

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI”

Facultatea de Biologie și Geologie

Școala Doctorală de Biologie Integrativă

Teză de doctorat

**Studiul funcției proteinei D1 a fotosistemului
II la cianobacterii**

-Rezumat-

Student-doctorand:

CHIȘ CIPRIAN

Conducător științific:

Prof. Dr. BANCIU HORIA LEONARD

Cluj-Napoca

2019

Cuprins

Argument.....	1
Scopul și obiectivele tezei de doctorat	2
Mulțumiri.....	3
I. Introducere	4
I.1. Informații generale despre cianobacterii	4
I.2. Structura și funcția aparatului fotosintetic cianobacterian	5
I.2.1. Descrierea generală a procesului de fotosinteză	5
I.2.2. Caracteristici ale fotosintezei cianobacteriene.....	7
I.2.3. Structura fotosistemului II.....	11
I.2.4. Ciclul de reparare al fotosistemului II	13
I.2.5. Clasificarea funcțională a proteinei D1 la cianobacterii.....	16
I.3. Influența factorilor de mediu asupra funcției fotosintetice a cianobacteriilor	19
I.3.1. Influența intensității mărite a luminii asupra fotosistemului II.....	19
I.3.2. Influența radiațiilor UV-B asupra fotosistemului II.....	20
I.3.3. Influența condițiilor de microaerobioză asupra fotosistemului II.....	21
II. Materiale și metode	22
II.1. Tulpini cianobacteriene și medii de creștere	22
II.1.1. Tulpini cianobacteriene utilizate	22
II.1.2. Condiții de creștere pentru tulpinile cianobacteriene studiate	25
II.1.3. Medii de creștere pentru cianobacteriile studiate.	26
II.2. Metode de investigare a exprimării genice	27
II.2.1. Analiza cantitativă a exprimării genice prin qRT-PCR	27

II.3. Metode de investigare a funcționalității fotosistemului II.....	30
II.3.1. Măsurarea fluorescenței clorofiliene.....	30
II.4. Detecția și cuantificarea proteinei D1	31
II.4.1. Izolarea proteinelor	31
II.4.2. Separarea electroforetică a proteinelor în condiții denaturante în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE) și analiza western blot	32
II.5. Analiza bioinformatică.....	33
II.6. Condiții experimentale specifice	34
III. Rezultate și discuții.....	36
III.1. Analiza bioinformatică a diversității proteinelor D1 la cianobacterii	36
III.2. Efectul microaerobiozei asupra exprimării unor izoforme ale proteinei D1 și funcției fotosistemului II la cianobacterii.....	47
III.2.1. Efectul microaerobiozei asupra exprimării unor izoforme D1 la cianobacterii	48
III.2.2. Efectul microaerobiozei asupra funcționării PS II la cianobacterii	50
III.3. Efectul stresului oxido-reducător asupra funcționalității fotosistemului II la tulpini cianobacteriene model.....	55
III.3.1. Influența variației de intensitate a luminii asupra funcționalității fotosistemului II la tulpini cianobacteriene model	55
III.3.2. Influența radiațiilor UV-B asupra funcționalității fotosistemului II la tulpini cianobacteriene model.....	60
III.4. Influența CO ₂ asupra fotosistemului II de la cianobacterii.....	68
III.5. Rolul funcțional al proteinei D1` în răspunsul la stresul fotic, UV și hipoxic la cianobacterii	76
III.6. Modificările funcționale ale fotosistemului II în timpul	

ciclurilor lumină/întuneric	86
IV. Concluzii generale	99
V. Bibliografie.....	100
VI. Activitate științifică.....	112

Cuvinte cheie: Fotosistem II, Gena *psbA*, Proteina D1, Cianobacterii, Studiul fotosintezei

Scopul și obiectivele tezei de doctorat

Scopul acestei teze de doctorat constă în studierea amplă a funcției proteinei D1 a fotosistemului II la cianobacterii iar pentru atingerea scopului au fost formulate următoarele obiective științifice:

În acest context, prezenta teză de doctorat își propune atingerea următoarelor obiective științifice: (i) descrierea diversității izoformelor proteinei D1 la cianobacterii, precum și a modalităților lor de exprimare genetică, prin analiza bioinformatică a secvențelor genetice a *psbA* disponibile în bazele de date biologice; (ii) explorarea moleculară și fiziologică a rolului izoformelor proteinei D1 în menținerea funcționalității fotosistemului II la cianobacterii; (iii) identificarea diverșilor factori de mediu care au efect asupra exprimării izoformelor proteinei D1 de la cianobacterii-model și (iv) identificarea experimentală a unor izoforme noi pentru proteina D1, necaracterizate funcțional până în prezent.

I. Introducere

Cea mai scurtă definiție a cianobacteriilor ar fi aceea de organisme procariote capabile să realizeze fotosinteza. Ele reprezintă excelente organisme model pentru studiul procesului de fotosinteză, realizând un proces asemănător cu plantele superioare, având avantajul că cresc mai repede decât ele, au cerințe de creștere mult mai simple și se pretează ușor manipulărilor genetice. Primul organism fotosintetic al cărui genom a fost complet secvențat a fost cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko și colab., 1996).

Ca mediu de viață, trebuie subliniat faptul că cianobacteriile au colonizat practic toate mediile de viață cu condiția existenței luminii, astfel că le găsim atât în ape dulci cât și în cele marine; de la deșert arctic

până în vârful munților se găsesc comunități cianobacteriene (Pepper și colab., 2015). Organismele fotosintetice mai primitive, cum ar fi cianobacteriile oxigenice, proclorofitele sau bacteriile fotosintetice anoxigenice nu au organite celulare, astfel că procesul de fotosinteză are loc în interiorul celulelor, în membranele tilacoidale (Govindjee și colab., 1986).

Cianobacteriile sunt capabile să realizeze un proces de fotosinteză extrem de performant, în intervalul de 450-655 nm, prin absorbția luminii printr-o familie de proteine intens colorate numite ficobiliproteine (Glazer și Clark., 1986). Ele se unesc formând ficobilisomi mari, stabilizate și legate de proteine linker necolorate, pe suprafața externă a lamelei fotosintetice (Sonani și colab., 2016). Ficobilisomii sunt complexe proteice ce constau în proteine solubile în apă, care au atașate covalent cromofori și ficobiline ce dau cianobacteriilor culoarea caracteristică albastră-verzui (Sidler, 1994)

Ficobilisomii transferă energia de excitare în primul rând fotosistemului II, ele putând fi cuplate și cu fotosistemul I, în procesul de reglare pe termen scurt a captării energiei fotosintetice care servește pentru ajustarea distribuției energiei de excitare la centrele de reacție din cele două fotosisteme (van Thor și colab., 1998). Arhitectura ficobilisomilor le permite să absoarbă lumina vizibilă la lungimi de undă de 500-670 nanometri, mai mult, transferul energiei în cadrul ficobilisomului poate acționa ca un mecanism protector ce previne deteriorarea fotosistemelor de către energia luminii în exces (Liu și colab., 2008). Energia luminii, capturată de ficobilisomi este apoi rapid transferată fotosistemelor II și I.

Fotosistemul II este un complex proteic localizat în membrana tilacoidală a organismelor ce realizează fotosinteza oxigenică prin o serie

de reacții de transfer al electronilor induse de lumină care au ca rezultat clivirea moleculelor de apă în protoni și oxigen molecular. La cianobacterii, este format din 17 subunități transmembranare și 3 proteine periferice, precum și un număr de cofactori, având greutatea moleculară totală de 350 kDa (Umena și colab., 2011). Ciclul de biosinteză a fotosistemului II este unul dinamic, ce își are originea în membranele citoplasmice și continuă apoi în membrana tilacoidală.

Nucleul centrului de reacție al fotosistemului II este format din proteinele D1 și D2, nucleu ce leagă toate componentele redox active: donatorul primar - clorofila P680, acceptorul primar – feofitina, donatorul secundar – tirozina Yz și acceptorii primari și secundari – chinonele Q_A și Q_B. Separarea primară a sarcinilor în PS II rezultă în cationi de clorofilă P680 oxidați, singurele elemente destul de puternice cât să determine oxidarea apei. Recombinarea P680 cu cofactori din aval de lanțul transportor de electroni poate determina formarea unor stări triplet ale clorofilei și în final a oxigenului singlet, care deteriorează aparatul fotosintetic, în special proteina D1 din centrul de reacție (Mulo și colab., 2009). Mecanismele de reparare acționează pentru înlocuirea proteinei D1 cu o nouă copie a ei, înlocuire ce are loc la fiecare 5 ore în condiții de iluminare normală și la fiecare 20 de minute în condiții de iluminare intensă (Tyystjärvi și colab., 1994). Proteina D1 este codificată de o familie de gene *psbA*, ce conține între 1 și șase membri și a căror expresie trebuie să fie sub control strict pentru a asigura funcționalitatea aparatului fotosintetic în condițiile schimbării condițiilor de mediu.

După deteriorarea fotosistemului II și în principal a proteinei D1 de către diferiți factori de mediu intervine mecanismul de reparare a fotosistemului II. Imediat, dimerii funcționali ai PS II se dezassemblează, proteina D1 este accesată de proteazele FtsH și degradate. În pasul

următor, ribosomul cu lanțul D1 nou sintetizat se atașează de membrana tilacoidală, urmând ca noua proteină D1 să fie inserată post-tranlaționar în membrană. Capătul C – terminal al proteinei D1 este procesat post tranlaționar, fotosistemul II este reasamblat și activat iar dimerii sunt din nou formați (Mulo și colab., 2009).

Prezența multiplelor gene *psbA* ce codifică diferite izoforme ale proteinei D1 este un indiciu al importanței pe care acestea le au în procese reglatoare responsabile pentru menținerea funcționalității fotosistemului II (Mulo și colab., 2009). Aceste procese de reglare urmează cel puțin două strategii distincte, și anume o strategie folosită este aceea de a înlocui proteina D1 prezentă în centrele de reacție a fotosistemului II cu o altă izoformă a ei o dată cu detectarea condițiilor de stres (Oquist și colab., 1995), iar cealaltă strategie presupune creșterea ratei de sinteză a aceleiași proteine D1 la detectarea condițiilor de stres. Aceste două strategii au fost descrise la mai multe specii cianobacteriene, recent fiind documentat un nou mecanism observat atunci când în cadrul condițiilor normale de creștere intervine scăderea cantității de oxigen (Summerfield și colab., 2008) sau microaerobioză (Sicora și colab., 2009).

Din punct de vedere funcțional, izoformele proteinei D1 la cianobacterii pot fi împărțite în următoarele grupe:

- A. D1_m sau D1major
- B. D1:1
- C. D1:2
- D. D1'
- E. D1 *rogue* sau D1 *sentinel*

A. D1_m este o formă a proteinei D1 prezentă și exprimată în condiții normale de creștere și indusă în majoritatea condițiilor de stres. (Mulo și colab., 2009).

B. D1:1 este o formă a proteinei D1 asamblată și exprimată în fotosistemul II în condiții normale de creștere dar reprimată în condiții de stres (Mulo și colab., 2009).

C. D1:2 este o formă a proteinei D1 reprimată în condiții normale de creștere, indusă și acumulată în fotosistemul II în condiții de stres. Astfel, în condiții de stres, izoforma D1:2 este puternic exprimată, înlocuind izoforma D1:1 din celule.

D. D1' este o izoformă a proteinei D1 " silențioasă" în condiții standard de creștere, dar indusă în condiții de microaerobioză.

E. D1 *rogue* sau D1 *sentinel* este o izoformă a proteinei D1 evidențiată în ultimii ani. În anul 2012 s-a demonstrat existența acestei izoforme prin studii *in silico* (Murray, 2012), fiind asociată cu cianobacteriile diazotrofe. Ea are capacitatea de a bloca fotosistemul II pe timpul nopții, permițând fixarea azotului.

În ultimii ani, cercetători din toată lumea își axează studiile pe înțelegerea mecanismelor de reparare a fotosistemului II în urma diferitelor tipuri de stres, precum și a proceselor de fotosinteză și respirație per ansamblu.

II. Materiale și metode

Tulpinile cianobacteriene folosite în prezentul studiu au fost obținute de la Colecția de Culturi a Institutului Pasteur (PCC, Franța) și de la Institutul de Cercetări Biologice Cluj Napoca. Acestea sunt: *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Cyanothece* sp. PCC 8801 și *Anabaena variabilis* ATCC 29413 obținute de la PCC Franța respectiv tulpina de *Cyanothece* sp. ATCC 51142 a fost obținută de la Institutul de Cercetări Biologice Cluj Napoca.

***Synechocystis* sp. PCC 6803** este prima cianobacterie al cărei întreg genom a fost secvențat, iar datele au fost depuse în baza de date

CyanoBase. Familia *psbA* la *Synechocystis* sp. PCC 6803 conține 3 gene, exprimate diferit în funcție de condițiile de mediu (Jansson și colab., 1987).

***Synechococcus* sp. PCC 7002** este de asemenea o tulpină model, halotolerantă, cu genom complet secvențat, unicelulară, formează uneori filamente scurte de 2-4 celule, la temperatura optimă de creștere de 38°C. Familia de gene *psbA* conține 3 gene, exprimate diferit în funcție de condițiile de mediu.

***Cyanothece* sp. ATCC 51142** este o cianobacterie unicelulară, diazotrofă. S-a descoperit că această bacterie are un ciclu circadian în 2 stadii. În timpul zilei realizează fotosinteza iar noaptea fixează azot din aer. Proteina D1 este exprimată prin 5 gene *psbA*, ce codifică 4 izoforme ale proteinei D1, una din ele fiind o proteină D1 *rogue* ipotetică.

***Anabaena variabilis* ATCC 29413** este o cianobacterie filamentoasă, formatoare de heterocite, celule specializate care sunt sediul fixării azotului în filamentele crescute în mediu bogat în oxigen. Familia *psbA* la această tulpină conține 5 gene (Park și colab., 2013).

***Cyanothece* sp. PCC 8801** este o cianobacterie unicelulară diazotrofă. *Cyanothece* sp. PCC 8801 are patru gene *psbA* care codifică diferite izoforme a proteinei D1, una din ele fiind o proteină D1 *rogue* ipotetică (Murray, 2012).

Tulpina 7002 mutant fost primită de la colaboratorii noștri din Berlin din grupul profesorului Holger Dau, și anume de la doamna Dr. Yvonne Zilliges, este o cianobacterie care nu conține gena ce codifică izoforma D1` a proteinei D1, respectiv *a2164*.

Condiții de creștere

Tulpinile de *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Synechococcus* sp. PCC 8801 și *Synechocystis* sp. PCC

6803 au fost menținute în vase Erlenmeyer, aproximativ 300 ml/vas, în camera climatică, crescute în regim continuu, la o intensitate luminoasă de 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (50 μE), la o temperatură constantă de 30 °C, cu agitare continuă la aproximativ 130 RPM.

Tulpinile *Synechococcus* sp. PCC 7002 respectiv tulpina mutant de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (ΔA2164), tulpini cianobacteriene termotolerante, au fost menținute în vase cilindrice, aproximativ 300 ml/vas, într-un bioreactor de tip acvariu, construit de noi, crescute în regim continuu, la o intensitate a luminii de 50 μE la o temperatură constantă de 38 °C, cu barbotare de aer.

Principalele metode de investigare au fost:

- **Metode de investigare a exprimării genice** - Izolarea ARN total cianobacterian prin folosirea Trizolului, Sinteza ADNc (ADN complementar) cu Kit-ul de sinteză iScript cDNA de la BioRad respectiv amplificarea ADNc prin PCR în timp real (Q-RT-PCR), într-un analizor de tip IQ5, BioRad, folosind amorse specifice pentru fiecare izoformă a proteinei D1.

- **Metode de investigare a funcționalității fotosistemului II** prin tehnica de fluorescență clorofiliană. Fluorescența a fost măsurată cu ajutorul unui fluorimetru cu dublă modulare FL-3500. Măsurătorile de fluorescență clorofiliană se efectuează atât pentru a observa transferul de electroni între partea donoare și cea acceptoare a PSII, cât și pentru a monitoriza numărul de centri activi/ potențial activi în momentul impulsului luminos. Transferul între quinonele Q_A și Q_B are loc în microsecunde până la o milisecundă și poate fi măsurat cu ajutorul unui fluorimetru.

- **Metode de detecție și cuantificare a proteinei D1**, ce implică izolarea proteinelor folosind un protocol descris de Brown și colab.,

2008, separarea electroforetică a proteinelor în condiții denaturante în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE) respectiv analize de imunoamprentare prin tehnica western blotting, folosind un anticorp general pentru proteinele D1, cu specificitate pentru capătul C-terminal- AS01016, Agrisera.

- **Metodologia de analiză bioinformatică**- Toate secvențele de gene *psbA* au fost obținute din baza de date CyanoBase și importate în programul CLC Sequence Viewer 6.9.1. Folosind secvențele de aminoacizi, s-a procedat la o aliniere multiplă a tuturor celor 91 de secvnte, bazată pe algoritmul de aliniere progresivă. Alinierea a fost editată manual, regiunile non informative au fost șterse, rezultând secvențe de aproximativ 360 de poziții. Aceasta a făcut posibilă compararea aminoacizilor conservați la toate izoformele proteinei D1. Următorul pas a fost contruirea unui arbore filogenetic prin metoda Neighbour Joining, 1000 de replicare, realizat cu programul CLC Sequence Viewer 6.9.1.

Teste aplicate tulpinilor cianobacteriene

- **Studiul influenței intensității luminii asupra funcționalității PS II** – culturile cianobacteriene au fost crescute la o intensitate luminoasă de bază de 50 μE , apoi au fost trecute la o intensitate crescută de 600 μE pe perioada tratamentului, urmând să se revină la condițiile inițiale de creștere pentru 60 de minute (perioada de recuperare).

- **Evaluarea influenței radiațiilor UV-B asupra funcționalității PS II** – culturile cianobacteriene au fost crescute la o intensitate a luminii de bază de 50 μE până la o concentrație a clorofilei de 6 $\mu\text{g chl ml}^{-1}$ ($D.O_{.580\text{ nm}} = 1$), corespunzătoare creșterii exponențiale a celulelor. Peste condițiile inițiale de creștere au fost aplicate radiații UV-B cu o intensitate

de 0,307 (mW/cm²), iar apoi s-a revenit pentru 60 de minute la condițiile inițiale de creștere (perioada de recuperare).

- **Testarea efectelor microaerobiozei asupra exprimării unor izoforme ale proteinei D1 și funcției PS II-** Tratamentul a fost aplicat prin barbotarea cu N₂ timp de 120 de minute, urmând apoi revenirea la condițiile inițiale de creștere timp de 60 de minute.

- **Evaluarea modificărilor funcționale ale PS II în timpul ciclurilor lumină / întuneric-** Tulpinile cianobacteriene au fost crescute în regim de 12 ore lumină 12 ore întuneric, la 30 °C și 50 μE intensitate de lumină până când celulele au ajuns la o concentrație a clorofilei de 6μg chl ml⁻¹, corespunzătoare etapei exponențiale de creștere a celulelor. Experimentele au vizat prelevarea de probe pentru măsurarea fluorescenței clorofiliene la fiecare 60 de minute timp de 26 de ore, în absența și prezența DCMU.

- **Determinarea influenței CO₂ asupra PS II** – celulele crescute în condiții normale (intensitate a luminii de bază de 50 μE și 30 °C) au fost supuse următoarelor tipuri de experimente: trecerea de la aer atmosferic la N₂ pentru 120 de minute (inducerea condițiilor de microaerobioză), trecerea de la un amestec de gaze de 5% CO₂ și 95% aer, la aer atmosferic (cu o concentrație a CO₂ de 0,03-0,04%) respectiv trecerea de la aer atmosferic la aer sintetic, fără conținut de CO₂ pentru o perioadă de 48 de ore.

III. Rezultate și discuții

III.1. Analiza bioinformatică a diversității proteinelor D1 la cianobacterii

Scopul prezentei cercetări a fost sistematizarea prin aplicarea unor instrumente bioinformatic, a informațiilor de secvență pentru producții de traducere conceptuală a genelor *psbA* de la diverse specii cianobacteriene,

utilizând secvențele disponibile în baza de date Cyanobase (<http://genome.annotation.jp/cyanobase>). De asemenea, s-a intenționat propunerea unor modele de evoluție a genelor *psbA* de la un număr de tulpini cianobacteriene selectate.

În urma analizei celor 90 de secvențe de aminoacizi deduse prin traducerea conceptuală a genelor *psbA* care codifică diferite izoforme ale proteinei D1 la 30 de tulpini cianobacteriene cu genom secvențat, s-au stabilit atât distribuția genelor la diferite specii, cât și tipurile de aminoacizi conservați pentru fiecare categorie de izoformă D1 codificată de genele *psbA*.

Pentru izoforma D1:1, caracteristică este substituția acidului glutamic (E) cu glutamina (Q), în poziția 130. Din 30 de tulpini cianobacteriene analizate, 27 au gene (42) care codifică potențial izoforma D1:1 (Campbell și colab., 1998).

Pentru izoforma D1:2, s-a observat prezența conservată a acidului glutamic (E) în loc de glutamina (Q) în poziția 130 la cele 17 (din 30) tulpini cianobacteriene analizate. La acestea, s-au observat 45 de gene *psbA* care codifică potențial izoforma D1:2 a proteinei D1.

La izoforma D1', pe baza alinierii efectuate, s-au identificat secvențele proteice cu cele 3 modificări în structura aminoacizilor caracteristice izoformei D1', în pozițiile 80, 158, 286 (Sicora și colab., 2009). Din analiza datelor de secvențe disponibile pentru 30 de tulpini cianobacteriene, 10 tulpini au determinanți genetici pentru izoforma D1'.

Pentru izoforma D1 *rogue* Murray (2012) a concluzionat existența ipotetică a unei noi izoforme a proteinei D1 care ar bloca PS II în decursul nopții, permițând fixarea N₂. Izoforma D1 *rogue* prezintă 6 modificări specifice în secvența de aminoacizi (Murray, 2012). După analiza tuturor secvențelor celor 30 de tulpini cianobacteriene cu genom secvențat, s-au

observat cinci tulpini a căror proteine deduse au 3, 4 sau 5 modificări în succesiunea aminoacizilor caracteristice proteinei *D1rogue*.

Alinierea celor 90 de secvențe de aminoacizi a stat la baza construirii unui arbore filogenetic utilizând algoritmul Neighbour Joining cu 1000 replicare. În urma analizei noastre se poate concluziona că există două căi posibile prin care genele *psbA* și proteina D1 codificată de acestea au evoluat. O strategie implică transferul orizontal de gene, a doua posibilă strategie ar implica duplicarea genelor existente și mutagenază spontană a duplicațiilor, urmată de selecție, ca o nevoie de adaptare la noi condiții de mediu.

III.2. Efectul microaerobiozei asupra exprimării unor izoforme ale proteinei D1 și funcției PS II la tulpini model de cianobacterii

Celulele cianobacteriene se confruntă cu condiții de oxigen scăzut în diferite habitate cum ar fi izvoarele termale sau chiar în cazul unor celule specializate cum sunt heterocitele în care fotosinteza este limitată (Voorhies și colab., 2012). Adaptarea celulelor la aceste condiții și tranziția lor la condiții de aerobioză rămâne de importanță majoră pentru înțelegerea reglării procesului fotosintezei și per ansamblu pentru înțelegerea complexității procesului de fotosinteză (Summerfield și colab., 2011).

Primul experiment a constat în aplicarea unui stres microaerobic tulpinii cianobacteriene de *Synechocystis* sp. PCC 6803, astfel că la această tulpină cianobacteriană s-a observat efectul documentat anterior (Summerfield și colab., 2008; Sicora și colab., 2009), de inducere puternică a genei *psbA1* în condiții de microaerobioză. La această tulpină s-a observat prin studii de fluorescență clorofiliană și un efect asupra

părții donoare a fotosistemului II, efect exprimat printr-o accelerare a fazei mijlocii pe curba de reoxidare.

În cazul tulpinii *Synechococcus* sp. PCC 7002, tratamentul de microaerobioză nu a avut efecte semnificative asupra exprimării izoformelor *psbA* (Figura 1), deși această tulpină cianobacteriană are modificările caracteristice izoformei D1' conservate în structura de aminoacizi. Expresia nealterată a genei *psbA3* în timpul tratamentului de microaerobioză rămâne un aspect unic al experimentelor noastre.

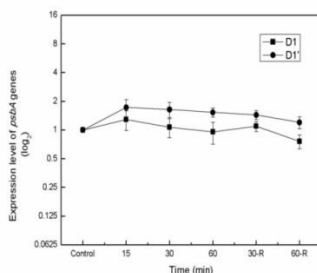


Figura 1. Efectul microaerobiozei asupra transcrierii genei *psbA1* la *Synechococcus* sp. PCC 7002.

III.3. Efectul stresului oxido-reducător asupra funcționalității fotosistemului II la tulpini cianobacteriene model

III.3.1. Influența variației de intensitate a luminii asupra funcționalității fotosistemului II la tulpini cianobacteriene model

O necesitate a tuturor organismelor capabile să realizeze procesul de fotosinteză este adaptarea la modificări ale intensității luminoase diferite în mediul lor de creștere. În experimentele noastre, s-a investigat efectul pe care îl are trecerea, de la intensitatea luminoasă de bază la o intensitate a luminii crescută, asupra funcționalității fotosistemului II.

Scopul experimentelor a fost înțelegerea diversității funcționale a proteinei D1 în condițiile modificării factorilor de mediu.

Tulpinile cianobacteriene avute în vedere au fost *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Cyanothece* sp. ATCC 51142 și *Anabaena variabilis* ATCC 29413.

În ceea ce privește tulpina cianobacteriană *Synechococcus* sp. PCC 7002 s-a evidențiat un efect al intensității crescute a luminii ce s-a manifestat prin scăderea eficienței PS II observată printr-o scădere a numărului de centri activi până la 65% și o recuperare a lor până la 70% în absența DCMU respectiv o scădere până la 50% cu o recuperare până la 70% a numărului total de centri activi disponibili ai fotosistemului II în prezența DCMU. În absența DCMU, s-a observat o alterare în faza mediană a curbei de fluorescență corespunzătoare transferului electronilor de la Q_A^- la Q_B cu locusul Q_B liber în momentul impulsului luminos evidențiată prin un transfer rapid al electronilor în partea acceptoare a fotosistemului II. Efectul este cel mai evident la 60 de minute de tratament, urmat de o revenire în timpul condițiilor de recuperare. În prezența DCMU nu au fost prezente modificări ale curbei de fluorescență arătând faptul că stresul cauzat de intensitatea crescută nu are efecte majore asupra transferului de electroni în partea donoare a fotosistemului II la *Synechococcus* sp. PCC 7002.

III.3.2. Influența radiațiilor UV-B asupra funcționalității fotosistemului II la tulpini cianobacteriene model

Tulpinile cianobacteriene asupra cărora au fost realizate experimente de urmărire a efectului radiațiilor UV-B au fost *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 și *Cyanothece* sp. ATCC 51142. În ceea ce privește efectul radiațiilor UV-B asupra tulpinii cianobacteriene *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Figura 2),

în absența DCMU are loc o decelerare a transferului de electroni între chinonele Q_A și Q_B , în etapa mediană-rapidă, decelerare reversibilă în timpul perioadei de recuperare și mai evidentă la proba de 60 de minute de tratament. Este prima dată când acest efect este înregistrat la o tulpină cianobacteriană în timpul tratamentului cu radiații UV-B care, la alte specii, cum ar fi *Synechocystis* sp. PCC 6803 și *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, nu induc modificări ale părții acceptoare a fotosistemului II în condiții experimentale similare (Sicora și colab., 2008; Vass și colab., 1999). În prezența DCMU este vizibilă o accelerare a transferului electronilor în partea donoare a fotosistemului II, efect descris anterior la alte specii (Vass și colab., 1999), reprezentând recombinarea Q_A^- cu co-factori mai apropiați ai lanțului de transfer ai electronilor, cauzat de o inhibare a complexului de oxidare al apei (Sicora și colab., 2003).

S-a observat o scădere a numărului de complexe active ale fotosistemului II și implicit a eficienței procesului de fotosinteză de 40 % urmată de o recuperare de 10 % atât în absența cât și în prezența DCMU.

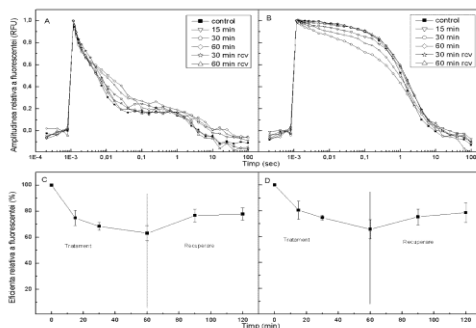


Figura 2. Efectul radiațiilor UV-B asupra părții acceptoare și asupra părții donoare a PS II la tulpina cianobacteriană *Synechococcus* sp. PCC 7002.

III.4. Influența dioxidului de carbon (CO₂) asupra fotosistemului II de la cianobacterii

Cianobacteriile, responsabile atât pentru formarea oxigenului atmosferic cât și pentru faptul că sunt la originea plastidelor, au dezvoltat diferite strategii pentru adaptarea la condițiile de mediu variabile, deci implicit și la diferite niveluri ale CO₂ în mediu. Scopul experimentelor noastre a fost să observăm cum se comportă celulele tulpinii *Synechocystis* sp. PCC 6803 în 3 tipuri de experimente, descrise în capitolul Materiale și Metode.

Având în vedere faptul că studii anterioare (Sicora și colab., 2008; Summerfield și colab., 2009) au arătat că gena *psbAI* este indusă la înlăturarea oxigenului și au concluzionat că efectul se datorează și oxigenului, s-a intenționat înlăturarea, pe rând, a celorlalte gaze din compoziția aerului (O₂ și CO₂) pentru a urmări efectul lor separat. S-a evidențiat astfel, din experimentele noastre, că tulpina cianobacteriană supusă microaerobiozei arată o inducție puternică a genei *psbAI*, așa cum a fost documentat anterior (Summerfield și colab., 2008; Sicora și colab., 2009). O dată cu revenirea la condițiile inițiale de creștere, nivelul de exprimare scade și ajunge la nivelul inițial.

Pornind de la premisa că, în timpul microaerobiozei, barbotarea mediului de creștere cu azot, cu scopul de a îndepărta din mediu O₂, ar putea cauza și eliminarea CO₂ din mediu și ar induce astfel exprimarea genei *psbAI*, s-a presupus că ar trebui să observăm o inducție a genei independentă de concentrația de oxigen. Pentru a testa această ipoteză, s-au supus celulele crescute cu 5% CO₂ unui tratament cu aer sintetic, compus doar din oxigen și azot și s-a urmărit efectul de inducție a genei *psbAI*. S-a evidențiat astfel faptul că, contrar așteptărilor noastre, în cazul

celulelor supuse tratamentului cu aer sintetic, nu există o inducție a genei *psbA1*.

Testul de trecere de la CO₂ înalt la nivelul CO₂ atmosferic a fost realizat prin barbotarea culturii, inițial cu 5% CO₂, până când valoarea densității optice a culturii la 730 nm a ajuns la 0.8, iar apoi aerul de barbotare a fost înlocuit cu CO₂ ambiental (atmosferic), adică cu un nivel scăzut de CO₂ pentru următoarele 120 de minute (Figura 3). O dată cu trecerea la nivel scăzut al dioxidului de carbon gena *psbA1* a arătat o inducție de 30 de ori în primele 15 minute de tratament și a rămas indusă timp de 120 de minute în timpul barbotării cu aer atmosferic. Este evidentă, totuși, o descreștere a exprimării genei după 120 de minute de tratament, exprimarea rămânând mult deasupra nivelului controlului. Interesant este faptul că în condițiile de recuperare, când celulele au fost supuse din nou amestecului de gaze cu 5% CO₂, nivelul de exprimare al genei *psbA1* continuă să crească.

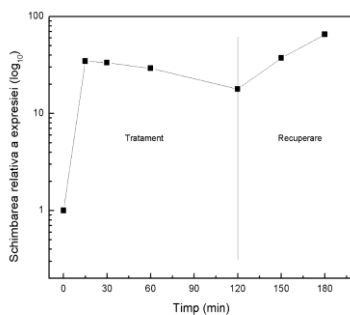


Figura 3. Exprimarea genei *psbA1*, cuantificată prin RT-PCR, în celulele crescute cu 5% CO₂ și apoi transferate la aer atmosferic.

În continuare s-a dorit investigarea existenței vreunui element de reglare implicat în controlul exprimării genei *psbA1* dependentă de nivelul de CO₂. Din acest motiv, s-a analizat secvența promotor al genei

psbA1. NdhR, un reglator de tip LysR, controlează exprimarea majorității genelor dependente de nivelul CO₂ la *Synechocystis* sp. PCC 6803 prin legarea de o secvență de semnătură evidențiată printr-un motiv de tip T-N11-A (Figge și colab., 2001). Într-adevăr, investigarea secvenței genei *psbA1* a dezvăluit o secvență motiv palindromică similară motivului, această constatare reprezintă o dovadă certă a reglării exprimării prin NdhR în condiții de scădere a concentrației de CO₂.

III.5. Rolul funcțional al proteinei D1` în răspunsul la stresul fotic, UV și hipoxic la cianobacterii

Pentru evidențierea rolului funcțional al izoformei D1`, s-au efectuat experimente pe două tulpini de *Synechococcus* sp. PCC 7002, tulpina “sălbatică” sau “wild type” denumită de acum “7002 tip sălbatic”, respectiv o tulpină mutantă a acestei cianobacterii care nu conține gena ce codifică izoforma D1` a proteinei D1, respectiv a2164, denumită de acum “7002 tip mutant”. Pentru a verifica dacă tulpina *Synechococcus* sp. PCC 7002 are potențialul genetic pentru izoforma D1` a proteinei D1, s-au analizat secvențele genetice corespunzătoare din baza de date Cyanobase. Alinierea a fost obținută cu programul CLC Sequence Viewer 6.9.1. *Synechococcus* sp. PCC 7002 are trei gene *psbA* ce codifică izoforme diferite ale proteinei D1, respectiv, *psbA1*, *psbA2* și *psbA3*.

S-au evidențiat astfel prezența în secvența de aminoacizi a proteinei SYN-PCC7002_A2164 a celor trei substituții caracteristice izoformei D1` a proteinei D1.

În continuare s-a dorit observarea posibilelor modificări în ceea ce privește spectrul de absorbție al pigmentilor fotosintetici din cele 2 tulpini cianobacteriene. S-a observat că tulpina tip mutant de *Synechococcus* sp. PCC 7002 are un raport mai bun al clorofilei raportat la ficobiliproteine, lucru asociat cu o capacitate mai mare de captare a luminii (Figura 4).

În continuare, s-au aplicat diferite tipuri de stres asupra celor două tulpini cianobacteriene pentru a vedea cum se comportă ele în aceste condiții. În timpul tratamentului cu intensitate mărită a luminii, s-a obținut o capacitate a tulpinii mutant de recuperare mai mare decât a tulpinii tip sălbatic la 120 de minute de tratament aplicat, atât în absența cât și în prezența DCMU. Studiile noastre nu au relevat diferențe notabile între *Synechococcus* sp. PCC 7002 tipul sălbatic și cel mutant în microaerobioză sau prin iradierea UV-B.

În timpul perioadei de recuperare consecutivă stresului ambiental (fotic, UV și hipoxic) s-a detectat o cantitate mai mare de proteină D1 totală, efect tipic pentru o reacție celulară ce urmează unei perioade de stres.

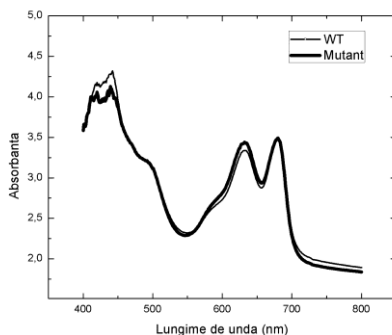


Figura 4. Spectre de absorbție in vivo ale tulpinilor de *Synechococcus* sp. PCC 7002 tip sălbatic și tip mutant.

III.6. Modificările funcționale ale fotosistemului II în timpul ciclurilor lumină / întuneric

Principalul obiectiv al studiilor prezentate în acest capitol a fost observarea felului în care au loc modificări ale fotosistemului II în partea donoare și cea acceptoare în timpul unui ciclu de 12 ore lumină 12 ore

întuneric, pentru a înțelege mecanismele intrinseci ale adaptării la aceste condiții. Un al obiectiv a fost acela de a explora eventuala implicare a izoformei D1 *rogue* în aceste mecanisme de răspuns la variațiile de lumină. În acest scop, s-au utilizat tehnici de măsurare a fluorescență clorofiliană aplicate la tulpinile cianobacteriene *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Anabaena variabilis* 29413, *Cyanothece* sp. PCC 8801 și *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Tulpinile cianobacteriene au fost crescute în regim de 12 ore lumină 12 ore întuneric. Experimentele au vizat prelevarea de probe pentru măsurarea fluorescenței clorofiliene la fiecare 60 de minute timp de 26 de ore, în absența și prezenta DCMU. Următorul pas a fost să investigăm dacă modificările apărute în partea donoare și acceptoare a PS II sunt sau nu dependente de sinteză proteică, astfel că s-a adăugat lincomicina, un inhibitor capabil să blocheze sinteza noilor proteine, în mediul de cultură (Vazquez, 1974).

În ceea ce privește tulpina *Cyanothece* sp. ATCC 51142, în partea acceptoare a fotosistemului II s-a manifestat o încetinire a transferului de electroni între chinonele Q_A și Q_B , accelerare vizibilă foarte bine în centrele care au locusul Q_B liber la momentul impulsului luminos. S-a evidențiat faptul că modificarea apare deja la 15 minute de la stingerea luminii și este reversibilă la 15 minute de la aprinderea luminii, recuperarea fiind totală la aproximativ o oră după instaurarea luminii în camera climatică.

Apariția acestei faze rapide în transferul electronilor de asemenea în partea donoare a fotosistemului II sugerează o inhibare a complexului de oxidare a apei. Modificarea apare imediat după instaurarea întunericului, fiind vizibilă la 15 minute, și este perfect reversibilă o dată cu debutul luminii

În ceea ce privește numărul de centri activi ai fotosistemului II, observăm că modificările în partea donoare și acceptoare, se corelează cu o scădere a numărului de centri activi cu până la 60% în timpul nopții urmată de o recuperare a numărului de centri activi o dată cu aprinderea luminii, atât în absența cât și în prezența DCMU. Scăderea numărului de centri activi ai fotosistemului II în timpul nopții sugerează o inhibare a fotosistemului II pe timpul condițiilor de întuneric.

Pentru a investiga dacă modificările apărute în partea donoare sau acceptoare a fotosistemului II la *Cyanothece* sp. ATCC 51142 sunt dependente de sinteza proteică, s-a adăugat, înainte de instaurarea condițiilor de întuneric, lincomicina, substanță capabilă să blocheze sinteza proteică. În prezența lincomicinei, s-a constatat o accelerare a transferului de electroni între chinonele Q_A și Q_B de mai mică amploare decât în absența lincomicinei.

Toate cele trei specii cianobacteriene purtătoare a unei posibile izoforme D1 rogue, prezintă modificări în partea acceptoare a fotosistemului II, în special la nivelul combinării Q_A - cu centre care au situsul Q_B liber la momentul impulsului luminos. Această constatare sugerează o puternică modificare a fotosistemului II în timpul perioadei de întuneric.

Tulpina control, *Synechocystis* sp. PCC 6803 nu prezintă modificări în partea donoare sau acceptoare a fotosistemului II, menținându-și un fotosistem II funcțional în timpul perioadei de întuneric.

IV. Concluzii generale

a. Analiza bioinformatică a secvențelor genei *psbA* din bazele de date a permis evidențierea unor modificări specifice fiecărei izoforme a proteinei D1.

b. În urma testării efectului microaerobiozei asupra tulpinii cianobacteriene *Synechococcus* sp. PCC 7002 s-a observat faptul că aceasta conține o formă funcțională atipică a proteinei D1 cu rol neelucidat până în prezent.

c. Un alt element de noutate al prezentei teze de doctorat, îl reprezintă observarea efectului atipic al radiațiilor UV-B asupra părții acceptoare de electroni a fotosistemului II de la *Synechococcus* sp. PCC 7002, efect nedocumentat până în prezent.

d. Studiile asupra tulpinii *Synechocystis* sp. PCC 6803 au arătat că atât O₂, cât și CO₂ acționează ca agenți abiotici declanșatori în inducerea exprimării genei *psbAI*, prin mecanisme independente unul de celălalt. O altă noutate a acestei cercetări este faptul că, în structura genei *psbAI* s-au evidențiat elemente reglatoare ale exprimării sub acțiunea CO₂ ca factor declanșator.

e. În urma cercetărilor noastre, s-a demonstrat faptul că tulpina mutant de *Synechococcus* sp. PCC 7002 lipsită de proteina D1` funcțională, are o eficiență crescută de reparare a PS II în urma efectului dăunător al factorilor de stres, probabil prin declanșarea unor mecanisme interne de protecție – răspuns la stres, ce trebuie investigate prin studii suplimentare ulterioare.

f. Studiile care au vizat efectul ciclurilor lumină-întuneric asupra funcționalității fotosistemului II la *Cyanothece* sp. ATCC 51142 au arătat că modificările apărute în partea donoare și acceptoare a fotosistemului II depind parțial și de sinteza proteică de novo.

Astfel, pe baza sistematizării datelor disponibile în baza de date Cyanobase, s-au indentificat aminoacizii specific conservați pentru fiecare izoformă a proteinei D1 și s-au propus unele modele evolutive a familiei de gene *psbA*. În urma experimentelor de microaerobioză s-a identificat o formă atipică, nedocumentată până acum, a proteinei D1 la tulpina cianobacteriană *Synechococcus* sp. PCC 7002. La această tulpină cianobacteriană s-a observat și un efect atipic al radiațiilor UV-B asupra părții acceptoare a lanțului transportor de electroni, efect nedocumentat până în prezent. Studiile asupra tulpinii cianobacteriene *Synechococcus* sp. PCC 6803 au arătat un efect independent al O₂ și CO₂ de inducere a exprimării genei *psbA1*, precum și existența unui element reglator al exprimării sub acțiunea CO₂ ca factor declanșator. În urma cercetărilor noastre s-a demonstrat faptul că tulpina mutant de *Synechococcus* sp. PCC 7002 are o eficiență crescută de reparare a PS II în urma acțiunii dăunătoare a diversilor factori de mediu și de asemenea un element de noutate îl reprezintă faptul că modificările apărute atât în partea donoare cât și în partea acceptoare a PS II în timpul ciclurilor lumină/întuneric la *Cyanothece* sp. ATCC 51142 sunt dependente parțial de sinteza proteică *de novo*.

Per ansamblu, putem afirma că prezentele studii contribuie la crearea unei imagini mai complete a PS II de la cianobacteriile luate în studiu și deschid calea spre alte abordări experimentale în scopul elucidării aspectelor genetice și fiziologice rămase încă neclare.

V. Bibliografie selectivă

Campbell D, Eriksson MJ, Öquist G, Gustafsson P, Clarke A. 1998, The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 364-369.

Chiş C, Drugă B, Carmel D, Chiş I, Ardelean A, Sicora CI. 2016, UV-B stress changes the electron flow on photosystem II complex in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Rom Biotechnol Lett* **22**, 12142-12146.

Chiş C, Carmel D, Chiş I, Ardelean A, Dragos N, Sicora C. 2017, Expression of *psbA1* gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is influenced by CO₂. *Open Life Sci* **12**, 156-161.

Glazer AN, Clark JH. 1986, Phycobilisomes: macromolecular structure and energy flow dynamics. *Biophys J* **49**, 115-116.

Govindjee, Ames J, Fork DC. 1986, Light emission by plants and Bacteria. *Academic Press*, Orlando.

Kaneko T, Matsubayashi T, Sugita M, Sugiura M. 1996, Physical and gene maps of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 6301. *Plant Mol Biol* **31**, 193-201.

Liu LN, Elmalk AT, Aartsma TJ, Thomas J-C, Lamers GEM, Zhou B-C, Zhang Y-Z. 2008, Light-induced energetic decoupling as a mechanism for phycobilisome-related energy dissipation in red algae: a single molecule study. *PLOS ONE* **3**(9): e3134.

Mulo P, Sicora CI, Aro EM. 2009, Cyanobacterial *psbA* gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. *Cell Mol Life Sci* **66**(23):3697–3710.

Murray JW. 2012, Sequence variation at the oxygen-evolving centre of photosystem II: a new class of ‘rogue’ cyanobacterial D1 proteins. *Photosynth Res* **110**, 177–184.

Öquist G, Campbell D, Clarke AK, Gustafsson P. 1995, The cyanobacterium *Synechococcus* modulates Photosystem II function in response to excitation stress through D1 exchange. *Photosynth Res* **46**, 151-158.

Park J-J, Lechno-Yossef S, Wolk CP, Vieille C. 2013, Cell-specific gene expression in *Anabaena variabilis* grown phototrophically, mixotrophically, and heterotrophically. *BMC Genomics* **14**:759.

Pepper IL, Gerba GB, Gentry TJ. 2015, *Environmental Microbiology, third edition*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00001-6>.

Sander J, Nowaczyk M, Kopczak M, Rogner M. 2008, Role of the *psbA* gene family of PSII from the thermophilic cyanobacterium *ThermoSynechococcus elongatus*. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH,

Osmond B (eds) Photosynthesis. Energy from the Sun. *Springer, Dordrecht*, 745-748.

Sicora CI, Appleton SE, Brown CM, Chung J, Chandler J, Cockshutt AM, Vass I, Campbell DA. 2006, Cyanobacterial *psbA* families in *Anabaena* and *Synechocystis* encode trace, constitutive and UVB-induced D1 isoforms. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* **1**, 47-56.

Sicora CI, Ho F, 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.

Sidler WA. 1994, Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In: The molecular biology of cyanobacteria. *Kluwer Academic Publisher, The Netherlands* 139-216.

Sonani RR, Rastogi RP, Patel R, Madamwar D. 2016, Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World J Biol Chem* **7**(1): 100-109.

Summerfield TC, Toepel J, Sherman LA. 2008, Low-oxygen induction of normally cryptic *psbA* genes in cyanobacteria. *Biochemistry* **47**, 12939–1294.

Summerfield TC, Nagarajan S, Sherman LA. 2011, Gene expression under low-oxygen conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 demonstrates Hik31-dependent and -independent responses. *Microbiology* **157**, 301–312.

Tyystjärvi T, Aro EM, Jansson C, Mäenpää P. 1994, Changes of aminoacid sequence in PEST-like area and QEEET motif affect degradation rate of D1 polypeptide in photosystem II. *Plant Mol Biol* **25**, 517–526.

Umena Y, Kawakami K, Shen J.-R, Kamiya N. 2011, Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* **473**, 55–60.

Van Thor JJ, Gruters OWM, Matthijs HCP, Hellingwerf KJ. 1999, Localization and function of ferredoxin: NADP⁺ reductase bound to the phycobilisomes of *Synechocystis*. *EMBO Journal* **18**, 4128-4136.

Vass I, Kirilovsky D, Perewoska I, Mate Z, Nagy F, Etienne A-L. 2000, UV-B radiation induced exchange of the D1 reaction centre subunits produced from the *psbA2* and *psbA3* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **267**, 2640-2648.

Vass I, Kirilovsky D, Etienne A-L. 1999, UV-B radiation induced donor and acceptor-side modifications of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **38**, 12786–12794.

VI. Activitate științifică

ARTICOLE

Chiș C, Chiș I, Sicora O, Dalton C, Grec A, Ardelean A, Dragoș N, Sicora C. (2014) Comparative analysis of D1 protein sequences in cyanobacteria, *Studia UBB Biologia* **59** (2): 5-16.

Chiș I, Drugă B, Dalton C, **Chiș C**, Ardelean A, Dragoș N, Sicora CI. (2016) Effect of microaerobiosis on photosystem II in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Studia UBB Biologia* **61** (2): 197-204.

Chiș C, Drugă B, Dalton C, Chiș I, Ardelean A, Sicora CI. (2016) UV-B stress changes the electron flow on photosystem II complex in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Rom Biotechnol Lett* **22** (6): 12142-12146. (IF²⁰¹⁶=0,396; AIS²⁰¹⁶=0.083 – conf. InCites JCR Clarivate Analytics)

Chiș C, Dalton C, Chiș I, Ardelean A, Dragoș N, Sicora CI. (2017) Expression of *psbA1* gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is influenced by CO₂. *Open Life Sci* **12** (1): 156-161.

(IF²⁰¹⁷= 0,764; AIS²⁰¹⁷=0,15 conf. InCites JCR Clarivate Analytics).

Chiș C, Chiș I, Sicora O, Dalton C, Grec A, Ardelean A, Dragoș N, Sicora C. (2014) Forward electron transport measured *in situ* in microbial mats from a hot spring in N-W Romania, *Studia UBB Biologia* **59** (2): 17-26.

CAPITOLE DE CARTE

Chiș C, Mahboob A, Vassiliev S, Bica A, Peca L, Brouce D, Aro EM, Sicora C. (2013) D1' – a new member of D1 protein family in cyanobacteria, *Photosynthesis: Research for food, fuel, and future. Advanced Topics in Science and Technology in China*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 358-360. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7_75 .