

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Heterologní exprese a purifikace evolučních variant Hli
proteinů sinic**

Bakalářská práce

Markéta Milichovská

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

České Budějovice 2022

Bibliografický údaj: Milichovská, M., 2022: Heterologní exprese a purifikace evolučních variant Hli proteinů sinic. [Heterologous expression and purification of evolutionary variants of Hli proteins of cyanobacteria. Bc. Thesis, in Czech.] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Světlosběrné antény (LHC) zelených řas a rostlin jsou unikátní svou schopností přepínat mezi světlosběrnou funkcí, kdy je absorbovaná energie přenesena do fotosystémů, a funkcí fotoprotektivní, kdy je absorbovaná energie disipována jako teplo. LHC se vyvinuly ze sinicových proteinů nazývaných *High light inducible* proteiny (Hlips). Modelová sinice *Synechocystis* PCC 6803 obsahuje čtveřici Hlips (HliA-D), které vážou chlorofyl a β -karoten a absorbovanou energii disipují (zhášejí exciton) během několika ps jako teplo. Nicméně není známo, zda je vazba pigmentů a zhášení původní vlastností všech zástupců Hlips, nebo se jedná o odvozenou schopnost podskupiny Hlips, která vedla k evoluci LHC. Bakalářská práce je zaměřena na heterologní expresi, purifikaci a charakterizaci čtyř evolučně vzdálených variant Hli proteinů (HliX,Y,W,Z) v *Synechocystis* PCC 6803. Všechny tyto 4 Hlips byly izolované s navázaným chlorofylem, ale odlišnými karotenoidy (zeaxanthin, echinenon) a všechny varianty zhášely. PsbW byl izolován v komplexu s fotosystémem II.

Annotation:

Light harvesting antennas (LHC) of green algae and plants are unique for their ability to switch between light harvesting functions, where absorbed energy is transfer to photosystems, and photoprotective function, where absorbed energy is dissipated as heat. LHC evolved from cyanobacterial proteins called *High light inducible* proteins (Hlips). The model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 contains four Hlips (HliA-D), all of which binds chlorophyll and β -carotene and are capable to dissipate absorbed energy as heat (quench exciton) in a few ps. However it is unknown whether pigment binding and quenching are common properties of all Hlips, or if it is an aquired ability of a Hlip subgroup, the-ancestors, of LHC. This bachelor thesis focuses on the heterologous expression, purification and characterization of four evolutionary distant variants of Hli proteins (HliW,X,Y,Z) using *Synechocystis* PCC 6803 as a host organism. All four Hlips were isolated with bound chlorophyll, but with different carotenoid species

(zeaxanthin, echinenon) and all variants were able to quench chlorophyll fluorescence. In addition HliW was isolated in a tight complex with photosystem II.

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

V Českých Budějovicích

Datum:

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych v prvé řadě poděkovala svému školiteli doc. Ing. Romanu Sobotkovi Ph.D. Především za odborné vedení a trpělivost, která mi byla v průběhu práce věnována. Dále mé poděkování patří Mgr. Lucii Kovářové, která se mě ujala a s trpělivostí mne začlenila do průběhu laboratoře a Bc. Janě Zahradníkové, která byla vždy ochotna pomoci a poradit. Velké díky patří též Honzovi Janouškovci za zpracování a dodání důležitých evolučních dat, které byly v práci použity. V neposlední řadě chci také poděkovat celé skupině docenta Sobotky a skupině profesora Josefa Komendy za jejich cenné rady. Závěrečný dík patří především mým rodičům a blízké rodině, kteří mě během studia nepřestali podporovat.

Obsah

1. Úvod.....	7
1.1. Oxygenní fotosyntéza	7
1.2. Struktura PSI a PSII komplexů.....	9
1.3. Světlosběrné komplexy	10
1.4. Rozšířená rodina LHC proteinů	10
1.5. Ne-fotochemické zhášení v rodině LHC proteinů	13
2. Cíle práce	16
3. Materiály a metody	18
3.1. Izolace tylakoidních membrán z buněk <i>Synechocystis</i>	19
3.2. Izolace Hli proteinů pomocí nikl-afinitní chromatografie	19
3.3. Clear-nativní elektroforéza (CN-PAGE)	20
3.4. Denaturační elektroforéza (SDS-PAGE), druhý rozměr k CN-PAGE	21
3.5. Absorpční spektra proteinů v nativním gelu	21
3.6. Analýza pigmentů pomocí HPLC	22
4. Výsledky	23
4.1 Izolace Hlips pomocí His kotvy a separace elucí na CN-PAGE	24
4.2. Separace His-HliY a His-HliZ proteinů pomocí 2D CN/SDS-PAGE.....	26
4.3. Purifikace His-HliW v pufru B s použitím jemného detergentu GDN.....	27
4.4. Absorpční spektra a obsah pigmentů purifikovaných His-Hli proteinů	29
5. Diskuze	32
5.1. Tvorba homo-dimerů a heterodimerů Hlips	32
5.2. Interakce HliW s PSII	33
5.3. Vazba pigmentů na HliW-Z proteiny	34
6. Seznam použité literatury	36

7. Příloha.....	43
7.1. Proteinové sekvence HliW-Z.....	43

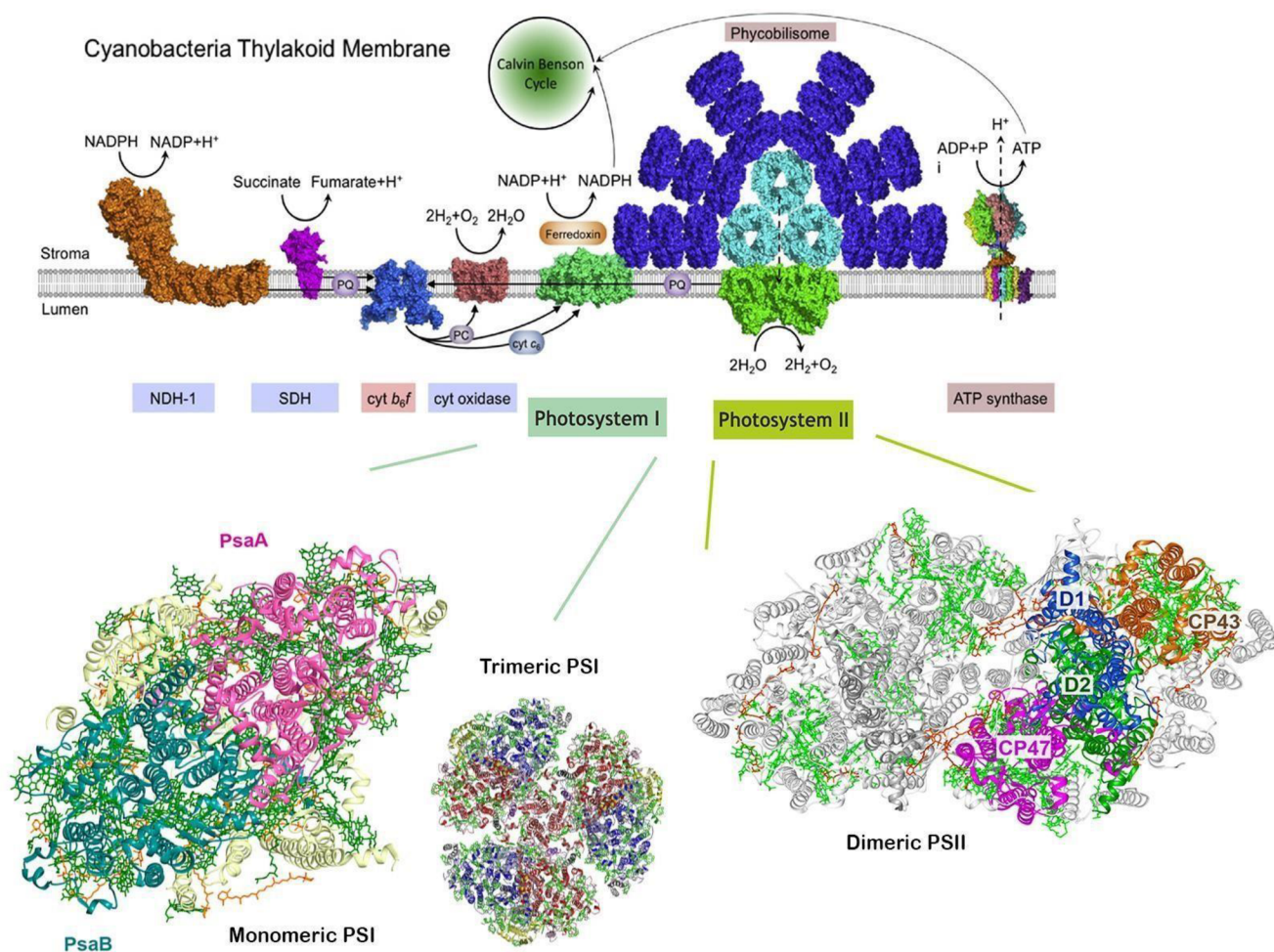
1. Úvod

1.1. Oxygenní fotosyntéza

Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších biochemických procesů na naší planetě. Jedná se o proces, při kterém se přeměňuje energie slunečního záření dopadajícího na Zemi, na energii chemických vazeb (Barber, 2009). Ačkoli je známá i anoxygenní fotosyntéza, při které nedochází k rozkladu vody a vývoji kyslíku, zásadní pro život na naší planetě je oxygenní typ fotosyntézy.

Ta se vyskytuje u sinic, řas a rostlin a je uskutečňována pomocí složitých enzymů (fotosystémů) nacházejících se na specializované membráně (tylakoidech). Ačkoli se fotosystémy a membrány u různých skupin oxygenních fototrofů mohou odlišovat, základní mechanismy jsou velmi konzervované (Stephenson et al., 2011).

Oxygenní fotosyntézu lze rozdělit podle přítomnosti světelné energie na dvě fáze. Během takzvané světelné fáze dochází nejprve k pohlcení energie fotonů pomocí pigmentů, především chlorofylů (Chl). Pigmenty jsou navázané jak na samotné fotosystémy, tak také na tzv. externí světlosběrné antény, které obklopují fotosystémy a navyšují počet absorbovaných fotonů. Absorbovaná energie se ve formě excitonu šíří z antén přes jednotlivé pigmenty do reakčních center fotosystémů. V komplexu fotosystému II (PSII) je energie světla využita na oxidaci molekul vody, které se rozpadají na elektrony, protony a kyslík. Získané elektrony prochází elektronovým transportem, kterého se účastní plastochinon a cytochrom *b₆f*, při kterém dochází ke generování protonového gradientu. Přes protein plastocyanin jsou poté elektrony přeneseny na fotosystém I (PSI), který využije energii fotonů na redukci ferredoxinu. V posledním kroku je redukován ferredoxin použitý na tvorbu NADPH, zatímco ATP syntáza produkuje ATP za spotřeby protonového gradientu (Nelson and Yocum, 2006). Temnostní fáze fotosyntézy, která nevyžaduje světelnou energii, se nazývá Calvin-Benson cyklus. Cyklus představuje sérii chemických reakcí, při nichž je inkorporována molekula CO₂ do organických molekul. Pro běh cyklu jsou nutné NADPH a ATP produkované ve světelné fázi, jejichž výsledným produktem je molekula glycerinaldehyd-3-fosfátu, kterou organismy využívají pro syntézu zásobních látek (glykogen, škrob) či stavební blok pro tvorbu biomasy.



Obr. 1 Struktury proteinových komplexů účastníci se oxygenní fotosyntézy a respirace na tylakoidní membráně sinic. PSII spolu s NADPH dehydrogenázou (NDH-1) a sukcinát dehydrogenázou (SDH) redukuje plastochinon, který je poté oxidován cytochromem b₆f (cyt b₆f) za tvorby protonového gradientu. Elektrony jsou poté buď přeneseny na cytochrom c, nebo na plastocyanin. Cytochrom c je oxidován cytochrom c oxidázou (cyt oxidase), která se podílí na tvorbě protonového gradientu. Plastocyanin je oxidován PSI a dochází k redukci ferredoxinu. PSI můžeme najít buď ve formě monomeru obsahující jednotku PsaA a PsaB nebo ve formě trimeru (Jordan et al., 2001), který celkem obsahuje 6 podjednotek PsaA/PsaB. PSII existuje ve formě dimeru a hlavní podjednotky PSII jsou D1, D2, CP47, CP43. Na stromální straně je na PSII navázán gigantický komplex fykobilizom, který slouží jako externí světlosběrná anténa. Na lumenální straně se na PSII připojuje – kyslík tvořící komplex (OEC). Poslední enzym účastníci se světelné fáze fotosyntézy je ATP syntáza, která syntetizuje ATP za spotřeby protonového gradientu (Xu et al., 2004).

1.2. Struktura PSI a PSII komplexů

Fotosystémy jsou složité komplexy složené z celé řady proteinových podjednotek a navázaných kofaktorů. Strukturu fotosystémů lze rozdělit na reakční centra fotosystémů, kde probíhají fotochemické reakce a na vnitřní světlosběrné antény. Struktury PSI a PSII jsou vysoce konzervovaná u všech oxygenních fototrofních organismů (Jordan et al., 2001; Ben-Shem et al., 2003; Malavath et al., 2018).

PSII je jeden z nejsložitějších enzymů, který evoluce vytvořila (Obr. 1). Reakční centrum PSII (RCII) má strukturu heterodimeru složeného z proteinových jednotek D1 a D2 a několika malých proteinů (Minagawa and Takahashi, 2004). Obě D1 a D2 podjednotky obsahují pět transmembránových helixů, které jsou organizované do půlkruhu (Pagliano et al., 2013). Součástí RCII je primární donor PSII, tzv. P680, který tvoří těsně nahlučené molekuly Chl. Po excitaci světlem jsou tyto pigmenty schopny separace náboje, tj. ztrácí elektron, který je zachycen a přenášen dalšími kofaktory na plastochinon. Elektron, chybějící v P680, je doplněn oxidací vody na manganovém klastru, který je součástí RCII. Vnitřní antény PSII tvoří podjednotky CP47 a CP43, které obsahují šest transmembránových helixů a váží 13-14 a 14-17 molekul Chl spolu s molekulami karotenoidů (Vasil'ev et al., 2001; Kamiya and Shen, 2003; Ferreira et al., 2004).

Struktura PSI je podobná PSII, nicméně obsahuje odlišné kofaktory, které nejsou součástí PSII např. Fe-S klastry. U sinic je PSI převážně trimerní (Obr. 1), zatímco u eukaryotních organismů má podobu monomeru. Reakční centrum PSI (RCI) je heterodimer složený proteinových podjednotek PsaA a PsaB, a k nim přidružených 14 menších podjednotek (Blankenship, 2014). RCI obsahuje dvojici Chl označovaných jako P700, které po excitaci separují náboj, podobně jako P680 v PSII. Další kofaktory vázané v RCI jsou elektronové akceptory: tři 4Fe-4S centra, Chl A0 a A1 a fylochinon (Webber and Malkin, 1990). V porovnání s PSII, který lze popsat jako silnou oxidázu, je PSI silná reduktáza schopna redukovat ferredoxin. PsaA a PsaB vážou velký počet Chl (>80) a slouží zároveň jako vnitřní antény PSI (Obr. 1). U eukaryotních organismů se na PSI váží externí antení komplexy (LHC-I).

1.3. Světlosběrné komplexy

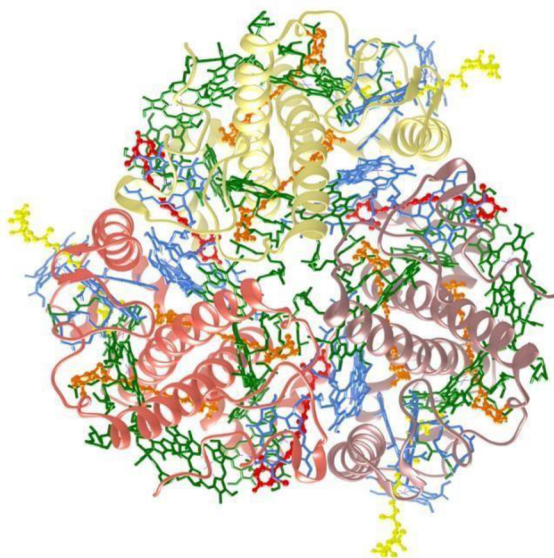
Ačkoli mají oba fotosystémy vlastní (vnitřní) světlosběrné antény, které slouží k pohlcování světla, především v případě PSII je tato kapacita nedostatečná. Nedílnou součástí fotosystémů oxygenních fototrofů jsou proto takzvané (externí) světlo-sběrné komplexy, které slouží k absorpci dostatečného množství fotonů. Sinice a červené řasy používají jako světlosběrné komplexy fykobilizomy (Obr. 1). Rostliny a zelené řasy mají jiný typ antény tzv. *Light harvesting complex* (LHC) proteiny, které jsou lokalizované přímo v membráně a jeden LHC polypeptid má tři membránové helixy (Obr. 2). LHC proteiny jsou obecně schopné navázat množství molekul Chl a dalších pigmentů a přenést absorbovanou energii do reakčních center PSII a PSI (Durnford et al., 1999). Unikátní vlastnost LHC proteinů je schopnost “přepnout“ ze světlosběrného nastavení do nastavení, kdy je pohlcená energie téměř okamžitě ($< 10^{-10}s$) vyzářena jako teplo. Jedná se o foto-protektivní mechanismus, který ochraňuje komponenty fotosyntetického aparátu (Vasil'ev et al., 2001; Kamiya and Shen, 2003; Ferreira et al., 2004).

LHC jsou nejrozšířenější typem membránových proteinů na naší planetě. Jedná se o rozsáhlou rodinu proteinů, které se liší typem navázaných Chl, např. u rostlin a zelených řas se jedná o Chl-*a* a Chl-*b*, zatímco u rozsivek a dalších druhů řas je navázaný Chl- *a/c* (tzv. FCP antény) (Durnford et al., 1999). Ještě výraznější je variabilita v zastoupení karotenoidů. Navzdory různorodého zastoupení pigmentů homologie v primárních genových sekvencích potvrzuje teorii vzniku LHC proteinů z jednoho předka (Green and Durnford, 1996).

1.4. Rozšířená rodina LHC proteinů

LHC antény jsou nicméně pouze jednou skupinou z mnohem širší rodiny evolučně příbuzných proteinů (tzv. *extended LHC* superfamily). Proteiny spadající do této rodiny lze charakterizovat přítomností konzervovaného Chl-vázaného motivu (ExxN/HxR) na transmembránovém helixu; počet helixů s tímto motivem se u různých typů LHC proteinů liší. Vedle LHC-I a LHC-II antén, které tvoří vnější světlosběrné komplexy asociované k PSI a PSII, najdeme u řas a rostlin různé typy tzv. LHC-like proteinů, které zjevně nemají světlosběrnou funkci (Engelken et al., 2010). Tyto

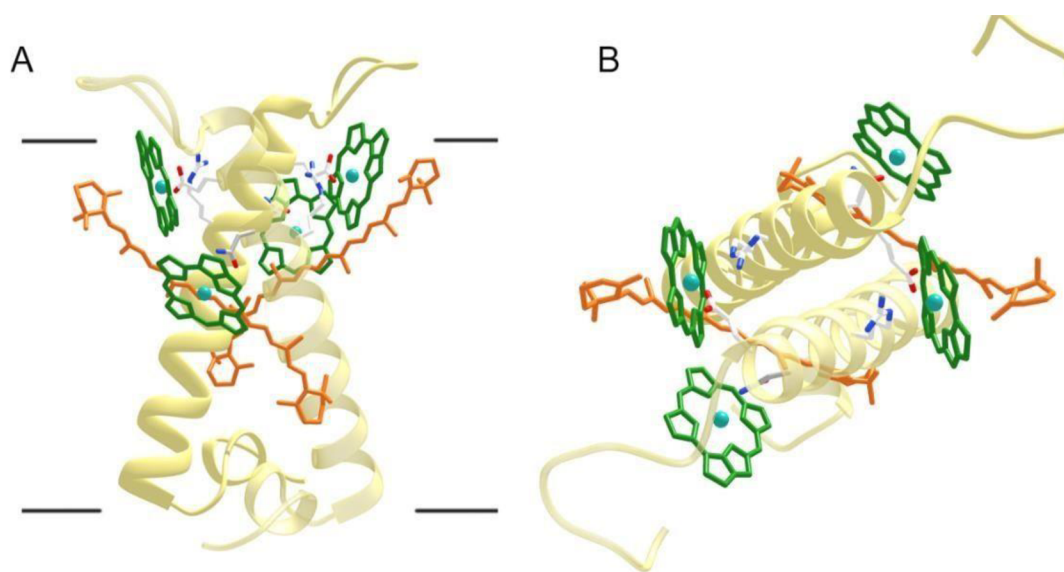
proteiny mají nejpravděpodobněji foto-protektivní funkci a dělí se podle počtu transmembránových helixů na OHP (*One helix proteins*, jeden helix), SEP/LIL (*stress-enhanced proteins*, dva helixy) a ELIP (*Early light induced proteins*, tři helixy).



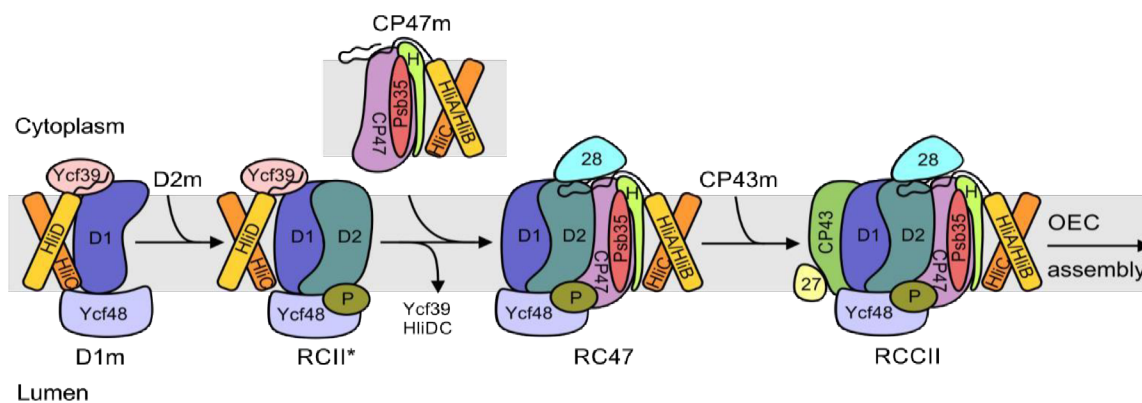
Obr. 2 Pohled ze stromální strany na trimerickou strukturu LHCII rostlin. Zelenou barvou je znázorněn Chl- a, modrou barvou Chl-b, oranžově jsou znázorněny molekuly luteinu, žlutě neoxanthin a červeně violaxanthin (Standfuss et al., 2005).

Evolučně nejstarší zástupci proteinů spadající do LHC skupiny byly objeveny u sinic. Jedná se o tzv. jedno-helixové proteiny nazvané *High light induced* proteiny (Hlips) obsahující identický ExxN/HxR motiv pro vazbu Chl jako eukaryotní LHC antény (Komenda and Sobotka, 2016). Rozdíly mezi Hlips a LHC jsou přisuzovány postupným genetickým duplikacím, delecím či inzercím genů (Engelken et al., 2010). Oproti LHC mají Hlips pouze jeden transmembránový helix s ExxN/HxR motivem a k navázání pigmentů musí vytvořit dimer (Obr. 3) (Dolganov et al., 1995). Hlips nejsou pro sinice esenciální, nicméně bylo prokázáno, že během zvýšeného světelného ozáření nejsou schopny přežít bez Hlips (Havaux, M. et al., 2003). Ocitne-li se sinice v nevýhodných životních podmínkách, reaguje na stres masivním zvýšením exprese *hli* genů kódující Hlips. Způsob, jakým Hlips zajišťují ochranu buňkám před oxidativním stresem zatím není známý, ale nejpravděpodobněji tyto proteiny napomáhají tvorbě nových PSII komplexů (Komenda and Sobotka, 2016).

Biogeneze PSII je vysoce regulovaný proces, kterého se u sinic účastní zmíněné Hlips (Obr. 4). Proces je zahájen tvorbou čtyř tzv. *assembly* modulů, z nichž každý obsahuje jednu Chl- vaznou podjednotku PSII (D1, D2, CP47 nebo CP43) obklopené několika malými PSII proteiny. Vytvořené moduly již obsahují Chl a karotenoidy. Prvním krokem vlastního sestavení PSII je tvorba funkčního centra PSII (RCII), při které dochází k dimerizaci D1 a D2 jednotek. Následuje připojení CP47 k RCII, čímž vznikne meziprodukt nazývaný RC47 (Komenda et al., 2012) a dále k napojení modulu CP43, jehož výsledkem je tvorba monomerního reakčního centra (RCCII), který neobsahuje kyslík tvořící komplex (OEC). Posledním krokem je připojení OEC k RCCII na lumenální straně komplexu a vytvoření monomeru PSII, který se dále dimerizuje na plně funkční fotosystém. Aktivní role Hlips při sestavování PSII je poměrně detailně popsána u modelové sinice *Synechocystis* PCC 6803 (dále *Synechocystis*) (Komenda and Sobotka, 2016).



Obr. 3 *Struktura dimeru HliC (model) ze sinice Synechocystis PCC 6803. Dva malé transmembránové proteiny HliC spolu tvoří dimerní symetrickou strukturu, která váže 2 molekuly karotenoidů (β -karoten) a 4 molekuly Chl-a. Pohled na HliC v membráně (A) Pohled na dimer HliC ze stromatu (B) (Shukla et al., 2018).*



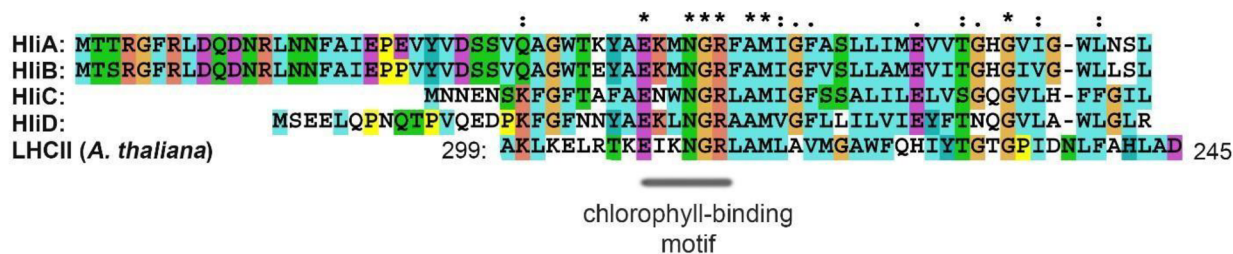
Obr. 4 Skládání PSII u *Synechocystis*. Nejprve se k modulu D1 (D1m) obsahující D1, Ycf48, dimer HliD/C (Hlips) a Ycf39 připojí modul D2, čímž vytvoří komplex RCII*. Následně se odpojí Ycf39 s HliD/C a dojde k připojení modulu CP47 obsahující CP47, Psb35 a HliA/C a HliB/C heterodimer. Připojením modulu CP47 se vytvoří RC47. K RC47 se nakonec připojí modul CP43 a vytvoří RCCII. Proces skládání se zakončí připojením OEC a dimerizací (Konert et al., 2022).

Genom sinice *Synechocystis* kóduje čtveřici Hlips (Konert et al., 2022), které jsou pojmenované abecedně HliA, HliB, HliC a HliD a všechny se účastní procesu skládání PSII (Obr. 4). V časných krocích biogeneze PSII se heterodimer HliD a HliC naváže na protein D1 reakčního centra PSII (RCII) a pravděpodobně je schopný dissipovat jako teplo většinu energie absorbované Chl v D1 a D2 proteinech (Knoppová et al., 2014). V porovnání s větším množstvím dostupných informací týkající se HliC a HliD jsou HliA a HliB méně studované (Promnares et al., 2006; Yao et al., 2007; Pascual-Aznar et al., 2021). Podobně jako HliD tvoří heterodimer s HliC, také HliA a HliB vytváří HliA/C a HliB/C heterodimery, které jsou schopny vázat Chl a β -karoten; homodimery HliA[2], nebo HliB[2] nebyly detekovány. Nicméně, na rozdíl od HliC/D, HliA a HliB neinteragují s reakčním centrem PSII, ale s jeho podjednotkou CP47 (Obr. 4). Předpokládá se, že HliA a HliB mají také foto-protektivní funkci a schopnost zhášet Chl lokalizované v CP47 (Konert et al., 2022).

1.5. Ne-fotochemické zhášení v rodině LHC proteinů

Energie z fotonů slunečního světla je nezbytná pro průběh fotosyntézy. Nicméně intenzita ozáření je velmi variabilní a často se dramaticky mění během několika min. Při nadměrném ozáření dochází

k zahlčení fotosyntetického aparátu. Zároveň dochází k přenosu velkého množství protonů přes membránu, což se projeví příliš hlubokým poklesem pH v lumenu a narušení homeostázy. Přijetím excitační energie do RCII dojde k excitaci chlorofylů P680 a následné separaci náboje.



Obr. 5 Porovnání proteinových sekvencí Hlips z modelové sinice *Synechocystis* (HliA-D) spolu se sekvencí třetího transmembránového genu LHCII. Chl-vazný motiv (ExxNGR), konzervovaný v celé rodině LHC (like) proteinů je zvýrazněn (Konert et al., 2022).

Pokud není elektron z excitovaného P680 dostatečně rychle odevzdán na následný akceptor, dojde k opětovné rekombinaci a návratu do základního stavu. V důsledku zahlčení transportního řetězce se prodlužuje doba excitovaného stavu, což zvyšuje pravděpodobnost vytvoření tzv. excitovaného chlorofylového tripletu. Vytvořený triplet s vysokou pravděpodobností reaguje s molekulárním (tripletním) kyslíkem a dává vzniku singletního kyslíku. Singletní kyslík nakonec oxiduje proteiny, či lipidy fotosyntetického aparátu, čímž je poškozují a způsobuje fotoinhibici (Solovchenko et al., 2019).

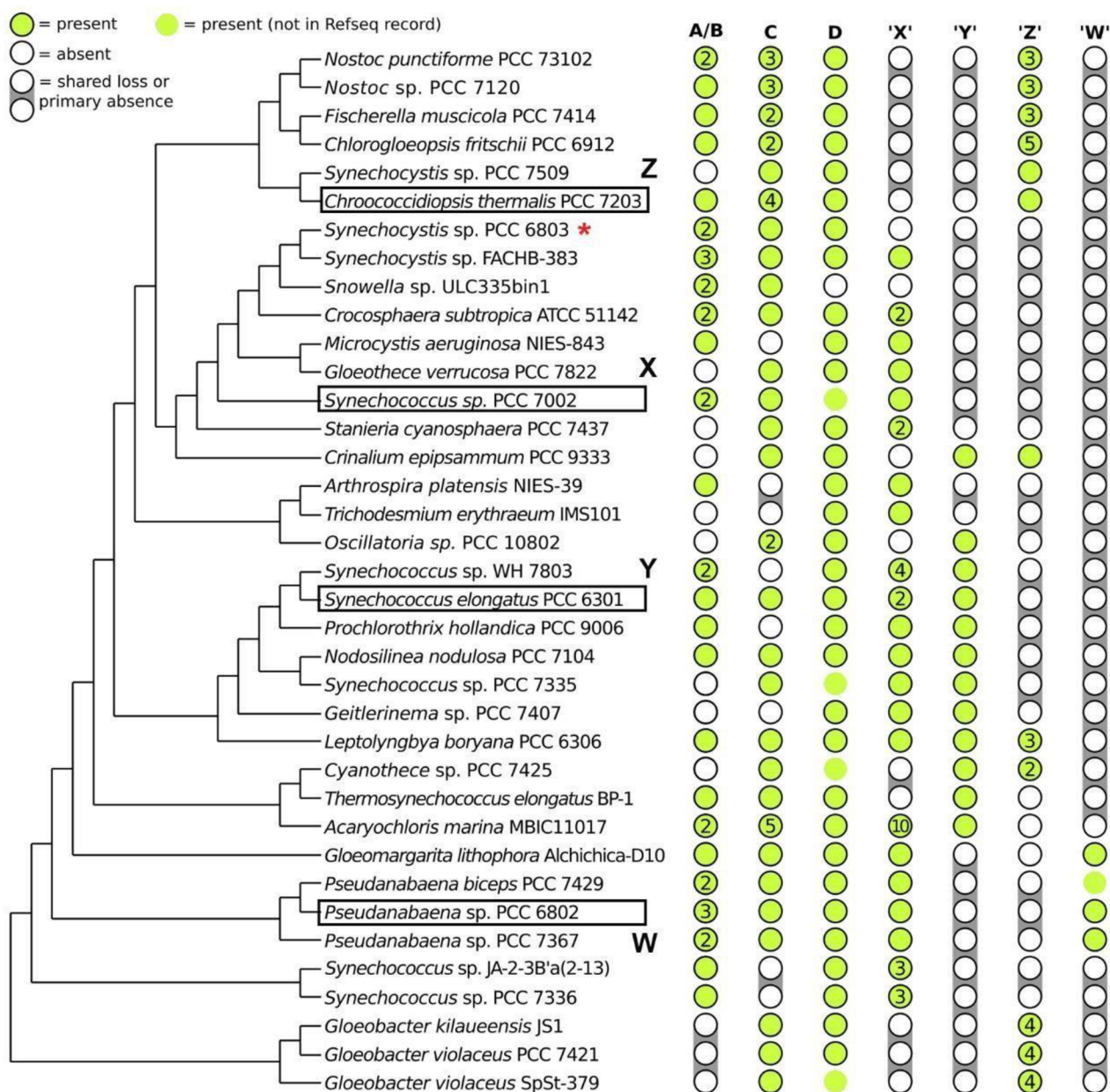
Během nadměrné ozáření uplatňují organismy různé ochranné (foto-protektivní) mechanismy zabráňující poškození fotosyntetického aparátu. Jednou z nejčastějších strategií, aplikovaných během vysokého, ale i příliš nízkého ozáření, je regulace počtu anténních komplexů - tzv. fotoaklimace. Při nízké ozáření se počet antén zvyšuje a naopak (Solovchenko et al., 2019). Organismy nicméně využívají i další (rychlejší) mechanismy. Zásadním ochranným procesem u eukaryotních organismů je ne-fotochemické zhášení (NPQ), kdy dochází k tepelné disipaci přebytečné energie v LHC anténách. Proces ne-fotochemického zhášení není zatím plně pochopen, ale existuje několik teorií, jak by reakce mohla probíhat. Je velmi pravděpodobné, že se procesu účastní karotenoidy, konkrétně lutein v případě rostlinných LHC (Horton et al., 1996). Je pravděpodobné, že energie absorbovaná molekulami Chl v LHC je nakonec přenesena na lutein,

kde se disipuje jako teplo změnou vibračních stavů molekuly luteinu. Shodný mechanismus byl prokázán u Hlips (konkrétně HliC a HliD), pouze místo luteinu je zhášejícím karotenoidem β -karoten (Staleva et al., 2015). U rostlin a zelených řas existuje specifický ochranný proces, tzv. xantofylový cyklus, který je aktivován jako zpětná reakce na výrazný pokles pH v lumenu. Cyklus obsahuje karotenoidy (violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin), které svou přeměnou snižují koncentraci protonů v lumenu na membráně. Zároveň jsou schopné aktivace ne-fotochemického zhášení v LHC-II, a tedy omezení tvorby tripletového Chl a singletového kyslíku. (Latowski et al., 2004; Gruszecki et al., 2006).

2. Cíle práce

Ačkoli je k dispozici již velké množství informací o vazbě pigmentů na Hlips, funkci těchto proteinů během skládání PSII, asociovaných pigmentech, či mechanismu zhášení, téměř všechny informace jsou založené na studiu jediného druhu sinice (*Synechocystis* PCC 6803) obsahující tři varianty Hlips: HliA/B (HliA a HliB jsou téměř identické) HliC, HliD. Nyní je k dispozici kolem 2000 genomů sinic ze všech fylogenetických skupin. Analýza genů ukázala, že existují přinejmenším další čtyři evolučně odlišné typy Hlips (označené HliW-Z) u různých druhů sinic (J. Janouškovec, nepublikovaná data). U *Synechocystis* nejsou zastoupené evolučně nejstarší varianty HliX a HliZ, které se vyskytují u evolučně původních druhů *Goleobacter* a *Synechococcus* (Obr. 6). Nicméně není známo, jestli tyto varianty Hlips váží pigmenty, a pokud ano, zda jsou schopné disipovat absorbovanou energii. Pro většinu druhů sinic není známá možnost genetické manipulace, mnohé je obtížné i kultivovat.

Cílem bakalářské práce je exprese, purifikace a charakterizace čtyř evolučních variant Hli proteinů (HliW-Z), pomocí modelové sinice *Synechocystis*, která tyto varianty neobsahuje. Nicméně, tento druh lze využít pro heterologní produkci Chl-vazných proteinů, jak bylo dokázáno nedávno v případě rostlinných LHC-like proteinů (Skotnicova et al., 2021). Tato práce má za úkol prokázat, nakolik je vazba pigmentů a zhášení konzervované v celé rodině Hlips.



Obr. 6 *Fylogenetický strom sinice, který zahrnuje všechny významné skupiny a zobrazuje přítomnost, či absenci jednotlivých typů Hlips. Hodnota v kroužku označuje počet kopií genů pro každou variantu Hlips u daného kmene. Zarámované jsou druhy, využité jako zdroj genu kódující HliW, HliX, HliY, HliZ proteiny pro expresi v Synechocystis (označený hvězdičkou) (J. Janouškovec, nepublikované výsledky).*

Sekvence HliW, HliX, HliY a HliZ viz Příloha 1.

3. Materiály a metody

Chemikálie a pufry:

Purifikace proteinů

- Pufr A: 25 mM Na-fosfátový pufr, pH 8.0, 0.1 M NaCl
- Pufr B: 25 mM MES/NaOH, pH 6.5, 20 mM $MgCl_2$, 20 mM $CaCl_2$
 - Ekvilibrační pufr: pufr A/B + 500 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM imidazol
 - Promývací pufr: pufr A/B + 50 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM imidazol
 - Eluční pufr: pufr A/B + 50 mM NaCl, 10% glycerol, 200 mM imidazol

Nativní gel

- Gelový pufr 6x: 3M kyselina amino-kapronová, 300mM Bis-Tris/HCl, pH 7.6
- Akrylamid (AB): 50% AA, 0.83% BIS
- Katodový pufr: 50 mM Tricín, 15 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0
- Anodový pufr: 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0

Denaturační akrylamidový gel

- Gelový pufr: 2.8M Tris/HCl, pH 8.6
- Acrylamid (AB): 50% AA, 0.83% BIS
- Katodový pufr: 25 mM Tris, 0,1.92 M glycin
- Anodový pufr: 25 mM Tris/HCl, pH 8.3
- Sacharóza, močovina (7M), TEMED, 10% SDS, 10% APS, 1% dodecyl- β -maltoside (DDM), inhibitor proteáz s 50xEDTA (complete Protease inhibitor cocktail, CO-RO Roche), 0.04% DDM, resin (Protino Ni-NTA Agarose), 1% glycodiosgenin (GDN), 10mM imidazol, 0.04% GDN

HPLC (analýza pigmentů)

- Solvent A: 35% (v/v) metanol, 15% (v/v) acetonitril v 0.25 M pyridinu
- Solvent B: 20% (v/v) metanol, 20% (v/v) aceton, 60% (v/v) acetonitril

Metody:

3.1. Izolace tylakoidních membrán z buněk *Synechocystis*

Skliženou kulturu (3.5 L) buněk *Synechocystis* jsem rozdělila do dvou zkumavek na rozbíjení a objem zkumavek doplnila tylakoidním pufrem. Během projektu jsem používala dva různé tylakoidní pufrы: pufr A a pufr B (složení–viz seznam pufrů).

Buňky jsem centrifugovala po dobu 15 min na 8840x g na 4°C. Získaný supernatant jsem odstranila, přidala 4 mL tylakoidního pufru a resuspendovala usazený pelet štětečkem. Poté jsem opakovala centrifugaci a odstranila supernatant. Do obou zkumavek jsem přidala 1 mL tylakoidního pufru, 200 μ L inhibitoru proteáz s 50 x EDTA a 5 mL zirkoniových kuliček (průměr 0.1 mm). Zkumavky jsem vložila do homogenizátoru (Bertin precellys evolution homogenizer) a použila tři cykly. Každý cyklus zahrnoval rozbíjení 9 min, chlazení suchým ledem a poté inkubaci na ledu po dobu 10 min. Následně jsem přidala 4 mL tylakoidního pufru a centrifugovala po dobu 2 min na 3180x g na 4°C. Získaný lyzát buněk jsem odebrala do nových centrifugačních zkumavek a kuličky na rozbíjení, dále promyla 4 mL tylakoidního pufru. Tento krok jsem opakovala, dokud nebyly kuličky bezbarvé. K oddělení membránové frakce a rozpustných proteinů jsem získaný buněčný lyzát centrifugovala 42748 x g na 4°C po dobu 25 min. Supernatant jsem odstranila a pelet představující membránovou frakci postupně resuspendovala v tylakoidním pufru a zamrazila na - 80°C.

3.2. Izolace Hli proteinů pomocí nikl-afinitní chromatografie

Purifikace proteinů s pufrem A (*Na-fosfátový pufr*) a DDM

Do roztoku membrán izolovaných ze *Synechocystis* jsem přidala 1% DDM a inhibitor proteáz s 50 x EDTA. Zkumavku jsem jemně promíchala, zabalila do alobalu a membrány solubilizovala po dobu 10 min v chladicím boxu. Po solubilizaci jsem přenesla roztok do centrifugační zkumavky typu falkon a centrifugovala po dobu 30 min na 47540 x g na 4°C. Výsledný supernatant jsem přenesla do nové centrifugační zkumavky a přidala 0.5 M NaCl a 10 mM imidazol pro snížení

nespecifických interakcí během inkubace s resinem obsahující navázaný nikl. Pro přípravu resinu jsem odebrala do 50 mL zkumavky 5 mL ekvilibračního pufru a smíchala s 2,5 mL resinu (Protino, Macherey Nagel). Následně jsem resin centrifugovala po dobu 5 min na 680 x g na 10°C odebrala vrstvu nad resinem a celý předchozí krok opakovala 2x. K solubilizovaným tylakoidům jsem přidala ekvilibrovaný resin, zkumavku zabalila do alobalu a nechala točit po dobu 1 hod v chladícím boxu. Poté jsem materiál přenesla na chromatografickou kolonu a nechala protéci skrz resin. Po protečení nenavázaných proteinů (frakce *flow through*) jsem promyla kolonu 3x 1 mL ekvilibračního pufru a dále 3x 1 mL promývacího pufru. Navázané proteiny jsem vymyla z kolony pomocí 1 mL elučního pufru. Výsledná eluce byla zakoncentrována pomocí 10 kDa MW cut-off spin kolonek (Millipore) na finální objem ~ 150 μ L a ponechána na ledu přes noc do další analýzy.

Purifikace proteinů s B pufrem a směsí detergentů DDM a GDN

První kroky purifikace byly identické jako u purifikace s pufrem A. Po skončení 30 minové centrifugace solubilizovaných membrán jsem výsledný supernatant přenesla do nové centrifugační zkumavky a přidala 0.5 M NaCl, 10mM imidazol a 1% GDN. Do ekvilibračního, promývacího a elučního pufru jsem spolu s 0.04% DDM přidala a také 0.04% GDN. Dále se pracovní postup opět shodoval s purifikací s pufrem A.

3.3. Clear-nativní elektroforéza (CN-PAGE)

Pro přípravu 4-14% gradientového nativního gelu jsem namíchala tři různé roztoky akrylamidu (4% a 14% gradient a 4% na svrchní gel). Před naléváním jsem přidala 38 a 19 μ L 10% čerstvého persulfátu amonného (APS) do 14% a 4% roztoků akrylamidu. Po nalití 4-14% gradientu jsem gel převrstvila destilovanou vodou a ponechala 1 hod polymerizovat. Poté jsem vodu odsála stříčkou, přidala hřebínek na tvorbu jamek a gel převrstvila 4% svrchním gelem, do kterého jsem před naléváním přidala 40 μ L APS. Svrchní 4% gel jsem převrstvila destilovanou vodou a gel ponechala 1 hod a 30 min polymerizovat. Připravená skla s gelem jsem vložila do aparatury-Bio-Rad Protean II xi cell. Horní část aparatury s gely jsem naplnila katodovým pufrem a spodní část aparatury anodovým pufrem. Do každého vzorku byl přidán 1% A8-35 amfipol, 1% DDM, 1% GDN. Po

napipetování vzorků do jamek byla aparatura chlazena na 4°C a proteiny separovány při napětí 1000 V po dobu 60 min.

3.4. 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). Před naléváním jsem přidala 360 μL 10% SDS a 36 μL 10% APS do 16% a 20% roztoku akrylamidu. Po nalití 16-20% gradientu jsem gel převrstvila destilovanou vodou a ponechala 1 hod polymerizovat. Poté jsem vodu stříčkou odsála a gel převrstvila 5% svrchním gelem, do kterého jsem před naléváním přidala 180 μL 10% SDS a 36 μL 10% APS. 5% gel jsem převrstvila destilovanou vodou a ponechala polymerizovat po 1 hod a 30 min. Destilovanou vodu jsem opět stříčkou odsála a připravená skla s gely vložila do aparatury (Bio-Rad Protean II xi cell). Horní část aparatury s gely jsem naplnila katodovým pufrem a spodní část aparatury anodovým pufrem. 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 separované na 16 mA, 350 V po dobu 16 hod a aparatura byla během celé doby separace temperována na 23°C. Pro další analýzu byly gely obarveny v Coomassie blue.

3.5. Absorpční spektra proteinů v nativním gelu

Pro získání absorpčních spekter pigmentů asociovaných s purifikovanými Hlips, jsem odřízla část CN gelu (cca 2 x 2 mm) obsahující Hlip komplexy a umístila je na plastový proužek připojený ke speciálně vyrobenému adaptoru. Adaptor je na míru vyrobený, aby pasoval do běžné 1 mL kyvetové štěrbině ve spektrofotometru. Spektra byla měřena v rozsahu 350 nm – 750 nm na spektrofotometru Shimadzu UV-3000. Jako referenci jsem použila CN gel bez proteinů.

3.6. Analýza pigmentů pomocí HPLC

Pro identifikace pigmentů asociovaných s purifikovanými His-Hlips jsem vyřízla část CN gelu (cca 3x2 mm) obsahující separované Hlips a gel nařezala skalpelem na malé kousky. Kousky jsem nechala inkubovat v 200 ml MES pufru s 0.04 % DDM přes noc. Proteiny eluované z gelu byly denaturované 75% metanolem a extrahované pigmenty nastříknuty do HPLC Agilent-1260 vybavený *diode-array* detektorem. Pigmenty jsem separovala na koloně obsahující reverzní fázi (Zorbax Eclipse C18, 5 μm , 3.9 x 150 mm; Agilent). Pigmenty byly separované pomocí lineárního gradientu solventu B (30-95% (v/v) po dobu 25 min) v solventu A při rychlosti průtoku 0.8 mL min^{-1} na 40 °C. Chl-*a* a karotenoidy jsem detekovala absorbancí na 440 nm; plochy výsledných píků jsem integrovala a následně vypočítala molární stechiometrii z kalibračních křivek připravených pomocí autentických standardů.

4. Výsledky

Pro projekt byla zvolena exprese a purifikace těchto čtyř Hlips (viz Obr. 6 a Příloha 1.):

HliW z *Pseudonabaena* sp. PCC 6802

HliX z *Synechococcus* sp. PCC 7002

HliY z *Synechococcus elongatus* PCC 6301

HliZ z *Chroococidiopsis thermalis* PCC 7203

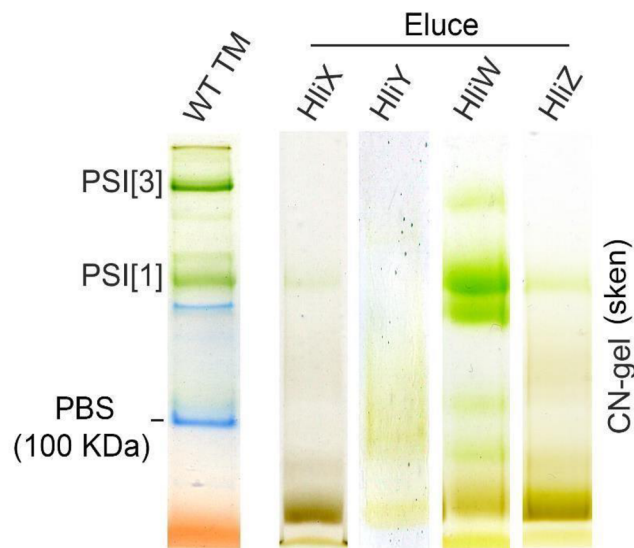
Geny kódující tyto proteiny byly buď amplifikovány z chromozomální DNA dané sinice (*hliX* a *hliZ*), nebo byla objednána syntéza genů (*hliW* a *hliY*) u firmy GenScript. Klonování genů do plasmidů a přípravu expresních kmenů *Synechocystis* jsem neprováděla. Obdržela jsem již hotové kmeny, které exprimují Hlips s 8xHis kotvou na N-konci pod promotorem *PsbAII*.

Kmeny, exprimující požadovaný protein, byl vymražený z -80°C a rozpěstovány do Erlenmeyerových baněk (50 mL) na třepačce s intenzitou světla $50 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a následně kultivovány v 1 L odměrných válcích bublaných vzduchem. 18 hod před ukončením kultivace bylo světlo zvýšeno na $500 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, aby se zvýšila exprese *hli* genů; *psbAII* promotor je částečně regulován světlem.

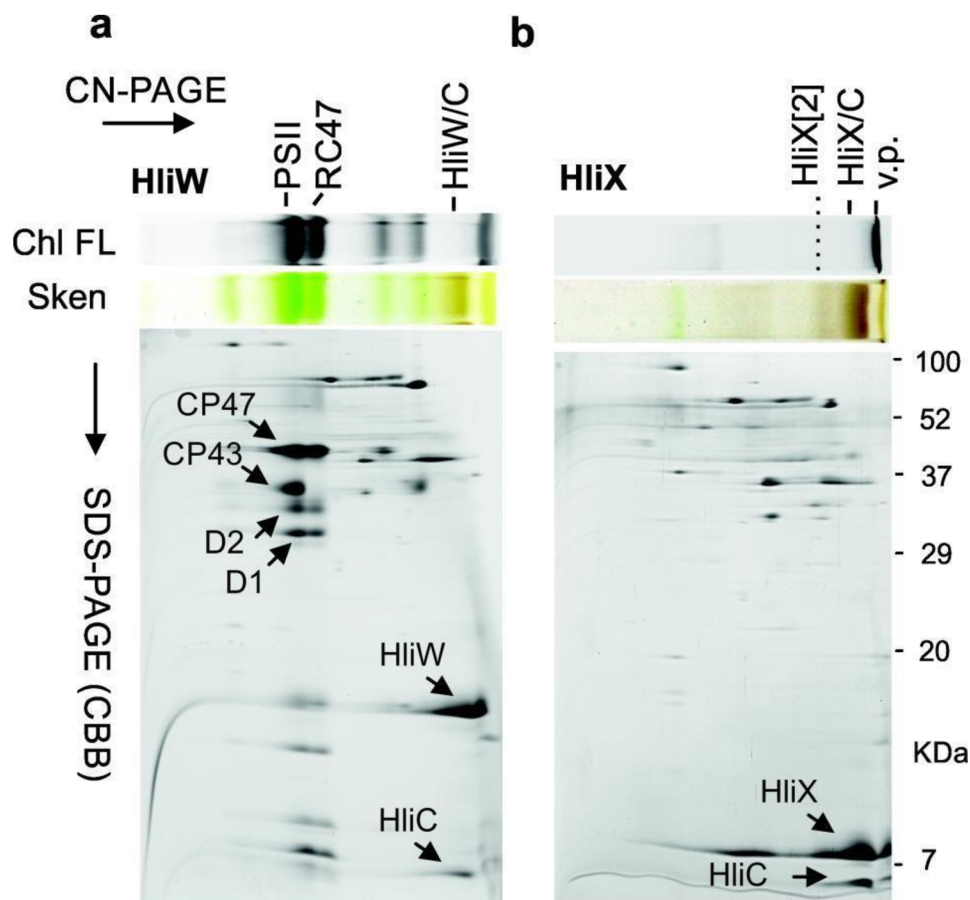
Z namnožených kmenů jsme dohromady získali 1700 mL buněčné kultury o optické denzitě 750 nm kolem 1. Tyto buňky se sklídily buď do pufru A nebo B s ohledem na následující metodiku (viz. dále) a zamrazily. Izolace proteinů v pufru A (fosfátový pufr bez Mg^{2+} , vyšší pH) vedou typicky k disociaci tylakoidních komplexů, takže Hlips jsou izolované bez svých proteinových “partnerů“. Např. HliC se v těchto podmínkách izoluje pouze jako dimer HliC/D bez dalších interagujících proteinů jako je RCII (Obr. 4) (Shukla et al., 2018). Oproti tomu izolace pomocí pufru B, navíc s vyžitím velmi jemného detergentu GDN, stabilizuje membránové komplexy, ale vede také k vyššímu množství kontaminujících proteinů (Konert et al., 2022).

4.1 Izolace Hlips pomocí His kotvy a separace elucí na CN-PAGE

V prvním kroku byly ze všech čtyřech kmenů izolovány tylakoidní membrány v pufru A, které byly posléze solubilizovány pomocí DDM. Proteiny byly purifikovány na koloně s niklem díky afinitě His-kotvy k tomuto kovu. Získaný eluát (~ 4 mL) byl koncentrován pomocí 10 kDa MW cut-off spin kolonek (Millipore) na finální objem ~ 150 μ L. V případě purifikovaných proteinů HliX, HliY a HliZ byl výsledný eluát žluto-hnědý, zatímco v případě HliW byl eluát zelený. K objasnění proteinového a pigmentového složení eluátů byla v prvním kroku použita CN-PAGE (Obr. 7). Zhruba třetina objemu každé eluce byla separována v přítomnosti A8-35 amfipolu (Kameo et al., 2021) a GDN (viz. metody). Pro porovnání mobility separovaných Hlips v gelu byl separován také vzorek tylakoidních membrán kontrolního kmene obsahující zelené proužky fotosystémů, modré proužky fykobilisomů a oranžový pruh volných karotenoidů. Výsledek ukázal, že HliX a HliZ obsahují převážně žlutý protein či proteinový komplex s hmotou pod 100 KDa (velikost hexamerních proteinů fykobilizómů, Obr. 7), tedy pravděpodobně Hlips. Výsledek separace HliY nebyl ideální, protože tento protein nevytvořil proužek, ale byl rozmázlý. HliW byl zjevně koizolovaný s Chl-proteiny, pravděpodobně fotosystémy (Obr. 7).



Obr. 7. Separace purifikovaných Hlips pomocí CN-PAGE. Proteiny byly izolované v pufru A v přítomnosti DDM (0.04%). Vzorky elucí (HliW-Z) byly pipetovány na CN-PAGE po 60 μ l spolu s 1% amfibolem A8-35 a 1% GDN. WT TM – tylakoidní membrány (5 μ g Chl) izolované z kontrolního kmene. PSI[3] – trimerní PSI, PSI[1] – monomerní PSI, PBS-hexamer fykobilinoproteinů.



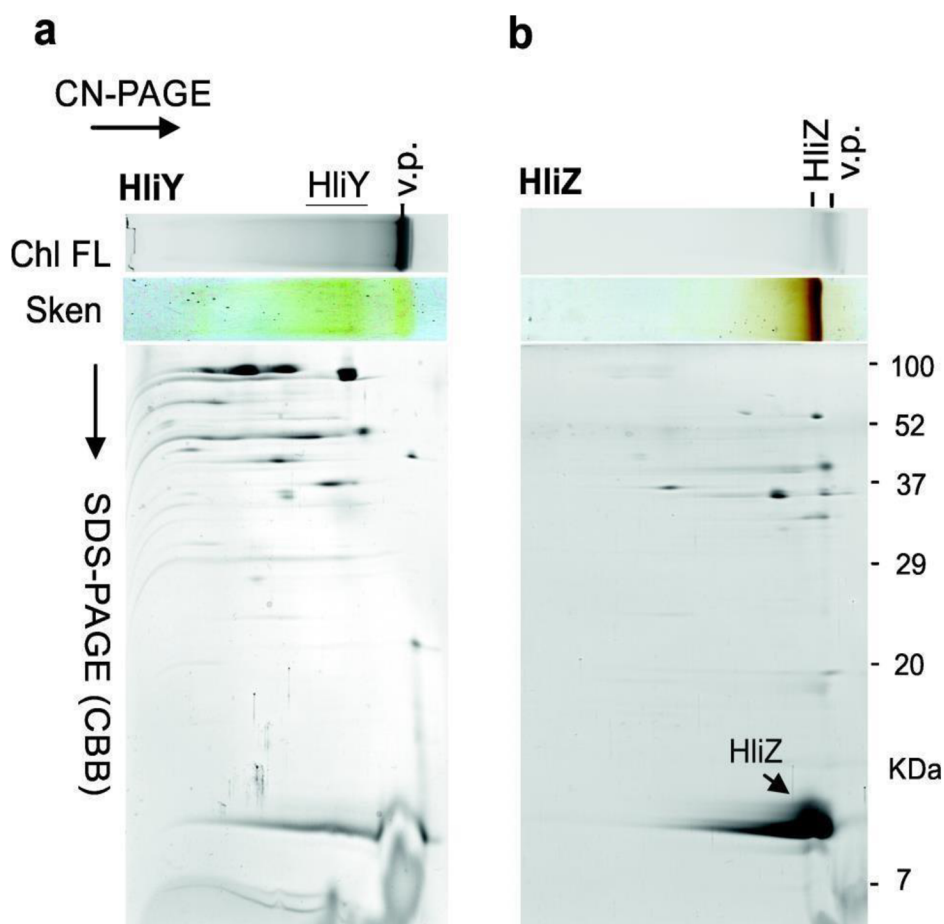
Obr. 8 2D CN/SDS-PAGE separace proteinových komplexů *His-HliW* a *His-HliX*. Oba proteiny byly izolované v pufru A po solubilizaci v DDM. **a)** Získaný proužek gelu z CN-PAGE byl před denaturací skenován na fluorescenci Chl po osvětlení modrým světlem (Ch FL) pomocí Fuji LAS 4000. Proteinové komplexy byly poté separovány pomocí SDS elektroforézy (SDS-PAGE) a výsledný gel byl obarven v Coomassie blue (CBB). Podjednotky PSII a CP47 byly označeny na základně předchozích výsledků v laboratoři, HliW a HliC byly identifikovány pomocí MS (hmotnostní spektrometrie). **b)** Identická analýza pro *His-HliX*. PSII- fotosystém II, RC47 – reakční centrum PSII s navázanou podjednotkou CP47, HliW/HliC – heterodimer HliW a HliC, HliX[2] – dimerní HliX, HliX/C – heterodimer HliX a HliC. v.p. – volné pigmenty.

Vzorek *His-HliW* separovaný v druhém rozměru obsahoval HliW a také HliC protein. Oba proteinové spoty vyříznuté z gelu byly analyzovány pomocí hmotnostní spektroskopie ve spolupráci s Mgr. Petrem Koníkem (Přf JU). Protože byl HliW naizolován s HliC a zároveň spolu oba proteiny ko-migrovaly na gelu, je hodně pravděpodobné, že tvoří heterodimer HliW/C (Obr. 8a). Tento dimer ne-emituje prakticky žádnou fluorescenci Chl (Chl FL v Obr. 8a), což prokazuje,

že je absorbovaná energie zhášena jako v případě nativních Hlips ze *Synechocystis* (Konert et al., 2022; Shukla et al., 2018). Druhý rozměr SDS-PAGE obsahoval v horní části rozdělené komplexy PSII a RC47, velké strukturní podjednotky D1, D2, CP43 a CP47 jsou označené na gelu (Obr. 8a). Jak ukázala separace purifikovaného His-HliX na 2D CN/SDS-PAGE, je tento protein také v komplexu s HliC (Obr. 8b). Nicméně je ještě možné rozlišit jeden pigmentový proužek s o něco vyšší hmotou, který je pravděpodobně homodimer HliX[2]. Oba komplexy (HliX/C a HliX[2]) nemají žádnou detekovatelnou fluorescenci Chl, jeví se tedy opět zhášené (Obr. 8b). Jediný signál fluorescence Chl je z volných pigmentů na čele gelu. Všechny ostatní proteiny detekované na barevném gelu jsou pravděpodobně pouze nespecifické kontaminace.

4.2. Separace His-HliY a His-HliZ proteinů pomocí 2D CN/SDS-PAGE

Výsledek 2D CN/SDS-PAGE His-HliY eluce prokázal, že tento protein je opravdu separovaný jako šmouha přes velkou část gelu a výtěžek purifikace His-HliY je mnohem nižší než u ostatních tří Hlips (Obr. 9a). Nicméně tento výsledek i tak jasně prokázal, že má HliY schopnost zhášet, jelikož u proteinu nebyla detekována žádná fluorescenci Chl, ačkoli frakce pigmentů stále komigruje s HliY. Jediný signál fluorescence Chl je z volných pigmentů na čele gelu (v.p.). Všechny ostatní proteiny detekované na barevném gelu jsou pravděpodobně pouze nespecifické kontaminace. Jestli je His-HliY purifikovaný s jinými Hlips ze *Synechocystis*, není z purifikovaného množství HliY možné určit. Vzorek His-HliZ separovaný v druhém rozměru obsahoval pouze značné množství HliZ proteinu a fluorescenci Chl navázaného na HliZ byla evidentně také zhášená. Jediný signál fluorescence Chl je opět pouze z volných pigmentů na čele gelu (Obr. 9b). Purifikovaný His-HliZ je velmi pravděpodobně homodimer.

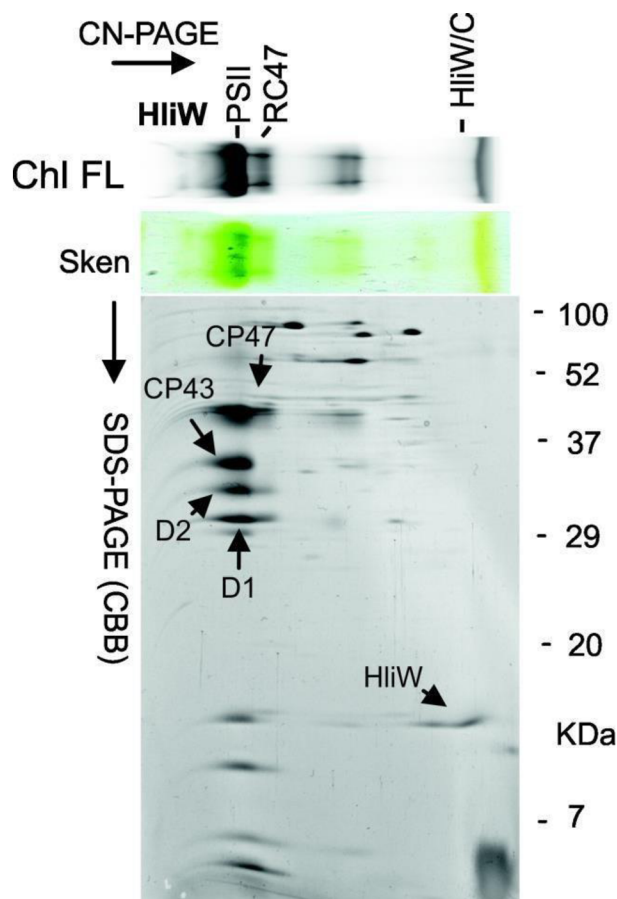


Obr. 9 2D CN/SDS-PAGE separace His-HliY a His-HliZ proteinů. Oba proteiny byly izolovány v pufru A po solubilizaci v DDM. **a)** Získaný proužek gelu z CN-PAGE byl před denurací skenován na fluorescenci Chl po osvětlení modrým světlem (Ch FL) pomocí Fuji LAS 4000. Proteinové komplexy byly poté separovány pomocí SDS elektroforézy (SDS-PAGE) a výsledný gel byl obarven v Coomassie blue (CBB). **b)** Identická analýza pro izolovaný His-HliX. v.p. – volné pigmenty.

4.3. Purifikace His-HliW v pufru B s použitím jemného detergentu GDN

Výsledek analýzy His-HliW proteinu (Obr. 8a) byl překvapivý. Přestože byl protein izolován v pufru A, který má tendenci disociovat proteinové interakce v tylakoidní membráně, eluát His-HliW obsahoval značnou koncentraci PSII (nebo RCCII) a RC47 komplexů. Přítomnost RC47 nicméně mohla být způsobena rozpadem PSII v přítomnosti pufru A. Pro objasnění, se kterým komplexem HliW interaguje, byl proveden obdobný experiment izolace His-HliW proteinu, ale tentokrát v pufru B s – směsí detergentů GDN/DDM (Obr. 10). Pufr B byl použit pro lepší stabilitu

proteinových komplexů zásluhou nízkému pH (6.5) a přítomnosti Mg^{2+} iontů. Detergent GDN je velmi jemný detergent, nicméně použití pouze GDN vedlo k precipitaci membránových proteinů (Konert MM, nepublikované výsledky). Proto byla použita směs GDN/DDM. Po izolaci byl HisHliW eluát znovu separován na 2D CN-SDS-PAGE. Barevný gel opět obsahoval v horní části komplex PSII (nebo RCCII; viz. Obr. 4) a také RC47, nicméně výrazně méně než v případě pufru A (Obr. 10). Evidentní byl také spot HliW, v případě izolace v pufru B je proteinu výrazně méně v porovnání s PSII proteiny. HliC protein nebyl na barevném gelu detekovatelný, což je ale pravděpodobně kvůli nízkému množství separovaného HliW. Opětovná izolace tedy potvrdila velmi silnou vazbu HliW k PSII komplexu, ačkoli není zřejmé, ke které podjednotce PSII se HliW váže (viz. diskuze).

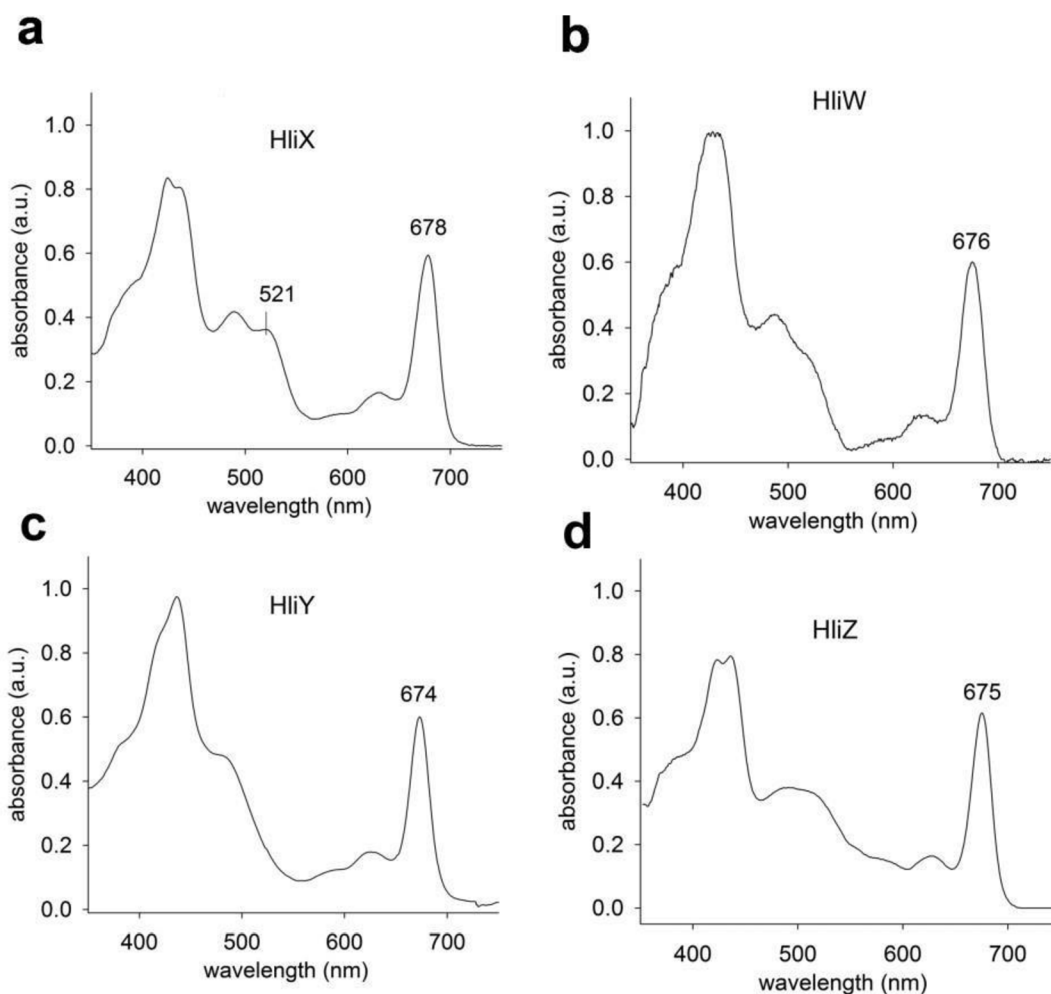


Obr. 10 2D CN/SDS-PAGE separace His-HliW proteinu izolovaného v pufru B a s použitím směsi detergentů GDN/DDM. Získaný proužek gelu z CN-PAGE byl před denurací skenován na fluorescenci Chl po osvětlení modrým světlem (Ch FL) pomocí Fuji LAS 4000. Proteinové komplexy byly poté separovány pomocí SDS elektroforézy (SDS-PAGE) a výsledný gel byl obarven v Coomassie blue (CBB). Podjednotky

PSII byly označeny na základě předchozích výsledků v laboratoři. RC47 – reakční centrum s pre-komplexem CP47, HliW/C – heterodimer HliW a HliC.

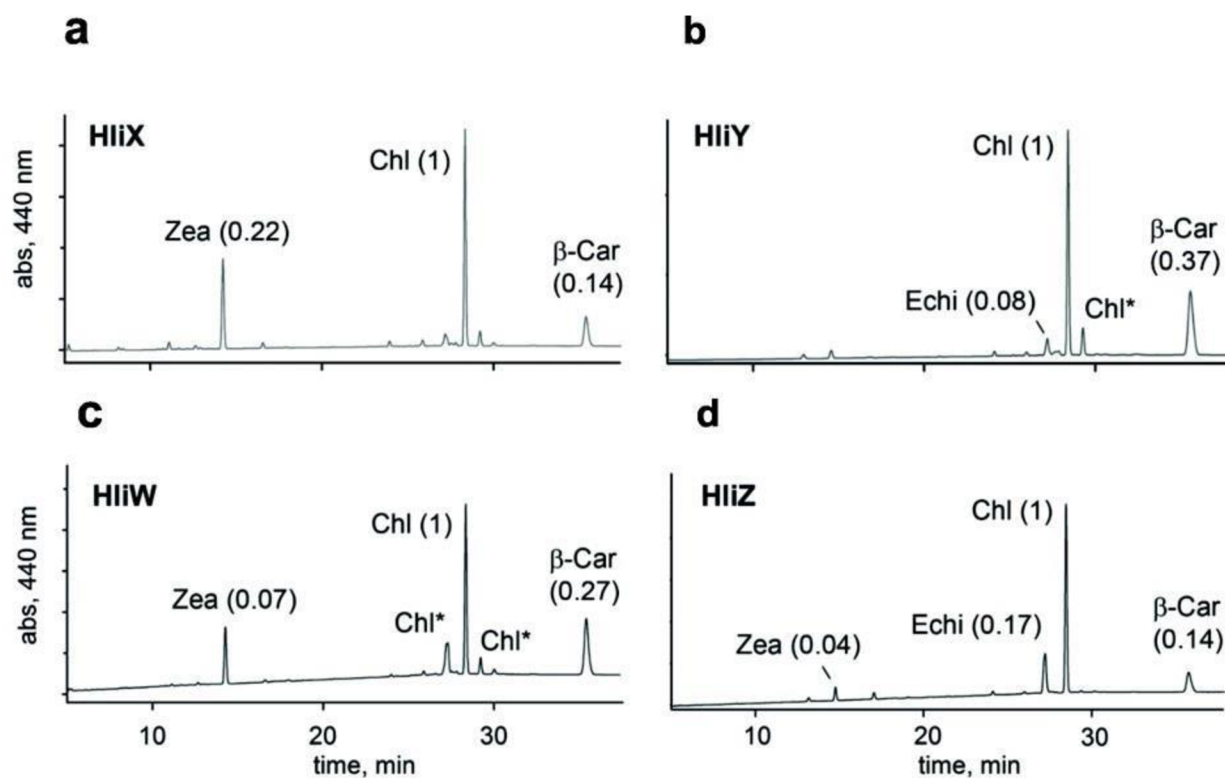
4.4. Absorpční spektra a obsah pigmentů purifikovaných His-Hli proteinů

Purifikované proteiny na niklové koloně mohou být kontaminované jak volnými pigmenty, tak malým množstvím PSI. K získání nezkráslených absorpčních spekter byly Hlips měřeny po separaci přímo v CN gelu. Před denaturací CN proužků pro 2D SDS-PAGE byly odříznuty z CN gelů malé části (cca 2 x 2 mm) obsahující Hlip komplexy a absorpčních spektra měřena ve spektrofotometru pomocí upravené kyvety (Obr. 11). Získané absorpční spektrum separovaného His-HliW (Obr. 11a) a His-HliX (Obr. 11b) se velmi podobalo spektrům HliD a HliC (Staleva et al., 2015; Shukla et al., 2018). Charakteristickým znakem pro Hlips, stejně jako pro LHC-like proteiny, je značný posun absorbance vázaných karotenoidů k červeným vlnovým délkám (*redshift*) (Skotnicová et al., 2021). Tento posun je jasně patrný u HliX, HliW a HliZ. Absorbance His-HliZ je posunuta do červené oblasti světla až extrémně a také tvar absorbance karotenoidů je nezvyklý (Obr. 11d). Absorpční spektrum His-HliY úplně postrádá posun do červena a je proto možné, že pigmenty byly v době měření již částečně disociované od proteinu (Obr. 11c). V posledním kroku byly identifikovány pigmenty vázané na Hlips pomocí HPLC (Obr. 12). Pro identifikaci pigmentů byla vyříznuta část CN gelu (3 x 2 mm) obsahující separovaný Hlip, a gel nařezán skalpelem na malé kousky. Rozřezaný gel byl inkubován přes noc s 0.04% DDM v pufru B, čímž byl protein eluován z gelu do pufru. Po odstranění gelu centrifugací byl odebrán supernatant obsahující proteiny (zhruba 50 μ L) a smíchán se 150 μ L metanolu. Tento roztok byl nastříknutý do HPLC a separován na chromatografické koloně (viz. metody).



Obr. 11 Absorbanční spektra separovaných Hliů v CN gelu a) Z SDS-PAGE gelu byl vyříznut kousek gelu obsahující His-HliX-HliC dimer (viz Obr. 8b) a vložen do spektrofotometru. Spektrofotometr zaznamenal absorbanci světla od 350 nm – 750 nm, b-d) Měření spekter His-HliC, His-HliY a His-HliZ bylo provedeno identicky. Wavelength (nm) – vlnová délka, (a.u.) – náhodné jednotky.

HPLC analýza ukázala, že všechny čtyři naizolované Hliů obsahují molekuly Chl-*a* a různé druhy karotenoidů (Obr. 12). His-HliX a His-HliW váží jak β -karoten, tak a zeaxanthin (Obr. 12 a,c), zatímco His-HliY je asociován s β -karotenem a malým množstvím echinenonu (Obr. 12b). Nejzajímavější je složení spektrum pigmentů vázané na His-HliZ, protože nejvíce zastoupený karotenoid je echinenon, β -karoten je v poměru k Chl méně a množství zeaxanthinu je velmi nízké (Obr. 12d).



Obr. 12 HPLC analýza extrahovaných pigmentů. Z CN gelu byly vyříznuty malé kousky gelu obsahující purifikovaný Hlips. Kousky gelu byly poté inkubované v MES pufru pH 6.5 s 0,04% DDM a následně denaturované 75% metanolem. Extrahované pigmenty byly vstříknuty do HPLC a analyzovány, obrázky představují chromatogramy pigmentů extrahovaných z His-HliX (**a**), HliY (**b**), HliW (**c**) a HliZ (**d**). Abs, 440 nm – absorbance na 440 nm. time - retenční čas pigmentů. Čísla v závorkách znázorňují molární poměr jednotlivých karotenoidů ke Chl.

5. Diskuze

5.1. Tvorba homo-dimerů a heterodimerů Hlips

V této práci se podařilo izolovat čtyři různé typy Hlips, které nejsou přítomné u modelové sinice *Synechocystis*. Podle předpokladů mohou Hlips vázat pigmenty pouze v dimerní formě (Staleva et al., 2015). Všechny čtyři naizolované proteiny tak pravděpodobně tvoří buď komplexy heterodimerů (HliW/C, HliX/C) či homodimerů (HliZ[2], HliX[2]). Dimerizace není patrně nutná pouze pro vazbu pigmentů, ale také pro stabilitu Hlips v buňce. HliA a HliB proteiny ze *Synechocystis* netvoří homodimery, ale striktně pouze heterodimery s HliC. Pokud je gen pro HliC inaktivován, jak HliA, tak HliB protein není v buňce detekován ani za stresových podmínek. Tyto výsledky ukazují, že monomerní Hlips jsou rychle degradovány (Konert et al., 2022).

Jelikož se dimerizace vyskytuje u všech dosud popsáných Hlips je velmi pravděpodobné, že se aminokyselinová sekvence, která je zodpovědná za dimerizaci Hlips, nachází u všech proteinů. Podle struktury LHC-II proteinů je za dimerizaci helixů zodpovědný motiv (ExxN/HxR), který je zároveň motivem pro vazbu Chl (Obr. 5, Obr. 13) (Shukla et al., 2018). To potvrzuje vysoká konzervovanost tohoto úseku a jeho výskyt u všech analyzovaných Hlips (HliA-D, HliW-Z; viz Příloha 1.). Je zajímavé, že HliW a HliX proteiny, nepůvodní v modelové sinici *Synechocystis*, tvoří dimer s HliC. V publikaci Konert et al., (2022) bylo navrženo, že primární funkcí HliC je vytvářet druhý „helix“ do páru k ostatním Hlips. Podle tohoto modelu jsou Hlips v buňce funkčně organizované jako heterodimery HliA/C, HliB/C a HliD/C. Důvodem tohoto uspořádání je nepochybně fakt, že HliC neinteraguje s žádným jiným proteinem kromě ostatních Hlips. HliA/B/D se vážou na CP47 a Ycf39 (Obr. 4) a pokud by se jednalo o homodimery, docházelo by k „agregaci“ PSII komplexů. Dva nedokončené PSII komplexy by se propojily přes jeden Hli homodimer, což by mohlo komplikovat biogenezi PSII.

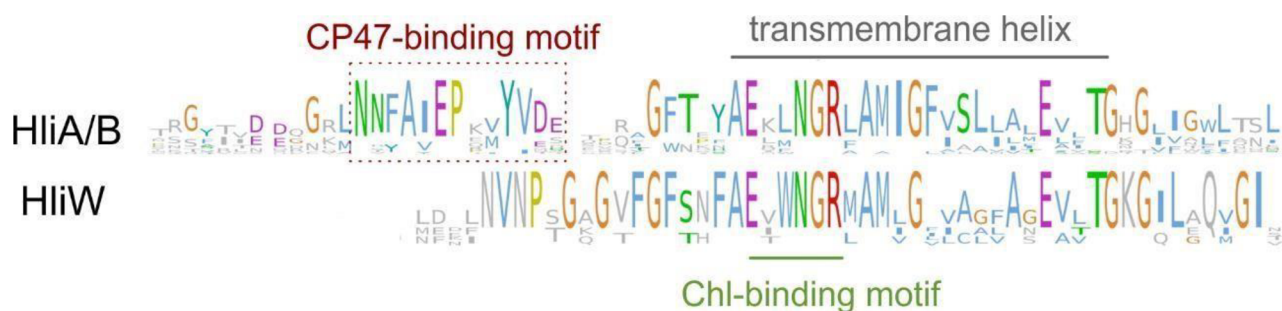
Mechanismus umožňující párování HliC se všemi ostatními Hlips je dosud neznámý. Jedna z možností je klíčová aminokyselina v pozici - 3 před ExxNGR motivem (konkrétně Alanin v HliC, viz. Obr. 5) a pak velmi krátký N-terminální konec (Konert et al., 2022). Nicméně je zjevné, že je

tento mechanismus velmi konzervovaný, protože se v *Synechocystis* tvoří HliW/C a HliX/C heterodimery. Geny pro HliC jsou přítomné jak v *Pseudanabaena* PCC 6802 (HliW; viz. Obr.6), tak v *Synechococcus* PCC 7002 (HliX; viz. Obr. 6), a patrně tedy také fungují jako HliW/C a HliX/C heterodimery v původních organismech.

5.2. Interakce HliW s PSII

Proteiny HliA a HliB prokazatelně fyzicky interagují s PSII podjednotkou CP47, zatímco interakce mezi HliD a RCII je zajištěna vazbou na Ycf39. Celý HliD/C-Ycf39 komplex se poté váže na RCII (Obr. 4; Knoppova et al., 2014; Konert et al., 2022). Jak vazba na CP47, tak na Ycf39 je pravděpodobně zajištěna N-terminální sekvencí Hlips, která se jeví velmi specifická pro jednotlivé typy Hlips (Obr. 11). Je zajímavé, že v *Synechocystis* se exprimovaný dimer HliW/C také váže na některý z PSII komplexů. Tato vazba je natolik stabilní, že částečně přetrvává i purifikaci v pufru A, ve kterém už disociuje i CP43 podjednotka od jádra PSII (Obr. 8a). V pufru B se HliX/C pravděpodobně purifikuje ve stoichiometrickém poměru (1:1) s PSII. Předpokládám, že se nejedná o funkční PSII, ale RCCII komplex (Obr. 4), protože na 2D gelu není patrný spot pro PsbO podjednotku kyslík vyvíjejícího komplexu (Obr. 10).

Jakým způsobem interaguje PsbW s PSII podjednotkami není zatím jasné. N-terminální konec PsbW je odlišný od HliA/B (Obr. 13), takže není pravděpodobné, že by PsbW používalo shodné vazebné místo na CP47, jako HliA/B proteiny. Také se nejedná o podobnou interakci, jako je popsána u HliD, protože k jeho vazbě na D1 je třeba protein Ycf39. Je proto možné, že HliW, který je přítomný pouze u sinic rodu *Pseudanabaena* (Obr. 6), interaguje s PSII strukturně zcela odlišným způsobem pomocí C koncového helixu. Tento segment se u ostatních známých Hlips nevyskytuje.



Obr. 13 Konzervované aminokyselinové zbytky (logo) u HliA/B a HliW proteinů. Obrázek byl vytvořen pomocí programu WebLogo3 na základě všech známých sekvencí HliA/B a HliW v databázi NCBI (poskytnuto Dr. Janem Janouškovicem). Konzervovaný motiv na N- konci proteinů HliA/B se uplatňuje ve vazbě na stromální PSII podjednotky CP47. Chl-vazný motiv (ExxNGR), konzervovaný u všech Hlips, je také znázorněn. *PsbW* má ještě druhý transmembránový helix, který není na obrázku znázorněn.

5.3. Vazba pigmentů na HliW-Z proteiny

Analýza pigmentů pomocí HPLC prokázala, že všechny Hlips studované v této práci vážou Chl-*a* a různé typy karotenoidů (β -karoten, zeaxanthin a echinenon). Důvod výskytu různých karotenoidů u Hlips není znám, ale patrně všechny zjištěné typy mohou dissipovat energii, a tak zhasět absorbovanou energii. Přesné vysvětlení, jakým způsobem jsou pigmenty v Hlips uzpůsobeny, aby docházelo k velmi rychlému přenosu energie z Chl na karotenoidy zatím chybí. Původní představa mechanismu byla taková, že vyžaduje přesné vyladění (zkroucení) molekuly karotenoidu (Llansola-Portoles et al., 2017). V případě HliA-D, které vážou pouze β -karoten (Staleva et al., 2015), by se tedy očekávalo evoluci vyladěné vazebné místo specificky pro tento karotenoid. Avšak z našich výsledků vyplývá, že na struktuře karotenoidu až tolik nezáleží; všechny naizolované Hlips prokázaly schopnost zhasení nehlédě na typ navázaných karotenoidů. Studované Hlips obsahují jak xantofyl (zeaxanthin), tak β -karoten, nebo dokonce echinenon. Podle získaných dat se zdá, že zhasení je velmi robustní, a stačí téměř jakýkoli karotenoid o určité pozici, aby zhasení fungovalo (Koskela et al., 2020). Konkrétní druh karotenoidu se každopádně nejeví úplně zásadní pro vlastní mechanismus zhasení. Například nedávno se podařilo připravit mutantní rostliny tabáku obsahující pouze karotenoid astaxanthin, který se v rostlinách vůbec nevyskytuje (Xu et al., 2020). Tyto rostliny akumulovaly LHC komplexy a byly schopné disipace absorbované energie. Získaná

absorpční spektra HliW a HliX se podobaly spektrům HliC a HliD (Shukla et al., 2018; Staleva et al., 2015) s charakteristickým posunem absorbance karotenoidů do červena. Absorpční spektra HliY a HliZ se lišily. Spektrum HliZ bylo velmi neobvyklé oproti zbylým třem Hlips, protože navázané karotenoidy absorbovaly až kolem 580 nm, což je extrémní posun do červené oblasti spektra. Zaoblený tvar absorbance karotenoidů v HliZ (Obr. 12d) naznačuje, že je hlavním pigmentem echinenon, což odpovídá výsledkům analýzy pigmentů pomocí HPLC. K poměru k Chl je echinenon nejvíce zastoupeným karotenoidem v izolovaném HliZ proteinu (Obr. 12).

6. Seznam použité literatury

1.

Barber, James. (2009). Photosynthetic energy conversion: Natural and artificial. *Chemical Society reviews*. 38. 185-96. [10.1039/b802262n](https://doi.org/10.1039/b802262n).

2.

Ben-Shem, A., Frolow, F., & Nelson, N. (2003). Crystal structure of plant photosystem I. *Nature*, 426(6967), 630–635. <https://doi.org/10.1038/nature02200>

3.

BLANKENSHIP, Robert E., 2014. Photosystem I structure and electron transfer pathway. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Second edition. Wiley Blackwell, s.123-296. ISBN 978-1-4051-8976-7.

4.

Dolganov, N. A., Bhaya, D., & Grossman, A. R. (1995). Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: evolution and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(2), 636–640. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.2.636>

5.

Durnford, D. G., Deane, J. A., Tan, S., McFadden, G. I., Gantt, E., & Green, B. R. (1999). A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution. *Journal of molecular evolution*, 48(1), 59–68. <https://doi.org/10.1007/pl00006445>

6.

Engelken, J., Brinkmann, H., & Adamska, I. (2010). Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily. *BMC evolutionary biology*, 10, 233. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-233>

7.

Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., & Iwata, S. (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5665), 1831–1838. <https://doi.org/10.1126/science.1093087>

8.

Green, B. R., & Durnford, D. G. (1996). THE CHLOROPHYLL-CAROTENOID PROTEINS OF OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, *47*, 685–714. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.685>

9.

Gruszecki, W. I., Grudzinski, W., Gospodarek, M., Patyra, M., & Maksymiec, W. (2006). Xanthophyll-induced aggregation of LHCII as a switch between light-harvesting and energy dissipation systems. *Biochimica et biophysica acta*, *1757*(11), 1504–1511. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.08.002>

10.

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*, 655–684. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.655>

11.

Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., & Krauss, N. (2001). Threedimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, *411*(6840), 909–917. <https://doi.org/10.1038/35082000>

12.

Kameo, S., Aso, M., Furukawa, R., Matsumae, R., Yokono, M., Fujita, T., Tanaka, A., Tanaka, R., & Takabayashi, A. (2021). Substitution of Deoxycholate with the Amphiphilic Polymer Amphipol A8-35 Improves the Stability of Large Protein Complexes during Native Electrophoresis. *Plant & cell physiology*, *62*(2), 348–355. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa165>

13.

Kamiya, N., & Shen, J. R. (2003). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(1), 98–103. <https://doi.org/10.1073/pnas.0135651100>

14.

Knoppová, J., Sobotka, R., Tichy, M., Yu, J., Konik, P., Halada, P., Nixon, P. J., & Komenda, J. (2014). Discovery of a chlorophyll binding protein complex involved in the early steps of photosystem II assembly in *Synechocystis*. *The Plant cell*, *26*(3), 1200–1212. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123919>

15.

Komenda, J., & Sobotka, R. (2016). Cyanobacterial high-light-inducible proteins: Protectors of chlorophyll-protein synthesis and assembly. *Biochimica et biophysica acta*, *1857*(3), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.08.011>

16.

Komenda, J., Sobotka, R., & Nixon, P. J. (2012). Assembling and maintaining the Photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Current opinion in plant biology*, *15*(3), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.01.017>

17.

Konert, M. M., Wysocka, A., Koník, P., & Sobotka, R. (2022). High-light-inducible proteins HliA and HliB: pigment binding and protein-protein interactions. *Photosynthesis research*, <https://doi.org/10.1007/s11120-022-00904-z>

18.

Koskela, M. M., Skotnicová, P., Kiss, É., & Sobotka, R. (2020). Purification of Proteincomplexes from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Using FLAG-affinity Chromatography. *Bio-protocol*, *10*(10), e3616. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3616>

19.

Latowski, D., Akerlund, H. E., & Strzałka, K. (2004). Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity. *Biochemistry*, *43*(15), 4417–4420. <https://doi.org/10.1021/bi049652g>

20.

Llansola-Portoles, M. J., Sobotka, R., Kish, E., Shukla, M. K., Pascal, A. A., Polívka, T., & Robert, B. (2017). Twisting a β -Carotene, an Adaptive Trick from Nature for Dissipating Energy during Photoprotection. *The Journal of biological chemistry*, *292*(4), 1396–1403. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.753723>

21.

Havaux, M., Guedeney, G., He, Q., & Grossman, A. R. (2003). Elimination of highlightinducible polypeptides related to eukaryotic chlorophyll *a/b*-binding proteins results in aberrant photoacclimation in *Synechocystis* PCC6803. *Biochimica et biophysica acta*, *1557*(1-3), 21–33. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00391-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00391-2)

22.

Malavath, T., Caspy, I., Netzer-El, S. Y., Klaiman, D., & Nelson, N. (2018). Structure and function of wild-type and subunit-depleted photosystem I in *Synechocystis*. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, *1859*(9), 645–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.02.002>

23.

Minagawa, J., & Takahashi, Y. (2004). Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynthesis research*, 82(3), 241–263.

<https://doi.org/10.1007/s11120-004-2079-2>

24.

Nelson, N., & Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual review of plant biology*, 57, 521–565.

<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350>

25.

Pagliano, C., Saracco, G., & Barber, J. (2013). Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynthesis research*, 116(2-3), 167–188.

<https://doi.org/10.1007/s11120-013-9803-8>

26.

Pascual-Aznar, G., Konert, G., Bečkov, M., Kotabov, E., Gardian, Z., Knoppov, J.,

Bučinsk, L., Kaňa, R., Sobotka, R., & Komenda, J. (2021). Psb35 Protein Stabilizes the CP47 Assembly Module and Associated High-Light Inducible Proteins during the Biogenesis of Photosystem II in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant & cell physiology*, 62(1), 178–190. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa148>

27.

Promnares, K., Komenda, J., Bumba, L., Nebesarova, J., Vacha, F., & Tichy, M. (2006). Cyanobacterial small chlorophyll-binding protein ScpD (HliB) is located on the periphery of photosystem II in the vicinity of PsbH and CP47 subunits. *The Journal of biological chemistry*, 281(43), 32705–32713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606360200>

28.

Shukla, M. K., Llansola-Portoles, M. J., Tichý, M., Pascal, A. A., Robert, B., & Sobotka, R. (2018). Binding of pigments to the cyanobacterial high-light-inducible protein HliC. *Photosynthesis research*, *137*(1), 29–39. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0475-7>

29.

Skotnicová, P., Staleva-Musto, H., Kuznetsova, V., Bína, D., Konert, M. M., Lu, S., Polívka, T., & Sobotka, R. (2021). Plant LHC-like proteins show robust folding and static non-photochemical quenching. *Nature communications*, *12*(1), 6890. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27155-1>

30.

Solovchenko, A., Baulina, O., Ptushenko, O., & Gorelova, O. (2019). Ultrastructural patterns of photoacclimation and photodamage to photosynthetic algae cell under environmental stress. *Physiologia plantarum*, *166*(1), 251–263. <https://doi.org/10.1111/ppl.12912>

31.

Staleva, H., Komenda, J., Shukla, M. K., Šlouf, V., Kaňa, R., Polívka, T., & Sobotka, R. (2015). Mechanism of photoprotection in the cyanobacterial ancestor of plant antenna proteins. *Nature chemical biology*, *11*(4), 287–291. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1755>

32.

Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Lamborghini, M., & Kühlbrandt, W. (2005). Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea lightharvesting complex at 2.5 Å resolution. *The EMBO journal*, *24*(5), 919–928. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600585>

33.

Stephenson, P. G., Moore, C. M., Terry, M. J., Zubkov, M. V., & Bibby, T. S. (2011). Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. *Trends in biotechnology*, *29*(12), 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.005>

34.

Vasil'ev, S., Orth, P., Zouni, A., Owens, T. G., & Bruce, D. (2001). Excited-state dynamics in photosystem II: insights from the x-ray crystal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8602–8607. <https://doi.org/10.1073/pnas.141239598>

35.

Webber, A. N., & Malkin, R. (1990). Photosystem I reaction-centre proteins contain leucine zipper motifs. A proposed role in dimer formation. *FEBS letters*, 264(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80749-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80749-9)

36.

Xu, H., Vavilin, D., Funk, C., & Vermaas, W. (2004). Multiple deletions of small Cab-like proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: consequences for pigment biosynthesis and accumulation. *The Journal of biological chemistry*, 279(27), 27971–27979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403307200>

37.

Xu, P., Chukhutsina, V. U., Nawrocki, W. J., Schansker, G., Bielczynski, L. W., Lu, Y., Karcher, D., Bock, R., & Croce, R. (2020). Photosynthesis without β -carotene. *eLife*, 9, e58984. <https://doi.org/10.7554/eLife.58984>

38.

Yao, D., Kieselbach, T., Komenda, J., Promnares, K., Prieto, M. A., Tichy, M., Vermaas, W., & Funk, C. (2007). Localization of the small CAB-like proteins in photosystem II. *The Journal of biological chemistry*, 282(1), 267–276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605463200>

7. Příloha

7.1. Proteinové sekvence HliW-Z

His-HliX

MHHHHHHHHHENQESKFGFSAFAENWNGRLAMLGFVIGLLTELLTGKGILAQLGLM

His-HliY

MHHHHHHHHHSGNSAKRDNLPEPDPAFGWSAYAERINGRFAMVGFVALLLLEFFTHQD
LITWLGLRP

His-HliW

MHHHHHHHHHHTTNIATNSTTSTTINKINLDELNVNPSGQGVFGFSNFAEIWNGRMAMLGF
LAALASEVVTGKGILGQIGINTTGGGILVALFLTGFTVATTLGYYAVKLNQVKGNEPKN
Q

His-HliZ

MHHHHHHHHHETRETRPATDVPPVAKAYNGVDRNAFIFGLNPQAEIWNRLAMIGFLA
YLIWDLAGFSVLRDVLHLIGY

Příloha 1. Aminokyselinové sekvence Hlips exprimovaných v *Synechocystis*. 8xHis kotva je potřzená, konzervovaný Chl-vazný motiv je vyznačený tučně.