

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

## **Funkce histidinové kinázy Hik33 v genové regulaci sinic**

Diplomová práce

**Bc. Markéta Milichovská**

Školitel: Prof. Ing. Roman Sobotka, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Markéta Linhartová, Ph.D.

České Budějovice 2024

**Bibliografický údaj:** Milichovská, M., 2024: Funkce histidinové kinázy Hik33 v genové regulaci sinic. [Function of histidine kinase Hik33 in gene regulation of cyanobacteria. Mgr. Thesis, in Czech.] – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

Histidinová kináza 33 (Hik33) patří mezi nejlépe prostudované proteiny dvousložkového systému u sinic. Její hlavní funkcí je ochrana sinice, před stresem, pomocí regulace genové exprese. V minulosti byly vytvořeny a analyzovány mutantní kmeny sinice *Synechocystis* postrádající Hik33. Výsledky analýz se u jednotlivých publikací lišily, což je vzhledem k použití stejného kmenu zvláštní. Pravděpodobná příčina odlišných výsledků spočívá v tvorbě takzvaných revertantních kmenů, u kterých došlo vlivem stresu k tvorbě supresorovým mutacím. Diplomová práce je zaměřena na popis fenotypových vlastností mutantu Hik33, tvorbě a analýze revertantních kmenů a jejich supresorových mutací, a nakonec k objasnění struktury a vazebných jednotek histidinové kinázy 33 pomocí tvorby genového konstruktů *hik33-Strep*.

**Annotation:**

Histidine kinase 33 (Hik33) is one of the most well studied proteins of the two-component system in cyanobacteria. Its main function is to protect the cyanobacterium from stress by regulating gene expression. In the past, mutant strains of *Synechocystis* lacking Hik33 have been generated and analysed. The results of the analyses varied from publication to publication, which is strange given the use of the same strain. The probable cause of the different results lies in the formation of so-called revertant strains, in which suppressor mutations were generated due to stress. This thesis is aimed at describing the phenotypic properties of the Hik33 mutant, the formation and analysis of revertant strains and their suppressor mutations, and finally the elucidation of the structure and binding units of histidine kinase 33 by means of the formation of the *hik33-Strep* gene construct.

**Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.**

V Českých Budějovicích

Datum:

Podpis:

## **Poděkování:**

Nejprve bych chtěla poděkovat mé školitelce specialistce Mgr. Markétě Linhartové, Ph.D., se kterou jsem většinu práce v laboratoři prováděla. Dále mé poděkování patří školiteli Prof. Ing. Romanovi Sobotkovi, Ph.D. za jeho trpělivost a odborné vedení, které mi při práci věnoval. Velké díky patří i Mgr. Petře Skotnicové, Ph.D. za odborné rady v průběhu celé práce s mutantním kmenem  $\Delta hik33$  sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé fotosyntetické skupině profesora Romana Sobotky a skupině profesora Josefa Komendy za užitečné rady poskytnuté v průběhu diplomové práce. Závěrečné díky patří mým blízkým, hlavně rodičům, kteří mě přes mé průběžné stresové vypětí dokázali povzbudit a namotivovat k dokončení studia i této diplomové práce.

# Obsah

1. Úvod .....	7
1.1. Reakce bakterií na stres .....	7
1.2. Vnímání stresu u sinic .....	10
1.3. Modelový organismus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 .....	13
1.4. Dvousložkový mechanismus regulace u sinic .....	15
2. Cíle práce .....	18
3. Materiály a metody .....	19
3.1. Chemikálie a puify .....	19
3.2. Experimentální metody .....	20
3.2.1. Kultivace <i>Synechocystis</i> .....	20
3.2.2. Konstrukce expresního kmene <i>hik33-Strep</i> .....	20
3.2.3. Měření optické hustoty, buněčných spekter a koncentrace chlorofylu .....	21
3.2.4. Stanovení rychlosti růstu na agarózových plotnách .....	22
3.2.5. Izolace tylakoidních membrán .....	22
3.2.6. Clear-nativní elektroforéza (CN-PAGE) .....	22
3.2.7. Denaturační elektroforéza (SDS-PAGE), druhý rozměr k CN-PAGE .....	23
3.2.8. Izolace DNA z buněk sinice <i>Synechocystis</i> .....	23
3.2.9. Celogenomové sekvenování .....	24
3.2.10. PCR .....	24
3.2.11. Klonování .....	24
3.2.12. Transformace <i>Synechocystis</i> .....	25
4. Výsledky .....	26
4.1. Charakteristika mutantu $\Delta hik33$ .....	26
4.2. Analýza supresorových mutací v revertovaných kmenech $\Delta hik33$ .....	28
4.3. Fenotyp $\Delta hik33$ a revertovaných variant .....	31

4.4. Příprava kmene produkující protein Hik33-Strep .....	36
5. Diskuze.....	38
5.1. Mutanti $\Delta hik33$ sinice <i>Synechocystis</i> .....	38
5.2. Problém přípravy delečního mutanta $\Delta hik33$ .....	39
5.3. Funkce Hik33 .....	39
5.4. Detekované mutace v <i>hik26</i> a funkce této kinázy .....	40
6. Závěr.....	43
7. Seznam použité literatury .....	45
8. Přílohy .....	53
8.1. Genové sekvence .....	53
<i>NdeI</i> (forward).....	53
<i>Strep XmaII</i> (reverse):.....	53
8.2. Proteinové sekvence .....	53
Protein Hik26 (gen <i>slr0484</i> ).....	53
Protein Hik33 (gen <i>ycf26</i> ).....	53

# 1. Úvod

## 1.1. Reakce bakterií na stres

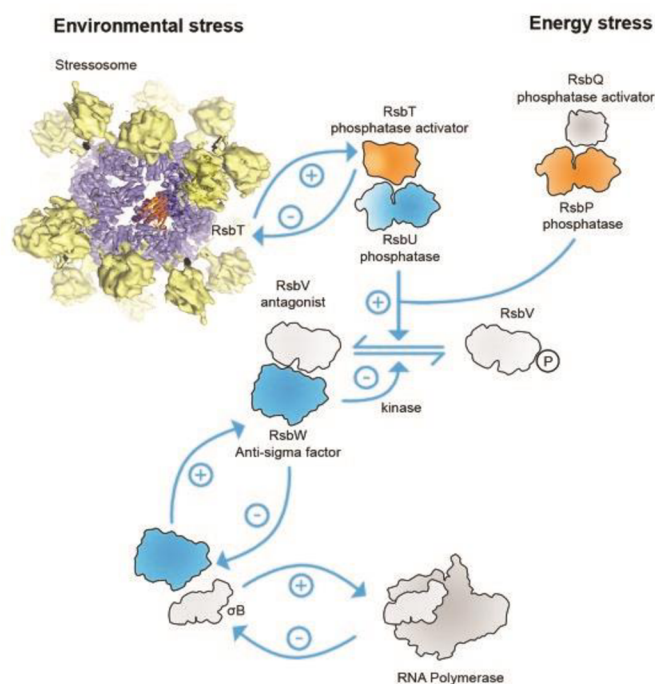
Prokaryotní organismy prokázaly během svého evolučního vývoje fascinující schopnost přizpůsobit se měnícím se podmínkám planety Země (Rožanov a Astafieva, 2009). Bakterie, a stejně tak Archea, nacházíme běžně i v extrémních ekosystémech jako jsou polární oblasti, nebo horké prameny. Ačkoli jsou bakteriální buňky adaptované na určité (optimální) podmínky, jsou zároveň často schopné tolerovat velké výkyvy od tohoto optima. Nicméně, fluktuující podmínky prostředí i tak představují pro organismy energetickou zátěž, která vede ke snížení fitness a může mít až fatální důsledky pro přežití buňky (Flores-Molina *et al.*, 2014). Během evoluce se tak prokaryotní organismy musely naučit vypořádat s výkyvy teplot, salinity, pH, oxidativním stresem či nedostatkem přísunu živin (Kumar *et al.*, 2014; Raven a Giordano, 2014).

Stresové odpovědi prokaryot je možné rozdělit na odpovědi obecného charakteru, které se prakticky aktivují při každé stresové reakci, a poté na reakce, které souvisí specificky s určitým stresovým podmětem. Je zřejmé, že oba typy odpovědí nelze úplně oddělit či definovat. Jak již bylo řečeno, obecná odpověď je vyvolána jakýmkoliv odchýlením od optima, například nedostatkem živin, stacionární fází růstu, výkyvy teplot, oxidativním či osmotickým stresem (Gottesman, 2019). Obecné i specializované reakce na stres se téměř vždy odehrávají na různých úrovních regulace – od transkripce genů, po regulaci translace, post-translační modifikace, interakce proteinů a malých signálních molekul.

Z hlediska obecné bakteriální odpovědi je nejlépe studovaným mechanismem aktivace alternativních sigma faktorů. Sigma faktor je malý regulační protein, který je součástí bakteriálních DNA-dependentních RNA polymeráz. Sigma faktor zesiluje vazbu polymerázy na konkrétní promotory (velké sety genů zvané regulony). Regulon se běžně skládá z několika stovek genů, což buňce umožňuje měnit globálně a synchronně hladinu velkého množství transkriptů (Rachedi *et al.*, 2020). Bakterie nevlastní pouze jeden typ sigma faktoru, nýbrž často celou škálu. Jeden z faktorů je typicky esenciální a udržuje

expresi tzv. *house-keeping* genů potřebných pro základní chod buňky. Další sigma faktory se nazývají alternativní a k jejich využití dochází v buňce během stresových podmínek. Funkce těchto sigma faktorů se často značně překrývají, ale lze vysledovat určitou specializaci. Například u bakterií, *Geobacter sulfurreducens* či *Escherichia coli* (*E. coli*), se vyskytují alternativní sigma faktory, které se účastní ochranných reakcí proti extrémním teplotám (RpoE), teplotnímu šoku (RpoH), hladovění (RpoS) či limitace dusíkem (RpoN) (Methé *et al.*, 2003).

Jak u Gram-pozitivních, tak u Gram-negativních bakterií je aktivace alternativních sigma faktorů součástí obrovského molekulárního komplexu zvaného stresozóm. Konkrétně u Gram-pozitivních kmenů, jako je *Bacillus subtilis*, je tento multi-proteinový komplex, který je uložený v cytoplazmě, složen z mnoha kopií proteinů RsbR, RsbS a RsbT. Stresozóm je esenciálním zprostředkovatelem při regulaci transkripce genů obecné odpovědi na probíhající stres (Delumeau *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2003). Při změně podmínek je u bakterií stresozóm určitým, ale zatím ne zcela jasným, způsobem aktivován, což vede k fosforylaci navázaných proteinů, a nakonec k aktivaci alternativních sigma faktorů jako je např. SigB u *Bacillus subtilis* (Obr. 1). Geny kódující komplex stresozómu byly objeveny u široké škály bakteriálních druhů (Price *et al.*, 2001).





**Obr. 1. Aktivace alternativního sigma B faktoru ( $\sigma^B$ ) u *Bacillus subtilis*. Signální kaskáda bakterie *B. subtilis* s naznačenou strukturou stresozómu získané pomocí elektronové mikroskopie. N koncové domény RsbR jsou zobrazené žlutě, C-koncová část RsbR fialově a oranžově je zvýrazněna molekula RsbT. Stresozóm v případě detekce stresového signálu fosforyluje RsbT, což spustí regulační kaskádu, která uvolní sigma faktor B z komplexu s anti-sigma faktorem, který ho blokuje (Marles-Wright a Lewis, 2008).**

Teplotní výkyvy jsou pro bakterie velmi častým zdrojem stresu, následná regulace je odlišná dle toho, zda se jedná o příliš vysoké, či příliš nízké teploty. Během zvýšené teploty dochází u bakterií k takzvanému teplotnímu šoku, který způsobuje rozpad esenciálních proteinových komplexů a narušuje tak vnitřní homeostázu buňky. Typickou reakcí na teplotní šok je produkce proteinů zvaných chaperony, které opětovně skládají (neboli refoldují) chybně složené proteiny. Zároveň se zvýší hladina proteáz, které odstraňují nevratně poškozené proteiny (Gottesman, 2019). Spolu s chaperony a proteázami se ochranného procesu účastní i další důležité proteinové systémy jako například tzv. heat shock proteiny (Hsp) fungující jako holdázy, jejichž hlavní funkci je zabránění nevratné agregace proteinů (Kim *et al.*, 2021).

Naopak při rapidním snížení teploty (např. o 20°C) se bakterie snaží udržet si energetickou bilanci a přechodně utlumí dělení. Po několika hodinách dojde k obnovení růstu a k aklimatizaci tzv. adaptivní reakcí (změnou genové exprese). Během adaptivní reakce dochází ke snížení, zpomalení, nebo v extrémních případech i k zastavení transkripce a translace u bakterií. Navzdory utlumené tvorbě proteinů indukuje bakterie *E. coli* během chladového stresu expresi 26 genů kódující tzv. cold shock response proteiny (CSPs) (Graumann *et al.*, 1997; Hébraud a Potier 1999; Ermolenko a Makhatadze, 2002; Goldstein *et al.*, 1990). Tyto proteiny jsou přítomny v buňce neustále, ale při poklesu teplot, dochází k jejich silné akumulaci. CSPs se vážou na jednořetězcové nukleové kyseliny (RNA i DNA), čímž brání formování stabilních sekundárních struktur, které blokují transkripci, či translaci (Heinemann, 2021).

Nedostatek živin v prostředí a hladovění způsobuje oxidativní stres. V tomto případě dochází k aktivaci globálních regulátorů metabolismu. Mezi důležité regulátory bakterie *E.*

*coli* patří proteiny SpoT, AI-2 či alternativní sigma faktor RpoE. SpoT, spolu s dalším regulátorem, RelA, chrání bakterii při hladovění tím, že ovlivňuje metabolismus důležitých stresových alarmonů (viz. dále). Druhý zmíněný regulátor AI-2 pomáhá *E. coli* lépe se adaptovat na hladovění pomocí zvýšené stability mRNA (McDougald *et al.*, 2002).

V případě hladovění používají bakterie nejen již zmíněné mechanismy, ale také ochranný proces nazývaný stringent control. Při poklesu koncentrace aminokyselin v buňce blokuje tento mechanismus dělení buněk a translaci, a zároveň udržuje syntézu antistresových faktorů. Klíčovou roli hrají univerzální stresové alarmony ppGpp (guanosin tetrafosfát) a pppGpp (guanosin 5'-trifosfát 3'-difosfát), které fungují jako druhý posel (*second messenger*) a jsou produkovány při nedostatku živin. Hlavním úkolem (p)ppGpp je kontrola translace a transkripce konkrétních genů. Koncentrace ppGpp během nutriční deprivace přechodně stoupá, ale po vymizení stresu opět klesá (Ferenci a Spira, 2007).

## 1.2. Vnímání stresu u sinic

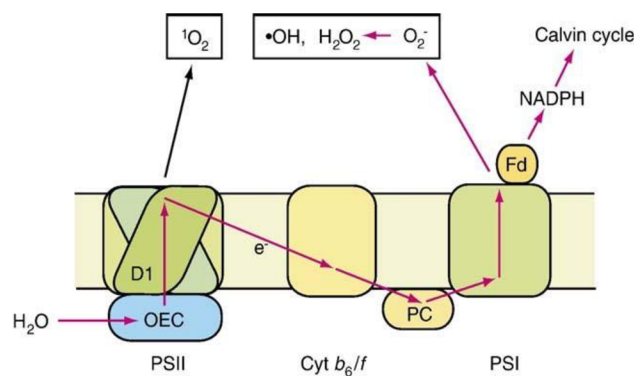
Sinice najdeme stejně jako jiné bakterie na mnoha různorodých stanovištích, často i extrémních. Na rozdíl od heterotrofních bakterií si sinice dokázaly vyvinout unikátní formu metabolismu, která se nazývá oxygenní fotosyntéza. Dokážou tedy využít energii fotonů pro fotolýzu vody (zdroj elektronů) a fixaci CO<sub>2</sub> (případně N<sub>2</sub>). Ke své existenci nepotřebují živiny ve formě redukováného uhlíku jako heterotrofové, ale staly se závislými na konkrétním abiotickém zdroji, a to světlu a přístupu CO<sub>2</sub> (Christmas *et al.*, 2015).

Světelná ozáření je velmi proměnlivá a sinice se proto potýkají se stresy, které u ostatních prokaryot nehrají zásadní roli. Problémem je jak příliš nízká, tak příliš vysoká ozáření. V prvním případě sinice v podstatě hladoví, v druhém případě dochází k poškození fotosyntetického aparátu radikály kyslíku (ROS, viz. dále). Reakce na nízké světlo zahrnuje fototaxi – snaha uniknout ze zastínění, a také zvýšení množství světlosběrných pigmentů. V případě sinic se jedná o množství a také pigmentové složení fykobilizomů. Používání fototrofního metabolismu nutí sinice adaptovat se vůči nadměrnému ozáření a regulovat tak množství světelné energie, které do fotosyntézy

vstupuje. Nadměrné ozáření je velmi škodlivé, jelikož jeho výsledkem je fotoinhibice a fotodestrukce fotosystémů (Sinetova a Los, 2016).

Poškození fotosystémů (PSI a PSII) je způsobeno ROS, kam můžeme zařadit také singletový (tedy excitovaný) kyslík, superoxid či peroxid vodíku. Ačkoli ROS vznikají v každé buňce, při oxygenní fotosyntéze vzniká kyslík jako odpadní produkt (Obr. 2), jehož koncentrace je v buňce vysoká. ROS se generují v důsledku zahlcení fotosystémů nadměrným množstvím fotonů. To vede k excitaci chlorofylového páru P680 v reakčním centru PSII, a pokud nedojde k rychlému předání elektronu na akceptor, dochází k tvorbě tripletních stavů chlorofylu. Chlorofylový triplet je stabilní a ochotně reaguje s molekulárním (tripletním) kyslíkem za vzniku singletního kyslíku, který je velmi reaktivní a oxiduje proteiny, či lipidy fotosyntetického aparátu, čímž je poškozuje a způsobuje fotoinhibici (Solovchenko *et al.*, 2019). Sinice proto během stresu zvyšují syntézu karotenoidů, které mají jednak schopnost zhaset tripletní chlorofyl a také reagují se singletním kyslíkem, čímž ochraňují klíčové struktury jako je PSII (Horton *et al.*, 1996).

ROS sice poškozují všechny buněčné struktury, ale právě PSII je velmi náchylný na poškození. Tento komplikovaný membránový komplex se vyskytuje ve formě dimeru a jeho centrálními podjednotkami jsou D1, D2, CP47 a CP43 proteiny (Komenda a Sobotka, 2016). Pokud dojde k poškození podjednotky PSII (nejčastěji proteinu D1), je nutné samotný protein odstranit pomocí specifických proteáz a nahradit ho nově vytvořenou kopií (reverzibilní fotoinhibice). Tento proces probíhá za podmínek, kdy buňka zvládá protein nahradit, jinak a dochází k hromadění neaktivních komplexů PSII, které generují další ROS (ireverzibilní fotoinhibice) (Nishiyama *et al.*, 2006).



**Obr. 2. Produkce kyslíkových radikálů a singletního kyslíku během oxygenní fotosyntézy.** Kyslíkové radikály (ROS) jsou tvořeny jako vedlejší produkt při nadměrném elektronovém transportu v tylakoidních komplexech PSI a PSII. Na akceptorové straně PSII, při běžném přenosu elektronů či u nefunkčního komplexu, dochází ke tvorbě  $^1O_2$ . Druhý komplex, PSI, přenáší nadbytečné elektrony na molekuly kyslíku, které tím redukuje na superoxid  $O_2^-$ . Ten je konvertován enzymem superoxid dismutázou na  $H_2O_2$  (Nishiyama *et al.*, 2006).

Přestože se tvorba ROS u sinice zásadně liší od heterotrofních bakterií, obě skupiny využívají podobný ochranný mechanismus na detoxifikaci ROS. Obecně se jedná o aktivaci enzymů jako jsou superoxid dismutázy, katalázy a peroxidázy, v reakci na zvýšenou koncentraci ROS. U bakterií je koncentrace superoxidu detekována redoxními senzory SoxRS a koncentrace  $H_2O_2$  je naopak vnímána transkripčními faktory LysR a OxyR, jejichž aktivace je založena na oxidaci cysteinových zbytků peroxidem. Výjimkou jsou některé bakterie, které plně postrádají OxyR a vlastní tzv. peroxid sensing represor (PerR). Sinice *Synechocystis* také využívá represor PerR a za pomoci histidinových kináz (viz. další kapitola) a dalšího dosud neznámého regulátoru, výsledně modulují transkripci cílových genů (Storz a Imlay, 1999).

Vedle ozáření je dalším zásadním faktorem pro oxygenní fotosyntézu koncentrace  $CO_2$ . Sinice se dokáží rychle adaptovat na pokles  $CO_2$  v prostředí. Klíčovým mechanismem je produkce membránových transportérů, které přenáší uhlík z vnějšího prostředí, a to jak  $CO_2$ , tak  $HCO_3^-$ , který je následně uvnitř buňky přeměněn na  $CO_2$ . Dále je buňka schopna navýšit koncentraci  $CO_2$  v okolí enzymu RuBisCO pomocí  $CO_2$  koncentračního mechanismu (CCM) (Burnap *et al.*, 2015).

Kromě nadměrného ozáření čelí sinice dalším enviromentálním stresorům, jako je salinita či výkyvy teplot. Při vysoké koncentraci iontů, zvýšené salinitě, dochází ke ztrátě vody v buňce a hromadění potenciálně škodlivých anorganických iontů. Naopak při nízké koncentraci solí se do buňky dostává voda a ve výsledku způsobí lýzy vlivem vysokého turgorového tlaku. Většina buněk sinic reaguje na vysokou salinitu prostředí strategií vysolování, ale existují i další adaptace. Například u *Synechocystis* se opět setkáváme s adaptací v podobě regulace genové exprese, a to konkrétně syntézy sacharózy

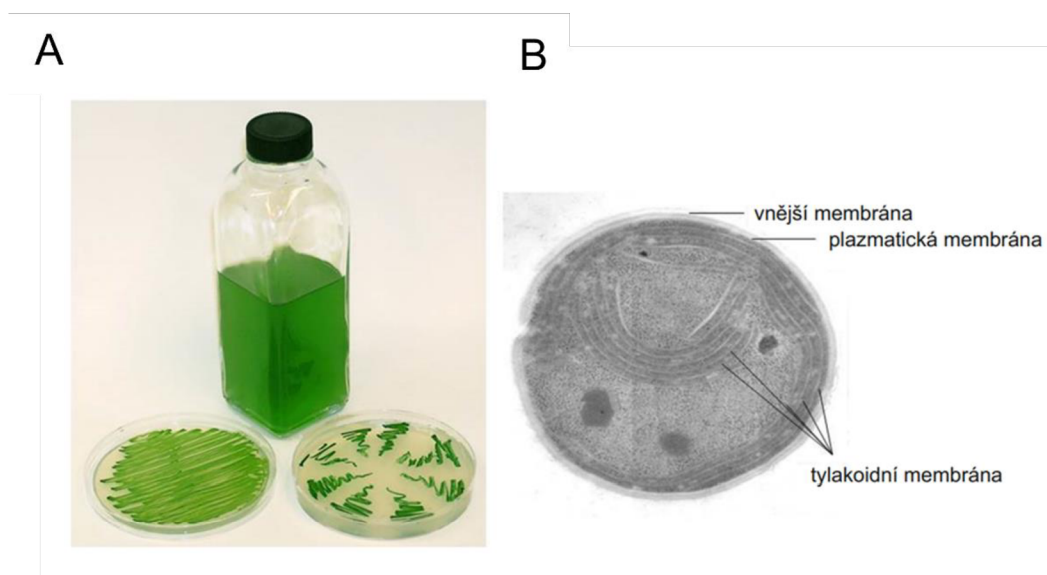
a glykosylglycerolu. Tyto látky nenarušují celkový metabolismus, ale zadržují vodu a udržují vnitřní homeostázu (Rachedi *et al.*, 2020). Na syntéze sacharózy se podílí dva enzymy: Spp (sacharóza-6'-fosfát fosfatáza) a SpsA (Spermidin syntáza). Za běžných podmínek je exprese genu *spsA* potlačena regulátorem odpovědi Rre39, ale při stresu se úroveň transkripce *spsA*, a následně aktivita SpsA zvýší. Na syntéze glykosylglycerolu se rovněž podílí dva enzymy: GgpS (Geranylgeranyl pyrofosfát syntáza) a GgpP (Geranylgeranyl difosfát syntáza), jejichž produkce je při stresu zesílena (Hagemann *et al.*, 1997).

Podle typu teplotního výkyvu (teple či chlad) sinice aktivují dvě skupiny genů, a to buď teplem indukované geny (teplotního šoku) či chladem indukované geny (chladového šoku). U sinice se během chladového stresu specificky indukuje až 100 genů, 60 z nich se ale zároveň aktivuje i při jiných formách stresu, jakými jsou například ROS, vysoké světlo nebo salinita. V reakci na změnu teploty a také osmolarity, musí sinice kompenzovat snížení či zvýšení fluidity membrán (Sinetova a Los, 2016). Cytoplazmatická membrána je považována za primární místo vnímání teplotních a osmotických změn (Murata a Dmitry, 1997; Vigh *et al.*, 1998). Fluidita membrán závisí na enzymatické saturaci či desaturaci acylových řetězců membránových lipidů. Během chladového stresu jsou proto produkovány desaturázy mastných kyselin (FADs; Kempf a Bremer, 1998; Wood, 1999).

### **1.3. Modelový organismus *Synechocystis* sp. PCC 6803**

*Synechocystis* sp. PCC 6803 (Obr. 3) (*Synechocystis*) je sladkovodní jednobuněčná sinice. Poprvé byla izolována roku 1968 v USA (Ikeuchi a Tabata, 2001). Dnes se řadí mezi jeden z nejpoužívanějších modelových organismů, primárně na výzkum oxygenní fotosyntézy, ale také pro biotechnologické aplikace. Jedná se o diazotrofní sinici, která tedy postrádá schopnost fixovat vzdušný dusík. Povrch *Synechocystis* je obalen slizovou vrstvou umožňující sinici výměnu materiálu a ochranu. Pod slizovou vrstvou se nachází buněčný obal, který se skládá z vnější membrány, peptidoglykanové vrstvy a cytoplazmatické membrány. Jako většina sinic obsahuje *Synechocystis* vnitřní systém (tylakoidních) membrán, kde je lokalizován fotosyntetický aparát. Popularita *Synechocystis*, jakožto

modelového organismu, je dána několika faktory. Hlavní výhodou *Synechocystis* byla brzy dostupná sekvence jejího genomu, a to již v roce 1996. Další výhody spočívají ve snadné tvorbě mutantních kmenů a možnosti kultivace kmenů jak fotoautotrofně, tak i fotoheterotrofně v tekutém médiu nebo na agarózových plotnách. Běžná kultivace zahrnuje použití BG11 média s pH okolo 7-8 při teplotě 30°C. Nevýhodou používání *Synechocystis* jsou její poměrně pevné buňky, které je nutné pracně rozbít například pomocí velmi rychlého třepání se skleněnými kuličkami. Buňka *Synechocystis* obsahuje několik kopií (~7-10) cirkulárního chromozómu, a každou indukovanou mutaci je nutné segregovat do všech kopií. Získání plně segregovaných mutantů je díky tomu poměrně pomalé v porovnání s jinými modelovými organismy (*E.coli* či *Saccharomyces cerevisiae*) (Zavřel *et al.*, 2017).



**Obr. 3. Modelová sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803.** A) Modelová sinice *Synechocystis* kultivovaná v tekutém médiu a na pevném médiu na Petriho misce. B) Obrázek tenkého řezu buňky *Synechocystis* připravený pomocí transmisní elektronové mikroskopie s vyznačenou vnější membránou, plazmatickou membránou a vnitřní tylakoidní membránou (upraveno od Liberton *et al.*, 2006).

#### 1.4. Dvousložkový mechanismus regulace u sinic

Změna vlastností membrán je buňkou vnímána a využívána pro regulaci exprese genů prostřednictvím takzvaného dvousložkového systému. Pomocí tohoto systému sinice přijímají a vnímají signály z vnějšího prostředí, a v reakci na ně aplikují různé mechanismy ochrany (typicky změnou exprese genů). Dvousložkový regulační systém se skládá jednak z transmembránové histidinové (His) kinázy, a dále, z proteinu nazývaného regulátor odpovědi (*response regulator*), Rre. His kinázy byly poprvé popsány jako senzor pro detekci chladu; později se ukázalo, že se účastní i detekce tepla, osmolarity, světla či oxidativního stresu. Ve dvousložkovém systému je hlavní funkcí His kináz přijetí a zpracování intracelulárních či extracelulárních signálů a jejich následný přenos na konkrétní Rre proteiny (Ge *et al.*, 2017).

Schopnost His kináz aktivovat různé odpovědi, dle typu vnějšího signálu, je u sinic považována za základní mechanismus aklimatizace na vnější podmínky (Sakayori *et al.*, 2009). Molekulární mechanismus, jakým kináza rozlišuje jednotlivé typy přicházejících signálů není stále objasněn, ale pravděpodobně dochází k detekci fyzických změn v cytoplazmatické membráně v reakci na environmentální stresory. His kinázy najdeme u většiny prokaryot a nejnovější poznatky potvrdily jejich přítomnost i u primitivních eukaryot (protozoa). His kinázy jsou součástí mnoha různých ochranných biochemických reakcí, které pro prokaryota představují otázku života či smrti (Maksimov *et al.*, 2017).

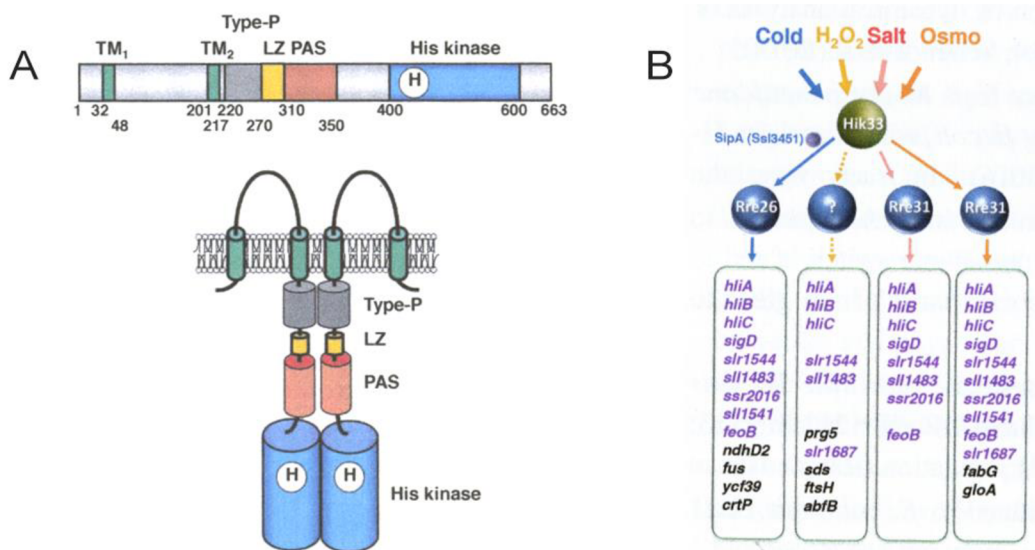
Histidinové kinázy (Hik) jsou ve většině případů predikované jako transmembránové proteiny, výjimku tvoří například kinázy Hik2 či RpaA, které najdeme volně v cytoplazmě (Bairagi *et al.*, 2022). Strukturně se His kinázy skládají z několika domén: sensorová, histidin-kinázová, přijímací (*receiver*) a výstupní. Sensorová doména je složena z několika menších signálních domén PAS (Per-Arnt-Sim) či GAF (gGMP specifická fosfodiesteráza, adenylát cykláza a FhlA). Její hlavní funkcí je vnímání a rozpoznávání vnějších signálů z prostředí. Signální podjednotky sensorové domény, PAS a GAF, pravděpodobně váží malé signální molekuly (ligandy), ale o jaký ligand se jedná je v drtivé většině případů neznámé. Vazbou ligandu dochází ke konformačním změnám vedoucím k přenosu signálu na nadcházející histidin-kinázovou doménu (Ma a Phillips-Jones, 2021). Histidin-kinázová

doména obsahuje několik domén účastnících se procesu autofosforylace: HisKA (Histidin-kináza A), HATPáza\_c (Histidine ATPáza) a přídatné stabilizační struktury. HATPáza\_c umožňuje uvolnění fosfátové skupiny z ATP hydrolyzou vazeb a HisKA je zodpovědná za přenos fosfátové skupiny na vlastní konzervovaný histidin. Molekula fosfátu je záhy přenesena na konzervovaný aspartát (*receiver*) domény (Wolanin *et al.*, 2002). To způsobí její dimerizaci a předání fosfátu na konečnou výstupní doménu, odkud se přenesou na regulátor odpovědi (Hulko *et al.*, 2006).

Rre jsou rozpustné proteiny, které buď fungují jako transkripční faktory, tedy podobně jako transkripční faktory inhibují či indukují expresi genů, nebo jako regulátory transkripčních, posttranskripčních či postranlačních procesů. První typ Rre obsahuje známý motiv HTH (*helix-turn-helix*) vázající se na DNA. Oproti tomu druhý typ regulátorů odpovědi obsahují doménu vázající RNA (Galperin, 2006). U mnoha Rre zastávají funkci zmíněných domén enzymy, jakými jsou například: methylesterázy, fosfodiesterázy, fosfatázy a jiné. Navzdory odlišným výstupním doménám jednotlivých regulátorů obsahující proteiny společný motiv, a to takzvanou fosfoakceptorovou doménu (REC), která je fosforylována His kinázou (Galperin, 2010).

U sinice *Synechocystis* je popsáno několik dvousložkových systémů Hik33-Rre31, Hik34-Rre31, Hik10-Rre3, Hik16-Hik41-Rre1 a Hik33-Rre26, ale His kináz bylo identifikováno 40 (Los *et al.*, 2010). Při reakci na hyperosmotický stres se podílí všechny výše zmíněné dvousložkové systémy, ale každý z nich reguluje jiný počet genů. Znalosti ohledně dvousložkových systémů se rozšiřují a nyní je již obecně známo, že u *Synechococcus* PCC 7942 reaguje systém Hik34-Rre1, na tepelný stres (Fedurayev *et al.*, 2018). Nejlépe probádanou je Hik je zřejmě Hik33 (Obr. 4.A), která rozpoznává nejméně tři odlišné Rre (Obr. 4.B). Hik33 je přičítána ochrana před různými stresy (chladový, oxidativní, solný a hyperosmotický, viz. Obr. 4.B) a jsou známy i některé klastry genů, které reguluje. Molekulární mechanismus rozpoznání stresu Hik33 je stále neznámý (Shimura *et al.*, 2012), a to i přesto, že chování  $\Delta hik33$  mutantů bylo také studováno několika vědeckými týmy.





**Obr. 4. A) Struktura a zapojení Hik33 do genové regulace u *Synechocystis*. Hik33 je transmembránový protein, který se vyskytuje ve formě dimery. Protein obsahuje domény HAMP a HAMP-linker, dále, leucinový zip (LZ), PAS doménu a histidin-kinázovou doménu. Funkční mechanismus předpokládá, že k aktivaci histidin-kinázových domén a autofosforylaci dochází vlivem snížené fluidity membrán (Taylor a Zhulin, 1999). B) Přehled stresorů aktivující regulaci exprese cílových skupin genů Hik33 kinázou a konkrétní regulátory odpovědi. Přehled vnějších stresorů (chladový, solný, hyperosmotický a oxidační stres) aktivující Hik33 a cílové genové klastry (Los, 2018).**

## 2. Cíle práce

Přestože His kinázy hrají klíčovou úlohu v regulaci sinicové buňky, o vlastních mechanismech této regulace se ví velmi málo. Genom *Synechocystis* kóduje desítky His kináz, ale pouze několik málo jich bylo detailněji studováno. Nejvíce pozornosti bylo věnováno Hik33, ale i v tomto případě zůstává mnoha otazníků a nejasností. V minulých letech byla publikována řada prací zaměřených na fenotyp a změny exprese jednotlivých genů u mutantů *Synechocystis* kteří postrádali Hik33. Popis vlastností mutantů se v publikacích překvapivě a zásadně liší, přestože by se mělo jednat prakticky o identický kmen.

V Laboratoři fotosyntézy, MBÚ v Třeboni, byl nezávisle vytvořený nový  $\Delta hik33$ , který byl posléze ověřen celo-genomovým sekvenováním (viz. Metody). Je zajímavé, že tento mutant vykazuje, v porovnání s kontrolou, výrazně horší růstové parametry, než již publikované kmeny  $\Delta hik33$ . Tento kmen je nicméně geneticky nestabilní a vytváří supresorové linie, které obsahují přídavné mutace, čímž kompenzují ztrátu Hik33.

Cílem mé práce je jednak přesně popsat kmen  $\Delta hik33$  sinice *Synechocystis*, izolovat a charakterizovat supresorové kmeny a identifikovat jednotlivé supresorové mutace. Dalším cílem je konstruovat kmen, který exprimuje Hik33 protein fúzovaný se Strep II kotvou. Purifikace této kinázy a následná analýza ko-purifikovaných proteinů umožní lépe pochopit, jak tento regulační systém funguje.

## 3. Materiály a metody

### 3.1. Chemikálie a pufrы

#### Nativní polyakrylamidový gel – gradient 4-14 %

- Gelový pufr: 0,5M kyselina amino-kapronová, 50mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0
- Roztok akrylamidu (AB): 50% akrylamid a 0.83% N,N'-methylenbisakrylamid
- Katodový pufr: 50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0
- Anodový pufr: 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0
- Další látky: glycerol, TEMED, 10% ammonium persulfate, 1% dodecyl- $\beta$ -maltoside (DDM)

#### Denaturační polyakrylamidový gel – gradient 16-20 %

- Gelový pufr: 0,65 M Tris/HCl, pH 8.6
- Roztok akrylamidu (AB): 50% akrylamid a 0.83% N,N'-methylenbisakrylamid
- Katodový pufr: 25 mM Tris, 1.92 M glycin, SDS (0.2%)
- Anodový pufr: 25 mM Tris/HCl, pH 8.3
- Další látky: sacharóza, močovina, TEMED, 10% ammonium persulfate, SDS

#### Příprava vzorků pro elektroforézu

- inhibitor proteáz s EDTA (complete Protease inhibitor cocktail, CO-RO Roche), 1% SDS, 1% dodecyl- $\beta$ -maltoside (DDM)

#### Izolace DNA z buněk sinice *Synechocystis*

- TE pufr: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0.1 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific)
- RNAsa (Thermo Fisher Scientific)
- EDTA (complete Protease inhibitor cocktail, CO-RO Roche)

### Pufry pro izolaci tylakoidních membrán z buněk *Synechocystis*

- Tylakoidní pufr (pufr B: 25 mM MES/NaOH, pH 6.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>)

### Klonování

- Oranžový pufr: 10x pufr O (Thermo Fisher Scientific)
- T4 DNA ligáza (Thermo Fisher Scientific)
- SOC médium: SOB +20mM Glukóza (Glc)
- SOB médium (Thermo Fisher Scientific): 20 g/L tryptone, 5g/L kvasinkový extrakt, 2,4 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g/L NaCl, and 0,186 g/L KCl

## 3.2. Experimentální metody

### 3.2.1. Kultivace *Synechocystis*

Mutantní kmen postrádající Hik33 ( $\Delta hik33$ ) jsem kultivovala spolu s kontrolní variantou (WT-P) mixoheterotrofně v tekutém BG11 médiu nebo na 1% agarových plotnách s BG11 s přidavkem 10 mM TES pufru a 5 mM glukózou (BG11+TES+Glc) při nízkém ozáření (LL, 5  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ ). Pro získání supresorových mutantů jsem  $\Delta hik33$  kultivovala na médiu BG11 s TES pufr (BG11+TES) při normálním ozáření (NL, 40  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ ). Získané kolonie revertantů mutanta  $\Delta hik33$  jsem kultivovala fotoautotrofně na Petriho miskách s BG11 médiem a TES pufr (BG11+TES) při 28°C.

### 3.2.2. Konstrukce expresního kmene *hik33-Strep*

Pro přípravu kmene *hik33-Strep*, který exprimuje StrepII-tagovaný Hik33 protein, jsem vytvořila PCR produkt obsahující gen *hik33* ze *Synechocystis* se StrepII kotvou na konci genu. Vytvořený konstrukt jsem dále vložila do plazmidu p-C-FLAG pomocí restrikčních míst *NdeI* a *XmaII*. Tento plazmid obsahuje *psbAII* promotor, kanamycinovou rezistenci a místa pro rekombinaci do *psbAII* lokusu v genomu *Synechocystis*. Výsledný plazmid,

jsem amplifikovala v *E.coli*, ověřila sekvenováním, a použila k transformaci *Synechocystis*. Pro segregaci konstruktů do všech kopií chromozómu jsem buňky selektovala na zvyšující se koncentraci kanamycinu tak, že jsem narostlé rezistentní kolonie přenesla na nové médium (TES a BG11 s antibiotikem) a kultivovala za optimálních růstových podmínek. Úplnou segregaci jsem potvrdila pomocí PCR.

### 3.2.3. Měření optické hustoty, buněčných spekter a koncentrace chlorofylu

Pro měření optické hustoty (OD) jsem odebrala 1 mL buněčné kultury *Synechocystis* a proměřila absorbanci na spektrofotometru (Specord 250 plus) při 750 nm proti destilované vodě. Křivky buněčných spekter jsem měřila na stejném přístroji v rozsahu od 350 nm do 750 nm a normalizovala na stejnou hodnotu při 750 nm.

Pro měření koncentrace chlorofylu jsem do 1,5 mL mikrozkušavek přenesla 1 mL napěstované buněčné kultury z tekutého média o známém  $OD_{750}$  a vzorek stočila po dobu 10 minut na 5500 x g. Po centrifugaci jsem odstranila 950  $\mu$ L supernatantu a pelet resuspendovala ve zbylých 50  $\mu$ L média. Pro extrakci chlorofylu jsem ke vzorku přidala 950  $\mu$ L methanolu, protřepala a stočila v centrifuze 5 minut při 16800 x g. Absorbanci supernatantu jsem poté změřila spektrofotometricky při 666 nm oproti slepému vzorku metanolu. Získané hodnoty jsem dosadila do vzorečku  $\frac{1}{OD_{750}} \cdot \frac{OD_{666}}{0,082}$  pro výpočet koncentrace chlorofylu ( $\mu$ g/mL).

Pro měření koncentrace chlorofylu v izolovaných tylakoidních membránách (TM) jsem k 13,5  $\mu$ L vzorku přidala 1,5  $\mu$ L 10%  $\beta$ -DDM a vzorek stočila v centrifuze 5 min při 16800 x g o teplotě 4°C. 10  $\mu$ L získaného supernatantu jsem přenesla do 1 mL metanolu a vzorek stočila na 2 minuty při 3400 x g při 4°C. Absorbanci supernatantu jsem změřila spektrofotometrem při 666 nm a 720 nm oproti slepému vzorku metanolu. Obdržené hodnoty jsem dosadila do vzorečku pro absorbanci chlorofylu a (Chl-a) =  $(A_{666} - A_{720}) \cdot 12,61 \cdot 110$ .

### 3.2.4. Stanovení rychlosti růstu na agarózových plotnách

Na agarózové plotny jsem napipetovala ředící řadu kultury *Synechocystis*. Ředící řadu jsem si předpřipravila v mikrozkušavkách. Do prvních sloupců jsem napipetovala 200  $\mu\text{L}$  buněčných kultur naředěných na  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0.1$ . Do druhých sloupců jsem přenesla 10x ředěné vzorky. U nadcházejících sloupců jsem postupovala stejným způsobem, rozdíl byl pouze v násobném ředění. Získané plotny byly kultivovány za různých podmínek.

### 3.2.5. Izolace tylakoidních membrán

100 mL tekuté kultury buněk *Synechocystis* jsem nejprve centrifugovala v Lynx 600 Sorvall a pelet resuspendovala v 30 mL tylakoidního pufru (pufr B). Objem buněk jsem rozdělila do dvou 15 mL zkumavek (příslušenství Precellys Evolution), centrifugovala po dobu 15 minut na 4400 x g při 4°C. Získaný supernatant jsem odstranila, přidala 1 mL čerstvého tylakoidního pufru a 1x inhibitor proteáz obsahující EDTA a také 5 mL zirkoniových kuliček (balotina 0,15 mm). Zkumavky jsem vložila do homogenizátoru (Precellys evolution) a použila tři cykly rozbíjení. Každý cyklus zahrnoval 6 x 15 sekund rozbíjení s mezikrokem chlazení suchým ledem, a poté dodatečné chlazení na ledu po dobu 10 minut. Vzniklý lyzát buněk jsem promyla 30 mL B pufru, abych se zbavila kuliček. K oddělení membránové frakce a rozpustných proteinů z rozbitých buněk jsem použila centrifugaci 42748 x g při 4°C po dobu 25 min. Supernatant (rozpustné proteiny) jsem odstranila a pelet (membránové proteiny) jsem postupně resuspendovala štětcem v tylakoidním pufru do objemu 15 mL a také zamrazila.

### 3.2.6. Clear-nativní elektroforéza (CN-PAGE)

Pro přípravu 4-14% gradientového nativního gelu jsem namíchala tři různé roztoky akrylamidu (4% a 14% rozdělující gradient a 4% na zaostřovací gel). Připravená skla s gelem jsem vložila do aparatury-Bio-Rad Protean Ixi cell. Horní část aparatury s gely jsem naplnila katodovým pufrem a spodní část aparatury anodovým pufrem. Do každého vzorku byl přidán 1% amfipol A8-35, 1% DDM (n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosid) a 1% GDN

(glyko-diosgenin). Během separace byla aparatura chlazena na 4°C a proteiny separovány při konstantním napětí 11 mA po dobu 60 min.

### **3.2.7. Denaturační elektroforéza (SDS-PAGE), druhý rozměr k CN-PAGE**

Pro přípravu 16-20% gradientového SDS gelu jsem namíchala tři různé roztoky akrylamidu (16% a 20% gradient a 5% svrchní gel) a připravený gel vložila do aparatury (Bio-Rad Protean II xi cell). Horní část aparatury s gelem jsem naplnila katodovým pufrům a spodní část aparatury anodovým pufrům. Proužek (cca 1 cm široký) clear-nativního gelu jsem denaturovala (solubilizovala) ve vaničce s 1% DDT a 1% SDS po 20 min a poté vložila do aparatury na horní hranu denaturačního gelu. Proteiny byly separovány při 16 mA/gel, po dobu 16 hod a aparatura byla během celé doby separace temperována na 23°C. Pro další analýzu byly gely obarveny v Coomassie blue.

### **3.2.8. Izolace DNA z buněk sinice *Synechocystis***

Pro izolaci DNA jsem použila fenol-chloroformovou extrakci. Nejprve jsem do označených 0.5 mL mikrozkuvek přidala 200 µL TE pufru, ve kterém jsem resuspendovala buněčný materiál. Následně jsem přidala 200 µL fenolu a 20 sekund třepala v ruce. Poté jsem zkumavky nechala 5 minut stát a třepání zopakovala. Pro oddělení dvou fází, jsem zkumavky centrifugovala po dobu 2 minut na 4400 x g. Poté jsem odebrala vrchní (vodní) fázi do nových označených 0.5 mL zkuvek, k ní přidala 150 µL chloroformu a 20 sekund třepala v ruce. Poté jsem vzorky centrifugovala 2 minuty při 16800 x g. Z mikrozkuvek jsem opět odebrala svrchní vrstvu, jejíž objem jsem si zaznamenala. Abych odstranila RNA ze vzorku, přidala jsem 1 µL RNAsy a nechala inkubovat 20 minut při 37°C. V předposledním kroku jsem DNA ze vzorku vysrážela přidáním 1/10 objemu 1M Na-acetátu a 2,5 násobku objemu 95% etanolu. Zkumavky jsem poté dala na 1 hodinu zamrazit při -70°C. Poté jsem vzorky centrifugovala po dobu 15 minut na 16800 x g. Všechnu tekutou fázi jsem odsála, peletky opláchla 200 µL 70% etanolem a znovu centrifugovala 5 minut na 16800 x g a odsála. Zbytkový etanol jsem ponechala odpařit ještě 20 minut

v digestoři. Na závěr jsem izolovanou DNA rozpustila ve 20  $\mu\text{L}$  TE pufru a poté skladovala zamraženou při  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.2.9. Celogenomové sekvenování

Pro analýzu genomových mutací revertantních kmenů  $\Delta hik33$  mutantů jsem změřila koncentraci naizolovaných DNA vzorků, které jsem následně pojmenovala a zaslala na Illumina sekvenování (Eurofins Genomics). Osekvenované genomy jsem zpracovala v komerčně dostupném programu Geneious Prime, ve kterém jsem genomy mutantů porovnávala s referenčními genomy *Synechocystis* (Kazusa a WT-P) a vyhledávala úplně segregované mutace.

### 3.2.10. PCR

V diplomové práci jsem používala dvě různé polymerázy: Q5 (Thermo Fisher Scientific) a Dream Tag (Thermo Fisher Scientific). Pro vzorky určené na klonování, kontrolu kmenů před sekvenováním a kolonií po transformaci jsem použila proof-reading Q5. Pro ověření přítomnosti genového produktu během segregace jsem použila Dream Tag polymerázu. Vzorky získaných produktů PCR jsem pročistila pomocí kitu GeneJET PCR purification kit od firmy Thermo Scientific.

### 3.2.11. Klonování

PCR produkt (*hik33-Strep*) a požadovaný plazmid p-C-Flag s kanamycinovou rezistencí jsem štěpila pomocí restrikčních enzymů *NdeI* a *XmaII* (oba od Thermo Fisher Scientific, viz. Příloha 1) ve dvou paralelních reakcích. Štěpnou reakci jsem prováděla v objemu 10  $\mu\text{L}$ . Složení bylo následující: 1  $\mu\text{L}$  restrikčního pufru, 0.5  $\mu\text{L}$  enzymu *NdeI*, 0.75  $\mu\text{L}$  enzymu *XmaII*, 2.75  $\mu\text{L}$  destilované vody a nakonec 5  $\mu\text{L}$  PCR produktu. Štěpení plazmidu p-C-Flag jsem prováděla v celkovém objemu 10  $\mu\text{L}$ . Složení reakce bylo 4.75  $\mu\text{L}$  vody, 1  $\mu\text{L}$  restrikčního pufru, 3  $\mu\text{L}$  plazmidu a opět 0.5  $\mu\text{L}$  enzymu *NdeI* a 0.75  $\mu\text{L}$  enzymu *XmaII*. Reakce byla inkubována 1 hodinu při  $37^\circ\text{C}$ . Následně byly enzymy inaktivovány vystavením teploty  $80^\circ\text{C}$  po dobu 20 minut.



Produkty štěpné reakce jsem smíchala a spojila v ligační směsi: 2  $\mu\text{L}$  vody, 1.5  $\mu\text{L}$  pufru, 1.5  $\mu\text{L}$  ATP, 6  $\mu\text{L}$  PCR štěpného produktu, 3  $\mu\text{L}$  štěpného plazmidu a 1  $\mu\text{L}$  enzymu ligázy (T4 DNA). Ligace probíhala přes noc při 4  $^{\circ}\text{C}$ . Před elektroporací jsem směs přečistila přidáním 400  $\mu\text{L}$  butanolu a následnou centrifugací 10 minut 16800 x g. Po odsátí supernatantu jsem pelet rozpustila v Merck vodě.

Pro elektroporaci jsem sterilizovala elektroporační kyvetu 96% etanolem. Sterilně jsem si také připravila bakteriální 10mL zkumavku s 1 mL tekutého SOC média, které jsem předehtřála na 37 $^{\circ}\text{C}$  v inkubátoru. Elektroporační kyvetu jsem si předchladila na ledu a do ní přenesla 40  $\mu\text{L}$  směsi buněk DH5 $\alpha$  (elektrokompetentní *E.coli*) s 1  $\mu\text{L}$  přečištěné ligační směsi a ponechala 5 minut inkubovat. Elektroporace proběhla při nastavení 2.5 KV/1.8 KV. Obsah kyvety jsem poté přenesla do předehtřátého SOC média a pěstovala 1 hodinu za stálého míchání v inkubátoru při 37 $^{\circ}\text{C}$ . Poté jsem odebrala 200  $\mu\text{L}$  kultury a rozetřela sterilizovanou skleněnou hokejkou na předem nalité LB misky s kanamycinem (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a inkubovala při 37 $^{\circ}\text{C}$  přes noc. Pro izolaci plazmidu z buněk *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) jsem používala komerčně dostupný GeneJet Plazmid Miniprep kit (Thermo scientific).

### **3.2.12. Transformace *Synechocystis***

Z napěstované kultury *Synechocystis* jsem odebrala pomocí sterilní špičky masu buněk. Ty jsem přenesla do 0,5 mL Eppendorf zkumavky obsahující 100  $\mu\text{L}$  BG11 média a re-suspendovala. Následně jsem k buňkám přidala 1-2  $\mu\text{L}$  izolovaného plazmidu a inkubovala je na světle po dobu 2 hod. Poté byla směs rozetřena na misku s médiem BG11 a kultivována přes noc při teplotě 28 $^{\circ}\text{C}$  na nízkém světle v kultivátoru Precival (Percival Scientific). Druhý den byly kolonie přesazeny na misky s médiem, 10 mM TES, 5 mM glukózou a kanamycin o koncentraci 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

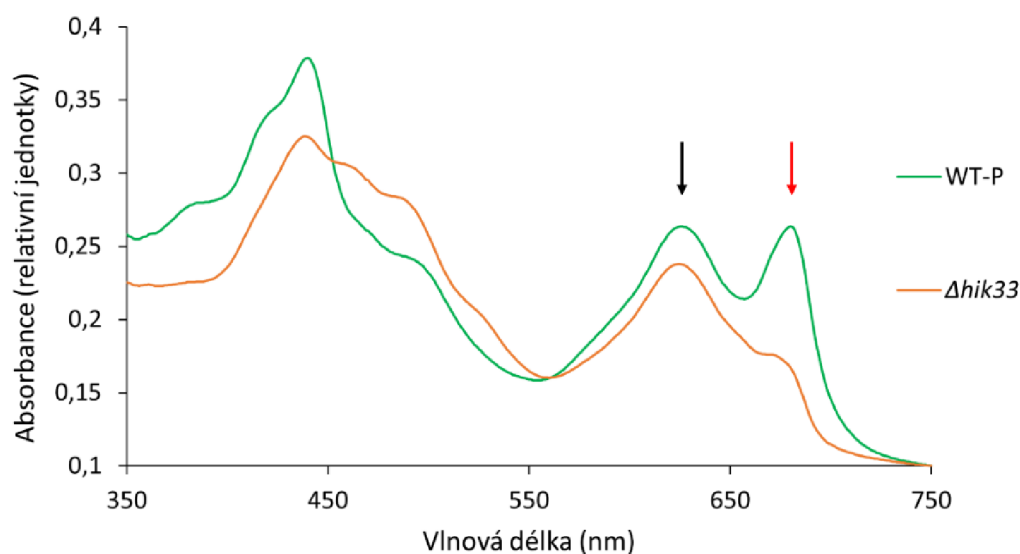
## 4. Výsledky

V Laboratoři fotosyntézy, MBÚ Třeboň, byl vytvořen deleční kmen  $\Delta hik33$ , který postrádá Hik33 (viz. Příloha 2). Příprava kmene proběhla před začátkem mého projektu Dr. Petrou Skotnicovou a na počátku práce byl genom kmene kontrolně sekvenován pro ověření, že neobsahuje žádné další mutace kromě delece genu *hik33*.

Pro projekt diplomové práce byly vybrány dva kmeny sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803, a to deleční kmen mutantu  $\Delta hik33$  a kmen WT-P, který je kontrolním kmenem k tomuto mutantu (byl použitý jako výchozí kmen).

### 4.1. Charakteristika mutantu $\Delta hik33$

Prvním úkolem mé práce bylo určit, jak ztráta Hik33 ovlivní růst a pigmentaci buněk. Buněčná spektra byla měřena u buněčných kultur kultivovaných fotoautotrofně na NL s  $OD_{750}$  kolem 0,1. Mutant, na rozdíl od kontrolního kmene, měl poměrně drasticky sníženou koncentraci chlorofylu na buňku (absorbance 675 nm) i fykobilisomů (625 nm). Avšak absorbance reprezentující koncentraci karotenoidů (400-500 nm) byl u  $\Delta hik33$  výrazně vyšší než u WT-P. Tyto výsledky ukazují na sníženou akumulaci fotosyntetických komplexů (málo chlorofylu) a zvýšený oxidativní stres – zvýšenou koncentrací karotenoidů.

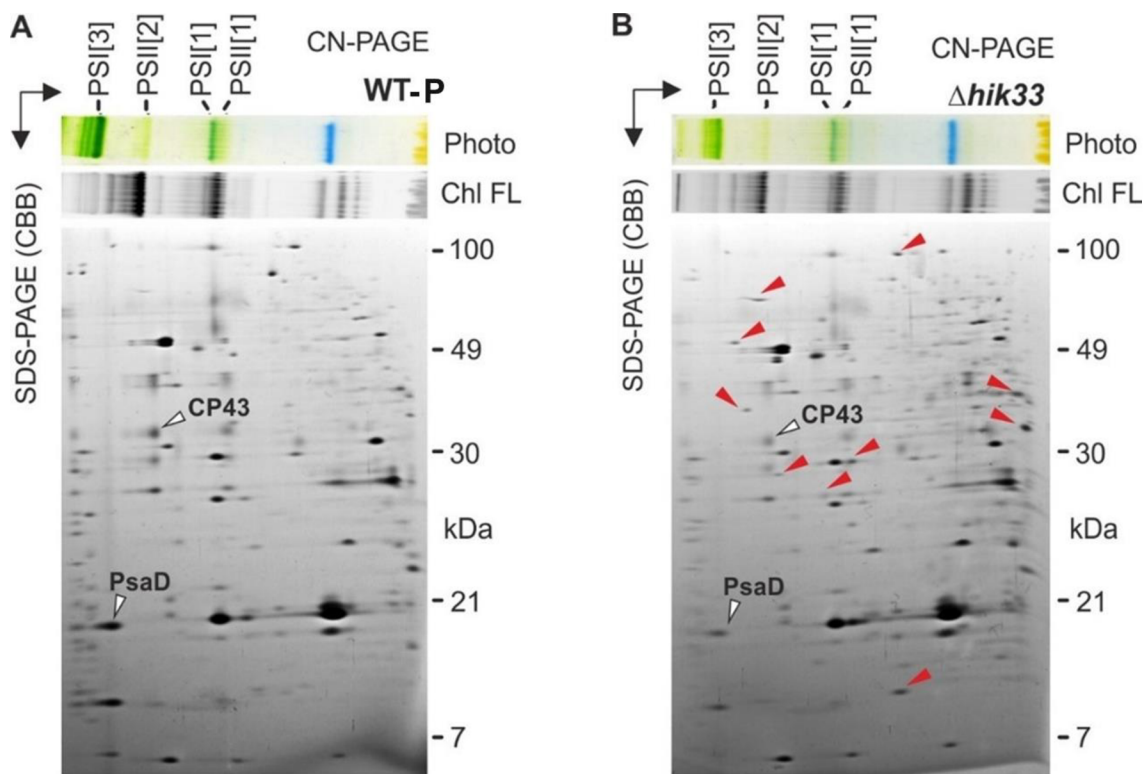


**Obr. 5. Absorbanční spektra kmenů WT-P a  $\Delta hik33$ .** Oranžově je vyznačené absorbanční spektrum kmene  $\Delta hik33$  a zeleně spektrum kontrolního kmene (WT-P). Mutantní kmen má velmi nízký obsah chlorofylu, ale zároveň zvýšenou koncentraci karotenoidů. Černou šipkou je označen pik fykobilizomů a červenou pik chlorofylu (Chl).

Pro objasnění efektu delece Hik33 na proteinové složení tylakoidních membrán byly membrány připraveny (viz. Metody) z buněk kultivovaných na nízkém světle v přítomnosti glukózy. Po solubilizaci byly membránové proteiny separovány pomocí nativní elektroforézy (CN-PAGE) za použití amfipolu A8-35 (viz. Metody). Získaný nativní gel byl naskenován a dále byla analyzována fluorescence chlorofylu v gelu. Tato technika umožňuje detekovat PSII komplexy, které obsahují méně molekul chlorofylu než PSI, ale mají velmi intenzivní fluorescenci (viz. dále).

Výsledný CN-PAGE kmenů potvrdil velmi rozdílný obsah komplexů PSI a PSII u kontrolního kmene a mutanta. To kontrastovalo s porovnatelnou hladinou fykobilizomů, zatímco koncentrace volných karotenoidů u  $\Delta hik33$  jasně převyšovala koncentraci u WT-P. Tyto poznatky potvrzují výsledky měření celobuněčných absorbančních spekter (Obr. 5). Gelové proužky z prvního rozměru byly dále separovány v druhém rozměru na denaturačním gelu (SDS-PAGE), čímž se rozdělily podjednotky jednotlivých proteinových komplexů. Výsledný denaturační gel byl posléze obarven pomocí Coomassie blue.

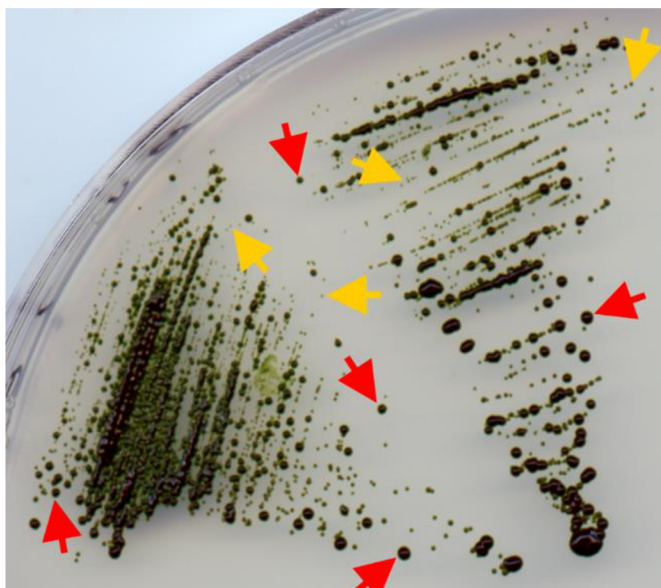
SDS-PAGE jasně potvrdil, že  $\Delta hik33$  je silně deficientní na obsah trimerní formy PSI (PSI[3]) a jak monomerní, tak dimerní formy PSII (PSII[1] a PSII[2]). Tento závěr je evidentní z intenzity barvení podjednotek obou fotosystémů. Na gelu je vyznačený jako marker podjednotka PSI CP43 a podjednotka PSII PsdD, ale týká se to samozřejmě i ostatních podjednotek fotosystémů. Je velmi překvapivé, že u mutanta  $\Delta hik33$  je hladina celé řady membránových proteinů výrazně vyšší než u WT-P (červené šipky, Obr. 6). Identita těchto proteinů není zatím známá, připravuje se analýza pomocí hmotnostní spektroskopie.



**Obr. 6. 2D CN/SDS-PAGE analýza membránových proteinů u kmenů A) WT-P a B)  $\Delta hik33$ .**  
 A) Gelový proužek WT-P získaný z CN-PAGE byl nejprve ofocen a poté skenován na fluorescenci chlorofylu po excitaci modrým světlem (Ch FL) pomocí Fuji LAS 4000. Rozdělené proteinové komplexy byly dále separovány pomocí SDS-PAGE a získaný gel dále obarven v Coomassie blue (CBB). B) Stejným způsobem proběhla analýza membránových proteinů  $\Delta hik33$ . Podjednotka PSII a PSI (CP43 a PsaD) byly označeny na základě předchozích výsledků v laboratoři. Červeně byly vyznačeny proteiny vyskytující se ve vyšší koncentraci u mutantu než u WT-P. PSI[3] – trimerní PSI, PSII[2] – dimerní PSII, PSI[1] – monomerní PSI, PSII[1] – monomerní PSII.

#### 4.2. Analýza supresorových mutací v revertovaných kmenech $\Delta hik33$

Při pěstování  $\Delta hik33$  na miskách bez glukózy bylo vyzorováno, že je tento kmen geneticky nestabilní a tvoří rychleji-rostoucí kolonie (Obr. 7). To naznačuje tvorbu revertovaných buněk, které obsahují jednu, nebo několik supresorových mutací. Analýza mutací, které komplementují (vylepší) původní fenotyp může přinést velmi cenné výsledky pro pochopení určitého mechanismu (Skotnicová *et al.*, 2024), v mém případě role Hik33.



**Obr. 7. Kolonie revertantních kmenů  $\Delta hik33$ .** Červené šipky označují výrazně rychleji rostoucí kolonie, žluté šipky původní kolonie  $\Delta hik33$  mutantů. Toto chování ukazuje na tvorbu sekundárních mutací (revertantních kmenů).

V mém projektu jsem se proto rozhodla izolovat set revertantů, ideálně s odlišným fenotypem, abych získala různé supresorové mutace. Pro získání supresorových mutantů byl  $\Delta hik33$  kmen kultivován fotoautotrofně na NL ozářenosti. Po 3 týdnech jsem získala revertované kmene (kolonie) a 31 těchto kolonií bylo přesazeno na novou misku a dále kultivováno na NL. Přesazování na novou agarózovou plotnu probíhalo každé dva týdny. U mutantů (R6, R10, R12, R13, R18), které se na plotně jevíly fenotypově odlišně, byla izolována DNA a zaslána na komerční celogenomové sekvenování. Hrubá sekvenační data (*reads*) jsem analyzovala pomocí programu Geneious Prime s použitím referenčních genomů.

V porovnání s referenčním genomem Kazusa (původní genom z roku 1996) jsem u revertantů R18, R13, R12, R10 a R6 našla mutace ve čtyřech různých genech: *slr1609*, *slr1753*, *rpl3* a *slr0484*. Gen *slr1609* kóduje enzym CoA ligázy dlouhých řetězců mastných kyselin, *slr1753* kóduje protein s neznámou funkcí, gen *rpl3* ribosomální protein L3 a *slr0484* je gen pro His kinázu 26 (Hik26). Nicméně další analýza referenčního genomu WT-P kmene ukázala, že geny *slr1609*, *slr1753* a *rpl3* se neliší u kontrolního kmene

a referenčního kmene Kazusa. Z tohoto důvodu jsem tyto mutace dále nezkoumala, jelikož se nejedná o mutace způsobené stresem z delece Hik33.

Mutace v genu *slr0484* (viz. Příloha 2), kódující histidinovou kinázu 26 (Hik26), byla přítomna u revertantních kmenů s výjimkou R10 mutanta, u kterého se mi nepodařilo identifikovat žádnou mutaci (Tabulka 1). U ostatních kmenů se jednalo o identickou mutaci (inzerce báze) v Hik26, která způsobila posun čtecího rámce a pravděpodobně úplné vyřazení Hik26. Zároveň se jako jediná mutace, na rozdíl od prvních tří, vyskytovala pouze u revertantů, nikoli u WT-P. Jelikož se supresorová mutace v genu *slr0484* jevila jako velmi frekventovaná, byl u dalších revertovaných kmenů sekvenován pouze tento gen (PCR produkt) pomocí komerčního Sangerova sekvenování.

<b>Revertovaný kmen</b>	<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Mutace (gen)</b>	<b>Mutace (protein)</b>
R6	<i>slr0484</i>	Hik26	adice C	R189fs
R10	-	-	-	-
R12	<i>slr0484</i>	Hik26	adice C	R189fs
R13	<i>slr0484</i>	Hik26	adice C	R189fs
R18	<i>slr0484</i>	Hik26	adice C	R189fs

**Tabulka 1. Supresorové mutace identifikované pomocí celogenomového sekvenování.** Sekvenační data mutantů byla zpracovávána v programu Geneious Prime a porovnávány s kontrolním kmenem *Synechocystis* WT-P. V případě kmene R10 se žádná mutace nepodařila identifikovat.

U druhé sady sekvenačních dat (Tabulka 2) jsem dohromady objevila deset unikáních mutací v genu pro Hik26, z nichž většina vedla k posunutí čtecího rámce (šest mutací), nebo k tvorbě předčasného stop kodónu (dvě mutace). Další dvě nalezené mutace způsobily záměnu aminokyseliny za jinou, konkrétně cystein za cystein (tichá mutace) a serin za izoleucin. Dohromady se u většiny revertantů vyskytovala aspoň jedna mutace způsobující narušení funkce Hik26, výjimkou R10 a R11. Narušení funkčnosti Hik26 je tak

nepochybně důležité pro vylepšení růstové vlastnosti mutantního kmene  $\Delta hik33$ , alespoň na NL (viz. dále).

Revertovaný kmen	Gen	Protein	Mutace (gen)	Mutace (protein)
R5	<i>slr0484</i>	Hik26	G na T	S135I
R5	<i>slr0484</i>	Hik26	delece T	W294fs
R5	<i>slr0484</i>	Hik26	delece G	V306fs
R1, R2, R4, R7, R8, R15, R16, R23, R26, R31	<i>slr0484</i>	Hik26	delece G	G601fs
R22	<i>slr0484</i>	Hik26	delece 32 bází	G46fs
R3, R9, R19, R21, R24, R25, R27, R28, 30	<i>slr0484</i>	Hik26	adice C	R189fs
R17, R28	<i>slr0484</i>	Hik26	adice G	G601fs
R14, R20, R29	<i>slr0484</i>	Hik26	C na T	Q632STOP
R14	<i>slr0484</i>	Hik26	T na G	Y211STOP
R11	<i>slr0484</i>	Hik26	T na C	C435R

**Tabulka 2.** Výsledky sekvenace genu *slr0484* u ostatních revertantů  $\Delta hik33$ . U mutantních kmenů byly sekvenáčnı data porovnána s referenční oblastı genu *hik26*. Dohromady bylo objeveno 10 mutací, jejichž poloha a typ je popsán v tabulce.

### 4.3. Fenotyp $\Delta hik33$ a revertovaných variant

Jelikož velká část osekvenovaných revertantní kmenů obsahovaly supresorové mutace postihující Hik26, bylo důležité zjistit, jak moc mutace ovlivnily růstové vlastnosti a obsah fotosyntetických komplexů v porovnání s původním  $\Delta hik33$  a WT-P. Pro analýzu fenotypu jsem měřila rychlost dělení kmenů za různých podmınek, dále obsah jejich

buněčného chlorofylu a pigmentů a na závěr poměr zastoupení proteinových komplexů tylakoidních membrán.

Nejprve byla provedena analýza rychlosti dělení (růstová křivka) jednotlivých kmenů a měření obsahu chlorofylu na buňku (viz. Metody). Pro analýzu jsem kultivovala šest revertantních kmenů (R5, R8, R10, R17, R21, R22), WT-P a  $\Delta hik33$  v BG11 s osvětlením 50  $\mu\text{mol fotonů /m}^2/\text{s}$ . Optická hustota ( $\text{OD}_{750}$ ) byla měřena 18, 21,5, 25, 29 a 42 hodin od počátku měření. Výsledky ukázaly výrazně rychlejší růst u revertantů (kolem 20 h) než u původního mutanta (27,3 h, Tabulka 3). Nejrychlejší růst byl zaznamenán u kmene R10 (18,5 h), u kterého se nicméně nepodařilo identifikovat supresorovou mutaci. Přesto byla rychlost růstu tohoto kmene stále ještě výrazně pomalejší než kontrolního kmene (13,8 h). Výsledky rychlosti růstu byly v souladu se zvýšenou koncentrací chlorofylu na buňku. Revertanti obsahovaly větší množství pigmentu v buňce oproti  $\Delta hik33$ , ale méně než WT.

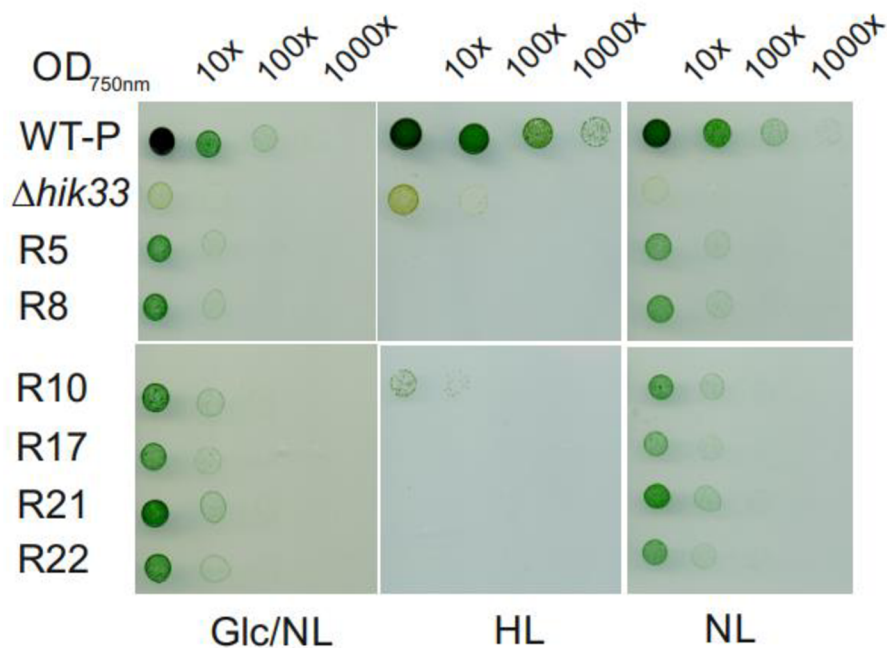
Kmeny	WT-P	$\Delta hik33$	R5	R8	R10	R17	R21	R22
Rychlost zdvojení (h)	13,8	27,3	22	21,1	18,5	21	20,2	20,8
Obsah chlorofylu na buňku ( $\mu\text{g/L}/\text{OD}_{750} = 1$ )	5.25	3.11	4.78	4.47	4.30	4.67	4.26	4.53

**Tabulka 3. Rychlost zdvojení u kmenů WT-P,  $\Delta hik33$  a šesti vybraných revertantů (R5, R8, R17, R21, R22).** Většina kultur, kromě WT-P, byla měřena bez nutnosti ředění. Nejrychlejší růst byl zaznamenán u WT-P a poté u revertanta R10. Naopak nejpomaleji se dělil  $\Delta hik33$ .

Ačkoli všechny analyzované revertované kmeny rostly v kultuře lépe než původní mutant fotoautotrofně na NL, bylo zajímavé zjistit, jak sekundární mutace v Hik26 ovlivňují schopnost aklimatizace na odlišné podmínky (vysoké světlo, mixotrofní růst) v porovnání s  $\Delta hik33$  a WT-P. Rychlost růstu byla testována na miskách (ředící řada, viz. Metody) kultivovaných na NL, fotoautotrofně na HL (300  $\mu\text{mol fotonů /m}^2/\text{s}$ ) a mixotrofně s glukózou na NL. Jednotlivé kultury byly ředěny 4x desetinásobně. Všechny revertované



kmeny prokázaly výrazné zlepšení růstu oproti  $\Delta hik33$  na NL za přítomnosti glukózy i fotosynteticky na NL (Obr. 8). Je zajímavé, že kromě kmene R10, nebyly revertované kmeny schopné růst na HL, zatímco původní mutant rostl rychleji než na NL. R10 vykazoval velmi omezený, nicméně detekovatelný růst na HL (Obr. 8).

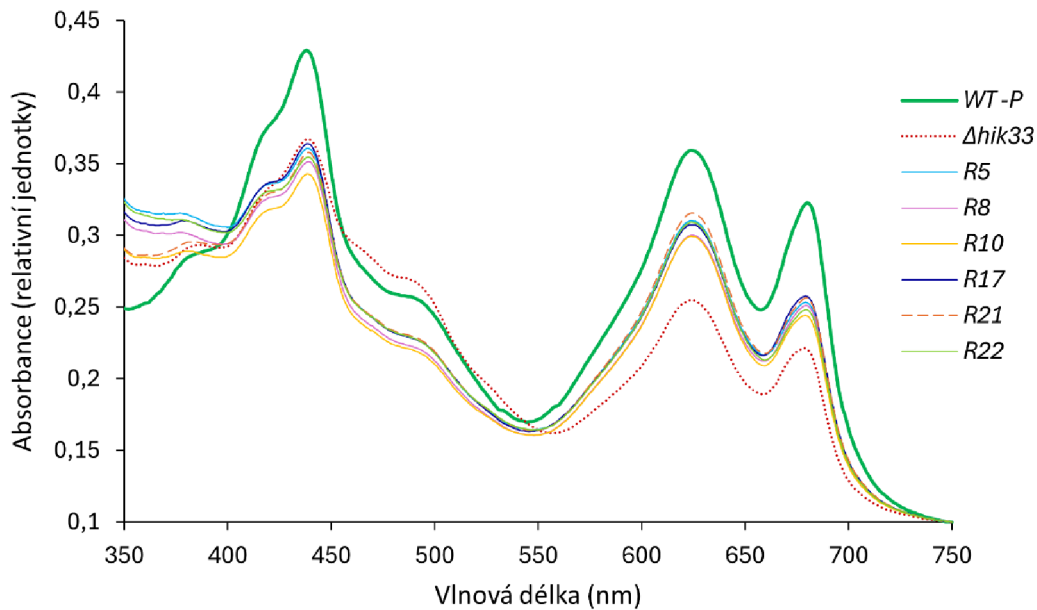


**Obr. 8. Schopnost proliferace WT-P,  $\Delta hik33$  mutantu a revertantů za různých podmínek.** Analýza životaschopnosti buněk probíhala pomocí dot assay na miskách ve čtyřech ředění ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) při třech různých podmínkách – fotoautotrofně na NL, mixotrofně na NL a fotoautotrofně na HL.

Vzhledem ke zvýšené koncentraci chlorofylu v buňkách revertantů (Tabulka 3), byly kultury R5, R8, R10, R17, R21, R22, WT-P a  $\Delta hik33$  dále analyzovány na obsah fykobiliproteinů, karotenoidů a chlorofylu pomocí celo-buněčných spekter.

Absorbanční spektra revertantů obsahovala vysoké píky, jinými slovy vysokou koncentraci, chlorofylu a v porovnání s WT-P a  $\Delta hik33$  (Obr. 9). Všechny absorbanční píky u revertantů opisovaly podobné trajektorie a dosahovaly téměř totožných výšek. Shodovaly se v koncentracích přítomných pigmentů a nejvyšších hodnot dosahoval kmen R17

a nejnižších R10. Na druhou stranu koncentrace fykobilisomů byla u revertantů nízká, ale převyšovala píky u  $\Delta hik33$ . Koncentrace karotenoidů byla u revertantů a WT-P totožná, ale v porovnání s  $\Delta hik33$  velmi nízká. Absorbanční spektra revertantních kmenů se více než spektru mutanta  $\Delta hik33$  podobala WT-P, který převyšovaly v koncentraci chlorofylu.

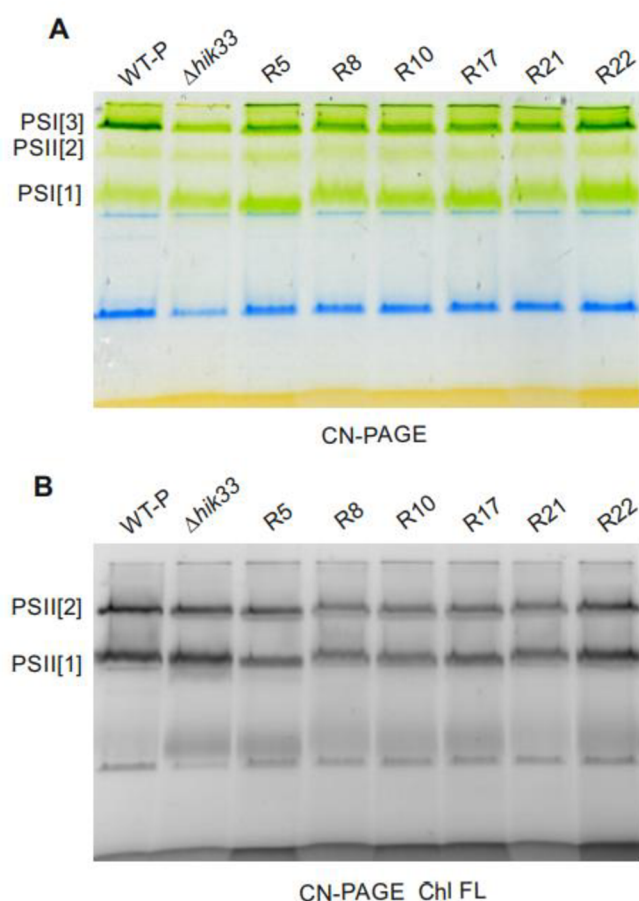


**Obr. 9.** Absorbanční spektra vzorků WT-P,  $\Delta hik33$ , R5, R8, R10, R17, R21 a R22. Spektra revertantních kmenů, zeleně označeného kontrolního kmene (WT-P) a červeně označeného  $\Delta hik33$  mutanta.

Pro bližší charakterizaci fenotypu kmenů bylo potřeba zjistit i složení a poměr proteinových komplexů tylakoidních membrán pomocí CN-PAGE. Obsah trimerního komplexu PSI byl evidentně velmi nízký u  $\Delta hik33$  v porovnání s WT-P a také s revertanty. To odpovídá měřením obsahu chlorofylu a buněčným spektrům, protože většina molekul chlorofylu v buňce je vázána v tomto komplexu. (Obr. 10.A). Zajímavá je vyšší hladina monomerního komplexu PSI u všech revertantů.

Analýza fluorescence chlorofylu umožní kvantifikovat PSII (Obr. 10.B) a bylo překvapivé, že koncentrace jak monomerní, tak dimerní formy PSII, není příliš ovlivněna ztrátou Hik33. Tento výsledek se odlišuje od mutantního kmene rostlého mixotrofně na

nízkém světle (Obr. 6), kdy byla hladina PSII u mutanta evidentně nižší než u kontrolního kmene. U revertovaných kmenů se hladina PSII jeví lehce nižší než u původního mutanta, což naznačuje, že ztráta Hik26 vede ke kompenzaci PSI na úkor PSII. Signál fluorescence chlorofylu u  $\Delta hik33$  a všech revertovaných kmenů obsahuje širší pás fluorescence nad separovanými fykobilisomy (Obr. 10.B). Toto je typické pro volné podjednotky PSII, konkrétně CP47 a CP43. Pro potvrzení bude nutné analyzovat komplexy v druhém rozměru (SDS-PAGE), ale je pravděpodobné, že všichni mutanti mají problém se skládáním, či opravou PSII.

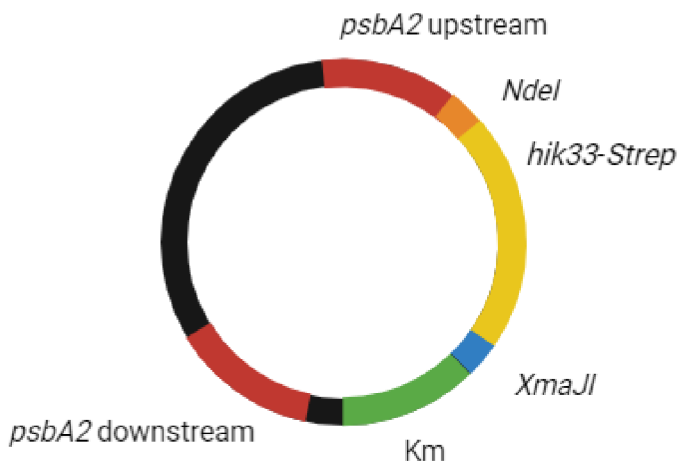


**Obr. 10. Analýza fotosyntetických komplexů v kmenech WT-P,  $\Delta hik33$ , R5, R8, R10, R17, R21 a R22 pomocí CN-PAGE.** Všechny kmene byly rostlé fotoautotrofně na NL. Tylakoidní membrány byly izolované v pufru B a 20 minut solubilizované ve směsi detergentů (GDN a  $\beta$ -DDM). Po přidání amfipolu A8-35 byly proteiny nanášeny na gel a separovány. CN-PAGE gel byl ofocen, poté oskenován (A) a fluorescence chlorofylu (Chl FL) detekována po excitaci modrým světlem pomocí

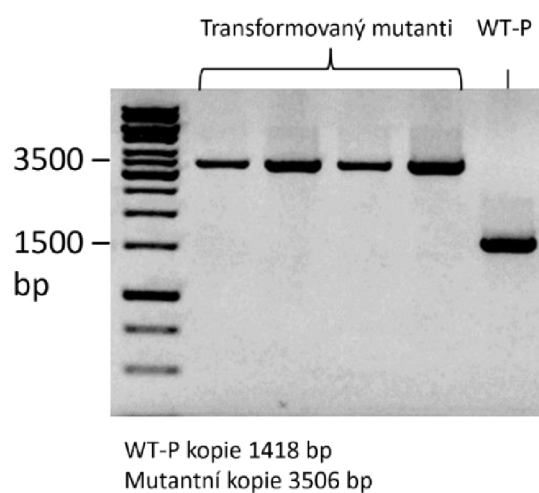
*Fuji LAS 4000. PSI[3] -trimerní PSI, PSII[2] – dimerní PSII, PSI[1] – monomerní PSI, PSII[1] – monomerní PSII.*

#### 4.4. Příprava kmene produkující protein Hik33-Strep

Jedním z cílů mé magisterské práce byla izolace Hik33 proteinu ze *Synechocystis* pomocí Strep II kotvy. Konstrukce plazmidu *hik33-Strep-Km* (Obr. 11) je popsána v metodice. Plazmid byl transformován do *Synechocystis* a mutantní lokus byl segregován do všech kopií chromozomu (Obr. 12). Získaný kmen *Synechocystis* exprimující Hik33-Strep neměl žádné problémy v růstu při NL ozáření, na rozdíl od  $\Delta hik33$  mutantu či revertantních mutantů, a jeho fenotypový projev byl velmi podobný WT-P kmenu. Bohužel, z technických důvodů s FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) jsem nebyla v rámci své magisterské práce schopna izolovat protein purifikací.



**Obr. 11. Schéma plazmidu *hik33-Strep-Km*.** Genový konstrukt se skládá z vyznačených upstream a downstream lokusu *psbA2* (červeně), upstream sekvence obsahuje i vlastní promotor. Žlutě je vyznačen Gen *hik33-Strep*, oranžově a modře štěpná místa pro enzymy *NdeI* a *XmaJI* a zeleně je označen gen rezistence pro kanamycin (*Km*).



**Obr. 12. Kontrola segregace kmene *hik33-Strep* pomocí PCR.** Za použití shodného páru primerů má amplifikovaný lokus *psbA2* u WT-P velikost 1418 bp, po vložení gene *hik33-Strep* je očekávána velikost 3506 bp. PCR produkty byly separované na agarózovém gelu.

## 5. Diskuze

### 5.1. Mutanti $\Delta hik33$ sinice *Synechocystis*

V této práci se podařilo analyzovat fenotypový projev  $\Delta hik33$  mutanta a supresorových mutantů (revertantů) v porovnání s kontrolním kmenem (WT-P). Mutantní kmen *Synechocystis* s inaktivním Hik33 byl již vytvořen (a publikován) nezávisle alespoň 5x (Morrison *et al.*, 2005, Suzuki *et al.*, 2000, Hsiao *et al.*, 2004, Zabulon *et al.*, 2007, Bartsevich a Shestakov, 1995). Tyto kmeny není jednoduché porovnat s našim kmenem, u kterého máme potvrzeno, že neobsahuje další mutace. Nicméně alespoň částečně se „náš“  $\Delta hik33$  kmen shodoval s popsányými projevy.

Konkrétně byl u několika publikovaných kmenů popsán zhoršený fotoautotrofní růst při nízké i vysoké ozářenosti a sníženou koncentrací chlorofylu (Ge *et al.*, 2017). Růst kmenů byl mírně vylepšen přidáním glukózy do média, ale v porovnání s WT-P stále strádal (Ge *et al.*, 2018). Ačkoliv se  $\Delta hik33$  shodoval v popsáných fenotypových projevech s většinou článků, existují zjevné rozpory u některých z nich. Exprese genů v  $\Delta hik33$  v publikacích Tu *et al.*, (2004) a Hsiao *et al.*, (2004) totiž nevykazovaly žádnou transkripční změnu od kontrolního kmene (WT-P), mutanti se více podobaly WT-P než kmenu postrádající Hik33. Vzhledem k fenotypu  $\Delta hik33$  je velmi nepravděpodobné, že není (dramaticky) ovlivněn celkový transkript. Hlavně u genů podjednotek PSI lze očekávat výrazný pokles mRNA. Podobně zarážející jsou výsledky publikace Marin *et al.*, (2003), kde autoři uvádějí, že mutant  $\Delta hik33$  rostl podobně jako kontrola. V publikaci Morrison *et al.*, (2005) má mutant porovnatelný obsah chlorofylu na NL s kontrolou. Vzhledem k mým výsledkům je tedy dost pravděpodobné, že se v článku jedná o revertovaný kmen, nikoli  $\Delta hik33$ . Je docela možné, že všechny čtyři kmeny publikované jako  $\Delta hik33$ , jsou ve skutečnosti revertované kmeny, protože „čistý“  $\Delta hik33$  je podle mých výsledků geneticky velmi nestabilní.

## 5.2. Problém přípravy delečního mutantu $\Delta hik33$

Je otázkou, proč se autorům předchozích publikací pravděpodobně nedařilo získat mutantu  $\Delta hik33$ . Problém s genetickou nestabilitou se nicméně stal zjevný až zhruba v poslední dekádě díky rozvoji celogenomového sekvenování. Problém genetické nestability se často přehlížel a dá se očekávat, že celá řada publikovaných kmenů *Synechocystis* jsou ve skutečnosti revertované kmene (viz. např. Kiss *et al.*, 2023). Rozlišení revertovaných kolonií a pravého  $\Delta hik33$  na miskách je náročné a je důležitá neustálá kontrola fenotypových projevů  $\Delta hik33$  v porovnání s WT-P. V mé práci byl mutantní kmen neustále přesazován na čerstvé misky s glukózou, pro zabránění předčasnému vzniku revertantů. Zároveň byl mutant kultivován spolu s WT-P na jedné misce, kvůli lepší vizualizaci případných změn ve fenotypu  $\Delta hik33$ . Pro přesnější určení, zda kmen stále geneticky uniformní, byl mutant i revertované kmene ověřovány pomocí PCR na segregaci mutantního lokusu.

## 5.3. Funkce Hik33

Hik33, také nazývaná DspA, patří mezi nejvíce studované His kinázy sinic. Název DspA (divalentní kationový sensor protein A) souvisí se získanou rezistencí na herbicidy u mutantu postrádající Hik33 (Bartsevich a Shestakov, 1995). Experimenty s mutanty *hik33* prokázaly přítomnost kinázy při vnímání velké škály vnějších stresorů. Souhrnně funguje Hik33 jako senzor pro chlad (Suzuki *et al.*, 2001), hyperosmotický (Paithoonrangsarid *et al.*, 2004), solný stres, ROS (Kanesaki *et al.*, 2007) a výkyvy ozáření (konkrétně červené světlo) (Mironov *et al.*, 2014). Ve dvousložkovém systému je Hik33 spojena s regulátory odpovědi Rre26 či Rre31. Systém Hik33-Rre26 dohromady reguluje expresi 21 chladem indukovaných genů, např. *hliA*, *hliB*, *hliC* kódující tzv. *High light inducible* proteiny účastníci se ochrany procesu skládání PSII (Suzuki *et al.*, 2001; Murata a Los, 2006). Pomocí druhého regulátoru odpovědi (Rre31) reguluje Hik33 minimálně dalších 11 genů (Kaneko *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 2000, Shoumskaya *et al.*, 2005).

Mechanismus, kterým Hik33 rozlišuje jednotlivé typy stresových signálů, a aktivuje specifické regulační mechanismy, není stále plně pochopen. Jedna z možností, jakým kináza

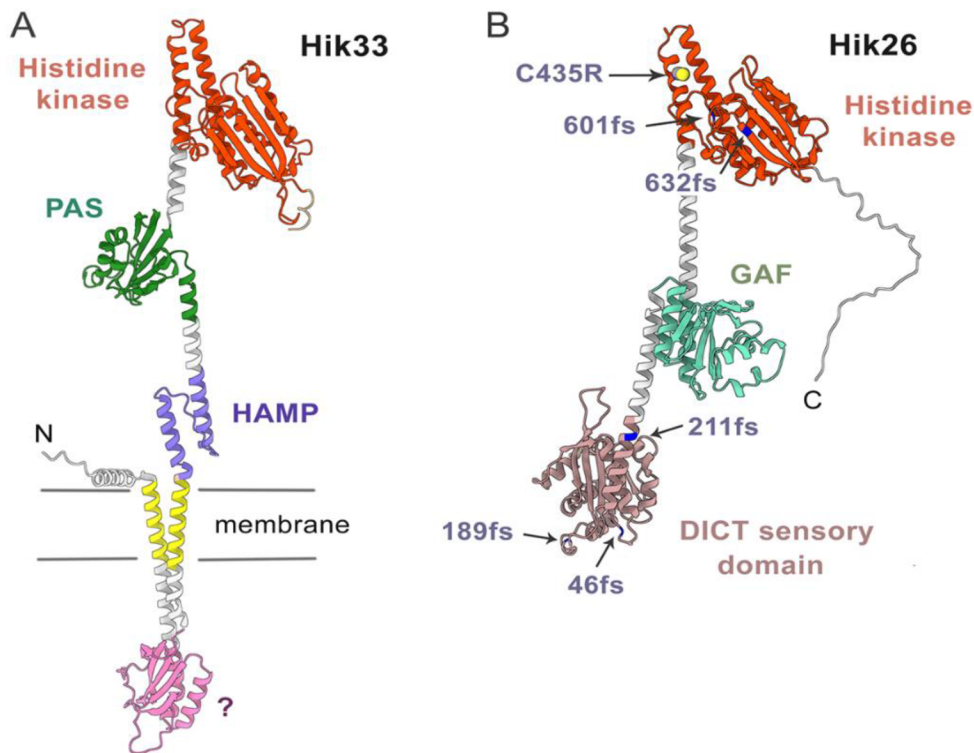
rozpozná konkrétně chladový stres je detekce změn fluidity membrány. Tato hypotéza koreluje se strukturním uspořádáním Hik33, která je považována za transmembránový protein (Obr. 13) ukotvený v tylakoidní membráně (viz. [www.cyanoatlas.com](http://www.cyanoatlas.com), gen *sl10698* kódující Hik33).

U Hik33 mutanta dochází ke změnám v transkriptu během stresu (Yoshikawa *et al.*, 2021). V podmínkách běžného osvětlení (NL), lze předpokládat, že Hik33 indukuje exprese skupiny genů podílející se na mechanismech (viz. Diskuze 5.1). Tyto skupiny zahrnují geny zapojené do fotosyntézy (*psba* a *psb* geny) a fixace uhlíku (*rbc* geny) potřebné pro efektivní zpracování energie. Vzhledem k malému množství fotosyntetických komplexů, chlorofylu a další pigmentů u mutanta postrádající Hik33, lze říci, že transkribované geny, jejichž exprese je regulovaná kinázou, jsou důležitou pro akumulaci fotosyntetických komplexů, především PSI. Lze tedy spekulovat, že alespoň určitá frakce Hik33 je neustále aktivní a chladový stres (a jiné stresy) kinázovou aktivitu umlčují. To je v souladu s poznatkem, že Hik33 pravděpodobně nehraje roli při ochraně proti vysoké ozáření. Naopak, při podmínkách HL Hik33 pravděpodobně není esenciální ochranou kinázou, jelikož  $\Delta hik33$  roste srovnatelně na NL a HL (viz. Obr. 9).

#### **5.4. Detekované mutace v *hik26* a funkce této kinázy**

Poznatek, že ztráta Hik33 je u *Synechocystis* rostlé na NL kompenzovaná téměř exkluzivně mutacemi v Hik26, poukazuje na funkční propojení těchto dvou kináz. Výskyt mutací v *hik26* koreluje s výsledky studie zaměřené na tvorbu kmene *Synechocystis* s vysokou tolerancí ke světlu (Yoshikawa *et al.*, 2021). Výsledný „vyšlechtěný“ kmen obsahoval dvě mutace v genomu, z nichž jedna se nacházela v genu pro Hik26. Získaná data tedy naznačují, že Hik26 hraje klíčovou roli v toleranci vůči nadměrnému ozáření. V naší práci byly mutace náhodné mutagenese trojího charakteru: posun čtecího rámce (fs), záměna aminokyseliny (AMK) a tvorba stop kodónu (stop). Tvorba stop kodónů i posun čtecího rámce patří mezi mutace inaktivující pravděpodobně celý protein, protože kinázové domény je funkce Hik26 těžko představitelná. Zajímavá je bodová mutace C435R v úseku před His kinázou (Obr 13 B), protože je možné, že tento protein je stále funkční. To musí prokázat budoucí analýza.





**Obr. 13. Struktury Hik33 a Hik26 predikované programem Alphafold 2.** A) Protein Hik33 ukotvený v tylakoidní membráně s vyznačenými doménami. Mezi struktury nacházející se na cytoplazmatické straně membrány patří červeně zvýrazněná histidinová kináza (červeně), PAS doména (zeleně), HAMP doména (fialově). Transmembránové segmenty jsou vyznačené žlutě, neznámá doména (magenta) v periplasmě. B) Hik26 nemá predikovaný transmembránový segment, ale je asociovaná s membránou různých typů včetně tylakoidní membrány (podle serveru CyanoAtlas). Hik26 také obsahuje histidin - kinázu, dále GAF doménu (zeleně) a DICT (diguanylate cyclase typical) senzorkou doménu (hnědě). Vyznačeny jsou mutace nalezené pomocí sekvenování hik26 u 31 revertantů  $\Delta hik33$ .

Histidinová kináza (Hik26) patří mezi méně charakterizované kinázy dvousložkového systému. Funkce a regulátory odpovědi Hik26 nejsou známy a zůstávají stále předmětem debat a hypotéz. Strukturně se kináza skládá ze třech domén: histidin-kinázové, GAF a senzorkové DICT (*diguanylate cyclase typical*) domény (viz. Obr. 13). Předpokládá se, že větší frakce Hik26 je lokalizována v periplasmě (na vnější membráně)

a menší frakce asociovaná s tylakoidní membránou (CyanoAtlas; Hernandez-prieto a Futschik, 2012). Vzhledem k přítomnosti senzorických GAF a DICT domén (vázájící ligandy), lze považovat jednu (nebo obě) z těchto domén jako jednotku aktivující funkci proteinu Hik26. Vazebná regulační molekula pro Hik26 nebyla stále objasněna, ale vzhledem k přítomnosti DICT domény se může jednat o takzvanou di-cGMP molekulu. di-cGMP patří mezi cyklické signální molekuly, které se účastní regulačních procesů u bakterií, především během stresu (Enomoto *et al.*, 2023). DICT, je typická doména pro enzym diguanylát cyklázu, která hraje klíčovou roli v bakteriální signalizační dráze regulací hladiny di-cGMP.

Dle výsledků z webu CyanoExpress (CyanoEXpress; Wang *et al.*, 2022), dochází k potlačení změnám transkripce genu pro Hik26 (*slr0484*) při nízkém osvětlení až tmy. Tady se jedná o podmínky, kdy tato kináza není potřebná. Pro porovnání, v případě Hik33 dochází k expresi – při jakémkoli vychýlení podmínek nízkého stresu. Revertanti bez Hik33 s vyřazeným Hik26 projeví vylepšení schopnosti aklimatizace a rychlosti růstu, oproti původnímu  $\Delta hik33$  (viz. Výsledky: Porovnání WT-P,  $\Delta hik33$  a revertantních kmenů). Mutanti zároveň obsahovali výrazně vyšší hladinu PSI, což by mohl být jedním z klíčových cílů regulace jak Hik33, tak Hik26. Je pravděpodobné, že aktivní Hik26 potlačuje syntézu PSI při stresových podmínkách, zatímco Hik33 udržuje hladinu PSI při nízkém stresu. Hik26 je patrně aktivována zvýšenou hladinou di-cGMP. Protein Hik26 tedy může fungovat jako antagonist Hik33, tlumící expresy genů, které Hik33 kináza indukuje.

## 6. Závěr

Ve své diplomové práci jsem charakterizovala mutantní kmen  $\Delta hik33$  sinice *Synechocystis* a zároveň připravila a popsala 31 revertantních kmenů tohoto mutanta, včetně identifikace jejich supresorových mutací. Poslední cíl mé práce, tvorba konstruktů *hik33-Strep*, jeho purifikace a následná analýza ko-purifikovaných proteinů, nebyl dotažen do konečné podoby. Tvorba konstruktů a kmenu, exprimující umělý *hik33-Strep*, proběhla úspěšně, ale následná izolace proteinu se nepodařila kvůli technickým problémům.

Výsledky diplomové práce ukazují, že kmen  $\Delta hik33$  má výrazně zhoršený fotoautotrofní růst, snížený obsah pigmentu chlorofylu a také nízkou koncentraci komplexu PSI. Zároveň jsem byla schopna poukázat na vylepšení fenotypu revertantních kmenů, vlivem supresorových mutací, které se svými fenotypovými projevy více podobaly WT-P než  $\Delta hik33$ . Vysoká frekvence mutací v Hik26 nasvědčují tomu, že oba proteiny (Hik33 a Hik26) antagonisticky regulují podobné geny (PSI geny). Podle všeho Hik26 potlačuje do jisté míry vliv Hik33 proteinu. Překvapivým výsledkem práce byl růst kmene  $\Delta hik33$  na vysokém světle (viz Obr. 8). Jedno z možných vysvětlení spočívá v dramaticky potlačené transkripci fotosyntetických genů ve dvojitým mutantu (revertantu) postrádající obě kinázy.

Tato diplomová práce přispěla k pochopení funkce Hik33, a také upozornila na problematiku genové nestability u mutantů *Synechocystis* (viz. Diskuze 5.1). Výsledky charakterizace revertantních kmenů a identifikace jejich supresorových mutací byly ve shodě s hypotézou publikovanou ve článku od Yoshikawa *et al.*, (2021). Publikace pojednává o vztahu mezi ztrátou Hik26 a vyšší tolerancí mutantních kmenů na vysoké světlo. Ztráta Hik26 proteinu pomocí supresorových mutací potvrdila vylepšenou schopnost mutantů růst a přežívat za stresových podmínek.

Vzhledem k očekávané funkci Hik33 v kontrole transkripce je v dalším kroku nutné provést analýzu transkriptomu pomocí RNAseq. V prvním kroku se porovnají změny transkripce WT-P a  $\Delta hik33$  za různých podmínek. Vzhledem k získaným sekvenčním datům, je pro bližší determinaci a potvrzení hypotézy ohledně funkce Hik26, důležitá charakterizace samotného proteinu (viz. Diskuze 5.4). Navrhuji proto podrobit Hik26 stejné

analýze jako Hik33 v mé práci, tedy: vytvořit delečního mutantu  $\Delta hik26$ , porovnat jeho fenotyp s WT-P a  $\Delta hik33$  a izolovat protein Hik26 pomocí proteinové kotvy. Velmi zajímavé výsledky by měla také poskytnout izolace proteinu Hik33 (konstrukt *hik33-Strep*) a následná analýza interagujících proteinů. K izolaci bych použila mnou vytvořené kmeny exprimující *hik33-Strep*.

## 7. Seznam použité literatury

1. Bairagi, N., Watanabe, S., Nimura-Matsune, K., Tanaka, K., Tsurumaki, T., Nakanishi, S., & Tanaka, K. (2022). Conserved Two-component Hik2-Rre1 Signaling Is Activated under Temperature Upshift and Plastoquinone-reducing Conditions in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant and Cell Physiology*, *63*(2), 176–188. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab158>
2. Bartsevich, V. V., & Shestakov, S. V. (1995). The dspA gene product of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 influences sensitivity to chemically different growth inhibitors and has amino acid similarity to histidine protein kinases. *Microbiology*, *141*(11), 2915–2920. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-11-2915>
3. Burnap, R. L., Hagemann, M., & Kaplan, A. (2015). Regulation of CO<sub>2</sub>concentrating mechanism in cyanobacteria. *Life*, *5*(1), 348–371. <https://doi.org/10.3390/life5010348>
4. Chen, C. C., Lewis, R. J., Harris, R., Yudkin, M. D., & Delumeau, O. (2003). A supramolecular complex in the environmental stress signalling pathway of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *49*(6), 1657–1669. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03663.x>
5. Christmas, N. A. M., Anesio, A. M., & Sánchez-Baracaldo, P. (2015). Multiple adaptations to polar and alpine environments within cyanobacteria: A phylogenomic and Bayesian approach. *Frontiers in Microbiology*, *6*(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01070>
6. Delumeau, O., Chen, C. C., Murray, J. W., Yudkin, M. D., & Lewis, R. J. (2006). High-molecular-weight complexes of RsbR and paralogues in the environmental signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *188*(22), 7885–7892. <https://doi.org/10.1128/JB.00892-06>
7. Enomoto, G., Wallner, T., & Wilde, A. (2023). Control of light-dependent behaviour in cyanobacteria by the second messenger cyclic di-GMP. *MicroLife*, *4*(April), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqad019>
8. Ermolenko, D. N., & Makhatadze, G. I. (2002). Bacterial cold-shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *59*(11), 1902–1913. <https://doi.org/10.1007/PL00012513>
9. Fedurayev, P. V., Mironov, K. S., Gabrielyan, D. A., Bedbenov, V. S., Zorina, A. A., Shumskaya, M., & Los, D. A. (2018). Hydrogen peroxide participates in perception and transduction of cold stress signal in *synechocystis*. *Plant and Cell Physiology*, *59*(6), 1255–1264. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy067>

10. Ferenci, T., & Spira, B. (2007). Variation in stress responses within a bacterial species and the indirect costs of stress resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113(61 2), 105–113. <https://doi.org/10.1196/annals.1391.003>
11. Flores-Molina, M. R., Thomas, D., Lovazzano, C., Núñez, A., Zapata, J., Kumar, M., Correa, J. A., & Contreras-Porcía, L. (2014). Desiccation stress in intertidal seaweeds: Effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. *Aquatic Botany*, 113, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2013.11.004>
12. Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: Diversity of output domains and domain combinations. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4169–4182. <https://doi.org/10.1128/JB.01887-05>
13. Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>
14. Ge, H., Fang, L., Huang, X., Wang, J., Chen, W., Liu, Y., Zhang, Y., Wang, X., Xu, W., He, Q., & Wang, Y. (2017). Translating divergent environmental stresses into a common proteome response through the histidine kinase 33 (Hik33) in a model cyanobacterium. *Molecular and Cellular Proteomics*, 16(7), 1258–1274. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.068080>
15. Ge, H., Fang, L., Huang, X., Wang, J., Chen, W., Zhang, Y., Wang, X., Sui, N., Xu, W., He, Q., & Wang, Y. (2018). Activation of the Oxidative Pentose Phosphate Pathway is Critical for Photomixotrophic Growth of a hik33-Deletion Mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics*, 18(20), 1–31. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800046>
16. Goldstein, J., Pollitt, N. S., & Inouyet, M. (1990). Major cold shock protein of *Escherichia coli*. 87(January), 283–287.
17. Gottesman, S. (2019). Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 294(31), 11685–11700. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.005593>
18. Graumann, P., Wendrich, T. M., Michael, H. W., Schro, K., & Chemie, F. (1997). A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. 25, 741–756.
19. Hagemann, M., Schoor, A., Jeanjean, R., Zuther, E., & Joset, F. (1997). The stpA gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encodes the glucosylglycerol-phosphate phosphatase involved in cyanobacterial osmotic response to salt shock. *Journal of Bacteriology*, 179(5), 1727–1733. <https://doi.org/10.1128/jb.179.5.1727-1733.1997>

20. Heinemann, U. (2021). *Cold-Shock Domains—Abundance, Structure, Properties, and Nucleic-Acid Binding*.
21. Hernandez-prieto, M. A., & Futschik, M. E. (2012). CyanoEXpress : A web database for exploration and visualisation of the integrated transcriptome of. *Bioinformatics*, 8(13).
22. Hébraud, M, and P Potier. “Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria.” *Journal of molecular microbiology and biotechnology* vol. 1,2 (1999): 211-9.
23. Horton, P., Ruban, A. V., & Walters, R. G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 655–684. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.655>
24. Hsiao, H. Y., He, Q., Van Waasbergen, L. G., & Grossman, A. R. (2004). Control of photosynthetic and high-light-responsive genes by the histidine kinase DspA: Negative and positive regulation and interactions between signal transduction pathways. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3882–3888. <https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3882-3888.2004>
25. Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N., & Coles, M. (2006). The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell*, 126(5), 929–940. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.058>
26. Ikeuchi, M., & Tabata, S. (2001). Ikeuchi & Tabata, 2001. *Photosynthesis Research*, 73–83.
27. Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., ... Tabata, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Research*, 3(3), 185–209. <https://doi.org/10.1093/dnares/3.3.185>
28. Kanesaki, Y., Yamamoto, H., Paithoonrangsarid, K., Shoumskaya, M., Suzuki, I., Hayashi, H., & Murata, N. (2007). Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Journal*, 49(2), 313–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02959.x>
29. Kempf, B., & Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 170(5), 319–330. <https://doi.org/10.1007/s002030050649>

30. Kim, H., Wu, K., & Lee, C. (2021). Stress-Responsive Periplasmic Chaperones in Bacteria. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.678697>
31. Kiss, É., Talbot, J., Adams, N. B. P., Opekar, S., Moos, M., Pilný, J., Kvasov, T., Schneider, E., Koník, P., Šimek, P., & Sobotka, R. (2023). Chlorophyll biosynthesis under the control of arginine metabolism. *Cell Reports*, 42(11). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113265>
32. Komenda, J., & Sobotka, R. (2016). Cyanobacterial high-light-inducible proteins - Protectors of chlorophyll-protein synthesis and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(3), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.08.011>
33. Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2014). Salinity and desiccation induced oxidative stress acclimation in seaweeds. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 71). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00004-4>
34. Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R., & Pakrasi, H. B. (2006). Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma*, 227(2–4), 129–138. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0145-7>
35. Los, Dmitry. (2018). Cyanobacteria: Signaling and Regulation Systems. 10.21775/9781910190876.
36. Los, D. A., Zorina, A., Sinetova, M., Kryazhov, S., Mironov, K., & Zinchenko, V. V. (2010). Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria. *Sensors*, 10(3), 2386–2415. <https://doi.org/10.3390/s100302386>
37. Ma, P., & Phillips-Jones, M. K. (2021). Membrane sensor histidine kinases: Insights from structural, ligand and inhibitor studies of full-length proteins and signalling domains for antibiotic discovery. *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26165110>
38. Maksimov, E. G., Mironov, K. S., Trofimova, M. S., Nechaeva, N. L., Todorenko, D. A., Klementiev, K. E., Tsoraev, G. V., Tyutyayev, E. V., Zorina, A. A., Feduraev, P. V., Allakhverdiev, S. I., Paschenko, V. Z., & Los, D. A. (2017). Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 133(1–3), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0337-3>
39. Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., Hagemann, M., & Murata, N. (2003). Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 9061–9066. <https://doi.org/10.1073/pnas.1532302100>



40. Marles-Wright, J., & Lewis, R. J. (2008). The *Bacillus subtilis* stressosome . *Communicative & Integrative Biology*, *1*(2), 182–184. <https://doi.org/10.4161/cib.1.2.7225>
41. McDougald, D., Gong, L., Srinivasan, S., Hild, E., Thompson, L., Takayama, K., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2002). Defences against oxidative stress during starvation in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *81*(1–4), 3–13. <https://doi.org/10.1023/A:1020540503200>
42. Methé, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Madupu, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., ... Fraser, C. M. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal Reduction in Subsurface Environments. *Science*, *302*(5652), 1967–1969. <https://doi.org/10.1126/science.1088727>
43. Mironov, K. S., Sidorov, R. A., Kreslavski, V. D., Bedbenov, V. S., Tsydendambaev, V. D., & Los, D. A. (2014). Cold-induced gene expression and  $\omega$ 3 fatty acid unsaturation is controlled by red light in *Synechocystis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *137*, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.03.001>
44. Morrison, S. S., Mullineaux, C. W., & Ashby, M. K. (2005). The influence of acetyl phosphate on DspA signalling in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *BMC Microbiology*, *5*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-47>
45. Murata, N., & Dmitry, A. (1997). *Membrane Fluidity and Bemperature Perception* . *3*(1 997), 875–879.
46. Murata, N., & Los, D. A. (2006). Histidine kinase Hik33 is an important participant in cold-signal transduction in cyanobacteria. *Physiologia Plantarum*, *126*(1), 17–27. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00608.x>
47. Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., & Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1757*(7), 742–749. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.013>
48. Paithoonrangarid, K., Shoumskaya, M. A., Kanesaki, Y., Satoh, S., Tabata, S., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Hayashi, H., Tanticharoen, M., Suzuki, I., & Murata, N. (2004). Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(51), 53078–53086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410162200>

49. Price, C. W., Fawcett, P., C er monie, H., Su, N., Murphy, C. K., & Youngman, P. (2001). Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *41*(4), 757–774. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02534.x>
50. Rachedi, R., Foglino, M., & Latifi, A. (2020). Stress signaling in cyanobacteria: A mechanistic overview. *Life*, *10*(12), 1–24. <https://doi.org/10.3390/life10120312>
51. Raven, J. A., & Giordano, M. (2014). Algae. *Current Biology*, *24*(13), 590–595. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.039>
52. Rozanov, A. Y., & Astafieva, M. M. (2009). The evolution of the early precambrian geobiological systems. *Paleontological Journal*, *43*(8), 911–927. <https://doi.org/10.1134/S0031030109080103>
53. Sakayori, T., Shiraiwa, Y., & Suzuki, I. (2009). A synechocystis homolog of sip a protein, Ssl3451, enhances the activity of the histidine kinase hik33. *Plant and Cell Physiology*, *50*(8), 1439–1448. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp089>
54. Shimura, Y., Shiraiwa, Y., & Suzuki, I. (2012). Characterization of the subdomains in the N-terminal region of histidine kinase Hik33 in the cyanobacterium synechocystis sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, *53*(7), 1255–1266. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs068>
55. Shoumskaya, M. A., Paithoonrangsarid, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Tanticharoen, M., Suzuki, I., & Murata, N. (2005). Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(22), 21531–21538. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412174200>
56. Sinetova, M. A., & Los, D. A. (2016). New insights in cyanobacterial cold stress responses: Genes, sensors, and molecular triggers. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1860*(11), 2391–2403. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.006>
57. Skotnicova, P., Srivastava, A., Aggarwal, D., Talbot, J., Karlınova, I., Moos, M., Mareš, J., Bučinska, L., Konık, P., Šimek, P., Tichy, M., & Sobotka, R. (2024). A thylakoid biogenesis BtpA protein is required for the initial step of tetrapyrrole biosynthesis in cyanobacteria. *New Phytologist*, *241*(3), 1236–1249. <https://doi.org/10.1111/nph.19397>
58. Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Selyakh, I., Semenova, L., Ismagulova, T., Lukyanov, A., Mamedov, I., Vinogradova, E., Karpova, O., Konyukhov, I., Vasilieva, S., Mojzes, P., Dijkema, C., Vecherskaya, M., Zvyagin, I., Nedbal, L., & Gorelova, O. (2019). Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Research*, *43*(September), 101651. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>

59. Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). *Current Opinion in Microbiology-Oxidative stress*. 1. <http://biomednet.com/elecrefl1369527400200188>
60. Suzuki, I., Dmitry A, L., Kanesaki, Y., Mikami, K., & Murata, N. (2000). The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO Journal*, 19(6), 1327–1334. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.6.1327>
61. Suzuki, T., Park, H., Anderson Till, E., & Lennarz, W. J. (2001). The PUB domain: A putative protein-protein interaction domain implicated in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(5), 1083–1087. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5688>
62. Taylor, B. L., & Zhulin, I. B. (1999). PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 479–506. <https://doi.org/10.1128/mubr.63.2.479-506.1999>
63. Tu, C. J., Shrager, J., Burnap, R. L., Postier, B. L., & Grossman, A. R. (2004). Consequences of a deletion in *dspA* on transcript accumulation in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3889–3902. <https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3889-3902.2004>
64. Vigh, L., Maresca, B., & Harwood, J. L. (1998). Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends in Biochemical Sciences*, 23(10), 369–374. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01279-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01279-1)
65. Wang, J., Huang, X., Ge, H., Wang, Y., Chen, W., Zheng, L., Huang, C., Yang, H., Li, L., Sui, N., Wang, Y., Zhang, Y., Lu, D., Fang, L., Xu, W., Jiang, Y., Huang, F., & Wang, Y. (2022). The quantitative proteome atlas of a model cyanobacterium. *Journal of Genetics and Genomics*, 49(2), 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.09.007>
66. Wolanin, P. M., Thomason, P. A., & Stock, J. B. (2002). Histidine protein kinases: Key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3(10), 1–8. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013>
67. Wood, J. M. (1999). Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 230–262. <https://doi.org/10.1128/mubr.63.1.230-262.1999>
68. Yoshikawa, K., Ogawa, K., Toya, Y., Akimoto, S., Matsuda, F., & Shimizu, H. (2021). Mutations in *hik26* and *slr1916* lead to high-light stress tolerance in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01875-y>

69. Zabulon, G., Richaud, C., Guidi-Rontani, C., & Thomas, J. C. (2007). NblA gene expression in *Synechocystis* PCC 6803 strains lacking DspA (Hik33) and a NblR-like protein. *Current Microbiology*, *54*(1), 36–41. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0251-y>
70. Zavřel, T., Očenášová, P., & Červený, J. (2017). Phenotypic characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrains reveals differences in sensitivity to abiotic stress. *PLoS ONE*, *12*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189130>

## 8. Přílohy

### 8.1. Genové sekvence

#### *NdeI* (forward)

GGCAAGGACATATGGGGACTTCTGTGTCCAATCCAA

#### *Strep XmaJI* (reverse):

GTCAAAGCCTAGGCTATTTCTCAAATTGCGGATGGGACCAGCCCACCACCATC  
AACATGG

**Příloha 1.** Genové sekvence primerů pro přípravu hik33-*Strep* konstrukt.

### 8.2. Proteinové sekvence

#### Protein Hik26 (gen *slr0484*)

MSNSPSVLTELLQALPNLRAQTYFKSSLTALSHAMEDQVLAESTAGNPLIIAAFQRRERFYRQEAHR  
YRRIADKSSQVYVLSAPETEFKHNNGIYETIAFTPEDSLAQEWHLIVIGDRYASCLICRERPTQDK  
WDSNRRFEGVWTPFDRQVSRVAAQLLLQRI LAYRPELQAKIEEATQTLQPSCTVPPRGIDDNPDP  
FVQRLITYLQAGQYKLIKANRNLQDKEERERLLNSITGAVRRSLDPEEIMQVAVEKLGQGLGICRC  
VIYRCSADDTVATINHEFLGSGVGSIKGYPWPLKDNPLFQEVVVLKEAIAIDNIDRDPRLGEPEPS  
TGEVKTIVKSCAILLSWMLVPIFYRERLLGMMEFHHCGPAPTEWEDDALTVEGVATQIGVALIQAE  
SYANLQELNEQLAALDRTRS NLVAITGHELRTPLSTIQVCLESLATEPDMPQELRQVMLNTALEDA  
ERMKLVQDFLTLSQLESGRVEWNAEPI SLEECVELSLSHIRAHNRGQEVPIVNQVNGETPMVEA  
DGEWLVELLTKLLDNAIKFTPTNGRISIAVDRPNPSQLEVTITDTGRGIEPNRLETVFD RFYQEEG  
ALRRSRGGTGIGLAICRQIVSGWGGEIWAASDGKNHGTQFHFTVPIVMPENPNLGVEEVAPKKRKA  
TSPRIASRSKKKQKFS

#### Protein Hik33 (gen *yef26*)

MGTSVSNPTAILQTMQGFLRKWWSEFNLQTRLMAAATLVVSLMSGLTFWAVNTIQEDAQLVNTRF  
GRDVGLLLAANVAPMIADKNL TEVARFSSRFYENTSNIRYMIYADPSGKIFFGIPYSEETVQNSLT  
LERRIELPQIDPHNFDQPFVRQHHTPNGDVTDFIPLQYQGKFLGVLAIGINPNPAAVNSSNLTRD  
VTIAVFISIWVMVILGAVFNALTITQPIKELLLGVKNIAAGNFKQRITL PFGGELGELIVNFNEMA  
ERLERYEAQNI EELTAEKAKLDTLVSTIADGAMLVDTNLQLLL VNPTARRLFAWENKPIIGENLLE  
NLPPEITAQLTQPLRELAADQGSLLFSPGHGPQEEEQDKTYAPEEFRISLTQPFPR TIRLMLTQVL  
DQNRENLRGIVMMVQDITREVELNEAKSQFISNVSHELRTPLFNIKSFIETLSEFGEDLSEVERKE

FLETANHETDRLSRLVNDVLDLSKLESSKIYQLDAVDLYQLIEQSLRSYQLNAKDKQLQLEKILDP  
DLPFALGNYDLLLQVMTNLIGNSFKFTKAGGKIIVRAYPLHRSNLRAEDGPGLVRVEISDTGIGID  
PEDQAAIFERFYRVENRVHTLEGTGLGLSIVKNIIAKHQSQIHLVSEVGVGTTFWFDLAVYQSMLM  
VVG

**Příloha 2.** *Proteinová sekvence genů hik26 a hik33.*