

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALA DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

FICOBILISOMUL CIANOBACTERIAN:
INVESTIGAȚII STRUCTURALE ȘI
FUNCȚIONALE

~ REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT ~

Student doctorand:
Alin Sebastian PORAV

Conducător științific:
Prof. Dr. Nicolaie DRAGOȘ

Cluj-Napoca,
2020

Cuprins

Lista de abrevieri	I
Mulțumiri	III
Capitolul I. Introducere generala	1
1. Context și motivație	1
2. Fotosinteză: aspecte generale	5
3. Reacții fotochimice și energetice	6
4. Arhitectura fotosintezei	7
4.1. Pigmenți	7
4.1.1. Clorofile	8
4.1.2. Carotenoizi	8
4.1.3. Biline	9
4.2. Centrele de reacție în fotosinteza anoxigenică.....	10
4.2.1. Centrul de Reacție I	10
4.2.2. Centrul de Reacție II	11
4.3. Fotosistemele în fotosinteza oxigenică (cianobacterii, alge verzi și plante superioare)	11
4.3.1. Fotosistemul I	12
4.3.2. Fotosistemul II	13
4.3.3. Citocromul b ₆ f	13
4.3.4. Sintetaza ATP (F-ATP-ase)	14
4.3.5. Ferredoxina NADP Reductază.....	14
4.3.6. Ferredoxină	14
4.3.7. Plastocianină	15
4.4. Antene colectoare de energie solară – strategii structural diferite pentru aceeași funcție	15
4.4.1. LHA în fotosinteza anoxigenică	16
4.4.1.1. LH-I	16
4.4.1.2. LH-II	16
4.4.1.3. Clorozomul	17
4.4.2. Antene colectoare de energie solară la plantele superioare și algele verzi	18
4.4.2.1. Antena colectoare II	18
4.4.2.2. Antena colectoare I	19
4.5. Antena colectoare de energie solară în cianobacterii și alge verzi.....	19
4.5.1. Componentele structurale ale ficobilisomului	21
4.5.2. Ficocianină	21
4.5.3. Ficoeritrină.....	22
4.5.4. Aloficocianină	22
4.5.5. Familia proteinelor linker	22
4.5.6. Transferul de energie în cadrul ficobilisomului	23

4.5.7. Adaptarea cromatică	24
4.5.8. Rezervorul de nitrogen.....	25
4.6. Microscopia electronica criogenica in biologia structurală.....	26
4.6.1. De la “blobology” la Premiul Nobel – o perspectivă istorică	27
4.6.2. Formarea imaginii și interacțiunile specimen-electroni	28
4.6.3. Metode de microscopie electronica pentru analiza structurala a proteinelor „.....	30
4.6.3.1. Colorația negativă	30
4.6.3.2. Microscopie electronica criogenică.....	32
4.6.4. Analiza particulelor singulareryo-EM – SPA)	33
4.6.4.1. Corectarea mișcării specimenului.....	34
4.6.4.2. Estimarea și corectarea CTF	35
4.6.4.3. Culegerea particulelor.....	35
4.6.4.4. Clasificarea 2D	35
4.6.4.5. Generarea modelului inițial	36
4.6.4.5. Clasificarea 3D	36
4.6.4.6. Rafinarea structurii.....	36
Capitol II. Scopul și obiectivele tezei.....	37
Capitol III. Purificarea ficobilisomilor și optimizarea colorației negative	39
1. Introducere	40
2. Material și metode	41
2.1. Materiale	41
2.1.1. Chimicale	41
2.1.2. Material biologic	41
2.2. Metode	41
2.2.1. Condițiile de creștere	41
2.2.2. Prepararea extractului brut	42
2.2.3. Purificarea ficobilisomilor – system apos bifazic (ATPS)	42
2.2.4. Purificarea ficobilisomilor – centrifugare în gradient de sucroză.....	42
2.2.5. Măsurători spectroscopice.....	42
2.2.6. Electroforeză în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE	42
2.2.7. Colorație negativă	42
3. Rezultate și discuții	44
3.1. Pregătirea extractului brut	44
3.2. Purificarea ficobilisomilor	45
3.3. Optimizarea colorației negative	50
4. Concluzii	54
Chapter IV. Dinamica transferului energetic în cadrul ficobilisomilor.....	55
1. Introducere	55
2. Material și metode	57

2.1. Material biologic	57
2.2. Purificarea ficobilisomilor	57
2.3. Măsurători spectroscopice	57
2.4. Time resolved spectroscopy	57
2.4.1. Spectroscopia de absorbție tranzitorie	57
2.4.2. Spectroscopia de fluorescență rezolvată în timp	58
2.5. Analiza datelor	60
3. Rezultate și discuții	62
3.1. Transferul energetic în ficobilisom extras din tulpina de <i>A. platensis</i> AICB 49.....	63
3.2. Transferul energetic în ficobilisom extras din tulpina de <i>Cronbergia</i> sp. AICB 1097	68
3.3. Transferul energetic în ficobilisom extras din tulpina de <i>Coelomoron pusillum</i> AICB 1012	73
3.4. Transferul energetic în ficobilisom extras din tulpina de <i>Fremyella</i> sp. UTEX 481	77
3.5. Analiza comparativă a dinamicii transferului energetic.....	78
4. Concluzii	80
Capitol. V. Componentele structural ale ficobilisomului si predicția structurii 3D.....	81
1. Introducere	81
2. Material și metode	83
2.1. Material biologic	83
2.2. Izolarea ADN genomic	83
2.3. Secvențierea genomurilor cianobacteriene	83
2.4. Modelarea pe bază de omologie a componentelor ficobilisomului.....	84
2.5. Analiza gradului de conservare	84
2.6. Analiza modelelor	85
3. Rezultate și discuții	86
3.1. Asamblarea genomurilor.....	86
3.2. Modelarea pe bază de omologie.....	89
3.2.1. Ficobiliproteine	89
3.2.2. Polipeptide de legătură asociate ficobiliproteinelor.....	92
3.2.3. Polipeptide de legătură asociate interacțiunii dintre miez și tije.....	95
3.2.4. Polipeptide de legătură asociate interacțiunii dintre miez și membrana.....	97
4. Concluzii	99
Capitol. VI. Flexibilitatea conformațională a ficobilisomilor	100
1. Introducere	100
2. Material și metode	102
2.1. Pregătirea ficobilisomilor și analiza prin colorația negativă	102
2.2. Achiziția imaginilor	102

2.3. Analiza imaginilor	101
2.4. Analiza flexibilității	103
3. Rezultate și discuții	105
3.1. Depistarea inițială a flexibilității PBS	105
3.2. Flexibilitatea structurală a ficobilisomilor de la AICB 49.....	107
3.2.1. Structura globala.....	109
3.2.2. Analiza conformațională	110
3.2.3. Analiza flexibilității prin dinamică	114
3.2.4. Flexibilitatea ficobilisomilor în 3D	119
4. Concluzii	123
Capitol VII. Analiza crio-EM a ficobilisomilor de la <i>Arthrospira platensis</i>	124
1. Introducere	124
2. Material și metode	125
2.1. Pregătirea probelor pentru analiza crio-EM	125
2.2. Pregătirea probelor pentru analiza crio-EM și colectarea de date.....	125
2.3. Procesarea imaginilor.....	125
3. Rezultate și discuții	127
3.1. Optimizarea grilelor de crio-EM	127
3.2. Depistarea microgafiilor optime	129
3.3. Clasificarea 2D	132
3.4. Reconstrucția 3D a ficobilisomului	134
3.5. Structura ficobilisomului	136
4. Concluzii	148
Capitol VIII. Concluzii și perspective	149
Lista de publicații	151
Proiecte de cercetare	155
Bibliografie	156
Anexe	178

Lista de abrevieri

AmAC – acetat de amoniu	G_PBS – PBS purificați prin centrifugare în gradient
APC - aloficocianină	GTA - glutaraldehidă
ATP - adenzinotriofosfat	IRF – funcția de răspuns al instrumentului
ATPS – sistem apos bifazic	K – coeficientul de partiționare
Bchl - bacterioclorofila	KPI – tampon fosfat-potasic
CBB – ciclul Calvin-Benson-Bassham	Lcm – proteine asociate interacțiunii dintre miex și membrană
CCD - couple charge device	LHA – antenna colectoare de energie solară
Chl - clorofila	LH-I – antenna colectoare I
crio-EM – microscopie electronica criogenică	LH-II – antenna colectoare II
cryo-EM - SPA – analiza particulelor singular prin crio-EM	LP – polipeptide de legătură
CTF – funcția transferului de contrast	Lc - polipeptide de legătură asociate miezului
D_PBS – ficobilisomi disociați	Lr - polipeptide de legătură asociate tijelor
ddH ₂ O – apă dublu distilată	Lrc - proteine asociate interacțiunii dintre miex și tije
DDD – dispozitiv de detecție direct a electronilor	MAS – unghiul magic de rotire
DNP – polarizarea dinamică a nucleului	MCA – analizor multicanal
DQE – eficiența de detecție cuantică	MRA – alinierea 2D cu referințe multiple
EADS – spectru diferențial asociat evoluției absorbției	MWCO – limita de excludere a greutateii moleculare
EAFS - spectru diferențial asociat evoluției fluorescenței	NADP - Nicotinamid adenin dinucleotid fosfatul
EET – transferal energiei de excitare	NCC – corelație încuciușată normalizată
EMDB - Electron Microscopy Data Bank	NM - fascicul de de lumină albă în cristalul RMN neliniar
F-ATP-ase – sintetaza-ATP	NMR - rezonanță magnetică nuclear
FNR – reductaza ferredoxin NADP	NS – colorație negativă
FSC – curba de corelare Fourier	OCP - proteină carotenoidă portocalie
FMO – complexul Fenna–Matthews–Olson	OEC – complexul de evoluție al oxigenului
FWHM - lățimea completă la jumătate maximă	

P - puritate	RE_PBP - eficiența de recuperare totală a ficobiliproteinelor
PBS – ficobilisomi	Rg – raza de girare
PC - ficocianină	RMSD – deviație medie a rădăcină-pătrată
PCB - ficocianobilină	RMSF – fluctuația medie rădăcină-pătrată
PE - ficoeritrină	ROS - reactive oxygen species
PEB - ficoeritrobilină	RuBP - ribulose-1,5-bisphosphate
PEC - ficoeritrocianină	SDS-PAGE - electroforeza în gel de poliacrilamidă cu dodecil sulfat de sodiu
PGA – acid fosfoglicerol	SEC – coloană de excluziune sterică
Pf – factor de purificare	SEM – microscop electronic de baleiaj
PQ - plastoquinonă	SNR – raport între semnal și zgomot
PQH - cuplarea plastoquinol-ului	Spx - spirilloxantină
PLC - plastocianină	SQ – limita Sockley-Queisser
PSI - fotosistem I	TAC - time-to-amplitude converter
PSII - fotosistem II	TCSPC - numărarea fotonilor corelată în timp
PSC – cellule solare de tip Perovskite	TEM – microscop electronic de transmisie
PUB - ficourobilină	TMHs – helix transmembranar
PVB - ficoviolobilină	Vr – raportul de volum
QA – quinonă primară	WL – lumină albă
RC – centrul de reacție	
RCI - centrul de reacție de tip I	
RCII - centrul de reacție de tip II	
Re – eficiența de recuperare	

Cuvinte cheie: ficobilisomi cianobacterieni, microscopie electronica criogenica, reconstrucția particulelor singular, structura complexelor macromoleculare, dinamica macromoleculara, spectroscopie ultra-rapida

Capitolul I. Introducere generală

Încălzirea globală este una dintre cele mai presante probleme ale umanității din secolul XXI. Acest fenomen poate fi definit ca o creștere a temperaturilor medii pe glob la nivelul atmosferei și al suprafeței mării. Atmosfera pământului, din perioada preistorică, a acționat ca o seră pentru a capta căldura de la Soare, asigurând astfel o temperatură pozitivă compatibilă cu apariția și evoluția vieții pe Pământ. Chiar dacă acesta nu este un fenomen nou în istoria geologică a Pământului, fiind raportate mai multe evenimente glaciare, tendința actuală de încălzire are o semnificație deosebită datorită ritmului rapid cu care are loc. Astfel, temperatura medie a suprafeței Pământului în 2017 a crescut cu aproape 1 grad Celsius față de epoca preindustrială, ca rezultat al activităților și emisiilor antropice (Grupul Băncii Mondiale, 2020). Unul dintre pilonii cheie recunoscuți de Uniunea Europeană ca fiind esențial pentru atingerea statutului unei societăți neutre din punct de vedere climatic este energia regenerabilă. Astăzi, aproximativ 40% din energia din Europa provine din energie regenerabilă, în principal din energie solară și eoliană. Prin implementarea strategiei Green Deal, UE își propune ca peste 80% din energia totală utilizată la mijlocul secolului va proveni din energie regenerabilă. Conform limitei Shockley-Queisser (SQ) (limita de eficiență radiativă), eficiența celulelor fotovoltaice actuale este foarte aproape de randamentul lor teoretic. Depășirea barierei Shockley-Queisser și îmbunătățirea eficienței conversiei celulelor solare convenționale nu este o sarcină banală, o posibilă soluție poate proveni de la natură (Scholes, 2011). Unul dintre cele mai eficiente mecanisme ce valorifică energia Soarelui este fotosinteza, un mecanism metabolic complex dezvoltat în natură de-a lungul a miliarde de ani.

Fotosinteza oxigenică este procesul fundamental responsabil pentru existența vieții pe Pământ, acesta asigurând atât compușii organici, sintetizați din apă și CO₂ atmosferic, prin folosirea luminii ca sursă de energie, cât și oxigenul ca produs secundar al aceleiași set de reacții. Acest proces poate fi definit ca fiind unul metabolic, în care energia solară este captată și stocată de un organism, în vederea folosirii acestei energii pentru alimentarea tuturor procesele celulare (Blankenship, 2002). Fotosinteza oxigenică a apărut acum aproximativ 3 miliarde de ani și a avut un impact major, schimbând toate procesele energetice ale vieții. Pentru a conștientiza mai bine importanța acestui proces, trebuie să înțelegem că majoritatea resurselor noastre alimentare și energetice au fost dezvoltate folosind energia solară captată în timpul fotosintezei. Principiul acestui procedeu este destul de simplu, și anume, absorbția energiei solare de către o moleculă de clorofilă și generarea unui gradient de protoni care este folosit ca forță motrice pentru sintetizarea moleculei energetice universale a celulelor vii, respectiv adenzina trifosfat (ATP) (Xiong și Bauer, 2002).

Primul și probabil cel mai limitant pas al fotosintezei, indiferent de tip, este recoltarea și transferul energiei solare către centrele de reacție. În acest proces care se desfășoară în complexe pigment-proteine înalt specializate, energia solară este captată și ulterior transferată cu viteză mare (1-100 ps) către centrele de reacție. Întregul proces se bazează pe transferul unidirecțional al energiei electronilor într-o rețea de cromofori (pigmenți), ținta finală fiind perechea specială de clorofilă din miezul centrelor de reacție (Croce și colab., 2018). Forma, dimensiunea, decalajul de energie și punctele de absorbție determină modul în care apoproteinele modulează interacțiunile dintre cromofori. Recoltarea luminii poate fi privită ca un proces în două etape, unde, în primul rând, fotonii solari sunt absorbiți de cromoforii moleculari, care stochează energia într-o stare electronică excitată, urmată de transportul energiei, prin transferul de energie rezonantă Förster, intra și inter proteic, până când atinge ținta (Mirkovic și colab., 2017). Scopul principal al antenei de colectare a energiei solare, este extinderea spectrelor din care fototrofele sunt capabile să se absoarbă, conferindu-le astfel un avantaj adaptativ într-un mediu aflat în continuă schimbare.

Ficobilisomii, care se regăsesc în cianobacterii, alge roșii și glaucofite, sunt al doilea cel mai mare complex de tip antena colectoare a energie solare (LHA), după clorozomi, cu o greutate moleculară cuprinsă între 1 MDa și 18 MD având dimensiuni de până la $68 \times 45 \times 39$ nm. Acest complex se găsește într-o varietate de forme, de la hemidisoidal și hemielipsoidal până la o formă de tip bloc, putând fi segregate din punct de vedere structural și funcțional în două compartimente, un miez cilindric din care radiază mai multe tije de discuri stivuite (MacColl, 1998). Nucleul variază într-o manieră dependentă de specie, de la formă bicilindrică și tricilindrică până la forma pentacilindrică, dar este întotdeauna alcătuit din discuri de aloficocianină (APC) păstrate împreună de polipeptide de legătură. Tijele sunt asamblate din discuri hexamerice de ficocianină (PC), iar în unele tulpini de discuri de ficocianină și ficoeritrină (PE), cea din urmă fiind localizată distal de PC (Adir, 2005). Tijele sunt asamblate și atașate la miezul de APC de polipeptide de legătură specifice (Mullineaux, 2008). Chiar dacă studiile structurale ale ficobilisomului datează încă din 1960, fiind realizate în cadrul grupurilor lui Gantt, Glazer și Bryant, până de curând, au fost disponibile doar structuri de rezoluție scăzută obținute prin tehnica de microscopie electronică a proteinelor prin colorație negativă (Yi și colab., 2005; Chang și colab., 2015). Zhang și colab. (2017) a reușit să obțină prima structură de înaltă rezoluție (3,5 Å) a ficobilisomului de la *Griffithsia pacifica* în 2017. De atunci, o altă structură de înaltă rezoluție a fost rezolvată pentru ficobilisomul de la *Porphyridium purpureum* de către Ma et al., (2020). Ambele structuri rezolvate ale ficobilisomilor provin de la algele roșii, ceea ce înseamnă că structura PBS cianobacteriană este încă nerezolvată la o rezoluție suficient de ridicată, încât să permită construirea modelului atomic.

Capitolul II. Scopul și obiectivele tezei

Scopul principal al acestei teze a fost explorarea caracteristicilor structurale ale ficobilisomilor cianobacterieni la rezoluția sub-nanometrică în vederea dezvăluirii arhitecturii sale de bază, lărgind astfel înțelegerea noastră a principiilor după care se ghidează atât procesul de asamblare, cât și funcția acestui „gigant” macromolecular. Considerăm că realizarea cu succes a acestor studii va oferi informații noi și interesante despre modul în care fotosinteza valorifică energia solară.

Pentru a atinge cu succes acest obiectiv ambițios, am definit cinci obiective operaționale, și anume:

- a)* dezvoltarea unei metode de purificare adecvată și de vizualizare a ficobilisomilor cianobacterieni;
- b)* analiza dinamicii transferului de energie în interiorul ficobilisomilor;
- c)* identificarea și caracterizarea componentelor moleculare ale ficobilisomului cianobacterian;
- d)* analiza heterogenității conformaționale a ficobilisomilor și identificarea unui specimen adecvat analizei crio-electron microscopice;
- e)* analiza 3D a structurii ficobilisome folosind microscopia electronică criogenică împreună cu analiză de particule unice.

Aceste obiective au fost abordate pe larg în capitole dedicate.

Capitolul III. Purificarea ficobilisomilor și optimizarea colorației negative

{Acest capitol a fost publicat parțial ca Porav, A. S., Bocăneală, M., Fălămaș, A., Bogdan, D. F., Barbu-Tudoran, L., Hegeduș, A., & Dragoș, N. (2020). Sequential aqueous two-phase system for simultaneous purification of cyanobacterial phycobiliproteins. Bioresource Technology, 315, 123794. doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123794}

1. Introducere

Ansambelele biomoleculare, cunoscute și sub numele de complexe macromoleculare sau mașini moleculare, îndeplinesc o gamă largă de funcții biologice. Acestea sunt asamblate în mod ordonat și alcătuite din două până la câteva mii de subunități individuale, incluzând ADN, ARN, proteine și lipide (Scarff și colab., 2018). Aceste mașini moleculare sunt menținute împreună de legături covalente sau interacțiuni proteine-proteine slabe, și de obicei, suferă modificări conformaționale pentru a-și îndeplini funcția. Elucidarea structurii acestor nano-mașinării este crucială pentru înțelegerea funcției lor celulare și a modului în care celulele funcționează atât mod normal, cât și în cazul unor afecțiuni (Chang și colab., 2015). Din punct de vedere al localizării, aceste mașini pot fi clasificate în trei categorii: proteine solubile, care se găsesc în citoplasmă sau nucleu; proteine de

membrană, găsite ancorate sau complet încorporate în diferite membrane celulare; și proteine asociate matricii extracelulare (Beck și Baumaister, 2016). Indiferent de metoda selectată pentru investigarea structurală, aceste complexe trebuie obținute într-o stare extrem de pură, fără a afecta însă structura sau funcția acestora. Ficobilisomii sunt complexe extrem de sensibile, care sunt relativ stabile într-un tampon cu tărâie ionică mare bazat pe fosfați (Gantt, 1975). Datorită cerințelor speciale de stabilitate, PBS sunt ținte dificile atât pentru analiza prin colorație negativă, cât și pentru crio-microscopia electronică. Pentru colorația negativă, dezavantajul major este prezența în concentrație mare a fosfatului, care reacționează puternic cu sărurile de uraniu formând precipitate. Pentru crio-EM, problema este reprezentată de tărâia ionică a tamponului (1 M), care împiedică formarea de gheață vitrificată, aceasta fiind similară cu starea cristalină și zaharoza. De asemenea, prezența în concentrații mari a fosfatului crește zgomotul de fond al imaginilor, ceea ce face aproape imposibilă identificarea complexelor proteice. PBS este unul dintre cele mai bune exemple de complexe supramoleculare care sunt biochimic pure, dar structural, prezintă variabilitate compozițională. Acest lucru se datorează compoziției globale a PBS, care este asamblat din subunități identice și, prin urmare, absența sau prezența uneia sau mai multor subunități identice nu pot fi identificate prin metode biochimice standard, cum ar fi electroforeza în gel de poliacrilamidă cu sodiu dodecil sulfat (SDS-PAGE).

Aici, ne-am propus să dezvoltăm și să optimizăm o metodologie de investigare a caracteristicilor structurale și funcționale ale ficobilisomilor cianobacterieni. Procesul de optimizare a urmat trei etape majore: dezvoltarea unei metode adecvate pentru purificarea PBS, optimizarea colorației negative și optimizarea procesului de vitrificare.

2. Materiale și metode

- Am folosit patru tulpini cianobacteriene diferite, *Arthrospira platensis* tulpina AICB 49, *Cronbergia* sp. tulpina AICB 1097, *Coelomoron pussillum* tulpina AICB 1012 și *Fremyella diplosiphon* tulpina UTEX 481. Acestea fiind achiziționate de la Colecția de alge și cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca (Dragos și colab., 1997). Tulpini cianobacteriene au fost alese pentru aceste investigații, datorită particularităților ficobilisomilor.
- Ficobilisomii s-au purificat utilizând două abordări: a) una presupunând dezvoltarea unui sistem apos bifazic, bazat pe fosfat de potasiu și PEG, și b) centrifugarea în gradient de zaharoză. Probele obținute prin ambele metode au fost supuse unei alte etape de purificare, și anume cromatografia de excluziune sterică.

- Puritatea PBS și integritatea funcțională au fost investigate folosind SDS-PAGE și tehnicile spectroscopice de absorbție și de fluorescență.
- Procedura optimizată de colorare negativă pentru vizualizarea PBS a fost adaptată de la Arteni și colab. (2008) cu mai multe modificări.

3. Rezultate și discuții

Pentru a explora eficacitatea purificării și concentrării PBS, utilizând un sistem apos bifazic am analizat comportamentul de partitionare a ficobiliproteinelor cianobacteriene. Este cunoscut faptul că PC tinde să migreze în faza bogată în PEG, în timp ce APC preferă faza bogată în sare (Patil și colab., 2008). Aici am evitat compartimentarea PBP individuale prin menținerea PBS în forma lor intactă, astfel concentrând și purificând parțial PBS. Toate probele au fost tratate anterior cu Triton X-114 (TX-114), sistemul apos bifazic fiind format prin adăugarea de PEG solid 10%, rezultând un raport volumic de 0,7, ceea ce indică o fază PEG concentrată (Figura III.1).

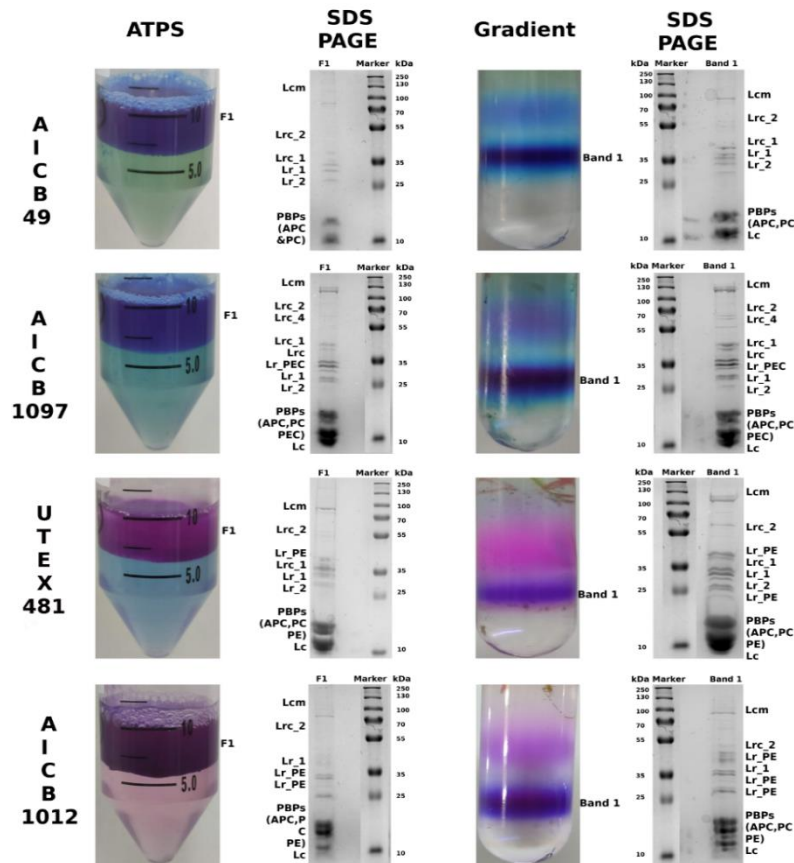


Figura III.1. Purificarea ficobilisomilor și profilurile SDS-PAGE asociate.

Parametrii pentru proiectarea ATPS, cum ar fi concentrația PEG, concentrația de sare și pH-ul au fost stabiliți pe baza diagramelor de fază găsite în literatură (Glyk și colab., 2014). În toate probele, complexe proteice vizate au arătat o afinitate ridicată pentru faza PEG. Coeficientul de partiție (K) și eficiența de recuperare a PBS, asociate cu creșterea purității, confirmă că cea mai mare parte a PBP se găsește în faza superioară. Eficiența de recuperare în *A. platensis* a fost mai mare de 97%, în timp ce pentru *Cronbergia* a fost ~ 92%. În ambele cazuri, puritatea PBP-urilor totale a crescut cu un factor de 5, în comparație cu extractul brut și cu un factor de 2 în comparație cu extractul obținut în urma tratamentului cu TX-114. Coeficientul de recuperare și partiție a PBS a fost mai mic la probele care prezintă ficoeritrina (PE), având un randament de 76% pentru *Fremyella*, în timp ce pentru *C. pusillum* randamentul a fost de 88%. Randamentul de recuperare al PBP individual în *A. platensis* și *Cronbergia*. au prezentat rezultate mai omogene în comparație cu tulpinile care conțin PE, ceea ce sugerează că PBS de la aceste tulpini este mai stabil. Deși, rata de recuperare de la *Fremyella* a fost mai mică, analiza PBP individuală a arătat că atât PE cât și PC au fost recuperate în procent de peste 90%, randamentul scăzut fiind asociat pierderii APC, probabil datorită unor interacțiuni slabe între miezul și tijele PBS. Comparând gradul de puritate al PBP individuale din eșantioanele purificate pe baza sistemului apos bifazic (ATPS_PBS) cu cele obținute prin purificarea în gradient C_PBS, am stabilit că raportul de contaminare cu proteine ce nu sunt implicate în structura PBS este scăzut (<10%). Centrifugarea în gradient fiind o metodă consacrată pentru purificarea complexelor macromoleculare mari. Similar cu ATPS, faza puternic colorată a probele tratate TX-114 a fost utilizat pentru purificarea PBS prin centrifugare. În urma centrifugării, probele au fost separate în 2 până la 3 straturi distincte. Pentru AICB 49 au existat două benzi principale, una la 1 M, care conținea PBS activ funcțional și una între 0,4 și 0,8, compuse în mare parte din ficobiliproteine individuale. În cazul tulpinilor care conțin PE și PEC, am obținut trei benzi, la 1,2 M, la 0,8 M și una între 0,4 și 0,8 M. Banda dintre și 0,4 și 0,8 a fost similară cu cea obținută pentru AICB 49, conținând în special ficobiliproteine. În cazul complexelor ce conțin PE și PEC, banda de 0,8 M nu este foarte concentrată, ceea ce face dificilă vizualizarea ei fiind formată din PBS parțial disociat. Cea mai joasă bandă (1,2 M) este compusă din PBS intactă.

Comportamentul de partiționare a tuturor eșantioanelor, obținute atât prin ATPS cât și prin centrifugarea în gradient este prezentat în Figura III.1. De asemenea, compoziția proteică, rezolvată prin SDS-PAGE, este ilustrată în aceeași figură,

Colorația negativă reprezintă o tehnică puternică pentru analiza dinamicii structurale a proteinelor la rezoluții mici. Din păcate, chiar dacă această tehnică este considerată „antică” și ușor de aplicat, succesul acesteia depinde de calitatea probei ce urmează a fi analizată. Protocoalele

convenționale de colorare negativă urmează, de obicei, trei etape principale: a) adsorbția specimenului pe o grilă EM acoperită cu carbon, care a fost anterior hidrofilizată; b) spălarea grilei pe una sau două picături de apă distilată; c) colorarea cu o soluție de metale grele. Așa cum s-a discutat anterior, datorită proprietăților particulare ale ficobilisomilor și cerințelor lor speciale de tampon, protocolul tradițional de colorare negativă nu este aplicabil. Din acest motiv, a fost necesară investigarea și optimizarea unei metode adecvate de a colora negativ PBS.

În procesul de optimizare am urmărit influența diferitelor metode de hidrofilizare a grilei asupra absorbției și orientărilor PBS; comportamentul diferitelor săruri de metale grele și capacitatea de colorare a PBS fără a afecta integritatea lor structurală; diverse metode de îndepărtare a sărurilor fosfatate precum și mai multe tipuri de grile. Alți parametri determinați experimental pentru colorarea negativă au fost timpul de expunere necesar atât pentru adsorbția și colorarea PBS, cât și pentru concentrația optimă a probei. Rezultatele obținute în urma procesului de optimizare sunt ilustrate în figura III.2.

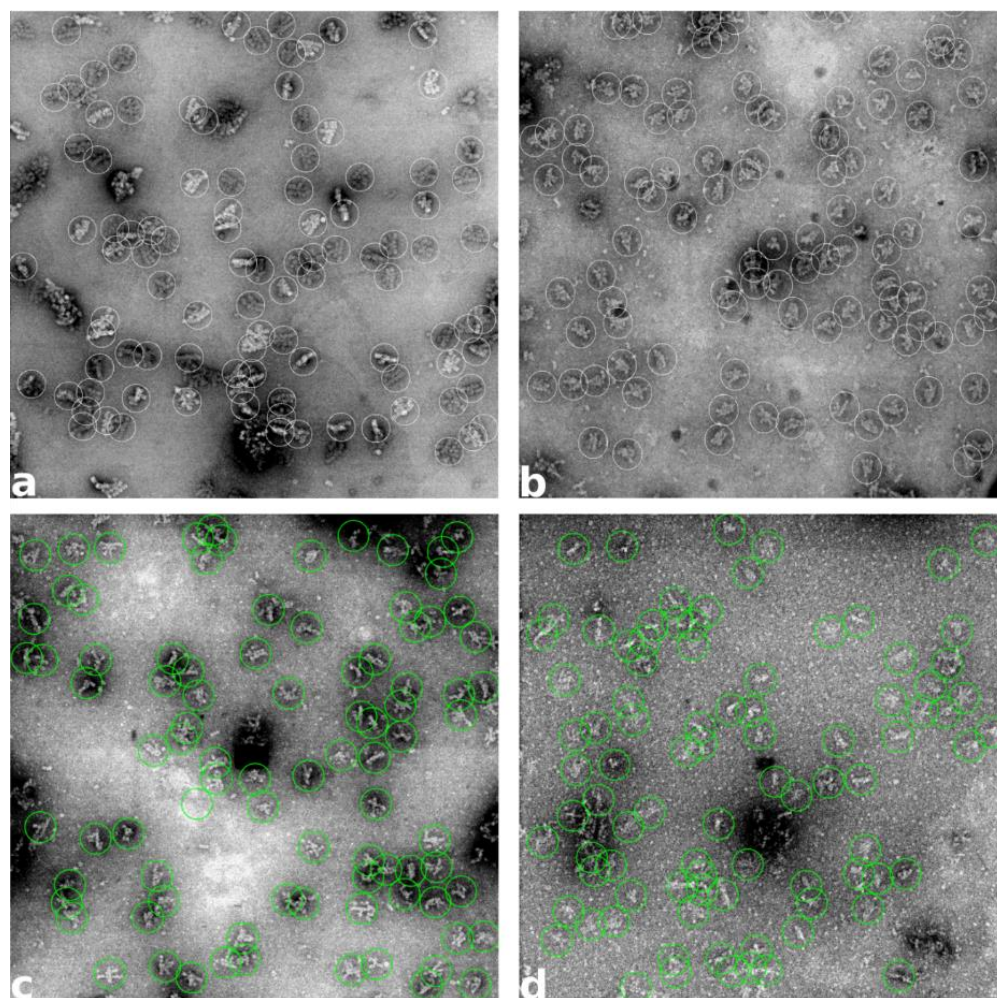


Figura III.2. Imagini ale ficobilisomilor obținute prin colorație negativă. a) *A. platensis* PBS; b) *Cronbergia* PBS; c) *C. pusillum* PBS; d) *Fremyella* PBS. Toate imaginile au fost achiziționate la o mărire nominală de 60.000x.

4. Concluzii

În studiul de față, am dezvoltat și optimizat cu succes o metodă pentru analiza ficobilisomilor cianobacterieni prin microscopie electronică de colorare negativă. Chiar dacă ATPS este o metodă rapidă și bună pentru purificarea PBS, dificultatea eliminării PEG face ca această metodă să nu fie potrivită pentru analiza prin colorația negativă. Adăugarea unei etape purificare prin cromatografie de excluziune sterică a îmbunătățit omogenitatea eșantionului cu cel puțin 30%. Procedura de colorare negativă prezentată aici poate fi aplicată oricărui specimen care este vulnerabil structural la condițiile de mediu, nu numai la ficobilisomi.

Capitolul IV. Dinamica transferului energetic în cadrul ficobilisomilor

*{Acest capitol a fost publicat parțial ca Fălămaș, A., Porav, S. A., & Tosa, V. (2020). Investigations of the energy transfer in the phycobilisome antenna of *Arthrospira platensis* using femtosecond spectroscopy. Applied Sciences, 10(11), 4045. doi.org/10.3390/app10114045}*

1. Introducere

Fotosinteza este un proces crucial, care menține viața pe Pământ prin transformarea energiei solare în energie chimică stocabilă. Acest proces are loc în organismele fototrofe precum plante, alge eucariote și cianobacterii. Conversia energiei solare depinde în mare măsură de capacitatea organismului de a capta și transfera eficient energia către centrele de reacție catalitică (Blankenship, 2014). Organismele fotosintetice au dezvoltat în timp, diferite strategii structurale pentru creșterea disponibilității de energie la nivelul centrelor de reacție fotochimic prin lărgirea spectrului de absorbție a luminii (Croce et al., 2018). Această etapă cheie în fotosinteză este realizată cu ajutorul sistemelor de tip antenă colectoare cde energie solar[formate preponderent din complexe cromofor-proteină. Complexele LHA captează și stochează energia în stările electronice excitate ale cromoforilor, care este apoi este transferată în interiorul complexului până când ajunge la cromoforii țintă din centrul de reacție (Scholes și colab., 2011). Măsurările de absorbție și fluorescență rezolvate în timp au fost folosite pentru a investiga mecanismul transferului de energie în cadrul PBP pe o scală de timp de la femtosecundă (fs) la nanosecundă (ns) (Liu și colab., 2013). Au fost propuse multiple teorii pentru dinamica ultrarapidă observată în PBP, cele mai multe implicând transferul de energie Förster bazat pe transferul rezonant al energiei între dipolii de tranziție a moleculelor donator și acceptor, ce pot avea loc la distanțe $\geq 20 \text{ \AA}$. Spectrele de absorbție ale diferitelor PBP coincid cu spectrele de excitație, astfel încât pigmentii care absorb la lungimi de undă inferioare transferă și concentrează energia la

nivelul pigmentilor cu lungimi de undă mai mari. Acest lucru este posibil numai dacă acestea din urmă se află la distanță favorabilă și prezintă orientarea corectă a momentelor dipolului.

Înțelegerea transferului de energie în ficobilisomii cianobacterieni poate fi utilă pentru construirea sistemelor hibride biomimetice în vederea optimizării procesului de colectare a energiei solare și amplificarea foto-curentului.

2. Material și metode

- Am folosit același material biologic prezentat în capitolul precedent.
- Integritatea complexelor PBS a fost evaluată folosind spectroscopia de fluorescență și SDS-PAGE.
- Dinamica transferului de energie a fost investigată prin spectroscopia rezolvată în timp utilizând atât absorbția tranzitorie cât și fluorescența rezolvată în timp. Pe scurt, eșantioanele au fost pompate cu impulsuri la 580 nm, timpii de fluorescență au fost obținuți folosind un amplificator parametric optic (Orpheus, Light Conversion) din impulsul de 1030 nm emis de un laser Yb: KGW (Pharos, Light Conversion). Impulsul a avut o durată de 170 fs și o frecvență de repetare de 80 kHz. Pentru experimentele de absorbție tranzitorie (TA), s-a obținut un impuls de sondă supercontinuu prin focalizarea a 10% din impulsul de 1030 nm într-un cristal de safir. După călătoria printr-o linie de întârziere optică, lumina transmisă prin eșantion este detectată folosind un spectrometru de 300 L / mm combinat cu un detector matriceal. Polarizarea dintre impulsurile pompei și sondă a fost setată la unghiul magic 54,7. Cinetica fluorescenței a fost investigată folosind configurația de numărare a unui foton corelat în timp (TCSPC) (CHIMERA, Light Conversion). Probele au fost excitate cu lumină polarizată vertical, iar emisia de fluorescență a fost colectată printr-un filtru cu pas lung, adecvat pentru fiecare emisie de probă și un polarizator de emisie setat la același unghi magic 54,7. Semnalul de fluorescență a fost focalizat pe fanta de intrare a unui monocromator dublu și detectat folosind un fotomultiplicator fotosensibil (Becker și Hickl PMC-100-1 standard). FWHM a funcției de răspuns a instrumentului (IRF) a fost de 340 ps. Pentru experimentele TCSPC, puterea medie a fasciculului pompei a fost de 2 mW, în timp ce pentru experimentele TA, s-au utilizat impulsuri laser de 3–4 mW.

3. Rezultate și discuții

Cinetica de fluorescență a PBS de la *Arthrospira platensis* a fost înregistrată în regiunea spectrală 645-700 nm după ce sistemul a fost pompat cu impulsuri laser la 580 nm. Datele TCSPC rezultate sunt prezentate în figura IV.4. Spectrele de emisie de fluorescență au arătat un maxim în jurul valorii de 660 nm cu o deplasare către 670 nm pentru spectrele de emisie înregistrate la intervale de

timp diferite. Cinetica fluorescenței a făcut obiectul unei analize globale, asumând un model secvențial simplu. Am presupus că energia de excitație a fost transferată între diferite specii moleculare din PBS, pe calea cea mai eficientă din punct de vedere energetic. Pentru o potrivire satisfăcătoare a modelului cinetic, fluorescența PBS necesita asumarea a două componente spectro-cinetice. A fost detectată o componentă scurtă în intervalul IRF al sistemului nostru și o componentă lungă de 1,77 ns. EAFS rezultat a arătat maxime la 655 nm și, respectiv, 668 nm.

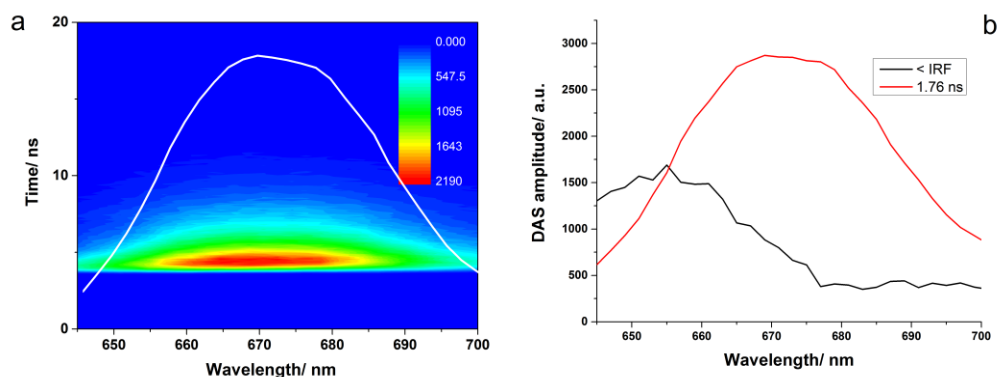


Figura IV.4. a) Spectrul 3D TCSPC înregistrat pentru PBS (AICB 49) excitat la 580 nm. Spectrul alb corespunde spectrului de emisie de fluorescență în stare constantă; (b) EAFS obținut în urma analizei globale.

Prima componentă a arătat o amplitudine mai mică în comparație cu cea de-a doua, ceea ce ar putea indica un randament mai mic indus de transferul de energie excitațională către emițătorul terminal. Mai mult decât atât, maximul componentei scurte EAFS a fost observat la 655 nm și s-a potrivit cu emisia de fluorescență maximă a PC, dar și cu EAFS-ul scurt obținut în unele probe de APC. Prin urmare, această componentă cinetică poate fi asociată PC sau unei forme spectrale de PCB în APC, care are rolul de a transfera energia către emițătorul terminal din APC. Rezultatele obținute se integrează bine cu datele prezente în literatura. Rezultate similare fiind raportate de van Stokkum și colab., (2018) pentru PBS de la tulpina de *Synechocystis* PCC 6803, acesta alocând vârfurile de la 649 și 660 nm la PC 650 și APC 660.

În continuare am aplicat spectroscopie de absorbție rezolvată în timp pentru a reliefa procesele de transfer de energie în cadrul PBS și pentru a identifica timpii de decadentă ultrarapida. Semnalul de absorbție a diferenței de absorbție rezolvată în timp a fost detectat pe o gamă largă de lungimi de undă de la 475 la 750 nm. Figura IV.2 prezintă spectrele de absorbție diferențială obținute la diferite momente de timp, utilizând o excitație a PBS la 580 nm. O stingere a stării excitate, centrată la 624 nm a apărut imediat în urma excitației laser, în primele 400 fs. Concomitent, au fost observate două benzi de absorbție pozitive, una mai mică în intervalul spectral 470-550 nm și una mai puternică în intervalul spectral de 650-700 nm. Această din urmă bandă raportată în literatura de specialitate ca

fiind absorbția PC aflată în stare excitată, concomitent cu banda de întoarcere la starea inițială (Theiss și colab., 2008).

Prima banda de absorbție prezintă o dinamică asemănătoare cu cea de albire, în timp ce următoarea a scăzut în limita a 1-100 ps, devenind apoi negativă și în final apropiindu-se de starea inițială. Un studiu mai recent realizat de Niedzwiedzki și colab. (2019) pentru componentele PBS de la *Acaryochloris marina*, sugerează că din moment ce această banda pozitivă din intervalul 650-700 nm se descompune mai repede decât cea înregistrată în intervalul 470-550 nm nu poate fi atribuită unei absorbții în stare excitată, fiind asociată în schimb unui răspuns electrochromic temporar al ficocianobilinelor aflate într-o stare inițială similară cu cea excitată. După atingerea maximului, banda de absorbție a început să scadă, iar vârful a migrat la 633 nm până având o întârziere de 100 ps.

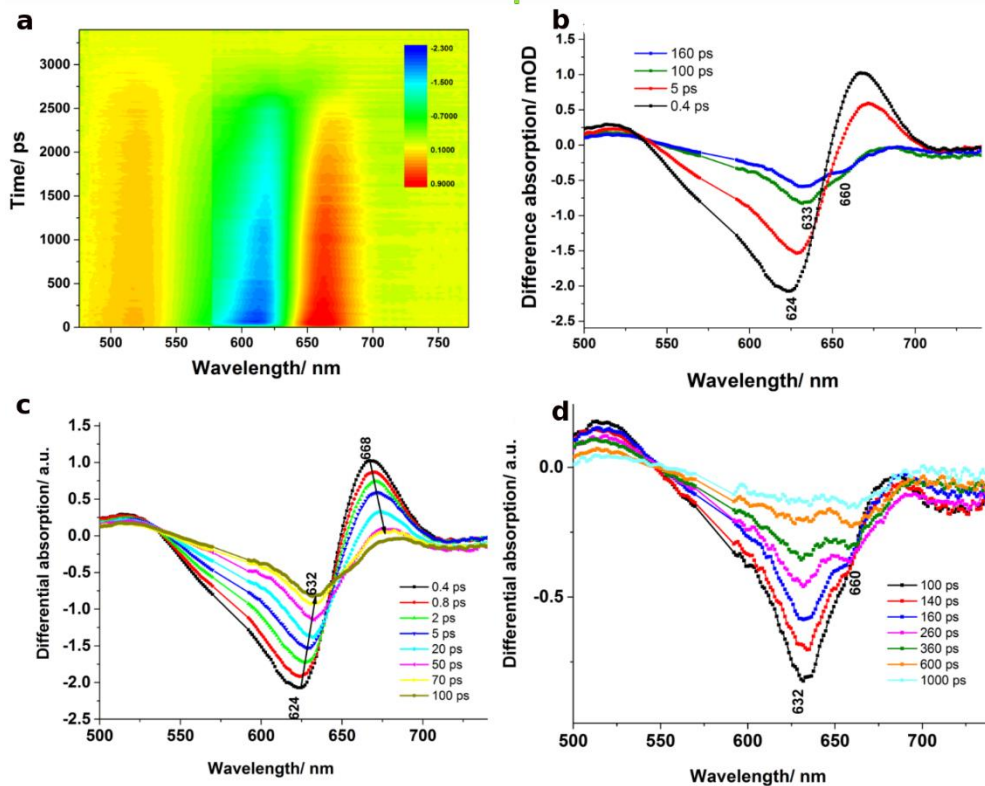


Figura IV.2. a) Spectrul 3D obținut pentru PBS (AICB 49) pompat la 610 nm, b) spectre de absorbție tranzitorii ale PBS care arată întoarcerea la starea inițială și c) evoluția spectrelor de diferență asociate, rezultate în urma analizei globale și d) cinetica de absorbție împreună cu potrivirile obținute.

Prima banda de absorbție prezintă o dinamică asemănătoare cu cea de albire, în timp ce următoarea a scăzut în limita a 1-100 ps, devenind apoi negativă și în final apropiindu-se de starea inițială. Un studiu mai recent realizat de Niedzwiedzki și colab. (2019) pentru componentele PBS de la *Acaryochloris marina*, sugerează că din moment ce această banda pozitivă din intervalul 650-700 nm se descompune mai repede decât cea înregistrată în intervalul 470-550 nm nu poate fi atribuită

unei absorbții în stare excitată, fiind asociată în schimb unui răspuns electrochromic temporar al ficocianobilinelor aflate într-o stare inițială similară cu cea excitată. După atingerea maximumului, banda de absorbție a început să scadă, iar vârful a migrat la 633 nm până având o întârziere de 100 ps.

Investigații similare au fost efectuate asupra ficobilisomilor purificați din celelalte trei tulpini cianobacteriene, și anume *Coelomoron pussilum* AICB 1012, *Cronbergia* sp. AICB 1097 și la *Fremyella diplosiphon* UTEX 481. Spațiul limitat, precum și faptul că rezultatele obținute pentru cele trei tulpini cianobacteriene menționate mai sus nu au fost publicate, ne-au determinat să nu includem rezultatele în acest rezumat, acestea fiind detaliate în teză.

4. Concluzii

Lucrarea de față descrie cinetica și dinamica ultrarapidă a transferului de energie în ficobilisomii extrasi de la patru tulpini cianobacteriene, și anume *Arthrospira platensis* AICB 49, *Coelomoron pussilum* AICB 1012, *Cronbergia* sp. AICB 1097 și *Fremyella diplosiphon* sp. UTEX 481. Rezultatele obținute pentru *A. platensis* sunt în conformitate cu cele raportate în literatura de specialitate pentru alte tulpini de *Arthrospira platensis* dar și de *Synechocystis* sp., acesta prezentând o compoziție similară a ficobilisomului. În cadrul acestui capitol prezentăm pentru prima dată comportamentul dinamic al transferului de energie, probat prin spectroscopie rezolvată în timp, între componentele PBS provenind de la *Coelomoron pussilum* AICB 1012 și *Cronbergia* AICB 1097. Datorită imensității și complexității ficobilisomii, există probabil mult mai multe interacțiuni între cromofori și deci o dinamică de transfer energetic mai complexă, dar datorită limitărilor infrastructurii existente nu pot fi identificate.

Capitolul V. Componente structurale fitobilizomice și modelare de omologie.

1. Introducere

Modelele atomice ale proteinelor sunt esențiale pentru înțelegerea mecanismelor moleculare ale proceselor biologice. În ultimii 20 de ani, numărul structurilor determinate experimental a crescut exponențial de la 13.589 în 2000, la peste 165.400 în mai 2020, în mare parte datorită avansului tehnologic atât în cea ce privește componenta hardware cât și cea software (Marks și colab., 2012). Chiar dacă numărul structurilor proteice disponibile a crescut substanțial, tehnologia de secvențare a evoluat de asemenea, într-un mod drastic, rezultând un număr uriaș de genomuri secvențiate. În consecință, decalajul dintre structura și secvențe proteice disponibile a crescut enorm (Marks și colab., 2012). Pentru a face față acestei discrepante, au fost dezvoltate metode computaționale pentru

prezicerea și modelarea structurii 3D a proteinelor monomerice dar și a complexelor. Metodelor de predicție a structurii 3D prezintă deficiențe majore în cea ce privește acuratețea, acestea fiind o consecință directă a informațiilor structurale experimentale disponibile în momentul de față. Cea mai mare parte a cunoștințelor structurale fiind furnizate de cristalografia cu raze-X, o tehnică care este capabilă să ofere informații doar despre o singură conformație a proteine, conformație ce este susceptibilă cristalizării. În domeniul EM, deși s-au făcut avansuri tehnologice substanțiale, devenind o rutină obținerea unor rezoluțiilor apropiate de cele atomice (2-5 Å), pentru proteine globulare și complexe stabile, este nevoie pentru construcția modelului 3D de cunoașterea inițială a anumitor informații esențiale, cum ar fi secvența proteinelor, caracteristicile 2D și chiar structuri omologe (Elmlund și Elmlund, 2017).

Scopul acestui capitol a fost identificarea tuturor componentelor structurale ale ficobilisomilor din trei tulpini cianobacteriene (*A. platensis* AICB 49, *Cronbergia* sp. AICB 1097, *C. pussilum* AICB 1012) și obținerea structurii lor 3D prin predicție structurală pe bază de omologie. Pentru a realiza acest lucru, am secvențiat și adnotat genomele cianobacteriene, proteinele asociate ficobilisomului fiind extrase pe baza pe secvențelor cunoscute din literatură și bazele de date publice, urmate de o predicție a structurii lor folosind mai multe pachete software.

2. Material și metode.

- *Tulpini de cianobacterii: A. platensis* AICB 49, *Cronbergia* sp. AICB 1097 și *C. pussilum* AICB 1012 au fost crescute așa cum au fost descrise anterior.
- *Izolarea genomică a ADN-ului:* izolarea gDNA a fost realizată folosind kit-ul ZR Soil Microprobe ADN MiniPrep™ (Zymo Research, Irvine, CA, SUA), conform protocolului recomandat de producător. Proba ADN obținută a fost cuantificată spectrofotometric la NanoDrop 2000 (ThermoScientific, SUA).
- Secvențierea genomului tulpinilor cianobacteriene a fost efectuată folosind tehnica de secvențiere “Shotgun” pe o platformă Illumina Novaseq 6000 (Novogene, HongKong, China). Librăriile genomice brute Illumina (cuprinzând între 9 și 13 milioane de secvențe) au fost prelucrate în prealabil pentru a elimina secvențele de adaptare precum și cele ce prezentau o calitate scăzută folosind pachetul bbmap. Ulterior, programul bbdut.sh a fost utilizat pentru identificarea și îndepărtarea posibilă a contaminării cu PhiX și p-Fosil2 ($k = 21$ ref = vector file ordered cardinality). Contig-urile obținute (3 seturi de date), cu lungimi mai mari de 2 kb, au fost utilizate pentru predicția genelor care codifică proteine cu PRODIGAL v2.6.3.

- **Predicția structurii:** Secvențele componentelor proteice ale fitobilisomilor a fost preluată din genomurile secvențiate și folosite ca ținte pentru căutarea șabloanelor. Cele mai bune șabloane, cu cel mai mare scor de calitate și cel mai bun procent de identitate globală (GI), au fost utilizate pentru modelarea structurilor tridimensionale atât cu serverul Phyre2 (Kelley et al., 2015) cât și cu serverul Swiss-Model (Waterhouse et al., 2018) folosind setările implicite.
- **Calitatea modelelor de proteine** obținute a fost estimată pe baza parametrilor statistici ai Global Model Quality Estimation (GMQE) și a Quality Model Energy Analysis (QMEAN). De asemenea, cel mai bun model obținut pentru fiecare proteină a fost supus analizei de tip Ramachandran utilizând programul Rampage.

3. Rezultate și discuții

Structura și compoziția PBP a fost studiată pe scară largă în ultimii 25 de ani, fapt dovedit de numărul relativ mare de structuri disponibile în PDB. Așa cum se arată în figura V.1, gradul de omologie între subunități ale aceluiași PBP de la specii diferite este foarte mare. Compararea lor cu structurile cristalografice disponibile au arătat o similaritate structurală ridicată. Astfel, pentru modelarea subunităților PBP am folosit șablonul 1HA7 de la *A. platensis* găsit în PDB. Toate subunitățile PBP au fost modelate cu confidență de 100%, având o acoperire secvențială cuprinsă între 95% pentru AICB 1012 până la 100% pentru AICB 49. Analiza structurii secundare a subunității α a relevat că ~ 60% din structură este formată din motive alfa helix, în timp ce restul polipeptidei este compus din regiuni dezordonate, de obicei întâlnite între helix-urile alfa (Figura V.1).

Subunitatea β este formată din 6 motive de tip alfa helix, care însumează 70% din proteină. Similar cu subunitatea α , restul subunității β este reprezentat de regiuni dezordonate. Foițele beta nu se întâlnesc la nici o subunitate a ficobiliproteinelor. Cele mai conservate regiuni din ambele subunități sunt domeniile de legare a bilinei. Toate polipeptidele PBP au aceeași structură, asemănătoare cu o penă, ceea ce indică un grad ridicat de conservare structurală între ele.

Polipeptidele de legătură au un rol crucial în asamblarea ficobilisomului, formând scheletul ce ghidează procesul. Până de curând (Zhang și colab., 2017), datorită instabilității lor, au existat doar câteva structuri experimentale, determinate în mare parte cristalografic sau prin spectroscopie RMN. De asemenea, au fost disponibile doar structuri pentru au fost pentru peptidele de legătură mici, asociate APC și PC. Odată cu publicarea structurii PBS de la *G. pacifica* de Zhang și colab. (2017), informațiile structurale despre structurile peptidelor de legătură au fost extinse, facilitând astfel predicția structurii 3D a acestora cu o confidență mare. Am constatat că miezul PBS de la fiecare tulpină studiată are doar un linker asociat APC (ApcC). Modelul 3D a fost prezis folosind șablonul de

la *M. laminosus*, având codul de identificare 1B33. Structura secundară este compusă din două foișțe beta (24%) și două motive alfa helix (46%). Procentul ridicat al regiuni dezordonate face ca structura să fie extrem de flexibilă.

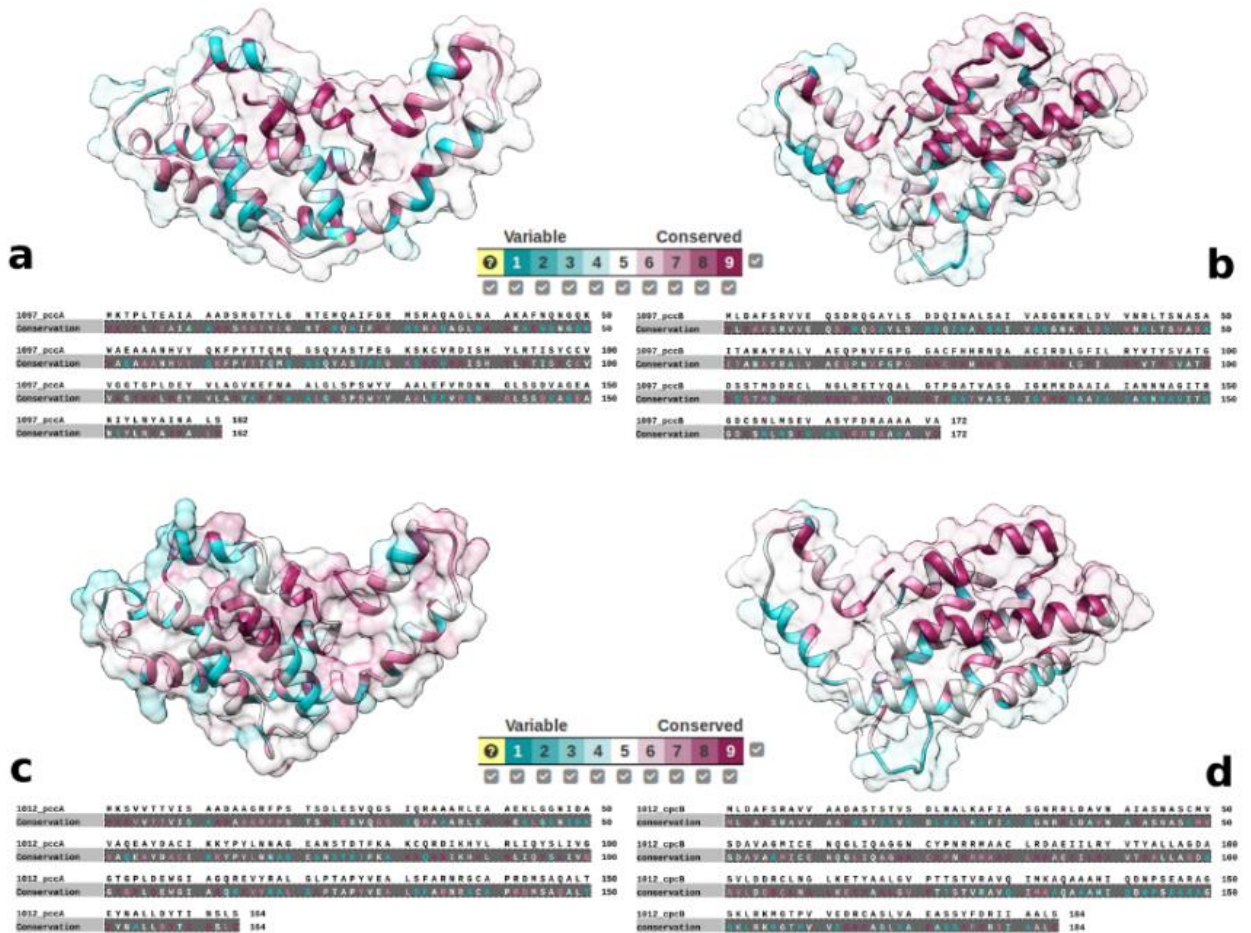


Figura V.1. Modele 3D de ficobiliproteine, colorate în funcție de gradul de conservare. a) PEC-subunitate PEC; b) subunitatea PEC; c) subunitatea PE α ; d) subunitatea PE β

Analiza compoziției structurale a polipeptidelor de legătură asociate tijelor a evidențiat prezența domeniului pfam PF01383 cunoscut și sub denumirea de domeniu CpcD (Figura V.4). Peprida de legatură specifică PC (CpcD2) a fost modelat folosind același șablon ca la ApcC. Comparativ cu linkerul APC, CpcD2 are mai multe foișțe beta (5) și doar un alfa helix. Regiunile dezorganizate acoperă mai mult de 50% din întreaga proteină. Prezența aceluiași domeniu (PF01383), sugerează importanța acestuia în asamblarea hexamerică a PBPs. Peptidele de legatura de dimensiuni mari specifici fiecărei ficobiliproteine au fost modelați pe baza șabloanelor linkerilor extrași din structura PBS de la *G. pacifica* (5Y6P) (Zhang și colab., 2017) și *P. purpureum* (6KGX) (Ma și colab., 2020). Identitatea secvenței dintre proteinele țintă și șabloane a fost relativ scăzută (~ 35%), dar

combinând șabloanele am acoperit aproximativ 90% din structură, în timp ce restul proteinei a fost modelat *de novo*. Investigația structurală a arătat o topologie similară pentru toate peptidele mari asociate tijelor, indiferent de ficobiliproteină cu care interacționează. Practic, fiecare dintre ele are un domeniu PF00427 în partea N-terminală în timp ce aproape de capătul C-terminal se regăsește parțial domeniul PF01383. Peptida de legătură asociată PC se regăsește în toate cele trei tulpini de cianobacterii, în timp ce peptidele asociate PEC doar la AICB 1097 iar peptidele de legătură specifice PE doar la AICB 1012. În ciuda faptului că secvențele prezintă o identitate scăzută, aceeași organizare structurală a fost descrisă pentru toate polipeptidele specifice ficobiliproteinelor ce compun tijele.

4. Concluzii

Modelarea omologiei este un instrument de calculațional puternic pentru analiza structurilor 3D ale proteinelor, ce exploatează restricția evolutivă ce presupune că structura suferă modificări mai lente decât secvența. Prin secvențiere și asamblarea genomurilor tulpinilor cianobacteriene utilizate în această lucrare, am identificat și extras secvențele fiecărui component structural al PBS. Fiecare tulpină are propriile sale particularități PBS, deși prezintă aceeași arhitectură. Aici, prezentăm pentru prima dată compoziția moleculară a ficobilisomului de la tulpinile *Cronbergia* sp. AICB 1097 și *Coelomoron pussilum* AICB 1012. Numărul de proteine unice ce participă în calitate de component structural în asamblarea PBS variază între tulpini. Fiecare ficobiliproteină are polipeptidele sale unice de legătură care, chiar dacă nu prezintă omologie înaltă a secvențelor, au o structură aproape identică. Analiza de conservare structurală a arătat un grad ridicat de similaritate între componentele PBS de la diferite tulpini.

Capitolul VI. Flexibilitatea conformațională a ficobilisomilor.

1. Introducere

Proteinele sunt elementele de bază ale fiecărei căi metabolice găsite în celulele vii. Îndeplinirea funcției lor este strâns legată de dinamica și capacitatea lor de a interacționa și de a se adapta la semnalele interne și externe. Majoritatea proteinelor își îndeplinesc funcția specifică în asociere cu alte proteine, formând complexe macromoleculare extrem de organizate. Adaptarea structurală la o anumită funcție poate fi de natură compozițională sau de natură conformațională.

În ciuda a numeroase încercări de a rezolva structura PBS atât de la cianobacteriene cât și de la alge roșii, există doar două structuri de înaltă rezoluție a PBS, ambele aparute recent și doar de la alge roșii acestea fiind disponibile în PDB sub codurile 6KGX- *P. purpureum* (Ma et al., 2020),

5Y6P- *G. pacifica* (Zhang și colab., 2017). De asemenea exista și trei structuri cu rezoluție mică ale PBS cianobacteriene depuse în Banca de Date de Microscopie Electronică (EMDB) sub următoarele coduri: EMD-2821 - tulpină *Anabaena* sp. PCC 7120 (Chang și colab., 2015), EMD-6430-*Halomicronema hongdechloris* (Li și colab., 2016) și EMD-4601 - *Synechosystis* sp. PCC 6803 (Rast și colab., 2019). Paradoxal, chiar dacă cel mai comun PBS este cel de tip hemidisoid , aceasta fiind și cea mai studiată structură, structurile de înaltă rezoluție disponibile, descriu forma PBS de tip bloc (5Y6P) (Zhang și colab., 2017) și forma de tip hemielipsoidală (6KGX) (Ma și colab., 2020). În mod controversat, deși toate formele PBS de formă hemidisoidă prezintă aceleași compartimente organizatorice, miezul și tijele, structurile model propuse, bazate pe analizei prin microscopie electronică, sunt extrem de versatile. Diversitatea modelului 3D nu vizează doar numărul de tije sau al cilindrilor ce formează miezul, ci și distribuția tijelor, distanțele și unghiurile dintre acestea.

În contextul prezentat, obiectivul principal al acestui capitol a fost investigarea flexibilității ficobilisomului și originea acesteia. Pentru o abordare cât mai completă a acestei probleme, am ales să utilizăm o combinație de trei metode distincte, fiecare având propriile particularități, și anume: microscopie electronică prin colorare negativă, analiza imaginii și simulări ale dinamicii moleculare. Pentru a asigura o acoperire optimă de a tipurilor de PBS, am ales să investigăm cele trei tulpini cianobacteriene care prezintă o compoziție diferită a PBP, și anume *A. platensis* AICB 49, *Cronbergia* sp. AICB 1097 și *C. pussillum* AICB 1012.

2. Material și metode

- Prepararea probei de ficobilisome pentru analiza EM prin colorație negativă a fost realizată într-o manieră similară cu cea descrisă anterior.
- *Achiziție de imagini:* probele PBS au fost examinate cu un microscop electronic de transmisie prin scanare HD-2700 (Hitachi High-Tech, Tokyo, Japonia), operat la 200 kV. Micrografiile ficobilisomilor de la AICB 49 au fost înregistrate cu DigiscanII (Gatan Inc., Pleasanton, CA) la o dimensiune fizică de 2048x2048 și o mărire nominală de 80 k, rezultând o dimensiune a pixelilor la nivelul probei de 4,1 Å. Micrografiile ficobilisomilor de la AICB 1097 și AICB 1012, au fost înregistrate cu același sistem, dar la o dimensiune de 4096x4096 și o mărire nominală de 60 k, ceea ce a dus la o dimensiune de pixelilor de 4 Å. Pentru fiecare tulpină, am colectat 200 de micrografii în vederea identificării tipurilor morfologice de PBS. După o analiză preliminară am ales să achiziționăm în continuare 1.100 de micrografii pentru ficobilisomii de la AICB 49.

- *Analiza imaginii:* Micrografiile au fost procesate în pachetele software cryoSPARC (Punjani et al., 2017) și Relion (Scheres, 2012). Funcția transferului de contrast (CTF) a fost estimată și corectată folosind programul CTFFIND4 (Rohou & Grigoriev, 2015). Pentru fiecare set de date am ales manual 2.000 de particule (în jur de 20 de micrografii) care au fost folosite pentru a antrena o rețea neuronală în CrYOLO (Wagner și colab., 2019). Particulele culese au fost împrejmuite și extrase din imaginii în pătrate de 600 Å. Particulele extrase au fost supuse mai multor runde de clasificare 2D nesupravegheate, în Relion, cu scopul de a curăța setul de date de artefacte, particule agregate sau deteriorate. Clasificarea 3D a fost realizată cu setări standard, dar restrângerea numărului de clase la număr de cinci. Rafinarea structurii s-a repetat de 3 ori iar sablonul utilizat ca model inițial a fost filtrat „low-pass” la 60 Å înainte de fiecare iterație.
- *Analiza flexibilității:* variabilitatea conformațională ridicată a tijelor ficobilisomilor de la AICB 49 ne-a determinat să evaluăm flexibilitatea proteinelor de legătură responsabile de interacțiunea tijelor cu miezul. Modelele 3D a polipeptide de legătură au fost supuse analizei de flexibilitate în serverul CABS-flex 2.0 (Kuriata și colab., 2018). Acest program folosește simulări de dinamică moleculară de tip atomistic având diferite seturi de restricții pentru a evalua fluctuația proteinelor, în final fiind raportate cele mai bune modele de convergență. Setările de configurare utilizate pentru aceste simulări au fost modul SS2 cu o valoare a diferenței de 3, restricții minime și maxime de 3, respectiv 8. Am folosit 100 de cicluri la o temperatură medie (1,4) și traiectoriile au fost salvate la fiecare 10 cicluri. Modelele care prezintă o mobilitate ridicată au fost investigate în continuare simulări de dinamică moleculară îndelungate de tip “Corse Grained” folosind serverul UNRES (Czaplewski et al., 2018).

3. Rezultate și discuții

Grilele care conțin PBS colorate negativ de la AICB 49 au fost supuse unei runde de „screening” vizual la microscop, pentru a identifica cele mai bune probe în ceea ce privește distribuția PBS și calitatea colorației. La final, două grile au fost selectate pentru achiziția manuală a 1.100 de micrografii. În comparație cu partea de screening, unde am ales manual toate particulele, aici am ales manual particule din 20 de micrografii și le-am folosit pentru a antrena o rețea neurală în crYOLO în vederea prelevării automate a particulelor. Prin utilizarea modelului instruit, am obținut 95,745 particule, rezultând o valoare medie de 87 de particule per micrografie. O schemă de curățare ca în etapa de screening a fost aplicată cu modificări minore. Pentru a ne asigura că majoritatea particulelor ce prezintă defecte sunt ușor de distins, am împărțit particulele în zece stive egale și am efectuat trei pași iterativi de clasificare 2D fără referință, cerând 250 de clase rezultând aproximativ 40 de particule

pe clasă. După îndepărtarea fiecărei clase din fiecare stivă de particule care nu arăta caracteristici clare de proteine, particulele rămase au fost reunite într-o singură stivă și au fost supuse unei alte etape de curățare folosind ca restricție 100 de particule pe clasă. După această procedură am îndepărtat peste 50% din particulele, rezultând o stivă finală de 42.420 particule bune. Această stivă a fost utilizată în continuare pentru analiza flexibilității.

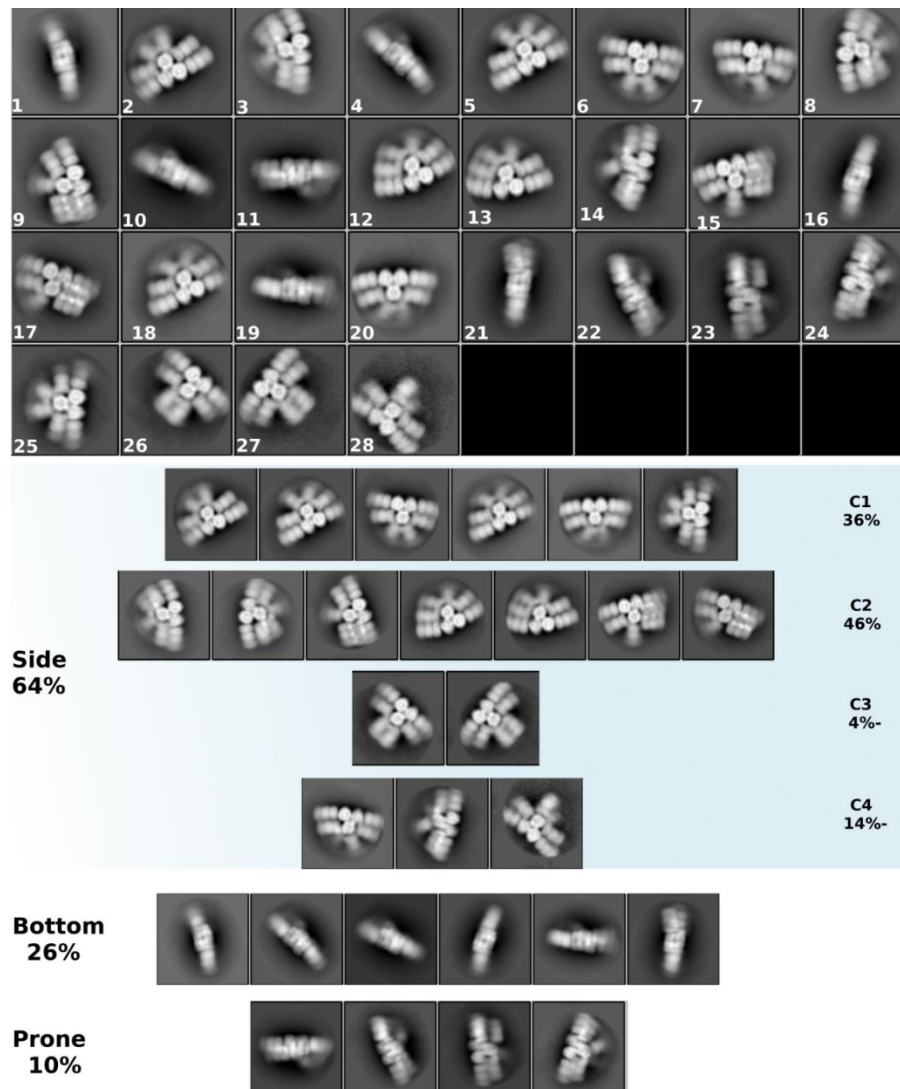


Figura VI.1. Clasele 2D de obținute pentru ficobilisomi de la AICB 49, reprezentând diverse orientări a tijelor superioare. Un pătrat are 80 nm.

Figura VI.1 prezintă clasele 2D obținute din setul de date curat. După cum se poate observa, sunt prezente mai multe conformații, cea mai mare parte a variabilității structurale fiind situată la nivelul celei de-a treia pereche de tije (perechea superioară). Pe baza distribuției unghiulare a acestei perechi de tije, am identificat patru conformații diferite. Datorită faptului că variabilitatea unghiulară

poate fi observată pe clase care ilustrează o proiecție laterală a PBS, doar aceste clase au fost împărțite în funcție de conformațiile identificate și îmbinate într-o singură stivă de particule reprezentativă pentru fiecare din cele patru conformații. Aceeași procedură a fost aplicată atât pentru orientarea de jos, cât și pentru cea oblică. În total, am obținut 28 de clase din care 18 au fost proiecții laterale diferite, 6 proiecții inferioare și 4 reprezentate de proiecții oblice. Proiecțiile laterale reprezintă 64% din stiva de particule finale, în timp ce partea inferioară și oblică reprezentau doar 26%, respectiv 10%. După cum s-a menționat mai sus, clasele cu orientare laterală au fost împărțite în patru conformații (C1-4) după cum urmează: C1: clasa 2, 5, 6, 18, 20, 25; C2: clasa 3, 8, 9, 12, 13, 15, 17; C3: 26, 27; C4: 7, 14, 28. Particulele nu au fost distribuite uniform între cele 4 conformații, primele două conformații fiind populate cu mai mult de 80% din totalul particulelor ce reprezintă proiecții laterale. Cea mai slab reprezentată a fost a treia conformație, doar 4%, în timp ce a patra conformație reprezintă 14%.

Flexibilitatea extrem de localizată la interfața dintre miez și perechea de tije superioare ne-a făcut să postulăm că una dintre peptidele de legătură dintre tijă-miez (Lrc) identificate în genom poate juca un rol cheie. Această teorie a fost consolidată de datele găsite în literatură, ceea ce sugerează că ficobiliproteinele au o flexibilitate redusă. Conform lui Su et al., (2017), PC în ambele forme, trimeric și hexameric, prezintă o flexibilitate redusă, fluctuația reziduurilor fiind de aproximativ 1 Å. Pentru o abordare comprehensivă a problemei de flexibilitate, am utilizat structura 3D a peptidelor de legătură (CpcG) de la cele trei tulpini cianobacteriene caracterizate în capitolul precedent (V), pentru a realiza simulări de dinamică moleculară prin două pachete software complementare, CABS-flex și UNRES. Indiferent de programul folosit, înainte derularea simulării am efectuat, pentru fiecare structură proteică, o etapă de minimizare a energiei timp de o ns. Pe baza simulării dinamicii moleculare efectuate aici, am arătat că proteina de legătură CpcG2 prezintă o flexibilitate mai mare decât proteina de legătură CpcG1, atât în domeniile C-cât și N-terminale.

Mai mult, am încercat să evidențiem flexibilitatea tijeii în 3D prin aplicarea mai multor runde de rafinare heterogenă având diferite șabloane ca punct de pornire. Pentru obținerea șabloanelor care ilustrează poziții diferite pentru perechea de tije flexibile, am utilizat aceleași stive de particule folosite pentru evidențierea mișcării tijeii în 2D. Acestea au fost utilizate pentru a genera modelele inițiale printr-un proces de reconstrucție *ab-initio*. După o rundă de clasificare 3D, sau obținut cinci modele 3D, ce au fost utilizate la rândul lor ca șabloane pentru rafinarea heterogenă a stivei de particule curate. Folosind această abordare, am reușit să obținem 15 modele PBS, fiecare arătând o localizare arhitecturală diferită a perechii de tije superioare. În unele cazuri, modelele nu prezintă tije cu lungime completă, probabil datorită numărului redus de particule care ilustrează proiecția specifică. Cu toate

acestea, chiar dacă densitatea tijei este redusă, este suficient să deducem orientarea lor. Așa cum era de așteptat, perechea de tije superioare a AICB 49 PBS dezvăluie o mișcare amplă a acestora.

4. Concluzii

În studiul de față am utilizat o abordare hibridă, combinând microscopia electronică cu dinamica moleculară, pentru a investiga caracteristicile structurale ale ficobilisomului cianobacterian. Prin urmare, aici prezentăm pentru prima dată un model 3D pentru ficobilisom hemidiscoidal clasic de la *A. platensis*. Ficobilisomul de la AICB 49 este caracterizat printr-un miez tri-cilindric din care radiază șase tije. Rezultatele noastre au arătat, contrar cunoștințelor anterioare, că PBS poate adopta în cadrul aceleiași tulpini mai multe conformații, datorită flexibilității tijelor. Folosind dinamica moleculară, am confirmat că anumiți proteine de legătură caracteristice interacțiunii dintre miez și tije au flexibilitate ridicată, fiind candidații perfecți pentru a efectua mișcările ample ale tijelor. Mai mult, în timpul procesului de screening, am reușit să stabilim organizarea structurală a PBS atât de la *Cronbergia* AICB 1097 (hemidiscoidal cu opt tije) cât și *C. pussillum* AICB 1012 (PBS hemidiscoidal cu șase tije).

Capitol. VII. Analiza crio-EM a ficobilisomilor de la *Arthrospira platensis*

1. Introducere

Inovațiile recente în domeniul crio-EM au transformt această metodă de la o tehnică descrisă ca și „blobologie” (datorită rezoluției mici la care se obțineau modelele 3D) în metoda preferată pentru abordarea caracteristicilor structurale cu rezoluție atomică a complexelor macromoleculare dinamice mari, ce sunt intangibile pentru tehnicilor structurale convenționale, cum sunt cristalografia cu raze-X sau RMN. Determinarea structurii acestor complexe este esențială pentru elucidarea secretelor funcțiilor metabolice cheie, cum ar fi transcripția, traducerea, splicingul, transportul de electroni, transportul intra și celular sau chiar fotosinteza. De obicei, procesul fotosintetic este realizat de supracomplexe mari, formate prin asocierea centrelor de reacție fotochimice cu antenelor colectoare de energie solară. Eficiența fotosintetică ridicată este strâns corelată cu capacitatea antenelor proteice de a recolta și furniza fotoni centrelor de reacție. Mecanismul molecular al transferului energetic este încă neclar, în ciuda faptului că a fost intens studiat (Mirkovic și colab., 2017). Majoritatea studiilor structurale, care investighează LH) sunt axate pe cele de mici dimensiuni în a căror componență intră doar cromofori de tipul cloroflei, precum cele găsite la plante superioare și în bacteriile fotosintetice anoxigenice.

Înțelegerea complexității și funcțiilor complexelor fotosintetice și supercomplexelor, va ajuta în cele din urmă la proiectarea și construirea de dispozitive bio-mimetice care să asigure un aport energetic curat și stabil, contribuind astfel la rezolvarea uneia dintre provocările centrale ale secolului XXI. Astfel, în acest capitol ne-am propus să investigăm structura ficobilisomilor cianobacterieni la o rezoluție apropiată celei atomice utilizând microscopia electronică criogenică.

2. Material și metode

- Verificarea integrității ficobilisomilor prin colorație negativă a fost efectuată în modul descris anterior în capitolul III.
- *Pregătirea eșantionului Cryo-EM și colectarea datelor:* O metodă hibridă, similară cu cea utilizată pentru colorarea negativă pentru investigarea crio-EM a PBS. Aceasta a fost cuplată cu metoda de analiză a particulelor singulare. Pe scurt, 4 μ l de probă ce conține PBS proaspăt purificat la concentrație de 0,2 mg / ml, a fost adsorbită pe un film de carbon de tip „lacey” susținut de un film de carbon continuu ultrasubțire. Filmul de carbon a fost hidrofilizat anterior depunerii probei timp de 30 de secunde folosind un PELCO easiGlow™. Vitrifierea probei s-a efectuat cu Vitrobot Mark IV (FEI Company) la umiditate de 100% folosind un timp de sugativare de 6 s (hârtie de filtru Whatman fără cenușă nr. 1), cu o forță de presare egală cu 6. În urma acestui proces grilele au fost imersate rapid în etan lichid. Grilele astfel vitrificate au fost încărcate într-un microscop electronic de tip G2 Titan Krios (compania FEI) echipată cu un detector direct de electroni FALCON III (Astbury Biostructure Facility, Leeds, Marea Britanie). Microscopul a fost operat la 300 kV la o mărire nominală de 75 k. Software-ul EPU a fost utilizat pentru a crea o mediul de colectare automată microgafiilor pe o perioadă de 96 de ore, care a dus la achiziția a 13,635 de micrografii cu o dimensiune nominală a pixelilor de 1.065 Å. Microgafiile au fost achiziționate la un timp de expunere de 1,5 sec., având o doză totală de 74,4 e / Å² distribuită de-a lungul a 59 de fracții, ceea ce a dus la o doză pe fracție de 1,26 e / Å². Intervalul de defocalizare a fost stabilit între -1 și -3,5 μ m.
- *Procesare imagini:* Întregul flux de lucru de a fost efectuat în cadrul pachetelor software cryoSPARC v2.15 (Punjani et al., 2017) și Relion 3.0 (Scheres, 2012; Zivanov și colab., 2018), cu excepția cazurilor în care s-a specificat altfel. MotionCor2 (Zheng și colab., 2017) a fost utilizat pentru corectarea mișcării induse de fasciculul, în timp ce parametrii CTF au fost estimați folosind software-ul CTFFIND4 (Rohou și Grigorief, 2015). Identificarea automată a particulelor s-a realizat utilizând două abordări, prima a presupus instruirea unei rețele neuronale în crYOLO

(Wagner și colab., 2019) și folosită în cadrul aceluiași pachet pentru identificarea de particule, în timp ce a doua abordare a implicat identificarea particule bazată pe șabloane 2D în cryoSPARC . Pentru îndepărtarea din setul de date a particulelor deteriorate, a marginilor de carbon și a cristalelor de gheață au fost efectuate mai multe clasificări 2D fără referință. Setul de date curat a fost utilizat pentru obținerea unui model 3D inițial folosind reconstrucția de tip *ab initio*. Modelul obținut a fost utilizat în continuare pentru rafinarea omogenă. Stiva finală de particule a fost utilizată pentru o nouă rundă de rafinare omogenă, urmată de rafinare neuniformă și rafinarea CTF.

3. Rezultate și discuții

Utilizarea clasificării 2D fără referință a fost utilizată pentru curățarea particulelor folosind o procedură similară cu cea descrisă în capitolul VI la secțiunea 3.1. După trei iterații de clasificări 2D, am eliminat majoritatea particulelor deteriorate, prin îndepărtarea claselor slab rezolvate. Aceeași procedură a fost efectuată pe ambele stive de particule, obținute pe baza de șabloane (tb-stack), cât și pe baza rețelelor neuronale în crYOLO (cr-stack). După etapa de curățare, particulele identificate pe bază de șablon au însumat 62.135 particule, în timp ce cea stiva aleasă de crYOLO a avut 57.526 particule după etapa finală de curățare. Exemple ale claselor 2D obținute pentru cele două stive de particule sunt prezentate în figura VII.1. După cum se poate observa, în ciuda numărului de clase generate, nu există diferențe majore între cele două abordări în ceea ce privește numărul de orientări a particulelor.

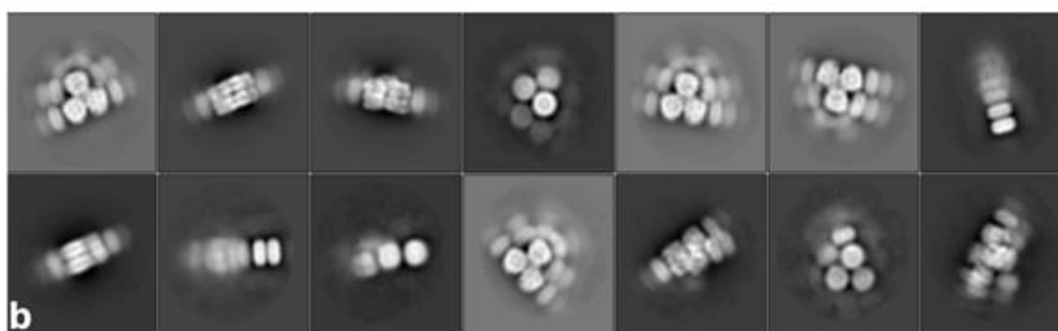


Figura VII.1. Exemple de clase 2D obținute pentru ficobilisomii vitrificați.

În comparație cu clasele obținute prin colorație negativă, unde am reușit să obținem mai multe conformații diferite și dovedind astfel existența flexibilității, în clasele crio 2D nu am putut evidenția orientări diferite pentru perechea de tije superioare. În plus, tijele PBS vitrificate par a fi formate doar din 2 hexamere și nu trei, ca cele din probele utilizate pentru colorația negativă, ceea ce sugerează că PBS a fost purificat dintr-o cultură aflată într-un stadiu diferit sau că intensitatea luminii a fost mai mare. Motivul acestei modificări denotă cerințele de pregătire a PBS pentru investigații structurale la

scurt timp după purificare. Astfel, cultura de *A. platensis* AICB 49 din care au fost pregătite probele de PBS au fost cultivate la Centrul Astbury, schimbând astfel locația și odată cu ea sistemul de cultură. Chiar dacă am încercat să menținem aceiași parametri de cultură, se pare că intensitatea iluminării la nivelul culturii a fost relativ mai mare.

Rezoluția obținută pentru ambele stive de particule este cuprinsă între 4,5 Å și 9,8 Å. După cum se poate observa în figura VII.1, la clasele 2D obținute, se pot distinge caracteristici de structură secundară, precum alfa helix-uri. Structura generală este identică cu cea găsită prin colorație negativă, prezentând un miez tri-cilindric din care radiază șase tije. Structura miezului este cea mai stabilă parte a PBS, așa cum rezultă din clasele 2D, această zonă având caracteristicile structurale cel mai bine rezolvate. În cazul tijelor, un singur hexamer este clar rezolvat, în timp ce al doilea hexamer de PC este încețoșat. Acest lucru indică faptul că nu toate particulele au al doilea hexamer PC pe tije sau care sunt complet încorporate în gheață din cauza dimensiunilor mari ale PBS.

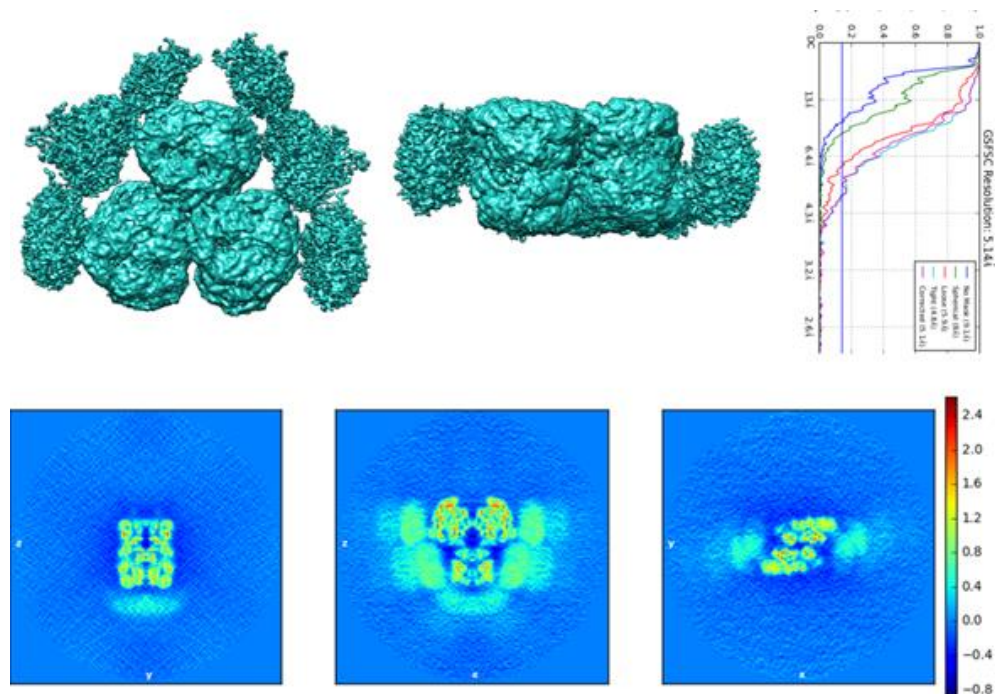


Figura VII.2. Modelul 3D al fibobilisomului de la AICB 49

Stiva de particule curate, obținută în cryoSPARC, a fost utilizată în continuare pentru reconstrucția structurii 3D. În primă fază, am folosit reconstrucția *ab initio* pentru a genera un model 3D inițial al complexului. Modelul astfel obținut a fost utilizat ca șablon pentru clasificarea 3D în RELION. Analizând clasele 3D, am observat că două din cinci clase se aseamănă cu structura PBS obținută prin colorarea negativă, în timp ce celelalte trei prezentau structuri deteriorate. Cele două clase considerate „bune” însumează 82% din particule. Pentru a asigura omogenitatea stivei de

particule înainte de a efectua rafinarea omogenă, am repetat procedura de clasificare 3D, într-un mod iterativ, îndepărtând de fiecare dată clasele care înfățișează particule deteriorate. Pentru a îmbunătăți calitatea particulelor, am folosit rafinarea heterogenă în cryoSPARC cu scopul de a sorta particulele ce prezintă heterogenitatea compozițională. După această procedură de curățare, am îndepărtat aproape 35% din particulele utilizate pentru obținerea claselor 2D, stiva finală de particule fiind formată din 37.418 particule.

Rafinarea neuniformă fără simetrie impusă a dus la o structură similară cu cea obținută prin rafinare omogenă, în timp ce impunerea unei simetri de tip C2 a dus la o îmbunătățire generală a structurii, rezoluția finală fiind de **5,14 Å** (figura VII.2). În încercările noastre de a îmbunătăți structura PBS, am reluat procesul de rafinare perfecționare structurală folosind diferiți parametri în ceea ce privește simetria impusă, modelul de zgomot, rafinarea CTF locală și globală precum și diferite măști cu grade secvențiale de constrângere. Din toți parametrii testați, numai rafinarea locală a CTF a avut o influență pozitivă, mică, asupra calității vizuale a structurii, dar, din păcate, fără a îmbunătăți rezoluția nominală.

Structura 3D a PBS de la *A. platensis* AICB 49 a fost determinată pe baza microscopie electronice criogenice cuplată cu metoda de reconstrucție pe baza particulelor singulare la o rezoluție globală de **5,14 Å**. O inspecție vizuală mai atentă a arătat că rezoluția variază foarte mult între regiuni. Astfel, calculând rezoluția locală, am stabilit că aceasta variază de la 3 Å, în mijlocul miezului, la 11 Å pentru unele regiuni din tije. Acest lucru confirmă afirmația anterioară potrivit căreia miezul este cea mai stabilă parte a PBS. Datorită acestui gradient de rezoluție, cumulat cu faptul că un singur hexamer de pe fiecare tijă prezintă o densitate adecvată, am reușit să construim o structură 3D minimală a PBS. Acesta fiind compusă dintr-un miez tricilindric de APC și șase tije fiecare cu un singur hexamer PC. Aceasta a fost considerată a fi structura minimă a unui PBS complet funcțional, ce prezintă toate proteinele esențiale. Al doilea și al treilea hexamer pentru PC ar fi asamblate pe tije într-o manieră de tip polimerizare fără a prezenta roluri funcționale suplimentare. Astfel, dimensiunile fizice obținute pentru PBS prin tehnica criogenică sunt mai mici decât cele raportate prin colorație negativă, având 356 Å lungime, 275 Å înălțime și o grosime de aproximativ 140 Å.

Chiar dacă PBS de la AICB 49 reprezintă unul dintre cele mai mari complexe macromoleculare care a fost investigat structural, este semnificativ mai mic în ceea ce privește dimensiunea și masa, în comparație cu celelalte două structuri ale PBS de la *G. pacifica* (Zhang și colab., 2017) respectiv *P. purpureum* (Ma și colab., 2020).

4. Concluzii

În capitolul de față am determinat pentru prima dată structura unui ficobilisom cianobacterian (*Arthrospira platensis*) la rezoluție sub-nanometrică folosind microscopia electronică criogenică cuplată cu tehnica de analiză a particulelor singulare. Ficobilisomul, datorită particularităților sale, prezintă unele dificultăți pentru analiza crio-EM, dar acestea au fost depășite cu succes, rezultând un nou protocol hibrid pentru vitrificarea probelor biologicesensibile, protocol ce implică fixarea moleculelor pe grilă și dializa tamponului fără a fi sugativate. Folosind mai mult de 13.000 de micrografi am obținut o structură cu o rezoluție globală de **5,14 Å**, ceea ce ne-a permis să reconstruim structura minimă prin montarea moleculară. Structura PBS reconstruită aici are 144 cromofori individuali de ficocianobilină și mai mult de 170 de polipeptide. Diferențele dintre organizarea de bază a PBS de alge roșii și cianobacterii și chiar între diferite cianobacterii pun sub semnul întrebării importanța plasticității arhitecturale în interacțiunile ficobilisom-fotosistem.

Capitolul VIII. Concluzii și perspective.

Principalele concluzii ale investigațiilor prezentate în această teză sunt următoarele:

- Ficobilisomii cianobacterieni sunt complexe macromoleculare extrem de instabile care necesită un mediu tampon cu tărie ionică ridicată, ce interferează cu analizele structurale. Metoda de purificare a ficobilisomilor dezvoltată aici, bazată pe un sistem apos bifazic este puternică și fiabilă, dar, din păcate, este potrivită numai pentru analize spectroscopice și nu pentru investigații structurale. Aceasta este prima dată când ATPS este utilizat pentru purificarea complexelor macromoleculare mari;
- Spectroscopia ultrarapidă confirmă că transferul de energie între componentele ficobilisomului are loc secvențial, de la componentele periferice către miez. Pentru fiecare tulpină investigată, procesul de transfer de energie a fost explicat folosind patru timpi de descompunere și două compartimente (tijă și miez). Din câte știm, acesta este primul studiu comparativ care arată că proteinele ce intră în compoziția ficobilisomului nu influențează schema de transfer de energie, ci modifică cinetica;
- Analiza genomică a relevat faptul că numărul de proteine unice implicate în structura ficobilisomilor variază între tulpini, fiind strans corelate cu tipul de ficobiliproteine. Analiza secvențelor a arătat că ficobiliproteinele individuale prezintă un grad ridicat de conservare structurală chiar dacă omologia secvențelor între tipurile de ficobiliproteine este relativ mică, acestea având aceeași structură asemănătoare cu o pană. Similar cu ficobiliproteinele,

omologia de secvență a polipeptidelor de legătură este scăzută, dar structura este relativ conservată;

- Arătăm aici, pentru prima dată, că numărul mare de modele structurale propuse în literatura de specialitate pentru ficobilisomul hemidiscoidal, poate fi o consecință a flexibilității conformaționale. Ficobilisomii cu cel mai înalt grad de flexibilitate au fost identificați la *Arthrospira platensis* AICB 49. Regiunea flexibilă fiind la interfața dintre tijele superioare și miez, ceea ce sugerează un rol cheie pentru peptidele de legătura responsabile de atașarea tijelor de miez. În plus, folosind simulări de dinamica moleculară, am argumentat că una dintre peptidele de legătura de la nivelul tije-miez, întâlnite la *Arthrospira platensis* are un grad de mobilitate mai mare decât cele de la *Cronbergia* sp. AICB 1097 și *Coelomoron pussilum* AICB 1012;
- Prezentăm prima structură sub-nanometrică a unui ficobilisom cianobacterian (5,14 Å), și anume cel de la *Arthrospira platensis* AICB 49. Structura generală prezintă o formă hemidiscoidală cu un miez tri-cilindric la care sunt ancorate șase tije. Rezolvând structura ficobilisomului cianobacterian, am putut observa diferențele cheie la nivelul structurii miezului de APC în comparație cu structura prezentă la algele roșii. Aceste diferențe sunt probabil o consecință a numărului de tije ancorate la miez, fiind probabil implicate în mecanismul de conectare și comunicare dintre ficobilisom și fotosistem.

Ca o remarcă finală, rezultatele prezentate în această teză oferă informații interesante despre organizarea structurală și cinetica funcțională a ficobilisomului cianobacterian, care împreună cu flexibilitatea conformațională dovedită prin dinamica moleculară, conturează o imagine moleculară complexă a procesului de colectare a energiei solare în fotosinteza timpurie.

Cu toate acestea, multe întrebări ce privesc procesul de recoltare a energiei solare în cadrul cianobacteriilor au rămas fără răspuns.

- În primul rând, care este semnificația funcțională a flexibilității ficobilisomului? Datele disponibile despre structura acestui complex sub diferite regimuri de iluminare sunt rare, permițându-ne astfel să facem doar presupuneri asupra rolului funcțional jucat de flexibilitatea tijelor.
- O întrebare ce nu își găsește răspunsul în această teză este legată de conservarea structurală a ficobilisomilor în timpul evoluției. Chiar dacă am arătat aici că structura ficobilisomului nostru cianobacterian este asemănătoare cu structura minimală funcțională a celor din algele roșii, nu ne putem să nu ne întrebăm de ce ficobilisomul algelor roșii poate atașa direct la miez o tijă formată doar din ficoeritrină.

Lista publicațiilor referitoare la teză

Cercetările efectuate în cadrul acestei teze de doctorat au fost parțial publicate în următoarele articole:

Drulyte, I., Johnson, R. M., Hesketh, E. L., Hurdiss, D. L., Scarff, C. A., **Porav**, S. A., Ranson, N. A., Muench, S. P., & Thompson, R. F. (2018). Approaches to altering particle distributions in cryo-electron microscopy sample preparation. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 74(6), 560–571. (IF: 3.227)

Fălămaș*, A., **Porav***, S. A., & Tosa, V. (2020). Investigations of the energy transfer in the phycobilisomeantenna of *Arthrospira platensis* using femtosecond spectroscopy. *Applied Sciences*, 10(11), 4045. (IF: 2.474)

Porav, A. S., Bocăneală, M., Fălămaș, A., Bogdan, D. F., Barbu-Tudoran, L., Hegeduș, A., & Dragoș, N. (2020). Sequential aqueous two-phase system for simultaneous purification of cyanobacterial phycobiliproteins. *Bioresource Technology*, 315, 123794. (IF: 7.539)

* *autorii au contribuit în egală măsură la manuscris.*

Bibliografie selectiva

- Adir, N. (2005). Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: Reconstructing a giant. *Photosynthesis Research*, 85(1), 15–32. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-2143-y>
- Beck, M., & Baumeister, W. (2016). Cryo-Electron Tomography: can it reveal the molecular sociology of cells in atomic detail? *Trends in Cell Biology*, 26(11), 825–837. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.006>
- Blankenship, R. E. (Ed.). (2002). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470758472>
- Blankenship, R. E. (Ed.). (2014). *Molecular mechanisms of photosynthesis* (2nd ed). Wiley/Blackwell.
- Cardona, T., Shao, S., & Nixon, P. J. (2018). Enhancing photosynthesis in plants: The light reactions. *Essays in Biochemistry*, 62(1), 85–94. <https://doi.org/10.1042/EBC20170015>
- Chang, L., Liu, X., Li, Y., Liu, C.-C., Yang, F., Zhao, J., & Sui, S.-F. (2015). Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II. *Cell Research*, 25(6), 726–737. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.59>
- Croce, R., Grondelle, R. van, Amerongen, H. van, & Stokkum, I. van (Eds.). (2018). *Light harvesting in photosynthesis*. CRC Press
- Czaplewski, C., Karczyńska, A., Sieradzan, A. K., & Liwo, A. (2018). UNRES server for physics-based coarse-grained simulations and prediction of protein structure, dynamics and thermodynamics. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W304–W309. <https://doi.org/10.1093/nar/gky328>
- Dragoş, N., Péterfi, L. S., Momeu, L. & Popescu, C. (1997). *An Introduction to the Algae and the Culture Collection of Algae at the Institute of Biological Research, Cluj-Napoca*. Cluj University Press
- Gantt, E. (1975). Phycobilisomes: light-harvesting pigment complexes. *BioScience*, 25(12), 781–788. <https://doi.org/10.2307/1297221>
- Glyk, A., Scheper, T., & Beutel, S. (2014). Influence of different phase-forming parameters on the phase diagram of several PEG–salt aqueous two-phase systems. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 59(3), 850–859. <https://doi.org/10.1021/je401002w>
- Kuriata, A., Gierut, A. M., Oleniecki, T., Ciemny, M. P., Kolinski, A., Kurcinski, M., & Kmiecik, S. (2018). CABS-flex 2.0: A web server for fast simulations of flexibility of protein structures. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W338–W343. <https://doi.org/10.1093/nar/gky356>
- Li, Y., Lin, Y., Garvey, C. J., Birch, D., Corkery, R. W., Loughlin, P. C., Scheer, H., Willows, R. D., & Chen, M. (2016). Characterization of red-shifted phycobilisomes isolated from the chlorophyll f-containing cyanobacterium *Halomicronema hongdechloris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(1), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.009>

- Ma, J., You, X., Sun, S., Wang, X., Qin, S., & Sui, S.-F. (2020). Structural basis of energy transfer in *Porphyridium purpureum* phycobilisome. *Nature*, 579(7797), 146–151. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2020-7>
- MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, 124(2–3), 311–334. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4062>
- Marks, D. S., Hopf, T. A., & Sander, C. (2012). Protein structure prediction from sequence variation. *Nature Biotechnology*, 30(11), 1072–1080. <https://doi.org/10.1038/nbt.2419>
- Mirkovic, T., Ostroumov, E. E., Anna, J. M., van Grondelle, R., Govindjee, & Scholes, G. D. (2017). Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. *Chemical Reviews*, 117(2), 249–293. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00002>
- Mullineaux, C. W. (2008). Phycobilisome-reaction centre interaction in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 95(2–3), 175–182. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9249-y>
- Patil, G., Chethana, S., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 99(15), 7393–7396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.028>
- Planavsky, N. J., Asael, D., Hofmann, A., Reinhard, C. T., Lalonde, S. V., Knudsen, A., Wang, X., Ossa Ossa, F., Pecoits, E., Smith, A. J. B., Beukes, N. J., Bekker, A., Johnson, T. M., Konhauser, K. O., Lyons, T. W., & Rouxel, O. J. (2014). Evidence for oxygenic photosynthesis half a billion years before the Great Oxidation Event. *Nature Geoscience*, 7(4), 283–286. <https://doi.org/10.1038/ngeo2122>
- Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J., & Brubaker, M. A. (2017). cryoSPARC: Algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nature Methods*, 14(3), 290–296. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>
- Scarff, C. A., Fuller, M. J. G., Thompson, R. F., & Iadanza, M. G. (2018). Variations on negative stain electron microscopy methods: tools for tackling challenging systems. *Journal of Visualized Experiments*, 132, 57199. <https://doi.org/10.3791/57199>
- Scheres, S. H. W. (2012). RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of Structural Biology*, 180(3), 519–530. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.09.006>
- Scholes, G. D., Fleming, G. R., Olaya-Castro, A., & van Grondelle, R. (2011). Lessons from nature about solar light harvesting. *Nature Chemistry*, 3(10), 763–774. <https://doi.org/10.1038/nchem.1145>
- Su, H.-N., Wang, Q.-M., Li, C.-Y., Li, K., Luo, W., Chen, B., Zhang, X.-Y., Qin, Q.-L., Zhou, B.-C., Chen, X.-L., Zhang, Y.-Z., & Xie, B.-B. (2017). Structural insights into the cold adaptation of the photosynthetic pigment-protein C-phycocyanin from an arctic cyanobacterium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(4), 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.02.004>

- Rohou, A., & Grigorieff, N. (2015). CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *Journal of Structural Biology*, 192(2), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.08.008>
- Stewart, A., & Grigorieff, N. (2004). Noise bias in the refinement of structures derived from single particles. *Ultramicroscopy*, 102(1), 67–84. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2004.08.008>
- van Stokkum, I. H. M., Gwizdala, M., Tian, L., Snellenburg, J. J., van Grondelle, R., van Amerongen, H., & Berera, R. (2018). A functional compartmental model of the *Synechocystis* PCC 6803 phycobilisome. *Photosynthesis Research*, 135(1–3), 87–102. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0424-5>
- Wagner, T., Merino, F., Stabrin, M., Moriya, T., Antoni, C., Apelbaum, A., Hagel, P., Sitsel, O., Raisch, T., Prumbaum, D., Quentin, D., Roderer, D., Tacke, S., Siebolds, B., Schubert, E., Shaikh, T. R., Lill, P., Gatsogiannis, C., & Raunser, S. (2019). SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM. *Communications Biology*, 2(1), 218. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0437-z>
- World Bank; IFC; MIGA. 2016. *World Bank Group Climate Change Action Plan 2016-2020*. World Bank, Washington, DC. World Bank. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/24451> License: CC BY 3.0 IGO
- Xiong, J., & Bauer, C. E. (2002). Complex evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 503–521. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135212>
- Yi, Z.-W., Huang, H., Kuang, T.-Y., & Sui, S.-F. (2005). Three-dimensional architecture of phycobilisomes from *Nostoc flagelliforme* revealed by single particle electron microscopy. *FEBS Letters*, 579(17), 3569–3573. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.033>
- Zivanov, J., Nakane, T., & Scheres, S. H. W. (2019). A Bayesian approach to beam-induced motion correction in cryo-EM single-particle analysis. *IUCrJ*, 6(1), 5–17. <https://doi.org/10.1107/S205225251801463X>
- Zhang, Jun, Ma, J., Liu, D., Qin, S., Sun, S., Zhao, J., & Sui, S.-F. (2017). Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*. *Nature*, 551(7678), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature24278>