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 2014*

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 şi etapa din anul 2013 când au fost demarate studii privind caracterizarea funcţională a proteinei D1 din diferite comunităţi cianobacteriene, în anul 2014 au fost:

- Continuate studiile privind caracterizarea funcţionalităţii fotosistemului II la culturi cianobacteriene model care au genomul complet secvenţat; în acest sens a fost identificată o genă reporter caracteristică tulpinii cianobacteriene *Synechococcus sp*. PCC 7002, şi au fost cercetate de asemenea noi aspecte ale lanţului transportor de electroni la această tulpină.
- Continuate studiile privind caracterizarea funcţională a formelor proteinei D1 din comunităţi cianobacteriene în scopul stabilirii condiţiilor de mediu propice pentru exprimarea diferitelor izoforme ale proteinei D1.
- Continuate studiile privind modificări specifice în secvenţele de aminoacizi ale proteinei D1 caracteristice diferitelor izoforme ale proteinei.
- În urma acestor experimente s-a generat un volum mare de date experimentale pe baza cărora 3 articole au fost finalizate şi publicate în diferite reviste cotate ISI (1 articol) şi BDI (2 articole). De asemenea sunt în curs de redactare alte articole ştiinţifice. 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

Synechococcus sp. PCC 7002 este o tulpină cianobacteriană unicelulară, fotoheterotrofă, eurihalină, tolerantă la diferite intensităţi luminoase, la expunerea la stres oxidativ, schimbări de temperatură, salinitate. În experimente realizate alături de colaboratorii noştri de la Institutul de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca, am urmărit selecţia unor gene de referinţă pentru această cianobacterie, folosind experimente de PCR cantitativ. Au fost analizate în acest scop 6 gene de referinţă. Culturile cianobacteriene au fost expuse la diferite forme de stres, apoi datele au fost calculate folosind 3 algoritmi diferiţi, rezultând o listă de gene de referinţă care pot fi folosite în experimente de PCR cantitativ. În reacţiile de PCR cantitativ, mulţi factori pot să afecteze rezultatele, ceea ce face necesară o standardizarea lor pentru a dezvălui schimbări semnificative în nivelul ARNm (Nolan şi colab., 2006). Pentru a face posibilă compararea concentraţiilor de transcript între probe diferite, este necesară de asemenea normalizarea datelor. Cea mai comună metodă este normalizarea la o genă de referinţă endogenă, deoarece atât gena de interes cât şi gena de referinţă sunt cuantificate în cadrul aceleiaşi reacţii de amplificare PCR. Astfel, în cadrul acestor experimente a fost evaluată stabilitatea în expresie a unor gene de referinţă la *Synechococcus sp*. PCC 7002 sub influenţa a 3 tipuri de stres (microaerobioză, incubare în întuneric respectiv stres UVB). Genele de referinţă au fost alese pe baza studiilor anterioare care au folosit această tulpină cianobacteriană în studii de PCR. S-au făcut reacţii PCR, pe baza rezultatelor extrase din sistemul IQ5 de la Bio-Rad s-au calculat valorile exprimării genice. Datele au fost normalizate şi s-a ajuns la concluzia că există 4 gene de referinţă care se pot folosi pentru exprimarea *Synechococcus sp*. PCC 7002 în diferite condiţii de mediu. Aceste rezultate au fost publicate în articolul "**Selection of proper reference genes for the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7002 using real-time quantitative PCR- FEMS Microbiol Lett 359 (2014) 102–109**".

2. Măsurători de fluorescenţă şi imunodetecţie a proteinei D1 în diferite condiţii experimentale

În aceste studii am folosit o tulpină mutant de *Synechococcus* sp. PCC 7002 care are inhibată o genă care codifică izoforma D1' a proteinei D1, comparativ cu tulpina normal de *Synechococcus* sp. PCC 7002, care are 3 gene ce codifică diferite izoforme ale proteinei D1. Tulpina mutant a fost un cadou din partea colaboratorilor nostril de la Universitatea din Berlin. Scopul experimentelor a fost înţelegerea rolului izoformelor proteinei D1 în diferite condiţii de mediu. Încercăm astfel să înţelegem natura şi originea modificărilor observate în curbele de fluorescenţă, precum şi mecanismului transferului liniar de electroni la cianobacterii. Condiţiile standard de creştere au fost: intensitate luminoasă de 50 $\mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$ şi 38°C.

Stresul luminos a fost aplicat 120 de minute, urmat de o revenire la condiţiile iniţiale de iluminare pentru 60 de minute. La o altă cultură, condiţiile iniţiale de lumină au fost înlocuite cu radiaţii UVB pentru 120 de minute, urmate de o revenire la condiţiile iniţiale de iluminare pentru 60 de minute. Pentru a induce microaerobioza, sau condiţiile de oxigen scăzut, în cultură s-a barbotat N_2 timp de 120 de minute, urmând ca în perioada de recuperare să fie barbotată cu aer pentru 60 de minute. Măsurătorile de fluorescenţă clorofiliană s-au făcut în absenţa şi prezenţa DCMU ((3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), un ierbicid care blochează transferul electronilor între Q_A şi Q_B şi permite vizualizarea funcţionalităţii părţii donoare a lanţului transportor de electroni în fotosinteză. Măsurătorile s-au realizat cu fluorimetrul FL3500. De asemenea au fost prelevate şi probe pentru izolarea acizilor nucleici şi a proteinelor.

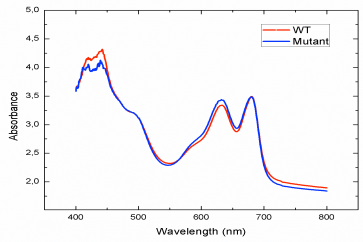


Figura 1: Spectrul total de absorbţie al celulei la tulpinile de *Synechococcus sp*. PCC 7002 normal şi mutant.

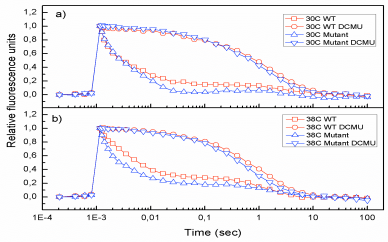


Figura 2: Reoxidarea Q_A măsurată prin fluorescenţă clorofiliană în prezenţa şi absenţa DCMU la tulpinile de *Synechococcus sp*. PCC 7002 normal şi mutant.

Se observă astfel că în condiţii de creştere normală, tulpina mutant arată un transfer accelerat între Q_A şi Q_B, modificare mai accentuată în special la 38ºC (Figura 2) şi de asemenea că tulpina mutant prezintă un raport mai mare între clorofilă şi ficobilizomi (Figura 1) ceea ce sugerează o capacitate mai mare de captare a energiei luminoase. Din figura 3 şi 4 se observă cu nu există diferenţe notabile între celulele normale şi cele mutante în cazul tratamentelor cu microaerobioză respectiv cu stres UVB

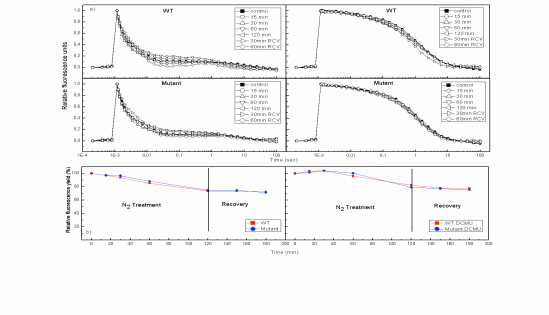


Figura 3: Efectul condiţiilor de microaerobioză asupra părţii donoare şi acceptoare a PSII la tulpinile de *Synechococcus sp*. PCC 7002 normal şi mutant.

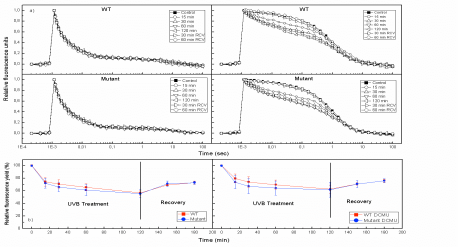


Figura 4: Efectul stresului UVB asupra părţii donoare şi acceptoare a PSII la tulpinile de *Synechococcus sp*. PCC 7002 normal şi mutant.

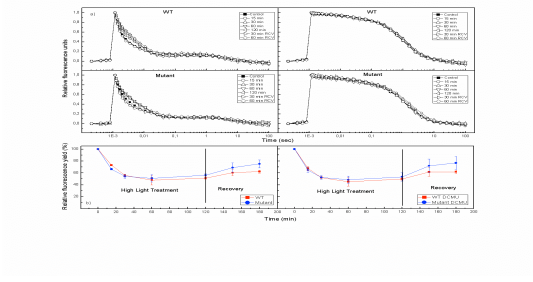


Figura 5: Efectul stresului cu intensitate luminoasă crescută asupra părţii donoare şi acceptoare a PSII la tulpinile de *Synechococcus sp*. PCC 7002 normal şi mutant.

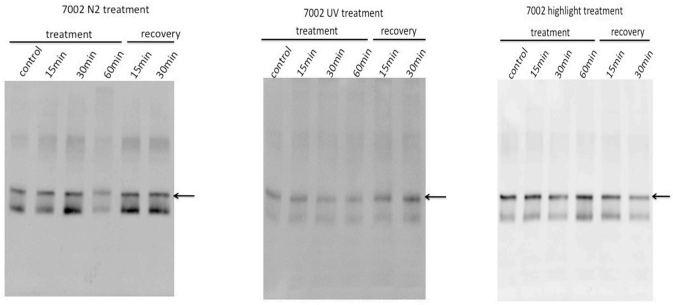


Figura 6: Detecţia proteinei D1 folosind un anticorp global anti D1 la *Synechococcus sp*. PCC 7002 în timpul tratamentului de microaerobioză, tratament UVB şi tratament luminos.

În cazul experimentelor de stres luminos însă, se observă o capacitate mai mare de recuperare a celulelor tulpinii mutant după 120 de minute de tratament, atât în prezenţa cât şi în absenţa DCMU (Figura 5). În ceea ce priveşte analizele de proteomică efectuate, se observă o creştere a cantităţii totale de proteină

D1 în timpul perioadei de recuperare, creștere tipică unei reacții celulare post stres. Aceste rezultate au fost prezentate în cadrul celui de-al IX-lea Workshop European pe Biologia Moleculară a Cianobacteriilor, simpozion internațional de prestigiu care a avut loc în Olanda în luna Septembrie, sub forma unui poster cu titlul „**New Insights in PSII Electron Transport Chain in Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002**”. Menționăm că datorită restricțiilor bugetare din anul 2014 finanțarea participării la această conferință de prestigiu în domeniul fotosintezei s-a facut din alte surse decât cele din proiect.

Tot în acest an am continuat și studiile cu privire la influența ritmului circadian asupra fotosistemului II în condiții de ciclu zi-noapte la unele specii de cianobacterii model. În acest sens, am continuat experimentele de măsurare a fluorescenței clorofiliene la tulpina cianobacteriană *Cyanothece sp.* ATCC 51142 la fiecare 60 de minute timp de 26 de ore, atât în prezența cât și în absența DCMU. De asemenea s-au realizat măsurători de fluorescență în prezența lincomicinei (300µg/ml), un inhibitor ce blochează sinteza de noi proteine. Măsurătorile s-au realizat cu fluorimetrul FL3500 de la Photon Systems Instruments, s-a folosit un protocol de reoxidare a Q_A^-, apoi datele au fost procesate în programul Origin.8, după aplicarea în prealabil a unei corecții Joliot asupra fiecărei curbe. De asemenea au fost prelevate și probe pentru izolarea acizilor nucleici și a proteinelor.

Se observă astfel că în timpul întunericului partea acceptoare a PSII este modificată prin apariția unei încetiniri a transferului între Q_A și Q_B, (Figura 7), modificare mai evidentă în centrele care au în timpul impulsului luminos locusul Q_B liber. Apariția unei faze rapide pe curba fluorescenței în prezența DCMU (Figura 8) în timpul perioadei de întuneric sugerează o inhibare a complexului de oxidare a apei, modificare reversată la aproximativ o oră de la aprinderea luminii. Tratamentul cu Lincomicină, aplicat cu 80 de minute înainte de stingerea luminii, au redus modificările observate atât în partea donoare, cât și în cea acceptoare a PSII, dar nu a schimbat semnificativ evoluția numărului de centri activi ai PSII. Aceasta sugerează că, cel puțin în parte, modificările observate în timpul perioadei de întuneric se datorează sintezei *de novo* a proteinelor

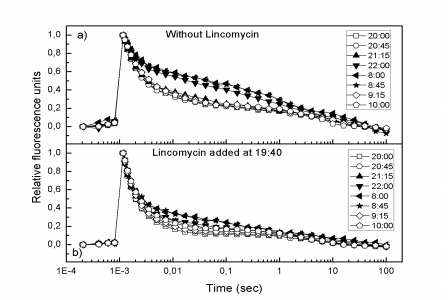


Figura 7: Modificări în partea acceptoare a funcției fotosistemului II în timpul unui ciclu de 12h lumină/12h întuneric la cianobacteria *Cyanothece* sp. ATCC 51142, în absența (a) și prezența (b) Lincomicinei.

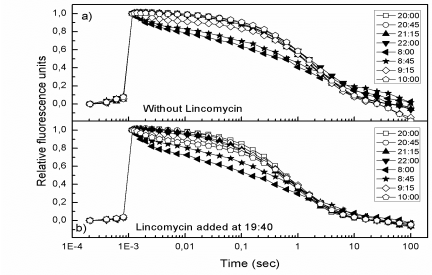


Figura 8: Modificări în partea donoare a funcției fotosistemului II în timpul unui ciclu de 12h lumină/12h întuneric la cianobacteria *Cyanothece* sp. ATCC 51142, în absența (a) și prezența (b) Lincomicinei.

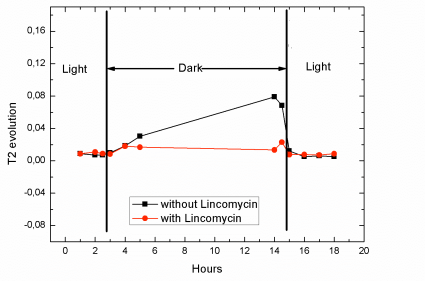


Figura 9: Evoluția parametrului T2 în partea acceptoare a fotosistemului II în timpul unui ciclu de 12h lumină/12h întuneric la cianobacteria *Cyanothece* sp. ATCC 51142, în absența și prezența Lincomicinei.

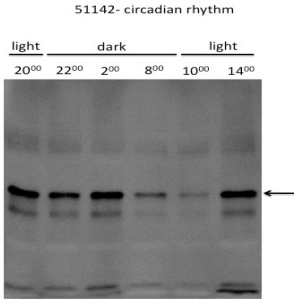


Figura 10: Modificări în cantitatea totală a proteinei D1 în timpul unui ciclu de 12h lumină/12h întuneric la cianobacteria *Cyanothece* sp. ATCC 51142.

Folosind un anticorp general pentru proteina D1 se observă schimbări semnificative în cantitatea totală a proteinei D1 în cadrul ciclurilor de lumină/întuneric (Figura 10), modificări care se corelează cu

schimbările observate la măsurătorile de fluorescență. Aceste rezultate au fost prezentate în cadrul celui de-al 9lea Workshop European pe Biologia Moleculară a Cianobacteriilor, simpozion internațional de prestigiu care a avut loc în Olanda în luna Septembrie, sub forma unui poster cu titlul „**Changes In Photosystem II (PSII) Function During Dark and Light Cycles In Cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142"**. Menționăm că datorită restricțiilor bugetare din anul 2014 finanțarea participării la această conferință de prestigiu în domeniul fotosintezei s-a facut din alte surse decât cele din proiect.

3. **Poze de geluri agaroză reprezentând izolarea ADN din probele de mediu.**

În acest sens s-a realizat optimizarea protocolului de extracție ADN la comunitățile cianobacteriene de la izvorul termal de la Ciocaia, județul Bihor.

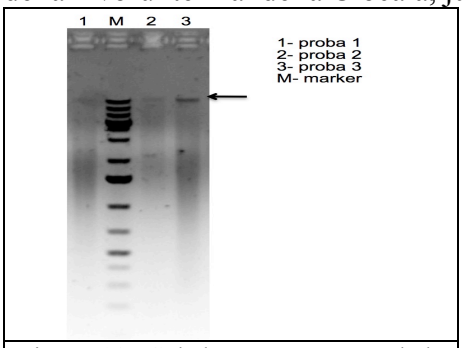


Figura 11: Gel de agaroză cu probele de la Ciocaia pentru optimizarea protocolului de extragere ADN.

Pentru izolarea ADN-ului s-au folosit cantități diferite de cultură cianobacteriană (50mg și 100mg). Extracția ADN-ului s-a realizat cu kit-ul Isolate II Plant DNA kit (Bioline). Cele trei probe de ADN obținute au fost cuantificate cu spectrofotometrul Nanodrop (Thermoscientific). Cele trei probe au fost supuse electroforezei în gel de agaroză (Figura. 11) în vederea verificării ADN-ului obținut. Benzile obținute pe gel corespunzătoare celor trei probe de ADN confirmă concentrațiile diferite obținute conform quantificării spectrofotometrice și anume: proba1- 18.3ug/ul (50mg material start, 3 sec. sonicare), proba2- 21.4ug/ul (50mg material start, 8 sec sonicare), proba3- 40ug/ul (100mg material start, 8 sec sonicare). Se poate concluziona că eficiența extracției ADN-ului din cultura cianobacteriană creste odată cu cantitatea de material vegetal și cu timpul de sonicare. Cantitatea de material vegetal și timpul de sonicare folosit în cazul probei 3 din experimentul nostru reprezintă condițiile optime pentru izolarea unui ADN cianobacterian de calitate fără degradări substanțiale ale acidului nucleic izolat.
Următoarea etapă a acestei activități va viza optimizarea condițiilor pentru PCR cu primeri corespunzători pentru amplificarea fragmentelor genice de interes.

4. **Măsurători de fluorescență clorofiliană ce evidențiază prezența unor forme ale proteinei D1 în probe din mediu.**

În acest an s-au realizat mai multe deplasări la izvorul termal de la Ciocaia, pentru monitorizarea comunităților cianobacteriene de aici. Menționăm că din aceste deplasări, una s-a realizat din fondurile existente la acest proiect.

De asemenea au fost incepute studii preliminare de monitorizare a lacurilor hipersaline din Transilvania in vederea evidentierii comunitatilor bacteriene edificate in acest tip de ecosistem. Lacurile hipersaline sunt un ecosistem de nisa ce prezinta o diversitate deosebita de tulpini de cianobacterii ce pot prezenta conformatii interesante ale formelor proteinei D1 din fotosistemul II. Mai jos prezentam pe scurt o descriere a experimentelor efectuale in locatia Ciocaia.

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. Astfel, am realizat un studiu comparativ al modificărilor în funcția PSII la comunități crescute în jurul izvorului termal și comunități crescute în condiții de laborator. Cultura din laborator a fost menținută la o intensitate luminoasă de 50 $\mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$ și 38°C, în mediu BG11, barbotată încontinuu cu aer. Analiza la microscop a culturii, a arătat faptul că în comunitățile microbiene de la Ciocaia predomină o tulpină de *Phormidium sp*., tulpină folosită ca și control în măsurătorile de fluorescență.

După ce am optimizat protocolul pentru măsurarea fluorescenței clorofiliene în teren, se observă în cazul comunității cianobacteriene verzi (Figura 12 panel a) o curbă de fluorescență asemănătoare cu curba control, arătând o curbă de reoxidare Q_A^- tipică. În acest caz se observă o încetinire a transferului între Q_A și Q_B, iar valoarea F_M este apropiată de 1.2.

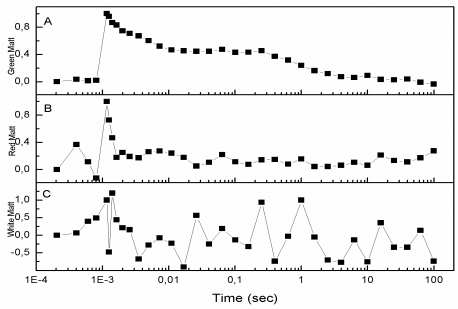


Figura 12: Modificări în partea acceptoare a lanțului transportor de electroni al PSII la comunitatea cianobacteriană verde (a), roșie (b) și albă (c) de la izvorul termal de la Ciocaia

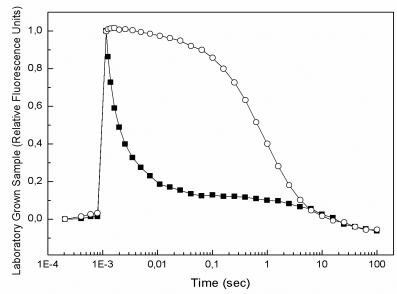


Figura 13: Caracteristicile funcționalității părții donoare și acceptoare a PSII măsurate în absența (pătrate negre) și prezența DCMU (cercuri) la cultura crescută în laborator izolată de la izvorul termal de la Ciocaia.

În cazul comunității roșii (Figura 12 panel b), se observă o separare clară a sarcinilor în momentul impulsului de saturare, arătând formarea lui Q_A^-. Totuși, reoxidarea Q_A^- este puternic conturbată, fără caracteristicile tipice unei curbe de fluorescență. Această activitate se coreleaza cu organismele care nu realizează un proces de fotosinteză tipic, ci probabil o fotosinteza bacterioclorofil-dependentă. În cazul comunității albe (Figura 12 panel c) nu se observă un răspuns la impulsurile de lumină.

Cultura de *Phormidium sp*. crescută în laborator din comunitatea cianobacteriană verde de la Ciocaia, prezintă un transfer al electronilor mai rapid între Q_A și Q_B, corespondent cu o funcționare normală a părții acceptoare a fotosistemului II. De asemenea în ceea ce privește curbele cu DCMU sunt nemodificate, sugerând o parte donoare standard a PSII la această cianobacterie. Faptul că la proba de laborator curba de fluorescență este mai rapidă decât măsurătorile în teren, indică o deteriorare a transferului de electroni care apare în mod normal când celulele sunt expuse la lumină. Acestea sunt primele măsurători ale lanțului transportor de electroni la un izvor termal, observație foarte importantă în condițiile în care, în majoritatea experimentelor sunt efectuate în condiții de laborator care pretind să mimeze condițiile naturale. Mai multe date cu privire la aceste măsurători au fost publicate într-un articol cu titlul „**Forward Electron Transport Measured In Situ In Microbial Mats From A Hot Spring in N-W Romania**” în revista “Studia Universitatis Babes-Bolyai”.

De asemenea, în acest an am continuat studiile de bioinformatică cu scopul de a sintetiza informația existentă în bazele de date cu privire la modificări cheie în secvența de aminoacizi a diferitelor izoforme ale proteinelor D1. De asemenea am prezentat o posibilă distribuție funcțională a izoformelor proteinei D1 pe baza cunoștințelor acumulate, și am realizat o diagramă Venn înbunătățită și completată, care arată clar distribuția diferitelor izoforme ale proteinei D1 în cadrul tulpinilor cianobacteriene.

Se observă astfel că, din totalul de 30 de genomuri cianobacteriene studiate, 4 tulpini au toate cele 3 izoforme ale proteinei D1 (D1:2, D1’ și D1r). 17 genomuri conțin izoforma D1:2, din care nouă genomuri au doar această izoformă, patru au izoformele D1:2, și D1’, iar 3 genomuri cianobacteriene conțin toate izoformele discutate. Datele prezentate aduc o interpretare originală a informațiilor existente privind familiile de gene psbA și a proteinelor D1 codificate de acestea, disponibile din genomurile cianobacteriene secvențate până în acest moment. Rezultatele acestor analize s-au concretizat în acest an într-un articol cu titlul **“Comparative Analysis of D1 Protein Sequences in Cyanobacteria”** în revista “Studia Universitatis Babes-Bolyai”.

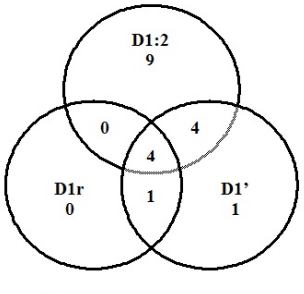


Figura 14: Diagrama Venn ce prezinta distribuția izoformelor proteinei D1 la tulpinile cianobacteriene studiate.

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

Data: 24 Noiembrie 2014