Raport stiintific

privind implementarea proiectului proiectului " ***Diversitatea functionala a proteinelor D1 din fotosistemul II la cianobacterii"*** *cod PN-II-ID-PCE-2011-3-0765 in perioada ianuarie – decembrie 2012*

Dupa faza initiala de implementare a proiectului desfasurata in 2011, cand s-au efectuat primele activitati pregatitoare in 2012 au fost:

- finalizata completarea echipei de cercetare prin ocuparea postului de posdoc;
- finalizarea achizitiei de aparatura majora necesara proiectului prin achizitionarea unui fotobioreactor specific studiilor de eficienta fotosintetica asupra cianobacteriilor
- demararea studiilor privind caracterizarea fuctionala a formelor proteinei D1 prezente in culturi cionaobacteriene model care au genomul complet secventat. 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;
- in aceasta perioada s-au stabilit relatii de colaborare si am fost vizitati de catre 3 cercetatori renumiti in domeniu, de la Centrul de Cercetari Biologice Szeged, Imperial College Londra si Turku University Finlanda.

Speciile luate in studiu in aceasta faza sunt: *Anabaena variabilis* ATCC29413; *Cyanothece* ATCC51142 si *Synechococcus sp.* PCC7002

1. Studiul influentei cresterii radiatiei luminoase asupra functionalitatii fotosistemului II .

S-a studiat influenta cresterii radiatiei luminoase asupra speciilor *Anabaena variabilis* ATCC29413; *Cyanothece* ATCC51142 si *Synechococcus sp.* PCC7002.

Culturile crescute la 30°C, 50μE intensitate luminoasa, au fost supuse unor tratamente cu 600 μE respectiv 500 μE intensitate luminoasa, in cuva de 10/10. Au fost prelevate probe pentru fluorescenta clorofiliana, precum si pentru ARN si proteine. Pentru exemplificare, prezentam rezultatele studiului influentei cresterii radiatiei luminoase asupra functionalitatii fotosistemului II la specia *Cyanothece* ATTC51142.

Specia		Concentratia de clorofila (μg/ml)	Intensitate luminoasa de baza (μE)	Intensitate luminoasa tratament (μE)	Volum cultura (ml)	Temperatura (°C)	Mediu de crestere
Cyanothece ATCC 51142	Exp.1	5.98	50	500	150	30	ASP2
	Exp.2	5.96	50	500	150	30	ASP2
	Exp.3	6.05	50	500	150	30	ASP2

Tabel 1. Prezentarea parametrilor experimentali folositi in cadrul tratamentelor cu lumina asupra speciei *Cyanothece ATCC51142*

Rezultatele de fluorescenta indica efectul intensitatii luminoase asupra partii donoare si acceptoare a fotosistemului II. Panelurile a si b (Fig.1) ne indica transportul electronilor prin lantul transportor de electroni al fotosistemului II, in absenta (Fig1.a) si in prezenta DCMU (Fig1.b). **control** reprezinta proba la 50μE, **15, 30, 60 min** reprezinta probele la 15, 30 60 minute trament cu lumina vizibila la 500 μE, iar probele de **30min rcv** respectiv **60 min rcv** reprezinta recuperarea celulelor la intensitatea luminoasa initiala, de 50 μE.

Panelurile c si d (Fig.1) reprezinta o medie a amplitudinilor relative a fluorescentei la 3 experimente in prezenta si absenta DCMU. Se observa un efect puternic de scadere a amplitudinii relative a fluorescentei cu pana la 50% in timpul tratamentului, urmata de o revenire cu 30-40% in timpul perioadei de recuperare.

La *Anabaena variabilis*, desi nu se observa o modificare a formei curbelor de fluorescenta, este evidentiata o scadere la aproximativ 50% a amplitudinii fluorescentei in timpul tratamentului, urmata de o revenire cu 10-15 procente in timpul perioadei de recuperare.

La *Synechococcus sp.* PCC7002 este evidenta o scadere a amplitudinii fluorescentei la amproximativ 50%, urmata de o revenire cu 25-30% in timpul perioadei de recuperare.

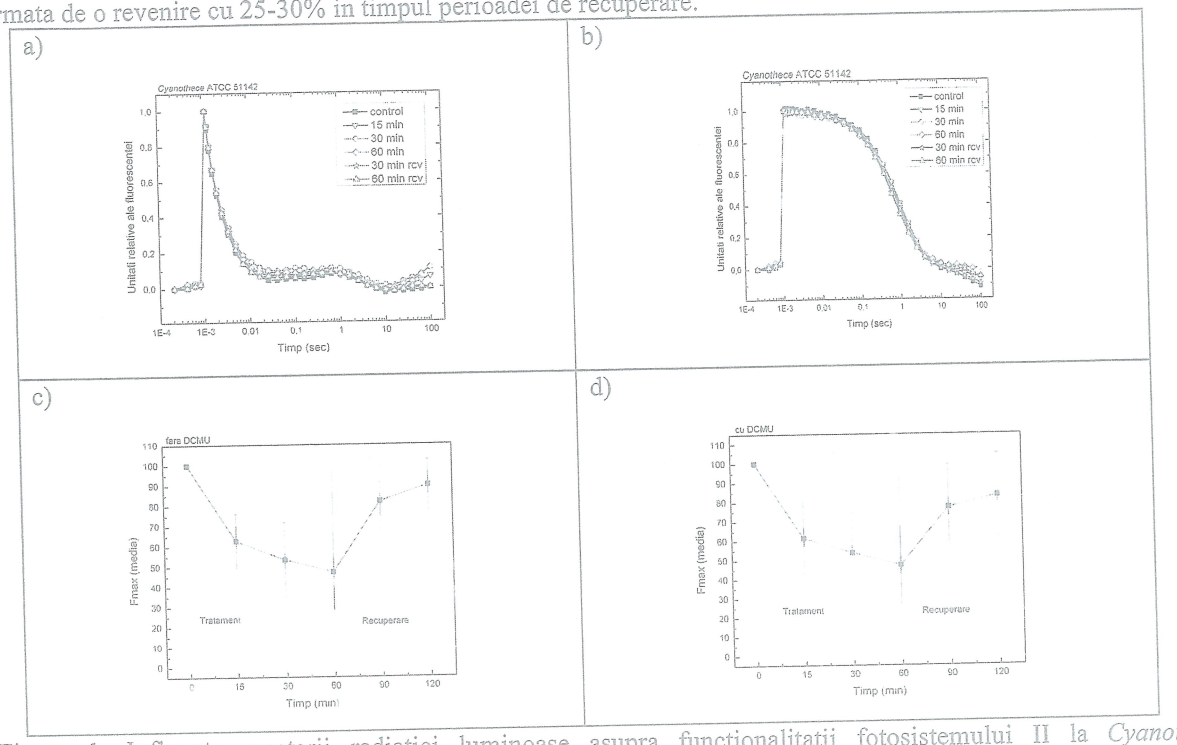


Figura 1. Influenta cresterii radiatiei luminoase asupra functionalitatii fotosistemului II la *Cyanothece ATCC51142*

2. Studiul influentei radiatiei UVB asupra functionalitatii fotosistemului II

S-a studiat influenta cresterii radiatiei UVB asupra speciilor *Anabaena variabilis* ATCC29413; *Cyanothece* ATCC51142 si *Synechococcus sp.* PCC7002.

Culturile crescute la o intensitate luminoasa de 50 μE, au fost supuse unor tratamente cu radiatii UVB (280-315nm). Intensitatea radiatiei UVB initiala a fost de 0,737 mw/cm^2, in timpul tratamentului peste cultura s-a adaugat un filtru de K_2CrO_4 (strat 0,8cm), acesta reducand intensitatea radiatiei UVB la aproximativ 0.307mw/cm^2. S-au preluat probe pentru masurarea fluorescentei clorofiliene, precum si probe pentru izolarea ARN si a proteinelor. Pentru exemplificare, prezentam rezultatele influentei radiatiei UVB asupra speciei *Anabaena variabilis* ATCC29413

Specia		Concentratia de clorofila (μg/ml)	Intensitate luminoasa de baza (μE)	Intensitate UVB (mw/cm^2)	Volum cultura (ml)	Temperatura (°C)	Mediu de crestere
Anabaena variabilis ATCC 29413	Exp.1	6.02	50	0.307	200	30	BG11
	Exp.2	6.19	50	0.307	200	30	BG11
	Exp.3	6.09	50	0.307	200	30	BG11

Tabel 2. Prezentarea parametrilor experimentali folositi in cadrul tratamentelor cu radiatii UVB asupra speciei *Anabaena variabilis* ATCC 29413

Panelurile a si b (Fig. 2) ne indica transportul electronilor prin lantul transportor de electroni al fotosistemului II, in absenta (Fig2.a) si in prezenta DCMU (Fig 2.b). **control** reprezinta cultura la intensitatea luminoasa de crestere, de 50μE; **15, 30, 60 min** indica durata tratamentului cu radiatii UVB; **30min rcv** respectiv **60min rcv** reprezinta perioada de recuperare, de trecere a celulelor din nou la intensitatea luminoasa de baza, de 50 μE;

Panelurile c si d (Fig.2) reprezinta o medie a amplitudinilor relative a fluorescentei la 3 experimente in prezenta si absenta DCMU.

Se observa in prezenta DCMU o accelerare a vitezei transportului de electroni (Fig 2.b), precum si o scadere a amplitudinii fluorescentei la 70% in timpul tratamentului, urmata de o revenire cu aprox 10 procente a amplitudinii in perioada de recuperare (Fig 2. c, d).

La *Cyanothece* se observa o crestere a vitezei transportului de electroni la proba de 60 min, si o scadere a amplitudinii relative a fluorescentei cu 20-25%, urmata de o revenire in perioada de recuperare.

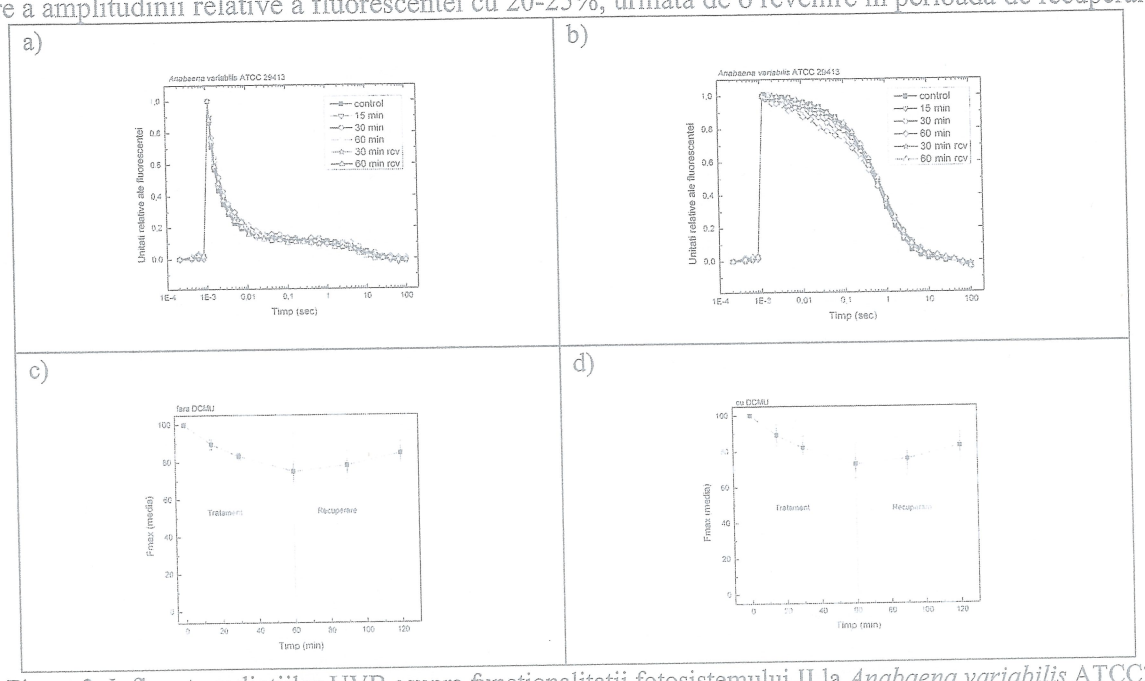


Figura 2. Influenta radiatiilor UVB asupra functionalitatii fotosistemului II la *Anabaena variabilis* ATCC29413

Au fost efectuate si studii preliminare de cuantificare a proteinei D1 cu ajutorul unor anticorpi specifici prin metoda Western Blot. Exemplificam printr-un experiment de tratament cu UVB la *Synechococcus sp.* PCC7002

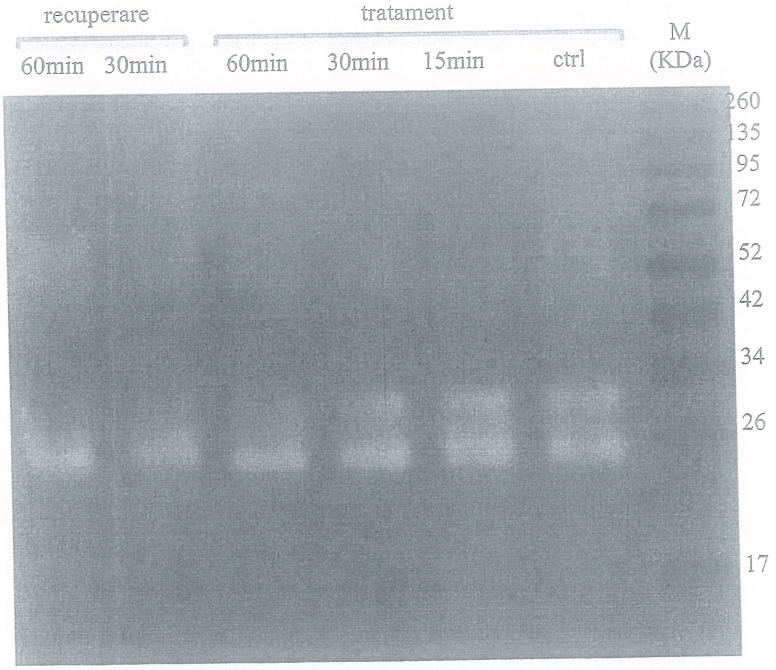


Fig. 3 Efectul tratamentului cu UV-B asupra cantitatii de proteina D1 la *Synechococcus sp.* PCC 7002. Sunt notati in figura timpii la care s-au recoltat probele (ctrl-control, timpul 0, 15min, 30min si respectiv 60min) de la inceperea tratamentului timpii de prelevare ai probelor pe parcursul perioadei de recuperare 30 si respectiv 60min.

Cultura de *Synechococcus sp.* PCC 7002 a fost crescuta in conditii optime si cand a ajuns in faza logaritmica de crestere (concentratia de clorofila 6μg/ml) i s-a aplicat tratamentul cu raze UV-B si au fost prelevate probe la diferite interval de timp- 15, 30, 60min. Proba control s-a prelevat la timpul 0. Apoi cultura a fost supusa perioadei de reuperare timp in care a fost iluminata cu lumina optima si prelevate probe la 30 si 60min. Probele prelevate au continut apx. 30μg clorofila/ml. Au fost centrifugate 5min la 10000g si la 4^0C, peletul recuperat si pastrat la -80^0C pana la procesarea ulterioara. Din peletul congelat s-au izolat proteinele dupa un protocol optimizat si apoi au fost folosite pentru Western Blot .

Din imunoblotul prezentat in Fig. 3 se poate observa ca iradierea tulpinii de *Synechococcus sp.* PCC 7002 cu lumina UV-B nu a avut nici o influenta asupra expresiei proteinei D1, aceasta fiind exprimata aproximativ la acelasi nivel atat in proba de control cat si in probele de tratament si de recuperare.

3. Studiul influentei mircoaerobiozei asupra functionalitatii fotosistemului II

Speciile de *Anabaena variabilis* ATCC29413; *Cyanothece* ATCC51142 si *Synechococcus sp.* PCC7002 au fost crescute cu barbotare de aer 100%, apoi au fost supuse microaerobiozei prin barbotare cu 100%N_2. Au fost prelevate probe de control , 100% aer, 15min, 30min, 60min barbotate cu 100% N2, apoi probele de 30min rcv si 60min rcv recuperare, probe cu 100% aer. Exemplificam cu rezultate ale influentei microaerobiozei asupra speciei *Synechococcus* sp. 7002.

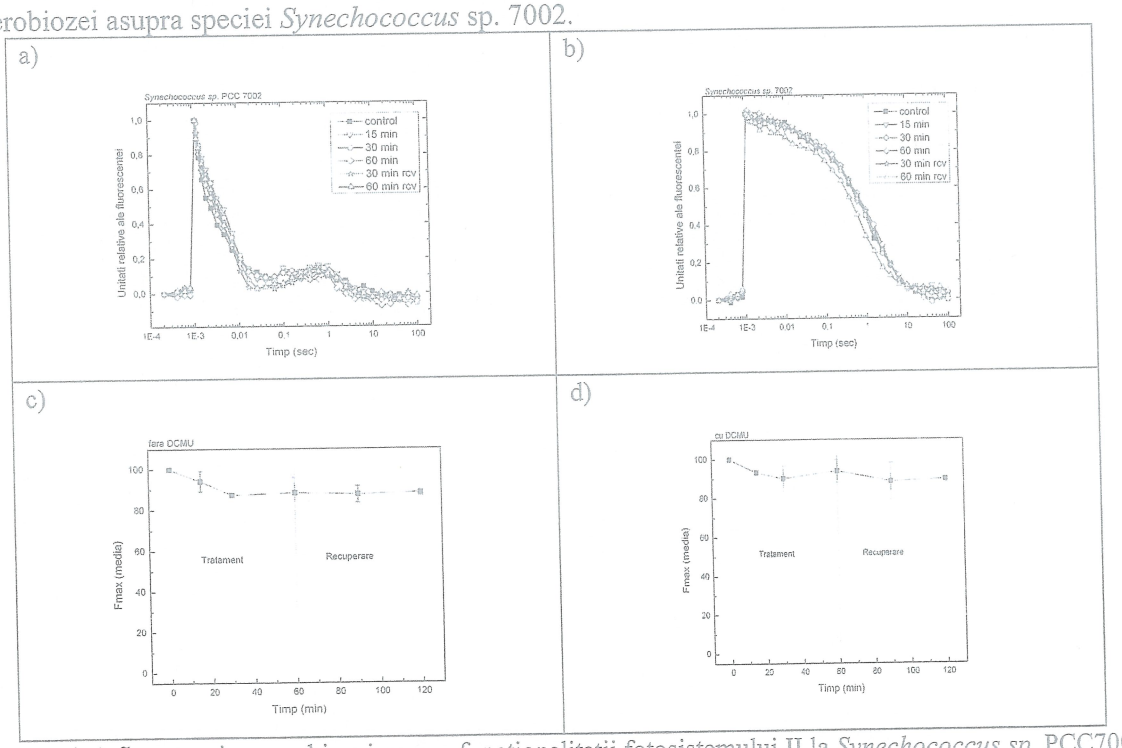


Figura 4. Influenta microaerobiozei asupra functionalitatii fotosistemului II la *Synechococcus sp.* PCC7002

In Fig. 4 este prezentat efectul microaerobiozei asupra partii donoare (panel a) si partii acceptoare (panel b) a fotosistemului II, prin masurarea curbelor de fluorescenta in prezenta respectiv absenta DCMU. Se observa ca tratamentul cu microaerobioza are un efect asupra transferului electronilor in partea acceptoare a fotosistemului II (panel a) fara insa a manifesta un efect si asupra partii donoare (panel b). In

panelurile c si d este prezentata influenta tratamentului cu N2 asupra numarului de fotosisteme II active la un moment dat (panel c) cat si a numarului total de fotosisteme II (panel d).

Ca urmare a vizitei colaboratorilor nostri din Ungaria, s-au realizat un numar de experimente in ritm circadian la specia *Cyanothece* ATCC 51142, tot atunci s-a realizat si o prelucrare avansata a curbelor de fluorescenta, prin aplicarea asupra datelor normalizate a corectiei Joliot, pas urmat de realizarea fittingului curbelor.

Astfel, corectia Joliot se aplica prin formula:

$Q_A^-(t) = D_1/[1-0.5*(1-D_1)]$

unde D1 reprezinta prima valoare a coloanei normalizate, iar 0.5 este o constanta.

Fittingul se realizeaza prin introducerea formulei

$y = y0+A1*\exp(-(x-x0)/T1)+A2*\exp(-(x-x0)/T2)+A3/(1+(x-x0)/T3)$

Functia are 2 componente exponentiale si o componenta hiperbolica, astfel o curba careia i s-a aplicat corectia Joliot si fittingul ne da informatii asupra timpului fiecaror etape ale curbelor de fluorescenta, precum si a erorilor standard aplicate fiecaror etape.

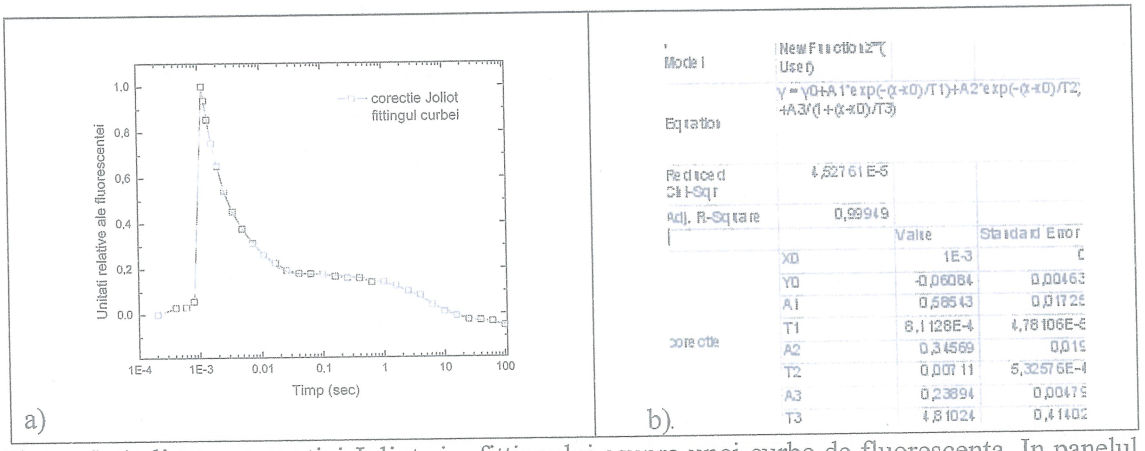


Figura 5. Aplicarea corectiei Joliot si a fittingului asupra unei curbe de fluorescenta. In panelul a este prezentata curba de fluorescenta masurata (patrat negru) si curba obtinuta matematic in urma fittingului (linie rosie continua). In panelul b sunt prezentati parametri ecuatiei rezultati in urma procesului de fitting.

3 Decembrie 2012

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