

Raport privind stagiul de cercetare efectuat la Centrul Astbury pentru Biologie Moleculară Structurală din cadrul Universității Leeds, Marea Britanie.

1. **Solicitant : Alin Sebastian PORAV;**
2. **Echipa de cercetare : E4 – Sisteme moleculare și biomoleculare complexe;**
3. **Tipul acțiunii : Stagiul de cercetare (SC);**
4. **Destinația: Leeds, Marea Britanie;**
5. **Perioada : 27.04.2019 – 18.06.2019;**
6. **Scop:** dezvoltarea unei colaborări pe termen lung în domeniul biologiei structurale bazată pe tehnici de crio-microscopie electronică.

7. Obiective și rezultate obținute.

01. Finisarea structurii 3D a ficobilisomului (PBS) cianobacterian la rezoluție sub-nanometrică, prin achiziția unui nou set de imagini de înaltă rezoluție.

Pe baza datelor obținute în cadrul institutului am reușit să obținem o structură 3D completă a PBS la o rezoluție de $\sim 22 \text{ \AA}$, rezoluție limitată atât de tehnica folosită (colorație negativă) cât și de particularitățile microscopului. În urmă unei vizite de cercetare în cadrul Universității din Leeds am reușit să obținem o structură parțială a PBS la o rezoluție de 8 \AA , în cazul acesta rezoluția fiind limitată de numărul mic de imagini precum și flexibilitatea intramoleculară a unor componente.

Pentru atingerea acestui obiectiv am întreprins următoarele activități:

- a1. reprocesarea setului de date cu ajutorul unor noi algoritmi și software-uri;
- a2. optimizarea distribuției particulelor pe grilă;
- a3. achiziționarea unui nou set de imagini la parametri ce permit îmbunătățirea rezoluției structurii finale;

Rezultate obiectiv 1/activități:

a1) reprocesare setului de date cu ajutorul unor noi algoritmi și software-uri

În urmă aplicării noilor algoritmi în procesarea setului de date anterior am reușit să îmbunătățim rezoluția structurii centrale (core) a complexului de la 8 \AA la 6 \AA . Acest fapt ne-a permis să construim un model 3D atomic prin potrivirea structurii cristalografice a aloficocianinei cu codul 2VJT din Protein Data Bank. În figura 1 se poate observa diferența dintre cele 2 structuri precum și modelul atomic obținut. În aceeași figură se poate observa că în centru aloficocianinei

există o porțiune mai densă ce provine de la peptidele linker caracteristice, dar datorită rezoluției modeste (6Å) structura acestora nu a putut fi modelată.

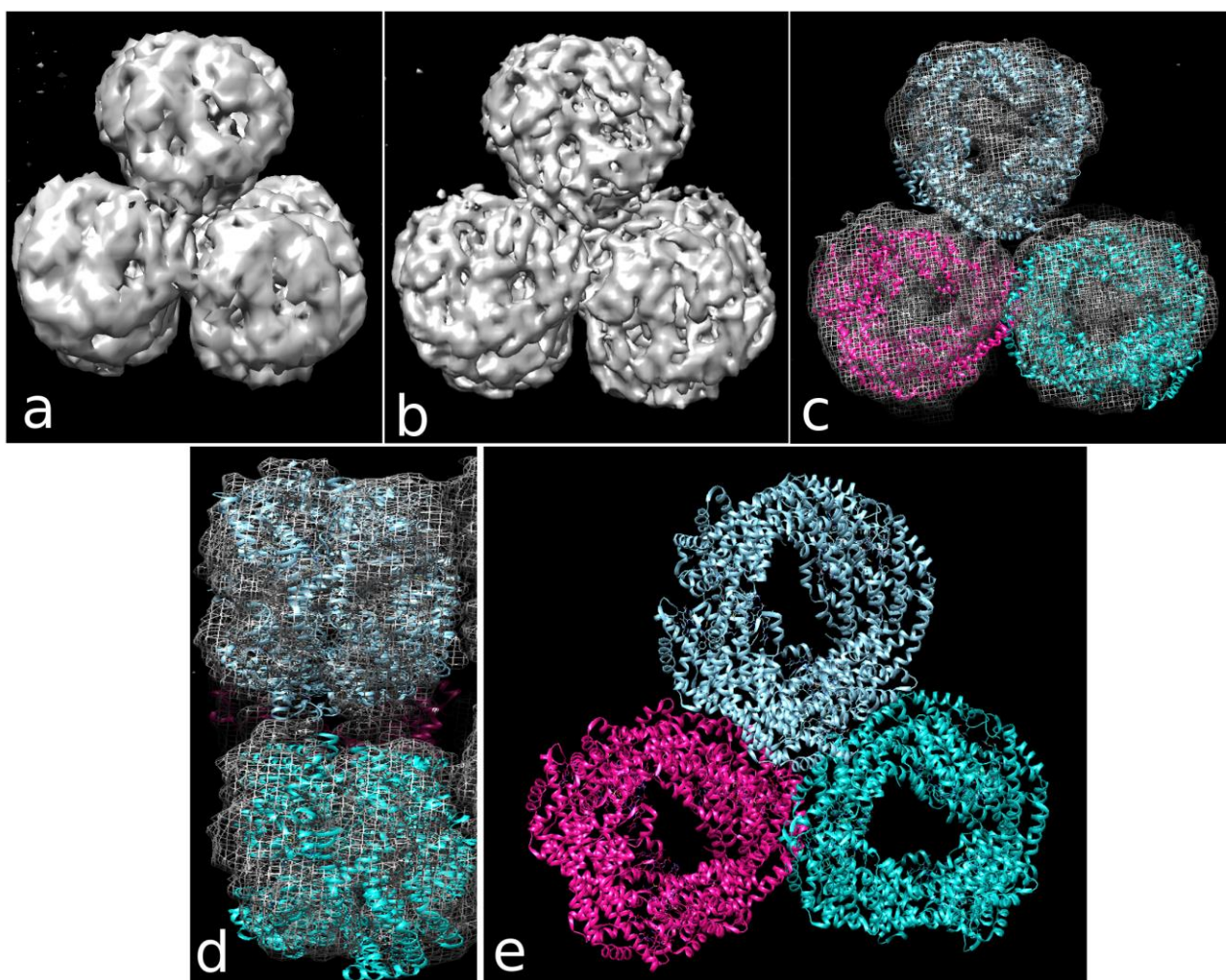


Fig. 1 Construcția modelului atomic pe baza structurii cu rezoluție de 6Å.

a) structura cu rezoluție de 8Å, b) structura pentru 6Å, c) fitarea structurii aloficocianinei în modelul de 6Å - văzut din față, d) fitarea structurii aloficocianinei în modelul de 6Å -văzut din lateral, e) modelul atomic rezultat.

a2) optimizarea distribuției particulelor pe grilă;

În cadrul acestei etape am încercat diferite metode de hidrofilizare a grilelor atât pentru a îmbunătăți numărul de orientări a complexului cât și pentru a crește afinitatea acestuia pentru filmul de carbon. Astfel am utilizat timpi diferiți de „glow-discharge”, aparate diferite (Cressington, Easy Glow, GloQube) dar și atmosfere diferite (nitrogen, argon, amilamina etc.). Pentru a obține un număr optim de particule per micrografie am încercat diferite concentrații, variind de la 0.1 mg/ml până la 4 mg/ml. O componentă

importantă în acest proces a fost utilizarea diferitelor tipuri de grilă de la cele de tip quantifoil 2/1.3, atât de cupru cât și de aur, până la grile cu film *lacey* susținute de un film subțire de carbon (~2nm).

Verificarea distribuției particulelor pe grilă s-a realizat în prima fază prin colorație negativă, etapă urmată de optimizarea parametrilor de crio: timpul de sugativare, forța de sugativare precum și viteza de înghețare.

Ultima parte a procesului de optimizare a constat în reducerea concentrației fosfatului în tampon de la 1M la un minim de 0.45 M fără a afecta integritatea complexului. Pentru a realiza acest lucru am testat: diluarea complexului înainte de aplicarea pe grilă, diluarea complexului pe grilă, utilizarea unui aparat de pulverizare prin canale microfluidice, fixarea cu glutaraldehidă atât în gradient cât și pe grilă.

În urmă acestor etape de optimizare am constatat că cea mai bună abordare este utilizarea grilelor de cupru cu film *lacey* hidrofilizate timp de 55 secunde la o presiune de 350 mb în aparatul produs de Cressington, iar aplicarea probei pe grilă (~4 microlitri) și fixarea acesteia pentru îndepărtarea fosfatului mențin complexul intact. În ceea ce privește procesul de înghețare, cea mai bună variantă a fost aplicarea unei forțe și timp de sugativare reduse.

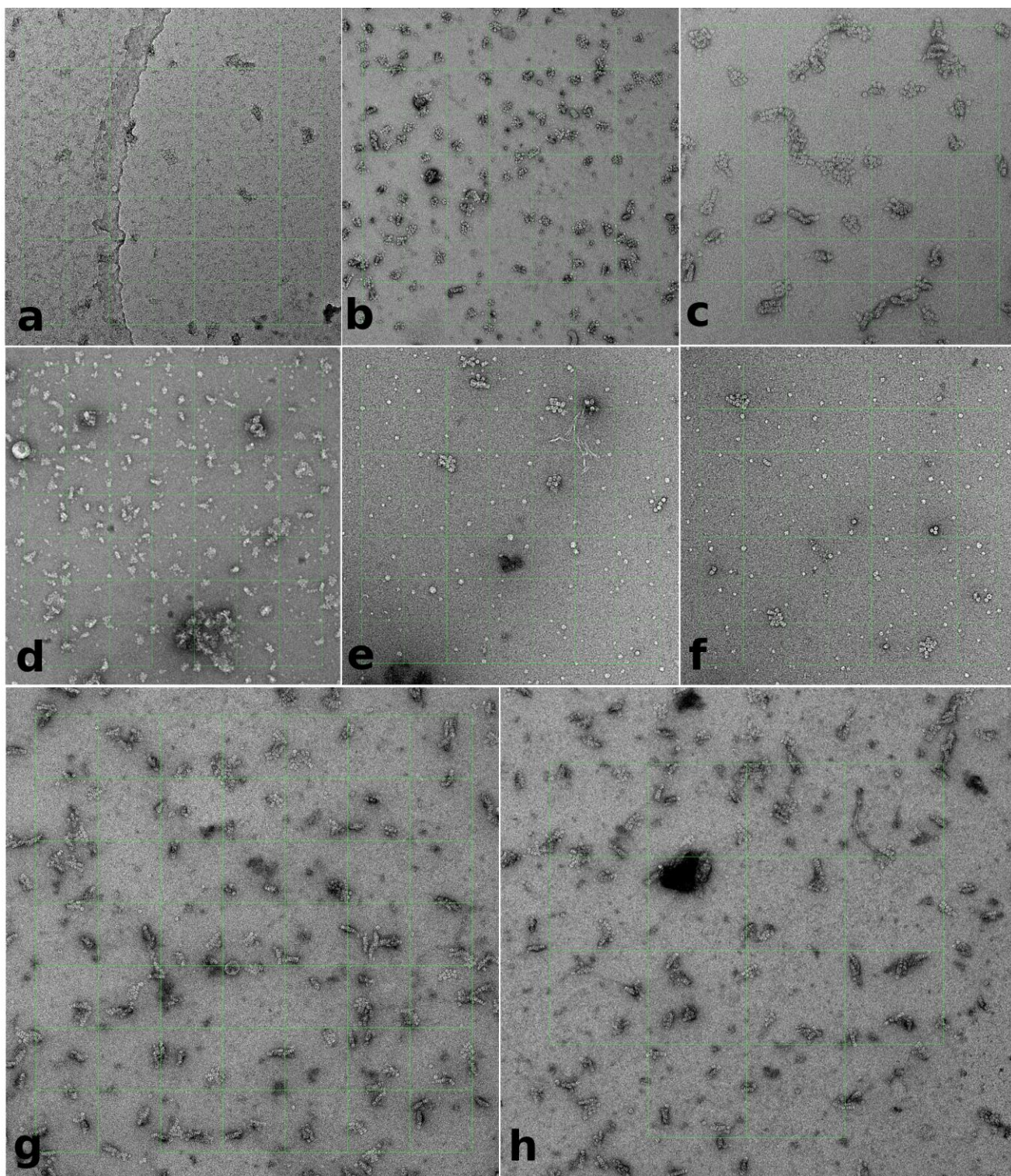


Fig.2. Etape ale optimizării distribuției particulelor pe grilă.

a) grile quantifoil, b) grile lacey, c) hidrofilizare cu aparatul Cressington, d) diluarea tamponului înainte de aplicarea probei, e-f) pulverizarea probei prin canalele microfluidice, g-h) imagini reprezentative ale procesului optimizat.

a3) achiziționarea unui nou set de imagini la parametri ce permit îmbunătățirea rezoluției structurii finale;

În cadrul acestui stagiu am reușit, datorită optimizării procesului de obținere a probelor vitrificate, să obțin un set mare de date ce cuprinde un număr de **13650** de filme a 56 de cadre secvențiale ce însumează în total **~26 Tb**. Imaginile au fost achiziționate pe un microscop Krios dotat cu un detector de tip DED (direct electron detector) produs de FEI (Falcon 3). În urma alinierii cadrelor și comprimării acestora s-au obținut imaginile finale ce vor fi folosite în continuare pentru procesare. Imaginile comprimate insumează un total de **2,6 Tb**. Parametrii de achiziție a imaginilor pot fi găsiți în tabelul 1.

Tabel 1. Parametrii de achiziție a micrograțiilor.

Microscope	Krios I
Detector (mode)	Falcon III (integrating)
Accelerating voltage (keV)	300
Pixel size (Å)	1.065
Dose	
Total dose (e/Å ²)	71.7
Number of fractions	59
Dose per fraction (e/Å ²)	1.2
EPU parameters	
Defocus range (-μm)	-1 -3.5
Autofocus	every 10 μm
Drift measurement	once per gridsquare (0.05 nm/s)
Apertures (size in microns)	
C1	2000
C2	70
C3	2000
Objective	100

02. Evaluarea utilizării complexelor fotosintetice (fotosistemul I, fotosistemul II, citocromul b6f) ca potențiale ținte în inhibarea dezvoltării înfloririlor cianobacteriene (algale) toxice, în vederea dezvoltării unei propuneri de proiect de cercetare comun în contextul mecanismului de finanțare al bioeconomiei, în special axa Blue Growth.

Infloririle de cianobacterii toxice reprezintă o problemă globală majoră afectând atât apele teritoriale cât și pe cele maritime. Toxinele eliberate de acestea au un impact negativ ecologic dar și economic prin distrugerea acvaculturilor și creșterea costurilor de epurare a apelor contaminate. Pentru abordarea acestei probleme în cadrul unui proiect mai amplu și pentru a crește șansele de reușită ne propunem obținerea unor rezultate preliminare. Astfel în cadrul acestui obiectiv urmărim să obținem un set de imagini cu citocromul b6f în mediu nativ prin utilizarea tehnicii SMALP (Styrene Maleic Acid co-polymer Lipid Particle) de solubilizare. Această tehnică permite obținerea complexelor proteice membranare în mediu nativ, menținând lipidele aflate în contact direct.

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv am parcurs următoarele activități:

- a1) purificarea complexelor fotosintetice prin solubilizare cu detergent n-dodecyl maltoside;
- a2) optimizarea procesului de solubilizare a tilacoidelor cu SMA (styrene maleic acid);
- a3) purificarea complexelor fotosintetice prin solubilizare cu SMA și verificarea integrității acestora prin colorație negativă;
- a4) investigarea utilizării cromatografiei de excluziune sterică în purificarea finală a complexelor fotosintetice;
- a5) dezvoltarea unei colaborări pe termen lung în cea ce privește dinamică structurală a complexelor fotosintetice.

a1) purificarea complexelor fotosintetice prin solubilizare cu detergent (n-dodecyl maltoside (DM));

a2) optimizarea procesului de solubilizare a tilacoidelor cu SMA (styrene maleic acid)

În cadrul acestor activități am reușit să purific membranele tilacoidale de la specia *Arthrospira platensis* precum și solubilizarea acestora cu DM (fig.3-a). În cazul solubilizării cu SMA complexe fotosintetice au fost extrase doar parțial, fapt datorat probabil atât fluidității mici specifice membranelor tilacoidale precum și densității mari de proteine (fig.3-b,c). În urma creșterii cantității de NaCl și glicerol extragerea complexelor proteice s-a îmbunătățit semnificativ (fig.3-d).

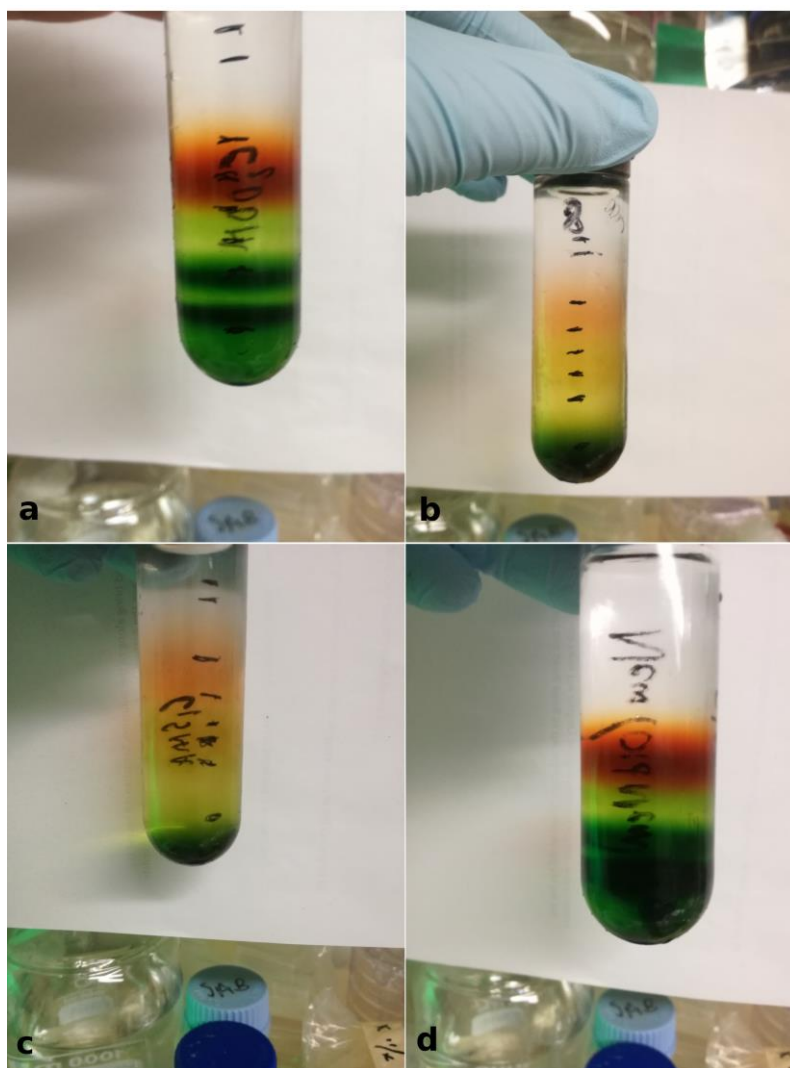


Fig.3 Solubilizarea membranelor tilacoidale și purificarea complexelor fotosintetice în gradient de sucroza.

a) solubilizare cu DM, b-c) solubilizare inițială cu SMA, d) protocol de solubilizare cu SMA optimizat.

a3) purificarea complexelor fotosintetice prin solubilizare cu SMA și verificarea integrității acestora prin colorație negativă

a4) investigarea utilizării cromatografiei de excluziune sterică în purificarea finală a complexelor fotosintetice;

Aceste activități au presupus investigarea atât a purității cât și integritatea celor 3 complexe fotosintetice purificate în gradient de sucroză, citocrom b6f- fracția maro, fotosistem II – fracția verde din mijloc, fotosistem I- fracția verde de jos. După cum se poate observa în fig.4 complexele fotosintetice recuperate din gradient prezintă o puritate de aproximativ 90% și homogenitate mare a structurii.

Pentru a îmbunătăți gradul de puritate am trecut fracțiile obținute din gradient pe o coloană de excluziune sterică utilizând un aparat de tip FPLC GE Healthcare Akta Prime,

iar coloana a fost împachetată cu rășină Superose 6, faza mobilă fiind reprezentată de tamponul specific fiecărui complex proteic. Astfel am reușit să îmbunătățim atât puritatea cât și omogenitatea probelor.

Pentru investigațiile structurale prin colorație negativă am utilizat grile de Cu cu mesh de 400 acoperite cu un film subțire de carbon. În cazul fotosistemelor concentrația finală a probelor a fost 0.2mg/ ml, iar în cazul citocromului b6f concentrația a fost 0.1mg/ml.

a5) dezvoltarea unei colaborări pe termen lung în cea ce privește dinamică structurală a complexelor fotosintetice.

Datorită intereselor comune în cea ce privește dinamică structurală a complexelor macromoleculare dar și datorită faptului că am reușit să obținem complexe fotosintetice cu o puritate mare, am început o colaborare în vederea rezolvării structurii 3D la intervale diferite de timp, prin excitarea cu un fascicul luminos. În acest proiect vom încerca să surprindem dinamică structurală a procesului fotosintetic. Deasemenea vom dezvolta o propunere comună de proiect pe următorul proiect cadru de finanțare al Uniunii Europene-**Horizon Europe**.

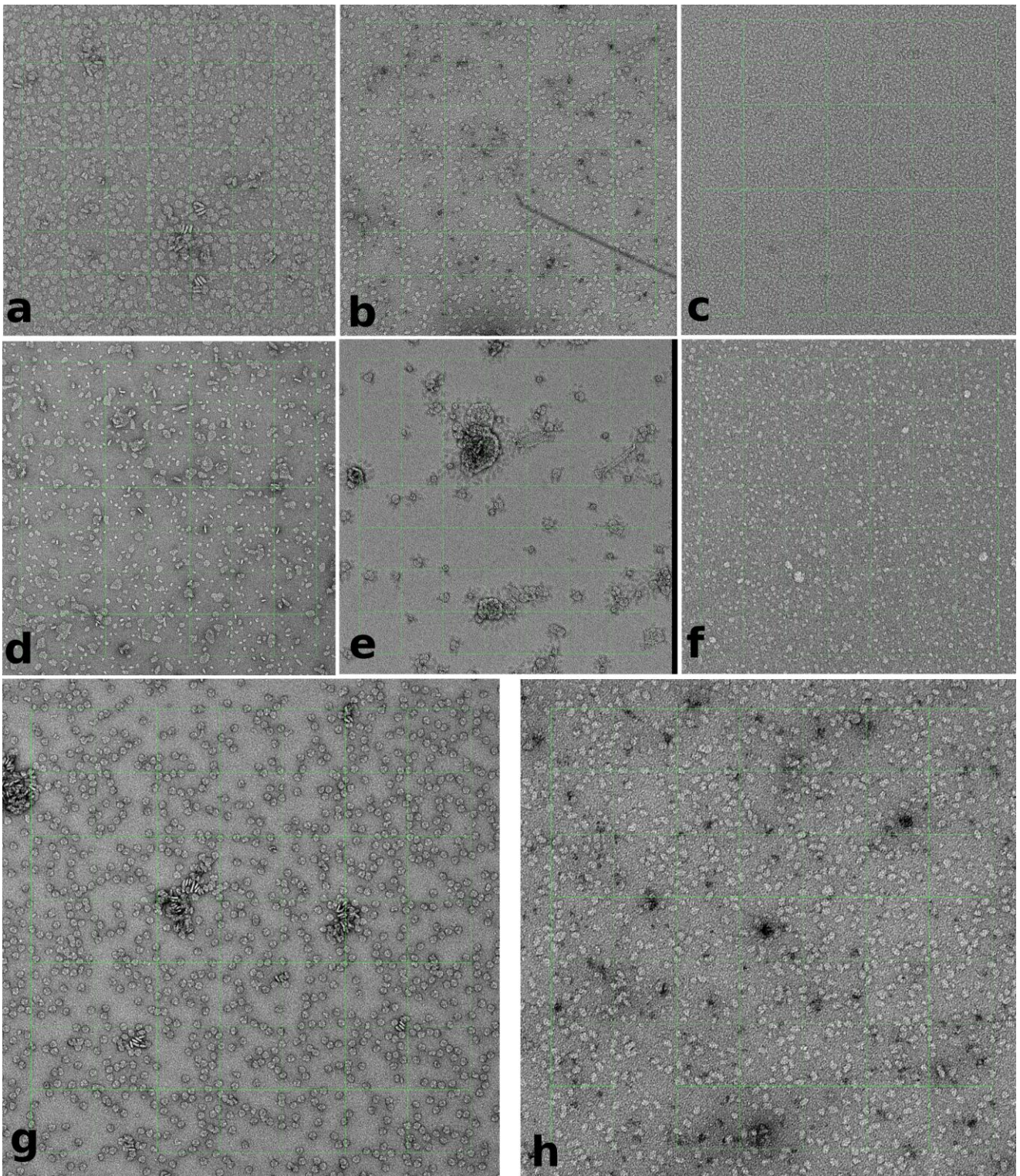


Fig4. Imagini reprezentative ale complexelor fotosintetice.

a) PSI-DM, b) PSII-DM, c) Citocrom b6f-DM, d) PSI-SMA, e) PSII-SMA, f) Citocrom b6f-SMA, g) PSI-după cromatografie, h) PSII-după cromatografie.

8. Rezultate estimate

În urmă acestui stagiu de cercetare consider că prin îndeplinirea celor două obiective vom reuși să publicăm rezultatele obținute în 2 articole ISI în decursul a 12 luni, din care unul într-o revistă situată în primul sfert al zonei roșii. Considerăm că publicarea unui articol în zona roșie este posibilă prin obținerea unei structurii 3D complete a ficobilisomului cianobacterian la o rezoluție subnanometrică, în prezent fiind publicată la această rezoluție doar structura complexului de la algele roșii (grup evolutiv distinct).

Pe baza rezultatelor obținute până în prezent considerăm că este posibilă, prin îmbunătățirea calității datelor, obținerea unei structurii cu o rezoluție apropiată de 4 Å, prag ce ne va permite investigarea atomică a interacțiunilor intramoleculare prin fitting și docking a structurilor cristalografice. Îmbunătățirea rezoluției ficobilisomului crește potențialul de publicare al structurii într-o revista din top 3 a zonei roșii.

Al doilea articol va avea la baza studiul preliminar al obținerii complexelor fotosintetice cianobacteriene în mediu nativ și caracterizarea structurală a acestora, cu accent pe propunerea unor zone de destabilizare a complexului.

Prin obținerea rezultatelor preliminare în cea ce privește dinamică structurală a complexelor fotosintetice, considerăm că acestea pot sta la baza unei propuneri internaționale în contextul strategiei europene de dezvoltare sustenabilă a bioeconomiei.

9. Abilități dobândite în urmă stagiului de cercetare.

În urmă acestui stagiu am reușit atât să îmi îmbunătățesc aptitudinile din domeniul crio-microscopiei electronice de înaltă rezoluție și a purificării complexelor macromoleculare cât și să dobândesc noi aptitudini în aceste domenii. Totodată în cadrul acestui stagiu am reușit să învăț tehnici avansate de procesare a imaginilor în vederea construirii modelelor atomice și a validării acestor structuri. Abilitățile dobândite în urma acestui stagiu vizează:

- utilizarea SMA în purificarea proteinelor membranare;
- utilizarea aparatelor de tip Akta FPLC pentru purificarea proteinelor;
- obținerea grilelor vitrificate;
- programarea sesiunilor de screening la microscopul de tip KRIOS;
- programarea sesiunii de achiziție la microscopul de tip KRIOS;
- utilizarea software-urilor specifice tehnicii „single particle reconstruction”

- utilizarea ultracentrifugii analitice;
- utilizarea aparatelor de pulverizare a probei prin canale microfluidice;
- construcția modelelor atomice bazate pe densități obținute din cryo-microscopie;
- validarea structurilor atomice;

10. Concluzii

Consider că acest stagiu a fost un real succes în cea ce privește atingerea obiectivelor propuse dar și datorită numărului mare de aptitudini noi dobândite. Consider că aceste abilități vor contribui decisiv atât în dezvoltarea profesională proprie cât și a INCDTIM prin deschiderea unor noi ramuri de cercetare.