

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Eliška Kobercová

Indukovaná RNAi proti esenciálním genům metabolismu dusíku jako nástroj
pro kontrolu GM rostlin

Inducible RNAi against essential genes of nitrogen metabolism as a
tool for control of GM plants

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Praha, 2017

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli RNDr. Lukášovi Fischerovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, podporu a podnětné diskuze během experimentální části a za trpělivost při sepisování této práce. Děkuji rovněž za vymyšlení a nabídnutí zajímavého tématu, které ne zcela zapadá do výzkumného zaměření laboratoře.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Lence Sikorové, Ph.D., za prvotní zaučení do metod molekulární biologie a Mgr. Vojtěchovi Čermákovi za zaškolení do pokročilejších metod, poskytnutí výchozích vektorů během klonování a za podělení se o cenné rady a zkušenosti. Můj dík patří i Mg. Adéle Růžičkové za pomoc při optimalizaci aplikování estradiolu. Děkuji všem kolegům z laboratoře 210 za vytvoření příjemného pracovního prostředí, přátelskou atmosféru a ochotu vždy pomoci, zejména pak RNDr. Miroslavu Srbovi, Ph.D., za odborné konzultace.

Ráda bych poděkovala Ing. Jibanu Kumarovi, Ph.D., za umožnění experimentu v CO₂ klimaboxech na Výzkumném ústavu rostlinné výroby, dále pak Ing. Janě Jarošové, Ph.D., za ochotu a pomoc během tohoto pokusu, zejména během technických problémů.

Můj dík patří i Mgr. Petře Cifrové za zařizování okolo CO₂/etylenového boxu na katedře a za ochotu vždy poradit a povzbudit.

V neposlední řadě můj velký dík patří mým rodičům za podporu psychickou i materiální po dobu studia a za trpělivost během zpracovávání diplomové práce. Děkuji Radkovi a všem, kteří mě podporovali.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 15. 8. 2017

Podpis:

Abstrakt

Jednou z obav při pěstování geneticky modifikovaných (GM) rostlin je nebezpečí jejich nekontrolovaného šíření. Možným nástrojem pro jejich kontrolu by teoreticky mohla být indukovaná RNA interference proti některému z životně důležitých genů. Po aplikaci indukční látky by došlo k umlčování exprese tohoto esenciálního genu a tím i k usmrcení GM rostliny rozšířené mimo vyhrazenou kultivační plochu.

Pro testování této strategie a indukci umlčování byly v této práci zvoleny geny pro dva klíčové enzymy dusíkového metabolismu, glutamát syntázu (GOGAT) a glutamín syntázu (GS). GS zpracovává amonné ionty do podoby glutaminu, GOGAT pak přenáší amidovou skupinu z glutaminu na 2-oxoglutarát za vzniku dvou glutamátů. GS a GOGAT jsou hlavní cestou na zpracování amonných iontů, které mohou být ve zvýšené míře pro rostliny toxické a blokování jejich fixace při fotorespiraci vede k silné inhibici fotosyntézy.

Cílem této práce bylo popsat projevy umlčování genů pro GOGAT a GS u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Pro umlčování byly připraveny vlásenkové konstrukty pod konstitutivním nebo pod estradiolem-indukovatelným promotorem.

U vybraných transformantů nesoucích vlásenku proti *GOGAT* byly při aplikaci estradiolu v *in vitro* podmínkách pozorovány projevy umlčování tohoto genu projevující se jako chloróza a redukovaný vzrůst. Postřík estradiolem *ex vitro* se ukázal problematický, navození umlčování v rámci celé rostliny nebylo úspěšné. V případě GS byl pro umlčování vybrán především gen pro GS2, plastidovou isoformu, u níž nebyl u *A. thaliana* dosud popsán fenotyp knock-out mutanta a není tudíž jasná její úloha v metabolismu amonných iontů. Je možné, že mutace v *GS2* je letální anebo, že její úlohu může zajistit některá z cytosolických isoform GS1. V této práci byly charakterizovány fenotypové projevy snížené hladiny GS2, a to jednak u linií nesoucích konstrukt pro navození RNAi a jednak u promotorového mutanta získaného z veřejné kolekce, u něhož byla v rámci diplomové práce zjištěna snížená hladina transkriptu *GS2* zhruba na třetinu v porovnání s divokým typem. Snížení exprese *GS2* se projevilo menší biomasou, žlutějším zbarvením a změnami některých fotosyntetických parametrů. Tyto projevy byly aspoň částečně potlačovány v atmosféře se zvýšeným CO₂, *GS2* se tedy zřejmě podílí na fixaci amonných iontů při fotorespiraci.

Abstract

Uncontrolled spreading of genetically modified (GM) plants is one of the main concerns about their cultivation. Inducible RNA interference against an essential gene could be a tool for control of GM plants. After spraying with a chemical inducer, the essential gene will be silenced so the treated GM plant will die. For testing this strategy we chose two key enzymes of nitrogen metabolism, glutamate synthase (GOGAT) and glutamine synthetase (GS). GS processes ammonium ions into glutamine, then GOGAT transfers the amide group from glutamine to 2-oxoglutarate to form two glutamates. GS/GOGAT cycle is the main pathway for assimilation of ammonium ions, which could be toxic to plants in a higher concentration. Disruption of ammonium assimilation during photorespiration causes a strong inhibition of photosynthesis.

The aim of this work was to describe the effects of silencing *GOGAT* and *GS* genes in *Arabidopsis thaliana*. To induce silencing, RNAi hairpin constructs under a control of constitutive or estradiol-inducible promoter were prepared.

In selected independent transformants with the inducible hairpin against GOGAT, chlorosis and reduced growth were observed after the estradiol treatment in *in vitro* conditions. However, the spraying with estradiol was tricky, at the whole plant level, the induction of silencing was not successful.

In the case of GS, we chose the gene for plastid isoform GS2, because knock-out mutant in *GS2* has not been hitherto described in *A. thaliana*. The function of GS2 in photorespiratory assimilation of ammonium is not clear. It is possible that mutation in *GS2* is lethal or the function of GS2 can be complemented by some of cytosolic GS1 isoforms. Using a promoter mutant in *GS2* and RNAi against *GS2*, we deduce that reduction in *GS2* expression causes decrease in biomass, yellowing and changes in some photosynthetic parameters. These phenotype effects were partially suppressed in an atmosphere with elevated CO₂, so GS2 appears to be involved in the fixation of ammonium ions during photorespiration.

Klíčová slova:

glutaminsyntetáza, glutamátsyntáza, dusíkový metabolismus, amonné ionty, indukční systém, RNA interference, kontrola GMO, estradiol, fotorespirace, *Arabidopsis thaliana*

Keywords:

glutamine synthetase, glutamate synthase, nitrogen metabolism, ammonium ions, inducible system, RNA interference, GMO control, estradiol, photorespiration, *Arabidopsis thaliana*

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Cíle	2
2. Přehled literatury.....	3
2.1 RNA interference jako nástroj pro studium genové funkce.....	3
2.2 Glutaminsyntetáza.....	6
2.2.1 Evoluce glutaminsyntetáz	6
2.2.2 Struktura a vlastnosti GS	8
2.2.3 GS1	9
2.2.4 GS2	11
2.3 Glutamátsyntáza.....	12
2.3.1 Obecné vlastnosti glutamátsyntáz – evoluce a struktura	12
2.3.2 Fd-GOGAT	14
2.3.3 NADH-GOGAT.....	17
3. Materiál a metodika	18
3.1 Příprava konstruktů.....	18
3.2 Klonování vlásenkových konstruktů.....	27
3.3 Charakterizace mutantních linií <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
3.4 Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.5 Analýza hladiny transkriptu	36
3.6 Indukce umlčování pomocí estradiolu	39
3.7 Fenotypová analýza rostlin	40
3.8 Vyhodnocování dat	42
4. Výsledky	43
4.1 Indukovaná RNAi proti <i>GOGAT</i> jako nástroj pro usmrcování GM rostlin.....	43
4.1.1 Charakterizace mutantních linií v <i>GOGAT</i>	43
4.1.2 Umlčování <i>GOGAT</i> pomocí inducibilní vlásenky	47

4.1.3	Optimalizace aplikování estradiolu.....	53
4.2	Úloha GS2 u <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
4.2.1	Design experimentů – <i>in silico</i> analýza	55
4.2.2	Charakterizace mutantních linií v <i>GS2</i> , <i>GLN1;1</i> a <i>GLN1;2</i>	57
4.2.3	Umlčování <i>GS2</i> pomocí RNAi	62
4.2.4	Fenotypová analýza promotorových mutantů v <i>GS2</i> a rostlin <i>35S-GS2-IR</i>	64
5.	Diskuze	71
5.1	Indukovaná RNAi jako nástroj pro cílené usmrcování GM rostlin	71
5.2	Úloha a zastupitelnost GS2 u <i>A. thaliana</i>	77
6.	Závěry	82
7.	Seznam použité literatury	83

Seznam použitých zkratk

35S-GS2-IR – vlásenkový konstrukt pro konstitutivní umlčování *GS2*

ACR11 – protein ACT domain repeats 11

AGO – Argonaute

ANOVA – analysis of variance

bp – base pairs

CRISPR/Cas9 – clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR
associated protein 9

dH₂O – destilovaná voda

DCL – protein Dicer-like

DMSO – dimetylsulfoxid; kontrola k ošetření estradiolem

DMF – dimetylformamid

dNTPs – směs deoxyribonukleotidů pro PCR

dsRNA – double-stranded RNA

EC – z angl. enzyme commission, označuje číselnou klasifikaci enzymu

ESTR – estradiol; *sensu lato* varianta ošetřená estradiolem

Fd – ferredoxin

Fd-GOGAT – glutamátsyntetáza využívající jako kofaktor ferredoxin

FAD – flavinadenindinukleotid

FMN – flavinmononukleotid

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

GDC – z angl. glycine decarboxylase complex

GFP – green fluorescent protein

GLN, resp. *GLN1;1* – označení genu pro glutamínsyntetázu

GM – geneticky modifikovaný

GOGAT – glutamin:2-oxoglutarát aminotransferáza neboli glutamátsyntetáza;
sensu stricto Fd-GOGAT1 u *A. thaliana*

GS – glutamínsyntetáza

GS1 – cytosolická isoforma glutamínsyntetáz u krytosemenných rostlin

GS2 – chloroplastová isoforma glutamínsyntetáz u krytosemenných rostlin

iGFP – rostliny nesoucí indukibilní GFP (regulováno aplikací estradiolu)

IR – invertovaná repetice

IR_GFP – rostliny, nesoucí gen pro GFP a zároveň vlásenku proti *GFP*

MSO – methion sulfoximin, specifický inhibitor GS

miRNA – microRNA

NADH – nikotinamidadenindinukleotid – redukovaná forma

nt – nukleotidy

PCR – polymerase chain reaction

PPT – phosphinothricin, specifický inhibitor GS

qRT-PCR – quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction

RDR – RNA deependentní RNA polymeráza

RISC – RNA-induced silencing complex

RNAi – RNA interference

SDS – sodium dodecyl sulfate

SHMT – serin hydroxymetyltransferáza

siRNA – short-interfering RNA

T-DNA – transferová DNA odvozená od plazmidu *A. tumefaciens*

Tris – tris(hydroxymetyl)aminometan

VÚRV – Výzkumný ústav rostlinné výroby v Ruzyni

WT – wild type

XVE – estradiolový indukční systém

XVE-GOGAT-IR – vlásenkový konstrukt pro inducibilní umlčování *Fd-GOGAT1*

1. Úvod

Genetické modifikace rostlin umožňují vylepšování vlastností zemědělských plodin rychlejší cestou než klasické šlechtění. Můžou se uplatňovat při zvyšování výnosů, zlepšování nutriční hodnoty, navození rezistence k biotickým či abiotickým stresům atd. Mohou tak pomáhat k překonání problémů současného intenzivního zemědělství, ale také čelit změnám klimatu. Rozšíření geneticky modifikovaných (GM) rostlin je však nutné kontrolovat z ekologických i legislativních důvodů. Je nutné zabránit šíření GM rostlin do životního prostředí. Dále pak je nutné zabránit šíření transgenu do přirozených populací či konvenčně pěstovaných plodin. Kontrola GM rostlin se tedy zaměřuje především na omezení tvorby semen nebo navození pylové sterility. U rostlin rozmnožujících se hlavně vegetativním způsobem by bylo výhodné moci GM rostliny cíleně likvidovat (navodit jejich odumření), pokud by se rozšířily za hranice kultivační plochy. Takový způsob indukovaného usmrcování rostlin by se dal využít i pro kontrolu pěstování invazních rostlin, např. křídlatky jako bioenergetické plodiny.

Na pozadí této diplomové práce stojí právě myšlenka indukovaného usmrcování křídlatky, což lze brát i jako ilustrační příklad. Křídlatka by byla předem geneticky modifikována tak, aby se po aplikaci indukční látky (např. zředěného roztoku etanolu) začal umlčovat životně důležitý gen, a tím pádem by došlo k odumření rostliny rozšířené mimo vyhrazenou kultivační plochu. Tento způsob by teoreticky mohl být jednodušším a ekologicky šetrnějším než aplikace herbicidu. Jako cílové geny pro umlčování pomocí indukované RNA interference byly vybrány geny pro glutaminsyntetázu a glutamátsyntázu, dva ústřední enzymy dusíkového metabolismu.

Dusík je součástí proteinů, nukleových kyselin a dalších látek důležitých jak pro jednotlivé buňky, tak pro rostlinu jako celek. Dusík je proto klíčovou živinou rostlin, jejíž nedostupnost je však často limitujícím faktorem růstu a vývoje rostliny. Z pohledu zemědělství se jedná i o jednu z nejdražších živin. Celosvětová spotřeba dusíkatých hnojiv se pohybuje přes 110 milionů tun za rok (FAO, 2017). Nadměrné používání dusíkatých hnojiv navíc negativně ovlivňuje životní prostředí. Dlouhodobě se tedy usiluje o zvýšení využitelnosti dusíku rostlinami.

Glutaminsyntetáza (GS) a glutamátsyntáza (neboli glutamin:2-oxoglutarát amidotransferáza, GOGAT) jsou klíčové enzymy metabolismu dusíku. GS katalyzuje reakci amonných iontů s glutamátem za vzniku glutaminu. Funkčně pak navazuje GOGAT, která přenáší amidovou skupinu z glutaminu na 2-oxoglutarát za vzniku dvou

glutamátů. Tento GS/GOGAT cyklus je hlavní cestou zpracovávající amonné ionty u rostlin. Amonné ionty jsou jedinou formou dusíku, která je přímo zabudována do aminokyselin a následně pak do proteinů. Amonné ionty se uvolňují v řadě procesů v rostlinách – během asimilace nitrátu, při fotorespiraci, během senescence, při klíčení a tvorbě semen, v metabolismu fenylpropanoidů. V nadměrném množství ale mohou být amonné ionty pro rostliny toxické. Význam GS/GOGAT cyklu dokládá i fakt, že specifický inhibitor GS, fosfinitricin, je účinnou látkou běžně používaného totálního herbicidu Basta (Lam *et al.*, 1996).

U rostlin se GOGAT dělí dle využívaného kofaktoru na isoformu Fd-GOGAT využívající ferredoxin (u *Arabidopsis thaliana* kódována 2 geny) a na NADH-GOGAT (1 gen u *A. thaliana*). Mutace v *Fd-GOGAT1* je dle literatury podmíněně letální, patří mezi tzv. fotorespirační mutace. V podmínkách potlačujících fotorespiraci (např. v atmosféře se zvýšeným CO₂) rostou mutanti v *Fd-GOGAT1* stejně jako kontrolní rostliny, pokud jsou však vystaveny běžné atmosféře, žloutnou a časem odumírají (Coschigano *et al.*, 1998).

GS se u rostlin nachází ve formě chloroplastové GS2, která je u *A. thaliana* kódována jedním genem, a ve formě cytosolické GS1 (u *A. thaliana* 5 genů). GS2 se nachází zejména ve fotosyntetických pletivech a je považována za klíčovou pro zpracování amonných iontů uvolněných při dekarboxylaci glycinu během fotorespirace. Na rozdíl od *Fd-GOGAT1* nebyl u *A. thaliana* mezi fotorespiračními mutanty mutant v *GS2* nalezen. Překvapivě u této modelové rostliny zcela chybí jakýkoli popis mutace v *GS2*. Je tedy možné, že mutace v *GS2* je letální nebo že úlohu GS2 během fotorespirace zastupuje některá z cytosolických isoform (Lam *et al.*, 1996).

1.1 Cíle

Cílem této diplomové práce bylo u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*:

1. Zkusit pomocí indukované RNA interferenci proti *Fd-GOGAT1* usmrtit rostliny
2. Objasnit úlohu plastidové GS2 a její zastupitelnost cytosolickými isoformami

2. Přehled literatury

2.1 RNA interference jako nástroj pro studium genové funkce

RNA interference (RNAi) je významným regulačním mechanismem podílejícím se u rostlin na kontrole genové exprese během ontogeneze a v odpovědi na biotické či abiotické stresy, dále pak na obraně proti cizorodým nukleovým kyselinám (virům, transpozonům) a na udržování heterochromatinu. RNAi je konzervovaným procesem v rámci eukaryot (Baulcombe, 2004). Prvně byl fenomén RNAi pozorován u rostlin *Petunia hybrida*, do kterých byl vnesen gen pro chalkonsyntázu za účelem výraznějšího zabarvení květů. Překvapivě došlo k opačnému efektu, ke ztrátě barvy v rámci celých květů anebo nerovnoměrně v některých oblastech, tedy k blokování endogenního genu kosupresí (Napoli *et al.*, 1990). Mechanismus RNAi (role dsRNA v tomto procesu) byl pak ozřejměn u hád'átka *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998).

Základní složkou RNAi jsou malé RNA o velikosti 21-24 nt, které umožňují rozpoznání cílové RNA na základě komplementarity. Malé RNA vznikají z prekurzorové dvouvláknové RNA (dsRNA). V buňce můžou vznikat dsRNA různými způsoby (dle konkrétní dráhy malých RNA). Prekurzorová dsRNA je štěpena proteinem z rodiny Dicer-like (DCL) na malé RNA, které jsou na koncích obou vláken metylovány pomocí HEN1 (Hua enhancer1). Následně jsou malé RNA rozpoznány proteinem Argonaut (AGO). Ten jedno vlákno RNA odbourá a druhé vlákno, tzv. vedoucí vlákno, využije pro hledání komplementární RNA. Vytváří se tak tzv. RISC komplex (RNA-induced silencing complex). Po navázání RISC na komplementární mRNA může dojít buď k jejímu rozštěpení anebo k blokaci translace. Tímto způsobem je navozeno posttranskripční umlčování daného genu (viz Obr. 2.1). Komplex AGO s navázanou RNA se může podílet i na navození metylace DNA a na změně chromatinového stavu v promotorové oblasti genu, čímž dochází k transkripčnímu umlčování (Bologna & Voinnet, 2014).

Při posttranskripčním a transkripčním umlčování se uplatňují odlišné typy malých RNA (vzniklých odlišným způsobem) a různé paralogy DCL a AGO, u *A. thaliana* jsou 4 paralogy DCL a 10 AGO. Základní způsob dělení malých RNA je na regulační microRNA (o velikosti 20-21nt), které vznikají přepisem rostlině vlastního MIR genu a kontrolují expresi rostlinných genů během ontogeneze či v odpovědi na stresové podmínky, a na ostatní malé RNA, tj. siRNA (short-interfering RNA). Skupina siRNA je dosti variabilní, dle způsobu biogeneze malých RNA se dělí do dalších podskupin.

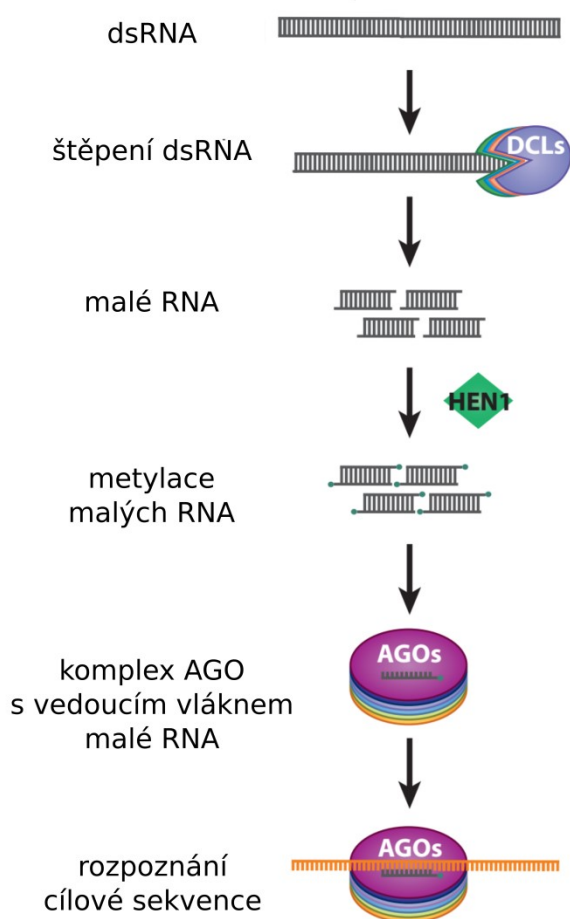
Uplatňuje se např. při transkripčním umlčování nebo v odpovědi na virovou infekci (Bologna & Voinnet, 2014).

V experimentální biologii je RNAi využívána pro umlčování genů našeho zájmu. Uměle lze navodit posttranskripční umlčování několika způsoby. Prvním historicky používaným způsobem bylo vnesení genu našeho zájmu v antisense orientaci (Rothstein *et al.*, 1987), i když tehdy ještě nebyl znám mechanismus RNAi a soudilo se, že vnesení antisense RNA pouze mechanicky brání translaci v důsledku párování dvou komplementárních RNA. Výrazně účinnějším způsobem je vnesení invertované repetice daného genu oddělené spojovací sekvencí. Transkripcí pak vzniká vlásenková struktura. Pokud je pro spojení sense a antisense vlákna použita sekvence sestříhovaného intronu, dochází prakticky ke 100% umlčování daného genu (Smith *et al.*, 2000). Dalším způsobem navození RNAi je vložení genu v sense orientaci pod silný promotor, avšak bez sekvence terminátoru. Dojde k produkci aberantních transkriptů bez koncové polyadenylace, které jsou substrátem pro RNA-dependentní RNA polymerázu (RDR), která vytvoří druhé vlákno RNA a dá tak vzniknout prekurzorové dsRNA (Luo & Chen, 2007). V porovnání s invertovanou repeticí a s antisense přístupem se jedná o nejméně účinné umlčování (Čermák, 2012). Pro umlčování lze využít i vnesení tzv. artificiální miRNA, která napodobuje vlásenkovou strukturu endogenních miRNA, ale cílí na gen našeho zájmu. Výhodou je, že z této artificiální miRNA vzniká pouze jedna konkrétní malá RNA, která cílí na danou mRNA. Nehrozí tedy ovlivnění ostatních transkriptů jako u ostatních přístupů (Tiwari *et al.*, 2014).

RNAi se hodí zejména pro studium genů, u nichž nejsou ve veřejných databázích dostupní mutanti. Rovněž se dá využít pro současné umlčování několika homologických genů, jejichž proteinové produkty mohou být v rostlinách vzájemně zastupitelné. Předpokladem je však dostatečně konzervovaná oblast pro zacílení RNAi. Dále se RNAi může využít pro studium genů, jejichž mutace je letální. Umlčování pomocí RNAi může probíhat různě silně, lze tedy sledovat projevy snížené hladiny esenciálního proteinu. Alternativně může být konstrukt pro navození RNAi vložen pod inducibilní promotor. Umlčování životně důležitého genu bude probíhat až po aplikaci indukční látky. Lze použít i pletivově specifické promotory a konkrétní gen by tak mohl být umlčován jen v daném rostlinném pletivu.

RNAi má i praktické využití v zemědělské praxi. Řada genetických modifikací plodin je založena na umlčování daného genu pomocí RNAi. Příkladem může být první komerčně pěstovaná GM plodina, rajče Flavr Savr vyznačující se prodlouženou

trvanlivostí. Rajče Flavr Savr nese v antisense orientaci gen pro polygalakturonázu, která se účastní degradace buněčné stěny (Krieger *et al.*, 2008). Zmínit lze i odrůdu bramboru Amfloru, která byla v minulosti schválena pro pěstování v EU. Amflora nesla v antisense orientaci gen pro škrobsyntázu vázanou na škrobová zrna. Bramborové hlízy tak obsahovaly škrob tvořený z 97 % amylopektem, což je výhodné pro technické zpracování (Wandelt, 2007). Genetické modifikace plodin založené na RNAi se podílí např. na navození rezistence k abiotickým či biotickým stresům (např. rezistence vůči virovým chorobám), na snížení obsahu nevhodných látek (alergenů, alkaloidů) nebo naopak zvýšení obsahu nutričně výhodných látek, na vytvoření bezsemenných odrůd nebo zvýšení odolnosti plodů ke skladování (Kamthan *et al.*, 2015).



Obr. 2.1 - Schéma dráhy RNA interference

DCLs značí proteiny Dicer-like, HEN1 označuje metyltransferázu Hua enhancer 1, AGOs značí proteiny z rodiny Argonaut. Schéma bylo převzato z práce (Bologna & Voinnet, 2014), a upraveno.

2.2 Glutaminsyntetáza

2.2.1 Evoluce glutaminsyntetáz

Glutaminsyntetáza (GS, EC 6.3.1.2) katalyzuje za spotřeby ATP reakci amonných iontů s glutamátem za vzniku glutaminu. GS jsou všudypřítomné, starobylé enzymy. Nalézáme je u domény *Eukaryota*, *Eubacteria* i *Archaea*. Dle molekulové hmotnosti a struktury dělíme GS do tří skupin: GSI, GSII a GSIII (Betti *et al.*, 2012).

Dodekamerní GSI se vyskytuje zejména u *Eubacteria* a *Archaea*. Dekamerní GSII se nachází především u domény *Eukaryota*. Dodekamerní GSIII se vyskytuje u skupin *Bacteroides*, *Butyvirio* a některých sinic, ale i u některých eukaryot, např. u hlenek, rozsivek, obrněnek. Toto rozdělení je však překonané. Předpokládá se totiž, že GSI, GSII a GSIII vznikly velmi dávno, zřejmě ještě před oddělením eukaryot a prokaryot. Evoluce GS na bázi vývoje eukaryotických a prokaryotických organismů je dosti komplexní, zahrnuje genové duplikace a horizontální přenosy. Tomu odpovídá i variabilní výskyt GSI, GSII a GSIII v rámci všech třech domén (Kumada *et al.*, 1993; Pesole *et al.*, 1995; Ghoshroy *et al.*, 2010).

U rostlin se nachází tzv. GSI-like proteiny, které jsou homologické k prokaryotickým GSI. Tyto proteiny nemají katalytickou aktivitu glutaminsyntetáz. U rostlin byly popsány jednak vlastní GSI-like proteiny, jednak fúzní proteiny Nod-GSI, jejichž C-koncová část je zhruba ze 40 % podobná GSI a N-koncová část sdílí homologii s noduliny (Mathis *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2015). Snížení *Nod-GSI* pomocí RNAi u *A.thaliana* vedlo k výraznému omezení růstu jak primárního kořene, tak laterálních kořenů (Doskočilová *et al.*, 2011). U *Medicago truncatula* byly charakterizovány dva GSI-like proteiny. Exprese těchto *GSI-like* je výrazná v kořenech a kořenových hlízkách a je negativně regulována v přítomnosti glutaminu, glutamátu nebo asparaginu v substrátu. Lze spekulovat, že by GSI-like proteiny mohly mít signální úlohu u rostlin, mohly by vázat glutamin a sloužit jako senzory organického dusíku v rostlinách (Silva *et al.*, 2015).

Glutaminsyntetázy u vývojové větve rostlin (tj. *Chloroplastida*) odpovídají typu GSII. U zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* byly popsány dva zástupci GSII - cytosolická GS eukaryotického typu (GSIIe - eukaryotická), a plastidová GS, která se více podobá proteinům GSII u eubakterií (Chen & Silflow, 1996; Ghoshroy *et al.*, 2010). Eubakteriální typ GSII (tj. GSIIb) se u *Chloroplastid* nachází jen u nižších vývojových skupin, u zelených řas a bazálních zástupců streptofyt až po vranečky (*Selaginella*). U semenných rostlin se GSIIb již nevyskytuje (Ghoshroy *et al.*, 2010). Autoři se přikláníjí

k hypotéze, že se GSIIb dostala do *Chloroplastid* horizontálním genovým přenosem z γ -proteobakterií. GSIIb totiž nebyla nalezena u ruduch ani glaukofyt, což by v opačném případě naznačovalo endosymbiotický původ GSIIb (Ghoshroy *et al.*, 2010).

Před oddělením krytosemenných a nahosemenných rostlin došlo ke genové duplikaci původní cytoplasmatické GSIIe a ke vzniku cytoplasmatické GS1 a chloroplastové GS2 (Biesiadka & Legocki, 1997).

U většiny nahosemenných však byla GS2 sekundárně ztracena. Výjimkou je *Ginkgo*, u kterého byla plastidová GS2 nalezena (García-Gutiérrez *et al.*, 1998). U jehličnanů se nachází dvě pletivově a funkčně odlišné cytosolické isoformy. GS1a se vyskytuje zejména ve fotosyntetických pletivech, funkcí se podobá chloroplastové GS2 u krytosemenných rostlin. GS1b je typická pro nefotosyntetická pletiva, je dominantní v kořenech, hypokotylu a v embryu v časně fázi klíčení (Avila *et al.*, 2001).

U krytosemenných rostlin se GS dělí dle lokalizace v buňce na chloroplastovou isoformu GS2 (o velikosti monomeru kolem 45 kDa), která je kódována zpravidla jedním genem, a na cytosolickou GS1 (38-41 kDa), která je kódována malou genovou rodinou (3-5 genů) (Tingey *et al.*, 1988). Výjimkou jsou dva geny pro GS2 u vojtěšky (*Medicago truncatula*), které vznikly při nedávné genové duplikaci během vývoje bobovitých rostlin (Seabra *et al.*, 2010). Nutno dodat, že u *A. thaliana* je GS2 směřována jak do chloroplastů, tak do mitochondrií (Taira *et al.*, 2004). Duální směrování GS2 však zatím nebylo potvrzeno u dalších druhů rostlin. GS2 se tvoří zejména ve fotosyntetických pletivech, jen minoritně se nachází v kořenech (Edwards *et al.*, 1990).

GS1 je lokalizována hlavně v cévních svazcích, konkrétně ve floému. Je hlavní isoformou v kořenech a dalších nefotosyntetických orgánech (Edwards *et al.*, 1990). Nutno zmínit, že v rámci krytosemenných rostlin netvoří geny pro GS1 (označované též *GLN1*) žádné evolučně konzervované podskupiny. K divergenci *GLN1* došlo zřejmě až po ustanovení hlavních taxonů (Biesiadka & Legocki, 1997). Nelze tedy předpokládat, že např. *GLN1;1* popsaná u *A. thaliana* bude mít podobné vlastnosti jako *GLN1;1* u tabáku. Jinými slovy – stejné označení proteinů *GLN1* nevypovídá o jejich evoluční příbuznosti. Výjimkou jsou však jednoděložné rostliny – u nich *GLN1* vytváří tři konzervované podskupiny (Swarbreck *et al.*, 2011).

Následující text se zaměřuje především na GS u *A. thaliana*, poznatky u dalších rostlinných druhů by měly sloužit jen jako zajímavosti ilustrující význam GS u rostlin.

2.2.2 Struktura a vlastnosti GS

Rostlinné glutaminsyntetázy odpovídají dekamerním enzymům typu GSII. Deset podjednotek je uspořádáno ve dvou kruzích (viz Obr. 2.2A). Aktivní místa se nachází na rozhraní sousedních podjednotek (tudíž je jich celkem 10). Aktivní místo obsahuje 3 kationty Mn^{2+} , pro tepelnou stabilitu enzymu je klíčové reziduum Ile-161 v případě GS1a u kukuřice (Unno *et al.*, 2006). Rovněž byla stanovena krystalická struktura GS1a u *Medicago truncatula* (Seabra & Jose, 2009). Popsaná struktura GS1a u kukuřice a u *M. truncatula* se liší v rotaci pentamerních kruhů vůči sobě. U kukuřice byla ale krystalizována GS1a spolu s inhibítozem GS. Je tedy možné, že po vazbě substrátu dochází k rotaci pentamerních kruhů (Torreira *et al.*, 2014).

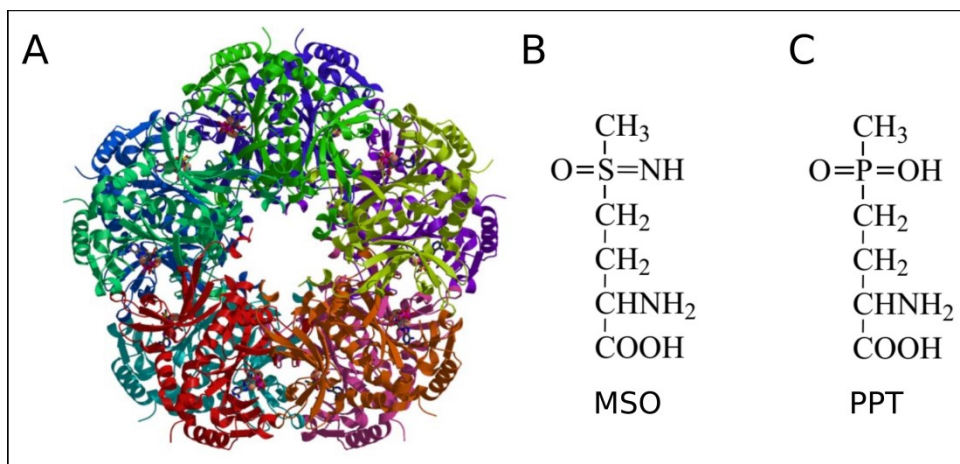
Následně byla určena i struktura GS2 u *Medicago truncatula*. GS2 je rovněž tvořena dvěma pentamerními kruhy nad sebou, ale interakce mezi pentamery je velmi labilní. Je možné, že se GS může vyskytovat i ve formě pentameru (Torreira *et al.*, 2014). Aktivní pentamery GS byly detekovány u hlízek *M. truncatula* (Seabra *et al.*, 2013). U GS2 je konzervována sekvence 16 aminokyselin na C-konci, které nejsou přítomné u GS1. Tento peptidický přesah by teoreticky mohl mít úlohu při transportu GS2 do chloroplastu podobně jako tranzitní peptid na N-konci. Ukázalo se ale, že C-koncová sekvence má vliv na aktivitu GS2, pozitivně ovlivňuje vazbu substrátu, zatímco vliv na transport do chloroplastu nebyl pozorován (Ferreira *et al.*, 2017). Dále je navrhováno, že u GS2 dochází ve tmě (při pH 6 ve stromatu) k posttranslační modifikaci, možná sumoylací. Vytváří se tak komplex veliký 560 kDa, který není enzymaticky aktivní a který je vyvazován na tylakoidní membrány. Na světle při pH8 by se GS2 měla nacházet ve stromatu v aktivní formě o velikosti 420 kDa (Kimata-Arigo & Hase, 2014).

Specifickými inhibitory GS jsou fosfínotricin (PPT, synonymum L-glufosinát) a methionin sulfoximin (MSO; viz Obr. 2.2), strukturální homology glutamátu. PPT je 5-10x efektivnějším inhibítozem GS než MSO (Wild & Manderscheid, 1984; Evstigneeva *et al.*, 2003). Navíc některé isoformy GS, např. GS2 u *M. truncatula*, vykazují zvýšenou rezistenci k MSO (Torreira *et al.*, 2014).

Fosfínotricin je účinnou látkou totálního herbicidu dostupného pod komerčními názvy Basta či Liberty. Po aplikaci PPT dochází během 3-5 dnů ke chloróze, následuje nekróza během 1-2 týdnů. Tyto projevy nejsou zřejmě způsobeny toxicitou amonných iontů, ale inhibicí fotosyntézy kvůli nefunkční fotorespirační dráze. Nedostatek glutaminu a s tím související nedostatek glutamátu pro transaminační reakci glyoxylátu na glycin

vede k akumulaci fosfoglykolátu, glykolátu a glyoxylátu, který inhibuje enzym rubisco (Hess, 2000).

Mezi posttranslační modifikace GS patří fosforylace a vazba proteinu 14-3-3, dále pak sumoylace, nitrace tyrosinu a regulace thiolových skupin thioredoxiny (Betti *et al.*, 2012).



Obr. 2.2 - Struktura GS a její inhibitory

A – struktura GS u kukuřice, barevně jsou odlišeny jednotlivé podjednotky, převzato z Unno *et al.*, 2006.
 B – chemický vzorec methionin sulfoximinu (MSO), převzato z Evstigneeva *et al.*, 2003.
 C – chemický vzorec fosfinotricinu (PPT), převzato z Evstigneeva *et al.*, 2003.

2.2.3 GS1

Cytosolická isoforma GS1 je u rostlin kódována malou rodinou genů, u *A. thaliana* najdeme 5 genů označovaných *GLN1;1* až *GLN1;5*. GS1 je lokalizována hlavně v cévních svazcích, konkrétně ve floému. Je dominantní isoformou v kořenech a dalších nefotosyntetických orgánech (Edwards *et al.*, 1990; Peterman & Goodman, 1991).

Vzhledem k tomu, že jsou GS1 hlavní isoformou v kořenech, mají zásadní úlohu při primární asimilaci dusíkatých živin. Jednotlivé isoformy GS1 mají odlišné kinetické vlastnosti, jinou lokalizaci v rámci kořenových pletiv a liší se i způsobem regulace. U *A. thaliana* nacházíme nízkoafinitní *GLN1;2* a *GLN1;3* a vysokoafinitní *GLN1;1* a *GLN1;4* (Ishiyama *et al.*, 2004; v této studii nebyla detekována *GLN1;5*, jejíž exprese je obecně velmi nízká). Tyto isoformy sdílí na proteinové úrovni nejméně 83,6% podobnost. U *GLN1;1* a *GLN1;4* byla popsána aminokyselinová rezidua (Gln49 a Ser174), která zajišťují enzymu vysokoafinitní aktivitu (Ishiyama *et al.*, 2006). V rámci pletiv kořene se jednotlivé isoformy liší svou lokalizací. Specificky na povrchu kořene se nachází isoforma *GLN1;1*. Pro cévní svazky v kořenech je typická *GLN1;2*. Isoforma *GLN1;3* se vyskytuje ve starších částech kořenů. *GLN1;4* se specificky vyskytuje v buňkách pericyklu,

v oblastech vzniku postranních kořenů. Exprese *GLN1;2* je zvýšena za přítomnosti amonných iontů, u *GLN1;1* dochází naopak k inhibici. Exprese *GLN1.3* je snížena při vysoké koncentraci glutamátu (Ishiyama *et al.*, 2004).

V listech se isoformy GS1 vyskytují zejména ve vodivých pletivech (konkrétně v průvodních buňkách floému). Nejvýrazněji je v listech *A. thaliana* exprimována *GLN1;2* a to především při dostatku nitrátu v substrátu. Mutace *gln1;2* vede při dostatku nitrátu (10mM) k redukci rostlinné biomasy (Lothier *et al.*, 2011). Navíc se ukázalo, že je *GLN1;2* exprimována v mezofylových buňkách (na rozdíl od ostatních GS1) a je klíčová při detoxifikaci nadbytku amonných iontů v substrátu (Guan *et al.*, 2016; Konishi *et al.*, 2017).

Isoforma *GLN1;2* je rovněž důležitá při remobilizaci dusíku během tvorby semen nebo během klíčení. U mutantu *gln1;2* a dvojitého mutantu *gln1;1/gln1;2* byl pozorován nižší výnos semen, menší počet šesulí a menší semena (Guan *et al.*, 2015). Tvorbu semen ovlivňuje aktivita *GLN1;2* v prýtu, nikoliv v kořenech (jak ukázaly roubovací pokusy), tedy se jedná o efekt remobilizace (Guan & Schjoerring, 2016).

U isoform *GLN1;1*, *GLN1;2*, *GLN1;3* a *GLN1;4* byli studováni jednotliví mutanti, rovněž byli připraveni dvojíti mutanti a dokonce i trojitý mutant *gln1;1/gln1;2/gln.1;3*, který vykazoval velmi redukovaný vzrůst. Nebyl ovšem vytvořen trojitý mutant *gln1;1/gln1;2/gln1;4*, důvodem je zřejmě narušení vývoje pylových zrn (Ji, 2011).

Do úvah o funkční specializaci jednotlivých isoform *GS1* u *A. thaliana* musíme zahrnout i zjištění, že na sestavení dekamerického enzymu se můžou podílet různé isoformy *GS1*. Může docházet ke kombinaci podjednotek *GLN1;1* a *GLN1;3*, resp. *GLN1;2* a *GLN1;3*, v různých poměrech v rámci holoenzymu. Je možné, že dochází i ke kombinaci *GLN1;1* a *GLN1;2*. Další kombinace nejsou vyloučeny, v této studii nebyly totiž detekovány *GLN1;4* a *GLN1;5*, jejichž exprese je nízká (Dragičević *et al.*, 2014).

Isoformy *GS1* mají úlohu i během senescence listů, kdy dochází k poklesu hladiny *GS2*, tedy i celkové aktivity *GS*. Projevy senescence mohou být vyvolané nejen stářím, ale i působením stresu. U *A. thaliana* je zvýšena transkripce genů *GLN1;1*, *GLN1;3* a *GLN1;4* po vystavení chladu, solnému stresu (100mM NaCl) i biotickému stresu (působení houbového patogenu *Colletotrichum higginsianum*). U mutantu *gln1;1* byla pozorována vyšší citlivost ke zmiňovaným stresům. Lze tedy soudit, že hlavní úlohu během stresu má isoforma *GLN1;1* (Ji, 2011).

Zvýšení exprese *GS1* ve fotosynteticky aktivních pletivech vede ke zvýšení biomasy, obsahu proteinů, chlorofylu. V případě transgenního topolu (exprimujícího *GS1a*

z borovice) byly provedeny již polní zkoušky (Jing *et al.*, 2004). Při zvýšení exprese genu pro isoformu GS1, která je důležitá při plnění semen (např. GLN1;3 u kukuřice) můžeme pozorovat zvýšení výnosů zrn až o 30 % (Martin *et al.*, 2006). Kromě zvýšeného růstu a využitelnosti dusíku bylo však pozorováno v některých studiích i předčasné kvetení a senescence, rozporuplné výsledky v některých případech ukazují, že při overexpresi GS1 záleží na zvoleném rostlinném druhu a použitém konstruktu (Good *et al.*, 2004).

2.2.4 GS2

Plastidová isoforma GS2 je zpravidla kódovaná jedním genem (jak je tomu i u *Arabidopsis thaliana*). Výjimkou je např. vojtěška (*Medicago truncatula*) se dvěma paralogy GS2, které vznikly při relativně nedávné duplikaci (Seabra *et al.*, 2010). Isoforma GS2 je majoritní ve fotosyntetických pletivech, v malé míře se vyskytuje i v kořenech (Edwards *et al.*, 1990; Peterman & Goodman, 1991).

Předpokládá se, že GS2 se spolu s Fd-GOGAT uplatňuje při zpracování amonných iontů uvolňovaných při dekarboxylaci glycinu v mitochondriích během fotorespirace. Mutaci v GS2 lze řadit mezi tzv. fotorespirační mutace. Fotorespirační mutanti jsou letální v normální atmosféře, ale přežívají v atmosféře se zvýšeným CO₂, tedy v podmínkách potlačujících fotorespiraci. Zatímco fotorespirační mutanti s poškozeným genem pro Fd-GOGAT byli nalezeni u různých druhů rostlin (*A. thaliana*, ječmen, hrách, tabák), překvapivě mutanti v GS2 byli popsáni pouze u ječmene a štirovníku (Wallsgrave *et al.*, 1987; Orea *et al.*, 2002; Betti *et al.*, 2012). Projevy podobné fotorespiračním mutantům byly pozorovány i u rostlin tabáku, které byly transformovány GS2 v antisense orientaci, u vybraných linií klesla aktivita GS2 v listech na 40-60 % aktivity u kontrolních rostlin (Migge & Becker, 2000). Pokusy najít fotorespirační mutanty v GS2 u *A. thaliana* nebyly úspěšné. Lam *et al.* (1996) navrhl několik vysvětlení - nejpravděpodobnější se zdá, že mutace v GS2 je letální i při zvýšeném CO₂ anebo že je GS2 během fotorespirace nahrazována některou z cytosolických isoform.

Klasickou představu o fotorespirační dráze narušuje zjištění, že minimálně u *A. thaliana* je GS2 směřována jak do plastidů, tak i do mitochondrií (Taira *et al.*, 2004). Naskýtá se tak možnost, že amonné ionty jsou rovnou asimilovány v mitochondriích, kde se uvolňují činností glycinderkarboxylázového komplexu.

Kromě fotorespirace se GS2 uplatňuje i v dalších procesech – např. během primární asimilace (ať už v prýtu při redukci nitrátů či v menší míře v kořenech) nebo při plnění semen, kterého se specificky účastní jeden z paralogů GS2 u vojtěšky (Seabra *et al.*, 2010),

nebo při reakci na stresové podmínky (sucho, chlad, vysoká ozářenost apod.). GS2 je důležitá pro plastidovou biosyntézu prolinu během stresové odpovědi (podobně jako GS1). Např. u mutantu *gs2* u štirovníku se při suchu tvořilo méně prolinu a došlo tak k vážnějšímu oxidativnímu poškození (Díaz *et al.*, 2010).

Zvýšení exprese GS2 zatím nevedlo k výraznějším změnám výnosů na rozdíl od overexprese GS1. I když byla zvýšena hladina transkriptu až osmnáctkrát, došlo ke zvýšení aktivity GS v listech pouze dvakrát, což lze vysvětlit regulací GS2 na posttranslační úrovni (Migge *et al.*, 2000).

2.3 Glutamátsyntáza

2.3.1 Obecné vlastnosti glutamátsyntáz – evoluce a struktura

Glutamátsyntáza (neboli glutamin:2-oxoglutarát aminotransferáza, GOGAT) katalyzuje přenos amidové skupiny z glutaminu na 2-oxoglutarát za vzniku dvou glutamátů. Patří do skupiny amidotransferáz typu Ntn (NH₂-terminal nucleophile). Jedná se o vícekomponentní enzym obsahující klastry Fe-S a flavinový kofaktor (FMN, FAD). Dle používaného kofaktoru a struktury se glutamátsyntázy dělí na Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1), NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14) a NADPH-GOGAT (EC 1.4.1.13). Glutamátsyntázy jsou podobně jako GS starobylé enzymy, vyskytují se u domén *Eukaryota*, *Eubacteria* i *Archaea*, s výjimkou skupiny *Chordata*, včetně člověka (Heuvel *et al.*, 2004; Vanoni & Curti, 2008).

NADPH-GOGAT se vyskytuje zejména u bakterií. Jedná se o hexamerní enzym. Monomer je tvořen α -podjednotkou (160 kDa), která katalyzuje vlastní syntézu glutamátu, a β -podjednotkou (52 kDa), která slouží k oxidaci NADPH a transportu redukčních ekvivalentů (Heuvel *et al.*, 2004).

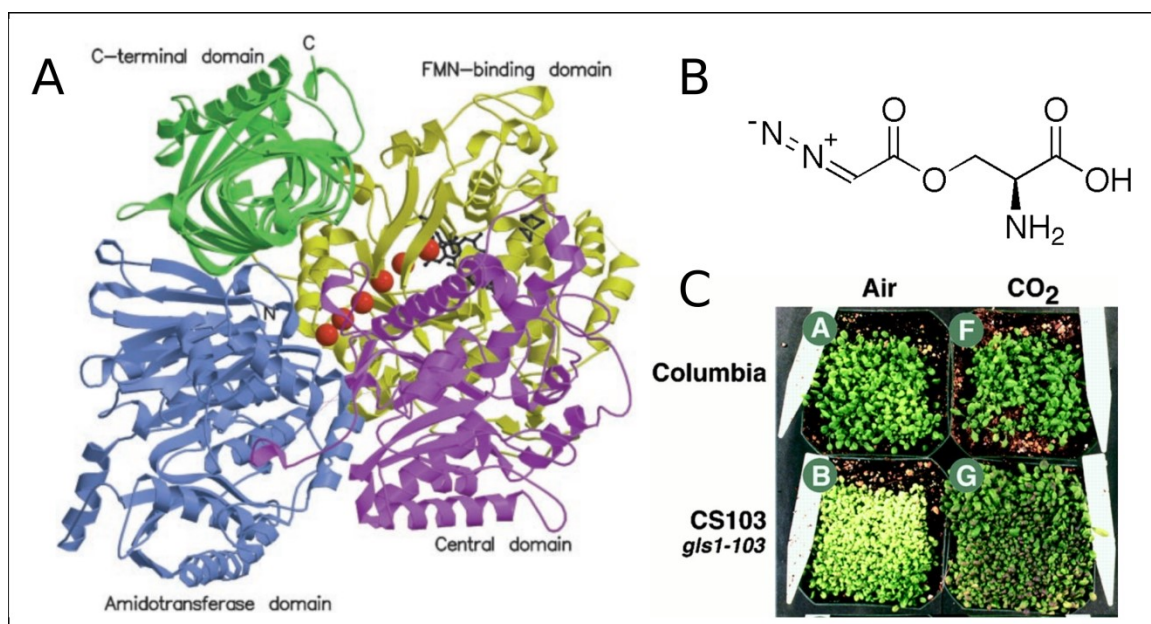
NADH-GOGAT se vyskytuje u rostlin, hub a nižších živočichů. Podobá se bakteriální NADPH-GOGAT, α -podjednotka a β -podjednotka se však propojily do jednoho proteinu o velikosti kolem 200 kDa (Heuvel *et al.*, 2004).

Fd-GOGAT se nachází u sinic, řas a rostlin. Fd-GOGAT je homologická k α -podjednotce bakteriální NADPH-GOGAT. Obsahuje jeden klastr [3Fe-4S] a FMN. Jedná se zřejmě o monomerní enzym o velikosti zhruba 165 kDa (Heuvel *et al.*, 2004). Je však možné, že se v rostlinách může vyskytovat i v tetramerech či jiných oligomerních formách (Kimata-Arigo & Hase, 2014). Rostlinné Fd-GOGAT jsou sinicového původu, byly vneseny do rostlinné vývojové větve během endosymbiózy sinicového předka chloroplastu (Reyes-Prieto & Moustafa, 2012).

U rostlin tedy nacházíme isoformy Fd-GOGAT, která je typická pro fotosyntetická pletiva, a NADH-GOGAT, která je hlavně v heterotrofních orgánech. Fd-GOGAT a NADH-GOGAT jsou u rostlin kódovány malou rodinou genů (zpravidla 1-2 geny). Jedná se o plastidové proteiny. Bohužel u rostlin nejsou známy krystalické struktury těchto enzymů, na základě homologie lze u Fd-GOGAT využít strukturu ze sinice *Synechocystis* sp. (viz Obr. 2.3A). U Fd-GOGAT lze rozpoznat 4 různé domény: C-terminální doménu, doménu vázající FMN, centrální doménu a amidotransferázovou doménu (Heuvel *et al.*, 2002).

Specifickým inhibitorem GOGAT je azaserin, strukturální homolog glutaminu, viz Obr. 2.3B (Wallsgrrove *et al.*, 1977).

Velmi málo je známo o posttranslačních modifikacích. Fd-GOGAT je regulována přes thiolové skupiny thioredoxinem (Lichter & Haberlein, 1998) a interaguje s proteinem ACR11 (Takabayashi *et al.*, 2016, více viz Kapitola 2.3.2.1). Dosud nebyla popsána žádná fosforylační místa u Fd-GOGAT (Hodges *et al.*, 2013).



Obr. 2.3 - Struktura a vlastnosti Fd-GOGAT u rostlin

A – struktura enzymu Fd-GOGAT u *Synechocystis* sp., černě jsou vyznačeny [3Fe-4S] a FMN, červeně pak tunel pro amoniak. Převzato z práce Heuvel *et al.*, 2002.

B – chemický vzorec azaserinu, specifického inhibitoru GOGAT (převzato z <https://en.wikipedia.org/wiki/Azaserine>)

C – fenotyp fotorespiračního mutantu v *Fd-GOGAT1* neboli CS103 v atmosféře s běžnou koncentrací CO₂ („Air“) a v atmosféře s 2% CO₂ (označeno „CO₂“). Mutant CS103 byl charakterizován v práci Somerville & Ogren (1980), kontrolní rostliny jsou ekotypu Columbia. Převzato z publikace Coschigano *et al.*, 1998.

2.3.2 Fd-GOGAT

Isoforma Fd-GOGAT, využívající ferredoxin jako zdroj redukčních ekvivalentů, se nachází hlavně ve fotosyntetických pletivech (Suzuki & Knaff, 2005). Fd-GOGAT patří mezi plastidové proteiny, avšak u *A. thaliana* bylo prokázáno směřování jak do plastidů, tak do mitochondrií (Jamai *et al.*, 2009). U rostlin je kódována zpravidla jedním genem (např. u kukuřice, rýže, špenátu) nebo dvěma geny (*A. thaliana*, ječmen, tabák; Suzuki & Knaff, 2005).

U *A. thaliana* se tedy nachází Fd-GOGAT1, která je exprimována zejména ve fotosyntetických pletivech a jejíž mutace se řadí mezi fotorespirační, a Fd-GOGAT2, která je slabě exprimována v rámci celé rostliny, nejvíce však v kořenech. Fd-GOGAT1 a Fd-GOGAT2 tak mají odlišné funkce a jsou rozdílně regulovány (Coschigano *et al.*, 1998). Následující text bude zaměřen zejména na Fd-GOGAT1 .

Fd-GOGAT je důležitá během fotorespirace. Mutanti v *Fd-GOGAT* byli nalezeni mezi fotorespiračními mutanty u *Arabidopsis thaliana*. Tyto mutantní rostliny měly méně jak 5 % enzymové aktivity Fd-GOGAT v porovnání s WT. Mutanti byli neživotaschopní v běžné atmosféře (viz Obr. 2.3C), avšak normálně rostli v podmínkách potlačujících fotorespiraci (1% CO₂). Po vystavení běžné atmosféře docházelo během 4 dnů ke chlorotickým projevům. Došlo k inhibici fotosyntézy, k výrazné akumulaci amonných iontů a k poklesu glutamátu v porovnání s kontrolou (Somerville & Ogren, 1980). Později bylo upřesněno, že fotorespirační mutace odpovídá genu *Fd-GOGAT1*, ostatní glutamátsyntázy nejsou schopné nahrazovat Fd-GOGAT1 během fotorespirace (Coschigano *et al.*, 1998).

Podobně byli získáni fotorespirační mutanti v *Fd-GOGAT* u ječmene (Kendall *et al.*, 1986). Rovněž byly fotorespirační projevy pozorovány u rostlin tabáku, které byly transformovány částí cDNA *Fd-GOGAT* v antisense orientaci. Byly získány rostliny se sníženou aktivitou Fd-GOGAT, nejvíce umlčující rostliny vykazovaly pouze 10% aktivity v porovnání s kontrolou. Tyto rostliny byly silně chlorotické v běžné atmosféře, projevy byly potlačeny ve zvýšeném CO₂ (Ferrario-Méry *et al.*, 2000). Fotorespirační projevy byly pozorovány i u mutantní rostliny rýže *es7* (*early senescence7*), která měla sníženou aktivitu Fd-GOGAT na 26%. Mutant *es7* byl získán při screenu na předčasnou senescenci, vyznačuje se totiž dřívějším žloutnutím. U mutantu *es7* je negativně ovlivněn i růst rostliny a tvorba semen. Tyto projevy jsou potlačeny ve zvýšeném CO₂. U knock-out mutantu u rýže vytvořeného pomocí CRISPR/Cas9 mutagenese je výrazně narušen růst a vývoj, rostlina odumírá již ve fázi semenáčku (Bi *et al.*, 2017).

S fotorespirací souvisí i interakce Fd-GOGAT1 se serin hydroxymetyltransferázou (SHMT) u *A. thaliana*. SHMT je mitochondriální enzym, který katalyzuje přenos metylového zbytku z N⁵, N¹⁰-metylentetrahydrofolátu na molekulu glycinu za vzniku serinu. SHMT tak navazuje na aktivitu glycindekarboxylázy (GDC) během fotorespirace. C-koncová doména Fd-GOGAT1 interaguje s SHMT, pro interakci není potřeba katalytická doména Fd-GOGAT, tedy ani vlastní enzymatická aktivita. Narušení této interakce mutací v C-koncové doméně Fd-GOGAT1 vede k výraznému snížení aktivity SHMT a tím pádem i k fotorespiračním projevům u rostlin. Překvapivé je, že plastidová Fd-GOGAT1 interaguje s SHMT v mitochondriích. V této práci bylo zjištěno, že Fd-GOGAT1 je částečně směřována i do mitochondrií (Jamai *et al.*, 2009). Je možné spekulovat, že Fd-GOGAT1 by mohla spolu s GS2, která je rovněž směřována jak do plastidů, tak do mitochondrií (Taira *et al.*, 2004), mohla zpracovávat amonné ionty během fotorespirace přímo v místě jejich vzniku, tj. v mitochondriích.

Ukazuje se, že Fd-GOGAT má roli i při remobilizaci dusíku. U rýže byla v nedávné době popsána řada bodových mutantů v *Fd-GOGAT* v rámci různých mutantních screenů - např. na předčasnou senescenci, žlutost listů, neobvyklý tvar listů nebo abnormální odpověď na cytokininy (Chen *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Muñoz-Nortes *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017; Bi *et al.*, 2017). U těchto bodových mutantů (které mají sníženou aktivitu GOGAT na 30-40%) byla pozorována předčasná senescence, výrazné omezení počtu semen a snížení dalších výnosových parametrů (Yang *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2017). Dále byla pozorována abnormální morfologie listů (menší listová plocha, světle zelený fenotyp) a odlišnosti v palisádovém parenchymu (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). U bodového mutantu v *Fd-GOGAT* byla rovněž pozorována zvýšená rezistence k patogenu *Xanthomonas oryzae*. Zvýšená odolnost zřejmě souvisí s tím, že jsou u mutantů v *Fd-GOGAT* indukovány geny odpovědi na stres, zejména související s oxidativním stresem (Chen *et al.*, 2016).

2.3.2.1 Regulace Fd-GOGAT

Expresa *Fd-GOGAT1* u *A. thaliana* je indukována světlem. Rovněž pozitivně reaguje na červené záření (Coschigano *et al.*, 1998; Ziegler *et al.*, 2003). Zdá se, že tato regulace probíhá přes fytochromy, avšak je nezávislá na hlavním regulátoru vývoje na světle, tedy transkripčním faktoru HY5 (Long hypocotyl 5), který mimo jiné reguluje expresi genů pro nitrátreduktázu (NIA2) a pro nitrátový přenašeč NRT1.1 (Jonassen *et al.*, 2009). Expresa *Fd-GOGAT* je rovněž indukována přítomností sacharózy (Coschigano *et*

al., 1998; Ziegler *et al.*, 2003). Také je pozitivně ovlivněna přítomností nitrátu (Suzuki & Knaff, 2005). Podobným způsobem je regulována i plastidová GS2.

Exprese *Fd-GOGAT1* je pozitivně regulována transkripčními faktory z rodiny GATA, proteiny GNC (GATA, nitrate inducible, carbon-metabolism-involved) a CGA1/GNL (cytokinin-resposive GATA1/GNC-like). GNC a CGA1/GNL jsou aspoň částečně redundantní. Oba transkripční faktory se vážou na promotorovou oblast *Fd-GOGAT1*. Zdá se, že GNC a CGA1/GNL by mohly integrovat signály v odpovědi na světlo, dusík, cytokininy, gibbereliny a regulovat asimilaci dusíku a vývoj chloroplastů. Kromě *Fd-GOGAT1* regulují totiž i některé geny biosyntézy chlorofylu. Toto regulační propojení je zajímavé, protože Fd-GOGAT1 produkuje glutamát, výchozí látku biosyntézy chlorofylu.

Fd-GOGAT1 interaguje s plastidovým proteinem ACR11 (ACT domain repeats 11), který obsahuje doménu ACT (Takabayashi *et al.*, 2016). Zkratka ACT odkazuje na bakteriální enzymy nesoucí tuto doménu: aspartátkinázu, chorismátmutázu a TyrA (prefenátdehydrogenázu). U bakterií ACT doména slouží k vazbě aminokyselin a ke zpětnovazebné regulaci metabolických enzymů, např. serin se váže na ACT doménu 3-fosfoglycerátdehydrogenázu a alostericky inhibuje její aktivitu (Chipman & Shaanan, 2001).

Protein ACR11 je důležitý pro stabilitu Fd-GOGAT1. Protein ACR11 není stabilní na pozadí mutanta v *Fd-GOGAT1*, na druhou stranu Fd-GOGAT1 je na proteinové úrovni méně akumulován u mutanta *acr11*. Navíc ACR11 ovlivňuje množství Fd-GOGAT1 v odpovědi na střídání dne a noci, při nedostatku dusíku a při dodání zdroje dusíku. Změny v Fd-GOGAT1 nelze vysvětlit změnou transkripce. ACR11 je tedy posttranslačním regulátorem Fd-GOGAT1 v odpovědi na stav dusíkového metabolismu. ACR11 by mohl vázat glutamin, obsahuje totiž dvě ACT domény, které jsou podobné doménám vázající glutamin u regulačního proteinu GlnD u *E. coli* (Takabayashi *et al.*, 2016). ACR11 je tak jedním z kandidátů na senzor glutaminu, resp. stavu dusíkového metabolismu a množství asimilovaného dusíku. Takový senzor a zároveň regulátor enzymů dusíkového metabolismu nebyl zatím u rostlin popsán (Gent & Forde, 2017). Navíc se nedávno ukázalo, že ACR11 interaguje i s GS2 a zvyšuje její aktivitu (Osanai *et al.*, 2017).

Další posttranslační regulací u Fd-GOGAT1 je redukce disulfidických můstků. Aktivita Fd-GOGAT *in vitro* se zvyšuje v přítomnosti redukčního činidla dithiotreitolu, rovněž také v přítomnosti chloroplastových thioredoxinů (Lichter & Haberlein, 1998).

Thioredoxiny tedy regulují aktivitu Fd-GOGAT, podobně jako u GS2 a dalších proteinů spjatých s fotosyntézou.

2.3.3 NADH-GOGAT

NADH-GOGAT je typická pro nefotosyntetická pletiva rostlin (zejména kořeny, cévní svazky prýtu). U rostlin je tento plastidový protein kódován jedním genem (*A. thaliana*), případně dvěma geny (rýže, Suzuki & Knaff, 2005).

NADH-GOGAT je klíčová během primární asimilace. Exprese NADH-GOGAT je indukována v přítomnosti amonných iontů. Po indukci dochází k akumulaci proteinu ve svrchních vrstvách kořene (u rýže, Ishiyama *et al.*, 1998).

U *A. thaliana* není NADH-GOGAT zastupitelná Fd-GOGAT2, která je rovněž exprimována v kořenech. U mutanta v *NADH-GOGAT* dochází k omezení vzrůstu, menší biomase a snížení obsahu chlorofylu zhruba o 20-30% po přidání 5mM NH₄⁺ do substrátu (Kojima *et al.*, 2014). Omezený vzrůst odpovídá narušené primární asimilaci, nikoliv nefunkčnímu zpracování amonných iontů během fotorespirace (jak ukázala kultivace ve zvýšeném CO₂, Lancien *et al.*, 2002).

Naopak navýšení NADH-GOGAT vede ke zvýšení biomasy prýtu, jak bylo ukázáno u rostlin tabáku, u kterých byla enzymová aktivita NADH-GOGAT zvýšena o 15-40 % (Chichkova *et al.*, 2001).

Zvláštní úlohu má NADH-GOGAT u bobovitých rostlin, kde je silně exprimována v hlízkách, zejména pak v částech fixující vzdušný dusík. U vojtěšky tedy mutace v NADH-GOGAT snižuje počet hlízek, hlízky jsou menší a žlutější (Gregerson *et al.*, 1993; Cordoba *et al.*, 2003).

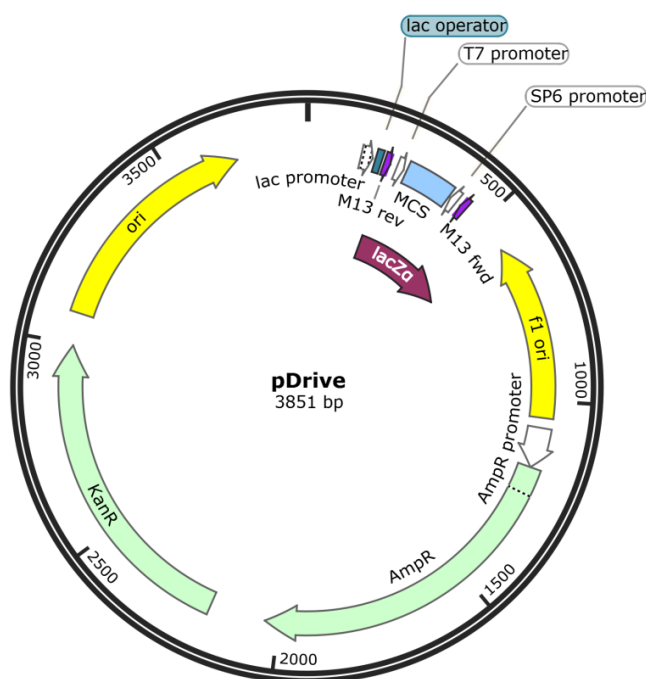
NADH-GOGAT má rovněž roli při remobilizaci dusíku. U rýže je isoforma NADH-GOGAT2 zodpovědná za remobilizaci dusíku během senescence a během plnění semen (Tamura *et al.*, 2011). Rovněž je NADH-GOGAT exprimovaná během klíčení semen, obdobně jako GS1 (u vojtěšky, Glevarec *et al.*, 2004).

3. Materiál a metodika

3.1 Příprava konstruktů

Výchozím materiálem pro přípravu vlásenkových konstruktů byly následující plazmidy:

- *pDrive*, malý plazmid používaný pro TA-klonování PCR produktů (QUIGEN PCR Cloning Kit). Tento plazmid nese gen pro kanamycinovou a ampicilinovou rezistenci, dále obsahuje gen pro β -galaktosidázu (*LacZ*) s integrovaným klonovacím úsekem (*MCS*), které lze využít pro modrobílou selekci kolonií nesoucích plazmid s inzertem (viz Obr. 3.1). V případě začlenění PCR produktu je narušen čtecí rámeček genu *LacZ*, po indukci *lac* promotoru a přidání substrátu X-gal (neboli 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galaktopyranosidu) nebude docházet k jeho štěpení β -galaktosidázou na modrý produkt, transformované kolonie tedy zůstanou bílé.

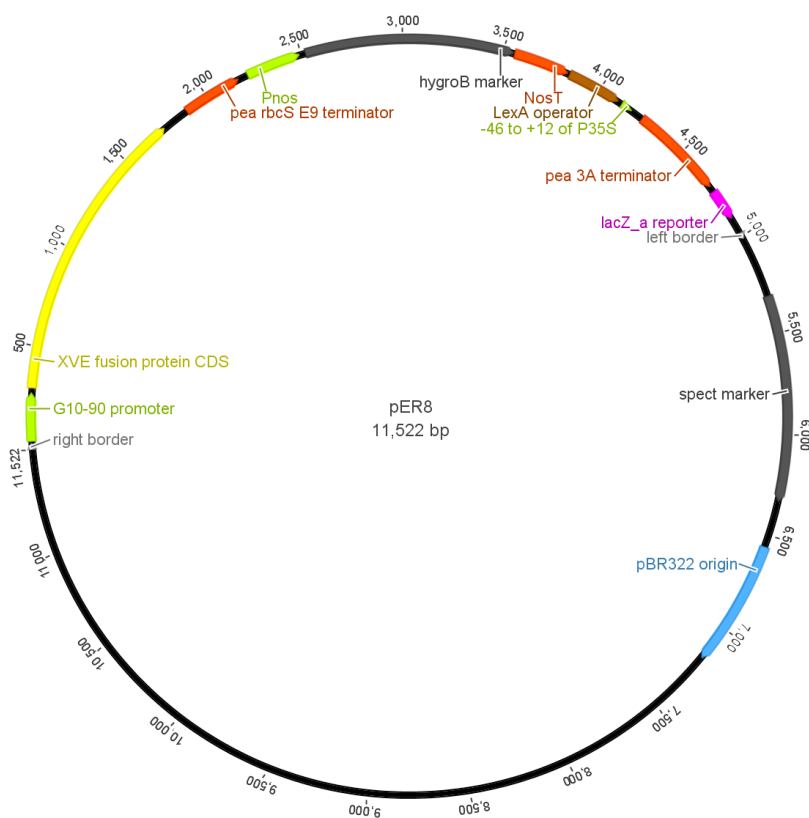


Obr. 3.1 - Mapa plazmidu *pDrive*

Vytvořeno pomocí aplikace SnapGene.

- *pER8*, binární vektor (s počátkem replikace pro *E. coli* a *A. tumefaciens*) nesoucí gen pro rezistenci ke spektinomycinu pro bakterie a *T-DNA* s genem rezistence k hygromycinu pro rostlinné buňky (viz Obr. 3.2). Úsek DNA vkládaný do *T-DNA* je pod kontrolou indukčního systému XVE. Fúzní protein XVE je tvořen DNA-vazebnou doménou bakteriálního represoru LexA (X), transkripční doménou VP16 (V) a lidským estrogenovým receptorem (E). Protein XVE je konstitutivně

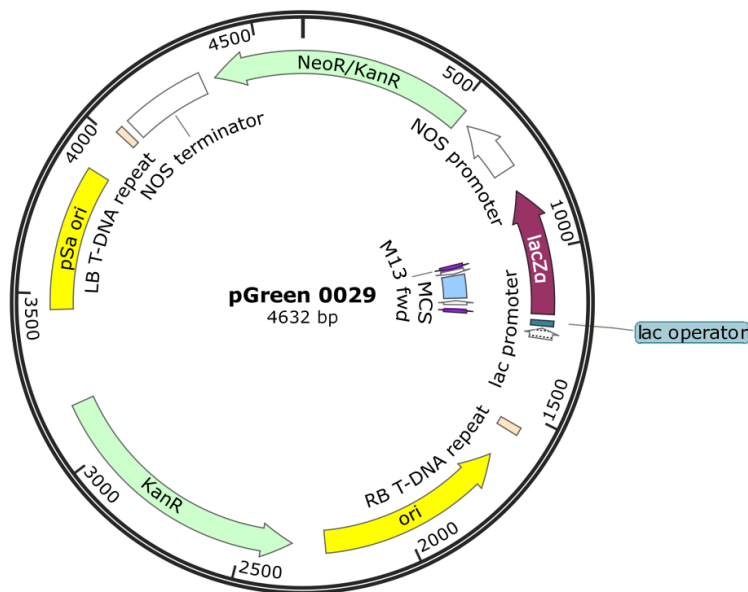
exprimován. V přítomnosti indukční látky – estradiolu - fúzní protein spouští expresi z promotoru, který obsahuje kopie *LexA* operátoru, dochází tak k transkripci sekvence našeho zájmu (Zuo *et al.*, 2000). Od *pER8* odvodila Mgr. Šárka Motylová vektor *pER8-kan*, který nese namísto hygromycinové rezistence gen pro kanamycinovou rezistenci (Motylová, 2015).



Obr. 3.2 - Mapa vektoru *pER8*

Mapu vektoru laskavě poskytl Mgr. Vojtěch Čermák. Vytvořeno v programu Geneious.

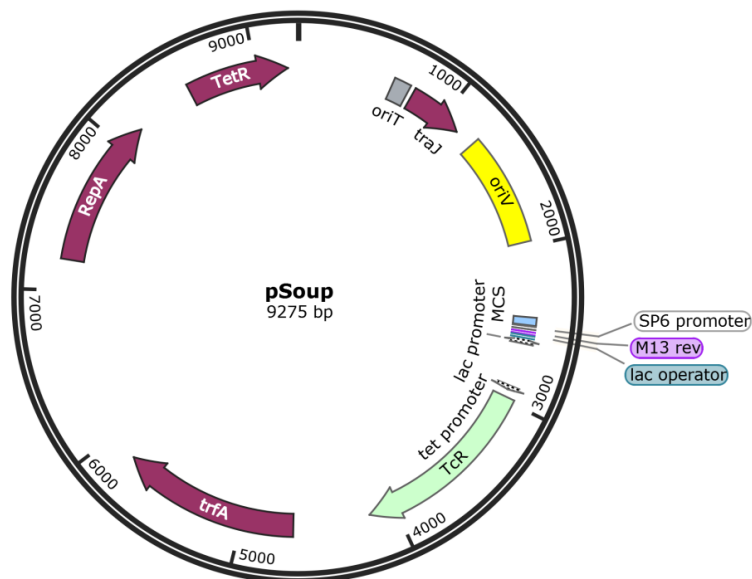
- *pGreen*, binární vektor (s počátkem replikace pro *E.coli* a *A. tumefaciens*) nesoucí gen pro rezistenci ke kanamycinu pro bakterie a *T-DNA* s genem pro rezistenci k hygromycinu (*pGreen 0129*) nebo ke kanamycinu v rostlinách (*pGreen 0029*, viz Obr. 3.3, (Hellens *et al.*, 2000). Jako výchozí plazmid byl použit *pGreen 0129-mCherry-STOP*, který odvodili dr. Fischer a dr. Bellinvia od vektoru *pGreen 0129* a který nese mCherry pod konstitutivním *CaMV35S* promotorem.



Obr. 3.3 - Mapa plazmidu *pGreen 0029*

Vytvořeno pomocí aplikace SnapGene.

- *pSoup*, pomocný plazmid potřebný pro replikaci vektoru *pGreen* v *A. tumefaciens* (nese gen pro replikázu). Vektor obsahuje gen pro rezistenci k tetracyklinu (viz Obr. 3.4).



Obr. 3.4 - Mapa plazmidu *pSoup*

Vytvořeno pomocí aplikace SnapGene.

Pro namnožení DNA během klonování PCR produktů byl použit kmen *Escherichia coli* JM109. V případě tvorby vlásenky proti *GS2* bylo nutno použít kmen *E. coli* SCS110, který postrádá aktivitu Dam a Dcm metyltransferáz (viz Kapitola 3.2). Kultivace *E. coli* probíhala při 37 °C na LB médiu s příslušnými antibiotiky pro daný plazmid (viz Tab. 3.1 a Tab. 3.2). Pro dlouhodobé skladování vybraných bakteriálních klonů bylo smícháno

800 µl bakteriální suspenze s 200 µl 50% sterilního glycerolu, zamraženo v tekutém dusíku a uchováváno při -80 °C.

Tab. 3.1 - Složení LB média

LB	1% pepton, 0,5% kvasinkový extrakt, 1% NaCl, (1,75% agar)
----	---

- Médium bylo sterilizováno autoklávováním (20 min, 120 °C).

Tab. 3.2 - Použitá antibiotika pro selekci bakterií

Antibiotikum	Koncentrace v médiu [mg/l]	Koncentrace zásobního roztoku [mg/ml]	Skladování
kanamycin	50	50	v dH ₂ O, při 4 °C, sterilizováno přes 0,22µm filtr Nalgene
spektinomycin	50	50	v dH ₂ O, při -20 °C, sterilizováno přes 0,22µm filtr Nalgene

Kompetentní buňky *E. coli* byly připraveny následujícím způsobem: Buňky *E. coli* (JM109) ze zásobní konzervy byly „rozčárkovány“ na plotnách s LB médiem (bez antibiotik) a kultivovány do druhého dne při 37 °C. Následně byly 1-3 samostatné kolonie zaočkovány do 50 ml tekutého LB média ve dvou 100ml Erlenmeyerových baňkách a kultivovány přes noc při 37 °C na třepače (160-180 otáček/ min, Ceromat[®] H Biotech International). Další den bylo asi 6 ml narostlé bakteriální suspenze zaočkováno do 400 ml LB média v Erlenmeyerově baňce (2 l) tak, aby optická denzita hned po zaočkování odpovídala 0,08 při vlnové délce 600 nm (délka kyvety 1 cm, spektrofotometr BioMate5, Thermo Spectronics). Bakterie byly kultivovány do optické denzity 0,4 (případně 0,6) při 600 nm. Poté byla baňka se suspenzí přenesena do ledové lázně a asi 20 min chlazena za občasného míchání. Na ledu bylo vychlazeno 9 sterilních centrifugačních zkumavek (50ml typu Falcon). Bakteriální suspenze byla nalita po 25 ml do 8 zkumavek a centrifugována při 4 °C, 2 500 g, po dobu 10 min (podmínky centrifugace zůstaly v dalších krocích stejné). Supernatant byl slit a sediment resuspendován v 6 ml vychlazené sterilní dH₂O (ustříženou špičkou 10ml pipety) a přenesen do 9. zkumavky. Do 8 zkumavek bylo znovu nalito 25 ml suspenze a centrifugováno. Sediment byl resuspendován v 34 ml dH₂O a bylo přidáno 6 ml z 9. zkumavky do celkového objemu 40 ml. Následovala centrifugace. Sediment byl resuspendován v 25 ml sterilního vychlazeného 10% glycerolu. Opět proběhla centrifugace. Sediment byl resuspendován v 1 ml 10% glycerolu v každé zkumavce a soustředěn do jedné zkumavky (celkový objem 8 ml). Proběhla centrifugace. Supernatant byl opatrně odstraněn sterilní špičkou připojenou na vývěvu. Sediment byl resuspendován v 800 µl sterilního vychlazeného GYT média (viz Tab. 3.3). Byla změřena optická denzita 100x zředěné suspenze a přibližně stanoven obsah buněk (OD₆₀₀=1,0

odpovídá zhruba $2,5 \cdot 10^8$ buněk/ml). Suspenze byla naředěna na koncentraci $2 \cdot 10^8$ až $3 \cdot 10^8$ buněk/ml a následně rozpipetována po 40 μ l do 1,5ml sterilních mikrozkuavek (typu Eppendorf). Připravené kompetentní buňky byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80 °C.

Tab. 3.3 - Složení GYT média

GYT	10% glycerol, 0,125% kvasinkový extrakt, 0,25% pepton
-----	---

- Médium bylo sterilizováno přes jednorázový 0,22 μ m filtr Nalgene a skladováno při 4 °C.

Pro tvorbu umlčovací vlásenky byla vytipována oblast daného genu v délce kolem 500 bp, ideálně ke konci čtecího rámce. Vybraná oblast genu byla amplifikována pomocí PCR z cDNA (pro přípravu cDNA viz Kapitola 3.5). Pro amplifikaci byly použity specifické primery opatřené adaptory s restričními místy pro následné klonování (viz Tab. 3.6). Byla využita DreamTaq DNA polymeráza (Fermentas), která je schopná na 3'konci vytvářet přesahy tvořené deoxyadenosinem (které jsou klíčové pro TA-klonování do vektoru *pDrive*). DreamTaq DNA polymeráza se liší od běžně používané *Taq* polymerázy (Fermentas) menší chybovostí při syntéze. Směs PCR reakce byla namíchána na ledové lázni (viz Tab. 3.4) a vložena do termocykleru s příslušným programem (viz Tab. 3.5).

Tab. 3.4 - Složení PCR reakce pro amplifikaci úseků z cDNA

cDNA	1 μ l
10x pufr „DreamTaq Buffer“	5 μ l
primery forward + reverse (10 μ M)	1 μ l + 1 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
dH ₂ O	40,5 μ l
DreamTaq polymeráza (50U/ μ l)	0,5 μ l

Tab. 3.5 - Program PCR

Program	Teplota [°C]	Čas	Opakování cyklu
Počáteční denaturace	94	3 min	1x
Denaturace	94	30 s	25-35x
Nasedání primerů	T _A *	30-45 s	
Syntéza DNA	72	30 s	
Syntéza přesahů dA	72	10 min	1x
Chlazení	4	∞	1x

*T_A – odpovídá teplotě nasedání primerů, která je o 5 °C nižší než jejich teplota tání T_M. Teplota tání byla přibližně odhadnuta dle vzorce: $T_M = 2\Sigma(A+T) + 4\Sigma(G+C)$.

Tab. 3.6 - Seznam primerů použitých během klonování
(primery byly vyrobené firmou Generi Biotech)

Název	Gen	Sekvence	T _A [°C]	Restrikční místa
GS2senseF	<i>GS2</i>	CTCGAGGACAGTGGGAGTTCCAAGTTG	60	<i>XhoI</i>
GS2senseR	<i>GS2</i>	AAGCTTGTACAATGTATGGGTCCATGT	60	<i>HindIII</i>
GS2antiF	<i>GS2</i>	CTGCAGTCTAGAGACAGTGGGAGTTCCAAGTTG	60	<i>PstI, XbaI</i>
GS2antiR	<i>GS2</i>	GGATCCGTCACAATGTATGGGTCCATGT	60	<i>BamHI</i>
GS1senseF	<i>GLN1;1</i>	CTCGAGTCGCTCGTTACATTTTGGAGAG	60	<i>XhoI</i>
GS1senseR	<i>GLN1;1</i>	GTCGACCACGTCCTACTCGGATCGATG	60	<i>SalI</i>
GS1antiF	<i>GLN1;1</i>	CTGCAGTCTAGATCGCTCGTTACATTTTGGAGA G	60	<i>PstI XbaI</i>
GS1antiR	<i>GLN1;1</i>	GGATCCCACGTCCTACTCGGATCGATG	60	<i>BamHI</i>
GLU1senseF	<i>GOGAT</i>	CTGCAGTCTAGATTGTGGTCGTGTTGCTGGTG	57	<i>PstI, XbaI</i>
GLU1senseR	<i>GOGAT</i>	GGATCCTTGGATCTTCACTATCTCTCTG	57	<i>BamHI</i>
GLU1antiF	<i>GOGAT</i>	CTCGAGTTGTGGTCGTGTTGCTGGTG	57	<i>XhoI</i>
GLU1antiR	<i>GOGAT</i>	AAGCTTTTGGATCTTCACTATCTCTCTG	57	<i>HindIII</i>
MSPi F	<i>MSP</i>	CTCTGCCCTTGTGTCTCA	60	-
MSPi R	<i>MSP</i>	GAACTCCTTACAGCATTAGCT	60	-
M13 F	-	GTAAAACGACGGCCAGT	50	-
M13 R	-	AACAGCTATGACCATG	50	-

Produkty PCR byly přečištěny agarózovou elektroforézou v elektrickém poli o intenzitě asi 4 V/cm. Nejčastěji byl použit 1,2% agarózový gel s 0,005% GelRed™ (Biotinum) pro vizualizaci DNA v 0,5x TAE pufru. Nanášené vzorky byly smíchány s 6x koncentrovaným nanášecím roztokem BPB (viz Tab. 3.7). Pro odečtení délky fragmentů byl použit 1kbp nebo 100bp marker GeneRuler (Fermentas). Gel byl následně zdokumentován na zařízení G:BOX (Syngene) pomocí programu GeneSnap (verze 7.09, Syngene).

Tab. 3.7 - Složení elektroforetických roztoků

50xTAE	2M Tris-báze, 1M ledová kyselina octová, 0,05M EDTA (pH 8,0)
BPB	0,025% bromfenolová modř a 30% glycerol v 10mM Tris-HCl (pH 7,8)

Z agarózového gelu byly na transluminátoru co nejpřesněji vyříznuty PCR fragmenty. Následovala izolace produktů PCR z agarózového gelu pomocí kitu Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid). Získaná DNA byla rozpuštěna v 20 µl 1mM Tris-HCl (pH=8,5), koncentrace DNA byla zjištěna pomocí elektroforézy a následné kvantifikace porovnáním s nanášeným markerem v programu GeneTools (verze 4.01, Syngene).

Produkty PCR byly vneseny do vektoru *pDrive* pomocí TA-klonování dle kitu QUIGEN PCR Cloning Kit. Postupováno bylo podle přiloženého návodu – na ledové lázni

byla připravena ligační směs (viz Tab. 3.8), ligace probíhala 3 h při 12 °C, následovala inkubace 10 min při 70 °C pro deaktivaci ligázy.

Tab. 3.8 - Ligační směs pro TA-klonování

Složka	pDrive cloning vector (50 ng/μl)	2x Ligation Master Mix	produkt PCR	dH ₂ O
Množství	1 μl	5 μl	max. 4 μl (optimálně cca 13 ng na 100 bp délky fragmentu)	doplnění do 10 μl

Ligační směs byla následně odsolena v „odsolovacích kolonkách“ po dobu 90 min při 4 °C. Roztok pro odsolení ligační směsi (obsahující 1% agarózu a 100mM glukózu) byl rozehrát a za tepla po cca 1 ml napipetován do 1,5ml mikrozkuvek. Mikrozkuvky byly překryty papírovou páskou, která byla následně propíchnuta 100μl špičkou, která byla zanořena do tekuté agarózy (pro vytvoření jamek). Připravené odsolovací kolonky byly nechány ztuhnout 20 min při 4 °C.

K rozmraženým elektrokompetentním buňkám *E. coli* na ledové lázni byly přidány 3 μl odsolené ligační směsi (nebo 10 ng plazmidové DNA) a nechány po dobu 1 min inkubovat. Následně byla bakteriální suspenze převedena do vychlazené elektroporační kyvety a sklepnuta na dno. Kyveta byla okamžitě vložena do elektroporátoru (Eppendorf Eporator[®]), nastaveného na 2,5kV a 200 Ω. Byl aplikován elektrický pulz (optimálně v rozmezí 4,2- 4,5 ms). Ihned poté byl k bakteriální suspenzi přidán 1 ml SOC média (viz Tab. 3.9). Po elektroporaci byly buňky *E. coli* kultivovány ve sterilních zkuvkách po dobu 1 h při 37 °C na třepačce při 160-180 otáček/min a poté byly vysety na selekční plotny s LB médiem a příslušnými antibiotiky (viz Tab. 3.1 a Tab. 3.2) v různých množstvích zpravidla odpovídajících objemu 50 μl a 950 μl suspenze.

Tab. 3.9 - Složení SOC média

SOC	2% pepton, 0,5% kvasinkový extrakt, 20mM glukóza, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄
-----	---

- Médium bylo sterilizováno přes jednorázový 0,22μm filtr Nalgene a skladováno při 4 °C.

Bakteriální kolonie narostlé na selekčním médiu byly ověřeny pomocí PCR. Do reakce byl jako templát použit malý stěr bakterií na párátku. Pro PCR z bakteriálních klonů platí stejné složení a podmínky jako u „standardní“ PCR reakce (viz Tab. 3.10 a Tab. 3.11). PCR reakce byla namíchána na ledové lázni, pro jeden vzorek bylo použito 20 μl připraveného premixu.

Tab. 3.10 - Složení "standardní" PCR reakce (50 µl)

Složky	Výchozí koncentrace složek	Množství do reakce
templát	50-200 ng/µl pro genomovou DNA nebo 5-10 ng/µl pro plazmidovou DNA nebo stěr z bakterií	1 µl
MgCl ₂	25mM	3 µl
Taq pufr s (NH ₄) ₂ SO ₄ bez MgCl ₂	10x koncentrovaný (od firmy Fermentas)	5 µl
dNTPs	10mM	1 µl
primery (forward a reverse)	10µM	1 µl + 1 µl
Taq polymeráza	5U/µl, (od firmy Fermentas)	0,5 µl
dH ₂ O	-	37,5 µl

Tab. 3.11 - PCR program

Program	Teplota [°C]	Čas	Opakování cyklu
Počáteční denaturace	94	3 min	1x
Denaturace	94	30 s	nejčastěji 29x (obecně 20-40x)
Nasedání primerů	T _A	30-45 s	
Elongace	72	30 s	
Chlazení	4	∞	1x

- T_A –teplota nasedání primerů, která je stanovena o 5 °C nižší než jejich teplota tání T_M. Teplota tání byla přibližně odhadnuta dle vzorce: $T_M = 2\Sigma(A+T) + 4\Sigma(G+C)$.
- Doba elongace záleží na délce fragmentu – obecně 60 s na 1kbp (pro Taq polymerázu).
- PCR reakce probíhala v termocykleru T100™ Thermal Cycler (firmy Bio-Rad) nebo MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (firmy MJ Research).

Vybrané bakteriální klony byly pomocí párátka zaočkovány do 3 ml LB média s příslušnými antibiotiky a kultivovány přes noc (16-20 h) při 37 °C na třepače při 180 otáček/min. Narostlá suspenze byla nalita do 1,5ml mikrozskumavky a centrifugována 30 s při 13 800 g, supernatant byl slit. Postup byl zopakován se zbývající suspenzí. Zbytek média byl opatrně odsát špičkou připojenou na vývěvu. Následovala izolace plazmidu kitem The Wizard® Plus SV Minipreps Purification system (firmy Promega). V posledním kroku byla plazmidová DNA rozpuštěna v 50 µl 1mM Tris-HCl (pH=8,5). Izolovaný plazmid byl restrikcčně naštěpen (pro ověření vloženého fragmentu, nejčastěji pomocí

EcoRI), koncentrace plazmidu byla stanovena kvantifikací na agarózovém gelu (v programu GeneTools) nebo na přístroji NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrofotometer (ThermoScientific) v programu NanoDrop2000 (ver.1.5).

Pro další postup při tvorbě vlásenek bylo nutné restrikční štěpení příslušnými restriktázami v místech adaptorů. Použité restrikční enzymy a jejich pufrы pocházely od firmy Fermentas a New England Biolabs, podmínky štěpení byly převzaty z doporučení výrobce. Množství restriktázy použité v reakci bylo určeno na základě poměru délky DNA a počtu příslušných restrikčních míst v našem plazmidu v porovnání s fágem λ . Do reakce bylo použito dvojnásobné množství enzymu oproti vypočítanému, objem přidávaných roztoků enzymů však nepřekročil 10 % celkového objemu reakce (viz Tab. 3.12).

Tab. 3.12 - Ukázkové složení restrikční směsi

Složky	plazmid <i>pDrive</i> (100 ng/ μ l)	enzym <i>EcoRI</i> (10 U/ μ l)	pufr <i>EcoRI</i>	dH ₂ O
μl/10 μl reakce	2	0,2	1	6,8

Produkt restrikčního štěpení byl přečištěn na agarózové elektroforéze a izolován z elektroforetického gelu pomocí kitu QUIEX II Agarose Gel Extraction (firmy Quigen). Bylo postupováno dle přiloženého protokolu. Závěrečná eluce DNA probíhala v 10 μ l 1mM Tris-HCl (pH=8,5) 10 min při 50 °C, postup byl poté zopakován s dalšími 5 μ l 1mM Tris-HCl. Koncentrace naštěpeného plazmidu a fragmentu byla stanovena pomocí elektroforézy (v programu GeneTools).

Následovala ligace fragmentu s naštěpeným cílovým vektorem pomocí T4 DNA ligázy. Stechiometrický poměr vektor:inzert byl 1:7. Ligační směs (viz Tab. 3.13) byla namíchána na ledové lázni (na zahřátí je citlivá T4 ligáza i její pufr obsahující ATP). T4 DNA ligáza i její pufr pocházely od firmy Fermentas. Ligace probíhala zpravidla 8 h při 15 °C, následovala deaktivace ligázy 10 min při 65 °C.

Tab. 3.13 - Složení ligační směsi

Složky	vektor	inzert	pufr (10x T4 DNA Ligase Buffer)	T4 ligáza (5U/ μ l)
μl/10 μl reakce	až do celkového množství 100 ng		1	0,5

Vytvořené konstrukty byly ověřeny jednak restrikčním štěpením, jednak sekvenací. Sekvence probíhala v servisní laboratoři sekvenace na PřF UK. Vzorčky pro sekvenaci byly připraveny v 0,2ml mikrozkušavkách. Do celkového objemu reakce (8 μ l) bylo přidáno 0,5 μ l příslušného primeru (obvykle primery M13 nebo MSPi pro detekci

vlásenek, viz Tab. 3.6), dále pro plazmidovou DNA 3-5 ng/100bp, pro PCR fragment 5-10 ng/100bp (ne však více než 300 ng DNA do reakce) a případně doplněno dH₂O. Výsledky sekvenace byly vyhodnoceny pomocí programu Geneious (verze 8.1.5).

3.2 Klonování vlásenkových konstruktů

Pro tvorbu umlčovacích konstruktů byla vytipována oblast kódující sekvence daného genu o délce kolem 500 bp, ideálně ke konci čtecího rámce. V případě *GOGAT* se jednalo o úsek odpovídající 27.- 31. exonu (z celkových 33 exonů), u *GS2* od 8. až po poslední 11. exon, u *GS1* (konkrétně *GLN1;1*) pak o 5.-7. exon (z celkem 9 exonů). Pro amplifikaci tohoto úseku byly navrženy primery opatřené vhodnými adaptory pro následné klonování (viz Tab. 3.6). Pomocí těchto primerů byl amplifikován daný úsek cDNA, který byl následně vložen do vektoru *pDrive* pomocí TA-klonování. Následovalo ověření pomocí sekvenace (viz Kapitola 3.1).

Postup vytváření vlásenky byl inspirován Čermákem (2012) a je znázorněn na schématu Obr. 3.5, které na příkladu *GOGAT* shrnuje typický postup klonování. Vlášenkový konstrukt je tvořen dvěma sekvencemi *GOGAT* v opačné orientaci (*ANTI* a *SENSE*), které jsou odděleny sekvencí intronu z genu pro MSP (mangan stabilizující protein) ze *Solanum tuberosum*. Pro indukované umlčování byla vytvořená vlásenka vyštěpena z vektoru *pDrive-GOGAT-IR* pomocí *XhoI* a *XbaI* a vložena do vektoru *pER8* (naštěpeného *BcuI* a *XbaI*), enzymy *BcuI* a *XhoI* vytváří konce, které jsou navzájem komplementární.

Přehled vytvořených vlásenkových konstruktů pro umlčování *GOGAT*, *GS2* a *GS1* shrnuje Tab. 3.14. Oproti popsanému způsobu klonování (viz Obr. 3.5), bylo u *GS1* vlásenky nutné použít v adaptoru restrikční místo pro *SalI*, namísto *HindIII*. U *GS2* vlásenky bylo problematické vkládání do *pER8* přes štěpení *XhoI* a *XbaI*. Ukázalo se totiž, že restrikční místo *XbaI* spolu se sekvencí primerů tvoří sekvenci GATC, která je rozpoznávána Dam metyltransferázou. Metylace restrikčního místa tak zabraňovala štěpení pomocí *XbaI*. Bylo tedy nutné vnést a namnožit plazmid *pDrive-GS2-IR* v kmeni *E. coli* SCS110, který nese mutaci v genu pro Dam metyltransferázu. Pro konstitutivní umlčování pak byla *GS2* vlásenka vložena do vektoru *pGreen 0129* pod *CaMV35S* promotor, přes štěpení enzymy *XhoI* a *XbaI*.

Tab. 3.14 - Seznam vytvořených konstruktů

Označení:	Inzert:	Použitý vektor:	Rostlinná rezistence:	Využití:
<i>XVE-GS2-IR</i>	GS2 vlásenka	<i>pER8</i>	hygromycin	inducibilní umlčování <i>GS2</i>
<i>XVE-GS2-IR(kan)</i>	GS2 vlásenka	<i>pER8(kan)</i>	kanamycin	inducibilní umlčování <i>GS2</i> , kotransformace
<i>XVE-GS1-IR</i>	GS1 vlásenka	<i>pER8</i>	hygromycin	inducibilní umlčování <i>GLN1;1</i> a <i>GLN1;2</i> , kotransformace
<i>35S-GS2-IR</i>	GS2 vlásenka	<i>pGreen 0129</i>	hygromycin	konstitutivní umlčování <i>GS2</i>
<i>XVE-GOGAT-IR</i>	GOGAT vlásenka	<i>pER8</i>	hygromycin	inducibilní umlčování <i>GOGAT</i>

3.3 Charakterizace mutantních linií *Arabidopsis thaliana*

V práci byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia-0 (Col-0, dále označované jako WT rostliny). Dále byly získány T-DNA inzerční mutantní linie (viz Tab. 3.15), které nesou mutaci v promotorové oblasti genu *GS2* (SALK_137721C, SAIL_258_B08, SAIL_383_D08), v genu *GLN1;1* (GABI-Kat linie GK-265C09), v genu *GLN1;2* (SALK_102291) a v genu *GOGAT* (SALK_104287, SALK_019917). Mutantní linie byly objednány přes The Nottingham Stock Arabidopsis Centre (NASC).

Tab. 3.15 - Popis mutantních linií

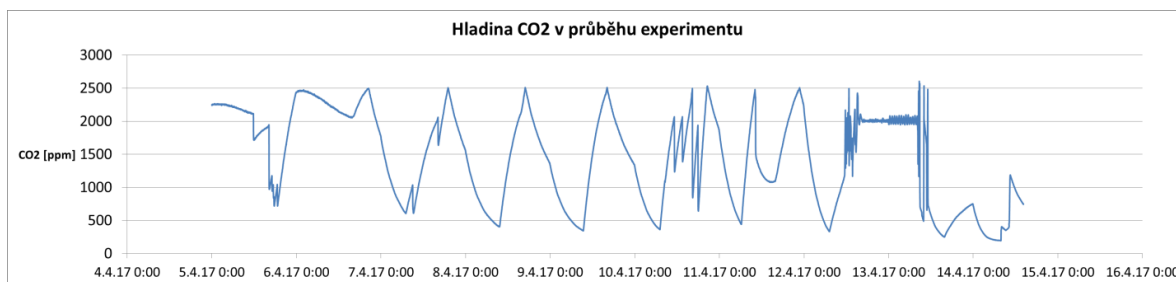
Název linie:	Označení mutanta:	NASC ID:	Cílový gen:	Označení genu:	Genetické pozadí:	Rezistence linie:
SALK_137721C	<i>gs2-1</i>	N677094	<i>GS2</i>	<i>AT5G35630</i>	Col-0	kanamycin
SAIL_383_D08	<i>gs2-2</i>	N817620	<i>GS2</i>	<i>AT5G35630</i>	Col	Basta
SAIL_258_B08	<i>gs2-3</i>	N812058	<i>GS2</i>	<i>AT5G35630</i>	Col-3	Basta
GK-265C09	<i>gln1;1</i>	N425377	<i>GLN1;1</i>	<i>AT5G37600</i>	Col-0	sulfadiazin
SALK_102291	<i>gln1;2</i>	N602291	<i>GLN1;2</i>	<i>AT1G66200</i>	Col-0	kanamycin
SALK_104287	<i>gogat-1</i>	N604287	<i>GOGAT</i>	<i>AT5G04140</i>	Col-0	kanamycin
SALK_019917	<i>gogat-2</i>	N519917	<i>GOGAT</i>	<i>AT5G04140</i>	Col-0	kanamycin

- Linií GK-265C09 lze najít v databázích i pod označením CS425377.
- U GK-265C09 se jedná o set 12 individuálních linií, mezi kterými se genotypováním musí nalézt homozygotní linie.
- SALK_137721C je dle dodavatele homozygotní linií.
- U T-DNA inzerčních linií (zejména typu SALK) může docházet k umlčování genu pro danou rezistenci.

Rostliny *A. thaliana* byly pěstovány na rašelinových peletkách (Jiffy) v kultivační místnosti s periodou 16 h světlo/8 h tma při teplotě 24 °C, ozáření byla přibližně 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Tyto podmínky budou dále v práci označovány za standardní. Před výsevem byla semena *A. thaliana* kvůli odstranění škůdců (zejména třásněnek) nechána přes noc v -20 °C nebo sterilizována v 98% etanolu (1 min), 10 min v 50% roztoku SAVO a poté 4-5x promyta sterilní dH₂O, posléze byla semena v dH₂O 2-3 dny stratifikována v lednici. Pro sklizení semen byl použit tzv. ARA systém (firmy Betatech bvba), který snižuje ztráty semen a zároveň zabraňuje kontaminaci jiných experimentů v rámci kultivační místnosti.

Mutantní rostliny *gogat*, které vykazovaly projevy fotorespiračního mutanta, byly kultivovány ve speciálním CO₂ boxu, do kterého byl vháněn CO₂ z bomby tak, aby se v boxu ustanovila koncentrace 0,7-1% CO₂ (měřeno pomocí infračerveného snímače GTO CO₂ firmy Aseko). CO₂ box (o rozměrech 60x60x70 cm, vyrobený z průhledného plexiskla) je otevřeným systémem, vháněn je nejen CO₂, ale i vzduch, zároveň je box mírně odvětráván. CO₂ box je umístěn v termostatické komoře Economic Delux ECD01E od firmy Snijders Scientific přisvětlené led diodami. Ozáření bylo zhruba 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Kultivační teplota byla nastavena na 24 °C, fotoperioda byla 16 h světlo/8 h tma.

Alternativním způsobem kultivace v atmosféře se zvýšeným CO₂ bylo využití klimaboxů na Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Ruzyni (dále jen „klimaboxy VÚRV“). Jednalo se o dva kultivační boxy od firmy Poly klima, typ M-1. Jeden box byl použit pro kultivaci ve zvýšeném CO₂ (2000 ppm), druhý box byl kontrolní (hladina CO₂ 450 ppm). Ostatní parametry se v obou boxech shodovaly – teplota 24 °C, vlhkost 60%, ozáření zhruba 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V tomto experimentu byly kvůli vyčerpání boxů rostliny nejprve týden předpěstovány v kultivační místnosti (perioda 16 h světlo/8 h tma, teplota 24 °C, ozáření 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Teprve poté byly rostliny přesunuty do klimaboxů. Vzhledem k řadě technických problémů bylo nutné rostliny několikrát přesunout zpátky do kultivační místnosti, kontinuální kultivace ve zvýšeném CO₂ probíhala tedy jen jeden týden (před sklizením rostlin na fenotypovou analýzu). Navíc ani během tohoto týdne klimabox se zvýšeným CO₂ nebyl schopen udržet nastavenou hodnotu 2000 ppm, hladina CO₂ tak dosti kolísala (viz Obr. 3.6).



Obr. 3.6 - Hladina CO₂ v průběhu experimentu

Časový záznam koncentrace CO₂ v klimaboxu VÚRV se zvýšeným CO₂ (nastaveno 2000 ppm). Záznam odpovídá kontinuální kultivaci v posledním týdnu experimentu (5.-14. 4. 2017). Měření probíhalo automaticky každou minutu.

Pro navození výraznějších projevů fotorespiračních mutantů byly rostliny kultivovány v tzv. podmínkách intenzivnější fotorespirace. Rostliny byly pěstované v peletách položených na perlitu, který odvádí přebytečnou vlhkost z rašelinových peletek, a při vyšší ozáření (asi 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Ostatní parametry byly shodné se standardní kultivací.

Pro kultivaci v *in vitro* podmínkách byla semena *A. thaliana* sterilizována plynným chlorem minimálně po dobu 3 h (semena byla vložena do exsikátoru, kde se vyvinul plynný chlor po přidání 1,5 ml koncentrované HCl do 50 ml roztoku SAVO – 5% NaClO). Alternativním způsobem sterilizace bylo promytí semen 5 min v 70% roztoku etanolu, posléze 15 min v 0,5% SDS. Následovalo promytí ve sterilní dH₂O (zopakované 4x). Sterilní semena byla vyseta na Petriho misky (o rozměrech 12x12 cm) s ½ MS médiem (viz Tab. 3.16). Před anebo po výsevu byla semena 2-3 dny stratifikována v lednici. Poté byly misky přeneseny do kultivační místnosti pro *in vitro* kultury (s teplotou 22 °C, s fotoperiodou 16/8 h).

Tab. 3.16 - Složení ½ MS média

½ MS	2,2 g/l MS soli, 1% sacharóza, 0,8% agar
	<ul style="list-style-type: none"> MS soli odpovídají produktu Murashige and Skoog Basal Salt Mixture od firmy Sigma, který vychází ze složení MS média (Murashige & Skoog, 1962) pH média bylo upraveno 1M KOH na hodnotu 5,8 MS médium bylo sterilizováno autoklávováním (20 min, 120 °C)

Pro genotypování mutantních linií byla izolována DNA následujícím způsobem: Do 2ml mikrozkušavky (typu Eppendorf) byly sklizeny 1-2 listy malé rostliny *A. thaliana*. Byly přidány skleněné kuličky a vzorek byl zamražen v tekutém dusíku. Homogenizace probíhala na homogenizátoru (Mixer Mill MM301 firmy Retch) 5 min při frekvenci 25 kmitů s⁻¹. Vzorky byly neustále udržovány ve zmrzlém stavu. K homogenizovaným

vzorkům bylo přidáno 400 µl extrakčního pufru (viz Tab. 3.17). Vzorky byly důkladně promíchány. Dále bylo přidáno 400 µl chloroformu a promícháno. Následovala centrifugace 3 min při 13 800 g. Z horní vodné fáze bylo odebráno 330 µl do nové 1,5ml mikrozkuhavky. Bylo přidáno 330 µl isopropanolu. Po důkladném promíchání byly nechány vzorky stát 2 min na stole. Následovala centrifugace 5 min při 13 800 g. Pipetou byla odsáta veškerá tekutina a vzorky byly vysušeny. Sediment DNA byl rozpuštěn v 100 µl 1mM Tris-HCl(pH=8,5). Do následující PCR reakce byl použit 1 µl genomové DNA.

Tab. 3.17 - Složení pufru pro extrakci DNA

Extrakční pufr	200mM Tris-HCl (pH=7,5), 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS
----------------	--

Mutantní linie byly genotypovány pomocí PCR s primery *RP* a *LP* pro detekci WT alely daného genu a s primery *RP* a vnitřním *LB* (ležícím v *T-DNA* dané inzerční linie) pro detekci mutantní alely (viz Tab. 3.18 a Tab. 3.19). U mutantních linií bylo přesné místo *T-DNA* inzerce v genomu ověřeno sekvenací PCR produktu *RP+LB* pomocí příslušného *LB* primeru (viz Tab. 3.20). Dále byla z homozygotních mutantů izolována RNA a zjištěna přítomnost, resp. absence transkriptu pomocí RT-PCR.

Mutanti *gln1;1* a *gln1;2* byly zkříženy – po odstranění květních obalů a tyčinek byl na bliznu přenesen pyl z druhého genotypu. Křížení probíhalo oběma směry. Po uzrání nakřížených šesulí byla semena (F1 generace) vyseta. V následující generaci (F2) probíhala identifikace dvojitého mutantu pomocí genotypování.

Tab. 3.18 - Primery pro genotypování mutantů

Název	Gen	Sekvence	T _A [°C]
<i>SALK_137721C_LP</i>	<i>GS2</i>	AGAATGTAGCAAAACTATCAATGT	57
<i>SALK_137721C_RP</i>	<i>GS2</i>	GGACCCTAAGATCTACTGGAA	57
<i>SAIL_383_D08_LP</i>	<i>GS2</i>	TGGGCATAATCAAAATCGGGA	56
<i>SAIL_383_D08_RP</i>	<i>GS2</i>	GGACCCTAAGATCTACTGGAA	56
<i>SAIL_258_B08_LP</i>	<i>GS2</i>	ATGCGCCACTCGTAGTCCA	56
<i>SAIL_258_B08_RP</i>	<i>GS2</i>	CGGTACTCGAACCATCATAG	56
<i>GK-265C09_RP</i>	<i>GLNI;1</i>	GACTGACCCTTCGCAGCTAC	57
<i>GK-265C09_LP</i>	<i>GLNI;1</i>	CCAGCAATCTCTGTGATCCTC	57
<i>SALK_102291_RP</i>	<i>GLNI;2</i>	TCATAGATCAAAAACGGACCAG	57
<i>SALK_102291_LP</i>	<i>GLNI;2</i>	TCAGTGGGATCAATGGAGAAG	57
<i>SALK_104287_LP</i>	<i>GOGAT</i>	AAAGAGGAGCTTGTGGAGTTG	57
<i>SALK_104287_RP</i>	<i>GOGAT</i>	TGATTCTTGTATGCCTCAGGG	57
<i>SALK_019917_LP</i>	<i>GOGAT</i>	TGCAAAAGTATCAGTCAAGCTAG	57
<i>SALK_019917_RP</i>	<i>GOGAT</i>	CATACCGGGAATCAAAAAGCAC	57
<i>SALK_LB</i>	<i>T-DNA SALK</i>	CTTGCTGCAA CTCTCTCAGG	57

	linie (<i>pBIN-pROK2</i>)		
<i>SAIL_LB</i>	<i>T-DNA</i> SAIL linie (<i>pCSA110-pDAP10</i>)	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	56
<i>GABI_CS425377_LB</i>	<i>T-DNA</i> GABI linie (<i>pAC161</i>)	ATATTGACCATCATACTCATTGC	57
<i>PnosR_adaptor</i>	promotor nopalinsyntázy	AAGCTTGAAACGATCCAGATCCGGTG	57

- T_A značí použitou teplotu nasedání primerů; primery byly vyrobeny firmou Generi Biotech.

Tab. 3.19 - Genotypování inzerčních mutantů

Název linie:	Velikost PCR produktu <i>RP+LP</i> pro WT alelu (bp)	Přibližná velikost PCR produktu <i>RP+LB</i> pro mutantní alelu (bp)
SALK_137721C	1248	710
SAIL_383_D08	1075	940
SAIL_258_B08	1105	1130
GK-265C09	893	710
SALK_102291	1140	600
SALK_104287	1191	690
SALK_019917	1526	740

Tab. 3.20 – Mutantní linie a jejich místa inserce

Název linie:	Označení mutanta:	Místo inserce na daném chromozomu:	Zasažená oblast:
SALK_137721C	<i>gs2-1</i>	13 830 247	promotor <i>GS2.1</i> a <i>GS2.3</i>
SAIL_383_D08	<i>gs2-2</i>	13 830 413	promotor <i>GS2.1</i> a <i>GS2.3</i>
SAIL_258_B08	<i>gs2-3</i>	13 830 966	promotor <i>GS2.2</i>
GK-265C09	<i>gln1;1</i>	14 934 435	6. exon <i>GLN1;1</i>
SALK_102291	<i>gln1;2</i>	24 655 526	poslední exon <i>GLN1;2</i>
SALK_104287	<i>gogat-1</i>	1 131 149	2. exon <i>GOGAT</i>
SALK_019917	<i>gogat-2</i>	1 136 727	intron <i>GOGAT</i>

- Místo inserce odpovídá u genů *GS2*, *GLN1;1* a *GOGAT* pozici na chromozómu 5, v případě *GLN1;2* na chromozómu 1. Údaje pro *gogat* mutanty pochází z databáze TAIR, u ostatních odpovídají výsledkům sekvenace PCR produktu *RP+LB*.
- U *GS2* se vyskytují 3 různé transkripční začátky, tj. 3 různé transkripční formy označené *GS2.1*, *GS2.2*, *GS2.3* (viz Kapitola 4.2.2, Obr. 4.16). Rovněž u *GOGAT* jsou dvě sestřihové formy – údaje v tabulce platí pro *AT5G04140.2*.

3.4 Transformace *Arabidopsis thaliana*

Rostliny *A. thaliana* byly transformovány metodou založenou na namáčení květenství s poupaty do suspenze *Agrobacterium tumefaciens*, který nese plazmid s genem našeho zájmu (Clough & Bent, 1998).

Pro transformaci *A. thaliana* byl využit kmen *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, který nese genomově kódovanou rezistenci k rifampicinu a gen pro rezistenci ke gentamycinu na pomocném plazmidu. Pro transformaci *A. tumefaciens* vektorem *pGreen* byly použity kompetentní buňky nesoucí pomocný plazmid *pSoup*, který obsahuje gen pro rezistenci k tetracyklinu.

Kompetentní buňky *A. tumefaciens* byly připraveny následujícím způsobem: Na pevné LB médium s rifampicinem a gentamycinem, případně s tetracyklinem (viz Tab. 3.22) byl rozčárkován kmen GV3101 ze zásobní konzervy a kultivován 2-3 dny při 28 °C. Poté byly 1-2 samostatné kolonie zaočkovány do 10 ml YEB média (viz Tab. 3.21) s příslušnými antibiotiky a kultivovány přes noc (16-20 h) při 28 °C za stálého třepání (160 otáček/min). Následující den byly zaočkovány 4 ml bakteriální suspenze do 200 ml YEB média s rifampicinem a gentamycinem a kultivovány za stálého třepání do dosažení optické hustoty 0,6 při vlnové délce 600 nm. Hned poté byla suspenze zchlazena na ledové lázni. Do 8 vychlazených centrifugačních zkumavek (50ml typu Falcon) bylo nalito 25 ml suspenze a centrifugováno při 4 °C, 2 500 g po dobu 10 min (podmínky centrifugace byly v následujících krocích stejné). Supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 25 ml vychlazené sterilní dH₂O (ustříženou špičkou 10ml pipety), následovala centrifugace. Sediment byl resuspendován v 10 ml vychlazené sterilní dH₂O. Objem dvou zkumavek byl slit dohromady a doplněn do 25 ml, následovala centrifugace. Sediment byl resuspendován v 2 ml sterilního 10% glycerolu, objem všech 4 zkumavek byl sjednocen do jedné. Opět proběhla centrifugace. Supernatant byl opatrně odsát sterilní špičkou připojenou na vývěvu. Sediment byl resuspendován v 1 ml sterilního 10% glycerolu, rozpipetován po 100 µl do 1,5ml sterilních mikrozkušavek a zamražen v tekutém dusíku. Připravené kompetentní buňky byly dále skladovány při -70 °C.

Transformace *A. tumefaciens* probíhala obdobně jako transformace *E. coli* (viz Kapitola 3.1) s těmi rozdíly, že elektroporátor byl nastaven na 2 kV a 200 Ω, místo SOC média bylo použito médium YEB recovery (viz Tab. 3.21) a po elektroporaci následovala kultivace 3 h při 28 °C za stálého třepání. Poté byla suspenze vyseta na selekční plotny s příslušnými antibiotiky a kultivována 3 dny při 28 °C. Narostlé kolonie byly „rozčárkovány“ tak, abychom získali jednotlivé klony. Vnesení daného plazmidu bylo ověřeno pomocí PCR ze stěru z kolonie.

Tab. 3.21 - Média pro *A. tumefaciens*

YEB	1% pepton, 0,1% kvasinkový extrakt, 0,5% sacharóza, 0,05% MgSO ₄	sterilizováno klávováním; roztok MgSO ₄ byl sterilizován zvlášť a přidán těsně před použitím (kvůli možnému vysrážení)
YEB recovery	1% pepton, 0,1% kvasinkový extrakt, 200mM sacharóza, 100mM NaCl, 25mM KCl, 100mM MgCl ₂ , 100mM MgSO ₄	sterilizován přes jednorázový 0,22µm filtr Nalgene; skladován při 4°C

Pro transformaci *A. thaliana* byl nejprve zaočkován vybraný klon *A. tumefaciens* (nesoucí příslušný konstrukt) do 10 ml YEB média s antibiotiky (rifampicin, gentamycin a antibiotikum pro selekci daného plazmidu; viz Tab. 3.22). Následovala kultivace přes noc při 28 °C za stálého třepání. Další den bylo 0,6 ml narostlé bakteriální suspenze převedeno do 300 ml YEB média s příslušnými antibiotiky (v případě kotransformace použito jen 150 ml YEB). Suspenze byla kultivována na třepačce při 28 °C přes noc (16-20h). Následující den byly ostříhány šešule a všechny otevřené květy zhruba šestitýdenních rostlin *A. thaliana*. Narostlá bakteriální suspenze byla zcentrifugována v 6 centrifugačních zkumavkách (50ml typu Falcon) při 4°C, 4000 g po dobu 20 min. Supernatant byl slit a sediment resuspendován v 10 ml 5% sacharózy s 0,05% smáčedlem Silwet[®] Star (od firmy AgroBio Opava), objem všech zkumavek byl sjednocen do jedné. Suspenze byla převedena do vhodné nádoby (např. velké Petriho misky). V případě kotransformace byly smíchány dvě bakteriální suspenze v poměru 1:1. Do bakteriální suspenze byla na 5 s ponořena květenství. Ošetřené rostliny byly zabaleny do igelitu, přes noc byly nechány ve zvýšené vlhkosti v chladné temnostní komoře. Následující den byly transformované rostliny vráceny do standardních podmínek kultivační místnosti.

Z transformovaných rostlin (tj. z T₀ generace) byla sklizena semena (T₁ generace). Část semen byla sterilizována pro výsev na selekční plotny v *in vitro* podmínkách (viz Kapitola 3.4). Sterilní semena byla vyseta na Petriho misky s ½ MS médiem (viz Tab. 3.16), do kterého byla přidána příslušná antibiotika pro selekci a claforan pro zabránění růstu *A. tumefaciens* (viz Tab. 3.22). Po výsevu byla semena 2-3 dny stratifikována v lednici, poté byly misky přeneseny do kultivační místnosti pro *in vitro* kultury (22 °C, fotoperioda 16/8 h).

Tab. 3.22 - Antibiotika použita během transformace *A. thaliana*

Antibiotikum	Koncentrace v médiu [mg/l]	Koncentrace zásobního roztoku [mg/l]	Skladování
rifampicin	25	10	v metanolu, při -20 °C
gentamycin	50	50	v dH ₂ O, při -20 °C, sterilizováno přes 0,22µm filtr Nalgene
tetracyklin	5	5	v dH ₂ O, při 4 °C, sterilizováno přes 0,22µm filtr Nalgene
claforan (cefotaxim)	100	100	ve sterilní dH ₂ O, při -20 °C
kanamycin	50	50	v dH ₂ O, při 4 °C, sterilizováno přes 0,22µm filtr Nalgene
hygromycin	25	25	v dH ₂ O, při -20 °C, sterilizováno přes 0,22µm filtr Nalgene

3.5 Analýza hladiny transkriptu

Pro analýzu hladiny transkriptu bylo sesbíráno 80-90 mg mladých listů *A. thaliana* do 2ml mikrozkuvek (typu Eppendorf), byly přidány dvě ocelové kuličky a ihned byl vzorek zamražen v tekutém dusíku. Sběr materiálu probíhal zpravidla v 15 h (tzn. 10 hodin po rozsvícení v kultivační místnosti), protože exprese *GS2* a *GOGAT* úzce souvisí s fotosyntézou a se světelným režimem, jejich exprese by se tedy mohla měnit během dne. Rostlinný materiál byl následně rozdrcen na homogenizátoru (Mixer Mill MM301 firmy Retch) při frekvenci 25 kmitů s⁻¹ po dobu 5 min. Vzorky byly neustále uchovávány ve zmrzlém stavu. Následovala izolace RNA kitem NucleoSpin[®] RNA Plant (firmy Macherey-Nagel), postupováno bylo dle přiloženého protokolu. Závěrečná eluce RNA v 50 µl „RNase-free dH₂O“ byla provedena dvakrát se stejnou tekutinou (pro zvýšení výtěžku). Při práci s RNA bylo nutné vyhnout se možné kontaminaci RNázami (vzorky RNA byly uchovávány na ledové lázni, bylo pracováno v rukavicích, se sterilními špičkami pipet, sterilními roztoky atd.).

Koncentrace a kvalita izolované RNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop 2000. Poměr absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm by se pro RNA měl pohybovat kolem hodnoty 2, poměr 260/230 by měl být v rozmezí 2-2,2 (nižší hodnoty mohou značit kontaminace proteiny). Dále byla ověřena integrita RNA

na elektroforetickém gelu. Byl použit 1,2% agarózový gel s 0,005% barvivem GelRed™ (Biotinum) v pufru 0,5xTBE (viz Tab. 3.23). Ve všech fázích RNA elektroforézy bylo pracováno co nejvíce sterilně (veškeré elektroforetické vybavení bylo důkladně vymyto a opláchnuto 70% etanolem). Vzorky RNA (2 µl) byly smíchány s 2 µl FDE (viz Tab. 3.23) a inkubovány 10 min při 65 °C. Vzorky byly okamžitě zchlazeny na ledové lázni a naneseny na připravený gel, elektroforéza probíhala v elektrickém poli o intenzitě 4 V/cm.

Tab. 3.23 - Roztoky použité při elektroforéze RNA

5xTBE	0,445M Tris, 0,445M kyselina boritá, 0,01M EDTA (pH=8,0)
FDE	100% deionizovaný formamid, 10mM EDTA (pH=8,0), 1,86mM xylene cyanol FF (Sigma), 1,49mM bromfenolová modř

Ke stanovení hladiny transkripce byla použita kvantitativní RT-PCR. Při analýze exprese byly využity následující primery (viz Tab. 3.24).

Tab. 3.24 - Seznam primerů pro analýzu exprese

Název	Gen	Sekvence	T _A [°C]
<i>GS2-3UTR F</i>	<i>GS2</i>	CTCACTTTTGGCAGAGACCAC	59
<i>GS2-3UTR R</i>	<i>GS2</i>	CAACCATTGGACATGCTCTAAC	59
<i>GOGAT-3UTR F</i>	<i>GOGAT</i>	CGCAACGATTCTGAATGAGTG	55
<i>GOGAT-3UTR R</i>	<i>GOGAT</i>	AATCTGCTCTCCATAGTCCTC	55
<i>GK-265C09_RP</i>	<i>GLN1;1</i>	GACTGACCCTTCGCAGCTAC	57
<i>GK-265C09_LP</i>	<i>GLN1;1</i>	CCAGCAATCTCTGTGATCCTC	57
<i>GLN1;2_SAIL_613_E02_RP</i>	<i>GLN1;2</i>	ACCATGAGTCTTCTTGCAGATC	59
<i>GLN1;2_SAIL_613_E02_LP</i>	<i>GLN1;2</i>	AGGCTTTGTAGTGAGCATCAAC	59
<i>GLN1.2_SALK_102291_LP</i>	<i>GLN1;2</i>	TCAGTGGGATCAATGGAGAAG	57
<i>GLN1;2_3UTR_R</i>	<i>GLN1;2</i>	GATCATCCTTTCAAGGGTTCC	57
<i>EF1a F</i>	<i>EF1a</i>	GCACTGTCATTGATGCTCCTGGTC	60
<i>EF1a R</i>	<i>EF1a</i>	CACCAAGGGTGAAAGCAAGGAGAG	60

Výchozím krokem pro kvantitativní RT-PCR je příprava cDNA. Nejprve však proběhlo odstranění DNA z vyizolované RNA. K 1 µg RNA doplněné sterilní dH₂O do celkového objemu 7,5 µl byl přidán 1 µl pufru „10x Reaction Buffer with MgCl₂ for DNaseI“, 0,5 µl inhibitoru RNáz RiboLock a 1 µl DNázy I (vše od firmy Fermentas). Následovala inkubace v 37 °C po dobu 30 min, poté byla reakce ukončena přidáním 1 µl 25mM EDTA. Posléze byla reakční směs inkubována při 65 °C 10 min pro inaktivaci DNázy. Pro reverzní transkripci bylo použito 5 µl reakční směsi po DNázování (tj. 0,5 µg RNA). Byl přidán 1 µl oligo-T primeru a 6,5 µl dH₂O. Směs byla inkubována 5 min při 70 °C. Potom byly přidány 4 µl pufru pro reverzní transkriptázu, 2 µl dNTPs a 0,5 µl inhibitoru RNáz RiboLock. Následovala inkubace 5 min při 41 °C. Poté byla přidána

reverzní transkriptáza RevertAid (Fermentas) v množství 0,7 μ l. Směs byla inkubována 60 min při 42 °C, poté 10 min při 70 °C. Do následné PCR reakce byl použit 1 μ l cDNA. Pro kvantitativní RT-PCR byly vzorky cDNA zředěny 2:3 (bylo přidáno 30 μ l dH₂O). Jako kontrola kontaminací byl spolu se vzorkem cDNA zpracován stejným způsobem zbytek po DNázování, jen nebyl při reverzní transkripci přidán RiboLock a reverzní transkriptáza.

Kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR) probíhala na přístroji LightCycler[®] 480 Real-Time PCR (od firmy Roche), který je součástí servisní genomické laboratoře PřF UK. Množství PCR produktu bylo detekováno fluorescenčním signálem SYBR[®] Green po interkalaci do dvouvláknové DNA. V rámci jedné qRT-PCR byl detekován transkript genu našeho zájmu (např. *GS2*), dále transkript vnitřního standardu (tj. elongační faktor *EF1 α*). Jako kontrola kontaminací byl použit příslušný vzorek DNázované RNA (detekován byl *EF1 α*). Pro každý vzorek byla provedena tři technická opakování. Premix pro qRT-PCR (viz Tab. 3.25) byl po 9 μ l rozpipetován do jamek destičky LightCycler[®] 480 Multiwell Plate 384, white od Roche. Poté byl přidán 1 μ l dané cDNA (nebo DNázované RNA). Destička byla poté překryta fólií LightCycler 480 Sealingfoil (Roche). Před vložením do lightcykleru byla destička zcentrifugována (2 min, 2500 RPM). Byl spuštěn program pro qRT-PCR (viz Tab. 3.26). Výsledná data byla zpracována v programu LightCycler[®]480(verze 1.5.0) – byly definovány oblasti se stejným premixem, byly pojmenovány vzorky a určeny replikáty. U vzorků byl stanoven „crossing point Cp“ (v programu označen jako AbsQuant/2nd Derivative Max), odpovídající cyklu, při kterém dochází k překročení prahu detekce fluorescence; dále pak „melting point Tm“ (označen jako Tm calling), vypovídající o specifitě PCR produktu. Data byla exportována do excelu a zhodnocena (průměr, míra variability, přítomnost kontaminací apod.). Primární data ze softwaru LightCycler 480 byla konvertována pomocí programu LC480 Conversion (verze 2014.1) do podoby excelové tabulky. Následně byla stanovena účinnost PCR u jednotlivých premixů pomocí programu LinRegPCR (verze 2015.3). Relativní koncentrace transkriptu byla určena jako (Účinnost PCR)^{-Cp}. Pro daný vzorek byl stanoven aritmetický průměr z triplikátů. Z další analýzy byla případně vyloučena nepovedená technická opakování (dle hodnot Tm). Průměrná koncentrace transkriptu našeho zájmu (*GS2*) byla vztažena na průměr vnitřního standardu. Tento poměr (*GS2/EF1 α*) byl použit pro porovnání jednotlivých vzorků vůči výsledkům z WT rostlin. Pokud byly použity v qRT-PCR dva vzorky z WT rostlin (viz qRT-PCR2, Kapitola 4.2.4, Obr. 4.27), byly výsledky vztaženy na jejich geometrický průměr.

Tab. 3.25 - Premix pro qRT-PCR (množství pro 1 vzorek)

Celkem	10 µl
cDNA	1 µl
iQ™ SYBR® Green Supermix (firmy BIORAD)	5 µl
primery forward + reverse	0,2 + 0,2 µl
dH ₂ O	3,6 µl

Tab. 3.26 - Program pro qRT-PCR

preinkubace		1 cyklus	
amplifikace		50 cyklů	
tání (melting)		1 cyklus	
chlazení		1 cyklus	
Program	Teplota [°C]	Čas	Rychlost změn teploty [°C/s]
preinkubace	94	3 min	4,8
amplifikace	94	15 s	4,8
	60	30 s	1,6
	72	20 s	3,2
melting	95	20 s	4,8
	40	1 min	2,5
	58	1 s	2
	95	kontinuální	0,1
chlazení	40	10 s	2,5

3.6 Indukce umlčování pomocí estradiolu

Estradiol (přesněji 17β-estradiol), indukční látka XVE systému, byl standardně aplikován ve finální koncentraci 10µM do média (v případě *in vitro* experimentů), anebo postříkem s přidávkem smáčedla 0,01% Silwet® Star (od firmy AgroBio Opava). Estradiol, vyrobený firmou Sigma (Cat. No. E2758), byl skladován v podobě zásobního roztoku o koncentraci 20mM v DMSO (dimetylsulfoxidu) při -20 °C. Vzhledem k tomu, že je estradiol zřejmě citlivý k rozmrazování a k rozkladu na světlo (Borghini, 2010), byly používány 1ml alikvoty, které byly po použití hned vráceny do mrazáku. Jelikož může mít estradiol karcinogenní účinky, při jeho aplikaci byly používány ochranné pomůcky, postřík rostlin probíhal v digestoři za ochranným sklem. V experimentech s aplikací estradiolu budou používány zkratky ESTR (pro aplikaci estradiolu) a DMSO (pro aplikaci samotného DMSO na kontrolní rostliny).

Vzhledem k tomu, že se v průběhu experimentů ukázala aplikace ESTR postříkem nepřítli účinná, bylo přistoupeno k optimalizaci. Během optimalizace bylo spolupracováno s kolegyní Adélou Růžičkovou, která během své diplomové práce připravila rostliny *A. thaliana* nesoucí inducibilní GFP (*iGFP*) - tyto rostliny exprimují po aplikaci estradiolu fluorescenční protein GFP, který je snadno detekovatelný na fluorescenční binolupě - Olympus SZX7 s univerzální epifluorescenčním osvětlovačem (Kramer) a fluorescenčním

zdrojem X-Cite 120Q (firmy Lumen Dynamics). Dále byly využity rostliny (*GFP_IR*) nesoucí v rámci jednoho konstruktů gen pro GFP i vlásenku proti *GFP*, která je exprimována po aplikaci estradiolu. Po aplikaci ESTR tedy dochází k umlčování *GFP* (pro více informací viz Růžičková, 2015). V obou případech byly použity ověřené linie transformovaných rostlin (*iGFP13*, *GFP_IR5*) v T₂ generaci, které reagují na aplikaci ESTR. U čtrnáctidenních rostlin *iGFP13* pěstovaných na jiffech byly vyzkoušeny různé způsoby aplikace estradiolu: postřik 10 μ M roztokem estradiolu s 0,01% smáčedlem Silwet; zálivka 10 μ M nebo 100 μ M roztokem estradiolu seshora na jiff. Po 3 dnech bylo detekováno GFP na fluorescenční binolupě. Snímání pomocí fotoaparátu EOS 60D (Canon) probíhalo při expozici 5s, ISO100, vyvážení bílé „Cloudy“ a zaostření na střed. Na rostliny *GFP_IR5* (staré 19 dní) byla aplikována zálivka 100 μ M estradiolu do jiffu (opakována po 3 dnech), postřik 10 μ M roztokem estradiolu s 0,01% smáčedlem Silwet opakovaný po 3 dnech anebo každý den. Dále bylo vyzkoušeno i zvýšení koncentrace smáčedla Silwet na 0,1%. Nebyl pozorován žádný negativní efekt na rostliny, lze tedy používat i postřik s 0,1% smáčedlem Silwet.

3.7 Fenotypová analýza rostlin

Během fenotypové analýzy byla stanovena čerstvá biomasa rostlin. Prýt rostlin po osušení na filtračním papíře byl zvážen na analytických váhách. Sušina byla stanovena po lyofilizaci vzorků, které byly použity pro stanovení čerstvé biomasy. Zamražené vzorky v 2ml mikrozkušavkách (typu Eppendorf), které měly proděravěné víčko, byly lyofilizovány přes noc (16-20 h) pomocí přístroje Lyovac GT 2 (Finn-Aqua), poté byly vzorky zváženy na analytických váhách.

Stanovení maximální kvantové účinnosti fotosystému II (neboli poměru F_V/F_M) probíhalo pomocí přenosného fluorimetru FluorPen FP100 (firmy Photon Systems Instruments). Rostliny adaptované na tmou mají fotosystémy II (PSII) a plastochinony v oxidovaném stavu, změřením fluorescence slabým měřícím paprskem získáváme hodnotu F_0 , tj. minimální výtěžek fluorescence. Po vystavení rostlin saturačnímu paprsku dochází k vysycení fotochemických procesů na PSII, všechny plastochinony vázané na PSII jsou v redukované formě – dostáváme tak maximální výtěžek fluorescence (F_M). Rozdíl F_M a F_0 je označován jako maximální výtěžek variabilní fluorescence u temnostně adaptovaných rostlin (F_V). Poměr F_V/F_M je běžně používaným parametrem, který odráží stav fotosyntetického aparátu. U zdravých rostlin se F_V/F_M pohybuje kolem hodnoty 0,83. Po vystavení rostlin stresovým podmínkám hodnota F_V/F_M klesá (Roháček, 2002).

Rostliny byly minimálně na 20 minut přesunuty do tmy, hned po vyndání rostliny byla stanovena kvantová účinnost (QY) u třech různých listů. Nastavení FluorPenu bylo během měření následující: měřící paprsek (f-pulse) $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, saturační paprsek (F-pulse) $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, aktinické světlo (A-pulse) $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Získané hodnoty byly zprůměrovány v rámci jedné rostliny, tyto průměry pak posloužily pro analýzu rozptylu jednotlivých linií.

Obsah chlorofylu byl stanoven spektrofotometricky po extrakci barviv pomocí dimethylformamidu (DMF). K zamraženému listovému materiálu o hmotnosti 5-10 mg byl přidán 1 ml DMF. Vzorek byl obalen alobalem a umístěn přes noc v lednici. Po odbarvení rostlinného materiálu byla stanovena absorbance při vlnových délkách: 480, 647, 664, 750. Měření probíhalo na spektrofotometru BioMate5 (Thermo Spectronics), používána byla skleněná kyveta (protože DMF leptá běžně používané polystyrenové kyvety). Hodnoty absorbance by se měly pohybovat v rozmezí 0,3-1. Pokud tedy přesáhla absorbance hodnotu 1, daný vzorek byl definovaně naředěn přidáním DMF. Obsah chlorofylů a karotenoidů (v $\mu\text{g}/\text{ml}$) byl určen pomocí rovnic popsanych v práci Wellburn (1994):

$$\text{Chlorofyl a (Chl a)} = 11,65*(A_{664} - A_{750}) - 2,69*(A_{647} - A_{750})$$

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

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

Při výpočtu bylo nutné zahrnout množství použitého DMF, resp. faktor zředění. Obsah chlorofylů (Chl a + Chl b) byl pak vztáhnut na výchozí čerstvou biomasu (v jednotkách mg/g).

V experimentu s promotorovými mutanty v *GS2* (viz Kapitola 4.2.4) byly vstupním materiálem pro extrakci chlorofylu listové terčíky (o průměru 0,25 mm). Obsah chlorofylu tak mohl být vztáhnut na listovou plochu, výsledky testovaných linií se však nelišily od chlorofylu vztaženého na čerstvou biomasu. Dále byl chlorofyl stanovován pouze na čerstvinu. V experimentu s rostlinami *XVE-GOGAT-IR* (viz Kapitola 4.1.2) byl použit směsný vzorek všech rostlin dané linie. Po stanovení čerstvé biomasy byl materiál rozmělněn v třecí misce vychlazené tekutým dusíkem a přendán do 50ml zkumavky (typu Falcon). Následně byl přidán DMF (15-30 ml).

Dále byl stanoven poměr Chl a / Chl b, který vypovídá o stavu fotosyntetického aparátu, resp. o poměru světlosběrných antén a fotosystémů. Chlorofyl b se vyskytuje pouze ve světlosběrných anténách, chlorofyl a je přítomný v reakčních centrech fotosystémů i ve světlosběrných komplexech. Vyšší hodnota poměru indikuje snížení počtu světlosběrných komplexů vůči fotosystému II. Dalším stanoveným parametrem byl

poměr chlorofylů ku karotenoidům, který je indikátorem „zelenosti“ rostlin, nižší hodnoty tohoto poměru značí senescenci, stres a poškození fotosyntetického aparátu. Slunné listy mívají hodnoty 4,2-5, stinné listy pak v rozmezí 5,5-7. Žluté listy mají poměr kolem 3,5, s postupující senescencí mohou být hodnoty ještě nižší (Lichtenthaler & Buschmann, 2001).

3.8 Vyhodnocování dat

Pro fotografickou dokumentaci rostlin byl použit fotoaparát Nikon D3200, snímky byly zpracovány v programu Zoner Photo Studio 17. Schémata v této práci byla vytvořena v Inkscape (verze 0.92).

Naměřená data byla zpracována v programu Microsoft Excel 2010. Statistické vyhodnocení probíhalo pomocí programu RStudio (verze 1.0.136), včetně dostupných rozšíření (package ggplot2 pro tvorbu grafů a userfriendlyscience). Data byla většinou vyhodnocena pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), využit byl model lineární regrese (s interakcemi). Pro porovnání jednotlivých variant byl použit Tukeyův post-hoc test. Předpoklady pro ANOVA, tj. normalita dat a homogenita variance, byly testovány pomocí Shapirova testu, resp. Barlettova testu. Rovněž byly zhodnoceny diagnostické grafy daného modelu. Pokud data nevykazovala normální rozdělení, bylo přistoupeno k transformaci dat (nejčastěji ke zlogaritmování). Pokud byl výrazně narušen předpoklad stejných rozptylů, byla využita Welch ANOVA, pro porovnání variant pak neparametrický post-hoc test Games-Howellův. V grafech je využito následující označení statistické významnosti: * pro p-hodnotu menší než 0,05; ** pro $p < 0,01$ a *** pro $p < 0,001$.

4. Výsledky

4.1 Indukovaná RNAi proti GOGAT jako nástroj pro usmrcování GM rostlin

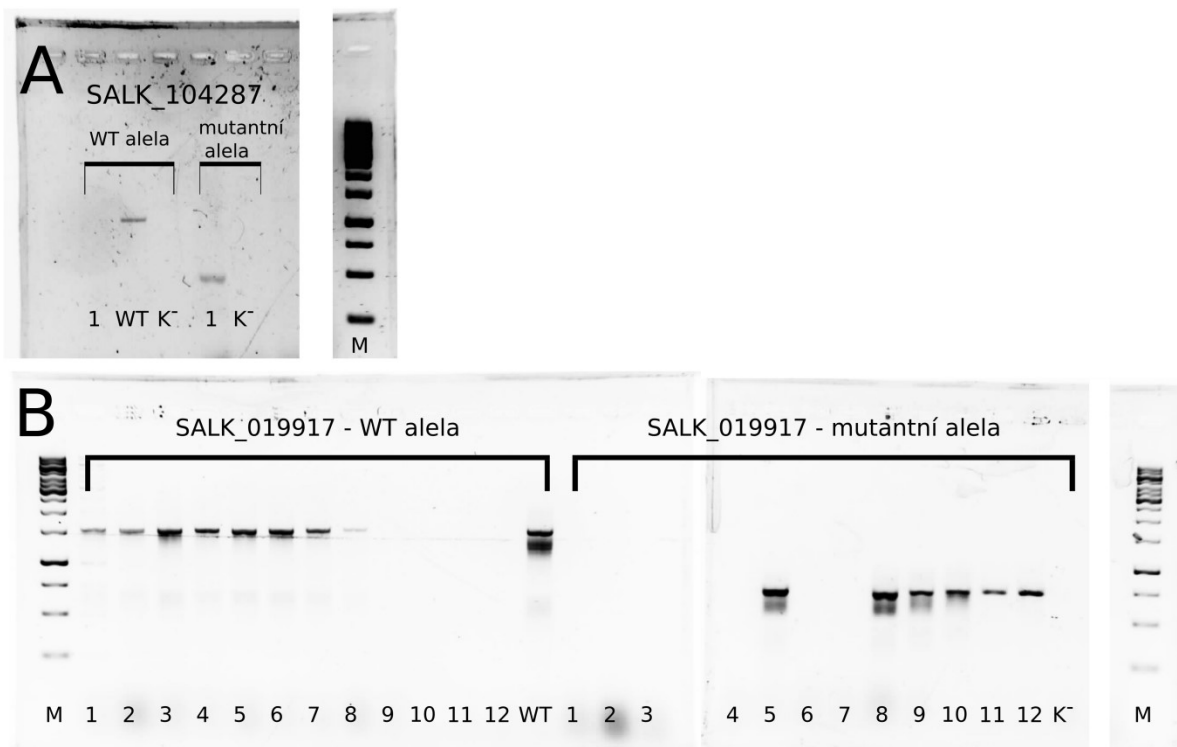
Pro studium indukovaného usmrcování rostlin byl vybrán gen pro glutamátsyntázu, konkrétně pro isoformu Fd-GOGAT1, která je majoritní ve fotosyntetických pletivech a je klíčová pro fixaci amonných iontů během fotorespirace. Knock-out mutant v tomto genu má projevy jako ostatní fotorespirační mutanti – v intenzivních fotorespiračních podmínkách velmi špatně roste, žloutne, až nakonec odumírá; pokud je však pěstován v podmínkách potlačujících fotorespiraci (např. zvýšená hladina CO₂), tyto projevy jsou potlačeny (Coschigano *et al.*, 1998). Mutace v *Fd-GOGAT1* je tedy fakultativně letální. Pro zjednodušení bude nadále v textu používána zkratka *GOGAT*.

Aby bylo možné navodit indukovanou RNAi proti *GOGAT*, byl do rostlin vnesen konstrukt s invertovanou repeticí části kódující sekvence tohoto genu, jejíž transkripce je pod kontrolou XVE systému. Indukční systém XVE je tvořen fúzním proteinem, který obsahuje DNA-vazebnou doménu LexA (X), transaktivační doménu VP16 (V) a lidský estrogenový receptor (E). Fúzní protein je konstitutivně exprimován. V přítomnosti indukční látky – estradiolu, spouští fúzní protein silnou expresi z promotoru, který obsahuje kopie *LexA* operátoru (Zuo *et al.*, 2000). V našem případě dochází po aplikaci indukční látky k tvorbě vlásenkové RNA dávající vznik malým RNA proti *GOGAT* a k umlčování tohoto genu na posttranskripční úrovni. U ošetřených rostlin by se tedy měly po aplikaci estradiolu dostavit projevy podobné jako u fotorespiračních mutantů (žloutnutí, případně odumírání). Jako kontrola pro indukované umlčování *GOGAT* byly použity jednak rostliny WT, jednak dva fotorespirační inzerční (knock-out) mutanti v *GOGAT*.

4.1.1 Charakterizace mutantních linií v *GOGAT*

Pro získání fotorespiračních mutantů byly objednány a charakterizovány dvě inzerční linie v genu pro *Fd-GOGAT1* (*AT5G04140*): SALK_104287 (dále označovanou *gogat-1*) a SALK_019917, která byla již popsána v práci Kissen *et al.*, 2010 a bude nadále označována *gogat-2*. Obě linie byly vysety jak do standardních podmínek kultivační místnosti, tak do podmínek zvýšené koncentrace CO₂ (CO₂ boxu). Předpokládali jsme, že homozygotní rostliny budou mít problém s růstem ve standardních podmínkách, proto bude nutné tyto rostliny umístit na dopěstování do CO₂ boxu, tj. do podmínek potlačujících fotorespiraci. Genotypováním příslušnými primery pro mutantní alelu (*RP* +

SALK_LB) a pro WT alelu (*LP + RP*) byly identifikovány homozygotní rostliny (viz Obr. 4.1, více o genotypování v Kapitole 3.3).



Obr. 4.1 - Genotypování *gogat* mutantů

A – genotypování linie SALK_104287 neboli *gogat-1*

B – genotypování linie SALK_019917 neboli *gogat-2*

Číslice označují jednotlivé testované rostliny, M značí marker (1 kbp), WT slouží jako pozitivní kontrola, K značí kontrolu kontaminací (zbytek premixu).

Homozygotní rostliny *gogat-1* i *gogat-2* vykazovaly v kultivační místnosti projevy fotorespiračních mutantů – byly menší a žlutější než WT (viz Obr. 4.2). Tyto projevy byly však mírnější, než jsme předpokládali. Rostliny byly v kultivační místnosti schopné dlouhodobě růst a produkovat semena. Po přesunu *gogat-1* do boxu se zvýšeným CO₂ došlo ke zmírnění fotorespiračních projevů. Jelikož obě linie *gogat* mutantů vykazovaly shodné fenotypové projevy, v dalších pokusech byla použita zejména linie *gogat-2*.



Obr. 4.2 - Porovnání rostlin *gogat-2* a WT ve standardních kultivačních podmínkách
Rostliny WT a *gogat-2* byly pěstovány při 24 °C, fotoperiodě 16 h světlo/8 h tma, ozáření kolem 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Vyfoceno 35 dnů po výsevu.

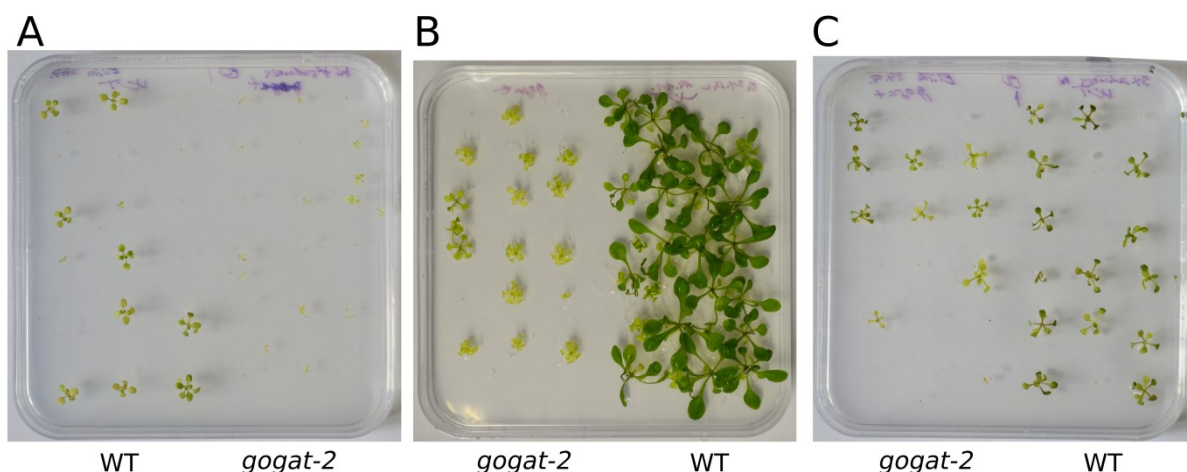
Vzhledem k tomu, že *gogat* mutanti vykazovali ve standardních podmínkách jen relativně mírné fotorespirační projevy, snažili jsme se najít podmínky, za kterých by byl rozdíl mezi fotorespiračními mutanty a WT rostlinami kontrastnější. Předpokládali jsme, že indukované umlčování *GOGAT* pomocí RNA interference povede k podobným či spíše ještě slabším projevům než u knock-out mutanta, takové projevy by pak byly za standardních podmínek jen těžce odlišitelné. Pro navození intenzivnější fotorespirace byly rostliny *gogat-2* a WT umístěné na vyšší ozáření (asi 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a byly pěstovány na vrstvě perlitu, která odvádí přebytečnou vlhkost z rašelinových peletek (viz Obr. 4.3). Tento způsob kultivace se osvědčil (rozdíly mezi WT a mutanty se prohloubily) a byl použit i v experimentu pro fenotypovou analýzu (viz Kapitola 4.2.4).



Obr. 4.3 – Fenotyp rostlin *gogat-2* a WT v podmínkách intenzivnější fotorespirace
Rostliny *gogat-2* a WT byly pěstovány na perlitu, při vyšší ozáření (asi 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Teplota byla 24 °C, fotoperiodě 16 h světlo/8 h tma. Vyfoceno 29 dní od výsevu.

Kultivace fotorespiračních mutantů byla optimalizována i v *in vitro* podmínkách. Bylo totiž žádoucí mít jednoduchý selekční systém pro odhalení transformovaných rostlin, které reagují na indukční látku (estradiol) a umlčují *GOGAT*. Systém v *in vitro* podmínkách umožňuje selekci jednak na základě přítomnosti *T-DNA* (rezistence na antibiotika), jednak na základě fotorespiračních projevů vyvolaných aplikací estradiolu – tedy fungující RNAi proti *GOGAT*.

V *in vitro* podmínkách byly rostliny *gogat-2* jen lehce menší a žlutější než WT rostliny. Standardně používané médium pro kultivaci rostlin *in vitro* totiž obsahuje 1% sacharózu. Jak bylo již dříve popsáno, dodání sacharózy potlačuje projevy fotorespiračních mutantů (Igarashi *et al.*, 2003). Pro zvýraznění rozdílů mezi *gogat-2* a WT rostlinami bylo použito médium bez sacharózy. V tomto případě byl mutant *gogat-2* výrazně menší a žlutější než WT, skoro na pokraji přežití. Bohužel nebylo možné tento způsob kultivace použít pro další experimenty, protože klíčivost a růst rostlin v raném stádiu byly negativně ovlivněny absencí sacharózy. Byla tedy optimalizována kultivace *gogat-2* a WT rostlin na médiích s různým obsahem sacharózy (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 a 1% sacharóza). Ideálním kompromisem z hlediska klíčivosti a růstu rostlin a zároveň s výrazným rozdílem mezi WT a *gogat-2* se ukázalo médium s 0,2% sacharózou (viz Obr. 4.4).



Obr. 4.4 - Optimalizace selekce fotorespiračních mutantů *in vitro*

Porovnání růstu WT a *gogat-2* na 0,5 MS médiu s různým obsahem sacharózy:

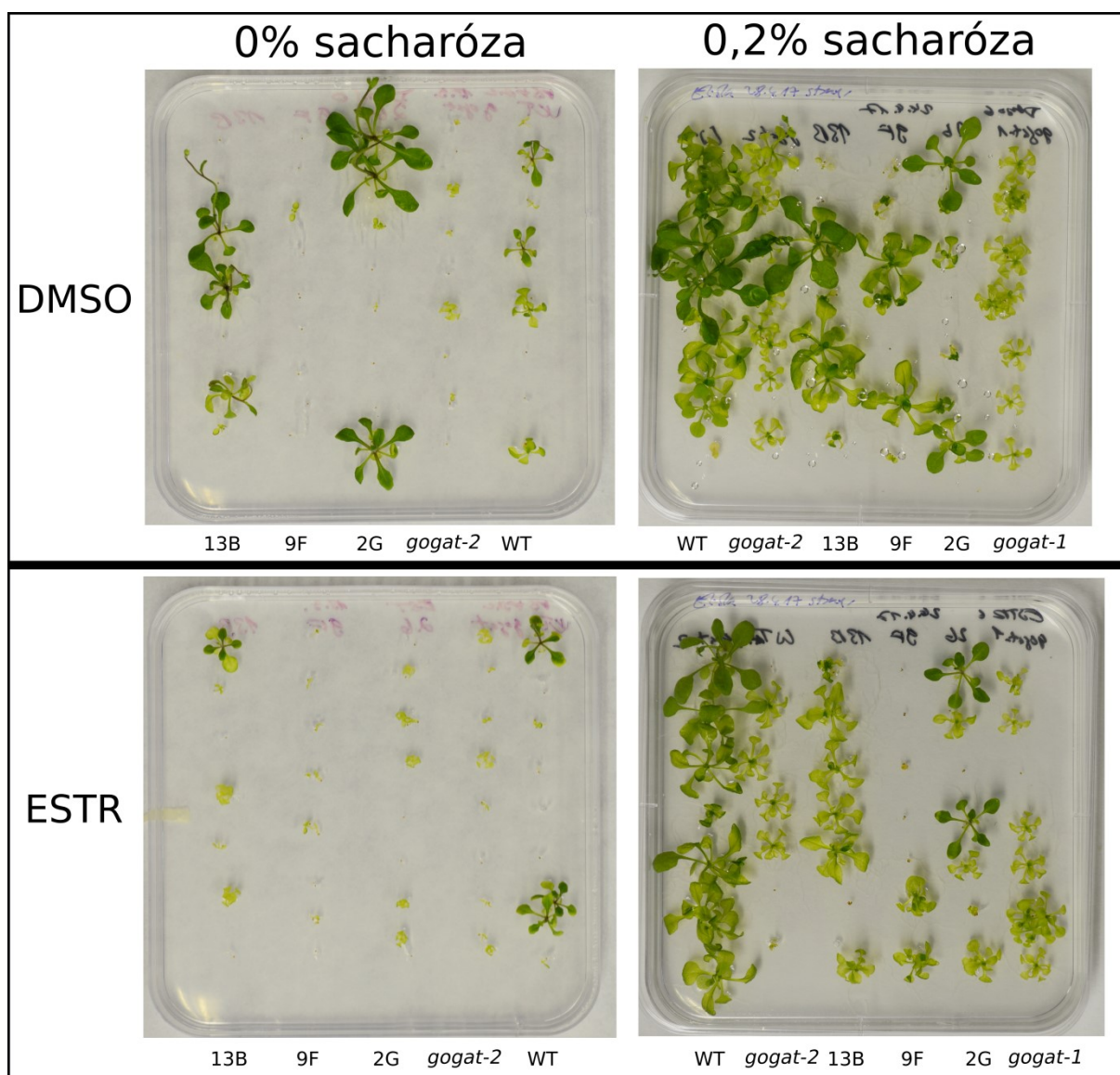
A - médium bez sacharózy; B – médium s 0,2% sacharózou; C – médium s 1% sacharózou.

V případě A a C se jedná o rostliny 14 dní od výsevu, v případě B 21 dní od výsevu.

4.1.2 Umlčování *GOGAT* pomocí inducibilní vlásenky

Pro inducibilní umlčování *GOGAT* byl vytvořen konstrukt *XVE-GOGAT-IR*, nesoucí vlásenku proti *GOGAT* pod promotorem, jenž je indukován aplikací estradiolu (pro popis klonování viz Kapitola 3.2 a 3.3). Tento konstrukt byl transformován do rostlin *A. thaliana*. Po selekci na hygromycinu bylo získáno více jak 20 nezávislých linií transformantů. V následující generaci (tj. T₂ generaci) byl aplikován na rostliny estradiol (10μM, postřik) – linie, které vykazovaly alespoň mírné projevy žloutnutí, byly vybrány do dalších pokusů. Nutno podotknout, že se posléze ukázalo, že tento způsob aplikace estradiolu není příliš spolehlivý, a proto byl zaváděn systém pro *in vitro* selekci popsany dříve (viz Kapitola 4.1.1). U vybraných linií byla získána homozygotní T₃ generace (tj. nevyštěpující netransformované jedince při výsevu na selekci), která byla použita pro testování účinků estradiolu. Použité homozygotní linie nadále ponese označení *XVE-GOGAT-IR 2G; 9F a 13B*. Indukované umlčování pomocí estradiolu bylo testováno jednak v *in vitro* podmínkách, jednak aplikací postřiku na rostliny pěstované v kultivační místnosti.

V *in vitro* podmínkách byly vysety linie *XVE-GOGAT-IR 2G, 9F a 13B* na médium s 10μM ESTR a na kontrolní médium (s přídavkem DMSO). Kontrolou byl v obou případech jak WT, tak fotorespirační mutant *gogat-2*. Nejprve bylo použito médium bez sacharózy, posléze se ukázalo jako vhodnější médium s 0,2% sacharózou. V obou případech byly zřejmé projevy umlčování *GOGAT* (menší vzrůst, žlutost) u všech třech linií (2G, 9F a 13B) na médiu s estradiolem na rozdíl od kontrolního výsevu na DMSO (viz Obr. 4.5). Vzhledem k velké variabilitě rostlin na bezsacharózovém médiu, byly použity pro fenotypovou analýzu rostliny z výsevu na 0,2% sacharóze.



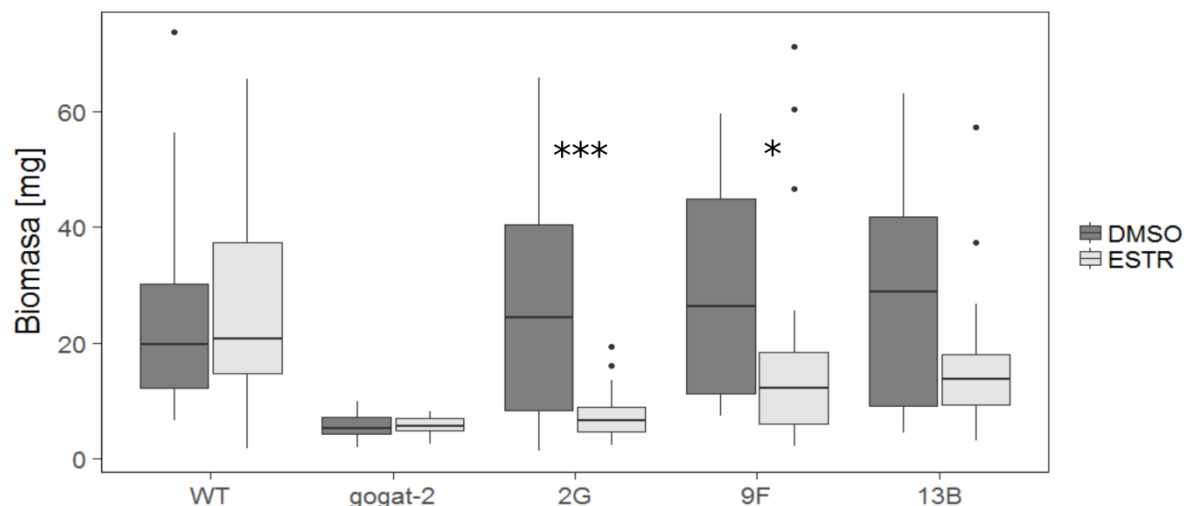
Obr. 4.5 - Aplikace estradiolu na vybrané linie *XVE-GOGAT-IR* v *in vitro* podmínkách

Porovnání rostlin *XVE-GOGAT-IR* 2*G*, 9*F*, 13*B* ošetřených ESTR s rostlinami pěstovanými na kontrolním médiu s DMSO. Kontrolou v obou případech byly WT rostliny a *gogat* mutanti. V prvotním pokusu bylo použito médium bez sacharózy, v dalším pokusu (Experimentu č. 2) pak médium s 0,2% sacharózou. Rostliny byly vyfoceny 22 dní od výsevu.

V prvním pokusu z výsevu na 0,2% sacharóze (tj. Experimentu č. 1) však opět byla značná variabilita mezi rostlinami. Byla stanovena čerstvá biomasa (viz Obr. 4.6) – efekt ošetření a linie byl významný (po zlogaritmování dat, ANOVA, $p=4,169 \cdot 10^{-16}$, resp. $8,231 \cdot 10^{-6}$). Rostliny *XVE-GOGAT-IR* 2*G* a 9*F* ošetřené estradiolem měly signifikantně menší biomasu než kontrolní rostliny na DMSO (2*G* $p<0,001$, 9*F* $p=0,032$, Tukey test). Počet analyzovaných rostlin v Experimentu č. 1 udává Tab. 4.1.

Tab. 4.1 - Počet hodnocených rostlin v Experimentu č.1

	WT	<i>gogat-2</i>	<i>2G</i>	<i>9F</i>	<i>13B</i>
DMSO	29	23	33	29	26
ESTR	22	18	23	24	21

**Obr. 4.6 - Stanovení čerstvé biomasy u rostlin *XVE-GOGAT-IR* – Experiment č. 1**

Porovnání čerstvé biomasy u rostlin WT, *gogat-2* a *XVE-GOGAT-IR 2G, 9F, 13B* ošetřených ESTR s rostlinami kontrolními (ošetřenými DMSO). Rostliny byly pěstovány na médiu s 0,2% sacharózou. Biomasa byla zhodnocena pomocí ANOVA po zlogaritmování dat ($n=18-33$). Rostliny *2G* a *9F* ošetřené ESTR se liší od kontroly na DMSO ($2G$ $p<0,001$; $9F$ $p=0,032$; Tukey test).

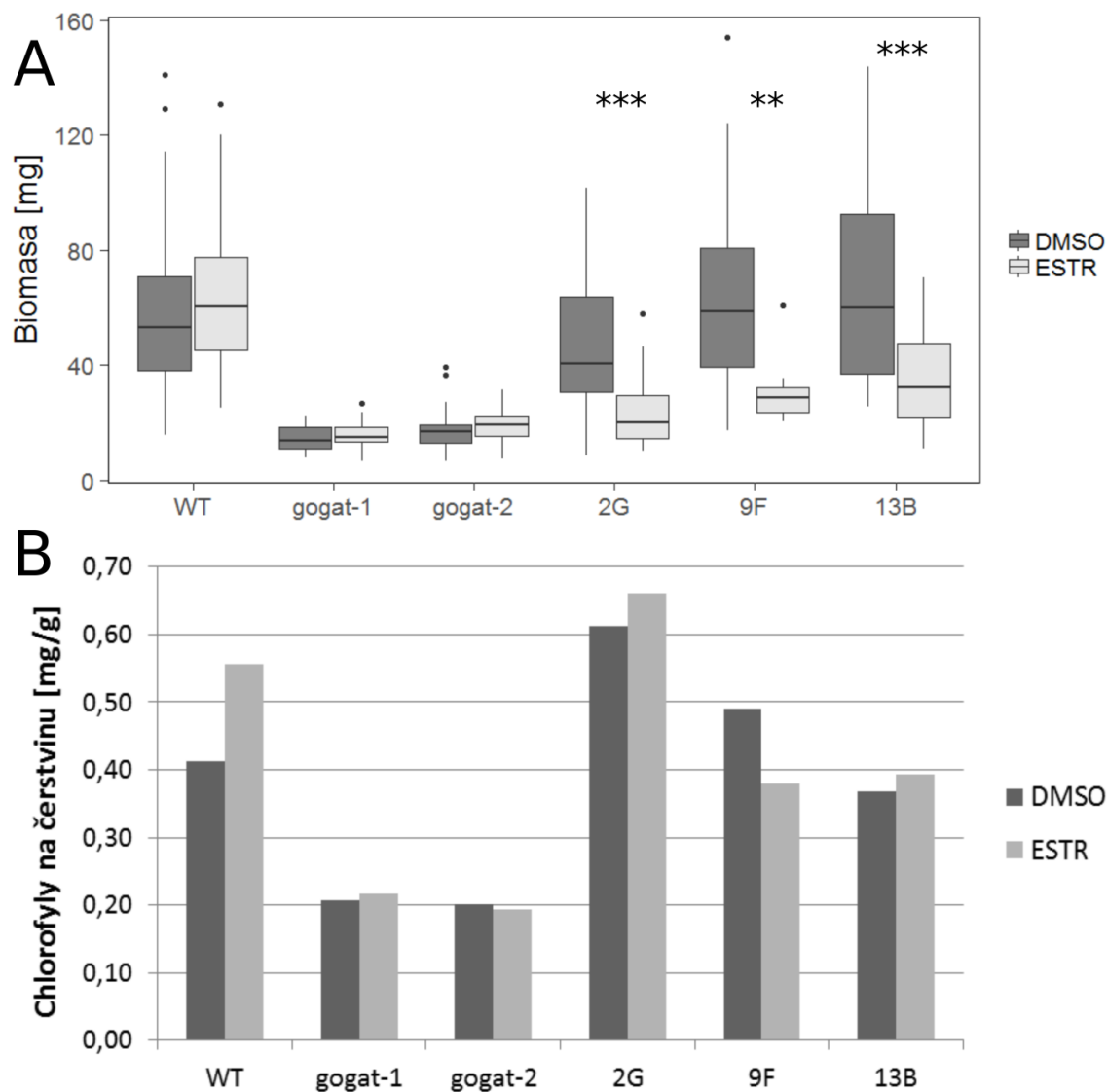
V druhém pokusu (Experimentu č. 2) byly do analýzy zařazeny jen rostliny, které vytvořily standardní klíční rostliny do 4. dne od výsevu. Toto opatření bylo nutné vzhledem k poměrně velké variabilitě klíčení u všech genotypů. U rostlin byla stanovena čerstvá biomasa (viz Obr. 4.7A). Počet hodnocených rostlin pro jednotlivé varianty udává Tab. 4.2. Na čerstvou biomasu měly signifikantní vliv ošetření ($p=0,003$) i typ linie ($p=2,2 \cdot 10^{-16}$, ANOVA, po zlogaritmování dat). Rostliny *XVE-GOGAT-IR 2G, 9F* a *13B* ošetřené estradiolem měly signifikantně menší biomasu než tytéž rostliny ošetřené DMSO (pro $2G$ $p<0,001$; $9F$ $p=0,015$; $13B$ $p<0,001$; Tukey test).

Tab. 4.2 - Počet hodnocených rostlin v Experimentu č. 2

	WT	<i>gogat-1</i>	<i>gogat-2</i>	<i>2G</i>	<i>9F</i>	<i>13B</i>
DMSO	50	51	50	21	11	17
ESTR	47	43	42	34	11	32

Po stanovení čerstvé biomasy byly všechny rostliny dané varianty zamrazeny a následně rozetřeny ve třecí misce – tento směsný vzorek posloužil jednak pro odběr na izolaci RNA (a následně pro stanovení hladiny transkriptu pomocí qRT-PCR), tak pro extrakci chlorofylu. Jak je vidět na grafu Obr. 4.7B, celkový obsah chlorofylu se lišil

pouze u fotorespiračních mutantů (*gogat-1* a *gogat-2*). U *XVE-GOGAT-IR* rostlin nebyl patrný rozdíl u rostlin ošetřených ESTR (vůči kontrolním rostlinám na DMSO). Vzhledem k tomu, že byl použit pro stanovení chlorofylu směsný vzorek všech rostlin dané varianty, nebylo bohužel možné data vhodně statisticky vyhodnotit.

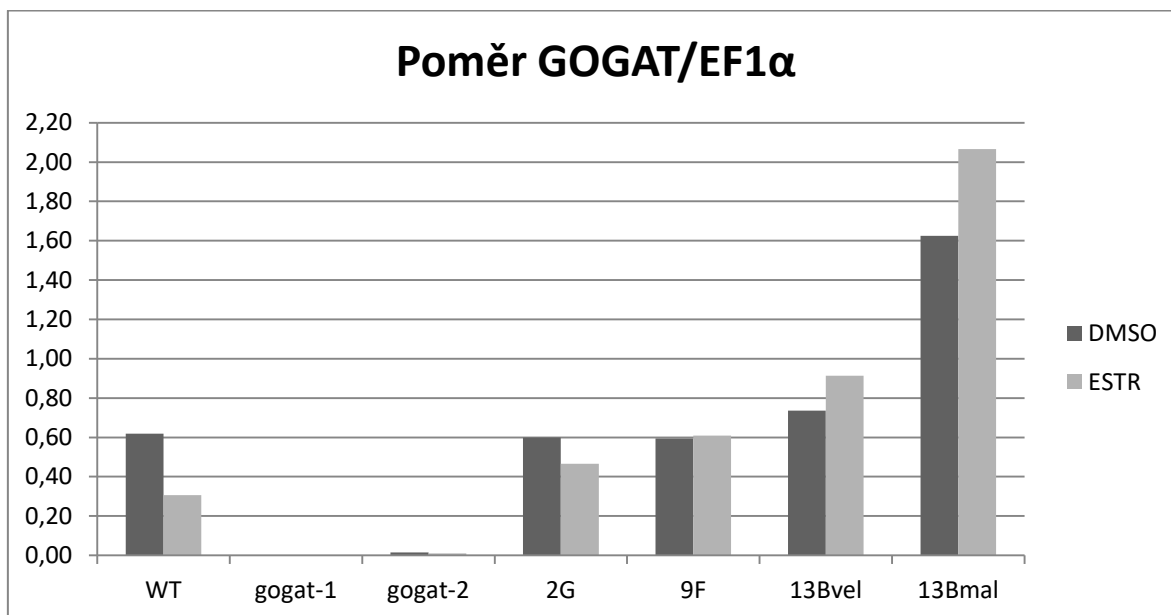


Obr. 4.7 - Stanovení čerstvé biomasy a chlorofylu u rostlin *XVE-GOGAT-IR* ošetřených ESTR v *in vitro* podmínkách – Experiment č. 2

Porovnání čerstvé biomasy (A) a obsahu chlorofylu (B) u rostlin WT, *gogat-2* a *XVE-GOGAT-IR* 2G, 9F, 13B ošetřených ESTR s rostlinami kontrolními (ošetřeny DMSO). Rostliny byly pěstovány na médiu s 0,2% sacharózou. Biomasa byla zhodnocena pomocí ANOVA po zlogaritmování dat (n= 11-51). Rostliny 2G, 9F, 13B ošetřené ESTR se liší od kontroly na DMSO (2G p<0,001; 9F p=0,015; 13B p<0,001; Tukey test).

V Experimentu č. 2 byla rovněž stanovena hladina transkriptu *GOGAT* u daných linií po ošetření ESTR (viz Obr. 4.8). Kromě linie *XVE-GOGAT-IR* 13B byl jako výchozí materiál použit směsný vzorek. U linie 13B byla RNA izolována z jednotlivých rostlin. Byla vybrána velká, zelená rostlina 13Bvel, u které bylo předpokládáno, že při výsevu

na ESTR nereaguje na indukci. Jako kontrola byla vybrána podobně velká rostlina na DMSO. Analogicky byla vybrána menší, žlutější rostlina *13Bmal* na ESTR (resp. DMSO). Detekci hladiny transkripce *GOGAT* u těchto vzorků jsme chtěli ověřit, že velké zelené rostliny, které považujeme za nereagující na ESTR, skutečně mají vyšší hladinu *GOGAT* než malé žluté rostliny na ESTR. Bohužel se dle qRT-PCR ukázalo, že se v době odběru vzorků hladina *GOGAT* u rostlin *XVE-GOGAT-IR* na ESTR nelišila v porovnání s kontrolními rostlinami na DMSO (viz Obr. 4.8). Navíc v porovnání s WT došlo k navýšení *GOGAT* (zejména u vzorků *13Bmal*). U mutantů *gogat-1* a *gogat-2* nebyl detekován transkript, potvrdilo se tak, že se jedná o knock-out mutaci. Výsledky qRT-PCR jsou však rozporuplné i vzhledem k rozdílu u WT na ESTR a DMSO, stanovení by bylo třeba zopakovat i s jiným časem odběru.



Obr. 4.8 - Hladina transkriptu *GOGAT* u *XVE-GOGAT-IR* rostlin z Experimentu č. 2 Porovnání hladiny transkriptu *GOGAT* (vztaženého na vnitřní standard *EF1α*) u rostlin WT, *gogat-1*, *gogat-2* a *XVE-GOGAT-IR* 2G, 9F a 13B ošetřených ESTR (resp. DMSO). U linie 13B byly jako výchozí materiál použity jednotlivé rostliny (velké zelené 13Bvel a menší žlutější 13Bmal), u ostatních linií byl použit směsný vzorek.

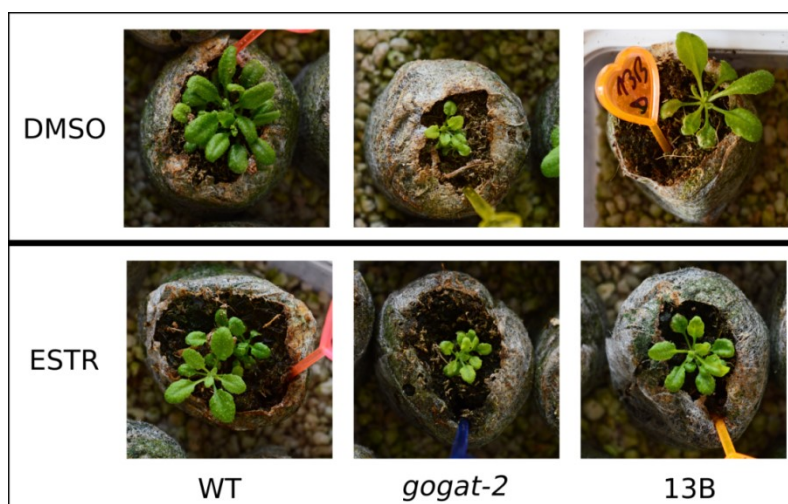
U vybraných linií *XVE-GOGAT-IR* 2G, 9F a 13B, které reagují na aplikaci estradiolu v *in vitro* podmínkách, byla testována i aplikace ESTR postřikem na rostliny pěstované na jiffech v podmínkách intenzivnější fotorespirace. Jako kontroly byly zařazeny rostliny WT a *gogat-2*. První postřik estradiolem (10 μ M roztok s 0,1% smáčedlem Silwet) byl aplikován 6 dní od výsevu, aplikace byla opakována obden během následujících dvou týdnů. Rostliny *XVE-GOGAT-IR* 2G, 9F a 13B ošetřené estradiolem se výrazně nelišily od kontroly ošetřené postřikem DMSO, což dokládá i stanovení čerstvé

biomasy (viz Obr. 4.9 a Obr. 4.10). Počet rostlin pro stanovení biomasy udává tabulka Tab. 4.3.

Tab. 4.3 - Počet rostlin v pokusu *XVE-GOGAT-IR* ošetřených ESTR na jífkách

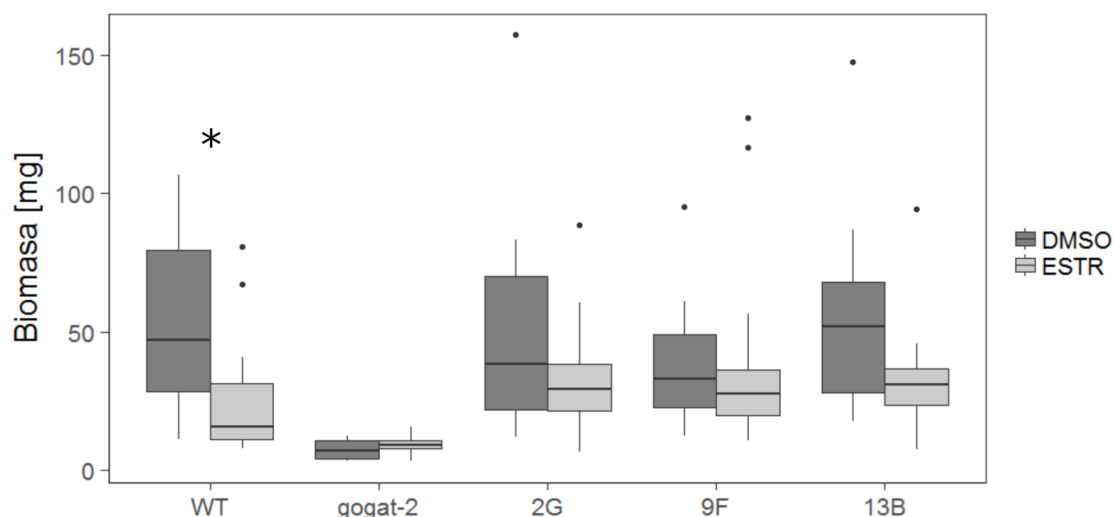
	WT	<i>gogat-2</i>	<i>2G</i>	<i>9F</i>	<i>13B</i>
DMSO	12	11	17	19	10
ESTR	21	13	13	19	12

Na čerstvou biomasu měla signifikantní vliv linie ($p = 1,092 \cdot 10^{-15}$) i ošetření ESTR ($p = 0,003$; ANOVA, po zlogaritmování dat). Post-hoc test však ukázal signifikantní rozdíl jen mezi WT rostlinami ošetřenými ESTR oproti kontrole ošetřené DMSO ($p = 0,023$, Tukey test). U rostlin *XVE-GOGAT-IR* nebyl rozdíl signifikantní. Výsledek byl překvapivý a je rozebrán v diskuzi.



Obr. 4.9 - Aplikace estradiolu na linie *XVE-GOGAT-IR* na jífkách

Porovnání rostlin *XVE-GOGAT-IR* 13B, WT a *gogat-2* ošetřených postříkem ESTR s kontrolními rostlinami, které byly ošetřeny DMSO. Rostliny byly pěstovány v podmínkách intenzivnější fotosynthese. Vyfotografováno 33 dní od výsevu.



Obr. 4.10 - Stanovení čerstvé biomasy u rostlin *XVE-GOGAT-IR* ošetřených ESTR

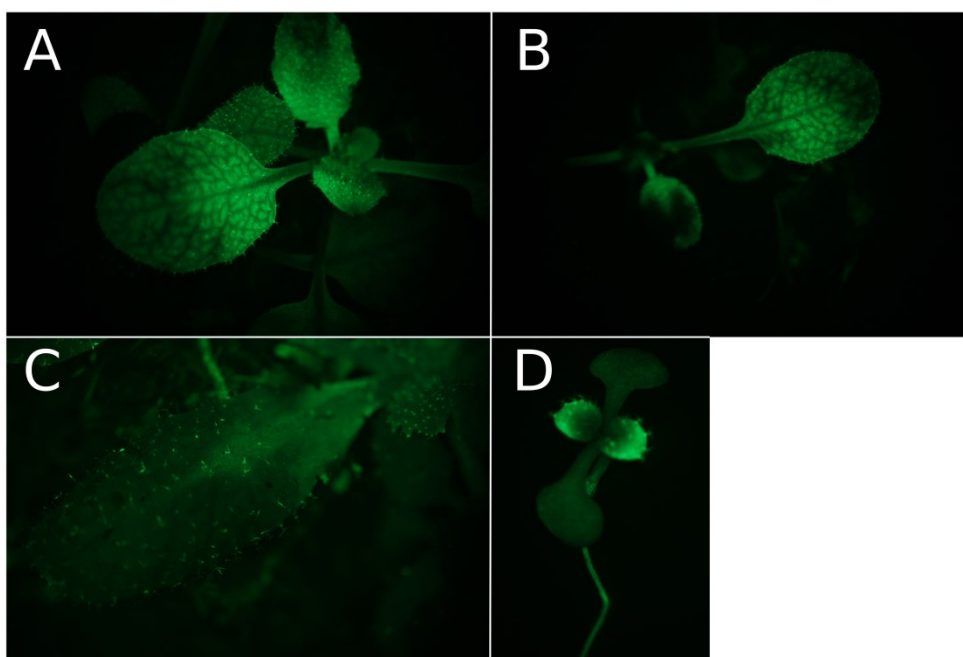
Porovnání čerstvé biomasy rostlin WT, *gogat-2* a *XVE-GOGAT-IR 2G, 9F, 13B* ošetřených postřikem ESTR s rostlinami kontrolními (ošetřenými DMSO). Zhodnoceno pomocí ANOVA po zlogaritmování dat ($n=10-21$), pouze WT ošetřený ESTR se liší od kontroly ošetřené DMSO (Tukey test, $p=0,023$).

4.1.3 Optimalizace aplikování estradiolu

V průběhu experimentů s indukovaným umlčováním *GOGAT* se ukázalo, že aplikace estradiolu postřikem je problematická, i když je v publikacích běžně používána (shrnuje Borghi, 2010). Optimalizace aplikace ESTR byla prováděna ve spolupráci s kolegyní Adélou Růžičkovou, která během své diplomové práce připravila rostliny s inducibilním GFP (*iGFP*, viz Růžičková, 2015). Tyto rostliny exprimují po aplikaci ESTR fluorescenční protein GFP, který je snadno detekovatelný (na rozdíl od projevů fotorespiračních mutantů). U vybrané linie *iGFP13* byla ověřena reakce na estradiol v *in vitro* podmínkách (přídavek $10\mu\text{M}$ ESTR do média). Rostliny rostoucí na estradiolovém médiu tvořily GFP, i když variabilita v odpovědi jednotlivých rostlin byla značná. U některých rostlin byla fluorescence GFP pozorována jen v kořenech, u některých v kořenech i dělohách, u jiných byl indukován GFP i v prvních pravých listech (viz Obr. 4.11D).

U čtrnáctidenních rostlin *iGFP13* pěstovaných na jiffech byly vyzkoušeny tyto způsoby aplikace estradiolu: postřik $10\mu\text{M}$ ESTR s 0,01% smáčedlem Silwet; zálivka $10\mu\text{M}$ nebo $100\mu\text{M}$ roztokem ESTR shora na jiff. Po 3 dnech byla sledována fluorescence GFP na fluorescenční binolupě – ve všech případech aplikování ESTR docházelo k tvorbě GFP, ale byla pozorována výrazná variabilita mezi rostlinami i v rámci orgánů jedné rostliny (viz Obr. 4.11 A, B). Účinek postřiku $10\mu\text{M}$ ESTR a zálivky $100\mu\text{M}$ ESTR byl podobný, zálivka $10\mu\text{M}$ roztokem se ukázala méně účinná.

V případě umlčování *GOGAT* pomocí RNA interference by mohla být nerovnoměrná distribuce estradiolu v rámci rostliny překonána šířením malých RNA do orgánů a pletiv, kam se ESTR nedostal. Z tohoto důvodu byla testována i aplikace ESTR u rostlin, které inducibilně umlčují vnesené GFP. Tyto rostliny nesou v rámci jednoho konstruktů gen pro GFP i vlásenku proti *GFP*, která je exprimována po aplikaci ESTR (viz Růžičková, 2015). Byla použita ověřená linie *GFP_IR5*, před aplikací ESTR byla zkontrolována exprese *GFP* pod binolupou. Na rostliny (staré 19 dní) byla aplikována zálivka 100 μ M ESTR do jiffu, postřik 10 μ M roztokem ESTR s 0,01% smáčedlem Silwet opakovaný po 3 dnech anebo každý den. Po týdnu bylo u některých rostlin pozorováno umlčování GFP, ovšem jen v některých oblastech (zejména na špičkách listů, viz Obr. 4.11C). Nejlépe dopadla varianta postřiku aplikovaného každý den. Bohužel žádný z testovaných způsobů aplikace ESTR nezajistil umlčování u všech rostlin, které by měly reagovat a v rámci celých rostlin.



Obr. 4.11 - Optimalizace aplikování estradiolu (u rostlin *iGFP* a *GFP_IR*)

A – rostlina *iGFP13* ošetřená postřikem 10 μ M ESTR s 0,01% smáčedlem Silwet

B – *iGFP13* ošetřená zálivkou 10 μ M ESTR seshora do jiffu

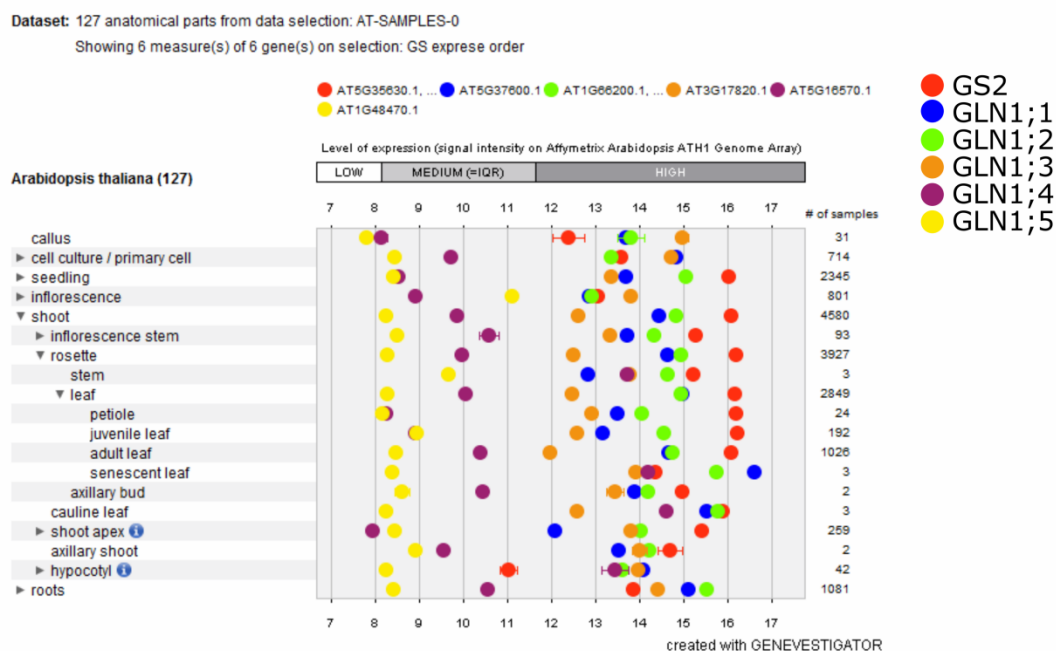
C – rostlina *GFP_IR5* umlčující GFP po postřiku 10 μ M ESTR s 0,01% Silwet aplikovaném každý den

D – *iGFP13* v *in vitro* podmínkách, ESTR přidán do média (konečná koncentrace 10 μ M)

4.2 Úloha GS2 u *Arabidopsis thaliana*

4.2.1 Design experimentů – *in silico* analýza

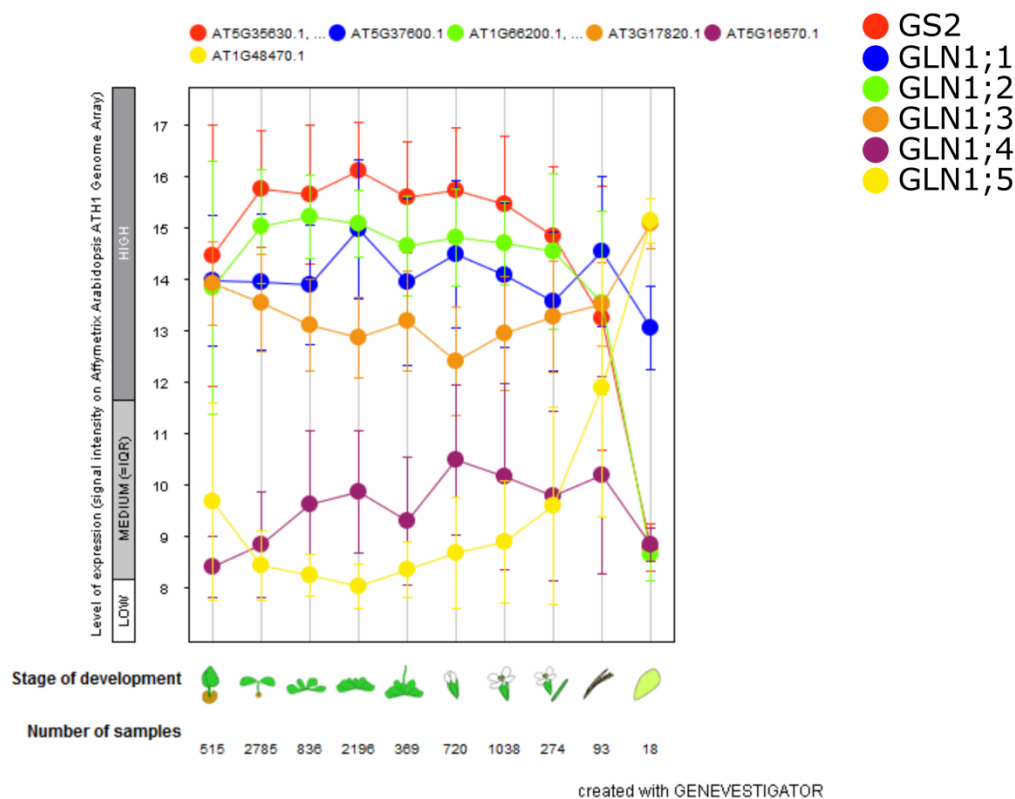
U *Arabidopsis thaliana* překvapivě nebyl dosud popsán knock-out mutant v genu pro plastidovou glutaminsyntetázu GS2. Mutant *gs2* není dostupný ani v příslušných databázích (TAIR, Araport, NASC). Navíc mutant *gs2* nebyl popsán ve screenu na fotorespirační mutanty. Jak poukazoval již Lam s kolegy (Lam *et al.*, 1996), je možné, že u *A. thaliana* je mutace v *GS2* letální i v podmínkách potlačujících fotorespiraci anebo že je *GS2* nahrazována některou z cytosolických isoform. Dle databáze Genevestigator jsou nejvíce exprimovanými isoformami GS1 v listech *GLN1;1* a *GLN1;2* (viz Obr. 4.12 a Obr. 4.13). Zejména nízkoafinitní isoforma *GLN1;2* by mohla nahrazovat úlohu *GS2* – je exprimovaná v mezofylových buňkách a je klíčová při detoxifikaci nadbytku amonných iontů v substrátu (Guan *et al.*, 2016).



Obr. 4.12 - Expresse glutaminsyntetáz v listech *Arabidopsis thaliana*
Schéma vytvořeno pomocí databáze Genevestigator.

Dataset: 10 developmental stages from data selection: AT-SAMPLES-0

Showing 6 measure(s) of 6 gene(s) on selection: GS express order

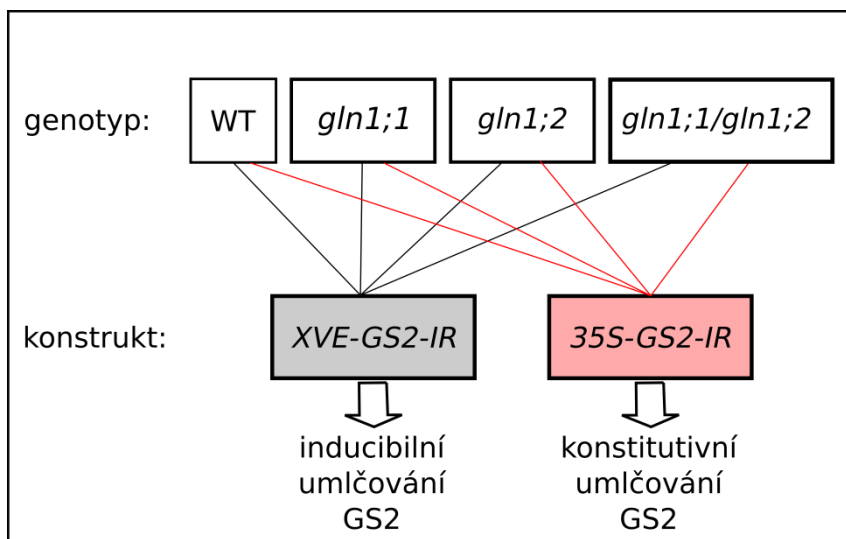


Obr. 4.13 - Expresa glutaminsyntetáz v rámci vývoje rostlin *A. thaliana*

Schéma bylo vytvořeno pomocí databáze Genevestigator.

Úloha GS2 u *A. thaliana* byla v této diplomové práci zkoumána jednak pomocí inzerčních mutantů v promotorové oblasti GS2, jednak umlčováním GS2 prostřednictvím RNA interference.

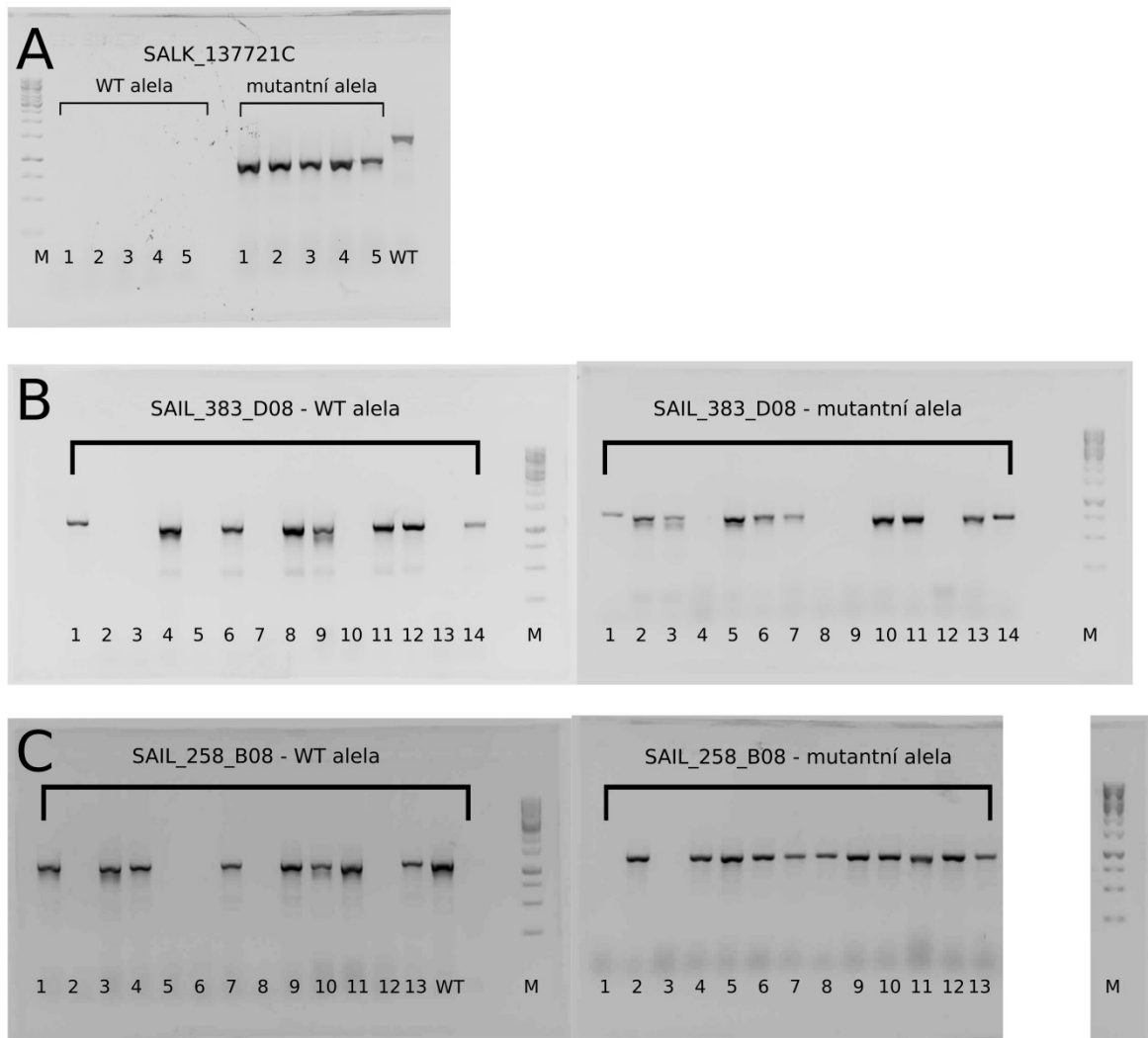
Vzhledem k tomu, že mutace GS2 může být letální, bylo kromě konstitutivního umlčování použito i umlčování indukované aplikací estradiolu. Pro odlišení, která z cytosolických isoformů případně nahrazuje GS2 během fotorespirace, byli studováni i inzerční mutanti v *GLN1;1* a *GLN1;2* a následně jejich dvojitý mutant *gln1;1/gln1;2*. Do genetického pozadí mutantů v cytosolických isoformách byl vnesen konstrukt pro umlčování GS2 (konstitutivní či indukibilní, viz design transformací na Obr. 4.14).



Obr. 4.14 - Design umlčování *GS2* pomocí RNA interference

4.2.2 Charakterizace mutantních linií v *GS2*, *GLN1;1* a *GLN1;2*

V kolekcích inzerčních mutantů není dostupná žádná linie s inzercí v transkribované oblasti genu *GS2*. Byli proto objednáni tři mutanti s inzercemi ležícími v promotorové oblasti genu *GS2*: SALK_137721C, SAIL_383_D08 a SAIL_258_B08 – označování dále dle místa inzerce *gs2-1*, *gs2-2* a *gs2-3*. Genotypováním příslušnými primery pro mutantní alelu (*RP* + *SALK_LB*, resp. *SAIL_LB*) a pro WT alelu (*LP* + *RP*) byly nalezeny homozygotní rostliny (viz Obr. 4.15), jejichž potomstvo bylo použito v dalších pokusech.



Obr. 4.15 - Genotypování promotorových mutantů *gs2*

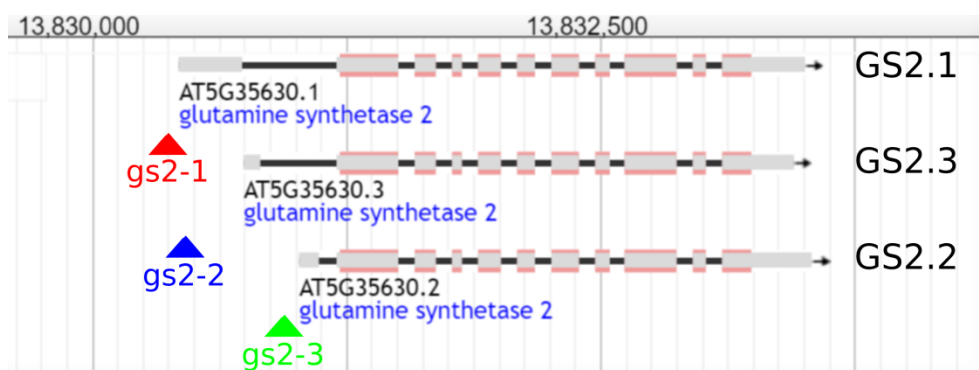
A – genotypování linie SALK_137721C neboli *gs2-1*

B – genotypování linie SAIL_383_D08 neboli *gs2-2*

C – genotypování linie SAIL_258_B08 neboli *gs2-3*

Číslice označují jednotlivé testované rostliny, M značí marker (1 kbp), WT značí pozitivní kontrolu.

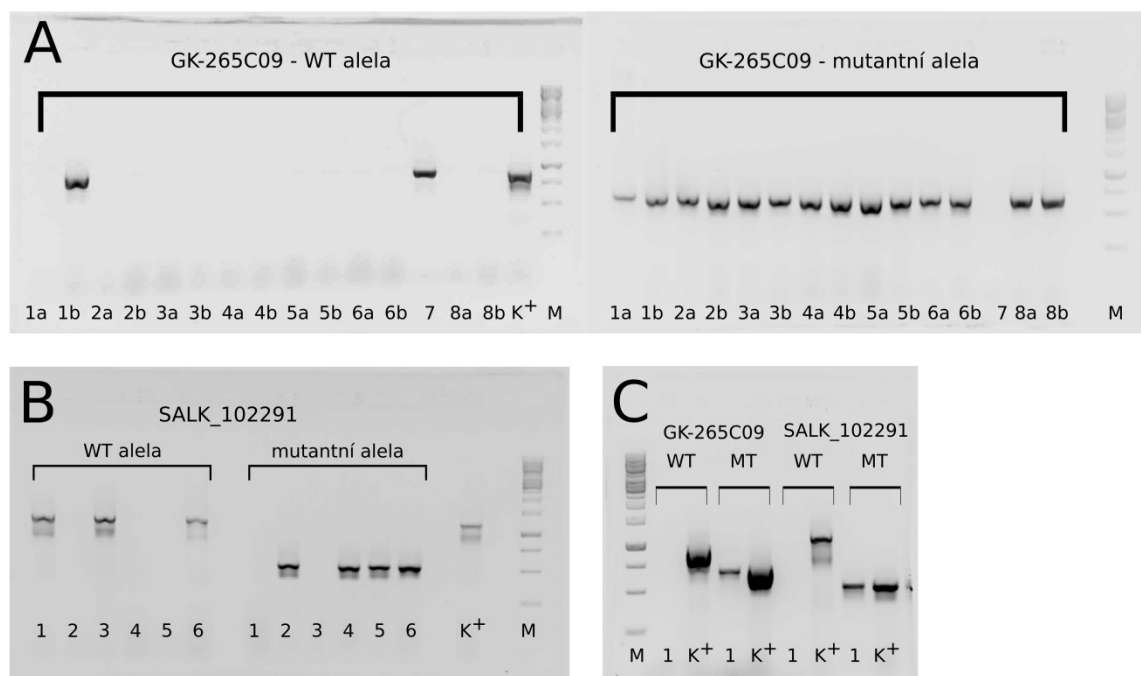
Inzerce u promotorovým mutantů *gs2* leží v těsné blízkosti transkribované oblasti *GS2*. U *GS2* jsou tři různé začátky transkripce, resp. tři různé transkripční formy *GS2.1*, *GS2.2* a *GS2.3*. Žádná z inzercí nenarušuje nejkratší transkripční formu *GS2.2*, i když její promotor může být ovlivněn u mutantu *gs2-3*. U mutantů *gs2-1* a *gs2-2* může být ovlivněna promotorová oblast *GS2.1*, resp. *GS2.3* (viz Obr. 4.16). Tři transkripční začátky jsou zajímavým fenoménem, který může mít význam v regulaci transkripce *GS2*.



Obr. 4.16 - Promotoroví mutanti *gs2* a tři transkripční formy *GS2*

U *GS2* nacházíme tři různé transkripční formy (s odlišnými začátky transkripce) označované *GS2.1*, *GS2.2* a *GS2.3*. Ve schématu je přibližně naznačeno místo inserce u promotorových mutantů *gs2-1*, *gs2-2* a *gs2-3*. Schéma bylo převzato z databáze Araport (aplikace JBrowse).

Byly rovněž objednány inserční linie v cytosolických isoformách *GLN1;1* a *GLN1;2*. Pro *GLN1;1* se jednalo o GABI kat linii GK-265C09, u které je dodáván set 12 jednotlivých linií, mezi kterými je nutné objevit tu homozygotní. Genotypovány byly vždy dvě rostliny z dané linie – byla detekována WT alela (*LP + RP*) a mutantní alela (primery *RP + GABI_CS425377_LB*). V případě *GLN1;2* byla objednána linie SALK_102291 a příslušnými primery genotypována. Homozygotní rostliny *gln1;1* a *gln1;2* byly posléze zkříženy. V F_2 generaci byl nalezen dvojitý mutant *gln1;1/gln1;2* (viz Obr. 4.17)



Obr. 4.17 - Genotypování *gs1* mutantů

A – genotypování linie GK-265C09 neboli *gln1;1*

B – genotypování linie SALK_102291 neboli *gln1;2*

C – genotypování dvojitého mutantu *gln1;1/gln1;2*

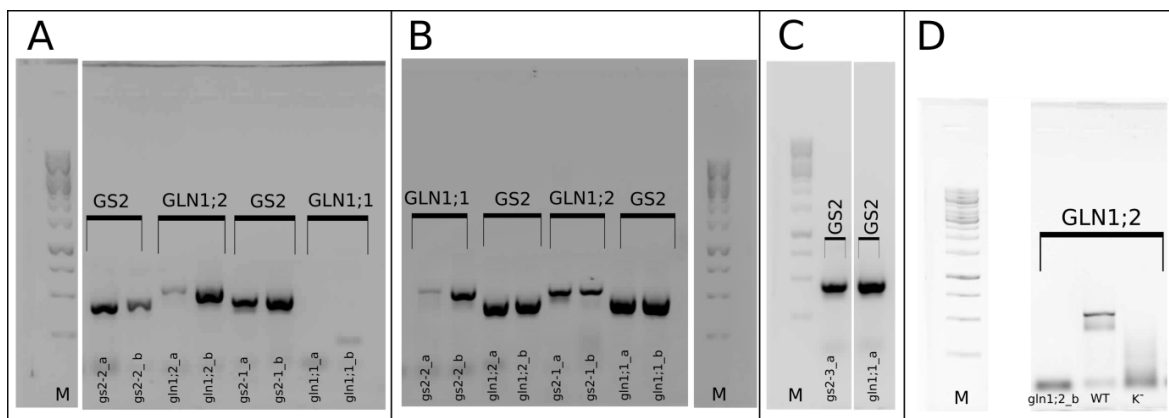
Číslice označují jednotlivé testované rostliny (v případě GK-265C09 jednotlivé linie GABI setu), M značí marker (1 kbp ladder), K^+ označuje pozitivní kontrolu (WT).

U všech výše zmíněných homozygotních mutantů bylo potvrzeno místo inserce sekvenací PCR produktu mutantní alely příslušným *LB* primerem (viz Kapitola 3.3, Tab. 3.20).

Rovněž byla izolována RNA a detekován příslušný transkript pomocí RT-PCR, aby se ověřilo, jestli se jedná o knock-out mutaci (viz Kapitola 3.5 a Obr. 4.18). V případě promotorových mutantů *gs2-1*, *gs2-2* a *gs2-3* byl detekován transkript *GS2*. U *gln1;1* se potvrdilo, že se jedná o knock-out mutanta v *GLN1;1*. Překvapivě u *gln1;2* byl detekován transkript. U tohoto mutantu leží inserce v posledním exonu, jen pár nukleotidů před stop kodómem. Přesné místo inserce bylo ověřeno sekvenací a shoduje se s údaji v databázích. Rovněž byl navržen primer ležící přes místo inserce (*GLN1;2_3UTR_R*), v tomto případě nebyl u *gln1;2* detekován transkript (viz Obr. 4.18D). Lze tedy spekulovat, že je *GLN1;2* sice transkribována, ale kvůli inserci *T-DNA* nevzniká kompletní transkript potřebný pro následnou translaci anebo je narušena stabilita výsledného proteinu. V řadě prací byla tato inzerční linie používána a nebyl u ní detekován protein GLN1;2 (viz Ji, 2011; Lothier *et al.*, 2011; Dragičević *et al.*, 2014; Konishi *et al.*, 2017). Na rozdíl však od Lothier *et al.*, 2011, byl u této linie detekován transkript, což je v souladu s recentní prací Konishi *et al.*, 2017. Pro zjištění, jaký konec proteinu může vznikat při překlada mRNA s vloženou *T-DNA*, byla pomocí PCR s primery *PnosR* a *GLN1.2_SALK_102291_LP* detekována pravá hraniční oblast *T-DNA* a sekvenována. Překladem sekvence do aminokyselin (pomocí aplikace <http://web.expasy.org/translate/>) se ukázalo, že u linie SALK_102291 *gln1;2* může vznikat zkrácený protein (pokud je rozpoznáván první stop kodón), jehož konec se odlišuje jen v několika aminokyselinách:

- C-konec proteinu GLN1;2 - **M I A E T** T L L W N P **Stop**
- C-konec proteinu GLN1;2 u mutantu *gln1;2* - **M I A E T** L I V **Stop**

Lze spekulovat, že absence asparaginu, polární aminokyseliny, u zkrácené verze proteinu může narušovat jeho stabilitu, a proto nebyl ve výše zmiňovaných pracích produkt genu detekován.



Obr. 4.18 - Detekce transkriptu u *gs2* a *gs1* mutantů pomocí RT-PCR

A – detekce příslušného transkriptu (*GS2* u promotorových mutantů *gs2*; *GLN1;1* u mutantů *gln1;1* a *GLN1;2* u *gln1;2*), u každého mutantu byly použity dva vzorky cDNA (izolované ze dvou různých rostlin).

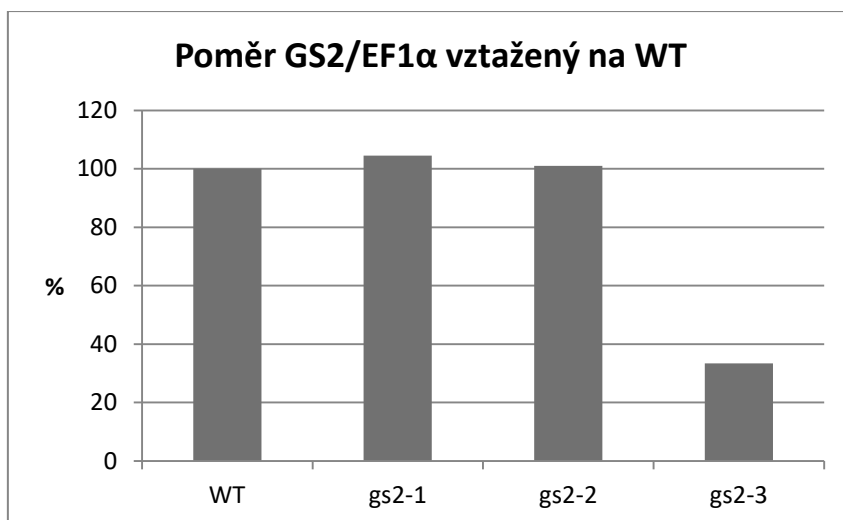
B – kontrolní PCR (kontrola kvality použité cDNA), detekován transkript jednoho náhodně vybraného genu.

C – dodatečná RT-PCR pro mutantu *gs2-3*. (Vzorek *gln1;1_a* slouží jako pozitivní kontrola.)

D – detekce transkriptu *GLN1;2* u mutantu *gln1;2* primery ležícími přes místo inzerce (kombinace primerů *GLN1;2_3UTR_R* + *GLN1.2_SALK_102291_LP*). Jako pozitivní kontrola byla použita cDNA z WT.

M značí marker (1 kbp), K značí negativní kontrolu (bez přidané cDNA).

U promotorových mutantů *gs2-1*, *gs2-2* a *gs2-3* byla stanovena hladina transkriptu *GS2* pomocí qRT-PCR1 (viz Obr. 4.19). U mutantu *gs2-3* byla hladina *GS2* snížena asi na třetinu hladiny u WT. Navíc u mutantu *gs2-3* bylo pozorováno, že je menší než WT rostlina (viz Obr. 4.20). Je tedy možné, že snížení *GS2* vede k redukci biomasy, což bylo dále zkoumáno při fenotypové analýze (viz Kapitola 4.2.4).



Obr. 4.19 - Hladina transkriptu *GS2* u promotorových mutantů *gs2*

Stanoveno pomocí qRT-PCR1, transkript *GS2* byl vztahován na hladinu transkriptu vnitřního standardu *EF1α*.



Obr. 4.20 – Fenotyp promotorového mutantu *gs2-3*

Porovnání *gs2-3* mutantu a WT ve standardních kultivačních podmínkách. Rostliny jsou staré 30 dní od výsevu.

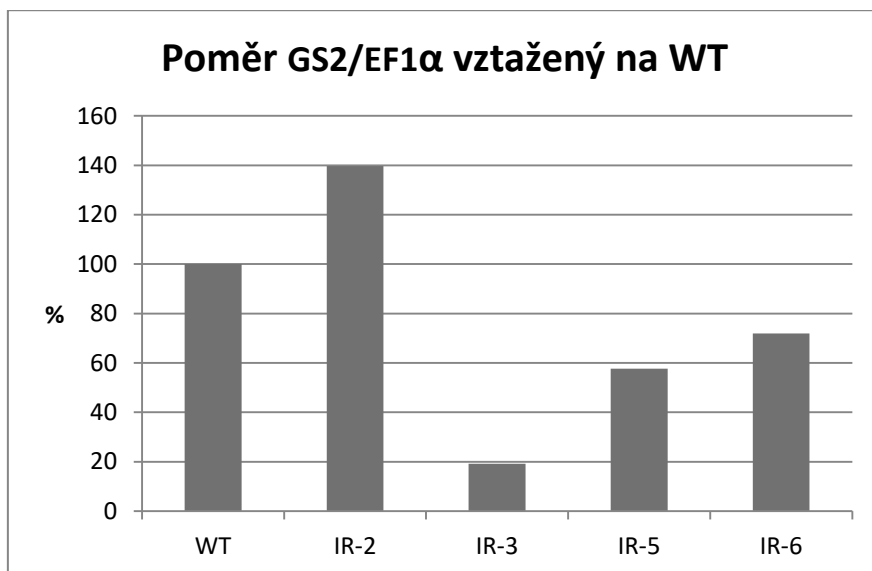
4.2.3 Umlčování *GS2* pomocí RNAi

Pro konstitutivní umlčování *GS2* byl vytvořen vlásenkový konstrukt *35S-GS2-IR* (více o klonování viz Kapitola 3.2). Vlášenska proti *GS2* byla rovněž vložena pod promotor, který je indukován aplikací estradiolu. Inducibilní systém *XVE-GS2-IR* by byl totiž výhodný, pokud by se ukázalo, že mutace v *GS2* je přece jen letální. Oba typy konstruktů byly vneseny do rostlin WT, mutantů *gln1;1*, *gln1;2* a dvojitého mutantu *gln1;1/gln1;2* (viz schéma transformací Obr. 4.14). Množství vyselektovaných transformantů ukazuje tabulka Tab. 4.4. I když transformace daným konstruktem probíhaly najednou, u dvojitého mutantu *gln1;1/gln1;2* nebyli zatím získáni žádní transformanti nesoucí *35S-GS2-IR*.

Tab. 4.4 - Přehled transformací vlásenkou proti *GS2*

Genotyp:	Vnášený konstrukt:	Vyseto semen:	Počet transformantů:
WT	<i>35S-GS2-IR</i>	600 µl, 5 misek 600 µl, 5 misek	9 7 (další selekce)
<i>gln1;1</i>	<i>35S-GS2-IR</i>	500 µl, 5 misek 500 µl, 5 misek	6 8 (další selekce)
<i>gln1;2</i>	<i>35S-GS2-IR</i>	500 µl, 5 misek 500 µl, 5 misek	3 4 (další selekce)
<i>gln1;1/gln1;2</i>	<i>35S-GS2-IR</i>	500 µl, 5 misek 500 µl, 5 misek	0 0 (další selekce)
WT	<i>XVE-GS2-IR</i>	200 µl, 2 misky	8
<i>gln1;1</i>	<i>XVE-GS2-IR</i>	600 µl, 5 misek	24
<i>gln1;2</i>	<i>XVE-GS2-IR</i>	600 µl, 5 misek	15
<i>gln1;1/gln1;2</i>	<i>XVE-GS2-IR</i>	600 µl, 5 misek	8

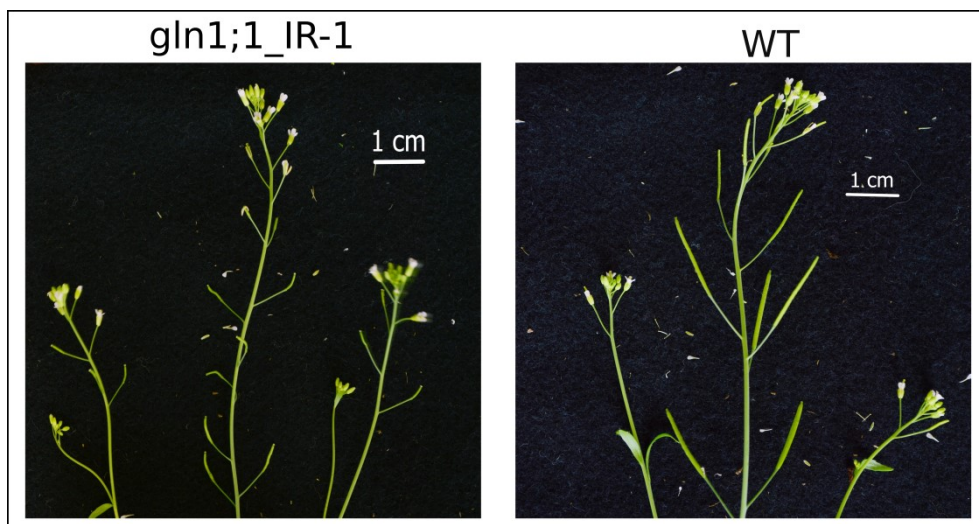
Vzhledem k velkému množství transformačních variant se tato práce dále zaměřuje pouze na charakterizaci *35S-GS2-IR* na pozadí WT. U vybraných linií *35S-GS2-IR* byla stanovena hladina transkriptu *GS2* pomocí qRT-PCR1 (viz Obr. 4.21). Významné snížení *GS2* bylo pozorováno u linie *35S-GS2-IR-3* (zhruba na 20% hladiny *GS2* u WT), proto byla tato linie zařazena do fenotypové analýzy (viz Kapitola 4.2.4).



Obr. 4.21 - Hladina transkriptu *GS2* u *35S-GS2-IR* linií

Stanoveno pomocí qRT-PCR1, transkript *GS2* byl vztažen na hladinu transkriptu vnitřního standardu *EF1α*.

U některých linií nesoucích vlásenku proti *GS2* (včetně linie *35S-GS2-IR-3*) bylo pozorováno výrazné snížení tvorby semen. Tyto rostliny měly redukované šesule a jejich květní stvoly byly výrazně rozvětvenější než u WT rostlin. Tyto projevy byly pozorovány u několika nezávislých linií transformantů, nezávisle na genetickém pozadí výchozích rostlin. Velmi výrazná redukce šesulí byla pozorována u *gln1;1* mutanta transformovaného *35S-GS2-IR* (linie *gln1;1-IR-1*, viz Obr. 4.22). Z důvodů výrazného snižování počtu semen nebyla taky u linie *35S-GS2-IR-3* získána homozygotní T₃ generace a v následujících experimentech bylo nutné pracovat s T₂ generací.



Obr. 4.22 - Redukce šišulí a tvorby semen u rostlin transformovaných *35S-GS2-IR*
 Porovnání šišulí u WT rostliny a *gln1;1* mutanta transformovaného konstruktem *35S-GS2-IR*.

4.2.4 Fenotypová analýza promotorových mutantů v *GS2* a rostlin *35S-GS2-IR*

U promotorových mutantů v *GS2* a u vybraných rostlin nesoucích vláseňku proti *GS2* (konkrétně u linie *35S-GS2-IR-3*) byla provedena fenotypová analýza zaměřená zejména na parametry související s projevy fotorespiračních mutantů (biomasa, obsah chlorofylu, kvantová účinnost fotosystému II aj.). Jako kontrola byly v následujících experimentech použity WT rostliny a *gogat* mutanti. Nutno podotknout, že u linie *35S-GS2-IR-3* byla použita T₂ generace rostlin, u které zřejmě docházelo k vyštěpování WT rostlin. Z tohoto důvodu má *35S-GS2-IR-3* v následujících grafech výraznou variabilitu.

Rostliny byly vysety do podmínek intenzivnější fotorespirace, po třech týdnech byla u rostlin změřena kvantová účinnost fotosystému II neboli poměr F_v/F_m , pomocí přenosného fluorimetru FluorPen. Následovalo stanovení čerstvé biomasy (a následné stanovení sušiny). Dále byly odebrány listové terčíky pro extrakci chlorofylu (více viz Kapitola 3.7).

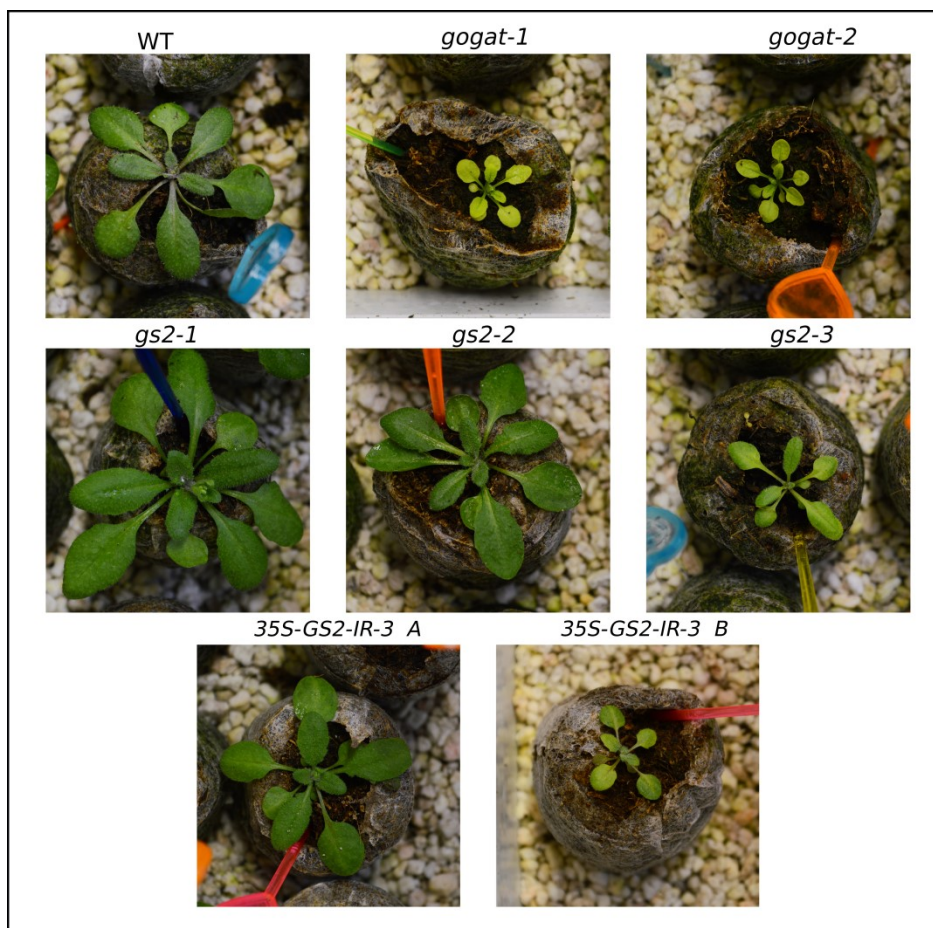
Jak je možné vidět na Obr. 4.23, promotorový mutant *gs2-3* se výrazně odlišoval od WT rostlin i od ostatních promotorových mutantů, byl menší a žlutější. Vykazoval prostřední fenotyp v porovnání s *gogat* mutanty a rostlinami WT. Podobné projevy byly pozorovány i u některých rostlin *35S-GS2-IR-3*.

Promotorový mutant *gs2-3* stejně jako oba *gogat* mutanti měl signifikantně menší čerstvou biomasu (viz Obr. 4.24) v porovnání s WT (Welch ANOVA $p=8,204 \cdot 10^{-7}$, Games-Howell test $p=0,032$). Stejně tomu bylo i u sušiny - Welch ANOVA pro efekt linie ($p=2,224 \cdot 10^{-7}$), post-hoc test Games-Howell pro porovnání s WT (pro *gogat* mutanty $p=0,018$, pro *gs2-3* $p=0,017$).

U poměru F_V/F_M vyšel signifikantní rozdíl pouze u *gogat-1* vůči WT (Welch ANOVA $p= 2,343 \cdot 10^{-11}$, Games-Howell test $p<0,001$). U mutantu *gs2-3* je však patrný trend snížení F_V/F_M .

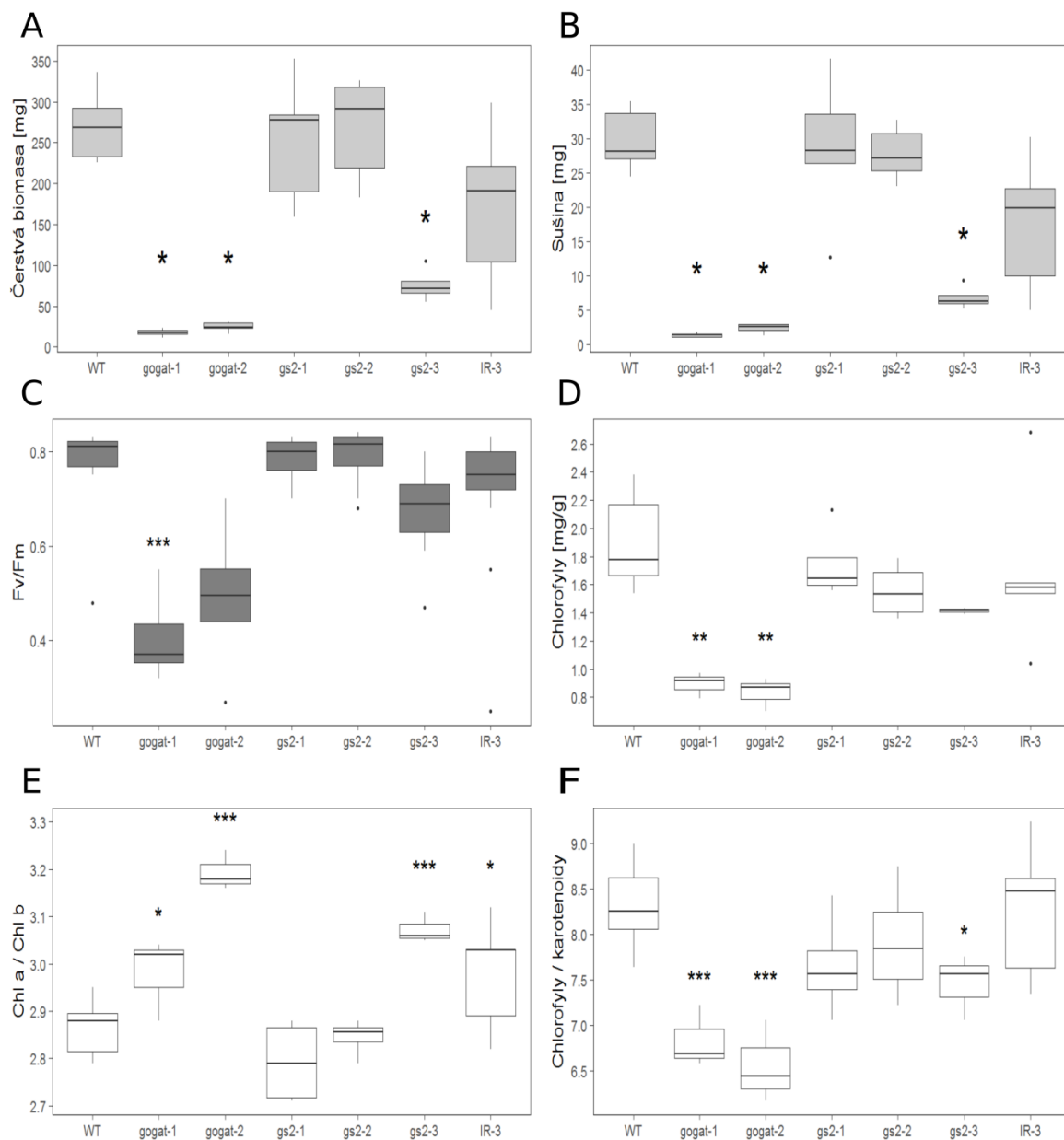
Celkový obsah chlorofylu vyšel významně odlišný pouze u *gogat* mutantů v porovnání s WT (Welch ANOVA $p=0,0001$; Games Howell test $p=0,006$). Opět je u *gs2-3* pozorovatelný trend snížení obsahu chlorofylů. U poměru chlorofylu a ku chlorofylu b, který reflektuje množství světloběrných antén vůči fotosystému II, vyšel významný rozdíl u mutantů *gogat-1* ($p= 0,034$), *gogat-2* ($p= 1,39 \cdot 10^{-6}$), *gs2-3* ($p=0,0004$) i linie *35S-GS2-IR-3* ($p=0,015$; ANOVA). Poměr chlorofylu ke karotenoidům, který je indikátorem „zelenosti“ rostlin, vyšel signifikantně odlišný u *gogat-1* ($p=0,0007$), *gogat-2* ($p=0,0001$) i mutantu *gs2-3* ($p=0,035$; ANOVA).

Lze tedy shrnout, že *gs2-3* mutant má menší biomasu a pozměněné některé fotosyntetické parametry v porovnání s WT rostlinami. Otázkou zůstává, jestli se jedná o mírné projevy fotorespirační mutace – tedy jestli budou pozorované projevy potlačeny v atmosféře se zvýšeným CO_2 , kde se snižuje míra fotorespirace.



Obr. 4.23 – Fenotyp promotorových mutantů v *GS2* a rostlin *35S-GS2-IR*

Porovnání rostlin WT, *gogat-1*, *gogat-2*, promotorových mutantů *gs2-1*, *gs2-2*, *gs2-3* a linie *35S-GS2-IR-3* pěstovaných v podmínkách intenzivnější fotorespirace. U linie *35S-GS2-IR-3* byla použita T₂ generace – dochází zřejmě k vyštěpování WT (viz rostlina A) a transformantů (viz rostlina B). Rostliny byly staré 21 dní od výsevu.



Obr. 4.24 - Fenotypová analýza u promotorových mutantů v *GS2* a rostlin *35S-GS2-IR*

Porovnání rostlin WT, *gogat-1*, *gogat-2*, promotorových mutantů *gs2-1*, *gs2-2*, *gs2-3* a linie *35S-GS2-IR-3* (zkráceně *IR-3*) pěstovaných v podmínkách intenzivnější fotorespirace:

A – čerstvá biomasa (Welch ANOVA, Games-Howell test; n =4-6)

B – sušina (Welch ANOVA, Games-Howell test; n =4-6)

C – poměr F_v/F_m (Welch ANOVA, Games-Howell test; n=7-13)

D – obsah celkového chlorofylu (Welch ANOVA, Games-Howell test; n=3-8)

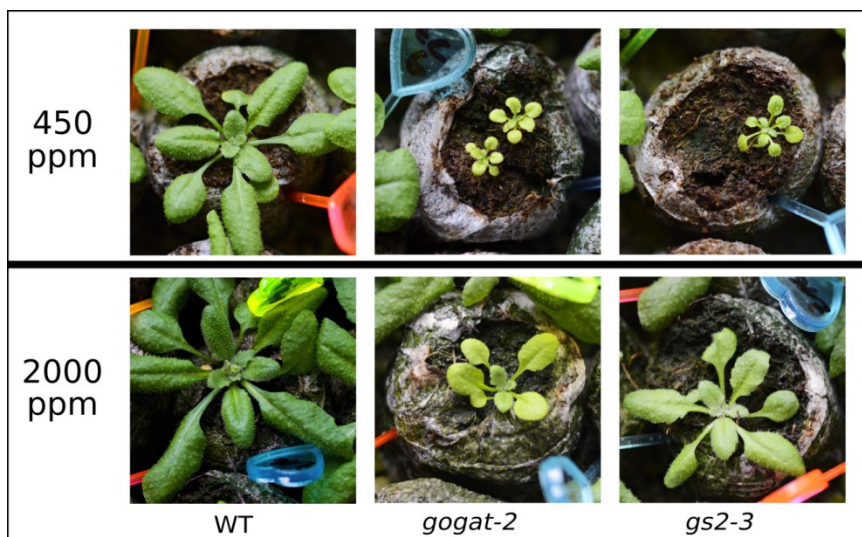
E – poměr chlorofylu a ku chlorofylu b (ANOVA, n=3-8)

Experiment s kultivací rostlin při zvýšeném CO₂ probíhal v klimaboxech ve VÚRV, jeden box byl pro zvýšené CO₂ (2000 ppm), druhý box sloužil jako kontrola (450 ppm CO₂). Do pokusu byly zařazeny promotoroví mutanti *gs2-1*, *gs2-2*, *gs2-3*, linie *35S-GS2-IR-3* a další dvě linie nesoucí konstitutivní vlásenku proti *GS2* (*35S-GS2-IR-16* a *gln1;1_IR-1*). Pro všechny linie *35S-GS2-IR* byly použity rostliny v T₂ generaci (tedy zřejmě docházelo k vyštěpování WT rostlin). Kontrolou byly WT rostliny a *gogat* mutanti. Počet rostlin pro jednotlivé varianty udává Tab. 4.5.

I přes značné technické problémy s kultivačními boxy během kultivace, je zřejmé, že zvýšení CO₂ vedlo alespoň k částečnému potlačení projevů nejen u *gogat* mutantů, ale i u *gs2-3* (viz Obr. 4.25). Čerstvá biomasa rostlin pěstovaných ve zvýšeném CO₂ se významně lišila od kontrolních rostlin z běžné koncentrace CO₂ (Welch ANOVA $p=2,2 \cdot 10^{-16}$) - u *gogat-2* ($p=0,003$) a *gs2-3* ($p<0,001$, Games Howell test).

Dá se shrnout, že WT rostliny jsou průměrně 2x větší ve zvýšeném CO₂, *gogat-2* mutanti jsou však v průměru 5x větší a *gs2-3* dokonce 8x větší (viz Obr. 4.26). Promotorový mutant *gs2-3* tedy zřejmě vykazuje slabé projevy fotorespiračního mutanta.

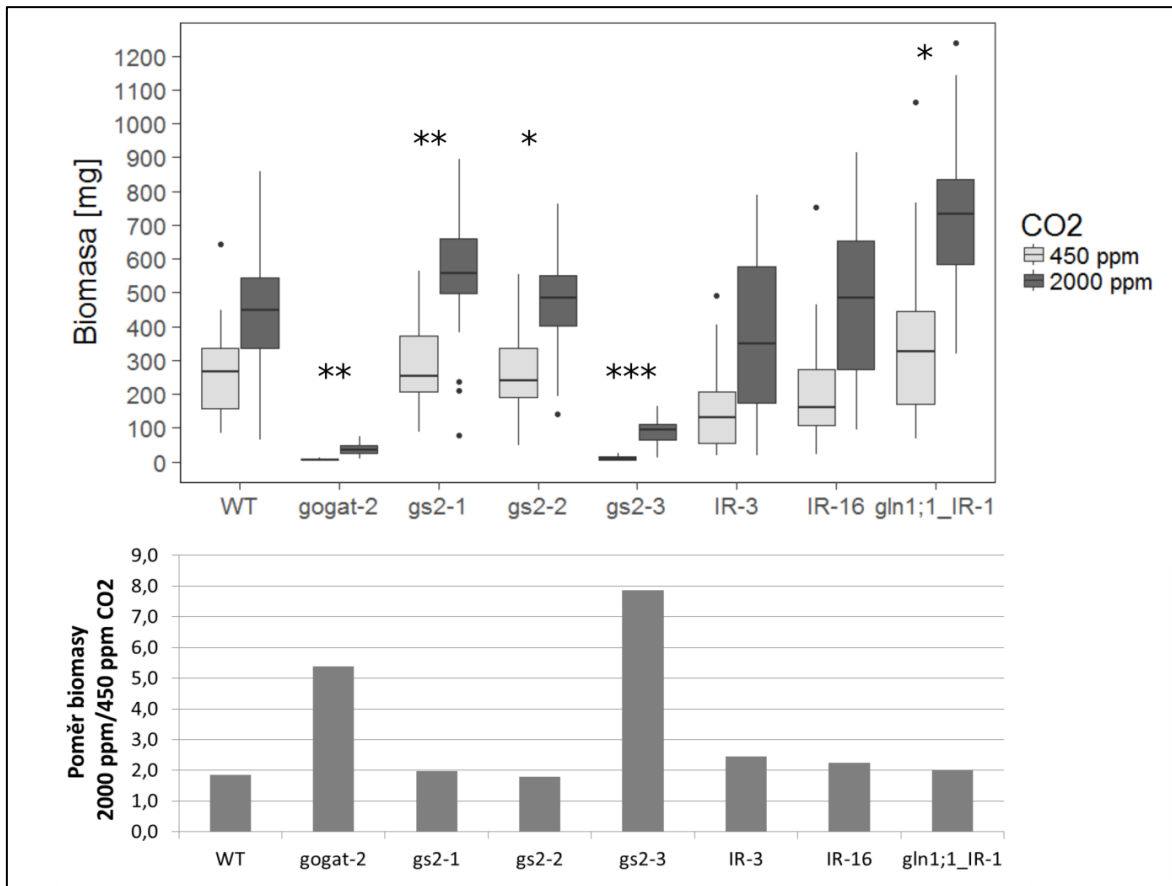
U rostlin pěstovaných v klimaboxu při 450 ppm CO₂ byla u vybraných linií stanovena hladina transkriptu *GS2* pomocí qRT-PCR2 (viz Obr. 4.27). Jednalo se o biologické opakování qRT-PCR1 (viz Obr. 4.19 a Obr. 4.21), která ukázala, že *gs2-3* má sníženou hladinu *GS2* zhruba na třetinu, linie *35S-GS2-IR-3* pak na 20% hladiny u WT. Překvapivě při qRT-PCR2 dosahoval transkript *GS2* u *gs2-3* mutanta 70% a u *35S-GS2-IR-3* zhruba 50% hladiny *GS2* u WT (viz Obr. 4.27). Navíc u promotorového mutanta *gs2-2* došlo k téměř dvojnásobnému navýšení transkriptu *GS2* oproti WT. Výrazný pokles *GS2* byl pozorován u linie *35S-GS2-IR-16* (na 11% hladiny *GS2* u WT).



Obr. 4.25 – Fenotyp rostlin WT, *gogat-2* a *gs2-3* pěstovaných ve zvýšeném CO₂
 Rostliny byly kultivovány v klimaboxech VURV – při zvýšené koncentraci CO₂ (2000 ppm) nebo při běžné hladině CO₂ (450 ppm). Rostliny byly vyfotografovány 24 dní po výsevu.

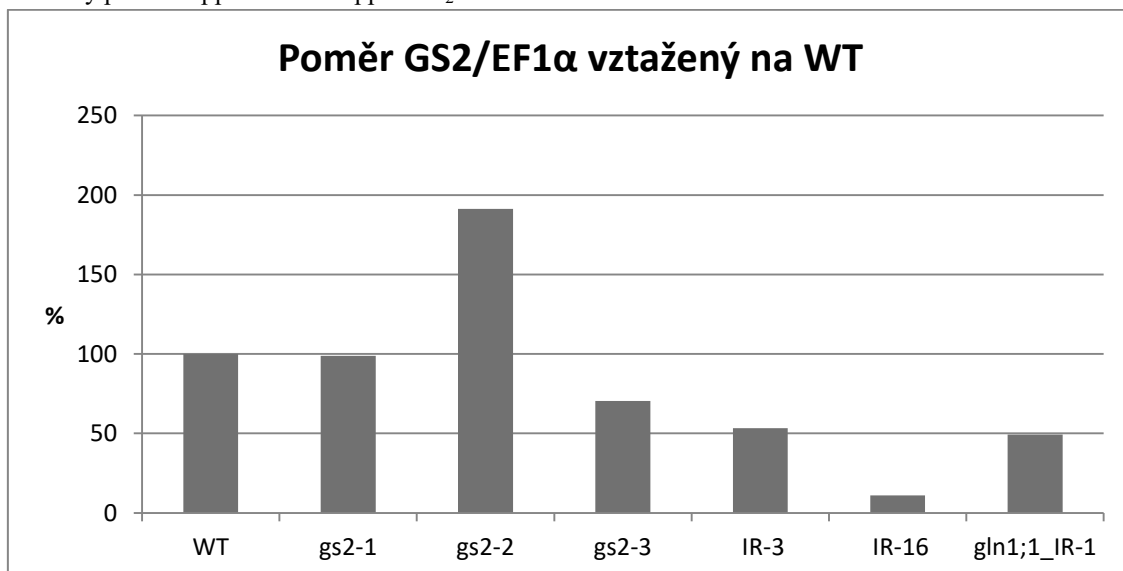
Tab. 4.5 - Počet analyzovaných rostlin pro čerstvou biomasu v CO₂ experimentu

Linie	WT	<i>gogat-2</i>	<i>gs2-1</i>	<i>gs2-2</i>	<i>gs2-3</i>	<i>IR-3</i>	<i>IR-16</i>	<i>gln1;1_</i> <i>IR-1</i>
CO ₂								
450 ppm	16	20	27	26	29	29	21	12
2000 ppm	26	17	24	22	33	22	27	28



Obr. 4.26 - Stanovení čerstvé biomasy v experimentu se zvýšeným CO₂

Porovnání čerstvé biomasy u rostlin WT, *gogat-2*, promotorových mutantů *gs2-1*, *gs2-2*, *gs2-3* a rostlin *35S-GS2-IR* (linie *IR-3*, *IR-16* a *gln1;1_IR-1*) pěstovaných v klimaboxu se zvýšeným CO₂ (2000 ppm) oproti rostlinám pěstovaným v běžné atmosféře (CO₂ 450 ppm). Ve spodním grafu je vyneseno poměr průměrné biomasy při 2000 ppm vůči 450 ppm CO₂.



Obr. 4.27 - Hladina transkriptu GS2 – výsledky qRT-PCR2

Porovnání hladiny transkriptu *GS2* (vztaženého na vnitřní standard) u promotorových mutantů *gs2* a vybraných linií *35S-GS2-IR* (označených *IR-3*, *IR-16* a *gln1;1_IR-1*), pěstovaných při 450 ppm v klimaboxu VÚRV.

5. Diskuze

5.1 Indukovaná RNAi jako nástroj pro cílené usmrcování GM rostlin

Jednou z obav při pěstování GM rostlin je jejich nekontrolovatelné rozšíření do životního prostředí. GM rostliny rozšířené mimo vyhrazené kultivační plochy mohou být od konvenční plodiny odlišeny např. na základě navození citlivosti k herbicidu bentazonu. Konvenční plodiny (např. kukuřice, rýže, pšenice) jsou k bentazonu přirozeně rezistentní. Do transgenní rostliny je však vnesen RNAi konstrukt pro umlčování cytochromu P450, který se podílí na detoxifikaci bentazonu. Aplikace bentazonu tak usmrtí jen GM rostliny (Lin *et al.*, 2008).

Dalším aspektem je zabránění šíření transgenu z GM rostlin do přirozených populací nebo do konvenčně pěstovaných plodin. Pro omezení šíření transgenu jsou navrhovány různé technologické přístupy - souhrnně označované zkratkou GURT (gene use restriction technologies). Transgen může být např. vnesen do plastidů, které jsou u většiny druhů krytosemenných rostlin přenášeny maternálně, tedy nedochází k šíření transgenu přes pyl (i když maternální dědičnost nemusí fungovat vždy stoprocentně). Dalšími přístupy je navození kleistogamie, apomixie nebo genomové inkompability. Komerčně využívanou technikou je pak navození samčí sterility expresí toxického genu (např. pro RNÁzu barnázu) pod promotorem specifickým pro buňky tapeta. Dále může být transgen ohraničen *loxP* místy a vystřižen pomocí Cre rekombinázy, jejíž exprese je pod kontrolou pletivově specifického nebo chemicky inducibilního promotoru. Rovněž jsou známy technologie pro zabránění šíření semen (např. narušením otevírání šesulí) či navození sterility semen - např. technologie Terminator, která je založená na specifické tvorbě toxinu usmrcujícího embrya, která je kontrolována přes rekombinázu a tetracyklinový represivní systém (Daniell, 2002; Hills *et al.*, 2007; Lombardo, 2014).

Většina technik se tedy zaměřuje na kontrolu generativního rozmnožování. Ovšem u rostlin rozmnožujících se hlavně vegetativním způsobem by bylo výhodné moci GM rostliny cíleně usmrtit, pokud by se rozšířily za hranice kultivační plochy, a to pokud možno ekologicky šetrnějším způsobem než je aplikace bentazonu či totálního herbicidu. GM rostlina by mohla být předem modifikována tak, aby se po aplikaci indukční látky (např. zředěného roztoku etanolu) začal umlčovat životně důležitý gen, a tím pádem by došlo k cílenému odumření rostliny rozšířené mimo vyhrazenou kultivační plochu.

V této práci bylo pro cílené usmrcování rostlin zvoleno indukované umlčování genu pro glutamát syntázu Fd-GOGAT1, která je klíčová během fotorespirace. Mutace

v *Fd-GOGAT1* je podmíněně letální, patří mezi tzv. fotorespirační mutace (Somerville & Ogren, 1980; Coschigano *et al.*, 1998). Pro indukované umlčování byl do rostlin vnesen vlásenkový konstrukt *XVE-GOGAT-IR*, který by měl po aplikaci indukční látky (estradiolu) spouštět umlčování *Fd-GOGAT1* přes RNA interferenci. U třech nezávislých linií transformantů *XVE-GOGAT-IR* došlo po aplikaci estradiolu v *in vitro* podmínkách k projevům podobným fotorespirační mutaci, tj. ke chloróze a omezení růstu. Toto pozorování je založeno na třech nezávislých experimentech, i když kvůli velké variabilitě v rámci rostlin jsou uvedeny výsledky jen dvou pokusů (viz Kapitola 4.1.2). Jedním z indentifikovaných zdrojů variability bylo opožděné klíčení části některých semen (všech genotypů), proto byly v závěrečném pokusu (Experimentu č. 2) takové rostliny vyloučeny z analýzy. U všech třech linií *XVE-GOGAT-IR* došlo k signifikantnímu snížení biomasy v porovnání s kontrolními rostlinami. Podobně jako v předchozích pokusech byly však u rostlin *XVE-GOGAT-IR* ošetřených ESTR pozorovány i rostliny, které zřejmě nereagují na estradiol. Fenotypem se podobají rostlinám divokého typu. Nelze je však považovat za vyštěpené WT, protože v pokusech byly použity homozygotní linie, u kterých bylo ověřeno, že při výsevu na selekci WT rostliny nevyštěpují. Lze spekulovat, že u těchto rostlin došlo ke ztrátě schopnosti reagovat na ESTR, např. je možné, že došlo k umlčení XVE systému. Tyto rostliny však vnášejí do pokusů další stupeň variability. Proto byla v Experimentu č. 2 u linie *XVE-GOGAT-IR 13B* izolována RNA z jednotlivých odlišně reagujících rostlin s cílem porovnat hladinu transkripcce *GOGAT* u velkých zelených rostlin oproti malým žlutým, které na ESTR převažují. Bohužel výsledky qRT-PCR byly rozporuplné a nepřinesly očekávanou odpověď na charakter velkých zelených rostlin. U rostlin *XVE-GOGAT-IR* ošetřených ESTR nebyla totiž snížena hladina transkriptu *GOGAT*, naopak v porovnání s WT došlo k jejímu navýšení. Lze spekulovat, že během třítydenní kultivace došlo k degradaci ESTR v médiu (Borghini, 2010), což vedlo k obnově exprese *GOGAT* a možná i k jejímu zpětnovazebnému zvýšení. Vzhledem k rozdílům v hladině transkriptu *GOGAT* u WT (DMSOxESTR) lze uvažovat i o vhodnosti použitého vnitřního standardu. Při této qRT-PCR byl jako vnitřní standard použit transkript jednak pro elongační faktor *EF1 α* , jednak pro ribozomální protein *RPS24a* (gen *AT3G04920*, data z *RPS24a* nejsou uvedena, Czechowski *et al.*, 2005). Expres *EF1 α* i *RPS24a* může být totiž ovlivněna u rostlin s narušeným dusíkovým metabolismem. Jak bylo zjištěno v transkriptomické práci u rýže, u bodového mutanta v *Fd-GOGAT* dochází k výraznému zvýšení exprese genů pro ribozomální proteiny a obecně můžou být ovlivněny i další komponenty biosyntézy proteinů (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). Bylo by tedy v budoucnu

žádoucí zopakovat qRT-PCR s dřívějším časem odběru rostlinného materiálu (po indukci ESTR) a za využití jiného vnitřního standardu (např. genu pro aktin, Czechowski *et al.*, 2005).

U *XVE-GOGAT-IR* linií ošetřených ESTR nebyl překvapivě pozorován rozdíl v obsahu chlorofylu. Je možné, že výsledek byl zkreslen přítomností zelených rostlin (zřejmě nereagujících na estradiol) ve směsném vzorku, kde i při nízkém počtu tvořily vzhledem k větší biomase nezanedbatelný podíl. Alternativním, již diskutovaným vysvětlením může být, že ESTR už nebyl po 22 dnech přítomný v médiu a došlo tedy k částečnému obnovení normálních hladin fotosyntetických pigmentů.

Využití *XVE-GOGAT-IR* jako systému pro indukované usmrcování rostlin v našich experimentech narazilo na dva stěžejní problémy – na překvapivě vysokou životaschopnost knock-out mutantů v *Fd-GOGAT1* a na účinnost aplikace estradiolu a jím navozeného umlčování.

Knock-out mutanti v *Fd-GOGAT* byli popsáni již v prvních screenech na fotorespiračními mutanty. Stejně jako ostatní fotorespirační mutanti tedy rostou normálně v podmínkách potlačujících fotorespiraci, tj. při zvýšeném CO₂, pokud jsou však vystaveni běžné atmosféře, dochází k inhibici fotosyntézy, tedy k zastavení růstu, ke žloutnutí a následně odumření rostliny (Somerville & Ogren, 1980). Jak bylo následně upřesněno, fotorespirační mutace leží v genu pro *Fd-GOGAT1*. Ostatní glutamátsyntázy, tj. *Fd-GOGAT2* a *NADH-GOGAT*, nejsou schopné nahrazovat *Fd-GOGAT1* během fotorespirace (Coschigano *et al.*, 1998). Překvapivě knock-out mutantní linie v *Fd-GOGAT1*, tj. *gogat-1* a *gogat-2*, používané v této práci vykazovaly ve standardních podmínkách kultivační místnosti pouze mírný fotorespirační projev. Rostliny byly sice žlutější a výrazně menší než WT, ale byly životaschopné a produkovaly semena. Výraznější fenotypové projevy byly pozorovány při kultivaci v podmínkách intenzivnější fotorespirace, tj. při vyšší ozáření a snížené dostupnosti vody. Slabší fenotypový projev u *gogat* mutantů v porovnání s literaturou lze přičíst odlišným kultivačním podmínkám – v obou případech (Somerville & Ogren, 1980; Coschigano *et al.*, 1998), byly rostliny kultivovány při kontinuální ozáření, i když u jiných fotorespiračních mutantů byly fotorespirační projevy pozorovány i při běžném denním režimu - např. u mutantu v *Fd-GOGAT* u ječmene (Kendall *et al.*, 1986) nebo u mutantu v genu pro glutamát:glyoxylát aminotransferázu u *A.thaliana* (Igarashi *et al.*, 2003). Bohužel informace o kultivaci *gogat* mutantů při kontinuální ozáření byla při plánování pokusů přehlédnuta a v budoucnosti

by stálo zato ji vyzkoušet. Alternativně by se výraznější projevy fotorespirační mutace mohly navodit kultivací při vysoké ozáření.

V přirozených podmínkách, vyznačujících se řádově vyšší ozářeností (během slunného dne až $1600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) než běžné kultivační místnosti a navíc proměnlivostí dopadajícího záření, by *gogat* mutanti mohli být přece jen neživotaschopní. Je tedy možné, že v polních podmínkách by indukovaná RNAi proti *GOGAT* mohla usmrcení GM rostlin navodit.

I přesto by bylo pro indukované umlčování GM rostlin vhodnější vybrat gen, který je naprosto esenciální pro rostlinu. Např. by mohl být vhodný gen pro fytoendesaturázu, jehož mutace vede k narušení biosyntézy karotenoidů a vyznačuje se trpasličím vzrůstem a albino fenotypem (Qin *et al.*, 2007). Rovněž indukované umlčování fytoendesaturázy (kontrolované teplotním stresem) vede k blednutí listů (Masclaux *et al.*, 2004). Dále je ke zvážení i využití RNAi. U rostlin nesoucích vlásenkový konstrukt je poměrně často pozorováno samovolné umlčování cílového genu, což by v polních podmínkách bylo nepřijatelné. RNAi je totiž velmi citlivá dráha - pro umlčování stačí jen velmi slabá transkripce vlásenky (Sijen *et al.*, 2001). Efektivní usmrcování rostlin bylo pozorováno při indukované tvorbě rostlinného toxinu. Pod kontrolou XVE systému byl do rostlin *A. thaliana* vnesen gen pro toxin YoeB, který pochází ze *Streptococcus pneumoniae*. Po třech dnech od aplikace estradiolu byly u rostlin patrné první známky nekrózy, po 8-9 dnech následované odumřením rostlin (Bakar *et al.*, 2015). Indukovaná tvorba toxinu se tedy zdá spolehlivějším technologickým přístupem pro kontrolu GM rostlin, ale na rozdíl od přístupů založených na RNAi při ní v cílové rostlině vzniká nový proteinový produkt, jehož bezpečnost by bylo nutné prokázat před možným použitím daných GM rostlin jako potraviny či krmiva.

Dalším problematickým bodem využití *XVE-GOGAT-IR* rostlin v našich experimentech bylo aplikování estradiolu a účinnost indukce. Estradiolový systém byl v této práci zvolen, protože se vyznačuje precizní kontrolou indukce, rychlou odpovědí na induktor a absencí negativních vedlejších účinků na vývoj a růst rostlin. Indukční systém je navíc stabilní i v dalších generacích (Zuo *et al.*, 2000). Standardně se používá aplikace ESTR do kultivačního média, ale postřik rostlin roztokem ESTR s přísadou smáčedla je taky používán (Borghini, 2010). Během pokusů na *XVE-GOGAT-IR* rostlinách se však ukázalo, že aplikace ESTR postřikem příliš nefunguje. Není totiž jasné, jak účinně se hydrofobní molekula estradiolu dostává do rostlinných pletiv. Obecně se předpokládá, že je ESTR transportován z kořenů transpiračním proudem do listů, kde se akumuluje. Rovněž je

známo, že působí lokálně, tj. po nanesení ESTR na část listu se nerozšíří mimo ošetřené místo (Brand *et al.*, 2006). Kvůli nejistému účinku postřiku ESTR, bylo pristoupeno k testování a optimalizaci aplikování estradiolu za využití rostlin nesoucích inducibilní GFP (viz Kapitola 3.6 a 4.1.3). Odpověď na ESTR se ukázala značně variabilní u jednotlivých rostlin, variabilita byla i v rámci pletiv, ať už byl ESTR aplikován postřikem či zálivkou přímo k rostlinám. Z výsledků se zdá, že je ESTR nerovnoměrně distribuován v rámci rostlinného těla, ale není jasné, co způsobuje rozdíly mezi stejně ošetřenými rostlinami.

V případě indukované RNAi by nerovnoměrná distribuce ESTR mohla být překonána rozšířením umlčovacího signálu přes malé RNA, které mohou být systémově šířeny rostlinou (Molnar *et al.*, 2010). Aplikace estradiolu tak byla testována i u rostlin *GFP_IR*, které inducibilně umlčují *GFP*. Umlčování *GFP* bylo pozorováno jen u několika rostlin, navíc jen v určitých oblastech (zejména na špičkách listů). Interpretace je však složitější, používané GFP je totiž poměrně stabilní protein, jeho úbytek reflektuje snížení transkripce až velmi opožděně (Mgr. Adéla Růžičková, ústní sdělení). Aplikace ESTR postřikem však nebyla účinná ani u vybraných linií *XVE-GOGAT-IR*, které reagovaly na ESTR v *in vitro* podmínkách. Nebyl pozorován signifikantní rozdíl v biomase u rostlin *XVE-GOGAT-IR* ošetřených ESTR. Celkově však byly rostliny ošetřené ESTR (včetně WT rostlin!) menší než kontrolní rostliny ošetřené DMSO. Rozdíly se mohou připsat rozdílným podmínkám při pěstování na dvou platech. Dalším vysvětlením by mohl být inhibiční efekt ESTR na rostliny, avšak to se zdá nepravděpodobné vzhledem k tomu, že nebyla toxicita ESTR dříve popsána (Zuo *et al.*, 2000).

Lze shrnout, že jediným spolehlivým způsobem aplikace ESTR je přidání do média. Postřik ESTR ani zálivka shora na jiff se neukázaly příliš účinné. Používaná koncentrace ESTR (10 μ M) je nadhodnocená, XVE systém by měl být spouštěn už při koncentraci 8nM ESTR. Při 5 μ M ESTR je systém již plně saturován (Zuo *et al.*, 2000), proto nemá cenu zvyšovat koncentraci používaného ESTR. Pro lepší pronikání do pletiv lze zvýšit obsah detergentu (z 0,01% na 0,1% Silwet). Rovněž je otázkou pravidelnost postřiku. Je možné, že opakování aplikace každý 2.-3. den není dostatečné pro udržování indukce. Daly by se zvážit i jiné způsoby aplikace ESTR, které byly popsány v literatuře. Např. aplikace štětcem na jednotlivé listy, která byla použita i v případě indukované tvorby toxinu YoeB (Bakar *et al.*, 2015). Dále je navrhována aplikace ESTR v podobě lanolinové pasty na listy, tento způsob by však mohl negativně ovlivnit růst celé rostliny. Ke zvážení je i hydroponická kultivace rostlin a přidání ESTR do kultivačního roztoku (Borghi, 2010),

avšak tento způsob není příliš vhodný pro navozování fotorespirace. Hydroponická kultivace v malém měřítku (v krabičce od pipetovacích špiček, kvůli spotřebě ESTR) je nyní optimalizována ve spolupráci s Mgr. Adélou Růžičkovou.

Závěrem lze konstatovat, že estradiolový systém se ukázal jako nevhodný pro laboratorní testování indukovaného usmrcování rostlin. Odpověď na ESTR je dosti variabilní a ne všechny rostliny, které by měly na ESTR reagovat, na indukci odpovídají. Pokud už rostlina reaguje na ESTR, reakce je nerovnoměrná v rámci orgánů a pletiv. Navíc v polních pokusech by aplikace ESTR, potenciálně karcinogenní steroidní látky, nebyla přípustná. Otázkou je využití jiného indukčního systému.

U rostlin byla popsána řada indukčních systémů založených jednak na indukcii chemickou sloučeninou nebo vystavení specifickým podmínkám (např. vyšší teplotě). U teplotního inducibilního systému je indukovaný gen vložen pod promotor, který je aktivován proteinem HSP18.2 (heat shock protein), pokud jsou rostliny vystaveny teplotnímu stresu (35-37 °C, Takahashi *et al.*, 1992). Mezi chemické indukční systémy patří Alc systém spouštěný aplikací etanolu (Caddick *et al.*, 1998), tetracyklinový systém založený na kontrole exprese pomocí tetracyklinového represoru (Gatz *et al.*, 1992), GVG systém spouštěný dexamethasonem (Aoyama & Chua, 1997), dále pak ekdyzonový VGE systém spouštěný methoxyfenozidem (Koo *et al.*, 2004) nebo ACE/Cu systém indukovaný přítomností mědi (Saijo & Nagasawa, 2014). Zmiňované systémy se liší rychlostí indukce exprese, koncentračním rozpětím pro indukci, způsobem příjmu a mírou vedlejších účinků, popř. toxicity indukční látky, a schopností striktně reagovat jen v přítomnosti indukční látky (Moore *et al.*, 2006).

Každý indukční systém má své výhody i nevýhody. Např. u GVG systému se prokázal negativní vliv na vývoj a růst rostliny, způsobený vedlejšími účinky exprese fúzního proteinu GVG, nikoliv toxicitou vlastního dexamethasonu (Kang *et al.*, 1999). U etanolového indukčního systému, který by byl potenciálně použitelný v polních pokusech, zřejmě dochází k indukci i bez přítomnosti indukční látky (Padidam, 2003). Nejvhodnějším kandidátem pro zemědělské využití se jeví VGE systém, který je indukován methoxyfenozidem, tedy účinnou látkou komerčně používaného insekticidu Intrepid 2. Ovšem pronikání methoxyfenozidu do rostlin je problematické - účinná je zálivka, tedy transport přes transpirační sání, postřik na listy není zřejmě příliš účinný (Padidam, 2003), podobně jako jsme pozorovali v případě ESTR.

Pro potenciální využití indukovaného usmrcování rostlin jako nástroje pro kontrolu GM rostlin, je tedy klíčové mít spolehlivý indukční systém, který se nespouští bez

přítomnosti indukční látky. Rovněž by indukční látka neměla být toxická (pro rostliny, ani pro životní prostředí). Indukce by měla probíhat jednoduchým způsobem (např. postříkem) a neměla by být příliš finančně nákladná. Takové vlastnosti však žádný z dosud popsaných indukčních systému nesplňuje (Padidam, 2003; Corrado & Karali, 2009; Saijo & Nagasawa, 2014).

5.2 Úloha a zastupitelnost GS2 u *A. thaliana*

Plastidová GS2 je považovaná za klíčovou isoformu pro zpracování amonných iontů uvolňovaných během fotorespirace, kde spolupracuje s Fd-GOGAT, jejímuž umlčování jsem se věnovala v první části práce. Mutace v GS2 byla popsána mezi fotorespiračními mutanty u štírovníku (Orea *et al.*, 2002) či u ječmene (Wallsgrave *et al.*, 1987). Fotorespirační projevy byly pozorovány i u rostlin tabáku, které exprimovaly gen GS2 v antisense orientaci (Migge & Becker, 2000). Překvapivě u *Arabidopsis thaliana* nebyl mutant v GS2 nalezen mezi fotorespiračními mutanty. Již Lam a kolegové (Lam *et al.*, 1996) navrhovali pro tuto skutečnost několik vysvětlení: 1) Screen na fotorespirační mutanty nebyl saturovaný, což se zdá nepravděpodobné, protože bylo objeveno 58 mutantů v *Fd-GOGAT1*. 2) Některá z cytosolických isoform GS se tvoří i v mezofylových buňkách a zastupuje GS2 během fotorespirace. 3) U *A. thaliana* je další gen pro GS2 (což však bylo již popřeno sekvenací genomu). 4) Mutace v GS2 je letální i při zvýšené koncentraci CO₂. Nejpravděpodobnější se zdá vysvětlení, že je mutace v GS2 letální nebo že je nahrazována některou z cytosolických isoform. Po více jak 20 letech však nebylo nalezeno uspokojivé vysvětlení. Navíc knock-out mutant v GS2 nebyl dosud u *A. thaliana* popsán, proto jsem se během diplomové práce zaměřila na úlohu GS2 u *A. thaliana* a na její možnou zastupitelnost cytosolickými GS1.

Úloha GS2 u *A. thaliana* byla v této diplomové práci zkoumána jednak s využitím inzerčních mutantů v promotorové oblasti GS2, jednak umlčováním GS2 prostřednictvím RNA interference. Ve sbírkách inzerčních mutantů totiž není dostupná žádná linie s inzercí v transkribované oblasti genu GS2.

V této práci byli charakterizováni tři promotoroví mutanti v GS2 označovaní dle místa inzerce *gs2-1*, *gs2-2* a *gs2-3*. Zajímavý se ukázal mutant *gs2-3*, u kterého byl pozorován mírně menší vzrůst oproti WT. V podmínkách intenzivnější fotorespirace, vyšlo, že *gs2-3* mutant má signifikantně menší biomasu než WT (ať už čerstvinu či sušinu). Dále se *gs2-3* mutant lišil od WT v některých fotosyntetických parametrech. Např. poměr chlorofylu a ku chlorofylu b nabýval u *gs2-3* vyšších hodnot, což značí méně

světlosběrných komplexů vůči fotosystému II, tedy i méně účinnou fotosyntetickou dráhu (Roháček, 2002). Ostatní promotoroví mutanti se fenotypem nelišili od WT. Mutant *gs2-3* tak vykazoval podobné projevy jako slabý fotorespirační mutant. V souladu s touto hypotézou byly fenotypové projevy mutace zmírňovány v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂.

Analýza exprese (qRT-PCR1) ukázala, že mutant *gs2-3* měl sníženou hladinu *GS2* na zhruba třetinu hodnot u WT. V následující qRT-PCR2 však byla hladina *GS2* u *gs2-3* mutanta na úrovni 70% v porovnání s WT. Lze spekulovat, že rozdíly ve výsledcích dvou qRT-PCR jsou dány rozdílnými kultivačními podmínkami – rostliny pro qRT-PCR1 byly pěstovány ve standardní kultivační místnosti, pro qRT-PCR2 pak v klimaboxu na VÚRV, ve kterém byla nastavena vyšší ozářenost. Překvapivě byla v případě qRT-PCR2 u mutanta *gs2-2* skoro dvojnásobně zvýšená hladina transkriptu *GS2* oproti WT. Je možné spekulovat, že inserce *T-DNA* u *gs2-2* zasáhla některý důležitý regulační element, zřejmě sloužící jako negativní regulátor. Promotoroví mutanti by tak mohli být skvělým nástrojem pro studium transkripční regulace *GS2*, pokud se podaří zmiňované výsledky potvrdit.

Druhým metodickým přístupem pro studium *GS2* bylo snižování *GS2* pomocí RNA interference. Do rostlin byl vnesen vlásenkový konstrukt pod *CaMV 35S* promotorem. Byla získána linie *35S-GS2-IR-3*, která dle qRT-PCR1 měla sníženou hladinu *GS2* na méně jak čtvrtinu (ovšem v qRT-PCR2 byla *GS2* na 50% hladiny u WT). Linie *35S-GS2-IR-3* byla použita i ve fenotypové analýze. Bohužel kvůli nedostatku semen v T₃ generaci byla používána T₂ generace, která vyštěpuje netransformované rostliny. Zdá se, že se u *35S-GS2-IR-3* vyskytují podobné malé rostliny jako je mutant *gs2-3*. Zřejmě se jedná z pohledu transgenu o homozygotní rostliny. Odlišení homozygotních a heterozygotních rostlin, potažmo vyštěpených WT je obtížné, zdá se totiž, že se fenotypové projevy mění kontinuálně a nebylo možné nalézt oddělené kategorie odpovídající jednotlivým genotypům. Navíc nelze odlišit homozygoty a heterozygoty genotypováním. Pro tento účel by bylo v budoucnu vhodné pomocí TAIL-PCR (Liu *et al.*, 1995) zjistit místo inserce transgenu a navrhnout primery na genotypování mutantní a WT alely.

Dle fenotypových projevů promotorového mutanta *gs2-3* a částečně i rostlin *35S-GS2-IR-3*, lze soudit, že snížení *GS2* vede k slabým projevům fotorespirační mutace.

Pozorované fenotypové projevy u *gs2-3* jsou v souladu s výsledky diplomové práce Boven, 2016. Autor měl za úkol zamapovat mutaci u mutanta vyznačujícího se tzv. opožděným růstem. Tento mutant byl vytvořen jako součást chromozomové substituční

knihovny. Vykazoval velmi malý růst a lehkou chlorózu. Autor tedy zamapoval tuto mutaci na chromozóm 5, do oblasti o velikosti zhruba 115 kbp, kde leží kromě deseti transponovatelných elementů a dvou pseudogenů gen pro GS2. Pro potvrzení, že je fenotyp opožděného růstu spjat s narušením genu pro GS2, autor použil dvě promotorové inzerční linie SALK_137721 a SAIL_258_B08 (použité i v této diplomové práci, odpovídají označení *gs2-1* a *gs2-3*). U obou inzerčních linií pozoroval podobné projevy jako u mutantu s opožděným růstem, avšak u SAIL_258_B08, tj. *gs2-3*, byly projevy chlorózy výraznější než u SALK_137721, tj. *gs2-1*, u kterého v našich kultivačních podmínkách nebyl pozorován odlišný fenotyp od WT. Autor mutantní linie dále necharakterizoval (např. na úrovni transkripce *GS2*). I tak se zdá, že je fenotyp opožděného růstu spjat s genem pro GS2 (Boven, 2016).

I přes pozorované fenotypové projevy u *gs2-3* mutantu, nelze vyloučit, že některá z cytosolických isoform částečně nezastupuje GS2. Je totiž otázkou, jestli slabý fotorespirační fenotyp u *gs2-3* mutantu je kvůli nedostatečnému snížení GS2 anebo jestli odpovídá již kompenzačním mechanismům (např. navýšení některé GS1). U *A. thaliana* se nachází pět cytosolických isoform. Nejlepším kandidátem na kompenzaci GS2 během fotorespirace je nízkoafinitní isoforma GLN1;2. Jak se ukázalo, GLN1;2 se tvoří i v mezofylových buňkách. Navíc má GLN1;2 úlohu při detoxifikaci nadbytku amonných iontů přidaných do substrátu (Guan *et al.*, 2016). Další isoformou GS1, která je nejvíce exprimována v listech (dle databáze Genevestigator), je GLN1;1, u které je známo, že se navyšuje při biotickému či abiotickému stresu (Ji, 2011).

Původním přístupem pro zjištění, zda některá z GLN1;1 či GLN1;2 případně nahrazuje GS2 během fotorespirace, bylo současné umlčování *GS2* a *GS1* pomocí RNA interference. Byla vytvořena vlásenka proti konzervované části *GLN1;1* a *GLN1;2* a vložena pod inducibilní promotor (tj. *XVE-GS1-IR*, viz Kapitola 3.2). Do rostlin byly kotransformací vneseny konstrukty *XVE-GS1-IR* a *XVE-GS2-IR(kan)*. Tento směr byl však opuštěn – účinnost kotransformace byla velmi nízká, byly získány jen dvě nezávislé linie transformantů (data nejsou uvedena). Navíc pravděpodobnost, že po aplikaci ESTR budou indukovány obě vlásenky a budou umlčovat podobnou mírou příslušné geny, je velmi nízká - proto jsme se rozhodli pro jistější přístup přes transformaci inzerčních mutantů *gln1;1*, *gln1;2* a dvojitého mutantu *gln1;1/gln1;2*.

Do genetického pozadí mutantů v cytosolických isoformách byl vnesen konstrukt pro umlčování *GS2* (konstitutivní či inducibilní, viz Kapitola 4.2.1, Obr. 4.14). Z počtů získaných transformantů u jednotlivých variant (viz Kapitola 4.2.3, Tab. 4.4) se zdá, že

jednotlivé genotypy jsou transformovány s různou účinností. Mutant *gln1;1* je transformován stejně účinně jako WT, avšak mutant *gln1;2* o poznání méně (s poloviční frekvencí u *35S-GS2-IR*, resp. s frekvencí 0,65 u *XVE-GS2-IR*). U dvojitého mutantu *gln1;1/gln1;2* nebyli dokonce získáni žádní transformanti nesoucí *35S-GS2-IR* (frekvence u *XVE-GS2-IR* byla třetinová v porovnání s WT). Je možné spekulovat, že pokud není funkční GLN1;1 ani GLN1;2 a navíc dojde k výraznému snížení GS2 (po vnesení *35S-GS2-IR*), tak je narušen vývoj rostliny ať už na úrovni vývoje embryí a tvorby semen nebo během klíčení. Zdá se, že by v tomto případě mohly isoformy GS1 (zvláště GLN1;2) částečně komplementovat funkci GS2. Alternativním vysvětlením odlišné účinnosti transformací může být horší interakce s agrobaktériem u některých genotypů v důsledku pozměněných hladin metabolitů v mutantech, což by byl rovněž zajímavý fenomén. Bylo by tedy vhodné v budoucnu otestovat účinnost transformace jednotlivých genotypů při použití prázdného vektoru, aby se odlišil vliv umlčování *GS2* a vliv agrobaktéria.

V současné době nelze vyloučit ani hypotézu, že je mutace v *GS2* u *A. thaliana* (embryonálně) letální. Naznačuje to jednak malá účinnost vnášení *35S-GS2-IR* do rostlin, jednak snížená tvorba semen u některých linií *35S-GS2-IR* (viz Kapitola 4.2.3, Obr. 4.22). Tyto rostliny měly redukované šesule a jejich květní stvoly byly výrazně rozvětvenější než u WT rostlin. Projevy byly pozorovány u několika nezávislých linií transformantů, nezávisle na genetickém pozadí výchozích rostlin, nezdá se tedy, že by šlo o projev náhodné inzerční mutace. U rostlin nesoucích konstrukty pro RNAi bylo ale pozorováno, že může s určitou frekvencí docházet k pylové sterilitě (Xing & Zachgo, 2007), avšak frekvence byla významně nižší v porovnání s liniemi *35S-GS2-IR*, tedy tento fenotypový projev se zdá být specifický.

Silně snížená tvorba semen u linií *35S-GS2-IR* může být důsledkem toho, že *GS2* má úlohu při plnění semen, při embryogenezi nebo při vývoji pylu (snížená funkčnost pylu se totiž taky projevuje snížením počtu semen a redukcí šesulí).

Při tvorbě semen se ale předpokládá, že mají hlavní úlohu zejména cytosolické GS. U mutantu *gln1;2* u *A. thaliana* byl pozorován negativní vliv na šesule a vývoj semen. Došlo k redukcii počtu šesulí, šesule byly kratší a obsahovaly méně semen (Guan *et al.*, 2015). *GS2* rovněž nepatří mezi isoformy významně exprimované při tvorbě semen, ani při tvorbě pylu (dle databáze Genevestigator). Je však možné, že je v těchto procesech klíčová subcelulární lokalizace *GS2* v plastidech, resp. v mitochondriích. Pro možnou úlohu *GS2* během plnění semen svědčí fakt, že jeden z paralogů *GS2* u *Medicago truncatula*, který vznikl při nedávné duplikaci během vývoje bobovitých rostlin, je

specificky exprimován v semenech (Seabra *et al.*, 2010). Je možné, že duplikace *GS2* umožnila funkční specializaci jednotlivých paralogů dle teorie EAC (Escape from Adaptive Conflict; Hittinger & Carroll, 2007), tedy oddělení funkcí, které u ostatních rostlin zajišťuje jediná *GS2*.

Konečnou odpověď na letalitu mutace v *GS2* a zastupitelnost cytosolickými isoformami by měla přinést CRISPR/Cas9 cílená mutageneze proti *GS2*. Konstrukt pro navození knock-out mutace v *GS2* pomocí CRISPR/Cas9 byl již připraven a vnesen do rostlin (a to opět do různého genetického pozadí – WT, *gln1;1*, *gln1;2* a *gln1;1/gln1;2*). Pokud by se ukázalo, že je mutace v *GS2* přece jen letální, dalo by se pro další pokusy a zjištění, která vývojová fáze je narušena, využít potomstvo heterozygotních rostlin. CRISPR/Cas9 mutageneze byla prováděna nad rámec této diplomové práce (proto nebyla uvedena).

6. Závěry

- 1) Indukované umlčování *Fd-GOGAT1* u třech nezávislých linií *XVE-GOGAT-IR* vede v *in vitro* podmínkách k fenotypovým projevům podobným jako u fotorespiračních mutantů.
- 2) Použití *XVE-GOGAT-IR* rostlin pro indukované usmrcování naráží na problém s aplikací estradiolu *ex vitro*. Aplikace ESTR postřikem nebo zálivkou shora na jiff nejsou příliš účinné. Odpověď na ESTR je navíc dosti variabilní. Ne všechny rostliny, které by měly na ESTR reagovat, na indukci odpovídají. Pokud už rostlina reaguje na ESTR, reakce je nerovnoměrná v rámci orgánů a pletiv. Lze tedy jen stěží předpokládat, že půjde estradiolovým postřikem na rostliny *XVE-GOGAT-IR* navodit silné projevy fotorespiračních mutantů, resp. rostliny indukovaně zabít podobně jako aplikací herbicidu.
- 3) Promotorový mutant *gs2-3*, který má sníženou hladinu transkriptu *GS2* zhruba na třetinu oproti WT, je žlutější, má menší biomasu a pozměněné některé fotosyntetické parametry. Tyto projevy byly aspoň částečně potlačeny kultivací ve zvýšeném CO₂ (tj. v podmínkách potlačujících fotorespiraci). Snížení *GS2* tak zřejmě vede k slabým projevům fotorespiračního mutantu (dle výsledků u mutantu *gs2-3* a linie *35S-GS2-IR-3*, nesoucí konstitutivní vlásenku proti *GS2*).
- 4) U některých rostlin *35S-GS2-IR* bylo pozorováno výrazné snížení tvorby semen. Je možné, že *GS2* má úlohu během tvorby semen, embryogeneze nebo při vývoji pylu.
- 5) Z výsledků zatím nelze vyloučit, ani že je mutace v *GS2* letální, ani že je *GS2* nahrazována některou z cytosolických isoform (zejména *GLN1;2*). Konečnou odpověď by měla přinést CRISPR/Cas9 mutagenese zacílená proti *GS2*.

7. Seznam použité literatury

- Aoyama T, Chua N, 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal* **11**, 605–612.
- Avila C, Suárez MF, Gómez-Maldonado J, Cánovas FM, 2001. Spatial and temporal expression of two cytosolic glutamine synthetase genes in Scots pine: functional implications on nitrogen metabolism during early stages of conifer development. *The Plant Journal* **25**, 93–102.
- Bakar FA, Yeo CC, Harikrishna JA, 2015. Expression of the *Streptococcus pneumoniae* yoeB chromosomal toxin gene causes cell death in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *BMC Biotechnology* **15**, 26.
- Baulcombe D, 2004. RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356–363.
- Betti M, García-Calderón M, Pérez-Delgado C *et al.*, 2012. Glutamine synthetase in legumes: recent advances in enzyme structure and functional genomics. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 7994–8024.
- Bi Z, Zhang Y, Wu W *et al.*, 2017. ES7, encoding a ferredoxin-dependent glutamate synthase, functions in nitrogen metabolism and impacts leaf senescence in rice. *Plant Science* **259**, 24–34.
- Biesiadka J, Legocki A, 1997. Evolution of the glutamine synthetase gene in plants. *Plant Science* **128**, 51–58.
- Boven, Joram van 2016 - Mapping qualitative and quantitative traits in an *Arabidopsis thaliana* chromosome substitution library. Master Thesis, Wageningen University. Dostupné na <http://edepot.wur.nl/389527>
- Bologna NG, Voinnet O, 2014. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 473–503.
- Borghi L, 2010. Inducible gene expression systems for plants. *Methods in Molecular Biology* **655**, 65–75.
- Brand L, Horler M, Nuesch E *et al.*, 2006. A versatile and reliable two-component system for tissue-specific gene induction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**, 1194–1204.
- Caddick MX, Greenland AJ, Jepson I *et al.*, 1998. An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology* **16**, 177–180.
- Clough SJ, Bent AF, 1998. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735–743.
- Cordoba E, Shishkova S, Vance CP, Hernandez G, 2003. Antisense inhibition of NADH

- glutamate synthase impairs carbon/nitrogen assimilation in nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Plant Journal* **33**, 1037–1049.
- Corrado G, Karali M, 2009. Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotechnology Advances* **27**, 733–743.
- Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, Coruzzi GM, 1998. Arabidopsis gls mutants and distinct Fd-GOGAT genes. Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *The Plant Cell* **10**, 741–52.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R, 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization. *Plant Physiology* **139**, 5–17.
- Čermák, V, 2012. Studium mechanismu posttranskripčního a transkripčního umlčování transgenů v buněčné linii tabáku BY-2. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze. Dostupné na <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/99186/>
- Daniell H, 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature biotechnology* **20**, 581–586.
- Díaz P, Betti M, Sánchez DH, Udvardi MK, Monza J, Márquez AJ, 2010. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. *The New Phytologist* **188**, 1001–1013.
- Doskočilová A, Plíhal O, Volc J *et al.*, 2011. A nodulin/glutamine synthetase-like fusion protein is implicated in the regulation of root morphogenesis and in signalling triggered by flagellin. *Planta* **234**, 459–476.
- Dragičević M, Todorović S, Bogdanović M, Filipović B, Mišić D, Simonović A, 2014. Knockout mutants as a tool to identify the subunit composition of Arabidopsis glutamine synthetase isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry* **79**, 1–9.
- Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM, 1990. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 3459–3463.
- Evstigneeva ZG, Solov'eva N, Sidel'nikova L, 2003. Methionine sulfoximine and phosphinothrycin: A review of their herbicidal activity and effects on glutamine synthetase. *Applied Biochemistry and Microbiology* **39**, 539–543.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017 –World fertilizer trends and outlooks to 2020, dostupné na <http://www.fao.org/3/a-i6895e.pdf>
- Ferrario-Méry S, Suzuki A, Kunz C *et al.*, 2000. Modulation of amino acid metabolism in

- transformed tobacco plants deficient in Fd-GOGAT. *Plant and Soil* **221**, 67–79.
- Ferreira MJ, Vale D, Cunha L, Melo P, 2017. Role of the C-terminal extension peptide of plastid located glutamine synthetase from *Medicago truncatula*: Crucial for enzyme activity and needless for protein import into the plastids. *Plant Physiology and Biochemistry* **111**, 226–233.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.
- García-Gutiérrez A, Dubois F, Cantón FR, Gallardo F, Sangwan RS, Cánovas FM, 1998. Two different modes of early development and nitrogen assimilation in gymnosperm seedlings. *The Plant Journal* **13**, 187–199.
- Gatz C, Frohberg C, Wendenburg R, 1992. Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* **2**, 397–404.
- Gent L, Forde BG, 2017. How do plants sense their nitrogen status? *Journal of Experimental Botany* **68**, 2531–2539.
- Ghoshroy S, Binder M, Tartar A, Robertson DL, 2010. Molecular evolution of glutamine synthetase II: Phylogenetic evidence of a non-endosymbiotic gene transfer event early in plant evolution. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 198.
- Glevarec G, Bouton S, Jaspard E *et al.*, 2004. Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* **219**, 286–97.
- Good AG, Shrawat AK, Muench DG, 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science* **9**, 597–605.
- Gregerson RG, Miller SS, Twary SN, Gantt JS, Vance CP, 1993. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *The Plant Cell* **5**, 215–226.
- Guan M, Bang TC De, Pedersen C, Schjoerring JK, 2016. Cytosolic glutamine synthetase Gln1;2 is the main isozyme contributing to GS1 activity and can be up-regulated to relieve ammonium toxicity. *Plant Physiology* **171**, 1921–1933.
- Guan M, Moller IS, Schjoerring JK, 2015. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms play specific roles for seed germination and seed yield structure in *Arabidopsis*.

- Journal of Experimental Botany* **66**, 203–212.
- Guan M, Schjoerring JK, 2016. Peering into the separate roles of root and shoot cytosolic glutamine synthetase 1;2 by use of grafting experiments in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* **11**, e1245253.
- Hellens RP, Anne Edwards E, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM, 2000. pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* **42**, 819–832.
- Hess FD, 2000. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science* **48**, 160–170.
- Heuvel RHH Van Den, Curti B, Vanoni MA, Mattevi A, 2004. Cellular and molecular life sciences glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. *Cellular and Molecular Life Science* **61**, 669–681.
- Heuvel RHH Van Den, Ferrari D, Bossi RT *et al.*, 2002. Structural studies on the synchronization of catalytic centers in glutamate synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 24579–24583.
- Hills MJ, Hall L, Arnison PG, Good AG, 2007. Genetic use restriction technologies (GURTs): strategies to impede transgene movement. *Trends in Plant Science* **12**, 177–183.
- Hittinger CT, Carroll SB, 2007. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* **449**, 677–681.
- Hodges M, Jossier M, Boex-Fontvielle E, Tcherkez G, 2013. Protein phosphorylation and photorespiration. *Plant Biology* **15**, 694–706.
- Chen H, Li C, Liu L *et al.*, 2016. The Fd-GOGAT1 mutant gene lc7 confers resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* in rice. *Scientific Reports* **6**, 26411.
- Chen Q, Silflow CD, 1996. Isolation and characterization of glutamine synthetase genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **112**, 987–996.
- Chichkova S, Vance CP, Herna G, 2001. Transgenic tobacco plants that overexpress alfalfa NADH-glutamate synthase have higher carbon and nitrogen content. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2079–2087.
- Chipman DM, Shaanan B, 2001. The ACT domain family. *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 694–700.
- Igarashi D, Miwa T, Seki M *et al.*, 2003. Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in Arabidopsis. *The Plant Journal* **33**, 975–987.
- Ishiyama K, Hayakawa T, Yamaya T, 1998. Expression of NADH-dependent glutamate

- synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to the supply of ammonium ions. *Planta* **81**, 288–294.
- Ishiyama K, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Obara M, Yamaya T, Takahashi H, 2004. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 16598–16605.
- Ishiyama K, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H, 2006. Gln49 and Ser174 residues play critical roles in determining the catalytic efficiencies of plant glutamine synthetase. *Plant & Cell Physiology* **47**, 299–303.
- Jamai A, Salomé PA, Schilling SH, Weber APM, McClung CR, 2009. Arabidopsis photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *The Plant Cell* **21**, 595–606.
- Ji Y, 2011. The role of cytosolic glutamine synthetases in abiotic stress and development in Arabidopsis thaliana. *Ph.D. thesis, University of Saskatchewan*.
- Jing ZP, Gallardo F, Pascual MB *et al.*, 2004. Improved growth in a field trial of transgenic hybrid poplar overexpressing glutamine synthetase. *New Phytologist* **164**, 137–145.
- Jonassen EM, Sandsmark BAA, Lillo C, 2009. Unique status of NIA2 in nitrate assimilation: NIA2 expression is promoted by HY5/HYH and inhibited by PIF4. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 1084–1086.
- Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, Datta A, 2015. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science* **6**, 208.
- Kang H, Fang Y, Singh KB, 1999. A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in Arabidopsis and induces defense-related genes. *The Plant Journal* **20**, 127–133.
- Kendall AC, Wallsgrove RM, Hall NP, Turner JC, Lea PJ, 1986. Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* **168**, 316–323.
- Kimata-Arigo Y, Hase T, 2014. Multiple complexes of nitrogen assimilatory enzymes in spinach chloroplasts: Possible mechanisms for the regulation of enzyme function. *Plos One* **9**, e108965.
- Kissen R, Winge P, Tran DHT *et al.*, 2010. Transcriptional profiling of an Fd-GOGAT1/GLU1 mutant in Arabidopsis thaliana reveals a multiple stress response and extensive reprogramming of the transcriptome. *BMC Genomics* **11**, 190.

- Kojima S, Konishi N, Beier MP *et al.*, 2014. NADH-dependent glutamate synthase participated in ammonium assimilation in Arabidopsis root. *Plant Signaling & Behavior* **9**, e29402.
- Konishi N, Ishiyama K, Beier MP *et al.*, 2017. Contributions of two cytosolic glutamine synthetase isozymes to ammonium assimilation in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany* **68**, 613–625.
- Koo JC, Asurmendi S, Bick J, Woodford-Thomas T, Beachy RN, 2004. Ecdysone agonist-inducible expression of a coat protein gene from tobacco mosaic virus confers viral resistance in transgenic Arabidopsis. *The Plant Journal* **37**, 439–448.
- Krieger EK, Allen E, Gilbertson LA *et al.*, 2008. The Flavr Savr tomato, an early example of RNAi technology. *HortScience* **43**, 962–964.
- Kumada Y, Benson DR, Hillemann D *et al.*, 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3009–3013.
- Lam H-M, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM, 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 569–593.
- Lancien M, Martin M, Hsieh M, Leustek T, Goodman H, Coruzzi GM, 2002. Arabidopsis *glt1* -T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *The Plant Journal* **29**, 347–358.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F:F4:F4.3.
- Lichter A, Haberlein I, 1998. A light-dependent redox signal participates in the regulation of ammonia fixation in chloroplasts of higher plants - Ferredoxin : glutamate synthase is a thioredoxin- dependent enzyme. *Journal of Plant Physiology* **153**, 83–90.
- Lin C, Fang J, Xu X *et al.*, 2008. A built-in strategy for containment of transgenic plants: creation of selectively terminable transgenic rice. *Plos One* **3**, e1818.
- Liu Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF, 1995. Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* **8**, 457–463.
- Lombardo L, 2014. Genetic use restriction technologies: a review. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 995–1005.
- Lothier J, Gaufichon L, Sormani R *et al.*, 2011. The cytosolic glutamine synthetase

- GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in Arabidopsis rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1375–90.
- Luo Z, Chen Z, 2007. Improperly terminated , unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**, 943–958.
- Martin A, Lee J, Kichey T *et al.*, 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *The Plant Cell* **18**, 3252–3274.
- Masclaux F, Charpentreau M, Takahashi T, Pont-Lezica R, Galaud J-P, 2004. Gene silencing using a heat-inducible RNAi system in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **321**, 364–369.
- Mathis R, Gamas P, Meyer Y, Cullimore J, 2000. The presence of GSI-like genes in higher plants: support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes. *Journal of Molecular Evolution* **50**, 116–122.
- Migge A, Becker TW, 2000. Greenhouse-grown conditionally lethal tobacco plants obtained by expression of plastidic glutamine synthetase antisense RNA may contribute to biological safety. *Plant Science* **153**, 107–112.
- Migge A, Carrayol E, Hirel B, Becker TW, 2000. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* **210**, 252–260.
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC, 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* **328**, 872–875.
- Moore I, Samalova M, Kurup S, 2006. Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *The Plant Journal* **45**, 651–683.
- Motylová, Š, 2015. Dynamika a mechanismus umlčování reportérového genu pro GFP v závislosti na aktivitě RDR6 a způsobu indukce RNA interference v buněčné linii tabáku BY-2. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze. Dostupné na <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/143843/?lang=cs>
- Muñoz-Nortes T, Pérez-Pérez JM, Sarmiento-Mañús R, Candela H, Micol JL, 2017. Deficient glutamate biosynthesis triggers a concerted upregulation of ribosomal protein genes in Arabidopsis. *Scientific Reports* **7**, 6164.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with

- tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R, 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* **2**, 279–289.
- Orea A, Pajuelo P, Pajuelo E, Quidiello C, Romero JM, Márquez AJ, 2002. Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. *Physiologia Plantarum* **115**, 352–361.
- Osanai T, Kuwahara A, Otsuki H, Saito K, Hirai MY, 2017. ACR11 is an activator of plastid-type glutamine synthetase GS2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* **58**, 650–657.
- Padidam M, 2003. Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 169–177.
- Pesole G, Gissi C, Lanave C, Saccone C, 1995. Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 189–197.
- Peterman TK, Goodman HM, 1991. The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Molecular & General Genetics* **230**, 145–154.
- Qin G, Gu H, Ma L *et al.*, 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research* **17**, 471–482.
- Reyes-Prieto A, Moustafa A, 2012. Plastid-localized amino acid biosynthetic pathways of *Plantae* are predominantly composed of non-cyanobacterial enzymes. *Scientific Reports* **2**, 955.
- Roháček K, 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: The definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* **40**, 13–29.
- Rothstein SJ, Dimairo J, Strand M, Rice D, 1987. Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8439–8443.
- Růžičková, A, 2015. Vliv způsobu indukce RNA interference na umlčování reportérového genu pro GFP u *Arabidopsis thaliana*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze. Dostupné na <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/143941/>
- Saijo T, Nagasawa A, 2014. Development of a tightly regulated and highly responsive copper-inducible gene expression system and its application to control of flowering time. *Plant Cell Reports* **33**, 47–59.

- Seabra AR, Jose P, 2009. Crystallization and preliminary crystallographic characterization of glutamine synthetase from *Medicago truncatula* crystallization communications. *Acta Crystallographica Section F* **F65**, 1309–1312.
- Seabra AR, Silva LS, Carvalho HG, 2013. Novel aspects of glutamine synthetase (GS) regulation revealed by a detailed expression analysis of the entire GS gene family of *Medicago truncatula* under different physiological conditions. *BMC Plant Biology* **13**, 137.
- Seabra AR, Vieira CP, Cullimore J V, Carvalho HG, 2010. *Medicago truncatula* contains a second gene encoding a plastid located glutamine synthetase exclusively expressed in developing seeds. *BMC Plant Biology* **10**, 183.
- Sijen T, Vijn I, Rebocho A *et al.*, 2001. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology* **11**, 436–440.
- Silva LS, Seabra AR, Leitão JN, Carvalho HG, 2015. Possible role of glutamine synthetase of the prokaryotic type (GSI-like) in nitrogen signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Science* **240**, 98–108.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM, 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319–320.
- Somerville C, Ogren W, 1980. Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* **286**, 257–259.
- Suzuki A, Knaff DB, 2005. Glutamate synthase : structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. *Photosynthesis Research* **83**, 191–217.
- Swarbreck SM, Defoin-Platel M, Hindle M, Saqi M, Habash DZ, 2011. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. *Journal of experimental botany* **62**, 1511–22.
- Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, Ludwig RA, 2004. *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *The Plant Cell* **16**, 2048–2058.
- Takabayashi A, Niwata A, Tanaka A, 2016. Direct interaction with ACR11 is necessary for post-transcriptional control of GLU1-encoded ferredoxin-dependent glutamate synthase in leaves. *Scientific Reports* **6**.
- Takahashi T, Naito S, Komeda Y, 1992. The *Arabidopsis* HSP18.2 promoter/GUS gene fusion in transgenic *Arabidopsis* plants: a powerful tool for the isolation of regulatory mutants of the heat-shock response. *The Plant Journal* **2**, 751–761.
- Tamura W, Kojima S, Toyokawa A, Watanabe H, Tabuchi-kobayashi M, 2011. Disruption

- of a novel NADH-glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice. *Frontiers in Plant Science* **2**, 1–9.
- Tingey S V, Tsai F, Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM, 1988. Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 9651–9657.
- Tiwari M, Sharma D, Triverdi P, 2014. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant Molecular Biology* **86**, 1–18.
- Torreira E, Saebra A, Marriott H *et al.*, 2014. The structures of cytosolic and plastid-located glutamine synthetases from *Medicago truncatula* reveal a common and dynamic architecture research papers. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **D70**, 981–993.
- Unno H, Uchida T, Sugawara H *et al.*, 2006. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 29287–96.
- Vanoni MA, Curti B, 2008. Structure-function studies of glutamate synthases: a class of self-regulated iron-sulfur flavoenzymes essential for nitrogen assimilation. *IUBMB life* **60**, 287–300.
- Wallsgrave RM, Hareli E, Lea PJ, Miflin BJ, 1977. Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants. *Journal of Experimental Botany* **28**, 588–596.
- Wallsgrave RM, Turner JC, Hall NP, Kendall AC, Bright SWJ, 1987. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase - biochemical and genetic analysis. *Plant Physiology* **83**, 155–158.
- Wandelt C, 2007. Implementation of general surveillance for Amflora potato cultivation - Data Management. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2**, 70–71.
- Wellburn AR, 1994. The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* **144**, 307–313.
- Wild A, Manderscheid R, 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. *Z. Naturforsch. Section C, Biosciences* **39**, 500–504.
- Xing S, Zachgo S, 2007. Pollen lethality: A phenomenon in *Arabidopsis* RNA interference plants. *Plant Physiology* **145**, 330–333.
- Yang X, Nian J, Xie Q *et al.*, 2016. Rice ferredoxin-dependent glutamate synthase

- regulates nitrogen-carbon metabolomes and is genetically differentiated between japonica and indica subspecies. *Molecular Plant* **9**, 1520–1534.
- Zeng D-D, Qin R, Li M *et al.*, 2017. The ferredoxin-dependent glutamate synthase (OsFd-GOGAT) participates in leaf senescence and the nitrogen remobilization in rice. *Molecular Genetics and Genomics* **292**, 385–395.
- Ziegler C, Feraud M, Jouglet T *et al.*, 2003. Regulation of promoter activity of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 649–655.
- Zuo J, Niu Q-W, Chua N-H, 2000. An estrogen-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal* **24**, 265–273.