

NICOTIN-DEHIDROGENAZA DIN *ARTHROBACTER NICOTINOVORANS* – METODĂ ALTERNATIVĂ DE OBȚINERE A 6-HIDROXI-NICOTINEI

- Lucrare de licență -



ALEXANDRU IOAN CUZA UNIVERSITY of IAȘI

www.uaic.ro

Moței Diana Elena*

*Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași

Coordonator științific: Conf. Dr. Habil. Mihășan Marius

Email: moteidianaelena@yahoo.com



Introducere

Capitolul I. *Arthrobacter nicotinovorans* – sursă de compuși neuroprotectivi

Capitolul II. Proprietățile enzimei nicotin-dehidrogenaza din *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1+

Capitolul III. Metode de cercetare

Capitolul IV. Rezultate și discuții

Concluzii

Maladia Alzheimer (AD)



47 milioane
persoane suferă de
AD

 **131**
milioane
până în anul 2050

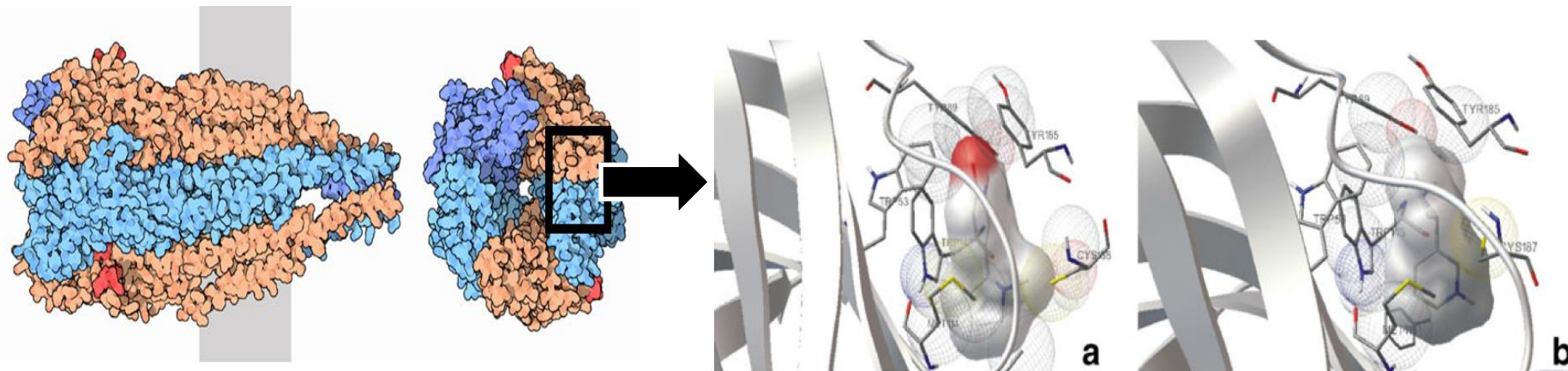
Costuri la nivel global
818 miliarde
dolari

Trei modificări majore la nivelul creierului:

- **Formarea plăcilor β -amiloidice extracelulare**
- **Apariția formelor hiperfosforilate a proteinei tau**
- **Scăderea nivelului de acetilcolină**

- Alzheimer's Disease International (ADI) - World Alzheimer Report 2016, 3, 2016
- M.L. Daviglus, C.C. Bell, W. Berrettini, P.E. Bowen, E.S. Connolly, N.J. Cox, J.M. Dunbar-jacob, et al. (2010). NIH State-of-the-Science Conference Statement: Preventing Alzheimer's Disease and Cognitive Decline. NIH consensus and state-of-the-science statements

6-hidroxi-nicotina – modulator nAChR



Receptor pentru acetilcolină nAChR (PDBID 2BG9) Modul de legare al **6HLN** (a) și al **nicotinei** (b) de nAChR, așa cum a rezultat din experimente de andocare moleculară computerizată (*in silico*)

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

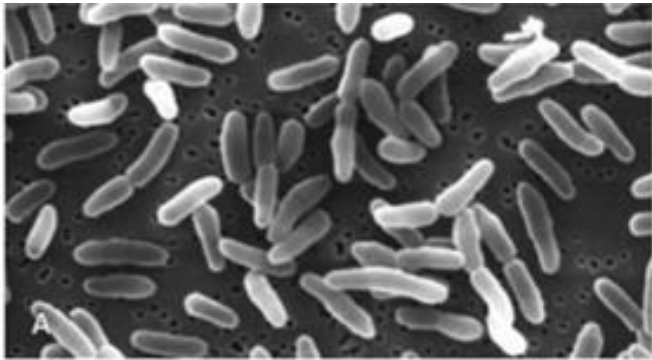


Arthrobacter nicotinovorans – sursă de 6-hidroxi-nicotină

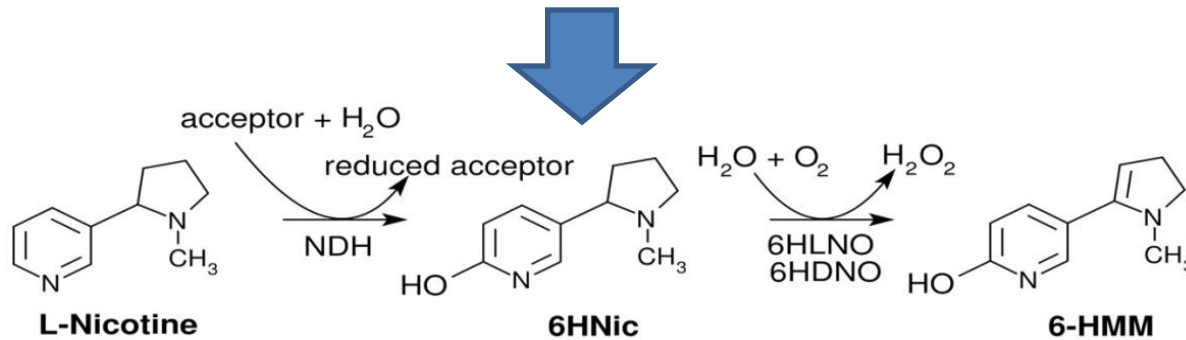
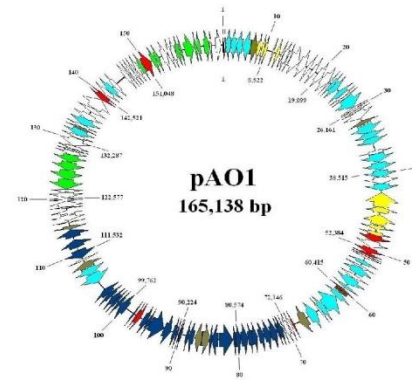
ALEXANDRU IOAN CUZA UNIVERSITY of IAȘI

www.uaic.ro

A. nicotinovorans



Megaplasmidă pAO1



Prokaryotes (2006) 3:945–960
DOI: 10.1007/0-387-30743-5_36

CHAPTER 1.1.21

The Genus *Arthrobacter*

DOROTHY JONES AND RONALD M. KEDDIE

Appl Microbiol Biotechnol (2006) 69: 493–498
DOI 10.1007/s00253-005-0226-0

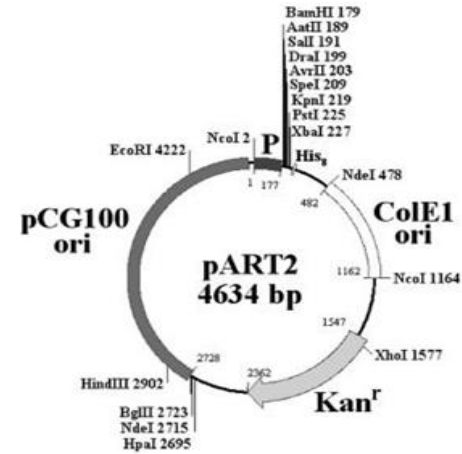
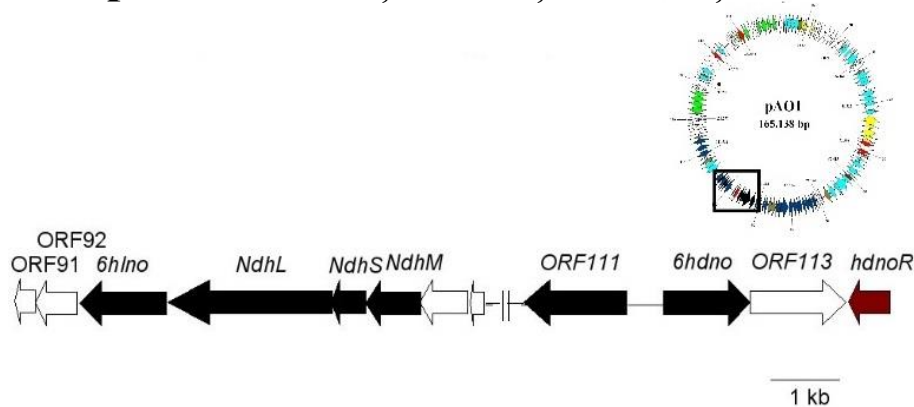
MINI-REVIEW

Roderich Brandsch

Microbiology and biochemistry of nicotine degradation



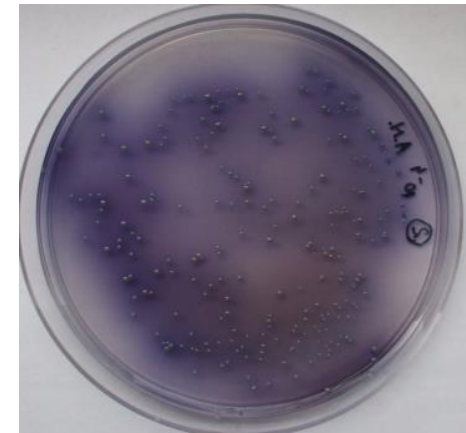
✓ Tulpini utilizate și condiții de creștere



- Tulpină *A. nicotinovorans* pAO1 (wt)

- Tulpină *A. nicotinovorans* pAO1 modificată genetic - pART2ndh

Tulpinile au fost cultivate în mediu citrat suplimentat cu nicotină 0,05% și 0,005% soluție de minerale pe un agitator la 28°C/190rpm.



- Sandu, C., Chiribau, C.-B., Sachelaru, P., & Brandsch, R. (2005). *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8920–4.



Metode de cercetare

Identificarea și cuantificarea Nic și 6HNic – **cromatografie de înaltă performanță în mediu lichid**



Sistem HPLC Shimadzu Prominence

- Degazificator DGU-20A5
- Coloană MN Nucleodur 100-3 C18ec
- 2 Pompe LC20AD
- Injector SIL20AC
- Cuptor CT20AC
- Detector (UV-VIS) SPD M20A DAD

Faza mobilă - 1 mM acid sulfuric:metanol 75:25

Debit - 1 ml/min.

Curba de calibrare - nicotină (între 0.19 și 3 mM)

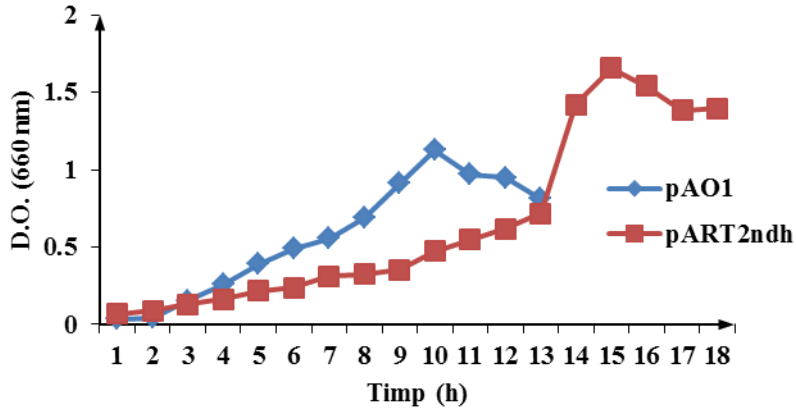
- 6HNic (între 0.19 și 3 mM)

Rezultate și discuții

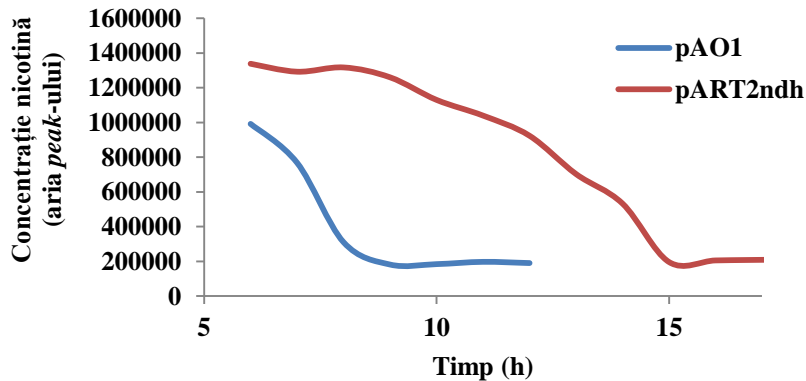


✓ *A. nicotinovorans* pAO1+ vs *A. nicotinovorans* pART2ndh

• Curbe de creștere



• Dinamica consumului de nicotină



• Acumularea de 6-hidroxi-nicotină

<i>A. nicotinovorans</i>	Timp (h)	Acumularea relativă de 6HNic (%)
pAO1	8	100
pART2NDH	6	260,1335
	7	313,1256
	8	324,16
	9	375,2371
	10	374,1411
	11	401,6738
pART2NDH	12	435,7216
	13	483,8436



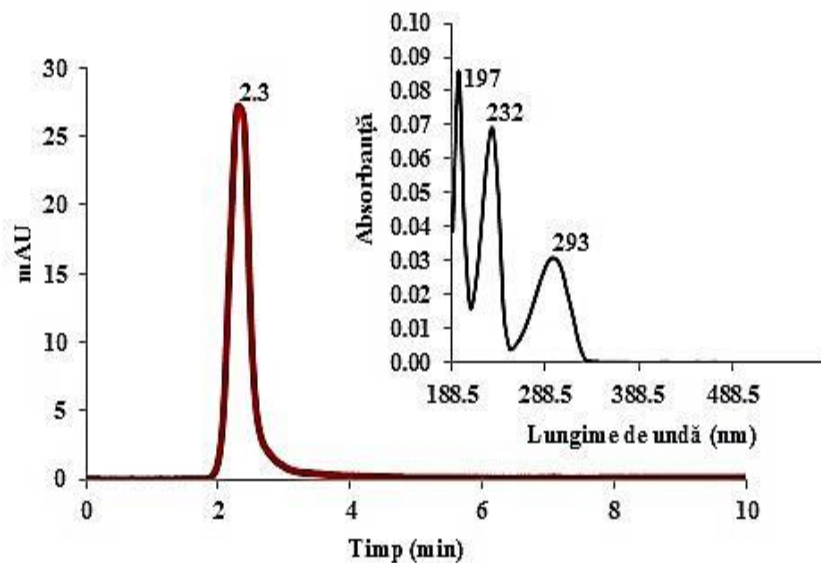
INHIBITORS	ORGANISM	UNIPROT	COMMENTARY
(R)-6-Hydroxynicotine	Arthrobacter nicotinovorans	Q93NH4	-
6-Hydroxy-D-nicotine	Arthrobacter nicotinovorans	-	competitive inhibitor
6-Hydroxy-D-nicotine	Arthrobacter nicotinovorans	-	50% inhibition at 0.18 mM
6-Hydroxy-D-nicotine	Arthrobacter nicotinovorans	-	-
DL-2-hydroxynicotine	Arthrobacter nicotinovorans	-	-
HgCl ₂	Arthrobacter nicotinovorans	-	100% inhibition at 0.005 mM
methylene blue	Arthrobacter nicotinovorans	-	strong inhibitor
Na ₂ MoO ₄	Arthrobacter nicotinovorans	-	12% inhibition at 0.05 mM
o-phenanthroline	Arthrobacter nicotinovorans	-	69% inhibition at 9 mM
p-Chloromercuriphenylsulfonate	Arthrobacter nicotinovorans	-	60% inhibition at 0.025 mM, inhibition can be reversed by an excess of thiol compounds
Urea	Arthrobacter nicotinovorans	-	at 4 M, 38% inhibition and at 7.2 M, 93% inhibition
ZnSO ₄	Arthrobacter nicotinovorans	-	57% inhibition at 0.05 mM

BRENDA - Information on EC 1.5.3.5 - (S)-6-hydroxynicotine oxidase



✓ Test inhibitori - utilizând tulpina *A.nicotinovorans* pART2ndh

- Acumularea de 6HNic



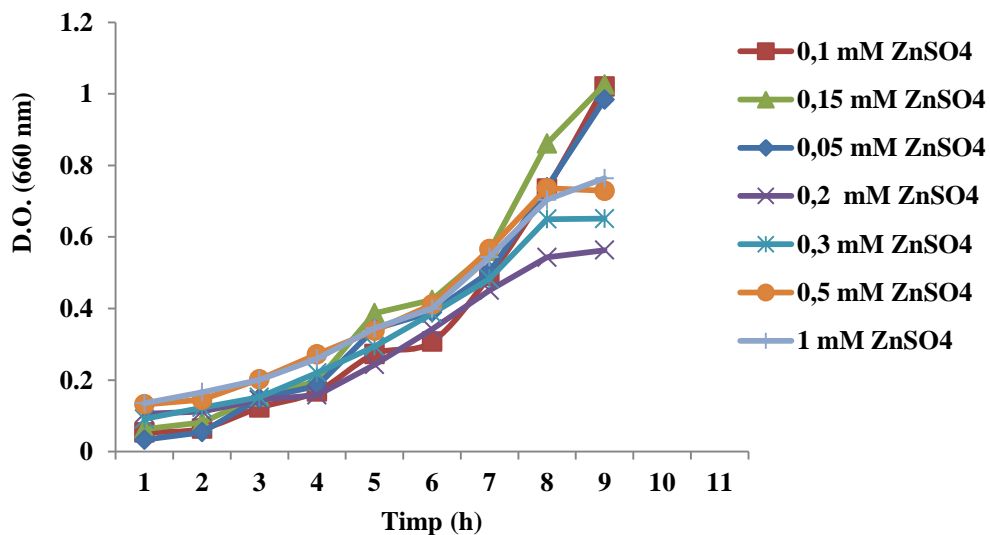
- Analiza HPLC: 6HLNic la 290 nm

Inhibitor	(%)
-	100%
ZnSO ₄ (0.05 mM)	160.56
MB (1 mM)	142.46
HgCl ₂ (0.005 mM)	82.77



✓ Influența diferitelor concentrații de ZnSO₄

• Curbe de creștere

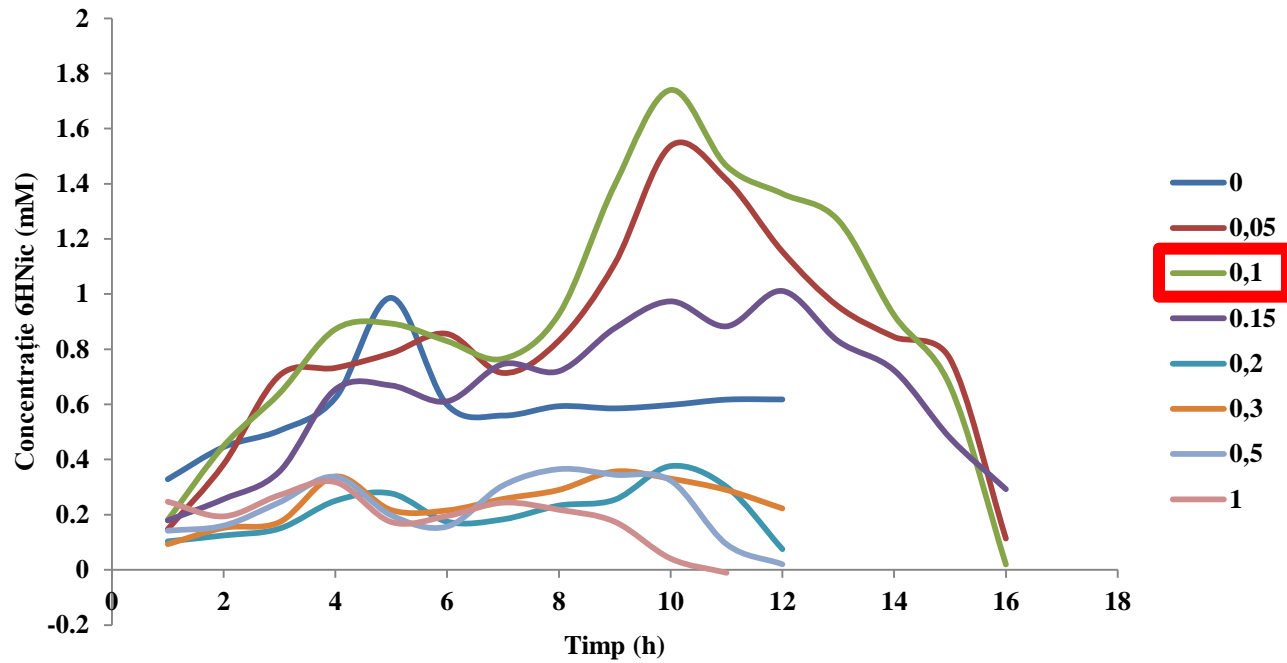


• Dinamica consumului de nicotină

ZnSO ₄ (mM)	Viteza de degradare a nicotinei (μM/h)
0	0,2001
0,05	0,5256
0,1	0,467
0,15	0,4601
0,2	0,2527
0,3	0,2707
0,5	0,2651



- **Dinamica acumulării de 6-hidroxi-nicotină**



CONCLUZII

- ✓ **Tulpina recombinată genetic *A. nicotinovorans* pART2*ndh* constituie o metodă viabilă de producere de 6HNic ce poate sta la baza dezvoltării unei biotehnologii de producere a acestui compus.**
- ✓ **Utilizarea inhibitorilor pentru 6-hidroxi-nicotin oxidaza a avut ca rezultat creșterea concentrațiilor de 6HNic din mediu.**
- ✓ **Cea mai mare acumulare de 6HNic a fost obținută în cazul unei concentrații de ZnSO₄ 0,1 mM.**



LUCRĂRI PUBLICATE/PREZENTATE ÎN URMA ACESTUI STUDIU

• Articole indexate ISI Web of Science

1.Hrițcu, L., Ioniță, R., **Moței, D. E.**, Babii, C., Ștefan, M.,Mihășan, M., 2017. "Nicotine versus 6-Hydroxy-L-Nicotine against Chlorisondamine Induced Memory Impairment and Oxidative Stress in the Rat Hippocampus." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 86: 102–8;

• Conferințe

1.Moței Diana, Babii Cornelia, Mihalache Gabriela, Ștefan Marius, Mihășan Marius, "A genetically engineered *Arthrobacter nicotinovorans* strain for improved production of 6-hidroxy-nicotine", **Young Researchers in BioSciences - International Symposium, Cluj-Napoca (România), 2016;**

2.Moței Diana, Babii Cornelia, Mihalache Gabriela, Ștefan Marius, Mihășan Marius, "A genetically engineered *Arthrobacter nicotinovorans* strain for improved production of 6-hidroxy-nicotine", **Faculty of Biology Annual Scientific Meeting, Iași (România), 2016;**

3.Moței Diana, Babii Cornelia, Mihalache Gabriela, Ștefan Marius, Mihășan Marius, "Nicotin-dehidrogenaza din *Arthrobacter nicotinovorans* - metodă alternativă de obținere a 6-hidroxi-nicotinei", **Sesiunea Științifică Anuală A Studenților Naturaliști, Iași (România), 2017 (PREMIUL I).**

• Articole în extenso în volumele unor conferințe

1.Gabriela Mihalache,Prof. Dr. Marius Ștefan, Cornelia Babii, **Diana Moței**, Assoc. Prof. Dr. Marius Mihășan, "Steps towards an *Arthrobacter Nicotinovorans* based biotechnology for production of 6-hidroxy-nicotine", **16th**

International Multidisciplinary Scientific Geoconference, Vienna (Austria), 2016.



Vă mulțumesc pentru atenție!

