

PURIFICAREA ENZIMEI 2 - CETO - GLUTARAT DEHIDROGENAZA DIN *ARTHROBACTER* *NICOTINOVORANS* pAO1



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Cheorbeja Brîndușa

Facultatea de Biologie, Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași

e-mail: brandusa.cheorbeja@gmail.com

Conducător științific:
lucrări dr. Mihășan Marius

Șef

Cuprins



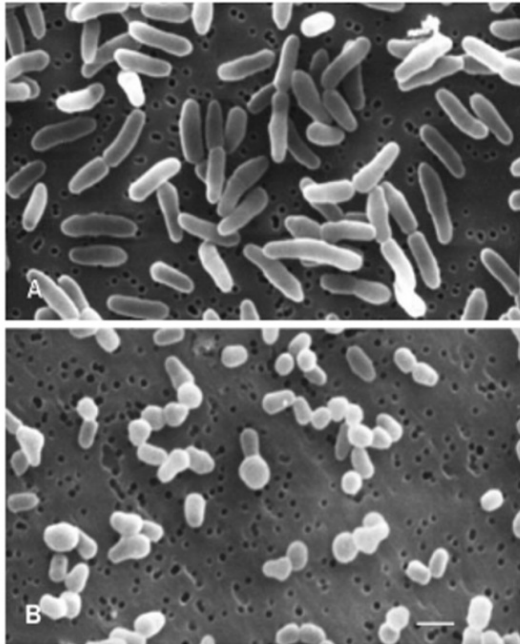
- I. *Arthrobacter nicotinovorans* și megaplasmidul pAO1;
- II. ORF38 și metabolismul xilozei;
- III. Tehnici de purificare a proteinelor + IMAC;
- IV. Materiale și metode;
- V. Rezultate și discuții;
- VI. Concluzii.

Arthrobacter nicotinovorans și megaplasmidul pA01

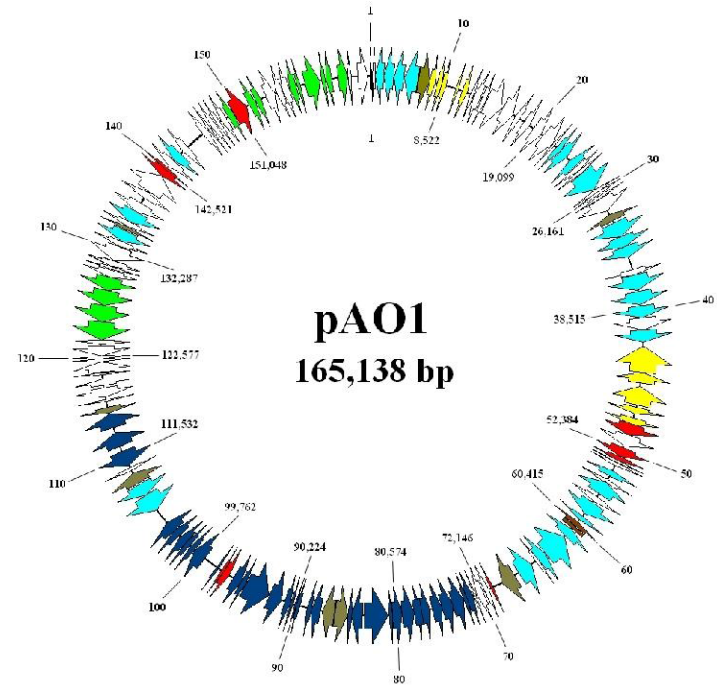


UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro



Aspectul morfologic al celulelor de *Arthrobacter nicotinovorans* în timpul dezvoltării. **A.** Forme bacilare și asociații în forme de V în cazul unei culturi tinere. **B.** Forme cocoide în cazul unei culturi în faza staționară (Mihășan, 2009).



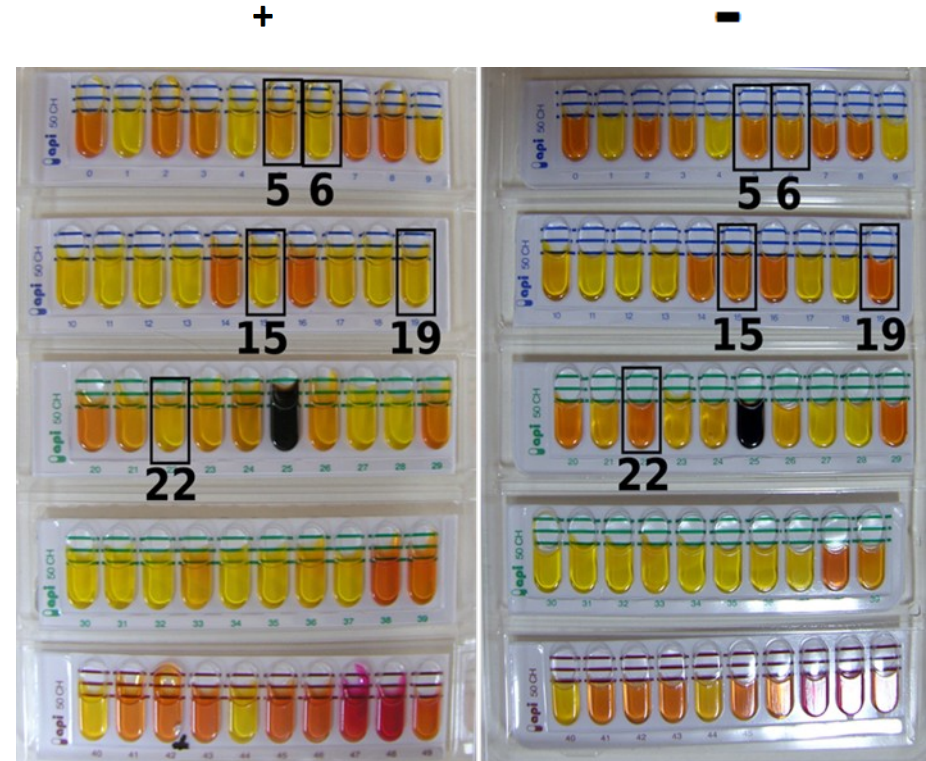
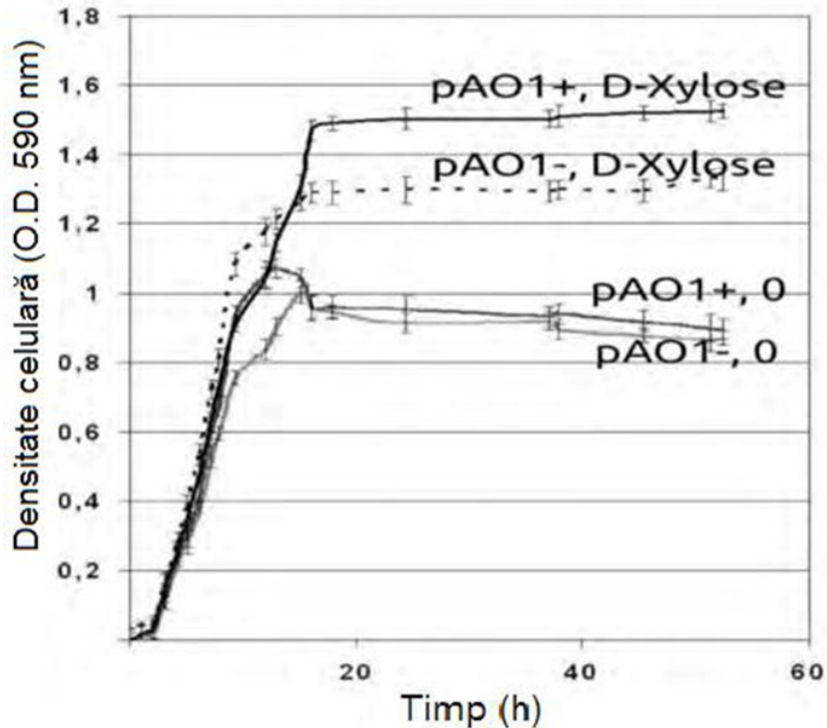
Cadrele de citire de pe megaplasmidul pA01 (Mihășan, 2011)



Capacitatea de a degrada xiloza

- Mihășan, M. (2009): Unele implicații moleculare ale plasmidului pA01 în metabolismul microorganismului *Arthrobacter nicotinovorans* (Teză de doctorat), pag. 8, 77-86
- Mihășan, M. (2011): *Megaplasmidul pA01*, Editura Universității "Alexandru Ioan Cuza", Iași, 7-14, 79-83

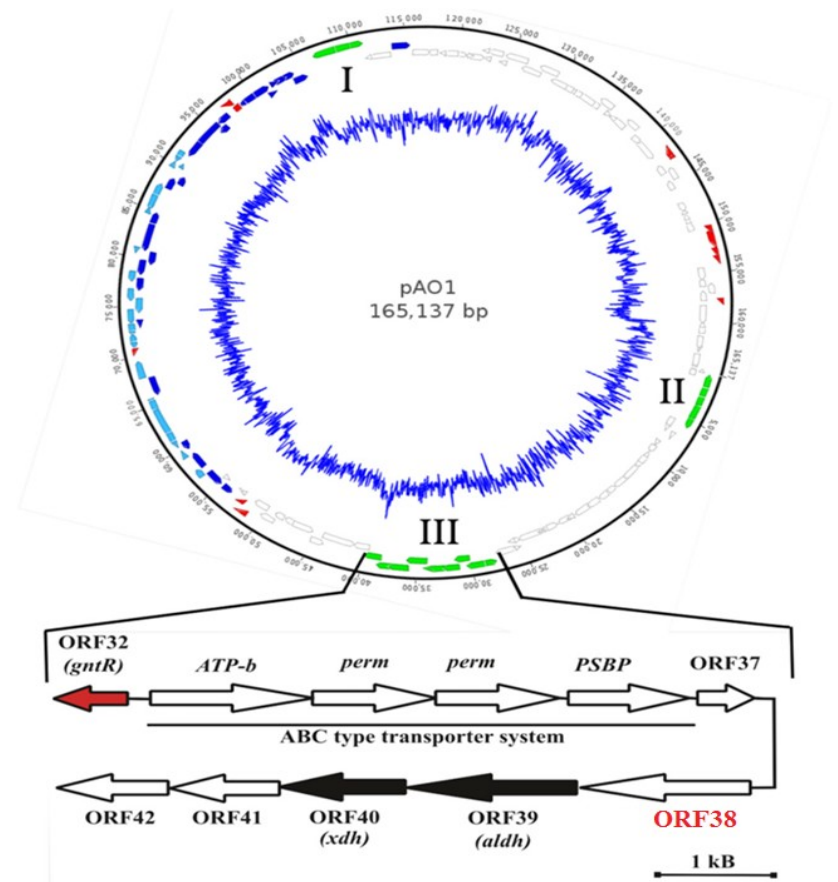
ORF38 și metabolismul xilozei



- Mihășan, M. (2011): *Megaplasmidul pAO1*, Editura Universității "Alexandru Ioan Cuza", Iași, 7-14, 79-83
- Mihășan, M. et al. (2013): Evidence of a plasmid-encoded oxidative xylose catabolic pathway in *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, *Research in Microbiology* 164:22-30

orf32 - orf42 : un grup de gene ce descriu o cale metabolică implicată în degradarea xilozei.

Prin sistemul ABC de transport, xiloza este introdusă în celule și apoi, prin intermediul unor enzime specifice, este metabolizată oxidativ (Davidson et al., 2008).



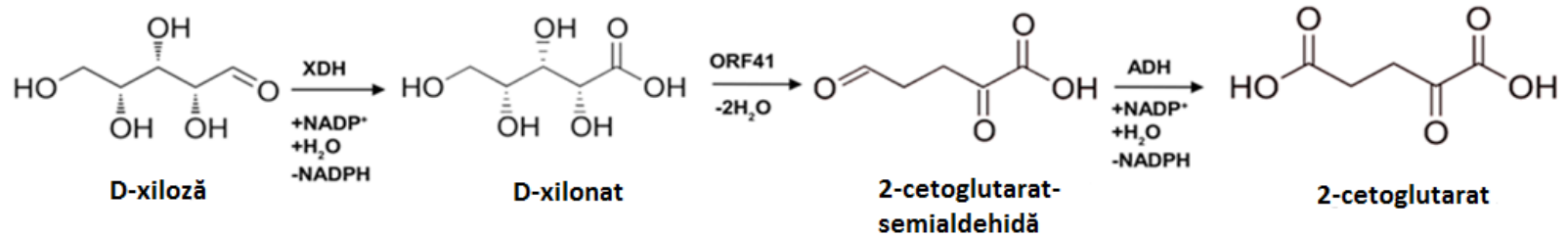
Organizarea genetică a megaplsmidului pAO1. III - gene implicate în metabolismul xilozei (Mihășan et al., 2013)

***orf38 (gdh)* - codifică o presupusă 2-ceto-glutarat-dehidrogenază**

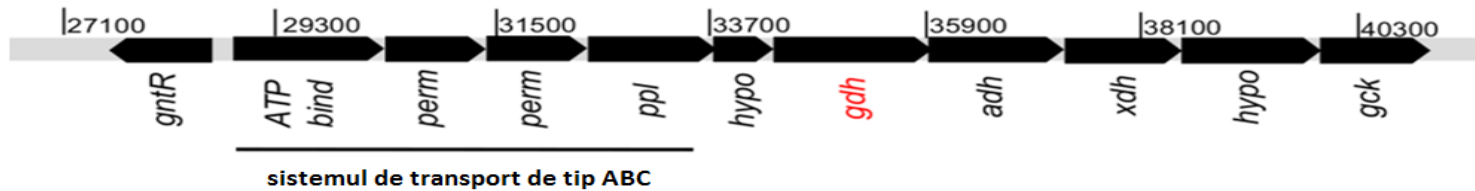
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J. (2008): *Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems*, Microbiology and Molecular Biology, Reviews : MMBR, 72(2), 317-64
- Mihășan, M. et al. (2013): Evidence of a plasmid-encoded oxidative xylose catabolic pathway in *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, Research in Microbiology, 164, 22-30



Calea oxidativă pentru degradarea D-xilozei



Calea oxidativă pentru degradarea D-xilozei codificată de către operonul *xyl* din megaplasmidul pAO1 prezent la microorganismul *Arthrobacter nicotinovorans* (Cheorbeja et al., 2015).



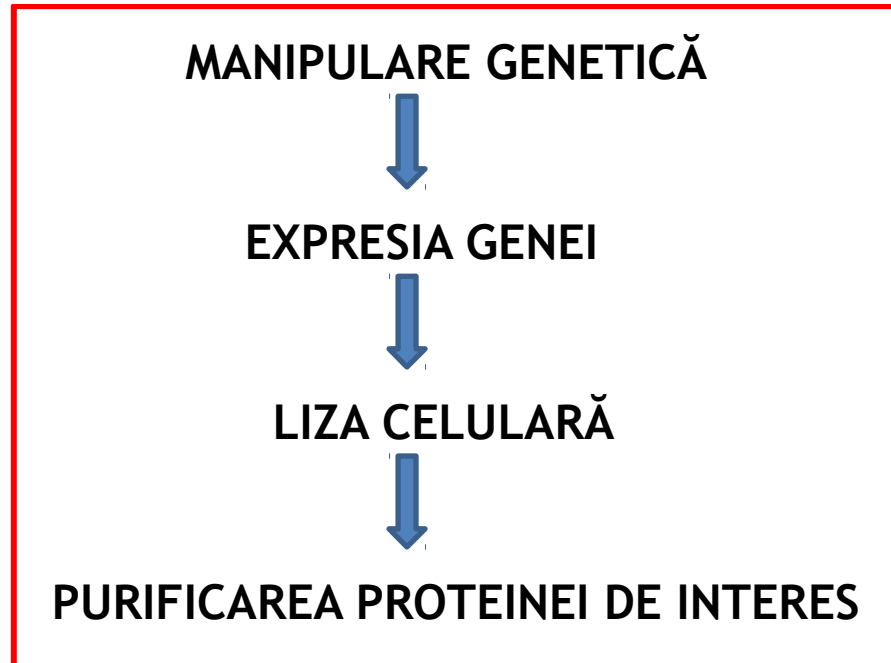
Operonul *xyl* din megaplasmidul pAO1. *gdh* - presupusa ceto-glutarat-dehidrogenază (Cheorbeja et al., 2015)

- Cheorbeja, B., Bujderu, M.B., Arnăutu, C., Mihășan, M. (2015): Heterologous over-expression and *in-silico* characterisation of a putative 2-keto-gluconate dehydrogenase from *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, TOM XVI, Fascicula 3, 2015

Tehnici de purificare a proteinelor



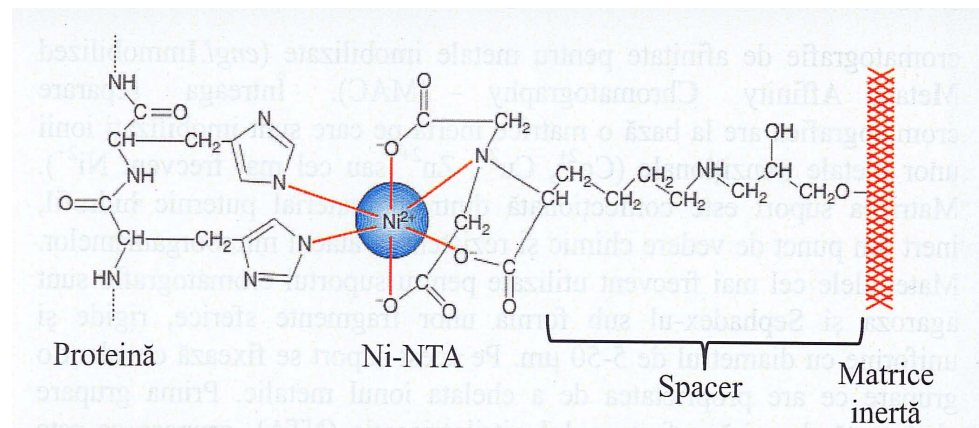
- ❖ variază de la simple proceduri de precipitare până la tehnici de cromatografie și afinitate;
- ❖ cele mai bune se bazează pe proprietățile proteinelor:
 - sarcinile suprafeței;
 - dimensiunea și forma;
 - încărcătura netă;
 - proprietățile.
- ❖ diferă și în funcție de localizarea proteinelor (Ausubel et al., 2003).



Cromatografia de afinitate pentru metale immobilizate (IMAC)



- ➡ descrisă pentru prima dată de Porath și colab. (1975);
- ➡ se bazează pe atașarea la unul din capetele C sau N terminale ale proteinei de interes a unei **cozi polipeptidice de fuziune (tag)** cu afinitate pentru suporturi immobilizate;
- ➡ aduce modificări minime în structura proteinelor;
- ➡ baza = **o matrice inertă**, pe care sunt immobilizați ionii unor metale tranziționale, cum ar fi: Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , sau cel mai frecvent Ni^{2+} (Mihășan et al., 2012).



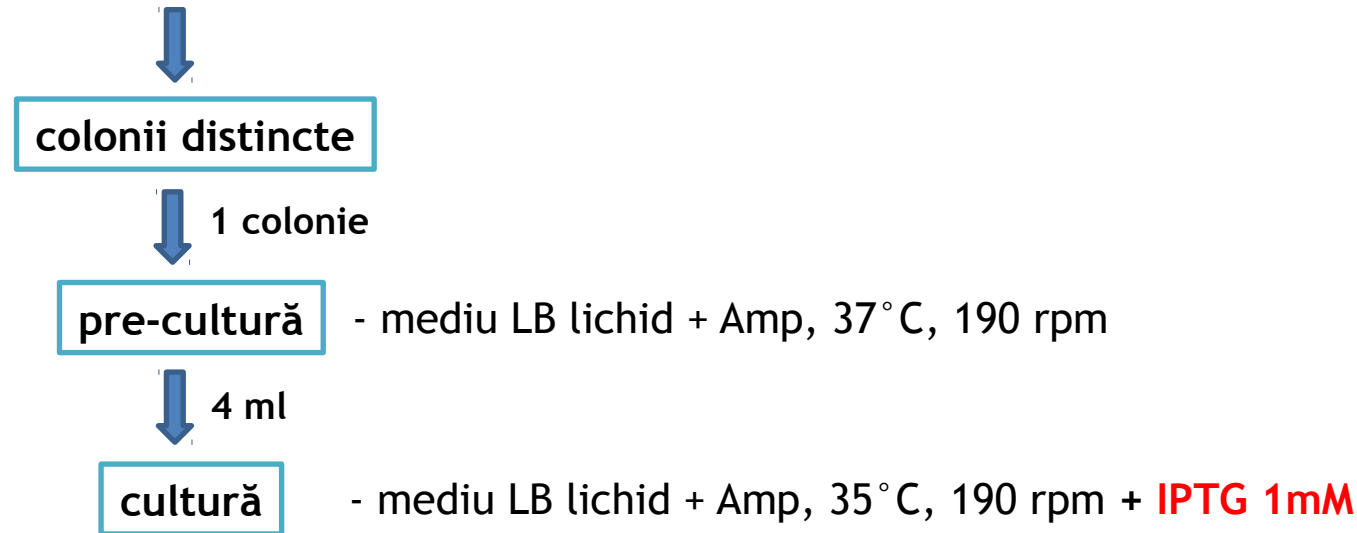
Interacțiunile dintre partenerii complexului matrice-Ni-NTA-proteină, ce stau la baza cromatografiei de afinitate pentru metale immobilizate (IMAC) (Mihășan et al., 2012)

- Mihășan, M., Ștefan, M., Olteanu, Z. (2012a): *Biologie Moleculară*, Editura Universității "Alexandru Ioan Cuza", Iași, 177-180, 224-229, 253-259
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975): *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*, Nature, 1975, 258(5536), 598-9

Materiale și metode



- Tulpina utilizată - *Escherichia coli* XL-1 Blue → conține plasmidul **pH6EX3** cu gena **orf38**;
- Condiții de creștere - pe mediul LB solid, suplimentat cu ampicilină 50 mg/ml, la temperatura de 37°C (Ausubel et al., 2002);



SUPRA-EXPRESIA GENEI *orf38*

- Ausubel, F.M., 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

- Monitorizarea creșterii tulpinii *Escherichia coli* XL-1 Blue pH6EX3orf38 pe mediul LB lichid - cu ajutorul spectofotometrului Beckman-Coulter UV/VIS DU730 Life Science;
- Obținerea extractului acelar (cell free extract, CFE) - prin liză celulară - cu soluții de lizozim, TRIS, NaCl și detergenți (Tween 20 și Triton X-100);
- Purificarea proteinei recombinante prin IMAC (Mihășan et al., 2012a):
 1. Regenerarea și pregătirea coloanei cromatografice
 - ❖ suport - Ni-Sepharose High-Performance (HP)
 - a) Eliminarea urmelor de etanol - cu H₂O_d;
 - b) Eliminarea ionilor de Ni²⁺- cu EDTA;
 - c) Eliminarea proteinelor-balast - cu soluții de NaCl și NaOH;
 - d) Reîncărcarea coloanei cu ioni de Ni²⁺ - cu soluție de NiCl₂.
 2. Purificarea proteinei ORF38 - eluții cu soluții de imidazol de diferite concentrații.
- Determinarea concentrației proteinelor - metoda Bradford (Mihășan et al., 2012a);
- Verificarea purității proteinei - prin electroforeza SDS-PAGE.
- Mihășan, M., Ștefan, M., Olteanu, Z. (2012a): *Biologie Moleculară*, Editura Universității “Alexandru Ioan Cuza”, Iași, 177-180, 224-229, 253-259



Rezultate și discuții



1. Purificarea proteinei ORF38 prin cromatografie de afinitate pentru metale imobilizate

- ❖ nivel puternic de expresie a proteinei ORF38 - pe mediu LB

a) Metoda cu soluție de liză ce conține EDTA:

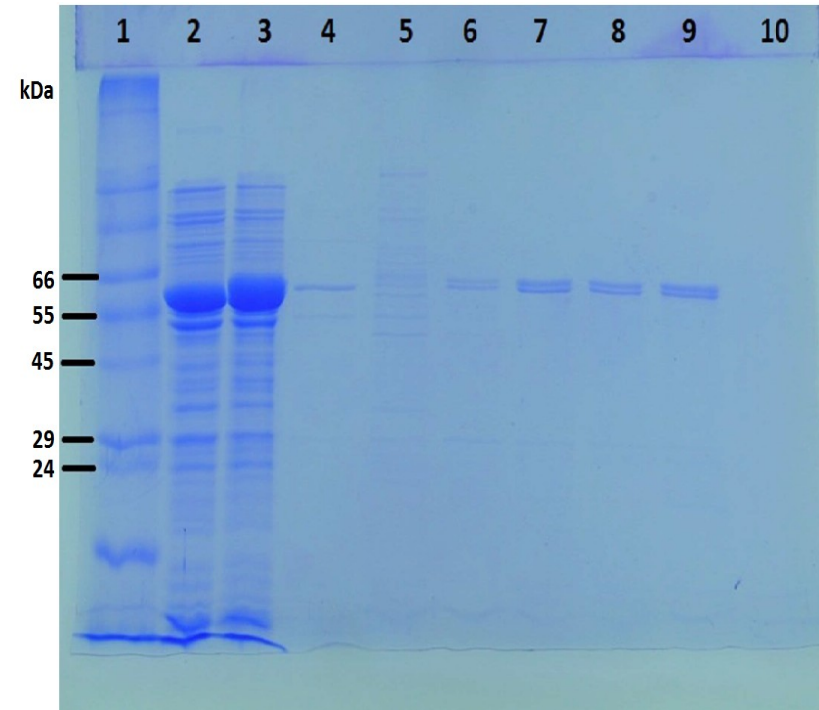
Rezultatele metodei Bradford pentru determinarea concentrației proteice pentru metoda cu EDTA

Nr. crt.	Proba recoltată	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1	Proteine totale	6,8
2	CFE	4,8
3	10 mM	*
4	40 mM	*
5	80 mM	*
6	200 mM	*
7	200 mM	*
8	200 mM	*
9	500 mM	*

*concentrația a fost sub limita de sensibilitate a metodei

Modul de încărcare a gelului de concentrare cu probele de proteină ORF38 purificată

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	M	Totale	CFE	10 mM	40 mM	80 mM	200 mM	200 mM	200 mM	500 mM
SDS-LB (μl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Probă (μl)	5	3,6	20	20	20	20	20	20	20	20
H ₂ O _d (μl)	15	16,4	0	0	0	0	0	0	0	0



SDS-PAGE cu fracțiile rezultate în etapa de eluție a produsului cadrului de citire 38 de pe coloana cu Ni²⁺. 1 - marker Sigma Wide Range Molecular Weight Markers; 2 - proteine totale; 3 - CFE, extract de proteine solubile; 4 - fracție eluată cu imidazol 10 mM; 5 - fracție eluată cu imidazol 40 mM; 6 - fracție eluată cu imidazol 80 mM; 7, 8, 9 - fracții eluate cu imidazol 200 mM; 10 - fracție eluată cu imidazol 500 mM.

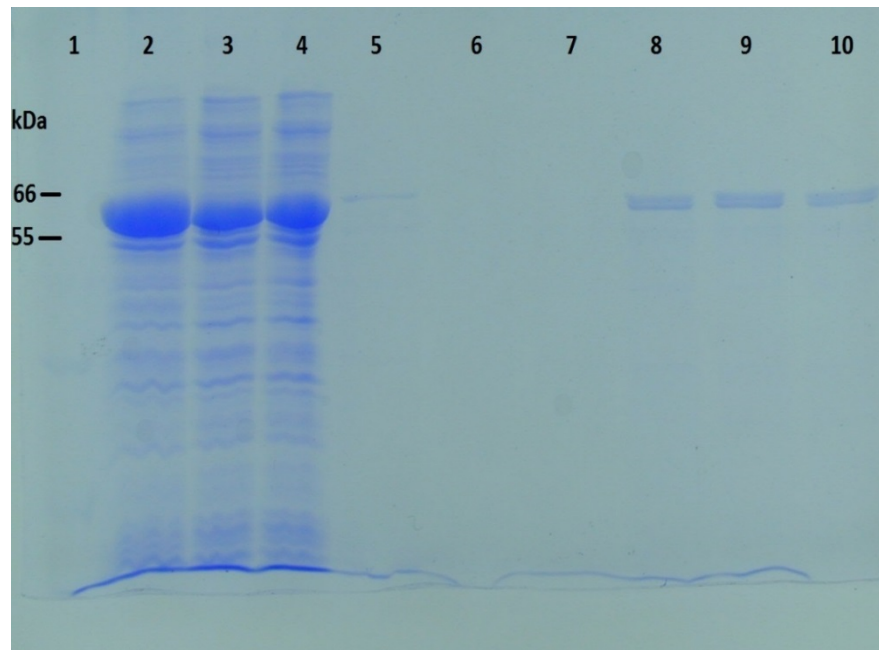


b) Metoda cu soluție de liză fără EDTA:

Rezultatele metodei Bradford pentru determinarea concentrației proteice pentru metoda fără EDTA

Nr. crt.	Proba recoltată	μg/ μl
1	Proteine totale	6,8
2	CFE	4,8
3	FLOW	3,5
4	10 mM	*
5	40 mM	*
6	80 mM	*
7	200 mM	0,1
8	200 mM	0,3
9	500 mM	0,2

*concentrația a fost sub limita de sensibilitate a metodei



SDS-PAGE cu fracțiile rezultate în etapa de eluție a produsului cadrului de citire 38 de pe coloana cu Ni²⁺, după utilizarea unei soluții de liză fără EDTA. 1 - marker Sigma Wide Range Molecular Weight Markers; 2 - proteine totale; 3 - CFE, extract de proteine solubile; 4 - FLOW, fracție eluată cu soluție-tampon de liză; 5 - fracție eluată cu imidazol 10 mM; 6 - fracție eluată cu imidazol 40 mM; 7 - fracție eluată cu imidazol 80 mM; 8, 9 - fracții eluate cu imidazol 200 mM; 10 - fracție eluată cu imidazol 500 mM.



2. Randamentul metodei de purificare utilizate

În cazul ambelor metode, randamentul de purificare este scăzut, fapt care poate fi observat pe gelurile colorate cu Brilliant Blue. Acest rezultat nu oferă posibilitatea unei caracterizări ulterioare a proteinei. Cu toate acestea, putem afirma, pe baza imaginilor obținute, că aceasta are o masă moleculară de 58 kDa, ceea ce corespunde cu masa ei moleculară teoretică.

3. Posibile strategii viitoare de îmbunătățire a randamentului de purificare

Chiar și după eliminarea EDTA-ului din soluția de liză, tot nu s-a putut obține un randament crescut de purificare



PROPUNERE

Utilizarea unei alte soluții de liză, care să nu conțină EDTA, dar care să nu afecteze expresia și cantitatea de proteină ORF38 solubilă.



CONCLUZII



1. S-a reușit expresia proteinei ORF38 pe mediu LB, spre deosebire de mediul ZYP, pe care aceasta nu a putut fi detectată.
2. S-a realizat **purificarea proteinei ORF38** folosind IMAC (Cromatografie de afinitate pentru metale immobilizate).
3. Am determinat masa moleculară a proteinei ORF38, ca fiind de 58 kDa.
4. Randamentul metodelor de purificare a fost, totuși, unul scăzut, ceea ce nu a permis caracterizarea ulterioară a proteinei ORF38.

Rezultatele obținute au permis:



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

- **Publicarea unui articol:**

Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară
TOM XVI, Fascicula 3, 2015

**HETEROLOGUS OVER-EXPRESSION AND *IN-SILICO*
CHARACTERISATION OF A PUTATIVE 2-KETO-GLUCONATE
DEHYDROGENASE FROM *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS*
pAO1**

BRÎNDUȘA CHEORBEJA¹, MĂDĂLINA BIANCA BUJDER¹, CLAUDIU ARNAUTU¹,
MARIUS MIHĂȘAN^{1*}

Received: 19 November 2015 / Revised: 19 November 2015 / Accepted: 23 November 2015
Published: 25 November 2015

Keywords: *Arthrobacter*, homology modeling, over-expression, growth medium, FAD protein

Abstract: *Arthrobacter nicotinovorans* is a gram positive soil actinobacteria which is able to grow on nicotine contaminated soils due to the presence of a large plasmid - pAO1. It has been shown that pAO1 encodes not only the pathway for nicotine mineralization, but also newly described oxidative xylose-catabolic pathway. Part of the genes cluster encoding this last pathway is also *gdh*, a putative 2-keto-gluconate dehydrogenase with no experimentally shown function. Based on sequence homology, a 3D model of the GDH protein was generated. The protein over-expression was tested on two growth mediums, but was found to be satisfactory only on LB medium when using 0.1 mM IPTG. Using immobilized metal affinity chromatography, GDH was purified to homogeneity, but the yield was extremely low and did not allowed for further characterization of the protein.

- **Participarea la două conferințe:**

1. Simpozionul Internațional „Tineri Cercetători în Științe Biologice”, Ediția a III-a, Cluj-Napoca, 2015;
2. Sesiunea Științifică Anuală a Facultății de Biologie a Universității “Alexandru Ioan Cuza” din Iași, 2015.