

**UNIVERSITATEA BABEȘ–BOLYAI**  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**(REZUMAT)**

**GENE IMPLICATE ÎN ACTIVITATEA SCVALEN-  
SINTAZICĂ LA DIFERITE RASE CHIMICE DE  
*BOTRYOCOCCUS* (CHLOROPHYTA)**

**Doctorand:**

**Tiberiu SZÖKE-NAGY**

**Cond. științific:**

**Prof. univ. Dr. Nicolaie DRAGOȘ**

**Cluj–Napoca**

**2019**

# CUPRINS

	Pag.
LISTA DE ABREVIERI.....	6
INTRODUCERE.....	9
<b>Cap. I. DATE GENERALE PRIVIND COMBUSTIBILII FOSILI ȘI RESURSELE ALTERNATIVE DE ENERGIE</b>	
I. 1. Prezentare generală .....	11
I. 2. Situația actuală și perspective privind producerea energiei folosind combustibilii fosili .....	12
I. 3. Sursele regenerabile de energie.....	13
I. 4. Concluzii .....	17
<b>Cap. II. MICROALGELE ȘI PRODUCEREA BIOCOMBUSTIBILILOR – O ALTERNATIVĂ VIABILĂ LA COMBUSTIBILII CONVENȚIONALI?</b>	
II. 1. Prezentare generală .....	18
II. 2. Potențialul algelor ca sursă pentru producerea biocombustibililor .....	21
II. 2.1. Gazificarea.....	23
II. 2.2. Piroliza .....	24
II. 2.3. Lichefierea.....	24
II. 3. Biocombustibilii.....	25
II. 3.1. Biocombustibili de primă generație .....	26
II. 3.2. Biocombustibili de generația a doua .....	27
II. 3.3. Biocombustibili de generația a treia .....	29
II. 3.3.1. Bioetanolul .....	31
II. 3.3.2. Biodieselul .....	32
II. 4. Concluzii.....	34
<b>Cap. III. BIOLOGIA ȘI METABOLISMUL LIPIDIC LA <i>BOTRYOCOCCUS BRAUNII</i></b>	
III. 1. Prezentare generală.....	35
III. 2. Caractere morfologice .....	35
III. 2.1. Forma celulelor și organizarea colonială .....	35
III. 2.2. Cloroplastul.....	36
III. 2.3. Nucleul.....	37
III. 2.4. Reproducerea .....	37
III. 2.5. Citoplasma .....	37
III. 2.6. Corpii lipidici .....	37
III. 2.7. Reticulul endoplasmic.....	38
III. 2.8. Matricea extracelulară.....	38
III. 3. Condițiile de creștere și cultivare .....	39
III. 4. Scvalen sintazele .....	41
III. 5. Rasele chimice și sinteza hidrocarburilor.....	42
III. 5.1. Biosinteza hidrocarburilor la <i>B. braunii</i> rasa A .....	42
III. 5.2. Biosinteza hidrocarburilor la <i>B. braunii</i> rasa B .....	45
III. 5.3. Mecanismul de biosinteza a botriococenelor la <i>B. braunii</i> rasa B .....	47
III. 5.4. Mecanismul de biosinteza a lycopadienelor la <i>B. braunii</i> rasa L .....	48
III. 6. Poziția filogenetică a scvalen sintazelor de la <i>B. braunii</i> .....	50
III. 8. Importanța biotehnologică și compuși cu potențial bioeconomic .....	52

III. 9. Concluzii.....	55
<b>Cap. IV. OBIECTIVELE STUDIULUI .....</b>	<b>56</b>
<b>Cap. V. MATERIAL ȘI METODE</b>	
V. 1. Tulpinile algale folosite și condiții de creștere .....	57
V. 2. Microscopia optică și de fluorescență.....	58
V. 3. Analiza moleculară .....	60
V. 3.1. Obținerea biomasei algale .....	60
V. 3.2. Izolarea ADNg (genomic).....	60
V. 3.3. Izolarea ARN total .....	61
V. 3.4. Sinteza ADN complementar (ADNc) .....	62
V. 3.5. Reacția în lanț a polimerazei (PCR).....	62
V. 3.5.1. Construcția amorsoarelor .....	62
V. 3.5.2. Amplificarea PCR a genelor și a produșilor de transcriere .....	65
V. 3.5.3. Izolarea produșilor PCR .....	66
V. 3.5.4. Clonarea produșilor de PCR .....	66
V. 3.6. Secvențierea și analiza cromatogramelor .....	68
V. 4. Analiza filogenetică.....	68
V. 5. Predicția structurilor tridimensionale .....	76
<b>Cap. VI. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b>	
VI. 1. Microscopia optică și de fluorescență .....	80
VI. 1.1. Concluzii .....	87
VI. 2. Analiza moleculară.....	88
VI. 2.1. Izolarea ADN și ARN.....	88
VI. 2.2. Amplificarea PCR a produșilor de transcriere a genelor SSL-1, SSL-2 și SSL-3 .....	91
VI. 2.3. Amplificarea PCR a genelor SSL-1, SSL-2 și SSL-3.....	94
VI. 2.4. Secvențierea și identificarea scvalen sintazelor-like.....	96
VI. 2.4.1. Identificarea produșilor de transcriere.....	96
VI. 2.4.2. Identificarea și structura genelor responsabile pentru activitatea SSL.....	97
VI. 2.5. Analiza domeniilor conservate .....	101
VI. 2.6. Analiza filogenetică .....	104
VI. 2.7. Concluzii.....	108
VI. 3. Predicția structurilor tridimensionale .....	109
VI. 3.1. Analiza structurii primare (parametri fizico-chimici).....	109
VI. 3.2. Analiza structurilor secundare .....	110
VI. 3.3. Predicția structurii tridimensionale .....	118
VI. 3.3.1. Generarea structurilor pe baza omologiei.....	118
VI. 3.3.2. Rafinarea structurilor și analiza post-rafinare .....	122
VI. 3.3.3. Analiza comparativă a structurilor tridimensionale .....	128
VI. 3.3.4. Predicția situsurilor catalitice și a liganzilor .....	136
VI. 3.4. Concluzii.....	149
CONCLUZII GENERALE .....	150
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE .....	152
ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ .....	182

**Cuvinte cheie:** *Botryococcus*, biocombustibili, hidrocarburi, scvalen sintaze-like, gene, analize moleculare, filogenie, predicția structurilor tridimensionale.

## Lista de abrevieri

aa	aminoacizi
ADN	Acid dezoxiribonucleic
ADNc	ADN complementar
ADNg	ADN genomic
AICB	Colecția de Alge și Cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice
Ala	Alanină
Arg	Arginină
ARN	Acid ribonucleic
Asn	Asparagină
Asp	Acid aspartic
BLAST	<i>eng.</i> Basic Local Alignment Search Tool
FPP	Farnezil difosfat
FPS	Farnezil pirofosfat
Gln	Glutamină
Glu	Acid glutamic
GRAVY	<i>eng.</i> Grand average of hydropathy
Leu	Leucină
LG + G	<i>eng.</i> Le Gascuel 2008 model + Gamma distributed
LOS	Licopaoctaen sintază
Lys	Lizină
ML	<i>eng.</i> Maximum Likelihood
NADPH	Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat forma redusă
NJ	<i>eng.</i> Neighbor-Joining
ONU	Organizația Națiunilor Unite
PCR	Reacția în lanț a polimerazei, <i>eng.</i> Polymerase Chain Reaction
PREFMD	<i>eng.</i> Protein REFinment via Molecular Dynamics
PSPP	Prescvalen difosfat
NMR	Rezonanță magnetică nucleară
SSL	Scvalen sintaza-like
SSL-1	Scvalen sintaza-like 1
SSL-2	Scvalen sintaza-like 2
SSL-3	Scvalen sintaza-like 3
TD-PCR	Touchdown PCR
TEP	Tone echivalent petrol
TM	Transmembranar
Tyr	Tirozină
Val	Valină

## INTRODUCERE

Societatea actuală, pe fondul creșterii numărului total de locuitori (conform statisticilor ONU, 7,7 mld. în prezent și aproximativ 12 mld. la finalul secolului XXI), a speranței de viață și a creșterii economice, se îndreaptă spre o criză a resurselor, în special în ceea ce privește consumul și epuizarea rezervelor de combustibili fosili. Dacă în ultimele două secole speranța de viață s-a dublat, necesarul de energie a crescut de aproximativ 35 de ori. În prezent, 80% din energia consumată la nivel mondial este produsă utilizând combustibili fosili, pe de altă parte în perioada 2030-2040, majoritatea zăcămintelor exploatare în prezent vor ajunge la maturitate, urmând un declin al extracției acestora. În acest context, nevoia utilizării resurselor regenerabile de energie, datorită dezvoltărilor tehnologice rapide din aceste domenii, căpătă un avânt din ce în ce mai mare.

O astfel de energie regenerabilă este reprezentată de utilizarea microalgelor pentru producerea diverselor tipuri de biocombustibili, utilizarea algelor pentru producerea biocombustibililor prezintă mai multe avantaje detaliate în partea teoretică a tezei.

*Botryococcus braunii* (Clasa Trebouxiophyceae), se deosebește de restul microalgelor datorită faptului că în condiții optime de creștere ale culturilor, celulele algale pot acumula până la 86% din greutatea uscată a biomasei algale (Brown și colab., 1969), hidrocarburi similare celor din depozitele de petrol. Tulpinile de *B. braunii* pot produce diverse tipuri de hidrocarburi, fiind subclasificate în patru rase chimice: A, B, L, și S.

Lucrarea de față a avut ca și obiective principale: 1) caracterizarea morfologică, optimizarea metodelor de extracție a acizilor nucleici din biomasă algală și stabilirea unui protocol pentru amplificarea produșilor de transcriere, respectiv a genelor implicate în activitatea scvalen sintazică la diferite tulpini din genul *Botryococcus* depozitate în Colecția de Alge și Cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice, Cluj-Napoca (AICB); 2) identificarea produșilor de transcriere și a genelor, respectiv predicția structurii 3D și a principalelor domenii structurale aparținând scvalen sintazelor-like de la tulpinile studiate.

Gradul de originalitate pe plan național al acestei lucrări reiese din numărul tulpinilor investigate, acestea fiind izolate din material biologic, provenit din diferite regiuni ale Transilvaniei, reprezentând totodată o nouă valorificare a Colecției de Alge și Cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice, Cluj-Napoca.

Aș dori să precizez faptul că această lucrare a fost realizată sub atenta supraveghere și îndrumare a conducătorului meu de doctorat, domnul prof. dr. Nicolae Dragoș, căruia aș dori să îi mulțumesc în mod special pentru sfaturile oferite pe parcursul stagiului doctoral.

De asemenea, aș dori să prezint mulțumiri membrilor comisiei de îndrumare, domnilor prof. dr. Corneliu Tarba, prof. dr. Horia Leonard Banciu, conf. dr. Vasile Muntean și conf. dr. Lucian

Barbu-Tudoran, pentru sfaturile și sprijinul acordat, dar mai ales pentru observațiile critice și constructive.

Le mulțumesc domnilor acad. prof. dr. Octavian Popescu, CS I dr. Cosmin Sicora, director al Grădinii Botanice din Jibou și CS I dr. Cristian Coman pentru că au avut amabilitatea de a-mi fi referenți în comisia de doctorat.

Aș dori de asemenea să le mulțumesc foștilor colegi din cadrul Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca, CS III dr. Hegedűs Adriana, CS III dr. Bogdan Drugă, CS III dr. Andreea Baricz și doamnei tehn. Dorina Moldovan pentru sfaturile practice și utile oferite de-a lungul experimentelor derulate și prezentate în lucrarea de față.

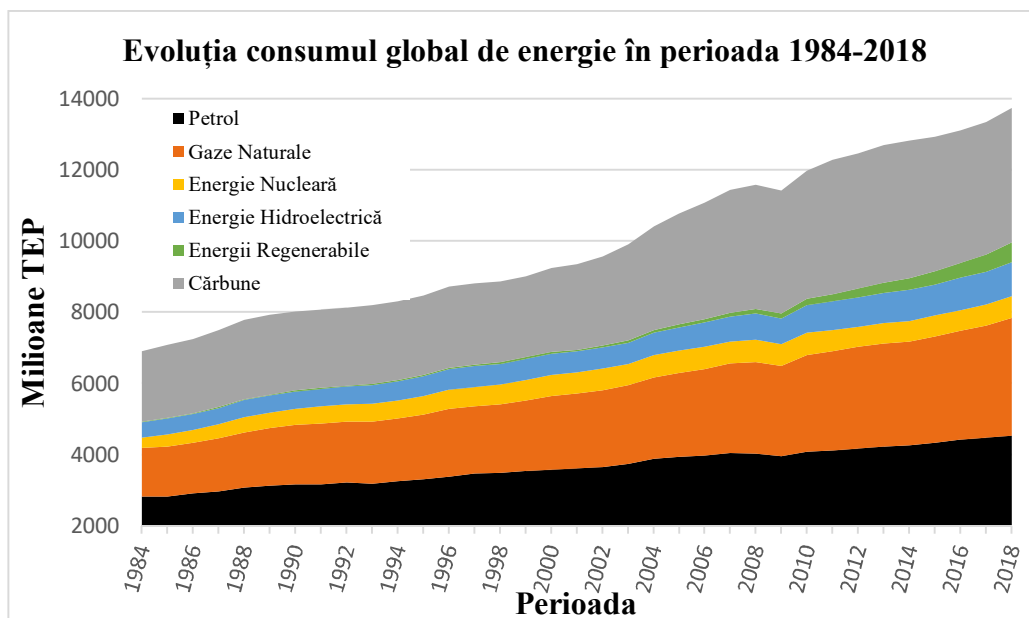
Nu în ultimul rând, aș dori să le mulțumesc părinților și surorii mele pentru dragostea de care au dat dovadă și sprijinul acordat în toții anii petrecuți departe de ei.

În final, aș dori să transmit mulțumiri sincere prietenilor, drd. Sebastian Alin Porav, Mihai Dorin Birtoc, și iubitei mele, Diana Galea, care m-au susținut, fiindu-mi alături în toate momentele dificile și fără de care lucrarea de față nu ar fi fost finalizată.

## CAP. I. DATE GENERALE PRIVIND COMBUSTIBILII FOSILI ȘI RESURSELE ALTERNATIVE DE ENERGIE

În ceea ce privește consumul de energie la nivel global, se poate observa din figura 1 că în anul 2018, petrolul rămâne sursa principală de energie cu aproximativ 33% din totalul energiei consumate, urmată îndeaproape de consumul de cărbune (27,5%), gaze naturale (24,1%), energia hidroelectrică (6,9%), energia nucleară (4,4%) și nu în ultimul rând energiile regenerabile, toate la un loc având un procent de 4,1% din total (British Petroleum, 2019). Petrolul este fără doar și poate cea mai importantă sursă de energie consumată de populația zilelor noastre, depășind celelalte tipuri de combustibili. Deși combustibilii fosili se mai produc și astăzi, la adâncimi mari datorită presiunii și temperaturilor ridicate, rata de generare a zăcămintelor nu este la fel de rapidă pe cât este consumul lor, din acest motiv, combustibilii fosili nu sunt considerați surse regenerabile de energie. Ca urmare a deficitului dintre generarea și consumul petrolului, tendința de viitor este orientarea spre resursele alternative de energie și din fericire avântul tehnologic din ultimele decenii va face această tranziție posibilă (Kirtay, 2009).

Sursele de energie se pot clasifica în două mari grupe: resurse fosile de energie și resurse regenerabile, altfel spus în resurse neregenerabile și resurse regenerabile de energie. Sursele neregenerabile de energie includ: cărbunele, petrolul, gazele naturale și material fisionabil (uraniu și toriu), în timp ce resursele regenerabile cuprind: energia eoliană, geotermală, solară, hidro și biomasă.



**Fig. 1.** Evoluția consumului global de energie în perioada 1984-2018, exprimată în milioane tone echivalent petrol (TEP). Consumul global de petrol a rămas și în anul 2018 sursa principală de energie având un procent de 33% din totalul consumat (British Petroleum, 2019).

Combustibilii fosili sunt folosiți în prezent pentru producerea a peste 80% din totalul energiei, dar datorită avansului tehnologic și a noilor descoperiri în domeniul energiilor regenerabile, tendința este spre noile resurse regenerabile de energie (Demirbas, 2016).

În acest context folosirea combustibililor fosili ca surse primare pentru obținerea energiei va conduce mai devreme sau mai târziu la o criză energetică și la poluarea mediului la nivel global. Costul energiei obținut din surse regenerabile (energia eoliană, geotermală, solară, hidro și biomasă) poate fi adus la un nivel competitiv cu cel produs din surse neregenerabile (petrol, gaze naturale și cărbuni), datorită dezvoltărilor tehnologice rapide din aceste domenii. Prin urmare, în perioada imediat următoare sursele regenerabile de energie vor căpăta un avânt din ce în ce mai mare, pe fondul limitării resurselor fosile (Demirbas, 2016).

Energiile regenerabile includ: energia solară, hidroelectrică, eoliană, geotermală și energia produsă cu ajutorul biomasei. La nivelul anului 2018, energia hidroelectrică a avut cea mai mare pondere reprezentând aproximativ 62,8% din totalul energiilor alternative utilizate, urmată de energia eoliană cu 19%, energia geotermală, biomasă și alte tipuri de energii alternative cu un procent de 9,4%, iar procentul cel mai mic de aproximativ 8,8% fiind reprezentat de consumul energiei solare (British Petroleum, 2019). În ultima perioadă punându-se accentul tot mai puternic pe obținerea biocombustibili de origine algală sau utilizând biomasă de natură algală (Dale și colab., 2011).

## **CAP. II. MICROALGELE ȘI PRODUCEREA BIOCOMBUSTIBILILOR – O ALTERNATIVĂ VIABILĂ LA COMBUSTIBILII CONVENȚIONALI?**

Microalgele sunt organisme fotosintetizante capabile de a fixa dioxidul de carbon, provenit din diferite surse precum: CO<sub>2</sub> atmosferic, CO<sub>2</sub> provenit din evacuarea gazelor industriale și nu numai sau chiar săruri carbonatice dizolvate (Brennan și Owende, 2010). Fixarea biologică a CO<sub>2</sub> cu ajutorul microalgelor oferă mai multe avantaje deoarece nu se produce CO<sub>2</sub> suplimentar, iar substanțele nutritive sunt consumate în mod continuu, ceea ce duce la producerea biocombustibililor (Judd și colab., 2017) și a altor metaboliți secundari de interes economic (da Rosa și colab., 2018).

Folosirea algelor pentru producerea biocombustibililor prezintă o serie de avantaje: i) algele sintetizează și acumulează cantități mari de lipide neutre (Spolaore și colab., 2006; Ghafari și colab., 2018); ii) cultivarea microalgelor în anumite zone cu climat favorabil poate conferi producție pe tot parcursul anului (Chisti, 2007; Demirbas, 2016); iii) cultura algelor necesită o cantitate mai mică de apă (Dismukes și colab., 2008); iv) cultivarea algelor nu necesită tratamente costisitoare de întreținere (Rodolfi și colab., 2008; Ortiz-Marquez și colab., 2013); v) algele pot capta CO<sub>2</sub> provenit din diverse surse, prin urmare având rol major în reducerea gazelor cu efect de seră (Consoletti și



Prinsen, 2019); vi) algele pot contribui la bioremedierea apelor uzate prin îndepărtarea poluanților (Cantrell și colab., 2008; Salama și colab., 2017; Yang și colab., 2019); vii) anumite specii alge pot fi crescute în ape saline, salmastre sau din zonele de coastă, în special pe terenuri nearabile, prin urmare nu concurează cu resursele utilizate în mod tradițional în agricultură (Searchinger și colab., 2008); viii) biomasa algală poate fi folosită pentru obținerea biocombustibililor (Voloshin și colab., 2016; Bibi și colab., 2017);

Biocombustibilii se pot clasifica, la modul general, în biocombustibili primari și secundari. Biocombustibilii primari sunt folosiți fără a mai fi prelucrați în prealabil, iar biocombustibilii secundari sunt produși prin prelucrarea în prealabil a biomasei. Biocombustibilii secundari pot fi clasificați, în funcție de materia primă și de procedeul care stă la baza producerii acestora, în: biocombustibili de generația întâi, a doua și a treia (Nigam și Singh, 2011).

Biocombustibilii de generația întâi cuprinde biocombustibilii produși prin fermentația zaharurilor sau amidonului extrase din plantele de cultură și amidon extras din boabele de porumb sau alte plante cu conținut ridicat de amidon (Marzo și colab., 2019).

Biocombustibilii din generația a doua sunt produși din materii prime de natură lignocelulozică. Marele avantaj al acestor biocombustibili este reprezentat de materia primă folosită, aceasta fiind necomestibilă și prin urmare, producția acestora nu concurează cu resursele de hrană ca în cazul biocombustibililor de primă generație (Naik și colab., 2010).

Biocombustibilii de generația a treia este reprezentată cei produși cu ajutorul bacteriilor, drojdiilor sau microalgelor în special bioetanol și biodiesel (Chisti, 2007; Nigam și Singh, 2011).

### **CAP. III. BIOLOGIA ȘI METABOLISMUL LIPIDIC LA *BOTRYOCOCCUS BRAUNII***

*Botryococcus braunii* (Chlorophyta) este o microalgă colonială, care poate sintetiza intracelular și apoi excreta (externaliza) mari cantități de hidrocarburi, acestea fiind acumulate în matricea colonială extracelulară care înglobează celulele. În condiții optime de creștere, hidrocarburile pot constitui până la 86% din greutatea uscată a biomasei algale (Brown și colab., 1969).

Observate la microscopul fonic, celulele privite în poziție laterală prezintă un aspect obovoid (piriform), iar din poziție verticală prezintă un contur rotunjit. Celulele pot fi rar singulare, cel mai adesea grupate în colonii. Coloniile prezintă o formă aproximativ sferică, eliptică sau chiar neregulată (frecvent aprox. 100 μm), la unele tulpini fiind observate sub-colonii, legate între ele prin prelungiri matriceale mucilaginoase (Hegedűs și colab., 2014). Cloroplastul este dispus parietal, are formă de cupă, cu cel puțin 2 lobi majori care se prelungesc sub forma unor segmente până aproape

de apexul celulei (Wolf și Cox, 1981). Reproducerea celulelor se realizează numai asexuat, prin generarea mitotică a 2 până la 4 autospori (Komárek și Marvan, 1992). Citoplasma conține pe lângă cloroplast, mitocondrii, reticul endoplasmic și corpi Golgi un număr mare de vezicule și corpi lipidici (Largeau și colab., 1980a).

Tulpinile de *B. braunii* pot produce diverse tipuri de hidrocarburi, tradițional *B. braunii* este subclasificată în trei rase chimice și anume: rasele chimice A, B și L. Rasa chimică A sintetizează *n*-alcadiene și/sau *n*-triene și derivați ale acestora ( $C_{23}$ - $C_{33}$ ) (Metzger și colab., 1986; Metzger și Largeau, 2005). Rasa B acumulează triterpene  $C_nH_{2n-10}$ , predominant botriococcene ( $C_{30}$ - $C_{37}$ ) (Metzger și colab., 1985; Metzger și Largeau, 2005), scvalene, precum și derivați metilați ai acestora (Huang și Poulter, 1989; Achitouv și colab., 2004). Rasa L sintetizează lycopadiene și lycopatriene (Metzger și Casadevall, 1987; Metzger și colab., 1990; Thapa și colab., 2016). Kawachi și colab. (2012) au semnalat prezența unei noi rase de *B. braunii*, denumită rasa S, aceasta sintetizând preponderent sintetizează epoxi-*n*-alcani și *n*-alcani.

Mecanismul de sinteză a scvalenelor și botriococcenelor la *B. braunii* se realizează în două etape. În prima etapă are loc o condensare cap-cap a două molecule de farnezil difosfat (FPP) pentru a forma prescvalen difosfat (PSPP). În a doua etapă prescvalen difosfatul suferă modificări reductive în prezența NADPH rezultând scvalene care are o legătură C1-C1' între cele două molecule de FPP (Blagg și colab., 2002). Poulter (1990) sugerează că biosinteza botriococcenelor poate avea loc printr-un mecanism analog având comună prima etapă cu cea din sinteza scvalenelor dar în a doua etapă PSPP, în urma rearanjării reductive, formează o legătură C3-C1' între cele două molecule de FPP. Niehaus și colab. (2011) folosind asamblarea *de novo* a bibliotecilor de ADNc reușesc identificarea a trei enzime denumite scvalen sintaze-like (SSL) implicate în ultimele etape ale sintezei scvalenelor și botriococcenelor la *B. braunii* Showa. Astfel, SSL-1 este implicată în condensarea moleculelor de FPP în PSPP; ulterior PSPP este convertit la scvalenă (SSL-2) sau botriococcene (SSL-3); toate cele trei reacții fiind NADPH dependente.

Potențialul biotehnologic al *B. braunii* este conferit datorită capacității de sintetiză și acumulare de hidrocarburi la nivelul matricii extracelulare. În funcție de tulpină și condițiile de creștere, acestea pot să ajungă până la 86% (Brown și colab., 1969; Wolf și Cox, 1981).

Rasele chimice de la *B. braunii* au fost studiate, printre altele și din punctul de vedere al compoziției pigmentilor. La rasele chimice B și L, unul dintre cele mai importante carotenoide este luteina (20-29% din totalul carotenoidelor) urmată de  $\beta$ -caroten, echinone, 3-OH echinone, cantaxantină, violaxantină, loroxantină și neoxantină (Ranga Rao și colab., 2017).

Anumite tulpini de *B. braunii*, produce până la 4,0-4,5 g/L EPS, în schimb produc foarte puține hidrocarburi (5%) raportat la masa uscată. În medie, tulpinile raselor A și B pot produce până la 250 mg/L EPS, în schimb tulpinile de rasă L pot produce până la 1g/L (Banerjee și colab., 2002).

## CAP. IV. OBIECTIVELE STUDIULUI

Colecția de Alge și Cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice (AICB) din Cluj-Napoca depozitează peste 1300 de tulpini algale din 9 filumuri principale de microorganisme (Chlorophyta, Cyanobacteria, Euglenophyta, Xantophyta, Bacillariophyta, Cryptophyta, Rhodophyta, Chrysophyta și Dinophyta). Dintre acestea, o parte mai redusă numeric, dar importantă, o reprezintă tulpinile algale catalogate ca fiind *B. braunii* rasa A și *B. terribilis* rasa chimică B.

*Botryococcus braunii* este o microalgă unicelulară, colonială, aparținând filumului Chlorophyta, Clasa Trebouxiophyceae. Importanța acestei microalge este dată de faptul că aceasta poate sintetiza și, ulterior, acumula hidrocarburi similare celor din depozitele de petrol. În ultima perioadă tot mai multe cercetări s-au bazat pe identificarea mecanismului de sinteză a hidrocarburilor. Cu toate acestea producerea hidrocarburilor la scară industrială utilizând această specie algală, rămâne un deziderat greu de atins.

Pornind de la informațiile disponibile în literatura de specialitate, în studiul de față ne-am propus următoarele obiective:

- Caracterizarea morfologică a tulpinilor din genul *Botryococcus* rasa chimică A și B depozitate în Colecția AICB prin observații efectuate în microscopie optică și de fluorescență, utilizând colorații specifice cu Nile Red și roșu neutru.
- Testarea metodelor de extracție a acizilor nucleici și stabilirea unui protocol PCR pentru amplificarea produșilor de transcriere, respectiv a genelor implicate în activitatea scvalen sintazică.
- Identificarea produșilor de transcriere și a genelor SSL, analiza regiunilor conservate și studierea poziției filogenetice a enzimelor implicate în calea de sinteză a hidrocarburilor la tulpini aparținând rasei B.
- Predicția structurii 3D și a principalelor domenii structural funcționale aparținând scvalen sintazelor-like, pe baza unui studiu aprofundat al tulpinii *B. Terribilis* AICB 870, comparativ cu cele prezente și caracterizate la specia *B. braunii* tulpina Showa.

## CAP. V. MATERIAL ȘI METODE

### V. 1. Tulpinile algale folosite și condiții de creștere

Tulpinile algale folosite în prezenta lucrare au fost izolate din flora algală a Transilvaniei, mai exact, din diferite bălți de pe raza județelor Cluj, Mureș și Bihor, fiind reprezentate de tulpinile AICB 53, AICB 413 AICB 414, AICB 415, AICB 416, AICB 438, AICB 442, AICB 475, AICB 870, AICB 872 și AICB 874.

### V. 2. Microscopia optică și de fluorescență

Analizele morfologice s-au bazat pe observarea coloniilor algale la microscopul optic, atât în spectrul vizibil, cât și în fluorescență. Colorația cu Roșu de Nil (Nile Red) a fost utilizată pentru vizualizarea hidrocarburilor, respectiv pentru studierea corpiilor lipidici; colorația cu roșu neutru (Neutral Red) fiind realizată pentru evidențierea și vizualizarea veziculelor.

### V. 3. Analiza moleculară

Protocolul experimental utilizat pentru identificarea produșilor de transcriere și a unor gene responsabile de activitatea scvalen sintazică la tulpinile AICB de *Botryococcus* a presupus parcurgerea următoarelor etape: i) obținerea biomasei algale (secțiunea V. 3.1); ii) izolarea acizilor nucleici (ADNg și ARN total), în acest sens fiind testate mai multe kit-uri disponibile comercial, precum și tehnica clasică pe bază de fenol-cloroform-alcool izoamilic (detaliate în secțiunile V. 3.2. și V. 3.3.); iii) sinteza ADNc (secțiunea V. 3.4); iv) obținerea produșilor de PCR a presupus: construcția amorșelor și testarea acestora *in silico* în prealabil; amplificarea PCR utilizând diferite tehnici precum PCR în condiții normale, PCR în gradient termic sau TD-PCR; izolarea și clonarea produșilor de amplificare obținuți (secțiunea V. 3.5); v) secvențierea fragmentelor nucleotidice obținute aparținând genelor SSL cât și pentru produșii de transcriere ale acestora, respectiv analiza cromatogramelor și obținerea contig-urilor (secțiunea V. 3.6).

### V. 4. Analiza filogenetică

În vederea construirii arborilor filogenetici au fost interogate bazele de date UniProtKB/Swiss-Prot și Genbank. În urma interogării acestora fiind realizate două seturi de date, astfel: un set de date conținând un număr de 68 de secvențe proteice provenite de la toate grupele de organisme utilizat pentru identificarea domeniilor conservate și reconstrucție filogenetică, respectiv un set de date conținând 24 de secvențe proteice provenite de la organisme algale utilizat de asemenea pentru reconstrucția filogenetică. Secvențele au fost aliniat folosind programul Mega 7 (Kumar și colab., 2016), algoritmul ClustalW (Larkin și colab., 2007) cu setările standard. Arborii

filogenetici au fost construiți pe baza alinierilor multiple folosind metodele Maximum Likelihood (ML) și Neighbor-Joining (NJ) având valoarea bootstrap setată la 1000 de replicare.

## **V. 5. Predicția structurilor tridimensionale**

Metodologia experimentală abordată pentru realizare *in silico* a structurilor tridimensionale ale SSL a urmărit: i) obținerea structuri tridimensionale brute folosind server-ul Phyre2 (Lawrence și colab., 2015); ii) controlului calitativ al acestora, realizat cu ajutorul programelor RAMPAGE (Lovell și colab., 2003), ProSA-web (Wiederstein și Sippl, 2007) și MolProbity (Chen și colab., 2009); iii) rafinarea structurilor s-a realizat local în GROMACS (Abraham și colab., 2015), pe baza protocolului PREFMD (Heo și Feig, 2018); iv) controlul calitativ al structurilor rafinate, descrise în etala a doua; v) identificarea regiunilor funcționale s-a realizat folosind serverul ConSurf (Ashkenazy și colab., 2016); vi) predicția situsului de legare a ligandului, s-a realizat folosind P2Rank (Jendele și colab., 2019; Krivák și Hoksza, 2018) și COACH (Yang și colab., 2013); vii) vizualizarea structurilor tridimensionale și generarea imaginilor s-a realizat folosind aplicația UCSF CHIMERA (Petersen și colab., 2004).

## CAP. VI. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### VI. 1. Microscopie optică și de fluorescență

Tulpinile algale investigate prezintă toate caracterele specifice speciei *B. braunii* rasa chimice A , conform descrierilor realizate de Largeau și colab. (1980b), Wolf și Cox (1981), Komárek și Marvan (1992), Weiss și colab. (2012), Hirose și colab. (2013), Hegedűs și colab. (2016).

Coloniile sunt laxe, de formă mai mult sau mai puțin sferică (Fig. 2-D1) sau eliptică; Dimensiunea coloniilor variază între 21  $\mu\text{m}$  (Hegedűs și colab., 2016) și 80  $\mu\text{m}$  (Fig. 2-D2). Matricea extracelulară este formată dintr-o rețea reticulată de hidrocarburi (Fig. 2-D2). Celulele sunt delimitate de o teacă mucilaginoasă în formă de cupă (Fig. 2-A2), telescopică și stratificată (Fig. 2-C1), bogată în hidrocarburi (Fig. 2-B2, Fig. 2-C2). Teaca mucilaginoasă acoperă în mod normal aproape 2/3 din celulă, cu excepția zonei apicale, care formează o calotă polizaharidică incoloră (Fig. 2 A4), lipsită de hidrocarbură (Fig. 2 B4).

Colorația dublă (Nile Red și roșu neutru) a evidențiat prezența veziculelor și a corpiilor lipidici aceste fiind strâns legate de stadiul de creștere și diviziune celulară (Fig. 2 A1-3).

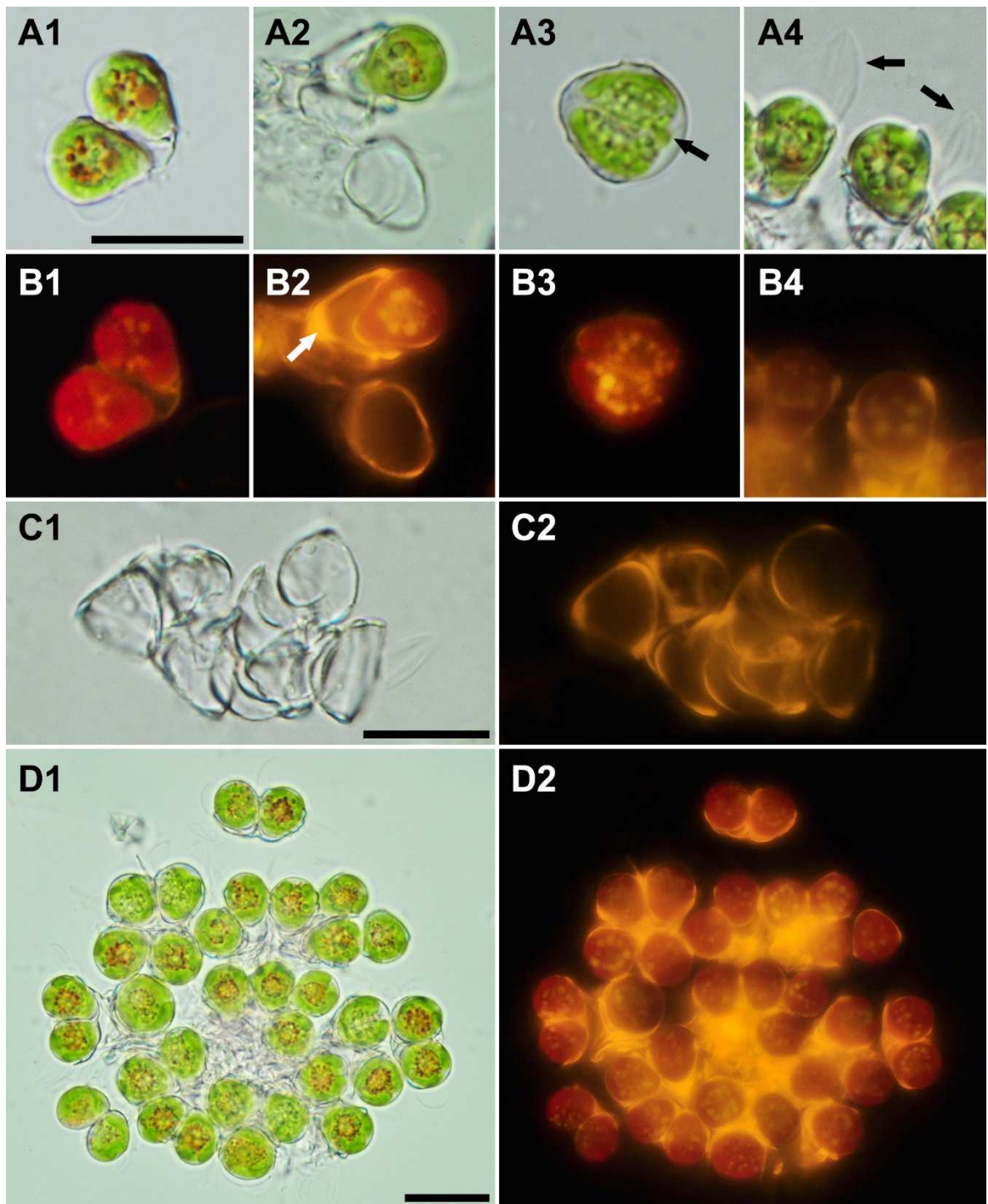
Observațiile morfologice realizate folosind tulpinile algale de *Botryococcus* AICB 413, 414, 418, 438, 442 și 870 (Fig. 3), au evidențiat aspectul eliptic (Fig. 3D) sau sferic (Fig. 3E1) al coloniilor algale.

Sub-coloniile sunt compacte, fiind legate între ele prin prelungiri mucilaginoase (Fig. 23A, C, D – săgeată neagră), bogate în hidrocarburi (Fig. 3B – săgeată albă). În anumite situații la tulpina AICB 870 au putut fi observate la periferia coloniilor procese mucilaginoase, scurte, neregulate, uneori ramificate sau chiar arborescente (Fig. 3A, C, D – săgeată albă); procesele mucilaginoase fiind bogate în hidrocarburi (Fig. 3B). În mod ocazional, au putut fi observate picături de hidrocarbură pe aceste prelungiri sau în apropierea coloniilor (Fig. 3E1).

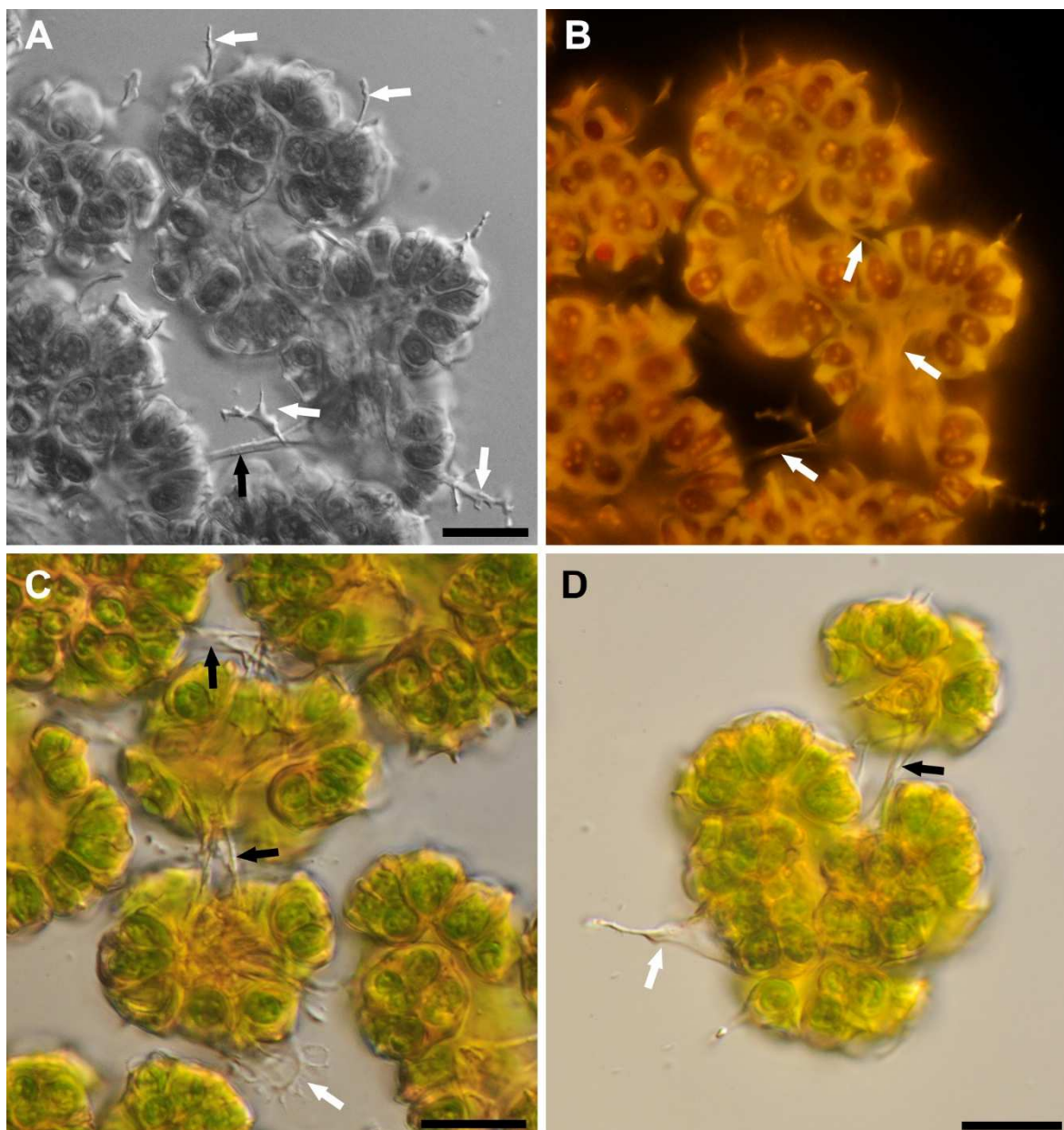
Celulele au aspect piriform, sunt mărginite de o teacă mucilaginoasă în formă de cupă, orientate mai mult sau mai puțin radiar, fiind înglobate parțial sau în totalitate (mai rar) într-o matrice mucilaginoasă bogată în hidrocarburi (Fig. 3B și E3).

Prezența corpiilor lipidici a putut fi evidențiată, prin colorație cu Nile Red (Fig. 3B, E3); aceștia sunt numeroși și prezintă dimensiune variabilă. Corprii lipidici joacă un rol important în externalizarea hidrocarburilor și depozitarea acestora în matricea colonială. Uneori sub presiunea lamelei se pot observa picături de hidrocarburi în proximitatea coloniilor (Fig.3 E1).

Observațiile de microscopie optică au arătat că tulpinile de *Botryococcus* AICB investigate prezintă toate caracterele specifice speciei *B. terribilis*, conform descrierilor realizate de Komárek și Marvan (1992), Treviño și colab. (2009), Mendes și colab. (2012), Hegedűs și colab. (2014).



**Fig. 2.** Microscopie optică și fluorescență la celule algale cu colorație dublă, Nile Red și roșu neutru, aparținând tulpinii *B. braunii* AICB 53. Celulele sunt în diferite stadii de diviziune: celulele în interfază prezintă multe vezicule roșu neutru-pozitive dispuse central (A1) și puțini corpi lipidici (B1); celulele aflate în diviziune sau care sunt pe cale de a intra în mitoză, prezintă un număr mic de vezicule (A2) și o creștere a numărului corpilor lipidici (B2); odată cu formarea septului (A3), numărul și volumul corpilor lipidici crește (B3). Celulele prezintă la polul apical calotă (A4) de natură polizaharidică (B4), fiind înconjurată de o cupă (B2, C1) impregnată în hidrocarburi (C2). Celulele formează colonii laxe (D1), înglobate în matricea extracelulară bogată în hidrocarburi (D2). Imaginile preluate în câmp vizibil prezintă efect Nomarski. Bara = 20  $\mu$ m pentru toate imaginile.



**Fig. 3.** Imagini de microscopie optică prezentând organizarea colonială la tulpina *B. terribilis* AICB 870 (A-D). Sub-colonii unite prin fâșii mucilaginoase (A, C, D - săgeată neagră) și diferite tipuri de procese mucilaginoase (A, C, D - săgeată albă) impregnate cu hidrocarburi (B).

## VI. 2. Analiza moleculară

### VI. 2.1. Izolarea ADN și ARN

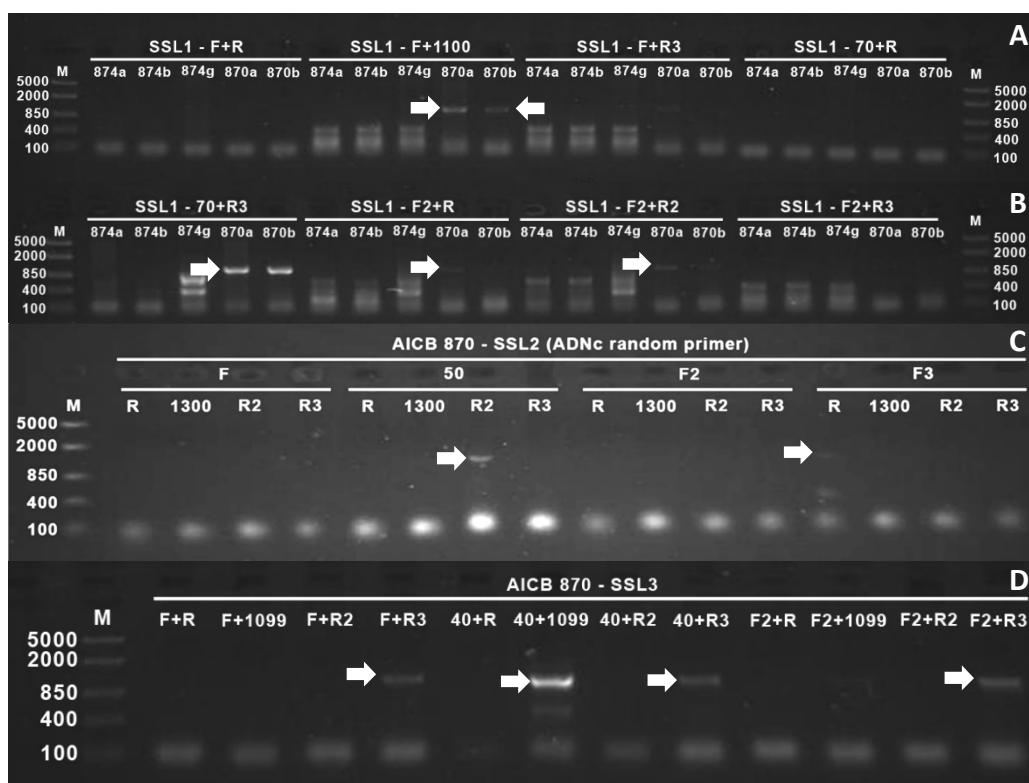
Pentru extracția acizilor nucleici s-au utilizat mai multe Kit-uri disponibile comercial precum și metoda clasică de extracție utilizând fenol-cloroform-alcool izoamilic (PCI); astfel rezultatele obținute au evidențiat următoarele: Kit-ul ZR Soil Microprobe DNA MiniPrep™ folosit pentru extracția ADN și metoda PCI pentru extracția ARN au oferit cele mai bune rezultate, oferind cantități însemnate de acizi nucleici, cu puritate ridicată. Cele mai mari cantități de ADN au fost obținute la tulpina AICB 416 ( $398,9 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , având valoarea raportului  $A_{260}/A_{280}$  de 2,16, respectiv



2,30 la  $A_{260}/A_{230}$ ), iar în privința ARN cele mai mari cantități s-au obținut la tulpina AICB 874 (3228,4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , având valoarea raportului  $A_{260}/A_{280}$  de 1,98, respectiv 1,92 la  $A_{260}/A_{230}$ ). Datele obținute fiind comparabile cu cele obținute de Kim și colab. (2012), respectiv Ghawana și colab. (2011), folosind metode similare de extracție a acizilor nucleici la diferite tulpini de *B. braunii*.

### VI. 2.2. Amplificarea PCR a produșilor de transcriere a genelor SSL-1, SSL-2 și SSL-3

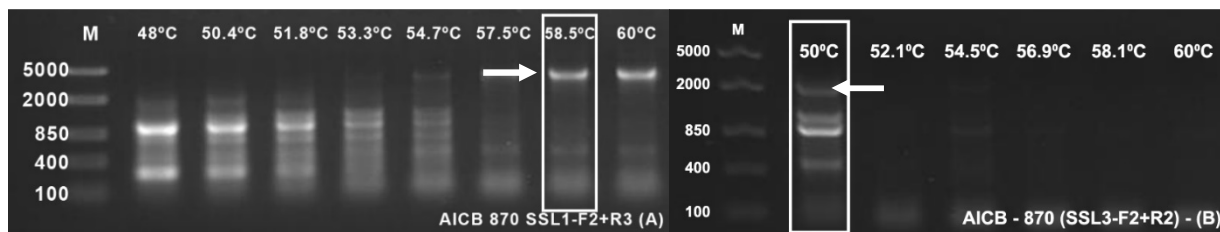
Amplificarea produșilor de transcriere aparținând celor trei sevalen sintaze-like de la rasa B (Fig. 4) a fost posibilă doar prin abordarea TD-PCR, făcându-se un screening între mai multe combinații de amorse. Migrarea produșilor de PCR în gelul de agaroză a relevat existența benzilor electroforetice pentru probele obținute prin amplificarea cu amorsele construite *de novo*.



**Fig. 4.** Electroforegrama produșilor de transcriere pentru SSL-1 (A și B), SSL-2 (C) și SSL-3 (D) prin tehnica TD-PCR. (A-B) Reacția de TD-PCR folosind matrice ADNc sintetizat cu amorse universale (870a, 874a), oligo (dT)<sub>18</sub> (870b, 874b) sau ADNg (874g). Ampliconii care corespund celor trei produși de transcriere sunt indicați cu săgeată albă.

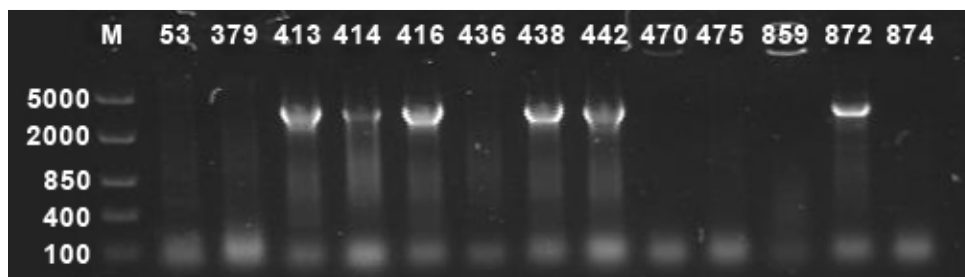
### VI. 2.3. Amplificarea PCR a genelor SSL-1, SSL-2 și SSL-3

Amplificarea genelor SSL s-a realizat utilizând PCR în gradient termic (gradientul termic fiind aplicat la etapa de aliniere a amorșelor), rezultând: un fragment de aprox. 4000 pb aparținând genei SSL-1 (Fig. 5A), și patru fragmente între 400 și 2000 pb aparținând genei SSL-3, pe baza informațiilor anterioare fiind selectat doar fragmentul cu lungimea de 2000 pb (Fig. 5B). Pentru secvențiere acestea au fost izolate din gel, clonate și apoi secvențiate. La tulpinile aparținând rasei chimice A nu au putut fi amplificate gene similare celor de la rasa B.



**Fig. 5.** Electroforegrame cu produși PCR obținuți în urma amplificării genelor SSL-1 (A) și SSL-3 (B). Probele marcate cu chenar au fost selectate pentru analizele ulterioare.

Amplificarea genei pentru SSL-1 la alte tulpini algale din rasa chimică B a fost posibilă folosind combinația de amorse SSL1-F2 și SSL1-R3. Migrarea produșilor de PCR în gelul de agaroză (Fig. 6) a evidențiat existența benzilor electroforetice la tulpinile AICB 413, 414, 416, 438, 442 și 872, lungimea fragmentului amplificat fiind similar cu cel obținut la tulpina AICB 870.



**Fig. 6.** Electroforegramă ilustrând amplificarea prin PCR a genei SSL-1 la tulpinile AICB (413, 414, 416, 438, 442 și 872).

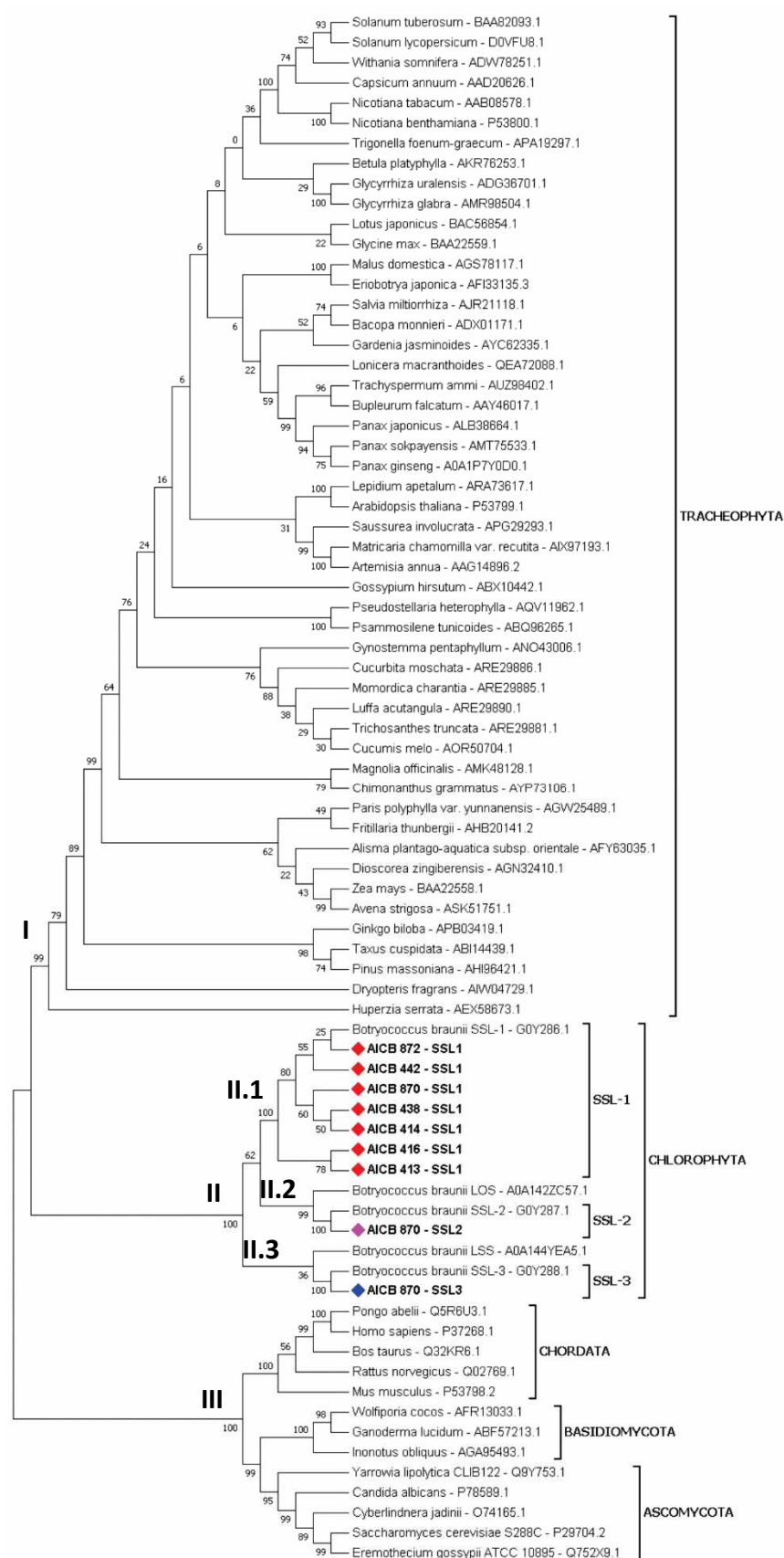
#### VI. 2.4. Secvențierea și identificarea scvalen sintazelor-like

Cromatogramele produșilor de transcriere aparținând fragmentelor secvențiate au fost adnotate manual, după care s-a realizat o căutare folosind algoritmul BLAST. Raportul BLAST a indicat un grad de identitate între 95,78% și 99,91% cu cele de la *Botryococcus braunii* Showa (HQ585058.1, HQ585059.1 și HQ585060.1) publicate de Niehaus și colab. (2011), ceea ce a confirmat faptul că fragmentele identificate și izolate de noi sunt similare cu cele din baza de date.

Secvențierea fragmentelor genice, având în vedere lungimea acestora s-a realizat folosind tehnica primer walking. În urma adnotării și asamblării genelor au rezultat următoarele contiguri: AICB 413 (3828 pb), AICB 414 (3615 pb), AICB 416 (3845 pb), AICB 438 (3614 pb), AICB 442 (3755 pb), AICB 870 (3821 pb) și AICB 872 (3811 pb).

Pe baza alinierii secvențelor genice și ale fragmentelor aparținând produșilor de transcriere s-a determinat structura genei SSL-1. Gena SSL-1 de la tulpinile AICB prezintă opt exoni, având lungimea între 101 și 246 de nucleotide și șapte introni cu lungimea cuprinsă între 345 și 675 nucleotide. Analiza cromatogramei (Fig. 7) a dezvăluit prezența regiunii variabile 864-940 la nivelul





**Fig. 8.** Arbore filogenetic, construit pe baza secvențelor scvalen sintazelor provenite de la tulpinile AICB și a celor provenite din bazele de date, construit prin algoritmul ML, modelul LG+G. Numerele de pe ramuri reprezintă valorile testului de semnificație statistică *bootstrap*, la 1000 de replicate.

### **VI. 3. Predicția structurilor tridimensionale**

#### **VI. 3.1. Analiza structuri primare (parametri fizico-chimici)**

Parametri fizico-chimic analizați au inclus: i) lungimea secvenței de aminoacizi (aa); ii) greutatea moleculară; iii) punctul izoelectric; iv) resturile cu sarcină negativă (Asp+Glu); v) resturile cu sarcină pozitivă (Arg+Lys); vi) numărul total de atomi; vii) coeficientul de extincție; viii) timpul de înjumătățire; ix) Coeficientul de instabilitate; și x) indicele GRAVY. Parametrii fizico-chimici au fost calculați cu ajutorul platformei ProtParam din ExPASy (Gasteiger și colab., 2005).

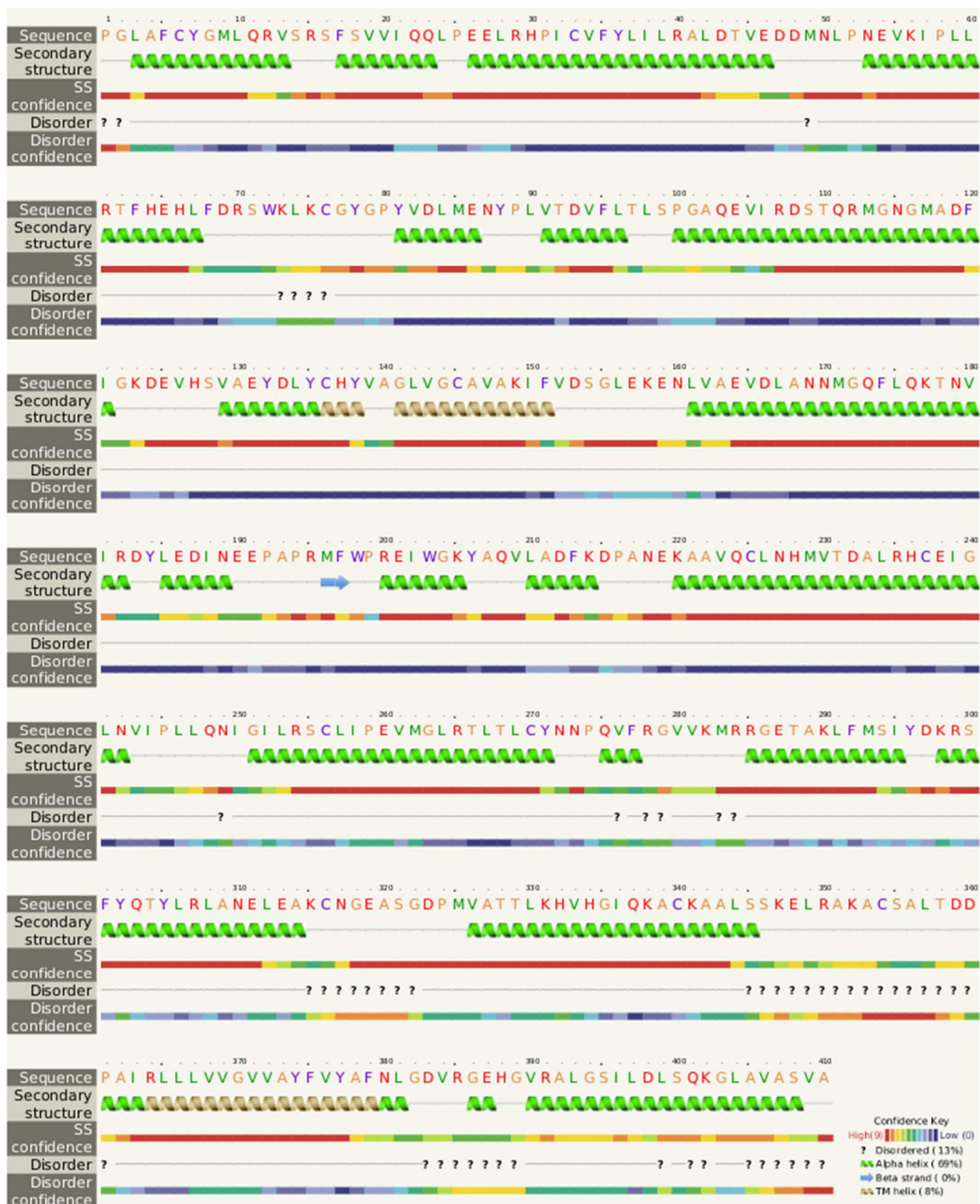
Parametrii fizico-chimici analizați au relevat faptul că secvențele de aminoacizi analizate prezintă valori similare, în cazul celor mai mulți parametri analizați, diferențele apărute fiind puse pe baza secvențelor parțiale aparținând SSL-2 și SSL-3. În privința pI s-a observat că SSL-1 prezintă o valoare a acestuia cu totul aparte și anume 7,96, observându-se de asemenea că această enzimă prezintă o sarcină electrică net pozitivă comparativ cu proteinele SSL de la *B. braunii*, care sunt neutre din punct de vedere electric.

#### **VI. 3.2. Analiza structurilor secundare**

Predicția structurilor secundare de tipul  $\alpha$ -helix și folie  $\beta$  pliată a relevat faptul că toate cele trei SSL prezintă aproximativ același număr de motive  $\alpha$ -helix și folii  $\beta$  pliate, diferența majoră fiind la SSL-2 care în cazul tulpinii AICB 870 prezintă doar 2 domenii TM, în schimb la tulpina Showa sunt prezente 3 domenii TM. Cele două domenii transmembranare sunt reprezentate de secvențele de aminoacizi CHYVAGLVGCAVAKIF din pozițiile 136-151 și RLLLVVGVVAYFVYAFN din pozițiile 364-379, capetele amino- și carboxi-terminal regăsindu-se pe aceeași parte a membranei, datorită utilizării unei secvențe proteice parțiale. La SSL-2 de la *B. braunii* Showa, domeniile TM sunt reprezentate de secvențele 169-184 (CHYVAGLVGSAV), 397-412 (RLLLLVGVVAYFAYAF) și 435-451 (KGLAVASVALLLVLLA). Modelul raportului generat de Phyre2 în privința predicției structurilor secundare la SSL-2 aparținând speciei *B. terrestris* AICB 870 este redat în Fig. 9.

#### **VI. 3.3. Predicția structurii tridimensionale**

Modelele tridimensionale ale scvalen sintazelor-like, atât de la *B. terrestris* tulpina AICB 870, cât și cele de la *B. braunii* Showa (disponibile în GenBank) au fost obținute utilizând serverul Phyre2, predicția structurilor realizându-se pe baza omologiei cu proteine similare a căror structură a fost obținută experimental prin tehnici de RMN sau raze X. Proteinele model utilizate pentru generarea structurilor au fost: 3wcc\_C (scvalen sintaza de la *Trypanosoma cruzi*) și 1ezf\_A (scvalen sintaza umană); capetele terminale ale proteinelor, fiind modelate *ab initio* datorită lipsei omologiei structurale.



**Fig. 9.** Structurile secundare ( $\alpha$ -helix și folie  $\beta$  pliată), prezise cu ajutorul platformei Phyre2 la scvalen sintaza-like 2 aparținând speciei *B. terribilis* AICB 870. Conform structurilor secundare prezise, SSL-2 prezintă: 13% zone dezordonate, 69%  $\alpha$ -helix, o singură folie  $\beta$  pliată și 8%  $\alpha$ -helix TM.

Prin combinarea modelelor mai sus menționate s-a obținut pentru SSL-1 (*B. terribilis* AICB 870) un număr de 339 de aminoacizi modelați cu confidență de peste 90%, aceștia reprezentând 85% din structura proteinei, restul structurii, reprezentată de capetele terminale ale proteinei, a fost modelată *ab initio* datorită lipsei omologiei structurale.

În cazul SSL-2 (*B. terribilis* AICB 870) chiar dacă identitatea de secvență este mai mare, s-a obținut o valoare procentuală mai mică a resturilor modelate cu confidență mare. Acest domeniu, format din 334 de aminoacizi este localizat în partea centrală a proteinei și reprezintă 83% din structura sa. Resturile modelate *ab initio* nu au prezentat confidență mai mare de 90% și au fost regăsite în porțiunile distale ale proteinei, formând capetele acesteia.

Modelul structural al SSL-3 (*B. terribilis* AICB 870), prezintă cel mai mare scor de confidență dintre cele trei proteine analizate la tulpina AICB 870. Astfel, în cazul acestei proteine s-a identificat un segment structural, format din 319 aminoacizi care au fost modelați cu confidență >90%. Acest domeniu, care reprezintă 91% din structura secvenței proteice, formează partea centrală a proteinei. La fel ca și în cazul celorlalte proteine modelate, cele două capete ale proteinei nu au putut fi prezise pe baza structurilor model, fiind modelate *ab initio*.

Pentru predicția structurilor tridimensionale ale scvalen sintazelor-like de la *B. braunii* (Showa) a fost utilizată o metodologie similară.

Structurile tridimensionale astfel obținute au fost analizate din punct de vedere calitativ prin trei metode distincte: ProSA-web, diagrame Ramachandran (RAMPAGE) și evaluarea globală a calității modelului structural (MolProbity).

Dacă în cazul analizei cu programul ProSA-web rezultatele au fost promițătoare (Fig. 10), analiza graficelor Ramachandran a dezvăluit că nu toate modelele obținute prezintă o calitate structurală mare. Astfel, SSL-1 AICB 870 (Fig. 11 A<sub>1</sub>), s-a observat că doar un procent de 86,5 % din aminoacizi pot fi clasificați în zone favorabile, având 15 aminoacizi în zone nepermise. Un rezultat asemănător a fost obținut și pentru modelul structural de la SSL-2 AICB 870 (Fig. 11 B<sub>1</sub>), acesta având în zone favorabile 86,3% din aminoacizi în timp ce 20 de resturi sunt în zone nepermise. Din punctul de vedere al orientărilor unghiurilor diedrice, modelul obținut pentru proteina SSL-3 AICB 870 (Fig. 11 C<sub>1</sub>).

Datorită faptului că aceste două tipuri de analize calitative nu au fost foarte concludente s-a efectuat un test suplimentar, mai exhaustiv, al structurilor prezise prin utilizarea unui program de validare pe baza structurilor obținute experimental. Astfel, toate modelele prezise au fost supuse procesului de validare cu programul MolProbity ce presupune adăugarea atomilor de hidrogen în structura aminoacizilor, urmată de estimarea punctelor de contact al atomilor din structura proteinei. În evaluarea calității structurii s-a ținut cont doar de scorul global al proteinelor, nu și de evaluările locale ale atomilor de carbon din pozițiile  $\alpha$  și  $\beta$ . În urma acestei analize, s-a confirmat că dintre cele

3 proteine analizate, modelul tridimensional obținut pentru SSL-3 AICB 870 este cel mai apropiat de o structură nativă având un scor global de 3,05 (MolProbity score) urmat de SSL-1 AICB 870 cu 3,84 și SSL-2 AICB 870 cu 3,93.

Pe baza rezultatelor obținute anterior structurilor proteice prezise au fost supuse procesului de rafinare prin aplicarea protocolului utilizat de programul PREFMD de rafinare a structurii proteinelor prin simulare de dinamică moleculară. Protocolul de lucru a presupus parcurgerea secvențială a etapelor enumerate în secțiunea VI. 3.3.2.

În urma procesului de rafinare, s-a reușit îmbunătățirea structurii globale a modelelor proteice prezise. Astfel pentru SSL-1 de la *B. terribilis* AICB 870 procentul aminoacizilor situați în zona favorabilă a crescut cu aproape 10% de la 86,5% la 96,3% (Fig. 11 A<sub>2</sub>), concomitent cu reducerea numărului de resturi aflate în zona nepermisă (Tyr119, Asn195, Arg234, Lys 356 și Gln357). Acest rezultat este confirmat și de scorul global generat de MolProbity, acesta fiind redus de la 3,84 la 1,17. Analiza ProSA-web (Fig. 10 A<sub>2</sub>) a arătat o modificare minoră a scorului Z. O îmbunătățire majoră a calității structurale s-a observat și pentru SSL-2 de la aceeași tulpină, în cazul căreia raportul procentual al resturilor aflate în zona favorabilă crește la 94,4%, în timp ce numărul resturilor aflate în zona nepermisă se reduce la 4 și anume: Pro225, Arg228, Lys315 și Asp330 (Fig. 11 B<sub>2</sub>). Scorul global al proteinei pe baza analizei MolProbity s-a îmbunătățit de 3,93 la 1,26. Tendința de ameliorare structurală în urma procedurii de rafinare, se poate observa și în cazul SSL-3. procentul de aminoacizi localizați în zona favorabilă crescând cu doar 2%, până la 97,7%, iar resturile de aminoacizi situați în zona nepermisă rămâne nemodificat (Fig. 11 C<sub>2</sub>). Scorurile parametrului-Z obținute din ProSA-web, în cazul SSL-2 (AICB 870) a prezentat o ușoară îmbunătățire de la -7,39 la -6,47 (Fig. 10 B<sub>2</sub>), iar în cazul SSL-3 (AICB 870), acest parametru rămâne aproape neschimbat (Fig. 10 C<sub>2</sub>).

Analiza comparative a modelelor proteice brute și cele rafinate, a evidențiat că partea centrală a proteinelor este aproape identică între modelele prezise inițial și cele rafinate,  $\alpha$  helixurile ce formează miezul proteinei sunt stabile, existând un grad mare de simetrie și suprapunere între modele (Fig. 12). Modificări minore de conformație pot fi observate la nivelul resturilor ce formează buclele, acest lucru fiind unul așteptat datorită flexibilității structurale relativ mari ce caracterizează aceste tipuri de structuri secundare.

În cazul SSL-1 (AICB 870) s-a observat (Fig. 12 A<sub>1</sub>) prezența a unui segment dezordonat format din 14 aminoacizi care în timpul rafinării se răsucește la nivelul Lys40 și Asp41 cu aproximativ 90° (Fig. 12 A<sub>2</sub>). Aceeași tendință poate fi observată și la capătul C terminal unde răsucirea lanțului are loc la nivelul Lys385.



La nivelul structurii SSL-2 (AICB 870) se observă apariția unei ancore ce include unul din domeniile transmembranare (Fig. 12 B1 și B2). Această diferență conformațională pleacă de la torsiunea Lys344 față de Ala343 cu aproximativ 30°.

În urmă rafinării structurii SSL-3 (AICB 870) (Fig. 12 C1) se observă două modificări conformaționale minore. Acestea sunt reprezentate de apariția a două răsuciri în singura regiune cu dezordine intrinsecă. Astfel prima răsucire poate fi identificată între Arg28 și Lys29 iar a doua la nivelul Glu30 și se realizează față de Asp32.

Modelul tridimensional al SSL-3 (Fig. 12 C1) prezintă în urma rafinării (Fig. 12 C2) cea mai mică modificare conformațională dintre structurile prezise ale scvalen sintazelor-like de la AICB 870, fapt ce se datorează obținerii unui model structural brut de calitate ridicată. Unul din factorii care au stat la baza obținerii unui astfel de model a fost prezența redusă a zonelor de dezordine structurală comparativ cu SSL-1 și SSL-2. Aceste regiuni, datorită instabilității și flexibilității crescute, reprezintă unul din impedimentele majore în obținerea structurilor 3D atât prin metode computaționale, cât și experimentale.

În urma analizei efectuate prin suprapunerea perechilor de scvalen sintaze-like (SSL-1 Showa - SSL-1 AICB 870; SSL-2 Showa - SSL-2 AICB 870; SSL-3 Showa - SSL-3 AICB 870) au fost vizibile diferențe la nivelul celor două capete polipeptidice. Prin analiza locală a acestor segmente s-a observat că de fapt există omologie structurală mare fiind vorba doar de o modificare simetrică (în oglindă) a acestora. Acest lucru este caracteristic zonelor ce prezintă variabilitate structurală intrinsecă datorată regiunilor cu grad mare de dezordine. În acest rezumat este prezentată doar comparația prin suprapunerea structurilor tridimensionale de la SSL-1 aparținând tulpinilor Showa și AICB 870.

### **Scvalen sintaza-like 1 de la tulpina Showa și AICB 870**

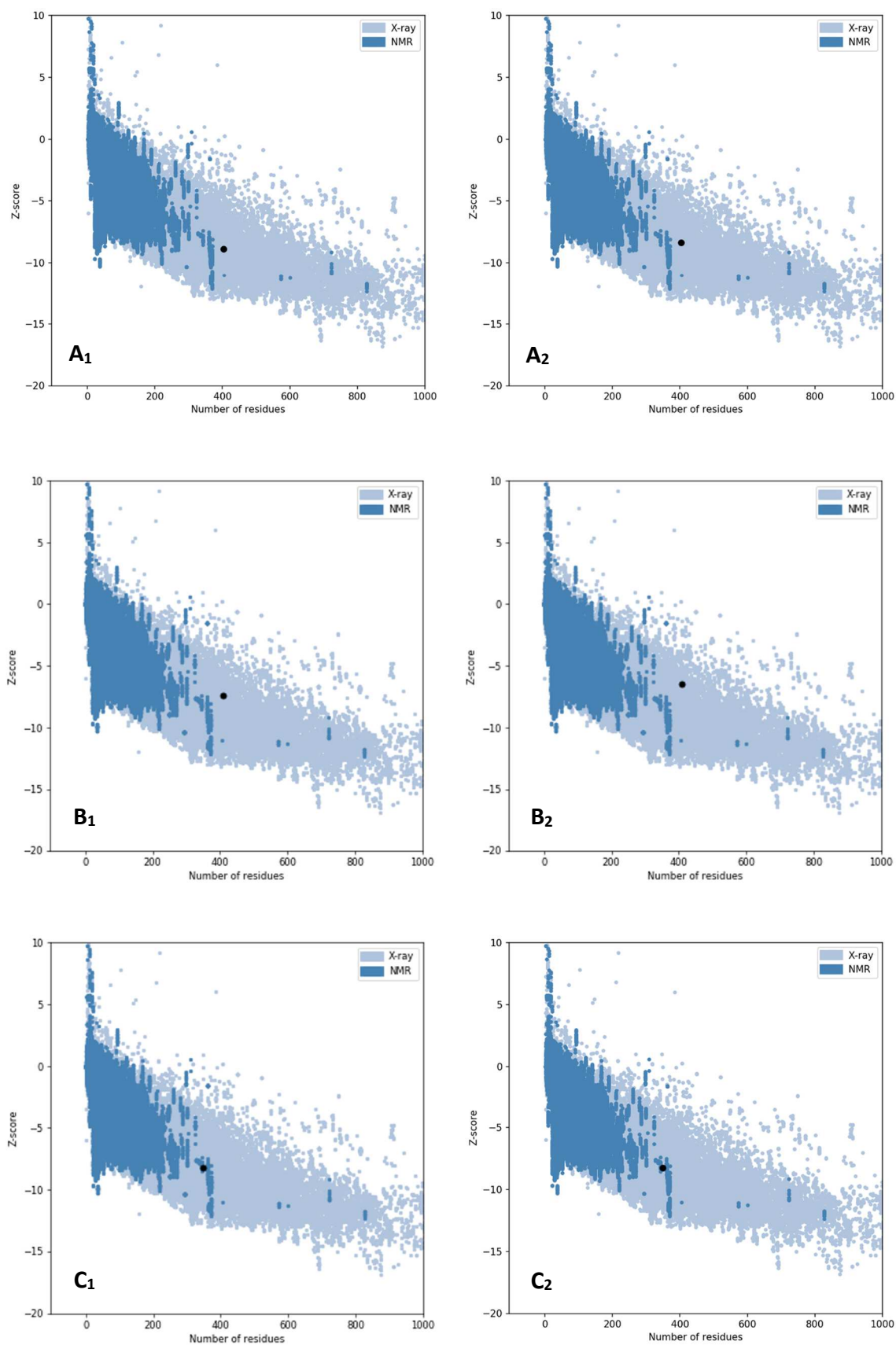
Pe baza alinierii secvențelor de aminoacizi s-a constatat că la nivelul proteinei SSL-1 există 5 nepotriviri la resturile din pozițiile 24, 124, 256, 259, 263. Dintre acestea primele două nu influențează nici structura secundară nici pe cea tridimensională (Fig. 13), acestea fiind situate într-un motiv  $\alpha$ -helix bine structurat. Singura diferență vizibilă se regăsește la nivelul restului 256 care participă la formarea unei bucle. Aici, un rest de Glu256 (Showa) este înlocuit de Lys256 (AICB 870), fapt ce determină formarea unei curburi mai accentuate a buclei. Deși nu există diferențe structurale semnificative între cele două SSL-1, acestea prezintă o diferență relativ mare a punctului izoelectric, care în cazul SSL-1 (Showa) este de 7,12 pe când la SSL-1 (AICB 870) valoarea pI este de 7,96. Această creștere semnificativă poate fi explicată atât pe baza substituției de la poziția 256, unde Asp, aminoacid cu sarcină negativă, este înlocuit de un rest de Lys cu sarcină puternic pozitivă Lys, dar și de prezența Arg263.

Predicția situsurilor catalitice și a liganzilor s-a realizat utilizând P2Rank (Jendele și colab., 2019; Krivák și Hoksza, 2018), iar verificarea gradului de conservare al acestora utilizând ConSurf (Ashkenazy și colab., 2016).

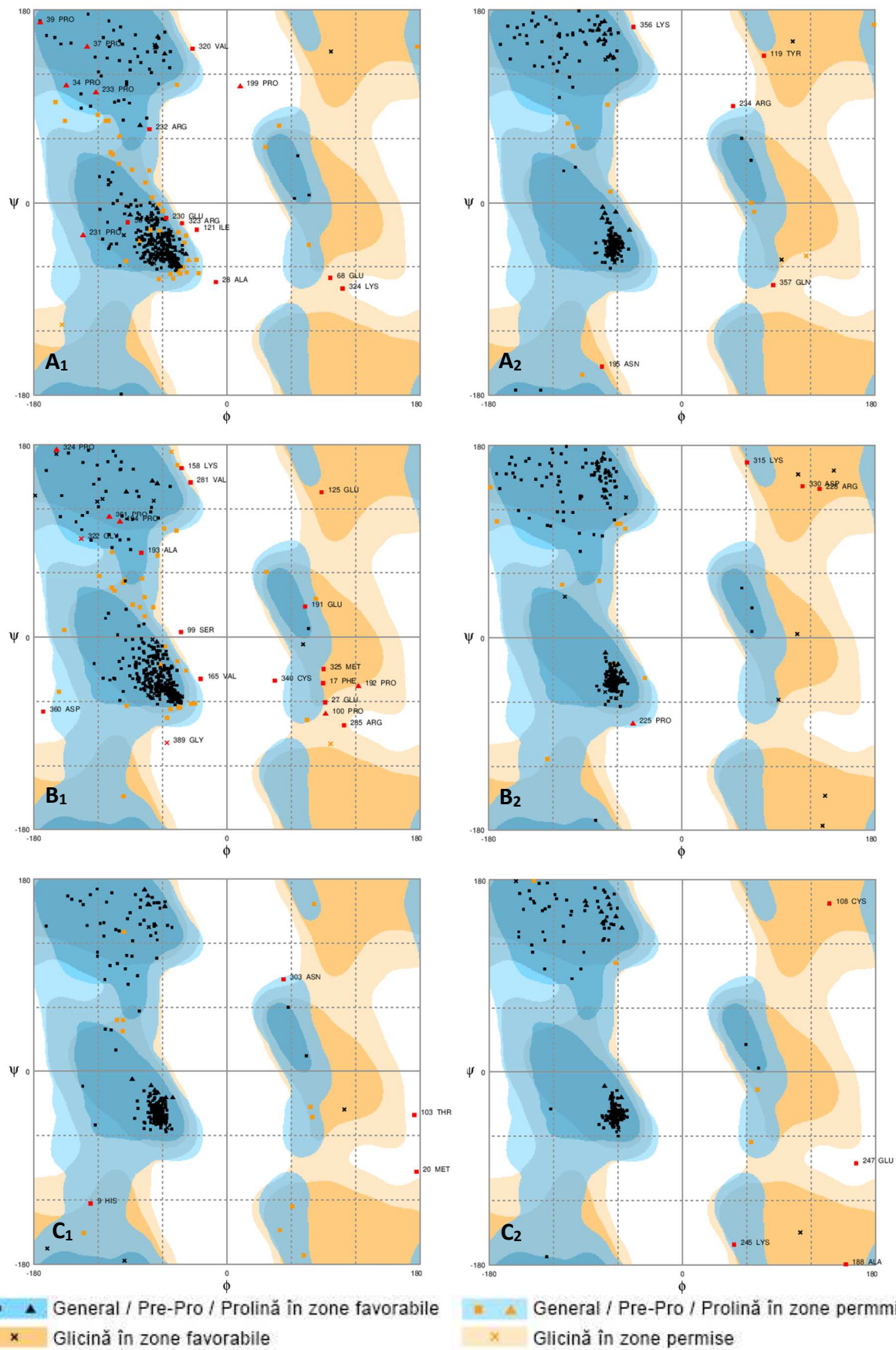
La toate structurile analizate au fost identificați câte doi potențiali liganzi și anume: FPS – farnezil pirofosfat și PS7 {(1R,2R,3R)-2-[(3E)-4,8-DIMETILNONA-3,7-DIEN-1-YL]-2-METIL-3-[(1E,5E)-2,6,10-TRIMETILUNDECA-1,5,9-TRIEN-1-YL]CICLOPROPIL}METIL TRIHIDROGEN DIFOSFAT, de asemenea au putut fi identificați și ionii de  $Mg^{2+}$  implicați în stabilizarea liganzilor la situsul catalitic.

Predicția buzunarelor la SSL-1 de la tulpina AICB 870 a dezvăluit existența a patru buzunare potențiale însă doar unul singur a fost luat în calcul datorită scorului de fidelitate foarte ridicat (Fig. 13 A1). SSL-2 de la *B. terribilis* AICB 870 a prezentat 9 astfel de potențiale buzunare dintre care doar primul a prezentat un scor >50, restul fiind eliminate (Fig. 13 B1). La SSL-3 de la *B. terribilis* AICB 870, pe baza scorurilor de fidelitate, au putut fi identificate două buzunare, reprezentate prin culori distincte (Fig. 13 C1). În mod similar, predicția buzunarelor la *B. braunii* Showa a relevat existența aceleiași număr de buzunare prezise în cazul tuturor SSL analizate.

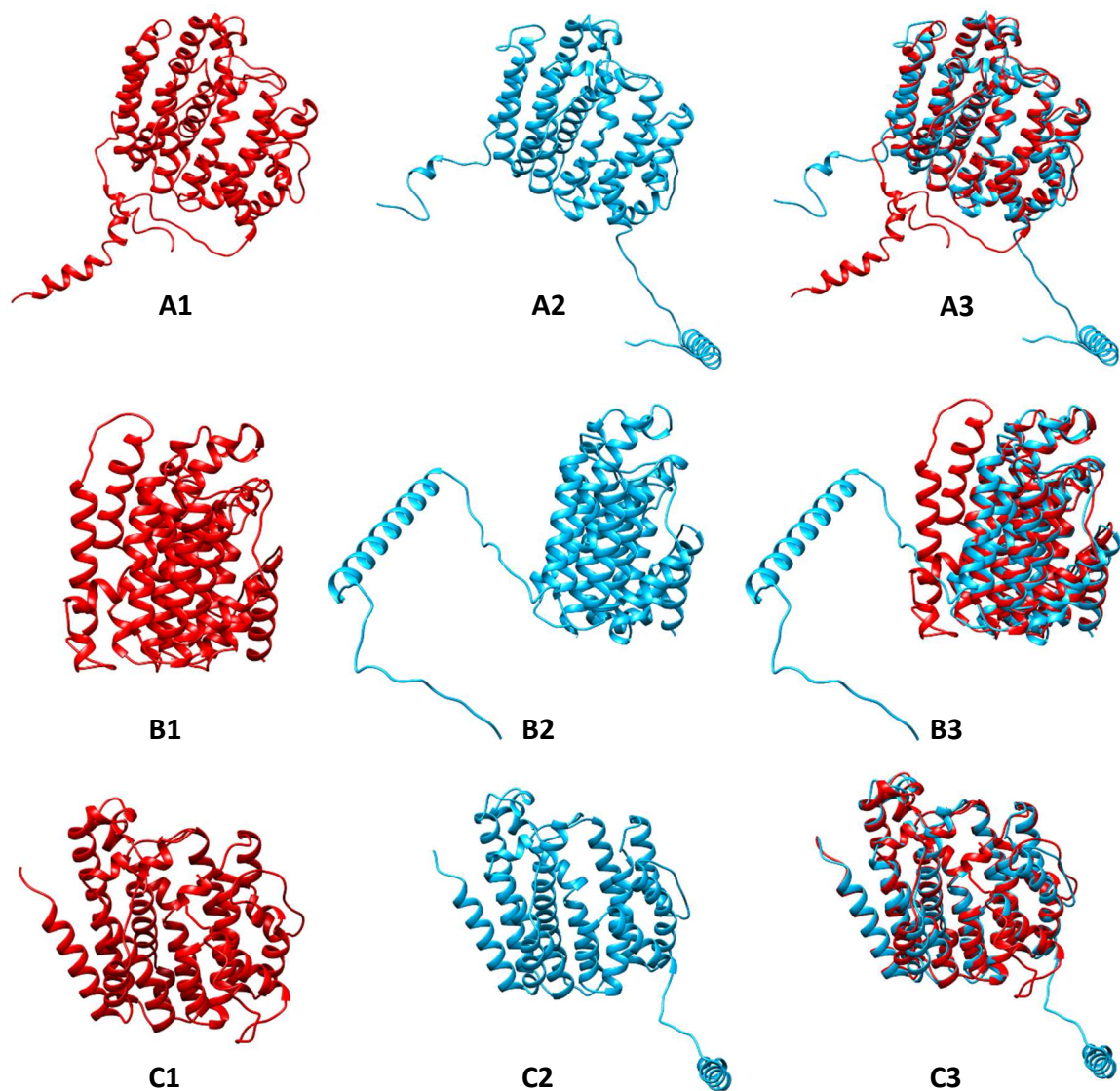
După cum bine se poate observa în figurile menționate anterior, buzunarele identificate se suprapun parțial peste cele 4 domenii conservate analizate în secțiunea VI. 2.5; mai mult aminoacizii implicați în formarea buzunarelor prezintă un grad ridicat de conservare. Pe baza acestor observații putem afirma că la nivelul acestor buzunare are loc condensarea cap-cap a moleculelor de FPP pentru a forma PSPP (SSL-1), ulterior PSPP fiind convertit la sevalenă de SSL-2 sau botriococcene (SSL-3).



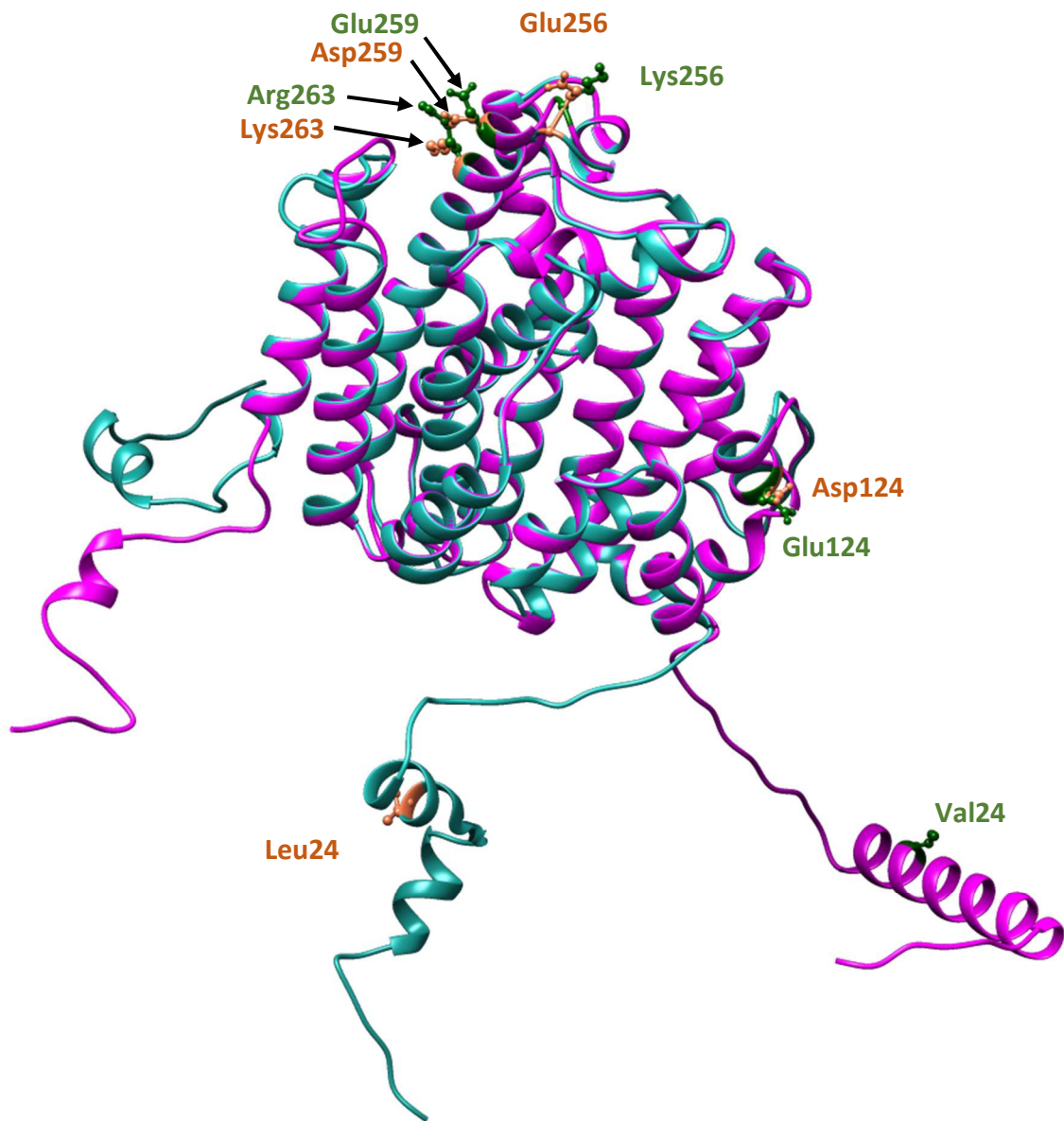
**Fig. 10.** Reprezentarea grafică a scorului Z obținut cu ajutorul ProSA-web la SSL-1 (A), SSL-2 (B) și SSL-3 (C) de la *B. terribilis* AICB 870, înainte (indice 1) și după (indice 2) rafinarea structurilor.



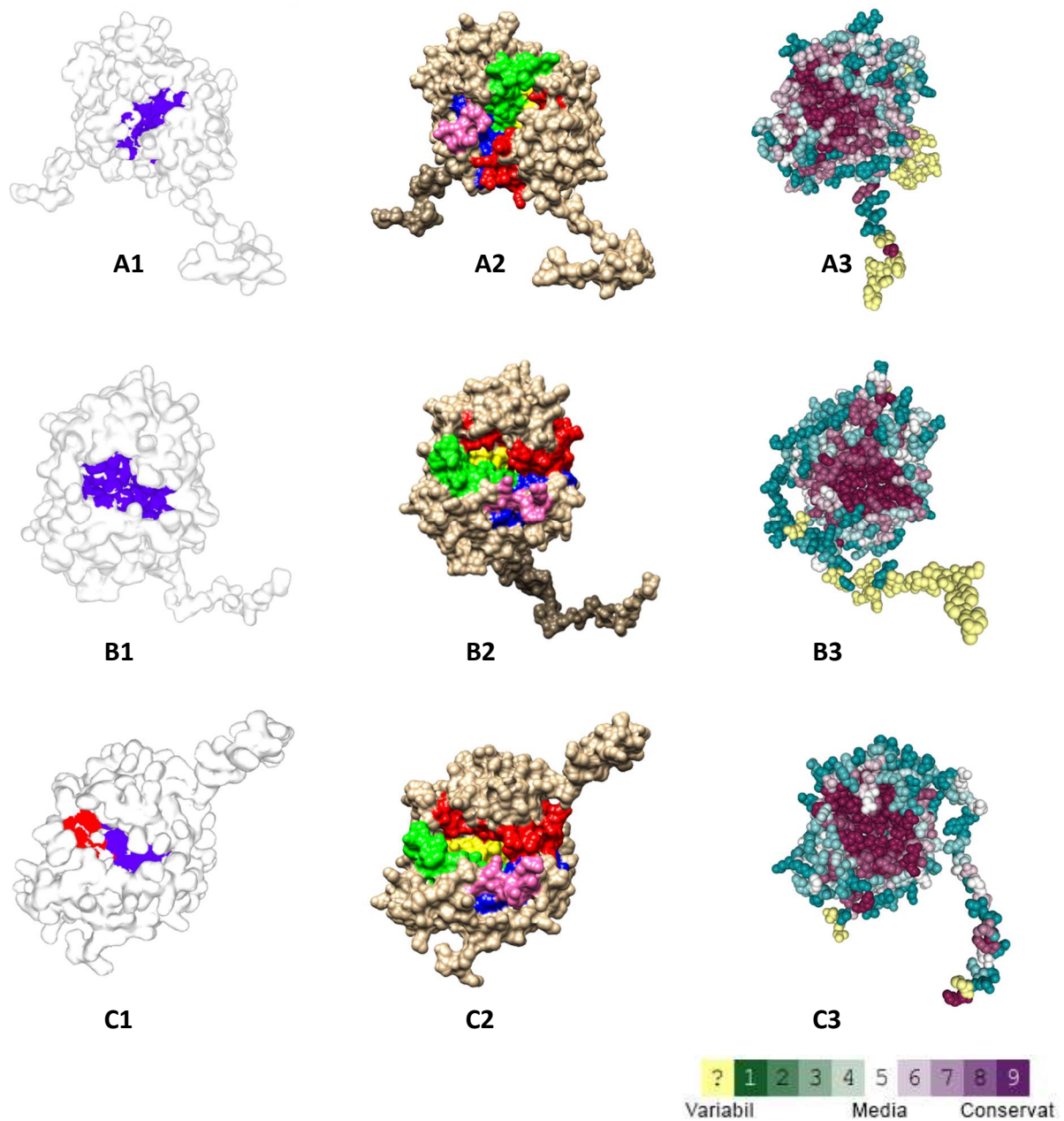
**Fig. 11.** Diagrama Ramachandran obținută cu ajutorul RAMPAGE la SSL-1 (A), SSL-2 (B) și SSL-3 (C) de la *B. subtilis* AICB 870, înainte (indice 1) și după (indice 2) rafinarea structurilor. Resturile de aminoacizi colorați cu roșu sunt situate în zone nepermise.



**Fig. 12.** Structurile tridimensionale ale SSL-1 (A), SSL-2 (B) și SSL-3 (C) prezise, de la *B. terribilis* AICB 870. 1 (roșu) – structura inițială brută, înainte de rafinare, 2 (albastru) – structură obținută după etapa de rafinarea; 3 – suprapunere reprezentând structura inițială și finală.



**Fig. 13.** Imagine ilustrând suprapunerile structurilor tridimensionale obținute în urma procesului de rafinare ale structurilor proteice de SSL-1 de la *B. terribilis* AICB 870 (magenta) și *B. braunii* Showa (albastru). Pe structurile obținute sunt evidențiate resturile de *aa* diferite identificate pe baza alinierii. Resturile de *aa* evidențiate cu verde (AICB 870) și portocaliu (Showa).



**Fig. 14.** (1) - Reprezentarea grafică a buzunarelor prezise cu P2Rank; (2) Reprezentarea domeniilor conservate conform descrierii lui Lee și Poulter (2008), Domeniu I - roșu, Domeniul II - galben, Domeniul III - verde, Domeniu IV - albastru, Domeniu de legare NADPH – roz; (3) Gradul de conservare a resturilor de *aa* conform ConSurf; la SSL-1 (A), SSL-2 (B) și SSL-3 (C) de la *B. subtilis* AICB 870.

Scvalen sintazele-like sunt enzimele implicate în calea de biosinteză a hidrocarburilor fiind descrise și caracterizate pentru prima dată la microalga verde *Botryococcus braunii* (Niehaus și colab., 2011). Aceștia au descris trei enzime denumite generic SSL-1 (EC: 2.5.1.103), SSL-2 (EC: 1.3.1.96) și SSL-3 (EC: 1.3.1.97), fiecare din acestea fiind responsabilă pentru catalizarea unei anumite etape de la finalul căii de sinteză a hidrocarburilor. Sinteza hidrocarburilor la *B. braunii*, posibil și la *B. terribilis*, pornește de la condensarea cap-cap a două molecule de FPP pentru a forma un intermediar stabil, PSPP, această etapă fiind catalizată de SSL-1; ulterior SSL-2 printr-o reacție NADPH dependentă, se convertește PSPP la scvalenă. În mod similar, biosinteza botriococenelor are loc tot cu ajutorul intermediarului PSPP care este convertit de către SSL-3 la botriococene (Niehaus și colab., 2011).

Analiza comparativă a topologiei structurilor tridimensionale înainte și după procesul de rafinare a dezvăluit câteva situații speciale: 1) capătul amino-terminal al SSL-1 (AICB 870) este un segment dezordonat format din 14 aminoacizi care în timpul rafinării se răsucește la nivelul Lys40 și Asp41 cu 90°, tendință care se păstrează și la capătul carboxi-terminal, la nivelul restului Lys385; și 2) la SSL-2 (AICB 870) a fost evidențiată prezența unei ancore ce cuprinde unul din domeniile transmembranare, diferența conformațională placând de la torsiunea Lys344 față de Ala343.

Structurile tridimensionale obținute în prezentul studiu au fost analizate și din perspectiva identificării potențialilor liganzi, fiind identificați doi astfel de liganzi și anume: FPS și PS7. Elumalai și colab. (2018) au observat în cazul SQS de la *B. braunii* BB1 un al treilea ligand reprezentat de 8PH.

Scvalen sintazele de la plante au fost supraexprimate în plante medicinale precum *Panax ginseng* (Lee și colab, 2004) sau *Eleutherococcus senticosus* (Seo și colab., 2005) cu scopul de a stimula producția de fitosteroli sau triterpene. Prin co-exprimarea SSL-1 și SSL-3 provenite de la *B. braunii* Showa, în drojdi s-a reușit obținerea botriococenelor la o rată de 100 mg L<sup>-1</sup> (Niehaus și colab., 2011).

Comparând datele obținute la cele disponibile în literatura de specialitate am constatat faptul că numărul lucrărilor care abordează predicția și analiza structurilor tridimensionale ale enzimelor scvalen sintaze-like de la *B. braunii* sau alte specii din genul *Botryococcus* este foarte redus. De la publicarea acestora în anul 2011 de Niehaus și colab. (2011) până în prezent, s-au remarcat două studii care abordau structurile tridimensionale ale SSL la *B. braunii* Showa, și anume lucrarea lui Bell și colab. (2014) și Elumalai și colab. (2018). Bell și colab. (2014) folosesc modelările structurilor tridimensionale și mutageneza direcționată, pentru a înțelege mai bine modul de rearanjare a PSPP la nivelul legăturilor 1'-1 și 1'-3, de asemenea încearcă identificarea resturilor de aminoacizi și/sau a domeniilor responsabile pentru această etapă critică în sinteza scvalenelor și botriococenelor.



## CONCLUZII GENERALE

Prin studiul tulpinilor algale de *B. terribilis* rasa chimică B, depozitate în Colecția de Alge și Cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca, această lucrare a avut ca obiective majore identificarea produșilor de transcriere, respectiv a genelor implicate în activitatea scvalen sintazică folosind o abordare moleculară și predicția structurilor tridimensionale ale acestora pe baza analizelor *in silico*.

- Investigațiile moleculare realizate pe materialul genetic provenit de la tulpinile AICB au avut drept rezultat identificarea unor combinații de amorse construite *de novo* și stabilirea unei metodologii de amplificare a produșilor de transcriere și ale genelor SSL care să constituie un punct de plecare solid pentru investigațiile ulterioare.
- Identificarea genelor responsabile pentru activitatea scvalen sintazică s-a dovedit a fi mult mai dificilă datorită în principal, lungimii acestora (între 3800-6000 pb) și secundar, prezenței regiunilor intronice, cu variabilitate foarte ridicată; cu toate acestea a putut fi identificată și analizată SSL-1 la șapte tulpini aparținând speciei *B. terribilis*.
- Analizele realizate *in silico* au avut două obiective principale: stabilirea unei metodologii experimentale pentru predicția structurilor tridimensionale ale SSL, analiza calitativă a acestora și rafinarea structurilor prezise pentru a obține modele tridimensionale cât mai apropiate de cele native; și analiza comparativă a tuturor structurilor obținute cuplată cu predicția celor mai conservate situsuri catalitice implicate în ultimele etape ale biosintezei scvalenelor și botriococenenelor.
- Metodologia descrisă pentru procesul de obținere a structurilor 3D – analiză – rafinare a structurilor obținute s-a dovedit a fi foarte eficientă, reușind să îmbunătățească semnificativ calitatea structurilor prezise în special în cazul SSL-1 și SSL-2 identificate și analizate la tulpina de *B. terribilis* AICB 870.
- Analiza comparativă a modelelor rafinate a reliefat modificări minore la nivelul nucleului proteic responsabil pentru conversia FPP la PSPP (SSL-1) și a PSPP la scvalenă (SSL-2) sau botriococene (SSL-3), modificările substanțiale fiind obținute la nivelul bucelor și capetelor amino- și carboxi-terminal, însă acestea nu prezintă o importanță deosebită deoarece nu sunt implicate în mod activ în activitatea catalitică a enzimelor. Studiarea regiunilor funcționale a demonstrat existența buzunarelor, acestea prezentând un grad ridicat de conservare, doi potențiali liganzi (FPS și PS7) respectiv prezența motivelor pentru legarea ionilor divalenți de  $Mg^{2+}$  a căror rol principal este stabilizarea grupărilor difosfat de la nivelul precursorului utilizat pentru producerea hidrocarburilor.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., et al., 2015, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, **1-2**, pp. 19-25.
- Achitouv, E., Metzger, P., Rager, M.N., Largeau, C., 2004, C<sub>31</sub> - C<sub>34</sub> methylated squalenes from a bolivian strain of *Botryococcus braunii*, *Phytochem.*, **65**, pp. 3159-3165.
- Amit, M., Donyo, M., Hollander, D., Goren, A., Kim, E., et al., 2012, Differential GC content between exons and introns establishes distinct strategies of splice-site recognition, *Cell Rep.*, **1**, pp. 543-556.
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., et al., 2016, ConSurf2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules, *Nucleic Acids Res.*, **44**, pp. W344-W350.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., 2002, *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **22**, pp. 245-279.
- Bell, S. A., Niehaus, T. D., Nybo, E., Chapell, J., 2014, Structure-function mapping of key determinants for hydrocarbon biosynthesis by squalene and squalene synthase-like enzymes from the green alga *Botryococcus braunii* race B, *Biochem.*, **53**, 7570-7581.
- Bibi, R., Ahmad, Z., Imran, M., Hussain, S., Ditta, A., et al., 2017, Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **71**, pp. 976-985.
- Blagg, B. S. J., Jarstfer, M. B., Rogers, D. H., Poulter, C. D., 2002, Recombinant squalene synthase. A mechanism for the rearrangement of presqualene diphosphate to squalene, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, pp. 8846-8853.
- Brennan, L., Owende, P., 2010, Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **14**, pp. 557-577.
- British Petroleum, 2019, BP Statistical Review of World Energy, 68<sup>th</sup> Edition.
- Brown, A. C., Knights, B. A., Conway, E., 1969, Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in green alga *Botryococcus braunii*, *Phytochem.*, **8**, 543-547.
- Cantrell, K. B., Ducey, T., Ro, K. S., Hunt, P. G., 2008, Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities, *Biores. Technol.*, **99**, pp. 7941-7953.
- Chen, V. B., Arendall III, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., et al., 2009, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Cryst. D*, **66**, pp. 12-21.

- Chisti, Y., 2007, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.*, **25**, pp. 294-306.
- Choi, J. S., Kim, J. S., Joe, C. O., Kim S., Ha, K. S., et al., 1999, Improved cycle sequencing of GC-rich DNA template, *Exp. Mol. Med.*, **31**, pp. 20-24.
- Consoletti, S. F., Prinsen, P., 2019, Carbon dioxide biosequestration and wastewater treatment using microalgae, in: Environmental Sustainability and Education for Waste Management. Education for Sustainability (Eds., So, W., Chow, C., Lee, J.), Springer, Singapore, pp. 241-270.
- da Rosa, G. M., de Moris, M. G., Vieira Costa, J. A., 2018, Green alga cultivation with monoethanolamine: Evaluation of CO<sub>2</sub> fixation and macromolecule production, *Biores. Technol.*, **261**, pp. 206-212.
- Dale, M., Krumdieck, S., Bodger, P., 2011, Net energy yield from the production of conventional oil, *Energy Policy*, **39**, 7095-7102.
- Demirbas, A., 2016, Introduction, in: Waste Energy for Life Cycle Assessment, (Ed., Demirbas, A.), Springer Internat. Publ., Switzerland, pp. 1-30.
- Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., Posewitz, M. C., 2008, Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, pp. 235-240.
- Elumalai, S., Sangeetha, T., Rajesh Kanna, G., 2018, *In silico* modeling and characterization of squalene synthase and botryococcene synthase enzymes from a green photosynthetic microalga *Botryococcus braunii*, *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, **9**, 3.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., et al., 2005, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in: Proteomics Protocols Handbook, (Eds. Walker, J. M.), Humana Press, pp. 571-607.
- Ghafari, M., Rashidi, B., Haznedaroglu, B. Z., 2018, Effects of macro and micronutrients on neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae, *Biofuels*, **9**, pp. 147-156.
- Ghawana, S., Paul, A., Kumar, H., Kumar, A., Singh, H., et al., 2011, An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites, *BMC Research Notes*, **4**: 85.
- Gu, P., Ishii, Y., Spencer, T. A., Shechter, I., 1998, Function-structure studies and identification of three enzyme domain involved in the catalytic activity in rat hepatic squalene synthase, *J. Biol. Chem.*, **273**, pp. 12515-12525.
- Hata, S., Sanmiya, K., Kouchi, H., Matsuoka, M., Yamamoto, N., Izui, K., 1997, cDNA cloning of squalene synthase genes from mono- and dicotyledonous plant, and expression of the gene in rice, *Plant Cell Physiol.*, **38**, pp. 1409-1413.

- Hegedűs, A., Moca, A., Barbu-Tudoran, L., Coman, C., Dragoş, N., 2016, Molecular phylogeny of *Botryococcus braunii* strains (race A) – An integrative approach, *Algal Res.*, **19**, pp. 189-197.
- Hegedűs, A., Mocan, A., Barbu-Tudoran, L., Coman, C., Drugă, B., Sicora, C., Dragoş, N., 2014, Morphological, biochemical, and phylogenetic assessments of eight *Botryococcus terribilis* strains collected from freshwaters of Transylvania, *J. Appl. Phycol.*, **27**, pp. 865-878.
- Heo, L., Feig, M., 2018, PREFMD: a web server for protein structure refinement via molecular dynamics simulations, *Bioinformatics*, **36**, pp. 1063-1065.
- Hirose, M., Mukaida, F., Okada, S., Noguchi, T., 2013, Active hydrocarbon biosynthesis and accumulation in a green alga *Botryococcus braunii* (Race A), *Eukaryot. Cell*, **12**, pp. 1132 - 1141.
- Huang, Z., Poulter, C. D., 1989, Tetramethylsqualene, a triterpene from *Botryococcus braunii* var. Showa, *Phytochem.*, **28**, pp. 1467-1470.
- Jendele, L., Krivák, R., Škoda, P., Novotný, M., Hoksza, D., 2019, PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization, *Nucleic Acids Res.*, **47**, pp. W345-W349.
- Judd, S. J., Al Momani, F. A. O., Znad, H., Al Ketife, A. M. D., 2017, The cost benefit of algal technology for combined CO<sub>2</sub> mitigation and nutrient abatement, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **71**, pp. 379-387.
- Kawachi, M., Tanoi, T., Demura, M., Kaya, K., Watanabe, M. M., 2012, Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*, *Algal Res.*, **1**, pp. 114-119.
- Kim, B. H., Ramanan, R., Cho, G. G., La, H. J., Ahn, C. Y., et al., 2012, Simple, rapid and cost-effective method for high quality nucleic acids extraction from different strains of *Botryococcus braunii*, *PLoS ONE*, **7**.
- Kirtay, E., 2009, World's population and energy demand, *Soc. Polit. Econ. Cult. Res.*, **1**, pp. 145-169.
- Komárek, J., Marvan, P., 1992, Morphological differences in natural populations of *Botryococcus* (Chlorophyceae), *Arch. Protistenkd*, **141**, pp. 65-100.
- Krivák, R., Hoksza, D., 2018, P2Rank: machine learning based tool for rapid and accurate prediction of ligand binding sites from protein structure, *J. Cheminform.*, **10**, 39.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.*, **33**, pp. 1870-1874.
- Largeau, C., Casadevall, E., Berkaloff, C., 1980a, The biosynthesis of the long-chain hydrocarbon in the green alga *Botryococcus braunii*, *Phytochem.*, **19**, pp. 1081-1085.
- Largeau, C., Casadevall, E., Berkaloff, C., Dhamelincourt, P., 1980b, Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*, *Phytochem.*, **19**, pp. 1043-1051.

- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., et al., 2007, ClustalW and ClustalX version 2.0, *Bioinformatics*, **23**, pp. 2947-2948.
- Lawrence, A. K., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E., 2015, The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, *Nature Protoc.*, **10**, pp. 845-858.
- Lee, S., Poulter, C.D., 2008, Cloning, solubilization, and characterization of squalene synthase from *Thermosynechococcus elongates* BP-1, *J. Bacteriol.*, **190**, pp. 3808 – 3816.
- Lee, M. H., Jeong, J. H., Seo, J. W., Shin, C. G., Kim, Y. S., 2004, Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene, *Plant Cell Physiol.*, **45**, pp. 976- 984.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall III, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., et al., 2003, Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation, *Prot. Struct. Funct. Genet.*, **50**, pp. 437-450.
- Marzo, C., Díaz, A. B., Caro, I., Blandino, A., 2019, Status and perspectives in bioethanol production from sugar beet, in: Bioethanol Production from Food Crops, (Eds., Ramesh C. R., Ramachandran, S.), Acad. Press, pp. 61-79.
- Mendes, M. C. Q., González, A. A. C., Moreno, M. L. V., Figueira, C. P., Nunes, J. M. C., 2012, Morphological and ultrastructure features of a strain of *Botryococcus terribilis* (Trebouxiophyceae) from Brazil, *J. Phycol.*, **48**, 1099-1106.
- Metzger, P., Largeau, C., 2005, *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids, *Appl. Microbiol. Biot.*, **66**, pp. 486-496.
- Metzger, P., Allard, B., Casadevall, E., Berkaloff, C., Coute, A., 1990, Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon, *J. Phycol.*, **26**, pp. 258-266.
- Metzger, P., Casadevall, E., 1987, Lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon from new strains of the green alga *Botryococcus braunii*, *Tetrahedron Lett.*, **28**, pp. 3931-3934.
- Metzger, P., Templier, J., Largeau, C., Casadevall, E., 1986, An *n*-alkatriene and some *n*-alkadienes from the A race of the green alga *Botryococcus braunii*, *Phytochem.*, **25**, pp. 1869-1872.
- Metzger, P., Casadevall, E., Pouet, M.-J., Pouet, Y., 1985, Structures of some botryococcenes: branched hydrocarbons from the B race of the green alga *Botryococcus braunii*, *Phytochem.*, **24**, pp. 2995-3002.
- Nakashima, T., Inoue, T., Oka, A., Nishino, T., Osumi, T., Hata, S., 1995, Cloning, expression, and characterization of cDNAs encoding *Arabidopsis thaliana* squalene synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, pp. 2328-2332.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., Dalai, A. K., 2010, Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **14**, pp. 578-597.

- Niehaus, T. D., Okada, S., Devarenne, T. P., Watt, D. S., Sviripa, V., Chappell, J., 2011, Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, pp. 12260-12265.
- Nigam, P. S., Singh, A., 2011, Production of liquid biofuels from renewable resources, *Progr. Energ. Combust.*, **37**, pp. 52-68.
- Ortiz-Marquez, J. C. F., Do Nascimento, M., Zehr, J. P., Curatti, L., 2013, Genetic engineering of multispecies microbial cell factories as an alternative for bioenergy production, *Trends Biotechnol.*, **31**, pp. 521-529.
- Petersen, H. I., Rosenberg, P., Nytoft, H. P., 2008, Oxygen groups in coals and alginite-rich kerogen revisited, *Int. J. Coal. Geol.*, **74**, pp. 93-113.
- Poulter, C. D., 1990, Biosynthesis of non-head-to-tail terpenes-formation of 1'-1 and 1'-3 linkages, *Acc. Chem. Res.*, **23**, pp. 70-77.
- Ranga Rao, A., Gogisetty, D., Gokare, R. A., Ravi, S., Bikkina, P. N., Su, Y., Lei, B., 2017, *Botryococcus* as an alternative source of carotenoids and its possible applications – an overview, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **38**, pp. 541-558.
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., et al., 2008, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*, **102**, pp. 100-112.
- Salama, E-S., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., El-Dalatony, M. M., Yang, Il-S., Min, B., Jeon, B.-H., 2017, Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **79**, pp. 1189-1211.
- Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R. A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., et al., 2008, Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change, *Science*, **319**, pp. 1238-1240.
- Seo, J. W., Jeong, J. H., Shin, C. G., Lo, S. C., Han, S. S., et al., 2005, Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation, *Phytochem.*, **66**, pp. 869-877.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006, Commercial applications of microalgae, *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, pp. 87- 96.
- Thapa, H. R., Naik, M. T., Okada, D., Takada, K., Molnár, I., Xu. Y., Devarenne, T. P., 2016, A squalene synthase-like enzyme initiates production of tetraterpenoid hydrocarbons in *Botryococcus braunii* Race L, *Nature Commun.*, **7**, e11198.
- Treviño, F. I., Sánchez-Castillo, P., Comas González, A., 2009, Contribution to the taxonomic study of the family Botryococcaceae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) in southern Spain, *Cryptogamie Algol.*, **30**, pp. 17-30.

- Voloshin, R. A., Rodionova, M. V., Zharmukhamedov, S. K., Veziroglu, T. N., Allakhverdiev, S. I., 2016, Review: Biofuel production from plant and algal biomass, *Int. J. Hydrogen Energ.*, **41**, pp 17257-17273.
- Wiederstein, M., Sippl, M. J., 2007, ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Res.*, **35**, pp. W407-W410.
- Weiss, T. L., Roth, R., Goodson, C., Vitha, S., Black, I., et al., 2012, Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix, *Eukaryot. Cell*, **11**, pp. 1424-1440.
- Wolf, F. R., Cox, E. R., 1981, Ultrastructure of active and resting colonies of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae), *J. Phycol.*, **17**, pp. 395-405.
- Yang, Z., Pei, H., Hou, Q., Jiang, L., Zhang, L., Nie, Z., 2019, Algal biofilm-assisted microbial fuel cell to enhance domestic wastewater treatment: Nutrient, organics removal and bioenergy production, *Chem. Eng. J.*, **332**, pp. 277-285.
- Yang, J., Roy, A., Zhang, Y., 2013, Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment, *Bioinformatics*, **29**, pp.2588-2595.

## ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ

### 1. Articole *in extenso* din subiectul tezei.

**Szóke-Nagy, T.**, Porav, A. S., Dragos, N, *In silico* modelling and analysis of squalene synthase-like 1 (SSL-1) from green microalga *Botryococcus terribilis* AICB 872, *Studia UBB Biologia* – Acceptat spre publicare.

**Szóke-Nagy, T.**, Hegedűs, A., Baricz, A., Chiriac, C., Szekeres E., Coman, C., Dragoș, N., 2015, Identification, isolation and bioinformatic analysis of squalene synthase-like cDNA fragments in *Botryococcus terribilis* AICB 870 strain, *Studia UBB Biologia*, LX (1), pp. 23-37.

### 2. Studii publicate în volumele unor manifestări științifice recunoscute național și internațional din subiectul tezei.

**Szóke-Nagy, T.**, Baricz, A., Chiriac, C., Szekeres, E., Coman, C., Dragoș, N., 2015, Identification of gene encoding squalene synthase-like 1 in five *Botryococcus terribilis* AICB Strains, 7<sup>th</sup> National Congress with International Participation and 33<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, Baia Mare, 10-14 June 2015, Bull. RSBC no. 43, pp. 50.

**Szóke-Nagy, T.**, Hegedűs A., Coman, C., Drugă, B., Dragoș, N., 2014, Identification of Three Synthase-Like cDNA Fragments in *Botryococcus terribilis* AICB 870, a botryococcene producing microalga, 6<sup>th</sup> National Congress with International Participation and 32<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, Târgu Mureș, 4-7 June 2014, Bull. RSBC no. 42, pp. 113.

**Szóke-Nagy, T.**, Dragoș, N., 2012, 3D structure prediction of squalene-synthases from algae and plants, 16<sup>th</sup> Symposium of Biology Students in Europe, Szeged-Gödöllő, 27 July - 6 August 2012, Hungary, pp. 48-49.

### 3. Participări la conferințe internaționale, naționale și workshop-uri.

12<sup>th</sup> International Conference on Halophilic Microorganisms, 24-28 June, 2019, Cluj-Napoca, Romania – ORGANIZATOR.

11<sup>th</sup> International Conference on Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2017), 27-29 Septembrie 2017, Cluj-Napoca, Romania.

7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), 9-13 Iulie 2017, Valencia, Spania.

6<sup>th</sup> International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2015), 28-30 Octombrie 2015, Barcelona, Spain,



7<sup>th</sup> National Congress with International Participation and 33<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 10-14 June 2015, Baia Mare, Romania. **Lucrare din teză.**  
Promovare și Diseminare în Domeniul Dezvoltării Durabile și Protecției Mediului, 11-14 Decembrie 2014, Sinaia, România – Workshop.

6<sup>th</sup> National Congress with International Participation and 32<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 4-7 June 2014, Târgu Mureș, Romania. **Lucrare din teză.**  
16<sup>th</sup> Symposium of Biology Students in Europe, Szeged-Gödöllő, 27 July - 6 August 2012, Hungary – Workshop. **Lucrare din teză.**

4<sup>th</sup> International Congress and 30<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 13-17 June 2012, Satu Mare-Debrecen, Romania-Hungary.

Microscopia electronică în România, o nouă perspectivă a cercetării în medicină și biologie, 6 Iunie 2012, București, România – Workshop.

#### **4. Alte articole în reviste indexate ISI în calitate de autor principal.**

**Szóke-Nagy, T.**, Porav, A. S., Coman, C., Cozar, I. B., Dina, N. E., Tripon, C., 2018, Characterization of the action of antibiotics and essential oils against bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy and scanning electron microscopy, *Anal. Lett.*, <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1430150>, **52** (1), PIM Sp. Iss., pp. 190-200, (IF **1.206**).

#### **5. Alte articole în reviste indexate ISI în calitate de coautor.**

Dragoș, N., Chiriac, C., Porav, S., **Szóke-Nagy, T.**, Coman, C., Török, L., Hegedűs, A., 2019, *Desmodium tropicus* (Chlorophyta) in the Danube Delta – reassessing the phylogeny of the series Maximi, *Eur. J. Phycol.*, <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1558286> (IF **2.481**).

Szekeres, E., Chiriac, C. M., Baricz, A., **Szóke-Nagy, T.**, Lung, I., Soran, M.-L., Rudi, K., Dragoș, N., Coman, C., 2018, Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas, *Environ. Pollut.*, **236**, pp. 734-744 (IF **4.358**).

Cozar, I. B., Colniță, A., **Szóke-Nagy, T.**, Gherman, A. M. R., Dina, N. E., 2017, Label-free detection of bacteria using surface-enhanced Raman scattering and principal component analysis, *Anal. Lett.*, <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1445747>, **52** (1), PIM Sp. Iss., pp. 177-189, (IF **1.206**).

- Dina, N. E., Zhou, H., Colniță, A., Leopold, N., **Szóke-Nagy, T.**, Coman, C., Haisch, C., 2017, Rapid single-cell detection and identification of pathogens by using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Analyst*, **142**, pp. 1782-1789 (IF **3.864**).
- Dina, N. E., Colniță, A., **Szóke-Nagy, T.**, Porav, A. S., 2017, A critical review on ultrasensitive, spectroscopic-based methods for high-throughput monitoring of bacteria during infection treatment, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **47** (6) pp. 499-512 (IF **3.231**).
- Dina, N. E., Leș, A., Baricz, A., **Szóke-Nagy, T.**, Leopold, N., Sârbu, C., Banciu, H. L., 2017, Discrimination of haloarchaeal genera using Raman spectroscopy and robust methods for multivariate data analysis, *J. Raman Spectrosc.*, **48** (8), 2017, pp. 1122–1126 (IF **2.879**).
- Opriș, O., Soran, M. L., Lung, I., Trușcă, M. R. C., **Szóke-Nagy, T.**, Coman, C., 2016, The optimization of the antibiotics extraction from wastewaters and manure using Box–Behnken experimental design, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **14** (3), pp. 473-480, DOI 10.1007/s13762-016-1165-2 (IF **1.915**).

## 6. Alte Articole BDI în calitate de coautor.

- Chiriac, C. M., Barbu-Tudoran, L., Baricz, A., Szekeres, E., **Szóke-Nagy, T.**, Dragoș, N., Coman, C., 2015, Bacterial diversity in a microbial mat colonizing a man-made geothermal spring from Romania, *Studia UBB Biologia*, LX (1), pp. 2-22.
- Szekeres, E., Dragoș, N., Porav, A. S., Baricz, A., Chiriac, C., **Szóke-Nagy, T.**, Coman, C., 2015, Evaluation of bio-resources: monitoring *Arthrospira* growth in supplemented brackish water, *Studia UBB Biologia*, LX, Sp. Iss., pp. 45-48.
- Bica, A., Barbu-Tudoran, L., Drugă, B., Coman, C., Nicoară, A., **Szóke-Nagy, T.**, Dragoș, N., 2012, *Desmodesmus communis* (Chlorophyta) from Romanian freshwater: cenobial morphology and molecular taxonomy based on the ITS2 of new isolates, *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, XVII (1), pp. 16-28.

## 7. Brevete.

- Dina, N. E., Colniță, A., Marconi, D. S., **Szóke-Nagy, T.**, Gherman, A. M. R., Leopold, N., Ștefăncu, A., 2018, Procedeu de detecție prin Spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS) într-un sistem de curgere microfluidic utilizând un spot de argint ca substrat amplificator SERS – Cerere de Brevet la OSIM A00976/28.11.2018.

## 8. Capitole de carte.

Baricz, A., **Szőke-Nagy, T.**, Szekeres, E., Chiriac, C., 2016, Methods for nucleic acids extraction in: Methodological guide for monitoring antibiotics and antibiotic resistance in the environment, (Ed. Coman, C.), ISBN 978-606-561-165-8, Publisher Accent, Cluj-Napoca, Romania, pp. 41-62.

Hegedűs, A., **Szőke-Nagy, T.**, Butiuc-Keul, A., 2016, Identification of antibiotic resistant microorganisms and the antibiotic resistance genes, in: Methodological guide for monitoring antibiotics and antibiotic resistance in the environment, (Ed. Coman, C.), ISBN 978-606-561-165-8, Publisher Accent, Cluj-Napoca, Romania, pp. 227-306.

## 9. Alte Studii publicate în volumele unor manifestări științifice recunoscute național și internațional în calitate de autor principal sau coautor.

Colniță, A., **Szőke-Nagy, T.**, Gherman, A.-M. R., Cozar, I. B., Dina, N. E., 2018, Detection and identification of pathogenic microorganisms using ultrasensitive Raman spectroscopy, *Conferința Națională de Biofizică*, September 7, București, Romania – *Prezentare orală*.

Colniță, A., Gherman, A. M. R., **Szőke-Nagy, T.**, Cozar, I. B., Dina, N. E., 2018, The use of *in situ* surface enhanced Raman spectroscopy technique for antibiotic resistance determination of pathogenic microorganisms, *International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-AMBES 2018)*, May 23-25, Brașov, Romania – POSTER.

Buimaga-Iarinca, L., Morari, C., Colniță, A., Neamțu, S., Fischer-Fodor, E., **Szőke-Nagy, T.**, Farcas, A., Turcu, I., 2018, IMAGCELL – Assessing living cells natural features by employing optical microscopy and statistical analysis, *International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-AMBES 2018)*, May 23-25, Brașov, Romania – *Prezentare orală*.

Gherman, A. M. R., Marconi, D., Colniță, A., Szabo, L., Leopold, N., **Szőke-Nagy, T.**, Dina, N. E., 2018, Microfluidic portable device for pathogens' rapid SERS detection, *International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-AMBES 2018)*, May 23-25, Brașov, Romania – POSTER.

Porav, S., **Szőke-Nagy, T.**, Dina, N. E., Cozar, B., Muntean, C., Tripon, C., 2017, Structural features induced in pathogenic bacteria by their interaction with natural and synthetic antibiotic agents, *11<sup>th</sup> International Conference on Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2017)*, September 27-29, Cluj-Napoca, România Spania – POSTER.

**Szőke-Nagy, T.**, Gherman, A. M. R., Colniță, A., Cozar, I. B., Dina, N. E., 2017, Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophilia* monitored through SERS mapping methodology,

- 11<sup>th</sup> International Conference on Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2017), September 27-29, Cluj-Napoca, România Spania – POSTER.
- Hegedus, A., Porav, S., **Szóke-Nagy, T.**, Torok, L., Coman, C., Dragoş, N., 2017, *Desmodemus tropicus* in Danube Delta: morphological and phylogenetic approaches, 1<sup>st</sup> International Congrress of Danube Region Botanical Gardens, September 7-9, Arad, Romania – POSTER.
- Dina, N. E., Colniţă, A., Cozar, I. B., **Szóke-Nagy, T.**, 2017, Bacterial barcoding - a SERS mapping technique for ultrasensitive detection of pathogens, 3<sup>rd</sup> International Conference on Enhanced Spectroscopies (ICES 2017), Septembrie 4-7, München, Germania – POSTER.
- Szóke-Nagy, T.**, Dina, N. E., Colniţă, A., Cozar, I. B., 2017, Bacterial cell membrane barcoding, a SERS mapping methodology for identificaton and detection of potential pathogenic bacteria, 7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), July 9-13, Valencia, Spania – POSTER.
- Szóke-Nagy, T.**, Dina, N. E., Porav, S., Tripon, C., 2017, Antimicrobial and inhibitory effects of therapeutic-grade essential oils against three environmental isolated bacterial strains, 7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), July 9-13, Valencia, Spania – POSTER.
- Szekeres, E., Barcz, A. I., Chiriac, C. M., **Szóke-Nagy, T.**, Andrei, Ş. A., Coman C., 2016, Antibiotics and antibiotic resistant microorganisms: anthropic impact on natural environments, “Kolozsvári Biológus Napok”, April 2016, Cluj-Napoca, Romania – *Prezentare orală.*
- Szekeres, E., Dragoş, N., Porav, A. S., Baricz, A., Chiriac, C., **Szóke-Nagy, T.**, Coman, C., 2015, Evaluation of Bio-Resources: Monitorig *Arthospira* growth in supplemented rackish water, *International Conference: Molecular Biology – Current Aspects and Prospects*, Novembre 6-8, Cluj-Napoca, Romania, – POSTER.
- Andrei, Ş. A., Szekeres, E. K., **Szóke-Nagy, T.**, Chiriac, C. M., Baricz, A. I., Dragoş, N., Coman, C., 2015, Environmental filtering reduces antibiotic resistance genes abundance in urban wastewater treatment plants, 6<sup>th</sup> International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2015), Octobre 28-30, Barcelona, Spain – POSTER.
- Chiriac, CM., Szekeres, E. K., Baricz, A. I., **Szóke-Nagy, T.**, Andrei, Ş. A., Dragoş, N., Coman, C., 2015, Evaluation of antibiotic resistance genes in human impacted environments from Romania: a preliminary step for an environmental protection strategy, 6<sup>th</sup> International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2015), Octobre 28-30, Barcelona, Spain – POSTER.

- Coman, C., Baricz, A. I., Chiriac, C. M., Szekeres, E. K., **Szóke-Nagy, T.**, Andrei, Ș. A., Dragoș, N., 2015, A methodological framework to monitor pollution with antibiotics and antibiotic resistant microorganisms – the EnviroAMR project, *6<sup>th</sup> International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2015)*, Octobre 28-30, Barcelona, Spain – POSTER.
- Chiriac, C., Baricz, A., Szekeres, E., **Szóke-Nagy, T.**, Dragoș, N., Coman, C., 2015, A perspective on the ecological functions of antibiotics in natural environments, *7<sup>th</sup> National Congress with International Participation and 33<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology*, June 10-14, Baia Mare, Romania, Bull. RSBC no. 43, pp. 36 – POSTER.
- Hegedűs (Bica), A., Coman, C., Drugă, B., **Szóke-Nagy, T.**, Sicora, C., Dragoș, N., 2013, Single-colony PCR, a new molecular technique in studying the *Botryococcus* Genus Diversity, *Deltas and Wetlands*, nr. 1, Tulcea, pp. 13 – POSTER.
- Filip, A., Uțiu, I., Munteanu, C., Guțu, M., **Szóke-Nagy, T.**, Crăciun, C., Guțu, D., Lang, C., Roșioru, C., 2012, *Trigonella foenum-graecum* seeds - a natural hepatoprotector, *4<sup>rd</sup> International Congress and 30<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology*, June 13-17, Satu Mare-Debrecen, Bull. RSBC no. 40, p. 59 – POSTER.
- Szóke-Nagy, T.**, Pribac, G., Tripon, S., Crăciun, C., Roșioru C., 2012, Ultrastructural modifications in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats *4<sup>rd</sup> International Congress and 30<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology*, June 13-17, Satu Mare-Debrecen, – *Prezentare orală*.
- Trif, M., Filip, A., Crăciun, C., Munteanu, C., Uțiu, I., **Szóke-Nagy, T.**, Lukaci, C., Tripon, S., Roșioru, C., 2012, Biological activities of furil-benzothiazole (R)- and (S)- enantiomers and racemic in the liver of ethanol-intoxicated rats, *4<sup>rd</sup> International Congress and 30<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology*, June 13-17, Satu Mare-Debrecen, Bull. RSBC nr. 40, p. 57 – POSTER.

## 10. Membru în proiecte de cercetare.

- PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0010: „Emerging molecular technologies based on micro and nano-structured systems with biomedical applications”.
- PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0387: “Emerging technologies for the industrial capitalization of 2d structures (graphene and nongraphenic)”.
- PN-III-P1-1.1-TE-2016-0032: “Design of highly efficient antimicrobial peptides: in silico prediction and experimental validation”.
- PN-III-P2-2.1-PED-2016-0983: „Development of a microfluidic portable device for pathogen’s rapid SERS detection”.

- Granturi EEA 2009-2014 - 3499/20.05.2015: “Methodological guide for monitoring antibiotic residues and antimicrobial resistance in the environment as a supporting instrument for an enhanced quality management of surface waters and groundwater (EnviroAMR)”.
- PN-II-RU-TE-2014-4-0862: “Pathogenic microorganisms’ rapid detection and identification using high sensitive raman spectroscopy”.