

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Ústav akvakultury

Bakalářská práce
**Proteiny fotosyntetických organismů – struktura a
interakce ve fotosystemu II**

Autor: Jan Tvaroh

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Michal Kutý, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová,
Ph.D.

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: III.

České Budějovice, 2013

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské (diplomové) práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum

Jan Tvaroh

Děkuji svému školiteli Mgr. Michalu Kutému, Ph.D. a konzultantům doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. a Mgr. Jaroslavě Kohoutové, Ph.D. za vedení metodiky práce, odbornou pomoc v problematice a veškeré rady podané k sepsání této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat znovu Mgr. Michalu Kutému, Ph.D. za pomoc při orientaci a modelování proteinů v daných programech.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan TVAROH**
Osobní číslo: **V10B055P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Proteiny fotosyntetických organismů - struktura a interakce ve fotosystému II**
Zadávající katedra: **Ústav komplexních systémů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Krystalizace proteinů PsbQ a PsbP podle popsaných krystalizačních podmínek.

Fotosyntéza je proces probíhající ve fotosyntetických organizmech, kdy dochází k přeměně světelné energie na energii chemickou. Jedním z produktů reakce je kyslík, který vzniká v membránovém komplexu - fotosystému II. Součástí membránového komplexu fotosystému II je kyslík vyvíjející komplex, který se skládá z proteinů PsbO, PsbQ, PsbP a PsbR. Určení struktury jednotlivých proteinů tvořících kyslík vyvíjející komplex umožní pochopit mechanismus tvorby kyslíku v procesu fotosyntézy.

Krystalizační podmínky a struktura proteinů PsbP a PsbQ z fotosystému II vyšších rostlin je popsána. Cílem práce je zvládnutí metodiky použité pro krystalizaci proteinu z fotosystému II vyšších rostlin. Student získá znalosti proteomiky (příprava roztoků, SDS-PAGE analýza, určení koncentrace proteinů, získání vzorků potřebné koncentrace) a krystalizace (získání krystalů vhodných pro měření jejich difrakce a následné strukturní analýzy). Pro přípravu proteinů budou připraveny dvě modifikace rekombinantních proteinů a porovnány jejich krystalizační podmínky a kvalita krystalů.

Rozsah grafických prací: **3 - 10**

Rozsah pracovní zprávy: **20 - 30**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. M. Balsera, J.B. Arellano, J.L. Revuelta, J. De Las Rivas, J.A. Hermoso, The 1.49A resolution crystal structure of PsbQ from photosystem II of *Spinacia oleracea* reveals a PPII structure in the N-terminal region, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 1051-1060

2. Kohoutová, J., Kuta Smatanová, I., Brynda, J., Lapkouski, M., Revuelta J. L., Arellano, J. B. & Ettrich, R.(2009). Crystallization and preliminary crystallographic characterization of the extrinsic PsbP protein of photosystem II from *Spinacia oleracea*, *Acta Cryst.* F65, 111-115

3. Fyziologie rostlin - dostupná literatura k dané problematice

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Michal Kutý, Ph.D.**

Ústav komplexních systémů

Konzultant bakalářské práce: **doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.**

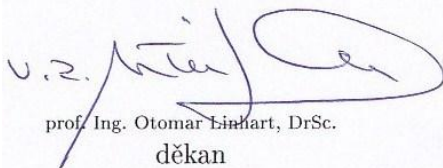
Ústav komplexních systémů

Ostatní konzultanti: **Mgr. Jaroslava Kohoutová, Ph.D.**


Ústav komplexních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **2. prosince 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2013**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


Ing. Petr Císař, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární část	9
2.1.Fotosyntéza	9
2.1.1. Primární fáze fotosyntézy	9
2.1.1.1 Chloroplast a supramolekulární komplexy	10
2.1.1.2 Proteiny OEC	12
2.1.1.3 Protein PsbQ	13
2.1.1.4 Struktura PsbQ	14
2.1.1.5 Protein PsbP	14
2.1.1.6 Struktura PsbP	14
2.1.2. Sekundární fáze fotosyntézy	15
2.2.Krystalizace proteinů	16
2.2.1. Krystalizační techniky	18
2.2.1.1.Metoda založena na dialýze	18
2.2.1.2.Metoda založena na difúzi par	19
2.2.2. Faktory ovlivňující krystalizaci	21
2.3.Zpracování difrakčních dat	21
2.4.WinCoot	22
2.5.VMD	22
3. Materiál a metodika	23
3.1.Ústav komplexních systémů	23
3.2.SDS-PAGE	23
3.2.1. Příprava gelů SDS-PAGE	23
3.3.Příprava srážecích roztoků	25
3.3.1. Roztok pro PsbQ	25
3.4.Metoda sedící kapky	26
3.5. Testování krystalů	33
3.5.1. CRASH test	33
3.5.2. DYE test	33
3.6.Modelování molekulárních struktur	33
3.6.1. PsbQ	33
3.6.2. PsbP	34
3.6.3. PSII	34
4. Výsledky	35
4.1.Gelová elektroforéza	35
4.2.Krystalizace PsbQ	35
4.3.Krystalizace HisPsbQ	36
4.4.Krystalizace PsbP	37
4.5.CRUSH test	38
4.6.DYE test	39
4.7.Modelování v programu WinCoot	40
4.8.Modelování v programu VMD	40
5. Diskuse	43

6. Závěr	45
7. Použitá literatura	46
8. Seznam příloh	48
9. Přílohy	49
10. Abstrakt	53
11. Abstract	54

1. Úvod

Fotosyntéza je biochemický proces přeměny světelné energie slunečního záření na energii chemickou, která je ukládána v organických sloučeninách. Jako vedlejší produkt fotosyntézy je v mnoha případech elementární kyslík, který je limitujícím prvkem pro život na zemi.

Proteiny obsažené ve fotosyntetickém aparátu jsou již delší dobou předmětem výzkumu. Jejich molekulární struktura poskytuje nezbytné údaje pro objasnění jejich funkce a mechanismu biochemických procesů probíhajících při fotosyntéze. Molekulární struktura fotosyntetických proteinů je dlouhodobě studována metodou proteinové krystalografie, díky níž byl detailně prostudován fotosyntetický aparát bakterií a sinic, nicméně fotosyntetické proteiny vyšších rostlin jsou nadále předmětem tohoto výzkumu.

Cíle

Cílem této práce je popis a aplikace metody krystalizace fotosyntetických proteinů PsbQ a PsbP izolovaných z vyšších rostlin (ze špenátu *Spinacia oleracea*) a na základě difrakčních dat z rentgenové difrakce příprava 3D molekulárních modelů obou uvedených proteinů.

2. Literární část

2.1. Fotosyntéza

Fotosyntéza je biochemický proces, při němž dochází k přeměně energie sluneční na energii chemických vazeb. Vedlejším produktem fotosyntézy je obvykle molekulární kyslík, který je nezbytným prvkem pro vznik našeho pozemského života. Tento složitý proces probíhá ve fotosyntetických, tzv. autotrofních organismech, jakými jsou hnědé a zelené řasy, fotosyntetizující bakterie včetně sinic, zelené rostliny aj.

2.1.1. Primární fáze fotosyntézy

Primární fáze fotosyntézy neboli světelná fáze je sled reakcí závislých na světelném záření, přičemž dochází k přeměně světelné energie (fotonů) na chemickou energii ve formě molekul NADPH a ATP a vedlejším produktem je u mnoha organismů vznikající kyslík.

Zachycením viditelného světla fotosyntetickými pigmenty začíná vlastní proces fotosyntézy, přičemž např. zelené rostliny využívají světlo v rozsahu vlnových délek 400–750 nm.

Pro průběh fotosyntézy je tedy nutné, aby organismy obsahovaly pigmenty zachycující sluneční záření. Tyto pigmenty se u vyšších rostlin vyskytují v organelách zvaných chloroplasty a nazývají se chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Každý chloroplast obsahuje kolem 600 milionů chlorofylů (von Wettstein a kol. 1995).

Základem molekulární struktury chlorofylu jsou porfyriny, což jsou tetrapyroly vzájemně spojené metinovými můstky (-CH=) a s vázaným kationtem Mg^{2+} . Rozdíl mezi chlorofylem *a* a chlorofylem *b* je tvořen pouze rozdílnými skupinami na 3. atomu uhlíku (pyrolový kruh II).

Chlorofyl *a* je nejdůležitějším barvivem pro průběh fotosyntézy. Ostatní barviva mají jen pomocnou funkci, tj. dodávají energii z excitovaného stavu na chlorofyl *a*.

Mezi fotosyntetické pigmenty se kromě chlorofylů také řadí fykobiliny a karotenoidy. Fykobiliny jsou pouze doplňková barviva a u vyšších rostlin se

nevyskytují. Skládají se z chromoforu fykobilinu a z příslušného proteinu. Obecně jsou ve vodě velmi dobře rozpustné. Základem karotenoidů (izoprenoidů) je řetězec 40 atomů uhlíku, tzv. tetraterpen. Jsou to buď uhlovodíky (karoteny) nebo kyslíkaté deriváty (xantofyly). Vyskytují se u vyšších rostlin. Jejich nejčastější podobou je β -karoten, z xantofylů je to violaxantin, lutein a zeaxantin. Také karotenoidy bývají vázány na protein. Jejich funkcí je chránit fotosyntetický aparát před nevratnou fotooxidací (Procházka a kol., 1998).

V případě, že molekula pigmentu absorbuje foton (tj. kvantum světelné energie), dostane se přeskokem elektronu na vyšší energetickou hladinu do prvního či do druhého excitovaného stavu a nabytou energii může molekula vyčerpat mnohými způsoby, z nichž jsou nejdůležitější následující čtyři procesy:

Vnitřní přeměna (konverze) přebytečné excitační energie na teplo neboli kinetickou energii molekuly. Uvedený děj je velmi rychlý.

Fluorescence, děj kdy je bez užítku vyzářen foton s nižší energií než přijatý. Tento pochod je pomalejší než vnitřní přeměna.

Přenos excitační energie na sousední molekuly díky vzájemnému překryvu jejich molekulových orbitalů. Fotosyntetické pigmenty (tzv. anténní pigmenty) absorbují fotony a přenášejí excitační energii do fotosyntetického reakčního centra. Významným pigmentem fotosyntetického aparátu je akceptor (příjemce) chlorofyl a.

Fotooxidace, děj, při němž je vypuzen slabě vázaný elektron z molekuly chlorofylu, přičemž se vytváří oxidovaná forma chlorofylu (Chl^+) (kationtový volný radikál). Energie vyexcitovaného elektronu je následně využita v postupných chemických reakcích fotosyntézy.

2.1.1.1. Chloroplast a supramolekulární komplexy

Chloroplast je organelou, která i po samostatné izolaci váže CO_2 a vytváří sacharidy. Pod dvěma membránami je vnitřní médium nazývané stroma. Typickými útvary chloroplastů jsou tylakoidy. U vyšších rostlin chloroplast obsahuje tzv. grana, což jsou shluky tylakoidů.

V tylakoidní membráně chloroplastu u sinic a vyšších rostlin se nacházejí čtyři následující supramolekulární komplexy:

Fotosystém II (PSII) katalyzuje rozklad vody za uvolnění molekulárního kyslíku. Přenos energie PSII je postupně předán z anténních světlosběrných systémů na chlorofyly reakčního centra označované jako P680, kde dojde po excitaci k separaci elektrického náboje a elektron je předán na feofytin, představující primární akceptor PSII. Oxidovaný P680⁺ je následně redukován uvolněným elektronem z vody.

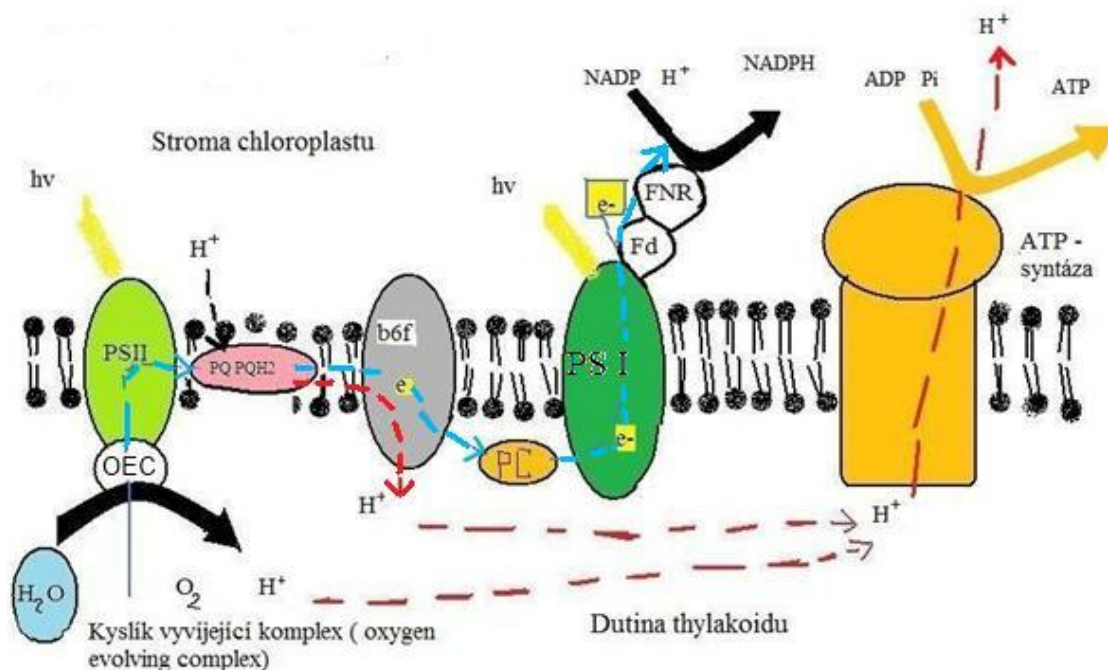
Redukovaný feofytin předává elektrony na jedoelektronový přenašeč plastochinon Q_A, z něhož pak přecházejí na Q_B, který přenáší dva vodíkové atomy. Na přenosu elektronu mezi Q_A a Q_B se podílí i atom železa (Fe) vázaný na histidin proteinu komplexu PSII. Zde jsou ke dvěma elektronům přijaty dva H⁺ ze stromatu chloroplastu. Zredukován plastochinon, plastochinon PQH₂ předává elektrony do komplexu cytochromu b₆f.

Cytochrom b₆/f slouží jako přenašeč elektronů z PSII do fotosystému I (PSI).

Fotosystém I získává elektron pomocí pohyblivých přenašečů z reakčního centra, a jeho přenosem redukuje molekulu NADP⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) na NADPH.

Čtvrtým komplexem je enzym ATP-syntáza, která využívá protonový gradient vytvořený přenosem elektronů k syntéze (tzv. fotofosforylaci) adenosintrifosfátu (ATP) na vnějším povrchu tylakoidní membrány.

Výsledkem primární fáze fotosyntetického procesu je tedy fotolýza vody za uvolnění kyslíku a chemická energie obsažená ve formě ATP a NADPH, která vstupuje do sekundární temnostní fáze k tvorbě glukózy (Procházka a kol., 1998).



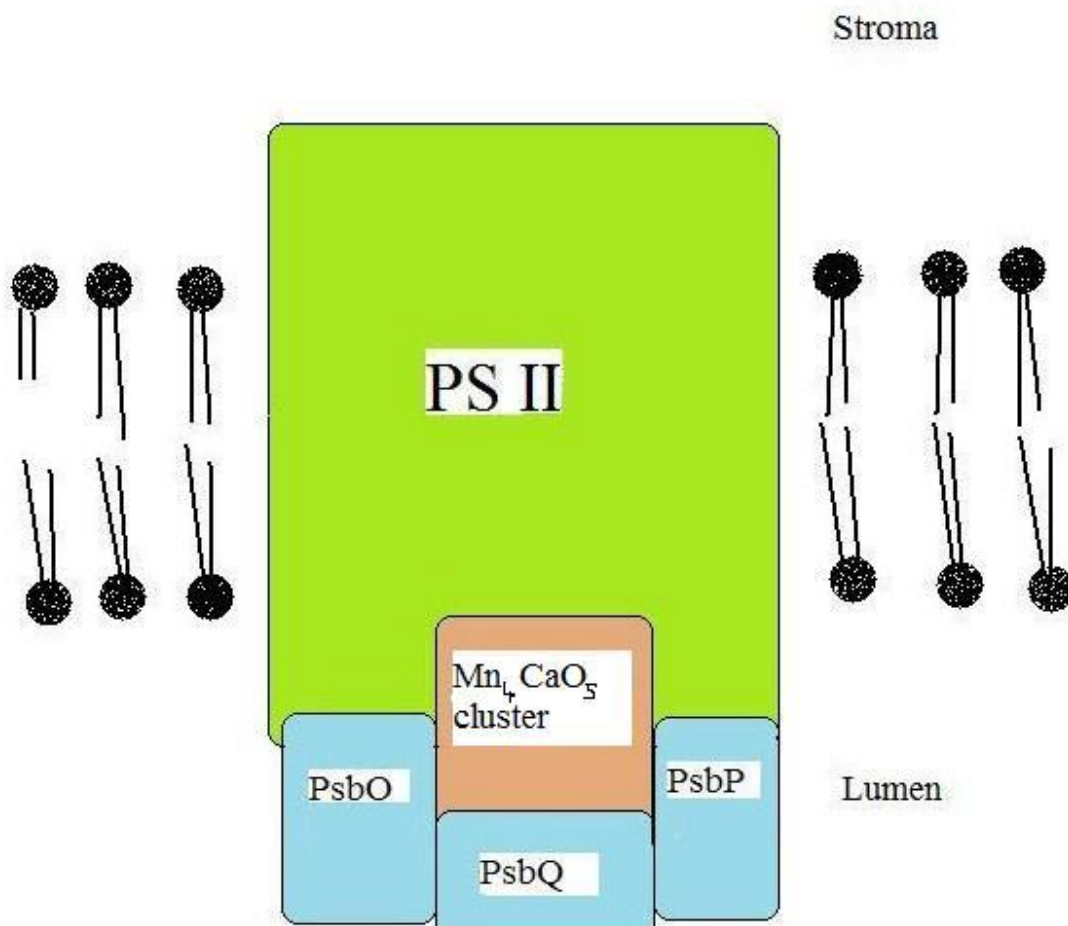
Obrázek 1 Průběh fotosyntetických reakcí (převzato z www.mojchemie.cz/biochemie)

2.1.1.2 Proteiny OEC

Kyslík vyvíjející komplex (oxygen-evolving complex – OEC) je součástí fotosystému II (PS II) a nachází se na lumenální straně membrány tylakoidu. Ve vyšších rostlinách je tvořen proteiny PsbQ, PsbP a PsbO a u sinic je tvořen proteiny PsbU, PsbV a PsbO. Jejich vzájemné uspořádání je předmětem výzkumu. V těchto proteinech se odehrává fotolýza vody a mají tedy podíl na vzniku kyslíku v průběhu fotosyntézy. Funkce těchto proteinů je umožněna přítomností anorganických kofaktorů (ionty vápníku, chloru a manganový klastr Mn_4). Protein PsbO je také nazýván Mn-stabilizační protein. Důvodem je vazba stabilizačního manganového klastru, a to při vystavení nízkým koncentracím chloru nebo exogenním redukčním činidlům. Proteiny PsbP a PsbQ modulují vápníkové a chloridové požadavky PSII při tvorbě kyslíku (Bricker a kol. 2003). U PsbQ proteinu bylo zjištěno, že zvyšuje afinitu Cl^- k PSII a u PsbP je to zjištěno nejen u iontu Cl^- , ale také u iontů Ca^{2+} (Bondarava a kol. 2005).

Při experimentu s proteiny PsbP a PsbQ izolovaných z vyšší rostliny (tabák, *Nicotiana tabacum*) bylo prokázáno, že chybějící PsbP protein naruší světelnou fázi fotosyntézy a při temnostní fázi došlo dokonce k rozkladu manganového

stabilizačního klastru. V případě chybějícího proteinu PsbQ bylo prokázáno, že rostlina nestrádá, a tudíž protein PsbQ není pro vyšší rostliny nepostradatelný (Ikufu a kol. 2005).



Obrázek 2 Umístění *PsbQ* a *PsbP* v membráně (převzato z www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_11/Page2.html a http://www.frontiersin.org/plant_physiology/10.3389/fpls.2011.00028/pdf/full)

2.1.1.3 Protein PsbQ

Nejasnosti ve funkci proteinu PsbQ vedou k snaze objasnit jeho strukturu a fyziologickou funkci v procesu fotosyntézy. Z tohoto důvodu byl připraven vektor rekombinantního proteinu PsbQ ze špenátu (Balsera a kol. 2005) pro biochemické studie. Tento protein je vhodným modelovým proteinem i pro proteinovou krystalizaci, velice dobře se skládá už při teplotách okolo -20°C , je rozpustný ve vodě a je termostabilní.

2.1.1.4. Struktura PsbQ

Jedná se o vnější protein z fotosystému II (PSII). Obsahuje 149 aminokyselin a jeho velikost je 17 kDa. Protein PsbQ se nachází v blízkosti proteinu PsbO a v blízkosti manganového klastru v OEC. U tohoto proteinu se předpokládá, že je součástí fotolýzy vody. Tento protein se nenachází u sinic (Ristvejová a kol. 2006).

Dle již zjištěné struktury proteinu za pomoci modelů, spektroskopie a jiných biofyzikálních metod víme, že protein PsbQ je složen převážně z α -šroubovic. Protein se skládá ze 4 α -šroubovic a paralelního β -listu, kotvící smyčkou nedaleko N-konce. Strukturní data z rentgenové difrakce jsou přístupná z proteinové databanky s kódovým označením „1VYK“.

2.1.1.5. Protein PsbP

Tento protein obsahuje 186 aminokyselin, jeho odhadovaná velikost je 23 kDa. Byl popsán ve vyšších rostlinách, ale v řasách se nenachází. Také se podílí na optimalizaci koncentrace iontu Ca^{2+} a Cl^- v PSII. Vyskytuje se v blízkosti proteinu PsbO a PsbQ (Barber 2003). Pro analýzy byl připraven vektor rekombinantního proteinu PsbP (Kouhoutová a kol. 2009), který je v porovnání s rekombinantním proteinem PsbQ značně nestabilní.

2.1.1.6. Struktura PsbP

Sekundární struktura tohoto proteinu byla získána pomocí FTIR spektroskopie v roztoku při různých fyziologických teplotách a PHS s minimálním vzorkem přípravku, který není k dispozici pro jiné techniky, jako je rentgenostrukturní analýza či nukleární magnetická rezonance.

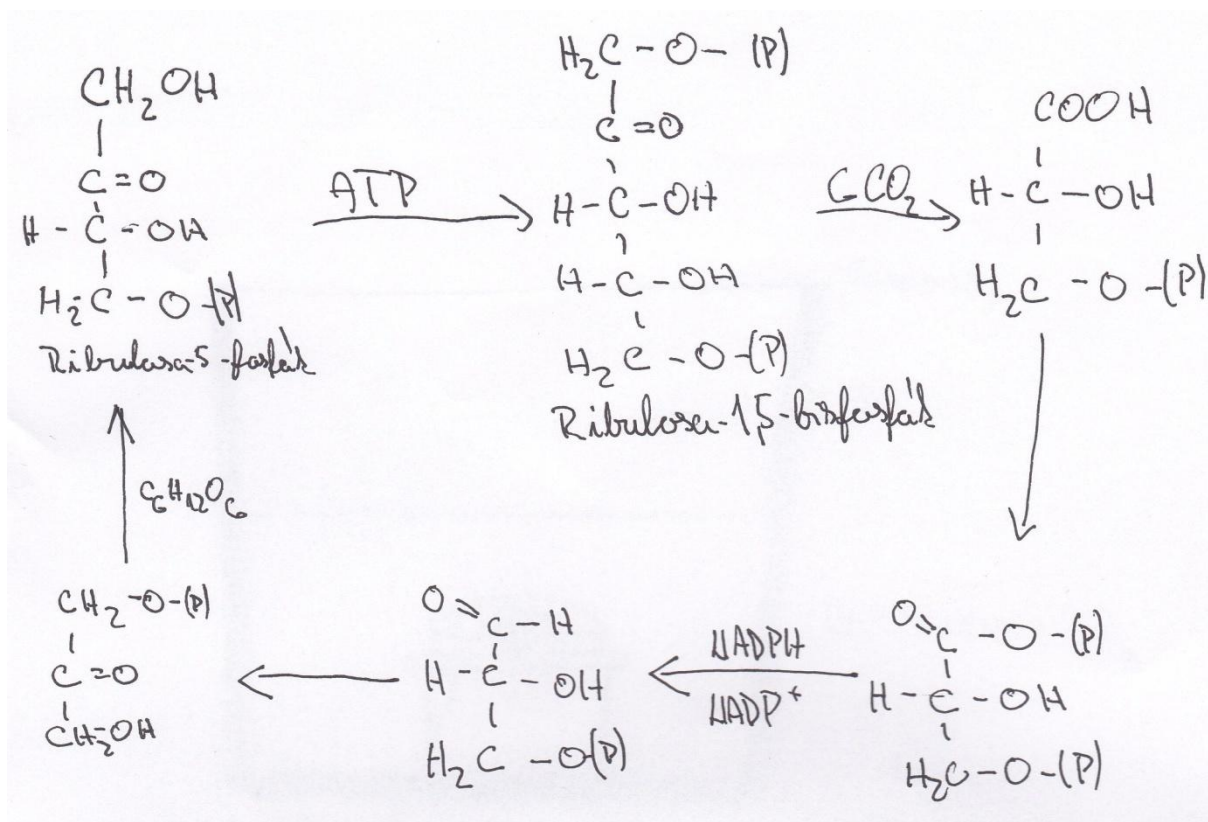
Poměrně překvapivým faktem je zjištění, že PsbP obsahuje neobvykle velké množství rozšířených β -listů (37%) a pouze 5% je α -helikální. Uvedená struktura se proto výrazně odlišuje od sekundární struktury reakčního centra PSII, které má vysoký obsah α -šroubovic (40 – 62%, stanoveno opět metodou FTIR spektroskopie).

Struktura PsbP proteinu izolovaného z vyšší rostliny tabáku byla detailně objasněna metodou rentgenové difrakce s rozlišením 1.68 Å (Ifuku a kol. 2004) a ze špenátu s rozlišením 1,98 Å (Kohoutová a kol. 2009).

Ve strukturních studiích proteinu PsbP (Ifuku a kol 2005) a předchozích biochemických pracích (Ifuku a kol 2004) bylo potvrzeno, že flexibilní část proteinu PsbP, která nemůže být viděna na 3D modelu, je nezbytná pro udržení iontů Ca^{2+} a Cl^- v PSII.

2.1.2 Sekundární fáze fotosyntézy

Sekundární fáze fotosyntézy, tzv. temnostní fáze, může probíhat i bez přístupu slunečního záření. Dochází k postupné redukci CO_2 na monosacharid, kterým je D-glukosa, a to za využití redukovaných koenzymů a ATP. Tato fáze může probíhat třemi různými cykly. Nejběžnějším je Calvinův cyklus, ve kterém dochází k přeměně CO_2 za pomoci nejrozšířenějšího proteinu rubisca, kde vzniká glukosa-6-fosfát. Rostliny, které využívají tento cyklus, se nazývají rostliny C3.



Obrázek 3 Schéma sekundární fáze fotosyntézy (převzato z www.e-chembook.eu.cz, Jan Břížďala UK Praha)

2.2. Krystalizace proteinů

Krystalizace proteinů nám pomáhá objasnit strukturu proteinů a následovně jejich fyziologickou funkci a biologický význam. Veškeré tyto poznatky lze využít v průmyslu, biochemii, lékařství, farmakologii či v ochraně životního prostředí nebo vodních zdrojů (Řezáčová 2003).

Podstata proteinové krystalizace spočívá v hledání podmínek a v jejich optimalizaci s cílem připravit krystaly studované látky, které jsou následně analyzovány pomocí rentgenového záření. Získaná difrakční data jsou použita k určení molekulární 3D struktury proteinu a ke zjištění a popisu jeho fyziologické funkce.

Podstatou krystalizace je přivést roztok daného proteinu za určitých podmínek (teplota, pH, koncentrace proteinu) do stavu přesycení, kdy může dojít ke tvorbě krystalů (Kutá Smatanová 2006).

Růst krystalu ovlivňuje rozpustnost dané látky a způsob. Růst krystalu znamená fázovou přeměnu kapaliny (protein v roztoku) na skupenství pevné (krystalický protein). Jednou z nezbytných podmínek nukleace je dostatečné přesycení roztoku, jehož výsledkem je sraženina (precipitace) nebo stabilní krystal.

Celková krystalizace proteinů se skládá ze tří částí (Obrázek č. 4). První fází je nukleace, při které dochází ke vzájemnému kontaktu vhodně orientovaných molekul resp. iontů a po překročení limitu nasycení se začínají tvořit stabilní agregáty, submikroskopické krystalické zárodky (Kutá Smatanová 2006).

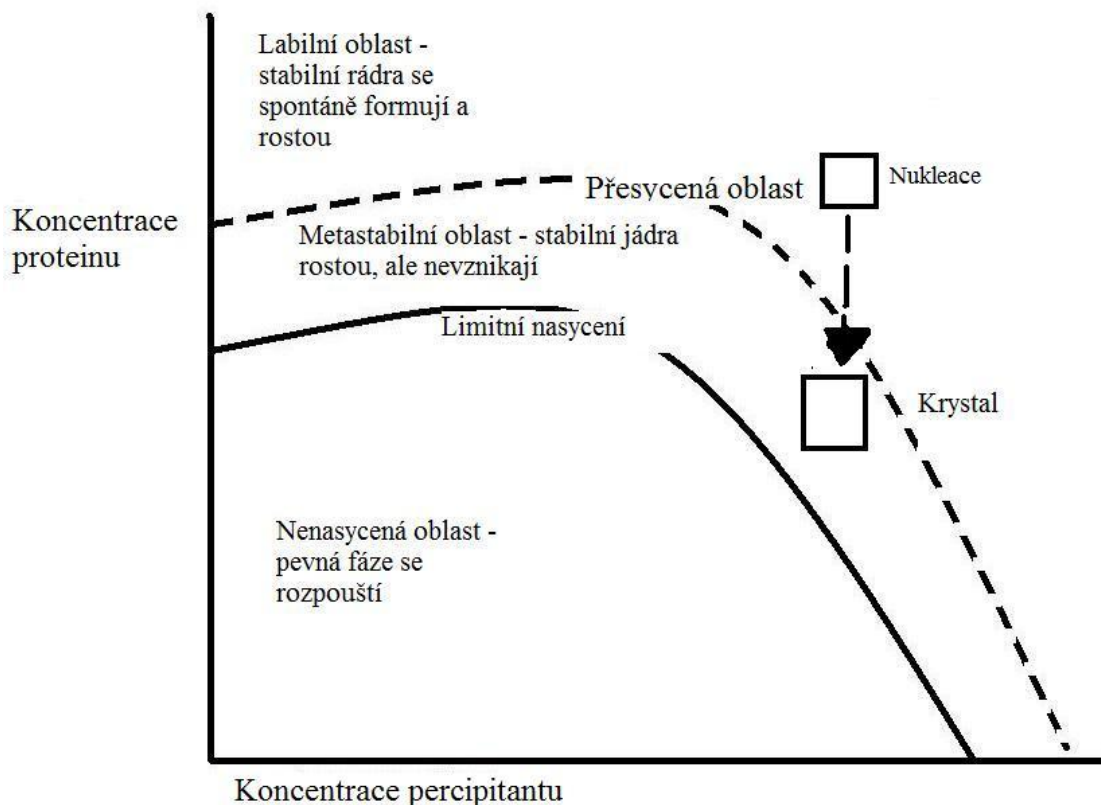
Další fází krystalizace je růst krystalu. Tato fáze je také nazývána termínem dynamický proces. Dochází zde k interakci vhodně orientovaných iontů a molekul, které následovně reagují s povrchem zárodku, a to způsobem, že se usidlují dané molekuly a ionty na povrchu zárodku. Rychlost růstu krystalu je ovlivněna difúzním a depozičním stupněm. Difúzní stupeň je rychlost zabudování molekul a iontů na povrch zárodku a depoziční stupeň je rychlost přenosu molekul z objemu roztoku do místa krystalizace. V případě nízkého depozičního stupně je krystalizace inhibována a růst zpomalen, ale pokud je depoziční stupeň vysoký, tak dochází k vzniku množství malých rychle narostlých krystalů s velkým množstvím defektů. Ideální

krystaly vznikají z malého množství zárodků při pozvolném růstu, tím je i omezeno množství defektů a krystaly jsou vhodné pro difrakční experiment (Kutá Smatanová 2006).

Růst krystalů je dále ovlivněn fyzikálně-chemickými podmínkami. Obecně známá je například závislost na teplotě, kdy platí čím nižší teplota tím lepší růst krystalů. Nižší teplota snižuje transfer molekul a zvyšuje růstový stupeň. Působením vhodných intermolekulárních interakcí dochází ke snížení rychlosti přenosu molekul. Následkem zpomalení přenosu molekul je tvorba a kvalitnější růst krystalů.

Finální fází je ukončení růstu krystalů. Malé krystaly mohou růst pomalu a následně zvětšovat své rozměry, tyto jsou pak vhodné pro rentgenovou strukturní analýzu. Také může docházet k růstu velkého množství mikrokystalů nebo naopak tvorbě velkých krystalických agregátů. Tyto agregáty se nazývají například dendrity (vypadají jako sněhová vločka) nebo sferulity (tenké jehlice). Dále také mohou vznikat hydrofobní olejovité agregáty. Přítomnost daných agregátů naznačuje, že malou modifikací podmínek může dojít ke vzniku krystalů. V opačném případě může dojít k tvorbě amorfních gelů či pudrů nebo nedochází k žádné změně a roztok zůstává čirý (Kutá Smatanová 2006).

Na základě uvedených skutečností je možné konstatovat, že získání vhodného monokrystalu pro difrakční experimenty je často časově náročné z důvodu mnohdy enormního počtu podmínek, které ovlivňují krystalizaci, a z důvodu nemožnosti proces krystalizace predikovat nebo jej simulovat. Pro hledání vhodných krystalizačních podmínek je proto nezbytné počítat řádově s několika týdny až několika roky.



Obrázek 4 Fázový diagram popisující krystalizaci proteinů (převzato z A. McPherson, 1999).

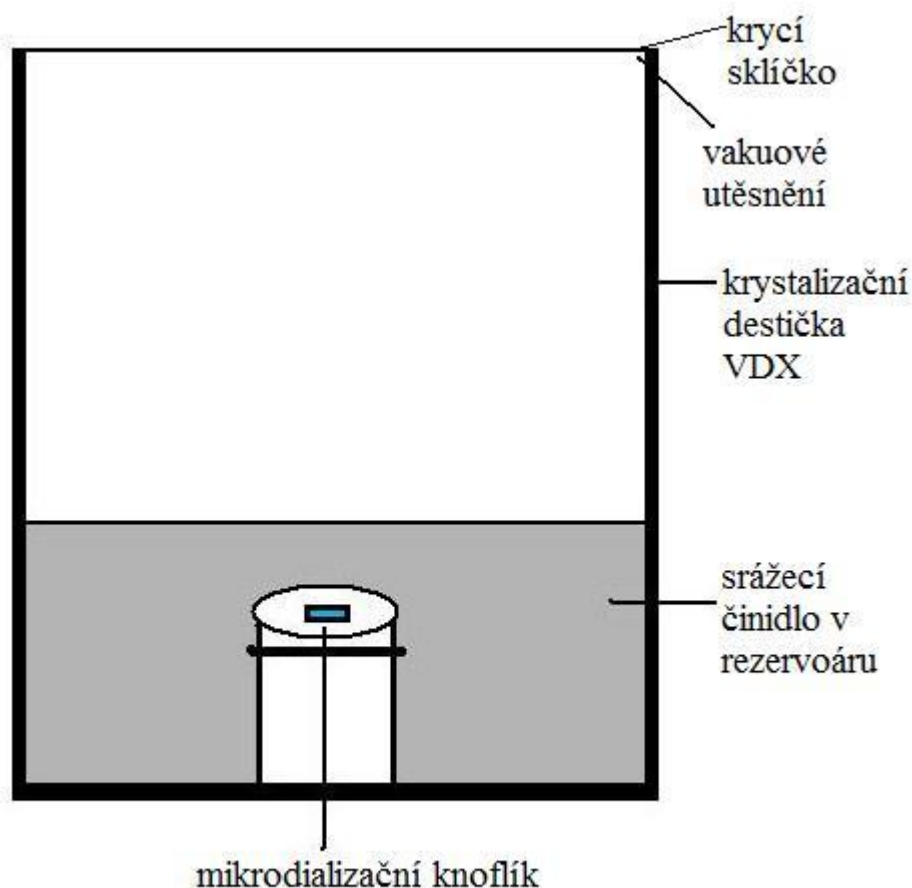
2.2.1. Krystalizační techniky

Mezi nejčastěji používané krystalizační techniky v dnešní době patří dialýza a krystalizace založená na difúzi par. Tyto dvě metody nám pomáhají produkovat krystaly proteinů vhodné k rentgenovému měření. Podstata obou technik spočívá v kombinaci difúze par s použitím daných precipitátů (srážecích roztoků), kdy je proteinový roztok přiveden do bodu nasycení regulovaným způsobem. (Kutá Smatanová 2006)

2.2.1.1 Metoda založená na dialýze

Tato metoda je založená na difúzi malých molekul a iontů přes póry polopropustné membrány, která odděluje roztok proteinu od roztoku vnějšího, který obsahuje srážecí roztok. Průchod malých molekul a iontů přes polopropustnou membránu způsobuje vytvoření koncentračního gradientu. Vytvoření tohoto gradientu se nazývá tzv. oblast lokálního přesycení ve vnitřním roztoku. Proteinový

roztok zůstává ve vnitřním roztoku a postupně dochází k jeho nasycování. To způsobuje tvorbu krystalických zárodků, ty dále rostou a dochází k tvorbě požadovaných krystalů (obrázek č. 4). Rychlost dosaženého přesycení závisí na použití dané membrány, na koncentračním gradientu mezi vnitřním a vnějším roztokem a také na teplotě. (Kutá Smatanová 2006)



Obrázek 5 Dialýza v dialyzačním knoflíku (převzato z Hampton Research:

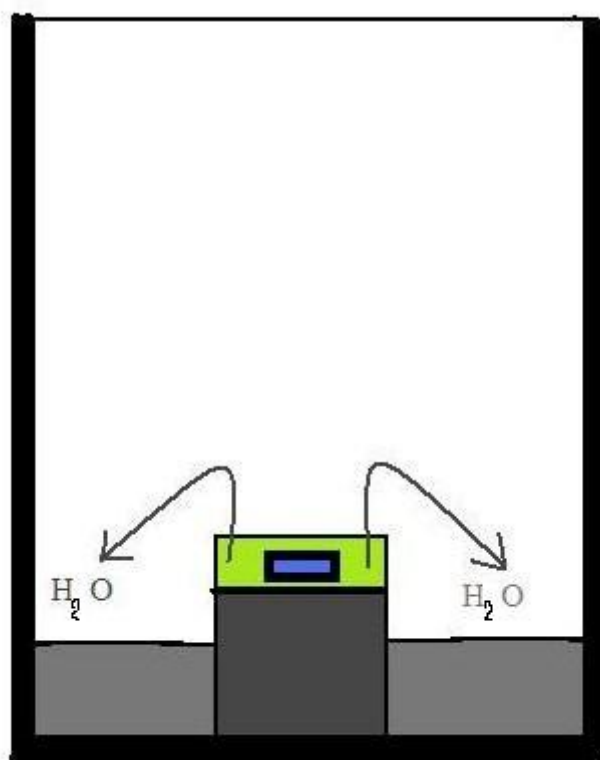
Crystallization: Research Tools, Vol. 11, No. 1 (2001) 152-165)

2.2.1.2. Metoda založena na difúzi par

Při těchto metodách se dosahuje přesycení proteinového roztoku pomalým odpařováním rozpouštědla. Jelikož stav, při kterém za daných podmínek dochází k vylučování krystalů z rozpouštědla, je závislý na dosažení minimální povrchové energie pro daný krystal, je vhodnější využití co nejmenších kapek. Molekuly uvnitř

kapky mají jinou energii než molekuly uložené na povrchu dané kapky. Za daných podmínek může mít pevná fáze sklon k vyloučení v kapce a vznikne krystal. Metody, při kterých se dosahuje přesycení v mikrokapkách, jsou založeny na difúzi par. Uvedená technika je založena na transportu rozpouštědla mezi kapkou s proteinem, pufrem, srážecím činidlem a s aditivem (2-25 μ l) a velký objem srážecího činidla v rezervoáru (0,75 – 25ml) se stejným složením kromě roztoku proteinu. V důsledku rozdílné koncentrace roztoku a těkavosti látek (zejména vody) dochází k postupnému vyrovnání koncentrací a následovnému ustálení rovnováhy. K uvedenému jevu dochází vypařováním vody z kapky do rezervoáru. Migrace molekul je velmi ovlivněna koncentrací a rozpustností proteinu, koncentrací srážecího činidla a dalšími faktory.

Krystalizaci založenou na difúzi par je možné provádět například v kapce visící ("hanging drops"), sedící ("sitting drops") nebo sendvičové ("sandwich drops") (Kutá Smatanová 2006).



Obrázek 6 Krystalizace v sedící kapce (převzato z www.xray.cz)

I když metoda sedící kapky patří k nejjednodušším metodám, dojít k výsledkům je častokrát zdlouhavá cesta. Z těchto důvodů jsou využívány komerčně vyráběné sady srážecích roztoků, které umožňují rychlé poskytnutí hmatatelných důkazů použitelných pro další krystalizaci. Také odstraňují časově náročnou přípravu daných činidel. Tato metoda slouží jak ke zjištění krystalizačních podmínek, tak i k pěstování krystalů a jejich použití pro difrakční měření.

2.2.2. Faktory ovlivňující krystalizaci

Mezi tyto faktory, které dokáží znatelně ovlivnit výsledek krystalizačního pokusu, zejména patří několik základních podmínek. Nejdůležitějším faktorem je čistota proteinu, která zajišťuje i kvalitní výsledky. Krystalizaci může dále ovlivnit teplota, při které byl protein skladován či teplota, při které byla krystalizace prováděna. Velký vliv má také srážecí činidlo a jeho pH a také koncentrace.

2.3. Zpracování difrakčních dat

Rentgenová difrakce (rentgenostrukturní analýza) je v současnosti hlavní přímou metodou pro studium prostorové struktury látek v pevném stavu ve formě monokrystalů. Při rentgenové difrakci se používá rentgenové záření jako elektromagnetické vlnění s vlnovou délkou 10 až 0,01 nm. Monochromatizované rentgenové záření podléhá při dopadu na krystal absorpci (což je nežádoucí pro krystalografii) a také difrakci (ohybu paprsku) na elektronech hmotných atomů. Při difrakci rentgenového záření dochází k interferenci rentgenových vln po ohybu rentgenového záření na elektronech difraktujícího atomu. Difrakční záznam (difraktogram) znázorňuje závislost intenzit difraktovaného záření na orientaci vzorku (monokrystalu). Nasnímaný difrakční obraz však nepřipomíná chemickou strukturu molekul v monokrystalu, tuto je možné získat teprve po matematickém zpracování poloh a intenzit naměřených difrakcí. Pro zpracování difrakčních dat se používá například program MOSFLM, který je součástí programového balíčku CCP4 nebo je poskytován samostatně. Výstupem z tohoto programu je model elektronové hustoty zkoumané molekuly ve formátu MTZ (Řezáčová 2003).

2.4. WinCoot

Slouží pro vizualizaci elektronových hustot získaných z difrakční analýzy a modelů makromolekul, jakými jsou například proteiny či nukleové kyseliny. Mimo uvedené funkce Wincoot obsahuje vlastní nástroje pro validaci modelu makromolekuly. Vstupními daty programu je mapa elektronových hustot ve formátu *mtz* a struktura molekuly ve formátu *pdb*.

2.5. VMD

Tento program slouží k vizualizaci, analýze a modelování biomakromolekulárních látek, jakými jsou proteiny, nukleové kyseliny, lipidy apod. VMD nabízí širokou škálu metod pro zobrazování molekul a podporuje více než 60 molekulárních formátů a datových typů. Pomocí VMD lze přehrát a analyzovat dráhu molekulární simulace dynamiky (MD) a interaktivně ovládat molekuly, jež jsou simulovány na vzdálených počítačích. Výstupem tohoto programu je například 3D model proteinu, který nám dokonale zobrazuje vazby v daném proteinu a znázorňuje sekundární strukturní prvky proteinu, α -šroubovice a β -skládané listy.

3. Materiál a metodika

3.1. Ústav komplexních systémů

Veškeré prováděné experimenty této bakalářské práce byly prováděny na Fakultě rybářství a ochrany vod v laboratořích Ústavu komplexních systémů v Nových Hradech.

Pro krystalizační experimenty byly použity rekombinantní fotosyntetické proteiny PsbP, PsbQ a modifikace PsbQ-HisPsbQ (His -20 AA).

Analýza rekombinantních proteinů byla provedena metodou SDS – PAGE vertikální elektroforézy. Samotná krystalizace zahrnovala přípravu krystalizačních roztoků, srážecích roztoků a metodou sedící kapky byla provedena krystalizace proteinů. Vzniklé krystaly fotosyntetických proteinů byly podrobeny testům původu, CRUSH test a DYE test.

Poslední fází práce bylo modelování proteinů PsbP, PsbQ a komplexu PSII za pomoci programů WinCoot (Cowtan 2006) a VMD (Emsley a kol. 2009). Z naměřených difrakčních dat a map elektronové hustoty byly vytvořeny 3D modely studovaných proteinů, které byly použity k dalšímu popisu jejich struktury a funkce.

3. 2. SDS – PAGE

Metoda SDS-PAGE (Sodium Dodecyl-Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v SDS a slouží k separaci proteinů dle jejich velikosti (délky peptidového řetězce) a molekulární hmotnosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Využití této metody k izolaci proteinů je nenahraditelné.

3.2.1. Příprava gelů SDS – PAGE

Látky byly smíchány za účelem polymerace v pořadí a množství, které je uvedeno v tabulkách. Množství TEMEDU bylo zdvojnásobeno pro rychlejší ztuhnutí gelu a snížení časové náročnosti.

Gel č. 1 (horní tzv. zaostřovací (5%)), celkové množství 4ml

Destilovaná voda	2,700 ml
30% Akrylamid mix	0,670 ml
1,0M Tris (<i>tris</i> (hydroxymethyl)aminomethan (pH = 6,8))	0,500 ml
10% SDS	0,040 ml
10% Amonium persulfát	0,040 ml
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin)	0,008 ml

Gel č. 2 (spodní tzv. separační (12%)), celkové množství 10 ml

Destilovaná voda	3,300 ml
30% Akrylamid mix	4,000 ml
1,5 M Tris (pH = 8,8)	2,500 ml
10% SDS	0,100 ml
10% amonium persulfát	0,100 ml
TEMED	0,004 ml

Ze zaostřovacího gelu se vyjme hřebínek, který tvoří prostor pro vzorkovací komůrky. Tato metoda umožňuje testovat několik vzorků naráz. Destička je vložena dle návodu výrobce do elektroforetického přístroje, napipetují se dané vzorky a zalije se pufrem o těchto vlastnostech: 25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycinu a 0.1% SDS. Vedle vzorků je napipetován i tzv. proteinový marker s proteiny o známé velikosti, který nám pomáhá při určení velikosti sledovaného proteinu.

Do prvních dvou komůrek byl napipetován protein PsbQ, do komůrky uprostřed byl napipetován marker Unstained Biorad a do dalších dvou krajních komůrek byl napipetován protein PsbP. Oba proteiny byly pipetovány ve dvou poměrech a to 1 : 5 (1 μ l roztoku proteinu a 5 μ l pufru) a 1 : 1 (5 μ l roztoku proteinu a 5 μ l pufru).

Po dolití pufru do maximální hranice uzavření elektroforetického přístroje byla aparatura spuštěna dle uvedených podmínek (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1 Podmínky elektroforézy

Elektrický proud	25 mA
Elektrické napětí	300 V
příkon	150 W
čas	90 min.

Po ukončení průběhu gelové elektroforézy byl gel vyjmut a umístěn na míchající aparaturu do roztoku barvičky Coomasie blue, kterým byl celý gel obarven do modra. Následovně byl gel vyjmut (cca po 30 min.), opláchnut destilovanou vodou a vložen do roztoku 7% kyseliny octové. Došlo k vybarvení pouze námi studovaných proteinů, které barvivo váží, zatímco gel samotný nikoli.

3.3. Příprava srážecích roztoků

Pro proteiny PsbQ a PsbP byly připraveny srážecí roztoky pro vyvolání srážecí reakce s roztokem proteinu.

Byly připraveny zásobní roztoky:

50% PEG 6000 (PolyEthylenGlykol)

50% PEG MME (Polyethylenglykol monomethyl ether)

1M MES [2-(N-Morfolino) etansulfonová kyselina] pH 6.5, 1M bisTRIS pH 6.5, 1M TRIS pH 7.0, 1M TRIS pH 7.5, 1M TRIS pH 8.0

1M octan zinečnatý, 1M chlorid zinečnatý a 0,2M síran zinečnatý

Pro protein HisPsbQ byly nové krystalizační podmínky hledány za pomoci komerčních roztoků distribuovaných firmou Sigma.

3.3.1. Příklad přípravy srážecího roztoku pro PsbQ

Základním krokem při přípravě srážecího roztoku pro protein PsbQ je výpočet molárních hmotností daných činidel.

Bylo vypočítáno, že pro přípravu 100 ml srážecího roztoku s výslednými koncentracemi 25% PEG 6000, 0.1M MES a 0.3 M octanu zinečnatého je třeba navážít 25 g 25 % PEG 6000, dále 1,952 g MES a 6,58g octanu zinečnatého.

Nejprve byl rozpuštěn 0,1 M MES a upraveno pH na 6.5, potom přidán 0,3 M octan zinečnatý a nakonec byl rozpuštěn PEG 6000, a to za stálého míchání pomocí magnetické míchačky.

Množství vypočítané pro 1 M chlorid zinečnatý je 1,363g a pro 0,2 M síran zinečnatý je 2,875 g. Tyto roztoky solí byly využity jako zásobní roztoky pro přípravu roztoků o koncentracích 5mM, 20mM, 100mM a 300mM.

3.4. Metoda sedící kapky

Při této metodě byly použity krystalizační destičky CrysChem plate (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA), které mají rezervoár a uprostřed něho stojánek, na který se umísťuje roztok proteinu v určitém poměru (viz. Tabulky č. 2-10). Tyto krystalizační podmínky byly aplikovány na stejný typ destiček jako pro chlorid zinečnatý.

Tabulka 2 Podmínky pro krystalizaci PsbQ, při použití soli ZnCl₂ jako aditiva, zobrazeno pipetované množství látek a různé pH

PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 20mM ZnCl ₂	15%	20%	25%	30%
PEG 6k 50% (μl)	300	400	500	600
1 M Tris pH=8 (μl)	100	100	100	100
100mM ZnCl ₂ (μl)	200	200	200	200
Dest. H ₂ O (μl)	400	300	200	100

PEG 6k, 0.1M TRIS, pH 7.50 20mM ZnCl ₂	15%	20%	25%	30%
PEG 6k 50% (μ l)	300	400	500	600
1 M Tris pH=7,5 (μ l)	100	100	100	100
100mM ZnCl ₂ (μ l)	200	200	200	200
Dest. H ₂ O (μ l)	400	300	200	100

PEG 6k, 0.1M TRIS, pH 7.00 20mM ZnCl ₂	15%	20%	25%	30%
PEG 6k 50% (μ l)	300	400	500	600
1 M Tris pH=7 (μ l)	100	100	100	100
100mM ZnCl ₂ (μ l)	200	200	200	200
Dest. H ₂ O (μ l)	400	300	200	100

PEG 6k, 0.1M BisTris, pH 6.50 20mM ZnCl ₂	15%	20%	25%	30%
PEG 6k 50% (μ l)	300	400	500	600
1 M BisTris pH=6,5 (μ l)	100	100	100	100
100mM ZnCl ₂ (μ l)	200	200	200	200
Dest. H ₂ O (μ l)	400	300	200	100

Tyto krystalizační podmínky byly použity při metodě sedící kapky, kdy veškeré chemikálie byly pipetovány do zásobníku v krystalizační destičce, následovně byl protein pipetován do středu stojánku (sedící kapka) a v daném poměru přidáno odpovídající množství roztoku ze zásobníku (Obrázek č. 7).



Obrázek 7 Krystalizace metodou sedící kapky (foto autor)

Tabulka 3 Krystalizační podmínky proteinu PsbQ při použití aditiva octanu zinečnatého

PEG 6k 15%	PEG 6k 20%	PEG 6k 25%	PEG 6k 30%
PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM octan zinečnatý
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM octan zinečnatý
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM octan zinečnatý
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM octan zinečnatý

Tabulka 4 Krystalizační podmínky proteinu PsbQ za použití přípravku síranu zinečnatého

PEG 6k 15%	PEG 6k 20%	PEG 6k 25%	PEG 6k 30%
PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60 mM ZnSO ₄
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM ZnSO ₄
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM ZnSO ₄

Tabulka 5 Podmínky pro krystalizaci HisPsbQ, kdy byl použit ZnCl₂ a různého pH.

PEG 6k 15%	PEG 6k 20%	PEG 6k 25%	PEG 6k 30%
PEG 6k 0.1M BisTris , pH 6.50 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M BisTris, pH 6.50 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M BisTris, pH 6.50 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M BisTris, pH 6.50 20mM ZnCl ₂
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 20mM ZnCl ₂
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 20mM ZnCl ₂	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 20mM ZnCl ₂

Tabulka 6 Krystalizační podmínky proteinu HisPsbQ, kdy byl použit octan zinečnatý

PEG 6k 15%	PEG 6k 20%	PEG 6k 25%	PEG 6k 30%
PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM octan zinečnatý
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM octan zinečnatý
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM octan zinečnatý
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM octan zinečnatý	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM octan zinečnatý

Tabulka 7 Krystalizační podmínky proteinu HisPsbQ kdy byl testován efekt síranu zinečnatého

PEG 6k 15%	PEG 6k 20%	PEG 6k 25%	PEG 6k 30%
PEG 6k 0.1M MES , pH 6.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M MES, pH 6.50 60 mM ZnSO ₄
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.0 60mM ZnSO ₄
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 7.50 60mM ZnSO ₄
PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM ZnSO ₄	PEG 6k 0.1M TRIS, pH 8.00 60mM ZnSO ₄

Tabulka 8 Krystalizační podmínky proteinu PsbP za použití ZnCl₂

PEG 550 MME 25%	PEG 550 MME 25%
PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.0 5 mM ZnCl ₂	PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.5 5 mM ZnCl ₂
PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.0 20 mM ZnCl ₂	PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.5 20 mM ZnCl ₂
PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.0 100 mM ZnCl ₂	PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.5 100 mM ZnCl ₂
PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.0 300 mM ZnCl ₂	PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.5 300 ZnCl ₂

Tabulka 9 Krystalizační podmínky proteinu PsbP za použití ZnSO₄

PEG 550 MME 25%	PEG 550 MME 25%
PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.0 5 mM ZnSO ₄	PEG 550 0,1M TRIS, pH 7.5 5 mM ZnSO ₄
PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.0 20 mM ZnSO ₄	PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.5 20 mM ZnSO ₄
PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.0 100 mM ZnSO ₄	PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.5 100 mM ZnSO ₄
PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.0 300 mM ZnSO ₄	PEG 550 MME 0,1M TRIS, pH 7.5 300 ZnSO ₄

Tabulka 10 Krystalizační podmínky proteinu PsbP kdy bylo využito octanu zinečnatého

PEG MME 25%	PEG MME 25%
PEG MME 0,1M TRIS, pH 7.0 5 mM Octan zinečnatý	PEG MME 0,1M TRIS, pH 7.5 5 mM Octan zinečnatý
PEG MME 0,1M TRIS, pH 7.0 20 mM Octan zinečnatý	PEG MME 0,1M TRIS, pH 7.5 20 mM Octan zinečnatý
PEG MME 0,1M TRIS, pH 7.0 100 mM Octan zinečnatý	PEG MME 0,1M TRIS, pH 7.5 100 mM Octan zinečnatý
PEG MME 0,1M TRIS, pH 7.0 300 mM Octan zinečnatý	PEG MME 0,1M TRIS, pH 7.5 300 mM Octan zinečnatý

Tyto krystalizační podmínky byly aplikovány na stejný typ destiček jako pro předchozí protein PsbQ a protein HisPsbQ.

3.5. Testování krystalů

Testování krystalů probíhá z důvodu nutnosti zjistit proteinový charakter krystalů.

3.5.1. CRUSH test

Crush test je založen na mechanickém rozbíjení krystalů proteinů či solí při pozorování pod mikroskopem. Krystal proteinu snadno podléhá mechanickému působení a rozpadá se, zatímco krystal anorganické soli mechanickému poškození odolává a nedochází k jejímu rozpadu.

3.5.2. DYE test

Tento test je založen na principu difúze barviva krystalem proteinu. Využívá se barvivo IzIt (Hamptorn Research), které obarví krystaly proteinu do modra. Test funguje na základě průniku barviva do vodných kanálů proteinového krystalu. Výsledkem je buď obarvený krystal proteinu, nebo neobarvený krystal jiné různorodé látky, nejspíš soli.

3.6. Modelování proteinů

Z internetových stránek University v Leicestru <http://www2.le.ac.uk>, byla stažena a nainstalována volně dostupná verze programu WinCoot, a softwarový nástroj VMD pro vizualizace strukturních dat a molekulárně dynamické simulace.

3.6.1. PsbQ

Tento protein byl získán z volně dostupné proteinové databanky (www.pdb.org) s kódovým označením 1VYK a zpracován v programu VMD do výsledného 3D modelu.

3.6.2. PsbP

Tento protein byl získán z volně dostupné proteinové databanky (www.pdb.org), s kódovým označením 1V2B a zpracován v programu VMD do výsledného 3D modelu.

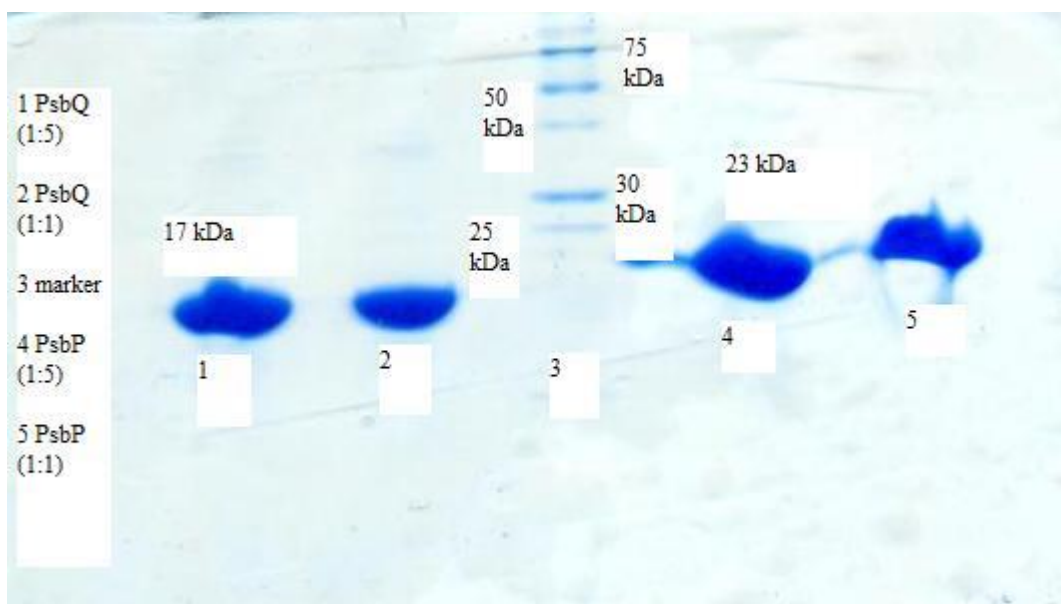
3.6.3 PSII

Molekulární struktura proteinového komplexu Fotosystému II (PSII) z vyšších rostlin se doposud nedaří experimentálně určit v kvalitním rozlišení, a proto byla využita data fotosystému II ze sinic. Tento protein byl získán z proteinové databanky (www.pdb.org) s kódovým označením 3BZ1 a 3BZ2 a byl zpracován v programu VMD do výsledného 3D modelu.

4. Výsledky

4.1. Gelová elektroforéza

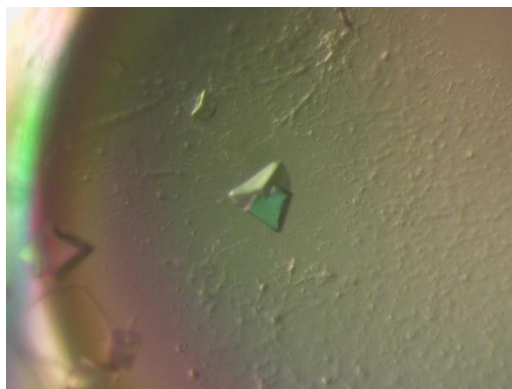
Na základě získání barevných proužků na gelu a jejich porovnání s markerem o známé velikosti bylo zjištěno, že proteiny neobsahují žádné příměsi a jsou vhodné pro další použití při krystalizaci. Je zřejmé, že protein PsbQ má hmotnost 17 kDa a protein PsbP 23 kDa (Obrázek č. 8).



Obrázek č. 8 Výsledek gelové elektroforézy proteinů PsbQ a PsbP (foto autor)

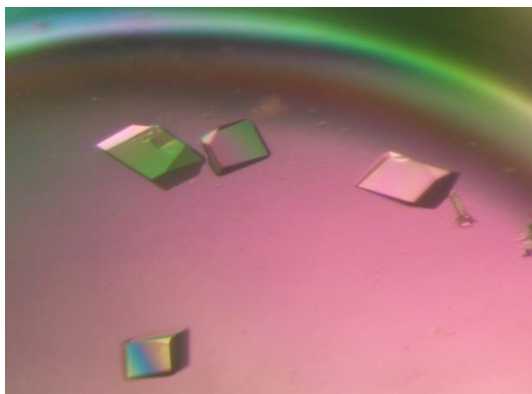
4.2. Výsledky krystalizace proteinu PsbQ

Krystaly proteinu PsbQ byly vypěstovány v sedící kapce z krystalizačních roztoků při pH = 6,5 a 7,5, PEG 30%, 0,1 M ZnCl₂ (Obrázek č. 9).



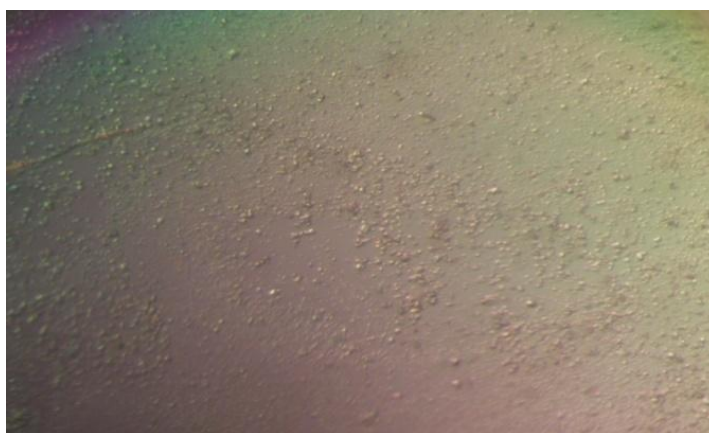
Obrázek č. 9 Krystal proteinu PsbQ, jako aditivum použita sůl chloridu zinečnatého o koncentraci 100 mM (foto autor)

Další krystaly byly vypěstovány při použití soli octanu zinečnatého o koncentraci 0,3 M a pH = 6,5 (Obrázek č. 10).



Obrázek č. 10 Krystal *PsbQ* o velikosti 0,25mm x 0,2mm x 0,2mm, získaný z roztoku obsahujícího 10 mM roztoku octanu zinečnatého (foto autor)

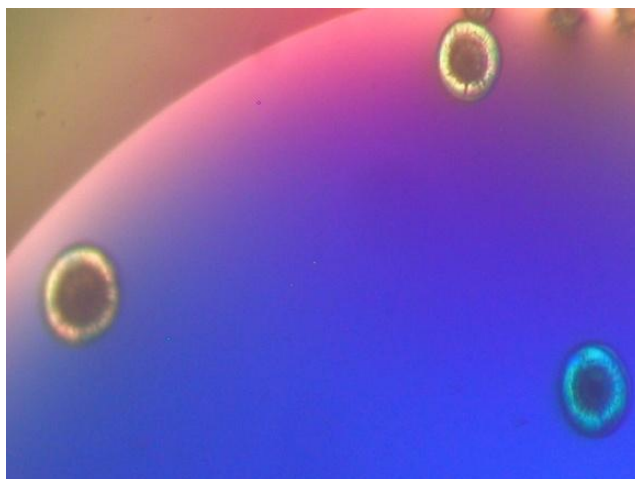
Při přidání síranu zinečnatého do krystalizačního roztoku o koncentraci 20 mM byl pozorován vznik mikrokrytalů (Obrázek č. 11).



Obrázek č. 11 Mikrokrystaly proteinu *PsbQ*, použita sůl síranu zinečnatého o koncentraci 20 mM (foto autor)

4.3. Výsledky krystalizace HisPsbQ

Krystalizace těchto proteinů probíhala za stejných podmínek jako krystalizace proteinu *PsbQ* s použitím komerčních sad krystalizačních roztoků. Rozdíl mezi oběma modifikacemi proteinu je v N-terminální části – HisPsbQ obsahuje 20 aminokyselin navíc (tzv. His kotva), která je flexibilní. Výsledkem krystalizace je pouze krystal neproteinového charakteru (Obrázek č. 12), nové krystalizační podmínky nebyly nalezeny ani pro protein HisPsbQ.



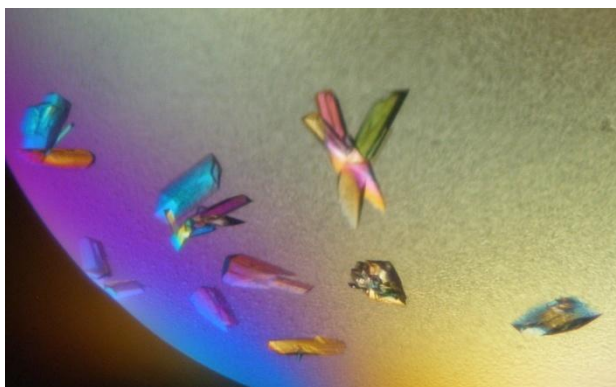
Obrázek č. 12 Krystal neproteinového charakteru při krystalizaci HisPsbQ, (foto autor)

4.4. Výsledek krystalizace PsbP

Výsledkem krystalizace proteinu PsbP byly monokrystaly (Obrázek č. 13 a 14). Tyto krystaly jsou závislé na $\text{pH}=7$. Vznikaly při dodání solí ZnCl_2 (100 mM) a octanu zinečnatého (20 a 100 mM). Po přidavku soli síranu zinečnatého k vykrystalizování nedošlo.



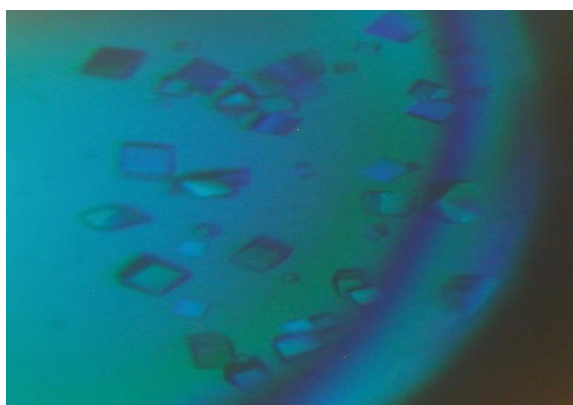
Obrázek č. 13 Krystal PsbP, při použití chloridu zinečnatého o koncentraci 100 mM (foto autor)



Obrázek č. 14 Krystal proteinu PsbP po přidání soli octanu zinečnatého o koncentraci 100 mM (foto autor)

4.5. Testování krystalů DYE test

Testování krystalů proběhlo za pomoci barviva IzIt , které bylo aplikováno 30 minut před pozorováním změn. Krystaly proteinu byly obarveny (Obrázek č. 15), zatímco krystaly soli obarveny nebyly (Obrázek č. 16).



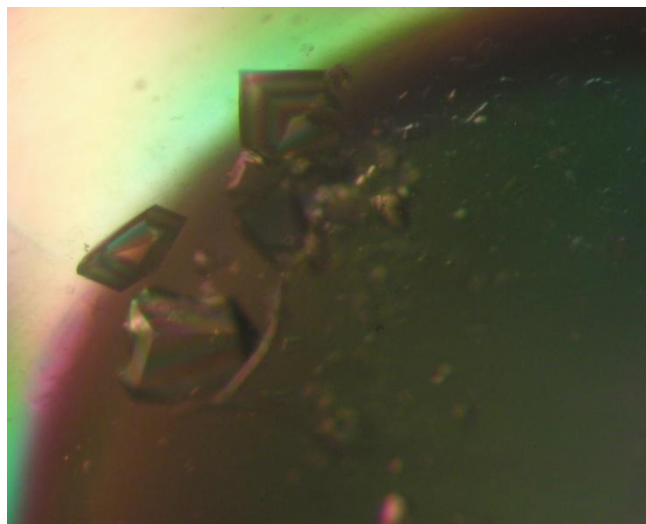
Obrázek č. 15 Obarvené krystaly proteinu PsbQ (foto autor)



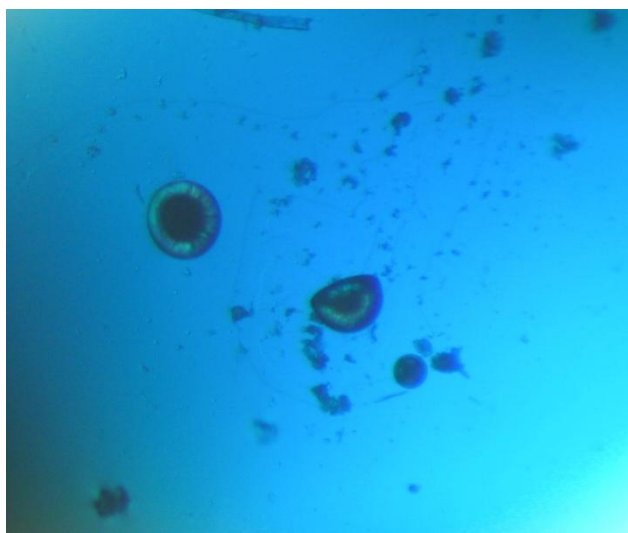
Obrázek č. 16 Neobarvený krystal soli (foto autor)

4.6. Testování krystalů CRUSH testem

Tato metoda je založena na mechanické křehkosti krystalu proteinu, který snadno podléhá mechanickému poškození (Obrázek č. 17). Krystaly ostatních látek jsou proti mechanickému poškození odolnější (Obrázek č. 18)



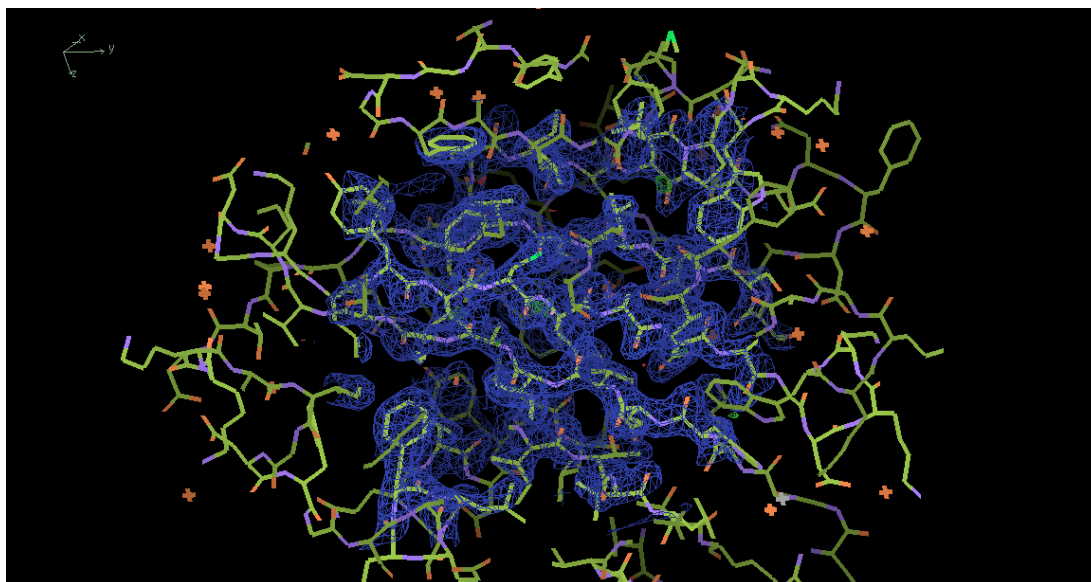
Obrázek č. 17 Krystal proteinu PsbQ po CRUSH testu (foto autor)



Obrázek č. 18 Krystaly soli vzniklé při pokusu o krystalizaci HisPsbQ po CRUSH testu (foto autor)

4.7. Modelování proteinů programem WinCoot

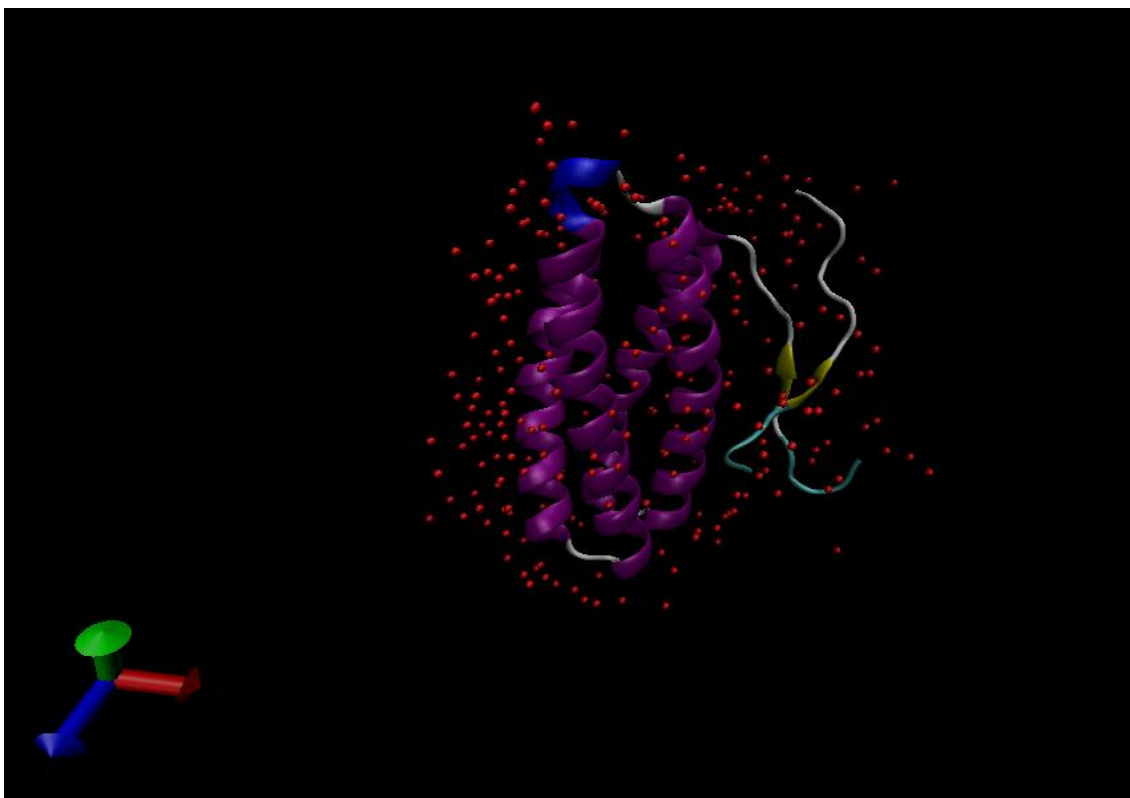
Softwarový nástroj Wincoot umožnil znázornit mapu elektronové hustoty získané z difrakční analýzy. Následně nato byla do elektronové hustoty postupně fitována primární struktura proteinu, a takto byla budována prostorová molekulární struktura studovaných proteinů (Obrázek č. 19).



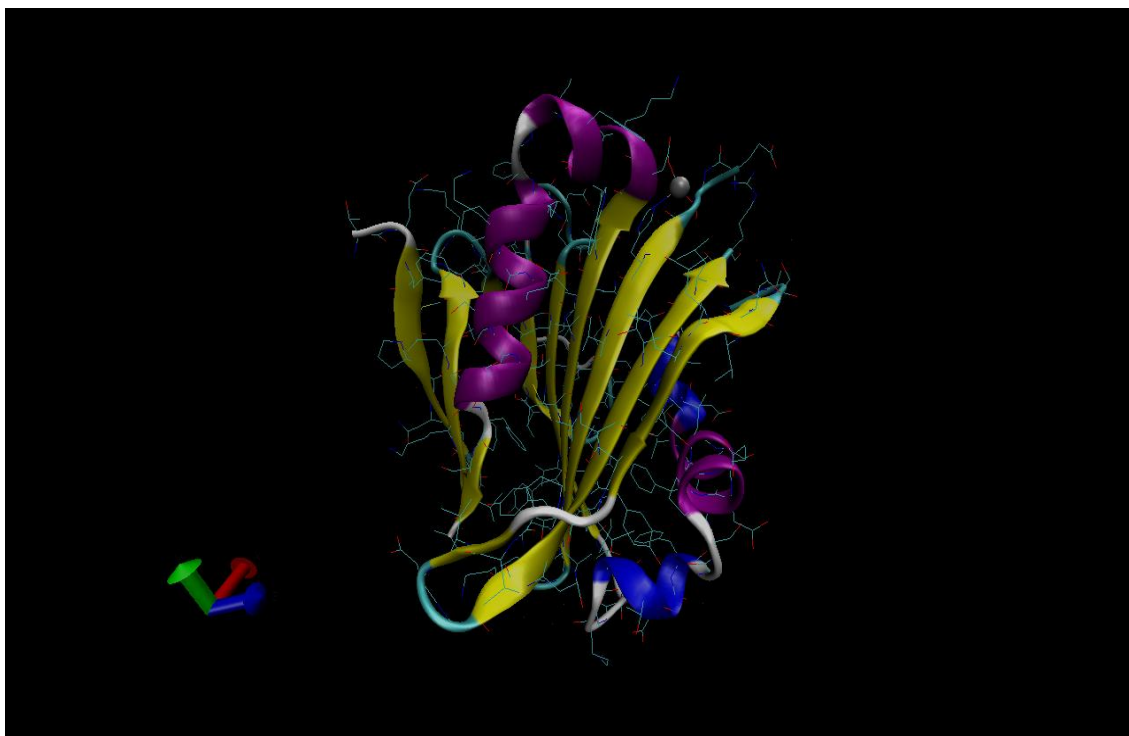
Obrázek č. 19 Elektronová hustota a drátový model molekuly proteinu PsbQ (foto autor)

4.8. Modelování proteinů programem VMD

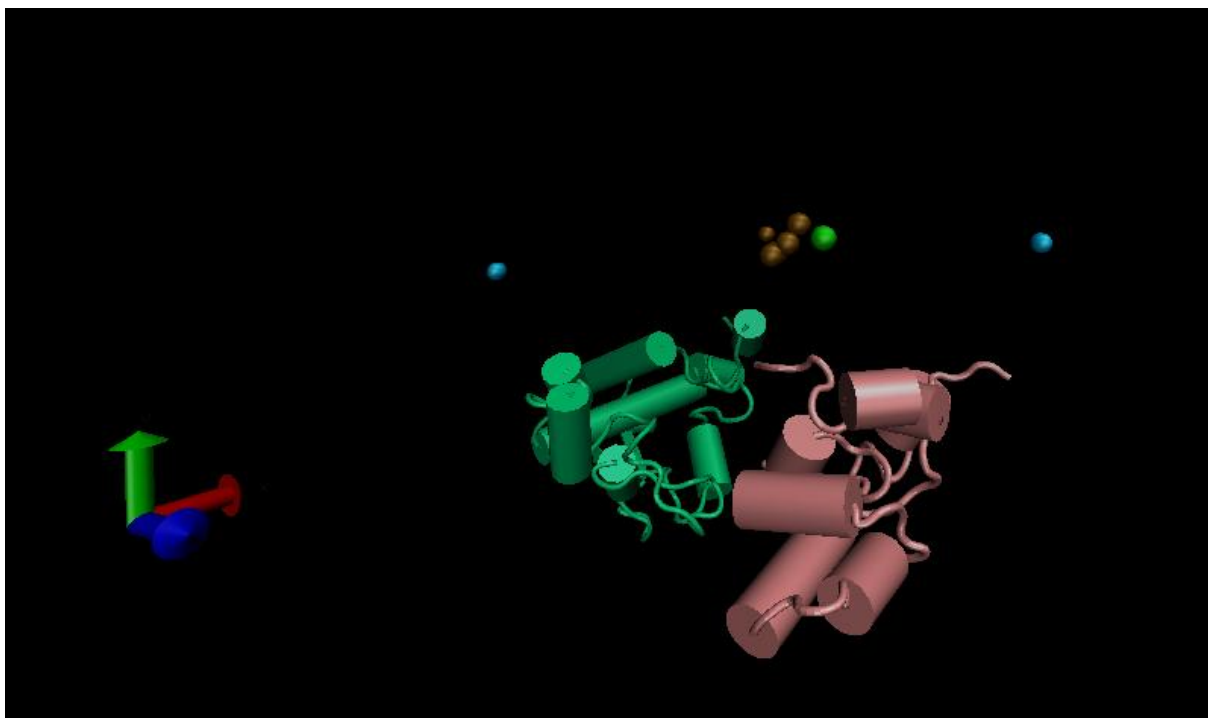
Programem VMD byl připraven prostorový molekulární model proteinu PsbQ (obrázek č. 20), dále model proteinu PsbP (Obrázek č. 21) a model fotosystému II ze sinic a znázornění umístění proteinů PsbQ, PsbP a manganového klastru společně s Ca^{2+} a Cl^- (Obrázek č. 22). Bylo prozkoumáno „srdce fotosyntézy“, reakční centrum PSII s feofytinem a chlorofylem *a* (Obrázek č. 23) a také chlorofyly světlosběrných antén.



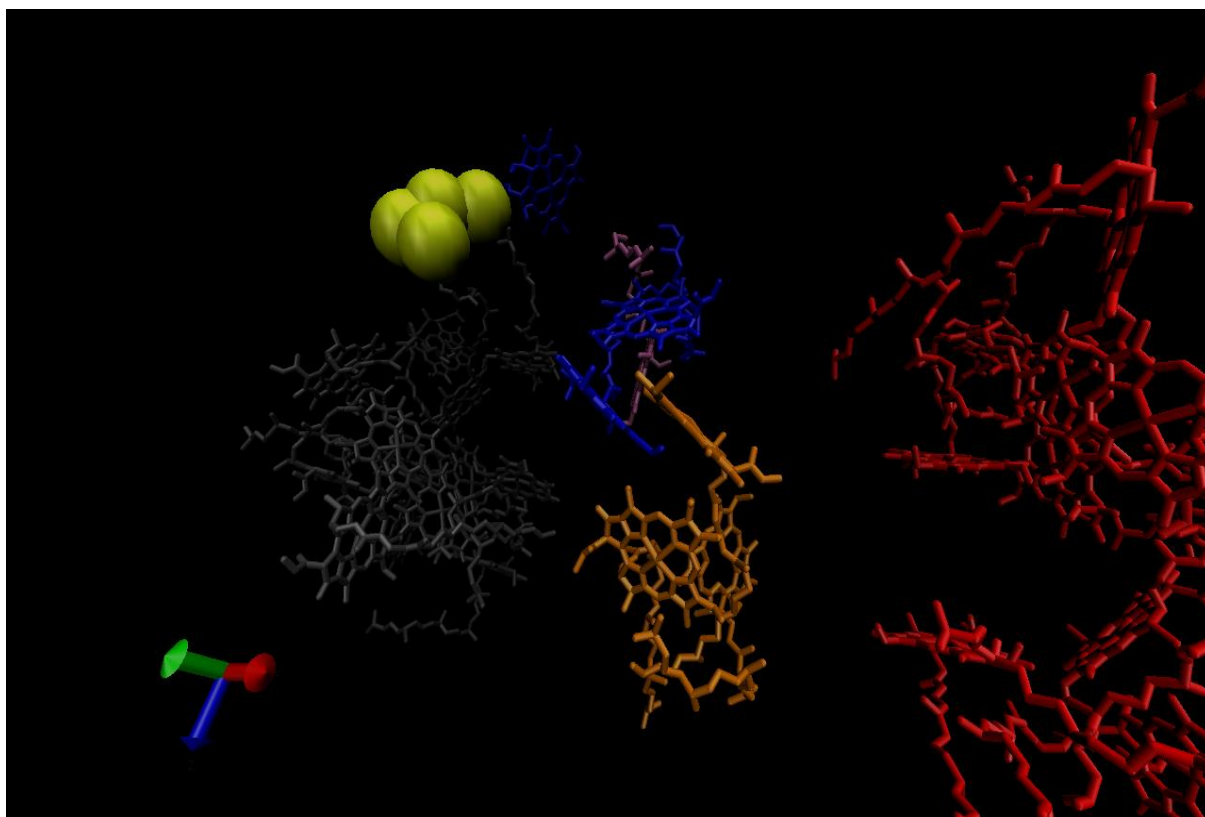
Obrázek č. 20 Model proteinu PsbQ, fialově α -šroubovice, žlutě β -list a červeně molekuly vody, šedě vazby mezi α -šroubovicí a β -listem (foto autor)



Obrázek č. 21 Model proteinu PsbP, fialově α -šroubovice, žlutě β -list, šedě Zn, modře přechod z α -šroubovice a β -listu, bíle vazby mezi α -šroubovicí a β skládaným listem, světle modře vazby mezi aminokyselinami (foto autor)



Obrázek č. 22 Model proteinů *PsbU* a *PsbV* fotosystému II ze sinic, které jsou obdobou rostlinných proteinů *PsbP* a *PsbQ*. *PsbQ* je znázorněn zeleně a *PsbP* růžově, Ca^{2+} modře, OEC hnědě a Cl zeleně (foto autor)



Obrázek č. 23 Významné molekuly, které jsou součástí tzv. reakčního centra PSII, modře a oranžově chlorofyly a s feofytinem, zeleně manganový klastr, ostatní chlorofyly a (červeně) jako součást světlosběrných antén. (foto autor)

5. Diskuze

Veškeré experimenty uvedené v práci byly provedeny v Ústavu komplexních systémů na Nových Hradech. Během experimentů byly dodrženy sterilní podmínky bez osvětlení slunečním světlem a za stabilní teploty 4 °C. Krystaly byly získány z fotosyntetických proteinů PsbP, PsbQ. Při krystalizaci proteinu HisPsbQ byly získány pouze krystaly soli. Ačkoliv proteiny PsbQ a HisPsbQ byly krystalizovány za stejných krystalizačních podmínek, protein PsbQ o hmotnosti 17 kDa vykrytalizoval za přítomnosti soli octanu zinečnatého, chloridu zinečnatého a také síranu zinečnatého (Balsera a kol., 2005), zatímco HisPsbQ protein s kotvou His nevykrytalizoval z důvodů své velikosti a jiných nároků na nasycení svého roztoku. Dle našeho názoru musejí být podmínky pro protein HisPsbQ upraveny tak, aby došlo k přesycení roztoku a následovné krystalizaci proteinu (Kutá Smatanová 2006). Pro protein PsbQ je na základě vlastních experimentů nejvhodnější sůl octanu zinečnatého, při jehož použití došlo ke vzniku největších monokrystalů. Nejméně vhodnou solí pro protein PsbQ je síran zinečnatý, při kterém byly pozorovány pouze mikrokrytaly. Protein PsbP nejlépe krystalizoval za stabilních podmínek při teplotách okolo 18 °C, a to za přítomnosti octanu zinečnatého a chloridu zinečnatého, kdy vznikly monokrystaly. Z tohoto důvodu není nutné u krystalizace tohoto proteinu aplikovat sůl síranu zinečnatého. Molekulární 3D struktura proteinu PsbQ byla stažena z proteinové databanky www.pdb.org s kódem 1VYK. Molekulární struktura byla následně zpracována v programu VMD a zobrazeny sekundární prvky, šroubovice a skládané listy a vazby mezi nimi. Díky dobrému rozlišení 1,49 Å bylo možné znázornit molekulární model proteinu a pochopit jeho strukturně-funkční vztahy. Struktura proteinu PsbP byla stažena taktéž z proteinové databanky www.pdb.org s kódem 2VU4. Také tato molekulární struktura byla zpracována programem VMD a zobrazena podobně jako v předchozím případě. Díky poměrně vysokému rozlišení 1,98 Å bylo možné kvalitní znázornění proteinu. Data pro celý proteinový komplex fotosystému II (PSII) ze sinic byla stažena z www.pdb.org pod kódem 3BZ1 a 3BZ2. Tento model byl zpracován programem VMD, kterým bylo zobrazeno aktivní místo primární fáze fotosyntézy s chlorofyly *a* a feofytiny. Dále byl znázorněn (Obrázek č. 22) kyslík vyvíjecí komplex OEC, který se podílí na tvorbě atmosférického kyslíku. Na shodném obrázku je patrné umístění PsbQ a PsbP

v blízkosti OEC komplexu a jejich postavení v celém systému a v membráně (Obrázek č. 2).

6. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo osvojit si a aplikovat základní metody proteomiky, krystalografie a metod molekulárního modelování na modelovém a vybraném fotosyntetickém proteinu.

Pro proteinovou krystalizaci byla použita standardní metoda sedící kapky, byl ověřen krystalizační protokol (Prudniková T. a kol. 2011) a vypěstovány krystaly studovaných proteinů.

Struktura proteinu PsbQ a PsbP byla řešena pomocí modelovacích softwarových nástrojů WinCoot a vizualizovaná nástrojem VMD, jimiž byly připraveny molekulární 3D modely a popsány strukturně-funkční vztahy. Byl taktéž připraven model fotosystému II (PSII), bylo znázorněno jeho aktivní místo a proteinový komplex OEC, který obsahuje anorganické kofaktory (manganový klastr Mn_4 a ionty Ca^{2+} a Cl^-).

7. Použitá literatura

- Balsera M., Arellano J. B., Revuelta J. L., De Las Rivas J., Hermoso J. A.,: The 1.49Å^o resolution crystal structure of PsbQ from photo system II of *Spinacia oleracea* reveals a PPII structure in the N-terminal region., *J. Mol. Biol.* 350, 2005, 1051–1060
- Barber J., Photo system II: the engine of life, *Q. Rev. Biophys.* 36, 2003, 71–89
- Bondarava, Beyer, Liszkay: Function of the 23 kDa protein of photosystem II as a manganese binding protein and its role in photoactivation., *Biochim. Biophys. Acta* 1708, 2005, 63-70
- Břízd'ala J. PŘF UK Praha, e-chembook.eu.cz/biochemie/fotosyntéza
- Cowtan, K., 2006. *Acta Cryst.* D62, 1002–1011
- Dreyfuss a Thorneber 1994, (fyziologie rostli S. Procházka a kol.1998) 132-133
- Emsley P., Lohkamp B., Scottc W. G. and Cowtand K. , 2009, Features and development of Coot, *Acta Crystallographica*, ISSN 0907-4449
- Hamton research: Crystalization: Research, VOL. 11 NO.1 2001 152-165
- Chitnis et all 1995 (fyziologie rostli S. Procházka a kol.1998) 137
- Ifuku, Yamamoto, Ono, Ishihara, Sato: PsbP protein but not PsbQ protein is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants., *Plant Physiology* 139, 2005,1175-1184
- Ifuku, K., Nakatsu, T., Kato, H., Sato, F.2004 *Embo rep.* 5 362-367
- Kohoutová J., Kuta Smatanová, I., Brynda, J., Lapkouski, M., Revuelta J. L., Arellano, J. B. & Ettrich, R.(2009) Crystallization and preliminary crystallographic characterization of the extrinsic PsbP protein of phorosystem II from *Spinacia oleracea*, *Acta Cryst.* F 65, 111-115
- Kuta Smatanová I., krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi (ústav komplexních systémů
- Lichthenthaler 1990, (fyziologie rostli S. Procházka a kol.1998) 131
- McPherson, 1999, *Crystallization of Biological Macromolecules*, New York. CSHL Press
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., Gloser J., Havel L., Nátr L., Prášil I., Sladký Z., Šantůreček J., Tesařová M., Vyskot B., *Fyziologie rostlin*, Akademie věd ČR, Vydání 1., Praha 1998 Ed. Č. 4903 ISBN 80-200-0586-2 (130-131,132, 134,137, 137-138,
- Prudnikova T., Chaloupkova R., Sato Y., NagataY., Degtjarik O., Kutý M., Rezacova P., Damborsky J., Kuta Smatanova I., 2011, Development of a Crystallization Protocol for the DbeA1 Variant of Novel Haloalkane Dehalogenase from *Bradyrhizobium elkanii* USDA94. *Crystal Growth and Design* 11, 516-519

Ristvejova, Kopecky, Sovova, Balsera, Arellano, Green, Etrich: Structure and dynamics of the N-terminal loop of PsbQ from photosystem II of *Spinacea oleracea*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 345, 287-291, 2006

Řezáčová P., *Krystalografie biologických makromolekul 2003*, studijní literatura ÚMG AV ČR

Internetové odkazy:

www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_11/page2.html

www.pdb.org

www.xray.cz

www.e-chembook.eu.cz

www.frontiersin.org

8. Seznam příloh

Příloha č. 1: Certifikát krystalizačního kurzu v Nových Hradech

Příloha č. 2: Abstrakt publikovaný v časopise *Materials structure*, vol. 20, no 1 (2013)

Příloha č. 3: Kurz AV ČR s názvem BIOPOL a jeho program

9. Přílohy

Příloha č. 1



Certifikát

o úspěšném absolvování kurzu

Krystalizace makromolekulárních látek

pro:

Jan Tvaroh

Nové Hradky, 27.-29. 11. 2012

Doc. Mgr. Ivana Kutá Šmatanová, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
a Akademie věd ČR, Nové Hradky

RNDr. Jindřich Hašek, DrSc.
předseda České a Slovenské
Krystalografické společnosti



JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Škola komplexních systémů
Zámek 136, 373 33, Nové Hradky
-2-



WWW.KFSV.CZ

Krystalografická společnost
162 00 Praha 6, Hrybovského nám. 2
IČO : 18625192 (1)



1. Carmona AT, Fialova P, Kren V, Ettrich R, Martinkova L, Moreno-Vargas AJ, Gonzales C, Robinal. 2006. Cyanodeoxy-glycosyl derivatives as substrates for enzymatic reactions. *Eur. J. Org. Chem.* 8:1876–1885.
2. Fialova P, Carmona AT, Robina I, Ettrich R, Sedmera P, Prikylova V, Petraskova-Husakova L, Kren V. 2005. Glycosyl azide—a novel substrate for enzymatic transglycosylations. *Tetrahedron Letters.* 46(5): 8715–8718.
3. Ogata M, Zeng X, Usui T, Uzawa H. 2007. Substrate specificity of N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* to artificial glycosyl acceptors having various substituents at the reducing ends. *Carbohydr Res.* 342(1):23–30.
4. Bojarova P, Slamova K, Krenek K, Gazak R, Kulik N, Ettrich R, Pelantova H, Kuzma M, Riva S, Adamek D, Bezouska K and Kren V. 2011. Charged hexosaminides as new substrates for β -N-acetylhexosaminidase-catalyzed synthesis of immunomodulatory disaccharides. *Adv. Synthesis & Catalysis*, 353:2409–2420.

P20

PRACTICAL ASPECTS OF PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY

Ivana Kuta Smatanova^{1,2}, Jakub Jung¹, Pavel Malcher¹, Pavel Nemeč¹, Martin Papez¹, Jan Tvaroh¹, Oksana Degtjarik¹, Jaroslava Kohoutova¹, Tatyana Prudnikova¹, Katsiaryna Tratsiak¹, and Michal Kutý^{1,2}

¹ University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, CENAKVA and Institute of Complex Systems, Zamek 136, 373 33 Nove Hradky

² Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Nanobiology and Structural Biology GCRC, Zamek 136, 373 33 Nove Hradky

The protein crystallography is one of the powerful techniques used for studying of protein structures and description their mechanism and function. This is possible only in the case of obtaining diffractable monocrystals. Different crystallization techniques such as standard, advanced and alternative methods are used to crystallize soluble and membrane proteins and protein complexes. Research projects are designed for graduate students and postgraduates who work on these projects on different levels. Finally developed methods and obtained crystallization and crystallographic data are compiled and results are published in prestigious journals.

Nowadays more than 20 proteins, protein complexes and their mutant variants are systematically studied. The

main target is focused on research of (1) soluble haloalkane dehalogenases e.g. DhaA from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064, DbeA of *Bradyrhizobium elkanii* USDA94, LinB of *Sphingobium japonicum* UT26 or new haloalkane dehalogenases DpcA from *Psychrobacter cryohalolentis* K5 and DmxA from *Marynobacter* sp ELB 17, as well as (2) membrane photosynthetic proteins isolated from different higher plants.

This research is supported by the ME CR (COST LD11011 and CZ.1.05/2.1.00/01.0024), GACR (P207/12/0775 and P207/11/0717), and by the AS CR.

P21

TOWARDS A STRUCTURE OF GREEN PLANT PHOTOSYSTEM II

Michal Kutý^{1,4}, Jaroslava Kohoutová¹, Jiří Heler^{1,2}, Marie Plevako^{1,2}, Tatsiana Holubeva¹, Daryna Kulik¹, Ondřej Šedo³, Zbyněk Zdrahal³, Ivana Kutá Smatanová^{1,4}

¹ University of South Bohemia in České Budějovice, Institute of complex systems FFPW, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

² University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Branišovská 31, 37005 České Budějovice

³ Core Facility – Proteomics, CEITEC, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno

⁴ Academy of Sciences of the Czech Republic, Inst. of Nanobiology and Structural Biology GCRC, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

Photosystem II (PSII) is a pigment-protein complex of thylakoid membrane in cyanobacteria, algae and higher plants. PSII performs series of light driven reactions resulting in charge separation and subsequently in a reduction of an electron-transport chain and water oxidation.

Primary site of the light to chemical energy conversion is located in so-called reaction center (RC).

PSII is a multisubunit complex embedded in the thylakoid membrane of plants, algae and cyanobacteria. The function of the PSII in different organisms is identical



**Kurz „Výpočetní postupy v makromolekulární krystalografii“
v Nových Hradech, 12-14. 3. 2013**

Pořadatelé:

**Česká společnost pro strukturní biologii a Ústav makromolekulární chemie AV ČR,
projekt BIOPOL, reg.č. CZ.1.07/2.3.00/30.0029**

PROGRAM KURZU

Úterý 12. 3

- 13:00 Registrace
- 14:00 Zahájení, úvodní poznámky
- 14:15 **Overview of computational tools for macromolecular crystallography in CCP4**, *Martin Noble, Newcastle University, Předseda hlavní pracovní skupiny CCP4*
- 15:15 **Základy proteinové krystalografie**, *Jiří Brynda, UOCHB a ÚMG AV ČR, Praha*
- 16:00 Přesávka, společná fotografie
- 16:20 **Zpracování difrakčních dat makromolekulární difrakce**, *Petr Kolisko*
- 17:15 **Řešení fázového problému, molekulární nahrazení**, *Karla Fejferová*
- 18:00 **Úvod do praktik, instalace programů** (notebooky účastníků), *Karla Fejferová, Petr Kolisko, Tomáš Kovař, Jan Dohnálek, Jan Stránský*
- 19:00 Raut

Středa 13. 3

- 9:00 **Řešení fázového problému, SIR, MIR, kombinace metod**, *Jan Dohnálek*
- 9:45 **Řešení fázového problému, SAD, MAD**, *Tomáš Kovař*
- 10:30 Přesávka
- 11:00 **Upřesňování makromolekulárních struktur**, *Tereza Skálová*
- 12:00 Oběd
- 13:30 **Výpočetní praktika, Zpracování difrakčních dat**, *Petr Kolisko*
- 15:30 Přesávka
- 16:00 **Výpočetní praktika, Řešení fázového problému**, *K. Fejferová, T. Kovař, J. Dohnálek*
- 19:00 Večeře





Čtvrtek 14.3

- 9:00 **Optimization of protein stability conditions by dynamic light scattering technique to improve crystallization success**, T. Chernovets, BTÚ AV ČR, Praha
- 9:15 **Combination of Methods to Improve Protein Crystallizability**, J. PISAČKOVÁ, ÚOCHB, ÚMG AVČR, Praha
- 9:30 **Štúdium N-terminálnej oblasti ľudského srdcového ryanosťového receptora**, L. Borko, ÚMB SAV, Bratislava
- 9:45 **Functional coupling of duplex translocation to DNA cleavage in a type I restriction enzyme**, T. Baikova, INSB GCRC AS CR, Nové Hradky
- 10:00 Přestávka
- 10:15 **Výpočetní praktika, Upešňování makromolekulárních struktur**, T. Skálová
- 11:50 Zakončení kurzu
- 12:00 Oběd

(14:00 Začátek programu XI Discussions in Structural Molecular Biology 14. – 16. 3. 2013, Nové Hradky)



10. Abstrakt

Cílem této bakalářské práce byla strukturní studie fotosyntetických proteinů PsbP a PsbQ s použitím základních krystalizačních technik a metod molekulárního modelování. V našich krystalizačních experimentech jsme aplikovali metodu sedící kapky principiálně založenou na difúzi par. Dále byly použity softwarové nástroje pro tvorbu molekulárního 3D modelu studovaných proteinů. Na základě experimentální mapy elektronové hustoty získané z difrakčních dat a na základě známé primární struktury studovaných proteinů byly připraveny 3D molekulární modely studovaných proteinů pomocí softwarového nástroje WinCoot. Následně byl použit program VMD pro detailní vizualizace získané prostorové struktury proteinů. Význam bakalářské práce spočívá nejenom v osvojení moderních biofyzikálních metod pro studium struktury a funkce proteinů, ale také v získání výsledků, které mohou napomoci detailněji pochopit strukturu a také protein-proteinové interakce mezi podjednotkami PsbQ a PsbP v rámci multiproteinového komplexu fotosystému II.

11. Abstract

The aim of this bachelor thesis is the structural study of photosynthetic proteins PsbP and PsbQ with the use of basic crystallization techniques and molecular modelling methods. In our crystallization experiments we have used sitting drop method that is based on vapor diffusion. Further we have used molecular modeling software to build the structure of proteins of interest. The molecular 3D structure of proteins was solved from electron density maps and known primary structure using software tool WinCoot and visualization was done by VMD software. The results of this bachelor thesis could be used for closer understanding protein-protein interactions of subunits PsbQ and PsbP within Photosystem II.