

Modelarea structurii tridimensionale a proteinei codificate de gena ORF38 din *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Arnăutu Claudiu Robert

Facultatea de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași

Coordonator științific:
Conf. Dr. Habil. Mihășan Marius

Cuprins



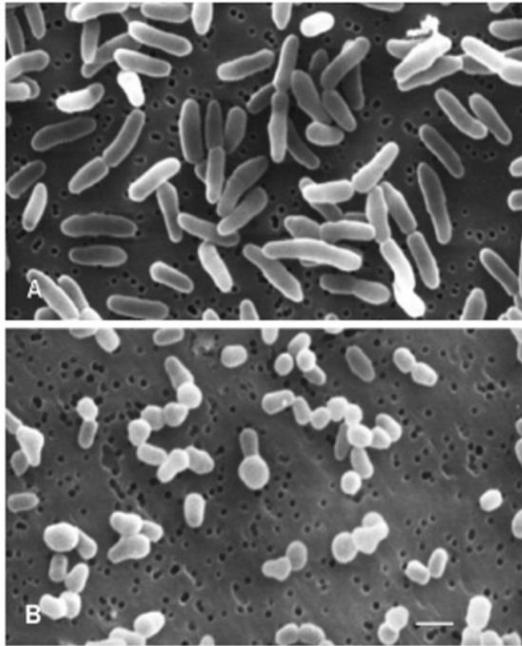
- **Capitolul I.** Caracterizare taxonomică și fiziologică a megaplasmidului pAO1 din *Arthrobacter Nicotinovorans*
- **Capitolul II.** Metode computaționale de caracterizare a proteinelor
- **Capitolul III.** Metode de cercetare
- **Capitolul IV.** Rezultate și discuții
- **Concluzii**

Arthrobacter nicotinovorans și Megaplasmidul pAO1

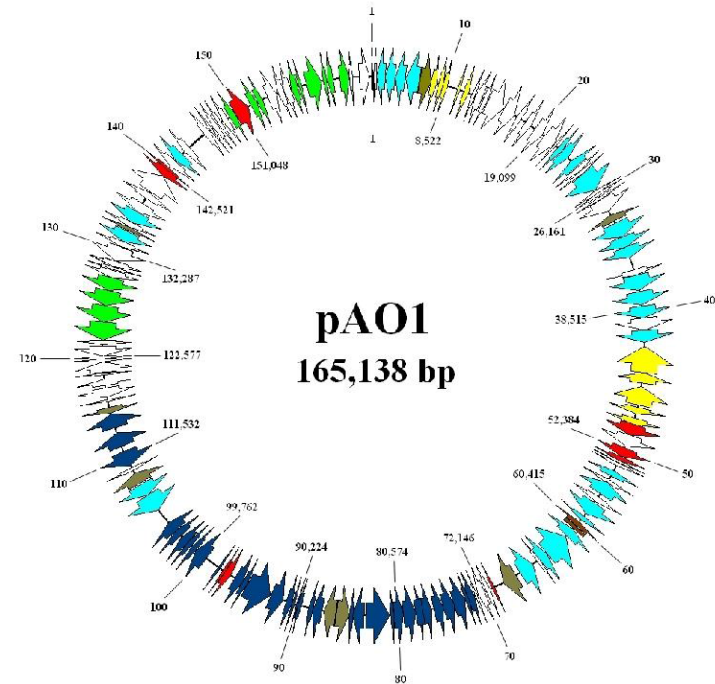


UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro



Celule din *Arthrobacter nicotinovorans*

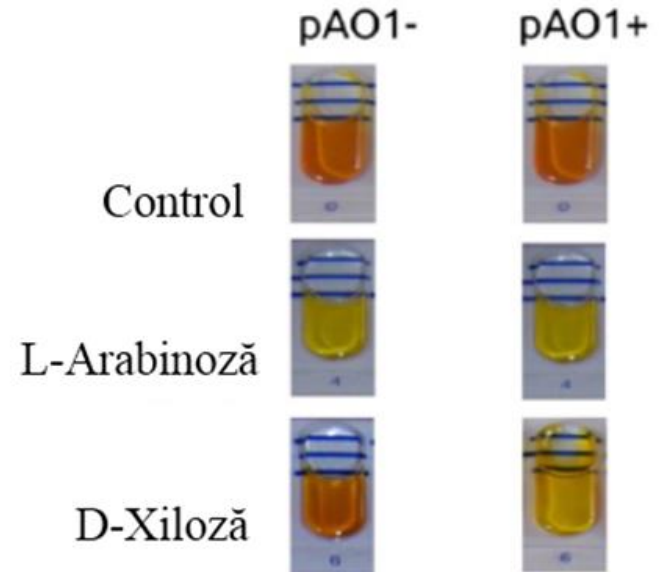
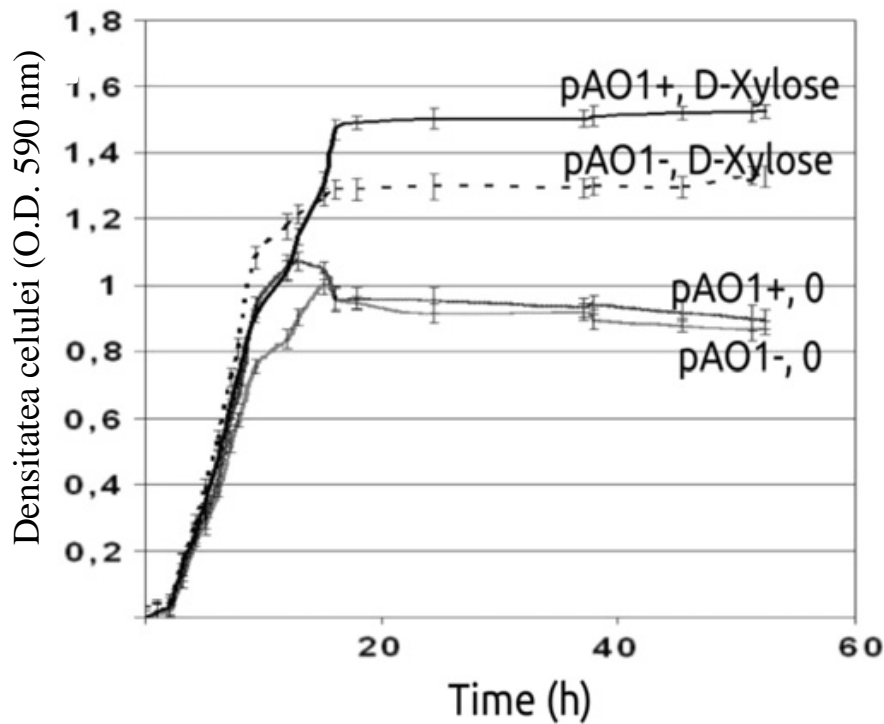


Megaplasmidul pAO1



Capacitatea de a degrada xiloza

- Mihășan, M. (2011): *Megaplasmidul pAO1. Structură și funcție*, Editura Universității "Al. I. Cuza" Iași, 12-19



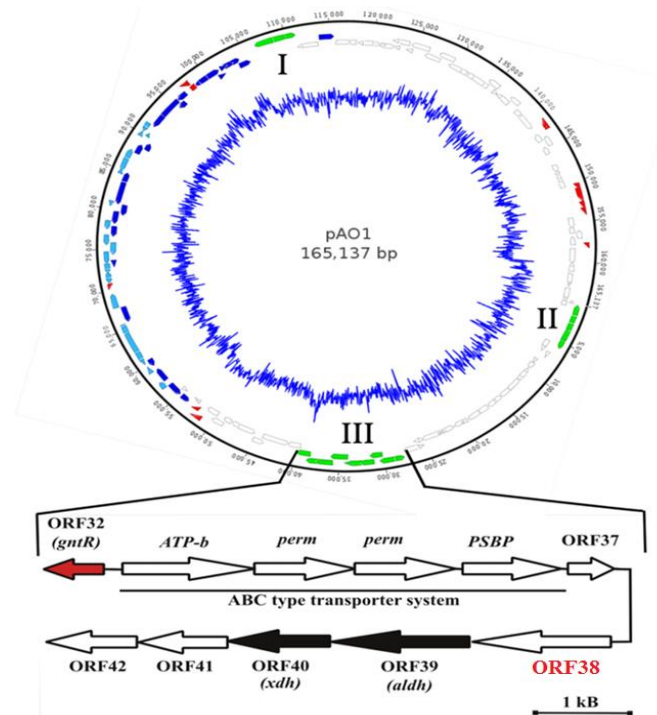
Curbele de creștere a tulpinii pAO1+ și pAO1- *Arthrobacter nicotinovorans* pe medii cu și fără xiloză.

Diferențe metabolice între tulpinile pAO1+ și pAO1- *Arthrobacter nicotinovorans*

- **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 : o cale metabolică implicată în degradarea xilozei



Organizarea genică a megaplasmei pAO1.
III - gene implicate în metabolismul xilozelor

ORF38 – Codifică o presupusă 2-keto-gluconat-dehidrogenază

- Mihășan, M. et al. (2013): Evidence of a plasmid-encoded oxidative xylose catabolic pathway in *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, Research in Microbiology, 164, 22-30



Motivația lucrării



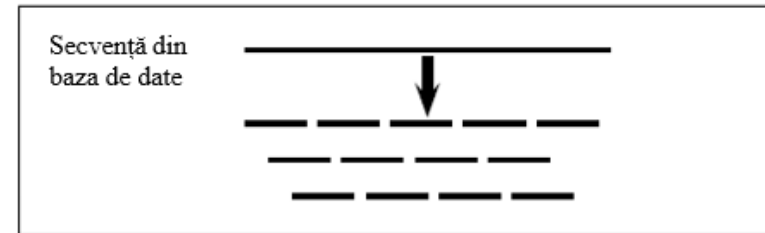
>gi|25169060|emb|CAD47896.1| 2-keto-gluconate dehydrogenase-like protein

[*Arthrobacter nicotinovorans*]

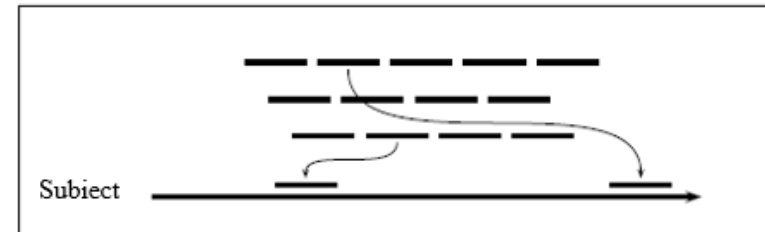
MKKYDLTDDDDVAVIIGSGPGGATLALRLVQQGLKVVLLEAG
PWITNDKFINDERESYKQLTWTDTLRLATGSWSLAKDFPGSP
AWNGKAVGGTATFWTGLTPRFKWHEFKTHTYTYGDLDPGTI
ADWPLDLDELHYYTAAEKAVGASHRHGRPPLPASNGYKV
LANGAERIGYRHYATGPYATNVEPYDGRPGTVQDGFAMAG
DKSRAKWSPLVSEIPKALATGLLELRTEAQAVQITLGPDGRA
DGVVYTDTVGNLQRQRARLVAVAGNAIETPRLLLLSATS GH
TDGLANSSGQVGRNYMRHTTGLVYAEFPNEVHMYRGEPM
AGIISDESRHDP SRGFVGGYYIEMIAQGLPSFSTFMSPGEWGP
QFTEKVEAYTRTAALWICGEDVPQASNRVTLSENTVTDRLGL
PAPVVHYDDHPNDIAMRNHGYEQGEKLFKSVG AIRTTRAPG
MPSGHNLTARMSQKPDEGVVNSFGQAHDVPNLFVSDGSQ
FTTGAAANPTLTIVALSMRQGDYIGRQLSAAAL

Secvența de aminoacizi pentru gena
ORF 38

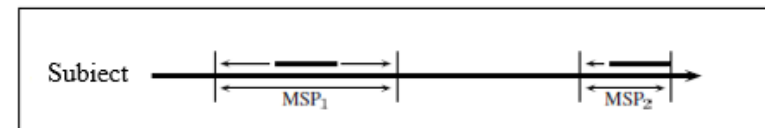
A



B



C



Cei trei pași în cadrul algoritmului BLAST. A: generarea unei liste de secvențe similare cu secvența țintă; B: căutarea de potriviri cât mai exacte între subiect și elementele listei generate anterior; C: generarea de zone perfect alinierte (MSP *engl. Maximal segment pairs*) prin extinderea stânga și dreapta atât timp cât crește scorul

- **GenBank:** CAD47896.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/25169060?report=fasta>
- **Haubold, B., & Wiehe, T.** (2006). Introduction to Computational Biology: An Evolutionary Approach, 329.

Platforme *in-silico* utilizate



- **ProtParam** calculează diferite proprietăți fizico-chimice, care pot fi deduse dintr-o secvență de proteine, nefiind necesare informații suplimentare privind proteina în cauză.
- **Swiss-Model** folosește modelarea pe bază de omologie, ca metodă de predicție. Utilizează șabloane cu structura provenită din baza de date cu structuri tridimensionale RCSB PDB (RCSB Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>). Poate fi considerat pionier în domeniul modelării automate deoarece reprezintă prima alternativă în modelarea de proteine disponibilă pe internet

Identificarea șabloanelor omoloage cu ORF38

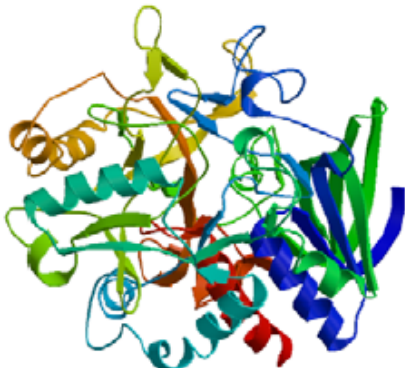
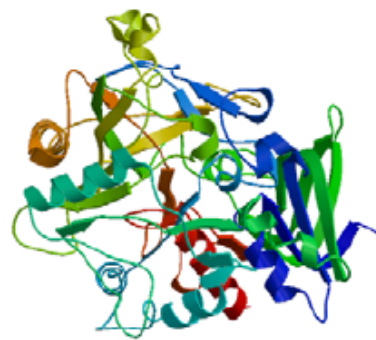



Nr.crt	Cod (SMTL)	Denumire	Grad de omologie	Rol	Origine	Funcție demonstrată experimentală
1	Icoy.1	Colesterol oxidaza	21,29	Este o enzima flavin dependentă care catalizează oxidare și izomerizarea a 3 beta-hidroxi steroid	<i>Brevibacterium sterolicum</i>	Da
2	1mxt.1.A	Colesterol oxidaza	20,84	Resturile de histidina din centrul activ al acestei flavin oxidaza, au un rol deosebit de important în reacțiile redox acționând defapt ca o legătură de hidrogen donoare decât una acceptoare	<i>Streptomyces sp</i>	Nu
3	3cnj.1.A	Colesterol oxidaza	20,27	Funcția nu este precizată în textul de referință	<i>Streptomyces sp. SA-COO</i>	Da
4	2jbv.1.A	Colin oxidaza	20,09	Catalizează oxidarea colinei la glicină betaină și realizează oxidarea substratului alcoolic.	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Da
5	3gyi.1.A	Colesterol oxidaza	20,13	Este o flavoenzima ce catalizează oxidarea și izomerizarea a 3 beta-hidroxisteroizi.	<i>Streptomyces sp. SA-COO</i>	Da
6	3ljp.1.A	Colin oxidaza	20,13	Oxidarea cofactorilor flavinei reduse cu ajutorul oxigenului este o reacție foarte importantă din care rezultă apă și peroxid de hidrogen	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Da
7	3gyi.1.A	Colesterol oxidaza	20,09	Este o flavoenzima ce catalizează oxidarea și izomerizarea a 3 beta-hidroxisteroizi.	<i>Streptomyces sp. SA-COO</i>	Da
8	4mig.1.A	Piranoz 2-oxidaza	18,85	Catalizează oxidarea β-d-glucozei până la 2-keto zahărurile corespunzătoare concomitent cu formarea peroxidului de hidrogen în timpul solubilizării ligninei	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Da
9	1tzi.1.A	Piranoz oxidaza	19,07	Catalizează oxidarea unui număr de carbohidrați folosind dioxid de azot	<i>Peniophora sp. SG</i>	Da
10	3bg7.1.A	Piranoz oxidaza	19,03	Catalizează oxidarea a diverse zahăruri în poziția C2 în timp ce concomitent electronii sunt transferați către oxigen la fel se întâmplă și pentru acceptori alternativi de electroni.	<i>Trametes ochracea</i>	Da

Proteine cu secvență de aminoacizi similară cu ORF38

Descrierea modelelor obținute



	Modelul 1 / 1coy.1.A	Modelul 2 / 2jbv.1.A	Modelul 3 / 4mig.1.A
Parametrii			
Gradul de acoperire	0,86	0,89	0,93
Alinierea (Range)	6 – 517	7 - 513	9 – 518
Gradul de similaritate	0,3	0,29	0,29
Starea oligomerică	Monomer	Monomer	Homotetramer
Metoda de determinare a structuri 3D	Raze X	Raze X	Raze X
Rezoluția	1,80 Å	1,86 Å	1,80 Å
GMQE	0,54	0,56	0,56
QMEAN	- 8,12	- 6,56	- 5,26

Parametrii utilizați de către Swiss-Model pentru descrierea modelelor tridimensionale

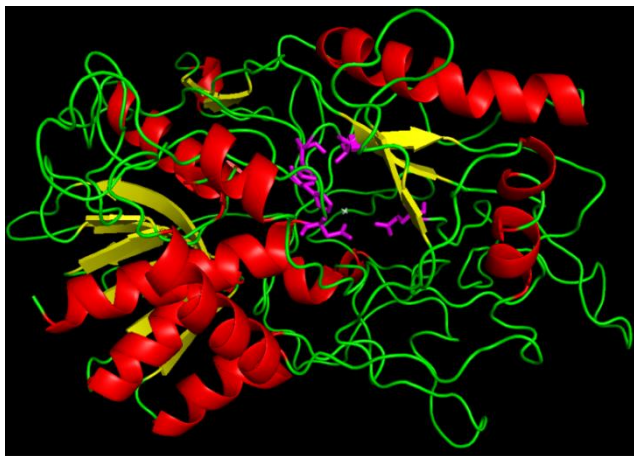
Analiza situsul catalitic



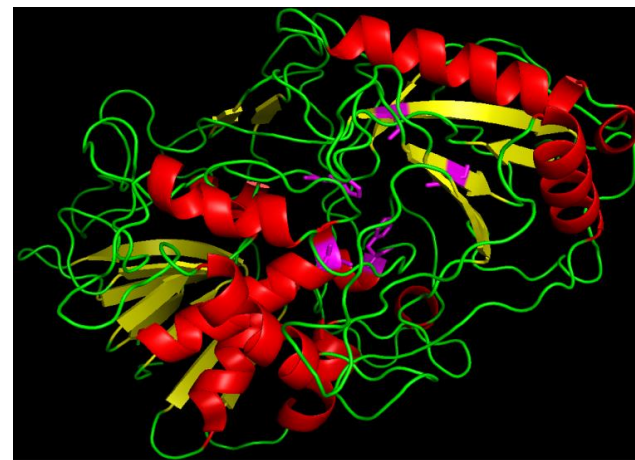
	AA prezenți în structura situsului catalitic		AA cu rol activ în oxidare		Rolul catalitic al template-ului
	Template	Model	Template	Model	
Model 1 1coy.1.A	Phe 359 Tyr 446 Met 325 Ile 218 Phe444	Tyr 345 Gly 453 Leu 307 Met 200 Pro 451	His 447 Asn 485 Glu 361 Asn 321 Asn 323	His 454 Asn 497 Glu 347 His 303 Thr 305	Catalizează oxidarea și izomerizarea 3-beta-hidroxi steroizi
Model 2 2jbv.1.A	Val 464 Asn 462 Tyr 465 Thr 376 Phe 357 Trp 331 Trp 61 Ile 103	Ser 452 Met 450 Gly 453 Trp 383 Ser 355 Gly 326 Arg 54 Leu 99	His 466 Asn 512 Glu 312 His 351 His 99	His 454 Thr 499 Ile 349 Thr 305 Phe 95	- Catalizează oxidarea colinei până la glicină și betaină; - Rol în legarea și poziționarea substratului de alcool pentru cataliză; - Responsabil de eliminarea hidroxilului H + din colină ;
Model 3 4mig.1.A	Tyr 476 Arg 492 Asp 472 His 470 Thr 174 Leu 576 Gln 468 Phe 474	- Trp383 - Thr 370 Thr 97 Arg 443 Pro 354 -	His 567 Asn 610 Gln 468 Asp 472 Tyr 476 Ala 565	His 454 Asn 497 Gln 368 Lys 372 - Ser 452	Catalizează oxidarea β-D-glucozelor până la zahărul 2-ceto corespunzător concomitent cu formarea peroxidului de hidrogen în timpul solubilizării ligninei.

Aminoacizii cu rol catalitic din structura template-urilor selectate și corespondenții lor în structura modelelor tridimensionale

Analiza situsul catalitic



Modelul ORF 38 generat pe baza șablonului 1coy.1.A,
aminoacizii catalitici: His 454, Asn 497, Glu 347, His
303, Thr305.



Modelul ORF 38 generat pe baza șablonului 2jbv.1.A,
aminoacizii catalitici: His 454, Thr 499, Ile 349,
Thr305, Phe95.



Modelul ORF 38 generat pe baza șablonului 4mig.1.A,
aminoacizii catalitici: His 454, Asn 497, Gln 368, Lys
372, Ser 452.

Concluzii



- Prin comparare cu datele din literatură legate de rolul genei ORF 38, acest studiu confirmă posibila funcție de reducere a glucidelor comune dar fără specificitate față de un anumit compus glucidic.
- Modelul obținut prin alinierea genei ORF 38 cu șablonul 4mig.1 obține cel mai bun scor QMEAN și GMQE, ceea ce îl include în lista pentru viitoare studii ce au la baza gena ORF 38.
- În urma analizei situsului catalitic aminoacizii His 454, Asn 497, Glu 347, Gln368 se regăsesc în măcar două din cele trei modele 3D, deci putem presupune că acești aminoacizi au rol activ în reducerea oxidativă a glucidului necunoscut.

Modelarea structurii tridimensionale a proteinei codificate de gena ORF38 din *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

