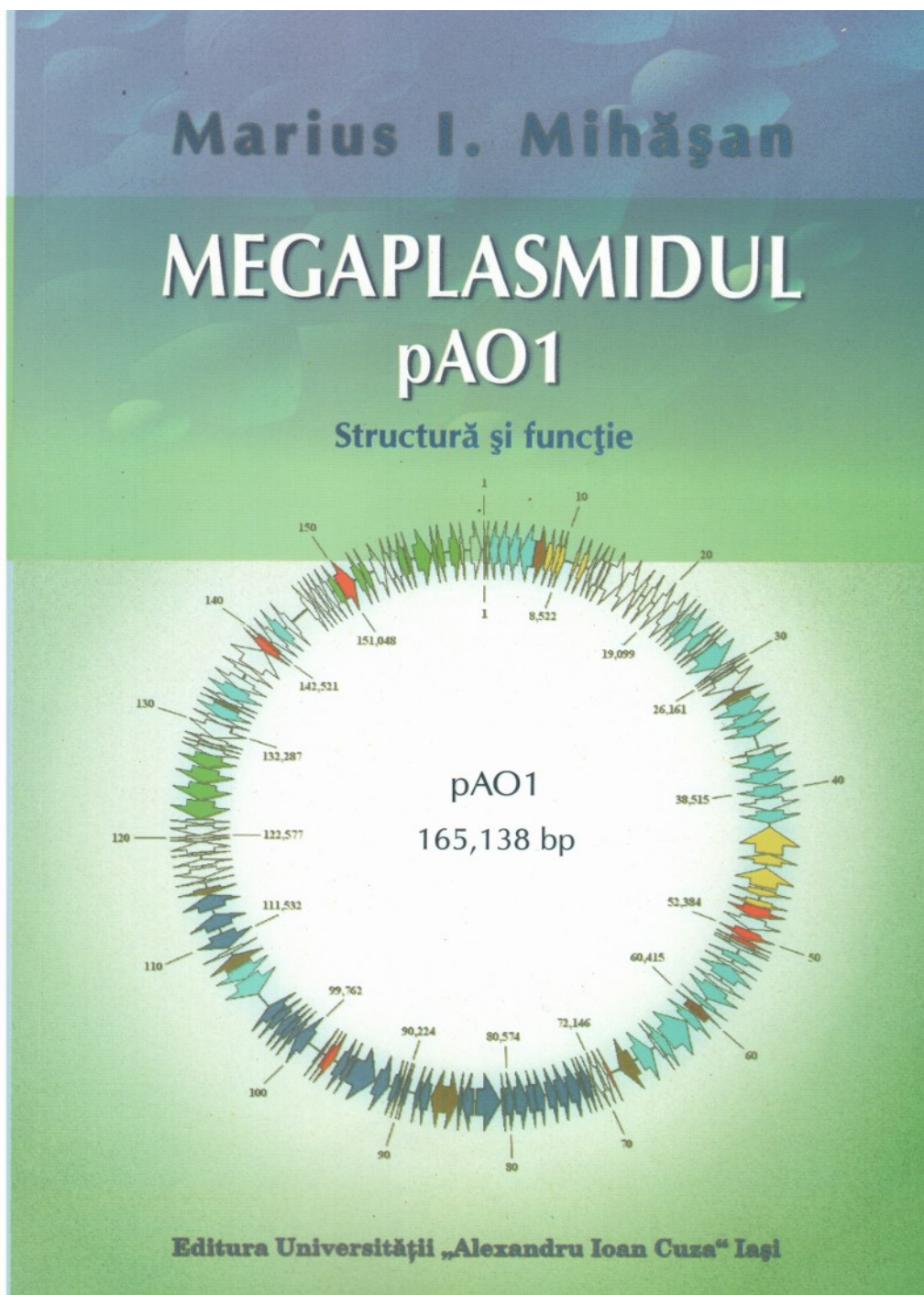


Megaplasmidul pAO1 - Structură și funcție
Mihășan I. Marius



Editura Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași
2011
ISBN: 978-973-640-669-0

Cuprins

<i>I.1. Încadrarea taxonomică a speciei <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pAOI+</i>	<i>10</i>
<i>I.2 Particularitățile metabolice și fiziologice ale genului <i>Arthrobacter</i>.....</i>	<i>12</i>
<i>I.3. Cromozomul bacterian în cadrul genului <i>Arthrobacter</i></i>	<i>15</i>
<i>I.4. Plasmide în genul <i>Arthrobacter</i></i>	<i>16</i>
1.4.1. Megaplasmidul pAO1	18
<i>II.1. Gene implicate în replicare.....</i>	<i>24</i>
<i>II:2 Gene implicate în conjugare.....</i>	<i>28</i>
<i>II.3. Gene implicate în fenomenele de transpoziție</i>	<i>31</i>
<i>II.4. Gene implicate în rezistența la antibiotice.....</i>	<i>35</i>
<i>II.5. Gene implicate în utilizarea nutrienților</i>	<i>35</i>
<i>II.6. Apariția și evoluția megaplasmidului pAO1</i>	<i>36</i>
<i>III.1. Desfacerea inelului pirolidinic</i>	<i>39</i>
<i>III.2. Clivarea și metabolizarea catenei laterale</i>	<i>45</i>
<i>III. 3 pAOI+ și stresul oxidativ.....</i>	<i>51</i>
III.3.1 ORF54 și albastrul de nicotină	51
III.3.2 Mecanismul de reacție al NBOR.....	56
III.3.3 Rolul fiziologic al NBOR.....	62
<i>III.4. Gene implicate în sinteza cofactorului molibdenic</i>	<i>62</i>
<i>III.5 Gene implicate în transportul nicotinei și a produșilor de metabolism ai acesteia</i>	<i>65</i>
<i>III.6 Gene cu funcție necunoscută.....</i>	<i>67</i>
<i>III.7 Reglarea căii de degradare a nicotinei</i>	<i>68</i>
<i>IV.1. Gene posibil a fi implicate in metabolismul carbohidratilor de pe megaplasmidul pAO1</i>	<i>77</i>
IV.1.1 Cadrul de citire 39 codifică o aldehyd-dehidrogenază	82
Produsul cadrului de citire 39 este monomer în soluție	91
Gena orf39 codifică o aldehyd-dehidrogenază ce preferă NADP ⁺	92
In situsul activ al ALDH se află un rest de cisteină.....	93
IV.1.2 ORF40 codifică o proteină tetrameră cu funcție oxido-reductazică	95
ORF40 este tetrameră în soluție	100
ORF40 conține Zn slab legat.....	102
IV.1.3. Catabolismul D-xylozei este codificat de megaplasmidul pAO1	103

Analiza computerizată a preferinței de substrat	108
Testarea experimentală a preferinței de substrat	112

Introducere

Cromozomul bacterian este un depozit de gene care codifică funcțiile de bază, vitale pentru viața celulei procariote. Din acest motiv, majoritatea lor au rămas virtual neschimbate pentru o perioadă foarte lungă de timp, cromozomul bacterian fiind din acest punct de vedere asemănător cu scrisul în comunicarea umană: deși a suferit mici modificări privind instrumentele de scris, în esența sa a rămas neschimbat în ultimele sute de ani. Pentru varietate și diversitate, pentru echivalentul microbial al televizorului și internetului din lumea modernă, trebuie să luăm în calcul plasmidele. Aceste grupări de gene citoplasmice "împrumută" de la gazdă majoritatea funcțiilor necesare metabolismului lor și totuși rămân separate fizic de cromozom. Prin această independență specifică, ele joacă un rol esențial în evoluția bacteriană, permițând schimbul activ de gene și fenomenele de recombinare.

Termenul de *plasmid* a fost introdus în literatura de specialitate de către Joshua Lederberg prin lucrarea publicată în 1952 în *Physiological Reviews* (4; 7). În 1981, Rosenberg și colaboratorii introduc termenul de *megaplasmid* pentru a descrie un plasmid cu o masă moleculară mai mare de 30×10^6 (5). Valoarea reprezintă masa moleculară relativă exprimată așa cum se obișnuia pe atunci și se traduce prin ~450 kb. Această limită a fost în mod arbitrar aleasă de către autori și a fost ulterior modificată, recent termenul de megaplasmid fiind acceptat pentru a descrie plasmide mai mari de 100 kb.

Trebuie precizat că această separare plasmid/megaplasmid nu este una foarte clară, deși în mod paradoxal diferențele între cele două tipuri de repliconi nu se rezumă doar la dimensiune. Megaplasmidele contribuie în general la biologia gazdei într-un mod mult mai complex decât plasmidele mici, asigurând în unele cazuri căi metabolice complete ce permit gazdei supraviețuirea în nișe ecologice specifice. Mai mult decât atât, unele dintre căile metabolice descrise pe megaplasmide s-au dovedit a avea un impact ecologic și biotehnologic cu totul deosebit (6).

Arthrobacter nicotinovorans este un bun exemplu în această direcție. Numea inițial *A. oxidans*, specia a fost reclasificată de Kodama și colab. în 1992 (3) și a primit numele actual, nume ce reflectă o caracteristică metabolică interesantă: capacitatea de a metaboliza nicotina. Calea metabolică de degradare a acestui alcaloid este cantonată pe un megaplasmid. Izolarea acestuia s-a realizat în 1984 (1) când a primit numele de pAO1, iar în 2003 a fost complet secvențiat (2).

Deși prin prisma căii de degradare a nicotinei biologia acestui megaplasmid a fost intens studiată de către grupurile conduse de Rittenberg, Decker și apoi Brandsch, elucidarea în detaliu a originii și funcției sale este departe a fi completă. În acest context, lucrarea de față își propune realizarea unei extensive revizuirii a literaturii de specialitate și utilizarea datelor originale deținute în scopul realizării unei imagini de ansamblu privind implicațiile megaplasmidului pAO1 în metabolismul speciei *Arthrobacter nicotinovorans*.

Bibliography/Bibliografie

- (1) Brandsch, R. & Decker, K. (1984). Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxidans*. *Archives of Microbiology*, 138, 15-7.
- (2) Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2003). Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *Journal of Bacteriology*, 185, 1976-86.
- (3) Kodama, Y., Yamamoto, H., Amano, N. & Amachi, T. (1992). Reclassification of 2 Strains of *Arthrobacter oxydans* and proposal of *Arthrobacter nicotinovorans* Sp-Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 234-239.
- (4) Lederberg, J. (1952). Cell Genetics and Hereditary Symbiosis. *Physiological Reviews*, 32, 403-430.
- (5) Rosenberg, C., Boistard, P., Dénarié, J. & Casse-Delbart, F. (1981). Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Molecular & General Genetics* : MGG, 184, 326-33.
- (6) Schwartz, E. (2009), *Microbial Megaplasמידs*, Springer, 9-12
- (7) Summers, D. K. (1996), *The Biology of Plasmids*, Wiley-Blackwell, 5-9

Capitolul. I Particularități taxonomice, morfologice și metabolice ale microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+

Datorită existenței unei legături foarte strânse între megaplasmidul pAO1 și gazda sa, microorganismul *Arthrobacter nicotinovorans*, o prezentare a particularităților taxonomice, morfologice și metabolice a acestui microorganism este nu doar binevenită ci chiar obligatorie pentru o bună înțelegere a biologiei și rolului pAO1.

I.1. Încadrarea taxonomică a speciei *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+

Specia *Arthrobacter nicotinovorans* face parte din genul *Arthrobacter*. Numită inițial *A. oxidans*, a fost reclasificată de Kodama et. al. (11) în 1992 și a primit numele actual, nume ce reflectă principala caracteristică metabolică, și anume abilitatea de a metaboliza nicotina.

După Bergey (10), în care clasificarea microorganismelor se face exclusiv după caractere fiziologice și biochimice (așa numita chemo-taxonomie) acest gen este inclus în Secțiunea 15 – Bacili gram pozitivi neregulați, ne-sporulanți, Clasa *Thallobacteria*, Divizia *Firmicutes*, Regn *Procariota*.

În cadrul Ribosomal Database Project (RDP)(3) s-au acumulat o serie de secvențe de ARN ribozomal 16S de la bacterii coreyforme în majoritate aerobe și doar câteva facultativ aerobe care sunt grupate în așa numitul grup *Arthrobacter*. Conform Loveland-Curtze și colab. (16) acest grup cuprinde subgrupul *Microbacterium*, *Clavibacter*, *Arthrobacter* și *Dermatophilus*. Împărțirea tradițională pe genuri se face în cadrul acestor subgrupuri, astfel încât subgrupul *Arthrobacter* cuprinde genurile *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Renibacterium* și *Rothia*.

Combinând tehnicile tradiționale de taxonomie cu analiza secvenței ARN 16S, genul *Arthrobacter* a fost încadrat în familia *Micrococcaceae*, familie ce cuprinde de asemenea și genul *Micrococcus*. Relațiile ce se stabilesc între această familie și unitățile taxonomice superioare pot fi observate în figura 1.

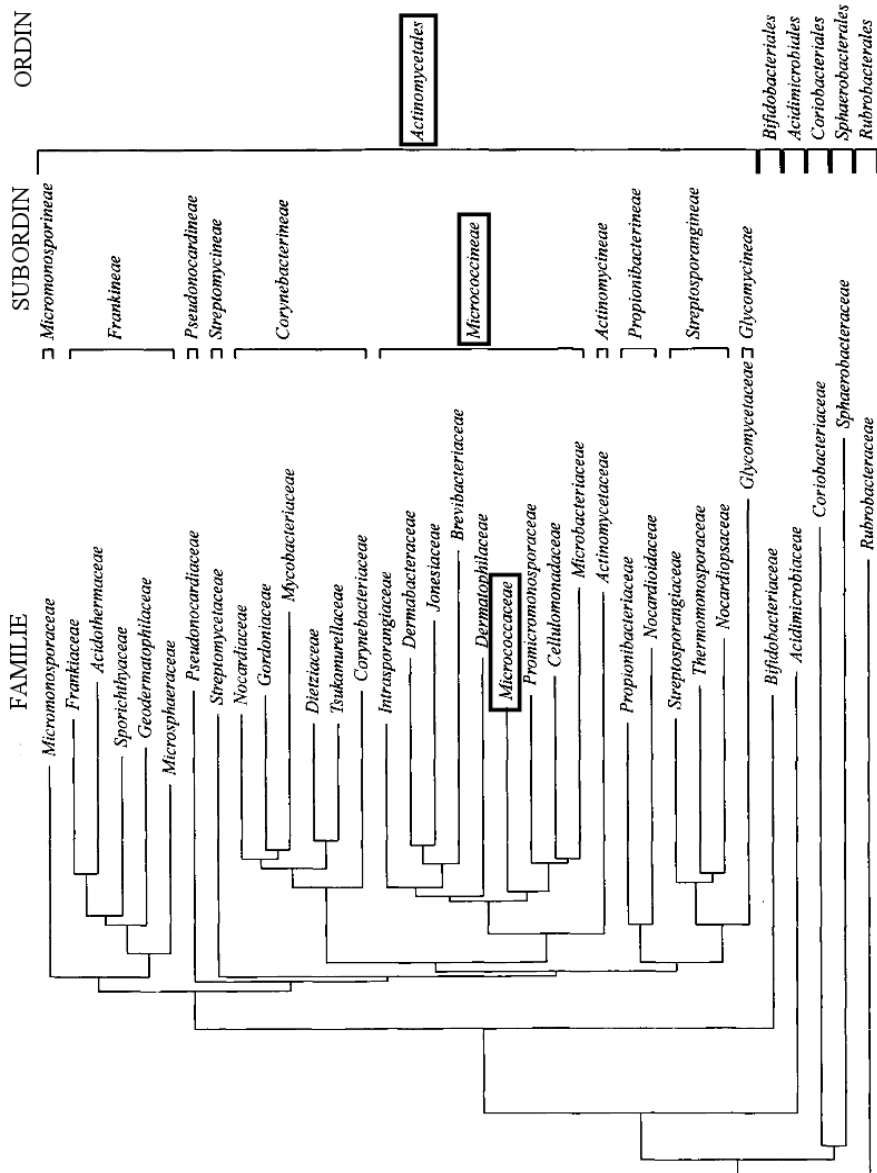


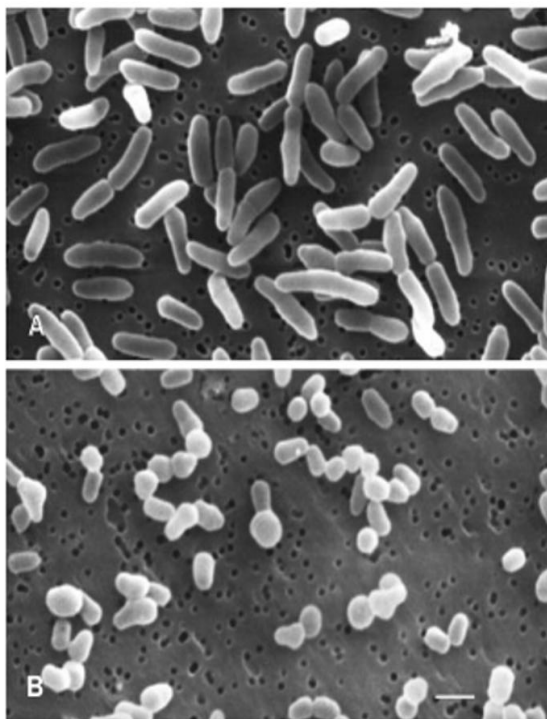
Figura 1. Legăturile filogenetice dintre diversele unități taxonomice din cadrul subclasei *Actinobacteridae*. În stanga jos, scala de mărime care reprezintă 5 substituții nucleotidice/100 nucleotide (după (27))

Stackenbrandt și colab. (27) încadrează așadar familia *Micrococcaceae* în subordinul *Micrococcineae*, ordinul *Actinomycetales*, subclasa *Actinobacteridae* și creează de asemenea o nouă clasă, clasa *Actinobacteria*.

I.2 Particularitățile metabolice și fiziologice ale genului Arthrobacter

Genul *Arthrobacter* conține specii de gram pozitive, strict aerobe de bacterii foarte frecvente în sol. Acestea fac parte din grupul actinomicetelor-coryneforme producătoare de catalază, cu un conținut mare de G+C (16), în medie de 59-70% (32). Specia *A. nicotinovorans* are un conținut în G+C de 62%, ceea ce corespunde foarte bine cu caracteristica genului.

Trăsătura distinctivă a acestui gen este variabilitatea formei celulei în timpul ciclului celular. Astfel, în faza staționară (când culturile au 2 -7 zile) celulele sunt majoritatea mari, cocoide cu diametru de 0,6-1,0 μm. Aceste celule transferate pe mediu de cultură proaspăt, se cresc neuniform, se divid și duc la formarea de bacili neregulați. Uneori, bacili rezultați prin diviziune rămân asociați



formează structuri asemănătoare cu picioarele articulate ale artropodelor, de unde și numele genului. Bacili sunt imobili, nu formează endospori și devin mai scurți pe măsură ce cultura înaintază în vârstă, fiind treptat înlocuiți de formele cocoide (10).

Figura 2. Variabilitatea morfologică a unui izolat aparținând genului *Arthrobacter* în timpul dezvoltării. A. Forme bacilare și asociații sub forma de V în cazul unei culturi tinere, la 230 unități Klett (aprox. 1,2 OD600) B. Forme cocoide în cazul unei culturi în faza staționară, la 450 unități Klett (aprox. 2,25 OD600)

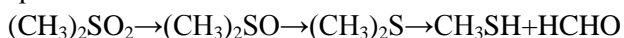
O trăsătură caracteristică, care poate fi utilizată pentru identificarea speciilor aparținând acestui gen este compoziția

chimică a peretelui celular. Acidul gras din componența acestuia este reprezentat, de cele mai multe ori de 1,3-metilpentadecanoic, diamino-acidul este reprezentat din lizină, iar peptidoglicanul este de tipul Lys-Ala-Tre-Ala.

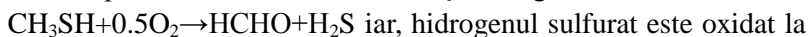
Speciile acestui gen sunt foarte rezistente la condiții extreme. Astfel, de pe gheața din Antarctica au fost izolate numeroase specii aparținând acestui gen, precum: *Arthrobacter antarcticus* (22), *Arthrobacter flavus* (23) și *Arthrobacter* sp. 32C (5). Speciile *Arthrobacter livingstonensis* și *Arthrobacter cryotolerans* au dovedit a fi extrem de tolerante nu doar la temperaturi scăzute, dar și la concentrații mari de săruri (4). *Arthrobacter koreensis* este o specie care rezistă la valori mari de pH (7-12) (13). Rezistența acestor microorganisme la condiții extreme merge până acolo încât o tulpină aparținând acestui gen fost izolată de pe stația spațială Mir: *Arthrobacter ruscicus* (33).

Versatilitate metabolică este o altă caracteristică specifică genului, ce permite acestor microorganisme utilizarea unui număr mare de substraturi ca sursă de carbon și azot și deci ocuparea a numeroase nișe ecologice.

Diferitele specii de *Arthrobacter* pot metaboliza un număr variat de compuși toxici pentru om sau animale, din acest punct de vedere ele constituind un subiect foarte interesant de investigat. Astfel speciile *A. methylotrophus* și *A. sulfonivorans* au capacitatea de a metaboliza dimetil-sulfona și dimetil-sulfoxidul cu ajutorul a două reductaze. Într-o primă etapă dimetil-sulfona este redusă cu ajutorul unei reductaze NADPH-dependente la dimetilsulfoxid și apoi dimetil-sulfid. Prin mono-oxigenarea acestuia din urmă se obține metan-tiol și formaldehidă, după schema:



Metan-tiolul este mai departe oxidat la formaldehida și hidrogen-sulfurat:



sulfat (1).

În acest fel aceste 2 specii au abilitatea de a utiliza metilsulfona, compus ce nu poate fi degradat prin metode chimice, fiind foarte rezistent la atacul acizilor tari sau a agenților de oxidare.

O altă specie cu un metabolism interesant ce face parte din acest gen este *A. chlorophenolicus*, care după cum arată și numele are capacitatea de a metaboliza 4-clorofenol. Compusul este unul toxic și rezultă din procesul de clorinare a apelor uzate, din degradarea erbicidelor sau din degradarea anaerobă a unor fenoli înalt-halogenati. Toxicitatea lui este demonstrată și de faptul că nu există decât câteva specii care pot degrada acest compus, dar în cantități foarte mici, de ordinul 0,2-0,8

mM (32). Deși alea de degradare nu a fost încă descrisă, diverse modalități de îmbunătățire a randamentului de degradare acestu compus toxic au fost descrise (12; 25).

Cromul hexavalent este un alt compus extrem de toxic, a cărui inactivare ridică numeroase probleme. Recent o specie încă incomplet descrisă, dar clasificată ca făcând parte din genul *Arthrobacter*, a fost izolată în culturi pure prin selecție cu cantități mari de crom. Nu numai că izolatul este capabil să crească la concentrații mari de Cr(VI), dar poate de asemenea să îl reducă la Cr(III), formă ce este de 100 de ori mai puțin toxică. Potențialul biotehnologic al acestei specii este deosebit de mare, poluarea cu Cr(VI) fiind foarte frecventă datorită utilizării lui în industria coloranților și pielăriei (18).

De asemenea, au fost descrise specii de *Arthrobacter* capabile să metabolizeze nu doar compuși exotici ce apar în mod natural (cianotoxine peptidice, (microcistine) (17), alcaloidul swainsonină (30), dar și compuși de sinteză chimică foarte periculoși pentru mediu precum ierbicidul atrazina (29), insecticidul isocarbophos (24), nitroglicerina (6), p-nitrofenolul (15) sau un foarte intens utilizat intermediar pentru chemosinteză: trietilamina (28).

Genul nu cuprinde specii patogene, însă au fost semnalate și cazuri în care au fost izolate specii aparținând acestui gen din diferitele fluide al corpului uman. Acestea proveneau însă în general de la indivizi cu dereglări ale sistemului imunitar, de aceea au fost catalogate drept patogeni oportuniști (31), (8).

La ora actuală au fost descrise un număr de 62 specii aparținând acestui gen care au fost izolate în culturi pure și sunt catalogate în diferite colecții de microorganisme. Legăturile filogenetice dintre specia *Arthrobacter nicotinovorans* și celelalte specii din același gen pot fi observate în figura 3.

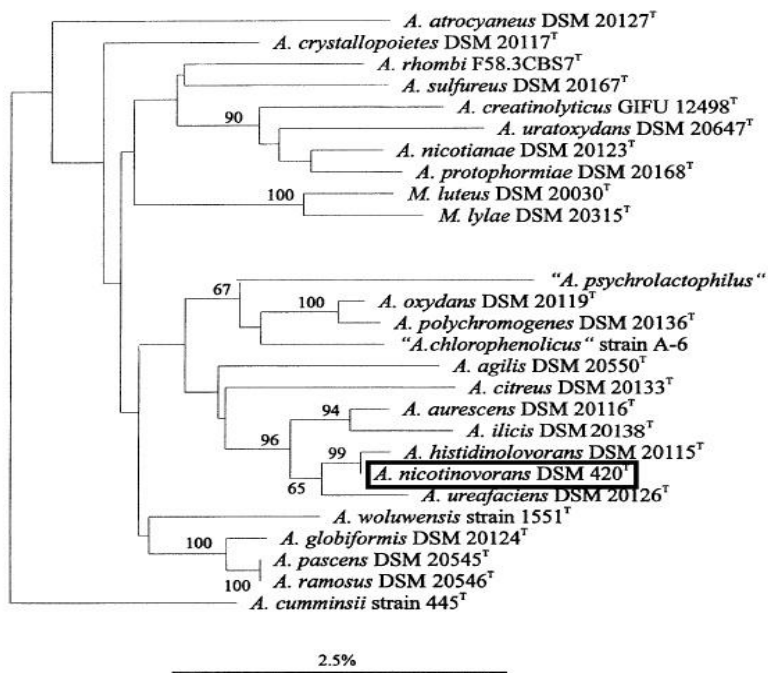


Figura 3. Dendrograma speciilor aparținând genului *Artrobacter* realizată pe baza secvenței ARN 16S (scala de jos reprezintă 2,5 substituții nucleotidice / 100 nucleotide)

I.3. Cromozomul bacterian în cadrul genului *Arthrobacter*

Accesibilitatea tehnicilor de izolare și de secvențiere a acizilor nucleici au dus la dezvoltarea fulminantă a proiectelor de secvențiere a întregului genom a diverselor specii. Genul *Arthrobacter*, datorită caracteristicilor metabolice atrăgătoare constituie un interesant subiect de studiu, din acest motiv existînd nu mai puțin de 5 proiecte de secvențiere completă a genomului unor specii aparținînd acestui gen. Secvența de nucleotide a cromozomilor circulari secvențiați până în prezent poate fi accesată prin intermediul bazei de date GeneBank, după cum urmează:

Specia	GeneBank ID	Dimen. (Mb)	Continut GC (%)	Gene codificatoare (%)	Stare

Specia	GeneBank ID	Dimen. (Mb)	Continut GC (%)	Gene codificatoare (%)	Stare
Arthrobacter arilaitensis RE117	FQ311875.1	3,85	59	83	Finalizat, (20)
Arthrobacter phenanthrenivora ns Sphe3	CP002379	4,25	65	88	Finalizat, nepublicat
Arthrobacter chlorophenicus A6	CP001341	4,39	66	89	Finalizat, nepublicat
Arthrobacter sp. FB24	CP000454	4,69	65	89	Finalizat, nepublicat
Arthrobacter aurescens TC1	CP000474	4,59	62	89	Finalizat, (19)

1.4. Plasmide în genul Arthrobacter

Adaptabilitatea deosebită este unul din rezultatele unui intens fenomen de transfer orizontal de gene (HGT)(9) ce are loc în cadrul acestui gen. Cum recombinarea cromosomală, datorită frecvenței reduse nu poate sta la baza evoluției adaptative (14), plasmidele rămân principalul vector de transport al genelor între specii. Așa se face că cel mai frecvent, caracteristicile metabolice deosebite precum capacitatea de a degrada compuși artificiali variați, rezistența la antibiotice sau la factori de mediu sunt amplasate pe plasmide.

În ciuda numeroaselor caracteristici metabolice interesante descrise la specii aparținând genului *Arthrobacter*, plasmidele ce le codifică au fost relativ puțin studiate.

Până în prezent au fost descrise 20 plasmide în specii aparținând genului *Arthrobacter*, principalele lor caracteristici fiind prezentate în tabelul 1.

Tabellul 1. Plasmlde descrise la diverse tulpini aparținând genului *Arthrobacter*

Plasmlid	Specia gazdă	Dimensiuni (pb)	Proteine codificate	GenBank ID	Observații
pACHL01	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	426858	554	CP001342	
pACHL02	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	158475	151	CP001343	
pASPHE301	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	190450	189	CP002380	
pASPHE302	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	94456	99	CP002381	
pFB24-104	<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	159538	158	CP000455	
pFB24-105	<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	115507	110	CP000456	
pFB24-136	<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	96488	96	CP000457	
pRE117-1	<i>Arthrobacter arilaitensis</i> RE117	50407	47	FQ311475	(20)
pRE117-2	<i>Arthrobacter arilaitensis</i> RE117	8528	12	FQ311476	(20)
pACHL01	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	426858	554	CP001342	
pACHL02	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	158475	151	CP001343	

Plasmid	Specia gazdă	Dimensiuni (pb)	Proteine codificate	GenBank ID	Observații
pTC1	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	328237	297	CP000475	(19)
pTC2	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	300725	254	CP000476	(19)
pSI-1	<i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	99213	97	EF495211	(9)
pChr15	<i>Arthrobacter</i> sp.	49633	63	EF495212	(9)
pAL1	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	112992	103	AM286278	(21)
pAO1	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	165137	165	AJ507836	(7)
pART1	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	Aprox. 5440	-	-	(26)
pART2	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	4634	-	DQ191047	(26)
pART3	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	5406	-	DQ191048	(26)

1.4.1. Megaplasmidul pAO1

Cultivat pe mediu Luria- Bertani (LB), microorganismul *Arthrobacter nicotinovorans* se dezvoltă sub forma unor colonii gălbui, cu pigmentul nedifuzabil. Specia se poate dezvolta se asemenea pe mediu mineral simplu, dacă conține sări de amoniu ca sursă de azot, glucoză ca sursă de carbon și biotină (10). Pe același mediu mineral, fără glucoză, dar conținând alcaloidul nicotină, microorganismul se dezvoltă cu formarea unui pigment difuzabil, intens colorat în albastru, cunoscut sub numele de albastru-nicotină (nicotine-blue, NB). În culturile mai vechi, acest pigment capătă tente roșiatice sau galben-maronii. Capacitatea speciei *Arthrobacter nicotinovorans* de a degrada nicotina și de a forma pigmentul albastru este legată de prezența plasmidului catabolic pAO1, pe care se află genele ce

codifică enzimele implicate în această cale metabolică.

Plasmidele catabolice sunt în general de dimensiuni mari, peste 100 de kb, și, deși nu conțin gene esențiale pentru supraviețuirea gazdei, oferă acesteia o înaltă versatilitate metabolică și capacitatea de a utiliza ca sursă de carbon și azot diferiți compuși naturali sau sintetici. Sunt de asemenea responsabile de răspândirea pe linie orizontală, inter-specifică a acestor proprietăți.

Plasmidul pAO1 a fost izolat pentru prima dată în 1984 de către Brandsch și Decker (2), iar în 2003 a fost complet secvențiat de Igloi și Brandsch (7). Secvența poate fi găsită în baza de date GenBank și are indicativul gi|25169022, iar în baza de date EMBL-EBI are indicativul AJ507836. Demn de menționat este faptul că, deși au fost identificate numeroase plasmide catabolice, numărul celor complet secvențiate este mic.

Analiza cantitativă a bazelor azotate din secvența pAO1 arată un conținut de G+C de 59,7%, mai scăzut decât nivelul de G+C caracteristic speciei, dar încadrându-se în limitele caracteristicile genului. Dacă se urmărește distribuția conținutului de G+C funcție de poziția pe secvență, se poate observa clar că, la fel ca majoritatea plasmidelor mari, pAO1 are o structură modulară, fiind alcătuit din blocuri de gene achiziționate pe parcursul evoluției prin transpoziții succesive. Un exemplu clar este porțiunea dintre Tn554 și IS1473 conținând genele de la *orf52* până la *orf96*. Pe lângă prezența elementului de inserție și factorului de transpoziție, conținutul de GC este de aproximativ 56%, mai scăzut decât conținutul mediu al plasmidului. Aceste trei elemente demonstrează clar că acest fragment (și deci implicit calea metabolică pe care o codifică) a fost preluat de la un alt microorganism sau plasmid care avea un conținut de GC diferit de pAO1.

Dimensiunea plasmidului este de 163 127 bp și se pare că 83,2% din secvență codifică proteine. Astfel au fost descrise un număr de 126 cadre de citire (ORF – open reading frames) care sunt similare cu proteine caracterizate sau cu funcție presupusă. Alte 39 de ORF-uri au fost identificate manual, fără însă a avea un grad înalt de similitudine cu secvențele din bazele de date investigate. ORF-urile sunt distribuite egal pe cele 2 catene cu 79 pe una și 85 pe cealaltă. Pe baza similitudinii secvenței cu diferite proteine cu funcție cunoscută cadrele de citire au fost împărțite funcție de rolul lor în: proteine implicate în replicare, conjugare, transpoziție, rezistență la antibiotice și utilizarea nutrienților. O prezentare generală a acestui plasmid cu amplasarea cadrelor de citire se poate observa în figura 4.

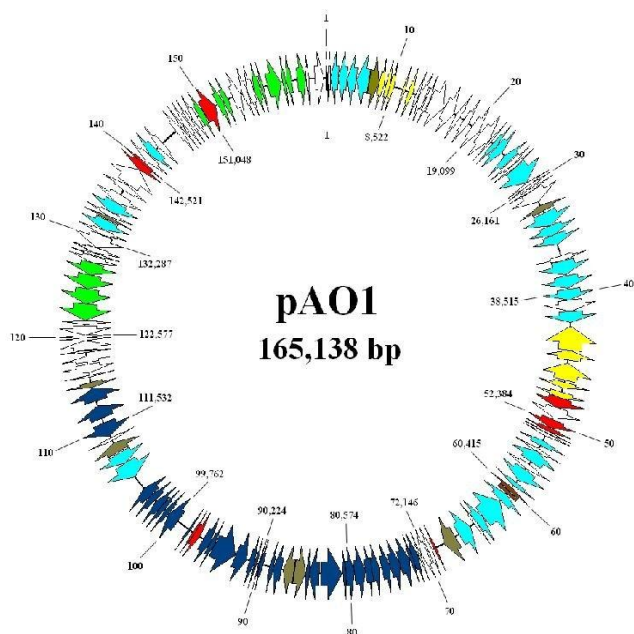


Figura 4. Cadrele de citire de pe plasmidul pAO1. Cu roșu sunt reprezentate genele implicate în transpoziție, cu galben cele implicate în replicare, cu albastru închis cele implicate în utilizarea nicotinei, albastru deschis în metabolizarea glucidelor, alb cu funcție necunoscută (Brandsch și colab., nepub).

Bibliography/Bibliografie

- (1) Borodina, E., Donovan, P. K., Schumann, P., Rainey, A. F., Ward-Rainey, L. N. & Wood, P.A. (2002). Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov. *Arch. Microbiol*, *177*, 173-183.
- (2) Brandsch, R. & Decker, K. (1984). Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxidans*. *Archives of Microbiology*, *138*, 15-7.
- (3) Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M. & Tiedje, J.M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, *37*, D141-D145.
- (4) Ganzert, L., Bajerski, F., Mangelsdorf, K., Lipski, A. & Wagner, D. (2011). *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil. *International Journal of Systematic*

- and Evolutionary Microbiology*, 61, 979-984.
- (5) Hildebrandt, P., Wanarska, M. & Kur, J. (2009). A new cold-adapted beta-D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c - gene cloning, overexpression, purification and properties. *BMC Microbiology*, 9, 151.
 - (6) Husserl, J., Spain, J. C. & Hughes, J.B. (2010). Growth of *Arthrobacter* sp Strain JBH1 on Nitroglycerin as the Sole Source of Carbon and Nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1689-1691.
 - (7) Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2003). Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *Journal of Bacteriology*, 185, 1976-86.
 - (8) Imirzalioglu, C., Hain, T., Hossain, H., Chakraborty, T. & Domann, E. (2010). Erythema caused by a localised skin infection with *Arthrobacter mysorens*. *BMC Infectious Diseases*, 10, .
 - (9) Jerke, K., Nakatsu, C. H., Beasley, F. & Konopka, A. (2008). Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids. *Plasmid*, 59, 73-85.
 - (10) Keddie M.R., Collins M.D., Jones D. (1984), Genus *Arthrobacter*, Conn and Dimmick, 1942 - *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition, Williams & Wilkins,
 - (11) Kodama, Y., Yamamoto, H., Amano, N. & Amachi, T. (1992). Reclassification of 2 Strains of *Arthrobacter oxydans* and proposal of *Arthrobacter nicotinovorans* Sp-Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 234-239.
 - (12) Kurakake, M., Takao, J., Asano, O., Tanimoto, H. & Komaki, T. (2011). Production of L-Arabinose from Corn Hull Arabinoxylan by *Arthrobacter aurescens* MK5 alpha-L-Arabinofuranosidase. *Journal of Food Science*, 76, C231-C235.
 - (13) Lee Jung-Sook, Lee Keun Chul, Pyun Yu-Ryang, Bae Kyung Sook, (2003). *Arthrobacter koreensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1277-1280.
 - (14) Levin, B. & Bergstrom, C. (2000). Bacteria are different: Observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 6981-6985.
 - (15) Liu, P., Zhang, J. & Zhou, N. (2010). Characterization and mutagenesis of a two-component monooxygenase involved in para-nitrophenol degradation by an *Arthrobacter* strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, 293-299.
 - (16) Loveland-Curtze Jennifer, Sheridan P Peter, Gutshall R Kevin, Brenchley E Jean, (1999). Biochemical and phylogenetic analyses of psychrophilic isolates belonging to the *Arthrobacter* subgroup and description of *Arthrobacter psychrolactophilus*, sp. nov. *Archives of Microbiology*, , 355-363.
 - (17) Manage, P. M., Edwards, C., Singh, B. K. & Lawton, L.A. (2009). Isolation and Identification of Novel Microcystin-Degrading Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6924-6928.

- (18) Megharaj, M., Avudainayagam, S. & Naidu, R. (2003). Toxicity of Hexavalent Chromium and Its Reduction by Bacteria Isolated from Soil Contaminated with Tannery Waste. *Current Microbiology*, *47*, 51-54.
- (19) Mongodin, E. F., Shapir, N., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Emerson, J. B., Shvartzbeyn, A., Radune, D., Vamathevan, J., Riggs, F., Grinberg, V., Khouri, H., Wackett, L. P., Nelson, K. E. & Sadowsky, M.J. (2006). Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genetics*, *2*, e214.
- (20) Monnet, C., Loux, V., Gibrat, J., Spinnler, E., Barbe, V., Vacherie, B., Gavory, F., Gourbeyre, E., Siguier, P., Chandler, M., Elleuch, R., Irlinger, F. & Vallaes, T. (2010). The *arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PLoS ONE*, *5*, e15489.
- (21) Parschat, K., Hauer, B., Kappl, R., Kraft, R., HÄ¼ttermann, J. & Fetzner, S. (2003). Gene Cluster of *Arthrobacter ilicis* RÄ¼61a Involved in the Degradation of Quinaldine to Anthranilate. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 27483-27494.
- (22) Pindi, P. K., Manorama, R., Begum, Z. & Shivaji, S. (2010). *Arthrobacter antarcticus* sp. nov., isolated from an Antarctic marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*, 2263-2266.
- (23) Rasko, D. A. & Mongodin, E.F. (2005). The first decade of microbial genomics: what have we learned and where are we going next?. *Genome Biology*, *6*, 341.
- (24) Rong, L., Guo, X., Chen, K., Zhu, J., Li, S. & Jiang, J. (2009). Isolation of an Isocarboxiphos-Degrading Strain of *Arthrobacter* sp scl-2 and Identification of the Degradation Pathway. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*, 1439-1446.
- (25) Sahoo, N. K., Pakshirajan, K. & Ghosh, P.K. (2010). Enhancing the biodegradation of 4-chlorophenol by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 via medium development. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *64*, 474-480.
- (26) Sandu, C., Chiribau, C., Sachelaru, P. & Brandsch, R. (2005). Plasmids for Nicotine-Dependent and -Independent Gene Expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and Other *Arthrobacter* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 8920-8924.
- (27) Stackenbrandt, E., Rainy F.A, Ward-Rainey, N., (1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov.. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, *47*, 479-491.
- (28) Wagenknecht, M. & Meinhardt, F. (2011). Copy number determination, expression analysis of genes potentially involved in replication, and stability assays of pAL1-the linear megaplasmid of *Arthrobacter nitroguajacolicus* Ru61a. *Microbiological Research*, *166*, 14-26.
- (29) Wang, J., Zhu, L., Liu, A., Ma, T., Wang, Q., Xie, H., Wang, J., Jiang, T. & Zhao, R. (2011). Isolation and characterization of an *Arthrobacter* sp strain HB-5 that transforms atrazine. *Environmental Geochemistry and Health*, *33*, 259-266.
- (30) Wang, Y., Hu, Y., Wang, J., Yu, Y., Song, Y., Yang, G. & Geng, G. (2010). Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp HW08 capable of biodegrading swainsonine.

- African Journal Of Microbiology Research*, 4, 1635-1638.
- (31) Wauters Georges, Charlier Jacqueline, Janssens Michele, Delmee Michel, (2000). Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, , 2412-2425.
- (32) Westerberg, K., Elvang, M. A., Stackebrandt, E. & Jansson, K.J. (2000). *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, , 2083-2092.
- (33) Yoshiaki Kawamura, Nagatoshi Fujiwara, Takashi Nakazaki, Hongsheng Liu Xinxiang, Huang Kazuo Kobayashi, Takayuki Ying Li, (2004). *Rothia aerea* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter ruscicus* sp. nov., isolated from air in the Russian space laboratory Mir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 827-835.

Capitolul II. Organizarea genică a megaplasmidului pAO1

II.1. Gene implicate în replicare

Una dintre proprietățile fundamentale ale tuturor plasmidelor, fără de care acestea nu au autonomie, este capacitatea lor de a se replica independent de cromozomul bacterian. Sinteza ADN-ului se realizează urmând regulile replicării semi-conservative a ADN-ului la care se adaugă o serie de particularități ce rezultă din structura de cerc - închis a plasmidului.

În general replicarea se realizează între un situs de inițiere *ori* și unul de terminare *ter*, fragmentul de ADN dintre aceste 2 situs-uri constituind o unitate de replicare, adică un *replicon* (13). Plasmidul constituie un replicon independent de cromozomul bacterian, însă poate fi legat de acesta prin enzimele necesare replicării (polimeraza, spre exemplu), acestea fiind codificate de gene plasate pe cromozom.

Originea de replicare *ori* este o zonă bogată în A-T, pentru a fi ușor de desfăcut cele 2 catene în vederea inițierii sintezei ADN-ului. La *E. coli* există o singură origine de replicare pe cromozom, origine ce a primit numele de *oriC*. Adăugarea în mod artificial a acestei origini pe orice fragment ADN circular îl transformă într-un plasmid autoreplicabil în *E.coli*. Secvența acestei origini a fost descrisă și se constituie din 245 de nucleotide, conținând 7 secvențe repetitive în tandem (3 secvențe cu 13 baze și 4 cu 9 baze) (10).

Originea de replicare *ori* nu este importantă doar pentru inițierea replicării, ci are implicații și în reglarea numărului de copii existente pe celulă și de asemenea în fenomenele de incompatibilitate. Este binecunoscut faptul că un plasmid dat poate exista în celulă într-o singură copie sau în copii multiple. Numărul de copii este o consecință directă a mecanismelor de control al replicării, mecanisme care în general sunt de tip negativ. Ele au fost clasificate în două categorii mari, o primă categorie fiind cele ce funcționează după mecanismul inhibitor-țintă, iar a doua categorie cele ce funcționează după mecanismul numit *iteron-binding* (10).

În cazul primului mecanism, inhibitorul este o moleculă de ARN care acționează asupra unei a doua molecule de ARN. Aceasta fie codifică o proteina Rep necesară replicării, fie funcționează ca primer pentru ADN-polimeraza. Un exemplu de acest tip de control al replicării este plasmidul ColE1, pe care îl vom descrie mai în detaliu atunci când vom vorbi despre fenomenul de incompatibilitate, plasmidul pT181 de la stafilococi sau plasmidul F.

Cel de-al doilea mecanism a primit numele de la trăsătura sa esențială, și anume prezența unor secvențe repetitive de aproximativ 20 de perechi de baze, numite iteroni (10). Aceștia sunt plasați în apropierea originii de replicare și a genelor inițiatoare a replicării *rep*. Asemenea sistem se întâlnește în cazul plasmidelor P1, R6K, și pSC101.

Indiferent care ar fi mecanismul de acțiune, controlul replicării are în vedere păstrarea constantă a numărului de origini de replicare existente în celulă și, prin aceasta, numărul de copii ale plasmidului.

În general, numerotarea bazelor azotate din secvența plasmidului se face începând de la originea de replicare *ori*. Caracteristic pentru pAO1 este faptul că nu au putut fi identificate nici unul din elementele cheie ce marchează specific originea de replicare: secvențele repetitive în tandem (iteroni) sau genele *rep*. De altfel acest lucru nu a fost posibil pentru nici unul din plasmidii izolați din specii aparținând genului *Arthrobacter* secvențiați până în prezent (6). Poziționarea originii rămâne deci necunoscută și din aceste motive numerotarea bazelor azotate începe de la situsul de restricție al enzimei BamH1 (4).

O problemă ce trebuie rezolvată de către procesul de replicare plasmidială este împărțirea (partiția) plasmidelor nou produse între cele două celule fiice. În cazul plasmidelor ce există într-un număr mare de copii în celulă, nu este necesară existența unor sisteme speciale pentru a realiza acest lucru, simpla împărțire pe baza unor legi probabilistice fiind suficientă.

În cazul plasmidelor ce sunt menținute într-o singură copie în celulă există un mecanism specific prin care se asigură ca fiecare celulă fiică să primească câte un exemplar. Acest sistem de partiționare cuprinde 2 gene *par* (*parA* și *parB*) și o secvență specifică cu care acestea interacționează (*parS*). *ParA* este o ATP-ază care interacționează cu *ParB*, iar aceasta din urmă se leagă de secvența *parS*. Această secvență are lungimea de 34 perechi de baze și constă din 3 situsuri de recunoaștere pentru 2 proteine diferite. Un prim situs este recunoscut de IHF, proteină dimeră care, odată legată, îndoiește molecula de ADN și apropie celelalte două situsuri (*boxA* și *boxB*) făcându-le accesibile dimerului format din *ParB*. Interacțiunea dintre *ParA* și *ParB*, deși este tranzitorie, este una esențială pentru buna desfășurare a procesului (10).

ParS joacă același rol pe care îl are centromerul pentru celula eucariotă. Odată toate aceste proteine legate de *parS*, se formează o structură ce ancorează cele 2 plasmide fiice independent una de cealaltă. Modul exact în care se desfășoară mai departe deplasarea este încă necunoscut, dar nu este exclusă implicarea *ParA*

(în special datorită funcției ATP-azice) și legarea de septul format în timpul diviziunii celulei bacteriene.

Ca o metodă suplimentară unele plasmide dispun de un mecanism strategic prin care se asigură că celulele fiice dețin plasmidul după diviziune. Astfel, ele codifică pe de o parte o toxină cu un timp de înjumătățire foarte mare și, pe de altă parte, antidotul pentru această toxină cu un timp de înjumătățire redus. Strategia e simplă: după diviziune ambele celule moștenesc o cantitate de toxină și antidot. Antidotul dispare rapid iar cantitatea de toxină este suficientă săucidă celula lipsită de plasmidul capabil să producă antidotul. Celulele lipsite de plasmid sunt deci condamnate la moarte. Un exemplu în acest sens este plasmidul R1 în care toxina este o proteină iar antidotul o moleculă de ARN antisens ce se leagă de ARNm pentru toxină (10). *pAO1* conține două gene care probabil formează un sistem toxina-antitoxina *orf30* (HipA) și *orf30* HipB.

Cum am amintit mai sus, originea de replicare este implicată și în fenomenul de incompatibilitate. Incompatibilitatea apare ca urmare a imposibilității celulei de a distinge între două origini de replicare într-un moment esențial pentru plasmid (replicare sau segregare), astfel încât cele două origini (plasmide) segregă sau una dintre ele dispare. Cel mai bine studiat și explicat este mecanismul de incompatibilitate din cazul plasmidului ColE1. Acesta este un plasmid ce există în aproximativ 20 de copii pe celulă. Replicarea acestuia începe prin sinteza unei catene ARN la aproximativ 555 de nucleotide de originea de replicare. Atunci când sinteza acestei catene ARN atinge originea, nucleaza H clivează molecula de ARN într-un situs specific, iar fragmentul rămâne fixat pe ADN și oferă un capăt 3'-OH, funcționând ca amorsă (primer) pentru ADN polimeraza.

De pe catena opusă, din aceeași regiune o altă moleculă de ARN poate fi produsă (numită ARNi). Aceasta se poate lega de amorsă (primer), legarea ducând la imposibilitatea realizării clivării. Transcripția continuă și replicarea nu se mai produce din lipsa amorsei (primerului). Prin controlul concentrației de ARNi se realizează deci un control al replicării și, prin aceasta, al concentrației numărului originilor de replicare (12). Dacă se introduce în celulă un nou plasmid cu aceeași origine de replicare acesta nu va fi replicat (deoarece numărul de origini de replicare este strict controlat) și va segregă în momentul diviziunii (îl va moșteni doar una dintre celule, nu și cealaltă).

Un element deosebit de important pentru procesul de replicare plasmidială îl constituie și secvențele de terminare. Odată inițiată replicarea, ea poate continua unidirecțional sau bidirecțional. În cazul în care se realizează bidirecțional, este

necesar ca cele 2 furci de replicare să fie coordonate, în așa fel încât replicarea să se sfârșească într-o regiune bine determinată. Acesta este rolul regiunilor terminatoare. Ele sunt plasate în așa fel încât furca de replicare de pe o parte, pentru a ajunge la regiunea *ter* corespunzătoare ei trece peste regiunea *ter* corespunzătoare celeilalte furci. Atunci când atinge *ter*, replicarea se oprește și furca care ajunge prima o așteaptă pe cealaltă. În acest fel celula se asigură că replicarea moleculei circulare s-a realizat complet și s-a sfârșit într-un punct determinat.

Câteva clustere cu gene codificând posibile proteine implicate în replicare au fost identificate în secvența plasmidului pAO1. Un prim asemenea cluster începe cu *orf*-urile 7, 8 și 9, proteine asemănătoare cu *ParB*, continuă cu *orf11*, similar cu proteine ce se leagă de ADN-ul monocatenar și se termină cu *orf18*, similar cu un factor de control al transcripției genelor implicate în partiționare (*kfrA*).

Caracteristic pentru pAO1 este faptul că gena similară cu *parB* pare a fi fragmentată în 3 *orf*-uri distincte, iar *orf143*, asemănător cu *parA* este plasată la aproximativ 28 kb de *parB*, într-un set de ORF-uri (142 până la 149) cu funcție necunoscută. Aceasta distanță între *parA* și *parB* pare a fi o caracteristică a plasmizilor aparținând acestui gen (5). Bucla P-loop, caracteristică pentru *parA* și omologilor acesteia poate fi identificată și în *orf143*. O comparație între modul de aranjare a acestor gene în plasmidul P1 din *E. coli* și pAO1 este prezentat în figura 5.

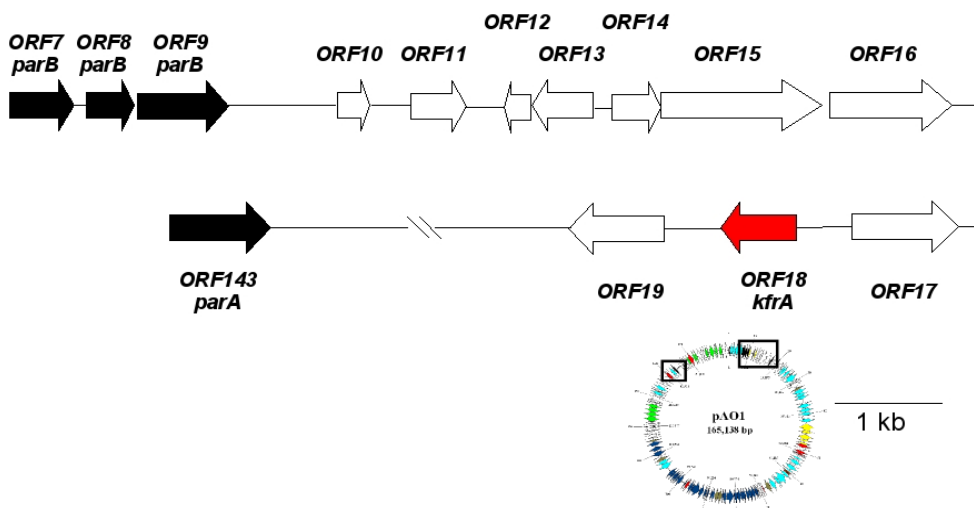


Figura 5. Modul de aranjare a celor 2 clustere de gene posibil a fi implicate

în replicarea plasmidului pAO1.

Un al doilea cluster posibil a fi implicat în replicare conține cadrul de citire numărul 43, cel mai mare ORF identificat în pAO1, similar cu o helicază, și ORF-urile 44,45,46. Funcția acestora este încă neelucidată, neavând nici un grad de homologie cu proteine cunoscute.

II:2 Gene implicate în conjugare

Conjugarea este un fenomen frecvent în lumea bacteriilor, fenomen ce implică transferul de gene între 2 celule aflate în contact. Cel mai frecvent acest transfer implică un plasmid însă, în anumite condiții, fragmente sau chiar întreg cromozomul bacterian pot fi transferate.

Există două condiții distincte ce trebuie îndeplinite pentru ca fenomenul de conjugare să aibă loc. Prima este ca celulele să fie capabile să intre în contact în mod specific (în principal prin formare de pili), iar a doua condiție este ca în interiorul acestor celule să existe molecule de ADN mobilizabile. Incapacitatea de a îndeplini oricare din aceste 2 condiții duce la imposibilitatea realizării transferului.

Foarte bine studiat este mecanismul conjugării în cazul factorului F la *E. coli*, acesta fiind descoperit în 1946 de Laderberg și Tatum (11). În acest proces este implicat un plasmid de aproximativ 100 kb pe care se află toate genele necesare transferului. Celulele de *E.coli* care nu au acest plasmid nu pot realiza conjugare și poartă numele de F⁻. În interiorul celulelor, plasmidul poate exista în trei stări distincte: ca entitate auto-replicativă, independentă de cromozom (celule F⁺), integrat în cromozom (caz în care celulele realizează conjugări foarte frecvent, Hfr) sau ca entitate replicativă independentă conținând însă și gene preluate de pe cromozomul bacterian (plasmid F[']).

Factorul F conține patru regiuni distincte (11): regiunile numite *inc* și *rep* responsabile de replicare, o regiune cu 4 elemente transpozabile și regiunea *tra* responsabilă de transferul propriu-zis. Această ultimă regiune măsoară aproximativ 33 kb și conține 40 de gene (11), organizate în 2 grupe *tra* și *trb*. În cadrul clusterului *tra*, grupul de gene de la *traY* până la *traI* formează o unitate de transcripție (un operon), *traM* și *traJ* fiind exprimate separat. Reglarea activității este realizată de *traJ*, care activează atât *traY-I* cât și *traM*. Dintre toate aceste gene numai 4 sunt direct responsabile de transferul ADN-ului, restul fiind implicate în realizarea și menținerea contactului între celule.

Transferul factorului F de la o celulă F⁺ la F⁻ debutează prin realizarea unei punți de legătură între cele 2 celule. Puntea este reprezentată dintr-un pil, structură formată prin polimerizarea produsului genei *traA*, pilina. În procesul de maturare a produsului genei și de edificare a structurii pilului sunt implicate cel puțin alte 12 gene *tra*. Receptivitatea celulei pentru atașarea de pil este de asemenea codificată în plasmid, genele *traS* și *traT* codificând o serie de proteine membranare ce împiedică atașarea pilului de membrană. Celulele ce expun aceste proteine la exterior, au deja factorul F și nu pot avea rol de celule receptoare.

Odată pilul format, el funcționează ca un tunel, prin care ADN-ul este transferat de la celula donoare la cea acceptoare. Mecanismul molecular al acestui transfer nu este încă în totalitate cunoscut (8), fiind propus un proces alcătuit din 2 etape. Se presupune că proteina TrwC acționează ca un adaptor, clivează una dintre catene într-un situs specific desemnat *oriT* (prin analogie cu originea de replicare) și rămâne atașată covalent de această catenă la capătul 5'. La nivelul pilului există un sistem de proteine ce aparțin sistemului de secreție transmembranară de tip IV care recunosc TrwC și o transportă prin membrană, antrenând și catena de care este atașată. Acest transport este unul activ, necesitând ATP.

În cazul factorului F clivarea catenei este realizată de acțiunea cuplată a produsului genelor *tral*, *traY* și *traM*. În urma transferului, în celula donoare pe baza catenei rămase se sintetizează o nouă catenă complementară, iar în celula acceptoare ca matriță se folosește catena nou introdusă.

După realizarea transferului contactul dintre celule se desface fără a apare leziuni vizibile la nivelul celulelor. Modul în care se realizează acest lucru este însă puțin înțeles.

Plasmidul pAO1 este și el unul conjugativ, așa cum experimentele realizate de Igloi și colab.(4) au demonstrat. Autorii au împerecheat o sușă de *Arthrobacter nicotinovorans* lipsită de pAO1 și rezistentă la cloramfenicol (prin integrarea genei de rezistență pentru acest antibiotic cu ajutorul unui transpozon în cromozomul bacterian) cu tulpina posedând plasmidul pAO1, sensibilă la cloramfenicol. Rezultatul a fost obținerea unei tulpini rezistente la cloramfenicol care putea metaboliza nicotina (și deci posedă plasmidul). Frecvența de conjugare a fost de $10^3 - 10^2$.

Analiza cadrelor de citire aflate pe pAO1 indică care gene ar putea fi implicate în realizarea transferului plasmidului de la o celulă la alta. În primul rând *orf124* a fost descrisă în 2003 de către Igloi și colab. (4) ca având similitudini cu o proteină membranară TrsK, implicată în procesul conjugativ. Un nou BLAST

arată că similitudinea are scorul de 40.4 biți, și un E value de 0,25, însă noi proteine descoperite au un grad de omologie mai mare. Astfel, *orf124* pare a fi înrudită cu VirD4, proteină aparținând sistemului de excreție transmembranară de tip IV, realizând un scor de 59,3 și un E value de $5e^{-07}$.

Orf127 ar putea fi asociată și ea cu conjugarea, fiind asemănătoare cu gena *trbL*, produsul căreia face parte din complexul implicat în transferul conjugativ al ADN-ului la *Rhodococcus equi*. *Orf126* are similitudini cu o proteină membranară, iar *orf125* cu o proteină ce leagă ATP-ul. Toate aceste gene sunt plasate în aceeași direcție și par a forma un bloc cu alte ORF-uri cu funcție total necunoscută. În sens opus se află *orf134* care se aseamănă cu un presupus factor de reglare a transcripției din *C. glutamicum* ATCC 13032. Această genă ar fi deci un bun candidat pentru reglarea activității întregului operon descris mai sus. O reprezentare grafică a modului de dispoziție a acestor gene este prezentată în figura 6.

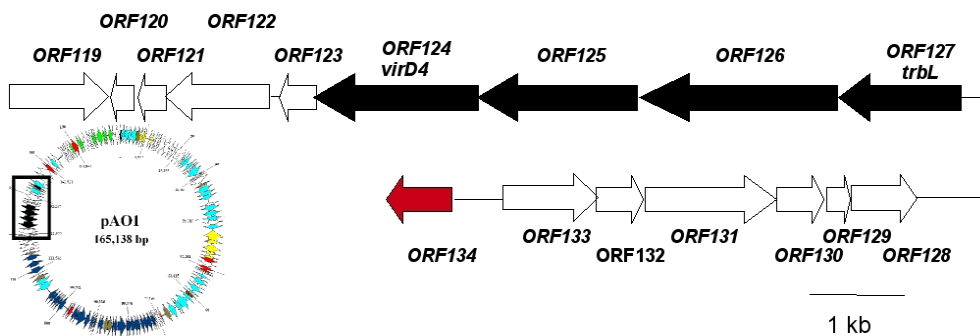


Figura.6 Modul de aranjare a celor 5 cadre de citire posibil a fi implicate în conjugare și amplasarea lor pe megaplasmidul pAO1.

Pe lângă acestea, demn de menționat este și *ORF162* care este similară pe toată lungimea ei cu *dprA* (echivalentă cu *sfm* din *E.coli*), genă esențială în competența speciilor de *Haemophilus* sau *Helicobacter*. Mai mult decât atât, o secvență de 376 bp de la capătul 5' al *ORF162* este repetată la capătul 5' al *ORF164*. Prezența acestor 2 fragmente repetitive la ambele capete al *ORF162* ar putea sugera implicarea în evenimentele de recombinare ce pot avea loc în timpul acceptării ADN-ului plasmidial.

II.3. Gene implicate în fenomenele de transpoziție

Evoluția genomului bacterian se realizează prin două modalități esențiale: achiziția de noi secvențe și rearanjarea celor preexistente (7). Modul de realizare a acestor fenomene a constituit mult timp o necunoscută, considerându-se că doar recombinarea omoloagă singură este responsabilă de modificările materialului genetic. Descoperirea de către B. McClintock a elementelor transpozabile din porumb a uimit lumea științifică și a cauzat numeroase dispute.

La ora actuală este pe deplin acceptată nu numai existența acestor elemente atât la eucariote cât și la procariote, dar și importanța deosebită pe care acestea o au în evoluție. Prin definiție, elementele transpozabile sunt elementele genetice capabile să își schimbe poziția în cadrul moleculei de ADN prin transpoziție și integrare, independent de fenomenele de recombinare omoloagă (14). Caracteristic pentru fenomenul de transpoziție este lipsa oricărei legături între secvența donor și cea acceptor. Mobilizarea se poate realiza direct ca ADN sau printr-un intermediar ARN, din acest punct de vedere transpozoni se clasifică în 2 mari clase (7)).

Primele elemente transpozabile descoperite aveau o structură simplă și au primit numele de elemente de inserție (insertion elements, IS). Datorită dimensiunilor mici, ele nu conțin alte gene în afara celor necesare pentru realizarea propriei lor mobilități. Caracteristic acestor elemente este prezența la ambele capete a unor scurte secvențe de baze repetate și inversate (inverted repeats), iar în interior a unei gene ce codifică o transpozază. Această proteină este responsabilă de controlul ratei de inserție (8). Notarea lor se face cu literele IS urmate de numere. Numerele indică clasa din care fac parte, în ordinea descoperirii.

Transpozoni sunt elemente transpozabile de dimensiuni mai mari, care alături de genele necesare pentru propria lor mobilitate conțin și gene ale gazdei. La ora actuală au fost descrise 2 tipuri de transpozoni: compuși și simpli (3). Cei compuși sunt alcătuiți din 2 IS aproape identice ce flanchează restul de secvență a transpozoniului, constituind așadar 2 secvențe repetate inversate de dimensiuni mari (inverted repeats, IR). Mobilitatea se realizează concomitent, deoarece doar una din transpozazele codificate de IS este funcțională, cealaltă fiind inactivă datorită unor mutații. Un exemplu din acest tip de Transpozoni este *Tn10*, ce conține 2 IS₁₀ iar în interior o genă ce conferă rezistență la tetraciclină.

Transpozoni simpli se aseamănă cu cei compuși dar IS nu conțin gene pentru transpozază. Mobilizarea se realizează prin intermediul unui transpozaze plasate între cele 2 elemente de inserție. Un exemplu este *Tn3*, care, pe lângă IR

care îi marchează începutul și sfârșitul, conține și o genă pentru transpozază, un element de control al expresiei acesteia și o genă pentru rezistența la antibiotice.

În privința procesului de transpoziție la ora actuală există un număr de 4 modele de realizare: transpoziția replicativă, conservativă, prin excizie și prin retrotranspoziție (14). Primele trei modele au o serie de elemente comune. Astfel procesul debutează prin clivarea moleculei acceptoare în mod specific de către transpozază. Clivarea moleculei de ADN acceptoare se realizează pe ambele catene, însă în situs-uri diferite, astfel încât capete rezultate sunt monocatenare, coezive. Inserția ADN-ului transpozozonului se face între aceste capete. Capetele moleculei de ADN ce alcătuiește transpozozonul sunt însă drepte, de aceea prin inserție vor apare 2 zone monocatenare de o parte și de alta a transpozozonului. Acestea vor fi reparate de gazdă și vor forma 2 secvențe repetitive. Aproape toate elementele transpozabile sunt flancate de această repetiție a situsului de integrare (3), constituind alături de IR un marker de recunoaștere a acestora.

Transpoziția replicativă presupune formarea unui intermediar de fuziune între molecula donoare și cea acceptoare și, din aceste motive, este necesară o enzimă suplimentară care să realizeze desfacerea intermediarului. Numele arată că în proces apare o dublare a Transpozozonului, astfel încât la sfârșitul procesului o copie rămâne în situs-ul donor, iar cealaltă este integrată în molecula acceptoare. Procesul debutează printr-o clivare a ambelor catene a ADN la nivelul situs-ului specific de integrare din molecula acceptoare. În molecula donoare, transpozaza realizează clivarea unei singure catene la un capăt, și a celeilalte catene la celălalt capăt al Tn. Ligarea duce la formarea a 2 porțiuni monocatenare (formate la cele 2 catene ale Tn). Sistemul reparator al gazdei completează pe baza catenei existente a doua catenă, replică Transpozozonul și formează intermediarul mai sus menționat. Desfacerea lui este realizată de o rezolvază codificată de Tn, ce asigură repartizarea celor 2 copii între molecula donoare și cea acceptoare (3).

Retro-transpoziția presupune formarea unui intermediar ARN care mai apoi este revers-transcris și integrat în molecula acceptoare.

Compararea secvenței plasmidului pAO1 cu bazele de date cu secvențe au indicat existența atât a elementelor de inserție cât și a transpozozonilor. Este deosebit de tentant de analizat plasarea acestor elemente în raport cu celelalte gene, deoarece permit emiterea unor ipoteze privitoare la apariția și evoluția acestui plasmid.

În ordinea în care au fost numerotate primele elemente transpozabile ce apar pe secvență sunt *ORF97* și *ORF98*, care alcătuiesc *IS1473*. Acest element de inserție este întâlnit într-o singură copie pe plasmid, între gena *ndhM* și *moaD*, și nu

apare pe cromozomul acestei specii. A fost însă demonstrată existența lui în ADN-ul total al speciilor înrudite, *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter ramosus* și *Arthrobacter ureafaciens*. Cele 2 orf-uri codifică 2 proteine ce au un mare grad de similitudine cu fragmente din transpozaze și integreze întâlnite în *IS481* și *IS1002* din *Bordetella*, *IS476* din *Xanthomonas campestris*. Cele două peptide sunt suprapuse și este foarte probabil ca, prin realizarea unei defazări -1 programate a cadrului de citire în poziția 97833, ele să fuzioneze pentru a forma transpozaza activă. Acest gen de mecanism este comun pentru elementele de inserție aparținând clasei 1(9).

Al doilea set de IS prezente pe pAO1 sunt reprezentate de *ORF140* și 141. Acestea au un grad mare de omologie cu *IS1473* și la fel ca acesta conține două peptide care ar putea fuziona printr-un salt -1 a cadrului de citire în poziția 142519 (4).

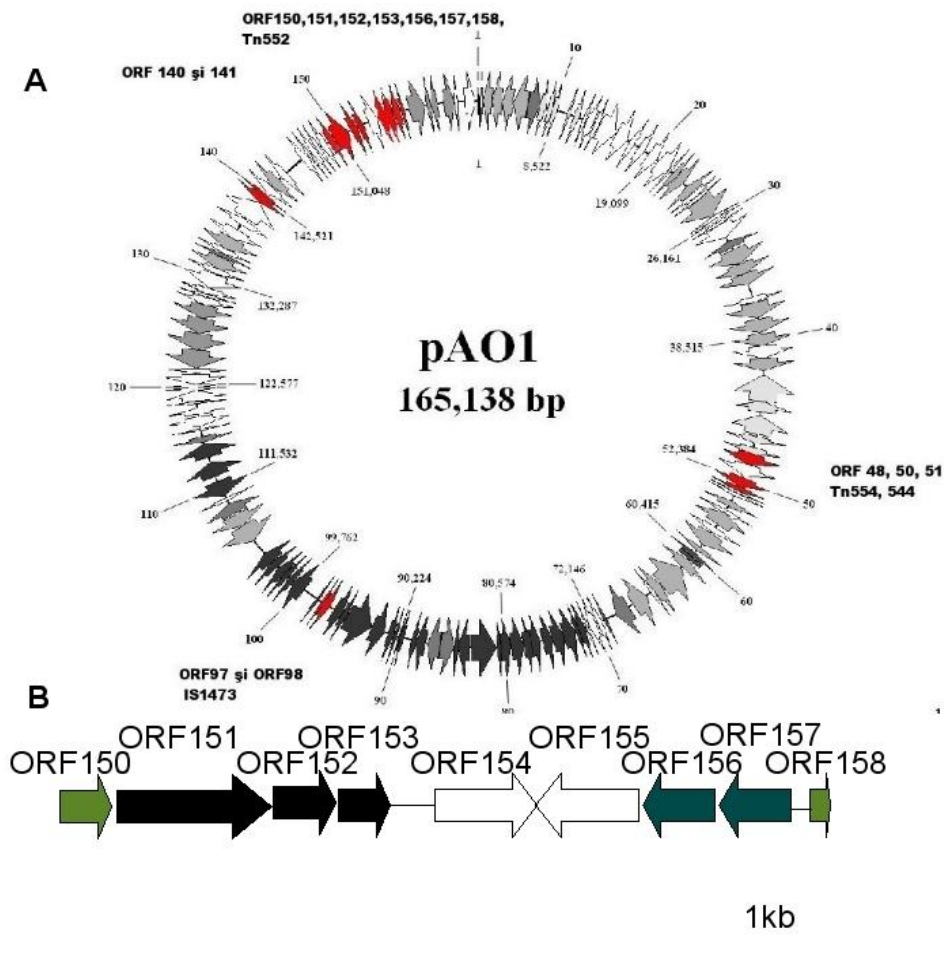


Figura 7. Elementele genetice transpozabile plasate pe pAO1 (A) și modul de aranjare al cadrelor de citire în presupusul transpozon Tn554.

Alături de aceste elemente transpozabile simple în secvența plasmidului pAO1 au fost identificați și 2 transpozoni compuși, ambii asemănându-se cu elemente transpozabile din *Staphylococcus aureus*. O primă indicație în acest sens este ORF48, care prezintă asemănări cu numeroase domenii înalt conservate implicate în procesele de transpoziție și recombinare (precum *cd01194*, *cd00798*, *cd01182*). Proteina codificată de această genă se aseamănă cu transpozaza A (TpnA) din Tn554 (scorul $205 e\text{-value } 2^{e-51}$).

ORF 50 și 51 pe de altă parte sunt similare cu *tpnB* și respectiv *tpnC* din

Tn544. Acest Transpozon este alcătuit din trei gene (*tpnA*, *tpnB*, *tpnB*) urmate de determinanții pentru rezistență la eritromicină și spectomicină. O privire mai atentă asupra genelor din această regiune arată ca între *ORF48* și *ORF50* se interpune o genă cu funcție necunoscută. Este deosebit de tentant a specula că aceasta codifică un factor de rezistență necunoscut. Cel de-al doilea presupus transpozon compozit se aseamănă cu *Tn552* din *S.aureus* (188). Acesta se poate integra urmând mecanismul replicativ, cu formarea unui co-integrat și presupune deci existența unei transpozaze și a unei rezolvaze. De asemenea elementul mai conține și o genă ce mediază rezistența la antibioticele beta-lactamice. Asemănător cu acesta, și presupusul transpozon din pAO1 este alcătuit din *ORF152* înrudit cu o proteina ce leagă ATP-ul, *ORF151* înrudit cu transpozaza din *Tn552*, *ORF153* asemănătoare cu recombinază din *Tn552*. O beta-lactamază nu a putut fi descrisă. Plasată 5' de cadrele de citire menționate se află *ORF150* ce codifică de asemenea o recombinază. Surprinzător, *ORF 158* reprezintă o copie a acesteia, lipsită de codonul start și de situs-ul de legare al ribozomului. Deoarece *ORF157* și *156* sunt ambele similare cu aceeași proteină cu funcție necunoscută, este posibil ca la acest nivel să se fi petrecut un fenomen de duplicare ca urmare a unei excizii incorecte a unui transpozon (din care a rămas doar recombinaza trunchiată).

II.4. Gene implicate în rezistența la antibiotice

Rezistența la antibiotice este frecvent codificată de gene plasate pe plasmide, oferind acestora o serie de avantaje selective. Pe pAO1 au fost descrise o serie de cadre de citire posibil implicate în rezistența la antibiotice. Astfel *ORF19* pare a codifica rezistența la vancomicină, iar *ORF60* și *ORF61* sunt cele 2 componente ale unei pompe de eflux cu specific foarte larg (1). Cu toate acestea nu au putut fi observate diferențe între tulpinile de *Arthrobacter nicotinovorans* cu și fără plasmid în privința rezistenței la vancomicină, sărurile de amoniu, bromură de etidiu sau metale grele (4)

II.5. Gene implicate în utilizarea nutrienților

Datele experimentale, alături de compararea genelor plasate pe plasmidul pAO1 cu cele existente în bazele de date arată că acest plasmid codifică pe de o parte calea metabolică de degradare a nicotinei (clusterul de gene *nic*), iar pe de altă

parte, o cale metabolică de degradare a carbohidraților. Genele implicate în realizarea acestor căi sunt prezentate în capitolul următor.

II.6. Apariția și evoluția megaplasmidului pAO1

Analiza conținutului G+C raportate la cadrele de citire identificate pe acest plasmid arată clar faptul că are o structură modulară, generată prin o serie de fenomene de transpoziție. Fragmentul de ADN cuprins între Tn554 și *IS1473* care conține genele implicate în metabolizarea nicotinei (*nic*) are un conținut de G+C mediu mai scăzut decât al restului de plasmid, 56% față de 62% (4), fiind clar că a fost achiziționat de la o specie cu un conținut al ADN-ului diferit în aceste 2 baze.

Transpozonii implicați în căi catabolice sunt frecvent plasați pe plasmide transmisibili și sunt flancați de elemente IS înrudite, dar nu identice. Pot avea dimensiuni mari, mai mult de 50 kB. Cel mai bine cunoscuți sunt cei implicați în degradarea compușilor aromatici. Este și cazul plasmidului pAO1, în care fragmentul cuprins între 97125 și 142769 este flancat de *IS1473* și 2 elemente de inserție înrudite cu acesta alcătuind un Transpozon. Conținutul mediu de GC este de asemenea diferit (60,2 % față de 62%) și conține genele implicate în producția cofactorului molibdenic și de asemenea 6-HDNO (4).

Așadar, plasmidul pAO1 s-a format în urma a 2 fenomene transpoziționale prin care pe un plasmid ancestral conținând cadrele de citire 1 până la 46 au fost grefate 2 fragmente, primul conținând calea de degradare a nicotinei și cel de-al doilea cu genele presupusele proteinei transportoare, genele pentru biosinteza cofactorului și *hdno*.

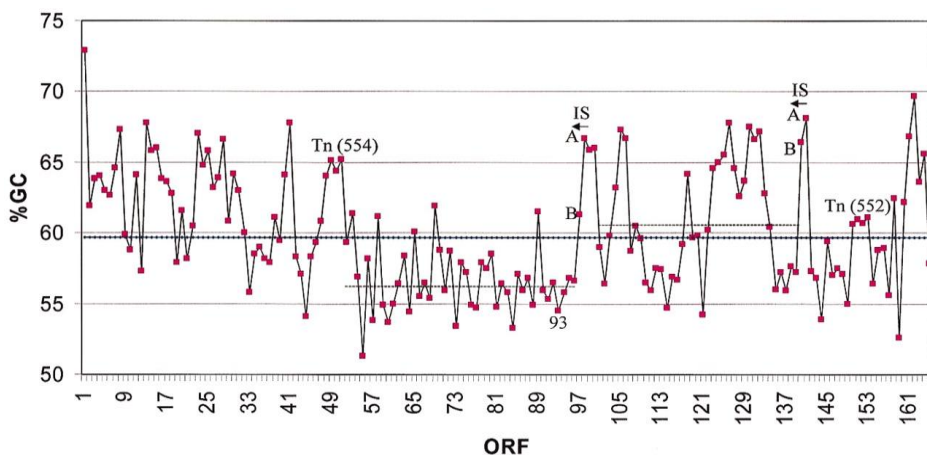


Figura. 8 Distribuția conținutului mediu de GC funcție de cadrul de citire. Linia punctată din zona orf-urilor 57-97 desemnează zona cu un conținut mediu GC de 56% (clusterul nic). Linia punctată din zona 105-140 desemnează a doua zonă cu conținut mediu GC de 60,2% cuprinzând genele implicate în producția cofactorului molibdenic și de asemenea 6-HDNO (după (4)).

Relativ recent, Ganas și colab. (2) au demonstrat faptul că genele implicate în metabolizarea nicotinei de pe plasmidul pAO1 se aseamănă cu gene din genomul speciei *Nocardioides* sp. JS614. Cele două specii nu sunt înrudite din punct de vedere taxonomic, aparținând unor familii și genuri diferite. Analizând conținutul de G+C al celor două grupe de gene asemănătoare din fiecare specie, autorii au demonstrat că atât în cazul lui *A. nicotinovorans* cât și în cazul speciei *Nocardioides*, genele pentru metabolizarea nicotinei diferă de restul genomului bacterian. Ele provin cel mai probabil de la o bacterie din sol și au fost achiziționate printr-un proces de transfer orizontal de gene mediat de un plasmid sau un fag.

Bibliography/Bibliografie

- (1) Ganas, P., Mihasan, M., Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2007). A two-component small multidrug resistance pump functions as a metabolic valve during nicotine catabolism by *Arthrobacter nicotinovorans*. *Microbiology*, 153, 1546-55.
- (2) Ganas, P., Sachelaru, P., Mihasan, M., Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2008). Two closely related pathways of nicotine catabolism in *Arthrobacter nicotinovorans* and *Nocardioides* sp. strain JS614. *Archives of Microbiology*, 189, 511-7.

- (3) Griffiths JF Anthony (2000), An Introduction to Genetic Analysis, W.E. Freeman, pp. 423-434
- (4) Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2003). Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *Journal of Bacteriology*, *185*, 1976-86.
- (5) Jerke, K., Nakatsu, C. H., Beasley, F. & Konopka, A. (2008). Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids. *Plasmid*, *59*, 73-85.
- (6) Jerke, K., Nakatsu, C. H., Beasley, F. & Konopka, A. (2008). Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids. *Plasmid*, *59*, 73 - 85.
- (7) Lewin Benjamin (2004), Genes VII, Pearson Prentice Hall, pp. 366-370
- (8) Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M. & de la Cruz Fd, F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*, *45*, 1-8.
- (9) Menéndez, C., Igloi, G. L. & Brandsch, R. (1997). IS1473, a putative insertion sequence identified in the plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans*: isolation, characterization, and distribution among *Arthrobacter* species. *Plasmid*, *37*, 35-41.
- Perlin, M. H. (2003). The Subcellular Entities a.k.a. Plasmids. In Y. E. Streips NU (Ed.), *Modern microbial genetics* (Volume 1, pp. 464-482). John Wiley and sons.
- (11) Porter RD (2003), Conjugation - Modern microbial genetics, John Wiley and sons, pp. 464-482
- (12) Reddy, G. S., Aggarwal, R. K., Matsumoto, G. I. & Shivaji, S. (2000). *Arthrobacter flavus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from a pond in McMurdo Dry Valley, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50 Pt 4*, 1553-61.
- (13) Robinson R (2002), Genetics (Macmillan Science Library), Gale, 256-259
- (14) Whittle, G. & Salyers, A. (2003), Transposons - An Increasingly Diverse Group of Elements - Modern microbial genetics, John Wiley and sons, pp. 464-482

Capitolul III . Metabolismul nicotinei în *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+

De departe cea mai intens studiată proprietate metabolică a tulpinii *Arthrobacter nicotinovorans* este capacitatea sa de a folosi nicotina ca sursă de C și N. Primii pași în descifrarea mecanismului de degradare a alcaloidului sus menționat au fost făcuți de echipa condusa de Sydney C. Rittenberg (26). Într-o suită de 8 lucrări publicate între 1958-1972, acest autor descrie aproape toți intermediarii ce apar pe parcursul procesului de metabolizare a nicotinei, fără însă a putea preciza în detaliu enzimele implicate în procesul de degradare. Legătura directă între megaplasmidul pAO1 și metabolizarea nicotinei este evidențiată experimental în 1984 de către K. Decker și R. Brandsch, (8). Ultimul dintre cei doi autori continuă foarte intens studiul căii de degradare a nicotinei și reușeste să caracterizeze aproape complet enzimele implicate în procesul de degradare și mecanismele lor de reglare a expresiei(6).

Capacitatea de a folosi nicotina ca sursă de carbon și oxigen nu este specifică doar acestei tulpini, ci a fost descrisă și la alte specii de bacterii precum *Pseudomonas putida* (56), *Bacillus*, *Achromobacter*, *Microsporium* și de asemenea la fungi.

Degradarea acestui alcaloid de către microorganisme se poate realiza pe 3 căi: printr-un atac la inelul piridinic, printr-un atac la inelul pirolidonic sau prin demetilare. În cazul speciei luate în discuție, metabolizarea debutează printr-o hidroxilare la inelul piridinic ce duce la activarea moleculei și face posibile din punct de vedere energetic etapele următoare ale degradării. Aceste etape pot fi grupate în reacții ce au ca finalizare desfacerea inelului piridinic, alcătuiind o așa numită cale metabolică superioară, și reacții de asimilare a catenei laterale, alcătuiind așa numita cale metabolică inferioară.

III.1. Desfacerea inelului pirolidinic

Capacitatea extractelor totale de *Arthrobacter nicotinovorans* de a oxida aerob nicotina a fost pentru prima dată semnalată de Hochstein în 1958 ((26); (25). Același autor reușește și izolarea din mediul de cultură, dar și din reacții *in vitro*, a primului produs a acestei căi sub forma unor cristale albe cu punctul de topire de 120-122⁰C . Proprietățile fizico-chimice ale compusul obținut au indicat că este 6-hidroxinicotină (25).

Enzima care realizează această primă reacție a fost purificată abia în 1988 de către Freudenberg și colab. (17). Este alcătuită din 3 subunități, una mare de 82kDa conținând cofactorul molibdenic, una mijlocie de 30 kDa cu FAD legat ne-covalent și una mică de 15 kDa cu 2 clusteri 2Fe-S. Masa moleculară în forma nativă a complexului este de 120 kDa (17), ceea ce corespunde unei structuri de forma $(\alpha\beta\gamma)_2$ (6). Numele enzimei este nicotin-dehidrogeaza (NDH, nicotin:acceptor oxido-reductaza (hidroxilantă)) și este codificată de 3 gene plasate pe pAO1 în aceeași direcție, după cum se poate vedea în figura 9.

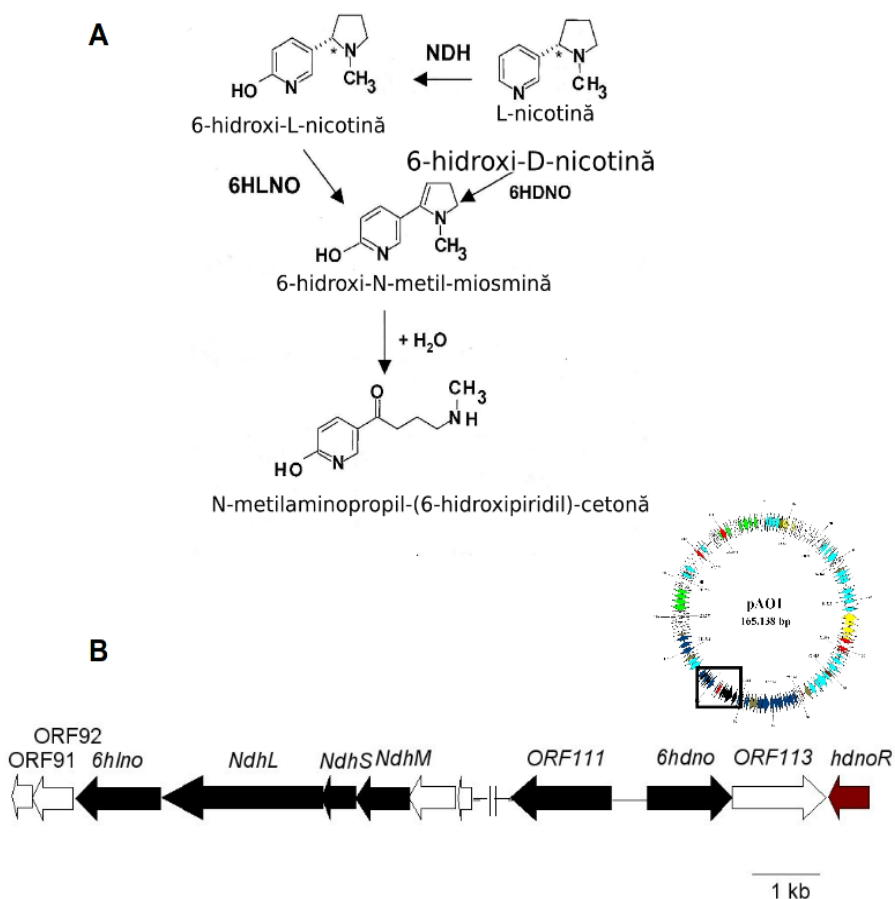


Figura 9. Primele etape în calea metabolică de degradare a nicotinei A, (după (6)) și modul de aranjare a genelor implicate (B) în cadrul plasmidului pAO1.

Următoarea etapă constă dintr-o oxidare realizată de 6-hidroxi-nicotin-oxidaza. Produsul acestei reacții este 6-hidroxi-metilmiosmina [3-(4,5-dihidro-1H-pirol-2-il)-piridina], compus instabil ce reacționează spontan cu apa formând 6-hidroxi-pseudo-oxinicotina. Astfel se explică de ce Hochstein și colab. reușesc să prepare o fracție proteică care poate transforma 6-hidroxinicotinina în 6-hidroxi-pseudo-oxinicotină (24).

Interesant este un anumit aspect al acestei reacții și anume stereo-specificitatea. În condiții normale planta de tutun produce L-nicotină și doar cantități foarte mici de D-nicotină. Racemizarea poate avea loc în timpul descompunerii plantei și de asemenea prin încălzire. Dacă NDH nu manifestă stereo-specificitate, convertind atât L cât și D-nicotina la 6-hidroxi-L și respectiv D-nicotină, nu același lucru se poate spune și despre etapa următoare. Pentru oxidarea celor 2 izomeri D și L există 2 enzime care diferă fundamental una de cealaltă. Enzima (6HLNO) ce transformă izomerul L este o flavoproteină dimeră cu masa moleculară de 46 kDa (54) ce face parte din clasa amin-oxidazelor. Gena care o codifică este plasată, după cum se poate vedea în figura 9, în aceeași direcție cu *ndhLSM* alcătuind aparent un operon.

Echivalentul ce transformă izomerul D este o enzimă monomerică ce conține un FAD legat covalent de un rest de histidină. Modul de legare al cofactorului de aminoacidul sus amintit este însă mai puțin obișnuit, implicând atomul de N1 și nu atomul N3. Enzima a fost purificată și cristalizată și s-a arătat că modul de legare al co-factorului diferă radical de 6HLNO, enzima făcând parte din o cu totul altă clasă de proteine (33). Datele obținute prin studiul structurii acestei proteinei cristalizate vin în sprijinul ideii generale că enantiomerii impun diferențe mari la nivel proteic (structura este depusă în PDB cu indicativul: 2bvf).

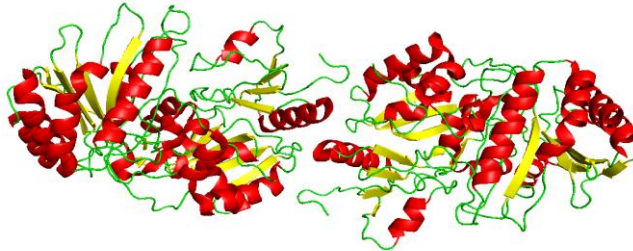


Figura. 10. Structura tridimensională a 6HDNO (după Koetter și colab.(33))

Avem așadar două enzime cu 2 substraturi diferite și ne-am aștepta ca mecanismul de reglare al expresiei să țină cont de acest lucru. În mod paradoxal nu este așa, deoarece adăugarea în mediu a D-nicotinei duce la activarea ambelor enzime. Multă vreme s-a considerat că aceasta reprezintă o indicație a existenței unei racemaze care să asigure transformarea izomerului D în L. Până în prezent o asemenea activitate nu a fost demonstrată (5).

Mecanismul de reglare a fost în parte elucidat prin experiențele realizate de Bernauer și colab. în 1992 (5) și Sandu și colab. (52). În 1992, Bernauer și colab. indică faptul că extractele proteice au capacitatea de a realiza o întârziere la migrarea prin geluri de poli-acrilamidă a 2 fragmente de ADN cuprinzând repetiții inversate din regiunea promotorului genei *6hdno* (IR1) și din regiunea de la capătul 3 al *6hdno*(IR2). Acest lucru arată existența în extract a unei proteine capabilă să recunoască în mod specific și să interacționeze cu aceste 2 secvențe. Abia după ce s-a realizat secvențierea completă a plasmidului pAO1, poziționarea genelor a fost clar stabilită și a fost demonstrat rolul fiecărei gene și proteine implicate în reglare. După cum se poate vedea în figura 9, *6hdno* este plasată într-un operon diferit de cel al *6hlno*, având direcție opusă. Aproape de aceasta, despărțită prin cadrul de citire *ORF113* se află un ORF care se aseamănă cu regulatorii ai transcripției din familia TetR. Acest cadru de citire a fost clonat în vectorul de expresie pH6EX3, iar proteina recombinată cu o coadă de 6 resturi His a fost purificată utilizând cromatografia de afinitate pentru metale (Imobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC). Masa moleculară este de aproximativ 19 kDa, iar experimentele de cros-linking au arătat că în soluție proteina este dimeră (52).

Testată pentru legarea de ADN utilizând fragmentele menționate mai sus, proteina a dovedit că se leagă în mod specific de acestea. Interacțiunea este una dependentă de concentrația ADN-ului și de asemenea, este orientată, mai întâi proteina legându-se de IR1 și apoi de IR2. Astfel, *in vitro* interacțiunea proteinei cu IR1 este complet pierdută în prezența 6-hidroxi-L-nicotinei și 6-hidroxi-D-nicotinei, dar nu este influențată de derivați ai nicotinei substituiți în diverse poziții. Aceste experimente efectuate au demonstrat că produsul acestui cadru de citire este elementul activ din extractele utilizate de Bernauer și colab. și că este un represor, care în prezența atât a izomerului L cât și D se desprinde de pe molecula de ADN permițând exprimarea *hdno*. Gena a primit numele de *hdnoR* (52).

Interesantă este și capacitatea de a se lega de IR2, fragment plasat la începutul cadrului de citire 111, asemănător cu o permează. Aceasta este plasată în direcție opusă fața de *hdno* și s-ar putea ca represorul mai sus menționat să regleze și activitatea acestei gene. Analiza ARN-ului total prin RT-PCR a demonstrat că acest cadru de citire este exprimat în prezența nicotinei și că, așa cum era de așteptat, nu face parte din același operon cu *hdno*. Surprinzător, nici *orf113* nu este transcrisă pe aceeași moleculă de ARN cu *hdno*, deși este exprimată în prezența nicotinei și are aceeași orientare cu aceasta. Situs-ul de START al transcripției *orf111* și de asemenea potențiale regiuni de legare a ribosomului au fost descrise, însă o demonstrație directă a reglării activității de către HdnOR nu a fost realizată (52).

Caracterizarea acestui represor și a secvențelor de care acesta se leagă a permis realizarea unor vectori de expresie utilizabili în *Arthrobacter* și specii înrudite, care ar putea rezolva problemele ce apar în mod normal la supraexprimarea proteinelor în alte gazde (53). De asemenea s-a demonstrat posibilitatea utilizării acestui represor într-un sistem de control al expresiei proteinelor în celulele eucariote (39).

Reglajul activității acestor enzime nu se reduce doar la reglajul transcripției realizat prin *HdnOR*, ci este un proces mult mai complex. În bacterii co-factorii enzimatici organici sunt de multe ori implicați în reglajul activității apoenzimelor corespunzătoare. Acest lucru a fost observat și la această specie, unde nivelul de activitate al NDH, 6HLNO și 6HDNO este dependent de cantitatea de FAD liber. Se știe că enzima ne-flavinilată este rapid degradată în *E. coli* (9), astfel încât se pune problema dacă nu cumva această dependență se datorează unor procese proteolitice. Studiile efectuate au arătat că, într-adevăr, procese de proteoliză apar și în cazul speciei luate în discuție, dar viteza lor nu poate explica

lipsa totală a activității în cazul unor nivele foarte reduse de FAD. Mai mult decât atât, investigându-se nivelul de ARN produs prin transcripție, s-a observat că și acesta este dependent de nivelul de FAD. Deci este vorba de un reglaj la nivelul transcripției realizat prin conținutul de coenzimă liberă, urmat de un reglaj la nivelul maturării apoenzimei realizat prin degradarea apoenzimei neflavinilate(7) .

După hidroxilarea realizată de 6HDNO și 6HLNO 6-hidroxi-pseudo-oxinicotina este supusă unei alte activări prin o nouă hidroxilare realizată la C2, etapă catalizată de o enzimă înrudită cu NDH. Enzima are numele systemic 6-hidroxi-pseudo-oxinicotin:acceptor oxido-reductază (hidroxilantă) și este cunoscută ca ceton-dehidrogenaza (KDH). KDH este o proteină trimeră, având o subunitate mică de 17 kDa care conține 2 clusterii (2Fe-S), o subunitate mijlocie de 30 kDa cu FAD și o subunitate mare de 85 kDa conținând cofactorul molibdenic. Produsul format este 2,6 dihidroxi-pseudo-oxi-nicotina, foarte instabil, ce se transformă *in vitro* în 2,6-dihidroxi-metil-miosmină, acest compus fiind pentru prima dată evidențiat ca intermediar în calea de degradare a nicotinei de către Richardson și Rittenberg (47).

Deosebit de intrigant este modul de aranjare al genelor corespunzătoare celor 3 subunități ale KDH pe plasmidul pAO1. După cum se poate vedea în figura 11, subunitatea mare (kdhL) este plasată în direcție opusă și la aproximativ 4 kb depărtare de subunitățile mijlocii (kdhM) și mici (kdhS), care par a forma un operon.

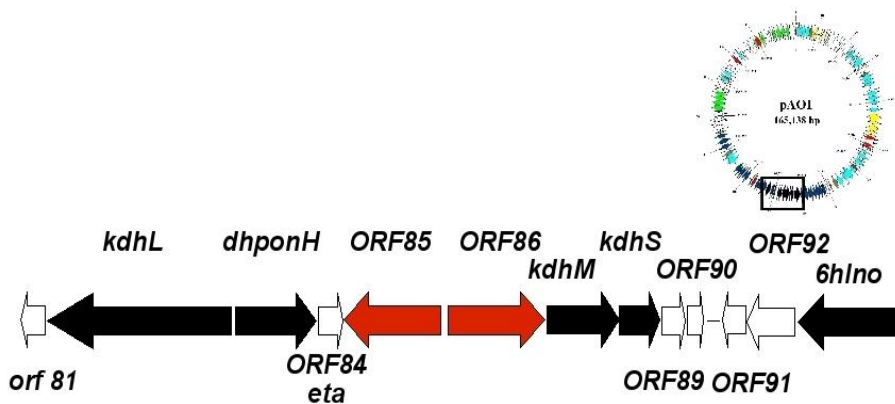


Figura 11. Aranjarea genelor responsabile de producerea subunităților M, S și L a enzimei KDH și amplasarea lor pe megaplasmidul pAO1.

Cei 4 kb cuprind 4 cadre de citire, dintre acestea doar *dhonH* are funcție cunoscută (va fi luată în discuție mai jos). *Orf84* este un cadru mic, codificând doar 116 aminoacizi ce alcătuiesc o proteină asemănătoare cu o enzima implicată în utilizarea etanolaminei la *C. perfringens*, iar *orf85* și *87* codifică proteine probabil implicate în reglarea transcripției (29).

Modul în care se realizează reglarea transcripției genelor *kdhL*, *kdhM*, *kdhS* este încă necunoscut, fiind foarte posibil ca cele 2 cadre de citire dintre ele să fie implicate. Datorită unor probleme de solubilitate, produșii lor de transcripție nu au putut fi purificați și caracterizați (6).

III.2. Clivarea și metabolizarea catenei laterale

Pentru multă vreme modul în care se realizează clivarea catenei laterale rezultate pe nucleul aromatic din etapele prezentate anterior a constituit o necunoscută. Faptul că are loc o clivare a acestei catene a fost demonstrat încă din 1965 de către Gherna și colab (21). Factorul ce catalizează această reacție a constituit un mister până în 2005. În acel an, enzima care realizează această reacție a fost indicată de către Sachelaru și colab. (49), oferind posibilitatea indicării etapelor ulterioare din această cale.

Este vorba despre produsul cadrului de citire 83, enzimă cu masa moleculară de 43,5 kDa, monomerică în soluție. Substratul este reprezentat, după cum se poate observa și în figura 12 de 2,5-dihidroxi-pseudo-oxinicotina, iar produșii de reacție sunt 2,6-dihidroxipiridina și acidul metil- γ -N-aminobutiric. Enzima a fost numită 2,6-dihidroxi-pseudo-oxinicotin-hidroxilaza (DHPONH)(48).

Reacția de clivare a legăturilor de tip C-C este una relativ rară, fiind întâlnită în special în căile de degradare a diferiților compuși aromatici. Enzimele care o realizează fac parte dintr-o clasă de hidrolaze foarte variate din punct de vedere al secvenței primare, dar care împart un element al structurii terțiare comun. Datorită acestuia, această clasă a primit numele de clasa hidrolazelor α/β -fold. Așa cum elucidarea structurii terțiare a DHPONH a demonstrat (55), comun pentru această clasă este și mecanismul de acțiune precum și aminoacizii implicați în actul catalitic: serină, aspartat și histidină.

Soarta celor 2 produși de reacție este diferită, după cum este indicat de Holmes și colab. (27; 28). Astfel, 2,6-dihidroxipiridina suferă o nouă hidroxilare și este eliminată în mediu, ducând la formarea pigmentului albastru caracteristic, iar acidul metil- γ -N-aminobutiric este integrat în calea acizilor tricarboxilici.

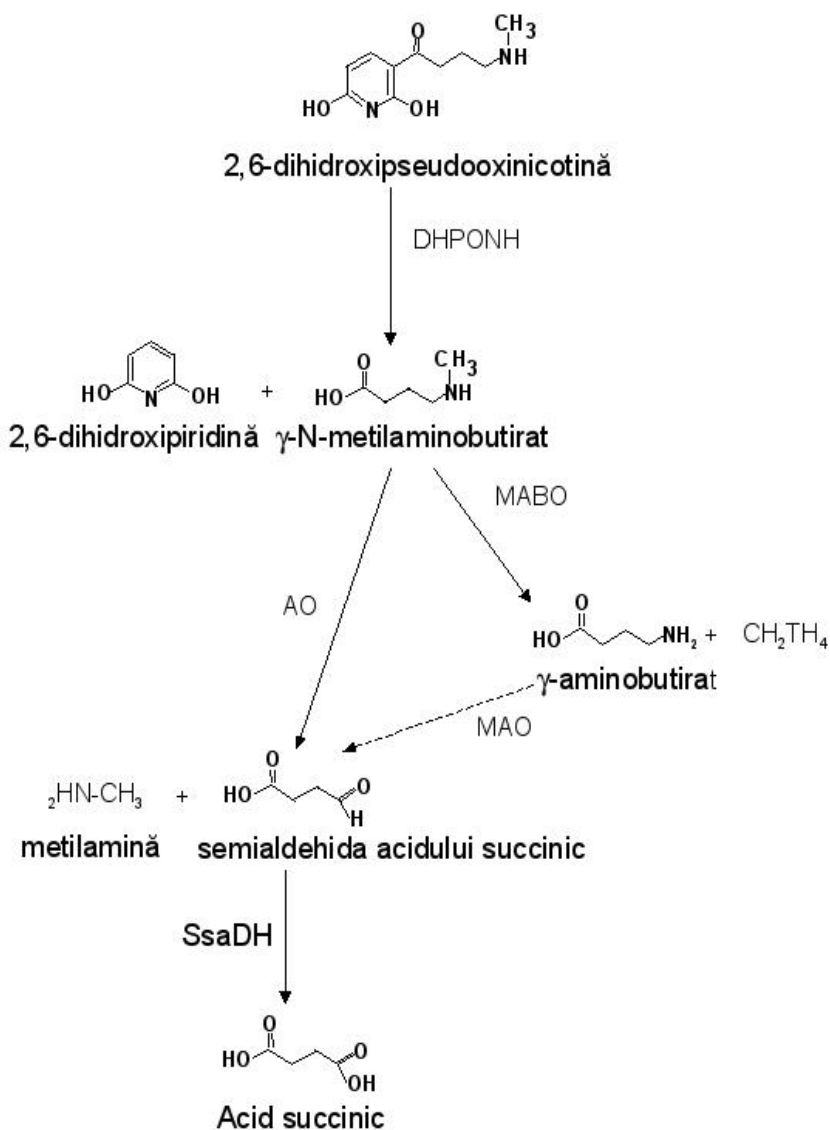
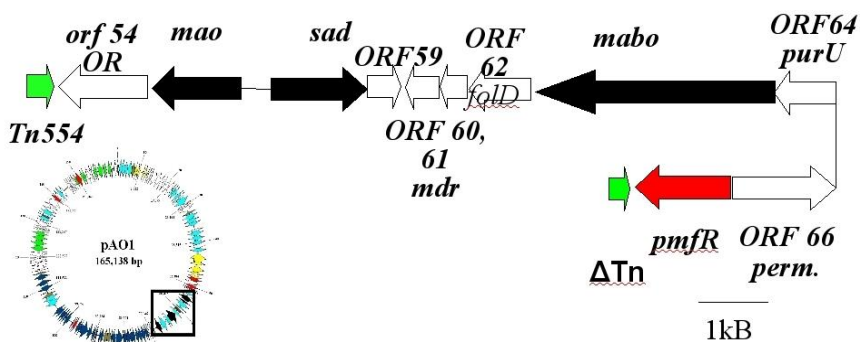


Figura 12. Schema reacțiilor implicate în clivarea și degradarea catenei laterale.

Această integrare este realizată tot de cadre de citire plasate pe plasmidul pAO1 și se poate realiza în două moduri. Genele implicate sunt plasate între transpozonul Tn554 și o gena trunchiată a unei transpozaze din *C. glutamicum*, părând a fi organizate în 3 operoane a cărui funcționare este reglată de produsul

cadrelui de citire 67. Modul de dispoziție este prezentat în figura 13.

Figura 13. Modul de aranjarea al cadrelor de citire implicate în metabolizarea acidului metil- γ -N-aminobutiric și amplasarea lor pe megaplasmidul pAO1.



O primă modalitate de integrare este prin dezaminarea oxidativă a acidului metil- γ -N-aminobutiric cu formare de metilamină și acid γ -aminobutiric (GABA). Enzima care realizează această reacție este produsul cadrului de citire 63 și a primit numele de metil- γ -N-aminobutirat oxidază demetilantă (MABO). Are o masă moleculară relativă de 90 de kDa și conține în calitate de co-factor FAD. Precipitarea cu acid triclor acetic, agent ce destabilizează proteinele fără a rupe legăturile covalente, duce la obținerea unui precipitat galben, indicând faptul că FAD este legat covalent. Spectrul UV-VIS al enzimei și raportul dintre absorbanta la 466 și 280 nm au indicat prezența unei molecule de FAD per molecula de proteină. Reducerea în condiții anaerobe cu acidul metil- γ -N-aminobutiric și sarcozină au arătat că în reacție nu se formează radicali semichinonici, mecanismul de reacție implicând deci transferul a 2 e⁻.

În privința specificității de substrat s-a observat că enzima este înalt specifică pentru metil- γ -N-aminobutirat, cu un K_m de 140 μ M și k_{cat} de 800 s^{-1} , dar poate accepta ca substrat și sarcozina (K_m 25 mM și k_{cat} 4 s^{-1}). Față de dimetilglicină, metilaminopropionitril, metil-amino-propilamină sau α -metilaminobutirat enzima s-a dovedit total inactivă (11).

A doua cale de integrare este deschisă de produsul cadrului de citire 56 reprezentat dintr-o proteină de 421 aminoacizi. Recent ea a fost purificată în forma recombinată cu 6 resturi de histidină la capătul N terminal. Culoarea galben intens a preparatului pur demonstrează faptul că este o flavoproteină. Precipitarea cu acid

tricoloracetic a dus la formarea unui precipitat de culoare albă, indicând o legare necovalentă a co-factorului. Analiza supernatantului prin cromatografie pe strat subțire a dus la identificarea acestuia ca fiind FAD. Masa moleculară a proteinei determinată prin SDS-PAGE este de 46 kDa, iar cromatografia de filtrare prin gel a demonstrat că proteina este monomeră în soluție (13). Enzima este o mono-aminoxidază (MAO) care utilizează ca substrat acidul metil- γ -N-aminobutiric, produșii de reacție fiind semialdehida acidului succinic și metilamina. Enzima poate de asemenea utiliza și GABA, însă cu o eficiență mai mică, după cum se poate vedea din tabelul 2

Tabel 2. Constantele cinetice ale enzimelor AO și SaDH și variația acestora funcție de substrat, după Chiribău și colab. (13), cu modificări:

Enzima	Substrat	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat /Km (μM ⁻¹ *s ⁻¹)
AO	Acidul metil- γ -N-aminobutiric	0.25 ± 0.2	1230 ± 20	5.71
AO	Acidul γ -N-aminobutiric	6.66 ± 0.16	878 ± 32	0.131
SaDH	semialdehida acidului succinic	0.34 ± 0.1	23000 ± 700	67.6
SaDH	NADP+	0.13 ± 0.01	25000 ± 800	191

Cele 2 enzime, MABO și MAO, concurează pentru același substrat, MABO fiind de aproximativ 10 ori mai activă decât MAO. Apare întrebarea rolului jucat de cele 2 enzime. Competiția a fost foarte bine dovedită *in vitro* (13), dar nu și *in vivo*. Mai mult decât atât studiile cu nicotină marcată radioactiv au arătat că în mediu de cultură se acumulează metil-amină, ceea ce ar indica că *in vivo* predominantă este această a doua cale. Probabil celula are posibilitatea de a alege predominanța unei sau alteia din căi, funcție de nevoile celulare. Deoarece diferența dintre căi constă în mobilizarea unui atom de C în plus și păstrarea N sub forma grupării amino atunci când acționează MABO, este posibil ca această cale să fie activată în condițiile privării celulei de o altă sursă de N.

Metabolizarea GABA nu este dependentă de prezența plasmidului pAO1

deoarece și celule ce nu posedă acest plasmid pot utiliza acest compus ca unică sursă de C și N (13). Pe plasmid se află însă un cadru de citire ce asigură recordarea produsului de dezaminare la ciclul acizilor tricarboxilici. Este vorba despre cadrul de citire 58, plasat în direcție opusă față de MAO, al cărui produs este o dehidrogenază a semi-aldehidei acidului succinic (SaD). Gena a fost clonată și proteina purificată prin IMAC, în soluție fiind homo-dimeră, monomerul având masa moleculară de 51 kDa. Enzima poate utiliza atât NAD^+ cât și NADP^+ , însă cu NAD^+ reacția este de 25 de ori mai lentă. Pe lângă substratul mai sus menționat enzima mai poate dehidrogena și aldehida acidului butiric și aldehida acidului propionic, dar cu o viteză mai redusă (8,5% respectiv 1,6% din activitatea înregistrată cu semialdehida acidului succinic)(13).

Toate aceste trei gene sunt plasate, după cum am văzut, între 2 elemente ce par a marca un eveniment recombinational: *Tn554* la un capăt și gena trunchiată a unei recombinaze la celălalt capăt. Între aceste granițe ar fi de așteptat să existe și un factor de reglare a expresiei. *ORF 67* manifestă un grad mare de identitate cu o proteină implicată în reglarea transcripției la *S. coelicolor* (45% identitate și un scor de $4e^{-022}$) fiind un foarte bun candidat. Gena a fost clonată în vectorul de expresie pH_6EX_3 și produsul purificat. Proteina are o masă moleculară de 50 kDa, în soluție formând probabil tetrametri cu o masă moleculară de 190 kDa (12).

Privind modul de aranjare a cadrelor de citire în regiunea *mao* și *mabo* este ușor de imaginat că *mabo* formează, împreună cu cadrul de citire 64, similar cu o tetrahidrofolat-deformilază (*purU*), un operon. După *purU* se află un ORF asemănător cu o permează pentru aminoacizi (*perm*), între cele 2 cadre de citire aflându-se aproximativ 740 de perechi de nucleotide. Analiza ARN-ului produs în prezența nicotinei a demonstrat că *perm* nu formează un operon cu *purU*, însă aceasta din urmă este prima genă dintr-un operon ce conține atât *mabo* cât și cadrul de citire următor (*orf 62*, înrudită cu o metilentetrahidrofolat dehidrogenază *Fold*)(12).

Produsul purificat al cadrului de citire 67 a fost testat pentru capacitatea de a se lega de ADN utilizând tehnica întâzierii în gel. (EMSA, electromobility gel shift assay). Au fost testate fragmente plasate la capătul 5' al genelor *purU* și *perm*, proteina legându-se doar de fragmentul din fața lui *purU*. Aceasta arată o posibilă implicare a acestui factor în reglarea operonului *purUmabOfold*, dar nu și a *perm*, în concordanță cu datele obținute prin analiza ARN-ului. Datorită acestui fapt proteina a primit numele de *pmfR*.

Situs-ul de legare a proteinei *pmfR* a fost și el determinat având secvența

5'-ARCAAAGTCGCAGTTTACCTTAGTACCAAACCATGGTCTTTTC-3', și fiind plasat între pozițiile -48 și -88 fata de codonul START al *purU*. Nucleotidele protejate la digestia cu DNA-ză sunt subliniate. Din această secvență se pare că esențiale sunt doar palindroamele parțiale CAGTTTAC și AAAACCA, deoarece clivarea fragmentului mai sus menționat în situs-ul indicat cu litere îngroșate duce la dispariția interacțiunii. În cadrul acestor 2 elemente palindromice, schimbarea a 2 nucleotide T din prima regiune cu G a dus la reducerea complexelor ADN-proteină cu aproximativ 10%, iar a 2 nucleotide A cu C din a doua zonă a dus la reducerea la aproximativ 84% a interacțiunii, comparativ cu secvența normală. Dacă sunt realizate ambele înlocuiri mai sus menționate în același timp intensitatea semnalului corespunzătoare interacțiunii scade la 8%. Se pare așadar că *pmfR* are nevoie, pentru a se lega, de o regiune bogată în TA, de forma GTTT-14pb-AAAC (12).

Aceste date nu arată dacă produsul genei *pmfR* este un activator sau un represor. Studiul acestui aspect s-a realizat prin crearea unui mutant având gena inactivată. Pentru aceasta *pmfR* a fost clonată în vectorul de expresie pH6EX3 și digerată cu *RsaI*. Capetele coezive obținute au fost făcute drepte cu fragmentul Klenow de la ADN-polimeraza și tratate cu *Sall*. În acest fel un fragment de 316 pb a fost excizat din mijlocul genei, în locul acestuia a fost ligată ulterior caseta ce conferă rezistență la cloramfenicol (*cmx*). În acest fel gena a fost inactivată prin realizarea unei deleții și introducerea unui noi gene în interiorul celei originale. Plamidul obținut, *pH6EX3pmfR:cmx* nu se poate replica în *Arthrobacter*, fiind astfel un bun vector de transport al genei inactivate. Datorită resturilor din *pmfR* ce flanchează *cmx* pot avea loc fenomene de recombinare omologă, care duc la înlocuirea genei normale cu cea care conține caseta de rezistență la cloramfenicol (*cmx*) și o inactivare a cadrului de citire. Fenomenele de recombinare sunt foarte rare, dar totuși apar, iar microorganismele care suferă acest fenomen sunt rezistente la cloramfenicol și pot fi selectate pe plăci conținând acest antibiotic.

Tulpina mutantă obținută astfel a fost crescută în prezența nicotinei și s-a încercat evidențierea enzimelor MABO și MAO cu anticorpi specifici. Lipsa acestor proteine demonstrează că *pmfR* este activator, în lipsa lui expresia enzimelor menționate neputând avea loc. Situs-ul de start al transcripției pentru operonul *purU-mabO-fold* a fost și el identificat, fiind reprezentat din adenina plasată la 107 nucleotide în amonte de codonul start al genei *purU*. La -10 nucleotide de acesta (nucleotida A), secvența TATGGT, este un bun candidat pentru regiunea -10 sau cutia Pribnow. În aceeași direcție, cu încă 18 nucleotide în amonte

de regiunea -10 secvența, ATGGAA se aseamănă suficient de mult cu regiunea consens -35 din *E coli* (TTGACA) pentru a avea acest rol (12).

Celălalt produs rezultat în urma reacției de clivare a catenei laterale este 2,6-dihidroxi-piridina care este supus unei hidroxilări în urma căreia se formează 2,3,6-tri-hidroxi-piridina. Reacția și produsul ei au fost evidențiate pentru prima dată de Holmes și colaboratorii ((21); (28)). Mai mult decât atât ei reușesc să purifice parțial și enzima responsabilă de această transformare, utilizând un ansamblu de metode ce implică precipitarea cu sulfat de amoniu și cromatografia de schimbători de ioni pe DEAE-celuloză. Pentru eliminarea proteinelor contaminante ne-flavonilate, probele conținând enzima au fost trecute pe o coloană de hidroxiapatită și concentrate cu polietilenglicol (27), obținându-se un randament al recuperării de 15% și o creștere de 50 de ori a gradului de purificare.

Identificarea cadrului de citire ce codifică această enzimă a fost realizată abia în 2001, fiind vorba despre ORF-ul 79, plasat în același sens cu *kdhL* și probabil pe același operon. Acest presupus operon conține o serie de gene a căror funcție este complet necunoscută, dar care se întâlnesc frecvent în preajma proteinelor din aceeași clasă cu KDH.

Gena 79 a fost clonată în vectorul pH6EX3 și exprimată ca o proteină recombinată ce manifestă afinitate pentru Ni^{2+} . Masa moleculară determinată pe geluri de poli-acrilamidă denaturante este de 45 kDa, în stare nativă enzima fiind homo-dimeră. Culoarea galbenă prezentă din nou indică o flavo-proteină cu 2 moli de FAD per mol de proteină, legarea fiind ne-covalentă. Acționând asupra 2,6-dihidroxi-piridinei enzima are un pH optim de 8 și o temperatură optimă de 20°C. În aceste condiții parametrii cinetici determinați au fost: K_m 8,3 μM , V_{max} 0,47 $\mu mol/min$ și k_{cat} $3,9 \times 10^{-6} s^{-1}$. Compuși precum 2-hidroxi-piridina, 2,4-dihidroxi-piridina, 2,6-dimetoxi-piridina, resorcina sau 2,6-dihidroxi-nicotinamida nu constituie substrate, dar acționează ca inhibitori (4). Produsul reacției este 2,4,6-trihidroxi-piridina.

Cadrul de citire 54 face parte din același operon cu *mao* și *ssd* fiind de așteptat ca rolul acestei gene să fie legat de ultimul produs al căii metabolice, și anume 2,4,6-trihidroxi-piridina.

III. 3 *pAOI+* și stresul oxidativ

III.3.1 ORF54 și albastrul de nicotină

S-a demonstrat că expresia cadrului de citire *orf54* în *Arthrobacter*

nicotinovorans este dependentă de prezența nicotinei în mediu (44), de aceea substratul natural al acestei enzime trebuie să fie un compus rezultat din metabolismul acestui alcaloid.

ORF54 a fost clonată cu succes în vectorul pH6EX3 și exprimată sub formă recombinată, având capătul C-terminal de forma HHHHHHLVPRGSL, aminoacidul L reprezentând codon-ul nativ TTG de start al transcripției. Folosind cromatografia de afinitate pentru metale (IMAC) proteina recombinată a fost purificată la omogenitate, iar prin SDS-PAGE s-a determinat masa moleculară relativă: 23 kDa. Utilizarea cromatografiei de filtrare prin gel a permis stabilirea de asemenea a masei moleculare native: 100 kDa, ceea ce indică faptul că proteina este tetrameră în soluție (44).

Deși în literatura de specialitate este specificat ca oxido-reductazele sunt în general homo-dimere (cromat reductaza din *E.coli* (1) spre exemplu), există și enzime de acest tip homo-tetramere (16), precum este WrbA din *E.coli* (46). Aceste date vin să sprijine ideea înrudirii acestei enzime (ORF54) cu FMN-reductaza din *Pseudomonas aeruginosa* (3) și NADPH-FMN oxido-reductaza din *Sinorhizobium melioli* (ArsH) (59) observată prin analiza secvenței, ambele enzime fiind tetramere.

Sub formă purificată, enzima prezintă o puternică culoare galbenă, culoare care în general este caracteristică proteinelor flavinilate (41). Motivul de legare al FMN-ului specific flavodoxinelor ((T/S)XTGXT) lipsește din secvența acestei proteine, și cu toate acestea conține FMN. Situația nu este singulară, atât FMN-reductaza din *Pseudomonas aeruginosa* cât și o NADPH-FMN oxido-reductază din *Sinorhizobium melioli* (ArsH) nu prezintă această secvență consens, dar leagă cofactorul enzimatic. Analiza secvenței de aminoacizi a ORF54 și compararea ei cu secvențele celor două proteine mai sus menționate indică existența unui motiv înalt conservat de forma LFVTPEYNXXXXXXXXLKNAIDXXS între pozițiile 74 și 96, despre care se presupune că este implicată în legarea FMN-ului (16), (2). Similar cu spectrul UV-Vis al enzimei din *Sinorhizobium melioli* (59), și cel al enzimei purificate (figura 14), prezintă 2 maxime de absorbție, unul la aproximativ 365 nm și celălalt la aproximativ 440 nm. Spectrul este astfel foarte asemănător cu cel al FMN-ului în formă redusă.

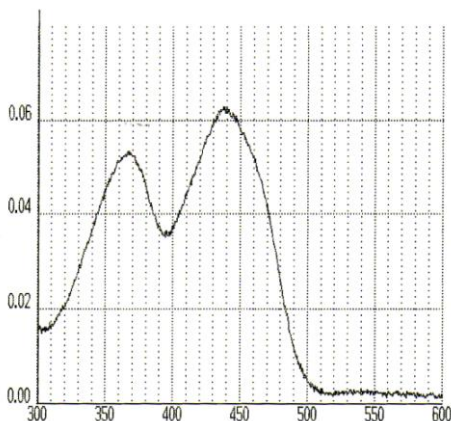


Figura 14. Spectrul UV-Vis al flavoproteinei codificate de cadrul de citire 54.

Cofactorul flavinic, fie că este vorba despre FAD, FMN sau riboflavină, este în majoritatea cazurilor legat slab de proteină, prin forțe de natură fizică și, în destul de puține cazuri, cofactorul poate fi legat prin legături puternice de natură covalentă (14; 15). Folosind denaturarea termică și/sau denaturarea chimică sub influența acidului triclor acetic, s-a demonstrat că distrugerea structurii terțiare a proteinei atrage după sine eliberarea cofactorului enzimatic (44). Legarea cofactorului enzimatic de enzimă se realizează așadar necovalent, prin legături de natură fizică, slabe.

În vederea identificării cofactorului, supernatantul obținut în urma denaturării proteinei purificate a fost analizat prin cromatografie în strat subțire (TLC). Cromatograma obținută (figura 15) indică faptul că enzima conține FMN în calitate de coenzimă.

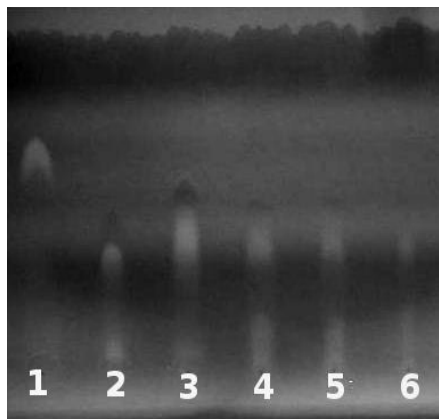


Figura 15. TLC pentru identificarea cofactorului enzimatic

1- FAD – 10 microL dintr-o soluție 33 mM

2-Riboflavina - 10 microL dintr-o soluție 33 mM

3- FMN - 10 microL dintr-o soluție 33 mM

4,5,6 – supernatant rezultat în urma tratamentului termic al enzimei purificate – 15, 10 și respectiv 5 microL

Enzimă prezintă în zona C-terminală un motiv de forma SXGXXG, motiv ce se aseamănă cu cel de legare al NAD(P)H-ului (AXGXXG)(40). Aceasta indică faptul că enzima folosește în calitate de

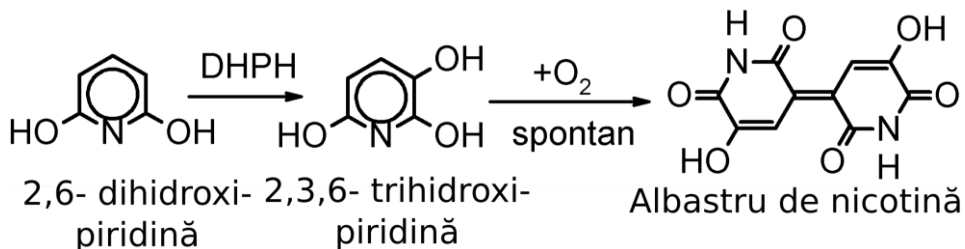
cosubstrat una sau ambele coenzime mai sus menționate.

Analiza *in-silico* mai detaliată a cadrului de citire 54 în vederea identificării domeniilor înalt conservate indică faptul că acest cadru de citire ar face parte din super-familia flavodoxinelor. Acestea sunt enzime implicate în transferul electronilor și conțin FMN legat puternic, prin legături de tip necovalent (51). Caracteristic enzimelor din această super-familie este de asemenea o modalitate specifică de realizare a structurii secundare, de forma β - α - β , cu un nucleu de tip beta-pliat răsucit alcătuit din 5 catene paralele. Situs-ul de legare al FMN-ului este plasat la capătul C-terminal al acestei structuri (3).

În super-familia flavodoxinelor sunt incluse numeroase familii de proteine, ORF54 manifestând similitudini doar cu două dintre acestea. Este vorba despre FMN_Red (pfam03358), reductaze NADH dependente conținând FMN și mai important, familia WrbA (COG0655). Aceasta din urmă cuprinde proteine similare cu WrbA (tryptophan binding protein) care au fost caracterizate ca NAD(P)H-chinon oxido-reductaze (NQO) (3).

În contextul metabolismului nicotinei în *A. Nicotinovorans*, substratul logic al acestei enzime trebuie să fie legat de tri-hidroxi-piridină. Spontan, acest compus dimerizează și formează un pigment albastru specific, cunoscut sub numele de albastru de nicotină (nicotine-blue, NB). Pigmentul albastru a fost descris de Holmes și colab.(28) și Kaiser și colab. (31) ca fiind o chinonă (4,4',5,5'-tetrahidroxi-3,3'- diazodifeno-chinonă (2,2')), ceea ce corespunde foarte bine cu observația că ORF54 este înrudită cu chinon-oxidoreductazele. Structura chimică a albastrului de nicotină a fost descrisă de Knackmuss și colab. (32) și poate fi observată în figura 16.

A.



B.

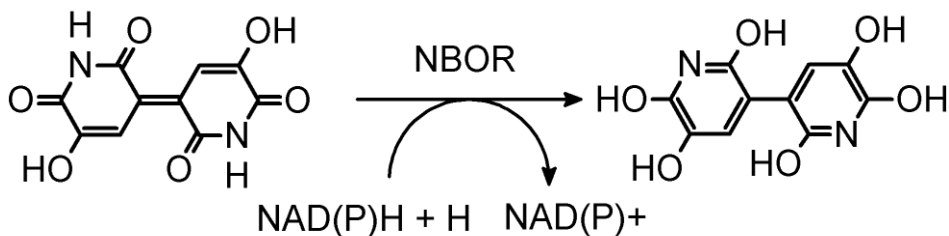


Figura 16. Reacția de formare a albastrului de nicotină (A) și cea de decolorare a acestuia sub acțiunea enzimei NBOR (B)

Determinările realizate au demonstrat că enzima flavinică codificată de cadrul de citire 54 poate realiza reducerea pigmentului albastru prin transferul de electroni atât de la NADPH cât și de la NADH. În urma acestui transfer se produce o rearanjare intramoleculară a legăturilor duble. Dacă în substrat legăturile duble sunt conjugate, această conjugare ducând la apariția culorii specifice albastre, în produsul de reacție conjugarea dispare, compusul rezultat fiind incolor. Schema reacției catalizate de această enzimă este prezentată în figura 16,B.

Enzima codificată de cadrul de citire 54 este deci o NAD(P)H:chinon oxido-reductază (E.C. 1.6.99.2 (36)) și a primit numele de NAD(P)H – albastru (blue) de nicotină – oxido-reductază (NBOR). Aceasta este denumirea pe care o vom utiliza în continuare pentru a ne referi la ORF54. De remarcat este faptul că prin activitatea descrisă, enzima poate fi asimilată cu o diaforază. O asemenea activitate a fost descrisă anterior de către (27) în extractele de *Arthrobater nicotinovorans*.

Testele realizate în laborator au demonstrat că enzima poate utiliza în calitate de cofactor atât NADH cât și NADPH. Constanta lui Michaelis-Menten K_M determinată practic pentru NADH a fost de $35 \pm 2,88$ microM. Pentru NADPH nu a fost posibilă determinarea acestei constante, deoarece nu a putut fi atinsă concentrația de saturație. La aceleași concentrații în coenzimă și NB, activitatea NBOR cu NADPH este 70% din cea cu NADH. Enzima preferă așadar NADH în favoarea NADPH-ului, în bună concordanță cu implicarea într-o cale de degradare, și nu în una biosintetică.

Pe lângă albastrul de nicotină, enzima poate reduce și alte chinone. Parametrii cinetici prezentați în tabelul 3 indică faptul că, așa cum era de așteptat enzima are cea mai mare viteză de transformare (310,8 molecule/secundă) atunci când acționează asupra NB. În cazul celorlalte substraturi, viteza se

reduce drastic, ajungând până la 0,05 molecule/sec în cazul durachinonei.

Tablelul 3 Specificitatea de substrat a NBOR

Substrat	Activitatea specifică * ($\mu\text{M NADH min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteină)	K_m (μM)	V_{max}/K_m (s^{-1})
NB	$893 \pm 61,56$	nd [#]	310,8
1,4 - naftochinină	733 ± 17.62	6.25 ± 0.144	3,71
1,4 - benzochinonă	536.75 ± 15.19	8.83 ± 0.73	2,22
2,6 – diclorfenol indofenol	368.43 ± 6.95	23 ± 0.57	0,95
menadionă	102.57 ± 5.94	nd	0,58
durachinonă	4.26 ± 0.34	nd	0,05

* - activitate determinată la 200 mM concentrația finală a substratului

nd - K_m -ul nu a putut fi determinat

Spectrul larg de substrat nu este ieșit din comun fiind o caracteristică a chinon-reductazelor, enzime ce au rolul de a elimina substanțele xenobiotice din celulă (16). În cazul NBOR ar putea fi o specializare, enzima evoluând în favoarea utilizării substratului cel mai frecvent, albastrul de nicotină.

III.3.2 Mecanismul de reacție al NBOR

Chinonele (Q) pot fi reduse de reductazele celulare prin două mecanisme, care presupun fie transferul unui electron, fie a doi electroni simultan, după mecanismul prezentat în figura 17.

Transferarea de la enzimă la chinonă a unui singur electron duce la formarea unui radical semichinonic (Q^{\cdot}), care reacționează rapid cu O_2 și formează ionul superoxid $\text{O}_2^{\cdot-}$ reformând chinona inițială Q (58). Reacția este realizată de numeroase flavoenzime precum NADPH-citocrom P450 reductaza sau NADPH-citocrom b5 reductaza.

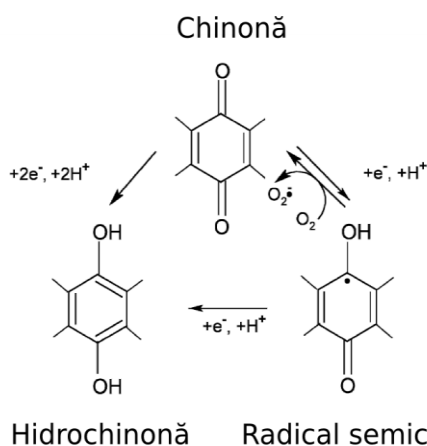


Figura 17. Mecanismul de reducere al chinonelor. Hidrochinona este formată direct prin transferul a 2 electroni, în timp ce transferul unui electron duce la formarea de radicali semichinonic (după Deller și colab. (16))

Mecanismul ce realizează reducerea prin transferul a 2 electroni duce la formarea din chinone a hidrochinonelor corespunzătoare (QH₂). Această reacție este o modalitate de inactivare a toxicității chinonelor, inactivare în urma căreia nu se produce ionul superoxid. Cea mai cunoscută enzimă ce realizează această reacție este diaforaza (37), intens studiată atât în organismul uman cât și la plante și bacterii, datorită rolului deosebit în apărarea împotriva stresului oxidativ.

Un prim indiciu privind mecanismul de funcționare al NBOR este reactivitatea foarte mare a produsului de reacție. NB sub formă redusă este extrem de reactiv. El poate fi menținut redus doar în condiții anaerobe, deoarece în prezența oxigenului, reacționează spontan cu acesta și reface forma oxidată. În urma acestei reacții unul dintre produșii formați este ionul superoxid, după cum se poate observa din spectrul EPR din figura 18, C. Acest comportament este similar cu cel al semichinonelor formate prin reacția de reducere prin transferul unui singur electron, dar nu este prezent doar la acești compuși. Watanabe și colab. (58) descriu un mecanism prin care chinonele reduse se autooxidează, și printr-un mecanism de co-proporționare, generează ioni superoxid (figura 18 C).

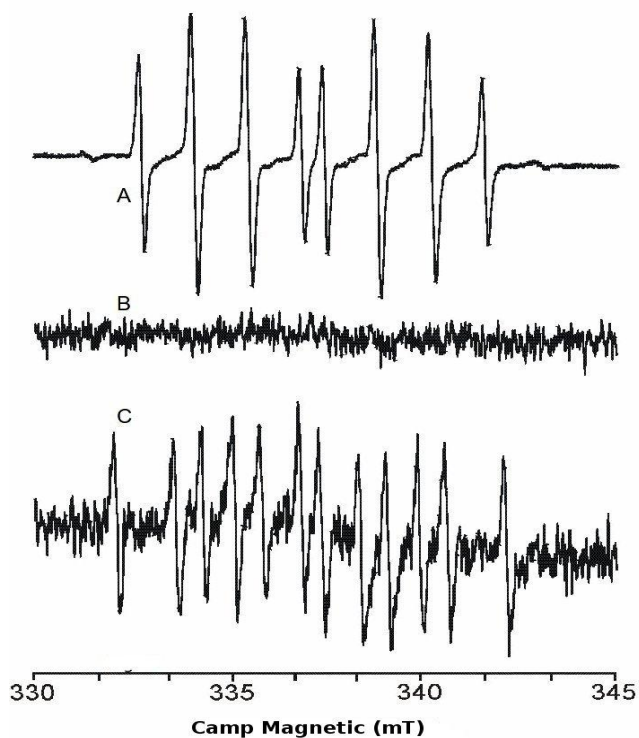


Figura 18. Spectrul EPR al reacțiilor de reducere și reoxidare a NB. Reacțiile au fost realizate în prezența a 100 mM DEPMPO și înregistrate la o frecvență de 9,65 GHz, modulația amplitudinii de 0,1 mT, constanta de timp 0,164, rata de scanare 5,4 mT/min

A. control pozitiv, reacția Fenton

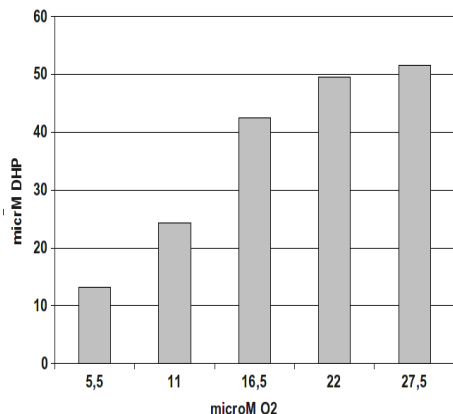
B. reacția de reducere a NB realizată de NBOR

C. reacția de reoxidare spontană a NB în prezența O_2 .

Reacția de reoxidare a NB redus este, după cum am văzut, una dependentă de O_2 . Raportul dintre numărul de molecule de O_2 și cel de NB reoxidat este de $0,446 \pm 0,024$, o bună aproximație a valorii de 0,5. Dacă ținem cont de faptul că NB este măsurat ca DHP, adică 2 molecule de DHP formează o moleculă de pigment, valoarea de 0,5 va însemna 1 mol de O_2 consumat pentru fiecare moleculă de dimer. Molecula de O_2 va accepta 1 electron și se va transforma în ionul superoxid explicând astfel spectrul EPR. Comportamentul acesta este din nou similar cu cel al semichinonelor, dar poate fi explicat și prin mecanismul menționat anterior și descris

de Watanabe și colab. (figura 19,B).

A.



B

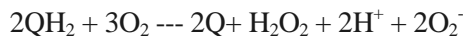
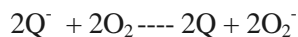
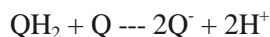


Figura 19. Dependenta cantității de pigment albastru (NB) reoxidat funcție de cantitatea de O₂ disponibilă (A) și o cale posibilă de realizare a acestei reacții (B).

Un element important este și preferința față de substrat a NBOR. În tabelul 4 sunt prezentate, în ordinea utilizării lor de către NBOR potențialele redox a 4 din chinonele testate.

Tabelul 4. Potențialele redox ale chinonelor utilizate în studiu

Chinonă	Activitatea specifică (μM NADH min ⁻¹ μg ⁻¹ proteină)	Potențial redox după Trumpower (57)		Potențiale redox după Cenas (10)	
		E(Q/Q ⁻) (mV)	E(Q/Q ²⁻) (mV)	E(Q/Q ⁻) (V)	E(Q/Q ²⁻) (V)
1,4 naftochinonă	733 ± 17.62	-	-	-0,15	0,28
1,4 benzoquinonă	536.75 ± 15.19	99	286	0,09	0,04
menadionă	102.57 ± 5.94	-203	-5	-0,2	0,03

durachinonă	4.26 ± 0.34	-240	57	-0,26	0,04
-------------	-----------------	------	----	-------	------

După cum se poate observa, enzima pare să prefere substratele în ordinea potențialelor de reducere a chinonelor după mecanismul ce presupune transferul unui singur electron, ceea ce indică faptul că această enzimă funcționează după acest mecanism. Doar în cazul benzochinonei și a naftochinonei această preferință nu este corelată cu potențialul redox, dar specificitatea de substrat nu depinde doar de potențial, ci și de forma situs-ului activ al enzimei (10).

Toate aceste elemente sunt dovezi indirecte privind mecanismul de reacție al NBOR, și nu oferă o imagine clară a mecanismului de reacție. Indicația directă a mecanismului de reacție a NBOR este spectrul UV-VIS al enzimei reduse. Fie că reducerea enzimei se face cu NADPH, NADH sau prin lumină după metoda descrisă de Deller și colab. (16), spectrul obținut este similar cu cel din figura 20. După cum se poate observa, nu apar maximele de absorbție la 600 nm specifice radicalilor FMN-ului, caracteristici unei reacții de transfer a unui singur electron, radicali indicați de (123) sau de (160). Datorită absorbției puternice a pigmentul albastru de nicotină în zona de 600 nm nu am putu realiza reacția inversă, cea de oxidare a enzimei cu substratul natural.

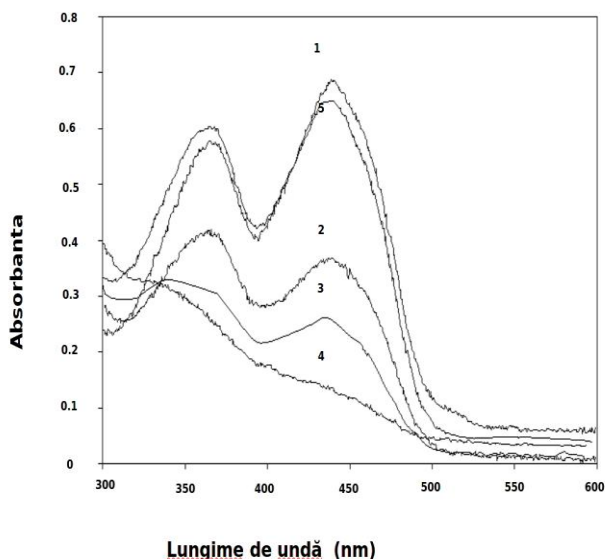


Figura 20. Spectrul UV-VIS al NBOR foto-redușă prin expunerea pentru perioadă

variabilă la o lampă cu halogen.

1. - 0 s; 2. - 10 s; 3. - 20 s; 4. - 30 s; 5. - 100 s urmată de adăția de O₂

În concluzie, enzima preia simultan 2 electroni de la molecula de NADPH sau NADH, fără a forma un radical semichinonic flavinic. Celelalte date, dovezi indirecte, par să indice un mecanism bazat pe transferul unui singur electron de la enzimă la substratul chinonic. Totuși, majoritatea acestor dovezi indirecte pot fi explicate și prin prisma unui mecanism de transfer simultan a 2 electroni. Nu este exclus însă nici un mecanism mixt, de transfer al unui electron la substrat, urmat de transferul celui de-al doilea electron precum procesul descris de Cenas și colab. (10). Suntem tentați să credem că această enzimă are un rol activ în protecția celulei împotriva stresului oxidativ, și de aceea mecanismul de funcționare este cel de transfer simultan a 2 electroni. O schemă a transferului de electroni intermediat de enzimă este realizată de către Deller pentru (NQO1) și este prezentată în figura 21.

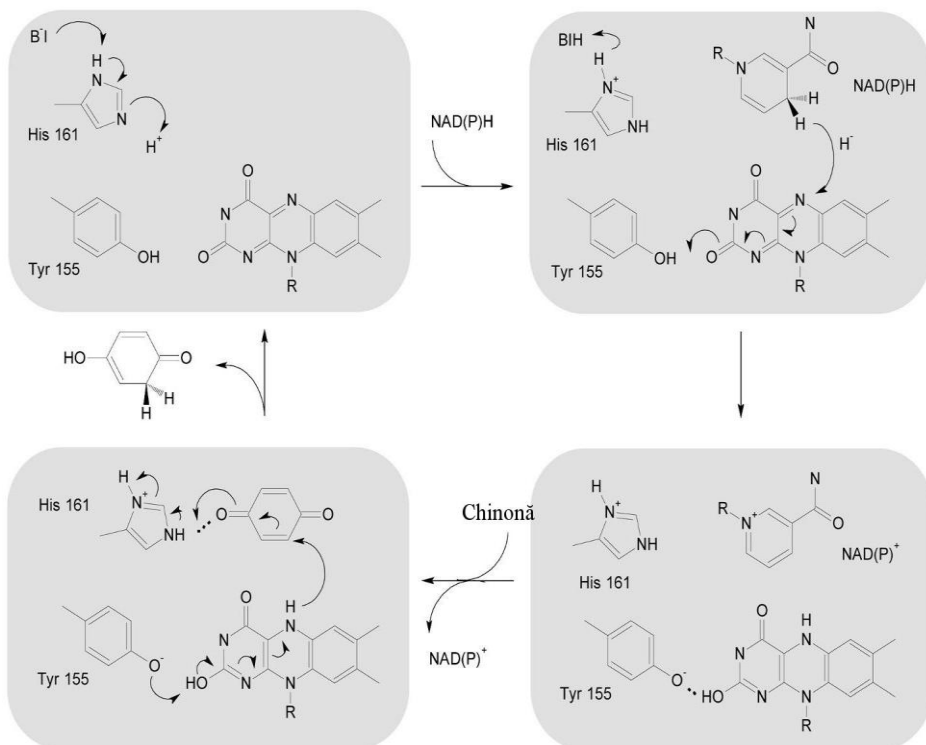


Figura 21. Mecanismul de reacție a NQO1, chinon-reductaza din organismul uman ce funcționează după un mecanism ce presupune transferul a 2 electroni către

substratul chinonic (după Deller și colab., 2008 (16)).

Reprezentantul WrbA are o serie de caracteristici ce diferențiază această familie de ceilalți membri ai superfamiliei flavodoxinelor. Astfel, mecanismul de reacție presupune transferul simultan a 2 electroni de la NADPH la substrat (nu unul ca în cazul flavodoxinelor) (22).

III.3.3 Rolul fiziologic al NBOR

Nu este exclus ca în genomul speciei *Arthrobacter nicotinovorans* să existe și alte chinon-reductaze care funcționează prin transferul unui singur electron, deoarece aceste enzime sunt frecvente în lumea vie, având rol activ în inactivarea diverselor xenobiotice. În general, chinon-reductazele cu rol în detoxifiere au o specificitate largă de substrat, ce le permite inactivarea unei game largi de compuși(16). Prin acțiunea lor asupra pigmentului albastru, aceste enzime ar putea să genereze ioni superoxid, ducând la apariția unui stres oxidativ. Prezența NBOR reduce acest pericol, inactivând rapid BP prin transferul a 2 electroni de la NADH. Hidrochinonele obținute prin transferul a 2 electroni sunt mult mai hidrosolubile și mai ușor de excretat în mediu (30), facilitând astfel eliminarea pigmentului în exces.

III.4. Gene implicate în sinteza cofactorului molibdenic

După cum am văzut două din enzimele cheie din calea de degradare a nicotinei, NDH și KDH conțin în calitate de cofactor molibden. Acesta este un cofactor deosebit de frecvent întâlnit în lumea vie, în special la enzimele ce realizează o reacție redox ce implică transferul a $2 e^-$ (23). Atomul de molibden este liber doar în cazul nitrogenazelor, la celelalte enzime este întotdeauna coordonat de un compus organic cu care formează așa numitul cofactor molibdenic (MoCo) (38). La bacterii cofactorul molibdenic poate fi sub forma unui atom de Mo^{2+} legat de pterină, alcătuind molibdopterina (MPT) sau sub forma metalului coordonat de un derivat al pterinei, format prin adăugarea unui nucleozid mono-fosfat la aceasta. Nucleozidul poate conține guanozină, caz întâlnit la *E.coli*, co-factorul fiind deci molibdopterin-guanozin-nucleotidul (MGD) sau citozină, cazul speciei *Arthrobacter nicotinovorans*, co-factorul fiind deci molibdopterin-citozin-nucleotidul (MCD), (figura 22 (34)).

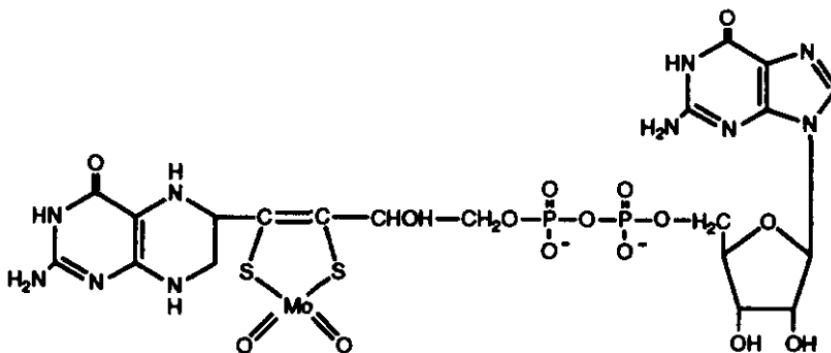


Figura 22. Structura cofactorului MCD, după (34)

Acest cofactor este foarte frecvent în lumea vie, de aceea calea lui de sinteză este înalt conservată. Ea cuprinde trei etape (23), (48) prima constând în convertirea unui derivat al guanozinei într-un compus lipsit de S ce a primit numele de precursorul Z. În următoarea etapă, sub acțiunea enzimei hetero-tetramerică MPT sintaza are loc transferul a 2 atomi de S la C₁ și C₂ ai inelului piranic și se formează MPT-ene dithiolat. Etapa finală și cea mai enigmatică constă în atașarea ionului de Mo²⁺ la MPT. Această cale este continuată la bacterii cu atașarea nucleotidelor și formarea derivaților mono- sau bi-nucleotidici. După sinteza cofactorului acesta trebuie inserat în apo-enzimă, acest proces fiind catalizat la microorganismele de MogA și MoeA. Recent s-a demonstrat existența unei etape esențiale în sinteza acestui compus și anume o etapă de adenilare a molibdopterinei fără de care inserția lui în apoenzimă nu se realizează (38).

Pe lângă sinteza cofactorului, una din problemele pe care celula trebuie să le rezolve este aprovizionarea cu Mo²⁺. La *E. coli* importul acestui metal este realizat de o pompă specializată. Pompa este alcătuită dintr-un ansamblu de 3 proteine: o proteina periplasmatică ModA ce manifestă afinitate față de Mo²⁺, o proteina dimeră ce formează porul transmembranar ModB și o proteina asociată de membrană capabilă să lege și să hidrolizeze ATP-ul ModC (42).

Separate de clusterul de gene ce codifică NDH prin elementul de inserție *IS1473* se află o serie de 8 gene implicate în biosinteza cofactorului molibdenic. Pe baza similarității cu gene cunoscute din *E.coli* ele au fost notate *modABC*, *moaDACE*, *moeA*, modul lor de distribuție putând fi observat în figura următoare.

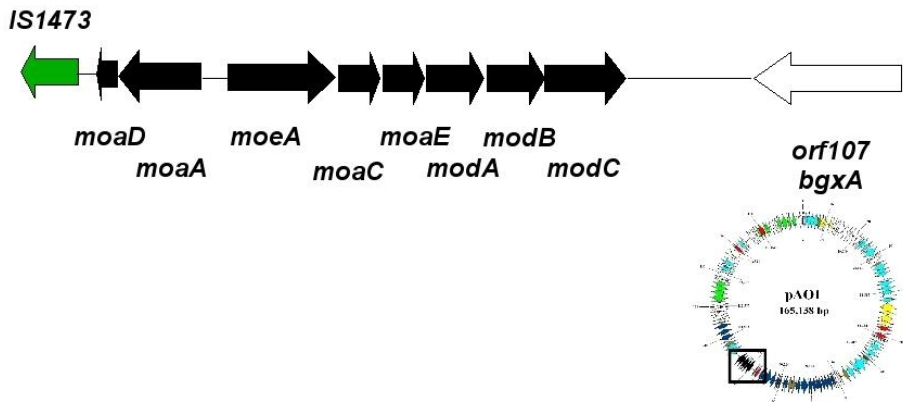


Figura 23. Aranjamentul ORF-urilor implicate în biosinteza cofactorului molibdenic și amplasarea lor în megaplasmidul *pAO1*.

ModA prezintă la capătul terminal o peptidă semnal pentru translocarea prin membrana citoplasmatică, în concordanță cu observația că echivalentul din *E.coli* este o proteină periplasmică. Din secvența de aminoacizi a *ModB* se poate observa existența a 6 regiuni transmembranare, fiind deci un bun candidat pentru formarea porului transmembranar necesar importului de molibden. *ModC* manifestă similarități cu o listă lungă de ATP-aze, alcătuind așadar ultimul element component al pompei pentru Mo^{2+} . Similaritățile de secvență sunt completate de observația experimentală că *modC* din *Arthrobacter* poate complementa și restabili întreaga funcționalitate a unei tulpini de *E.coli* având *modC* inactivă (42).

Gena ce pare să deschidă operonul pe care se află genele ce formează pompa, *moeA*, a fost clonată și purificată. Pe geluri SDS-PAGE proteina duce la formarea a 2 benzi apropiate ce dispar prin creșterea cantității de agent reducător. Acest comportament apare datorită existenței unor punți disulfidice intramoleculare. Pe geluri native însă, proteina rămâne în gelul de concentrare demonstrând formarea unor complexe macromoleculare mari. De altfel soluțiile ce depășesc concentrația de 1 mg/ml se gelifică în mod spontan. Legare covalentă cu glutaraldehidă a complexelor duce la obținerea de dimeri și trimeri. Analizând la microscopul electronic gelurile se poate observa formarea unor fibre cu lungimea de 10-30 nm. Proprietatea de a gelifica și de a forma este una reversibilă, fiind influențată de prezența ATP-ului și Mg^{2+} .

Pe lângă această proprietate produsul genei *moeA* mai are și activitate ATP-

azică cu generare de ADP și poate de asemenea lega dimerii de neurotubulină. Aceste observații indică rolul acestei proteine în formarea unui schelet ce conectează pompa pentru Mo^{2+} cu enzimele implicate în sinteza cofactorului, ajutând la protejarea acestui metal în interiorul celulei (42), participând de asemenea la inserția Mo^{2+} în apoenzimă (Mo^{2+} insertază, (6)).

În direcție opusă față de *moeA*, plasată la începutul unui operon alcătuit din 2 gene se află cadrul de citire cu numărul 100, *moaA*. Produsul genei a fost purificat sub forma unei proteine recombinante cu 6 resturi de His și masa moleculară de aproximativ 40 kDa sau sub forma unei proteine de fuziune cu GST având masa moleculară de 67 kDa. Masa moleculară a proteinei fără tag este de 39 kDa. Proteina purificată are culoare maro, indicând prezența ionilor de fier. Analiza cantitativă și EPR a demonstrat existența unui cluster de tipul 3Fe-3S per mol de proteină. În privința rolului pe care îl joacă această proteină în contextul celorlalte proteine se poate presupune că aceasta ar fi donorul de S în procesul de sinteza a co-factorului molibdenic (43). Faptul că funcția este reală o arată experimentele de complementare, gena din *Arthrobacter* fiind capabilă să restaureze complet fenotipul unei tulpini mutante pentru *moaA* la cel normal (6).

În același cluster sunt cantonate un număr de 3 alte gene a căror funcție este încă nedemonstrată practic, putând fi însă presupusă pe baza similarităților cu alte proteine. *MoaD*, plasată în același sens cu *moaA*, împreună cu *moaE*, plasată în direcție opusă, ar putea forma enzima hetero-tetramerică molibdopterin-sintaza, responsabilă de transferul atomilor de S la molecula de pterină.

Acest aranjament al genelor pentru sinteza co-factorului molibdenic este specific plasmidului pAO1 și nu a mai fost descris pentru alte plasmide până acum.

III.5 Gene implicate în transportul nicotinei și a produșilor de metabolism ai acesteia

Compușii aromatici pot străbate membrana celulară prin simpla difuzie însă pentru moleculele de care au nevoie, microorganismele și-au creat mecanisme specifice de transport: difuzia facilitată realizată prin intermediul permeazelor (50), sisteme ce utilizează fie hidroliza directă a ATP-ului și sisteme anti- sau simport de transport ce folosesc forța motrice a unui gradient transmembranar.

Deoarece nicotina este o baza puternică, cu un pK_a de aproximativ 11,

simpla ei difuzie prin membrana celulară este limitată. Pentru ca celula de *Arthrobacter* să poată utiliza nicotina ca sursă de C și N, ar fi necesare așadar mecanisme specifice de transport transmembranar a acestui alcaloid. Asemenea sisteme au fost descrise în alte specii, ele asigurând importul transmembranar al diverselor molecule cu sarcină electrică (35). În același timp, nicotina este totuși o substanță toxică pentru celulă fiind necesare mecanisme specifice de reglaj a conținutului de nicotină intracelulară, și de export a produșilor de degradare.

Dependența proceselor de transport a nicotinei de plasmidul pAO1 a fost descrisă în 2003, odată cu secvențierea completă a plasmidului (29). Urmărind evoluția în timp a importului de nicotină, autorii au putut observa că din momentul introducerii alcaloidului în mediu apare o perioadă de lag de aproximativ 10 minute până când degradarea nicotinei debutează propriu-zis. Acesta este un indiciu clar al faptului că importul trebuie indus, timpul scurs fiind cel necesar pentru ca alcaloidul să pătrundă prin difuzie lentă în celulă și să activeze enzimele implicate în transport și în degradare. Parametrii cinetici ai acestui sistem de transport determinați sunt K_M $5,6 \pm 2,2$ μM și V_{max} $0,6 \pm 0,06$ nmol/min, similar cu ai unor pompe cu afinitate mare dar capacitate mică pentru aminoacizi (29).

Utilizarea de blocați ai sintezei ATP (Carbonil cianide *m*-clorofenil hidrazonă - CCCP, dinitrofenol - DNP) și de compuși ce disipă gradientele transmembranare de protoni (nigericină), de K^+ (valinomycină) sau de Na^+ (monesină) nu modifică însă cu nimic capacitatea celulelor de *A. nicotinovorans* pAO1+ de a transporta nicotina în compartimentul intracelular (18). Acest lucru indică faptul că transportul acestui alcaloid nu se realizează prin mecanisme de transport activ primar sau secundar, ci mai degrabă printr-un mecanism de difuzie transmembranară.

Experimentele realizate de Ganas și Brandsch (18) au demonstrat că transportul nicotinei este legat de metabolizarea sa, fiind strâns corelat cu activitatea NDH. Prin degradarea permanentă a alcaloidului în interiorul celulei bacteriene, de-a lungul membranei celulare se creează un gradient de concentrație (mare în exterior, mică în interior) ce permite difuzia facilitată a nicotinei din exterior spre interiorul celulei. Un mecanism similar intens studiat este sistemul de transport al glucozei de la celulele eucariote (45).

Acest mecanism de transport facilitat presupune existența unei permeaze transmembranare. Două cadre de citire ce flanchează *bhdno* ar sugera o posibilă implicare în transportul nicotinei, în special prin poziție și gradul mare de similitudine cu o aminoacid-permează (*orf III*), respectiv cu o proteină de transport

a aminoacizilor (*orf 113*). Mai mult decât atât, cele două gene sunt transcrise numai în prezența nicotinei (18). În ciuda eforturilor depuse, nu au fost găsite dovezi experimentale care să lege aceste două cadre de citire de transportul nicotinei. De asemenea, o observație interesantă este faptul că deși *Nocardioides* sp. JS614 conține o cale metabolică pentru nicotină aproape identică cu cea din *A.nicotinovorans* pAO1+, având capacitatea de a metaboliza acest alcaloid (20), totuși nu prezintă un echivalent ale celor două cadre de citire mai sus amintite. Rolul fiziologic al *orf 111* și *orf 113* rămâne încă neclar.

Plasate diametral opus în raport cu cluster-ul responsabil de metabolizarea nicotinei, în apropiere de *mabO* se află alte 2 cadre de citire (*nepA* și *nepB*) ce au un grad mare de similitudine cu proteine transportoare ce conferă rezistența la diverse medicamente. Cele două proteine sunt co-transcrise într-o manieră dependentă de nicotină împreună cu *purU*, *mabO* și *fold* cu care formează un operon aflat sub controlul pmfR. Recent, funcția proteinelor codificate de cele 2 gene a fost stabilită, ele având rolul de a exporta produșii finali și intermediari rezultați în procesul de metabolizare a nicotinei (19). Cele 2 proteine alcătuiesc împreună un sistem de export transmembranar ce se comportă ca o valvă metabolică, controlând concentrația intracelulară a produșilor de degradare a nicotinei, preîntâmpinând astfel suprasaturarea căii metabolice.

III.6 Gene cu funcție necunoscută

Deși calea de degradare a nicotinei, după cum am văzut, este bine cunoscută nu toate genele plasate în regiunea aceasta au funcții cunoscute sau măcar presupuse. De departe, zona cu cele mai multe necunoscute se află între *kdhS* și *orf 68*. Este vorba despre 22 de cadre de citire, dintre care doar 4 au funcție cunoscută și demonstrată experimental. ORF-urile sunt grupate probabil în 3 operoane, unul începând cu *kdhS* iar cel de-al treilea și cel mai mare cu *kdhL*. În acest ultim operon sunt plasate o serie de cadre de citire ce apar deosebit de frecvent asociate cu enzimele molibdenice, rolul lor fiind încă neelucidat. Este vorba despre *orf 78* o presupusă oxido-reductază membranară, *orf 76* o ATP-ază din familia AAA+ și *orf 75* o subtilizin-protează. Este probabil ca aceste gene să fie responsabile de integrarea cofactorului enzimatic în apoenzimă. Singurul cadru de citire care a fost în mod indirect implicat în acest proces este *orf 72*, cadru similar cu proteina *mobA*. Inserția prin recombinare omologă a casetei *cmx* în *orf 80* duce la inactivarea întregului ansamblu de gene plasate după acesta în sensul

transcripției. Într-o tulpină modificată în acest mod nu au putut fi evidențiate activitățile ale enzimelor KDH și NDH. De asemenea, KDHL izolat din această tulpină este lipsită de MCD și nu este asamblată în enzima tri-componentă. Complementarea însă cu o copie funcțională a genei *orf 72* duce la refacerea totală a celor 2 activități și izolarea de KDH activă. Așadar produsul acestei gene este implicat în asamblarea în forma activă a enzimelor molibdenice (48), în ce mod însă nu este foarte în detaliu stabilit.

III.7 Reglarea căii de degradare a nicotinei

Toate genele cunoscute ca fiind implicate în calea de degradare a nicotinei sunt exprimate numai în prezența acestui alcaloid. La ora actuală sunt cunoscute câteva elemente privind factorii proteici ce realizează reglarea acestei întregi căi. Astfel, s-a demonstrat modul în care represorul *hdnoR* reglează expresia enantio-enzimelor 6HDNO și 6HLNO și faptul că funcționarea operon-ului *purUmabOfold* este controlată de activatorul *pmfR*. Factorii centrali, implicați în reglarea enzimelor NDH, KDH sunt încă necunoscuți. Aceștia ar putea fi reprezentați de *orf 85* și *86* care, prin amplasarea lor și prin similitudinea cu alți factori proteici cunoscuți sunt cei mai buni candidați (6). Cluster-ul de gene implicat în sinteza co-factorului molibdenic conține și el la capătul dinspre *6hdno* un cadru de citire asemănător cu factorul de transcripție *lacI*. Implicarea lui în reglaj nu a fost demonstrată, Brandsch (6). considerând a face parte dintr-un operon vechi, întrerupt prin inserarea genelor *mob*, operon implicat în degradarea glucidelor.

Alături de acest reglaj principal în expresia și maturarea enzimelor în formele active pot interveni și alți factori precum, cantitatea de coenzimă disponibilă, așa cum este cazul enzimei NDH (9).

Bibliography/Bibliografie

- (1) Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Park, C. H., Blake, R. 2., Keyhan, M. & Matin, A. (2004). Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 873-82.
- (2) Agarwal, R., Bonanno, J. B., Burley, S. K. & Swaminathan, S. (2006). Structure determination of an FMN reductase from *Pseudomonas aeruginosa* PA01 using sulfur anomalous signal. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 62, 383-91.

- (3) Andrade, S. L. A., Patridge, E. V., Ferry, J. G. & Einsle, O. (2007). Crystal structure of the NADH:quinone oxidoreductase WrbA from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *189*, 9101-7.
- (4) Baitsch, D., Sandu, C., Brandsch, R. & Igloi, G.L. (2001). Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2,6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase. *Journal of Bacteriology*, *183*, 5262-7.
- (5) Bernauer, H., Mauch, L. & Brandsch, R. (1992). Interaction of the regulatory protein NicR1 with the promoter region of the pAO1-encoded 6-hydroxy-D-nicotine oxidase gene of *Arthrobacter oxidans*. *Molecular Microbiology*, *6*, 1809-20.
- (6) Brandsch, R. (2006). Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *69*, 493-8.
- (7) Brandsch, R. & Bichler, V. (1990). Riboflavin-dependent expression of flavoenzymes of the nicotine regulon of *Arthrobacter oxidans*. *The Biochemical Journal*, *270*, 673-8.
- (8) Brandsch, R. & Decker, K. (1984). Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxidans*. *Archives of Microbiology*, *138*, 15-7.
- (9) Brandsch, R., Bichler, V. & Krauss, B. (1989). Binding of FAD to 6-hydroxy-D-nicotine oxidase apoenzyme prevents degradation of the holoenzyme. *The Biochemical Journal*, *258*, 187-92.
- (10) Cenas, N., Anusevicius, Z., Nivinskas, H., Miseviciene, L. & Sarlauskas, J. (2005), Structure-Activity Relationships in Two-Electron Reduction of Quinones - *Methods in Enzymology*, Academic Press,
- (11) Chiribau, C. B., Sandu, C., Fraaije, M., Schiltz, E. & Brandsch, R. (2004). A novel gamma-N-methylaminobutyrate demethylating oxidase involved in catabolism of the tobacco alkaloid nicotine by *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *271*, 4677-84.
- (12) Chiribau, C. B., Sandu, C., Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2005). Characterization of PmfR, the transcriptional activator of the pAO1-borne purU-mabO-fold operon of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Journal of Bacteriology*, *187*, 3062-70.
- (13) Chiribau, C., Mihasan, M., Ganas, P., Igloi, G. L., Artenie, V. & Brandsch, R. (2006). Final steps in the catabolism of nicotine. *The FEBS Journal*, *273*, 1528-36.
- (14) Decker, C. (1991), *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*, CRC Press,
- (15) Decker, K. & Brandsch, R. (1997), *Determining Covalent Flavinylation - Methods in Enzymology*, Academic Press,
- (16) Deller, S., Macheroux, P. & Sollner, S. (2008). Flavin-dependent quinone reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *65*, 141-60.
- (17) Freudenberg, W., Konig, K. & Andreesen, J.R. (1988). Nicotine dehydrogenase from *Arthrobacter oxidans*: A molybdenum-containing hydroxylase. *FEMS Microbiology Letters*, *52*, 13-17.
- (18) Ganas, P. & Brandsch, R. (2009). Uptake of L-nicotine and of 6-hydroxy-L-nicotine by *Arthrobacter nicotinovorans* and by *Escherichia coli* is mediated by facilitated

- diffusion and not by passive diffusion or active transport. *Microbiology*, *155*, 1866-77.
- (19) Ganas, P., Mihasan, M., Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2007). A two-component small multidrug resistance pump functions as a metabolic valve during nicotine catabolism by *Arthrobacter nicotinovorans*. *Microbiology*, *153*, 1546-55.
 - (20) Ganas, P., Sachelaru, P., Mihasan, M., Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2008). Two closely related pathways of nicotine catabolism in *Arthrobacter nicotinovorans* and *Nocardioides* sp. strain JS614. *Archives of Microbiology*, *189*, 511-7.
 - (21) Gherna L Robert, Richardson S H , Rittenberg C Sydney, (1965). The Bacterial Oxidation of Nicotine VI. The Metabolism of 2,6-Dihydroxypseudoxyonicotine. *The Journal of Biological Chemistry*, *240*, 3669-3673.
 - (22) Grandori, R., Khalifah, P., Boice, J. A., Fairman, R., Giovanielli, K. & Carey, J. (1998). Biochemical characterization of WrbA, founding member of a new family of multimeric flavodoxin-like proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*, 20960-6.
 - (23) Guse, A., Stevenson, C. E. M., Kuper, J., Buchanan, G., Schwarz, G., Giordano, G., Magalon, A., Mendel, R. R., Lawson, D. M. & Palmer, T. (2003). Biochemical and structural analysis of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MobA. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 25302-7.
 - (24) Hochstein, L. & Rittenberg, C. (1958). The Bacterial Oxidation of Nicotine III. The Isolation and Identification of 6-Hydroxypseudoxyonicotine. *Journal of Biological Chemistry*, *234*, 156-160.
 - (25) Hochstein, L. & Rittenberg, C. (1958). The Bacterial Oxidation of Nicotine II. The Isolation of the first oxidative product and its identification as (1)-6-Hydroxynicotine. *The Journal of Biological Chemistry*, *234*, 156-161.
 - (26) Hochstein, L. & Rittenberg, S. (1958). The Bacterial Oxidation of Nicotine I. Nicotine Oxidation by Cell-free preparations. *The Journal of Biological Chemistry*, *234*, 151-155.
 - (27) Holmes E Paul, Rittenberg C Sydney, (1972). The bacterial oxidation of nicotine. VII. Partial purification and properties of 2,6-dihydroxypyridine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *247*, 7628-7633.
 - (28) Holmes PE, Rittenberg SC, Knackmuss HJ, (1972). The bacterial oxidation of nicotine. 8. Synthesis of 2,3,6-trihydroxypyridine and accumulation and partial characterization of the product of 2,6-dihydroxypyridine oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, *1972*, 23.
 - (29) Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2003). Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *Journal of Bacteriology*, *185*, 1976-86.
- Jaiswal, A. K. (2004). Regulation of Antioxidant Response Element-Dependent Induction of Detoxifying Enzyme Synthesis. In , *Methods in Enzymology* (Volume Volume 378, pp. 221-238). Academic Press.
- (31) Kaiser, J. P., Feng, Y. & Bollag, J.M. (1996). Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions.

- Microbiological Reviews*, 60, 483-98.
- (32) Knackmuss, H. J. & Beckmann, W. (1973). The structure of nicotine blue from *Arthrobacter oxidans*. *Archiv fur Mikrobiologie*, 90, 167-9.
- (33) Koetter, J. W. A. & Schulz, G.E. (2005). Crystal structure of 6-hydroxy-D-nicotine oxidase from *Arthrobacter nicotinovorans*. *Journal of Molecular Biology*, 352, 418-28.
- (34) Lake, M. W., Temple, C. A., Rajagopalan, K. V. & Schindelin, H. (2000). The crystal structure of the *Escherichia coli* MobA protein provides insight into molybdopterin guanine dinucleotide biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 40211-7.
- (35) Leveau, J. H., Zehnder, A. J. & van der Meer, J.R. (1998). The *tfdK* gene product facilitates uptake of 2,4-dichlorophenoxyacetate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *Journal of Bacteriology*, 180, 2237-43.
- (36) Li, R., Bianchet, M. A., Talalay, P. & Amzel, L.M. (1995). The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 8846-50.
- (37) Lind, C., Hochstein, P. & Ernster, L. (1982). DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 216, 178-85.
- (38) Llamas, A., Mendel, R. R. & Schwarz, G. (2004). Synthesis of adenylated molybdopterin: an essential step for molybdenum insertion. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 55241-6.
- (39) Malphettes, L., Weber, C. C., El-Baba, M. D., Schoenmakers, R. G., Aubel, D., Weber, W. & Fussenegger, M. (2005). A novel mammalian expression system derived from components coordinating nicotine degradation in *arthrobacter nicotinovorans* pAO1. *Nucleic Acids Research*, 33, e107.
- (40) Maruyama, A., Kumagai, Y., Morikawa, K., Taguchi, K., Hayashi, H. & Ohta, T. (2003). Oxidative-stress-inducible *qorA* encodes an NADPH-dependent quinone oxidoreductase catalysing a one-electron reduction in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 149, 389-98.
- (41) Massey, V. (2000). The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions*, 28, 283-96.
- (42) Menéndez, C., Otto, A., Igloi, G., Nick, P., Brandsch, R., Schubach, B., Böttcher, B. & Brandsch, R. (1997). Molybdate-uptake genes and molybdopterin-biosynthesis genes on a bacterial plasmid--characterization of MoeA as a filament-forming protein with adenosinetriphosphatase activity. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 250, 524-31.
- (43) Menéndez, C., Siebert, D. & Brandsch, R. (1996). MoeA of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 involved in Mo-pterin cofactor synthesis is an Fe-S protein. *FEBS Letters*, 391, 101-3.
- (44) Mihasan, M., Chiribau, C., Friedrich, T., Artenie, V. & Brandsch, R. (2007). An

- NAD(P)H-nicotine blue oxidoreductase is part of the nicotine regulon and may protect *Arthrobacter nicotinovorans* from oxidative stress during nicotine catabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2479-2485.
- (45) Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 219, 713-25.
 - (46) Patridge, E. V. & Ferry, J.G. (2006). WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Journal of Bacteriology*, 188, 3498-506.
 - (47) Richardson S H, Rittenberg C Sydney, (1961). The bacterial oxidation of nicotine. IV. The isolation and identification of 2,6-dihydroxy-N-methylmyosmine. *The Journal of Biological Chemistry*, 236, 959-963.
 - (48) Sachelaru, P., Schiltz, E. & Brandsch, R. (2006). A functional mobA gene for molybdopterin cytosine dinucleotide cofactor biosynthesis is required for activity and holoenzyme assembly of the heterotrimeric nicotine dehydrogenases of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5126-31.
 - (49) Sachelaru, P., Schiltz, E., Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2005). An alpha/beta-fold C-C bond hydrolase is involved in a central step of nicotine catabolism by *Arthrobacter nicotinovorans*. *Journal of Bacteriology*, 187, 8516-9.
 - (50) Saier, M. H. J. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64, 354-411.
 - (51) Sancho, J. (2006). Flavodoxins: sequence, folding, binding, function and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 63, 855-64.
 - (52) Sandu, C., Chiribau, C. B. & Brandsch, R. (2003). Characterization of HdnR, the transcriptional repressor of the 6-hydroxy-D-nicotine oxidase gene of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, and its DNA-binding activity in response to L- and D-nicotine Derivatives. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 51307-15.
 - (53) Sandu, C., Chiribau, C., Sachelaru, P. & Brandsch, R. (2005). Plasmids for Nicotine-Dependent and -Independent Gene Expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and Other *Arthrobacter* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8920-8924.
 - (54) Schenk, S., Hoelz, A., Krau[beta], B. & Decker, K. (1998). Gene structures and properties of enzymes of the plasmid-encoded nicotine catabolism of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Journal of Molecular Biology*, 284, 1323-1339.
 - (55) Schleberger, C., Sachelaru, P., Brandsch, R. & Schulz, G.E. (2007). Structure and action of a C-C bond cleaving alpha/beta-hydrolase involved in nicotine degradation. *Journal of Molecular Biology*, 367, 409-18.
 - (56) Tang, H., Wang, S., Ma, L., Meng, X., Deng, Z., Zang, D., Ma, C., Xu, P. (2008). A Novel Gene, Encoding 6-Hydroxy-3-Succinoylpyridine Hydroxylase, Involved in Nicotine Degradation by *Pseudomonas putida* Strain S16. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1567-1574.
 - (57) Trumpower, B. (1981), Function of Quinones in Energy Conserving Systems,

Academic Press,

- (58) Watanabe, B., Dickinson, D., Liu, R., Forman, H. (2004), Quinones and Glutathione Metabolism - Methods in Enzymology, Academic Press,
- (59) Ye, J., Yang, H., Rosen, B. P. & Bhattacharjee, H. (2007). Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Letters*, 581, 3996-4000.

Capitolul IV. Metabolismul glucidelor în *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+

Capacitatea de a utiliza glucidele din mediu este o însușire destul de comună în cadrul regnului *Procariorota*, de aceea este în general codificată de gene plasate pe cromozomul bacterian. Membrii genului *Arthrobacter* au capacitatea de metaboliza o serie de glucide comune precum: D-xiloza, D-glucoza, D-manoza, D-galactoza, D-fructoza, celobioza, maltoza, trehaloza, sucroza, rafinoza sau meleziatoza (33).

Pe lângă întreaga cale metabolică responsabilă de metabolizarea nicotinei, pe plasmidul pAO1 au fost identificate, pe baza homologiei cu alte gene, o serie de cadre de citire care ar putea fi implicate în reacții metabolice legate de degradarea glucidelor. Este vorba despre un grup de gene amplasate între poziția 344 și 40893, grup ce cuprinde un număr de 42 de ORF-uri. Dintre acestea, 14 cadre de citire nu au putut fi asociate pe baza omologiei cu alte gene cu funcție cunoscută, iar restul au funcții deduse doar teoretic.

Prezența lor este surprinzătoare, cu atât mai mult cu cât grupul de gene *nic* responsabil de degradarea nicotinei a fost achiziționat mai târziu de către un plasmid ce conținea gene codificând tocmai această calea necunoscută de degradare glucidelor. Cum plasmidele supraviețuiesc doar dacă oferă un avantaj evolutiv, este interesant de aflat ce avantaj au oferit sau încă oferă aceste cadre de citire tulpinii de *Arthrobacter* ce poartă plasmidul pAO1.

În literatură sunt semnalate numeroase cazuri în care specii de *Arthrobacter* au dovedit capacitatea de a metaboliza glucide mai puțin comune. Astfel, încă din 1980 se demonstra capacitatea culturilor de *Arthrobacter* de a degrada peretele celular al drojdiilor cu formare de sferoplaști. Aceasta este posibil datorită unei α -mananaze și a unei β -1,3 endoglucanaze (15). Abia recent aceasta din urmă a putut fi purificată și cristalizată în stare nativă, urmând a-i fi determinată și structura (50). În ultimii ani, la specii aparținând acestui gen, au fost descrise o serie de glicozilaze interesante din punct de vedere al specificității de substrat, precum:

- o galactozidaza activă la temperaturi mici (cu potențiale aplicații în industria laptelui (61),

- o izomalto-dextranaza (care degradează dextranul cu formare de izomaltoza (31)

- o maltosil-transferaza ce produce un tetrazaharid ciclic din amidon.

O primă întrebare legată de posibilele căi metabolice pentru degradarea

glucidelor codificate de pAO1 este dacă acestea sunt active. Achiziția grupului de gene *nic* ar putea duce la inactivarea completă sau parțială a acestora, cu atât mai mult cu cât transpozonul *TN554* pare să fie inserat chiar în mijlocul unui grup de gene cu rol în metabolizarea glucidelor. De asemenea, între grupul de gene *nic* și cel pentru sinteza molibdopterinei există un rest de trei cadre de citire a căror poziție este discrepantă raportată la rolul presupus și a căror existență nu poate fi explicată decât prin fenomene recombinatoriale.

Igloi și colab. (29) au reușit, prin cultivarea repetată *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ pe medii bogate în nutrienți, să obțină o tulpină lipsită de acest megaplasmid și care nu poate degrada nicotina și forma pigmentul albastru caracteristic (fig. 24).



Figura 24. Dezvoltarea diferită pe mediu conținând nicotină a tulpinii *Arthrobacter nicotinovorans* conținând megaplasmidul pAO1 (notată +) și a unei tulpini de *Arthrobacter nicotinovorans* fără plasmid (notată -)

Tulpina lipsită de megaplasmid, notată *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1-, are un foarte mare potențial ca instrument de studiu cu utilizări multiple, inclusiv pentru investigarea metabolismului glucidelor.

Testarea capacității microorganismelor de a metaboliza glucidele se realizează destul de ușor, deoarece în urma degradării carbohidraților bacteriile produc acizi organici. Aceștia duc la acidifierea mediului de cultură, scăderea valorii pH-ului fiind vizualizată prin intermediul unui indicator. Dacă se folosește

roșu-nețru ca indicator, o reacție pozitivă constă în virarea culorii mediului de la roșu la galben. O modalitate extrem de rapidă de a testa un număr mare de glucide și care funcționează după acest principiu este sistemul API 50CH produs de Biomerieux (Franța).

Compararea comportamentului pe medii cu diverse glucide a celor două tulpini: *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ și *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1-, a demonstrat o serie de diferențe clare (figura 25). Astfel, prezența plasmidului pAO1 este esențială pentru metabolizarea D-ribozei, D-xilozei, L-ramnozei, D-sorbitolului și a N-acetilglucosaminei, ceea ce demonstrează integritatea și valabilitatea reacțiilor metabolice de catabolizare a carbohidraților codificate de genele de pe pAO1. Deși experimentul simplu din figura 25 reprezintă prima dovadă clară a implicării megaplasmidului pAO1 în catabolismul glucidelor, el nu poate preciza exact care genă este responsabilă pentru degradarea cărui glucid și care sunt reacțiile biochimice implicate.

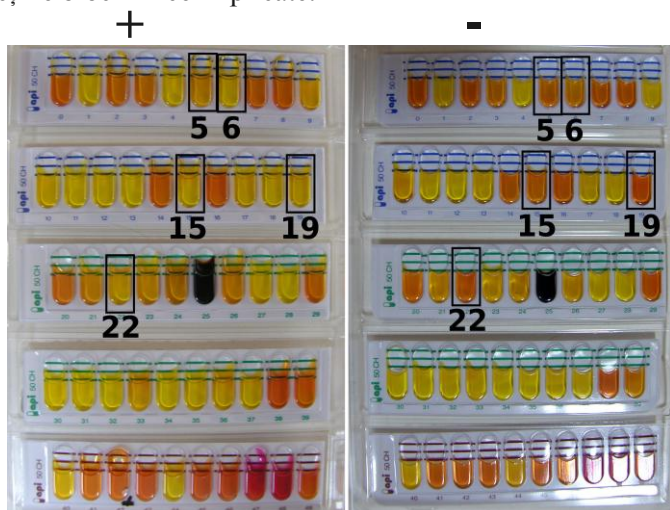


Figura 25. Diferențele metabolice între tulpina *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ (notată +) și pAO1- (notată -) evidențiate perin testul API 50CH în privința capacității de a degrada D-ribozei (5), D-xilozei (6), L-ramnozei (15), D-sorbitolului (19) și a N-acetilglucosaminei (22).

IV.1. Gene posibil a fi implicate în metabolismul carbohidraților de pe megaplasmidul pAO1

Un prim grup (cluster) de gene posibil a fi implicat în metabolizarea glucidelor este deschis chiar de al doilea cadru de citire de pe plasmidul pAO1 și cuprinde 4 ORF-uri, urmate de un cadru de citire cu orientare opusă, posibil a fi un factor de reglaj al transcripției. Primul cadru de citire codifică o proteină care are 264 de aminoacizi a cărei secvență este similară cu hidrolazele α/β -fold. Interogarea bazei de date conținând domenii înalt conservate (43) arată că produsul acestei gene conține cu 4 domenii înalt conservate înrudite, și anume:

- MhpC, (numărul de acces pe CD search COG0596.2), comun pentru hidrolaze și acetiltransferaze
- Abhydrolase_1 (n.a.CDS pfam00561.12) domeniul catalitic al clasei hidrolazelor α/β -fold
- COG1647, domeniu presupus a fi conservat în lipaze, esteraze
- PldB, (n.a. CDS COG2267.2) domeniu conservat în lisofosfolipaze

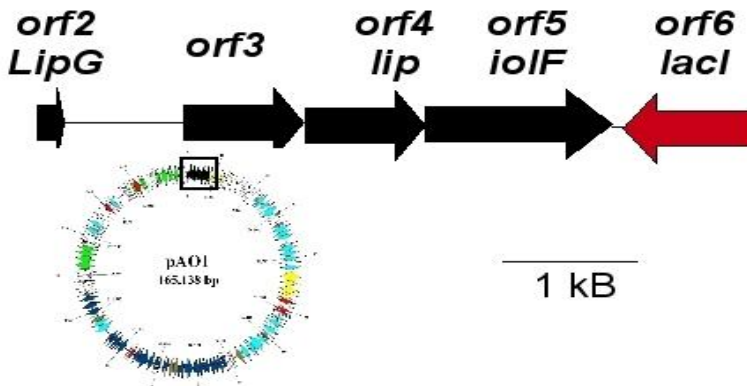


Figura 26. Orientarea și amplasarea în cadrul megaplasmidului pAO1 a cadrelor de citire în cazul primului cluster presupus a fi implicat în catabolismul glucidelor.

Următorul cadru de citire, *orf3* are, după cum poate fi observat din figura 26, aceeași orientare cu cel anterior iar produsul de transcripție este similar cu o sucroz-hidrolază din *E.coli*. Urmează un ORF similar cu o lipază din *B.halodurans* și un cadru de citire similar cu proteina de transport al inozitolului din *B. subtilis*. Dintre toate, doar genele 3 și 4 sunt în același cadru de citire și cel mai probabil

sunt transcrise și translate împreună. Pentru a fi translate de pe aceeași moleculă de ARN și celelalte 2 cadre ar fi necesar un shift al cadrului de citire. Oricum, prin funcția dedusă teoretic, toate aceste gene par a fi implicate în metabolizarea glicolipidelor, de aceea ne vom referi la el ca grupul de gene *glip*.

Un al doilea grup (cluster) de gene ce ar putea codifica proteine legate de metabolismul glucidelor începe în poziția 21370, fiind separat de cluster-ul anterior prin un ansamblu de cadre de citire implicate în partiționare și replicare. El este cel mai mare cluster de gene posibil a fi implicate în metabolismul glucidelor, conținând nu mai puțin de 10 cadre de citire.

Din lungul șir de cadre de citire cu funcție necunoscută primul care se remarcă este *orf 24* ce codifică o proteină cu 249 de aminoacizi. Aceasta este similară cu un precursor al celulozei din *C.thermocellum*. În baza de date Pfam(16), glicosil-hidrolazele sunt clasificate funcție de similaritățile în secvență în 85 de familii, grupate funcție de structura 3D (fold) în clanuri. ORF 24 luat în discuție prezintă un domeniu înalt conservat ce indică că face parte din clanul Tim barrel glycosyl hydrolase superfamily, familia Glyco_hydro_26 (n.a. CDS: PF02156). Această familie cuprinde doar mananaze, hidrolizând mananul, galactomananul, glucomananul și galactoglucomananul. De asemenea, activitate redusă a fost observată și asupra unor alte polizaharide din pereții celulari ai plantelor (59).

Următoarele 7 cadre de citire ce urmează după presupusa enzimă cu funcție celulozică nu au funcții nici măcar presupuse, determinarea existenței lor făcându-se manual, prin analiza secvenței și identificarea unor potențiali codon-i start și a situs-urilor de legare a ribozomilor.

Produsul cadrului de citire 32 însă se aseamănă cu factorul de reglaj al transcripției PdhR. Modul în care este plasat, având direcție opusă față de ambele gene nu oferă nici o indicație asupra rolului său. În secvență se pot însă detecta o serie de domenii înalt conservate. Este vorba în primul rând de domeniul GntR (pfam00392.21) care conține regiunea N-terminală cu motivul helix-turn-helix specific factorilor de transcripție și proteinelor ce se leagă de ADN. La capătul C terminal factorii de transcripție din această familie au un domeniu responsabil de legarea efectorului sau de fenomenele de oligomerizare. Proteinele din această familie au fost grupate în 6 subfamilii (54). De altfel, celelalte domenii înalt conservate cu care *orf32* se aseamănă indică legătura dintre acest cadru de citire și 2 dintre subfamilii: GntR, cuprinzând proteine înrudite cu represorul responsabil de reglarea genelor pentru metabolizarea acidului gluconic (46) și FadR (COG2186.2), factor implicat în reglarea căii de metabolizare a acizilor grași (14).

După acest cadru de citire se află (figura 27), un număr de 4 ORF-uri ce alcătuiesc un sistem de transport al glucidelor de tipul ABC (ATP-binding cassette). Acest sistem este unul foarte frecvent întâlnit atât la microorganisme cât și la eucariote, fiind alcătuit întotdeauna din 3 componente: un sistem periferic de legare și hidroliză a ATP-ului alcătuit din una sau două proteine, 2 proteine fiecare având 6 segmente transmembranare cu formează un por transmembranar și o proteină periplasmică de legare a substratului (60).

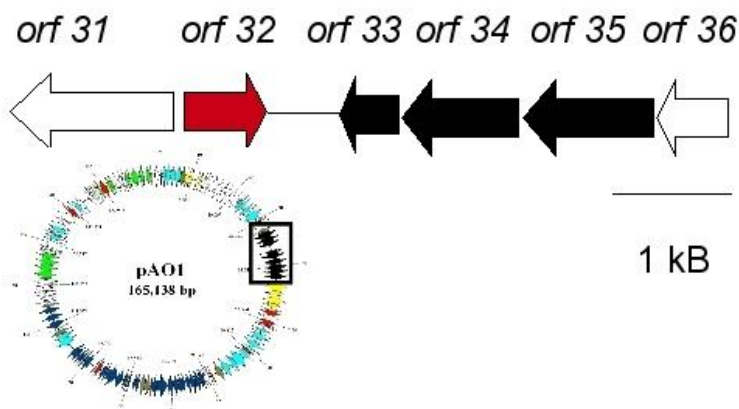


Fig. 27. Gruparea de gene ce alcătuiește sistemul de transport de tip ABC al glucidelor de pe pAO1 din *Arthrobacter nicotinovorans* și amplasarea lor în cadrul plasmidului pAO1

În cazul cluster-ului de 4 gene mai sus amintit, primul cadru de citire se aseamănă cu o ATP-ază întâlnită în sistemul mai sus menționat și conține de asemenea domeniul înalt conservat specific familiei ABC_Carb_Monos_I (cd03216.3). Aceasta familie cuprinde ATP-aze ABC ce fac parte din sisteme de transport ale glucidelor simple ce au o caracteristică distinctivă : hidroliza ATP-ului este realizată de un singur lanț polipeptidic conținând 2 regiuni de legare a nucleotidului, detaliu ce corespunde perfect cu situația acestui cluster.

În aval de *orf33* se află *orf34* și *orf35*, proteinele codificate de acestea aseamănându-se cu cele 2 proteine transmembranare ale sistemului ABC de transport al ribozei, xilozei, arabinozei și galactozidelor la *C. perfringens* și respectiv *T. tengcongensis* (29).

Ultimul element component al acestui tip de sistem de transport este proteina periplasmică ce recunoaște și leagă molecula ce urmează a fi transportată. Acesta ar putea fi reprezentat de produsul cadrului de citire 36, care

este asemănător cu componenta periplasmică a sistemului de transport al glucidelor de tip ABC de la *R. etli*.

Secvența de aminoacizi a ORF-ului 38 arată că face parte din familia GMC_oxred_N (Accession number: PF00732). Toate aceste enzime au în comun o serie de regiuni similare ca secvență. Una dintre aceste regiuni, localizată în partea N-terminală corespunde unui domeniu de legare a FAD-ADP (9). Sunt deci toate flavoproteine, utilizând FAD în calitate de cofactor pentru a oxida substrat precum glucoza, colina, metanolul sau celobioza (24). Rolul celorlalte regiuni cu grad mare de similitudine nu este încă elucidat.

Un BLAST cu secvența acestui *orf* indică că gena se aseamănă cu o serie de alte cadre de citire cu funcție necunoscută, dar presupuse a dehidrogena 2-cetoglutarat. Genele a căror funcție a fost stabilită și care au un grad mare de similaritate cu acest ORF sunt:

-metil-1,2-propanediol dehidrogenaza din *Mycobacterium austroafricanum*, enzima implicată în degradarea metil terț-butil eter-ului,

-glucozid 3-dehidrogenaza (EC 1.1.99.13) din *Halomonas sp.* alpha-15 ce poate oxida grupele OH ale piranozei și derivaților exceptând poziția C1 (38).

-glucoz-dehidrogenaza din *Burkholderia cepacia*, enzima termostabilă și cu un maxim de activitate la 70°C (30)

-o subunitate a 2-ceto-gluconat dehidrogenazei din *Pantoea citrea* (53)

Rolul acestei gene în *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ este necunoscut, dar el trebuie căutat în conexiune cu restul de gene care o flanchează. Pe de o parte cele 5 ORF ce codifică sistemul de transport tip ABC, ORF32 ce are un grad mare de homologie cu o proteina reglatoare PdhR și, pe de alta parte genele care o preced, adică ORF 39 și 40.

ORF39 face parte din clanul Aldh-like superfamilii, familia Aldeh (Accession number: PF00171). Aceasta familie cuprinde o serie de dehidrogenaze care acționează asupra unei game variate de aldehide aromatice sau alifatic, utilizând NADP⁺ în calitate de cofactor (16). Gradul înalt de identitate (56%) cu enzima succinic-semialdehid-dehidrogenaza (SSADH) din *M. tuberculosis* oferă o serie de informații în plus referitoare la posibilul rol al acestei enzime în *Arthrobacter*.

În general aceasta enzimă face parte din șuntul acidului gama-amino butiric, descris atât la microorganisme cât și la plante și animale. Împreună cu Glu-decarboxilaza și GABA-trans-aminaza asigură transformarea acidului glutamic în acid succinic care este apoi degradat în ciclul acizilor tricarboxilici (CAT) (7). La

plante acest șunt este important, asigurând o mai bună protecție împotriva stresului oxidativ. Mutanți de *Arabidopsis* în care gena SSADH a fost inactivată manifestă o mai mare sensibilitate la lumină și căldura, surse de ROS (8).

La mamifere această enzimă intervine în calea de degradare a GABA, principalul neuroinhibitor al sistemului nervos central. A fost purificată din câteva surse și este deosebit de interesantă din punct de vedere medical, constituind cauza unei maladii genetice autosomale recesive rare, caracterizată prin acumularea de gama-hidroxi-butarat și întârzieri în dezvoltarea psiho-motorie.

Există însă și cazuri în care enzima îndeplinește funcții specifice.

M. tuberculosis, spre exemplu, conține 2 gene responsabile de această activitate, *gabD1* și *gabD2* cu care *orf39* are un înalt grad de similitudine. Ele formează în *M. tuberculosis* o variantă a ciclului acizilor tricarboxilici, în care alfa-ceto-glutaratul este decarboxilat la semialdehida acidului succinic, iar aceasta este transformată în succinat care reintră în ciclul acizilor tricarboxilici. Această cale secundară pare să ofere microorganismului o serie de avantaje în condiții microaerobe și poate oferi o cale de combatere a acestui patogen. Un rol asemănător a fost descris și la microorganismul *Bradyrhizobium japonicum*, această cale secundară asigurând o mai bună integrare a ciclului acizilor tricarboxilici cu procesul de fixare simbiotică a azotului (22).

La *E.coli* această activitate asigură etapa finală de integrare a căii de degradare a acizilor 3- și 4-hidroxi-fenilacetic în ciclul acizilor tricarboxilici.

Cadrul de citire cu numărul 40 codifică o proteină de 388 de aminoacizi și se află plasat în aceeași direcție cu cel anterior (*orf39*). Comparând secvența cu cele existente într-o bază de date cu domenii înalt conservate se poate observa că proteina conține un așa numitul Rossmann-fold, implicat în legarea NAD^+ sau NADP^+ . Pfam indică faptul că face parte din familia GFO_IDH_MocA (Accession number: PF01408), familie ce grupează o serie de enzime care utilizează NADP^+ sau NAD^+ . Aici sunt incluse și proteinele: GFO - care convertește D-glucoza și D-fructoza în D-glucunolactonă și D-dulcitol (64), MOCA - o proteină implicată în metabolismul rhizopinei (20) și de asemenea o serie de proteine cu funcție necunoscută din *E.coli* sau *Sacharomices*. O căutare BLAST după secvența acestui ORF arată că majoritatea proteinelor cu care are un grad mare de similitudine au funcție necunoscută și nu oferă nici un indiciu asupra rolului ei.

Secvența de aminoacizi a cadrului de citire 41 indică faptul că această proteină face parte din familia dihidrodipicolinat-sintazei, membră a aldolazelor din clasa I. Cadrul de citire 42 face parte din familia glicero-kinazei, care cuprinde

enzime ce realizează fosforilarea substratului.

După acest cluster urmează grupul masiv al genelor implicate în metabolizarea nicotinei și pentru sinteza cofactorului molibdenic. Acest grup începe în poziția 53904 cu cadrul de citire 54 și se termină în poziția 105108 cu *orf106*, *modC*. Interesant este că urmează 3 cadre de citire ce sunt clar implicate în metabolismul glucidelor și apoi *6-HDNO* și *hdnoR*. Cele 3 gene codifică proteine similare cu o β -glucosidază din *E. chrysanthemi*, o presupusă proteină transportoare membranară din *C. crescentus* CB15 și un factor de reglaj al transcripției. Interesant este că și primul cluster, cel posibil a fi implicat în metabolizarea glicolipidelor, conține o proteină transportoare. Cele două secvențe se suprapun pe o zonă conținând 510 aminoacizi, dar au doar 8% identitate, indicând faptul că transportă două glucide diferite (18).

Este clar așadar că cluster-ul de gene *nic* a fost inserat printr-un fenomen de recombinare în interiorul acestui vechi operon legat de metabolizarea glucidelor.

IV.1.1 Cadrul de citire 39 codifică o aldehyd-dehidrogenază

La doar 53 de baze de codonul STOP al cadrului de citire 38 începe *orf39*, respectiv din poziția 35896. Situs-ul de legare al ribozomului este 35892-AAGGAG, iar codonul STOP este 37271-TGA, gena având astfel o lungime de 1375 de perechi de baze.

Analiza *in-silico* a secvenței de aminoacizi codificată de această genă demonstrează că este omoloagă cu o serie de enzime cu funcție dehidrogenazică acționând asupra semi-aldehydei succinice și de asemenea, conține o serie de domenii înalt conservate înrudite, precum:

- *gabD1* și *gabD2* – dehidrogenaze ale semi-aldehydei acidului succinic ;
- *aldehydh* – familia aldehyd-dehidrogenazelor, familie foarte heterogenă ce conține enzime ce folosesc NAD^+ sau NADP^+ în calitate de cofactor pentru a transforma o serie de aldehyde în acizii corespunzători ;
- *putA* – cuprinde aldehyd-dehidrogenaze NAD^+ -dependente ;
- *PRK10090* – cuprinde aldehyd-dehidrogenaze de tip A ;
- *PRK09847* - gama-Glu-gama-amino-butir-aldehyd-dehidrogenaza, NAD(P)H -dependentă.

Toate aceste domenii fac parte din familia extinsă ALDH, familie ce cuprinde o gamă largă de enzime care catalizează oxidarea aldehydelor în acizii

corespunzători folosind în calitate de cofactor NAD^+ sau NADP^+ . Analiza secvențelor enzimelor din această familie a permis organizarea lor în 2 trunchiuri, care conțin un număr de 8 clase (42). Dintre acestea, 3 sunt mai importante din punct de vedere practic, și au fost intens studiate. Acestea se diferențiază printre altele, și funcție de specificitatea de substrat:

- clasa 1 - o specificitate largă de substrat, dar preferând aldehidele cu lanț lung de atomi de C, citosolice ;
- clasa 2 - o specificitate largă de substrat, dar preferând aldehidele cu lanț scurt, mitocondriale ;
- clasa 3 – o specificitate îngustă față de substrat, frecvente în celulele tumorale (2; 51).

Prin realizarea unei comparații pe baza analogiei de secvență între produsul de translație a genei 39 și reprezentanți ai clasei 3 (al3a1_rat, PDB id 1ad3) și respectiv ai clasei 1 (aldehid dehidrogenaza din ficatul de oaie, PDB id 1bxs), se pot identifica și potențiali aminoacizi implicați în legarea cofactorului enzimatic sau în cataliza propriu-zisă, aceștia fiind prezentați în tabelul 5.

Tabelul 5. Echivalența aminoacizilor considerați înalt conservați în clasa aldehid-dehidrogenazelor și ORF39

Rat-3 aldehid dehidrogenaza citosolica din șobolan (AL3A1_RAT)	Aldehid dehidrogenaza citosolica din ficatul de oaie (1BXS)	Aldehid dehidrogenaza mitocondrială bovină (1AG8)	ORF 39 pAO1 Arthrobacter nicotinovorans	Funcție *
Gly187	Gly246	Gly244	Gly210	-legarea inelului nicotinic din NAD
Phe335	Phe402	Phe400	Phe365	
Gly240	Gly300	Gly298	Gly263	-poziționarea grupei nucleofile catalitice reprezentate de un rest de

Rat-3 aldehyd dehidrogenaza citosolica din șobolan (AL3A1_RAT)	Aldehyd dehidrogenaza citosolica din ficatul de oaie (1BXS)	Aldehyd dehidrogenaza mitocondrială bovină (1AG8)	ORF 39 pAO1 Arthrobacter nicotinovorans	Funcție *
				cisteină
Asn114	Asn170	Asn168	Asn135	- stabilizarea oxigenului carbonilic din substratul aldehydic în timpul catalizei
Cys243	Cys303	Cys301	Cys266	-gruparea tiolică nucleofilă catalitică prezentă în toate enzimele cu activitate enzimatică
Gly131	Gly186	Gly187	Gly152	
Lys137	Lys193	Lys191	Lys158	
Pro337	Pro404	Pro402	Pro367	
Gly383	Gly450	Gly448	Gly413	
Gly211	Gly271	Gly269	Gly234	-prima glicină din cadrul dipeptidei Gly-Gly ce markează granița dintre

Rat-3 aldehyd dehidrogenaza citosolica din șobolan (AL3A1_RAT)	Aldehyd dehidrogenaza citosolica din ficatul de oaie (1BXS)	Aldehyd dehidrogenaza mitocondrială bovină (1AG8)	ORF 39 pAO1 Arthrobacter nicotinovorans	Funcție *
				domeniul de legare a coenzimei și cel catalitic
Asn388	Asn455	Asn453	Asn418	
Arg25	Arg85	Arg83	Arg47	
Gly105	Gly161	Gly159	Gly126	
Pro116	Pro172	Pro170	Pro137	

* în conformitate cu Perozich și colab. 1999 (172)

Numărul mare de resturi înalt conservate din proteina de pe megaplasmidul pAO1 indica faptul că enzima folosește în calitate de cofactor NAD^+ sau/și NADP^+ și este posibil să funcționeze după același mecanism de acțiune cu aldehyd-dehidrogenazele. Trebuie făcute însă unele observații în privința motivului de legare al dinucleotidului. Este cunoscut faptul că legarea NAD(P)^+ se realizează de cele mai multe ori prin intermediul unei structuri specifice tridimensionale de forma $\beta\alpha\beta\beta$ cunoscută sub numele de Rossmann fold (52). Structura secundară a enzimei ORF39 obținută cu ajutorul utilitarului Jpred (6) indică o succesiune de structuri secundare foarte asemănătoare cu cea descrisă de (57) pentru aldehyd-dehidrogenaza bovină (PDB id.1AG8).

1-----11-----21-----31-----41-----51-----61-----71-----81----
MAIATIDPTTGITLTKTDFDAHTPEEVENRIARAEAAFRSLQNTSFEERARWMHKAADILESEADEVARLIATEMGKTLTTAKYEALK
-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----
--E-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----
--E-----HE-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----
--E-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----
--E-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----
--E-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----
--E-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----
1788767998834553269998999999998699987458995799999999999986627899999864387146899999

---b1,2---b2,3---alfaA-----alfaB-----alfaC---
---91-----101-----111-----121-----131-----141-----151-----161-----17
SATGMRHFADHAQRYLSPETVPVASEVNASNLHVQFDPLGVVLAVMPWNYPLWQAVRFAAPALMAGNTGLLKHASNPQCALYLG
H-----E-----E-----H-----E-----H-----
H-----E-----E-----H-----E-----H-----
H-----E-----E-----H-----H-----H-----E-----H-----
H-----E-----E-----H-----H-----H-----E-----H-----
H-----E-----E-----H-----H-----H-----E-----H-----
H-----E-----E-----H-----H-----H-----E-----H-----
H-----E-----E-----H-----H-----H-----E-----H-----
977567778765885557566677666564157897057449995388543222046768888288136408978758999999

-----b5-----b6-----b7-alfaD-----b8-----alfaE---
1-----181-----191-----201-----211-----221-----231-----241-----251---
LFARGGFPEGAFQTLLEVKDVIPLVDDARIRAVTLTGSVAAGSAIAEAAAGRNIKRSVLELGGMDVFIVMPSADIEKAAAQVIAR
H-----E-----HE-----E-----H-----E-----E-----H-----
H-----E-----EE-----E-----H-----E-----E-----H-----H-----
H-----E-----H-----E-----H-----E-----E-----E-----H-----
H-----E-----H-----E-----H-----E-----E-----E-----H-----
H-----E-----H-----E-----H-----E-----E-----E-----H-----
H-----E-----H-----E-----H-----E-----E-----E-----H-----
H-----E-----H-----E-----H-----E-----E-----E-----H-----
9985489997179852886378887502995238872634889999987415899343868999627960981689999999856

-----b9-----alfaF-----b10-----alfaG-----b11-----b12-----alfaH---

```

--261-----271-----281-----291-----301-----311-----321-----331-----341-
LQNSGQSCIAAKRFYVHEDVYRFEHLFVTGMAEAVAGDPLDESTSFGPLATERGRQDVHELVRDAREKGAAVQCGGEIPEGEGWY
H-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----E-----
H-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----E-----E
H-----EE-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----E-----E
HH-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----E-----E
HH-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----E-----
-----E-----H-----H-----E-----H-----H-----E-----
H-----E-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----H-----E-----E
50699810786457760205856577662998886189988876776655789999999999998872688586289888999861

-----b13-----alfaI-----alfaJ-----b14-----

-----351-----361-----371-----381-----391-----401-----411-----421-----
YPATVLTGVTEDMRIYREECFGPVAclykVSSLQEAIALSNDSDFLSSSVWtNDEtEATEARSIEAGGVFINGLTASFPVVPFG
--E-----H-----E-----H-----E-----H-----E-----E-----
E-E-----H-H-----E-----H-----E-----H-----E-----E-----
E-----E-----H-----H-----E-----H-----E-----E-----
E-E-----H-----E-----H-----E-----H-----E-----E-----
E-E-----H-----E-----H-----E-----H-----E-----E-----
25536763899872412454565144677277799999846688886100053548991121187526544215556567776655
--b15-----alfak-----b16-----alfaL-----b17-----alfam-----b18-----

431-----441-----451----- :
GLKDSGYGRELSAYGIREFVNIKTWVTS : OrigSeq
-----H----- : jalign
-----HHEEEEE----- : jfreq
-----H-----E----- : jhmm
-----H-----E----- : jnet
-----H-----E----- : jpssm
-----H-----E----- : jpred

```

Figura 28. Structura secundară a ORF39 dedusă teoretic. E- regiuni β -plate, H-regiuni helicale. Numerotarea elementelor de structură secundară

este realizată după Steinmetz și colab. (57)

Pe ansamblu, ordinea structurilor secundare dedusă teoretic se aseamănă foarte mult cu cea a enzimei mai sus amintite, doar în partea N-terminală lipsind 2 structuri β pliate. Ca și această enzimă, probabil și cea din *Arthrobacter* conține 2 structuri de tip Rossman fold, ambele fiind implicate în legarea dinucleotidului. Prin analogie cu enzima din mitocondrie, aceste structuri ar fi alcătuite din structurile β pliate 1-4, 7-11 și α -helixurile A-G. Formarea structurii Rossman induce o serie de restricții de secvență ce duc la apariția unui motiv de legare a nucleotidelor descris de Bellamacina și colab. (4). Acesta este alcătuit din 4 zone distincte, prima fiind așa numita zonă consens de legare a fosfatului. Această zonă este una bogată în glicină și are secvența de forma GXGXXG (sau GXXGXXG). În cazul enzimei din *Arthrobacter* singura regiune similară cu această secvență are forma GSVAAG (marcat cu italic și îngroșat pe figura 28) și este plasată în capătul N-terminal al α G, similar cu secvența consens din aldehyd-dehidrogenaza mitocondrială GSTEVG. Un indiciu interesant este prezența pe ultima poziție a secvenței consens a unui rest de glicină, element specific pentru enzimele ce funcționează cu NAD^+ (la enzimele NADP^+ -dependente acest ultim rest este înlocuit de aminoacizi mai mari – Ala, Ser, Pro (4)).

În structura aldehyd-dehidrogenazei din mitocondrie, inelul adeninei este legat între α F și α G prin realizarea unor legături de tip van der Waals între Gly225, Pro226, Val249 și Leu 252. Riboza din adenozină este menținută în poziție prin legături de hidrogen între OH 2' și 3' și Lys 192 și în plus, restul OH din 2' de asemenea cu Glu195, restul OH 3' cu Ile166. Fosfatul din adenozină este fixat prin 2 legături de H cu Ser246. Riboza din nicotinamidă este la rândul ei fixată prin interacțiuni de H cu Glu399 și de tip van der Waals cu Phe401. Inelul nicotinamidic este menținut în poziție prin interacțiuni van der Waals cu Asn169, Thr244, Cys302 și printr-o singură legătură de H cu Ile269.

Comparând secvența din *Arthrobacter* cu cea din mitocondria bovină se poate observa că nu toți aminoacizii enumerați mai sus, ci doar următorii au echivalenți în gena de interes: Gly225 (echivalent cu Gly191), Lys192(Lys158), Ser246(Ser211), Glu399(Glu363), Phe401(Phe365), Asn169(Asn135), Tre244 (Tre209), Cys302(Cys266), Ile269(Leu233). Aminoacizii ce nu corespund sunt tocmai cei ce vin în contact cu inelul de adenină al NAD-ului. Mai mult decât atât, conform lui Perozich și colab. (52), enzimele ce folosesc NAD^+ au ca element de recunoaștere prezența unui rest de aminoacid dicarboxilic la sfârșitul unei structurii

beta-plate ce vine în contact cu OH 2' din structura adenozei. În enzimele ce leagă NADP acest aminoacid este înlocuit de unul mai mic pentru a face loc restului fosfat din aceeași poziție 2'. În structura 1AG8, enzimă ce utilizează NAD⁺, restul 2' este legat de aminoacidul Glu195, aminoacid plasat la capătul terminal al structurii β8, în bună concordanță cu teoria mai sus amintită. Acest aminoacid corespunde însă în secvența ORF39 cu Ser161. Aceeași situație este întâlnită la aldehyd-dehidrogenaza din *Vibrio harvey* (Glu195 corespunde unui rest Thr-175 (2)), enzima cu o mare afinitate față de NADP⁺ ceea ce ar indica faptul că enzima codificată de *orf39* preferă NADP⁺.

Programele ESyPred3D (11), și 3D-JIGSAW (3) au modelat structura tridimensională a proteinei pe baza a două modele aldehyd-dehidrogenaza din ficatul de oaie (PDB id. 1bxs (47)) (cu care enzima din *Arthrobacter* are un grad de 30.4% identitate) și respectiv aldehyd-dehidrogenaza mitocondrială din ficatul uman (PDB id. 1cw3, (29.7% identitate cu ORF39 și 95% identitate 1bxs (49)). Modelul este prezentat în figura 29, împreună cu o aliniere a secvenței de aminoacizi a acestor proteine.

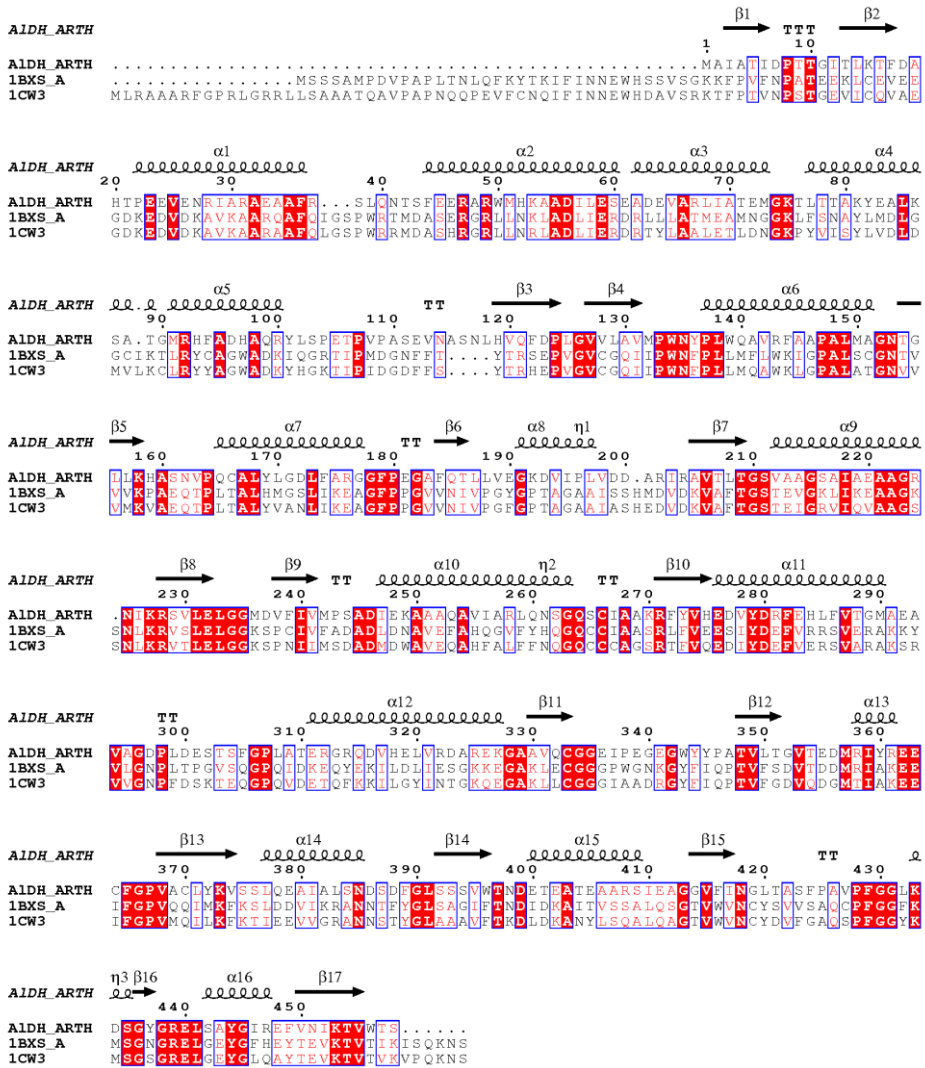


Figura 29. Aliniere pe baza omologiei de secvență și structură între ORF39 din *Arthrobacter nicotinovorans* și 1bxs - aldehyd-dehidrogenaza din ficatul de oaie, 1cw3 - aldehyd-dehidrogenaza mitocondrială din ficatul uman.

În partea superioară se poate observa succesiunea structurilor secundare din modelul dezvoltat *in-silico* pentru orf39 din *Arthrobacter nicotinovorans*.

Analiza secvenței în vederea stabilirii proprietăților fizico-chimice a acestei proteine arată că greutatea moleculară teoretică este de 49420.7 Da, valoarea punctului izoelectric este de 4.91, iar coeficientul de extincție în 6.0 M clorură de guanidină, 0,02 M tampon fosfat pH 6.5, este de $51130 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, la 280 nm.

Rata de înjumătățire estimată în celula de *Escherichia coli* este >10 ore, ceea ce plasează enzima ca fiind una stabilă. Analiza prezenței de regiuni transmembranare (10) demonstrează că enzima este liberă, solubilă, iar lipsa oricăror secvențe *leader* de export dovedește că enzima este una citoplasmatică.

Produsul cadrului de citire 39 este monomer în soluție

Modul în care ORF39 a fost clonată duce la modificarea capătului N-terminal prin adăugarea unor aminoacizi noi, secvența proteinei devenind în această zonă de forma: HHHHHLVPRGSATRSIM, aminoacidul M reprezentând codonul ATG de start al transcripției nativ. Masa moleculară calculată teoretic pentru această proteină recombinată este de 51244.79 Da.

Cele 6 resturi de histidină inserate la capătul C-terminal au permis izolarea și purificarea ORF39 prin cromatografie de afinitate pentru metale (IMAC), preparatul obținut având o puritate de aproximativ 95% (figura 30).

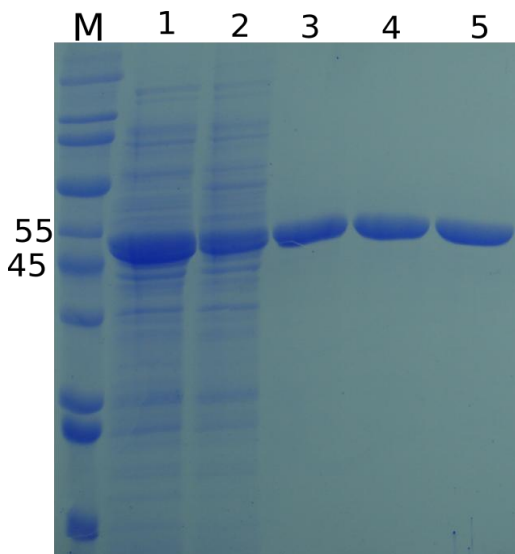


Figura 30. Gradul de puritate al preparatului enzimatic obținut prin IMAC.

M – Marker molecular de masa Sigma Wide Range.

1 – Extract total (25 microg proteină).

2 – Extract clarificat prin centrifugare (CFE, 30 microg proteină).

3, 4, 5 - Frații obținute prin eluția cu 80, 100 și respectiv 200 mM imidazol (10 micrograme proteină).

În general, aldehyd-dehidrogenazele din clasa 1 și 2 sunt tetramere, iar cele din clasa 3 sunt dimere (2). Cromatografia de filtrare prin gel de Sephadex a demonstrat ca proteina eluează la un volum de 71.54 ml, ceea ce corespunde unei valori K_{av} de 0.35 și unei mase moleculare de 64.8 kDa. Valoarea nu pare a corespunde unui dimer, ci mai degrabă această masă moleculară nativă este mai apropiată de masa moleculară relativă. Diferența se poate explica prin faptul că molecula are un grad mai mic de împachetare, are o structură tridimensională mai laxă și implicit un volum mai mare. Până acum în literatură nu am identificat o altă aldehyd-dehidrogenază monomerică.

Gena orf39 codifică o aldehyd-dehidrogenază ce preferă NADP⁺

Preparatul proteic obținut prezintă activitate aldehyd-dehidrogenazică, enzima fiind capabilă să dehidrogeneze o gamă largă de aldehyde, după cum se poate vedea în tabelul 6.

Tabelul 6. Activitatea aldehyd-dehidrogenazică testată pe diverse substraturi

Substraturi testate	Activitate dehidrogenazică (nmoli NADPH/min/mg proteină)*
Gliceraldehydă	93.78
Glutaraldehydă	77.71
Formaldehydă	26.8
Butiraldehydă	229.1
Benzaldehydă	36.17
Eritroză	ND
Semialdehydă acidului succinic	ND

*Activitate măsurată NADP în calitate de cofactor, ND- activitatea aldehyd-dehidrogenazică nu a fost detectată.

Enzima poate utiliza în calitate de cofactor pe lângă NADP⁺ și NAD⁺, însă cu o viteză mult mai mică, după cum se poate observa din tabelul 7. Acest lucru corespunde cu concluzia trasă prin analiza secvenței de aminoacizi, conform căreia

amplasarea Ser în poziția 161 permite poziționarea în situs-ul catalitic a grupei fosfat din poziția 2' a adenozinei din NADP⁺. Asemenea aldehyd dehidrogenaze cu capacitatea de a utiliza ambele coenzime, dar preferând forma fosforilată au fost de asemenea descrise și de Veladi și colab., 1995 (62) și Ahvazi, 2000 (2). Enzima codificată de cadrul de citire 39 de pe megaplasmidul pAO1 este deci o aldehyd-dehidrogenază NADP-dependentă (ALDH) (45).

Tabelul 7. Activitatea relativă a ALDH folosind în calitate de coenzimă NAD⁺ sau NADP⁺

Substrat (33 mM)	nmoli NADH*min ⁻¹ *μg ⁻¹ proteină	nmoli NADPH*min ⁻¹ *μg ⁻¹ proteină
Gliceraldehidă	176.85	281.35
Glutaraldehidă	64.31	233.12
Butiraldehidă	24.12	458.2

In situsul activ al ALDH se află un rest de cisteină

O particularitate a ALDH este faptul că, atunci când este purificată fără β-mercaptoetanol, pe gelurile de poliacrilamidă migrează sub forma a două benzi foarte apropiate ca masă moleculară și nu are activitate aldehyd-dehidrogenazică. După cum se poate observa în figura 31, prezența în tamponul de electroforeză a agenților reducători β-mercaptoetanol sau DTT la concentrații de până la 500 mM nu duce la eliminarea celor două benzi.

Acest comportament este cel mai frecvent explicat prin existența a două resturi de cisteină apropiate spațial, care duc la formarea unei legături disulfidice. În acest fel, catena de aminoacizi formează o buclă care modifică masa moleculară aparentă cu aproximativ 2 kDa, în bună concordanță cu valorile descrise de Schägger, 2006 (55). Interesant este însă faptul că această legătura este una deosebit de puternică, reducerea cu β-mercaptoetanol sau cu DTT în concentrații de până la 500 mM nu duce la dispariția acestei benzi duble, fapt nemaiîntâlnit de noi în literatură. Acest lucru ar putea fi explicat prin faptul că legătura este ascunsă în structura, parte dintr-un domeniu hidrofob ce nu poate fi desfăcut prin tratamentul cu DTT. Lipsa activității ar putea indica faptul că legătura se formează între un

aminoacid implicat în cataliza enzimatică sau perturbă organizarea situs-ului catalitic.

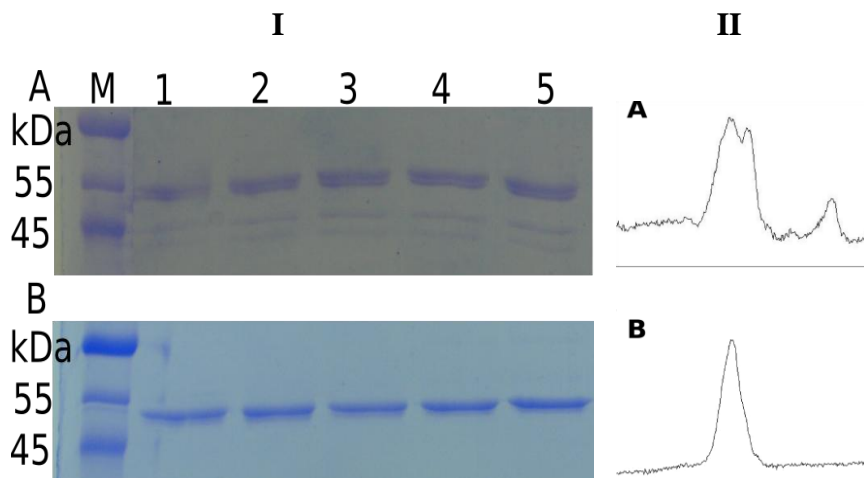


Figura 31. Modul de migrare diferit al enzimei ALDH purificate în lipsa β -mercaptoetanolului (A) și în prezența acestuia (B).

I. SDS-PAGE cu 1 microgram proteină în fiecare godeu. Soluția tampon de încărcare conține β -mercaptoetanol în următoarele concentrații: 1. absent 2. 10 mM 3. 50 mM 4. 100 mM 5. 500 mM.

II. Densitograma probelor din godeul 3 realizate cu ajutorul aplicației ImageJ (56).

Această constatare este în bună concordanță cu concluzia privind rolul activ al restului de Cys din poziția 266. Mecanismul de acțiune al acestei enzime este deci asemănător cu al altor aldehyd-dehidrogenaze descris de Marchal și Branlant (1999) (41) (figura 32), presupunând un atac nucleofil al Cys din situs-ul activ ce duce la formarea un intermediar covalent. Aceasta face ca carbonul din gruparea aldehidică să capete o formă tetraedrală, permițând astfel transferul unui ion H^+ de la acest atom la poziția C-4 din inelul nicotinamic. În cazul în care purificarea se realizează fără prezența agentului reducător în soluție, restul de Cys266 este implicat probabil în formarea unei legături covalente ireversibile ce împiedică formarea intermediarului covalent.

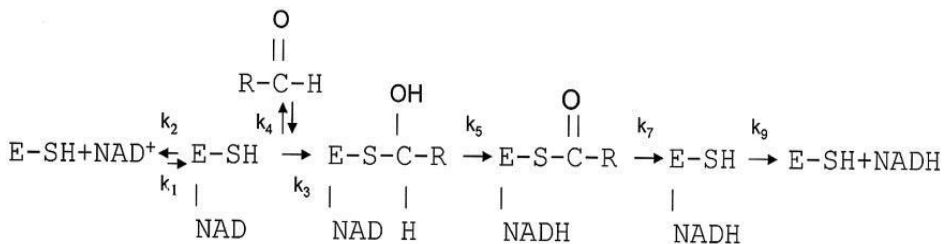


Figura 32. Mecanismul de acțiune al aldehyd-dehidrogenazelor, după Ki Ho (2005) (27), presupune un atac nucleofil al Cys din situs-ul activ și formarea un intermediar covalent.

IV.1.2 ORF40 codifică o proteină tetrameră cu funcție oxido-reductazică

Cadrul de citire 40 începe în poziția 37349 și se termină în poziția 38512-CTA. O analiză BLAST cu ajutorul serverelor EXPASY utilizând secvența de aminoacizi a ORF40 nu oferă prea multe indicii referitoare la funcția posibilă pe care acest cadru de citire ar putea-o avea. Toate proteinele care au nivel înalt de similitudine cu proteina de interes sunt descrise ca oxido-reductaze, fără a avea însă un rol biologic stabilit experimental. Aplicația CD-Search (43) indică faptul că proteina codificată de cadrul de citire 40 conține un domeniu înalt conservat care o plasează în cadrul familiei Oxido-reductazelor ce conțin așa numitul NAD-binding Rossmann fold. Această familie mai poartă de asemenea și numele de GFO/IDH/MOCA family, după enzimele reprezentative a căror funcție este cunoscută:

- GFO- glucoz-fructoz oxido-reductaza ce convertește D-glucoza și D-fructoza în D-gluconolactonă și D-glucitol;
- IDH - inositol-dehidrogenaze;
- MOCA – o proteină implicată probabil într-o reacție de dehidrogenare NADH-dependentă din catabolismul rizopinei.

Din cadrul acestei familii, 2 sunt proteinele care au fost mai pe larg studiate, structura lor tridimensională fiind elucidată la o rezoluție suficient de bună. Este vorba despre GFO din *Zymomonas mobilis* (PDB id. 1OFG) și de asemenea biliverdin-reductaza din șoarece (PDB id. 1GCU).

Serverele EsysPred3D (39) indică că cea mai apropiată proteină ca structură cu ORF40 este GFO, în timp ce Swiss Model (34), indică cea mai

apropiată structură ca fiind cea a a 1,5-anhidro-D-fructoz-reductaza NADP(H) dependentă (PDB id. 2GLX). Modul de organizare al modelului propus de aceste servere, împreună cu o aliniere cu 2GLX și 1OFG pot fi observate în figura 33.

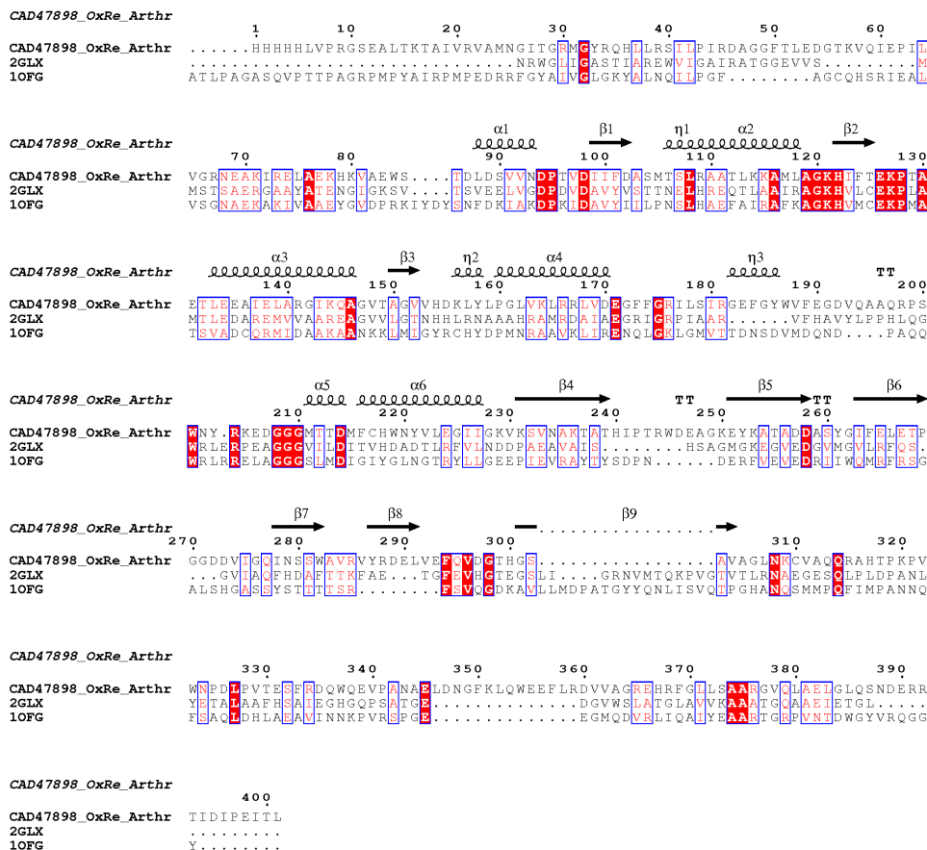


Figura 33. Aliniere pe baza omologiei de secvență și structură între ORF40 din *Arthrobacter nicotinovorans* și IGLX - 1,5-anhidro-D-fructoz-reductaza NADP(H) dependentă

1OFG - glucoz-fructoz – oxido-reductaza *Zymomonas mobilis*

În partea superioară se poate observa succesiunea structurilor secundare din modelul dezvoltat *in-silico* pentru orf40 din *Arthrobacter nicotinovorans*

GFO este o proteină tetrameră implicată în metabolismul glucidelor care contribuie în mod activ la rezistența la concentrații mari de glucide în mediu a speciei *Zymomonas mobilis* (32). Specific acestei enzime este faptul că leagă

foarte puternic NADP-ul, fără însă a forma o legătură covalentă (36). Analiza structurii secundare a acestei proteine cu cea a modelului pentru ORF40 generat de serverele mai sus menționate demonstrează existența unui număr de deosebiri. În primul rând, așa numitul braț N-terminal, implicat în formarea de tetrameri pare să lipsească. De asemenea domeniul de legare a NADP⁺-ului este mai redus ca dimensiuni în ORF40. Cu toate acestea, structurarea generală, sub forma unui domeniu N-terminal de forma $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ și unul C-terminal predominant alcătuit din structuri β -pliate pare să existe. Deși un motiv foarte clar de legare a dinucleotidelor nu a putut fi identificat în cadrul secvenței ORF40, o serie de aminoacizi implicați în legarea NADP⁺-ului în GFO sunt conservați și în ORF40 (Tabelul 8). Numărul de legături de H formate cu NADP⁺-ul în cazul GFO este de 21 (36), iar în cazul ORF40 posibil doar 7, ceea ce ne face să credem că, dacă această enzimă folosește în calitate de cofactor NADP⁺, acesta este slab legat.

Tabelul 8. Aminoacizii implicați în legarea NADP⁺-ului în GFO și echivalenții lor în ORF40

Aminoacizi din secvența GFO	Aminoacizi echivalenți din structura ORF40
Thr13	Thr17
Pro11	Thr15
Ala15	Ile19
Arg17	Arg21
Lys41	Ser40
Lys69	Lys71
Ser64	Val65
Leu39	Leu38
Leu106	Ser104

Aminoacizi din secvența GFO	Aminoacizi echivalenți din structura ORF40
Trp199	Trp201
Tyr87	-
Gly65	Gly66
Arg200	Asn202
Asn108	T106
Tyr42	Ile41
Lys129	Lys127
Gly128	Gly126
Arg157	Asp155
Tyr217	Glu224

Important este de asemenea faptul că aminoacidul Lys69, care, prin poziția sa din GFO la sfârșitul unei structurii beta-pliate ce vine în contact cu OH 2' din structura adozinei indică preferința pentru NADP⁺, este conservat și în ORF40, această enzimă putând fi deci NADP⁺ dependentă.

1,5-Anhidro-D-fructoz-reductaza (AFR) este o enzimă izolată din microorganismul *Sinorhizobium morelense* care are capacitatea de a transforma 1,5-anhidro-fructoza în 1,5-anhidromanitol (13). Structura terțiară este foarte asemănătoare cu a GFO, fiind alcătuită dintr-un domeniu N-terminal asociat cu legarea NADP-ului și un domeniu C-terminal conținând probabil aminoacizii implicați în cataliză.

Structura tridimensională a proteinei codificate de cadrul de citire *orf40* modelată de serverele mai sus menționate urmează aceeași organizare. Zona N-terminală conține o alternanță de α -helixuri și structuri β -pliate ce ar putea alcătui așa numitul Rosmann-fold. Această structură tridimensională a fost cel mai frecvent

asociată și cu o secvență consens de forma **GXGXXG** sau, pentru enzime NADP⁺-dependente, de forma **GXGXXA**, secvență plasată în zona de conexiune dintre prima structură β -pliată și primul α -helix din componența fold-ului Rosmann. În cadrul secvenței de aminoacizi ORF40 nu a putut fi identificată o asemenea secvență, cea mai apropiată fiind 26-**GITGRMG**. Acest lucru nu este ieșit din comun, deoarece nici AFR nu prezintă această zonă consens. În zona în care ORF40 prezintă secvența mai sus menționată iar alte enzime NAD(P)-dependente prezintă secvența consens, AFR prezintă secvența 8-**GASTIA**. Structura tridimensională a acestei enzime a demonstrat modul în care acești aminoacizi reușesc să suplinească rolul secvenței consens.

Spre deosebire de GFO, în care NADP⁺-ul era puternic legat, în AFR numărul de interacțiuni pe care molecula cofactorului îl are cu resturile de aminoacizi este mai redus și adoptă o conformație diferită. Comparând secvența AFR cu cea a ORF40 se poate observa că un număr destul de redus de aminoacizi implicați în legarea cofactorului enzimatic sunt conservați. Gradul de identitate de altfel al celor două secvențe este unul nu foarte mare, doar de 26%. Din cei 18 aminoacizi implicați în mod direct la legarea cofactorului enzimatic, sunt conservați doar un număr de 8. Dintre aceștia, 2 par a fi mai importanți, fiind înalt conservați și alcătuind o altă secvență consens. Este vorba despre E93 din AFR (E126 în ORF40), aminoacid care este la o distanță de 2,8 Å cu carbonul NC2 din inelul nicotinamidic și formează legături de H cu OH 2' și 3', legături esențiale pentru legarea cofactorului (52). Al doilea aminoacid este K94 (K127 în ORF40) care este la o distanță de 5 Å de inelul nicotinamidic și formează o interacțiune de tip cation- π .

Secvența consens în alcătuirea căreia intră acești doi aminoacizi este AGKHVxCEKP, fiind doar parțial conservată în ORF40, având forma 119-AGKHIFTEKP-128. Această secvență consens este una specifică pentru clasa glucid-dehidrogenazelor (63).

Domeniul C-terminal al AFR este alcătuit dintr-un număr de 8 structuri β -pliate și, așa cum am mai spus, conține probabil aminoacizii implicați în procesul catalitic. Nu toți aminoacizii implicați în reducerea 1,5-anhidrofructozei au fost identificați, însă s-a dovedit că cel puțin K94, D176 și H180 sunt implicați în legarea substratului și cataliză (13). Dintre aceștia, His180 ar putea servi ca grupare acido-bazică, polarizând gruparea carbonil a 1,5-anhidrofructozei și făcând posibil transferul unui proton de la NADPH la substrat. Toți acești aminoacizi sunt conservați în cadrul secvenței ORF40, având corespondența: K127, D214, H218,

fiind deci posibil a fi și ei implicați în reacția enzimatică catalizată de această enzimă.

În concluzie, enzima codificată de cadrul de citire ORF40 pare a fi o oxido-reductază NADP-dependentă ce leagă cofactorul în mod slab. Lipsa brațului N-terminal, alături de faptul că AFR este monomeră în soluție ar indica faptul că și ORF40 este monomeră. Prezența secvenței consens pentru glucid-dehidrogenaze, deși nu complet păstrată, ar indica că această enzimă este implicată în procesul de dehidrogenare a glucidelor. Formarea prin dehidrogenare a unei aldehide ar fi în bună concordanță cu activitatea aldehyd dehidrogenazică descrisă pentru ORF39, cele două enzime acționând una după alta în vederea transformării substratului într-un acid ușor de integrat în ciclul acizilor tricarboxilici.

Analiza secvenței de aminoacizi oferă de asemenea o serie de informații legate de proprietățile fizico-chimice ale proteinei codificate de *orf40*. Masa moleculară calculată teoretic pentru proteina recombinată este de 46,047 kDa, pI 5.46 iar coeficientul de absorbție la 280 nm în 6M clorură de guanidină, tampon fosfat 0.02 M este de $61545 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, fiind așadar ușor de cuantificat prin măsurarea densității optice a soluției la lungimea de undă menționată. Rata de înjumătățire estimată în celula de *Escherichia coli* este >10 ore, ceea ce plasează enzima ca fiind una stabilă. Analiza prezenței de regiuni transmembranare (10) demonstrează că enzima este liberă, solubilă, iar lipsa oricăror secvențe leader de export demonstrează că enzima este una citoplasmatică.

ORF40 este tetrameră în soluție

În vederea caracterizării produsului de translație a cadrului de citire 40 de pe pAO1 din punct de vedere funcțional și al proprietăților fizico-chimice, gena mai sus menționată a fost clonată în plasmidul pH6EX3, pusă sub controlul operatorului *tac* și exprimată în *E. coli* XL1. Capătul N-terminal are secvența HHHHHLVPRGSEAL și datorită cozii polihistidinice, proteina recombinată a putut fi purificată la omogenitate prin cromatografie de afinitate pentru metale (figura 34).

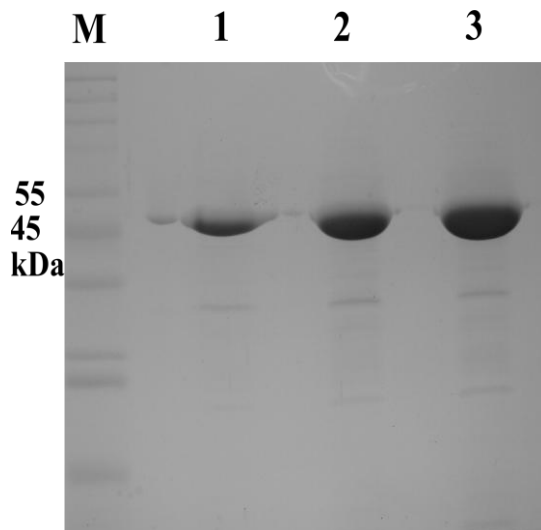


Figura 34. Gradul de puritate al preparatului obținut în urma purificării prin IMAC a ORF40

M. Sigma Wide Range Molecular Weight Marker

1. 5 microg proteină
2. 10 microg proteină
3. 20 microg. Proteină

Gelul utilizat a fost de 12% acrilamidă, în format midi.

Cromatograma pentru determinarea masei moleculare native a acestei proteine prin filtrare pe gel Superdex HiPrep 200 este prezentată în figura 35 și indică existența a două peak-uri clare: unul mic, corespunzând unui volum de eluție de 43,95 ml și celălalt predominant, corespunzând unui volum de eluție de 56,52 ml. Primul peak, datorită volumului foarte apropiat de volumul liber al coloanei (45 ml) conține probabil conglomerate proteice care au un diametru mai mare decât cel al porilor gelului. Al doile peak însă, corespunzător proteinei ORF40 indică o masă moleculară de 163 kDa, ceea ce ar corespunde unui structurii tetramere. Același comportament a fost descris și la GFO, partea responsabilă de oligomerizare fiind indicată ca fiind brațul N-terminal. La modelul propus pentru structura ORF40 nu există acest braț, de aceea rămâne deschisă întrebarea substratului molecular și interacțiunilor ce duc la formarea acestor structuri cuaternare.

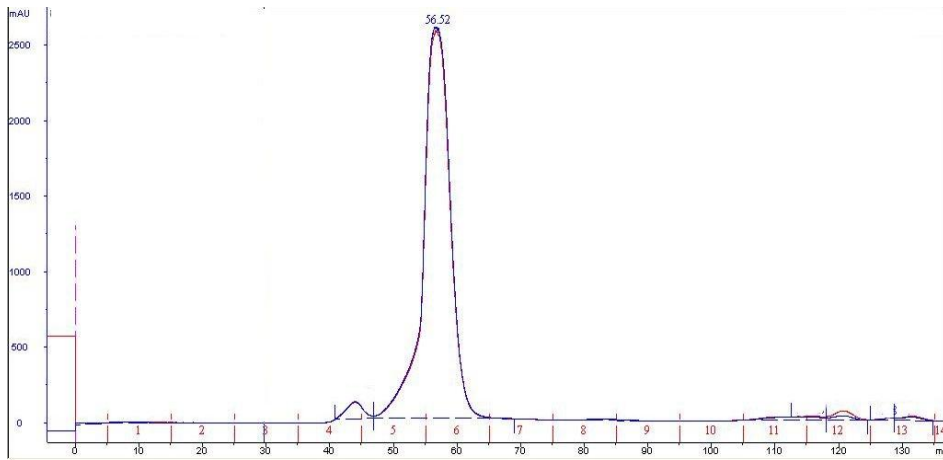
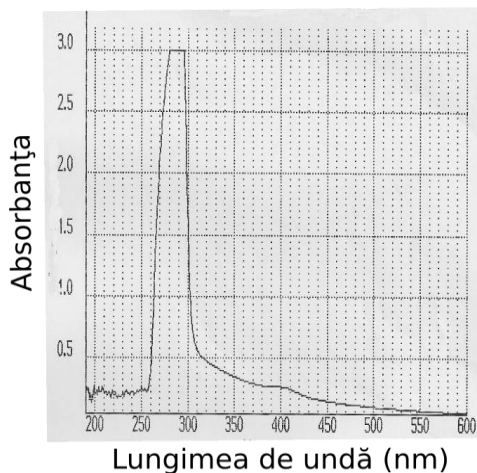


Figura 35. Cromatograma obținută în urma filtrării prin gel a preparatului enzimatic conținând ORF40. Aproximativ 10 mg proteină într-un volum de 600 microl au fost injectate pe o coloana HiLoadSuperdex 200 PrepGrade (Amersham, Elveția)

ORF40 conține Zn slab legat

Soluția foarte concentrată de proteină purificată are o ușoară culoare maro, acest lucru fiind observabil și în spectrul UV-VIS (figura 36). Astfel, se poate observa existența unui peak de dimensiuni mari la 275 nm caracteristic proteinelor, dar și un umăr la 405 nm.



Analiza conținutul de Mn, Zn și Fe al preparatului obținut au arătat un conținut neglijabil de Fe și Mn, însă conținutul de Zn este semnificativ, ceea ce indică faptul că molecula proteică conține acest element.

Figura 36. Spectrul de absorbție al proteinei purificate.

Soluția concentrată de proteină menținută la frigider pentru o perioadă mai mare de timp formează un precipitat maro. Dacă însă precipitarea proteinei se realizează prin fierbere la 95 °C pentru 5 minut sau prin tratarea cu ATC 5%, precipitatul obținut este de culoare albă. Precipitarea în frigider se realizează cu menținerea unui oarecare grad de organizare secundară și păstrarea deci a cofactorului enzimatic legat. Căldura sau acidul tricloracetic duc la destabilizarea totală a structurilor secundare și eliberarea cofactorului.

Cantitatea de Zn determinată corespunde unui raport de 2 atomi de Zn pentru fiecare moleculă de monomer. Un asemenea raport a fost descris și pentru L-arabinitol 4-dehidrogenaza din *Neurospora crassa* (58) sau pentru manitol dehidrogenaza din *Leuconostoc pseudomesenteroides*, un atom fiind implicat în reacția enzimatică iar celălalt având rol structural (23). Ambele enzime sunt de asemenea tetramere. Cele două enzime fac parte însă dintr-o altă clasă de enzime, cea a sorbitol-dehidrogenazelor. În clasa din care face parte ORF40 și anume GFO/IDH/MocA există o serie de proteine care prezintă un al doilea domeniu de legare al acestui metal. O regiune cu un grad mare de omologie cu acest domeniu nu a fost indicat însă de nici unul dintre serverele utilizate pentru investigarea secvenței proteinei codificate de ORF40.

Enzimele ce conțin Zn se împart în 5 categorii: polimeraze DNA și RNA, fosfataze alcaline, peptidaze, carbonic anhidraze și alcool-dehidrogenaze (35). Este posibil ca proteina codificată de ORF40 să fie o alcool-dehidrogenază care să acționeze asupra unui glucid cu formarea unei aldehide și scurtarea sau nu a lanțului de atomi de carbon. Aldehida formată este apoi dehidrogenată la acid de către ORF39, acidul rezultat fiind apoi integrat în ciclul acizilor tricarboxilici. În acest fel, cele două enzime constituie elementele finale ale unei căi de degradare a unui glucid, cale integrată în metabolismul general al celulei prin intermediul ciclului acizilor tricarboxilici.

Deoarece ORF40 are un grad mare de similaritate cu GFOR, enzimă ce conține NAD legat necovalent, am dorit să investigăm și acest aspect. Experiențele de cromatografie în strat subțire au demonstrat însă că enzima purificată nu conține acest cofactor legat în mod stabil.

IV.1.3. Catabolismul D-xylozei este codificat de megaplasmidul pAO1

Dintre toate genele prezentate mai sus, grupul de gene ce începe cu

ORF32 pare a fi organizat ca un operon de sine stătător (figura 37). Acest grup începe cu un factor de transcripție din familia de GntR, urmând apoi 4 ORF-uri ce codifică componentele unui sistem de transport transmembranar al glucidelor de tip ABC: o presupusă ATP-ază, două proteine transmembranare ce formează un por și o proteină periplasmică ce leagă substratul. În continuare se regăsesc un număr de dehidrogenaze și oxidoreductaze: ORF38 (GI:25169060) – o presupusă 2-ceto-gluconat dehidrogenază, ORF39 (GI:25169061) – proteină cu funcție aldehyd-dehidrogenazică (45), ORF40 (GI:25169062) – o presupusă oxidoreductază și ORF41 (GI:25169063) – o proteină înalt conservată similară cu DUF993. La sfârșitul acestui grup de gene este ORF42 (GI:25169064) – o proteină înrudită cu glicerat-kinaza (29). Modul de aranjare alături de funcțiile demonstrat sau presupuse ale proteinelor sugerează o cale metabolică în care substratul este transportat prin membrană folosind sistemul tip ABC după care este oxidat în etape la intermediari metabolici comuni.

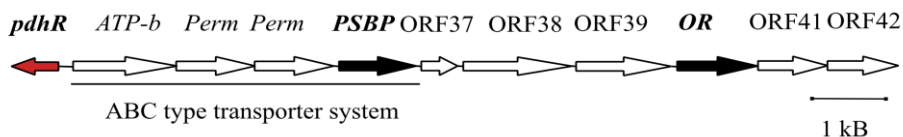


Figura 37. Organizarea generală a celui mai mare grup de gene posibil a fi implicat în metabolizarea glucidelor de pe megaplasmidul pAO1 din *Arthrobacter nicotinovorans*

Am văzut că megaplasmidul pAO1 este necesar pentru ca *Arthrobacter nicotinovorans* să poată metaboliza nicotina, dar și D-riboza, D-xiloza, L-ramnoza, D-sorbitol și a N-acetilglucosamina. Pentru a stabili preferința de substrat a operonului de gene mai sus descris a fost propusă o alternativă inovatoare (44). Aceasta implică identificarea genelor al căror produs ar putea intra în contact direct cu substratul și realizarea unei selecții *in-silico* în vederea identificării ligandului comun.

Candidatul cel mai puternic pentru identificarea proteinelor ce leagă substratul trebuie căutat în sistemul de transport de tip ABC (60). Dintre cele 4 gene, proteina ORF36 este singura care interacționează cu substratul, având rolul de a-l și de a-l transporta în celulă folosind energia furnizată de liza ATP-ului. De aici încolo pe parcursul acestei cărți, ne vom referi la ORF35 ca PSBP (Periplasmic Substrate-Binding Protein).

În general, pentru a activa căile catabolice reglate negativ,

represorul trebuie să lege sau să interacționeze cumva cu substratul. Așa cum se poate vedea în figura 37, grupul de gene începe cu *orf32* ce codifică un factor de reglaj al transcripției aparținând familiei GntR family. Membrii acestei familii de proteine sunt în marea lor majoritate represori (14; 25; 26). Deși este posibil ca represorul să aibă o specificitate de substrat, iar proteina periplasmică altă specificitate de substrat, nu sunt puține cazurile în care cele două proteine manifestă preferințe pentru un compus comun. Spre exemplu, GalS (represor, R) și MglB (periplasmic binding protein, P) ambele leagă D-galactoza/D-glucoza; XylR (R) și XylF (P) leagă D-xiloza; iar RbsR (R) și RbsB (P) leagă D-riboza (17). Din acest motiv și ORF32 (la care ne vom referi ca GntR) este un candidat destul de puternic pentru a identifica substratul căii metabolice codificate de pAO1.

După ce substratul pătrunde în celulă este metabolizat printr-o suită de evenimente ce sunt declanșate de prima enzimă a căii. Grupul de gene ce codifică oxidoreductaze și dehidrogenaze ce urmează sistemului de transport tip ABC trebuie să conțină această enzimă. Rezultatele furnizate de analiza BLAST indică faptul că ORF38 (2-ceto-gluconat dehidrogenaza), ORF39 (aldehyd-dehidrogenaza (45)) și ORF42 (glicerat-chinaza) au funcție în avalul căii metabolice. Pe de altă parte, ORF40 conține secvența consens 119-AGKHIFTEKP-128 asemănătoare cu motivul AGKHVxCEKP specific glucid-dehidrogenazelor (63), indicând că prima etapă din această cale metabolică este o reacție de dehidrogenare.

Pentru nici una din cele trei proteine identificate ca potențiale puncte de interacțiune glucid-proteină nu există structuri secundare sau terțiare descrise. Pe baza secvenței de aminoacizi este posibilă însă modelarea structurii secundare a acestora folosind eventuala omologie cu proteine cunoscute și studiate experimental. Asemenea modelări sunt realizate pe calculator, una dintre aplicațiile intens folosite fiind serverul complet automat 3D-JIGSAW (3).

Modelul pentru GntR a fost construit de 3D-JIGSAW folosind ca matriță structura existentă în PDB (5) pentru factorul transcripțional LdlR din *Corynebacterium glutamicum* (PDB ID 2di3) (19). În modelul teoretic obținut, 86,8 % din reziduurile non-glicină și non-prolină au unghiuri conformaționale (ϕ , ψ) în zona favorabilă a graficului lui Ramachandran, 8,8 % sunt în zona 'adițional favorabilă', 3,35% în zona 'generos favorabilă' și doar 1.1 % sunt amplasate în zona 'defavorabilă'. 5 din 8 resturi de prolină

și 11 din 12 resturi de glicină sunt într-o conformație permisă. Valoare RMS dintre model teoretic și modelul real folosit ca matriță este de 1.42 Å pentru 105 atomi C α

Tabelul 9. Rezultatele coparațiilor pe baza de structură a modelelor generate *in-silico* și template-urilor corespunzătoare. Comparații realizate cuDaliLite (28)

Nr.	Model;Template_lant	Scor Z	Aminaczi alineați	Identitate [%]
1	GntR;2di3_A	22,1	195	24
2	PSBP;2fn8_A	37.1	271	20
3	OR;2glx_A	36.5	310	18

Modelul structurii tridimensionale a GntR generat de către 3D-JIGSAW urmează aceeași organizare generală cu două domenii ca și LdlR din *Corynebacterium glutamicum* (19). În zona N-terminală, LdlR conține un domeniu caracteristic numit „winged helix-turn-helix” (wHTH), domeniu caracteristic pentru proteinele din familia GntR (21). În modelul pentru GntR din *A. nicotinovorans*, cele două structuri alfa-helicale dins structura domeniului sunt prezente, dar structurile pliate ce formează aripa (wing) nu (figura38). Aceste structuri beta pliate conectează capătul N-terminal cu cel C-terminal, întreaga zonă fiind foarte prost modelată datorită similarității reduse dintr GntR și LdlR. Important este însă faptul că domeniul C-terminal implicat în legarea substratului este foarte bine modelat. Cavitataea din mijlocul structurii direct implicată în legarea substratului (19) este foarte bine definită pe modelul realizat de calculator, ceea ce face din acesta un bun candidat pentru etapa de selecție computerizată a substratelor.

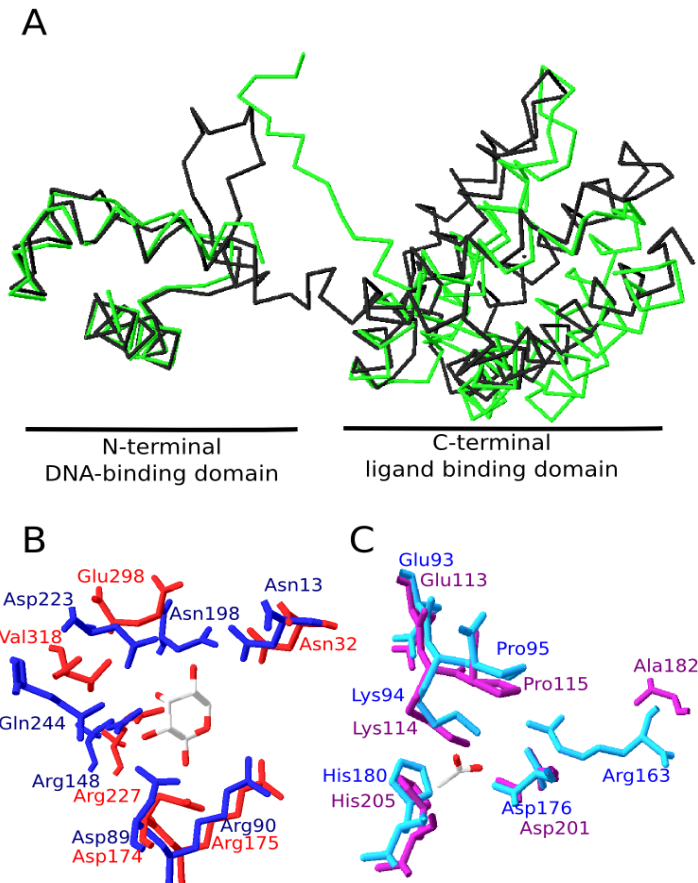


Figura 38. Suprapunere între modelele generate de computer și moleculele template utilizate

A. GntR din pAO1 (verde) și LdlR trdin *Corynebacterium glutamicum* (negru, 2di3) **B.** Aminoacizii implicați în formarea legăturilor de H și legarea D-ribozei în PSBP din pAO1 (albastru) și RBP din *Thermotoga maritima* (2fn8, roșu) **C.** Aminacizii implicați în formarea legăturilor de H dintre ionul acetat și OR din pAO1 (albastru) și NADP(H) 1,5-Anhidro-D-fructoz-reductaza din *Sinorhizobium morelense* (2glx). Suprapunere realizată cu Swiss-PdbViewer v4.0.1

Modelul teoretic al PSBP a fost construit de către serverul 3D-JIGSAW plecând de la RBP (Riboze Binding Protein, PDB ID 2fn8),

proteină responsabilă de transportul ribozei în *Thermotoga maritima*(12). Analiza graficului Ramachandran indică faptul că modelul obținut este unul de calitate, nu mai puțin de 91,7% din aminoacizii constituenți (exceptând glicina și prolina) având unghiuri conformaționale amplasate în zona 'favorabilă', 6,5% din aminacizi sunt amplasați în zona 'aditional favorabilă' și doar 2,8% dintre resturile de aminoacizi sunt amplasate în zona 'defavorabilă'. 9 din 35 resturi de Gly și 8 din 13 Pro sunt amplasate în zona 'defavorabilă'. Valoare RMS dintre model teoretic și modelul real folosit ca template este de 1.73 Å pentru cei 151 atomi Cα .

Structura generală a PBP prezintă caracteristicile comune tururilor membrilor superfamiliei proteinelor periplasmice: un lob bilobat cunoscut ca "capcana de muște a lui Venus" (1). Acest element este alcătuit din două domenii pseudo-simetrice unite printr-o "balama" din câteva structuri β-pliate (12). Structura matrice utilizată pentru modelare este în poziția deschisă, conținând riboza în forma piranozică legată la interfața dintre cele două domenii. Analiza secvenței și structurii secundare a celor două proteine (PSBP din pAO1 și 2fn8) indică faptul că majoritatea aminoacizilor implicați în legarea substratului sunt înalt conservați, principalele diferențe fiind: N198 din 2fn8 este înlocuit cu L274 în PSBP, D223 este înlocuit cu E298 și D224 este înlocuit cu V318 (figura 38).

Modelul structurii tridimensionale a OR a fost construit plecând de la 1,5-Anhidro-D-fructoz-reductaza din *Sinorhizobium morelense* (2glx) (13). Analiza realizată cu ajutorul programului Procheck în vederea aprecierii calității și validării modelului indică faptul că 91,4% din aminoacizii constituenți (exceptând glicina și prolina) au unghiuri conformaționale amplasate în zona 'favorabilă' a graficului Ramachandran, în timp ce 5,8% din aminacizi sunt amplasați în zona 'aditional favorabilă' iar 2,9% dintre resturile de aminoacizi sunt amplasate în zona 'defavorabilă'. 15 din cele 20 resturi de Gly și 8 din cele 12 resturi de Pro sunt amplasate în zona 'favorabilă'. Valoare RMS dintre model teoretic și modelul real folosit ca template este de 1.12 Å pentru cei 265 atomi Cα . Toți aminoacizii implicați în legarea ionului acetat, un inhibitor competitiv al 2glx, sunt înalt conservați, exceptând Arg163 care este înlocuit de Ala182 (figura 38).

Analiza computerizată a preferinței de substrat

A doua etapă din abordarea mai sus amintită este cea de selecție și

identificare a moleculei substrat ce se poate lega de proteina de interes. Substratul trebuie să îndeplinească o serie de condiții ce țin atât de formă și volum molecular, cât și de interacțiunile pe care le realizează cu aminoacizii din situsul catalitic, interacțiuni ce sunt exprimate ca energie de legătură. Realizarea manuală a acestei selecții este practic imposibilă, numărul de variabile de care trebuie ținut cont fiind foarte mare. Programul Dock6 (48) a fost creat de către colectivul de bio-informaticieni de la Universitatea din San Francisco special pentru a rezolva această problemă, el permițând testarea și selecția *in-silico* a mii de molecule în timpi rezonabili funcție pe de o parte de geometria situsului de legare a proteinei, de forma substratului și în special funcție de energia de legare.

Atât modelele teoretice obținute pentru cele trei proteine codificate de pAO1 (GntR, PSBP, OR) cât și structurile folosite ca matriță (2di3, 2fn8, 2glx) au fost utilizate ca receptori într-o suită de experimente de docking în care s-au testat peste 80 de molecule glucidice. Rezultatele obținute au fost ordonate manual funcție de situsul de legare și energia de legătură, cele mai bine 10 glucide fiind prezentate în tabelul 10.

Tabel 10. Rezultatele experimentelor de docking *in-silico*. Doar liganzii cu cel mai bun scor sunt prezentați pentru fiecare pereche matriță (stânga) și model (dreapta).

Glucid	Scor	vdw	Glucid	Scor	vdw
2DI3			GntR		
sucroză-6-fosfat	-32.95	-32.95	D-Tagatoză 1,6-bisfosfat	-51.46	48.76
xiloză-1,5-bisfosfat	-32.17	-32.17	ribuloză-1,5-difosfat	-46.31	48.86
D-fructoză-6-fosfat	-32.11	-32.11	xiloză-1,5-bisfosfat	-44.58	46.68
ribuloză-1,5-difosfat	-31.67	-31.67	ribuloză-5-fosfat	-42.55	36.71
β-fructoză-1,6-difosfat	-29.56	-29.56	D-fructoză-6-fosfat	-42.23	39.36
celobioză	-29.29	-29.29	D-altro-hept-2-uloză 7-fosfat	-41.84	41.84
maltoză	-29.28	-29.28	riboză-5-fosfat	-39.68	33.52

Glucid	Scor	vdw	Glucid	Scor	vdw
			5-O-fosfono-D-riboză	-37.87	35.17
fructoză-2,6-difosfat	-29.23	-29.23			
α -fructoză-1,6-difosfat	-29.02	-29.02	D-fructoză	-37.87	32.17
3-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranză	-27.97	-27.97	L-xiluloză 5-fosfat	-37.8	33.07

2FN8			PSBP		
riboză (pyranose form)	-33.45	-33.45	D-Tagatoză 1,6-bisfosfat	-82.78	42.26
α -D-fructoză-1,6-difosfat	-32.4	-32.4	fructoză-2,6-difosfat	-76.6	43.64
maltoză	-32.27	-32.27	xiloză-1,5-bisfosfat	-76.2	36.86
xiluloză-1,5-bisfosfat	-32.21	-32.21	D-fructoză-6-fosfat	-68.81	45.44
D-fructoză-6-fosfat	-32.2	-32.2	β -fructoză-1,6-difosfat	-66.81	37.42
β -fructoză-1,6-difosfat	-32.1	-32.1	α -fructoză 1,6-difosfat	-65.84	39.69
D-altro-hept-2-ulose 7-fosfat	-31.43	-31.43	sucroză-6-fosfat	-65.74	41.27
fructoză-2,6-difosfat	-30.28	-30.28	ribuloză-1,5-difosfat	-64.1	40.07
3-O- α -D-glucopiranozil- α -D-glucopiranoză	-29.71	-29.71	trehalose	-62.77	47.84
celobioză	-29.34	-29.34	ribuloză-5-fosfat	-60.59	31,79

2GLX			OR		
α -D-fructoză	-44.27	-44.27	D-Tagatoză 1,6-bisfosfat	-74.24	37.73
D-fructoză-6-fosfat	-42.89	-42.89	fructoză-2,6-difosfat	-71.6	36.49
maltoză	-42.74	-42.74	xiloză-1,5-bisfosfat	-70.96	39.41

Glucid	Scor	vdw	Glucid	Scor	vdw
β -fructoză-1,6-difosfat	-42.49	-42.49	sucrose-6-phosphaate	-68.49	47.71
3-O- α -D-glucopiranozil- α -D-glucopiranoză	-42.26	-42.26	β -fructoză-1,6-difosfat	-67.77	39.25
fructoză-2,6-difosfat	-42.17	-42.17	D-fructoză-6-fosfat	-63.57	36.65
ribuloză-1,5-difosfat	-42.04	-42.04	β -L-xilopiranoză	-62.99	50.33
D-Tagatoză 1,6-bisfosfat	-41.59	-41.59	ribuloză-1,5-difosfat	-61.39	37.72
metanitrofenil-alfa-D-galactozid	-40.07	-40.07	α -fructoză-1,6-difosfat	-58.67	35.58
xiluloză-1,5-bisfosfat	-39.89	-39.89	maltoză	-57.65	-41,6

În cazul modelului structurii GntR din *A. nicotinovorans* toate cele 81 de molecule glucidice testate s-au legat în interiorul unui tunel sub formă de U având un volum total de 637 Å³ (volumul total al proteinei 18275 Å³), tunel ce trece prin centrul domeniului C-terminal. Domeniul este cunoscut ca fiind implicat în legarea substratului, modul specific de legare fiind însă încă nedocumentat.

Aplicația Pocket-Finder (40) a identificat în cazul proteinei PSBP o cavitate de 919 Å³, amplasată între cei doi lobi ce formează "capcana de muște a lui Venus". Glucidele testate s-au legat în marea lor majoritate în această cavitate, în apropiere de aminoacizii înalt conservați implicați în cataliză.

În cazul modelului structurii proteinei OR, glucidele testate s-au grupat în câteva cavități amplasate pe toată suprafața proteinei. Liganzii situați pe primele 10 locuri sunt comasați în cavitatea cu volumul cel mai mare, al cărei pereți sunt alcătuiți din aminoacizii înalt conservați presupuși a fi implicați în cataliză, elemente ce indică faptul că aici este situsul catalitic.

În cazul modelelor folosite ca matriță pentru generarea structurilor secundare se poate observa o foarte bună concordanță între rezultatele obținute *in-silico* și liganzii identificați experimental, ceea ce mărește

încrederea în rezultatele obținute cu modelele proteinelor din pAO1.

Această abordare nu oferă un răspuns extrinsec, dar permite o ierarhizare a potențialelor substraturi. Comparând datele din tabelul 10 cu rezultatele obținute în urma testelor API 50CH, se poate observa o suprapunere clară în cazul D-xilozei.

Testarea experimentală a preferinței de substrat

Ipoteza formulată folosind pe de o parte tehnicile bioinformaticice și pe de altă parte testul API 50 CH conform căreia xiloza este substratul căii metabolice necunoscute codificate de megaplasmidul pAO1 este una pe cât de tentantă, pe atât de logică. Nu trebuie uitat că xiloza este componenta principală a hemicelulozei, capacitatea de a o metaboliza oferind microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* un avantaj important într-o nișa ecologică ce abundă în resturi vegetale: solul (de unde tulpina a fost de altfel și izolată).

Un test relativ simplu de realizat pentru a verifica această ipoteză este acela al dezvoltării microorganismului pe mediul ce conține xiloză. Folosind același mediu minimal cu citrat descris de Knackmuss (37) în care nicotina este înlocuită de xiloză se obțin curbele de creștere din figura 39.

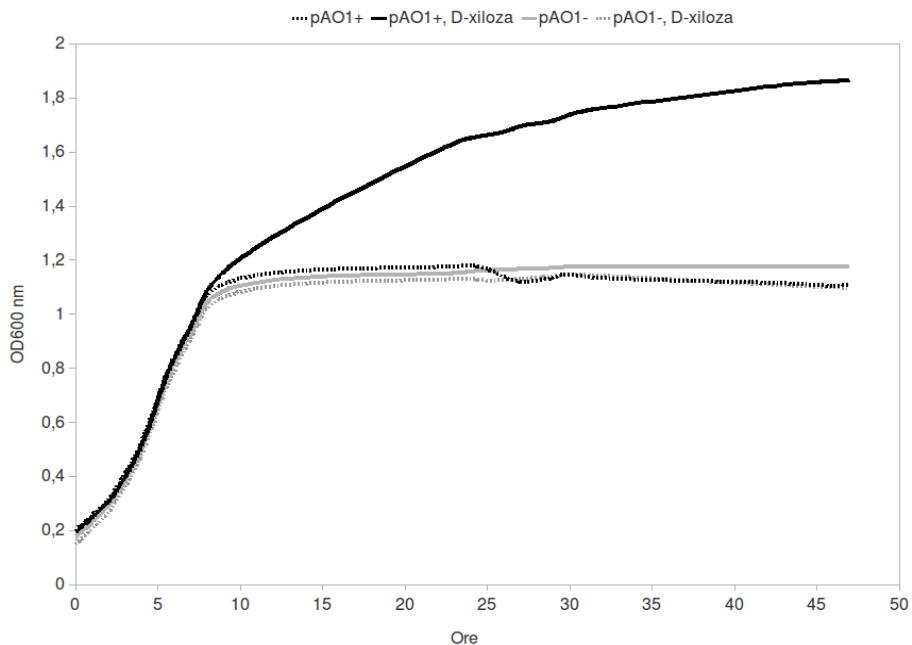


Figura 39. Curba de creștere pentru două tulpini de *Arthrobacter nicotinovorans*, una prezentând megaplasmidul pAO1 și una fără acesta în prezența și în absența xilozei.

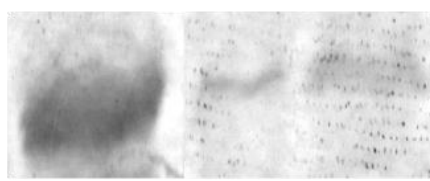
După cum se poate observa, prezența megaplasmidului pAO1 în celula bacteriei de *Arthrobacter nicotinovorans* permite menținerea fazei de creștere pe o perioadă mai lungă și atingerea unei densități optice mai mari în mediul lichid. Tulpina cu pAO1 poate metaboliza atât ionul citrat, cât și xiloza, în timp ce tulpina fără megaplasmid este limitată din punct de vedere al sursei de C la ionul citrat.

Anti ALDH



1. 2. 3.

Anti GntR



1. 2. 3.

Figura 40. Imunodetecția proteinelor AIDH și GntR în lizatele celulare de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 cultivată pe mediu cu D-xiloză (2) și mediu fără cu D-xiloză (3). 1- control cu 5 microg proteină (AIDH și respectiv GntR) purificată.

Legătura clară dintre genele din grupul ORF32-ORF42 este demonstrată fără echivoc prin Western-Blott. Separarea electroforetică urmată de detecția imunologică a proteinelor GntR și AIDH indică două situații aparent diferite. Pe de o parte, enzima AIDH este detectabilă în lizatele celulare de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 numai dacă celulele au fost crescute pe medii conținând xiloză. Pe de altă parte, factorul reglator al transcripției pare să fie prezent în lizatele celulare indiferent de prezența sau absența glucidului (figura 40). Acest comportament este perfect explicabil dacă ținem cont de faptul că factorii de reglaj (represorii în special) sunt proteine exprimate intrinsec, ce trebuie să existe în concentrații mici în permanență în celulă pentru a putea interacționa cu substratul și activa o cale metabolică dată. Enzimele catabolice însă sunt activate doar în prezența substratului, sinteza lor continuă fiind foarte costisitoare din punct de vedere energetic pentru celulă.

Acest ultim experiment ce folosește imunodetecția indică așadar legătura clară dintre cel puțin o genă de pe megaplasmidul pAO1 (AIDH, ORF39) și metabolismul xilozei în *Arthrobacter nicotinovorans*.

Bibliografie

Bibliography

- (1) Acher, F. C. & Bertrand, H. (2005). Amino acid recognition by Venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. *Biopolymers*, 80, 357-66.
- (2) Ahvazi, B., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meighen, E. & Vrielink, A. (2000). Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *The Biochemical Journal*, 349 Pt 3, 853-61.
- (3) Bates, P. A., Kelley, L. A., MacCallum, R. M. & Sternberg, M.J. (2001). Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins, Suppl 5*, 39-46.
- (4) Bellamacina, C. R. (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison

- of nucleotide binding proteins. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *10*, 1257-69.
- (5) Bourne, P. E., Beran, B., Bi, C., Bluhm, W. F., Dimitropoulos, D., Feng, Z., Goodsell, D. S., PrliÄ□, A., B. Quinn, G., W. Rose, P., Westbrook, J., Yukich, B., Young, J., Zardecki, C. & Berman, H.M. (2011). The evolution of the RCSB Protein Data Bank website. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *1*, 782-789.
 - (6) Briffeuil, P., Baudoux, G., Lambert, C., De Bolle, X., Vinals, C., Feytmans, E. & Depiereux, E. (1998). Comparative analysis of seven multiple protein sequence alignment servers: clues to enhance reliability of predictions. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *14*, 357-66.
 - (7) Busch, K. B. & Fromm, H. (1999). Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant Physiology*, *121*, 589-97.
 - (8) Busch, K., Piehler, J. & Fromm, H. (2000). Plant succinic semialdehyde dehydrogenase: dissection of nucleotide binding by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, *39*, 10110-7.
 - (9) Cavener, D. R. (1992). GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *Journal of Molecular Biology*, *223*, 811-4.
 - (10) Cserzö, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. & Elofsson, A. (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Engineering*, *10*, 673-6.
 - (11) Cuff, J. A. & Barton, G.J. (2000). Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins*, *40*, 502-11.
 - (12) Cuneo, M. J., Beese, L. S. & Hellinga, H.W. (2008). Ligand-induced conformational changes in a thermophilic ribose-binding protein. *BMC Structural Biology*, *8*, 50.
 - (13) Dambe, T. R., Kühn, A. M., Brossette, T., Giffhorn, F. & Scheidig, A.J. (2006). Crystal structure of NADP(H)-dependent 1,5-anhydro-D-fructose reductase from *Sinorhizobium morelense* at 2.2 Å resolution: construction of a NADH-accepting mutant and its application in rare sugar synthesis. *Biochemistry*, *45*, 10030-42.
 - (14) DiRusso, C. C. & Nunn, W.D. (1985). Cloning and characterization of a gene (fadR) involved in regulation of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *161*, 583-8.
 - (15) Doi, K. & Doi, A. (1986). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for an *Arthrobacter beta*-(1----3)-glucanase. *Journal of Bacteriology*, *168*, 1272-6.
 - (16) Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R. & Bateman, A. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, *38*, D211-22.
 - (17) Fukami-Kobayashi, K., Tateno, Y. & Nishikawa, K. (2003). Parallel evolution of ligand specificity between LacI/GalR family repressors and periplasmic sugar-binding proteins. *Molecular Biology and Evolution*, *20*, 267-77.

- (18) Ganas, P., Igloi, G. & Brandsch, R. (2009), The Megaplasmid pAO1 of *Arthrobacter Nicotinovorans* and Nicotine Catabolism in Microbial Megaplasms, Springer,
- (19) Gao, Y., Suzuki, H., Itou, H., Zhou, Y., Tanaka, Y., Wachi, M., Watanabe, N., Tanaka, I. & Yao, M. (2008). Structural and functional characterization of the LldR from *Corynebacterium glutamicum*: a transcriptional repressor involved in l-lactate and sugar utilization. *Nucleic Acids Research*, *36*, 7110-7123.
- (20) Gardener, B. & de Bruijn FJ (1998). Detection and isolation of novel rhizopine-catabolizing bacteria from the environment . *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 4944-9.
- (21) Gorelik, M., Lunin, V. V., Skarina, T. & Savchenko, A. (2006). Structural characterization of GntR/HutC family signaling domain. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, *15*, 1506-11.
- (22) Green, L. S., Li, Y., Emerich, D. W., Bergersen, F. J. & Day, D.A. (2000). Catabolism of alpha-ketoglutarate by a sucA mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle. *Journal of Bacteriology*, *182*, 2838-44.
- (23) Hahn, G., Kaup, B., Bringer-Meyer, S. & Sahn, H. (2003). A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. *Archives of Microbiology*, *179*, 101-7.
- (24) Henriksson, G., Johansson, G. & Pettersson, G. (2000). A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology*, *78*, 93-113.
- (25) Hillerich, B. & Westpheling, J. (2006). A new GntR family transcriptional regulator in *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and controls transcription of an ABC transporter in response to carbon source. *Journal of Bacteriology*, *188*, 7477-87.
- (26) Hillerich, B. & Westpheling, J. (2008). A new TetR family transcriptional regulator required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, *190*, 61-7.
- (27) Ho, K. K. & Weiner, H. (2005). Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the aldB gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *187*, 1067-1073.
- (28) Holm, L. & Park, J. (2000). DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *16*, 566-7.
- (29) Igloi, G. L. & Brandsch, R. (2003). Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *Journal of Bacteriology*, *185*, 1976-86.
- (30) Inose, K., Fujikawa, M., Yamazaki, T., Kojima, K. & Sode, K. (2003). Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from *Burkholderia cepacia* in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1645*, 133-8.
- (31) Iwai, A., Ito, H., Mizuno, T., Mori, H., Matsui, H., Honma, M., Okada, G. & Chiba, S. (1994). Molecular cloning and expression of an isomalto-dextranase gene from

- Arthrobacter globiformis T6. *Journal of Bacteriology*, 176, 7730-4.
- (32) Kanagasundaram, V. & Scopes, R.K. (1992). Cloning, sequence analysis, and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, 174, 1439-47.
- (33) Keddie M.R., Collins M.D., Jones D. (1984), Genus Arthrobacter, Conn adn Dimmick, 1942 - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition, Williams & Wilkins,
- (34) Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L. & Schwede, T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*, 37, D387-92.
- (35) Kimura, E. (1992). Roles Of Zinc(Ii) Ion in Zinc enzymes. *Abstr Pap Am Chem S*, 203, 338-INOR.
- (36) Kingston, R. L., Scopes, R. K. & Baker, E.N. (1996). The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP. *Structure (London, England : 1993)*, 4, 1413-28.
- (37) Knackmuss, H. J. & Beckmann, W. (1973). The structure of nicotine blue from *Arthrobacter oxidans*. *Archiv fur Mikrobiologie*, 90, 167-9.
- (38) Kojima, K., Tsugawa, W. & Sode, K. (2001). Cloning and expression of glucose 3-dehydrogenase from *Halomonas* sp. alpha-15 in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 21-7.
- (39) Lambert, C., Léonard, N., De Bolle, X. & Depiereux, E. (2002). ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18, 1250-6.
- (40) Laurie, A. T. R. & Jackson, R.M. (2005). Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21, 1908-16.
- (41) Marchal, S. & Branlant, G. (1999). Evidence for the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry-U S*, 38, 12950-12958.
- (42) Marchal, S. & Branlant, G. (2002). Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 39235-42.
- (43) Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Omelchenko, M. V., Robertson, C. L., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. & Bryant, S.H. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39, D225-9.
- (44) Mihasan, M. (2010). In-silico evidence of a pAO1 encoded pathway for the catabolism of tagatose derivatives in *Arthrobacter nicotinovorans*. *Biologia (Lahore)*,

- Pakistan*), 65, 760-767.
- (45) Mihasan, M., Artenie, V. & Brandsch, R. (2008). A monomeric aldehyde dehydrogenase as part of a pAO1 encoded pathway for sugar utilization. *Febs Journal*, 275, 285-285.
- (46) Miwa, Y. & Fujita, Y. (1988). Purification and characterization of a repressor for the *Bacillus subtilis* gnt operon. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 13252-7.
- (47) Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M. & Baker, E.N. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure (London, England : 1993)*, 6, 1541-51.
- (48) Mukherjee, S., Balius, T. E. & Rizzo, R.C. (2011). Algorithmic improvements and development for DOCK6.4. *Abstr Pap Am Chem S*, 241, Amer Chem Soc.
- (49) Ni, L., Zhou, J., Hurley, T. D. & Weiner, H. (1999). Human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase: three-dimensional structure and the restoration of solubility and activity of chimeric forms. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 8, 2784-90.
- (50) Pang, Z., Kang, Y., Ban, M., Oda, M., Kobayashi, R., Ohnishi, M. & Mikami, B. (2005). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of endo-1,3-beta-glucanase from *Arthrobacter* sp. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 61, 68-70.
- (51) Patridge, E. V. & Ferry, J.G. (2006). WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Journal of Bacteriology*, 188, 3498-506.
- (52) Perozich, J., Kuo, I., Wang, B. C., Boesch, J. S., Lindahl, R. & Hempel, J. (2000). Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267, 6197-203.
- (53) Pujol, C. J. & Kado, C.I. (2000). Genetic and biochemical characterization of the pathway in *Pantoea citrea* leading to pink disease of pineapple. *Journal of Bacteriology*, 182, 2230-7.
- (54) Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F. & Dusart, J. (2002). Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 12507-15.
- (55) Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16-22.
- (56) Sheffield, J. O. E. L. B. (2007). ImageJ, a useful tool for biological image processing and analysis. *Microscopy And Microanalysis*, 13, 200-201.
- (57) Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. & Hurley, T.D. (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure (London, England : 1993)*, 5, 701-11.
- (58) Sullivan, R. & Zhao, H. (2007). Cloning, characterization, and mutational analysis of a highly active and stable L-arabinitol 4-dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 845-52.
- (59) Taylor, E. J., Goyal, A., Guerreiro, C. I. P. D., Prates, J. A. M., Money, V. A., Ferry, N.,

- Morland, C., Planas, A., Macdonald, J. A., Stick, R. V., Gilbert, H. J., Fontes, C. M. G. A. & Davies, G.J. (2005). How family 26 glycoside hydrolases orchestrate catalysis on different polysaccharides - Structure and activity of a clostridium thermocellum lichenase, CtLic26A. *Journal Of Biological Chemistry*, 280, 32761-32767.
- (60) Tomii, K. & Kanehisa, M. (1998). A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Research*, 8, 1048-59.
- (61) Trimbur, D. E., Gutshall, K. R., Prema, P. & Brenchley, J.E. (1994). Characterization of a psychrotrophic *Arthrobacter* gene and its cold-active beta-galactosidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4544-52.
- (62) Vedadi, M., Szittner, R., Smillie, L. & Meighen, E. (1995). Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP(+)-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry*, 34, 16725-32.
- (63) Wiegert, T., Sahm, H. & Sprenger, G.A. (1997). The substitution of a single amino acid residue (Ser-116 --> Asp) alters NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* into a glucose dehydrogenase with dual coenzyme specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 13126-33.
- (64) Zachariou, M. & Scopes, R.K. (1986). Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *Journal of Bacteriology*, 167, 863-9.