

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Bc. Gabriela Častulíková

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Reporterové linie jako nástroj
studia exprese genu *LHCB8*
u *Arabidopsis thaliana***

Diplomová práce

Bc. Gabriela Častulíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademičký rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Gabriela ČASTULÍKOVÁ
Osobní číslo: R220025
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Reporterové linie jako nástroj studia exprese genu LHC88 u *Arabidopsis thaliana*
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte přehled problematiky na předložené téma.
2. Na základě stanovení počtu kopií transgenu pomocí Digital Droplet PCR vylétektujte z předložených reporterových linií *Arabidopsis thaliana* homozygotní rostliny.
3. Analyzujte expresi genu *LHC88* v různých fázích ontogenetického vývoje *Arabidopsis thaliana*.
4. Analyzujte expresi genu *LHC88* za vybraných stresových podmínek.
5. Naměřené výsledky diskutujte. Zaměřte se na možný mechanismus funkce proteinu LHC88 v rámci fotosystému II za stresových podmínek.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tiskáená**

Seznam doporučené literatury:

- Albanese P, Manfredi M, Marengo E, Saracco G, Pagliano C. 2019. Structural and functional differentiation of the light harvesting protein Lhcb4 during land plant diversification. *Physiologia Plantarum* 166: 336–350.
- Floris M, Bassi R, Robaglia C, Alboresi A, Lanet E. 2013. Post-transcriptional control of light-harvesting genes expression under light stress. *Plant Molecular Biology* 82: 147–154.
- Grinzato A, Albanese P, Marotta R, Swiec P, Saracco G, Bolognesi M, Zanotti G, Pagliano C. 2020. High-Light versus Low-Light: Effects on Paired Photosystem II Supercomplex Structural Rearrangement in Pea Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 8643.
- Klimmek F, Sjödin A, Noutsos C, Leister D, Jansson S. 2006. Abundantly and Rarely Expressed Lhc Protein Genes Exhibit Distinct Regulation Patterns in Plants. *Plant Physiology* 140: 793–804.
- Sawchuk MG, Donner TJ, Head P, Scarpella E. 2008. Unique and Overlapping Expression Patterns among Members of Photosynthesis-Associated Nuclear Gene Families in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* 148: 1908–1924.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.**
UEB Olomouc

Datum zadání diplomové práce: 24. října 2022
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Dr.Sc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 3. listopadu 2022

Bibliografická identifikace:

| | |
|--------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora: | Bc. Gabriela Častulíková |
| Název práce: | Reporterové linie jako nástroj studia exprese genu <i>LHCB8</i> u <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| Typ práce: | Diplomová práce |
| Pracoviště: | Katedra Buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci |
| Vedoucí práce: | Mgr. Iva Ilíková, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce : | 2024 |
| Klíčová slova: | Reportérové linie, PSII, LHCBII, LHCB8, GUS, RUBY |
| Počet stran : | |
| Počet příloh: | 0 |
| Jazyk: | Český |

Souhrn: Cílem této diplomové práce bylo přispět k objasnění exprese genu *LHCB8* u *Arabidopsis thaliana*. V současné době se předpokládá, že u rostlin je protein LHCB8 přítomen téměř výhradně za stresových podmínek, zejména za vysoké intenzity světla, kdy je mu přisuzována role ve fotoprotekci fotosystému II. V rámci diplomové práce byla připravena reportérová linie s vizuálním RUBY markerem pro sledování aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}* a pomocí digital droplet PCR byly vyselektovány homozygotní linie dalších dvou reporterových linií pro *AtLhcb8_{pro}*. Aktivita promotoru *AtLhcb8_{pro}* byla analyzována v rámci ontogenetického vývoje *Arabidopsis thaliana* pomocí histochemického barvení GUS a byla také provedena analýza potenciální funkce proteinu LHCB8 ve fotosyntéze pomocí metody chlorofylové fluorescence.

Předložené výsledky překvapivě indikují, že aktivita promotoru *AtLhcb8_{pro}* je u *Arabidopsis thaliana* poměrně vysoká i za běžných pěstebních podmínek a že v průběhu ontogenetického vývoje vykazuje výraznou heterogenitu v rámci rostliny. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u nejmladších listů s vysokým podílem dělicích se buněk. Zjištěné výsledky budou nadále využity k detailní analýze funkce proteinu LHCB8.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Gabriela Častulíková

Title: Reporter lines as a tool for the monitoring of *LHCB8* gene expression in *Arabidopsis thaliana*

Type of thesis: Diploma thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics, UP Olomouc, Olomouc

Supervisor: Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Keywords: Reporter lines, PSII, LHCBII, LHCB8, GUS, RUBY

Number of pages:

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary: The aim of this diploma thesis was to contribute to the clarification of the expression of the LHCB8 gene in *Arabidopsis thaliana*. In plants, the LHCB8 protein is currently thought to be present almost exclusively under stress conditions, particularly under high light intensities, where it is attributed a role in photoprotection of photosystem II. In the frame of the diploma thesis, a reporter line with a visual RUBY marker was prepared for monitoring the activity of the promoter *AtLhcb8_{pro}*, and using digital droplet PCR, homozygous lines of the other two reporter lines for *AtLhcb8_{pro}* were selected. The activity of the promoter *AtLhcb8_{pro}* was analyzed within the ontogenetic development of *Arabidopsis thaliana* using GUS histochemical staining, and the potential function of the LHCB8 protein in photosynthesis was also analyzed using the chlorophyll fluorescence method.

The presented results surprisingly indicate that the activity of the promoter *AtLhcb8_{pro}* is relatively high in *Arabidopsis thaliana* even under normal growing conditions and that it shows significant heterogeneity within the plant during ontogenetic development. The highest activity was recorded in the youngest leaves with a high proportion of dividing cells. The obtained results will continue to be used for a detailed analysis of the function of the LHCB8 protein.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí práce Mgr. Ivi Ilíkové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

Gabriela Častulíková

Poděkování:

Týmto bych chtěla ráda poděkovat své vedoucí diplomové práce Mgr. Ivě Ilíkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a připomínky při zpracování teoretické a experimentální části práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Kučerové, PhD. za pomoc při měření chlorofylové fluorescence, které bylo provedeno na katedře biofyziky.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1 Úvod..... | 1 |
| 2 Cíle práce..... | 2 |
| 3 Literární přehled..... | 3 |
| 3.1 Fotosyntéza | 3 |
| 3.1.1 Organizace fotosystému II | 4 |
| 3.1.1.1 Jádru PSII..... | 5 |
| 3.1.1.2 Světloběrné antény | 5 |
| 3.1.2 Minoritní anténa LHCB4 | 6 |
| 3.1.2.1 Minoritní světloběrná anténa LHCB8 | 7 |
| 3.1.2.1.1 Exprese genu <i>LHCB8</i> | 7 |
| 3.1.2.1.2 Funkce proteinu LHCB8 v rámci PSII..... | 8 |
| 3.2 Analýza genové exprese..... | 9 |
| 3.2.1 Reportérové linie..... | 10 |
| 3.2.2 Reportérové geny | 11 |
| 3.2.2.1 β -glukuronidáza - GUS | 12 |
| 3.2.2.2 Fluorescenční proteiny (FP)..... | 13 |
| 3.2.2.3 Reportérová kazeta RUBY..... | 15 |
| 3.2.4 Příprava reportérových linií | 16 |
| 3.2.4.1 Příprava reportérového konstruktů..... | 16 |
| 3.2.4.1.1 Gateway klonování..... | 17 |
| 3.2.4.3 Selektce transgenních homozygotních linií u <i>Arabidopsis thaliana</i> | 19 |
| 3.2.4.3.1 Identifikace transformovaných rostlin pomocí markerů | 20 |
| 3.2.4.3.2 Stanovení počtu kopií transgenu u transformovaných rostlin | 20 |
| 3.2.4.3.2.1 Digital droplet PCR (ddPCR)..... | 21 |
| 4 Materiál a metodika: | 24 |
| 4.1 Biologický materiál..... | 24 |
| 4.2 Chemikálie: | 24 |
| 4.3 Přístrojové vybavení: | 25 |
| 4.4 Metody: | 27 |
| 4.4.1 Rostlinný materiál a podmínky pěstování..... | 27 |
| 4.4.2 Charakterizace použitých plazmidů | 27 |
| 4.4.3 Příprava reportérové linie AtLhcb8 _{pro} ::RUBY | 28 |
| 4.4.3.1 Rozpěstování bakterií z konzerv nebo misek s tuhým LB médiem | 28 |
| 4.4.3.2 Izolace plazmidové DNA pomocí ThermoFisher GeneJet Plasmid kitu | 28 |
| 4.4.3.3 PCR amplifikace pomocí Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerasy..... | 29 |
| 4.4.3.4 Přečištění PCR produktu pomocí QIAquick PCR Purification Kitu..... | 29 |
| 4.4.3.5 Gateway klonování BP a LR reakce | 30 |
| 4.4.3.6 Transformace bakterií pomocí teplotního šoku a jejich rozpěstování..... | 30 |

| | |
|--|----|
| - Transformace <i>E. coli</i> | 30 |
| 4.4.3.7 Colony PCR | 31 |
| - Příprava vzorku – přímá metoda (bakteriální kolonie)..... | 31 |
| 4.4.3.8 Ověření konstruktů pomocí restrikčního štěpení XmnI | 32 |
| 4.4.3.9 Elektroforetická separace v agarózovém gelu..... | 33 |
| 4.4.3.11 Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 34 |
| 4.4.4 Metody selekce homozygotních rostlin | 35 |
| 4.4.4.1 Fluorescenční mikroskopie – selekce transgenních a homozygotních rostlin..... | 35 |
| 4.4.4.2 Ověření pozitivnosti transgenních rostlin | 35 |
| - Příprava vzorku pro PCR – přímá metoda | 35 |
| 4.4.4.3 Izolace genomické DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plant II | 35 |
| 4.4.4.4 Stanovení počtu kopií reporterového genu v transgenních rostlinách pomocí Digital droplet PCR (ddPCR)..... | 36 |
| 4.4.4.5 Seznam použitých primerů pro PCR a Sangerovo sekvenování (Tab. 11) | 38 |
| 4.4.5 Analýza aktivity promotoru genu <i>LHCB8</i> pomocí histochemického GUS barvení..... | 38 |
| 4.4.5.1 Mikroskopie pro pozorování aktivity promotoru genu <i>LHCB8</i> | 39 |
| 4.4.6 Měření chlorofylové fluorescence..... | 40 |
| 5. Výsledky | 42 |
| 5 Diskuze..... | 69 |
| 6 Závěr | 77 |
| 8. Zdroje | 79 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|-------------------|--|
| 2D-PAGE | Dvoudimenzionální polyakrylamidová elektroforéza |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| CAT | Chloramfenikol acetyltransferáza |
| CNV | Copy number variation |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| ddPCR | Digital droplet PCR |
| ETR I | Transport elektronů přes fotosystém I |
| ETR II | Transport elektronů přes fotosystém II |
| FAM | Fluorescein |
| FAST | Fluorescence-accumulating seed technology |
| Fm | Maximální výtěžek fluorescence |
| Fm' | Maximální fluorescence na světle |
| Fo | Minimální výtěžek fluorescence |
| FP | Fluorescenční protein |
| Fv/Fm | Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II |
| GFP | Zelený fluorescenční protein |
| GUS | β -glukuronidáza |
| HEX | Hexachlorfluorescein |
| HM | Homozygot |
| HZ | Heterozygot |
| IME | Intron mediated enhancement |
| LB | Luria-Bertani médium |
| LHC | Světloběrný komplex |
| LHCII | Světloběrný komplex fotosystému II |
| NADP ⁺ | Nikotinamidadeninukleotidfosfát – oxidovaná forma |
| NADPH | Nikotinamidadeninukleotidfosfát - redukováná forma |
| NPQ | Nefotochemické zhášení |
| OEC | Kyslík vyvíjející komplex |
| OLE1 | Oleosin |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce |
| PSI | Fotosystém I |
| PSII | Fotosystém II |

| | |
|--------|---|
| QA | Plastochinon A |
| RC | Reakční centrum |
| RFP | Zelený fluorescenční protein |
| RNA | Ribonukleová kyselina |
| TBE | Tris/Borate/EDTA |
| T-DNA | Transferová DNA |
| VIC | Xanthénové barvivo |
| WT | Wilde type |
| X-gluc | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glukunidu |
| YEB | Yeast Extract Beef médium |

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Model organizace tylakoidních membrán v rámci chloroplastu.

Obrázek 2 – Strukturální model PSII C₂S₂M₂ superkomplexu.

Obrázek 3 – Konstrukt reportérového genu.

Obrázek 4 – Enzymatická reakce β-glukuronidázy za použití X-Gluc substrátu.

Obrázek 5 – Reportérová kazeta RUBY.

Obrázek 6 – Gateway klonování.

Obrázek 7 – Rekombinační místa att.

Obrázek 8 – 2-D graf zobrazující fluorescenci kapiček.

Obrázek 9 – Elektroforeticky rozdělený PCR produkt DNA RUBY fragmentu.

Obrázek 10 - BP reakce.

Obrázek 11 – Elektroforeticky rozdělené PCR produkty colony PCR.

Obrázek 12 - Elektroforeticky rozdělené produkty restriktivního štěpení.

Obrázek 13 – LR reakce

Obrázek 14 - Elektroforeticky rozdělené PCR produkty colony PCR.

Obrázek 15 – Výsledek sekvenace inzertu AtLhcb8_{pro}::RUBY.

Obrázek 16 – Elektroforeticky rozdělené PCR produkty colony PCR.

Obrázek 17 – Selekcce transgenních semen v T1 generaci u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::RUBY

Obrázek 18 – Elektroforeticky rozdělené PCR produkty části sekvence inzertu Lhcb8_{pro}::LHCB8::GUS pro ověření pozitivnosti reportérové linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS.

Obrázek 19 - Elektroforeticky rozdělené PCR produkty části sekvence inzeru Lhcb8_{pro}::GUS pro ověření pozitivnosti reportérové linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS.

Obrázek 20 – Elektroforeticky rozdělené PCR produkty *části* sekvence inzeru AtLhcb8_{pro}::RUBY pro ověření pozitivnosti reportérové linie AtLhcb8_{pro}::RUBY.

Obrázek 21 – Graf CNV v T1 generaci rostlin u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS.

Obrázek 22 – Graf CNV v T1 generaci rostlin u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS.

Obrázek 23 – Graf CNV v T1 generaci rostlin u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::RUBY.

Obrázek 24 - Rostliny AtLhcb8_{pro}::RUBY a jejich počet kopií.

Obrázek 25 – Graf CNV v T2 generaci rostlin u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS

Obrázek 26 – Graf CNV v T2 generaci rostlin u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS.

Obrázek 27 – Fluorescence semen vytvořená expresí markerového konstruktů OLE1-RFP u T3 generace rostlin reportérové linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS.

Obrázek 28 – Optimalizace GUS barvení.

Obrázek 29 – GUS barvení jednotýdenních rostlin.

Obrázek 30 – GUS barvení dvoutýdenních rostlin.

Obrázek 31 – GUS barvení čtyřtýdenních rostlin.

Obrázek 32 – GUS barvení šestitýdenních rostlin.

Obrázek 33 – GUS barvení jedenáctitýdenních rostlin.

Obrázek 34 – GUS barvení senescentních listů.

Obrázek 35 – Lokalizace aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} v rámci buněk listu

u reportérových linií $AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS$ a $AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS$ se dvěma kopiemi inzertu

Obrázek 36 – Lokalizace aktivity promotoru $AtLhcb8_{pro}$ v rámci květu a stonku u linií $AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS$ a $AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS$ se dvěma kopiemi inzertu

Obrázek 37 – Porovnání lokalizace promotoru $AtLhcb8_{pro}$ pomocí GUS barvení a měření chlorofylové fluorescence na ploše listu u linie $AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS$ pomocí FluorCamu.

Obrázek 38 – Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (Fv/Fm).

Obrázek 39 – Elektronový transport přes PSII ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu.

Obrázek 40 – Elektronový transport přes PSI ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu.

Seznam tabulek

Tab. 1 – Seznam dalších nejběžněji používaných GFP variant.

Tab. 2 – Složení PCR reakční směsi.

Tab. 3 – Základní časový a teplotní profil PCR reakce

Tab. 4 – Složení PCR reakční směsi

Tab. 5 – Základní časový a teplotní profil PCR reakce

Tab. 6 – Složení sekvenační reakce

Tab. 7 – Teplotní a časový profil sekvenační reakce

Tab. 8 – ddPCR reakční směs

Tab. 9 – Použité primery a sondy při detekci počtu kopií pomocí ddPCR

Tab. 10 – Základní časový a teplotní profil ddPCR

Tab. 11 – Seznam použitých primerů pro PCR a Sangerovo sekvenování a jejich označení

Tab. 12 – Protokol histochemického barvení GUS

Tab. 13 – Koncentrace plazmidové DNA vyizolované z kolonií 3 a 4

Tab. 14 – Koncentrace plazmidové DNA vyizolované z kolonií 1 a 2

1 Úvod

Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších biologických procesů, kde fotosystém II (PSII) má klíčovou roli, jelikož pomocí katalytické fotolýzy vody dochází k produkci kyslíku, který je nezbytný pro život na této planetě.

Fotosystém II se skládá z dimerního jádra, kde dochází k nábojové separaci, a ze systému periferních světlosběrných antén, které zachycují světelnou energii a přenáší ji do jádra PSII. Zastoupení těchto světlosběrných antén je variabilní a zastávají ochrannou funkci při stresových podmínkách tím, že regulují velikost světlosběrného anténního komplexu LHCBII (Jansson, 2006). Například protein LHCB8 (isoforma LHCB4.3), který je málo prozkoumán a má předpokládanou fotoprotektivní funkci.

Donedávna se myslelo, že u rostlin se tento protein za běžných podmínek vůbec neexprimuje a exprimuje se pouze za stresových podmínek vysoké intenzity světla, díky čemuž mu právě byla přiřazena fotoprotektivní funkce (Klimmek *et al.*, 2006). Existují náznaky, že by se protein LHCB8 mohl exprimovat i za běžných podmínek, ale detailní analýza zatím nebyla provedena.

Motivací této diplomové práce je přispět k objasnění exprese genu *LHCB8* během ontogenetického vývoje u *Arabidopsis thaliana*, lokalizovat v jakých buňkách je potenciálně exprimován a jakou potenciální funkci by mohl v těchto buňkách zastávat.

2 Cíle práce

Cílem mé diplomové práce je:

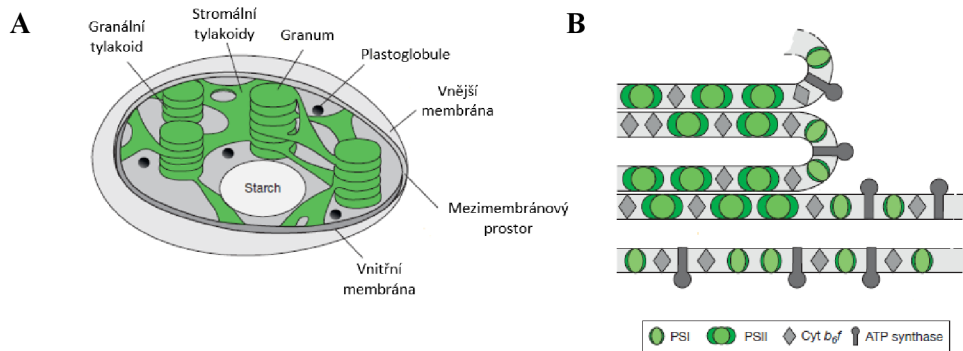
1. Zpracovat přehled o problematice zabývající se expresí genu *LHCB8* za běžných a stresových podmínek, funkcí proteinu LHCB8 ve fotosystému II
2. Zvládnout na základě stanovení počtu kopií transgenu pomocí Digital Droplet PCR vyselektovat z předložených reporterových linií *AtLhcb8_{pro}::GUS* a *AtLhcb8_{pro}::Atlhcb8::GUS* homozygotní rostliny.
3. Analyzovat expresi genu *LHCB8* v různých fázích ontogenetického vývoje *Arabidopsis thaliana*.
4. Analyzovat expresi genu *LHCB8* za vybraných stresových podmínek.
5. Vyhodnotit možný mechanismus funkce proteinu *LHCB8* v rámci fotosystému II za stresových podmínek a diskutovat obdržené výsledky.

3 Literární přehled

3.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších procesů, který slouží k udržování života na Zemi. Při fotosyntéze dochází k přeměně světelné energie na energii chemickou, kdy dochází k fixaci CO_2 do organické molekuly (sacharidy) a uvolnění O_2 do atmosféry.

Fotosyntéza se odehrává v tylakoidní membráně uvnitř specializovaných semiautonomních organel nazývaných chloroplasty. Chloroplasty jsou uvnitř vyplněny stromou, která obklopuje tylakoidní membrány (Obr. 1A). Společným rysem u zelených rostlin je skládání tylakoidních membrán do sloupců pojmenovaných jako grana (singulár: granum), kde jsou umístěny proteinové komplexy (obr. 1B). Jednotlivá grana jsou mezi sebou propojena pomocí stromálních tylakoidů. Tylakoidy jsou vnitřně vyplněny vodnou fází nazývanou se lumen (Kirchhoff, 2013; Rascio, 2013).



Obrázek 1- Model organizace tylakoidních membrán v rámci chloroplastu. Model ukazuje chloroplast obsahující čtyři grana spojená pomocí stromálních tylakoidů (část A). Průřez granem ukazuje distribuci hlavních komponentů fotosyntézy (B). Granum – PSII a LHCII, Lamely – PSI, ATP syntáza, NDH a cytochrom b_6/f komplex; Převezato a upraveno (Rascio, 2013)

Proces fotosyntézy je rozdělen na dvě fáze, a to na primární fázi a sekundární fázi. V primární fázi (odehrává se v tylakoidní membráně) dochází k absorpci slunečního záření pomocí molekul chlorofylů a přenosu excitační energie do reakčního centra fotosystému II (PSII) – P_{680} . Poté následuje přenos elektronů z PSII, které byly získány rozkladem vody, pomocí plastochinonu, komplexu cytochromu b_6/f a plastocyaninu až na fotosystém I (PSI). Následně dochází k excitaci reakčního centra PSI – P_{700} . Přenášený elektron je pak necyklickou cestou využit pro redukci NADP^+ za vzniku produktu NADPH a zároveň při transportu elektronu dochází ke generování protonového gradientu přes tylakoidní membránu, který je využit pro syntézu ATP pomocí ATP syntázy. Dále může elektron putovat cyklickou cestou, kdy dochází pouze k tvorbě protonového gradientu bez redukce NADP^+ . V sekundární fázi (Calvinův cyklus, odehrávající se ve stromatu chloroplastů) dochází k využití produktů primární

fáze - ATP, NADPH - k fixaci CO₂ do organické molekuly (sacharidy) (Gao *et al.*, 2018; Pribil a Leister, 2017).

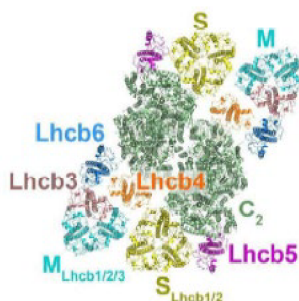
3.1.1 Organizace fotosystému II

PSII je multi-proteinový komplex, který se v rámci chloroplastu nachází uvnitř granálních tylakoidních membrán. Je zodpovědný za rozklad vody, tvorbu kyslíku a redukci plastochinonu. Skládá z jádra a variabilního počtu vnějších světlosběrných antén II (LHCII) (Lu, 2016).

Jádro PSII spolu s LHCII tvoří PSII – LHCII superkomplex. LHCII u PSII je u většiny suchozemských rostlin za fyziologických podmínek tvořen proteiny LHCB 1 – 6, které se dělí na majoritní (LHCB 1 – 3) a minoritní (LHCB 4 – 6) (Boekema *et al.*, 1995; Boekema *et al.*, 1998; Jansson, 1994).

Funkční formou PSII-LHCII superkomplexu je vždy forma dimeru a u většiny suchozemských rostlin se vyskytuje ve formě superkomplexu označeného jako C₂S₂M₂ (Obr. 2). U suchozemských rostlin je tento komplex tvořen jádrem (C₂), dvěma velmi silně vázanými světlosběrnými trimery (S trimery, tvořenými proteiny kódovanými geny *LHCB1* a *LHCB2*) a dvěma středně silně vázanými trimery (M trimery, tvořenými proteiny kódovanými geny *LHCB1*, *LHCB2* a *LHCB3*). M a S trimery jsou k jádru PSII vázány pomocí minoritních světlosběrných antén - S trimer je vázán pomocí LHCB5 (CP26) a M trimer pomocí LHCB6 (CP24) a LHCB4 (CP29) (Boekema *et al.*, 1995; Boekema *et al.*, 1998).

V rámci rostlin byly pozorovány i další superkomplexy PSII, např. C₂S₂, který vzniká odpojením M trimerů v důsledku snížené exprese proteinů LHCB3 a LHCB6 při dlouhodobém vystavení rostliny nadměrné intenzitě světla (Boekema *et al.*, 2000).



Obrázek 2 - Strukturální model PSII C₂S₂M₂ superkomplexu. C₂S₂M₂ superkomplex u *Arabidopsis thaliana*; Převezato a upraveno z (Kouřil *et al.*, 2016)

3.1.1.1 Jádru PSII

Základ jádra (C) PSII, které se vyskytuje jako homodimer (C₂), jsou proteiny PSBA (D1) a PSBD (D2), vnitřní světlosběrné antény PSBC (CP43) a PSBB (CP47), podjednotky cytochromu b₅₅₉ PSBE (alfa) a PSBF (beta), proteiny o nízké molekulové hmotnosti PSBH, PSBI, PSBJ, PSBK, PSBL, PSBM, PSBN, PSBT, PSBW, PSBX, PSBY a PSBZ a kofaktory hem b, chlorofyl A, feofytin, plastochinon, plastochinol a β - karoten zprostředkovávající elektronový transport z PSII na PSI . Dále je součástí jádra PSII kyslík vyvíjející komplex (OEC) zodpovídající za katalytický rozklad vody, který je tvořen proteiny PSBO, PSBP, PSBQ a PSBR. (Bricker *et al.*, 2012; Nickelsen a Rengstl, 2013). Složení jádra je v rámci suchozemských rostlin stálé (Umena *et al.*, 2011; Nickelsen a Rengstl, 2013).

3.1.1.2 Světlosběrné antény

Světlosběrné antény jsou membránové proteiny obsahující tři transmembránové α-helixy, které vážou pigmenty (chlorofyly a karotenoidy) jako kofaktory sloužící k absorpci světelné energie a přenosu excitační energie do RC PSII (Green a Durnford, 1996). Jednou z jejich nejdůležitějších funkcí je ochrana PSII před fotooxidačním poškozením, které vzniká při vystavení rostliny nadměrné intenzitě světla nebo jiným stresovým podmínkám. Za těchto podmínek může docházet ke zvýšené produkci nebezpečných reaktivních forem kyslíku, které vedou k oxidativnímu poškození proteinů, lipidů i nukleových kyselin. Tyto reaktivní molekuly mohou vznikat mimo jiné i přenosem energie z dlouhodobě excitované molekuly chlorofylu na kyslík. Aby se zabránilo tvorbě reaktivních forem kyslíku, tak proteiny LHCB pomocí nefotochemického zhášení (NPQ) zháší excitované chlorofyly a neškodně převádí přebytečnou excitační energii na teplo (Müller *et al.*, 2001). Počet a zastoupení těchto antén interagujících s jádrem PSII je variabilní, jelikož jejich zastoupení je závislé na vnějších podmínkách jako je například nízká nebo vysoká intenzita světla.

- Majoritní světlosběrné antény

Majoritní světlosběrné antény (LHCII) se vyskytují ve formě trimerů a jsou u většiny suchozemských rostlin tvořeny proteiny LHCB1, LHCB2 a LHCB3. Jedinou doposud známou výjimkou jsou nahosemenné rostliny, které ztratily gen pro protein LHCB3. Zatímco silně vázané S trimery jsou tvořeny různými kombinacemi proteinů LHCB1 a LHCB2, M trimery obsahují jeden protein LHCB3 spolu s dvěma proteiny

LHCB1/LHCB2 (Teramoto *et al.*, 2001).

U *Arabidopsis* jsou LHCB1 proteiny kódovány pěti geny *LHCB1.1*, *LHCB1.2*, *LHCB1.3*, *LHCB1.4* a *LHCB1.5*, kde proteiny LHCB1.1 – LHCB1.3 jsou identické a proteiny LHCB1.4 a LHCB1.5 se od nich odlišují (Jansson, 1999; Leutwiler *et al.*, 1986; McGrath *et al.*, 1992). LHCB2 je u *Arabidopsis* kódován třemi geny *LHCB2.1*, *LHCB2.2*, *LHCB2.3* a LHCB3 je kódován jedním genem (Jansson, 1999; Klimmek *et al.*, 2006). Zastoupení těchto antén u suchozemských rostlin je v poměru 8:3:1 (Jansson, 1994).

- **Minoritní světloběrné antény**

Minoritní světloběrné antény se vyskytují ve formě monomerů za zajišťují vazbu LHCI trimerů na jádro PSII. Patří k nim proteiny LHCB4 (u *Arabidopsis* je kódován třemi geny *LHCB4.1*, *LHCB4.2* a *LHCB4.3*), LHCB5 (kódován jedním genem) a LHCB6 (kódován jedním genem) (Jansson, 1999; Ganeteg *et al.*, 2004). Tyto antény slouží k připojení LHCI trimerů k jádru PSII a dávají vzniku PSII superkomplexu (Dekker a Boekema, 2005).

Hlavní funkcí proteinu LHCB5 je připojení S trimeru k jádru PSII (Viz. Obr. 2). Protein LHCB6 má důležitou funkci v organizaci PSII a má spolu s antenou LHCB3 roli v modulaci velikosti antén PSII při dlouhodobé aklimatizaci na vysoké světlo, kdy snížením jeho exprese dochází k modulaci velikosti antén (Kovács *et al.*, 2006; Caffarri *et al.*, 2009).

3.1.2 Minoritní anténa LHCB4

Protein LHCB4 je přítomný u všech zelených rostlin a má důležitou funkci, kdy za normálních světelných podmínek LHCB4 zprostředkovává vazbu S i M trimerů k jádru PSII za vzniku C₂S₂M₂ superkomplexu PSII, kde reguluje tok excitační energie z LHCI do RC PSII (de Bianchi *et al.*, 2011). LHCB4 je jedinečný tím, že při jeho úplné absenci v PSII-LHCI komplexu nedochází k jeho nahrazení jinou podjednotkou LHCB. Při diverzifikaci suchozemských rostlin došlo u několika linií k evolučním změnám vlivem genové duplikace, která vedla k diferenciaci LHCB4 až na tři isoformy. U *Arabidopsis* je LHCB4 prezentován isoformami – LHCB4.1, LHCB4.2 a LHCB4.3 (de Bianchi *et al.*, 2011).

Proteiny LHCB4.1 a LHCB4.2 mají vysoce homologní sekvenci (u *Arabidopsis* podobnost až 87,2 %), podobnou strukturu, funkci a regulaci. Zastoupení obou podjednotek za běžných podmínek je 1:1 (Ilíková *et al.*, 2021) a na základě studií

se předpokládá, že se můžou funkčně zaměňovat. Delece jedné z isoform *LHCB4.1* nebo *LHCB4.2* vedla vždy k nahrazení druhou podjednotkou. Toto však neplatí pro protein *LHCB4.3*, jelikož není za normálních podmínek u většiny krytosemenných přítomen, ale jeho množství se zvyšuje při podmínkách vysoké intenzity světla (de Bianchi *et al.*, 2011; Klimmek *et al.*, 2006).

Proteiny *LHCB4.1* a *LHCB4.2* mají zakonzervovanou oblast dlouhou 15 aminokyselin na jejich C konci (Klimmek *et al.*, 2006), která je důležitá pro navázání *LHCB6*, který slouží k navázání *LHCB3* v M trimeru. (Albanese *et al.*, 2016). Tato interakce je klíčová pro vznik $C_2S_2M_2$ superkomplexu. U *LHCB4.3* tato část C konce chybí, a i svou sekvencí se odlišuje od proteinů *LHCB4.1* a *LHCB4.2*, a i na základě odlišného expresního profilu bylo navrženo přejmenování *LHCB4.3* na *LHCB8* (gen - *LHCB8*) (Klimmek *et al.*, 2006).

3.1.2.1 Minoritní světlosběrná anténa *LHCB8*

U *Arabidopsis thaliana* je protein *LHCB4*, jak již bylo uvedeno výše (viz. kap. 3.1.2), prezentován třemi isoformami. *LHCB8* se od zbylých dvou isoform liší svou sekvencí a absencí C konce, zprostředkovávající interakci s proteinem *LHCB6* a nepřímo s *LHCB3*. Předpokládá se, že pokud je *LHCB8* přítomen, váže se na stejné místo v PSII jako *LHCB4.1* a *LHCB4.2*.

Dlouhou dobu se předpokládalo, že gen *LHCB8* (*LHCB4.3*) se vyskytuje pouze u krytosemenných rostlin skupiny Eurosids a Caryophylles (Klimmek *et al.*, 2006). Z nejnovějších studií ale vyplývá, že se vyskytuje také u nahosemenných rostlin s výjimkou skupin Cyadaceae a Cycadales (Grebe *et al.*, 2019). U všech rostlin, u kterých se vyskytuje *LHCB8*, existuje zároveň alespoň jeden gen pro *LHCB4* a v tomto smyslu byl dlouho *LHCB8* chápán jako speciální forma *LHCB4* která se uplatňuje pouze za specifických podmínek. Tento pohled je ovšem do značné míry zpochybněn zjištěním, že u skupiny nahosemenných rostlin Pinaceae a Gnetales došlo ke ztrátě genů pro dominantní formu *LHCB4*, a tedy jedinou isoformou, kterou obsahují, je *LHCB8* (Grebe *et al.*, 2019).

3.1.2.1.1 Exprese genu *LHCB8*

Na gen *LHCB8* bylo dlouho pohlíženo jako na gen exprimovaný za běžných podmínek jen zřídka a málo, a tudíž protein *LHCB8* a jeho potenciální role ve fotosyntéze byl dlouho na okraji zájmu (Klimmek *et al.*, 2006). V novější studii,

kteřá se zaměřovala na screening exprese *LHCB* genů během ontogenetického vývoje na rostlinách *Arabidopsis* starých v rozmezí 2,5 – 6 dní, bylo však objeveno, že gen *LHCB8* se exprimoval i za běžných podmínek. Při studii bylo zjištěno, že gen *LHCB8* se exprimuje jen v určité subpopulaci buněk, jejichž množství se během ontogenetického vývoje snižuje a tím dochází k postupné lokalizaci exprese do malých buněčných domén, které se vyskytovaly na okraji listu (Sawchuk *et al.*, 2008).

Při podmínkách vysoké intenzity světla dochází k zvýšené expresi *LHCB8* v rámci celé rostliny, kde vykazuje vyšší expresi až o 255 % (Albanese *et al.* 2016, 2018, 2019; Alboresi *et al.* 2011; Flanery *et al.*, 2021; Floris *et al.* 2013; Klimmek *et al.* 2006;). Některé studie naznačují, že k expresi *LHCB8* dochází i za jiných stresových podmínek, např. při teplotním stresu nebo při vystavení rostlin těžkým kovům (Ruckle *et al.* 2012) (Soltani *et al.* 2019), (Tang *et al.* 2016). I přes tyto relativně solidní a konzistentní transkriptomická data byla akumulace proteinu LHCB8 v tylakoidní membráně pozorována jen ve velmi malém počtu studií (Albanese *et al.* 2016, 2018, 2019; de Bianchi *et al.* 2011; Miller *et al.* 2017).

Dále bylo zjištěno, že exprese genu *LHCB8* může být za určitých podmínek regulována až na úrovni translace, kde důležitou roli pro aktivování translace má pravděpodobně doba, kterou je rostlina vystavena světlu o vysoké intenzitě. Tento způsob regulace genové exprese značí, že pozorované množství mRNA nemusí odpovídat celkovému množství naměřeného proteinu (Floris *et al.*, 2013). Dále je podezření, u genu *LHCB8*, který se skládá ze dvou exonů a jednoho intronu, může mít intron regulační roli, tím že dochází ke zvýšené akumulaci mRNA. Tento jev byl popsán jako Intron mediated enhancement (IME) (Gallegos a Rose, 2015).

3.1.2.1.2 Funkce proteinu LHCB8 v rámci PSII

Jak již bylo zmíněno dříve (Viz. kap.3.1.2.1.1), tak protein LHCB8 se exprimuje při podmínkách vysoké intenzity světla. Na základě toho byla tomuto proteinu přiřazena fotoprotektivní funkce (Albanese *et al.*, 2016; Grinzato *et al.*, 2020). Při fotoprotekci má důležitou roli, jak umístění proteinu LHCB8 v rámci PSII-LHCII superkomplexu, tak absence jeho C konce. Za normálních podmínek proteiny LHCB4 zajišťují interakci mezi RC PSII a M trimery skrze LHCB6, a to pomocí domény na C – konci zprostředkovávající vazbu LHCB6. Pokud ale dojde k nahrazení LHCB4 proteinů proteinem LHCB8, který tento konec neobsahuje, tak pravděpodobně nemůže dojít k vazbě LHCB6, a to má za následek změnu velikosti světlosběrných antén, jelikož

dochází odpojení M trimeru za tvorby C₂S₂ superkomplexu. Díky tomu dochází ke zmenšení rozsahu světlosběrných antén, což je jeden z fotoprotektivních mechanismů uplatňujících se u rostlin při vystavení vysoké intenzitě světla. (Albanese *et al.*, 2016; Albanese *et al.*, 2019). Z důvodu nízké akumulace proteinu LHCB8 v tylakoidní membráně byla navržena hypotéza, že protein LHCB8, který se exprimuje během podmínek vysoké intenzity světla, vytlačí LHCB4.1 a LHCB4.2 z již existujícího C₂S₂M₂ superkomplexu a díky své krátké životnosti destabilizuje a sníží množství C₂S₂M₂ superkomplexů v rámci tylakoidní membrány (Albanese *et al.*, 2019).

U smrku ztepilého (*Picea abies*) má protein LHCB8 speciální funkci, jelikož se jedná o jedinou formu LHCB4, která se u něho vyskytuje (Grebe *et al.*, 2019). Při studiích struktury PSII smrku bylo zjištěno, že u C₂S₂M₂ superkomplexu chybí proteiny LHCB3 a LHCB6, u kterých se dříve myslelo, že jsou nepostradatelné pro připojení M trimeru k jádru PSII. Ztráta těchto světlosběrných antén nejspíše souvisí právě s přítomností pouze LHCB8. Ztráta těchto proteinů a přítomnost pouze LHCB8 naznačuje, že se nejspíše jedná o evoluční adaptaci společného předchůdce rostoucího dlouhodobě za podmínek vysokého světla jako způsob fotoprotekce (Kouřil *et al.*, 2016).

3.2 Analýza genové exprese

Genová exprese zahrnuje transkripci DNA do mRNA, zhotovení mRNA, transport mRNA z jádra do cytoplazmy, translaci na sekvenci aminokyselin a post-translační modifikace. Každý dílčí krok genové exprese je regulovaný, což znamená, že vztah mezi kvantifikací mRNA a proteinu nebo není rovnocenný. Studium genové exprese může být provedeno buď na úrovni transkriptomiky (RT-qPCR, RNA-seq, reportérové linie) nebo proteomiky (hmotnostní spektrometrie, western blot, polyakrylamidová elektroforéza – PAGE).

Studium transkripce DNA pomocí RT-qPCR je založeno na kvantifikaci genové exprese v reálném čase. Jako templát se používá mRNA, která se před průběhem qPCR přepisuje do komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkriptázy. Kvantifikace může být buď absolutní nebo relativní. U absolutní kvantifikace jsou data exprese porovnávána s externí kalibrační křivkou vytvořenou koncentrační řadou studovaného amplikonu a získaná data odpovídají počáteční koncentraci studovaného vzorku, u relativní kvantifikace se porovnává variabilita mezi dvěma i více vzorky na základě intenzity fluorescence (Bustin, 2000). U RNA-seq je metoda založená na

využití vysoce výkonných sekvenačních metod poskytující náhled do transkriptomu buňky. Její hlavní výhodou je, že umožňuje objevení nových transkriptů, identifikaci alternativního sestřihu genů a detekci alelově specifické exprese (Kurkuba a Montgomery, 2015). Hlavní nevýhodou obou výše zmíněných metod je obtížná izolace mRNA, destruktivnost, v rámci vzorku může být analyzován pouze jeden časový bod a ztrácí se informace o prostorové distribuci specifické mRNA. Z tohoto důvodu vedl vývoj k vytvoření různých reportérových systémů, které slouží ke studii aktivity promotoru zájmu a touto metodou se budu v rámci diplomové práce blíže zabývat.

Studium proteomu pomocí hmotnostní spektrometrie je zaměřené na identifikaci proteinu z komplexní směsi a kvantifikaci úrovně exprese těchto proteinů. Limitací této metody je komplexnost analýzy a dynamický rozsah vzorku, který omezuje stanovení méně zastoupených proteinů (Kolker *et al.*, 2006). Dále lze využít western blotting, metodu založenou na dostupnosti protilátky zaměřené proti specifickému proteinu nebo epitopu, která slouží pro identifikaci proteinu a kvantifikaci úrovně jeho exprese. Dvourozměrná gelová elektroforéza (2D-PAGE) využívá elektrický proud k oddělení proteinů v gelu na základě jejich náboje (1. rozměr) a hmotnosti (2. rozměr). Tato metoda se nejčastěji používá pro separaci proteinů před další analýzou (např. hmotnostní spektrometrie) (Beeton-Kempen, 2020).

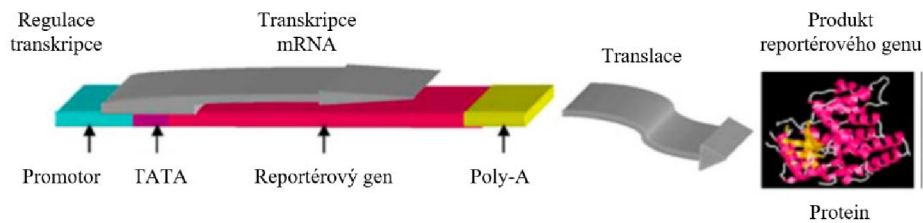
V rámci studií genové exprese je důležité pro pochopení, jak se určitý gen exprimuje za daných podmínek propojit, tyto dva způsoby, jelikož z důvodu regulace genové exprese na úrovni translace nemusí naměřené množství mRNA odpovídat množství naměřeného proteinu.

3.2.1 Reportérové linie

Reportérové linie slouží jako nástroj pro studium genové exprese za použití reportérového konstruktů. První reportérový systém byl vytvořen v 80. letech 20. století a byl založen na měření enzymové aktivity (měření aktivity promotoru) (Gorman *et al.*, 1982). Reportérovým konstruktem se rozumí konstrukt reportérového genu a regulačního komplexu (Obr. 3). Regulační komplex zahrnuje kontrolní komponenty transkripce (promotor nebo zesilovače), které mají buď funkci konstitutivní, nebo indukibilní (molekulárně-genetické senzory), které slouží k iniciaci a regulaci exprese reportérového genu.

Reportérový konstrukt se nejčastěji skládá ze dvou komponent: specifický

reportérový gen a regulační komplex (např. promotor genu zájmu). Produktem genu je buď enzym, který katalyzuje chemickou reakci substrátu, nebo protein, který po ozáření světlem vyzařuje fluorescenci. Tento konstrukt slouží pro posouzení aktivity promotoru, úrovně exprese a lokalizace aktivity promotoru (Serganova a Blasberg, 2019).



Obrázek 3 – Konstrukt reportérového genu. Konstrukt obsahuje promotor genu zájmu, TATA box, a reportérový gen. Převzato a upraveno z Serganova a Blasberg (2019)

3.2.2 Reportérové geny

Reportérový gen je exogenní kódující oblast připojená k promotorové sekvenci v expresním vektoru. Ideální reportérový gen by neměl být endogenně exprimován v buňce zájmu a měl by být vysoce citlivý pro detekci. Reportérový protein má aktivitu, která se dá lehce kvantifikovat *in vitro* nebo může být vizualizována *in planta*.

Prvním popsaným reportérovým genem byl bakteriální enzym chloramfenikol acetyltransferáza (CAT) sloužící k detoxifikaci antibiotika chloramfenikol pomocí acetylace. Tento systém však neumožňoval vizualizaci buněk nebo tkáně (Shaw *et al.*, 1979).

První reportérový systém schopný vizualizace aktivity reportérového genu byl založen na enzymu bakterie *E. coli* – β -glucuronidáza (GUS). (Jefferson *et al.*, 1987). Jednalo se o první reportérový gen, který se dal použít u rostlin a jeho použití je velmi oblíbené dodnes. Krátce poté byl vytvořen další reportérový systém založený na enzymu bakterie *E. coli* – *lacZ* genu kódující glykosid-hydrolázu. Jednalo se o první reportérový gen, který se dal použít u eukaryotních buněk a zvířat (Jefferson *et al.*, 1986; Jefferson *et al.*, 1987).

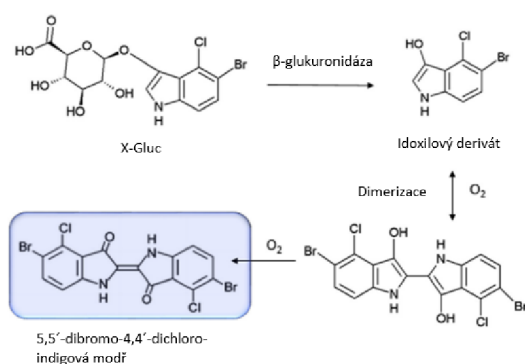
Dnes jsou nejpoužívanějšími reportérovými geny GUS, fluorescenční proteiny – zelený fluorescenční protein (GFP) a červený fluorescenční protein (RFP), gen kódující luciferázu a nově používaná genová kazeta RUBY. V rámci své práce se budu blíže zabývat GUS, GFP, RFP a RUBY reportérovými geny.

3.2.2.1 β -glukuronidáza - GUS

β -glukuronidáza je kódována genem odvozeným od *gus* operonu *Escherichia coli*. Jeho použití jako reportérový gen se datuje zpět do roku 1987, kdy byl poprvé použit ve studii Jefferson *et al.* (1987). Čtecí rámec *uidA* (GUS) genu kóduje protein β -glukuronidázu (GUS) o hmotnosti 68 kD. Tento protein v aktivní formě (homotetramer) katalyzuje hydrolýzu substrátu – β -glukoronidů a β -galakturonidů. Substrát se vybírá podle způsobu vizualizace, která může být např. histochemická, spektrofotometrická nebo fluorometrická (Jefferson *et al.*, 1987). Aktivita proteinu GUS v rámci rostlinné tkáně se detekuje pomocí přidání substrátu 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glukunidu (X-Gluc). Reakce probíhá ve dvou krocích, kde nejdříve dochází ke katalyzované hydrolýze X-Gluc substrátu pomocí enzymu GUS za vzniku dvou indoxylových derivátů, které potom oxidativně dimerizují za vzniku modrého pigmentu 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigové modře (Obr. 4). Tento modrý pigment by se měl ukázat pouze v tkáních a buňkách, ve kterých je promotor kódující GUS aktivní (Dedow *et al.*, 2022).

GUS reportérový gen je dodnes velice oblíbeným reportérovým genem u rostlin, protože pro jeho vizualizaci není potřeba drahá technika, GUS protein je velmi stabilní a nevykazuje žádnou toxicitu pro růst a vývoj rostliny. Další jeho výhodou možnost vizualizovat i velmi slabou aktivitu promotorů.

Jeho hlavní nevýhodou je, nemožnost sledovat genovou expresi daného genu v čase, jelikož jeho vizualizací dochází k destrukci rostlinného materiálu a dále u některých rostlin dochází k endogenní aktivitě GUS, což má za následek falešné pozitivní nálezy (Hu *et al.*, 1990).



Obrázek 4 – Enzymatická reakce β -glukuronidázy za použití X-Gluc substrátu. Převzato a upraveno (Mahran *et al.*, 2020)

3.2.2.2 Fluorescenční proteiny (FP)

Fluorescenční proteiny (FP) nachází využití pro specifické a cílené značení proteinů, organel, buněk, tkáně a celého organismu *in vivo*. Jejich výhodou je, že nepotřebují žádné dodatečné enzymy a kofaktory, kromě molekulárního kyslíku pro vytvoření molekuly chromoforu (Shcherbakova *et al.*, 2012). Jejich hlavní nevýhodou je, že pro detekování signálu je potřeba mnoho transkriptů a potřebují čas pro správné složení proteinu a zrání fluoroforu (doba za kterou se fluorescenční protein správně poskládá a začne vyzařovat fluorescenci). Proto bylo vytvořeno několik druhů mutantních fluorescenčních proteinů, které tyto nevýhody překonávají (Baird *et al.*, 2000; Wiehler *et al.* 2001).

FP mají širokou škálu fluorescenčních barev, které pokrývají celé viditelné spektrum od krátké fialové až po dalekou červenou (azurová, modrá, zelená, žlutá a červená) (Shcherbakova *et al.*, 2012). Nejznámějšími zástupci jsou zelený fluorescenční protein (GFP – green fluorescent protein), proteiny odvozené od GFP a červený fluorescenční protein (RFP – red fluorescent protein).

- Zelený fluorescenční protein – GFP

Jedná se o malý monomerní fluorescenční protein o hmotnosti 27 kD izolovaný z medúzy *Aequorea victoria* v roce 1960. Skládá se z 11 beta-vláken, které se sbalují do velmi kompaktního beta-barelu, kde je ukryta molekula chromoforu. Po ozáření UV nebo modrým světlem vykazuje správně složený protein světle zelenou fluorescenci (emisní vlnová délka 507 nm) (Chalfie *et al.*, 1994).

Hlavním problémem, kterým se GFP potýkal u rostlin, je autofluorescence, kvůli které může být obtížné GFP signál detekovat (Hraška a Rakouský, 2005). Tento problém pomohla vyřešit modifikace GFP, kde pro účinnější expresi byla z kódující sekvence GFP odstraněna sekvence pro kryptický intron. Dále byly provedeny úpravy GFP, čímž vznikly varianty s větší stabilitou, jasně a rychlejší dobou zrání (Tab. 1). Například nejvíce využívaná varianta EGFP má až 4x rychlejší dobu zrání než divoký typ GFP (Yang *et al.* 1996).

Tab. 1 – Seznam dalších nejběžněji používaných GFP variant

| Vrianta GFP | Efekt modifikace | Reference |
|-------------|--|----------------------------------|
| mGFP4 | Zvýšení fluorescence proteinu | Haseloff a Amos (1995) |
| mGFP5 | Lepší skládání proteinu při 37 °C, zvýšená fluorescence | Haseloff <i>et al.</i> , (1997) |
| sGFP | Zvýšená exprese a fluorescence | Haas <i>et al.</i> , (1996) |
| SGFP S65T | Zvýšené detekční limity, zvýšený jas, rychlejší tvorba chromoforu, pomalejší fotobleaching | Chiu <i>et al.</i> (1996) |
| mut3GFP | Skládání proteinu při vyšších teplotách | Siemering <i>et al.</i> , (1996) |
| smGFP | Zlepšená rozpustnost proteinu a zvýšený jas | Davis a Viestra (1998) |
| smRS-GFP | Zlepšená rozpustnost, jas a posun emise do červené oblasti | Davis a Viestra (1998) |
| smBFP | Zlepšená rozpustnost, jas a posun emise do modré oblasti | Davis a Viestra (1998) |
| synGFP | Zvýšená účinnost translace a zvýšená exprese | Rouwental <i>et al.</i> , (1997) |
| BFP | Emise v modré oblasti, slabší jas a fotobleaching | Reichel <i>et al.</i> (1996) |
| mYFP | Emise ve žluté oblasti | Haseloff <i>et al.</i> , (1999) |
| mCFP | Emise v tyrkysové (azurové) oblasti | Haseloff <i>et al.</i> , (1999) |

- RFP – Červený fluorescenční protein

Jedná se o malý fluorescenční protein o hmotnosti 25,9 kD, jenž byl izolován ze živočichů rodu *Discosoma* a pojmenován DsRed (Baird *et al.*, 2000). DsRed má excitační vlnovou délku 558 nm a emisní vlnovou délku při 583 nm. Nevýhodou proteinu DsRed je jeho doba zrání, která je kolem 24 hodin a podstatná část proteinových molekul tvoří zelený fluorescenční produkt, což omezuje jeho použitelnost pro vícebarevné zobrazovací experimenty v kombinaci s GFP (Cotlet *et al.*, 2001). Další nevýhodou je, že DsRed je tetramerní protein. Proto jakýkoliv protein fúzovaný s DsRed se stane taky tetramerní, což může narušit lokalizaci cílového proteinu (Gross *et al.*, 2000; Yarbrough *et al.*, 2001). Proto byly pomocí genetického inženýrství vyvinuty monomerní varianty RFP, které tyto problémy překonávají. Díky tomu existuje v dnešní době několik variant RFP, které emitují oranžovou, červenou a daleko-červenou fluorescenci.

Varianty RFP lze rozdělit do dvou skupin, a to RFP odvozené od DsRed, kam patří: mRFP1 s rychlejší dobou zrání, ale nevýhodou je redukce fluorescence a

fotostability (Campbell *et al.*, 2002; Shaner *et al.*, 2008); mOrange2 kódující oranžovočervený fluorescenční protein se zlepšenou fotostabilitou (Shaner *et al.*, 2008); mCherry, který patří k nejpoužívanějším RFP v bakteriálním výzkumu (Shcherbo *et al.*, 2009); dále sem patří mPlum, mRouge a řada dalších variant (Shen *et al.*, 2015).

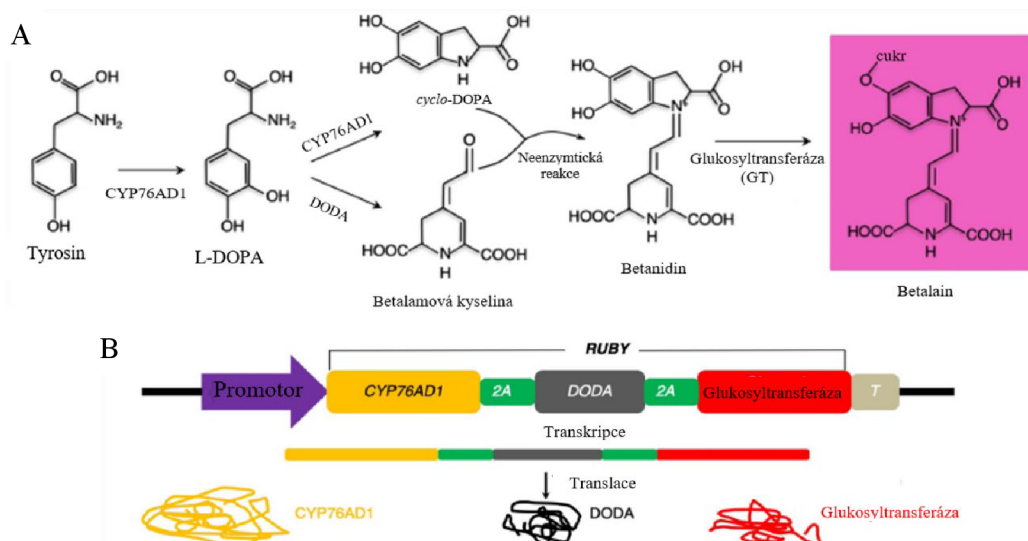
Druhou skupinou jsou RFP odvozené od RFP eqFP578 pocházejícího z mořské sasanky *Entacmaea quadricolor* (Wiedenmann *et al.*, 2002). K tomuto typu proteinu patří: TagRFP, kódující oranžovočervený fluorescenční protein produkující jasnější fluorescenci, ale s nízkou fotostabilitou (Shaner *et al.*, 2008); FusionRed, vykazující sníženou cytotoxicitu v savčích buňkách (Shemiakina *et al.*, 2012); mKate2, s vynikající odolností vůči pH a vysokou fotostabilitou; dále mRuby, mNeptune a další varianty (Shen *et al.*, 2015).

3.2.2.3 Reportérová kazeta RUBY

Jedná se o reportérový gen, jehož předností je neinvazivní sledování genové exprese bez použití speciálního zařízení nebo chemického substrátu. Vizualizace je založena na schopnosti rostliny produkovat barevné deriváty aminokyseliny tyrosinu – betalainy (Strack *et al.*, 2003).

Betalainy jsou látky červené barvy, se kterými se můžeme setkat např. u červené řepy, dračího ovoce nebo švýcarského mangoldu. Syntéza betalainu je založena na třech enzymatických reakcích. Při reakci nejdříve dochází k hydroxylaci tyrosinu za vzniku L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L – DOPA) za katalýzy enzymem P450 oxygenázou CYP76AD1. L – DOPA je následně oxidován na *cyklo*-DOPA za katalýzy enzymem CYP76AD1. Alternativní cestou může být L – DOPA metabolizován enzymem L – DOPA 4,5-dioxigenázou (DODA) na betalamovou kyselinu. Následně bez účasti enzymu dochází ke kondenzaci betalamové kyseliny a *cyklo*-DOPA za tvorby betanidinu, kde následným přidáním cukerného zbytku pomocí glukosyltransferázy dochází k vytvoření betalainu (Obr. 5). Geny kódující tyto enzymy jsou součástí RUBY kazety.

Hlavní výhodou reportéru RUBY je, že každá buňka obsahuje aminokyselinu tyrosin. Díky tomu se nemusí tyrosin exogenně přidávat jako substrát (He *et al.*, 2020; Polturak a Aharoni, 2019).



Obrázek 5 - Reportérová kazeta RUBY. Chemická reakce pro přeměnu tyrosinu na betalain, který má červenou barvu (A). Reportérový konstrukt exprimující trojici enzymů účastnících se biosynetické dráhy betalainů. Převzato a upraveno (He *et al.*, 2020)

3.2.4 Příprava reportérových linií

Příprava reportérové linie zahrnuje přípravu reportérového konstrukt pomocí metod klonování, následně transformaci rostliny a selekci pozitivních transformantů a nakonec selekci homozygotních linií.

3.2.4.1 Příprava reportérového konstrukt

Reportérovým konstruktem se rozumí plasmidový vektor exprimující reportérový protein. Tento konstrukt se připravuje pomocí metod klonování, kterým je několik fragmentů DNA rekombinováno dohromady v rámci plazmidu a následně naklonovány v bakteriálních hostitelích. Po dlouhou dobu bylo klonování prováděno pomocí restričních endonukleáz, kterými se generovaly kompatibilní konce mezi vektorem a inzertem a následně došlo k jejich spojení pomocí T4 DNA ligázy. Avšak tímto způsobem je tvorba konstrukt omezena přítomností nebo absencí vhodných restričních míst a zároveň se jedná o velmi pracný proces zahrnující izolaci fragmentů DNA (Green a Sambrook, 2012). Proto byly vytvořeny alternativní metody zahrnující Golden Gate Assembly, Gibson Assembly a Gateway klonování, kterým se budu zabývat blíže.

Golden Gate Assembly je metoda usnadňující propojení více fragmentů DNA do jednoho celku. Tato metoda využívá restriční enzymy typu IIS, které štěpí DNA mimo jejich rozpoznávací sekvenci a díky tomu vznikají nepalindromické přesahy, které umožňují propojení několika fragmentů DNA a následné jejich spojení pomocí T4

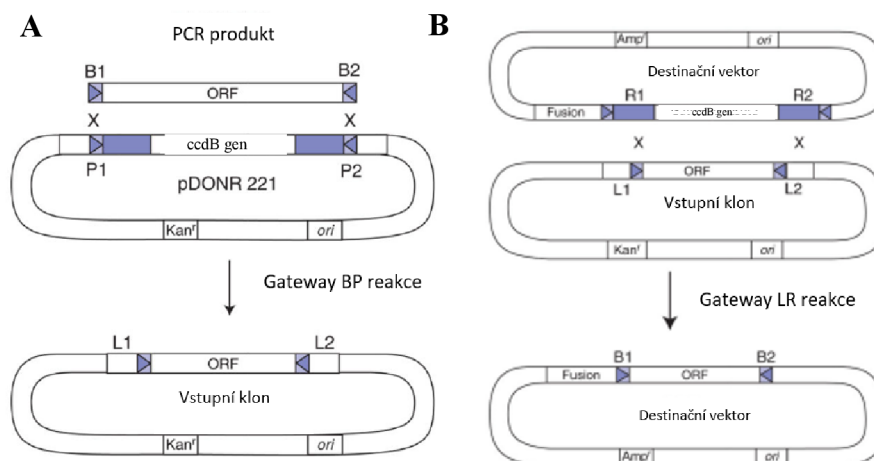
ligázy (Lebedenko *et al.*, 1991; Szybalski *et al.*, 1991).

Pomocí Gibson Assembly může být spojeno až několik fragmentů DNA obsahujících 20–40 bp dlouhý přesah, který slouží pro spojení se sousedním fragmentem DNA. Tento přesah je vytvořen pomocí speciálně navržených primerů. Následné spojení jednotlivých fragmentů je provedeno pomocí 3 enzymů, kdy exonukleáza odstraní část sekvence z 5' konce, díky čemuž dojde k propojení jednotlivých fragmentů, následně DNA polymeráza vyplní vzniklé mezery a nakonec dojde ke spojení pomocí DNA ligázy (Gibson *et al.*, 2009).

3.2.4.1.1 Gateway klonování

Gateway klonovací systém je založen na místně specifické rekombinaci DNA bakteriofága λ do genomu *Escherichia coli* (Hartley *et al.* 2000). Umožňuje paralelní klonování více fragmentů DNA za použití stejných enzymů, což je značnou výhodou oproti konvenčnímu klonování (Hartley *et al.* 2000; Walhout *et al.* 2000; Reboul *et al.* 2001).

Při Gateway klonování se využívají dva typy rekombinačních reakcí zprostředkované enzymovými mixy zvanými BP a LR clonasy. Nejdříve dochází k PCR amplifikaci zájmového DNA fragmentu za použití speciálně navržených primerů. Tyto primery jsou na 3' konci kompatibilní s DNA fragmentem a na 5' obsahují attB přesah. Při první reakci dochází k rekombinaci attB přesahů PCR produktu s attP konci donorového vektoru za vzniku vstupního klonu v němž je klonovaný fragment DNA ohraničen attL konci (BP reakce) (Obr. 6A). Následně při druhé reakci dochází k rekombinaci attL přesahů DNA fragmentu ve vstupním klonu s attR konci Gateway kazety destinačního vektoru za vzniku destinačního klonu s attB konci (LR reakce) (Obr.6B) (Reece-Hoyes a Walhout, 2018).



Obrázek 6 – Gateway klonování. BP reakce (A), LR reakce (B). Převzato a upraveno (Reece-Hoyes a Walhout, 2018)

Každá rekombinační reakce je velice přesná a rozpoznání rekombinačních míst *att* je extrémně specifické. Celkem existují 4 typy *att* míst, které obsahují jádro (rozpoznávací oblast) o velikosti 25 bp a liší se od sebe přítomností/absencí ramen – *attP*, *attB*, *attL* a *attR* místa (Obr. 7A). Ramena obsahují interakční místa pro rekombinační enzymy. Uvnitř jádra je rozpoznávací oblast, kde dochází ke štěpení a následnému znovuspojení DNA (Obr. 7B). Zavedením nukleotidových změn do jádra vedlo k vytvoření různých podtypů *att* míst, které rekombinují pouze mezi sebou. Tyto modifikace usnadňují klonování fragmentů DNA pouze v jedné orientaci paralelně za sebou (Reece-Hoyes a Walhout, 2018).



Obrázek 7 – Rekombinační místa *att*. Rekombinační místa *attP*, *attB*, *attL* a *attR* (A), Rozpoznávací oblast jádra, kde dochází k restričnímu štěpení (B). Převzato a upraveno (Reece-Hoyes a Walhout, 2018)

Hlavní nevýhodou tohoto systému je, že jakmile je použito Gateway klonování, je těžké přejít na jiný rekombinační systém nebo se vrátit ke konvenčnímu klonování (např. Gateway vektorům mohou chybět vhodná místa pro restriční štěpení). Další nevýhodou je cena restričních enzymů nebo že při klonování více fragmentů DNA mezi nimi zůstávají *att* místa (Reece-Hoyes a Walhout, 2018).

3.2.4.2 Transformace *Arabidopsis thaliana* – floral dip

Transformace rostlin je genetický proces, při kterém jsou geny zájmu zavedeny do rostlinných buněk a stabilně integrovány do genomu. Konvenční transformační metody zahrnují přípravu rostlinných buněk nebo tkání pro transformaci, zavedení genu zájmu do buněk pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nebo biolistickou metodou, selekci transformovaných buněk a jejich regeneraci do transgenní rostliny (Christou, 1996).

Celkově se jedná o zdlouhavý a složitý proces. V roce 1987 byla v průkopnické práci Feldmann *et al.* (1987) popsána metoda transformace „in planta“, kde byly úspěšně, ale s nízkou účinností transformovány klíčící semena *Arabidopsis*. O několik let později byla účinnost transformace zvýšena pomocí metody vakuové transformace. Pro provedení transformace musely rostliny vytrhnuty a poté znovu zasazeny (Feldmann *et al.*, 1987; Bechtold *et al.*, 1993).

Tyto transformační postupy byly postupem času zjednodušeny a vylepšeny, kdy se jednoduše květ ponořil do buněčné suspenze *Agrobacterium* s přidanou povrchově aktivní látkou – Silwet L-77 pro zvýšení účinnosti transformace. Tato transformační metoda se označuje jako metoda květinového namáčení (floral dip) (Clough a Bent, 1998). Jejimi hlavními výhodami jsou nenáročnost, využití relativně levného vybavení, nízké množství specializovaných činidel, produkce velkého počtu transgenních linií u *Arabidopsis* během krátké doby.

3.2.4.3 Selektce transgenních homozygotních linií u *Arabidopsis thaliana*

Analýza transgenních linií je velice důležitý proces. Z potomků primárně transformovaných rostlin je třeba nejdříve vybrat transgenní jedince, tj. takové, kteří ve svém genomu nesou požadovaný gen/inzert. V T1 generaci rostlin je inzert prakticky vždy přítomen pouze v jedné alele (hemizygotní rostliny). Při práci s hemizygotem by mohlo dojít v následujících generacích ke ztrátě inzertu v důsledku Mendelova zákona o segregaci alel, z tohoto důvodu je prakticky vždy potřeba pro další práci s transgenními rostlinami vyselektovat homozygotní linie, kde inzert je přítomen ve dvou alelách (Bubner a Baldwin, 2004; Miego *et al.*, 2013). Při procesu transformace rostlin často dochází k vícenásobné inzerci transgenu do genomu a pokud je u rostliny počet vložených kopií transgenu vysoký, výrazně to komplikuje nebo dokonce prakticky znemožňuje selekci homozygotů. Z tohoto důvodu je užitečné při selekci homozygotních linií z transgenních rostlin využít některou z metod pro stanovení počtu kopií inzertu.

3.2.4.3.1 Identifikace transformovaných rostlin pomocí markerů

Selekce transformovaných rostlin/ semen je založena na použití selekčních markerů, které jsou součástí klonovacího vektoru. Selekcce transgenních rostlin se konvenčně dosahuje pomocí selekčních markerů, které umožňují transgenním rostlinám růst v přítomnosti určitého antibiotika nebo herbicidu. Tyto tradiční selekční metody mají však několik nevýhod. Za prvé tyto selekční markery vyžadují práci ve sterilních podmínkách, což je překážkou při práci s velkým počtem rostlin v T2 generaci, kdy jsou potřebné velké prostory pro jejich pěstování. S tím pak souvisí použití velkého množství růstových médií a pracnost a časová náročnost při vysetí mnoha semen. A za druhé dochází k tomu, že transformované rostliny s růstově vývojovými vadami jsou částečně senzitivní na použitá antibiotika a herbicidy, i přesto, že ve svém genomu nesou geny rezistence (Yin *et al.*, 2008). Dále bývá problém v situaci, kdy je potřeba provést transformaci inzerční linie, která již ve svém genomu obsahuje transgen s genem rezistence vůči antibiotiku (např. spectinomycin), jelikož ho nelze znovu použít a omezuje se tím výběr selekčního markeru pro novou transformaci.

Další metodou pro selekci transformovaných rostlin u *Arabidopsis* je selekce semen pomocí fluorescenčního markeru. Jedná se novou technologií nazývanou se FAST (fluorescence-accumulating seed technology, Shimada *et al.*, 2010), která je založena na fúzi OLE1 promotoru (*AtOLE1_{pro}*) s fluorescenčním reportérovým genem (GFP, RFP). OLE1 (oleosin) je strukturální protein, který je součástí membrán oleosomů a běžně se vyskytuje v buňkách semen *Arabidopsis thaliana*. Díky tomu může být u této rostliny použit jako ideální selekční marker. Hlavními výhodami této technologie jsou, že umožňuje identifikaci transformovaných semen ihned po jejich sklizení a tím překonává nedostatky konvenčních selekčních markerů, šetří čas, eliminuje potřebu antibiotik a herbicidů a není finančně náročná. Největší výhodou FAST technologie je, že jedná o ko-dominantní markery, které lze kromě selekce transformované rostliny v T1 generaci využít i k rozlišení homozygotní rostliny od hemizogtní v T2 generaci na základě intenzity fluorescence semen (Shimada *et al.*, 2010).

3.2.4.3.2 Stanovení počtu kopií transgenu u transformovaných rostlin

Transgenní rostliny se připravují vložením transferové DNA (T-DNA) do genomu rostliny pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. T-DNA se může v rámci rostlinného genomu integrovat do různých míst a zároveň často dochází také k vícenásobné inzerci,

kteřá komplikuje selekci homozygotních rostlin. Vysoký počet kopií transgenů může vést k extrémně vysoké expresi genu a někdy může vést až k jeho umlčení (Głowacka *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2007), proto v ideálním případě je lepší vyselektovat v T1 generaci rostliny s 1 kopií vloženého transgenů (hemizygoti) a následně v T2 generaci vyselektovat rostliny s dvěma kopiemi inzeru (homozygoti).

Pro určení počtu kopií inzeru se používá několik přístupů. Jedním z nich je například Southern blot, kde je genomická DNA štěpena restriční endonukleázou, následně separována elektroforézou a po přenosu na membránu jsou fragmenty obsahující transgen detekovány pomocí značených DNA sond (Cantsilieris *et al.*, 2013). Dnes často používaná metoda je kvantitativní PCR, kdy se porovnává intenzita fluorescence vzorku se sekvencí zájmu s intenzitou fluorescence validovaného referenčního genu (Pfaffl, 2001). Dále lze využít sekvenační metody, kdy za pomoci cíleného zachycení sekvence, jsou izolovány oblasti DNA, které obsahují požadovanou sekvenci. Tato metoda zahrnuje přípravu DNA sekvenační knihovny skládající se z náhodně dlouhých fragmentů templátové DNA, kde poté dochází k hybridizaci mezi zájmovou sekvencí a biotinylovanými syntetickými oligonukleotidy (sondami). Nežádoucí sekvence DNA jsou vymyty a tím dochází k obohacení DNA. To umožnilo určení přesného počtu kopií inzeru a identifikaci míst inzerce (Guttikonda *et al.*, 2016).

Každá z těchto metod má své specifické nevýhody jako je nepřesnost určení nebo vysoké náklady. Dnes je z jedné nejefektivnějších a nejrychlejších metod pro určení počtu kopií genu/ inzeru v genomu je digital droplet PCR (ddPCR).

3.2.4.3.2.1 Digital droplet PCR (ddPCR)

Digital droplet PCR je metoda, která byla vyvinuta pro absolutní kvantifikaci nukleové kyseliny ve vzorku. Jedná se o vysoce výkonný, přesný a citlivý systém překonávající nepřesnosti real-time PCR. Své uplatnění nachází jak ve výzkumných, tak diagnostických aplikacích (Hindson *et al.*, 2011).

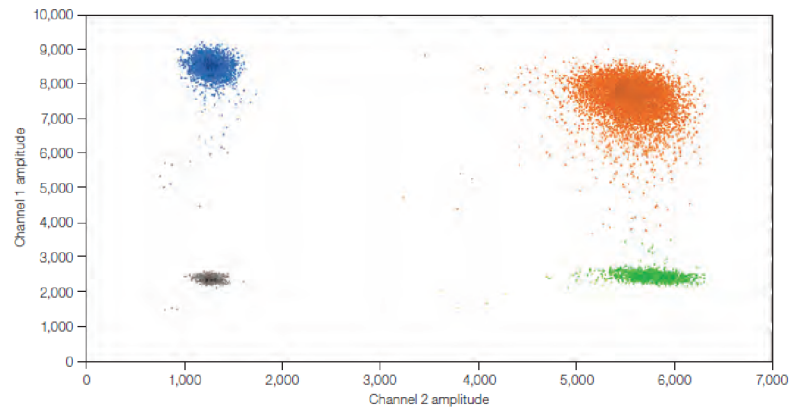
Absolutní kvantifikace zájmové DNA sekvence je založena na rozdělení směsi (vzorek a olej) obsahující cílovou sekvenci DNA až na 20000 kapiček (dropletů). Každá kapička slouží jako samostatná reakční jednotka, v níž probíhá PCR reakce sekvencí zájmu za využití TaqMan sond značených reportérovými fluorofory FAM, VIC nebo HEX nebo interkalačních barviv typu EvaGreen. Po reakci je následně analyzována každá kapička samostatně za využití dvoubarevného detekčního systému (FAM a VIC), kde se vyhodnotí přítomnost (pozitivní kapičky) nebo nepřítomnost (negativní kapičky)

fluorescenčního signálu. Pozitivní kapičky jsou tedy obecně ty, které obsahují alespoň jednu kopii cílové sekvence DNA.

Pro zjištění počtu kopií vloženého inzertu v genomu se používá ddPCR v módu CNV (copy number variation). Termín CNV je termín obecně používaný pro označení situace, kdy se určitá sekvence genomu opakuje a počet opakování se mezi jedinci stejného druhu liší. Tato změna počtu kopií může mít vliv na výsledný fenotyp (např. morfologie, změna metabolismu, náchylnost k infekčním chorobám). Při stanovení počtu kopií inzertu u transgenních rostlin se jako studovaná sekvence (target) volí úsek DNA, který je součástí inzertu, a jako reference se volí obvykle gen, který se v genomu studované rostliny nachází ve dvou kopiích.

Při měření CNV se pro vizualizaci amplifikace studované a referenční sekvence DNA často využívají TaqMan hydrolyzační sondy (proby). Jedná se o syntetické oligonukleotidové proby, které v intaktním stavu obsahují fluorofor a zhášec velmi blízko sebe a to má za následek že fluorofor (barvivo FAM – fluorescein emitující modrozelenou fluorescenci, VIC – xanthénové barvivo emitující žlutozelenou fluorescenci a HEX – hexachlorfluorescein emitující zelenožlutou fluorescenci) je zhášen. Během PCR reakce tyto proby nasedají na komplementární sekvenci DNA a v okamžiku, kdy DNA polymeráza při amplifikaci narazí na probu, využije své 5'-3' exonukleázové aktivity a proba se tím hydrolyzuje za uvolnění fluoroforu, který se oddělí od zhášeče, což má za následek zvýšení fluorescence (<https://www.thermofisher.com>).

Při duplexním experimentu mohou být sledovány dvě cílové sekvence, přičemž pro každou z nich musí být navržena TaqMan sonda s jiným fluoroforem. V tomto případě jsou data vizualizovaná jako 2-D graf (Obr. 8), ve kterém je znázorněna fluorescence kanálu 1 (sonda 1, obvykle FAM) proti fluorescenci kanálu 2 (sonda 2, obvykle HEX nebo VIC) pro každou kapku (Hindson et al., 2011, <https://www.bio-rad.com>). Jelikož je distribuce sekvencí DNA do kapiček náhodná, tak u takového duplexního experimentu je možné kapičky dělit na čtyři skupiny: dvojitě negativní kapičky, kapičky pozitivní pro fluorofor 1, kapičky pozitivní pro fluorofor 2 a kapičky pozitivní pro oba fluorofory (dvojitě pozitivní). Software poté spočítá počet pozitivních a negativních kapiček pro jednotlivé fluorofory a pomocí výpočtu vycházejícího z Poissonova statistického rozdělení určí buď absolutní koncentraci cílové sekvence DNA v jednotkách kopie/ μ l, nebo relativní zastoupení jedné sledované sekvence vůči druhé (referenci) (<https://www.bio-rad.com>).



Obrázek 8 – 2-D graf zobrazující fluorescenci kapiček. Na grafu lze pozorovat negativní kapičky (šedá barva), pozitivní kapičky pouze pro FAM (modrá barva), pozitivní kapičky pouze pro VIC (zelená barva) a pozitivní pro oba fluorofory (oranžová). Převzato a upraveno z manuálu pro ddPCR (<https://www.bio-rad.com>)

4 Materiál a metodika:

4.1 Biologický materiál

- *Agrobacterium tumefaciens* kmen GV3101
- *Arabidopsis thaliana* – ekotyp Columbia (Col-0)
- *Arabidopsis thaliana* – mutant *lhcb8* (SALK_032779)
- *Arabidopsis thaliana* reportérová linie - AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS
- *Arabidopsis thaliana* reportérová linie - AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS
- *Arabidopsis thaliana* reportérová linie - AtLhcb8_{pro}::RUBY
- *Escherichia coli* kmen NEB5α
- *Escherichia coli* kmen Stb12
- Plasmid At2S3:RUBY (Addgene, kat. č. 160906, He *et al.*, 2020)
- Plasmid pDONR P4-P1r_AtLhcb8_{pro}
- Plasmid pDONR207 (Invitrogen, kat. č. V011826)
- Plasmid pH7m24GW-FAST (VIB, ID 5_43)

4.2 Chemikálie:

- 10X CutSmart pufr (NEB, kat. č. B6004S)
- 5X Sequencing Buffer (Thermo scientific, kat.č 4336697)
- 5x TBE (Tris/Borate/EDTA) pufr
- Aceton 90%
- Agaróza (Sigma, kat.č. A9539)
- čisticí prostředek na GMO – Krystal SANAN KLASIK
- destilovaná voda
- Etanol 80%
- Etidium bromid
- GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use (Thermo scientific, kat.č. SM1553)
- Gentamicin 50 mg/ml
- Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymeráza (NEB, kat. č. M0493S)
- Q5 Reaction Buffer Pack (NEB, kat. č. B9027S)
- Restrikční enzym MfeI (NEB, kat. č. R3589S)
- Restrikční enzym XmnI (NEB, kat. č. R0194S)
- Rifampicin 50 mg/ml
- Silwet L-77
- Spectinomycin 100 mg/ml

Použité soupravy:

- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo scientific, kat.č. 4337456)
- Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix (Invitrogen, kat. č. 10348582)
- Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Invitrogen, kat. č. 10134992)
- NucleoSpin® Plant II kit
- Phire Plant Direct PCR Master Mix kit (ThermoFisher Scientific, kat.č. F160S)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, kat. č. 28106)
- ThermoFisher GeneJet Plasmid kit (ThermoFisher Scientific, kat. č. K0503)

Použité roztoky a jejich příprava:

- 10% Triton X
- 100 mM Acetosyringon: 19,62 mg/ml v DMSO
- 100 mM $K_3[Fe(CN)_6]$: 1,65 g $K_3[Fe(CN)_6]$ v 50 ml dH_2O .
- 100 mM $K_4[Fe(CN)_6]$: 2,12 g $K_4[Fe(CN)_6]$ v 50 ml dH_2O .
- 100 mM $NaPO_4$ roztok: smíchat 7 ml 200 mM NaH_2PO_4 s 18 ml 200 mM Na_2HPO_4 a doplnit do 50 ml dH_2O ; pH 7,2
- 100 mM X-gluc: Rozpustit 100 mg X-gluc ve 2 ml DMSO
- 5% Sacharóza: 50g/l v dH_2O
- 500 mM EDTA: 9,3 g Na_2EDTA v 50 ml dH_2O ; pH 8
- SOC médium (NEB, kat. č. B9035S)
- Sterilní LB (Luria-Bertani) médium: 10 g/l trypton, 5 g/l kvasničný extrakt, 10g/l NaCl, pH 7; pro přípravu tuhého média přidat agar do konečné koncentrace 1,5%
- Sterilní YEB (Yeast Extract Beef) médium: 5 g/l hovězí extract, 1g/l kvasničný extrakt, 5 g/l pepton, 5 g/l sacharóza, 0,3 g/l $MgSO_4$, pH 7,2; pro přípravu tuhého média přidat agar do konečné koncentrace 1,5%

4.3 Přístrojové vybavení:

- Analytické váhy (Scaltec instruments GmbH, Německo)
- Automatické pipety (Nichipet, USA)
- Biologický termostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)
- Centrifuga (Labnet International, Inc., USA)
- Centrifuga 5430 R (Eppendorf, Německo)
- Droplet Generator QX200 (Bio-Rad, USA)

- Droplet Reader QX200 (Bio-Rad, USA)
- DUAL-Pam-100 (Walz, Německo)
- Elektroforetická komůrka (Thermo Fisher Scientific, USA)
- FluorCam 700MF (Photon Systems Instruments, ČR)
- Fotoaparát Nikon D90 (Nikon)
- Fytotron (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
- GentleGrab (Labdeers, ČR)
- Luminární box (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Lyofilizátor (LaboGene, Dánsko)
- Mikrocentrifuga Fresco 17 (Thermo Fisher scientific, USA)
- Mikroskop Olympus IX81 (Olympus, Japonsko)
- Mixer Mill (Retsch GmbH, Německo)
- PCR Plate Sealer PX1 (Bio-Rad, USA)
- Spektrofotometer NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Stereoskopický mikroskop EP50 (Olympus, Japonsko)
- Stereoskopický mikroskop SZX16 (Olympus, Japonsko)
- Světelný mikroskop BX60 (Olympus, Japonsko)
- Thermal cycler (Bio-Rad, USA)
- Třepačka MAXQ 4000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Třepačka vortex 4 bas (IKA, Německo)
- UV transilluminátor (Syngene International Limited, India)
- Vakuová pumpa (KNF LAB, Německo)
- Vodná lázeň (Grant Instruments Ltd, Anglie)
- Zdroj jednosměrného napětí (Thermo Fisher Scientific, USA)

Použitý Software

- Snapgene
- Microsoft excel

4.4 Metody:

4.4.1 Rostlinný materiál a podmínky pěstování

V průběhu experimentu byly využity rostliny *Arabidopsis thaliana*. Konkrétně divoký typ (WT, ekotyp Columbia, Col-0), mutantní linie s inzerací v genu kódující protein LHCB8 (*kolhcb8*) a reportérové linie, kde první linie obsahuje inzert, který se skládá ze sekvence promotoru *LHCB8* (AtLhcb8_{pro}, (AtLhcb8_{pro}, sekvence 1428bp upstream od start kodonu genu *LHCB8*) a reportérového genu GUS a GFP (AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS) a druhá linie, jejíž inzert se skládá ze sekvence AtLhcb8_{pro}, genu *LHCB8* a reportérového genu GUS a GFP (ALhcb8_{pro}::Atlhcb8::EGFP-GUS). Obě linie obsahují fluorescenční selekční marker OLE1-RFP (Shimada *et al.*, 2010) a byly poskytnuty vedoucí práce. V průběhu práce byla připravena třetí linie, jejíž inzert se skládá ze sekvence AtLhcb8_{pro} a reportérové kazety RUBY (AtLhcb8_{pro}::RUBY). Tato linie obsahuje fluorescenční selekční marker OLE1-GFP.

Vysazení rostlin pro selekci homozygotních linií probíhalo tak, že nejdříve byla semínka stratifikována (namočení semínek do vody a umístění do prostředí o teplotě cca 4 °C po dobu 2 dní). Poté byla semínka vyseta a umístěna do fytotronu za následujících podmínek pěstování: den (16h světlo o intenzitě 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 19 °C, a 60% vlhkost) a noc (8 h tma, 18°C a 60% vlhkost).

Pro analýzu aktivity AtLhcb8_{pro} a charakterizaci fotosyntetické funkce rostlin byla nejdříve vyseta semínka následujících genotypů: WT, *kolhcb8* a reportérová linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}::Atlhcb8::EGFP-GUS. Pro vyklíčení byla semínka nejdříve stratifikována. Poté byla vysazena a dána do fytotronu za podmínek pěstování: den (8h světlo o intenzitě 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 22 °C, a 60% vlhkost) a noc (16 h tma, 22°C a 60% vlhkost).

4.4.2 Charakterizace použitých plazmidů

V průběhu experimentu byly použity: plazmidy At2S3:RUBY (Addgene, kat. č. 160906), který obsahuje RUBY kazetu a byl použit pro neinvazivní vizualizaci *in vivo* aktivity AtLhcb8_{pro}, donorový plasmid pDONR207 (Invitrogen, kat. č. V011826), který sloužil pro vytvoření vstupního klonu obsahujícího RUBY kazetu v rámci Gateway klonování a obsahuje selekční gen rezistence na antibiotikum gentamicin, a plasmid pDONR P4 P1r_AtLhcb8_{pro}, který sloužil jako vstupní vektor obsahující sekvenci AtLhcb8_{pro}, který byl připraven a dodán vedoucí práce. Plasmid

pH7m24GW-FAST (VIB, ID 5_43) sloužil jako destinační vektor pro zaklonování sekvence AtLhcb8_{pro} a RUBY fragmentu a obsahuje selekční gen rezistence na antibiotikum spectinomycin.

4.4.3 Příprava reportérové linie AtLhcb8_{pro}::RUBY

4.4.3.1 Rozpěstování bakterií z konzerv nebo misek s tuhým LB médiem

Do sterilní zkumavky bylo napipetováno 5 ml tekutého LB média, antibiotikum gentamicin $c = 50 \mu\text{g/ml}$ (pDONR207::RUBY), spectinomycin $c = 100 \mu\text{g/ml}$ (At2S3::RUBY, pH7m24GW-FAST::AtLhcb8_{pro}::RUBY). Při rozpěstování z bakteriálních konzerv bylo do zkumavky přidáno 2,5 μl bakteriální kultury z bakteriální konzervy, při rozpěstování kolonií z misek s tuhým LB médiem byla požadovaná kolonie odebrána pomocí plastové špičky a přenesena do zkumavky. Poté byla zkumavka inkubována na třepačce přes noc (225 otáček, 37 °C) a následující den byla provedena izolace plazmidu. Veškerá práce s bakteriemi byla provedena ve sterilním prostředí.

4.4.3.2 Izolace plazmidové DNA pomocí ThermoFisher GeneJet Plasmid kitu

Narostlá kultura bakterií obsahující cílový plazmid byla rozlita po 2 ml do dvou mikrozkuvek (2 ml). Následně byly mikrozkuvky zcentrifugovány (6800g, 2 min) a k peletu bylo přidáno 125 μl resuspendačního roztoku s RNAasou. Obě směsi byly zvortexovány a resuspendované bakterie byly přepipetovány do jedné 1,5ml mikrozkuvky. Poté bylo k resuspendovaným bakteriím přidáno 250 μl lyzačního roztoku a směs byla nechána stát dobu 5 min při pokojové teplotě. Poté bylo k směsi přidáno 350 μl neutralizačního roztoku. Směs byla opatrně promíchána a následně stočena (12000g, 10 min).

Po centrifugaci byl supernatant přepipetován na filtr, kde po centrifugaci (12000g, 1 min) došlo k navázání DNA. Následně bylo celkem 3x provedeno promytí filtru pomocí promývacího roztoku, kde směs byla při každém promývání centrifugována při 12000g (1 minuta).

Filtr byl přemístěn do nové 1,5ml mikrozkuvky a na filtr bylo napipetováno 30 μl elučního pufru. Směs se nechala stát 5 min při pokojové teplotě, poté byla pro eluci plazmidu zcentrifugována (12000g, 2 min) a nakonec byla pomocí spektrofotometru NanoDrop při vlnových délkách 260 nm a 280 nm změřena

koncentrace DNA.

4.4.3.3 PCR amplifikace pomocí Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerasy

Nejříve byla připravena PCR reakční směs podle protokolu PCR Using Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Tab. 2).

Tab. 2 – Složení PCR reakční směsi

| Reagencie | Konečná koncentrace | Objem |
|---------------------------|---------------------|---------------|
| 5X Q5 buffer | 1X | 10 μ l |
| 10mM dNTPs | 200 μ M | 1 μ l |
| Q5 polymeráza | 0,02 U/ μ l | 0,5 μ l |
| Směs primerů (25 μ M) | 0,5 μ M | 1 μ l |
| Deionizovaná voda | - | Do 50 μ l |
| Templátová DNA | - | 5 ng |

Následně směs byla jemně promíchána a krátce zcentrifugována. Poté byla provedena PCR reakce podle základního časového a teplotního profilu (Tab. 3).

Tab. 3 – Základní časový a teplotní profil PCR reakce

| Proces | Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|--------------|-------|-------------|
| Počáteční denaturace | 98 | 30 s | 1 |
| PCR amplifikace | 98 | 10 s | 35 |
| | * | 30 s | |
| | 72 | * | |
| Závěrečná elongace | 72 | 2 min | 1 |

*Teplota pro nasedání primerů se liší na základě použitých kombinací primerů a délka elongace na základě délky amplifikovaného PCR produktu, konkrétní hodnoty – výsledky

4.4.3.4 Přečištění PCR produktu pomocí QIAquick PCR Purification Kitu

Produkty PCR reakcí byly v případě potřeby purifikovány pomocí QIAquick PCR Purification Kitu. K PCR produktu byl přidán PB pufr v poměru 1:5. Následně byla směs napipetována na kolonku a zcentrifugována (17900g, 60 s) pro navázání DNA na filtr. Poté byla DNA 2x promyta pomocí PE pufru, kde směs byla při každém promývání centrifugována při 17900g 60 s.

Filtr byl přenesen do nové 1,5ml mikrozkušavky a na filtr bylo napipetováno 30 μ l elučního pufru. Směs byla nechána stát 1 min při pokojové teplotě, poté byla pro

eluci plazmidu zcentrifugována (17900g, 1 min). Nakonec byla pomocí spektrofotometru NanoDrop při vlnových délkách 260 nm a 280 nm změřena koncentrace DNA.

4.4.3.5 Gateway klonování BP a LR reakce

Pro Gateway klonování byly použity komerční kity Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix a Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Invitrogen) a reakce byly provedeny podle protokolů doporučených výrobcem.

- **BP reakce:** Pro zaklonování amplifikované RUBY kazety do vstupního vektoru pDONR207 byla použita reakce, kde bylo napipetováno 50 fmol amplikonu RUBY kazety, donorový vektor pDONR207 ($c = 500 \text{ ng}/\mu\text{l}$) o koncentraci $150 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $2 \mu\text{l}$ BP clonase enzyme mixu a TE pufr (pH 8) do celkového objemu $8 \mu\text{l}$. Po napipetování byla směs zvortexována $2 \times 2 \text{ s}$ a inkubována 1h na pokojové teplotě. Po inkubaci byl ke směsi přidán $1 \mu\text{l}$ Proteinasy K a poté následovala inkubace v termobloku při 37°C 10 min, která sloužila k ukončení reakce. Takto připravený vstupní klon byl připraven k transformaci do *E. coli*. Pro přepočítání fmol na ng byl použit webový NEBioCalculator.

- **LR reakce:** Pro vytvoření finálního reportérového konstruktů byla použita reakce, kde bylo napipetováno 10 fmol pDONR207::RUBY a pDONRP4P1r::AtLhcb8_{pro} (vstupní vektory), 20 fmol destinačního vektoru pH7m24GW-FAST, $2 \mu\text{l}$ LR clonase enzyme mixu a TE pufr (pH 8) do celkového objemu $8 \mu\text{l}$. Po napipetování byla směs zvortexována $2 \times 2 \text{ s}$ a inkubována přes noc na pokojové teplotě. Po inkubaci byl ke směsi přidán $1 \mu\text{l}$ Proteinasy K a poté následovala inkubace v termobloku při 37°C 10 min, která sloužila k ukončení reakce. Poté byl destinační vektor s finálním reportérovým konstruktem připraven k transformaci do *E. coli*. Pro přepočítání fmol na ng byl použit webový NEBioCalculator.

4.4.3.6 Transformace bakterií pomocí teplotního šoku a jejich rozpěstování

- Transformace *E. coli*

Po BP i LR reakci byl vždy výsledný konstrukt natransformován do bakterií *E. coli* kmene Stb12/NEB5 α . Chemicky kompetentní bakterie byly vytaženy z mrazáku -80°C a nechány pro pomalé rozpuštění na ledu. Po rozmrazení bylo k bakteriím přidáno $5 \mu\text{l}$ BP/ LR reakce a směs byla opatrně zamíchána.

Poté byla směs inkubována 30 min na ledu. Po inkubaci následovala transformace bakterií pomocí tepelného šoku, kdy bakterie byly vystaveny teplotě

42°C po dobu 30 s a následně byly ihned přeneseny a nechány 2 – 3 minuty na ledu. Poté bylo k bakteriím přidáno 900 µl LB/SOC média a mikrozkušavky byly přeneseny na 1,5 hodiny na třepačku (225 rpm při 37 °C).

Poté následovala centrifugace mikrozkušavek (5000g, 3 min) a odpipetování 850 µl supernatantu. Pelet byl ve zbytku média resuspendován a rozdělen na dvě Petriho misky s tuhým LB médiem a příslušným antibiotikem [gentamicin c = 50 µg/ml (pDONR207::RUBY) a spectinomycin c = 100 µg/ml (pH7m24GW-FAST::AtLhcb8_{pro}::-RUBY)]. Nakonec následovala inkubace bakterií v termostatu při 37°C přes noc.

- **Transformace *A. tumefaciens***

Chemicky kompetentní bakterie *A. tumefaciens* kmene GV3101 byly vytaženy z mrazáku -80 °C. Následně na zmrzlé buňky byl napipetován plazmid (ca 1 - 1,5 µg) a poté byly nechány pro pomalé rozpuštění na ledu.

Poté následovala transformace bakterií pomocí tepelného šoku, kdy bakterie byly na 30 s ponořeny do tekutého dusíku, přesunuty na 5 min do termobloku (37°C) a následně přeneseny na několik minut na led. Poté bylo k bakteriím přidáno 900 µl YEB média a mikrozkušavky byly přeneseny na 4 hodiny na třepačku (225 rpm při 28 °C).

Poté následovala centrifugace mikrozkušavek (8000g, 2 min) a odpipetování 900 µl supernatantu. Pelet byl ve zbytku média resuspendován a rozdělen na dvě Petriho misky s tuhým YEB médiem a příslušnými antibiotiky (Rifampicin c = 25 µg/ml, Gentamicin c = 50 µg/ml a Spectinomycin c = 100 µg/ml). Nakonec následovala inkubace bakterií v termostatu při 28°C (2 – 3 dny).

4.4.3.7 Colony PCR

- **Příprava vzorku – přímá metoda (bakteriální kolonie)**

Pro rychlý screening bakteriálních koloí bylo provedeno odebrání kolonie pomocí plastové špičky a špička byla poté vložena do mikrozkušavky s 20 µl dilučního pufru (součást Phire Plant Direct PCR Master Mix kitu, ThermoFisher Scientific). DNA byla extrahována pomocí rozetření vzorku špičkou o stěnu mikrozkušavky.

- **Přímá PCR**

Přímá PCR s využitím Phire Plant Direct PCR Master Mixu (Thermo Fisher) byla použita pro rychlý screening jak rostlin, tak bakteriálních kolonií (colony PCR). Podle protokolu výrobce byla připravena PCR reakční směs (Tab. 4).

Tab. 4 – Složení PCR reakční směsi

| Reagencie | Konečná koncentrace | Objem [μ l] |
|---------------------------------------|---------------------|------------------|
| 2X Phire Tissue Direct PCR Master Mix | 1X | 4,5 |
| směs primerů (25 μ M) | 0,5 μ M | 0,2 |
| Deionizovaná voda | - | 4,55 |
| Vzorek | - | 0,25 |

Následně byly všechny mikrokumavky zvortexovány a krátce zcentrifugovány. Poté byla provedena PCR reakce podle základního časového a teplotního profilu (Tab. 5).

Tab. 5 - Základní časový a teplotní profil PCR reakce

| Proces | Teplota [$^{\circ}$ C] | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|-------------------------|---------------|-------------|
| Počáteční denaturace | 98 | 5 min | 1 |
| PCR amplifikace | 98 | 5 s | 35 |
| | * | 5 s | |
| | 72 | 20 s / 1 kb * | |
| Závěrečná elongace | 72 | 1 min | 1 |

* Teplota pro nasedání primerů se lišila na základě použitých kombinací primerů a délka elongace na základě délky amplifikovaného PCR produktu, konkrétní hodnoty pro jednotlivé primery jsou uvedené v kap. Výsledky.

4.4.3.8 Ověření konstruktů pomocí restrikčního štěpení XmnI

Restrikční štěpení plazmidové DNA bylo provedeno podle protokolu doporučeného výrobcem použitého restrikčního enzymu XmnI (NEB). Do reakční směsi o celkovém objemu 10 μ l bylo napipetováno 1 μ l restriktázy XmnI o katalytické jednotce 2 U, 1 μ l 10X pufru Cutsmart, 200 ng plazmidu a voda do doplnění objemu.

Po napipetování byla směs jemně promíchána a následně bylo štěpení provedeno v PCR termobloku po dobu 1 h při 37 $^{\circ}$ C.

4.4.3.9 Elektroforetická separace v agarózovém gelu

Stanovení PCR produktů a produktů restrikčního štěpení bylo provedeno pomocí elektroforetické separace v agarózovém gelu (0,8 – 1%, dle velikosti amplifikovaného PCR fragmentu) v elektroforetické komůrce naplněné 0,5x TBE pufrem.

Do jamek bylo naneseno vždy 4 μl DNA ladderu (GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use, Thermo Fisher) a v případě PCR 5 μl PCR produktu (PCR amplifikace pomocí Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerasy) nebo 7 μl PCR produktu (Přímá PCR) a v případě restrikčního štěpení bylo naneseno 7 μl vzorku (1:6 - 1 μl 6X STOP C a 6 μl štěpného produktu). Elektroforéza probíhala s nastavením na 60 min při 4 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Po dokončení elektroforézy byl gel na obarvení dán na 20 minut do ethidium bromidu a po obarvení byl umístěn k vyhodnocení do UV transluminátoru (300 nm).

4.4.3.10 Sangerovo sekvenování

Pro ověření správnosti sestavení konečného konstruktů pH7m24GW-FAST::AtLhcb8_{pro}::-RUBY bylo použito Sangerovo sekvenování podle protokolu doporučeného výrobcem kitu (Tab. 6)

Tab. 6 – Složení sekvenační reakce

| Reagencie | koncentrace | Objem [μl] |
|----------------------|----------------------------|-------------------------|
| Sekvenační pufr | - | 1,5 |
| Big dye | - | 0,5 |
| Sekvenační primer | 10 μM | 1 |
| Plazmid | 60 $\text{ng}/\mu\text{l}$ | 1,5 |
| Voda | - | 5,5 |
| Celkový objem reakce | | 10 |

Pro sekvenační reakci bylo použito celkem 13 primerů (celkem 13 sekvenačních reakcí, Tab. 11) pokrývající inzert ATLhcb8_{pro}::RUBY. Poté byla provedena PCR reakce podle základního časového a teplotního profilu (Tab. 7).

Tab. 7 - Teplotní a časový profil sekvenační reakce

| Proces | Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|--------------|-------|-------------|
| Počáteční denaturace | 98 | 5 min | 1 |
| PCR amplifikace | 96 | 10 s | 35 |
| | 50 | 5 s | |
| | 60 | 4 min | |
| Hold | 4 | ∞ | - |

4.4.3.11 Transformace *Arabidopsis thaliana* pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Na transformaci rostlin *A. thaliana* byl použit upravený protokol podle Cough, S.J. and Bent, A.F. (1998). První den bylo provedeno naočkování malého objemu YEB média, kdy do 5 ml YEB média s antibiotiky (Rifampicin $c = 25 \mu\text{g/ml}$, Gentamicin $c = 50 \mu\text{g/ml}$ a Spectinomycin $c = 100 \mu\text{g/ml}$) byly naočovány kolonie agrobakterií z Petriho misky. Poté následovala inkubace přes noc při 225 rpm a 28°C.

Druhý den bylo provedeno naředění bakteriální kultury tak, že do jedné Erlenmeyerovy baňky obsahující 100 ml čerstvého YEB média s antibiotiky bylo napipetováno 100 μl bakteriální kultury a do druhé bylo napipetováno 500 μl bakteriální kultury. Poté následovala inkubace přes noc při 225 rpm a 28°C.

Třetí den bylo nejdříve provedeno měření fáze růstu bakteriální kultury na základě OD_{600} (optická densita) změřené na spektrofotometru, kde OD bakterií by mělo být 0,7 – 0,8. Následně byly narostlé bakterie stočeny v 2x50ml Falkonkách (4500rpm, 20 min, 4°C). Poté byl pelet resuspendován v 5 – 10 ml 5% sacharóze a slit do kádinky, kde byl zředěn na $\text{OD} (600\text{nm}) = 0,8$. Následně k suspenzi byl přidán acetosyringon do výsledné koncentrace 200 μM a smáčidlo Silwet L-77 do výsledné koncentrace 0,05%. Poté byly květy 4 – 5 týdních rostlin *A. thaliana* (celkem byly transformovány čtyři rostliny) ponořeny do roztoku a následně byly rostliny zakryty pytlíkem po dobu 24 – 48 h. Nakonec byly rostliny dopěstovány do semen za výše popsaných podmínek (viz. 4.4.1).

4.4.4 Metody selekce homozygotních rostlin

4.4.4.1 Fluorescenční mikroskopie – selekce transgenních a homozygotních rostlin

Pro selekci transgenních rostlin v T1 generaci a homozygotních rostlin v T2 generaci byla semena na Petriho misce umístěna pod fluorescenční mikroskop. Poté na základě intenzity fluorescence reportérového genu GFP/RFP - OLE1 byla vybírána semena, která byla přenesena pomocí přístroje GentleGrab do mikrozkuřavky. Selekcce probíhala na fluorescenčních mikroskopech Olympus IX81 a Olympus SZX16.

4.4.4.2 Ověření pozitivnosti transgenních rostlin

- Příprava vzorku pro PCR – přímá metoda

Před každým odběrem vzorku byly nejdříve nůžky vydezinfikovány pomocí přípravku Krystal SANAN KLASIK, následně byly namočeny v 70% ethanolu a poté v destilované vodě. Následně byl odstřižen kousek listu z dvoutýdenní rostliny o velikosti cca 1 mm². Tento vzorek listu byl vložen do mikrozkuřavky s 20 µl dilučního pufru (součást Phire Plant Direct PCR Master Mix kitu, ThermoFisher Scientific). DNA byla extrahována pomocí rozetření vzorku špičkou o stěnu mikrozkuřavky.

- Přímá PCR

Přímá PCR s využitím Phire Plant Direct PCR Master Mixu (Thermo Fisher) byla použita pro rychlý screening rostlin. Podle protokolu výrobce byla připravena PCR reakční směs (viz. 4.4.3.7). Výsledek separace byl pak vizualizován pomocí elektroforetické separace (viz. 4.4.3.9).

4.4.4.3 Izolace genomické DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plant II

Nejdříve byly vybrány listy o rozměru cca 3 cm², které byly dány do mikrozkuřavek (2 listy na 1 mikrozkuřavku). Poté byly přes noc listy vysušeny lyofilizací. Další den byly listy za přítomnosti skleněných kuliček homogenizované pomocí mlýnku Mixer Mill (4 min při 27 otáčkách/s).

Následně byla provedena izolace genomické DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plant II. Do mikrozkuřavek s rozemletým materiálem bylo přidáno 400 µl lyzačního roztoku a 10 µl RNAasy pro lýzi buněk. Poté byly vzorky zároveň s elučním pufrem (PE) umístěny na 20 minut do horké lázně (65 °C). Poté do mikrozkuřavky s fialovým filtrem bylo přepipetováno 400 µl lyzátu s následnou centrifugací při 11000 g (2 min). Eluát, byl přelit do nové 1,5 ml mikrozkuřavky za přidání 450 µl PC pufru

s následným promícháním. Směs byla přelita do mikrozkušavky se zeleným filtrem a po deseti minutách byla směs centrifugována při 11000g (1 minuta), kdy došlo k navázání DNA na filtr.

Poté bylo celkem 3x provedeno promývání filtru promývacím pufrem, kde směs byla při každém promývání centrifugována při 11000g. Při prvních dvou promývání centrifugace trvala 1 minutu. Třetí centrifugace trvala 2 minuty. Filtr byl přemístěn do nové mikrozkušavky a na filtr bylo napipetováno 30 μ l elučního pufru (zahřátý na 65 °C). Následně byla směs pro eluci DNA centrifugována při 11000g (1 minuta). Nakonec byla změřena koncentrace vyizolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop při vlnových délkách 260 nm a 280 nm.

4.4.4.4 Stanovení počtu kopií reporterového genu v transgenních rostlinách pomocí Digital droplet PCR (ddPCR)

Restrikční štěpení rostlinné DNA bylo provedeno podle protokolu doporučeného výrobcem použitého restrikčního enzymu MfeI (NEB). Do reakční směsi o celkovém objemu 10 μ l bylo napipetováno 1 μ l restriktazy XmnI o katalytické jednotce 2 U/ μ l, 1 μ l 10X pufru Cutsmart, 200 ng DNA a voda do doplnění objemu. Po napipetování byla směs jemně promíchána a následně bylo štěpení provedeno v termobloku po dobu 1 h při 37 °C.

Po restrikčním štěpením byly vzorky zředěny na koncentraci 2 ng/ μ l přidáním 90 μ l H₂O. Poté vzorky byly použity pro ddPCR, kde na základě protokolu byla připravena reakční směs (1 reakce/20 μ l) (Tab. 8). Z důvodu následného přepipetování do cartridge bylo připraveno 21 μ l směsi, kde bylo nejdříve napipetováno 19 μ l premixu bez DNA a následně do každé jamky bylo napipetováno 2 μ l DNA.

Tab. 8 – ddPCR reakční směs

| Reagencie | Koncentrace | Objem [μ l] |
|----------------------|---------------|------------------|
| ddPCR supermix | - | 10 |
| Primery na referenci | 25 μ M | 0,36 |
| Primery na target | 25 μ M | 0,36 |
| Probe REF | 10 μ M | 0,5 |
| Probe TARGET | 10 μ M | 0,5 |
| Naštěpená DNA | 2 ng/ μ l | 2 |
| Deionizovaná voda | - | 7,28 |

Pro PCR amplifikaci byla použita kombinace dvou dvojic primerů, kdy první dvojice Hyg_FP1 a Hyg_RP1 sloužila k amplifikaci sekvence hygromycinu, kterou obsahuje vložený inzert, a druhá dvojice primerů AtAAP1_FP a AtAAP1_RP sloužila k amplifikaci sekvence aminokyselinové permeázy 1, která slouží jako referenční marker. Fluorescenční sondy Hyg_probe_FAM a AAP1_probe_VIC následně sloužily k vyhodnocení CNV. Sekvence použitých primerů a Taq-Man sond jsou uvedeny v Tab.9.

Tab. 9 – Použité primery a sondy při detekci počtu kopií pomocí ddPCR

| Použité primery/próby | název | sekvence |
|-----------------------|-----------------|---------------------------|
| Primery | Hyg_FP1 | tctacatcgaagctgaaag |
| | Hyg_RP1 | atgaaaaagcctgaactcacc |
| | AtAAP1_FP | gatgtagttggttgggtttaaac |
| | AtAAP1_RP | aatttgggatctggctaagaataac |
| Sondy | Hyg_probe_FAM | tcttcgcctccgagagctg |
| | AAP1_probe_VIC* | tgccaaaaaccgcatatacgg |

*Sekvence sondy AAP1 je převzatá z Collier et al. The Plant Journal (2018) 95, 573-583.

Po připravení reakční směsi byla provedena příprava pro vygenerování dropletů tak, že byla připravena cartridge na kterou bylo napipetováno 60 μ l oleje a 20 μ l vzorku. Následně na cartridge byla umístěna guma. Takto připravená cartridge byla dána do Droplet generátoru pro vygenerování dropletů. Po vygenerování dropletů bylo 40 μ l směsi dropletů (voda a olej) přepipetováno do ddPCR destičky. Následně byla deska zatavena pomocí folie a poté byla provedena PCR reakce podle základního časového a teplotního profilu (Tab. 10).

Tab. 10 – Základní časový a teplotní profil ddPCR

| Proces | Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|--------------|----------|-------------|
| Počáteční denaturace | 95 | 10 min | 1 |
| PCR amplifikace | 94 | 30 s | 39 |
| | 60 | 1 min | |
| | 98 | 10 min | |
| Hold | 4 | ∞ | - |

Po provedení PCR byla destička umístěna do droplet readeru, kde bylo provedeno vyhodnocení počtu kopií inzertu pomocí módu CNV2 se dvěma probami

4.4.4.5 Seznam použitých primerů pro PCR a Sangerovo sekvenování (Tab. 11)

Tab. 11 – Seznam použitých primerů pro PCR a Sangerovo sekvenování a jejich označení

| Název primeru | Sekvence | Označení |
|----------------------|---|----------|
| IL87_attb_RUBY_FP | ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatggatcatgacccctcg | 1 |
| IL88_attb_RUBY_RP | ggggaccactttgtacaagaaagctgggtttcactggaggcttgctcaa | 2 |
| IL89_Ruby_col_RP | cgggccagagctgcagc | 3 |
| IL90_Ruby_seq1_FP | cgtggatattggcaaggccgc | 4 |
| IL91_Ruby_seq2_FP | ggcctcggcaaggacaagc | 5 |
| IL92_Ruby_seq3_FP | gaagatgatgaacggcgaggac | 6 |
| IL93_Ruby_seq4_FP | gaactggaagctcgccatcc | 7 |
| IL94_Ruby_seq5_FP | caggcatttcagcccagccag | 8 |
| IL95_Ruby_seq6_FP | ggctcccagaacacgatcagc | 9 |
| Start_seq_FP | ccgcggtagtcagttagat | 10 |
| Prom4.1_seq_RP1 | aggcatgagagcttgag | 11 |
| KK0063 | atggatcatgacccctcgcc | 12 |
| IL32_promAT8_seq_FP2 | gaagccaaggctgtctctc | 13 |
| IL33_promAT8_seq_RP1 | aatgttaaagctaacaactgcc | 14 |
| IL34_promAT8_seq_RP2 | tggtcccagttgaagttctg | 15 |
| IL31_promAT8_seq_FP1 | accaagccaaagttgtagacca | 16 |
| IL29_GUS_seq_RP1 | cggcgtggtgtagagcatta | 17 |

4.4.5 Analýza aktivity promotoru genu *LHCB8* pomocí histochemického GUS barvení

Pro GUS barvení byly použity jednotýdenní, dvoutýdenní, čtyřtýdenní, šestitýdenní, jedenáctitýdenní (rostlina s květy) a senescentní rostliny. Pro analýzu fotosyntetické funkce byly použity šestitýdenní rostliny.

Pro GUS barvení byly nejdříve rostliny (listy) vloženy do kádinky s 90% acetonem. Fixace acetonem trvala 20 minut. Poté byl připraven barvicí roztok (Tab.12)

Tab. 12 – Protokol histochemického barvení GUS

| Reagencie | Finální koncentrace | +Xgluc (20 ml) |
|---------------------------------------|---------------------|----------------|
| NaPO ₄ roztok | 50 mmol/l | 10 ml |
| K ₄ [Fe(CN) ₆] | 2 mmol/l | 400 µl |
| K ₃ [Fe(CN) ₆] | 2 mmol/l | 400 µl |
| Triton | 0,1% | 200 µl |
| EDTA | 10 mmol/l | 400 µl |
| X-gluc v DMSO | 2 mmol/l | 400 µl |
| Deionizovaná voda | - | do 20 ml |

Poté byly rostliny (listy) přeneseny do barvicího roztoku +Xgluc a pro infiltraci substrátem X-gluc byly dány do vakuové pumpy (15 min, 19 mbar). Následně byla provedena inkubace při 37°C (přes noc).

Na druhý den byl +Xgluc roztok vyměněn za 70% ethanol, který sloužil k odstranění chlorofylu. Následně vzorky byly inkubovány při 37°C přes noc. Nakonec bylo provedeno vyhodnocení analýzy aktivity promotoru.

V průběhu optimalizace byly vyzkoušeny čtyři varianty protokolu, kdy první varianta odpovídala výše zmíněnému postupu barvení, druhá varianta se lišila tím, že nebyla provedena fixace v acetonu. Třetí varianta zahrnovala fixaci v acetonu, preinfiltraci pomocí X-gluc roztoku (roztok, který odpovídá složením + Xgluc roztoku, ale neobsahuje substrát pro vizualizaci) a infiltraci v +X-gluc roztoku a čtvrtá varianta zahrnovala pouze preinfiltraci v X-gluc roztoku a infiltraci v +X-gluc roztoku.

4.4.5.1 Mikroskopie pro pozorování aktivity promotoru genu *LHCB8*

Pro podrobnější charakterizaci aktivity promotoru genu *LHCB8* byly rostliny, jednotlivé listy, stonky a květy pozorovány a vyfoceny pod kamerou Olympus EP50. Focení probíhalo tak, že do Petriho misky naplněné 70% ethanolem byly položeny rostliny/list/stonky s květy a poté byly pořízeny fotky.

Pro detailnější charakterizaci aktivity promotoru genu *LHCB8* byly z rostlin odebrány listy a květy, u kterých byly detaily pozorovány na mikroskopu Olympus BX60. Vzorek pro pozorování pod mikroskopem byl připraven tak, že list/části květu (tyčinky, okvětní lístky, korunní lístky) byly umístěny na podložní sklíčko s kapkou ethanolu a následně byl vzorek zakryt krycím sklíčkem. Následně byl vzorek vložen

pod mikroskop a detaily byly vyfoceny.

4.4.6 Měření chlorofylové fluorescence

Před začátkem měření byly rostliny během 30 minut adaptované na tmou. Tato metoda slouží k měření fluorescenční indukce chlorofylu a NADPH (měření stavu PSII), měření transmitance při příslušných vlnových délkách odrážející redoxní stav P700 (stav PSI) a plastocyaninu a napětí na tylakoidních membráně. Na počátku měření docházelo k excitaci chlorofylu slabým měřicím světlem, které nemá dostatečnou intenzitu k tomu, aby indukoval fotochemické procesy v PSII a RC zůstávají otevřené. Tímto krokem byal změřena minimální fluorescence (F_0). V druhém kroku docházelo k ozáření listu saturačním pulzem o větší intenzitě, vedl k uzavření RC a k indukci maximální fluorescence (F_m). Poté došlo k zapnutí aktinického světla, které postupně indukovalo fotochemické i nefotochemické zhášení, které bylo doprovázeno poklesem fluorescenčního signálu. V rámci měření byly vyhodnoceny následující parametry:

- Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII, $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, kde F_0 je hodnota minimální a F_m je hodnota maximální fluorescence. Hodnota tohoto parametru informuje, zda byla rostlina vystavena stresovým podmínkám. Za fyziologických podmínek u nestresovaných rostlin je $F_v/F_m \geq 0,8$. (Heinz Walz GmbH, 2009).
- Nefotochemické zhášení, NPQ – Stanovuje se jako poměr $(F_m - F_m')/F_m'$, kde F_m' je maximální fluorescence, která je změřena pomocí saturačních pulzů za současného použití aktinického světla. Tento parametr charakterizuje nefotochemické zhášení – regulovaná přeměna přebytečné absorbované energie na teplo.
- Transport elektronů přes PSII, ETR II – Tento parametr charakterizuje úroveň transportu elektronů přes PSII.
- Transport elektronů přes PSI, ETR I – Tento parametr charakterizuje úroveň transportu elektronů přes PSI (Heinz Walz GmbH, 2009)

Měření bylo provedeno na FluorCamu, který je schopen měřit heterogenitu fluorescenčních parametrů v rámci listu a na DualPamu, který měří fluorescenční parametry jen v určitém místě listu.

- FluorCam

Po adaptaci na tmou byly ustříženy z rostliny tři mladé listy a tři staré listy. Tyto listy byly umístěny na podložku s navlhčeným ubrouskem a umístěny do FluorCamu

k měření.

Měření probíhalo podle protokolu, který trval přibližně 20 minut. Rostlina byla nejdříve vystavena aktinickému světlu $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nebo $1600 \mu\text{mol fotonů.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, které bylo přerušováno saturačními pulzy ($10000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$) po dobu 300 ms. V první polovině měření (10 minut) bylo aktinické světlo zapnuto, v druhé polovině měření (od 10 minut) vypnuto. Během měření byly na rostlinu aplikované saturační pulzy v intervalech 60 s až do konce měření.

- **DualPam**

Po adaptaci byl ustříhnut list, který byl umístěn mezi měřící hlavice a stopka listu byla položena na stojan obsahující kapku vody.

Měření probíhalo podle protokolu, kde byla rostlina vystavena aktinickému světlu $1600 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$. To bylo v průběhu měření přerušeno saturačními pulzy ($10000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$) po dobu 300 ms. V první polovině měření (10 minut) bylo aktinické světlo zapnuto, v druhé polovině (po 10 minutách) měření vypnuto. Během měření byly na rostlinu aplikované saturační pulzy v intervalech 10 s, 30 s a 60 s a poté následně v 60s intervalech až do konce měření.

5. Výsledky

Pro studium aktivity AtLhcb8_{pro} pomocí reportérových linií byly připraveny tři reportérové konstrukty. První dva konstrukty AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS byly již připravené a natransformované do rostlin *Arabidopsis thaliana* vedoucí práce. Tyto dva konstrukty se liší přítomností sekvence genu *LHCB8*, který sloužil pro zjištění, zda intron uvnitř genu má regulační funkci. Třetí konstrukt AtLhcb8_{pro}::RUBY pro vizualizaci aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} byl připraven v rámci práce pomocí Gateway klonování jako alternativa k reporterovému genu EGFP-GUS pro rychlé a neinvazivní screenování aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} především za stresových podmínek. Správnost sestaveného konstruktu byla ověřena pomocí sangerova sekvenování. Následně byl reportérový konstrukt natransformován do rostlin *Arabidopsis thaliana*.

Poté následovala selekce transgenních rostlin všech tří reporterových linií na základě fluorescenčního selekčního markeru a selekce homozygotních reportérových linií obsahující dvě a čtyři kopie inzertu pomocí ddPCR.

Po selekci byla provedena optimalizace protokolu histochemického barvení GUS, který následně byl použit pro studium aktivity AtLhcb8_{pro}.

Studium aktivity AtLhcb8_{pro} probíhalo na rostlinách starých jeden, dva, tři, čtyři, šest, jedenáct týdnů a na senescentních listech. V šestém týdnu bylo provedeno studium vlivu proteinu LHCB8 na fotosyntetickou funkci pomocí přístrojů FluorCam a DualPam.

A. Tvorba reportérového konstrukt AtLHCB8_{pro}_RUBY pomocí Gateway klonování

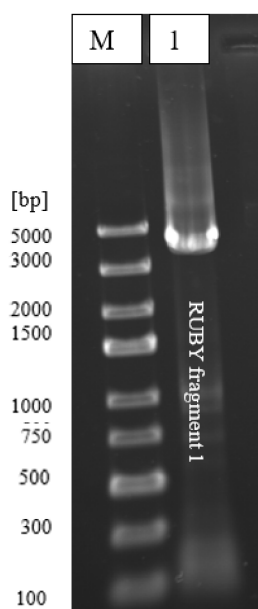
Z důvodu problematické vizualizace fluorescence GFP u listů vystavených světlu, který měl sloužit pro monitorování aktivity AtLhcb8_{pro} během různých stresových podmínek, byl připraven reportérový konstrukt AtLhcb8_{pro}::RUBY obsahující reportérovou kazetu RUBY. Příprava zahrnovala izolaci plazmidu At2S3 obsahujícího sekvenci kódující RUBY kazetu pomocí ThermoFisher GeneJet Plasmid kitu, jeho amplifikaci a přečištění pomocí QIAquick PCR Purification Kitu. Poté byl připravený RUBY fragment pomocí BP reakce podle protokolu Gateway zaklonován do donorového vektoru pDONR, čímž byl vytvořen vstupní klon pro LR reakci. Následně byla provedena LR reakce kde byl vytvořen destinační klon obsahující konečný konstrukt AtLhcb8_{pro}::RUBY.

Správnost sestavení konstruktů byla ověřena sangerovým sekvenováním a následně byl konstrukt natransformován pomocí *Agrobacterium tumefaciens* do rostlin *A. thaliana*.

Amplifikace RUBY kazety

Pro přípravu reportérového konstruktů AtLhcb8_{pro}::RUBY byly nejdříve přes noc rozpěstovány bakterie obsahující plazmid At2S3:RUBY (Addgene plasmid # 160906, He *et al.*, 2020) v LB médiu s antibiotikem (viz. kap. 4.4.3.1). Následně pomocí ThermoFisher GeneJet Plasmid kitu byl vyizolován plazmid (viz. kap. 4.4.3.2) o celkové koncentraci $c = 197,6 \text{ ng/}\mu\text{l}$. Poté byla provedena PCR amplifikace RUBY kazety podle protokolu PCR pro Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerasu (viz. kap. 4.4.3.4) s gen specifickými primery 1 a 2 (Viz. Tab. 11) při teplotě nasednutí (T_m) 68°C a elongací 2 min. Primery byly navrženy tak, aby amplifikovaly celou sekvenci zahrnující RUBY kazetu. Na jejich konce byly přidány attB1 a attB2 konce, které byly potřebné pro zaklonování RUBY fragmentu do donorového vektoru pomocí BP reakce Gateway klonování.

Úspěšnost amplifikace byla ověřena pomocí elektroforetické separace v 0,8% agarózovém gelu, kde PCR produkt byl vizualizován pomocí UV transluminátoru. Amplifikovaný PCR produkt (RUBY fragment 1) se nachází v jamce č. 1 (Obr. 9).



Obrázek 9 - Elektroforeticky rozdělený PCR produkt DNA RUBY fragmentu. GeneRuler Express DNA Ladder (jamka M), RUBY fragment 1 (jamka 1) .

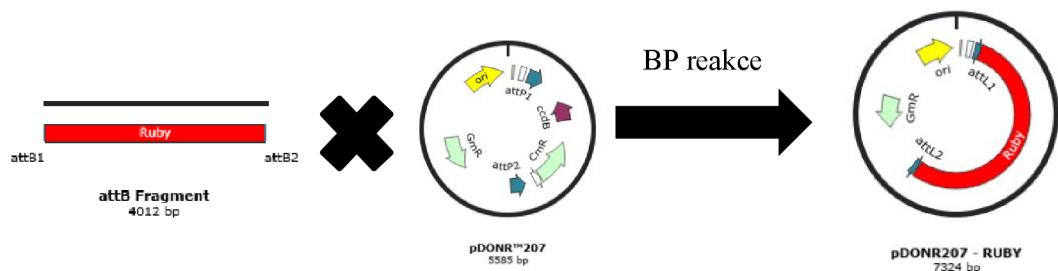
Podle elektroforetogramu byla ověřena správnost amplifikace RUBY kazety, jejíž PCR produkt má dle předpokladů mít velikost cca 4019 bp, což se porovnáním s markerem velikosti DNA potvrdilo.

Poté bylo provedeno pomocí QIAquick PCR Purification Kitu (viz. kap. 4.4.3.4) přečištění PCR produktu, jelikož jeho součástí byly primery, nukleotidy, enzymy, soli a další nečistoty a pro klonování byla potřeba čisté DNA.

Po přečištění byla zaměřena koncentrace DNA, kdy koncentrace přečištěného produktu vyšla $c = 253 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

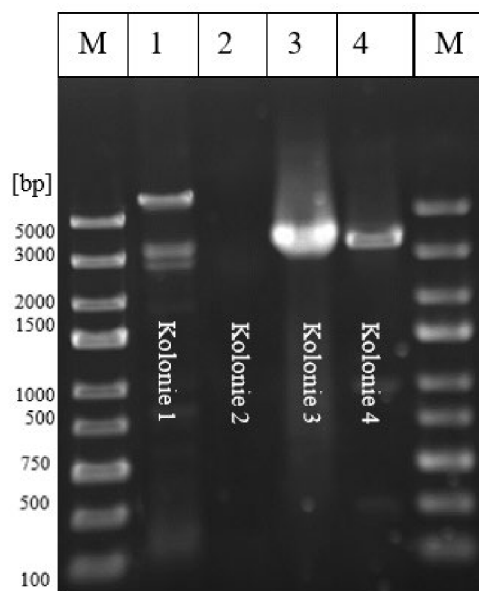
Gateway klonování

Vyizolovaný a přečištěný fragment byl pomocí BP reakce zaklonován do donorového vektoru pDONR207, kde reakce proběhla podle protokolu Gateway (Viz. kap. 4.4.3.5). Během BP reakce proběhla mezi attB1 a attB2 přesahy RUBY fragmentu a attP1 a attP2 místy v donorovém pDONR207 vektoru rekombinační reakce za vzniku attL míst. Do donorového vektoru byl začleněn RUBY fragment a tím vznikl požadovaný vstupní klon pDONR207 – RUBY (Obr. 10).



Obrázek 10 – BP reakce. Rekombinační reakce mezi attB konci RUBY fragmentu a attP místy v pDONR207 vektoru za vzniku vektoru pDONR207-RUBY.

Poté byla BP reakční směs natransformována do kompetentních bakteriálních buněk *E. coli* kmene Stbl2 pomocí teplotního šoku, kde přes noc byly rozpěstovány kolonie na miskách s LB médiem obsahující antibiotikum Gentamicin (Viz. kap. 4.4.3.6). Na druhý den byla provedena colony PCR podle protokolu PhireDirect PCR (Viz. kap. 4.4.37), kde pomocí Phire Hot Start II DNA polymerázy a primerů 3 a 4 (viz. Tab. 1) s $T_m = 69^\circ\text{C}$ a dobou elongace 80 s byla amplifikována část sekvence RUBY kazety o velikosti produktu 3667 bp. Celkem byly testovány 4 kolonie, kde pro identifikaci kolonií nesoucí plasmidový konstrukt byla provedena elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu (Obr. 11).



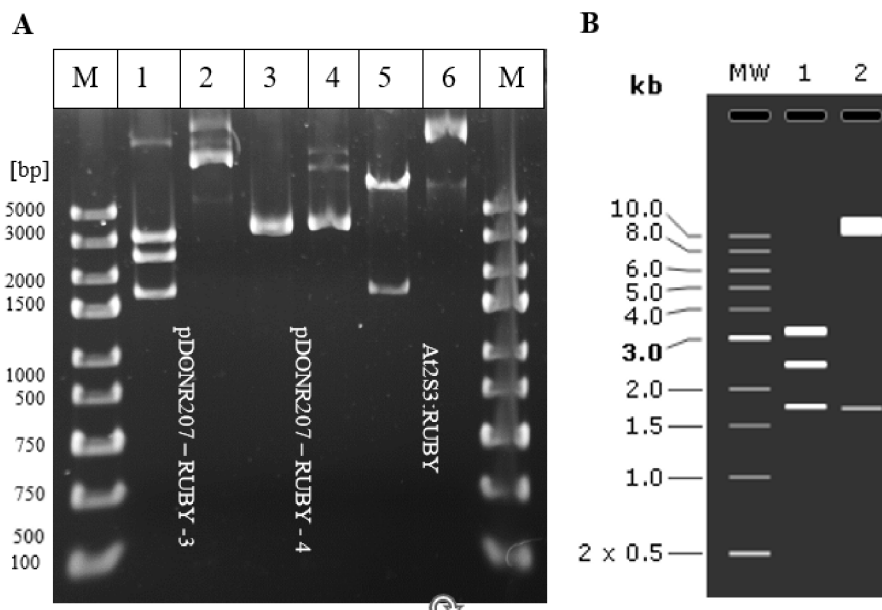
Obrázek 11 - Elektroforeticky rozdělené PCR produkty colony PCR. GeneRuler Express DNA Ladder (jamky M), PCR produkty colony PCR části sekvence RUBY kazety (jamky 1, 2, 3 a 4)

Podle elektroforetogramu byly určeny kolonie nesoucí plazmidový konstrukt, u nichž vyšla velikost PCR produktu 3667 bp. Pozitivně se prokázaly kolonie 3 a kolonie 4, a proto byly odebrány z misky a přeneseny do tekutého LB média s antibiotikem gentamicin pro rozpěstování přes noc. Po rozpěstování byl z kolonií 3 a 4 vyizolován plazmid pDONR207 – RUBY – 3 a 4 pomocí ThermoFisher GeneJet Plasmid kitu (viz. kap. 4.4.3.2) a následně byla změřena koncentrace DNA (Tab. 13).

Tab. 13 – Koncentrace plazmidové DNA vyizolované z kolonií 3 a 4

| Vzorek | Koncentrace DNA [ng/μl] |
|---------------------|-------------------------|
| pDONR207 – RUBY – 3 | 289,3 |
| pDONR207 – RUBY - 4 | 105 |

Pro potvrzení úspěšnosti klonování bylo provedeno enzymatické štěpení plazmidu pomocí restrikčního enzymu XmnI (Viz. kap. 4.4.3.8) u vzorků pDONR207 – RUBY – 3 ($c = 289,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$), pDONR207 – RUBY - 4 ($105 \text{ ng}/\mu\text{l}$) a At2S3:RUBY ($c = 232,7 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Vzorky byly pipetovány v duplikátu, kdy první obsahoval restrikční enzym XmnI a druhý sloužil jako negativní kontrola bez enzymu. Výsledek štěpení byl pak elektroforeticky separován v 0,8% agarózovém gelu a vizualizován v UV transluminátoru (Obr. 12A). Velikost štěpných produktů byla předikována *in silico* pomocí programu Snapgene (Obr. 12B).



Obrázek 12 - Elektroforeticky rozdělené produkty restričního štěpení. GeneRuler Express DNA Ladder (jamky M), restriční profily restriktázy XmnI - pDONR207 – RUBY – 3 (Jamka 1), pDONR207 – RUBY – 4 (jamka 3) a At2S3:RUBY (jamka 5). Kontroly bez restričního enzymu - pDONR207 – RUBY – 3 (Jamka 2), pDONR207 – RUBY – 4 (jamka 4) a At2S3:RUBY (jamka 6) (A), Štěpení pDONR207 – RUBY (Jamka 1) a At2S3:RUBY (jamka 2) *in silico* (B).

Na základě restričního štěpení vyšlo, že pouze vzorek pDONR207 – RUBY – 3 (jamka 1 a 2), jehož štěpné produkty byly 3183 bp, 2428 bp a 1713 bp obsahuje RUBY kazetu, a proto byl použit jako vstupní klon. U vzorku pDONR207 – RUBY - 4 (jamka 3 a 4) štěpné produkty neodpovídaly předpokladu (možná přestavba) a u vzorku At2S3:RUBY (jamka 5 a 6) vyšly štěpné produkty 12372 bp a 1713 bp.

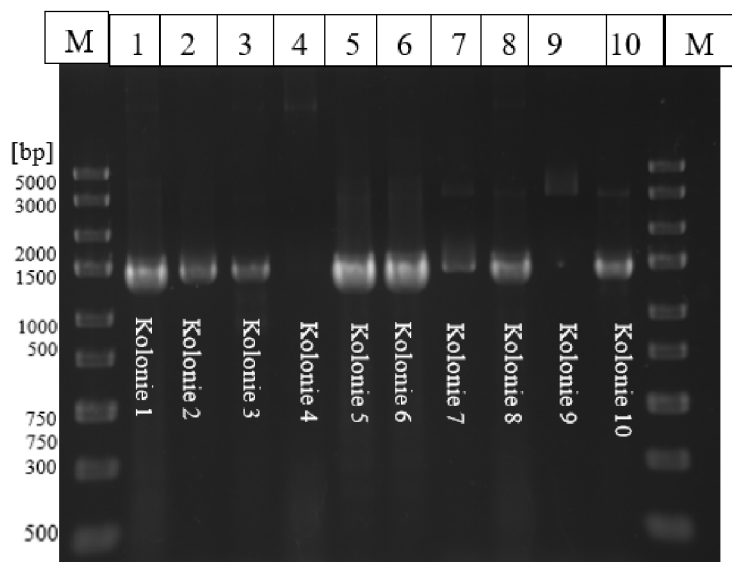
Následně byla provedena LR reakce (Viz. kap. 4.4.3.5) a tím byl připraven konečný reportérový konstrukt. Rekombinační reakce proběhla paralelně mezi attL4 – attR1 místy pDONRP4-P1r_AtLhcb8_{pro} vstupního vektoru (který byl vytvořen vedoucí práce a jako promotor obsahoval sekvenci 1428bp upstream of start kodonu genu *LHCB8*), attL1 – attL2 místy pDONR207 - RUBY vstupního vektoru a attR4 – attR2 místy pH7m24GW-FAST destinačního vektoru (Obr. 13).

Tím vznikl požadovaný destinační vektor pH7m24GW-FAST_ATLhcb8_{pro}_RUBY obsahující konečný reportérový konstrukt.



Obrázek 13 – LR reakce. Rekombinační reakce mezi attL4 – attR1 místy pDONRP4-P1r_AtLhcb8_{pro} vstupního vektoru, attL1 – attL2 místy pDONR207 - RUBY vstupního vektoru a attR4 -attR2 místy pH7m24GW-FAST destinačního vektoru za vzniku vektoru pH7m24GW-FAST_ATLhcb8_{pro}_RUBY

LR reakční směs byla následně natransformována do *E. coli* a přes noc byly rozpěstovány bakteriální kolonie na miskách s LB médiem obsahující antibiotikum spectinomycin (Viz. kap. 4.4.3.6). Poté bylo vybráno 10 narostlých kolonií, kde pro potvrzení přítomnosti plazmidu byla provedena colony PCR podle protokolu Phiredirect PCR (Viz. kap. 4.4.3.7), kde pomocí Phire Hot Start II DNA polymerázy a primerů 16 a 12 (Viz. Tab. 11) s $T_m = 65^\circ\text{C}$ a dobou elongace 35 s, byla amplifikována část sekvence AtLhcb8_{prom}::RUBY o velikosti produktu 1400 bp. Kombinace primerů byla vybrána tak, aby byla amplifikovaná část sekvence inzertu, kde došlo propojení AtLHCB8_{pro} a RUBY kazety. Poté pro identifikaci kolonií nesoucí plazmidový konstrukt byla provedena elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu (obr. 14).



Obrázek 14 - Elektroforeticky rozdělené PCR produkty colony PCR. GeneRuler Express DNA Ladder (jamky M), PCR produkty colony PCR (jamky 1 - 10)

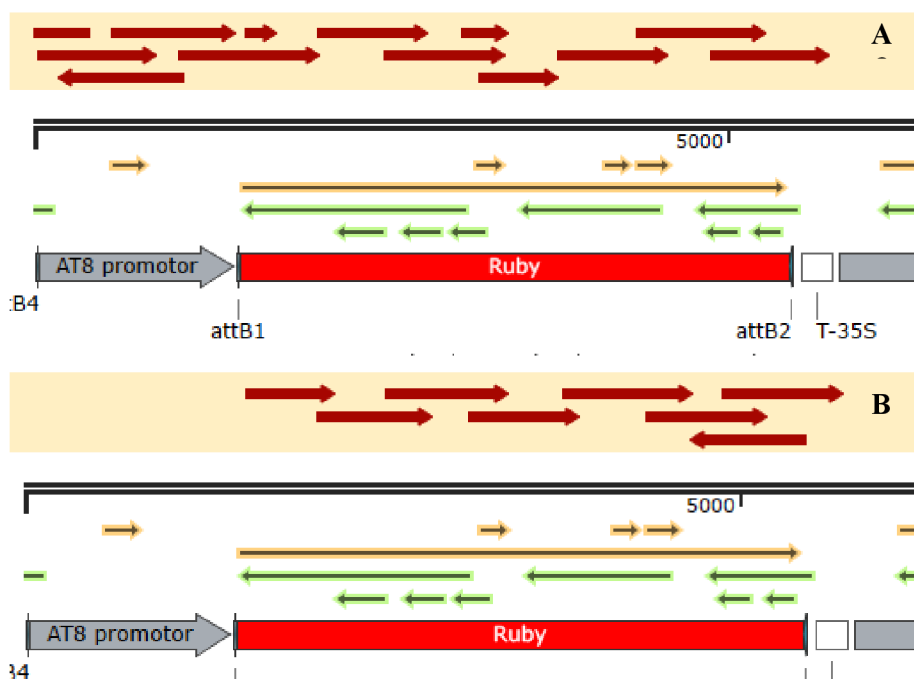
Podle elektroforetogramu byly určeny kolonie nesoucí plazmidový konstrukt, u nichž vyšla velikost PCR produktu 1400 bp. Nazákladě toho byly určeny kolonie č. 1, 2, 3, 5, 6, 8 a 9 jako pozitivní. Nakonec byly odebrány kolonie 1 a 2, které byly

následně rozpěstovány přes noc. Po rozpěstování bylo z kolonií 1 (AtLhcb8_{pro}::RUBY – 1) a 2 (AtLhcb8_{pro}::RUBY – 2) vyizolována plazmidová DNA pomocí ThermoFisher GeneJet Plasmid kitu (viz. kap. 4.4.3.2) a změřena koncentrace DNA (Tab. 14).

Tab. 14 – Koncentrace plazmidové DNA vyizolované z kolonií 1 a 2

| Vzorek | Koncentrace DNA [ng/μl] |
|-----------------------------------|-------------------------|
| AtLhcb8 _{pro} ::RUBY - 1 | 123,2 |
| AtLhcb8 _{pro} ::RUBY - 2 | 564,4 |

Nakonec pro úplné potvrzení správnosti složení finálního konstruktů byla připravena sekvenační reakce pro Sangerovo sekvenování (Viz. kap. 4.4.3.10), kde byl pomocí primerů 4 – 16 (Viz. Tab. 13) sekvenován inzert AtLhcb8_{pro}::RUBY. Výsledek sekvenování byl zpracován v programu Snapgene (Obr. 15).



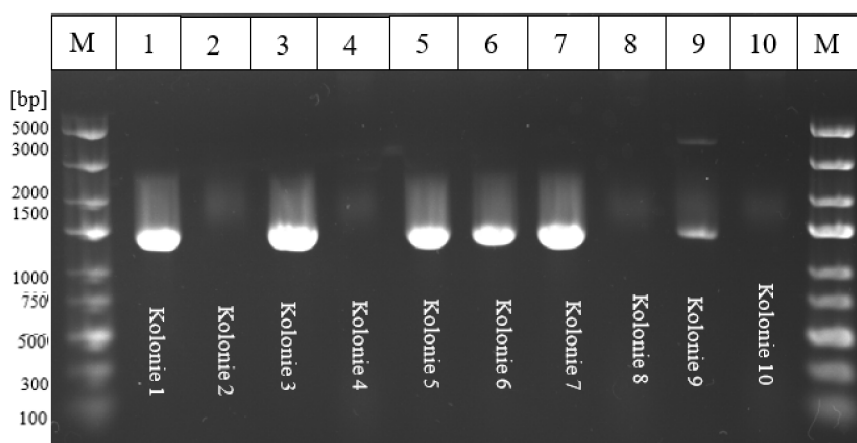
Obrázek 15 – Výsledek sekvenace inzertu AtLhcb8_{pro}::RUBY. Osekvenovaný inzert u vzorku AtLhcb8_{pro}::RUBY - 1 (A) a osekvenovaný inzert u vzorku AtLhcb8_{pro}::RUBY - 2 (B)

Na základě výsledků sekvenace se oba konstrukty AtLhcb8_{pro}::RUBY - 1 a 2 jeví jako správně složené, ale u konstruktů AtLhcb8_{pro}::RUBY - 2 byly nekvalitní sekvenační ready pokrývající promotor, a proto byl pro transformaci *Agrobacterium tumefaciens* vybrán vektor AtLhcb8_{pro}::RUBY - 1.

Poté byla provedena transformace *Agrobacterium tumefaciens* AtLhcb8_{pro}::RUBY - 1 plazmidem a následně byly rozpěstovány (po dobu tří dnů) bakteriální kolonie na miskách s YEB médiem obsahující antibiotika rifampicin,

gentamicin a spectinomycin (Viz. kap. 4.4.3.6).

Bylo vybráno 10 narostlých kolonií, kde pro potvrzení přítomnosti plazmidu byla provedena colony PCR podle protokolu PhireDirect PCR (Viz. kap. 4.4.3.7). Kombinace primerů a délka elongace byly stejné jak při identifikaci kolonií nesoucí plazmidový konstrukt u *E. coli*. Pro identifikaci kolonií nesoucí plazmidový konstrukt byla provedena elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu (obr. 16).



Obrázek 16 - Elektroforeticky rozdělené PCR produkty colony PCR. GeneRuler Express DNA Ladder (jamky M), PCR produkty colony PCR (jamky 1 - 10)

Podle elektroforetogramu byly určeny kolonie nesoucí plazmidový konstrukt, u nichž vyšla velikost PCR produktu 1400 bp. Nazákladě toho byly určeny kolonie č. 1, 3, 5, 6 a 7 jako pozitivní. Nakonec byla odebrána kolonie 1, která byla následně rozpěstována v tekutém YEB médiu s antibiotiky a použita na transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*.

Poté byla provedena transformace čtyř rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí metody floral dip podle upraveného protokolu podle Cough, S. J. and Bent, A. F. (1998). Po transformaci byly rostliny nechány k dozrání do semen.

B. Selekcce homozygotních rostlin u reportérových linií AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS, AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}::RUBY

Pro studium genové exprese byly připraveny tři linie, kdy linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS, AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS byly dodány ve formě semen z primárních transformovaných rostlin od vedoucí práce a linie AtLhcb8_{pro}::RUBY byla připravena v rámci práce.

Pro selekci homozygotních rostlin byly nejdříve v T1 generaci vyselektovány transgenní semena pomocí reportérového konstruktů OLE1-GFP/OLE1-RFP. Poté byla vybraná semena vyseta a ve stáří cca 3 týdny byly z rostlin odebrány listy k izolaci DNA. Vyizolovaná DNA byla použita pro stanovení počtu kopií inzertu pomocí

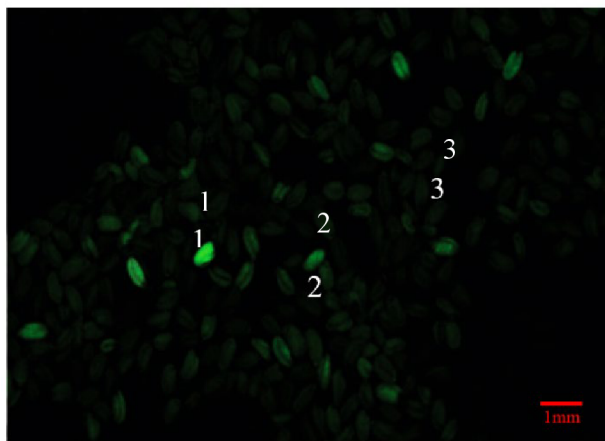
ddPCR, jelikož bylo potřeba vyselektovat rostliny s jednou a dvěma kopiemi inzertu.

Jelikož rostliny v T1 generaci byly hemizygoti (inzert pouze v jedné alele) a mohlo by dojít k jeho ztrátě, tak následně pro jeho stabilizaci byli v T2 generaci vybrána homozygotní semena na základě intenzity fluorescence reportérového konstruktů OLE1-GFP/OLE1-RFP. Poté byla vybraná semena vysazena a ve stáří rostliny cca 3 týdny byly opět odebrány listy k izolaci DNA. Vyizolovaná DNA byla použita pro ověření zda jsou vyselektované rostliny homozygoti (inzert je ve dvou alelách) na základě stanoveného počtu kopií inzertu pomocí ddPCR.

Selekce semen nesoucích požadovaný insert na základě fluorescenčního markeru

Selekce transgenních semen v T1 generaci pod fluorescenčním mikroskopem probíhala pouze u linie AtLhcb8_{pro}::RUBY, jelikož T1 generace linií AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS byla již vysazena vedoucí práce. Selektce probíhala pomocí reportérového konstruktů OLE1-GFP, kdy byla vybírána semena na základě intenzity GFP fluorescence (Viz. kap. 4.4.4.1). Semena s nejvyšší intenzitou fluorescence obsahovala obvykle větší počet kopií inzertu, proto bylo potřeba vybrat semena se slabší fluorescencí.

V rámci sesbírání semen z jedné rostliny bylo celkové zastoupení semen nesoucí insert nízké a převládala semena bez inzertu (Obr. 17).



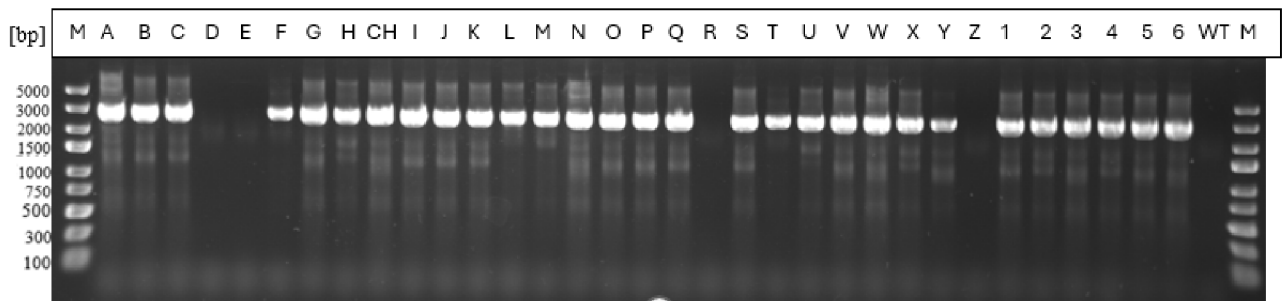
Obrázek 17 - Selektce transgenních semen v T1 generaci u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::RUBY. Semeno s vysokou intenzitou fluorescence značí větší počet kopií inzertu (1), semeno s nižší intenzitou fluorescence (2) a semeno bez inzertu (3)

Selekce hemizygotních rostlin v T1 generaci s jednou a dvěma kopiemi inzertu

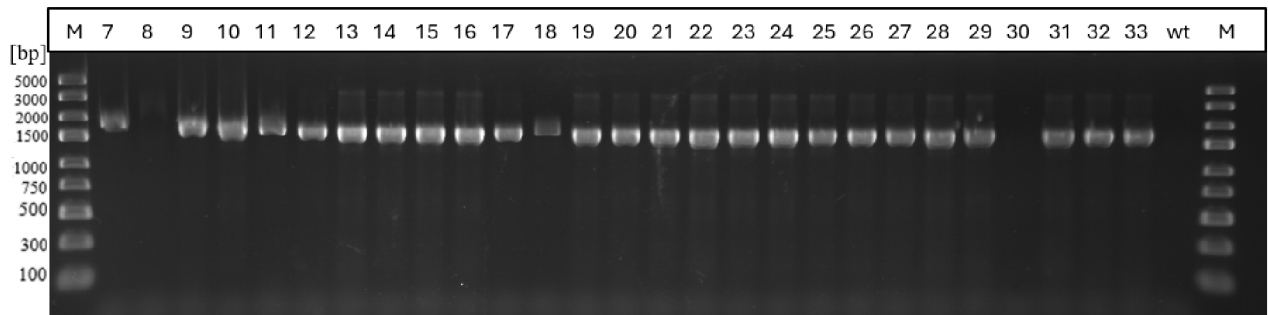
Pro potvrzení, zda vybrané rostliny opravdu obsahují insert byl proveden rychlý screening cca 30 rostlin v T1 generaci rostlin reportérových linií AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS (Obr. 19), AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS (Obr. 18) a AtLhcb8_{pro}::RUBY (Obr. 20), pomocí PhireDirect PCR (Viz. kap. 4.4.3.7). U linií AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS

a *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* byla amplifikace provedena pomocí primerů 16 a 17 (Viz. Tab. 13) s $T_m = 65^\circ\text{C}$ s výsledným produktem 1742 bp (*AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS*) a 3047 bp (*AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS*). Kombinace primerů byla vybrána tak, aby byla amplifikována část sekvence inzertu, kde došlo propojení *AtLhcb8_{pro}* a GUS sekvence (*AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS*) a *AtLhcb8_{pro}*, sekvence *LHCB8* genu a GUS sekvence (*AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS*). U linie *AtLhcb8_{pro}::RUBY* byla amplifikace provedena pomocí primerů 16 a 12 (Viz. Tab. 10) s $T_m = 65^\circ\text{C}$ s výsledným produktem 1400 bp. Kombinace primerů byla vybrána tak, aby byla amplifikována část sekvence inzertu, kde došlo propojení *AtLhcb8_{pro}* a RUBY kazety.

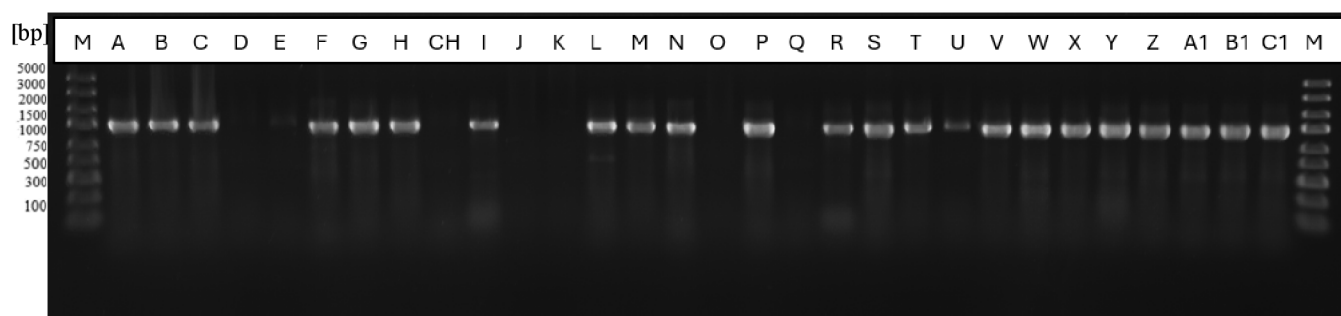
Následně byly PCR produkty separovány pomocí elektroforetické separace v 1,2% gelu a vizualizovány pomocí UV transluminátoru.



Obrazek 18 - Elektroforetický rozdělené PCR produkty části sekvence inzertu *Lhcb8_{pro}::LHCB8::GUS* pro ověření pozitivnosti reportérové linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS*. GeneRuler Express DNA Ladder (jamky M), PCR produkty inzertu (jamky A – Z a 1 - 6), negativní kontrola (jamka WT)



Obrazek 19 - Elektroforetický rozdělené PCR produkty části sekvence inzertu *Lhcb8_{pro}::GUS* pro ověření pozitivnosti reportérové linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS*. GeneRuler Express DNA Ladder (jamky M), PCR produkty inzertu (jamky 7 – 33), negativní kontrola (jamka WT)



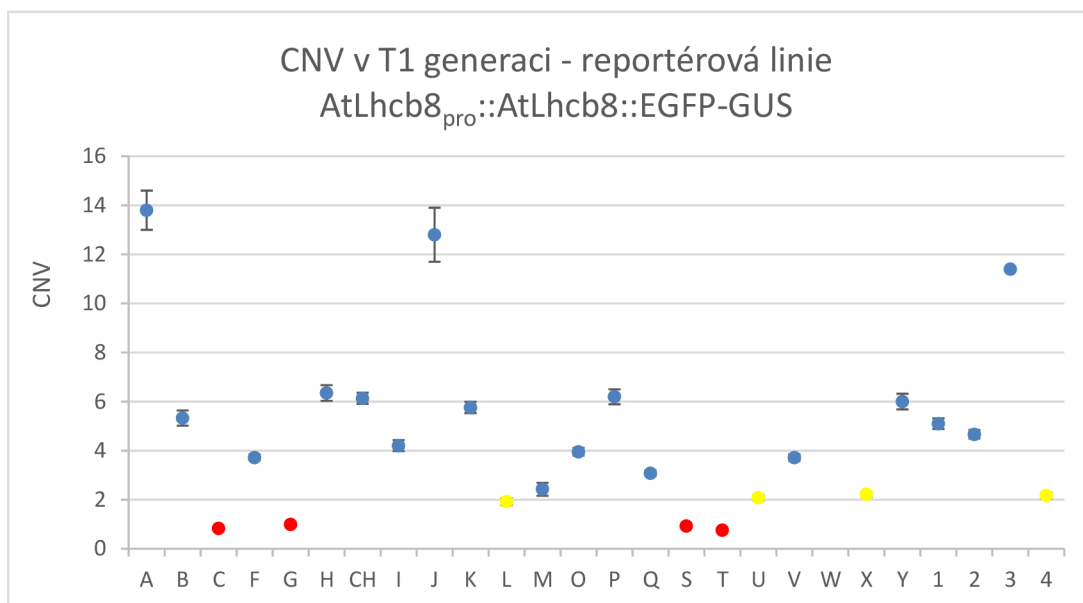
Obrázek 20 - Elektroforeticky rozdělené PCR produkty části sekvence inzertu AtLhcb8_{pro}::RUBY pro ověření pozitivnosti reportérové linie AtLhcb8_{pro}::RUBY. Express DNA Ladder (jamky M), PCR produkty inzertu (jamky A – C1).

Na základě elektroforetogramu byly identifikovány rostliny, u kterých se vyskytuje inzert. U reportérové linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS byl amplifikován PCR produkt o velikosti 3047 bp u rostlin A, B, C, F, G, H, CH, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, S, T, U, V, W, X, Y, 1, 2, 3, 4, 5 a 6. Celkem z 33 testovaných rostlin bylo 29 pozitivních.

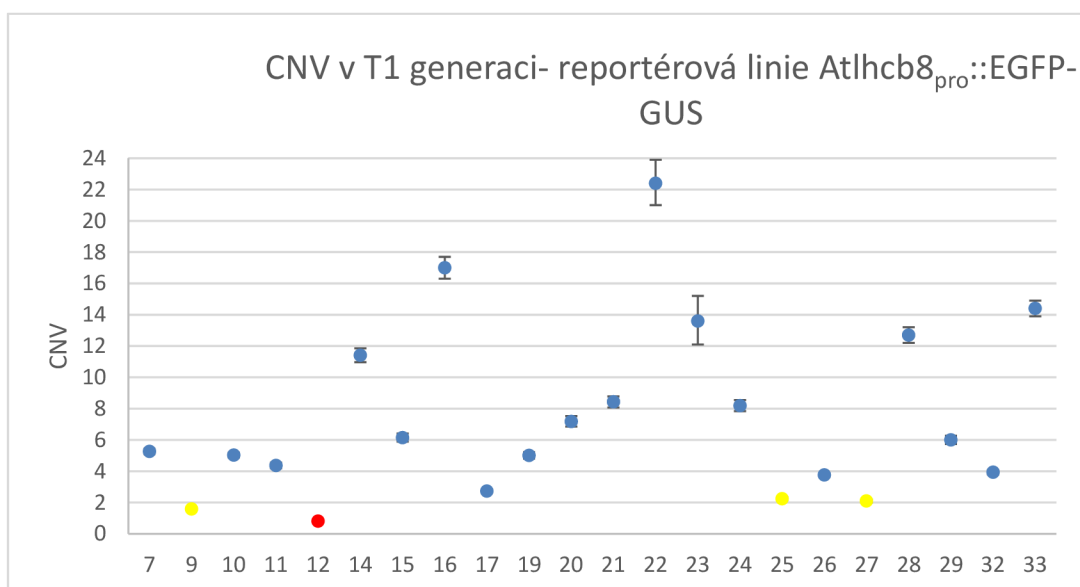
U reportérové linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS byl amplifikován PCR produktu o velikosti 1742 bp u rostlin 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32 a 33. Celkem z 27 testovaných rostlin bylo 24 pozitivních.

U reportérové linie AtLhcb8_{pro}::RUBY byl amplifikován PCR produktu o velikosti 1400 bp u rostlin A, B, C, F, G, H, I, L, M, N, P, R, S, T, V, W, X, Y, Z, A1, B1 a C1. Celkem z 30 testovaných bylo 22 pozitivních.

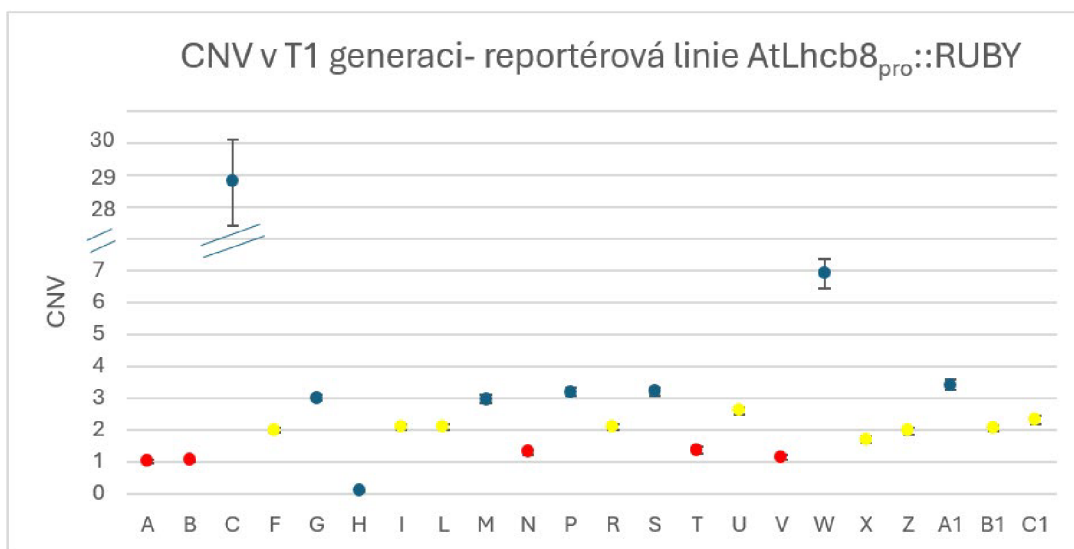
Následně byla z těchto rostlin vyizolována DNA pomocí NucleoSpin Plant II kitu (Viz. kap. 4.4.4.3). Poté byla naštěpena pomocí restrikčního enzymu MfeI. Po naštěpení DNA byla provedena ddPCR podle základního protokolu (Viz. kap. 4.4.5.4), která sloužila pro stanovení počtu kopií vloženého inzertu u linií AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS (Obr. 22), AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS (Obr. 21) a AtLhcb8_{pro}::RUBY (Obr. 23).



Obrázek 21 – Graf CNV v T1 generaci rostlin u reportérové linie $AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS$. Rostliny obsahující jednu kopii inzertu (červená barva), rostliny obsahující dvě kopie inzertu (žlutá barva). \pm SD odpovídá 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení.



Obrázek 22 – Graf CNV v T1 generaci rostlin u reportérové linie $AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS$. Rostliny obsahující jednu kopii (červená barva), rostliny obsahující dvě kopie inzertu (žlutá barva). \pm SD odpovídá 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení.



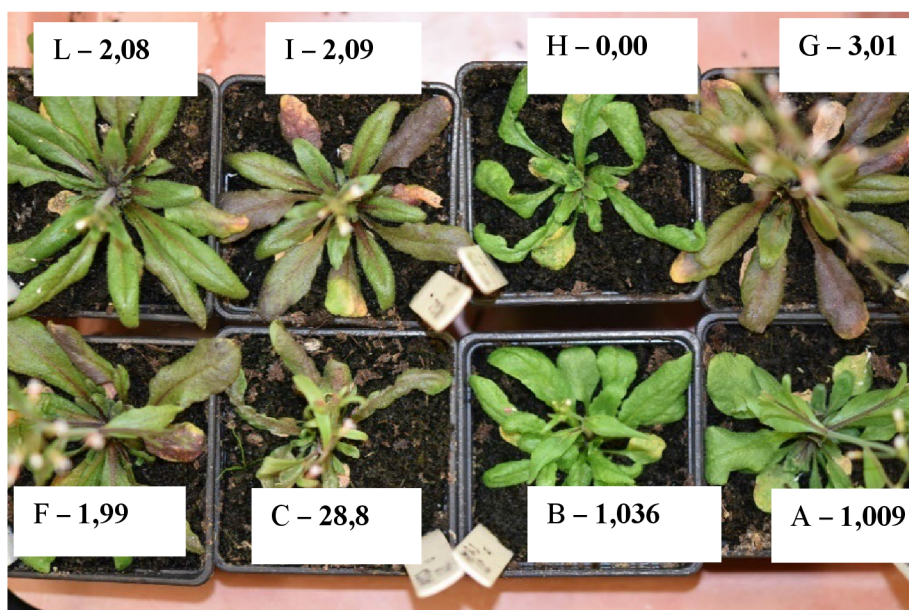
Obrázek 23 - Graf CNV v T1 generaci rostlin u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::RUBY. Rostliny obsahující jednu kopii (červená barva), rostliny obsahující dvě kopie inzertu (žlutá barva). ± SD odpovídá 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení

Pro studium exprese genu *LHCB8* bylo potřeba v T1 generaci vyselektovat rostliny s jednou a dvěma kopiemi inzertu (hemizygoti) u všech linií. Na základě výsledků z ddPCR, bylo určeno, že u linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS obshávají rostliny C, G, S a T jednu kopii inzertu a rostliny L, U, X a 4 dvě kopie inzertu.

U linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS obsahuje rostlina 12 jednu kopii inzertu a rostliny 9, 25 a 27 dvě kopie inzertu.

U linie AtLhcb8_{pro}::RUBY obsahují rostliny A, B, N, T a V jednu kopii inzertu a rostliny F, I, L, R, U, X, Z, B1 a C1 dvě kopie inzertu (Obr 24).

Tyto rostliny byly nechány, aby dozrály do semen a tato semena byla použita pro selekci homozygotních rostlin.



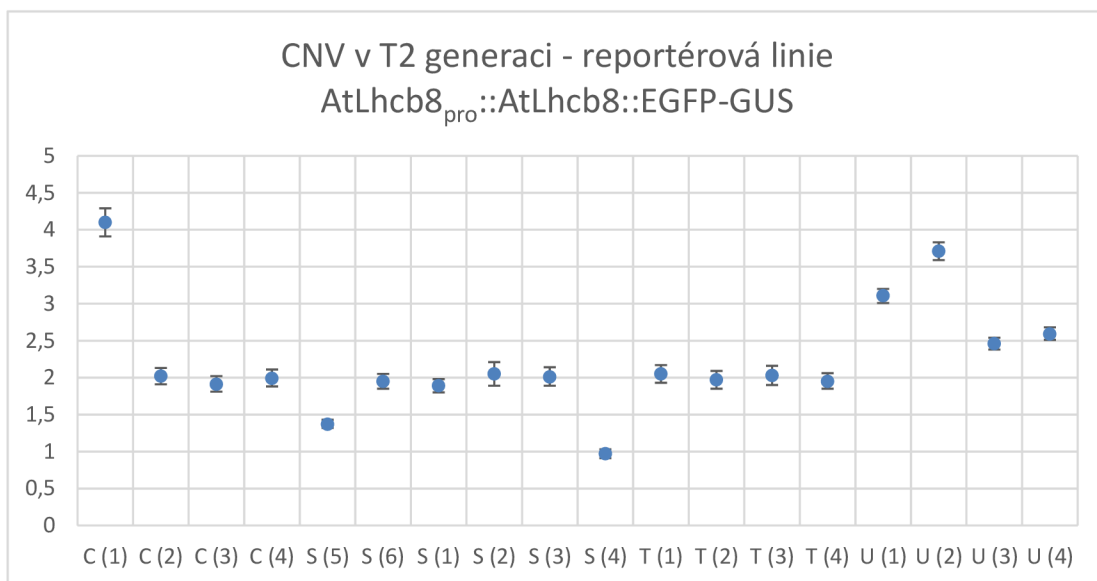
Obrázek 24 – Rostliny AtLhcb8_{pro}::RUBY a jejich počet kopii.

Selekce homozygotních rostlin v T2 generaci – rostliny se dvěma a čtyřmi kopiemi inzertu

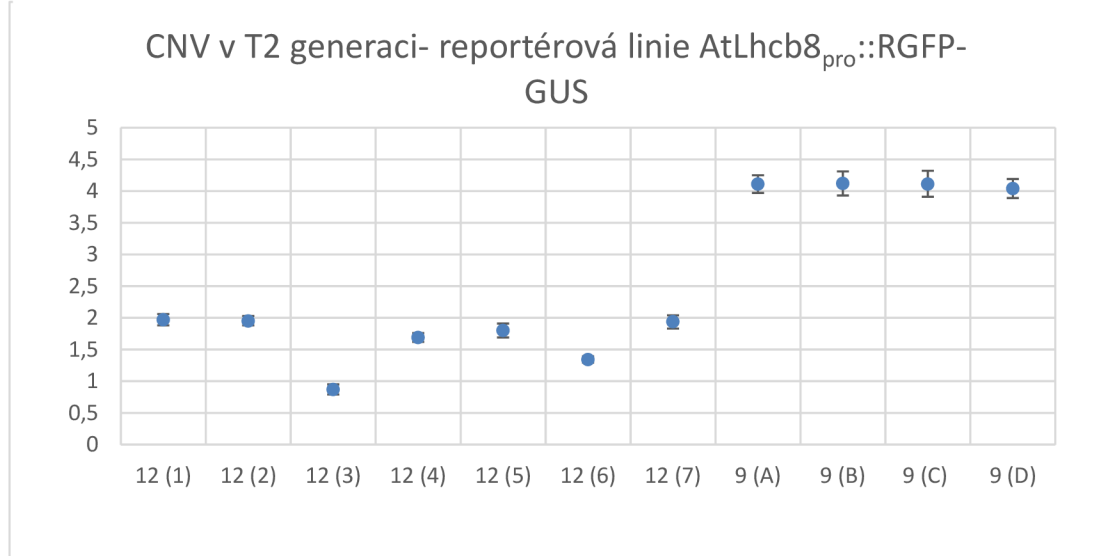
Po selekci rostlin s jednou a dvěma kopiemi inzertu (hemizygoti), byly vybrány rostliny, z nichž se sesbíraly semena (T2 generaci) pro selekci homozygotních rostlin. U linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS byly vybrány rostliny C, S, T (jedna kopie inzertu) a U (dvě kopie inzertu). U linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS byly vybrány rostliny 12 (jedna kopie inzertu) a 9 (dvě kopie inzertu). A u linie AtLhcb8_{pro}::RUBY vybrány rostliny A, B, V (jedna kopie inzertu) a F, L, R (dvě kopie inzertu).

Selekce semen potenciálních homozygotních rostlin byla provedena na základě reportérového genu OLE1 – RFP (linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS) pod fluorescenčním mikroskopem (Viz. kapt. 4.4.5.1), kde homozygotní semena (dvě a čtyři kopie) měly silnou fluorescenci, hemizygotní semena (jedna a dvě kopie) slabší fluorescenci a semena bez inzertu žádnou. Zastoupení semen u hemizygotů s jednou kopií byl 1/4 homozygoti, 2/4 hemizygoti a 1/4 bez inzertu. Na základě toho bylo od každé rostliny vybráno cca 4 – 6 semen s nejvyšší intenzitou fluorescence.

Následně byly u cca třítýdenních rostlin odebrány listy, vyzolována DNA pomocí NucleoSpin Plant II kitu (Viz. kapt. 4.4.5.3), a následně byla DNA naštěpena pomocí enzymu MfeI pro následnou ddPCR (Viz. kap. 4.4.5.4) pro ověření správnosti selekce homozygotních semen. Screening byl proveden u linií AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS (Obr. 26) a AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS (Obr. 25). U linie AtLhcb8_{pro}::RUBY se screening T2 generace připravuje.



Obrázek 25 – Graf CNV v T2 generaci rostlin u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS. ± SD odpovídá 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení. Písmeno značí rostlinu z T1 generace a číslice značí T2 generaci.



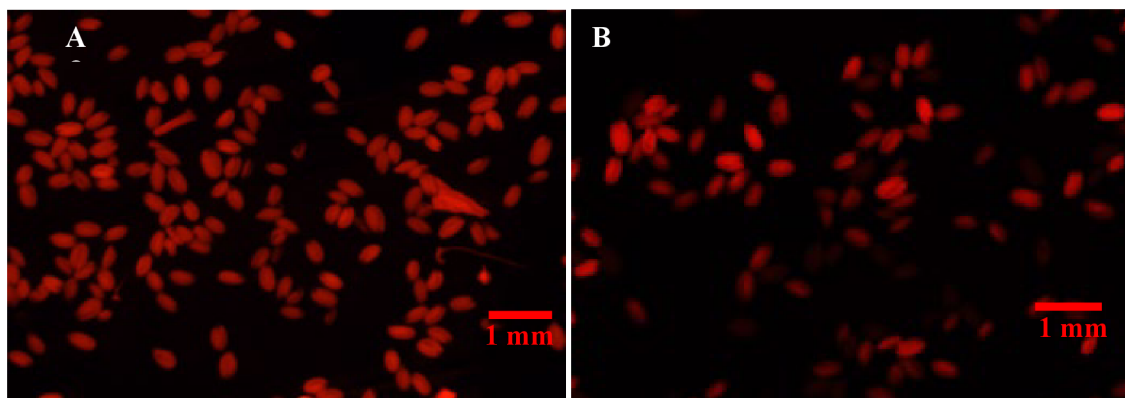
Obrázek 26 – Graf CNV v T2 generaci rostlin u reportérové linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS. ± SD odpovídá 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení. Písmeno značí rostlinu z T1 generace a číslice značí T2 generaci.

Na základě výsledků z ddPCR, bylo ověřeno, že vybrané rostliny z linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS jsou opravdu homozygoti. Konkrétně u linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS rostliny S6, S1, S2, S3, T1, T2, T3 a T4 obsahují dvě kopie inzertu; u linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS – 12-1, 12-2, 12-4, 12-5 a 12-7 obsahují dvě kopie inzertu a 9A, 9B, 9C a 9D obsahují čtyři kopie inzertu.

U rostliny C bylo zjištěno, že při screeningu v T1 generaci pravděpodobně došlo k chybě a rostliny původně obsahovaly v T1 generaci dvě kopie inzertu. Screening v T2 generaci vyšel, že rostliny C2, C3 a C4 obsahují dvě kopie inzertu (hemizygot) a C1

obsahuje čtyři kopie inzertu (homozygot) (Obr. 25). Tento výsledek selekce u rostlin C 1-4 byl ověřen u T3 generace semen, kde byla na základě reportérového genu OLE1 - RFP pozorována pod fluorescenčním mikroskopem u rostliny C1 uniformní silná fluorescence značící homozygota (Obr. 26A) a u rostliny C2 byla pozorována segregace alel, projevující se rozdílnou intenzitou fluorescence hemizygot (Obr. 26B).

Pro další experimenty byla vybrána semena od rostlin S1 (dvě kopie inzertu), C1 (čtyři kopie inzertu), 12-1 (dvě kopie inzertu) a 9A (čtyři kopie inzertu).



Obrázek 27 – Fluorescence semen vytvořená expresí markerového konstruktů OLE1-RFP u T3 generace rostlin reportérové linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS. Uniformní fluorescence semen homozygotní rostliny (A), Různá intenzita fluorescence značící segregaci u semen heterozygotní rostliny (B)

C. Optimalizace histochemického barvení GUS

Pro studium aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} za fyziologických podmínek byla nejdříve provedena optimalizací metody GUS barvení. Optimalizace histochemického barvení GUS vycházela ze standardního protokolu pro GUS barvení, na základě jeho dostupných modifikací. Při optimalizaci byly testovány celkem čtyři modifikace:

1. Fixace rostlinného materiálu pomocí acetonu, preinfiltrace v -Xgluc roztoku (Roztok slouží k preinfiltraci a neobsahuje substrát glukoronidázu) a infiltrace pomocí +Xgluc roztoku (roztok obsahuje substrát glukoronidázu) - (Act, -Xgluc, +Xgluc)
2. Fixace rostlinného materiálu pomocí acetonu a infiltrace pomocí Xgluc roztoku - (Act, +Xgluc)
3. Preinfiltrace pomocí -Xgluc roztoku, infiltrace pomocí Xgluc roztoku - (-Xgluc, +Xgluc)
4. Infiltrace pomocí Xgluc roztoku - (+Xgluc)

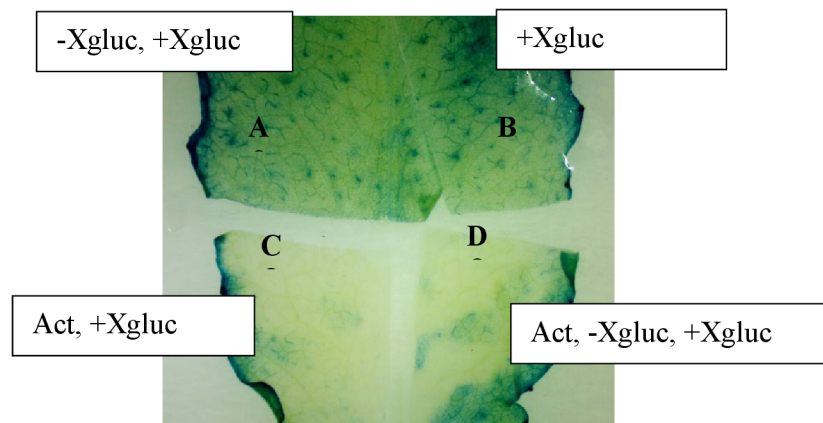
Optimalizace protokolu GUS barvení, kde každá varianta byla provedena ve čtyřech opakování, pokaždé na jednom listu rozděleném na čtyři části z důvodu

zjištění heterogenity. Každá část listu pak byla barvena podle jedné ze čtyř modifikací protokolu (Obr. 28), aby byly vidět jednotlivé rozdíly v heterogenitě barvení v rámci jednoho listu.

Při optimalizaci bylo pozorováno, že při fixaci listu acetonem byl list lépe odbarven, následné barvení +Xgluc roztokem bylo více sjednocené (Obr. 28C, D), ale list se zdál pro manipulaci více křehčí než ty listy, které nebyly fixované v acetonu.

U listů, u kterých byla provedena preinfiltace v -Xgluc roztoku nelze pozorovat výrazné rozdíly (Obr. 28A, D) oproti listům které byly barveny bez preinfiltace (Obr. 28B, C).

Proto na základě tohoto pozorování byl pro barvení vybrán upravený protokol skládající se z fixace rostlinného materiálu pomocí acetonu a infiltrace pomocí +Xgluc roztoku.



Obrázek 28 – Optimalizace GUS barvení. Část listu, která byla namočená v -Xgluc roztoku a následně + Xgluc roztoku (A), část listu, která byla namočená pouze v +Xgluc roztoku (B), část listu, která byla fixovaná pomocí acetonu a namočená v +Xgluc roztoku (C) a část listu, která byla fixovaná v acetonu, namočená v -Xgluc roztoku a v +Xgluc roztoku (D)

D. Analýza aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}* a funkce proteinu LHC8

Studium a lokalizace aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}* bylo provedeno u reportérových linií *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* a *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* pomocí histochemického barvení GUS. Obecné vyhodnocení lokalizace aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}* bylo provedeno pod mikroskopem Olympus EP50. Detailnější vyhodnocení následně bylo provedeno pod mikroskopem Olympus BX60.

Dále byl studován vliv proteinu LHC8 na fotosyntézu pomocí chlorofylové fluorescence. Měření bylo provedeno pomocí FluorCamu na mladých a starých listech reportérové linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS*, kde byla studována heterogenita

fluorescenčních parametrů v místech, kde byla sledována aktivita promotoru AtLhcb8_{pro} a v místech bez aktivity.

Dále bylo provedeno měření chlorofylové fluorescence pomocí DualPamu na mladých a starých listech genotypů *kolhcb8* a WT *A. thaliana*, kde byly vyhodnoceny následující parametry: maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII, NPQ a transport elektronů přes PSII a PSI.

- **Studium aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} během ontogenetického vývoje pomocí histochemického barvení GUS**

Důvod studia aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} během ontogeneze je nedávná studie Sawchuk *et al.*, (2008), která naznačuje že se gen *LHCB8* může exprimovat i za běžných podmínek, jelikož se mělo za to, že se exprimuje pouze za stresových podmínek. Pro další studie je tedy podstatné podstatné vědět, jak se tento gen exprimuje. Byly testovány dvě linie lišící se přítomností sekvence genu *LHCB8*, které budou sloužit pro zjištění zda intron v genu má regulační funkci.

Studium aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} bylo provedeno na různě starých rostlinách. V 1. a 2. týdnu bylo provedeno GUS barvení na homozygotních rostlinách s dvěma i čtyřmi kopiemi. U zbylých fází byly barveny pouze homozygotní rostliny s dvěma kopiemi.

V prvním, druhém, čtvrtém a šestém týdnu byly barveny v 4-5 opakováních celé rostliny. V jedenáctém týdnu byly ve třech opakováních barveny stonek a listy (od nejmladšího po nejstaší list). Senescentní listy byly barveny ve třech opakováních od nejmladšího po nejstarší list.

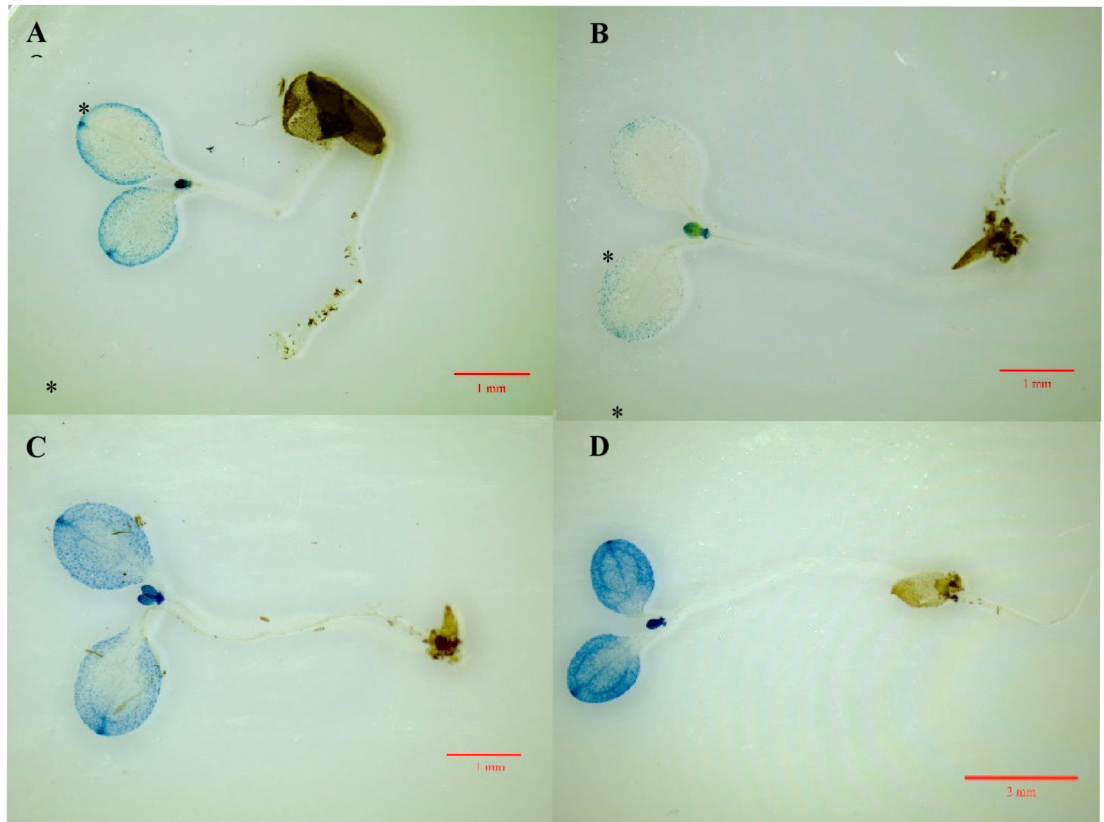
V aktivitě promotoru AtLhcb8_{pro} lze v prvním a druhém týdnu pozorovat rozdíl mezi reportérovou linií AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS, kde u linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS (Obr. 29A, B; Obr. 30A, B) lze pozorovat sníženou expresi konstruktů po ploše listu a v nejmladších listech oproti linii AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS (Obr. 29C, D; Obr. 30C, D). Tento rozdíl mohl být způsoben přítomností sekvencí genu *LHCB8* v rámci reportérové konstruktů u linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS. Společným rysem je, že u obou linií dochází k intenzivní expresi konstruktů na okrajích listů a v hydatodech (jednotýdenní rostliny mají jednu hydatodu, dvoutýdenní rostliny mají tři hydatody).

U rostlin starých čtyři a šest týdnů lze pozorovat, že u obou linií je promotor AtLhcb8_{pro} nejvíce aktivní v nejmladších listech, kde je obarvena celá plocha listu, u mladých listů je nejintenzivnější aktivita na okrajích a částečně po ploše listu,

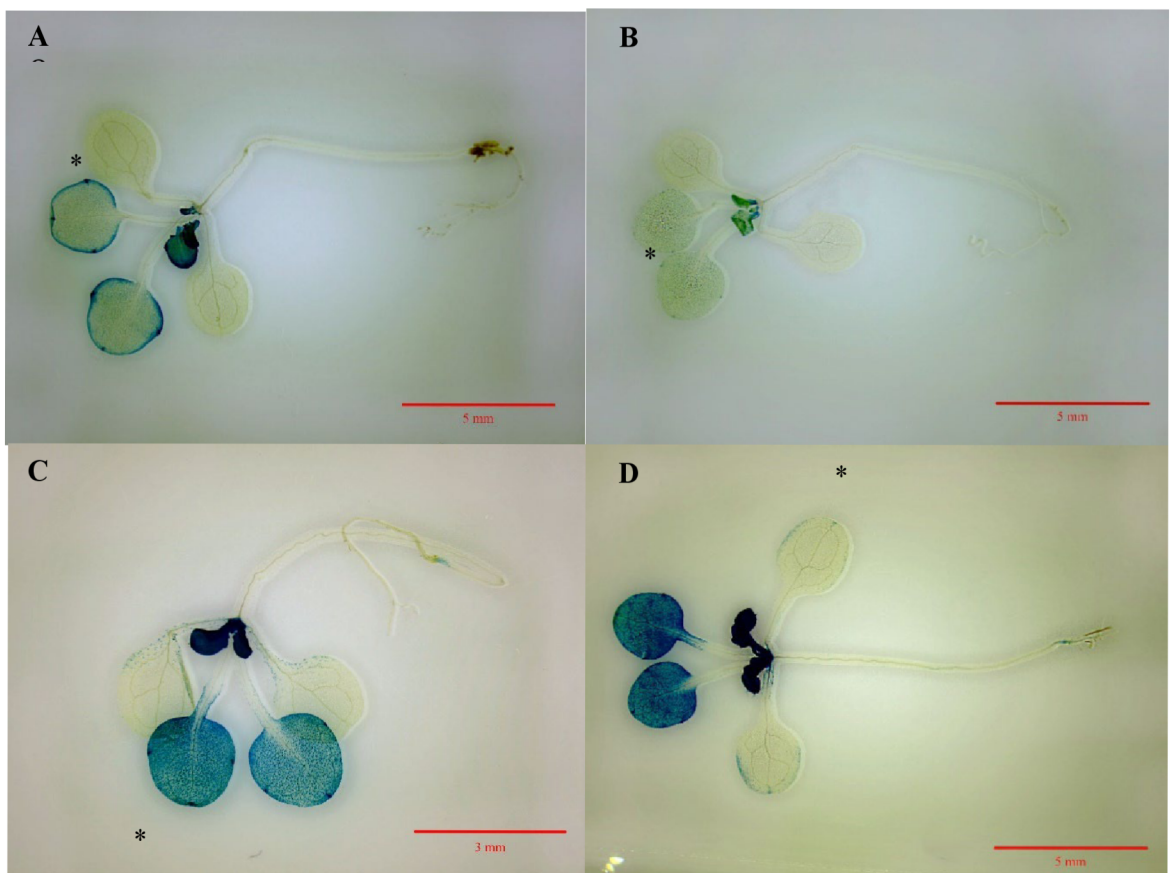
u starších listů je aktivita promotoru lokalizovaná pouze na okrajích listu a v hydatodech a u nejstarších listů je aktivita promotoru lokalizovaná pouze v hydatotech (Obr. 31C, D; Obr. 32C, D).

U rostlin starých 11 týdnů s narostlými květy, lze u obou linií pozorovat aktivitu promotoru *AtLhcb8_{pro}* v květech, po stonku, po celé ploše nejmladších listů a v mladých listech, kde se aktivita nejvíce lokalizuje po okrajích listu (Obr. 33). Zároveň byl u obou linií pozorován rozdíl v aktivitě promotoru u senescentních listů, kde u linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* nebyla pozorována aktivita promotoru (Obr. 34A), zatímco u linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* docházelo ke zvýšené aktivitě promotoru *lhcb8* po celé ploše listu (Obr. 34B). To mohlo být způsobeno přítomností sekvence genu *LHCB8*, jak již bylo posáno u rostlin starých 1. a 2. týden.

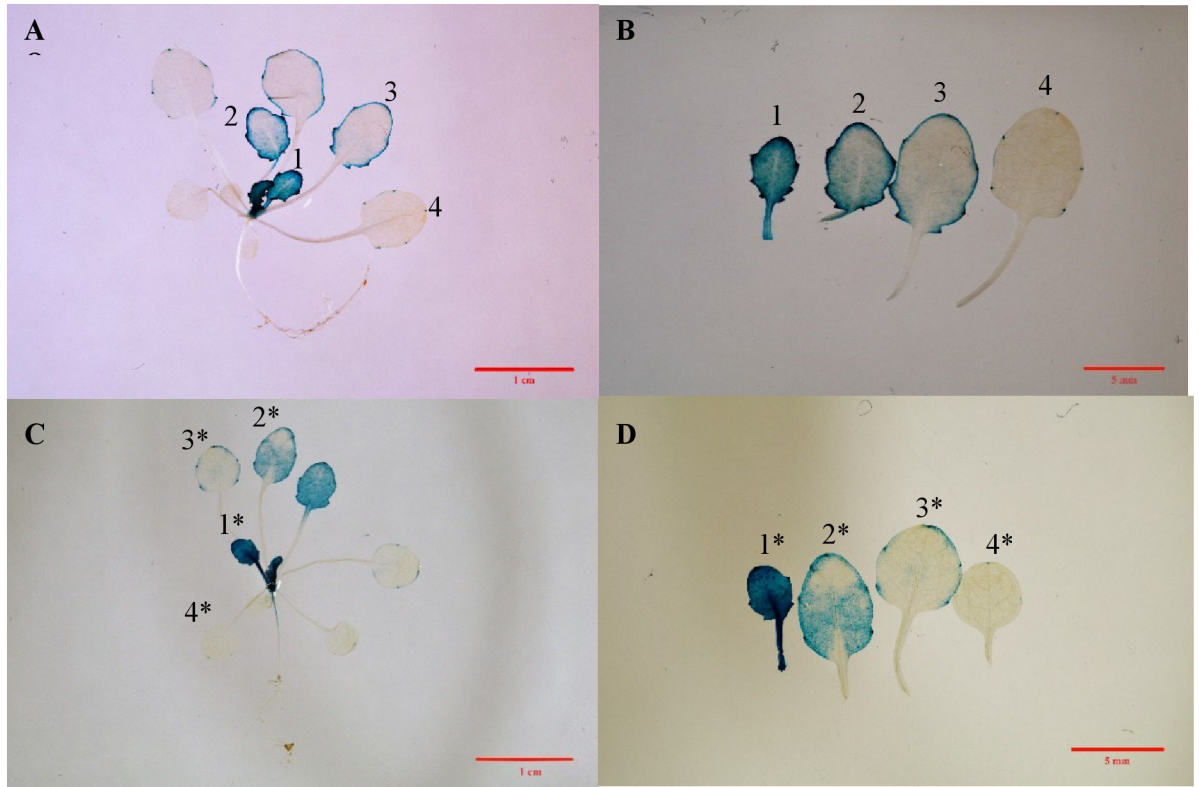
Poté byly pro detailnější studium aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}* vybrány listy a květy, které byly pozorovány pod mikroskopem Olympus BX60 (Viz. kap. 4.4.5.1). U rostlin starých jeden a dva týdny byla pozorována aktivita promotoru v hydatodě (Obr. 35E, F) a v průduších (Obr. 35A, B, E). U rostlin starých čtyři až 11 týdnů byla aktivita promotoru pozorována v hydatodách, v průduších a v pokožkových buňkách z nichž vyrůstají trichomy (Obr. 35C, D). U jedenáctitýdenních rostlin byla pozorována aktivita promotoru v rámci květu (Obr. 36A) v kališních i korunních lístcích (Obr. 36C, D) a v průduších tyčinek (Obr. 36B). V rámci stonku byla aktivita promotoru pozorována v pokožkových buňkách z nichž vyrůstají trichomy (Obr. 36E, F).



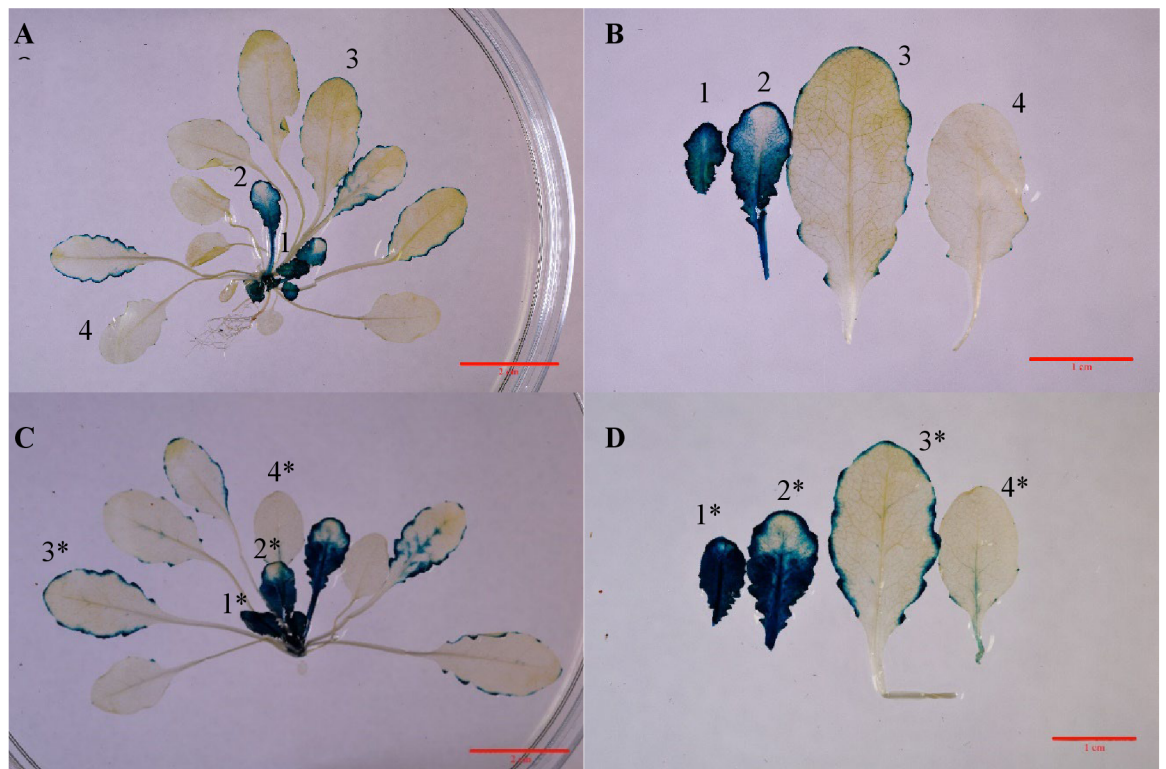
Obrázek 29 – GUS barvení jednotýdenních rostlin. Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu (A), Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* se čtyřmi kopiemi inzertu (B), Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu (C), Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* se čtyřmi kopiemi inzertu (D). * Značí hydatomy.



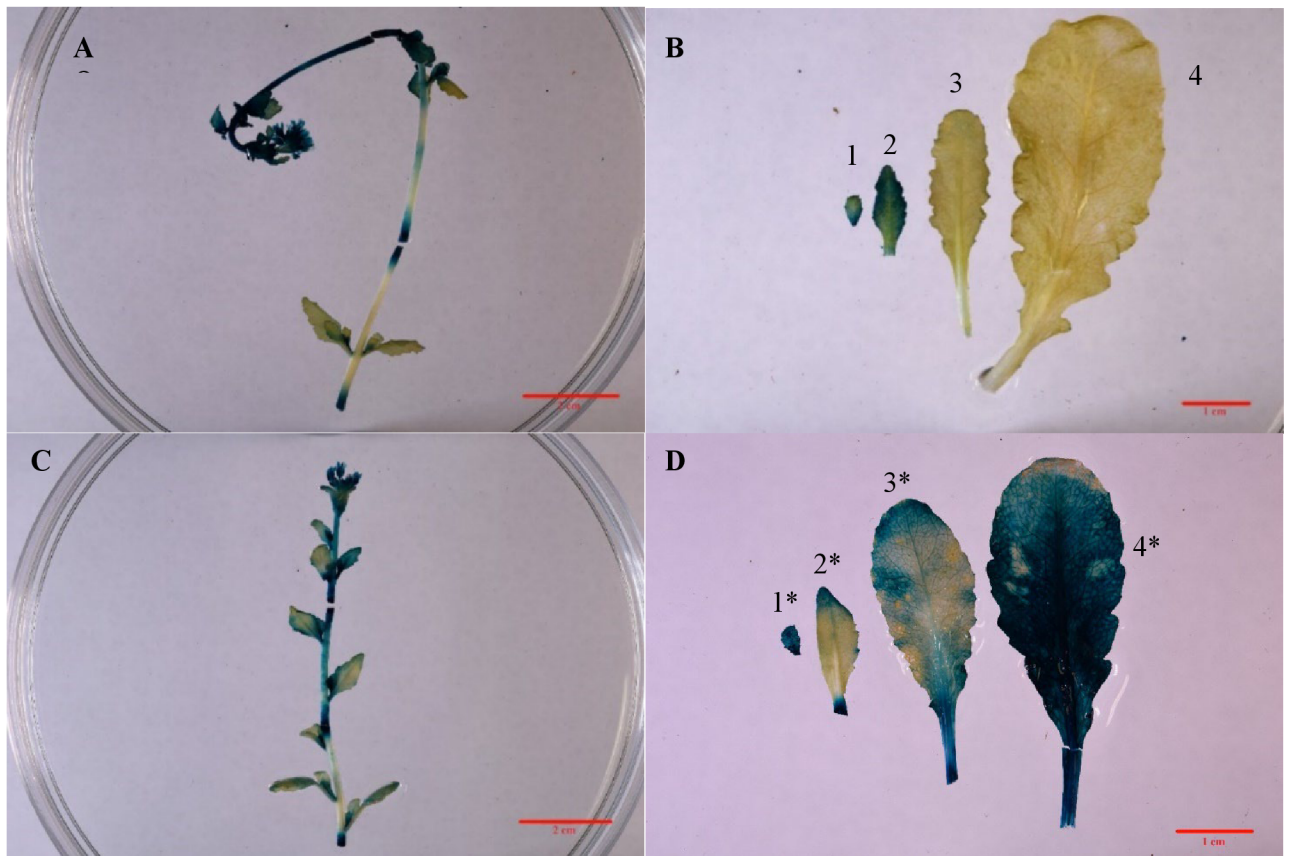
Obrázek 30 - GUS barvení dvoutýdenních rostlin. Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu (A), Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* se čtyřmi kopiemi inzertu (B), Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu (C), Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* se čtyřmi kopiemi inzertu (D). * Značí hydatomy.



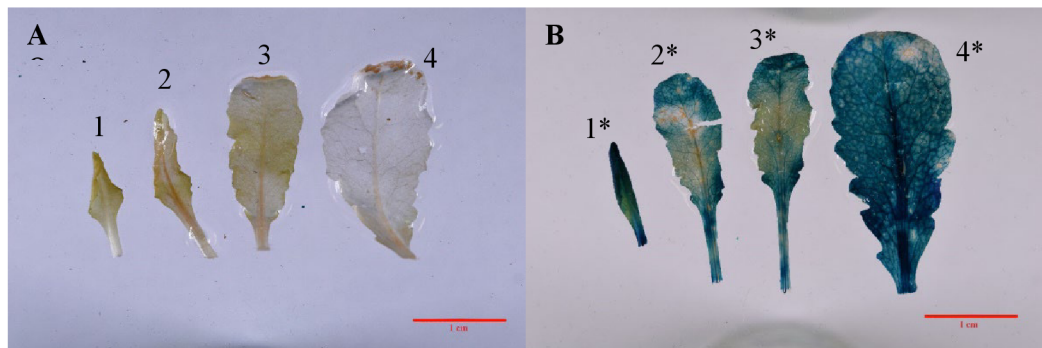
Obrázek 31 - GUS barvení čtyřtýdeních rostlin. Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu celá rostlina (A) a odebrané listy podle stáří (B), kde jsou nejmlaší listy (list 1), mladé listy (list 2), starší listy (list 3) a staré listy (list 4). Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu celá rostlina (C) a odebrané listy podle stáří (D), kde jsou nejmlaší listy (list 1*), mladé listy (list 2*), starší listy (list 3*) a staré listy (list 4*).



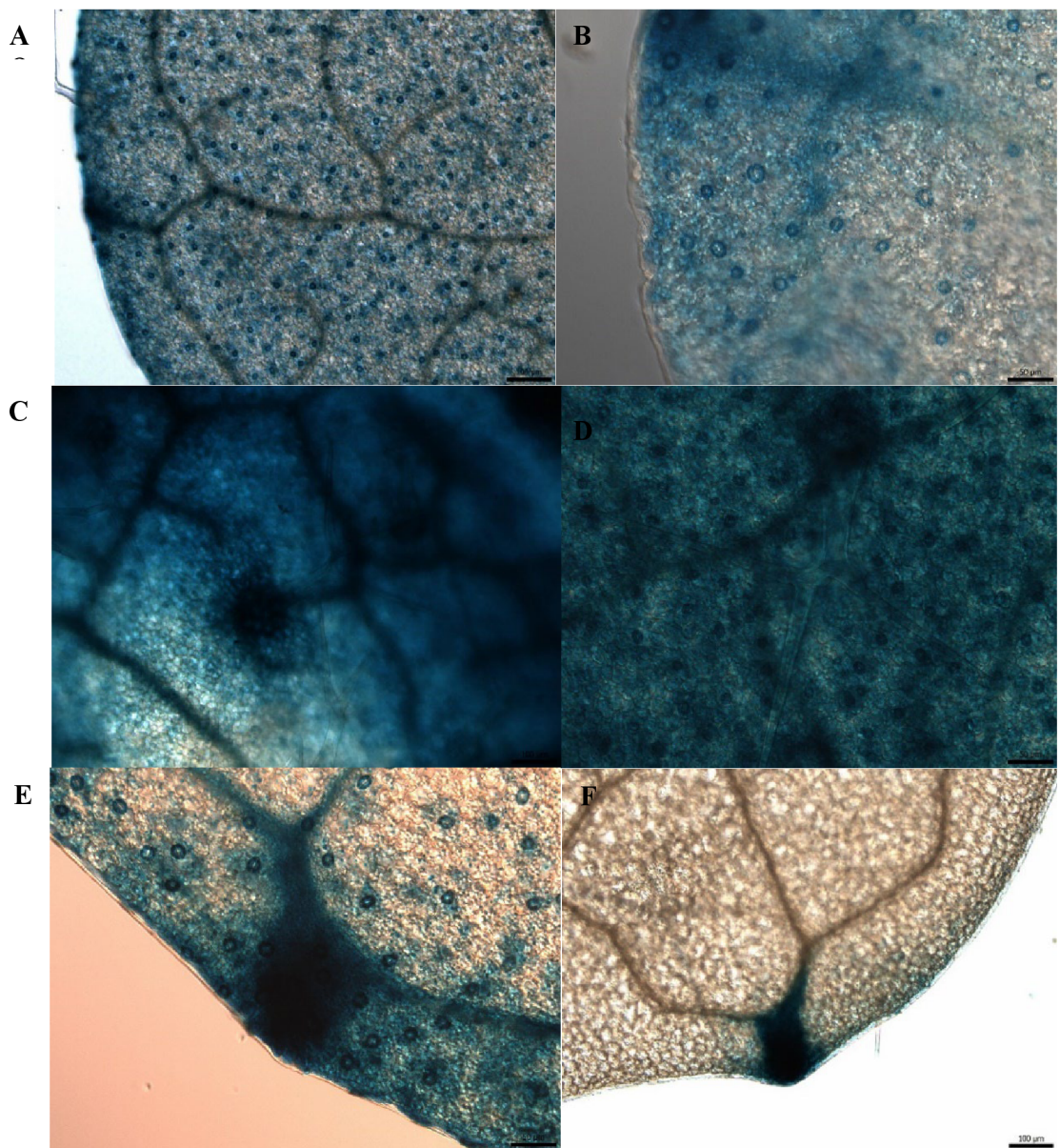
Obrázek 32 - GUS barvení šestitýdenních rostlin. Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu celá rostlina (A) a odebrané listy podle stáří (B), kde jsou nejmlaší listy (list 1), mladé listy (list 2), starší listy (list 3) a staré listy (list 4). Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu celá rostlina (C) a odebrané listy podle stáří (D), kde jsou nejmlaší listy (list 1*), mladé listy (list 2*), starší listy (list 3*) a staré listy (list 4*).



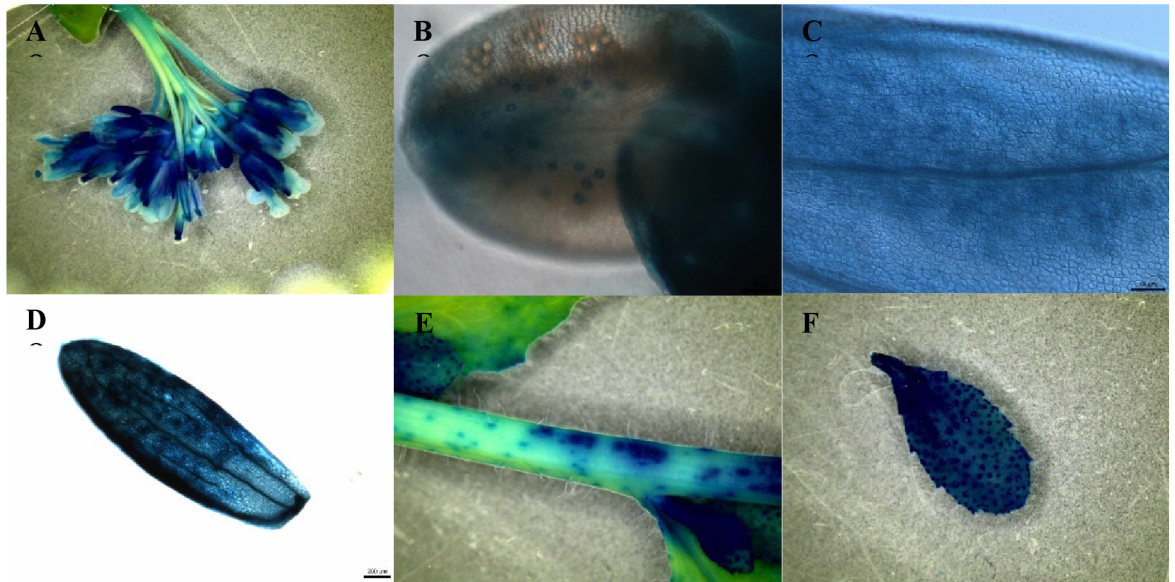
Obrázek 33 - GUS barvení jedenáctidenních rostlin. Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu – stonek + květy (A) a odebrané listy podle stáří (B), kde jsou nejmlaší listy (list 1), mladé listy (list 2), starší listy (list 3) a staré listy (list 4). Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu – stonek + květy (C) a odebrané listy podle stáří (D), kde jsou nejmlaší listy (list 1*), mladé listy (list 2*), starší listy (list 3*) a staré listy (list 4*).



Obrázek 34 - GUS barvení senescentních listů. Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu - odebrané listy podle stáří (A), kde jsou nejmlaší listy (list 1), mladé listy (list 2), starší listy (list 3) a staré listy (list 4). Reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* se dvěma kopiemi inzertu - odebrané listy podle stáří (B), kde jsou nejmlaší listy (list 1*), mladé listy (list 2*), starší listy (list 3*) a staré listy (list 4*).



Obrázek 35 – Lokalizace aktivity promotoru $AtLhcb8_{pro}$ v rámci buněk listu u reportérových linií $AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS$ a $AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS$ se dvěma kopiemi insertu. Lokalizace aktivity v průduších (A, B, E), v pokožkových buňkách z nichž vyrůstají trichomy (C, D) a v hydatodech (E, F).

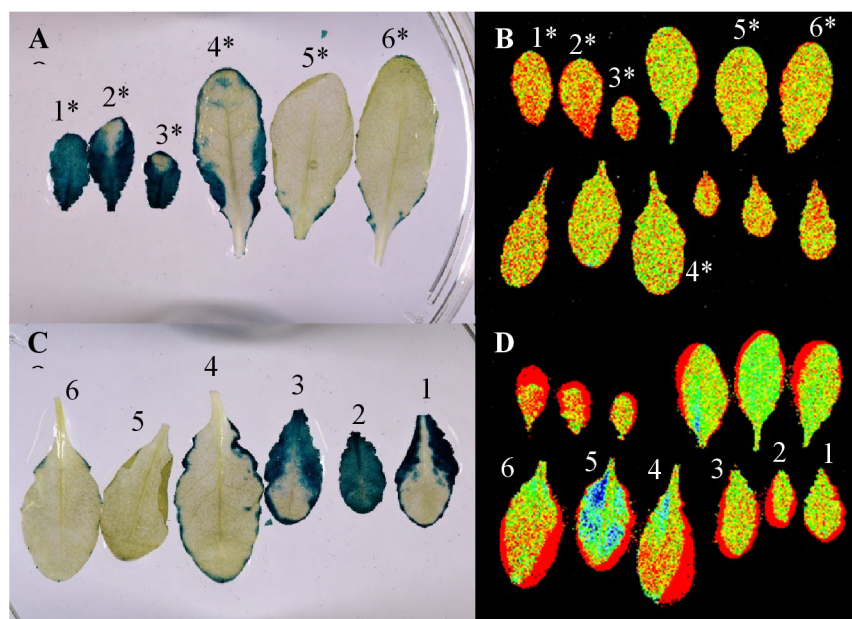


Obrázek 36 – Lokalizace aktivity promotoru $AtLhcb8_{pro}$ v rámci květu a stonku u linií $AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS$ a $AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS$ se dvěma kopiemi inzertu. Lokalizace aktivity v květu (A), v okvětních lístcích (C), v průduších lokalizovaných v tyčinkách (B), v korunních lístcích (D), v pokožkových buňkách z nichž vyrůstají trichomy v lokalizovaných na stonku (E) a na mladých listech stonku (F).

- Funkce proteinu LHCB8 ve fotosyntéze

Protein LHCB8 není běžně součástí PSII. Ví se, že se exprimuje za stresových podmínek, na základě čehož má přiřazenou fotoprotektivní funkci. Při studiu ontogeneze bylo zjištěno, že LHCB8 byl nejvíce exprimován nejmladších listech a na okraji mladých listů. U starých listů byla jeho exprese minimální. Proto na základě těchto zjištění byla provedena charakterizace funkce fotosyntézy u mladých a starých listů genotypů WT a *kolhcb8* a linie $AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS$.

Pro studium vlivu proteinu LHCB8 na fotosyntézu bylo provedeno dvojí měření na mladých a starých listech šestitýdenních rostlin. První měření bylo provedeno na rostlinách reportérové linie $AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS$ se dvěma kopiemi inzertu pomocí Fluorcamu (Viz. kap. 4.4.6), kdy byly sledovány rozdíly fluorescenční indukce chlorofylu v místech, kde byla sledována aktivita promotoru $AtLhcb8_{pro}$ s místy bez aktivity (Obr. 36). Měření bylo provedeno ve čtyřech opakováních, kdy první dvě opakování byly měřeny při intenzitě aktinického světla $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Obr. 37B) a druhé dvě opakování byly měřeny při intenzitě $1600 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Obr. 37D).



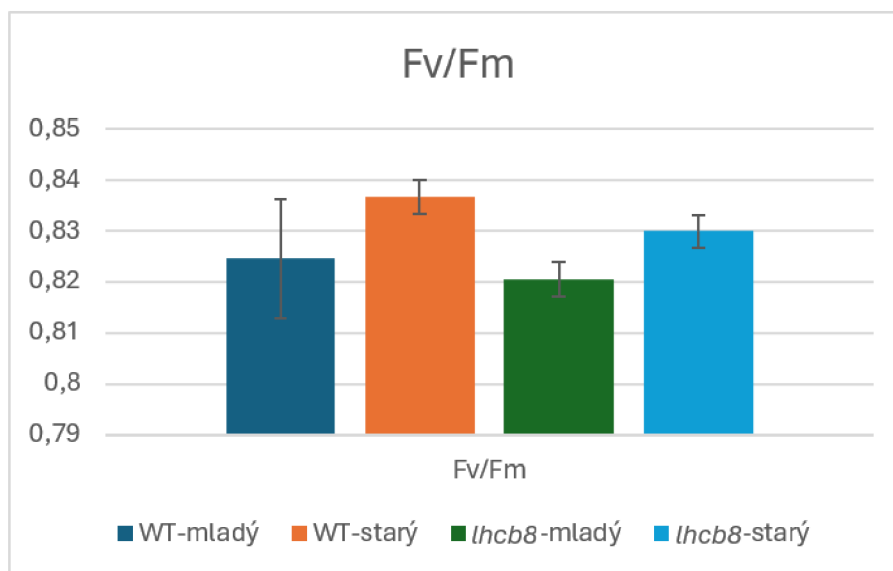
Obrázek 37 – Porovnání lokalizace promotoru *AtLhcb8_{pro}* pomocí GUS barvení a měření chlorofylové fluorescence na ploše listu u linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* pomocí FluorCamu. Listy barveny histochemickým barvením GUS (A, C), listy měřeny při intenzitě aktinického světla 800 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (B) a při 1600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (D). Čísla znázorňují jednotlivé listy.

Měření probíhalo při dvou intenzitách aktinického světla. Měření při intenzitě aktinického světla 800 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ neprokazovalo zásadní vliv proteinu LHCB8 na fotosyntetickou funkci. Proto bylo provedeno měření při intenzitě aktinického světla 1600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$, kde z důvodu vysoké intenzity záření docházelo k ohybání okrajů listů, které byly cílem zájmu (pozorovaná aktivita promotoru *AtLhcb8_{pro}*), a tím ke zkreslení dat. Měření bylo původně provedeno na celých rostlinách, ale z důvodu ohybání okrajů listů, bylo poté měření provedeno na jednotlivých listech, kde též docházelo z důvodu vysoké intenzity záření ke zkreslení dat.

Proto byla provedena charakterizace fotosyntetické funkce u mladých a starých listů genotypů WT a *kolhcb8* pomocí DualPamu, kdy se vyhodnotily čtyři parametry a to maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII, nefotochemické zhášení (NPQ) a transport elektronů přes PSII (ETR II) a PSI (ETR I).

Maximální kvantový výtěžek – Fv/Fm

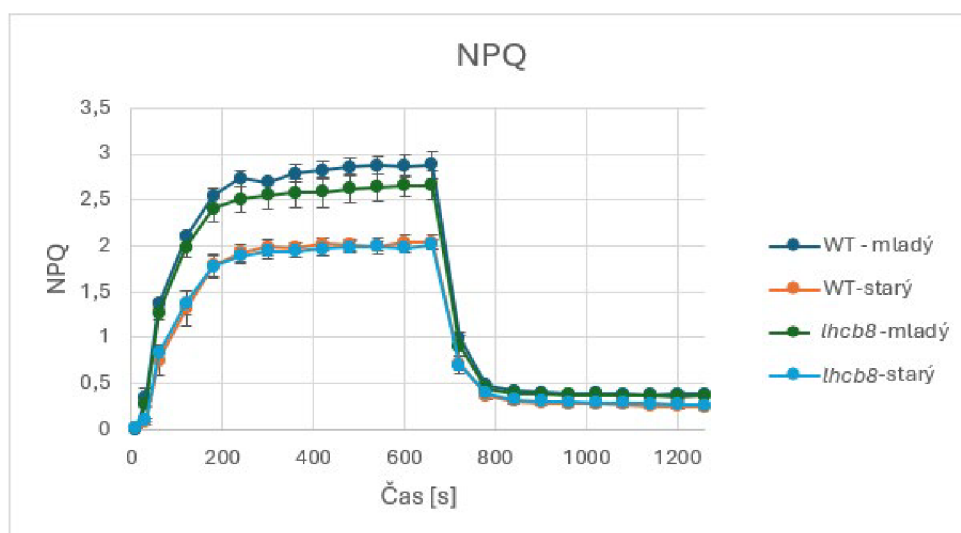
Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (Fv/Fm), který je používán jako indikátor stresu u rostlin indikuje, že absence proteinu LHCB8 nemá vliv na hodnotu maximálního kvantového výtěžku jelikož hodnoty odpovídají fyziologické hodnotě 0,8 (Obr. 38). Dále není pozorován žádný výrazný rozdíl mezi starými a mladými listy.



Obrázek 38 - Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (Fv/Fm). Prezentované hodnoty jsou vyjádřené jako průměr, n = 3 (WT), n = 5 (*kolhcb8*). Prezentované hodnoty jsou vyjádřené jako průměr ± SD, n = 3 (WT), n = 5 (*kolhcb8*).

Indukce nefotochemického zhášení - NPQ

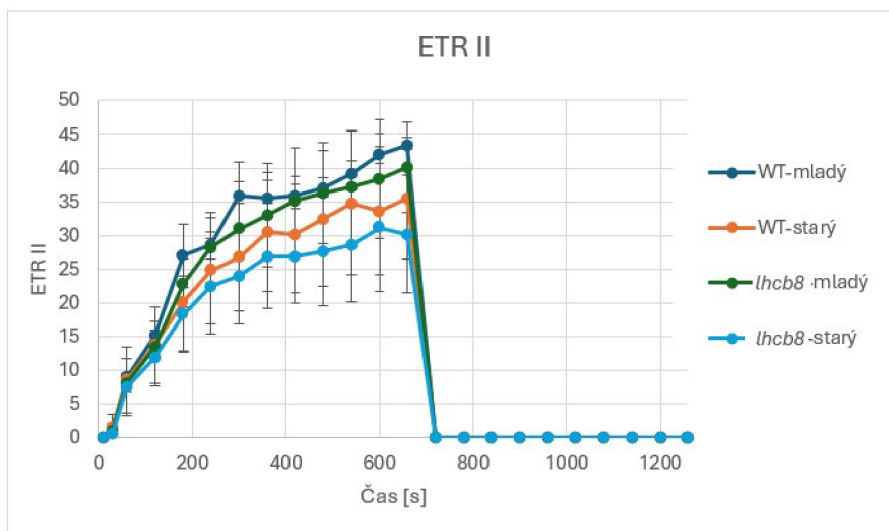
Při porovnání genotypů *kolhcb8* a WT nebyly pozorovány žádné významné změny při indukci NPQ (fotoprotektivní funkce rostlin, kde se jedná o regulovanou přeměnu přebytečné absorbované energie na teplo). Jediný rozdíl byl pozorován mezi mladými a starými listy, kdy indukce NPQ byla nižší u starých listů (Obr. 38).



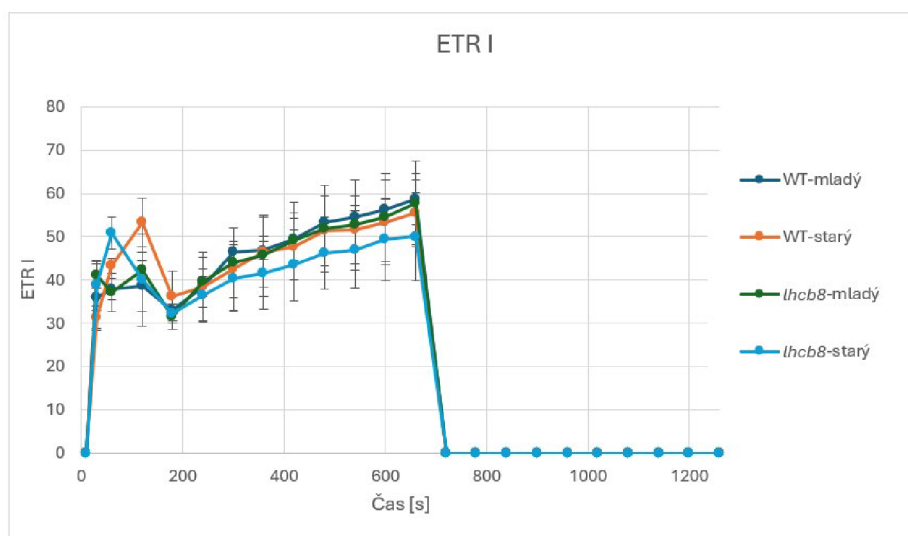
Obrázek 38 - Indukce nefotochemického zhášení u rostlin ve světelné fázi a následná relaxace NPQ ve tmě u jednotlivých variant rostlin, které byly před měřením adaptovány 30 min na tmě. Prezentované hodnoty jsou vyjádřené jako průměr ± SD, n = 3 (WT), n = 5 (*kolhcb8*).

Transport elektronů přes PSII – ETR II a PSI – ETR I

Elektronový transport přes PSII (Obr. 40) a PSI není nijak výrazně omezen u *kolhcb8* při porovnání s WT. Nelze pozorovat výrazné změny mezi jednotlivými genotypy a ani mezi starými a mladými listy.



Obrázek 39 - Elektronový transport přes PSII ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu. Prezentované hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, n = 3 (WT), n = 5 (*kolhcb8*).



Obrázek 40 - Elektronový transport přes PSI ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu. Prezentované hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, n = 3 (WT), n = 5 (*kolhcb8*).

Závěrem lze říct, že při měření za daných podmínek se nepovedlo zaznamenat výraznější vliv proteinu LHC8 na funkci fotosyntézy. Proto pro budoucí studie bude potřeba použít jiný způsob měření.

5 Diskuze

Studii zaměřených na expresi, funkci a charakteristiku proteinu LHCB8 je velmi málo. Postupem času se ale zjistilo, že se exprimuje i za běžných podmínek (Sawchuk *et al.* 2008) a díky tomu se zájem o něj začal zvětšovat se zaměřením na jeho expresi a regulaci, proteomickou analýzu a jakou funkci zastává ve fotosyntetickém aparátu.

Hlavní funkcí proteinu LHCB8, který kóduje gen *LHCB8* je fotoprotekce PSII při podmínkách vysoké intenzity světla (Floris *et al.* 2012). Většina dosavadních studií byla zaměřena pouze na studium exprese genu *lhcb8* za stresových podmínek a není přesně známo jak a kde se v rámci rostliny exprimuje během ontogenetického vývoje za fyziologických podmínek, což je podstatné pro aplikaci do dalších studií.

Na základě literatury bylo zjištěno, že gen *LHCB8* vykazuje zvýšenou expresi při podmínkách vysokého světla, kde vykazuje až o 255% vyšší expresi (Flanery *et al.*, 2021). Dále na základě studií bylo zjištěno, že exprese genu *LHCB8* je pravděpodobně regulována až na úrovni translace, kde hlavní vliv na aktivitu translace má zřejmě intenzita světla (Floris *et al.* 2012).

1. Příprava reporterových linií pro studium aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}*

Proto na základě těchto informací byla testována aktivita promotoru genu *LHCB8* pomocí dvou reportérových linií: *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* a *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS*, které byly dodány vedoucí práce ve formě semen primárně natransformovaných rostlin (T0 generace). V rámci předložené diplomové práce byla vytvořena ještě třetí linie *AtLhcb8_{pro}::RUBY*.

Reporterové linie využívající GUS barvení

Linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* a *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* obsahovaly bifunkční fúzní reportérový konstrukt EGFP a GUS (Quaedvlieg *et al.* 1998). Tento bifunkční konstrukt kombinuje výhody GUS reportérového genu s výhodami využití fluorescenčních proteinů. Hlavním benefitem použití GUS jako reportérového genu je vysoká citlivost detekce aktivity promotoru (vizualizace promotorů s nízkou aktivitou), nicméně jeho velkou nevýhodou je komplikovaná analýza aktivity promotoru genu zájmu v čase v rámci rostliny, jelikož při vizualizaci GUS barvení dochází k destrukci rostlinného materiálu. Tuto nevýhodu překonává fluorescenční protein EGFP, který měl být původně použit pro rychlý a nedestruktivní screening podmínek, při kterých dochází v rostlině k aktivaci studovaného promotoru *AtLhcb8_{pro}*. Při experimentech se bohužel ukázalo, že fluorescenci EGFP nebylo možno detekovat ani v listech, u kterých byla exprese *AtLhcb8_{pro}* potvrzena pomocí GUS. Absenci EGFP fluorescenčního signálu je

možné vysvětlit buď vybělováním (fotobleaching) v důsledku trvalého vystavení studovaných rostlin světlu během jejich pěstování, jeho nižší stabilitou v rostlinných buňkách v porovnání s GUS, případně kombinací obou faktorů nebo nízkým množstvím transkriptů.

Důvod přípravy reportérových linií GUS je nedostatek informací týkajících se regulace genové exprese za běžných podmínek, kde regulace exprese *LHC* genů mohou zahrnovat regulaci na úrovni transkripce, translace a posttranslačních modifikací. Na základě studie Floris *et al.* (2012) bylo zjištěno, že za některých podmínek (např. vysoká intenzita světla) může regulace na úrovni translace předcházet regulaci na úrovni transkripce. V rámci této studie byl právě tento způsob regulace pozorován u genu *LHCB8*. Dále je podezření, že u genu *LHCB8*, který se skládá ze dvou exonů a jednoho intronu (www.arabidopsis.org) může mít intron regulační funkci a z tohoto důvodu byly připraveny dvě reportérové linie EGFP-GUS lišící přítomností sekvence genu *LHCB8*.

- **Intron Mediated Enhancement (IME)**

Pro správný vývoj a funkci organismu je důležité, aby za určitých podmínek v určitém čase nebo jen ve specifických buňkách byly exprimovány jen některé geny. Z tohoto důvodu bylo velké úsilí věnováno k pochopení toho, jak jsou geny regulovány. Jedním z nově překvapujících objevů je účinek některých intronů na genovou expresi. Dokonce některé z těchto intronů mohou být primárním prvkem řídicí expresi nejvíce se exprimujících genů v genomu.

Určité introny, které jsou v rámci transkribované sekvence umístěny blízko ke konci genu mají velký vliv na akumulaci mRNA (Callis *et al.*, 1987). Tento jev byl popsán jako Intron mediated enhancement (IME) (Gallegos a Rose, 2015) a významně se liší od regulace pomocí enhancerů a promotorů (Zabidi a Stark, 2016; Medina-Rivera *et al.*, 2018). Pravděpodobnou podmínkou IME je, že intron nesmí být v rámci transkribované oblasti umístěn dále než 1 kb od místa počátku transkripce (Rose, 2004; Gallegos a Rose, 2017) a aby byl jeho efekt spustěn, tak musí být přepsán do mRNA (Rose, 2002). Tento regulační element je dostatečně silný na to, aby mohl být použit jako nástroj ke zvýšení exprese cílových genů (Rose, 2019). Bylo zjištěno, že IME můžou působit prostřednictvím zvýšené míry transkripce, zvýšeného jaderného exportu, zvýšení stability transkriptu a dokonce i zvýšením úrovně translace (Gallegos a Rose, 2015; Shaul, 2017).

Intron u genu *LHCB8* splňuje obě výše popsané podmínky, kde jeho umístění

v rámci genu je spíše blíže ke konci genu a je umístěný blíže než 1 kb od místa počátku transkripce. Zároveň lze IME odhadnout na základě výpočetního algoritmu IMETER (Rose *et al.*, 2008; Parra *et al.*, 2011), kde u *LHCB8* byl tento intron predikován jako IME se skórem 10,96 a percentilem 95 (http://korflab.ucdavis.edu/cgi-bin/IMETER_2014/web-imeter2.1.pl), což značí vysokou pravděpodobnost, že tento intron může mít roli v regulaci exprese genu *LHCB8* (Rose 2019).

B Reporterová linie využívající vizualizaci barvení

Protože nám nefungovalo EGFP, rozhodli jsme se udělat reportérovou linii s RUBY kazetou (He *et al.*, 2020) pro rychlý screening. Hlavní využití této linie je plánováno při screeningu stresových podmínek, při kterých dochází k expresi genu *LHCB8*. Z literatury je známo, že jeho exprese je spojená se stresem (vysoká intenzita světla, ale nejspíše i jiné stresy), a analýza exprese „naslepo“ pomocí reportéru GUS by byla pracná. Plán je využít linie AtLhcb8_{pro}:RUBY na pre-screening, kdy se vytipují stresové podmínky, kdy lze pozorovat RUBY a ty se potom použijí pro u linií obsahující reportérový gen GUS.

Z tohoto důvodu byla připravena třetí reportérová linie AtLhcb8_{pro}:RUBY obsahující reportérovou kazetu RUBY, která taky umožňuje neinvazivní sledování aktivity promotoru *in vivo* a byla představena v publikaci He *et al.* (2020). RUBY kazeta je složena ze sekvencí tří genů kódující enzymy, které se podílejí na syntéze betalainů, což jsou látky červené barvy. Výhodou tohoto reportéru je, že pro syntézu betalainu využívá jako substrát aminokyselinu tyrosin, který se endogenně vyskytuje ve všech buňkách, dále ho lze využít i pro kvantifikaci úrovně exprese, kterou lze odvodit na základě intenzity červené barvy a bylo i prokázáno, že ho lze použít u *Arabidopsis* jako selekční marker transformovaných semen (He *et al.*, 200).

Tato linie byla připravena pomocí Gateway klonování, jehož předností je paralelní klonování více fragmentů DNA za použití stejného enzymu. Správnost složení finálního konstruktů byla provedena pomocí sangerova sekvenování. Nakonec byl reportérový konstrukt natransformován do rostlin *Arabidopsis* pomocí floral dip metody.

C Selektce homozygotních rostlin s definovaným počtem kopií reporterového genu

Selektce hmozygotních linií s definovaným počtem kopií je důležitý proces, jelikož primární transformované rostliny obsahují vložený inzert pouze v jedné alele

(hemizygoti) a v následujících generacích by mohlo dojít k jeho ztrátě. Z tohoto důvodu je tedy nutné vyselektovat homozygotní rostliny, které obsahují inzert ve dvou alelách. Zároveň v procesu transformace rostlin dochází k vícenásobné inzerci transgenů do genomu a to může výrazně zkomplikovat nebo prakticky znežhnit selekci homozygotů.

Tradiční postup selekce transgenních rostlin pomocí antibiotik a selekce homozygotů na základě segregace je celkově pomalý a pracný proces, hlavně když se vychází z transformantů s vyšším počtem kopií (Shimada *et al.*, 2010). Proto je důležitým krokem stanovit počet kopií vloženého inzertu (např. Southern blot, kvantitativní PCR, sekvenování), ale tyto metody mají své specifické nevýhody jako je nepřesnost stanovení nebo vysoké náklady a běžně k tomuto účelu nepožívají.

V rámci této diplomové práce měly všechny reportérové linie, které byly použity, součástí inzertu semínkový marker OLE1-RFP/GFP, čímž se eliminovalo použití antibiotik a zrychlila se tím celá selekce. Už v T1 generaci pomocí ddPCR byly vyselektovány hemizygotní rostliny s 1 a 2 kopiemi inzertu. Následně v T2 generaci byly vybrána semena s největší intenzitou fluorescence (tyto semena by měla být homozygotní), kdy pomocí ddPCR se stanovil počet kopií inzertu a pomocí toho už v T2 generaci byly vyselektovány homozygotní rostliny s 2 a 4 kopiemi inzertu.

Hlavními výhodami reportérového markeru OLE1-GFP/RFP oproti použití antibiotik jsou identifikace transformovaných semen ihned po sklizení, jedná se o kodominantní marker, který lze použít zároveň pro selekci homozygotů v T2 generaci, eliminace práce ve sterilním prostředí a vysoká úspěšnost selekce transformovaných rostlin, kde se při screeningu potvrdilo, že z cca 30 vysazených rostlin bylo 78 – 90 % rostlin pozitivních, zatímco při selekci pomocí antibiotik je úspěšnost nižší.

V rámci použitých reportérových linií byl u linie AtLhcb8_{pro}::RUBY použit jako selekční marker OLE1-EGFP a u reportérových linií AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS byl použit selekční marker OLE1-RFP, jelikož přítomnost EGFP byla součástí reportérového konstruktů, který sloužil pro studium aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} proto musel být použit jiný fluorescenční protein.

Jedinou nevýhodou markeru OLE1-RFP/GFP je, že při selekci transgenních rostlin v T1 generaci bylo potřeba vybírat semena s nižší intenzitou fluorescence, jelikož se při screeningu ukázalo, že většinou semena s největší intenzitou fluorescence měla velký počet kopií vloženého inzertu (cca 8 – 20 kopií) a při selekci mohlo dojít k výběru semene se slabou autofluorescencí.

Pro určení CNV byla použita ddPCR jejíž hlavní předností je přesnost stanovení

počtu kopií inzertu. Pro stanovení počtu kopií inzertu byla jako studovaná sekvence zvolena sekvence pro hygromycin, který byl součástí inzertu a jako reference byla zvolena sekvence aminokyselinové permeázy 1. DdPCR se osvědčila jako rychlá metoda, díky níž už byla v T2 generaci vyselektována homozygotní rostlina s požadovaným počtem kopií.

2. Analýza aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} během ontogenetického vývoje Arabidopsis thaliana

Důvod studie aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} v průběhu ontogenetického vývoje je ten, že se o expresi genu *LHCB8* toho moc neví. Na základě literatury se předpokládá, že se nejvíce exprimuje hlavně při stresových podmínkách (např. vysoká intenzita světla, ale byly pozorované i jiné podmínky). Za fyziologických podmínek se předpokládá, že exprese genu *LHCB8* je velmi nízká, čemuž odpovídají i data z proteomických analýz (Ilíková *et al.*, 2021; McKenzie *et al.*, 2019). Ve studii Sawchuk *et al.* (2008), bylo ale naznačeno, že exprese genu *LHCB8* by mohla být heterogenní, což v těchto typech dat není reflektováno, jelikož tyto analýzy se obvykle dělají z celých rostlin, takže i když je exprese silná, ale jen v určitých částech rostliny, tak v průměru se zdá jako nízká. Proto na základě těchto studií byly vytvořeny reporterové linie, aby se zjistilo jak se gen *LHCB8* exprimuje. Studie byla provedena na liniích AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}AtLhcb8::EGFP-GUS. U linie AtLhcb8_{pro}::RUBY, která bude sloužit pro screening stresových podmínek, probíhá finální screening T2 generace rostlin pro selekci homozygotů.

Analýza aktivity promotoru AtLhcb8_{pro} během ontogenetického vývoje byla provedena v rozmezí 1 – 11. týden + senescenční listy pomocí histochemického barvení GUS. Během prvního a druhého týdne bylo barvení provedeno na liniích s dvěma i čtyřmi kopiemi inzertu.

Během barvení byl u linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS pozorován rozdíl v intenzitě barvení mezi rostlinami s dvěma a čtyřmi kopiemi inzertu (Viz. obr. 29, 30). Dle předpokladu měly mít rostliny se čtyřmi kopiemi inzertu silnější intenzitu barvení, což se potvrdilo pouze u linie AtLhcb8_{pro}AtLhcb8::EGFP-GUS, ale u linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS měly rostliny se čtyřmi kopiemi inzertu slabší odezvu. Toto chování bylo nejspíše způsobeno tím, že inzert u linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS se čtyřmi kopiemi není kompletní, což se potvrdilo při celogenomovém sekvenování (provedeno v rámci jiného projektu), proto další barvení bylo provedeno pouze u linií

obsahující dvě kopie inzertu.

Ve většině experimentů GUS barvení nebyl pozorován rozdíl mezi liniemi. Při GUS barvení byla nejintenzivněji lokalizována aktivita promotoru AtLhcb8_{pro} po celé ploše nejmladších listů. Následně v průběhu ontogeneze docházelo k postupnému snižování aktivity promotoru, kde u mladých listů aktivita promotoru směrem od vrcholu listu ustávala a nejvíce byla lokalizována na okraji listu, v hydatodách, v pokožkových buňkách, z nichž vyrůstají trichomy a v průduších. U staršího listu byla aktivita lokalizována v okraji listu a silně v hydatodách a u nejstaršího listu byla slabá aktivita pozorována v hydatodách nebo nebyla pozorována vůbec. Dále aktivita promotoru byla pozorována v květech a v pokožkových buňkách stonku z nichž vyrůstají trichomy.

Tyto výsledky jsou do značné míry v souladu se studií Sawchuk *et al.* (2008), kde byl proveden screening exprese *LHC* genů pomocí reportérových linií obsahující reportérový gen kódující YFP (žlutý fluorescenční protein). V rámci studie byla pozorována aktivita promotoru AtLhcb8_{pro} v průběhu ontogenetického vývoje rostlin *Arabidopsis* v rozmezí 2,5 – 6 dní, která se nejintenzivněji vyskytovala na okraji listu. Na základě toho bylo predikováno, že *LHCB8* se exprimuje jen v určité subpopulaci buněk, jejichž podíl se v průběhu vývoje orgánu snižuje. Na základě publikace Gonzalez *et al.* (2012) a studie Gügel *et al.* (2017) zabývajících se ontogenezi listů u *Arabidopsis* a získaných výsledků během GUS barvení se zdá, že aktivita promotoru AtLhcb8_{pro} by mohla být vyšší především v buňkách, které se aktivně dělí.

Při barvení rostlin v prvním a druhém týdnu byl mezi liniemi AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS a AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS pozorován rozdíl v intenzitě barvení (Viz. obr. 29, 30) a dále byl rozdíl mezi liniemi pozorován u senescenčních listů, kdy u linie AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS byla lokalizována aktivita promotoru AtLhcb8_{pro} po celé ploše listu (Viz. obr. 34B), zatímco u linie AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS nebyla aktivita promotoru pozorovaná vůbec (Viz. obr. 34A). Tento rozdíl v aktivitě promotoru AtLhcb8_{pro} byl nejspíše způsoben přítomností sekvence genu *LHCB8*. Jak již bylo zmíněno výše, jednou z příčin mohla být regulace genové exprese na základě IME, díky němuž mohlo dojít k zesílení aktivity promotoru AtLhcb8_{pro}. Pro potvrzení této hypotézy bude potřeba provést ověření a zjistit zda to bylo způsobeno přítomností sekvence intronu, nebo sekvencí genu *LHCB8*. Ověření bude provedeno vytvořením reportérových linií, kde součástí jedné linie bude sekvence genu *LHCB8* bez intronu, která vznikne přepisem mRNA do cDNA, součástí druhé linie

bude pouze sekvence intronu a jako třetí linie se použije *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGP-GUS* a bude se studovat aktivita promotoru *AtLhcb8_{pro}* při podmínkách, kde byly pozorovány rozdíly.

3. Vliv exprese genu *LHCB8* na funkci fotosyntetického aparátu

Pomocí reportérových linií byla sledována aktivita promotoru genu *LHCB8*. Protože některé studie naznačují, že syntéza proteinu LHCB8 může být regulována až na úrovni translace (Floris *et al.*, 2013), aktivita *AtLhcb8_{pro}*, která byla pozorována pomocí reportérových linií, nemusí odpovídat celkovému množství proteinu LHCB8. Pro ověření této korelace bude použita metoda hmotnostní spektrometrie, neboť jednodušší stanovení proteinu LHCB8 pomocí Western blotu není možné z důvodu nedostupnosti specifické protilátky.

Přestože zvýšené zastoupení proteinu LHCB8 v mladých listech *Arabidopsis* vykazujících zvýšenou aktivitu *AtLhcb8_{pro}* zatím nebylo experimentálně potvrzeno, byla provedena analýza funkce fotosyntetického aparátu u genotypů WT a *kolhcb8* a linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGP-GUS* pomocí metody chlorofylové fluorescence. Měření bylo provedeno pomocí dvou přístrojů, kde první měření bylo provedeno pomocí FluorCamu na linii *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGP-GUS*, kde hlavním cílem bylo porovnat funkci fotosyntézy v místech se zvýšenou expresí *AtLhcb8_{pro}* s místy bez aktivity. První experimenty byly provedeny na celých rostlinách a následně na samostatných listech. Měření bylo provedeno při dvou intenzitách aktinického světla, kdy při 800 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nebyl pozorován vliv proteinu LHCB8 na funkci fotosyntézy. Proto bylo provedeno další měření při intenzitě 1600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ale z důvodu vysoké intenzity světla docházelo ke ohýbání okrajů listů, čímž docházelo ke zkreslení dat v zájmových oblastech. Dále bylo měření provedeno na mladých a starých listech, ale znovu z důvodu vysoké intenzity světla docházelo ke zkreslení dat. Proto byl proveden druhý způsob měření pomocí DualPamu na rostlinách WT a *kolhcb8*, kde hlavním cílem bylo porovnat parametry fotosyntézy u mladých a starých listů. V rámci měření se nepovedlo prokázat významné rozdíly mezi genotypy. Při vyhodnocení F_v/F_m vycházely hodnoty u obou genotypů kolem 0,8, což značí že rostliny nebyly vystaveny stresu. NPQ vyšlo mezi oběma genotypy podobně. Tyto výsledky jsou v souladu se studií Bianchi *et al.* (2011), kde byla provedena studie na rostlinách mutantních v isoformách genu *LHCB4* a u genotypu WT nebyly pozorovány výrazné rozdíly ve funkci fotosyntézy. Jediným rozdílem, který byl pozorován, byl

rozdíl v NPQ u mladých a starých listů, nicméně tento rozdíl byl stejný u WT i *kolhcb8* a nebyl tedy způsoben přítomností LHCB8. Dále byly vyhodnoceny parametry ETRII a ETRI, u kterých nebyly pozorovány výrazné rozdíly mezi genotypy a ani listy.

Důvody absence rozdílů mohou být způsobeny tím, buď nekoreluje aktivita promotoru *AtLhcb8_{pro}* s množstvím proteinu LHCB8, nebo se protein uplatňuje (ovlivňuje fotosyntézu) za jiných podmínek, než jaké byly použity při experimentech.

6 Závěr

V rámci diplomové práce jsem se v teoretické části věnovala funkci a struktuře fotosystému II a jeho systému světlosběrných antén se zaměřením na minoritní světlosběrnou anténu LHCB4, konkrétně na její isoformu LHCB8 (LHCB4.3). Dále byla přestavena metoda reportérových linií, možnost jejich přípravy a moderní postupy pro selekci homozygotních linií u transformovaných rostlin, které byly využity v rámci experimentální části této práce.

Cílem experimentální části bylo provést u reportérových linií *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* a *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* studium aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}* pomocí histochemického barvení GUS během ontogenetického vývoje a provést analýzu aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}* pomocí reportéru EGFP za vybraných stresových podmínek. Z důvodu nefunkčnosti EGFP, byla v rámci práce pomocí Gateway klonování připravena reportérová linie *AtLhcb8_{pro}::RUBY*. Následně u linií byla provedena selekce homozygotních rostlin pomocí ddPCR. U linie *AtLhcb8_{pro}::RUBY* se screening T2 generace připravuje.

Linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* a *AtLhcb8_{pro}::EGFP-GUS* byly následně využity ke studiu aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}* v průběhu ontogenetického vývoje. Dále byla provedena analýza funkce fotosyntézy u genotypů WT a *kolhcb8* pomocí metody chlorofylové fluorescence s cílem objasnit vliv LHCB8 na funkci PSII.

Při studiu aktivity promotoru *AtLhcb8_{pro}*, v rámci ontogenetického vývoje byla pozorována heterogenní aktivita promotoru. Nejintenzivněji byla aktivita promotoru *AtLhcb8_{pro}* pozorována v nejmladších listech, kde v průběhu ontogenetického vývoje se postupně aktivita promotoru lokalizovala na okraj listu, v hydratodech a v pokožkových buňkách z nichž vyrůstají trichomy. U nejstaršího listu byla aktivita promotoru lokalizovaná pouze v hydratodech nebo vůbec. Dále byl pozorován vliv přítomnosti sekvence genu *LHCB8* na aktivitu promotoru *AtLhcb8_{pro}*, kde u senescenčních listů linie *AtLhcb8_{pro}::AtLhcb8::EGFP-GUS* byla pozorovaná zvýšená aktivita transkripce oproti linii *AtLhcb8::EGFP-GUS*. Tento způsob regulace by mohl být pravděpodobně způsoben přítomností intronu, u kterého je podezření, že může mít regulační funkci IME.

Při analýze funkce fotosyntézy pomocí metody chlorofylové fluorescence se u genotypu *kolhcb8* neprojeví žádné výrazné rozdíly vůči WT. Jediný rozdíl, který byl pozorován byl v indukci NPQ mezi starými a mladými listy, kde u starých listů docházelo ke snížené indukci NPQ.

Do budoucna se bude muset dodělat screening T2 generace u linie *AtLhcb8^{pro}::RUBY*, která bude využita pro lokalizaci aktivity promotoru *AtLhcb8^{pro}* *in vivo* při stresových podmínkách vysoké intenzity světla. Na základě zjištěných výsledků dále bude nutné otestovat, zda intron obsažený v sekvenci genu *LHCB8* má opravdu regulační funkci. Dále se pěstují rostliny, které budou použity pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie pro zjištění, zda pozorovaná aktivita promotoru *AtLhcb8^{pro}* koreluje se zvýšeným zastoupením protein. Bude provedena analýza struktury PSII u mladých a starých listů genotypu WT pomocí polyakrylamidové elektroforézy a elektronové mikroskopie pro porovnání zda protein LHCB8 má nějaký vliv na strukturu a funkci PSII v rámci tylakoidních membrán.

8. Zdroje

- Albanese, P., Manfredi, M., Meneghesso, A., Marengo, E., Saracco, G., Barber, J., Morosinotto, T., Pagliano, C. (2016): Dynamic reorganization of photosystem II supercomplexes in response to variations in light intensities. *Biochim Biophys Acta* 1857: 1651–1660.
- Albanese, P., Manfredi, M., Marengo, E., Saracco, G., Pagliano, C. (2019): Structural and functional differentiation of the light-harvesting protein Lhcb4 during land plant diversification. *Physiologia Plantarum* 166(1): 336-350.
- Albanese, P., Manfredi, M., Re, A., Marengo, E., Saracco, G., Pagliano, C. (2018): Thylakoid proteome modulation in pea plants grown at different irradiances: quantitative proteomic profiling in a non-model organism aided by transcriptomic data integration. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 96(4): 786–800.
- Alboresi, A., Dall'osto, L., Aprile, A., Carillo, P., Roncaglia, E., Cattivelli, L., Bassi, R. (2011): Reactive oxygen species and transcript analysis upon excess light treatment in wild-type *Arabidopsis thaliana* vs a photosensitive mutant lacking zeaxanthin and lutein. *BMC plant biology* 11.
- Arabidopsis Home Page. [online] [navštíveno 21.4.2024]. Dostupné z <https://www.arabidopsis.org/>
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2000): Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(22): 11984–11989.
- Ballottari, M., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., Bassi, R. (2007): Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *The Journal of biological chemistry* 282(12): 8947–8958.
- Beeton-Kempen, N. (2020): *Proteomics: Principles, Techniques and Applications. Proteomics and Metabolomics.*
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993): In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie Life Sci.* 316: 1194–1199.
- Bio-RAD. [online] [navštíveno 14.4.2024]. Dostupné z <https://www.bio-rad.com/>
- Boekema, E. J., Hankamer, B., Bald, D., Kruip, J., Nield, J., Boonstra, A. F., Barber, J., Rögner, M. (1995): Supramolecular structure of the photosystem II complex from green

plants and cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(1): 175–179.

Boekema, E. J., van Roon, H., Dekker, J. P. (1998): Specific association of photosystem II and light-harvesting complex II in partially solubilized photosystem II membranes. *FEBS letters* 424(1-2): 95–99.

Boekema, E. J., van Breemen, J. F. L., van Roon, H., Dekker, J. P. (2000): Arrangement of photosystem II supercomplexes in crystalline macrodomains within the thylakoid membrane of green plant chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* 301: 1123–1133.

Bricker, T. M., Roose, J. L., Fagerlund, R D., Frankel, L. K., Eaton-Rye, J. J. (2012): The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 121–142.

Bubner, B., Baldwin, I. T. (2004): Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant cell reports* 23(5): 263–271.

Bustin, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* 25(2): 169–193.

Caffarri, S., Kouřil, R., Kereïche, S., Boekema, E.J., Croce, R. (2009): Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *The EMBO Journal* 28: 3052–3063.

Callis, J., Fromm, M., & Walbot, V. (1987): Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes & development* 1(10): 1183–1200.

Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2002): A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(12): 7877–7882

Cantsilieris, S., Baird, P. N., & White, S. J. (2013): Molecular methods for genotyping complex copy number polymorphisms. *Genomics* 101(2): 86–93.

Clough, S. J., Bent, A. F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(6): 735–743.

Cotlet, M., J. Hofkens, M. Maus, T. Gensch, M. van der Auweraer, J. Michiels, G. Dirix, M. Van Guyse, J. Vanderleyden, A. J. W. G. Visser, F. C. De Schryver. (2001): Excited-state dynamics in the enhanced green fluorescent protein mutant probed by picosecond time-resolved single photon counting spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* 105: 4999–5006

de Bianchi, S., Betterle, N., Kouril, R., Cazzaniga, S., Boekema, E., Bassi, R., Dall’Osto, L. (2011): *Arabidopsis* Mutants Deleted in the Light-Harvesting Protein

- Lhcb4 Have a Disrupted Photosystem II Macrostructure and Are Defective in Photoprotection. *The Plant Cell* 23(7): 2659-2679.
- Davis, S. J., Vierstra, R. D. (1998): Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant molecular biology* 36(4): 521–528.
- Dedow, L. K., Oren, E., Braybrook, S. A. (2022): Fake news blues: A GUS staining protocol to reduce false-negative data. *Plant direct* 6(2): e367.
- Dekker, J.P., Boekema, E.J. (2005): Supermolecular organization of the thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* 1706: 12–39
- Feldmann, K.A., Marks, M.D. (1987): Agrobacterium mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* 208: 1–9.
- Floris, M., Bassi, R., Robaglia, C., Alboresi, A., & Lanet, E. (2013): Post-transcriptional control of light-harvesting genes expression under light stress. *Plant molecular biology* 82(1-2): 147–154.
- Gallegos, J. E., Rose, A. B. (2015): The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Sci.* 237: 8–15.
- Gallegos, J. E., Rose, A. B. (2017): Intron DNA sequences can be more important than the proximal promoter in determining the site of transcript initiation. *Plant Cell* 29: 843–853.
- Gallegos, J. E., Rose, A. B. (2019): An intron-derived motif strongly increases gene expression from transcribed sequences through a splicing independent mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports* 9(1): 13777.
- Ganeteg, U., Klimmek, F., Jansson, S. (2004): Lhc5: an LHC-type protein associated with photosystem I. *Plant Mol Biol* 54: 641–651.
- Gao, J., Wang, H., Yuan, Q., Feng, Y. (2018): Structure and function of the photosystem supercomplexes. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-7.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O. (2009): Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* 6(5): 343–345.
- Głowacka, K., Kromdijk, J., Leonelli, L., Niyogi, K. K., Clemente, T. E., Long, S. P. (2016): An evaluation of new and established methods to determine T-DNA copy

number and homozygosity in transgenic plants. *Plant, Cell & Environment* 39(4): 908-917.

Gonzalez, N., Vanhaeren, H., Inzé, D. (2012): Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in plant science* 17(6): 332–340.

Gorman, C. M., Moffat, L. F., Howard, B. H. (1982): Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 2(9): 1044–1051.

Grebe, S., Trotta, A., Bajwa, A. A., Suorsa, M., Gollan, P. J., Jansson, S., Tikkanen, M., Aro, E. M. (2019): The unique photosynthetic apparatus of *Pinaceae*: analysis of photosynthetic complexes in *Picea abies*. *Journal of Experimental Botany* 70(12): 3211-3225.

Green, B. R., Durnford, D. G. (1996): THE CHLOROPHYLL-CAROTENOID PROTEINS OF OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 47: 685–714.

Green, M., Sambrook, J. (2012): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Grinzato, A., Albanese, P., Marotta, R., Swuec, P., Saracco, G., Bolognesi, M., Zanotti, G., Pagliano, C. (2020): High-Light versus Low-Light: Effects on Paired Photosystem II Supercomplex Structural Rearrangement in Pea Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 21(22).

Gross, L. A., Baird, G. S., Hoffman, R. C., Baldrige, K. K., Tsien, R. Y. (2000): The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(22): 11990–11995.

Gügel, I. L., Soll, J. (2017): Chloroplast differentiation in the growing leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 254(5): 1857–1866.

Guttikonda, S. K., Marri, P., Mammadov, J., Ye, L., Soe, K., Richey, K., Cruse, J., Zhuang, M., Gao, Z., Evans, C., Rounsley, S., Kumpatla, S. P. (2016): Molecular Characterization of Transgenic Events Using Next Generation Sequencing Approach. *PLoS one* 11(2).

Haas, J., Park, E. C., Seed, B. (1996): Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Current biology* : CB 6(3): 315–324.

Hartley, J. L., Temple, G. F., Brasch, M. A. (2000): DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* 10(11): 1788–1795.

- Haseloff, J. (1999): GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods in cell biology* 58: 139–151.
- Haseloff, J., Amos, B. (1995): GFP in plants. *Trends in genetics: TIG* 11(8): 328–329.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., Hodge, S. (1997): Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(6): 2122–2127.
- He, Y., Zhang, T., Sun, H., Zhan, H., Zhao, Y. (2020): A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. *Horticulture research* 7(1): 152.
- Heinz Walz GmbH (2009): Dual-PAM-100 Measuring System. 2nd ed. Heinz Walz GmbH, Eichenring, 87 stran.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., et al. (2011): High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry* 83(22): 8604-8610.
- Hraška, M., Rakouský, S. (2005): GFP dedetection in low level signal/noise ratio plant samples. *Journal of applied biomedicine* 3 (1): 1-58
- Hu, C. Y., Chee, P. P., Chesney, R. H., Zhou, J. H., Miller, P. D., O'Brien, W. T. (1990): Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant cell reports* 9(1): 1–5.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)* 263(5148): 802–805.
- Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., Sheen, J. (1996): Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current biology: CB* 6(3): 325–330.
- Christou, P. (1996): Transformation technology. *Trends Plant Sci.* 1: 423–43.
- Ilíková, I., Ilík, P., Opatíková, M., Arshad, R., Nosek, L., Karlický, V., Kučerová, Z., Roudnický, P., Pospíšil, P., Lazár, D., Bartoš, J., Kouřil, R. (2021): Towards spruce-type

photosystem II: consequences of the loss of light-harvesting proteins LHCB3 and LHCB6 in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 187: 2691–2715.

IMEter. [online] [navštíveno 21.4.2024] Dostupné z http://korflab.ucdavis.edu/cgi-bin/IMEter_2014/web-imeter2.1.pl

Jansson, S. (1994): The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1184: 1–19.

Jansson, S. (1999): A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 4(6): 236-240.

Jefferson, R. A., Burgess, S. M., Hirsh, D. (1986): beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(22): 8447–8451.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987): GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal* 6(13): 3901–3907.

Johnson, M.P. (2016): Photosynthesis. *Essays In Biochemistry* 60: 255–273.

Kirchhoff, H. (2013): Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynth Res.* 116: 481–487.

Klimmek, F., Sjödin, A., Noutsos, C., Leister, D., Jansson, S. (2006): Abundantly and Rarely Expressed Lhc Protein Genes Exhibit Distinct Regulation Patterns in Plants. *Plant Physiology* 140(3): 793-804.

Kolker, E., Higdon, R., Hogan, J. M. (2006): Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *Trends in microbiology* 14(5): 229–235.

Kovacs, L., Damkjær, J., Kereiche, S., Iliaia, C., Ruban, A.V., Boekema, E.J., Jansson, S., Horton, P. (2006): Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *The Plant Cell* 18: 3106–3120.

Kouřil, R., Nosek, L., Bartoš, J., Boekema, E. J., Ilík, P. (2016): Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant groups – break-up of current dogma. *New Phytologist*, 210(3) 808-814.

Kukurba, K. R., Montgomery, S. B. (2015): RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor protocols* 2015(11): 951–969.

- Lebedenko, E. N., Birikh, K. R., Plutalov, O. V., Berlin YuA (1991): Method of artificial DNA splicing by directed ligation (SDL). *Nucleic acids research* 19(24): 6757–6761.
- Leutwiler, L. S., Meyerowitz, E. M., Tobin, E. M. (1986): Structure and expression of three light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein genes in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research* 14(10): 4051–4064.
- Lu, Y. (2016): Identification and Roles of Photosystem II Assembly, Stability, and Repair Factors in Arabidopsis. *Frontiers in plant science* 7: 168.
- McGrath, J. M., Terzaghi, W. B., Sridhar, P., Cashmore, A. R., Pichersky, E. (1992): Sequence of the fourth and fifth Photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein genes of *Arabidopsis thaliana* and evidence for the presence of a full complement of the extended CAB gene family. *Plant molecular biology* 19(5): 725–733.
- McKenzie, S. D., Ibrahim I. M., Aryal U. K., Puthiyaveetil S. (2020): Stoichiometry of protein complexes in plant photosynthetic membranes. *Biochim Biophys Acta* 1861.
- Medina-Rivera, A., Santiago-Algarra, D., Puthier, D., Spicuglia, S. (2018): Widespread Enhancer Activity from Core Promoters. *Trends in biochemical sciences* 43(6): 452–468.
- Mieog, J.C., Howitt, C.A. Ral, JP. (2013): Fast-tracking development of homozygous transgenic cereal lines using a simple and highly flexible real-time PCR assay. *BMC Plant Biol* 13: 71.
- Miller, M.A.E., O'Cualain, R., Selley, J., Knight, D., Karim, M.F., Hubbard, S.J. Johnson, G.N. (2017): Dynamic acclimation to high light in *Arabidopsis thaliana* involves widespread reengineering of the leaf proteome. *Front. Plant Sci.* 8: 1–15.
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K. (2001): Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125: 1558-1566.
- Nickelsen, J., & Rengstl, B. (2013): Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annual review of plant biology* 64: 609–635.
- Parra, G., Bradnam, K., Rose, A. B., Korf, I. (2011): Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants. *Nucleic acids research* 39(13): 5328–5337.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9): e45.

- Polturak, G., Aharoni, A. (2019): Advances and future directions in betalain metabolic engineering. *The New phytologist* 224(4): 1472–1478.
- Pribil, M., Leister, D. (2017): Photosynthesis. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*: 90–95.
- Quaedvlieg, N. E., Schlaman, H. R., Admiraal, P. C., Wijting, S. E., Stougaard, J., Spink, H. P. (1998): Fusions between green fluorescent protein and beta-glucuronidase as sensitive and vital bifunctional reporters in plants. *Plant molecular biology* 37(4): 715–727.
- Rascio, N. (2013): Chloroplasts. *Encyclopedia of Biological Chemistry*: 506–510.
- Reboul, J., Vaglio, P., Rual, J. F., Lamesch, P., Martinez, M., Armstrong, C. M., Li, S., Jacotot, L., Bertin, N., Janky, R., Moore, T., Hudson, J. R., Jr, Hartley, J. L., Brasch, M. A., Vandenhaute, J., Boulton, S., Endress, G. A., Jenna, S., Chevet, E., Papanotiropoulos, V., ... Vidal, M. (2003): *C. elegans* ORFeome version 1.1: experimental verification of the genome annotation and resource for proteome-scale protein expression. *Nature genetics* 34(1): 35–41.
- Reece-Hoyes, J. S., Walhout, A. J. M. (2018): Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harbor protocols* 2018(1).
- Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B., Maas, C. (1996): Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(12): 5888–5893.
- Rose, A. B. (2002): Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*. *RNA (New York, N.Y.)* 8(11): 1444–1453.
- Rose, A. B. (2004): The effect of intron location on intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40(5): 744–751.
- Rose, A. B. (2019): Introns as Gene Regulators: A Brick on the Accelerator. *Frontiers in genetics* 9: 672.
- Rose, A. B., Elfersi, T., Parra, G., Korf, I. (2008): Promoter-proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression. *The Plant cell* 20(3): 543–551.
- Rouwendal, G. J., Mendes, O., Wolbert, E. J., Douwe de Boer, A. (1997): Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. *Plant molecular biology* 33(6): 989–999.

- Ruckle, M. E., Burgoon, L. D., Lawrence, L. A., Sinkler, C. A., Larkin, R. M. (2012): Plastids are major regulators of light signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 159(1): 366–390.
- Sawchuk, M. G., Donner, T. J., Head, P., Scarpella, E. (2008): Unique and overlapping expression patterns among members of photosynthesis-associated nuclear gene families in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 148(4): 1908–1924.
- Serganova, I., & Blasberg, R. G. (2019): Molecular Imaging with Reporter Genes: Has Its Promise Been Delivered?. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 60(12): 1665–1681.
- Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., Tsien, R. Y. (2008): Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature methods* 5(6): 545–551.
- Shaul, O. (2017): How introns enhance gene expression. *The international journal of biochemistry & cell biology* 91(Pt B): 145–155.
- Shaw, W. V., Packman, L. C., Burleigh, B. D., Dell, A., Morris, H. R., Hartley, B. S. (1979): Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids. *Nature* 282(5741): 870–872.
- Shemiakina, I. I., Ermakova, G. V., Cranfill, P. J., Baird, M. A., Evans, R. A., Souslova, E. A., Staroverov, D. B., Gorokhovatsky, A. Y., Putintseva, E. V., Gorodnicheva, T. V., Chepurnykh, T. V., Strukova, L., Lukyanov, S., Zarausky, A. G., Davidson, M. W., Chudakov, D. M., Shcherbo, D. (2012): A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity. *Nature communications* 3: 1204.
- Shen, Y., Lai, T., Campbell, R. E. (2015): Red fluorescent proteins (RFPs) and RFP-based biosensors for neuronal imaging applications. *Neurophotonics* 2(3).
- Shcherbakova, D. M., Hink, M. A., Joosen, L., Gadella, T. W., Verkhusha, V. V. (2012): An orange fluorescent protein with a large Stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *Journal of the American Chemical Society* 134(18): 7913–7923
- Shcherbo, D., Murphy, C. S., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Chepurnykh, T. V., Shcheglov, A. S., Verkhusha, V. V., Pletnev, V. Z., Hazelwood, K. L., Roche, P. M., Lukyanov, S., Zarausky, A. G., Davidson, M. W., Chudakov, D. M. (2009): Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *The Biochemical journal* 418(3): 567–574.
- Shimada, T. L., Shimada, T., Hara-Nishimura, I. (2010): A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 61(3): 519–528.

- Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R., Haseloff, J. (1996): Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current biology: CB* 6(12): 1653–1663.
- Soltani, A., Weraduwage, S.M., Sharkey, T.D. et al. (2019): Elevated temperatures cause loss of seed set in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) potentially through the disruption of source-sink relationships. *BMC Genomics* 20: 312.
- Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W. (2003): Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62(3): 247–269.
- Szybalski, W., Kim, S. C., Hasan, N., Podhajaska, A. J. (1991): Class-II restriction enzymes--a review. *Gene* 100: 13–26.
- Tang, W., Newton, R. J., Weidner, D. A. (2007): Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. *Journal of experimental botany* 58(3): 545–554
- Tang, L., Yao, A., Ming Yuan, Tang, Y., Liu, J., Liu, X., Qiu, R. (2016): Transcriptional up-regulation of genes involved in photosynthesis of the Zn/Cd hyperaccumulator *Sedum alfredii* in response to zinc and cadmium. *Chemosphere* 164: 190–200.
- Teramoto, H., Ono, T., Minagawa, J. (2001): Identification of Lhcb gene family encoding the light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant & cell physiology* 42(8): 849–856.
- ThermoFisher Scientific. [navštíveno 19.4.2024]. Dostupné z <https://www.thermofisher.com>
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., Kamiya, N. (2011): Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473(7345): 55–60.
- Walhout, A. J., Temple, G. F., Brasch, M. A., Hartley, J. L., Lorson, M. A., van den Heuvel, S., Vidal, M. (2000): GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods in enzymology*, 328: 575–592.
- Wiedenmann, J., Schenk, A., Röcker, C., Girod, A., Spindler, K. D., Nienhaus, G. U. (2002): A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (*Anthozoa, Actinaria*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(18): 11646–11651.
- Wiehler, J., von Hummel, J., Steipe, B. (2001): Mutants of *Discosoma* red fluorescent protein with a GFP-like chromophore. *FEBS letters* 487(3): 384–389.

Yang, T. T., Cheng, L., Kain, S. R. (1996): Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic acids research* 24(22): 4592–4593.

Yarbrough, D., Wachter, R. M., Kallio, K., Matz, M. V., Remington, S. J. (2001): Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(2): 462–467.

Yin, X. L., Jiang, L., Song, N. H., Yang, H. (2008): Toxic reactivity of wheat (*Triticum aestivum*) plants to herbicide isoproturon. *Journal of agricultural and food chemistry* 56(12): 4825–4831.

Zabidi, M. A., Stark, A. (2016): Regulatory Enhancer-Core-Promoter Communication via Transcription Factors and Cofactors. *Trends in genetics: TIG* 32(12): 801–814.