Raport ştiinţific

privind implementarea proiectului

" Diversitatea funcţională a proteinelor D1 din fotosistemul II la cianobacterii" cod PN-II-ID-PCE-2011-3-0765 în perioada ianuarie – decembrie 2015

După etapele anterioare de implementare a proiectului, respectiv etapa iniţială desfăşurată în 2011 când a fost demarat proiectul cu primele activităţi pregătitoare, cea din 2012 când au fost începute studii pentru caracterizarea funcţională a proteinei D1, etapa din anul 2013 când au fost demarate studii privind caracterizarea funcţională a proteinei D1 din diferite comunităţi cianobacteriene şi cea din anul 2014 când au fost continuate studiile începute anterior, anul acesta s-au realizat următoarele activităţi:

- Au fost continuate studiile privind caracterizarea funcţionalităţii fotosistemului II la culturi cianobacteriene model care au genomul complet secvenţat; în acest sens au fost cercetate de asemenea noi aspecte ale lanţului transportor de electroni la tulpina cianobacteriană *Synechococcus sp.* PCC 7002, precum şi măsurători de evoluţie de oxigen pentru caracterizarea funcţională a proteinei D1 la specia cianobacteriană model *Cyanothece sp.* ATCC 51142.
- Studiul funcţionalităţii proteinelor D1 la *Synechocystis* sp. PCC 6803 prin metoda de imunodotecţie cu anticorpi specifici
- Continuate studiile pe cianobacterii recoltate din mediu în vederea caracterizării funcţionale a proteinelor D1.

În urma acestor experimente s-a generat un volum mare de date experimentale pe baza cărora 2 articole au fost finalizate şi publicate în diferite reviste cotate ISI. De asemenea este în curs de publicare un alt articol ştiinţific cotat ISI. O sinteză a acestor date o prezentăm în cele ce urmează.

1. *Rezultate de expresie a genelor psbA ce codifică diferite forme ale proteinei D1*

Au fost analizate comparativ nivelul de expresie a două isoforme ale proteinei D1 codificate de genele *psbA* de la cianobacteria model *Synechococcus sp.* PCC 7002 folosind tehnica de Real-time q-RT-PCR. Celulele au fost expuse stresului cu radiaţii UVB timp de 60 min urmate de perioada de recuperare cu lumină din spectrul vizibil de 60 min. Rezultatele indică o diferenţă semnificativă între cantităţile relative ale celor două tipuri de isoforme studiate. În toate probele isoforma D1 este dominantă reprezentând mai mult de 99,9% din totalul transcriptelor analizate (tabelul 1). Isoforma D1' este uşor indusă în timpul stresului UVB în timp ce expresia genelor ce codifică pentru celelalte isoforme ale proteinei D1 scade uşor în aceleaşi condiţii de tratament (Fig.1).

Transcripte ale isoformei *psbA*	Tratament UV-B				Recuperare	
	Control	15 min	30 min	60 min	30 min	60 min
D1	99.9854	99.9539	99.9637	99.9649	99.9888	99.9796
D1'	0.0146	0.0461	0.0363	0.0351	0.0112	0.0204

Tabel 1. Cantitatea relativă de transcript a diferitelor isoforme D1 în timpul controlului, tratamentului cu radiaţii UV-B şi a recuperării în lumină vizibilă

2. *Măsurători de fluorescenţă pentru caracterizarea funcţională a proteinelor D1 în diferite condiţii experimentale*

Măsurătorile de fluorescenţă au fost efectuate pe celulele de *Synechococcus sp.* PCC 7002 în condiţii de tratament cu lumină UVB, probele fiind recoltate la timpul 0 (control), după 60 min de tratament şi după perioada de recuperare de 60 min în lumină din spectrul vizibil. Probele au fost tratate sau netratate cu DCMU.

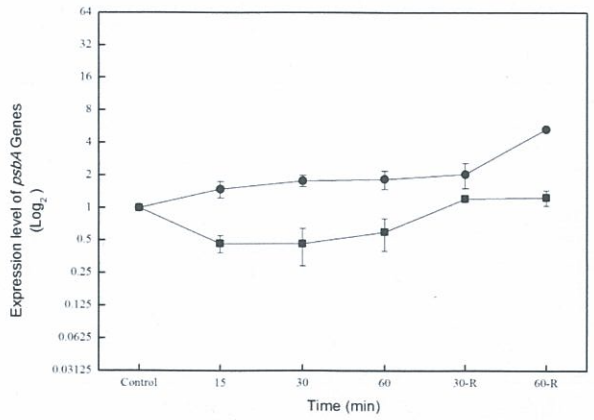


Fig. 1. Analiza expresiei prin qRT-PCR a psbA-D1'(pătrat) și a altor isoforme D1 (cerc) în timpul stresului UV-B urmat de perioada de recuperare la *Synechococcus sp.* PCC 7002.

Amplitudinea semnalului de fluorescență reprezintă un indicator al numărului relativ de centri activi ai Fotosistemului II (PSII) la momentul aplicării impulsului actinic. În condiții normale, există o heterogenitate a centrilor activi și inactivi din membrana celulelor de cianobacterii (Fig 2a). Prin adăugarea DCMU, toți centri devin activi indicând numărul total potențial de centri activi PSII din membrană (Fig 2b). În timpul tratamentului cu UVB se observă o reducere semnificativă (cu 35%) a numărului centrilor activi PSII care se recuperează în proporție de 90% (Fig 2a și b).

Masuratorile de fluorescență au fost efectuate folosind un fluorimetru cu dublă modulare (PSI, Cehia) si utilizându-se o scară logaritmică s-a urmarit scăderea fluorescenței după impulsul actinic aplicat. S-au urmărit celule tratate și netratate cu DCMU. În prezența DCMU partea acceptoare a PSII este blocată și Q_{A^-} se recombină cu complexul de oxidare al apei rezultând într-o conservare de mai lungă durată a fluorescenței (apx.100ms) (fig. 2d) comparativ cu probele netratate (fig. 2c). În timpul tratamentului cu UV-B apare o fază rapidă specifică la timpi foarte scurți. De asemenea, se observă că stresul UV-B induce o modificare în partea donoare a PSII prin forțarea recombinării Q_{A^-} cu TyrZ sau P_{680}. Această modificare este foarte rapidă și dispare complet în timpul perioadei de recuperare. Aceasta poate fi legată de mecanismele specifice de acțiune ale UV-B ce afectează mașinăria fotosintetică la *Synechococcus sp.* PCC 7002 sau de mecanismele particulare ale fluxului de electroni ai PSII ale acestei specii care vor fi investigate ulterior.

Aceste date au fost publicate în Romanian Biotechnology Letters ca UV-B stress changes the electron flow on photosystem II complex in *Synechococcus* PCC 7002, Chis C., Druga B., Chis I., Ardelean A., Sicora C. I.

3. Măsurători de evoluție de oxigen la cianobacterii model pentru caracterizarea funcțională a formelor proteinei D1

S-au realizat măsurători de evoluție de oxigen atât în prezența, cât și în absența lincomicinei (300µg/ml), un inhibitor ce blochează sinteza proteică *"de novo"*, pe două culturi de cianobacterii, folosind Oxylab 1.15 de la Hansatech Instruments.

S-a realizat un experiment pe cultura de *Synechococcus sp.* PCC 7002 mutant, în mediu BG11 cu Turks Island Salts și vitamina B12, crescută la intensitate luminoasă continuă de 50µE/m^2 s, la 38^{0}C, până la o concentrație clorofiliană de 14µg chl/ml. S-a aplicat tratament cu radiații UVB (500 mV/cm^2) cu filtru de cromat de potasiu. S-au realizat experimente paralele pe cultura tratată și netratată cu lincomicină. În prima etapă, se măsoară evoluția de oxigen a culturii control, în prezența 2,6-dimetoxibenzochinona DMBQ (1µl/mL), după 10 minute la lumina vizibilă (50µE) se adaugă lincomicina și după 15 minute se începe tratamentul cu UVB prin filtru de cromat de potasiu recoltându-se probe la 15, 30, 60 și respectiv 90 minute de tratament și la 30, 60 și 90 minute de recuperare a culturii în lumină din spectrul vizibil. Rezultatele sunt prezentate în fig. 3.

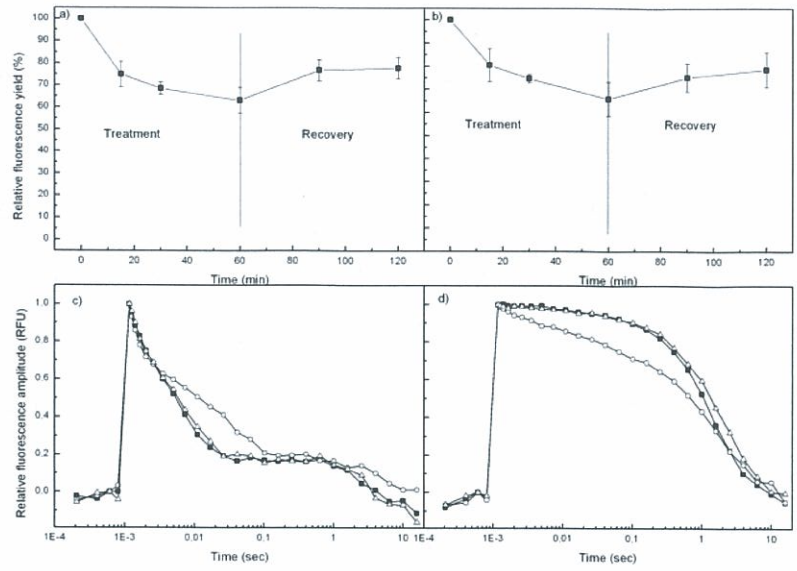


Figura 2. Influența radiației UV-B asupra funcției PSII de la *Synechococcus sp.* PCC 7002. Modificări ale numărului de centri activi (panel a) sau ai potențialilor centri activi (panel b) la control, tratament UV-B și recuperare în absența (panel a) sau în prezența DCMU (panel b). Fluorescența indusă de impulsul luminos actinic a fost măsurată pe celule control, supuse tratamentului cu UV-B și supuse perioadei de recuperare în absența (panel c) sau în prezența (panel d) DCMU.

În urma experimentului, la partea de recuperare, de revenire la condițiile normale de creștere, s-a observat o rată a evoluției de oxigen mai mică la cultura tratată cu lincomicină comparativ cu cultura control, fapt care sugerează că blocarea sintezei proteice cu lincomicină împiedică sinteza unor proteine ale PSII implicate în reacția celulelor la stres.

De asemenea, s-au realizat măsurători ale evoluției de oxygen și pe o cultură de *Cyanothece sp.* ATCC 51142, crescută în ciclu zi-noapte, la o concentrație clorofiliană de 10µg chl/ml și un volum final de 250ml, pentru a observa variația evoluției de oxigen pe durata unui ciclu zi-noapte. Probele au fost recoltate la orele 7^{00}, 9^{00}, 14^{00}, 19^{00}, 21^{00} și 2^{00} și s-a măsurat evoluția de oxigen. Rezultatele sunt prezentate în figura 4, panel a.

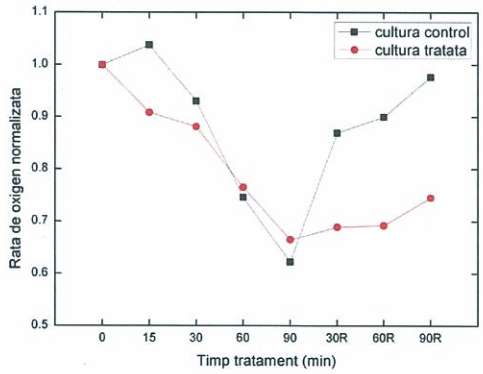


Figura 3. Variația evoluției de oxigen a culturii de *Synechococcus sp.* PCC 7002 mutant, în condiții de lumină vizibilă și radiații UVB.

S-a observat că există o perioadă în cursul zilei, când respirația atinge un maxim, astfel că experimentul a fost reluat pe o perioadă de 12 ore, la lumină vizibilă, fiind recoltate probe pentru măsurarea evoluției de oxigen din oră în oră. Rezultatele, prezentate în graficul 3, evidențiază o modulare a activității PSII în cursul unei zile, cu un maxim în jurul orei 13^{00} (fig. 4, panel b).

4. Immunodetecția proteinei D1 folosind tehnica Western-Blot pentru caracterizarea funcțională a proteinei D1

S-a utilizat tulpina cianobacteriana model *Synechocystis sp.* PCC 6803 care a fost supusă tratamentului cu un amestec de gaze (azot 95% , dioxid de carbon 5%) în scopul realizării condițiilor de microaerobioză, fiind demonstrat anterior că microaerobioza conduce la expresia unor gene care în condiții normale de creștere nu sunt exprimate. Studii de Real-Time qRT-PCR au fost făcute anterior pe această tulpină observându-se o modificare a expresiei genei *psbA-D1*' în condiții de microaerobioză.

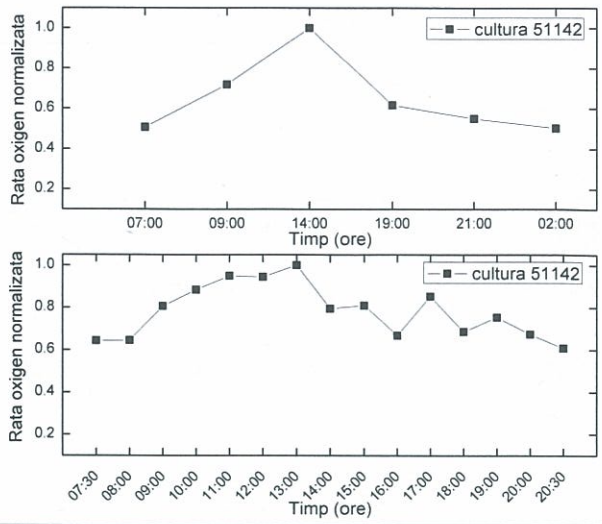


Figura 4. Variația evoluției de oxigen a culturii de *Cyanothece sp.* ATCC 51142 crescută în ritm zi-noapte (panel a) sau pe o perioadă de 12 ore (panel b).

Am dorit să aflăm dacă există o influență a microaerobiozei, vizibilă la nivelul expresiei proteice. Pentru aceasta s-au recoltat probe la timpul 0 (control), la 15, 30 și 60 min de tratament cu amestecul de gaze menționat și apoi la 30 și 60 min din timpul perioadei de recuperare. Probele au fost procesate conform protocolului pentru izolare de proteine, proteinele izolate au fost cuantificate și o cantitate egală de proteină din toate probele a fost încarcată pe gel, migrate în sistemul de electroforeză și ulterior transferate pe membrană de nitroceluloză în vederea imunodetecției. Imunodetecția s-a făcut utilizând anticorp găină anti-proteina D1 total, C-terminal (Agrisera) 1:10000 și anticorp secundar iepure anti-găină marcat cu peroxidaza (HRP), 1:5000. După developare modelul de benzi obținut (banda la apx 30KDa) indică o ușoară scădere a cantității de D1 total în urma tratamentului de 60min microaerobioză care dispare odată cu încetarea tratamentului. Aceasta indică un ușor efect inhibitor a microaerobiozei asupra expresiei proteinelor D1 de la *Synechocystis sp.* PCC 6803 dar nu oferă indicații asupra isoformei afectate așa cum indică metoda RT-q-RT-PCR în ceea ce privește expresia diferitelor gene pentru isoforme diferite ale D1. Inexistența anticorpilor specifici pentru aceste isoforme datorată asemănării secvenței de aminoacizi a acestor isoforme proteice limitează informațiile obținute în urma experimentelor de immunoblot.

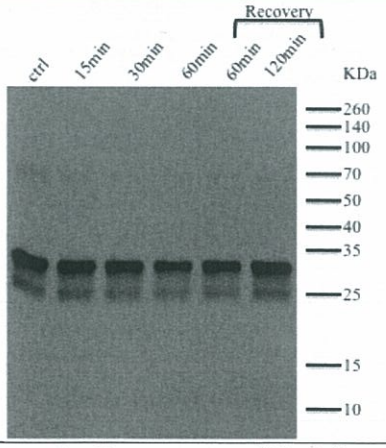


Figura 5. Immunoblot cu expresia proteinei D1 totale la *Synechocystis sp.* PCC 6803 în timpul tratamentului de microaerobioză. Se observă banda specifică la apx. 30KDa corespunzătoare proteinei D1.

5. Detectarea diferiților ampliconi PCR în probe de mediu

S-au realizat izolări de ADN pe probele recoltate din mediu conform protocolului optimizat în laboratorul nostru. Amorsele specifice pentru diverse gene ce codifică pentru isoforme ale proteinei D1 au fost construiți cu ajutorul programului Primer3 (NCBI). Amplificarea PCR folosind amorsele specifice nu a dus la apariția ampliconilor asteptați. Procesul de optimizare a PCR-ului cu amorse specifice este în desfășurare.

6. Măsurători de fluorescență clorofiliană pe culturi recoltate din mediu

Crustele bacteriene reprezintă aglomerări de microorganisme dispuse în straturi suprapuse care apar la interfața dintre diverse substraturi, mai ales substraturi umede. Crustele microbiene sunt alcătuite din comunități de prokariote fotosintetizante, bacterii și archeae. Aceste cruste cianobacteriene sunt un valoros model experimental pentru a observa modulările procesului de fotosinteză în funcție de condițiile de mediu.

Izvorul termal de la Ciocaia, din județul Bihor prezintă o varietate de temperaturi, de la 65.5°C la izvor, 60.5°C la 2 metri de la izvor și între 32-38°C în zona unde se formează comunitățile microbiene. Se observă foarte aproape de izvor, la temperatura cea mai crescută o comunitate bacteriană albă, urmată de o comunitate roșie și una verde la temperaturi mai scăzute. Comunitatea de culoare verde este reprezentată de o crustă cianobacteriană. O parte considerabilă a acestei cruste a fost recoltată împreună cu apă de la izvorul termal și transportată în laboratorul institutului nostru. Aici a fost plasată într-o cuvă cu pereți dubli cu apă de la izvorul termal Ciocaia, barbotată cu aer și mentinută la 37^0C prin recircularea apei din pereții cuvei de creștere. După două săptămâni apa de la izvorul termal a fost înlocuită treptat (amestec 2:1, 1:1, 1:2) cu mediu de cultură BG11 netamponat.

Măsurarea fluorescenței clorofiliene la această probă adaptată la condițiile de creștere din laborator indică un transfer mai rapid de electroni între Q_A și Q_B indicând faptul că partea acceptoare a PSII funcționează normal. În prezența DCMU care blochează transferul de electroni de la Q_A la Q_B și Q_{A-} se combină cu componentele părții donoare a PSII, în special cu complexul de reoxidare al apei, se observă o perioadă de conservare mai lungă a fluorescenței dar nu se observă alte modificări specifice. Comparativ cu probele măsurate anterior în crustele de la izvorul termal Ciocaia, unde s-a observat o încetinire a transportului de electroni, probele noastre arată un transfer mai rapid al electronilor ceea ce se explică prin faptul că în crustele bacteriene, celulele cianobacteriene sunt expuse luminii solare și astfel transportul electronilor este încetinit ca răspuns la lumina solară.

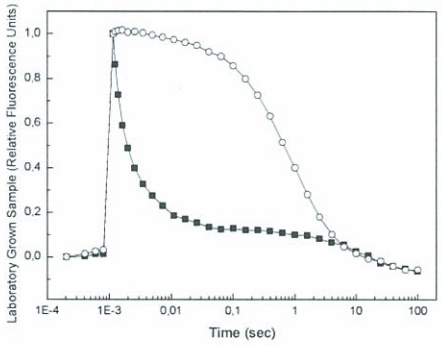


Figura 6. Fluorescența clorofiliană măsurată pe cultura cianobacteriană adaptată în laborator netratată (cerc plin) și tratată (cerc gol) cu DCMU.

7. *Evidențierea grupelor taxonomice din lacuri saline folosind tehnica qRT-PCR*

S-au făcut studii taxonomice de tipul "metabarcoding" pe probe din două lacuri hipersaline meromictice din bazinul transilvănean- Lacul Ursu și Lacul Fără Fund. Lacurile hipersaline meromictice reprezintă medii extreme în care stratificarea apei este asociată cu gradiente fizico-chimice și cu concentrații mari de sare. Pentru a analiza compoziția și structura comunităților de prokariote din aceste lacuri s-au colectat probe care s-au folosit pentru secvențierea tip "deep-coverage"a ampliconilor subunității mici (16S) de ADN ribosomal. Acești ampliconi s-au obținut în urma experimentelor de PCR cantitativ folosind amorse specifice pentru ADNr 16S pentru filumul Bacteria sau Archaea. Pentru aceasta, a fost izolat ADN din probele recoltate din lac din diverse zone de stratificare și au fost efectuate experimente de qRT-PCR pentru a evalua abundența relativă a indivizilor din filumul Archaea și respectiv Bacteria folosind primeri specifici pentru Archaea și Bacteria SSU ADNr. Dupa secvențarea ampliconilor 16S ADNr de bacterii și de archae s-a construit un arbore filogenetic care oferă indicii despre compoziția în prokariote a lacurilor studiate. Astfel, s-a observat că diversitatea filumului Archaea si Bacteria crește odată cu creșterea nivelului de salinitate. Acest studiu prezintă un caracter de unicitate pentru țara noastră fiind primul studiu de acest gen realizat pe lacurile hipersaline. Importanța studiului constă în faptul că s-au identificat o serie de tulpini de cianobacterii, cu precădere specii ale genului *Synechococcus* identificate în Lacul Ursu și care vor fi studiate în continuare din punct de vedere al expresiei genelor *psbA* în aceste condiții extreme de mediu din lacurile analizate. Aceste date au fost publicate ca Andrei AŞ, Robeson II MS, Baricz A, Coman C, Muntean V, Ionescu A, Etiope G, Alexe M, Sicora CI, Podar M, Banciu HL. 1 May 2015. Contrasting taxonomic stratification of microbial communities in two hypersaline meromictic lakes. ISME J doi:10.1038/ismej.2015.60.

Data
27.11.2015

Director de proiect
C.S.I. Dr. Cosmin Ionel Sicora