

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Gabriela Častulíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv proteinu PsbR na organizaci
fotosyntetického aparátu v tylakoidní
membráně u mutantů huseníčku rolního se
sníženým množstvím světlosběrných antén**

Bakalářská práce

Gabriela Častulíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Gabriela ČASTULÍKOVÁ
Osobní číslo: R19822
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Vliv proteinu PsbR na organizaci fotosyntetického aparátu v tylakoidní membráně u mutantů huseníčku rolního se sníženým množstvím světlosběrných antén
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte přehled o problematice vlivu proteinu PsbR na funkci, strukturu a organizaci fotosystému II v tylakoidní membráně.
2. Zvládněte metodu přípravy dvojitého (koLhcb6/PsbR), případně trojitého (koLhcb3/koLhcb6/PsbR) mutantu *Arabidopsis thaliana* a ze získaných rostlin pomocí genotypování vyberte jedince homozygotní ve všech znacích.
3. Proveďte základní charakterizaci fotosyntetické funkce získaných rostlin.
4. Proveďte studium struktury fotosystému II a jeho organizace v tylakoidní membráně pomocí transmisní elektronové mikroskopie.
5. Vyhodnoťte vliv absence proteinu PsbR na funkci a strukturu fotosystému II a diskutujte obdržené výsledky.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

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. *Physiol. Plant.* 166: 336-350.
- Allahverdiyeva Y, Suorsa M, Rossi F, Pavesi A, Kater MM, Antonacci A, Tadini L, Pribil M, Schneider A, Wanner G, Leister D, Aro EM, Barbato R, Pesaresi P (2013) *Arabidopsis* plants lacking PsbQ and PsbR subunits of the oxygen-evolving complex show altered PSII super-complex organization and short-term adaptive mechanisms. *Plant J.* 75: 671-684.
- Kirchhoff H (2013) Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* 116: 481-487.
- Kirchhoff H (2018) Structure-function relationships in photosynthetic membranes: challenges and emerging fields. *Plant Sci.* 266: 76-82.
- Kouřil R, Dekker JP, Boekema EJ (2012) Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 2-12.
- Kouřil R, Nosek L, Semchonok D, Boekema EJ, Ilík P (2018) Organization of plant photosystem II and photosystem I supercomplexes. *Subcell. Biochem.* 87: 259-286.
- Kouřil R, Wientjes E, Bultema JB, Croce R, Boekema EJ (2013) High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* 1827: 411-419.
- Podmaniczki A, Nagy V, Vidal-Meireles A, Tóth D, Patai R, Kovács L, Tóth SZ (2021) Ascorbate inactivates the oxygen-evolving complex in prolonged darkness. *Physiol. Plant.* 171: 232-245.

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
Katedra biofyziky

Datum zadání bakalářské práce: 25. února 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Štechtův 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901
-2-

V Olomouci dne 25. února 2021

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Gabriela Častulíková
Název práce:	Vliv proteinu PsbR na organizaci fotosyntetického aparátu v tylakoidní membráně u mutantů huseníčku rolního se sníženým množstvím světlosběrných antén
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra Buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
Rok obhajoby práce :	2022
Klíčová slova:	Knockout mutace, PSII, PsbR, tylakoidní membrána, NPQ
Počet stran :	52
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Souhrn: Cílem této bakalářské práce bylo objasnit vliv proteinu PsbR na organizaci fotosyntetického aparátu v tylakoidní membráně u rostlin bez světlosběrných antén Lhcb3 a Lhcb6. U proteinu PsbR je známo, že je podstatný pro stabilitu a správnou funkci fotosyntézy. V nejnovějších pracích byla navržena hypotéza, že se protein PsbR může podílet na interakci mezi sousedními komplexy fotosystému II skrze jejich stromální stranu, a že může být důležitý pro tvorbu granálních tylakoidů. Dále bylo zjištěno, že se PsbR preferenčně vyskytuje v komplexech fotosystému II s menším množstvím světlosběrných antén, což napovídá i situaci např. v mutantech *Arabidopsis thaliana* bez proteinů Lhcb3 a Lhcb6.

V rámci bakalářské práce byl pomocí křížení linií *kolhcb6* a *kopsbR* připraven dvojitý mutant a pomocí *kolhcb3kolhcb6* a HZ (*lhcb3lhcb6psbR*) trojitý mutant. U mutantů byla charakterizována fotosyntetická funkce pomocí metody chlorofylové fluorescence a následně byla studována organizace tylakoidních membrán a komplexů fotosystému II pomocí transmisní elektronové mikroskopie a nativní elektroforézy. Prezentované výsledky se přiklání k hypotéze, že protein PsbR může mít vliv na interakce mezi fotosystémy II a přispívat tak ke strukturní organizaci tylakoidní membrány.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Gabriela Častulíková

Title: A role of PsbR protein on organization of photosynthetic apparatus in thylakoid membrane of *Arabidopsis thaliana* mutant with a reduced light-harvesting antenna

Type of thesis: Bachelor thesis

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

Supervisor: RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Keywords: Knockout mutation, PSII, PsbR, thylakoid membrane, NPQ

Number of pages: 52

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary: The aim of this bachelor thesis was to elucidate the influence of PsbR protein on the organization of the photosynthetic apparatus in the thylakoid membrane in plants without light-harvesting antennas Lhcb3 and Lhcb6. The PsbR is known to be essential for the stability and correct functioning of photosynthesis. Recent work suggests that the PsbR may be involved in the interaction between neighboring photosystem II complexes through their stromal side, and that it may be important for the formation of granular thylakoids. Furthermore, it was founded that PsbR preferentially occurs in complexes of photosystem II with smaller number of light-harvesting antennas, which suggests the situation, for example, in *Arabidopsis thaliana* mutants without Lhcb3 and Lhcb6 proteins.

In the frame of the bachelor's thesis, a double mutant was prepared by crossing the *kolhcb6* and *kopsbR* lines and a triple mutant using *kolhcb3kolhcb6* and HZ (*lhcb3lhcb6psbR*). In mutants, photosynthetic function was characterized by chlorophyll fluorescence method and than the organization of thylakoid membranes and photosystem II complexes was studied using transmission electron microscopy and native electrophoresis. The presented results support the hypothesis that the PsbR may affect the interaction between photosystem II and thus to the structural organization of the thylakoid membrane.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Romana Kouřila, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

Gabriela Častulíková

Poděkování:

Týmto bych chtěla ráda poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Romanu Kouřilovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady trpělivost a připomínky při zpracování teoretické a experimentální části práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Ivě Ilíkové, Ph.D. za umožnění přípravy mutantních rostlin na Ústavě experimentální botaniky.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3.1 Arabidopsis thaliana.....	3
3.1.1 Knockout mutace	3
3.2 Příprava jednoduchých a mnohonásobných mutantních linií.....	4
3.2.1 Mnohonásobní mutanti bez genové vazby	4
3.2.2 Působení genové vazby	6
3.3 Genotypování.....	7
3.3.1 Příprava vzorku	7
3.3.2 PCR – Polymerázová řetězová reakce	8
3.3.3 Principy PCR genotypování.....	10
3.4 Oxygenní fotosyntéza	11
3.4.1 Organizace fotosystému II	12
3.4.1.2 Světloběrné komplexy PSII	13
3.4.1.3 Interakce sousedních PSII v rámci tylakoidních membrán.....	14
3.5 Metody studia struktury a funkce fotosyntetického aparátu	16
3.5.1 Nefotochemické zhášení fluorescence (NPQ).....	16
3.5.1.1 Zhášecí analýza	16
3.5.2 Chlorofylová fluorescence – studium funkce fotosyntézy	17
3.5.3 Elektroforéza – nástroj pro studium složení proteinových komplexů v rámci tylakoidní membrány.....	18
3.5.4 Elektronová mikroskopie	18
4. Materiál a metodika	20
4.1 Biologický materiál.....	20
4.2 Chemikálie:	20
4.3 Přístrojové vybavení:	21
4.4 Metody:	22
4.4.1 Příprava dvojitého a trojitého mutantu pomocí křížení:.....	22
4.4.2 Genotypování.....	23
4.4.3 PCR amplifikace	24
4.4.4 Podmínky pěstování rostlin pro fotosyntetickou charakterizaci	25
4.4.5 Měření – chlorofylová fluorescence.....	25
4.4.6 Fenotypová analýza – hmotnost nadzemní části rostlin.....	26
4.4.7 Izolace tylakoidních membrán	26
4.4.8 Separace pigment-proteinových komplexů pomocí CN – PAGE	27
4.4.9 Příprava vzorků tylakoidních membrán pro transmisní elektronovou mikroskopii.....	28
5 Výsledky:	30
6 Diskuze.....	43

7 Závěr:	47
8 Zdroje:	48

Seznam použitých zkratek

APS	Amonium persulfát
ATP	Adenosintrifosfát
Chl	Chlorofyl
CN-PAGE	Nativní polyakrylamidová elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EM	Elektronová mikroskopie
ETR I	Transport elektronů přes fotosystém I
ETR II	Transport elektronů přes fotosystém II
F generace	Filiální generace
Fm	Maximální výtěžek fluorescence
Fm´	Maximální fluorescence na světle
Fo	Minimální výtěžek fluorescence
Fv/Fm	Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
HM	Homozygot
HZ	Heterozygot
Ko3+6	<i>Kolhcb3+lhcb6</i>
Ko3+6+R	<i>Kolhcb3+lhcb6+psbR</i>
Ko6	<i>Kolhcb6</i>
Ko6+R	<i>Kolhcb6+psbR</i>
LHC	Světlosběrný komplex
LHCII	Světlosběrný komplex fotosystému II
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát – oxidovaná forma
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát - redukována forma
NPQ	Nefotochemické zhášení
OEC	Kyslík vyvíjející komplex
P generace	Parentální generace
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
QA	Plastochinon A
RC	Reakční centrum
RFC	Relativní centrifugační síla

SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TBE	Tris/Borate/EDTA
T-DNA	Transferová DNA
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
THEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Ti-plazmid	Tumor indukující plazmid
WT	Wilde type
Y (I)	Fotochemický kvantový výtěžek fotosystému I
Y (II)	Efektivní kvantový výtěžek fotosystému II
Y (NA)	Limitace na akceptorové straně fotosystému I
Y (ND)	Limitace na donorové straně fotosystému I

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Genotypizace homozygotně mutantních rostlin pomocí PCR amplifikace a následné charakterizaci PCR produktu.

Obrázek 2 – Model organizace tylakoidních membrán v rámci chloroplastu.

Obrázek 3 – Strukturální model PSII C₂S₂M₂ superkomplexu.

Obrázek 4 – Organizace PSII v rámci tylakoidní membrány u *Arabidopsis thaliana*.

Obrázek 5 – Párování sousedních C₂S₂M PSII-LHCII superkomplexů v rámci tylakoidních membrán.

Obrázek 6 – Propojení sousedních C₂S₂M PSII-LHCII superkomplexů v rámci tylakoidních membrán.

Obrázek 7 – Cesty absorpce světla

Obrázek 8 – Analýza chlorofylové fluorescence

Obrázek 9 – elektroforeticky rozdělené PCR produkty genomové DNA *Arabidopsis thaliana* pro selekci dvojitého mutantu.

Obrázek 10 - elektroforeticky rozdělené PCR produkty genomové DNA *Arabidopsis thaliana* pro selekci trojitého mutantu.

Obrázek 11 – Elektroforeticky rozdělené PCR produkty za použití kombinace primerů PsbR RP + LBb1 a PsbR RP + LBb1.3.

Obrázek 12 - elektroforeticky rozdělené PCR produkty genomové DNA *Arabidopsis thaliana* izolované kitem NucleoSpin pro ověření pravosti výsledků.

Obrázek 13 – Fenotyp *Arabidopsis thaliana* WT a mutantních genotypů (*ko6*, *ko3 + 6*, *kpsbR*, *ko6 + psbR*, *ko3 + 6 + psbR*).

Obrázek 14 - Průměrná váha jedné rostliny *Arabidopsis thaliana* WT a mutantních genotypů.

Obrázek 15 – Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (Fv/Fm).

Obrázek 16 – 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 tmu.

Obrázek 17 – Počáteční fáze indukce NPQ v průběhu 200 s po zapnutí aktinického světla.

Obrázek 18 – Efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII u rostlin ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu.

Obrázek 19 - fotochemický kvantový výtěžek PSI u rostlin ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu.

Obrázek 21 – Elektronový transport přes PSII ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu.

Obrázek 22 – Elektronový transport přes PSI ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu.

Obrázek 23 – Separace a strukturní charakterizace superkomplexů PSII u WT (wild type) a mutantních rostlin.

Obrázek 24 - Organizace PSII v rámci tylakoidní membrány u *Arabidopsis thaliana*.

Obrázek 25 – Zvětšení krystalického uspořádání PSII v rámci tylakoidní membrány pro vyhodnocení mřížových parametrů u ko3 + 6 (A) a ko3 + 6 + PsbR (B).

Obrázek 26 – Rozložení genů zájmu (*Lhcb3*, *Lhcb6* a *PsbR*) na chromozómech *A. thaliana*

Seznam tabulek

Tab. 1 – Punnettova tabulka pro stanovení genotypového štěpného poměru u dihybrida

Tab. 2 - Punnettova tabulka pro stanovení genotypového štěpného poměru u trihybrida

Tab. 3 – Koncentrace agarózového gelu vhodná na separaci molekul lineární DNA

o různých velikostech

Tab. 4 – Sekvence primerů použitých během genotypování

Tab. č. 5 – Kombinace primerů použita při genotypování

Tab. č. 6 – Složení PCR reakční směsi

Tab. č. 7 – Teplotní profil PCR reakce

Tab. 8 – Příprava vzorků pro izolaci proteinových komplexů tylakoidních membrán

Tab. 9 – Příprava vzorků pro solubilizaci tylakoidních membrán

Tab. 10 – Koncentrace izolované DNA ve vzorcích mutantů *Arabidopsis thaliana*

Tab. 11 – mřížové parametry C₂S₂ superkomplexů u *Arabidopsis lhcb3 lhcb6* a *lhcb3 lhcb6 psbR*

Tab. 12 – Poměr chlorofylu *a/b* v jednotlivých genotypech

1 Úvod

Fotosyntéza je jedním z nejvýznamnějších biologických procesů, jelikož její vznik a vývoj umožnil vznik dnešní kyslíkaté atmosféry, potřebné pro život.

Pro pochopení její funkce v rámci různých podmínek, kterými může být např. prostředí se zvýšenou nebo sníženou intenzitou světla, jsou důležité studie zabývající se strukturou a uspořádáním jednotlivých fotosyntetických komplexů v rámci tylakoidních membrán, což s jejich fotosyntetickou funkcí úzce souvisí. Konkrétně se jedná o studie zaměřené na strukturu a organizaci fotosystému II a fotosystému I.

Při studiu organizace a uspořádání fotosystémů II v rámci tylakoidních membrán bylo navrženo, že protein PsbR, který je součástí komplexu vyvíjející kyslík, se zprostředkovává stromální interakci mezi dvěma sousedními superkomplexy fotosystému II (Albanese *et al.*, 2017). Dále bylo zjištěno, že PsbR se preferenčně vyskytuje u rostlin se sníženým množstvím světlosběrných antén (Albanese *et al.*, 2016a).

Na základě těchto zjištění vznikla hypotéza, která předpokládá, že protein PsbR může mít vliv na organizaci fotosystému II v rámci tylakoidních membrán právě u rostlin se sníženým množstvím světlosběrných antén. Pro objasnění této skutečnosti se v rámci bakalářské práce připravil knockout mutant v genech *lhcb3*, *lhcb6*, kódující světlosběrné antény a *PsbR*. Charakterizace tohoto mutantu byla zaměřena na základní funkci fotosyntézy a studium organizace PSII v rámci tylakoidních membrán pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

2 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce je:

1. Zpracovat přehled o problematice vlivu proteinu PsbR na funkci, strukturu a organizaci fotosystému II v tylakoidní membráně.
2. Zvládnout metodu přípravy dvojitého (*lhcb6 psbR*), případně trojitého (*lhcb3 lhcb6 psbR*) mutantu *Arabidopsis thaliana* a ze získaných rostlin pomocí genotypování vybrat jedince homozygotní ve všech znacích.
3. Provést základní charakterizaci fotosyntetické funkce získaných rostlin.
4. Provést studium struktury fotosystému II a jeho organizace v tylakoidní membráně pomocí transmisní elektronové mikroskopie.
5. Vyhodnotit vliv absence proteinu PsbR na funkci a strukturu fotosystému II a diskutovat obdržené výsledky.

3.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (huseníček rolní) je jeden z důležitých modelových organismů molekulární biologie. Modelové organismy se v dnešní době používají pro získávání nových poznatků, které se dále aplikují při studii složitějších organismů. Nejčastěji se jedná o poznatky z rostlinné molekulární biologie, genetiky, fyziologie rostlin a biochemie.

Huseníček rolní je krytosemenná, vyšší dvouděložná rostlina, která patří do čeledi brukvovité (*Brassicaceae*) a rodu huseníček (*Arabidopsis*). Ze zemědělského hlediska se jedná o bezvýznamnou rostlinu, ale pro molekulární biologii má obrovský význam (Holland a Jez, 2018). I přes jeho malou výšku, která dosahuje pouze 15–20 cm a zemědělskou neužitečnost, má v biologických oborech velice důležitý a nezastupitelný (Meinke *et al.*, 1998). Je výhodný pro pěstování v malých prostorech, jako jsou například fytotrony. Tato zařízení umožňují pěstování rostlin za přesně definovaných podmínek a manipulace s menšími rostlinami je o hodně jednodušší než zacházení s větší rostlinou. Dalším důvodem, proč je huseníček používán jako modelová rostlina je ten, že má krátký životní cyklus, který trvá přibližně 6-8 týdnů, a velké množství semen, které může činit až 20–30 semen na jednu šesuli (Padole a Ingle, 2017).

Jednou z nejdůležitějších výhod je malý diploidní genom o velikosti 120 Mb, který byl osekvenován v roce 2000 a celkem má rostlina pět chromozómů $n = 5$ (diploidní počet $2n = 10$) (Meinke *et al.*, 1998). Další výhodou této rostliny je schopnost samoopylení, které je výhodné pro přípravu mutantních rostlin.

3.1.1 Knockout mutace

S dostupností kompletní sekvence genomu u organismů jako je *Arabidopsis* se výzkum přesunul směrem k funkční genomice, kde se jako centrální nástroj používá mutagenese, sloužící pro studování základních biologických vlastností. Nejčastěji u mutantního genotypu dochází ke změně nebo k znefunkčnění (knockout) určitého genu a tuto změnu lze studovat pomocí fenotypové analýzy (Radhamony *et al.*, 2005).

Hlavním nástrojem pro studium vztahů mezi geny a fenotypem je transferová DNA (T-DNA) mutagenese, která je založená na principu vložení cizí DNA do oblasti genu zájmu. To vede k znefunkčnění, nebo částečné redukci funkce genu. Pro zvýšení šance, že funkce genu bude pozastavena úplně, je důležité místo inserce. Proto je nejvíce preferováno vkládání Ti-plazmidu (tumor indukující plazmid) do exonu,

protože dochází k úplnému znefunkčnění (knockout) genu. (O'Malley *et al.*, 2017).

T-DNA pochází z Ti – plazmidu bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Rod *Agrobacterium* je všudypřítomná půdní bakterie, infikující široké spektrum rostlin a způsobuje různá onemocnění (crown gall, cane gall a hairy root). V oblastech těchto nádorů dochází k přirozenému přenosu T – DNA do genomu rostliny (Chilton *et al.*, 1977; Gelvin, 2009; O'Malley *et al.*, 2010).

Samotná příprava mutantů cílená na konkrétní gen zájmu není možná, jelikož proces inserce je náhodný, proto se několik laboratoří po světě spojilo s cílem vytvoření kolekcí inzerčních linií. Veškerá tato práce je přístupná ve formě kolekcí v indexovaných inzerčních knihovnách jako jsou například GABI-KAT, SAIL, Salk, WISC a FLAG (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003a; Rosso *et al.*, 2003b; Woody *et al.*, 2007).

3.2 Příprava jednoduchých a mnohonásobných mutantních linií

Jednoduché mutantní linie jsou mutanti obsahující mutaci ovlivňující jeden gen. Nejjednodušší metodou pro jejich přípravu je využití předpřipravené mutantní linie z inzerčních kolekcí, obsahující inzert v místě, kde dochází k úplné pozastavení funkce genu (O'Malley *et al.*, 2017).

Proto, aby mohly být sledovány základní biologické vlastnosti jednotlivých genů, tak se musí selektovat rostliny homozygotně–recesivní v daném znaku, protože jediné v tomto případě dochází k úplné inaktivaci genu a může se funkce daného znaku porovnávat s WT. Výhodou homozygotně–recesivních mutantů je jejich stálost v rámci další generace (O'Malley *et al.*, 2010; Snustad a Simmons, 2012).

Mnohonásobné mutantní rostliny jsou ty, které obsahují většinou dvě a více mutací. Pro vznik mnohonásobného mutantu se nejčastěji používají předpřipravené inzerční linie s jednou mutací, které se navzájem kříží.

Složitost křížení je ovlivňována množstvím mutací, které má požadovaná rostlina mít a taky vazbou mezi geny na stejném chromozomu.

3.2.1 Mnohonásobní mutanti bez genové vazby

Nejjednodušším případem selekce vícenásobného mutantu je případ, kdy na geny nepůsobí vazba. V takovém případě nedochází k žádným odchylkám od genotypového štěpného poměru a následná selekce rostlin jak v F1, tak v F2 generaci se bude řídit

podle Mendelových zákonů dědičnosti. Tím se ulehčuje předpovězení genotypového štěpného poměru potomků v následující generaci a díky tomu už můžeme mít v F2 generaci, při křížení dihybrida, vyselektovanou mutantní rostlinu našeho zájmu. Jako příklad nejjednodušší formy vícenásobného mutantu bez genové vazby je mutant se dvěma mutacemi, který se připravuje pomocí křížení mezi dvěma jednoduchými mutantními liniemi.

Genotypové štěpné poměry formuloval v 19. století Gregor Johann Mendel jako základní principy dědičnosti, které jsou až na některé odchylky (geny ve vazbě, mimojaderná dědičnost, pohlavní chromozomy, interakce genů) základní pilíře genetiky. Tyto zákony jsou založeny na jeho vlastním pozorování sedmi znaků u hrachu setého (*Pisum sativum*). Znění těchto zákonů je:

1. Zákon o stejnorodosti první filiální generace: Jsou-li mutantní rodiče ve sledovaném znaku homozygotní, potom jsou potomci v F1 generaci genotypově i fenotypově stejnorodí. Pokud by došlo ke křížení dominantního a recesivního homozygota v daném znaku, tak v generaci F1 jsou všichni potomci uniformní heterozygoti.
2. Zákon o nestejnorodosti druhé filiální generace: Při křížení heterozygotních mutantů, se nám v generaci F1 vyštěpí znaky hybridních rodičů v charakteristickém poměru celých čísel, kde genotypový štěpný poměr bude 1 : 2 : 1, fenotypový štěpný poměr při úplné dominanci 3 : 1 a v případě neúplné dominance 1 : 2 : 1.
3. Zákon o volné kombinovatelnosti alel: Při dihybridním křížení se alely různých genů kombinují nezávisle na sobě a vytvářejí tolik typů gametických kombinací, kolik jich je možných mezi vzájemně nezávislými veličinami (Snustad a Simmons, 2017).

Při křížení je vždy důležité si vypočítat genotypový štěpný poměr. Ten lze předpovědět pomocí třech základních metod, a to je Punnettova tabulka (mendelistický čtverec), rozvětovací metoda a matematické hodnocení pravděpodobnosti. Všechny tři principy vedou ke stejnému výsledku (Snustad a Simmons, 2017). Pro selekci jak dvojitého, tak trojitého mutantu byla pro výpočet štěpného genotypového poměru použita Punnettova tabulka.

Punnettova tabulka se používá ke grafickému znázornění všech možných kombinací gamet samčího a samčího organismu v následující generaci (nejčastěji generace F2). Jeho základní princip je založený na tom, že gamety, které může vytvořit samčí organismus, jsou znázorněny v hlavičkách řádků a gamety samčího organismu jsou znázorněny v hlavičkách sloupců. Vnitřní pole tabulky poté znázorňuje zygoty, které vzniknou splýváním odpovídajících gamet. Genotypový štěpný poměr pak

zjistíme sečtením odpovídajících genotypů v polích tabulky (Tab. 1) (Edwards, 2012).

Tab. 1 – Punnettova tabulka pro stanovení genotypového štěpného poměru u dihybrida

		♂ AaBb			
		AB	Ab	aB	ab
♀ AaBb	AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
	Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
	aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
	ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

U trojitého mutanta je selekce náročnější než u dvojitého mutanta. Proto je důležité si nejdříve stanovit pořadí vhodné generace pro selekci.

Pro přípravu trojitého recesivně homozygotního mutanta, se nejčastěji používá způsob, který je založený na tom, že se nejdříve zkříží rostliny mutantní v jednom znaku, kde v F1 generaci budeme mít pouze heterozygoty ve dvou znacích. Poté se heterozygot zkříží třetím recesivním homozygotem. Následně se potom v F2 generaci vyselektuje mutant heterozygotní ve třech znacích s pravděpodobností 1 : 3 a po samoopylení se následně v generaci F3 vyselektuje mutant ve třech znacích s pravděpodobností 1 : 63 (Tab. 2).

3.2.2 Působení genové vazby

Pokud se ale dva geny nachází na stejném chromozomu, tak na ně působí vazba. Jedná se o sílu, která poutá geny jako fyzickou součást jedné struktury (chromozom) a při meióze by měl chromozom putovat jako jeden celek. Jediný možný způsob, jak se geny v takovémto případě mohou kombinovat za vzniku nové kombinace je tzv. „crossing-over“. Ke „crossing-over“ dochází v profázi I meiotického dělení a vyžaduje fyzickou výměnu genů mezi homologními chromozomy v místech, které se nazývají chiazmata. Četnost rekombinace je odvozena od vzájemné vzdálenosti genů od sebe. Když se geny vyskytují velmi blízko sebe, tak četnost rekombinace může být skoro nulová, ale když jsou geny více vzdálené od sebe, tak četnost rekombinace se může přibližovat 3. Mendelovu zákonu o volné kombinovatelnosti alel (Snustad a Simmons, 2017).

Jelikož za těchto podmínek neplatí zákon o volné kombinovatelnosti genů a dochází k odchylkám v genotypovém štěpném poměru, který nelze předpovědět pomocí výpočtů, tak se komplikuje postup na přípravu vícenásobného mutantu.

Tab. 2 - Punnettova tabulka pro stanovení genotypového štěpného poměru u trihybrida

♀ \ ♂		AaBbCc							
		ABC	ABc	AbC	Abc	aBC	aBc	abC	abc
Aa Bb Cc	ABC	AABBCC	AABBcc	AABbCC	AABbCc	AaBBCC	AaBBcc	AaBbCC	AaBbCc
	ABc	AABBCC	AABBcc	AABbCC	AABbcc	AaBBCC	AaBBcc	AaBbCC	AaBbcc
	AbC	AABbCC	AABbCc	AAbbCC	AAbbCc	AaBbCC	AaBbCc	AabbCC	AabbCc
	Abc	AABbCc	AABbcc	AAbbCc	AAbbcc	AaBbCc	AaBbcc	AabbCc	Aabbcc
	aBC	AaBBCC	AaBBcc	AaBbCC	AaBbCc	aaBBCC	aaBBcc	aaBbCC	aaBbCc
	aBc	AaBBCC	AaBBcc	AaBbCC	AaBbcc	aaBBCC	aaBBcc	aaBbCC	aaBbcc
	abC	AaBbCC	AaBbCc	AabbCC	AabbCc	aaBbCC	aaBbCc	aabbCC	aabbCc
	abc	AaBbCc	AaBbcc	AabbCc	Aabbcc	aaBbCc	aaBbcc	aabbCc	aabbcc

3.3 Genotypování

Nejběžnějším způsobem selekce mutantních genotypů bývá selekce založená na běžném pozorování fenotypu okem. To znamená, že mutantní rostlina má výrazný fenotypový projev a liší se od divoké (WT, wild-type) rostliny. Někdy ale rostliny nemají výrazný fenotypový projev a nelze je odlišit pouhým okem. V takovém případě se volí způsob genotypizace pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a následná charakterizace PCR produktu.

3.3.1 Příprava vzorku

Před genotypizací je nejdříve potřeba zpracovat rostlinný materiál do formy vzorku obsahující genomickou DNA, která se následně použije na genotypování.

První způsob izolace genomové DNA je zdlouhavý proces. Nejdříve je zapotřebí rostlinný materiál, pro získání lyzovaných buněk, dehydratovat v lyofilizátoru. Poté následuje samotná purifikace DNA, na kterou se nejčastěji používá chromatografická kolonka. Tímto způsobem pak máme vyizolovanou velmi čistou DNA, jejíž koncentrace a čistota se měří pomocí ultrafialové (UV) absorpční spektrofotometrie. Absorbance se nejčastěji měří při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Jejich poměr se používá k ověření čistoty. V čistém vzorku DNA vychází poměr absorbancí 260 nm

a 280 nm 1,8. Pokud je poměr nižší než 1,8, tak vyizolovaná DNA je kontaminovaná buď proteiny, nebo fenolem (Brown, 2007).

Druhá metoda izolace DNA se nejčastěji používá při screeningu velkého množství vzorků, jelikož její výhodou je rychlost. Základem je čerstvý materiál, který se pouze vloží do dilučního roztoku, kde se zhomogenizuje a tímto způsobem je připravený vzorek na testování (Kuusisto a Chum, 2013).

3.3.2 PCR – Polymerázová řetězová reakce

Jedná se o technologii, využívající se v molekulární biologii, která slouží k amplifikaci sekvence určitého úseku DNA. V rámci několika cyklů amplifikace nám může vzniknout tisíc až milion kopií úseku DNA. PCR byla vynalezena v roce 1984 a jejím autorem je americký biochemik Kary Mullis. Jejimi výhodami je rychlost, cena, jednoduchost a nepříliš vysoké nároky na vzorek DNA (Bartlett, 2003; Joshi a Deshpande, 2011).

Principem PCR je, že dochází k amplifikaci DNA pomocí specifického enzymu – DNA polymerázy, která je schopná spojovat jednotlivé nukleotidy (adenin–A, Thymin–T, Guanin–G, Cytosin–C), za vzniku dlouhých lineárních řetězců DNA. Dále reakce vyžaduje malé fragmenty DNA (oligonukleotidy), které se označují jako primery, bez kterých by reakce nemohla být zahájena.

Základem PCR jsou tři hlavní kroky, a to jsou denaturace, hybridizace primerů a amplifikace, kde v prvním kroku dochází k denaturaci dvouvláknové DNA pomocí vysoké teploty (90–97 °C) na jednovláknovou DNA (DNA templát). Ve druhém kroku dochází k nasednutí primeru na DNA templát.

Primery jsou fragmenty DNA a označují počátek replikace. Při PCR se využívají uměle nasyntetizované primery a jedná se o oligonukleotidové řetězce specificky se vážající na jednovláknovou DNA. Teplota, při které dochází k nasednutí primerů na templátovou DNA je individuální. Odlišuje se na základě složení nukleových bází, délce primeru a typu použité polymerázy. Teplota při nasedání primerů se nejčastěji používá v rozmezí 50–60 °C.

Ve třetím kroku dochází k prodlužování řetězce, a to ve směru 5'→ 3'. Dochází ke vzniku komplementárního vlákna DNA. K elongaci řetězce dochází díky teplotně stabilním DNA – polymerázám, mezi které patří např. *Taq* polymeráza, která syntetizuje nové vlákno DNA a tím dochází k duplikaci původní DNA. Proto nově

vzniklá molekula DNA obsahuje jak vlákno původní, tak vlákno nově nasyntetizované. Elongace probíhá většinou při 72°C po dobu 2–5 minut (Gibbs, 1990; Joshi a Deshpande, 2011).

Při PCR se používají teplotně stabilní DNA polymerázy, vyizolované z organismů, žijících v prostředí s vysokou teplotou. Příkladem z používaných DNA polymeráz může být *Taq* polymeráza, která byla vyizolována z mikroorganismu *Thermus aquaticus* (Snustad a Simmons, 2017).

Aby mohlo dojít k charakterizaci PCR produktu, je zapotřebí agarózové elektroforézy. Jedná se o metodu pro charakterizaci DNA nebo RNA.

Pro přípravu gelu se používají pufrы, které se mísí s agarózou na požadovanou koncentraci, o obvyklé koncentraci 0,3 – 2 %. Procentuální koncentrace se u gelu volí podle toho, jak velké fragmenty chceme izolovat – čím menší je fragment, tím vyšší bude koncentrace gelu a naopak (Tab. č. 3). Dále se tyto pufrы používají pro zajištění pohybu segmentů, jelikož obsahují ionty, které podporují vodivost. Jako příkladem používaných pufrů mohou být TAE (Tris/Acetate/EDTA) nebo TBE (Tris/boritan/EDTA) (Lane *et al.*, 1992).

K rozdělení molekul dochází na základě toho, že molekuly s nízkou molekulovou hmotností migrují rychleji, zatímco molekuly s vysokou molekulovou hmotností migrují pomaleji, protože jsou více zadržovány v gelu. (Brown, 2007; Ylmaz *et al.*, 2012).

Rychlost pohybu unášených molekul nukleových kyselin v agarózovém gelu směrem k anodě je ovlivňována napětím, které se volí v rozmezí (5–8 V.cm⁻¹). Celkový náboj migrujících molekul je v podmínkách elektroforézy záporný (Ylmaz *et al.*, 2012).

Jelikož výsledek separace molekul není na gelu vidět, tak se DNA musí vizualizovat. Nejčastěji se pro vizualizaci používají fluorescenční barviva, které interagují s DNA a RNA. Příkladem fluorescenčních barviv může být ethidium bromid (2,7-diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridiniumbromide) nebo SYBR Green 1 (Dragan *et al.*, 2012). Následně se pak obarvený gel osvítlí UV světlem o vlnové délce cca 300 nm (Ylmaz *et al.*, 2012).

Tab. 3 – Koncentrace agarózového gelu vhodná na separaci molekul lineární DNA o různých velikostech, Převzaté a upravené (Ylmaz et al., 2012)

Koncentrace agarósy v gelu [%]	Rozsah separovaných molekul lineární DNA [kb]
0,3	5 – 60
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3
2	0,1 – 2

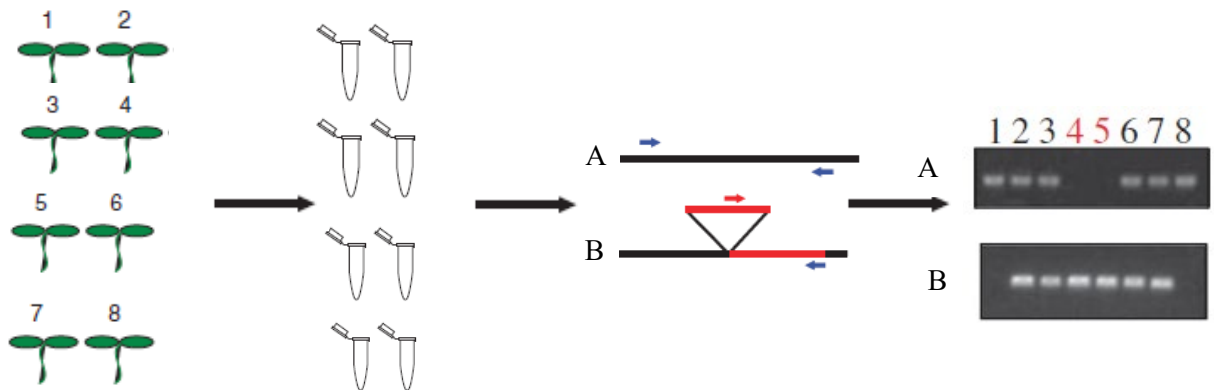
3.3.3 Principy PCR genotypování

Při funkční genomice se nejčastěji pracuje s homozygotně recesivními mutanty (obě kopie DNA obsahují inzerci). Jelikož se často pracuje s geny bez výrazného fenotypového projevu, tak se mutantní rostlina selektuje pomocí PCR.

Pro amplifikaci genomové DNA se používají dva typy párů primerů, které jsou složeny z forward (nasedají na vlákno, orientované ve směru 3' → 5') a reverse primerů (nasedají na vlákno, orientované ve směru 5' → 3'). První pár primerů slouží k detekci divokého typu (WT) a jsou navrženy na místo, které se nachází na genomické DNA bez inzerce. Druhý pár primerů slouží k detekci T-DNA inzerce. Ten je složený z primeru specifického pro T-DNA inzerce a primeru specifického na genomickou DNA. Podle orientace T-DNA je pak gen-specifický primer navržený buď na reverse nebo forward vlákno.

Současné použití obou párů primerů nám umožňuje selekci rostlin mutantních v obou znacích (homozygotní mutanti), mutantní pouze v jednom znaku (heterozygot) nebo ty, které neobsahují žádný inzerce (divoký typ) (Obr. 1). U homozygotních mutantů se bude tvořit jen PCR produkt za přítomnosti primeru nasedajícího na T-DNA v kombinaci s gen-specifickým primerem (varianta B, Obr. 1), protože přítomnost T-DNA znemožňuje amplifikaci primerům specifickým pro genomovou DNA (varianta A, Obr. 1). U rostlin divokého typu se naopak bude tvořit pouze PCR produkt za přítomnosti gen-specifických primerů, protože replikace DNA není zamezena inzercí T-DNA. U heterozygotů se amplifikují jak primery pro mutantní typ, tak primery pro divoký typ, protože jedno vlákno obsahuje inzerční T-DNA (amplifikace pomocí primerů pro mutantní typ) a druhé vlákno inzerci neobsahuje (amplifikace pomocí

primerů pro divoký typ) (O'Malley *et al.*, 2010).

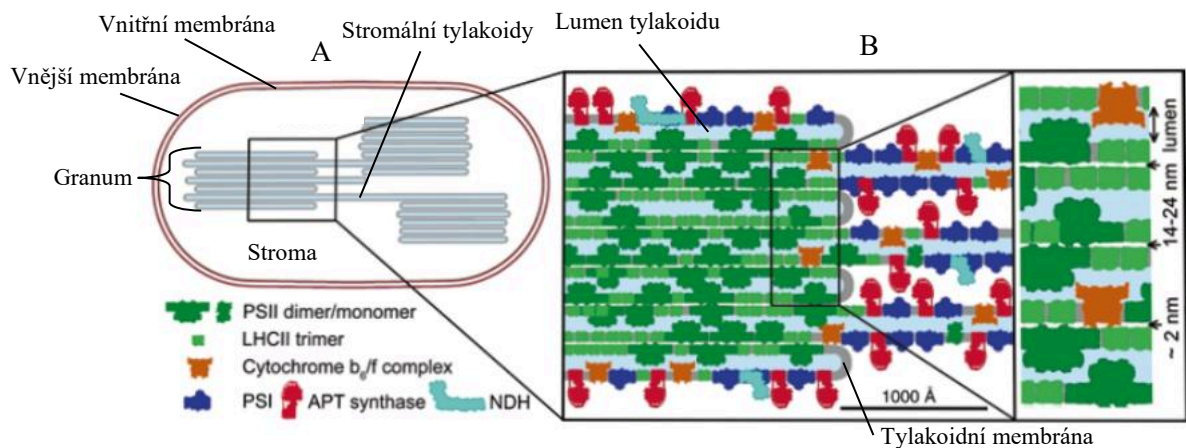


Obrázek 1 – Genotypizace homozygotně mutantních rostlin pomocí PCR amplifikace a následné charakterizaci PCR produktu. Při genotypování se nejdříve odebere vzorek z listu testované rostliny a umístí se do mikrozkuřavky (krok 1). Poté se vyizoluje DNA u každé rostliny (krok 2) a poté se provede PCR amplifikace pomocí specifických primerů, kde se pro selekci mutantních rostlin použije primer pro inzert T-DNA (3B) genomově specifický primer (3A), (krok 3). Poslední částí je určení genotypu u testovaných rostlin, kde mutantními rostlinami jsou vzorky č. 4 a 5, heterozygoty jsou vzorky 2, 3, 6 a 7 a rostliny divokého typu jsou vzorky 1 a 8. (krok 4). Převzaté a upravené (O'Malley *et al.*, 2010)

3.4 Oxygenní fotosyntéza

Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších dějů na zemi, kde dochází k přeměně sluneční energie na energii chemickou. Pomocí tohoto procesu dochází k fixaci CO₂ do organické molekuly a vypouštění O₂ do atmosféry. Proto je fotosyntéza nejdůležitějším dějem pro udržování života na zemi.

Fotosyntéza se odehrává v tylakoidní membráně uvnitř specializovaných semiautonomních organel – chloroplasty, které obsahují tylakoidní membrány obklopené stromou, ve které probíhá Calvinův cyklus. Tylakoidní membrány jsou v rámci chloroplastu (Obr. 2) uspořádané do sloupců a tvoří grana, ukrývající pigmentové proteinové komplexy, které jsou zodpovědné za světelnou fázi fotosyntézy. Jednotlivá grana jsou pospojované mezi sebou pomocí stromálních tylakoidů. Vnitřní vodná fáze tylakoidu se nazývá lumen (Kirchhoff, 2013).



Obrázek 2 – Model organizace tylakoidních membrán v rámci chloroplastu.

Model ukazuje chloroplast obsahující tři 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 b₆/f komplex; Převzato a upraveno (Kouřil *et al.*, 2018; Dekker a Boekema, 2005)

Proces fotosyntézy se dělí na dvě části. Na primární fázi (světelná fáze) a sekundární fázi (temnostní fáze). V primární fázi nejdříve dochází k absorpci slunečního světla molekulami chlorofylů a přenosu excitační energie do reakčního centra fotosystému II (PSII) (P₆₈₀). Následně dochází k přenosu elektronů získaných rozkladem vody. Tyto elektrony jsou dále přenášeny pomocí plastochinonu, komplexu cytochromu b₆/f a plastocyaninu až na fotosystém I (PSI), kde dochází k excitaci reakčního centra. Poté může přenášený elektron putovat buď necycleckou cestou, kdy je využit pro redukci NADP⁺ za vzniku produktu NADPH, nebo cyklickou cestou zpět na cytochrom b₆/f komplex, kdy dochází ke zvýšení množství transportovaných protonů do lumen, které vytváří elektrochemický gradient protonů pohánějící syntézu ATP pomocí ATP syntázy.

Následně v sekundární fázi (Calvinův cyklus) dochází k využití ATP a NADPH k fixaci CO₂ do organické molekuly (sacharidy) (Gao *et al.*, 2018).

3.4.1 Organizace fotosystému II

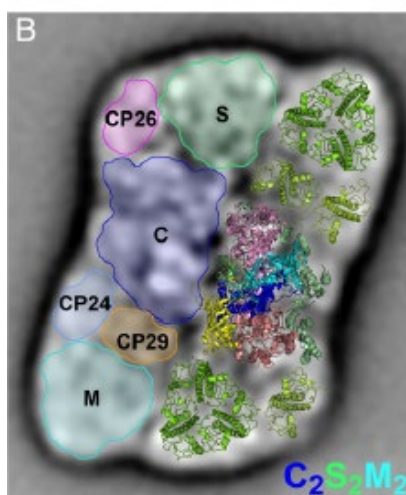
PSII je multi-proteinový proteinový komplex, který se skládá z jádra a přilehlých světlosběrných antén. Základem jádra, které se vyskytuje jako homodimer, jsou dva proteiny D1 (PsbA) a D2 (PsbD) spolu s vnitřními světlosběrnými anténami CP43 (PsbC) a CP47 (PsbB) (Kouřil *et al.*, 2018). Dále jsou jeho součástí proteiny, které tvoří kyslík vyvíjející komplex (OEC). Konkrétně se jedná o proteiny PsbO (33 kDa), PsbP (23 kDa), PsbQ (17 kDa) a PsbR (10 kDa) (Allahverdiyeva *et al.*, 2013). Tyto proteiny

jsou u *Arabidopsis* kódovány dvojicí genů – PsbO (PsbO1 a PsbO2), PsbQ (PsbQ1 a PsbQ2) a PsbP (PsbP1 a PsbP2), zatímco PsbR je kódován pouze jedním genem a to PsbR1 (Suorsa *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2008; <http://www.arabidopsis.org>).

Jádro PSII interaguje s vnějšími světlosběrnými anténami (LHCII) za vzniku PSII - LHCII superkomplexu. Konkrétně u PSII je LHC tvořen proteiny Lhcb 1 – 6, které se dělí na majoritní (Lhcb 1 – 3) a minoritní (Lhcb 4 – 6). Počet těchto antén, v jakém se váží na jádro PSII, je značně variabilní, jelikož jejich uspořádání je závislé na intenzitě různého světla.

Funkční forma PSII–LHCII superkomplexu je vždy ve formě dimeru. U *Arabidopsis* se označuje jako C₂S₂M₂ superkomplex a je tvořen jádrem (C₂), dvěma pevně spojenými S₂ trimery (proteiny kódované geny Lhcb1 a Lhcb 2) a dvěma středně silně vázanými M₂ trimery (obsahují navíc Lhcb3 proteiny). Pro spojení M a S trimerů k jádru slouží monomerní minoritní antény, kde S trimer je vázán k jádru pomocí CP26 (Lhcb5) a M trimer pomocí CP24 (Lhcb6) a CP29 (Lhcb4) (obr. 3) (Boekema *et al.*, 1995; Boekema *et al.*, 1998)

V rámci rostlin byly pozorovány i další superkomplexy a to například C₂S₂, který vzniká odpojením antén Lhcb3 a Lhcb6 (CP24) (Boekema *et al.*, 2000).



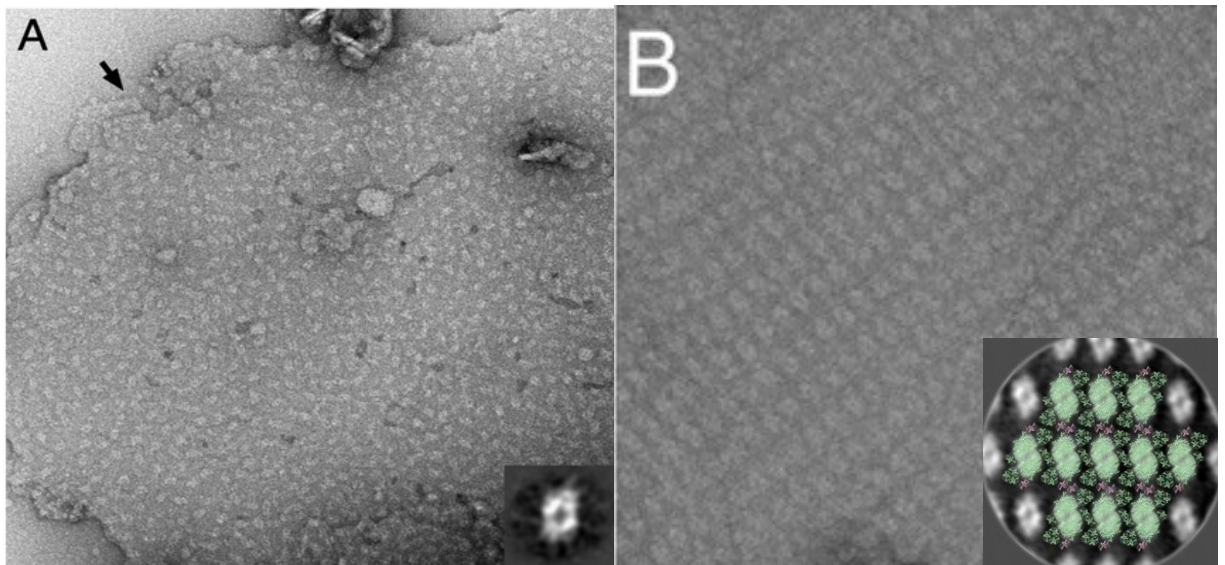
Obrázek 3 – Strukturální model PSII C₂S₂M₂ superkomplexu. C dimer – jádro, S a M trimer – majoritní světlosběrné antény, CP29 (Lhcb4), CP26 – (Lhcb5), CP24 (Lhcb6) – minoritní světlosběrné antény; Převzato a upraveno z (Kouřil *et al.*, 2012)

3.4.1.2 Světlosběrné komplexy PSII

Světlosběrné komplexy jsou zodpovědné za absorpci světla a přenos excitační energie do RC. Další z důležitých funkcí je fotoprotekce PSII proti fotooxidačnímu poškození, vznikajícímu při vystavení rostliny nadměrné intenzitě světla. (Jansson, 1994).

Dále se budu zabývat proteiny Lhcb3 a Lhcb6, jelikož interakce těchto proteinů je nepostradatelná pro stabilní připojení M trimerů na PSII (Kovacs *et al.* 2006; Caffarri *et al.* 2009; Kouřil *et al.* 2013). To znamená, že tyto proteiny jsou zodpovědné za kontrolu velikosti antén PSII během jak adaptace, tak aklimatizace na světelné podmínky (Bailey *et al.* 2001; Ballottari *et al.* 2007; Betterle *et al.* 2009; Kouřil *et al.* 2013). Příkladem mohou být podmínky s vysokou intenzitou světla, kdy bylo v průběhu pěstování rostlin za různé intenzity světla zjištěno, že dochází k potlačení exprese proteinu Lhcb3 a snížení exprese proteinu Lhcb6 (Kouřil *et al.* 2013).

Při studiu uspořádání PSII v rámci tylakoidních membrán (obr. 4, B) bylo zjištěno, že absence Lhcb3 a Lhcb6 vede k absenci M trimery a k tvorbě C₂S₂ komplexu, který vytváří krystalické (pravidelné) uspořádání PSII, zatímco u WT jsou PSII z větší části umístěny náhodně (obr. 4, A) (Ilíková *et al.*, 2021).

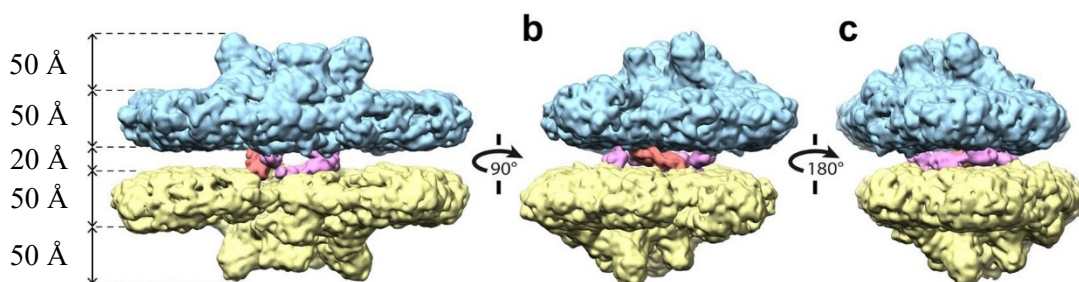


Obrázek 4 – Organizace PSII v rámci tylakoidní membrány u *Arabidopsis thaliana*. Mikroskopický snímek ukazuje náhodné (A) nebo krystalické (B) uspořádání PSII; Převzato a upraveno z (Kouřil *et al.*, 2012; Kouřil *et al.*, 2013).

3.4.1.3 Interakce sousedních PSII v rámci tylakoidních membrán

Jak již bylo zmíněno výše (kap. 3.4.1.2), tak uspořádání PSII v rámci tylakoidních membrán může být uspořádané do tzv. krystalických struktur, nebo může být náhodné.

Při nedávné studii, zabývající se interakcí PSII v rámci tylakoidních membrán (obr. 5), bylo zjištěno, že propojení mezi dvěma sousedními superkomplexy na stromální straně je zajištěno dvěma rozdílnými podjednotkami nazývanými se jako „pant“ – „hinge“ a „uzel“ – „knot“ (Albanese *et al.*, 2017).

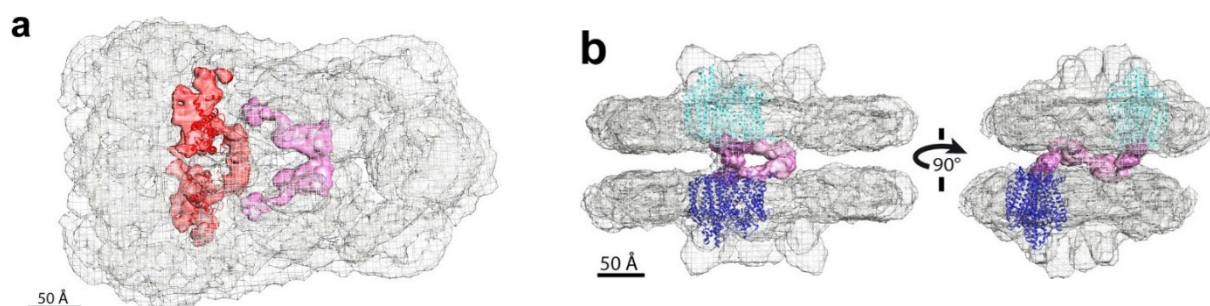


Obrázek 5 – Párování sousedních C₂S₂M PSII-LHCII superkomplexů v rámci tylakoidních membrán; Převzato a upraveno z (Albanese *et al.*, 2017)

Při studiu propojení PSII v rámci tylakoidních membrán byla na struktuře nazývané tzv. „pant“ zjištěna přítomnost proteinu na stromální straně PSII, který dle autorů na základě biochemických a proteomických analýz odpovídá PsbR (Albanese *et al.*, 2017). V rámci tohoto propojení bylo zjištěno, že protein PsbR je vázán na párové superkomplexy C₂S₂, které se nejvíce vyskytují u rostlin aklimatizovaných na vysokou intenzitu světla – PSII se sníženým množstvím světlosběrných antén (Lhc3 a Lhcb6) (Albanese *et al.*, 2016a)

Při charakterizaci knockout PsbR mutanta u *Arabidopsis* bylo zjištěno, že vlivem absence PsbR dochází také ke snížení množství proteinu PsbP, který je nezbytný pro sestavení jádra PSII a organizaci tylakoidních membrán. Toto zjištění indukuje, že PsbR může mít důležitou roli jak pro stabilní sestavení OEC, tak pro stabilizaci PSII-LHCII superkomplexů (Allahverdiyeva *et al.*, 2013)

Na základě těchto zjištěných informací vznikla hypotéza, která předpokládá, že PsbR může mít důležitou roli při organizaci fotosyntetického aparátu v rámci tylakoidních membrán u rostlin se sníženým množstvím světlosběrných antén, tj. na organizaci menších forem PSII – C₂S₂ a C₂S₂M (obr. 6).



Obrázek 6 – Propojení sousedních C₂S₂M PSII-LHCII superkomplexů v rámci tylakoidních membrán. A – Pohled shora přes luminální povrch připojených C₂S₂M superkomplexů (šedě zbarvená struktura), „Pant“ (purpurově zbarvená struktura) a „uzel“ (červeně zbarvená struktura). B – Boční pohledy na C₂S₂M superkomplexy v rámci úrovně membrán ukazují propojení mezi superkomplexy pomocí „pantu“ (purpurově zbarvená struktura) propojující monomer horního superkomplexu PSII (tyrkysová barva) s monomerem dolního superkomplexu PSII (modrá struktura); Převzato a upraveno z (Albanese *et al.*, 2017).

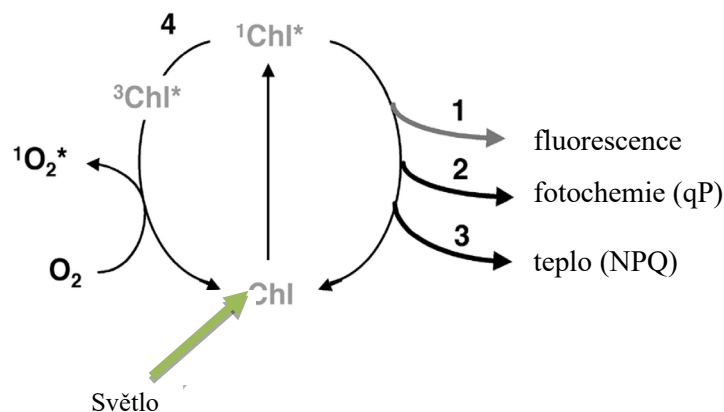
3.5 Metody studia struktury a funkce fotosyntetického aparátu

3.5.1 Nefotochemické zhášení fluorescence (NPQ)

Rostliny jako fotoautotrofní organismy potřebují světlo pro svůj život, jenže světlo o vysoké intenzitě může způsobit zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku, které jsou pro rostlinu škodlivé. Tyto reaktivní radikály kyslíku vznikají z nadměrně excitovaného chlorofylu, který přechází do tripletního excitovaného stavu ($^3\text{Chl}^*$) (Müller et al., 2001).

Aby nedocházelo k tvorbě reaktivních forem kyslíku, tak se u rostlin vyvinulo několik ochranných mechanismů. Jedním typem ochrany jsou nefotochemické procesy, které zhášejí excitované chlorofyly a neškodně převádí přebytečnou excitační energii na teplo (NPQ).

Dalším mechanismem, jak se rostlina může zbavovat přebytečné excitační energie je pomocí chlorofylové fluorescence (obr. 7) (Müller et al., 2001).



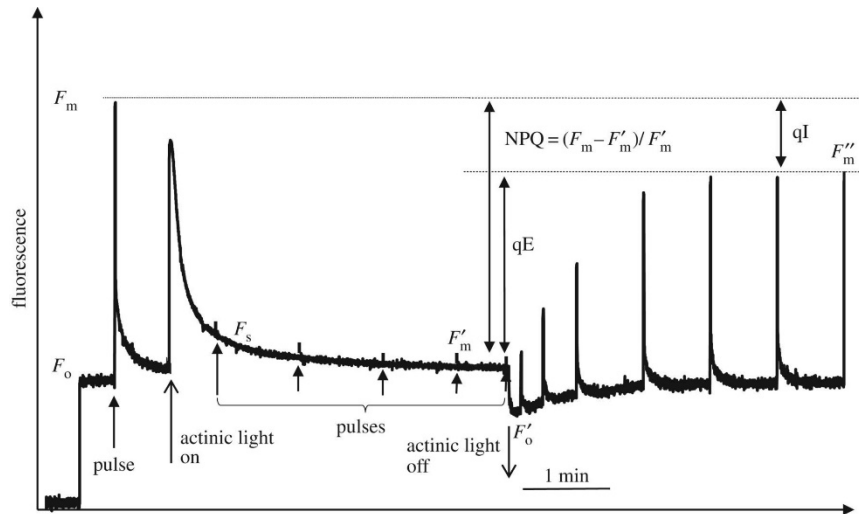
Obrázek 7 – Cesty absorpcí světla. Absorpce světla způsobí excitaci chlorofylu, který může pohlcenou energii nazpět vyzářit formou fotonu a tato cesta vyzáření se nazývá fluorescence (1. krok.). Další možností je přenesení energie do RC, kde se využije na nábojovou separaci – fotochemické zhášení (2. krok) nebo může přebytečnou energii přeměnit na teplo – nefotochemické zhášení (3. krok). Nebo může excitovaný chlorofyl přejít do tripletového stavu, který přenáší energii na kyslík za vzniku ROS (4. krok); Převzato a upraveno z (Müller *et al.*, 2001)

3.5.1.1 Zhášecí analýza

Zhášecí analýza představuje efektivní metodu pro studium funkce fotosyntézy a NPQ. Pro studium se používají rostliny, které se před měřením umístí na 30 minut do tmy, protože dochází k přechodu RC PSII do otevřeného stavu (oxidace elektronových přenašečů) a k relaxaci NPQ.

Na počátku měření dochází k excitaci chlorofylu slabým měřicím světlem, které nemá dostatečnou intenzitu k tomu, aby indukoval fotochemické procesy v PSII a RC zůstávají otevřená. Tímto krokem se měří minimální fluorescence (F_0). V druhém kroku dochází k ozáření listu saturačním pulzem o větší intenzitě a díky tomu dochází

k uzavření RC (redukce QA) a k indukci maximální fluorescence (F_m). Poté dojde k zapnutí aktinického světla, které postupně indukuje fotochemické i nefotochemické zhášení, které je doprovázeno poklesem fluorescenčního signálu (obr. 8) (Murchie a Lawson, 2013; Stirbet *et al.*, 2014).



Obrázek 8 – Analýza chlorofylové fluorescence; Převzato a upraveno z (Ruban, 2017)

3.5.2 Chlorofylová fluorescence – studium funkce fotosyntézy

Při studiu fotosyntézy pomocí chlorofylové fluorescence se využívá několik základních definovaných parametrů, kde patří:

- Minimální výtěžek fluorescence, F_o – výtěžek fluorescence pro otevřená RC PSII u rostlin adaptovaných na tmu, s maximálním fotochemickým zhášením a minimálním NPQ. Naměřená hodnota fluorescence za použití slabého měřicího světla.
- Maximální výtěžek fluorescence, F_m – výtěžek fluorescence u rostlin adaptovaných na tmu, s minimálním NPQ (po první aplikaci saturačního pulzu).
- Maximální fluorescence na světle, F_m' - naměřené hodnoty F_m' bývají menší, než hodnoty F_m , protože dochází k aktivaci NPQ a jedná se o maximální fluorescenci, která se změří pomocí saturačních pulzů za současného použití aktinického světla.
- Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII, F_v/F_m – vypočítá se pomocí vzorce $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, kde F_v je variabilní 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).

3.5.3 Elektroforéza – nástroj pro studium složení proteinových komplexů v rámci tylakoidní membrány

Ke studiu složení proteinových komplexů se nejčastěji používá bezbarvá nativní polyakrylamidová elektroforéza (CN-PAGE). Poprvé byla tato technika použita pro separaci mitochondriálních komplexů dýchacího řetězce (Schägger *et al.*, 1994; Wittig *et al.*, 2007).

Pro separaci proteinových komplexů se u CN-PAGE používá gradientový dělicí gel. Vzniku gradientu je dosaženo tak, že dochází k postupné zvyšování koncentrace akrylamidu, kde nejběžnějším používaným rozsahem je 5 – 13% gradient. Tento rozsah spolehlivě pokrývá rozmezí velikosti proteinů od 10^5 až do 10^6 Da. Výhodou gradientového gelu je, že pokud proteinový komplex dosáhne určité hustoty gelu, tak dojde k jeho „zastavení“ a tím je pak dosaženo lepšího rozlišení (Schägger a von Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994; Wittig a Schägger, 2005).

Za přidání směsi detergentů do katodového pufru dochází u proteinů k posunu náboje směrem k zápornějším hodnotám a tím i ke zvýšení jejich pohyblivosti směrem k anodě. Nejvíce používanými detergenty jsou dodecyl- β -D-maltosid, deoxycholát sodný a Triton X – 100 (Wittig *et al.*, 2007; Wittig a Schägger, 2009).

Výhodou techniky CN-PAGE je, že dokáže zachovat membránové proteinové komplexy v původním nedeturovaném stavu. Zpočátku měla hlavní využití spíše pro separaci mitochondriálních membránových komplexů, ale v poslední době nalézá využití i pro separaci pigment-proteinových komplexů izolovaných z tylakoidních membrán (Järvi *et al.*, 2011).

3.5.4 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie slouží ke studiu struktury biologických vzorků, jako jsou např. buněčné organely, viry, izolované proteiny a proteinové komplexy. Jako zdroj pro zobrazení se používá svazek elektronů, který umožňuje v porovnání se světelnou mikroskopií větší prostorové rozlišení. Obecně se EM dělí na transmisní (TEM) a skenovací (SEM).

TEM funguje na principu detekce elektronového svazku, který prochází vzorkem. Elektrony, které pronikají přes vzorek, jsou využity pro tvorbu projekčního obrazu vzorku, který je následně zaznamenán detektorem. U TEM se pracuje ze vzorky, které jsou dostatečně tenké kvůli omezené hloubce průniku elektronů samotným vzorkem.

Tato metoda elektronové mikroskopie umožňuje studovat strukturu vzorků s vysokým (atomárním) rozlišením.

U SEM dochází ke skenování povrchu vzorku pomocí tenkého svazku elektronů. Při interakci elektronového paprsku se vzorkem vznikají různé typy signálu (např. sekundární elektrony nebo zpětně odražené elektrony). Tyto signály jsou pak zaznamenány detektorem, který je umístěn nad vzorkem, a umožňují vznik obrazu. Výhodou SEM oproti TEM je, že není vyžadován ultratenký vzorek a nejčastěji se využívá pro studium malých organismů, tkání, virů a buněk (Wolff *et al.*, 2021).

4. Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

- *Arabidopsis thaliana* – ekotyp Columbia (Col-0)
- *Arabidopsis thaliana* – mutant *lhcb6 psbR*, který vznikl pomocí křížení mutantů *lhcb6* a *psbR*
- *Arabidopsis thaliana* – mutant *lhcb3 lhcb6 psbR*, který vznikl křížením mutantů *lhcb3 lhcb6* a *lhcb3/+ lhcb6/+psbR/+* (HZ v *lhcb3, lhcb6* a *psbR*)
- *Arabidopsis thaliana* – mutant *lhcb6* (SALK_077953)
- *Arabidopsis thaliana* – mutant *lhcb3 lhcb6* (SALK_020314c, SALK_077953)
- *psbR* (SALK_114469)

4.2 Chemikálie:

- 4% a 8% polyakrylamid
- 5x TBE (Tris/Borate/EDTA) pufr
- 80% aceton
- Agaróza (Sigma, kat.č. A9539)
- Ammonium Persulfát (BIO-RAD, kat.č. 1610700)
- čisticí prostředek na GMO – Krystal SANAN KLASIK
- destilovaná voda
- Digitonin (Sigma, kat.č. D141)
- Dodecyl α -D-maltoside (Sigma, kat.č. D5544)
- Etanol 70% a 96%
- Etidium bromid
- GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use (Thermo scientific, kat.č. SM1553)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (Sigma, kat.č. T9281)
- Thermo scientific GeneRuler 100+ bp (Thermo scientific, kat.č. SM0321)
- Uranylacetát (Spi Supplies, kat.č. 02624-AB)

Použité soupravy:

- NucleoSpin® Plant II kit (Thermo Fisher Scientific, kat.č. NC0269448)
- Thermo Scientific™Phire™Plant Direct PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, kat.č. F160S)

Použité roztoky a jejich příprava:

A Pufr (pH 7,2): 136,8 g sacharózy + 8,4 g HEPES + 23,35 g NaCl + 0,8 g MgCl₂ · 6H₂O + 1 g Na-Asc + 2 g BSA rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH₂O, upravit pomocí NaOH na požadované pH, doplnit vodou do 1000 ml.

B pufr (pH 7,5): 1,5 g HEPES + 2,2 g NaCl + 0,4 g MgCl₂ · 6H₂O + 0,093 g EDTA-Na rozpustit za stálého míchání v 150 ml dH₂O, upravit pomocí NaOH na požadované pH, doplnit vodou do 250 ml.

C pufr (pH 7,2): 34,2 g sacharózy + 3 g HEPES + 0,22 g NaCl + 0,26 g MgCl₂ · 6H₂O rozpustit za stálého míchání v 150 ml dH₂O, upravit pomocí NaOH na požadované pH, doplnit vodou do 250 ml.

1,2% agaróza: 3,6 g agarózy rozpustit ve 300 ml TBE pufru

Katodový pufr, 10x koncentrovaný: ředěním zásobního roztoku (1x) připravit 150 ml pufru + 43 mg maltosidu + 86 mg deoxycholátu + 48 µl 35% HCl

Anodový pufr, 1x koncentrovaný (pH 7,0): 0,05 M Bis-Tris/HCl

4.3 Přístrojové vybavení:

- Amersham imager 600 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švédsko)
- Analytické váhy (Scaltec instruments GmbH, Německo)
- Automatické pipety (Nichipet, USA)
- Centrifuga (Labnet International, Inc., USA)
- Centrifuga 5430 R (Eppendorf, Německo)
- DUAL-Pam-100 (Walz, Německo)
- Elektroforetická komora Mini Protean Tetra cell (Biorad, USA)
- Elektroforetická komůrka (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Elektronový mikroskop Tecnai (FEI Company, USA)
- Fytotron (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
- Homogenizátor T25basic (IKA Labortechnik, Německo)
- Lyofilizátor (LaboGene, Dánsko)
- Magnetická míchačka Big Squid (IKA, Německo)
- Mixer Mill (Retsch GmbH, Německo)
- PELCO easiGlow (TED PELLA, USA)

- Peristaltická pumpa PCD 21 (Čerpadla Kouřil, Kyjov, Česká republika)
- pH metr WTW inoLab 7110 (WTW, Německo)
- Powerpac 1000 (Biorad, USA)
- Spektrofotometer NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Spektrofotometr UV550 (Thermo Spectronic, USA)
- Světelný mikroskop (Wild Heerbrugg, Švýcarsko)
- Thermal cycler (Bio-Rad, USA)
- Třepačka vortex 4 bas (IKA, Německo)
- UV transilluminátor (Syngene International Limited, India)
- Vodná lázeň (Grant Instruments Ltd, Anglie)
- Vortex mixér (Heidolph, Německo)
- Zdroj jednosměrného napětí (Thermo Fisher Scientific, USA)

4.4 Metody:

4.4.1 Příprava dvojitého a trojitého mutanta pomocí křížení:

Pro přípravu dvojitého a trojitého mutanta byly nejdříve vysazeny homozygotní mutantní linie *psbR*, *lhb3*, *lhcb6* a heterozygot HZ (*lhcb3 lhcb6 psbR*). Vysazení rostlin 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 vysazena a umístěna do fytostronu za následujících podmínek pěstování: den (16h světlo, 19 °C, a 60% vlhkost) a noc (8 h tma, 18°C a 60% vlhkost).

Po čtyřech týdnech růstu docházelo ke křížení rostlin, kde byly nejdříve upraveny stonky (byly odstraněny listy a šešule) vybraných rostlin. Poté byly u vybraných květů odstraněny tyčinky pomocí pinzety vydezinfikované v 96% etanolu pod světelným mikroskopem (Wild Heerbrugg, Švýcarsko).

Na druhý den po odstranění tyčinek bylo provedeno křížení, kde blizna květů s odstraněnými tyčinkami byla opylena zralými tyčinkami z otcovské rostliny.

P: *psbR* x *lhcb6*

F1: *lhcb6/+ psbR/+*

F2: *lhcb6 psbR*

P: *lhcb3 lhcb6* x *lhcb3/+ lhcb6/+ psbR/+*

F1: *lhcb3* (HM) *lhcb6/+ psbR/+*

F2: *lhcb3 lhcb6 psbR*

4.4.2 Genotypování

- Příprava vzorku – 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 odstrižen kousek listu z dvoutýdenní rostliny o velikosti cca 1 mm². Tento vzorek listu byl vložen do mikroskopické pipety, kde bylo napipetováno 20 µl dilučního pufru (součást Phire Plant Direct PCR Master Mix kitu, ThermoFisher Scientific). DNA byla extrahována pomocí rozetření vzorku špičkou o stěnu mikroskopické pipety. Pro případ další potřeby byly vzorky uchovány v mrazáku při -20 °C.

- Izolace genomové DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plant II

Nejdříve byly vybrány listy o rozměru cca 3 cm², které byly dány do mikroskopických pipet (2 listy na 1 mikroskopickou pipetu). Poté byly přes noc listy lyofilizovány. Další den byly listy za přítomnosti skleněných kuliček homogenizovány pomocí mlýnku Mixer Mill (4 min při 27 otáčkách/s).

Následně byla provedena izolace genomové DNA, kde v prvním kroku byly připraveny mikroskopické pipety s fialovým a zeleným filtrem. Do mikroskopických pipet s rozemletým materiálem bylo přidáno 400 µl pufru PL1 a 10 µl RNAasy pro lýzi buněk. Poté byly vzorky zároveň s elučním pufrem (PE) dány na 20 minut do horké lázně (65 °C).

Dále se připravila mikroskopická pipeta s fialovým filtrem, kde bylo přepipetováno 400 µl lyzátu. Následně byl lyzát pro jeho přečištění centrifugován při 11000 g na 2 min. To, co protéklo, bylo přelito do nové 1,5 ml mikroskopické pipety za přidání 450 µl PC pufru a následně byla směs promíchána na třepačce.

Směs byla přelita do mikroskopické pipety se zeleným filtrem a po deseti minutách byla směs centrifugována při 11000g (1 minuta), kdy došlo k navázání DNA na filtr. Po centrifugaci byl filtrát vylit. Poté bylo celkem 3x provedeno promývání filtru promývacím pufrem, kde směs byla při každém promývání centrifugována při 11000g. Při prvních dvou promýváních centrifugace trvala 1 minutu. Třetí centrifugace trvala 2 minuty.

Filtr byl předán do nové mikroskopické pipety a na filtr bylo napipetováno 30 µl pufru PE (zahřátý na 65 °C). Následně byla směs centrifugována při 11000g (1 minuta)

a tento krok byl znovu zopakován (eluce DNA). Nakonec byla změřena koncentrace vyzolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop při vlnových délkách 260 nm a 280 nm.

4.4.3 PCR amplifikace

Pro určení genotypu byly vzorky DNA amplifikovány pomocí gen specifických primerů a primerů sloužící k detekci T-DNA inzerce (Tab. 4), které se při genotypování kombinovaly (Tab. 5).

Tab. 4 – Sekvence primerů použitých během genotypování

Sledovaný gen	Typ primeru	Sekvence primeru
LBb1	univerzální	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
LBb1.3	univerzální	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
<i>lhcb6</i>	FP	GGTGAGGAACGAAGAACCAA
	RP	CCAAACTCCCGACTTTACCA
<i>lhcb3</i>	FP	AGAATTCCCTGGCGATTATGG
	RP	ATAAAGGTCGTCACCGGAAATG
<i>psbR</i>	FP	ACCGGATCTTCTCCTCCCTCGT
	RP	TCTTGTGCATGGAAATCATAAAGGA

Tab. č. 5 – Kombinace primerů použita při genotypování

Gen	Kombinace primerů	Délka fragmentů (bp)	Označení pro kombinace primerů*
<i>psbR</i>	PsbR RP + PsbR FP	900	PsbR – WT
	PsbR RP + LBb1.3	550	PsbR - MUT
<i>lhcb6</i>	lhcb6 FP + lhcb6 RP	730	Lhcb6 – WT
	lhcb6 FP + LBb1.3	350	Lhcb6 – MUT
<i>lhcb3</i>	lhcb3 FP + lhcb3 RP	920	Lhcb3 – WT
	lhcb3 FP + LBb1.3	730	Lhcb3 - MUT

*označení používáno během genotypování

Poté byla připravena PCR reakční směs (Tab. 6), pomocí protokolu Thermo Scientific Phire Tissue Direct PCR Master Mix.

Tab. č. 6 – Složení PCR reakční směsi

Látka	Konečná koncentrace	Objem [μ l]
Deionizovaná voda	-	4,55
Primer A + B	0,5 μ M	0,2
2X Phire Tissue Direct PCR Master Mix	1X	5
Celkem PCR reakční směsi	-	9,75
Vzorek	-	0,25

Následně byly všechny zkumavky zvortexovány a krátce zcentrifugovány. Poté bylo 9,75 µl PCR reakční směsi napipetováno do 96 jamkové destičky spolu s 0,25 µl vzorku a byla provedena PCR reakce podle základního časového a teplotního profilu (Tab. 7).

Tab. č. 7 – Teplotní profil PCR reakce

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	5 min	1
PCR amplifikace	98	5 s	35
	63 (60)*	5 s	
	72	45 s	
Závěrečná elongace	72	1 min	1

Poznámka: *63 °C – pro gen specifické primery a v kombinaci s LBb1, 60 °C – pro kombinaci gen specifického primeru s LBb1.3

Dále pro stanovení PCR produktu byl připraven 1,2% agarózový gel (300 ml). Nejdříve byla v mikrovlnné troubě rozvařena agaróza v 0,5x TBE pufri, která po ochladnutí na cca 50 °C byla nalita do vaničky s vloženým hřebínkem. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vytáhnout a gel byl vložen do elektroforetické komůrky, která byla naplněná 0,5x TBE pufrem. Do jamek bylo nanášeno pomocí mikropipety 7 µl PCR produktu a 4 µl standartu molekulové hmotnosti. Komůrka po nanášení vzorků byla uzavřena a připojena ke zdroji el. napětí s nastavením na 60 min při 4 V·cm⁻¹. Po proběhnutí elektroforézy byl gel na obarvení dán na 20 minut do ethidium bromidu a po obarvení se umístil k vyhodnocení do UV transluminátoru (300 nm).

Po vyselektování dvojitého a trojitého mutanta se semínka posbíraly pro další experimenty.

4.4.4 Podmínky pěstování rostlin pro fotosyntetickou charakterizaci

Pro charakterizaci rostlin byla nejdříve vysazena semínka následujících genotypů: WT, *kolhcb6*, *kolhcb3 lhcb6*, *psbR*, *lhcb6 psbR* a *lhcb3 lhcb6 psbR*. Po vysazení byla semínka pro vyklíčení dána do fytostronu za podmínek pěstování: den (8h světlo, 22 °C, a 60% vlhkost) a noc (16 h tma, 22°C a 60% vlhkost). Pro základní charakterizaci fotosyntetické funkce byly použity sedmitýdenní rostliny.

4.4.5 Měření – chlorofylová fluorescence

Měření funkce fotosyntézy (PSII a PSI) bylo provedeno pomocí přístroje Dual – PAM 100, který je schopen pomocí chlorofylové fluorescence vyhodnotit stav PSII a zároveň pomocí změn absorpance P700 hodnotit stav PSI.

Před začátkem měření byly rostliny během 30 minut adaptované na tmu. Po adaptaci byl ustříhnut jeden list, který byl umístěný mezi měřicí hlavice a stopka listu byla položena na stojan obsahující kapku vody.

Měření probíhalo podle protokolu, kde nejdříve byla rostlina vystavena aktinickému světlu ($800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$). 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 (po dobu 15 min) bylo aktinické světlo zapnuto, v druhé polovině měření (15 - 30 minut) 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.

4.4.6 Fenotypová analýza – hmotnost nadzemní části rostlin

Před izolací tylakoidních membrán byla nadzemní část rostliny odstříhnutá a zvážena. Celkem bylo vážení provedeno v deseti opakováních, ze kterých se poté stanovila průměrná hmotnost. Vážení bylo provedeno pro každý genotyp (WT, *lhcb6*, *lhcb3 lhcb6*, *psbR*, *lhcb6 psbR*, *lhcb3 lhcb6 psbR*).

4.4.7 Izolace tylakoidních membrán

Den před izolací byly připraveny pufry (A, B, C), které byly vychlazeny na $0-4^{\circ}\text{C}$. Před izolací byly rostliny na 30 minut umístěny do tmy.

Po vážení rostlin byly odstřížené nadzemní části vloženy do homogenizační nádoby obsahující 250 ml A pufru. Ostrými nůžkami byly listy prostrhávány pro ulehčení homogenizace. Následně byla směs zhomogenizovaná pomocí tyčového homogenizátoru při 13000 otáčkách za minutu. Po ukončení homogenizace byl homogenát přefiltrován přes dvě vrstvy filtrační síťky. Po filtraci byl filtrát rovnoměrně rozdělen do čtyř centrifugačních kyvet. Poté následovala centrifugace při 5000g na 6 min (před centrifugací byly kyvety vyváženy).

Po centrifugaci byl z kyvet odlit supernatant a k peletu byl přidán B pufr. Následně pomocí štětce byl pelet resuspendován a všechna směs byla slita do jedné centrifugační kyvety. Poté proběhla centrifugace (5000g a 10 minut).

Po centrifugaci byl z kyvety odlit supernatant a k peletu byl přidán C pufr. Poté proběhla resuspendace pomocí štětce a následovala centrifugace (5000g a 5 minut). Na závěr byl odlit supernatant a pelet byl resuspendován v cca 1,5 ml C pufru.

Izolace probíhala při osvětlení slabým zeleným světlem za neustálého chlazení

pomocí ledu a při centrifugaci byla centrifuga vychlazena na 4 °C.

Následně byl vzorek (10 µl) pro stanovení koncentrace chlorofylů zředěn ve 2 ml vychlazeného acetonu, kde následovala centrifugace při nejvyšším RFC na 6 minut. U supernatantu byla poté změřena absorbance při vlnových délkách 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm a 750 nm. Jako blank byl použit 80% aceton. Po změření jednotlivých absorbancí byla pomocí Lichtenthalerových rovnic spočítána koncentrace chlorofylu *a* a *b*.

$$chl_a = 12,25(A_{663.2} - A_{750}) - 2,79(A_{646.8} - A_{750})$$

$$chl_b = 21,50(A_{646.8} - A_{750}) - 5,10(A_{663.2} - A_{750})$$

chl_a – koncentrace chlorofylu *a* v µg . ml⁻¹

chl_b – koncentrace chlorofylu *b* v µg . ml⁻¹

4.4.8 Separace pigment-proteinových komplexů pomocí CN – PAGE

Nejdříve byla sestavena aparatura pro nalití gelů se spacery 1 mm. Poté byl připraven gradientový gel. Pro přípravu gradientového gelu bylo napipetováno nejdříve do komory dále od výtoku 3 ml 4% gelu a do komory blíže k výtoku 3 ml 8% gelu. Poté bylo ke gelům přidáno 5 µl THEMEDU a pro zahájení polymerizační reakce 20 µl 10% APS.

Následně byla zapnuta peristaltická pumpa a gel byl lit mezi skla. Po naplnění skel byl do gelu vložen hřebínek a následně byl gel odnesen na noc do chladicí místnosti.

Následující den byly připraveny vzorky pro nanesení na gel (Tab. 8).

Tab. 8 – Příprava vzorků pro izolaci proteinových komplexů tylakoidních membrán

	1	2	3	4	5	6
	WT	<i>lhcb6</i>	<i>lhcb3 lhcb6</i>	<i>psbR</i>	<i>lhcb6 psbR</i>	<i>lhcb3 lhcb6 psbR</i>
Chl [µg]	10	10	10	10	10	10
Chl [µg/ml]	4857	2718	3046	6090	4913	1713
DM/50 Chl	15	15	15	15	15	15
Celkem [µl]	30	30	30	30	30	30
*C pufr [µl]	24,9	23,3	23,7	25,4	25	21,2
5% DM [µl]	3	3	3	3	3	3
Vzorek [µl]	2,1	3,7	3,3	1,6	2	5,8
DM [%]	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

Poznámka: DM – dodecyl- α -D-maltosid, DM/Chl – hmotnostní poměr, *C pufr s glycerolem

Poté byl gel umístěn do elektroforetické komůrky, která se naplnila anodovým a katodovým pufrům.

Po přípravě byly vzorky zcentrifugovány a následně napipetovány na gel. Po napipetování byla aparatura připojena ke zdroji elektrického napětí nejdříve na 7 mA (15 minut) a poté na 15 mA (2 hodiny).

Po proběhnuté elektroforéze byl gel analyzován pomocí gel skeneru kolorimetricky a následně pro rozlišení PSII od PSI fluorescenčně o vlnové délce 460 nm při pokojové teplotě.

4.4.9 Příprava vzorků tylakoidních membrán pro transmisní elektronovou mikroskopii

Nejdříve byly připraveny vzorky pro solubilizaci tylakoidních membrán (Tab. 9). Po napipetování byly vzorky umístěny do ledové lázně, umístěné na míchače (150 otáček) po dobu 25 minut.

Tab. 9 – Příprava vzorků pro solubilizaci tylakoidních membrán

	Detergent* [μl]	Vzorek [μl]	*C pufr [μl]	Celkem [μl]
<i>lhcb3 lhcb6</i>	10	33	157	200
<i>psbR</i>	20	33	347	400
<i>lhcb3 lhcb6 psbR</i>	10	58	132	200

Poznámka: *detergent = digitonin, C pufr bez obsahu sacharózy

Po 25 minutách byly vzorky zcentrifugovány při 9000g/6min. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován a k peletu byl přidán 1 ml C pufru. Následně byl pelet resuspendován a poté byly vzorky zcentrifugovány při 9000g/6 minut. Tento krok se opakoval celkem dvakrát. Nakonec byl supernatant odpipetován a vzorky byly resuspendovány buď v 50 μl (*psbR*), nebo v 70 μl (*lhcb3 lhcb6*, *lhcb3 lhcb6 psbR*) C pufru.

Poté byl připraven vzorek pro elektronový mikroskop, kde se nejdříve předpřipravila měděná síťka (CF-400-Cu) pomocí doutnavého výboje (PELCO easiGlow). Následně bylo na připravenou síťku napipetováno 5 μl vzorku, který se nechal absorbovat cca 1 minutu. Zbytek vzorku byl odsát pomocí filtračního papíru. Poté následovalo kontrastování vzorku 2% uranylacetátem, který byl

napipetován (5 μ l) na síťku s absorbovaným vzorkem. Po ukončení kontrastování byl zbytek uranylacetátu odsát filtračním papírem. Poté byl vzorek umístěn do elektronového mikroskopu, kde bylo provedeno snímkování při zvětšení 67132x s velikostí pixelu 4,46 nm.

5 Výsledky:

Pro vyhodnocení vlivu proteinu PsbR na organizaci PSII v rámci tylakoidní membrány byl nejdříve připraven pomocí křížení a následně pomocí genotypování vyselektován *lhcb6 psbR* a *lhcb3 lhcb6 psbR*. V rámci genotypování byla DNA pro rychlý screening vyzolovaná pomocí dilučního pufru. Poté byla DNA pro ověření výsledků izolována pomocí kitu NucleoSpin plant II.

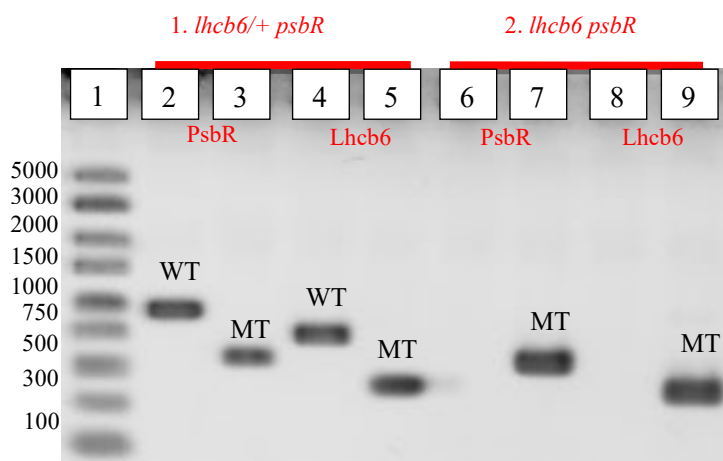
Příprava dvojitého a trojitého mutanta pomocí křížení a následná genotypizace

Při křížení rostlin se jako parentální (P) generace použili mutanti *lhcb6* a *psbR* (pro dvojitého mutanta) a *lhcb3 lhcb6* x *lhcb3/+ lhcb6/+ psbR/+* (pro trojitého mutanta). Tito mutanti byli mezi sebou kříženi pro přípravu první filiální (F1) generace. U dvojitého mutanta obsahovala F1 generace pouze rostliny heterozygotní ve dvou znacích, kde mutanti HM ve dvou znacích byl vyselektován v F2 generaci ze 45 rostlin s přibližnou pravděpodobností 1 : 44 (bez vlivu vazby 1 : 15), jelikož na geny *lhcb6* a *psbR* působí vazba. U trojitého mutanta byly ze 35 rostlin v F1 generaci selektovány pouze *lhcb6 lhcb3 psbR/+* s přibližnou pravděpodobností 1 : 34 (bez vlivu vazby 1 : 7). Následně v F2 generaci byl vyselektován mutant ve třech znacích z 15 rostlin s přibližnou pravděpodobností 1 : 2 (bez vlivu vazby 1 : 3).

Genotypizace – přímá metoda izolace vzorku

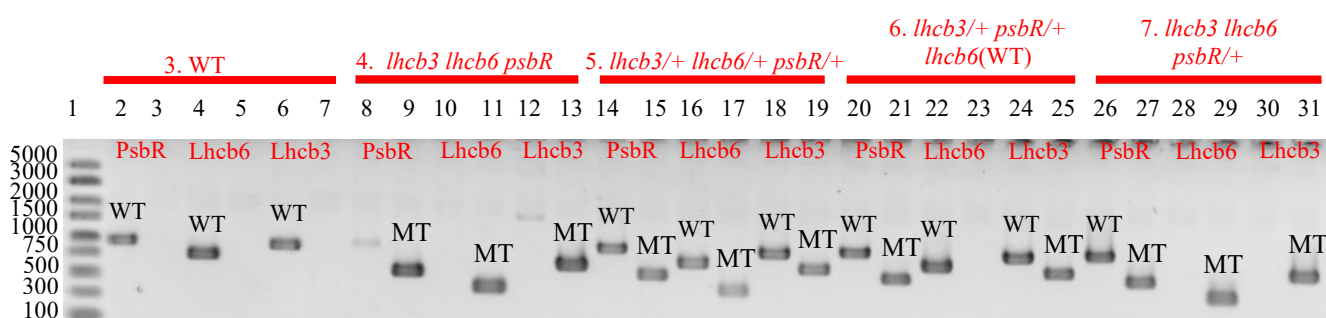
Nejdříve byly vypěstované rostliny genotypovány pomocí PCR amplifikace, za použití gen specifických a T-DNA primerů. Poté byla provedena elektroforetická separace PCR produktů pro nalezení dvojitého (*lhcb6 psbR*) a trojitého (*lhcb3 lhcb6 psbR*) mutanta. Izolace DNA pro rychlý screening byla provedena pomocí dilučního pufru. Po dokončení elektroforézy byl výsledek separace pro dvojitého (obr. 9) a trojitého mutanta (obr. 10) zviditelněn pomocí UV transluminátoru.

Během genotypizace byly testovány primery LBb1 a LBb1.3 v kombinaci s PsbR RP (Obr. 11), jelikož u primeru LBb1 v kombinaci s PsbR RP docházelo ke vzniku artefaktu o velikosti 450 bp. Při použití primeru LBb1.3 nedocházelo ke vzniku artefaktu a v kombinaci s PsbR RP vznikl cílový produkt o velikosti 550 bp.



Obrázek 9 – elektroforeticky rozdělené PCR produkty genomové DNA *Arabidopsis thaliana* pro selekci dvojitého mutanta. HZ – heterozygot, Ko – Knockout mutant, WT – wild type, MT – mutant, pipetování: PsbR – WT (jamka 2 a 6), PsbR – MUT (jamka 3 a 7), Lhcb6 – WT (jamka 4 a 8) a Lhcb6 – MUT (jamka 5 a 9)

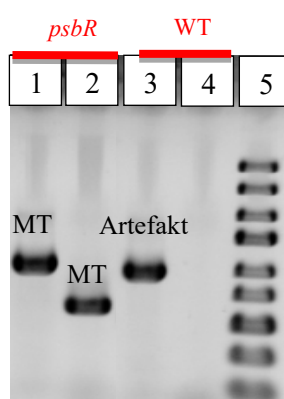
Podle elektroforeogramu jsem vyselektovala dvojitého mutanta *ko6 + psbR* u mnou zpracovaných vzorků. V jamkách se nachází amplifikované produkty pro PsbR – WT (jamka 2 a 6), PsbR – MUT (jamka 3 a 7), Lhcb6 – WT (jamka 4 a 8) a Lhcb6 – MUT (jamka 5 a 9). V jamce č. 1 se nachází marker molekulové hmotnosti GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use. Dvojitý mutant byl selektován podle toho, že testovaný vzorek musel obsahovat pouze PCR produkty pro T-DNA inzert. Tímto způsobem jsem určila, že vzorek č. 2 je dvojitý mutant. Vzorek č. 1 jsem určila, že je heterozygot pro oba dva geny, protože obsahuje PCR produkty jak pro divoký typ, tak pro T-DNA inzert.



Obrázek 10 - elektroforeticky rozdělené PCR produkty genomové DNA *Arabidopsis thaliana* pro selekci trojitého mutanta. HZ – heterozygot, Ko – Knockout mutant, WT – wild type, MT – mutant, pipetování: PsbR – WT (jamky 2, 8, 14, 20 a 26), PsbR – MUT (jamky 3, 9, 15, 21 a 27), Lhcb6 – WT (jamky 4, 10, 16, 22 a 28), Lhcb6 – MUT (jamky 5, 11, 17, 23 a 29), Lhcb3 – WT (jamky 6, 12, 18, 24 a 30) a Lhcb3 – MUT (jamky 7, 13, 19, 25 a 31)

Následně jsem podle elektroforeogramu selektovala trojitého mutanta *ko3+6+psbR* u mnou zpracovaných vzorků. V jamkách se nachází PCR produkty pro PsbR – WT (jamky 2, 8, 14, 20 a 26), PsbR – MUT (jamky 3, 9, 15, 21 a 27), Lhcb6 – WT (jamky 4, 10, 16, 22 a 28), Lhcb6 – MUT (jamky 5, 11, 17, 23 a 29), Lhcb3 – WT (jamky 6, 12, 18, 24 a 30) a Lhcb3 – MUT (jamky 7, 13, 19, 25 a 31). V jamce č. 1 se nachází marker molekulové hmotnosti GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use.

U vzorku č. 4 se tvořily pouze PCR produkty pro T-DNA inzert, proto se jedná o mutanta ve třech znacích. Naproti tomu u vzorku č. 3 se tvořily PCR produkty pro divoký typ, proto se jedná o WT. Vzorek č. 5 obsahuje u *psbR*, *lhcb6* a *lhcb3* PCR produkty jak pro divoký typ, tak s T-DNA inzercí, proto se jedná o heterozygota ve všech znacích. U vzorku č. 6 se u *psbR* a *lhcb3* amplifikovaly jak geny pro divoký typ, tak i obsahující T-DNA inzert a gen *lhcb6* se amplifikoval pouze jako divoký typ, proto se jedná o heterozygota ve dvou znacích. U vzorku č. 7 se u *lhcb6* a *lhcb3* amplifikovaly pouze geny obsahující T-DNA inzert a u *psbR* se amplifikovaly jak pro T-DNA inzert, tak pro divoký typ, proto se jedná o heterozygota v jednom znaku a mutanta ve dvou znacích.



Obrázek 11 – Elektroforeticky rozdělené PCR produkty za použití kombinace primerů *PsbR* RP + *LBb1* a *PsbR* RP + *LBb1.3*. MT-mutant, WT-wild type, pipetování: *PsbR* RP + *LBb1* (jamka 1 a 3), *PsbR* RP + *LBb1.3* (jamka 2 a 4)

Genotypizace – Izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin Plant II (nepřímá metoda)

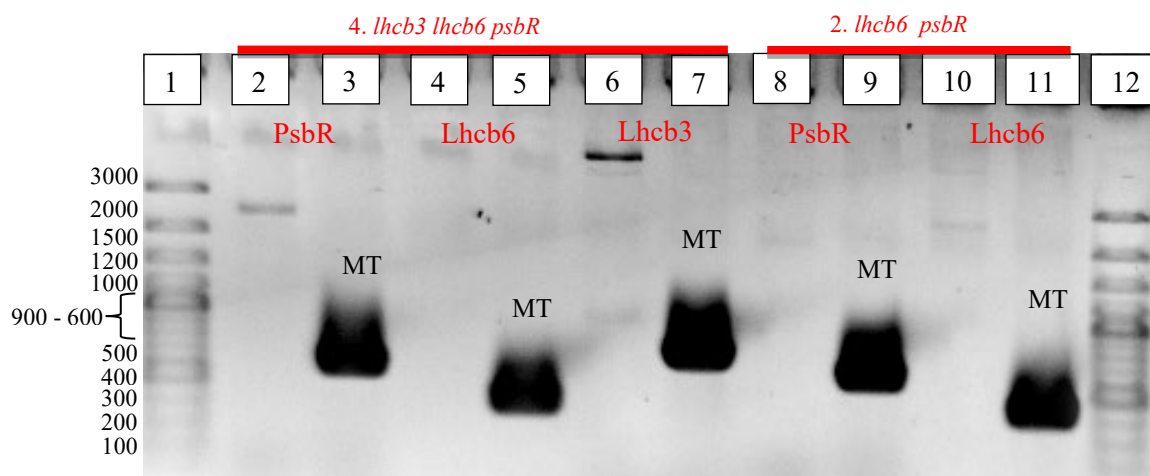
Pro potvrzení a správného určení mutantů, byla provedena izolace genomové DNA pomocí kytu NucleoSpin plant II. Po izolaci rostlinné DNA byla změřena koncentrace DNA (Tab. 10) na spektrofotometru Nanodrop. Pro PCR amplifikaci byl vybrán vzorek č. 4, jehož koncentrace DNA je $43,5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a vzorek č. 2, jehož koncentrace je $73,1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Celkem na jednu reakční směs bylo použito 100 ng DNA.

Tab. 10 – Koncentrace izolované DNA ve vzorcích mutantů *Arabidopsis thaliana*

Genotyp mutantů	Koncentrace DNA [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	Použitý objem [μl]
<i>lhcb6 psbR</i> – vzorek č. 2	73,1	1,4
<i>lhcb3 lhcb6 psbR</i> (1)	24,6	4,1
<i>lhcb3 lhcb6 psbR</i> (2) – vzorek č. 4	43,5	2,3
<i>lhcb3 lhcb6 psbR</i> (3)	46,8	2,1

Následně byla provedena PCR amplifikace u vzorků č. 2 a č. 4. Poté následovala

charakterizace PCR produktu (Obr. 12) pomocí agarózové elektroforézy.



Obrázek 12 - elektroforeticky rozdělené PCR produkty genomové DNA *Arabidopsis thaliana* izolované kitem NucleoSpin pro ověření pravosti výsledků. HZ – heterozygot, Ko – Knockout mutant, WT – wild type, MT – mutant, pipetování: PsbR – WT (jamka 2 a 8), PsbR – MUT (jamka 3 a 9), Lhcb6 – WT (jamka 4 a 10), Lhcb6 – MUT (jamka 5 a 11), Lhcb3 – WT (jamka 6) a Lhcb3 – MUT (jamka 7)

Podle elektroforeogramu jsem si ověřila správnost určení dvojitého (*ko6+psbR*) a trojitého mutanta (*ko3+6+psbR*). V jamkách byly napipetány PCR produkty pro gen PsbR – WT (jamka 2 a 8), PsbR – MUT (jamka 3 a 9), Lhcb6 – WT (jamka 4 a 10), Lhcb6 – MUT (jamka 5 a 11), Lhcb3 – WT (jamka 6) a Lhcb3 – MUT (jamka 7). V jamce č. 1 se nachází marker molekulové hmotnosti Thermo Scientific GeneRuler 100+ bp.

Správnost selekce dvojitého a trojitého mutanta u *Arabidopsis* byla potvrzena, protože se nám vizualizovaly pouze PCR produkty genů obsahující T-DNA inzert.

Charakterizace rostlin

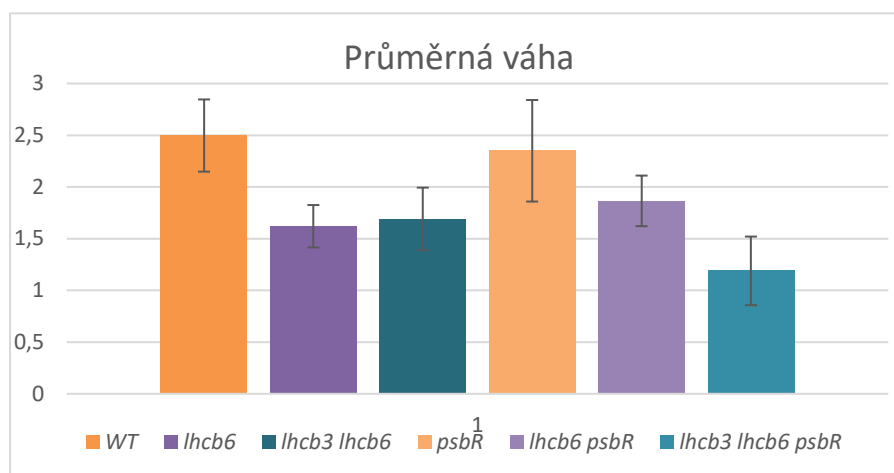
Po selekci dvojitého a trojitého mutanta byla provedena charakterizace pro vyhodnocení vlivu proteinu PsbR u *Arabidopsis thaliana* WT, *kolhcb6*, *kolhcb3 lhcb6*, *kopsbR*, *kolhcb6 psbR* a *kolhcb3 lhcb6 psbR*, která se skládá z fenotypové analýzy, hodnocení fotosyntetické funkce pomocí chlorofylové fluorescence, elektroforetické separace pro strukturální charakterizaci superkomplexů PSII a studie organizace PSII v rámci tylakoidní membrány pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Při charakterizaci fenotypu u *A. thaliana* WT a jednotlivých mutantů (obr. 12) nelze pozorovat výrazné změny mezi jednotlivými genotypy. Jediným projevem, který lze pozorovat je menší vzrůst a velikost listů, který je shodný u knockout mutantů *lhcb3 lhcb6* a *kolhcb3 lhcb6 psbR*. U *kopsbR* nebyly pozorovány žádné změny oproti WT.



Obrázek 13 – Fenotyp *Arabidopsis thaliana* WT a mutantních genotypů (*lhcb6*, *lhcb3 lhcb6*, *psbR*, *lhcb6 psbR*, *lhcb3 lhcb6+psbR*).

Při vážení nadzemní části rostlin (Obr. 14) se potvrdilo, že mutanti se sníženým množstvím světlosběrných antén mají menší hmotnost oproti WT. U trojitého mutantu *lhcb3 lhcb6 psbR* byla hmotnost nadzemní části nejmenší a to 1,19 g. U *psbR* nebyly pozorovány žádné výrazné změny ve váze oproti WT.



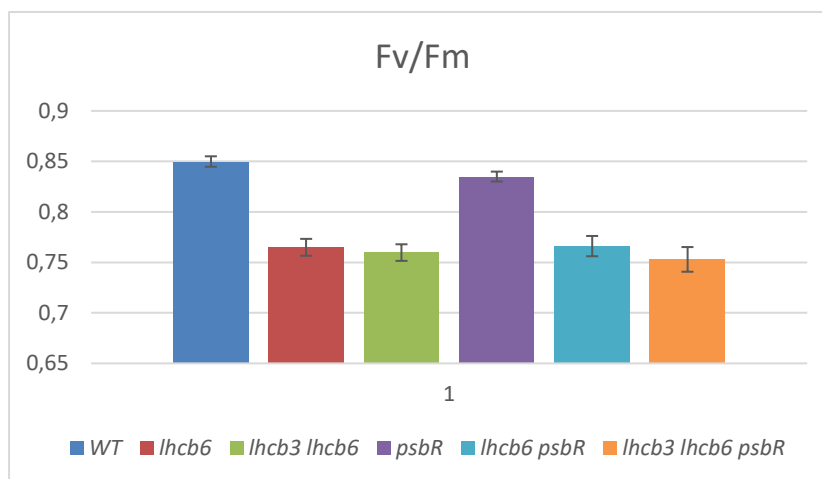
Obrázek 14 - Průměrná váha jedné rostliny *Arabidopsis thaliana* WT a mutantních genotypů. Prezentované hodnoty jsou průměrné hodnoty \pm SD, n = 10.

Analýza funkce fotosyntetického aparátu

Pro zjištění, jestli má absence proteinu PsbR vliv na funkci fotosyntetického aparátu, byla provedena charakteristika fotosyntetické funkce pomocí měření chlorofylové fluorescence u mutantů a WT *A. thaliana*, kde byly vyhodnoceny následující parametry: maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII, NPQ, efektivní kvantový výtěžek, fotochemický kvantový výtěžek a transport elektronů přes PSII a PSI.

A. Maximální kvantový výtěžek

Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (Fv/Fm), který je používán jako indikátor stresu u rostlin (Obr. 15), indukuje, že mutanti se sníženým množstvím světlosběrných antén (Lhcb3 a Lhcb6) mají nižší hodnotu kvantového výtěžku. U WT a *kopsbR* hodnota kvantového výtěžku odpovídala fyziologické hodnotě 0,8. Z naměřených hodnot vyplívá, že absence proteinu PsbR nemá vliv na Fv/Fm.

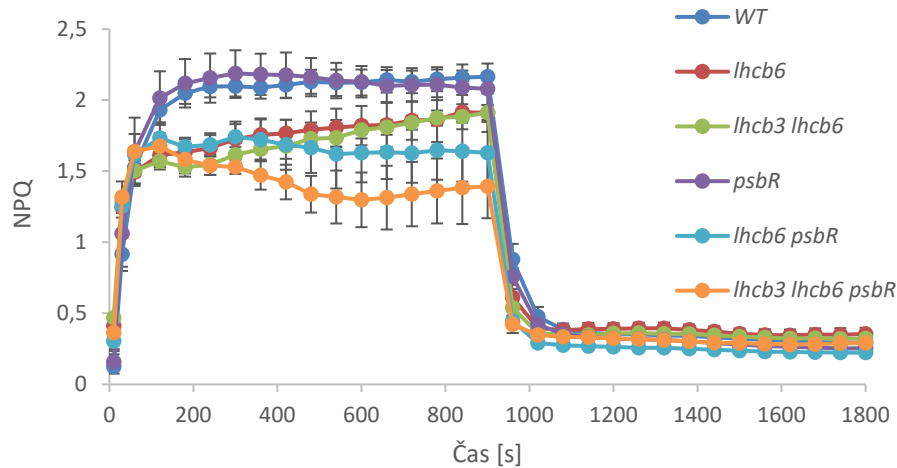


Obrázek 15 – Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (Fv/Fm). Prezentované hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, n = 5.

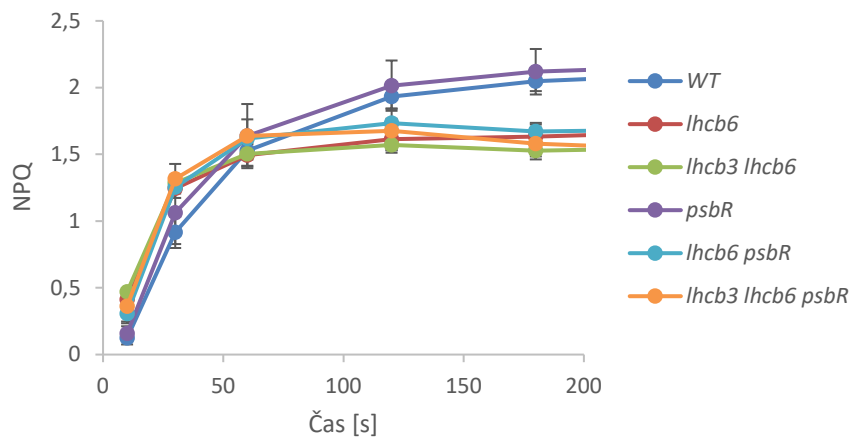
B. Indukce nefotochemického zhášení

Indukce NPQ (obr. 16) u mutantů s absencí světlosběrných antén byla v počátcích měření rychlejší jak u WT (obr. 17), ale poté následoval pomalý nárůst NPQ až do konce měření při zapnutém aktinickém světle. Samotný *psbR* mutant se chová stejně jako WT, ale v kombinaci s *lhcb3 lhcb6* docházelo ke snížení schopnosti indukovat NPQ, která se projevovala mírným poklesem NPQ až do konce měření při aktinickém světle.

Při měření ve tmě docházelo k relaxaci NPQ a naměřené hodnoty jsou u všech testovaných genotypů velmi podobné.



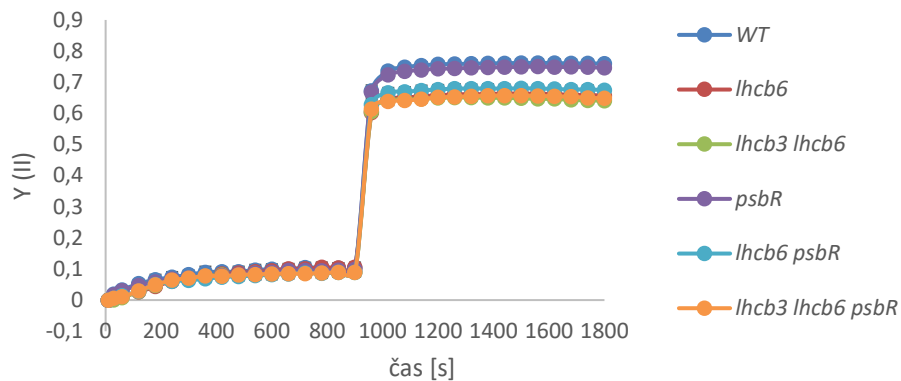
Obrázek 16 – Indukce nefotochemického zhášení u rostlin ve světelné fázi a následná relaxace NPQ ve tmě u jednotlivých variant rostlin, které byly před měřeními adaptovány 30 min na tmu. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, $n = 5$.



Obrázek 17 – Počáteční fáze indukce NPQ v průběhu 200 s po zapnutí aktinického světla. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, $n = 5$.

C. Efektivní kvantový výtěžek PSII – Y (II)

Efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII (Obr. 18), který dává informaci o relativním zastoupení otevřených RC PSII, je u všech testovaných genotypů na počátku měření po zapnutí aktinického světla blízky nule. Během měření na světle je u všech genotypů postupně otevřeno cca 10 %. U zbylých 90% dochází k indukci NPQ. Po vypnutí aktinického světla dochází u WT a *psbR* k otevření cca 80 % RC a u mutantů se sníženým množstvím světlosběrných antén a i v kombinaci s *psbR* je otevřeno cca 65 % RC. U zbylých RC stále přetrvává NPQ. Z hodnot vyplývá, že protein PsbR nemá vliv na množství otevřených RC PSII.

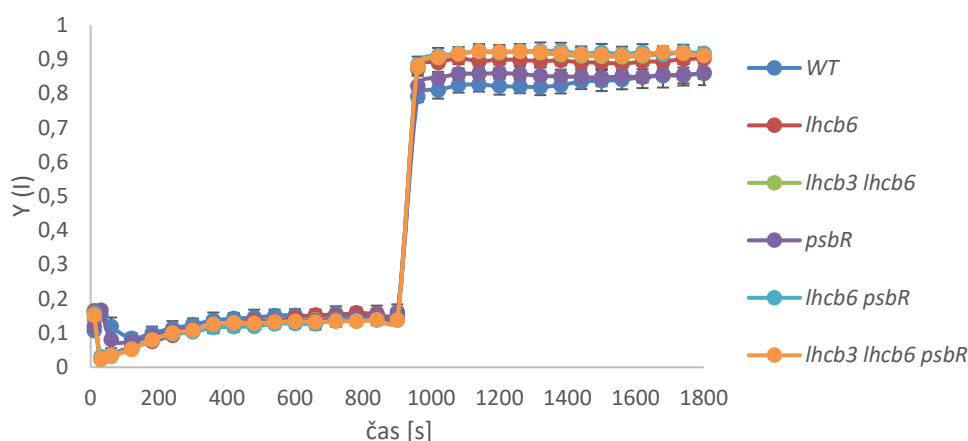


Obrázek 18 – Efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII u rostlin ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu. Prezentované hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, n = 5.

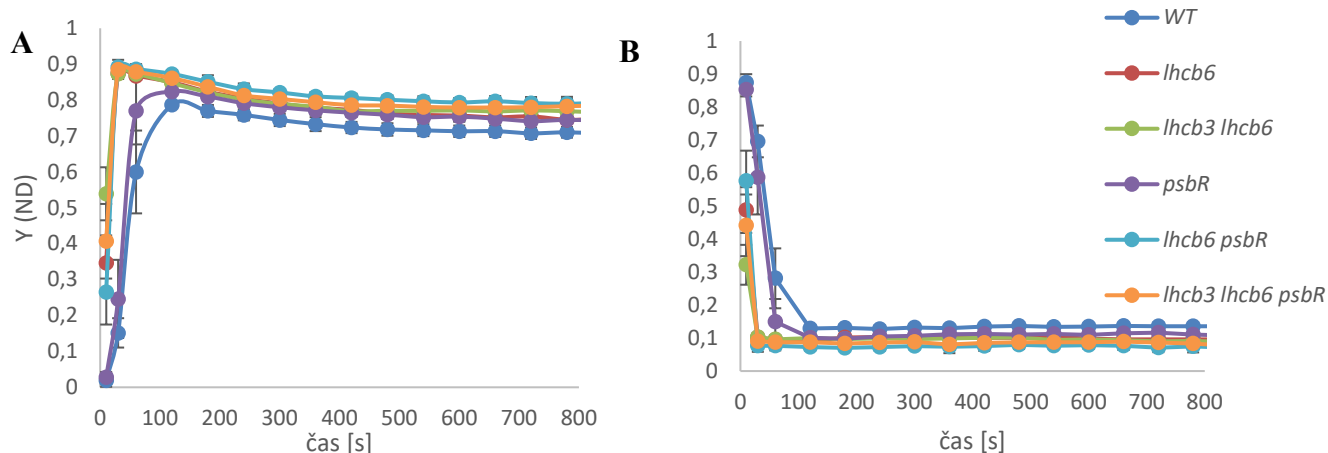
D. Fotochemický kvantový výtěžek PSI – Y (I)

Kvantový výtěžek fotochemie PSI (Obr. 19) hodnotí, kolik RC PSI je oxidovaných a kolik redukovaných, jelikož separace náboje je možná pouze tehdy, pokud jsou RC redukované. U mutantů *lhcb6*, *lhcb3 lhcb6*, *lhcb6 psbR* a *lhcb3 lhcb6 psbR* jsou v počátcích měření hodnoty nejdříve shodné s WT. Následně dochází u těchto mutantů k úplné oxidaci P700, protože hodnota Y (I) se blíží k nulové hodnotě. To je způsobeno nejspíše tím, že dochází k limitaci na donorové straně – Y (ND) (Obr. 20, A), kvůli zpomalení transportu elektronů mezi PSII a PSI. Rychlejší kinetika nárůstu Y(ND) u těchto mutantů může být způsobena tvorbou krystalických domén PSII, které mohou ovlivnit rychlost transportu elektronů mezi PSII a komplexem cyt *b₆f*.

U WT i *psbR* nedochází v počáteční fázi po zapnutí aktinického světla k úplné oxidaci P700. Vyšší míra transportu elektronů přes PSI vede k limitaci na akceptorové straně Y (NA) (Obr. 20, B), která může být způsobena přechodným nedostatkem ferredoxinů.



Obrázek 19 - fotochemický kvantový výtěžek PSI u rostlin ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n = 5.

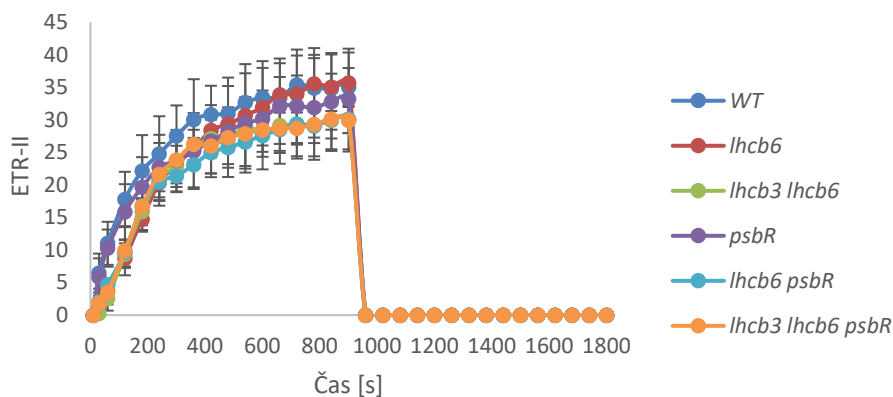


Obrázek 20 – Kvantový výtěžek nefotochemické přeměny energie v PSI v důsledku omezení na donorové (A) a akceptorové (B) straně ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n = 5.

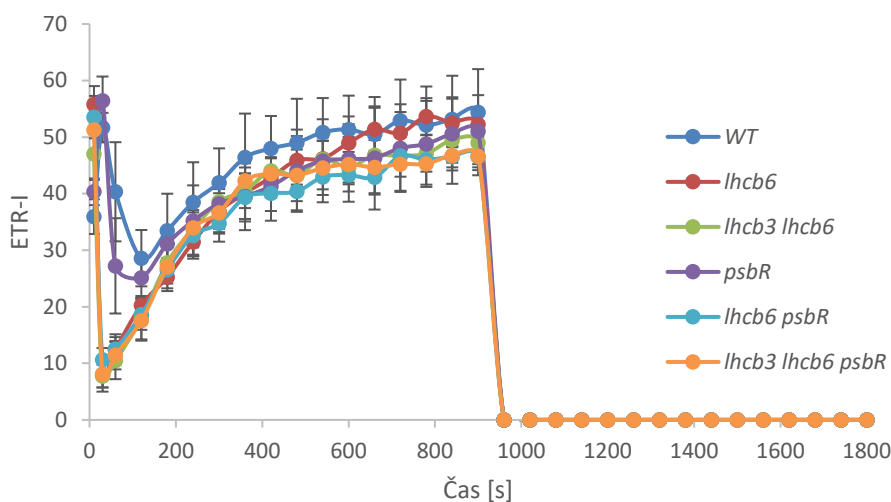
E. Transport elektronů přes PSII – ETR II a PSI – ETR I

Elektronový transport přes PSII (Obr. 21) začíná u všech genotypů postupným nárůstem, ale u mutantů *lhcb6 psbR*, *lhcb3 lhcb6 psbR* a *lhcb3 lhcb6* je tento prvotní nárůst výrazně nižší. To je způsobeno tím, že dochází k limitaci elektronového transportu přes plastochinon. Limitace může být způsobena krystalickým uspořádáním PSII v rámci tylakoidních membrán.

Transport elektronů přes PSI (Obr. 22) je v počáteční fázi po zapnutí aktinického světla výrazně pomalejší u mutantů *lhcb6*, *lhcb3 lhcb6*, *lhcb6 psbR* a *lhcb3 lhcb6 psbR*, což je způsobeno omezeným transportem elektronů z PSII k donorové straně PSI.



Obrázek 21 – Elektronový transport přes PSII ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu. Prezentované hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, n = 5.



Obrázek 22 – Elektronový transport přes PSI ve světelné fázi po 30 min adaptaci na tmu. Prezentované hodnoty jsou vyjádřené jako průměr \pm SD, n = 5.

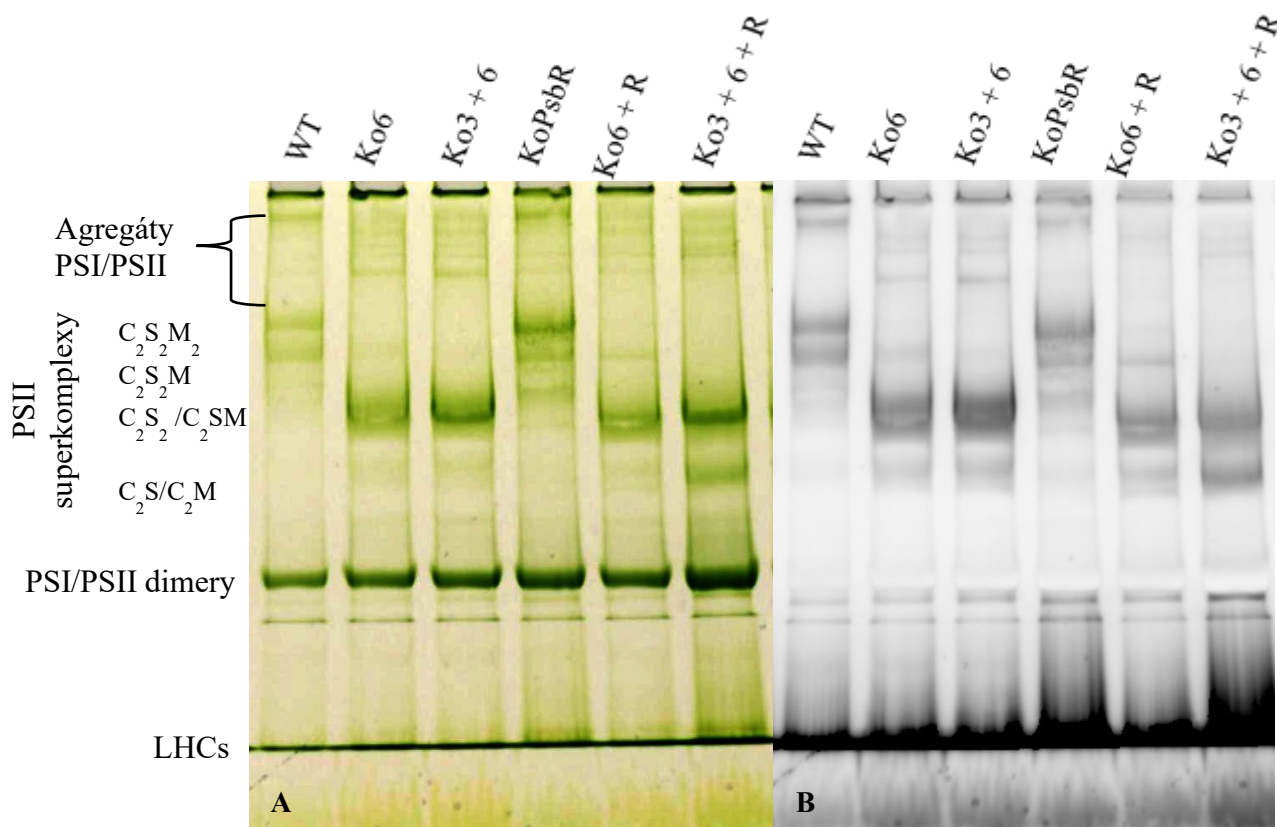
Strukturální charakterizace superkomplexů PSII

Pro analýzu vlivu absence proteinu PsbR u mutantů se sníženým množstvím světlosběrných antén (Lhcb3 a Lhcb6), na strukturu superkomplexů PSII u *Arabidopsis*, byla provedena bezbarvá-nativní elektroforéza (CN-PAGE) (obr. 23), která umožnila oddělit jednotlivé fotosyntetické proteinové komplexy ze solubilizovaných tylakoidních membrán. Analýza byla provedena u rostlin *Arabidopsis thaliana* WT, *lhcb6*, *lhcb3 lhcb6*, *psbR*, *lhcb6 psbR* a *lhcb3 lhcb6 psbR*.

Po separaci superkomplexů PSII, jsou v horní části gelu vidět agregáty PSI/PSII, případně megakomplexy PSII. WT a *psbR* lze pozorovat, že největší zastoupení v rámci tylakoidních membrán mají C₂S₂M₂ a C₂S₂M superkomplexy a minoritně se zde vyskytují i C₂S₂ nebo C₂SM superkomplexy. U *lhcb6*, *lhcb3 lhcb6*, *lhcb6 psbR* a *lhcb3 lhcb6 psbR* jsou nejvíce zastoupeny C₂S₂ nebo C₂SM superkomplexy a dále lze

I pozorovat zastoupení C₂S nebo C₂M superkomplexů PSII, které mají nejvýraznější band u *lhcb3 lhcb6 psbR*. Dále lze na gelu pozorovat výrazné bandy, které značí výskyt PSI/PSII dimerů.

Na základě CN-PAGE lze vyhodnotit, že absence samotného proteinu PsbR a ani v kombinaci s Lhcb6 nemá vliv na strukturu superkomplexů PSII. Pouze u varianty *lhcb3 lhcb6 psbR* je pozorováno větší C₂S/C₂M oproti variantě *lhcb3 lhcb6* je pozorováno větší množství forem C₂S/C₂M oproti variantě *lhcb3 lhcb6*.



Obrázek 23 – Separace a strukturní charakterizace superkomplexů PSII u WT (wild type) a mutantních rostlin - *lhcb6* (ko6), *lhcb3 lhcb6* (ko3 + 6), *psbR* (KoPsbR), *lhcb6 psbR* (Ko6 + R), *lhcb3 lhcb6 psbR* (Ko3 + 6 + R). Formy separovaných superkomplexů PSII se skládají z dimerního jádra (C₂) a z jedné nebo dvou kopií silně (S) nebo středně (M) vázajících se světlosběrných trimerů. A – kolorimetrická analýza gelu, B – fluorescenční analýza při 460 nm pro identifikaci superkomplexů PSII.

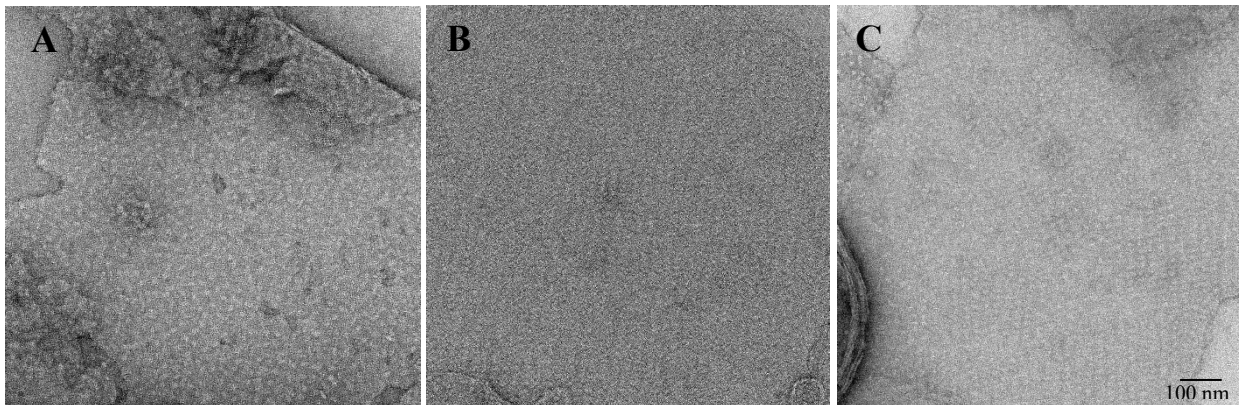
Studium organizace superkomplexů PSII v tylakoidní membráně pomocí transmisní elektronové mikroskopie

Pro studium organizace superkomplexů PSII v rámci tylakoidní membrány bylo provedeno u vybraných genotypů (*psbR*, *lhcb3 lhcb6* a *lhcb3 lhcb6 psbR*) snímkování pomocí EM (obr. 24).

U *psbR* (obr. 24, A) lze pozorovat, že superkomplexy PSII jsou v tylakoidní membráně organizovány z velké části náhodně. U *lhcb3 lhcb6* (obr. 24, B) lze vidět, že

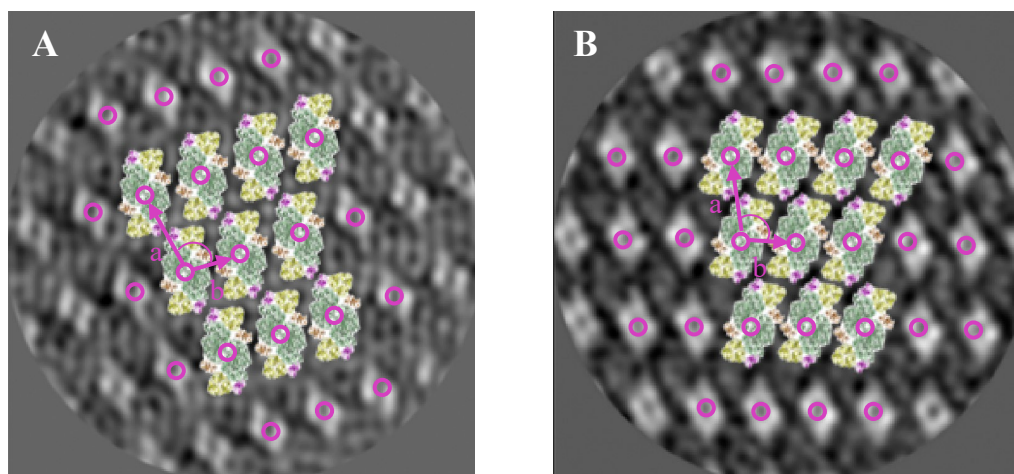
uspořádání superkomplexů PSII je organizováno do krystalické struktury a u *lhcb3 lhcb6 psbR* (obr. 24, C) je taky pozorováno krystalické uspořádání superkomplexů PSII, ale v menší míře, než u *lhcb3 lhcb6*.

Tvorba krystalických oblastí je způsobena kvůli tomu, že absence Lhcb3 a Lhcb6 vede k tvorbě C₂S₂ superkomplexů, které vznikají kvůli absenci M trimeru.



Obrázek 24 - Organizace PSII v rámci tylakoidní membrány u *Arabidopsis thaliana*. Mikroskopický snímek ukazuje náhodné uspořádání PSII u *psbR* (A) a krystalické uspořádání PSII u *lhcb3 lhcb6* (B) a *lhcb3 lhcb6 psbR* (C)., Zvětšení = 67132x.

Jelikož se u *lhcb3 lhcb6* a *lhcb3 lhcb6 psbR* vyskytovaly krystalické oblasti, tak pro vyhodnocení vlivu PsbR na organizaci PSII, byly vypočítány mřížové parametry elementární buňky (Tab. 11). U *lhcb3 lhcb6 psbR* (obr. 25, B) vychází mřížové parametry analyzovaných krystalů $(245 \pm 3) \times (163 \pm 2) \text{ \AA}$ s úhlem $\alpha 99 \pm 0^\circ$. U *lhcb3 lhcb6* (obr. 25, A) vychází mřížové parametry o něco větší $(253 \pm 3) \times (167 \pm 1) \text{ \AA}$ s úhlem $\alpha 98 \pm 1^\circ$, což může naznačovat, že protein PsbR může mít vliv na organizaci superkomplexů PSII v rámci tylakoidních membrán.



Obrázek 25 – Zvětšení krystalického uspořádání PSII v rámci tylakoidní membrány pro vyhodnocení mřížových parametrů u *lhcb3 lhcb6* (A) a *lhcb3 lhcb6 psbR* (B). Elementární buňka je definována parametrem a, parametrem b a úhlem α . Střed y jádra komplexů PSII představují mřížové body (purpurová barva).

Tab. 11 – mřížové parametry C₂S₂ superkomplexů u *Arabidopsis lhcb3 lhcb6* a *lhcb3 lhcb6 psbR*

	a (Å)	b (Å)	α (°)
<i>lhcb3 lhcb6</i>	253 ± 3	167 ± 1	99 ± 0
<i>lhcb3 lhcb6 psbR</i>	245 ± 3	163 ± 2	98 ± 1

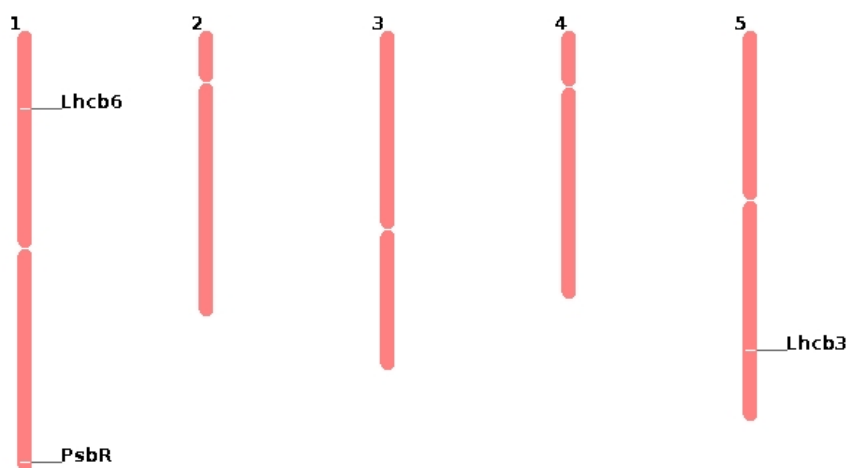
Parametr a a b jsou délky vektorů jednotlivých elementárních buněk, α je úhel mezi vektory a a b. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n = 7; odnoty jsou vyjádřeny v Å, kde 1 nm = 10 Å.

Na základě provedených experimentů, lze usoudit, že protein PsbR může mít vliv na organizaci PSII nebo jejich vzájemnou interakci v rámci tylakoidní membrány.

6 Diskuze

Důvodem přípravy knouckout mutanta *A. thaliana* v genech *lhcb3*, *lhcb6* a *psbR* byla informace, že protein PsbR se preferenčně vyskytuje u rostlin se sníženým množstvím světlosběrných antén. V rámci studie bylo autory dále navrženo, že PsbR zprostředkovává stromální interakci mezi dvěma sousedními superkomplexy fotosystému II a může mít důležitou roli při jejich organizaci (Albanese *et al.*, 2017).

Na přípravu dvojitého mutanta (*lhcb6 psbR*) byla zvolena metoda postupného křížení inzerčních linií *lhcb6* a *psbR*. U trojitého mutanta (*lhcb3 lhcb6 psbR*) byla zvolena metoda, kde se křížily linie *lhcb3 lhcb6* a *lhcb3/+ lhcb6/+ psbR/+* (viz 4.4.1). Důvodem použití těchto metod je ten, protože geny *lhcb6* a *psbR* se vyskytují společně na prvním chromozomu, zatímco gen *lhcb3* se vyskytuje samostatně na pátém chromozomu (Obr. 26). Kvůli tomu, že se dva geny lokalizují společně na jednom chromozomu, tak dochází ke vzniku genové vazby a tím odchází k odchýlkám od genotypových štěpných poměrů formulované Mendelem (viz 3.2.1). Kvůli tomu dochází ke komplikovanější selekci, ale jelikož je vzdálenost mezi geny dostatečně velká, tak dochází ke „crossing-over“ mezi geny a díky tomu lze uskutečnit úspěšnou selekci mutanta.



Obrázek 26 – Rozložení genů zájmu (*Lhcb3*, *Lhcb6* a *PsbR*) na chromozómech *A. thaliana* – chromozómová mapa připravená pomocí aplikace na internetové stránce Arabidopsis (<https://www.arabidopsis.org/>).

Díky takto zvolené strategii se nám podařilo mít už v F2 generaci vyselektované požadované mutanty. Následně se rostliny z F3 generace, které vznikly samoopylením mutanta, použily na fyziologickou charakteristiku fotosyntetické funkce a na izolaci vzorků tylakoidních membrán pro CN-PAGE a TEM.

Při genotypování během PCR amplifikace docházelo při použití primeru LBb1

ke vzniku artefaktů, kde se jednalo o produkty o velikosti přibližně 450 bp. Problémem bylo, že se tento artefakt velikostně překrýval s požadovaným produktem, který vznikal za použití dvojice primerů PsbR RP + LBb1. Tento problém primeru LBb1 byl pozorovaný i jinými skupinami (http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html). Proto pro vyřešení problému byl proveden test primerů LBb1 a LBb1.3 v kombinaci PsbR RP. Z výsledku elektroforetické separace (Obr. 11) plyne, že primer LBb1.3 je pro genotypizaci lepší, protože u něho nedocházelo k tvorbě artefaktů. Jedinou nevýhodou je změna teploty pro PCR amplifikaci (Tab. 7), protože se při genotypování musely využívat dva PCR cyclery.

Při fenotypové charakterizaci rostlin vychází, že hmotnost rostlin WT je v porovnání s *lhcb6* a *lhcb3 lhcb6* vyšší. Tento jev je v souladu s nedávnou prací Ilikova *et al.* (2021). Při absolutním srovnání hmotnosti jednotlivých rostlin s výše uvedenou prací však vychází, že v mém případě byly hmotnosti rostlin vyšší, protože pro experimenty byly použity osm týdnů staré rostliny. U *psbR* nebyly pozorovány výrazné změny velikosti rostliny a ani její váhy při porovnání s WT. Toto zjištění týkající se vizuálního hodnocení je v souladě s prací Allahverdiyeva *et al.* (2013). Výrazný rozdíl v hmotnosti se vyskytnul u *lhcb3 lhcb6 psbR* při porovnání s WT. Tato změna by mohla souviset se sníženou fotosyntetickou funkcí. Důvodem snížení fotosyntetické funkce může být krystalické uspořádání a nestabilita superkomplexů. Pro lepší srovnání s literaturou by bylo třeba srovnat stejně staré rostliny. Při zopakování experimentu by se zároveň ověřil výrazný pokles hmotnosti pozorovaný u *lhcb6 lhcb3 psbR*.

Při hodnocení funkce fotosyntetického aparátu pomocí chlorofylové fluorescence byly časové průběhy všech měřených parametrů u WT, *lhcb6* a *lhcb3 lhcb6* v souladu s prací Ilikova *et al.* (2021). U *psbR* vycházela všechna měření podobně jako u WT, což značí, že samostatný protein PsbR nemá zásadní vliv na funkci fotosyntézy. K podobným závěrům přišli i autoři prací Allahverdiyeva *et al.* (2013) a Podmaniczki *et al.* (2020). V práci Allahverdiyeva *et al.* (2013) dochází u *psbR* ke snížení indukce NPQ, zatímco v této práci se indukce NPQ rovná WT. Tato odchylka mohla být způsobena tím, že autoři pěstovali rostliny při nižší intenzitě světla. U *lhcb6 psbR* a *lhcb3 lhcb6 psbR* ve většině parametrů nebyly pozorovány změny od *lhcb3 lhcb6* a *lhcb6*. Jedinou výraznou změnou bylo snížení schopnosti indukovat NPQ u *lhcb6 lhcb3 psbR*. To mohlo být způsobeno jinou organizací PSII v rámci tylakoidní membrány, proto byla nejdříve provedena strukturální charakterizace superkomplexů PSII u jednotlivých mutantů pomocí nativní elektroforézy a poté následovala analýza

tylakoidních membrán pomocí TEM.

Při strukturální charakterizaci pomocí CN-PAGE vycházel výsledek separace pro WT, *lhcb6* a *lhcb3 lhcb6* obdobně jako v práci Ilikova *et al.* (2021). U *psbR* vychází výsledek separace velmi podobně jak u WT, kde nejvíce zastoupenými PSII superkomplexy jsou C₂S₂M₂ a C₂S₂M. Na základě předešlé studie Allahverdiyeva *et al.* (2013), která usuzuje, že *psbR* se výrazně neliší od WT, lze usoudit, že i v zastoupení superkomplexů PSII v rámci tylakoidní membrány se nebudou výrazně lišit. Zastoupení PSII C₂S₂ superkomplexů u *ko6+psbR* se výrazně neliší od *lhcb6* nebo *lhcb3 lhcb6*, ale v kombinaci *lhcb3 lhcb6 psbR* dochází ke zvýšenému výskytu C₂S/C₂M. Dále lze pozorovat u *lhcb3 lhcb6 psbR* zvýšený počet LHCB proteinů. To koresponduje s hodnotou poměru chl *a/b* (Tab. 12), který byl stanoven během měření koncentrace chl *a+b* u vyzolovaných tylakoidních membrán. Nejmenší poměr 2,58 byl naměřen u *lhcb3 lhcb6 psbR*, což by mohlo značit zvýšený obsah chl *b* a tudíž i relativní nárůst LHCB proteinů, ale pro přesnější výsledky by bylo potřeba provést více měření, jelikož výsledky jsou pouze orientační.

Tab. 12 – Poměr chlorofylu *a/b* v jednotlivých genotypech

	Chl <i>a/b</i>
WT	2,94
<i>lhcb6</i>	2,92
<i>lhcb3 lhcb6</i>	2,89
<i>psbR</i>	2,65
<i>lhcb6 psbR</i>	2,83
<i>lhcb3 lhcb6 psbR</i>	2,58

Poznámka: Hodnoty byly měřeny v rámci izolace tylakoidních membrán, n = 1

Studium organizace superkomplexů PSII v tylakoidní membráně pomocí TEM bylo provedeno u *psbR*, kde organizace PSII v rámci tylakoidní membrány byla ve většině oblastech náhodná. Tato organizace se na základě výsledku CN-PAGE dala očekávat, jelikož vyšla obdobně jak u WT, u kterého je náhodné uspořádání PSII ve většině oblastí v rámci tylakoidní membrány typické (Iliková *et al.*, 2021). U *lhcb3 lhcb6* bylo pozorováno krystalické uspořádání PSII superkomplexů, což je v souladu s prací Ilikova *et al.* (2021). Jedinou odlišností byla vyšší hodnota mřížového parametru *a*, která mi vyšla 253 ± 3 Å. Zbývající hodnoty mřížových parametrů (*b* a úhel α) byly v souladu

s prací Ilikova *et al.* (2021). Pro posouzení správnosti měření by bylo potřeba udělat více měření. U *lhcb3 lhcb6 psbR* byl výskyt krystalického uspořádání PSII v rámci tylakoidních membrán s porovnáním *lhcb3 lhcb6* menší, což lze přisoudit zvýšenému výskytu superkomplexů C₂S/C₂M (Obr. 23), které tvoří krystalické oblasti.

V práci Ilikova *et al.* (2021), byla u *lhcb3 lhcb6* pozorována specifická interakce PSII v sousedních tylakoidních membrán, která vedla k vytvoření tzv. kobercového motivu pozorovatelného přímo v mikroskopických snímcích. Tento motiv nebyl pozorován u *lhcb3 lhcb6 psbR*, kde bylo vyhodnoceno přes 60 snímků z EM. Z toho lze usoudit, že absence proteinu PsbR by mohla mít vliv na interakci mezi sousedními PSII. Při porovnání mřížových parametrů (Tab. 12), lze pozorovat, že velikost elementární buňky pro *lhcb3 lhcb6 psbR* je o něco menší, než u *lhcb3 lhcb6*. Pro potvrzení těchto tvrzení by bylo potřeba provést důkladnější analýzu více snímků.

7 Závěr:

V rámci bakalářské práce jsem se v teoretické části věnovala v první části *Arabidopsis thaliana* jako modelovému organismu a jeho využití při studiu knockout mutantů a v druhé části jsem se zabývala základní funkcí fotosyntézy se zaměřením na organizaci PSII a jeho uspořádání v rámci tylakoidní membrány.

Cílem experimentální části bylo prostudovat vliv proteinu PsbR na funkci fotosyntetického aparátu a organizaci PSII v rámci tylakoidní membrány s využitím dvojitého (*lhcb6 psbR*) a trojitého (*lhcb3 lhcb6 psbR*) mutanta *Arabidopsis thaliana*, připravených v rámci této práce.

Při základní charakterizaci funkce fotosyntetického aparátu se ve většině parametrech *ko3+6+psbR* shodoval s *kolhcb3+lhcb6*. Jediným významným rozdílem je snížená indukce NPQ u *ko3+6+psbR*, která může být způsobena jinou organizací PSII v rámci tylakoidní membrány. Indiciemi pro vliv absence proteinu PsbR na organizaci PSII v rámci tylakoidní membrány u rostlin se sníženým množstvím světlosběrných antén jsou menší vzrůst rostliny ($m = 1,19 \pm 0,33$ g), menší stabilita superkomplexů PSII, kde byl zvýšený výskyt C₂S/C₂M forem a LHCB proteinům, a nižší poměr chl *a/b* = 2,58. Dále kvůli zvýšenému výskytu C₂S/C₂M forem docházelo v rámci tylakoidní membrány ke snížení četnosti krystalického uspořádání PSII a v rámci snímkování EM nebylo pozorováno specifické uspořádání PSII vedoucí k vytvoření tzv. kobercového motivu, které se vyskytuje u *kolhcb3+lhcb6* na úrovni membrán. Dále při porovnání mřížových parametrů vycházelo, že elementární buňka PSII u *ko3+6+psbR* je o něco menší, než u *kolhcb3+lhcb6*.

Tato zjištění naznačují, že by absence proteinu PsbR u rostlin se sníženým množstvím světlosběrných antén mohla mít vliv na strukturu a organizaci PSII v rámci tylakoidní membrány, a že by mohla ovlivňovat interakci PSII v rámci sousedních granálních membrán.

Pro potvrzení vlivu absence proteinu PsbR u rostlin se sníženým množstvím světlosběrných antén by bylo potřeba provést další měření a důkladnější analýzu těchto dat..

8 Zdroje:

Albanese, P., Manfredi, M., Meneghesso, A., Marengo, E., Saracco, G., Barber, J., Morosinotto, T., Pagliano, C. (2016a): Dynamic reorganization of photosystem II supercomplexes in response to variations in light intensities. *Biochim Biophys Acta* 1857: 1651–1660.

Albanese, P., Melero, R., Engel, B.D. et al. (2017): Pea PSII-LHCII supercomplexes form pairs by making connections across the stromal gap. *Sci Rep* 7, 10067: 1-16.

Allahverdiyeva, Y., Suorsa, M., Rossi, F., Pavesi, A., Kater, M. M., Antonacci, A., Tadini, L., Pribil, M., Schneider, A., Wanner, G., Leister, D., Aro, E. M., Barbato, R., Pesaresi, P. (2013): Arabidopsis Plants lacking PsbQ and PsbR subunits of the oxygen-evolving complex show altered PSII super-complex organization and short-term adaptive mechanisms. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 75(4): 671–684

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R. (2003): Genome-Wide insertional mutagenesis of. *Science* 301: 653-657.

Arabidopsis Home Page: <https://www.arabidopsis.org/> (3.5.2022).

Bailey S, Walters RG, Jansson S et al (2001): Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213:794–801

Ballottari M, Dall'Osto L, Morosinotto T et al (2007): Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *J Biol Chem* 282: 8947–8958

Bartlett, J. M. S., Stirling D. (2003) A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*: 226: 3-6.

Betterle N, Ballottari M, Zorzan S et al (2009): Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *J Biol Chem*. 284(22):15255–15266

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.

Brown, T. A. (2007). Klonování genů a analýza DNA. Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika

- Caffarri, S., Kouřil, R., Kerešiče, S., Boekema, E.J., Croce, R. (2009): Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *The EMBO Journal* 28: 3052-3063.
- Dekker, J.P., Boekema, E.J. (2005): Supermolecular organization of the thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta.* 1706: 12–39
- Dragan, A.I., Pavlovic, R., McGivney, J.B. et al. (2012): SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc* 22: 1189–1199
- E.J. Boekema, B. Hankamer, D. Bald, J. Kruip, J. Nield, A.F. Boonstra, J. Barber, M. Rögner (1995): Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 175–179.
- E.J. Boekema, H. van Roon, J.P. Dekker (1998): Specific association of photosystem II and light-harvesting complex II in partially solubilized photosystem II membranes, *FEBS Lett.* 424: 95–99.
- Edwards, A.W.F. (2012): Reginald crundall Punnett: first arthur balfour professor of genetics, Cambridge, 1912. *Genetics* 192: 3-13.
- Gao, J., Wang, H., Yuan, Q., Feng, Y. (2018): Structure and function of the photosystem supercomplexes. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-7.
- Gelvin, S.B. (2009): *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant Physiol.* 150: 1665–1676.
- Gibbs, R.A. (1990): DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 62: 1202–1214.
- Heinz Walz GmbH (2009): Dual-PAM-100 Measuring System. 2nd ed. Heinz Walz GmbH, Eichenring, 87 stran.
- Holland C. K., Jez J. M. (2018): *Arabidopsis*: the original plant chassis organism. *Plant Cell* 10: 1359-1366.
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merio, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11: 263–271.
- 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.
- Järvi S., Suorsa M., Paakkarinen V., Aro E. M. (2011): Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochem. J.* 439: 207-214.

- Joshi, M., Deshpande, J.D. (2011): Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research* 2: 81-97.
- Kirchhoff, H. (2013): Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynth Res.* 116: 481–487.
- Kouřil, R., Dekker, J. P., & Boekema, E. J. (2012): Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(1): 2–12.
- Kouřil, R., Nosek, L., Semchonok, D., Boekema, E.J., Ilík P. (2018): Organization of plant photosystem II and photosystem I supercomplexes. *Subcell Biochem.* 87: 259 - 286.
- Kouřil, R., Wientjes, E., Bultema, J.B., Croce, R., Boekema, E.J. (2013): High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta.* 1827: 411 – 419
- Kovacs, L., Damkjær, J., Kerešiče, 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.
- Kuusisto, P., Chum, P.Y. (2013): Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit: plant genotyping and transgene detection without DNA purification., Thermo Fisher Scientific Inc.:1-3.
- Lane, D., Prentki, P., Chandler, M. (1992): Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiological Reviews* 56: 509-528.
- Meinke D.W., J.M. Cherry, C. Dean, S.D. Rounsley, M. Koornneef (1998): *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282 (5389): 662–682.
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K. (2001): Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125: 1558-1566.
- Murchie, E.H., Lawson, T. (2013): Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64: 3983-3998.
- O'Malley, R.C., Barragan, C.C., Ecker, J.R. (2017): A User's guide to the *Arabidopsis* T-DNA insertional mutant collections, *Methods Mol Biol*: 1284, 323-342.
- O'Malley, R.C., Ecker, J.R. (2010): Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *The Plant Journal* 61: 928-940.
- Padole D. A., Ingle K. P. (2017): *Arabidopsis*-a model plant. *Trends in Biosciences* 10 (2): 557-559.

Podmaniczki, A., Nagy, V., Vidal-Meireles, A., Tóth, D., Patai, R., Kovács, L., & Tóth, S. Z. (2021): Ascorbate inactivates the oxygen-evolving complex in prolonged darkness. *Physiologia plantarum*, 171(2): 232–245.

Radhamony R. N., Prasad A. M., Srinivasan R. (2005): T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology* 8: 82-106.

Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., Weisshaar, B. (2003): An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* 53: 247-259.

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

Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., Goff, S.A. (2002): A High-Throughput *arabidopsis* reverse genetics system. *The Plant Cell* 14: 2985-2994.

Schägger H., Cramer W. A., von Jagow G. (1994): Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane-protein complexes by 2-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217: 220-230.

Schägger H., von Jagow G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231.

SIGNAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory Home Page: http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html (3.5.2022).

Snustad D.P., Simmons M.J., (2017): Genetika. Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika

Stirbet, A., Riznichenko, G.Yu., Rubin, A.B., Govindjee (2014): Modeling chlorophyll a fluorescence transient: Relation to photosynthesis. *Biochemistry (Moscow)* 79: 291-323.

Suorsa, M., Sirpio, S., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Mamedov, F., Styring, S. and Aro, E.M. (2006): PsbR, a missing link in the assembly of the oxygen-evolving complex of plant photosystem II. *J. Biol. Chem.* 281: 145–150.

Wittig I., Karas M., Schägger H. (2007): High resolution clear native electrophoresis for In-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* 6: 1215-1225.

Wittig I., Schägger H. (2009): Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics* 9: 5214-5223.

Wolff, G., & Bárcena, M. (2021): Multiscale electron microscopy for the study of viral replication organelles. *Viruses*, 13(2), 197: 1-17.

Woody, S.T., Austin-Phillips, S., Amasino, R.M., Krysan, P.J. (2007): The WiseDsLox T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *Journal of Plant Research* 120: 157-165.

Ylmaz, M., Ozic, C., Gok, I. (2012): Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. In: *gel electrophoresis - principles and basics*. (Magdeldin, S., ed.), InTech, London: 33-40.