

1. ÚVOD

1.1. PŘEDMLUVA

V této části bych také chtěl říci pár slov o svých důvodech, které mě vedly k tomu, že jsem si vybral toto téma.

Jedním z nich bylo, že mě lákala představa podílet se na tomto projektu, být jeho součástí a svým malým dílem přispět k celkovému cíli, jímž je objevení struktury fotosystému II, prostě mít dobrý pocit z toho, že moje práce je k něčemu prospěšná a není výzkumem, který by končil ve slepé uličce a k ničemu nevedl.

Další pohnutka, která mě vedla k tomu, že jsem prováděl své výzkumy právě na tomto pracovišti je daleko prozaičtější, mám velmi rád okolní krajinu a tato oblast je mi velmi blízká, neboť do Nových Hradů jsem začal jezdit už od svých jedenácti let, kdy jsem se jako žák páté třídy ZŠ účastnil přírodovědné soutěže pořádané místní školou tzv. memoriálu Stanislava Kučery, známého také pod názvem: „Znáš Novohradsko“. Nové Hrady jsou známé také Terčinným údolím a v blízkosti sousedícími Novohradskými horami. Dá se říci, že se mým životem prolínají jako stříbrná nit, protože v nich bydlí i má první láska ze střední školy a dále i kamarádka z jazykovky, která shodou okolností také pracuje na stejném místě (na zámku), jako jsem i já pracoval. V současné době zde mám i několik kamarádů z vysoké školy.

1.2. ÚVODNÍ ČÁST

Tato práce byla vypracována na oddělení struktury a funkce proteinů, společného pracoviště Ústavu Systémové Biologie a Ekologie AVČR a Ústavu fyzikální biologie Jihočeské univerzity v Č.B., se sídlem v Nových Hradech. Výzkum struktury fotosystému II, zde probíhající na molekulární úrovni, je jedním z několika odvětví tamějšího výzkumu.

Jednou z oblastí výzkumu jsou i proteiny kyslík-vyvíjecího komplexu, který je součástí fotosystému II. Můžeme směle tvrdit, že fotosystém II je jedním z nejlépe prozkoumaných biochemických komplexů, o kterém toho hodně víme, ale na druhou stranu je toho strašně moc, co zatím není známo a může být objeveno, jelikož jeho struktura je velmi složitá. Dle mého názoru bude trvat ještě hodně dlouho, než bude zcela objasněna, což by ale na druhou stranu přineslo ohromné množství nových technologií, postupů a možností, neboť jak víme, nerostné bohatství je tzv. neobnovitelným zdrojem a je jen otázkou času, kdy se lidstvo bude muset poohlédnout po jiném zdroji energie. K dalším výhodám patří, že se jedná o ekologický zdroj energie, který je základním zdrojem kyslíku na naší planetě.

Závěrem tohoto úvodu bych chtěl konstatovat, že všechny mé pokusy byly prováděny s bakterií *Escherichia coli* a ve všech případech se jednalo o běžné laboratorní postupy genového inženýrství, které nebyly nijak modifikované. Z tohoto důvodu jsem také necítil potřebu uvádět použitý spotřební materiál, neboť šlo o běžné vybavení laboratoře, které je člověku pracujícímu v tomto oboru známo. Jelikož převážná většina mojich studijních materiálů byla v angličtině, ale tato práce je psána v češtině snažil jsem se i o překlad anglických názvů, které se mezi vědci v češtině běžně používají, jakými jsou např. loop, helix, ale které podle slovníku neexistují. Jedna skupina těchto názvů šla přeložit lehce, ale ve vyjimečných případech, kdy by překlad byl dosti krkolomný, název je oficiálním označením

např. komerčního kitu pod kterým se prodává, nebo čeština nemá ekvivalent se v práci vyskytují i anglické pojmy.

1.3. STANOVENÉ CÍLE

Proteiny kyslík vyvíjejícího komplexu fotosystému II hrají důležitou roli pro nastolení optimálních podmínek pro štěpení vody při procesu fotosyntézy. Jedná se o extramembránové proteiny, z nichž pouze 33 kDa protein je společný všem kyslík-vyvíjejícím organismům. Ostatní dva proteiny jsou různé u sinic a ruduch a u vyšších rostlin a zelených řas.

33 kDa protein je kódován genem PsbO a je velmi konzervovaný (45%) mezi organismy (Tohri a kol. 2002). Bylo prokázáno, že je možné tento protein zaměnit jak mezi *Spinacia oleracea* a *Arabidopsis thaliana*, tak i mezi sinicemi a vyššími rostlinami, nebo ruduchami a vyššími rostlinami (Enami a kol. 2000). Vyšší rostliny a řasy obsahují vedle tohoto proteinu ještě dva proteiny s molekulovou hmotností 23 a 16 kDa kódované geny PsbP a PsbQ (Seidler 1996 and ref. herein). Tyto proteiny se účastní vazby vápenatých a chloridových iontů, které jsou potřebné pro optimální funkci tohoto komplexu. V komplexu vyvíjejícím kyslík jsou tyto proteiny nejpravděpodobněji v poměru 1:1:1. Jeden kyslík-vyvíjející komplex se váže na jeden komplex fotosystému II.

U sinic a ruduch (organismů, které mají jako světlosběrné antény komplexy fykobilisomu) se 23 kDa a 16 kDa proteiny nevyskytují a jsou nahrazeny cytochromem b550 a 12 kDa proteinem kódovanými geny PsbU a PsbV. Vazba a funkce těchto dvou proteinů je podobná proteinům 23 kDa a 16 kDa u vyšších rostlin, avšak jejich struktura je zásadně odlišná (Shen a kol. 1995; 1997).

Pro pochopení funkce jednotlivých proteinů kyslík-vyvíjejícího komplexu je nutná znalost jejich struktury. Struktura byla na dostatečné úrovni vyřešena pouze u cyt b550. U 33 kDa a 12 kDa proteinů je známa pouze v rozlišení 3,4 Å, u 23 kDa a 16 kDa proteinů je struktura známá jen částečně.

Cílem projektu, kterého je tato bakalářská práce součástí je získat poznatky, které mohou doplnit současné znalosti struktury a funkce proteinů kyslík-vyvíjejícího komplexu (OEC) fotosystému II (PSII) a přispět k řešení otázky vzniku a evoluce oxygenní fotosyntézy. Hlavními body projektu jsou i) *Izolace rekombinantních proteinů OEC*, ii) *Strukturální analýza proteinů pomocí vibrační spektroskopie a molekulárního modelování*, iii) *Studium vzájemných interakcí proteinů OEC použitím biofyzikálních metod*.

Bakalářská práce se zabývá studiem proteinů kyslík-vyvíjejícího komplexu fotosystému II metodami molekulární a strukturní biologie a tím přispěje k řešení prvního a třetího bodu.

Metodický, hlavní důraz práce je kladen na zvládnutí metod exprese a purifikace rekombinantních proteinů, konkrétně PCR, rekombinantní exprese v *Escherichia coli*, SDS-PAGE, bodové mutace a purifikace proteinů pomocí FPLC a HPLC. Částečně se práce zabývá i hodnocením sekvenčních dat a určení koncentrace a čistoty.

Vědecký význam této práce je určení vztahu struktury a funkce proteinu u vnějších proteinů fotosystému II ze špenátu (*Spinacia oleracea*). Práce se konkrétně zabývá proteinem PsbQ ze špenátu, který je připraven rekombinantně v *Escherichia coli*. Pomocí teoretického modelu PsbQ jsou identifikovány klíčové aminokyseliny s potenciálem hrát důležitou úlohu v interakci proteinů PsbP, PsbQ a PsbO, které společně vytvářejí kyslík-vyvíjející komplex u

vyšších rostlin. Následně jsou připravené bodové mutace těchto vytipovaných aminokyselin, které budou sloužit v dalším výzkumu ke cross-linkovacím studiím, k ověření teoretické predikce, resp. k upřesnění. Tímto přispívá tato práce důležitým podílem k dlouhodobému výzkumu fotosyntézy na atomární úrovni, jednoho z hlavních směrů novohradského pracoviště. Pochopení fotosyntézy a možnost jejího ovlivňování patří v dnešním světě, který hledá alternativní zdroje energie v souladu s udržitelným rozvojem, ke klíčovým znalostem s velkým potenciálem pro budoucí využití v mnoha oblastech.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. FOTOSYNTÉZA

Fotosyntéza, tento pojem pochází z řeckého fós, fótos – „světlo“ a synthesis – „shrnutí“, „skládání“. Jedná se o složitý, několikastupňový biochemický proces fotoautotrofních organismů, při kterém se váže sluneční energie na energii chemických vazeb.

2.1.1. Průběh fotosyntézy

Rovnice celkového průběhu fotosyntézy



Tato rovnice bývá často zjednodušována na tento tvar $6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2$

Vnitřní energie získaná během fotosyntézy $\Delta H = 2870 \text{ kJ/mol}$.

Tento děj se odehrává v chloroplastech a není zatím zcela objasněn. Jsou při něm nezbytná zelená barviva, tzv. chlorofyly, která jsou uložena v thylakoidních membránách chloroplastů. Ta pohlcují fotony viditelné složky slunečního záření o vlnové délce přibližně 400 – 700 nm. Fotosyntéza probíhá ve dvou za sebou zařazených fotosystémech a chlorofyly využívají pohlcenou energii k fotolýze vody na kyslík (který uniká do atmosféry) a vodík (protony) a elektrony, které najdou uplatnění při tvorbě energeticky bohatých chemických vazeb (v ATP) a redukčních látek (NADPH). Tato fáze se nazývá světelná. V temnostní fázi není již světlo zapotřebí a je využívána energie získaná ze světelné fáze. Tato energie je využita k fixaci a redukci CO_2 . Takto vzniklé cukry slouží jako zásobárna a zdroj energie, nebo jako stavební suroviny při tvorbě složitějších molekul (např. glykosidy, polysacharidy). Procesy temnostní fáze se odehrávají v cyklech a podle různých druhů se liší.

Rozlišujeme tzv. C_3 rostliny, kterých je většina a které váží CO_2 pomocí enzymu ribulózabisfosfátkarboxylázy v tzv. Calvinově cyklu. Další skupinu tvoří C_4 rostliny, např. kukuřice, cukrová třtina a některé tropické rostliny (zvláště trávy), kde se jedná o tzv. Hatchův - Slackův cyklus. Třetí skupinou jsou tučnolisté rostliny se smíšeným typem (CAM) fotosyntézy, který jim umožňuje šetřit vodou. Fotosyntetizující organismy jsou jedinými producenty živé hmoty z anorganických látek pomocí pohlceného slunečního záření, které je jedním ze základních faktorů podmiňujících život. Fotosyntéza je také základním zdrojem O_2 v atmosféře. Mezi faktory na nichž závisí průběh fotosyntézy patří voda, teplota, světlo a koncentrace CO_2 ve vzduchu.

2.1.2. Fotosyntetizující organismy

Mezi organismy, které se vyživují autotrofně, resp. autofototrofně patří takové, které si energii potřebnou k životu zajišťují pomocí fotosyntézy. Mezi ně patří hlavně zelené rostliny a dále některé druhy zelených (*Chlorophyta*) a hnědých (*Chromophyta*) řas, sinic (*Cyanobacteria*), ruduch (*Rhodophyta*), obrněnek (*Dinophyta*), skrytěnek (*Cryptophyta*), krásnooček (*Euglenophyta*) a v neposlední řadě i bakterií.

2.1.3. Význam fotosyntézy

Z hlediska současného života na Zemi je fotosyntéza pokládána (podle některých autorů) za nejdůležitější biochemický proces. Biosféra by totiž bez ní byla dnes zásobena organickými látkami buď vůbec, nebo jen ve velmi omezené míře (chemoautotrofní bakterie). Organické látky takto vytvořené jsou spotřebovávány heterotrofními organismy, tedy i člověkem při jejich výživě. Fotoautotrofní organismy zachytí ročně asi 10^{71} kJ energie a vyrobí přibližně 14×10^{11} tun organické hmoty, přičemž uvolní 15×10^{11} tun O_2 , fixují 20×10^{11} tun CO_2 ze vzduchu a oceánů. Dnešní průmysl využívající tzv. fosilní paliva (ropa, uhlí, zemní plyn) je tedy vlastně na produktech fotosyntézy také závislý.

Opačným procesem k fotosyntéze je respirace, při které se nahromaděná energie v chemických vazbách uvolňuje oxidací při spotřebovávání O_2 a je přeměňována na ATP. Jako ATP je poté energie dostupná pro všechny reakce vyžadující dodání energie v organismu (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotosyntéza,ref.herein,>) (<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/129023-fotosynteza>).

2.2. FOTOSYSTÉM II

Abychom porozuměli molekulárnímu mechanismu kyslík-vyvíjející reakce je klíčovou prerekvizitou znalost struktury fotosystému II. Význam komplexu fotosystému II je umocněn i skutečností, že na něm vzniká veškerý kyslík na naší planetě potřebný pro život. Vznik oxygenní fotosyntézy byl pravděpodobně podmíněn vznikem syntézy chlorofylu. Předchůdce chlorofylu – bakteriochlorofyl totiž není schopen při své oxidaci dosáhnout tak vysokého redoxního potenciálu, který by mohl štěpit vodu. (Barber 2003)

2.2.1. Struktura fotosystému II

Fotosystém II (PSII) je pigment-proteinový komplex, který se skládá z více než 25 různých proteinových podjednotek, v současnosti označených jako PsbA-Z podle genů, které je kódují. Většina z nich je ukotvena v thylakoidní membráně (Barber 2003). PSII je lokalizován v thylakoidech vyšších rostlin, řas a sinic, kde redukuje plastochinon použitím vody jako dárce elektronů v na světle závislé víceré reakci, která jako vedlejší produkt produkuje molekulární kyslík (Balsera 2003, ref. herein). Vedle chlorofylu je ke štěpení kyslíku nutná i přítomnost atomů manganu na fotosystému II a kyslík-vyvíjejícího komplexu (OEC) těsně sousedícího s fotosystémem II (Buchel a kol. 1999, Bondarava a kol. 2005).

Uvolnění molekulárního kyslíku se odehrává na straně lumenu PSII po sekvenční akumulaci 4 oxidujících ekvivalentů v anorganickém klastru, formovaném čtyřmi redoxně-aktivními Mn ionty a neredoxně-aktivními Ca^{2+} a Cl^- ionty. Takzvaný manganový kluster je umístěn mezi lumen čelícími proteiny základního matrixu transmembránových podjednotek PSII jádra (PsbA, PsbB, PsbC a PsbD) a lumen vnějšími jednotkami PSII. PsbO(33 kDa, mangan stabilizující protein, PsbP (23 kDa) a PsbQ(16 kDa, 17 kDa – v literatuře není sjednocená hodnota molekulové hmotnosti, protože skutečná molekulová hmotnost je 16,64 kDa) jsou tři hlavní vnější proteiny PSII ve vyšších rostlinách a zelených řasách. Tyto proteiny jsou nezbytné pro stabilitu a plnou aktivitu OEC, protože vytváří správné iontové prostředí během oxidace vody, přestože žádný z nich nevypadá, že se k manganu váže přímo. Nicméně v sinicích a nezelených řasách je PsbO spojen se dvěma různými proteiny a to proteinem PsbV (cytochrom c-550) a PsbU. (Balsera 2003, ref. herein)

Dodatečně byl v rostlinném PSII nalezen protein PsbR, který má molekulovou hmotnost 10 kDa a tuší se, že hraje důležitou roli v oxidaci vody, ale jeho fyziologický význam zatím zůstává záhadou (Suorsa M., 2006).

2.2.1.1. Kyslík-vyvíjející komplex (OEC)

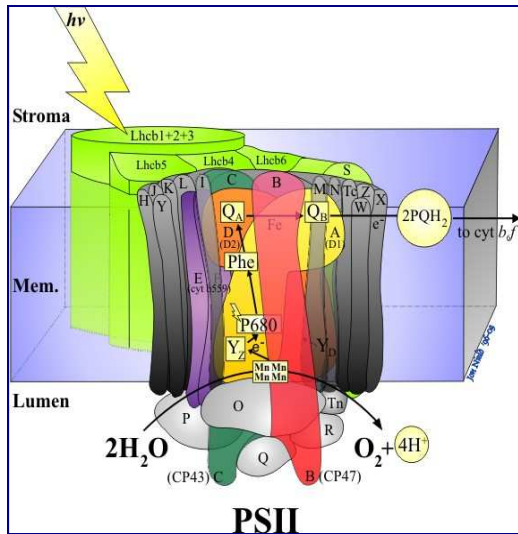
Jak již bylo řečeno, proteiny kyslík-vyvíjejícího komplexu fotosystému II jsou důležité pro nastavení optimálních podmínek pro štěpení vody při fotosyntéze. Jedná se o extramembránové proteiny, z nichž jenom PsbO protein je společný všem autotrofním organismům. Další dva proteiny jsou jiné u sinic a ruduch a u vyšších rostlin a zelených řas. Protein kódovaný genem PsbO, je velmi konzervovaný (45%) mezi organismy (Tohri a kol. 2002). Výzkumy dokázaly, že tento protein může být zaměněn jak mezi *Spinacia oleracea* a *Arabidopsis thaliana* tak i mezi sinicemi a vyššími rostlinami nebo ruduchami a vyššími rostlinami (Enami a kol. 2000). Vyšší rostliny a řasy vedle tohoto proteinu mají ještě proteiny PsbP a PsbQ. Tyto proteiny se podílí na vazbě vápenatých a chloridových iontů, jež jsou zapotřebí pro optimální fungování tohoto komplexu (Seidler 1996, ref. herein) a to tak, že vytvářejí vhodné iontové prostředí během oxidace vody, kdežto červené řasy a sinice mají kromě PsbO proteiny PsbU a PsbV a PsbQ-like protein, který dostal toto označení díky své podobnosti s PsbQ proteinem. Dále existuje tzv. PsbP-like protein, jehož existence byla zatím prokázána jen u sinic. Struktura rekombinantního PsbQ proteinu PSII ze *Spinacia oleracea* byla zatím rozřešena metodou rentgenové difrakce při rozlišení 1,49 Å (Balsera 2005). V komplexu vyvíjejícím kyslík se tyto proteiny s největší pravděpodobností nachází v poměru 1:1:1. Jeden kyslík-vyvíjející komplex se váže k jednomu komplexu fotosystému II. U sinic a ruduch, jež mají jako světlosběrné antény komplexy fykobilisomu, se PsbP a PsbQ proteiny nenacházejí a jsou nahrazeny cytochromem b550 a 12 kDa proteinem kódovanými geny PsbU a PsbV. Vazba a funkce těchto dvou proteinů je blízká proteinům PsbP a PsbQ u vyšších rostlin, ale jejich struktura se zásadně liší (Shen a kol. 1995. 1997).

Pro pochopení funkce jednotlivých proteinů kyslík-vyvíjejícího komplexu je nutná znalost jejich struktury, jako i vzájemná interakce mezi proteiny. Jsou známy oblasti (nikoli však konkrétní aminokyseliny), u kterých se předpokládá, že se podílí na interakci proteinů OEC. Existují také elektronové snímky PSII na nichž jsou vidět obrysy kyslík vyvíjejícího komplexu. Zdá se, že se na interakci těchto proteinů podílí hlavně vodíkové vazby mezi jejich podjednotkami a v menší míře i solné můstky. Ukázalo se, že PsbP interaguje s PsbQ dvěma oblastmi a to kličkou mezi 3. a 4. β-vláknem a první α-šroubovicí, zatímco u interakce proteinu PsbQ s proteinem PsbP se účastní pouze N-koncová klička mezi 1. a 2. vláknem. Jak již bylo dříve uvedeno PsbO, PsbP a PsbQ proteiny vyšších rostlin jsou nejpravděpodobněji ve stechiometrickém poměru 1:1:1. Jenom PsbO protein se může vázat k vnitřním proteinům PSII (jmenovitě D1, D2, CP47 a CP43 proteiny) bez účasti dalších vnějších proteinů. Ze studií interakcí proteinů OEC je zřejmé, že PsbP potřebuje k vazbě na vnitřní proteiny PsbO protein a že PsbQ protein nemůže být navázán bez účasti PsbO a PsbP (Barber 2003).

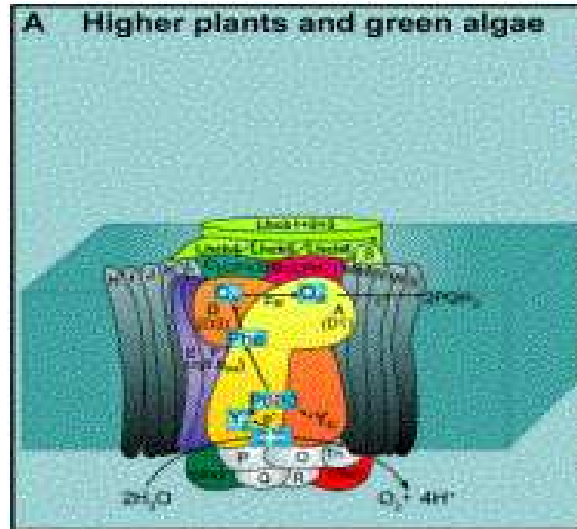
Obrázky č.1 - 3 Vnější proteiny OEC vyšších rostlin a zelených řas.

PsbO (33 kDa)
PsbP (23 kDa)
PsbQ (17kDa)

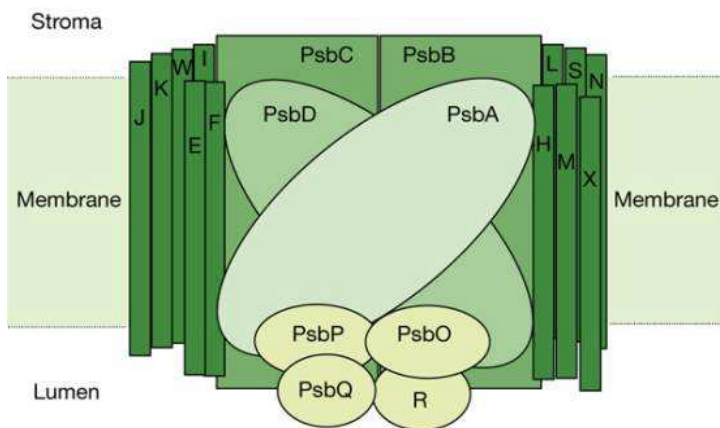
Jak je z uvedených následujících obrázků zřejmé, zatím není přesně známo uspořádání proteinů kyslík vyvíjejícího komplexu a jednotliví autoři se ve svých hypotézách liší.



www.bio.ic.ac.uk/research/barberupsImages/PSII.html



www.botanik.biologie.unimuenchen.de/botphys/staff/eichacker/eichacker/deu.html



www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_11/Page2.html

2.2.1.2. Popisy proteinů kyslík-vyvíjejícího komplexu (s výjimkou PsbQ)

Geny kódující proteiny pro PSII jádro bývají také označovány jako *psb* (fotosystém b) geny. Ve vyšších rostlinách a řasách je většina těchto genů lokalizována v chloroplastovém genomu, ale některé jsou kódovány jaderně. V určitých případech jsou tyto komponenty rozříděny do určité třídy organismu. Navíc jsou zde geny, které kódují proteiny vnějších anténových systémů, tzv. *cab* geny ve vyšších rostlinách a zelených řasách, dávající vznik sériím chlorofylu a/chlorofylu b vázajícím proteinům (Lhc1-6) zatímco *apc* a *cpc* geny kódují protein fykobilisomů v sinicích a červených řasách (Barber 2003, ref. herein).

PsbO - 33 kDa mangan stabilizující protein

Mezi vyššími rostlinami a sinicemi je tento protein vysoce konzervován, obsahující po zpracování 241 až 247 zbytků. Ačkoli je o kompletním PsbO proteinu často hovořeno jako o 33 kDa proteinu je jeho odhadovaná molekulová hmotnost okolo 26.5 kDa. Jedná se o vnější protein s velkým obsahem β vlákna a hraje důležitou roli v udržování optimálního prostředí při oxidaci vody. Různé studie indikují, že se tak děje stabilizováním manganového klastru, ale nejsou zde důkazy, že váže mangan přímo. Vskutku, nepřítomnost PsbO genu v *Synechocystis* 6803 neinhibuje vyvíjení kyslíku nebo fotoautotrofický růst. Za těchto podmínek může být funkce PsbO proteinu provedena PsbV proteinem. Studie napříč indikují, že je úzce orientován na lumenální smyčce proteinu CP47 a k PsbE a PsbI proteinům (Barber 2003, ref. herein) .

PsbP - 23 kDa vnější protein

Po zpracování PsbP protein obsahuje okolo 186 aminokyselin s odhadovanou molekulovou hmotností okolo 23 kDa. Přestože byl nalezen ve vyšších rostlinách a řasách, tento protein není zachován u sinic. Jeho funkcí se zdá být optimalizace Ca^{2+} a Cl^- hladin potřebných při reakci oxidace vody (Barber 2003, ref. herein) a je lokalizován v blízkosti PsbO proteinu.

PsbU protein

Jedná se o sinicový protein, o kterém bylo uvedeno, že se nachází vně, na lumenální straně PSII blízko k PsbO proteinu. Jeho domnívaná molekulová hmotnost činí 10 kDa (Barber 2003, ref. herein).

PsbV protein

Protein PsbV, také známý jako cytochrom c550 se nachází jen v sinicích. Má molekulovou hmotnost 15.1 kDa , je vnějším proteinem na lumenální straně PSII a hraje roli v oxidaci vody , jeho nepřítomnost přesto nezastaví fotoautotrofický růst, ačkoli je to požadováno, když gen PsbO je také nepřítomen (Barber 2003, ref. herein).

2.2.1.3. Funkce vnějších proteinů OEC (PsbP, PsbO a PsbQ)

Funkce tří vnějších proteinů OEC vyšších rostlin je požadována pro vysoko-rychlostní vyvíjení kyslíku při fyziologických koncentracích anorganických kofaktorů. PsbO protein byl nazván mangan stabilizující protein díky jeho stabilizaci manganového klastru během vystavení se nízkým chloridovým koncentracím, nebo exogenním redukčním činidlům. PsbP a PsbQ proteiny modulují kalciové a chloridové požadavky pro úspěšné vyvíjení kyslíku (Bricker a kol. 2003). U PsbQ proteinu bylo prokázáno, že zvyšuje vázací afinitu Cl^- k PSII a u PsbP, že se podílí na zvyšování vázacích afinit obou Cl^- a Ca^{2+} iontů navíc k jejich běžné funkci, která je ve stabilizování manganového klastru (Bondarava a kol. 2005 ref. herein).

Fyziologická funkce PsbQ ve vyšších rostlinách je přesto stále nejasná (Ifuku a kol. 2005). Předpokladem je, že hlavní role PsbQ je v udržování optimální koncentrace Cl^- v PSII. Experimenty s mutanty *Nicotiana tabacum* postrádající proteiny PsbP, PsbQ ukázaly, že v případě, když chyběl PsbP protein, tak byla fotochemická reakce ve světelné fázi velice porušena a v temnotní fázi toto vedlo až k rozložení manganového klastru, zatímco v případě, když chyběl protein PsbQ tak se rostlinný fenotyp nezměnil. Z toho vyplývá, že psbP je na rozdíl od PsbQ nepostradatelný pro rostlinné přežití a normální funkce PSII ve vyšších rostlinách in vivo (Ifuku a kol. 2005) .

Další funkce navrhované pro PsbP a PsbQ jsou:

- (a) utvoření brány, která je otevřená pro substráty a produkty, ale uzavřená nefyziologickým redukcujícím činidlům
- (b) vytvoření slabého dielektrického média, jež je optimální pro vázání Ca^{2+} a Cl^- k PSII.
- (c) vyladění magnetických vlastností manganového klastru (Balsera 2003, ref. herein).

K tomuto může PsbQ hrát roli v udržování celkové stability PSII. PsbQ byl hlášen jako termostabilní s bodem tání $\sim 65^\circ\text{C}$. Toto je slučitelné s některými rysy nalezenými v sekvenci PsbQ. PsbQ upřednostňuje Arg (5.4%), ale vyhýbá se termolabilnímu Cys a His ve všech jeho sekvencích a také Pro (kromě Pro72) v jeho čtyřech α -šroubovicích. Příslušející frekvence těchto aminokyselinových zbytků jsou ve vztahu k termostabilitě proteinů, dávající tušit, že PsbQ může splnit tyto potřeby. Mimo to, solné můstky formované mezi aminokyselinovými zbytky, které jsou k sobě relativně blízko v sekvenci, jsou také známy stabilizací proteinů. PsbQ a PsbP mohou být od PSII odděleny za pomoci vysokých iontových sil. (Balsera 2003, ref. herein).

2.3. PROTEIN PsbQ

PsbQ protein, který byl hlavní částí mé práce je ve své podstatě skoro úplně ideální protein. Jedná se o termostabilní, ve vodě rozpustný, reverzibilní, jednoduchý protein, který se relativně dobře skladuje při -20°C také není moc reaktivní s ostatními látkami.

2.3.1. Sekundární struktura proteinu PsbQ

Jedná se o vnější protein PSII, který když je plně vyvinutý obsahuje okolo 149 aminokyselin a jako protein PsbP se nachází blízko u PsbP proteinu a manganového klastru v OEC. U tohoto proteinu se také předpokládá, že se účastní optimalizace iontového prostředí nezbytného pro vyvíjení kyslíku (Ristvejová a kol. 2006, ref. herein). Přesto se tento protein nenachází u sinic.

Struktura PsbQ byla stanovena pomocí Fourier transformované infračervené spektroskopie, Ramanovy vibrační spektroskopie a spektroskopie cirkulárního dichroismu. a strukturními a počítačovými předpověďmi metodami. Získané výsledky dávají tušit, že protein má hlavně α -šroubovicitou strukturu. viz. Tabulka 1

Tabulka č. 1 Sekundární struktura PsbQ

Sekundární strukturní obsah (v procentech) PsbQ odhadovaný z amidových skupin I a II Fourier transformovanou infračervenou spektroskopií a pomocí analýzy nejmenších čtverců s referenční sadou 19 proteinových spekter amid I skupiny Ramanovy spektroskopie analýzou nejmenších čtverců s referenční sadou 15 proteinových spekter a modelování pomocí molekulární dynamiky. (Ristvejová a kol. 2006, ref. herein)

Structure type	FTIR	Raman	Circular dichroism [4]	MD modeling
α -Helix	63 \pm 10	65 \pm 4	64 \pm 9	63
β -Sheet	5 \pm 8	4 \pm 4	7 \pm 4	7
β -Turn	12 \pm 4	8 \pm 2	—	7
Bend	6 \pm 4	—	—	5
Other	16 \pm 6	19 \pm 2	29 \pm 7	18

(Ristvejová a kol. 2006, ref. herein)

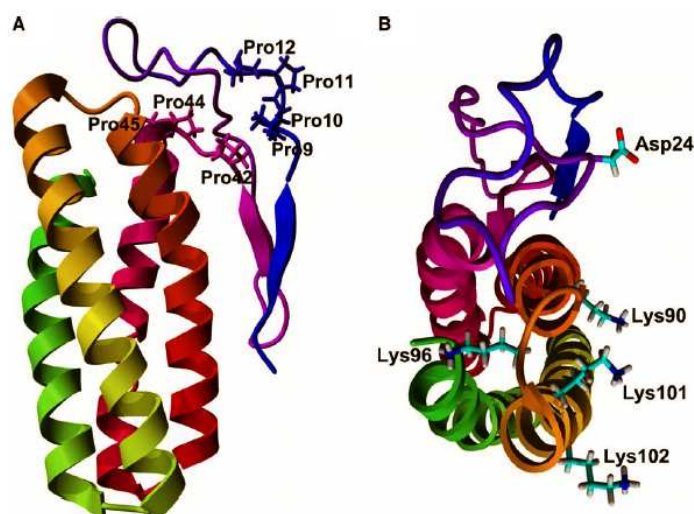
2.3.2. Celková struktura PsbQ

Konečný model PsbQ obsahuje 4 α -šroubovice a paralelní β -list, kotvící smyčkou nedaleko N-konce. Šroubovice a paralelní list pochází ze struktury templátu 1 VYK. Smyčka mezi Leu13 a Thr34 chybějící v krystalové struktuře zvětšuje β -list přidáním jednoho malého vlákna formovaného dvěma aminokyselinami, jak bylo vypočítáno molekulovým modelováním s následnou molekulární dynamikou, shodujícími se s odhady sekundární struktury pomocí vibrační spektroskopie. Ve smyčce můžeme nalézt Arg27, nabitý aminokyselinový zbytek, plně zachovaný v PsbQ sekvenční podrodině vyšších rostlin. Arg27 má během 20 ns tři hlavní interakce se zbytkem proteinu. Analýza vodíkových vazeb ukazuje, že Arg27 má řádné vodíkové vazby s Thr46, Glu47 a Glu21. Takto můžeme odhalit, že 2/3

vyskytujících se vodíkových vazeb jsou ve smyčce s Glu21 a 1/3 se šroubovicovitými aminokyselinovými zbytky Thr46 a Glu47. Jako výsledek těchto slabých interakcí se zbytkem proteinu má smyčka mezi Leu13 a Thr34 náhodně svinutou strukturu s odlišně stabilním žlábkem. Přesto je její flexibilita o hodně větší, než jaká je u uspořádané sekundární struktury, což se zdá být důvodem, proč nemůže být struktura rozřešena rentgenovou difrakcí. (Ristvejová a kol. 2006)

Vybroušený model PsbQ odhalí, že jeho monomerní struktura má podlouhlý tvar, který svým vzhledem připomíná protáhlý elipsoid. Celkový tvar je výsledkem přispění dvou různých strukturních oblastí. N-koncová oblast (aminokyselinové zbytky 1–44) a C-terminálního regionu (aminokyselinové zbytky 45–149). C-koncová oblast je složena jako obousměrný čtyř-šroubovicový svazek s krátkými smyčkami spojujícími šroubovice a je podobná té, která byla pozorována v nekompletním modelu stanoveném pro PsbQ z přírodního špenátu. naproti tomu N-koncová oblast, prvně stanovená pro člena PsbQ rodiny je volně sbalená, ukazující protáhlé konformační elementy a dvě krátká β vlákna. Navzdory vysokému rozlišení (1,49 Å) smyčka mezi aminokyselinovými zbytky 14–33 ukázala velikou neuspořádanost a žádná struktura pro tento region nemůže být stanovena. Malý úspěch v rozřešování 3D struktury tohoto sekvenčního fragmentu, ať už byly podmínky pro růst krystalu jakékoli dávat tušit, že vysoká úroveň neuspořádání v této konkrétní smyčce je spojena s její přirozenou flexibilitou, přinejmenším, když je PsbQ volně v roztoku a nechává simulace molekulární dynamikou jako jedinou přijatelnou alternativu ke studiu flexibility chování této smyčky. (Balseira 2005, ref. herein).

Obrázek č. 4 Celková struktura proteinu PsbQ



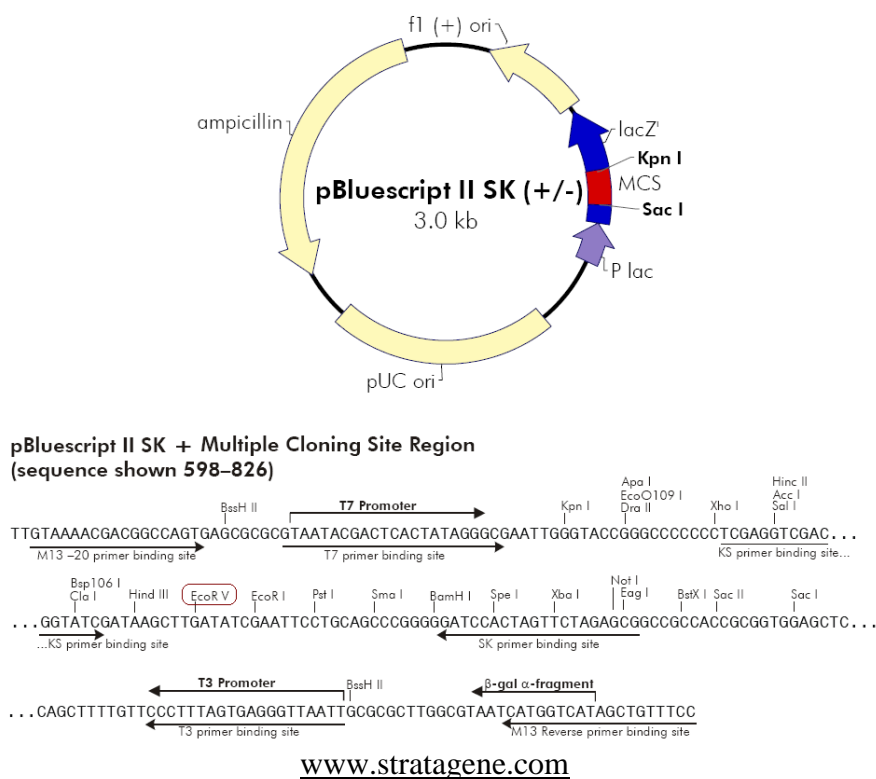
PsbQ po 20 ns molekulární dynamiky při 300 stupních Kelvina. (A) čtyři prolinové aminokyselinové zbytky (zbytky 9–12) vyplňují prostorové rysy sekundární konformační struktury označené jako polyprolinový typ II ve spojení s Pro42, Pro44 a Pro45 formují otevřenou bránu pro aminokyselinové zbytky Asp24 a Ala25 aniž by přímo interagovali s těmito zbytky vodíkovými vazbami. (B) Zachovaná smyčka aminokyselinového zbytku Asp24 ukazuje umístění na té samé straně proteinu jako tři lisylové aminokyselinové zbytky, které jsou pravděpodobně orientovány k lumenálně čelícím vnitřním proteinům PSII. (Ristvejová a kol. 2006)

(Ristvejová a kol. 2006)

2.4. KONSTRUKT REKOMBINANTNÍHO PsbQ PROTEINU

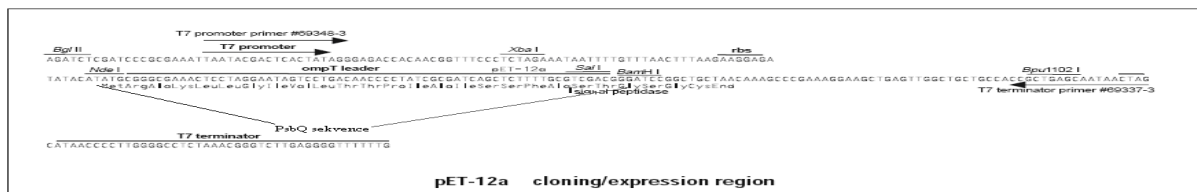
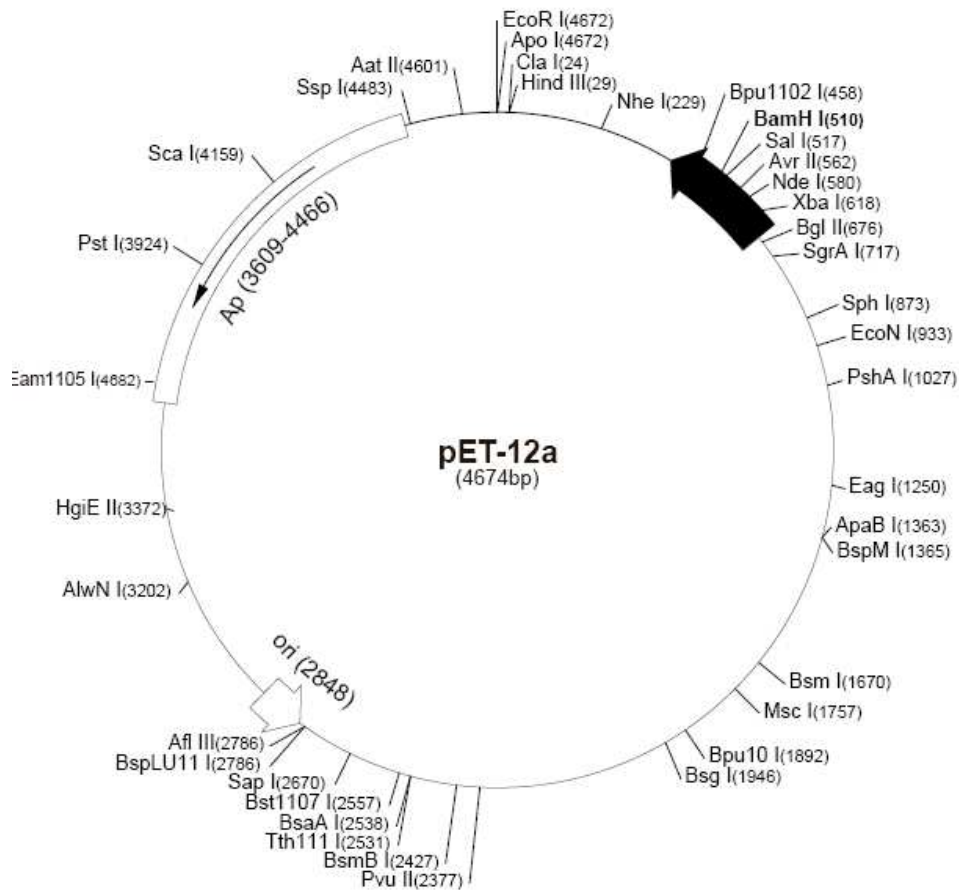
Metody vybrané pro studium struktury PsbQ proteinu vyžadují vysokou koncentraci proteinu, jako i jeho stabilitu. Tyto kritéria splňují rekombinantní proteiny. PsbQ rekombinantní protein byl připraven v laboratoři vedené Juanem B. Arelanem. Díky spolupráci s touto laboratoří v Salamance bylo možné získat plazmidovou DNA obsahující PsbQ sekvenci (JR 2592). Konstrukt byl připraven použitím kódovacího regionu nativního PsbQ proteinu metodou PCR s templátem pSoc16.11 (Balsera 2003). Pro PCR byly použity PCR-primery 5'-CCATATGGAGGCCAGGCCCATCGTTGTT-3' (FW) a 5'-GGGATCCTTAACCGAGCTTGGCAAGAA-3' (RW). Získaný PCR produkt byl vložen do vektoru pBluescript II SK(+) linearizovaném restrikční endonukleázou EcoR V.

Obrázek č. 5 pBluescript II SK (+)



PCR primery obsahují restrikční místa pro restrikční endonukleázy NdeI a BamHI. Po kontrole se PsbQ sekvence pomocí DNA sekvenátoru byla PsbQ sekvence vyštěpena v daných restrikčních místech a vložena do expresního vektoru pET-12a (předštěpený BamHI a NdeI). Daný konstrukt byl pojmenován JR 2592 a přenesen do hostitelského kmene *Escherichia coli* B121 (DE3) pLyS. Buňky byly pojmenovány B96 a uchovány při -20°C.

Obrázek č. 6: pET-12a klonovací/expresní vektor



www.novagene.com

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. MATERIÁL A TECHNICKÉ VYBAVENÍ

3.1.1. Použitý materiál

3.1.1.1. Chemikálie

AGARÓZA	AMPRESCO
AKRYLAMID	SIGMA
ALKALICKÁ FOSFATÁZA	ROCHE
AMPICILIN	DUCHEFA
APS	SERVA
BAKTOAGAR	OXOID
BRILLIANT BLUE - COOMASIE R250	SIGMA
BROMFENOLOVÁ MODŘ	SIGMA
DIHYDROGEN FOSFOREČNAN SODNÝ	PENTA
DUSIČNAN STRÍBRNÝ	SAFINA
EDTA	DUCHEFA
ETANOL	PENTA
ETIDIUMBROMID	SIGMA
FORMALDEHYD	PENTA
GLYCEROL	DUCHEFA
GLYCIN	DUCHEFA
HYDROGEN FOSFOREČNAN SODNÝ	PENTA
HYDROGEN UHLÍČITAN SODNÝ	PENTA
HYDROXID SODNÝ	PENTA
CHLORAMFENIKOL	SERVA
CHLORID HOŘEČNATÝ	PENTA
CHLORID SODNÝ	PENTA
CHLORID VÁPENATÝ	PENTA
IPTG	DUCHEFA
IZOPROPANOL	DUCHEFA
KYSELINA CHLOROVODÍKOVÁ	PENTA
KYSELINA OCTOVÁ	PENTA
LB MEDIUM HIGH SALT	DUCHEFA
LYZOZYM	SERVA
METANOL	PENTA
OCTAN SODNÝ	PENTA
PCR REAKČNÍ SLOŽKY :	
dNTP	STRATAGENE
PRIMERS	SIGMA
Pfu DNA POLYMERÁZA	PROMEGA
PEG 4000	FLUKA
PMSF	FLUKA
PROTEINOVÝ MARKER	BIORAD
RNA-áza A	NEW ENGLAND BIOLABS
RESTRIKČNÍ ENDONUKLEÁZY :	
BamHI	NEW ENGLAND BIOLABS

NdeI	NEW ENGLAND BIOLABS
EcoRV	NEW ENGLAND BIOLABS
SDS	BIO-RAD
SÍRAN AMONNÝ	PENTA
TEMED	SERVA
TETRACYKLÍN	SERVA
THIOSÍRAN SODNÝ	FLUKA
TRIS	DUCHEFA
T4 – DNA ligáza	FERMENTAS
UHLIČITAN SODNÝ	PENTA
VEKTOR pBLUESCRIPT II BSK ⁺	STRATAGENE
X-gal	SERVA
1kbp/100bp LADDER	NEW ENGLAND BIOLABS

3.1.1.2. Zásobní roztoky

AMPICILIN

100 mg/ml v dH₂O

CHLORAMFENIKOL

20 mg/ml v etanolu

TETRACYKLIN

1,25 mg/ml v etanolu

Etidium bromid

10 mg/ml (skladovat v temné nádobě při 4°C)

IPTG

1 mol/dm³

P1 ROZTOK (rozsuspendování buněk)

TRIS-HCl	0,05 mol/dm ³
EDTA	0,05 mol/dm ³
RNA-áza A	1 mg/ml

P2 ROZTOK (lyzační roztok)

NaOH	0,2 mol/dm ³
SDS	1%

P3 ROZTOK (neutralizační roztok)

Octan sodný 3 mol/dm³
pH = 5,5 (ledovou kyselinou octovou)

FENOL : CHLOROFORM

Fenol	50%
Chloroform	50%

TE-TLUMIVÝ ROZTOKTRIS-HCl 0,010 mol/dm³EDTA 0,001 mol/dm³

pH = 8,00

50xTAE - TRIS-ACETÁTOVÝ TLUMIVÝ ROZTOKTRIS 2,00 mol/dm³EDTA 0,05 mol/dm³

pH = 7,8 (ledovou kyselinou octovou)

STOP ROZTOK (pro DNA)EDTA 0,001 mol/dm³

Bromfenolová modř 0,05%

Glycerol 50,00%

Roztok CaCl₂ - MgCl₂CaCl₂ 0,02 mol/dm³MgCl₂ 0,08 mol/dm³**Roztok CaCl₂**CaCl₂ 0,100 mol/dm³TRIS-HCl 0,100 mol/dm³

pH = 8,00

TRIS PUFR (pro rozbití buněk)TRIS-HCl 0,800 mol/dm³EDTA 0,001 mol/dm³

pH = 8,00

TRIS PUFR (pro purifikaci)TRIS-HCl 0,020 mol/dm³EDTA 0,001 mol/dm³

pH = 8,00

TRIS PUFR + 1 M NaCl (pro purifikaci)TRIS-HCl 0,020 mol/dm³EDTA 0,001 mol/dm³NaCl 1,000 mol/dm³

pH = 8,00

FOSFÁTOVÝ PUFR (pro purifikaci)Na₂HPO₄ 0,020 mol/dm³EDTA 0,001 mol/dm³NaCl 1,000 mol/dm³pH = 8,00 (pomocí NaH₂PO₄)**LYZOZYM**

LYZOZYM 10 mg/ml

TRIS-HCl 0,01 mol/dm³

SOLUBILIZAČNÍ ROZTOK (pro proteiny)

DDT	0,1%
Glycerol	25,0%
SDS	5,0%
TRIS-HCl, pH = 8,00	0,6%

SDS-PAGE elektroforéza

HORNÍ PUFŘ (katodový pufr)

TRIS-HCl	0,025 mol/dm ³
Glycin	0,192 mol/dm ³
SDS	0,1%

SPODNÍ PUFŘ (anodový pufr) 100x

TRIS-HCl	2,5 mol/dm ³
----------	-------------------------

pH = 8,3

GELOVÝ PUFŘ (pro separační gel)

TRIS-HCl	1,5 mol/dm ³
----------	-------------------------

pH = 8,8

GELOVÝ PUFŘ (pro zaostřovací gel)

TRIS-HCl	1,0 mol/dm ³
----------	-------------------------

pH = 6,8

Roztok SDS

SDS	10,0%
-----	-------

Roztok APS

APS	10,0%
-----	-------

BARVENÍ S BRILLIANT BLUE - COOMASIE R250

OBARVOVACÍ ROZTOK

RBS-250	0,1%
Metanol	45,0%
Kyselina octová	10,0%

ODBARVOVACÍ ROZTOK

Kyselina octová	7,0%
Metanol	20,0%

BARVENÍ STŘÍBREM

FIXAČNÍ ROZTOK

Etanol	50,00%
Kyselina octová	12,00%
Formaldehyd	0,05%

OBARVOVACÍ ROZTOK

AgNO ₃	0,012 mol/dm ³
Formaldehyd	0,05%

VYVÍJECÍ ROZTOK

Na ₂ CO ₃	0,566 mol/dm ³
Na ₂ S ₂ O ₃	0,000002 mol/dm ³
Formaldehyd	0,05%

ODBARVOVACÍ ROZTOK

UKONČOVACÍ ROZTOK

Etanol	50%
Kyselina octová	12%

PROMÝVACÍ ROZTOK

..	Metanol	50%
----	---------	-----

3.1.1.3. Kultivační média

LB MÉDIUM

Komponenty na 1 litr média (25 g v 1 litru destilované vody)

Kvasničný extrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g

BAKTO AGAR

Komponenty na 1 litr média (25 g v 1 litru destilované vody)

Kvasničný extrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Agar	1% (10 g do 1 litru LB média)

3.1.1.4. Laboratorní kmeny

BL21(DE3)pLysS

E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)[pLysS Cam^r]

XL1-Blue superkompetentní buňky

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

XL1 MRF

Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

3.1.1.5. Komerční kity a chromatografické kolony

KOMERČNÍ KITY

**MAXIPREP
ANION EXCHANGE COLUMNS FOR QUICK PURIFICATION OF
NUCLEIC ACIDS** MACHEREY-NAGEL

**MINIPREP
ZYPPY™ PLASMID MINIPREP I, II KIT** ZYMO-RESEARCH

**ZYMOCLEAN
GEL DNA RECOVERY KIT** ZYMO-RESEARCH

CLEAN & CONCENTRATOR™-25 ZYMO-RESEARCH

CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY

SP SEPHAROSE™ FAST FLOW GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES

SP SEPHAROSE™ FAST FLOW GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES

SUPERDEX 75 COLUMN GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES

3.1.2. Technické vybavení

MIKROVLNKA	CONCEPT
ELEKTROFORETICKÁ APARATURA HORIZONTÁLNÍ	OMNIBIO
ELEKTROFORETICKÁ APARATURA VERTIKÁLNÍ	ATTO
FLOW BOX HELA FLOW 30	HELAGO
CENTRIFUGA 3K30	SIGMA
CENTRIFUGA MIKRO 200R	METTLICH
CENTRIFUGA UNIVERSAL 320R	METTLICH
KOMPRESOR KIF LAB	LABOPORT
MÍCHAČKA ELECTRONIC RÜHER MONO	VARIOMAG
FRENCH PRESS TRIGON- PLUS	THERMO
VÝROBNÍK LEDU AF 100	SCOTSMAN
SPEKTROFOTOMETR V-530	JASCO
TŘEPACÍ INKUBÁTOR	SHEL LAB
PŘEDVÁŽKY 440-33	KERN
pH-Elektroda SenTix 41	WTW
HOTPLATE & STIRRER JENWAY 1000	P-LAB a.s.
TŘEPAČKA TITRAMAX 1000	HEIDOLPH
VORTEX MR 100	HEIDOLPH
MYČKA FAVORIT	AEG ELECTROLUX
PCR MINI CYCLER	MJ RESEARCH
ÄKTA PURIFIER FPLC SYSTEM	GE HEALTHCARE

3.2. METODIKA PRÁCE

3.2.1. Růstová křivka – měření rychlosti růstu bakteriálních kolonií

Bakteriální buňky B96 byly inokulovány do 25 ml LB média s přidavkem Cm (20 µg/ml) a Amp (100 µg/ml). Měření rychlosti růstu bakteriálních kolonií kultury B96 bylo prováděno spektrofotometricky měřením optické hustoty (O.D.) při vlnové délce 600 nm. Monitorování růstu bakteriálních kolonií bylo prováděno v průběhu 8 hodin, v dvouhodinových intervalech. Ze získaných výsledků byla v počítačovém programu Microsoft Excel sestrojena růstová křivka - grafické závislosti $t(\text{hod.})=f(\text{O.D.}(\lambda=600 \text{ nm}))$.

3.2.2. Izolace a vizualizace plazmidové DNA

3.2.2.1. Izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí

Bakteriální buňky získané centrifugací (10000 r.p.m., 10 min., 4°C) z 25 ml noční kultury B96 narostlé v tekutém LB médiu [Amp (100 µg/ml), Cm (20 µg/ml)] byly rozsuspendovány v 2,5 ml vychlazeného roztoku P1, 2,5 ml lyzačního roztoku P2 a 2,5 ml neutralizačního roztoku P3. Směs se inkubovala na ledu 15 minut a následně centrifugovala (12000 r.p.m., 5 min., 4°C). K supernatantu, který byl přenesen do nové zkumavky byl přidán stejný objem roztoku fenol/chloroform (1:1) a zkumavka důkladně promíchána vícenásobným intenzivním třepáním. Směs byla centrifugována (12000 r.p.m., 20 min., 4°C), extrakce a centrifugace byla 2x opakována. Po přidání izopropanolu (0,75 objemu), byla směs 5 minut inkubována na ledě a odlit supernatant. Dvojvláknová DNA byla vysrážena dvěma objemy vychlazeného 99% etanolu (30 - 60 min., -20°C). Po centrifugaci (15000 r.p.m., 10 min., 4°C), byl supernatant odsát, zkumavka postavena na filtrační papír dnem nahoru a všechny kapky etanolu ze stěn zkumavky byly odstraněny. Sraženina DNA byla opatrně promyta vychlazeným 70% etanolem, vysušena ve vakuu a rozpuštěna v 50 µl roztoku TE. Vyizolovaná plazmidová DNA se vizualizovala a porovnávala s plazmidovou DNA elektroforeticky použitím 0,7% agarózového gelu s kontrastní látkou etidium bromid pod UV světlem. Plazmidová DNA (JR2592) byla uchovávána při -20°C.

3.2.2.2. Izolace plazmidové DNA MINIPREPOM

Bakteriální buňky byly získány centrifugací (14000 r.p.m., 1 min., 4°C) z 5 ml noční bakteriální kultury B96. K peletu bylo přidáno 200 µl pufru P1, v němž byly buňky rozsuspendovány. Následovala inkubace na ledu 5 minut. Po přidání 200 µl pufru P2 byla směs opatrně promíchána. Následně bylo přidáno 400 µl pufru P3 opatrně promícháno. Po centrifugaci (14000 r.p.m., 3 min., 4°C) byl supernatant přenesen do Zymo-spin I kolony a centrifugován (14000 r.p.m., 30 s., 4°C). Do kolony bylo přidáno 600 µl promývacího pufru a stočeno na centrifuze (14000 r.p.m., 30 s., 4°C). Tento krok byl proveden 2x. Nakonec bylo na kolonu přidáno 25 µl pufru TE, centrifugováno (14000 r.p.m., 15 s., 4°C), přičemž byl plazmid zachycen ve vymývacím pufru do mikrozukavky. () Vyizolovaná plazmidová DNA se vizualizovala elektroforeticky použitím 0,7% agarózového gelu s kontrastní látkou etidium bromid pod UV světlem.

3.2.2.3. Izolace plazmidové DNA MAXIPREPOM

Bakteriální buňky byly získány centrifugací ze 150 ml noční bakteriální kultury B96. Pelet byl opatrně rozsuspendován v pufru S1+RN-áza A. K suspenzi byl přidán pufr S2 a směs byla opatrně promýchána převrácením centrifugační kyvety. Směs se nechala inkubovat (2 - 3 minuty) při pokojové teplotě. Ke směsi byl přidán pufr S3, směs byla opatrně promýchána a ponechána 5 minut v ledu. Po centrifugaci (15000 r.p.m., 10 min., 4°C) byla suspenze přefiltrována. Následovala kalibrace kolony pufrům N2 (6 ml) a vyčištěný lyzát z předešlého kroku byl nalit do kolony. Kolona byla promyta pufrům N3, následovalo vymytí a získání plazmidové DNA s pufrům N5. Na vysrážení plazmidové DNA byl použit izopropanol při pokojové teplotě. Po centrifugaci (15000 r.p.m., 30 min., 4°C), a odstranění supernatantu a přidání 70% ledově vychlazeného etanolu k peletu. a centrifugováno (15000 r.p.m., 5 min., 4°C). Etanol byl odstraněn a pelet byl vysušen (5 - 10 minut) při pokojové teplotě a znovu rozpuštěn v odpovídajícím množství TE pufru. Vyizolovaná plazmidová DNA se vizualizovala elektroforeticky použitím 0,7% agarózového gelu s kontrastní látkou etidium bromid pod UV světlem.

3.2.2.4. Štěpení JR2592 restričními endonukleázami *BamHI* a *NdeI*

Plazmidová DNA (JR2592) byla linearizována restriční endonukleázou *BamHI*, sekvence *PsbQ* proteinu byla z plazmidu JR2592 vystřižena použitím restričních endonukleáz *BamHI* a *NdeI* (Balsera 2003).

Reakční směs 10 μ l

Plazmidová DNA	1 μ l
Pufr pro enzym	1 μ l
<i>BamHI</i>	1 μ l
dH ₂ O	7 μ l

Reakční směs 10 μ l

Plazmidová DNA	1 μ l
Pufr pro enzymy	1 μ l
<i>BamHI</i> + <i>NdeI</i>	1 + 1 μ l
dH ₂ O	6 μ l

Inkubace 1 hodinu při 37 °C

Výsledek štěpení restričními endonukleázami se analyzoval pomocí elektroforetického dělení v 1% agarózovém gelu (0,5 g agarózy v 50 ml destilované vody) s přídatkem etidium bromidu pod UV.

3.2.3. MUTAGENEZE

3.2.3.1. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* XL1-Blue, XL1 MRF použitím chloridu vápenatého a hořečnatého

Do 25 ml LB média bylo naočkováno 250 µl noční kultury (*Escherichia coli* XL1-Blue, XL1 MRF). Bakteriální kultura se nechala narůst na O.D.₆₀₀ 0,3 - 0,4 při teplotě 37°C. Následně byla bakteriální kultura ochlazená v ledu (30 minut) a centrifugována (7000 r.p.m., 10 min., 4°C). Poté byly bakteriální buňky rozsuspendovány ve vychlazeném sterilním roztoku CaCl₂ - MgCl₂ v 1/5 (5 ml) původního objemu a inkubovány 5 minut v ledu. Po opětovné centrifugaci (7000 r.p.m., 10 min., 4°C) byly buňky rozsuspendovány v 1/25 (1 ml) původního objemu bakteriální kultury ve vychlazeném sterilním roztoku CaCl₂.

3.2.3.2. Transformace buněk *Escherichia coli* XL1-Blue plazmidem JR2592

Takto připravené bakteriální buňky byly rozděleny (po 100 µl) do vychlazených ependorfových zkumavek a bylo přidáno (po 1 µl) plazmidové DNA v TE. Směs byla ponechána v ledu 30 minut. Poté byly zkumavky ponořeny (na 45 s.) do vodního termostatu vytemperovaného na 42°C (tepelný šok) a potom 2 minuty ochlazeny v ledě. Následně bylo přidáno (po 800 µl) LB média do každé zkumavky a směs se nechala inkubovat v teplovzdušném termostatu při 37°C 1 hodinu. Bakteriální buňky byly vysety na vytemperované LB agarové platny [Amp (100 µg/ml) a Cm (20 µg/ml)] a inkubovány v teplovzdušném termostatu při 37°C až do vyrostení jednotlivých bakteriálních kolonií.

3.2.3.3. Příprava mutace pomocí PCR-Quick site direct mutagenesis kit

Na přípravu mutantů byla použita metoda PCR s použitím kitu Quick site direct mutagenesis kit, se kterou můžeme získat mutanty s výtěžností 80%. Při PCR byly použity primery obsahující mutaci z Trp na Tyr a z Trp na Phe.

Forward primer z Trp na Tyr (FM Y):

5'-AGGAAGGCATATCCATCTCTAC-3'

Reverse primer z Trp na Tyr (RM Y):

5'-GTAGAGATGGATTGCCTTCCTG-3'

Forward primer z Trp na Phe (FM F)

5'-AGGAAGGCATTCCATCTCTAC-3'

Reverse primer z Trp na Phe (RM F):

5'-GTAGAGATGGGAAATTGCCTTCCTG-3'

Reakční směs

Obsah reakčních složek v 50 µl:

Pufr pro <i>Pfu</i> DNA-high fidelity polymerázu	5,0 µl
dNTP	2,5 µl
<i>Pfu</i> DNA-high fidelity polymeráza	0,5 µl
DNA	2,0 µl
forward primer FM	1,5 µl
reverse primer RM	1,5 µl
dH ₂ O	37,0 µl

Teplotně-časový profil PCR (manuál Quick site direct mutagenesis kit)

Úvodní denaturace	94°C	1 min.	
Denaturace	94°C	1 min.	
Nasednutí	60°C	1 min.	10x
Prodloužení	72°C	10 min.	
Denaturace	94°C	1 min.	
Nasednutí	55°C	1 min.	10x
Prodloužení	72°C	10 min.	

Získané PCR produkty se analyzovaly pomocí elektroforetického dělení v 1% agarózovém gelu s přidavkem etidium bromidu pod UV světlem. PCR produkt byl podroben štěpení restriční endonukleázou *DpnI* (odstranění původní plazmidové DNA) a byl přenesen do buněk kmenu *Escherichia coli* XL1-Blue.

3.2.3.4. Příprava mutace pomocí PCR-metodou tzv. Overlap extension

3.2.3.4.1. PCR reakce

Na přípravu mutantů byla použita metoda PCR tzv. Overlap extension. Použitím dané metodiky se získala sekvence s mutací ve třech krocích. Při PCR byly použity primery obsahující mutaci z Trp na Tyr a z Trp na Phe a primery pro získání celé sekvence PsbQ proteinu (Balsera 2003).

Forward primer z Trp na Tyr (FM Y):

5'-AGGAAGGCATATCCATCTCTAC-3'

Reverse primer z Trp na Tyr (RM Y):

5'-GTAGAGATGGATTGCCTTCCTG-3'

Forward primer z Trp na Phe (FM F)

5'-AGGAAGGCATTCCATCTCTAC-3'

Reverse primer z Trp na Phe (RM F):

5'-GTAGAGATGGGAAATTGCCTTCCTG-3'

Forward primer z (F)
5'-CCATATGGAGGCCAGGCCCATCGTTGTT-3'
Reverse primer z (R)
5'-GGGATCCTTAACCGAGCTTGGCAAGAA-3'

1. PCR: (F) + (RM)
2. PCR: (R) + (FM)

Reakční směs

Obsah reakčních složek v 100 µl:

Pufr pro <i>Pfu</i> DNA polymerázu	10 µl
dNTP	5 µl
<i>Pfu</i> DNA polymeráza	1 µl
DNA	1 µl
forward primer (F)	6 µl
reverse primer (RM)	6 µl
dH ₂ O	71 µl

Teplotně - časový profil PCR

Úvodní denaturace	94°C	5 min.	
Denaturace	94°C	1 min.	
Nasednutí	55°C	1 min.	30x
Prodloužení	72°C	3 min.	
Prodloužení	72 °C	10 min.	

Získané PCR produkty se analyzovaly pomocí elektroforetického dělení v 1% agarózovém gelu s přidávkem etidium bromidu pod UV. PCR produkty byly získány z agarózového gelu pomocí kitu Zymoclean gel DNA recovery kit a použité při třetí PCR reakci jako templát.

3. PCR (F) + (R)

Reakční směs

Obsah reakčních složek v 100 µl:

Pufr pro <i>Pfu</i> DNA polymerázu	10 µl
dNTP	5 µl
<i>Pfu</i> DNA polymeráza	1 µl
DNA (PCR/1 + PCR/2)	10 µl
forward primer (F)	6 µl
reverse primer (R)	6 µl
dH ₂ O	62 µl

Teplotně - časový profil PCR

Úvodní denaturace	94°C	5 min.	
Denaturace	94°C	1 min.	
Nasednutí	55°C	1 min.	30x
Prodloužení	72°C	3 min.	
Prodloužení	72°C	10 min.	

Získaný PCR produkt se analyzoval pomocí elektroforetického dělení v 1% agarózovém gelu s přídatkem etidium bromidu pod UV světlem.

3.2.3.4.2. Linearizace vektoru pBluescript II SK(+) restriční endonukleázou *EcoRV*

K naklonování zmutované sekvence *PsbQ* byl vybrán vektor pBluescript II SK(+), který byl linearizován restriční endonukleázou *EcoRV*.

Reakční směs 10 µl

Plazmidová DNA	1 µl
Pufr pro enzym	1 µl
<i>EcoRV</i>	1 µl
dH ₂ O	7 µl

Inkubace 1 hodinu při 37 °C

Výsledek linearizace se analyzoval pomocí elektroforetického dělení v 1% agarózovém gelu s přídatkem etidium bromidu pod UV. Linearizovaný produkt byl z gelu získán pomocí kitu Zymoclean gel DNA recovery kit.

3.2.3.4.3. Defosforylace linearizovaného vektoru pBluescript II SK(+)

Pro zvýšení účinnosti vložení mutované *PsbQ* sekvence do vektoru pBluescript II SK(+) byly tupé konce linearizovaného vektoru defosforylovány alkalickou fosfatázou.

Reakční směs 20 µl

Vektor pBluescript II SK(+)	10 µl
Pufr pro alkalickou fosfatázu	2 µl
Alkalická fosfatáza	2 µl
dH ₂ O	6 µl

Inkubace 1 hodinu při 37 °C

3.2.3.4.4. Ligace PsbQ sekvence do linearizovaného vektoru pBluescript II SK(+)

Po defosforylaci linearizovaného vektoru pBluescript II SK(+) byl k reakční směsi přidán přečištěný PCR produkt 3 (mutovaná sekvence PsbQ) a T4 DNA ligáza.

Reakční směs 30 μ l	
Defosforylovaný vektor	20 μ l
Pufir pro T4 DNA ligázu	3 μ l
T4 DNA ligáza	1 μ l
PEG 4000 (50%)	3 μ l
dH ₂ O	3 μ l
Inkubace 2 hodiny při 4 °C	

3.2.3.4.5. Transformace buněk *Escherichia coli* XL1 MRF ligační směsí

Ke kompetentním bakteriálním buňkám XL1 MRF byla přidána ligační směs (po 10 μ l). Směs byla ponechána v ledu 30 minut. Poté byly zkumavky ponořeny (na 45 s.) do vodního termostatu vytemperovaného na 42°C (tepelný šok) a potom 2 minuty ochlazeny v ledě. Následně bylo přidáno (po 800 μ l) LB média do každé zkumavky a směs se nechala inkubovat v teplovzdušném termostatě při 37°C 1 hodinu. Bakteriální buňky byly vysety na vytemperované LB agarové platny [Amp (100 μ g/ml) a Tet (12 μ g/ml)] s přídatkem 2% X-gal a 10 mM IPTG a inkubovány v teplovzdušném termostatě při 37°C až do vyrostení jednotlivých bakteriálních kolonií.

Molecular Cloning a laboratory manual Sambrook J., Russell D.W., Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York, 2001

3.2.5. Izolace rekombinantního proteinu PsbQ

3.2.5.1. Indukční test

Bakteriální buňky B96 obsahující plazmid JR 2592 se nechaly narůst ve 200 ml LB média obohaceného antibiotiky (Amp 100 μ g/ml, Cm 20 μ g/ml). Když optická hustota kultury dosáhla hodnoty 0,6 při $\lambda = 580$ nm, byla exprese rekombinantního proteinu PsbQ iniciována přidáním různé koncentrace IPTG (0 mM – kontrola, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). Bakteriální buňky byly sklizeny po 18 hodinové inkubaci při 30°C a po 3 hodinové inkubaci při 37°C. Poté byla kultura centrifugována (10000 r.p.m., 10 min., 4°C). Následně byly rozsuspendovány v TRIS pufru (pro rozbití buněk) + lyzozym (0,1 mg/ml). Po 5 minutové sonifikaci byly vzorky centrifugovány (10000 r.p.m., 10 min., 4°C) a následně analyzovány SDS-PAGE elektroforézou.

3.2.5.2. Izolace proteinu PsbQ

3.2.5.2.1. Rozbití buněk B96

Bakteriální buňky B96 obsahující plazmid JR2592 se nechaly narůst ve 200 ml LB média obohaceného antibiotiky [Amp (100 μ g/ml) a Cm (20 μ g/ml)]. Když optická hustota kultury dosáhla hodnoty 0,6 při $\lambda = 580$ nm, exprese rekombinantního proteinu PsbQ byla

iniciována přidáním 1mM IPTG. Bakteriální buňky byly sklizeny po 18 hodinové inkubaci při 30 °C centrifugací (10000 r.p.m., 10min., 4°C). Následně byly rozsuspendovány v TRIS pufru (pro rozbití buňek) a rozbité pomocí French-pressu. Pro odstranění nerozbitého materiálu centrifugací (10000 r.p.m., 10 min., 4°C) byl supernatant odebrán a protein PsbQ vysrážen síranem amonným (do 70% saturace). Sraženina obsahující PsbQ protein byla rozsuspendována v TRIS pufru (pro purifikaci) a dialyzována v daném pufru přes noc při 4°C. Nerozpustný materiál byl odstraněn centrifugací (15000 r.p.m., 45 min., 4°C).

3.2.5.2.2. Iontová chromatografie

Supernatant obsahující PsbQ protein byl nanesen na kolony DEAE Sepharose + SP Sepharose, které byly nakalibrovány pufrům TRIS (pro purifikaci). PsbQ protein byl vymyt z kolony SP Sepharose lineárním gradientem NaCl do koncentrace 0,4 M v průběhu 20 minut při průtoku přes kolonu 2 ml/min.. Frakce obsahující PsbQ protein byly sesbírány, promyty fosfátovým pufrům a zakoncentrovány použitím centrikonu Amicom Ultra (10000 MWCO).

3.2.5.2.3. Gelová Filtrace

Zakoncentrované frakce PsbQ byly následně naneseny na kolonu Superdex 75, kalibrované fosfátovým pufrům s průtokem přes kolonu 0,2 ml/min.. Frakce obsahující PsbQ protein byly sesbírány a analyzovány SDS–PAGE elektroforézou.

3.2.5.3. Analýza vzorků použitím SDS-PAGE elektroforézy

Podle návodu byla sestavena elektroforetická aparatura. Následovala příprava gelu s obsahem akrylamidu v separačním gelu 12% a zaostřovacím gelu 5%. Po zpolymerizování gelu byly naneseny vzorky solubilizované v solubilizačním roztoku (pro proteiny). Separace proteinů trvá při 20 V 60 minut. Pro analýzu byl použit proteinový marker.

10 ml separační gel 12%
3,3 ml dH₂O
4,0 ml 30% AA
2,5 ml Gelový pufr (pro separační gel)
0,1 ml 10% SDS
0,1 ml 10% APS
10 µl TEMED

3 ml zaostřovací gel 5%
2,1 ml dH₂O
0,5 ml 30% AA
0,38 ml Gelový pufr (pro zaostřovací gel)
0,03 ml 10% SDS
0,03 ml 10% APS
3 µl TEMED

3.2.5.3.1. Barvení stříbrem

Polyakrylamidový gel byl po proběhnutí elektroforézy vložen do fixačního roztoku na 1 hodinu. Následně byl 3x promýván roztokem 50% metanolu v daných intervalech (5 min., 10 min., 15 min.). Po promytí roztokem 0,8 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a destilovanou vodou byl gel obarvován v obarvovacím roztoku po dobu 20 minut. Po promytí destilovanou vodou následovalo vyvíjení ve vyvíjecím roztoku, které bylo ukončeno odbarvovacím roztokem.

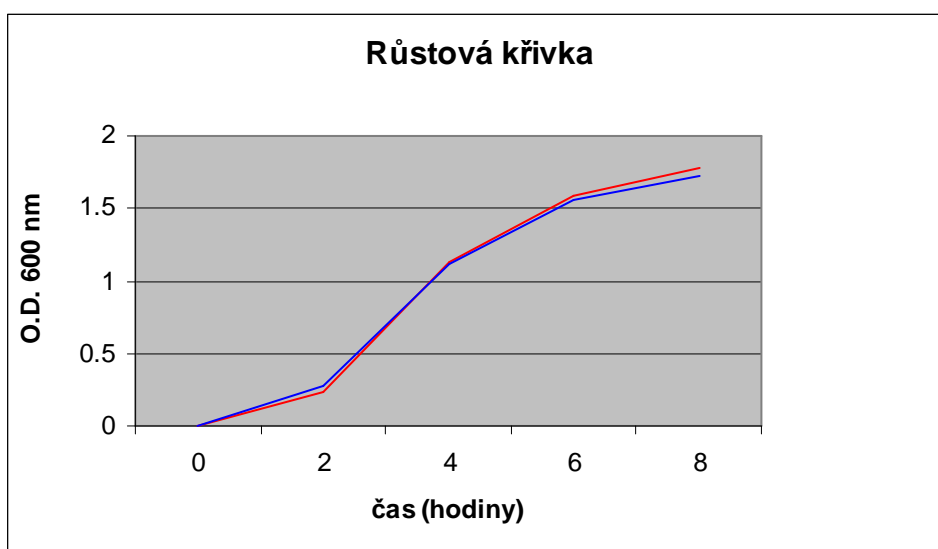
3.2.5.3.2. Barvení použitím Coomasie-Blue R250

Polyakrylamidový gel byl po proběhnutí elektroforézy vložen do barvicího roztoku obsahujícího Coomasie-Blue R250 na dobu 20 minut. Po inkubaci v odbarvovacím roztoku bylo možné analyzovat proteinové vzorky.

4. VÝSLEDKY

4.1. RŮSTOVÁ KŘIVKA - MĚŘENÍ RYCHLOSTI RŮSTU BAKTERIÁLNÍCH KOLONIÍ

Na sledování růstu bakteriálních buněk B96 se použilo spektrofotometrické měření optické hustoty (O.D.) při vlnové délce 600 nm. Monitorováním růstu buněk v LB médiu [Amp (100 µg/ml), Cm (20 µg/ml)] v průběhu 8 hodin, v dvouhodinových intervalech se sestrojily růstové křivky - grafické závislosti $t(\text{hod.})=f(\text{O.D.}_{(\lambda=600 \text{ nm})})$, které charakterizují vitalitu bakteriálních buněk B96.



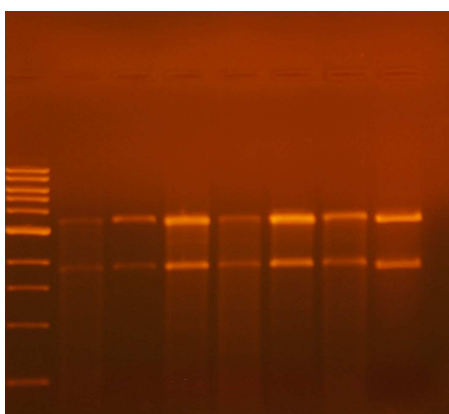
Graf č.1: Růstová křivka kultury B96: grafická závislost $t(\text{hod.})=f(\text{O.D.}_{(\lambda=600 \text{ nm})})$,

Z dané závislosti je zřejmé, že při O.D. = 0,6 začíná exponenciální růst.

4.2. IZOLACE A VIZUALIZACE PLAZMIDŮ

4.2.1. Izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí, MINIPREPOM a MAXIPREPOM

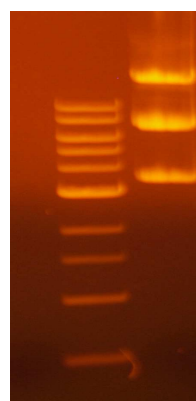
Použitím tří různých metod byla získána plazmidová DNA z buněk B96, tzv. plazmid JR2592. Kvalita plazmidové DNA závisí na způsobu izolace a proto pro další experimenty se využívala plazmidová DNA izolovaná MINIPREPOM a nebo MAXIPREPOM.



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.

Obrázek č.7: Plazmidová DNA JR2592 izolovaná MINIPREPOM.

1. 1 kbp ladder
2. - 8. JR2592



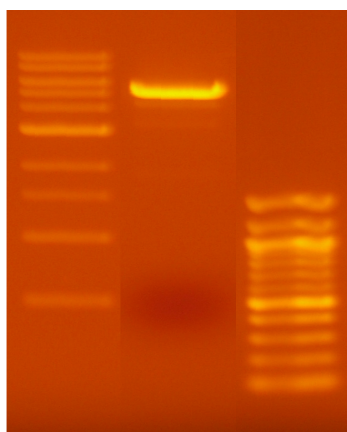
1. 2.

Obrázek č.8: Plazmidová DNA JR2592 izolovaná MAXIPREPOM.

1. 1 kbp ladder
2. JR2592

Z plazmidových profilů není možno určit velikost plazmidu JR2592, protože cirkulární a superhelikální formy mají jinou pohyblivost v agarózovém gelu, než lineární formy DNA (použité v 1 kbp ladder). Z tohoto důvodu byla plazmidová DNA naštěpena restriční endonukleázou *Bam*HI.

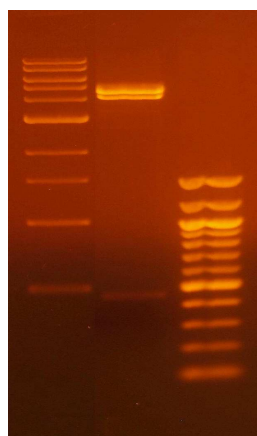
4.2.2. Štěpení JR2592 restričními endonukleázami



1. 2. 4.

Obrázek č.9: Linearizace plazmidu JR2592.

1. 1 kbp ladder
3. JR 2592 + *BamHI*
5. 100 bp ladder



1. 2. 3.

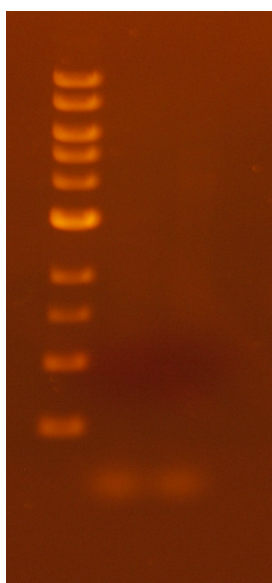
Obrázek č.10: Štěpení plazmidu JR2592 restričními endonukleázami *BamHI* + *NdeI*.

1. 1 kbp ladder
2. JR2592 + *BamHI* + *NdeI*
3. 100 bp ladder

Z plazmidového profilu je patrné, že velikost vektoru JR2592 je okolo 5000 bp (5120 bp). Jelikož primery obsahovaly štěpné místo pro *BamHI* a *NdeI* restriční endonukleázy pro vyštěpení *PsbQ* sekvence byly použity právě tyto restriční enzymy. Velikost *PsbQ* sekvence je mezi 400 – 500 bp (446 bp).

4.3. MUTAGENEZE

4.3.1. Příprava mutace pomocí PCR-Quick site direct mutagenesis kit



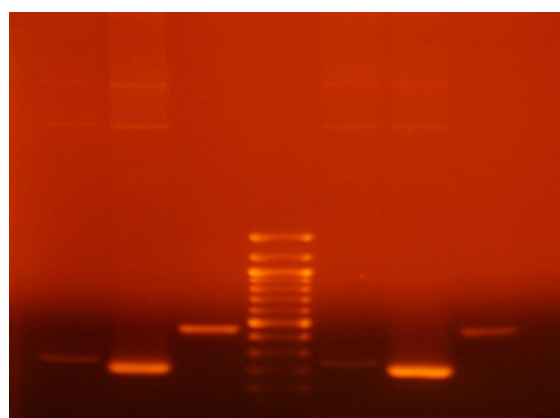
Obrázek č.11: PCR produkty z přípravy mutace použitím Quick site direct mutagenesis kitu.

1. 1 kbp ladder
2. PCR/ mutace Trp na Tyr
3. PCR/ mutace Trp na Phe

1. 2. 3.

Z analýzy PCR produktů mutagenese pomocí Quick site direct mutagenesis kitu je zřejmé, že nedošlo k amplifikaci celé plazmidové DNA, z tohoto důvodu byla v provedena mutagenese metodou tzv. Overlap extension.

4.3.2. Příprava mutace pomocí PCR-metodou tzv. Overlap extension

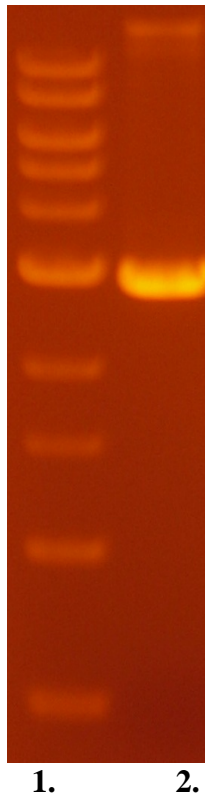


Obrázek č.12: PCR produkty mutací použitím metody tzv. Overlap extension.

1. PCR/2 mutace Trp na Phe
2. PCR/1 mutace Trp na Phe
3. PCR/3 mutace Trp na Phe
4. 1 kbp ladder
5. PCR/ 2 mutace Trp na Tyr
6. PCR/ 1 mutace Trp na Tyr
7. PCR/ 3 mutace Trp na Tyr

PCR produkty/3 (PCR/3) byly následně použity v ligaci s linearizovaným vektorem

4.3.2.1. Linearizace vektoru pBluescript II SK(+) restriční endonukleázou *EcoRV*



Obrázek č.13: Linearizace vektoru pBluescript II SK(+).

1. 1 kbp ladder
2. Vektor pBluescript II SK(+) + *EcoRV*

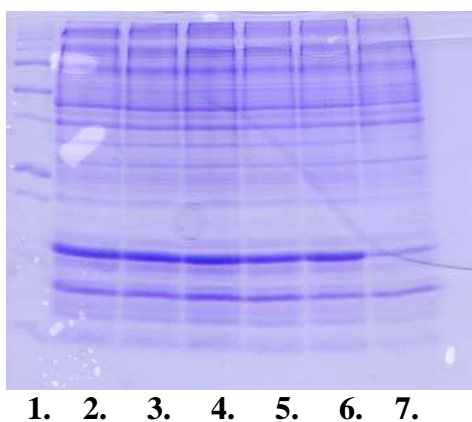
Velikost vektoru pBluescript II SK(+) je 3000 bp (2961 bp). Linearizovaný vektor byl z gelu přečištěný pomocí Zymoclean recovery kitu a použité v ligaci s PCR produktem/3 (PCR/3) .

4.3.2.2. Transformace buněk *Escherichia coli* XL1 MRF ligační směsí

Kompetentní buňky XL1 MRF byly transformovány ligační směsí a inkubovány na LB platnách obohacené 10mM IPTG a 2% X-gal, což umožnilo tzv. modro-bílou selekci. Vektor pBluescript II SK(+) bez mutované *PsbQ* sekvence obsahuje gen *lacZ*, takže buňky produkují β -galaktozidázu rozkládající X-gal, což se projeví modrým zbarvením. Vložení *PsbQ* mutované sekvence do genu *lacZ* nedochází k produkci β -galaktozidázi, z čehož vyplývá, že kolonie jsou bílé. Po izolaci plazmidu z bílých kolonií bude plazmidová DNA podrobena analýze použitím sekvenátoru.

4.4. IZOLACE PSBQ

4.4.1. Indukční test

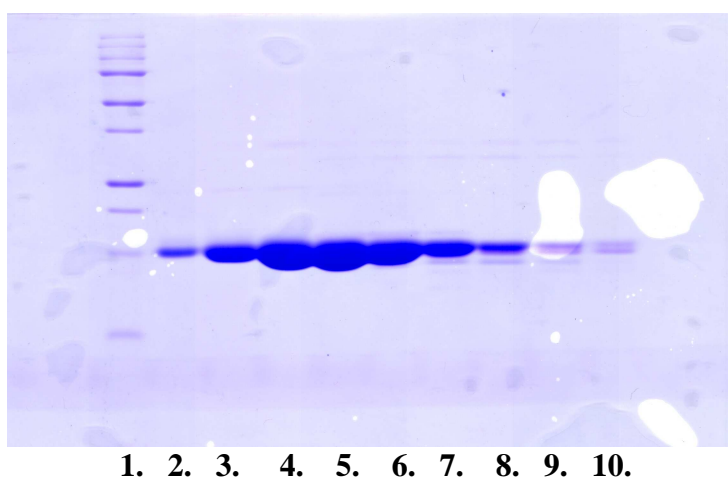


Obrázek č.14: Indukční test při 37°C.

1. 1 kbp ladder
2. 0,5 mM IPTG
3. 1 mM IPTG
4. 5 mM IPTG
5. 10 mM IPTG
6. 20 mM IPTG
7. 0 mM IPTG

V počátečním bodě exponenciální fáze bylo přidáno IPTG o různých koncentracích. Po analýze vzorku pomocí SDS-PAGE se ukázalo, že zvyšování koncentrace IPTG výrazně neovlivňuje expresi proteinu. Při indukci 30°C byly výsledky shodné. Pro indukci proteinu se zvolila indukce 1 mM IPTG při 30°C 18 hodin, s ohledem na další kroky purifikace.

4.4.2. Iontová chromatografie

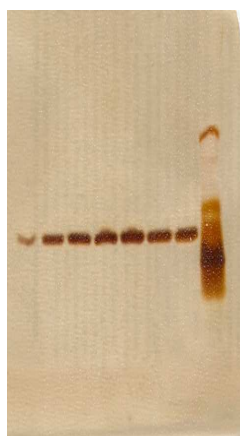


Obrázek č.15: Iontová chromatografie.

1. 1 kbp ladder
2. – 10. Frakce eluované z SP kolony lineárním gradientem.

Frakce získané eluováním z SP kolony byly zakonzentrovány a protein přečištěn na Superdex 75 koloně.

4.4.3. Gelová filtrace



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.

Obrázek č.16: Gelová filtrace.

1. – 7. Frakce z Superdex 75

8. marker

Čistota proteinu PsbQ se potvrdila analýzou proteinových frakcí ze Superdex kolony použitím gelů barvených stříbrem.

Metodika použitá na přečištění PsbQ proteinu se bude následně používat na přečištění mutantů PsbQ.

5. DISKUZE

Cílem této bakalářské práce bylo přispět k celkovému objevení struktury PSII, potažmo i celkovému fungování fotosyntetické reakce. Nejdůležitější částí byla manipulace s proteinem PsbQ, u kterého se předpokládá, že hraje důležitou roli v kyslík-vyvíjejícím komplexu během procesu oxidace vody. V našem případě bylo pracováno s rekombinantním proteinem PsbQ, tedy s proteinem, neexprimovaným v původním druhu (špenát), nýbrž ve vybraném bakteriálním druhu. Rekombinantní protein je možno získat ve vyšší koncentraci (dostatečné pro měření fyzikálními metodami), stabilitě (protein musí být časově stálý, tudíž musí vydržet v nativní formě alespoň několik dní) a čistotě (eliminace nepřesných údajů).

Při rekombinantní expresi je důležité, aby daný bakteriální kmen, v našem případě kmen *Escherichia coli* měl dobrou vitalitu, což zaručuje úspěšnost exprese rekombinantního proteinu a proto je potřeba najít vhodný kmen a optimalizovat podmínky jeho růstu. Pro tento účel byly vybrány bakteriální buňky *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS, neboť předběžné pokusy na pracovišti potvrdily, že se jedná o vhodný druh k expresi PsbQ proteinu.

První částí našich pokusů bylo sestavení růstové křivky bakteriální kultury B96, obsahující PsbQ sekvenci, pomocí které jsme zjišťovali vitalitu bakteriálních buněk B96. Byly odebírány vždy dva vzorky po dvouhodinových intervalech v průběhu 8 hodin, u kterých byla měřena optická hustota na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Dvě růstové křivky získané z naměřených dat byly vůči sobě ve velmi dobré shodě. Celkový tvar křivky odpovídá ideálnímu tvaru růstové křivky, jež obsahuje šest různých fází: lag fáze, fáze zrychleného růstu, fáze exponenciálního růstu, fáze zpomaleného růstu, fáze stacionární a fáze odumírání buněk. Všechny tyto fáze jsou v uvedeném grafu dobře patrné vyjma lag fáze, neboť ta trvá přibližně prvních 20 minut a fáze zrychleného růstu, jelikož by odebírané vzorky musely být v menších časových intervalech, což má negativní vliv na další růst buněk B96. Okolo 8 hodiny růstu začíná fáze stacionární, tudíž se měření dat neprovádělo. Výsledky indikují dobrou vitalitu buněk B96 a tudíž byla v dalších experimentech použita právě tato kultura.

Z růstové křivky nám bylo umožněno určit začátek exponenciální fáze, tudíž počátek indukce exprese rekombinantního proteinu PsbQ (O.D = 0,6 po 3 hod.). Proto abychom zjistili, jaká koncentrace IPTG a teplota kultivace je nejlepší pro expresi proteinu PsbQ v buňkách B96 bylo nutné optimalizovat koncentraci IPTG a vhodnou teplotu. Srovnáním produkce PsbQ proteinu v kontrole – bez přídavku IPTG s produkcí PsbQ proteinu v buňkách indukovaných odlišnými koncentracemi IPTG je možné určit zдалipak koncentrace IPTG ovlivňuje expresi proteinu a do jaké míry. Po analýze vzorku pomocí SDS-PAGE se ukázalo, že zvyšování koncentrace IPTG výrazně neovlivňuje produkci PsbQ proteinu, jako i to, že výsledky při indukci při 30°C a 37°C byly shodné. Pro indukci proteinu se zvolila indukce 1 mM IPTG při 30°C 18 hodin, s ohledem na další kroky purifikace.

Je všeobecně známo, že kroky čištění proteinu podléhají vlastnostem daného proteinu, jako jsou rozpustnost, stabilita v daných pufrch a při dané teplotě. PsbQ protein je stabilní při 4°C ve fosfátovém, jako i v Trisovém pufru. Na uskladnění při -20°C se však jako vhodným kandidátem stal právě fosfátový pufr, což ovlivnilo i výběr pufrů použitých při purifikaci PsbQ proteinu. Vhodnou metodou na získání PsbQ proteinu se stala iontová chromatografie, která umožní rozdělení proteinu na základě rozdílného izoelektrického bodu. Nanesením proteinového roztoku na DEAE + SP kolonu bylo umožněno lepší prvotní pročištění PsbQ proteinu od ostatních proteinových zbytků, které byly navázány na DEAE koloně. Rekombinantní protein PsbQ se navázal na SP kolonu, z které byl eluován přídavkem soli NaCl. Frakce z SP kolony byly zakoncentrovány a PsbQ přečištěn na Superdex 75 koloně, která zároveň posloužila na výměnu Trisového pufru za pufr fosfátový. Z výsledků analýzy vzorků pomocí SDS-PAGE a velmi citlivou metodou barvení stříbrem vyplývá, že

byly získány požadované frakce o dostatečné čistotě, které se lišily jenom koncentrací. Optimalizaci čištění proteinu byl získán PsbQ protein o koncentraci 10 mg/ml stabilní při -20°C ve fosfátovém pufru několik týdnů. Pročištěný protein byl použit na strukturní analýzu fyzikálními metodami (FTIR, Raman spektroskopie,...). Z výsledků se ukázalo jako vhodnou metodou na zkoumání interakčních míst mezi PsbP a PsbQ proteinů právě Ramanova spektroskopie. Tato metoda je citlivá na tryptofan, jehož aromatický kruh má detekovatelné dýchací vibrace a může tudíž sloužit jako značka. Přípravou vhodných mutací na tryptofan v okolí předpokládaných interakcí by bylo možné zkoumat tyto interakce právě metodou Ramanovy spektroskopie. V první řadě je však zapotřebí odstranit signál tryptofanu umístěného v 71. pozici PsbQ proteinu a pak vložit tryptofan do blízkosti předpokládané oblasti interakce PsbQ proteinu s proteinem PsbP. Pro mutagenezi byly na základě výsledků z počítačového modelování a předpovědi interakcí těchto proteinů, provedeného kolegy na pracovišti, vybrány aminokyseliny fenylalanin a tyrozin, které by měly původní strukturu ovlivňovat nejméně, resp. by neměly nastat výrazné změny v struktuře PsbQ jako i v jeho stabilitě.

Pro mutagenezi je velmi kritická stabilita DNA, v našem případě plazmidové DNA-JR2592. Proto bylo zapotřebí vybrat nejvhodnější metodu izolace JR2592. První používaná metoda, tzv. metoda alkalickou lyzí se ukázala jako nevyhovující, neboť při této metodě nebyl vyizolovaný plazmid JR2592 v dostatečné čistotě a na gelu byly patrné tzv. šmouhy. Z tohoto důvodu byly upřednostněny komerčně dodávané kity, jejichž výhodou je, že obsahují vše potřebné a také s jejich pomocí lze snadno a rychle připravit dostatečné množství požadované plazmidové DNA v dobré kvalitě. Při výzkumu byly používány kity MINIPREP, nebo MAXIPREP. Takto získaná plazmidová DNA už postačovala našim záměrům a bylo s ní nadále pracováno.

Jelikož mají plazmidové formy, jako např. superhelikální a cirkulární různou pohyblivost v agarózovém gelu, narozdíl od formy lineární byl za účelem zjištění velikosti plazmidu JR2592 plazmid naštěpen restrikcími endonukleázami. V prvním případě byl plazmid naštěpen restrikcí endonukleázou *BamHI* a jako laddery byly použity 100 bp a 1 kbp ladder. Z výsledků vyplývá, že velikost vektoru JR2592 je okolo 5000 bp, což dobře odpovídá skutečné velikosti, která je 5120 bp. Protože primery obsahovaly také štěpné místo pro *NdeI* restrikcí endonukleázu byl plazmid JR2592 také naštěpen restrikcími endonukleázami *BamHI* a *NdeI*, čímž bylo potvrzeno, že velikost sekvence PsbQ je mezi 400 – 500 bp, což také dobře odpovídá, neboť jeho skutečná velikost je 446 bp.

Pro mutagenezi byl vybrán komerční kit tzv. PCR-Quick site direct mutagenesis kit. Kit obsahuje *Pfu* DNA High Fidelity polymerázu, která umožňuje mutace provádět přímo na plazmidové DNA. Z výsledků však vyplývá, že u této metody nedošlo k amplifikaci celé plazmidové DNA a z tohoto důvodu byla provedena mutageneze pomocí metody tzv. Overlap extension. V tomto případě se mutageneze povedla ve třech krocích a získané PCR produkty s danou mutací byly z agarózového gelu následně získány použitím Zymoclean recovery kitu a použité v ligaci s linearizovaným vektorem pBluescript II SK(+). Při linearizaci vektoru pBluescript II SK(+) restrikcí endonukleázou *EcoRV* jsme zjistili, že velikost vektoru je asi 3000 bp, což odpovídá skutečné velikosti, která činí 2961 bp. Linearizovaný vektor byl z gelu přečištěný pomocí Zymoclean recovery kitu a použit v ligaci s PCR produktem s mutací tryptofanu na fenylalanin anebo tyrozin.

Po transformaci buněk *Escherichia coli* XL1 MRF ligační směsí a jejich inkubaci na LB platnách obohacené 10 mM IPTG a 2% X-gal (tzv. modro-bílou selekce) se bílé kolonie (s pBluescriptem obsahující mutovanou PsbQ sekvencí) nakultivují a izolovaná plazmidová DNA se podrobí analýze na sekvenátoru. Jelikož pBluescript není expresní vektor, je zapotřebí PsbQ mutovanou sekvencí překlónovat do vektoru umožňujícího vysokou expresi proteinu, v našem případě je to vektor použitý na expresi PsbQ proteinu a tedy vektor

pET-12a. Následnou transformací buněk *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS JR2592 plazmidem s mutací získáme buňky schopné produkovat náš požadovaný mutant. Jeho pročištění bude provedeno podle metodiky čištění rekombinantního proteinu PsbQ.

6. ZÁVĚR

Metodický cíl

Závěrem bych chtěl konstatovat, že cíle, které se týkaly metodické části byly splněny. Všechny metody popsané v metodické části jsem si vyzkoušel nejprve pod odborným dohledem a posléze i zcela samostatně a získal jsem dobré teoretické a praktické zkušenosti, které se mi v budoucnu budou hodit ať už při mém dalším studiu, nebo eventuálně při hledání uplatnění na trhu práce.

Vědecký cíl

Cílem práce byla purifikace PsbQ rekombinantního proteinu a příprava mutací tryptofanu v 71. pozici PsbQ na fenylalanin anebo tyrozin. Popsanou metodikou purifikace PsbQ jsme získali protein stabilní ve fosfátovém pufru při -20°C s koncentrací 10 mg/ml. Daný protein byl použit na strukturní analýzu použitím fyzikálních metod. Mutovaná sekvence PsbQ bude analyzována pomocí sekvenátoru a mutanty následně připraveny budou použité na studium interakcí proteinů PsbP a PsbQ. Studium struktury jako i interakcí pomůže k celkové studii procesu v kyslík-vyvíjejícím komplexu.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PSII	fotosystém II
ATP	adenosintrifosfát
CAM	Crassulaceae acid metabolismus
Lhcb	světlosběrné antény
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
OEC	kyslík-vyvíjející komplex
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
Amp	ampicilin
Cm	chloramfenikol
Tet	tetracyklin
LB	Luria Broth médium
bp/kbp	bázové/kilobázové páry
dNTP	deoxynukleotidfosfát
O.D.	optická hustota
λ	vlnová délka
UV	ultrafialové světlo
F	forward primer
R	reverse primer
FM	forward primer s mutací
RM	revers primer s mutací
c	koncentrace
r.p.m.	počet otáček za minutu
APS	persíran amonný
AA	akrylamid
Bis	bis akrylamid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
UREA	močovina
IPTG	izopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
PMSF	fenylmetylsulfofluorid
PEG	polyetylen glykol
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
TRIS	1,1,1 – TRIS – (hydroxymetyl) – aminoetan
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosid
HCl	chlorovodíková kyselina
CaCl₂	chlorid vápenatý
MgCl₂	chlorid hořečnatý
NaCl	chlorid sodný
CH₃COOH	kyselina octová
NaOH	hydroxid sodný
C₂H₃NaO₂	octan sodný
Na₂S₂O₃	thiosíran sodný
Na₂CO₃	uhličitan sodný
NaHCO₃	hydrogenuhličitan sodný

Na₂HPO₄	hydrogenfosforečnan sodný
NaH₂PO₄	dihydrogenfosforečnan sodný
dH₂O	destilovaná voda
DTT	dithiotreitol
RBS-250	Brilliant Blue-Coomasie R250
AgNO₃	dusičnan stříbrný

8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY A INTERNETOVÝCH ODKAZŮ

8.1. CITOVANÁ LITERATURA

- (1) Balsera M., Arellano J.B., Gutierrez J.R., Heredia P., Revuelta J.L., De Las Rivas J.,: Structural analysis of the PsbQ protein of photosystem II by fourier transform infrared and circular dichroic spectroscopy and by bioinformatic methods., *Biochemistry* 42, 2003, 1000–1007
- (2) Balsera M., Arellano J.B., Revuelta J.L., De Las Rivas J., Hermoso J.A.,: The 1.49Å^o resolution crystal structure of PsbQ from photosystem II of *Spinacia oleracea* reveals a PPII structure in the N-terminal region., *J. Mol. Biol.* 350,2005, 1051–1060
- (3) (Barber J., Photosystem II: the engine of life, *Q. Rev. Biophys.* 36, 2003, 71–89)
- (4) Bondarava, Beyer, Liszkay: Function of the 23 kDa protein of photosystem II as a manganese binding protein and its role in photoactivation., *Biochim. Biophys. Acta* 1708, 2005, 63-70
- (5) Bricker, T.M. & Frankel, L.K. Carboxylate groups on themanganese-stabilizing protein are required for efficient binding ofthe 24 kDa extrinsic protein to Photosystem II., *Biochemistry* 42, 2003,2056–2061
- (6) Claudia Buchel , Jim Barber, Gennady Ananyev, Said Eshaghi, Richard Watt and Charles Dismukes , Photoassembly of the Manganese Cluster and Oxygen Evolution from Monomeric and Dimeric CP47 Reaction Center Photosystem II Complexes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 96, No. 25 (Dec. 7, 1999), pp. 14288-14293.
- (7) Enami, Yoshira, Tohri, Okumura, Ohta, Shen: Cross reconstitution of various extrinsic proteins and photosystem II complexes from cyanobacteria, red algae and higher plants, *Plant Cell Physiol.* 41(12), 1354-1364, 2000.
- (8) Ifuku, Yamamoto, Ono, Ishihara, Sato: PsbP protein but not PsbQ protein is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants., *Plant Physiology* 139, 2005,1175-1184
- (9) Ristvejova, Kopecky, Sovova, Balsera, Arellano, Green, Etrich: Structure and dynamics of the N-terminal loop of PsbQ from photosystem II of *Spinacea oleracea*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 345, 287-291, 2006
- (10) Seidler A., The extrinsic polypeptides of photosystem II., *Biochem. Biophys. Acta* 1277,1996, 35–60
- (11) Shen, Burnap, Inoue, An independent role of cytochrome c-550 in cyanobacterial photosystem II as revealed by double deletion mutagenesis of the PsbO and PsbV genes in *Synechocystis* sp.PPC 6803, *Biochemistry* 1995, 34, 12661-12668.

(12) Shen, J.-R., Ikeuchi, M. & Inoue, Y. (1997) Analysis of the PsbU gene encoding the 12-kDa extrinsic protein of photosystem II and studies on its role by deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PPC 6803. *J. Biol. Chem.* 272, 17821-17826.

(13) Suorsa M., Sirpio S., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Mamedov F., Styring S., Aro E., : PsbR, a Missing Link in the Assembly of the Oxygen-evolving Complex of Plant Photosystem II., *J. Biol. Chem.* 281, 2006,145–150.

(14) Tohri A, Suzuki T, Okuyama S, Kamino K, Motoki A, Hirano M, Ohta H, Shen JR, Yamamoto Y, Enami I. Comparison of the structure of the extrinsic 33 kDa protein from different organisms, *Plant Cell Physiol.* 2002 Apr;43(4):429-392002

8.2. INTERNETOVÉ ODKAZY A LABORATORNÍ MANUÁLY

(1) <http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotosyntéza>

(2) <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/129023-fotosynteza>

(3) www.bio.ic.ac.uk/research/barberúpsIIimages/PSII.html

(4) www.botanik.biologie.unimuenchen.de/botphys/staff/eichacke/eichacker/deu.html

(5) www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_11/Page2.html

(6) www.stratagene.com

(7) www.novogene.com

(1) *Molecular Cloning a laboratory manual* Sambrook J., Russell D.W., Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York, 2001