

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Role FtsH4 proteázy při adaptaci na environmentální stres

Bakalářská práce

Kateřina Novotná

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Josef Komenda, CSc., DSc.

Školitelka: Mgr. Vendula Krynická, Ph.D., MBÚ Třeboň

České Budějovice 2022

Bibliografické údaje:

Novotná, K., 2022: Role FtsH4 proteázy při adaptaci na environmentální stres. [The role of FtsH4 protease during adaptation to environmental stress. Bc. Thesis, in Czech] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

FtsH proteases are membrane-embedded proteolytic complexes important for protein quality control and regulation of various physiological processes in bacteria, mitochondria and chloroplasts. Most cyanobacteria, including the model species *Synechocystis* sp. PCC 6803, contain four FtsH homologues, FtsH1-FtsH4. FtsH1-3 form two hetero-oligomeric complexes, FtsH1/3 and FtsH2/3 that play an important role in acclimation to nutrient deficiency and photosystem II (PSII) quality control, respectively. FtsH4 differs from the other three homologs by the formation of a homo-oligomeric complex. The role of this complex remained unknown. To reveal the function of FtsH4 protease, we characterized mutants lacking and over-expressing the *ftsH4* gene, under various stress conditions. Our results revealed that FtsH4 participates in transition to stationary phase. The excess of FtsH4 protein slows down the transition. In addition, FtsH4 plays an important role in short- and long-term acclimation to high light stress, especially after dilution from stationary phase. After short-term high light exposition, FtsH4 contributes to faster cell growth, presumably by promoting the expression of proteins required for acclimation to the stress. After long-term exposition to high light, it regulates the level of HliD protein which is important for protection and hence stabilization of PSII complex. Our results also indicate that FtsH4 is implicated in a regulation of carbon metabolism.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích,

dne

.....

Kateřina Novotná

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především své školitelce Vendule Krynické za odborné vedení a poskytnutí cenných rad, jak při psaní práce, tak i práce v laboratoři. Velice si vážím její trpělivosti a odhodlání během práce se mnou, jelikož to nebylo vždy snadné. Dále bych ráda poděkovala všem kolegům z MBÚ Třeboň (Centrum ALGATECH), kteří mi byli vždy ochotni poskytnout rady a pomoci v případě jakékoli těžkosti a komplikace. Mé velké díky patří Lence Bučinské a Petře Skotnicové, které se staly důležitými články pro konzultování mé práce. Jejich věcné komentáře a názory byly pro mě klíčovými zejména při dokončování práce. Ráda bych také poděkovala Janě Zahradníkové, která mně učila metodické postupy v laboratoři v mých začátcích. Jsem opravdu ráda, že jsem měla možnost být součástí týmu MBÚ v Třeboni, který mimo skupinu vědeckých pracovníků tvoří i přátelský kolektiv. V poslední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mi byla oporou, zejména horších časech.

Finanční podpora:

Tato práce byla financována z grantu Mgr. Venduly Krynické Ph.D. 310 313 Grantové agentury České republiky a realizovaná v Laboratoři fotosyntézy na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, Centrum ALGATECH v Třeboni.

Obsah

1	Cíle práce	1
2	Teoretická část	1
2.1	Fotosyntéza	1
2.2	Sinice	3
2.2.1	Synechocystis	4
2.3	Proteázy	5
2.3.1	Proteázy nezávislé na ATP	6
2.3.2	Proteázy závislé na ATP	6
2.3.3	Membránové proteázy	7
2.3.3.1	FtsH proteázy	7
2.3.3.1.1	FtsH u <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
2.3.3.1.2	FtsH u <i>Escherichia coli</i>	8
2.3.3.1.3	FtsH u sinic rodu <i>Synechocystis</i>	8
2.4	Mikrobiální růst	9
3	Materiál a metody	10
3.1	Použité kmeny	10
3.2	Pěstování a udržování kmenů sinic	10
3.3	Měření celobuněčných absorpčních spekter	11
3.4	Měření velikosti a počtu buněk na přístroji Multisizer 4 COULTER COUNTER	11
3.5	Izolace tylakoidních membrán	11
3.6	Solubilizace tylakoidních membrán a příprava vzorků pro CN-PAGE	12
3.7	CN-PAGE	12
3.8	2D SDS-PAGE	13
3.9	Přenos proteinů z gelu na membránu	14
4	Výsledky	16
4.1	Růstová křivka FtsH4 mutantních kmenů	16
4.2	Vysoké světlo po naředění ze stacionární fáze zpomaluje růst obou FtsH4 mutantních kmenů	18
4.3	Vliv ztráty nebo nadbytku FtsH4 proteázy na množství pigmentů za podmínek HL _{SC}	23
4.4	Složení membránových proteinových komplexů u FtsH4 mutantních kmenů za podmínek HL _{SC}	25
4.5	Vliv množství CO ₂ na růst FtsH4 mutantních kmenů	28
4.5.1	Nadbytek CO ₂	28

4.5.2	Limitace CO ₂	30
5	Diskuze	32
6	Závěr	36
7	Seznam literatury	38
8	Seznam obrázků	42

Seznam použitých zkratek

2D SDS-PAGE	Dvourozměrná elektroforéza
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AAA+	ATPázy spojené s různou buněčnou aktivitou
ADP	Adenosin difosfát
ATP	Adenosin trifosfát
ATPáza	Adenosytrifosfátová syntáza
β -DDM	β -Dodecylmaltosid
Clp	Caseinolytická peptidáza
CN-PAGE	Nativní elektroforéza
Ctp	C-terminální karboxypeptidázy
Deg	Degradace periplazmatických proteinů
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EXP	Exponenciální fáze růstu
FL	Fluorescence
GT	Na glukózu tolerantní
HL	Expozice vysokou intenzitou světla
HL _{EXP}	Expozice vysokou intenzitou světla po naředění z exponenciální fáze růstu
Hlips	Proteiny indukované vysokou intenzitou světla

HL _{sc}	Expozice vysokou intenzitou světla po naředění ze stacionární fáze růstu
Chl	Chlorofyl
OD	Optická denzita
OEC	Kyslík vyvíjející komplex
PCC	Pasteur Culture Collection
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
RNA	Ribonukleová kyselina
RuBisCo	Ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza
SC	Stacionární fáze růstu
SDS	Dodecylsírán sodný
SP	Signální peptidáza
SppA	Peptid signální peptidázy
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
TM	Tylakoidní membrány, tylakoidy
WT	Wild type (kontrolní kmen)

1 Cíle práce

Cílem této práce je studium funkce FtsH4 proteázy v modelové sinici *Synechocystis* sp. PCC 6803 (dále *Synechocystis*) charakterizací FtsH4 delečního a over-expresního mutantního kmenu. Zaměřila jsem se na porovnání rychlosti růstu, velikosti buněk, absorpčních spekter a složení membránových proteinů FtsH4 mutantních kmenů pod vlivem různých stresových podmínek, jako je vysoká intenzita světla, stacionární fáze a nedostatek či nadbytek CO₂.

2 Teoretická část

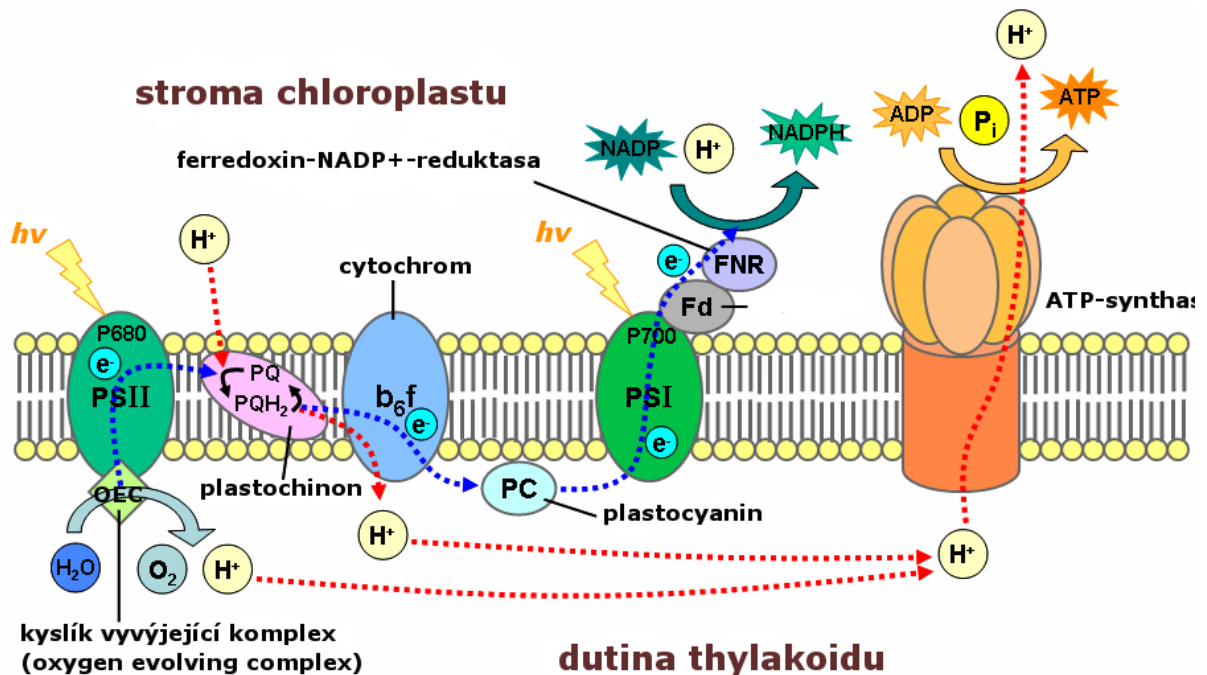
2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je jeden z nejdůležitějších biochemických procesů, při kterém dochází k zachycování sluneční energie, která je využita k následné syntéze organických látek z oxidu uhličitého a vody. Fotosyntéza probíhá u sinic a purpurových bakterií na vnitřních membránových strukturách, které se u sinic nazývají tylakoidy nebo tylakoidní membrány. Řasy a rostliny fotosyntetizují díky chloroplastům, speciálním semiautonomním organelám, které se vyvinuly z prapředka sinic. Uvnitř chloroplastu je tylakoidní membrána organizovaná do spletné sítě, kterou tvoří grana, navzájem propojená intergranálními tylakoidy (Mazur a kol., 2021). Fotosyntetické komplexy obsahují vlastní fotosyntetická barviva, díky kterým je zachycována světelná energie. U sinic, zelených řas a rostlin je typický chlorofyl *a* a *b*. U hnědých řas je přítomen chlorofyl *a* a *c*. Také u některých zástupců sinic je přítomen i chlorofyl *b* (*Prochloron*, *Prochlorococcus*, *Prochlorothrix*), *c* (*Prochlorococcus*) i *d* (*Acaryochloris marina*) (Garcia-Pichel, 2009). Kromě chlorofylu jsou u fotosyntetických organismů zastoupené další pigmenty, karoteny a fykobiliny. Ty absorbují energii světla o jiných vlnových délkách a také dávají organismům jiné zbarvení. Karoteny jsou zodpovědné za oranžovou barvu, fykobiliny za modrou a chlorofyl za zelenou.

Fotosyntetická rovnice $6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2$

Při fotosyntéze se světelná energie mění na energii chemických vazeb ATP a NADPH, kde ATP a NADPH je následně využito k asimilaci uhlíku a tvorbě cukrů. Rozlišujeme fotosyntézu oxygenní (při které vzniká kyslík a pro jejíž zahájení je potřeba voda) a anoxygenní (nedochází k uvolňování kyslíku), přičemž rozeznáváme různé typy anoxygenní

fotosyntézy podle toho, zda je pro její zahájení potřeba sulfan, nebo organické kyseliny (Blankenship, 2013). Oxygenní fotosyntéza probíhá ve dvou fázích, světelné a temnostní.



Obrázek 1: Schéma světelné fáze fotosyntézy (Voet, Voetová, 1995).

Při světelné fázi fotosyntézy (Obr.1) hrají hlavní úlohu dva fotosyntetické komplexy, fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII), vázané v tylakoidní membráně. Komplexy PSII a PSI, v tomto pořadí, se pomocí molekuly chlorofylu, kterou mají vázanou ve svých reakčních centrech P680 a P700 podílí na přeměně energie slunečního záření na energii chemickou. Světlo je do reakčních center směřováno pomocí světlosběrných antén, které zachycují světelnou energii a předávají ji na molekulu chlorofylu. U sinic jsou antény tvořeny fykobiliproteiny, které se skládají do pyramidové struktury fykobilizómu. Fotosystémy v chloroplastech jsou obklopeny komplikovanějším systémem vnějších a vnitřních antén, které mají ve své struktuře molekuly chlorofylů a karotenů (Blankenship, 2013). Energie zachycená těmito anténami se přeneše na chlorofyl vázaný v reakčním centru P680, tento chlorofyl pohlcuje energii světla, a přitom dochází k excitaci elektronu, jeho separaci a přenosu na molekulu plastochinonu. Tím dojde k oxidaci molekuly chlorofylu. Oxidovaná molekula chlorofylu na P680 doplní zpět elektron díky procesu nazvanému fotolýza vody, při němž dochází k rozkladu vody a následnému uvolňování kyslíku, který je pro fotosyntetické

organismy „odpadní“ látkou (Břížďala, 2022). Fotolýza vody probíhá na proteinovém komplexu OEC (z angl. oxygen-evolving complex – kyslík vyvíjející komplex), který je součástí PSII (Šetlík a kol., 2004). Elektron odštěpený z P680 je molekulou plastochinonu transportován na komplex cytochrom b6f a z něj pomocí plastocyaninu na PSI. Tam se díky světelnému záření opět elektron excituje a dalšími přenašeči je transportován až na finální akceptor, molekulu NADP, která je enzymem ferredoxin-NADP⁺ reduktázou redukována na NADPH. Během světelné fáze fotosyntézy vzniká přebytek H⁺ iontů ve vnitřním prostoru tylakoidu, který se nazývá lumen. Protonový gradient umožňuje pomocí enzymu ATP syntázy tvorbu ATP (Alberts a kol., 1998).

Temnostní fáze fotosyntézy probíhá u sinic také na tylakoidech, v případě eukaryotických organismů ve stromatu. Tato fáze není závislá na přístupu světla a využívá energii získanou z ATP a NADPH. Ve výsledku tak dochází k fixaci CO₂ do jednoduchých sacharidů (Břížďala, 2022).

2.2 Sinice

Sinice řadíme mezi gramnegativní bakterie a dosud nejstarší fosilní nálezy sinic jsou 3,5 miliardy let staré (Hofmann, 1976). Právě díky oxygenní fotosyntéze, jejíž vedlejším produktem je uvolňování kyslíku, sinice přispěly k postupnému zvyšování koncentrace kyslíku, které vedlo k vytvoření atmosféry dnešního typu. Tyto změny umožnily vznik a evoluci dalších životních forem. Tento proces se nazývá Velká kyslíková katastrofa, z anglického překladu Great Oxidation Event (Sessions a kol., 2008).

Morfologicky patří sinice k nejvíce různorodým prokaryotickým organismům. Díky široké škále adaptačních mechanismů se přizpůsobily velmi proměnlivým podmínkám. Sinice kolonizovaly převážně vodní prostředí a půdu, ale žijí také v extrémních podmínkách, jakou jsou suché a polární oblasti či horké prameny. Jsou jednobuněčné a často žijí v koloniích tvaru kokálních shluků či vláknitých stélek (Komárek, 2014). Také díky této různorodosti je velikost buňky sinic v rozmezí zhruba 1-10 μm. Některé druhy sinic mají specializované buňky heterocyty, pomocí kterých mohou vázat vzdušný dusík. Toho pak využívají jiné organismy, které se sinicemi vstupují do symbiózy. Typické specializované struktury u řetízkových sinic (*Anabaena*) jsou akinety, klidové buňky sloužící k přečkávání nepříznivých podmínek (Sukeník a kol., 2019). Rozmnožování sinic je také druhově rozmanité a je založené buď na zaškrcování buněk či stavění přepážek mezi dceřinými buňkami.

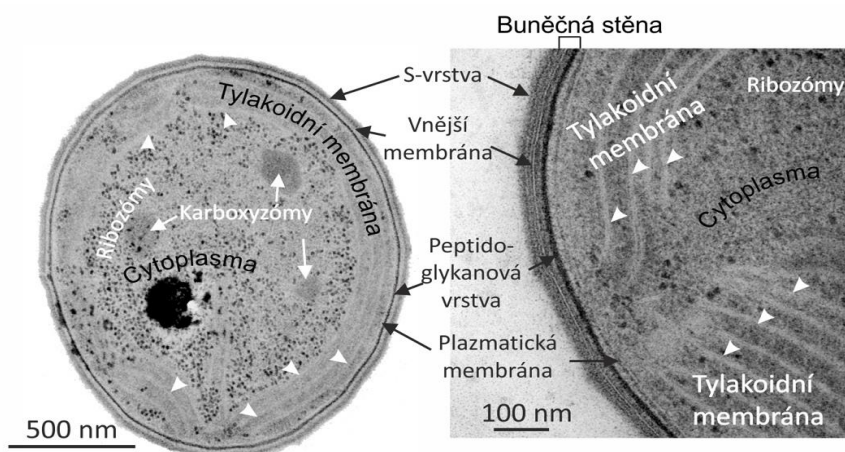
Některé druhy sinic mají kolem celé buňky slizový obal, nazývaný glykokalyx, který chrání celou buňku. Samotná buňka sinic je na povrchu chráněna proteinovou S-vrstvou (Šmarda a kol., 2002) a buněčnou stěnou, která je tvořena dvěma membránami, vnější membránou a plazmatickou membránou. Mezi membránami buněčné stěny se nachází periplazmatický prostor s peptidoglykanem. Vnitřní prostor buňky, cytoplazma, je po obvodu vyplněn tylakoidními membránami (Liberton, Pakrasi, 2008), ale jejich uspořádání v buňce se liší u jednotlivých skupin sinic (Mareš a kol., 2019). Mezi tylakoidními membránami a ve volném prostoru buňky se nachází zásobními granule (například cyanofycinové, glukózové, škrobové či lipidové) a karboxyzómy (Stanier, 1988). Karboxyzómy jsou proteinové útvary, pravidelného šestiúhelníkového tvaru, tvořené enzymem RuBisCo, který je zodpovědný za fixaci uhlíku z CO₂ během temnostní fáze fotosyntézy procesem zvaném Calvinův cyklus (Stanier, Cohen-Bazire, 1977). V centrální části cytoplazmy sinic je také uložený chromatinový aparát, který tvoří několik kopií kruhové DNA a bakteriální typ ribozomů. Ribozomy jsou tvořené malou ribozomální podjednotkou 16S RNA a velkou podjednotkou 23S RNA (Herrero, Flores, 2008).

Díky zmíněné adaptaci buněk sinic na různé biotopy mají některé sinice v buňkách další specializované struktury například aerotopy. Aerotopy jsou svazky plynových měchýřků, které zaplňují vnitřní prostor buňky u vodních zástupců sinic. Pomocí nich se sinice mohou pohybovat ve vodním sloupci a regulovat tak přístup k světlu a oxidu uhličitému, což je nezbytné pro fotosyntézu (Gonzalez-Esquer a kol., 2016).

2.2.1 Synechocystis

Sinice rodu *Synechocystis* je jedním z častých modelových organismů využívaných ke studiu fotosyntézy. Tento kmen jednobuněčných sinic je schopen fototrofně růst procesem oxygenní fotosyntézy během světelné fáze dne, a zároveň heterotrofně růst procesem glykolýzy a oxidativní fosforylace v průběhu temnostní fáze dne. Tento kmen byl izolován ze sladkovodních jezer v roce 1968 (Tichý a kol., 2016). V laboratorních podmínkách lze snadno tyto sinice kultivovat buď na agarové misce nebo v tekutém médiu. pH pro optimální růst by mělo být mezi 7 a 8,5. Velikost buňky je kolem 1,5-2 μm v průměru. Detailní popis buňky je uveden v Obr. 2, který je pořízen elektronovým mikroskopem. Stejně jako ostatní gramnegativní bakterie mají dvě membrány, vnější a plazmatickou, mezi nimi vrstvu peptidoglykanu. Uvnitř buňky se nachází cirkulární molekula DNA. Výhodou tohoto modelového organismu je, že celý jeho genom je už několik desítek let osekvenovaný a

podrobně anotovaný (Kaneko a kol., 1996). Navíc je tato sinice přirozeně transformovatelná cizorodou DNA pomocí homologní rekombinace, což usnadňuje přípravu mutantních kmenů.



Obrázek 2: Ultrastruktura buňky sinice *Synechocystis* v transmisním elektronovém mikroskopu s detailem organizace membrán; Tylakoidní membrány zvýrazněné hlavičkou bílé šipky. (©Lenka Bučinská, obrázek použit se souhlasem).

2.3 Proteázy

Proteázy jsou enzymy, které katalyzují proteolýzu. Tímto procesem se pomocí molekul vody štěpí proteiny na menší polypeptidy nebo jednotlivé aminokyseliny. Proteázy klasifikujeme do několika skupin podle různých kategorií. Hlavní rozdělení určuje schopnost štěpit peptidy na konkrétních místech a podle toho je dělíme na exo- a endo-proteázy (Naqvi a kol., 2005). Exo-proteázy odštěpují aminokyseliny od konců řetězce, zatímco endo-proteázy štěpí proteiny uvnitř peptidického řetězce. Proteázy lze také rozdělit do dvou skupin podle mechanismu jejich katalýzy. V jedné skupině slouží jako nukleofil samotný protein, oproti druhé, kde je nukleofilem aktivovaná molekula vody. Do první skupiny patří serinový, threoninový a cysteinový typ proteáz. Do druhé skupiny aspartické, glutamové a metaloproteázy (Rawlings, Barrett, 1999; Rawlings a kol., 2014). Metaloproteázy jsou proteolytické enzymy, které pro svou funkci využívají kov, převážně zinek, nebo kobalt. Pro tento typ proteáz je typické neutrální pH. Dále lze proteázy rozdělit do dvou skupin podle toho, jestli pro svou plnou funkčnost potřebují energii získanou hydrolýzou ATP. Tudíž se rozdělují na ATP závislé nebo nezávislé proteázy (Válek, Pohanka, 2018).

2.3.1 Proteázy nezávislé na ATP

U sinic existují čtyři hlavní skupiny proteáz nezávislých na ATP: Deg, Ctp, SP a SppA.

Deg proteázy jsou serinové proteázy s trypsinovou katalytickou doménou, které se nacházejí téměř ve všech žijících organismech. Deg proteáza má u bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) dvojí funkci, jak chaperonovou, tak i proteázovou, která je ovlivňována teplotou. U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) jsou Deg proteázy umístěny ve stromatu chloroplastu a lumenu. Tyto proteázy se podílí na kontrole kvality PSII. V genomu *Synechocystis* se nachází tři Deg proteázy, které jsou umístěny na tylakoidech a plazmatické membráně (Strauch a kol., 1989; Lipinska a kol., 1990).

Ctp proteázy patří k C-terminálním karboxypeptidázám, které fungují jako serinové proteázy s PDZ doménou (Paetzel, Dalbey, 1997). *Synechocystis* kóduje tři homology Ctp proteázy, a to CtpA, CtpB a CtpC. CtpA se nachází v tylakoidní membráně v blízkosti PSII, CtpB v periplazmatickém prostoru a CtpC v okolí plazmatické membrány. CtpA proteáza se u fotoautotrofních organismů podílí na maturaci D1 proteinu (Anbudurai a kol., 1994). Funkce dalších dvou homologů není známa.

Další dvě proteázy SP (signální peptidázy) a SppA (signální peptidové peptidázy) jsou transmembránové proteázy s dlouhou C terminální doménou vystupující do periplazmatického prostoru (Wang a kol., 2008). Funkcí SP proteáz je odstraňování signálních peptidů po translokaci prekursoru sekrečního proteinu z cytoplazmatické membrány. Proteáza SppA je zodpovědná za degradaci signálních peptidů, které jsou odštěpené pomocí SP (Dalbey a kol., 2012).

2.3.2 Proteázy závislé na ATP

Proteázy závislé na ATP neboli ATP dependentní proteázy, pro svou plnou funkčnost potřebují energii získanou hydrolýzou ATP. Patří k superskupině AAA+ proteinů neboli ATPáz spojených s rozdílnou buněčnou aktivitou. Obecně jsou to multimerní komplexy, které jsou tvořeny dvěma doménami, přičemž jedna se vyznačuje ATPázovou a druhá proteolytickou aktivitou (Langklotz a kol., 2012). Tyto enzymy využívají energii z hydrolýzy ATP k rozbalení specifických substrátových proteinů a jejich transportu do vnitřní proteolytické dutiny. Hlavní funkcí těchto proteáz je kontrola kvality proteinů, tzn. selektivní degradace nesestavených, nekompletně sestavených a poškozených membránových proteinů

(Langklotz a kol., 2012). Zároveň mají i regulační funkci, kdy kontrolují hladinu regulačních proteinů, jako jsou např. transkripční faktory (Shao a kol., 2018).

Mezi hlavní tři skupiny ATP dependentních proteáz patří Clp, Lon a FtsH proteázy (Suzuki a kol., 1997).

Clp proteázy jsou řazeny do skupiny serinových endopeptidáz, jedná se o rozpustné multimerní proteiny (Rawlings a kol., 2014) které se vyskytují jak u bakterií, tak v mitochondriích a chloroplastech. U sinic hrají důležitou roli při adaptaci na změny prostředí (Clarke, 1999). U kyttek se podílejí také na biogenezi chloroplastů (Shikanai a kol., 2001).

Lon proteázy jsou serinové endopeptidázy, které se nacházejí v archeích, bakteriích a mitochondriích a peroxizomů u eukaryot. Aktivita Lon proteáz je esenciální pro buněčnou homeostázi, metabolickou regulaci a řízení kontroly kvality proteinů. Stejně jako FtsH proteázy patří mezi membránové proteázy (Lee, Suzuki, 2008).

O FtsH proteázách bude více pojednáno v kapitole 2.3.3.1.

2.3.3 Membránové proteázy

Membránové proteázy jsou proteázové enzymy, které jsou umístěny na buněčné membráně. Můžeme je rozdělit na periferní proteiny, které neprocházejí napříč celou membránou, ale jsou pouze umístěny na vnitřní nebo vnější straně membrány. Druhou skupinou jsou transmembránové proteiny, prostupující jednou nebo vícekrát celou fosfolipidovou dvojvrstvou. Membránové proteiny lze rozdělit podle typu do šesti skupin. Membránové proteiny I. typu membránou procházejí pouze jednou, a to v místě C terminálního konce. Proteiny II. typu procházejí membránou také pouze jednou, ale v místě N terminálního konce. Proteiny III. typu procházejí membránou několikrát. Proteiny IV. typu tvoří v membráně transmembránové kanály. Proteiny V. typu jsou navázané pomocí kovalentních vazeb k fosfolipidům na membráně. Proteiny VI. typu jsou navázané s fosfolipidům a zároveň procházejí přes membránu (Cammack, 2006).

2.3.3.1 FtsH proteázy

FtsH je transmembránová ATP dependentní metaloproteáza nacházející se v bakteriích, mitochondriích a chloroplastech (Langklotza kol., 2012). *ftsH* gen bývá pro gramnegativní bakterie esenciální, zatímco pro grampozitivní bakterie ne. Většina bakterií

kóduje pouze jeden gen pro FtsH protein. Výjimku tvoří sinice, z nichž většina kóduje čtyři FtsH homology (Kato, Sakamoto, 2018). Také eukaryotní organismy obsahují v genomu více kopií pro gen *FtsH*. Například mitochondrie kvasinek a člověka kódují tři geny pro FtsH. Nejvíce FtsH homologů bylo nalezeno u rostliny *A. thaliana*, modelového organismu reprezentujícího říši rostlin, která kóduje dokonce 12 genů pro FtsH (Janska a kol., 2013). Funkcí FtsH proteáz je kontrola kvality proteinů. Degradují špatně sestavené nebo poškozené membránové proteinové komplexy (Langklotz a kol., 2012). Mají také regulační funkci, při které degradují regulátory transkripce a další regulační proteiny (Krynická a kol., 2019). Termín FtsH proteáza je používán u bakterií a chloroplastů, zatímco AAA proteáza je výraz používán pro mitochondriální enzymy (Janska, 2005).

2.3.3.1.1 FtsH u *Arabidopsis thaliana*

Genom *A. thaliana* obsahuje 12 genů kódujících FtsH proteázy (Kato, Sakamoto, 2018). Devět z nich je lokalizováno v chloroplastech, zbylé tři v mitochondriích (Janska a kol., 2013). Nejvíce popsáné jsou 4 homology vázané v tylakoidní membráně (FtsH1/2/5/8). Tyto proteiny se podle homologie dále řadí do dvou skupin: typ A (FtsH1, FtsH5) a typ B (FtsH2, FtsH8) a tvoří spolu hetero-hexamerní komplex, který se skládá vždy ze tří podjednotek ze skupiny A a tří podjednotek ze skupiny B. Rolí těchto proteáz je kontrola kvality PSII proteinů. Také se podílí na biogenezi plastidů (Kato, Sakamoto, 2018). Mitochondriální FtsH v *A. thaliana* jsou důležité pro kontrolu kvality komplexů elektron-transportního řetězce (Janska a kol., 2010).

2.3.3.1.2 FtsH u *Escherichia coli*

U *E. coli* je FtsH kódována pouze jedním genem, a tato ATP dependentní proteáza je esenciální pro životaschopnost buňky. Hlavní roli má zřejmě v regulaci poměru fosfolipidů a lipoproteinů (Ito, Akiyama, 2005). Další důležitou roli hraje při aklimatizaci buňky na vysokoteplotní šok pomocí regulace hladiny transkripčních faktorů (Guisbert a kol., 2008). Také se podílí na obraně buňky proti napadení fágem lambda, tím, že degraduje jeho transkripční faktor, čímž způsobuje jeho lyzi (Nonaka a kol., 2006).

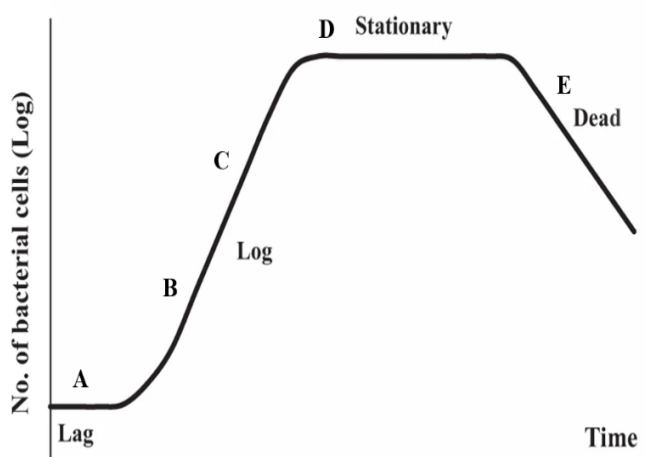
2.3.3.1.3 FtsH u sinic rodu *Synechocystis*

V genomu *Synechocystis* se nacházejí čtyři geny pro FtsH proteázy (Mann a kol., 2000). FtsH homology tvoří tři proteázové komplexy (Boehm a kol., 2012). Dva komplexy

jsou hetero-oligomerní (FtsH2/3 a FtsH1/3). FtsH2/3 komplex je hexamer sestavený z pravidelně se střídajících se podjednotek FtsH2 a FtsH3. Tento komplex není esenciální a je lokalizovaný v tylakoidní membráně. Hraje důležitou roli v regulaci fotosyntézy tím, že kontroluje kvalitu podjednotek PSII a podílí se na jeho opravě, zejména podjednotky D1 (Komenda a kol., 2006). Druhý hetero-oligomerní komplex FtsH1/3 je lokalizovaný v plazmatické membráně a je pro buňku esenciální (Boehm a kol., 2012). Z jakého důvodu je pro život buňky nezbytný zatím není známo, ale zjistilo se, že hraje důležitou roli při adaptaci na nedostatek základních nutrientů, jako je dusík, uhlík, železo a fosfor (Krynická a kol., 2019). Třetím FtsH komplexem u *Synechocystis* je homo-oligomerní komplex FtsH4. Tento komplex je lokalizován v tylakoidní membráně a jeho funkce zatím nebyla popsána.

2.4 Mikrobiální růst

Mikrobiální růst probíhá v pěti fázích (Obr. 3, A-E). První fáze je klidová, nazývaná také lag fáze. Během této fáze se buňky dělí velice pomalu, připravují proteinový aparát potřebný pro adaptaci na vnější podmínky a pro následné dělení. Díky tomu dochází v této fázi k výraznému zvětšení buněk. (Rolfe a kol., 2012). Z lag fáze přechází bakterie do exponenciální fáze růstu. Jak je z názvu patrné, v této fázi dochází k exponenciálnímu nárůstu buněk. Délka této fáze je závislá na okolních podmínkách a následně je limitována množstvím živin a světla. Růstová křivka tak plynule přechází do lineární fáze, ve které dochází ke zpomalení – lineárnímu nárůstu buněk. Při dalším úbytku živin, a v důsledku velké hustoty buněk i výraznému úbytku světla, přechází buňky do stacionární fáze, kde se jejich růst zpomalí, až dojde do stádia rovnováhy, kdy se počet buněk již nemění. V poslední fázi růstu, kdy dojde k úplnému vyčerpání živin, dochází k odumírání buněk (Wang a kol., 2015).



Obrázek 3: Fáze bakteriálního růstu. A-lag fáze; B-exponenciální fáze; C-lineární fáze; D-stacionární fáze; E-fáze odumírání (Wang a kol., 2015).

3 Materiál a metody

3.1 Použité kmeny

Všechny kmeny používané pro tyto studie jsou na glukózu tolerantní kmeny rodu *Synechocystis* sp. PCC 6803 původně pocházející z Pasteur Culture Collection (odtud zkratka PCC). Kontrolní kmen (wild type, dále WT), z něhož byly připraveny i používané mutantní kmeny, byl poskytnutý laboratoří Prof. Petera Nixona na Imperial College v Londýně (GT; Tichý a kol., 2016).

Pro studium funkce FtsH4 proteázy byly použity dva FtsH4 mutantní kmeny sinice *Synechocystis*:

1. deleční kmen Δ FtsH4, ve kterém je původní gen pro FtsH4 (*sll1463*) nahrazen kazetou pro kanamycinovou rezistenci. Díky této delecí nedochází k produkci FtsH4 proteázy (Boehm a kol., 2012). Tento kmen se porovnával s kontrolním kmenem WT.
2. FtsH4 over-expressní kmen FtsH4-over, ve kterém je gen *ftsH4* exprimována výlučně pod *psbA2* promotorem, namísto *psbA2* genu kódujícímu D1 protein (podjednotka PSII). *PsbA2* promotor je využíván pro over-expresi proteinů, protože se jedná o silný promotor. Navíc delece *psbA2* výrazně neovlivňuje fenotyp buňky, protože D1 protein je v kmenu WT kódovaný třemi homology (*psbA1*, *psbA2*, *psbA3*). V kmenu FtsH4-over se D1 protein syntetizuje hlavně pomocí exprese homologu *psbA3*. Pro FtsH4-over používáme jako kontrolu kmen A3, u kterého gen pro *psbA2* také chybí.

3.2 Pěstování a udržování kmenů sinic

Kmeny rodu *Synechocystis* rostly autotrofně v kultivační místnosti při teplotě 28 °C a intenzitě světla 40 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ v živném médiu BG11. Pro dlouhodobé udržování kmenů byly sinice *Synechocystis* přechovávány na agarových miskách.

Pro experimentální využití se kmeny pěstovaly ve 100 ml tekutého média BG11 v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml na rotační třepačce za výše uvedených podmínek. Pro HL experimenty bylo použito bílé LED světlo o intenzitě 550 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.3 Měření celobuněčných absorpčních spekter

Absorpční spektra buněčných kultur odebíraných v různých fázích růstu byla měřena na spektrofotometru Shimadzu uv-1800. Pokud není ve výsledcích uvedeno jinak, byly buněčné kultury před měřením naředěny na stejnou optickou denzitu měřenou při 750 nm (dále OD_{750nm}), a to $OD_{750nm} = 0,1$. Ze získaných dat byly vytvořeny grafy v programu Sigma Plot.

3.4 Měření velikosti a počtu buněk na přístroji Multisizer 4 COULTER COUNTER

Velikost a počet buněk byl měřen na přístroji Multisizer 4 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter) s použitím apertury 30 μm . Pro měření byla kultura (dle hustoty) ředěna do 10 ml 0,9 % roztoku NaCl. Získaná data byla zpracována pomocí programu Multi4 a dále pak Sigma Plot.

3.5 Izolace tylakoidních membrán

Pro účely izolace membránových proteinů byly tekuté kultury kmenů sinic převedeny centrifugací do 500 μl mikrozkušavek určených pro rozbíjení skleněnými kuličkami v přístroji Mini-Beadbeater™ (Biospec Products). Po celou dobu byly vzorky uchovávány na ledu a vystaveny pouze zelenému světlu, aby nedošlo k degradaci fotosyntetických komplexů. Suspenze byla nejprve 3x promyta 200 μl izolačního pufru (MES pufr; pH 6,5 obohacený Ca^{2+} a Mg^{2+}). Po promytí byl pelet homogenizován ve 200 μl izolačního pufru. K buněčné suspenzi bylo přidáno 200 μl skleněných kuliček 100-200 μm velkých (balotina). V přístroji Mini-Beadbeater™ se tato směs protřepávala 20 vteřin, poté byla 1 minutu chlazená na ledu. Proces rozbíjení byl opakován pětkrát. Rozbité buňky byly převedeny do nové mikrozkušavky tzv. odmýváním buněk z balotiny, tj. postupnými přidávkami 200 μl izolačního pufru ke směsi s balotinou, přičemž suspenze nad balotinou byla sbírána do nové zkumavky. Odmývání suspenze z balotiny se opakovalo, dokud nebyla balotina opět bílá. Suspenze rozbitých buněk byla stočena 30 vteřin na 2000 rpm, aby se oddělily nerozbité buňky od rozbitých. Supernatant obsahující rozbité buňky byl převeden do nové mikrozkušavky a stáčen v centrifuze (Sigma) při 4 °C po dobu 20 minut při 38 000 rfc (tzv. denzní centrifugace). Po centrifugaci došlo k oddělení membránové buněčné frakce od rozpustné frakce. Supernatant s rozpustnou frakcí

byl odpipetován a pelet, obsahující membránovou frakci, byl resuspendován ve 100 μ l izolačního pufru.

3.6 Solubilizace tylakoidních membrán a příprava vzorků pro CN-PAGE

Pro elektroforetickou separaci membránových proteinových komplexů byly komplexy solubilizovány 1 % detergentem β -DDM. Do mikrozkušavek byl nejprve napipetován izolační pufr, poté 10 % β -DDM a nakonec suspenze TM. Vzorky byly po mírném promíchání ponechány 1 minutu na ledu a následně byly stočeny při 4 °C po dobu 20 minut při 38 000 rfc v centrifuze (Sigma). Supernatant, který obsahoval solubilizované proteiny, byl ihned po stočení nanášen do jamek nativního gelu.

3.7 CN-PAGE

Jednorozměrná bezbarvá elektroforetická separace byla použita na separaci proteinových komplexů. Pro nalévání gelu byla použita aparatura BioRad Maxi pro vertikální elektroforézu, skla byla sestavena na gel o tloušťce 1 mm. Na přípravu 4–14 % gelu byly použity a smíchány chemikálie podle Tab. 1. Polovina obsahu 14 % roztoku byla použita na spodní část gelu. Poté byl 4 % a zbytek 14 % roztoku nalit do komor pro přípravu gradientového gelu. Do komory dál od výpusti byl nalit 14 % gel, do komory blíže 4 % gel. Po otevření přepusti mezi komorami docházelo k postupnému míchání obou roztoků. Směs byla pomocí pumpy nalévána mezi skla tak, aby došlo při nalévání gelu k vytvoření gradientu. Poté se převrstvil 1 ml vody a nechal po dobu 1 hodiny ztuhnout. Po hodině se voda odsála a podle Tab. 1 byl připraven roztok 4 % horního gelu. Horní gel se pomocí velké pipety přenesl mezi skla a byl do něj umístěn hřebínek na vytvoření jamek tak, aby u jamek nevznikla žádná vzduchová bublina. Po hodině tuhnutí se z gelu opatrně vytáhl hřebínek a jamky se promyly vodou.

Tabulka 1: Složení nativního gelu.

	4 %	14 %	4 % horní
Glycerol	0 g	3,2 g	0 g
Voda	6,4 ml	6,7 ml	3,7 ml
Gelový Pufř	1,4 ml	2,8 ml	0,85 ml
AB	0,68 ml	4,8 ml	0,4 ml
Temed	3,5 μ l	7 μ l	5 μ l
10 % persulfát amonný	19 μ l	38 μ l	40 μ l
Celkový objem	8,5 ml	17 ml	5 ml

AB: roztok 50 % akrylamidu a 0,87 % bis-akrylamidu

Složení gelového pufřu 6x: 3 M aminokapronová kyselina; 300 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,6

Takto připravený gel byl umístěn do aparatury na průběh samotné elektroforézy. Do aparatury se nalil spodní anodový (0,05 M Bis-Tris/HCl; pH 7,0) a vrchní katodový pufř (0,05 M Tricin; 15 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0). Na závěr se do jamek gelu napipetovaly solubilizované vzorky TM. Elektroforéza byla spuštěna při teplotě 4 °C, proudu 11 mA, maximálním napětí 1000 V po dobu cca 1 hodiny, než karotenoidy ve vzorcích doputovaly v gelu do vzdálenosti cca 6,5 cm od dna jamky. Po ukončení byla aparatura rozebrána a gel vyjmut. Gel byl přemístěn do průhledné fólie a vyfocen pomocí kamery ve snímacím zařízení ImageQuantTM LAS4000 (GE Healthcare) a naskenován ve skeneru Epson Perfection V550 Photo (Epson).

3.8 2D SDS-PAGE

Metoda 2D SDS-PAGE je dvourozměrná elektroforéza, díky které jsou proteinové komplexy, separované pomocí nativní elektroforézy, následně rozděleny na jednotlivé proteiny. Pro SDS-PAGE byl použit 16–20 % gradientový gel, který byl překryt 5 % zaostřovacím gelem. Pro přípravu gelu pro SDS-PAGE byla použita stejná aparatura a postup, jako v případě nativního gelu, s tím rozdílem, že se naléval gel o tloušťce 1,5 mm a gradient se naléval po celé délce skla. Roztoky pro gradientový gel byly namíchány podle Tab. 2.

Tabulka 2: Složení SDS gelu.

	16 % gel	20 % gel	5 % gel
Sacharóza	0 g	1,8 g	0 g
Močovina	7,7 g	7,7 g	0 g
Voda	2,64 ml	0 ml	6 ml
Pufř	4,2 ml	4,2 ml	2,1 ml
AB	5,76 ml	7,2 ml	0,9 ml
Temed	9 μ l	9 μ l	9 μ l
10 % SDS	360 μ l	360 μ l	180 μ l
10 % persulfát amonný	36 μ l	36 μ l	36 μ l
Celkový objem	18 ml	18 ml	9 ml

AB: roztok 50 % akrylamidu a 0,87 % bis-akrylamidu

Složení gelového pufřu: 2,8 M Tris/HCl; pH 8,6

Gel z nativní elektroforézy byl nařezán na proužky, podle jednotlivých vzorků. Tyto proužky byly solubilizovány v solubilizačním pufřu (25 mM Tris/HCl; pH 7; 1 % SDS; 1 % dithiotreitolu) po dobu 30 minut. Po solubilizaci byla délka proužků zkrácena maximálně na 7,8 cm a poté byly proužky gelu přeneseny mezi skla. Na jednom SDS gelu byly použity vždy 2 proužky gelů se vzorky ze CN-PAGE proti sobě tak, aby byly zrcadlově orientovány vůči sobě a zároveň volnými proteiny od sebe. Elektroforéza byla spuštěna při teplotě 22 °C, proudu 28 mA, maximálním napětí 350 V po dobu 16-17 hodin, za použití těchto pufřů: katodového pufřu (25 mM Tris; 0,192 M glycin) a anodového pufřu (37,5 mM Tris/HCl; pH 8,3). Po ukončení elektroforézy byla aparatura rozebrána a vyjmutý gel byl následně promyt vodou a umístěn na 1 hodinu do barvicího roztoku s 0,01 % SYPRO Orange fluorescenční barvou (SYPRO Orange Protein Gel Stain; Sigma-Aldrich) v uhličitanovém pufřu (3 mM Na₂CO₃; 10 mM NaHCO₃) s 10 % metanolem. Po obarvení byl gel několikrát promyt vodou a následně byl vyfocen pomocí snímací kamery ImageQuant™ LAS4000 (GE Healthcare).

3.9 Přenos proteinů z gelu na membránu

Pro účely imunodetekce byly proteiny z SDS gelu přeneseny na PVDF membránu (Immunobilon-P, Merck Millipore), tzv. mokřým elektropřenosem v uhličitanovém pufřu (viz. složení výše) za podmínek: teplota 4 °C, elektrický proud 850 mA po dobu 3 hodin. Po ukončení přenosu byla membrána blokována proti nespecifické vazbě protilátek roztokem 0,2

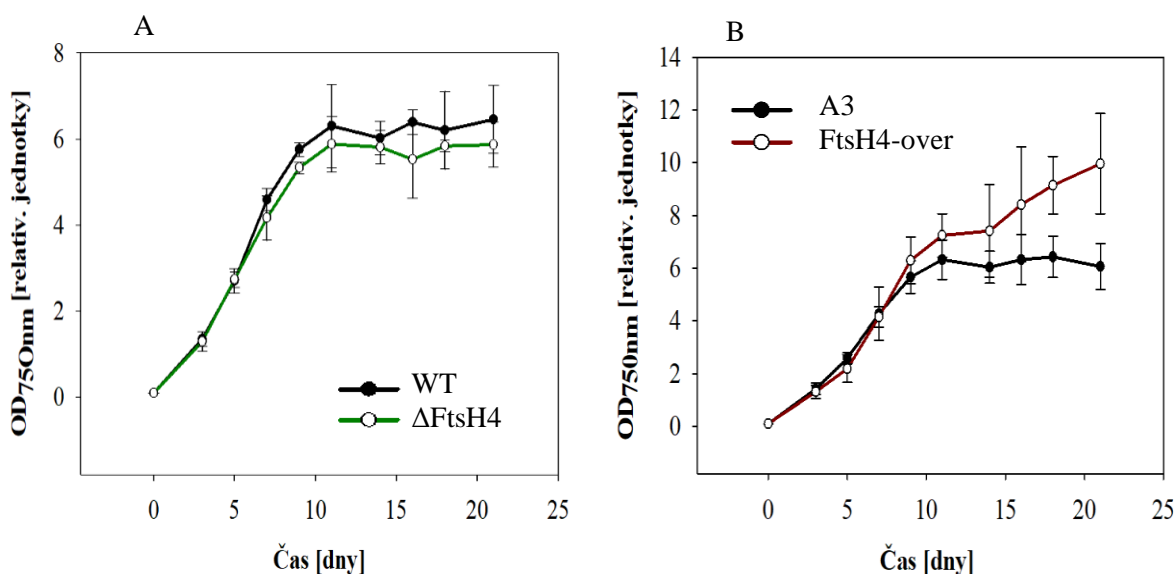
% Tweenu v pufru o složení 10 mM Tris/HCl; pH 7,6; 150 mM NaCl. Na detekci proteinů byly použity primární protilátky specifické pro D1 (Komenda a kol., 2006), SbtA (Zhang a kol., 2004) a HliD proteiny (Agrisera, cat.no. AS10 1615). Pro vizualizaci primárních protilátek byla použita sekundární protilátka proti imunoglobulinu těchto protilátek vytvořených v králíkovi. Sekundární protilátka byla konjugována s polymerizovanou křenovou peroxidázou, která reaguje s přidaným substrátem. Chemiluminiscenční signál byl detekován pomocí ImageQuant™ LAS4000 (GE Healthcare). Pro ředění protilátek a promývání byl použit pufr o složení 10 mM Tris/HCl; pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween.

4 Výsledky

4.1 Růstová křivka FtsH4 mutantních kmenů

Pro základní charakteristiku FtsH4 mutantních kmenů byla porovnávána jejich růstová křivka s příslušnými kontrolními kmeny.

FtsH4 mutantní kmeny a jejich kontroly byly naočkovány z agarové misky do tekutého živného média BG11, naředěny na stejnou optickou denzitu ($OD_{750nm} = 0,1$) a pěstovány 21 dní na normálním světle ($40 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Růstový graf (Obr. 4A) porovnává růst kmenu WT a ΔFtsH4 v závislosti na čase. ΔFtsH4 kmen rostl na začátku podobně jako WT kmen. Po přechodu do lineární fáze růstu, tj. přibližně od 5. dne, se růst ΔFtsH4 kmenu mírně zpomalil a jeho OD_{750nm} dosahovala v porovnání s WT kmenem nižších hodnot. Oba kmeny přecházely z lineární do stacionární fáze (SC) přibližně 11. den růstu. Od 14. dne se už OD_{750nm} obou kmenů výrazně neměnilo a 21. den růstu dosahovala průměrná hodnota OD_{750nm} u ΔFtsH4 kmenu $5,9 \pm 0,5$ a u WT kmenu $6,5 \pm 0,8$.

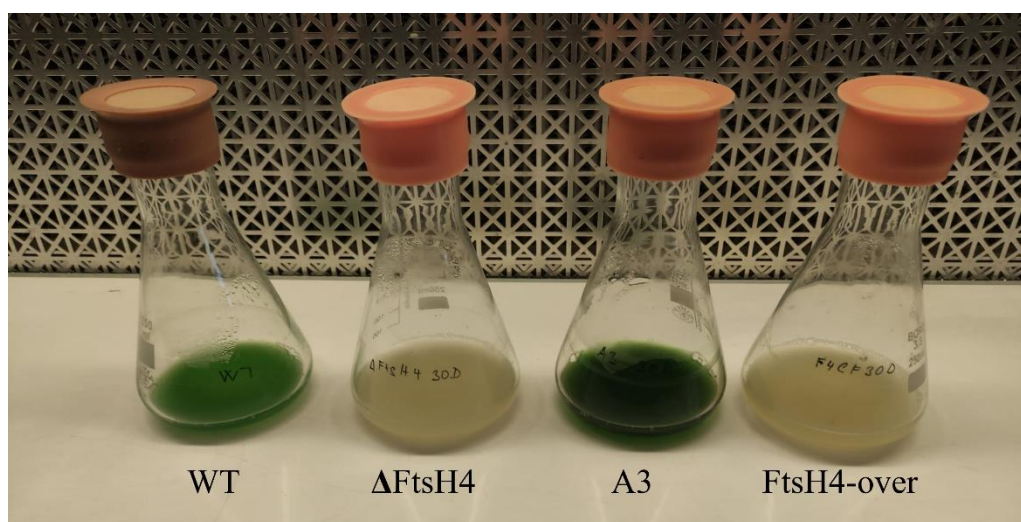


Obrázek 4: Růstový graf kmenů WT a ΔFtsH4 (A), A3 a FtsH4-over (B) v závislosti na čase. Před začátkem experimentu byly oba kmeny naředěny na stejnou optickou denzitu $OD_{750nm} = 0,1$ a pěstovány 21 dní na normálním světle ($40 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ve dnech 0, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 16, 18 a 21 byla měřena OD_{750nm} na přístroji Shimadzu. Hodnoty v grafu odpovídají průměru ze 3 biologických replikátů \pm SD.

Výraznější rozdíl v růstu oproti kontrole byl zaznamenán v případě FtsH4-over kmenu (Obr. 4B). Mutantní kmen FtsH4-over rostl do 9. dne podobnou rychlostí jako kontrolní kmen A3. Od 11. dne, na počátku SC, ale FtsH4-over vykazoval opačný růstový trend než deleční mutant. Ve srovnání s kontrolou rostl výrazně rychleji. Od 14. dne, kdy už se OD_{750nm} kontrolního kmenu A3 téměř neměnilo, u FtsH4-over kmenu opět došlo k lineárnímu nárůstu kultury. 21. den růstu dosahovala průměrná hodnota OD_{750nm} u FtsH4-over $10 \pm 1,9$ a u A3 $6 \pm 0,9$.

Zatímco Δ FtsH4 kmen mírně zpomalil růst už při přechodu do lineární fáze a ve SC už tak nedosáhl hodnot WT kmene, FtsH4-over při přechodu do SC růst oproti kontrole zrychlil a po krátké růstové stagnaci mezi 11. a 14. dnem opět přešel do lineární fáze. V měřeném časovém intervalu 21 dní už SC nedosáhl. Z výsledků vyplývá, že trend růstu FtsH4 delečního a over-expresního kmenu je opačný.

Kultury byly dále pěstovány dalších 9 dní, tj. do 30. dne, aniž by bylo měřeno OD_{750nm}. Opakovaně se stalo, že po 30 dnech kultivace byly kontrolní kmény ještě zelené, zatímco oba mutantní kmény ztrácely pigmenty, což naznačovalo nadcházející buněčnou smrt. Vzhled kultur typický pro 30. den růstu znázorňuje Obr. 5.



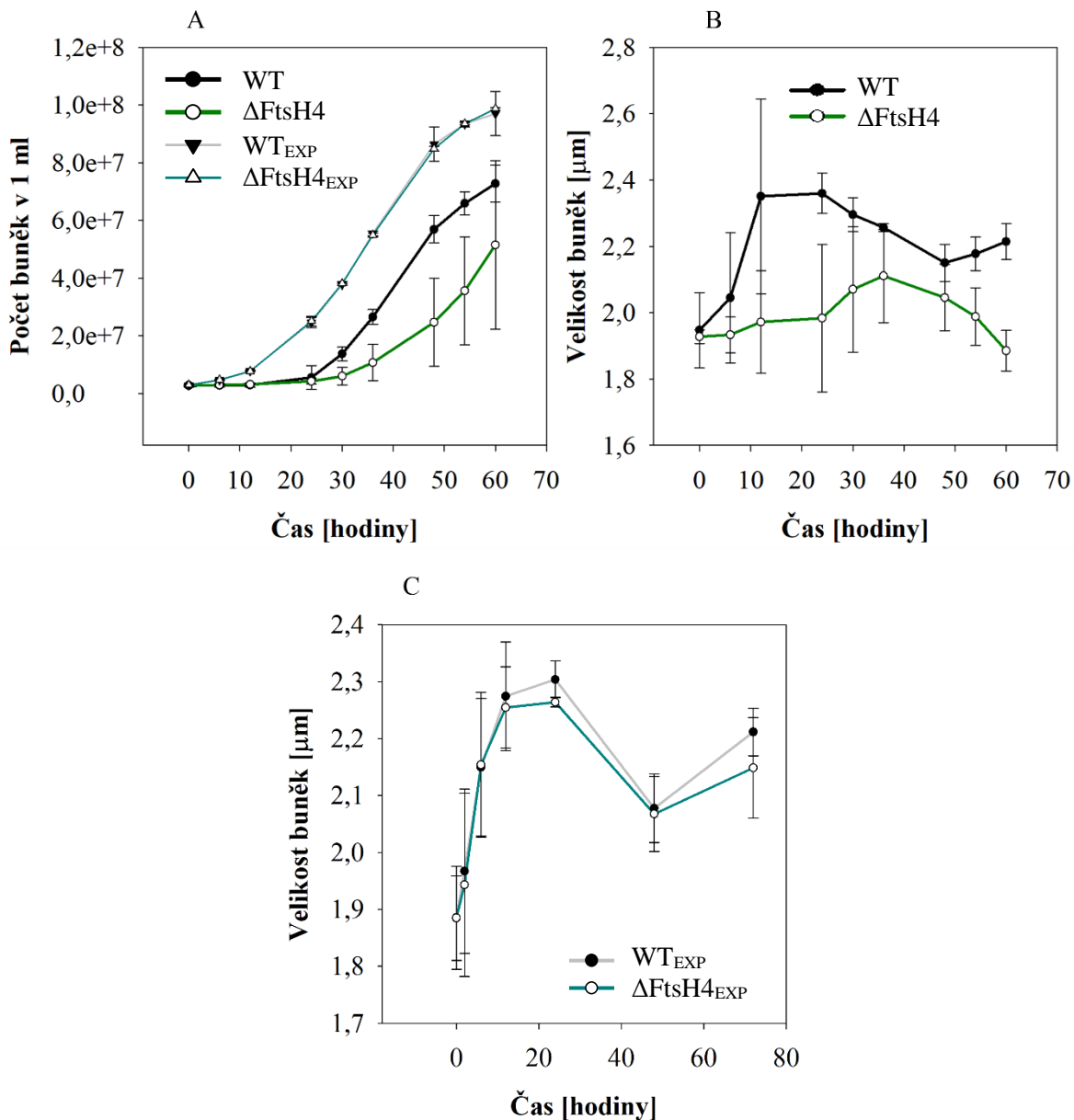
Obrázek 5: Růst buněčných kultur za normálních podmínek po 30 dnech růstu.

4.2 Vysoké světlo po naředění ze stacionární fáze zpomaluje růst obou FtsH4 mutantních kmenů

V SC je mnoho biochemických procesů, jako exprese proteinů, dělení buněk utlumeno, protože buňky nemají k růstu dostatek živin a světla. Naopak, po naředění buněk a expozici vysokým světlem (HL) dochází v buňkách k indukci buněčného dělení. Zvyšuje se exprese proteinů důležitých pro dělení buňky a zároveň proteinů potřebných pro adaptaci na HL (Krynická a kol., 2015). Protože se růst FtsH4 mutantních kmenů nejvíce lišil od kontroly po přechodu do SC, zajímalo nás, jak budou oba mutantní kmeny reagovat po naředění ze SC a následné expozici HL (kombinace obou podmínek dále uváděna jako HL_{SC}). V tomto experimentu byly napěstovány kultury kmenů WT, ΔFtsH4, A3 a FtsH4-over do SC, tj. 14 dní od nasazení kultury. Následně se kmeny naředily na stejnou optickou denzitu (OD_{750nm} = 0,05) a vystavily HL, tj. 550 μmol fotonů m⁻² s⁻¹. Během expozice kmenů HL byla opět měřena rychlost růstu obou mutantních kmenů. Pro získání přesnějších informací o počtu buněk a jejich velikosti v čase, byly kultury analyzovány pomocí přístroje Multisizer 4 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter) a programu Multi4, namísto měření optické denzity, jelikož tato metoda vypovídá pouze o množství biomasy (Obr. 6, 7). Pro srovnání byla rychlost růstu za podmínek HL_{SC} ještě porovnávána s podmínkami, kde byly kultury vystaveny HL stresu v exponenciální fázi růstu (dále HL_{EXP}) namísto stacionární fáze (Obr. 6A, 7A). změna velikosti buněk za podmínek HL_{SC} a HL_{EXP} je pro přehlednost uvedena zvlášť (Obr. 6B, C, 7B, C).

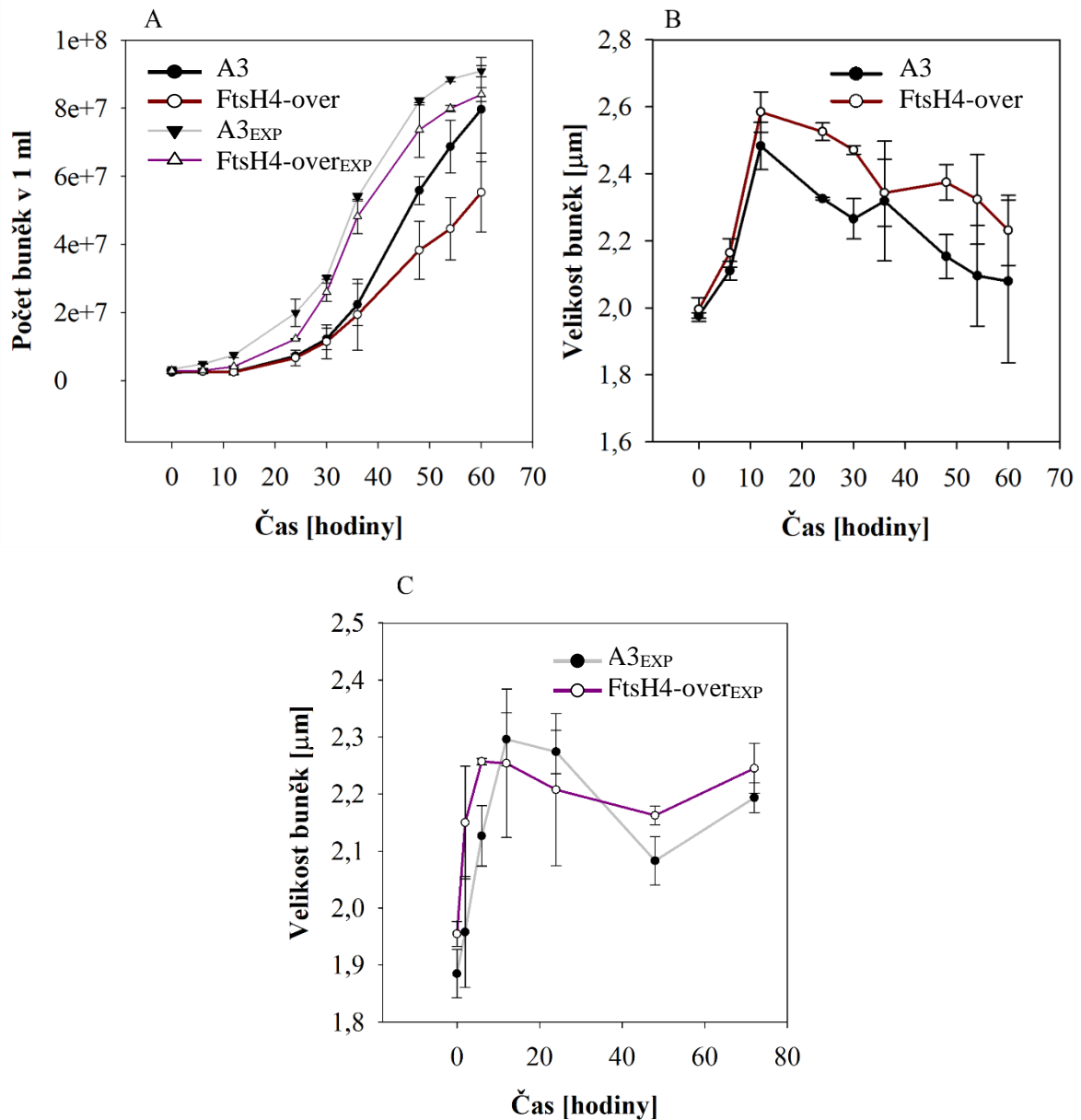
V grafu (Obr. 6A) je znázorněno, jak se měnil počet buněk u WT a ΔFtsH4 závislosti na čase. Prvních 24 hodin experimentu se počet buněk ani u jednoho kmene výrazně nezvyšoval. Z porovnání s HL_{EXP} je patrné, že po naředění ze SC byla lag fáze u všech kmenů delší. WT přecházel do exponenciální fáze růstu zhruba po 24 hodinách, zatímco ΔFtsH4 měl oproti WT 6 hodin zpoždění a exponenciální růst byl pomalejší. Po 50 hodinách HL se růst WT kmenu postupně zpomaloval a přecházel do lineární fáze, zatímco u kmenu ΔFtsH4 naopak růst zrychloval. Po 60 hodinách byl počet buněk u ΔFtsH4 srovnatelný s WT kmenem. V případě HL_{EXP} nebyl během 60 hodin pozorován žádný významný rozdíl mezi ΔFtsH4 a WT kontrolou (Obr. 6A), což vypovídá o tom, že zpoždění v růstu u ΔFtsH4 za podmínek HL_{SC} bylo způsobeno hlavně tím, že byly buňky ve stacionární fázi růstu. Změna velikosti buněk během HL_{SC} (Obr. 6B) korelovala s růstem. Po dosažení SC měly buňky všech měřených kmenů průměr přibližně 1,9 μm. Z našich výsledků vyplývá, že se velikost buněk

po expozici HL zvětšuje. U WT došlo už během 12 hodin na HL k prudkému zvětšení buněk. Maximálního průměru dosáhly buňky po 24 hodinách HL. Poté, když buňky přešly do exponenciální fáze růstu, se průměr buněk zmenšoval a zhruba od 48. hodiny, kdy WT zpomalil růst, byl zaznamenán opětovný nárůst buněčného průměru. Na rozdíl od buněk WT se buňky Δ FtsH4 zvětšovaly výrazně pomaleji a nedosáhly maximální velikosti naměřené u buněk WT. Průměr buněk Δ FtsH4 dosáhl maxima až po 36 hodinách. Poté, když se Δ FtsH4 začal dělit rychleji, došlo k prudkému poklesu jejich buněčného průměru. Za podmínek HL_{EXP} jsme nepozorovali výrazný rozdíl mezi WT a Δ FtsH4 kmenem.



Obrázek 6: Počet a velikost buněk WT a Δ FtsH4 během expozice HL po naředění ze stacionární fáze (HL_{SC}) v čase. WT a Δ FtsH4 kmeny byly napěstovány do stacionární fáze a poté naředěny na $OD_{750nm} = 0,05$ a vystaveny HL. Během HL expozice byl v časových intervalech 0 až 72 hodin odebrán 1ml kultury, u kterého byla následně pomocí přístroje 4 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter) měřena velikost a počet buněk. A. Počet buněk WT a Δ FtsH4 během HL_{SC}. Pro srovnání je v grafu prezentována i růstová křivka za podmínek HL_{EXP} (expozice HL po naředění z exponenciální fáze); B. Velikost buněk WT a Δ FtsH4 během HL_{SC}; C. Velikost buněk WT a Δ FtsH4 během HL_{EXP}. Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze 3 biologických replikátů \pm SD

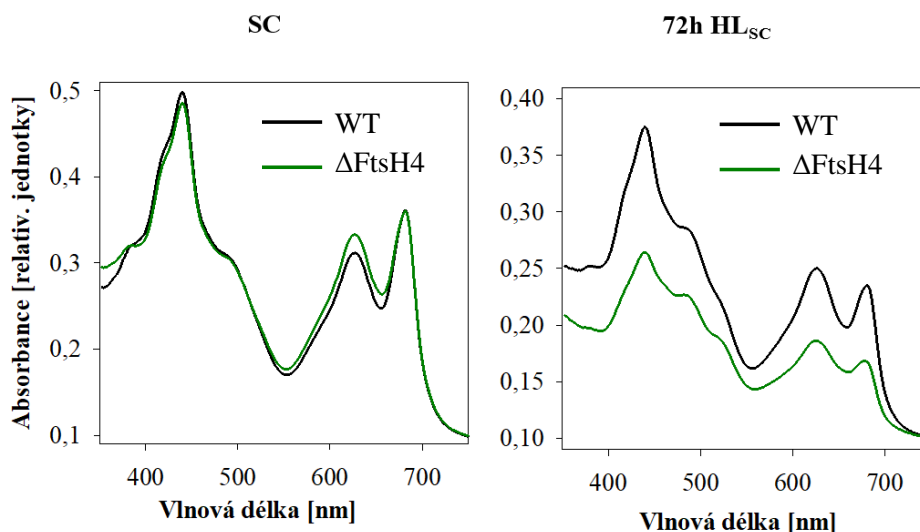
V případě A3 a FtsH4-over byla situace v prvních hodinách na HL_{SC} podobná jako u WT a Δ FtsH4 (Obr. 7). Buňky obou kmenů setrvaly v lag fázi zhruba do 30. hodiny a pak oba kmeny přešly do exponenciální fáze růstu (Obr. 7A). Na rozdíl od Δ FtsH4, růst FtsH4-over po dlouhodobé expozici HL (zhruba po 48 hodinách) oproti kontrole A3 výrazně zpomalil. Za podmínek HL_{EXP} nebyl pozorován žádný významný rozdíl v růstu mezi oběma kmeny (Obr. 7A). Překvapivě, průměr buněk u FtsH4-over rostl během prvních 30 hodin HL_{SC} výrazně rychleji než u kontrolního kmenu A3. Celkově buňky FtsH4-over dosahovaly větší velikosti než kontrola. I v tomto případě byl pozorován u FtsH4-over opačný trend než u Δ FtsH4 (Obr. 7B). Naopak, za podmínek HL_{EXP} se velikost buněk mezi A3 a FtsH4-over nijak významně nelišila (Obr. 7C).



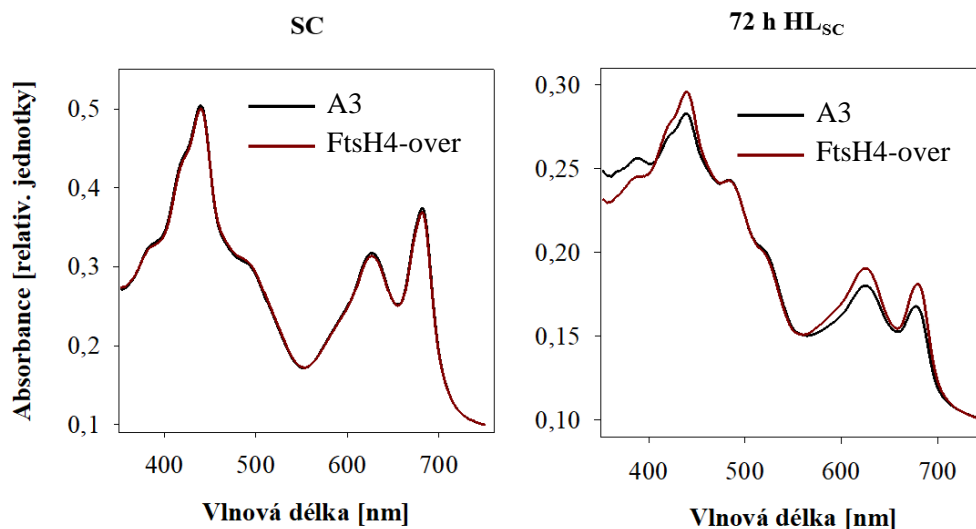
Obrázek 7: Počet a velikost buněk A3 a FtsH4-over během expozice HL po naředění ze stacionární fáze (HL_{SC}) v čase. A3 a FtsH4-over kmeny byly napěstovány do stacionární fáze a poté naředěny na $OD_{750nm} = 0,05$ a vystaveny HL. Během HL expozice byl v časových intervalech 0 až 72 hodin odebrán 1ml kultury, u kterého byla následně pomocí přístroje Multisizer 4 COULTER COUNTER[®] (Beckman Coulter), Multi4 měřena velikost a počet buněk. A. Počet buněk A3 a FtsH4-over během HL_{SC} Pro srovnání je v grafu prezentována i růstová křivka za podmínek HL_{EXP} (expozice HL po naředění z exponenciální fáze); B. Velikost buněk A3 a FtsH4-over během HL_{SC}; C. Velikost buněk A3 a FtsH4-over během HL_{EXP}. Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze 3 biologických replikátů \pm SD.

4.3 Vliv ztráty nebo nadbytku FtsH4 proteázy na množství pigmentů za podmínek HL_{SC}

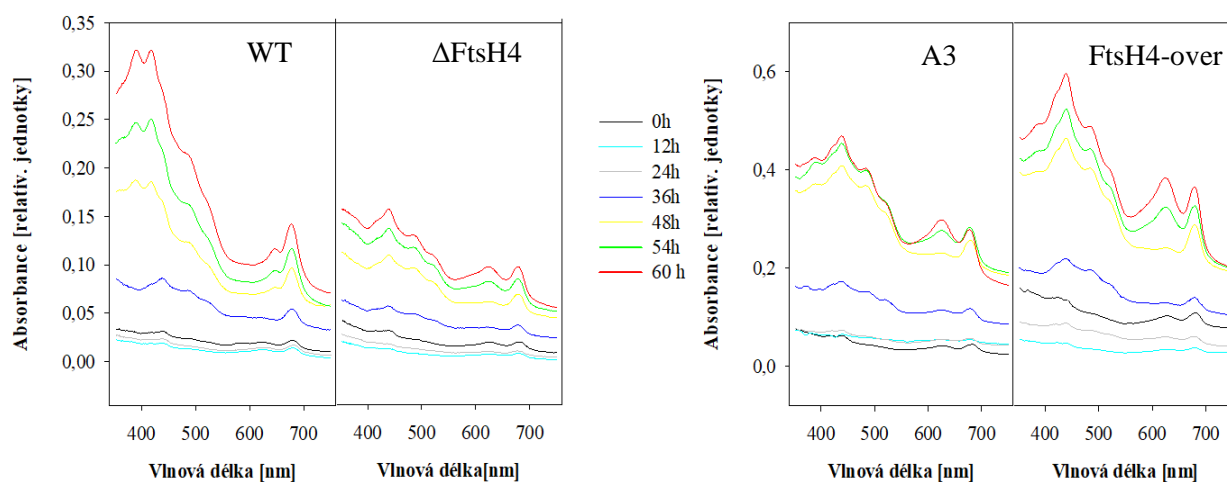
Zajímalo nás, jak delece nebo over-exprese FtsH4 proteázy ovlivňuje množství a složení pigmentů v průběhu expozice vysokým světlem po naředění ze SC. U jednotlivých kmenů byla na přístroji spektrofotometru (Shimadzu) měřena celobuněčná absorpční spektra v časech 0, 12, 24, 36, 48, 54 a 60 hodin HL_{SC}. Grafy (Obr. 8, 9) zachycují rozdíl absorpčních spekter mezi mutantem a kontrolou v SC a po 72 hodinách HL_{SC}. Spektra jsou normalizovaná na OD_{750nm}. V SC bylo množství pigmentů u obou FtsH4 mutantních kmenů ve srovnání s kontrolou podobné. Po 72 hodinách HL_{SC} se jejich množství změnilo. Zatímco u delečního mutantu množství všech pigmentů oproti kontrole výrazně klesá, v over-expressním mutantu naopak roste. Na obrázku (Obr. 10) je zobrazeno, jak se měnila absorpční spektra v průběhu času, přičemž v tomto případě nebyly buňky před měřením ředěny a spektra nejsou normalizovaná na stejné OD_{750nm}. I z tohoto grafu je patrné, že Δ FtsH4 vykazuje opačný trend než FtsH4-over.



Obrázek 8: Celobuněčná absorpční spektra kmenů WT a Δ FtsH4 v SC a po 72 h HL_{SC}. Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru (Shimadzu). Spektra jsou normalizovaná na OD_{750nm}.



Obrázek 9: Celobuněčná absorpční spektra kmenů A3 a FtsH4-over v SC a po 72 h HL_{SC}. Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru (Shimadzu). Spektra jsou normalizovaná na OD_{750nm}.



Obrázek 10: Celobuněčná absorpční spektra kmenů WT, Δ FtsH4, A3 a FtsH4-over. Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru (Shimadzu) u v časových intervalech 0, 12, 24, 36, 48, 54 a 60 hodin. Spektra nejsou normalizovaná na OD_{750nm}.

4.4 Složení membránových proteinových komplexů u FtsH4 mutantních kmenů za podmínek HL_{SC}

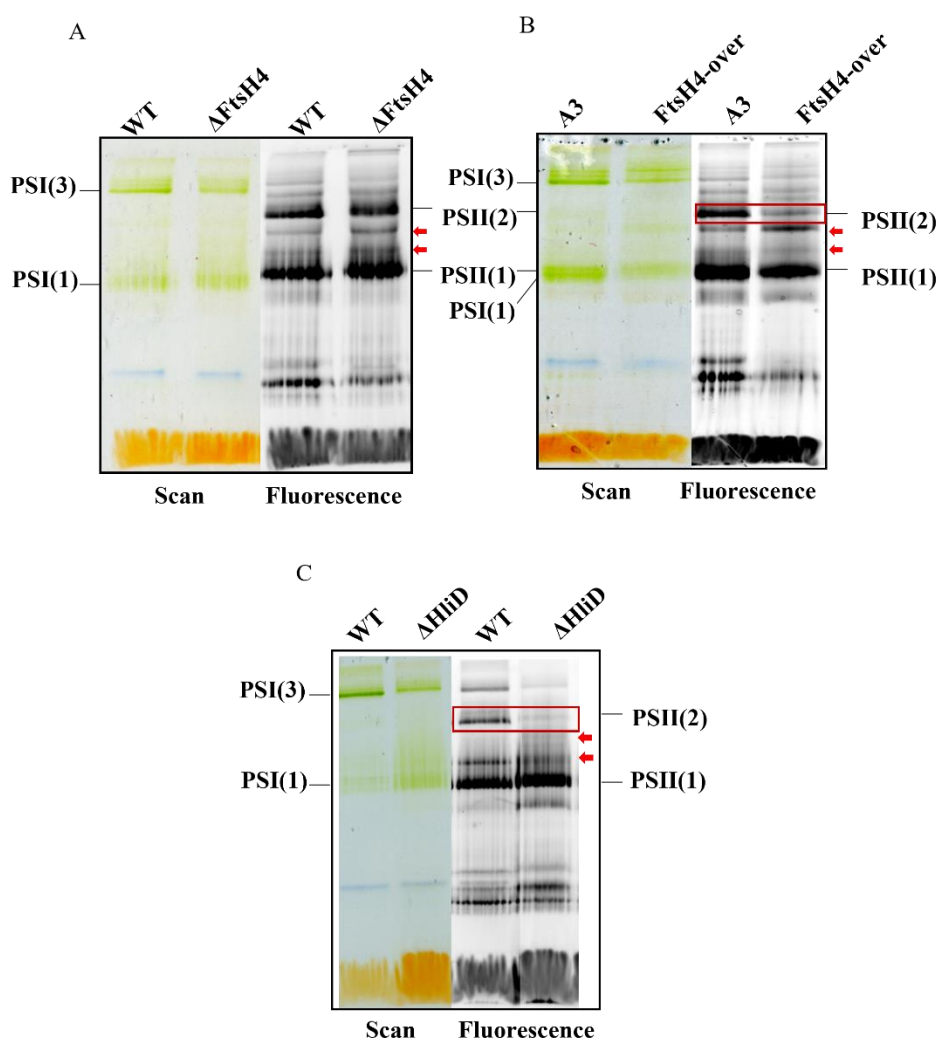
Vzhledem k zjevným fenotypickým rozdílům FtsH4 mutantních kmenů za podmínek HL_{SC} nás zajímalo složení jejich membránových proteinových komplexů. Pro tento účel byla použita metoda CN-PAGE, neboli Clear native polyacrylamid gel electrophoresis. CN-PAGE je bezbarvá nativní elektroforéza v akrylamidovém gelu, která slouží k separaci pigment-proteinových komplexů izolovaných z tylakoidních membrán v nativním stavu. Metoda se využívá ke studiu složení multiproteinových komplexů a ke studiu vzájemných protein-proteinových interakcí. Kmeny WT, Δ FtsH4, A3 a FtsH4-over byly pěstovány 72 hodin za podmínek HL_{SC}. Poté byly membránové komplexy naizolovány a solubilizovány 1 % β -DDM detergentem. Horní pufr obsahoval 0,05 % deoxycholát, který dodává proteinovým komplexům záporný náboj. Takto solubilizované membránové komplexy se rozdělily na akrylamidovém gelu podle velikosti.

Na obrázku gelů (Obr. 11A, B) jsou vidět proužky gelu po nativní elektroforéze u kmenů WT, Δ FtsH4, A3 a FtsH4-over pěstovaných 72 hodin na HL_{SC}. Na CN gelu vyfoceném pomocí skeneru Epson Perfection V550 Photo (Epson) jsou vidět pigment-proteinové komplexy. Oranžovou barvu mají volné karoteny, modrou fykobiliproteiny a zelenou komplexy obsahující chlorofyl, což vypovídá zejména o množství PSI, který obsahuje chlorofylu více než PSII. Černobílý snímek zachycuje fluorescenci chlorofylu (Fluorescence) vázaném v komplexech a subkomplexech PSII. Fluorescence chlorofylu v PSI je za normální teploty zhasena.

Z obrázku nativního gelu (Obr. 11A, B) je vidět, že oba FtsH4 mutantní kmeny obsahují po 72 hodinách HL_{SC} méně PSI než jejich kontroly. Zajímavý je rozdíl v množství PSII. Zatímco deleční mutant akumuluje víc PSII monomeru než kontrola, kmen FtsH4-over neobsahuje téměř žádný dimer PSII (PSII(2)). Zato akumuluje více PSII meziproductů. V Obr. 11B jsou označeny červenými šipkami. Z výsledků vyplývá, že u delečního mutantu jsou komplexy PSII stabilizovány, zatímco over-expressní mutant jich celkově obsahuje méně a má problémy se sestavením dimeru PSII.

Nativní gel (Obr. 11C) porovnává složení komplexů po 72 hodinách HL_{SC} mezi kmenem WT a kmenem Δ HliD. Kmen byl naizolován z proteinových komplexů, kterým chybí gen pro HliD protein, a pěstován za podmínek jako kmen FtsH4-over. Na obrázku po

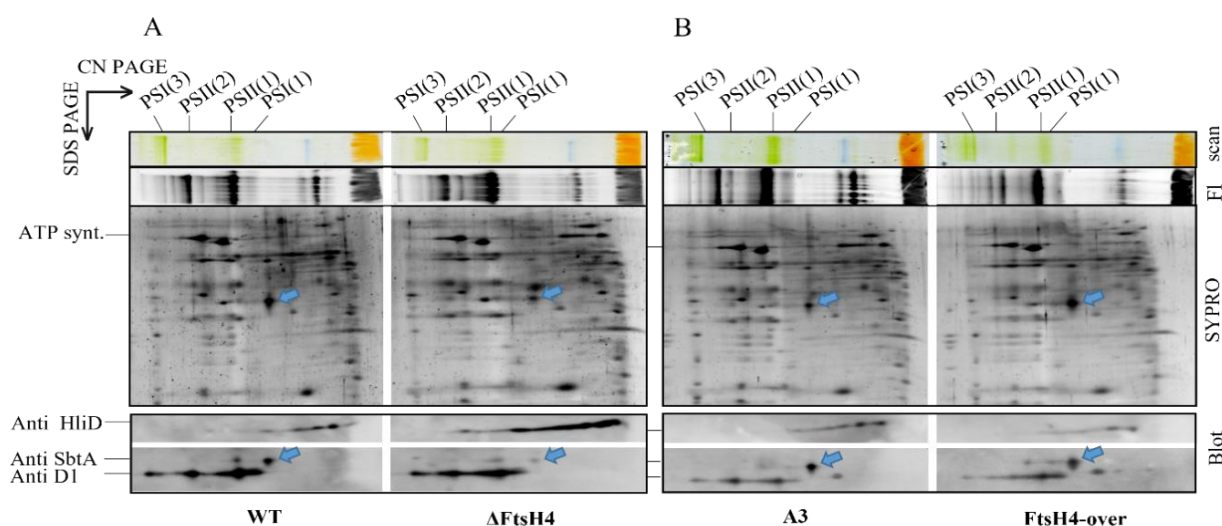
fluorescenci je vidět rozdílné množství PSII dimeru, který je akumulován ve větším množství u kmenu WT. U kmenu WT byla přítomnost PSI trimeru také větší než u kmenu Δ HliD. Zato ale deleční mutant HliD akumuloval více PSI monomeru.



Obrázek 11: Složení fotosyntetických komplexů u kmenů WT, Δ FtsH4, A3, FtsH4-over a Δ HliD po 72 h HL_{SC}. Membrány izolované z kmenů WT a Δ FtsH4 (A), A3 a FtsH4-over (B), WT a Δ HliD (C) pěstovaných 72 hodin za podmínek HL_{SC} byly solubilizovány v 1 % β -DDM a jednotlivé proteinové komplexy byly rozděleny na nativním gelu. Gel byl vyfocený na skeneru (Scan) a vyvolaný fluorescenční kamerou s použitím autofluorescence chlorofylu (Fluorescence). PSI(1) a PSI(3): monomer respektive trimer PSI; PSII(1) a PSII(2): monomer, respektive dimer PSII. Červený obdélník označuje rozdíl v akumulaci PSI(3). Červené šipky označují meziproducty PSII. Vzorky byly nanášeny na OD_{750nm}.

Membránové proteiny byly dále charakterizovány pomocí dvourozměrné elektroforézy. Nativní (CN-PAGE) gel byl nařezán na proužky a pomocí metody SDS-PAGE byly proteinové komplexy rozděleny na jednotlivé proteiny. 2D gel byl následně obarven

pomocí fluorescenční barvy SYPRO Orange (Obr. 12). Proteiny z gelu byly přeneseny na membránu a dále detekovány pomocí protilátek. Ve spodní části obrázku se nacházejí výřezy z imunodetekce po použití specifických protilátek proti SbtA, HliD a D1 proteinům. U obou FtsH4 mutantních kmenů jsme pozorovali rozdíly v množství HliD proteinu. Zatímco Δ FtsH4 obsahoval HliD proteinu ve srovnání s kontrolou více, FtsH4-over méně. Abychom potvrdili, že nedostatek HliD proteinu v kmenu FtsH4-over má vliv na množství a složení komplexů PSII, provedli jsme CN-PAGE analýzu membránových proteinových komplexů izolovaných z kmene, kterému chybí gen pro HliD protein (Obr. 11C). Tento kmen byl pěstovaný za stejných podmínek jako kmen FtsH4-over. Z obrázku nativního gelu je zřejmé, že množství a složení PSII komplexů je obdobné. Nevýraznější rozdíl jsme pozorovali v množství SbtA proteinu (označen v Obr. 12 modrou šipkou). SbtA je protein zodpovědný za transport bikarbonátu do buněk. U kmenu Δ FtsH4 je transportérů přítomno nápadně méně než u kontrolního kmenu WT. Naopak u kmenu FtsH4-over je těchto transportérů výrazně více než u kontrolního kmene A3, což je vidět hlavně na barveném gelu. Tyto výsledky naznačují, že FtsH4 by mohla hrát roli v metabolismu anorganického uhlíku.



Obrázek 12: Analýza membránových proteinů pomocí dvourozměrné SDS-PAGE.

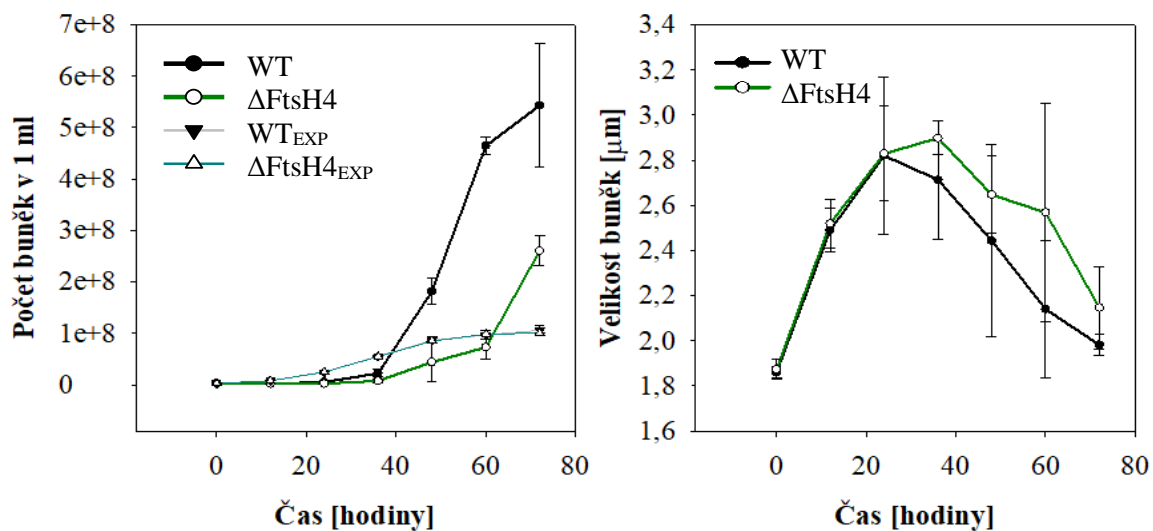
Izolované membránové proteinové komplexy kmenů WT a Δ FtsH4 (A), A3 a FtsH4-over (B) byly rozděleny pomocí nativní elektroforézy (CN-PAGE). Nativní gel byl vyfocen (scan) a skenován na fluorescenci chlorofylu (Fluorescence). CN gel byl nařezán na proužky po jednotlivých vzorcích a proužky byly použity pro dvourozměrnou (2D) SDS-PAGE. 2D SDS-PAGE gel byl obarven SYPRO Orange (SYPRO) a z něj na membránu přeneseny proteiny, které byly detekovány pomocí protilátek specifických proti HliD, D1 a SbtA. PSI(1) a PSI(3) je monomer, respektive trimer PSI; PSII(1) and PSII(2) je monomer, respektive dimer PSII. Signál ATP syntázy (ATP synt.) na SYPRO gelu slouží jako kontrola nanášky. Vzorky byly nanášeny na OD_{750nm}.

4.5 Vliv množství CO₂ na růst FtsH4 mutantních kmenů

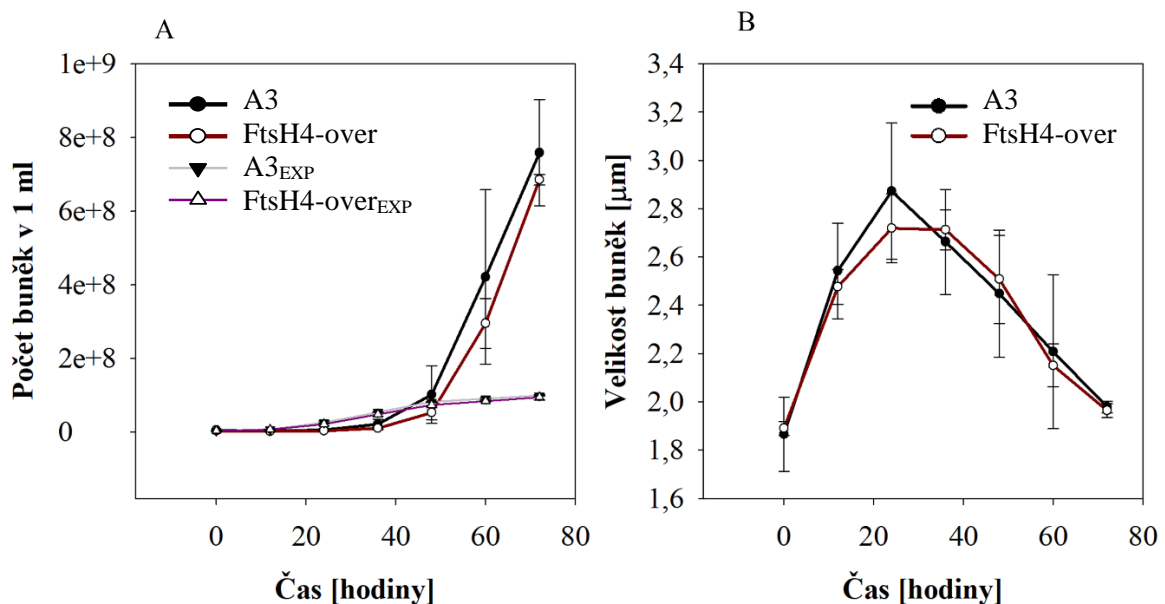
Protože byly u obou FtsH4 mutantních kmenů pozorovány rozdíly v akumulaci proteinu SbtA, týkajícího se metabolismu anorganického uhlíku, cílem bylo odhalit, jak budou FtsH4 mutantní kmeny reagovat na nadbytek (Obr. 13, 14), anebo naopak limitaci CO₂ (Obr. 15, 16). Buňky byly napěstovány do exponenciální fáze růstu, poté byly v případě nadbytku CO₂ naředěny na OD_{750nm} = 0,05 a v případě limitace CO₂ na OD_{750nm} = 0,1 a pěstovány na HL. Pro získání nadbytku CO₂ byly kultury probublávány vzduchem obsahujícím 0,5 % CO₂, což je zhruba 16× víc než obsah CO₂ ve vzduchu v kultivační místnosti. K docílení limitace CO₂ byly u kultur použity těsné vatové zátky, které umožňovaly pouze minimální výměnu plynů. Podmínky pro nadbytek/limitaci CO₂ budou dále v textu nazývány HL_{EXP} +CO₂ respektive HL_{EXP} -CO₂. V obou experimentech byly vzorky pro měření růstu odebrány v časovém intervalu 0 až 72 hodin. U odebraných kultur byla následně pomocí přístroje Multisizer 4 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter) a programu Multi4 měřena velikost a počet buněk (Obr. 13-16). Rychlost růstu za podmínek HL_{EXP} +CO₂ respektive HL_{EXP} -CO₂ byla porovnávána s kontrolními podmínkami HL_{EXP}, za kterých koncentrace CO₂ odpovídala koncentraci CO₂ v kultivační místnosti, což bylo přibližně 0,03 %.

4.5.1 Nadbytek CO₂

Jelikož je CO₂ zásadním substrátem pro fotosyntézu, jeho zvýšená koncentrace značně podporuje růst buněk. Proto buňky všech kmenů po 72 hodinách narostly podstatně více, než za kontrolních podmínek HL_{EXP} (Obr. 13 a 14). Buňky ale přecházely do exponenciální fáze růstu později než za podmínek HL_{EXP}. Hlavním předpokladem experimentu bylo, že nadbytek CO₂ bude mít pozitivní efekt zejména na FtsH4 delečnímu mutantu, který obsahoval méně SbtA transportérů. Překvapivě, deleční mutant rostl ve srovnání s WT kmenem výrazně pomaleji a v prvních 60 hodinách dokonce i pomaleji, než za normální koncentrace CO₂ (HL_{EXP}, Obr. 13A). Oproti HL_{SC} experimentu (Obr. 6A) se ani po dlouhodobé expozici na podmínky neadaptoval a ztrátu počtu buněk na WT kmen nedohnal ani po 72 hodinách. Naopak, průměr buněk u delečního mutantu dosahoval podobných hodnot jako u kontrolního kmenu WT. Po dlouhodobé expozici HL_{EXP}+CO₂ (zhruba po 48 h) se zdály být jeho buňky mírně větší než buňky WT. V případě FtsH4 over-expressního kmenu jsme za podmínek HL_{EXP}+CO₂ naopak nepozorovali žádný výrazný rozdíl mezi mutantem a kontrolou. Nadbytek CO₂ růst FtsH4-over stimuloval ve srovnání s podmínkami HL_{EXP} podobně jako u kontrolního kmenu A3 (Obr. 14). Také velikost buněk byla obdobná.



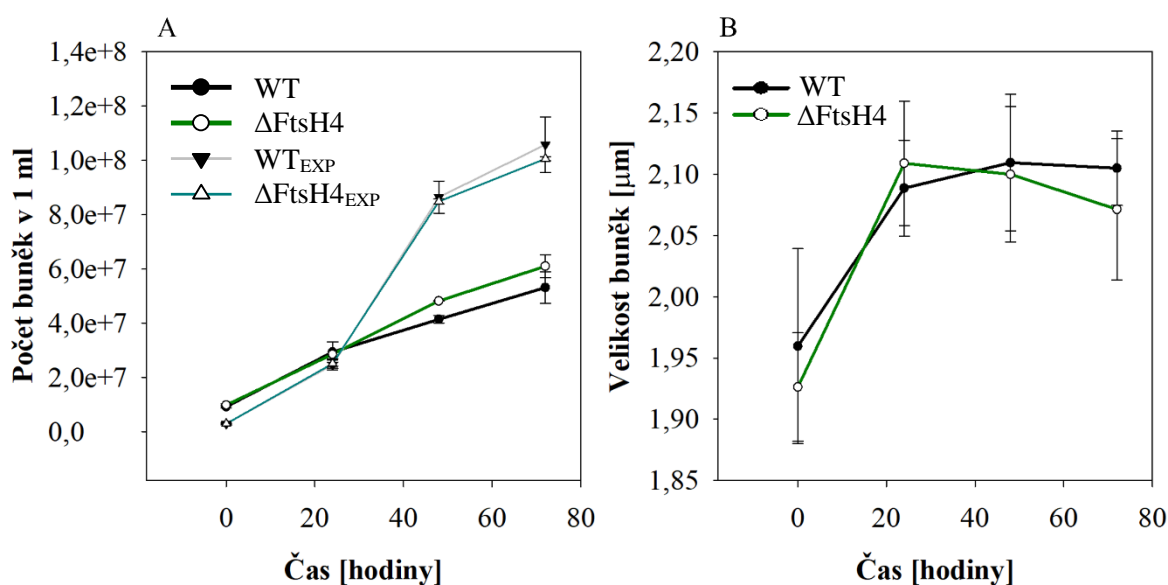
Obrázek 13: Počet a velikost buněk WT a $\Delta FtsH4$ během expozice HL a zvýšené koncentrace CO_2 v čase. WT a $\Delta FtsH4$ kmeny byly napěstovány do exponenciální fáze a poté naředěny na $OD_{750nm} = 0,05$ a vystaveny HL a probublávány 0,5 % CO_2 . Během HL expozice byl v časových intervalech 0 až 72 hodin odebrán 1ml kultury, u kterého byla následně pomocí přístroje Multisizer 4 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter), Multi4 měřena velikost u počet buněk. A. Počet buněk WT a $\Delta FtsH4$ během HL_{SC}; B. Velikost buněk WT a $\Delta FtsH4$ během HL_{SC}. Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze 3 biologických replikátů \pm SD.



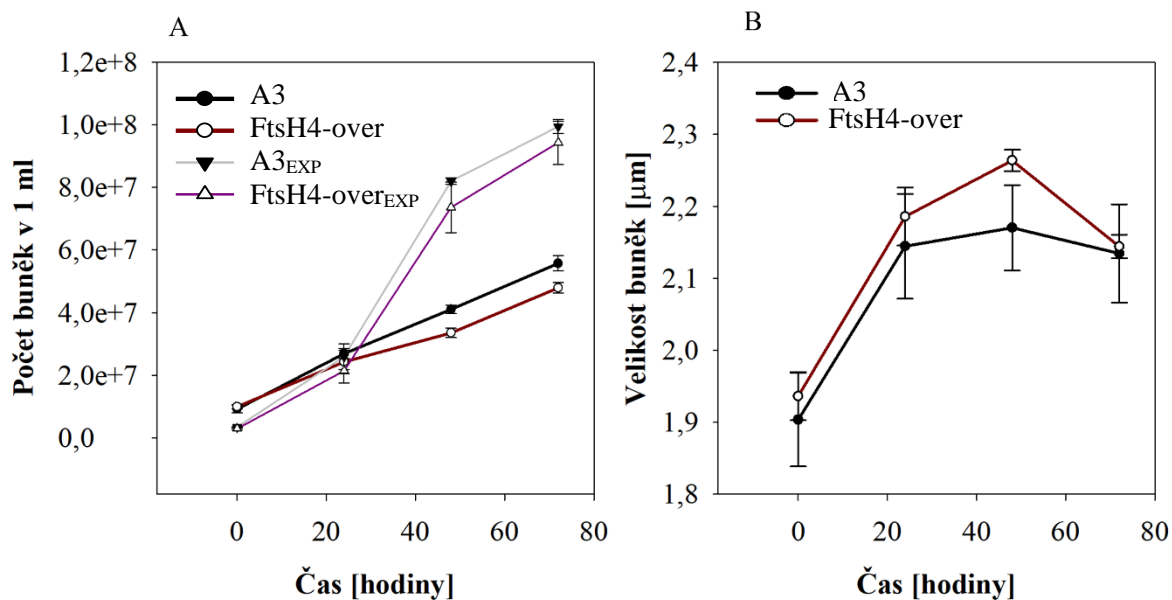
Obrázek 14: Počet a velikost buněk A3 a FtsH4-over během expozice HL a zvýšené koncentrace CO_2 v čase. A3 a FtsH4-over kmeny byly napěstovány do exponenciální fáze a poté naředěny a vystaveny HL a probublávány 0,5 % CO_2 . Během HL expozice byl v časových intervalech 0 až 72 hodin odebrán 1ml kultury, u kterého byla následně pomocí přístroje Multisizer 4 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter), Multi4 měřena velikost a počet buněk. A. Počet buněk A3 a FtsH4-over během HL_{SC}; B. Velikost buněk A3 a FtsH4-over během HL_{SC}. Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze 3 biologických replikátů \pm SD.

4.5.2 Limitace CO₂

V případě limitace CO₂ rostly všechny kmeny podle předpokladů výrazně pomaleji než za kontrolních podmínek HL_{EXP}. Očekávali jsme, že limitace CO₂ nejvíce zasáhne FtsH4 delečního mutanta, protože obsahoval nejméně transportérů bikarbonátu SbtA. Neočekávaně, ΔFtsH4 rostl podobně jako WT, v pozdějších hodinách dosahoval dokonce mírně vyššího počtu buněk než kontrola (Obr. 15A). Také co se týče velikosti buněk, se ΔFtsH4 mutant nijak zásadně nelišil od kontrolního kmene WT (Obr. 15B). Ani pro kmen FtsH4-over nebyla limitace CO₂ kritická. Kmen ale dosahoval, na rozdíl od ΔFtsH4, mírně nižšího počtu buněk než kontrolní kmen A3 (Obr. 16A). Na rozdíl od nadbytku CO₂ byly buňky FtsH4-over v porovnání s kontrolou A3 větší (Obr. 16B).



Obrázek 15: Počet a velikost buněk WT a ΔFtsH4 během expozice HL a snížené koncentrace CO₂ v čase. A3 a FtsH4-over kmeny byly napěstovány do exponenciální fáze a poté naředěny a vystaveny HL a probublávány 0,5 % CO₂. Během HL expozice byl v časových intervalech 0 až 72 hodin odebrán 1 ml kultury, u kterého byla následně pomocí přístroje Multisizer 4 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter), Multi4 měřena velikost a počet buněk. A. Počet buněk WT a ΔFtsH4 během HL_{SC}; B. Velikost buněk WT a ΔFtsH4 během HL_{SC}. Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze 3 biologických replikátů ± SD.



Obrázek 16: Počet a velikost buněk A3 a FtsH4-over během expozice HL a snížené koncentrace CO₂ v čase. A3 a FtsH4-over kmeny byly napěstovány do exponenciální fáze a poté naředěny a vystaveny HL a probublávány 0,5 % CO₂. Během HL expozice byl v časových intervalech 0 až 72 hodin odebrán 1ml kultury, u kterého byla následně pomocí přístroje Multisizer 4 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter), Multi4 měřena velikost a počet buněk. A. Počet buněk A3 a FtsH4-over během HL_{SC}; B. Velikost buněk A3 a FtsH4-over během HL_{SC}. Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze 3 biologických replikátů ± SD.

5 Diskuze

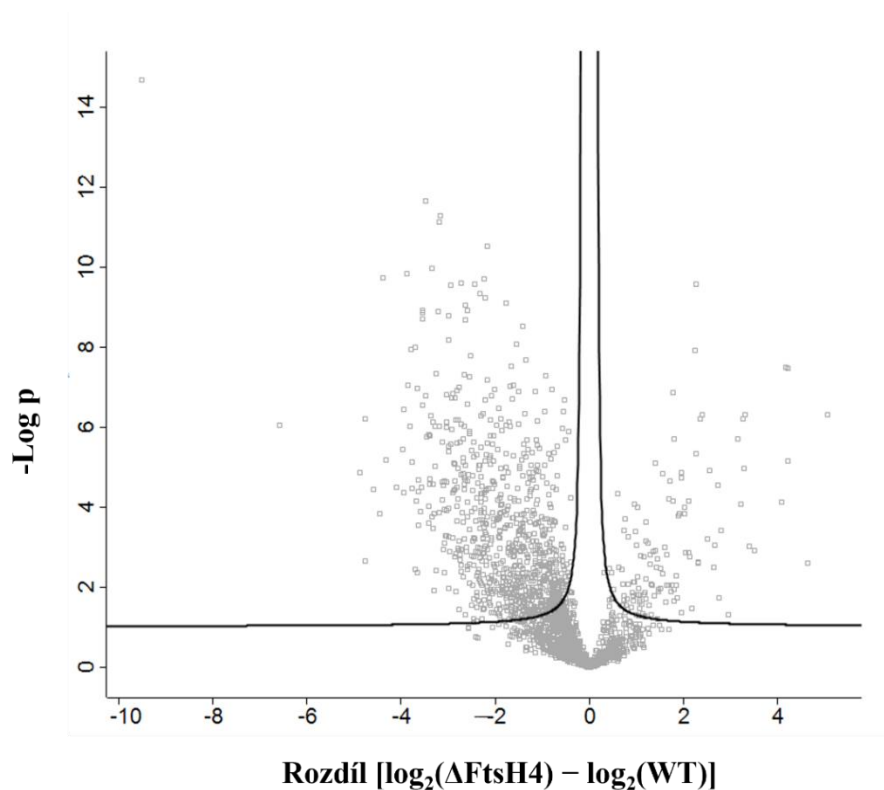
Mnoho biochemických procesů týkajících se oxygenní fotosyntézy probíhá v sinicích podobně jako ve vyšších rostlinách. Stejně tak je mnoho enzymů, nevyjímaje FtsH, ATP dependentní proteázu, konzervovaných jak v bakteriích, tak ve všech eukaryotních organismech, včetně rostlin. Tam hrají FtsH proteázy důležitou roli při vývoji plastidů a regulaci buňky na stresové podmínky. Mechanismus těchto dějů a funkce některých FtsH homologů ale stále zůstává neobjasněna. To platí i pro FtsH4 proteázu ze sinice *Synechocystis*, jejíž funkce nebyla dosud popsána. Vzhledem k lokalizaci FtsH4 v tylakoidní membráně (Boehm a kol., 2012) a faktu, že se její exprese zvyšuje za stresových podmínek jako je vysoká intenzita světla a stacionární fáze (Kopf a kol., 2014), jsme předpokládali, že bude hrát důležitou roli v regulaci fotosyntézy právě za těchto podmínek. Pro studium funkce FtsH4 proteázy jsme použili mutantní kmeny, ve kterých gen pro FtsH4 buď chyběl, anebo byla jeho exprese výrazně zvýšena. Tyto kmeny jsme vystavili výše uvedeným stresovým podmínkám a zaměřili se na jejich detailní charakterizaci.

Za normálních podmínek, tj. exponenciální fáze růstu na normálním světle, se oba mutantní kmeny chovaly obdobně jako jejich kontroly. V pozdějších fázích růstu už jsme ale pozorovali patrné rozdíly mezi jednotlivými kmeny. Při přechodu buněk z lineární do stacionární fáze růstu bylo zřejmé, že se růst delečního mutantu mírně zpomalil, zatímco over-expressní mutant jako by stacionární fáze vůbec nedosáhl a pokračoval v růstu až do posledního dne měření, tj. 21. dne. Kultury jsme pozorovali ještě další týden, aniž bychom měřili OD_{750nm} a opakovaně se stalo, že po 30 dnech kultivace byly kontrolní kmeny ještě zelené, zatímco oba mutantní kmeny ztrácely pigmenty, což naznačovalo nadcházející buněčnou smrt. U over-expressního kmenu byly tyto znaky ještě výraznější než u delečního mutantu (Obr. 5). Při přechodu do stacionární (klidové) fáze buňky zpomalí všechny metabolické děje, nedělí se a jsou schopny v této fázi přežít ještě desítky dní. Pokud buňky, přesto, že už jsou limitovány světlem a nedostatkem živin, do SC nepřejdou, a dále se dělí, kultura se vyčerpá a dojde k jejímu odumírání dříve, což jsme pozorovali právě u over-expressního mutantu. FtsH4 zřejmě hraje roli v regulaci metabolismu při přechodu do SC. Její přítomnost tento přechod zpomaluje, zatímco nedostatek urychluje. Čistě hypoteticky by FtsH4 proteáza mohla být zodpovědná za degradaci proteinu řídicího přechodu do SC, jako například některý ze stresových sigma faktorů (Srivastava a kol., 2020). Když FtsH4 chybí, protein se v buňce

akumuluje a buňky do SC přechází rychleji. Naopak, nadbytek FtsH4 způsobí vyšší degradaci tohoto proteinu a kultura do SC přechází pomaleji.

Kromě přechodu do SC měly FtsH4 mutantní kmeny problém s adaptací na HL, zejména poté, co byly naředěny ze SC (HL_{SC}). Zaměřili jsme na stanovení počtu a velikosti buněk v čase během HL_{SC}. Po naředění na nízké OD_{750nm} setrvávají buňky delší dobu v lag fázi, ve které dochází k expresi proteinů důležitých pro dělení buněk a adaptaci na HL. V této fázi se buňky zvětšují (Rolfe a kol., 2012). Když poté buňky přejdou do exponenciální fáze růstu, dojde opět k jejich zmenšení v důsledku dělení. Na rozdíl od WT se buňky delečního mutantu Δ FtsH4 zvětšovaly výrazně pomaleji a nedosáhly maximální velikosti naměřené u WT kmenu. U Δ FtsH4 kmenu bylo také patrné zpoždění s přechodem do exponenciální fáze. Naopak po delší expozici se Δ FtsH4 kmen začal dělit rychleji a ztrátu na WT kmen postupně dohnal. Over-expressní mutant FtsH4-over vykazoval naprosto opačný fenotyp. Buňky se krátce po expozici zvětšovaly rychleji, do exponenciální fáze růstu přešly ve stejný čas jako buňky kontrolního kmenu. Na rozdíl od Δ FtsH4 kmene měl kmen FtsH4-over problémy s dlouhodobou adaptací na HL. Po dvou dnech HL expozice se jeho růst zpomalil.

Tyto výsledky naznačují, že FtsH4 hraje roli nejen při krátkodobé ale i dlouhodobé adaptaci na světlo. FtsH4 krátce po přechodu na HL_{SC} moduluje expresi genů a tím tvorbu zásobních proteinů, které jsou potřebné pro adaptaci na HL a pro dělicí aparát, což se projevuje zvětšením buňky. Pokud FtsH4 chybí, tvorba zásobních proteinů je zpomalená, buňky jsou menší a přechází do exponenciální fáze později. Pokud je FtsH4 nadbytek, exprese proteinů je rychlejší a buňky větší. Tato hypotéza byla podpořena MS analýzou Δ FtsH4 po 48 hodinách HL_{SC} (Peter Koník, nepublikované výsledky). Výsledky odhalily velké množství proteinů, které u Δ FtsH4 kmenu chybí, anebo jich obsahuje ve srovnání s WT kmenem výrazně méně (Obr. 17).



Obrázek 17: Kvantitativní porovnání celobuněčného proteomu mezi Δ FtsH4 a WT po 48 h HL_{SC}. “Volcano plot“ byl vytvořen v programu Perseus. Rozdíl \log_2 transformovaných intenzit proteinů izolovaných z buněk kmenů Δ FtsH4 a WT je vyneseno na ose x. Proteiny byly kvantifikovány v programu MaxQuant. Pro kvantifikaci byly použity tři biologické replikáty. Osa y znázorňuje záporný logaritmus P value, spočítané pomocí T-testu, prahová hodnota signifikance, která odpovídá FDR 0,05, je v grafu znázorněna plnou černou čarou. Šedé čtverečky odpovídají jednotlivým proteinům. Graf ukazuje, že po 48 h HL_{SC} je v Δ FtsH4 množství většiny proteinů nižší (vyskytují se v záporných hodnotách na ose x), než u WT. MS analýza byla provedena Peterem Koníkem.

Role FtsH4 proteázy při adaptaci na dlouhodobou HL expozici by mohla souviset se stabilizací meziproductů PSII komplexů při jejich syntéze. Z obrázku nativního gelu (Obr. 10A, B) vidíme u obou mutantních kmenů rozdíl v množství PSII. Zatímco PSII komplexy byly u delečního mutantu akumulovány více než u WT, kmen FtsH4-over obsahoval celkově méně PSII komplexů a nevytvářel se téměř žádný dimer PSII. Na syntéze PSII komplexů, se za podmínek HL podílí High light inducible proteins (dále Hlips), včetně HliD proteinu. 2D proteinová analýza FtsH4 mutantních kmenů odhalila, že právě HliD protein se v Δ FtsH4 kmeni hromadí (Obr. 12A), zatímco v kmeni FtsH4-over je ho oproti kontrole méně (Obr. 12B). CN-PAGE analýza membránových proteinových komplexů izolovaných z kmenu, kterému chybí gen pro HliD, potvrdila, že nedostatek HliD proteinu má vliv na množství a složení komplexů PSII a neumožňuje tvorbu PSII dimeru (Obr. 11C). FtsH4 tedy přispívá k

adaptaci na dlouhodobou HL expozici tím, že reguluje množství Hlip proteinů, jmenovitě HliD. Pokud FtsH4 proteáza v buňce chybí, HliD protein se hromadí, což přispívá k vyššímu obsahu PSII komplexů v buňce. Akumulace HliD proteinu zřejmě také napomohla k rychlejšímu růstu Δ FtsH4 mutantního kmenu po dlouhodobé expozici HL_{sc}, kdy Δ FtsH4 dohnal ztrátu na WT. Nadbytek FtsH4 proteinu naopak vede k degradaci HliD proteinu a tím pádem nedostatečné ochraně PSII komplexů po dlouhodobé expozici HL, což mělo negativní vliv na růst buněk FtsH4-over kmenu.

2D proteinová analýza (Obr. 12) také potvrdila rozdíly v množství SbtA proteinu v obou FtsH4 mutantních kmenech. SbtA se v buňce podílí na transportu bikarbonátu do buněk. Zatímco deleční mutant ho obsahoval málo, over-expressní mutant ho naopak hromadil. Z tohoto důvodu jsme studovali růst obou FtsH4 mutantních kmenů ještě za podmínek nedostatku nebo nadbytku CO₂. Překvapivě se deleční mutant s nedostatkem CO₂ vyrovnal lépe než over-expressní mutant. Nadbytek CO₂ naopak snášel lépe over-expressní mutant. Tyto výsledky naznačují, že FtsH4 proteáza hraje důležitou roli v metabolismu uhlíku.

6 Závěr

Charakterizace FtsH4 mutantních kmenů za různých stresových podmínek odhalila, že FtsH4 proteáza hraje důležitou roli při přechodu buněk do stacionární fáze růstu. FtsH4 deleční mutant přecházel do stacionární fáze při nižší optické denzitě než kontrolní kmen, zatímco FtsH4 over-expressní mutant do stacionární fáze vůbec nepřešel. To vedlo u obou kmenů k urychlení buněčné smrti.

Experimenty dále ukázaly, že FtsH4 se podílí na adaptaci buňky na vysokou intenzitu světla, a to zejména po naředění ze stacionární fáze. FtsH4 deleční mutant rostl na začátku HL expozice pomaleji co do velikosti a počtu buněk, což naznačovalo, že má problém se syntézou proteinového aparátu potřebného pro aklimatizaci buňky na HL a pro její dělení. Tato hypotéza byla posléze potvrzena kvantitativní MS analýzou celobuněčného proteomu. FtsH4 deleční mutant obsahoval v porovnání s WT kontrolou podstatně méně proteinů. Buňky FtsH4 over-expressního mutantu byly naopak na začátku HL expozice větší než u kontroly, což by odpovídalo tomu, že obsahovaly více zásobních proteinů než kontrola. Problémem pro ně byla ale dlouhodobá adaptace na HL, kterou způsobilo nedostatečné množství HliD proteinu. HliD protein se podílí na ochraně PSII intermediátů před oxidativním stresem, což vede k celkové stabilizaci PSII. Po 72 hodinách HL_{SC} obsahoval FtsH4 over-expressní mutant méně HliD proteinu a díky tomu i méně PSII komplexů. Podobně jako Δ HliD mutantní kmen nebyl schopen sestavit PSII dimer. FtsH4 deleční mutant naopak akumuloval po 72 hodinách HL_{SC} více HliD proteinu a zřejmě díky tomu i více PSII komplexů než kontrolní kmen WT. Všechny tyto výsledky vedou k závěru, že FtsH4 pomáhá buňkám přežít HL stres jednak tím, že reguluje expresi proteinů potřebných pro adaptaci na tento stres, tak i reguluje množství HliD proteinu, který chrání fotosyntetické komplexy před oxidativním stresem.

Vliv vysoké intenzity světla se také promítnul v množství pigmentů u FtsH4 mutantních kmenů. Zatímco FtsH4 deleční mutant během HL expozice velkou část pigmentů ztratil, u FtsH4 over-expressního mutantu obsahoval pigmentů oproti kontrole naopak více.

2D proteinová analýza dále odhalila v obou FtsH4 mutantních kmenech rozdílnou akumulaci SbtA proteinu. SbtA protein, který je důležitý pro transport bikarbonátu do buněk, byl u FtsH4-over kmene zastoupen ve větším množství než u kontroly A3, zatímco u kmenu Δ FtsH4 bylo těchto transportérů méně než u kontroly WT. Tyto výsledky indikují, že FtsH4 proteáza by se v buňce mohla podílet také na metabolismu uhlíku. Proto byly oba FtsH4

mutantní kmeny vystaveny nadbytku, anebo naopak limitaci CO₂. Nadbytek CO₂ se překvapivě ukázal být prospěšný pro FtsH4 over-expressní kmen, zatímco FtsH4 deleční mutant rostl lépe při nedostatku CO₂. Role FtsH4 v regulaci homeostázy uhlíku zatím ale zůstává nevysvětlena a bude podrobena dalšímu zkoumání.

7 Seznam literatury

- Anbudurai PR, Mor TS, Ohad I, Shestakov SV, Pakrasi HB** (1994) The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 8082-8086.
- Alberts B, Dennis B, Hopkin K, Johnson A, Lewis N, Raff M, Roberts K, Walter P** (1998) *Essential cell biology: An introduction on molecular biology of the cell*.
- Blankenship RE** (2013) *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Wiley- Blackwell: 336.
- Boehm M, Yu J, Krynická V, Barker M, Tichý M, Komenda J, Nixon PJ, Nield J** (2012) Subunit organization of a *Synechocystis* hetero-oligomeric thylakoid FtsH complex involved in photosystem II repair. *Plant Cell* **24**: 3669-3683.
- Břížd'ala J** (2022) *Multimediální učebnice chemie pro gymnázia: Fotosyntéza In.*
- Cammack R** (2006) *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Oxford university press.
- Clarke AK** (1999) ATP-dependent Clp proteases in photosynthetic organisms - A cut above the rest! *Annals of Botany* **83**: 593-599.
- Dalbey RE, Wang P, van Dijl JM** (2012) Membrane proteases in the bacterial protein secretion and quality control pathway. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**: 311-330,
- Garcia-Pichel F** (2009) *Encyclopedia of micro biology (Third Edition). In.*
- Gonzalez-Esquer CR, Šmarda J, Rippka R, Axen SD, Guglielmi G, Gugger M, Kerfeld AC** (2016) Cyanobacterial ultrastructure in light of genomic sequence data. *Photosynthesis Research* **129**: 147-157.
- Guisbert E, Yura T, Rhodius VA, Gross CA** (2008) Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**: 545-+.
- Herrero A, Flores E** (2008) *Cyanobacteria: Molecular biology, genomics and evolution*. Caister Academic Press.
- Hofmann HJ** (1976) Precambrian microflora, belcher islands Canada—Significance and systematics *J Paleontol* **50**: 1040-1073.
- Ito K, Akiyama Y** (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *In Annual Review of Microbiology*, Vol 59, pp 211-231.
- Janska H** (2005) ATP-dependent proteases in plant mitochondria: What do we know about them today? *Physiologia Plantarum* **123**: 399-405.
- Janska H, Kwasniak M, Szczepanowska J** (2013) Protein quality control in organelles - AAA/FtsH story. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1833**: 381-387.
- Janska H, Piechota J, Kwasniak M** (2010) ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1797**: 1071-1075.
- Kaneko T, SS, 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, Wada T, Watanabe A, Yamada M MY, 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. *DNA res* **3**.
- Kato Y, Sakamoto W** (2018) FtsH Protease in the thylakoid membrane: Physiological functions and the regulation of protease activity. *Frontiers in plant science* **9**.
- Komárek J** (2014) Modern classification of Cyanobacteria. Sharma N.K. & al. (Eds.), *Cyanobacteria - an economic perspective*; Willey Blackwell: 21-39.
- Komenda J, Barker M, Kuviková S, de Vries R, Mullineaux CW, Tichý M, Nixon PJ** (2006) The FtsH protease slr0228 is important for quality control of photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 1145-1151.
- Kopf M, Klaehn S, Scholz I, Matthiessen JKF, Hess WR, Voss B** (2014) Comparative analysis of the primary transcriptome of *Synechocystis* sp PCC 6803. *DNA research* **21**: 527-539.
- Krynická V, Georg J, Jackson PJ, Dickman MJ, Hunter CN, Futschik ME, Hess WR, Komenda J** (2019) Depletion of the FtsH1/3 proteolytic complex suppresses the nutrient stress response in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *The Plant Cell* **31**: 2912-2928.
- Krynická V, Shao S, Nixon PJ, Komenda J** (2015) Accessibility controls selective degradation of photosystem II subunits by FtsH protease. *Nature Plants* **1**.
- Langklotz S, Baumann U, Narberhaus F** (2012) Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1823**: 40-48.
- Lee I, Suzuki CK** (2008) Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease-lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1784**: 727-735.
- Lipinska B, Zylicz M, Georgopoulos C** (1990) The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *Journal of Bacteriology* **172**: 1791-1797.
- Liberton M, Pakrasi HB** (2008) Membrane systems in Cyanobacteria. *In*.
- Mann NH, Novac N, Mullineaux CW, Newman J, Bailey S, Robinson C** (2000). "Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803." *Febs Letters* **479**(1-2): 72-77.
- Mareš J, Strunecký O, Bučinská L, Wiedermannová J** (2019) Evolutionary patterns of thylakoid architecture in Cyanobacteria. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY* **10**.
- Mazur R, Mostowska A, Kowalewska Ł** (2021) How to measure grana - Ultrastructural features of thylakoid membranes of plant chloroplasts. *Front Plant Sci* **12**: 756009.
- Naqvi N, Liu K, Graham RM, Husain A** (2005) Molecular basis of exopeptidase activity in the C-terminal domain of human angiotensin I-converting enzyme - Insights into the origins of its exopeptidase activity. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 6669-6675.

- Nonaka G, Blankschien M, Herman C, Gross CA, Rhodius VA** (2006) Regulon and promoter analysis of the *E-coli* heat-shock factor, sigma(32), reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes & Development* **20**: 1776-1789.
- Paetzel M, Dalbey RE** (1997) Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases. *Trends in Biochemical Sciences* **22**: 28-31.
- Rawlings ND, Barrett AJ** (1999) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* **27**: 325-331.
- Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A** (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* **42**: D503-D509.
- Rolfe MD, Rice CJ, Lucchini S, Pin C, Thompson A, Cameron ADS, Alston M, Stringer MF, Betts RP, Baranyi J, Peck MW, Hinton JCD** (2012) Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology* **194**: 686-701.
- Sessions AL, Doughty MD, Welander PV, Summons RE, Newman K** (2008) The continuing puzzle of the Great Oxidation Event. *Current Biology* **19**: R567-R574.
- Shao S, Cardona T, Nixon PJ** (2018) Early emergence of the FtsH proteases involved in photosystem II repair. *Photosynthetica* **56**: 163-177.
- Shikanai T, Shimizu K, Ueda K, Nishimura Y, Kuroiwa T, Hashimoto T** (2001) The chloroplast clpP gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant and Cell Physiology* **42**: 264-273.
- Srivastava A, Summers ML, Sobotka R** (2020) Cyanobacterial sigma factors: Current and future applications for biotechnological advances. *Biotechnol Adv* **40**: 107517.
- Stanier G** (1988) Fine structure of cyanobacteria. In *methods enzymol.* Academic Press **167**: 157-172.
- Stanier RY, Cohen-Bazire G** (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* **31**: 225-274.
- Strauch KL, Johnson K, Beckwith J** (1989) Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *Journal of Bacteriology* **171**: 2689-2696.
- Sukenik A, Rucker J, Maldener I** (2019) Chapter 4 - Dormant cells (Akinetes) of filamentous Cyanobacteria demonstrate a great variability in morphology, physiology, and ecological function. In AK Mishra, DN Tiwari, AN Rai, eds, *Cyanobacteria*. Academic Press, pp 65-77.
- Suzuki CK, Rep M, van Dijl JM, Suda K, Grivell LA, Schatz G** (1997) ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem Sci* **22**: 118-123.
- Šetlík I, Seidlová F, Šantrůček J** (2004) Fyziologie rostlin: Fotosyntetická barviva a světlosběrné antény.
- Šmarda J, Šmajš D, Komrska J, Krzyžánek V** (2002) S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron* **33**: 257-277.
- Tichý M, Bečková M, Kopečná J, Noda J, Sobotka R, Komenda J** (2016) Strain of *Synechocystis* PCC 6803 with aberrant assembly of photosystem NN contains tandem duplication of a large chromosomal region. *Frontiers in Plant Science* **7**.

- Válek T, Pohanka M**, (2018) Mikrobiální proteázy a jejich aplikační využití, *In*.
- Wang L, Fan D, Chen W, Terentjev EM** (2015) Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports* **5**: 15159.
- Wang P, Shim E, Cravatt B, Jacobsen R, Schoeniger J, Kim AC, Paetzel M, Dalbey RE** (2008) *Escherichia coli* signal peptide peptidase a is a serine-lysine protease with a lysine recruited to the nonconserved amino-terminal domain in the s49 protease family. *Biochemistry* **47**: 6361-6369.
- Zhang P, Battchikova N, Jansen T, Appel J, Ogawa T, Aro E-M** (2004) Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in *Synechocystis* sp PCC 6803. *The Plant cell* **16**: 3326-3340.

8 Seznam obrázků

Voet D, Voetová J (1995) Biochemie: Schéma membrány thylakoidů, 1. české vyd. Praha: Victoria Publishing.

Wang L, Fan D, Chen W, Terentjev EM (2015) Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports* **5**: 15159.