylo odebráno vždy 20 μl buněčné kultury a v mikrozkuhavce zředěno 0,4% roztokem trypanové modři v PBS-TK dle potřeby. Po 5 minutové inkubaci bylo 20 μl směsi nanášeno na hemocytometr. Buňky byly spočítány ve všech devíti čtvercích, přičemž bylo rozlišeno, zda jsou buňky živé (průhledné) či mrtvé (modré). Celkový počet živých buněk v oblasti čtverců hemocytometru byl podělen počtem čtverců, vynásoben faktorem ředění a faktorem $1 \cdot 10^4$, tudíž jednotka buněčné hustoty odpovídá $1 \cdot 10^6$ buněk/ml. Viabilita byla zjištěna z celkového počtu živých buněk poděleného počtem mrtvých buněk a vynásobena stem. Jednotka poté odpovídá procentům.

4.4.3 Kultivace buněčné linie HEK293T

Buňky na Petriho misce byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Po dvou dnech byla buněčná kultura o hustotě $1,76 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ přenesena do 30 ml Ex/F17 media předehřátého na 37 °C ve 100ml čtverhranné lahvi s prodyšným víčkem. Buňky byly kultivovány v inkubátoru na orbitální třepačce při 37 °C, 5% CO₂ a 135 ot./min.

Kultivované buňky byly udržovány každé 3 - 4 dny. Buněčná kultura byla vždy ředěna čerstvým médiem Ex/F17 předehřátým na 37 °C na buněčnou hustotu $0,2 \cdot 10^6 - 0,6 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Buňky byly kultivovány v objemu 30 ml ve 100ml čtverhranných láhvích nebo v objemu 75 ml ve 250ml čtverhranných lahvičkách. K buněčným kulturám užívaným k produkci proteinů bylo vždy přidáno příslušné množství antibiotika G418.

4.4.4 Stabilní transfekce HEK293T buněčné linie

Jako transfekční činidlo byl použit 25kDa IPEI v hmotnostním poměru IPEI:DNA = 3:1. V 50ml zkumavkách s víčkem bylo centrifugováno vždy celkem $55 \cdot 10^6$ buněk po dobu 5 min při $100 \times g$, 25 °C. Pelety byly resuspendovány ve 27 ml media F17.

Transfekční směsi obsahovaly 64 μl plasmidu pOPINTTGneo_PIN1 ($c = 0,9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) nebo 108 μl plasmidu pOPINTTGneo_PIN7 ($c = 1,56 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, dle agarosové elektroforézy je však koncentrace přibližně 3 \times menší) a 1,2 ml sterilního PBS-TK. Směsi byly zfiltrány pomocí 0,22 μm sterilního filtru. Poté bylo přidáno 16,5 μl IPEI (10 \times konc.). Transfekční směsi byly inkubovány přesně 5 min a poté přidány k buněčným suspenzím. Suspenze byly inkubovány 4 h při 37 °C a poté bylo přidáno 27 ml media ExCELL293.

Den po transfekci bylo do každé suspenze přidáno antibiotikum G418 v koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$, 16 dní poté byla koncentrace G418 snížena na 800 $\mu\text{g/ml}$

4.5 Imunofluorescence

Při prvním pokusu byly použity buněčné kultury o hustotě $3,92 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (kultura transfekovaná plasmidem pOPINTTGneo_PIN1) a $3,53 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (kultura transfekovaná plasmidem pOPINTTGneo_PIN7). Při druhém pokusu byly použity buněčné kultury o hustotě $3,38 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (kultura transfekovaná plasmidem pOPINTTGneo_PIN1), $2,65 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (kultura transfekovaná plasmidem pOPINTTGneo_PIN7) a $3,79 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (netransfekovaná kultura). Časový odstup obou pokusů byl přibližně dva měsíce.

4.5.1 Permeabilizované buňky

Pracovní postup probíhal dle článku [52]. Byl odebrán vždy 1 ml ze všech buněčných suspenzí. Suspenze byly v mikrozkuřavce centrifugovány 5 min při $100 \times g$. Supernatant byl slit a pelety byly resuspendovány v 0,5 ml 4% paraformaldehydu v PBS-TK a inkubovány 30 min při pokojové teplotě. Suspenze byly centrifugovány 5 min při $100 \times g$ a pelety byly pomocí centrifugace dvakrát opláchnuty 0,5 ml PBS-TK. Poté bylo k suspenzím přidáno 200 μl 0,01% roztoku Triton X-100 v 1% BSA v PBS-TK. Směsi byly ponechány inkubovat 30 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace 5 min při $100 \times g$ a pelety byly jednou opláchnuty PBS-TK. Pelety byly resuspendovány v 0,5 ml roztoku primární kozí polyklonální IgG protilátky proti PIN1 v 1% BSA v PBS-TK ředěné v poměru 1:100 pro buňky exprimující transportér PIN1, resp. králičí protilátky proti PIN7 ředěné v poměru 1:500 pro buňky exprimující transportér PIN7. Suspenze byly inkubovány 1 h při pokojové teplotě. Poté byly suspenze centrifugovány 5 min při $100 \times g$ a třikrát opláchnuty 0,5 ml 1% BSA v PBS-TK. Pelety byly resuspendovány v 0,5 ml roztoku sekundární oslí protilátky proti kozímu IgG značené fluoroforem Alexa Fluor 488 v 1% BSA v PBS-TK v poměru 1:1000 pro buňky exprimující transportér PIN1, resp. kozí protilátky proti králičímu IgG značené fluoroforem Alexa Fluor 488 v poměru 1:1000 pro buňky exprimující transportér PIN7. Směsi byly inkubovány 30 min při pokojové teplotě. Suspenze byly centrifugovány 5 min při $100 \times g$ a třikrát opláchnuty v 0,5 ml PBS-TK. Na podložní sklo bylo nanášeno několik kapek buněčné suspenze a buňky byly pozorovány konfokálním mikroskopem. Tato práce probíhala ve spolupráci s RNDr. Martinou Laňkovou, Ph.D. v Laboratoři hormonálních regulací u rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

4.5.2 Nepermeabilizované buňky

Pracovní postup probíhal dle článku [52]. Byl odebrán vždy 1 ml ze všech buněčných suspenzí. Suspenze byly v mikrozkuhavce centrifugovány 5 min při $100 \times g$. Supernatant byl slit a pelety byly resuspendovány v 0,5 ml 1% paraformaldehydu v PBS-TK a inkubovány 10 min při pokojové teplotě. Suspenze byly centrifugovány 5 min při $100 \times g$ a pelety byly pomocí centrifugace dvakrát opláchnuty 0,5 ml PBS-TK. Pelety byly resuspendovány v 0,5 ml roztoku primární kozi polyklonální IgG protilátky proti PIN1 v 1% BSA v PBS-TK ředěné v poměru 1:100 pro buňky exprimující transportér PIN1, resp. králičí protilátky proti PIN7 ředěné v poměru 1:500 pro buňky exprimující transportér PIN7. Suspenze byly inkubovány 1 h při pokojové teplotě. Poté byly suspenze centrifugovány 5 min při $100 \times g$ a třikrát opláchnuty 0,5 ml 1% BSA v PBS-TK. Pelety byly resuspendovány v 0,5 ml roztoku sekundární oslí protilátky proti kozímu IgG značené fluoroforem Alexa Fluor 488 v 1% BSA v PBS-TK v poměru 1:1000 pro buňky exprimující transportér PIN1, resp. kozí protilátky proti králičímu IgG značené fluoroforem Alexa Fluor 488 v poměru 1:1000 pro buňky exprimující transportér PIN7. Směsi byly inkubovány 30 min při pokojové teplotě. Suspenze byly centrifugovány 5 min při $100 \times g$ a třikrát opláchnuty v 0,5 ml PBS-TK. Na podložní sklo bylo nanášeno několik kapek buněčné suspenze a buňky byly pozorovány konfokálním mikroskopem. Tato práce probíhala ve spolupráci s RNDr. Martinou Laňkovou, Ph.D. v Laboratoři hormonálních regulací u rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

4.6 Akumulace auxinů a testování inhibitorů přenosu auxinu

Pro akumulační testy byly vždy použity buněčné suspenze HEK293T transfekované plasmidy pOPINTTGneo_PIN1, pOPINTTGneo_PIN7 a buňky netransfekované jako kontrola. Suspenze byly centrifugovány 5 min, $100 \times g$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$, poté byly pelety resuspendovány v 5 ml PBS(5,5) a znovu centrifugovány. Následně byly pelety resuspendovány v takovém objemu PBS(5,5), aby buněčné suspenze obsahovaly vždy $6 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ buněk. Akumulační testy byly prováděny ve spolupráci s RNDr. Martinou Laňkovou, Ph.D. v Laboratoři hormonálních regulací u rostlin v Ústavu experimentální botaniky AV ČR

4.6.1 Akumulace [^3H]IAA

K buněčné suspenzi bylo přidáno [^3H]IAA ve výsledné koncentraci 10 nM. Odběry činily vždy 0,5 ml suspenze. Nejprve byl proveden $4 \times$ nultý odběr. Následovaly vždy $4 \times$ čtyři

odběry s časovým odstupem přibližně 3 minut. Odebrané množství suspenze bylo ihned odsáto na filtru a filtr byl vložen do scintilační nádoby. K filtru bylo dále přidáno 0,5 ml 96% ethanolu a vše bylo 30 minut inkubováno při pokojové teplotě. Do nádoby byly přidány 4 ml scintilačního roztoku a filtr byl inkubován 20 minut při pokojové teplotě a za stálého třepání. Scintilační nádoby byly vloženy do kazet a aktivita měřena scintilátorem vždy po dobu 2 minut.

4.6.2 Akumulace [³H]IAA a NPA

K buněčné suspenzi bylo přidáno [³H]IAA ve výsledné koncentraci 10 nM. Odběry činily vždy 0,5 ml suspenze. Suspenze byla rozdělena do dvou kádinek. Do jedné bylo přidáno NPA o výsledné koncentraci 10 μM, do druhé DMSO také o koncentraci 10 μM. Suspenze byly ponechány 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Následovaly vždy 4× čtyři odběry s časovým odstupem přibližně 7 minut. Odebrané množství suspenze bylo ihned odsáto na filtru a filtr byl vložen do scintilační nádoby. K filtru bylo dále přidáno 0,5 ml 96% ethanolu a vše bylo 30 minut inkubováno při pokojové teplotě. Do nádoby byly přidány 4 ml scintilačního roztoku a filtr byl inkubován 20 minut při pokojové teplotě a za stálého třepání. Scintilační nádoby byly vloženy do kazet a aktivita byla měřena scintilátorem vždy po dobu 2 minut.

4.6.3 Akumulace [³H]IAA a [³H]2,4-D

Buněčná suspenze byla rozdělena do dvou kádinek. Do jedné bylo přidáno [³H]IAA ve výsledné koncentraci 10 nM a do druhé [³H]2,4-D také o výsledné koncentraci 10 nM. Odběry činily vždy 0,5 ml suspenze. Nejprve byl proveden 4× nultý odběr. Následovaly vždy 4× čtyři odběry s časovým odstupem přibližně 6 minut. Odebrané množství suspenze bylo ihned odsáto na filtru a filtr byl vložen do scintilační nádoby. K filtru bylo dále přidáno 0,5 ml 96% ethanolu a vše bylo 30 minut inkubováno při pokojové teplotě. Do nádoby byly přidány 4 ml scintilačního roztoku a filtr byl inkubován 20 minut při pokojové teplotě a za stálého třepání. Scintilační nádoby byly vloženy do kazet a aktivita byla měřena scintilátorem vždy po dobu 2 minut.

4.6.4 Akumulace [³H]NAA

K buněčné suspenzi bylo přidáno [³H]NAA ve výsledné koncentraci 10 nM. Odběry činily vždy 0,5 ml suspenze. Bylo provedeno vždy deset odběrů. Odebrané množství suspenze bylo ihned odsáto na filtru a filtr byl vložen do scintilační nádoby. K filtru bylo dále přidáno

0,5 ml 96% ethanolu a vše bylo 30 minut inkubováno při pokojové teplotě. Do nádoby byly přidány 4 ml scintilačního roztoku a filtr byl inkubován 20 minut při pokojové teplotě a za stálého třepání. Scintilační nádoby byly vloženy do kazet a aktivita byla měřena scintilátorem vždy po dobu 2 minut.

4.6.5 Akumulace [³H]NAA a NPA

K buněčné suspenzi bylo přidáno [³H]NAA ve výsledné koncentraci 10 nM. Odběry činily vždy 0,5 ml suspenze. Nejprve byl proveden 4× nultý odběr. Následně byla suspenze rozdělena do dvou kádinek. Do jedné bylo přidáno NPA o výsledné koncentraci 10 μM a do druhé DMSO také o výsledné koncentraci 10 μM. Poté byly provedeny vždy 4× čtyři odběry s časovým odstupem přibližně 3 minut. Odebrané množství suspenze bylo ihned odsáto na filtru a filtr byl vložen do scintilační nádoby. K filtru bylo dále přidáno 0,5 ml 96% ethanolu a vše bylo 30 minut inkubováno při pokojové teplotě. Do nádoby byly přidány 4 ml scintilačního roztoku a filtr byl inkubován 20 minut při pokojové teplotě a za stálého třepání. Scintilační nádoby byly vloženy do kazet a aktivita byla měřena scintilátorem vždy po dobu 2 minut.

4.6.6 Akumulace [³H]NAA, CHPAA a BFA

K buněčné suspenzi bylo přidáno [³H]NAA ve výsledné koncentraci 10 nM. Odběry činily vždy 0,5 ml suspenze. Nejprve byl proveden 4× nultý odběr. Následně byla suspenze rozdělena do tří kádinek. Do jedné bylo přidáno BFA o výsledné koncentraci 20 μM, do druhé CHPAA o výsledné koncentraci 10 μM a DMSO o výsledné koncentraci 10 μM a do třetí DMSO také o výsledné koncentraci 10 μM. Poté byly provedeny vždy 4× čtyři odběry s časovým odstupem přibližně 10 minut. Odebrané množství suspenze bylo ihned odsáto na filtru a filtr byl vložen do scintilační nádoby. K filtru bylo dále přidáno 0,5 ml 96% ethanolu a vše bylo 30 minut inkubováno při pokojové teplotě. Do nádoby byly přidány 4 ml scintilačního roztoku a filtr byl inkubován 20 minut při pokojové teplotě a za stálého třepání. Scintilační nádoby byly vloženy do kazet a aktivita byla měřena scintilátorem vždy po dobu 2 minut.

5 VÝSLEDKY

5.1 Mutace restrikčních míst v PIN7

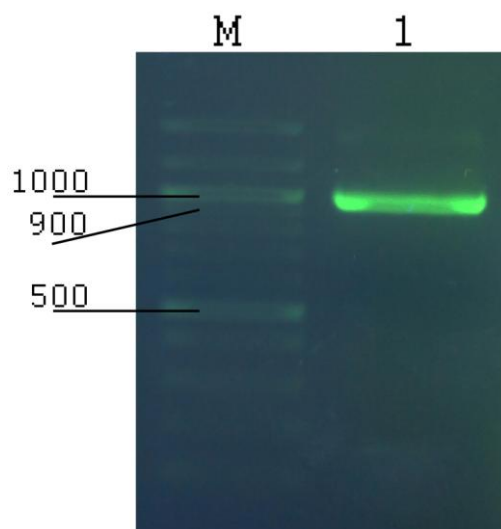
Jako výchozí materiál byl použit plasmid pJET_PIN7 poskytnutý RNDr. Martinou Laňkovou, Ph.D. z Laboratoře hormonálních regulací u rostlin Ústavu experimentální botaniky, AV ČR a plasmid pTW5_PIN1, který byl připraven již v rámci bakalářské práce.

Jelikož DNA sekvence PIN7 obsahovala tři restrikční místa pro endonukleasu AgeI (obr. 13), byla tato místa mutována pomocí PCR amplifikace (4.1). Vzniklé úseky byly stejným způsobem spojeny dohromady. Správnost PCR amplifikace byla vždy ověřena agarosovou elektroforézou (obr. 14 - 18, str. 42 - 43).

```
ATGATCACATGGCAGACCTCTACACCGTCCTCACGGCGGTGATACCACTCTACGTAGCCATGATCCTCGCTTACGGCTCAGT
CCGGTGGTGGAAAACTTCTCACCAGACCAATGTTCCGGCATAAACCGCTTCGTGCGTATTTTCGCCGTCCTCTTCTCTCTT
TCCACTTCATCTCCTCAAACAATCCTTACGCAATGAATCTCCGATTCATCGCAGCCGATACACTCCAAAACTAATCATGCTC
ACTCTCCTAATCATCTGGGCTAACTTCACTCGCTCCGGTAGTCTTGAATGGAGCATCACAATCTTCTCTCTTTCAACACTTCC
CAACTCTCGTTATGGGAATACCTCTCTTGATCGCCATGTACGGAGAATATTCGGGCTCACTCATGGTTCAGATCGTTGTTC
TTCAGTGTATAATCTGGTACACGCTTCTTCTTTCTTTTCGAATACAGAGGAGCTAAGATCTTGATCATGGAACAGTTTCCA
GAGACTGGTGTTCGATTGTATCGTTCAAAGTTGAGTCCGATGTTGTTTCTTTAGATGGACATGATTTTCTTGAAACTGATGC
TCAAATCGGTGACGATGGTAAGCTTTCATGTTACGGTGAGAAAATCAAACGCTTCTCGGAGATCTTTTTACGGTGGTGGTGGTA
CTAATATGACTCCTCGTCCGTCTAATCTCACCGGAGCTGAGATTTATAGTCTTAACACTACTCCAAGAGGATCTAACTTCAAT
CATTCTGATTTTTACTCTATGATGGGGTTTCCCGGTGGCCGGCTTTCGAACTTTGGTCCGGCGGATATGTACTCTGTTACGTC
CTCGAGAGGACCTACTCCTAGACCTTCGAATTTTGAGGAGAGTTGTGCTATGGCTTCTTCGCCAAGATTCGGGTATTACCCGG
GAGGAGCTCCCGGTCGTACCCAGCTCCTAATCCGGAGTTTTCTACCGGTAAATAAAACCGGTAGTAAAGCTCCAAAAGAGAAT
CATCATCATGTAGGAAAATCAAATAGTAATGATGCTAAGGAGCTTCATATGTTTGGTGGGGATCCAACGGATCACCCGTTTC
GGACCGAGCTGGTCTTCAAGTTGATAATGGAGCCAATGAACAAGTCGAAAAATCCGATCAAGGCGGTGAAAAGAGATTGCAA
TGTTGATCTCTGATCATACTCAAATGGTGAAAACAAAGCTGGTCCGATGAACGGGGACTATGGCGGGGAAGAAGAGTCGGAG
AGGGTAAAGGAAGTGCCTAACGGACTACACAAGCTTCGGTGTAACTCCACAGCAGAGCTAAACCCTAAAGAAGCTATAGAAAC
GGGTGAAACTGTACCGGTAAAACATATGCCACCAGCGAGTGTGATGACTCGGCTGATATTGATAATGGTGTGGAGGAACTCA
TAAGAAACCCAAACACTTACTCTAGTCTCATTGGTCTCATTGGGCTCTTGTGCTTTCAGGTGGGATGTGGCAATGCCTAAA
ATTATTCAACAATCAATCTCAATCTTTCTGATGCTGGTCTTGGTATGGCAATGTTCAAGTTCAGTTGGGGTGTTCATGGCATTGCA
ACCGAAATTAATTGCTTGCAGAAATTCGACGGCGACTTTTGCATGGCGGTGAGATCTTTACTGGACCAGCGGTAATGGCCG
TGGCAGCAATGGCTATTGGATTACGTGGAGACCTATGCGTGTGGCCATTGTTCAAGCTGCATTGCCTCAAGGGATCGTGCCG
TTTGTGTTTGCAAAAGAGTATAATGTTTCATCCCGCAATCTTGAGTACAGGGTAATATTTGGAATGCTTATCGCACTACCGAT
TACACTTGTTTACTACATTTTACTCGGGCTATAA
```

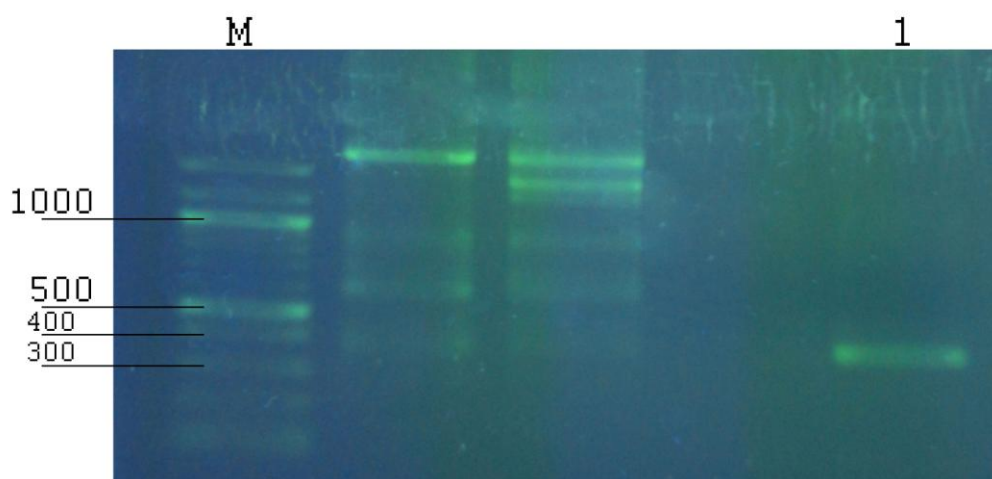
Obr. 13: Sekvence PIN7

Zeleně je vyznačen start kodon; **červeně** stop kodon; **růžově** mutovaná restrikční místa pro endonukleasu AgeI; podtržena jsou místa nasedání primerů PIN7_FW a PIN7_REV; podtrženo je místo nasedání primerů PIN7a_FW a PIN7a_REV; podtrženo je místo nasedání primerů PIN7b_FW a PIN7b_REV; **žlutě** je vyznačena část sekvence, která chybí v mutované verzi genu



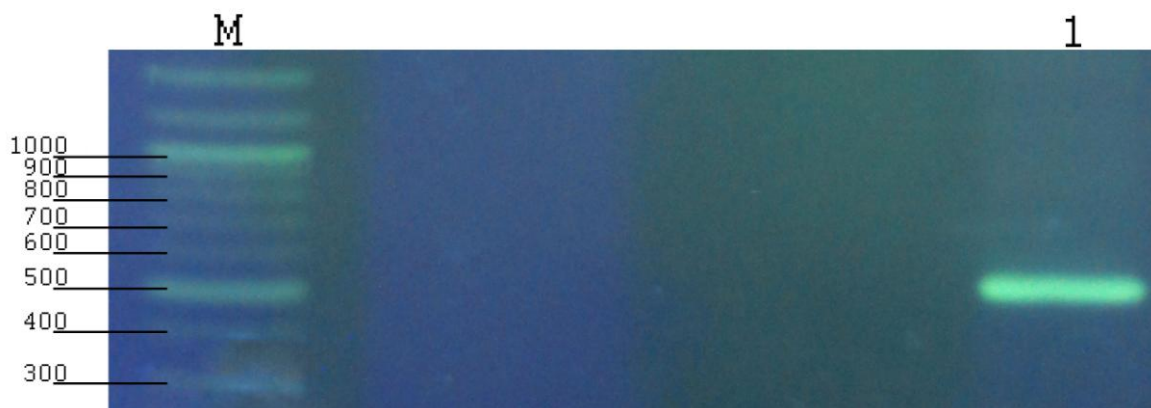
Obr. 14: Mutace restrikčního místa v úseku PIN7_FW - PIN7a_REV

Dráha M představuje 100bp DNA standard, v dráze 1 se nachází PCR produkt (očekávaná velikost je 979 bp)



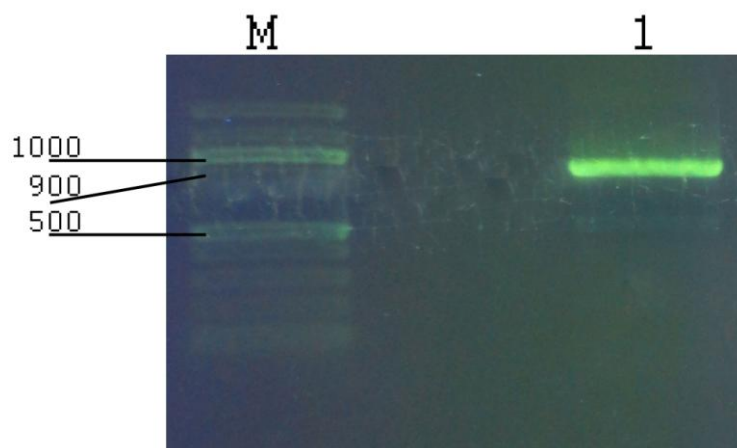
Obr. 15: Mutace restrikčního místa v úseku PIN7a_FW - PIN7b_REV

Dráha M představuje 100bp DNA standard, dráha 1 představuje PCR produkt (očekávaná velikost je 408 bp)



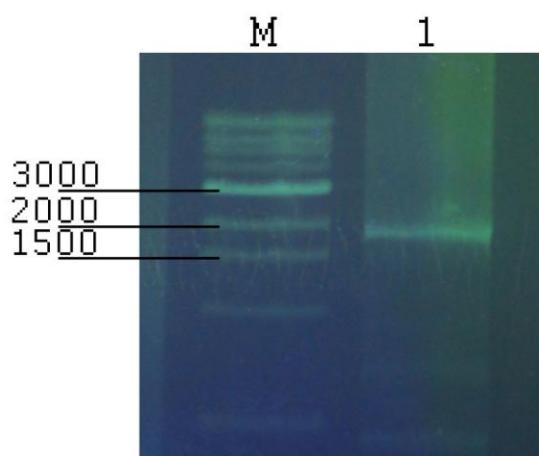
Obr. 16: Mutace restrikčního místa v úseku PIN7b_FW - PIN7_REV

V dráze M se nachází 100bp DNA standard, v dráze se nachází PCR produkt (očekávaná velikost je 528 bp)



Obr. 17: Spojení mutovaných úseků PIN7a_FW - PIN7b_REV a PIN7b_FW - PIN7_REV

V dráze M se nachází 100bp DNA standard, v dráze 1 PCR produkt (očekávaná velikost je 936 bp)



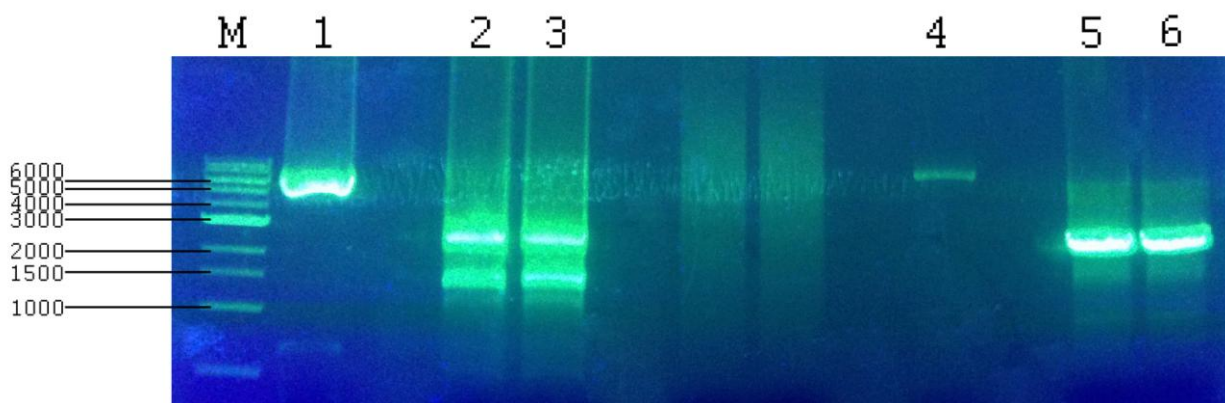
Obr. 18: Spojení celého PIN7

V dráze M se nachází 1kb DNA standard, v dráze 1 PCR produkt (očekávaná velikost je 1842 bp)

5.2 Příprava plasmidové DNA

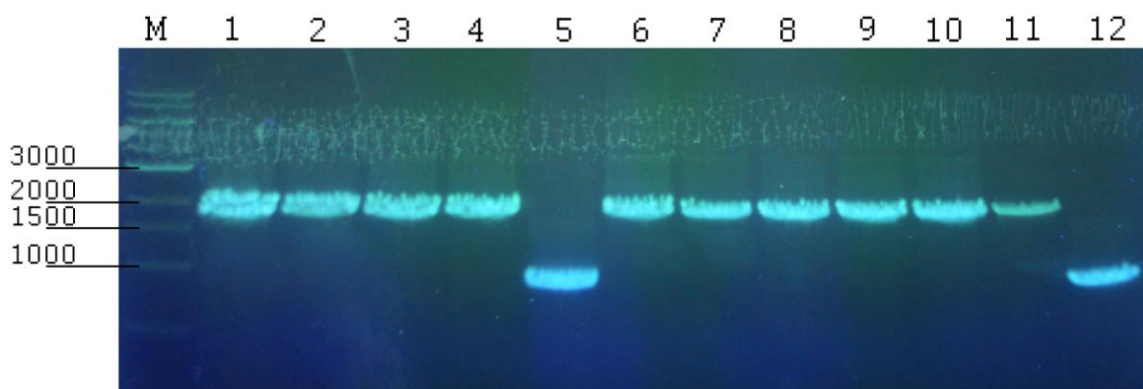
Inzert PIN7 byl klonován do plasmidu pTW5. Tato vzniklá plasmidová DNA byla následně sekvenována, přičemž bylo zjištěno, že v původní aminokyselinové sekvenci chybí čtyři AMK (viz. obr. 13, str. 41). Bylo zjištěno, že se jedná o přirozeně se vyskytující isoformu PIN7 (publikováno v [53]).

Plasmidy pTW5_PIN7 a pTW5_PIN1 byly použity jako výchozí materiály pro přípravu plasmidové DNA použité k přípravě stabilních linií HEK293. Pomocí PCR amplifikace byla plasmidová DNA upravena (4.2.1, obr. 19) tak, aby byla vhodná pro klonování do expresního vektoru pOPINTTGneo (obr. 22 - 23, str. 46 - 47). Inzerty byly vyčištěny pomocí kitu (4.2.2) a ligovány do vektoru pomocí komerční směsi InFusion (4.2.3) a touto ligační směsí byly transformovány kompetentní bakterie *Escherichia coli* ZH5a (4.2.4). Bakterie byly kultivovány na LB agaru a poté byla provedena PCR z kolonií (4.2.5, obr. 20, str. 45). Z pozitivních klonů (dráhy 1 - 4 a 6 - 11) byl vybrán vždy jeden pro každý vzorek a byla izolována plasmidová DNA (4.2.6), která byla následně sekvenována (4.2.7). Z důvodu velkého počtu bazí obou konstruktů byly využity také vnitřní primery. Všechny sekvenace daného konstruktů byly proloženy, a tím byla zjištěna správnost obou sekvencí.



Obr. 19: Úprava plasmidové DNA pomocí PCR

Dráha M představuje 1kb DNA standard, ve dráze 1 se nachází plasmid pTW5_PIN1, dráhy 2 - 3 obsahují PCR produkt konstruktů PIN1 (očekávaná velikost je 1863 bp), dráha 4 obsahuje plasmid pTW5_PIN7, ve dráhách 5 - 6 se nachází PCR produkt konstruktů PIN7 (očekávaná velikost je 1842 bp)

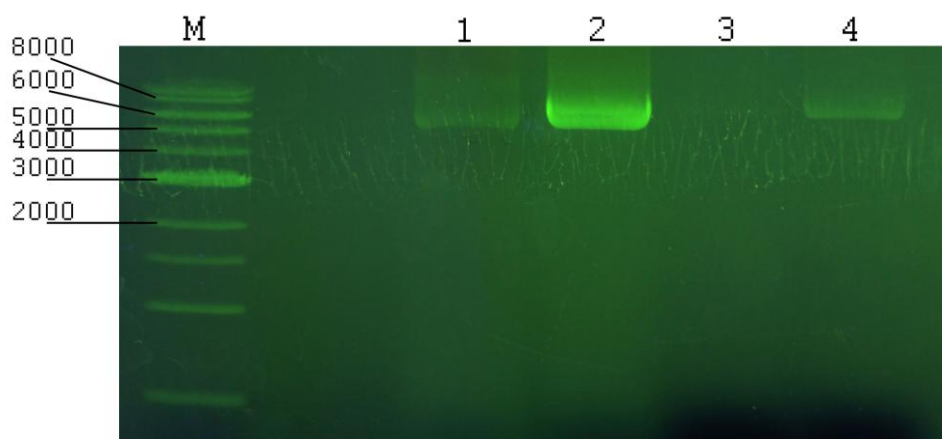


Obr. 20: PCR z kolonií

V dráze M se nachází 1kb DNA standard, dráhy 1 - 6 obsahují vzorky pro konstrukt PIN1 (očekávaná velikost je 1863 bp), dráhy 7 - 12 obsahují vzorky pro konstrukt PIN7 (očekávaná velikost je 1842 bp)

5.3 Příprava zásobního množství plasmidů

Kompetentní bakterie *E. coli* ZH5a. byly transformovány připravenými plasmidy a následně kultivovány vždy v 500 ml LB media (4.3.1). Pro velkoobjemovou přípravu plasmidové DNA byla použita komerční souprava (4.3.2). Celistvost vzniklých plasmidů byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy (4.3.4, obr. 21). Koncentrace a čistota plasmidové DNA byla změřena spektrofotometricky (4.3.3, Tab. 1, str. 46). Pravděpodobně došlo ke kontaminaci plasmidové DNA pOPINTTGneo_PIN1 bílkovinami, jelikož poměr A_{260}/A_{280} byl nižší než 1,8 (poměr klesá díky větší absorpci světla bílkovinami při 280 nm).

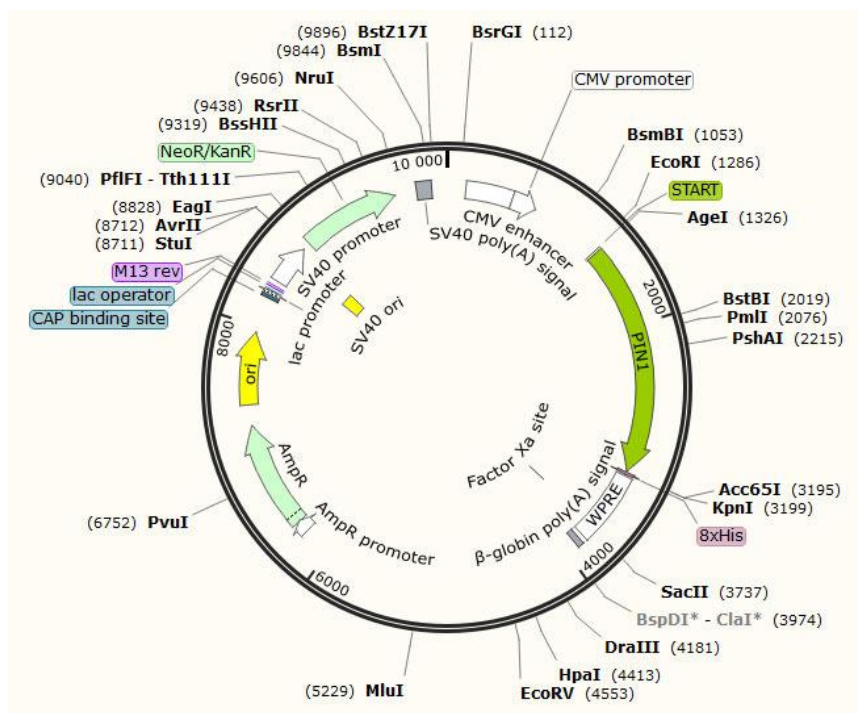


Obr. 21: Kontrola celistvosti plasmidů

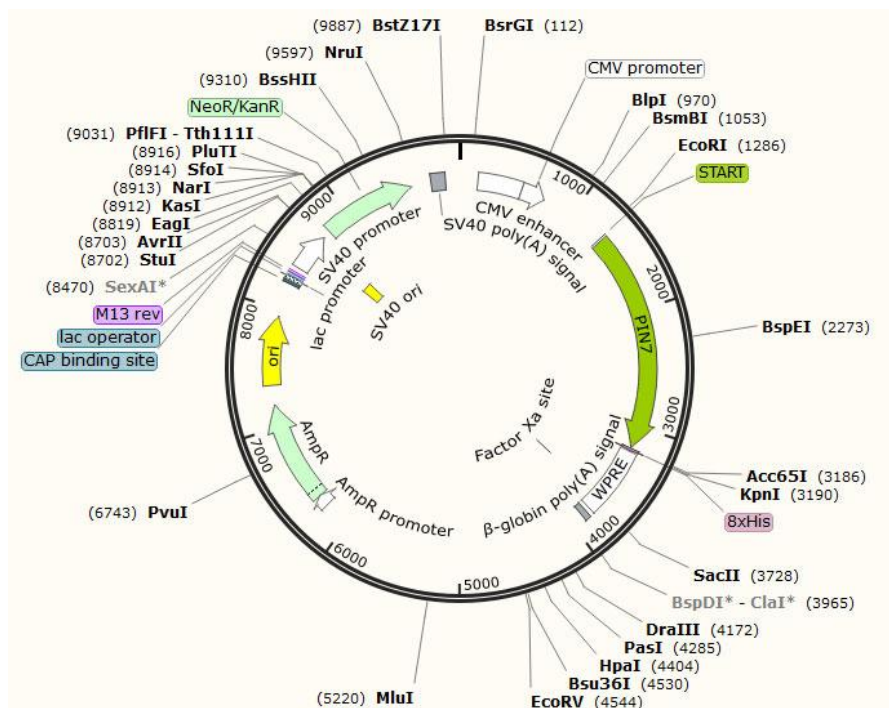
V dráze M se nachází 1kb DNA standard, dráha 1 obsahuje plasmid pOPINTTGneo_PIN7 (nanáška 10 µg, 9996 bp) a dráha 2 plasmid pOPINTTGneo_PIN1 (nanáška 10 µg, 10005 bp), dráha 3 obsahuje plasmid pOPINTTGneo_PIN7 (c = 1,56 µg/µl, 9996 bp) a dráha 4 plasmid pOPINTTGneo_PIN1 (c = 0,9 µg/µl, 10005 bp)

Tab. 1: Stanovení koncentrace a čistoty plasmidů

Plasmid	Koncentrace [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Čistota
pOPINTTGneo_PIN1	0,9	1,54
pOPINTTGneo_PIN7	1,56	1,76

**Obr. 22: Plasmid pOPINTTGneo_PIN1**

Vložení PIN1 do expresního vektoru pOPINTTGneo včetně histidinové kotvy a WPRE signálu z původního vektoru pTW5



Obr. 23: Plasmid pOPINTTGeo_PIN7

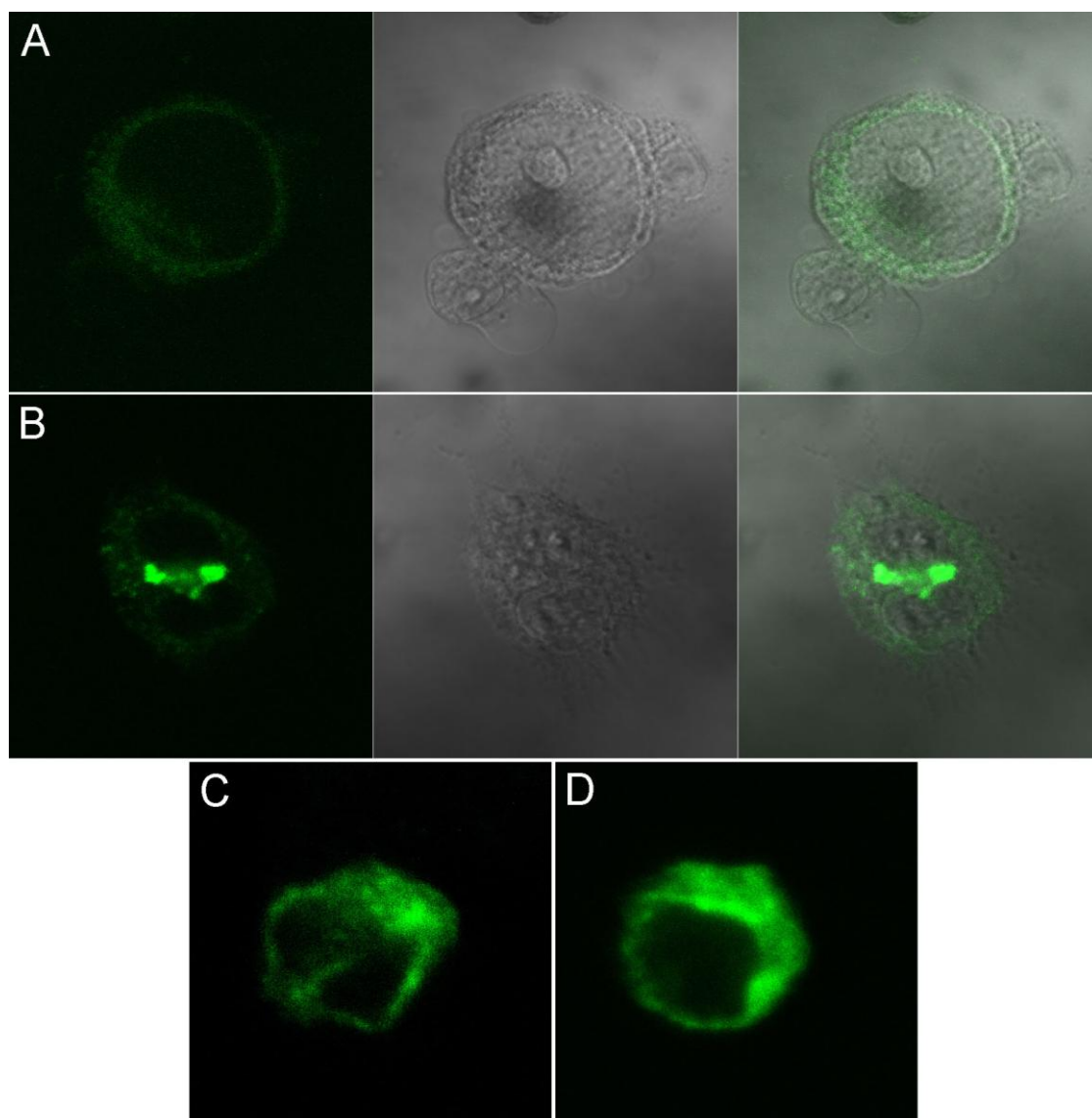
Vložení PIN7 do expresního vektoru pOPINTTGeo včetně histidinové kotvy a WPRE signálu z původního vektoru pTW5

5.4 Příprava stabilně transfekovaných buněčných linií

Buněčná linie HEK293T byla transfekována plasmidy pOPINTTGeo_PIN1 a pOPINTTGeo_PIN7 (4.4.4). K oběma kulturám bylo přidáno antibiotikum G418 v koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$, 16. den po transfekci byla koncentrace antibiotika snížena na 800 $\mu\text{g/ml}$. Viabilita buněčné kultury postupně klesala, což bylo způsobeno selekcí transfekovaných a netransfekovaných buněk. Po této selekci začala viabilita opět stoupat a udržovány byly pouze kultury obsahující plasmidy pOPINTTGeo_PIN1 a pOPINTTGeo_PIN7.

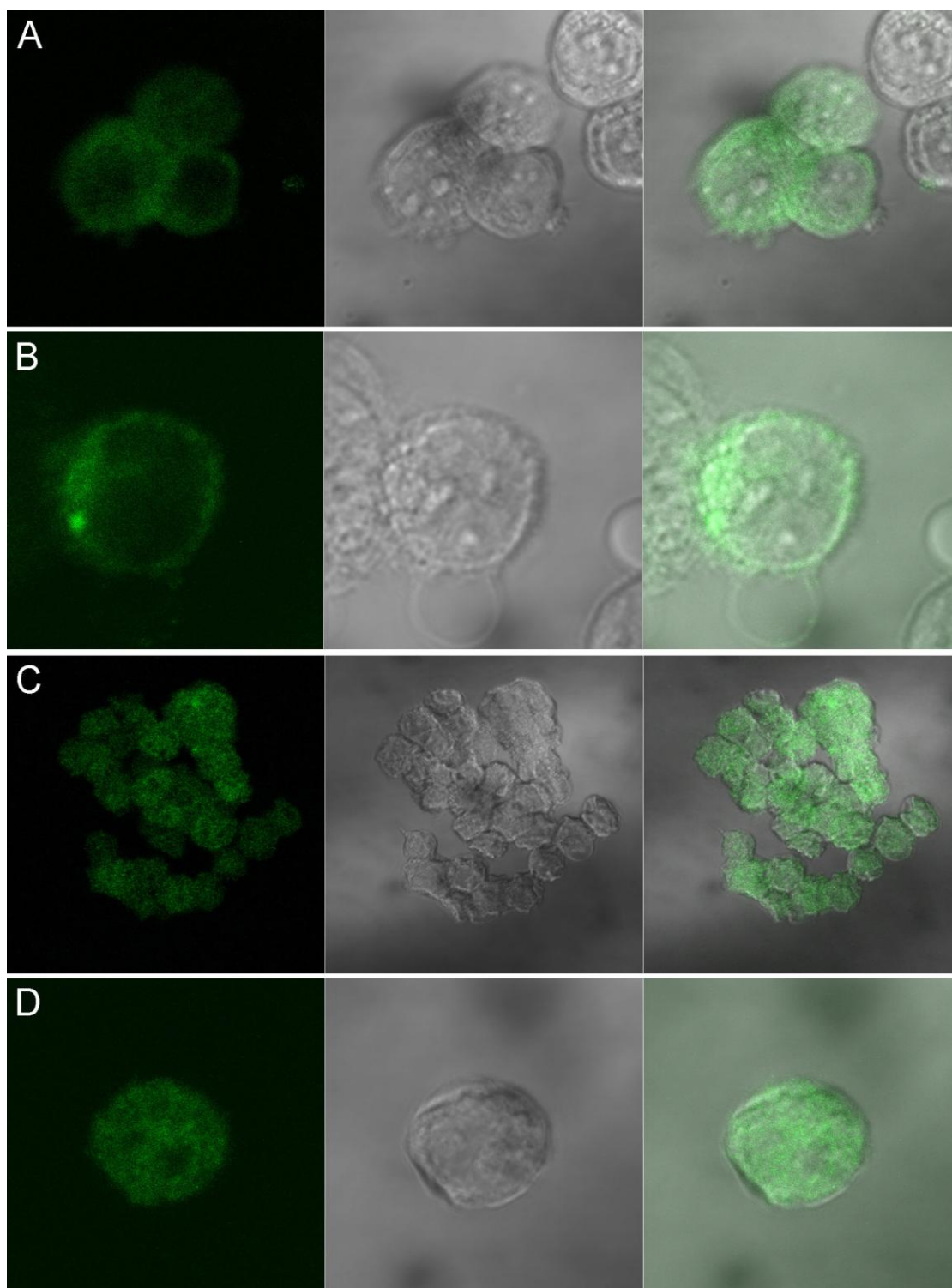
5.5 Imunofluorescence

Expese obou proteinů byla potvrzena pomocí imunofluorescence se specifickou primární protilátkou a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou. Pokus probíhal vždy ve dvou variantách. V jedné byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem a permeabilizovány detergentem (4.5.1), ve druhé byly pouze fixovány 1% paraformaldehydem a permeabilizovány nebyly (4.5.2). Imunofluorescence byla provedena nejprve před akumulací pokusy (obr. 24 - 25, str. 48 - 49) a poté znovu po nich (obr. 26 - 29, str. 50 - 53).



Obr. 24: Lokalizace transportéru PIN1

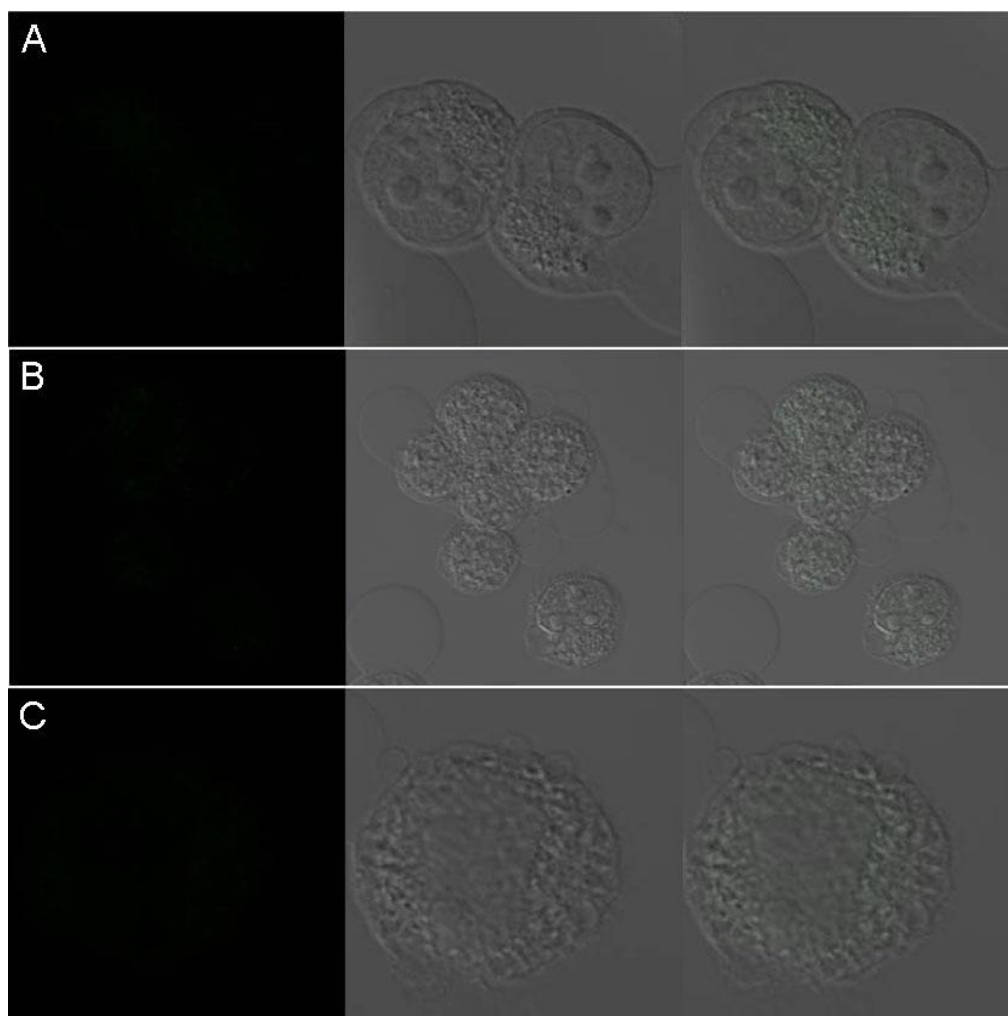
Buňky byly značeny primární protilátkou proti PIN1 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou. Fluorescence byla detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. A - nepermeabilizované buňky, vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů; B - nepermeabilizovaná dělicí se buňka, vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů; C, D - permeabilizované buňky



Obr. 25: Lokalizace transportéru PIN7

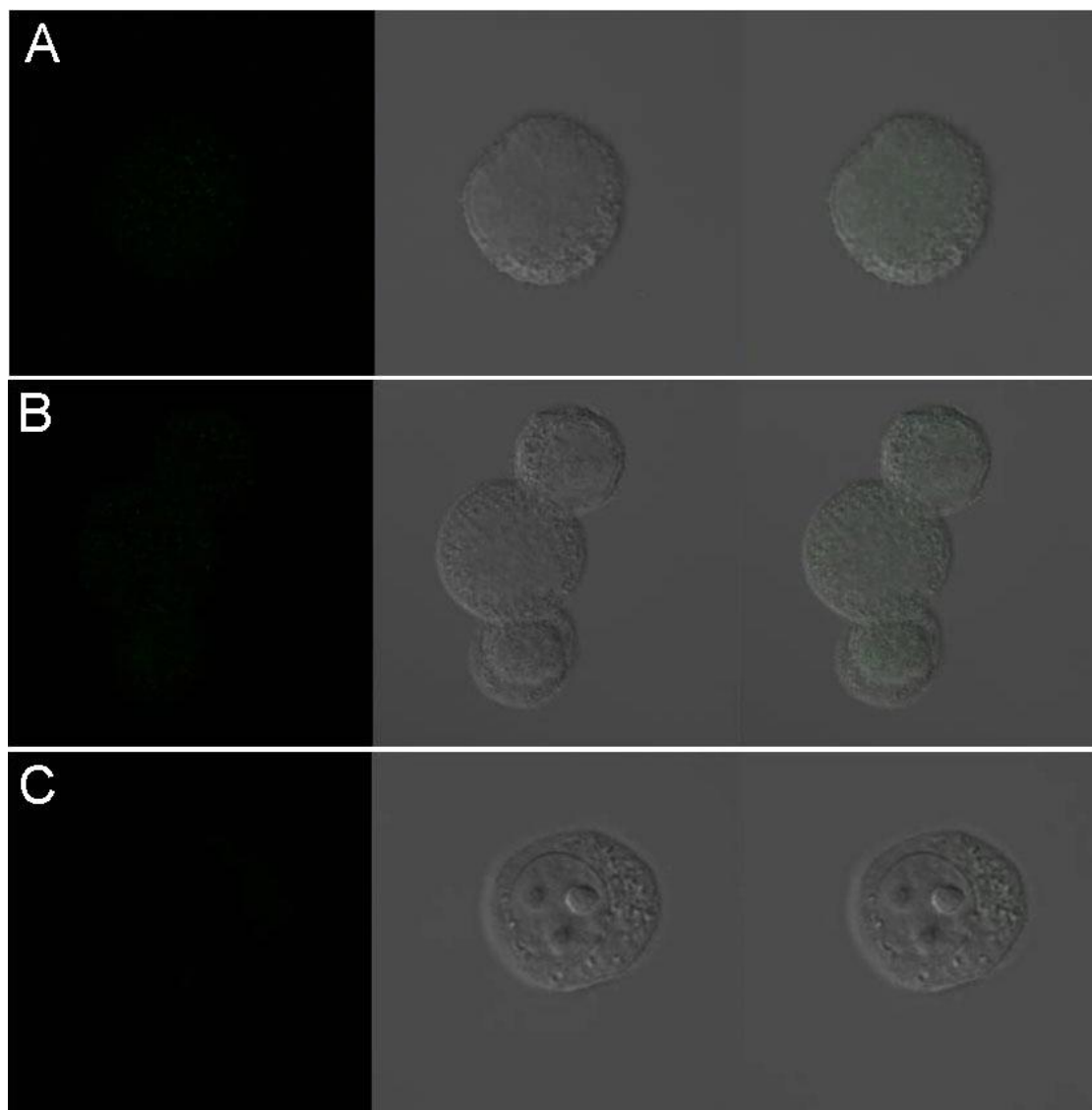
Buňky byly značeny primární protilátkou proti PIN7 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou. Fluorescence byla detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů. A, B - nepermeabilizované buňky; C, D - permeabilizované buňky

Imunofluorescence byla provedena po selekci transfekovaných a netransfekovaných buněk linií exprimujících transportéry PIN1 a PIN7. Je zde patrná lokalizace PIN1 na plasmatické membráně či v jejím okolí, a to u permeabilizované i nepermeabilizované varianty (obr. 24, str. 48). Protein PIN1 se také pravděpodobně kumuluje v místě dělení buňky (obr. 24b, str. 48). Lokalizace na plasmatické membráně je viditelná také u transportéru PIN7 (obr. 25, str. 49). Toto ovšem nelze potvrdit u permeabilizované varianty, jelikož z následujícího pokusu vyplývá, že v buňce může docházet k nespecifickému nasedání primární protilátky proti PIN7.



Obr. 26: Lokalizace transportéru PIN1 v nepermeabilizovaných buňkách

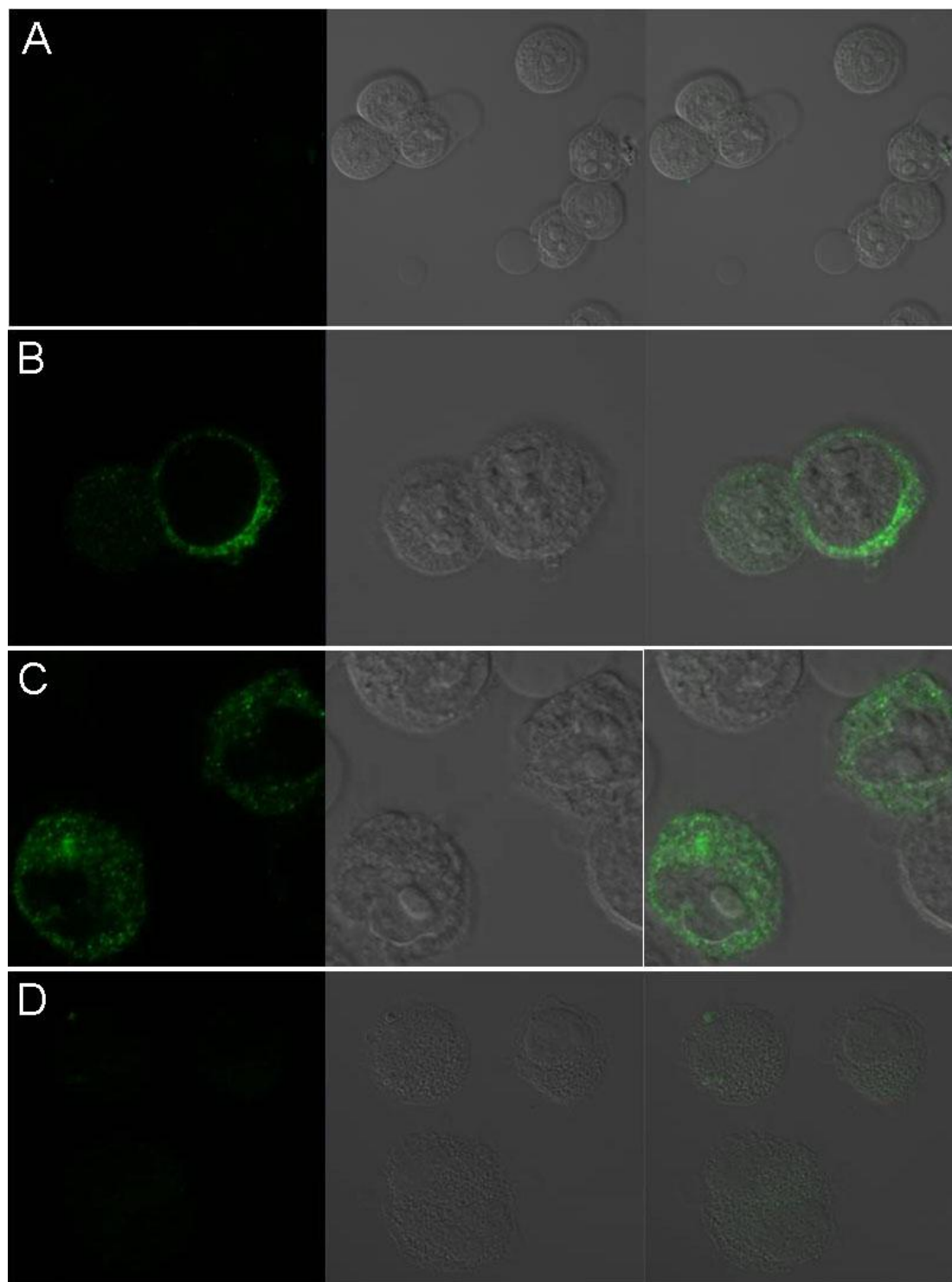
Fluorescence byla detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů. A - kontrolní netransfekované buňky značené primární protilátkou proti PIN1 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou B - buňky transfekované plasmidem pOPINTTGneo_PIN1 značené primární protilátkou proti PIN1 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou; C - buňky transfekované plasmidem pOPINTTGneo_PIN1 značené pouze fluorescenčně značenou sekundární protilátkou



Obr. 27: Lokalizace transportéru PIN1 v permeabilizovaných buňkách

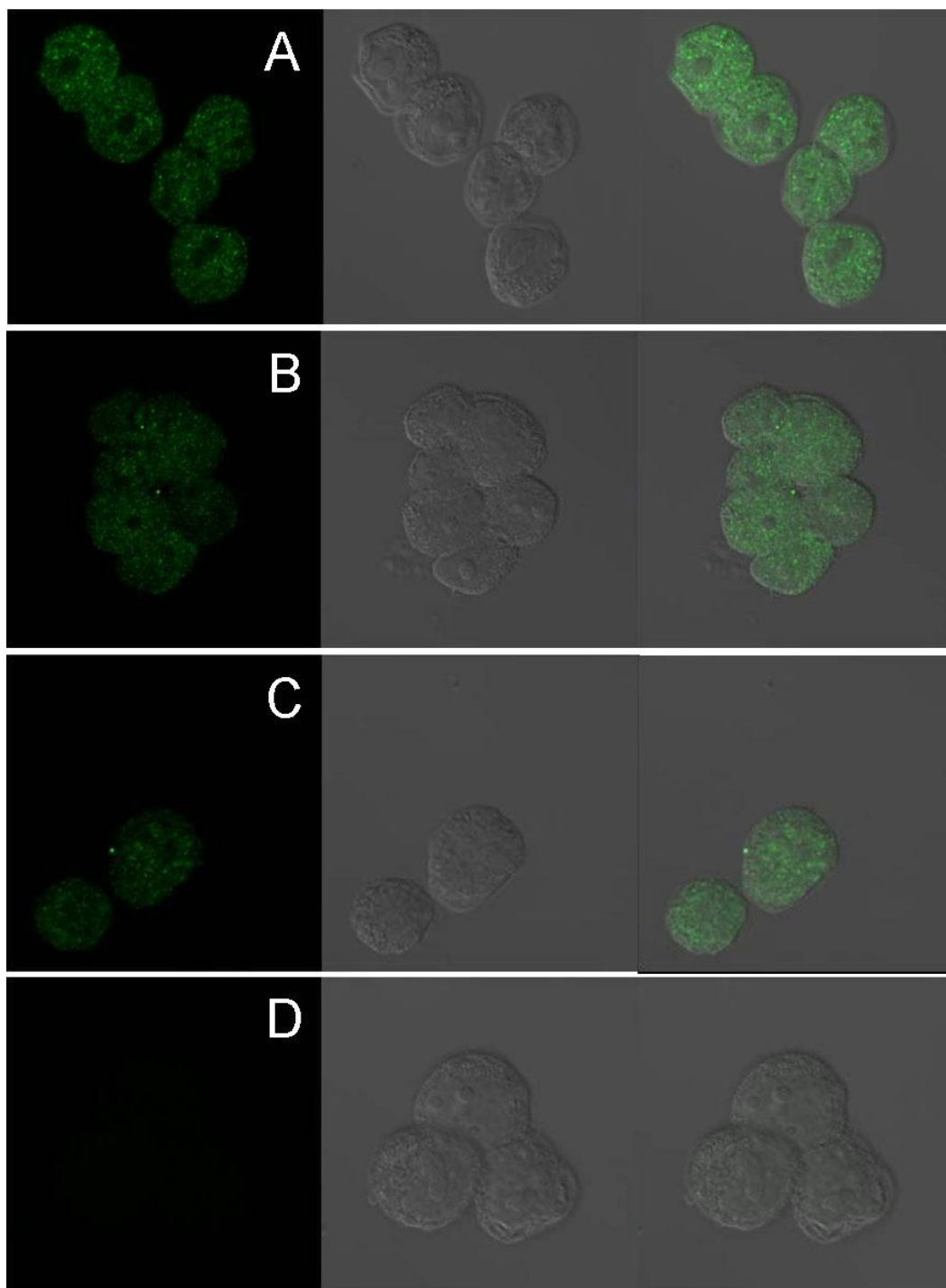
Fluorescence byla detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů. A - kontrolní netransfekované buňky značené primární protilátkou proti PIN1 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou B - buňky transfekované plasmidem pOPINTTGneo_PIN1 značené primární protilátkou proti PIN1 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou; C - buňky transfekované plasmidem pOPINTTGneo_PIN1 značené pouze fluorescenčně značenou sekundární protilátkou

Další imunofluorescenční pokus byl proveden přibližně po dvou měsících. Z výsledků tohoto experimentu vyplývá, že pravděpodobně dochází k utišení exprese proteinů. Exprese proteinu PIN1 byla patrně úplně zastavena, tudíž nebyl detekován žádný signál (obr. 26 - 27, str. 50 - 51).



Obr. 28: Lokalizace transportéru PIN7 v nepermeabilizovaných buňkách

Fluorescence byla detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů. A - kontrolní netransfekované buňky značené primární protilátkou proti PIN7 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou B, C - buňky transfekované plasmidem pOPINTTGeo_PIN7 značené primární protilátkou proti PIN7 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou; D - buňky transfekované plasmidem pOPINTTGeo_PIN7 značené pouze fluorescenčně značenou sekundární protilátkou



Obr. 29: Lokalizace transportéru PIN7 v permeabilizovaných buňkách

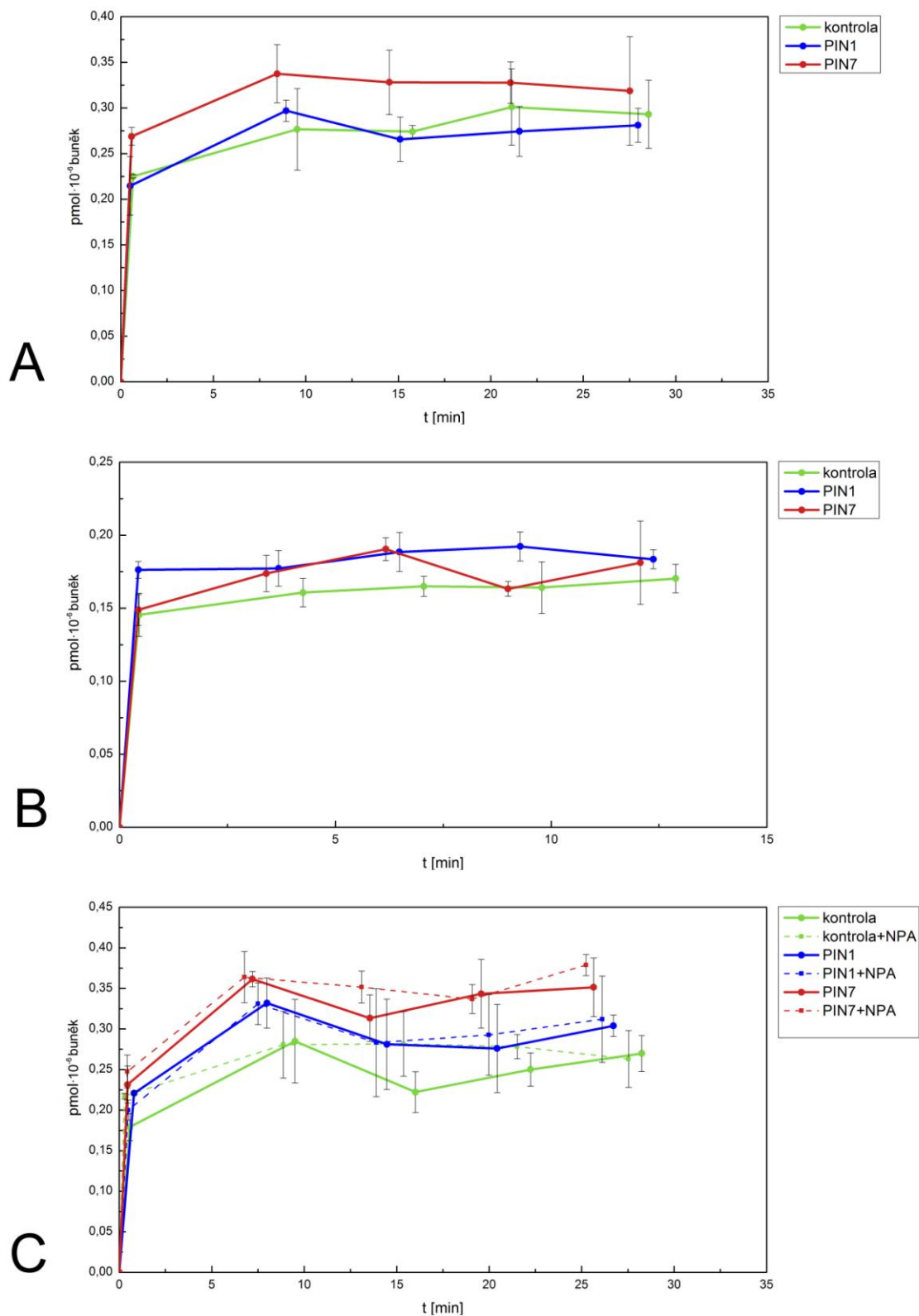
Fluorescence byla detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů. A - kontrolní netransfekované buňky značené primární protilátkou proti PIN7 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou B, C - buňky transfekované plasmidem pOPINTTGneo_PIN7 značené primární protilátkou proti PIN7 a fluorescenčně značenou sekundární protilátkou; D - buňky transfekované plasmidem pOPINTTGneo_PIN7 značené pouze fluorescenčně značenou sekundární protilátkou

Z množství buněk exprimujících transportér PIN7 je patrné, že oproti prvnímu provedení imunofluorescence, je protein exprimován v menší míře. Na rozdíl od proteinu PIN1 ovšem nedošlo k úplnému zastavení exprese. Lokalizace PIN7 je nadále viditelná na plasmatické membráně nebo v jejím okolí, což je opět prokazatelné pouze u nepermeabilizované varianty (obr. 28, str. 52). U varianty permeabilizované bylo zjištěno nespecifické nasedání primární protilátky proti PIN7 na buňku. Signál tedy vykazují i netransfekované kontrolní buňky (obr. 29a, str. 53).

Z těchto pokusů vyplývá, že oba transportéry byly exprimovány. Je patrné, že kultivované stabilní linie exprimují oba proteiny pouze z části.

5.6 Akumulace auxinů a testování inhibitorů přenosu auxinu

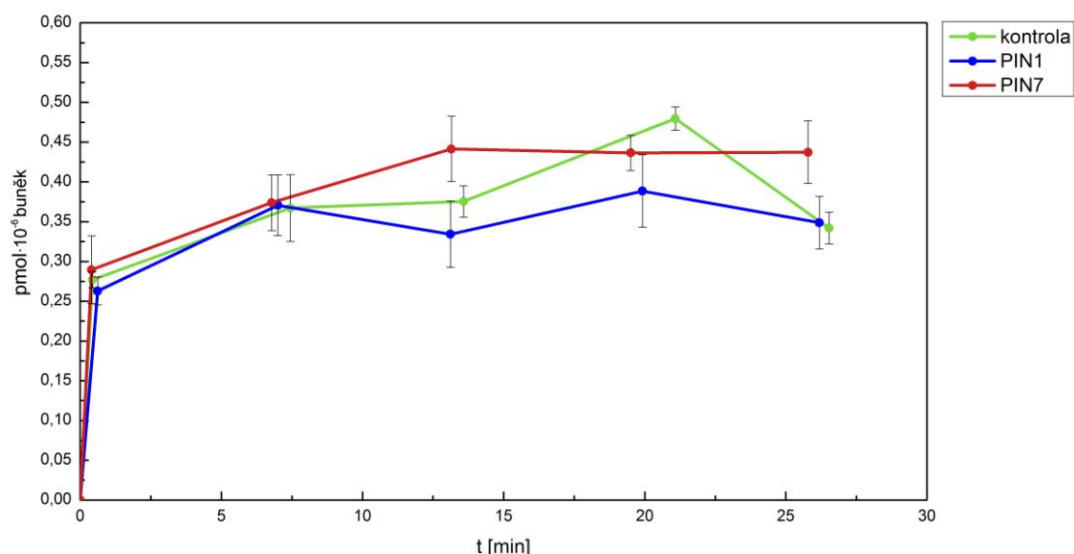
Pro zjištění biologické aktivity obou transportérů a vlivu inhibitorů transportu auxinu na proteiny PIN1 a PIN7 bylo provedeno několik akumulčních testů (4.6). Pro tyto pokusy byly použity auxiny, které byly radioaktivně značené na aromatickém kruhu.



Obr. 30: Akumulace [³H]IAA

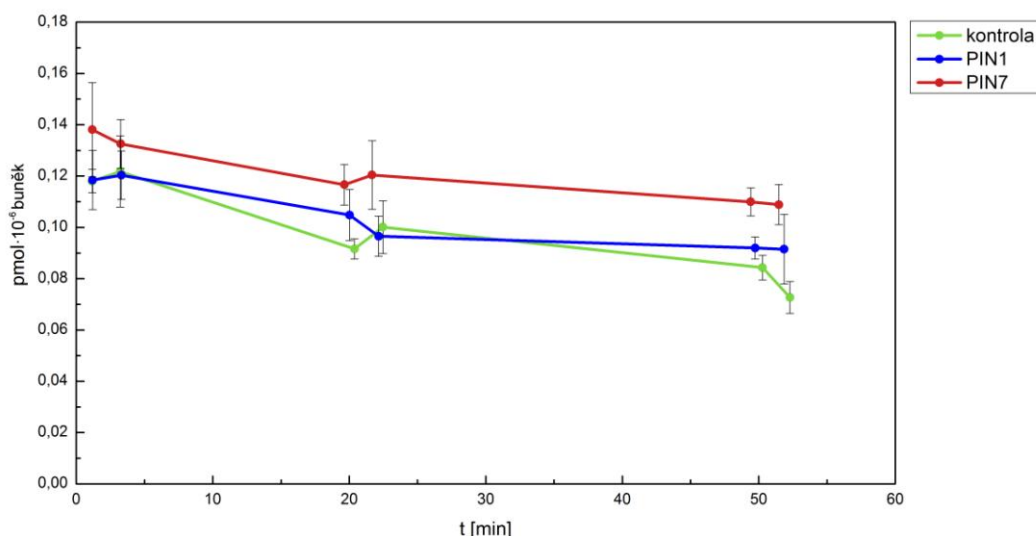
Jako kontrola byly použity netransfekované buňky. A, B - akumulace [³H]IAA, C - vliv inhibitoru NPA na akumulaci [³H]IAA

Z grafů je patrné, že transportér PIN7 je biologicky aktivní, ovšem nemá zde funkci exportéru. Jeho aktivita je obrácená a přesouvá auxin do buňky. Vzhledem k pravděpodobné ztrátě exprese nelze potvrdit také biologickou aktivitu transportéru PIN1. Protein PIN1 byl již zpočátku exprimován v mnohem menší míře než protein PIN1. Menší rozdíl akumulace buněk exprimujících PIN7 a kontrolními buňkami (obr. 30, str. 55) může být způsoben snižující se mírou exprese. Inhibitor NPA nemá na přenos IAA žádný vliv (obr. 30c, str. 55).

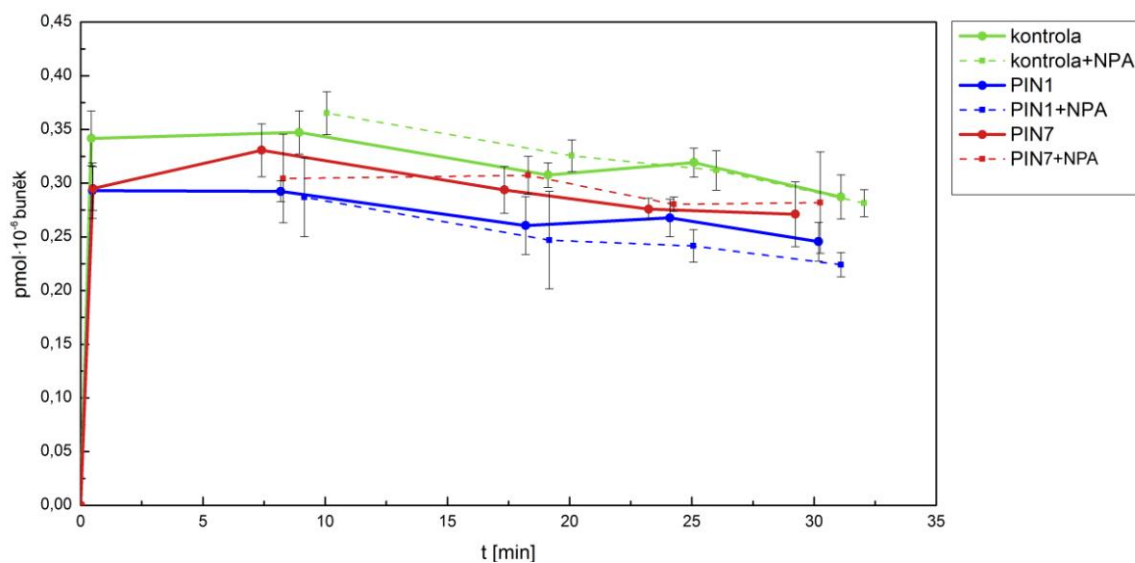


Obr. 31: Akumulace $[^3\text{H}]2,4\text{-D}$

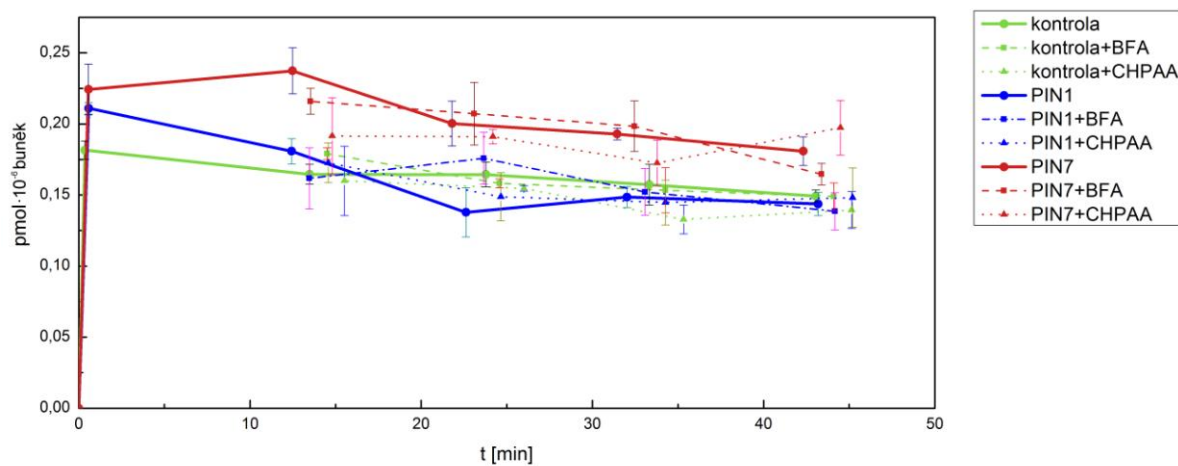
Při akumulaci $[^3\text{H}]2,4\text{-D}$ nebyl zaznamenán rozdíl hodnot pro transportér PIN1, PIN7 a netransfekované buňky (obr. 31). To potvrzuje, že 2,4-D je špatným substrátem pro auxinové exportéry.



Obr. 32: Akumulace $[^3\text{H}]NAA$



Obr. 33: Akumulace [^3H]NAA a inhibitoru NPA



Obr. 34: Akumulace [^3H]NAA a inhibitorů CHPAA a BFA

Při akumulaci [^3H]NAA nebyl příliš patrný rozdíl naměřených hodnot pro transportér PIN1, PIN7 a netransfokované buňky (obr. 32 - 34, str. 56 - 57). Z grafů je patrné, že inhibitory NPA, CHPAA a BFA nemají na transport NAA příliš patrný vliv (obr. 33 - 34).

6 DISKUZE

Cílem této práce byla heterogenní exprese auxinových transportérů PIN1 a PIN7 v lidských embryonálních ledvinných buňkách 293 a dále testy jejich biologické aktivity a vlivu inhibitorů přenosu auxinu.

Nejprve byl připraven expresní vektor pTW5_PIN7. Nukleotidová sekvence PIN7 byla nejprve pomocí PCR amplifikací mutována (obr. 14 - 18, str. 42 - 43), jelikož se v sekvenci nacházela tři restriční místa pro endonukleasu AgeI (obr. 13, str. 41), která byla spolu s endonukleasou KpnI použita k vyjmutí inzertu PIN7 z výchozího vektoru pJET_PIN7. Ten byl poskytnut Ústavem experimentální botaniky AV ČR. Expresní vektor pTW5 obsahuje histidinovou kotvu a WPRE signál. Tyto dva úseky byly následně spolu s inzerty PIN7 a PIN1 (plasmid pTW5_PIN1 byl připraven v rámci bakalářské práce) přeneseny do vektorů pOPINTTGneo (obr. 22 - 23, str. 46 - 47). Tento expresní vektor je vhodný pro tvorbu stabilně transfekovaných linií HEK293. Pro klonování těchto vektorů bylo použito bakterií *E. coli* ZH5a a plasmidová DNA byla po izolaci z bakterií vždy ověřována sekvenací. Při sekvenaci bylo zjištěno, že již výchozí plasmid pJET_PIN7 obsahuje verzi isoformy transportéru PIN7, která postrádá čtyři AMK. Tato isoforma by ovšem měla být plně funkční [53].

Bylo připraveno zásobní množství plasmidové DNA. Tato DNA byla izolována s poměrně malým výtěžkem a plasmid pOPINTTGneo_PIN1 také se špatnou čistotou. Poměr A_{260}/A_{280} byl nižší než 1,8, a tudíž došlo ke kontaminaci proteiny (tab. 1, str. 46). Pro izolaci DNA byly použity komerčně dodávané recyklované kolony. Kontaminace tedy mohla být způsobena nedostatečným promytím kolony.

Po transfekci buněk HEK293T bylo ke kulturám přidáno antibiotikum G418. Plasmid pOPINTTGneo zajišťuje buňkám rezistenci na toto antibiotikum. Během kultivace buněk zpočátku docházelo k selekci transfekovaných a netransfekovaných buněk. Viabilita se tedy postupně snižovala. Kultivované linie po určité době obsahovaly pouze buňky obsahující plasmidy pOPINTTGneo_PIN1 a pOPINTTGneo_PIN7.

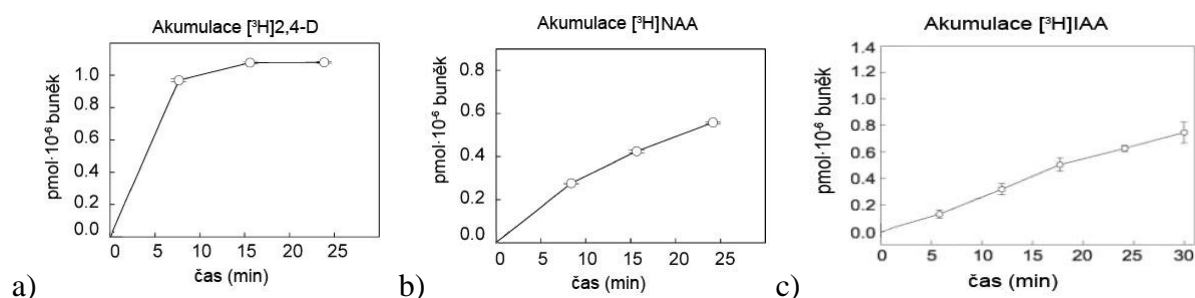
Pro ověření exprese obou proteinů byla provedena imunofluorescence, která zároveň poukázala na umístění PIN1 a PIN7 v buňce. Oba proteiny jsou pravděpodobně lokalizovány na plasmatické membráně (obr. 24 - 25, str. 48 - 49). Buňky byly vlivem fixace paraformaldehydem viditelně poškozené, a to především u permeabilizované varianty, u které byla navíc detergentem porušena plasmatická membrána. Z tohoto důvodu je u permeabilizovaných buněk patrné nespecifické značení také u kontrolních variant (obr. 29,

str. 53). Exprese PIN1 a PIN7 je tedy patrná spíše u nepermeabilizovaných buněk (obr. 24a,b - 25a,b a 28; str. 48 - 49 a 52). Během kultivace buněk pravděpodobně došlo k utišení exprese proteinu PIN1, proto při druhém opakování imunofluorescenčního pokusu nebyl protein PIN1 detekován (obr. 26 - 27, str. 50 - 51). Oproti tomu signál proteinu PIN7 byl patrný v okolí či na plasmatické membráně (obr. 28, str. 52). K úplnému objasnění subcelulární lokalizace proteinů by bylo třeba použít metodu kolokalizace s markery jednotlivých buněčných kompartmentů.

Ke zjištění biologické aktivity proteinů byly provedeny akumulací pokusy. Při nich byla měřena akumulace radioaktivně značených auxinů uvnitř buňky, a to nativního [³H]IAA a syntetických [³H]NAA a [³H]2,4-D. Auxin IAA vstupuje do buňky pasivně a je dobrým substrátem pro přenašeče auxinu do buňky i z buňky. Auxin NAA vstupuje do buňky především pasivně a je exportován z buňky pomocí přenašeče. Oproti tomu 2,4-D je dobrý substrát pro přenašeče do buňky a do buňky vstupuje pouze tímto způsobem. Spolu s nimi byl testován vliv prokázaných inhibitorů přenosu auxinu. Během testů bylo použito PBS o pH 5,5. Tento pufr byl použit z důvodu pouze částečně disociace auxinu při tomto pH, kdy nedisociovaná forma může přecházet do buněk difuzí. V rostlinných buňkách bylo prokázáno, že přenašeče z rodiny PIN, které mají dlouhou hydrofilní smyčku, tzv. dlouhé PIN proteiny, jsou lokalizovány na plasmatické membráně a přenáší auxin ven z buňky [30]. V buňkách obsahujících navíc transportéry PIN1 a PIN7 by mělo být akumulováno menší množství radioaktivně značených auxinů [³H]IAA a [³H]NAA, což jsou substráty pro přenašeče auxinu z buňky, a tedy by měla být nižší i naměřená aktivita než v buňkách, které exportéry neobsahují. Akumulace [³H]IAA byla u buněk exprimujících protein PIN7 překvapivě zvýšena (obr. 30, str. 55). U buněk s proteinem PIN1 nebyl tento rozdíl průkazný, patrně z důvodu snižování exprese proteinu PIN1 během kultivace buněk. Z akumulací [³H]IAA je patrné, že PIN7 je biologicky aktivní, ovšem jeho aktivita je obrácená, což bylo již dříve v buňkách HEK293 prokázáno i s transportérem PIN1 [54]. Vysvětlením malého rozdílu v akumulaci auxinu u linie transfekované PIN7 a linie kontrolní by mohla být nepřítomnost D6PK kinas v HEK293 buňkách. Bylo popsáno, že PIN1 a PIN3 proteiny exprimované v heterologním systému oocytů *Xenopus leavis* (Drápatka vodní) transportují auxin pouze v přítomnosti D6PK kinas, které fosforylují PIN proteiny [55]. Naopak byly již dříve popsány experimenty v heterologním systému HeLa buněk, které popisují, že proteiny PIN jsou schopné transportovat auxin i bez D6PK kinas [30], což naznačuje přítomnost jiných kinas, schopných aktivovat funkci proteinů PIN. Oproti akumulacím u tabákových BY-2 buněk (obr. 35b) dochází v HEK293 buňkách k velmi rychlému nárůstu akumulace [³H]IAA, a to již

v rámci sekund po přidání auxinu (obr. 30, str. 55), což je pravděpodobně způsobeno absencí buněčné stěny. To platí i pro akumulace $[^3\text{H}]2,4\text{-D}$ a $[^3\text{H}]\text{NAA}$ (obr. 45a a 45c). Z grafu pro akumulace $[^3\text{H}]2,4\text{-D}$ není patrný rozdíl mezi hodnotami pro buňky exprimující proteiny PIN1 a PIN7 a negativní kontrolu (obr. 31, str. 56) což není příliš překvapivé, jelikož 2,4-D je pro exportéry auxinu špatným substrátem. Tento auxin se do rostlinných buněk dostává pouze transportem pomocí přenašečů do buňky např. proteinů z rodiny AUX1/LAX u *Arabidopsis thaliana*. Buňky HEK293 mají pravděpodobně pro 2,4-D vlastní přenašeče. Grafy akumulací $[^3\text{H}]\text{NAA}$ také naznačují biologickou aktivitu PIN7 (obr. 32 - 34, str. 56 - 57), ovšem rozdíl hodnot pro tento transportér a pro negativní kontrolu není příliš velký, a proto z těchto pokusů nelze aktivitu s určitostí prokázat. Klesající tendence hodnot grafů je pravděpodobně způsobena tím, že je NAA nebo některý z jejích metabolitů exportován z buněk pomocí MDR transportérů.

Dle akumulací $[^3\text{H}]\text{IAA}$ a $[^3\text{H}]\text{NAA}$ inhibovaných pomocí NPA (obr. 30 a 33, str. 55 a 57) je patrné, že inhibitor na proteiny z rodiny PIN pravděpodobně nepůsobí. Mechanismus působení NPA není v rostlinných buňkách přesně znám. Jednou z teorií je existence tzv. NPA-binding proteinu. Je možné, že NPA působí na jiný protein spolupracující s PIN proteiny, který se ovšem v HEK293 buňkách pravděpodobně nevyskytuje. Dalšími testovanými inhibitory byly CHPAA a BFA (obr. 34, str. 57). CHPAA by jako inhibitor přenašeče auxinu z buňky neměla mít vliv na export auxinu. Brefeldin A zabraňuje cyklování proteinů mezi plasmatickou membránou a endosomálními kompartmenty, konkrétně doručování proteinů na plasmatickou membránu, a měl by působit v rostlinných i v živočišných buňkách. Neúčinnost tohoto inhibitoru během akumulace může být způsobena nízkou expresí proteinů.



Obr. 35: Grafy akumulací auxinů v BY-2 buňkách

a) akumulace $[^3\text{H}]2,4\text{-D}$, b) akumulace $[^3\text{H}]\text{NAA}$ – převzato a upraveno z [36], c) akumulace $[^3\text{H}]\text{IAA}$ – převzato a upraveno z [30]

Negativní výsledky pro transportér PIN1 lze vysvětlit mnohem nižší mírou exprese oproti PIN7. To vyplývá i z imunofluorescenčních pokusů, kdy při druhém experimentu již protein

PIN1 nebyl vůbec detekován (obr. 26 - 27, str. 50 - 51).

Expresse PIN7 je prokazatelná především u nepermeabilizované varianty buněk (obr. 28, str. 52). U permeabilizované varianty byl viditelný signál také u netransfekovaných buněk kontroly (obr. 29, str. 53). To lze vysvětlit nespecifickým nasedáním primární protilátky uvnitř buňky. Podobných výsledků bylo dosaženo také v HeLa buňkách [30].

Byl také proveden expresní test s protilátkou specifickou proti histidinové kotvě a s protilátkami specifickými proti PIN1 a PIN7. Ani jeden z testů neprokázal pozitivní výsledky. Vzhledem k nízké míře exprese pravděpodobně nebylo možné proteiny tímto způsobem detekovat.

7 ZÁVĚR

- Byly připraveny expresní vektory pOPINTTGneo_PIN1 a pOPINTTGneo_PIN7
- Podařilo se exprimovat přenašeče auxinu z buňky *AtPIN1* a *AtPIN7* (z *Arabidopsis thaliana*) v savčím heterologním expresním systému HEK293
- Pravděpodobná lokalizace *AtPIN1* a *AtPIN7* je na plasmatické membráně
- Byla prokázána biologická aktivita *AtPIN7* v HEK293 buňkách, aktivitu *AtPIN1* se díky utišení exprese prokázat nepodařilo
- Nebyla prokázána funkce NPA, CHPAA a BFA jako inhibitorů přenosu auxinu

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Hess D.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha, 1983
- [2] Barbez E., Kubeš M., Rolčík J., Béziat C., Pěňčík A., Wang B., Rosquete M. R., Zhu J., Dobrev P. I., Lee Y., Zažímalová E., Petrášek J., Geisler M., Friml J., Kleine-Vehn J.: A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants, *Nature* 485, 119-122 (2012)
- [3] Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J.: Auxin: Simply complicated, *Journal of Experimental Botany* 64, 2565-2577 (2013)
- [4] Ljung K., Hull A. K., Kowalczyk M., Marchant A., Celenza J., Cohen D. J., Sandberg G.: Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology* 49, 249-272 (2002)
- [5] Korasick D. A., Enders T. A., Strader L. C.: Auxin biosynthesis and storage forms, *Journal of Experimental Botany* 64, 2541-2555 (2013)
- [6] Chandler J. W.: Local auxin production: a small contribution to a big field, *BioEssays* 31, 60-70 (2009)
- [7] Grunewald W., Friml J.: The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells, *The EMBO Journal* 29, 2700-2714 (2010)
- [8] Zažímalová E., Murphy A. S., Yang H., Hoyerová K., Hošek P.: Auxin transporters - Why so many?, *Cold Springs Harbor Perspectives in Biology* 2, 1-14 (2010)
- [9] Vieten A., Sauer M., Brewer P. B., Friml J.: Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development, *Trends in Plant Science* 12, 160-168 (2007)

[10] Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Muller P., Delbarre A., Ueda T., Nakano A., Jürgens G.: The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth, *Cell* 112, 219-230 (2003)

[11] Muday G. K., DeLong A.: Polar auxin transport: controlling where and how much, *Trends in Plant Science* 6, 535-542 (2001)

[12] Michniewicz M., Zago K. M., Abas L., Weijers D., Schweighofer A., Meskiene I., Heislee G. M., Ohno C., Zhang J., Huang F., Schwab R., Weigel D., Meyerowitz M. E., Luschnig Ch., Offringa R., Friml J.: Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux, *Cell* 130, 1044-1056 (2007)

[13] Lee S. H., Cho H. T.: PINOID positively regulates auxin efflux in *Arabidopsis* root hair cells and Tobacco cells, *The Plant Cell* 18, 1604-1616 (2006)

[14] Blakeslee J. J., Peer W. A., Murphy A. S.: Auxin transport, *Current Opinion in Plant Biology* 8, 494-500 (2005)

[15] Bohn-Courseau I.: Auxin: The major regulator of organogenesis, *Comptes Rendus Biologies* 333, 290-296 (2010)

[16] Seifertová D., Skůpa P., Rychtář J., Laňková M., Pařezová M., Dobrev P. I., Hoyerová K., Petrášek J., Zažímalová E.: Characterization of transmembrane auxin transport in *Arabidopsis* suspension-cultured cells, *Journal of Plant Physiology* 171, 429-437 (2014)

[17] Woodward A. W., Bartel B.: Auxin: Regulation, action and interaction, *Annals of Botany* 95, 707-735 (2005)

[18] Peer W. A., Blakeslee J. J., Yang H., Murphy A. S.: Seven things we thing we know about auxin transport, *Molecular Plant* 4, 487-504 (2011)

- [19] Bennett M. J., Marchant A., Green H. G., May S. T., Ward S. P., Millner P. A., Walker A. R., Schultz B., Feldmann K. A.: *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948-950 (1996)
- [20] Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik A., Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L., Millner P., Tsurumi S., Moore I., Napier R., Kerr I. D., Bennett M. J.: Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1, *The Plant Cell* 16, 3069-3083 (2004)
- [21] Yang Y., Hammes U. Z., Taylor C. G., Schachtman D. P., Nielsen E.: High-Affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein, *Current Biology* 16, 1123-1127 (2006)
- [22] Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinská K., Mounier E., Hoyerová K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zažímalová E., Benková E., Nacry E., Gojon A.: Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants, *Developmental Cell* 18, 927-937 (2010)
- [23] Titapiwatanakun B., Murphy A. S.: Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition, *Journal of Experimental Botany* 60, 1093-1107 (2008)
- [24] Cho M., Lee Z. W., Cho H. T.: ATP-Binding cassette B4, an auxin-efflux transporter, stably associates with the plasma membrane and shows distinctive intracellular trafficking from that of PIN-FORMED proteins, *Plant Physiology* 159, 642-654 (2012)
- [25] Blakeslee J. J., Bandyopadhyay A., Lee O. R., Mravec J., Titapiwatanakun B., Sauer M., Makam S. N., Cheng Y., Bouchard R., Adamec J., Geisler M., Nagashima A., Sakai T., Martinoia E., Friml J., Peer W. A., Murphy A. S.: Interaction among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*, *The Plant Cell* 19, 131-147 (2007)

[26] Terasaka K., Blakeslee J. J., Titapiwatanakun B., Peer W. A., Bandyopadhyay A., Makam S. N., Lee O. R., Richards E. L., Murphy A. S., Sato F., Yazaki K.: PGP4 an ATP Binding Cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots, *The Plant Cell* 17, 2922-2939 (2005)

[27] www.science.leidenuniv.nl/index.php/ibl/mdg/latest_finding
(citováno 26.7.2015, upraveno)

[28] Křeček P., Skůpa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J., Zažímalová E.: The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters, *Genome Biology* 10, 249 (2009)

[29] Rosquete M. R., Barbez E., Kleine-Vehn J.: Cellular auxin homeostasis: Gatekeeping is housekeeping, *Molecular Plant* 5, 772-776 (2012)

[30] Petrášek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J. J., Abas M., Seifertová D., Wisniewska J., Tadele Z., Kubeš M., Čovanová M., Dhonukshe P., Skůpa P., Benkové E., Perry L., Křeček P., Lee O.R., Fink G. R., Geisler M., Murphy A. S., Luschnig C., Zažímalová E., Friml J.: PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux, *Science* 312, 914-918 (2006)

[31] Fozard J. A., King J. R., Bennett M. J.: Modelling auxin efflux carrier phosphorylation and localization, *Journal of Theoretical Biology* 319, 34-49 (2013)

[32] Kleine-Vehn J., Wabnik K., Martinière A., Langowski L., Willig K., Naramoto S., Leitner J., Tanaka H., Jakobs S., Robert S., Luschniq C., Govaerts W., Hell S. W., Runions J., Friml J.: Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane, *Molecular Systems Biology* 7, 1-13 (2011)

[33] Löffke Ch., Luschnig Ch., Kleine-Vehn J.: Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers, *Mechanisms of Development* 130, 82-94 (2013)

[34] Zourelidou M., Müller I., Willige C. B., Nill C., Jikumaru Y., Li H., Schwechheimer C.: The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in *Arabidopsis thaliana*, *Development* 136, 627-636 (2009)

[35] Palme K., Gälweiler L.: PIN-pointing the molecular basis of auxin transport, *Plant Biology* 2, 375-381 (1999)

[36] Laňková M., Smith R. S., Pešek B., Kubeš M., Zažímalová E., Petrášek J., Hoyerová K.: Auxin influx inhibitors 1-NOA, 2-NOA and CHPAA interfere with membrane dynamics in tobacco cells, *Journal of Experimental Botany* 61, 3589-3598 (2010)

[37] Robinson J. S., Albert A. C., Morris D. A.: Differential effects of brefeldin A and cycloheximide on the activity of auxin efflux carriers in *Cucurbita pepo* L., *Journal of Plant Physiology* 155, 678-684 (1999)

[38] Nebenführ A., Ritzenthaler Ch., Robinson D. G.: Brefeldin A: Deciphering an enigmatic inhibitor of secretion, *Plant Physiology* 130, 1102-1108 (2002)

[39] Huang F., Zago M. K., Abas L., Marion A., Galván-Ampudia C. S., Offringa R.: Phosphorylation of conserved PIN motifs directs *Arabidopsis* PIN1 polarity and auxin transport, *The Plant Cell* 22, 1129-1142 (2010)

[40] Robert S., Kleine-Vehn J., Barbez E., Sauer M., Paciorek T., Baster P., Vanneste S., Zhang J., Simon S., Čovanová M., Hayashi K., Dhonukshe P., Yang Z., Bednarek S. Y., Jones A. M., Luschnig Ch., Aniento F., Zažímalová E., Friml J.: ABP1 Mediates Auxin Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis in *Arabidopsis*, *Cell* 143, 111-121 (2010)

[41] Kleine-Vehn J., Dhonukshe P., Swarup R., Bennett M., Friml J.: Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1, *Plant Cell* 18, 3171-3181 (2006)

[42] Ariescu A. R., Lu W., Jones E. Y.: A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 62, 1243-1250 (2006)

[43] Lin Y. Ch., Boone M., Meuris L., Lemmens I., Van Roy N., Soete A., Reumers J., Moisse M., Plaisance S., Drmanac R., Chen J., Speleman F., Lambrecht D., Van de Peer Y., Tavernier J., Callewaert N.: Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations, *Nature Communications* 5, 1-12 (2014)

[44] <http://www.hek293.com/> (citováno 15.7.2015)

[45] Thomas P., Smart T. G.: HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51, 187-200 (2005)

[46] Durocher Y., Perret S., Kamen A.: High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells, *Nucleic Acid Research* 30, E9 (2002)

[47] Reeves P. J., Callewaert N., Contreras R., Khorana H. G.: Structure and function in rhodopsin: High-level expression of rhodopsin with restricted and homogenous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13419-13424 (2002)

[48] Sambrook, J., Russell, D. W.: *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA 2001

[49] JETQUICK Gel Extraction Spin Kit, dostupné z URL: <http://www.genomedna.com/pdf/Quick-PDFs/JETQUICK-Protocol.PDF> (citováno 1. 8. 2015)

[50] High-Speed Plasmid Mini Kit, dostupné z URL: <http://www.geneaid.com/sites/default/files/PD13.pdf> (citováno 1. 8. 2015)

- [51] Nucleobond Xtra Maxi Kit, dostupné z URL: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NuBoXtra.pdf (citováno 1. 8. 2015)
- [52] Wang H., Lee E. W., Cai X., Ni Z., Zhou L., Mao Q.: Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence, *Biochemistry* 47, 13778-13787 (2008)
- [53] Yamada K., Lim J., Dale J. M., Chen H., Shinn P., Palm C.J., Southwick A.M., Wu H.C., Kim C., Nguyen M., Pham P., Cheuk R., Karlin-Newmann G., Liu S.X., Lam B., Sakano H., Wu T., Yu G., Miranda M., Quach H.L., Tripp M., Chang C.H., Lee J.M., Toriumi M., Chan M.M., Tang C.C., Onodera C.S., Deng J.M., Akiyama K., Ansari Y., Arakawa T., Banh J., Banno F., Bowser L., Brooks S., Carninci P., Chao Q., Choy N., Enju A., Goldsmith A.D., Gurjal M., Hansen N.F., Hayashizaki Y., Johnson-Hopson C., Hsuan V.W., Iida K., Karnes M., Khan S., Koesema E., Ishida J., Jiang P.X., Jones T., Kawai J., Kamiya A., Meyers C., Nakajima M., Narusaka M., Seki M., Sakurai T., Satou M., Tamse R., Vaysberg M., Wallender E.K., Wong C., Yamamura Y., Yuan S., Shinozaki K., Davis R.W., Theologis A., Ecker J.R.: Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome, *Science* 302, 842-846 (2003)
- [54] Petermannová R.: Produkce uxinového transportéru PIN1 v HEK293 buněčné linii, bakalářská práce, PřF UK Praha, 2013
- [55] Zourelidou M., Absmanner B., Weller B., Barbosa I. C., Willige B. C., Fastner A., Streit V., Port S. A., Colcombet J., de la Fuente van Bentem S., Hirt H., Kuster B., Schulze W. X., Hammes U. Z., Schwechheimer C.: Auxin efflux by PIN-FORMED proteins is activated by two different protein kinases, D6 PROTEIN KINASE and PINOID, *eLife* 3, 1-25 (2014)