Raport stiintific

privind implementarea proiectului " ***Diversitatea functionala a proteinelor D1 din fotosistemul II la cianobacterii****" cod PN-II-ID-PCE-2011-3-0765 in perioada* ***octombrie – decembrie 2011***

Consideratii geerale privind diversitatea functionala a proteinolor D1

Din cauza reacţiilor puternic oxidative implicate în procesul de fotoliză a apei, proteina D1, spre deosebire de celelalte componente ale PSII, este în mod continuu fotodegradată si reînlocuită (Aro et al., 1993). Proteina D1 este degradată şi înlocuită de o nouă copie într-un interval de 20 min pâna la 5 ore în condiţii de intensitate luminoasă crescută şi respectiv scazută, pentru a menţine un nivel adecvat de proteină care să asigure o buna funcţionare a complexelor PSII. S-a observat că la organismele fotosintetice, rata de „turn-over" a proteinei D1 creşte în urma expunerii la lumină de intensitate crescută. Astfel, o descreştere severă a cantităţii acestei proteine se observă doar în urma stresului sever generat de expunerea de lungă durată la intensitaţi foarte mari ale luminii, ducând la reducerea capacităţii fotosintetice, i.e. fotoinhibiţie (Takahashi & Murata, 2008). Ca urmare, expresia genelor *psbA* trebuie sa fie strict controlată pentru a asigura funcţionarea proceselor fotosintetice în diferite condiţii de mediu. La plante există o singură genă *psbA* care codifică proteina D1, pe când la cianobacterii, întâlnim o familie de gene *psbA,* ai carei membri se exprimă diferenţiat în funcţie de condiţiile de mediu. Prezenţa multiplelor gene *psbA* care codifică izoforme diferite ale proteinei D1 indică importanţa acestora în mecanismele reglatoare pentru menţinerea în stare functională a PSII, în condiţiile schimbătoare de mediu, din variatele habitate populate de cianobacterii. În ultimele două decenii, numeroase studii de specialitate au tratat subiectul mecanismelor de reglare a expresiei genelor *psbA* cianobacteriene. Deşi apar mereu noi informaţii, nu se cunosc multe aspecte legate de mecanismele concrete de reglare, i.e. factorii de transcriere direct implicaţi. În funcţie de modul în care se exprimă în condiţii standard de cultură şi în condiţii de stres, proteinele cianobacteriene D1 pot fi clasificate in 4 categorii (Mulo et al., 2009):

I) $D1_m$, prezentă în centrii de reacţie ai PSII în condiţii normale de creştere. În condiţii de stres, expresia proteinei $D1_m$ se induce (ex.: proteina $D1_m$ codificată de genele *psbA2* şi *psbA3* în *Synechocystis* sp. PCC 6803);

II) D1:1, exprimată şi asamblată în PSII în condiţii normale de creştere, dar reprimată în condiţii de stres (ex.: proteina D1:1 codificată de gena *psbA1* în *Synechococcus* sp. PCC 7942);

III) D1:2, care nu se exprimă în condiţii normale de creştere, dar se exprimă şi se acumulează în PSII în condiţii de stres (ex.: proteina D1:2 codificată de genele *psbA2 şi psbA3* în *Synechococcus* sp. PCC 7942);

IV) D1', care nu se exprimă în condiţii standard, şi nici în cele uzuale de stres, dar se exprimă în condiţii microaerobice (sau/şi când cantitatea de oxigen este scăzută).

În prezent se cunosc două tipuri de reglare a expresiei membrilor familiei de gene *psbA* la cianobacterii. Prima strategie constă în înlocuirea proteinei D1 prezente în centrii de reacţie ai complexului PSII în condiţii normale (numită D1:1) cu o alta proteină (numită D1:2) codificată de o genă diferită (sau mai multe), în condiţii de stres. Cea de-a doua strategie, întâlnită la cianobacteriile care au un singur tip de proteină D1, este de a creşte, în condiţii de stres, rata de „turn-over" a aceleiaşi proteine produse in condiţii normale de mediu (proteina este numită în acest caz, $D1_m$) (Mulo et al., 2009). Recent s-a descoperit faptul că la câteva specii de cianobacterii una dintre genele *psbA* (divergentă ca secvenţa nucleotidică), considerată „tăcută" (practic neexprimată) până nu demult, este indusă de microaerobioză (sau/şi cantitate de O_2 scazută) (Sicora et al., 2009; Summerfield et al., 2008). O astfel de genă „misterioasă", a cărei funcţie este neelucidată) există în 4 din cele 5 specii de cianobacterii în care expresia familiei de gene *psbA* a fost caracterizată. Inducţia artificială a acestei gene (*psbA1*) la *Synechocystis* sp. PCC 6803 prin modificarea secvenţei promotorului (Salih & Jansson, 1997), produce o proteină funcţională (proteina D1') (Funk, et al., 2001; Sicora et al., 2004). Această genă este prezentă în *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. 7120 şi *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, şi s-a demonstrat faptul că la aceste organisme

cantitatea de transcript este crescută semnificativ în condiţii microaerobice (obţinute prin barbotare de argon). Răspunsul unitar al acestei gene la 3 specii neînrudite de cianobacterii, la acelaşi factor de mediu, indică faptul că gena şi proteina pe care o codifică (proteina D1') fac parte din mecanismul celular de aclimatizare la condiţii de microaerobioză. Nu există similarităţi la nivel de structură primară între aceste proteine D1', în afară de 3 reziduuri aminoacidice diferite fată de cele omologe din restul proteinelor D1, care par să fie conservate. Aceste modificari survenite în secvenţa proteinelor D1' sunt: G80 → A, F158 → L şi T286 → A.

Implementarea proiectului in perioada Octombrie-Decembrie 2011.

Proiectul a demarat incepand cu data de 1 Noiemnbrie 2011, data de la care a fost angajat directorul de proiect cat si marea majoritate a echipei de cercetare. Incepand cu aceasta data s-au demarat si au post finalizate pana in momentul predarii urmatoarele activitati mentionate in cererea de finantare a fi desfasurate in prima faza a proiectului:

- a fost initiata procedura de achizitie a echipamentelor si consumabilelor prevazute in bugetul acestui anacest capitol bugetar fiind folosit in proportie de 100%;

- a fost completata echipa de cercetare a proiectului dupa cum urmeaza: un post director proiect, doua posturi doctorand norma intreaga in proiect, un post masterand norma intreaga in proiect si doua posturi tehnician cu jumatate de norma in proiect. A ramas vacant un post de post-doc care urmeaza a fi incepand cu luna a treia, conform cererii de finantare si va fi anuntat ca vacant pe portalul alocat (www.euraxess.ro) cat si prin alte mijloace de popularizare a posturilor vacante.

- a fost creata o baza de date de secvente ADN si proteine pentru formele proteinei D1 prezente in tulpinile al caror genom a fost seventat si este disponibil online. Aceste secvente au fost aliniate si pe baza acestor aliniamente s-au creat arbori filogenetici reprezentand gradul de inrudire intre diferitele forme ale proteinei D1. S-au obtinut si optimizat in cultura un numar de 6 tulpini cianobacteriene model, al caror genom este secventat si care vor fi folosite in studiile ulterioare. A fost optimizat protocolul de izolare ARN, pas foarte important pentru buna desfasurare ulterioara a proiectului. O descriere mai detaliata si o prezentare a rezultatelor este facuta in sectiunea urmatoare.

Constituirea bazaei de date cu secvente D1. În baza de date cyanobase (http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase) s-au găsit 88 de gene *psbA* ce codifică diferitele izoforme ale proteinei D1. Secvenţele genelor au fost importate în programul *CLC Sequence Viewer 6.2.* Pe baza secvenţelor de nucleotide s-a realizat alinierea multiplă a acestora urmată de realizarea unui arbore filogenetic pentru a măsura distanţele evolutive dintre genele de interes. La fel s-a procedat si în cazul secvenţelor de aminoacizi, iar arborii filogenetici sunt prezentaţi in Figura 1.

Optimizarea protocoalelor de izolare ARN. În vederea optimizării, am testat mai multe variante de spargere a celulelor folosind beat-beaderul şi efectele lor asupra izolării ARN la *Synechocystis* PCC6803.Specia de interes a fost supusă mai multor variante de agitare, iar rezultatele experimentului sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Synechocystis PCC6803	Varianta 1	Varianta 2
ctrl	588µg\µl	504 µg\µl
cbd	796 µg\µl	449 µg\µl
cbi	1150 µg\µl	1772 µg\µl
fbd	450 µg\µl	400 µg\µl

fbi	950 µg\µl	918 µg\µl

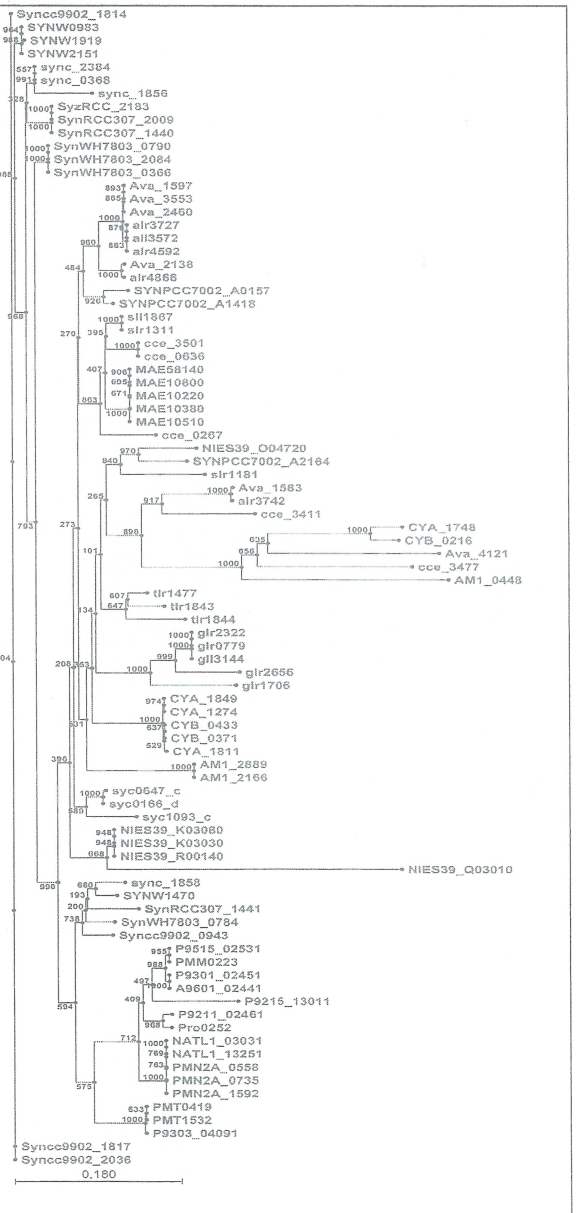
Legenda: Ctrl – control; Cbd - agitare cu bile după incubare; Cbi - agitare cu bile înainte de incubare; Fbd - agitare fără bile după incubare; Fbi - cu bile înainte de incubare

Din rezultatele prezentate în tabelul de mai sus s-a constatat faptul că agitarea cu bile înainte de incubare la viteza maximă timp de aproximativ3-5 minute are un efect de creştere semnificativă a cantităţii de ARN izolată.

Figura:1 Dendrograme reprezentand relatiile de inrudire dintre secventele de nucleotide (panel stanga) si respectiv proteinele codificate de acestea (panel dreapta) ale familiilor de gene *psbA* obtinute din CyanoBase.



a) inferenta filogenetica a secventelor de nucleotide la genele ce codifica diferite izoforme ale proteinei D1.



b) inferenta filogenetica a secventelor de aminoacizi la genele ce codifica diferite izoforme ale proteinei D1.

Izolarea ARN. Pentru cuantificarea expresiei familiei de gene *psbA* am folosit un protocol de izolare a ARN cu Trizol, modificat după McGinn *et all.* 2003. Un prim pas critic în această tehnică este reprezentat de izolarea ARN de puritate şi integritate crescute. Etapele izolării ARN sunt:

1. Se începe cu 10 ml cultură de cianobacterii, având 60µg clorofilă în total
2. se colectează celulele şi se adaugă 250µl Trizol
3. incubare 10 minute la 60° C, imediat după adăugare se vortexează pe beat beader la putere maximă, apoi după 5 min şi în final iar.
4. se adaugă chloroform 1\5 volum din cantitatea de Trizol, se aşteaptă 5 minute să se răcească înainte de a se centrifuga
5. centrifugare 10 minute\10Krpm
6. se colectează supernatantul într-un tub nou şi se aproximează cantitatea recoltată
7. se adaugă un volum gal de PCI (phenol\chlorophorm\isoamil alcohol) şi se amestecă bine pe vortex
8. se centrifughează 2 minute la 10Krpm
9. se colectează faza de sus cu grijă fără a atinge faza de jos, şi se aproximează volumul
10. se adaugă isopropanol în volum egal şi se amestecă dar nu foarte tare numai atât cât să se amestece fazele
11. incubare 10 minute la temperatura camerei \acoperit
12. centrifugare la rece 10 minute\10Krpm\4° C , după centrifugare se formează pelletul de ARN.

!!!De aici încolo protocolul se desfăşoară pe gheaţă

13. se înlatură supernatantul şi se adaugă 1 ml alcool etilic 70%, se amestecă un pic pe vortex astfel încât să pătrundă alcoolul etilic în peletul de ARN
14. centrifugare 2 minute\10Krpm\4° C
15. se înlătură iar cât mai mult etanol fără a atinge peletul de ARN, se mai pune la centrifugat scurt pentru a se aduna toate urmele de etanol care se îndepărtează
16. se lasă la uscat cu dopul deschis 30sec-60sec
17. se adaugă 30µl apă sterilă bidistilată. Este important ca peletul să se dizolve.
18. se cuantifică la spectrofotometru.

ARN total obţinut prin aplicarea acestui protocol la cianobacteriile model este în marea majoritate a cazurilor de foarte bună calitate, putând fi folosit cu succes la reacţii de sinteză de ADNc sau în qRT-PCR (data not shown).

Bibliografie:

Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochim. Biophys. Acta. 1143:113 – 134.

Funk C, Wiklund R, Schroder WP, Jansson C (2001) D1' centers are less efficient than normal photosystem II centers. FEBS Lett. 505: 113–117.

McGinn PJ, G. Price GD, Maleszka R and Badger MR (2003) Inorganic carbon limitation and light control the expression of transcripts related to the CO2-concentrating mechanism in the cyanobacterium Synechocystis sp.strain PCC 6803. Plant Physiol. 132: 218–229.

Mulo P, Sicora C, Aro E-M (2009) Cyanobacterial psbA gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. Cell. Mol. Life Sci. 66: 3697–3710.

Salih GF, Jansson C (1997) Activation of the silent psbA1 gene in the cyanobacterium Synechocystis sp strain 6803 produces a novel and functional D1 protein. Plant Cell 9: 869–878.

Sicora C, Wiklund R, Jansson C, Vass I (2004) Charge stabilization and recombination in photosystem II containing the D10 protein product of the psbA1 gene in Synechocystis 6803. Phys. Chem. Chem. Phys. 6: 4832–4837.

Sicora CI, Ho FM, Salminen T, Styring S, Aro EM (2009) Transcription of a "silent" cyanobacterial psbA gene is induced by microaerobic conditions. Biochim. Biophys. Acta 1787: 105–112.

Summerfield TC, Toepel J, Sherman LA (2008) Low-oxygen induction of normally cryptic psbA genes in cyanobacteria. Biochemistry 47: 12939–12941.

Takahashi S, Murata N (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? Trends Plant Sci. 13: 178–182.

Data: 12 Decembrie 2011

Director proiect,

Cosmin Ionel Sicora

MINISTERUL EDUCAȚIEI, CERCETĂRII ȘI INOVĂRII BUCUREȘTI
CENTRUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE
JIBOU
SĂLAJ
COD FISCAL
4494985