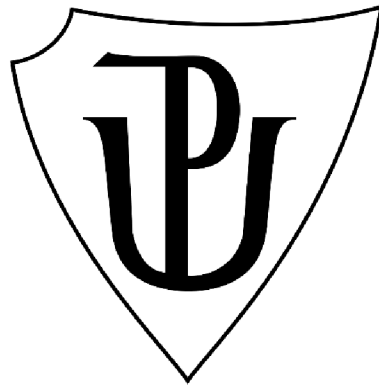


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Prírodovedecká fakulta

Katedra biotechnológií



**Vplyv proteínového zloženia svetlozberných antén  
LHCII na štruktúru superkomplexu fotosystému II v  
*Arabidopsis thaliana*: využitie multiplex CRISPR/Cas9  
editácie genómu**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Autor: **Bc. Gabriela Grofová**  
Študijný program: N0512A130007 Biotechnológie a génové inžinierstvo  
Špecializácia: Biotechnológie a génové inžinierstvo  
Forma štúdia: Prezenčná  
Vedúci práce: **Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.**  
Rok: 2024

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa .....

.....

Podpis študenta



## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Meno a priezvisko autora:	Bc. Gabriela Grofová
Názov práce:	Vplyv proteínového zloženia svetlozberných antén LHCII na štruktúru superkomplexu fotosystému II v <i>Arabidopsis thaliana</i> : využitie multiplex CRISPR/Cas9 editácie genómu
Typ práce:	Diplomová
Pracovisko:	Ústav experimentálnej botaniky AV ČR
Vedúci práce:	Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024

### Abstrakt:

Fotosyntéza patrí medzi najdôležitejšie biochemické procesy v prírode. Vďaka oxygénemu typu fotosyntézy vzniká kyslík a organické látky nevyhnutné pre veľkú časť života na Zemi. V rámci fotosyntetickej dráhy majú nezastupiteľnú úlohu veľké komplexy PSI a PSII. Vďaka elektrónovej mikroskopii boli postupom času získané molekulárne modely PSII, ktoré ukazujú jeho najviac sa vyskytujúcu formu známu ako C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>. V posledných rokoch boli skúmané nahosemenné druhy rastlín z rodov *Picea*, *Pinus* a *Gnetum*, ktoré počas evolúcie stratili LHCB3 a LHCB6 svetlozberné proteíny, a bol odhalený špeciálny typ PSII komplexu z druhu *Picea abies*. Výsledky naznačujú zloženie S-triméru v tomto type PSII superkomplexu iba z proteínu LHCB1.

S cieľom mimikovať špecifické zloženie LHCII svetlozberných antén PSII superkomplexu smreku obyčajného boli v priebehu experimentálnej časti práce pomocou metódy CRISPR-Cas9 vytvorené génové konštrukty cieľiace na všetky izoformy génov *LHCB1* a *LHCB2*. Konštrukt bol použitý na transformáciu rastlín *Arabidopsis thaliana* a bol vyselektovaný homozygotný jedinec obsahujúci „knock-out“ mutácie vo všetkých troch izoformách proteínu LHCB2.

Kľúčové slová:	PS II superkomplex, CRISPR-Cas9, Svetlozberné komplexy, <i>Picea abies</i> , génový „knock-out“
Počet strán:	89
Počet príloh:	0
Jazyk:	Slovenský

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Bc. Gabriela Grofová

Title: The effect of LHCII light harvesting antenna protein composition on PSII supercomplex structure in *Arabidopsis thaliana*: multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing approach

Type of thesis: Diploma

Department: Institute of Experimental Botany AS CR,

Supervisor: Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.

The year of presentation: 2024

### Abstract:

Photosynthesis is one of the most important biochemical processes in nature. Thanks to the oxygenic type of photosynthesis, oxygen and organic substances necessary for a large part of life on Earth are created. Within the photosynthetic pathway, the large PSI and PSII complexes have an irreplaceable role. Thanks to electron microscopy, molecular models of PSII have been obtained over time, showing its most abundant form known as C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>. In recent years, gymnosperm species from the genera *Picea*, *Pinus*, and *Gnetum*, which have lost LHCB3 and LHCB6 light-harvesting proteins during evolution, have been analysed, and a special type of PSII complex from *Picea abies* has been revealed. The results indicate the composition of the S-trimer in this type of PSII supercomplex to be only the LHCB1 protein.

In order to mimic the specific composition of the spruce PSII supercomplex, during the experimental part of this work, gene constructs targeting all isoforms of the *LHCB2* and *LHCB1* genes were created using the CRISPR-Cas9 method. The construct was used to transform *Arabidopsis thaliana* plants and a homozygous individual containing knock-out mutations in all three isoforms of the LHCB2 protein was selected.

Keywords: PS II supercomplex, CRISPR-Cas9, Light-harvesting antenna, *Picea abies*, gene knock-out

Number of pages: 89

Number of appendices: 0

Language: slovak

## CIELE PRÁCE

### TEORETICKÁ ČASŤ

1. Vypracujte prehľad problematiky na predloženú tému.

### PRAKTICKÁ ČASŤ

2. Navrhnete *in silico* gRNA pre „knock-out” všetkých izoformiem majoritných svetlozberných proteínov LHCB1/LHCB2.

3. Naklonujte CRISPR/Cas9 konštrukty pre prípravu mutantov *Arabidopsis thaliana*.

4. Natransformujte rastliny *Arabidopsis thaliana* a pokúste sa vyselektovať niektoré homozygotné rastliny s nefunkčnými génmi LHCB1/LHCB2, ktoré neobsahujú CRISPR/Cas9 kazetu.

5. Získané výsledky diskutujte v kontexte súčasnej literatúry.

## OBSAH

1 ÚVOD.....	1
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	2
2.1 Fotosyntéza a svetlozberné antény.....	2
2.1.1 Ultra-štruktúra chloroplastu.....	4
2.1.2 Štruktúra PSII.....	4
2.1.2.1 LHCB1, LHCB2 a LHCB3 .....	7
2.1.2.2 <i>Picea abies</i> vs. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
2.2 Genetická transformácia rastlín .....	10
2.2.1 Molekulárne klonovanie a technológia rekombinantnej DNA.....	10
2.2.2 Rôzne typy klonovacích stratégií na vloženie DNA inzertu do vektoru .....	12
2.2.2.1 Klonovanie pomocou restričných endonukleáz .....	12
2.2.2.2 Golden Gate klonovanie.....	14
2.2.2.3 Green Gate klonovanie.....	15
2.2.2.4 Gibson Assembly .....	15
2.2.2.5 Gateway klonovanie.....	16
2.2.3 Transformácia rastlín - <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	17
2.2.4 Miesto-špecifické metódy editácie genómu .....	19
2.2.4.1 TALEN .....	20
2.2.4.2 Zinkové prsty .....	21
2.2.4.3 CRISPR-Cas9.....	22
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	27
3.1 Materiál .....	27
3.1.1 Rastlinný a bakteriálny materiál.....	27
3.1.2 Chemikálie.....	27
3.1.2.1 Enzýmy .....	27
3.1.2.2 Golden Gate klonovacie a transformačné vektory .....	28
3.1.2.3 Médiá .....	28
3.1.2.4 Komerčné kity.....	28
3.1.2.5 Oligonukleotidy .....	28
3.1.3 Technický materiál .....	30
3.1.4 Počítačové programy .....	31
3.2 Metódy .....	32
3.2.1 <i>In silico</i> dizajn sgRNA .....	32
3.2.2 Hybridizácia oligonukleotidov .....	33

3.2.3	Príprava Multiplex CRISPR-Cas9 vektorov .....	33
3.2.3.1	Izolácia plazmidov .....	33
3.2.3.2	Klonovanie sgRNA do shuttle vektorov .....	34
3.2.3.3	Klonovanie sgRNA do destinačných vektorov .....	36
3.2.3.4	Transformácia <i>E.coli</i> teplotným šokom .....	36
3.2.3.5	Potvrdenie prítomnosti sgRNA vo vektore – Colony PCR.....	38
3.2.3.6	Sangerovo sekvenovanie destinačných vektorov.....	39
3.2.4	Pestovanie rastlín.....	39
3.2.5	Floral dip .....	39
3.2.5.1	Transformácia <i>A. tumefaciens</i> .....	40
3.2.5.2	Transformácia <i>A. thaliana</i> .....	40
3.2.6	Selekcia transgénnych semien – marker FAST .....	42
3.2.6.1	PCR potvrdenie prítomnosti transgénu .....	42
3.2.7	Selekcia „knock-out“ mutantných rastlín v LHCB2 .....	43
3.2.7.1	Dot blot .....	43
3.2.7.2	Izolácia DNA .....	44
3.2.7.3	Sangerovo sekvenovanie rastlín T1 a T2 generácie.....	45
4	Výsledky .....	47
4.1	<i>in silico</i> dizajn sgRNA .....	47
4.2	Golden Gate klonovanie sgRNA do multiplex CRISPR-Cas9 vektorov .....	47
4.2.1	Klonovanie sgRNA do „shuttle“ vektorov .....	49
4.2.2	Skladanie sgRNA do destinačných vektorov .....	51
4.2.3	Sangerovo sekvenovanie destinačných vektorov .....	53
4.3	Transformácia <i>A. thaliana</i> – Floral dip .....	54
4.3.1	Transformácia <i>A. tumefaciens</i> .....	55
4.4	Selekcia CRISPR-Cas9 mutantných rastlín T1 generácie .....	55
4.4.1	Marker FAST .....	56
4.4.2	Dot Blot .....	56
4.4.3	Sekvenácia Sangerovou metódou.....	58
4.5	Selekcia homozygotných mutantov – T2 generácia.....	63
4.5.1	Marker FAST .....	63
4.5.2	PCR .....	64
4.5.3	Sekvenovanie rastlín T2 generácie.....	65
5	DISKUSIA .....	69
5.1	CRISPR-Cas9 a LHCB proteíny v posledných rokoch.....	69

5.2	Príprava multiplex CRISP-Cas9 vektorov na transformáciu <i>A. thaliana</i> .....	71
5.2.1	pDGE multiplex CRISPR-Cas9 editačný systém.....	71
5.2.2	Dizajn sgRNA 1 a sgRNA 4 .....	72
5.2.3	Golden Gate klonovanie a transformačná úspešnosť .....	74
5.3	Selekcia KO homozygotných rastlín vo všetkých izoformách <i>LHCB2</i> .....	74
5.3.1	Metódy na identifikáciu CRISPR-Cas9 mutácii .....	74
5.3.2	Marker FAST .....	76
5.3.3	Dot blot.....	77
5.3.4	Sekvenácia T1 a T2 generácie .....	78
6	ZÁVER.....	79
7	POUŽITÁ LITERATÚRA .....	81
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....	89

# 1 ÚVOD

Fotosyntéza je základným biochemickým procesom v prírode. Počas fotosyntézy dochádza k zachyteniu energie svetelných kvánt a jej premeny na organické molekuly. Ide o základný proces tvorby biomasy a je nevyhnutný pre život veľkého množstva organizmov. Jedným z typov fotosyntézy je oxygénna fotosyntéza, ktorej vývoj podnietil vznik aeróbnej respirácie a evolúciu života tak, ako ho poznáme dnes. Fotosyntéza prešla počas evolúcie množstvom zmien a fotosyntetické organizmy sa postupne prispôbovali rôznym vonkajším podmienkam.

Dva najdôležitejšie pigment-proteínové komplexy svetelnej fázy fotosyntézy, fotosystém I a II (PSI a PSII), sú zachované naprieč fotosyntetickými druhmi na celej planéte. Oba komplexy sa nachádzajú v bunkách v špecializovaných organelách chloroplastoch a umožňujú zachytávanie svetelnej energie a následný tok excitovaných elektrónov. Fotosystém II je zložený z 2 základných častí – jadra a svetlozberných komplexov. Jadro PSII je vysoko konzervované medzi rôznymi druhmi, avšak posledné výskumy ukazujú na určitý stupeň variability v štruktúre okolitých svetlozberných antén.

V priebehu rokov došlo k postupnému odhaleniu štruktúry PSII pomocou elektrónovej mikroskopie (EM) u niekoľkých druhov vyšších, či nižších rastlín. Najnovší výskum poukázal na nezvyčajnú štruktúru PSII druhu *Picea abies*, ktorá oproti ostatným druhom vyšších rastlín naznačila zmenu v zložení svetlozberných antén (Opatíková *et al.*, 2023).

Na lepšie porozumenie odlišnosti PSII komplexu smreku od ostatných získaných štruktúr bola zvolená stratégia vytvoriť mutanty *Arabidopsis thaliana*, ktorých upravená genetická informácia bude viesť ku zmene zastúpenia proteínov tvoriacich svetlozberné komplexy a umožní mimikovať zloženie PSII u smreku. Za pomoci miesto-špecifickej metódy úpravy genómu CRISPR-Cas9 bol pripravený súbor mutovaných rastlín *Arabidopsis thaliana* s rôznym zložením svetlozberných proteínov.

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

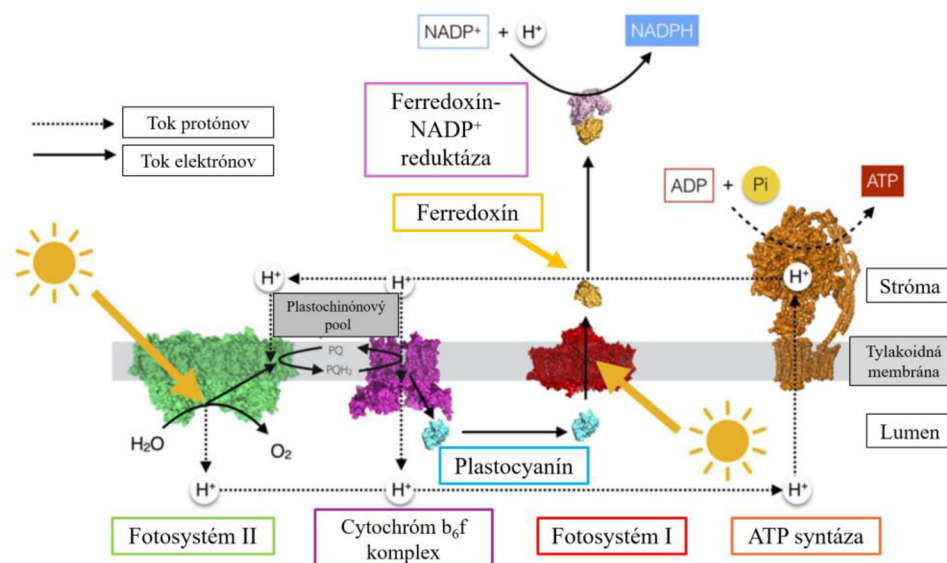
### 2.1 Fotosyntéza a svetlozberné antény

Fotosyntéza je jedným z kľúčových procesov pre veľkú časť života na zemi, pričom vytvára primárne zlúčeniny pre globálny potravinový reťazec. Oxygénna fotosyntéza a kyslík vznikajúci v priebehu jej reakcií, podnietili vývoj aeróbnej respirácie a života na Zemi tak, ako ho poznáme dnes. Rastliny, riasy a sinice majú jedinečnú schopnosť premieňať vodu a oxid uhličitý na organické zlúčeniny za prítomnosti energie zo svetelného žiarenia. Premena svetelnej energie na energiu chemických väzieb je umožnená vďaka množstvu rôznych molekúl. (Johnson, 2016).

Fotosyntetické deje sa dajú rozdeliť na dve fázy v závislosti od potreby svetelného žiarenia. Prvá fáza predstavuje reakcie, pre ktoré je energia dopadajúcich fotónov svetla nevyhnutná. Tieto svetelné reakcie prebiehajú na tylakoidnej membráne chloroplastov. Štruktúra chloroplastov bude podrobnejšie popísaná v nasledujúcej kapitole. Medzi dôležité molekuly pre svetelnú fázu fotosyntézy patria veľké pigment-proteínové komplexy fotosystému I a II, mobilné prenášače elektrónov a rôzne pigmenty (chlorofyl a, b alebo karotenoidy).

Svetelné reakcie začínajú absorpciou fotónov svetlozbernými komplexmi a ich prenosom do reakčného centra fotosystému II. Druhým krokom je excitácia dvoch molekúl chlorofylu a v reakčnom centre a odovzdanie vysoko-energetického elektrónu primárnemu akceptoru plastochinónu. Redukovaný plastochinón následne prenáša elektróny na cytochróm  $b_6f$  komplex a ďalej na plastocyanín. Druhý excitovaný elektrón vzniká v reakčnom centre PSI, ďalej putuje na ferredoxín a následne na finálny akceptor  $\text{NADP}^+$ . Elektróny v reakčnom centre PSII sa dopĺňajú rozkladom vody, v reakčnom centre PSI pomocou redukovaného plastocyanínu. Rozklad molekúl vody prebieha v OEC („oxygen evolving complex“ – kyslík vyvíjajúce centrum), pričom vzniká molekulárny kyslík, elektróny a protóny. Energia získaná v elektrón-transportnom reťazci umožňuje transport  $\text{H}^+$  zo strómy chloroplastu do tylakoidného lumenu. Výsledný protónový gradient je využitý na tvorbu ATP pomocou enzýmu ATP syntázy (Johnson, 2016). Svetelné reakcie a tok protónov a elektrónov počas nich zachytáva schéma na obrázku 1.





Obrázok 1 Tok elektrónov a protónov v rámci svetelnej fázy fotosyntézy. Tok začína rozkladom vody a absorpciou svetelnej energie vo fotosystéme II. Elektróny sú posúvané na plastochinón, ďalej na cytochróm  $b_6f$  komplex a pomocou plastocyanínu na fotosystém I. Vo fotosystéme I dochádza ku druhej absorpcii svetelnej energie a tu získané excitované elektróny sú prenášané na ferredoxín, ktorý je pomocou enzýmu ferredoxín-NADP<sup>+</sup> reductáza oxidovaný a dochádza ku vzniku NADPH. Tokom elektrónov dochádza aj k prenosu H<sup>+</sup> zo strómy chloroplastu do lumen tylakoidu a tento protónový gradient využíva ATP syntáza na tvorbu ATP. Prevzaté (Johnson, 2016) a upravené.

Druhá fáza fotosyntézy je známa ako Calvinov cyklus alebo tmavá fáza. Obsahuje súbor reakcií, pre ktoré nie je svetelná energia nutnosťou. ATP a NADPH syntetizované vo svetelnej fáze sú v Calvinovom cykle využité na redukciu CO<sub>2</sub>. Hlavnou reakciou Calvinovho cyklu je fixácia CO<sub>2</sub> enzýmom Rubisco na 5-uhlíkatý cukor ribulózu-1,5-bisfosfát. Nasleduje rozpad produktu na 2 molekuly 3-fosfoglycerátu a jeho premena na glycerinaldehyd-3-fosfát reakciami rovnakými ako pri obrátenej glykolýze. Glycerinaldehyd-3-fosfát sa ďalej využíva pri tvorbe glukózy. Naviazaním 3 molekúl CO<sub>2</sub> vznikne 6 molekúl glycerinaldehyd-3-fosfátu. V nasledujúcich reakciách pri premene na sacharidy, aminokyseliny alebo lipidy, v závislosti od potreby bunky, sa použije iba jedna. Zvyšných 5 molekúl sa použije na regeneráciu ribulózy-5-fosfátu. Glukóza, ktorá je najznámejším a najdôležitejším produktom fotosyntézy, slúži ako zásobná molekula a v bunke sa uchováva v podobe škrobu. Produktmi Calvinovho cyklu sú okrem organických látok aj ADP, Pi a NADP<sup>+</sup>, ktoré opätovne podliehajú svetelným reakciám (Johnson, 2016).

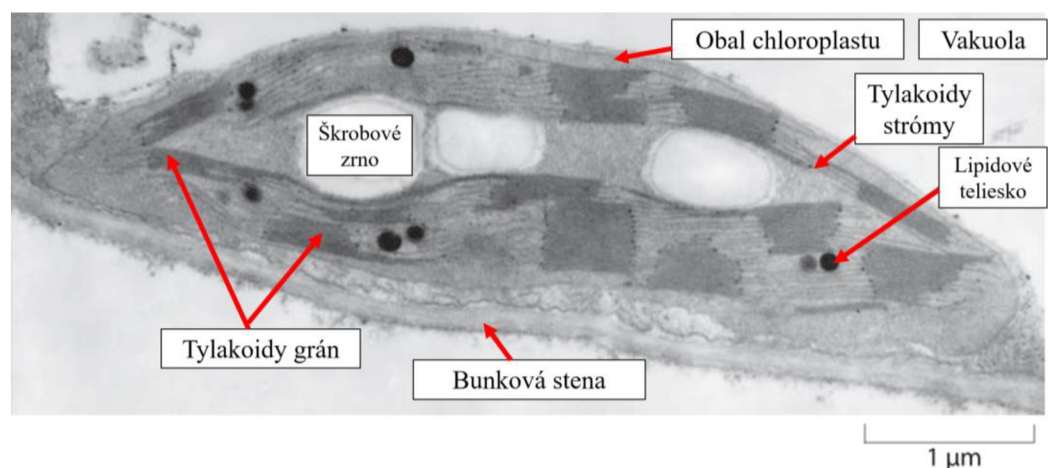
### 2.1.1 Ultra-štruktúra chloroplastu

Fotosyntetická dráha a jej súčasti sa v bunkách rias a vyšších rastlín nachádza v špecializovaných organelách zvaných chloroplasty. Chloroplast obsahuje na povrchu dve bezfarebné membrány, ktoré tvoria jeho obal. Vo vnútri sa nachádza tretia, tylakoidná membrána, obsahujúca komponenty svetelných reakcií. Okolie tylakoidnej membrány vyplňa stróma chloroplastu obsahujúca enzýmy Calvinovho cyklu (Mirkovic *et al.*, 2017).

Tylakoidná membrána v chloroplaste má 2 štrukturálne formy: tylakoidy grán a tylakoidy strómy. Gráná vyzerajú ako ploché disky naukladané stĺpkovito na seba a obsahujú predovšetkým komplexy PSII. Tylakoidy strómy prepájajú gráná ako tenké kanáliky a sú domovom najmä komplexov PSI a ATP syntázy (Ruban & Johnson, 2015). Okrem súčastí dôležitých pre fotosyntézu obsahujú chloroplasty aj vytvorené zásoby škrobu, či lipidové telieska (Obr. 2).

### 2.1.2 Štruktúra PSII

Fotosystém II (PSII) je veľký pigment-proteínový komplex lokalizovaný na tylakoidnej membráne chloroplastu. PSII je zodpovedný za absorpciu svetelného kvanta a za prenos elektrónov na primárny akceptor. Obsahuje kyslík-vyvíjajúce centrum (OEC), ktoré štiepi vodu a dodáva elektróny oxidovanému chlorofylu v reakčnom centre.



Obrázok 2 Fotografia vytvorená za pomoci elektrónového mikroskopu zachytávajúca ultra-štruktúru chloroplastu. Na povrchu chloroplastu sa nachádza jeho obal zložený z vonkajšej a vnútornej membrány. Tylakoidná membrána sa vyskytuje v dvoch formách – tylakoidy grán a tylakoidy strómy. Chloroplasty obsahujú zásobné látky v podobe škrobových zrn a lipidových teliesok. Prevzaté (Alberts *et al.*, 2002 ) a upravené.

Fotosystém II sa vyskytuje ako proteínový superkomplex, ktorý sa skladá z dvoch väčších súčastí – jadrového komplexu a vonkajších svetlozberných antén.

Jadrový komplex má štruktúru homodiméru (C<sub>2</sub>) s charakteristickou dvojitou symetriou. Získané EM štruktúry jadrových komplexov ukazujú vysokú štruktúrálne konzervovanosť a podobnosť medzi eukaryotickými a prokaryotickými fotosyntetickými organizmami.

Každý z monomérov sa skladá z niekoľkých menších súčastí. Ide o štyri hlavné vnútorné podjednotky PsbA (D1), PsbB (CP47), PsbC (CP43) a PsbD (D2). Okolo hlavných podjednotiek sa nachádza niekoľko menších podjednotiek s nízkou molekulovou hmotnosťou. Ide o proteíny PsbE, PsbF, PsbH, PsbI, PsbK-M, PsbTc, PsbTn, PsbW, PsbX a PsbZ, pričom väčšina z nich nemá priamu úlohu vo fotosyntetických reakciách (Nelson & Yocum, 2006; Opatíková *et al.*, 2023).

Ďalšie podjednotky PsbO, PsbQ a PsbP sú dôležité pre rozklad vody a vytváranie O<sub>2</sub>. Posledná podjednotka PsbS sa nachádza iba v eukaryotických fotosyntetických organizmoch a je dôležitá pre nefotochemické zhášanie excitovaného chlorofylu a (Kim *et al.*, 1992). U nahosemenných rastlín a riasy *Chlamydomonas* bola dokázaná prítomnosť aj podjednotky Ycf12 (Shen *et al.*, 2019; Opatíková *et al.*, 2023).

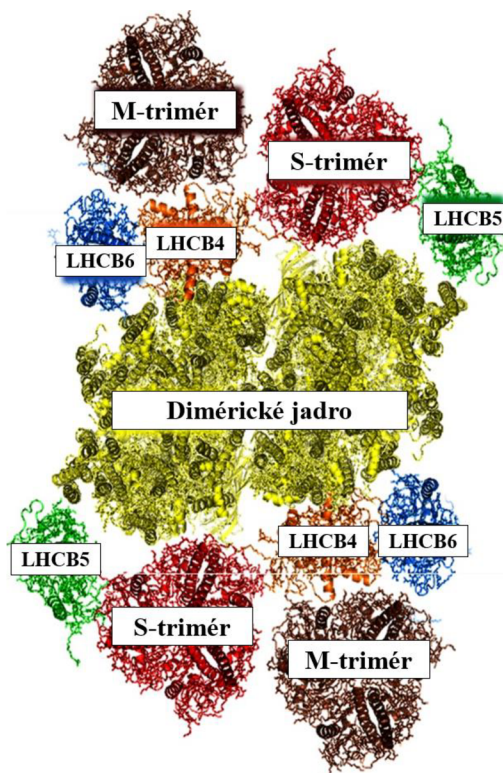
Na proteíny reakčného centra sú pripojené minoritné a majoritné svetlozberné antény. Minoritné svetlozberné antény sú tvorené monomérnymi proteínmi LHCB4 (CP29), LHCB5 (CP26) a LHCB6 (CP24). Minoritné antény sprostredkovávajú väzbu medzi jadrovým komplexom a majoritnými anténami.

Majoritné svetlozberné komplexy sa vyskytujú ako triméry z proteínov LHCB1-3. Existujú 3 typy LHCBII trimérov podľa sily väzby na reakčné centrum – silno naviazané (S), stredne silno naviazané (M) a slabo naviazané (L). Silne naviazané triméry sú zložené z proteínov LHCB1 a LHCB2 a ich väzbu s jadrovým komplexom sprostredkujú monomérne antény LHCB4 a LHCB5. M-triméry sú taktiež zložené z rôzneho pomeru proteínov LHCB1 a LHCB2, avšak obsahujú vždy aj jednu kópiu LHCB3. Ich väzba na reakčné centrum je sprostredkovaná vďaka monomérnym anténam LHCB4 a LHCB6 (Caffarri *et al.*, 2009). L-triméry sú najslabšie naviazané na jadro, vďaka čomu nie sú bežne izolované spolu s PSII-LHCBII superkomplexom. Tieto triméry boli charakterizované ako mobilné triméry v rámci komplexu PSI-LHCI-LHCBII a skladajú sa z proteínov LHCB1 a LHCB2 (Galka *et al.*, 2012). K presunu LHCBII trimérov ku PSI dochádza počas procesu

zvanom stavové prechody, ktorý umožňuje rovnovážnu excitáciu oboch fotosystémov. Rovnováha je dosiahnutá presúvaním LHCII trimérov medzi PSII a PSI v dôsledku rôznej intenzity svetla o rôznych vlnových dĺžkach (Murata, 1969).

Najčastejšie sa vyskytujúci typ PSII superkomplexu u vyšších rastlín je  $C_2S_2M_2$ , ktorý okrem diméru reakčného centra obsahuje dva silne a dva stredne silne naviazané LHCII triméry (Obr. 3) (Kouřil *et al.*, 2018). Okrem  $C_2S_2M_2$  typu PSII superkomplexu bola dokázaná prítomnosť aj iných foriem, avšak vo vyšších rastlinách sú iné formy väčšinou odpoveďou na podnety z vonkajšieho prostredia, napr. vysoká intenzita svetla vedie k redukcii počtu naviazaných M-trimérov a vzniká  $C_2S_2$  komplex (Kouřil *et al.*, 2013). Iná štruktúra PSII superkomplexu vedie k rozdielom v prenose excitačnej energie a má tak výrazný vplyv na celú fotosyntetickú dráhu (Croce & Van Amerongen, 2020).

Úlohou LHCII je zvyšovať počet absorbovaných fotónov. Excitačná energia sa prenáša od periférnych antén do vnútra komplexu a reakčného centra, tzv. konceptom lievika (Kouřil *et al.*, 2011).



Obrázok 3 Model  $C_2S_2M_2$  PSII superkomplexu z *A. thaliana*. Prevzaté (van Amerongen & Croce, 2013) a upravené.

### 2.1.2.1 LHCB1, LHCB2 a LHCB3

U *Arabidopsis* a ostatných vyšších rastlín sú LHCBII triméry tvorené rôznymi kombináciami proteínov LHCB1, LHCB2 a LHCB3. LHCB proteíny sú vysoko homológne jednak v sekvencii medzi sebou, ale aj medzi rôznymi rastlinnými druhmi. Jednotlivé LHCB proteíny v rámci jedného druhu zdieľajú až 50% rovnakej sekvencie aminokyselín. Proteín LHCB1 tvorí najpočetnejšiu izoformu v LHCBII triméroch, pričom pomer jednotlivých izoformiem u *Arabidopsis* bol zistený 7:4:1 (LHCB1:LHCB2:LHCB3) (Crepin & Caffarri, 2018).

V prípade modelovej rastliny *Arabidopsis* je LHCB1 kódovaný piatimi rôznymi génmi, ktoré neobsahujú žiadne intróny. Prvé tri gény sa nachádzajú v zhluku na chromozóme 1 a sú označené ako *LHCB1.1* (AT1G29920), *LHCB1.2* (AT1G29910) a *LHCB1.3* (AT1G29930). Tieto gény dávajú vznik takmer rovnakému finálnemu proteínu. Malé zmeny v sekvencii sa nachádzajú iba v tranzitnom peptide, ktorého úlohou je prenos proteínu do chloroplastu (Leutwiler *et al.*, 1986). Zvyšné dva gény *LHCB1.4* (AT2G34430) a *LHCB1.5* (AT2G34420) tvoria zhluk na chromozóme 2 a kódujú veľmi podobný finálny proteín s rozdielom iba troch aminokyselín oproti génom na chromozóme 1 (McGrath *et al.*, 1992).

LHCB2 proteín má u *Arabidopsis* tri rôzne izoformy, pričom každá obsahuje po jednom intróne. Dva gény sa nachádzajú v zhluku na chromozóme 2 (*LHCB2.1* - AT2G05100; *LHCB2.2* - AT2G05070) a posledný na chromozóme 3 (*LHCB2.3* - AT3G27690) (Jansson, 1999). Podobne ako LHCB1 izoformy, aj LHCB2 zdieľajú vysoký stupeň homológie.

LHCB3 proteín sa mierne líši od LHCB2 a LHCB1. U *Arabidopsis* sa vyskytuje ako jediná izoforma kódovaná génom na chromozóme 5 (AT5G54270) a obsahuje dva intróny. Na rozdiel od LHCB2 a LHCB1 proteín LHCB3 nie je schopný tvoriť homotriméry a vyskytuje sa iba v kombinácii s ostatnými LHCB proteínmi v M-triméroch.

LHCB3 je dôležitý pre sprostredkovanie väzby M-triméru na monoméru LHCB6 anténu a jej prostredníctvom na jadrový komplex. V neprítomnosti LHCB6 dochádza ku strate M-trimérov, čo potvrdzuje dôležitosť tohto monoméru proteínu vo väzbe M-triméru na jadrový komplex (Kovács *et al.*, 2006). Neprítomnosť ako LHCB6, tak aj LHCB3 vedie ku vzniku C<sub>2</sub>S<sub>2</sub> PSII

superkomplexov usporiadaných do semi-kryštalických štruktúr a ku väzbe M-trimérov na jadrový komplex v inej orientácii (Kouřil *et al.*, 2016).

#### **2.1.2.2 *Picea abies* vs. *Arabidopsis thaliana***

V priebehu rokov výskumu boli pomocou elektrónovej mikroskopie odhalené relatívne presné štruktúry superkomplexu PSII. Štruktúra získaná zo špenátu a hrachu potvrdila prítomnosť  $C_2S_2M_2$  superkomplexu ako najzastúpenejšej organizácie PSII a ukázali vysokú konzervovanosť jadra PSII s reakčným centrom medzi fotosyntetizujúcimi druhmi.

V priebehu rokov sa dogma ohľadom heterotrimérnej štruktúry LHCI s svetlozberných antén spôsobu ich väzby na reakčné centrum postupne narúšala. U nahosemenných rodov (*Gnetum*, *Picea*, *Pinus*) bola postupne odhalená nová, neznáma kompozícia PSII-superkomplexu.

Prvým objavom bola neprítomnosť funkčných génov pre LHCB3 a LHCB6 v genóme smreku obyčajného. Tieto proteíny sú významné pri tvorbe štandardných M-trimérov a ich väzbe na jadrové proteíny v rámci komplexu, ako bolo popísané v predošlej kapitole (Kouřil *et al.* 2016). Rody nahosemenných rastlín nie sú populárnym predmetom štúdia, preto analýza ich fotosyntetických vlastností zatiaľ nebola takmer vôbec prevedená.

Na analyzovanie dôsledkov straty LHCB3 a LHCB6 bol vytvorený dvojitý mutant *A. thaliana lhcb3 lhcb6*. Analýzou štruktúry PSII-superkomplexu bolo zistené, že dvojitý mutant *lhcb3 lhcb6* obsahoval iba malé  $C_2S_2$  formy PSII (Ilíkova *et al.*, 2021). Toto zistenie bolo v rozpore s dátami predtým získanými analýzou smreku, kde bola dokázaná prítomnosť väčších štruktúr PSII (Kouřil *et al.*, 2016).

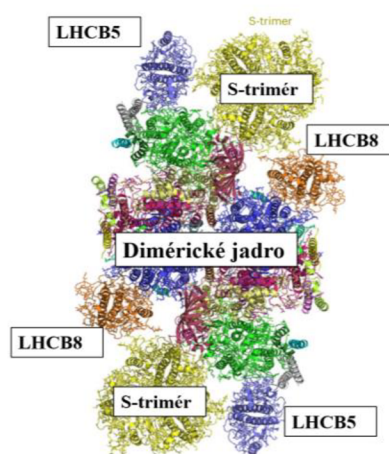
Okrem tejto odlišnosti bolo zistené, že nahosemenné druhy rastlín si zachovali iba jednu izoformu LHCB4 proteínu, konkrétne LHCB4.3 (niekedy nazývaná aj LHCB8). V snahe zistiť, ako dochádza ku väzbe M-trimérov v neprítomnosti LHCB3 a LHCB6 bol pripravený mutant pre všetky izoformy LHCB4 a následne komplementovaný sekvenciou pre LHCB8 zo smreku. Výsledky naznačili, že ani prítomnosť špecifickej formy LHCB8 zo smreku nevedie pri absencii proteínov LHCB3 a LHCB6 u *Arabidopsis* ku štruktúre PSII superkomplexu, ktorá by sa podobala PSII superkomplexu u *Picea abies* (Ilíková, nepublikované výsledky). Ďalším krokom na odhalenie špecifickej štruktúry PSII superkomplexu a jeho vlastností u smreku bolo získanie jeho EM štruktúry. Získaný EM model



(Opatikova *et al.*, 2023) ukazuje prítomnosť menších foriem PSII superkomplexu ( $C_2S_2$ ). Pomocou hmotnostnej spektrometrie bola dokázaná prítomnosť aj M-trimérov, avšak izolovať  $C_2S_2M_2$  formu v dostatočnom množstve na získanie EM štruktúry nebolo možné z dôvodu veľmi slabej väzby M-trimérov na zvyšok komplexu.

Získaná mapa elektrónovej denzity S-trimérov mala nezvyčajne vysoké rozlíšenie, čo naznačuje ich vysokú homogenitu. Vysoké rozlíšenie je spôsobené vďaka snímaniu rovnakých štruktúr a následnému prekryvu jednotlivých snímkov. Heterogénne štruktúry spôsobujú zníženie rozlíšenia, pretože na rôznych snímkach majú odlišné zloženie a po prekryve dochádza ku rozostreniu výsledného obrázku. Homogénne štruktúry majú na každom snímku rovnaké zloženie, vďaka čomu je zachovaná ostrosť aj výsledného obrázku. S-triméry u smreku sú potenciálne tvorené jediným LHCB proteínom, konkrétne LHCB1. PSII obsahuje podobne ako u iných organizmov dimér reakčného centra a naň napojené dva S-triméry prepojené proteínmi LHCB8 a LHCB5 (Obr. 4).

Vďaka získaným poznatkom bolo treba pristúpiť k ďalšiemu experimentu, ktorý by mohol pomôcť odhaliť vznik smrekovej formy PSII-superkomplexu a s ním súvisiace fotosyntetické vlastnosti tohto rozšíreného ihličňanu. Pomocou cielenej mutačnej techniky CRISPR-Cas9 bola snaha u *A. thaliana* mimikovať homotrimérne zloženie LHCB1 a získaného mutanta podrobiť rôznym analýzám. Vytvoreniu CRISPR-Ca9 mutantných rastlín v proteínoch LHCB1 a LHCB2 za použitia WT a jednoduchého mutanta *lhcb3* je venovaná experimentálna časť tejto práce.



Obrázok 4 Štruktúra  $C_2S_2$  PSII-superkomplexu z *Picea abies*. Prevzaté (Opatiková *et al.*, 2023) a upravené.

## 2.2 Genetická transformácia rastlín

Genetická transformácia rastlín patrí medzi najdôležitejšie metódy modernej vedy. Vďaka postupne sa rozvíjajúcemu odvetviu genetiky a biotechnológie bolo získaných nespočetne veľa základných poznatkov o biológii rastlín, čo umožnilo aj ich následné využitie. Príprava odolných a vylepšených transgénnych rastlín sa čím ďalej tým viac dostáva medzi priority v komerčnom poľnohospodárstve. Avšak, mnohé poľnohospodársky významné plodiny sú voči úspešnej transformácii rezistentné a vyvinúť účinný postup je naďalej výzva (Rustgi *et al.*, 2020).

V posledných rokoch sa okrem klasických nešpecifických metód editácie genómu dostávali do popredia aj cielené metódy, ktoré umožňujú presne na konkrétnom mieste upraviť genetickú informáciu v danom organizme. Od svojho objavu získava CRISPR-Cas9 metóda editácie genómu čoraz väčšiu popularitu, najmä vďaka svojej relatívnej presnosti a jednoduchosti. Nasledujúca kapitola je zameraná na najčastejšie používané techniky v génovom inžinierstve a samostatný celok je venovaný spomínanej metóde CRISPR-Cas9.

### 2.2.1 Molekulárne klonovanie a technológia rekombinantnej DNA

Molekulárne klonovanie je súbor techník, ktoré umožňujú namnoženie konkrétnych úsekov genómu na následné použitie vo výskume. Tieto techniky zahŕňajú aj výrobu rekombinantnej DNA a prenos konkrétnych DNA sekvencií z jedného organizmu do iného. Príprava rekombinantnej DNA je možná podľa viacerých stratégií a protokolov, no zakaždým pozostáva z niekoľkých krokov:

#### 1. Príprava cieľovej DNA, izolácia z pôvodného organizmu

- Teoreticky, každý jeden gén z hociktorého organizmu na Zemi sa dá naklonovať. Cieľová DNA musí byť vyizolovaná z pôvodného organizmu a správne upravená tak, aby mohla byť vložená do vektoru a následne použitá na transformáciu cieľového organizmu. Skúmaná DNA sekvencia môže byť vyizolovaná z pôvodného organizmu, získaná na základe mRNA sekvencie alebo syntetizovaná *in vitro*.
- V prvom kroku prípravy rekombinantnej DNA je nutné vkladať sekvenciu upraviť tak, aby bolo možné jej zapojenie do cieľového vektoru. Na úpravu DNA sa využívajú rôzne enzýmy, pričom presný typ závisí od zvolenej klonovacej stratégie a vektorov. Vektor a vkladaná



DNA musia mať kompatibilné presahy na svojich koncoch, aby mohlo dôjsť k ich spojeniu. Následne sa skúmaná molekula namnoží pomocou PCR reakcie a vkladá sa do vektoru pomocou ligačnej reakcie.

## 2. Vloženie cieľovej DNA do vektoru

- Vektor je DNA molekula schopná prenosu cudzej DNA do cieľového organizmu. Vektorov existuje niekoľko typov, pričom najčastejšie sa používajú bakteriálne plazmidy. Okrem plazmidov sa ako vektory môžu použiť rôzne vírusy alebo aj umelé chromozómy. Výber vektoru závisí na veľkosti vkladanej DNA a na hostiteľskom organizme.
- Vektor musí obsahovať niekoľko nevyhnutných sekvencií:
  - Replikačný počiatok (ori) – Ide o sekvenciu, ktorá je rozpoznávaná enzýmami hostiteľskej bunky a umožňuje replikáciu vektorovej DNA molekuly. Ori musí byť funkčný v konkrétnom druhu, v ktorom bude namnoženie cieľovej DNA prebiehať. Väčšinou sa na tento účel používa baktéria *Escherichia coli* vďaka rýchlemu rastu a nenáročným podmienkam na kultiváciu.
  - Selekčný gén – Gén, ktorý umožní odlišiť transformované bunky od netransformovaných a zaručuje stabilitu plazmidu. Pre selekciu bakteriálnych buniek sa väčšinou používajú gény rezistencie voči antibiotikám. Po transformácii sú všetky bunky nanosené na médium obsahujúce dané antibiotikum. Transformované bunky s génom rezistencie prežívajú, netransformované bunky sú antibiotikom usmrtené. Plazmid, najmä taký, ktorý má v jednej bunke niekoľko kópií, je pre samotnú bunku veľká záťaž a v priebehu času sa z generácie na generáciu postupne stráca. Neustálym selekčným tlakom z okolitého prostredia je zaručená stabilná prítomnosť plazmidu vo všetkých bunkách v kultúre.
  - „Multiple-cloning site“ (MCS; početné klonovacie miesto) – Nachádza sa vo vektoroch, ktoré sa používajú na klonovanie za pomoci restričných endonukleáz (RE). Ide o sekvenciu na vektore, ktorá obsahuje niekoľko restričných miest pre rôzne RE. DNA vkladaná do vektoru je ošetrená na koncoch rovnakou RE ako vektor, aby došlo ku vzniku kompatibilných koncov.

- Ďalšie sekvencie potrebné na správne fungovanie vektoru. V expresných vektoroch ide o sekvenciu promótoru, terminátoru, prípadne „UTR“ oblastí. Pri vektoroch slúžiacich na transformáciu dvoch druhov ide o sekvencie ori pre oba hostiteľské druhy, atď.
- Okrem klasických klonovacích stratégií, ktoré využívajú RE boli vyvinuté aj iné, efektívnejšie metódy ako dostať DNA inzert do vektoru. Rôzne typy klonovania sú podrobne popísané v nasledujúcej podkapitole.

### **3. Transformácia cieľového organizmu**

- Transformácia zahŕňa proces, pri ktorom je pripravený vektor s inzertom prenesený do hostiteľského organizmu. Transformačných metód existuje niekoľko, pričom sa mierne líšia vzhľadom na použitý hostiteľský organizmus. U baktérií sa dá použiť transformácia pomocou teplotného šoku alebo elektroporácie. U rastlín je najčastejšie využívaná metóda pomocou *Agrobacterium tumefaciens*, ktoré má prirodzenú schopnosť prenosu génov do rastlinných buniek.

### **4. Selekcia a verifikácia transformovaných organizmov**

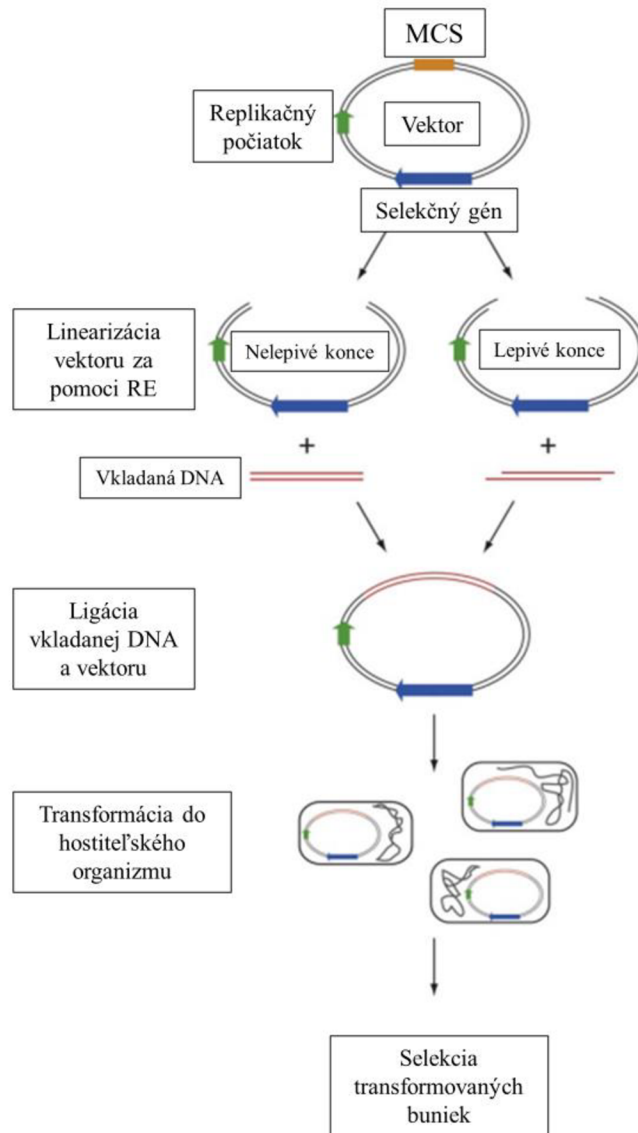
- Po transformácii dochádza ku selekcii transformovaných buniek vďaka selekčnému génu prítomnému vo vektore. Následne sú získané organizmy podrobené testovaniu na prítomnosť neporušeného transgénu a použité na ďalšie experimenty (Obr. 5, Glick *et al.*, 2022).

#### **2.2.2 Rôzne typy klonovacích stratégií na vloženie DNA inzertu do vektoru**

Existuje niekoľko experimentálnych stratégií, ktoré umožňujú vloženie cieľovej DNA sekvencie do vektoru. Ich objav a použitie bolo umožnené na základe získaných poznatkov z molekulárnej biológie, mikrobiológie a enzýmov súvisiacich s existenciou DNA v bunke (Glick *et al.*, 2022).

##### **2.2.2.1 Klonovanie pomocou restriktčných endonukleáz**

Najstarším a najčastejšie využívaným typom klonovania je metóda založená na použití restriktčných endonukleáz. Tieto enzýmy boli objavené štúdiom baktérie *E. coli* a jedným z prvých popísaných bol enzým EcoRI (Glick *et al.* 2022). Restriktčné endonukleázy často rozpoznávajú palindromické DNA sekvencie a



Obrázok 5 Schéma znázorňujúca jednotlivé kroky pri príprave rekombinantnej DNA a jej vloženia do hostiteľskej bunky. V prvom kroku sa vektor obsahujúci „MCS“, počiatok replikácie a selekčný gén podrobí pôsobeniu RE. V závislosti na použítí RE dôjde k linearizácii vektoru za vzniku lepivých alebo nelepivých koncov. Do pripraveného vektoru sa vkladá inzertná DNA a dochádza k ligácii – spojeniu vektoru a inzertu pomocou fosfodiesterovej väzby. Finálny vektor je vložený do hostiteľských buniek a po transformácii dochádza ku selekcii transgénnych organizmov. Prevzaté (Lessard, 2013) a upravené.

špecificky tvoria dvojvláknové zlomy. Vďaka štiepeniu konkrétneho miesta a špecifickej rozpoznávacej sekvencie enzýmu je možné vytvoriť komplementárne konce na skúmanom úseku DNA a na klonovacom vektore. Komplementarita a následné použitie DNA ligázy zabezpečí vloženie skúmaného úseku do klonovacieho vektoru. Existujú 4 typy restričných endonukleáz, avšak v génovom inžinierstve sa využíva takmer neustále iba typ II, pretože ten jediný

štiepi DNA priamo v rozpoznávacom mieste a umožňuje tak presnú tvorbu DNA fragmentov.

Niekedy je možné použiť aj dve rôzne restriktčné endonukleázy. Jeden enzým rozpozná sekvenciu na začiatku skúmanej DNA sekvencie a vytvorí prvý z komplementárnych koncov v transformačnom vektore. Druhý z použitých enzýmov musí byť zvolený tak, aby rozpoznával inú cieľovú sekvenciu. Vytvorí tak koniec klonovaného fragmentu a komplementárny previs nukleotidov na vektore. Vďaka vzniku dvoch rozdielnych komplementárnych úsekov sa zabráni vloženiu fragmentu do vektoru v nesprávnej orientácii, ktorá by mohla zabrániť správne fungovaniu vytváraného konštruktu.

Hlavnými výhodami „tradičného“ klonovania je nízka cena, široké spektrum použiteľných vektorov a relatívna jednoduchosť celej metódy. Nevýhodou metódy je nedostatočná účinnosť ligácie, pokiaľ do reakcie vstupuje niekoľko fragmentov DNA, ktoré majú byť začlenené do spoločného vektoru (Lessard, 2013)

#### **2.2.2.2 Golden Gate klonovanie**

Golden Gate metóda je efektívna metóda na skladanie niekoľkých fragmentov DNA za sebou do spoločného vektoru. Metóda je založená na použití rôznych restriktčných endonukleáz typu IIS („shifted“). RE IIS rozpoznávajú cieľovú sekvenciu, ale štiepia DNA o určitý počet nukleotidov vedľa rozpoznávacieho miesta. Vďaka tomu je možné dizajnovať DNA fragmenty tak, aby na svojich koncoch niesli iné previsy, ale s použitím jediného restriktčného enzýmu.

Výhodou použitia RE typu IIS je nezávislosť DNA sekvencie od miesta, ktoré rozpoznáva enzým a restriktčné miesto bude eliminované po klonovaní. Štiepenie a ligácia môže prebiehať naraz a pri viacerých fragmentoch, pretože majú rozdielne štiepne miesta. Najčastejšie používané enzýmy pri Golden Gate klonovaní sú BsaI a BpiI. Oba enzýmy vytvárajú 4-nukleotidové presahy, ktoré nemusia byť palindromické a neumožnia spájanie rovnakých fragmentov za sebou (Engler *et al.*, 2008).

Poradie a orientácia, ako sa majú jednotlivé fragmenty vkladať do vektoru, je zabezpečené pomocou previsov, ktoré vznikajú po štiepení RE. Rozpoznávacie miesto enzýmu určuje iba miesto, kde bude enzým štiepiť DNA, avšak nie konkrétne nukleotidy. Každý modul a fragment je lemovaný inými prevismi v inej

orientácii od 5' po 3' koniec, vďaka čomu je zaručená správna postupnosť, s akou sa zligujú za sebou vo finálnom konštrukte.

Golden Gate metóda umožňuje vytvárať rôzne moduly, ktoré sú už priamo pripravené na klonovanie a v jednej reakcii je možné pospájať až 24 DNA molekúl (Potapov *et al.*, 2018). Veľkou výhodou je relatívne vysoký výťažok správnych produktov vďaka nekompatibilite rovnakých fragmentov medzi sebou. V reakčnej zmesi sa hromadia iba stabilné výsledné produkty, nestabilné vedľajšie produkty sa premieňajú naspäť na reaktanty

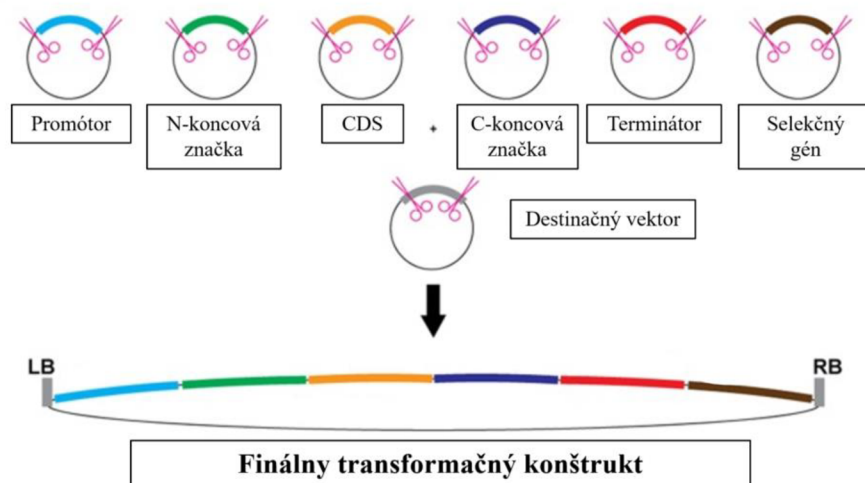
Nevýhoda Golden Gate metódy spočíva najmä v nemožnosti použiť taký DNA fragment, ktorý by obsahoval štiepne miesto pre použité endonukleázy uprostred sekvencie (Engler *et al.*, 2008).

### **2.2.2.3 Green Gate klonovanie**

Green Gate klonovanie vychádza z princípu Golden Gate klonovania. Táto metóda bola vytvorená špeciálne pre rastlinné vektory (Lampropoulos *et al.*, 2013). Green Gate umožňuje za princípu Golden Gate skladania fragmentov rýchlo a efektívne zaklonovať až 6 modulov za sebou do jedného vektoru. Väčšinou ide o hlavné genetické elementy – promótor, N-koncová sekvencia, samotná kódovacia sekvencia skúmaného génu, C-koncová sekvencia, terminátor a selekčný gén. Green Gate klonovací systém je reprezentovaný 6 pUC19 vektormi a jedným pGreen rastlinným destinačným vektorom (Obr. 6). Vďaka tejto technológii predpripravených rastlinných modulov je umožnené jednoduché skladanie niekoľkých vytvorených konštrukov do jedného spoločného vektoru, čím je možné vytvárať multigénne transformačné vektory.

### **2.2.2.4 Gibson Assembly**

Gibson Assembly je špecifická metóda klonovania, ktorá umožňuje spájanie niekoľkých sekvencií DNA. Využíva 3 rôzne enzýmy na úpravu DNA. Ako prvá sa používa T5 exonukleáza, ktorá vytvára jednoreťazcové presahy na DNA od 5' konca. Vzniknuté presahy musia byť komplementárne na molekulách, ktoré sa následne majú spojiť za sebou. Následne dochádza k „annealingu“ komplementárnych koncov. Aktivita DNA polymerázy vyplní prípadné medzery a ligáza obnoví fosfodiesterovú väzbu (Obr. 7). Všetky enzýmy fungujú nezávisle na sebe a všetky reakčné kroky prebiehajú naraz. Spojené DNA sekvencie môžu byť následne vložené priamo do vektorov pomocou presahov na oboch koncoch

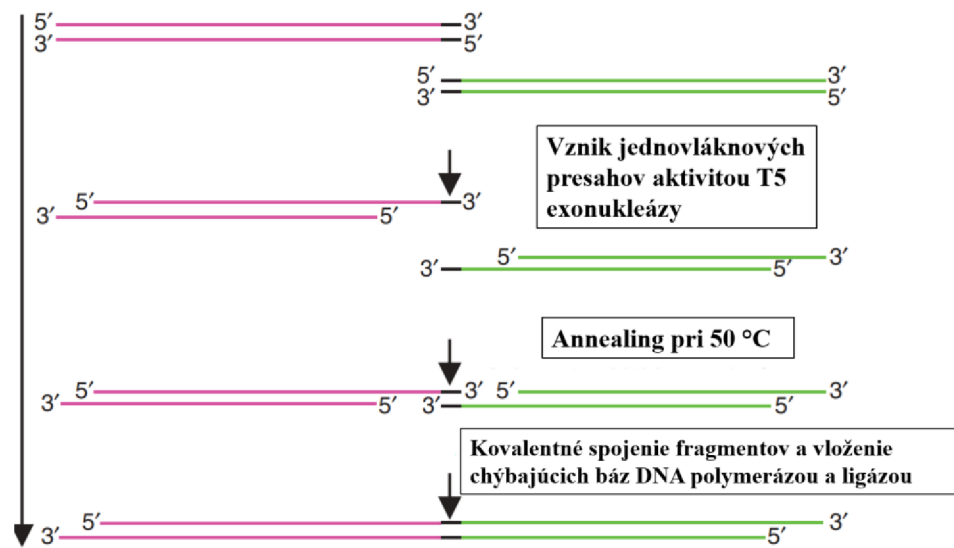


Obrázok 6 Schematické znázornenie Green Gate klonovacieho systému. Green Gate pozostáva zo 6 pUC19 vektorov. 6 vektorov obsahuje sekvencie rastlinného promótoru, N-terminálnu a C-terminálnu značku pre produkciu rekombinantných proteínov, samotnú kódovacia sekvencia génu (CDS) a rastlinný terminátor. Jednotlivé fragmenty nesené vo vektoroch sa princípom Golden Gate metódy spájajú za sebou do destinačného vektora, pričom vzniká finálny transformačný konštrukt so správnym usporiadaním jednotlivých modulov. Destinačný vektor obsahuje ľavé (LB) a pravé (RB) ohraničenie z Ti-plazmidu, aby bol konštrukt priamo pripravený na transformáciu rastlín pomocou *A. tumefaciens*. Fialové nožnice na schéme znázorňujú rozpoznávacie miesta pre RE BsaI. Prevzaté (Lampropoulos *et al.*, 2013) a upravené.

komplementárnych s presahmi vo vektore a použité na transformáciu hostiteľských buniek (Gibson *et al.*, 2009).

### 2.2.2.5 Gateway klonovanie

Metóda Gateway klonovania je založená na schopnosti špecifickej rekombinácie bakteriofága  $\lambda$ . Fág sa dokáže s vysokou presnosťou integrovať do genómu hostiteľskej bunky *E. coli* a taktiež sa z genómu vyštiepiť. Rekombinácia je umožnená vďaka prítomnosti špeciálnych sekvencií na DNA fága (attP) a *E. coli* (attB). Skúmaná DNA sa ohraničí attB sekvenciami a za pomoci rekombinačných enzýmov získaných z bakteriofága dochádza ku špecifickej rekombinácii s „entry“ vektorom obsahujúcim attP miesta. Úspešnou reakciou vznikajú attL sekvencie vo vektore, ktoré ohraničujú fragment a vďaka nim je možné fragment opätovne vyštiepiť a rekombinovať s attR sekvenciami na destinačnom vektore (Obr. 8, Hartley *et al.*, 2000; Reece-Hoyes & Walhout, 2018).

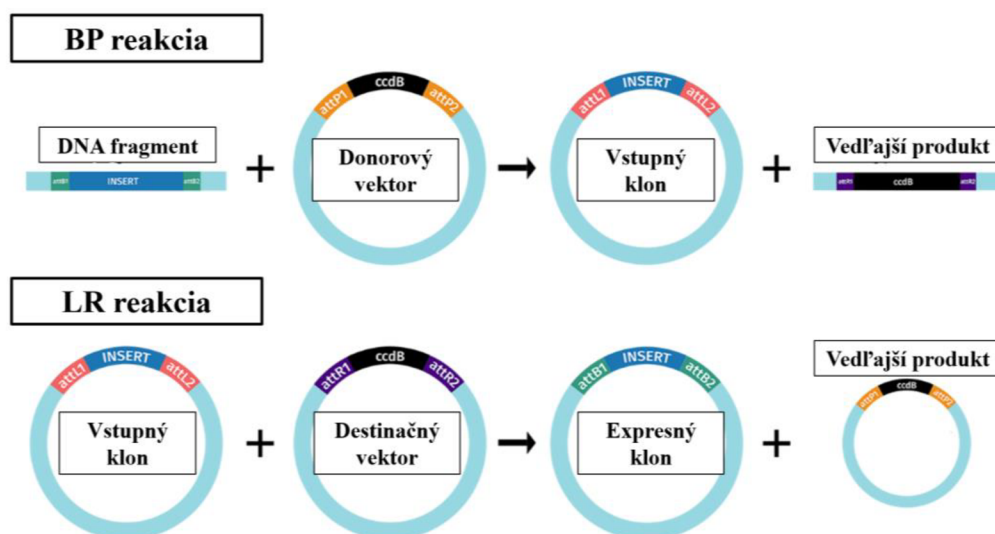


Obrázok 7 Schematické znázornenie skladania dlhších DNA fragmentov za sebou behom jednej reakcie. Dva rôzne fragmenty majú na koncoch rovnaké sekvencie (znázornené čiernou). Aktivitou T5 exonukleázy dochádza ku vzniku jednovláknových presahov, ktoré sú komplementárne medzi molekulami. Nasleduje „annealing“ – komplementárne zapadnutie jedného presahu do druhého pri 50 °C. Teplota inaktivuje T5 exonukleázu. Na záver DNA polymeráza a ligáza kovalentne spoja fragmenty a doplnia chýbajúce nukleotidy. Prevzaté (Gibson *et al.*, 2009) a upravené.

Gateway technológia nezávisí na RE, preto je možnú ju použiť aj v prípade DNA sekvencií obsahujúcich štiepne miesta pre RE uprostred. Na Gateway reakcie sa využívajú rovnaké sady enzýmov (špecifická sada pre BP a špecifická pre LR reakciu), preto je možné metódu relatívne jednoducho štandardizovať a používať vo veľkom. Všetky Gateway vektory obsahujú selekčnú kazetu s *ccdB* génom a génom rezistencie na antibiotikum. *ccdB* gén pôsobí letálne pre bežne používané kmene *E. coli* a umožňujú selekciu transformovaných buniek. Pri vložení inzertu do vektoru dochádza ku strate *ccdB* génu, čím je umožnený rast baktérií na médiu s príslušným antibiotikom (Bernard & Couturier 1992; Miki *et al.*, 1992).

### 2.2.3 Transformácia rastlín - *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* je prirodzene sa vyskytujúca pôdna baktéria z čeľade *Rhizobiaceae*. V prirodzených podmienkach ide o genetického parazita, ktorý sa vyznačuje výskytom Ti-plazmidu. Ide o relatívne veľký plazmid obsahujúci niekoľko funkčných oblastí. Ti-plazmid zaručuje infekčnosť daného kmeňa baktérie a schopnosť indukovať rast nádorov a syntézu biologicky významných látok pre *A. tumefaciens* rastlinnými bunkami.



Obrázok 8 Schematické znázornenie BP a LR reakcií Gateway klonovania. Pri BP reakcii je skúmaný DNA fragment lemovaný attB rekombinačnými miestami a dochádza k jeho vloženiu do donorového vektoru v attP miestach. Vzniká vstupný klon (z anj. „entry clone“) a vedľajší produkt obsahujúci *ccdB* gén. V druhom kroku dochádza k rekombinácii medzi vzniknutými attL miestami na vstupnom klone s attR miestami destinačného vektoru. Výsledkom reakcie je expresný klon (z anj. Expression clone) a vedľajší produkt s *ccdB* génom. Prevzaté (Gateway Cloning Technique: An overview of Thermo Fisher's Gateway Cloning technique and how to simulate the Gateway reaction in SnapGene.)a upravené.

Časť Ti-plazmidu nazývaná T-DNA obsahuje niekoľko génov pre syntézu opínov a rastlinných hormónov. Typicky obsahuje T-DNA 3 regióny. TL (ľavý), kde sa nachádzajú gény pre syntézu auxínu, cytokinínov a oktopínu. TC (stredný) región neobsahuje významné gény. TR (pravý) región obsahuje zvyšné gény pre tvorby opínov mannopínu a agropínu. T-DNA je ohraničená pravou a ľavou hraničnou sekvenciou, ktorá je rozpoznávaná vir proteínmi a umožňuje integráciu do rastlinného genómu. V génovom inžinierstve sa práve T-DNA región nahrádza skúmanými génmi. Pomocou modifikovaných Ti-plazmidov dochádza prirodzenou cestou ku genetickej úprave rastlinných buniek a vzniku želaných jedincov (Gelvin, 2003).

Druhou významnou časťou Ti-plazmidu je virulentná oblasť obsahujúca vir gény. Vir gény kódujú rôzne vir proteíny, ktoré priamo zodpovedajú za virulenciu baktérie a samotnú infekciu a prenos DNA do rastlinného genómu. Proteín vir A funguje ako periplazmatická anténa, ktorá rozpoznáva fenolické zlúčeniny vylučované poškodenými rastlinnými bunkami. Po aktivácii fosforyluje vir G proteín, ktorý napomáha transkripcii ostatných vir génov. Proteín vir D4 spolu



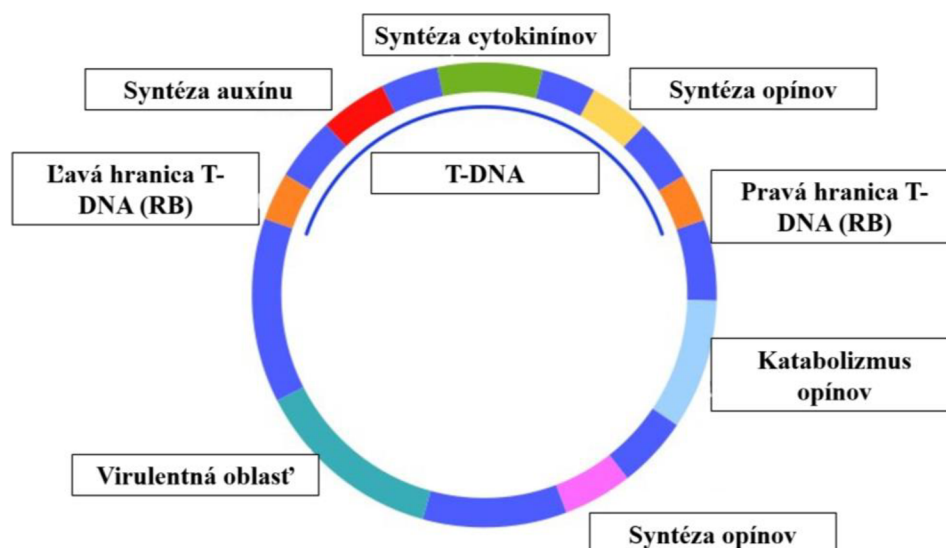
s 11 vir B proteínmi tvoria sekrečný systém typu IV a umožňujú samotný transport T-DNA spolu s niekoľkými ďalšími vir proteínmi. Vir D1 a D2 vyštepujú T-DNA sekvenciu z plazmidu a vir D2 spolu s virE2 sa prenášajú naviazané na T-DNA do rastlinnej bunky. Vir E obsahuje jadrový lokalizačný signál a bola naznačená jeho úloha v ochrane T-DNA pred nukleázami v cytoplazme rastlinných buniek (Gelvin, 2003). Zjednodušená schéma Ti plazmidu je zobrazená na obr. 9.

Transformácia pomocou *A. tumefaciens* je asi najpoužívanejšou metódou na transformáciu dvojklíčnolistových rastlín. Jednoklíčnolistové rastliny sú ťažko infikovateľné štandardnými kmeňmi, pričom úspešne sa dajú transformovať iba niektoré genotypy jednoklíčnolistových druhov (Hofmann, 2016).

#### 2.2.4 Miesto-špecifické metódy editácie genómu

Vytváranie mutácií v genómoch rôznych organizmov bolo donedávna umožnené iba pomocou náhodných metód. Za použitia chemických, biologických či fyzikálnych mutagénov dochádzalo k tvorbe náhodných mutácií, ktorých skúmanie prispelo k odhaleniu mnohých biologických procesov. Postupom času došlo k objavu techník, ktoré umožňujú zmenu v štruktúre DNA na konkrétnom želanom mieste. Techniky na editáciu genómu spôsobujú dvojité zlomy na vlákne DNA.

Zlomy na DNA sú dôsledkom pôsobenia sekvenčne špecifických nukleáz a neskôr sú opravené bunecnými reparačnými mechanizmami. Prvou možnosťou



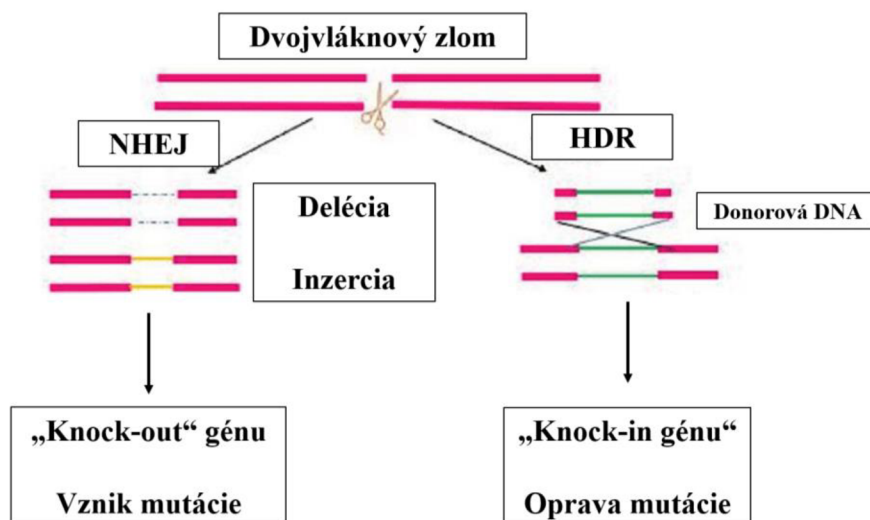
Obrázok 9 Mapa Ti plazmidu s vyznačením dôležitých oblastí. Prevzaté (Ti-plasmid: Features, Diagram and Uses) a upravené.

opravy je NHEJ (non-homologous end joining), kedy dochádza „natvrdo“ k spojeniu DNA koncov v rámci zlomu. NHEJ mechanizmus nie je presný a počas opravy dochádza k inzerciam alebo deléciám nukleotidov. Druhým, presnejším mechanizmom je HDR (homology-directed repair). HDR využíva vlákno na sesterskom chromozóme, ktoré slúži ako predloha na opravu poškodeného miesta. Pokiaľ sa do bunky vloží umelo fragment s rovnakou sekvenciou, ako miesto, kde došlo ku zlomu, môže byť umelý fragment použitý podobne ako templát. Vďaka HDR dochádza ku substitúciám a „knock-in“ génov v poškodenom mieste (Obr. 10; Symington & Gautier, 2011).

V súčasnosti sa využívajú 3 technológie založené na sekvenčne špecifických nukleázach: „zinkové prsty“ (ZFN); TALEN a CRISPR asociovaný proteín Cas 9.

#### 2.2.4.1 TALEN

Editačná technológia TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) je založená na proteínoch TALE, ktoré sú spojené s nukleázovou doménou. TALE boli objavené u rastlinných patogénnych baktérii rodu *Xanthomonas*. Tieto efektorové proteíny vylučujú baktérie do infikovaných rastlinných buniek pomo-



Obrázok 10 Schematické zobrazenie dvoch najčastejších reparačných mechanizmov v bunke pri oprave dvojvláknových zlomov na DNA. Nehomologické spájanie koncov (NHEJ) spôsobuje priame spojenie DNA vlákna v bode zlomu. Pri oprave dochádza ku strate bázy alebo ich doplnení navyše, pričom vznikajú inzercie alebo delécie. Výsledkom NHEJ môže byť „knock-out“ génu v mieste zlomu. Homologická rekombinácia (HDR) využíva na opravu dvojvláknového zlomu homologickú sekvenciu DNA, napr. na sesterskom chromozóme. Pri vložení umelej homológnej DNA sekvencie môže dôjsť ku vložení fragmentu do chromozómu v mieste zlomu („knock-in“) a oprave pôvodnej mutácie. Prevzaté ( Xu *et al.*, 2020) a upravené.

cou sekrečného systému typu III (Boch J & Bonas, 2010). TAL efekторы sú schopné viazať sa na DNA v prirodzených podmienkach slúžia na zmenu regulácie transkripcie niektorých génov. Ide buď o gény, ktoré umožňujú lepšiu virulenciu patogéna, alebo presne naopak, spúšťajú imunitnú odpoveď hostiteľa. Efekt TALE proteínov závisí na konkrétnej genetickej výbave hostiteľskej rastliny (Gu *et al.* 2005; Sugio *et al.*, 2007) DNA-väzbová doména TALE môže byť relatívne jednoducho upravená tak, aby boli schopné viazať akúkoľvek sekvenciu DNA.

Srdcom TAL efektorov je centrálna DNA-väzbová doména, ktorá je zodpovedná za funkciu proteínu. Zabezpečuje špecifickú väzbu na konkrétnu sekvenciu DNA v hostiteľskom genóme. Je zložená z opakujúcich sa sekvencií po 33-35 aminokyselinách, pričom 12. a 13. aminokyselina sa odlišuje („repeat variable diresidue“ – RVD). Práve tieto odlišujúce sa aminokyseliny rozpoznávajú konkrétne nukleotidy a sprostredkujú väzbu na DNA. Opakujúce sa sekvencie predstavujú kód, vďaka ktorému sa proteín viaže na presne určené miesto v DNA (Boch, 2011).

TALE sú vďaka svojej špecifickej povahe využívané v biotechnologickom výskume na editáciu genómu. Synteticky pripravené kombinácie jednotlivých opakujúcich sa AMK sekvencií umožňujú ciele väzbu na DNA. Pokiaľ sa ku takto vytvorenému proteínu sfúzuje ešte funkčná doména, napr. nukleáza alebo represor transkripcie, je možné cielene editovať skúmanú DNA sekvenciu a vytvárať špecifické mutácie. Na editáciu genómu sa využíva FokI nukleáza, ktorá patrí do skupiny RE IIs (Li *et al.*, 2010, Christian *et al.*, 2010). Veľkou nevýhodou použitia TAL proteínov je DNA-väzbová doména obsahujúca tandémové repetície, ktoré sú náročné na prípravu ako časovo, tak finančne (Zhang *et al.*, 2017).

#### **2.2.4.2 Zinkové prsty**

Editačné konštrukty na báze zinkových prstov boli vytvorené ako prvé využívajúce FokI nukleázu (Lloyd *et al.*, 2005). FokI nukleáza má 2 aktivity, pričom za každú aktivitu je zodpovedné iné aktívne miesto. Ide o DNA rozpoznávaciu a DNA štiepiacu funkciu. DNA-štiepiaca doména musí ostať zachovaná vo všetkých syntetických konštruktoch a funguje iba v prípade, že sa enzým nachádza v danom mieste ako dimér (Smith *et al.*, 2000). DNA-

rozpoznávací doména môže byť nahradená aj inou štruktúrou, pričom často sa využíva substitúcia prirodzenej domény práve 4-6 „zinkovými prstami“. Zinkové prsty obsahujú konzervovanú sekvenciu Cys2His2 a každá podjednotka s veľkosťou cca 30 AMK viaže 1 atóm zinku (Kim *et al.*, 1996). Každý „prst“ viaže 3 nukleotidy na DNA. Rôzne sekvencie zinkových prstov môžu byť vytvárané tak, aby rozpoznávali každú inú sekvenciu nukleotidov.

Keďže FokI nukleázová doména nedokáže štiepiť DNA ako monomér, je možné aktivitu konštruktov so zinkovými prstami jednoducho regulovať. Každý monomér sa sfúzuje s inou sekvenciou zinkových prstov tak, aby boli komplementárne so susednými sekvenciami okolo štiepneho miesta. Iba pokiaľ dôjde k rozpoznaní oboch strán okolo štiepneho miesta, dôjde k dimerizácii FokI a k tvorbe DSB. Vďaka tomu je zabezpečená relatívne vysoká špecificita štiepenej sekvencie a znižuje sa pravdepodobnosť „off-target“ štiepenia (Miller *et al.*, 2007).

Veľkou nevýhodou ZFN je ich náročnosť na prípravu, ako finančná, tak aj časová, a špecificita štiepenia už bola prekonaná inými technikami (Zhang *et al.*, 2017).

### **2.2.4.3 CRISPR-Cas9**

#### **2.2.4.3.1 CRISPR ako bakteriálny imunitný systém**

Prvý organizmus, u ktorého došlo k objavu CRISPR lokusov, bola *Escherichia coli* (Ischino *et al.*, 1987) CRISPR sekvencie boli objavené ako opakujúce sa repetície oddelené od seba neznámymi sekvenciami. Tieto sekvencie sa neskôr označili ako „spacery“ a ich pôvod je v genómoch vírusov a plazmidov infikujúcich daný druh baktérie (Bolotin *et al.*, 2005). Okrem CRISPR lokusov boli objavené aj CRISPR-asociované gény (cas gény), ktorých sekvencie sa nachádzali na okrajoch CRISPR lokusov (Jansen *et al.*, 2002).

Ďalší výskum ukázal, že CRISPR-cas systém umožňuje baktériám získavať imunitu voči napádajúcim cudzím nukleovým kyselinám. V priebehu infekcie dochádza k začleneniu časti cudzej nukleovej kyseliny do CRISPR lokusu a vzniká nový „spacer“. Získaná imunita je sprostredkovaná krátkymi RNA molekulami, ktoré vznikajú zo „spaceru“ (crRNA – CRISPR RNA), sú komplementárne ku infikujúcej DNA molekule a navádzajú obranné Cas proteíny proti vtrielcovi (Barrangou *et al.*, 2007, Brouns *et al.*, 2011).

Po transkripcii CRISPR lokusu dochádza k začleneniu crRNA do proteínového komplexu, ktorý prechádza po molekulách nukleových kyselín v bunke a hľadá sekvenciu komplementárnu k crRNA. Pokiaľ komplex narazí na komplementárnu sekvenciu, dôjde ku rozštiepeniu párovanej molekuly. Existuje niekoľko typov CRISPR-Cas systémov vyskytujúcich sa v prírode, pričom sa líšia medzi sebou jednak systémom rozpoznávania infikujúcich nukleových kyselín, ale aj spôsobom a miestom, kde sú tieto štiepené. U typu II, III, V, VI je votrelec rozštiepený presne v mieste jeho rozpoznania, prípadne neďaleko (Barrangou *et al.*, 2022).

CRISPR lokusy sú definované ako krátke opakujúce sa sekvencie, ktorú sú medzi sebou oddelene podobne krátkymi „spacer“ sekvenciami. Repetice sú odlišné medzi jednotlivými lokusmi a lokusy sa u väčšiny CRISPR systémov vyznačujú prítomnosťou jednej degenerovanej repetice odlišnej od ostatných väčšinou na 3' konci (Jansen *et al.*, 2002). Nové spacery sa pridávajú na okraji lokusu, pred prvú repetíciu, vďaka prítomnosti sekvencie bohatej na A-T, ktorá s prvou repetíciou priamo susedí. Väčšina CRISPR systémov v prírode dokáže získať nový spacer iba z DNA sekvencie (Barrangou *et al.*, 2007).

Rozpoznanie cudzej DNA sekvencie je zaistené niekoľkými mechanizmami. Väčšina prokaryotických organizmov má cirkulárne chromozómy, pričom väčšina infikujúcich DNA molekúl je lineárna. Druhým mechanizmom je prítomnosť PAM sekvencie, vďaka ktorej je možné dolíšiť cudziu molekulu od hostiteľovej. Samotnú integráciu „spacer“ sekvencie do CRISPR lokusu majú za úlohu proteíny Cas1 a Cas2 (Makarova *et al.*, 2020). Cas1 a Cas2 tvoria spolu s cudzím úsekom DNA integrázový komplex a vytvárajú nový „spacer“ (Nunez *et al.*, 2014).

#### **2.2.4.3.2 CRISPR-Cas9 ako nástroj editácie genómu**

Postupným výskumom CRISPR-Cas prirodzených systémov bolo odhalené ich možné využitie na editovanie genetickej informácie v bunkách. Po špecifických metódach založených na ZFN a TALE proteínoch sa CRISPR systém typu II v posledných rokoch zaradil do bežnej praxe pri tvorbe konkrétnych úprav genómov rôznych organizmov. Vďaka svojej jednoduchosti a vysokej špecificite štiepenia dovtedy používané metódy dokonca prekonal (Ledford, 2015).

CRISPR-Cas9 ako nástroj na editáciu genómu je jednoduchý systém, zložený len z dvoch súčastí – nukleázy Cas9, ktorá zabezpečí tvorbu zlomu na DNA, a „single-guide“ RNA, ktorá vďaka komplementarite k cieľovému úseku na DNA

zabezpečí navedenie Cas9 na konkrétne miesto. Rozpoznávací sekvencia sgRNA má väčšinou dĺžku okolo 20 nukleotidov, ktoré sú presne komplementárne k želaní sekvencii DNA (Jinek *et al.*, 2012, Doudna *et al.*, 2014). Jedinou podmienkou je prítomnosť „protospacer adjacent motif“ (PAM) sekvencie hneď vedľa cieľovej sekvencie DNA. Prítomnosť PAM je nutná pre Cas9 nukleázu, aby rozštiepila molekulu DNA (Sternberg *et al.*, 2014). V jednom kroku je možná editácia aj viacerých génov, pokiaľ sa použije niekoľko sgRNA s rôznou špecifickou sekvenciou na navedenie Cas9 nukleázy (Ma *et al.*, 2015).

Najčastejšie využívanou Cas9 nukleázou je proteín získaný z baktérie *Streptococcus pyogenes*, ktorá rozpoznáva PAM NGG. Cas9 proteín má 2 domény – RuvC a HNH. Obe domény majú nukleázovú aktivitu, pričom každá z nich štiepi jedno vlákno na DNA. Výsledkom aktivity oboch domén je dvojvláknový zlom s tupými koncami (Jinek *et al.*, 2012).

Druhou nevyhnutnou súčasťou CRISPR-Cas9 systému je „sgRNA“. Ide o umelo vytvorenú RNA sekvencia mimikujúcu prirodzenú formu crRNA a tracrRNA (Cong *et al.*, 2013, Jinek *et al.*, 2012). V prírode je tracrRNA (transactivating RNA) nevyhnutná pre aktiváciu Cas9 proteínu. crRNA funguje ako „navádzač“ pre celý komplex. sgRNA je kódovaná jedným génom, ktorý obsahuje rozpoznávací sekvencia sgRNA s dĺžkou okolo 20 nukleotidov umiestnenou na 5' konci a uniformným sgRNA „scaffoldom“ (Jinek *et al.*, 2012, Mali *et al.*, 2013).

Cas9/sgRNA komplex je navádzaný na správnu sekvenciu DNA pomocou hybridizácie medzi cieľovou molekulou a rozpoznávacou sekvenciou sgRNA. Po naviazaní sgRNA na DNA v prítomnosti PAM sa aktivujú jednotlivé domény Cas9 a dochádza k tvorbe DSB. DSB je následne opravený bunkovými reparačnými mechanizmami a dochádza ku vzniku mutácií na cieľovom mieste (Cong *et al.*, 2013). CRISPR-Cas9 sa najčastejšie používa na „knock-out“ génov, delécie, inzercie (knock-in), narušenie regulačných elementov a obmedzenie vírusových infekcií (Ma *et al.*, 2016).

#### **2.2.4.3.3 CRISPR rastlinné expresné vektory**

Prvou dôležitou súčasťou CRISPR expresného vektoru je „sgRNA scaffold“ s restričným miestom pre vloženie „spacer“ sekvencie na 5' koniec. sgRNA má celkovú dĺžku okolo 98 nukleotidov a jej expresia je najčastejšie riadená promotórmí U3 alebo U6 pre malé jadrové RNA (Ma *et al.*, 2016, Jiang *et al.*, 2013).

Kódujúca sekvencia pre Cas9 proteín musí obsahovať umelo pridaný jadrový lokalizačný signál v eukaryotických bunkách na zabezpečenie prechodu z cytoplazmy do jadra po translácii. Navyše, pre použitie v rastlinných bunkách je nutná optimalizácia kodónov pre daný druh, aby sa zabezpečila najvyššia možná efektívnosť štiepenia. Použitie neoptimalizovanej sekvencie Cas9 viedlo k nižšej efektívnosti (Zhang *et al.*, 2017). Na expresiu Cas9 sú väčšinou použité rôzne konštitutívne promótor, napr. ubiquitínový promótor z *Arabidopsis*, ryže, či kukurice. Silný CaMV 35S promótor bol taktiež používaný, avšak expresia Cas9 riadená ubiquitínovým promótorom vykazovala lepšiu efektívnosť gémovej editácie (Miao *et al.*, 2013, Svitashv *et al.*, 2015).

Ďalšie súčasti expresných vektorov závisia na použitej metóde klonovania a transformácie samotných rastlinných buniek. Štruktúra transformačných vektorov bola popísaná v kapitole 2.2.1.

#### **2.2.4.3.4 Všeobecné kritéria pre tvorbu gRNA**

Prvým krokom CRISPR experimentu je príprava a dizajn rozpoznávacej sekvencie sgRNA. Experimentálne bolo získaných niekoľko pravidiel, ktorými by sa mal dizajn riadiť. Zhrnutie a postup dizajnu sgRNA bol popísaný v Schindele *et al.*, 2020:

##### **1. Dĺžka**

Rôzne izoformy Cas9 proteínu najlepšie fungujú pri rozličných dĺžkach gRNA a využívajú rozdielne PAM sekvencie (Cebrian-Serrano & Davies, 2017). Najčastejšie používaná forma Cas9 pochádza z baktérie *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) a na jej funkciu sa väčšinou využíva gRNA s dĺžkou 20 nukleotidov a 5'-NGG-3' PAM. PAM sekvencia sa v genóme vyskytuje bežne a gRNA do určitej miery toleruje niektoré zamenené nukleotidy v cieľovej sekvencii („mismatches“), preto môže dochádzať ku štiepeniu DNA na neželaných miestach. Avšak, u rastlín sú 20-nukleotidové gRNA vysoko-precízne a neželané efekty sa vyskytujú len pri veľmi podobných sekvenciách alebo pokiaľ je zámena nukleotidov ďaleko od PAM sekvencie (Peterson *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018).

##### **2. Obsah C-G (%)**

Druhým dôležitým kritériom pri výbere rozpoznávacej sekvencie sgRNA je percentuálny obsah C-G báz. Experimentálne bolo zistené, že sekvencie s príliš vysokým obsahom C-G sú menej efektívne. U sgRNA používaných u rastlín bol



zistený použiteľný obsah C-G medzi 30 až 80%, pričom molekuly s viac ako 50% vykázali o niečo lepšiu efektívnosť (Ma *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2016).

### **3. Potenciálne „off-targets“**

sgRNA rozpoznáva cieľovú sekvenciu na DNA, aby mohlo dôjsť k jej rozštiepeniu a tvorbe zlomov na konkrétnom mieste. gRNA nemusí vždy rozpoznávať 100%-komplementárny úsek na DNA, môžu byť tolerované niektoré malé zámery v nukleotidoch. Následkom neúplne komplementárneho párovania môže byť DNA rozštiepená na inom mieste, než bolo pôvodne určené a môže tak dochádzať k mutáciám v nešpecifických častiach genómu (Fu *et al.*, 2013).

Druhým následkom neúplnej komplementarity môžu byť DNA alebo RNA „bulges“ (výdutiny). Vznikajú v prípade, že v reťazci ostane jeden alebo viacero nespárovaných nukleotidov a tieto vytvoria slučku. Cas9 dokáže tolerovať vytvorené slučky na DNA o veľkosti 1 nukleotid, ale väčšie jej aktivitu potlačia. Pri RNA slučkách závisí na ich umiestení. Ak sa nachádzajú v blízkosti PAM, nie sú tolerované vôbec. Vo väčšej vzdialenosti môžu byť tolerované aj s veľkosťou viac ako 1 nukleotid (Lin *et al.*, 2014).

Okrem nesprávneho párovania báz medzi gRNA a DNA vplýva na aktivitu Cas9 aj párovanie vnútri gRNA reťazca, ktoré ovplyvňuje väzbu medzi gRNA a DNA. Avšak, u rastlín je toto párovanie do určitej miery tolerované (Liang *et al.*, 2016).

### **4. Sekundárna štruktúra**

V rámci jednovláknového reťazca gRNA dochádza k párovaniu báz medzi sebou a vznikajú rôzne sekundárne štruktúry. Sekundárna štruktúra sgRNA má vplyv na interakciu a stabilitu komplexu s proteínom Cas9, a tým aj ovplyvňuje samotnú editáciu cieľovej DNA. Porovnaním rôznych sekundárnych gRNA štruktúr bolo zistené, že obsahujú 3 slučky („stem-loops“). Slučka 1 je dôležitá pri tvorbe komplexu Cas9-gRNA-DNA a slučky 2 a 3 majú veľký vplyv na efektívnosť editácie (Nishimasu *et al.*, 2014). Avšak, boli pripravené rôzne optimalizované verzie sgRNA „scaffoldu“, ktorých sekundárna štruktúra sa líšila od pôvodnej a napriek tomu dochádzalo ku zlepšeniu efektivity Cas9 a celého CRISPR systému (Dang *et al.*, 2015).



## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Rastlinný a bakteriálny materiál

- *Escherichia coli* – kmeň DB3.1, STBL2 a NEB10-beta
- *Agrobacterium tumefaciens* – kmeň GV3101
- *Arabidopsis thaliana* – ekotyp Columbia (Col-0, WT)
- T-DNA inzerčný „knock-out“ mutant *Arabidopsis thaliana* v LHCB3 – SALK\_020314c

#### 3.1.2 Chemikálie

- 0,5x TBE (Tris/Borate/EDTA) pufer
- agaróza (Sigma, USA)
- destilovaná voda
- etanol 70% a 96%
- etídium bromid
- čistiaci prostriedok na GMO – Krystal SANAN KLASIK
- 10 x Ligačný pufer
- 10 x BSA (1 mg/ml) (Roth)
- Antibiotiká: spektinomycín, karbenicilín, rifampicín, gentamycín (Merck)
- Sacharóza 5%
- Acetosyringon 100mM
- Silwet L-77
- Denaturačný pufr na proteíny
- Pufry na Dot Blot – TBST a TBS
- Primárna protilátka na LHCB2 1:2000 (Agrisera)
- Sekundárna protilátka 1:15 000 (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate) (Bio-Rad)
- Chemiluminiscenčný substrát (Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate) (Merck)
- GeneRuler Express DNA Ladder (ThermoFischer Scientific, USA)

##### 3.1.2.1 Enzýmy

- restrikčné endonukleázy: BpI, BsaI (New England Biolabs)
- T4 DNA Ligáza (ThermoFischer Scientific, USA)

- DreamTaq DNA polymeráza (ThermoFischer Scientific, USA)

### 3.1.2.2 Golden Gate klonovacie a transformačné vektory

Použité vektory a klonovací protokol uvedený v Stuttman *et al.*, 2021:

- „Shuttle“ vektory s promótorom U6 pre expresiu sgRNA:
  1. M1 (pDGE332) – AddGene #153241
  2. M2E (pDGE334) – AddGene #153243
- Destinačný vektor pDGE347: FAST\_Bar\_pRPS5a:Cas9\_ccdB – AddGene #153228

### 3.1.2.3 Médiá

- tekuté a tuhé LB (Luria-Bertani) médium
- tekuté a tuhé YEB médium
- tekuté médium NEB 10-beta/Stable Outgrowth Medium (New England Biolabs).

### 3.1.2.4 Komerčné kity

- Thermo Scientific™Phire™Plant Direct PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- NucleoSpin® Plant II kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific, USA)
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

### 3.1.2.5 Oligonukleotidy

Tabuľka 1 Zoznam použitých oligonukleotidov ako sgRNA.

Sekvencia	Názov
AGACTTGACGGTACGACGCA	sgRNA 1
GATGCGGCCACCGCCATTGG	sgRNA 2
GGTTCACAGATCTTCAGCGA	sgRNA 3
ACTCGGTCGGATCCGTACCA	sgRNA 4

Tabuľka 2 Zoznam použitých primerov.

Názov	Sekvencia	Použitie
Colony 1	ATGTGATGAACGCCACAGGT	Colony PCR, Sangerovo sekvenovanie
Colony 2	TACCGCCTTTGAGTGAGCTG	Colony PCR
Colony Seq	AAGGCGGGAAACGACAATCT	Colony PCR, Sangerovo sekvenovanie
Primer RFP1	TGCTAGGGAGGTCGCAGTAT	Detekcia RFP
Primer RFP2	ACCGTGAACAACCACCACTT	Detekcia RFP
Lhcb2.1 FP	CCACCACAGCCACTACCAAT	Amplifikácia génu <i>LHCB2.1</i>
Lhcb2.1 RP	CCGTGTCCAGGCCTACTTTT	Amplifikácia génu <i>LHCB2.1</i> , Sangerovo sekvenovanie
Lhcb2.2 FP	TTCAAACCGGTCTGGTCGAG	Amplifikácia génu <i>LHCB2.2</i>
Lhcb2.2 RP	GTGATGACTTGCTTCGCGTC	Amplifikácia génu <i>LHCB2.2</i> , Sangerovo sekvenovanie
Lhcb2.3 FP	ACTGCCACGAGATCTTCCAC	Amplifikácia génu <i>LHCB2.3</i> , Sangerovo sekvenovanie
Lhcb2.3 RP	GGAATCCAGAATCGGAAGCC A	Amplifikácia génu <i>LHCB2.3</i>
Seq Lhcb2.1	GCACAACCTTGAACAGCCCAG	Sangerovo sekvenovanie <i>LHCB2.1</i>
Seq Lhcb2.2	GCACAACCTTGAACAGCCCAG	Sangerovo sekvenovanie <i>LHCB2.2</i>
Seq Lhcb2.3	TGTCCCAACCGTAGTCTCCA	Sangerovo sekvenovanie <i>LHCB2.3</i>

### 3.1.3 Technický materiál

- 96-jamkové mikrodoštičky (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Analytické váhy (Scaltec instruments GmbH, Nemecko)
- Centrifúga (Labnet International, Inc., USA)
- Fytotron (Weiss Gallenkamp, Veľká Británia)
- Horizontálna elektroforetická komôrka (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Lyofilizátor (LaboGene, Dánsko)
- Malá centrifúga (VWR, Inc., USA)
- Mikroskúmavky (Eppendorf, Nemecko)
- Mikrovlnná rúra, papierové vrecúška, pinzety, lepiaca páska, sklenené skúmavky
- Mixer Mill (Retsch GmbH, Nemecko)
- Sada automatických pipiet (Nichipet, USA)
- Spektrofotometer NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Thermal cycler (Bio-Rad, USA)
- UV transiluminátor (Syngene International Limited, India)
- Vodný ohrievač (Grant Instruments Ltd, Anglicko)
- Zdroj jednosmerného napätia (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Holten Safety bench Laminair 1.8 (Holten, UK)
- IR sterilizátor nástrojov (Schuett-Biotec, Nemecko)
- Plynový kahan
- Bakteriologické hokejky
- Petriho misky
- Thermo Forma Orbital Shaker (Thermo Electron, USA)
- 250 ml Erlenmayerove banky, sada kadičiek s rôznymi veľkosťami
- Termoblok (Thermo Fisher Scientific)
- Fluorescenčný mikroskop (Olympus, Japonsko)
- GentleGrab (Labdeers, Česko)
- Amersham Imager 600RGB (GE HealthCare Life Sciences, Japonsko)
- The Biomek NXP Automated Workstation (Beckman Coulter, USA)
- 3730xl DNA Analyzer (AME BioScience, Nórsko)

- Biological Thermostat BT120M Incubator (Laboratory equipment Prague, Česko)

#### **3.1.4 Počítačové programy**

- Microsoft Excel a Powerpoint (MS Office, USA)
- CRISPR sgRNA dizajn:
  1. ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>)
  2. RGEN (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>)
  3. CCTOP (<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/>)
- Vyhodnotenie CRISPR indelov:
  1. SeqScreener (Thermo Fischer Cloud aplikácia - <https://apps.thermofisher.com/>, USA)
  2. ICE (<https://ice.synthego.com/#/>, USA)
- SnapGene (Dotmatics, USA)

## 3.2 Metódy

### 3.2.1 *In silico* dizajn sgRNA

Výber gRNA cieľovej sekvencie prebiehal zväčša podľa návodu uvedenom v Schindele *et al.* (2020). Okrem online aplikácii uvedených v danom článku bola použitá ešte aplikácia ChopChop. Dizajn sgRNA prebiehal nasledovne:

1. Získanie sekvencie pre *Arabidopsis thaliana* exóny *LHCB2.1* a *LHCB1.2* (Phytozome 13) a ich zadanie postupne do online aplikácii. Nastavenie parametrov – PAM 5'-NGG-3' pre Cas9 odvodenú od *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), maximálny tolerovaný počet „mismatches“ bol 4 a zvolený organizmus *Arabidopsis thaliana*.
2. Porovnanie sekvencií získaných z jednotlivých aplikácií a snaha vybrať takú, pri ktorej sa všetky aplikácie zhodovali. Kritériá pre výber boli obsah C-G, ktorý mal byť ideálne 50-60%, presné miesto cieľovej sekvencie na exóne a počet „off-targets“ (potenciálne miesta cielenia sgRNA mimo požadovaný gén). Snaha bola vybrať sekvenciu približne uprostred exónu a s čo najmenším množstvom „off-targets.“ „Off-targets“ v ostatných izoformách génov *LHCB2/LHCB1* neboli brané do úvahy, pretože cieľom experimentu je „knock-out“ všetkých týchto izoformiem a táto vlastnosť bola naopak vítaná.
3. Každý program hodnotil vypočítané sekvencie pomocou svojho interného skóre, ktoré sa medzi programami pre rovnakú sekvenciu líšilo. Toto skóre, bolo brané do úvahy až ako sekundárne kritérium. Každý program prikladá inú váhu iným parametrom, preto porovnávať sekvencie na základe tejto hodnoty nie je až tak objektívne. Snaha bola vyberať vždy sekvenciu, ktorá mala v jednotlivých programoch hodnotu skóre aspoň priemernú.
4. Návod v článku od Schindele *et al.* (2020) obsahuje ako dôležité kritérium aj sekundárnu štruktúru sgRNA. Avšak, sgRNA „scaffold“ obsiahnutý v použitých vektoroch sa líšil od bežne používaného, preto sa sekundárna štruktúra nedala porovnať a toto kritérium sa nebralo do úvahy (viď kapitola 5.1.3)

### 3.2.2 Hybridizácia oligonukleotidov

Nadizajnované DNA oligonukleotidy boli objednané a dodané komerčnou firmou (Eurofins Genomics, Nemecko). Objednané boli obe komplementárne vlákna, ktoré po hybridizácii vytvoria dsDNA možnú zaklonovať do vektoru.

Hybridizácia oboch vlákien prebiehala podľa protokolu uvedenom v Stuttmann *et al.*, (2021):

1. Na prípravu sa použili zásobné roztoky o koncentrácii 100  $\mu\text{M}$ .
2. Z každého roztoku obsahujúceho komplementárne vlákna DNA bolo odpipetovaných 5  $\mu\text{l}$ , vložených do čistej mikroskúmavky. Ku zmesi sa pridalo 40  $\mu\text{l}$  vody.
3. Pripravené roztoky oligonukleotidov sa nechali denaturovať v termocyclery po dobu 5 minút pri teplote 98°C.
4. Následne sa roztoky nechali pomaly schladit' pri izbovej teplote niekoľko minút.
5. Na ďalšie kroky sa použil 1:200 zriedený roztok pripravených hybridizovaných oligonukleotidov.
6. Rovnaký postup sa zopakoval pre všetky 4 sgRNA.

### 3.2.3 Príprava Multiplex CRISPR-Cas9 vektorov

Klonovanie sgRNA do vektorov bolo prevedené podľa protokolu v článku Stuttman *et al.*, (2021). Pred samotnou restriktívne-ligačnou reakciou boli 3 prázdne vektory (M1, M2E, pDGE347) namnožené v 5 ml tekutej kultúry *E. coli* kmeň DB3.1 (37°C, cez noc, 225rpm, ampicilín/spektinomycín podľa vektoru 100  $\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) rezistentnej na *ccdb* gén prítomný v prázdnom vektore. Z tekutých kultúr boli vyizolované plazmidy podľa postupu uvedeného nižšie a následne použité do klonovacej reakcie.

#### 3.2.3.1 Izolácia plazmidov

Izolácia plazmidovej DNA prebiehala za pomocou komerčného Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kitu (Thermo Fisher Scientific, USA).

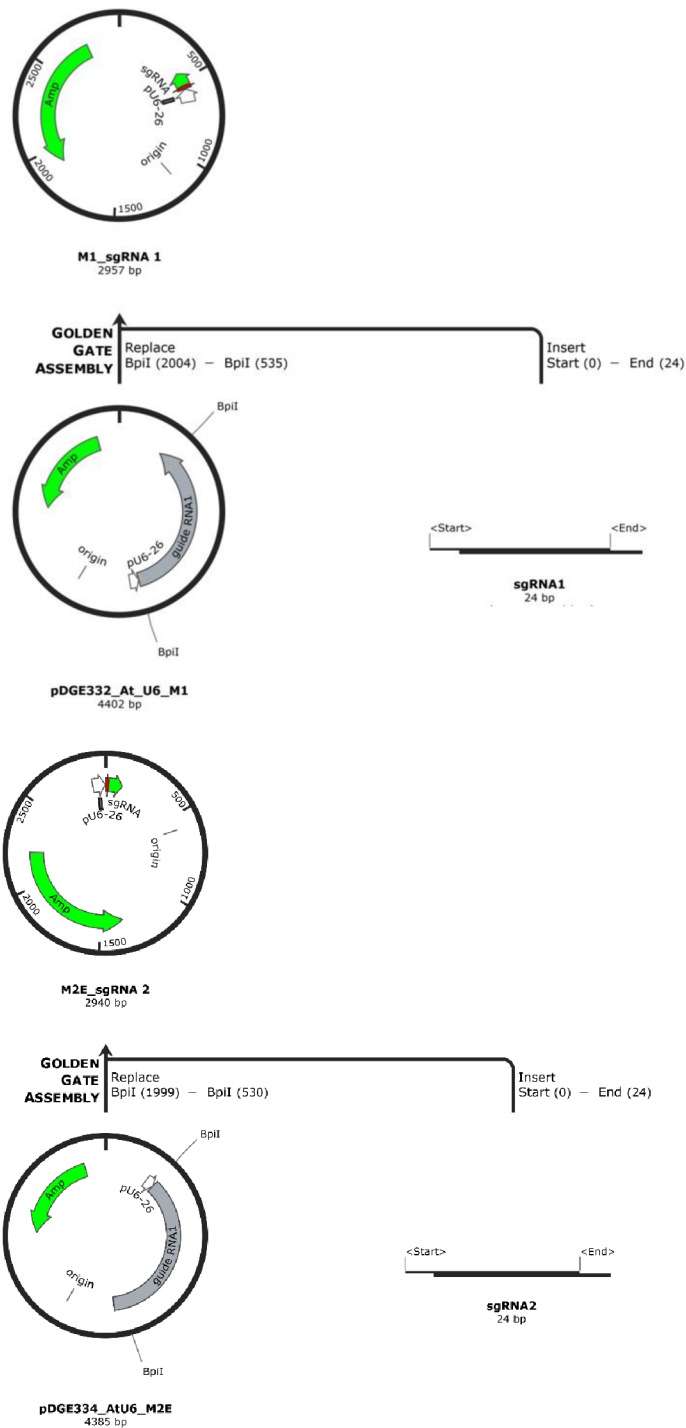
1. Oddelenie baktérií od média pomocou centrifugácie 2 min pri 12000g. Supernatant bol odliaty do odpadu a bakteriálny pelet bol pripravený na ďalšie použitie.

2. Resuspendácia buniek. Na resuspendáciu sa použilo 250  $\mu$ l resuspendačného roztoku. Pelet bol pomocou pipety a premiešavania dokonale resuspendovaný tak, aby neostali žiadne zhluky buniek.
3. Lýza buniek. K resuspendovaným bunkám sa pridalo 250  $\mu$ l lyzačného pufru, mikroskúmavka sa párkrát jemne premiešala a nechala inkubovať pri izbovej teplote po dobu maximálne 5 minút, aby nedošlo k denaturácii plazmidovej DNA. Po uplynutí inkubačnej doby sa bakteriálny lyzát neutralizoval pomocou 350  $\mu$ l neutralizačného roztoku. Takto pripravený lyzát sa centrifugoval po dobu 5 min 12000g, aby došlo k usadeniu zvyškov buniek a chromozomálnej DNA.
4. Zozbieranie plazmidov pomocou GeneJet kolónky zo supernatantu získaného v predošlom kroku. Kolónka sa umiestnila na čistú mikroskúmavku a pomocou pipety sa na ňu opatrne preniesol supernatant. Nasledovala centrifugácia 1 min 12000g. Pretečený roztok sa vylial do odpadu a kolónka s naviazanou plazmidovou DNA sa 2x prečistila 500  $\mu$ l premývacieho roztoku. Po každom napipetovaní roztoku prebiehala centrifugácia 1min 12000g a pretečený roztok sa odstránil.
5. Uvoľnenie plazmidov z kolónky a ich zozbieranie do čistej mikroskúmavky. Na elúciu sa použilo 50  $\mu$ l elučného pufru a prebiehala centrifugácia 2min 12000g. V mikroskúmavke sa po centrifugácii nachádzali izolované plazmidy, ktoré boli použité na ďalšie experimenty.
6. Stanovenie koncentrácie plazmidovej DNA spektrofotometricky pomocou prístroja NanoDrop. Koncentrácia DNA bola stanovená na základe absorbancie pri 260 nm v 1  $\mu$ l elučného pufru. Ako blank sa použil samotný pufr.

### **3.2.3.2 Klonovanie sgRNA do „shuttle“ vektorov**

Klonovanie sgRNA oligonukleotidov do „shuttle“ vektorov taktiež prebiehalo podľa návodu v Stuttman *et al.*, (2021). sgRNA 1 bol vložený do „shuttle“ vektoru M1 a sgRNA 2 do vektoru M2E (Obr. 11). Analogicky boli vložené sgRNA 3 do vektoru M1 a sgRNA 4 do vektoru M2E.





Obrázok 11 Ilustračná schéma vloženia sgRNA 1 do „shuttle“ vektoru M1 a sgRNA2 do „shuttle“ vektoru M2E metódou Golden Gate klonovania. sgRNA 1 a sgRNA2 obsahuje na oboch koncoch 4-nukleotidové presahy, ktoré sú komplementárne k lepivým koncom vzniknutým na vektore po štiepení enzýmom BpiI. BpiI enzým vyštípe *ccdB* gén a gén rezistencie pre chloramfenikol (úsek označený ako sgRNA 1 sivou farbou, pretože toto miesto bude po klonovaní sgRNA obsahovať). T4 ligáza na konci reakcie spojí kovalentne inzert a vektor.

Samotná reakcia prebiehala v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke. Po napipetovaní prebiehala reakcia v termocyckleri podľa protokolu v tabuľke 3.

### 3.2.3.3 Klonovanie sgRNA do destinačných vektorov

Druhým krokom v Golden Gate klonovaní je vyštípenie inzertov z „shuttle“ vektorov a ich vkladanie do destinačného finálneho vektora (Obr. 12). Samotná reakcia prebiehala v 96-jamkovej doštičke a zloženie jednotlivých reakcií je popísané v tabuľke 4. Protokol na priebeh reakcie bol rovnaký ako pri vkladaní sgRNA oligonukleotidov do „shuttle“ vektorov a je popísaný v tabuľke 3. Po dobehnutí druhej GoldenGate reakcie boli získané finálne vektory transformované do *E.coli* teplotným šokom.

### 3.2.3.4 Transformácia *E.coli* teplotným šokom

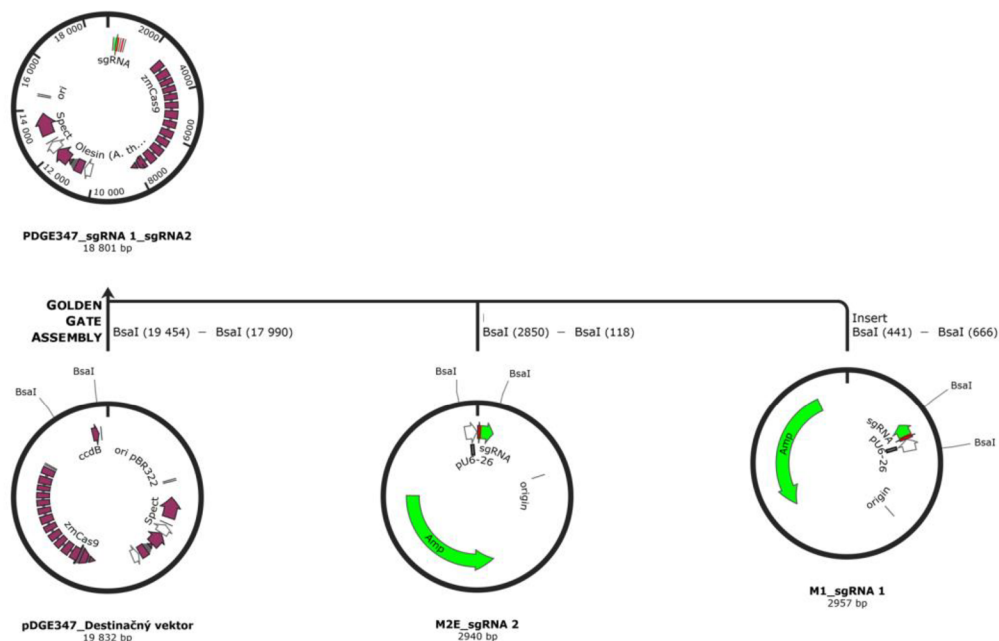
Transformácia *E. coli* prebiehala teplotným šokom podľa nasledovného postupu:

1. Zmrazené kompetentné bakteriálne bunky sa vytiahli z  $-80^{\circ}\text{C}$  a nechali pomaly roztopiť na ľade.
2. V laminárnom boxe sa z naklonovaných plazmidov odpipetovalo 7  $\mu\text{l}$  a pridalo k suspenzii buniek. Jemne sa suspenzia premiešala, aby nedošlo k zničeniu oslabených kompetentných buniek. Bunky s plazmidmi sa nechali následne inkubovať na ľade po dobu 30 min.
3. Ku koncu inkubácie sa nechal predhriať termoblok na  $42^{\circ}\text{C}$ . Samotná transformácia potom prebiehala vložением ľadovej bakteriálnej suspenzie do

Tabuľka 3 Zloženie a protokol restriktívne-ligačnej reakcie na vloženie sgRNA do shuttle vektoru. Objem roztoku jednotlivých „shuttle“ vektorov bol vypočítaný na základe koncentrácie vyizolovaných plazmidov. Kroky 2 a 5 minút sa zopakovali 20x.

Zloženie reakcie		Protokol	
Reaktant	Množstvo	Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	Čas (min)
„Shuttle“ vektor	60 ng	37	2
Hybridovaná sgRNA	1 $\mu\text{l}$	16	5
10x Ligačný pufr	1 $\mu\text{l}$	50	10
10x BSA (1mg/ml)	1 $\mu\text{l}$	80	10
BpiI	0,3 $\mu\text{l}$		
T4 DNA ligáza (1U)	0,3 $\mu\text{l}$		
H <sub>2</sub> O	Doplniť do 10 $\mu\text{l}$		

↑ x20



Obrázok 12 Vkladanie sgRNA1 a sgRNA2 zo „shuttle“ vektorov do destinačného vektoru pDGE347 pomocou GoldenGate reakcie. sgRNA inzerty sa vyštiepia zo „shuttle“ vektorov enzýmom BsaI. Na jednom konci každej sgRNA vznikne presah komplementárny s presahom druhej sgRNA a na opačnom konci vznikne presah komplementárny s presahom v destinačnom vektore. Destinačný vektor sa taktiež naštiepi enzýmom BsaI. Jednotlivé komplementárne presahy DNA sekvencií sa spoja a T4 ligáza obnoví fosfodiesterovú väzbu. Výsledkom reakcie je správna orientácia jednotlivých sgRNA inzertov na konkrétnom mieste v destinačnom vektore.

vyhriateho bloku na 45s (kmeň STBL2) alebo 30s (kmeň NEB10-beta).

4. Po teplotnom šoku sa baktérie opäť preniesli na ľad, nechali 2 min stáť a vo flowboxe sa k nim pridalo 950  $\mu$ l tekutého LB média (kmeň STBL2), v prípade NEB 10-beta sa pridalo NEB 10-beta/Stable Outgrowth Medium.
5. Baktérie sa nechali inkubovať na trepačke cca 60 min, 225rpm, 37°C.

Tabuľka 4 Zloženie restriktívno-ligačnej reakcie na vloženie sgRNA zo „shuttle“ vektorov do destinačného vektoru. Množstvo jednotlivých vektorov bolo vypočítané na základe koncentrácie získaných plazmidov.

Reaktant	Množstvo
Shuttle vektor	40 ng z každého
Destinačný vektor	300 ng
10x Ligačný pufr	2 $\mu$ l
10xBSA (1mg/ml)	2 $\mu$ l
BsaI	1 $\mu$ l
T4 DNA ligáza (1-5 U)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Doplniť do 20 $\mu$ l

6. Po skončení inkubácie sa baktérie centrifugovali 3 min pri 5000g a vo flowboxe sa odobralo 850  $\mu\text{l}$  supernatantu.
7. Pelet sa rozsuspendoval pipetou vo zvyšnom LB médiu a následne preniesol na Petriho misky s tuhým LB médiom s prídavkom antibiotika (karbenicilín 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pre „shuttle“ vektory, spectinomycín pre destinačný vektor).
8. Misky sa nechali kultivovať cez noc v inkubátore pri 37°C. Po úspešnej transformácii boli ráno na miskách kolónie, z ktorých sa pripravili tekuté kultúry na namnoženie plazmidov a bola verifikovaná prítomnosť vloženej sgRNA.

### 3.2.3.5 Potvrdenie prítomnosti sgRNA vo vektore – Colony PCR

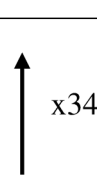
#### A) Vloženie sgRNA do vektoru

PCR reakcia prebiehala za použitia Thermo Scientific™ Phire™ Plant Direct PCR Master Mix kit. Ako primery boli použité Colony 1 a Colony Seq (Tab. 2). Protokol používaný pre PCR reakciu s použitím daného kitu je uvedený v tabuľke 5.

Prítomnosť získaných amplikónov bola v každej PCR reakcii v rámci experimentálnej časti práce overená pomocou agarózovej elektroforézy v 1,2% gély po dobu 60 min, 120V. Gély boli inkubované v roztoku etídium-bromidu po dobu 20 min a vizualizované pod UV svetlom. Veľkosť získaných produktov bola overená použitím GeneRuler Express DNA Ladder (ThermoFischer Scientific, USA).

Tabuľka 5 Protokol pre PCR reakciu za použitia Thermo Scientific™ Phire™ Plant Direct PCR Master Mix kit. Teplota „annealingu“ 65°C je špecifická pre použitú dvojicu primerov Colony 1 a Colony Seq.

Zloženie reakcie		Protokol	
Master Mix	5 $\mu\text{l}$	Teplota (°C)	Čas
Primery	0,2 $\mu\text{l}$	98	5 min
Vzorka	0,25 $\mu\text{l}$	98	5 s
Voda	4,55 $\mu\text{l}$	65	5 s
		72	20 s
		72	1 min
		4	inf



## **B) Kontrola správnej orientácie inzertov**

Druhá PCR reakcia prebiehala za použitia oligonukleotidov sgRNA ako primerov. V prípade shuttle vektorov bol použitý odpovedajúci oligonukleotid vloženej sgRNA a primer Colony 2 (Tab. 1 a 2). V prípade destinačných vektoroch sa použili dvojice oligonukleotidov sgRNA odpovedajúce zaklonovaným v danom vektore (Tab.1).

### **3.2.3.6 Sangerovo sekvenovanie destinačných vektorov**

Na sekvenovanie sa použili rovnaké primery Colony 1 a 2. Každý plazmid bol osekvenovaný oboma primermi. Prípravná reakcia na sekvenovanie prebiehala v plastových mikro-stripoch, jej zloženie a následný protokol je uvedený v tabuľke 6. Po prebehnutí prípravnej sekvenačnej reakcie boli jednotlivé reakčné zmesi prečistené pomocou magnetických guľčiek a následne sekvenované kapilárnym sekvenátorom Sangerovou metódou. Prečistenie a samotná sekvenácia bola prevedená zamestnancom laboratória.

### **3.2.4 Pestovanie rastlín**

Transformácia a následná selekcia CRISPR-Cas9 mutantov bola vykonaná na rastlinách *A. thaliana*. Použité boli dva genotypy: divoký typ – Columbia (WT) a mutantná línia s T-DNA inzerciou v géne pre proteín LHCB3 z kolekcie SALK. Semená boli pred výsevom vložené do mikroskúmavky. Pridala sa voda a skúmavka bola zabalená do alobalu. Stratifikácia prebiehala pri teplote 4 °C po dobu 72 hodín. Po stratifikácii boli semená pomocou pipety s ustrihnutou špičkou vysiate do kvetináčov v počte max. 5 semien na kvetináč. Kvetináče boli uložené do fytotronu pri podmienkach: deň – 16 h, 19 °C, intenzita svetla 130  $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , noc – 8 h, 18 °C, tma. Vlhkosť vzduchu bola konštantná po celý deň 65%. Po 3-4 týždňoch boli vyklíčené rastliny rozsadené do samostatných kvetináčov.

### **3.2.5 Floral dip**

Metóda Floral dip využíva schopnosť *Agrobacterium tumefaciens* a jeho schopnosť prenosu génov do rastlinných buniek. Na transformáciu rastlín boli použité destinačné vektory so zaklonovanými sgRNA vyizolované z tekutých kultúr *E.coli* ponechaných rásť cez noc (225 rpm, 37 °C, ampicilín).

Tabuľka 6 Zloženie a protokol prípravnej sekvenačnej reakcie.

Zloženie reakcie		Protokol	
Reaktant	Množstvo	Teplota (°C)	Čas
5x Seq buffer	1,5 µl	90	5 min
BigDye	0,5 µl	96	10s
Primer	1 µl	50	5s
Plazmid	60 ng	60	4 min
Voda	Doplniť do 10 µl	4	Inf.

↑  
x59

### 3.2.5.1 Transformácia *A. tumefaciens*

Transformácia *A. tumefaciens* prebiehala podobne ako transformácia *E.coli* teplotným šokom podľa nasledovného postupu:

1. Kompetentné bunky boli na vytiahnuté z -80°C a ponechané na ľade mierne rozmraziť.
2. Na stále zamrznuté baktérie sa napipetoval 1 µg plazmidu a ponechali sa úplne rozmraziť. Rozmriazuté baktérie boli podrobené teplotnému šoku.
3. Mikroskúmavky s baktériami boli ponorené na 30 s do tekutého dusíka a hneď na to prenesené do termobloku na 37 °C na 5 min.
4. Baktérie sa nechali odstáť na ľade na niekoľko minút a potom sa k nim pridalo 900 µl tekutého YEB média.
5. Inkubácia 4h na trepačke pri 28°C a 220-225 rpm.
6. Po inkubácii sa médium s bunkami centrifugovalo 2 min pri 8000g, odobralo sa 850 µl supernatantu a usadený pelet sa resuspendoval vo zvyšnom médiu.
7. Zvyšné tekuté médium s rozsuspendovanými baktériami sa rozdelilo na 2 Petriho misky obsahujúce tuhé YEB médium s prídavkom spektinomycínu, rifampicínu a gentimycínu.
8. Baktérie sa preniesli do inkubátoru a boli ponechané pri 28°C 2 dni.
9. Narastené kolónie boli podrobené Colony PCR na prítomnosť vložených plazmidov podobne ako v prípade *E.coli* (viď kapitola 3.2.3.5 A).

### 3.2.5.2 Transformácia *A. thaliana*

Metóda floral dip umožňuje tvorbu stabilných transgénnych GMO línií. Princípom metódy je namočenie nie plno vyvinutých otvorených kvetov *A. thaliana* do suspenzie *A. tumefaciens* nesúcej požadovaný génový konštrukt a transformácia vajíčka.

Metóda floral dip je rozdelená na 3 dni:

### **Deň 1**

1. Z narastenej kultúry na Petriho miske po transformácii sa odoberie pipetou malé množstvo a prenesie do skúmavky s 5 ml tekutého YEB média s obsahom príslušných antibiotík (Rif, Gent, Spect).
2. Naočkované tekuté médium sa nechalo inkubovať cez noc pri 28 °C a 225rpm.

### **Deň 2**

1. Narastené baktérie boli preočkované do väčšieho objemu. Z nočnej kultúry sa odobral vždy 1 ml a preniesol do 100 ml čerstvého tekutého YEB média a antibiotikami (Rif, Gent, Spect).
2. Takto pripravené banky sa nechali opäť kultivovať cez noc, 28 °C a 225rpm.

### **Deň 3**

1. Na tretí deň prebiehala samotná transformácia rastlín. V priebehu niekoľkých hodín sa kontrolovalo OD bakteriálnej kultúry pri 600 nm, až kým hodnota nebola 0,4 - 1.
2. Baktérie sa po dosiahnutí danej OD preliali do 50 ml falkón a nechali centrifugovať 20 min pri 4°C a 4500rpm.
3. Po centrifugácii sa prebytočné kultivačné médium odlialo a usadený bakteriálny pelet sa resuspendoval v 5-10 ml sacharózy (presný objem závisel na objeme a OD pôvodnej kultúry).
4. Následne sa baktérie preliali do kadičky a pridal sa roztok 5% sacharózy tak, aby výsledné OD bolo 0,8. Podľa finálneho objemu sa pridal acetosyringon 100mM a Silwet L-77 (400 µl a 100 µl resp. na 200 ml bakteriálnej suspenzie).
5. Do pripraveného roztoku bakteriálnej suspenzie sa postupne namáčali jednotlivé rastliny. Vzali sa vždy 2 rastliny z použitého genotypu a namočili sa do suspenzie nesúcej požadovaný konštrukt. Do suspenzie bolo treba namočiť predovšetkým čo najviac kvetov, pričom samotná doba ponorenia rastliny v bakteriálnej suspenzii bola 3 až maximálne 10 sekúnd.
6. Pokiaľ sa do kadičky nezmestili všetky kvety, zvyšné boli pokvapkané bakteriálnou suspenziou pomocou Pasteurovej pipety.

7. Na záver transformácie sa rastliny zakryli igelitovým vrečkom, do ktorého sa urobilo pár dier. Rastliny museli ostať vo vlhku po dobu aspoň 12 hodín, neskôr sa vrečko odstránilo.
8. Rastliny sa nechali dozrieť do semien, z ktorých sa potom vybrali transformované jedince.

### **3.2.6 Selekcia transgénnych semien – marker FAST**

Po transformácii boli rastliny ponechané vo fytotrone, až kým úplne nedozreli a nezoschli. Následne z nich boli odobrané semená obsahujúce aj transgénne jedince. Destinačný vektor, ktorý niesol sgRNA a Cas9 proteín, obsahoval marker FAST na rýchlu a jednoduchú selekciu. Ide o RFP, ktorý je exprimovaný ako fúzny proteín s OLE1 pod jeho natívnym promótorom v semennom obale (Shimada *et al.*, 2010). Transformované semenka pod fluorescenčným mikroskopom fluoreskujú na oranžovo.

Selekcia prebiehala postupne. Z každej rastliny sa na Petriho misku nasypalo určité množstvo semien, ktoré boli neskôr prechádzané pod fluorescenčným mikroskopom (Olympus). Fluorescenčné semená boli odoberané pomocou Gentle Grab (Labdeers) a prenášané do samostatnej čistej mikroskúmavky. Z každej rastliny (WT, *lhcb3*) sa odobralo približne 15 transformovaných semien. Všetky semená sa vysiali, rastliny sa nechali rásť po dobu 3 týždňov a potom prebiehalo druhé kolo selekcie metódou PCR.

#### **3.2.6.1 PCR potvrdenie prítomnosti transgénu**

Druhé kolo selekcie transformovaných rastlín prebiehalo pomocou PCR reakcie s primermi RFP1 a RFP2 (Tab, 2). PCR reakcia prebiehala na vzorke DNA odobratej priamo z listu pomocou Thermo Scientific™ Phire™ Plant Direct PCR Master Mix kit (Tab. 5). Teplota „annealingu“ pre danú dvojicu primerov bola 64,5 °C.

Vzorka bola pripravená tak, že pomocou sterilných nožníc sa odobral kúsok listu o veľkosti cc 1x1 mm, vložil do 20 µl dilučného roztoku a špičkou pipety rozotrel o steny mikroskúmavky. Nožnice boli pred každým odobratím vzorky sterilizované postupne v prípravku na GMO Krystal Sanan Klasik, v 70% etanole a na záver opláchnuté vo vode.



### **3.2.7 Selekcia „knock-out“ mutantných rastlín v LHCB2**

Prítomnosť proteínu LHCB2 a s ňou súvisiaca miera editácie genómu v T1 generácii bola skúmaná metódou Dot blot a konkrétne mutácie na úrovni genomickej DNA sa získali Sangerovým sekvenovaním všetkých izoforiem skúmaných génov.

#### **3.2.7.1 Dot blot**

1. Z každej rastliny sa odobralo cca 50 mg listov, ktoré sa vložili do mikroskúmavky. Listy boli presne zvážené.
2. K listom sa pridali 3 sklenené guľičky, mikroskúmavky sa rýchlo zmrazili ponorením do tekutého dusíka a listy boli homogenizované na homogenizátore.
3. Získaný prášok sa zmiešal s 10x objemom denaturačného pufru a vzorky sa nechali zahrievať na termobloku pri 70°C 30 min.
4. Po denaturácii sa vzorky rozdelili na alikvoty po 100 µl a uložili do mraziaka.
5. Na samotným dot blot sa použil 1 alikvot z každej vzorky a nechal rozmraziť v termobloku.
6. Následne sa zložila aparátúra na dot blot. Ako prvý sa ustrihol kúsok nitrocelulózovej membrány tak, aby sa vošiel do sklenených komôrok používaných na celý proces. Membrány sa namočili do TBST pufru a nechala zaschnúť na poduške a 2 vrstvách filtračného papiera. Vznikol „sendvič“, na stole bola poduška, na nej suchý filtračný papier, potom mokrá namočená do TBST a na ňom samotná membrána.
7. Na membránu sa napipetovalo 2 µl vzorky z alikvotu, zakaždým v triplikáte pod seba, a membrána sa nechala zaschnúť cca 1h.
8. Ďalším krokom bola príprava blokovacieho roztoku. Navážilo sa potrebné množstvo BSA a nechalo rozpustiť v TBST tak, aby vo finále vznikol 5% roztok.
9. Po inkubácii sa membrána premyla v TBS po dobu 5 min na trepačke. Následne sa membrána nechala blokovať v 5% roztoku BSA po dobu 30 min.
10. Roztok sa vymenil za roztok obsahujúci primárnu protilátku. Membrána sa nechala inkubovať ďalších 30 min.
11. Ďalšia inkubácia prebiehala so sekundárnou protilátkou. Roztok s primárnou protilátkou sa odstránil a membrána sa premyla 3x po 5 min v čistom TBST.

Sekundárna protilátka sa pridala do blokovacieho roztoku vo výslednej koncentrácii 1: 15000, roztok sa nalial na membránu a nechal inkubovať 30 min.

12. Po poslednej inkubácii bola membrána 3x premytá v TBST po dobu 15, a 2x 5 min. Na záver prišlo ešte posledné premytie v TBS (5 min) a membrána bola pripravená na vizualizáciu.
13. Vizualizácia prebiehala pomocou chemiluminiscencie. Tmavé škvrny na membráne označili naviazanú protilátku, bezfarebné miesta značili neprítomnosť protilátky, teda aj neprítomnosť skúmaného proteínu.

### **3.2.7.2 Izolácia DNA**

Pred samotnou izoláciou DNA bolo treba pripraviť vzorky. Do mikroskúmaviek boli odobraté 3 listy zo 4-týždňových rastlín a lyofilizované cez noc. Ku lyofilizovaným listom sa pridali sklenené guľičky a listy boli homogenizované v mlynčeku 3 min pri 130 otáčkách  $\text{min}^{-1}$ .

Izolácia DNA prebiehala podľa protokolu odporúčanom výrobcem komerčného kitu NucleoSpin<sup>®</sup> Plant II kit.

1. V prvom kroku bošlo k lýze buniek a degradácii RNA za použitia 400  $\mu\text{l}$  pufru PL1 a RNAzy. Vzorky sa nechali inkubovať 10 min pri 65 °C.
2. Vzniknutý lyzát sa bol prenesený na NucleoSpin<sup>®</sup> Filter a centrifugoval sa pri 10000xg, 2 min.
3. Ku získanému filtrátu sa pridalo 450  $\mu\text{l}$  PC pufru a mikroskúmavka sa jemne premiešala.
4. Vzorky boli prenesené na NucleoSpin<sup>®</sup> Column a prebiehala centrifugácia 1 min pri 10000xg. Pretečený roztok sa odstránil.
5. Naviazaná DNA na NucleoSpin<sup>®</sup> Column sa trikrát premyla. Premytie prebiehalo raz v 400  $\mu\text{l}$  PW1 pufru a dvakrát v PW2 pufre (700 a 200  $\mu\text{l}$  postupne). Po napipetovaní pufrův prebiehala zakaždým centrifugácia 1 min, 10000xg.
6. Na záver sa izolovaná DNA uvoľnila z NucleoSpin<sup>®</sup> Column pomocou 50  $\mu\text{l}$  PE elučného pufru, ktorý bol predhriaty na teplotu 65 °C. NucleoSpin<sup>®</sup> Column bol prenesený do čistej mikroskúmavky a prebiehala elúcia centrifugáciou 2 min, 10000xg.

7. Koncentrácia izolovanej DNA bola zistená spektrofotometricky pre každú vzorku pri vlnových dĺžkach 260 nm a 280 nm na NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA).

### 3.2.7.3 Sangerovo sekvenovanie rastlín T1 a T2 generácie

Príprava DNA na sekvenovanie kandidátnych rastlín prebiehala v niekoľkých krokoch:

1. Boli navrhnuté špecifické primery pre jednotlivé izoformy génu *LHCB2* pomocou online nástroja NCBI PrimerBlast. Primery boli navrhnuté separátne na PCR amplifikáciu jednotlivých fragmentov genomickej DNA a separátne na samotnú sekvenáciu Sangerovou metódou (Tab. 2).
2. Druhým krokom bolo namnoženie jednotlivých *LHCB2* izoforiem pomocou PCR reakcie. PCR reakcia prebiehala za pomoci DreamTaq polymerázy pričom množstvo jednotlivých komponentov je uvedené v tabuľke 7.
3. Prítomnosť získaných amplikónov bola overená pomocou agarózovej elektroforézy v 1,2% gély po dobu 60 min, 120V. Gély boli inkubované v roztoku etídium-bromidu po dobu 20 min a vizualizované pod UV svetlom.
4. Amplikóny boli následne prečistené enzýmami ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Tab. 8).
5. Prečistené DNA fragmenty boli následne sekvenované Sangerovou metódou podľa rovnakého postupu ako destinačné vektory (viď. Kapitola 3.2.3.6). Do každej sekvenačnej reakcie bolo pridaných 30 ng amplifikovanej DNA
6. Sekvenačné dáta boli vyhodnocované pomocou online aplikácie ThermoFisher SeqScreener a ICE (Synthego). Vyhodnocovala sa frekvencia editovaných DNA reťazcov, identická editácia jednej vzorky pri FP a RP primeroch, jednotlivé indely a ich vplyv na knock-out daného génu.

Tabuľka 7 Namnoženie fragmentov genomickej DNA na sekvenovanie PCR reakciou za použitia Dream Taq polymerázy.

Zloženie reakcie		Protokol	
Reaktant	Množstvo	Teplota (°C)	Čas
10x DreamTaq buffer	2 µl	95	3 min
dNTPs	0,4 µl	95	30s
Primery	0,8 µl	58,5	30s
Vzorka	2 µl	72	1 min
DreamTaq polymeráza	0,25 µl	72	5 min
Voda	14,45 µl	4	Inf.

↑ x34

Tabuľka 8 Zloženie a protokol ExoSap reakcie na prečistenie získaných PCR produktov ako príprava na sekvenovanie.

Zloženie reakcie ExoSap		Protokol		
Reaktant	Množstvo (µl)	Teplota (°C)	Čas	Krok
Exo	0,0714	37	30 min	Prečistenie PCR produktu
FastAP	0,714	80	20 min	Denaturácia enzýmov
1x koncentrovaný PCR pufr	6,21	4	Inf.	
Amplifikovaná DNA	3			

## 4 Výsledky

### 4.1 *in silico* dizajn sgRNA

CRISPR-Cas9 systém je jedna z najviac využívaných metód v súčasnosti na editáciu genómu v rôznych organizmoch. Skladá sa z dvoch častí – sgRNA slúžiacej na rozpoznanie cieľovej sekvencie v genóme a Cas9 nukleázy, ktorá na danom mieste vytvorí dvojláknový zlom. Vzniknuté poškodenie na DNA je rozpoznané bunecnými opravnými mechanizmami a opravené, často však s chybou. Vzniknuté mutácie majú často za následok „knock-out“ želaného génu, čo umožňuje skúmanie jeho funkcie v porovnaní s WT organizmom.

Prvým krokom pre prípravu CRISPR mutantov je dizajn správnej sgRNA sekvencie. Na tento účel boli použité 3 online nástroje a boli porovnané jednotlivé kritéria, podľa ktorých ten či ten nástroj navrhol konkrétnu sekvenciu. Použité nástroje CCTOP a RGEN boli vybraté na základe návodu na zostrojenie sgRNA uvedenom v Schindele *et al.*, (2020). Ako tretí na porovnanie bol zvolený ChopChop vďaka jednoduchému a veľmi intuitívnemu užívateľskému rozhraniu. Pri výbere finálnej sgRNA sekvencie sa zohľadnili všetky kritéria popísané v kapitole 3.2.1.

Počas dizajnovania sgRNA bola použitá sekvencia prvého exónu génu *LHCB2.1* (sgRNA 1) a *LHCB1.2* (sgRNA 4). Vybraná sekvencia sgRNA 1 mala cieľ aj v sekvencii pre *LHCB2.2*, preto na túto izoformu nebola hľadaná iná. gRNA na izoformy *LHCB2.3* (sgRNA 2) a *LHCB1.1, 1.3, 1.4* a *1.5* (sgRNA 3) boli prebrané od Bru *et al.*, 2022. Ilustračné mapy genomických sekvencií pre jednotlivé *LHCB1* a *LHCB2* izoformy (UTR oblasti, kódujúca oblasť, intróny) spolu s pozíciami sgRNA sekvencií je na obrázku 13 a 14.

Hľadali sa také sekvencie, ktoré mali minimálny počet „off-target“ cieľov (rovnakých alebo veľmi podobných sekvencií v genomickej DNA, kam by sa potenciálne mohla naviazať sgRNA), pričom ak bol cieľ v izoformách *LHCB1* alebo *LHCB2* izoformách, nebral sa do úvahy. Boli získané 4 sgRNA, ktoré mali predikované ciele vo všetkých izoformách *LHCB1* a *LHCB2* (Tab. 9).

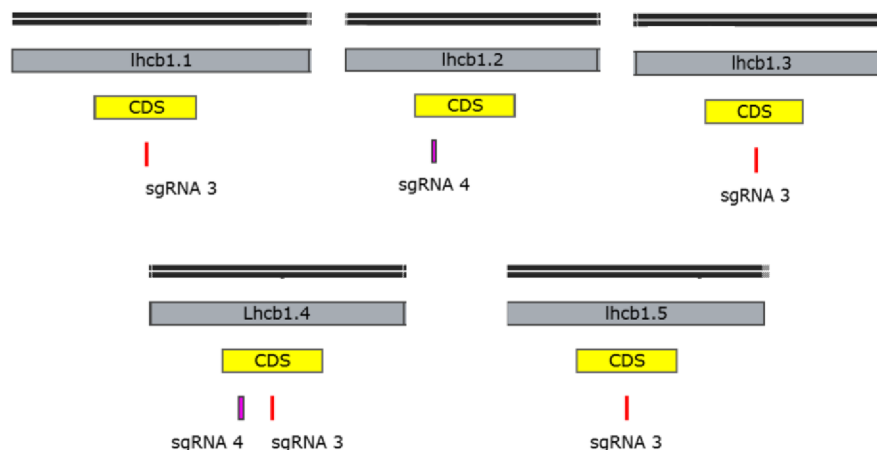
### 4.2 Golden Gate klonovanie sgRNA do multiplex CRISPR-Cas9 vektorov

Golden Gate klonovacia stratégia umožňuje jednoduché spájanie rôznych DNA sekvencií za sebou a ich vloženie do finálneho vektora v správnej orientácii. Pomocou Golden Gate systému je možné vytvoriť vektor obsahujúci niekoľko sgRNA

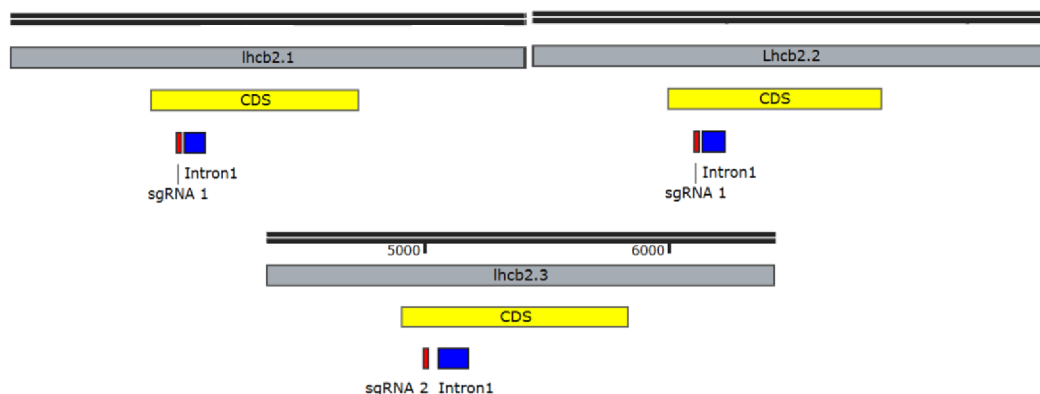
Tabuľka 9 Sekvencie sgRNA cieľiace na všetky izoformy génov Lhcb2 a Lhcb1. Tieto sekvencie boli v ďalšej časti práce použité na zostrojenie CRISPR-Cas9 vektorov na transformáciu *A. thaliana* a prípravu knock-out mutantov. Tabuľka zahŕňa obsah GC (%), skóre efektívnosti podľa jednotlivých použitých online aplikácií (uvedené buď ako číslo 0-1, alebo ako číslo 0-100, čím bližšie k 1 alebo 100, tým lepšie hodnotenie danej sgRNA sekvencie podľa použitého programu) a počet potenciálnych „off-targets“ (počet „mismatches“ je menej ako 4 a nepočítajú sa „off-targets“ v rámci iných Lhcb1/2 izoformiem).

Názov	Cieľ	Sekvencia	% GC	Skóre	„Off-targets“
sgRNA 1	Lhcb 2.1; Lhcb 2.2	AGACTTGACGGTACGACGCA	55	CCTop – 0,71	CCTop - 0
				RGEN – 77,24	RGEN - 0
				ChopCho p – 60,62	ChopCho p - 0
sgRNA 2	Lhcb 2.3	GATGCGGCCACCGCCATTGG	70	CCTop – 0,84 (vysoký)	CCTop - 0
				RGEN – 47,7	RGEN - 0
				ChopCho p – 52,16	ChopCho p - 0
sgRNA 3	Lhcb 1.1; Lhcb 1.3; Lhcb 1.4; Lhcb 1.5	GGTTCACAGATCTTCAGCGA	50	CCTop – 0,63 (stredný)	CCTop - 0
				RGEN – 58,95	RGEN - 0
				ChopCho p – 59,85	ChopCho p - 0
sgRNA 4	Lhcb 1.2; Lhcb 1.4	ACTCGGTCGGATCCGTACCA	60	CCTop – 0,82 (vysoký)	CCTop - 0
				RGEN – 69,0	RGEN - 0
				ChopCho p – 46,09	ChopCho p - 0

a zacieliť tak niekoľko rôznych génov alebo izoformiem. Stuttman *et al.* (2021) pripravili vektory umožňujúce vloženie až 32 sgRNA na multiplex editáciu genómu a získali *A. thaliana* mutantné rastliny nesúce až 12 „knock-out“ mutácií v jedinej generácii. Tento vysoko efektívny protokol bol použitý na prípravu transformačných vektorov v experimentálnej časti práce.



Obrázok 13 Ilustračné zobrazenie sekvencií izoform proteínu LHCBI získaných z databázy Phytozome 13 a pozícií jednotlivých cieľov pre sgRNA. Čierna dvojitá čiara označuje dvojlátkovú DNA, sivou je vyznačená celá genomická sekvencia pre danú izoformu vrátane UTR (UTR – „untranslated region“) oblastí, žltou sú vyznačené kódujúce oblasti (CDS – „Coding sequence“), červenou jednotlivé cieľové sekvencie navrhnutých sgRNA.



Obrázok 14 Ilustračné zobrazenie sekvencií izoform proteínu LHCBI2 získaných z databázy Phytozome 13 a pozícií jednotlivých cieľov pre sgRNA. Čierna dvojitá čiara označuje dvojlátkovú DNA, sivou je vyznačená celá genomická sekvencia pre danú izoformu vrátane UTR (UTR – „untranslated region“) oblastí, žltou sú vyznačené kódujúce oblasti (CDS – „Coding sequence“), červenou jednotlivé cieľové sekvencie navrhnutých sgRNA a modrou jediný intrón.

#### 4.2.1 Klonovanie sgRNA do „shuttle“ vektorov

Prvým krokom pri klonovaní bola hybridizácia komerčne nasynthetizovaných oligonukleotidových sekvencií a namnoženie všetkých vektorov v *ccdb* rezistentnom kmeni *E. coli* v prítomnosti selekčného antibiotika (ampicilín). Všetky používané vektory obsahovali *ccdb* gén, ktorý blokuje DNA gyrázu

a zabraňuje deleniu buniek. Vektory obsahujúce *ccdb* gén musia byť propagované v bakteriálnych kmeňoch, ktoré sú tolerantné na účinok *ccdb*, napr. *E.coli* DB3.1. Antibiotikum slúžilo na elimináciu buniek, ktoré neniesli vektor. Po kultivácii baktérii a namnožení vektorov boli plazmidy z buniek izolované a získala sa ich koncentrácia uvedená v tabuľke 10. Koncentrácia sa následne použila pri klonovaní na výpočet množstva plazmidu potrebného na reakciu.

Izolované plazmidy spoločne s hybridizovanými oligonukleotidy boli použité na prvú Golden Gate reakciu. Restričná endonukleáza BpiI naštiepi vektor, odstráni sa časť sekvencie nesúcu *ccdb* gén a vytvorí sa lepivé konce, ktoré sú komplementárne so 4-nukleotidovými presahmi na hybridizovaných oligonuklotidoch. T4 DNA ligáza potom obnoví fosfodiesterovú väzbu a vznikne plazmid nesúci požadovanú sgRNA sekvenciu. Takto pripravený plazmid bol vložený do hostiteľskej bunky *E.coli* a namnožený v LB médiu s pridaným ampicilínom. Vektor obsahuje gén umožňujúci transformovaným bunkám prežiť v prítomnosti selekčného antibiotika.

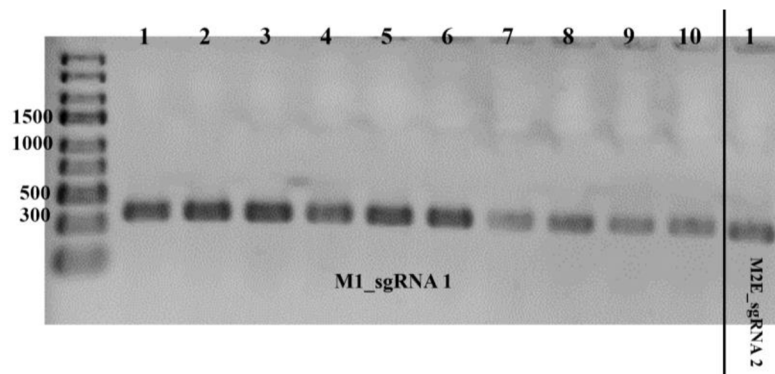
Po transformácii narástlo približne 20 kolónií so zaklonovanou sgRNA1 vo vektore M1 a iba jedna kolónia so zaklonovanou sgRNA2 vo vektore M2E. Prítomnosť sgRNA vo vektore bola overená pomocou PCR reakcie (primery Colony 1 a Seq), použilo sa 10 kolónií s vloženým vektorom a sgRNA1 a jedna s vektorom M2E (Obr. 15). PCR produkt bez vlozenej sgRNA by bol menší a dal by sa na gély odlišiť.

Podobne sa získali kolónie aj pre sgRNA 3 a 4. V oboch prípadoch narástlo po transformácii približne 100 kolónií nesúcich buď sgRNA3 vo vektore M1 alebo sgRNA4 vo vektore M2E. Vybralo sa v každom prípade 10 kolónií, ktoré boli

Tabuľka 10 Koncentrácia izolovaných plazmidových vektorov M1, M2E, a destinačného vektoru pDGE347 získaných po kultivácii cez noc pri 37 °C v tekutom LB médiu.

Vektor	Koncentrácia (ng/μl)
M1	151
M2E	310
Destinačný vektor (pDGE347)	344





Obrázok 15 Colony PCR na kolóniách nesúcich M1 so sgRNA 1 (zľava prvých 10 jamiek) M2E so sgRNA 2 (posledná jamka). Produkt bol 380 bp (M1) a 360 bp (M2E), pričom posledná jamka je o niečo nižšie na gély, než prvých 10 z dôvodu menšej veľkosti amplifikovaného úseku na M2E vektore než na M1.

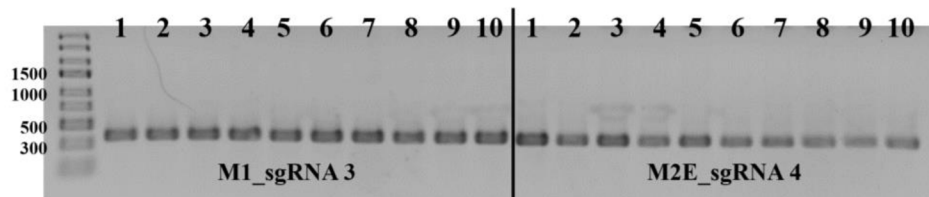
podrobené Colony PCR na overenie prítomnosti sgRNA vo vektore (Obr. 16).

Ako druhá metóda na overenie, či kolónie nesú správne zaklonovanú sgRNA vo vektore sa použila upravená PCR metóda. Jeden z primerov odpovedal práve sgRNA sekvencii, ktorá sa mala nachádzať vo vektore, druhý použitý primer bol Colony 2 (Tab. 1 a 2). Pokiaľ by sgRNA vo vektore nebola prítomná, primer by sa nemal kam naviazať a PCR produkt by sa na gély neobjavil. Na modifikovanú Colony PCR reakciu sa použili prvé 2 kolónie nesúce sgRNA3 a 4, prvé 3 kolónie nesúce sgRNA1 a jedna kolónia so sgRNA2. V prípade vektoru M1 mala byť veľkosť produktu 505 bp, v prípade M2E mala byť veľkosť 485 bp. Z gélu vyplýva, že všetky testované kolónie niesli správne vloženú sgRNA sekvenciu do vektoru (Obr. 17).

Na záver sa testované kolónie preočkovali do tekutého LB média s prídavkom ampicilínu a nechali cez noc rásť. Ďalší deň boli z buniek izolované plazmidy, ktoré sa použili v druhej Golden Gate reakcii – skladaní vždy dvoch a dvoch sgRNA do destinačných vektorov. Koncentrácie „shuttle“ vektorov po izolácii z buniek sú v tabuľke 11.

#### 4.2.2 Skladanie sgRNA do destinačných vektorov

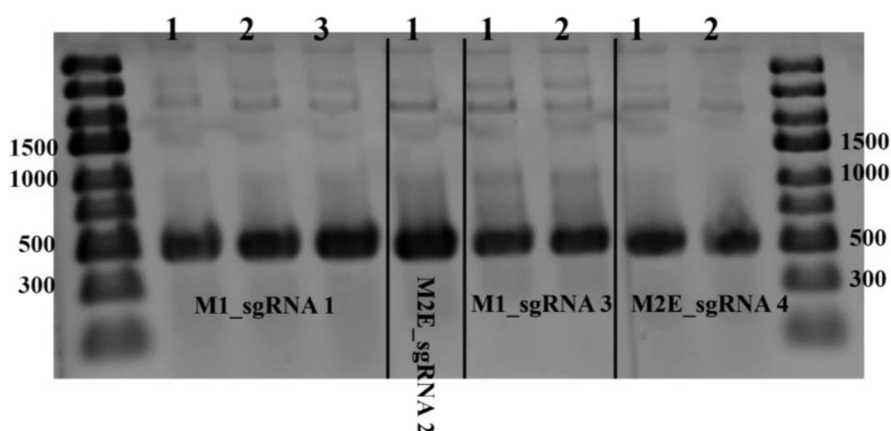
Izolované „shuttle“ vektory nesúce každý jednu sgRNA boli použité spoločne s destinačným vektorom pDGE347 a restričnou endonukleázou BsaI na druhú GoldenGate klonovaciu reakciu. Restričný enzým BsaI naštípi destinačný vektor a vystrihne fragmenty obsahujúce sgRNA sekvencie zo „shuttle“ vektorov.



Obrázok 16 Colony PCR na kolóniách nesúcich M1 so sgRNA 3 (zľava prvých 10 jamiek) M2E so sgRNA 4 (druhých 10 jamiek zľava). Použili sa primery Colony 1 a Seq. Produkt bol 380 bp (M1) a 360 bp (M2E).

Tabuľka 11 Koncentrácie „shuttle“ vektorov izolovaných z nočných kultúr.

Vektor	Kolónia	Koncentrácia (ng/μl)
M1_sgRNA1	1	78,2
	2	81,7
M2E_sgRNA2	1	130,3
M1_sgRNA3	1	97,2
	2	72
M2E_sgRNA 4	1	138,6
	2	143,8



Obrázok 17 Modifikovaná Colony PCR s použitím jednotlivých oligonukleotidov so sekvenciou sgRNA a primeru Colony 2. Zľava prvé 3 kolónie so sgRNA1 v M1, kolónia so sgRNA2 vo vektore M2, jamka 5 a 6 obsahuje kolónie nesúce sgRNA3 v M1 a posledné dve jamky obsahujú kolónie so sgRNA4 vo vektore M2E. Produkty boli M1 – 505 bp a M2E 485 bp.

Po reakcii vzniknú rôzne lepivé konce. 5' koniec prvej sgRNA je komplementárny s lepivým koncom na destinačnom vektore a 3' koniec je komplementárny s lepivým koncom na druhej sgRNA. Druhá sgRNA má na konci opäť sekvenciu zhodnú s presahom na destinačnom vektore a umožňuje vloženie oboch sgRNA a ich uzavretie vo vektore. T4 DNA ligáza pospája všetky konce a na záver reakcie

vznikne destinačný vektor nesúci 2 sgRNA cieľiace na rôzne genomické sekvencie.

V Golden Gate reakcii boli použité plazmidy získané z kolónie označenej ako 1 vo všetkých prípadoch sgRNA. Po transformácii narástlo približne 50 kolónií na každej miske s pridaným spektinomycínom, pričom bolo zvolených vždy 10, ktoré boli preočkované na nové misky a použité na založenie tekutej kultúry s následnou izoláciou finálnych plazmidov.

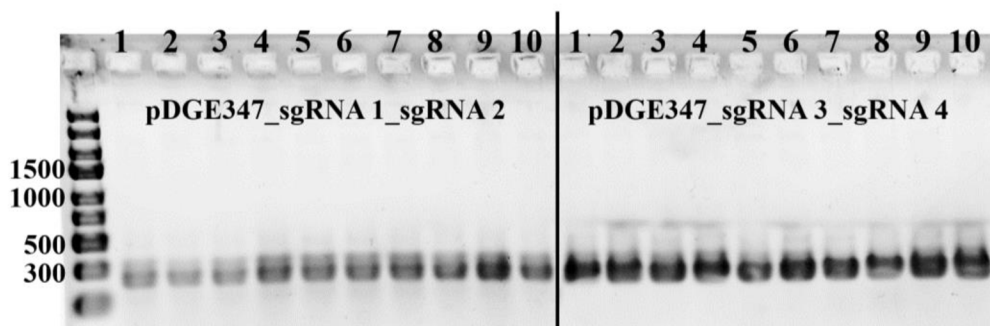
20 použitých kolónií nesúcich polovica destinačný vektor so sgRNA<sub>1,2</sub> a polovica destinačný vektor so sgRNA<sub>3,4</sub> boli pred izoláciou plazmidov podrobené Colony PCR reakcii na overenie správnej prítomnosti a orientácie vložených inzertov. Na tento účel sa ako primery použili jednotlivé odpovedajúce oligonukleotidové sekvencie sgRNA a amplifikoval sa región medzi nimi (Obr. 18, Tab. 1).

Po overení pomocou PCR s oligonukleotidmi ako primermi nasledovala izolácia plazmidov z tekutých kultúr. Použili sa vždy prvé 3 kolónie z predošlých 10. Získané koncentrácie finálnych plazmidov sú v tabuľke 12.

#### 4.2.3 Sangerovo sekvenovanie destinačných vektorov

Zvolených 6 plazmidov nesúcich sgRNA bolo sekvenovaných na zistenie presnej sekvencie, ktorá sa nachádza v mieste sgRNA. Každý z plazmidov bol sekvenovaný z oboch strán za pomoci dvojice primerov Colony 1 a Seq (Tab. 2), pričom miesto s vloženou sgRNA sa nachádzalo medzi nimi.

Všetkých 6 plazmidov malo sekvencie odpovedajúce teoreticky získanej sekvencii vektora so správne vloženou dvojicou sgRNA a mohli byť použité na

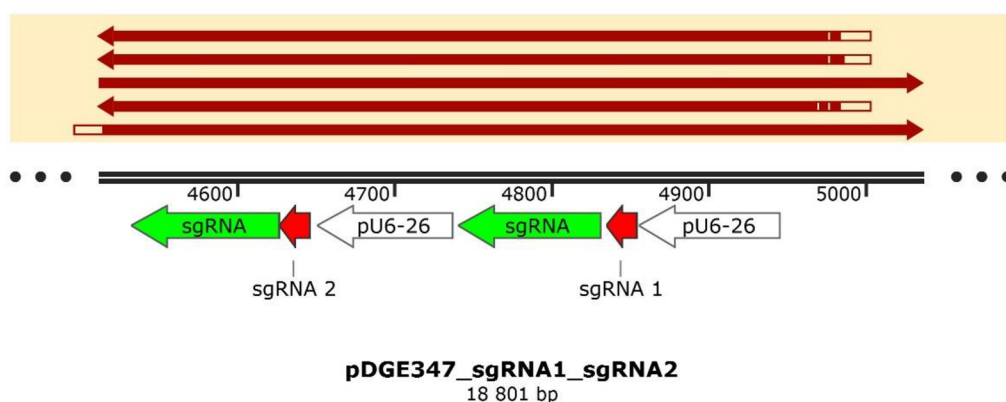


Obrázok 18 PCR overenie transformovaných kolónií. Použité primery boli oligonukleotidy odpovedajúce vloženým sgRNA (Tab. 1). Prvých 10 jamiek obsahuje sgRNA 1,2 v destinačnom vektore, druhých 10 jamiek obsahuje sgRNA 3,4. Produkt má 230 bp.

Tabuľka 12 Koncentrácie „shuttle“ vektorov izolovaných z nočných kultúr. Testovaná kolónia 3 nesúca sgRNA1 sa na ďalšiu prácu nepoužívala, keďže nebola nevyhnutná.

Destinačný vektor so sgRNA	Kolónia č.	Koncentrácia (ng/ul)
pDGE347_sgRNA1_sgRNA2	1	367
	2	262,7
	3	340
pDGE347_sgRNA3_sgRNA4	1	383
	2	326,1
	3	283,9

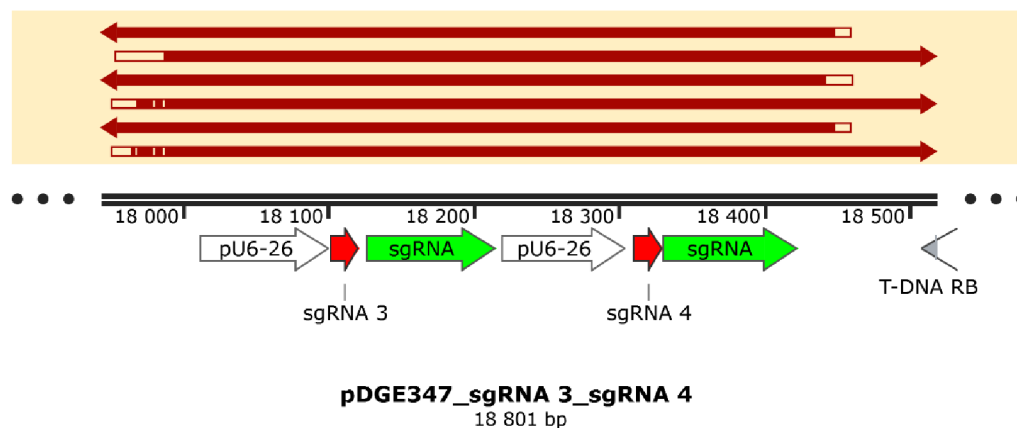
transformáciu *A. tumefaciens* a metódu Floral dip. Sekvenačné dáta boli vyhodnotené pomocou pomocou softvéru SnapGene, ktorý umožnil porovnať získané stopy s teoretickou sekvenciou destinačného vektoru. Sekvenačné stopy a ich odpovedajúca časť destinačného vektoru sú porovnané ako schematické znázornenie ako schematické znázornenie na obrázkoch 19 a 20. Jedna stopa, konkrétne „reverse primer“ pri plazmide č. 2 s vloženou sgRNA1,2, nebola správne mapovaná, kvôli jej nedostatočnej kvalite. Na ďalšie použitie v rámci experimentov boli vybrané plazmidy č.1 z oboch typov.



Obrázok 19 Ilustračná mapa sekvenačných stôp a ich polohy na destinačnom vektore nesúcom sgRNA 1 a sgRNA 2. Smer červených šípok ukazuje orientáciu sekvenovaného vlákna. Biele šípky znázorňujú promótor pU6-26, červené vedľa promótoru ukazujú sgRNA „spacer“ a zelené znázorňujú sgRNA „scaffold“. Mapa ukazuje 5 sekvenačných stôp, posledná šiesta nebola správne interpretovaná kvôli nedostatočnej kvalite. Vytvorené softvérom SnapGene.

### 4.3 Transformácia *A. thaliana* – Floral dip

Metóda Floral dip využíva schopnosť baktérie *Agrobacterium tumefaciens* prenášať prirodzene gény do rastlinných buniek a integrovať ich do chromozómov. Floral dip pozostáva z namnoženia bakteriálneho kmeňa nesúceho požadovaný konštrukt, aktivácie virulentných génov v baktériách pomocou



Obrázok 20 Ilustračná mapa sekvenčných stôp a ich polohy na destinačnom vektore nesúcom sgRNA 3 a sgRNA 4. Smer červených šípok ukazuje orientáciu sekvenovaného vlákna. Mapa ukazuje všetky 6 sekvenčných stôp. Biele šípky znázorňujú promótor pU6-26, červené vedľa promótoru ukazujú sgRNA „spacer“ a zelené znázorňujú sgRNA „scaffold“. Vytvorené softvérom SnapGene

fenolických látok (napr. acetosyringon) a následného namáčania nie plno rozvinutých kvetov na transformovaných rastlinách.

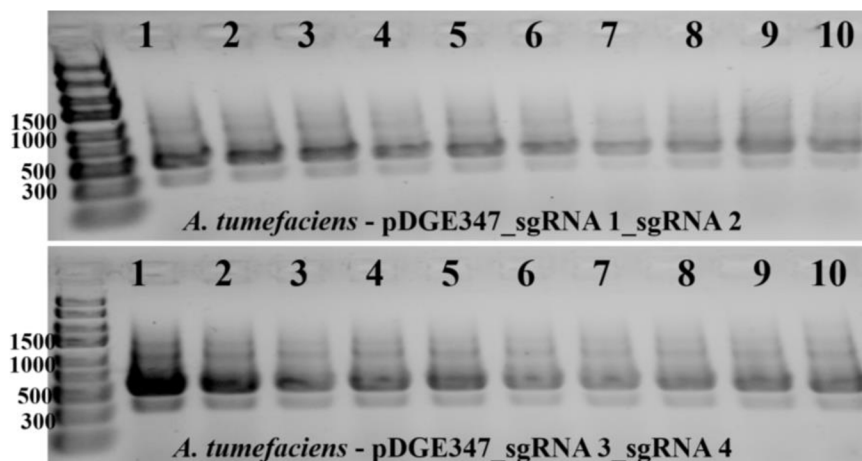
#### 4.3.1 Transformácia *A. tumefaciens*

Na začiatku boli izolované destinačné vektory z kolónie č. 1 *E. coli* vkladané do *A. tumefaciens* teplotným šokom. Po 48h kultivácie sa získalo približne 20 kolónií *A. tumefaciens* na každej miske. Bolo vybratých 10 kolónií nesúcich jeden a rovnako 10 kolónií nesúcich druhý konštrukt, na ktorých prebehla Colony PCR pre potvrdenie prítomnosti plazmidu za použitia primerov Colony 1 a Seq (produkt 550 bp) (Tab. 2, Obr. 21).

10 overených kolónií sa opäť označilo číslami a vždy prvá kolónia bola použitá na transformáciu rastlín. Baktérie sa postupne nechali namnožiť v priebehu 2 dní až do dosiahnutia požadovanej hodnoty OD pri 600 a boli použité na infikovanie kvetov transformovaných rastlín.

#### 4.4 Selekcia CRISPR-Cas9 mutantných rastlín T1 generácie

Poslednou kapitolou experimentálnej časti práce bola identifikácia a izolácia homozygotných rastlín s editovanými, pokiaľ možno, všetkými izoformami proteínu LHCB2. Z časových dôvodov a kvôli náročnosti celého selekčného procesu sa s transformovanými rastlinami pre „knock-out“ *LHCB1* viac nepracovalo. Po vybratí transgénnych semien za pomoci markeru FAST bol prvou



Obrázok 21 Colony PCR na *A. tumefaciens* nesúcich destinačné vektory s vloženými sgRNA. Hore – kolónie so sgRNA1,2 od 1 do 10 zľava; Dole – kolónie so sgRNA3,4 od 1 do 10 zľava. Použité primery Colony 1 a Seq, produkt 550 bp.

metódou na stanovenie prítomnosti/neprítomnosti proteínu LHCB2 Dot Blot – zjednodušená verzia klasického Western blotu, počas ktorej nedochádza ku separácii proteínov cez SDS-PAGE, analyzované sú celé proteínové extrakty vo vzorke.

#### 4.4.1 Marker FAST

FAST (fluorescence-accumulating seed technology) je špecifický proteínový marker slúžiaci na rýchlu identifikáciu transgénnych semien. FAST pozostáva z promótoru a kódujúcej sekvencie pre oleozín1 (OLE1), za ktorú je pripojená sekvencia pre fluorescenčný proteín, v prípade vektoru pDGE347 ide o RFP (Shimada *et al.* 2009, Ordon *et al.*, 2016). Selekcia semien prebieha pod fluorescenčným mikroskopom, vďaka špecifickému promótoru sú fluorescenčné proteíny exprimované v semennom obale a pod excitačným svetlom „svietia“ (Obr. 22). Spomedzi niekoľkých tisícov semien bolo relatívne jednoducho vybraných 20 svietiacich semien od každej transformovanej rastliny.

#### 4.4.2 Dot Blot

Rastliny s pozitívnou prítomnosťou transgénnej kazety boli analyzované pomocou Dot blotu. Na detekciu proteínu LHCB2 sa použila špecifická primárna protilátka, ktorá bola následne rozpoznaná sekundárnou protilátkou značenou enzýmom peroxidázou. Po inkubácii so substrátom bolo detekované chemiluminiscenčné sfarbenie, čo umožnilo určiť miesto, kam sa protilátka naviazala. Keďže bola snaha objaviť kandidátne rastliny bez prítomnosti proteínu

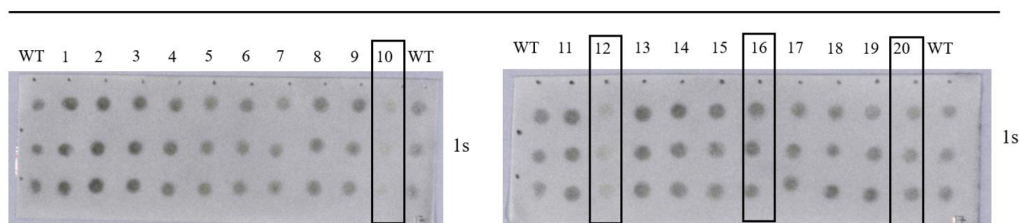


Obrázok 22 Transgénnne „svietiace“ semeno vpravo hore obklopené netransformovanými semenami pod fluorescenčným mikroskopom na prítomnosť/neprotomnosť proteínu LHCBI alebo LHCB2.

LHCB2, hľadali sa negatívne vzorky, kam sa protilátka nenaviazala. Negatívne vzorky boli následne sekvenované na potvrdenie výsledkov z Dot blotu. Analyzovali sa aj niektoré vzorky, ktoré na Dot blote vyšli pozitívne, medzi inými aj 17-16, pretože metóda Dot blot sa neukázala ako vysoko spoľahlivá a jednoznačne preukázateľná.

Testované boli línie 17 a 18. Línia 17 značila potomkov predtým transformovanej rastliny WT konštruktom sgRNA1,2 a línia 18 značila potomkov rastliny *lhcb3* mutanta transformovaného konštruktom sgRNA1,2. Z línie 17 boli vybrané vzorky 10, 12, 16, 20 a H (Obr 23, vzorka H nie je ukázaná). Z línie 18 boli vybrané vzorky 2, 4, 8, 13, 16, 19 a 20 (Obr 24).

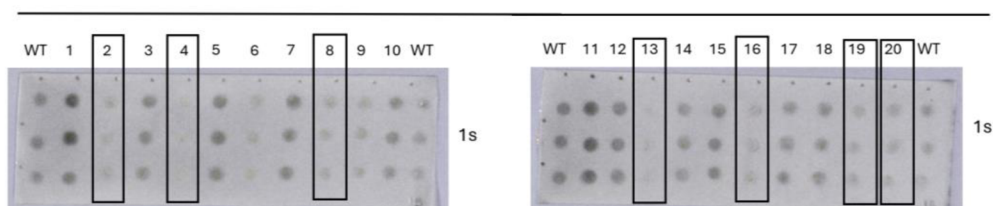
### #17



Obrázok 23 Výsledky z Dot blotu pre rastliny z línie 17. Membrány boli fotené pri expozičnom čase 1s. Vzorky boli nanášané v triplikáte pod seba. Čierne obdĺžniky označujú vzorky, ktoré boli ďalej skúmane pomocou MS a sekvenovaním. Autor obrázku Mgr. Zuzana Kučerová, Ph.D.



#18



Obrázok 24 Výsledky z Dot blotu pre rastliny z línie 18. Membrány boli fotené pri expozičnom čase 1s. Vzorky boli nanášané v triplikáte pod seba. Čierne obdĺžniky označujú vzorky, ktoré boli ďalej skúmane pomocou MS a sekvenovaním. Autor obrázku Mgr. Zuzana Kučerová, Ph.D.

#### 4.4.3 Sekvenácia Sangerovou metódou

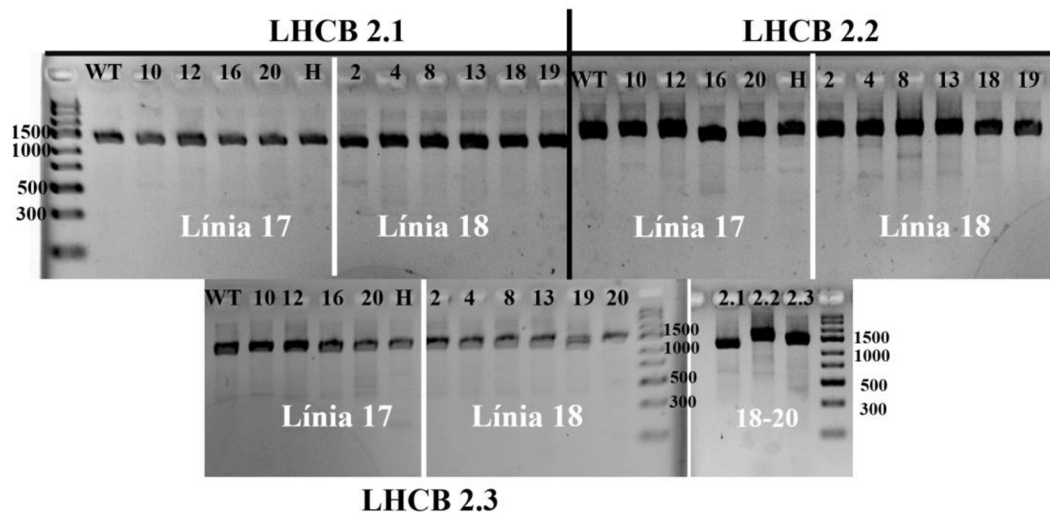
Keďže Dot blot sa neukázal ako spoľahlivá metóda, pristúpilo sa k finálnemu validačnému kroku CRISPR-Cas9 knock-out mutantov – osekvenovaniu *LHCB2* izoforiem v jednotlivých rastlinách. Vzhľadom na veľmi vysokú homológiu všetkých *LHCB2* izoforiem bolo treba pred samotným sekvenovaním jednotlivé genomické úseky namnožiť pomocou PCR (Obr. 25). Nebolo možné nájsť špecifické dvojice primerov priamo len pre jednu, či druhú alebo tretiu izoformu. Namnoženie jednotlivých úsekov bolo možné vďaka primerom navrhnutým do UTR oblastí génov, ktoré boli špecifické pre jednotlivé gény (Tab. 2).

Sekvenáciou sa dokázalo získať presné poradie nukleotidov a pri porovnaní s WT sekvenciou určiť presné mutácie v jednotlivých génoch. Sekvenácia prebiehala Sangerovou metódou, bolo použitých 5 vzoriek z línie 17 – 10, 12, 16, 20 a H; a 7 vzoriek z línie 18 – 2, 4, 8, 13, 16, 19, 20.

Sekvenačné stopy boli vyhodnocované pomocou online aplikácie SeqScreener (ThermoFischer, USA). SeqScreener umožnil nahratie jednotlivých sekvenačných stôp, ich automatické zaradenie do konkrétnej polohy na sekvenačnej doštičke a analýzu. Manuálne bolo treba ku každej nahranej vzorke priradiť sgRNA sekvenciu a kontrolnú sekvenciu, ktorá bola získaná sekvenovaním WT rastliny.

Softvér následne automaticky analyzoval jednotlivé stopy a snažil sa ich porovnať s kontrolnou sekvenciou. Na základe vypočítaných parametrov potom vyhodnotil jednotlivé vzorky ako „Ideal KO“ (zelená jamka s hviezdíčkou, KO – „knock-out“), „Good KO“ (zelená jamka) a „KO needs review“ (modrá jamka) (Obr. 26).





Obrázok 25 PCR namnoženie jednotlivých sekvencií *LHCB2* izoformami. Obrázok je zložený z viacerých gélov. Vzorka 18-20 sa nachádzala na gély samostatne a všetky izoformy sú v jamkách vedľa seba.

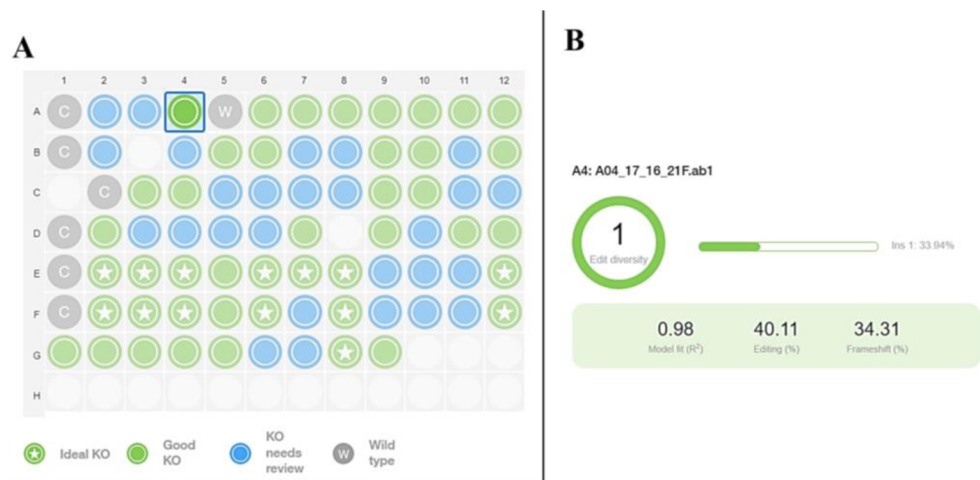
Parametre, ktoré sa použili na celkové zhodnotenie KO vzorky, boli Model fit -  $R^2$ , Editing (% editovaných sekvencií vo vzorke) a Frameshift (% sekvencií, v ktorých došlo s vysokou pravdepodobnosťou k posunutiu čítacieho rámca). Softvér ďalej ukázal detailné informácie pre každú vzorku, porovnanie konkrétnych sekvenčných stôp, počet všetkých detegovaných indelov a ich zastúpenie vo vzorke.

Parameter Model Fit ( $R^2$ ) označuje do akej miery bol softvér schopný po dekodovaní sekvenčnej stopy namapovať jednotlivé sekvencie v editovaných vzorkách na referenčnú sekvenciu. Ide o číslo medzi 0 a 1, pričom čím bližšie k 1, tým je kvalita stopy lepšia. Pre príklad sa dá použiť vzorka 16 z línie 17 sekvenovaná FP pre izoformu *LHCB2.1*. Parameter  $R^2$  je 0,98, čo znamená vysokú mieru identifikácie a kvality sekvenčnej stopy a vysoko presné priradenie jednotlivých editovaných sekvencií na kontrolnú sekvenciu. Pri porovnaní sekvenčnej stopy je vidieť niekoľko rôznych signálov na grafe, čo označuje prítomnosť rôzne editovaných sekvencií vo vzorke (Obr. 27).

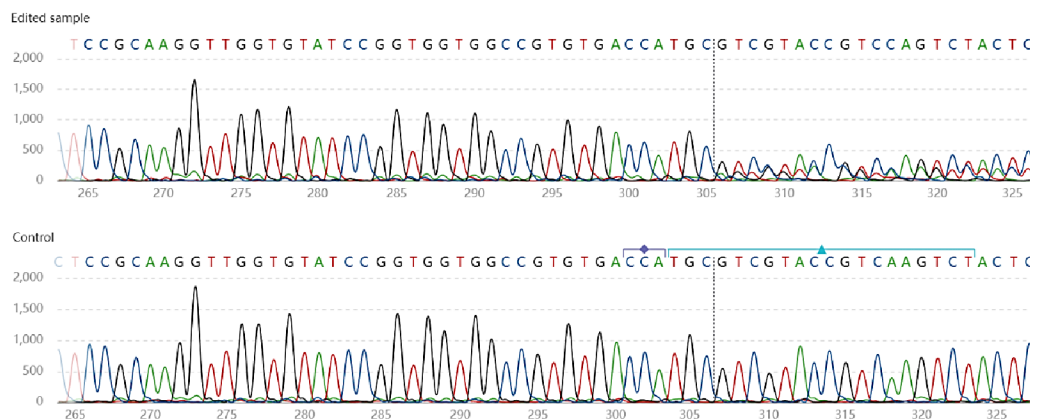
Druhým významným skúmaným parametrom je Editing (% editovaných sekvencií vo vzorke). Ide o percentuálny podiel upravených sekvencií zo všetkých prítomných vo vzorke. Ideálny počet editovaných sekvencií je 100%, pri heterozygotovi ide o 50% editáciu a pri WT jedincovi 0% editáciu. Čísla medzi týmito bodmi je treba manuálne interpretovať a vziať do úvahy aj editáciu pri druhom primery, či pri ostatných izoformách. Na príklade vzorky 16 z línie 17 je

možné vidieť číslo 40%, ktoré je na pomedzí medzi WT a heterozygotom. V tomto prípade je treba prihliadnúť na ostatné parametre

Posledným dôležitým parametrom je Frameshift (% sekvencií, pri ktorých editácia spôsobila posunutie čítacieho rámca a tým aj možný „knock-out“ proteínu). Na príklade vzorky 16 z línie 17 je vidieť iba 34% editovaných vlákien s posunutím čítacieho rámca vedúceho ku „knock-out“ proteínu. Väčšina DNA vo vzorke odpovedá WT sekvencii, teda s vysokou pravdepodobnosťou rastlina bude tvoriť funkčný proteín. Avšak, tretina vlákien editovaná je a teoreticky by bolo možné v niekoľkých nasledujúcich generáciách mutanta vyselektovať. Vzorka 17-16 bola nechaná na prípadné použitie, pokiaľ by sa nenašiel lepší kandidát.



Obrázok 26 A - Celková analýza sekvenačnej dosičky T0 generácie programom SeqScreener. Jednotlivé jamky boli označené podľa vypočítaných parametrov a zhodnotené ako Ideal KO (zelená s hviezdikou), Good KO (zelená) a KO needs review (modrá). Kontrolné vzorky sú označené C. B – detail vzorky 16 z línie 17 sekvenovanej FP pre izoformu *LHCB2.1* s vyhodnotenými parametrami Model fit, % Editing a % Frameshift.



Obrázok 27 Sekvenačná stopa pre vzorku 16 z línie 17, sekvenované FP *LHCB2.1*. Oproti kontrolnej stope je vidieť od sgRNA sekvencie diverzitu signálov. Vo vzorke bolo

prítomných niekoľko rôzne editovaných sekvencií, ktoré sa prejavili rôznymi signálmi na rovnakých pozíciách oproti kontrole. Sekvencia sgRNA je označená na kontrolnej vzorke tyrkysovou čiarou s trojuholníkom ak nej priliehajúci PAM CCA (komplementárny k NGG) tmavomodrým kosoštvorcom.

### **Línia 17**

Z línie 17 sa sekvenovalo 5 vzoriek – 10, 12, 16, 20 a H. Výsledky sekvenácie s vyhodnotenými parametrami sú v tabuľke 13. Vzorka 10 sa ukázala ako najlepší kandidát. V *LHCB2.2* a *2.3* boli všetky parametre pre knock-out proteínu vysoké a kvalita sekvenačnej stopy taktiež. Problém bol pri *LHCB2.1*, kedy v dôsledku nie vysokej kvality stopy sa parametre nedali vyhodnotiť.

Vzorka 12 mala vysoké hodnoty parametrov pri *LHCB2.3* a *FP LHCB2.2*, vďaka čomu by sa prípadne dal v nasledujúcej generácii získať homozygot pre obe vlákna. *LHCB2.1* sa nedal správne vyhodnotiť, parameter  $R^2$  bol len okolo 0,6, čo bolo spôsobené vysokou diverzitou editovaných vzoriek. Vzorka 12 sa nechala na prípadné ďalšie použitie.

Vzorka 16 mala podobne ako predchádzajúce, vysoko pravdepodobný „knock-out“ *LHCB2.3*. Vo zvyšných 2 skúmaných izoformách sa ukázala ako možný heterozygot, pri ktorom by sa teoreticky dalo v nasledujúcich generáciách získať kompletného homozygotného mutanta.

Vzorka 20 sa ukázala ako WT jedinec v izoformách *2.1*, *2.2* a deléciu o násobku 3 v *2.3*, preto sa s ňou už následne nepracovalo. Vzorka H sa, podobne, ukázala ako WT v dvoch izoformách, ďalej sa s ňou nepracovalo, a preto v tabuľke uvedená nie je.

### **Línia 18**

Z línie 18 sa sekvenovali vzorky 2, 4, 8, 13, 16, 19 a 20. Výsledky sekvenácie sú uvedené v tabuľke 14. Vzorky 16, 19 a 20 sa ukázali ako WT jedinci, s ktorými sa už ďalej nepracovalo, preto v tabuľke uvedení nie sú.

Vzorka 2 sa ukázala ako nádejný kandidát v izoformách *2.2* a *2.3*. Pri izoforme *2.1* je možné, že sa jedná o heterozygota, preto sa nechala na ďalšie použitie.

Vzorka 4 mala najlepšie hodnoty skúmaných parametrov pre „knock-out“ všetkých troch izoform a brala sa ako najlepšia možnosť na ďalšie skúmanie.

Vzorka 8 sa ukázala ako WT jedinec pri izoformách *2.1* a *2.2* a v tabuľke je uvedená len ako príklad zo 4 WT vzoriek, ktoré boli sekvenovaním identifikované (8, 16, 19, 20).

Pri vzorke 13 išlo o potenciálneho heterozygota v 2.1 a 2.2. Pri sekvenovaní 2.3 došlo k získaniu príliš veľkého množstva rôznych signálov a softvér ich nedokázal správne mapovať. Je možné, že ide o väčšie delécie, ktoré sa zle identifikovali. Táto vzorka bola ponechaná na ďalšiu analýzu.

Tabuľka 13 Vyhodnotenie sekvenácie T1 generácie kandidátnych rastlín z línie 17. V tabuľke sú uvedené parametre  $R^2$ , % Editing a Frameshift pre každú sekvenačnú stopu získanú s FP alebo RP. Zelenou sú označené stĺpce s vysokými hodnotami parametrov a vysokou pravdepodobnosťou „knock-out“ v danom vlákne. Červenou sú označené odhalené WT sekvencie. Sivou sú zvýraznené stopy s parametrom  $R^2 \leq 0,6$  a bielou sú označené vzorky heterozygotov. Pokiaľ bolo možné, identifikovali sa aj presné indely, pričom pokiaľ z rôznych dôvodov identifikácia nebola možná, táto možnosť bola označená „nedá sa určiť.“

17-10						
	<i>LHCB2.1</i>		<i>LHCB2.2</i>		<i>LHCB2.3</i>	
Primer	FP	RP	FP	RP	FP	RP
$R^2$	0	0,53	0,99	0,99	0,99	1
Editing	100	37,76	84,29	86,04	99,78	99,69
Frameshift	64,59	35,58	82,25	83,93	99,78	99,18
Indel	Nedá sa určiť	+1 N	+1 N	+1 N	+1 N	+1 N
17-12						
	<i>LHCB2.1</i>		<i>LHCB2.2</i>		<i>LHCB2.3</i>	
Primer	FP	RP	FP	RP	FP	RP
$R^2$	0,61	0,66	0,99	0,51	0,91	0,92
Editing	70,09	71,87	76,77	40,75	100	100
Frameshift	57,52	71,87	75,95	36,67	100	99,03
Indel	Nedá sa určiť	Nedá sa určiť	+1 N	+1 N	+7 N	+7 N
17-16						
	<i>LHCB2.1</i>		<i>LHCB2.2</i>		<i>LHCB2.3</i>	
Primer	FP	RP	FP	RP	FP	RP
$R^2$	0,98	0,86	0,75	0,6	0,99	0,99
Editing	40,11	51,3	46,22	67,47	99,48	98,89
Frameshift	34,31	48,25	45,05	64,8	99,44	98,25
Indel	Nedá sa určiť	Nedá sa určiť	Nedá sa určiť	Nedá sa určiť	+1 N	+1 N
17-20						
	<i>LHCB2.1</i>		<i>LHCB2.2</i>		<i>LHCB2.3</i>	
Primer	FP	RP	FP	RP	FP	RP
$R^2$	0,99	0,98	0,99	0,77	0,95	0,94
Editing	6,8	13,4	11,07	36,12	98,84	100
Frameshift	5,41	11,74	9,5	32,62	26,33	19,04
Indel	WT	WT	WT	WT	-21 N	-21 N

Tabuľka 14 Vyhodnotenie sekvenácie T1 generácie kandidátnych rastlín z línie 18. V tabuľke sú uvedené parametre  $R^2$ , % Editing a Frameshift pre každú sekvenačnú stopu získanú s FP alebo RP. Zelenou sú označené stĺpce s vysokými hodnotami parametrov a vysokou pravdepodobnosťou „knock-out“ v danom vlákne. Červenou sú označené odhalené WT sekvencie. Sivou sú zvýraznené stopy s parametrom  $R^2 \leq 0,6$  a bielou sú označené vzorky heterozygotov. Pokiaľ bolo možné, identifikovali sa aj presné indely, pričom pokiaľ z rôznych dôvodov identifikácia nebola možná, táto možnosť bola označená „nedá sa určiť.“

18-2						
	<i>LHCB2.1</i>		<i>LHCB2.2</i>		<i>LHCB2.3</i>	
Primer	FP	RP	FP	RP	FP	RP
$R^2$	0,94	0,76	0,76	0,85	0,89	0,66
Editing	36,99	46,8	72,74	70,56	98,94	100
Frameshift	33,92	43,5	67,87	69,59	98,4	97,19
Indel	Nedá sa určiť	Nedá sa určiť	Nedá sa určiť	Nedá sa určiť	+1, -23 N	+2, -22 N
18-4						
	<i>LHCB2.1</i>		<i>LHCB2.2</i>		<i>LHCB2.3</i>	
Primer	FP	RP	FP	RP	FP	RP
$R^2$	0,97	0,85	0,98	0,98	0,99	0,99
Editing	70,12	73,33	83,97	85,34	98,8	99,74
Frameshift	67,1	71,82	81,97	83,72	98,52	97,7
Indel	+1 N	+1 N	+1 N	+1 N	+1 N	+1 N
18-8						
	<i>LHCB2.1</i>		<i>LHCB2.2</i>		<i>LHCB2.3</i>	
Primer	FP	RP	FP	RP	FP	RP
$R^2$	0,97	0,97	0,99	0,73	0,54	0,52
Editing	18,86	20,64	17,14	87,91	93,52	79,46
Frameshift	12,96	15,99	14,04	86,54	91,33	66,38
Indel	WT	WT	WT	-1 N	+1, +19 N	Nedá sa určiť
18-13						
	<i>LHCB2.1</i>		<i>LHCB2.2</i>		<i>LHCB2.3</i>	
Primer	FP	RP	FP	RP	FP	RP
$R^2$	0,98	0,51	0,73	0,96	0	0,07
Editing	66,91	43,98	60,98	54,94	100	98,44
Frameshift	65,59	42,15	53,22	52,16	76,67	65,78
Indel	+1 N	+1 N	+1 N	+1 C	Nedá sa určiť	Nedá sa určiť

## 4.5 Selekcia homozygotných mutantov – T2 generácia

### 4.5.1 Marker FAST

V prípade T2 generácie išlo o vyselektovanie semien bez prítomnosti Cas9 transformačnej kazety. Pod mikroskopom sa preto vyberali semená, ktoré nemali

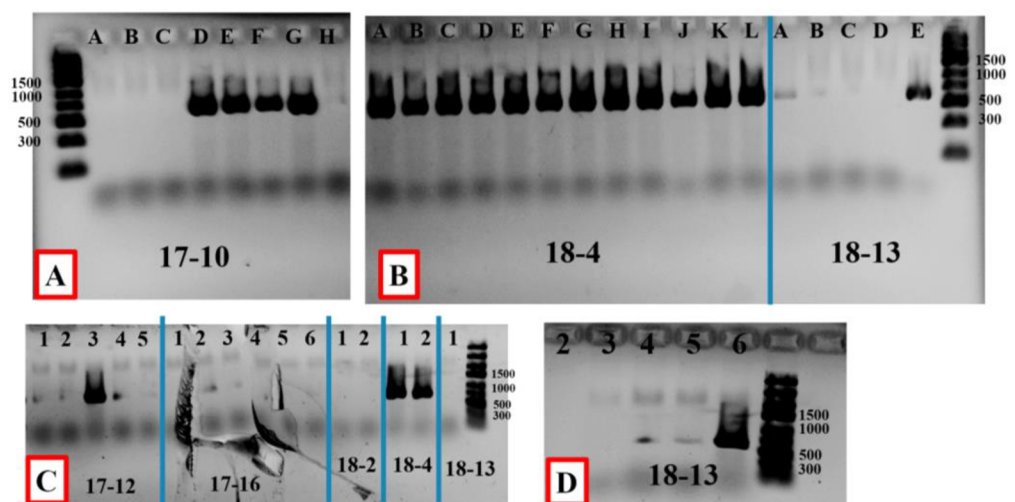
transgénny marker FAST, teda nefluoreskovali. Od každej rodičovskej rastliny z línii 17 a 18, ktoré boli vybrané na základe sekvenačných dát, bolo vybraných 10-15 semien, ktoré boli použité na ďalšie experimenty. Rastliny sa zasadili a vo veku 3 týždňov boli použité na overenie prítomnosti RFP a neskôr, vo veku 6-7 týždňov na izoláciu DNA a sekvenáciu.

#### 4.5.2 PCR

Rastliny boli ponechané vo fytotrone po dobu 3 týždňov a podrobené PCR skríningu. Z rastlín sa odobrali vzorky podľa postupu opísanom v kapitole 3.2.5.1. PCR prebiehala za použitia primerov RFP1 a RFP2, veľkosť produktu 630 bp (Tab. 2). Okrem skúmaných rastlín sa použil WT ako negatívna kontrola a čistý destinačný vektor ako pozitívna kontrola.

Z línie 17-10 boli získané 4 negatívne rastliny (A,B,C,H, Obr. 28A), z línie 17-12 tiež 4 (1,2,4,5) a z línie 17-16 6 negatívnych rastlín. Z línie 18-2 sa našli 2 negatívne vzorky (Obr. 28C) a z línie 18-13 7 negatívnych rastlín (A,B,C,D,1,2,3) (Obr. 28B,D). Najslubnejšia línia 18-4 nemala negatívneho zástupcu, preto nemohla byť ďalej skúmaná v rámci tejto práce (Obr. 28B, C).

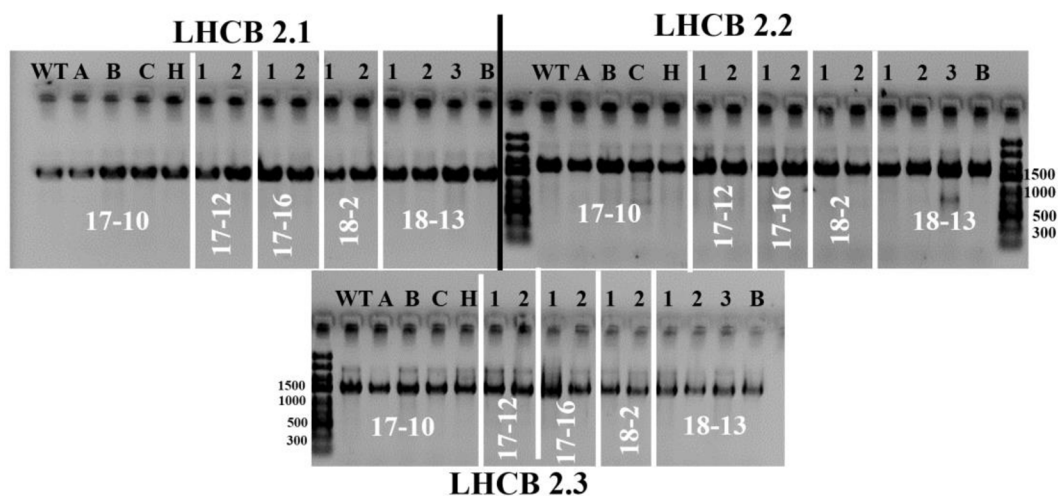
Z rastlín 17-A,B,C,H; 17-12 (1,2); 17-16 (1,2); 18-2 (1,2) a 18-13 (1,2,3,B) bola izolovaná genomická DNA a podobne ako v T1 generácii došlo k namnoženiu jednotlivých sekvencií izoforiem *LHCB2* pomocou špecifických primerov na UTR oblasti (Tab. 2) (Obr. 29).



Obrázok 28 Výsledky PCR skríningu na prítomnosť RFP proteínu v T2 generácii. Obrázok je zložený z viacerých gélov. A – potomkovia z línie 17-10. B – Potomkovia z línii 18-4 a časť z línie 18-13. C – Potomkovia z línii 17-12, 17-16, 18-2 a druhá časť



z línii 18-4 a 18-13. D – pokračovanie línie 18-13 z obrázka C. Použité primery RFP1 a RFP2, produkt 630 bp.



Obrázok 29 PCR namnoženie jednotlivých sekvencií *LHCB2* izoformami z vybraných vzoriek línii 17-10, 17-12, 17-16 a 18-2, 18-13. Obrázok je zložený z viacerých gélov.

#### 4.5.3 Sekvenovanie rastlín T2 generácie

Vybrané rastliny z T2 generácie neobsahujúce Cas9 kazetu podobne ako ich rodičia podrobené sekvenácii v snahe o odhalenie homozygotného mutanta vo všetkých izoformách *LHCB2*.

Vyhodnocovanie editácií v jednotlivých génoch v T2 generácii bolo pomocou programu ICE (Inference of CRISPR edits, Synthego). Program ICE bol zvolený ako alternatíva ku SeqScreeneru, pretože dokázal dekodovať aj sekvenačné stopy, ktoré SeqScreenner nevedel správne vyhodnotiť. Program ICE pracoval podobne ako SeqScreenner, taktiež vyhodnocoval parameter  $R^2$ , prítomné indely a stanovil KO skóre označujúce množstvo sekvencií, u ktorých s vysokou pravdepodobnosťou došlo k posunutiu čítacieho rámca, prípadne došlo k delícii viac ako 21 nukleotidov. Čím vyššie je KO skóre (od 0 do 100), tým je vyššia pravdepodobnosť „knock-outu“ génu. Výsledky sekvenácie T2 generácie sú zhrnuté v tabuľke 15.

##### Línia 17-10

V T1 generácii sa rastlina 17-10 ukázala ako najslubnejší kandidát na celkového KO mutanta pre proteín *LHCB2*. V T1 generácii boli získaní 4 potomkovia (A, B, C, H), ktorí nemali prítomnosť Cas9 kazety a mohli byť ďalej skúmaní. Všetky 4 rastliny mali vysoké skóre editácie pri všetkých izoformách, okrem niektorých nekvalitných stôp. Rastliny C a H mali kompletný súbor sekvenačných dáta

vyhodnotených a s veľmi vysokou pravdepodobnosťou ide o hľadaných KO mutantov pre všetky *LHCB2* izoformy.

#### Línia 17-12 a 17-16

Potomkovia rastliny 17-12 sa ukázali ako dobrí kandidáti na KO v *LHCB2.3*, avšak pri *LHCB2.1* a *LHCB2.2* išlo o heterozygotov v oboch testovaných rastlinách. V prípade potomkov línie 17-16 sa zistila WT sekvencia pre proteín *LHCB2.1*. S oboma líniami sa už ďalej nepracovalo.

#### Línia 18-2

Od rastliny 18-2 sa testovali 2 potomkovia. Obaja boli heterozygotní v *LHCB2.1* a č.2 obsahovalo WT sekvenciu pri *LHCB2.2*. *LHCB2.3* malo najvyššie skóre editácie v tejto línii, avšak vzhľadom na ostatné izoformy sa s touto líniov viac nepracovalo.

#### Línia 18-13

Potomkovia z tejto línie boli najnáročnejší na vyhodnotenie. Testovali sa 4 vzorky (1, 2, 3 a B). Vzorka 1 sa ukázala ako WT pri proteíne *LHCB2.1*. V prípade 2.2 a 2.3 išlo o heterozygota. Vzorka 2 sa ukázala ako dobrý kandidát na KO proteínu 2.2, ale v prípade 2.3 boli prítomné indely o veľkosti násobku 3, ktoré neviedli ku zmene čítacieho rámca. V prípade 2.1 išlo s veľkou pravdepodobnosťou o heterozygota, keďže jedno vlákno bolo editované s relatívne vysokou efektivitou, zatiaľ čo druhé nie. Vzorka 3 bola vyhodnotená podobne ako vzorka 2. V prípade poslednej vzorky B išlo o deléciu 15 nukleotidov, ktorá nemá za následok posun čítacieho rámca. *LHCB2.1* mala WT sekvenciu a 2.2 bola heterozygotná.

Tabuľka 15 Vyhodnotenie sekvenácie T1 generácie. V tabuľke sú uvedené parametre  $R^2$ , KO skóre a množstvo indelov pre každú sekvenačnú stopu získanú s FP alebo RP. Indely sú uvádzané v množinových zátvorkách ako {'počet':percentuálne zastúpenie}. Zelenou sú označené stĺpce s vysokými hodnotami parametrov a vysokou pravdepodobnosťou knock-out v danom vlákne. Červenou sú označené odhalené WT sekvencie a šedou vzorky s parametrom  $R^2 \leq 0,6$ .

17-10 A	$R^2$	KO- Skóre	Indel	17-16 2	$R^2$	KO- Skóre	Indel
2.1FP	0,94	94	{'1': 94.0}	2.1RP	0,93	0	{'0': 93.0, '-1': 0.0}
2.1RP	0,96	96	{'1': 96.0}	2.1FP	0,98	0	{'0': 98.0, '-1': 0.0}
2.2RP	0,97	97	{'1': 97.0}	2.2FP	0,96	48	{'0': 48.0, '1': 48.0}



2.2FP	0,97	97	{'1': 97.0}	2.2RP	0,95	47	{'0': 48.0, '1': 47.0}
2.3RP	Nedostatočná kvalita stopy			2.3FP	0,25	25	Nedá sa určiť
2.3FP	Nedostatočná kvalita stopy			2.3RP	0,32	27	Nedá sa určiť
<b>17-10 B</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>	<b>18-2 1</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>
2.1FP	0,95	95	{'1': 95.0}	2.1RP	0,84	42	{'0': 42.0, '1': 42.0}
2.1RP	0,94	94	{'1': 94.0}	2.1FP	0,95	46	{'0': 49.0, '1': 46.0}
2.2RP	0,93	93	{'1': 93.0}	2.2FP	0,94	46	{'0': 48.0, '1': 46.0}
2.2FP	0,96	96	{'1': 96.0}	2.2RP	0,96	49	{'0': 47.0, '1': 49.0}
2.3FP	Nedostatočná kvalita stopy			2.3FP	0,95	95	0,95
2.3RP	0,97	97	{'1': 97.0}	2.3RP	0,98	98	{'1': 98.0}
<b>17-10 C</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>	<b>18-2 2</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>
2.1FP	0,97	97	{'1': 97.0}	2.1FP	0,96	45	{'0': 51.0, '1': 45.0}
2.1RP	0,93	93	{'1': 93.0}	2.1RP	0,92	45	{'0': 47.0, '1': 45.0}
2.2RP	0,98	98	{'1': 98.0}	2.2FP	0,96	0	{'0': 96.0, '-1': 0.0}
2.2FP	0,98	98	{'1': 98.0}	2.2RP	0,97	0	{'0': 97.0, '-1': 0.0}
2.3FP	0,98	98	{'1': 98.0}	2.3FP	0,97	97	{'1': 97.0}
2.3RP	0,98	98	{'1': 98.0}	2.3RP	0,97	97	{'1': 97.0}
<b>17-10H</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>	<b>18-13 1</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>
2.1FP	0,96	96	{'1': 96.0}	2.1RP	0,9	0	{'0': 90.0, '-1': 0.0}
2.1RP	0,9	90	{'1': 90.0}	2.1FP	0,97	0	{'0': 97.0, '-1': 0.0}
2.2RP	0,95	95	{'1': 95.0}	2.2FP	0,91	40	{'0': 51.0, '1': 40.0}
2.2FP	0,93	93	{'1': 93.0}	2.2RP	0,89	38	{'0': 51.0, '1': 38.0}
2.3FP	0,95	95	{'1': 95.0}	2.3FP	0,86	36	{'3': 2.0, '-5': 1.0, '-9': 3.0, '18': 2.0, '-15': 42.0, + iné}
2.3RP	0,97	97	{'1': 97.0}	2.3RP	0,67	67	{'-14': 35.0, '-29': 32.0}
<b>17-12 1</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>	<b>18-13 2</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>

2.1FP	0,96	47	{'0': 49.0, '1': 47.0}	2.1FP	0,48	27	{'0': 9.0, '1': 18.0, '6': 2.0, '9': 1.0, '-': + iné}
2.1RP	0,94	49	{'0': 45.0, '1': 49.0}	2.1RP	0,91	91	{'1': 91.0}
2.2RP	0,93	49	{'0': 44.0, '1': 49.0}	2.2FP	0,93	93	{'1': 93.0}
2.2FP	0,95	51	{'0': 44.0, '1': 51.0}	2.2RP	0,95	95	{'1': 95.0}
2.3FP	0,9	90	{'1': 51.0, '7': 38.0, '-20': 1.0}	2.3RP	0,61	32	{'-15': 29.0, '-30': 31.0, '-31': 1.0}
2.3RP	0,9	90	{'1': 49.0, '7': 40.0, '-14': 1.0}	2.3FP	0,88	40	{'3': 1.0, '-3': 1.0, '-5': 1.0, '-9': 3.0, + iné}
<b>17-12 2</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>	<b>18-13 3</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>
2.1FP	0,95	47	{'0': 48.0, '1': 47.0}	2.1FP	Nedostatočná kvalita stopy		
2.1RP	0,9	47	{'0': 43.0, '1': 47.0}	2.1RP	0,92	47	{'0': 45.0, '1': 47.0}
2.2FP	0,95	47	{'0': 48.0, '1': 47.0}	2.2RP	0,9	90	{'1': 90.0}
2.2RP	0,9	47	{'0': 43.0, '1': 47.0}	2.2FP	0,94	94	{'1': 94.0}
2.3FP	0,9	90	{'1': 46.0, '7': 43.0, '-20': 1.0}	2.3FP	Nedostatočná kvalita stopy		
2.3RP	0,91	91	{'1': 46.0, '7': 44.0, '-14': 1.0}	2.3RP	0,95	15	{'1': 15.0, '-15': 80.0}
<b>17-16 1</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>	<b>18-13 B</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>KO-Skóre</b>	<b>Indel</b>
2.1FP	0,97	0	{'0': 97.0, '-1': 0.0}	2.1FP	0,98	0	{'0': 98.0, '-1': 0.0}
2.1RP	0,89	0	{'0': 89.0, '-1': 0.0}	2.1RP	0,93	0	{'0': 93.0, '-1': 0.0}
2.2FP	0,94	46	{'0': 48.0, '1': 46.0}	2.2RP	0,95	46	{'0': 49.0, '1': 46.0}
2.2RP	0,95	47	{'0': 48.0, '1': 47.0}	2.2FP	0,92	48	{'0': 44.0, '1': 48.0}
2.3FP	0,89	89	{'-37': 89.0}	2.3FP	0,99	0	{'-15': 99.0}
2.3RP	0,89	88	{'-10': 1.0, '-12': 1.0, '-17': 1.0, '-21': 1.0, + iné}	2.3RP	0,99	0	{'-15': 99.0}

## 5 DISKUSIA

### 5.1 CRISPR-Cas9 a LHCB proteíny v posledných rokoch

V tejto práci boli pripravené a vyselektované mutantné rastliny s „knock-outom“ v proteíne LHCB2 a bola snaha získať aj rastliny bez proteínu LHCB1. V priebehu posledných rokov už podobné experimenty boli publikované z rôznych dôvodov, najčastejšie za účelom výskumu zapojenia týchto proteínov do procesov nefotochemického zhášania (NPQ). Žiadny z publikovaných výsledkov neobsahuje prípravu CRISPR-Cas9 mutantu v T-DNA inzerčnej línii *lhcb3*. Podobne, zatiaľ žiadna z publikovaných štúdií nevedla k odhaleniu štruktúry PSII superkomplexu u *Arabidopsis* bez prítomnosti LHCB1/LHCB2 a zároveň aj LHCB3. Rastliny pripravené v rámci tejto práce a ich ďalší účel je preto zatiaľ unikátny.

Mutanty pripravené v rámci experimentálnej časti práce budú použité na analýzu štruktúrnych a funkčných vlastností PSII, v prípade, že sú jeden alebo viacero LHCB proteínov neprítomných (ako v prípade *Picea abies*). Keďže sa nepodarilo vyselektovať negatívnu rastlinu z línie 18-4, selekcia bude pokračovať ďalej po skončení tejto práce. Vytvorené CRISPR-Cas9 konštrukty budú použité na transformáciu ďalších mutantov, ktorí už majú rôzne editovanú skladbu LHCB proteínov. Ide najmä o rastliny *lhcb5* a PENTA (päťnásobný mutant *lhcb3 lhcb6 lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3*).

Ešte pred samotným „boom“ CRISPR-Cas9 technológie boli pripravené rastliny s takmer nulovou expresiou LHCB1 a LHCB2 proteínov pomocou RNA interferencie (Pietrzykowska *et al.*, 2014). Tieto mutanty boli pripravené za použitia umelo vytvorených miRNA. Strata LHCB1 proteínu sa prejavila fenotypovo, rastliny rástli pomaly a boli svetlejšie zelené než WT. Analýzou sa zistilo 30% zníženie chlorofylu v daných mutantov, pričom u LHCB2 deficitných rastlín neboli pozorované výrazné zmeny. Mutácie spôsobili zmenu pomeru jednotlivých LHCB izoforiem. U mutantu *lhcb1* došlo k výraznému zvýšeniu obsahu LHCB2 a LHCB3, u mutantu *lhcb2* došlo ku zvýšeniu LHCB3 a LHCB5. Tieto výsledky naznačili kompenzačný mechanizmus, ktorý sa uplatňuje iba v zložení LHCII trimérov., zvyšné komponenty PSII ostávajú nezmenené. Strata LHCB1 viedla ku zmene štruktúry PSII-superkomplexu a bolo dokázané, že oba proteíny LHCB1 aj LHCB2 sú nevyhnutné pre stavové prechody. Stavové

prechody boli hlavným cieľom výskumu, ktorý viedol k vytvoreniu týchto mutantných línií (Pietrzykowska *et al.*, 2014).

Pár rokov dozadu vznikla CRISPR-Cas9 línia mutantných rastlín bez LHCB1 (Ordon *et al.*, 2020). „Knock-out“ LHCB1 vznikol počas testovania nového systému vektorov pDGE pre multiplex CRISPR editáciu genómov. Vďaka použitiu 8 sgRNA boli v génoch *LHCB1* vytvorené veľké delécie, ktoré bolo možné identifikovať jednoduchou PCR reakciou. Prítomnosť/neprítomnosť proteínu LHCB1 bola následne potvrdená pomocou Western blotu. Tento systém multiplex vektorov sa ukázal ako vysoko účinný, preto bol použitý v experimentálnej časti práce a je detailnejšie popísaný v nasledujúcej kapitole.

*LHCB1* izoformy boli cieľom CRISPR-Cas9 editácie znova, tentoraz za účelom nadviazania na výsledky od Pietrzykowska *et al.*, (2014) (Sattari Vayghan *et al.*, 2022). CRISPR-Cas9 na rozdiel od miRNA technológie dokázal úplne deaktivovať expresiu všetkých 5 izoforiem. Nové mutanty boli pripravené za použitia iba 2 sgRNA cieľiacich na všetkých 5 génov. Analýza mutantov potvrdila znížený obsah chlorofylu, pomalý rast a svetlejšie zelené sfarbenie, podobne ako v Pietrzykowska *et al.*, (2014). Došlo ku zvýšeniu LHCB2 obsahu, pričom ostatné LHCB proteíny ostali nezmenené. Vytvorené mutanty boli ďalej podrobené analýzám zameraným na nefotochemické zhášanie. Zmeny oproti kontrolným rastlinám boli pozorované v procese stavové prechody a najrýchlejšej časti NPQ zvanej qE (Sattari Vayghan *et al.*, 2022). V poslednej dobe boli použité *lhcb1* a aj *lhcb2* CRISPR-Cas9 mutanty na hlbšiu analýzu zapojenia týchto proteínov do stavových prechodov (Cutolo *et al.*, 2023).

CRISPR-Cas9 systém bol okrem LHCB1 využitý aj na „knock-out“ LHCB2. „Knock-out“ LHCB proteínov bol doteraz stále zameraný na analýzu rôznych prvkov nefotochemického zhášania. qH je relatívne nový popísaný typ NPQ, u ktorého hrá významnú úlohu proteín SOQ1 (Brooks *et al.*, 2013). Bolo zistené, že qH prebieha sčasti aj v rámci LHCBII trimérov. Krížením T-DNA mutantu *soq1* s CRISPR-Cas9 pripravenými mutantmi *lhcb1* a *lhcb2* a T-DNA mutantom *lhcb3* bolo zistené, že došlo ku zvýšeniu celkového NPQ oproti jednoduchým použitím mutantom, avšak toto zvýšenie bolo uniformné a nezáviselo na konkrétnej izoforme (Bru *et al.*, 2022).

## 5.2 Príprava multiplex CRISP-Cas9 vektorov na transformáciu *A. thaliana*

### 5.2.1 pDGE multiplex CRISPR-Cas9 editačný systém

Od svojho objavu v roku 2012 sa metóda CRISPR-Cas9 odvodená od bakteriálneho imunitného systému dostala na prvú priečku v miesto-špecifických metódach editácie genómu. V priebehu rokov vzniklo množstvo rôznych variácií, vylepšení a modifikácií jednak proteínu Cas9, a aj expresných vektorov používaných v širokej škále organizmov. V súčasnosti najviac využívanou nukleázou je proteín Cas9 z baktérie *Streptococcus pyogenes*, ktorý sa spája so synteticky dizajnovanými gRNA cieľiacimi na konkrétne miesta v genóme skúmaného organizmu. U rastlín došlo k postupnej adaptácii CRISPR-Cas9 systému v niekoľkých modelových aj nemodelových organizmov, od rias až po vyššie rastliny (Ceasar *et al.*, 2016).

sgRNA využívaná na navedenie Cas9 nukleázy pozostáva z dvoch umelo spojených molekúl – „spacer“ a „scaffold“ (Jinek *et al.*, 2012). Vďaka expresii rôznych sgRNA v bunke je možné navádzať Cas9 proteín na rozličné sekvencie DNA v bunke a vytvárať tým niekoľko editácii súčasne. Avšak, doposiaľ väčšina editácii rastlinných genómov pozostávala iba z použitia jednej sgRNA, pretože viacero sgRNA vo vektore môže ovplyvňovať funkciu Cas9 proteínu kompetíciou o väzbové miesto na nukleáze medzi sebou. Pri použití príliš veľa sgRNA jednotiek môže dochádzať k ich umlčovaniu *in planta* a repetitívne sekvencie obsiahnuté vo vektoroch podliehajú občasnej rekombinácii (Stuttman *et al.*, 2021).

Avšak, boli už popísané fungujúce systémy s použitím viacerých sgRNA a úspešnou editáciou, len s potenciálne nižšou efektívnosťou. Takéto „multiplex“ CRISPR-Cas9 systémy pozostávajú z Cas9 nukleázy exprimovanej pod silným rastlinným promótorom spolu so sgRNA exprimovanými buď ako polycystronická transkripčná jednotka s následnými posttranskripčnými úpravami, alebo ako samostatná jednotka pre každú sgRNA (pod promótorom U3 alebo U6) (Cermak *et al.*, 2017) V súčasnosti existuje niekoľko experimentálnych dôkazov o úspešnom využití multiplex editácie DNA ako u jednoklíčnolistových (ryža), tak aj dvojklíčnolistových rastlín (*Arabidopsis*, *Solanum*, *Nicotiana*) (Ma *et al.*, 2015, Armario Najera *et al.*, 2019).

V roku 2016 bol publikovaný CRISPR-Cas9 editačný protokol s jednotlivými vektormi na uľahčenie multiplex editácie rastlinných buniek (Ordon *et al.*, 2016).

Nadizajnovaný protokol bol založený na Golden Gate klonovacej reakcii a zahŕňa niekoľko predpripravených modulov, ktoré sa dajú ľahko prispôbiť potrebám vlastných experimentov, a bol úspešne otestovaný v modelových rastlinách *A. thaliana* a *Nicotiana benthamiana*. Systém vektorov nazvaný pDGE pozostáva zo „shuttle“ vektorov na zaklonovanie a namnoženie sgRNA. Každý zo „shuttle“ vektorov obsahuje restričné miesto pre BpiI a BsaI. BpiI miesta umožňujú vloženie sgRNA „spaceru“ do vektoru a vystrihnutie *ccdb* selekčného génu. BsaI miesta umožňujú vystrihnutie celej sgRNA kazety do destinačného vektoru a spojenie jednotlivých kaziet za sebou. Jednotlivé shuttle vektory po naštípení BsaI získajú rôzne lepidivé konce a spájanie kaziet v správnej orientácii je zaručené vďaka ich komplementarite. pDGE systém umožnil zloženie až 8 sgRNA transkripčných jednotiek (TU) do destinačného vektoru iba vďaka použitiu 2 endonukleáz a s vysokou efektívnosťou. Efektívnosť reakcie pri spájaní 2 sgRNA TU sa pohybovala okolo 90%, pri 8 TU klesla, no stále bola vyššia ako 50% (Ordon *et al.*, 2016).

Vektorový systém pDGE bol neskôr vylepšený optimalizovaním Cas9 proteínu a rozšírený až na 32 rôznych sgRNA TU, ktoré možno spojiť do destinačného vektoru a použiť na editáciu genómu. Cas9 proteín bol optimalizovaný a testovaný vložením niekoľkých intronických sekvencií, optimalizovala sa expresia s použitím rôznych promótorov a terminátorov. Najlepšia optimalizovaná verzia Cas9 bola exprimovaná pod promótorom RIBOSOMAL PROTEIN S5a (RPS5a) a terminátorom rbcSE9 z hrachu (*Pisum sativum*). Efektívnosť Cas9 štiepenia bola preukázaná vďaka editácii všetkých izoforiem proteínu LHCB1 (Ordon *et al.*, 2020).

Vylepšený pDGE multiplex protokol bol testovaný na *Nicotiana benthamiana* (cieľ 8 génov, použitie 9 gRNA) a *A. thaliana* (12 génov, 24 gRNA). Bola preukázaná editácia všetkých skúmaných génov a izolovaný mutant *A. thaliana* bez prítomnosti Cas9 kazety. Výsledky ukázali, že najviac limitujúcim faktorom pri používaní multiplex systému vyzerá byť množstvo Cas9 proteínu a kompetícia jednotlivých sgRNA (Stuttman *et al.*, 2021).

### 5.2.2 Dizajn sgRNA 1 a sgRNA 4

Jednoduchý a účinný systém pDGE vektorov bol využitý na vytvorenie CRISPR-mutantov v rámci experimentálnej časti práce. Dôležitým krokom bol na začiatku

správny dizajn sgRNA. Navrhnuté boli sgRNA na exon 1 génu *LHCB2.1* (sgRNA 1) a taktiež na gény *LHCB1.2* a *1.4* (sgRNA 4). sgRNA, pre „knock-out“ ostatných génov boli prevzaté od Bru *et al.*, (2022). Dizajn sgRNA bol nutný, pretože sgRNA pre „knock-out“ *LHCB1.2* a *1.4* nebola prevzatá, z dôvodu jej relatívne nízkej účinnosti vyhodnotenej online aplikáciami a sgRNA pre gén *LHCB2.1* nebola v článku pripravená. Bru *et al.*, (2022) vytvorili CRISPR-Cas9 *lhcb2* mutantov transformáciou sgRNA pre *lhcb2.2* a *2.3* do už jednoduchého T-DNA mutantu v géne *lhcb2.1*. Prevzaté sgRNA boli dokázané ako správne navádzajúce pre Cas9 a vďaka nim boli úspešne pripravené mutanty v cieľných génoch.

Dizajn sgRNA pre izoformu *2.1* prebiehal za použitia troch online nástrojov. ChopChop a RGEN neukázali všetky možné „off-targets“ pri navrhnutých sekvenciách. Najviac detailov ohľadom predikovanej sekvencie ukázal CCTop. Program RGEN bol najmenej užívateľsky prístupný a jeho použitie bolo odkázané iba na návod uvedený v Schindele *et al.*, (2020). Program ChopChop bol veľmi jednoduchý na pochopenie a ovládanie, avšak ukázal len veľmi málo detailov o predikovaných sekvenciách. CCTop bola zlatá stredná cesta pri dizajnovaní sgRNA. Program umožnil navoliť niekoľko parametrov, ukázal dostatočné množstvo detailov pri navrhnutých sekvenciách a jeho použitie bolo relatívne jednoduché.

Počas výberu boli prihliadnuté na kritériá výberu uvedené v Schindele *et al.*, (2020), okrem kritériá sekundárna štruktúra celej sgRNA. Sekundárna štruktúra nebola braná do úvahy na základe osobnej komunikácie (Stuttman, 2024), kde boli uvedené informácie o inom zložení „scaffoldu“ nachádzajúcom sa vo vektoroch. Ďalej bolo spochybnené kritérium sekundárnej štruktúry pre správnu funkciu Cas9 a aj predikčná schopnosť online nástrojov. Podľa osobnej komunikácie nie je potrebné dávať veľkú váhu výsledkom z jednotlivých programov, najrelevantnejšie na posúdenie účinnosti je až otestovanie *in vivo*.

Najefektívnejšia sgRNA podľa výsledkov bola sgRNA 2 cieľaca na izoformu *LHCB2.3*. Vďaka sgRNA 2 vznikali relatívne veľké delécie a editovaných bolo najviac rastlín. sgRNA 1 mala podstatne nižšiu účinnosť, avšak najčastejšie vytvárala iba jednoduché jednonukleotidové indely, ktoré zaručujú zmenu čítacieho rámcu a môžu viesť k tvorbe nefunkčného proteínu.

### **5.2.3 Golden Gate klonovanie a transformačná úspešnosť**

Klonovanie prebiehalo v dvoch krokoch, pričom vzniknuté plazmidy sa vkladali do buniek *E.coli* za pomoci teplotného šoku. „Shuttle“ vektory boli účinne transformované do kmeňa STBL2. Pripravený destinačný vektor so zaklonovanými sgRNA bol pri prvom pokuse taktiež transformovaný do kmeňa STBL2, avšak nenarástli žiadne kolónie, transformácia bola neúspešná. Problémom mohol byť príliš veľký konštrukt, preto bol pri opakovanom pokuse kmeň zmenený na komerčne pripravený NEB10-beta kmeň, ktorý je vhodný na vkladanie veľkých plazmidov a jeho transformácia je vysoko účinná.

Sekvenovanie plazmidov a jemu predchádzajúce PCR testovania odhalili veľmi vysokú účinnosť Golden Gate reakcií. Spomedzi otestovaných kolónií boli správne zaklonované a overené všetky.

### **5.3 Selekcia KO homozygotných rastlín vo všetkých izoformách *LHCB2***

Selekcia CRISPR-Cas9 mutantných rastlín bol časovo náročná. Metóda Dot blot sa ukázala ako nie príliš spoľahlivá a v T2 generácii marker FAST nezaručoval prítomnosť/nepítomnosť transgénu. Ďalej bolo treba pri príprave vzoriek na sekvenáciu navrhnuť špeciálne primery na prvotné namnoženie DNA fragmentu skúmaného génu. Z dôvodu niekoľkých problematických krokov boli selektované iba rastliny z CRISPR-Cas9 *LHCB2* línii 17 (WT rastlina transformovaná konštruktom pDGE347\_sgRNA1\_sgRNA2) a 18 (*lhcb3* rastlina transformovaná konštruktom pDGE347\_sgRNA1\_sgRNA 2).

#### **5.3.1 Metódy na identifikáciu CRISPR-Cas9 mutácií**

Tvorba destinačných vektorov a transformácia rastlín je iba prvou časťou procesu prípravy mutantných jedincov v cieľových génoch. Po transformácii nasleduje selekcia a identifikácia mutácií spôsobených Cas9 nukleázou. Identifikovať mutantné jedince je možné niekoľkými metódami, buď na báze zmeny DNA sekvencie alebo na základe chýbajúceho proteínu.

Metód identifikácie na báze zmeny DNA sekvencie existuje niekoľko a sú často založené na PCR reakcii a následnej analýze štiepných fragmentov alebo na priamom sekvenovaní. Prvou často používanou metódou je „enzyme mismatch cleavage“, využívajúca nukleázu z bakteriofága T7. T7 enzým špecificky deteguje heteroduplexy DNA, v ktorých sa vyskytujú nesprávne spárované nukleotidy.



Metóda založená na T7 nukleáze je relatívne jednoduchá, spočíva v namnožení gDNA cieľových sekvencií pomocou PCR a následná denaturácia a renaturácia produktov. Pokiaľ došlo k mutácii na niektorom z vlákien DNA, počas pomalej renaturácie dochádza ku tvorbe heteroduplexov. Tieto heteroduplexy sú rozpoznávané T7 nukleázou a produkty štiepenia sú analyzované na agarózovom gély. Následne sa dá určiť frekvencia mutácii vzhľadom na intenzitu jednotlivých štepných fragmentov. Výhodou metódy je ľahké a rýchle prevedenie bez nutnosti špeciálneho vybavenia. Avšak, nedokáže určiť presné mutácie a môže občas poskytovať nepresné výsledky vzhľadom na prirodzene sa vyskytujúce polymorfizmy v DNA (Sentmanat *et al.*, 2017).

Druhou jednoduchou metódou založenou na PCR je CAPS („Cleaved Amplified Polymorphic Sequences“ – štiepené amplifikované polymorfne sekvenice). Metóda spočíva v namnožení gDNA z transformovaných buniek pomocou PCR a jej následné štiepenie špecifickou restričnou endonukleázou (RE). Nevyhnutnosťou metódy CAPS je prítomnosť špecifického rozpoznávacieho miesta pre RE priamo v sekvencii, na ktorú sa dizajnuje sgRNA. V prípade mutácie dochádza ku zániku tohto miesta a PCR produkt nie je štiepený, prípadne vzniká restričné miesto nanovo tam, kde sa predtým nenachádzalo. Restričné fragmenty sú následne analyzované na gély. Výhodou metódy je technická nenáročnosť, avšak nedokáže odhaliť presné mutácie a je limitovaná množstvom existujúcich špecifických restričných miest (Hodgens *et al.*, 2019).

Najpresnejšou metódou analýzy CRISPR-Cas9 vzniknutých mutácii je priame sekvenovanie cieľového úseku DNA. V dnešnej dobe existuje niekoľko sekvenačných metód, či už klasická Sangerova metóda založená na terminácii reťazca vložení dideoxynukleotidu, alebo vysoko výkonné metódy novej generácie (NGS). Sekvenácia umožňuje získanie priamo DNA sekvencie a následne sú sekvenačné stopy vyhodnocované rôznymi softvérmi identifikujúcimi mutácie. Sekvenácia fragmentov gDNA v spojení so softvérovým vyhodnotením bola použitá aj v experimentálnej časti tejto práce.

Identifikácia CRISPR-Cas9 „knock-out“ mutantov je možná aj na základe fenotypu, neprítomnosti proteínu, ktorého gén bol editovaný. Na tieto účely je možné využiť metódy Western blot (Dot blot), pokiaľ existuje protilátka rozpoznávajúca daný proteín. Táto primárna protilátka je rozpoznávaná sekundárnou značenou protilátkou a je umožnená detekcia proteínu vo vzorke.

Prípadne, na detekciu proteínu je možné využiť hmotnostnú spektrometriu, avšak táto metóda je relatívne drahá, vyžaduje špecializované vybavenie a v prípade detekcie niekoľkých podobných proteínov môže vyžadovať optimalizáciu zabehnutého protokolu.

### 5.3.2 Marker FAST

Prvým krokom selekcie transformovaných jedincov v rámci experimentálnej časti práce bolo zisťovanie prítomnosti alebo neprítomnosti transgénu pomocou markeru FAST. Marker FAST bol prítomný v destinačnom vektore na rýchle vyberanie transformovaných semien. Tento marker pozostáva z promotora pre proteín OLE1, ktorý je najviac zastúpený v semenách *Arabidopsis* (Shimada *et al.*, 2008). Okrem OLE1 sa u *Arabidopsis* vyskytujú aj iné proteíny patriace do skupiny oleozínov a fungujú ako štrukturálne proteíny v membránach olejových teliesok v semenách.

Marker FAST vznikol ako výsledok experimentu, kedy boli rastliny *Arabidopsis* transformované konštruktom OLE1-GFP, pod natívnym promótorom *ole1*. Semená týchto rastlín vykazovali špecifickú lokalizáciu GFP v olejových telieskach pri pozorovaní konfokálnym mikroskopom. Pri pozorovaní stereomikroskopom celé semená vyžarovali zelenú fluorescenciu, vďaka čomu mohol byť konštrukt používaný ako reportérový systém pre úspešnú transformáciu. Následne bol konštrukt upravený, miesto GFP sa použil RFP ako reportérový gén (Shimada *et al.*, 2010).

Účinnosť markeru FAST bola experimentálne potvrdená a štatisticky vyhodnotená. Podľa štatistickej analýzy niekoľkých desiatok transgénnych semien, mala intenzita fluorescencie priamo odpovedať homozygotnosti alebo heterozygotnosti skúmaných semien. V prípade vloženia jednej kópie transgénu mali najvyššiu mieru intenzity homozygotné semená, polovičnú mieru mali heterozygotné semená a netransformované semená „nesvietili“ (Shimada *et al.*, 2010). Výsledky tejto práce sú v rozpore s predtým zistenou účinnosťou markeru.

V T1 generácii sa marker ukázal ako relatívne spoľahlivý, všetky vyselektované RFP rastliny boli transformované a expresia transgénu u nich prebiehala. V T2 generácii, keď bol cieľ vyselektovať semená bez fluorescencie (bez Cas9 kazety) sa marker ukázal ako nedostatočne preukazný. Vyberali sa semená, ktoré

nevykazovali žiadnu fluorescenciu, avšak podľa výsledkov PCR skríningu na prítomnosť RFP sa časť z nich ukázala ako pozitívna.

Dôvodom, prečo marker FAST nebol exprimovaný u niektorých jedincov T2 generácie, pričom transgén obsahovali, môže byť niekoľko. Jednou z možností je umiestnenie transgénu na chromozóme pomocou *Agrobacteria* do transkripčne neaktívnej oblasti. Avšak, v tomto prípade by s veľkou pravdepodobnosťou nedochádzalo ani ku expresii Cas9 a sgRNA, keďže tieto boli súčasťou rovnakej T-DNA. Marker FAST sa ukázal ako najmenej spoľahlivý práve u línií rastlín, ktoré boli najlepšimi kandidátmi na „knock-out“ mutantov vo všetkých *LHCB2* izoformách, čo naznačuje správnu expresiu Cas9 a sgRNA.

Druhým dôvodom, prečo mohlo dôjsť k umlčaniu FAST je príliš vysoké množstvo vložených kópii transgénu. Bolo preukázané umlčovanie transkripcie génov na úrovni degradácie mRNA, pri dosiahnutí určitého množstva vznikajúcich transkriptov. Čím viac kópii daného génu sa v bunke nachádza, tým je väčšia pravdepodobnosť, že dôjde k jeho umlčaniu. S umlčaním génu súvisí aj sila promótoru. Promótor pre proteín OLE1 je relatívne silný a proteín sa vyskytuje vo veľkom množstve, preto mohla nadmerná expresia byť potlačená.

Sekvenovaním T1 generácie bolo preukázané, že u línií 17-10 a 18-4 k jej expresii dochádzalo a boli identifikované mutácie v cieľných sekvenciách. Potomkovia z línie 17-10 bez prítomnej transgéennej kazety potvrdili dedičnosť mutácii a boli identifikovaní ako „knock-out“ mutanti pre LHCB2 proteín. V prípade potomkov z línie 18-4 nedošlo k objaveniu takého jedinca, u ktorého by absentovala transgéenna kazeta a preto sa nemohlo pristúpiť ku sekvenácii a potvrdeniu dedičnosti mutácii a získaniu „knock-out“ mutantu pre všetky izoformy z tejto línie. Je pravdepodobné, že v tejto línii došlo ku vloženiu niekoľkých kópii transgénu do genómu a k ich vyselektovaniu bude treba získať ďalšiu generáciu (generácie).

### **5.3.3 Dot blot**

Po vybratí transformovaných semien boli rastliny overené PCR reakciou na skutočnú prítomnosť transgénu a ďalej analyzované Dot blotom. Dot blot je jednoduchšia a rýchlejšia verzia klasického Western blotu, kedy nedochádza ku separácii proteínov metódou SDS-PAGE, ale identifikujú sa priamo vo vzorke. Na identifikáciu sa používajú špecifické protilátky. V prípade tejto práce bola použitá

protilátka na LHCB2. Protilátka rozpoznáva všetky izoformy proteínu bez rozdielu, preto by homozygotný „knock-out“ mutant nemal poskytovať žiadny signál. Metóda dot blot sa ukázala nie veľmi spoľahlivá, lebo nedochádzalo vždy ku špecifickým väzbám na proteíny vo vzorkách rastlín, ktoré produkovali funkčné LHCB2 proteíny. Dot blot spoľahlivo identifikoval iba línie 17-10 a 18-4, ktoré sa neskôr potvrdili sekvenovaním.

#### **5.3.4 Sekvenácia T1 a T2 generácie**

Sekvenácia T1 generácie odhalila 3 potenciálnych kandidátov na homozygotných mutantov pre gén LHCB2 z línie 17 a rovnako aj z línie 18. Z výsledkov vyplýva, že ku najlepšej editácii dochádzalo na géne *LHCB2.3*, ktorý mal samostatnú cieľiacu gRNA. Gény *LHCB2.1* a *LHCB2.2* boli problematickejšie a ku efektívnej editácii nedochádzalo tak často. Efektivita dizajnovaných sgRNA sa preto líši a neodpovedá teoretickým predpokladom. Podľa online programov použitých na dizajnovanie sgRNA mali sgRNA 1 a sgRNA 2 podobné parametre, čo sa týka predikovaného skóre. Online predikčné aplikácie vypočítavajú skóre na základe určitých parametrov podľa matematicky zadaného algoritmu. V živých bunkách dochádza k nespočetným procesom, ktoré môže priamo alebo nepriamo vplývať na funkciu Cas9.

Najnovšie štúdie ukazujú, že sgRNA dizajnované rôznymi odlišnými algoritmami a vyhodnotenú ako vysoko efektívne, nemusia v živých systémoch také skutočne byť. Väčšina predikčných programov zbiera dáta z experimentov vedených na živočíšnych a ľudských bunkách, a hoci ponúkajú vo svojich databázach aj rastlinné genómy, predikcie bývajú nepresné. Dáta zo živočíšnych buniek nie je vždy možné aplikovať relevantne na rastlinné organizmy (Naim *et al.*, 2020). Pre zlepšenie editácie všetkých izoformiem by bolo zrejme potrebné navrhnúť viac sgRNA, podobne ako bolo popísané u Ordon *et al.*, (2020).

## 6 ZÁVER

V rámci teoretickej časti tejto diplomovej práce bol cieľ zostaviť prehľad problematiky na zvolenú tému. Prehľad problematiky bol rozdelený do dvoch väčších celkov, menovite fotosyntéza a štruktúra PSII a Genetická transformácia rastlín s dôrazom na prípravu rekombinantnej DNA a CRISPR-Cas9 technológiu. Prvý celok stručne charakterizuje svetelnú fázu fotosyntézy s hlavným zameraním na štruktúru PSII a s ním priliehajúcich LHCB1 a LHCB2 svetlozberných antén. Podstatná časť celku bola zameraná na nedávno získané poznatky o rozdieloch v štruktúre PSII medzi rodom *Picea* a *Arabidopsis thaliana*.

Druhá kapitola je zameraná na technológiu rekombinantnej DNA a genetickú transformáciu rastlín. Kapitola obsahuje teoretické princípy techniky rekombinantnej DNA, porovnanie niekoľkých typov klonovania, s hlavným zameraním na metódu Golden Gate a aj podkapitolu ohľadom využitia *Agrobacterium tumefaciens* na transformáciu rastlinných buniek. Na záver kapitoly sú popísané miesto-špecifické metódy editácie genómu s dôrazom na technológiu CRISPR-Cas9, ktorá bola následne využitá v experimentálnej časti práce.

V rámci experimentálnej časti práce boli pripravené Golden Gate klonovacie konštrukty pre „knock-out“ proteínov LHCB1 a LHCB2. Za použitia online aplikácií a poznatkov z literatúry boli získané 4 sgRNA, ktorých cieľom sú sekvencie génov kódujúce izofóry spomínaných proteínov. Samotné klonovanie prebiehalo podľa protokolu uverejnenom v Stuttman *et al.* (2021).

Destinačné vektory overené sekvenáciou sa použili na transformáciu rastlín *A. thaliana*. Boli transformované genotypy WT a inzerčný mutant *lhcb3*. Semená z transformovaných rastlín boli selektované pod fluorescenčným mikroskopom vďaka markeru FAST v destinačnom vektore. Funkčnosť metódy CRISPR-Cas9 bola overená pomocou metódy dot blot za použitia protilátok na proteín LHCB1 alebo LHCB2.

Vyselektované rastliny T1 generácie boli analyzované pomocou sekvenovania. Vďaka týmto dátam sa vybrali kandidátne rastliny s najväčším zastúpením editácií v génoch jednotlivých izofóriem. V T2 generácii bola snaha o získanie homozygotných mutantných rastlín bez Cas9 kazety. Kandidátne rastliny boli taktiež osekvenované a výsledky odhalili účinnosť jednotlivých sgRNA.

Selekcia CRISPR-Cas9 mutantov prebiehala veľmi dlho, pričom metóda Dot blot sa ukázala ako nie príliš efektívne. Na rýchlejšiu selekciu by bolo zrejme dobré dizajnovať sgRNA s prítomnosťou restričného miesta pre špecifickú endonukleázu, prípadne využiť metódy štiepenia heteroduplexov. Za zváženie by stálo aj prevedenie celého Western blotu, nie len jeho skrátenej verzie.

Napriek nie príliš účinnej editácii génov *LHCB2.1* a *2.2* sa podarilo získať mutantného jedinca vo všetkých izoformách z línie 17-10. Pri línií 18-4 bol s najväčšou pravdepodobnosťou problém vysokého počtu inzertov v genóme. Na získanie stabilného CRISPR-Cas9 mutantu z tejto línie budú potrebné mendelistické selekcie v ďalších generáciách na získanie jedincov bez transgénnej kazety a jeho následná sekvenácia na potvrdenie mutácii. Vytvorené CRISPR-Cas9 konštrukty boli úspešne overené, aj keď mali sgRNA rozličné účinnosti a môžu byť použité na transformáciu ďalších rastlín, ako vyššie spomínané mutanty *lhcb5* a PENTA (päťnásobný mutant *lhcb3 lhcb6 lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3*).

## 7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. (2002) 4th edition. New York: Garland Science.
- Armario Najera, V., Twyman, R. M., Christou, P., & Zhu, C. (2019). Applications of multiplex genome editing in higher plants. *Current opinion in biotechnology*, 59, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.015>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315 (5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Barrangou, R., Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (1.edition). (2022). *CRISPR: Biology and Applications*. Wiley.
- Bernard, P., & Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of molecular biology*, 226(3), 735–745. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90629-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90629-x)
- Boch J. (2011). TALEs of genome targeting. *Nature biotechnology*, 29(2), 135–136. <https://doi.org/10.1038/nbt.1767>
- Boch, J., & Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual review of phytopathology*, 48, 419–436. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Brooks, M. D., Sylak-Glassman, E. J., Fleming, G. R., & Niyogi, K. K. (2013). A thioredoxin-like/ -propeller protein maintains the efficiency of light harvesting in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), E2733–E2740. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305443110>
- Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5891), 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
- Bru, P., Steen, C. J., Park, S., Amstutz, C. L., Sylak-Glassman, E. J., Lam, L., Fekete, A., Mueller, M. J., Longoni, F., Fleming, G. R., Niyogi, K. K., & Malnoë, A. (2022). The major trimeric antenna complexes serve as a site for qH-energy dissipation in plants. *The Journal of biological chemistry*, 298(11), 102519. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102519>
- Caffarri, S., Kouril, R., Kereiche, S., Boekema, E. J., & Croce, R. (2009). Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *The EMBO journal*, 28(19), 3052–3063. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.232>
- Cesar, S. A., Rajan, V., Prykhodzhiy, S. V., Berman, J. N., & Ignacimuthu, S. (2016). Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(9), 2333–2344. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.009>
- Cebrian-Serrano, A., & Davies, B. (2017). CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 28(7-8), 247–261. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9697-4>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using

- CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Crepin, A., & Caffarri, S. (2018). Functions and Evolution of Lhcb Isoforms Composing LHCII, the Major Light Harvesting Complex of Photosystem II of Green Eukaryotic Organisms. *Current protein & peptide science*, 19(7), 699–713. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180222101534>
- Croce, R., & van Amerongen, H. (2020). Light harvesting in oxygenic photosynthesis: Structural biology meets spectroscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6506), eaay2058. <https://doi.org/10.1126/science.aay2058>
- Cutolo, E. A., Caferri, R., Guardini, Z., Dall'Osto, L., & Bassi, R. (2023). Analysis of state 1-state 2 transitions by genome editing and complementation reveals a quenching component independent from the formation of PSI-LHCI-LHCII supercomplex in *Arabidopsis thaliana*. *Biology direct*, 18(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13062-023-00406-5>
- Čermák, T., Curtin, S. J., Gil-Humanes, J., Čegan, R., Kono, T. J. Y., Konečná, E., Belanto, J. J., Starker, C. G., Mathre, J. W., Greenstein, R. L., & Voytas, D. F. (2017). A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *The Plant cell*, 29(6), 1196–1217. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
- Dang, Y., Jia, G., Choi, J., Ma, H., Anaya, E., Ye, C., Shankar, P., & Wu, H. (2015). Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome biology*, 16, 280. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0846-3>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS one*, 3(11), e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology*, 31(9), 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
- Galka, P., Santabarbara, S., Khuong, T. T., Degand, H., Morsomme, P., Jennings, R. C., Boekema, E. J., & Caffarri, S. (2012). Functional analyses of the plant photosystem I-light-harvesting complex II supercomplex reveal that light-harvesting complex II loosely bound to photosystem II is a very efficient antenna for photosystem I in state II. *The Plant cell*, 24(7), 2963–2978. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100339>
- Gateway Cloning Technique: An overview of Thermo Fisher's Gateway Cloning technique and how to simulate the Gateway reaction in SnapGene. Snapgene. Retrieved April 29, 2024, from <https://www.snapgene.com/guides/gateway-cloning>.
- Gelvin S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(1), 16–37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd, & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Glick, Bernard & Patten, Cheryl. (2022). *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, Sixth Edition. 10.1128/9781555819378.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), D1178–D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>



- Grebe, S., Trotta, A., Bajwa, A. A., Suorsa, M., Gollan, P. J., Jansson, S., Tikkanen, M., & Aro, E. M. (2019). The unique photosynthetic apparatus of Pinaceae: analysis of photosynthetic complexes in *Picea abies*. *Journal of experimental botany*, *70*(12), 3211–3225. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz127>
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G. L., White, F. F., & Yin, Z. (2005). R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, *435*(7045), 1122–1125. <https://doi.org/10.1038/nature03630>
- Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research*, *10*(11), 1788–1795. <https://doi.org/10.1101/gr.143000>
- Hodgens, C., Nimchuk, Z. L., & Kieber, J. J. (2019). Using indCAPS to Detect CRISPR/Cas9 Induced Mutations. *Bio-protocol*, *9*(18), e3374. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3374>
- Hofmann N. R. (2016). A Breakthrough in Monocot Transformation Methods. *The Plant cell*, *28*(9), 1989. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00696>  
<https://doi.org/10.1042/EBC20160016>
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J., & Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, *186*(2), 757–761. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>
- Ilíková, Iva & Ilik, Petr & Opatíková, Monika & Arshad, Rameez & Nosek, Lukáš & Karlický, Vaclav & Kučerová, Zuzana & Roudnický, Pavel & Pospíšil, Pavel & Lazar, Dusan & Bartoš, Jan & Kouril, Roman. (2021). Towards Spruce-type Photosystem II: Consequences of the Loss of Light-Harvesting Proteins LHCB3 and LHCB6 in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 187. 10.1093/plphys/kiab396.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, *169*(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jansen, R., Embden, J. D., Gaastera, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, *43*(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jansson S. (1999). A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis/IT>. *Trends in plant science*, *4*(6), 236–240. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01419-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01419-3)
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic acids research*, *41*(20), e188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Johnson M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays in biochemistry*, *60*(3), 255–273.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Feb 6;93(3):1156-60. doi: 10.1073/pnas.93.3.1156. PMID: 8577732; PMCID: PMC40048.
- Kim, S., Sandusky, P., Bowlby, N. R., Aebersold, R., Green, B. R., Vlahakis, S., Yocum, C. F., & Pichersky, E. (1992). Characterization of a spinach psbS cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II. *FEBS letters*, *314*(1), 67–71. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81463-v](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81463-v)

- Kouřil, R., Nosek, L., Bartoš, J., Boekema, E. J., & Ilík, P. (2016). Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant groups--break-up of current dogma. *The New phytologist*, 210(3), 808–814. <https://doi.org/10.1111/nph.13947>
- Kouřil, R., Nosek, L., Opatíková, M., Arshad, R., Semchonok, D. A., Chamrád, I., Lenobel, R., Boekema, E. J., & Ilík, P. (2020). Unique organization of photosystem II supercomplexes and megacomplexes in Norway spruce. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 104(1), 215–225. <https://doi.org/10.1111/tpj.14918>
- Kouřil, R., Nosek, L., Semchonok, D., Boekema, E. J., & Ilík, P. (2018). Organization of Plant Photosystem II and Photosystem I Supercomplexes. *Sub-cellular biochemistry*, 87, 259–286. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_9)
- Kouřil, R., Oostergetel, G. T., & Boekema, E. J. (2011). Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(3), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.007>
- 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*. *Biochimica et biophysica acta*, 1827(3), 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.003>
- Kovács, L., Damkjaer, J., Kerešiče, S., Iliaoa, 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(11), 3106–3120. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045641>
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic acids research*, 47(W1), W171–W174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>
- Lampropoulos, A., Sutikovic, Z., Wenzl, C., Maegele, I., Lohmann, J. U., & Forner, J. (2013). GreenGate---a novel, versatile, and efficient cloning system for plant transgenesis. *PloS one*, 8(12), e83043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083043>
- Ledford H. (2015). CRISPR, the disruptor. *Nature*, 522(7554), 20–24. <https://doi.org/10.1038/522020a>
- Lessard J. C. (2013). Molecular cloning. *Methods in enzymology*, 529, 85–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00007-0>
- Leutwiler, L. S., Meyerowitz, E. M., & Tobin, E. M. (1986). Structure and expression of three light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein genes in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research*, 14(10), 4051–4064. <https://doi.org/10.1093/nar/14.10.4051>
- Li, T., Huang, S., Jiang, W. Z., Wright, D., Spalding, M. H., Weeks, D. P., & Yang, B. (2011). TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic acids research*, 39(1), 359–372. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq704>
- Liang, G., Zhang, H., Lou, D., & Yu, D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific reports*, 6, 21451. <https://doi.org/10.1038/srep21451>
- Lin, Y., Cradick, T. J., Brown, M. T., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., Wile, B. M., Vertino, P. M., Stewart, F. J., & Bao, G. (2014). CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic acids research*, 42(11), 7473–7485. <https://doi.org/10.1093/nar/gku402>

- Lloyd, A., Plaisier, C. L., Carroll, D., & Drews, G. N. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(6), 2232–2237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409339102>
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Y., Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z., & Liu, Y. G. (2015). A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular plant*, *8*(8), 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., & Liu, Y. G. (2016). CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Molecular plant*, *9*(7), 961–974. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.009>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnys, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., Yan, W., ... Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature reviews. Microbiology*, *18*(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- McGrath, J. M., Terzaghi, W. B., Sridhar, P., Cashmore, A. R., & Pichersky, E. (1992). Sequence of the fourth and fifth Photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein genes of Arabidopsis thaliana and evidence for the presence of a full complement of the extended CAB gene family. *Plant molecular biology*, *19*(5), 725–733. <https://doi.org/10.1007/BF00027069>
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H., & Qu, L. J. (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell research*, *23*(10), 1233–1236. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.123>
- Miki, T., Park, J. A., Nagao, K., Murayama, N., & Horiuchi, T. (1992). Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in Escherichia coli. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. *Journal of molecular biology*, *225*(1), 39–52. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)91024-j](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)91024-j)
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., Beausejour, C. M., Waite, A. J., Wang, N. S., Kim, K. A., Gregory, P. D., Pabo, C. O., & Rebar, E. J. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature biotechnology*, *25*(7), 778–785. <https://doi.org/10.1038/nbt1319>
- Mirkovic, T., Ostroumov, E. E., Anna, J. M., van Grondelle, R., Govindjee, & Scholes, G. D. (2017). Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. *Chemical reviews*, *117*(2), 249–293. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00002>
- Murata, N. (1969). I. LIGHT-INDUCED CHANGE OF CHLOROPHYLL a FLUORESCENCE IN. *Biochim. Biophys. Acta*, *10*.
- Naim, F., Shand, K., Hayashi, S., O'Brien, M., McGree, J., Johnson, A. A. T., Dugdale, B., & Waterhouse, P. M. (2020). Are the current gRNA ranking prediction algorithms useful for genome editing in plants?. *PloS one*, *15*(1), e0227994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227994>
- Nelson, N., & Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual review of plant biology*, *57*, 521–565. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350>

- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, *156*(5), 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., & Doudna, J. A. (2014). Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature structural & molecular biology*, *21*(6), 528–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>
- Opatíková, M., Semchonok, D. A., Kopečný, D., Ilik, P., Pospíšil, P., Iliková, I., Roudnický, P., Zeljković, S. Č., Tarkowski, P., Kyriilis, F. L., Hamdi, F., Kastiris, P. L., & Kouřil, R. (2023). Cryo-EM structure of a plant photosystem II supercomplex with light-harvesting protein Lhcb8 and  $\alpha$ -tocopherol. *Nature plants*, *9*(8), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01483-0>
- Ordon, J., Bressan, M., Kretschmer, C., Dall'Osto, L., Marillonnet, S., Bassi, R., & Stuttmann, J. (2020). Optimized Cas9 expression systems for highly efficient Arabidopsis genome editing facilitate isolation of complex alleles in a single generation. *Functional & integrative genomics*, *20*(1), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00665-4>
- Ordon, J., Gantner, J., Kemna, J., Schwalgun, L., Reschke, M., Streubel, J., smi, J., & Stuttmann, J. (2017). Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *89*(1), 155–168. <https://doi.org/10.1111/tpj.13319>
- Park, J., Bae, S., & Kim, J. S. (2015). Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *31*(24), 4014–4016. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv537>
- Peterson, B. A., Haak, D. C., Nishimura, M. T., Teixeira, P. J., James, S. R., Dangl, J. L., & Nimchuk, Z. L. (2016). Genome-Wide Assessment of Efficiency and Specificity in CRISPR/Cas9 Mediated Multiple Site Targeting in Arabidopsis. *PLoS one*, *11*(9), e0162169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162169>
- Pietrzykowska, M., Suorsa, M., Semchonok, D. A., Tikkanen, M., Boekema, E. J., Aro, E. M., & Jansson, S. (2014). The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins Lhcb1 and Lhcb2 play complementary roles during state transitions in Arabidopsis. *The Plant cell*, *26*(9), 3646–3660. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127373>
- Potapov, V., Ong, J. L., Kucera, R. B., Langhorst, B. W., Bilotti, K., Pryor, J. M., Cantor, E. J., Canton, B., Knight, T. F., Evans, T. C., Jr, & Lohman, G. J. S. (2018). Comprehensive Profiling of Four Base Overhang Ligation Fidelity by T4 DNA Ligase and Application to DNA Assembly. *ACS synthetic biology*, *7*(11), 2665–2674. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00333>
- Reece-Hoyes, J. S., & Walkout, A. J. M. (2018). Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harbor protocols*, *2018*(1), pdb.top094912. <https://doi.org/10.1101/pdb.top094912>
- Ruban, A. V., & Johnson, M. P. (2015). Visualizing the dynamic structure of the plant photosynthetic membrane. *Nature plants*, *1*, 15161. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.161>
- Rustgi S., Luo H. (eds). (2020). *Biolistic DNA Delivery in Plants and Protocols: Methods and Protocols*. Berlin/Heidelberg: Springer Science+Business Media. 10.1007/978-1-0716-0356-7
- Sattari Vayghan, H., Nawrocki, W. J., Schiphorst, C., Tolleter, D., Hu, C., Douet, V., Glauser, G., Finazzi, G., Croce, R., Wientjes, E., & Longoni, F. (2022). Photosynthetic Light Harvesting and Thylakoid Organization in a CRISPR/Cas9 Arabidopsis



- Thaliana LHCBI Knockout Mutant. *Frontiers in plant science*, *13*, 833032. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.833032>
- Sentmanat, M. F., Peters, S. T., Florian, C. P., Connelly, J. P., & Pruett-Miller, S. M. (2018). A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Scientific reports*, *8*(1), 888. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>
- Shen, L., Huang, Z., Chang, S., Wang, W., Wang, J., Kuang, T., Han, G., Shen, J. R., & Zhang, X. (2019). Structure of a C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-type PSII-LHCII supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(42), 21246–21255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912462116>
- Shimada, T. L., Shimada, T., Takahashi, H., Fukao, Y., & Hara-Nishimura, I. (2008). A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *55*(5), 798–809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03553.x>
- Shimada, T. L., Shimada, T., & Hara-Nishimura, I. (2010). A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *61*(3), 519–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04060.x>
- Schindele, P., Wolter, F., & Puchta, H. (2020). CRISPR Guide RNA Design Guidelines for Efficient Genome Editing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *2166*, 331–342. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0712-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0712-1_19)
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F. G., Reddy, A. R., Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2000). Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic acids research*, *28*(17), 3361–3369. <https://doi.org/10.1093/nar/28.17.3361>
- Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J., & Mateo, J. L. (2015). CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PloS one*, *10*(4), e0124633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124633>
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, *507*(7490), 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
- Stuttman, J., Barthel, K., Martin, P., Ordon, J., Erickson, J. L., Herr, R., Ferik, F., Kretschmer, C., Berner, T., Keilwagen, J., Marillonnet, S., & Bonas, U. (2021). Highly efficient multiplex editing: one-shot generation of 8× *Nicotiana benthamiana* and 12× *Arabidopsis* mutants. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *106*(1), 8–22. <https://doi.org/10.1111/tbj.15197>
- Sugio, A., Yang, B., Zhu, T., & White, F. F. (2007). Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIAgamma1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(25), 10720–10725. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701742104>
- Svitashev, S., Young, J. K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S. C., & Cigan, A. M. (2015). Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant physiology*, *169*(2), 931–945. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00793>
- Symington, L. S., & Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual review of genetics*, *45*, 247–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132435>
- Ti-plasmid: Features, Diagram and Uses*. Byju's Biology. Retrieved April 22, 2024, from <https://byjus.com/biology/ti-plasmid>

- van Amerongen, H., & Croce, R. (2013). Light harvesting in photosystem II. *Photosynthesis research*, 116(2-3), 251–263. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9824-3>
- Xin Xu, Yujin Yuan, Bihong Feng, Wei Deng. (2020) CRISPR/Cas9-mediated gene editing technology in fruit quality improvement. *Food Quality and Safety*. Volume 4, Issue 4. Pages 159–166, <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa028>
- Zhang, Q., Xing, H. L., Wang, Z. P., Zhang, H. Y., Yang, F., Wang, X. C., & Chen, Q. J. (2018). Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in Arabidopsis and its prevention. *Plant molecular biology*, 96(4-5), 445–456. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0709-x>
- Zhang, Y., Ma, X., Xie, X., & Liu, Y. G. (2017). CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Plants. *Progress in molecular biology and translational science*, 149, 133–150. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.008>

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

PSI – Fotosystém I

PSII – Fotosystém II

EM – Elektrónová mikroskopia

OEC („oxygen evolving complex“) – kyslík vyvíjajúce centrum

CRISPR – „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“

Cas9 – „CRISPR associated protein 9“

Ori („origin of replication“) – replikačný počiatok

MCS („Multiple-cloning site“) - početné klonovacie miesto

RE – restričné endonukleázy

UTR („untranslated region“) – neprekladané oblasti génu

Ti-plazmid („tumor inducing plasmid“) – nádory indukujúci plazmid

T-DNA – „transfer DNA“

NHEJ („non-homologous end joining“) – nehomológne spájanie koncov

HDR („homology-directed repair“) – homológna rekombinácia

TALEN – „Transcription activator-like effector nucleases“

RVD - „repeat variable diresidue“

crRNA – CRISPR RNA

sgRNA – „single guide RNA“

PAM - „protospacer adjacent motif“

tracrRNA – „transactivating RNA“

WT („wild type“) – divoký typ