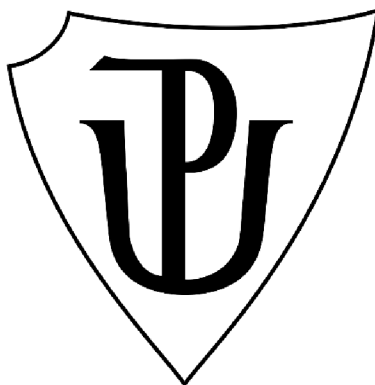


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Charakterizace transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* s modifikovaným proteinem LHCB4

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

|                   |                                |
|-------------------|--------------------------------|
| Autor:            | <b>Leona Popovská</b>          |
| Studijní program: | B0512A130008 Biochemie         |
| Studijní obor:    | Biochemie                      |
| Forma studia:     | Prezenční                      |
| Vedoucí práce:    | <b>Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.</b> |
| Rok:              | 2023                           |

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 9.5.2023

.....

Leona Popovská

Řešení této bakalářské práce bylo umožněno spoluúčastí na projektu Grantové agentury ČR 21-05497S s názvem „*Role proteinu LHCB8 v organizaci a funkci světlosběrného komplexu fotosystému II*“. Hlavním řešitelem tohoto projektu je RNDr. Roman Kouřil, Ph.D., kterému touto cestou děkuji za představení projektu. Mé velké díky patří vedoucí mé práce Mgr. Ivě Ilíkové, Ph.D. Tímto jí děkuji za věnovaný čas, odborné vedení a veškeré rady při zpracování této práce. Děkuji také Mgr. Zuzaně Kučerové, Ph.D. a Mgr. Tereze Vánské za rady při zpracování experimentální části. V neposlední řadě děkuji své rodině za nekonečnou podporu.

## Bibliografická identifikace

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Leona Popovská  |
| Název práce             | Charakterizace transgenních rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> s modifikovaným proteinem LHCB4 |
| Typ práce               | Bakalářská  |
| Pracoviště              | Katedra biochemie   |
| Vedoucí práce           | Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.   |
| Rok obhajoby práce      | 2023  |

### Abstrakt

Jednou z málo prozkoumaných světloběrných antén fotosystému II u rostlin je proteinový komplex LHCB8. Je to jedna ze tří izoform proteinu LHCB4 a předpokládá se, že hraje významnou roli ve specifickém uspořádání superkomplexu fotosystému II a fotoprotekci. Přispívá k tomu fakt, že LHCB8 je u rostlin většinou exprimován pouze za vysokých intenzit záření, ale na druhou stranu u smrku a ostatních zástupců Pinaceae a Gnetales je LHCB8 jedinou přítomnou izoformou LHCB4 a je exprimován za všech světelných podmínek. Cílem této bakalářské práce bylo přispět k objasnění funkce LHCB8. Využito bylo metod transformace rostlin a Digital Droplet PCR, kdy byly připraveny dvě homozygotní transgenní linie *Arabidopsis thaliana* se smrkovou variantou proteinu LHCB8 – *lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8*. Správnost vloženého konstruktu byla ověřena sekvenací a exprese proteinu byla potvrzena metodou Western blot. U těchto linií byla také provedena základní fyziologická charakterizace, zahrnující měření relativního zastoupení chlorofylu a analýzu funkce fotosystému II pomocí chlorofylové fluorescence. Předběžné výsledky indikují, že smrková varianta proteinu LHCB8 se pravděpodobně dokáže navázat na fotosystém II u *Arabidopsis thaliana*. Připravené linie budou dále využity k detailní analýze struktury a funkce superkomplexu fotosystému II v přítomnosti PaLHCB8.

|               |  |
|---------------|--|
| Klíčová slova | Fotosystém II, minoritní světloběrný komplex LHCB4/LHCB8, transgenní rostliny <i>A. thaliana</i> , Digital Droplet PCR |
|---------------|--|

|              |       |
|--------------|-------|
| Počet stran  | 66    |
| Počet příloh | 0     |
| Jazyk        | Český |

## Bibliographical identification

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Autor's first name and surname | Leona Popovská  |
| Title                          | Characterization of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> plants with modified LHCB4 protein |
| Type of thesis                 | Bachelor  |
| Department                     | Department of biochemistry  |
| Supervisor                     | Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.   |
| The year of presentation       | 2023  |

### Abstract

One of the least studied light-harvesting antenna in photosystem II is protein complex LHCB8. It is one of the three LHCB4 protein isoforms and it is assumed to play an important role within photosystem II in its specific organization and photoprotection. The fact that LHCB8 is mostly expressed under high light intensities, but on the other hand it is typical for spruce and other Pinaceae and Gnetales where it is expressed under all light conditions, contributes to this hypothesis. The aim of this bachelor thesis was to contribute to clarifying the function of LHCB8. Plant transformation and Digital Droplet PCR were used to prepare two homozygous transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* with spruce variant of LHCB8 protein – *lhcb4\_PaLHCB8* and *penta\_PaLHCB8*. The inserted construct was verified by sequencing and protein expression was confirmed by Western blotting. These lines were also subjected to basic physiological characterization, including measurement of relative chlorophyll abundance and analysis of photosystem II function using chlorophyll fluorescence. The preliminary results indicate that the spruce variant of the LHCB8 protein is likely to bind to photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. The prepared lines will be further used for a detailed analysis of the structure and function of the photosystem II supercomplex in the presence of PaLHCB8.

|          |   |
|----------|---|
| Keywords | Photosystem II, minor light-harvesting complex<br>LHCB4/LHCB8, transgenic <i>A. thaliana</i> plants,<br>Digital Droplet PCR |
|----------|---|

|                 |    |
|-----------------|----|
| Number of pages | 66 |
|-----------------|----|

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Number of appendices | 0     |
| Language             | Czech |

## OBSAH

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>ÚVOD.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>                             | <b>2</b>  |
| 2.1      | Základní koncept fotosyntézy .....   | 2         |
| 2.1.1    | Světelné reakce fotosyntézy .....  | 2         |
| 2.1.1.1  | Lineární elektronový transport .....                                       | 3         |
| 2.1.2    | Fotosystémy I a II .....   | 4         |
| 2.1.2.1  | Obecný princip funkce světlosběrných antén.....                            | 4         |
| 2.2      | PSII superkomplex .....  | 7         |
| 2.2.1    | Struktura PSII superkomplexu u krytosemenných rostlin .....                | 7         |
| 2.2.2    | Struktura PSII superkomplexu u nahosemenných rostlin .....                 | 9         |
| 2.3      | Minoritní anténa LHCB4.....  | 11        |
| 2.3.1    | Základní popis minoritní antény LHCB4.....                                 | 11        |
| 2.3.2    | Zastoupení LHCB4/LHCB8 v rámci fylogenetického stromu .....                | 12        |
| 2.3.3    | Role proteinu LHCB8 ve struktuře a funkci PSII .....                       | 14        |
| 2.4      | Transgenní rostliny <i>A. thaliana</i> .....                               | 16        |
| 2.4.1    | Princip vložení T-DNA do rostlinného genomu .....                          | 16        |
| 2.5      | Moderní postupy selekce homozygotních linií transformovaných rostlin ..... | 18        |
| 2.5.1    | Selekce transformovaných rostlin pomocí markerů.....                       | 19        |
| 2.5.2    | Selekce rostlin na základě počtu kopií T-DNA pomocí ddPCR.....             | 20        |
| 2.5.2.1  | Princip ddPCR .....  | 20        |
| 2.5.2.2  | Využití ddPCR pro stanovení počtu kopií T-DNA v genomu .....               | 23        |
| 2.5.2.3  | Další aplikace ddPCR.....  | 25        |
| <b>3</b> | <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>  | <b>26</b> |
| 3.1      | Materiál .....   | 26        |
| 3.1.1    | Biologický materiál .....  | 26        |
| 3.1.2    | Chemikálie .....   | 26        |
| 3.1.3    | Přístrojové a ostatní vybavení .....                                       | 28        |
| 3.1.4    | Kity a návody .....  | 29        |
| 3.2      | Metody.....  | 30        |
| 3.2.1    | Transformace rostlin .....   | 30        |
| 3.2.2    | Selekce transformovaných semen .....                                       | 32        |
| 3.2.3    | Izolace DNA z rostlin.....   | 32        |
| 3.2.4    | Stanovení počtu kopií T-DNA pomocí ddPCR.....                              | 34        |
| 3.2.4.1  | Příprava vzorku pro ddPCR.....   | 34        |
| 3.2.4.2  | Generování droplet .....   | 35        |
| 3.2.4.3  | PCR .....  | 35        |
| 3.2.4.4  | Analýza droplet .....  | 36        |



|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.2.5    | Sekvenace.....  | 36        |
| 3.2.6    | Měření chlorofylu.....  | 38        |
| 3.2.7    | Western blot .....  | 39        |
| 3.2.8    | Dual-PAM .....  | 40        |
| <b>4</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>   | <b>43</b> |
| 4.1      | Transformace rostlin <i>A. thaliana</i> .....                           | 43        |
| 4.2      | Selekce homozygotních linií .....                                       | 44        |
| 4.2.1    | Selekce primárních transformovaných semen .....                         | 44        |
| 4.2.2    | Stanovení počtu kopií T-DNA v rostlinách T1 generace pomocí ddPCR ..... | 45        |
| 4.2.3    | Identifikace homozygotních rostlin v T2 generaci .....                  | 47        |
| 4.3      | Ověření homozygotních linií sekvenací .....                             | 51        |
| 4.4      | Fenotyp a obsah chlorofylu .....  | 52        |
| 4.5      | Western blot .....  | 54        |
| 4.6      | Dual-PAM .....  | 55        |
| 4.6.1    | Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII.....                         | 55        |
| 4.6.2    | Nefotochemické zhášení .....  | 56        |
| 4.6.3    | Efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII .....                        | 58        |
| <b>5</b> | <b>ZÁVĚR .....</b>  | <b>59</b> |
| <b>6</b> | <b>LITERATURA.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>7</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>                          | <b>64</b> |

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

- Zpracování přehledu o problematice funkce a struktury fotosystému II a jeho světlosběrného komplexu, včetně proteinu LHCB4, u fotosyntetických organismů

### **Experimentální část**

- Selektce homozygotních transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí metody Droplet Digital PCR
- Provedení základní charakterizace fotosyntetické funkce získaných rostlin
- Vyhodnocení vlivu modifikovaného proteinu LHCB4 na funkci a strukturu fotosystému II a diskutování obdržených výsledků

# 1 ÚVOD

Fotosystém II (PSII) je klíčový článek fotosyntetického aparátu. Jako jediný v přírodě katalyzuje fotolýzu vody vedoucí k produkci kyslíku a zapojení elektronů do elektronového transportního řetězce. Tím je podmíněn chod fotosyntézy, děje, který je nezbytný k přežití nejen fotoautotrofních organismů, ale i nás, lidí.

Znalosti o struktuře a funkci tohoto fotosystému jsou primárně založeny na studiích rostlin pěstovaných v optimálním prostředí. Fotosystém II je tak složen z dimerního jádra, kde dochází k nábojové separaci, a z komplexního systému periferních světlosběrných antén, které přenáší zachycenou energii slunečního záření do jádra PSII. Stresové podmínky ale mohou u rostlin indukovat změnu této struktury ztrátou některých světlosběrných antén nebo tvorbou jejich jiných forem. Příkladem je protein LHCB8 (tj. jedna z izoform LHCB4), málo prozkoumaná světlosběrná anténa PSII s předpokládanou fotoprotektivní funkcí (Klimmek et al., 2006; de Bianchi et al., 2011; Kouřil et al., 2016)

U krytosemenných rostlin, které jsou vystaveny vysoké intenzitě záření, tento protein nahrazuje své dvě běžně se vyskytující izoformy (Klimmek et al., 2006). To vede ke ztrátě charakteristického vazebného místa pro další protein a k odtržení dalších antén (Albanese et al., 2016). Menší množství antén potom znamená menší přísun energie do jádra PSII, respektive jde o fotoprotektivní reakci rostliny na stres.

K dalšímu studiu LHCB8 pobízí také nedávný objev tohoto proteinu v PSII smrku ztepilého (a dalších příbuzných nahosemenných rostlin). Na rozdíl od krytosemenných je u těchto rostlin LHCB8 exprimován běžně, ne jen za stresových podmínek (Grebe et al., 2019).

Studiu LHCB8 se nyní věnuje projekt GAČR 21-05497S s názvem „*Role proteinu LHCB8 v organizaci a funkci světlosběrného komplexu fotosystému II<sup>c</sup>*“. Motivací této bakalářské práce je, v rámci tohoto projektu, přispět k objasnění úlohy LHCB8 ve funkci a strukturní organizaci PSII. K tomu je využito několika různých postupů, mezi které patří příprava transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* vložением transgenu pro smrkový protein LHCB8, selekce homozygotních linií těchto transgenních rostlin a následná fyziologická charakterizace.

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Základní koncept fotosyntézy**

Fotosyntéza (FS) je proces klíčový pro prakticky veškerý život na Zemi. Probíhá v rostlinách a ostatních fotoautotrofních organismech a je založena na komplexní sérii reakcí, které zahrnují absorpci světla, jeho přeměnu na energii chemických vazeb, elektronový a protonový transport a enzymatickou dráhu. U rostlin a většiny řas, tedy během oxygenní FS, dochází k „přeměně“ vzdušného oxidu uhličitého a vody na organické molekuly a kyslík.

Fotosyntézu lze rozdělit na dvě fáze podle požadavku na světlo. Světelné reakce probíhají v tylakoidních membránách (TM) chloroplastů a zahrnují štěpení vody na kyslík, protony a elektrony. Protony a elektrony jsou následně transportovány přes TM za vzniku adenosin trifosfátu (ATP) a nikotinamid-adenin dinukleotid fosfátu (NADPH). ATP a NADPH jsou poté využity v temnostních reakcích probíhajících ve stromatu chloroplastů k zabudování oxidu uhličitého do organických molekul, zejména monosacharidů, prostřednictvím Calvin-Bensonova cyklu (Johnson, 2016).

Fotosyntéza má klíčový význam i pro organismy heterotrofní, které využívají produkty fotosyntézy, tj. kyslík pro respiraci a sacharidy jako zdroj energie a uhlíku. Energie slunečního záření pro pohon fotosyntézy je tak nezbytným zdrojem veškeré biologické energie.

#### **2.1.1 Světelné reakce fotosyntézy**

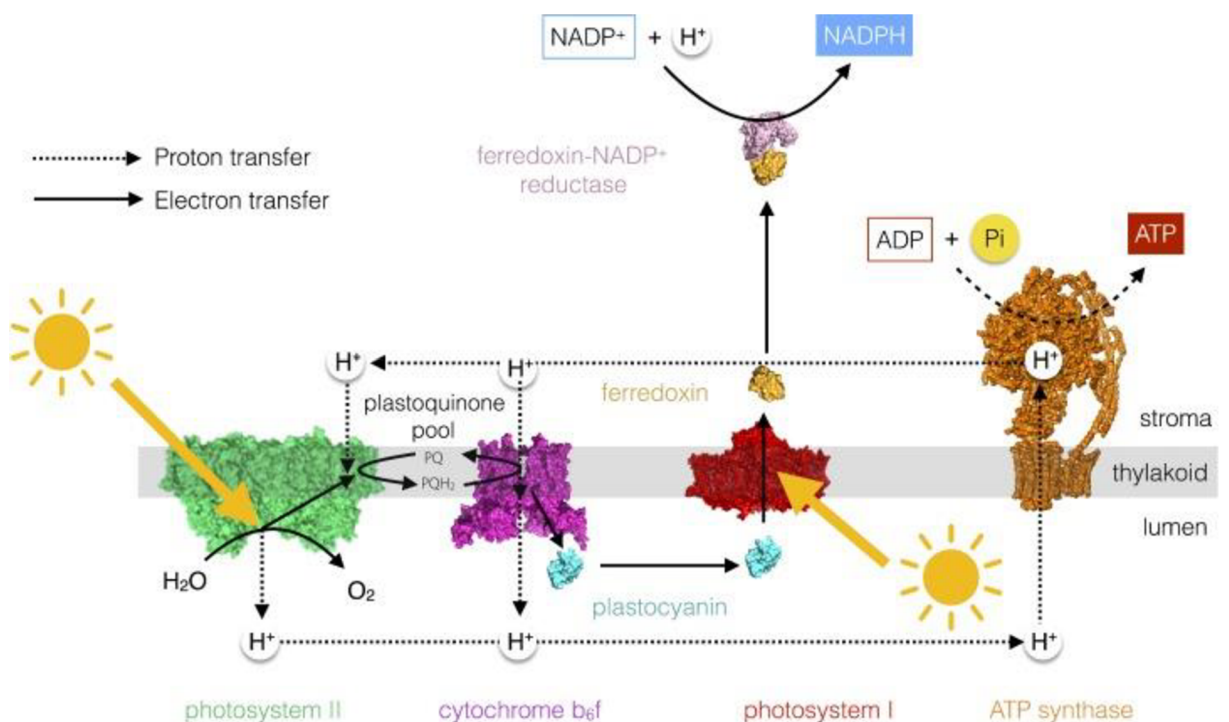
Dějištěm fotosyntézy (FS) u rostlin jsou chloroplasty. Tyto orgány mají komplexní vnitřní strukturu tvořenou membránovými strukturami nazývanými tylakoidy, které oddělují vnitřní (lumen) a vnější (stroma) prostor chloroplastu. Rozlišujeme granální a stromální tylakoidy. Granální tylakoidy jsou seřazeny na sebe a tvoří grana. Stromální tylakoidy jsou naopak samostatné a tvoří lamely propojující jednotlivá grana. V tylakoidech jsou umístěny všechny proteinové komplexy podílející se na světelné fázi FS.

Podstatnou částí fotosyntetického aparátu většiny fotoautotrofních organismů jsou v tylakoidech zabudované proteinové komplexy fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII). Společně se světlosběrnými komplexy (LHCs) a cytochromem  $b_6f$  (Cyt  $b_6f$ ) zprostředkovávají fotosystémy lineární elektronový transport přes tylakoidní membrány. Kromě uvedených komplexů obsahují tylakoidní membrány také zabudované komplexy

regulace protonového gradientu (PRG5, PGRL1), komplex NAD(P)H dehydrogenasu (NDH) a ATP synthasu (Kouřil et al., 2018).

### 2.1.1.1 Lineární elektronový transport

Energie absorbovaného záření je v PSII využita k nábojové separaci, kdy dojde k odtržení elektronu ze speciálního páru chlorofylů v reakčním centru PSII. Zatímco je tento elektron přes několik redoxních kofaktorů v rámci PSII přenesen na plastochinon (PQ), chybějící elektron v reakčním centru je doplněn prostřednictvím štěpení vody, při kterém se jako vedlejší produkt uvolňuje kyslík a protony do lumenu. Plastochinol (redukováný plastochinon, PQH<sub>2</sub>) je reoxidován zpět na plastochinon cytochrom b<sub>6</sub>f komplexem za současného přenesení protonů ze stromatu do lumenu. Elektrony z cytochrom b<sub>6</sub>f komplexu redukují další elektronový přenašeč, plastocyanin, který slouží jako donor elektronů do PSI. V PSI musí opět proběhnout nábojová separace s využitím světelné energie a elektron je přenesen až na elektronový akceptor ferredoxin. Ten je využit enzymem ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reduktasou pro tvorbu NADPH. Při přenosu elektronů vzniká na TM zároveň protonový gradient (protony se akumulují v lumenu), který je využit pro pohon enzymu ATP-synthasy a tím pro tvorbu ATP (Obr. 1, Johnson, 2016).



Obr. 1: Elektronový a protonový transport fotosyntézy. Lineární elektronový transport začínající štěpením vody ve fotosystému II, následovaný přenosem elektronů mezi volnými a v tylakoidech zabudovanými přenašeči, vedoucí ke tvorbě NADPH. Spřaženým procesem je ustavení protonového gradientu na membráně tylakoidu, čehož je využito k tvorbě ATP. Převzato z Johnson (2016).

Kromě uvedených drah využívají rostliny také elektronový transport cyklický, kdy dochází k tvorbě protonového gradientu bez redukce NADP<sup>+</sup>. Aktivací cyklického transportu jsou tedy rostliny schopny kontrolovat poměr NADPH/ATP (Johnson, 2016).

### **2.1.2 Fotosystémy I a II**

Základ fotosyntetického aparátu v tylakoidech tvoří fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII), multiproteinové komplexy, které se společně s dalšími proteinovými komplexy účastní světelné fáze FS. U vyšších rostlin jsou fotosystémy lokalizovány v odlišných částech TM. PSII komplexy jsou zabudovány hlavně v granálních tylakoidech, část se může nacházet ale i v tylakoidech stromálních, kde se jako monomery účastní PSII opravného cyklu. Komplexy PSI jsou výhradně ve stromálních tylakoidech a na okrajích gran (Kouřil et al., 2018).

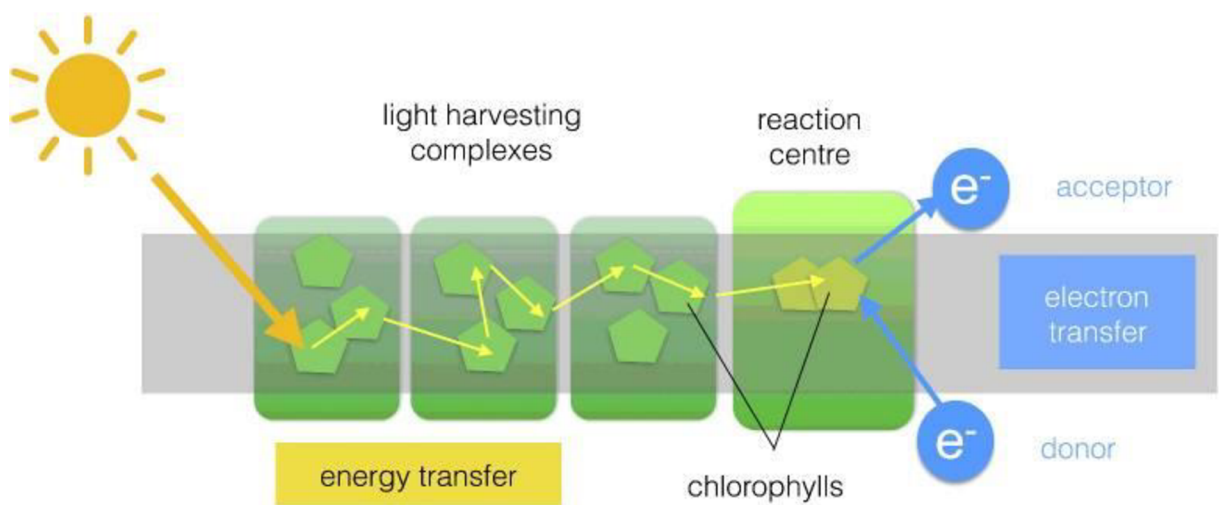
Oba typy fotosystémů mají stejnou obecnou strukturu, jsou složeny z jaderného komplexu a světlosběrných antén. Jádro fotosystémů obsahuje reakční centrum se všemi kofaktory nezbytnými pro fotochemické reakce, zatímco systém periferních světlosběrných antén zajišťuje přísun excitační energie pro daný fotosystém. Funkce těchto světlosběrných antén spočívá v zachycení fotonů a jejich přenosu s co největší účinností do reakčních center fotosystémů, kde je jejich energie využita pro nábojovou separaci (Kouřil et al., 2018). Obecně je jádro konzervované napříč všemi fotosyntetickými organismy, avšak systém světlosběrných antén vykazuje velkou variabilitu (Kouřil et al., 2018).

#### **2.1.2.1 Obecný princip funkce světlosběrných antén**

Kvanta světelné energie (fotony) jsou absorbována molekulami fotosyntetických pigmentů, které jsou lokalizované v tylakoidních membránách chloroplastů. U rostlin a zelených řas se jedná především o pigmenty ze skupin chlorofylů a karotenoidů, které jsou navázány na proteiny a tvoří světlosběrné komplexy (light-harvesting complexes, LHCs).

Absorpcí specifických vlnových délek záření, tedy fotonů o dané energii, pak  $\pi$ -elektrony konjugovaného systému dvojných vazeb v molekule pigmentu přechází ze svého základního do excitovaného stavu s vyšší energií. V tomto stavu jsou ale elektrony nestabilní a dochází proto k dalšímu přenosu energie. Ta je díky vysoké organizovanosti tylakoidních membrán dále využita pro pohon fotosyntézy.

Aby mohla být energie fotonu pohlcená pigmentem efektivně přenesena do reakčních center PSII a PSI a využita pro nábojovou separaci, zaujímají vůči sobě jednotlivé molekuly pigmentů specifické umístění, právě díky vazbě na proteiny v tylakoidech. Jedna molekula chlorofylu (Chl) v excitovaném stavu tak prostřednictvím rezonančního přenosu poskytne téměř veškerou pohlcenou energii fotonu druhé molekule chlorofylu, která je vůči té první ve vhodném umístění a vhodném, tedy základním, energetickém stavu. Takto je energie fotonu postupně přenášena ze světlosběrných komplexů (LHCs) až do reakčních center (RC) fotosystémů, kde je speciální pár fotochemicky aktivních Chl a kde je energie spotřebována pro pohon endergonických reakcí FS (Obr. 2).



Obr. 2: Základní princip funkce fotosystémů a způsob přenosu energie záření ze světlosběrných komplexů do reakčního centra fotosystémů. Převzato od Johnson (2016).

LHCs jsou klíčové také pro regulaci a optimalizaci množství světelné energie, která se dostává do RC fotosystémů. To vychází ze schopnosti rostlin využít různé mechanismy adaptace na měnící se světelné podmínky, případně jinou stresovou zátěž. Jednou z možností regulace je variabilita rozsahu LHCs, resp. antén, která umožňuje rostlinám přizpůsobit se různým světelným podmínkám. Rostliny obývající spíše stinná stanoviště mají tendenci akumulovat větší světlosběrnou anténu, zatímco dlouhodobé vystavení vysokým intenzitám záření vede k redukci velikosti antény. Roli zde hraje také obsah a typ jednotlivých pigmentů a tím i adaptace LHCs na různé vlnové délky. Tím jsou rostliny, potažmo jejich LHCs, schopny regulovat přenos a vstup excitační energie do RC (Ruban, 2014).

Rostliny jsou ale vybaveny také regulačními mechanismy, jejichž účinnost lze pozorovat už v krátkém časovém rozmezí. Jedná se zejména o tzv. stavový přechod a nefotochemické zhášení, které jsou taktéž založeny na činnosti LHCs. Stavový přechod se uplatňuje při nevyváženosti přísunu energie mezi PSI a PSII. Je to proces přerozdělení energie mezi fotosystémy vyvolaný fosforylací jedné z podjednotek LHCII. Fosforylovaný LHCII po odtržení od PSII interaguje s PSI. Oba fotosystémy jsou tímto schopny přibližně stejné absorpce záření. Druhým z uvedených regulačních mechanismů je nefotochemické zhášení (non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching, NPQ). Na rozdíl od stavového přechodu se NPQ odehrává za vysokých intenzit záření. Jedná se o proces, který umožňuje bezpečně uvolnit přebytečnou absorbovanou energii ve formě tepla (Ruban, 2014).



## 2.2 PSII superkomplex

Fotosystém II (PSII) je jedním z klíčových komplexů zapojených do světelných reakcí fotosyntézy. Jde o jediný enzym v přírodě, který je schopen štěpit vodu na protony, elektrony a kyslík (Johnson, 2016).

Rostlinný fotosystém II (PSII) je velký a vysoce variabilní proteinový superkomplex s velkým počtem podjednotek, jehož variabilita vychází ze schopnosti PSII jaderného dimeru vázat různý počet LHCI trimerů (Kouřil et al., 2018). Struktura tohoto superkomplexu je studována zejména pomocí rentgenové krystalografie v kombinaci s elektronovou mikroskopií a její určení hraje zásadní roli v pochopení procesů fotosyntézy a její regulace. Tyto znalosti jsou pak klíčové pro řadu odvětví přes zemědělství, biotechnologie, studium životního prostředí či výzkum obnovitelných zdrojů energie.

### 2.2.1 Struktura PSII superkomplexu u krytosemenných rostlin

Pro studium obecné struktury PSII superkomplexu jsou využívány kvetoucí, krytosemenné, rostliny. Jedním z hojně používaných zástupců je huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*).

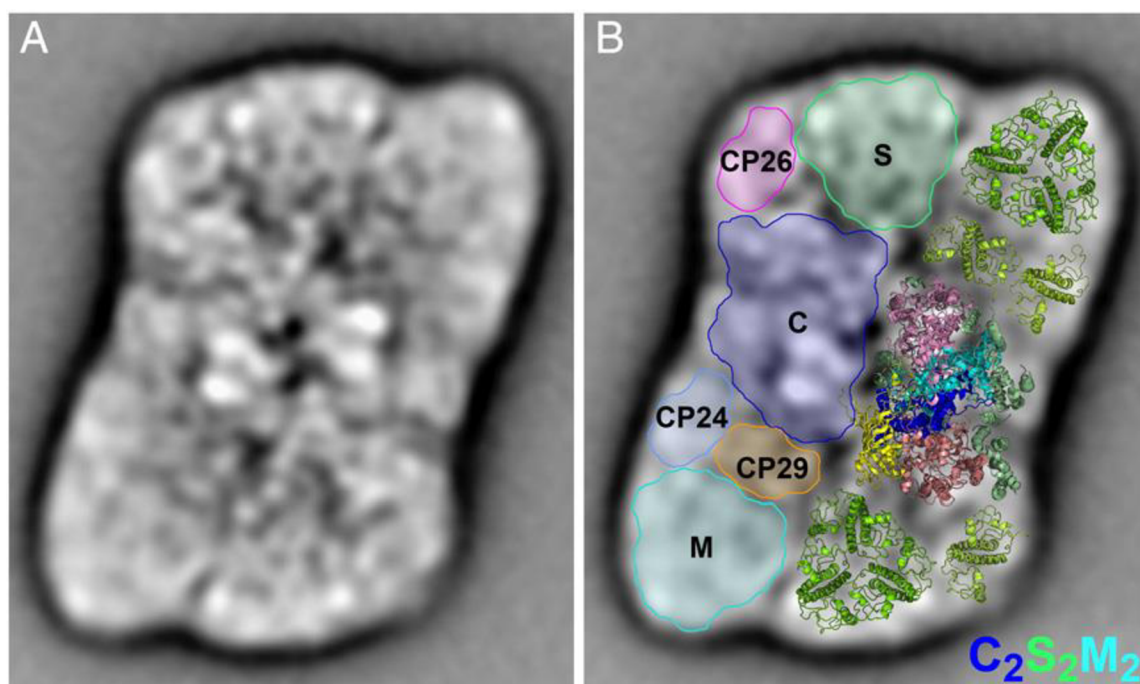
Jak již bylo uvedeno, rostlinný fotosystém II je složen z několika podjednotek, které se společně označují jako PSII-LHCI superkomplex. Z označení vyplývá i základní struktura, a tedy PSII jádro a na něho navázaný LHCI systém periferních pigment-proteinových komplexů, náležících do Lhc genové rodiny (Jansson, 1999; Kouřil et al., 2012).

Jádro PSII je dimerní ( $C_2$ ), kdy každý z monomerů obsahuje reakční centrum (RC) a probíhá zde tedy separace náboje. RC PSII sestává z D1/D2/cytochrom b559 komplexu nesoucího kofaktory pro elektronový transport. Tento komplex společně s podjednotkami CP43 a CP47 tvoří jaderný komplex, tzn. základ jádra PSII (Ferreira et al., 2004; de Bianchi et al., 2011).

Dimerní jádro  $C_2$  je asociováno s periferním systémem světlosběrných antén LHCI (light-harvesting complexes of photosystem II) (Obr. 3). Jedná se o pigment-proteinové komplexy, označované LHCB1-6. Rozlišujeme tzv. majoritní a minoritní LHCI anténní proteiny. Majoritní světlosběrné antény jsou reprezentovány třemi velmi podobnými proteiny LHCB1, LHCB2 a LHCB3, které tvoří trimery. Vzájemný poměr

LHCB1, LHCB2 a LHCB3 v TM je 8:3:1 (Jansson, 1994), z čehož plyne, že tvoří homoi heterotrimery. Minoritní anténní komplexy, označované jako LHCB4 (CP29), LHCB5 (CP26) a LHCB6 (CP24), jsou v superkomplexu přítomny jako monomery (Obr. 3, Kouřil et al., 2012; Kouřil et al., 2018).

Spojením jádra a periferních komplexů je výrazně zlepšena světlosběrná kapacita PSII, proteiny LHCBII komplexu totiž zásobují reakční centrum PSII excitační energií. Navíc mají také zásadní roli v ochraně PSII před foto-oxidačním poškozením nadměrným zářením (Kouřil et al., 2018).



Obr. 3: Projekční mapa strukturního modelu PSII  $C_2S_2M_2$  superkomplexu (typický, nejvíce zastoupený) *Arabidopsis thaliana* při pohledu shora. (A) Projekční mapa  $C_2S_2M_2$  superkomplexu získaná single particle elektronovou mikroskopií. (B) Zobrazení podjednotek superkomplexu pomocí jednotlivých struktur o vysokém rozlišení – PSII jádro (podjednotky D1, D2, CP43, CP47 a vnější podjednotka PsbO jsou zvýrazněny modrou, tyrkysovou, lososovou, růžovou a žlutou) a LHCB (trimerní LHCBII a monomerní LHCB zvýrazněny tmavě a světle zeleně). Schematicky je vyznačen PSII jaderný monomer „C“, LHCBII trimery „S“ a „M“ a minoritní antény CP24, CP26 a CP29. Převzato z Kouřil et al. (2012).

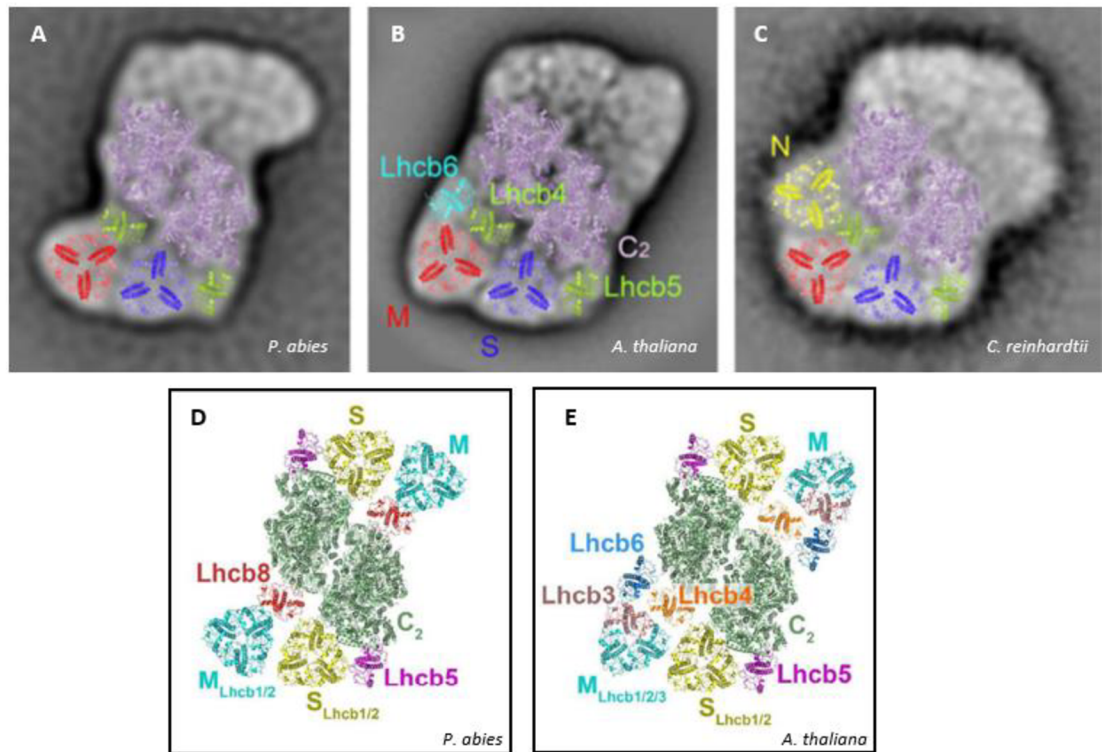
Velikost PSII-LHCII superkomplexu je do značné míry variabilní. U suchozemských rostlin je nejtypičtější forma PSII superkomplexu označovaná jako C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub> (Obr. 3). Obsahuje dva trimery S a dva trimery M navázané na dimerní jádro C<sub>2</sub> (Boekema et al, 1999). Značení trimerů S (strongly-bound) a M (moderately-bound) vychází z charakteru vazby daného trimery k jádru PSII (Dekker & Boekema, 2005; Kouřil et al., 2012). Zatímco S trimery jsou tvořeny kombinací LHCB1 a LHCB2 proteinů, u M trimerů je typicky přítomen i protein LHCB3. Samotnou vazbu trimerů na jádro PSII u krytosemenných rostlin zprostředkovávají monomery LHCB4-6, kdy připojení S-trimerů umožňují proteiny LHCB4 a LHCB5, zatímco M-trimery jsou navázány pomocí proteinů LHCB4 a LHCB6. Menší formy PSII-LHCII superkomplexu, jež jsou však obvykle méně zastoupené, postrádají ve své struktuře jeden nebo oba M-trimery (Kouřil et al., 2018).

### 2.2.2 Struktura PSII superkomplexu u nahosemenných rostlin

Dlouho se předpokládalo, že struktura nejběžnější formy superkomplexu fotosystému II – C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub> – je stejná napříč všemi druhy suchozemských rostlin. Tato jednotná struktura byla totiž již dříve pozorována u modelových zástupců krytosemenných a u jätrovek, tedy u evolučně nejmladších a nejstarších druhů suchozemských rostlin. Studie Kouřila et al. (2016) „*Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant groups – break-up of current dogma*“ ale odhalila ztrátu funkčních genů *LHCB3* a *LHCB6* u některých rostlin ze skupiny nahosemenných (rody *Picea* a *Pinus* (rodina Pinaceae) a *Gnetum* (Gnetales)) a s tím související strukturní a funkční změny PSII-LHCII superkomplexu. Tím byl vyvrácen do té doby obecně přijímaný fakt o uniformní struktuře superkomplexu PSII u suchozemských rostlin. Poprvé byla nová struktura C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub> superkomplexu pozorována u smrku ztepilého, lat. *Picea abies*, angl. Norway spruce (Obr. 4, Kouřil et al., 2016). Kvůli absenci proteinů LHCB3 (součást M trimery) a LHCB6 se M trimer váže k PSII komplexu jiným způsobem (Obr. 4), což do té doby nebylo pozorováno u jiných suchozemských rostlin. Obdobná struktura byla ovšem pozorována u zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii*, která - stejně jako většina ostatních zelených řas - také postrádá LHCB6 protein (Obr. 4, Kouřil et al., 2016).

Jaká je tedy evoluční výhoda ztráty LHCB3 a LHCB6, když byly tyto proteiny ještě donedávna považovány za jednu ze základních charakteristik suchozemských rostlin? Je známo, že většina kvetoucích rostlin reaguje při aklimaci na vysokou intenzitu světla snížením množství LHCB3 a LHCB6 proteinů. To pak vede k přechodu forem superkomplexů z C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub> na C<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (Kouřil et al., 2013). Je tedy možné, že vysoká intenzita

záření během evolučního vývoje společného předka rodin Pinaceae a Gnetales stojí za změnou struktury  $C_2S_2M_2$  u těchto druhů rostlin (Kouřil et al., 2016). Nedávná studie také ukázala, že ztráta funkčních proteinů LHCB3 a LHCB6 výrazně ovlivňuje způsob, jakým se fotosyntetický aparát smrku vyrovnává s aklimací na nízkou a vysokou intenzitu světla (Štroch et al., 2022).



Obr. 4: Strukturální přiřazení proteinových podjednotek PSII superkomplexu. PSII superkomplex z *Picea abies* (A), *Arabidopsis thaliana* (B) a *Chlamydomonas reinhardtii* (C). Zachyceny jsou projekční mapy  $C_2S_2M_2$  superkomplexů z *P. abies* a *A. thaliana* a  $C_2S_2M_2N_2$  z *C. reinhardtii* s nařazenými strukturami PSII jaderného komplexu ( $C_2$ , světle fialová) a trimerních (S, M a N trimery v modré, červené a žluté) a monomerních (LHCB4/LHCB8 a LHCB5 zeleně, LHCB6 tyrkysově) LHCB proteinů. Strukturální organizace  $C_2S_2M_2$  superkomplexu u *P. abies* (D) a *A. thaliana* (E). S a M trimery jsou specificky vázány k jadernému dimeru ( $C_2$ ) pomocí světlosběrných proteinů (LHCB4-6, 8). Vazba M trimernu k  $C_2$  je zprostředkována pomocí LHCB3, LHCB6 a LHCB4 u *A. thaliana* a pomocí LHCB8 u *P. abies*. Převzato a upraveno z Kouřil et al. (2016) a van Bezouwen et al. (2017).

## 2.3 Minoritní anténa LHCB4

### 2.3.1 Základní popis minoritní antény LHCB4

LHCB4 zaujímá v rámci PSII-LHCII superkomplexu důležité postavení. Zprostředkovává vazbu LHCII S a M trimerů k PSII jádru a má důležitou roli v přenosu energie a fotoprotekci (de Bianchi et al., 2011). LHCB4 protein je u rostlin obvykle přítomen ve více izoformách. U *A. thaliana* se konkrétně jedná o tři rozdílné izoformy (LHCB4.1, LHCB4.2 a LHCB4.3), které jsou kódovány třemi samostatnými geny: *LHCB4.1* (AT5G01530), *LHCB4.2* (AT3G08940) a *LHCB4.3* (AT2G40100) (de Bianchi et al., 2011, Kouřil et al., 2016).

Proteiny LHCB4.1 a LHCB4.2 mají velmi podobnou sekvenci (Obr. 5) a tím i podobnou strukturu, funkci a regulaci. Za běžných podmínek jsou v TM přítomny v poměru zhruba 1:1 (Ilíková et al., 2021) a předpokládá se, že jsou funkčně zaměnitelné. Delece jedné z těchto izoform je pak kompenzována tvorbou druhé izoformy, což neplatí pro protein kódovaný *LHCB4.3* (de Bianchi et al., 2011). Ten není za normálních podmínek u většiny krytosemenných prakticky přítomen, ale jeho množství se výrazně zvyšuje při vystavení vysokým intenzitám záření (Klimmek et al., 2006). Sekvence proteinu LHCB4.3 postrádá na rozdíl od LHCB4.1 a LHCB4.2 relativně velkou část C-terminální domény (Obr. 5, Klimmek et al., 2006), která je klíčová pro vazbu minoritní antény LHCB6 (Albanese et al., 2016). Rozdíly v sekvenci mezi LHCB4.1/4.2 a LHCB4.3 jsou dokonce výraznější než například mezi proteiny LHCB1 a LHCB2, a proto došlo ke změně označení LHCB4.3 na LHCB8, respektive *LHCB8* pro jeho gen (Klimmek et al., 2006).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp|Q07473|CB4A_ARATH      MAATSAAAAAASSIMGTRVAPGIHPGSGRFTAVFGFGKKKA----APKKSAKKTVTTDRP  56
sp|Q9XF88|CB4B_ARATH      -MAATSTAAAASSIMGTRVVS DISSNSSRFTARFGFGTKKA----SPKKA--KTVISDRP  53
sp|Q9S7W1|CB4C_ARATH      --MATTTAAAAASGIFGIRIQ-DPRPGTGRVQARFGFSFGKKKPAPPPKSRQVQDDGDRL  57
      : : : : * * * * * : * * * * * : : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|Q07473|CB4A_ARATH      LWYPGAI SPDWLDGSLVGDYGFDPFGLGKPAEYLQFDIDSLDQNLAKNLAGDVIIGTRTEA  116
sp|Q9XF88|CB4B_ARATH      LWFPGAKSPEYLDGSLVGDYGFDPFGLGKPAEYLQFDLDSLDQNLAKNLYGEVIIGTRTEA  113
sp|Q9S7W1|CB4C_ARATH      VWFPGANPPEWLDGSMIGDRGDFPFGLGKPAEYLQYDFDGLDQNLAKNVAGDIIGIIQES  117
      : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|Q07473|CB4A_ARATH      ADAKSTPFQPYSEVFGIQRFRECELIHGRWAMLATLGALSVEWLTGVTWQDAGKVELVDG  176
sp|Q9XF88|CB4B_ARATH      VDPKSTPFQPYSEVFGIQRFRECELIHGRWAMLATLGAITVEWLTGVTWQDAGKVELVDG  173
sp|Q9S7W1|CB4C_ARATH      SEIKPTPFQPYTEVFGIQRFRECELIHGRWAMLGTLGAI AVEALTGIAWQDAGKVELVEG  177
      : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|Q07473|CB4A_ARATH      SSYLGQPLPFSISTLIWIEVLVIGYIEFQRNAELDSEKRLYPGGKFFDPLGLAADPEKTA  236
sp|Q9XF88|CB4B_ARATH      SSYLGQPLPFSISTLIWIEVLVIGYIEFQRNAELDSEKRLYPGGKFFDPLGLASDPVKKA  233
sp|Q9S7W1|CB4C_ARATH      SSYLGQPLPFSLTTLIWIEVLVIGYIEFQRNSELDPEKRIYPGG-YFDPLGLAADPEKLD  236
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

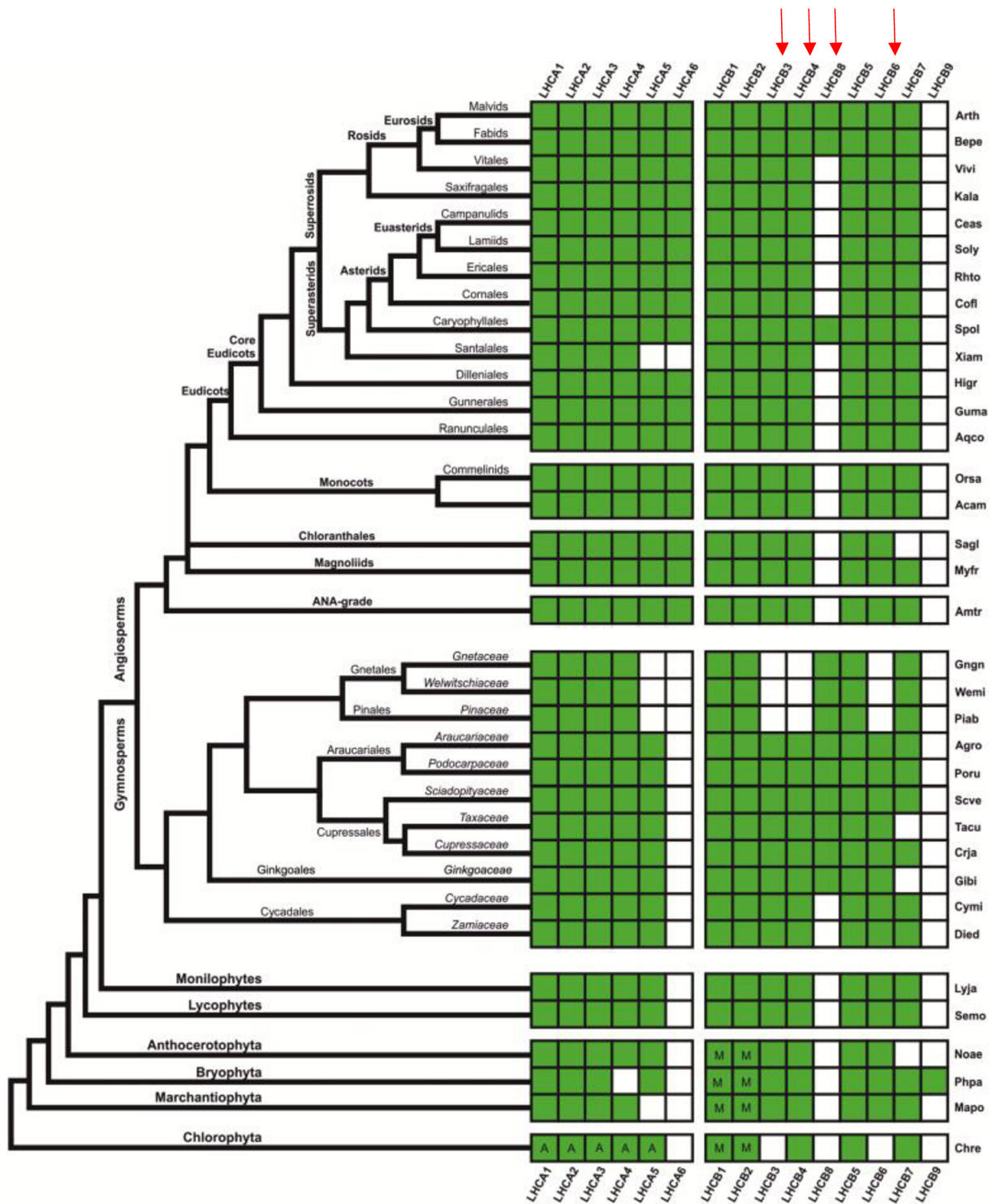
sp|Q07473|CB4A_ARATH      QLQLAEIKHARLAMVAF LGFAVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHTTIIIDTFSSS      290
sp|Q9XF88|CB4B_ARATH      QLQLAEIKHARLAMVGF LGFAVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHTTIIIDTFSSS      287
sp|Q9S7W1|CB4C_ARATH      TLKLAIEIKHSRLAMVAF LIFALQAAFTGKGPVSFLATFNN-----          276
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Obr. 5: Porovnání sekvencí LHCB4 izoforem *A. thaliana*. Sekvence pochází z UniProt databáze. Platí UniProt označení Q07473, Q99XF88 a Q9S7W1 pro proteiny *A. thaliana* LHCB4.1, LHCB4.2 a LHCB8. K porovnání byl použit program ClustalW Multiple Sequence Alignment (Madeira et al., 2022).

### 2.3.2 Zastoupení LHCB4/LHCB8 v rámci fylogenetického stromu

Dlouho se předpokládalo, že na rozdíl od genu/genů *LHCB4*, které se vyskytují víceméně univerzálně napříč rostlinnou říší, je gen *LHCB8* omezen pouze na krytosemenné rostliny skupiny Eurosids (Klimmek et al., 2006). Novější studie ale popsaly výskyt genu *LHCB8* nejen u krytosemenných skupin Eurosids a Caryophyllales, ale také u nahosemenných s výjimkou skupin Cyadaceae a Cycadales (Obr. 6, Grebe et al., 2019).



Obr. 6: Přehled výskytu LHC proteinů u vybraných skupin rostlin. Červeně vyznačeny jsou LHCb3, LHCb4, LHCb8 a LHCb6. Převzato z Grebe et al. (2019), upraveno.

Prakticky u všech rostlin, u kterých byla zjištěna přítomnost genu *LHCB8*, existuje paralelně alespoň jeden gen pro *LHCB4* (Obr. 6). Jedinou výjimku představují skupiny nahosemenných Pinaceae a Gnetales, u kterých chybí geny pro *LHCB4* a které tedy obsahují pouze jedinou izoformu LHCB4, a to LHCB8 (Grebe et al., 2019). Tato evoluční změna pravděpodobně souvisí s tím, že u těchto rostlin zároveň chybí minoritní anténa LHCB6 (kap. 2.2.2). LHCB4 protein s delším C-terminálním řetězcem, který je nutný pro vazbu LHCB6, byl tedy evolučně nahrazen proteinem LHCB8, kde tato konzervativní doména na C-konci chybí. Zda je tato unikátní změna spojena s nějakou evoluční výhodou a jaké důsledky přinesla pro funkci fotosytému II a aklimační strategii rostlin není zatím známé, což činí téma mé bakalářské práce velmi aktuální.

### **2.3.3 Role proteinu LHCB8 ve struktuře a funkci PSII**

*Arabidopsis thaliana*, modelová krytosemenná rostlina, obsahuje, jak již bylo uvedeno, tři LHCB4 izoformy. Isoforma LHCB8 je však u *Arabidopsis* a ostatních krytosemenných exprimovaná jen zřídka (Sawchuk et al., 2008). Podmínkou exprese je vystavení stresovým podmínkám, zejména zvýšené intenzitě záření (high light intensity, HL). Tvorba proteinu LHCB8 je pravděpodobně spojena s fotoprotekcí a ochranou před dalším stresem (Albanese et al., 2016; Grinzato et al., 2020). Schopnost fotoprotekce spočívá ve strategickém umístění LHCB8 v rámci PSII-LHCII superkomplexu a v odlišnosti sekvence tohoto proteinu od LHCB4. Proteiny LHCB4 tvoří za normálních podmínek „most“ mezi vnitřní anténou CP47 jaderného komplexu PSII a periferními trimery LHCII. Postavení LHCB4 tak zajišťuje interakci RC s M trimery skrze LHCB6, a to díky své charakteristické doméně na C-konci, která zprostředkovává vazbu LHCB6. Pokud jsou ale běžné LHCB4 nahrazeny proteinem LHCB8 bez tohoto C-konce, nemůže pravděpodobně dojít k vazbě LHCB6, což má za následek odpojení M trimeru z PSII superkomplexu. Tato hypotéza je podpořena již více studiemi, kdy vystavení rostliny HL vedlo ke zvýšení tvorby LHCB8 a současně k poklesu zastoupení LHCB6 a redukci PSII-LHCII superkomplexu ztrátou M trimerů (Albanese et al., 2016; Albanese et al., 2019). Změnou ve velikosti světlosběrných antén tak dochází k regulaci přísunu excitační energie z LHCII do RC fotosytému.



U *Picea abies* (smrk ztepilý) je ovšem LHCB8, jakožto jediná forma LHCB4, exprimován dominantně i za běžných podmínek. Tento protein se v rámci smrkového PSII fotosystému nachází na vazebném místě, které je za normálních podmínek u krytosemenných obsazeno proteinem LHCB4 (Grebe et al., 2019). Otázkou bylo, jakou roli při vzniku unikátní struktury PSII superkomplexu u smrku (Obr. 4) hraje ztráta proteinů LHCB3 a LHCB6 (viz kap. 2.2.2) a zda má případně vliv i přítomnost LHCB8. Vzhledem k tomu, že v současné době nelze geneticky upravovat smrk (ani by to nebylo vzhledem k jeho vlastnostem výhodné), je genetický výzkum prováděn na modifikovaných rostlinách *A. thaliana*. Záměrem je docílit smrkového PSII u modifikované *A. thaliana* vyvoláním různých změn v PSII, které mohou potenciálními faktory pro vznik charakteristické struktury tohoto superkomplexu u smrku. Bylo zjištěno, že ztráta proteinů LHCB3 a LHCB6 sama o sobě nevede u *A. thaliana* k vytvoření PSII superkomplexu smrkového typu (Ilíková et al., 2021). Na rozdíl od smrku, u *A. thaliana* všechny dosavadní studie ukazují, že připojení M trimeru není možné bez současné přítomnosti minoritní antény LHCB6 (Ilíková et al., 2021; Kovács et al., 2006). Otázkou tedy je, zda záměna LHCB4 a LHCB8 u smrku není právě oním klíčovým faktorem, který umožňuje vazbu M trimeru bez přítomnosti LHCB6 (Obr. 4) a vede k struktuře PSII superkomplexu typické pro smrk. Moje bakalářská práce se právě tímto tématem zabývá.

Zde je na místě uvést projekt Grantové agentury ČR 21-05497S, jehož hlavním řešitelem je RNDr. R.Kouřil, Ph.D. z PřF UP v Olomouci a jehož část se týká i mé závěrečné práce. Projekt nese název „*Role proteinu LHCB8 v organizaci a funkci světlosběrného komplexu fotosystému II*“. Projekt je zaměřen na analýzu vlivu přítomnosti proteinu LHCB8 na strukturu a fotosyntetickou funkci PSII superkomplexu u *P. abies* a *A. thaliana* a zároveň se snaží poskytnout přímý důkaz toho, že LHCB8 je zodpovědný za jedinečnou organizaci PSII superkomplexu u smrku.

## 2.4 Transgenní rostliny *A. thaliana*

*A. thaliana* neboli huseníček rolní je běžně se vyskytující plevel z čeledi brukvovitých, který našel uplatnění jako modelový organismus díky své nenáročnosti, malému vzrůstu, schopnosti samoopylení a krátké generační době (6–8 týdnů od vysetí), kdy při optimálním růstu získáme z jedné rostliny až několik tisíc semen. Navíc má tato rostlina jeden z nejmenších genomů v rostlinné říši, jenž se v roce 2000 podařilo plně sekvenovat (“Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*”, 2000). V jádře má pět párů chromozomů a haploidní genom obsahuje 125 Mb. A právě velikost genomu byla rozhodující při výběru *A. thaliana* jako první rostliny pro kompletní sekvenaci DNA (Řepková, 2007).

Po r. 2000 a zdárné sekvenaci genomu *A. thaliana* následovaly další projekty s cílem přiřadit funkce jednotlivým genům pomocí mutační analýzy. Jednou z možností studia funkce genů a následného vlivu exprimovaných proteinů na fenotyp organismu je u rostlin inzerční mutagenese. Jedná se o metodu funkčního ovlivnění genů prostřednictvím cizorodé DNA, přičemž pro vkládání cizorodé DNA do rostlinného genomu se běžně využívá T-DNA či transpozony. Jejich začleněním do rostlinné DNA dochází k inaktivaci nebo aktivaci genů. To nám umožňuje přímé pozorování vztahu mezi genem a fenotypem, z čehož také plyne možnost využít *A. thaliana* jako model pro fyziologické studie (Řepková, 2007; Ālker et al., 2008).

Na inaktivaci genů je založena příprava tzv. knockout mutantů. Příprava takovýchto mutantních rostlin je ale zdlouhavá, pracná a nákladná. V případě modelové rostliny *A. thaliana* jsou tyto problémy překonány díky dostupnosti několika databází a kolekcí T-DNA inserčních linií a také tomu přispívá fakt, že pro téměř každý její gen již existuje knockout mutace. Tyto databáze lze snadno prohledávat na základě znalosti sekvence a snadno tak lze také určit, zda jsou pro požadovaný gen k dispozici inserční linie T-DNA. Mezi čtyři nejvyužívanější T-DNA inserční linie patří GABI-Kat linie, SAIL, FLAGdb a SALK. Dostupnost těchto kolekcí tak výrazně usnadňuje další výzkumnou činnost a případnou produkci dalších transgenních rostlin. (Ālker et al., 2008)

### 2.4.1 Princip vložení T-DNA do rostlinného genomu

Jedním z klasických přístupů transformace rostlin je vložení cizorodé DNA pomocí vektoru založeného na přirozeně se vyskytujícím plazmidu bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tato bakterie vyvolává u rostlin tvorbu nádorů, přičemž její patologické

účinky souvisí s přítomností tzv. Ti plazmidu (Tumor-inducing plasmid). Jeho část, označovaná jako T-DNA (15-30 kb), je schopna se začlenit do náhodných míst rostlinného genomu. Této vlastnosti je využito při přípravě transgenních rostlin, kdy je do T-DNA začleněna požadovaná nukleotidová sekvence. Často se využívá tzv. binární vektorový systém, který využívá dvou plazmidů. Tím lze obejít problém s velikostí Ti plazmidu (okolo 200 kb), problém nalezení unikátního restrikčního místa, ale také tvorbu nádorů. Jeden plazmid obsahuje geny virulence, které jsou nezbytné pro přenos T-DNA do hostitele, druhý plazmid obsahuje samotnou T-DNA a přenášené geny. Výhodou této transformace je stabilita struktury T-DNA v rostlinné buňce a její přenos, jakožto nedílná součást rostlinného chromozomu, do dceřiných buněk.

Knockout linie a transgenní rostliny *A. thaliana* jsou využity také pro potřeby studia jednotlivých světlosběrných antén fotosystému II. Takto je v rámci PSII řešena i problematika minoritního světlosběrného proteinu LHCB4, jehož izoformy, zejména LHCB8 (tj. LHCB4.3), lze jen těžko rozlišit běžnými postupy, jako je například Western blot.

## 2.5 Moderní postupy selekce homozygotních linií transformovaných rostlin

Přenos genetické informace mezi dvěma různými organismy bez jejich přímého kontaktu, a tím tvorba transgenních organismů, je dnes již relativně běžným postupem molekulární biologie a genového inženýrství. Tato znalost, jak zacházet s geny, je mimo jiné využívána v rámci výzkumu fotosyntetického aparátu rostlin. Důležitým krokem, který je s přípravou transgenních rostlin neodmyslitelně spjatý, je také jejich samotná identifikace a selekce homozygotních linií pro danou genovou modifikaci.

Podstatným krokem pro fyziologickou charakterizaci rostliny je bezpochyby selekce jejích homozygotních linií. Takové rostliny jsou konstantní ve sledovaném znaku a lze je podrobit další analýze. Obecně jsou homozygoti (HM) jedinci, kteří jsou nositeli dvou stejných alel genu na daném chromozomovém lokusu. Zde je ale pozornost věnována přípravě homozygotních linií u transgenních rostlin, připravených vložením transferové DNA (T-DNA) do genomu rostliny pomocí vhodné bakterie. Transgenní rostlinu lze označit jako homozygotní, jestliže obsahuje na daném chromozomovém lokusu dvě stejné alely, tedy v případě diploidního genomu *A. thaliana* dva inserty transgenu.

T-DNA se může integrovat do různých míst rostlinného genomu a navíc často dochází také k vícenásobné inserci, což komplikuje selekci homozygotních rostlin. Je třeba také brát v potaz, že inserce T-DNA může vést i k umlčení některého genu, což může například následně ovlivnit fenotyp transformované rostliny. Ideálním případem je tedy selekce homozygotní rostliny, která obsahuje dvě kopie T-DNA v diploidním genomu a v níž inserce této T-DNA neovlivnila žádný klíčový gen. Problém možného ovlivnění genů lze vyřešit přesným stanovením místa inserce nebo přípravou alespoň dvou nezávislých linií s různým místem inserce. Na základě porovnání jejich fenotypu lze totiž usoudit, zda inserce ovlivnila některý z klíčových genů. K určení množství insertů se běžně využívá dvou přístupů. Jedním je odhad počtu kopií T-DNA pomocí segregáčního poměru, které je ale pracné, časově náročné a méně spolehlivé, druhým přístupem je stanovení počtu kopií T-DNA metodou ddPCR, případně tradiční metodou Southern blot (Głowacka et al., 2016).

Z uvedeného plyne potřeba vhodných selekčních technik nejen proto, aby bylo možné jednoduše vybrat transformované rostliny třeba i v případě, kdy nemají viditelný fenotyp,

ale také proto, aby bylo možné co nejefektivněji zjistit, kolik kopií transgenu rostlina nese. Tím je podmíněna rychlost selekce homozygota a míra exprese.

### **2.5.1 Selektce transformovaných rostlin pomocí markerů**

Výběr transformovaných semen je založen na použití markerů, které jsou důležitou součástí klonovacího vektoru a jsou tak spolu se sledovanými geny vkládány transformací do genomu hostitele. Konvenčně jsou transgenní rostliny identifikovány pomocí markerů selekčních (Brasileiro & Aragão, 2001; Shimada et al., 2010), které transformovaným rostlinám umožňují růst v přítomnosti určitého antibiotika nebo herbicidu. Tento přístup selekce se však často potýká s několika následujícími problémy. Práce s těmito markery vyžaduje sterilní prostředí, což je překážkou při práci s velkým množstvím rostlin několika generací. S tím pak souvisí také použití velkého množství růstových médií a pracnost a zdlouhavost při zasetí velkého množství semen. Navíc dochází k tomu, že jsou transformované rostliny často defektní ve svém růstu a částečně senzitivní na použítá antibiotika nebo herbicidy, přestože vůči nim nesou geny rezistence. Problematická bývá situace, kdy je potřeba provést transformaci knockout linie mutantních rostlin (kap. 2.4), které byly připraveny insercí transgenu již obsahujícího některý z genů rezistence. Příkladem může být transformace *Arabidopsis* knockout linií ze SALK kolekce, které už obsahují gen rezistence na kanamycin a nelze ho tedy znovu použít jako selekční marker pro novou transformaci.

Dalším typem markerů jsou markery screenovatelné. Sem patří mj. i technologie FAST (fluorescence-accumulating seed technology, Shimada et al., 2010), která umožňuje identifikaci transformovaných semen ihned po jejich odebrání a překonává tak nedostatky konvenčních selekčních markerů. Jejich použití výrazně šetří čas, je eliminována potřeba antibiotik a herbicidů a nejsou tak finančně náročné. Obrovskou výhodou této technologie je také to, že se jedná markery ko-dominantní, takže kromě selekce transformantů je lze využít také pro rozlišení heterozygotního a homozygotního stavu. Technologie FAST pro použití u *A.thaliana* je založena na expresi fúzního proteinu, konkrétně fluorescenčně značeného proteinu oleosin OLE1 (Shimada et al., 2010). Oleosin je strukturální protein zabudovaný v membránách lipido-proteinových struktur oleosomů a běžně se vyskytuje v semenech *A. thaliana*. Jako fluorescenční část fúzního proteinu se využívá buď GFP (green fluorescent protein) nebo RFP (red fluorescent protein), případně i jiné typy fluorescenčních proteinů. GFP má svůj původ u medúzy *Aequorea victoria*, ale v současné době existuje celá řada jeho modifikací lišících

se fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Celý fúzní protein je exprimován pod *OLE1* promotorem (*AtOLE1<sub>pro</sub>*), tj. k expresi dochází pouze v semenech transformované rostliny během dormance a tato semena pak lze selektovat jednoduše na základě fluorescence. Z toho důvodu je tato technika velmi rychlá a nedestruktivní (Shimada et al., 2010).

### 2.5.2 Selektce rostlin na základě počtu kopií T-DNA pomocí ddPCR

Jako nejlepší metoda pro selekci transformovaných homozygotních rostlin se nabízí Droplet Digital PCR (ddPCR) a její schopnost určit hodnotu CNV (copy number variation), resp. počet T-DNA insertů. Dalšími metodami pro stanovení počtu kopií T-DNA v genomu jsou Southern blot, termální asymetrická prokládaná (TAIL-)PCR a kvantitativní (q)PCR. Provést lze také odhad na základě segregčních analýz. Ty ale na rozdíl od ddPCR nedovedou stanovit mnohačetnou inserci ve stejném lokusu. Využití Southern blottingu pak zajišťuje sice na rozdíl od TAIL-PCR a qPCR přesnost, ale ne takovou rychlost jako ddPCR. Nepřesnost qPCR spočívá v neschopnosti odhalit malé rozdíly v počtu kopií kvůli nepřesnostem při vyhodnocení fluorescence, jak relativně (porovnáním vzorků), tak při odečtení koncentrace DNA z kalibrační křivky. V případě TAIL-PCR je opět problém při mnohačetné inserci, kdy jsou transgeny vloženy blízko u sebe. Dochází tak ke snížení pravděpodobnosti správného navázání degenerovaných primerů mezi jejich sekvencí. Technika ddPCR překonává problémy všech uvedených technik a navíc je díky rozdělení kroků amplifikace a kvantifikace relativně nenáročná na chyby při přípravě vzorků (Głowacka et al., 2016).

#### 2.5.2.1 Princip ddPCR

Droplet Digital PCR vyžaduje specializované přístrojové vybavení (například QX200 systém ddPCR od firmy Bio-Rad, Obr. 7) a umožňuje vysoce přesnou a absolutní kvantifikaci sekvencí nukleových kyselin díky využití mikrofluidiky (Hindson et al., 2011; Morcia et al., 2020).

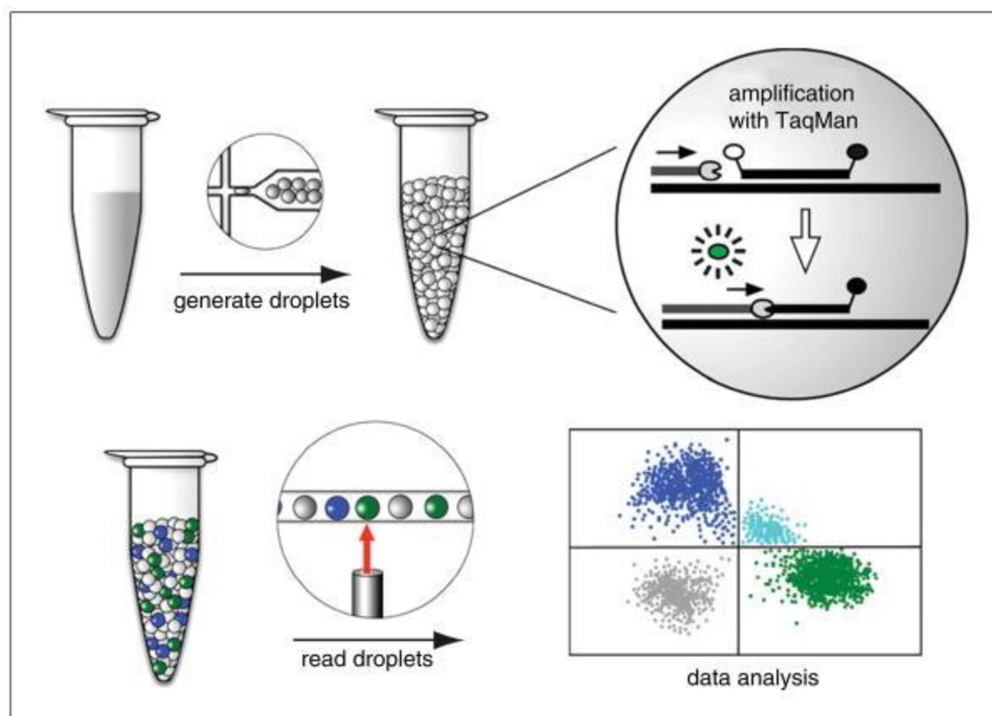


Obr. 7: QX200 Droplet Digitální PCR systém. Přístroj pro vyhodnocení droplet (vlevo), generátor droplet (vpravo). Převzato z manuálu pro ddPCR (Bio-Rad).

Využitím této technologie dochází k rozdělení PCR vzorku do přibližně 20 000 kapiček (water-in-oil dropletů) stejného objemu a v každé z nich potom probíhá PCR amplifikace jedné nebo více sledovaných sekvencí. Následuje stanovení, zda je daná kapka vzorku pozitivní nebo negativní pro sledované sekvence. Toho je docíleno měřením fluorescence reporterových molekul v každé kapce (nejčastěji prostřednictvím TaqMan hydrolyzačních prob, viz níže), přičemž kapky nad prahovou hodnotou se počítají jako pozitivní, čímž se získá digitální výsledek (ano/ne) (Obr. 8, Hindson et al., 2011).

Pozitivní droplety jsou obecně ty, které obsahují alespoň jednu kopii sledované (případně referenční nukleotidové sekvence) a vykazují tak zvýšenou fluorescenci oproti negativním dropletům. Data, která ddPCR poskytuje, lze pozorovat v 1-D a 2-D grafech podle toho, zda sledujeme jednu nebo porovnáváme dvě různé nukleotidové sekvence ve vzorku. V grafech je navíc umožněno posouvat prahovou hranici a tím ovlivnit, které droplety budou považovány za pozitivní. Na Obr. 9 je příklad 2-D grafu, kde je každá z droplet vyhodnocována dvoukanálovým systémem (target x reference). Přesný počet pozitivních a negativních droplet pro každý z fluoroforů v daném vzorku je vyhodnocován pomocí programu QuantaSoft™, který pomocí Poissonova rozdělení určuje buď absolutní koncentraci sledované nukleotidové sekvence v jednotkách kopie/μl vzorku, případně relativní zastoupení sledované sekvence vůči sekvenci referenční.

Existují tři základní typy experimentů, které lze pomocí ddPCR provést v každé jamce. Jedná se o absolutní kvantifikaci (ABS), detekci vzácných/minimálně zastoupených nukleotidových sekvencí v jinak komplexním vzorku (RED, rare event detection) a stanovení hodnoty variability počtu kopií (CNV). A právě třetí z uvedených typů experimentů je využit v této práci pro stanovení počtu insertů T-DNA v rostlinném genomu. Jinými slovy jde o měření koncentrace zájmové nukleotidové sekvence relativním porovnáním s koncentrací reference (Obr. 8 a Obr. 9).



Obr. 8: Princip ddPCR. Převzato z Mazaika & Homsy (2014).



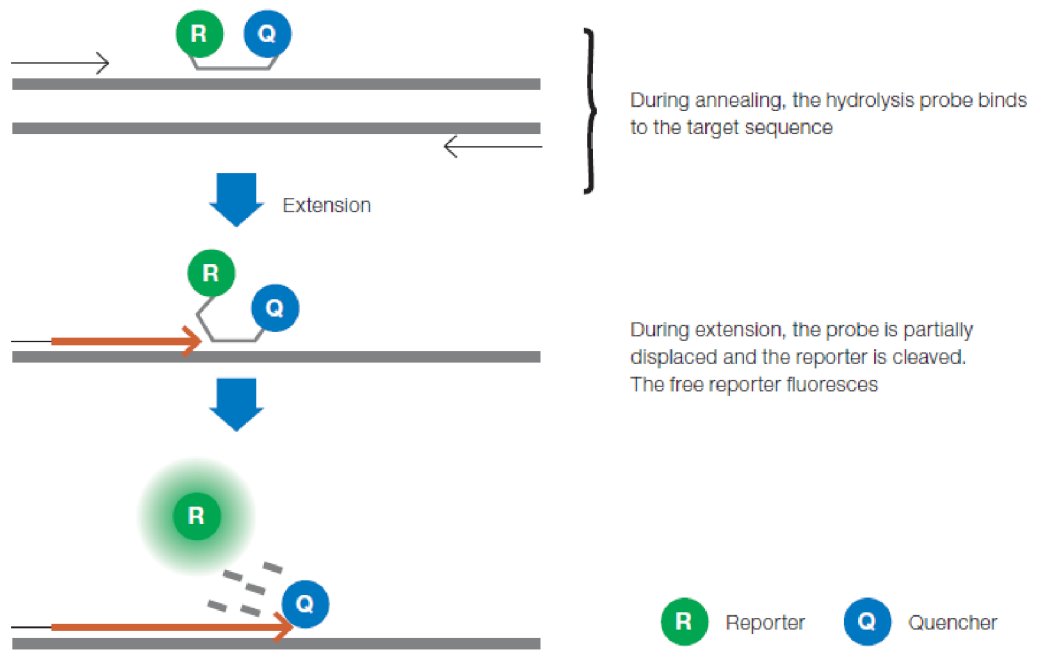
Obr. 9: Prostředí programu QuantaSoft (snímek obrazovky, zdrojem dat je vlastní experiment). Zobrazen je příklad 2-D grafu analýzy dropletů z jedné jamky/vzorku v modu Copy number variation s využitím TaqMan prob. V kanálu 1 byla detekována fluorescence fluoroforu FAM, v kanálu 2 fluorescence VIC. U dropletů je jasně patrné, které byly negativní (černá), pozitivní pouze pro FAM (modrá), pozitivní pouze pro VIC (zelená) a pozitivní pro oba fluorofory (oranžová). Výsledek analýzy, udávající počet kopií analyzovaných sekvencí, je uveden v tabulce vlevo nahoře.



### 2.5.2.2 Využití ddPCR pro stanovení počtu kopií T-DNA v genomu

V případě, že chceme zjistit počet insertů T-DNA v genomu, využíváme ddPCR v modu CNV (copy number variation). Variabilita počtu kopií – CNV – je obecně typ genetické variability, při které se v genomu organismu vyskytuje změna v počtu kopií určitého úseku DNA. Tyto změny v genomu jsou zcela běžné u většiny organismů, mají vliv na genovou expresi a vedou tak často také ke změnám fenotypu. Z podstaty se jedná o delecii nebo duplikaci dané sekvence a hodnoty CNV se proto charakterizují vzhledem k počtu kopií jiného známého referenčního úseku DNA. U stanovení počtu kopií T-DNA tedy jako studovanou sekvenci (target) volíme úsek který je součástí vložené T-DNA a jako referenci volíme obvykle některý nukleární gen který se v genomu studované rostliny nachází v jedné kopii.

V modu CNV se pro vizualizaci amplifikace studovaného/referenčního úseku DNA využívají především TaqMan hydrolyzační proby značené na jednom konci FAM, HEX nebo VIC reportérovým fluoroforem a na druhém konci zhášečem. Proby se na základě komplementarity vážou na sekvence zjišťovaného úseku DNA (target) a známého úseku DNA (reference). V okamžiku, kdy DNA-polymeráza při amplifikaci „narazí“ na probu navázanou na stanovovanou/referenční sekvenci, využije své 5'-3' exonukleasové aktivity a proba se hydrolyzuje za uvolnění fluoroforu, což má za následek zvýšení intenzity fluorescence (Obr. 10). Stanovení počtu insertů T-DNA (hodnoty CNV) je tak založeno na měření intenzity fluorescence v každé z droplet vzorku dvoubarevným detekčním systémem, kdy pro target a referenci je využit odlišný reportérový fluorofor. Droplety jsou vyhodnocovány jako pozitivní či negativní v závislosti na přítomnosti fluorescenčního signálu (resp. na přítomnosti sledované/referenční sekvence) a pomocí Poissonova rozdělení je stanoveno přesné relativní zastoupení studované sekvence vůči referenci.



Obr. 10: TaqMan systém. Reportérový fluorofor je značen písmenem R, zhášec písmenem Q. TaqMan probe jsou hydrolyzovány Taq polymerázou. Převzato z manuálu pro ddPCR (Bio-Rad).

### **2.5.2.3 Další aplikace ddPCR**

Využití technologie ddPCR má spoustu výhod. Mezi ty hlavní patří právě schopnost absolutní kvantifikace zájmové sekvence DNA, nesrovnatelná přesnost a citlivost, větší robustnost (zejména díky menší náchylnosti na chyby během amplifikace) nebo schopnost masivního rozdělení vzorků. Tím jsou mimo jiné zaručeny také menší provozní náklady a potřeba jen malých objemů vzorků (Hindson et al., 2011).

Kromě výše zmíněných typů experimentů (kap. 2.5.2.2) dokáže ddPCR sledovat také změny v genové expresi nebo zvyšovat přesnost sekvenačního procesu během NGS (next-generation sequencing). V případě NGS je výhodné použití ddPCR během amplifikace DNA fragmentů pro sekvenaci (masivní rozdělení vzorků), kvantifikace NGS knihoven (ddPCR nahrazuje komplikovanější a méně přesné metody kvantifikace) či pro validaci výsledků. Další možnou aplikací je zapojení ddPCR během analýzy jednotlivých buněk (single-cell analysis) nebo u detekce editací genomu, kdy zajímavým příkladem je zejména detekce CRISPR/Cas9 editace genomu (Peng et al., 2020). Ve všech případech technika ddPCR výrazně usnadňuje a urychluje proces.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

- Rostliny *Arabidopsis thaliana*, divoký typ (wild type, WT, ekotyp Col-0)
- Trojitý mutant *Arabidopsis thaliana lhcb4 (lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3)*, připravený křížením inserčních linií SAIL\_910\_D12, GABI\_282A07, SALK\_032779
- Pětinásobný mutant *Arabidopsis thaliana lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3 lhcb3 lhcb6*, připravený křížením inserčních linií SAIL\_910\_D12, GABI\_282A07, SALK\_032779, SALK\_020314c, SALK\_077953
- Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 s vektorem pH7m24GW-FAST nesoucím konstrukt *AtLHCB4.1<sub>pro</sub>::PaLHCB8*

#### 3.1.2 Chemikálie

##### Chemikálie pro transformaci rostlin:

- Spectinomycin (*Merck*)
- Gentamycin (*Merck*)
- Rifampicin (*Merck*)
- Sacharosa (*Lachner*)
- Silwet L-77 (*ClonTech*)
- DMSO (*Duchefa*)
- YEB medium (*Thermo Fisher Scientific*)

##### Chemikálie pro izolaci a štěpení DNA:

- Pufry pro izolaci rostlinné DNA (PL1, PC, PW1, PW2, PE) (*Macherey-Nagel*)
- RNasa A (*Macherey-Nagel*)
- Ethanol (*Merck*)
- CutSmart pufr (*New England Biolabs*)
- MfeI restriční enzym (*New England Biolabs*)

##### Chemikálie pro ddPCR:

- ddPCR supermix (*Bio-Rad*)
- Primery (*Eurofins Scientific*)
- Proby (*Thermo Fisher Scientific*)
- TE pufr (*Thermo Fisher Scientific*)

- Olej pro generování droplet (*Bio-Rad*)

#### Chemikálie použité pro ELFO a barvení fragmentů DNA:

- Agarosa (*Sigma-Aldrich*)
- DNA Ladder 100-5000 bp (*Thermo Fisher Scientific*)
- DNA Loading Dye, Blue (6X) (*Thermo Fisher Scientific*)
- Ethidium bromid (*NeoLab*)
- TAE pufr (10X) (*Thermo Fisher Scientific*)

#### Chemikálie pro amplifikaci vloženého genu:

- Q5 reakční pufr (*New England Biolabs*)
- dNTPs (*New England Biolabs*)
- Primery (*Eurofins Scientific*)
- Q5 DNA polymeráza (*New England Biolabs*)

#### Chemikálie pro purifikaci PCR produktu:

- Pufry PB, PE, EB (*Qiagen*)
- Ethanol (*Merck*)

#### Chemikálie pro sekvenaci:

- Sekvenační pufr (5X) (*Thermo Fisher Scientific*)
- BigDye (*Thermo Fisher Scientific*)
- Primery (*Eurofins Scientific*)
- ddNTPs (*Sigma-Aldrich*)

#### Chemikálie pro Western blot

- DTE (*Thermo Fisher Scientific*)
- DTT (*Bio-Rad*)
- SDS (*Merck*)
- Polyakrylamidový gel (*Bio-Rad*)
- Tris-Glycin SDS vzorkovací pufr (10X) (*Thermo Fisher Scientific*)
- $\beta$ -merkaptoethanol (*Thermo Fisher Scientific*)
- BSA (*Roth*)
- Tris-Tricin SDS pufr pro ELFO (10X) (*Bio-Rad*)
- Proteinový Ladder 10-180 kDa (*Thermo Fisher Scientific*)
- Methanol (*Merck*)

- Transferový pufr (5X) (*Bio-Rad*)
- Primární protilátka na LHCB4 (*Agrisera*)
- Sekundární protilátka (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate) (*Bio-Rad*)
- ddH<sub>2</sub>O
- TBST pufr (20X) (*Bio-Rad*)
- TBS pufr (10X) (*Bio-Rad*)
- Chemiluminiscenční substráty (Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate) (*Merck*)

### 3.1.3 Přístrojové a ostatní vybavení

- Centrifuga (*Labnet International*)
- Spektrofotometr (*Thermo Fisher Scientific*)
- Inkubátor (*Novus Ferro*)
- Třepačka (*Eppendorf*)
- Fluorescenční mikroskop (*Olympus*)
- Lyofilizátor (*LabGene*)
- Homogenizátor (*Qiagen*)
- Vodní lázeň (*Grant Instruments*)
- NanoDrop® ND 1000 spektrofotometr (*Thermo Fisher Scientific*)
- PCR cycler (*Bio-Rad*)
- QX200 ddPCR systém (*Bio-Rad*)
- Plate Sealer (*Bio-Rad*)
- Systém pro horizontální elektroforézu (*Thermo Fisher Scientific*)
- Digitální předvážky (*Scaltec instruments GmbH*)
- UV transiluminátor (*Syngene International Limited*)
- Kapilární sekvenátor (*Thermo Fisher Scientific*)
- Chlorofylmetr SPAD 502 Plus DL (*Konica Minolta*)
- Termoblok (*Thermo Fisher Scientific*)
- Elektroforetická cela pro separaci proteinů (*Bio-Rad*)
- PVDF membrány (*Bio-Rad*)
- Trans-Blot Turbo Blotting systém (*Bio-Rad*)
- UV transiluminátor
- Dual-PAM-100 (*Walz*)

### 3.1.4 Kity a návody

- Floral dip protokol (*upraveno podle Clough a Bent (1998)*)
- NucleoSpin® Plant II kit (*Mecherey-Nagel*)
- Q5 protokol pro amplifikaci vloženého genu z gDNA (*New England Biolabs*)
- Qiaquick PCR purification kit (*New England Biolabs*)
- Software QuantaSoft™ (*Bio-Rad*)
- Software SnapGene na vyhodnocení sekvenace (*Dotmatics*)
- Software a manuál pro Dual-PAM-100 (*Walz*)
- Manuál pro Digital Droplet PCR (*Bio-Rad*)
- Manuál pro Trans-Blot Turbo Blotting systém (*Bio- Rad*)

## 3.2 Metody

Rostliny *A. thaliana* využívané pro experimenty byly pěstovány ve fytostronu za dvou různých podmínek. Rostliny pro přípravu a selekci homozygotních linií byly pěstovány při fotoperiodě 16 h den (19 °C, intenzita světla 130  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a 8 h noc (18 °C), relativní vlhkost vzduchu byla 65 %. Rostliny pro fyziologickou charakteristiku byly naopak vystaveny světelnému cyklu 8 h den (22 °C, 100-120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a 16 h noc (20 °C). Před zasetím byla semínka přibližně po dobu 24 h namočená ve vodě.

### 3.2.1 Transformace rostlin

Pro přípravu požadovaných transgenních linií *Arabidopsis thaliana* (Tab. 1) bylo využito metody floral dip, resp. metody máčení květů. Použit byl upravený protokol podle autorů Clough a Bent (1998) a transformovány byly již mutantní rostliny *Arabidopsis* knockout linií, tj. rostliny trojitého a penta mutanta (Tab. 1).

Proces transformace metodou floral dip bylo nutné pro přípravu bakteriální suspenze rozdělit do tří dnů:

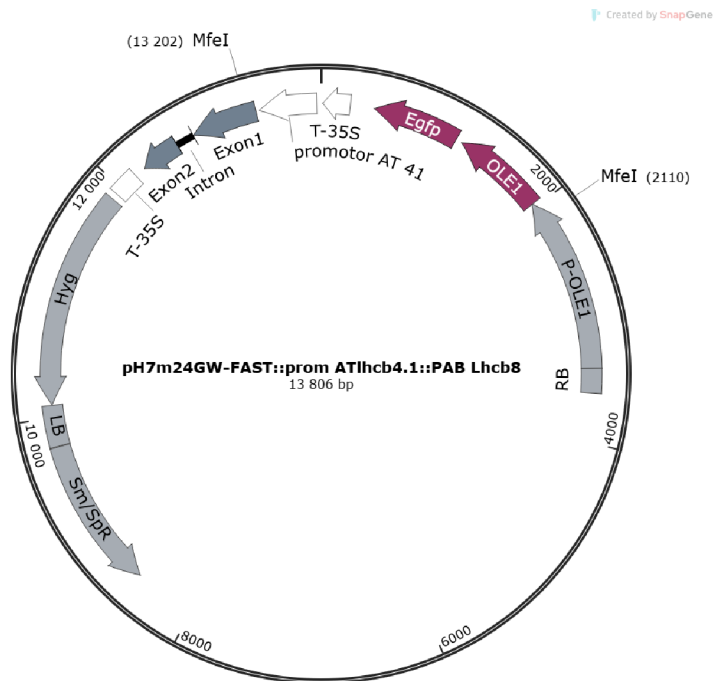
(1) První den bylo zajištěno naočkování malého objemu média. Jednalo se o 5 ml YEB (Yeast Extract Beef) média s antibiotiky (rifampicin, gentamycin, spectinomycin), do něhož byla naočkována kultura *A. tumefaciens* GV3101 nesoucí vektor pH7m24GW-FAST s genem pro protein LHCB8 ze smrku ztepilého (*Picea abies*, Pa) pod promotorem *AtLHCB4.1<sub>pro</sub>* genu *LHCB4.1* z *A. thaliana* (*AtLHCB4.1<sub>pro</sub>::PaLHCB8*) (Obr. 11). Inkubace proběhla přes noc na třepačce při 28 °C a 225 rpm.

Tab. 1: Přehled připravovaných transgenních linií *A. thaliana*

| Linie č. | rostlina <i>Arabidopsis</i> pro transformaci*                     | vložený konstrukt              |                |
|----------|---|--------------------------------|----------------|
|          |   | promotor                       | gen            |
| 1        | trojitý mutant <i>lhcb4</i><br>( <i>lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3</i> ) | <i>AtLHCB4.1<sub>pro</sub></i> | <i>PaLHCB8</i> |
| 2        | penta mutant<br><i>lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3 lhcb3 lhcb6</i>        | <i>AtLHCB4.1<sub>pro</sub></i> | <i>PaLHCB8</i> |

\* v následujícím textu je trojitý mutant označen *lhcb4*, penta mutant nese označení *penta*, transformanti z nich vycházející jsou označeni *lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8*.





Obr. 11: Vektor pH7m24GW-FAST s konstruktem pro transformaci knockout linií *A. thaliana*

(2) Druhý den byl třeba k naředění narostlých bakterií. 1 ml bakteriální suspenze byl převeden do 100 ml čerstvého YEB média s antibiotiky. Opět proběhla inkubace přes noc za stejných podmínek (28 °C, 225 rpm).

(3) Třetí den byla připravena výsledná suspenze *A. tumefaciens* a proběhla samotná transformace *Arabidopsis* máčením květů. Narostlé bakterie byly po dobu 20 min při 4 °C stočeny v 2 x 50ml falkonách při 4500 rpm. Pelet byl následně resuspendován v 5% sacharose tak, aby optická hustota vzorku dosahovala hodnoty  $OD_{600} = 0,8$ . Přidán byl ještě acetosyringon do výsledné koncentrace  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro urychlení přenosu T-DNA a smáčidlo Silwet L-77 do výsledné koncentrace 0,05 %. Do takto připravené suspenze byly namáčeny květy rostlin po dobu přibližně 3 s. Nakonec byly transformované rostliny zakryty sáčkem pro udržení vlhkosti a umístěny na 24 hod do tmy. Sáček byl ještě proděravěn pro zajištění výměny plynů. Po 24 hod byl sáček odstraněn a rostliny byly ponechány ve fytotronu, dokud nedozrály do semen.

### 3.2.2 Selekcce transformovaných semen

Pro selekci transformovaných semen byl využit selekční marker FAST (fluorescence-accumulating seed technology), který byl součástí T-DNA kazety vkládané do rostlin. Nejprve je konstruován fúzní gen obsahující GFP kódující nukleotidovou sekvenci spřaženou v odpovídajícím čtecím rámci s nukleotidovou sekvencí kódující studovaný protein. Fúzní gen je pak vpraven transformací do buněk. Tímto způsobem tak lze efektivně dokázat přítomnost transformovaných semen s využitím fluorescenční lupy.

V případě experimentů této práce se jednalo o konstrukt OLE1-GFP (Shimada et al., 2010), který byl exprimován v semenech pod přirozeným promotorem *AtOLE1<sub>pro</sub>*. Semena transformovaných rostlin *A. thaliana* a následně semena jejich jednotlivých generací tak byla vždy vybírána na základě fluorescence, tedy přítomnosti zeleného fluorescenčního proteinu GFP. Zřetel byl brán i na intenzitu fluorescence, kdy výrazná fluorescence indikovala větší počet insertů v transgenní rostlině.

Semena byla jednoduše pozorována pod fluorescenční lupou. Fluoreskující semena byla vybrána a zasetá. Takto byly vypěstovány jednotlivé generace transformantů *A. thaliana*.

Metoda byla mimo to využita také k ověření segregáčních poměrů, čímž se dala předpovědět zygotnost zkoumaných rostlin.

### 3.2.3 Izolace DNA z rostlin

Pro izolaci DNA z lyofilizovaných listů transgenních rostlin *A. thaliana* byl používán kit NucleoSpin Plant II. Tento kit je určen pro izolaci genomové DNA z různých rostlinných materiálů. Postup má několik kroků a podstata metody je následující. Z homogenizovaného rostlinného materiálu je DNA extrahována lyzačním pufrem s obsahem chaotropních solí, denaturačních činidel a detergentů. Standardně je lýze rostlinného materiálu zajištěna CTAB lyzačním pufrem (PL1). Alternativou je lyzační pufr s SDS. Lyzát je následně centrifugací zbaven polysacharidů, kontaminujících látek a zbytkového buněčného odpadu. Čistý supernatant je pak smíchán s vazebným pufrem (PC), čímž jsou zajištěny optimální podmínky pro vazbu DNA na křemičitanovou membránu. Následuje promývání navázané DNA na membráně pomocí dvou pufrů (PW1, PW2). Nakonec je provedena eluce DNA elučním pufrem (PE) s nízkou koncentrací solí. Takto izolovaná DNA může být hned použita pro další analýzu. (User Manual NucleoSpin® 96 Plant II)

(1) Příprava vzorků pro izolaci DNA: Pro uvedené experimenty byla DNA izolována z lyofilizovaných listů transgenních rostlin. Vzorek sestával vždy ze 2 středně velkých listů odebraných z dané transgenní rostliny *A. thaliana* a proces lyofilizace probíhal cca 12 hod. Homogenizace byla provedena na mlýnku pomocí skleněných kuliček, 4 min při 27 otáčkách  $\text{min}^{-1}$ .

(2) Lýze buněk: Do mikrozkuvek k rozemletému materiálu bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru PL1. Obsah byl důkladně promíchán na vortexu. Na dno každé mikrozkuvky bylo následně přidáno 10  $\mu\text{l}$  Rnasy A a obsah byl opět promíchán. Vzorky byly umístěny na vodní lázeň vyhřáté na teplotu 65 °C na 20 min, přičemž po 10 min byly vzorky promíchány.

(3) Filtrace a přečištění lyzátu: Pro filtraci a přečištění lyzátů byly použity filtry s fialovým označením z kitu. Tyto filtry byly vloženy do 2ml mikrozkuvek bez víčka, které byl opět součástí kitu. Na filtr bylo přepipetováno 400  $\mu\text{l}$  vzorku (lyzátu). Proběhla centrifugace při 11 000 x g 2 min. Filtr byl vyjmut a získán byl jasný zelený filtrát.

(4) Příprava DNA pro vazbu na membránu: Filtrát byl přelit do nové mikrozkuvky a přidáno k němu bylo 450  $\mu\text{l}$  vazebného pufru PC. Obsah byl promíchán na vortexu.

(5) Navázání DNA na křemičitanovou membránu: Součástí kitu byly také křemičitanové filtry, se zeleným označením, pro navázání DNA. Tyto filtry byly vloženy do 2ml mikrozkuvek bez víčka, opět součástí kitu. Na filtr bylo pipetováno 700  $\mu\text{l}$  připraveného vzorku s DNA. Vzorky byly ponechány na filtru přibližně 10 min při pokojové teplotě. Následně proběhla centrifugace při 11 000 x g 1 min. Filtrát byl vylit a filtr vrácen do mikrozkuvky, dále tak byl používán vždy jen filtr s navázanou DNA.

(6) Promývání a sušení křemičitanové membrány: Na filtr bylo pipetováno 400  $\mu\text{l}$  promývacího pufru PW1 a proběhla centrifugace při 11 000 x g 1 min (1. promývání). Filtrát byl vylit a na filtr bylo pipetováno 700  $\mu\text{l}$  promývacího pufru PW2. Proběhla centrifugace při 11 000 x g 1 min (2. promývání). Filtrát byl znovu vylit a nakonec bylo na filtr pipetováno ještě 200  $\mu\text{l}$  pufru PW2. Proběhla centrifugace při 11 000 x g 2 min (3. promývání a sušení membrány).

(7) Eluce DNA: Filtr byl vložen do nové mikrozkuvky bez víčka a bylo na něj pipetováno 35  $\mu\text{l}$  elučního pufru PE zahřátého na 65 °C. Mikrozkuvka pak byla přemístěna na vodní lázeň při 65 °C 5 min. Proběhla centrifugace při 11 000 x g 1 min.

Celý krok byl zopakován, celkem tak proběhla eluce DNA do 70 µl elučního pufru. Koncentrace izolované DNA pak byla stanovována pomocí spektrofotometru NanoDrop.

### 3.2.4 Stanovení počtu kopií T-DNA pomocí ddPCR

K určení počtu kopií vložené T-DNA sloužila technologie Droplet Digital PCR (ddPCR). Metoda umožňuje přesnou a absolutní kvantifikaci sledované sekvence nukleové kyseliny. Zde byla technologie ddPCR využita v modu CNV (Copy Number Variation) pro stanovení počtu vložených kopií T-DNA v genomu jednotlivých transgenních rostlin *A. thaliana*

Pro aplikaci této metody byla nutná správná příprava vzorku následovaná generováním droplet, několika cykly PCR a samotným měřením/čtením droplet a vyhodnocením sledovaných insertů T-DNA. Dodržován byl doporučený postup pro QX200 ddPCR systém firmy Bio-Rad.

#### 3.2.4.1 Příprava vzorku pro ddPCR

Pro každý vzorek byla nejprve naštěpena izolovaná DNA (20 ng/µl) pomocí restrikčního enzymu MfeI v prostředí CutSmart pufru. Štěpení probíhalo 60 min při 37 °C s využitím termocykleru. Po štěpení byla DNA naředěna na 2 ng/µl pro snížení koncentrace solí.

V dalším kroku byl připraven Master Mix, který obsahoval primery na sledovanou sekvenci (target) a referenci (Tab. 2), TaqMan sondy (proby) na target a referenci a odpovídající ddPCR supermix. Použity byly TaqMan proby značené na 5'konci fluoroforem (FAM nebo VIC) a na 3'konci zhášečem QSY (Tab. 2). Nakonec byla přidána naštěpená DNA.

Jednotlivé vzorky byly připraveny smícháním Master Mixu a dané naštěpené DNA v množství uvedeném v Tab. 3. Připravováno bylo vždy 21 µl vzorku, z čehož 20 µl bylo použito na generování droplet.

Tab. 2: Primery a fluorescenční TaqMan proby podle hledané sekvence

| Target (gen kódující rezistenci na Hygromycin, součást T-DNA) |                           |
|---|---------------------------|
| Hyg_FP1   | TCCTACATCGAAGCTGAAAG      |
| Hyg_RP1   | ATGAAAAAGCCTGAACCTACC     |
| Taq-man probe: Hyg_probe_FAM                                  | TCTTCGCCCTCCGAGAGCTG      |
| Reference (gen AAP1 (Collier et al., 2018))*                  |                           |
| AtAAP1_FP   | GATGTAGTTGGTTTGGTGTTTAAAC |
| AtAAP1_RP   | AATTTGGGATCTGGCTAAGAATAAC |
| Taq-man probe: AAP1_probe_VIC                                 | TGCCAAAACCGCCATATACGG     |

\* AAP1 – amino acid permease 1

Tab. 3: Reakční složky pro přípravu vzorku na jednu reakci ddPCR

| Reakční složky                  | Pipetovaný objem |
|---------------------------------|------------------|
| ddPCR supermix                  | 10 $\mu$ l       |
| 25 $\mu$ M primery na referenci | 0,36 $\mu$ l     |
| 25 $\mu$ M primery na target    | 0,36 $\mu$ l     |
| 10 $\mu$ M sonda na referenci   | 0,5 $\mu$ l      |
| 10 $\mu$ M sonda na target      | 0,5 $\mu$ l      |
| 2 ng/ $\mu$ l naštěpená DNA     | 2 $\mu$ l        |
| Voda                            | 7,28 $\mu$ l     |

### 3.2.4.2 Generování droplet

Pro generování droplet bylo 20  $\mu$ l připraveného vzorku, tedy PCR reakční směsi obsahující štěpenou DNA, primery, TaqMan sondy a odpovídající Bio-Rad ddPCR supermix, pipetováno do prostřední řady DG8<sup>TM</sup> kazety (dále jen kazeta) pro QX200 Generátor droplet. Velmi důležité zde bylo odstranění případných bublin ve vzorku, které by mohly znemožnit vygenerování droplet. Naplněno muselo být vždy všech osm jamek kazety.

Poté bylo pipetováno 60  $\mu$ l oleje pro generování droplet do spodních jamek kazety. Jamky kazety byly utěsněny gumičkou a kazeta byla umístěna do QX200 Generátoru droplet. Byly tak vytvořeny droplety, přibližně 20 000 droplet/vzorek.

### 3.2.4.3 PCR

Po generování droplet následovala PCR. Z vrchních jamek kazety bylo opatrně pipetováno 40  $\mu$ l droplet do ddPCR destičky. V jamkách pak byla vidět vrstva vody a vrstva droplet. Před PCR byla destička ještě zatavena pomocí určené fólie za použití přístroje Bio-Rad PX1<sup>TM</sup> PCR Plate Sealer. Destička byla umístěna do PCR termocyklieru, přičemž program PCR je následující (Tab. 4.).

Tab. 4: Program PCR pro amplifikaci ve vzorku droplet

| Teplota*         | Doba     |
|------------------|----------|
| 95 °C            | 10 min   |
| 94 °C            | 30 s     |
| 60 °C            | 1 min    |
| cyklus (94 – 60) | 39x      |
| 98 °C            | 10 min   |
| 4 °C             | $\infty$ |

\*Ramp rate: 2 °C/s

#### 3.2.4.4 Analýza droplet

K analýze droplet bylo využito přístroje QX200 Droplet Reader. Před měřením byla zkontrolována připravenost přístroje (množství hnacího oleje, prostor pro odpad). Nastavení experimentu bylo provedeno v programu QuantaSoft™. Zde byl zvolen mód CNV2 (tj. analýza CNV se dvěma probami). V programu byl dále nastaven supermix (konkrétně ddPCR Supermix for Probes, No dUTP), target a reference. V prvním kanálu byla měřena fluorescence sondy FAM, která byla součástí TaqMan probe na sekvenci genu pro hygromycinovou rezistenci (Tab. 2), který byl součástí T-DNA (Obr. 11). Jednalo se tak o naši target sekvenci. V druhém kanálu byla měřena fluorescence sondy VIC, součást probe pro referenční gen AAP1 (gen pro aminokyselinovou permeasu 1) (Tab. 2). Nastaven zde byl také počet kopií reference na genom, vůči kterému byl stanovován target. Pro AAP1 se jednalo o 2 kopie na diploidní genom. Následně byla do držáku přístroje vložena ddPCR destička po PCR amplifikaci. Nakonec bylo spuštěno měření.

#### 3.2.5 Sekvence

Pro ověření správnosti vloženého konstruktů byla u vybraných transformovaných rostlin provedena sekvenace. Zde bylo využito metody Sangerova sekvenování, tj. metody terminace řetězců. Před samotnou sekvenací musel být vložený gen ještě (1) amplifikován a vzniklý PCR produkt (2) purifikován.

(1) Amplifikace vloženého genu z genomické DNA byla provedena dle protokolu pro Q5 polymerázu (PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491)). Vzhledem k povaze reakce byly použity dva primery (Forward Primer, Reverse Primer) (Tab. 5) a templátem byla izolovaná genomická DNA z jednotlivých homozygotních linií. Zvolena byla reakce v objemu 50 µl, přičemž reakční složky pro jednu reakci jsou shrnuty v Tab. 6. Podmínky PCR byly zvoleny s ohledem na sekvenci použitých primerů a dokazovaného templátu a jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 5: Primery použité pro amplifikaci vloženého genu

| Primer                  | Sekvence              |
|-------------------------|-----------------------|
| start_seq_FP            | CCGCGGCTAGTCAGTTAGAT  |
| PCRproSEQ_lhcb4trans_RP | CCTGTGGGCATTTCAGTCTGG |

Tab. 6: Reakční složky a jejich koncentrace pro amplifikaci vloženého genu (převzato a upraveno dle Q5 protokolu)

| Reakční složky                  | Pipetovaný objem |
|---------------------------------|------------------|
| 5X Q5 Reakční pufr              | 10 $\mu$ l       |
| 10 mM dNTPs                     | 1 $\mu$ l        |
| 10 $\mu$ M Forward Primer       | 2,5 $\mu$ l      |
| 10 $\mu$ M Reverse Primer       | 2,5 $\mu$ l      |
| Templátová DNA                  | 25 ng            |
| Q5 High-Fidelity DNA polymerasa | 0,5 $\mu$ l      |
| Voda (ultračistá)               | do 50 $\mu$ l    |

Tab. 7: Podmínky PCR pro amplifikaci vloženého genu (převzato a upraveno dle Q5 protokolu)

| Teplota                   | Doba       |
|---------------------------|------------|
| 98 °C                     | 30 s       |
| 98 °C                     | 10 s       |
| 68 °C                     | 30 s       |
| 72 °C                     | 1 min 20 s |
| cyklus (98 – 68 – 72) 30x |            |
| 72 °C                     | 2 min      |
| 12 °C                     | $\infty$   |

(2) Následovala purifikace amplikonů za dodržení postupu uvedeného pro Qiaquick PCR purification kit. Purifikované amplikony sledovaného genu pro jednotlivé rostlinné homozygoty pak byly sekvenovány.

Sekvenační reakce probíhala vždy v 10  $\mu$ l. Celkem bylo použito osm sekvenačních primerů (Tab. 8), které byly zvoleny tak, aby se vznikající fragmenty dostatečně překrývaly. Pro ověření správnosti vloženého genu u jednoho homozygota tak proběhlo vždy 8 sekvenačních reakcí, pro každý primer jedna. Jednotlivé složky sekvenační reakce jsou uvedeny v Tab. 9 a podmínky syntézy fragmentů, tedy PCR, v Tab. 10.

Tab. 8: Sekvenační primery

| Sekvenační primery | Sekvence             |
|--------------------|----------------------|
| PAB8_seq_FP1       | GCGTGGACATGTTGAAAGGC |
| PAB8_seq_FP2       | GGTGAATGGAGGGCTTGA   |
| PAB8_seq_RP1       | GGTCTCTGGTGGGTGACTA  |
| PAB8_seq_RP2       | TTGAGCTTGTGGAAGGCTCC |
| Prom4.1_seq_FP     | CGTGGAGGTGAGTTTCGGAG |
| Prom4.1_seq_RP1    | AGGCATGCGAGAGCTTGAG  |
| Prom4.1_seq_RP2    | CTCCGAAACTCACCTCCACG |
| start_seq_FP       | CCGCGGCTAGTCAGTTAGAT |

Tab. 9: Složky sekvenační reakce a jejich množství

| Složky sekvenační reakce     | Pipetovaný objem |
|------------------------------|------------------|
| 5X Sekvenační pufr           | 1,5 $\mu$ l      |
| BigDye                       | 0,5 $\mu$ l      |
| 10 $\mu$ M Sekvenační primer | 1 $\mu$ l        |
| Amplikony DNA                | 40 ng            |
| Voda                         | do 10 $\mu$ l    |

Tab. 10: Podmínky PCR pro sekvenaci

| Teplota                   | Doba     |
|---------------------------|----------|
| 90 °C                     | 5 min    |
| 96 °C                     | 10 s     |
| 50 °C                     | 5 s      |
| 60 °C                     | 4 min    |
| cyklus (96 – 50 – 60) 59x |          |
| 4 °C                      | $\infty$ |

Nakonec byly fragmenty na základě jejich velikosti a díky fluorescenčnímu značení ddNTPs analyzovány kapilární elektroforézou. Během této analýzy dopadá na kapiláru laserový svazek a světlo emitované barvy při průchodu fragmentů se snímá čtyřmi detektory (podle barev fluorescenčních značek na ddNTPs). Signál je nakonec počítačově zpracován, čímž získáme sekvenci nukleotidů v analyzovaném fragmentu. V mém případě byla vlastní sekvenace provedena zaměstnancem laboratoře.

### 3.2.6 Měření chlorofylu

Měření obsahu chlorofylu v listech zkoumaných rostlin bylo provedeno pomocí ručního chlorofylmetru SPAD 502. Jedná se o metodu nedestruktivní bez nutnosti extrakce pigmentů. Obsah chlorofylu přístroj vyhodnocuje na základě propustnosti listu pro dvě vlnové délky. Jedná se o 650 nm (velká absorbance chlorofylů) a 940 nm (minimální absorbance chlorofylů).

Toto měření bylo provedeno na listech stejně starých a na přibližně stejném místě. Proměřeny byly všechny nové genotypy a pro srovnání i divoký typ (wild type, WT). Nejprve byla provedena kalibrace fotodiody přístroje uzavřením měřicí hlavy bez vzorku, poté byly vkládány do měřicí hlavy na detekční okénko jednotlivé listy. Pro každý genotyp byly proměřeny přibližně stejně staré listy alespoň v šesti opakováních.



### 3.2.7 Western blot

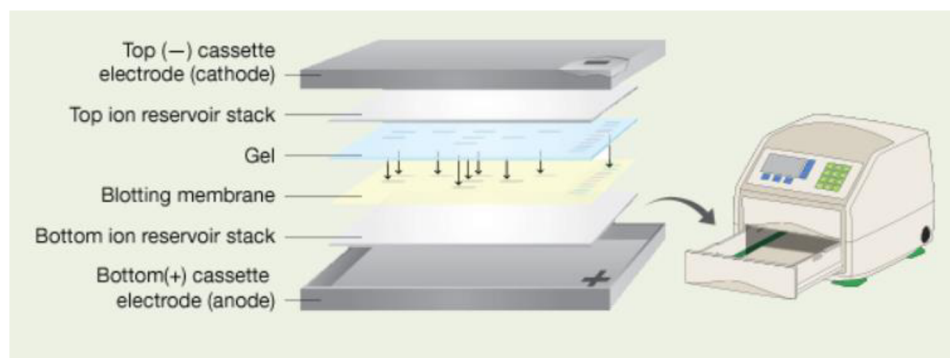
Western blot je obecně často používaná metoda pro kvalitativní nebo semikvantitativní detekci určitého proteinu ve vzorku. Zde byla tato metoda využita v rámci fyziologické charakterizace získaných rostlin pro kvalitativní detekci přítomnosti LHCB4/LHCB8 proteinu. Obecně tuto metodu tvoří tři základní kroky: (1) elektroforetická separace proteinů, (2) přenos separovaných proteinů a (3) detekce proteinů. Proteiny byly získány z listů *A. thaliana* jednotlivých genotypů, které byly po odebrání zváženy, uchovány a následně homogenizovány v tekutém dusíku. K homogenizovaným listům bylo přidáno desetinásobné množství extrakčního pufru DTE (pufr obsahující dithioerythritol) na čerstvou váhu listů ve vzorku a vzorky byly ponechány na termobloku při 70 °C 30 min. Po centrifugaci (19 200 x g 10 min) byl odebrán supernatant obsahující extrahované proteiny. Proteiny byly extrahovány pouze za zeleného světla až do denaturující elektroforézy.

(1) Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE, tj. pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS). Díky detergentu SDS jsou proteiny denaturovány a získávají záporný náboj. Při elektroforéze potom dochází k separaci záporně nabitých proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti.

K přípravě vzorku na elektroforézu (ELFO) bylo použito 10 µl extraktu proteinů, přidán byl vzorkovací pufr v poměru 1:1. Do vzorkovacího pufru (2X Tris-Glycin SDS vzorkovací pufr) bylo pipetováno ještě 5 µl β-merkaptioethanolu. Následovala inkubace při 70 °C 10 min na termobloku.

Na ELFO byly použity komerčně dostupné gely pro SDS-PAGE a Tris-tricinový systém pufrů (1X Tris-Tricin SDS elektroforetický pufr, pro dolní pufr bylo pH upraveno na 8,9). Do jamek gelu bylo pipetováno 2 µl proteinového markeru a vždy 20 µl připraveného vzorku. Podmínky elektroforézy byly 70 V po dobu 15 min, následovalo 100 V přibližně 30 min, konec separace pak probíhal při 70 V.

(2) Separované proteiny byly přeneseny na PVDF (polyvinilidendifluoridovou) membránu pomocí „turbo-blotu“ při 2,5 A a 25 V po dobu 7 min. Dodržován byl postup uvedený v manuálu pro Trans-blot Turbo od výrobce. PVDF membrána byla před použitím ekvilibrována v methanolu a aby nedošlo k jejímu vyschnutí při blottingu, byl používán transferový pufr. Rozložení při turbo-blotu je znázorněno na Obr. 12.



Obr. 12: Rozložení membrány a gelu při blottingu. Převzato z Bio-Rad manuálu pro blotting.

(3) Detekován byl na membráně protein LHCB4, resp LHCB8. K tomu bylo využito dvou protilátek, primární a sekundární. Principem je navázání primární protilátky na hledaný protein a v dalším kroku její rozpoznání protilátkou sekundární. Ta je nakonec detekována, v tomto případě chemiluminiscenčně.

V tomto kroku musela být membrána, ještě před detekcí proteinů, nejprve omyta postupně v methanolu, ddH<sub>2</sub>O a 1X TBST pufru (Tris-buffered saline with Tween 20). Následně proběhlo tzv. blokování nespecifického vázání protilátek na membránu máčením v roztoku 5% BSA v TBST po dobu 1 hod. Poté byla membrána promývána asi 10 min v 1X TBS pufru (Tris-buffered saline).

Následovalo máčení membrány v roztoku primární protilátky na LHCB4 po dobu 1 hod. Pak byla membrána opět promývána, tentokrát 5x v TBST (vždy po 10 min) a 1x v TBS (10 min). Po promytí byla membrána inkubována 1 hod v roztoku 5% BSA v TBST s přidavkem sekundární protilátky (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate) a nakonec proběhlo opět promývání membrány 5x v TBST a 1x v TBS. Až do vyhodnocení byla membrána uchována v novém TBS.

Vizualizace proteinů byla provedena chemiluminiscenčně pomocí chemiluminiscenčních substrátů. Zde se jedná o použití substrátů křenové peroxidasy (HRP substrate, HRP konjugována se sekundární protilátkou), konkrétně kombinace peroxidu a luminolu.

### 3.2.8 Dual-PAM

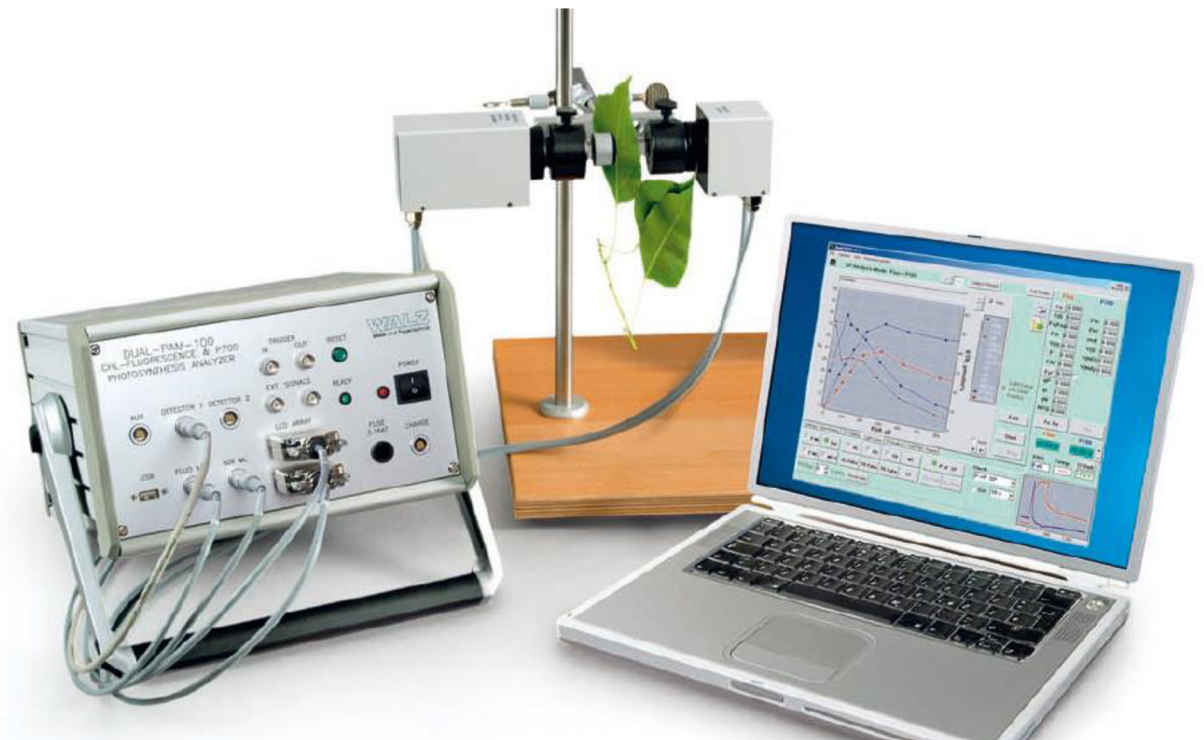
Pro fyziologickou charakterizaci připravených transgenních rostlin byl dále využit fluorescenční a absorpční systém Dual-PAM-100. Systém slouží k měření fluorescenční indukce chlorofylu a NADPH (tj. k měření stavu PSII), měření transmitance při

příslušných vlnových délkách odrážející redoxní stav P700 (tj. PSI) a plastocyaninu a napětí na tylakoidní membráně (Manuál Walz Dual-PAM-100). Zde bylo využito měření chlorofylové fluorescence metodou saturačních pulzů pro získání veličin hodnot  $F_v/F_m$ ,  $Y(II)$  a NPQ (Maxwell & Johnson, 2000; Murchie & Lawson, 2013). Parametr  $F_v/F_m$  charakterizuje maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII a stanovuje se jako poměr variabilní a maximální fluorescence  $(F_m - F_0)/F_m$ , kde  $F_0$  je hodnota minimální a  $F_m$  maximální fluorescence. Minimální fluorescence se stanoví použitím slabého měřicího světla u rostliny adaptované na tmu a maximální fluorescence je změřena během následné aplikace saturačního pulzu, jehož intenzita způsobí uzavření všech reakčních center; úroveň fotochemického zhášení je proto nulová a intenzita fluorescence je maximální. Parametr  $Y(II)$  naopak reprezentuje efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II a stanovuje se jako poměr  $(F_m' - F)/F_m'$ , kde  $F$  a  $F_m'$  jsou aktuální a maximální chlorofylová fluorescence u rostliny vystavené aktinickému záření (Maxwell & Johnson, 2000). Parametr NPQ charakterizuje tzv. nefotochemické zhášení, tedy regulovanou disipaci přebytečné absorbované energie na teplo která chrání rostlinu před fotooxidačním poškozením. Parametr NPQ se stanovuje u rostlin vystavených aktinickému záření jako poměr  $(F_m/F_m') - 1$  (Maxwell & Johnson, 2000). U rostlin adaptovaných na tmu, kdy  $F_m = F_m'$ , je hodnota NPQ rovna nule.

Proměřovány byly genotypy WT, *lhcb4\_PaLHCB8*, *lhcb4*, *penta\_PaLHCB8* a *penta*, přičemž každý genotyp byl měřen ve čtyřech opakování. Každá rostlina vybraná k měření musela být nejdříve na 30 min zatemněna. Veškerá manipulace rostlinou probíhala za velmi slabého zeleného světla. Po 30 min adaptace na tmu byl odebrán z dané rostliny list, který byl vložen mezi měřicí hlavice přístroje (Obr. 13), stopka listu byla ponořena do kapky vody. Přístroj měřil podle následujícího protokolu, který je obvykle používán i pro ostatní měření související s tímto projektem.

Délka měření byla přibližně 30 min (1 800 s). Zatemněná rostlina byla nejdříve vystavena silnému (saturačnímu) pulsu světla, pomocí kterého byla stanovena maximální kvantová účinnost fotosystému II ( $F_v/F_m$ ). Poté byla na 900 s rostlina vystavena aktinickému světlu ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), které bylo přerušováno saturačními pulzy ( $10\,000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) s trváním 30 ms a v intervalech 10 s, 30 s a 60 s. Ve druhé polovině měření (od 900 s) bylo aktinické světlo vypnuto a saturační pulzy měly interval 60 s. Aplikace saturačních pulzů během měření umožnila vyhodnotit aktivaci a relaxaci

nefotochemického zhášení PSII prostřednictvím parametru NPQ. Výsledky jsou zpracovány do grafů.



Obr. 13: Přístroj a prostředí Softwaru Dual-PAM-100. Převzato z manuálu Walz Dual-PAM-100.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Transformace rostlin *A. thaliana*

K přípravě transgenních rostlin *A. thaliana* bylo využito metody floral dip pomocí kmene *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 s vloženým plazmidem nesoucím požadovaný konstrukt *AtLHCB4.1<sub>pro</sub>::PaLHCB8* (Obr. 11), který byl připraven školitelem práce. Transformovány byly již mutantní rostliny *A. thaliana* (Tab. 1, pro přehlednost je zde uvedena ještě jednou), konkrétně proběhla transformace trojitého mutantu bez všech izoform světlosběrného proteinu LHCB4 (*lhcb4*) a pětinasobného mutantu *A. thaliana* bez proteinů LHCB3, LHCB6 a všech izoform LHCB4 (*lhcb3 lhcb6 lhcb4*, zkráceně *penta*). Vznikly tak dvě nové transformované linie (Tab. 1). Transformováno bylo 6 rostlin *lhcb4* mutantu a 4 rostliny *penta* mutantu, z nichž byla po dozrání odebrána semena pro selekci.

Tab. 1: Přehled připravovaných transgenních linií *A. thaliana*

| Linie č. | rostlina <i>Arabidopsis</i> pro transformaci*                     | vložený konstrukt              |                |
|----------|---|--------------------------------|----------------|
|          |   | promotor                       | gen            |
| 1        | trojitý mutant <i>lhcb4</i><br>( <i>lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3</i> ) | <i>AtLHCB4.1<sub>pro</sub></i> | <i>PaLHCB8</i> |
| 2        | penta mutant<br><i>lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3 lhcb3 lhcb6</i>        | <i>AtLHCB4.1<sub>pro</sub></i> | <i>PaLHCB8</i> |

\* v následujícím textu je trojitý mutant označen *lhcb4*, penta mutant nese označení *penta*, transformanti z nich vycházející jsou označeni *lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8*.

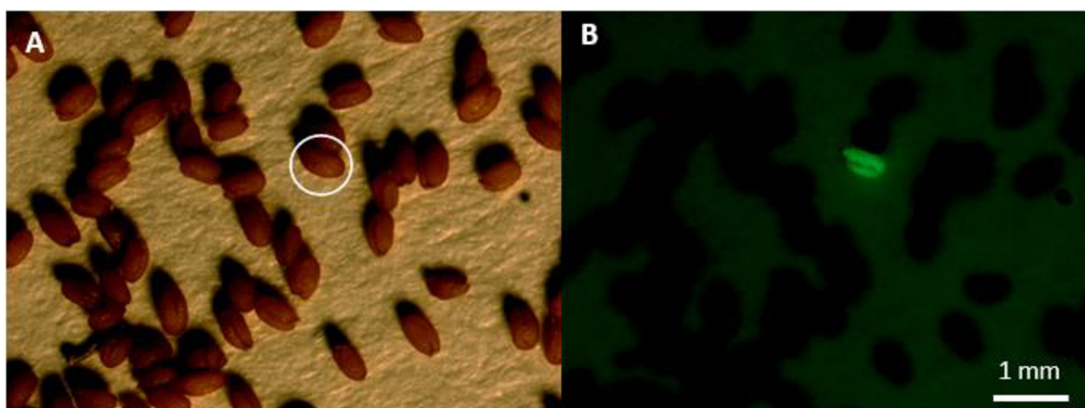
## 4.2 Selektce homozygotních linií

Dalším krokem byla selektce homozygotních transformovaných rostlin, což bylo podmínkou pro provedení fyziologické analýzy. K tomu byla potřeba metoda selektce semen z transformovaných rostlin a metoda ddPCR pro selektci rostlin na základě počtu kopií T-DNA, respektive selektce samotných homozygotů.

### 4.2.1 Selektce primárních transformovaných semen

Transformovaná semena byla selektována na základě fluorescence díky přítomnosti selekční kazety založené na expresi fúzního genu OLE1-GFP v semenech. Tento selekční marker je součástí vložené T-DNA a je tedy přítomen u všech transformovaných semen. Transformovaná semena tak byla identifikována na základě GFP fluorescence pod fluorescenční lupou (Obr. 14). Tato semena byla po namočení zaseta. Vyseto bylo okolo 30 semen od každé linie a z nich byly vypěstovány transgenní rostliny generace T1. Linie transformantů nesou označení *lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8* a pro odlišení jednotlivých rostlin je využito číselné nebo písmenné značení.

Z vypěstovaných transgenních rostlin byla izolována DNA pomocí kitu NucleoSpin Plant II. DNA byla dále naředěna, naštěpena pomocí restričního enzymu MfeI a využita pro stanovení počtu inzertů (kopií T-DNA) pomocí ddPCR podle protokolu detailně popsaného v sekci Metody.

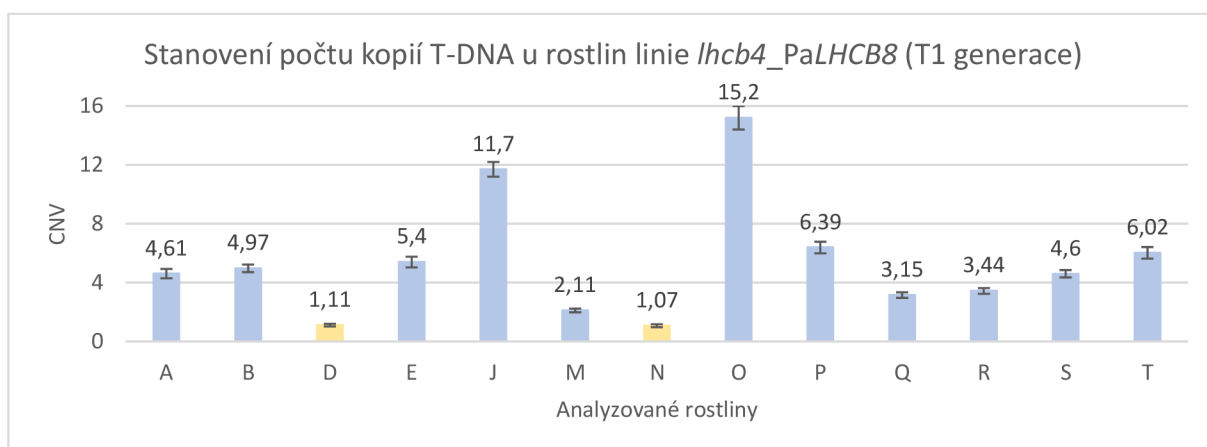


Obr. 14: Semena transformované *A. thaliana* pocházející z linie *lhcb4* pod fluorescenční lupou při (A) bílém osvětlení a (B) ve fluorescenčním režimu. Transformované semeno vykazující GFP fluorescenci je označeno bílým kroužkem.

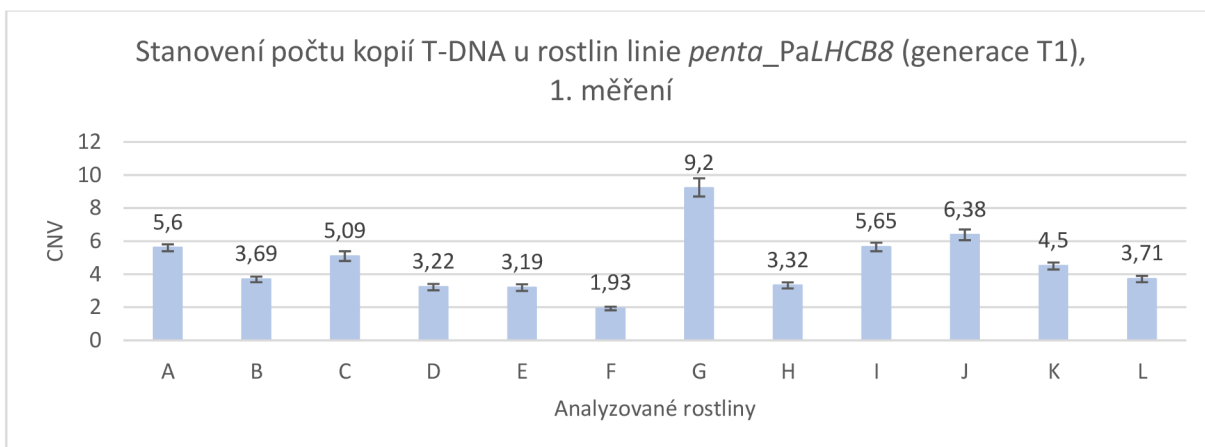
#### 4.2.2 Stanovení počtu kopií T-DNA v rostlinách T1 generace pomocí ddPCR

Pro stanovení počtu kopií T-DNA byly vybrány rostliny, které nevykazovaly výrazný vizuální fenotyp. Cílem selekce bylo identifikovat heterozygotní rostliny z obou transformovaných linií *lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8*, které obsahovaly ideálně jednu, maximálně dvě, kopie T-DNA. Informaci o počtu kopií zkoumané sekvence (část genu na hygromycinovou rezistenci která je součástí T-DNA) v genomu udává hodnota CNV (copy number variation).

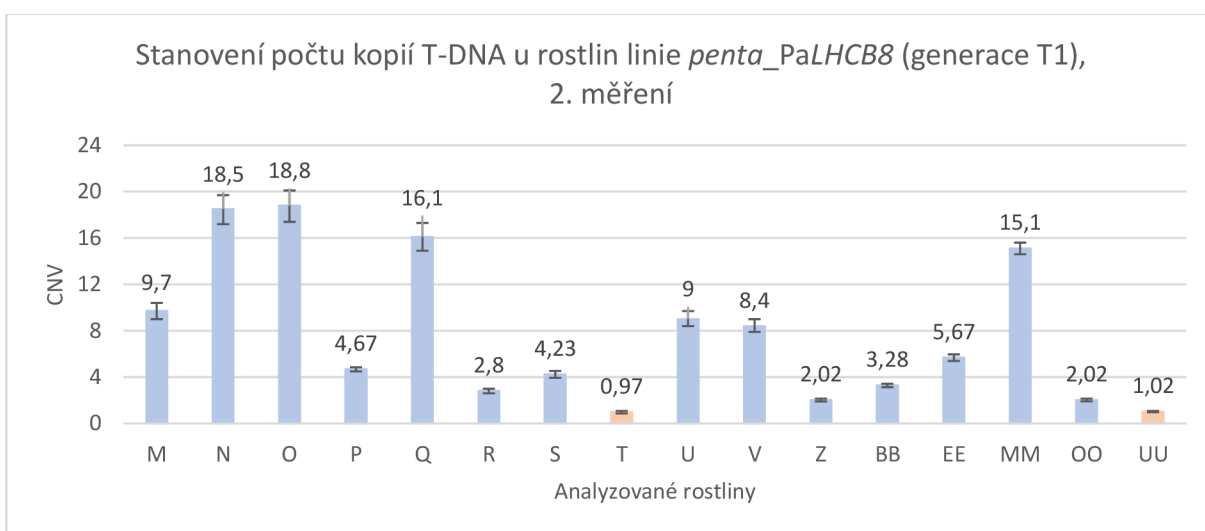
Z linie *lhcb4\_PaLHCB8* byly vybrány heterozygotní rostliny D (CNV = 1,11) a N (CNV = 1,07), u nichž byla stanovena 1 kopie T-DNA (Obr. 15). Pro linii *penta\_PaLHCB8* nebyla v prvním experimentu identifikována žádná heterozygotní rostlina s jedním insertem (Obr. 16). Proto bylo nutné pro tuto linii provést screening dalších rostlin, v rámci kterého se už podařilo najít dvě rostliny nesoucí jednu kopii insertu, *penta\_PaLHCB8* T (CNV = 0,97) a UU (CNV = 1,02) (Obr. 17).



Obr. 15: Stanovení počtu kopií T-DNA ve vybraných rostlinách T1 generace linie *lhcb4\_PaLHCB8*. Průměrný počet vyhodnocených droplet je  $13\,000 \pm 1\,000$ . Chybové úsečky odpovídají 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení (Manuál ddPCR).



Obr. 16: Stanovení počtu kopií T-DNA ve vybraných rostlinách T1 generace linie *penta\_PaLHCB8*. Průměrný počet vyhodnocených droplet je  $13\ 000 \pm 1\ 000$ . Chybové úsečky odpovídají 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení (Manuál ddPCR).

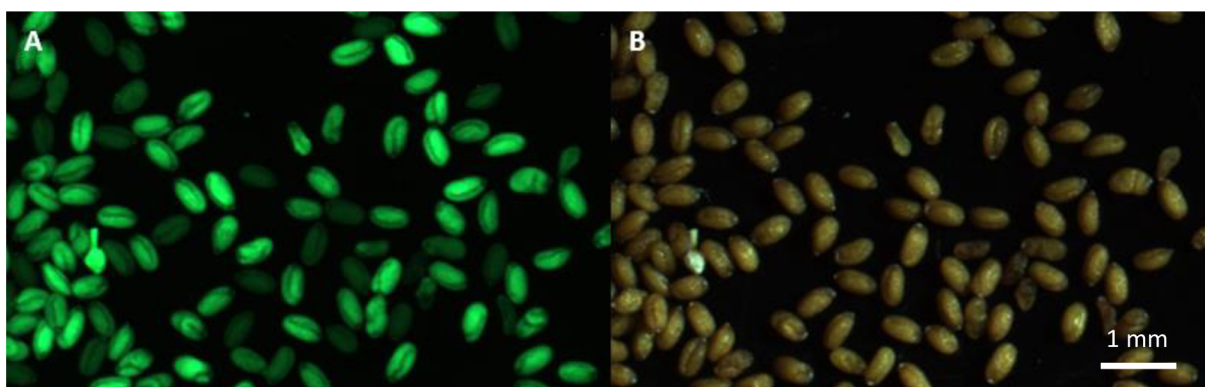


Obr. 17: Stanovení počtu kopií T-DNA ve vybraných rostlinách T1 generace linie *penta\_PaLHCB8*. Průměrný počet vyhodnocených droplet je  $13\ 000 \pm 2\ 000$ . Chybové úsečky odpovídají 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení (Manuál ddPCR).



### 4.2.3 Identifikace homozygotních rostlin v T2 generaci

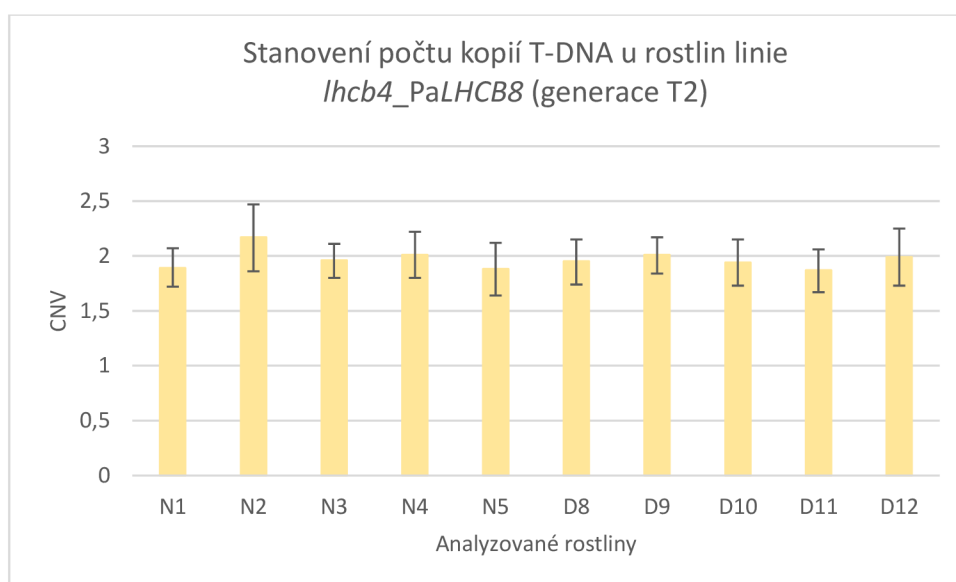
Ze selektovaných heterozygotních rostlin s jednou kopií T-DNA (*lhcb4\_PaLHCB8* D a N, *penta\_PaLHCB8* T a UU) byla sklizena semena, která byla zkontrolována pod fluorescenční lupou. V přítomnosti 1 kopie T-DNA u rodičovské rostliny lze v potomstvu očekávat segreganční poměr 1:2:1 odpovídající WT:HZ:HM, což bylo také přibližně potvrzeno na základě různé intenzity fluorescence (Obr. 18). K zasetí byla vybrána semena s nejsilnější fluorescencí, čímž jsme získali T2 generaci rostlin. Bylo tak zaseto a vypěstováno okolo 5 rostlin T2 generace pro každou ze 4 nových linií.



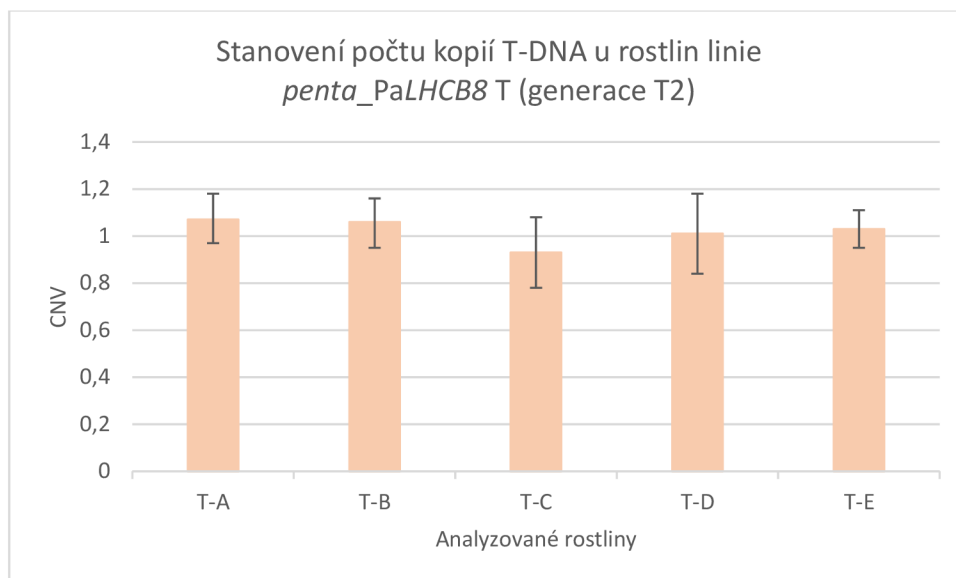
Obr. 18: Semena heterozygotní rostliny *lhcb4\_PaLHCB8* N (z T1 generace), u níž byla stanovena jedna kopie T-DNA. U semen je na základě fluorescence pozorován segreganční poměr přibližně 1:2:1 (WT:HZ:HM).

Pro rostliny T2 generace byla opět provedena izolace DNA a screening počtu kopií T-DNA pomocí ddPCR. V případě, že počet kopií T-DNA ve screenované rostlině odpovídal dvojnásobku počtu kopií zjištěného u heterozygotního rodiče (tj. v našem případě byly u rostlin identifikovány dvě kopie T-DNA), jednalo se o homozygoty. Pro linie D a N u *lhcb4\_PaLHCB8* mutanta byli tímto způsobem homozygoti opravdu selektováni. U potomků rostlin N a D byla u všech rostlin jednoznačně stanovena hodnota CNV 2, tyto rostliny tedy můžeme považovat za homozygotní (Obr. 19). Potvrdila to i uniformní fluorescence semen z těchto rostlin.

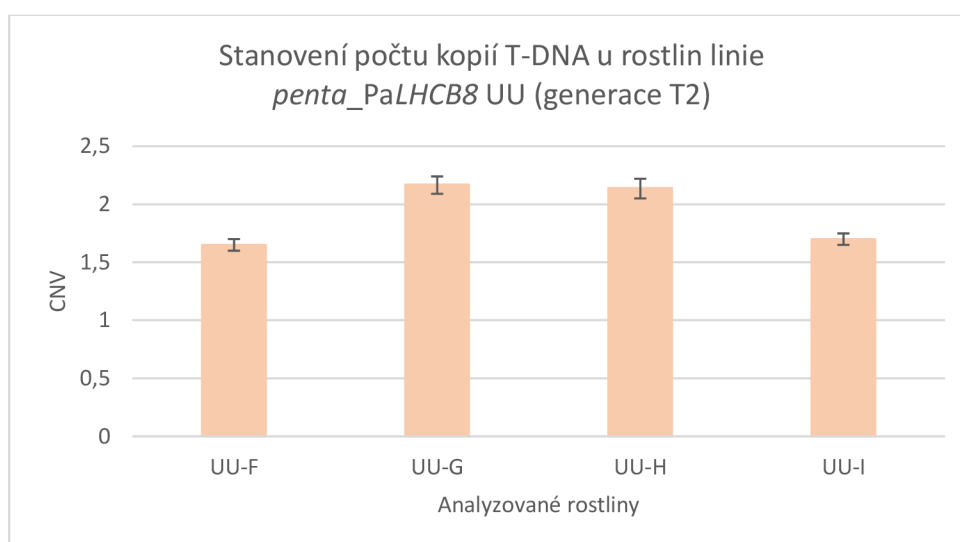
U selekce homozygotů z vytipovaných rostlin mutanta *penta\_PaLHCB8* byla situace složitější. U linie T jsme pozorovali nižší klíčivost semen a všechny analyzované rostliny byly v heterozygotním stavu (Obr. 20). Ani dodatečné experimenty na dalších rostlinách nevedly k izolaci homozygotních rostlin, což nás vedlo k závěru, že inserce T-DNA proběhla pravděpodobně v oblasti některého důležitého genu. Vyřazení obou kopií tohoto genu (tj. u hledaného homozygota v T-DNA) bylo zřejmě letální, což zároveň vysvětluje nižší klíčivost semen rostliny *penta\_PaLHCB8* T. U potomků rostliny UU jsme ve dvou případech zaznamenali neceločíselnou hodnotu počtu kopií (UU-F a UU-I, Obr. 21), což mohlo být způsobeno řadou faktorů. Nicméně u dalších dvou rostlin (UU-G a UU-H) byla stanovena hodnota CNV blízko 2 (Obr.21) a tyto rostliny jsme identifikovali jako homozygotní (Obr. 21), což bylo potvrzeno i uniformní fluorescencí jejich semen.



Obr. 19: Stanovení počtu kopií T-DNA v T2 generaci – v potomcích rostlin N a D linie *lhcb4\_PaLHCB8*. Průměrný počet vyhodnocených droplet je  $14\ 000 \pm 1\ 000$ . Chybové úsečky odpovídají 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení (Manuál ddPCR).



Obr. 20: Stanovení počtu kopií T-DNA v T2 generaci - u potomků rostliny T linie *penta\_PaLHCB8*. Průměrný počet vyhodnocených droplet je  $11\,000 \pm 1\,000$ . Chybové úsečky odpovídají 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení (Manuál ddPCR).



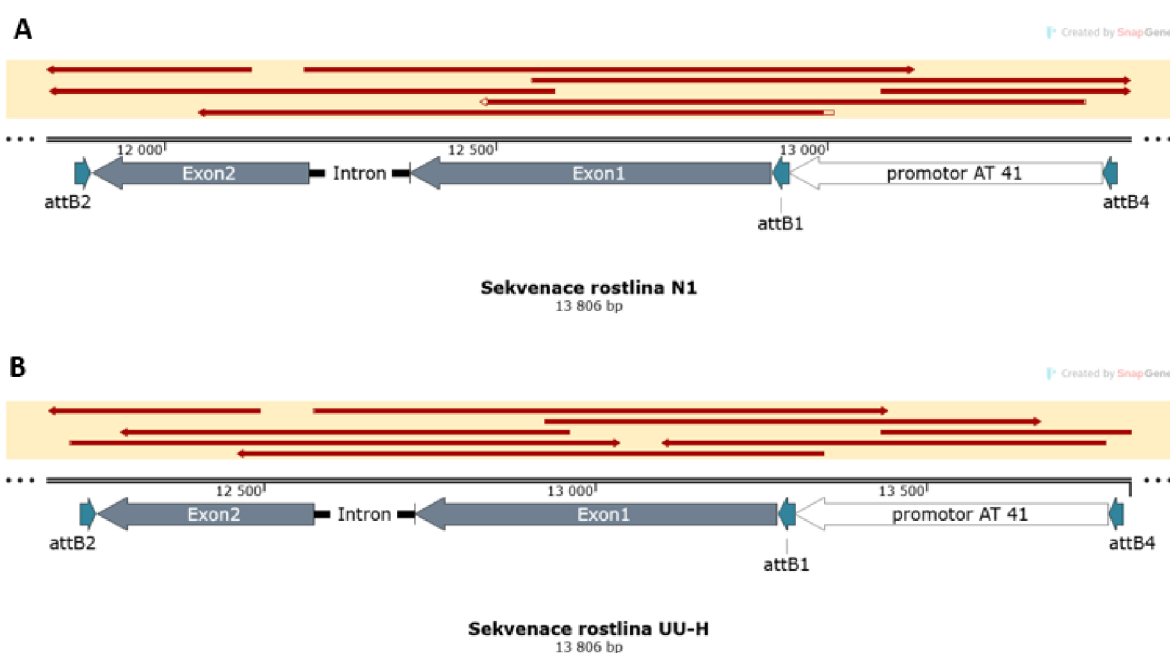
Obr. 21: Stanovení počtu kopií T-DNA v T2 generaci – u potomků rostliny UU linie *penta\_PaLHCB8*. Průměrný počet vyhodnocených droplet je  $15\,700 \pm 300$ . Chybové úsečky odpovídají 95% intervalu spolehlivosti pro Poissonovo rozdělení (Manuál ddPCR).

Vzhledem k tomu, že jsme chtěli mít alespoň dvě nezávislé homozygotní linie *penta\_PaLHCB8*, bylo nutné se vrátit k jiným potenciálně použitelným heterozygotním rostlinám z T1 generace. Přípravou alespoň dvou takových linií jsme totiž schopni vyloučit možné ovlivnění genů insertem T-DNA. Místo linie T, která byla problematická pravděpodobně kvůli místu inserce T-DNA, byly pro selekci homozygotů vybrány linie Z a OO, které mají na základě ddPCR screeningu dvě kopie T-DNA (Obr. 17). Z těchto rostlin byla vybrána semena s nejsilnější fluorescencí, přičemž očekávaný štěpný poměr byl 1:4:6:4:1. Jejich ddPCR screening dále probíhá.

### 4.3 Ověření homozygotních linií sekvenací

U homozygotů byla následně provedena sekvenace, jejímž účelem bylo ověření správnosti vloženého konstruktů *AtLHCB4.1<sub>pro</sub>::PaLHCB8*. Sangerova sekvenace, která byla použita v této práci, je založená na syntéze DNA *in vitro* v přítomnosti vybraných primerů a specifických terminátorů řetězců (fluorescenčně odlišené ddXTP). Terminací řetězců vzniká soubor fragmentů DNA, které by měly odpovídat dokazované sekvenci. Tyto fragmenty jsou zakončeny fluorescenčně značenými dideoxynukleotidy a nakonec jsou analyzovány kapilární elektroforézou. Výsledkem je sekvenogram, z něhož lze vyčíst hledanou sekvenci.

Získané sekvenogramy byly porovnány s očekávanou sekvencí *AtLHCB4.1<sub>pro</sub>::PaLHCB8* pomocí programu SnapGene (Dotmatics) a u obou sekvenovaných rostlin byla potvrzena správnost vložené sekvence (Obr. 22).



Obr. 22: Ověření správnosti vloženého konstruktů sekvenací. Dole je znázorněna část vložené sekvence T-DNA s vyznačením promotoru *AtLHCB4.1<sub>pro</sub>* a exonů a intronu genu *PaLHCB8*. Červenou barvou jsou vyznačeny překrývající se sekvenované fragmenty amplifikované z genomické DNA rostliny N1 linie *lhcb4\_PaLHCB8* (A) a rostliny UU-H linie *penta\_PaLHCB8* (B). Každá část analyzované sekvence je pokryta minimálně dvěma amplicony.

## 4.4 Fenotyp a obsah chlorofylu

Při pěstování za optimálních podmínek nebyl u jednotlivých transgenních linií pozorován žádný vizuálně rozpoznatelný fenotypový rozdíl (Obr. 23). V rámci fyziologických měření bylo nejprve provedeno porovnání obsahu chlorofylu (Chl) u jednotlivých genotypů připravených transgenních rostlin. Obsah chlorofylů byl stanovován nedestruktivní metodou pomocí ručního přístroje SPAD 502, přičemž toto stanovení bylo jen relativní a pouze za účelem vzájemného porovnání. Měření bylo provedeno v šesti opakováních pro každý genotyp.

Vzhledem k tomu, že je Chl podstatnou složkou světlosběrných antén fotosystému, lze údaj o jeho množství použít pro orientační porovnání velikosti těchto antén mezi genotypy. Z uvedené Tab. 11 je vidět, že obsah Chl se mezi jednotlivými genotypy výrazně neliší. Obecně se tedy dá říct, že záměna LHCB4, přirozeně se vyskytující u *A. thaliana*, za smrkovou LHCB8 u obou transformantů výrazně neovlivnila množství dalších světlosběrných antén.

Studované genetické modifikace se zde týkají fotosystému II. Za normálních podmínek obsahuje modelová rostlina *A. thaliana* nejvíce zastoupenou a největší formu superkomplexu tohoto fotosystému,  $C_2S_2M_2$ . U linií *lhcb4* a *penta* je ale známa pouze forma  $C_2S_2$  kvůli ztrátě proteinů podmiňující vazbu M trimerů (de Bianchi et al., 2011, nepublikovaná data). Pro vazbu M trimerů k jádru PSII je tedy u *Arabidopsis* nutná přítomnost LHCB4.1 nebo LHCB4.2, kdy tyto světlosběrné antény obsahují vazebné místo pro LHCB6 a skrze něj vážou M trimery k  $C_2S_2$  (Kouřil et al., 2016; Ilíková et al., 2021). To ale neplatí pro smrk, který je schopen tvořit  $C_2S_2M_2$  superkomplex, přestože mu chybí LHCB3 a 6 a obsahuje pouze LHCB8 (Kouřil et al., 2016; Grebe et al., 2019). Otázkou zde tedy je, zda přítomnost smrkové LHCB8 u *lhcb4* a *penta* mutantů neumožní M trimery zpět navázat a vytvořit tak superkomplex  $C_2S_2M_2$  typický pro smrk. Porovnání výsledků u transformantů s PaLHCB8 a WT by mohlo indikovat přítomnost M trimerů. Metoda ale neposkytuje informace o tom, zda jsou M trimery vázané nebo jen volné. Tyto informace lze získat například pomocí stanovení poměrů chlorofylů a a b, nízkoteplotních fluorescenčních spekter, nativní elektroforézy a analýzy superkomplexů PSII pomocí elektronové mikroskopie, které budou provedeny v nejbližší době, ale již mimo rámec předložené bakalářské práce.

Tab. 11: Relativní srovnání obsahu Chl mezi jednotlivými genotypy

| Relativní obsah Chl [SPAD]* |                      |              |                      |              |
|-----------------------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| WT                          | <i>lhcb4_PaLHCB8</i> | <i>lhcb4</i> | <i>penta_PaLHCB8</i> | <i>penta</i> |
| 21,3 ± 0,8                  | 20,0 ± 1,5           | 21,5 ± 1,1   | 19,4 ± 1,1           | 20,7 ± 0,8   |

\*Výsledky uvedeny jako průměr ± SD, vždy platí n = 6.

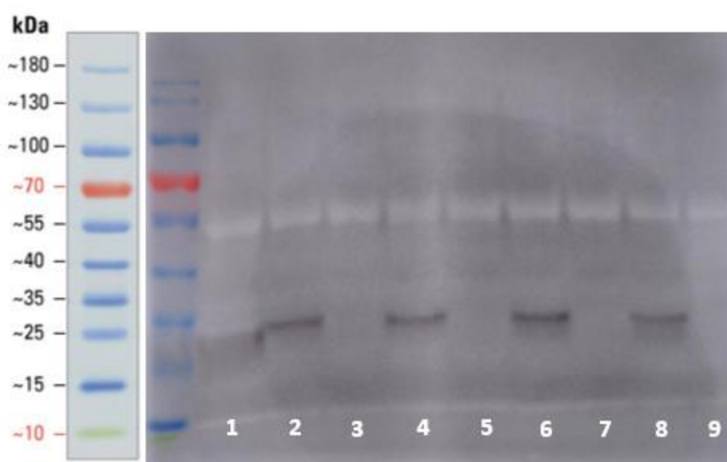


Obr. 23: Fenotyp *A. thaliana* divokého typu (WT) a studovaných mutantních genotypů, tj. *lhcb4*, *penta*, *lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8*.

## 4.5 Western blot

Za účelem ověření exprese PaLHCB8 proteinu u transformovaných rostlin byla provedena identifikace proteinů LHCB4/LHCB8 pomocí metody Western blot (Obr. 24). Pro účely jejich vzájemného rozlišení ale není tato metoda dostatečně citlivá. Samotné detekci proteinů předchází jejich denaturace a elektroforetická separace tak závisí pouze na velikosti. Vzhledem k tomu, že se zde jedná o proteinové izoformy s ne až tak výraznými rozdíly (Obr. 5), nedochází k jejich separaci a oba tyto proteiny jsou identifikovány pomocí stejné primární protilátky.

Jako pozitivní kontrola byl použit divoký typ (WT), u kterého byla pomocí protilátky potvrzena přítomnost proteinů LHCB4.1/4.2. Kombinace těchto dvou izoform s mírně odlišnými velikostmi vede pravděpodobně k tomu, že je band na Obr. 24 pod č. 1 nezaostřený. U netransformovaných mutantů *lhcb4* a *penta*, které sloužily jako negativní kontrola, nebyl podle očekávání protein LHCB4 identifikován, neboť u obou jsou knockoutované geny pro všechny izoformy tohoto proteinu. U obou linií transformovaných rostlin (*lhcb4\_PaLHCB8* i *penta\_PaLHCB8*) byla naopak potvrzena přítomnost proteinu LHCB8 (Obr. 24 č. 2 a 6 pro *lhcb4\_PaLHCB8* a č. 4 a 8 pro *penta\_PaLHCB8*). To potvrzuje, že gen *PaLHCB8* byl nejen úspěšně vložen do genomů požadovaných linií, ale že je zde i efektivně exprimován a že jsou tedy připravené linie vhodné pro fyziologickou analýzu vlivu přítomnosti *PaLHCB8* na strukturu a funkci PSII. Detailní kvantifikace relativního množství proteinu *PaLHCB8* bude v budoucnu provedena pomocí hmotnostní spektrometrie.



Obr. 24: Detekce proteinů LHCB4/8 na membráně metodou Western blot. Čísla odpovídají genotypům, u kterých byly tyto proteiny dokazovány, tj. WT (1), *lhcb4\_PaLHCB8* (2), *lhcb4* (3), *penta\_PaLHCB8* (4), *penta* (5), následuje opakování pro vzorky *lhcb4\_PaLHCB8* až *penta* (6-9).

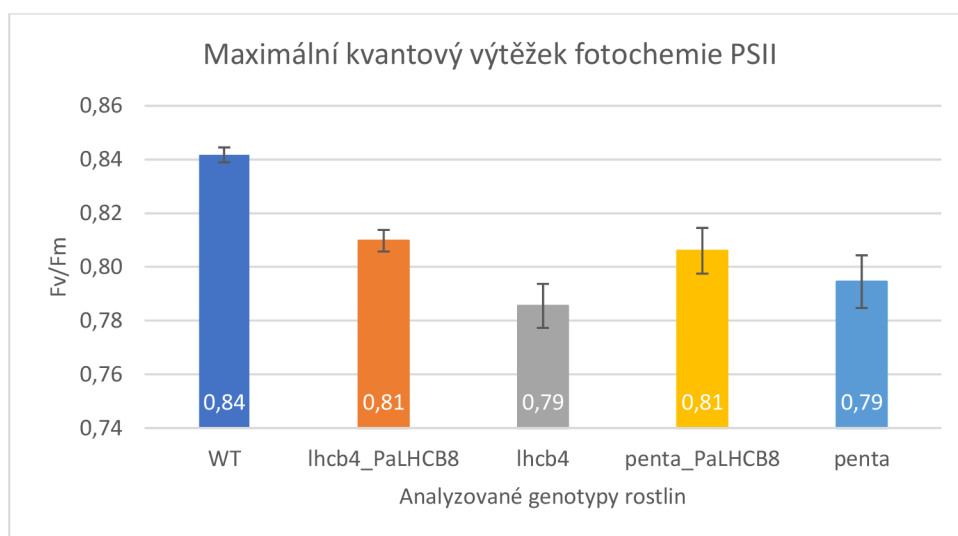


## 4.6 Dual-PAM

Třetí a poslední metodou v rámci fyziologické charakterizace připravených transgenních rostlin byl Dual-PAM. Tato metoda byla využita pro její schopnost měřit chlorofylovou fluorescenci po její indukci světelnými pulzy o různé charakteristické intenzitě a délce. Spektrum fluorescence je totiž jiné než spektrum absorbovaného záření a odráží využití pohlcené energie záření na fotochemické i nefotochemické děje FS. To nám umožňuje snadno získat informace o stavu PSII, základních mechanismech FS a jak zkoumané transgenní rostliny reagují na různé světelné podmínky. Je tedy umožněno propojit informace o genotypu s fenotypem.

### 4.6.1 Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII

Jedním z měřených parametrů byl maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ( $F_v/F_m$ ) (Obr. 25), kterého lze po vhodném období adaptace rostliny na tmu využít jako indikátor stresu u rostlin. U nestresovaných rostlin je hodnota  $F_v/F_m$  konzistentní okolo 0,83 (Maxwell & Johnson, 2000). Existence stresu vede k částečné inhibici funkce PSII nebo k indukci trvalého zhášení a následkem je snížení  $F_v/F_m$ . Z grafu na Obr. 25 je patrné, že ztráta světlosběrných antén u *lhcb4* a *penta* mutanta vede k poklesu maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII. U transgenních linií je díky přítomnosti PaLHCB8 pokles méně výrazný. To lze považovat za nepřímý indikátor toho, že exprimovaný protein PaLHCB8 ze smrku je schopný se vázat na PSII v *Arabidopsis* a ovlivňovat jeho funkci.



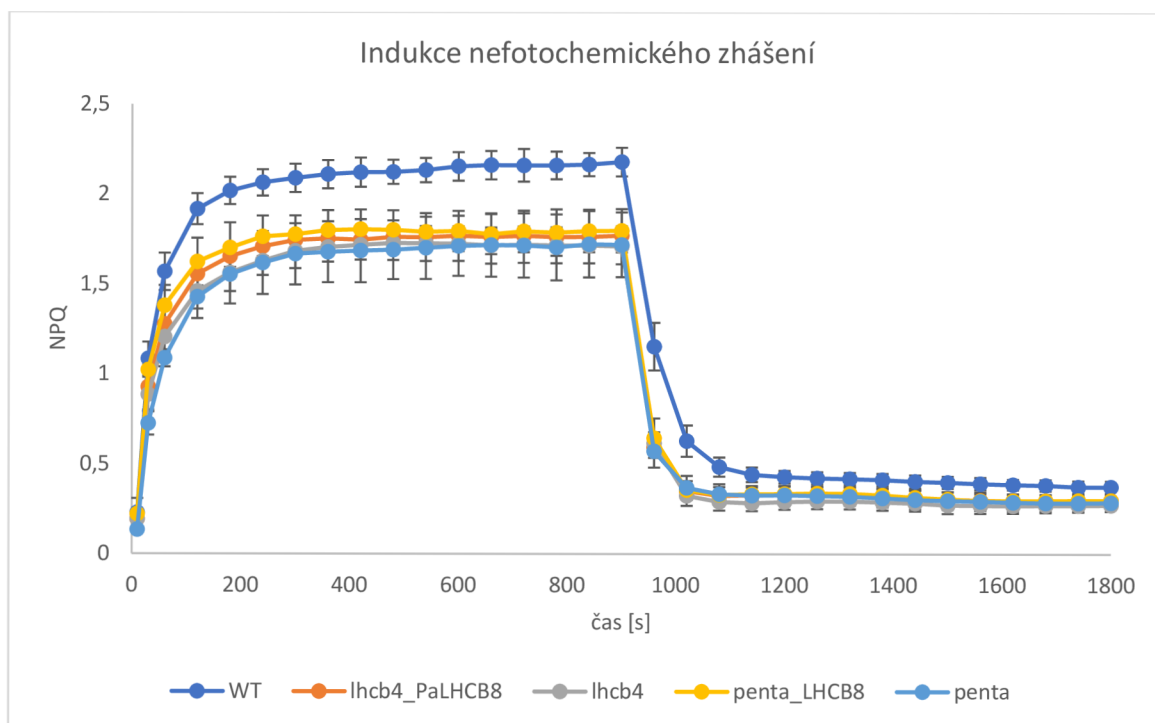
Obr. 25: Porovnání maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII ( $F_v/F_m$ ) u všech zkoumaných genotypů. Výsledky znamenají průměr  $\pm$  SD,  $n = 4$

#### 4.6.2 Nefotochemické zhášení

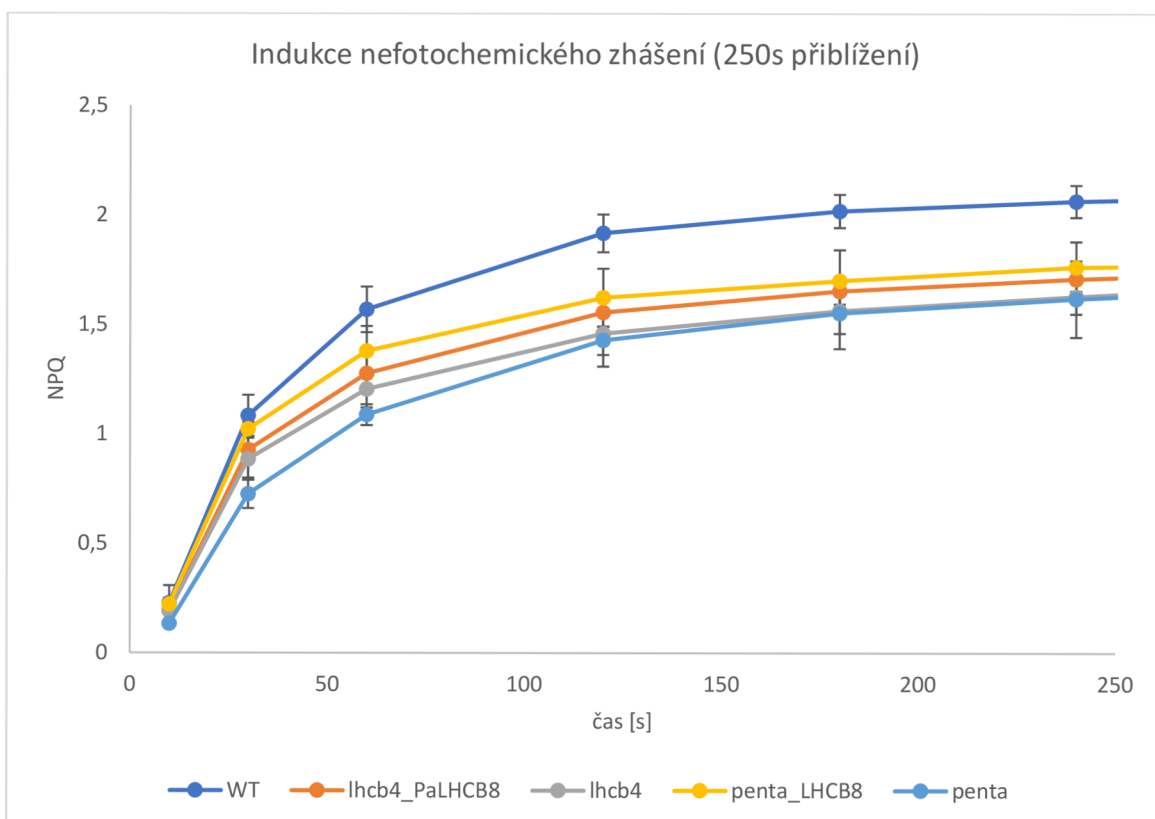
Dalším stanovovaným parametrem byla indukce nefotochemického zhášení (NPQ). Jedná se o fotoprotektivní proces v rámci FS, který odstraňuje přebytečnou excitační energii molekul Chl ve formě tepla, čímž brání tvorbě volných radikálů. Tento typ zhášení si vzájemně konkuruje se zhášením fotochemickým i fluorescenčním, systém Dual-PAM je ale dokáže oddělit. Důležitý je zde vztah mezi NPQ a PSII. NPQ je totiž regulováno snížením pH lumenu a kromě toho zahrnuje regulační protein PsbS a konverzi violaxantinu na zeaxantin v xantofylovém cyklu, což vede ke konformačním změnám PSII antény. V anténě je následně indukováno zhášení excitační energie ve formě tepla, tedy NPQ.

Během tohoto měření je opět využito rostlin adaptovaných na tmu. Když je taková rostlina najednou vystavena vyšší intenzitě záření, PSII není schopen absorbovanou energii využít a zvýší se výtěžek chlorofylové fluorescence. Během následujících minut ale fluorescence klesá, protože je postupně nastartována činnost PSII (fotochemické zhášení) a stejně tak rostlina začíná využívat NPQ. Průběh aktivace NPQ a jeho následné relaxace ve tmě je znázorněn v grafu na Obr. 26.

U WT byla pozorována křivka NPQ s typickým průběhem (Obr. 26). U mutantů byla pozorována pomalejší indukce NPQ a mnohem menší nárůst NPQ během působení aktinického světla (do 900 s) (Obr. 26, Obr. 27). Po vypnutí aktinického světla došlo k rychlejší relaxaci NPQ stejně u všech rostlin s mutantním genotypem. Z měření vyplývá, že přítomnost proteinu PaLHCB8 nemá výrazný vliv na průběh nefotochemického zhášení.



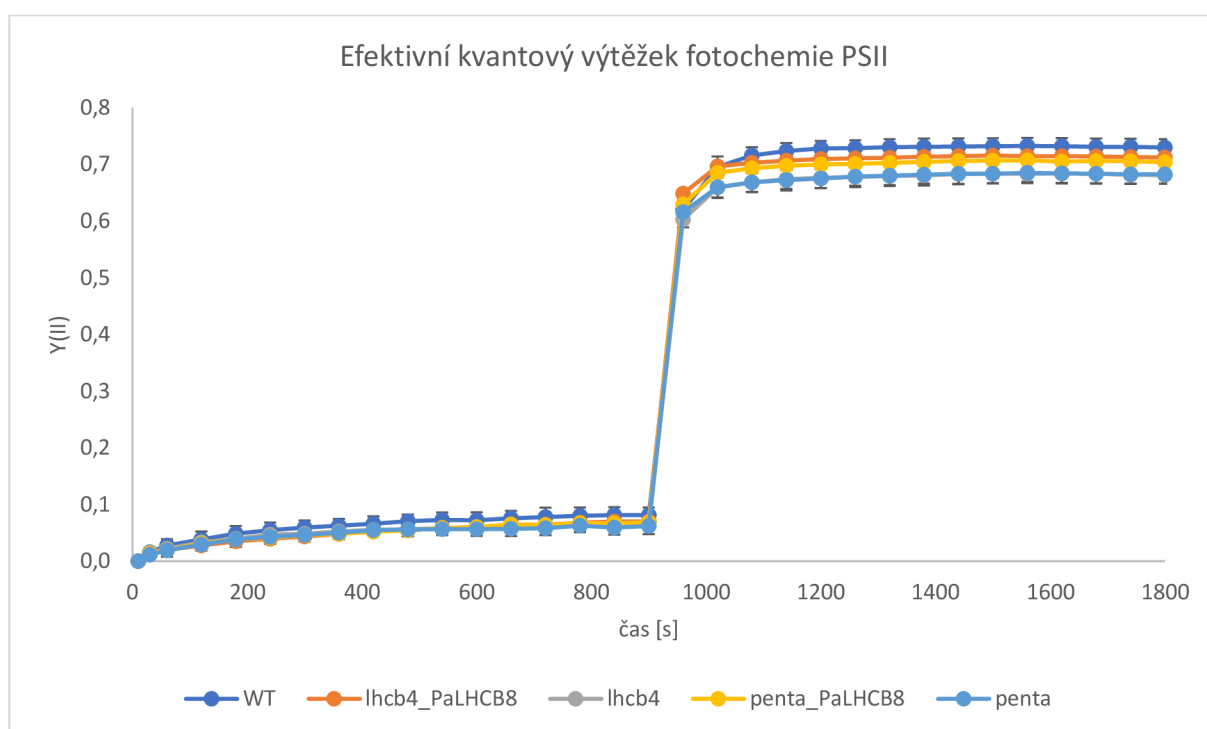
Obr. 26: Porovnání schopnosti indukce nefotochemického zhášení u všech zkoumaných genotypů. Vyznačené hodnoty jsou zaznamenány jako průměr, n = 4.



Obr. 27: Porovnání schopnosti indukce nefotochemického zhášení v prvních 250 s měření u všech zkoumaných genotypů. Vyznačené hodnoty jsou zaznamenány jako průměr, n = 4.

### 4.6.3 Efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII

Efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII ( $Y(II)$ ) je parametr, který poskytuje informaci o tom, jaká relativní část absorbované energie je využita pro fotochemické reakce (Maxwell & Johnson, 2000). U rostlin adaptovaných na tmu je  $Y(II)$  roven  $F_v/F_m$ , při vystavení světlu hodnota  $Y(II)$  klesá z důvodu aktivace nefotochemického zhášení, případně zvýšení neregulované disipace energie (Maxwell & Johnson, 2000; Murchie & Lawson, 2013). To můžeme pozorovat během prvních 900 s, kdy měření probíhalo za aktinického světla (Obr. 28). Pro všechny uvedené rostliny je tedy během první poloviny měření využito na fotochemické reakce asi jen 10 % absorbované energie, což koresponduje s vysokým nárůstem parametru NPQ (Obr. 26). Po vypnutí aktinického světla dochází k relaxaci NPQ (Obr. 26) a hodnota kvantového výtěžku fotochemie PSII se vrací k hodnotám kolem 0,7 (Obr. 28). Není pozorován žádný výrazný vliv ztráty světlosběrných antén, případně vliv přítomnosti PaLHCB8.



Obr. 28: Porovnání efektivního kvantového výtěžku fotochemie PSII u všech zkoumaných genotypů. Vyznačené hodnoty jsou zaznamenány jako průměr,  $n = 4$ .

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše týkající se funkce a struktury fotosystém II u vyšších rostlin a jeho systému světlosběrných antén. Detailněji popsán byl zejména světlosběrný komplex LHCB4, resp. jeho izoforma LHCB8. Dále byly představeny moderní postupy selekce homozygotních linií transformovaných rostlin, které byly následně využity v experimentální části této práce.

V experimentální části byly nejprve připraveny dvě transgenní linie *A. thaliana lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8* pomocí transformace metodou floral dip. Vycházelo se při tom z trojitého (*lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3*) a pětinásobného (*lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3 lhcb3 lhcb6*) mutantů *A. thaliana*, do kterých byl vložen gen pro smrkový protein LHCB8 (PaLHCB8). Motivací pro vytvoření těchto transgenních linií byla snaha o objasnění toho, jakou roli jednotlivé světlosběrné komplexy hrají při vzniku unikátní struktury superkomplexu PSII pozorované u smrku. Smrk postrádá analogy proteinů LHCB3, LHCB6, LHCB4.1 a LHCB4.2, naopak obsahuje specifickou formu proteinu LHCB4, která se označuje jako LHCB8. U linie *lhcb4\_PaLHCB8* byly tedy všechny tři nativní izoformy proteinu LHCB4 nahrazeny smrkovou variantou LHCB8, u linie *penta\_PaLHCB8* navíc ještě chybí proteiny LHCB3 a LHCB6.

Pro každou z připravených transgenních linií byly izolovány dvě nezávislé homozygotní linie pomocí moderní technologie ddPCR, která se prokázala jako velmi efektivní a umožnila velmi rychlou selekci rostlin na základě počtu kopií vloženého transgenu. Rostliny těchto linií byly podrobeny úspěšné sekvenaci pro ověření správnosti vloženého konstruktů a následně základní fyziologické charakterizaci s cílem objasnit vliv LHCB8 na funkci PSII.

Fyziologická charakterizace transgenních rostlin *A. thaliana lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8* vycházela z jejich porovnávání s genotypem WT a případně i s genotypem netransformovaných mutantů *lhcb4* a *penta*. Rostliny při pěstování za optimálních podmínek nevykazovaly žádný výrazný fenotypový rozdíl a také měření relativního množství chlorofylu indikovalo, že u transgenních rostlin pravděpodobně nedochází k výrazné změně množství světlosběrných antén. Z analýzy funkce PSII pomocí metod chlorofylové fluorescence vyplývá, že u transformantů *lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8* nedochází k výraznějším změnám. Ukázalo se ovšem, že přítomnost PaLHCB8 u *lhcb4* a *penta* mutantů mírně zvyšuje hodnotu  $F_v/F_m$ , tj. maximálního

kvantového výtěžku fotochemie PSII. To by mohlo znamenat, že PaLHCB8 je schopen se vázat na PSII a že by mohl mít vliv na strukturu celého PSII superkomplexu.

Linie *lhcb4\_PaLHCB8* a *penta\_PaLHCB8* připravené v rámci této bakalářské práce budou dále využity v řadě následných analýz, které by měly detailně objasnit vliv proteinu PaLHCB8 na strukturu a funkci PSII superkomplexu.

## 6 LITERATURA

- Ålker, B., Peiter, E., Dixon, D. P., Moffat, C., Capper, R., Bouché, N., Edwards, R., Sanders, D., Knight, H., & Knight, M. R. (2008). Getting the most out of publicly available T-DNA insertion lines. *The Plant Journal*, 56(4), 665-677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03608.x>
- Albanese, P., Manfredi, M., Meneghesso, A., Marengo, E., Saracco, G., Barber, J., Morosinotto, T., & Pagliano, C. (2016). Dynamic reorganization of photosystem II supercomplexes in response to variations in light intensities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(10), 1651-1660. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.06.011>
- Albanese, P., Manfredi, M., Marengo, E., Saracco, G., & Pagliano, C. (2019). Structural and functional differentiation of the light-harvesting protein Lhcb4 during land plant diversification. *Physiologia Plantarum*, 166(1), 336-350. <https://doi.org/10.1111/pp1.12964>
- Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. (2000). *Nature*, 408(6814), 796-815. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Boekema, E. J., van Roon, H., Calkoen, F., Bassi, R., & Dekker, J. P. (1999). Multiple Types of Association of Photosystem II and Its Light-Harvesting Antenna in Partially Solubilized Photosystem II Membranes. *Biochemistry*, 38(8), 2233-2239. <https://doi.org/10.1021/bi9827161>
- Brasileiro, A. C. M., & Aragão, F. J. L. (2001). Marker Genes for In Vitro Selection of Transgenic Plants. *Journal of Plant Biotechnology*, 3(3), 113-121.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
- Collier, R., Thomson, J. G., & Thilmony, R. (2018). A versatile and robust *Agrobacterium*-based gene stacking system generates high-quality transgenic *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal*, 95(4), 573-583. <https://doi.org/10.1111/tpj.13992>
- de Bianchi, S., Betterle, N., Kouril, R., Cazzaniga, S., Boekema, E., Bassi, R., & Dall'Osto, L. (2011). *Arabidopsis* Mutants Deleted in the Light-Harvesting Protein Lhcb4 Have a Disrupted Photosystem II Macrostructure and Are Defective in Photoprotection. *The Plant Cell*, 23(7), 2659-2679. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087320>
- Dekker, J. P., & Boekema, E. J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1706(1-2), 12-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.009>
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., & Iwata, S. (2004). Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. *Science*, 303(5665), 1831-1838. <https://doi.org/10.1126/science.1093087>
- Głowacka, K., Kromdijk, J., Leonelli, L., Niyogi, K. K., Clemente, T. E., & Long, S. P. (2016). An evaluation of new and established methods to determine T-DNA copy number and homozygosity in transgenic plants. *Plant, Cell & Environment*, 39(4), 908-917. <https://doi.org/10.1111/pce.12693>
- 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>
- Grinzato, A., Albanese, P., Marotta, R., Swuec, P., Saracco, G., Bolognesi, M., Zanotti, G., & Pagliano, C. (2020). High-Light versus Low-Light: Effects on Paired Photosystem II Supercomplex Structural Rearrangement in Pea Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228643>
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., et al. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604-8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>

- Ilíková, I., Ilík, P., Opatíková, M., Arshad, R., Nosek, L., Karlický, V., Kučerová, Z., Roudnický, P., Pospíšil, P., Lazar, D., Bartoš, J., & Kouřil, R. (2021). Towards spruce-type photosystem II: consequences of the loss of light-harvesting proteins LHCB3 and LHCB6 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 187(4), 2691-2715. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab396>
- Jansson, S. (1994). The light-harvesting chlorophyll ab-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1184(1), 1-19. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90148-1)
- Jansson, S. (1999). A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *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)
- Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 255-273. <https://doi.org/10.1042/EBC20160016>
- Klimmek, F., Sjödin, A., Noutsos, C., Leister, D., & Jansson, S. (2006). Abundantly and Rarely Expressed Lhc Protein Genes Exhibit Distinct Regulation Patterns in Plants. *Plant Physiology*, 140(3), 793-804. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073304>
- Kouřil, R., Dekker, J. P., & Boekema, E. J. (2012). Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(1), 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.05.024>
- 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 (BBA) - Bioenergetics*, 1827(3), 411-419. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.003>
- Kouřil, R., Nosek, L., Bartoš, J., Boekema, E. J., & Ilík, P. (2016). Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant groups – break-up of current dogma. *New Phytologist*, 210(3), 808-814. <https://doi.org/10.1111/nph.13947>
- Kouřil, R., Nosek, L., Semchonok, D., Boekema, E. J., & Ilík, P. (2018). Organization of Plant Photosystem II and Photosystem I Supercomplexes. In J. R. Harris & E. J. Boekema (Eds.), *Membrane Protein Complexes: Structure and Function* (pp. 259-286). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_9)
- Kovács, L., Damkjær, J., Kereiche, S., Iliaia, C., Ruban, A. V., Boekema, E. J., Jansson, S., & Horton, P. (2006). Lack of the Light-Harvesting Complex CP24 Affects the Structure and Function of the Grana Membranes of Higher Plant Chloroplasts. *The Plant Cell*, 18(11), 3106-3120. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045641>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W276-W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Mazaika, E., & Homsy, J. (2014). Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications. *Current Protocols in Human Genetics*, 82(1). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0724s82>
- Morcia, C., Ghizzoni, R., Delogu, C., Andreani, L., Carnevali, P., & Terzi, V. (2020). Digital PCR: What Relevance to Plant Studies?. *Biology*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/biology9120433>
- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983-3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Peng, C., Zheng, M., Ding, L., Chen, X., Wang, X., Feng, X., Wang, J., & Xu, J. (2020). Accurate Detection and Evaluation of the Gene-Editing Frequency in Plants Using Droplet Digital PCR. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.610790>
- Ruban, A. V. (2014). Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 66(1), 7-23. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru400>
- Řepková, J. (2007). Huseníček rolní a současný výzkum rostlinného genomu. *Živa*, 55(1), 5-7.
- Sawchuk, M. G., Donner, T. J., Head, P., & Scarpella, E. (2008). Unique and Overlapping Expression Patterns among Members of Photosynthesis-Associated Nuclear Gene Families in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 148(4), 1908-1924. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126946>



- Shimada, T. L., Shimada, T., & Hara-Nishimura, I. (2010). A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 61(3), 519-528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04060.x>
- Štroch, M., Karlický, V., Ilík, P., Ilíková, I., Opatíková, M., Nosek, L., Pospíšil, P., Svrčková, M., Rác, M., Roudnický, P., Zdráhal, Z., Špunda, V., & Kouřil, R. (2022). Spruce versus *Arabidopsis*: different strategies of photosynthetic acclimation to light intensity change. *Photosynthesis Research*, 154(1), 21-40. <https://doi.org/10.1007/s11120-022-00949-0>
- van Bezouwen, L. S., Caffarri, S., Kale, R. S., Kouřil, R., Thunnissen, A. -M. W. H., Oostergetel, G. T., & Boekema, E. J. (2017). Subunit and chlorophyll organization of the plant photosystem II supercomplex. *Nature Plants*, 3(7). <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.80>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

|  |  |
|--|--|
| <b>ABS</b>                                     | absolutní kvantifikace (mód ddPCR)                                       |
| <b>At</b>                                      | <i>Arabidopsis thaliana</i> (huseníček rolní)                            |
| <b>BSA</b>                                     | hovězí sérový albumin  |
| <b>C<sub>2</sub></b>                           | dimerní jádro PSII   |
| <b>C<sub>2</sub>S<sub>2</sub></b>              | forma superkomplexu PSII obsahující dimerní jádro a dva S trimery        |
| <b>C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub></b> | forma superkomplexu PSII obsahující dimerní jádro, dva S a dva M trimery |
| <b>CNV</b>                                     | variabilita počtu kopií  |
| <b>CP24</b>                                    | LHCB6  |
| <b>CP26</b>                                    | LHCB5  |
| <b>CP29</b>                                    | LHCB4  |
| <b>Cyt b<sub>6</sub>f</b>                      | cytochrom b <sub>6</sub> f   |
| <b>ddNTPs</b>                                  | dideoxyribonukleotidy  |
| <b>ddPCR</b>                                   | digitální dropletová PCR   |
| <b>DMSO</b>                                    | dimethylsulfoxid   |
| <b>dNTPs</b>                                   | deoxyribonukleotidy  |
| <b>DTE</b>                                     | dithioerythritol   |
| <b>DTT</b>                                     | dithiotreitol  |
| <b>EB/PE</b>                                   | eluční pufr  |
| <b>F<sub>0</sub></b>                           | minimální fluorescence chlorofylu  |
| <b>FAST</b>                                    | technologie pro selekci semen založená na jejich fluorescenci            |
| <b>F<sub>m</sub></b>                           | maximální fluorescence chlorofylu  |
| <b>F<sub>m</sub>'</b>                          | maximální fluorescence chlorofylu na světle                              |
| <b>FS</b>                                      | fotosyntéza  |
| <b>Fv/F<sub>m</sub></b>                        | maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII                               |
| <b>GFP</b>                                     | zelený fluorescenční protein   |
| <b>HL</b>                                      | záření o vysokých intenzitách  |
| <b>HM</b>                                      | homozygot  |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>HZ</b>                   | heterozygot  |
| <b>Chl</b>                  | chlorofyl  |
| <b>LHCB1-6</b>              | PSII světlosběrné komplexy 1-6   |
| <b><i>lhcb4</i></b>         | trojitý mutant se třemi knockout geny ( <i>lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3</i> )               |
| <b><i>lhcb4_PaLHCB8</i></b> | <i>lhcb4</i> s LHCB8 smrkového typu  |
| <b>LHCII</b>                | světlosběrný systém antén PSII   |
| <b>LHCs</b>                 | světlosběrné komplexy  |
| <b>NDH</b>                  | komplex NADPH dehydrogenasa  |
| <b>NGS</b>                  | sekvenování nové generace  |
| <b>NPQ</b>                  | nefotochemické zhášení   |
| <b>OLE1</b>                 | protein oleosin 1  |
| <b>P700</b>                 | chlorofyl PSI reakčního centra   |
| <b><i>Pa</i></b>            | <i>Picea abies</i> (smrk ztepilý)  |
| <b>PaLHCB8</b>              | LHCB8 smrkového typu   |
| <b>PB</b>                   | fosfátový pufr (purifikace PCR produktu)   |
| <b>PC</b>                   | vazebný pufr pro navázání DNA na membránu (izolace DNA)                                |
| <b><i>penta</i></b>         | pětinásobný mutant s pěti knockout geny ( <i>lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3 lhcb3 lhcb6</i> ) |
| <b><i>penta_PaLHCB8</i></b> | <i>penta</i> s LHCB8 smrkového typu  |
| <b>PGRL1, PRG5</b>          | komplexy regulace protonového gradientu  |
| <b>PL1</b>                  | lyzační pufr (izolace DNA)   |
| <b>PQ</b>                   | plastochinon   |
| <b>PQH<sub>2</sub></b>      | plastochinol   |
| <b>PSI</b>                  | fotosystém I   |
| <b>PSII</b>                 | fotosystém II  |
| <b>PSII-LHCII</b>           | superkomplex fotosystému II  |
| <b>PW1, PW2</b>             | promývací pufry (izolace DNA)  |
| <b>qPCR</b>                 | kvantitativní polymerázová řetězová reakce   |
| <b>RC</b>                   | reakční centrum  |

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>RED</b>        | detekce vzácných nukleotidových sekvencí (mód ddPCR)         |
| <b>SDS</b>        | dodecylsulfát sodný  |
| <b>TAE</b>        | tris-acetát-ethylendiamintetraoctová kyselina                |
| <b>TAIL-PCR</b>   | termální asymetrická prokládaná polymerázová řetězová reakce |
| <b>TBS</b>        | tris-pufrovaný fyziologický roztok                           |
| <b>TBST</b>       | TBS + Tween 20   |
| <b>T-DNA</b>      | transferová DNA  |
| <b>TE</b>         | tris-ethylendiamintetraoctová kyselina                       |
| <b>Ti plazmid</b> | tumor-indukující plazmid                                     |
| <b>TM</b>         | tylakoidní membrána  |
| <b>WT</b>         | divoký typ   |
| <b>Y(II)</b>      | efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII                   |
| <b>YEB médium</b> | médium pro růst <i>A. tumefaciens</i>                        |