

Unele implicații moleculare ale plasmidului pAO1 în
metabolismul microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans*

Mihășan Marius

Teză de Doctorat

Conducător Științific,
Prof. Dr. Vlad Artenie

Universitatea Alexandru Ioan Cuza Iași
Facultatea de Biologie
Specializarea Biochimie

Iași
2009

Cuprins

Introducere.....	3
Capitolul. I Particularități taxonomice, morfologice și metabolice ale microorganismului <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pAO1+.....	6
I.1. Încadrarea taxonomică a speciei <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pAO1+.....	6
I.2 Particularitățile metabolice și fiziologice ale genului <i>Arthrobacter</i> și a speciei <i>A. nicotinovorans</i>.....	7
1.2.1. Megaplasmidul pAO1.....	10
A. Gene implicate în replicare.....	12
B. Gene implicate în conjugare.....	17
C.. Gene implicate în fenomenele de transpoziție	20
D. Gene implicate în rezistența la antibiotice.....	25
E. Gene implicate în utilizarea nutrienților.....	26
F. Apariția și evoluția megaplasmidului pAO1.....	26
I.3. Metabolismul nicotinei în <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pAO1+.....	27
I.3.1.Desfacerea inelului pirolidinic	28
I.3.2.Clivarea și metabolizarea catenei laterale.....	34
I.3.3.Gene implicate în sinteza cofactorului molibdenic	42
I.3.4.Gene implicate în transportul nicotinei și a produșilor de metabolism al acesteia	46
I.3.5. Gene cu funcție necunoscută.....	47
I.3.6. Reglarea căii de degradare a nicotinei.....	48
I.4. Metabolismul glucidelor în <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pAO1+.....	48
I.4.1. Gene posibil a fi implicate în metabolismul glucidelor de pe pAO1.....	49
Capitolul II. Material și metode de cercetare.....	56
II.1 Tulpini bacteriene, vectori plasmidiali și condiții de creștere utilizate.....	56
II.1.1. Tulpini bacteriene și vectori plasmidiali utilizați.....	54
II.1.2. Condiții de creștere utilizate.....	57
II.1.2. Testarea capacității microorganismului <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> de a metaboliza diverse glucide	59
II.2. Clonarea genelor de interes.....	60
II.2.1. Izolarea genelor de interes.....	60
A. Reacția de amplificare în lanț.....	61
B. Izolarea fragmentelor amplificate.	63
Electroforeza ADN în geluri de agaroză.....	63
Izolarea din gel a fragmentelor amplificate.....	65
II.2.2. Digestia cu enzime de restricție a vectorului și fragmentelor.....	66
II.2.3. Ligarea in vitro a fragmentelor în vector. Obținerea de celule competente.....	68
II.2.4. Verificarea corectitudinii clonării.....	69
A. Prepararea ADN-ului plasmidial prin metoda lizei alcaline.....	70
B. Digestia vectorului recombinant cu enzime de restricție.....	71
C. Prepararea ADN-ului plasmidial cu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ...	72
D. Secvențierea plasmizilor recombinanți	73
II.3. Expresia și purificarea proteinelor recombinante	77
II.3.1. Supra-expresia proteinelor în <i>Escherichia coli</i>	78
II.3.2. Purificarea proteinelor recombinante prin cromatografie de afinitate pentru metale imobilizate.....	82
A. Obținerea extractului aceluilar.....	83
B. Regenerarea și pregătirea coloanei cromatografice.....	84
C. Cromatografia de afinitate pentru metale imobilizate.....	85

D. Desalinizarea preparatelor enzimatice	87
II.3.3. Determinarea concentrației proteinelor prin metoda Bradford	88
II.3.4. Verificarea purității extractelor obținute. Electroforeza SDS-PAGE	90
II.4. Determinarea maselor moleculare a proteinelor recombinante	93
II.5. Analiza cofactorilor. Cromatografia în strat subțire	96
II.6 Măsurarea activității NBOR	97
II.6.1. Producerea substratului.....	97
II.6.2. Determinarea coeficientului de absorbție molară a NB.....	98
II.6.3. Măsurarea activității NBOR.....	101
A. Măsurarea activității NBOR cu NB ca substrat.....	101
B. Măsurarea activității NBOR cu diverse chinone ca substrat.....	102
II.7. Reacția de reducere a FAD-ului din NBOR.....	103
II.7.Determinarea activității ALDH	103
II.9.Identificarea ionului superoxid prin rezonanță electrono- paramagnetică (EPR)	104
II.8. Instrumente bioinformatică și resurse web	105
Capitolul III Rezultate și discuții	111
III.1. Nicotine-blue Oxidore-reductaza – un potențial sistem de protecție împotriva stresului oxidativ	111
III.1.1. Clonarea cadrului de citire 54.....	111
III.1.2. ORF 54 se aseamănă la nivel de secvență cu chinon-reductaze din super- familia flavodoxinelor.....	112
III.1.3. ORF54 este o proteină tetrameră.....	114
III.1.4. Spectrul UV-VIS și conținutul flavinic al ORF54.....	116
III.1.5. Cadrul de citire orf54 codifică o NAD(P)H: nicotine-blue oxidoreductază.....	118
Specificitatea de substrat a NBOR.....	120
Mecanismul de reacție	122
III.1.6. Rolul fiziologic al NBOR	129
III.2. pAO1 codifică o posibilă cale de metabolizare a inulinei sau melobiozei.....	129
III.3. Clonarea cadrului de citire 24	133
III.3.1 Clonarea cadrului de citire 24.....	133
III. 4. Clonarea și supra-expresia cadrului de citire 38	138
III.3.1 Clonarea cadrului de citire 38.....	138
III.3.2.Testarea și tatonarea condițiilor optime de expresie în <i>E. coli</i> a cadrului de citire 38.....	141
III.3.3. Supraexpresia orf38 în <i>E.coli</i> duce la obținerea de corpi de incluziune. ..	142
III.4. Cadrul de citire 39 codifică o aldehyd-dehidrogenază.....	147
III.4.1. Clonarea cadrului de citire 39.....	147
III.4.2. Informații obținute prin analiza secvenței de aminoacizi a ORF39.....	150
III.4.3. Produsul cadrului de citire 39 este monomer în soluție.....	158
III.4.4. Gena orf39 codifică o aldehyd-dehidrogenază ce preferă NADP+.....	159
III.4.5. In situsul activ al ALDH se află un rest de cisteină	157
III.5. ORF40 codifică o proteină tetrameră cu o posibilă funcție oxidoreductazică	164
III.5.1. Clonarea cadrului de citire 40	164
III.5.2. Informații obținute prin analiza secvenței de aminoacizi a ORF40.....	166
III.5.2. ORF40 este tetrameră în soluție	171
III.5.3. ORF40 conține Zn slab legat.....	173
III.5.4 Analiza <i>in silico</i> a preferinței de substrat.....	176
Concluzii.....	80
Bibliografie.....	183

Abrevieri

2,6 – DHP – 2, 6 dihidroxipiridină
6HLNO - 6-hidroxi-L-nicotin-oxidaza
A - Alanină (Ala)
ATP – acid adenozintrifosforic
ADN – acid deoxiribonucleic
ARN – acid ribonucleic
ALDH - aldehyd-dehidrogenaza NADP-dependentă
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
CAT – ciclul acizilor tricarboxilici
C - Cisteină (Cys)
DHPONH – dihidroxi-pseudo-oxinicotin-hidroxilaza
dNTP – deoxi-nucleotid trifosfați
DHPH – dihidroxipiridin-hidroxilaza
DMSO - dimetil-sulfoxid
DCPIP - diclor-fenol- indofennol
DEPMPO - 5-Diethoxifosforil-5-metil-1-pirolina N-oxid
D – Acid Aspartic (Asp)
EPR – rezonanță electroparamagnetică nucleară (Electronic-Paramagnetic Resonance)
E – Acid Glutamic (Glu)
FAD – flavin-adenin-dinucleotidul
F - Fenilalanină (Phe)
GABA - acid γ -aminobutiric
GST – glutathion S-transferaza
G - Glicină (Gly)
H – Histidină (His)
IMAC – cromatografie de afinitate pentru metale
IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosid
IR - inverted repeats
IS - insertion elements, elemente de inserție
I - Izoleucină (Ile)
kDa – kilodaltoni
kb – kilo-perechi de baze
KDH – ceton-dehidrogenaza
K – Lizină (Lys)
LB - mediu Luria- Bertani
L - Leucină (Leu)
MABO - metil- γ -N-aminobutirat oxidază demetilantă
MAO – monaminoxidază
MCD - molibdopterin-citosin-nucleotidul
MCS – situs de clonare multiplu
MGD - molibdopterin-guanozin-nucleotidul
MPT – molibdopterina

M - Metionină (Met)
NADPH - nicotin-adenin-dinucleotidul fosfat redus
NDH - nicotin-dehidrogenaza
NB – albastru nicotină (Nicotine Blue)
NBOR – nicotina-blue oxidoreductaza
NQO - NAD(P)H-chinon oxodoreductaze
N - Asparagină (Asn)
ORF – cadre de citire (Open Reading Frames)
pb – perechi de baze
PCR - reacția de polimerizare în lanț
P - Prolină (Pro)
Q - Glutamină (Gln)
R - Arginină (Arg)
RDP - Ribosomal Database Project
ROS – specii reactive de oxigen (Reactive Oxygen Species)
SDS- sulf-dodecil sulfatul de Na
SaDH - dehidrogenaza semi-aldehidei acidului succinic
SDS-PAGE – electroforeză denaturantă în geluri de poliacrilamidă (SDS Poliacrilamida Gel Electrophoresis)
SMR- Small Multidrug Resistance Pump
soluție K-P - soluție tampon fosfat de K, 50 mM, pH 7,1
S - Serină (Ser)
T - Treonină (Thr)
TBE – tampon Tris Borat EDTA
TRIS – tris-hidroxi-metil-aminometan
Tn – transpozoni
TEMED – N,N,N',N'-Tetrametil-etilen-diamină
TCA – acid tricloroacetic
TLC - cromatografie în strat subțire
W - Tryptofan (Trp)
WrbA - tryptophan binding protein
V - Valină (Val)
Y - Tirozină (Tyr)

Introducere

Deși cataliza chimică este pe larg utilizată la scară industrială, ea are totuși o serie de dezavantaje. În primul rând presupune o serie de temperaturi și presiuni deosebit de mari, ce se reflectă în mod indiscutabil în costurile de producție. Utilizarea unor catalizatori precum metale sau alți compuși reduc acest inconvenient, fără a-l înlătura, dar pot constitui elemente de contaminare ale produsului final, ceea ce afectează calitatea acestuia.

O soluție pentru această problemă este utilizarea enzimelor, fie libere, fie fixate pe diferite suporturi inerte, în mediu apos sau neapos, care combină avantajul unei temperaturi și presiuni optime de acțiune la valori obișnuite cu un randament ridicat de reacție. În acest context descoperirea de noi enzime, de noi surse de enzime și noi modalități de purificare a acestora trebuie să constituie o prioritate în domeniul biochimiei.

Dezvoltarea și punerea la punct a tehnicilor de izolare a acizilor nucleici și de secvențiere au dus la acumularea unui număr mare de date. Un exemplu concludent ce demonstrează viteza de acumulare a secvențelor de gene este faptul că primul genom secvențiat a fost cel al microorganismului *Haemophilus influenzae* în 1995, iar doar 10 ani mai târziu (în 2005), încă 261 de genomuri microbiene au fost complet secvențiate și 669 erau în curs de secvențiere (180).

De asemenea, metodele de investigare a structurii și funcției proteinelor s-au diversificat foarte mult și se impune din ce în ce mai mult corelarea tuturor acestor date într-un sistem unitar. Acest lucru s-a realizat prin organizarea lor în baze de date și prin crearea de mijloace de investigare și prezentare a acestor informații. Asta face că la ora actuală cercetătorul are la îndemână o serie de metode care îi permit ca, având ca punct de plecare secvența totală sau parțială a genomului unui organism să identifice potențialele gene interesante din punct de vedere practic. Asemenea metode sunt de acum clasicul BLAST (147) , CD-Search (140) sau Pfam (66).

Progresele majore din domeniul biologiei moleculare și geneticii permit așadar o abordare cu totul nouă a unor direcții clasice ale biochimiei,

cercetătorul având acum posibilitatea de a parcurge un drum inversat față de cel clasic. Cunoscând secvența genei, cercetătorul poate determina secvența de aminoacizi, identifica elementele de secvență înalt conservate pe linie evolutivă și formula o serie de ipoteze privind funcția.

Această abordare, corelată cu un organism interesant din punct de vedere biochimic și fiziologic constituie punctul de plecare pentru o serie de cercetări ce au în vedere nu numai elucidarea unor probleme strict teoretice, dar și evidențierea unor enzime cu potențiale aplicații practice.

Din acest punct de vedere, microorganismele au două avantaje foarte mari. În primul rând ocupă o mare varietate de habitate, dezvoltându-se uneori în condiții extreme de mediu, și ca urmare, enzimele produse sunt active la valori foarte variate de pH sau temperatură. Un alt avantaj este de asemenea faptul că produc cel mai mare număr de enzime raportat la cantitatea de biomasă. Mai mult decât atât, datorită simplității sistemului genetic, producția de enzime poate fi îmbunătățită substanțial prin selecția tulpinilor, realizarea de mutații și tulpini recombinante genetic sau prin optimizarea mediului de cultură (142).

Arthrobacter nicotinovorans, microorganismul al cărui metabolism a fost luat în discuție în această lucrare reprezintă un candidat foarte bun pentru identificarea de noi enzime cu potențială importanță practică. Numită inițial *A. oxidans*, specia a fost reclasificată de Kodama și colab. în 1992 (116) și a primit numele actual, nume ce reflectă o caracteristică metabolică interesantă: capacitatea de a metaboliza nicotina. Aceasta se datorează prezenței în interiorul celulei a unui megaplasmid pe care se află toate genele necesare conversiei acestui alcaloid în energie. Izolarea plasmidului s-a realizat în 1984 (28), însă abia în 2003 a fost complet secvențiat (99). Secvențierea lui a oferit noi modalități de investigare care s-au concretizat prin elucidarea aproape completă a căii de degradare a nicotinei (30), dar a ridicat și o serie de întrebări. Una dintre acestea este originea plasmidului. Conținutul de GC al diferitelor fragmente demonstrează faptul că genele implicate în degradarea nicotinei au fost achiziționate în cadrul unor evenimente mutaționale de la o altă specie și grefate pe un plasmid ancestral. Acesta conținea genele necesare existenței ca entitate independentă, alături de gene ce par a fi în aparență

implicate în metabolizarea zaharidelor. Ținând cont că în cadrul aceleiași gen au fost descrise o serie de specii cu capacitatea de a degrada glucide mai puțin comune, precum cele din peretele drojdiilor,(167) sau ce produc enzime interesante din punct de vedere economic (galactozidaze active la temperaturi mici, cu aplicații în industria laptelui (220), izomalto-dextranaze (11) sau o maltosil-transferaza ce produce un tetrazaharid ciclic din amidon (109)), este interesant din punct de vedere teoretic, dar mai ales din punct de vedere practic investigarea funcției acestor gene, în eventuala identificare a unor enzime cu aplicații biotehnologice.

În cadrul acestei lucrări ne-am propus așadar investigarea rolului fiziologic al unui număr de 5 enzime cantonate pe megaplasmidul pAO1, în scopul caracterizării și identificării unor potențiale aplicații biotehnologice ale acestora. Aceste deziderate vor fi atinse prin realizarea unor obiective clare, și anume: clonarea genelor de interes în vectori de expresie, supraexpresia lor în *E.coli*, purificarea și caracterizarea cât mai în detaliu a produșilor de translație, în special din punct de vedere al activității enzimatică. La sfârșitul lucrării dorim să oferim o imagine cât mai clară a rolului pe care aceste enzime îl au în metabolismul speciei *Arthrobacter nicotinovorans*.

Capitolul. I Particularități taxonomice, morfologice și metabolice ale microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* 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.(116) în 1992 și a primit numele actual, nume ce reflectă principala caracteristică metabolică, și anume abilitatea de a metaboliza nicotina.

După Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (110), 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)(135) 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. (133) 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.

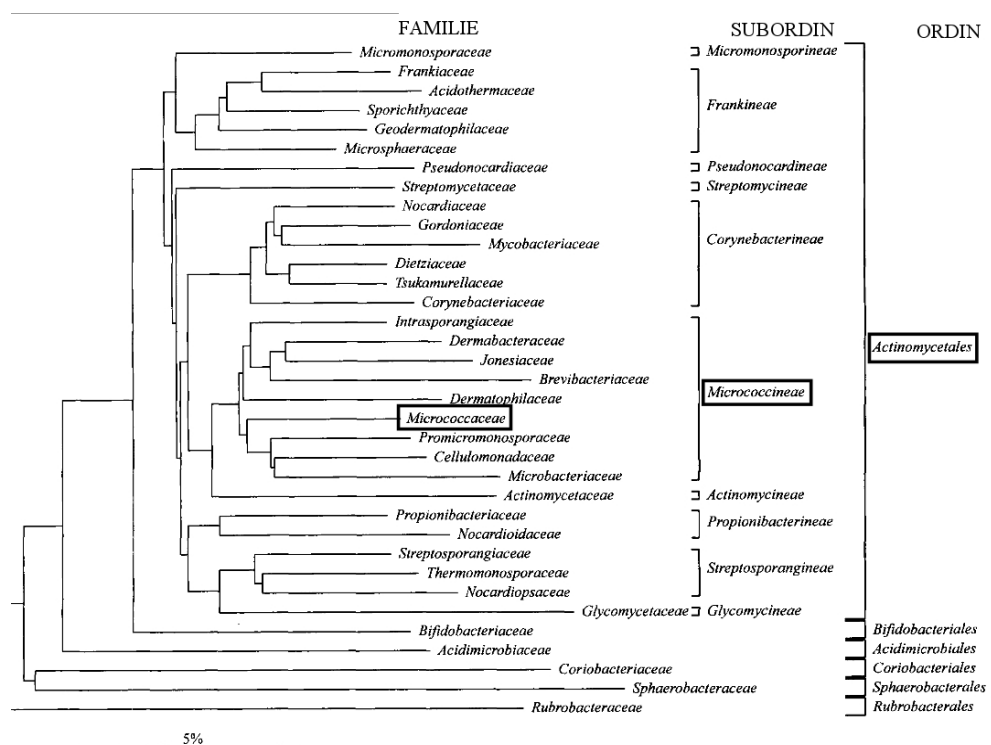


Figura 1. Legăturile filogenetice dintre diversele unități taxonomice din cadrul subclasei *Actinobacteridae*. În stanga jos, scala de mărime care reprezintă 5 substituții nucleotidice/100 nucleotide (după (207))

Stackenbrandt (207) încadrează așadar familia *Micrococcaceae* în subordinul *Micrococcineae*, ordinul *Actinomycetales*, subclasa *Actinobacteridae* și creează de asemenea o nouă clasă, clasa *Actinobacteria*.

1.2 Particularitățile metabolice și fiziologice ale genului Arthrobacter și a speciei A. nicotinovorans

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 (133), în medie de 59-70% (233). 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 (110).

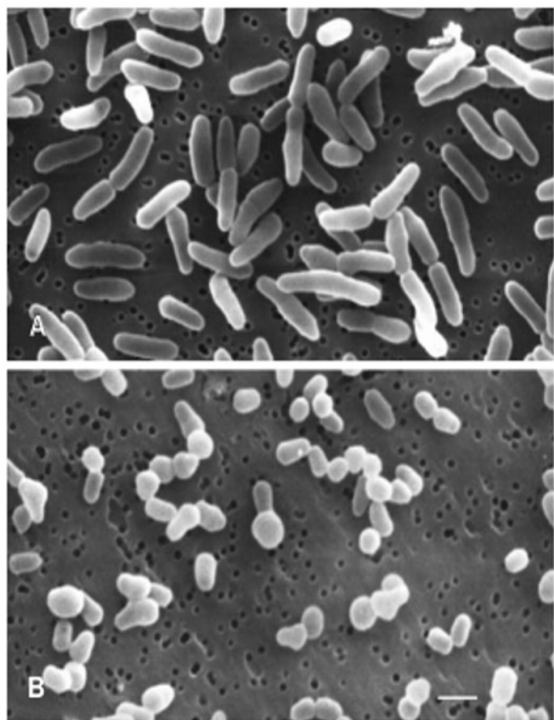


Figura 2. Variabilitatea morfologică a unui izolat aparținând genului *Arthrobacter* în timpul dezvoltării. A. Forme bacilare și asociații sub forma de V în cazul unei culturi tinere, la 230 unități Klett (aprox. 1,2 OD600) B. Forme cocoide în cazul unei culturi în faza staționară, la 450 unități Klett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

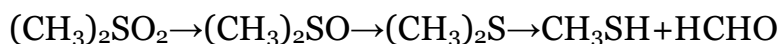
O trăsătură caracteristică, care poate fi utilizată pentru identificarea speciilor aparținând acestui gen este compoziția chimică a peretelui celular. Acidul gras din componența acestuia este reprezentat, de cele mai multe ori de 1,3-metilpentadecanoic, diamino-acidul este reprezentat din lizină, iar peptidoglicanul este de tipul Lys-Ala-Tre-Ala.

Speciile acestui gen sunt foarte rezistente la condiții extreme: specia *A. flavus* a fost izolată din gheața din Antarctica (180), specia *A. russicus* a fost izolată de pe stația spațială Mir (238) iar specia *A. koreensis* rezistă la valori mari de pH (7-12).

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:

$\text{CH}_3\text{SH} + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{HCHO} + \text{H}_2\text{S}$ iar, hidrogenul sulfurat este oxidat la sulfat (24).

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 (233). Calea de degradare nu a fost încă descrisă.

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 (149).

Alte substraturi pe care speciile aparținând acestui gen le pot metaboliza sunt: metil-tert-butil-eter, 2,4-dicloro-fenoxi-acetat-4-nitrofenol, dimetil-silan-diol, ftalat, nitroglicerină. Această mare versatilitate metabolică poate fi explicată prin gama largă de enzime pe care le produc. Recenta secvențiere a speciei *Arthrobacter* sp. FB24, (Gene Bank AAHG000000000) arată existența unui număr de 4576 de gene, dintre care 4522 codifică proteine.

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 (231).

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.

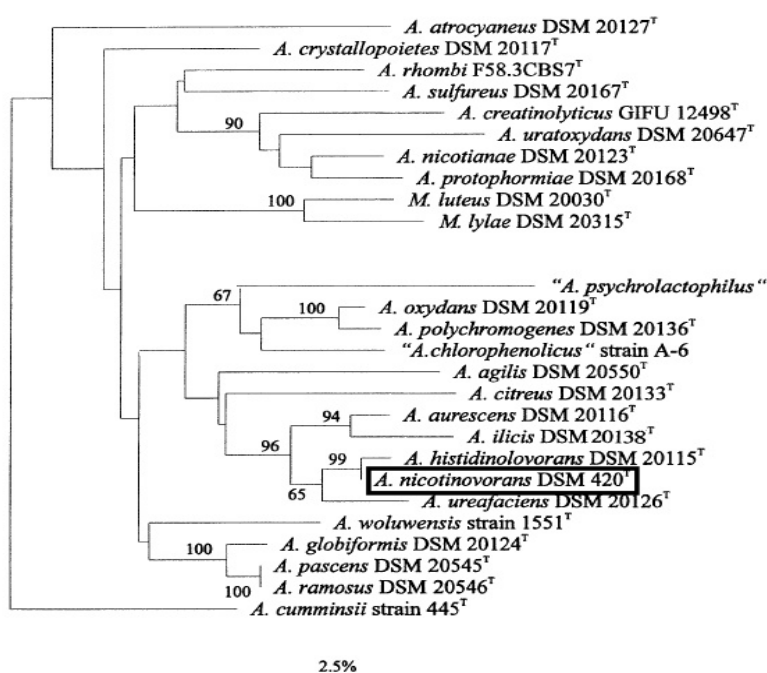


Figura 3. Dendrograma speciilor aparținând genului *Arthrobacter* realizată pe baza secvenței ARN 16S (scala de jos reprezintă 2,5 substituții nucleotidice / 100 nucleotide)

1.2.1. 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 asemenea pe mediu mineral simplu, dacă conține sări de amoniu ca sursă de azot, glucoză ca sursă de carbon și biotină (110). 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.

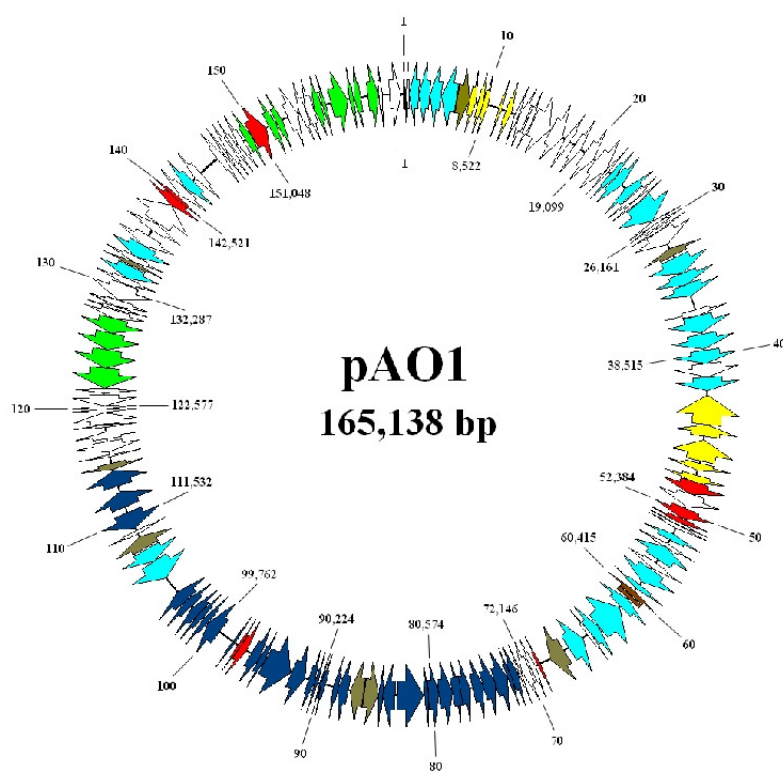
Plasmidele catabolice sunt în general de dimensiuni mari, peste 100 de kb, și, deși nu conțin gene esențiale pentru supraviețuirea gazdei, oferă acesteia o înaltă versatilitate metabolică și capacitatea de a utiliza ca sursă de carbon și azot diferiți compuși naturali sau sintetici. Ei sunt de asemenea responsabili 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 (28), iar în 2003 a fost complet secvențiat de Igloi și Brandsch (99). 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.



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* (187). 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 (170)).

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* (170).

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 (170). 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 plasmizii izolați din specii aparținând genului *Arthrobacter* secvențiați până în prezent (103). Poziționarea originii rămâne deci necunoscută și din aceste motive numerotarea bazelor azotate începe de la situsul de restricție al enzimei BamH1 (99).

O problemă ce trebuie rezolvată de către procesul de replicare plasmidială este împărțirea plasmidelor nou produse între cele două celule fiice (plasmid partitioning). 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, îndoaie 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 (170).

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 de 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 să ucidă 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 (170). 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 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 primer, legarea ducând la imposibilitatea realizării clivării. Transcripția continuă și replicarea nu se mai produce din lipsa primerului. Prin controlul concentrației de ARNi se realizează deci un control al replicării și, prin aceasta, al concentrației

numărului originilor de replicare (181). 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 segrega 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 replicare, 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*, replicare se oprește și furca care ajunge prima o așteaptă pe cealaltă. În acest fel celula se asigură ca 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 al 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 distanța între *parA* și *parB* pare a fi o caracteristică a plasmizilor aparținând acestui gen (103). 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.

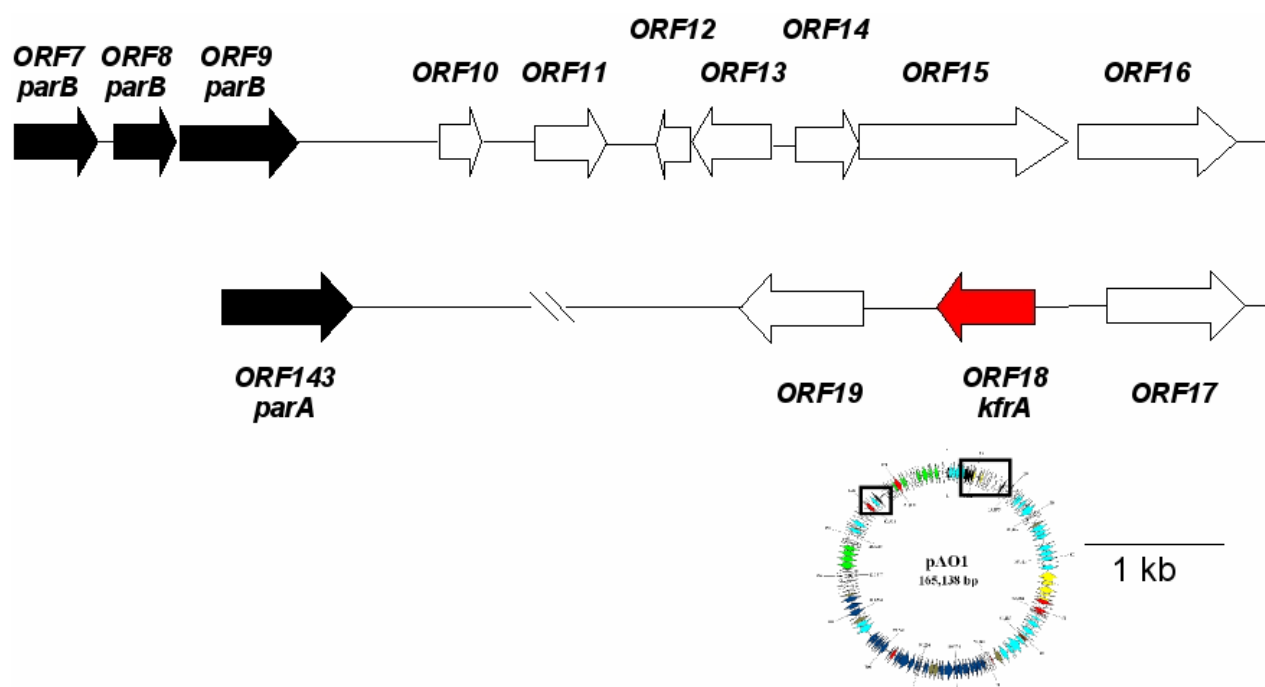


Figura 5. Modul de aranjare a celor 2 cluster de gene posibil a fi implicate în replicarea plasmidului pAO1.

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.

B. 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. Incapacitate 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 (177). 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 (177): 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 (177), organizate în 2 grupe *tra* și *trb*. În cadrul cluster-ului *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 sunt 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 vor putea 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 (145), 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 proteina este atașată. Acest transport este unul activ, necesitând ATP.

În cazul factorului F clivarea catenei este realizată de acțiunea cuplată a produsului genelor *traI*, *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 catenă 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.(99) 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. 2003, (99) 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.

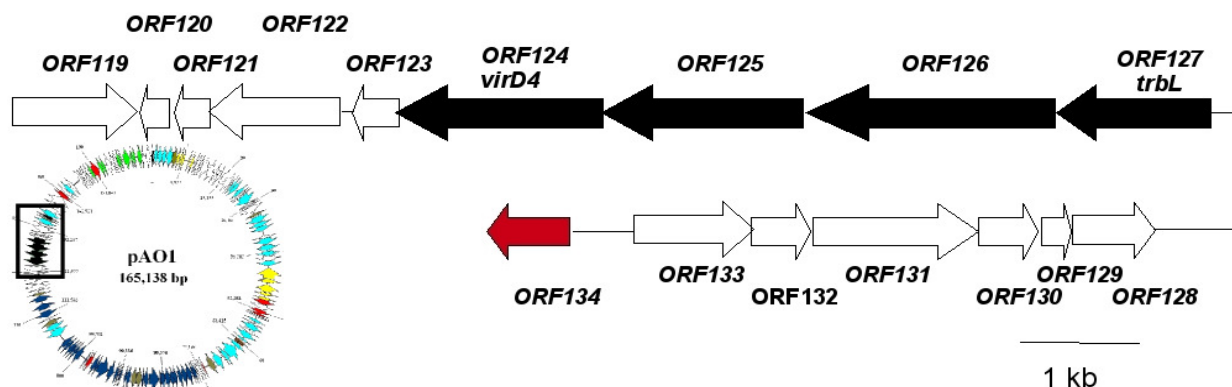


Figura.6 Modul de aranjare a celor 5 cadre de citire posibil a fi implicate în conjugare și amplasarea lor pe megaplasmidul pAO1.

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.

C. Gene implicate în fenomenele de transpoziție

Evoluția genomului se realizează prin două modalități esențiale: achiziția de noi secvențe și rearanjarea celor preexistente (129). Modul de realizare a acestor fenomene a constituit mult timp o necunoscută, considerându-se că doar recombinarea homoloagă 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 omologă (235). 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 transpozomii se clasifică în 2 mari clase (129).

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 (145). Notarea lor se face cu literele IS urmate de numere. Numerele indică clasa din care fac parte, în ordinea descoperirii.

Transpozomii 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 transpozomi: compuși și simpli (85). Cei compuși sunt alcătuiți din 2 IS aproape identice ce flanchează restul de secvență a transpozomului, 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 transpozomi este Tn10, ce conține 2 IS10 iar în interior o genă ce conferă rezistență la tetraciclină.

Transpozomii 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 (235). 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 transpozonului se face între aceste capete. Capetele moleculei de ADN ce alcătuiește transpozonul sunt însă drepte, de aceea prin inserție vor apare 2 zone monocatenare de o parte și de alta a transpozonului. 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 (85), 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 transpozomului, 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 transpozomul 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 (85).

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 transpozonilor. 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 (150).

Al doilea set de IS prezente pe pAO1 sunt reprezentate de *ORF140* și 141. Acestea au un grad mare de homologie 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 (99).

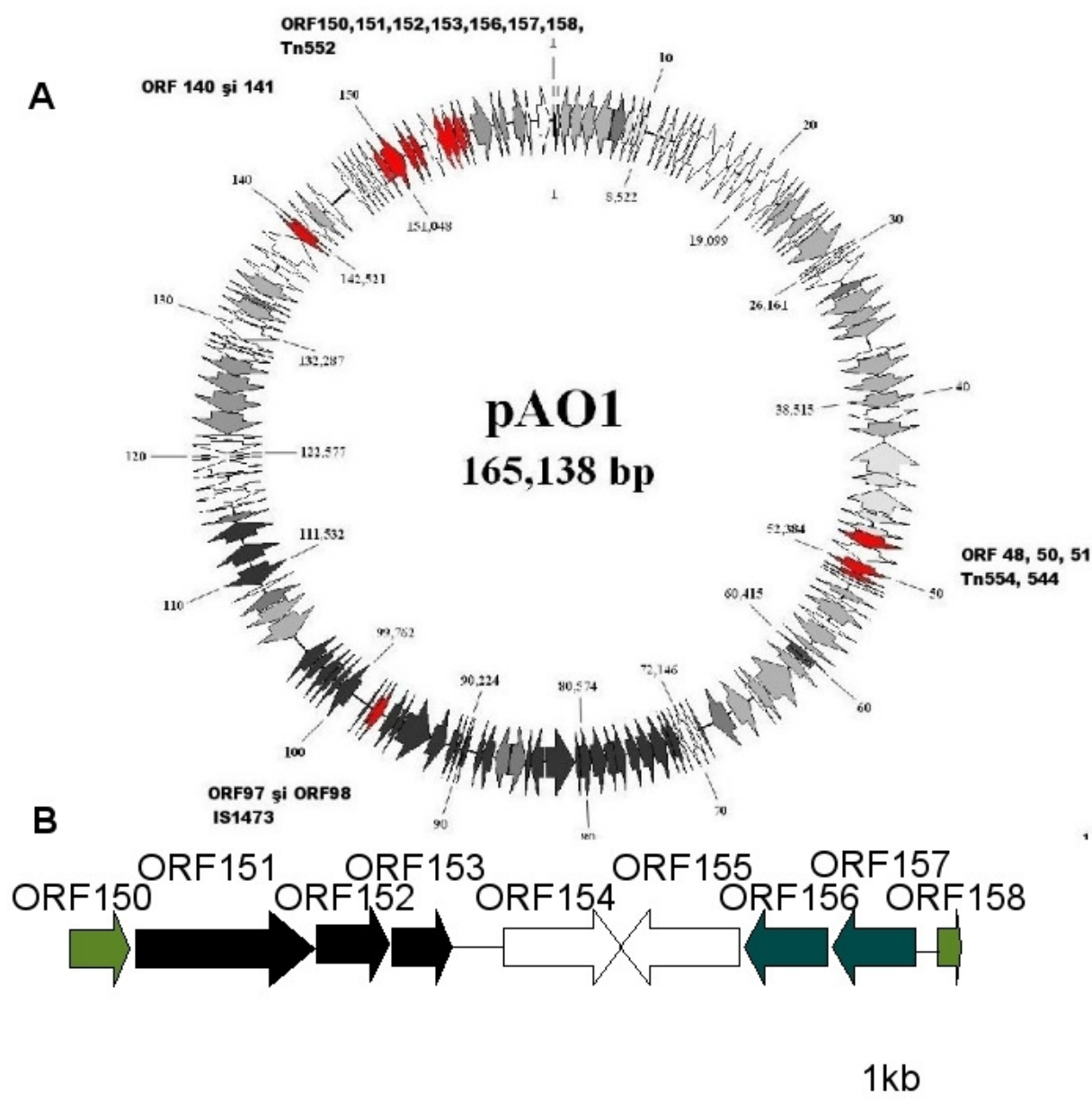


Figura 7. Elementele genetice transpozabile plasate pe pAO1 (A) și modul de aranjare al cadrelor de citire în presupusul transpozon *Tn554*.

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 *cdo1194*, *cdo0798*, *cdo1182*). Proteina codificată de această genă se aseamănă cu transpozaza A (TpnA) din *Tn554* (scorul 205 e-value 2^{e-51}).

ORF 50 și *51* pe de altă parte sunt similare cu *tpnB* și respectiv *tpnC* din *Tn544*. Acest transpozom este alcătuit din trei gene (*tpnA*, *tpnB*, *tpnC*) 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 codon-ul 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).

D. 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. 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 (99)

E. 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 genele *nic*), iar pe de altă parte, o cale metabolică de degradare a carbohidraților. Genele implicate în realizarea acestor căi sunt prezentate în sub-capitolele ce urmează.

F. 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% (99), 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 transpozom. Conținutul mediu de GC este de asemenea diferit (60,2 % față de 62%) și conține genele implicate în producția co-factorului molibdenic și de asemenea 6-HDNO (99).

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*.

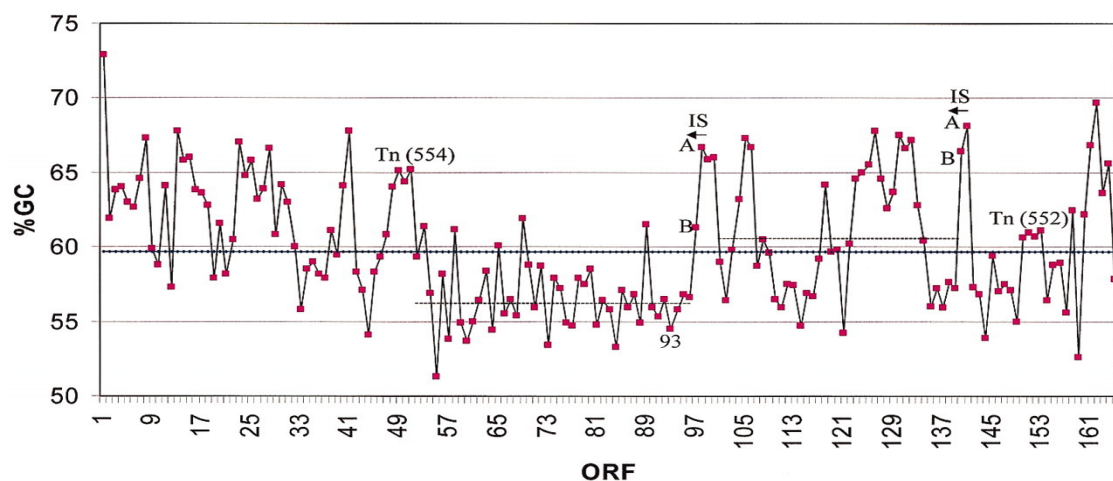


Figura. 8 Distribuția conținutului mediu de GC funcție de cadrul de citire.

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 (99)).

Relativ recent, Ganas și colab. (70) au demonstrat faptul că genele implicate în metabolizarea nicotinei de pe plasmidul pAO1 se aseamănă cu gene din genomul speciei *Nocardioide* 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 *Nocardioide*, 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.

I.3. Metabolismul nicotinei în *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+

De departe cea mai bine studiată cale metabolică plasată pe plasmidul pAO1 este cea a degradării nicotinei, aceasta fiind și cea mai interesantă proprietate metabolică a tulpinii. Primii pași în descifrarea mecanismului de degradare a alcaloidului sus menționat au fost făcuți de echipa condusa de Sydney C. Rittenberg (95). Acesta 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 și mecanismele lor de reglare a expresiei. Aceste aspecte sunt abordate de către colectivul condus de R. Brandsch (30), acesta reușind să clarifice o mare parte din mecanismele moleculare prin care se realizează degradarea acestui alcaloid.

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* (215), *Bacillus*, *Achromobacter*, *Microsporum* și de asemenea la fungi.

Degradarea acestui alcaloid de către microorganisme se poate realiza pe 3 căi: printr-un atac la inelul piridinic, unul 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 făcând posibile etapele următoare. Acestea pot fi grupate în reacții ce au ca finalizare desfacerea inelului piridinic, alcătuind o așa numită cale metabolică superioară, și reacții de asimilare a catenei laterale, alcătuind așa numita cale metabolică inferioară.

1.3.1. Desfacerea inelului pirolidinic

Capacitatea extractelor totale de *Arthrobacter nicotinovorans* de a oxida aerob nicotina a fost pentru prima dată semnalată de Hochstein în 1958 (95; 96). 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 120-122°C. Proprietățile fizico-chimice ale compusului obținut au indicat că este 6-hidroxinicotină (96).

Enzima care realizează această primă reacție a fost purificată abia în 1988 de către Freudenberg și colab. (68). 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 (68), ceea ce corespunde unei structuri de forma $(\alpha\beta\gamma)_2$ (30). 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.

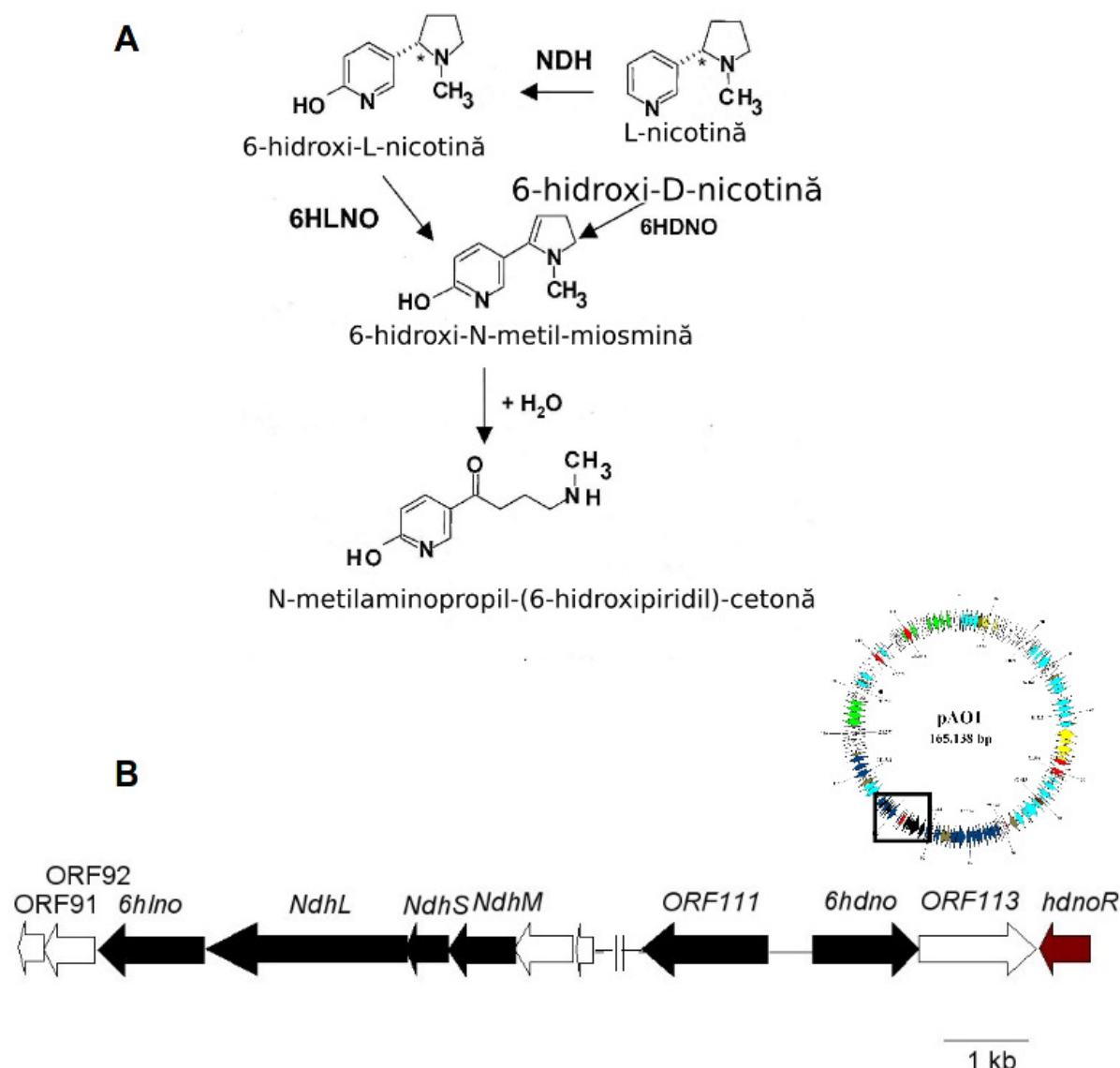


Figura 9. Primele etape în calea metabolică de degradare a nicotinei A, (după (30)) și modul de aranjare a genelor implicate (B) în cadrul plasmidului pAO1.

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 de 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 (94).

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 (199) 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 monomă 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 (117). 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).

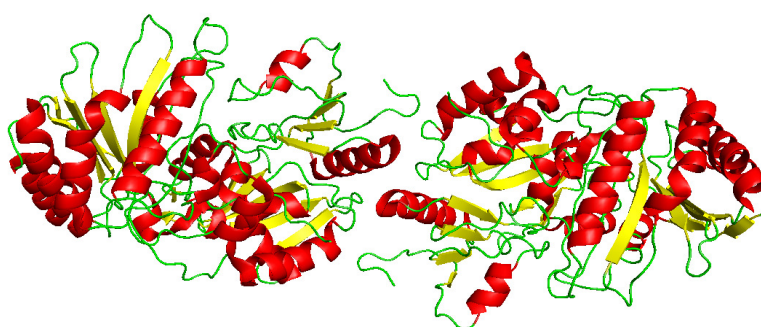


Figura. 10. Structura tridimensională a 6HDNO (după Koetter și colab.(117))

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 (21).

Mecanismul de reglaj a fost în parte elucidat prin experiențele realizate de Bernauer și colab. în 1992 (21) și Sandu și colab. (196). În 1992, Bernauer și colab. indică faptul că extractele proteice au capacitatea de a realiza o întârziere la migrarea prin geluri de poliacrilamidă 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 reglaj. 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 regulatori 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 His a fost purificată utilizând IMAC. Masa moleculară este de aproximativ 19 kDa, iar experimentele de cros-linking au arătat că în soluție proteina este dimeră(196).

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 *6hdno*. Gena a primit numele de *hdnoR* (196).

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 față de *hdno* și s-ar putea ca represorul mai sus menționat să regleze și activitatea acestei gene. Analiza ARN-ului 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 *6hdno*, 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 (196).

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 (194). De asemenea s-a demonstrat posibilitatea utilizării acestui represor într-un sistem de control al expresiei proteinelor în celulele eucariote (136).

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* (31), 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 ne-flavinilate (29).

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 sistemic

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-oxinicotina, 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 (184).

Deosebit de intrigant este modul de aranjare al genelor corespunzătoare celor 3 subunități ale KDH pe plasmidul pAO1. După cum se poate vedea în figură, 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.

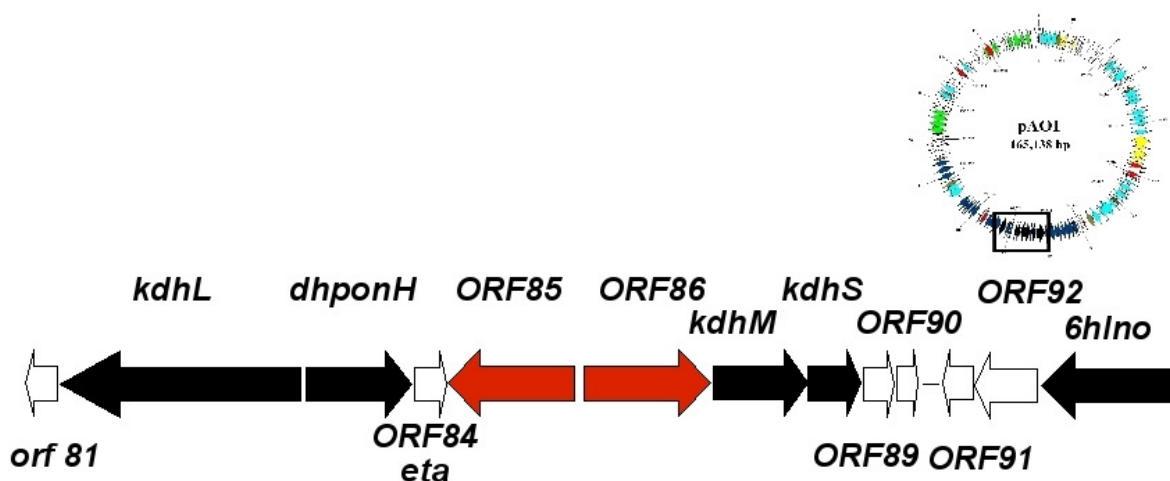


Figura 11. Aranjarea genelor responsabile de producerea subunităților M, S și L a enzimei KDH și amplasarea lor pe megaplasmidul pAO1.

Cei 4 kb cuprind 4 cadre de citire, dintre acestea doar *dhponH* 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 (99).

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 (30).

1.3.2. 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 (76). 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. (190), oferind posibilitatea indicării etapelor ulterioare din această cale.

Este vorba despre produsul cadrului de citire 83, enzimă cu masa moleculară de 43,5 kDa, monomeră 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)(190).

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 ce nu manifestă asemănări mari la nivel de secvență, dar se caracterizează printr-un element al structurii terțiare comun, datorită căruia au primit numele de clasa hidrolazelor α/β -fold. Comun este și mecanismul de acțiune și aminoacizii implicați în actul catalitic: serină, aspartat și histidină.

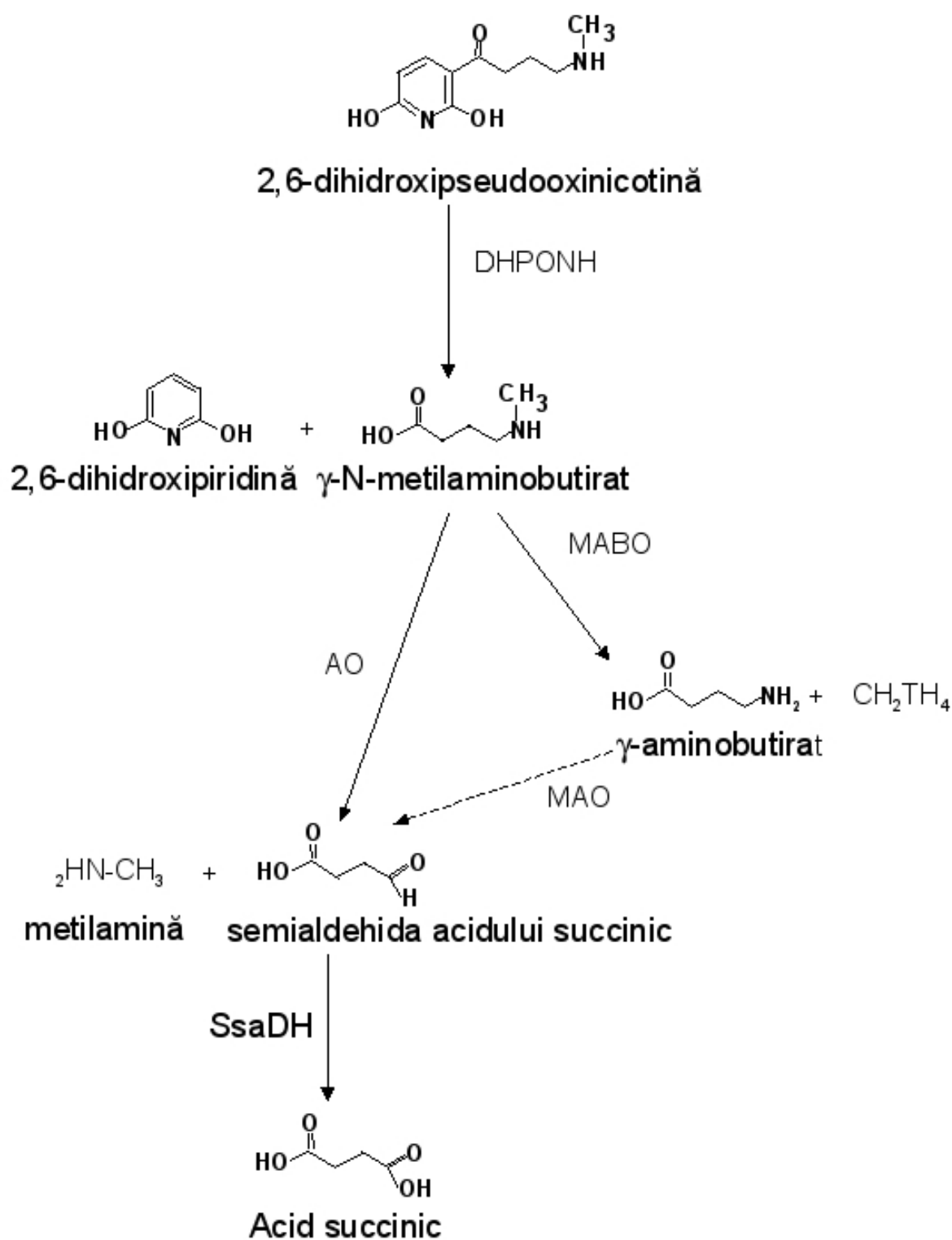


Figura 12. Schema reacțiilor implicate în clivarea și degradarea catenei laterale.

Soarta celor 2 produși de reacție este diferită, după cum este indicat de Holmes și colab. (98; 100). 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.

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 cadrului de citire 67. Modul de dispoziție este prezentat în figura care urmează.

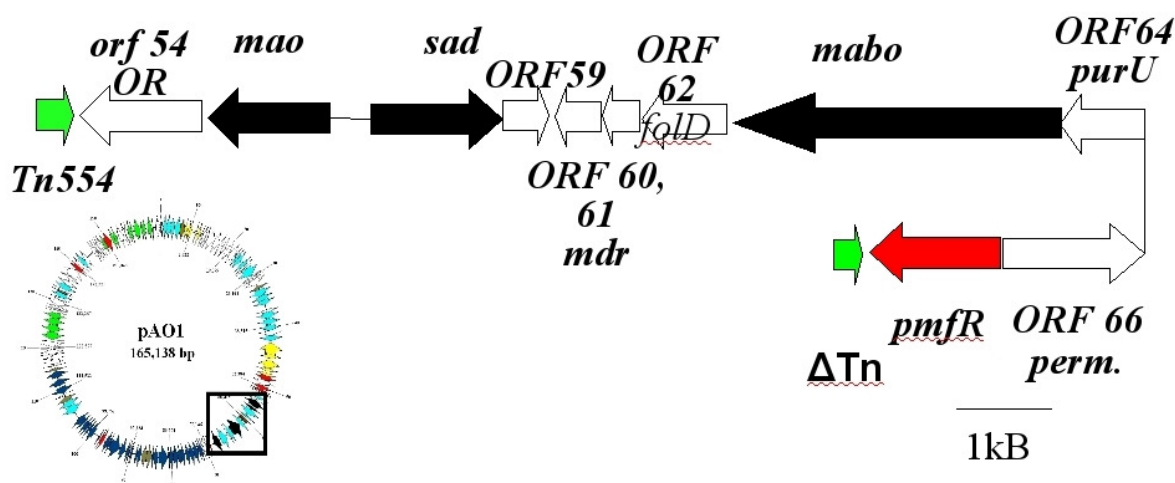


Figura 13. Modul de aranjarea al cadrelor de citire implicate în metabolizarea acidului metil- γ -N-aminobutiric și amplasarea lor pe megaplasmidul pAO1.

O primă modalitate de integrare este prin de-aminare 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.

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 tricloracetic 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 (39). Enzima este o mono-amin-oxidază (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 1.

Tabel 1. Constantele cinetice ale enzimelor AO și SsaDH și variația acestora funcție de substrat, după Chiribău și colab. (39), cu modificări:

Enzima	Substrat	Km (mM)	kcat (s-1)	kcat / Km ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
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
SaD	semialdehida acidului succinic	0.34 ± 0.1	23000 ± 700	67.6
SaD	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* (39), 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 (39). Pe plasmid se află însă un cadru de citire ce asigură racordarea produsului de de-aminare 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)(39).

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 pH₆EX₃ și produsul purificat. Proteina are o masă moleculară de 50 kDa, în soluție formând probabil tetrametri cu o masă moleculară de 190 kDa (39).

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*)(41).

Produsul purificat al cadrului de citire 67 a fost testat pentru capacitatea de a se lega de ADN utilizând tehnica întârzierii 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-'ARCAAAGTCGCAGTTTACCTTAGTACCAAAACCATGGTCTTTTC-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 CAGTTTAG 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 (41).

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 *SalI*. 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 (41).

Celălalt produs rezultat în urma reacției de clivare a catenei laterale este 2,6-dihidroxipiridina care este supus unei hidroxilări în urma căreia se formează 2,3,6-tri-hidroxipiridina. Reacția și produsul ei au fost evidențiate pentru prima dată de Holmes și colaboratorii (78; 100). 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-flavinilate, probele conținând enzima au fost trecute pe o coloană de hidroxiapatită și concentrate cu polietilenglicol (97), 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 poliacrilamidă 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-dihidroxipiridinei 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 $\mu\text{moli/min}$ și k_{cat} $3,9 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Compuși precum 2-

hidroxipiridina, 2,4-dihidroxipiridina, 2,6-dimetoxipiridina, resorcina sau 2,6-dihidroxinicotinamida nu constituie substrat, dar acționează ca inhibitori (14). Produsul reacției este 2,4,6-trihidroxipiridina.

O necunoscută rămâne funcția cadrului *orf54* care codifică o proteină înrudită cu NADPH:chinon oxido-reductaza care va constitui subiectul acestei teze. Activitatea enzimatică este legată probabil de cea a MAO, cu care se pare că alcătuiește un operon. Ținând cont că MAO are ca substrat catena laterală rezultată, că funcția presupusă a *orf154* este NADPH:chinon oxido-reductaza este tentant de presupus că substratul acestei enzime este ceea ce a mai rămas din molecula nicotinei (2,6-dihidroxipiridina, transformată prin hidroxilare în 2,4,6-trihidroxipiridinei).

I.3.3. 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 $2 e^-$ (86). 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) (132). 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 14 (124; 186).

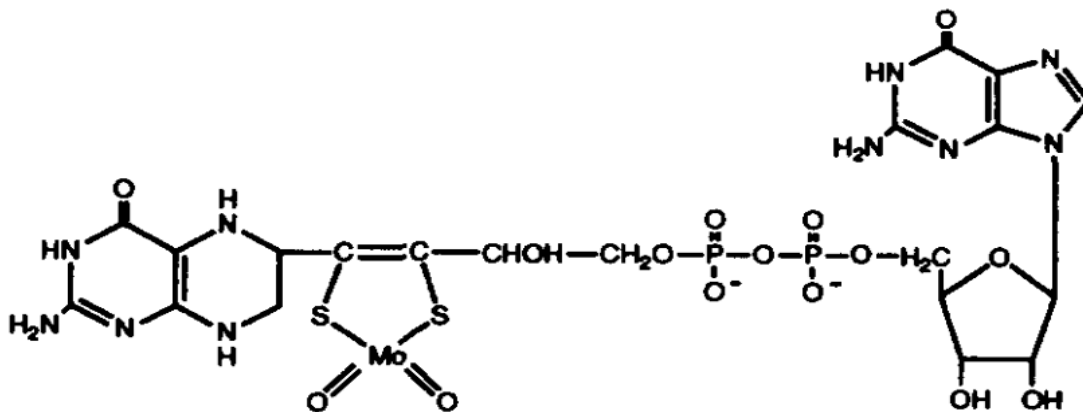


Figura 14. Structura cofactorului MCD, după (125)

Acest cofactor este foarte frecvent în lumea vie, de aceea calea lui de sinteză este înalt conservată. Ea cuprinde trei etape (86), (190) 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 heterotetramerice 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 microorganisme 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 (132).

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 (151).

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.

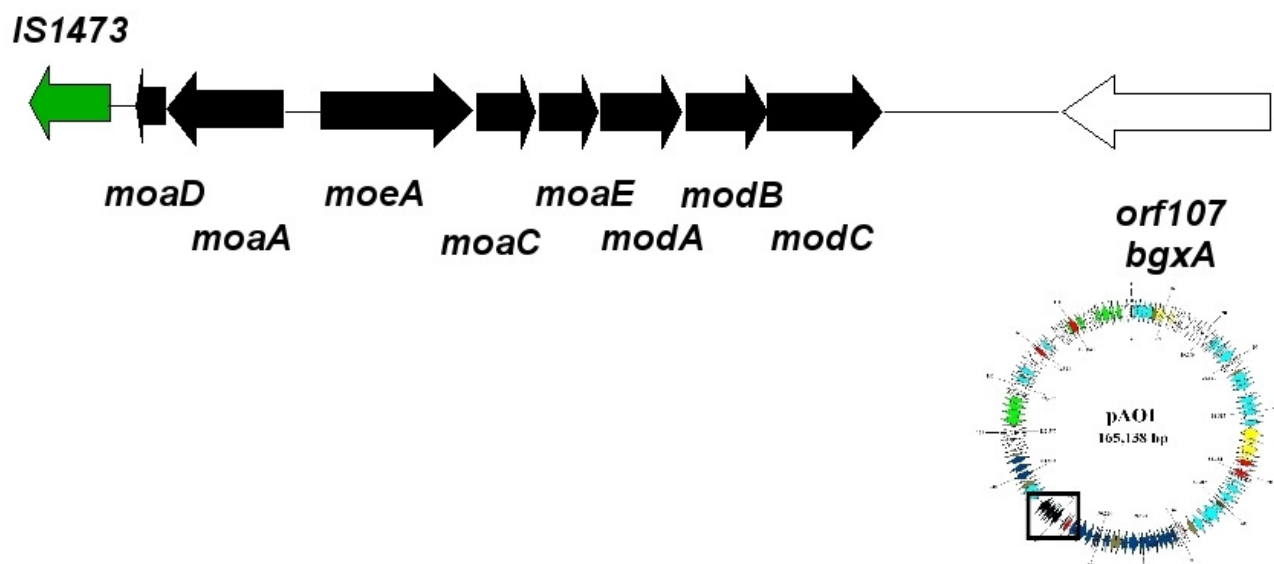


Figura 15. Aranjamentul ORF-urilor implicate în biosinteza cofactorului molibdenic și amplasarea lor în megaplasmidul pAO1.

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 (151).

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 (151), participând de asemenea la inserția Mo^{2+} în apoenzimă (Mo^{2+} insertază, (30)).

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 o 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 (152). 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 (30).

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 heterotetramerică 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.

I.3.4. Gene implicate în transportul nicotinei și a produșilor de metabolism ai acesteia

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 (128). 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 (99). Urmărind evoluția în timp a importului de nicotină, autorii au putut observa că din momentul introducerii alcaloidului în mediu apare unei perioade de lag de aproximativ 10 minute. 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 $5,6 \pm 2,2 \mu M$ și V_{max} $0,6 \pm 0,06 \text{ nmol/min}$, similar cu ai unor pompe cu afinitate mare dar capacitate mică pentru aminoacizi (99).

Secvența de nucleotide indică câteva cadre de citire cu potențial rol în transportul nicotinei. Flancând *6hdno* se află două cadre de citire (*orf 111* și *113*) al căror produs are un grad mare de similitudine cu o aminoacid permează din *C.acetobutylicum* (*orf 111*, 22% identitate) și respectiv cu o proteină de transport a aminoacizilor din *M. loti* (*orf 113*, 22% identitate). Influența aminoacizilor asupra transportului a fost testată și s-a observat că D-Arg și D-Pro au rol activator, prezența lor în mediu ducând la creșterea vitezei de import a nicotinei.

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 (SMR- small multidrug resistance pump). 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 al nicotinei (Ganas et al., 2007, 242). Cele 2 proteine se comportă ca o valvă metabolică, controlând concentrația intracelulară a componentilor căii metabolice.

I.3.5. 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 activității 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 (190), în ce mod însă nu este foarte în detaliu stabilit.

I.3.6. 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 (30). 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 (30) 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(31)

I.4. Metabolismul glucidelor în Arthrobacter nicotinovorans pAO1+

Capacitatea de a utiliza glucidele din mediu este o însușire destul de comună a speciilor de microorganisme (9), 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, melezitoza (110).

Pe megaplasmidul catabolic pAO1 au fost identificate o serie de gene care ar putea descrie o cale metabolică implicată în degradarea glucidelor. Prezența lor este surprinzătoare, cu atât mai mult cu cât, ținând cont de

structura plasmidului, cluster-ul de gene pentru degradarea nicotinei *nic* a fost achiziționat mai târziu de către un plasmid conținând genele ce codifică 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 (60). Abia recent aceasta din urmă a putut fi purificată și cristalizată în stare nativă, urmând a-i fi determinată și structura (166). 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(221)),

- o izomalto-dextranaza (care degradează dextranul cu formare de izomaltoza (11)

- o maltosil-transferaza ce produce un tetrazaharid ciclic din amidon (109).

I.4.1. Gene posibil a fi implicate în metabolismul glucidelor de pe pAO1

Un prim 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. Primului 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 (140) 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, esterase,

-PldB, (n.a. CDS COG2267.2) domeniu conservat în lisofosfolipaze

Cadrul de citire 3 are după cum poate fi observat din figura 16, 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 aceste gene par a fi implicate în metabolizarea glicolipidelor.

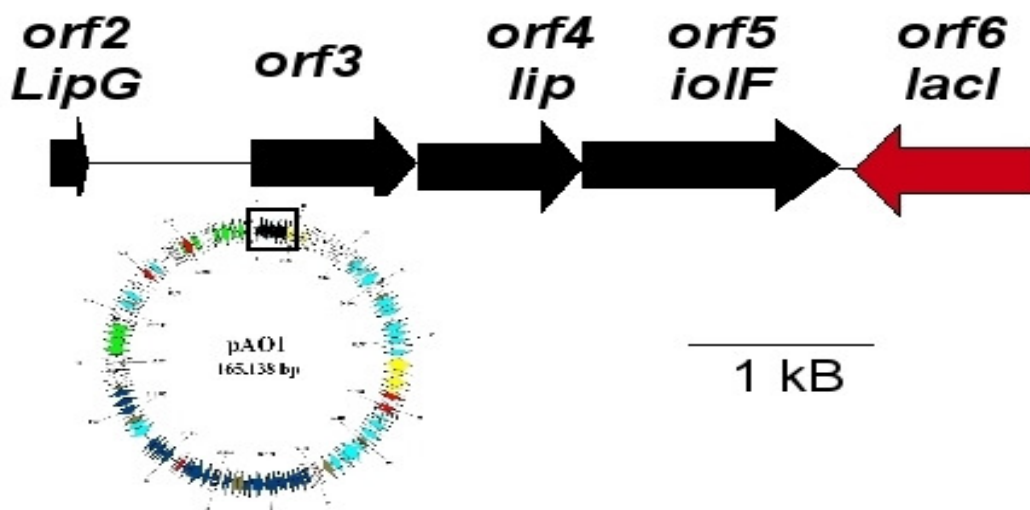


Figura 16. Orientarea și amplasarea în cadrul megaplasmidului pAO1 a cadrelor de citire în cazul primului cluster presupus a fi implicat în catabolismul glucidelor.

Un al doilea cluster care codifică 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 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 celulei din *C.thermocellum*.

În baza de date Pfam (67), 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 enzime cu o singură activitate cunoscută, și anume mananazică, hidrolizând deci mananul, galactomananul, glucomananul și galactoglucomananul. De asemenea, activitate redusă a fost observată și asupra unor alte polizaharide din pereții celulari ai plantelor (216).

Următoarele 7 cadre de citire ce urmează după presupusa enzimă cu funcție celulei 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 legare a efectorului sau responsabil de fenomenele de oligomerizare. Proteinele din această familie au fost grupate în 6 subfamilii (185). 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 (158) și FadR (COG2186.2), factor implicat în reglarea căii de metabolizare a acizilor grași (59).

După acest cadru de citire se află (figura 17), 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 (219).

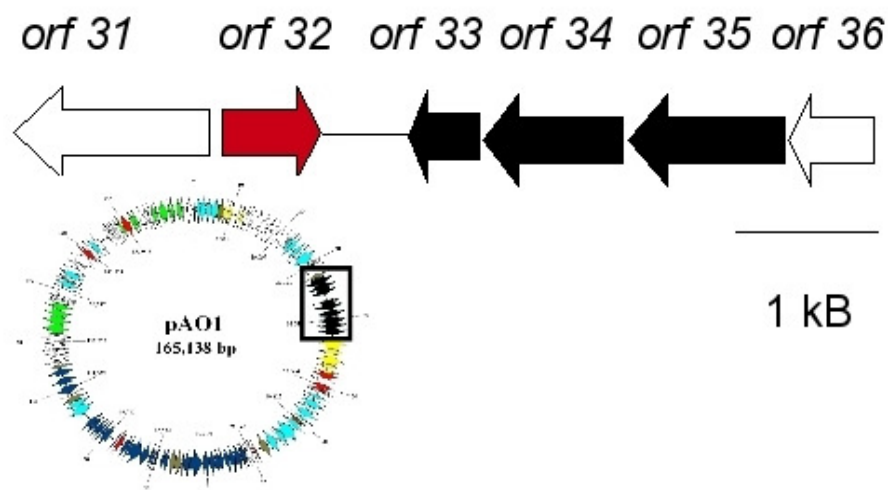


Fig. 17. Gruparea de gene ce alcătuiește sistemul de transport de tip ABC al glucidelor de pe pAO1 din *Arthrobacter nicotinovorans* și amplasarea lor în cadrul plasmidului pAO1

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 *orf 33* se află *orf 34* și *orf 35*, proteinele codificate de acestea asemănându-se cu cele 2 proteine transmembranare ale sistemului ABC de transport al ribozei, xilozei, arabinozei și galactozidelor la *C. perfringens* și respectiv *T. tengcongensis* (99).

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 (36). Sunt deci toate flavoproteine, utilizând FAD în calitate de cofactor pentru a oxida substrat precum glucoza, colina, metanolul sau celobioza (92). 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-ceto-glutarat. 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 (65),
- 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 (118).
- glucoz-dehidrogenaza din *Burkholderia cepacia*, enzima termostabilă și cu un maxim de activitate la 70°C (100)
- o subunitate a 2-ceto-gluconat dehidrogenazei din *Pantoea citrea* (178)

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, ORF 32 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.

ORF 39 face parte din clanul Aldh-like superfamiliy, 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 (67). 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) (33). La plante acest şunt este important, asigurând o mai buna 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 (25).

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, deoarece constituie 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 CAT. Această cale secundară pare să ofere microorganismului o serie de avantaje în condiții microaerobe și poate oferi o cale de combatere a acestui patogen (104). Un rol asemănător a fost descris și la microorganismul *Bradyrhizobium japonicum*, această cale secundară asigurând o mai buna integrare a CAT cu procesul de fixare simbiotică a azotului (82).

La *E.coli* această activitate asigură etapa finală de integrare a căii de degradare a acizilor 3- și 4-hidroxifenilacetic în ciclul acizilor tricarboxilici (58).

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 (238), MOCA -o proteina implicata în metabolismul rhizopinei (148) și de asemenea o serie de proteine cu funcție necunoscută din *E.coli* sau *Sacharomices*. O cautare Blast dupa secvența acestui ORF arată că majoritatea proteinelor cu care are un grad mare de similitudine au funcție necunoscută si 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. 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 (69).

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. Din datele prezentate este clar că acest operon străvechi conținea toate elementele necesare degradării, transportului și racordării acestei căi la ciclul acizilor tricarboxilici.

Capitolul II. Material și metode de cercetare

II.1 Tulpini bacteriene, vectori plasmidiali și condiții de creștere utilizate

II.1.1. Tulpini bacteriene și vectori plasmidiali utilizați

O listă cu tulpinile de microorganisme, plasmidele realizate și utilizate pe parcursul experiențelor efectuate, împreună cu marker-ii fenotipici relevanți este prezentată în tabelul următor.

Tabelul 2.

Tulpina bacteriană sau plasmidul	Genotip sau alt marker relevant	Sursa sau referința bibliografică
Tulpini		
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	<i>RecA1 andA gyrA96 thi-1 hsdR1 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> F- BL21(DE3)	<i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B-m_B⁻)λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Novagen
<i>Arthorbacter nicotinovorans</i> pAO1+	Tipul sălbatic, <i>nic</i> ⁺ , <i>kan</i> ^R	Igloi and Brandsch (99)
<i>Arthorbacter nicotinovorans</i> pAO1-	<i>Nic</i> ⁻ , <i>kan</i> ^R	Igloi and Brandsch, 2003 (99)
Plasmide		

pH6EX3	<i>Amp^R lacI^Q</i>	Berthold et al., 1992 (22)
pH6EX3nboR	<i>Amp^R lacI^Q</i>	pH6EX3 Mihasan et. al., conținând NBOR între 2007(155) BamHI-SalI
pH6EX3gfoR	<i>Amp^R lacI^Q</i>	pH6EX3 Acest studiu continand GFOR între HindIII-XhoI
pH6EX3aldH	<i>Amp^R lacI^Q</i>	pH6EX3 Acest studiu conținând ALDH între BclI-SalI
pH6EX3kgdH	<i>Amp^R lacI^Q</i>	pH6EX3 Acest studiu conținând KGDH între BamHI – SalI

II.1.2. Condiții de creștere utilizate

Tulpinile de *Escherichia coli* purtătoare de vectori plasmidiali au fost cultivate pe mediu Luria-Bertani (LB, 10 g NaCl, 5 g extract de drojdii (Roth, Germania), 10 g peptonă din cazeină (Roth, Germania) la 1000 ml apă) (13), suplimentat cu antibiotice conform tabelului 3. Pentru obținerea mediului solid s-au adăugat 16 g/ml agar (Roth, Germania).

Tabel 3. Concentrațiile de antibiotice utilizate la cultivarea tulpinilor de *Escherichia coli*

Tulpina bacteriana sau plasmidul	Antibiotic	Concentrația soluției stoc (mg/ml)	Concentratia finala în mediu (μg/ml)
<i>Escherichia coli</i> XL1	tetraciclină*	10	20

Blue			
<i>Escherichia coli</i> <i>BL21(DE3)</i>	cloramfenicol*	15	15
Tulpini de <i>Escherichia</i> cu pH6EX3 sau ceilalți plasmide derivați de la acesta	ampicilină	50	50

*Antibioticul a fost dizolvat în etanol

Tulpina *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1⁺ (28) și cea pAO1⁻ (99) au fost propagate pe mediu citrat cu adaos de minerale urmărind indicațiile lui Eberwein și colab., 1965 (63) și Gloger și Decker, 1969 (78).

Astfel, pentru prepararea mediului citrat se dizolvă în 1000 ml apă distilată:

- 2 g citrat trisodic
- 2 g (NH₄)₂SO₄
- 4,92 g Na₂HPO₄
- 3,06 g KH₂PO₄
- 5 g extract de drojdii (Roth, Germania)

Soluția obținută se sterilizează prin autoclavare și se păstrează la temperatura camerei. Dacă este necesară obținerea de mediu solid, se adaugă 16 g/L agar. Înainte de utilizare, se adaugă 5 ml/L soluție de minerale, kanamicină (70 μg/ml dintr-o soluție stoc 140 mg/ml) și, după caz, 0,05 % nicotină.

Soluția de minerale conține, pe litru:

- 0,75 g CaCl₂
- 3,5 g ZnSO₄·2H₂O
- 4,58 g H₃BO₃
- 0,22 g FeSO₄·7H₂O
- 0,24 g MnSO₄·7H₂O
- 0,1 g CuSO₄·5H₂O
- 0,1 g CoSO₄·7H₂O
- 2 g KH₂PO₄
- 2 g MgSO₄·7H₂O

7,5 g EDTA

După dizolvarea completă a sărurilor, soluția obținută se sterilizează prin filtrare și se păstrează la întuneric. Deși inițial soluția are culoarea verde, după câteva zile devine roșie. Aceasta nu afectează creșterea celulelor.

Plăcile cu mediul LB solid pentru cultivarea de *Escherichia coli* au fost incubate la 37°C peste noapte. Cele pentru cultivarea tulpinilor de *Arthrobacter* conținând mediu mineral citrat au fost incubate la 30°C pentru 48 ore (s-au până la obținerea de colonii distincte).

Pentru cultivarea tulpinilor de *Escherichia coli* în mediu lichid, o colonie de pe o placă cu *E. coli* a fost inoculată în 20 ml de mediu LB (în flacon de 50 ml) conținând antibioticul corespunzător și incubat peste noapte la 37°C sub agitație continuă (190 rpm).

Culturile de *Arthrobacter nicotinovorans* s-au obținut prin inocularea cu o colonie a 100 ml mediu citrat într-un flacon Erlenmayer și incubarea sub agitare continuă (190 rpm) pentru 24 ore la 30°C.

II.1.2. Testarea capacității microorganismului Arthrobacter nicotinovorans de a metaboliza diverse glucide

Testele metabolice în vederea comparării capacității de metabolizare a diverselor glucide de către *Arthrobacter nicotinovorans* cu și fără plasmidul pAO1 s-au realizat urmând indicațiile date de Atlas, 2005 (10) pe un mediu derivat de la mediul citrat standard. Acesta conține 2 g citrat de Na, 2 g (NH₄)₂SO₄, 0,1 mg biotină și 0,018 g roșu-phenol la litru, la care se adugă soluția de minerale conform (63). Mediul solid conține în plus 16 g/L agar. În general, o placă cu mediul solid mai sus menționat a fost inoculată la suprafață prin scaldarea acesteia cu 1 ml mediu dintr-o cultură ajunsă la saturație. Pe o placă au fost testate 4 glucide. Diferite glucide au fost adăugate după inoculare prin plasarea pe mediul solid a unor discuri impregnate cu respectivii compuși (Carbohydrates Differentiation Discs, Fluka, Germania). Plăcile astfel pregătite au fost incubate la 28°C, virajul culorii mediului din roșu în galben după 18 ore fiind considerată reacție pozitivă. După această observație inițială,

plăcile Petri au fost monitorizate pentru încă 30 de ore, la intervale de aproximativ 6 ore.

II.2. Clonarea genelor de interes

În principiu, clonarea unui fragment de ADN într-un vector este un proces simplu ce implică parcurgerea a 3 etape: izolarea fragmentului de interes, clivarea lui și a vectorului cu enzime de restricție și ligarea *in-vitro* a fragmentului în vector. Vectorul recombinat obținut este apoi folosit pentru transformarea celulelor competente.

Am utilizat așa numită clonare direcționată (223) ce presupune digestia fragmentului și a vectorului cu două enzime distincte care generează capete incompatibile. În acest fel, vectorul nu se poate re-circulariza decât dacă între cele două capete se inseră molecula donoare. Această abordare oferă avantajul că, spre deosebire de așa numitul blunt-cloning, modul de inserare al fragmentului în vector este strict coordonat prin alegerea enzimelor de restricție. Fragmentul clonat va avea o orientare foarte precisă în interiorul vectorului recombinat obținut.

II.2.1. Izolarea genelor de interes

Izolarea unor fragmente bine definite din genomul unei specii poate fi un proces destul de dificil și de durată. Cunoașterea secvenței genelor de interes duce la o simplificare deosebită a întregului proces, fiind necesare un minim de 2 etape distincte: amplificare fragmentului de interes prin reacția de amplificare în lanț a polimerazei (PCR) și purificarea lui din amestecul de reacție.

Purificarea fragmentului de interes se poate realiza fie direct, prin utilizarea diverselor truse cu reactivi gata preparați, fie prin intercalarea unei etape de electroforeza în geluri de agaroză, urmată de izolarea ADN-ului din matrix-ul de agaroză.

A. Reacția de amplificare în lanț

În cazul nostru, punctul de plecare al procesului de izolare a genei de interes a fost reacția de polimerizare în lanț (PCR). Aceasta realizează o amplificare foarte puternică a numărului de copii a unei secvențe date. Se realizează de asemenea o amplificare foarte specifică, doar a secvenței de interes, nu și a celorlalte secvențe din genomul din care provine, aceasta reacție ducând astfel și la izolarea fragmentului.

Genele codificând cadrele de citire de interes au fost izolate prin reacția de polimerizare utilizând ca template o suspensie celulară de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+. Secvențele primer-ilor degenerați utilizați au fost alese pe baza secvenței de nucleotide a pAO1 depusă în baza de date Entrez Nucleotide (NCBI) cu indicativul AJ507836. Sinteza primer-ilor s-a realizat în cadrul Institutului de Biologie III, Universitate din Freiburg. O listă cu primerii utilizați este prezentată în tabelul 4.

Tabelul 4. Oligonucleotidele utilizate pentru izolarea cadrelor de citire din acest studiu

Cadru de citire	Secvența primer-ului
<i>nboR</i>	5'-GAAAGGATTGGATCCATGGCAGCAAAATAC-3'
	5'-GTTTGCTGTCGACGCGCGT-3'
<i>gfoR</i>	5'-CTCTGAGGAAGCTTTGACTAAAACAGC-3'
	5'-GGAAGGATGCTCGAGGTCATTAGAGC-3'
<i>aldH</i>	5'-CAGCCATCGTGATCAGCAACAAGG-3'
	5'-GTTGAAGGGTCGACGCTGA GGTAG-3'
<i>kgdH</i>	5'-CGTGACCGAGGATCCAAGGACAGC-3'
	5'-GCTGGTAGGTCGACGGAACGGAATG-3'

Primer-ii au fost aleși în așa fel încât să introducă situs-uri de clivare pentru enzime de restricție, câte unul la fiecare capăt al fragmentului amplificat. Aceste situs-uri au fost amplasate întotdeauna înainte de codonul

START și cel STOP al genei amplificate. Alegerea enzimelor de restricție și localizarea situs-uri de restricție pe primer s-a realizat ținând cont de o serie de factori:

1. enzimele de restricție să fie plasate în situs-ul de clonare multiplu al plasmidului
2. după ligare, gena să păstreze cadrul de citire nativ și acesta să coincidă cu cel al cozii histidinice de pe plasmidul pH6EX3 (vezi sub-capitolul dedicat purificării)
3. să înlăture cât mai mult din situs-ul multiplu de clonare pentru ca proteina recombinată să fie cât mai puțin modificată.
4. să nu taie în secvența de clonat. Pentru aceasta a fost necesară realizarea unor hărți cu situs-urilor de restricție pentru fragmentele clonate. Ele au fost generate cu programul NEBcutter (214)

Pentru amplificare am utilizat enzima PfuTurbo® DNA Polymerase de la Stratagene (USA), livrată împreună cu soluția tampon de reacție. Un amestec tipic pentru reacția de polimerizare propriu-zisă a conținut:

Tampon reacție PfuTurbo (10X), Stratagene	5 μ l
Primer	10 pmoli din fiecare
Amestec dNTP, 10 μ M fiecare nucleotide trifosfat (Roche)	10 μ l
Suspensie celulară <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> pAO1+	1 μ l
PfuTurbo, Stratagene	1 μ l
Apă distilată sterilă	Până la 50 μ l

Amplificare *in-vitro* a fragmentelor ADN s-a realizat cu ajutorul unui aparat termocycler Biometra Tgradient (Goettingen, Germania), iar un program PCR tipic a conținut:

Tabel 5 Etapele programului PCR utilizat

Nr.crt.	Etapă	Timp	Temperatura
1	denaturare	1 minut	95°C
2	hibridare complementară	45 secunde	Variabilă
3	sinteză	variabil	72°C
4	etapele 1 – 3 repetate de 30 ori		
5	terminare	10 minute	72°C

În general pentru determinarea temperaturii de hibridare complementară s-a realizat o tatonare prin utilizarea unui gradient de temperatură, alegându-se temperatura la care amplificarea este foarte specifică și maximă din punct de vedere cantitativ.

B. Izolarea fragmentelor amplificate.

Electroforeza ADN în geluri de agaroză

Fragmentele amplificate au fost separate din amestecul de reacție prin utilizarea electroforezei în geluri de agaroză. Primele protocoale de separare electroforetică a moleculelor de ADN au fost puse la punct de către Thorne (218), iar cele de evidențiere a fragmentelor de ADN pe geluri de către Aaij și Borst (1) și apoi de Sharp (204). Metodologia de separare și evidențiere a ADN-ului a fost foarte intens dezvoltată în anii ce au urmat, sub forma protocolului utilizat de noi urmând indicațiile lui Sambrook și colab. (192) ajungând să fie una dintre cele mai utilizate metode de biologie moleculară.

Separarea ADN-ului prin electroforeză în geluri de agaroză a fost utilizată atât pentru a testa prezența produșilor PCR, pentru a verifica dimensiunile acestora și de asemenea pentru a separa fragmentele amplificate de restul de componente din reacția de PCR.

Materiale:

- soluție tampon TBE 5X – 0,9M Tris, 0,9M acid boric, 10 mM EDTA
- agaroză (Agarose NEEO Ultra Qualitat, Roth, Germania)

- soluție bromură de etidiu 10 mg/ml. Se păstrează la 4°C și întuneric
- soluție tampon de încărcare ADN – 0,25 % albastru de bromfenol, 0,25 % xilen – cianol, 30 % glicerol în apă deionizată.
- cuvă de electroforeză orizontală – geluri cu dimensiunile de 10X20 cm, piepteni cu dimensiunile dinților de 0,5X1 cm.
- Standard de masă moleculară 1 kb DNA Ladder, New England Biolabs GmbH, Germania.

Mod de lucru:

Turnarea gelurilor. Gelurile utilizate au fost aproape întotdeauna de concentrație 0,75% agaroză. 0,35 grame de agaroză au fost transferate într-un flacon Erlenmayer de 100 ml ce conținea 50 ml tampon TBE 1X. Amestecul a fost încălzit la un cuptor cu microunde la putere maximă pentru 2 minute sau până în soluție nu mai erau vizibile granulele de agaroză. S-au adăugat 7 microL soluție bromură de etidiu 10 mg/ml și, după omogenizare, soluția fierbinte a fost transvazată în modulul de turnare a gelului, iar pieptenul amplasat într-o poziție convenabilă. Dacă numărul de probe a fost mare, 2 piepteni au fost amplasați pe gel, unul la aproximativ 1 cm de una dintre extremități și celălalt la jumătatea gelului. Dacă volumul de probă a fost mai mare de 20 microL, câțiva dinți au fost lipiți cu bandă adezivă pentru a forma o bandă cu lățimea de 1 – 3 cm. După răcirea și gelificarea agarozei, gelul a fost imediat utilizat pentru separarea produsilor PCR sau a fost păstrat la frigider în pungi închise ermetic împreună cu câțiva ml de tampon TBE 1X.

Încărcarea probelor. Probele a câte 5 microL soluție rezultată din PCR au fost amestecate cu 5 microL soluție de încărcare geluri și amplasate în godeurile rezultate prin scoaterea pieptenului.

Separarea propriu-zisă. S-a realizat în tampon TBE 1x, la 100 V/gel până la obținerea unei separări satisfăcătoare.

Vizualizarea și excizia benzilor. După terminarea migrării prezența sau absența produsului PCR a fost determinată prin vizualizarea benzilor ADN în ultraviolet. Pentru aceasta s-a folosit o incintă cu transiluminator Vilber-Lourmat. Marker-ul de masă moleculară a fost utilizat pentru aprecierea cantitativă și calitativă (d.p.d.v. al masei moleculare) a fragmentului rezultat prin PCR.

Izolarea din gel a fragmentelor amplificate

După realizarea electroforezei, în vederea utilizării ulterioare, fragmentul de ADN trebuie izolat din matrix-ul de agaroză. Pentru aceasta am utilizat o metodă ce are la bază proprietatea membranelor de siliciu de a lega fragmentele de ADN la concentrații mari de săruri (227).

Materiale:

- trusă de izolare a ADN-ului din geluri de agaroză QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany
- microcentrifugă capabilă de 7,900 x g (13,000 rpm)
- alcool izopropilic
- etanol absolut
- incubator pentru microtuburi Eppi (Eppendorf Thermo Mixer)
- apă deionizată

Mod de lucru:

Pe transiluminatorul UV, purtând echipament de protecție adecvat, banda ADN de interes a fost excizată din gel și transferată într-o micro-eprubetă Eppendorf cântărită în prealabil. S-a determinat masa fragmentului de gel tăiat și s-a procedat conform instrucțiunilor producătorului trusei de extracție, după cum urmează:

2. Peste fragmentul de gel s-au adăugat 3 volume de tampon QG. Spre exemplu, dacă fragmentul are 100 mg, s-au adăugat 300 µl tampon QG.
3. Micro-eprubetele au fost incubate la 50°C pentru 10 min (sau până fragmentul de ADN s-a dizolvat complet)
4. După dizolvarea completă a gelului s-a adăugat 1 volum de izo-propanol
5. Pentru legarea ADN-ului amestecul obținut a fost aplicat pe o coloniță cu membrană de sticlă QIAquick și s-a centrifugat 1 min la 13 000 rpm. Dacă volumul probei a depășit 800 µl, a fost încărcată repetat, în volume de câte 800 µl pe aceeași coloană.
6. Colonița cu membrana de silicagel a fost apoi spălată prin aplicarea a 0.75 ml tampon PE și centrifugarea pentru 1 min.

7. Lichidul rezultat a fost eliminat și colonița a fost centrifugată pentru 1 min la 17,900 x g (13,000 rpm).
8. Colonița QIAquick a fost plasată într-o micro-eprubetă Eppendorf și pe membrană s-au aplicat 30 μl tampon EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) sau apă. Colonița a fost lăsată la temperatura camerei pentru 1 min și apoi centrifugată pentru 1 min.

Gradul de recuperare al fragmentului a fost apoi investigat prin electroforeza în geluri de agaroză. Atunci când reacție de amplificare *in vitro* nu pune nici un semn de întrebare (specificitatea primer-ilor, temperatura de hibridare complementară au fost verificate) etapa de migrare prin gel a fost sărită, soluția rezultată în urma reacției de amplificare a fost utilizată direct, înlocuind gelul din protocolul descris mai sus.

II.2.2. Digestia cu enzime de restricție a vectorului și fragmentelor

În experimentele noastre am utilizat ca vector de clonare plasmidul pH6EX3. Acesta a fost creat în 1991 de către Berthold și colab. (22) prin inserarea unui fragment de ADN între situs-urile *EcoNI* (269) și *EcoRI* (941) ale plasmidului pGEX-2T. În acest fel gena pentru GST a fost înlocuită cu un fragment ce conține o secvență ce codifică o histidin-hexapeptidă, un situs de clivare al trombinei (LVPRGS) și un situs de clonare multiplu (MCS). Harta acestui plasmid este prezentată în figura 18.

Clonarea genelor de interes s-a realizat în situs-ul de clonare multiplu, gena clonată fiind pusă sub controlul promotorului *trp-lac* (*tac*). După situs-ul de clonare se află o puternică secvență de terminare care împiedică obținerea de proteine de fuziune cu secvențele aflate în aval de MCS(22).

Pentru digestia fragmentelor rezultate în urma amplificării și a vectorului s-au utilizat enzime procurate de la New-England Biolabs, care au fost utilizate conform indicațiilor producătorului și ale lui Maniatis și colab.(191). În general un amestec de digestie a conținut:

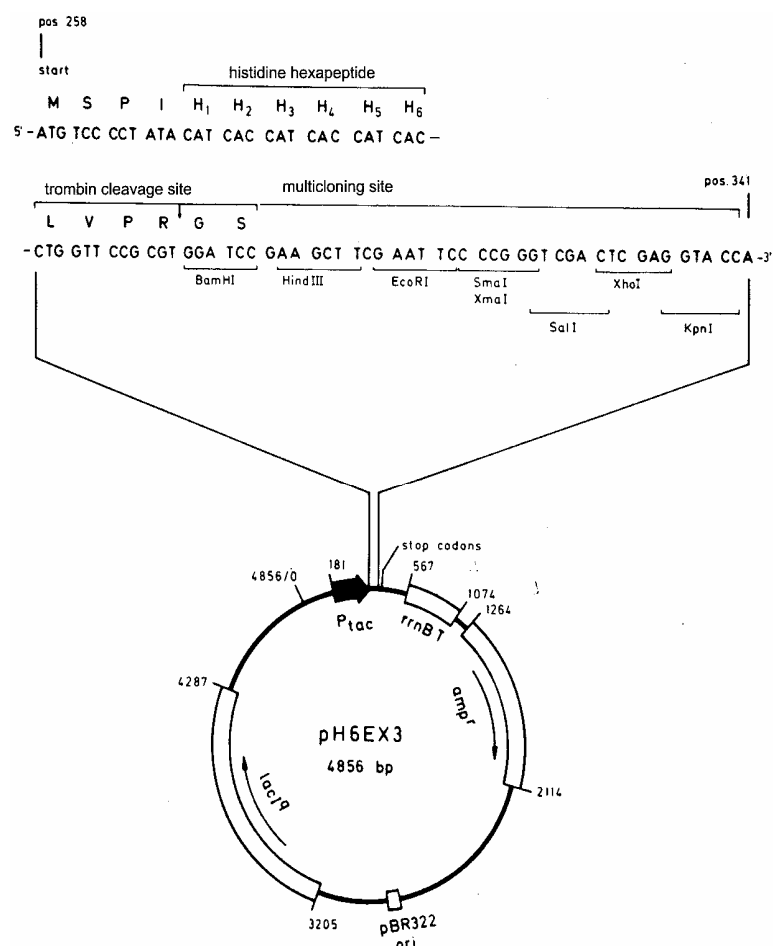


Figura 18. Harta plasmidului pH6EX3 (22)

Tabel 6. Componentele reacției de digestie enzimatică a ADN-ului

Component	Cantitate
Tampon specific 10X (livrat cu enzima)	2,5 μl
Albumină serică bovină 1 μg/μl	2,5 μl
Soluția ADN	1 – 3 μg (în general 10 - 20 μl)
Enzimă	20 unități
Apă sterilă	Până la 25 μl

De cele mai multe ori cele două enzime au permis realizarea de digestii duble, cu ambele enzime simultan și un tampon corespunzător. Digestia s-a realizat pentru 4 ore la temperatura indicată de producător (în general 37°C). Mai multe detalii specifice pentru condițiile utilizate pentru fiecare pereche de enzime de restricție utilizate la clivarea genelor clonate se pot găsi în capitolul de rezultate și discuții.

II.2.3. Ligarea *in vitro* a fragmentelor în vector. Obținerea de celule competente

Ligarea fragmentului în vector s-a realizat utilizând Rapid DNA ligation Kit (Roche) urmărind indicațiile producătorului. Așa cum și alți autori recomandă (191) s-a încercat păstrarea unui raport fragment: vector de 1:3. După reacția de ligare *in vitro* amestecul obținut a fost utilizat pentru transformarea celulelor de *E.coli* XL1Blue competente. Pentru transformarea propriu-zisă 200 μ l de celule preparate după metoda prezentă mai jos au fost amestecate cu 10 μ l amestec de ligare și incubate pe gheață pentru 30 minute. Amestecul obținut a fost plasat pe plăci cu mediu LB cu ampicilină și acestea incubate peste noapte la 37°C.

A doua zi, coloniile dezvoltate (colonii descendente ale unor celule purtătoare ale plasmidului pH5EX3 recombinat) au fost repicate pe plăci LB cu ampicilină câte aproximativ 12 colonii /placă. Au fost incubate încă 24 ore la 37°C pentru dezvoltare și apoi biomasa obținută utilizată pentru verificarea clonelor (sub-capitolul următor)

Obținerea de celule competente de Escherichia coli. Pentru obținerea de celule competente de *Escherichia coli* s-a utilizat trusa de reactivi Roti®-Transform, Roth, Germania. Aceasta induce o competență chimică prin utilizarea unor detergenți ce produc o liză parțială a peretelui celular bacterian.

Obținerea de celule competente s-a realizat urmărind etapele de mai jos:

1. 300 microL dintr-o precultură în vârstă de 12 ore (crescută peste noapte) de *Escherichia coli* în mediu LB cu antibioticul corespunzător a fost utilizată pentru inocularea a 30 ml mediul LB.
2. Cultura astfel înființată a fost menținută sub agitare la 37°C până când densitatea optică la 600 nm a atins 0,4 – 0,7.
3. Celulele din 10 ml cultură microbiană au fost recuperate prin centrifugare în recipiente sterile la 4000 rpm/20 min și resuspendate în 500 microL mediu LB.
4. Suspensia celulară a fost transferată în micro-eprubete Eppendorf

- sterile și s-au adăugat 450 microL reactiv Roti-Transform I rece. Micro-eprubeta a fost agitată agitată prin răsturnare de câteva ori
5. s-au adăugat 50 microL reactiv Roti-transform II și componentele au fost omogenizate prin răsturnarea micro-eprubetei de câteva ori
 6. 180 microL din suspensia celulară obținută s-au transferat în micro-eprubete de 0,5 ml răcite în prealabil și menținute pe gheață pentru 5 minute.
 7. Micro-tuburile conținând suspensia de celule competente au fost păstrate la -80°C până la utilizare.

II.2.4. Verificarea corectitudinii clonării

Deși există numeroase artificii ce se pot realiza pentru a se asigura obținerea cu succes a moleculelor ADN recombinat, procesul nu este 100% ferit de erori. Este suficient spre exemplu, ca una dintre enzimele de restricție să nu realizeze clivarea în situs-ul specific și vectorul se poate re-circulariza, conferind celulelor de *E. coli* rezistență la ampicilină fără a conține fragmentul de interes. De aceea este necesară punerea la punct a unor metode și modalități care să permită selecția coloniilor ce conțin vectorul recombinat. Metoda utilizată de noi constă în purificarea vectorului și digestia lui cu enzime de restricție care să îl cliveze în fragmente de dimensiuni cunoscute. Apariția numărului de fragmente se dimensiunile presupuse indică o potențială clonă pozitivă (191). Pentru siguranță, acolo unde a fost cazul, plasmidul recombinat a fost secvențiat în zona situs-ului multiplu de clonare.

Propriu-zis, am realizat un screening inițial prin prepararea ADN-ului plasmidial a 10-20 de colonii potențial recombinat utilizând metoda lizei alcaline descrise de Sambrook și colab. (191) și modificată de noi (156). Plasmidele au fost supuse digestiei enzimatice cu enzime ce flanchează fragmentul, apariția unui fragment de dimensiunile așteptate a indicat o potențială clonă.

A. Prepararea ADN-ului plasmidial prin metoda lizei alcaline

Metoda a fost descrisă pentru prima dată de Birnboim și Doly (23) și a fost intens dezvoltată până s-a ajuns la forma finală, cea descrisă de Sambrook și colab. (191). Poate fi împărțită în două etape distincte: liza celulară și precipitarea selectivă a ADN-ului plasmidial, urmată apoi de precipitarea ADN-ului cu solvenți organici.

Celulele bacteriene sunt lizate prin acțiunea NaOH (denaturează ADN-ul), și SDS-ului (denaturează proteinele), în vederea eliberării conținutului celular. Soluția obținută este neutralizată rapid, ceea ce face ca ADN-ul cromozomial, proteinele și SDS-ul să precipitate. Componentele insolubile sunt eliminate prin centrifugare. ADN-ul plasmidial, datorită dimensiunilor mici, se re-naturează și își păstrează solubilitatea, fiind astfel separat de componentele celulare. Din supernatant, ADN-ul plasmidial este recuperat prin precipitare cu etanol.

Datorită simplității sale se pot procesa 10-20 de tulpini simultan, astfel încât poate fi utilizată pentru o selecție preliminară rapidă a tulpinilor recombinante.

Materiale:

- soluție P1 – 50 mM Tris , 10 mM EDTA pH 8.0, RN-ază 100 microg/microL. Se păstrează la 4°C
- soluție P2 - 0,2N NaOH, 1% SDS
- soluție P3 - Acetat de potasiu 3M, pH 5,5 cu acid acetic
- etanol 95% și 70%
- micro-eprubete de 1.5 ml
- micro-centrifugă
- concentrator centrifugal cu vacuum - SpeedVac concentrator, Eppendorf

Mod de lucru:

1. De pe plăcile Petri pregătite în etapa anterioară, în vârstă de aproximativ 12 ore cu ajutorul unei anse s-a prelevat suficient material pentru a umple bucla ansei.
2. Materialul a fost re-suspendat în 100 μ l tampon P1
3. S-au adăugat 200 μ l soluție tampon P2 și s-a omogenizat prin

răsturnarea de câteva ori a micro-eprubetei. Realizarea completă a lizei celulare a fost marcată de clarificarea suspensiei celulare.

4. S-au adăugat 150 μ l soluție tampon P3 și imediat micro-eprubeta a fost răsturnată pentru omogenizare de câteva ori. Un precipitat alb, conținând proteinele și ADN-ul cromozomial s-a format. Pentru a asigura precipitarea completă, micro-eprubeta a fost incubată 10 min. pe gheață
5. Precipitatul a fost separat prin centrifugare 10 min. la 13 000 rpm, iar supernatantul a fost transferat într-o nouă micro-eprubetă
6. ADN-ul plasmidial din supernatantul clar a fost precipitat prin adăugarea a 1 ml etanol absolut rece și incubarea 10 min în azot lichid. Rezultate la fel de bune s-au obținut și prin incubarea pentru 30 minute într-un congelator la -20°C sau la temperatura camerei.
7. Micro-eprubeta a fost centrifugată 10 min la 13 000 rpm pentru depunerea ADN-ului plasmidial.
8. Precipitatul depus a fost spălat cu 1000 μ l etanol 70% și re-centrifugat pentru 10 min la 13000 rpm. După eliminarea supernatantului, precipitatul a fost uscat la 45°C pentru 20 minute folosind concentratorul centrifugal cu vacuum - SpeedVac
9. ADN-ul obținut a fost apoi re-suspendat în 25 μ l apă deionizată.

Soluția de ADN obținută a fost analizată prin electroforeză pe geluri de agaroză pentru a stabili dacă a fost izolat plasmidul și apoi folosită pentru digestii enzimatice.

B. Digestia vectorului recombinat cu enzime de restricție

Pentru verificarea potențialelor clone, ADN-ul preparat în etapa anterioară a fost supus digestiei cu enzime de restricție urmând instrucțiunile prezentate anterior. Enzimele utilizate au fost de cele mai multe ori cele folosite și pentru clonarea, astfel încât au realizat excizia fragmentului din vector. Amestecul de reacție a fost apoi analizat prin electroforeză în agaroză și vizualizat la ultraviolet. Prezența a două benzi, una de masă moleculară mare, corespunzătoare vectorului liniarizat și alta mică, corespunzătoare fragmentului a indicat o clonă potențial pozitivă.

Ulterior, din coloniile testate potențial pozitive s-au selectat 2-3 și a fost extras ADN-ul plasmidial prin folosirea unei truse de reactivi de la Qiagen. Acesta permite obținerea unui ADN de o calitate mai bună, în cantitate mai mare și permite realizarea unor digestii enzimatice mai complete.

C. Prepararea ADN-ului plasmidial cu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

Trusa de reactivi de la Qiagen se bazează tot pe liză alcalină precum metoda de mai sus, dar pentru recuperarea ADN-ului din supernatantul clar folosește colonițe cu membrane de siliciu. Metoda a fost utilizată oricând a fost necesară prepararea de ADN plasmidial de puritate mare (atât pentru digestii, cât și pentru transformări)

Materiale:

- QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen
- microcentrifugă
- 5 -10 ml de cultură de *E. coli* ajunsă la saturație (crescută peste noapte la 37°C)

Mod de lucru:

1. Cultura bacteriană a fost centrifugată pentru 20 min la 4000 rpm într-o centrifugă cu răcire pentru recuperarea celulelor de *E. Coli*.
2. Depozitul a fost resuspendat în 250 µl soluție tampon P1 și transferat într-o micro-eprubetă Eppendorf.
3. Au fost adăugați 250 µl soluție tampon P2 și s-a omogenizat prin răsturnarea micro-eprubetei de câteva ori. Liza celulelor este indicată de clarificare suspensiei celulare. Nu s-a permis ca această etapă de liză să depășească 5 minute.
10. S-au adăugat 350 µl soluție tampon N3 și imediat micro-eprubeta a fost răsturnată pentru omogenizare de câteva ori. Un precipitat alb, conținând proteinele și ADN-ul cromozomial s-a format. Pentru a asigura precipitarea completă, micro-eprubeta a fost incubată 10 min. pe gheață
11. Depozitul format a fost separat prin centrifugare 10 min. la 13 000 rpm. Supernatantul obținut a fost aplicat pe o coloniță cu membrană de siliciu

QIAquick și s-a centrifugat 1 min. la 13 000 rpm.

12. Colonița cu membrana de silicagel a fost apoi spălată prin aplicarea a 0.75 ml tampon PE și centrifugarea pentru 1 min.
13. Lichidul rezultat a fost eliminat și colonița a fost rec-entrifugată pentru 1 min la 17,900 x g (13,000 rpm).
14. Colonița cu membrană de siliciu QIAquick a fost apoi plasată într-o micro-eprubetă Eppendorf și pe membrană s-au aplicat 30 μl apă deionizată. Colonița a fost lăsată la temperatura camerei pentru 1 min și apoi centrifugată pentru 1 min. Soluția conținând ADN-ul plasmidial a fost recuperată și utilizată pentru digestia enzimatică sau păstrată la -80°C.

ADN-ul preparat a fost utilizat pentru o nouă serie de reacții de restricție sau pentru secvențiere. În reacțiile de digestie, au fost utilizate mai multe enzime în diverse combinații. Acestea au fost selecționate în așa fel încât pe de o parte să excizeze fragmentul din vector, pe de altă parte să cliveze în vector o dată și în fragment o dată. Apariția pe gel a fragmentelor cu masele moleculare deduse teoretic a fost suficientă pentru a considera colonia pozitivă. Detalii privind combinația de enzime și dimensiunile fragmentelor obținute pentru fiecare genă clonată pot fi găsite în capitolul cu rezultate. Această abordare a fost utilizată cu succes de Sachelaru și colab.(190) pentru identificarea coloniilor pozitive în cazul clonării genei *mobA*.

D. Secvențierea plasmidelor recombinanți

La sfârșitul anilor 70, atunci când metodele de determinare a secvenței ADN-ului au fost dezvoltate, secvențierea ADN-ului era privită cu neîncredere și considerată ca fiind o investigație strict descriptivă, care nu aduce nimic nou, deci ne-intelectuală (83). Acest mod de a privi lucrurile s-a schimbat și majoritatea cercetătorilor sunt de acord că secvența nucleotidelor în molecula de ADN este un aspect indispensabil al muncii lor. Inovațiile tehnologice introduse au dus la automatizarea din ce în ce mai mare a procesului și au făcut ca secvențierea ADN-ului să devină o tehnică mult mai accesibilă.

Cele două metode originale publicate în 1977 ((143; 194)) diferă destul de în principiul de funcționare. Metoda lui Sanger (197) constă în așa numită

metodă enzimatică sau de terminare cu dideoxinucleotide și implică sinteza unei catene ADN de pe o matriță monocatenară cu ajutorul ADN-polimerazei. Metoda lui Maxam și Gilbert (146) numită și metoda degradării chimice implică degradarea ADN-ului original utilizând patru tipuri diferite de reacții. În ambele metode rezultă populații de polinucleotide marcate radioactiv ce încep dintr-un punct fix (capătul marcat radioactiv) și se termină la o anumit tip de bază (A,T,G,C) din ADN-ul original. Polinucleotidele sunt apoi separate prin electroforeză în geluri de poliacrilamidă, și ordinea bazelor în ADN-ul original poate fi citită direct prin autoradiografie(16).

Metoda utilizată de noi folosește principiul metodologiei de secvențiere enzimatică cu dideoxinucleotide al lui Sanger, dar utilizează un alt sistem de separare și detecție. Metoda se numește *dye-terminator sequencing* deoarece nu primer-ul este marcat, ci dideoxinucleot-trifosfații utilizați. Marcarea este una fluorescentă, fiecare dintre cei 4 dideoxinucleotizi (dATP, ddGTP, ddCTP, or ddTTP) fiind cuplați cu un alt marker fluorescent, fiecare cu alte lungimi de undă pentru fluorescență și emisie. Acest lucru ușurează mult reacția de secvențiere, nefiind necesare realizarea a 4 reacții diferite (ca în metoda Sanger clasică), ci una singură. Populațiile de polinucleotide rezultate în urma reacției de amplificare au fost separate apoi prin electroforeză capilară într-un sistem automat de secvențiere, iar detectarea lor s-a realizat la 4 lungimi de undă diferite, corespunzătoare celor 4 nucleotide.

Deoarece s-a urmărit verificarea corectitudinii clonării a diverselor gene în același plasmid, primer- ul este unul specific pentru pH6EX3, a avut secvența 5'-CAATTAATCATCGGCTCGTATAAT-3' și se leagă în zone imediat dinaintea situs-ului multiplu de clonare (figura. 19)

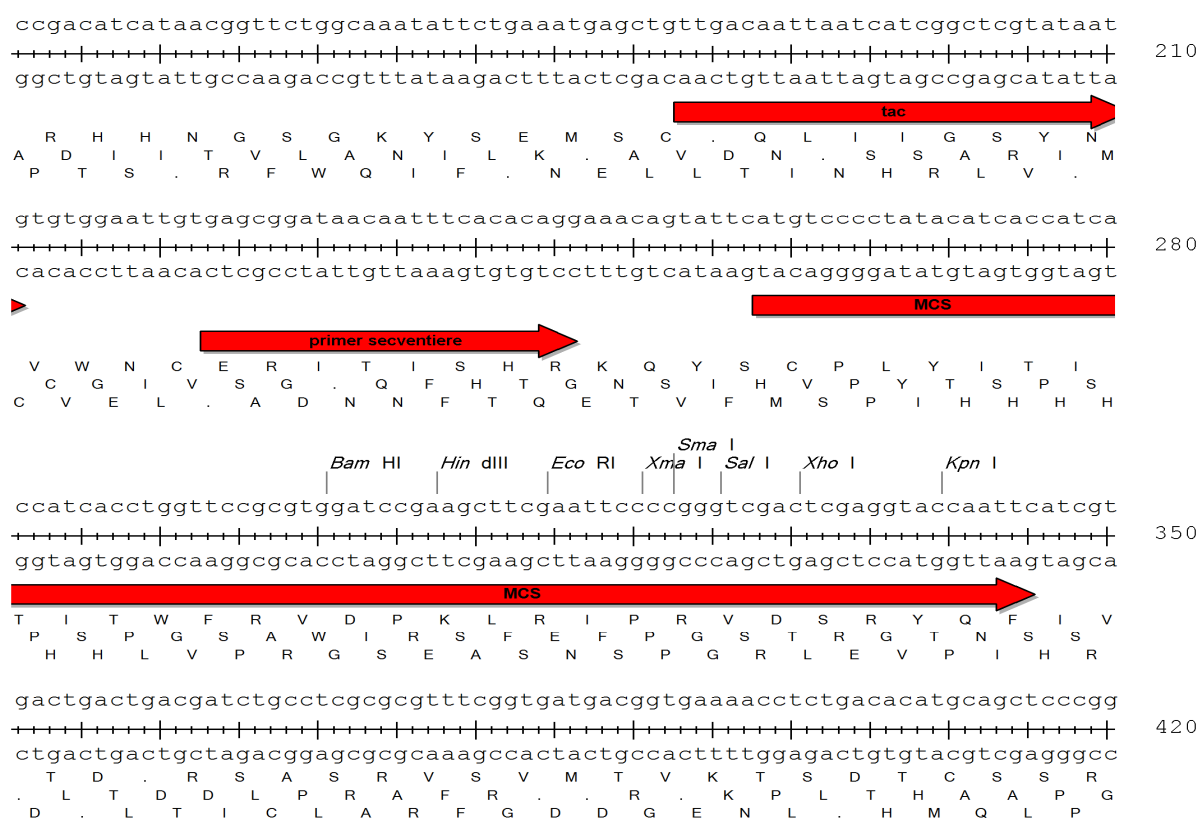


Figura 19. Localizarea în secvența plasmidului pH6EX3 a primer-ului utilizat pentru secvențiere

Materiale:

- spectrofotometru pentru micro-volume ATCGene ASP-3700
- sistem de secvențiere prin electroforeză capilară CEQ8000, Beckman Coulter
- trusă de reactivi pentru secvențiere GenomeLab Methods Development, Beckman Coulter
- concentrator centrifugal CentriVap DNA Centrifugal Vacuum Concentrator, Labconco
- termocycler PalmCycler cu gradient, Corbett
- ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)
- mediu LB steril repartizat câte 20 ml în flacoane de 100 ml
- ampicilină 50 mg/ml
- agitator orbital termostatat GFL 3033
- microcentrifugă Biofuge Fresco

- primer cu secvența SecventTAC 5'-CAATTAATCATCGGCTCGTATAAT-3'

Mod de lucru:

- 20 de ml de mediu LB steril suplimentat cu 50 µg/ml ampicilină au fost inoculați cu câte o colonie din tulpina de interes
- culturile au fost incubate peste noapte, la 37°C, sub agitare 190 rpm/min
- 3 ml de cultură saturată au fost centrifugați de 2 ori într-o micro-eprubetă la 13000 rpm/ 3 minute iar ADN-ul plasmidial a fost extras folosind trusa de reactivi illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) urmând instrucțiunile producătorului. Eluția s-a realizat în 100 µL tampon de eluție
- concentrația ADN-ului a fost stabilită folosind ATCGene ASP-3700.țiere s-a folosit trusă de reactivi GenomeLab Methods Development și s-a pregătit un amestec de reacție master conținând:

	Volum pentru o reacție de secvențiere
Tampon de reacție 10 x	2 µL
Amestec dNTP	1 µL
ddATP	2 µL
ddGTP	2 µL
ddCTP	2 µL
ddTTP	2 µL
Primer (10 µM)	0,5 µL
Taq	1 µL

- În vederea obținerii ADN-ului monocatenar, 7,5 µL din soluția conținând ADN-ul plasmidial (25-100 fmoli ADN dublucatenar) au fost amplasați într-o eprubetă pentru PCR și încălziți incubați pentru 5 min la 65°C, apoi răciți rapid la temperatura camerei în termocycler,
- Peste ADN-ul tratat termic au fost adăugați 12,5 µL de amestec de reacție și apoi realizată reacția de secvențiere în termocycler, folosind un program ce cuprinde:

Etapa	Temperatura	Timp
Denaturare	96°C	20 sec.
Legarea primer-ului	50°C	20 sec.
Sinteza	60°C	4 min.

Ciclul alcătuit din cele 3 etape mai sus enumerate a fost repetat de 30 ori. Amestecul de reacție a fost transferat în micro-tuburi de 0,2 ml și polinucleotidele rezultate în urma amplificării au fost precipitate cu etanol 95% în prezența glicogenului urmând instrucțiunile producătorului trusei de reactivi pentru secvențiere. Pentru separarea precipitatului, eprubetele au fost centrifugate la 14000 rpm pentru 10 minute

- Depozitul, reprezentat din polinucleotidele sintetizate a fost spălat de două ori cu etanol 70% și apoi uscat folosind concentratorul cetrifugal cu vacuum (10 min la 45°C)
- După uscarea completă a depozitului, acesta a fost resuspendat în tampon pentru probe (din trusa de reactivi) și încărcat în placa de probe a secvențiatorului CEQ8000. Separarea s-a realizat la 1,4 kV pentru 180 minute. Semnalele rezultate au fost achiziționate și prelucrate folosind pachetul software CEQ8000 Software.

II.3. Expresia și purificarea proteinelor recombinat

Purificarea proteinelor în formă activă a rămas o problemă deosebit de spinoasă a biochimiei(44; 46), în principal datorită variabilității foarte mari a proprietăților fizico-chimice a acestor molecule. Aceasta nu permite realizarea unei metodologii unitare, aplicabilă pentru toate moleculele proteice. De cele mai multe ori este necesară utilizarea în serie a unor tehnici de purificare care se bazează pe proprietăți distincte pentru a se atinge gradul de purificare dorit, tehnici ce reduc mult randamentul de recuperare. Dacă se ține cont și de faptul că unele molecule proteice nu sunt foarte abundente, se observă că o a doua problemă a purificării proteinelor este disponibilitatea lor în cantități suficiente.

Dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară, în special cele de izolare și manipulare a ADN-ului au permis însă o nouă abordare a rezolvării acestor probleme. Genele ce codifică proteinele de interes sunt puse sub controlul unui promotor puternic și li se conferă proprietăți cunoscute, care să ușureze efortul necesar obținerii de preparate pure.

Schema metodologiei abordate de noi este una simplă: proteina de interes a fost clonată în vectorul de expresie pH6EX3 sub controlul

promotorului *tac*, expresia ei fiind indusă prin adăugarea de IPTG în mediul de cultură. Clonarea genelor s-a realizat în așa fel încât să fie în același cadru de citire cu o hexapeptidă conținând His, proteina obținută fiind una recombinată cu afinitate pentru Ni^{2+} . Pe baza acestei proprietăți ea este purificată din extractul celular într-o singură etapă.

II.3.1. Supra-expresia proteinelor în Escherichia coli

Clonarea genelor de interes în vectori de expresie și punerea lor sub controlul unui promotor puternic permite producerea proteinelor codificate de aceste gene în gazde precum *Escherichia coli*(36; 180) . Prin alegerea unui promotor a cărei activitate este cunoscută și ușor de indus apare un avantaj foarte mare: sinteza proteinei poate fi „ordonată” la momente de timp strict controlate și de asemenea, cantitatea de proteină obținută poate fi extrem de mare comparativ cu gazda nativă.

În lucrarea de față am utilizat ca vector de clonare și de expresie plasmidul pH6EX3. Clonarea genelor în MCS pune aceste gene sub controlul promotorului *tac*. Acesta este un promotor puternic, obținut prin fuzionarea regiunii -35 de la promotorul operonului responsabil de calea de sinteză a triptofanului cu regiunea -10 de la operonul *lac* 5 (53; 180). Este capabil să inducă expresia genei țintă într-o asemenea măsură încât aceasta se acumulează în proporție de 20-30% din proteinele totale. Vectorii de expresie care au acest promotor poartă de asemenea și gena *lacO* și *lacI*. Acestea sunt necesare deoarece în lipsa lor ar avea loc expresia genei de interes în lipsa inductorului, numărul de molecule de represor produse de copia cromosomală a genei *lacI* nefiind suficiente pentru a repressa numărul mare de promotori existenți datorită plasmidelor(180; 205). Expresia genei de interes poate fi indusă cu lactoză sau cu un compus similar ne-metabolizabil: IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosid).

Inițial, clonele obținute în etapa anterioară au fost testate privind exprimarea proteinei de interes în două medii distincte: utilizând metoda clasică cu inducție cu IPTG descrisă de Ausubel și colab. (13) și de asemenea utilizând mediul autoinductibil descris de Studier (212). Procesul de expresie a fost monitorizat prin electroforeză SDS-PAGE urmând protocolul descris de

Sambrook și colab. (191) și utilizat cu succes de Studier (212). S-a realizat astfel o selecție a tulpinilor producătoare de proteină recombinată, a mediului și momentul optim de recoltare a celulelor pentru obținerea cantității maxime de proteină recombinată. Tulpina, mediul și condițiile specifice selectate în acest fel au fost utilizate oricând a fost necesară producerea de noi cantități de proteină recombinată.

Inducerea supraexpresiei cu IPTG

Materiale:

- cultură saturată (aproximativ 12 ore) cu tulpina de *E.coli* purtătoare a plasmidului recombinat
- mediul de cultură LB (10g NaCl, 10 g peptonă, 5 g extract de drojdii per litru)
- soluție IPTG 1M
- ampicilină 50 mg/ml
- agitator orbital termostatat.
- tampon probe SDS-PAGE - DTT 50 mM , SDS 2%, albastru de bromfenol 0,1% , glicerol 10 %
- termostat capabil să realizeze 95°C
- spectrofotometru

Mod de lucru:

- 10 ml din cultura saturată au fost utilizați pentru a inocula 1000 ml mediu LB (diluție 1:100) cu ampicilină (50 microg/ml). Cultura obținută a fost incubată la 37°C sub agitare (190 rpm)
- la fiecare oră densitatea optică la 600 nm a fost determinată față de mediu LB neinoculat.
- Când densitatea optică a culturii a atins 0,6 s-a realizat inducția culturii prin adăugarea a 1 ml IPTG 1M (concentrația finală în cultură 1 mM IPTG). Temperatura a fost scăzută la 30°C. De asemenea, 1 ml de cultură au fost centrifugați la 13 000 rpm/ 1 min pentru recuperarea celulelor. Depozitul a fost resuspendat în 100 microL tampon probe SDS-PAGE, incubat pentru 10 minute la 95°C și păstrat la -20°C până la procesare.
- La intervale regulate de 1 oră, probe de câte 1 ml au fost prelevate și procesate ca în etapa anterioară. Volumul de tampon probe SDS-PAGE utilizat pentru re-suspensia celulelor a variat în așa fel încât 10-20

microL tampon să conțină 0,08 unități de densitate optică.

- În general, după 6 ore de incubare expresia a fost extrem de puternică, cantitatea de proteină recombinată fiind foarte mare. Celulele au fost recuperate prin centrifugare la 4000 rpm/ 20 minute, procesate imediat sau păstrate la -20°C.
- Probele recoltate în timpul incubării au fost analizate prin electroforeza SDS-PAGE. Pentru aceasta, un volum conținând echivalentul a 0,08 unități optice a fost încărcat pe un gel de poliacrilamidă de 12% și procesat urmând indicațiile de la subcapitolul dedicat SDS-PAGE.

Supraexpresia proteinelor recombinat utilizând mediul autoinductibil

Două au fost motivele care ne-au motivat să căutăm o cale alternativă de expresie a proteinelor. Unul dintre acesta este faptul că, după cum am văzut, protocolul de expresie pe mediu LB presupune inducerea pentru 6 ore urmată de colectarea celulelor. Această abordare nu ne convine foarte mult, deoarece presupune de cele mai multe ori înghețarea celulelor până a doua zi când sunt procesate. Motivul cel mai puternic care ne-a motivat să căutăm un sistem alternativ de expresie este însă costul mare de achiziție al IPTG-ului.

Un asemenea sistem a fost propus pentru prima dată de Sreenath și colab. (206), și constă dintr-un mediu de creștere complex având la bază tampon fosfat, conținând glicerol și un anumit raport de glucoză/lactoza. Un studiu mai amplu al parametrilor ce influențează creșterea microorganismelor și expresia proteinelor a fost realizat de Studier (212). Avantajele pe care acest sistem le oferă au dus la apariția unor produse comerciale disponibile la EMD Biosciences (USA) care au fost comparate de către Grabski (80).

Principiul de funcționare este unul relativ simplu: tamponul fosfat are rolul de elimina aciditatea produsă prin creșterea microorganismelor, glucoza funcționează ca o sursă de carbon și asigură în același timp represia promotorului *lac* după mecanismul binecunoscut (10; 38; 45), iar lactoza asigură inducția promotorului *lac*. Ținând cont de faptul că microorganismul va consuma prima dată glucoza (74) și apoi lactoza, prin raportul dintre cei doi compuși se poate controla momentul inducției (prin cantitatea de glucoză) și intensitatea acesteia (prin lactoza).

Materiale:

- cultură saturată (aproximativ 12 ore) cu tulpina de *E.coli* purtătoare a plasmidului recombinat în mediu LB
- soluție 20 X P – 5,8 g Na_2HPO_4 , 20,6 g NaH_2PO_4 și 6,11(NH_4) SO_4 în 100 ml apă, sterilizată prin autoclavare
- soluție 50 X MgSO_4 - 24,6 g MgSO_4 în 100 ml apă, sterilizată prin autoclavare
- soluție 25 X 5052 – 5 ml glicerol, 0,25 g glucoză și 2 g fructoză în 100 ml apă, sterilizată prin autoclavare
- soluție ZYP – 10 g NaCl, 10 g peptonă, 5 g extract de drojdii în 900 ml apă, sterilizată prin autoclavare
- ampicilină 50 mg/ml
- agitator orbital termostatat
- tampon probe SDS-PAGE - DTT 50 mM , SDS 2%, albastru de bromfenol 0,1% , glicerol 10 %
- termostat capabil să realizeze 95°C
- spectrofotometru

Mod de lucru:

- înainte de utilizare, mediul de cultură a fost reconstituit prin adăugarea în 900 ml soluție ZYP 40 ml soluție 25 X 5052, 20 ml soluție 50 X MgSO_4 și 50 ml soluție 20 X P, 1 ml ampicilină 50 mg/ml
- 50 ml din cultura saturată au fost utilizați pentru a inocula 1000 ml mediu reconstituit (diluție 1:20). Cultura obținută a fost incubată la 37°C sub agitare.
- la fiecare oră densitatea optică la 600 nm a fost determinată față de mediu LB neinoculat.
- la fiecare citire a densității optice, 1 ml de cultură au fost prelevați și centrifugați la 13 000 rpm/ 1 min pentru recuperarea celulelor. Depozitul a fost resuspendat într-un volum de soluție tampon SDS-PAGE ales în așa fel încât 10-20 microL tampon să conțină 0,08 unități de densitate optică, incubat pentru 10 minute la 95°C și păstrat la -20°C până la procesare.
- în general, după 24 ore de incubare expresia a fost extrem de puternică,

cantitatea de proteină recombinată fiind foarte mare. Celulele au fost recuperate prin centrifugare la 4000 rpm/ 20 minute, procesate imediat sau păstrate la -20°C.

Probele recoltate în timpul incubării au fost analizate prin electroforeza SDS-PAGE. Pentru aceasta, un volum conținând 0,08 unități optice a fost încărcat pe un gel de poliacrilamidă de 12% și procesat urmând indicațiile de la subcapitolul dedicat SDS-PAGE.

II.3.2. Purificarea proteinelor recombinat prin cromatografie de afinitate pentru metale imobilizate

După cum am văzut tehnicile de manipulare a ADN-ului oferă căi specifice de control a expresiei unei proteine de interes și de amplificare a abundenței acesteia. Aplicabilitatea vectorilor de expresie nu se oprește doar aici. Ei permit de asemenea modificarea specifică a proprietăților proteinelor, în vederea dobândirii de proprietăți noi, utile din punct de vedere practic.

Una dintre cele mai utilizate abordări în această direcție este cea de fuzionare a proteinei de interes cu o secvență de aminoacizi ce conferă acesteia afinitate față de suporturi imobilizate. De cele mai multe ori această secvență este amplasată la capătul N sau C terminal, de aceea poartă numele de coadă (tag). Câteva exemple de asemenea cozi ar fi:

- Poli-Arg – conferă afinitate față de cationi
- Poli-His – conferă afinitate față de Ni²⁺ sau Co²⁺
- Chitin-binding domain – conferă afinitate față de chitină
- Glutathion S-transferaze – conferă afinitate față de glutation
- Maltose-binding protein – conferă afinitate față de maltoză (217)

În cadrul acestui studiu, toate proteinele au fost fuzionate cu o hexapeptidă poli-histidinică. Aceasta este alcătuită din un număr de 6 reziduuri de histidină, fiind o coadă intens folosită într-un număr mare de laboratoare datorită avantajelor pe care le are. În primul rând dimensiunile deosebit de mici fac ca modificările induse asupra structurii secundare și terțiare a proteinei de interes să fie minime.

Avantajul cel mai mare este însă faptul că întregul proces de purificare se

reduce la o singură etapă, care constă în legarea proteinei recombinante de coloane cu Ni^{2+} sau Co^{2+} imobilizat. De asemenea, demn de remarcat este că interacțiunea cu ionul metalic este independentă de structurile proteice secundare, fiind posibilă și purificarea în condiții denaturante (de exemplu 8M uree). Acest aspect este important, fiind astfel posibilă recuperarea unor proteine insolubile (84). Coada poate fi plasată fie în capătul N-terminal sau C-terminal, sau, dacă este cunoscut faptul că partea centrală a proteinei nu este importantă pentru funcție, chiar la acest nivel (240).

Această tehnică de purificare a fost descrisă pentru prima dată de Porath și colab. (176) și a primit numele de cromatografie de afinitate pentru metale imobilizate (IMAC). Ionul unui metal tranzițional (Co, Cu, Zn sau cel mai frecvent Ni) este imobilizat pe o matrice inertă. Aceasta trebuie să fie puternic hidrofilă, inertă din punct de vedere chimic și rezistentă la atacul microorganismelor.

Supportul cromatografic folosit de noi a fost reprezentat din particule de agaroză de 90 micrometri pe care sunt fixate grupările chelatante. Produsul este comercializat de GE Healthcare, fiind cunoscut sub numele de High-Performance Nickel-chelating Sepharose. Protocolul utilizat pentru purificarea propriu-zisă este unul adaptat după instrucțiunile producătorului și după etapele propuse de (12), fiind folosit cu succes pentru purificarea unor alte proteine recombinante (15); (40); (41); (195). Protocolul utilizat presupune realizarea a unor etape distincte: obținerea extractului aceluilar, regenerarea colonei, purificarea propriu-zisă, desalinizarea și verificarea purității.

A. Obținerea extractului aceluilar

Materiale:

- soluție tampon HEPES 40 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4
- lizozim (facultativ)
- cultura bacteriana la supraexprimând proteina de interes
- sonicator

Mod de lucru

- cultura bacteriană (1 L) supraexprimând proteina de interes a fost centrifugată pentru 10 minute la 4500 rpm în vederea recuperării

celulelor

- depozitul a fost resuspendat soluție tampon HEPES 40 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4, 10 ml soluție tampon / 1 g depozit celular
- s-a adăugat lizozim până la concentrația finală de 1 mg/ml și s-a incubat pe gheață pentru 1 oră*
- Soluția obținută a fost sonicată în 2 reprize de câte 2 minute pe gheață atunci când s-a utilizat un sonicator Branson S-450A Sonifier la puterea maximă sau 3 reprize de câte 2 minute atunci când s-a utilizat un sonicator Sonopuls HD 2070 (Bandelin electronics, Berlin, Germany) la 75% putere, 8 cicluri/s.
- Extractul total obținut a fost clarificat de reziduurile celulare insolubile prin centrifugare la 14500 rpm pentru 30 minute
- supernatantul clar obținut a fost utilizat ca sursă de enzimă.

*etapa a fost omisă în cazul utilizării sonicatorului Branson S-450A fără efecte negative asupra randamentului purificării

B. Regenerarea și pregătirea coloanei cromatografice

Suportul cromatografic utilizat a fost Ni-Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Bioscience, Freiburg, Germany. Acesta este menținut ca o suspensie 40% în alcool etilic 20% la frigider. 5 ml din suspensie au fost a pipetați într-o coloană din plastic pentru a obține un volum al suportului de 2 ml (CV).

Protocolul de regenerare a coloanei a constat din următoarele etape:

Tabel 7 Etapele urmate pentru pregătirea coloanei cu Ni-Sepharose 6 Fast Flow

Soluție	Volum	Rol
Apă distilată	10 CV	Eliminare resturilor de etanol
EDTA 0,05 M, NaCl 0,5 M	10x CV	Eliminarea ionilor de Ni ²⁺
NaCl 0,5 M	2-3x CV	Eliminarea proteinelor legate pe bază de interacțiuni ionice
NaCl 1M*	1x CV	
NaOH 2M	10x CV	Eliminarea proteinelor precipitate

		și a lipoproteinelor
Etanol 70%	10x CV	Eliminarea lipoproteinelor, lipidelor și a proteinelor legate prin interacții hidrofobe.
Apă distilată	10x CV	Eliminarea etanolului rezidual
NiCl ₂ 150 mM	4x CV	Reîncărcarea coloanei cu ioni de Ni ²⁺
Apă	10x CV	Eliminarea ionilor de Ni ²⁺ slab legați
HEPES 40mM, NaCl 500 mM, pH 7,4	10x CV	Echilibrarea coloanei cu soluția tampon în care se află proteina de interes

*această soluție este menținută în contact cu coloana pentru 15-20 minute

C. Cromatografia de afinitate pentru metale imobilizate

Datorită cozii hexa-histidinice, proteinele exprimate de pe vectorul de expresie pH6EX3 au afinitate puternică față de ionul de Ni²⁺. Ele vor fi singurele proteine din extractul acelușar clar care se leagă suficient de puternic de ioni de Ni²⁺ și deci de suportul pe care aceștia sunt sunt imobilizați. Interacțiunea este una reversibilă, agenții chelatanți ai Ni²⁺ precum imidazolul sau histidina la concentrații mari putând dezlocui moleculele proteice, realizând eluarea acestora de pe coloană.

În cazul de față, am utilizat ca agent de eluare imidazolul, în concentrații crescătoare (așa numitul step-gradient) de la 10 mM la 500 mM, în 5 pași (10, 40, 80, 200 și 500 mM)

Separarea cromatografică s-a realizat fie prin gravitație, fie coloana a fost conectată la o pompă peristaltică Pharmacia LKB P-1 pentru a asigura un debit constant de 5 ml/min. Pentru monitorizarea și colectarea fracțiunilor proteice, ieșirea din pompa peristaltică a fost conectată la o unitate de măsurare a absorbantei la 280 nm Pharmacia LKB UV-I și apoi la un colector

de fracții Pharmacia LKB Fraction Collector F-1.

Materiale necesare:

- soluție tampon HEPES, pH 7,4 - HEPES 40mM, NaCl 500 mM, pH 7,4
- imidazol 1 M în soluție tampon HEPES, pH 7,4
- coloană cromatografică cu Ni-Sepharose 6 Fast Flow echilibrată cu HEPES 40mM, NaCl 500 mM, pH 7,4
- micro-eprubete de 1,5 ml cu 100 microL glicerol – 30 buc.
- Seringă sau pompă peristaltică

Mod de lucru:

Etapele urmate pentru realizarea purificării au constat din:

- aplicarea extractului acelar clar pe coloană - la un debit redus de 1-2 ml/min. Pentru a îmbunătăți gradul de recuperare, suportul cromatografic a fost resuspendat în extractul acelar clar și lăsat să sedimenteze pentru 10 minute la temperatura camerei.
- Spălarea suportului cromatografic cu 10x CV (20 ml) soluție tampon HEPES, pH 7,4 pentru eliminarea proteinelor legate nespecifice
- Spălarea suportului cromatografic cu 30x CV (60 ml) imidazol 10 mM în soluție tampon HEPES, pH 7,4 pentru eliminarea proteinelor slab legate. Soluția a fost preparată prin pipetarea a 0,6 ml imidazol 1 M în 59,6 ml soluție tampon HEPES, pH 7,4
- Spălarea suportului cromatografic cu 30x CV (60 ml) imidazol 40 mM în soluție tampon HEPES, pH 7,4. Soluția a fost preparată prin pipetarea a 2,4 ml imidazol 1 M în 57,6 ml soluție tampon HEPES, pH 7,4
- Spălarea suportului cromatografic cu 30x CV (60 ml) imidazol 80 mM în soluție tampon HEPES, pH 7,4. Soluția a fost preparată prin pipetarea a 4,8 ml imidazol 1 M în 56,2 ml soluție tampon HEPES, pH 7,4. Au fost colectate fracții de câte 1 ml în micro-eprubetele cu glicerol pentru primii 10 ml eluați, deoarece unele proteine eluează la această concentrație de imidazol.
- eluția proteinelor legate cu 10 ml imidazol 200 mM în soluție tampon HEPES, pH 7,4. Soluția a fost preparată prin pipetarea a 2 ml imidazol 1 M în 8 ml soluție tampon HEPES, pH 7,4. Au fost colectate fracții de

câte 1 ml în micro-eprubetele cu glicerol. Cel mai frecvent proteinele recombinante eluează la această concentrație.

- eluția proteinelor legate cu 10 ml imidazol 500 mM în HEPES 40mM, NaCl 500 mM, pH 7,4. Soluția a fost preparată prin pipetarea a 5 ml imidazol 1 M în 5 ml soluție tampon HEPES, pH 7,4. Au fost colectate fracții de câte 1 ml în micro-eprubetele cu glicerol.

După colectare, fracțiile obținute au fost depozitate pe gheață până la procesarea ulterioară.

D. Desalinizarea preparatelor enzimaticice

La eluția de pe coloana cromatografică, proteina purificată se află într-o soluție cu un conținut mare de săruri: imidazol pe de o parte, în concentrații de până la 200 mM, NaCl pe de altă parte, în concentrație de 500 mM. Glicerolul adăugat în prealabil are rol stabilizator, în special în cazul în care preparatul este păstrat la temperaturi scăzute. De multe ori însă, concentrația mare de săruri duce la fenomene de precipitare a proteinelor, prin efectul de salting-out. Pentru a înlătura acest neajuns, am utilizat două modalități de diminuare a concentrației de sare:

- a. utilizare unui dispozitiv centrifugal Vivaspın MWCO 10000

Dispozitivul mai sus menționat conține o membrană filtrantă cu dimensiunea porilor de 10 Kda. Proteinele cu masă moleculară mai mare nu vor putea străbate membrana, în timp ce moleculele mici da. Dispozitivul este utilizat în special pentru concentrarea fracțiilor proteice, dar prin alternarea etapelor de concentrare cu cele de diluție cu soluție tampon de concentrație redusă în sare, tăria ionică a soluției se reduce considerabil.

În general, fracțiile conținând proteina purificată au fost diluate până la 20 ml cu soluție tampon HEPES 40mM, NaCl 100 mM, glicerol 10%, pH 7,4 și centrifugate până volumul de soluție se reduce 5 ml. Peste soluția concentrată s-a adăugat din nou HEPES 40mM, NaCl 100 mM, glicerol 10%, pH 7,4 până la refacerea volumului de 20 ml, și procedura a fost reluată de 3-4 ori.

- b. utilizarea unor coloane de desalinizare HiPrep 26/10 Desalting, Amersham, Freiburg

În acest caz am utilizat cromatografia de filtrare prin gel. Principiile generale și detalii suplimentare sunt prezentate în secțiunea dedicată determinării masei moleculare a proteinelor.

Pentru desalinizare coloana a fost conectată la un dispozitiv FPLK AKTA Basic, Amersham, Freiburg, Germania. Programul a constatat într-o etapă de echilibrare a coloanei cu 106 ml (2xCV) HEPES 40mM, NaCl 100 mM, glicerol 10%, pH 7,4, injecția probei (5 ml) și eluție izocratică cu HEPES 40mM, NaCl 100 mM, glicerol 10%, pH 7,4, fiind rulat la un debit de 10 ml/ min.

II.3.3. Determinarea concentrației proteinelor prin metoda Bradford

În vederea determinării concentrației de proteine în probe am preferat utilizarea metodei Bradford (27), metodă ce folosește proprietatea soluției acide de Coomasie Brilliant Blue G-250 de a-și schimba maximul de absorbție de la 465 la 595 nm atunci când se leagă de molecule proteice (90). Soluția de colorant utilizată a provenit din mai multe surse. Au fost utilizați reactivi gata preparați precum Roti-Quant (Roth, Germania), Bradford Reagent (Sigma-Aldrich), sau soluții preparate în laborator.

În vederea preparării soluției de colorant am procedat după indicațiile lui Artenie și colab. (8), metoda fiind descrisă în cele ce urmează.

Materiale:

1. etanol 96 %
2. acid fosforic 89 %
3. reactiv Bradford – poate fi achiziționat gata preparat de la furnizori consacrați precum Sigma, Biorad sau Roth. Pentru prepararea în laborator, 10 mg de colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 se dizolvă în 10 ml etanol 96% și 9,8 ml de acid fosforic 89% și se completează cu apă distilată până la 100 ml. Soluția obținută se păstrează la frigider în sticlă de culoare brună, fiind stabilă câteva săptămâni.
4. NaOH 1 M (opțional)– se dizolvă 4 g NaOH în 100 ml apă.
5. Soluție standard BSA 0.05 mg/ml - se cântărește la balanța analitică 5 mg BSA și transferă cantitativ într-un balon cotat de 100 ml. Se dizolvă proteina standard în 50 ml apă, după care se aduce la semn. Dizolvarea se realizează cu atenție, pentru a preîntâmpina formarea spumei

(aceasta conține proteină denaturată și modifică concentrația finală a soluției standard)

Mod de lucru:

- proba, într-un volum de maxim 500 microlitri se pipetează într-o eprubetă curată
- peste probă se pipetează cantitatea corespunzătoare de apă distilată, până la volum final de 500 microL
- se adaugă 1,5 ml reactiv Badford și se agită imediat.
- după 5 minute, se citește absorbanta la 595 nm față de controlul reactivilor (aceeași reactivi, în aceleași cantități ca în probă, doar că aceasta este înlocuită de tamponul de lucru). Culoarea este stabilă, dar este recomandat ca citirea extincțiilor să se realizeze nu mai târziu de 30 minute de la punerea în comun a reactivului Bradford cu soluția proteică.
- cantitatea de proteină se calculează de pe o curbă de etalonare. Pentru realizarea acesteia, se pipetează în eprubete curate volumele de soluție standard BSA 0.05 mg/ml și apă distilată precizate în tabelul 7. Peste acestea se adaugă 1,5 ml reactiv Bradford, se agită energic și se incubează la temperatura camerei pentru 5 minute. Se citește extincția și se trasează curba de etalonare, de pe care se vor exprima prin interpolare concentrațiile probelor necunoscute.

Tabel 8. Construirea curbei de etalonare pentru dozarea proteinelor prin metoda Bradford

Cantitate BSA (micrograme)	Volum standard (0,05 mg/ml BSA) (microL)	Apă distilată (microL)
0	0	500
2.5	50	450
5	100	400
7.5	150	350
10	200	300

12.5	250	250
15	300	200
20	400	100

Curbele de etalonare au fost realizate cu albumină serică bovină, câte una pentru fiecare soluție de colorant Bradford utilizată. Citirele pentru fiecare punct s-au realizat în triplu exemplar, dreaptele obținute având un coeficient de liniaritate R^2 de minim 0,96, intervalul de linearitate fiind între 2,5 μg și 15 μg de ASB.

II.3.4. Verificarea purității extractelor obținute.

Electroforeza SDS-PAGE

Pentru verificarea purității preparatelor enzimaticе obținute am utilizat electroforeza în condiții denaturante. Sistemul utilizat este unul derivat de la metoda de separare în sistem discontinuu al lui Ornstein și Davis (165) și îmbunătățit de Laemmli (124) prin utilizarea sulf-dodecil sulfatului de Na (SDS) ca agent denaturant.

Sub acțiunea temperaturii, SDS-ului și β -mercaptoetanolului, structura tridimensională a moleculelor proteice este alterată și sunt transformate în catenele liniare de aminoacizi care le compun. SDS-ului se fixează de catenele polipeptidice proporțional cu lungimea lor (1.4 g detergent per gram proteină (191)), sarcinile datorate resturilor de aminoacizi sunt ecranate. Toate proteinele vor fi deci încărcate negativ, dimensiunea sarcinii fiind direct proporțională cu cantitatea de SDS fixată, adică cu lungimea catenei. Separarea se realizează funcție de un singur parametru, și anume dimensiunile catenelor polipeptice.

Metodologia propriu-zisă urmată pentru separarea electroforetică a fracțiilor proteice este cea descrisă de Maniatis (191) și Popescu (175)

Materiale:

- Tampon TRIS 1,5 M, pH 8,8
- Tampon TRIS 1 M, pH 6,8
- TEMED – N,N,N',N'- tetrametiletilediamina

- Soluție de persulfat de amoniu 10%
- Soluție 10% SDS
- Tampon de electroforeză Tris-Glicină-SDS - 25 mM Tris-base, 250 mM glicină, 0,1 %SDS
- Soluție tampon probe 4X – 200 mM TrisCl (pH 6,8), 0,4% albastru de bromfenol, 40% glicerol, 8% SDS.
- soluție stoc DTT 1 M
- etanol 70%
- markeri de masă moleculară Sigma Wide Range Molecular Weight Markers
- soluție colorare – se prepară prin dizolvarea a 0.25% g Comassie Brilliant Blue R250 în metanol:acid acetic: apă 45:10:45 (v/v)
- soluție decolorare - metanol:acid acetic: apă 45:10:45 (v/v)
- soluție fixare – 10 % acid acetic
- cuva de electroforeza Biorad Protean III (Biorad, USA) sau miniVertigel2 (Apelex, Franța)
- sursa de curent Biorad PowerPac Plus 1000

Mod de lucru:

- *turnarea și polimerizarea gelului de separare.* În general, s-au folosit geluri de 10 sau 12%, iar volumul gelului a fost de 10 ml. Cantitățile de reactivi și ordine pipetării lor este prezentată în tabelul 9.

Tabel 9.

Componentă	Volumul fiecărei componente (ml) funcție de concentrația gelului	
	12%	10%
Apă distilată	3,3	4,0
30 % Acrilamidă	4,0	3,3
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5	2,5
10 % SDS	0,1	0,1
10 % APS	0,1	0,1
TEMED	0,004	0,004

După pipetarea componentelor, amestecul a fost turnat între plăcile de sticlă a modului pentru geluri asamblat în prealabil urmând indicațiile producătorului. Peste gel s-a turnat soluție etanol 70% pentru eliminare spumei, îndreptarea marginii superioare a gelului și împiedicare pătrunderii aerului. Gelul a fost apoi incubat pentru 30 min la temperatura camerei pentru polimerizare completă.

- *turnarea și polimerizarea gelului de concentrare* – Soluția alcoolică din partea superioară a gelului de separare a fost eliminată și gelul spălat cu apă distilată dintr-o pipetă. Gelul de concentrare utilizat a avut concentrația de 5% și a fost realizat urmând indicațiile din tabelul 10.

Tabel 10.

Componentă	Volumul din fiecare componentă (ml)
Apă distilată	3,4
30 % Acrilamidă	0,83
1 M Tris, pH 6,8	0,63
10 % SDS	0,05
10 % APS	0,05
TEMED	0,005

Amestecul obținut a fost turnat între plăcile din modulul de turnare, peste gelul de separare. După introducerea pieptenului, a fost incubat 30 minute la temperatura camerei pentru polimerizare.

- *pregătirea probelor* – într-o micro-eprubetă Eppendorf sau repartizat 5 μ L de tampon pentru probe 4X în care se adaugă soluția de analizat conținută într-un volum de maxim 15 microl. Volumul a fost ales în așa fel încât să conțină 5 μ g proteină purificată sau 25 μ g proteine totale din extractul acelular. S-a completat cu 2 μ L soluție DTT 1M și apă distilată până la volumul final de 20 μ L, după care micro-tuburile au fost incubate la 95°C pentru 5 minute. În paralel, în aceeași manieră s-a pregătit și soluția conținând marker-ii de masă moleculară.
- *Electroforeza propriu-zisă* - Gelurile au fost montate în cuva de electroforeză iar aceasta a fost umplută cu soluție tampon Tris-glicină-SDS. Cu o seringă Hamilton, probele au fost încărcate în godeurile din

gel. Separarea s-a realizat prin aplicarea unui curent de 10 mA/gel până frontul colorantului atinge limita de separare dintre cele gelul de concentrare și cel de separare, și apoi 15 mA/gel până frontul colorantului a atins limita inferioară a gelului.

- *Colorarea gelului* – în vederea evidențierii fracțiunilor proteice, gelul a fost supus colorării cu Brilliant Blue R-250. Aceasta a presupus incubarea sub agitare continuă a gelului imersat în: 0.25% g Comassie Brilliant Blue R250 în metanol:acid acetic: apă 45:10:45 (v/v) pentru 30 minute

- metanol:acid acetic: apă 45:10:45 (v/v) până la decolorarea fondului gelului și evidențierea fracțiunilor proteice

- 10 % acid acetic pe termen nelimitat

- *densitometrarea gelului*, atunci când a fost necesară s-a realizat prin utilizarea programului ImageJ(2). Cu ajutorul lui, prin utilizarea marker-ilor de masă s-a estimat masa moleculară relativă a proteinelor, și a făcut posibilă cuantificarea gradului de puritate a preparatului.

II.4. Determinarea maselor moleculare a proteinelor recombinate

Masele moleculare relative ale proteinelor au fost determinate prin electroforeza SDS-PAGE. Pentru aceasta, paralel cu proba au fost separate și un amestec de proteine marker (Sigma Wide Range Molecular Weight Marker). De pe fotografia gelului, cu ajutorul programului ImageJ (2) s-a stabilit R_f -ul fiecărei fracții. Acesta a fost utilizat pentru realizarea unei curbe de etalonare într-un sistem de coordonate semi-logaritmice, de pe care masa moleculară a proteinei de interes a fost interpolată.

În vederea determinării gradului de oligomerizare și implicit a maselor moleculare native a proteinelor purificate s-a utilizat o metodă cromatografică utilizată și de Watanabi și colab. (229) ce folosește filtrarea prin gel (GPC). Coloana utilizată a fost HiLoadSuperdex 200 PrepGrade (Amersham, Elveția) conectată la un sistem cromatografic AKTA Basic. Etapele utilizate pentru pregătirea coloanei și realizarea separării cromatografice sunt prezentate în tabelul 11.

Tabelul 11. Etapele folosite pentru pregătirea coloanei și realizarea separării

Etapă	Lungime (CV-volum de coloană, 128,8 ml)	Debit
Echilibrarea coloanei	1 CV	2 ml/min
Injectia probei pe coloană	600 microL -2 ml	1 ml/min
Eluția isocratică	1 CV	1 ml/min

În vederea calibrării coloanei am utilizat un kit de calibrare pentru GPC produs de Amersham Biosciences (Elvetia). 600 μ L soluție conținând 3 mg/mL din fiecare din proteinele standard din tabelul 12 au fost injectate în coloana echilibrată în prealabil cu HEPES 40mM, NaCl 100 mM pH=7,4. Programul rulat a fost identic cu cel prezentat în tabelul 11, momentul eluției proteinelor fiind detectat prin monitorizarea absorbției la 280 nm. Deși unii autori indică utilizarea directă a volumului de eluție pentru realizarea curbei curbei de etalonare (201), producătorul coloanei sugerează folosirea unui parametru derivat K_{av} (fracția din faza staționară care este disponibilă pentru difuzie speciei date) (179), calculat după formula:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o),$$

unde V_e - volumul de elutie

V_o – volumul liber

V_t – volumul fazei

imobile

Deoarece nu am avut în vedere determinarea maselor moleculare a unor alți compuși decât proteine, am considerat inoportună realizarea curbei de calibrare universale descrise de Dondos (62) și am preferat utilizarea parametrului derivat K_{av} , curba fiind realizată într-un sistem de axe semilogaritmice. Pe axa oY (normală) a fost plasat parametrul K_{av} și pe axa oX (logaritmice) masele moleculare ale proteinelor standard utilizate. Dreapta de regresie obținută (fig. 20) a fost una exponențială, cu formula:

$$y = 314.44e^{(-4.4433x)}, \text{ unde } y \text{ este masa moleculară și } x \text{ este } K_{av}.$$

Aceasta a fost și formula de calcul a maselor moleculare native a

proteinelor necunoscute. Proteinele utilizate împreună cu volumele de eluție și valorile Kav utilizate sunt prezentate în tabelul 12.

Tabelul 12. Standardele proteice utilizate pentru calibrarea coloanei de GPC

Standard proteic	Masa moleculară (kDa)	Volumul de eluție	Kav
Blue-Dextran	-	44.8500	Vo*
Feritina	440	46.1690	0.0173325
Catalaza	232	48.3200	0.0455979
Aldolaza	158	54.5600	0.1275953
Albumina	67	64.7000	0.2608410
Ovalbumina	43	80.4980	0.4684363
Ribonucleaza	17.4	96.2200	0.6750329

*Blue-dextranul are masa moleculară de 200000 kDa și a fost utilizat pentru determinarea volumului liber V_0

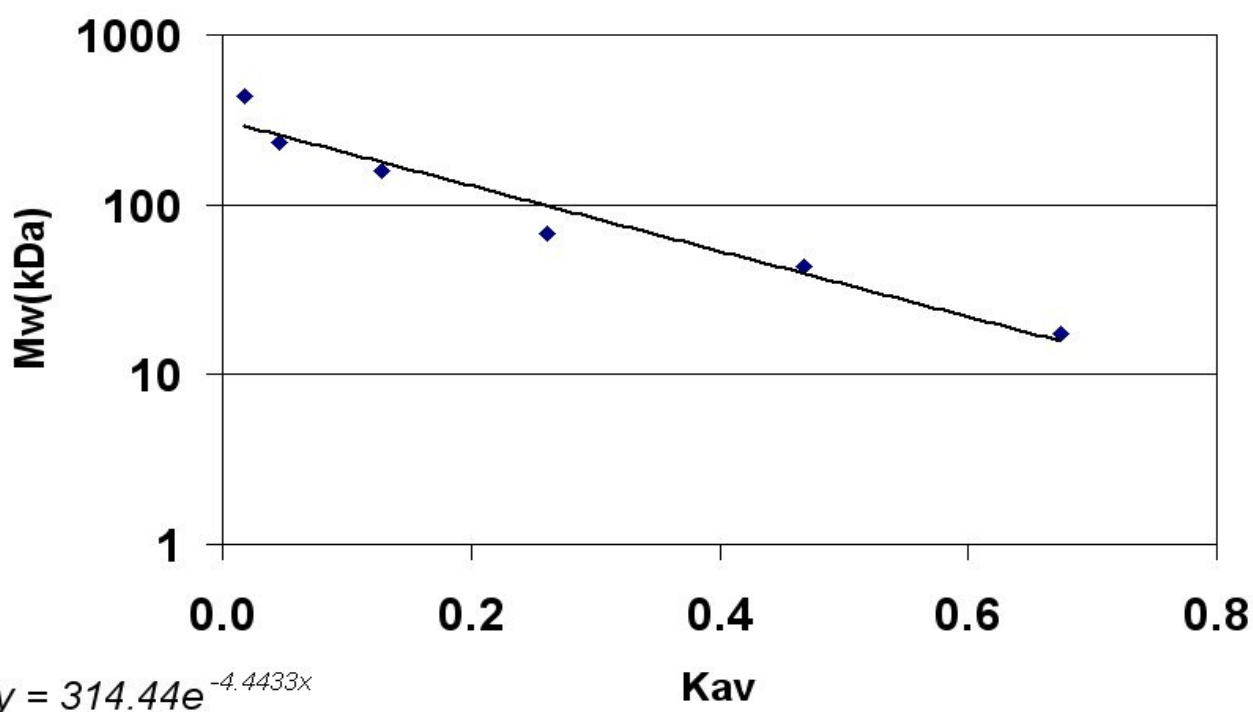


Figura. 20 Curba de etalonare folosită pentru determinarea maselor moleculare. În stânga jos, ecuația dreptei obținute.

II.5. Analiza cofactorilor. Cromatografia în strat subțire

Una dintre proteinele purificate (Nicotine-Blue Oxido-reductaza, NBOR) a fost identificată ca flavoproteină datorită culorii galbene intense. Analiza secvenței de aminoacizi a ORF40 a indicat ca ar putea conține NAD⁺ sau NADP⁺. Pentru a verifica prezența unui cofactor și pentru a stabili tipul de cofactor enzimatic conținut, am procedat după cum urmează: cofactorul enzimatic necovalent legat a fost pus în libertate prin tratament cu acid triclor acetic (TCA) (157), analizat prin cromatografie în strat subțire și comparat din punct de vedere al R_f-ului cu standarde cunoscute.

200 μl proteină purificată a fost tratată cu 5% TCA (concentrația finală) și incubat pentru 10 minute pe gheață. Apoenzima precipitată a fost separată prin centrifugare la 13000 rpm/30 minute. Supernatantul a fost neutralizat cu 80 μl of 1 M Na₂HPO₄ și 20 μl amestec au fost utilizați pentru identificarea cofactorului prin TLC.

Pentru identificare cofactorilor flavinici, sistemul de separare utilizat a fost cel descris de Chion și Leak (38) și a constatat din: faza imobila plăci de Silica Gel 60 F254, Merk (Germania) (20 cm X 20 cm, grosimea stratului 0.2 mm), faza mobila n-butanol \acid acetic \acetonă\apă (5 : 1 : 2 : 3,). Soluții cu FAD, FMN și riboflavină (1 mg/ml) au fost plasate pe placă în paralel cu proba și utilizate ca standarde. Separarea cromatografică s-a realizat până ce frontul fazei mobile a ajuns la 2/3 din lungimea plăcilor. Cromatograma a fost vizualizată și fotografiată sub lumina ultraviolet la 312 nm utilizând un transiluminator și un sistem de achiziție a imaginilor Vilber-Lourmat, Franța.

Conținutul de NAD⁺ sau NADP⁺ a fost analizat utilizând aceeași tehnică. Sistemul utilizat a fost descris de Datta și Bhattacharyya (51) și a constatat din: faza mobilă etanol:apă (90:10), faza imobilă plăci de silica gel 60 F254 pe folie de aluminiu (10 cm × 5 cm, Merck, Germania). 20 microL din extractele deproteinizate obținute după procedura descrisă mai sus au fost amplasate pe placa de TLC împreună cu câte 2.5–3.0 μl din soluții standard de NADH și NADPH (1 mg/ml) și separate până ce până ce frontul fazei mobile a ajuns la 2/3 din lungimea plăcilor. Vizualizarea și fotografierea s-a realizat urmând indicațiile de mai sus.

II.6 Măsurarea activității NBOR

Metoda de testare și măsurare a activității NBOR a fost pusă la punct în cadrul experiențelor realizate și a constat din 2 etape: producerea substratului și reacția de decolorare a acestuia, reacție catalizată de NBOR.

Producerea substratului s-a realizat prin reacția enzimatică NADH dependentă descrisă de Baitsch și colab. (14) și catalizată de enzima dihidroxi-piridin-hidroxilaza (DHPH). Atât reacția inițială de formare a substratului cât și cea catalizată de NBOR folosesc în calitate de co-substrat NADH. Aceasta a ridicat o serie de probleme legate de separarea foarte clară a celor 2 reacții, separare pe care am realizat-o prin metodologia urmată pentru obținerea albastrului de nicotină.

II.6.1. Producerea substratului

Pentru producerea de albastru de nicotină (NB), substratul enzimei NBOR, am utilizat proteina recombinată DHPH. Reacția catalizată de această enzimă este cea de hidroxilare în poziția 5 a 2,6-dihidroxipiridinei (2,6 – DHP) cu formare de trihidroxipiridină, reacție în urma căreia NADPH este transformat în NADP⁺. În general, reacția s-a realizat în volume mari (50 ml) și, funcție de utilizarea ulterioară a pigmentului, în exces de NADPH sau 2,6-dihidroxipiridină. După epuizarea reacției, proteina a fost eliminată cu ajutorul unui filtru centrifugal.

Materiale:

1. soluție tampon fosfat 100 mM, pH 7,1 - 2x
2. 2,6 – dihidroxipiridină 10 mM în dimetil-sulfoxid (DMSO)
3. soluție NADH 20 mM în apă
4. filtre centrifugale (Vivascience, Hanover, Germania)
5. centrifugă
6. spectrofotometru Ultrospec 3100 Pro UV/Visible spectrophotometer (Amersham)

Mod de lucru:

1. Într-un tub falcon cu capac, au fost adăugați 25 ml soluție tampon fosfat 100 mM pH 7,1, 250 μ l 2,6 – dihidroxipiridină 10 mM, 125 μ l soluție NADH 20

mM, 200 μ g DHPH și s-a completat la 50 ml cu apă deionizată. În cazul în care s-a dorit prepararea unui substrat din care să lipsească unul din componente, celălalt a fost adăugat în exces (în cazul preparatelor fără NADH s-au adăugat 500 μ l 2,6 – DHP, iar în cazul preparatelor fără 2,6 – DHP s-au adăugat au 250 μ l NADH)

2. Reacția a fost incubată pentru 10 minute la temperatura camerei, sub agitație

3. Finalizarea reacție a fost urmărită cu ajutorul unui spectrofotometru. În 1 ml amestec de reacție s-a adăugat, pe rând, exces din reactanți și s-a urmărit reacția la 578 nm. Dacă de exemplu s-a dorit prepararea de substrat lipsit de NADH, la verificarea reacției s-a adăugat exces de 2 μ l 2,6 – DHP și de 5 μ g DHPH și s-a urmărit evoluția densității optice la 578 nm pentru 5 minute. S-a adăugat apoi NADH și s-a urmărit din nou densitatea optică. Nemodificarea în limite decelabile a densității optice în prima etapă, urmată de creșterea în a doua a fost considerată ca o reacție pozitivă, indicând consumarea NADH din amestec.

4. Amestecul de reacție (49 ml) au fost centrifugați prin dispozitivul centrifugal Vivaspin MWCO 3000 la 3000 rpm până tot amestecul a a fost colectat în tubul inferior.

5. Preparatul obținut a fost verificat pentru prezența DGPH prin adăugarea, în 1 ml de extract a 5 μ l NADH și 2 μ l 2,6-DHP în exces și monitorizarea OD₅₇₈. Lipsa unor modificări decelabile a densității optice a fost considerată ca un rezultat pozitiv, indicând lipsa enzimei din reacție. Pentru completare, exces de enzimă (5 μ g) s-au adăugat și întotdeauna s-a observat creșterea densității optice, indicând producerea de pigment.

II.6.2. Determinarea coeficientului de absorbție molară a NB

Pentru a putea determina parametrii cinetici ce descriu reacția catalizată de NBOR a fost necesară stabilirea unei modalități de măsurare a concentrației pigmentului. Pentru aceasta am realizat în paralel o serie de reacții enzimatice de producere a acestui pigment, în exces de NADH și DHPH, dar cu cantități cunoscute de 2,6 - DHP. O curbă de etalonare a fost construită, pe baza căreia concentrația de pigment a fost exprimată în μ M 2,6 – DHP. Pe baza acestor

măsurători s-a determinat de asemenea și coeficientul de absorbție moleculară a NB (155).

Material:

1. soluție tampon fosfat 100 mM, pH 7,1 - 2x
2. 2,6 – dihidroxipiridină 10 mM în dimetil-sulfoxid (DMSO)
3. soluție NADH 20 mM în apă
4. soluție DHPH de concentrație cunoscută
4. spectrofotometru Ultrospec 3100 Pro UV/Visible spectrophotometer (Amersham)
5. cuve de spectrofotometru de 1 ml din plastic

Mod de lucru:

1. în cuve de spectrofotometrie din plastic au fost pipetați reactivii în ordinea și cantitățile din tabelul 13.

Tabel 13

Concentrația 2,6 - DHP (microM)	1	5	10	20	30	50	75	100	200
Soluție 2,6 - DHP 1mM (μl)	1	5	10	2	3	5	7,5	10	20
tampon fosfat 100 mM, pH 7,1 - 2x (μl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
NADH 20 mM (μl)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
apă deionizată (μl)	459	455	450	458	457	455	452,5	450	460

2. Reacția a fost inițiată prin adăugarea în sistem a 5 μl soluție DHP 0,7 μg/ μl (aproximativ 3,5 μg)
3. cuvele au fost agitate și incubate 20 minute la temperatura camerei
4. cantitatea de NB formată a fost cuantificată prin măsurarea densității optice la 578 nm. Valorile obținute au fost folosite pentru realizarea curbei de etalonare din figura 21.

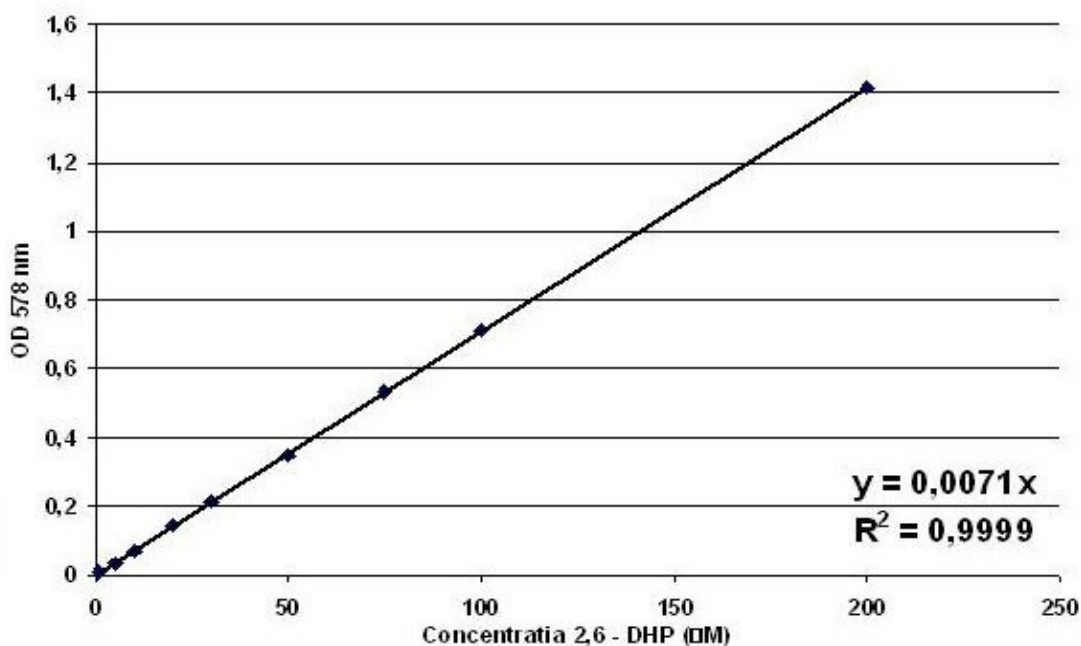


Figura 21. Zona de linearitate a dependenței cantității de NB de 2,6 – DHP .
În dreapta jos, ecuația dreptei utilizate pentru exprimarea cantității de NB.

5. Coeficientul de absorbție molară a NB a fost de asemenea calculat, după formula derivată din legea lui Beer–Lambert:

$$\xi = A/c \times l, \text{ unde}$$

ξ – coeficientul de absorbție molară ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

c – concentrația, în M

l – lungime drumului optic, în cm.

Cu ajutorul acestei formule, coeficientul a fost calculat la valoarea $7,154 \pm 0,114 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. De menționat este faptul că concentrația la care ne-am raportat a fost cea a 2,6 – DHP, și nu concentrația reală a NB. Structura presupusă a acestui compus indică faptul că 2 molecule de 2,6 – DHP ar forma o moleculă de NB. Ținând cont că structura NB nu a fost încă foarte clar stabilită, pentru siguranță și simplitate am preferat această modalitate de exprimare.

II.6.3. Măsurarea activității NBOR

Funcție de substratul testat, determinarea activității s-a realizat în diferite condiții.

A. Măsurarea activității NBOR cu NB ca substrat

În acest caz reacția a fost realizată în condiții anaerobe, deoarece produsul de reacție este deosebit de activ și reacționează cu oxigenul atmosferic, reformând produsul inițial (NB). Pentru aceasta am utilizat cuve de spectrometrie speciale, dotate cu capac de cauciuc și închise ermetic. Asemenea cuve au fost utilizate și de Bourel(26).

Materiale:

1. soluție tampon fosfat de potasiu, 50 mM, pH 7,1 (soluție K-P)
2. NB în tampon soluție tampon fosfat de potasiu, 50 mM, pH 7,1 preparat după metodologia expusă anterior
3. soluție NADH sau NADPH 20 mM în apă
4. cuve de spectrofotometrie din cuarț pentru reacții anaerobe, echipate cu dop de cauciuc, Hanna Instrumens
5. sursă de azot molecular
6. NBOR purificată, de concentrație cunoscută
7. seringă Hamilton
8. spectrofotometru Ultrospec 3100 Pro UV/Visible spectrophotometer (Amersham)

Mod de lucru:

1. în cuva de spectrofotometru se pipetează cantitățile necesare de reactivi pentru a se realiza condițiile următoare: 100 μ M NB, 200 μ M NADH sau NADPH în 50 mM soluție tampon K-P, pH 7,1
2. cuva a fost închisă ermetic și apoi s-a barbotat azot molecular pentru 5 minute pentru a îndepărta oxigenul molecular
3. reacția a fost inițiată prin adăugarea a 0,6 μ g NBOR purificată.
4. după 10 secunde, reducerea pigmentului albastru NB a fost monitorizată la 578 nm pentru 10 minute. Panta dreptei a fost utilizată pentru calcularea

activității.

Activitatea enzimatică a fost exprimată ca nanomoli NB redus/ minut/ microgram proteină.

B. Măsurarea activității NBOR cu diverse chinone ca substrat

Specificitate de substrat a NBOR a fost investigată în condiții anaerobe utilizând metodologia prezentată mai jos.

Materiale:

1. soluție tampon fosfat de K, 100 mM, pH 7,1 (soluție K-P)
2. soluție NADH 20 mM în apă
3. soluții de substrate 10 mM. Substratele testate au fost: 1,4 – naftochinonă (dizolvată în DMSO), 1, 4 – benzochinonă (dizolvă în apă), 2,6 – diclor-fenol-indofennol (DCPIP) (dizolvat în apă), 2,5-dihidroxi-1,4 – benzochinonă (dizolvată în DMSO), menadionă (metilnaftochinonă, dizolvată în etanol), durachinonă (dizolvată în etanol), cromat (dizolvat în apă)
4. cuve de cuarț

Mod de lucru:

1. în cuva de spectrofotometru au fost pipetați reactivii 500 μ L tampon K-P 100 mM, pH 7,1, 10 μ L NADH, 10 μ L substrat și 480 μ L apă.
2. reacția a fost inițiată prin adăugarea în cuvă a 1,6 μ g NBOR. Cuvă a fost acoperită cu parafilm și răsturnată de câteva ori.
3. după 10 secunde, dispariția NADH-ului a fost monitorizată la 340 nm pentru 5 minute.
4. controale negative au fost realizate, în care substratul a fost înlocuit de solvent (apă, DMSO sau etanol, după caz).

Viteza de oxidarea a NADH-ului, considerând un coeficient de absorbție de la 340 nm de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a fost utilizată pentru exprimarea activității relative a NBOR.

Condițiile precizate mai sus reprezintă reacțiile standard. Ele au fost modificate funcție de necesități pentru a putea calcula K_M -ul reacției catalizate

de NBOR cu diverse substraturi. Astfel, în aceste experiențe, concentrația NB a variat între 30 și 600 μM , iar pentru celelalte chinone între 5 și 1000 μM .

II.7. Reacția de reducere a FAD-ului din NBOR

Enzimele flavinice pot acționa prin două mecanisme distincte, cu formare sau nu de radicali flavinici. Pentru a stabili care este mecanismul după care NBOR acționează am realizat o serie de reacții de reducere a cofactorului conținut de aceasta enzimă.

Pe de o parte am realizat o reacție de foto-reducere, reacție clasică pentru flavoproteine. Aceasta a fost realizată folosind metoda descrisă de către Deller și colab. (57). Astfel, într-o cuvă de spectrofotometru pentru reacții anaerobe au fost pipetați 8.8 μmoli NBOR în 1 ml 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.5 mM EDTA. Cuvă a fost ferită de lumina prin învelirea ei în folie de aluminiu, iar O_2 din interior a fost eliminat prin barbotarea pentru 10 minute a N_2 . Cuvă astfel pregătită a fost expusă la o lampă halogen de 50 W halogen pentru perioade diferite de timp (10 - 100 sec) și imediat spectrul UV/vizibil a fost înregistrat cu ajutorul unui spectrofotometru Ultrospec 3100 Pro UV/Visible spectrophotometer (Amersham). Reacții control negativ au fost realizate cu enzima menținută la întuneric.

Pe de alta parte am avut în vedere realizarea de reacții de reducere cu substraturi. Datorită culorii puternic albastre și suprapunerii spectrului NB cu cel al NBOR, monitorizarea reducerii coenzimei flavinice cu nicotine-blue nu a fost posibilă.

Reducerea cu NADH și NADPH s-a realizat în aceleași condiții ca și foto-reducerea, doar ca lumina a fost înlocuită cu cantități crescătoare de NADPH.

II.7. Determinarea activității ALDH

Metodele de predicție a structurii și funcției unei proteine plecând de la secvența de aminoacizi nu au ajuns încă la performanța de a putea identifica rolul fiziologic al acestora. Dacă vorbim despre enzime, se poate identifica tipul de reacție catalizată și tipul de substrat, dar nu se poate încă identifica cu un

foarte mare grad de siguranță substratul fiziologic al acesteia (234). Iată de ce, punerea la punct a unei metode de măsurare a activității enzimei de interes este încă un aspect ce ridică numeroase semne de întrebare. Metoda pe care am folosit-o pentru măsurarea activității a aldehyd-dehidrogenazice are la bază metodele descrise de Caballero și colab.(34), Marchal și Branlant(138), Farrbs și colab. (64), Crow și Wittenberger (47), Vedadi și colab. (226). Amestecul de reacție a constat din tampon fosfat 100 mM pH 8,4, 10 mM β -mercaptoetanol, 1 mM NAD(P)⁺ și 20 μ g enzimă. Reacția a fost inițiată prin adăugarea substratului în concentrația finală de 33 mM. Formarea NAD(P)H-ului a fost monitorizată la 340 nm pentru 2 minute. Controale au fost realizate cu amestecuri de reacție fără preparatul enzimatic în vederea detectării unor eventuale reacții neenzimatică. Activitatea enzimatică a fost exprimată ca nanomoli NADH formați pe minut pe microgram proteină (valoare coeficientului molar de extincție pentru NAD 6220 M⁻¹*cm⁻¹).

II.9. Identificarea ionului superoxid prin rezonanță electro-paramagnetică (EPR)

Pentru a identifica formarea radicalului superoxid în urma reacțiilor catalizate de NBOR, am utilizat un spectrometru Bruker EMX 1/6 operat în banda X la 9,2 Ghz. Deoarece durata de viață a ionului superoxid este foarte scurtă, este necesară utilizarea unor compuși care să stabilizeze acest ion, făcând astfel posibilă detecția lui. În experiențele noastre am utilizat 5-Dietoxifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oxid (DEPMPO), compus care are capacitatea de a fixa ionul superoxid, transformându-se în radical DEPMPO-OOH. Acesta are o perioadă de înjumătățire de 8 minute și un spectru specific, putând fi ușor de identificat prin EPR (225).

În 1 ml de NB preparat după metodologia descrisă anterior au fost adăugați 20 μ L NADH 20 mM, 1 μ L DEPMPO și apoi în cuva a fost barbotat N₂ pentru 5 minute. 2 mg de NBOR au fost adăugate pentru reducerea pigmentului. Probe de câte 10 μ L au fost luate din cuvă, amplasate în tuburi de cuarț pline cu N₂ și plasate în spectrometru în vederea înregistrării spectrului.

Cu ajutorul unei seringi Hamiltor, cantități cunoscute de aer au fost introduse în cuva de reacție, noi probe au fost luate și spectrul înregistrat din nou. Reacția Fenton a fost folosită pentru control pozitiv, în vederea generării de ioni superoxid (203).

II.8. Instrumente bioinformatică și resurse web

Pe parcursul experimentelor am utilizat diverse programe și resurse web care au avut rolul pe de o parte, de a ușura pentru procesul de clonare, și pe de altă parte de a oferi informații suplimentare în vederea caracterizării proteinelor purificate. Vom prezenta succint fiecare din instrumentele bioinformatică utilizate, în ordinea utilizării lor pe parcursul experimentelor.

1. NEB cutter (214) - este un instrument disponibil on-line utilizat pentru identificarea enzimelor de restricție ce clivează un fragment dat. Pe baza secvenței de interes, programul generează hărți de restricție în format grafic sau sub formă de tabele.
 2. Sequence Manipulation Suite v.2 (211) - este o colecție de script-uri Java accesibile on-line la adresa www.Bioinformatics.org/sms2/. Le-am utilizat pentru manipularea secvențelor de ADN – obținerea revers-complementului, verificarea primer-ilor
 3. ProtParam (72)– un program accesibil on line pe site-ul Expasy.ch pe care l-am utilizat pentru a calcula proprietățile fizico-chimice teoretice ale proteinelor clonate – masă moleculară, pI.
 4. Baze de date cu secvențe de gene – GenBank (accesibilă on-line la adresa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) sau cu structuri tridimensionale de proteine Protein Data Bank (20) (www.rcsb.org) sau SwissProt (<http://www.expasy.org/sprot/>) (224).
 5. comparare a 2 secvențe pe bază de alinieri locale a fost realizată cu ajutorul programul BLAST (Basic Local Aligment Tool) (202). Deoarece investigațiile de acest tip completate de identificarea domeniilor înalt conservate au constituit punctul de plecare pentru lucrarea curentă, vom detalia principiile de bază din spatele algoritmilor utilizați.
- O aliniere locală (basic local aligment) constă într-o pereche de secvențe

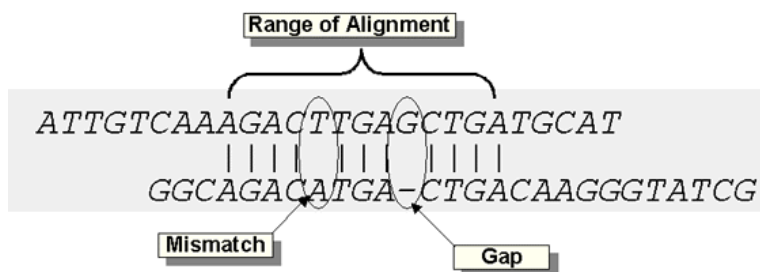
de aceeași dimensiune, câte una din fiecare secvență investigată, între care există potrivire perfectă. Cu ajutorul unui algoritm special (Smith-Watermann modificat) programul identifică rapid porțiunile ce realizează aceste alinieri locale și, pornind de aici, “suprapune” cele 2 secvențe. Astfel cele 2 secvențe investigate vor fi alcătuite din zone perfect aliniat și zone nealiniat (așa numitele GAP's). Acestea formează bucle între o aliniere locală și următoarea aliniere locală.

Pentru a cuantifica gradul de aliniere globală a 2 secvențe (aminoacizi sau baze) programul calculează un punctaj. Modul de calculare al punctajului diferă, existând mai multe modalități, mai mult sau mai puțin acceptate. O modalitate simplă este aceea prin care pentru o potrivire se alocă 1 punct iar pentru nepotrivire se alocă 0 puncte. Acest sistem lasă însă de dorit, deoarece nu ține cont de frecvența diferită cu care apar unele mutații în comparație cu altele.

Într-un studiu al înlocuirilor de aminoacizi cele mai frecvente observate pentru proteine înrudite și apropiate evolutiv, Dayhoff și colaboratorii elaborează un model numit PAM (point accepted mutation) de evoluție moleculară. Considerând o unitate PAM corespunzând la o șansă medie de 1% pentru fiecare aminoacid de a fi înlocuit, ei observă că după 100PAM nu toți aminoacizii vor fi înlocuiți: unii vor fi înlocuiți mai frecvent, alții vor fi înalt conservați. Astfel, fenilalanina este foarte rar înlocuit, și atunci când se întâmplă acest lucru, este înlocuită de aminoacizi aromatici precum tirozină și triptofan (119). Se poate astfel stabili, pe baza observațiilor practice, frecvența ca un aminoacid să fie înlocuit de un altul în proteine înrudite și se poate alcătui o matrice de substituție. O asemenea matrice este PAM, aceasta existând în mai multe tipuri în funcție distanța evolutivă dintre cele 2 proteine. Problema este însă a stabili care dintre matrici trebuie utilizată, deoarece distanța evolutivă dintre proteine este de cele mai multe ori necunoscută. Cel mai frecvent se utilizează o matrice generală: PAM-250.

În ultimul timp matricile PAM au fost mult criticate, și în ciuda îmbunătățirilor aduse au început a fi mai puțin utilizate. Henikoff și Henikoff au examinat alinieri multiple ale unor proteine înrudite, însă îndepărtate din punct de vedere evolutiv și au formulat un alt tip de matrice: BLOSUM. O

comparate un scor. Există mai multe tipuri de punctaje. Pe de o parte așa numitul Raw score (punctaj brut) -S-, calculat ca sumarea punctelor pentru fiecare pereche literă-literă, literă-nimic și penalizărilor pentru gap. Calcularea lui este schematizată în figura 23:



$$S = \sum (\text{identities, mismatches}) - \sum (\text{gap penalties})$$

$$\text{Score} = \text{Max}(S)$$

Figura 23. Calculul punctajului pentru o aliniere locală.

Acest tip de punctaj are o importanță redusă fără detalii despre sistemul de punctare utilizat, fiind echivalentul unei lungimi care nu are specificat unitatea de măsură (km, m, cm). Din aceste motive se utilizează un alt punctaj:

Scorul în biți S', se calculează pe baza lui S, prin normalizarea acestui scor funcție de anumite variabile statistice, depinzând de tipul de matrice utilizat. În acest mod se pot compara scoruri obținute prin metode diferite.

Formula de calcul a lui S' este:

$S' = (\lambda * S - \ln k) / \ln 2$, unde λ și k sunt 2 parametri ce depind de sistemul de alocare al punctelor.

Cu cât punctajul obținut este mai mare cu atât asemănarea dintre cele 2 secvențe este mai mare.

Alături de acest tip de investigare al alinierii între 2 secvențe, BLAST oferă și o serie de date statistice legate de semnificația acestor alinieri. Alături de S și S' o "comparație" se caracterizează și printr-un parametru statistic notat E, care se definește ca numărul de potriviri ce apar doar datorită șansei într-o bază de date de o anumită dimensiune. Valori ale lui E de 3 și mai mari de 3 sunt considerate a avea un înalt grad de semnificație (potrivirea fiind deci statistic semnificativă).

Pe în elaborarea lucrării curente am utilizat programul BLASTP pus la dispoziție de serverele NCBI. Întotdeauna am utilizat parametri sugerați de program – matrice BLOSUM32 și scorul pentru existența gap 11, pentru lipsa -1.

6. Pentru realizarea de alinieri locale cu secvențe date am utilizat aplicația Seqoia (32), generarea imaginilor pe baza alinierilor realizându-se cu ajutorul aplicației ESPript (79).

7. identificarea de domenii înalt conservate – am utilizat diverse servere accesibile on-line: - PFAM care conține un număr de 7973 de familii grupate în 17 clanuri, accesibil la adresa <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>(186)

- CDD (139)(conserved domain database) - integrat în serviciul de investigare și obținere a datelor Entrez de la NCBI, poate fi accesat prin interfața web la adresa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=cdd>.

- CD-Search care se lansează de la sine atunci când este accesat serviciul BLASTP și permite identificare rapidă interactivă a domeniilor înalt conservate. El poate fi accesat la adresa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>.

Identificarea domeniilor înalt conservate a fost un element deosebit de important în procesul de identificare a funcțiilor proteinelor clonate. Un domeniu trebuie văzut ca o unitate de structură tridimensională la nivelul căreia este cantonată o funcție. Există astfel domenii de legare a ADN-ului, a ATP-ului, domenii ce realizează clivarea unei anumite legături sau responsabile de integrarea unui anumit cofactor în enzimă. Caracteristic unui domeniu proteic nu este secvența, ci structura tridimensională, modul în care sunt dispuse helix-urile și structurile beta-pliate, puse în legătură directă cu funcția. O proteină poate fi alcătuită din unul sau mai multe domenii, funcție de rolul jucat. Ele reprezintă așadar și elemente genetice mobile care se rearanjează și se combină pentru a da naștere moleculelor noi (8).

8. Predicția structurilor secundare s-a realizat cu ajutorul unor servere ce modelează o secvență pe baza omologiei ei cu secvențe de proteine a căror structuri sunt cunoscute. Serverele utilizate au fost:

Jpred (49) <http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/> (127)

ESyPred3D

<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/> , și 3D-JIGSAW (17) <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/> . Structurile generate sub forma de fișiere .pdb au fost vizualizate cu ajutorul programului PyMol (55).

9. în vederea obținerii de informații legate de substratele posibile ce se pot lega la proteina codificată de cadrul de citire 39 o serie de experimente de docking *in-silico* au fost realizate. Structura tridimensională a proteinei de interes a fost generată cu ajutorul serverelor mai sus menționate, iar modelele tridimensionale ale moleculelor ligand au fost obținute din Protein Data Bank (19) sau generate cu ajutorul bazei de date ZINC (101). Atât modelul tridimensional al moleculei acceptoare cât și ale moleculelor ligand au fost pregătite pentru docking folosind programele Chimera (173) Antechamber (228), sphgen și grid(122). Procesul propriu-zis de identificare a posibilelor situsuri de legare și de cuantificare a energiei de legare a fost realizat cu ajutorul programului UCSF DOCK6.

Capitolul III Rezultate și discuții

III.1. Nicotine-blue oxido-reductaza – un potențial sistem de protecție împotriva stresului oxidativ

III.1.1. Clonarea cadrului de citire 54

Cadrul de citire 54 face parte din același operon cu *mao* și *ssd*, gene implicate în metabolismul nicotinei. În cazul procariotelor, codonul START al translației, nu este reprezentat doar de AUG, ci și de un număr de alți 7 codoni. În cazul acestei gene, translația genei în ARN începe în poziția 54517 de pe secvența de ADN, și anume codonul TTG, codon descris și de Kozak (120) ca având funcția de codon START. Gena are 614 pb și se încheie cu codonul STOP TAA-53903. Situs-ul de legare al ribozomului (așa numita secvență Shine-Delgarno (205)) începe la 8 nucleotide de codonul START și este ușor modificat față de secvența consens, având forma 54525-AGGAAAGAAAAGG-54537.

Clonarea s-a realizat prin utilizarea perechii de primeri:

primer 5' - 5'-GAAAGGATTGGATCCATGGCAGCAAAATAC-3'

primer 3' - 5'-GTTTGCTGTCGACGCGCGT-3'.

Aceștia introduc situs-uri de clonare pentru *BamHI* și respectiv *Sall*. Primer-ul 5' începe în poziția 54530, iar cel 3' se termină în poziția 53874, amplificând astfel întreaga secvență a acestui ORF și păstrând codonii START și STOP nativi. Clonarea acestei gene nu a fost realizată de noi, de aceea nu vom intra mai mult în detalii. În linii mari procesul a urmat aceleași etape ca și în cazul genelor descrise în subcapitolele următoare.

III.1.2. ORF 54 se aseamăna la nivel de secvență cu chinon-reductaze din super-familia flavodoxinelor

Analiza *in-silico* a secvenței de aminoacizi 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 (193). 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 (7).

În această super-familie sunt incluse numeroase familii, dintre care doar cu două ORF54 manifestă similitudini. 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) ce au fost caracterizate ca NAD(P)H-chinon oxido-reductaze (NQO) (7). 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). WrbA în forma activă este tetrameră și conține FMN, care este slab legat, fiind pierdut în cursul procesului de purificare(81).

O căutare BLAST indică similaritățile mari pe care ORF54 le are cu o serie de enzime a căror funcție este doar presupusă, aceea de chinon-reductaze NAD(P)H-dependente.

Am încercat generarea unui model tridimensional pe baza homologiei ORF40 cu alte proteine cunoscute. Serverul EsyPred3D (127) a creat structura ORF40 folosind ca model FMN-reductaza din *Pseudomonas aeruginosa* (pdb id. 1RTT) și o NADPH-FMN oxido-reductază capabilă să reducă coloranții azoici din *Sinorhizobium melioli* (pdb id. 2Q62). O aliniere pe bază

similarității de secvență cu aceste două enzime și cu azobenzen-reductaza din *Bacillus subtilis* (pdb. 1d. 1nni), poate fi observată în figura 24.

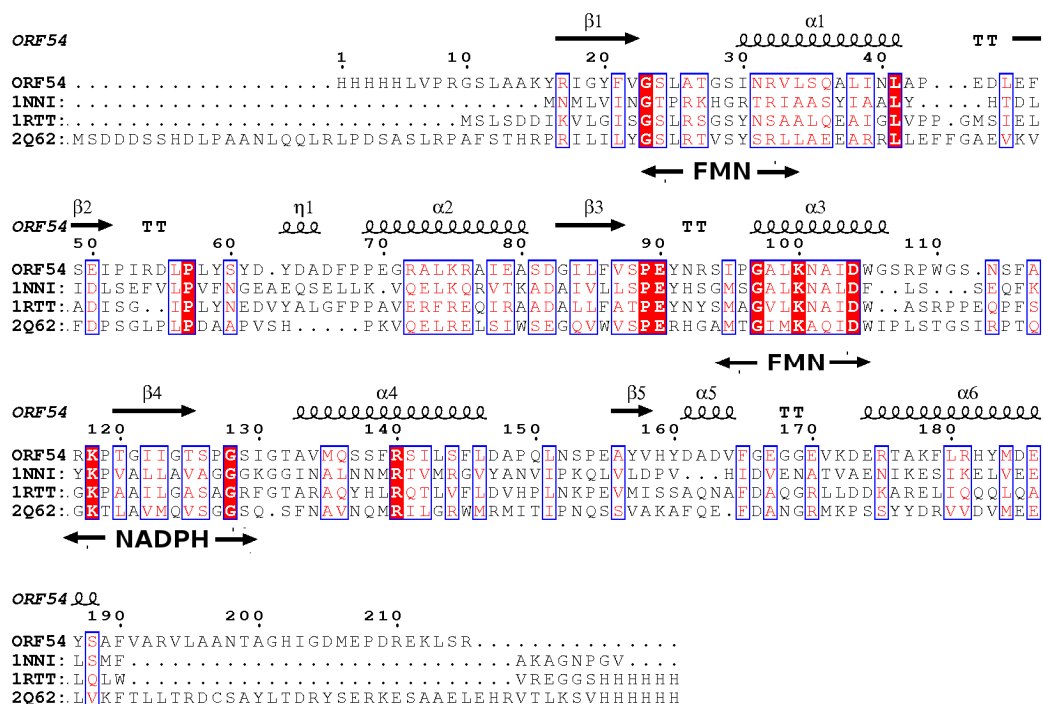


Figura 24. Aliniere pe baza omologiei de secvență și structură între ORF54 din *Arthrobacter nicotinovorans* și:

- 1RTT - FMN-reductaza din *Pseudomonas aeruginosa*;
- 2Q62 - NADPH-FMN oxido-reductaza din *Sinorhizobium melioli*;
- 1NNI - azobenzen-reductaza din *Bacillus subtilis*.

În partea superioară se poate observa succesiunea de structuri secundare din modelul generat pentru ORF40. Situs-urile de legare ale FMN și NADPH sunt de asemenea marcate în partea inferioară.

Modelul general urmează organizarea generală a flavodoxinelor, cu un nucleu conținând o structură beta-pliată alcătuită din 5 catene ($\beta 3$, $\beta 2$, $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 5$ din figura 24), flancate de structurile helicale $\alpha 1$ și $\alpha 5$ de o parte și $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ de cealaltă parte (237). De remarcat este un oarecare grad de conservare al aminoacizilor în trei situs-uri diferite, situs-uri care în 1RTT și 2Q62 sunt implicate în legarea FMN-ului și respectiv a NAD(P)H-ului. Situs-ul de legare al cofactorului flavinic în cazul acestor două enzime este realizat la interfața dintre 2 monomeri (7), prin concursul a două grupe de aminoacizi plasate distinct în cadrul secvenței primare, echivalenți în ORF54 cu 23Gly – Asn31 pe

de o parte și 89Pro-Asp104 pe de altă parte.

III.1.3. ORF54 este o proteină tetrameră

Cadrul de citire cu numărul 54 are 614 nucleotide, ceea ce corespunde la un număr de 204 aminoacizi. Modul în care a fost clonată duce la modificarea capătului N-terminal prin adăugarea unor aminoacizi noi, secvența proteinei devenind în această zonă de forma: HHHHHHLVPRGSL, aminoacidul L reprezentând codon-ul TTG de start al transcripției nativ. Masa moleculară calculată teoretic pentru această proteină este de 23625 Da.

Testarea expresiei s-a realizat doar pe mediu LB, rezultatele obținute demonstrând faptul că proteina este puternic exprimată. Din această etapă s-a trecut direct la obținerea extractului de proteine solubile și purificarea proteinei recombinante utilizând metodologia descrisă în subcapitolul II.3.2., rezultatul obținut putând fi observat în figura 25.

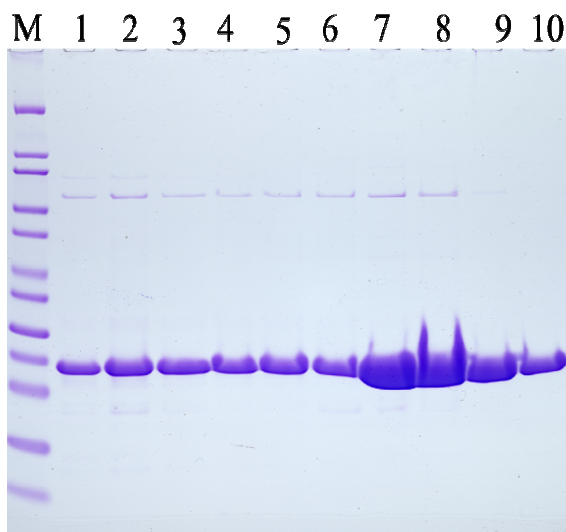


Figura 25. SDS-PAGE cu fracțiile rezultate în etapa de eluție a produsului cadrului de citire 54 de pe coloana cu Ni^{2+} :

1-5 – câte 20 microlitri din fracțiile 1-5 eluate cu 200 mM imidazol

6-10 – câte 20 microlitri din fracțiile 1-5 eluate cu 500 mM imidazol

După cum se poate observa, proteina obținută este de o puritate ridicată atât în fracțiile obținute prin eluția cu 200 mM cât și în cele obținute la eluția cu 500 mM imidazol. Astfel, în primele fracții preparatul enzimatic obținut atinge un

nivel de puritate de 90-95 %, iar în cele de 500 mM imidazol un grad de puritate de până la 99%. Indiferent care ar fi concentrația de imidazol utilizată pentru eluție se poate observa prezența unei fracțiuni proteice în zona de masă moleculară de 100 kDa. De asemenea se poate observa că, marea majoritate a proteinei recombinante eluează la 500 mM, ieșind din limitele generale de 0,8 – 250 mM imidazol pentru eluția unei proteine date de Hefti și colab. (91). Masa moleculară relativă a proteinei recombinante determinată de pe gelurile SDS-PAGE este în bună concordanță cu cea determinată teoretic, adică aproximativ 23 kDa.

Sub formă purificată, proteina are tendința de a precipita cel mai probabil datorită concentrației mari de NaCl și imidazol din soluția tampon de eluție. Din aceste motive imediat după purificare, tamponul în care se afla preparatul enzimatic a fost schimbat cu 40 mM HEPES, pH 7,01, 0,1 M NaCl și 1% glicerol prin utilizarea unor dispozitive centrifugale Vivaspin MWCO 10000 sau a unei coloane cromatografice pentru desalinizarea conectat la un sistem FPLC AKTA Basic 10. După acest tratament s-a reușit stabilizarea proteinei, aceasta fiind păstrată pe termen de 2-3 luni la 4°C fără apariția vreunui precipitat vizibil.

Cromatografia de filtrare prin gel, realizată urmând metodologia descrisă în subcapitolul II.4, a indicat faptul că proteina migrează corespunzător unei mase moleculare native de aproximativ 100 kDa, indicând că proteina este tetrameră în soluție. În timpul separării cromatografice, pe lângă peak-ul majoritar reprezentând proteina tetrameră, au fost observate și două peak-uri suplimentare, cu absorbție destul de redusă la 450 nm, manifestând deci un grad redus de flavinilare. Aceste peak-uri corespund unor mase moleculare de 50 și respectiv de 25 kDa și reprezintă probabil enzima în formă dimeră (50 Kda) și monomeră (25 kDa). Deși în literatura de specialitate este specificat ca oxido-reductazele sunt în general homo-dimere (cromat reductaza din *E.coli* (3) spre exemplu), există și enzime de acest tip homo-tetramere (56), precum este WrbA din *E.coli*(169). Aceste date vin să sprijine ideea înrudirii acestei enzime (NBOR) cu FMN-reductaza din *Pseudomonas aeruginosa* (57), și o NADPH-FMN oxido-reductază din *Sinorhizobium melioli* (ArsH) (237) observată prin analiza secvenței, ambele enzime fiind

tetramere.

III.1.4. Spectrul UV-VIS și conținutul flavinic al ORF54

Enzima purificată prezintă o puternică culoare galbenă, culoare care în general este caracteristică proteinelor flavinilate (144). Motivul de legare al FMN-ului specific flavodoxinelor ((T/S)XTGXT) lipsește din secvența acestei proteine, și cu toate acestea conține FMN. 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 (57), (5). Similar cu spectrul UV-Vis al enzimei din *Sinorhizobium melioli* (237), și cel al enzimei purificate (figura 26), 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.

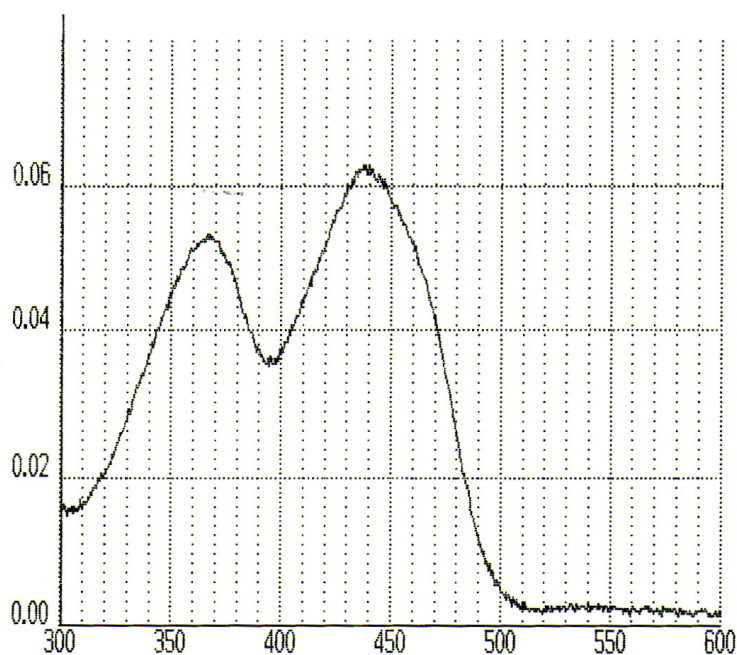


Figura 26. Spectrul UV-Vis al flavoproteinei codificate de cadrul de citire 54.

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 (53), (54). Pentru a identifica modul de legare a cofactorului și de asemenea pentru a stabili tipul de cofactor am procedat urmând metoda folosită de Chiribău și colab. (39) și de Ye și colab. (237). Soluția conținând proteina purificată (200 microg) a fost încălzită pentru 5 minute la 95°C sau tratată cu ATC (concentrația finală 2%). În urma centrifugării pentru 30 minute la 13000 rpm, proteina denaturată a fost separată pe fundul eprubetei sub forma unui precipitat alb. Supernatantul de culoare galbenă indică faptul că legarea cofactorului enzimatic de enzimă se realizează necovalent, prin legături de natură fizică, slabe. Denaturarea proteinei duce la ruperea acestor legături și eliberarea în soluție a co-factorului enzimatic.

Mai mult decât atât, se pare că acest cofactor, în cazul enzimei NQO1 din organismul uman, este fixat la interfața dintre doi monomeri ce formează enzima activă(56). S-ar părea ca așa este și în cazul NBOR deoarece, așa cum am menționat anterior, în experiențele de determinare a masei moleculare prin GPC apar și 2 peak-uri suplimentare, corespunzătoare dimerilor sau monomerilor, cu un nivel de flavinilare mult mai redus. În timpul cromatografiei, o parte din enzima activă tetrameră se desface în subunitățile componente și pierde coenzima.

În vederea identificării cofactorului, supernatantul obținut în urma denaturării proteinei purificate a fost analizat prin cromatografie în strat subțire (TLC) după metoda descrisă la capitolul II.5. Rezultatele obținute (figura 27) indică faptul că enzima conține FMN în calitate de coenzimă.

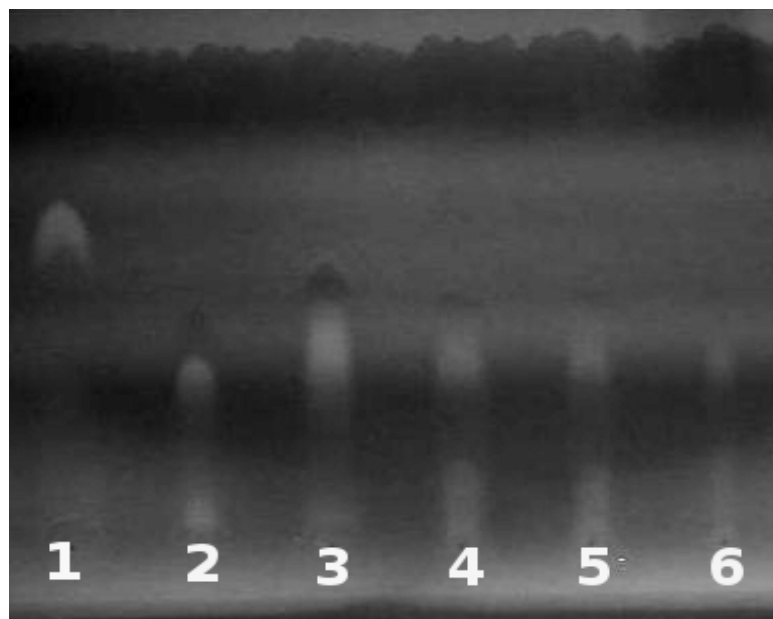


Figura 27. TLC pentru identificarea cofactorului enzimatic

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

Raportul stoechiometric FMN/proteină calculat cu enzima proaspăt preparată, utilizând o valoare a coeficientului molar de absorbție a FMN-ului de $12.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ la 450 nm, a fost întotdeauna subunitar (0,7 – 0,8), indicând fie că proteina nu este complet flavinilată, fie că aceasta pierde în timpul etapelor purificării o parte din coenzimă (134).

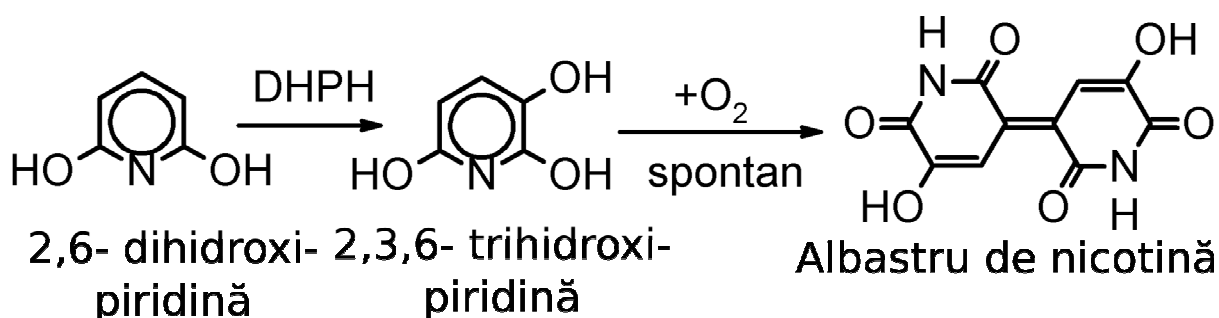
III.1.5. Cadrul de citire orf54 codifică o NAD(P)H: nicotine-blue oxido-reductază

Analiza *in-silico* a secvenței de aminoacizi deduse din secvența genei *orf54* a indicat faptul că se aseamănă cu o serie de chinon-oxido-reductaze. S-a demonstrat că expresia cadrului de citire *orf54* în *Arthrobacter nicotinovorans* este dependentă de prezența nicotinei în mediu (155), și de aceea substratul natural al acestei enzime trebuie să fie un compus rezultat din metabolismul acestui alcaloid. Candidatul logic este produsul de dimerizare spontană a tri-hidroxipiridinei, după reacția din figura 28. Acesta este cunoscut sub numele de nicotine-blue și duce la colorarea în albastru a

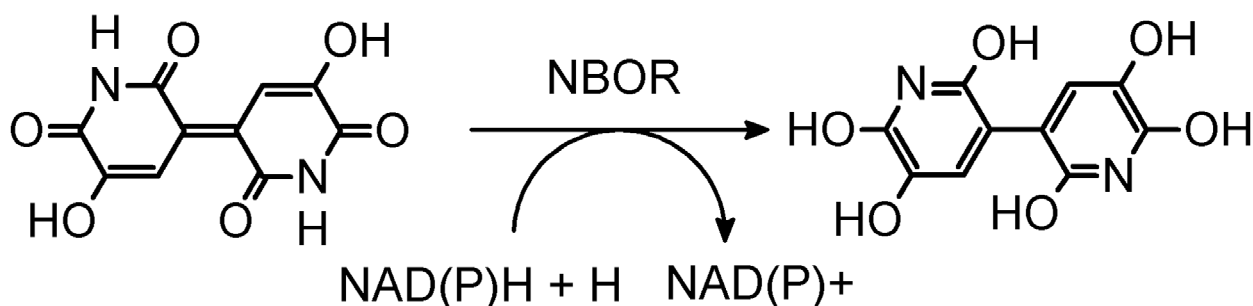
mediului de cultură. Acesta a fost descris de Holmes și colab. (98) și Kaiser și colab. (105) ca fiind 4,4',5,5'-tetrahidroxi-3,3'- diazodifeno-chinonă (2,2'). Singura structură descrisă în literatură este cea dată de Knackmuss și colab. (115), structură pe care am utilizat-o și noi pentru reprezentarea NB.

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)(143). Aceasta indică faptul că enzima folosește în calitate de cosubstrat una sau ambele coenzime mai sus menționate.

A.



B.



BP - forma albastră

BP - forma incoloră

Figura 28. Reacția de formare a albastrului de nicotină (A) și cea de decolorare a acestuia sub acțiunea enzimei NBOR (B)

Pentru realizarea unui test privind activitatea enzimei purificate, am sintetizat substratul albastru de nicotină plecând de la reacția de formare a 2, 3, 5 – trihidroxipiridinei catalizată de enzima DHPH, utilizând metoda descrisă în capitolul dedicat metodelor de cercetare. Soluția obținută a fost utilizată pentru testarea activității oxido-reductazice a flavoproteinei, în prezența NADPH sau NADH-ului, în condiții anaerobe. Deoarece piridina din

structura pigmentului albastru absoarbe puternic în zona UV al spectrului, consumul NAD(P)H-ului nu a putut fi înregistrat, iar reacția a fost monitorizată la 578 nm (dispariția pigmentului albastru).

Reacțiile 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 28.B.

Enzima codificată de cadrul de citire 54 este deci o NAD(P)H:chinon oxido-reductază (E.C. 1.6.99.2 (130)) și am denumit-o 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 (97) în extractele de *Arthrobater nicotinovorans*, fiind probabil identică cu activitatea descrisă de noi (NBOR).

Specificitatea de substrat a NBOR

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 NB, am testat și capacitatea enzimei de a reduce și alte chinone. Pentru fiecare dintre compușii pe care enzima îi acceptă ca substrat am determinat parametrii cinetici, K_M și V_{max}/K_M folosind metoda grafică Lineweaver–Burk. Determinarea fiecărei valori K_M s-a realizat în triplu

exemplar, pentru fiecare repetiție fiind realizate măsurători în cel puțin 10 puncte de concentrație a substratului. Valorile obținute sunt prezentate în tabelul 14.

Tabelul 14 Specificitatea de substrat a NBOR

Substrat	Activitatea specifică * (μM NADH min^{-1} μg^{-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

În cazul unora dintre substrate, constanta K_m nu a putut fi determinată deoarece solubilitatea lor este redusă și nu a permis atingerea saturației necesare pentru stabilirea V_{max} . În acest caz, pentru compararea substratelor, am utilizat constanta aparentă de ordinul întâi V_{max}/K_m . Aceasta a fost determinată prin calcularea pantei drepte ce descrie dependența activității enzimatică de concentrația substratului. De remarcat că valorile K_m -ului obținute în cazul utilizării 1,4-benzochinonei sunt comparabile cu cele obținute de Patridge în cazul WrbA din *Escherichia coli* (169).

Constanta de ordinul întâi V_{max}/K_m indică viteza reacției enzimatică. Astfel se poate observa că folosind NB ca substrat, enzima are cea mai mare viteză de transformare, 310,8 molecule/ secundă. În cazul celorlalte substrate, viteza se reduce drastic, ajungând până la 0,05 molecule/sec în cazul durachinonei. Aceste observații vin să confirme ipoteza înaintată de noi,

conform cărei substratul natural al acestei enzime este NB.

După cum se poate vedea în tabel urmărind valorile K_m , constantă ce descrie afinitatea față de substrat(45) , enzima preferă naftochinona în favoarea benzochinonei sau a diclorfenol-indofenolului. Acest lucru este explicabil, ținând cont de faptul că substratul natural al enzimei este pigmentul albastru de nicotină. Molecula acestuia este relativ mare, conținând 2 nuclee aromatice. Asemănător, din toate chinonele testate, doar naftochinona conține 2 nuclee aromatice, restul doar câte unul.

Spectrul larg de substrate nu este ieșit din comun fiind o caracteristică a chinon-reductazelor, enzime ce au rolul de a elimina substanțele xenobiotice din celulă (56). În cazul NBOR ar putea fi o specializare, enzima evoluând în favoarea utilizării substratului cel mai frecvent, albastrul de nicotină.

Mecanismul de reacție

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 29.

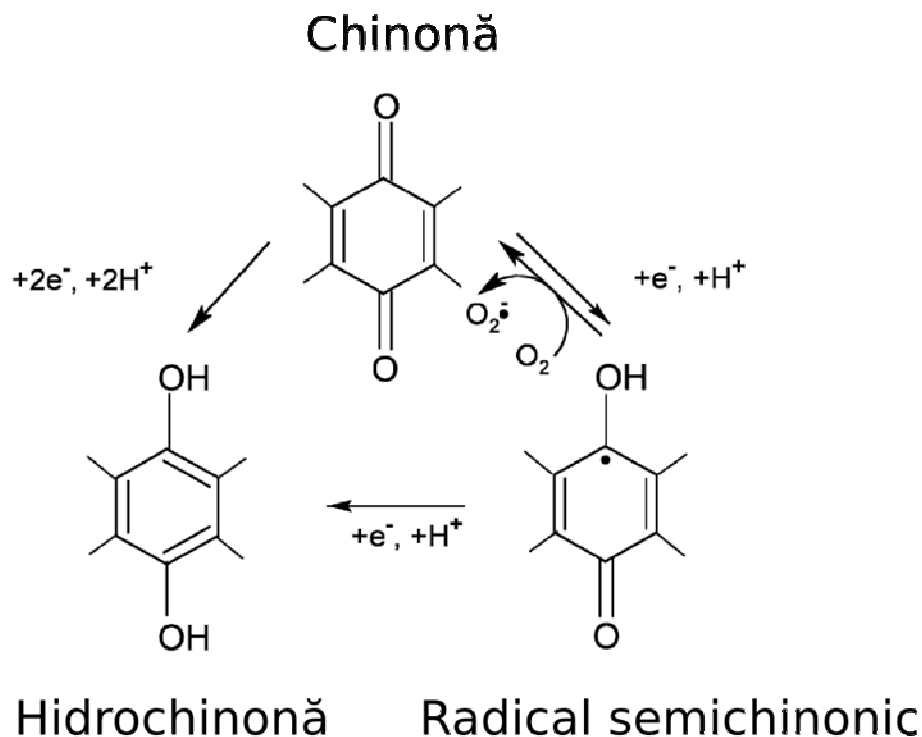


Figura 29. Mecanismul de reducere al chinonelor. Hidrochinona este formată direct prin transferul a 2 electroni, în timp ce transferul unui electron duce la formarea de radicali semichinonic (după Deller și colab. (56))

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 $O_2^{\cdot-}$, reformând chinona inițială Q (230). Reacția este realizată de numeroase flavoenzyme precum NADPH-citocrom P450 reductaza sau NADPH-citocrom b5 reductaza.

Mecanismul ce realizează reducerea prin transferul a 2 electroni duce la formarea din chinone a hidrochinonelor corespunzătoare (QH_2). 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 (131), 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 astfel termen nelimitat 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 30 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. (230) descriu un mecanism prin care chinonele reduse se autooxidează, și printr-un mecanism de co-proporționare, generează ioni superoxid (figura 31 C).

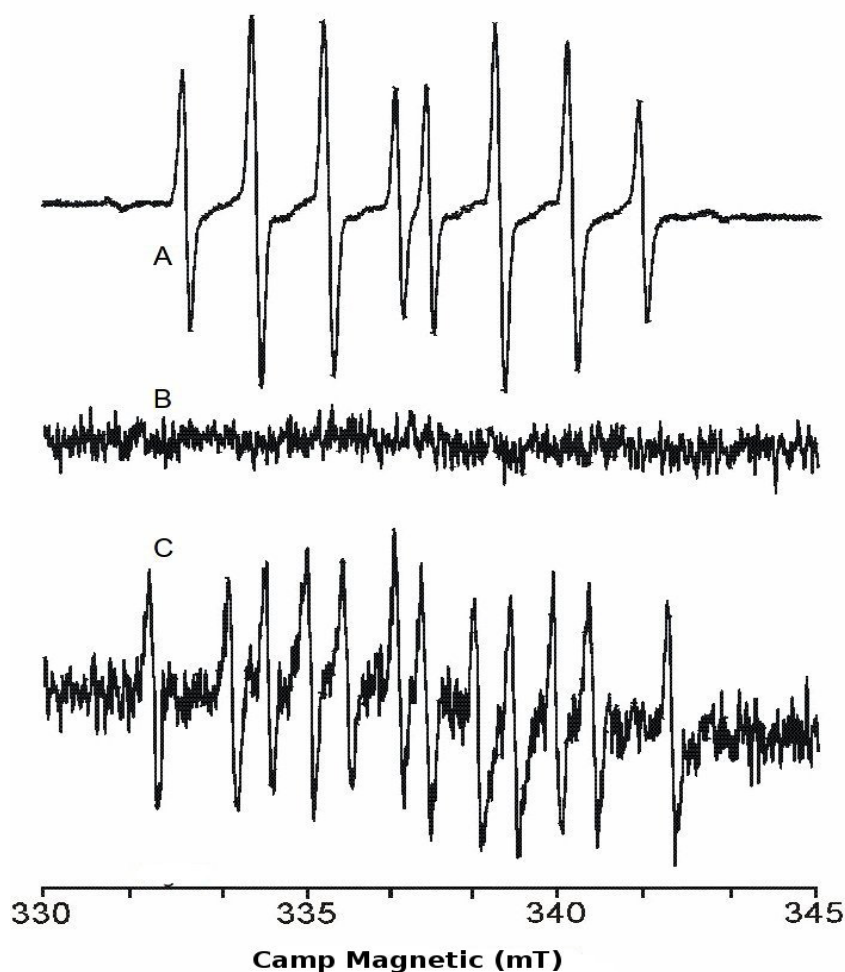


Figura 30. Spectrul EPR al reacțiilor de reducere și reoxidare a NB. Reacțiile au fost realizate în prezența a 100 mM DEPMPO și înregistrate la o frecvență de 9,65 Ghz, modulația amplitudinii de 0,1 mT, constanta de timp 0,164, rata de scanare 5,4 mT/min

A. control pozitiv, reacția Fenton

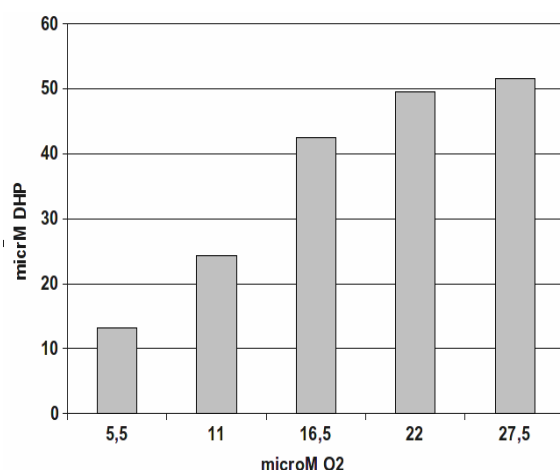
B. reacția de reducere a NB realizată de NBOR

C. reacția de reoxidare spontană a NB în prezența O₂.

Reacția de reoxidare a NB redus este, după cum am văzut, una dependentă de O₂. Pentru a stabili raportul dintre numărul de molecule de O₂ și cel de NB reoxidat, am realizat o titrare a produsului de reacție cu O₂. Pentru aceasta, 750 μ L pigment preparat după metoda descrisă la Material și Metode au fost amestecate într-o cuvă de spectrofotometrie pentru reacții anaerobe cu 125 μ L tampon fosfat 100 mM, pH 7.01, 5 μ L NADH 20 mM, 1 μ L catalază (10 U/ μ L). Amestecul a fost degazat prin barbotarea de N₂ pentru 5 minute și reacția de reducere inițiată prin adăugarea a 8 μ g NBOR. După 2 minute de incubare la temperatura camerei, timp în care pigmentul albastru

dispare complet, s-a adăugat apă oxigenată 4,4 mM în proporții variabile. Concentrația de pigment format a fost apoi determinată prin măsurarea extincției la 578 nm. Rezultatele obținute (figura 31,A), indică o dependență strictă a cantității de pigment formată de O₂ disponibil. De asemenea, raportul dintre numărul de moli de pigment albastru reoxidat și cel de O₂ consumat este de $0,446 \pm 0,024$, o bună aproximație a valorii de 0,5. Dacă ținem cont de faptul că BP este măsurat ca DHP, adică 2 molecule de DHP formează o moleculă de pigment, valoarea de 0,5 va însemna 1 mol de O₂ consumat pentru fiecare moleculă de dimer. Molecula de O₂ 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 31,B).

A.



B

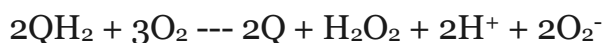
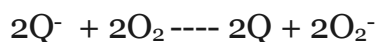
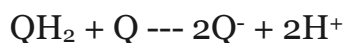
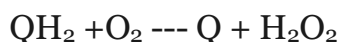
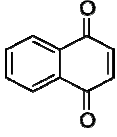
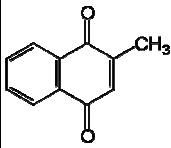
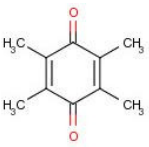


Figura 31. Dependenta cantității de pigment albastru reoxidat funcție de cantitatea de O₂ disponibilă (A) și o cale posibilă de realizare a acestei reacții (B).

Un element important este și preferința față de substrat a NBOR. În tabelul 15 sunt prezentate, în ordinea utilizării lor de către NBOR structurile și

potențialele redox a 4 din chinonele testate.

Tabelul 15. Potențialele redox ale chinonelor utilizate în studiu

Chinonă	Structură	Activitatea specifică * ($\mu\text{M NADH min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteină)	Potențial redox după Trumpower (222)		Potențiale redox după Cenás (37)	
			E(Q/Q ⁻) ₇ (mV)	E(Q/Q ²⁻) (mV)	E(Q/Q ⁻) ₇ (V)	E(Q/Q ²⁻) (V)
1,4 naftochinonă		733 ± 17.62	-	-	-0,15	0,28
1,4 benzochinonă		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 probabil că specificitatea de substrat nu depinde doar de potențial, ci și de forma situs-ului activ al enzimei (37).

Toate aceste elemente sunt dovezi indirecte privind mecanismul de reacție al NBOR, și nu oferă o imagine clară a mecanismului de reacție. Pentru

a realiza transferul unui singur electron, FMN-ul din structura enzimelor flavinilate trebuie să formeze un radical semichinonic al acestei coenzime. Kay și Webber menționează faptul că, în general, acest radical al FMN-ului poate fi detectat utilizând EPR (108), de aceea lipsa oricărui semnal în reacția directă ar putea indica faptul că asemenea radicali nu apar în această reacție. Avem rezerve în a face o asemenea afirmație, deoarece timpul de înjumătățire a acestui radical semichinonic flavinic ar putea fi foarte scurt, el dispărând înainte de a putea face măsurătoarea. Radicalul superoxid poate fi vizualizat, deoarece în amestecul de reacție este prezent DEPMPO (5-Diethoxifosforil-5-metil-1-pirolină N-oxid), compus ce funcționează ca o capcană specifică pentru acești ioni pe care îi stabilizează.

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. (57), spectrul obținut este similar cu cel din figura 32. 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 putut realiza reacția inversă, cea de oxidare a enzimei cu substratul natural.

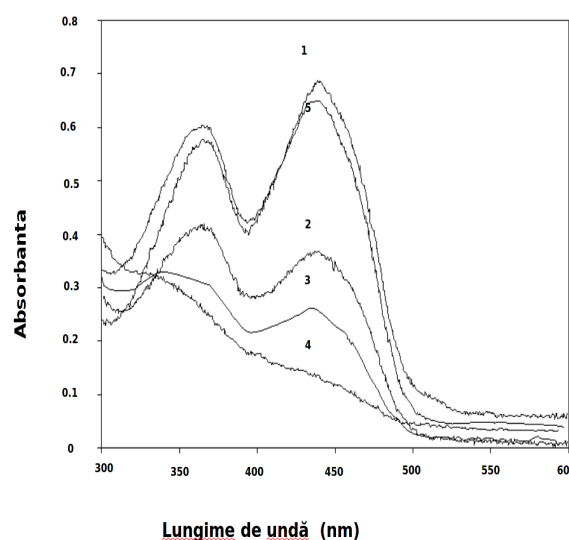


Figura 32. Spectrul UV-VIS al NBOR foto-redusă prin expunerea pentru perioadă variabilă la o lampă cu halogen.

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

În concluzie, singura indicație directă privind mecanismul de reacție al NBOR este spectrul UV-VIS al enzimei reduse. Acesta indică faptul că 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 a 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. (37). 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 33.

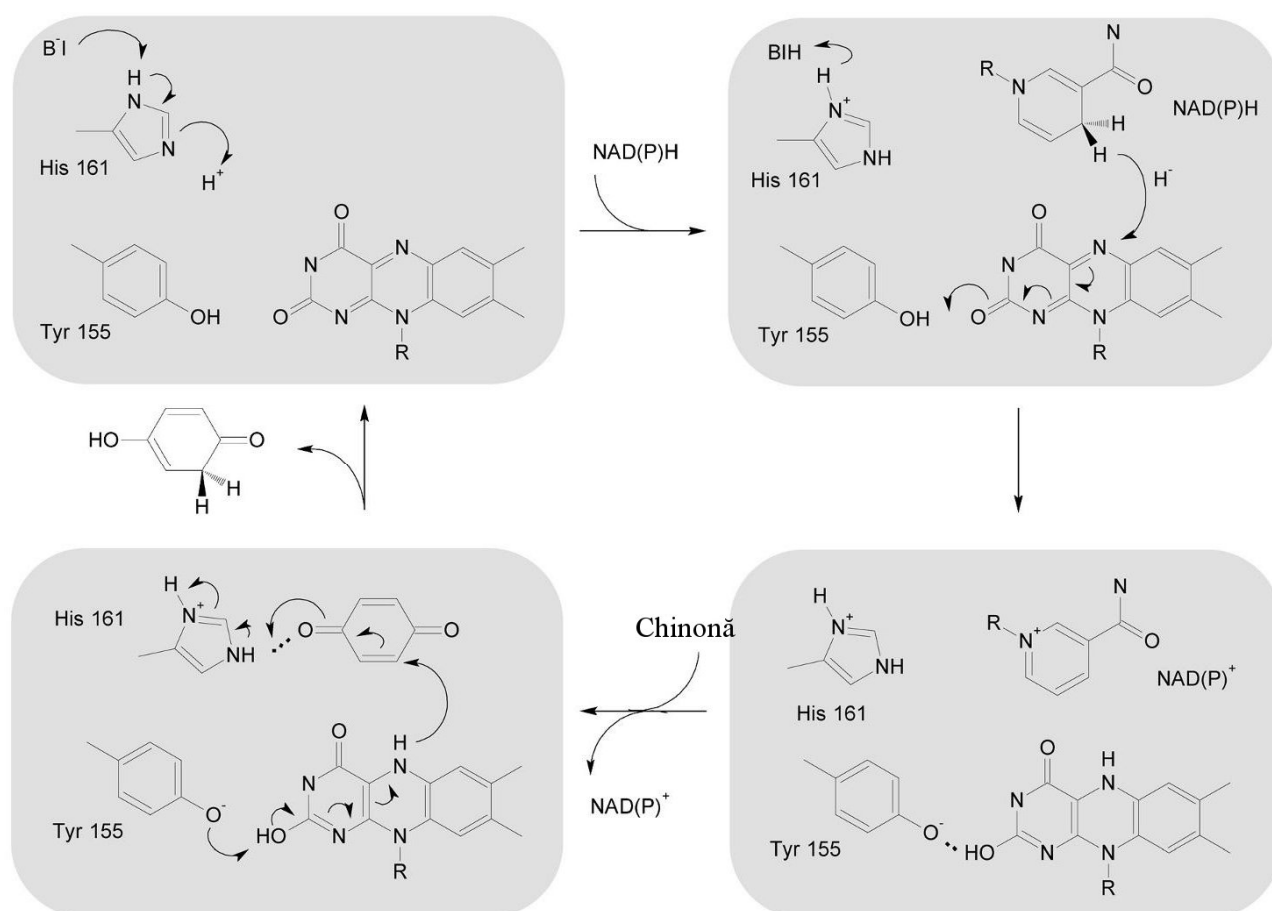


Figura 33. Mecanismul de reacție a NQO1, chinon-reductaza din organismul uman ce funcționează după un mecanism ce presupune transferul a 2 electroni

către substratul chinonic (după Deller și colab., 2008 (56)).

III.1.6. 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 (56). Prin acțiunea lor asupra BP, 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 (102), facilitând astfel eliminarea pigmentului în exces.

III.2. pAO1 codifică o posibilă cale de metabolizare a inulinei sau melobiozei

După cum am văzut, prezența plasmidului pAO1 în interiorul celulei de *Arthrobacter nicotinovorans* conferă acesteia capacitatea metabolică de a utiliza nicotina din mediu ca sursă de C și N și duce la apariția unei colorații albastre (așa numitul nicotine-blue) caracteristice. Igloi și colab. (99) au reușit, prin cultivarea repetată a acestei tulpini pe medii bogate în nutrienți, să obțină o tulpină lipsită de acest megaplasmid și care, în consecință, nu poate degrada nicotina și forma pigmentul albastru caracteristic (fig. 34 A). Pe lângă întreaga cale metabolică responsabilă de metabolizarea nicotinei pe plasmidul pAO1 a fost de asemenea dedusă, pe baza homologiei cu alte gene, și existența unei a doua căii metabolice de degradare probabil a unui glucid. Această cale este codificată de un cluster de gene plasat între poziția 344 și 40893, care 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 nicio funcție cunoscută, restul au funcții deduse doar teoretic. Modul de organizare și cadrele de citire conținute au fost prezentate pe larg în capitolul I. Ele par a fi aranjate într-o ordine

logică, calea metabolică fiind deschisă de o serie de hidrolaze ce degradează compușii macromoleculari în molecule de dimensiuni mici, care apoi sunt transportate în celulă de un sistem de transport multi-component asemănător cu ABC-transporter system din *E. coli*. Odată ajunși în celulă sunt apoi supuși unei serii de oxidări și reduceri ce au ca scop transformarea lor în acizi organici și integrarea în ciclul acizilor tricarboxilici.

Deoarece această cale metabolică este cantonată pe același plasmid, am considerat că un bun punct de plecare pentru identificarea rolului acestei căi necunoscute este identificarea posibilelor diferențe între tulpina purtătoare a megaplasmidului și cea fără acesta, diferențe referitoare la capacitatea de a metaboliza diverse glucide. Pentru aceasta, tulpinile au fost cultivate pe mediu minimal conținând diverse glucide (tabelul 16) și un indicator de pH. Datorită acizilor organici rezultați în urma procesului de catabolism al glucidelor, procesul este însoțit de o acidifiere a mediului, acidifiere vizualizată prin intermediul indicatorului de pH, o reacție pozitivă constând în virarea culorii mediului de la roșu la galben.

Tabel 16. Rezultatele testului privind metabolizarea glucidelor și derivaților acestora (cu * au fost marcate glucidele ce au fost descrise de Keddie și colab. (110) ca fiind metabolizabile de către specii aparținând genului *Arthrobacter*)

Nr. crt.	Glucide și derivați testați	<i>A. nicotinovorans</i> pAO1+	<i>A. nicotinovorans</i> pAO1-
1	Manitol*	+	+
2	Inozitol	-	-
3	Sorbitol	+	+
4	Dulcitol	-	-
5	Adonitol	-	-
6	Ramnoză	-	-
7	Xiloză	-	-
8	Fructoză*	+	+

Nr. crt.	Glucide și derivați testați	<i>A. nicotinovorans</i> pAO1+	<i>A. nicotinovorans</i> pAO1-
9	Galactoză	-	-
10	Arabinoză	-	-
11	Manoză*	+	+
12	Dextroză	-	-
13	Lactoză	-	-
14	Celobioză	-	-
15	Sucroză	-	-
16	Trehaloză	-	-
17	Melibioză	+	-
18	Maltoză	-	-
19	Rafinoză	-	-
20	Inulină	+	-
21	Salicină	-	-
22	Disc Steril (Control Negativ)	-	-

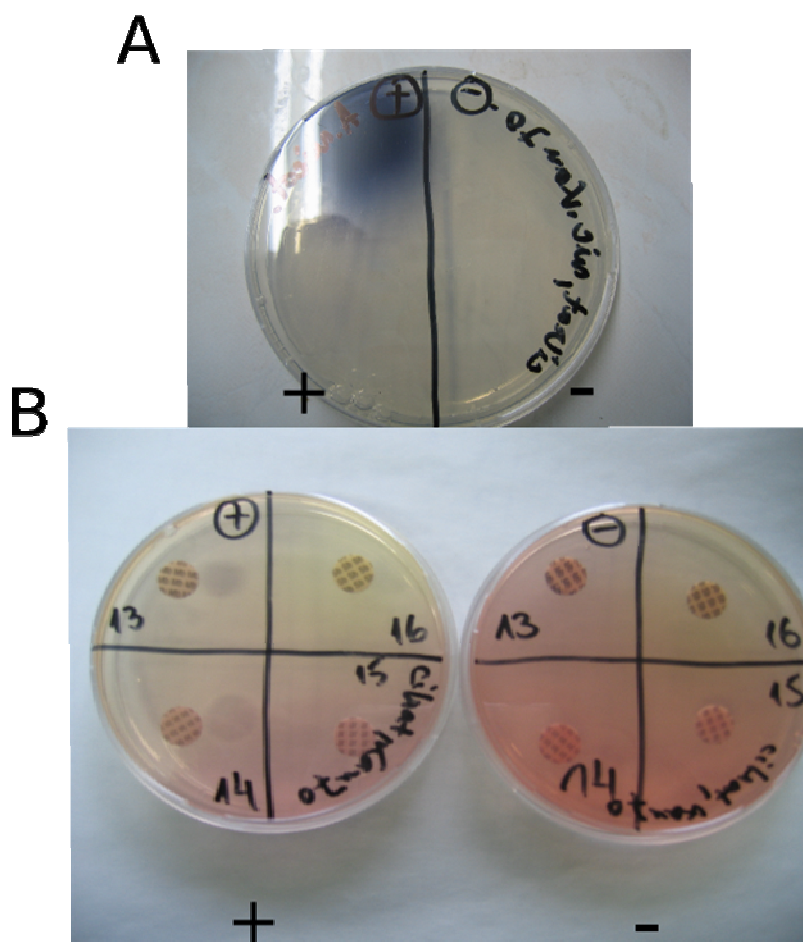


Figura 34. Modificările apărute pe două medii prin dezvoltarea tulpinilor de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+ și pAO1-. **A.** dezvoltarea pe mediu minimal cu nicotină și apariția culorii albastre în cazul tulpinii pAO1+ (notata cu +) ; **B.** dezvoltarea pe mediu minimal suplimentat cu un indicator de pH și diverse glucide. Apariția colorației galbene în cazul melibiozei (12) și inulinei (13) indică faptul că tulpina cu pAO1 (+) poate metaboliza acești compuși.

Este cunoscut faptul că prin dezvoltarea pe mediile cu peptonă această specie generează cantități mari de acizi organici(110), de aceea am utilizat pentru test un mediu derivat de la mediul citrat (63),(78) din care am eliminat soluția tampon fosfat. După cum se poate observa în tabel, pierderea plasmidului este însoțită și de pierderea capacității de a metaboliza melibioza și inulina. Melibioza (6-O-alfa-D-galactopiranozil-D-glucoza) este un diglucid alcătuit din o moleculă de galactoză și una de glucoză legate prin o legătură glicozidică α -1,6, iar inulina (beta-D-fructopiranozil-[D-fructofuranozil]_(n-1)-D-fructofuranozid) este un polimer alcătuit din resturi de fructoză conectate printr-o legătură glicozidică β -2,1. În capătul lanțului de resturi de fructoză se află o moleculă de glucoză legată α -(1,2) (163). Cele 2 glucide nu au nimic

așadar în comun din punct de vedere al subunităților componente și al tipului legăturii, ceea ce face extrem de dificilă explicarea acestui rezultat.

III.3. Clonarea cadrului de citire 24

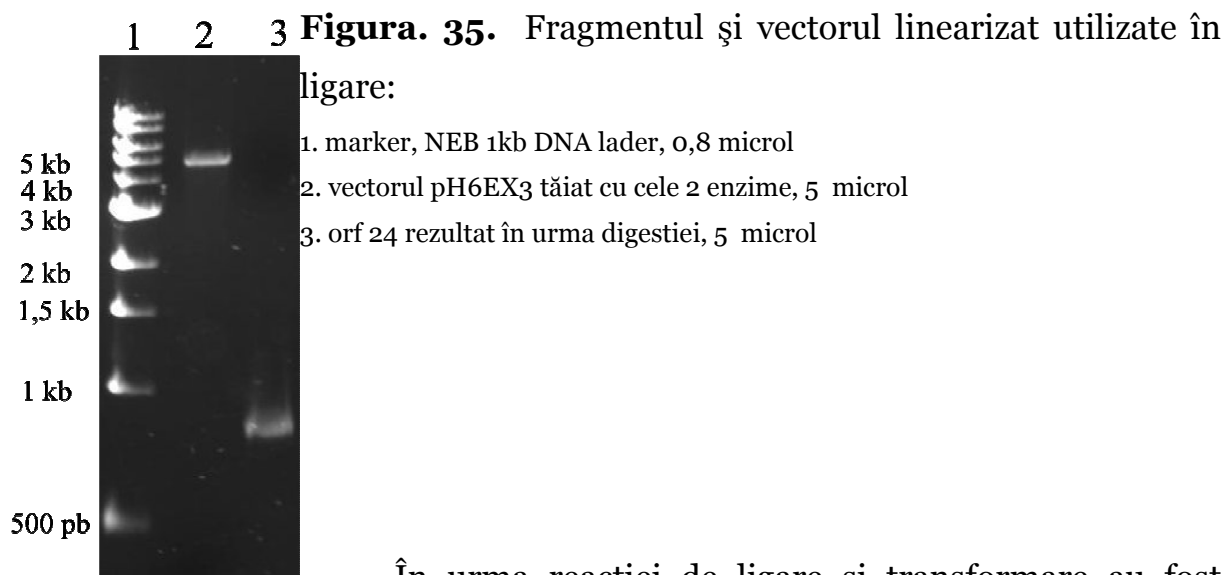
Cadrul de citire 24 este plasat în mijlocul unui șir de gene cu funcție necunoscută, al căror rol nu a putut fi dedus *in-silico*. Gena iese în evidență prin asemănarea sa cu o beta-mananază din *Cellulomonas flavigena*. Codonul START este 22119-GTG, iar cel stop 21370-GAT, cadrul de citire fiind deci plasat pe catena complementară și având 749 de nucleotide.

Pentru izolarea și clonarea acestui cadru de citire s-a folosit primerul degenerat 5' cu secvența 5'-AAGTTCAACGGATCCGGCGTACCG-3', care, prin înlocuirea 22141-A în G-22139 22139-G în T și A-22138 în C creează un situs de clivare pentru enzima *BamHI*. Primerul 3' a fost ales direct de pe secvența genei, fiind unul nedegenerat: 5'-CG GGAAGGTACCGCCTAGTGC-3'.

Etapa de tatonare pentru stabilirea condițiilor de PCR a demonstrat că primerii aleși se asociază cu matrița de ADN la orice temperatură cuprinsă între 48°C și 58°C, timpul de sinteza de 3 minute fiind suficient pentru amplificarea întregului fragment. Suplimentar față de condițiile standard descrise la capitolul dedicat metodelor de cercetare, pentru realizarea acestei amplificări a fost necesară utilizarea de DMSO 5% concentrația finală.

În reacția de amplificare *in vitro* a ADN-ului folosind polimeraza, fragmentul amplificat rezultat are ambele capete drepte. Din acest motiv, pentru realizarea reacției de ligare am utilizat o strategie simplificată, în care fragmentul amplificat conținând gena *orf24* a fost clivată doar cu o enzimă de restricție, și anume *BamHI*. Vectorul de expresie pH6EX3 a fost digerat cu 2 enzime: *BamHI* pe de o parte și *SmaI* pe de altă parte. Capătul terminal generat de *SmaI* este unul drept, compatibil deci cu cel al fragmentului rezultat în urma amplificării *in vitro*.

Ligarea s-a realizat în condițiile standard descrise în subcapitolul II.2.3 folosind 5 microlitri din fragment și 5 microlitri din vector. Concentrația soluțiilor utilizate poate fi apreciată pe gelul din figura 35.



În urma reacției de ligare și transformare au fost obținute 3 colonii. ADN-ul plasmidial a fost apoi izolat și supus unei analize inițiale. După cum se poate vedea în figura 36 A, două din cele 3 colonii migrează în aceeași manieră, cu un Rf ceva mai mare decât al plasmidului pH6EX3. Al treilea plasmid migrează pe gelurile de agaroză 1% mult mai repede decât plasmidul original, indicație că nu este un plasmid recombinat corect. Cele două colonii considerate a fi pozitive au fost supuse unui alt set de teste, prin utilizarea enzimelor din tabelul 17, al căror situs de clivare este prezentat în figura 36, A.

Tabelul 17. Enzimele utilizate pentru verificarea clonelor și fragmentele presupuse a apare în urma digestiei enzimatice.

	<i>I. BamHI și SalI</i>	<i>II. PstI și SmaI</i>	<i>III. KpnI și PstI</i>
pH6EX3	un fragment, plasmidul linearizat de 4,8 kb	un fragment, plasmidul linearizat de 4,8 kb	2 fragmente, 1,1 și respectiv 3,7 kb
pH6EX3orf38	2 fragmente, plasmidul linerizat de 4,8 kb și fragmentul clonat de 700 pb	2 fragmente, unul de 1,4 kb pb și respectiv 4,1 kb	3 fragmente, unul de 1,4 kb, respectiv 600 pb și 3,5 kb

Dimensiunea fragmentelor, așa cum reiese din tabelul 17 corespunde

foarte bine cu cele observate experimental (figura 36, C) ceea ce ne-a făcut să credem că fragmentul este inserat corect în vector în ambele colonii testate. Una dintre colonii a fost pentru testarea expresiei proteinei recombinante.

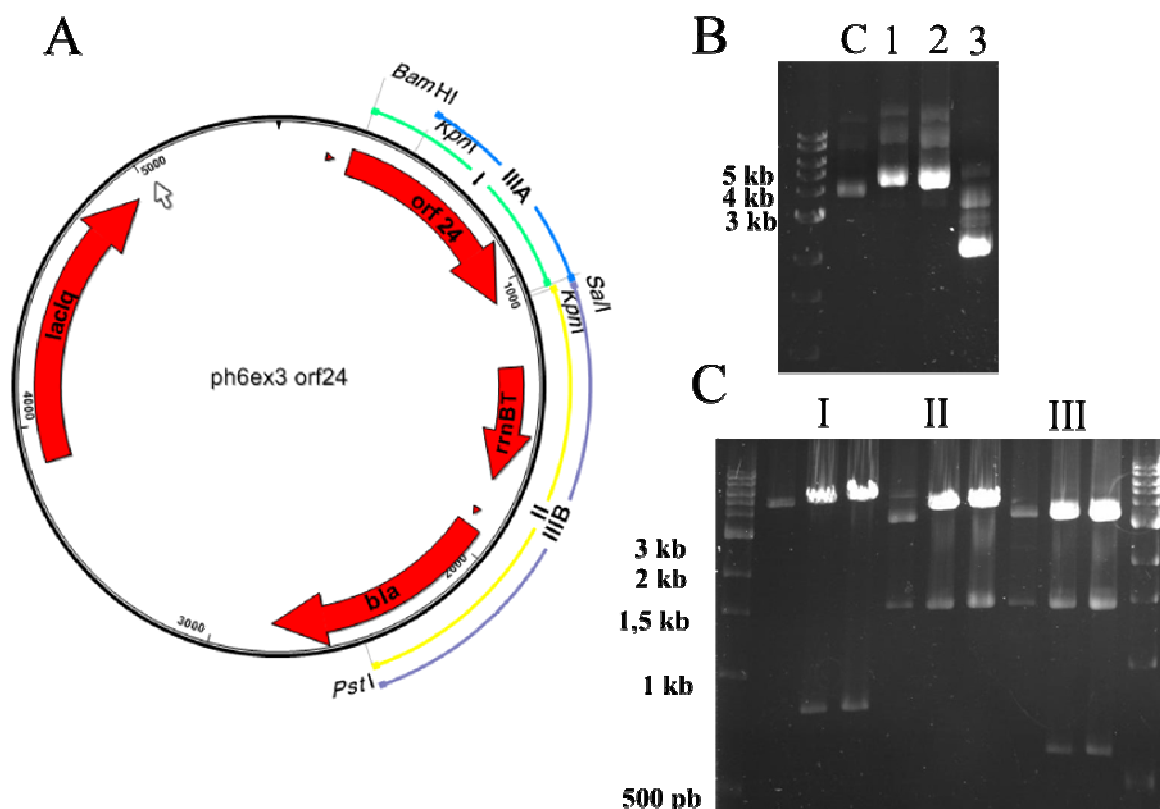


Figura 36. Vectorul recombinat pH6EX3orf24.

A. Modul de inserare al fragmentului în vector și amplasarea situs-urilor de restricție.

B. Comportamentul plasmidului recombinat (1-3; 5microl) față de pH6EX3 (C; 5 microl).

C. Fragmentele rezultate prin digestia pH6EX3orf24 și pH6EX3 cu perechile de enzime I,II, III din tabelul 17. În fiecare din godeuri au fost încărcat în ordine, ADN-ul plasmidial din pH6EX3, pH6EX3orf24 colonia 1 și pH6EX3orf24 colonia 2 digerat cu enzimele indicate.

Testele de expresie ale proteinei recombinante nu au indicat apariția unei benzi suplimentare caracteristice unei proteine supraexprimate la nici una din cele 2 colonii presupuse a fi pozitive. Cu toate acestea, am încercat purificarea proteinei recombinante, considerând că expresia ar putea fi una redusă, nedecelabilă prin metoda utilizată. Nici această abordare nu a dus la un rezultat, de aceea am considerat că este posibil ca procesul de clonare să se fi realizat greșit.

În general, clonarea direcționată prin utilizarea a două enzime cu capete coezive incompatibile este o abordare virtual lipsită de riscuri. Una


```

S 299 CTTCTCGCCCTGGACACCAACGGCGACGGCACCCTCACCATGCAGGACGACGCGTACGC 358
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
T 301 CTTCTCGCCCTGGACACCAACGGCGACGGCACCCTCACCATGCAGGACGACGCGTACGC 360

S 359 CCCGTACTATTCCGGGGGATGAGGCCGTGGACTGGGTGGGCATGTTCTGTATCACTGGGG 418
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
T 361 CCCGTACTATCCCGGGGATGAGGCCGTGGACTGGGTGGGCATGTCCCTGTATCACTGGGG 420

S 419 CGCGAAATACCCGTGGGGCGAGAATGAGCTGCCCGAGCCGGGCAAGTTCACTGACCAGCT 478
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
T 421 CGCGAAATACCCGTGGGGCGAGAATGAGCTGCCCGAGCCGGGCAAGTTCACTGACCAGCT 480

```

Figura 37. Secvența de nucleotide pH6EX3orf24 în zona MCS și a cozii polihistidinice. Cu italice sunt reprezentați codonii corespunzători cozii polihistidinice, iar cu îngroșat codonii START respectiv codonul STOP introdus prin clonare. T-secvența presupusă teoretic. S-secvența evidențiată practic

După cum se poate observa în urma comparării succesiunii de nucleotide obținute prin secvențierea plasmidului recombinat cu secvența dedusă, plasmidul recombinat obținut conține o nucleotidă suplimentară. Inserarea ei duce la modificarea codonului GAC ce devine GTA. Această modificare nu duce numai la o mutație la nivelul aminoacizilor, aminoacidul Asp fiind înlocuit de un rest de Val, ci, prin inserarea nucleotidei suplimentare, cadrul de citire în procesul de translație a ARNm este modificat. Aceasta duce la apariția unei cu totul altă succesiune de aminoacizi după acest codon și la apariția unui codon STOP. Acesta oprește procesul de sinteză a proteinei la 52 aminoacizi. Polipeptida produsă (figura 38) va avea o masă moleculară de 6287 Da, fiind deosebit dificilă a fi vizualizată pe gelurile SDS-PAGE.

```

S 1 - Met S P I H H H H H L V P R G S G V P V I V R F A H E Met N G S W Y - 33
      * * * * *
T 1 - Met S P I H H H H H L V P R G S G V P V I V R F A H E Met N G S W Y - 33

S 34 - A W S Q Q P Q E Y I A R V P D H R G R R P H P T R R L G D D V G A E L -68
      * * * * *
T 34 - A W S Q Q P Q E Y I A A Y R T I A D A V H T H A P G S A M M W A P N Y -68

S 69 - R R R V P V R R R H L Stop S Q P R T A D F L A L D T N G D G T L T M - -
      * * * * *
T 69 - G G G Y P F A G G T Y E A K P G T A D F L A L D T N G D G T L T M -102

```


Utilizând formula de calcul a temperaturii de topire pentru oligonucleotide menționată de Marmur și Doty, 1962, citat de Panjkovich și colab. (168) s-a calculat o temperatură de 62,5°C pentru primerul 5' și de 67,5°C pentru celălalt. Etapa de tatonare pentru stabilirea condițiilor de PCR a demonstrat că temperatura optimă pentru asocierea primer-ilor de matrița este de 62°C, iar timpul de sinteza a fost stabilit la 2 minute.

Deoarece cele 2 enzime de restricție mai sus menționate au activități optime în aceleași condiții, a fost posibilă digestia într-o singură etapă a vectorului și a fragmentului rezultat prin PCR în tamponul NEB 3 și BSA. Ligarea s-a realizat în condițiile standard descrise în subcapitolul II.2.3 folosind 6 microlitri din fragment și 2 microlitri din vector. Concentrația soluțiilor utilizate poate fi apreciată pe gelul din figura 39.

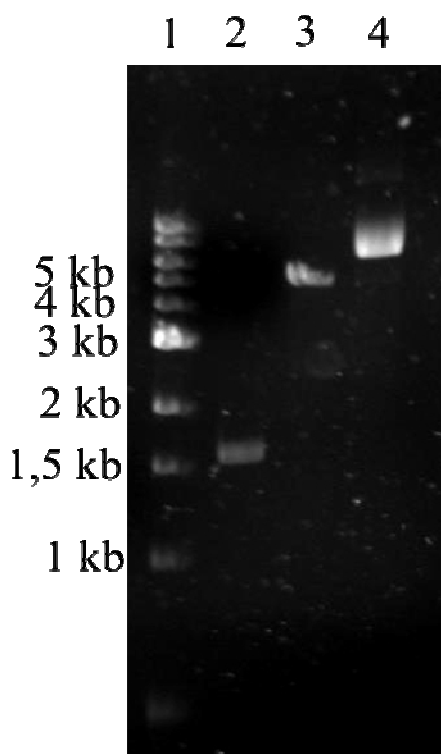


Figura. 39. Fragmentul și vectorul linearizat utilizate în ligare:

1. marker, NEB 1kb DNA lader, 0,8 microl
2. orf 38 rezultat în urma digestiei, 5 microl
3. vectorul tăiat cu cele 2 enzime, 5 microl
4. plasmidul pH6EX3 circular, 5 microl

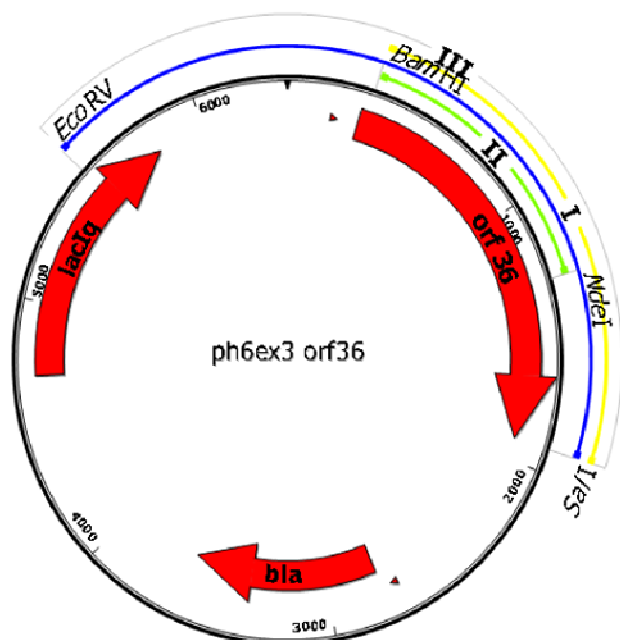
În urma reacției de ligare și transformare un număr de 10 colonii au fost obținute. ADN-ul plasmidial a fost apoi izolat și supus unei analize inițiale. Având în vedere modul în care plasmidele izolate din cele 10 colonii se comportă pe gelurile de agaroză (figura 40, B), concluzia inițială a fost că toate coloniile sunt pozitive. De aceea a fost aleasă în mod aleator o colonie care a fost supusă unui alt set de teste, prin utilizarea enzimelor din tabelul 18, al căror situs de clivare este prezentat în figura 38, A.

Tabelul 18. Enzimele utilizate pentru verificarea clonelor și fragmentele presupuse a apare în urma digestiei enzimatice.

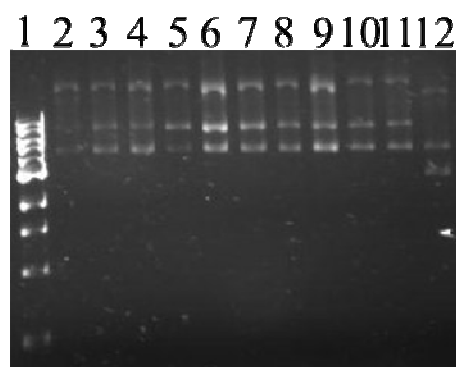
	<i>Bam</i> HI și <i>Sal</i> I	<i>Bam</i> HI și <i>Nde</i> I	<i>Eco</i> RV și <i>Sal</i> I
pH6EX3	un fragment, plasmidul linearizat de 4,8 kb	un fragment, plasmidul linearizat de 4,8 kb	2 fragmente, 1,1 și respectiv 3,7 kb
pH6EX3orf38	2 fragmente, plasmidul linerizat de 4,8 kb și fragmentul clonat de 1,6 kb	2 fragmente, 900 pb și respectiv 5,5 kb	2 fragmente, 2,7 și respectiv 3,7 kb

Dimensiunea fragmentelor, așa cum reiese din tabelul 18 corespunde foarte bine cu cele observate experimental (figura 39, C) ceea ce ne-a făcut să credem că fragmentul este inserat corect în vector. Această colonie a fost utilizată pentru expresie.

A



B



C

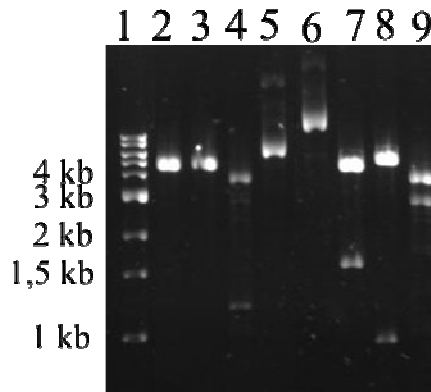


Figura 39. Vectorul recombinat pH6EX3orf38.

A. Modul de inserare al fragmentului în vector și amplasarea situs-urilor de restricție. B. Comportamentul plasmidului recombinat (2-11; 5microl) față de pH6EX3 (12; 5 microl). C.

Fragmentele rezultate prin digestia pH6EX3orf38 (2,3,4,5) și pH6EX3 (6,7,8,9) cu enzimele din tabelul 18.

1. marker, NEB 1kb DNA lader, 0,8 microl
2. pH6EX3 digerat cu *BamHI* și *SalI*,
3. pH6EX3 digerat cu *BamHI* și *NdeI*
4. pH6EX3 digerat cu *EcorV* și *SalI*
5. pH6EX3 circular
6. pH6EX3orf38 digerat cu *BamHI* și *SalI*,
7. pH6EX3orf38 digerat cu *BamHI* și *NdeI*
8. pH6EX3orf38 digerat cu *EcorV* și *SalI*
9. pH6EX3 circular

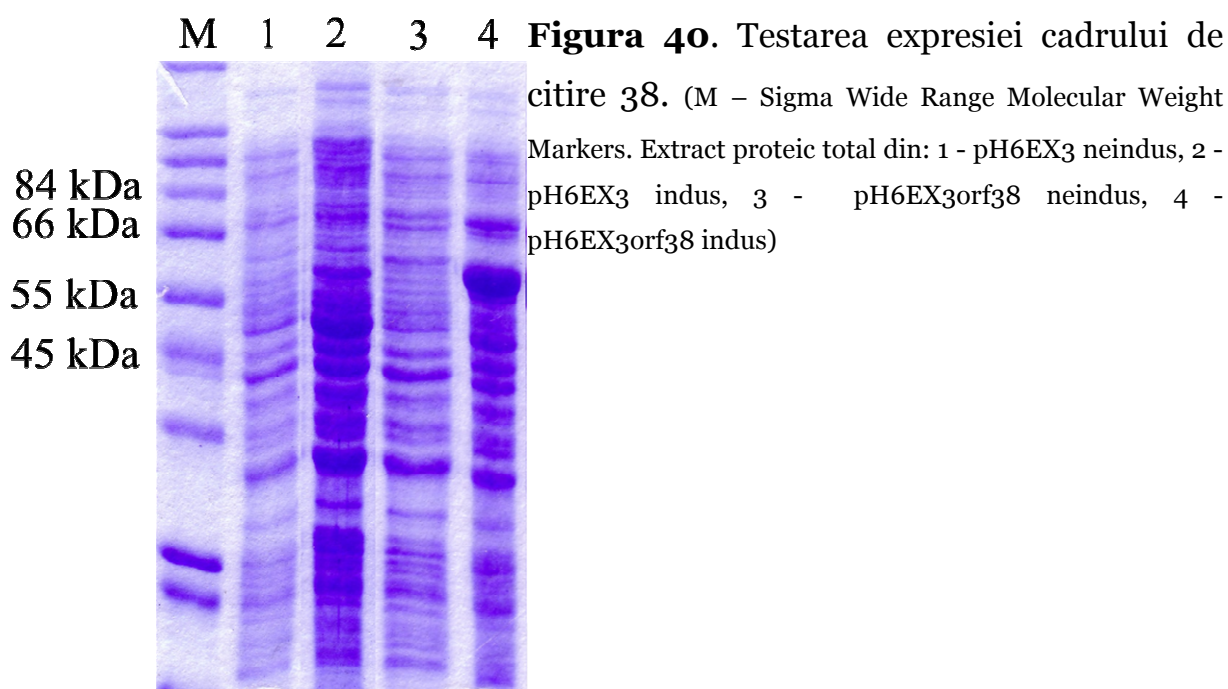
III.3.2. Testarea și tatonarea condițiilor optime de expresie în E. coli

a cadrului de citire 38

După testarea preliminară prin digestia controlată a plasmidului conținând cadrul de citire 38 s-a trecut la etapa următoare, care a constat în testarea expresiei proteinei recombinante. Un număr mare de autori, precum Hames și colab. (88), Sambrook și colab. (191) propun ca punct de plecare în abordarea problemei condițiilor de expresie a proteinelor recombinante în *E. coli* utilizând promotorul *tac*, un protocol ce cuprinde cultivarea tulpinii pe mediu LB pentru două ore la 37°C, urmată de inducția expresiei genei cu 1 mM IPTG pentru 6 ore la 30°C. Utilizând aceste condiții, am realizat 2 culturi, de câte 100 ml care au fost inoculate una cu 10 ml din o precultură de *E. coli* XL1 Blue purtând plasmidul pH6EX3 și cealaltă cu 10 ml precultură de *E. coli* XL1 Blue cu plasmidul recombinat (pH6EXorf38). Analiza conținutului proteic total s-a realizat după metoda descrisă în subcapitolul II.3.1, metodă ce constă în recuperarea celulelor din mediul de cultură la intervale stabilite, liza lor într-un volum fix de tampon SDS-PAGE și încărcarea pe un gel denaturant de poliacrilamidă în vederea aprecierii spectrului de proteine totale. Proteina supra-exprimată va apărea ca o bandă de dimensiuni apreciabile raportată la restul de fracții proteice.

Rezultatele obținute în cadrul testării pentru expresie pot fi observate în figura 40. Analizând spectrul de proteine totale din cultura indusă IPTG se

poate observa apariția unei benzi proeminente după inducție (fig. 40, 4), bandă care lipsește în cultura neindusă (fig. 40, 3) sau în cultura cu pH6EX3 (fig. 40, 1,2). Această bandă suplimentară corespunde unei mase moleculare de 58 kDa. Cadrul de citire 38 are, după cum am văzut, o lungime 1566 nucleotide, ceea ce corespunde la un număr de 522 aminoacizi. Masa moleculară dedusă teoretic cu ajutorul aplicației ProtParam (73), pentru proteina recombinată rezultată prin expresia genei clonate așa cum am descris în subcapitolul anterior este de 58308.25 Da. Corespondența foarte bună între masa moleculară dedusă teoretic și cea observată practic, alături de apariția benzii numai în cultura conținând plasmidul recombinat în prezența agentului inductor ne-au făcut să tragem concluzia că gena este corect clonată și este supra-exprimată în prezența IPTG-ului.



III.3.3. Supra-expresia orf38 în E.coli duce la obținerea de corpi de incluziune

După testarea expresiei proteinei de pe plasmidul pH6EX3orf38, am încercat purificarea ei utilizând metoda IMAC. Pentru aceasta, am procedat la obținerea unei culturi de 1 L indusă cu IPTG pentru 4 ore la 30°C. Celulele exprimând proteina de interes au fost recuperate prin centrifugare, resuspendate în tampon HEPES 40 mM, pH 7,1, NaCl 500 mM și sonicate pe

gheață în trei reprize de câte 2 minute. Extractul de proteine solubile separat după centrifugare la 14000 rpm/30 minute, a fost plasat pe o coloană cu sefaroză conținând Ni^{2+} imobilizat și procesat după metodologia descrisă în subcapitolul consacrat cromatografiei de afinitate pentru metale.

Deși nivelul supraexpresiei a fost unul destul de mare, în fracțiile rezultate după spălarea coloanei cu 80 mM, 200 mM și 500 mM imidazol nu a fost evidențiată prin SDS-PAGE nici o proteină. Acest lucru ne-a făcut să reluăm experiențele ce au avut în vedere supra-expresia și să investigăm solubilitatea proteinei codificate de *orf38*. În urma etapei de centrifugare la 14000 rpm se separă 2 componente: supernatantul ce conține proteinele solubile și depozitul conținând celule întregi, fragmente de celule, fragmente de perete celular și membrane. Analizând prin SDS-PAGE cele 2 componente am observat existența unei benzi caracteristice pentru o proteină supra-exprimată corespunzând unei masei moleculare de 58308.25 kDa în depozitul insolubil, această bandă lipsind cu desăvârșire în supernatant. Proteina este așadar produsă în *E.coli*, dar într-o formă insolubilă, inactivă, care îngreunează foarte mult procesul de purificare.

Supraexpresia proteinelor recombinante în *E.coli* a devenit tehnică de bază a biologiei moleculare și biochimiei, dar se confruntă cu o problemă majoră: solubilitatea proteinelor supra-exprimare(89).

Lipsa solubilității proteinelor supra-exprimare este rezultatul a două aspecte. Primul se referă la faptul că se încearcă expresia unei proteine noi într-o celulă gazdă care ar putea fi lipsită de anumite sisteme enzimatice necesare pentru corecta producere a proteinei de interes în stare activă (sisteme de control ale plierii proteinelor în forma activă - cheperones, sisteme de modificare postranlațională, sisteme de sinteză a cofactorilor enzimatici). De asemenea, această proteină nouă ar putea fi toxică pentru *E. coli*, celula gazdă reacționând în sensul inactivării ei.

Al doilea aspect este derivat din vectorii și sistemul de expresie utilizați. Se vorbește de fapt despre o supra-expresie, proteina de interes devenind dominantă în raport cu celelalte proteine celulare. Datorită vitezei mari de sinteză, de multe ori celula gazdă este copleșită și nu se poate adapta, ceea ce duce la defecte de creștere, moarte celulară sau depozitarea proteinei sub

formă de corpi de incluziune (89). Aceștia reprezintă așadar aglomerări masive cuprinzând în general o singură proteină inactivă, depliată (46). Recent s-a arătat că de fapt deplierea nu este totală, ci proteina păstrează un anumit grad de organizare al structurii secundare (111).

Una dintre sugestiile pe care literatura le indică pentru îmbunătățirea solubilității proteinelor este utilizarea unei alte tulpini de *E.coli* pentru expresie, și anume o tulpină mai săracă în proteaze intracelulare. Pentru a realiza acest lucru, plasmidul recombinat pH6EX3orf38 a fost utilizat pentru transformarea celulelor competente de *E.coli* BL21. Una dintre coloniile obținute a fost utilizată pentru expresia proteinei în condițiile standard amintite mai sus. Din păcate nu a fost observată o îmbunătățire semnificativă a solubilității proteinei recombinare.

Ca o modalitate de reducere a ratei de formare a corpurilor de incluziune, Sambrook și colab. (191) propun modificarea unor parametri de cultivare care au rolul de a promova creșterea solubilității. Asemenea modificări au fost utilizate de o serie de autori și au avut ca rezultat promovarea solubilității și sunt reprezentate din reducerea cantității de agent inductor la 0,3 mM, durata expresiei fiind mărită la 16 ore, menținerea temperaturii de expresie la 37°C, expresia durând doar 3 ore (195) sau reducerea temperaturii la 24°C, perioada inducției fiind mărită la 24 ore (196). În cazul acestei proteine, am încercat expresia la temperaturi de 28, 26, 22, 20, 18 și 16°C crescând corespunzător timpul de incubare. Într-o altă serie de experimente viteza de agitare a fost diminuată, și de asemenea cei doi factori combinați au fost testați. Nici unul dintre acești factori nu a dus la obținerea de ORF38 solubilă.

Viteza mare de producere a proteinei străine se datorează în principal IPTG-ului, care este un compus chimic de sinteză, similar lactozei, dar nemetabolizabil. Într-o altă serie de experimente, am avut în vedere reducerea concentrației de IPTG utilizată pentru inducție până la 0,01 mM, în combinație cu scăderea temperaturii și diminuarea vitezei de agitare. În nici una din condițiile testate nu s-au observat îmbunătățiri ale solubilității proteinei.

Într-o etapă finală am avut în vedere eliminarea completă a IPTG-ului și utilizarea mediului autoinductibil descris de Studier (212), mediu ce elimină dezavantajele folosirii mediului LB. Am preferat testarea și utilizarea acestui

mediu și datorită faptului că celulele sunt gata pentru procesare dimineața devreme, eliminându-se astfel necesitatea înghețării lor.

Pentru monitorizarea producției de proteină recombinată și stabilirea mediului de cultură optim și a momentului în care trebuie realizată colectarea celulelor, au fost luate probe de câte 1 ml la intervale regulate din două culturi, una care se dezvoltă pe mediu LB și o alta pe mediu ZYP5052. Prima probă a fost luată la momentul inoculului, fiind considerată martor (în care nu există proteină exprimată). După 2 ore de cultivare, cultura pe mediu LB a fost indusă cu o concentrație finală de 1 mM IPTG. Prelevarea probelor s-a făcut în general la un interval de 2 ore, pe o perioadă de 8 ore. După 24 ore de cultivare, o ultimă probă a fost prelevată ca un test al stabilității în timp al proteinei în condițiile date.

Rezultatele acestor experiențe sunt prezentate în figura 41. După cum se poate observa, în mediul LB nivelul de expresie atins este unul foarte mare încă de la începutul inducției (figura 41. B, godeul 4). Stabilitatea proteinei este însă destul de redusă, după 24 de ore de cultivare nivelul scade la 20% din proteinele totale după 3 ore de inducție și la 12% din proteinele totale la sfârșitul celor 24 ore. În cazul cultivării pe mediul ZYP5052, expresia începe la 2 ore de la începerea culturii și crește treptat fără a atinge însă nivelul foarte ridicat din mediul LB. Astfel, după 7 ore nivelul de expresie atinge maximum de doar 15 % din proteinele totale, după 24 de ore de cultivare nivelul de expresie de se menține la 10% . Pe ansamblu, dinamica acumulării proteinei se caracterizează printr-o evoluție lentă pe parcursul a 6 ore, după care proteina recombinată se menține la un nivel cuprins între 10- 15 % din proteinele totale. Datorită vitezei de sinteză mai mică se are în vedere utilizarea acestui sistem de expresie pentru exprimarea și purificarea enzimei recombinante. Cantitatea mai redusă de proteină produsă va fi contracarată de nivelul mult mai mare de saturație pe care cultura îl atinge (154).

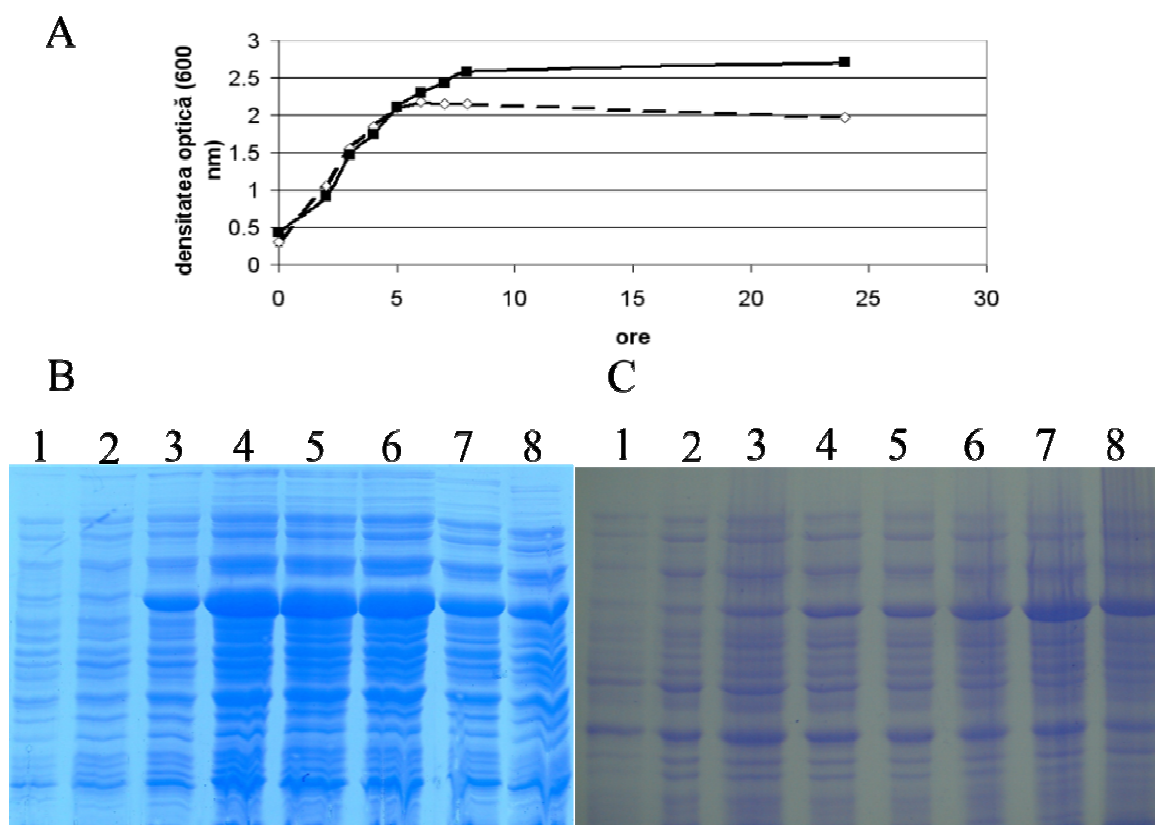


Figura 41. Dinamica supra-expresiei cadrului de citire 38

A. Curba de creștere a *E. coli* pH6EX3orf38 pe mediul LB – linie punctată și pe mediu ZYP5052- linie continuă.

B. Evoluția în timp a nivelului de proteină supraexprimată pe mediul LB.

C. Evoluția în timp a nivelului de proteină supra-expresată pe mediul ZYP5052. Probele au fost prelevate după cum urmează: 1- la momentul inoculării, 2 – la 2 ore după inoculare, moment în care cultura pe LB a fost indusă, 2-7 din oră în oră, 8- după 24 ore de cultivare.

Testul de solubilitate prin SDS-PAGE realizat cu proteina obținută prin cultivarea tulpinii pe acest mediu nu a indicat vreo îmbunătățire a solubilității.

Dacă până acum corpii de incluziune erau considerați un impediment, o situație fără ieșire, ei au început recent să fie priviți cu interes deoarece oferă două avantaje foarte mari: nivele mari și foarte mari de expresie a proteinei, chiar și a celei toxice pentru celula gazdă și ușurință în purificare. Corpii de incluziune conțin numai proteina supra-expresată și sunt foarte denși în raport cu celelalte componente celulare, astfel încât o etapă de centrifugare și una de spălare cu detergenți este suficientă pentru obținerea de preparate pure. Problema este însă readucerea în starea lor nativă, activă fiziologic, cu atât mai mult cu cât analiza secvenței de aminoacizi a ORF38 indică faptul că este o flavoproteină.

III.4. Cadrul de citire 39 codifică o aldehyd-dehidrogenază

III.4.1. Clonarea cadrului de citire 39

La 53 de baze de codonul STOP al cadrului de citire 38 este codonul START 35896-ATG pentru *orf39*. 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. Pentru clonarea ei am utilizat perechea de oligonucleotide cu secvența:

5'-CAG CCA TCG TGA TCA GCA ACA AGG-3'

5'-GTT GAA GGG TCG ACG CTG AGG GTT AG-3'

Aceste nucleotide flanchează o porțiune de ADN care începe cu poziția 35861 și se termină cu poziția 37329 și, prin modificarea nucleotidelor A35876 în T, A35875 în G, A35873 în C, C37318 în T, C37320 în A, au introdus situs-uri de restricție pentru *BclI* înainte cu 19 nucleotide de codonul START și *SalI* la 47 de nucleotide după codonul STOP. Pentru amplificare temperatura de asociere utilizată a fost de 56°C, iar timpul de amplificare de 2 minute și 30 secunde. În urma reacției de amplificare s-a obținut un fragment de aproximativ 1,5 kb care a fost supus digestiei enzimatice cu enzimele mai sus menționate. Vectorul pH6EX3 nu are un situs de clivare pentru *BclI*, însă capătul format de această enzimă este compatibil cu cel rezultat din acțiunea enzimei *BamHI*. Astfel a fost posibil ligarea fragmentului în vectorul digerat cu *BamHI* și *SalI*. Reacția de ligare s-a realizat prin utilizarea a unui microlitru de vector și 7 microlitri de fragment (fig. 42).

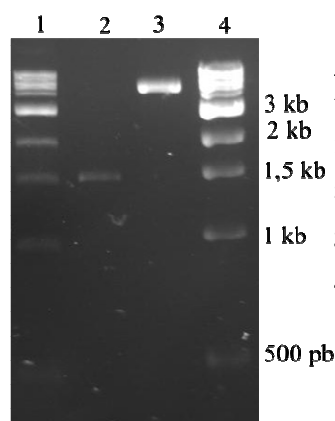


Figura 42. Fragmentul și vectorul linearizat utilizate în ligare:

1. marker, NEB 1kb DNA lader, 0,8 microl
2. *orf39* rezultat în urma digestiei, 3 microl
3. vectorul tăiat cu *BamHI* și *SalI*, 3 microl
4. marker, NEB 1kb DNA lader, 0,8 microl

În urma reacțiilor de ligare și transformare s-a obținut un număr de 10

colonii. Deoarece secvența formată prin ligarea capetelor *BamHI* cu *BclI* nu mai poate fi tăiată de nici una din aceste enzime, pentru o testare inițială s-a utilizat perechea *PstI/SalI*. Toate cele 10 colonii s-au dovedit a fi pozitive și, în mod aleator, am ales coloniile 2 și 5 pentru a fi testate mai în amănunt. Testarea s-a realizat utilizând enzimele din tabelul 19:

Tabelul 19. Enzimele utilizate pentru testare și fragmentele presupuse a rezulta în urma digestiei enzimatice

	I PstI	II PstI/SalI	III SacI/EcorV
pH6EX3	plasmidul linear, 4,8 kb	2 fragmente, unul de 3.3 kb și unul de 1,5 kb	plasmidul linear, 4,8 kb
pH6EX3orf39	2 fragmente, unul de 3,3 kb și unul de 3 kb	3 fragmente, unul de 1,3 1,4 kb și unul de 3,3 kb	2 fragmente, unul de 3.8 kb și unul de 2,5 kb

După cum se poate vedea în figura 43 panoul A, prezența cadrului de citire 39 duce la apariția a două situs-uri de restricție noi: *PstI* și *SacI*. Fragmentele rezultate în urma digestiei pot fi observate în figura 43, panoul C și ele corespund cu cele deduse teoretic. Se poate deci trage concluzia că gena a fost clonată corect.

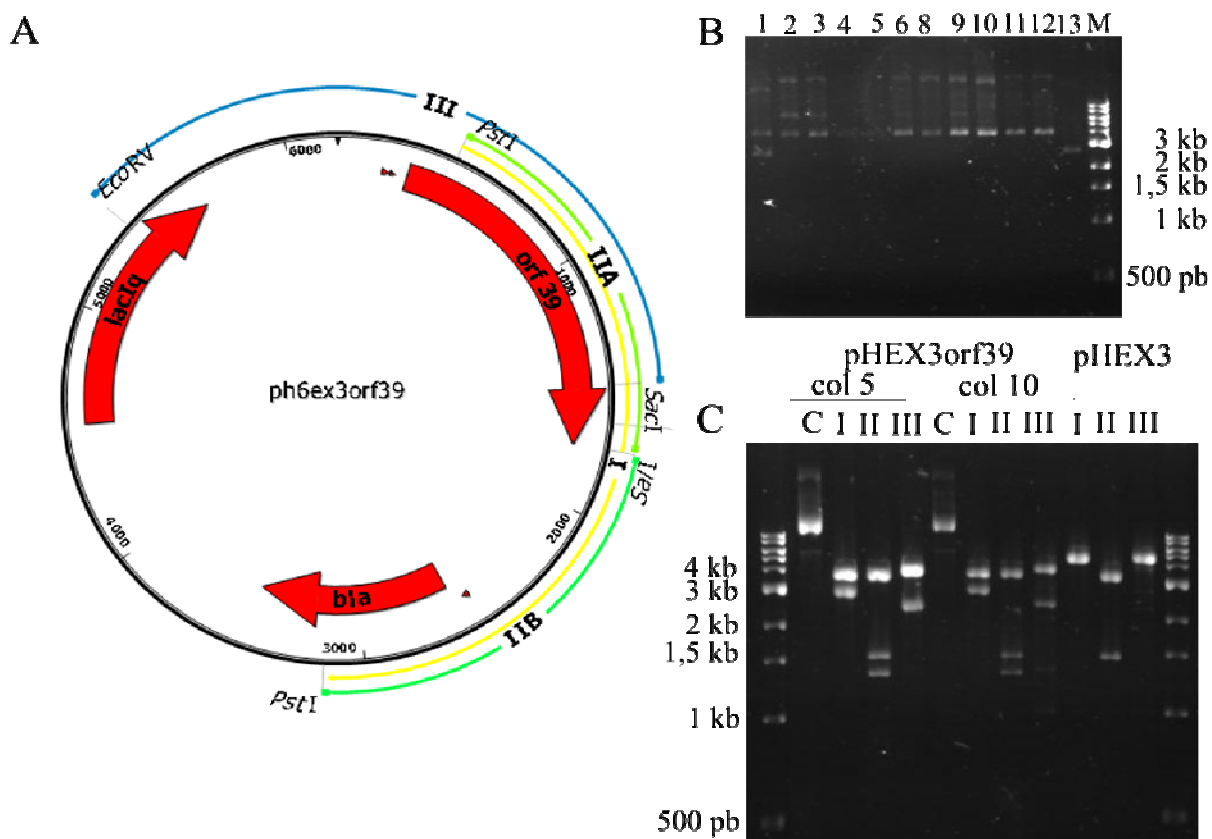


Figura. 43 Vectorul recombinat pH6EX3orf39.

A. Modul de inserare al fragmentului în vector și amplasarea situsurilor de restricție.

B. Comportamentul plasmidului recombinat (2-12; 5 microl) față de pH6EX3 (1,13; 5 microl).

C. Fragmentele rezultate prin digestia pH6EX3orf39 (2,3,4,5) și pH6EX3 (6,7,8,9) cu enzimele din tabelul 19 (C-control cu plasmidul circular, I,II,III- fragmentele rezultate prin digestia plasmidului cu enzimele corespunzătoare din tabelul 19).

III.4.2. Informații obținute prin analiza secvenței de aminoacizi a ORF39

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

- gabD1 și gabD2 – dehidrogenaze ale semi-aldehidei 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 aldehide 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(137). 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, mitochondriale ;
- clasa 3 – o specificitate îngustă față de substrat, frecvente în celulele tumorale(6; 169).

Realizând o aliniere 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 (aldehyd 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 20.

Tabelul 20. Echivalența aminoacizilor considerați înalt conservați în clasa aldehid-dehidrogenazelor și ORF 39

Rat-3 aldehyd dehidrogenaza citosolică din șobolan (AL3A1_RAT)	Aldehyd dehidrogenaza citosolică din ficatul de oaie (1BXS)	Aldehyd dehidrogenaza mitocondrială a 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 grupe nucleofile catalitice reprezentate de un rest de cisteină
Asn114	Asn170	Asn168	Asn135	- stabilizarea oxigenului carbonilic din substratul aldehidic în timpul catalizei
Cys243	Cys303	Cys301	Cys266	-gruparea tioică 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 marchează granița dintre 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 unui structuri

specifice tridimensionale de forma $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ cunoscută sub numele de Rossmann fold (171). Am realizat o predicție a structurii secundare a enzimei ORF39 cu ajutorul utilitarului Jpred (127), rezultatul fiind prezentat în figura 44. Demn de notat este faptul că succesiunea de structuri secundare este foarte asemănătoare cu cea descrisă de (209) pentru aldehyd-dehidrogenaza bovină (PDB id.1AG8).

[illegible]



Figura 44. Structura secundară a ORF39 dedusă teoretic. E- regiuni β -pliate, H-regiuni helicale. Numerotarea elementelor de structură secundară este realizată după Steinmetz și colab. (209).

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. (18). 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 44) 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 (18)).

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 adenzină 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 adenzină 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), Thr244 (Thr209), 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. (171), enzimele ce folosesc NAD⁺ au ca element de recunoaștere prezența unui rest de aminoacid dicarboxilic la sfârșitul unei structurii beta-pliate ce vine în contact cu OH 2' din structura adenozinei. 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 β 8, 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 (6)), enzima cu o mare afinitate

fata de NADP^+ ceea ar indica faptul că enzima codificată de *orf39* preferă NADP^+ .

Programele ESyPred3D (49), și 3D-JIGSAW (17) au modelat structura tridimensională a proteinei pe baza a două modele aldehyd-dehidrogenaza din ficatul de oaie (PDB id. 1bxs (159)) (cu care enzima din *Arthrobacter* are un grad de 30.4% identitate) și respectiv aldehyd-dehidrogenaza mitocondrială din ficatul uman (PDB id. 1cw3, (161) (29.7% identitate cu ORF39 și 95% identitate 1bxs (161))). Modelul este prezentat în figura 45, împreună cu o aliniere a secvenței de aminoacizi a acestor proteine.

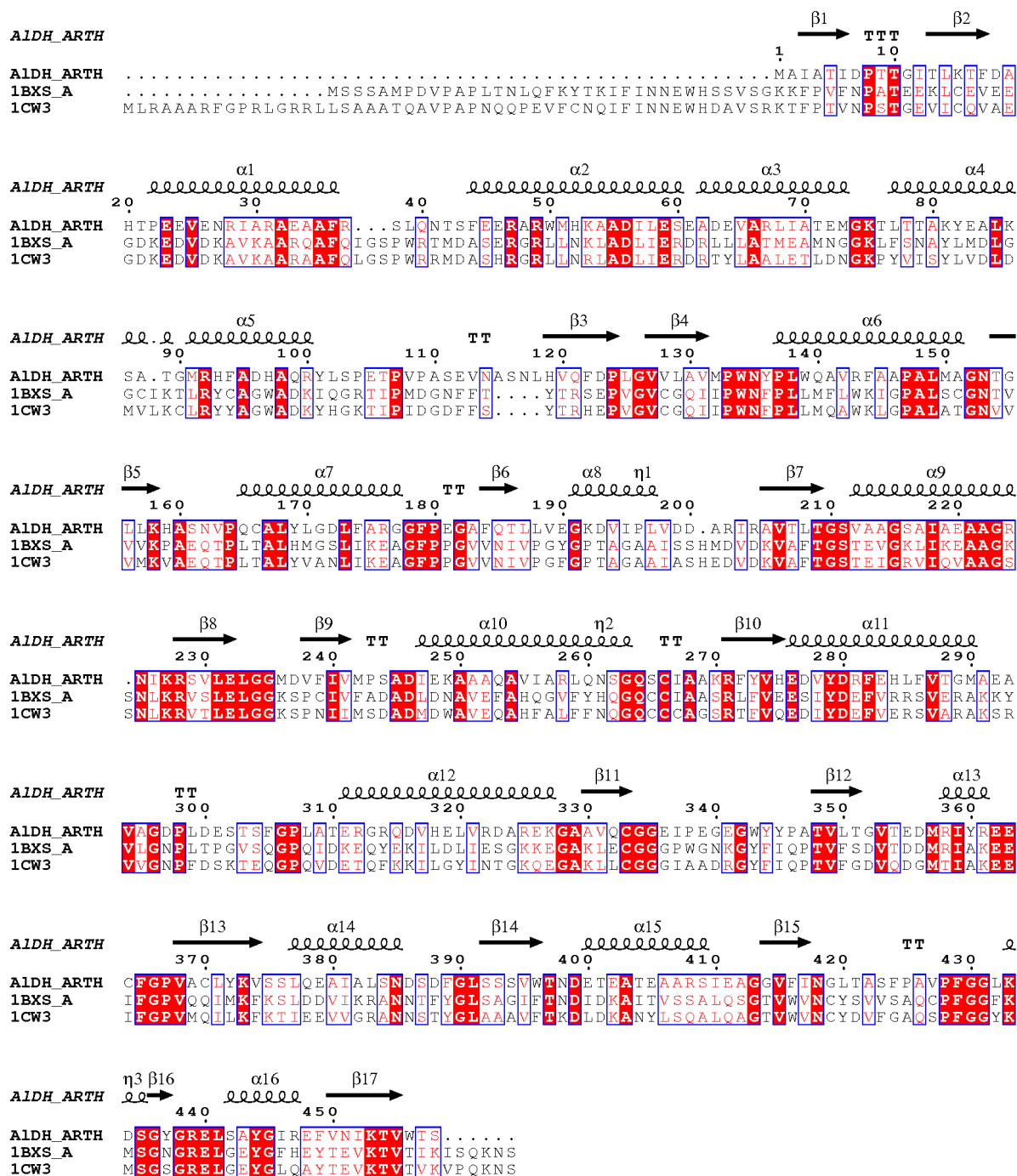


Figura 45. Aliniere pe baza omologiei de secvență și structură între ORF39 din *Arthrobacter nicotinovorans* și 1bxs - aldehyd-dehidrogenaza din ficatul de oaie, 1cW3 - aldehyd-dehidrogenaza mitocondrială din ficatul uman.

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 (48) demonstrează că enzima este liberă, solubilă, iar lipsa oricăror secvențe *leader* de export dovedește că enzima este una citoplasmatică.

III.4.3. Produsul cadrului de citire 39 este monomer în soluție

Cadrul de citire cu numărul 39 are 1376 nucleotide, ceea ce corespunde la un număr de 458 aminoacizi. Modul în care 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 native. Masa moleculară calculată teoretic pentru această proteină este de 51244.79 Da.

Testarea expresiei s-a realizat doar pe mediu LB, rezultatele obținute demonstrând faptul că proteina este puternic exprimată. Din această etapă s-a trecut direct la obținerea extractului de proteine solubile și purificarea proteinei recombinante utilizând mediul LB sau mediul autoinductibil, după metodologia descrisă în subcapitolul II.3.2., rezultatul obținut putând fi observat în figura 46. De notat este faptul că, purificarea enzimei în lipsa beta-mercaptoetanolului duce la pierderea completă a activității enzimatice, element ce susține experimental concluzia trasă prin analiza computerizată a secvenței de aminoacizi conform căreia Cys266 este gruparea tiolică implicată în cataliză. Din acest motiv, toate soluțiile tampon utilizate în purificare sau determinarea activității enzimatice au conținut acest compus în concentrația de 5 mM. Din 1L mediu am obținut în mod frecvent în jur de 5 mg proteină. Analiza gelului SDS-PAGE din figura 46 indică faptul că masa moleculară relativă este de 51.44 kDa, în bună concordanță cu masa moleculară dedusă teoretic, iar puritatea extractului obținut este de aproximativ 95 %.

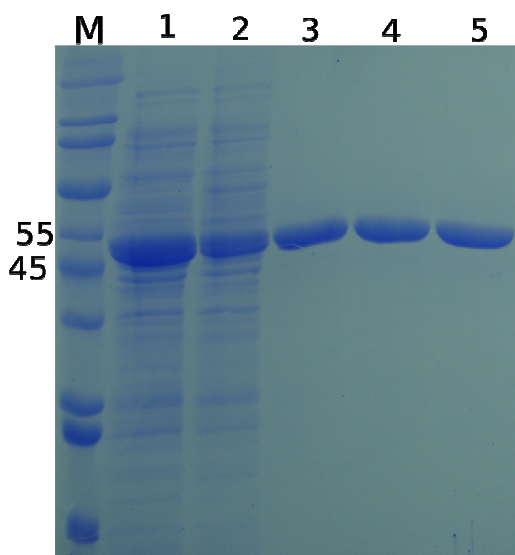


Figura 46. Gradul de puritate al preparatului enzimatic obținut prin IMAC.

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).

Deoarece aldehyd-dehidrogenazele din clasa 1 și 2 sunt tetramere, iar cele din clasa 3 sunt dimere(6) am avut în vedere determinarea masei moleculare prin cromatografie de filtrare prin gel. Am procedat urmând procedura descrisă în capitolul I. Aproximativ 1.6 mg proteină au fost injectate în coloana cromatografică, aceasta eluând 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 monomă.

III.4.4. Gena orf39 codifică o aldehyd-dehidrogenază ce preferă $NADP^+$

După purificare, proteina a fost supusă unor teste funcționale în vederea identificării substratului fiziologic și eventual a rolului ei în cadrul metabolismului microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans*. Metoda de măsurare a fost prezentată pe larg în cadrul capitolului II.7. Inițial, observația existenței unei activități dehidrogenazice în tuburile conținând enzima purificată a indicat ca un posibil substrat glicerolul. Testele cu glicerol din diverse surse și cu alți polioli (tabelul 21) au eliminat însă această posibilitate. O activitate de dehidrogenare a putut fi însă observată cu o serie de aldehide,

așa cum se poate vedea în tabelul 21.

Tabelul 21. Activitatea aldehyd-dehidrogenazică testată pe diverse substrat

Substrate testate	Activitate dehidrogenazică (nmoli NADPH/min/mg proteină)*
Glucoză	ND
Glucoză-6-P	ND
Galactoză	ND
Glicerol	ND
Sorbitol	ND
Manitol	ND
Xylitol	ND
Gliceraldehidă	93.78
Glutaraldehidă	77.71
Formaldehidă	26.8
Butiraldehidă	229.1
Benzaldehidă	36.17
Eritroză	ND
Semialdehida acidului succinic	ND

*Activitatea a fost măsurată în condițiile standard descrise în capitolul II, punctul II.7, folosind NADP în calitate de cofactor.

ND- activitatea aldehyd-dehidrogenazică nu a fost detectată.

După cum se poate observa din tabel, aceste teste preliminare demonstrează existența unei activități de dehidrogenare a unor aldehyde simple. Reacția observată este dependentă de cantitatea de enzimă (fig.47 A) și de substrat (gliceraldehidă, fig.47, B).

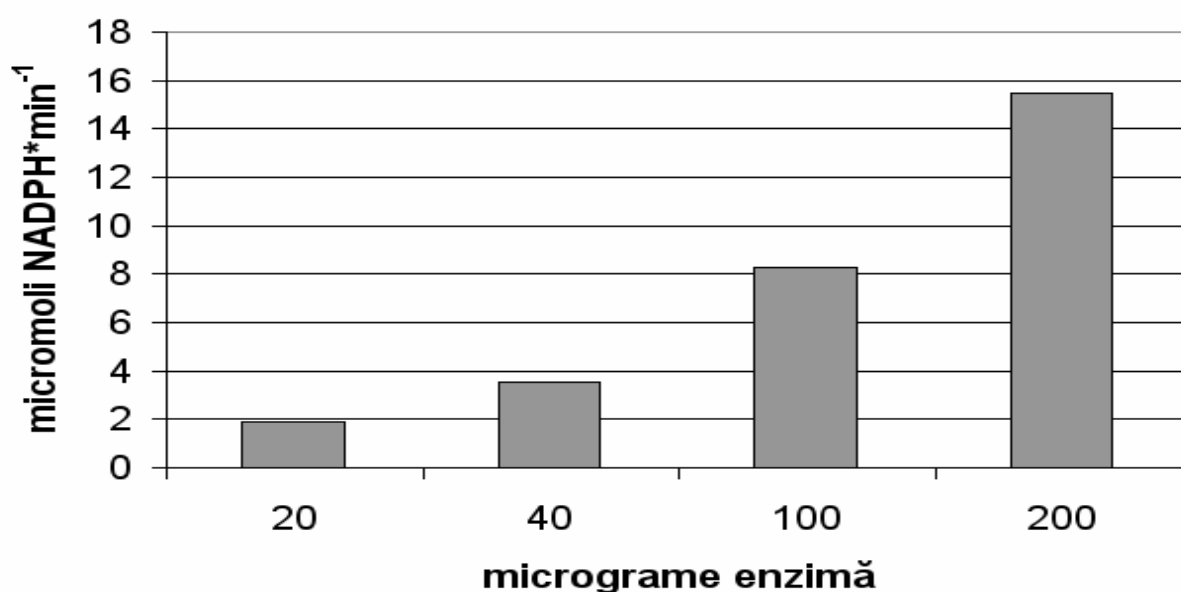
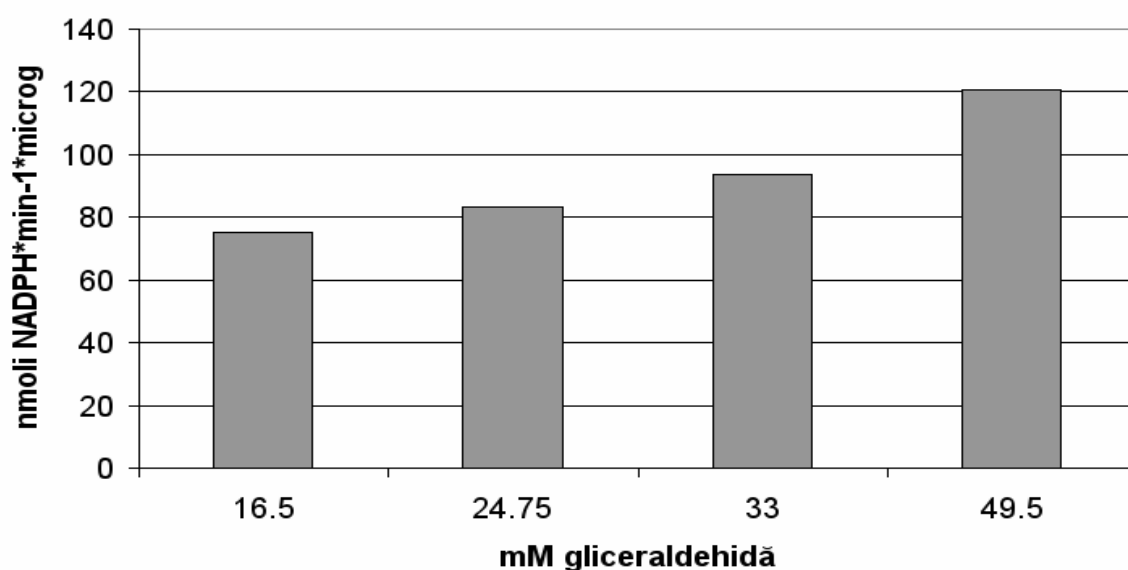
A**B**

Figura 47. Dependența reacției de dehidrogenare de cantitatea de enzimă (A) și de cantitatea de substrat (B)

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 22. 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 adenozei 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 (226) și Ahvazi, 2000(6). Enzima codificată de cadrul de citire 39 de pe megaplasmidul pAO1 este deci o aldehyd-dehidrogenază NADP-dependentă (ALDH) (153).

Tabelul 22. 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

III.4.5. 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 48, 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.

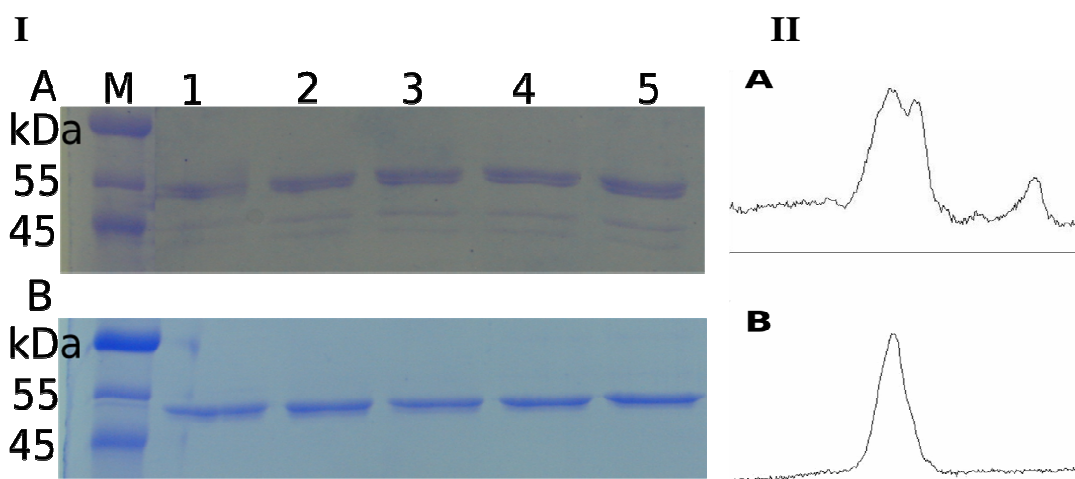


Figura 48. I. Modul de migrare diferit al enzimei ALDH purificate în lipsa β-mercaptoetanolului (A) și în prezența acestuia (B).

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 (2).

Comportamentul 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 (93). 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 nemaîntâlnit de noi în literatură. Acest lucru ar putea fi explicat prin faptul că legătura este ascunsă în structură, 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.

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) (138) (figura 49), presupunând un atac nucleofil al Cys din situs-ul activ ce duce la formarea unui intermediar covalent. Aceasta face ca carbonul din gruparea aldehydică să capete o formă tetraedrală, permițând astfel transferul unui ion H^+ de la acest atom la poziția C-4 din inelul nicotinamidic. 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.

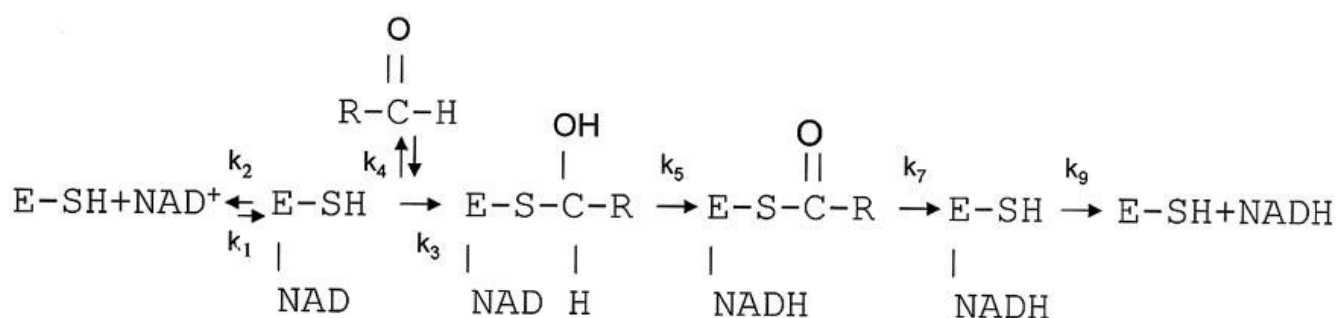


Figura 49. Mecanismul de acțiune al aldehyd-dehidrogenazelor, după Ki Ho (2005) (112), presupune un atac nucleofil al Cys din situs-ul activ și formarea

un intermediar covalent.

III.5. ORF40 codifică o proteină tetrameră cu o posibilă funcție oxido-reductază

III.5.1. Clonarea cadrului de citire 40

Pentru clonarea acestui cadru de citire au fost sintetizate *in vitro* o pereche de nucleotide care încadrează un fragment de ADN de pe pAO1 ce începe cu poziția 37331, la 18 nucleotide de codonul ATG și se termină cu poziția 38535, după 20 nucleotide de codonul stop 38512-CTA. Primer-ii sunt denaturați și introduc situs-uri de clivare pentru *HindIII* și pentru *XhoI*, situs-ul pentru *HindIII* rezultând din modificarea codonului START iar cel pentru *XhoI* fiind plasat la 4 nucleotide de codonul STOP nativ al cadrului de citire 40.

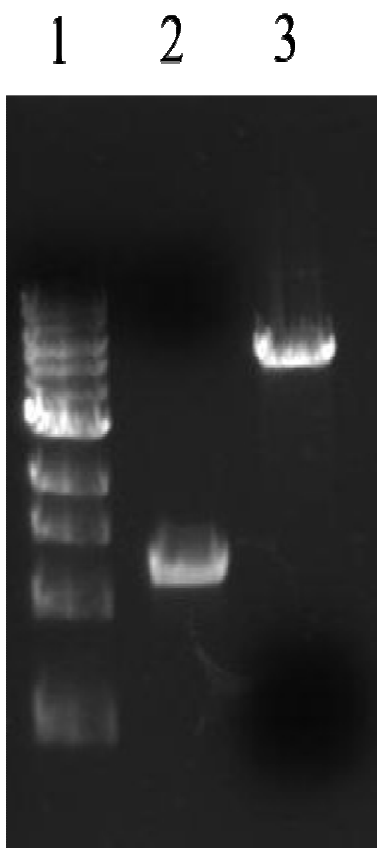
Secvența nucleotidelor a fost:

5'-C TCT GAG GAA GCT TTG ACT AAA ACA GC-3'

5'-G GAA GGA TGC TCG AGG TCA TTA GAG C-3'.

Etapă de asociere a primerilor la matricea ADN din cadrul programului de amplificare utilizat a fost realizată la temperatura de 56°C, iar etapa de sinteză a durat 2.5 minute. În acest fel a fost amplificat un fragment de aproximativ 1200 pb. Fragmentul și vectorul pH6EX3 au fost clivați cu enzimele indicate mai sus, și apoi utilizați în reacția de ligare. Aceasta s-a realizat urmând protocolul descris în sub-capitolul II.2.3 folosind 2 microlitri de plasmid și 6 microlitri din soluția conținând vectorul (figura 50).

Figura 50 Fragmentul și vectorul linearizat utilizate în ligare:



1. Marker, NEB 1kb DNA lader, 0,8 microl
2. Orf 40 rezultat în urma digestiei, 5 microl
3. Vectorul tăiat cu *HindIII* și *XhoI*, 3 microl

Acest raport vector:fragment a dus la obținerea unui număr de 15 colonii care se comportă diferit de plasmidul pH6EX3 pe gelurile de agaroză (figura 51, panoul B). Două dintre acestea (coloniile 1 și 3) au fost alese și testate prin digestie cu enzimele a căror localizare se poate observa în panoul A din figura 51. Fragmentele presupuse a apare în cazul integrării corecte a fragmentului sunt prezentate în tabelul 23.

Tabelul 23. Enzimele utilizate pentru verificare și fragmentele presupuse a rezulta în urma digestiei enzimatice a pH6EX3 și pH6EX3orf40

	I <i>HindIII/XhoI</i>	II <i>Xho/EcorV</i>	III <i>SalI/EcoRV</i>
pH6EX3	plasmidul linear, 4,8 kb	2 fragmente, unul de 3.7 kb și unul de 1,1 kb	2 fragmente, unul de 3.7 kb și unul de 1,1 kb
pH6EX3orf40	2 fragmente, unul de 1,2 kb și unul de 4.8 kb	2 fragmente, unul de 3.7 kb și unul de 2,3 kb	2 fragmente, unul de 4,6 kb și unul de 1,4 kb

După cum se poate observa din figura 51, panoul C, numărul fragmentelor și dimensiunile lor corespund cu cele presupuse teoretic. Cele două colonii au fost testate pentru expresia proteinelor.

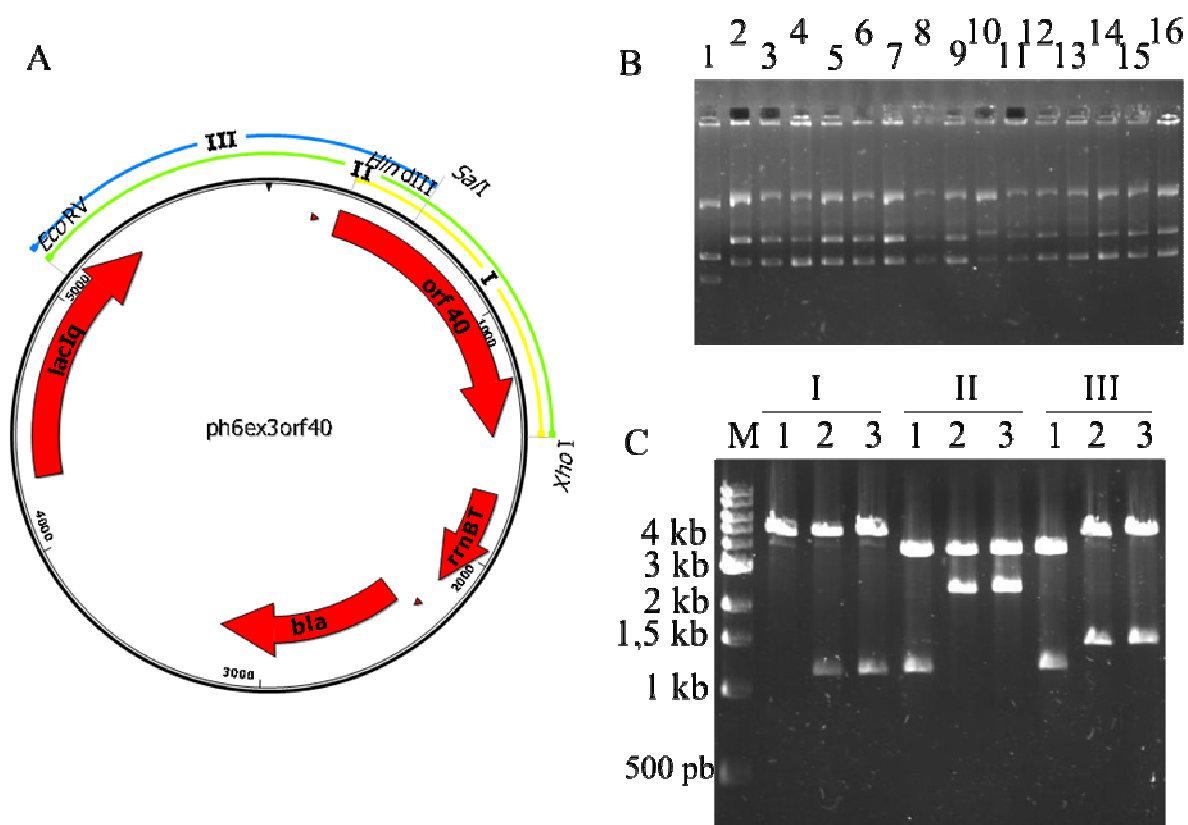


Figura 51. Vectorul recombinat pH6EX3orf40.

- A. Modul de inserare a fragmentului în vector și amplasarea situsurilor de restricție.
- B. Comportamentul plasmidului recombinat (2-16; 5microl) față de pH6EX3 (1; 5 microl).
- C. Fragmentele rezultate prin digestia pH6EX3orf40 (2,3) și pH6EX3 (1) cu enzimele din tabelul 23 (M-marker, NEB 1kb DNA lader, 0,8 microl, I,II,III- fragmentele rezultate prin digestia plasmidelor cu enzimele corespunzătoare din tabelul 23).

III.5.2. Informații obținute prin analiza secvenței de aminoacizi a *ORF40*

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 (139) 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(126) indică că cea mai apropiată proteină ca structură cu ORF40 este GFO, în timp ce Swiss Model (200), 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 52.

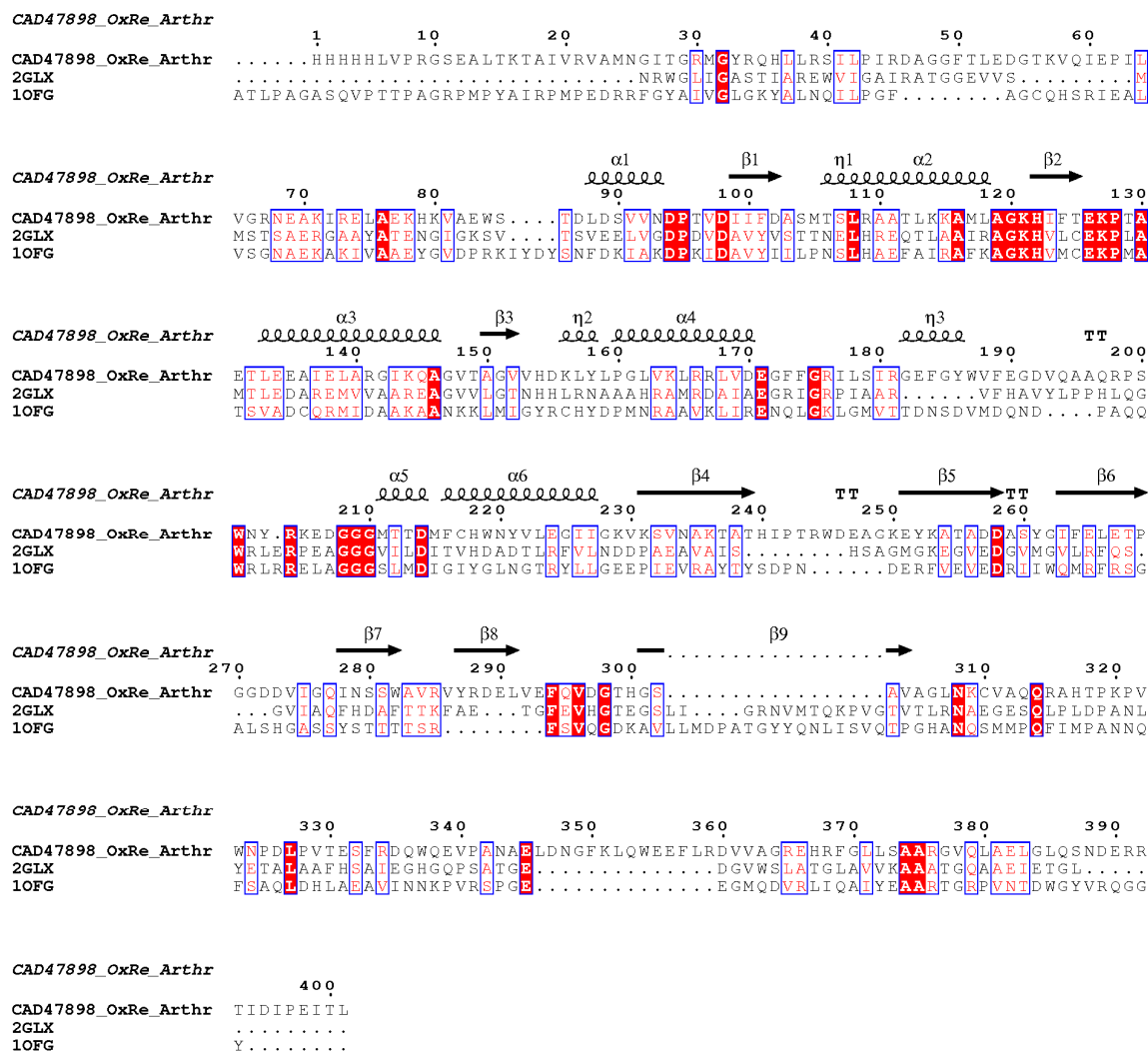


Figura 52. Aliniere pe baza omologiei de secvență și structură între ORF40 din *Arthrobacter nicotinovorans* și IGLX - 1,5-anhidro-D-fructoz-reductaza NADP(H) dependentă

10FG - 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* (106). Specific acestei enzime este faptul că leagă foarte puternic NADP-ul, fără însă a forma o legătură covalentă (114). 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 24). Numărul de legături de H formate cu NADP⁺-ul în cazul GFO este de 21 (114), 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 24. 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
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 adenozei 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 (50). 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 (171). 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 (236).

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 (50). 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 ar fi 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 M⁻¹ 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 (48) demonstrează că enzima este liberă, solubilă, iar lipsa oricăror secvențe leader de export demonstrează că enzima este una citoplasmatică.

III.5.2. 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, puritatea preparatului enzimatic obținut putând fi

observată în figura 53. În urma densitometrării gelului, gradul de puritate măsurat a fost de aproximativ 95%, iar masa moleculară relativă de 47 kDa, în bună concordanță cu masa moleculară dedusă teoretic.

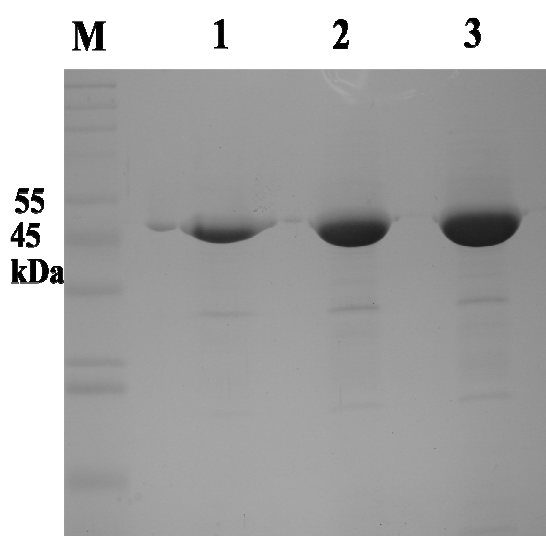


Figura 53. Gradul de puritate al preparatului obținut în urma purificării prin

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.

Deoarece proteinele cu care produsul de translație al *orf40* se înrudește cu proteine ce au variate stadii de oligomerizare, de la tetrameri la monomeri, am încercat determinarea masei moleculare native a acestei proteine prin filtrare pe gel Superdex HiPrep 200. Metodologia a fost descrisă la subcapitolul II.4, iar cromatograma obținută este prezentată în figura 54.

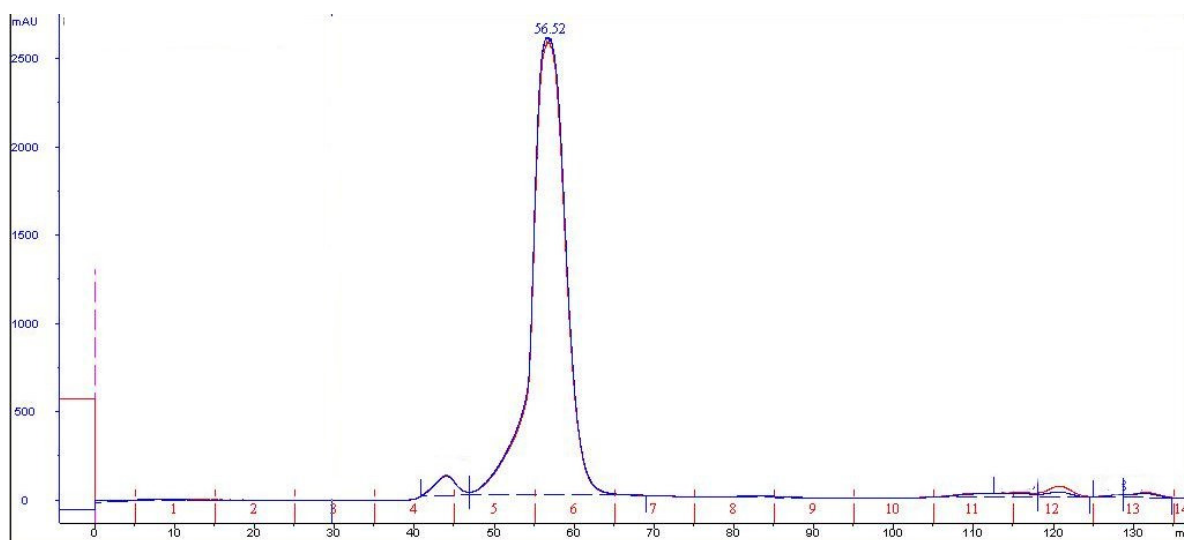


Figura 54. Cromatograma obținută în urma filtrării prin gel a preparatului enzimatic conținând ORF40. Aproximativ 10 mg proteină într-un volum de 600 microl au fost injectate pe o coloana HiLoadSuperdex 200 PrepGrade (Amersham, Elveția)

După cum se poate observa din figură, 2 peak-uri pot fi decelate clar, 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 (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 structuri tetramere. Același comportament a fost descris și la GFO (114), partea responsabilă de

oligomerizare fiind indicată ca fiind acel braț 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.

III.5.3. ORF40 conține Zn slab legat

După concentrarea preparatului proteic obținut prin utilizarea unui filtru centrifugal Vivaspın MWCO 3000, s-a putut observa că, soluția obținută, având o concentrație de 34 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$, avea o tentă ușor maronie. Un spectru al soluției proteice denotă existența unui peak de dimensiuni mari la 275 nm caracteristic proteinelor, dar și un umăr la 405 nm (figura 55). Aceste două elemente ar indica prezența unui cofactor enzimatic, din aceste motive am analizat conținutul de Mn, Zn și Fe al preparatului obținut. Rezultatele au arătat un conținut neglijabil de Fe și Mn, însă conținutul de Zn ar indica faptul că molecula proteică conține acest element. Un aspect interesant este faptul că, de asemenea, și filtratul are un conținut apreciabil de Zn, însă soluția tampon utilizată pe parcursul purificării nu.

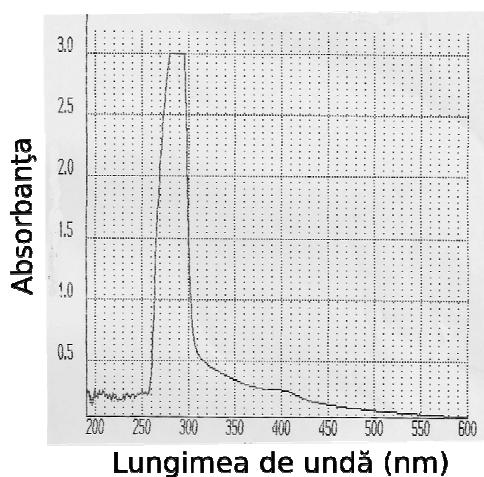


Figura 55. Spectrul de absorbție al proteinei purificate.

Tabel. 25. Conținutul de Zn al probelor analizate

Proba analizată	Conc Zn (mg/L)
Soluția tampon Hepes 40 mM, NaCl 500 mM, folosită pentru purificare	1,7
Filtratul	27,2
Soluția concentrată de proteină	43,2

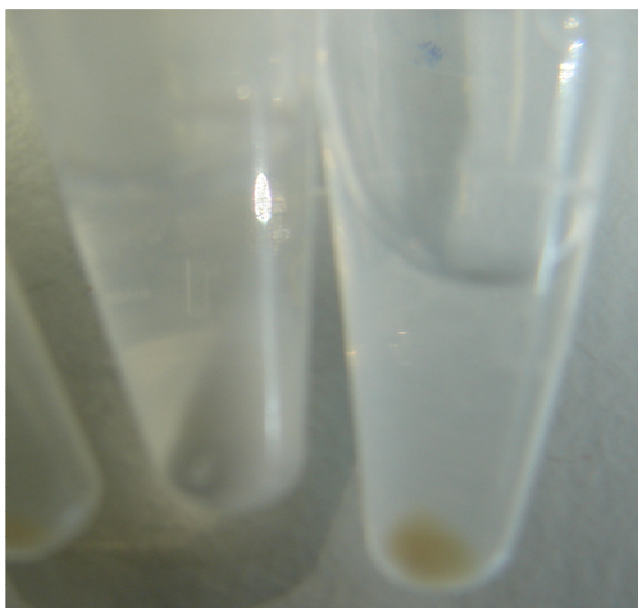


Figura. 56. Comportamentul diferit al precipitatului proteic funcție de agentul de precipitare.

A. Precipitare la frigider, culoare maro.

B. Precipitare prin tratare cu ATC 5% sau fierbere 95°C, culoare albă.

A

B

Soluția concentrată de proteină menținută la frigider pentru o perioadă mai mare de timp formează un ușor precipitat. La inspectarea vizuală a precipitatului format se poate observa că acesta are culoare maro (figura 56). 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. Această observație este în bună concordanță cu prezența Zn în filtrat și se explică prin aceea că acest element este legat necovalent de apoenzimă. Precipitarea în frigider se realizează cu menținerea unui 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* (213) sau pentru manitol dehidrogenaza din *Leuconostoc pseudomesenteroides*, un atom fiind implicat în reacția enzimatică iar celălalt având rol structural (87). 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 (113). 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 realizate după metoda descrisă în subcapitolul II.5 au demonstrat însă că enzima purificată nu conține acest cofactor legat în mod stabil.

III.5.4 Analiza in silico a preferinței de substrat

Pentru a stabili candidații potențiali ca substrate pentru enzima purificată, au fost realizate o serie de experimente *in-silico* utilizând programul dock6, un model tridimensional al ORF40 ca receptor și 29 glucide diferite ca liganzi. O asemenea abordare a fost realizată de Kriz și colab. (121) și Adam și colab. (4) pentru investigarea preferinței de substrat a lectinelor.

Toate modelele moleculelor de liganzi se pot lega de molecula receptor, modul de legare variind însă. Două din glucidele testate (O1-metil-glucoza și L-xilulozo-P) se leagă la suprafața moleculei și le-am omis. Restul de molecule ligand sunt grupate în două regiuni distincte (figura 57), pe care le-am notat situs A și situs B.

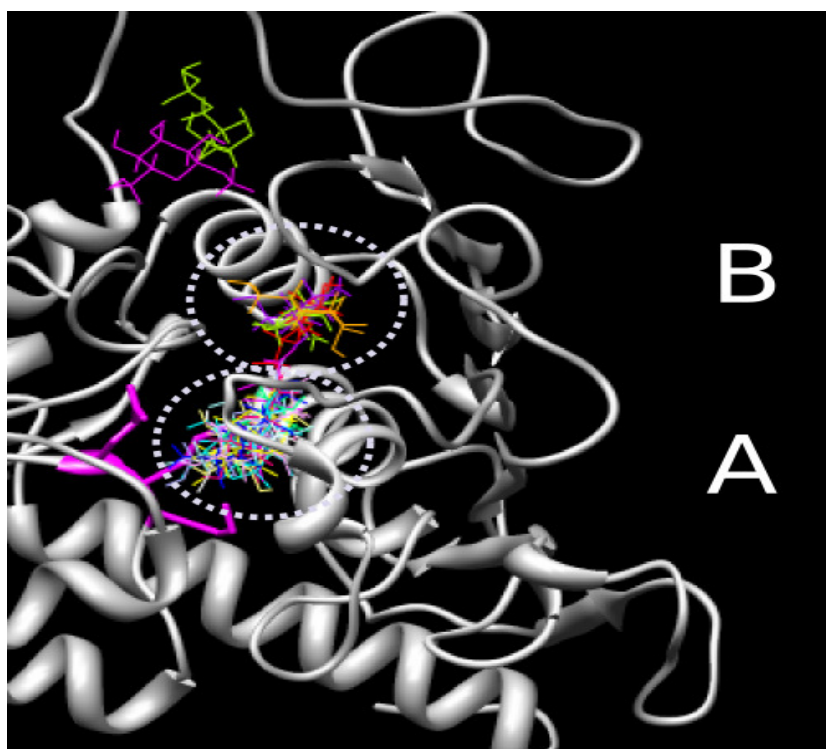


Figura 57. Cele doua situs-uri de legare a glucidelor din structura teoretică a ORF40. Situs A – locul de legare a 23 din cele 29 glucide testate, Situs B – locul de legare a 4 din cele 29 glucide testate.

Enzima GFOR, pe baza căreia a fost generată structura ORF40, acționează asupra glucidelor printr-un mecanism de ping-pong: glucoza este legată, transformată în gluconolactonă și eliberată, apoi fructoza este legată în situs-ul catalitic, redusă la sorbitol și eliberată. În mod surprinzător ambele substrate sunt legate la același situs (164), aproape de motivul 128-EKP-130. Cei trei aminoacizi sunt implicați în mod direct în cataliză și în legarea NADP⁺-ului. În structura ORF40, numai situs-ul A este în vecinătatea secvenței echivalente 126-EKP-128 (cei trei aminoacizi sunt marcați cu purpuriu în figura 57). Acest element, alături de faptul că 23 din 29 glucide testate se leagă de acest situs, indică faptul că situs-ul A este adevăratul loc de legare al substratului în ORF40.

Preferința pentru substrate. Pe lângă indicarea situs-ului de legare a substratului, programul **dock6** permite și cuantificare forței cu care are loc legarea prin calcularea unei energii de interacțiune (docking score). Rezultatele obținute pot fi observate în tabelul 26, împreună cu sursa de unde a fost preluat model tridimensional al ligandului și situs-ul de legare.

Tabelul 26. Liganzii utilizați și punctajele obținute în experiențele de docking *in-silico*

Ligand	Sursa (pdb id sau baza de date zinc)	Docking score	Situs de legare
D-Tagatoza	tag	-31.34	A
D-Psicoza	fru	-28.81	A
L-Sorboza	ZINC	-28.81	A
D-Xiloza	xls	-28.47	A
L-Xiluloza	xul	-28.45	A
D-Glucoza	bgc	-27.62	A
D-Fructoza	fru	-27.45	A
L-Xiluloza, lineară	xul	-27.24	A
D-galactoza	gal	-26.74	A
Anhidro-L-galactoza	ZINC	-26.53	A
D-lyxopyranoza	ldy	-26.47	A
L-xyloaza	ZINC	-25.93	A
D-sorboza	ZINC	-25.86	A
α -L-arabinoza	ara	-25.13	A
D-Deoxiriboza	ZINC	-24.56	A
L-riboza	ZINC	-24.48	A
β -L-arabinoza	arb	-24.36	A
D-mannoza	bma	-23.72	A
Anhidro-D-galactoza	ZINC	-23.23	A
D-Eritruloza	ZINC	-23.09	A
L-Manopiranoza	ZINC	-22.31	A
D-Eritroza	ZINC	-22.12	A
L-Treoza	ZINC	-22.12	A
D-Glicerinaldehida	ZINC	-18.4	A

Ligand	Sursa (pdb id sau baza de date zinc)	Docking score	Situs de legare
D-Aloza	aos	-27.22	B
L-manoza	ZINC	-23	B
L-Glucoza	BLGL	-22.6	B
D-beta-glucoza	glu	-22.33	B
L-Xiluloz-5-fosfat	lx1	-34.21	exterior
O1-metil-glucoza	MGL	-25.29	exterior

După cum se poate observa, enzima pare să prefere tagatoza, psicoza și sorboza. Această concluzie este în buna concordanță cu datele obținute anterior legate de ALDH. Astfel, dehidrogenarea cetohehexozelor de către ORF40 duce la formarea aldehidei corespunzătoare cu doi atomi de C mai scurtă, care este în continuare dehidrogenată de ALDH și transformată în acid, acesta fiind apoi integrat în ciclul Krebs. Punctul de plecare al acestui lanț de reacții nu poate fi o aldohexoză, deoarece produsul de dehidrogenare este direct un acid.

Am încercat evidențierea unei activități glucid-reducătoare utilizând enzima purificată și metodologia descrisă de Zachariou (239) și de Satory (198). Metoda de dozare a activității GFOR folosește gluconolactonaza. În principiu, gluconolactonaza are rolul de a hidroliza rapid produsul de reacție a GFOR (gluconolactonă) în acid glucuronic, acesta fiind cuantificat prin utilizarea unui indicator de pH (p-nitrofenol) sau prin titrare. În principiu, utilizarea glucunolactonei nu este obligatorie, deoarece în condiții normale glucunolactona hidrolizează spontan. Deoarece această enzimă nu a fost disponibilă la momentul realizării experimentelor, nu am putut realiza o reacție cuplată. Am realizat totuși o reacție de evidențiere a activității oxidoreducătoare a ORF40 asupra diverselor substrate în prezența $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$, modificarea pH-ului fiind urmărită cu ajutorul p-nitrofenolului pe parcursul a 24 ore. Nu am reușit însă să evidențiem clar o activitate enzimatică.

Concluzii

Datorită celor două căii metabolice distincte investigate, concluziile experimentelor efectuate se grupează funcție de acestea.

Legate de enzima codificată de cadrul de citire 54, enzimă implicată în etapele finale ale degradării nicotinei:

1. ORF 54 este o enzimă cu masa moleculară de 23 kDa, tetrameră în soluție, conținând FMN necovalent legat în calitate de cofactor.
2. Enzima este o NAD(P)H:chinon oxido-reductază (E.C. 1.6.99.2) al cărei substratul fiziologic este 4,4',5,5'-tetrahidroxi-3,3'-diazodifeno-chinonă (albastrul de nicotină, NB) ($V_{\max}/K_m$ 310,8 s⁻¹), dar poate cataliza cu randament mai mic și dehidrogenarea altor substrate precum 1,4 – naftochinină, 1,4 – benzochinonă, 2,6 – diclorfenol indofenol, menadionă, durachinonă. Enzima a fost numită NAD(P)H – albastru (blue) de nicotină – oxido-reductază (NBOR)
3. ORF 54 pare să funcționeze după un mecanism ce presupune transferul simultan a 2 electroni de la coenzima (NADH) la substrat (NB)
4. Rolul fiziologic al enzimei este de a reduce rapid NB prin transferul celor 2 electroni, hidrochinona formată fiind mai hidrosolubilă și mai ușor de eliminat din celulă. Astfel, pericolul autooxidării și formării de ioni superoxid este mult redus, NBOR protejând celula în mod activ împotriva stresului oxidativ.

În legătură cu enzimele implicate într-o posibilă cale de degradare a glucidelor, concluziile sunt următoarele:

1. Microorganismul *Arthrobacter nicotinovorans* poate metaboliza inulina și melibioza doar dacă megaplasmidului pAO1 este prezent în celulă. Din analiza secvenței acestui megaplasmid, s-au putut identifica 3 grupe de gene cu posibil rol în metabolizarea glucidelor. Gruparea cea mai voluminoasă ca număr conține o celulază, un factor de reglaj al transcripției, un sistem de transport transmembranar, 3 dehidrogenaze și oxido-reductaze, o aldolază și o

glicero-kinază.

2. S-a încercat clonarea genei *orf24* ce codifică o presupusă celulază în vectorul de expresie pH6EX3. Secvențierea clonei obținute a indicat o eroare în procesul de clonare, ceea ce a dus la modificarea cadrului de citire și imposibilitatea expresiei și purificării enzimei recombinante.
3. Facând parte din acest grup masiv, cadrul de citire 38 codifică o presupusă ceto-gluconat dehidrogenază cu masa moleculară de 58 kDa, exprimată sub formă de corpi de incluziune în *Escherichia coli*. Utilizarea unei tulpini cu expresie redusă de proteaze (*E.coli BL21*), a unor temperaturi și viteze de agitare variate, nu au dus la îmbunătățirea solubilității acestei proteine și din acest motiv nu a putut fi caracterizată mai în detaliu.
4. Cadrul de citire 39 codifică aldehyd-dehidrogenază (ALDH) cu masa moleculară de 51 kDa care este monomeră în soluție.
5. În centrul activ al acestei enzime se află un rest de cisteină (Cys266), mecanismul de acțiune implicând formarea unui intermediar covalent între substrat și acest aminoacid.
6. Aldehyd-dehidrogenaza descrisă preferă NADP⁺-ul în defavoarea NAD⁺ în reacția de dehidrogenare a aldehydelor simple precum gliceraldehida, glutaraldehida, formaldehida, butiraldehida și benzaldehida.
7. Cadrul de citire 40 codifică o oxido-reductază cu masa moleculară de 47 kDa, homotetrameră în stare nativă.
8. ORF40 purificată conține Zn slab legat, într-un raport aparent de 2 atomi de metal/moleculă monomer. Probabil unul dintre atomii de Zn are rol structural, celălalt rol în cataliză.
9. Analiza *in silico* a specificității pentru substrat a indicat preferința enzimei pentru cetohexoze, legarea realizându-se într-un situs apropiat de secvența consens 128-EKP-130.
10. Funcțiile atât teoretice cât și cele demonstrate practic ale proteinelor codificate de *orf38*, *orf39* și *orf40* indică faptul că alcătuiesc o serie de etape dintr-o cale catabolică. ORF 40 asigura dehidrogenarea

unui glucid necunoscut, cu formarea unei aldehide pe care ORF39 o dehidrogenează cu formarea unui acid sau a unui ceto-acid. Acesta este introdus în ciclul acizilor tricarboxilici fie direct, fie prin acțiunea ORF38.

Bibliography

- (1) Aaij, C., Borst, P., 1972 - The gel electrophoresis of DNA, *Biochim Biophys Acta* **269**:192-200.
- (2) Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004 - Image processing with Imagej . *Biophotonics International* **11**(7):36-42.
- (3) Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Park, C.H., Blake, R., Keyhan, M., Martin, A., 2004 - Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **70**:873-882.
- (4) Adam J., Kriz., Malinovska L., Lameignere E., Imberty A., Koca J., Wimmerova M., 2008 - Studying the binding properties of bcla lectin - experiment and modelling. *FEBS Journal*, **275** (supplement 1):157.
- (5) Agarwal, R., Bonanno, J.B., Burley, B.K., Swaminathan, S., 2006 - Structure determination of an FMN reductase from *Pseudomonas aeruginosa* pAO1 using sulfur anomalous signal. *Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr.* **62**:383-391.
- (6) Ahvazi B., Coulombe R., Delarge M., Vedadi M., Zhang L., Meighen L., Vrielink A., 2000 - Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio Harveyi* : structural implications for cofactor specificity and affinity . *Biochem. J.* **349**:853-861.
- (7) Andrade, Susana L.A., Patridge, E.V., Ferry, J.G., Einsle, O., 2007 - Crystal structure of the NADH:quinone oxidoreductase Wrba from *Escherichia coli* . *J Bacteriol* **189**:9101-9107.
- (8) Artenie V., Ungureanu E., Negura Anca-Mihaela, 2008 - *Metode de investigare a metabolismului glucidic si lipidic* , Editura Pim; Iași, 47-53
- (9) Artenie Vlad, 1991 - *Biochimie*, edit. Univ. Al. I Cuza, Iasi, 45-49, 285-296
- (10) Atlas, M. R., 2005 - *Handbook of media for environmental microbiology* , Taylor & Francis Group; 1203 – 1245
- (11) Atsushi I., Hiroyuki I., Takafumi M., Harauhide M., Hirokazu M., Mamora H., Gentaro Oka., Eiya C., 1994 - Molecular cloning and expression of an isomalto-dextranase gene from *Arthrobacter globiformis* T6. *Journal of Bacteriology* **176**(24):7730-7734.
- (12) Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. , 2003 - *Current protocols in molecular biology* , John Wiley & Sons, Inc.;
- (13) Ausubel M.F., Brent R., Kingston E.R., Moore D.D., Seidman J.G., Smith A.J., Struhl K., 2002 - *Short protocols in molecular biology* , John Wiley & Sons; New York, 2759-2897
- (14) 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 . *J Bacteriol* **183**(18):5262-5267.
- (15) Baldi., Cheng J., Vullo A., 2005 - Large-scale prediction of disulphide

- bond connectivity , MIT press; 62-67.
- (16) Barrell, B.,1991 - DNA sequencing: present limitations and prospects for the future. *FASEB J.* **5**:40-45.
 - (17) Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M., Sternberg, M.J., 2001 - Enhancement of protein modelling by human intervention in applying the automatic programs 3d-jigsaw and 3d-pssm. *Proteins: Structure, Function and Genetics, Suppl* **5**:39-46.
 - (18) Bellamacina R.C., 1996 - The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB Journal* **10**:1257-1269.
 - (19) Berman, H.M., Bhat, T.N., Bourne, P.E. Feng, Z., Gilliland, G., Weissig, H., Westbrook, J., 2000 - The protein data bank and the challenge of structural genomics. *Nat Struct Biol* **7 Suppl**:957-959.
 - (20) Berman, He., Henrick, K., Nakamura, H., 2003 - Announcing the worldwide protein data bank. *Nat Struct Biol* **10**:980.
 - (21) Bernauer H., Mauch L., Brandsch R., 1992 - Interaction of the regulatory protein ncr1 with the promoter region of the pAO1-encoded 6-hydroxy-d-nicotine oxidase gene of *Arthrobacter oxidans*. *Molecular Microbiology* **6**:1809-1820.
 - (22) Berthold H., Scanarini M., Abney C.C., Frorath B., Northemann W., 1992 - Purification of recombinat antigenic epitopes of the human 68-kda ribonucleoprotein antigen using the expression system pH6EX3 followed by metal chelating affinity chromatography. *Protein Expr Purif* **3**:50-56.
 - (23) Birnboim, H.C., Doly, J., 1979 - A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinat plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-1523.
 - (24) Borodina E., Donovan K.P., Schumann P., Rainey A.F., Ward-Rainey L.N., Wood P. Ann, 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.
 - (25) Bouche N., Fait A., Bouchez D., Muller G.S., Fromm H., 2000 - Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *PNAS* **100**(11):6843-6848.
 - (26) Bourel, G., Henini, S., Diviès, C., Garmyn, D., 2003 - The response of *Leuconostoc mesenteroides* to low external oxidoreduction potential generated by hydrogen gas. *J Appl Microbiol* **94**:280-288.
 - (27) Bradford, M., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**:248-254.
 - (28) Brandsch R., Decker K., 1984 - Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxidans*. *Arch Microbiol* **138**(1):15-17.
 - (29) Brandsch R., Bichler V., 1990 - Riboflavin-dependent expression of flavoenzymes of the nicotine regulon of *Arthrobacter oxidans*. *Biochem. J* **270**(3):673-678.
 - (30) Brandsch R., 2006 - Microbiology and biochemistry of nicotine

- degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **69**:493-498.
- (31) Brandsch R., Bichler V., Krauss B., 1989 - Binding of FAD to 6-hydroxy-D-nicotine oxidase apoenzyme prevents degradation of the holoenzyme. *Biochem. J* **258**:187-192.
 - (32) Bruns, C.M., Hubatsch, I., Ridderström, M., Mannervik, B., Tainer, J.A., 1999 - Human glutathione transferase α 4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. *J Mol Biol* **288**:427-439.
 - (33) Busch B.K., Fromm Hi., 1999 - Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant Physiology* **121**:589-597.
 - (34) Caballero E., Baldoma L., Ros J., Boronat A., Aguilar J., 1983 - Identification of lactaldehyde dehydrogenase and glycoaldehyde dehydrogenase as functions of the same protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **258**(12):7783-7792.
 - (35) Campeanu M. Mirela, Campeanu S.C., Bara I., *Adn-recombinat*, editura Corson, Iași; 37-42
 - (36) Cavener R. D., 1992 - GMC oxidoreductases a newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities . *J.Mol Biol* **223**(1):811-814.
 - (37) Cenas, N., Anusevicius, Z., Nivinskas, H., Miseviciene, L., Sarlauskas, J., 2004 *Structure-activity relationships in two-electron reduction of quinones* - Methods in enzymology, Academic Press, New York, 382:258-77
 - (38) Chion, C.K., Leak, D.J., 1996 - Purification and characterization of two components of epoxypropane isomerase/carboxylase from *Xanthobacter py2*. *Biochem J* **319** (Pt 2):499-506.
 - (39) Chiribău B.C., Sandu C., Fraaije M., Schiltz E., Brandsch R., 2004 - A novel γ -n-methylaminobutyrate demethylating oxidase involved in the catabolism of the tobacco alkaloid nicotine by *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1. *Eur.J.Biochem* **271**:4677-4684
 - (40) Chiribau C.B., Cheng L., Cucoranu I.C., Yu Y.S., Clempus R.E., Sorescu D. 2008, - FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts, *J Biol Chem*. 283(13):8211-7
 - (41) 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*. *J Bacteriol* **187**:3062-3070.
 - (42) Cîmpeanu, M.M., Maniu, M., Surugiu, C.I., 2002. Genetică – metode de studiu. , Corson, Iași; 37-42
 - (43) Cojocaru D.C., Sandu Mariana, 2004 -*Biochimia proteinelor si acizilor nucleici* , editura PIM, 2004; 61-73
 - (44) Cojocaru, D.C., Cojocaru D.I., Ciornea E., – 1999, *Biochimia hormonilor*, Iași, Ed. Corson, 150-165
 - (45) Cojocaru, D., 1997 -*Enzimologie*, Ed. Gama, Iași, 167-189
 - (46) Creighton E. T., 1999 -*Encyclopedia of Molecular Biology* , John Wiley & Son, Inc.;
 - (47) Crow V.L., Wittenberger C.L., 1979 - Separation and properties of NAD⁺- and NADP⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Streptococcus mutans*. *Journal of Biological*

- Chemistry* **254**(4):1134-1142.
- (48) Cserzo M., Wallin E., Simon I., von Heijne G., Elofsson A., 1997 - Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Prot. Eng.* **10**(6):673-676.
 - (49) Cuff, J. A., Barton, G. J. ,2000 - Application of enhanced multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins:Structure, Function and Genetics* **40**:502-511.
 - (50) Dambe R.T., Kuhn M.A., Brossette T., Giffhorn F., Scheidig J.A, 2006 - Crystal structure of NAD(P)H-dependent 1,5-anhydro-d-fructose reductase from *Sinorhizobium morelense* at 2,2 Å resolution: construction of a NADH-accepting mutant and its applications in rare sugar synthesis . *Biochemistry* **45**(0):10030-10042.
 - (51) Datta, P., Bhattacharyya, D., 2004 - Spectroscopic and chromatographic evidences of NADPH in human placental extract used as wound healer . *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **34**:1091-1098.
 - (52) de Boer A.H., Comstock J.L., Vasser M., 1983 - The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. NatL Acad. Sci. USA* **80**(0):21-25.
 - (53) Decker, C., 1991 -*Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* , CRC Press; vol II, 343-346
 - (54) Decker, K., Brandsch, R., 1997 -*Determining covalent flavinylation - Methods in enzymology*, Academic Press, vol 280, 413-415
 - (55) DeLano, W.L, 2002 -*The pymol user's manual* , DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA;
 - (56) Deller, S. Macheroux, P., Sollner, S., 2008 - Flavin-dependent quinone reductases . *Cell Mol Life Sci* **65**:141-160.
 - (57) Deller, S., Sollner, S., Trenker-El-Toukhy, R., Jelesarov, I., Gübitz, G.M., Macheroux, P., 2006 - Characterization of a thermostable NADPH:FMN oxidoreductase from the mesophilic bacterium *Bacillus subtilis*., *Biochemistry* **45**:7083-7091.
 - (58) Diaz E., Fernandez A., Prieto A.M., Garcia L.J., 2001 - Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**(4):523-569.
 - (59) DiRusso C.C., Nunn W.D., 1985 - Cloning and characterization of a gene (*fadr*) involved in regulation of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **161**:583-588.
 - (60) Doi Kenji, Doi Akemi, 1986 - Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for an *Arthrobacter* f-(1-^{*}3)-glucanase. *Journal of Bacteriology* **168**(3):1272-1276.
 - (61) Doi K., Gupta R., Aisen P., 1987, Spectroscopic studies on the interaction of phosphate with uteroferrin. *J Biol Chem.* 262(15):6982-5.
 - (62) Dondos A., 2006 - Applicability of the modified universal calibration of gel permeation chromatography on proteins. *Journal of Chromatography A* **1127**(0):183-186.
 - (63) Eberwein, H.F., Gries F.A., Decker K.,1965 - Uber den abbau des nikotins durch bakterienenzyme ii, isolierung und charakterisierung eines nikotinabbauenden bodenbakteiums. *Hoppe-Seyley'sZ. Physiol.*

- Chem.* **323**:236-248.
- (64) Farrbs J., Wang X., Takahashis K., Cunningham S.J., Wangn T., Weiner H., 1994 - Effects of changing glutamate⁴⁸⁷ to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* **269**:13854-13860.
 - (65) Ferreira, L.N., Labe, D., Fayolle-Guichard, F., Greer, W.C., 2006 - Genes involved in the methyl tert-butyl ether (mtbe) metabolic pathway of mycobacterium *Austroafricanum* ifp 2012. *Microbiology* **152**:1361-1374.
 - (66) Finn D.R., Mistry J., Schuster-Beckler B., Griffiths-Jones S., Hollich V., Lassmann T., Moxon S., Marshall M., Khanna A., Durbin R., Eddy R.S., Sonnhammer E., Bateman A., 2006 - Pfam: clans,web tools and services . *Nucleic Acids Res* **34**:d247-d251.
 - (67) Finn R.D., Tate J., Mistry J., Coghill P.C., Sammut S.J., Hotz H.R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E.L., Bateman A., 2008, The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2008 **36**:D281-8.
 - (68) Freudenberg, W., Konig, K., Andreesen, R.,J., 1988 - Nicotine dehydrogenase from *Arthrobacter oxidans*: a molybdenum-containing hydroxylase. *FEMS. Microbiol. Letters* **52**:13-18.
 - (69) Ganas, P., Igloi, G.L., Brandsch, R., 2009 - The megaplasmid pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* and nicotine catabolism in *Microbial megaplasms*, Springer, 271-281
 - (70) Ganas, P., Sachelaru, P., Mihasan, M., Igloi, G.L., Brandsch, R., 2008 - Two closely related pathways of nicotine catabolism in *Arthrobacter nicotinovorans* and *Nocardioide* sp. strain js614. *Arch Microbiol* **189**:511-517.
 - (71) 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**: 1546-1555;
 - (72) Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A., 2005 -*The proteomics protocols handbook* , Human Press; 28-32, 125-167
 - (73) Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A., 2003 ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis., *Nucleic Acids Res.* **31**(13):3784-8.
 - (74) Gavrilă L., Dăbală I, 1981 -*Descifrând tainele eredității* , editura Dacia, Cluj-Napoca; p. 120-136
 - (75) George, J., Chirikjian, J.G., 1982 - Sequence-specific endonuclease BamHI: relaxation of sequence recognition . *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:2432-2436.
 - (76) Gherna L.R., Richardson S.H., Rittenberg C.S., 1965 - The bacterial oxidation of nicotine vi. the metabolism of 2,6-dihydroxypseudooxynicotine. *The journal of biological chemistry* **240**:3669-3673.
 - (77) Gherna L.R., Richardson S.H., Rittenberg C.S., 1965 - The bacterial oxidation of nicotine VI. the metabolism of 2,6-dihydroxypseudooxynicotine. *The journal of biological chemistry*

- 240(9):3669-3673.**
- (78) Gloger, M., Decker K., 1969 - Zum mechanismus der induktion nicotinabbauender enzyme in *Arthrobacter oxidans*. Z. Naturforsch. **246**:1016-1025.
 - (79) Gouet, P., Robert, X., Courcelle, E., 2003 - Esript/endscript: extracting and rendering sequence and 3d information from atomic structures of proteins. Nucleic Acids Res **31**:3320-3323.
 - (80) Grabski, A., Mark, M., Drott, D., 2005 - The overnight express autoinduction system: high density cell growth and protein expression while you sleep. Nature Methods **2**:233-235.
 - (81) Grandori, R., Khalifah, P., Boice, J.A., Fairman, R., Giovanielli, K.C., 1998 - Biochemical characterization of Wrba, founding member of a new family of multimeric flavodoxin-like proteins. J Biol Chem **273**:20960-20966.
 - (82) Green S.L., Li Y., Emerich W.D., Bergersen J.F., Day A.D., 2000 - Catabolism of α -ketoglutarate by a SucA mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle. Journal of Bacteriology **182**(10):2838-2844.
 - (83) Griffin, H.G.; Griffin, A.M., 1993 - *DNA sequencing protocols, Methods in molecular biology*, Humana Press Inc., vol. 23 ;
 - (84) Griffiths J.F. Anthony, 2000 - *An Introduction to Genetic Analysis*, W.E. Freeman; 423-434
 - (85) Griffiths L.G., Choe L., Lee K.H., Reardon K.F., Orton E.C., 2008 - Protein extraction and 2-DE of water- and lipid-soluble proteins from bovine pericardium, a low-cellularity tissue. Electrophoresis. **29**(22):4508-15.
 - (86) Guse A., Stevenson E.M., Kuper J., Buchanan G., Schwarz G., Giordano G., Magalon A., Mendel R.R., Lawson M.D., Palmer T., 2003 - Biochemical and structural analysis of the molybdenum cofactor biosynthesis protein Moba. The journal of biological chemistry **278**:25302-25307.
 - (87) Hahn G., Kaup B., Bringer-Meyer S., Sahm H., 2003 - A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* atcc 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. Arch. Microbiol. **179**:101-107.
 - (88) Hames B.D., Higgins S.J., 1999 - *Protein Expression - A Practical Approach*, Oxford University Press;
 - (89) Hames C., Halbedel S., Hoppert M., Frey J., Stülke J., 2009 - Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. J Bacteriol. **191**(3):747-53.
 - (90) Harris A., 1992 - *Practical protein chromatography*, Humana Press; 124-158
 - (91) Hefti H.M., Van Vugt-Van der Toorna J.G., Dixon R., Vervoort J., 2001 - A Novel Purification Method for Histidine-Tagged Proteins Containing a Thrombin Cleavage Site . Analytical Biochemistry **295**(2):180-185.
 - (92) Henriksson G., Johansson G., 2000 - A critical review of cellobiose dehydrogenases. Journal of Bacteriology **78**(2):93-113.
 - (93) Hermann, S., 2006 - Tricine-SDS-PAGE. Nature Protocols **1**(1):16-22.

- (94) Hochstein, L.I., Rittenberg, C.S., 1958 - The bacterial oxidation of nicotine III. the isolation and identification of 6-hydroxypseudooxynicotine. *Journal of Biological Chemistry* **234**:156-160.
- (95) Hochstein, L.I., Rittenberg, S.C., - 1958 - The bacterial oxidation of nicotine I. nicotine oxidation by cell-free preparations. *J Biol. Chem* **234**(1):151-155.
- (96) Hochstein, L.I.; Rittenberg, C.S., 1958 - The bacterial oxidation of nicotine II. The isolation of the first oxidative product and its identification as (1)-6-hydroxynicotine. *J. Biol. Chem* **234**:156-161.
- (97) Holmes E.P., Rittenberg C.S. 1972 - The bacterial oxidation of nicotine. VII. Partial purification and properties of 2,6-dihydroxypyridine oxidase. *The journal of biological chemistry* **247**:7628-7633.
- (98) Holmes P.E., Rittenberg S.C., Knackmuss H.J., 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. *J. Biol. Chem* **1972**:23.
- (99) 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. *J Bacteriol* **185**:1976-1986.
- (100) 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**:133-138.
- (101) Irwin, J.J., Shoichet, B.K., 2005 - Zinc- a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* **45**(1):177-182.
- (102) Jaiswal, A.K., 2004 - *Regulation of antioxidant response element-dependent induction of detoxifying enzyme synthesis - Methods in enzymology*, Academic Press, vol. 378, 231-234
- (103) Jerke, Kurt; Nakatsu, Cindy H; Beasley, Fred; Konopka, Allan ,2008 - Comparative analysis of eight arthrobacter plasmid. *Plasmid* **59**: 73-85.
- (104) Jing T., Bryk R., Itoh M., Suematsu M., Nathan C., 2005 - Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of alpha-ketoglutarate decarboxylase. *PNAS* **102**:10670-10675.
- (105) Kaiser, J.P., Feng, Y., Bollag, J.M., 1996 - Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol Rev* **60**:483-498.
- (106) Kanagasundaram V., Scopes K. R., 1992 - Cloning, sequence analysis, and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology* **174**:1439-1447.
- (108) Kay, C., Weber, S., 2002 - *EPR of radical intermediates in flavoenzymes in electron paramagnetic resonance* , RCS Publishing, 223 - 278
- (109) Kazuhisa M., Hikaru W., Michio K., Hiroto C., Shigeharu F., Masashi K., 2006 - Purification, characterization, and gene cloning of a novel maltosyltransferase from an *Arthrobacter globiformis* strain that

- produces an alternating -1,4- and -1,6-cyclic tetrasaccharide from starch. *Appl Environ Microbiol* **72**:1065-1071.
- (110) 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;
 - (111) Khan R. H., Appa Rao K., Eshwari A., Totey, S.M., Panda A.K. , 1998 - Solubilization of Recombinat Ovine Growth Hormonewith Retention of Native-like Secondary Structure and Its Refolding from the Inclusion Bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **14**:722-728.
 - (112) Ki Ho K., Weiner H., 2005 - Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the aldb gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **187**(3):1067-1073.
 - (113) Kimura E., 1993 - Roles of Zn(II) ion in zinc enzymes. *Pure & Appl. Chem.* **65**:356-359.
 - (114) Kingston R., Scope R., Nakel E., 1996 - The structure of glucose-fructose -oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* - an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NAD⁺. *Structure* **4**(12):1413-1428.
 - (115) Knackmuss, H.J., Beckmann, W., 1973 - The structure of nicotine blue from *Arthrobacter oxidans*. *Arch Mikrobiol* **90**:167-169.
 - (116) Kodama Y., Yamamoto H., Amano N., Amachi T., 1992 - Reclassification of two strains of *Arthrobacter oxydans* and proposal of *Arthrobacter nicotinovorans* sp. nov . *Int J Syst Bacteriol* **42**:234-239.
 - (117) Koetter W.A., Schulz E.G., 2005 - Crystal structure of 6-hydroxy-d-nicotine oxidase from *Arthrobacter nicotinovorans*. *Journal of Molecular Biology* **352**:418-428.
 - (118) Kojima K., Tsugawa W., Sode K., 2001 - Cloning and expression of glucose 3-dehydrogenase from *Halomonas* sp. a-15 in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282**:21-27.
 - (119) Korf I., Yandell M., Bedell J., 2003 - Blast, editura O'Reilly, pag. 360
 - (120) Kozak, M., 1983 - Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* **47**(0):1-45.
 - (121) Kriz J., Adam J., Prokop M., Wimmerova M., Koca J., 2008 - Desciphering the sugar preference rules - computer assisted protein engineering of bacterial lectin pa-iiI . *FEBS Journal* **275**:169.
 - (122) Kuntz, I.D., Blaney, J.M., Oatley, S.J., Langridge, R., Ferrin, T.E, 1982 - A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol* **161**(0):269-288.
 - (123) Kurfürst, M., Ghisla, S., Presswood, R., Hastings, J.W., 1982 - Structure and catalytic inactivity of the bacterial luciferase neutral flavin radical. *Eur J Biochem* **123**:355-361.
 - (124) Laemmli, U.K., 1970 - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 . *Nature* **227**(0):680-685.
 - (125) Lake W.M., Temple A.C., Rajagopalan K.V., Schindelin H., 2008 - The crystal structure of the *Escherichia coli* Moba protein provides insight into molybdopterin guanine . *The journal of biological chemistry* **275**:40211-40217.
 - (126) Lambert C., Leonard N., De Bolle X., Depiereux E., 2002 - Esypred3D:

- prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* **18**(9):1250-1256.
- (127) Lambert C., Briffeuil, P., Baudoux, G., De Bolle X., Vinals C., Feytmans E., Depiereux E., Comparative analysis of seven multiple protein sequence alignment servers: clues to enhance reliability of predictions. *Bioinformatics*. 1998;14(4):357-66.
 - (128) 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). *J Bacteriol* **180**:2237-2243.
 - (129) Lewin Benjamin, 2004 - *Genes VII*, Pearson Prentice Hall; 366-370
 - (130) 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8846-8850.
 - (131) Lind, C., Hochstein, P., Ernster, L., 1982 - DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch Biochem Biophys* **216**:178-185.
 - (132) Llamas A., Mendel R., Schwarz G., 2004 - Synthesis of adenylated molybdopterin an essential step for molybdenum insertion. *The journal of biological chemistry* **279**(53):55241-55246.
 - (133) Loveland-Curtze J., Sheridan P., Gutshall R.K., Brenchley E.J., 1999 - Biochemical and phylogenetic analyses of psychrophilic isolates belonging to the *Arthrobacter* subgroup and description of *Arthrobacter psychrolactophilus*, sp. Nov. *Arch Microbiol* (171):355-363.
 - (134) Macheroux, P., 1999 - *Uv-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins - Flavoprotein protocols*, Humana Press, 1 - 9;
 - (135) Maidak, B.L., Larsen, N., McCaughey, M.J., Overbeek, R., Olsen, G.J., Fogel, K., Blandy, J., Woese, C.R., 1994 - The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res* **22**:3485-3487.
 - (136) Malphettes L., Weber C.C., El-Baba M.D., Schoenmakers G.R., 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**(12):e107
 - (137) 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**(18):39235-39242.
 - (138) 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* **38**:12950-12958.
 - (139) Marchler-Bauer A., Anderson J.B., Derbyshire M.K., DeWeese-Scott C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hao L., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Krylov D., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Lu F., Lu S., Marchler G.H., Mullokandov M., Song J.S., Thanki N., Yamashita R.A., Yin J.J., Zhang D., Bryant S.H., 2007 - CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* **35**(Database

- issue): D237–D240
- (140) Marchler-Bauer A., Bryant S.H., 2004 - CD-search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**():327-331.
 - (141) Marchler-Bauer, A., Panchenko A.R., Shoemaker, A.B., Thiessen, P.A., Geer, L.Y., Bryant S.H., 2002 - CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res* **30**:281-283.
 - (142) Martin Rowland M., Indge B., Baker M., 2000 - *A new introduction to biology (AQA biology specification a)*, Hodder & Stoughton; 12-28
 - (143) 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**:389-398.
 - (144) Massey V., 2000 - The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* **28**:283-296.
 - (145) Matxalen L., Gomis-Ruth F.X., Fernando de la Cruz M.C., 2002 - Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology* **45**:1-8.
 - (146) Maxam, A.M., Gilbert, W., 1977 - A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:560-564.
 - (147) McGinnis S., Madden L.T., 2004 - BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* **32**:w21-w25.
 - (148) McSpadden, Gardener B., de Bruijn F.J., 1998 - Detection and isolation of novel rhizopine-catabolizing bacteria from the environment. *Appl Environ Microbiol* **64**(12):4944-4949.
 - (149) 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.
 - (150) Menendez 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.
 - (151) Menendez C., Otto A., Igloi G., Nick P., Brandsch J. R., Schubach B., Bottcher B., Brandsch R., ,1997 - Molybdate uptake genes and molybdopterin biosynthesis genes on a bacterial plasmid: characterization of moeA as a filament-forming protein with ATP-ase activity. *Eur.J.Biochem* **250**():524-531.
 - (152) Menendez C., Siebert D., Brandsch R., 1996 - MoaA of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 involved in Mo-Pterin cofactor synthesis is an Fe-S protein. *FEBS Letters* **391**:101-103.
 - (153) Mihasan M., Artenie V., Brandsch R., ,2008 - A monomeric aldehyde-dehydrogenase, part of the pAO1 encoded pathway for sugar utilization. *FEBS Journal* **275**(supplement 1):285.
 - (154) Mihasan M., Ungureanu E., Artenie V. ,2007 - Optimum parameters for overexpression of recombinat proteins from *tac* promoters on autoinducible medium . *Roumanian Biotechnological letters* **12**:3473-3482.
 - (155) Mihasan, M., Chiribau, C.B., 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 . *Appl Environ Microbiol* **73**(12):2479-2485.
- (156) Mihășan, M., Niță, A., Artenie, V., 2007 - Optimal parameters for plasmid DNA preparation using the alkaline lysis method. *Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” (serie nouă) Secțiunea II a. Genetică și Biologie Moleculară* **VIII**:55-61.
- (157) Miller, V.P., Thorson, J.S., Ploux, O., Lo, S.,F., Liu, H.W., 1993 - Cofactor characterization and mechanistic studies of CDP-6-deoxy-delta 3,4-glucose reductase: exploration into a novel enzymatic C-O bond cleavage event. *Biochemistry* **32**:11934-11942.
- (158) Miwa Y., Fujita Y., 1988 - Purification and characterization of a repressor for the *Bacillus subtilis* gnt operon. *J. Biol. Chem* **263**:13252-13257.
- (159) Moore A.S., Baker M.H., Blythe T., Kitson K., Kitson M.T., Baker E. N. , 1998 - Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenase . *Structure* **6**(12):1541.
- (160) Munro, A.W., Daff, S., Coggins, J.R., Lindsay, J.G., Chapman, S.K., 1996 - Probing electron transfer in flavocytochrome P-450 bm3 and its component domains. *Eur J Biochem* **239**:403-409.
- (161) 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 Sci.* **8**:2784-2790.
- (163) Ninness, K.R.,1999 - Inulin and oligofructose: what are they?. *J Nutr* **129**:1402S-6S.
- (164) Nurizzo, D., Halbig, D., Sprenger, G.A., Baker, E.N., 2001 - Crystal structures of the precursor form of glucose-fructose oxidoreductase from zymomonas mobilis and its complexes with bound ligands. *Biochemistry* **40**:13857-13867.
- (165) Ornstein, L.,1964 - Disc electrophoresis. I. background and theory. *Ann NY Acad Sci* **121**:321-349.
- (166) Pang Z., Kang Y., Ban M., Masayuki, K., Ohnishia M., Mikam B., 2004 - Crystallization and preliminary crystallographic analysis of endo-1,3-b-glucanase from *Arthrobacter* sp. *Acta Cristallographica* **F61**:68-70.
- (167) Pang Z, Otaka K, Maoka T, Hidaka K, Ishijima S, Oda M, Ohnishi M., 2005 - Structure of beta-glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* **69**(3):553-8.
- (168) Panjkovich A., Melo F., 2005 - Comparison of different melting temperature calculation methods for short DNA sequences. *Bioinformatics* **21**:711-722.
- (169) Patridge, E., Ferry, J.G., 2006 - Wrba from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *J Bacteriol* **188**:3498-3506.
- (170) Perlin M.H., 2003 -*Modern microbial genetics* , John Willey and

- sons; 464-482
- (171) Perozich J., Kuo I., Wan B.C., Boesch J.S., Lindahl R., Hempel J., 2000 - Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem* **267**:6197-6203.
 - (172) Perozich J., Nicolas H., Wang, Bi-Cheng, Lindahl R., Hempel J., 1999 - Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science* **8**(1):137-147.
 - (173) Pettersen, E., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E., Ferrin, Thomas E., 2004 - UCSF chimera--a visualization system for exploratory research and analysis . *J Comput Chem* **25**:1605-1612.
 - (174) Pierce A.C., Sandretto L.K., Bemis W.G., 2002 - Kinase inhibitors and the case for CH-O hydrogen bonds in protein–ligand binding. *Proteins* **49**:567-576.
 - (175) Popescu, V.O., 1990 - *Electroforeza proteinelor în geluri de poliacrilamidă* , Editura Tehnică; 89
 - (176) Porath E., Carlsson ., Olsson I., Greta B., 1975 - Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**:598-599.
 - (177) Porter R.D. , 2003 - *Conjugation - Modern microbial genetics* , John Wiley and sons; 464-482
 - (178) Pujol J. C., Kado I. C., 2000 - Genetic and biochemical characterization of the pathway in *Pantoea citrea* leading to pink disease of pineapple. *Journal of Bacteriology* **182**(8):2230-2237.
 - (179) Ranadive S.A., Pipkin J.D., Varia S.A., Chang N.H., Barry E.P., Porubcan M., Unger S.E., McCormick T.J., 1995 - Formation, isolation and identification of oligomers of aztreonam . *Eur. J. Pharmaceutical Sciences* **3**:281-291.
 - (180) Rasko, D.A., Mongodin, E.F, 2005 - *The First Decade Of Microbial Genomics: What Have We Learned And Where Are We Going Next?*, *Genome Biol* **6**(9):341
 - (181) Reddy G.S.N., 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**:1553-1561.
 - (182) Reece J Richard , 2004 - *Analysis of genes and genomes* , John Wiley&Sons;
 - (183) Reece R.J., Beynon L., Holden S., Hughes A.D., Rébora K., Sellick C.A., 2006 - Nutrient-regulated gene expression in eukaryotes. *Biochem Soc Symp.*;**(73)**:85-96.
 - (184) Richardson S.H., Rittenberg C.S., 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.
 - (185) 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. *J. Biol. Chem* **277**:12507-12515.
 - (186) Robert D.F., Jaina M., Benjamin S., Sam G., Volker H., Timo L., Simon

- M., Mhairi M., Ajay K., Richard D., Sean R., Erik L.L Bateman A., 2006 - Pfam: calns,web tools and services. *Nucleic Acids Res* **34**:d247-d251.
- (187) Robinson R., 2002 - *Genetics (Macmillan science library)*, Gale; 150-153
- (188) Rowland S.J., Dyke K.G., 1990 - Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **4**:961-975.
- (189) 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*. *Appl Environ Microbiol* **71**:8929-8924.
- (190) 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*. *Appl Environ Microbiol* **72**:5216-5231.
- (191) Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989 - *Molecular cloning - A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1.7 - 1.21, 17.3 - 17.40, 18.3 - 18.86
- (192) Sambrook, J., 2001 - *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)*, Spring Harbor Laboratory Press; p 1.7 - 1.23, 17.7 - 17.40, 18.2 - 18.87
- (193) Sancho, J., 2006 - Flavodoxins: sequence, folding, binding, function and beyond. *Cell Mol Life Sci* **63**:855-864.
- (194) Sandu, C., Chiribau, C.B., Sachelaru, P., Brandsch, R., 2005 - Plasmids for nicotine-dependent and -independent gene expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and other *Arthrobacter* species. *Appl Environ Microbiol* **71**:8920-8924.
- (195) Sandu C., Brandsch R., 2002 Evidence for MoeA-dependent formation of the molybdenum cofactor from molybdate and molybdopterin in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. **178**(6):465-70.
- (196) Sandu C., Chiribau B.C., Brandsch R., 2003 - Characterization of *hdnoR*, 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**:51307-51315.
- (197) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977 - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467.
- (198) Satory, M., Furlinger, M., Haltrich, D., Kulbe, K.D., Pittner, D., Nidetzky, B., 1997 - Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnology Letters* **19**(12):1205-1208.
- (199) Schenk, S., Hoelz, A., Kraus, 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.
- (200) Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C., 2003 - Swiss-model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acid Research* **31**(13):3381-3385.

- (201) Scopes R.K., 2000 - *Encyclopedia of separation science, vol. II/ Chromatography-protein separation* , Academic Press; 405-410
- (202) Scott M.,Madden T.L., 2004 - BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* **32**(web server issue):w21-w25.
- (203) Sgherri, C.L, Pinzino, C., Samaritani, E., Navari-Izzo, F., 1999 - Activated oxygen generation from thylakoids: a novel spin trap. *Free Radic Res* **31** Suppl:S199-204.
- (204) Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J., 1973 - Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**:3055-3063.
- (205) Shine, J., Dalgarno, L., 1975 - Terminal-sequence analysis of bacterial ribosomal RNA. correlation between the 3'-terminal-polypyrimidine sequence of 16-s rna and translational specificity of the ribosome. *Eur J Biochem* **57**:221-230.
- (206) Sreenath K.H., Bingman A.C., Buchan W.B., Seder D.K., Burns T.B., Geetha V.H., Won Bae J.,Vojtik C. F., Aceti J.D., Frederick O.R., Phillips N. G., Fox G.B., 2005 - Protocols for production of selenomethionine-labeled proteins in 2-L polyethylene terephthalate bottles using autoinduction medium. *Protein Expression and Purification* **40**:256-267.
- (207) 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.
- (208) Stark J.R. Michael, 1987 - Multicopy expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Gene* **51**(2-3):255-267.
- (209) Steinmetz G.C., Xie P., Weiner H., Hurley D.T., 1997 - Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**(5):701-711.
- (210) Steven Henikoff J.H., 1992 - Amino acid substitution moatrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci* **89**:10915-10919.
- (211) Stothard, P., 2000 - The sequence manipulation suite: javascript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28**:1102, 1104.
- (212) Studier, F.W., 2005 - Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* **41**:207-234.
- (213) Sullivan R., Zhao H., 2007 - Cloning, characterization and mutational analysis of a highly active and stable l-arabinitol 4-dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**(4):845-852.
- (214) Tamas V., Posfai J., Robertsa J.R., 2003 - NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **31**:3688-3691.
- (215) 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 Enviromental Microbiology* **74**(5):1567-1574.

- (216) Taylor J.E., Goyal A., Guerreiro C., Prates A.M., Money A.V., Ferry N., Morland C., Planas A., Macdonald A.J., Stick V.R., Gilbert J.H., Fontes C., Davies J.G., 2005 - How family 26 glycoside hydrolases orchestrate catalysis on different polysaccharides structure and activity of a clostridium *Thermocellum lichenase*. The journal of biological chemistry **280**(38):32761-32767.
- (217) Terpe K., 2003 - Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol **60**:523-533.
- (218) Thorne, H.V., 1966 - Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. Virology **29**:234-239.
- (219) Tomii K., Kanehisa M., 1998 - A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. Genome Research **8**(10):1048-1059.
- (220) Trimbur E.D., Gutshall R.K., Prema P., Brenchley E.J., 1994 - Characterization of a psychrotrophic *Arthrobacter* gene and its cold-active 3-galactosidase. Applied and environmental microbiology. **60**:4544-4552.
- (221) Trimbur D.E., Mortlock R.P., 1991 - Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants able to utilize the novel pentose L-ribose. J Bacteriol., 173(8):2459-64.
- (222) Trumpower, B.L., 1981 - *Function of quinones in energy conserving systems*, Academic Press, 68-69
- (223) Twymann R.M., 1998 - *Advanced Molecular Biology - A Concise Reference*, Bios Scientific Publishers, 213 - 235
- (224) UniProt Consortium., 2009 - The universal protein resource (uniprot) 2009. Nucleic Acids Res **37**:D169-74.
- (225) Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Kennedy, M.C., ,2000 - Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. J Biol Chem **275**:14064-14069.
- (226) 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**:16725-16732.
- (227) Vogelstein, B., Gillespie, D., 1979 - Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci USA **76**:615-619.
- (228) Wang, J., Wang, W., Kollman, P.A., Case, D.A., 2006 - Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. J Mol Graph Model **25**:247-260.
- (229) Watanabe, S., Kodaki, T., Keisuke, M., 2005 - Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural Zn. The Journal of Biological Chemistry **280**(11):10340-10349.
- (230) Watanabe, B., Dickinson, D., Liu, R.M., Forman, H.J., 2004 - *Quinones and glutathione metabolism - Methods in enzymology*, Academic Press, vol. 378:319 - 325
- (231) Wauters, G., Charlier, J., Janssens, M., Delmee M., 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.
- (232) Wei, H., Therrien, C., Blanchard, A., Guan, S., Zhu, Z., 2008 - The fidelity index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **36**:e50.
- (233) 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* (50):2083-2092.
- (234) White H.R., 2006 - The difficult road from sequence to function. *Journal Of Bacteriology* **188**(10):3431-3432.
- (235) Whittle, G., Salyers, A., 2003 - *Transposons - an increasingly diverse group of elements - Modern microbial genetics* , John Willey and sons; 464-482
- (236) Wiegert T., Sahm H., Sprenger G.A., 1997 - The substitution of a single amino acid residue Ser-116 to Asp alters NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* into a glucose dehydrogenase with dual coenzyme specificity. *The journal of biological chemistry* **272**(20):13126-13133.
- (237) Ye, J., Yang, H., Rosen, B.P., Bhattacharjee, H., 2007 - Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett* **581**(0):3996-4000.
- (238) Yoshiaki K., Nagatoshi F., Takashi N., Hongsheng Liu X., Huang K.K., Takayuki Y. L., 2004 - *Rothia aeria* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russicus* sp. nov., isolated from air in the russian space laboratory Mir . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:827-835.
- (239) Zachariou, M., Scopes, R.K., 1986 - Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J Bacteriol* **167**(0):863-869.
- (240) Zenke F.T., Engles R., Vollenbroich V., Meyer J., Hollenberg C.P. Breunig K.D., 1996 - Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal8op. *Science* **272**:1662-1665.