

Dinamica producției intermediarului metabolic 6-hidroxinicotina de către *Arthrobacter nicotinovorans*



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

GUZUN DOINA

Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași

Coordonator științific: Lect. Dr. MIHĂȘAN Marius

[e-mail: guzun_doina@yahoo.com](mailto:guzun_doina@yahoo.com)



Capitolul I. Caracterizarea speciei *Arthrobacter nicotinovorans*

Capitolul II. Aplicații biotehnologice ale căii de degradare a nicotinei din *Arthrobacter nicotinovorans*

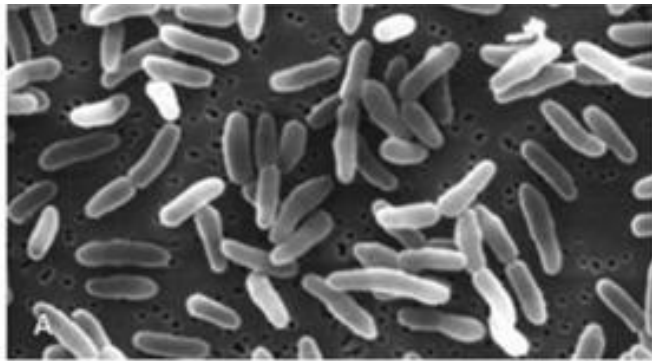
Capitolul III. Materiale și metode de cercetare

Capitolul IV. Rezultate și discuții

Arthrobacter nicotinovorans și pAO1



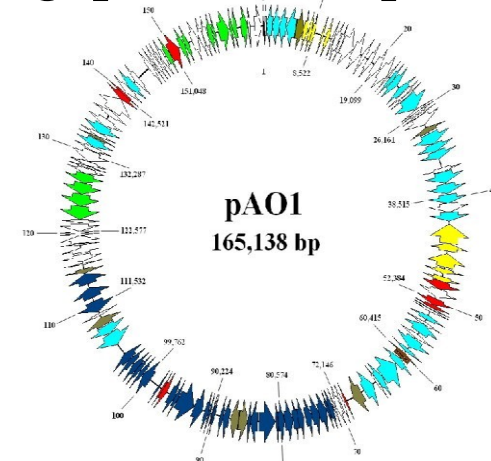
Celula gazdă *A. nicotinovorans*



M. R. Keddie, M. D. Collins, D. J. (1942).
Genus Arthrobacter. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition*.



Megaplasmidul *pAO1*



Igloi, G. L., & Brandsch, R. (2003).
Journal of Bacteriology, 185(6), 1976-86



Capacitatea de a degrada nicotina

Motivație!

- Degradarea nicotinei



metaboliti

Ex: 6-hidroxinicotina (6HNic):

⇒ Produsă în urma acțiunii **enzimei trimere NDH**;



⇒ Efecte asupra SNC similare, dar mai puternice decât ale nicotinei.

- M. Mihășan et al., *In-silico* identification of 6-hydroxy-L-nicotine as a novel neuroprotective drug, Rom. Biotechnol. Lett., Vol. 18, No. 3, Pag. 8333-8340;
- Hritcu et al. 2013, 6-hydroxy-L-nicotine from *Arthrobacter nicotinovorans* sustain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rats, J Physiol Biochem (2013) 69:25-34

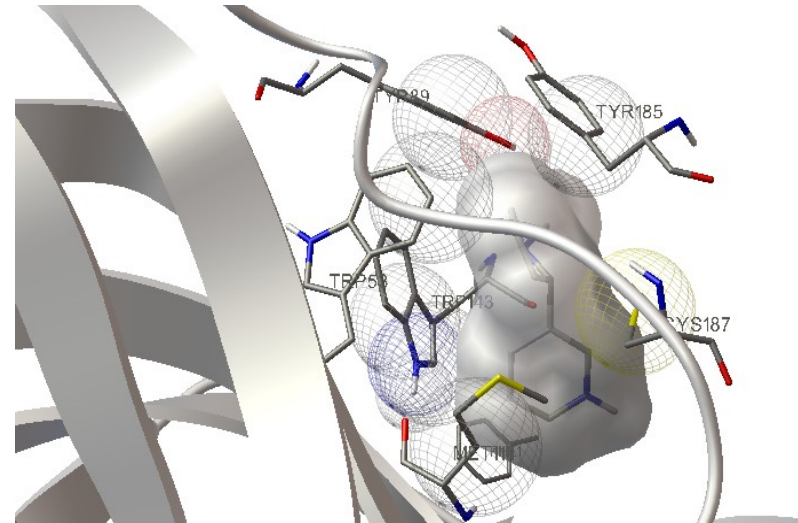
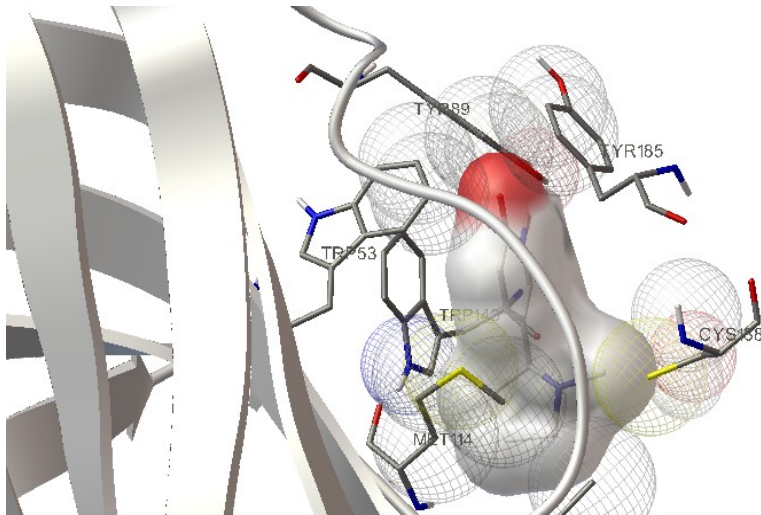
6-hidroxi-nicotina – posibil medicament?



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Legarea 6-hidroxi-L-Nicotinei (A) și nicotinei (B) în situsul receptorilor nicotin-acetilcolinici (nAChR)



J Physiol Biochem
DOI 10.1007/s13105-012-0184-9

ORIGINAL PAPER

6-hydroxy-L-nicotine from *Arthrobacter nicotinovorans* sustain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rats

Lucian Hritcu • Marius Stefan •
Roderich Brandsch • Marius Mihasan

Received: 19 October 2011 / Accepted: 5 June 2012
© University of Navarra 2012

Neuroscience Letters 591 (2015) 41–47

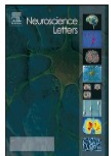
Contents lists available at ScienceDirect



ELSEVIER

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet



Research article

Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-L-nicotine in Alzheimer's disease rat model

Lucian Hritcu^{a,*}, Marius Stefan^a, Roderich Brandsch^b, Marius Mihasan^a

^a Department of Biology, Alexandru Ioan Cuza University of Iasi, Bd. Carol I, No. 11, 700506, Romania

^b Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Centre for Biochemistry and Molecular Cell Biology, Albert-Ludwigs-University Freiburg, Hermann Herder Strasse 7, Freiburg, Germany





- Sinteza chimică
- Izolarea și utilizarea enzimei NDH
- Izolarea din mediul de cultură

MATERIALE ȘI METODE



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Tulpini utilizate și condiții de creștere: *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+, pAO1- cultivate în mediul citrat suplimentat cu nicotină 0.05% și 0.005 % soluție de minerale pe un agitator rotativ la 28°C/190 rpm.*

Spectrale de absorbție au fost înregistrate pe un spectrofotometru Beckman Coulter DU 730 Life Science utilizând mediu citrat ca etalon.

Analiza HPLC a fost realizată pe un sistem Bischoff echipat cu 2 pompe, un detector DAAD, și o coloana Nucleodur RP C18 ec (150x4.6 mm, mărimea particulei 3μm).



*EBERWEIN H, GRIES FA, DECKER K. 1961.(On the decomposition of nicotine by bacterial enzymes. II. Isolation and characterization of a nicotine-splitting soil bacterium). Hope Seylers Z Physiol Chem 323:236-248.



Concentrația pigmentului (OD 585nm)

Densitatea celulară (OD 660nm)

1. Curba de creștere a tulpinii *Arthrobacter nicotinovorans* în mediu cu nicotină

Densitatea celulară

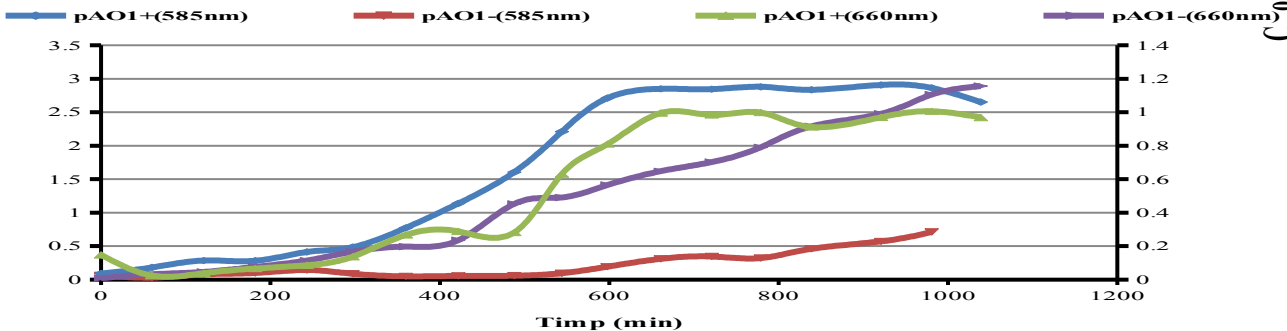


Figura 1. Dinamica tulpinii *Arthrobacter nicotinovorans* în mediu citrat suplimentat cu nicotină



2. Dinamica intermediarilor metabolici eliberați în mediul de cultură

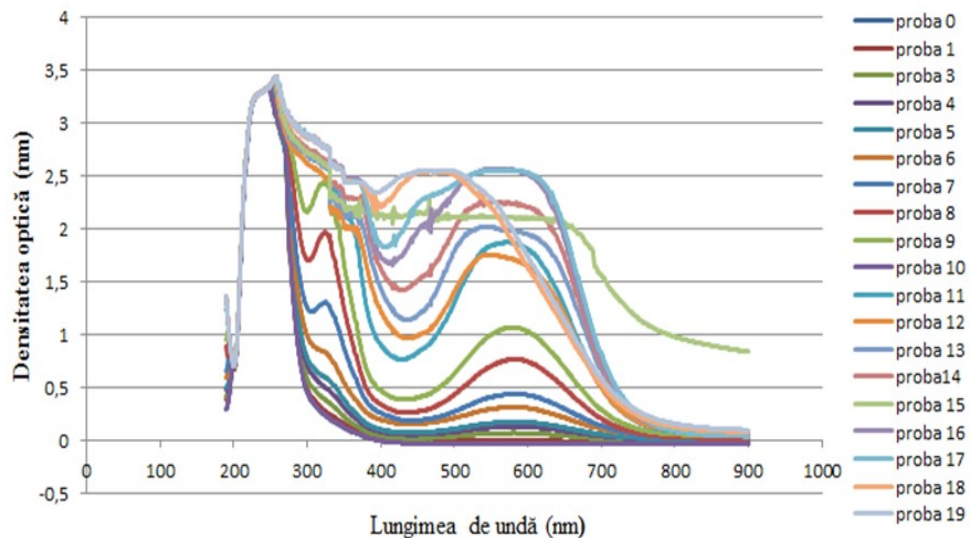
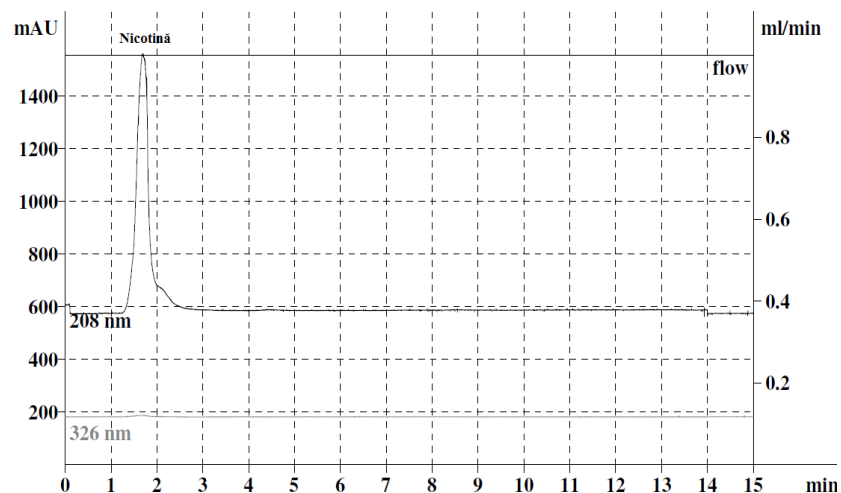
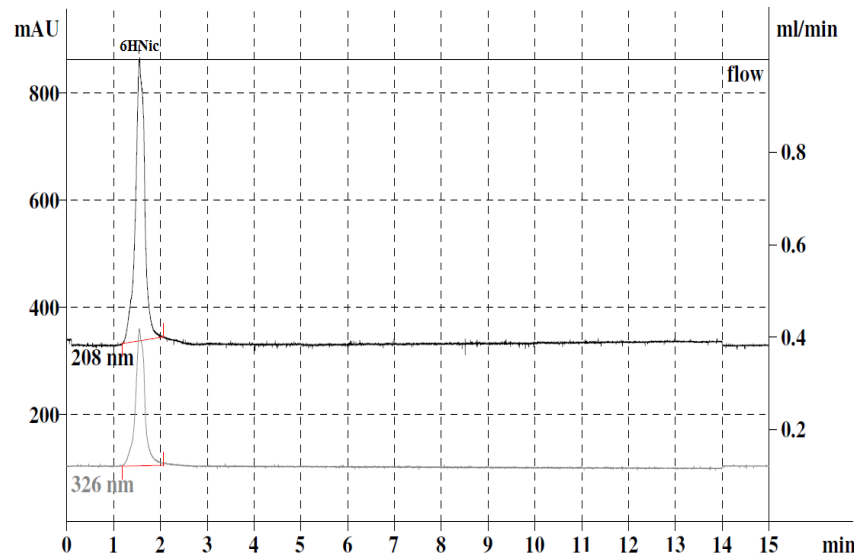


Figura 2. Spectrele de absorbție ale probelor extrase din mediul de cultură al tulpinii *A. nicotinovorans* pAO1+

Figura 3. Cromatograme tipice pentru nicotina și 6HNic în care s-a folosit ca fază mobilă amestecul 1mM H_2SO_4 ; metanol 75:25





- Tulpina de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 este capabilă să folosească nicotina din mediul de cultură ca sursă de carbon și azot.*

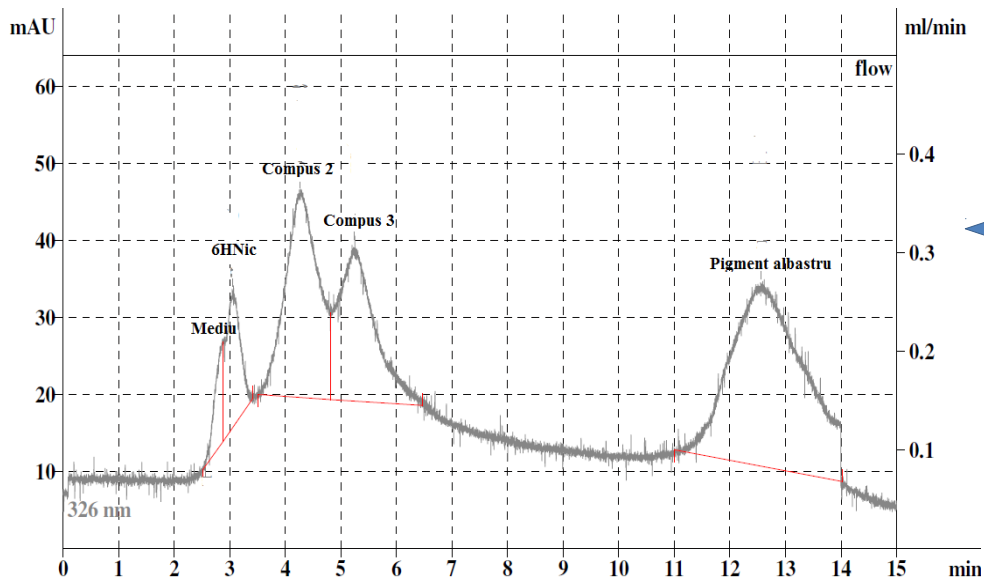


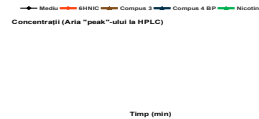
Figura 4. Separarea compușilor din mediul de cultură al tulpinii *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1

*Baitsch D, Sandu C, Brandsch R, Igloi GL. 2001. Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2,6-dihydropyridine 3-hydroxylase. *J Bacteriol* 183:5262–5267.



3. Corelația dintre vârsta culturii și intermediarii existenți

◀ **Figura 5.** Dinamica concentrațiilor de nicotină și ai derivaților ei pe parcusul creșterii



- Atunci când celulele de pAO1+ au ajuns în faza staționară, concentrația de nicotină a început să scadă terminându-se după 5 ore;
- Odată cu scăderea concentrației de nicotină, în mediu se acumulează 6Hnic atingând nivelul maxim după 11 ore de dezvoltare;
- De asemenea la HPLC au mai fost identificați 2 produși metabolici: pigmentul albastru (NB) și încă un produs necunoscut ce conține un inel aromatic.



- Utilizarea directă a celulelor de *A.nicotinovorans* pAO1+ pentru a converti nicotina în 6HNic este realizabilă chiar dacă acest proces are loc cu un randament scăzut;
- Cel mai bun moment de recoltare a celulelor este după 11 ore de creștere în mediul citrat suplimentat cu nicotină 0.05%.



Lucrări publicate in extenso:

1. BOIANGIU Răzvan, **GUZUN Doina**, MIHĂȘAN Marius (2014), Time dependent accumulation of nicotine derivatives in the culture medium of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, *Analele Științifice ale Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, Secțiunea II a. Genetică și Biologie Moleculară, TOM XV*, pag. 19-23;

Lucrări publicate în rezumat:

2. **GUZUN Doina**, BOIANGIU Răzvan-Ștefan, MIHĂȘAN Marius (13-14 Mai 2015), Dinamica acumulării derivaților nicotiniici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, Sesiunea națională de comunicări științifice studențești, Rezumatele comunicărilor: Științe ale naturii și exacte, Univ. de Stat din Moldova, pag. 3-4;

Lucrări prezentate la conferințe:

3. BOIANGIU Răzvan, **GUZUN Doina**, MIHĂȘAN Marius, Time dependent accumulation of nicotine derivatives in the culture medium of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **1st edition "Young Researchers in BioScience – International Symposium", Cluj-Napoca, România 23-27 Iulie 2014;**
4. BOIANGIU Răzvan, **GUZUN Doina**, MIHĂȘAN Marius, Dinamica acumulării derivaților nicotiniici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **Conferința științifică anuală a Facultății de Biologie, UAIC, "Conservarea biodiversității în contextul dezvoltării durabile", Iași, România 23-24 Octombrie 2014;**
5. **GUZUN Doina**, BOIANGIU Răzvan-Ștefan, MIHĂȘAN Marius, Dinamica acumulării derivaților nicotiniici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **Sesiunea națională de comunicări științifice studențești, Ediția a XIX-a, Etapa a I-a, USM, Chișinău, R. Moldova 17 Martie 2015 (PREMIUL I);**
6. **GUZUN Doina**, BOIANGIU Răzvan-Ștefan, MIHĂȘAN Marius, Dinamica acumulării derivaților nicotiniici în mediile de *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, **Sesiunea națională de comunicări științifice studențești, Ediția a XIX-a, Etapa a II-a, USM, Chișinău, R. Moldova 13-14 Mai 2015 (PREMIUL III);**



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

www.uaic.ro

Dinamica producției intermediarului metabolic 6-hidroxinicotina de către
Arthrobacter nicotinovorans