

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 ianuarie – decembrie 2013

Proteina D1 a fotosistemului II (PSII), codificata de genele *psbA*, este o componenta indispensabila a fotosintezei oxigenice. Datorita chimiei puternic oxidative a PSII, proteina D1 este supusa unei deteriorari constante, necesitand inlocuirea ei de catre o copie noua la fiecare 5h in conditii de iluminare slaba, si la fiecare 20 de minute in conditii de iluminare intensa, in timp ce majoritatea celorlalte componente ale PSII raman nedeteriorate. La cianobacterii, proteina D1 este codificata de familia de gene *psbA*, ce contine intre 1 si 6 membri. Prezenta multiplelor gene ce codifica diferitele izoforme ale D1 este un indicator clar al importantei lor in mecanismele reglatoare responsabile pentru mentinerea unui PSII functional in conditiile schimbarii conditiilor de mediu in habitatele naturale ale cianobacteriilor.

Dupa faza initiala de implementare a proiectului desfasurata in 2011, cand s-au efectuat primele activitati pregatitoare si cea din 2012 cand au fost incepute studii pentru caracterizarea functionala a proteinei D1 , in 2013 au fost:

- continuate studiile privind caracterizarea functionala a formelor proteinei D1 prezente in culturi cianobacteriene model care au genomul complet secventat.
- demarate studii privind caracterizarea functionala a formelor proteinei D1 din comunitati cianobacteriene. Scopul acestor studii este acela de a stabili o corelatie intre diferitele izoforme ale proteinei D1 si conditii specifice de mediu.
- Optimizate protocoale si metode de lucru pentru studiul functiei proteinei D1 in teren, atat in timpul zilei cat si a noptii.
- In urma acestor experimente s-a generat un volum mare de date experimentale pe baza carora sunt in curs de redactare mai multe articole stiintifice. O sinteza a acestor date o prezentam in cele ce urmeaza;

Speciile luate in studiu in aceasta faza sunt: *Synechocystis sp.* PCC6803; *Cyanothece* ATCC51142 si probe preluate din diferite comunitati cianobacteriene, un exemplu in acest sens fiind comunitatile cianobacteriene de la izvorul termal din Ciocaia, judetul Bihor.

1. Influenta CO₂ asupra expresiei genei *psbA1* din *Synechocystis sp.* PCC6803

In *Synechocystis sp.* PCC6803 sunt 3 gene *psbA* cu diferite strategii de reglare. *psbA2* este responsabila pentru producerea proteinei D1 in conditii normale de crestere, *psbA3* a fost descrisa ca gena care raspunde la tratamentele cu UVB, iar *psbA1*, considerata initial o gena silentioasa, s-a demonstrat ca se induce in conditii de oxigen scazut, sau microaerobioza.

Scopul experimentelor a fost acela de investigare a felului in care gena *psbA1* este influentata de cantitatea de CO₂ din mediu, rezultate importante pentru intelegerea felului in care aceasta gena este reglata in contextul larg al adaptarii celulei la conditiile din mediul inconjurator.

Synechocystis sp. PCC6803 a fost obtinuta de la Pasteur Culture Collection, si crescuta la 30°C si 50µmol fotoni m⁻²s⁻¹ lumina. Tulpina a fost crescuta pana la o concentratie a clorofilei de 6µg chl ml⁻¹.

Pentru a investiga influenta CO₂ asupra expresiei genelor *psbA*, am realizat 3 tipuri de experimente:

- In primele experimente, proba control a fost barbotata cu 5% CO₂ 95% aer, apoi cultura a fost barbotata cu aer pentru 120 de minute, revenind la amestecul initial de gaze pentru 60 de minute de recuperare.
- In cea de-a doua serie de experimente, aerul a fost inlocuit cu barbotarea de aer sintetic, fara CO₂, timp de 48 de ore, fara perioada de recuperare.
- La cea de-a treia serie de experimente, culturile au fost crescute prin barbotare de aer, apoi aerul a fost inlocuit cu N₂ pentru 120 de minute, apoi s-a trecut iar la aer pentru o perioada de recuperare de 60 de minute.

S-au prelevat probe de ARN si de fluorescanta de la toate cele 3 culturi. Masuratorile de fluorescanta au fost facute cu un fluorimetru FL3500 de la Photon Systems Instruments, cu un protocol de recombinare a

Q_A, apoi rezultatele au fost procesate in programul Origin.8. Fiecarei probe i-a fost aplicata o corectie Joliot inainte de grafic. Expresia genelor *psbA* din probele de ARN a fost analizata cu un sistem IQ5, de detectie RT-PCR de la Bio-Rad.

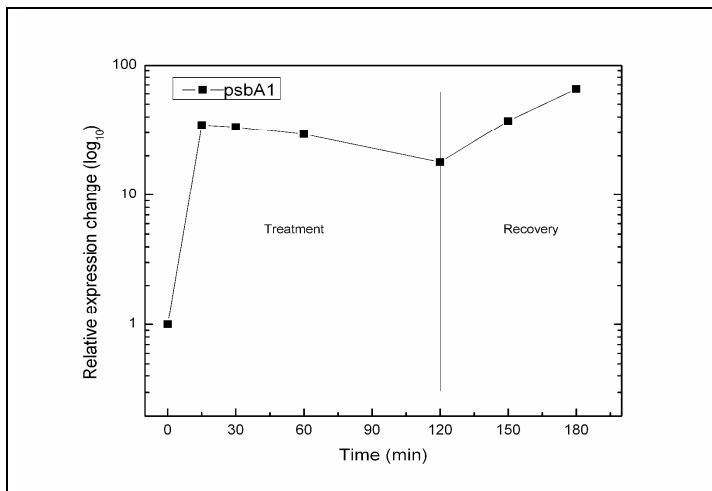


Figura 1: Efectul aerului atmosferic asupra expresiei genei *psbA1* in *Synechocystis sp.* PCC6803

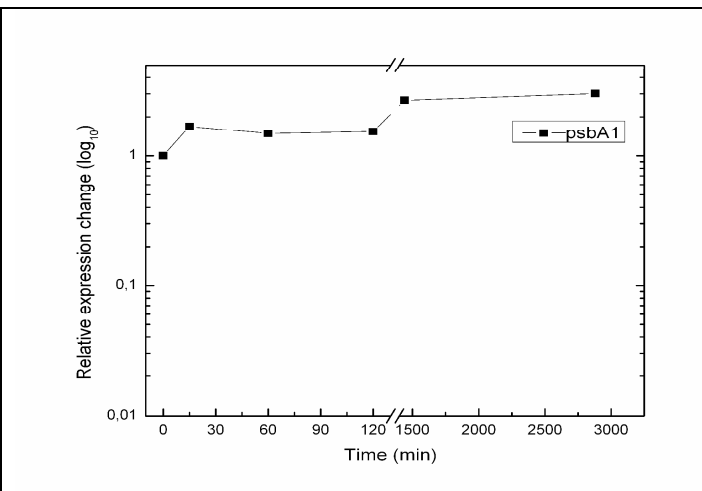


Figura 2: Efectul aerului sintetic asupra expresiei genei *psbA1* in *Synechocystis sp.* PCC6803

Se observa in Figura 1 pentru prima data o inductie a genei *psbA1* in prezenta aerului atmosferic, in timp ce trecerea culturii de la aer la aer sintetic arata o inductie slaba a genei *psbA1* (Figura 2).

Al 3-lea experiment, de barbotare a N₂ in cultura a fost folosit ca si experiment control, pentru a demonstra expresia genei *psbA1* in conditii de microaerobioza.

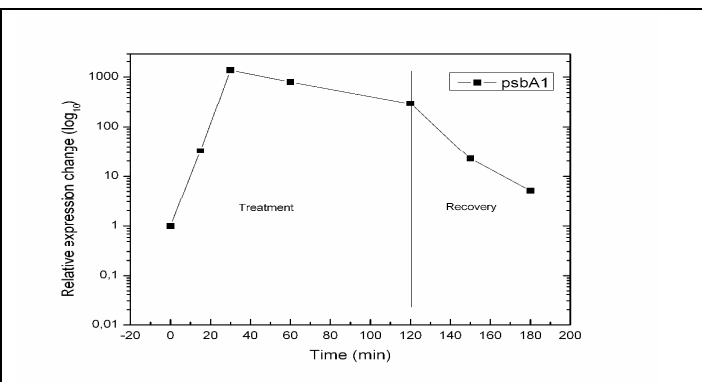
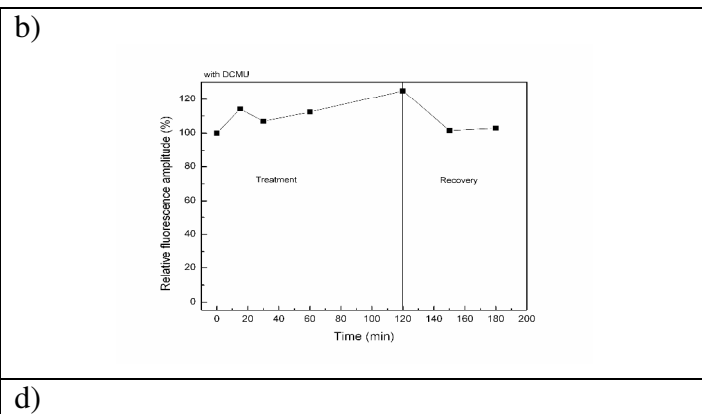
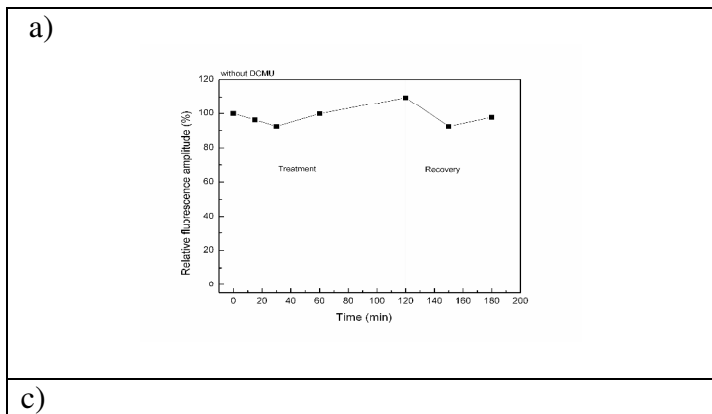


Figura 3: Efectul N₂ asupra expresiei genei *psbA1* in *Synechocystis sp.* PCC6803



c)

d)

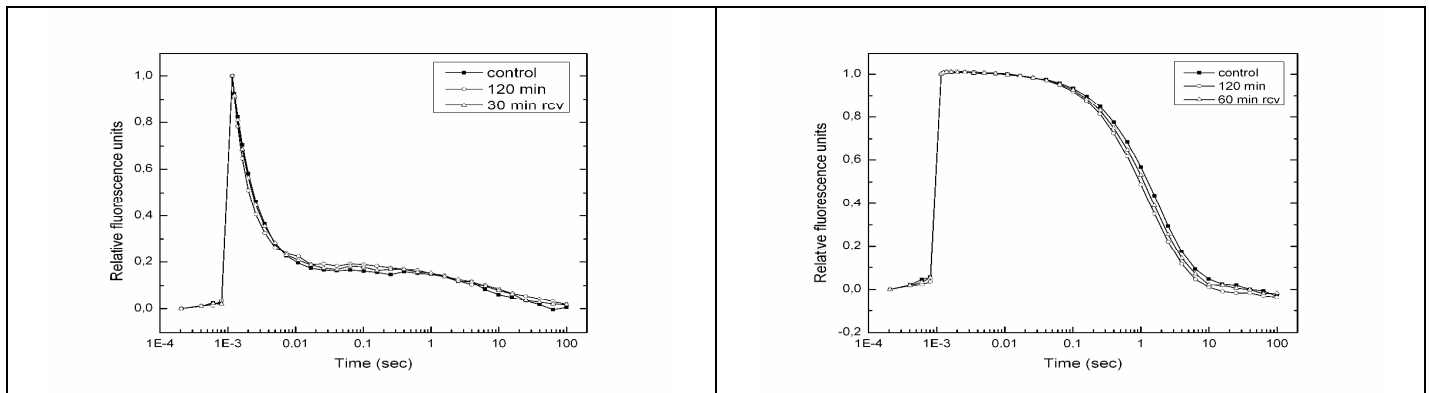


Figura 4: Efectul condițiilor de microaerobioza asupra amplitudinii fluorescenței în absența DCMU (panel a) și în prezența DCMU (panel b). Efectul microaerobiozei asupra părții acceptoare (panel c) respectiv asupra părții donoare (panel d) a lanțului transportor de electroni ai PSII.

Reducerea O_2 atmosferic, cauzată de barbotarea cu N_2 nu a avut un efect notabil asupra numărului de complexe active ale fotosistemului II, după cum se observă în figura 4, în absența (panel a) sau prezența (panel b) DCMU.

În absența DCMU, (panel c), barbotarea cu N_2 cauzează o accelerare a fazei rapide a lanțului transportor de electroni, ceea ce sugerează o alterare a transferului între Q_A și Q_B .

În prezența DCMU, (panel d), se poate observa un efect al condițiilor de microaerobioza asupra părții donoare a PSII, arătată prin o accelerare în faza mijlocie pe curba de reoxidare a Q_A^- .

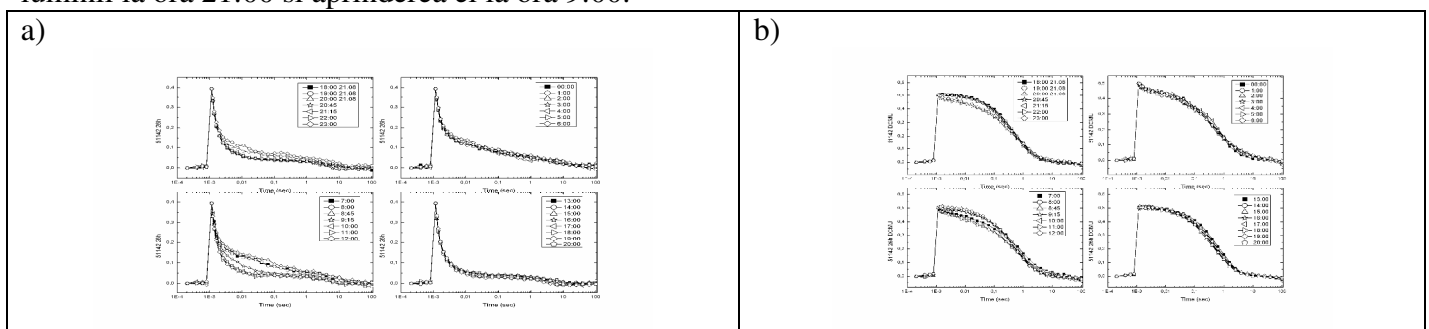
În concluzie, se observă în aceste experimente o inducție a genei *psbA1* atunci când concentrația CO_2 este trecută de la 5% la nivelul aerului, și concentrația oxigenului nu este modificată, inducție observată și în cazul dispariției totale a CO_2 din aer în prezența O_2 . De asemenea, barbotarea cu N_2 , care elimină atât CO_2 cât și O_2 are un efect inductor, ea induce gena *psbA1*, cum a fost anterior documentat.

2. Influența ritmului circadian asupra funcției fotosistemului II în condiții de ciclu-zi-noapte la unele specii de cianobacterii model.

În anul 2012, James Murray a publicat un articol intitulat “Sequence variation at the oxygen-evolving centre of photosystem II: a new class of “rogue” cyanobacterial proteins”, în care, în urma unor studii de bioinformatică, documentează o nouă izoformă a proteinei D1, și anume D1 rogue, (D1r), indusă la întuneric, precum și locusuri specifice în secvența de aminoacizi ale genelor unde se produc modificări în cazul proteinei D1r.

Pentru a verifica cum răspund culturile cianobacteriene în ciclul zi-noapte sau lumina-întuneric, am realizat experimente asupra 2 tulpini cianobacteriene model, și anume *Synechocystis sp.* PCC6803, și *Cyanothece* ATCC51142. Specia de *Cyanothece* ATCC51142 are 5 gene *psbA* ce codifică diferitele izoforme ale proteinei D1.

Experimentele au fost făcute în ciclu lumina-întuneric 12h/12h, au fost prelevate probe de ARN, proteine precum și de fluorescență clorofiliană, timp de 26h. Rezultatele au fost prelucrate în programul Origin.8. Ambele culturi cianobacteriene au fost aduse la o concentrație a clorofilei de $6\mu g\ chl\ ml^{-1}$, urmărindu-se efectul ciclului zi-noapte asupra lanțului transportor de electroni, dar și asupra genelor *psbA* și a expresiei lor, precum și asupra cantității de proteină D1. Camera climatică a fost setată pentru stingerea luminii la ora 21:00 și aprinderea ei la ora 9:00.



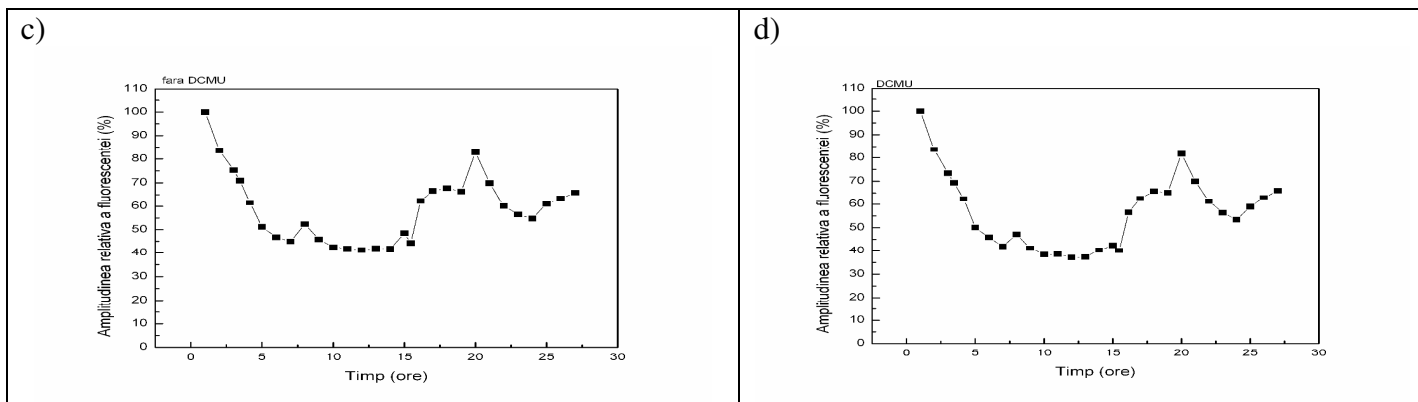


Figura 5: Efectul ritmului circadian asupra lantului transportor de electroni ai fotosistemului II atat in partea acceptoare a PSII (panel a) cat si asupra partii donoare a lantului transportor de electroni (panel b). Efectul ciclului lumina/intuneric asupra amplitudinii relative a fluorescentei in absenta (panel c) si in prezenta (panel d) DCMU.

Se observa astfel o accelerare a fazei mijlocii in partea acceptoare a lantului transportor de electroni la o ora dupa instalarea intunericului, accelerare prezenta pe toata perioada noptii (panel a) si corelata cu o scadere a numarului de centri activi ai PSII de aproximativ 60% , urmata de o revenire cu aproximativ 30 de procente in timpul zilei. In partea donoare a lantului transportor de electroni, in prezenta DCMU (panel c) se observa o faza rapida, ce apare o data cu instalarea intunericului si reprezinta recombinarea Q_A cu co-factori mai apropiati pe partea donoare, cauzata de o inhibitie a complexului de oxidare a apei. Si in partea donoare a lantului transportor de electroni, modificarile aparute se coreleaza cu o scadere a numarului de centri activi ai PSII de aproximativ 60% , urmata de o revenire cu aproximativ 30 de procente in timpul zilei (panel d).

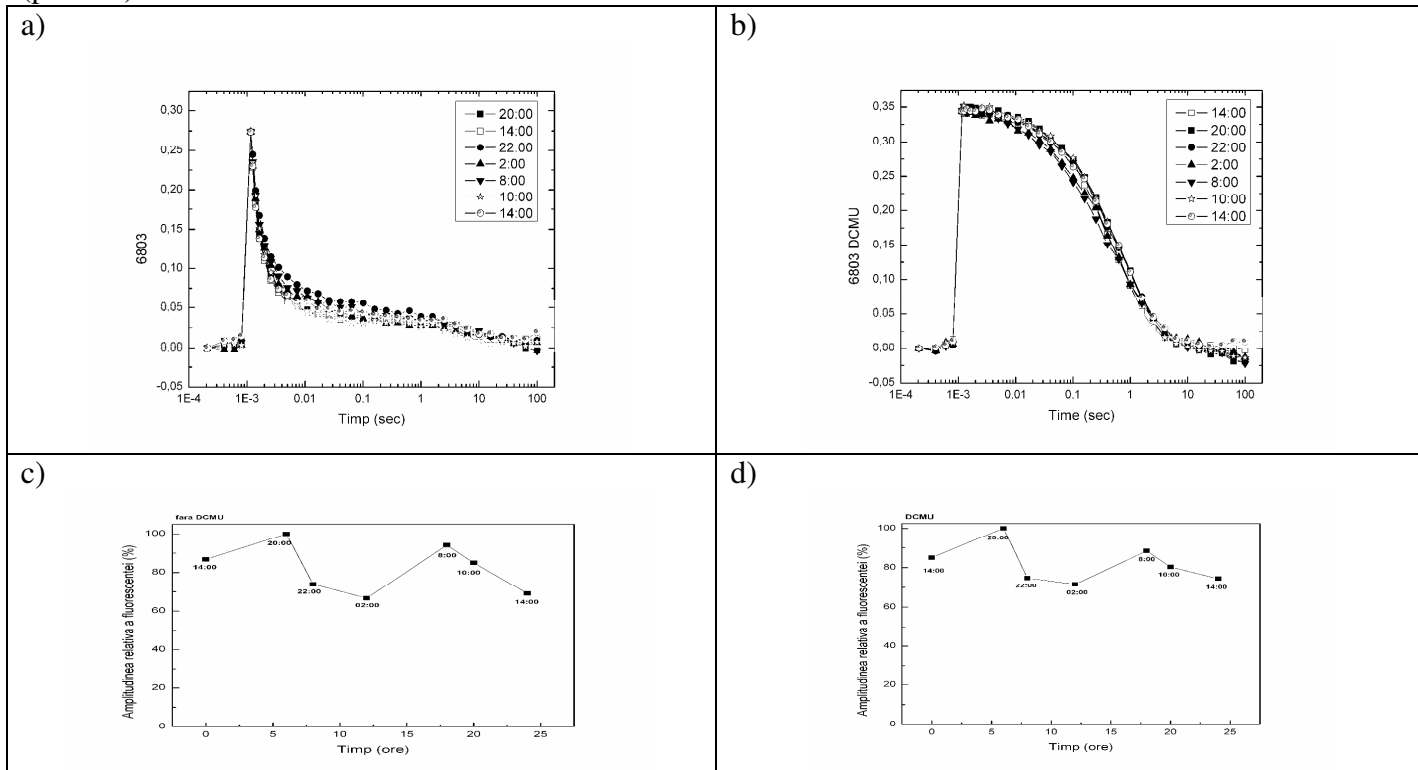


Figura 6: Efectul ritmului circadian asupra lantului transportor de electroni ai fotosistemului II atat in partea acceptoare a PSII (panel a) cat si asupra partii donoare a lantului transportor de electroni (panel b). Efectul ciclului lumina/intuneric asupra amplitudinii relative a fluorescentei in absenta (panel c) si in prezenta (panel d) DCMU.

Se observa astfel o incetinire a transferului de electroni in partea acceptoare a lantului transportor de electroni (panel a), corelata cu o scadere de aproximativ 35 de procente a numarului de centri activi ai PSII (panel b), urmata de o revenire totala a numarului de centri activi in urmatoarea dimineata, la lumina. Acest efect se coreleaza cu efectul asupra partii donoare a lantului transportor de electroni (panel c).

In concluzie, se observa o modificare de mai mare amploare, atat asupra partii donoare cat si acceptoare a PSII la specia *Cyanothece* ATCC51142, sub influenta intinericului. In studii urmatoare vom investiga o corelatie intre aceste modificari si o noua izoforma a proteinei D1 precum si functionalitatea proteinei D1 in timpul ritmului circadian.

3. Masuratori asupra functiei fotosistemului II la comunitatile cianobacteriene de la izvorul termal Ciocaia, judetul Bihor.

Deoarece scopul proiectului este studiul diversitatii functionale a proteinei D1 atat la cianobacterii cu genom secventat, tulpini cianobacteriene model, cat si la cianobacterii din comunitati cianobacteriene, am optimizat protocolul pentru masurarea fluorescetei clorofiliene la comunitati cianobacteriene, in teren. Astfel, putem primi in timp real informatii cu privire la partea acceptoare a lantului transportor de electroni. Una din locatiile alese pentru studiu este in Ciocaia, comuna Sacuieni, Judetul Bihor unde exista un izvor termal prin foraj cu iesire la suprafata in jurul caruia s-a format o crusta de cianobacterii adaptate la temperatura crescuta (apx. 35⁰C) (Figura 6). Din aceste cruste cianobacteriene s-au recoltat probe dupa cum urmeaza: in cursul primei deplasari au fost recoltate 10 probe, la a doua deplasare 14 probe si la a treia deplasare un numar de 12 probe recoltate dimineata si dupa-masa in scopul studierii eventualelor modificari din ciclul zi noapte. Din probele prelevate urmeaza izolare de ARN, ADN, proteine, secventare de genom si transcriptom, pentru a vedea atat numarul total de copii functionale ale genelor *psbA*, cat si genele *psbA* exprimate in comunitatile cianobacteriene, in anumite conditii de mediu.



Figura 6. Izvorul termal de la Ciocaia. a) comunitati cianobacteriene la Ciocaia, b) masuratori in teren la Ciocaia, c) date prelucrate din comunitatea cianobacteriana de la Ciocaia.

Astfel, studiile realizate completeaza eforturile internationale de înțelegere a diversității funcționale a proteinei D1 pentru a face o posibilă corelație între diferite izoforme ale D1 și mediul ecofiziologic.

Data: 12 Octombrie 2013

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