

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin



**Mutagenese genů *psbO1* a *psbO2* v *Arabidopsis thaliana* pomocí metody
CRISPR-Cas9**

CRISPR-Cas9 mutagenesis of *psbO1* and *psbO2* genes in
Arabidopsis thaliana

Kateřina Hlavsov

Diplomov práce
Praha 2020

Vedoucí práce: Mgr. Miloš Duchoslav
Konzultant: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci zpracovala samostatně, pod vedením Mgr. Miloše Duchoslava a RNDr. Lukáše Fischera., Ph.D., a uvedla jsem všechny použité zdroje literatury a informací. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. 8. 2020

Kateřina Hlavsová

1. Poděkování

Jako první bych chtěla poděkovat všem lidem, díky kterým byla práce na tomto projektu radost. Děkuji Miloši Duchoslavovi za bezmeznou trpělivost a pochopení a za vždy kritický přístup k výsledkům. Dále mu děkuji za pomoc při měření fluorescenčních parametrů na FluorCamu a se zpracováním a statistickým vyhodnocováním výsledků. Dále děkuji Lukáši Fischerovi za odborné konzultace, připomínky a za vytvoření prostředí, ve kterém jsem se nebála o nastalých problémech diskutovat a ptát se. Oběma děkuji za zdravé nadšení do problematiky, které na mě během spolupráce přenesli, a díky kterému budu na období strávené na tomto místě moc ráda vzpomínat.

Dále děkuji i ostatním lidem z laboratoře, jmenovitě Adéle Příbylové, Elišce Kobercové, Magdě Metličkové a Vojtovi Čermákovi za vždy přátelskou atmosféru, zaučení do potřebných metod a za pomoc s nejedním technickým problémem při provádění experimentů.

Ráda bych poděkovala katedře Botaniky PřF UK za možnost použití jejich přístroje FluorCam a laboratoři Ekofyziologie rostlin za zapůjčení přístrojů FluorPen a MultispeQ.

Nakonec bych chtěla poděkovat svým rodičům, a to za materiální i psychickou podporu během celého studia, bez které by toto období mého života bylo o moc těžší. Děkuji i ostatním blízkým a ségrám, které jsem kvůli škole v poslední době odbývala a které mi často v potřebných chvílích dodali sílu studium nevzdat.

OBSAH

1. PODĚKOVÁNÍ.....	4
2. SEZNAM ZKRATEK.....	8
3. ABSTRAKT.....	10
4. ABSTRACT.....	11
5. ÚVOD.....	12
5.1. CÍLE.....	12
6. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	13
6.1. FOTOSYSTÉM II.....	13
6.2. MANGANOVÝ KLASTR.....	13
6.3. PROTEIN PSBO.....	16
6.3.1. <i>Struktura</i>	16
6.3.2. <i>Funkce</i>	17
6.3.3. <i>Izoformy PsbO</i>	17
6.3.4. <i>Funkční rozdíly izofořem PsbO</i>	18
6.3.5. <i>Interakční rozdíly izofořem PsbO</i>	19
6.4. ANALÝZY MUTANTŮ <i>A. THALIANA</i> V IZOFORMÁCH <i>PSBO</i>	19
6.4.1. <i>Mutant psbo1</i>	19
6.4.2. <i>Mutant psbo2</i>	20
6.4.3. <i>Snížení celkového množství PsbO</i>	21
6.4.4. <i>Kompenzace snížené hladiny PsbO</i>	21
6.4.5. <i>Problémy s dostupnými výsledky</i>	22
6.4.6. <i>Přehled popsaných linií A. thaliana</i>	23
7. MATERIÁLY A METODY.....	24
7.1. MODELOVÉ ORGANISMY A JEJICH KULTIVACE.....	24
7.1.1. <i>Escherichia coli a Agrobacterium tumefaciens</i>	24
7.1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
7.2. PLAZMIDY.....	26
7.2.1. <i>pGreen, pSoup</i>	26
7.2.2. <i>pCBC-DT1T2, pHSE401</i>	27
7.2.3. <i>pDrive</i>	29

7.3.	PRÁCE S DNA	30
7.3.1.	<i>Izolace plazmidů</i>	30
7.3.2.	<i>Izolace rostlinné DNA</i>	30
7.3.3.	<i>Restrikční štěpení</i>	30
7.3.4.	<i>Ligace</i>	31
7.3.5.	<i>Sekvenace</i>	32
7.3.6.	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i>	33
7.3.7.	<i>Agarózová gelová elektroforéza fragmentů DNA</i>	35
7.3.8.	<i>Izolace DNA z elektroforetického gelu</i>	35
7.4.	PRÁCE S PROTEINY	36
7.4.1.	<i>Izolace proteinů</i>	36
7.4.2.	<i>Příprava gelu pro SDS-PAGE</i>	36
7.4.3.	<i>SDS-PAGE</i>	37
7.4.4.	<i>Imunoblotování (Western blot)</i>	37
7.4.5.	<i>Imunodetekce</i>	37
7.4.6.	<i>ECL systém</i>	38
7.5.	TRANSFORMACE MODELOVÝCH ORGANISMŮ	38
7.5.1.	<i>Příprava elektrokompetentních bakterií E. coli</i>	38
7.5.2.	<i>Příprava elektrokompetentních bakterií A. tumefaciens</i>	39
7.5.3.	<i>Transformace bakterií</i>	39
7.5.4.	<i>Transformace A. thaliana pomocí metody floral dip</i>	40
7.6.	CRISPR-CAS9 MUTAGENEZE <i>PSBO1</i> A <i>PSBO2</i>	40
7.6.1.	<i>Příprava konstruktů</i>	40
7.6.2.	<i>Příprava mutantních linií psbo1cr a psbo2cr</i>	41
7.6.3.	<i>Komplementace mutantů psbo1cr a psbo2cr</i>	42
7.6.4.	<i>Příprava psbo1isoL a psbo2isoL linií</i>	43
7.6.5.	<i>Příprava konstruktů obsahující psbO1/psbO2 z bramboru</i>	43
7.7.	DESIGN ANALÝZY ZÁKLADNÍCH FENOTYPOVÝCH CHARAKTERISTIK	44
7.7.1.	<i>Měření čerstvé hmotnosti</i>	44
7.7.2.	<i>Měření hmotnosti sušiny</i>	44
7.7.3.	<i>Izolace a měření obsahu pigmentů</i>	44
7.7.4.	<i>Měření obsahu proteinů</i>	45
7.7.5.	<i>Měření fluorescence chlorofylu a a plochy listové růžice (přístroj FluorCam)</i> . 45	
7.7.6.	<i>Měření pomocí přístroje MultispeQ</i>	45

7.7.7.	<i>Měření OJIP křivek</i>	45
7.7.8.	<i>Statistické zpracování výsledků</i>	46
8.	VÝSLEDKY	47
8.1.	VYTVOŘENÍ ROSTLIN S DELECÍ V GENECH <i>PSBO1</i> A <i>PSBO2</i>	47
8.1.1.	<i>psbO1</i>	47
8.1.2.	<i>psbO2</i>	48
8.2.	POROVNÁNÍ ROSTLIN WT, <i>PSBO1</i> , <i>PSBO1CR</i> , <i>PSBO2</i> A <i>PSBO2CR</i>	49
8.2.1.	<i>Základní fenotypové charakteristiky</i>	49
8.2.2.	<i>Velikost semen</i>	52
8.2.3.	<i>Obsah fotosyntetických barviv</i>	54
8.2.4.	<i>Fluorescence chlorofylu a</i>	57
8.2.5.	<i>Obsah proteinů PsbO1 a PsbO2</i>	64
9.	DISKUZE	67
9.1.	MUTANTI <i>PSBO1</i> A <i>PSBO1CR</i>	67
9.2.	MUTANTI <i>PSBO2</i> A <i>PSBO2CR</i>	70
10.	ZÁVĚRY	72
11.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73

2. Seznam zkratek

At – huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

A. tumefaciens - *Agrobacterium tumefaciens*

ATP - adenosintrifosfát

BiFC - bimolekulární fluorescenční komplementace (bimolecular fluorescence complementation)

BSA - bovine serum albumin

Col - Columbia (ekotyp huseníčku)

CRISPR-Cas9 – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated 9 (Cas)

CV - chloroplast vesiculation protein

Cyt – cytochrom

dH₂O – destilovaná voda

E. coli - *Escherichia coli*

GTP - guanosintrifosfát

HSP - heat shock protein

LHCII - světlosběrné komplexy fotosystému II (light-harvesting complexes II)

LTO - lumen thiol oxidoreductase (protein)

OEC – kyslík vyvíjející komplex (oxygen evolving complex)

PAGE - polyakrylamidová gelová elektroforéza (polyacrylamide gel electrophoresis)

PCR - polymerázová řetězová reakce (polymer chain reaction)

psbO1 – gen kódující protein PsbO1

PsbO1 – protein PsbO1

psbo1 – T-DNA inzerční mutantní linie *A. thaliana* s inzercí v genu *psbO1*

psbo1cr – mutantní linie *A. thaliana* s delecí v genu *psbO1* vytvořená pomocí metody CRISPR- Cas9

psbo1isoL – mutantní linie s celkovou hladinou PsbO jako má wt, která obsahuje pouze PsbO2

psbO2 – gen kódující protein PsbO2

PsbO2 – protein PsbO2

psbo2 – T-DNA inzerční mutantní linie *A. thaliana* s inzercí v genu *psbO2*

psbo2cr – mutantní linie *A. thaliana* s delecí v genu *psbO2* vytvořená pomocí metody CRISPR-Cas9

psbo2isoL - mutantní linie s celkovou hladinou PsbO jako má wt, která obsahuje pouze PsbO1

psbo2-psbO1/psbO1 – mutant s homozygotní mutací v genu *psbO2* a heterozygotní mutací v genu *psbO1*

PSI – fotosystém I (photosystem I)

PSII - fotosystém II (photosystem II)

QY - kvantový výtěžek (quantum yield)

SDS - dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulphate)

St - brambor (*Solanum tuberosum*)

TAE - elektroforetický pufr (Tris-acetát-EDTA buffer)

TEMED - tetramethylethylendiamin

Tris - 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

UTR - nepřekládaná oblast mRNA (untranslated region)

WKS1 - wheat kinase START1 (protein)

wt – divoký typ (wild type)

Y2H - dvouhybridní kvasinkový systém (yeast two-hybrid system)

3. Abstrakt

Protein PsbO je jednou z nezbytných podjednotek fotosystému II, proteinového komplexu nacházejícího se v tylakoidních membránách chloroplastů. PsbO má důležitou funkci pro stabilizaci manganového klastru, na které probíhá rozklad vody a produkce kyslíku. V *Arabidopsis thaliana* má dvě izoformy, jejichž funkce však nebyla doposud uspokojivě objasněna. Dosavadní poznatky o izoformách PsbO1 a PsbO2 pochází zejména z experimentů prováděných na T-DNA inzerčních mutantech *psbo1* a *psbo2*. Získáním životaschopných dvojitéch mutantů *psbo1 psbo2* vyvstala otázka ohledně míry exprese mutovaných genů u mutantů *psbo1* a *psbo2*. Proto jsme pomocí metody CRISPR-Cas9 vytvořili knock-out mutantní linie *psbo1cr* a *psbo2cr*, které jsme porovnali s doposud používanými T-DNA inzerčními mutanty *psbo1* a *psbo2*. Provedli jsme porovnání základních fenotypových charakteristik, parametrů fluorescence chlorofylu *a* a imunodotekci proteinů PsbO1 a PsbO2. Výsledky ukazují, že i když možná v T-DNA inzerčních mutantech probíhá slabá exprese mutovaných genů, měřené parametry mutantů *psbo1cr* a *psbo2cr* jsou s nimi shodné.

Klíčová slova: PsbO, fotosystém II, CRISPR-Cas9, mutageneze, *Arabidopsis thaliana*

4. Abstract

Protein PsbO is one of the essential extrinsic subunits of photosystem II, a protein complex that is embedded in a thylakoid membrane of chloroplasts. PsbO is important in stabilizing manganese cluster, a structure that breaks down water molecules and evolves oxygen. *Arabidopsis thaliana* encodes for two isoforms which functions have not yet been clearly explained. Up-to-date findings of PsbO1 and PsbO2 come from experiments using T-DNA insertion mutants *psbo1* and *psbo2*. Finding viable double mutants *psbo1 psbo2* had brought up questions about actual expression levels of mutated genes in *psbo1* and *psbo2* mutants. This is what led us to creating *psbo1cr* and *psbo2cr* knock-out mutant lines using CRISPR-Cas9 mutagenesis and then comparing them to the frequently used T-DNA insertion mutants *psbo1* and *psbo2*. We performed a comparison of basic phenotype characteristics, chlorophyll *a* fluorescence parameters and immunodetection of PsbO1 and PsbO2 proteins. Even though we might have observed slight expression of mutated genes in *psbo1* and *psbo2* lines, our results show that measured parameters of *psbo1cr* and *psbo2cr* are identical to those of *psbo1* and *psbo2*.

Key words: PsbO, photosystem II, CRISPR-Cas9, mutagenesis, *Arabidopsis thaliana*

5. Úvod

Vznik oxygenní fotosyntézy před asi 2,5 miliardami let je jednou z klíčových událostí v historii života na Zemi. Zvýšení koncentrace molekulárního kyslíku v atmosféře při tzv. Velké kyslíkové události (Great Oxygenic Event, shrnuto v Blaustein, 2016) umožnilo rozvinutí složitějšího eukaryotického života až do podoby, ve které ho známe dnes.

Oxygenní fotosyntéza je proces oxidace vody a redukce oxidu uhličitého za využití energie ze světelného záření vedoucí ke vzniku organických sloučenin a kyslíku. Atomy takto vznikajícího kyslíku pochází z molekul vody, které jsou v místě zvaném kyslík vyvíjející komplex z molekuly vody vytrženy (Ghanotakis & Yocum, 1990). Tento fascinující děj se odehrává v tylakoidních membránách sinic, řas a vyšších rostlin (De Las Rivas et al. 2004). Rozšíření znalostí o struktuře a funkci jednotlivých komponent účastnících se na tomto významném ději by mohlo zajímavým způsobem přispět k technickému pokroku např. na poli zpracování sluneční energie nebo vývoji mechanismů pro umělý rozklad vody (Chen et al., 2020; Liu et al., 2016).

Smyslem této práce je přispět k rozšíření poznatků o proteinech PsbO1 a PsbO2 vytvořením mutantních linií *A. thaliana* v genech *psbO1* a *psbO2* pomocí moderní metody CRISPR-Cas9. Tato metoda umožňuje cílené vytvoření spolehlivých knock-out mutantních linií, které na poli bádání o proteinu PsbO pravděpodobně zcela chybí. Cílem této práce je charakterizovat nově vytvořené mutanty *psbo1cr* a *psbo2cr* a srovnat je s jejich T-DNA inzerčními protějšky. Získání knock-out mutantních linií je přínosné nejen pro přesnější interpretaci získaných výsledků, ale také do budoucna umožní provádět řadu experimentů, které by mohly pomoci objasnit dlouhodobě nevyjasněnou podstatu rozdílu mezi izoformami PsbO.

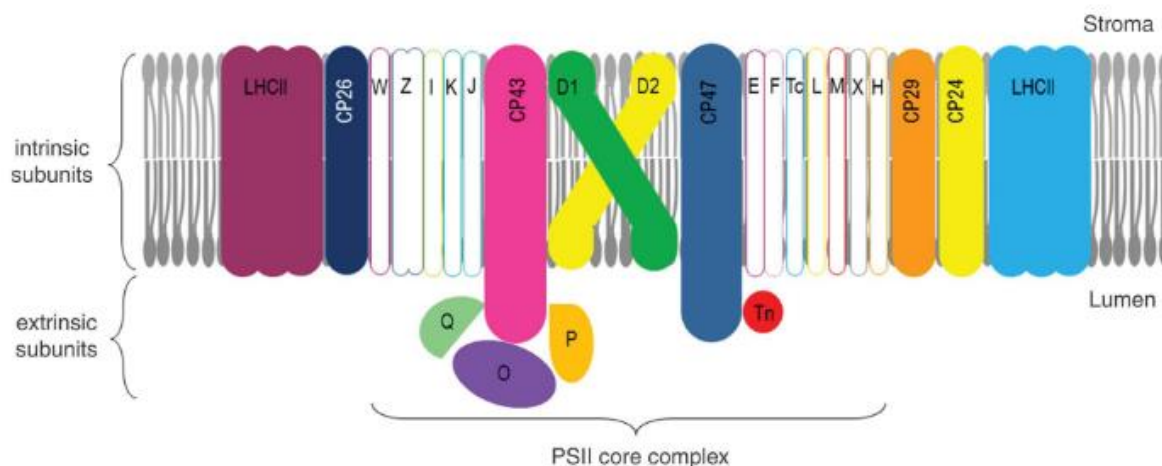
5.1. Cíle

- 1) Vytvoření knock-out mutantních linií *psbo1cr* a *psbo2cr* pomocí metody CRISPR-Cas9
- 2) Charakterizace mutantních linií *psbo1cr* a *psbo2cr*
- 3) Srovnání mutantních linií *psbo1cr* a *psbo2cr* s T-DNA inzerčními mutanty *psbo1* a *psbo2*

6. Literární přehled

6.1. Fotosystém II

Fotosystém II (PSII) je proteinový komplex v tylakoidní membráně sinic, řas a vyšších rostlin, který se skládá z mnoha podjednotek a kofaktorů (obr. 2.1). Jádru PSII je tvořeno alespoň dvaceti podjednotkami, z nichž většina je ukotvena v tylakoidní membráně transmembránovými helixy. Mezi tyto podjednotky patří proteiny reakčního centra D1, D2, vnitřní anténní proteiny CP43 a CP47 a větší množství podjednotek o nízké molekulární hmotnosti, včetně podjednotek PsbE a PsbF, které dohromady tvoří cytochrom b559 (Su et al., 2017). Na reakční centrum PSII je v závislosti na světelných podmínkách navázán různý počet světlosběrných antén (light harvesting complexes, LHC), které zvyšují efektivitu zachytávání fotonů, jejichž energii předávají do reakčního centra PSII. Na jádro PSII se z luminální strany váží vnější proteiny PsbO, PsbP a PsbQ (Wei et al., 2016). Vyšší rostliny mají navíc vnější podjednotku PsbTn (Wei et al., 2016). U zelených řas a rostlin může být navíc ještě vnější podjednotka PsbR (Bricker et al., 2012).

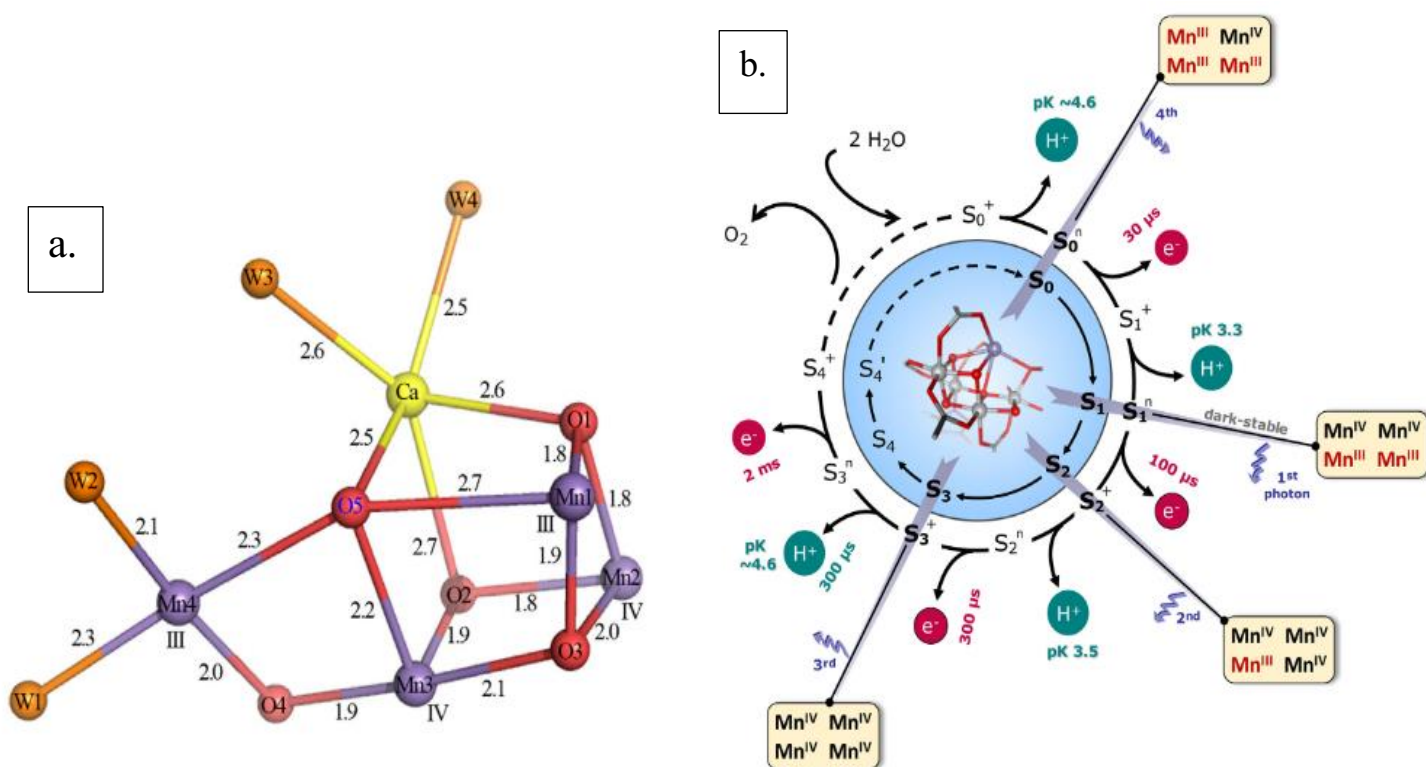


Obr. 2.1: Schéma superkomplexu PSII-LHCII hrachu setého (boční pohled, převzato ze Su et al., 2017).

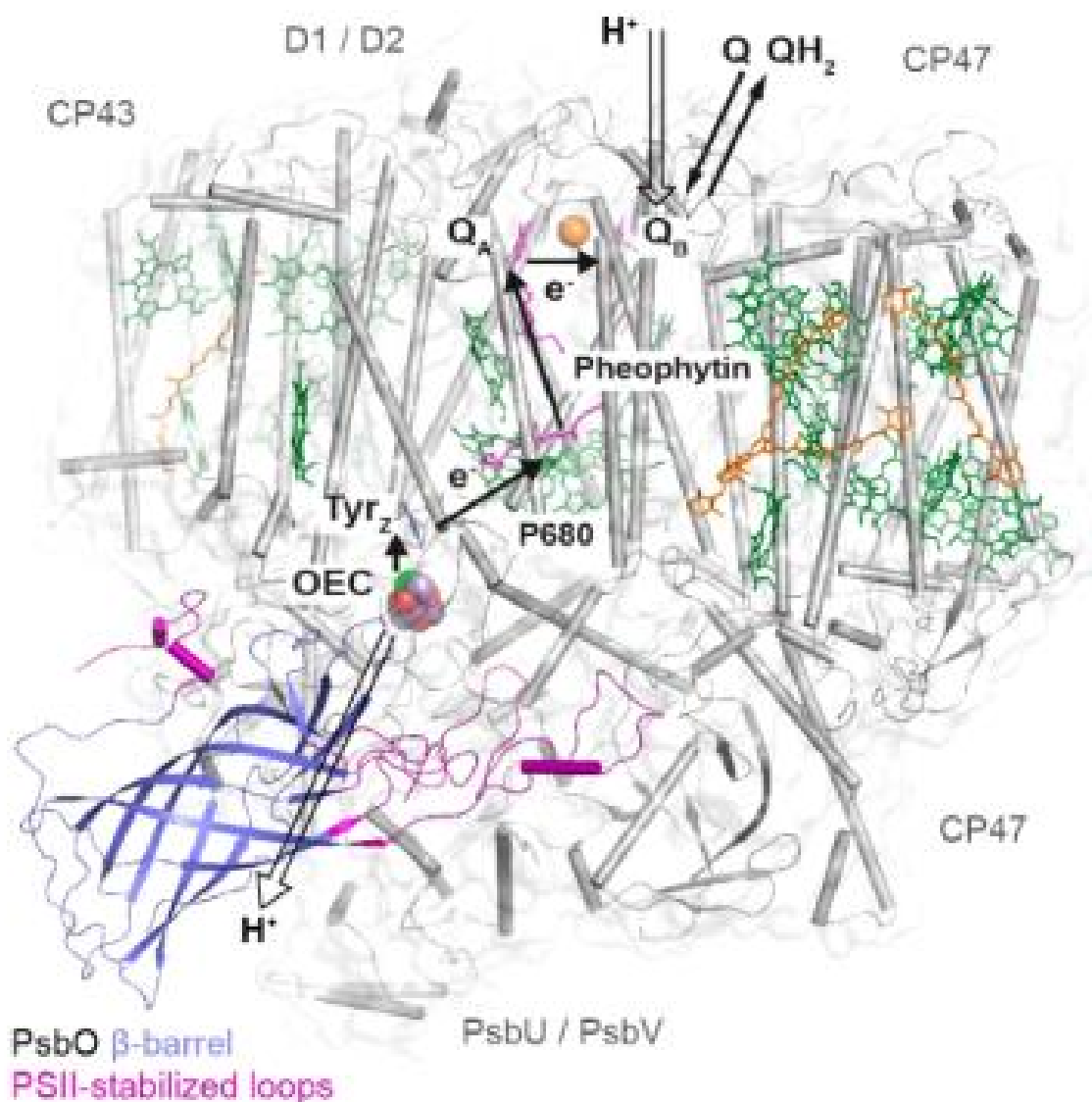
6.2. Manganový klastr

Komplex PSII zajišťuje mimojiné oxidaci vody, ke které dochází na tzv. manganovém klastru v jádru kyslík vyvíjejícího komplexu (oxygen evolving complex, OEC). Manganový klastr (obr. 2.2a) se skládá ze 4 atomů manganu, 1 atomu vápníku a 5 atomů kyslíku (Barber 2008) a prochází tzv. Kokovým cyklem, ve kterém postupně prochází pěti přechodnými stavy

(S₀ – S₄; Roelofs et al., 1996). Čísla jednotlivých stavů indikují počet uvolněných elektronů z OEC. Stavy S₀ a S₁ jsou temnostně stabilní (Kok et al., 1970; Roelofs et al., 1996). K uvolnění molekuly kyslíku dochází při přechodu ze stavu S₄ do stavu S₀. Ke vzniku jedné molekuly kyslíku je zapotřebí rozložení dvou molekul vody za uvolnění čtyř atomů H⁺ a čtyř elektronů (obr. 2.2b, shrnuto v Najafpour et al., 2020). Tyto elektrony zpětně redukují aminokyselinový zbytek Tyr161 (Yz, tyrozinový radikál) podjednotky D1, který byl oxidován silným oxidačním činidlem – oxidovaným P680⁺ (obr. 2.3, shrnuto v Lubitz et al., 2019).



Obr. 2.2: **a.** Struktura klastru Mn₄CaO₅. Červeně – O, fialově – Mn, žlutě – Ca, oranžově – molekuly vody **b.** Reakční cyklus oxidace vody. Vnitřní cyklus - klasický Kokův model; vnější cyklus zahrnuje i redukční stav jednotlivých atomů Mn, uvolňování protonů v jednotlivých fázích cyklu a relativní náboj v jednotlivých fázích vzhledem k temnostně stabilnímu stavu S₁ (převzato z Najafpour et al., 2020).



Obr. 2.3: Boční pohled na dimer PSII. Modře β -barel proteinu PsbO, růžově smyčky interagující s jádrem PSII, zeleně chlorofyly, oranžově β -karoten. Plné šipky znázorňují cestu elektronu, prázdné šipky znázorňují cestu H⁺ (jde o strukturu PsbO ze sinice *Thermosynechococcus elongatus*; převzato z (Bommer et al., 2016)).

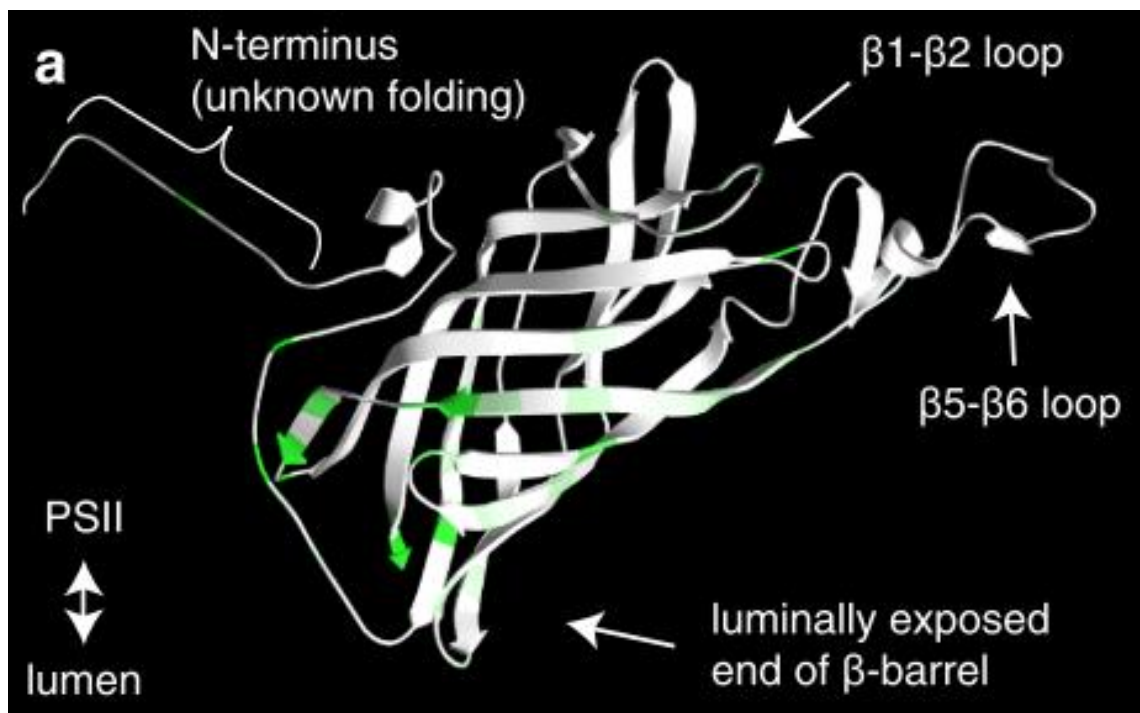
Pro optimální rozkládání molekul vody a efektivní produkci kyslíku jsou potřebné i chloridové anionty, které jsou vázány v blízkosti manganového klastru (Commet et al., 2012; Popelkova & Yocum, 2007; Seidler 1997). Vypadá to, že chloridové ionty mají důležitou funkci při přechodu manganového klastru mezi jednotlivými fázemi Kokova cyklu (shrnuo v Popelkova & Yocum 2007). Manganový klastr je vysoce reaktivní struktura, která je chráněna a stabilizována třemi vnějšími proteiny fotosystému II – PsbO, PsbP a PsbQ (Seidler 1997). Tyto tři proteiny dohromady tvoří trojúhelníkovou strukturu, která nasedá především na lumenální část CP43 a C-terminální část proteinu D1 (Wei et al. 2016). Dohromady pomáhají

udržovat vázané Cl⁻ a Ca²⁺ ionty a chrání OEC před redukčními činidly (Ifuku & Noguchi, 2016).

6.3. Protein PsbO

6.3.1. Struktura

Protein PsbO (obr 2.4), ve starší literatuře nazývaný jako mangan-stabilizující protein či *33 kDa extrinsic protein*, je kódovaný v jádře všech fotosyntetizujících eukaryotických organismů, které vyvíjejí kyslík, a vyskytuje se také u všech kyslík-vyvíjejících sinic (De Las Rivas et al., 2004). Je syntetizován na volných cytoplasmatických ribozomech a v prekurzorové formě je pomocí N-terminálního transitního peptidu importován do chloroplastu, kde je jako maturovaný protein (po odštěpení transitního peptidu) navázaný k PSII z lumenální strany (De Las Rivas & Heredia, 1999).



Obr. 2.4: Model proteinu PsbO z bramboru. Zeleně rozdíl mezi izoformami PsbO v čeledi Solanaceae (převzato z Duchoslav & Fischer, 2015).

Maturovaný PsbO obsahuje u rostlin zpravidla 246 – 249 aminokyselinových zbytků, které tvoří β -barelovou strukturu o osmi antiparalelních β -vláknech (β 1– β 8), třech α -helixech (h1-h3), hydrofilních smyčkách (*loops*) a ohybech (*turns*). Mezi vlákny β 5 a β 6 tvoří rozsáhlá smyčka „hlavovou“ doménu PsbO. Tato doména je důležitá pro interakci PsbO s lumenální částí PSII a pro stabilizaci manganového klastru (De Las Rivas & Barber, 2004). Do vnitřku β -barelu

zasahují hydrofobní aminokyselinové zbytky (De Las Rivas & Barber, 2004). Ke změnám v tomto proteinu v průběhu evoluce došlo především tam, kde se PsbO váže do PSII, a v aminokyselinových zbytcích směřujících svými bočními řetězci dovnitř beta-barelu (Duchoslav & Fischer, 2015).

6.3.2. Funkce

Funkcí PsbO je především zajišťovat ideální prostředí pro účinný rozklad vody stabilizací manganového klastru, a to zabráněním ztráty iontů vápníku a chloru (shrnutí v Bricker et al., 2012). Pro PsbO byly navrženy i další možné funkce, jako např. účast při opravách proteinu D1 reakčního centra fotosystému II, který je při fotosyntéze intenzivně poškozován (Lundin et al., 2007a). Podle další studie vykazuje PsbO také GTPázovou aktivitu (Lundin et al., 2007b). Autoři hypotetizují, že tato aktivita může být zapojena právě do výměny poškozeného proteinu D1 za nový. Další možnou rolí PsbO je zajištění rychlého odvodu protonů od manganového klastru (Bommer et al., 2016; Shutova et al., 2007). Vyšší rostliny postrádající PsbO pak nejsou schopny fotoautotrofního růstu (Yi et al., 2005).

6.3.3. Izoformy PsbO

A. thaliana exprimuje dvě izoformy PsbO - PsbO1 a PsbO2, kódované geny *psbO1* a *psbO2* (Murakami et al., 2005), které se u *A. thaliana* liší v 11 aminokyselinových zbytcích (Murakami et al., 2002). Hlavní exprimovanou izoformou je *psbO1*, zatímco *psbO2* je exprimován v menší míře (Murakami et al., 2005). Poměr proteinů PsbO1 a PsbO2 se nijak výrazně nemění ani v průběhu vývoje rostliny, ani při krátkodobém působení různých stresů. Podobně je tomu s hladinami mRNA kódujících jednotlivé izoformy (Lundin et al., 2008, potvrzují to rovněž data dostupná v aplikaci Genevestigator). Poměr exprese jednotlivých izoform se však liší u různých ekotypů huseníčku. Analýzou dostupných transkriptomických dat pro mnoho set ekotypů byla nalezena silná korelace s klimatickými podmínkami původu daného ekotypu. Gen pro PsbO2 je relativně více (vůči genu pro PsbO1) exprimován v ekotypech získaných z míst, kde je průměrně více slunečního záření, více větru a nižší vlhkost (Duchoslav & Fischer, v přípravě).

Dva geny kódující PsbO má i velká část dalších krytosemenných rostlin, kde se izoformy liší v 6 – 23 aminokyselinových zbytcích (Duchoslav & Fischer, 2015). Klíčové sekvence PsbO jsou nejen mezi rostlinami, ale i mezi řasami a sinicemi vysoce konzervované (De Las Rivas & Heredia, 1999). Podle Duchoslava a Fischera (2015) nedošlo u krytosemenných rostlin k duplikaci genu u společného předka, ale duplikace proběhla v každé

čeledi samostatně, a to pravděpodobně v rámci nezávisle probíhajících celogenomových duplikací. Izoformy jednoho druhu jsou si tedy evolučně bližší než izoformy mezi jednotlivými čeleděmi. Je zajímavé, že rozdíly mezi izoformami jednotlivých čeledí (paralogy) jsou na podobných místech struktury proteinu - nejčastěji jde o záměnu postranního řetězce aspartátu a glutamátu směřujících ven z beta-barelu (Duchoslav & Fischer, 2015). Je pravděpodobné, že duplikace PsbO umožnila funkční či strukturní specializaci duplikovaného PsbO, tzv. sub-funkcionalizaci (jev je označován jako *únik z adaptivního konfliktu*, více o tomto jevu v Sikosek et al., 2012), která při jediné kopii genu v genomu nebyla možná, neboť by mohla vést ke ztrátě funkce druhé. Zda došlo u paralogů PsbO k paralelní evoluci, tedy zda jsou rozdíly mezi funkcemi izoform jednotlivých čeledí podobné, dosud není dostatečně prozkoumané.

6.3.4. Funkční rozdíly izoform PsbO

Murakami et al. (2005) ve svých experimentech zjišťovali efektivitu produkce kyslíku jednotlivých izoform pomocí rekombinantních PsbO1 a PsbO2 z *A. thaliana*, které navazovali na PSII ze špenátu (*Spinacia oleracea*). Přestože se obě izoformy váží na PSII se stejnou afinitou, je PsbO1 schopný zajistit vyšší aktivitu PSII, tedy vyšší produkci kyslíku. Toto zjištění odpovídá poznatku, že PSII-vazebné části proteinů PsbO1 a PsbO2 jsou silně konzervované a mezi izoformami se neliší (Duchoslav & Fischer, 2015).

Podle Lundina et al. (2008) je jedním z funkčních rozdílů mezi PsbO1 a PsbO2 *A. thaliana* GTPázová aktivita. Usuzují tak ze svých experimentů, ve kterých naměřili různou GTPázovou aktivitu membrán obsahujících PSII z wt a mutantů *psbo1* a *psbo2*. Miloši Duchoslavovi se podařilo změřit, že rozdílnou GTPázovou aktivitu mají i přečištěné, v bakteriích exprimované izoformy PsbO bramboru (*Solanum tuberosum*; Duchoslav & Fischer, v přípravě). Protože duplikace genu pro PsbO proběhla nezávisle v čeledích Brassicaceae a Solanaceae (Duchoslav & Fischer 2015), mohla by rozdílná GTPázová aktivita jednotlivých izoform ukazovat na paralelní evoluci izoform mezi těmito čeleděmi. Funkce GTPázové aktivity PsbO v rámci fotosyntetického aparátu však zatím není dostatečně vysvětlena.

Kromě odlišné GTPázové aktivity by se izoformy PsbO mohly lišit také interakcí s ostatními proteiny PSII. Byly publikovány nejen interakce s membránovými podjednotkami PSII, ale také s ostatními vnějšími proteiny PSII, tedy PsbP a PsbQ (Su et al., 2017; Wei et al., 2016).

6.3.5. Interakční rozdíly izoform PsbO

Mimo podjednotek PSII byly dále publikovány i interakce s dalšími proteiny. Pomocí koimunoprecipitace byla zjištěna potenciální interakce PsbO1 i PsbO2 s proteinem CV (chloroplast vesiculation), který je silně exprimován při senescenci a abiotickém stresu a spouští degradaci chloroplastů (Songhu Wang & Blumwald, 2014). Interakce CV-PsbO1 byla autory dále potvrzena pomocí bimolekulární fluorescenční komplementace. Pomocí kvasinkového dvouhybridního systému (Y2H, yeast two-hybrid system) byla odhalena interakce PsbO s proteinem LTO1 (Karamoko et al., 2011), který pravděpodobně katalyzuje vytvoření disulfidického můstku v PsbO (Karamoko et al. 2011). Zdá se, že LTO je podstatný pro funkci PsbO a jeho ztráta *in vivo* směřuje PsbO k degradaci (Hall et al., 2010). Pomocí Y2H byla dále odhalena interakce se stromatálním chaperonem HSP90C (Jiang et al., 2017). Na špenátu bylo ukázáno, že PsbO je termostabilní protein, který se po teplotní denaturaci sbalí zpět do původního stavu i bez přítomnosti chaperonů (Lydakakis-Simantiris et al., 1999). HSP90C pravděpodobně chrání PsbO před degradací či agregací ve stromatu, než dojde k jeho translokaci do lumen tylakoidu (Jiang et al., 2017). Nedávno byla pomocí koimunoprecipitace při studiu rezistence pšenice vůči mykopatogenu *Puccinia striiformis* (Pst) popsána interakce PsbO s proteinem WKS1 (Wheat Kinase START1), která byla dále ověřena pomocí Y2H i BiFC. Protein WKS1 je produktem genu *Yr36 a* dospělým rostlinám uděluje odolnost proti mnoha kmenům infekce patogenem *Pst* (Wang et al., 2019). Podle této studie slouží fosforylace PsbO pomocí WKS1 k rychlé degradaci PsbO proteázami za účelem snížení rychlosti fotosyntézy a regulace chlorózy listů, která má být důležitá při rezistenci vůči *Pst*. Gen *Yr36* se však nachází pouze v rezistentních odrůdách pšenice, zatímco v ostatních zcela chybí (Wang et al. 2019). Popsání této interakce tedy pravděpodobně nepřinese žádné obecné poznatky o PsbO.

Popsání proteinových interakcí však zatím nepřispělo k vyjasnění jednotlivých funkcí izoform ani k uspokojivému objasnění rozdílu mezi nimi. Další informace o izoformách PsbO huseníčku pochází z analýz mutantů v jednotlivých izoformách, označovaných *psbo1* a *psbo2*.

6.4. Analýzy mutantů *A. thaliana* v izoformách *psbO*

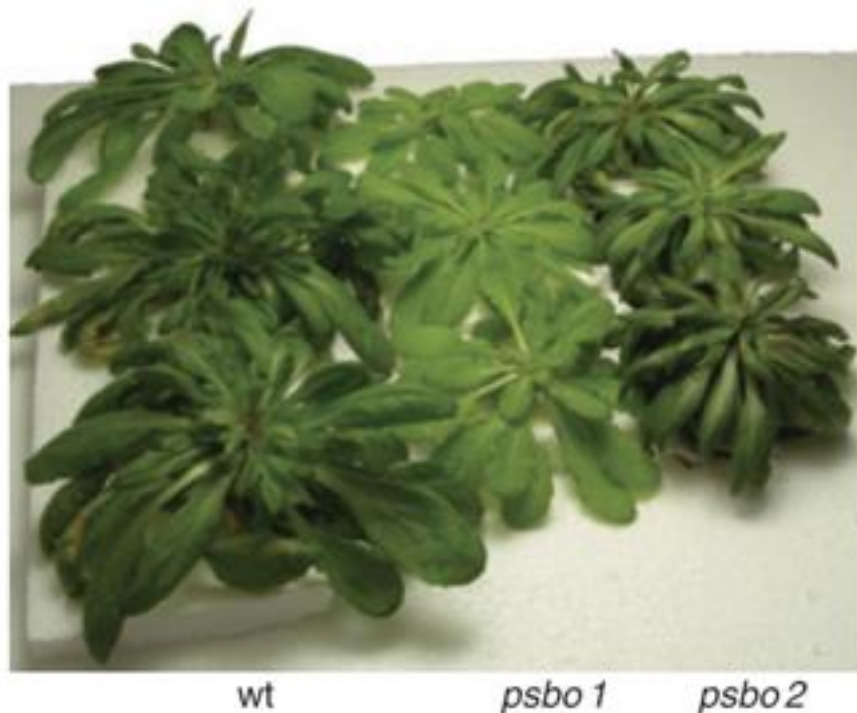
6.4.1. Mutant *psbo1*

Mutant *psbo1* (postrádající PsbO1) má oproti wt (wild type, divoký typ) značně odlišný fenotyp. Vyznačuje se zpomaleným růstem, světlejšími listy (nižším obsahem chlorofylu) a nižšími hodnotami maximálního kvantového výtěžku PSII (Fv/Fm; Lundin et al., 2007a;

Murakami et al., 2002; obr. 5). Tyto rostliny mají menší množství fotosystémů II i I (Suorsa et al., 2016) a vyšší poměr fotosystémů I (PSI) ku PSII, který způsobuje větší plastochinonový *pool* oproti wt, zvýšení cyklického transportu elektronů a rychlejší indukci nefotochemického zhášení (Allahverdiyeva et al., 2009). Tylakoidní membrány izolované z mutantů *psbo1* vykazují nižší produkci kyslíku (v porovnání s tylakoidními membránami z wt, vztaženo na množství chlorofylu; Lundin et al., 2007a). Zároveň se však produkce kyslíku izolovanými superkomplexy PSII-LHCII v případě wt a mutantu *psbo1* za testovaných podmínek významně nelišila (Lundin et al., 2007a). Výsledky z naší laboratoře ukazují, že při dlouhodobé velmi silné ozáření se mutanti *psbo1* fenotypově téměř neliší od wt (Duchoslav, nepublikováno).

6.4.2. Mutant *psbo2*

Informace ohledně fenotypu mutantů *psbo2* se v literatuře liší. Lundin et al. (2007a) uvádí při hydroponické kultivaci *psbo2* mutantů (obr 2.5) pomalejší růst, vyšší obsah chlorofylu v listech, větší množství PSII, vyšší náchylnost k nadměrné ozáření a zastavení degradace proteinu D1 při nadměrné ozáření. Podle následné publikace (Allahverdiyeva et al. 2009, na níž se podílel i Lundin s kolegy) se však *psbo2* mutant od wt vzhledem, vzrůstem ani různými sledovanými parametry PSII nijak neliší. V publikaci pouze dochází k závěru, že přítomnost izoformy PsbO2 je při nadměrných světelných podmínkách výhodná pro opravu poškozeného komplexu PSII, ač to nedokládají statisticky významnými výsledky. Suorsa et al. (2016) pro mutantu *psbo2* uvádí drobné změny ve fosforylaci PSII a LHCII a v množství některých proteinů (snížené množství PsbP a mírně zvýšené množství fosfatázy TAP38/PPH1). Mutant *psbo2* se v porovnání s wt neliší v naprosté většině sledovaných parametrů. Neliší se v rychlosti růstu, obsahu chlorofylu *a* ani *b*, v množství PSI a cyt *b6f* a množství většiny proteinů PSII (detailní výčet v Suorsa et al., 2016). Obdobné jsou i výsledky z naší laboratoře, kdy se mutant *psbo2* za různých testovaných podmínek, včetně nadměrné ozáření, ve většině případů neliší od wt. Předběžné výsledky pouze ukazují, že projev drobných fenotypových změn může být závislý na vlnové délce světla (Duchoslav, nepublikováno).



Obr. 2.5: Fenotyp mutantů *psbO* v porovnání s wt při pěstování hydroponicky v optimálních světelných podmínkách (120 umol fotonů/m²/s; převzato z Lundin et al., 2007a) *pozn.:* tento fenotyp *psbo2* nebyl v žádné jiné práci popsán.

6.4.3. Snížení celkového množství PsbO

Yi et al., (2005) ukazují, že transgenní rostliny *A. thaliana* s celkově nízkou expresí PsbO nemohou růst fotoautotrofně. Při pěstování těchto rostlin *in vitro* s přidáním sacharózy však rostliny rostou a jsou zelené. Snížení exprese PsbO vede také ke snížení celkového množství ostatních komponent komplexu PSII (a popisují taktéž snížení množství proteinu PsaB, který je součástí fotosystému I) zatímco světlosběrné antény LHCI zůstávají neovlivněny. Dwyer et al. (2012) potvrzují, že snížení hladiny obou izoform PsbO pomocí RNA interference způsobuje mnoho změn. Rostliny exprimující méně než 50% celkové hladiny PsbO rostou v porovnání s wt pomaleji, mají nižší obsah chlorofylu na jednotku listové plochy a snížený kvantový výtěžek (QY, quantum yield). Tyto rostliny se od wt naopak neliší v obsahu cytochromu b6f, ATP syntázy a Rubisco. Při saturační ozáření se také neliší v množství vyvíjeného kyslíku (Dwyer et al., 2012). V jejich studii měla RNA interference větší efekt na izoformu PsbO1, než na PsbO2.

6.4.4. Kompenzace snížené hladiny PsbO

Ačkoli je u mutantů ztráta jedné izoformy částečně kompenzována navýšením exprese druhé izoformy (Lundin et al., 2007b; Murakami et al., 2005; Suorsa et al., 2016), je celkové množství PsbO v *psbo1* oproti wt snížené; Lundin et al., (2007b) uvádí snížení na 75 %, Suorsa

et al., (2016) uvádí dokonce snížení na 17 %. Murakami et al. (2005) uvádí snížení na 40 % u mladých rostlin a 70 % u dospělých rostlin. Pro mutanta *psbo2* jsou uváděné hodnoty celkové hladiny PsbO ve srovnání s wt velmi rozdílné - Suorsa et al. (2016) uvádí 47 %, Lundin et al. (2007a) pak uvádí 125 %.

6.4.5. Problémy s dostupnými výsledky

Výsledky dostupných studií charakterizujících mutanty *psbo1* a *psbo2* je z mnoha důvodů komplikované interpretovat, a právě proto není funkční rozdíl mezi izoformami PsbO1 a PsbO2 stále uspokojivě objasněn. Největším problémem je nejasnost toho, které fenotypové projevy jsou skutečně spojeny s nepřítomností jedné z izoform, a které jsou způsobené rozdílnou celkovou hladinou PsbO v rostlinách mutantních v jednotlivých izoformách. Druhý problém souvisí s existujícími mutanty, na kterých bylo mnoho prací provedeno (seznam existujících mutantů – tab 1.). Analýzy T-DNA inzerčních mutantů v naší laboratoři (Duchoslav & Fischer, v přípravě) ukázaly, že absence izoformy PsbO1 u *psbo1* mutanta (SALK 093396) není absolutní, a za některých podmínek se může tvořit a kumulovat funkční protein (T-DNA inzerce je v nekódující oblasti genu viz tab. 1). Neexistuje tak práce, jejíž výsledky by pocházely z nezpochybnitelných knock-out mutantních linií (přestože si to autoři při zpracovávání výsledků nepřipouštěli) a interpretace jejich výsledků může být tímto faktem poměrně významně zatížena. K lepší interpretaci výsledků by posloužilo získání mutantních linií, které vůbec nemají celistvý gen pro danou izoformu (např. vytvořením delece pomocí metody CRISPR-Cas9) a zároveň exprimují izoformu druhou, a to v takovém množství, které se rovná celkové hladině PsbO ve wt. Tyto linie by umožnily spolehlivější rozlišení mezi fenotypovými projevy způsobenými absencí jedné izoformy a fenotypovými projevy souvisejícími se změněným celkovým množstvím PsbO v rostlině.

6.4.6. Přehled popsaných linií *A. thaliana*

Tabulka 2.1: Přehled popsaných linií *A. thaliana* se sníženou či vyřazenou expresí izoforem *psbO*

Autoři	Ekotyp	Mutant <i>psbO1</i>	<i>psbO2</i>
Murakami et al. 2002, Murakami et al., 2005	<i>Arabidopsis thaliana</i> Landsberg <i>erecta</i>	Bodová mutace <i>psbO1</i> , záměna C za T, mutace Gln159 na stop kodón	-
Yi & McChargue et al. 2005	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Col-0</i>	Snížení exprese <i>psbO1</i> i <i>psbO2</i> pomocí RNA interference (indukována jedním konstruktem proti oběma izoformám) a následné vybrání linií s nízkou, střední a vysokou celkovou hladinou PsbO.	
Lundin et al. 2007a, Lundin et al., 2008	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Col-0</i>	T-DNA inzerční mutant <i>psbo1</i> (SALK 093396), inzerce v 5' nepřekládané oblasti	T-DNA inzerční mutant <i>psbo2</i> (SALK 024720), inzerce v koncové části 3. exonu
Dwyer et al. 2012	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Col</i>	Snížení exprese <i>psbO1</i> i <i>psbO2</i> pomocí RNA interference a následné vybrání linií s expresí PsbO mezi 20 - 60 % oproti celkové hladině wt.	
V této práci, 2020	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Col-8</i>	CRISPR-Cas9 mutageneze, 104bp delece v tranzitním peptidu	CRISPR-Cas9 mutageneze, 24bp a 47 bp delece v koncové části kódující sekvence PsbO (2 linie)

7. Materiály a metody

7.1. Modelové organismy a jejich kultivace

7.1.1. *Escherichia coli* a *Agrobacterium tumefaciens*

Při klonování bylo použito bakterií *Escherichia coli* (*E. coli*) kmene DH5a. Pro transformaci *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) bylo použito bakterií *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) kmene GV3101. Bakterie byly kultivovány na Petriho miskách s 20-30 ml pevného LB média (složení tab 3.2). *E. coli* byly kultivovány po dobu 16-20 h ve 37 °C. *A. tumefaciens* pak po dobu 72 h v 27 °C. Při potřebě izolace plazmidů byly bakterie přeneseny do tekutého LB média, v případě *A. tumefaciens* do YEB média, a po dobu kultivace třepány na třepačce (Elmi, Unimed) rychlostí přibližně 250 ot/min. Do médií byla přidána příslušná selekční antibiotika podle konkrétních rezistencí obsažených plazmidů (tabulka koncentrací antibiotik 3.1). LB plotny s bakteriemi byly po dokončení kultivace skladovány v lednici. Práce s bakteriemi byla prováděna sterilně v laminárním flowboxu (LaminAir, Heraeus Instruments). Z některých kolonií byly pomocí 50% glycerolu vyrobeny tzv. konzervy (800 µl suspenze bakterií, 200 µl 50% glycerolu), které byly zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v -80 °C.

Tab. 3.1: Koncentrace používaných antibiotik

Název	Konc. zás. roztoku	Konc. v médiu	Příprava
Kanamycin	50 mg/ml	50 mg/l	V dest. vodě, sterilizace filtrací, skladování v lednici
Rifampicin	10 mg/ml	100 mg/l	V metanolu, není nutná sterilizace, skladování v -20°C
Gentamycin	50 mg/ml	50 mg/l	V dest. vodě, sterilizace filtrací, skladování v -20°C
Tetracyklin	5 mg/ml	5 mg/l	V 96% EtOH, skladování v -20°C, ve tmě, chelátován Mg ²⁺

Hygromycin	25 mg/ml	25 mg/l	V dest. vodě, sterilizace filtrací, skladování v -20°C
Klaforan	100 mg/ml	100 mg/l	V dest. vodě, skladování v -20°C

Tab. 3.2: Složení bakteriálních kultivačních médií

LB (1000 ml)	10 g pepton + 5 g yeast extract + 10 g NaCl + 17,5 g agar; doplnit dH ₂ O do 1000 ml *do tekutého média se nepřidá agar
YEB kompletní (500 ml)	5 g pepton + 0,5 g yeast extract + 2,5 g sacharóza; doplnit dH ₂ O do 450 ml + 50 ml MgSO ₄
MgSO ₄ (200 ml)	1 g MgSO ₄ , doplnit dH ₂ O do 200 ml
Soli recovery (100 ml)	0,58 g NaCl + 0,19 g KCl + 2,03 g MgCl ₂ ·6H ₂ O; doplnit dH ₂ O do 100 ml
YEB recovery (1 ml)	0,9 ml YEB kompletní + 0,1 ml soli recovery
SOC (50 ml)	1 g pepton + 0,25 g yeast extract + 0,18 g glukóza + 0,03 g NaCl + 0,009 g KCl + 0,1 g MgCl ₂ ·6H ₂ O + 0,12 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; doplnit dH ₂ O do 50 ml

Všechna média kromě SOC byla sterilizována klávováním (SterileMax™, Harvey; 121 °C, 20 min). SOC medium bylo sterilizováno filtrováním (0,22μm, Nalgene).

7.1.2. *Arabidopsis thaliana*

Ex vitro kultivace *A. thaliana* (Col-8, N60000) probíhala na rašelinových peletách o průměru 41 mm (Jiffy Products Internationals AS) na krátkém (8 h světlo, 16 h tma) či dlouhém (16 h světlo, 8 h tma) dni podle konkrétní potřeby experimentů, při intenzitě osvětlení 110 μmol/m²/s, teplotě 23 °C ve dne a 18 °C v noci a vlhkosti 60 %. Mutanti v genu *psbO1* byly zpravidla pěstováni na krátkém dni (na dlouhém dni sice dříve kvetou, ale tvoří velmi málo biomasy). Automatická závlhka probíhala jednou za 4 dny vodou s hnojivem (0,3 g/l Kristalon

Start AGRO CS - krátký den, 0,3 g/l Kristalon Plod a květ - dlouhý den). Podle potřeby byly rostliny ošetřovány proti škůdcům. Semínka byla před vysetím vždy namočena a alespoň dva dny stratifikována v chladu (4 °C). Po sklizení byla semena vždy alespoň na dva dny uložena do -20 °C, aby se omezil přenos případných škůdců do další generace.

In vitro kultivace probíhala na čtvercových Petriho miskách obsahujících 50 - 60 ml ½ MS media (složení tab. 3.3) s příslušnými antibiotiky v podmínkách dlouhého dne. Semena vysévaná *in vitro* byla buď sterilizována v uzavřené nádobě plynným chlorem (vytvořený smícháním 50 ml Sava (Unilever) a 1,5 ml HCl) po dobu 3,5 hodin nebo promýváním 96% ethanolem po dobu jedné minuty, 50% Savem po dobu 10 minut a následným promytím dH₂O (4 - 5 krát). Způsob sterilizace vždy závisel na počtu sterilizovaných semen (větší množství semen bylo sterilizováno plynným chlorem). Semena byla vysévána sterilně v laminárním flowboxu (LaminAir, Heraeus Instruments) buď “na mokro”- tedy po jednom, s přidanou dH₂O a pomocí mikropipety, nebo “na sucho”. Výsev “na sucho” byl používán při selekci transformovaných rostlin a byl prováděn poklepem na bok mikrozkuřavky. Po vysetí byly plotny umístěny na 72 hodin do 4 °C ke stratifikaci. Přibližně po deseti dnech kultivace v kultivační místnosti byly rostliny buď přesazeny do rašelinových pelet a dopěstovány *ex vitro*, nebo byly finálně vyhodnocovány v rámci příslušných experimentů.

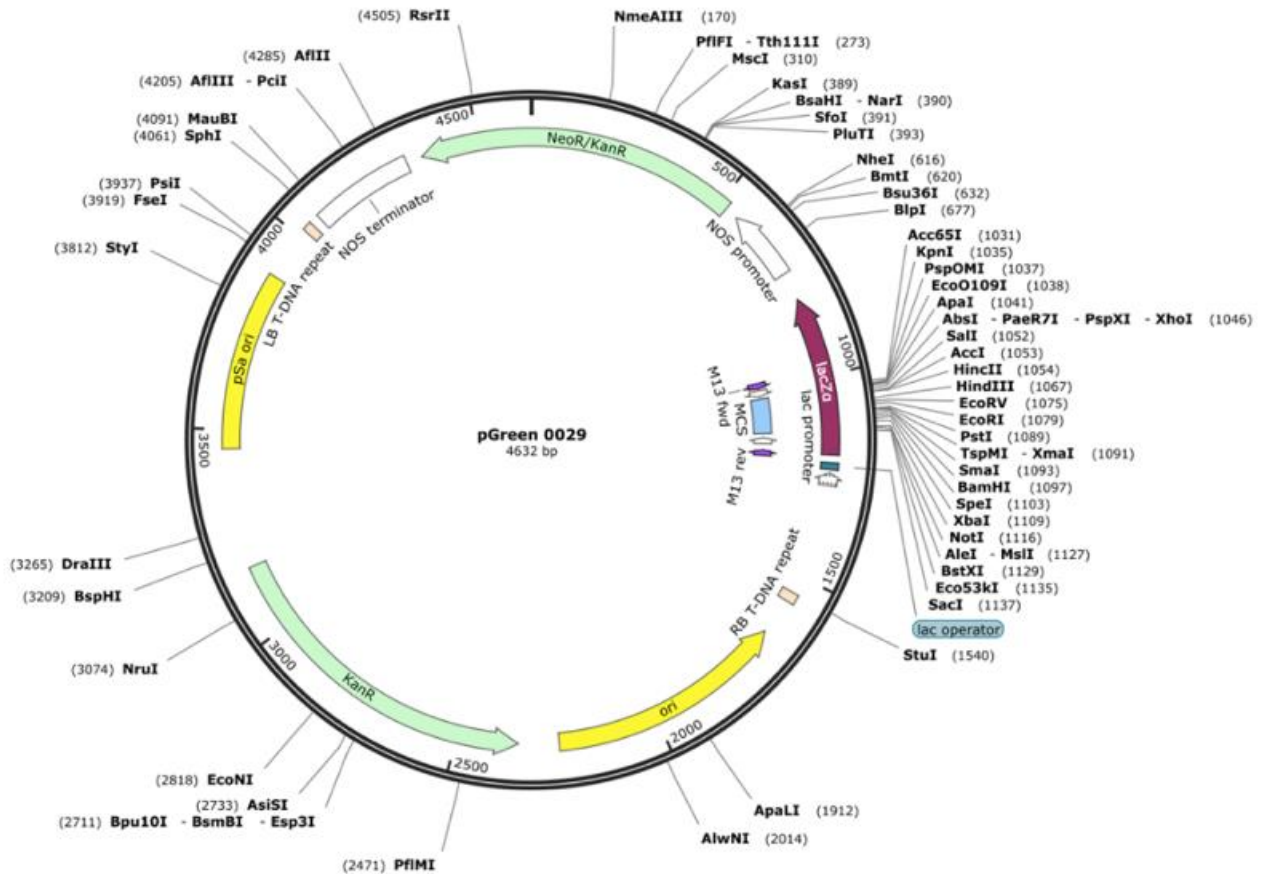
Tab. 3.3: Složení ½ MS media pro kultivaci *A. thaliana in vitro*

½ MS (1000 ml)	2,16 g MS solí (Sigma) + 10 g sacharóza (Penta) + 8 g agar (Penta); pH 5,8 (úprava pH pomocí 1M KOH)
----------------	--

7.2. Plazmidy

7.2.1. pGreen, pSoup

Plazmid pGreen (obr 3.1) je používán jako vektor při transformaci rostlin *A. tumefaciens*. Plazmid pGreen 0029 obsahuje gen pro kanamycinovou rezistenci na selekci v bakteriích a gen pro hygromycinovou pro selekci transformovaných rostlin. Aby se pGreen mohl replikovat v *A. tumefaciens*, potřebuje pomocný plazmid pSoup, který nese rezistenci na tetracyklin. pGreen obsahuje levou a pravou hraniční oblast, mezi kterou jsou vkládány příslušné transgeny. Plazmid pGreen byl použit pro vytvoření konstruktů ke komplementacím *psbo1cr* a *psbo2cr* a k vytvoření linií *psbo1isoL* a *psbo2isoL*.



Obr 3.1: Mapa plazmidů pGreen 0029

7.2.2. pCBC-DT1T2, pHSE401

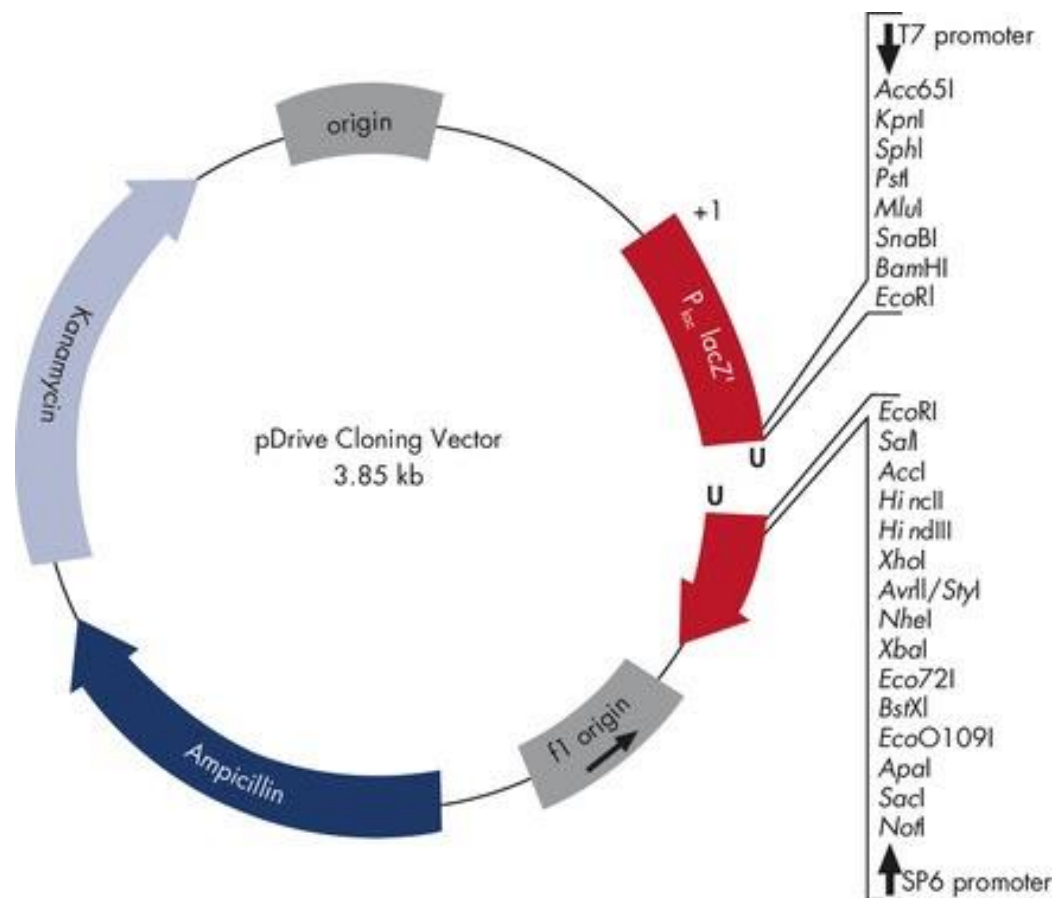
pCBC-DT1T2 (obr. 3.2) je syntetický vektorový plazmid, s jehož pomocí byl pomocí navržených primerů obsahující sekvence obou gRNA a scaffold sekvencí nasedajících na místa v pomocném plazmidu připraven fragment obsahující restrikční místo BsaI spolu se dvěma gRNA. Díky restrikčním místům BsaI může být produkt amplifikace v následné Golden Gate ligaci štěpen a následně zanesen do cílového vektoru pHSE401 (postup + vektory převzaty z Xing et al., 2014).

pHSE401 (obr 3.3) je syntetický vektorový plazmid nesoucí sekvenci pro *Cas9* pod promotorem 35S, gen pro hygromycinovou rezistenci pro selekci rostlin a gen pro kanamycinovou rezistenci pro selekci v bakteriích. Do tohoto vektoru byl pomocí Golden Gate ligace vložen fragment nesoucí dvě gRNA amplifikované v předchozím kroku.

7.2.3. pDrive

pDrive (obr. 3.4) plasmid je malý krátký vektorový plasmid (3851 bp) dodávaný v lineární formě s přesahem jednoho U na obou 3' koncích, které slouží k navázání na přesahující A na 5' koncích PCR produktů vytvořených specifickými polymerázami. pDrive obsahuje několik unikátních restrikčních sekvencí, které umožňují rychlé a jednoduché zaklonování rekombinantních genů. Vektor nese rezistenci na ampicilin a kanamycin.

V plasmidu pDrive (obr. 3.4) byly uloženy geny *psbO1*, *psbO2*, sekvence pro jejich promotory a také obě izoformy *psbO* z bramboru. Tyto konstrukty vytvořil v rámci své práce Václav Svoboda.



Obr. 3.4: Mapa vektorového plasmidu pDrive (Qiagen)

7.3. Práce s DNA

7.3.1. Izolace plazmidů

K izolaci plazmidů byl použit High Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid). Po izolaci plazmidů byla vždy změřena koncentrace DNA pomocí mikroobjemového spektrofotometru (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Přítomnost daného plazmidu byla u konstruktů určených ke komplementacím ověřena restričním štěpením (kapitola 3.3.3). Z důvodu složitějšího klonování plazmidů pro CRISPR-Cas9 mutagenезi bylo správné sestavení těchto konstruktů ověřeno sekvenací (kapitola 3.3.5.).

7.3.2. Izolace rostlinné DNA

Rostlinná DNA byla izolována z 1-2 malých lístků huseníčku. Spolu s 400 μ l extrakčního pufru (složení tab. 3.4), 400 μ l chloroformu a dvěma ocelovými kuličkami se listy zhomogenizují v mlýnku (Retsch, typ MM301) po dobu 5 minut rychlostí 25 kmitů za sekundu. Směs se poté zcentrifuguje po dobu 3 minut rychlostí 13 000 RPM (centrifuga Biofuge 13 Heraeus; $r = 7,3$ cm). Do nové mikrozkušavky bylo odebráno 330 μ l horní (vodné) fáze a přidáno 330 μ l izopropanolu, dobře promícháno a po dvou minutách stání byl obsah znovu centrifugován po dobu 5 minut. Byla odsána veškerá tekutina a mikrozkušavky se nechaly na vzduchu vysušit. Sediment DNA usazený na dně mikrozkušavky byl rozpuštěn v 100 μ l 2mM TRIS o pH 8,5.

Tab 3.4.: Složení extrakčního pufru pro izolaci DNA

Látka	Tris-HCl (pH 7,5)	NaCl	EDTA	SDS
Koncentrace	200 mM	250 mM	25 mM	0,5 %

7.3.3. Restriční štěpení

Pro restriční štěpení byly používány restriční enzymy (NEB). Použité množství jednotlivých enzymů je závislé na počtu restričních míst ve štěpeném plazmidu a na jeho množství. Dále je závislé na aktivitě enzymu, která se určuje podle množství enzymu potřebném k úplnému naštěpení fága lambda. Pokyny ke konkrétním enzymům jsou dostupné na webových stránkách firmy NEB. Množství DNA vkládané do reakce záleželo na potřebném

množství výsledných fragmentů a pohybovalo se od 150 - 800 ng. Naštěpené fragmenty byly rozděleny pomocí agarózové elektroforézy (kapitola 3.3.7.). Příklad restriční směsi je uveden v tabulce 3.5. Tato reakce běžela 120 min ve 37 °C.

Tab 3.5: Ukázka reakční směsi pro restrikci

DNA	pufř Cut Smart	restriktáza XmaI	dH ₂ O	Celkem
5 µl (720ng)	3 µl	0,5 µl	21,5 µl	30 µl

7.3.4. Ligace

3.3.4.1. „Klasická“ ligace

“Klasická” ligace byla použita při klonování jednotlivých složek konstruktů do plasmidu pGreen. V ligační směsi byly použity T4 ligáza, T4 ligační pufř, izolovaný fragment určený k ligaci a rozštěpený vektorový plasmid pGreen (stechiometrický poměr vektoru a fragmentu byl 1:7; schéma ligace viz kap. o přípravě konstruktů) a dH₂O. Příklad ligační směsi je uveden v tabulce 3.6. Tato ligační reakce běžela 3 h v 15 °C s následnou inaktivací ligázy po dobu 15 min v 65 °C.

Tab. 3.6.: Příklad ligační směsi

Fragment (3 ng/µl)	Vektor (8 ng/µl)	T4 ligáza	T4 pufř	dH ₂ O	Celkový objem
1,8 µl	0,6 µl	0,2 µl	1 µl	6,4 µl	10 µl

3.3.4.2. Golden Gate ligace

Při Golden Gate ligaci dochází v rámci jedné reakce ke štěpení ligovaného fragmentu restričním enzymem a jeho následné ligaci do cílového vektoru. Tato reakce byla použita k zaklonování dvou gRNA do vektoru pHSE401 (kap. X). Použitá ligační směs je uvedena v tabulce 3.7. Reakce běžela 5 h v 37 °C, 5 min v 50 °C a 10 min v 80 °C.

Tab. 3.7: Ligační směs Golden Gate ligace pro klonování gRNA do vektoru pHSE401

PCR fragment (100 ng/μl)	pHSE401 templátový vektor (100 ng/μl)	10x T4 pufr	10x BSA pufr	enzym BsaI	T4 DNA ligáza	dH ₂ O	celkový objem
2 μl	2 μl	1,5 μl	1,5 μl	1 μl	1 μl	6 μl	15 μl

3.3.4.3. Odsolení ligační směsi

Po ligaci je nutné provést odsolení ligační směsi. Odsolení probíhá v odsolovací kolonce (výroba kolonky tab. 8.8) ve 4 °C po dobu 90 minut.

Tab. 8.8.: Složení a výroba odsolovací kolonky

agaróza	0,500 g	Postup: Roztok se rozvaří, rozpipetuje do 1,5ml mikrozkušavek a nechá se ztuhnout v chladu spolu s pipetovací špičkou, která vytvoří jamku.
glukóza	0,900 g	
dH ₂ O	doplnit do celkové hmotnosti 50g	

7.3.5. Sekvenace

Sekvenace DNA byla prováděna ze vzorků PCR reakční směsi po provedení PCR. Přítomnost DNA v těchto vzorcích byla ověřena vizualizací části směsi na elektroforetickém gelu. Zbylá směs byla přečištěna od polymerázy a následně připravena k sekvenaci podle požadavků servisní sekvenační laboratoře Přírodovědecké fakulty UK (tab. 3.9).

Tab. 3.9: Postup přípravy vzorků k sekvenaci

Přečištění PCR směsi	5 μl PCR směsi + 0,66 μl Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) + 0,12 μl Exonuclease I + 4,22 μl dH ₂ O; na 30 minut do 37 °C, následně na 10 minut do 80 °C
Vzorek na sekvenaci	4 μl přečištěné směsi + 0,5 μl primer + 3,5 μl miliQ dH ₂ O

7.3.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Směsi pro PCR reakce byly připravovány na ledové lázni, mikrozkušavky byly chlazeny na vymrazovacím bločku. PCR směs vždy obsahovala 1 µl templátové DNA (izolace DNA viz kapitola) nebo malé množství bakterií setřené párátkem, DreamTaq reakční pufr (Thermo Fischer Scientific), DreamTaq polymerázu (5u/µl; Thermo Fischer Scientific), miliQ dH₂O, nukleotidy (10mM) a primery (10µM). Později v práci byl používán MasterMix (Thermo Fischer Scientific), který obsahoval reakční pufr, polymerázu a nukleotidy v jednom roztoku. V takové reakci tvořil MasterMix vždy polovinu objemu. Při přípravě konstruktů pro CRISPR-Cas9 mutagenizi byly při amplifikaci částí vektorů použity Q5 reakční pufr (NEB), Q5 polymeráza (NEB) a Q5 high GC Enhancer (NEB). Směsi byly vždy připraveny jako premix a následně rozpipetovány k jednotlivým vzorkům. Celkový objem PCR směsí byl 10 µl/vzorek, u konstruktů pro CRISPR-Cas9 mutagenizi byl objem 20 µl/vzorek.

Počáteční denaturace při 94 °C probíhala obvykle 3 minuty. Počáteční denaturace v každém dalším cyklu trvá 20-30 s, primery nasedají v závislosti na reakci 20 - 45 s při teplotě přibližně o 5 °C nižší než je jejich teplota tání. Rychlost polymerace DreamTaq i Q5 polymerázy je 1000 bází/min a probíhá při 72 °C. Konkrétní PCR program se tedy vždy lišil podle konkrétní reakce podle použitých primerů a délky výsledných produktů. PCR byla prováděna v teplotním cycleru (T100TM Thermal Cycler, Bio Rad nebo PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research) na zpravidla 30-35 cyklů.

3.3.6.1. Seznam používaných primerů

Tab 3.10: Seznam používaných primerů. Červeně - adaptorové sekvence; modře - sekvence pro restriční enzym BsaI; zeleně - sekvence gRNA

Název primeru	Sekvence primeru	Použití primeru
PsbOI_genot_CRISPR_Fw	GCT CCT TCT CGC GGA AGT TC	Detekce delece v genu <i>psbO1</i> při CRISPR- <i>Cas9</i> mutagenizi.
PsbOI_genot_CRISPR_Rv	ATT GGT TTA GGT GTT CTC AAG TGC	
PsbOII_genot_CRISPR_Fw	GGT TTT TCT TCA ATC ACT TAG TTC AAT CTC AG	Detekce delece v genu <i>psbO2</i> při

PsbOII_genot_CRISPR_Rv	TGT TCT TGA CGT TTT CCT TGG GAT AGC	CRISPR- <i>Cas9</i> mutagenezi.	
Cas-9 F	CTC GAC TCA CGG ATG AAC ACT AA	Detekce kazety <i>Cas9</i> v genomu	
Cas-P R	AAAA TCT GCT CAA TGA TCT CGT CGA	mutantů <i>psb1cr</i> a <i>psb2cr</i> .	
PsbO1_prom_At_F_SacI	GAG CTC AGG TCT GCG ATT CAC ACG AAG	Ověření správné orientace ligovaných fragmentů při tvorbě konstruktů.	
PsbO2_prom_At_F_SacI	GAG CTC GGT TCT CTG ATC CTG CTA CTG		
PsbO1_At_R_SalI	GTC GAC CCG TAA GGT TAA AAT CGG TAC TG		
PsbO2_At_R_SalI	GTC GAC GAA TCA CTC AAT CTG ACC GTA CC		
PsbO1_St_R_SalI	GT CGA CGC TTG TCC AAA TTG GGT CAC AG		
PsbO2_St_R_SalI	GT CGA CAG AGT CTA GGC AAT ATA GAT TGC		
DT1_BsF_AT5G66570_PsbOI	ATA TAT GGT CTC GAT TGA GCC CAA AAG ATT TGC CGA GTT		Namnožení fragmentů při tvorbě konstruktů pro CRISPR- <i>Cas9</i> mutagenezi + ověření přítomnosti plazmidů v bakteriích.
DT1_F0 AT5G66570_PsbOI	TGA GCC CAA AAG ATT TGC CGA GTT TTA GAG CTA GAA ATA GC		
DT2_R0 AT5G66570_PsbOI	AAC GTA AAT GCT CCG ACG CTG TCA ATC TCT TAG TCG ACT CTA C		
DT2_BsR AT5G66570_PsbOI	ATT ATT GGT CTC GAA ACG TAA ATG CTC CGA CGC TGT CAA		

DT1_BsF_AT3G50820_PsbOII	ATT ATT GGT CTC GAT TGG GAA ACC CGA AAG CTT CAG GTT	Namnožení fragmentů při tvorbě konstruktů pro CRISPR- <i>Cas9</i> mutagenezi + ověření přítomnosti plazmidů v bakteriích.
DT1_F0_AT3G50820_PsbOII	TGG GAA ACC CGA AAG CTT CAG GTT TTA GAG CTA GAA ATA GC	
DT2_R0_AT3G50820_PsbOII	AAC CCG GCA GGC AAA GCC ACT GCA ATC TCT TAG TCG ACT CTA C	
DT2_BsR_AT3G50820_PsbOII	ATT ATT GGT CTC GAA ACC CGG CAG GCA AAG CCA CTG CAA	
U6-29p-R	AGC CCT CTT CTT TCG ATC CAT CAA C	

7.3.7. Agarózová gelová elektroforéza fragmentů DNA

Při elektroforéze bylo používáno 1,2% agarózových gelů. Na 100 ml tohoto gelu případně 1,2 g agaru, 100 ml TAE roztoku (zásobní roztok 50x TAE: 242 g Tris + 57,1 ml ledové kys. octové + 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0) a 10 µl GelRed (Biotium; fluorescenční barva vážící se na DNA). Při genotypování rostlin na delece při CRISPR-Cas9 mutagenezi bylo použito hustšího gelu (2% agaróza) z důvodu potřeby přesnějšího rozlišení rozdílů mezi krátkými úseky DNA. Na 100 ml 0,5x TAE pak připadlo 2 g agarózy a 10 µl GelRed. Pro zobrazení obarvené DNA pod UV zářením byl používán přístroj G-Box (Syngene).

7.3.8. Izolace DNA z elektroforetického gelu

Pro izolaci DNA z elektroforetického gelu byl nejprve pod UV lampou vyříznut daný fragment. DNA byla z gelu následně izolována pomocí Monarch DNA Gel Extraction kitu (NEB).

7.4. Práce s proteiny

7.4.1. Izolace proteinů

Izolace proteinů proběhla podle Martínez-García et al. (1999) s úpravami. Ke vzorku získanému lyofilizací 100 mg listů bylo přidáno 100 µl pufru E (složení tab. 3.11) a dvě kovové kuličky. Vzorek byl rozmělněn v kulovém mlýnku Retsch MM301 (5 min, 25 Hz). Poté bylo přidáno 900 µl pufru E a vzorek byl opět stejným způsobem rozmělněn a následně centrifugován (10 min, 18 000 g). Supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek. Pro účel vypočítání koncentrace izolovaných vzorků bylo odebráno 2 krát 5 µl, které byly doplněny dH₂O do 25 µl. Ke zbytku supernatantu byl přidán pufr Z (tab. 3.11) v množství 1/10 objemu vzorku. Koncentrace proteinů byla měřena pomocí kitu DC Protein Assay (Bio-Rad). Pro standardní křivku byl použit protein BSA.

Tab 3.11: Složení pufrů pro izolaci proteinů

Pufr E	0,5 ml 2M Tris-HCl pH 6,8; 0,8 ml 10% SDS; 1,6 ml 50% glycerol; 76,04 mg Na ₂ S ₂ O ₅ ; doplnit dH ₂ O do 8 ml
Pufr Z	62,5 µl 2M Tris-HCl pH 6,8; 120 mg SDS; 200 µl 50% glycerol; 220 µl 100% merkaptoetanol; 10 µl 0,1% bromofenolová modř; doplnit dH ₂ O do 1 ml

7.4.2. Příprava gelu pro SDS-PAGE

Jednotlivé složky pro přípravu dělicího gelu (16 %, tab 3.12) byly smíchány a tato směs byla nalita do pečlivě sestavené vertikální vaničky (GE Healthcare Life Sciences; tloušťka 0,75 mm; délka 7 cm). Na směs byl nalit 1 ml dH₂O pro omezení přístupu vzduchu a směs byla ponechána 30 minut na zatuhnutí. Poté byla z gelu odstraněna vrstva vody a horní vrstva byla omyta vodou. Dále byly smíchány složky pro zaostřovací gel (tab 3.12), který byl nalit na zatuhlý dělicí gel. Do této vrstvy byl umístěn hřeben na vytvoření jamek a ponechán 20 minut na zatuhnutí. Pokud bylo nutné gely skladovat, byly zabaleny do mikrotenové folie a ponechány v lednici při 4 °C.

Tab. 3.12.: Složení elektroforetického gelu pro SDS-PAGE elektroforézu

Dělicí gel	6,4 ml 30% akrylamid; 0,5M Tris (pH 6,8); 2,45 ml H ₂ O; 4,32 g močoviny; 10% SDS; 15 µl 40% amonumpersulfát; 4 µl TEMED
Zaostřovací gel	700 µl 30% akrylamid; 1250 µl 0,5M Tris (pH 6,8), 3 ml H ₂ O; 50 µl 10% SDS; 10 µl 40% amonumpersulfát; 2,5 µl TEMED

7.4.3. SDS-PAGE

K rozdělení proteinů byla použita vertikální elektroforéza zespoda i zdola zalitá elektroforetickým pufrem (složení tab. 3.12), jímž byly pomocí 1ml pipety promyty jednotlivé jamky. Pro putování vzorků zaostřovacím gelem bylo použito napětí 50 V, po přechodu vzorků do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 150 V. Elektroforéza typicky běžela 2 - 3 hodiny.

Tab 3.12: Složení elektroforetického pufru pro SDS-PAGE elektroforézu

Elektroforetický pufr	25 mM Tris, 250 mM glycin, 0,1 % SDS
------------------------------	--------------------------------------

7.4.4. Imunoblotování (Western blot)

Do blotátoru byly vloženy tři tlusté filtrační papíry ve velikosti gelu, které byly namočené do transferového pufru (složení tab 3.13). Na ně byla položena nitrocelulósová membrána, na ni gel s proteiny a na něj další tři filtrační papíry nasáklé v transferovém pufru. K přebílení byl použit zdroj o nastavení 300 V, 300 mA, 10 W. Délka blotování se odvíjela od počtu membrán (zpravidla 1 h na jednu membránu). Po skončení byla membrána skladována usušená.

Tab. 3.13: Složení transferového pufru

Transferový pufr	14,4 g glycinu; 12,1 g Tris; 200 ml MetOH; doplnit dH ₂ O do 1 l
-------------------------	---

7.4.5. Imunodetekce

Membrána byla blokována v TBS pufru (složení tab 3.14) se 4% mlékem po dobu 1 h. Poté byla po dobu 1 h inkubována s primární protilátkou proti konkrétní izoformě (rozpuštěná

v TBS pufru s 0,5% mlékem, ředění 1:2000). Byly použity protilátky od firmy Agrisera (Vännäs, Švédsko), konkrétně anti-PsbO1 (AS14 2824) a anti-PsbO2 (AS14 2825). Následně byla 3x 10 min promyta pufrům TBS-T (TBS + 0,1% TWEEN) a byla přidána sekundární protilátka (4 ml TBS pufr s 0,5 % mlékem + 0,8 µl protilátky Goat anti-Rabbit IgG, Enzo Life Sciences) a inkubována 1 h. Následovalo promytí TBS-T pufrům (3x 10 min) a vyvinutí pomocí ECL systému.

Tab 3.14: Složení TBS pufru

TBS pufr	20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,4
-----------------	-------------------------------------

7.4.6. ECL systém

Podle návodu byl smíchán substrát na aktivaci luminescence proteinů na membráně (Pierce ECL Western Blotting) a do něj byla namočená membrána s proteiny. Takto aktivovaná membrána byla vložena do průhledné folie a na ní byl umístěn film, který byl vyvolán po různých dlouhých expozicích vždy podle potřeby (zpravidla 10 s, 30 s, 2 min, 10 min a 30 min).

7.5. Transformace modelových organismů

7.5.1. Příprava elektrokompetentních bakterií *E. coli*

E. coli (kmen DH5α) byly rozočkovány na tuhé plotny s LB médiem a ve 37 °C byly kultivovány do druhého dne. Samostatné kolonie byly zaočkovány do 50 ml tekutého LB média ve sterilních erlenkách a 16-20 h kultivovány na třepačce (160 ot./min) ve 37 °C. Třetí den bylo 10 ml suspenze zaočkováno do větších Erlenmeyerových baněk s 400 ml tekutého LB média a byla změřena optická denzita na spektrofotometru, která by měla dosahovat kolem 0,08. Bakterie byly dále kultivovány, dokud nedosáhly hodnoty optické denzity 0,4 při 600 nm. Sklizení takto narostlých bakterií probíhalo při nízké teplotě (na ledu, chlazená centrifuga atd.). Bakteriální roztok se centrifuguje po dobu 10 minut (4000 RPM; 4 °C; r = 7,3 cm). Supernatant byl slit a bakterie resuspendovány v destilované vodě. Bakteriální roztok byl znovu stejným způsobem centrifugován a sediment následně resuspendován ve sterilním vychlazeném 10% glycerolu. Tento roztok byl opět zcentrifugován a velmi pečlivě pomocí sterilní špičky napojené na vývěvu byl odsán supernatant. Bakterie byly finálně resuspendovány v 800 µl sterilního vychlazeného GYT média (složení tab 3.15) a byla zkontrolována optická denzita suspenze (0,4). Suspenze byla rozpipetována po 40 µl do sterilních mikrozkušavek a zamražena

v kapalném dusíku. Takto připravené elektrokompetentní bakterie byly dále skladovány v -80 °C.

Tab. 3.15: Složení GYT media

glycerol (100%)	yeast extract	pepton	dH ₂ O	sterilizace
1 ml	0,0125 g	0,25 g	doplnit do 10 ml	přes filtr (0,22 µm, Nalgene)

7.5.2. Příprava elektrokompetentních bakterií *A. tumefaciens*

Bakterie *A. tumefaciens* (kmen GV3101) byly rozčárkovány na pevné LB médium obsahující rifampicin (25 mg/l), gentamycin (40 mg/l) a tetracyklin 2 mg/l) a kultivovány tři dny při 28 °C. Třetí den byly 2 samostatné kolonie zaočkovány do 10 ml YEB media s antibiotiky a kultivovány po dobu 16-20 h za stálého třepání (160 ot/min) při 28 °C. Následující den byly bakteriální suspenze přeneseny do 200 ml YEB media s antibiotiky a kultivovány, dokud nedosáhly hodnotu optické denzity 0,6 při vlnové délce 600 nm. Suspenze byla zchlazena na ledové lázni a přenesena do zkumavek, aby mohla být zcentrifugována (4000 RPM; 10 minut; 4 °C; r = 7,3 cm). Supernatant byl slit, sediment resuspendován ve sterilní dH₂O a opět stejným způsobem centrifugován. Následně byl sediment resuspendován v 10% glycerolu a opět centrifugován. Pečlivě, sterilní špičkou napojenou na vývěvu, byl odsát supernatant. Sediment byl naposledy resuspendován v 1 ml sterilního 10% glycerolu a rozpipetován po 100 µl do 1,5ml sterilních mikrozkuvek, zamražen v kapalném dusíku a následně skladován v -80 °C.

7.5.3. Transformace bakterií

K elektrokompetentním buňkám rozmrazeným na ledu byl přidán 1 µl plasmidové DNA a do této směsi umístěné v elektroporační kyvetě byl dodán výboj o napětí 2000 V (*A. tumefaciens*) nebo 2500 V (*E. coli*). Ihned po impulsu (elektroporátor Eppendorf) byl přidán 1 ml regeneračního media YEB recovery (*A. tumefaciens*) nebo SOC (*E. coli*), ve kterém byly bakterie při třepání kultivovány - v případě *A. tumefaciens* po dobu 3 h v 28 °C, v případě *E. coli* po dobu 1 h v 37 °C. Následně byly bakterie vysety na agarovou LB plotnu s příslušnými antibiotiky a v případě *E. coli* kultivovány do druhého dne v 37 °C, v případě *A. tumefaciens* po dobu tří dnů v 28 °C. Po této době byly vybrané narostlé kolonie testovány pomocí PCR na přítomnost příslušných plazmidů, které byly následně izolovány a použity k navazujícím experimentům, nebo uloženy do - 80 °C pro pozdější použití.

7.5.4. Transformace *A. thaliana* pomocí metody *floral dip*

K transformaci *A. thaliana* bylo vždy použito metody *floral dip* (podle postupu Clough & Bent, 1998). *A. tumefaciens* nesoucí příslušný plasmid byly první den zaočkovány do 50 ml tekutého LB media s příslušnými antibiotiky a kultivovány do druhého dne (viz kapitola kultivace *A.t*), kdy byla suspenze po dobu 20 minut centrifugována (5 000 RPM, 50ml zkumavky, $r=7,2$ cm, 4 °C). Po odlití supernatantu byl do koupací nádoby připraven roztok narostlých bakterií resuspendovaných v 5% roztoku sacharózy, do které bylo přidáno 50-60 μ l smáčedla (Silwet). Z rostlin, které byly určeny k transformaci (4 - 5 týdnů staré *A. thaliana*), byly ostříhány všechny otevřené květy a šesule, a po dobu cca 5 s se nadzemní části namáčely do připravené suspenze. Po transformaci byly rostliny zabaleny do mikrotenového sáčku (zajistí vysokou vzdušnou vlhkost) a do následujícího dne se umístěny do tmy. Pro vyšší účinnost transformace byl celý postup po týdnu zopakován.

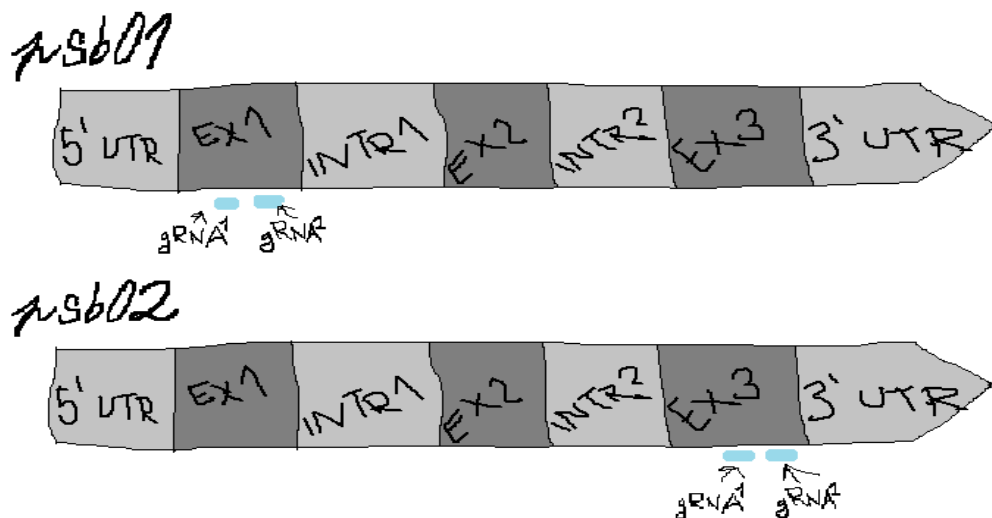
7.6. CRISPR-Cas9 mutageneze *psbO1* a *psbO2*

7.6.1. Příprava konstruktů

Byly sestaveny dva konstrukty pro přípravu knock-out mutantních linií *psbO1cr* a *psbO2cr* pomocí metody CRISPR-Cas9. Každý konstrukt obsahoval dvě gRNA proti příslušné izoformě *psbO* (tab. 3.16; obr. 3.5), gen pro Cas9 pod promotorem 35S a dvě rezistence na antibiotika – na kanamycin pro selekci v bakteriích a na hygromycin pro selekci rostlin. gRNA proti *psbO1* cílí do sekvence kódující tranzitní peptid a jsou umístěny 58 bp od sebe. gRNA proti *psbO2* cílí do koncové části kódující sekvence a jsou umístěny 82 bp od sebe. Všechny gRNA navrhla středoškolská studentka Tereza Müllerová s pomocí doktorské studentky Adély Příbylové.

Tab 3.16: Sekvence použitých gRNA proti příslušným izoformám:

gRNA <i>psbO1</i> (1)	GAG CCC AAA AGA TTT GCC GA
gRNA <i>psbO1</i> (2)	TGT CGC AGC CTC GTA AAT GC
gRNA <i>psbO2</i> (1)	GGG AAA CCC GAA AGC TTC AG
gRNA <i>psbO2</i> (2)	CGT CAC CGA AAC GGA CGG CC



Obr. 3.1.: Znárodnění cílového místa gRNA proti jednotlivým izoformám. EX – exon, INTR – intron.

Pomocí PCR byly amplifikovány úseky *psbO1* a *psbO2*, které byly vybrány jako gRNA. Produkty PCR byly poté izolovány z elektroforetického gelu a následně pomocí Golden Gate ligace vloženy do templátového vektoru pHSE401. Ligovaný produkt byl přenesen do odsolovací kolonky a následně elektroporován do *E. coli*, které byly dále standardním způsobem kultivovány na pevném LB mediu. Celkem 45 z narostlých kolonií bylo pomocí PCR otestováno na přítomnost vložených vektorů a z pěti pozitivně testovaných byly izolovány plazmidy. Koncentrace plazmidů byla změřena na mikroobjemovém spektrofotometru (Nanodrop). Správnost sestavených konstruktů byla ověřena GATC sekvenací (servisní sekvenace v sekvenační laboratoři PřF UK).

7.6.2. Příprava mutantních linií *psbO1cr* a *psbO2cr*

Rostliny *A. thaliana* byly transformovány pomocí *A. tumefaciens* nesoucím příslušným plazmidem proti *psbO1* nebo *psbO2*. Po vysetí sklizených semen na antibiotikovou selekci byly vybrány rezistentní rostliny, které byly dále genotypovány na případné delece. U obou izoform byly vybrány dvě heterozygotní linie, které byly nalezeny v T1 generaci. Linie mutantní v *psbO2* se ve svém fenotypu nijak výrazně nelišily od wt. Mutantní alely byly sekvenovány a u

obou delecí bylo potvrzeno posunutí čtecího rámce a vzniku předčasného stop kodonu. U první linie, *psbo2/7*, je delece na dvou místech - 8 bp a 16 bp. U druhé, *psbo2/101*, je jediná delece dlouhá 47 bp. Pro účely dalších experimentů jsme dále hledali linie bez *Cas9*. Homozygotní mutanty *psbo2* linie 101 bez *Cas9* v genomu jsme pojmenovali *psbo2cr* a používáme je k dalším experimentům.

Mutantní linie *psbo1/40* vykazovala změnu ve fenotypovém projevu (pomalejší růst, světlejší listy; obr 5.1). U druhé linie *psbo1/73* žádná z mutantních rostlin změnu ve fenotypu oproti *wt* nevykazovala. Obě mutantní alely byly sekvenovány a u *psbo1/40* byla identifikována delece 104 bp s posunutím čtecího rámce a vznikem předčasného stop kodonu. Pro *psbo1/73* byla delece 30 bp v tranzitním peptidu, bez ovlivnění čtecího rámce a bez vzniku předčasného stop kodonu. V těchto rostlinách tedy pravděpodobně vzniká protein, kterému chybí pouze 10 aminokyselinových zbytků v tranzitním peptidu, a proto jsou rostliny bez zjevné změny ve fenotypu.

V T2 generaci jsme nenašli žádného mutantu linie *psbo1/40*, který by zároveň neobsahoval *Cas9* kazetu. Zvolili jsme dva přístupy, které by mohly vést ke získání rostliny bez *Cas9*. Prvním z nich bylo křížení homozygota s *wt*, dalším bylo vyšetí T3 generace a hledání rostliny bez *Cas9* v ní. Zároveň jsme se rozhodli zjistit pravděpodobnou kopiovost kazety *Cas9* určením poměru rostlin s *Cas9* a bez *Cas9* pomocí selekce na hygromycinových plotnách *in vitro*.

Ze všech možností jsme nakonec jako první našli homozygota bez *Cas9* v T3 generaci. Tyto mutantní rostliny označujeme jako *psbo1cr*. Najít linii s odkříženou *Cas9* kazetou jsme považovali za důležité pro snížení komplikací při použití linií v dalších experimentech.

7.6.3. Komplementace mutantů *psbo1cr* a *psbo2cr*

3.6.3.1. Příprava konstruktů

Pro přípravu konstruktů byly z plazmidů pDrive pomocí restrikčních enzymů *SacI* a *XmaI* vyštěpeny sekvence promotorů pro obě izoformy *psbO* (plazmidy pDrive nesoucí sekvence promotorů *psbO1* připravil Václav Svoboda), které byly následně izolovány z gelu a ligovány do plazmidu pGreen 0029 místo promotoru 35S. Z dříve připravených plazmidů pDrive (připravil Václav Svoboda) nesoucích geny jednotlivých izoform byly pomocí restrikčního štěpení enzymy *XmaI* a *Sall* vyštěpeny fragmenty s geny *psbO1* a *psbO2*. Stejně restrikční štěpení bylo provedeno i s vektory pGreen nesoucími promotory jednotlivých genů. V následné ligaci byl do vektoru pGreen 0029 nesoucího promotor *psbO1* vložen fragment s genem *psbO1*. Analogicky byla provedena ligace promotoru *psbO2* s genem *psbO2*. Ligované

produkty byl elektroporován do *E. coli*. Z vybraných pěti narostlých kolonií od každé varianty byly izolovány plazmidy a pomocí restriktivního štěpení byla ověřena přítomnost a správná orientace ligovaných fragmentů. Mutant *psb1cr* byl komplementován genem *psbO1* pod promotorem *psbO1*, mutant *psb2cr* pak genem *psbO2* pod promotorem *psbO2*.

3.6.3.2. Selekce komplementovaných linií

Transformované linie byly vysety in vitro na ½ MS mediu a selektovány pomocí kanamycinu. Ani jedna ze dvou transformovaných rostlin bohužel nevyprodukovala rezistentní semena a tuto transformaci bude nutné zopakovat. Na komplementaci mutantu *psb1cr* už v rámci této práce nezbylo dost času a není tedy dále jejím obsahem.

7.6.4. Příprava *psb1isoL* a *psb2isoL* linií

3.6.4.1. Příprava konstruktů

Příprava těchto konstruktů probíhala analogicky k přípravě konstruktů pro komplementaci (kapitola 3.6.3). Konstrukty však obsahují vždy nativní gen pod promotorem opačné izoformy. Pro přípravu linie *psb1isoL* byl použit konstrukt nesoucí gen *psbO2* pod promotorem *psbO1*, pro přípravu *psb2isoL* linie byl použit konstrukt s genem *psbO1* pod promotorem *psbO2*.

3.6.4.2. Selekce transformovaných linií

Transformované linie byly vysety in vitro na ½ MS mediu a selektovány pomocí kanamycinu. U této transformace byly selektovány pouze *psb1isoL* mutantní rostliny, avšak na mediu nebyly žádné rostliny rezistentní a bude nutné transformaci zopakovat. Ani na tuto transformaci nezbylo dostatek času tyto transformace nejsou obsahem této práce.

7.6.5. Příprava konstruktů obsahující *psbO1/psbO2* z bramboru

V rámci této práce byly připraveny další čtyři konstrukty, které obsahují geny *psbO* z bramboru. Jako vektory byly použity plazmidy *pGreen* nesoucí jednotlivé promotory genů *psbO* z huseníčku, za které byly vloženy jedna i druhá varianta *psbO* z bramboru (plazmidy *pDrive* nesoucí geny *psbO* z bramboru připravil Václav Svoboda). Postup vytvoření těchto konstruktů byl stejný jako u výše popsané přípravy konstruktů (kap. 3.6.4). Tyto konstrukty nebyly z časových důvodů v rámci této práce dále použity, ale jsou připraveny pro použití v rámci dalšího projektu naší výzkumné skupiny.

7.7. Design analýzy základních fenotypových charakteristik

Pro analýzu základních fenotypových charakteristik bylo oseto 68 květináčků od každého genotypu (*psbo1*, *psbo1cr*, *psbo2*, *psbo2cr* a *wt*). Na jednu rašelinovou peletu byly vysety vždy dvě semínka, rostliny byly kultivovány v podmínkách krátkého dne. Pelety byly umístěny v samostatných květináčcích, které byly vyskládány tak, aby se jednotlivé genotypy pravidelně střídaly. Po dvaceti dnech kultivace byly pelety protrhány tak, aby na nich vždy zůstala jen větší z narostlých rostlin. Po dalších osmnácti dnech byla změřena fluorescence chlorofylu a pomocí přístroje FluorCam (měření prováděl Miloš Duchoslav). Následující den byly rostliny vyfoceny a část rostlin sklizena, nadzemní část byla zamražena v tekutém dusíku a uložena do -80 °C. Z těchto vzorků byla dále určována hmotnost sušiny, obsah proteinů a obsah fotosyntetických barviv. Deset rostlin od každého genotypu bylo dále kultivováno v kultivační místnosti na krátkém dni. Na těchto rostlinách byly měřeny některé fotosyntetické parametry pomocí přístrojů MultispeQ a FluorPen.

7.7.1. Měření čerstvé hmotnosti

Hmotnost čerstvé biomasy nadzemní části byla měřena na laboratorních vahách ihned po odstrižení z rašelinové pelety.

7.7.2. Měření hmotnosti sušiny

Vzorky pro určení hmotnosti sušiny nadzemní části byly uchovány v -80 °C. Následně byly vloženy do kapalného dusíku a lyofilizovány (Lyovac GT 2 Finn-Aqua) v 2ml nebo 1,5ml mikrozkušavkách (předem zvážených) s otevřeným víčkem (46 h, 0,01 mbar). Po dokončení lyofilizace byly mikrozkušavky uzavřeny a zváženy na laboratorních vahách. Hmotnost sušiny byla dopočítána odečtením hmotnosti zkumavky. Následně byl dopočítán poměr sušiny ku čerstvé hmotnosti a byly porovnány jednotlivé genotypy.

7.7.3. Izolace a měření obsahu pigmentů

Měření obsahu pigmentů proběhlo na 4 vzorcích *wt*, mutantů *psbo2* a *psbo2cr*, na 2 vzorcích *psbo1* a 1 vzorku *psbo1cr*. Rostliny byly 39 dnů staré, skladované v -80 °C.

Pigmenty byly izolovány přidáním 1 ml dimethylformamidu, vzorky byly zabaleny do alobalu pro zamezení přístupu světla a umístěny do 4 °C až do úplného odbarvení listů. Absorbance jednotlivých vzorků byla měřena na spektrofotometru (Biomate 5) při vlnových

délkách 480 nm, 647 nm, 664 nm a 758 nm. Obsah jednotlivých pigmentů byl vypočítán podle následujících rovnic (Wellburn, 1994):

$$\text{Chlorofyl } a \text{ (Chl } a \text{)} [\mu\text{g/ml}] = 11,65 \cdot (A_{664} - A_{750}) - 2,69 \cdot (A_{647} - A_{750})$$

$$\text{Chlorofyl } b \text{ (Chl } b \text{)} = 20,81 \cdot (A_{647} - A_{750}) - 4,53 \cdot (A_{664} - A_{750})$$

$$\text{karotenoidy} = (1000 \cdot A_{480} - 0,89 \cdot \text{Chl } a - 52,02 \cdot \text{Chl } b) / 245$$

7.7.4. Měření obsahu proteinů

Od každého genotypu byly sklizeny nadzemní části z rostlin o stáří 39 dnů a o hmotnosti přibližně 100 mg. U *psbo1* a *psbo1cr* muselo být pro dosažení této hmotnosti sklizeno 6 - 8 rostlin najednou; naopak u *psbo2*, *psbo2cr* či *wt* stačila k dosažení této hmotnosti vždy jedna rostlina. Vzorky byly před izolací lyofilizovány. Měření předcházela intenzivní optimalizace protokolu pro izolaci proteinů z lyofilizovaných vzorků (kap. 7.4.1).

7.7.5. Měření fluorescence chlorofylu *a* a plochy listové růžice (přístroj FluorCam)

Fluorescence chlorofylu *a* byla měřena pomocí přístroje FluorCam (Photon System Instruments, Drásov, Česká republika) u všech 34 rostlin každého genotypu o stáří 38 dnů. Měření bylo prováděno po temnostní adaptaci rostlin 1 - 2 hodiny při laboratorní teplotě. V rámci tohoto měření byla změřena i plocha listové růžice (plocha s fluorescencí chlorofylu při pohledu shora, oproti celkové listové ploše je menší o překryvy listů). Měření prováděl Miloš Duchoslav.

7.7.6. Měření pomocí přístroje MultispeQ

Měření pomocí přístroje MultispeQ v2.0 (PhotosynQ, East Lansing, USA; Kuhlert et al., 2016) probíhalo na 69 dnů starých rostlinách pěstovaných v rámci fenotypovacího pokusu na krátkém dni. Od každého genotypu bylo měřeno deset rostlin. Rostliny byly měřeny přímo v kultivační místnosti za světla. K měření byl použit protokol "Photosynthesis RIDES".

7.7.7. Měření OJIP křivek

Měření OJIP křivek proběhlo pomocí přístroje FluorPen (Photon System Instruments, Drásov, Česká republika) na 77 dní starých rostlinách pěstovaných v rámci fenotypovacího

pokusu na krátkém dni. Tomuto měření přecházela několik desítek minut dlouhá temnostní adaptace a samotné měření probíhalo za velmi slabého osvětlení.

7.7.8. Statistické zpracování výsledků

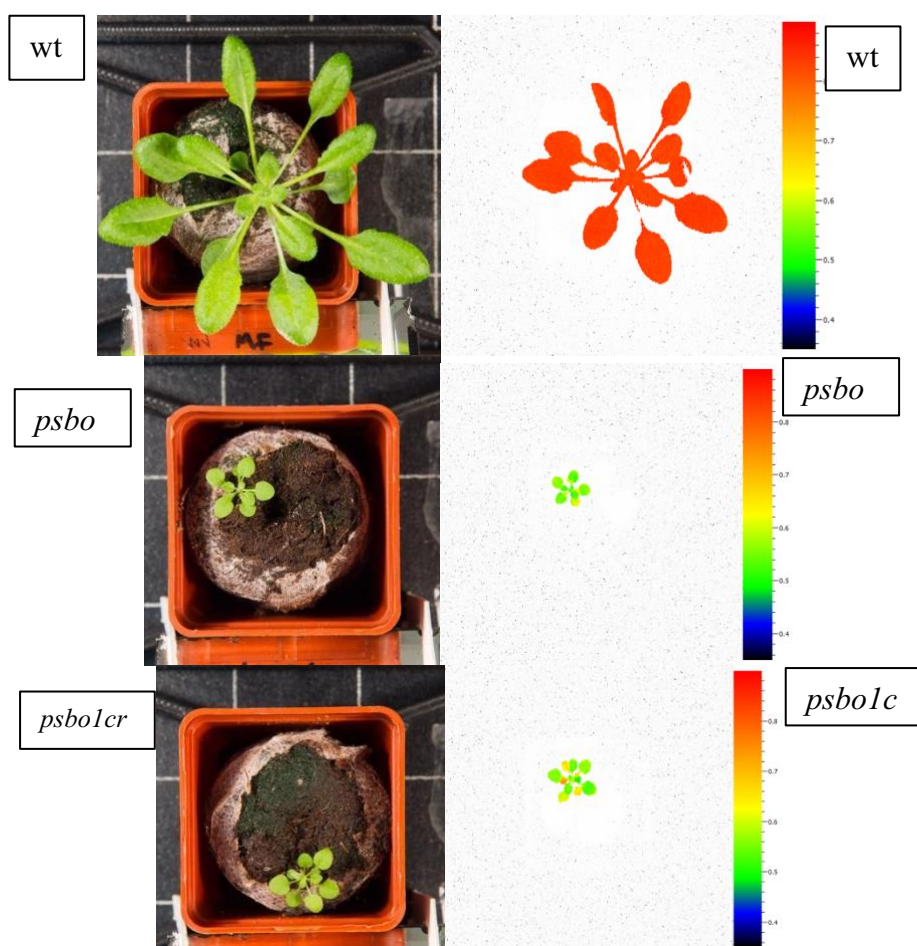
Statistické zpracování výsledků provedl Miloš Duchoslav v prostředí R. K testování rozdílů mezi genotypy byla využita jednocestná ANOVA s post-hoc porovnáními pomocí metody Tukey HSD (v případě čerstvé hmotnosti a sušiny byla v modelu použita logaritmická transformace).

8. Výsledky

8.1. Vytvoření rostlin s delecí v genech *psbO1* a *psbO2*

8.1.1. *psbO1*

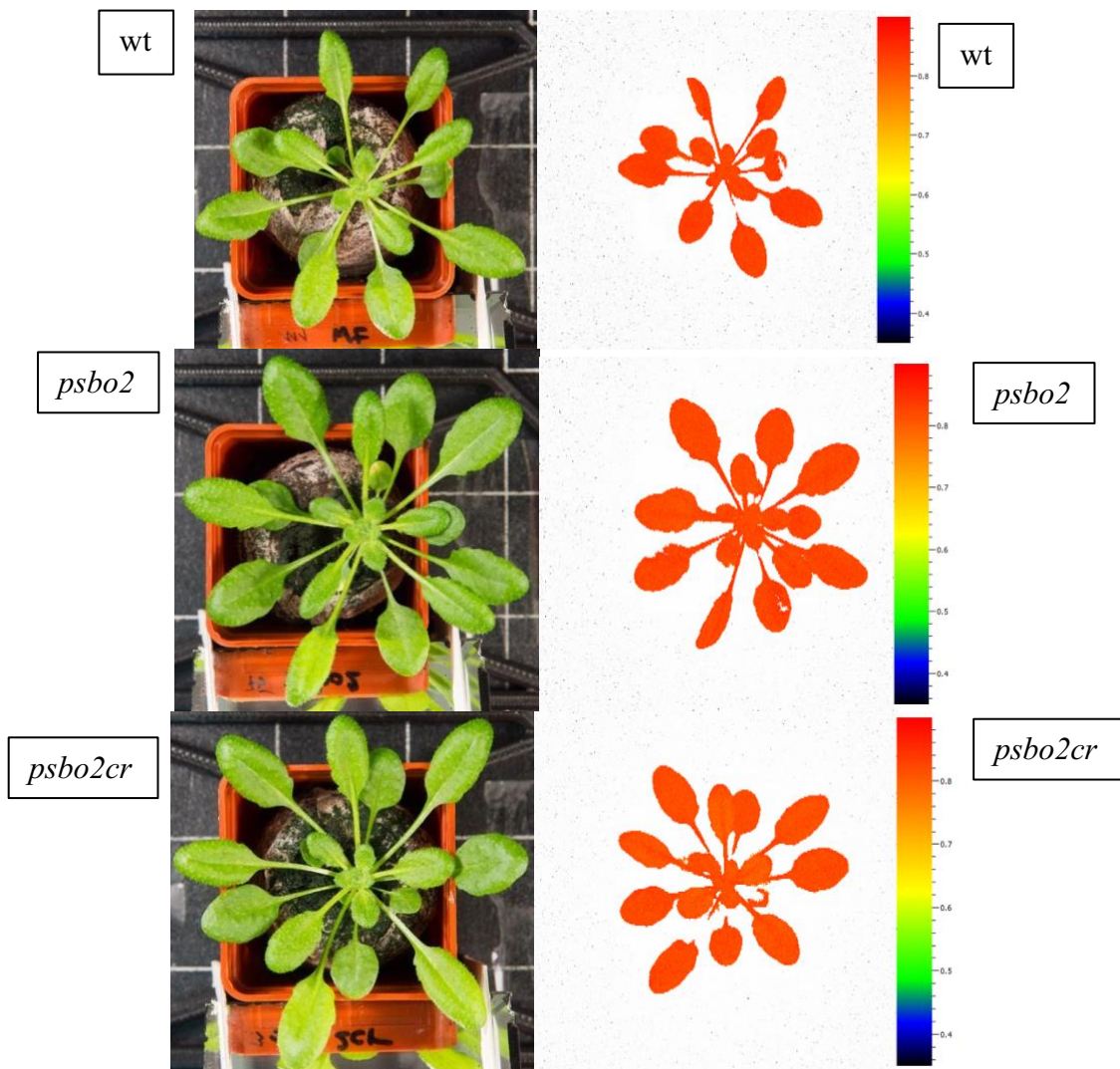
Pomocí mutagenese technikou CRISPR-Cas9 byla vytvořena jedna mutantní linie *psbo1cr* s delecí o délce 104 bp v sekvenci kódující tranzitní peptid pro *psbO1*. Tato delece vede ke vzniku stop kodonu a předčasnému ukončení transkripce. Rostliny homozygotní pro tuto delecii vykazují výrazně pomalejší růst, světlejší barvu listů a nižší hodnoty Fv/Fm (maximálního kvantového výtěžku PSII) oproti wt, podobně jako T-DNA inzerční mutant *psbo1* (obr. 4.1). Ze zobrazení hodnot Fv/Fm v rámci listové růžice je také vidět, že rostliny *psbo1cr* i *psbo1* mají výrazněji snížené hodnoty Fv/Fm v mladších listech, zatímco wt má hodnoty Fv/Fm ve všech listech stejné.



Obr. 4.1: Srovnání růstu wt, *psbo1* a *psbo1cr* mutantů a zobrazení jejich hodnot pro Fv/Fm. Rostliny byly 39 dní staré, pěstované v podmínkách krátkého dne. Strana květináčku měří 5 cm

8.1.2. *psbO2*

Byla vytvořena jedna mutantní linie *psbo2cr* s delecí o délce 47 bp v sekvenci kódující třetí exon *psbO2*, která vede ke vzniku stop kodonu a předčasnému ukončení transkripce. Rostliny homozygotní pro tuto delecí vykazují normální růst i barvu listů ve srovnání s wt, stejně jako T-DNA inzerční mutant *psbo2* (obr. 4.2).



Obr. 4.2: Srovnání růstu wt, *psbo2* a *psbo2cr* mutantů a zobrazení jejich hodnot pro Fv/Fm. Rostliny byly 39 dní staré, pěstované v podmínkách krátkého dne. Strana květináčku měří 5 cm.

8.2. Porovnání rostlin wt, psbo1, psbo1cr, psbo2 a psbo2cr

8.2.1. Základní fenotypové charakteristiky

Základní fenotypové charakteristiky byly měřeny na 39 dní starých rostlinách genotypů wt, *psbo1*, *psbo1cr*, *psbo2* a *psbo2cr* pěstovaných v podmínkách krátkého dne. Cílem bylo srovnat mutantní rostliny vytvořené CRISPR-Cas9 mutagenezí s T-DNA inzerčními mutanty.

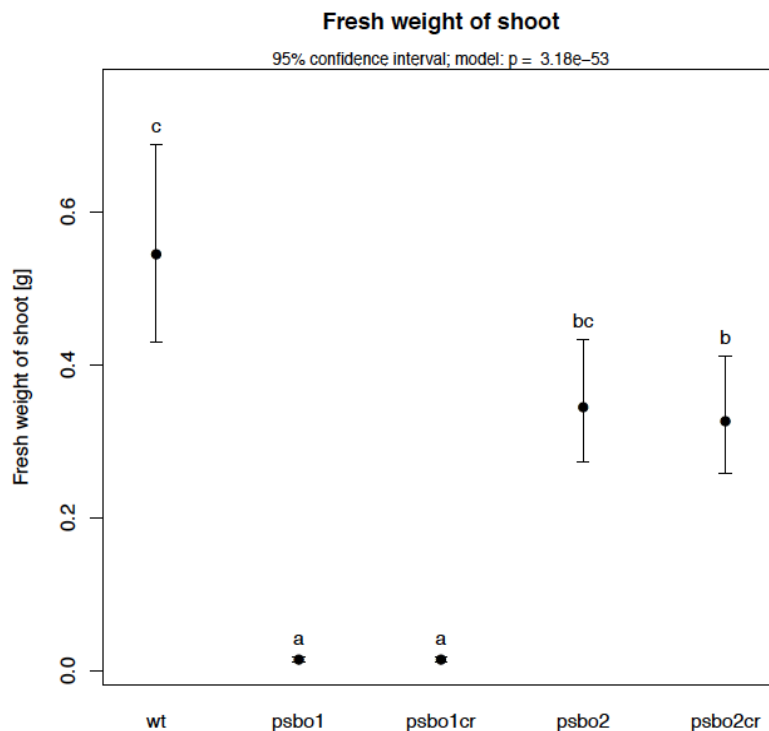
Rostliny mutované v genu *psbO1* rostou daleko pomaleji než rostliny wt a mutanti v genu *psbO2* (obr 4.1). To se projevilo na jejich čerstvé hmotnosti (graf 4.1), která je při stejném stáří rostlin výrazně nižší, než jakou má wt i mutanti v genu *psbO2*. Mutant *psbo2cr* má hodnoty čerstvé hmotnosti signifikantně nižší než wt, ale vyšší než mutanti v genu pro *psbO1*, a od mutantů *psbo2* se signifikantně neliší. Mutant *psbo2* má čerstvou hmotnost signifikantně vyšší než mutanti v genu *psbO1*, ale neliší se od wt ani od mutantu *psbo2cr*.

Oba mutanti v genu *psbO2* mají oproti wt také nižší hmotnosti sušiny (graf 4.2). Vzhledem k pomalému růstu mutantů v genu *psbO1*, a tedy nízké čerstvé hmotnosti v době sklizně, byla většina těchto rostlin použita na ostatní analýzy, konkrétně proteinové analýzy (odebíráno 100 mg) a analýzu pigmentů (odebíráno 10 mg). Na měření sušiny bohužel nezbylo dostatečné množství vzorků, které by bylo možné zahrnout do statistických výpočtů sušiny, a proto tyto údaje v grafu 2 chybí.

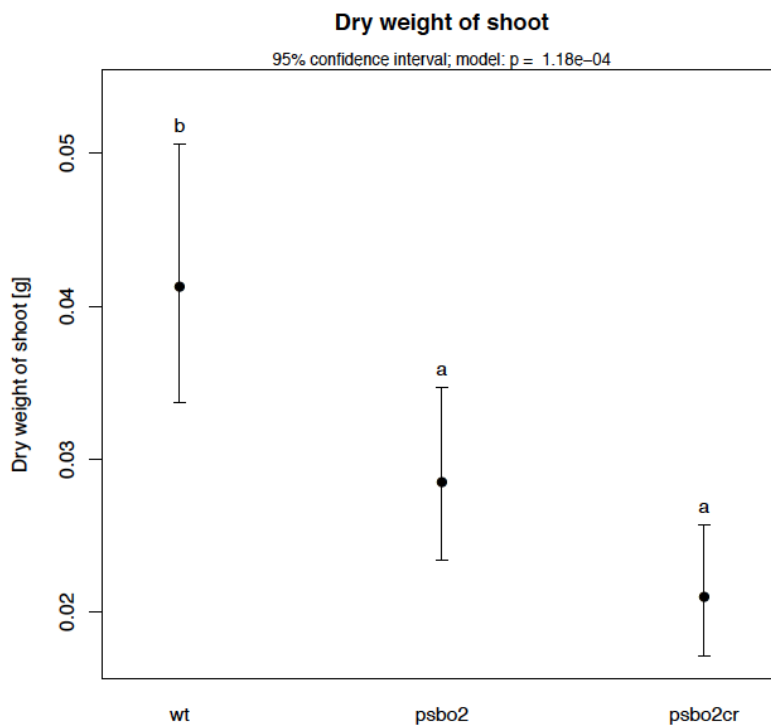
Pro výpočet poměru sušiny ku čerstvé hmotnosti mohly být zahrnuty i směsné vzorky z více rostlin, proto byli mutanti v genu *psbO1* do statistiky opět zahrnuty. Mutant *psbo1* má poměr sušiny ku čerstvé hmotnosti vyšší oproti wt a mutantům *psbo2* a *psbo2cr*. Mutant *psbo1cr* má poměr sušiny k čerstvé hmotnosti také o něco vyšší než wt, ale rozdíl oproti ostatním genotypům nevyšel signifikantně (graf 4.3).

V ploše listové růžice se opět *psbo1* a *psbo1cr* mutanti liší od wt a mutantů *psbo2* a *psbo2cr* nižší plochou. Mutanti *psbo2* a *psbo2cr* mají plochu listové růžice nižší oproti wt (graf 4.4).

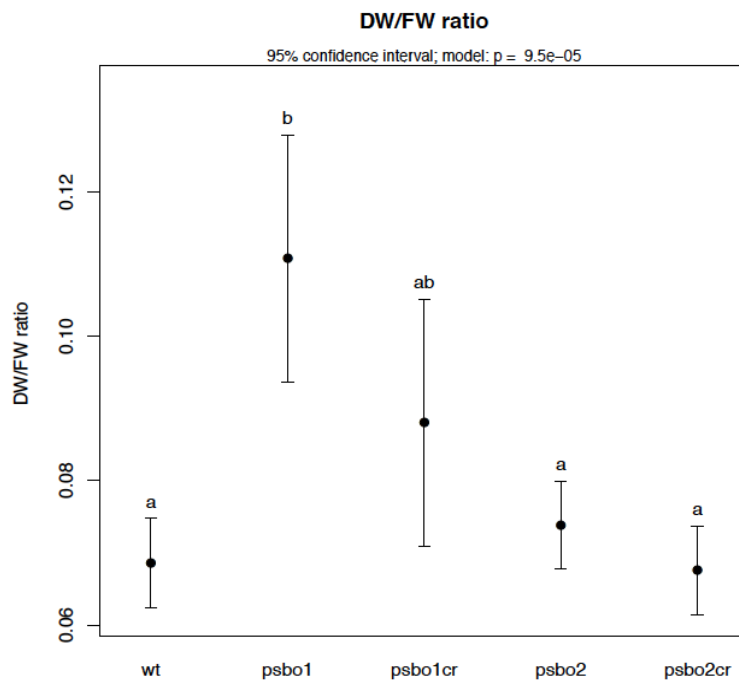
Tloušťku listu mají mutanti *psbo1* a *psbo1cr* nižší oproti wt a mutantům *psbo2* a *psbo2cr*, zatímco mutanti *psbo2* a *psbo2cr* se v tomto parametru od wt neliší (graf 4.5).



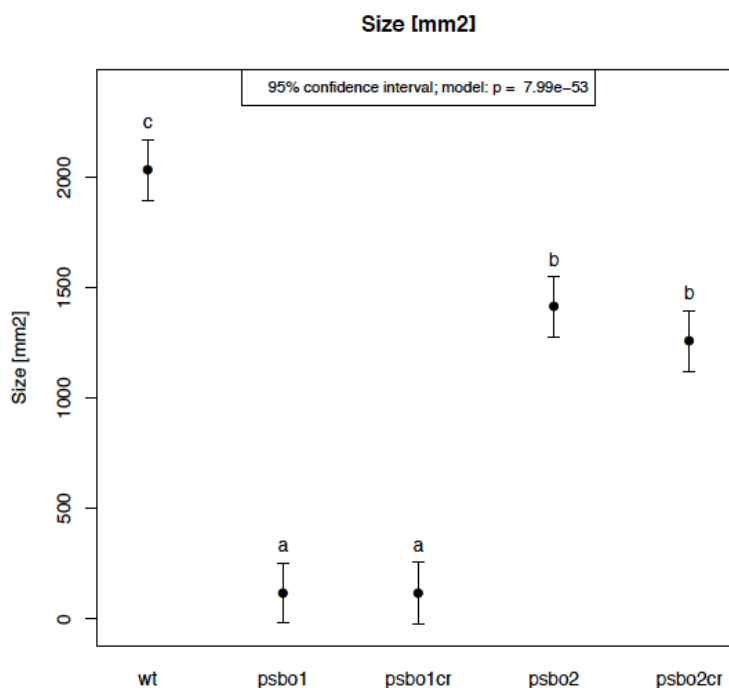
Graf 4.1: Čerstvá hmotnost nadzemní části jednotlivých genotypů. Čerstvá hmotnost byla měřena u 24 rostlin genotypů *psbo1* a *psbo2*, 23 rostlin genotypů *psbo2cr* a *wt*, a 22 rostlin genotypu *psbo1cr*. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



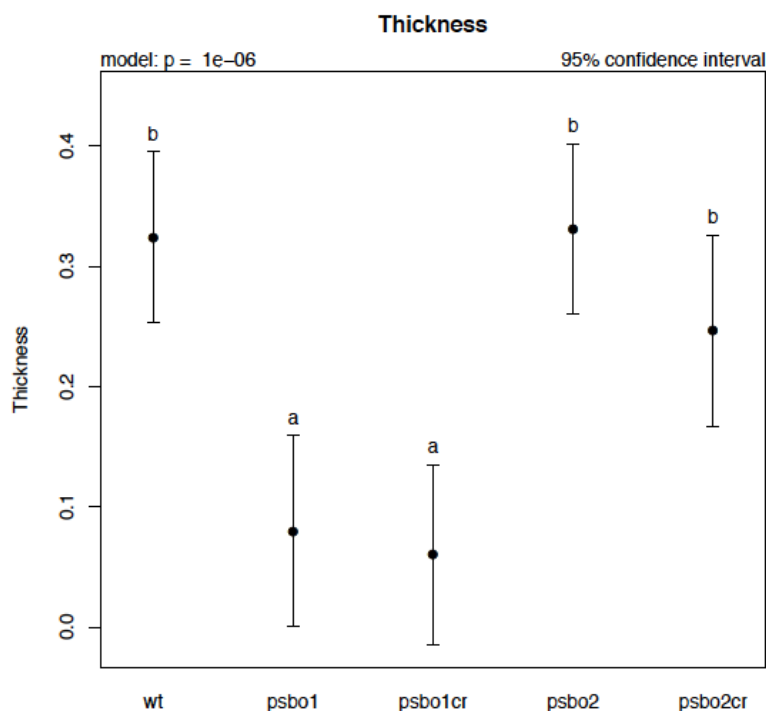
Graf 4.2: Hmotnost sušiny nadzemní části *wt* a mutantů *psbo2* a *psbo2cr*. Hmotnost sušiny byla měřena u 15 vzorků *wt* a *psbo2cr* a 16 vzorků *psbo2*. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



Graf 4.3: Poměr sušiny ku čerstvé hmotnosti nadzemní části. Bylo měřeno 23 vzorků *wt* a *psbo2cr*, 24 vzorků *psbo2* a 3 vzorky *psbo1* a *psbo1cr*, některé vzorky byly směsné z více rostlin. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.








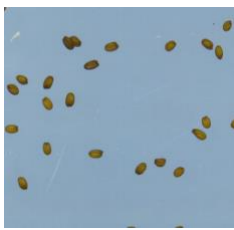




Graf 4.4: Plocha listové růžice. Bylo měřeno 34 rostlin od každého genotypu o stáří 38 dnů. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



Graf 4.5: Relativní tloušťka listu jednotlivých genotypů. Měření probíhalo na rostlinách starých 69 dnů pěstovaných v podmínkách krátkého dne. Od každého genotypu bylo měřeno 10 rostlin. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.

8.2.2. Velikost semen

Jak je uvedeno výše, mutanti v genu *psbO2* se lišily v čerstvé hmotnosti, sušině a ploše listové růžice od wt. Tento výsledek byl překvapující, protože v předchozích experimentech prováděných v naší laboratoři se v těchto parametrech od wt nelišili. Abychom našli příčinu zhoršeného růstu *psbo2* a *psbo2cr*, provedli jsme kontrolu semen. Bylo zjištěno, že semena, ze kterých byly oba mutanti v genu *psbO2* vyseti, mají menší semena jiného tvaru. To však pravděpodobně není způsobené mutací v daném genu, protože jiné várky semen těchto mutantů takové znaky nevykazují (obr. 4.3).

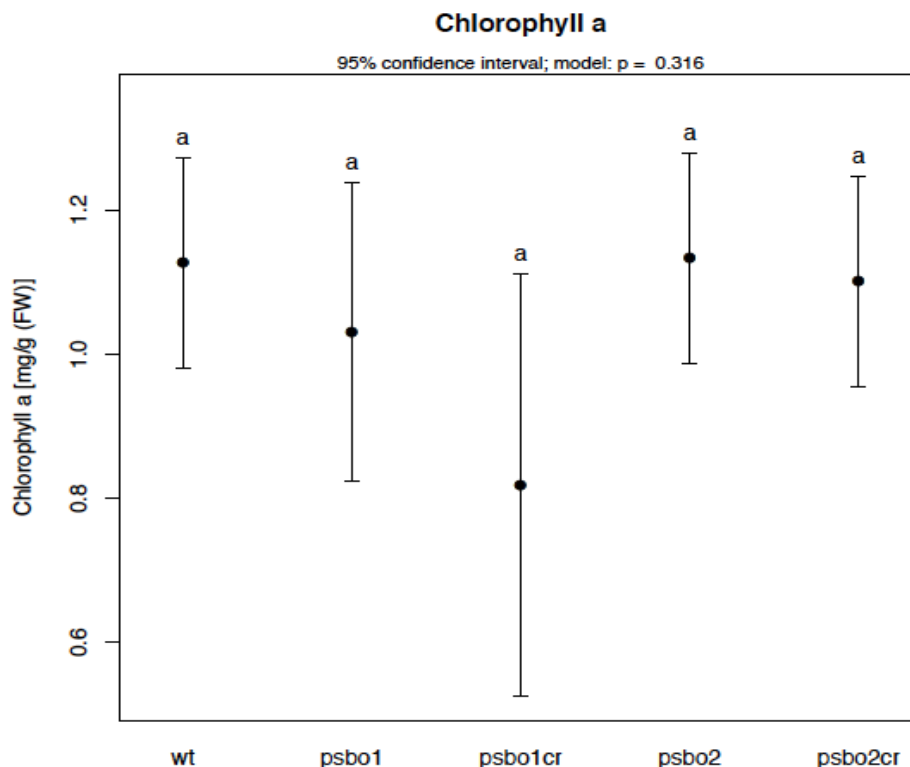
Genotyp	Semena použitá v experimentu	Jiná semena stejného genotypu
wt		
<i>psbo1</i>		
<i>psbo1cr</i>		
<i>psbo2</i>		
<i>psbo2cr</i>		

Obr. 4.3: Porovnání velikosti semen genotypů použitých v experimentu a dalších semen stejných genotypů.

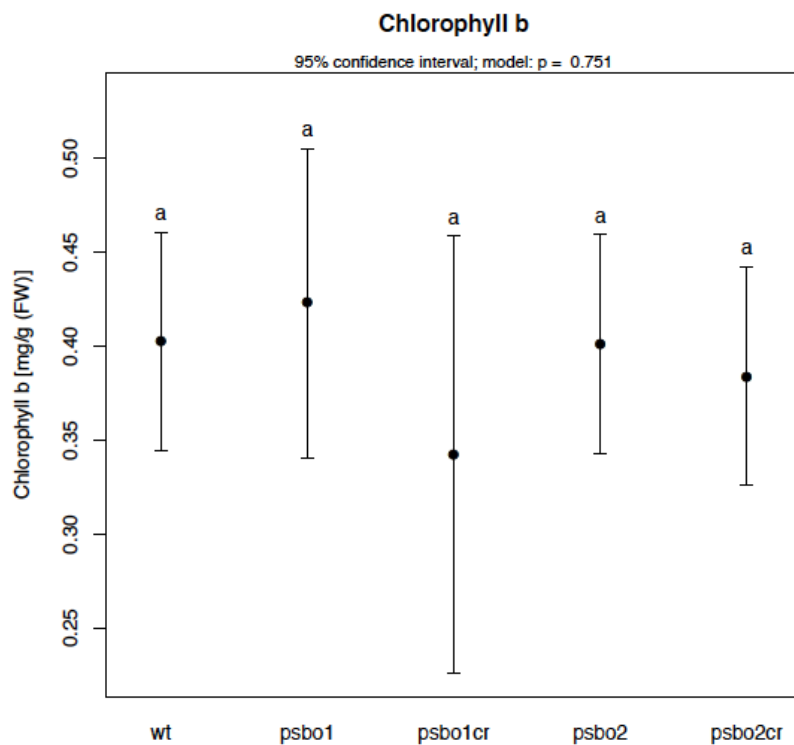
8.2.3. Obsah fotosyntetických barviv

Obsah fotosyntetických barviv byl měřen na čtyřech vzorcích wt, *psbo2* a *psbo2cr*, na dvou vzorcích *psbo1* a na jednom vzorku *psbo1cr* (pokud není uvedeno jinak). Rostliny byly staré 39 dnů.

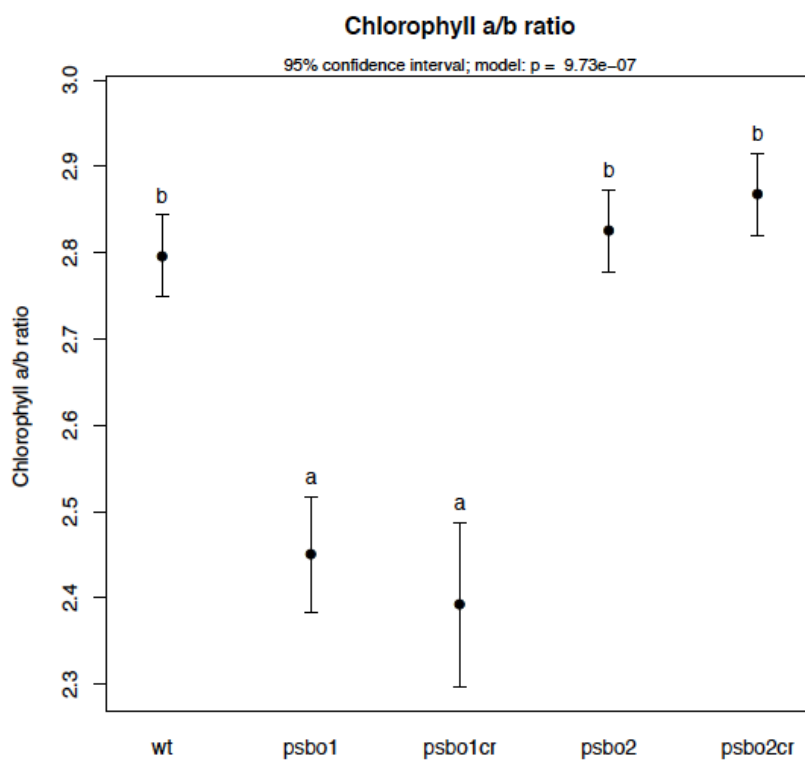
V obsahu chlorofylu a (graf 4.6), chlorofylu b (graf 4.7) a karotenoidů (graf 4.10) se od sebe genotypy signifikantně neliší. Stejně tak součet chlorofylu *a* a chlorofylu *b* nevychází u žádného genotypu se signifikantním rozdílem oproti wt (graf nezobrazen). Hodnotu poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* mají mutanti v genu *psbo1* signifikantně nižší (graf 4.8). Mutanti v genu *psbo2* mají tento poměr o něco vyšší než wt, ač ne signifikantně. Pokud do statistiky nejsou zahrnuti mutanti v genu *psbo1*, u kterých byl pouze malý počet vzorků, vychází tento poměr pro mutantu *psbo2cr* signifikantně vyšší oproti wt (graf 4.9). Relativním obsah chlorofylu byl změřen i pomocí přístroje MultispeQ přímo na živých rostlinách. Při tomto způsobu měření mají *psbo1* a *psbo1cr* signifikantně nižší obsah chlorofylu oproti ostatním genotypům (graf 4.11).



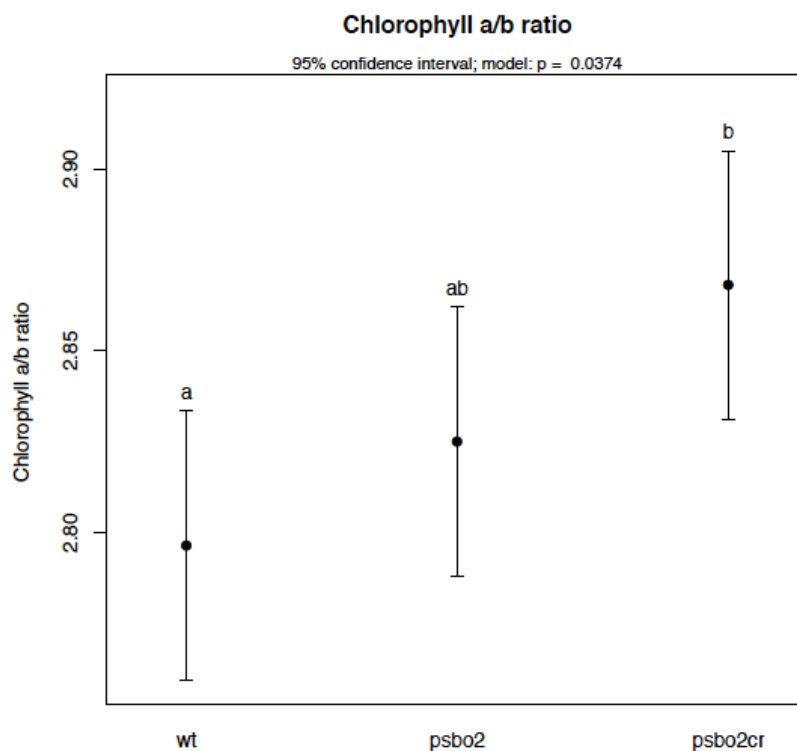
Graf 4.6: Množství chlorofylu *a* v jednotlivých genotypech. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



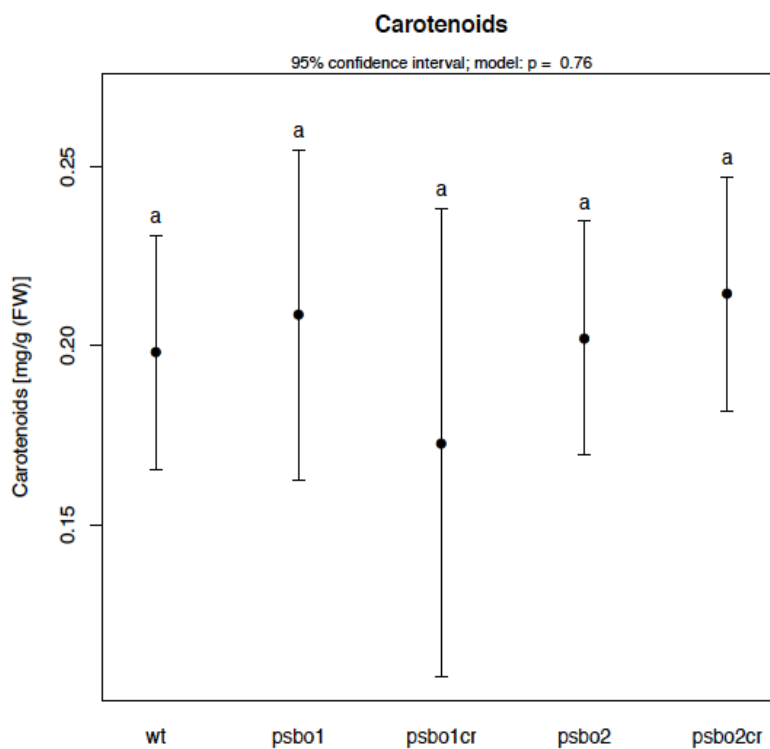
Graf 4.7: Množství chlorofylu *b* v jednotlivých genotypích. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



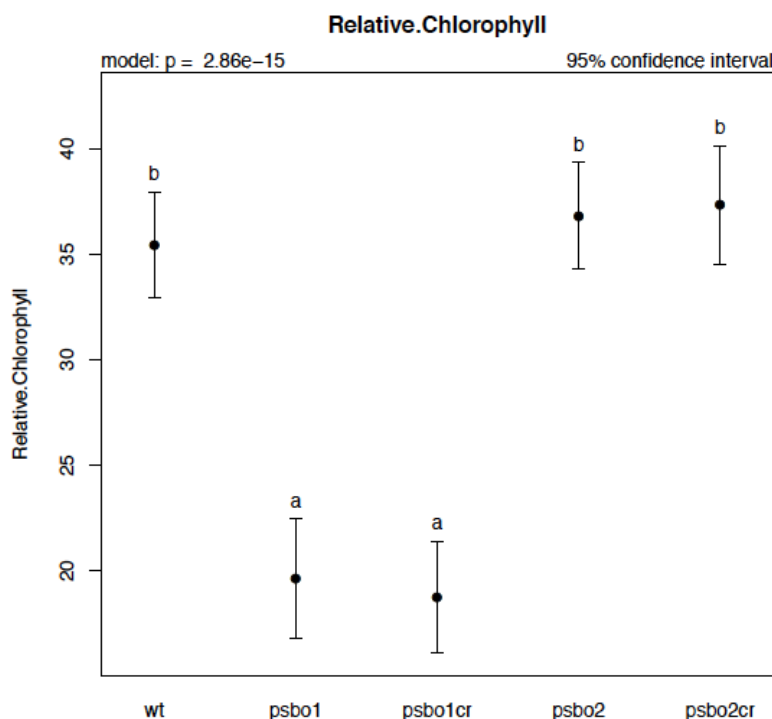
Graf 4.8: Poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*. Mutanti *psbo1* a *psbo1cr* se signifikantně liší od wt a mutantů *psbo2* a *psbo2cr*. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



Graf 4.9: Poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* bez zahrnutí *psbo1* a *psbo1cr* mutantů, u kterých proběhl pouze malý počet měření. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



Graf 4.10: Množství karotenoidů v jednotlivých genotypech. Žádný genotyp se obsahem karotenoidů signifikantně neliší od wt. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



Graf 4.11: Relativní obsah chlorofylu v jednotlivých genotypěch. Toto měření probíhalo na 69 dnů starých rostlinách. Od každého genotypu bylo měřeno 10 rostlin. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.

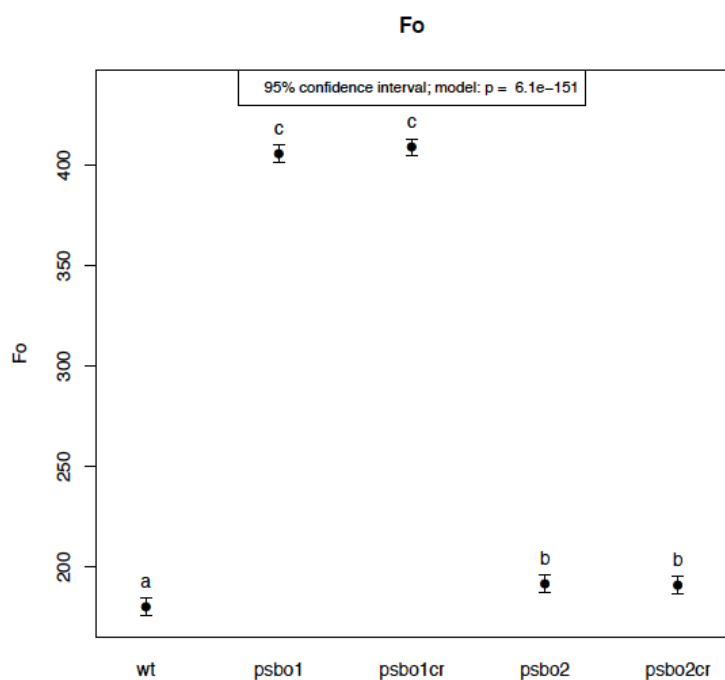
8.2.4. Fluorescence chlorofylu *a*

Měření fluorescence chlorofylu *a* probíhalo u 34 rostlin genotypů *wt*, *psbo1*, *psbo1cr*, *psbo2* a *psbo2cr* adaptovaných na tmu pod dobu minimálně 1 h. Stáří rostlin bylo 38 dní. Měření probíhalo pomocí přístroje FluorCam (PSI).

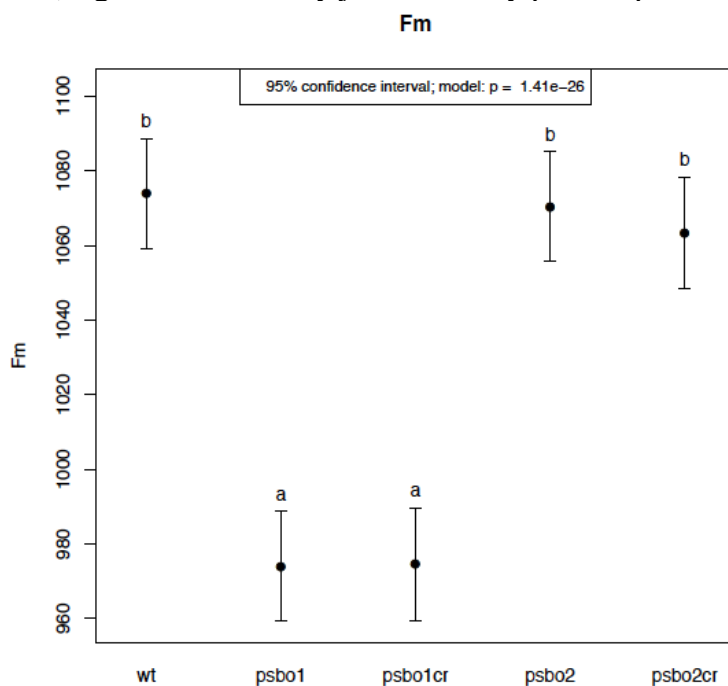
Hodnoty F_0 mají mutanti *psbo1* i *psbo1cr* výrazně vyšší oproti *wt*. Mutanti *psbo2* a *psbo2cr* mají tyto hodnoty jen o trochu vyšší oproti *wt*, ale rozdíl je statisticky významný (graf 4.12).

Hodnoty maximální fluorescence při saturačním pulzu (F_m) mají mutanti v genu *psbO1* nižší oproti *wt* i mutantům v genu *psbO2*, kteří se od *wt* signifikantně neliší (graf 4.13).

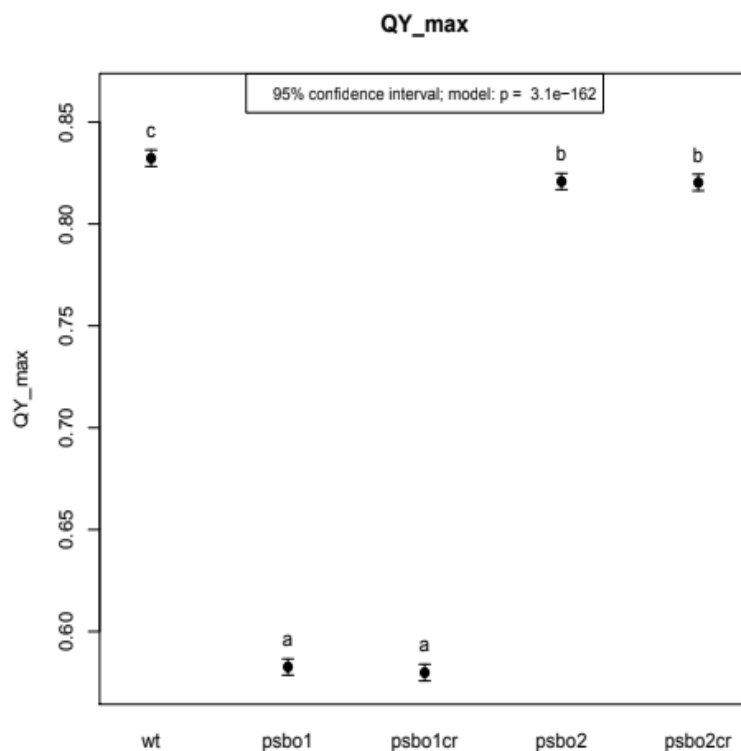
Hodnoty maximálního kvantového výtěžku (F_v/F_m) mají mutanti *psbo1* a *psbo1cr* výrazně nižší oproti *wt* i mutantům *psbo2* a *psbo2cr* (obr. 4.1 a 4.2). Mutanti *psbo2* a *psbo2cr* mají hodnoty jen drobně snížené (0,82 oproti 8,83 pro *wt*), nicméně rozdíl je statisticky významný. Jak je vidět z grafů 4.12 a 4.13, rozdíly v hodnotách F_v/F_m u jednotlivých genotypů jsou způsobené především rozdíly v F_0 a jen do malé míry změnou F_m .



Graf 4.12: Hodnoty Fo pro jednotlivé genotypy. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.

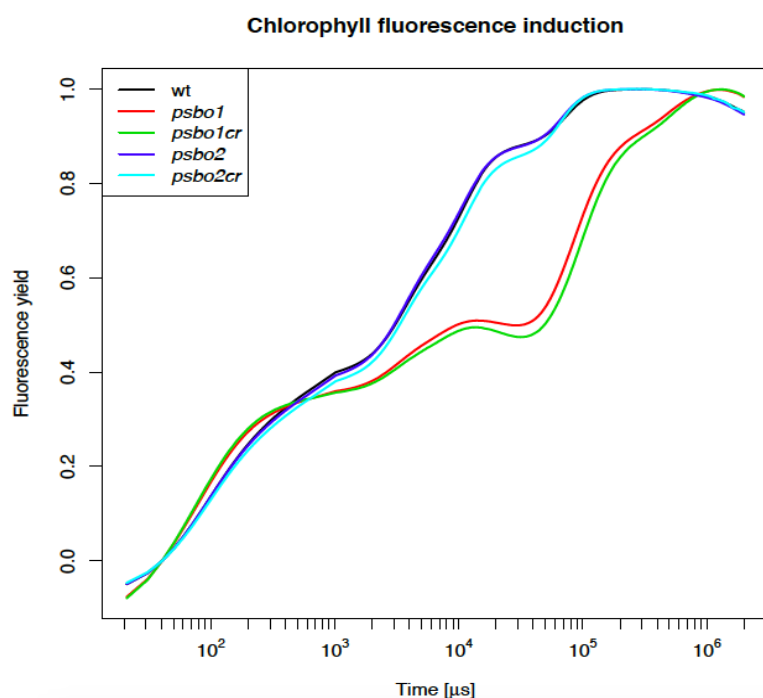


Graf 4.13: Hodnoty Fm pro jednotlivé genotypy. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.

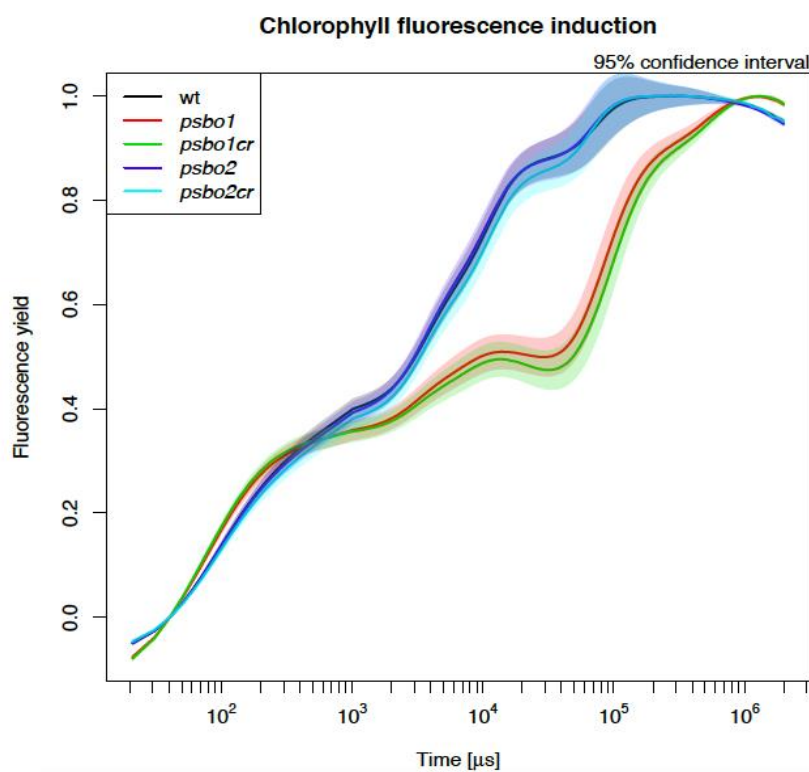


Graf 4.14: Hodnoty maximálního kvantového výtěžku PSII (Fv/Fm) pro jednotlivé genotypy. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.

Dále byla pomocí přístroje FluroPen (PSI) měřena rychlá indukce fluorescence chlorofylu (OJIP křivka). Na měření pomocí přístroje FluorPen jsou potřeba dostatečně velké listy, proto bylo měření provedeno na rostlinách o stáří 60 dnů pěstovaných v podmínkách krátkého dne (10 rostlin od každého genotypu). OJIP křivky jsou odlišné od wt pro mutanty v genu *psbO1*, zatímco křivky mutantů v genu *psbO2* se od wt neliší (grafy 4.15 a 4.16). U mutantů *psbO1* a *psbO1cr* je relativně menší fáze I-J. Maximální fluorescence (P) dosáhnou *psbO1* a *psbO1cr* později než wt.



Graf 4.15: OJIP křivky pro jednotlivé genotypy. Křivky jsou dvojitě normalizované.

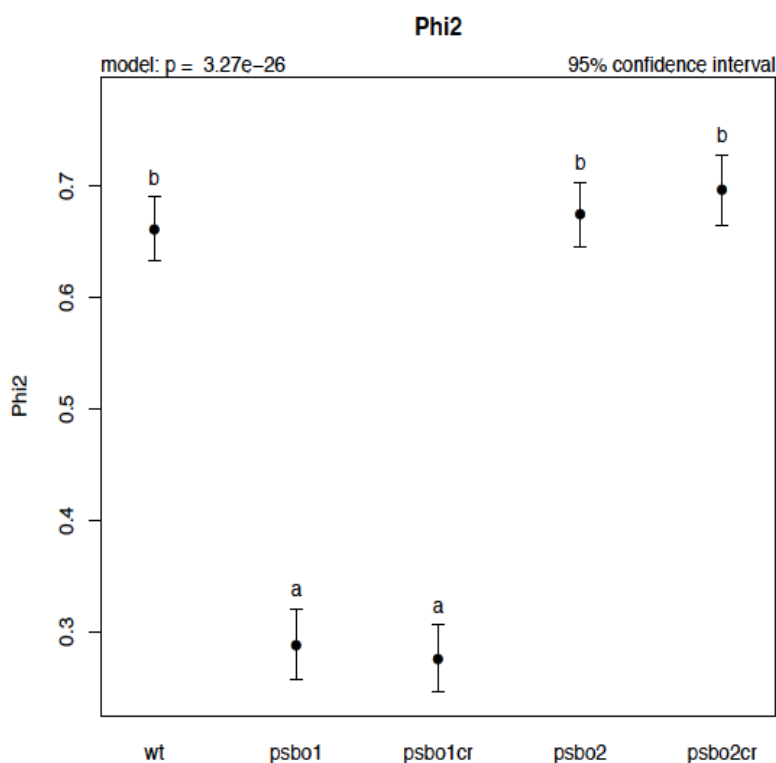


Graf 4.16.: OJIP křivky s vyznačeným konfidenčním intervalem pro jednotlivé genotypy. Křivky jsou dvojitě normalizované.

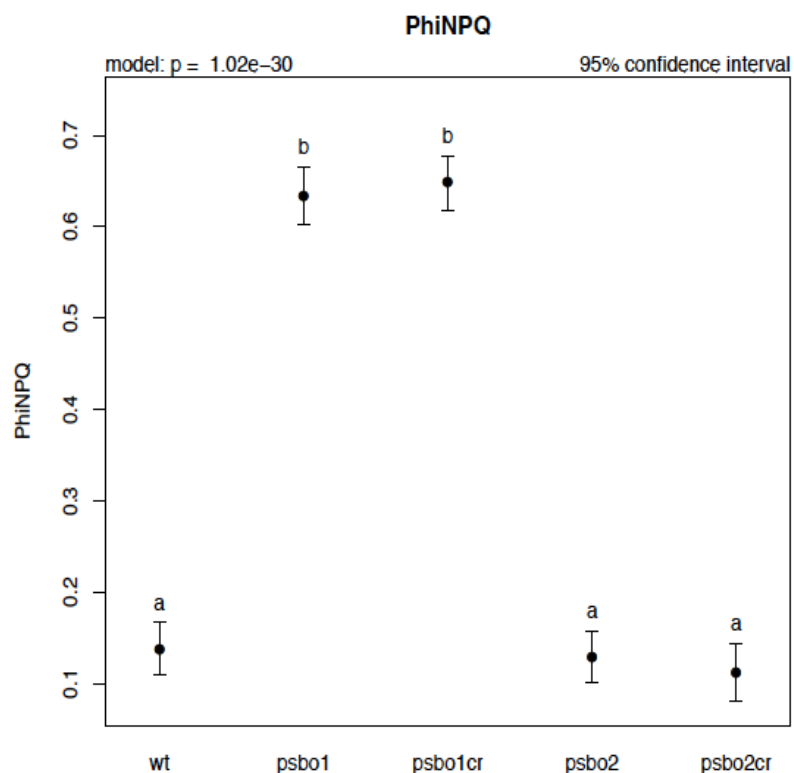
Stav fotosyntetického aparátu adaptovaného na světlo byl sledován pomocí přístroje MultispeQ (PhotosynQ, USA). Měření bylo prováděno na rostlinách o stáří 69 dnů pěstovaných v podmínkách krátkého dne adaptovaných na světlo v kultivační místnosti (10 rostlin od každého genotypu).

Hodnoty kvantového výtěžku PSII na světle (Φ_{II}), jsou nižší pro mutanty v genu *psbO1* (graf 4.17). Oproti tomu část energie, která jde do nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ}), je vyšší pro oba mutanty v genu *psbO1* oproti wt (graf 4.18). Hodnoty Φ_{NO} , které odrážejí množství energie, které je disipované neregulovanými procesy (procesy, které na rozdíl od nefotochemického zhášení nejsou indukovány světlem, Kramer et al., 2004) jsou nižší pro oba mutanty v genu *psbO1* oproti wt (graf 4.19.)

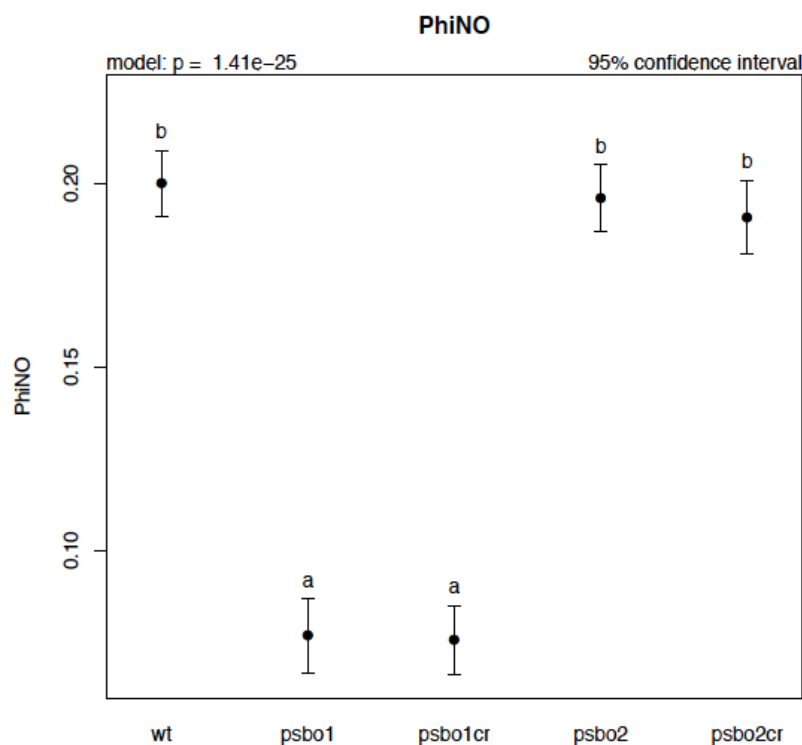
Přístroj MultispeQ umožňuje měřit i některé parametry fotosystému I (PSI). Hodnoty otevřených center PSI jsou nižší pro oba mutanty v genu *psbO1* oproti wt (graf 4.20). Mutanti v genu *psbO2* se v žádném parametru měřeném pomocí přístroje MultispeQ nelišili od wt.



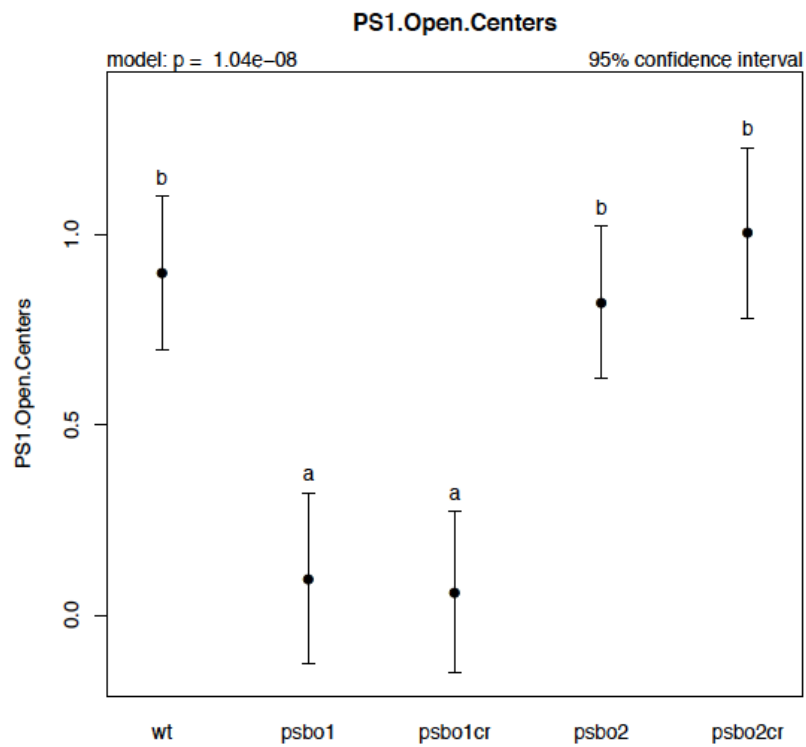
Graf 4.17: Hodnoty kvantového výtěžku PSII u rostlin adaptovaných na světlo (Φ_{II}). Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



Graf 4.18: Hodnoty kvantového výtěžku nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ}). Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.



Graf 4.19: Hodnoty kvantového výtěžku neregulovaných procesů (Φ_{NO}). Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.

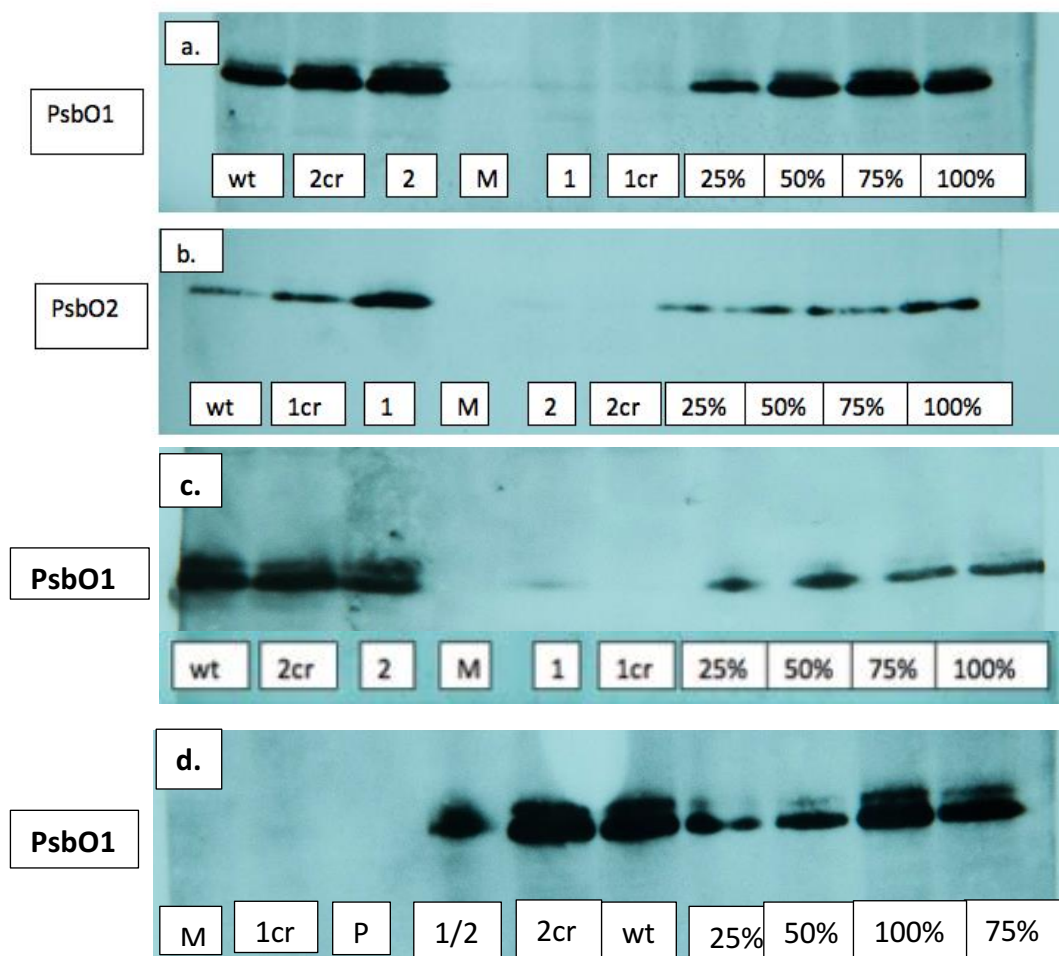


Graf 4.20: Hodnoty otevřených center PSI. Chybové úsečky zobrazují 95% konfidenční interval, signifikantní rozdíly jsou označeny pomocí písmenkového kódu.

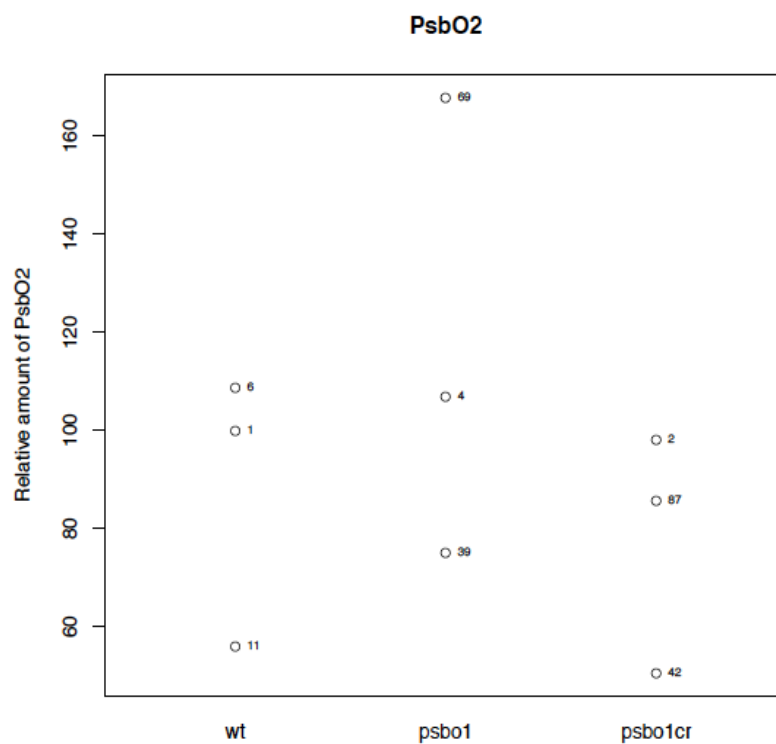
8.2.5. Obsah proteinů PsbO1 a PsbO2

Obsah proteinů byl měřen na třech vzorcích každého genotypu pomocí western blotů s protilátkami specifickými pro jednotlivé izoformy PsbO. Cílem bylo ukázat, (1) zda mutanti vytvoření mutagenézí CRISPR-Cas9 v daném genu opravdu neprodukují žádný protein, (2) zda T-DNA inzerční mutanti produkují protein, jehož gen mají mutovaný a (3) pokusit se kvantifikovat množství izoformy, kterou rostlina nemá vymutovanou. Z obrázku 4.3a je patrné, že mutanti *psbO1* i *psbO1cr* mají v místě PsbO slabý signál, který by mohl znamenat přítomnost malého množství izoformy PsbO1 (obr 4.3a). Z obrázku 4.3c, ve kterém jsou jiné vzorky stejného genotypu je však z neznámého důvodu tento signál patrný pouze u mutantu *psbO1*. Stejně tak z obrázku 4.3d patrný signál pro PsbO1 u *psbO1cr* není. Pro ověření dřívějších výsledků z naší laboratoře jsme analyzovali i proteiny z dvojitěho mutantu *psbO1 psbO2*, vytvořeného křížením T-DNA inzerčních mutantů *psbO1* a *psbO2*. Potvrdilo se, že dvojitý mutant má silný signál pro PsbO1, protože u něj pravděpodobně došlo k obnovení exprese genu *psbO1* (obr 4.3d). V případě imunodetekce PsbO2 je u mutantu *psbO2* slabý signál, který však v případě mutantu *psbO2cr* chybí nebo je daleko slabší (obr 4.3b). Podrobnější interpretace těchto výsledků je v Diskuzi.

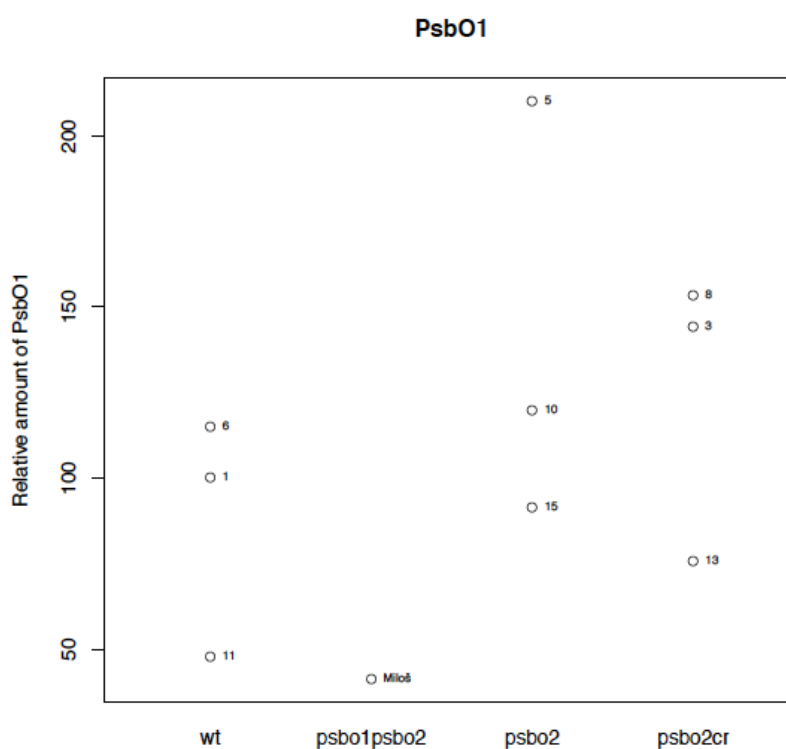
Množství nemutované izoformy PsbO (PsbO2 v mutantech *psbO1* a *psbO1cr*, PsbO1 v mutantech *psbO2* a *psbO2cr*) jsme se pokusili kvantifikovat. Nicméně hodnoty pro jednotlivé vzorky byly velmi odlišné, takže přesná kvantifikace nebyla možná (graf 4.21 a 4.22). Z výsledků se však zdá, že množství zbylé izoformy v mutantech není zásadně odlišné od množství dané izoformy ve wt.



Obr 4.3: Imunodetekce proteinu PsbO1 (a., c. a d.) a PsbO2 (b.); 1 – *psbo1*, 2 – *psbo2*, 1cr – *psbo1cr*, 2cr – *psbo2cr*, wt – wild type, M – marker, 1/2 - dvojitý mutant *psbo1 psbo2*, P – samotný vzorkový pufr. Jeden z vzorků z wt byl nanesen jako koncentrační řada (vzorky označené procenty). Vzorky byly nanášeny na základě celkového obsahu proteinů (10 μ g).



Graf 4.21: Relativní hodnoty hladiny PsbO2 ve wt, mutantu *psbo1* a mutantu *psbo1cr* pro jednotlivé vzorky (čísla označují čísla vzorků).



Graf 4.22: Relativní hodnoty hladiny PsbO1 ve wt, mutantu *psbo2* a mutantu *psbo2cr* a dvojitém mutant *psbo1/psbo2* pro jednotlivé vzorky (čísla označují čísla vzorků).

9. Diskuze

Během posledních 18 let bylo publikováno více studií zabývajících se mutanty huseničku (*Arabidopsis thaliana*) v genech *psbO1* a *psbO2* (Murakami et al. 2002, 2005; Liu et al. 2007; Lundin et al. 2007, 2008; Allahverdiyeva et al. 2009; Suorsa et al. 2016; Bricker & Frankel, 2008). V části z těchto prací byl použit bodový mutant v genu *psbO1* na pozadí ekotypu Landsberg erecta (Murakami et al. 2002, 2005; Liu et al. 2007; Bricker & Frankel 2008). Ve zbylých pracech byli použiti T-DNA inzerční mutanti *psbO1* a *psbO2* (Lundin et al. 2007ab, 2008; Allahverdiyeva et al. 2009; Suorsa et al. 2016). Jak ale ukázaly zatím nepublikované výsledky z naší laboratoře, za některých okolností může v těchto T-DNA inzerčních mutantech dojít k částečnému obnovení exprese (obr 4.3d) a nebylo jisté, jestli na nízké úrovni exprese mutovaných genů neprobíhá stále, což by mohlo ovlivňovat fenotyp těchto rostlin. Proto jsme se rozhodli vytvořit pomocí techniky CRISPR-Cas9 nové mutanty v genech *psbO1* a *psbO2*, u kterých bude jisté, že nemůžou daný gen exprimovat, a zjistit, jestli se liší od stávajících mutantů. Zároveň tito nově získaní mutanti (pojmenovaní *psbo1cr* a *psbo2cr*) poslouží k dalšímu studiu funkce proteinů PsbO1 a PsbO2, protože přes větší počet publikovaných studií není rozdíl ve funkci těchto proteinů uspokojivě objasněn, především pak funkce proteinu PsbO2.

Mutanty *psbo1cr* a *psbo2cr* se podařilo vytvořit a v rámci rozsáhlého pokusu byli porovnání s T-DNA inzerčními mutanty *psbo1* a *psbo2* a s wt.

9.1. Mutanti *psbo1* a *psbo1cr*

Výsledky ohledně mutantů v genu *psbO1*, které se v mnoha naměřených parametrech signifikantně liší od wt, nás s ohledem na již dříve publikované výsledky o T-DNA inzerčním mutantu *psbo1* výrazně nepřekvapily.

Mutanti *psbo1* i *psbo1cr* mají výrazně pomalejší růst a díky tomu i menší plochu listové růžice (graf 4.4) a menší čerstvou hmotnost (graf 4.1), čemuž odpovídají i výsledky ostatních autorů. Výsledky Suorsa et al. (2016) potvrzují menší listovou plochu mutantů *psbo1* oproti wt, stejně tak nižší rychlost růstu (autoři ve své studii měřili nikoliv plochu listové růžice, ale plochu listu). Menší plochu listu naměřili i u mutantu s homozygotní mutací pro *psbO2* a heterozygotní mutací pro *psbO1* (označovaného jako mutantu *psbo2-psbO1/psbo1*), který má oproti wt a mutantovi *psbo2* pomalejší růst a světlejší barvu. Oproti mutantovi *psbo1* je tento mutant o něco větší. Z tohoto pozorování lze usuzovat, že i menší množství PsbO1 může alespoň částečně přispět ke zlepšení fenotypového projevu mutantu *psbo1*, i když tyto rostliny

nemají PsbO2. Dwyer et al. (2012) při svých experimentech s rostlinami se sníženou expresí genů *psbO1* a *psbO2* pomocí RNA interference, která měla větší efekt na izoformu *psbO1*, taktéž naměřili nižší rychlost růstu a menší listovou plochu oproti wt. Tyto rostliny s nízkým obsahem PsbO se stejně jako naši mutanti *psbO1* a *psbO1cr* lišily od wt i nižší hmotností sušiny, čerstvou hmotností i tloušťkou listu.

Poměr sušiny k čerstvé hmotnosti je u mutantů *psbO1* a *psbO1cr* vyšší oproti wt (ač pro *psbO1cr* rozdíl nebyl signifikantní, graf 4.3). V tomto jsou rostliny s mutací v *psbO1* opět podobné rostlinám se sníženým množstvím PsbO (Dwyer et al., 2012).

Jednou ze základních charakteristik mutantů *psbO1* je snížený maximální kvantový výtěžek PSII (Fv/Fm, Murakami et al. 2002). Podle literatury se hodnoty Fv/Fm u mutantů v *psbO1* pohybují zhruba od 0,5 do 0,7 (Murakami et al. 2002, 2005; Lundin et al. 2007; Allahverdiyeva et al. 2009; Suorsa et al. 2016) s tím, že se hodnoty zvyšují s rostoucím stářím rostlin (Murakami et al. 2005). S tím souhlasí i naše měření (obr. 4.1). Podle Suorsa et al. (2016) má mutant *psbO1* nižší i hodnoty kvantového výtěžku PSII za světla (Φ_{II}), což opět potvrzuje i naše pozorování (graf 4.17).

Indukcí fluorescence chlorofylu (OJIP křivkami) u mutantů *psbO1* se ve svých experimentech zabývali Liu et al. (2007). Křivka, kterou získali, je podobná naší změřeným křivkám pro *psbO1* a *psbO1cr* (graf 4.16). Výrazné je snížení fluorescenčního výtěžku (fluorescence yield) mezi fázemi J-I. Podle Liu et al. (2007) to může značit poruchu OEC nebo neschopnost vytvořit stav Q_A Q_B .

Podle Suorsa et al. (2016) má mutant *psbO1* snížené množství karotenoidů a chlorofylu. Nižší hodnoty chlorofylu *a*, chlorofylu *b* i jejich poměru uvádí také Dwyer et al. (2012) pro rostliny se sníženým množstvím PsbO. Podobný výsledek (snížený obsah chlorofylu v *psbO1* a *psbO1cr*) jsme v případě měření pomocí přístroje MultispeQ na neporušených listech získali také (graf 4.11). Při měření izolovaných pigmentů jsme statisticky významný rozdíl v množství chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, jejich součtu ani v množství karotenoidů nezjistili (grafy 4.6, 4.7, 4.10). To však může být způsobeno tím, že jsme z důvodu nedostatku materiálu proměřili jen velmi málo vzorků (mutanta *psbO1* na dvou vzorcích, mutantů *psbO1cr* pouze na jednom vzorku). Poměr chlorofylu *a* k chlorofylu *b* byl v mutantech *psbO1* a *psbO1cr* nižší oproti wt, což odpovídá výsledku Dwyer et al. (2012) pro rostliny se sníženým množstvím PsbO.

Při provádění Western blotů bylo cílem ukázat, (1) zda mutanti vytvoření mutagenézí CRISPR-Cas9 v daném genu opravdu neprodukují žádný protein, (2) zda T-DNA inserční mutanti produkují protein, jehož gen mají mutovaný a (3) pokusit se kvantifikovat množství izoformy, kterou rostlina nemá vymutovanou. V publikovaných pracích se Western bloty na

detekci PsbO vyskutují (Lundin et al., 2007b; Dwyer et al., 2012; Suorsa et al., 2016). Není nám ale známa publikace, ve které by autoři pro imunodotekci používali specifické protilátky proti jednotlivým izoformám. Díky zatím nepublikovaným pokusům provedeným v naší laboratoři víme, že T-DNA inzerční mutant *psbO1* si může za určitých okolností expresi genu *psbO1* obnovit (minimálně při křížení s mutantem *psbO2*, viz obr 4.3d). To je možné díky tomu, že T-DNA není vložena přímo v kódující sekvenci, ale v 5' nepřekládané oblasti genu. Podobná situace je u T-DNA inzerčního mutantu *psbO2*, kde je T-DNA vložena na samém konci kódující sekvence a teoreticky by mohl vznikat jen drobně odlišný protein. Vzhledem k nesnadnému odlišení PsbO1 a PsbO2 bez použití specifických protilátek je možné, že případná slabá exprese mutovaného genu mohla být v publikovaných pracích přehlédnuta.

Na jednom našem western blotu bylo patrné, že *psbO1* i *psbO1cr* mutanti mají v předpokládaném místě PsbO slabý signál, který by mohl značit přítomnost izoformy PsbO1 (obr. 4.5a). Vzhledem k místu delece v mutantu *psbO1cr* však je velmi nepravděpodobné, že by v něm mohlo docházet ke vzniku proteinu PsbO1, takže by se dal slabý signál připsat nespecifické interakci protilátky. Na jiném blotu (obr 4.5c) však byl viditelný slabý signál anti-PsbO1 protilátky u mutantu *psbO1*, zatímco u mutantu *psbO1cr* nebyl. Je tedy otázka, jestli mutant *psbO1* malé množství proteinu PsbO1 obsahuje, nebo ne (případně jestli ho obsahují pouze někteří jedinci). Možnost obnovení exprese *psbO1* v tomto mutantovi však ukazuje přítomnost proteinu PsbO1 ve dvojitě mutantovi *psbO1 psbO2* (obr 4.5d).

Podle našich výsledků se nově vytvořený mutant *psbO1cr* v žádném ze sledovaných parametrů neliší od T-DNA inzerčního mutantu *psbO1*. Tento výsledek také naznačuje, že za běžných okolností nedochází v mutantovi *psbO1* k expresi genu *psbO1* ve významné míře.

Protože se v literatuře velmi liší informace o hladině proteinu PsbO2 u mutantů v genu *psbO1*, chtěli jsme pomocí specifických protilátek hladiny těchto proteinů spolehlivě kvantifikovat. I přes naši snahu se nám bohužel nepodařilo dostat přesvědčivá data, neboť hodnoty ze třech opakování byly velice odlišné (graf 4.21). Bylo by třeba ještě optimalizovat izolaci proteinů z rostlin a kvantitativní Western bloty.

Jak je výše uvedeno, mutanti *psbO1* a *psbO1cr* se v mnoha ohledech podobají rostlinám se sníženým množstvím PsbO (Dwyer et al., 2012). Jedním z vysvětlení může být to, že mají tyto rostliny změněný poměr PsbO1 a PsbO2 (množství PsbO1 je sníženo víc). Druhým možným vysvětlením je, že velká část fenotypového projevu *psbO1* a *psbO1cr* je způsobena sníženým celkovým množstvím PsbO a ne přímo absencí PsbO1. K rozlišení těchto dvou možností by mělo přispět vytvoření rostlin, které nebudou mít PsbO1, ale PsbO2 budou mít ve

stejném množství, jako je celkové množství PsbO ve wt. Tyto rostliny plánujeme získat transformací mutantů *psbo1cr* genem *psbO2* pod promotorem z *psbO1* (kapitola 3.4.6).

9.2. Mutanti *psbo2* a *psbo2cr*

V našem experimentu rostli mutanti *psbo2* a *psbo2cr* pomaleji než wt – měli menší plochu listové růžice (graf 4.4), nižší čerstvou hmotnost (graf 4.1) i sušinu (graf 4.2). K podobnému výsledku došli v minulosti pouze Lundin et al. (2007b). Jimi pozorovaný fenotyp *psbo2* byl však celkově odlišný od wt. V dalších publikacích (Allahverdiyeva et al. 2009; Suorsa et al. 2016) měl kupodivu stejný mutant *psbo2* vzrůst i další fenotypové charakteristiky shodné s wt. Stejná je i zkušenost z naší laboratoře, kde ve všech dosavadních experimentech nebyli mutanti *psbo2* fenotypově odlišní od wt. To nás vedlo k zjišťování, v čem byl rozdíl v tomto pokusu. Zjistili jsme, že oba mutanti v genu *psbO2* mají oproti wt menší semena a i jejich tvar je odlišný (obr 4.3). Zkontrolovali jsme také semena *psbo2* a *psbo2cr* sklizená v jinou dobu, kde rozdíl oproti wt nebyl, čímž jsme vyloučili, že tento fenotyp semen je způsoben mutací v *psbO2*. Vzhledem k tomu, že velikost semen má vliv na velikost rostlin, které z nich vyrostou (Elwell et al., 2011) předpokládáme, že pomalejší růst *psbo2* a *psbo2cr* v našem pokusu byl způsobený použitím nekvalitních semen. Je otázka, jestli nekvalitní semena měla vliv pouze na vzrůst rostlin. Očekáváme však, že případný vliv na fotosyntetický aparát byl zanedbatelný, protože výsledky měření fluorescence chlorofylu odpovídaly dalším experimentům provedeným v naší laboratoři.

Výsledky z měření obsahu pigmentů ukazují, že se *psbO2* mutanti neliší od wt v obsahu chlorofylu *a* (graf 4.6), chlorofylu *b* (graf 4.7), jejich součtu, relativním obsahu chlorofylu (graf 4.11) ani v obsahu karotenoidů (graf 4.10). Obsah barviv v mutantu *psbo2* měřili Suorsa et al. (2016), podle kterých je celková hladina chlorofylu a obsah karotenoidů o něco nižší, než ve wt, ale data v této publikaci bohužel nejsou statisticky zpracována. V mutantech *psbo2cr* a *psbo2* je poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* o něco vyšší než ve wt (pro *psbo2* tento rozdíl nevyhází signifikantně, graf. 4.9).

Při měření fluorescenčních parametrů vyšly pro mutanty v genu *psbO2* trošku nižší hodnoty Fv/Fm oproti wt a rozdíl je statisticky signifikantní (graf 4.14). Podobný rozdíl zjistili i Allahverdiyeva et al. (2009) a Suorsa et al. (2016), nicméně měli menší počet měření a výsledky nezpracovali statisticky, takže rozdíl nevypadal významně. Rozdíl v těchto hodnotách je způsoben především změnou hodnoty Fo a pouze do malé míry změnou hodnoty Fm, stejně jako u mutantů *psbo1* a *psbo1cr* (graf 4.12).

Při měření obsahu proteinů bylo stejně jako v případě mutantů v genu *psbO1* cílem (1) ukázat absenci PsbO2 v *psbo2cr* mutantovi, (2) ukázat případnou přítomnost PsbO2 v T-DNA inzerčním mutantovi *psbo2*, a (3) pokusit se o kvantifikaci PsbO1 v obou mutantech *psbo2* i *psbo2cr*. Zatímco absence PsbO2 v *psbo2cr* mutantovi se potvrdila, u T-DNA inzerčního mutantu *psbo2* ukázal western blot na přítomnost malého množství PsbO2 (obr 4.3b). Vzhledem k tomu, že u mutantu *psbo2cr* žádný signál pozorován nebyl, předpokládáme vysokou specifitu protilátky anti-PsbO2 a trůfáme si tvrdit, že T-DNA inzerční mutant alespoň v malé míře produkuje protein a není tedy úplným knock-out mutantem.

Stejně jako u mutantů *psbo1* a *psbo1cr* se nám ani u mutantů v genu *psbO2* nepodařilo určit přesné množství proteinu PsbO1.

Nově vytvořený mutant *psbo2cr* se v žádném z námi měřených parametrů neliší od T-DNA inzerčního mutantu *psbo2*. Případné malé množství proteinu PsbO2 v mutantu *psbo2* je tedy pravděpodobně zanedbatelné. Ve většině parametrů se tyto rostliny neliší ani od wt, což je v souladu s publikovanými pracemi (Allahverdiyeva et al. 2009; Suorsa et al. 2016). S publikací Lundina et al. (2007) se naše výsledky srovnávat nedají, protože jejich mutant *psbo2*, ač by to měl být stejný T-DNA inzerční mutant, měl z neznámého důvodu velmi odlišný fenotyp. My jsme na rozdíl od výše zmíněných prací (Allahverdiyeva et al. 2009; Suorsa et al. 2016) odhalili rozdíl v hodnotách maximálního kvantového výtěžku fotosystému II (Fv/Fm) a v poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*. Vzhledem k tomu, že se mutanti *psbo2* a *psbo2cr* liší od wt stejným způsobem, ač vznikli nezávisle, dá se předpokládat, že jsou tyto drobné rozdíly způsobeny opravdu mutací v genu *psbO2* a ne nějakou náhodnou vlastností dané linie rostlin.

10. Závěry

1. Vytvořili jsme knock-out mutantní linie *psbo1cr* a *psbo2cr* pomocí metody CRISPR-Cas9.
2. V žádném z měřených parametrů se mutant *psbo1cr* neliší od T-DNA inzerčního mutantu *psbo1*, stejně tak se mutant *psbo2cr* neliší od T-DNA inzerčního mutantu *psbo2*.
3. Mutanti *psbo2* a *psbo2cr* se liší od wt sice drobně, ale signifikantně v hodnotách maximálního kvantového výtěžku fotosystému II (Fv/Fm).
4. U T-DNA inzerčních mutantů *psbo2* vzniká pravděpodobně alespoň malé množství proteinu PsbO2.
5. Nebyli jsme schopni stoprocentně potvrdit ani vyvrátit, zda u T-DNA inzerčních mutantů *psbo1* vzniká alespoň malé množství proteinu PsbO1.

11. Seznam použité literatury

- Allahverdiyeva, Y., Mamedov, F., Holmström, M., Nurmi, M., Lundin, B., Styring, S., ... Aro, E. (2009). Comparison of the electron transport properties of the psbO1 and psbO2 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *BBA - Bioenergetics*, 1787(10), 1230–1237. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.05.013>
- Barber, J. (2008). Crystal Structure of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II, 47(6), 1700–1710.
- Blaustein, R. (2016). The Great Oxidation Event. *BioScience*, 66(3), 189–195. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv193>
- Bommer, M., Bondar, A. N., Zouni, A., Dobbek, H., & Dau, H. (2016). Crystallographic and Computational Analysis of the Barrel Part of the PsbO Protein of Photosystem II: Carboxylate-Water Clusters as Putative Proton Transfer Relays and Structural Switches. *Biochemistry*, 55(33), 4626–4635. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00441>
- Bricker, T. M., & Frankel, L. K. (2008). The psbO1 mutant of *Arabidopsis* cannot efficiently use calcium in support of oxygen evolution by photosystem II. *Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 29022–29027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805122200>
- Bricker, T. M., Roose, J. L., Fagerlund, R. D., Frankel, L. K., & Eaton-rye, J. J. (2012). The extrinsic proteins of Photosystem II ☆. *BBA - Bioenergetics*, 1817(1), 121–142. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.07.006>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>
- Commet, A., Boswell, N., Yocum, C. F., & Popelka, H. (2012). pH optimum of the photosystem II H₂O oxidation reaction: Effects of PsbO, the manganese-stabilizing protein, Cl⁻ retention, and deprotonation of a component required for O₂ evolution activity. *Biochemistry*, 51(18), 3808–3818. <https://doi.org/10.1021/bi201678m>
- De Las Rivas, J., Balsera, M., & Barber, J. (2004). Evolution of oxygenic photosynthesis: Genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins. *Trends in Plant Science*, 9(1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.11.007>
- De Las Rivas, J., & Barber, J. (2004). Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications. *Photosynthesis Research*, 81(3), 329–343. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000036889.44048.e4>
- De Las Rivas, J., & Heredia, P. (1999). Structural predictions on the 33 kDa extrinsic protein

- associated to the oxygen evolving complex of photosynthetic organisms. *Photosynthesis Research*, 61(1), 11–21. <https://doi.org/10.1023/A:1006265816104>
- Duchoslav, M., & Fischer, L. (2015). Parallel subfunctionalisation of PsbO protein isoforms in angiosperms revealed by phylogenetic analysis and mapping of sequence variability onto protein structure. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0523-4>
- Dwyer, A.S., Chow, W.S., Yamori, W., Evans, J.R., Kaines, S., Cosenza, I., & Caemmerer, S. von. (2012). Antisense reductions in the PsbO protein of photosystem methylation and chromatin patterning II leads to decreased quantum yield but similar maximal photosynthetic rates Maria. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 695–709. <https://doi.org/10.1093/jxb/err313>
- Elwell, A. L., Gronwall, D. S., Miller, N. D., Spalding, E. P., & Durham Brooks, T. L. (2011). Separating parental environment from seed size effects on next generation growth and development in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, 34(2), 291–301. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02243.x>
- Ghanotakis, D. F., & Yocum, C. F. (1990). Photosystem ii and the oxygen-evolving complex. Hall, M., Mata-Cabana, A., Åkerlund, H. E., Florencio, F. J., Schröder, W. P., Lindahl, M., & Kieselbach, T. (2010). Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. *Proteomics*, 10(5), 987–1001. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900654>
- Ifuku, K., & Noguchi, T. (2016). Structural coupling of extrinsic proteins with the oxygen-evolving center in photosystem II. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00084>
- Jiang, T., Oh, E. S., Bonea, D., & Zhao, R. (2017). HSP90C interacts with PsbO1 and facilitates its thylakoid distribution from chloroplast stroma in Arabidopsis, 1–25.
- Karamoko, M., Cline, S., Redding, K., Ruiz, N., & Hamel, P. P. (2011). Lumen thiol oxidoreductase1, a disulfide bond-forming catalyst, is required for the assembly of photosystem II in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23(12), 4462–4475. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089680>
- Kok, B., Forbush, B., & McGloin, M. (1970). Cooperation of Charges in Photosynthetic O₂ Evolution—I. a Linear Four Step Mechanism. *Photochemistry and Photobiology*, 11(6), 457–475. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1970.tb06017.x>
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O., & Edwards, G. E. (2004). New fluorescence parameters for the determination of Q. *Biological Chemistry*, 209–218.

- Kuhlgert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M. I., ... Kramer, D. M. (2016). MultispeQ Beta: A tool for large-scale plant phenotyping connected to the open photosynQ network. *Royal Society Open Science*, 3(10).
<https://doi.org/10.1098/rsos.160592>
- Li, Y., Yao, R., Chen, Y., Xu, B., Chen, C., & Zhang, C. (2020). Mimicking the catalytic center for the water-splitting reaction in photosystem II. *Catalysts*, 10(2), 1–20.
<https://doi.org/10.3390/catal10020185>
- Liu, H., Frankel, L. K., & Bricker, T. M. (2007). Functional analysis of photosystem II in a PsbO-1-deficient mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry*, 46(25), 7607–7613.
<https://doi.org/10.1021/bi700107w>
- Liu, Z. J., Wang, X. L., Qin, C., Zhang, Z. M., Li, Y. G., Chen, W. L., & Wang, E. B. (2016). *Polyoxometalate-assisted synthesis of transition-metal cubane clusters as artificial mimics of the oxygen-evolving center of photosystem II. Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 313). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.12.006>
- Lubitz, W., Chrysin, M., & Cox, N. (2019). Water oxidation in photosystem II. *Photosynthesis Research*, 142(1), 105–125. <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00648-3>
- Lundin, B., Nurmi, M., Rojas-Stuetz, M., Aro, E. M., Adamska, I., & Spetea, C. (2008). Towards understanding the functional difference between the two PsbO isoforms in *Arabidopsis thaliana* - Insights from phenotypic analyses of psbo knockout mutants. *Photosynthesis Research*, 98(1–3), 405–414. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9325-y>
- Lundin, B., Thuswaldner, S., Shutova, T., Eshaghi, S., Samuelsson, G., Barber, J., ... Spetea, C. (2007a). Subsequent events to GTP binding by the plant PsbO protein: Structural changes, GTP hydrolysis and dissociation from the photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(6), 500–508.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.10.009>
- Lundin, B., Vener, A. V., Spetea, C., & Hansson, M. (2007b). The *Arabidopsis* PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein, 528–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02976.x>
- Lydakis-Simantiris, N., Hutchison, R. S., Betts, S. D., Barry, B. A., & Yocum, C. F. (1999). Manganese stabilizing protein of photosystem II is a thermostable, natively unfolded polypeptide. *Biochemistry*, 38(1), 404–414. <https://doi.org/10.1021/bi981847z>
- Martínez-García, J. F., Monte, E., & Quail, P. H. (1999). A simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. *Plant Journal*, 20(2), 251–257. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00579.x>

- Murakami, R., Ifuku, K., Takabayashi, A., Shikanai, T., Endo, T., & Sato, F. (2002). Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant with impaired psb O , one of two genes encoding extrinsic 33-kDa proteins in photosystem II. *Elsevier Science B.V.*, *523*, 138–142.
- Murakami, R., Ifuku, K., Takabayashi, A., Shikanai, T., Endo, T., & Sato, F. (2005). Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO proteins, *272*, 2165–2175. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04636.x>
- Najafpour, M. M., Zaharieva, I., Zand, Z., Maedeh Hosseini, S., Kouzmanova, M., Hołyńska, M., ... Allakhverdiev, S. I. (2020). Water-oxidizing complex in Photosystem II: Its structure and relation to manganese-oxide based catalysts. *Coordination Chemistry Reviews*, *409*, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213183>
- Popelkova, H., & Yocum, F. C. (2007). Current status of the role of Cl⁻ ion in the oxygen-evolving complex, *1*, 111–121. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9121-5>
- Roelofs, T. A., Liang, W., Latimer, M. J., Cinco, R. M., Rompel, A., Andrews, J. C., ... Klein, M. P. (1996). Oxidation states of the manganese cluster during the flash-induced S-state cycle of the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(8), 3335–3340. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3335>
- Seidler, A. (1997). The extrinsic polypeptides of Photosystem II, *1277*(January).
- Shutova, T., Klimov, V. V., Andersson, B., & Samuelsson, G. (2007). A cluster of carboxylic groups in PsbO protein is involved in proton transfer from the water oxidizing complex of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1767*(6), 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.01.020>
- Sikosek, T., Chan, H. S., & Bornberg-Bauer, E. (2012). Escape from adaptive conflict follows from weak functional trade-offs and mutational robustness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(37), 14888–14893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115620109>
- Su, X., Wei, X., Zhu, D., Chang, W., & Liu, Z. (2017). Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex, *Biophysical Reviews*, *820*(August), 815–820. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0357-4>
- Suorsa, M., Rossi, F., Tadini, L., Labs, M., Colombo, M., Jahns, P., ... Pesaresi, P. (2016). PGR5-PGRL1-Dependent Cyclic Electron Transport Modulates Linear Electron Transport Rate in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, *9*(2), 271–288. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.001>

- Wang, Shuai, Li, Q. P., Wang, J., Yan, Y., Zhang, G. L., Zhang, H., ... Gou, J. Y. (2019). YR36/WKS1-Mediated Phosphorylation of PsbO, an Extrinsic Member of Photosystem II, Inhibits Photosynthesis and Confers Stripe Rust Resistance in Wheat. *Molecular Plant*, 12(12), 1639–1650. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.10.005>
- Wang, S., & Blumwald, E. (2014). Stress-induced chloroplast degradation in arabidopsis is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell*, 26(12), 4875–4888. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133116>
- Wei, X., Su, X., Cao, P., Liu, X., Chang, W., Li, M., ... Liu, Z. (2016). Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature*, 534(7605), 69–74. <https://doi.org/10.1038/nature18020>
- Wellburn, A. R. (1994). Wellburn.pdf. *Journal of Plant Physiology*.
- Xing, H. L., Dong, L., Wang, Z. P., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Liu, B., ... Chen, Q. J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
- Yi, X., Mcchargue, M., Laborde, S., Frankel, L. K., & Bricker, T. M. (2005). The Manganese-stabilizing Protein Is Required for Photosystem II Assembly / Stability and Photoautotrophy in Higher Plants *, 280(16), 16170–16174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501550200>