

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

**Studiul omic integrat al căii metabolice de
degradare a nicotinei din microorganismul**
Paenarthrobacter nicotinovorans

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. DR. HABIL. MIHĂȘAN MARIUS

Student-doctorand:

EL-SABEH AMADA

IAȘI

2025

CUPRINSUL TEZEI

INTRODUCERE.....	5
MULȚUMIRI.....	6
LISTĂ DE ABREVIERI.....	7
CUVINTE CHEIE	10
MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	11
Motivația științifică a studiului	12
Motivația economică și ecologică a studiului	13
Motivația medicală a studiului.....	14
Lacune în stadiul actual al cunoașterii relevante studiului.....	16
Scopul studiului	18
Obiectivele principale ale studiului.....	19
CAPITOLUL 1 - TAXONOMIA, BIOCHIMIA ȘI BIOLOGIA MOLECULARĂ A SPECIEI <i>PAENARTHROBACTER NICOTINOVORANS</i>	21
1.1 Taxonomia speciei <i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	21
1.2 Particularități morfologice, metabolice și fiziologice ale genului <i>Paenarthrobacter</i>	21
1.3 Necesitatea studiului metabolismului bacterian al nicotinei	22
1.4 Căile de degradare microbiană a nicotinei	25
1.5 Degradarea nicotinei la <i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> ATCC 49919	26
1.5.1 Megaplasmidul pAO1	26
1.5.2 Calea de degradare a nicotinei de la <i>P. nicotinovorans</i> ATCC 49919	28
CAPITOLUL 2 - ȘTIINȚELE OMICE ȘI APLICABILITATEA LOR ÎN STUDIUL MICROORGANISMELOR	32
2.1 Elemente definitorii ale științelor omice.....	32
2.2 Aplicații curente și potențiale ale științelor omice.....	34
2.3 Provocări ale științelor omice	36
2.3.1 Reproductibilitatea și replicabilitatea	38
2.3.2 Certitudinea reprezentării cu acuratețe a moleculelor biologice	39
2.3.3 Stocarea datelor masive din științele omice	40
2.3.4 Provocări specifice pentru studiile multiomice	47
2.4 Evoluția tehnicilor de secvențiere	49
2.4.1 Prima generație de tehnici de secvențiere.....	49
2.4.2 A doua generație de tehnici de secvențiere	51
2.4.3 A treia generație de tehnici de secvențiere	55
2.5 Genomica și aplicațiile sale în studiul microorganismelor	61
2.5.1 Progrese în studiul procariotelor determinate de dezvoltarea genomicii.....	61
2.5.2 Oportunități oferite de analiza genomică.....	62
2.5.3 Dificultatea genomicii bacteriene	63
2.5.4 Abordări pentru asamblarea completă a genomurilor	64
2.6 Transcriptomica și aplicațiile sale în studiul microorganismelor	71
2.6.1 Evoluția transcriptomicii	71
2.6.2 Oportunități oferite de analiza transcriptomică	72
2.6.3 Abordări în transcriptomică.....	73
2.6.4 Dificultăți în analiza transcriptomului bacterian	77
2.6.5 Studii transcriptomice ale căilor microbiene de degradare a nicotinei	81
2.7 Proteomica și aplicațiile sale în studiul microorganismelor	82
2.7.1 Evoluția proteomicii	82
2.7.2 Oportunități oferite de analiza proteomului.....	83
2.7.3 Abordări în proteomică.....	83
2.7.4 Dificultăți în analiza proteomului bacterian	85
2.7.5 Studii proteomice asupra genului <i>Arthrobacter</i>	87

CAPITOLUL 3 - METODE DE CERCETARE	89
3.1 Metode <i>in vitro</i>	89
3.1.1 Tulpini bacteriene și condiții de creștere utilizate	89
3.1.2 Determinarea momentelor cheie ale catabolismului nicotinei.....	91
3.1.3 Extracția, purificarea, tratamentul enzimatic și cuantificarea acizilor nucleici prealabile pregătirii bibliotecilor pentru secvențiere	96
3.1.4 Pregătirea bibliotecilor de secvențiere.....	113
3.1.5 Secvențierea cu citire scurtă sau lungă a acizilor nucleici.....	121
3.2 Metode <i>in silico</i>	124
3.2.1 Identificarea nucleotidelor din datele brute ONT – basecalling.....	124
3.2.2 Procesarea datelor de secvențiere a ADN-ului, asamblarea și analiza genomurilor.....	126
3.2.3 Procesarea datelor de secvențiere a ARN-ului și analiza DGE	142
3.2.4 Integrarea și vizualizarea datelor multiomice.....	172
3.2.5 Analiză statistică.....	175
CAPITOLUL 4 - REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	178
4.1 Asamblarea, adnotarea și analiza genomului <i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	178
4.1.1 Procesarea datelor genomice de la <i>P. nicotinovorans</i> ATCC 49919.....	179
4.1.2 Asamblarea <i>de novo</i> hibridă a genomurilor și adnotarea cu NCBI PGAP	184
4.1.3 Proprietățile genomului <i>P. nicotinovorans</i> ATCC 49919	185
4.1.4 Validarea genomului <i>P. nicotinovorans</i> ATCC 49919.....	187
4.1.5 Evaluarea funcționalității genomului <i>P. nicotinovorans</i> ATCC 49919.....	197
4.2 Analiza transcriptomică a degradării nicotinei la <i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	205
4.2.1 Momentele cheie ale catabolismul nicotinei	206
4.2.2 Optimizarea secvențierii directe a ARN-ului bacterian cu ONT Flongle.....	208
4.2.3 Procesarea datelor transcriptomice de la <i>P. nicotinovorans</i> ATCC 49919	212
4.2.4 Analiza expresiei diferențiale a genelor în timpul degradării nicotinei.....	224
4.2.5 Analiza pentru îmbogățirea funcțională a sDEGs	227
4.3 Analiza multiomică a degradării nicotinei la <i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	229
4.3.1 Rezultatele reinterpretării datelor proteomice folosind genomul complet	229
4.3.2 Gene plasmidiale exprimate diferențial în timpul degradării nicotinei	229
4.3.3 Gene cromozomiale exprimate diferențial în timpul degradării nicotinei.....	233
4.3.4 Integrarea căii de degradare a nicotinei în metabolismul general al celulei	234
4.3.5 Gene implicate în reglarea transcrierii.....	236
4.3.6 Gene implicate în transportul transmembranar.....	237
4.3.7 Gene implicate în răspunsul la stresul oxidativ	238
4.4 Contribuții în baze de date și platforme de dezvoltare software de referință internațională.....	241
CONCLUZII	242
PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR.....	246
BIBLIOGRAFIE.....	248
ANEXE	271

CUVINTE CHEIE

Paenarthrobacter nicotinovorans ATCC 49919, *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter nicotinovorans*, pAO1, degradare, studiu integrat, megaplasmid, bacterie, actinomicet, actinobacterie, microorganism, NDM, NDB, nicotină, citrat, TCA, 6-hidroxi-nicotină, catabolism, metabolism, genom, genomic, transcriptom, transcriptomic, proteom, proteomic, multiomic, expresie diferențială a genelor, expresie diferențială a proteinelor, analiză funcțională, DEG, DEP, DGE, DPE, DESeq2, secvențiere, secvențiere de ultimă generație, secvențiere cu citire scurtă, *de novo*, secvențiere cu citire lungă, secvențiere ADN, secvențiere ARN, direct-RNA sequencing, nanopor, Oxford Nanopore Technologies, ONT, MinION, Flongle, Mk1B, long-read sequencing, nanopore sequencing, short-read sequencing, asamblare hibridă, hybrid assembly, Unicycler, bioinformatică, spectrometrie de masă, cromatografie lichidă, UPLC, biotehnologii microbiene

MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Nicotina este un metabolit secundar, fiind un insecticid natural sintetizat de plante din familia *Solanaceae* ca mecanism de apărare împotriva insectelor. Datorită conținutului lor ridicat de nicotină, speciile de *Nicotiana* sunt culturi cu importanță economică în numeroase țări, compusul reprezentând 98% din alcaloizii totali ai plantei și 2-8% din masa sa uscată. În cantități mai reduse decât în planta de tabac, nicotina este prezentă și la alți membri ai familiei *Solanaceae* (cartofi, roșii, vinete, ardei iuți etc.) și chiar la varietățile de *Camellia sinensis* consumate la scară globală sub formă de ceaiuri.

Datorită toxicității sale și a acțiunii rapide în forma sa pură, nicotina a fost intens folosită în agricultură drept insecticid. Cu toate că este sintetizată de plante în mod natural, insecticidele pe bază de nicotină au fost interzise în SUA din 2001 de către Agenția pentru Protecția Mediului (*eng.* Environmental Protection Agency) pentru a preveni contaminarea produselor alimentare cu alcaloidul toxic. În ciuda acestor eforturi locale, la nivel mondial și într-un singur an (2014), industria tutunului a generat peste 32 de milioane de tone de tutun verde, din care au fost produse 6,5 milioane de tone de tutun uscat, 6 trilioane de țigări și, totodată, cantități semnificative de deșeuri care conțin nicotină. Aceste deșeuri sunt prezente sub forme multiple, variind de la materia vegetală uscată cu un conținut de nicotină de 0,83% (g/g) în tulpini și 1,5% - 2,22% (g/g) în frunze, la apele reziduale și materialele plastice contaminate cu nicotină. Atunci când conținutul de nicotină depășește 0,05% (g/g), Reglementările Uniunii Europene clasifică deșeurile de tutun drept „toxice și dăunătoare”.

Din cauza consumului de tutun și de alimente care conțin nicotină la nivel mondial, atât compusul organic propriu-zis cât și metaboliții săi activi sunt introduși continuu în mediul terestru și acvatic, prin căi și mecanisme numeroase și diverse, precum apele uzate municipale sau aruncarea necorespunzătoare a produselor cu nicotină și a deșeurilor industriale implicate în prelucrarea tutunului. Drept consecință, nicotina a devenit un poluant important din cauza activităților industriale umane, iar toxicitatea exercitată de compus și de derivații săi asupra mediului reprezintă o preocupare majoră în ultimele decenii, deșeurile necesitând tratamente adecvate pentru a fi eliminate în siguranță^{1,2}.

Mai mult, considerând povara economică substanțială necesară pentru deversarea în condiții de siguranță a deșeurilor de tutun, nu este surprinzător faptul că metodele de valorificare a acestor resurse de biomasă regenerabilă sunt discutate intens și în mod constant de la începutul secolului. Deoarece structura chimică a alcaloidului prezintă un inel piridinic și unul pirolidinic, nicotina reprezintă un substrat pentru sinteză sau biotransformare în

derivații săi funcționali și regenerabili, care variază de la substanțe de interes farmaceutic și agricol la precursori pentru sinteza unor astfel de compuși de interes economic.

Amintind că nicotina este un metabolit natural, nu este surprinzător faptul că microorganismele au dezvoltat seturi complete de gene care le permit degradarea nicotinei și utilizarea ei ca sursă de carbon și azot. Descoperirea în anii 1950 a bacteriilor și fungilor care pot degrada alcaloidul, în ciuda toxicității sale, a fost revoluționară, deoarece a sugerat că procesul catabolic mediat de agenți biologici ar putea reprezenta o strategie ecologică, economică și eficientă pentru tratamentul deșeurilor ce conțin nicotină. În prezent, microorganismele care degradează nicotina și aparatul lor enzimatic sunt de interes major pentru decontaminarea și reutilizarea deșeurilor de nicotină³.

Motivația științifică a studiului

Microorganismul care reprezintă obiectul acestui studiu este *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919, datorită capacității sale de a degrada și converti nicotina în compuși netoxici și utili. Având în vedere cunoștințele acumulate cu privire la mecanismele biochimice și genetice de reglare a metabolismului nicotinei la *P. nicotinovorans* ATCC 49919, această actinobacterie prezintă în primul rând importanță ca model de referință al unui microorganism care realizează catabolismul nicotinei utilizând calea piridinică. Degradarea nicotinei prin calea piridinică de la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 este cea mai bine studiată la momentul de față, fiind cunoscut că este codificată de către grupul de gene *nic* din secvența megaplasmidului pAO1⁴.

În al doilea rând, tulpina reprezintă un model pentru studiul evoluției moleculare a căilor catabolice și răspândirea lor prin transfer orizontal de gene (*eng.* horizontal gene transfer, HGT) prin intermediul plasmidelor bacteriene din sol. O analiză a relației dintre genotip și ecotip a demonstrat că pangenomul *Arthrobacter* este deosebit de deschis, fiind asociat cu un genom accesoriu volatil în comparație cu studiile anterioare ale pangenomului altor genuri. În privința reprezentatului *P. nicotinovorans* ATCC 49919, există dovezi puternice care susțin că grupul de gene *nic* a fost probabil dobândit de pAO1, sau de o plasmidă precursoră, din cromozomul unei bacterii posibil înrudită cu *Rhodococcus opacus* sau cu o specie de *Arthrobacter* încă necunoscută. În plus, pAO1 a fost implicat în HGT chiar de pe cromozomul tulpinii ATCC 49919 la alte specii din genul *Arthrobacter*⁵.

Motivația economică și ecologică a studiului

În al treilea rând, există un interes în creștere la nivel global pentru utilizarea agenților biologici reprezentați de bacteriile capabile de degradarea nicotinei (NDB) pentru

decontaminarea alcaloidului aflat în cantitățile importante de deșeuri generate anual de industria tutunului și eliminate necorespunzător. Așadar, datorită capacității sale de a cataboliza nicotina toxică, *P. nicotinovorans* ATCC 49919 este o tulpină de importanță ecologică și economică. Utilizarea sa în scopul decontaminării nicotinei și bioremedierii resurselor naturale ar adera cu ușurință la principiile chimiei verzi, biodegradabile, netoxice și prietenoase cu mediul^{3,4}.

În al patrulea rând, tulpina ATCC 49919 poate fi utilizată pentru conversia deșeurilor ce conțin nicotină într-o întreagă gamă de „substanțe chimice verzi”. Grupul actinobacteriilor, în care este cuprins și *P. nicotinovorans* ATCC 49919, este singur responsabil de producerea a 45% din metaboliții secundari documentați și a multor enzime litice cunoscute pentru funcțiile jucate în diverse procese fiziologice, celulare și biologice, inclusiv în transducția semnalelor care le permite interacțiunea cu mediul și adaptarea corespunzătoare⁶. Diverse specii de actinobacterii din genurile *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Nocardioide*s și *Corynebacterium* sunt utilizate drept fabrici celulare pentru sinteza de produse industriale utile. Prin urmare, nu este surprinzător că numeroși metaboliți intermediari ai căii de degradare a nicotinei de la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 au importanță industrială și farmaceutică.

De exemplu, în urma degradării nicotinei de către *P. nicotinovorans* ATCC 49919, în mediul de cultură se acumulează metilamina. În plus, la această specie sunt sintetizați și alți derivați nicotinici, precum acidul gama-aminobutiric (GABA), acidul α -cetoglutaric, acidul succinic etc. Metilamina este un compus intermediar major în industria chimică, folosită ca precursor pentru sinteza altor compuși organici. Metilamina este utilizată în industria farmaceutică pentru sinteza de teofilină și efedrină, fiind folosită și în obținerea de pesticide și solvenți, fiind estimat că în 2005 au fost produse aproximativ 115.000 de tone de metilamină prin metoda chimică. Acidul succinic a fost desemnat de către Departamentul pentru Energie a SUA drept unul din cei top 12 produși cu valoare adăugată din biomasă, reprezentând substanțe chimice de bază, cu multiple grupări funcționale care le conferă potențialul de a fi transformate în noi familii de molecule utile. În 2021, dimensiunea pieței globale a acidului succinic a fost evaluată la ~223 milioane USD.

Motivația medicală a studiului

Ceea ce deosebește *P. nicotinovorans* ATCC 49919 de alte microorganisme care au capacitatea de a utiliza nicotina ca sursă de carbon este potențialul tulpinii în industria farmaceutică, prin metaboliții secundari pe care îi sintetizează. Dintre aceștia, de relevanță

majoră sunt GABA, acidul α -cetoglutaric, 6-hidroxi-L-nicotina (6HLN) și chiar și metilamina discutată anterior.

Efectele 6HLN asupra deteriorării memoriei, anxietății și stresului oxidativ au fost testate într-un model animal al bolii Alzheimer indus de scopolamină la peștele zebură, *Danio rerio*. Testele comportamentale, determinarea biochimică a activității acetilcolinesterazei și ale enzimelor stresului oxidativ exprimate în creierul peștilor zebură, împreună cu analiza prin reacția de polimerizare în lanț cantitativă în timp real (RT-qPCR) a expresiei unor gene implicate în modularea proceselor de învățare și memorie au indicat că 6HLN a atenuat comportamentul anxios și deficitul de memorie, a redus stresul oxidativ și activitatea acetilcolinesterazei în creierul peștilor și a crescut expresia genelor marker testate⁷. Drept urmare, a fost postulat că 6HLN ar putea să compenseze epuizarea acetilcolinei și să restabilească funcțiile normale ale creierului, fiind o posibilă țintă pentru dezvoltarea medicamentelor utile în tratamentul tulburărilor asociate cu o reducere a nivelului de acetilcolină din creier, precum boala Alzheimer⁷.

Lacune în stadiul actual al cunoașterii relevante studiului

În urma celor expuse, putem constata că importanța tulpinii *P. nicotinovorans* ATCC 49919 este una multifactorială. Suplimentar valorii bacteriei pentru studiul căii de degradare a nicotinei prin calea piridinică, aceasta are potențialul de a deveni o fabrică celulară pentru compuși obținuți prin practicile chimiei verzi, care implică procese industriale mai durabile⁸, pornind de la resursele regenerabile reprezentate de cantitățile mari de nicotină produse anual și existente în apele și solurile deja contaminate. Produsele rezultate din catabolizarea nicotinei prin calea codificată de pAO1, dintre care au fost evidențiate metilamina, acidul α -cetoglutaric, acidul succinic, acidul γ -aminobutiric și 6-hidroxi-L-nicotina, au valoare economică intrinsecă, dar pot fi utilizate și în calitate de precursori pentru sinteza unei game largi de compuși cu aplicații în multiple arii ale industriei, între care cea farmaceutică, agricolă, alimentară și cosmetică.

În ciuda potențialului tulpinii *P. nicotinovorans* ATCC 49919 și a faptului că secvența megaplasmidului pAO1 este cunoscută⁹ din 2003, este surprinzătoare lipsa unui genom complet al unei tulpini de *P. nicotinovorans* în bazele de date de secvență. Din acest motiv, eforturile de valorificare a potențialului în ecologie și biotehnologie al oricăror tulpini de *Paenarthrobacter* sunt grav îngreunate sau chiar totalmente împiedicate de lipsa instrumentelor genetice adecvate pentru modificarea cu precizie a ratei de metabolizare a

oricăru substrat în vederea îmbunătățirii sintezei diversilor intermediari metabolici de interes.

Absența unui genom complet și adnotat funcțional este însoțită de volumul redus de date referitoare la mecanismele genetice de reglare ale căilor metabolice codificate atât de cromozomul bacterian în sine, dar și de plasmidele corespunzătoare, după caz. În plus, în cazul existenței plasmidelor, ceea ce este de relevanță pentru ATCC 49919, sunt esențiale cunoștințe exhaustive privind mecanismele prin care căile metabolice codificate de ADN-ul extracromozomial interacționează și se integrează cu cele codificate de cromozomul bacterian. Dobândirea acestor informații necesită, pe lângă explorarea implicită a genomului, și evaluarea modificărilor în funcție de condițiile de mediu, ce pot fi analizate doar la nivelul transcriptomului și proteomului. Lipsa secvenței complete a genomului bacterian este însoțită și de absența informațiilor cheie privind origini ale replicării, promotori, structura operonilor, situsurile de inițiere și terminare a transcrierii și sistemele CRISPR existente la genul *Paenarthrobacter*, ceea ce împiedică dezvoltarea instrumentelor de inginerie genetică. Mai mult decât atât, nici plasmidele genului *Paenarthrobacter* nu sunt îndeustul studiate, existând doar două publicații^{5,10} care s-au axat pe genomica comparativă și biologia moleculară a acestora.

Eliminarea obstacolului reprezentat de genomul incomplet al oricărei tulpini din genul *P. nicotinovorans* este un pas important înspre exploatarea acestor microorganisme. Cu toate acestea, secvențierea și asamblarea genomului bacteriei *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în mod specific este de și mai mare relevanță științifică și actualitate, fiind un pas important în completarea eforturilor deja depuse în caracterizarea căii de degradare a nicotinei prin intermediul piridinei. Abordarea „clasică” de clonare, purificare și caracterizare utilizată până în 2019 pentru studierea metabolismului nicotinei la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 nu a reușit să furnizeze date experimentale solide despre funcția a numeroase gene ce alcătuiesc calea piridinei codificată de pAO1¹¹.

Pentru a adresa această problemă, Mihașan et al. au utilizat o abordare proteomică folosind cromatografie nanolichidă cu detecție prin spectrometrie de masă în tandem (nanoLC-MS/MS) pentru a identifica toate proteinele exprimate de *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în trei medii de cultură diferite^{11–13}. Cu toate că această abordare a furnizat informații importante în privința exprimării genelor care codifică catabolismul nicotinei la pAO1, încă există numeroase întrebări referitoare la funcționalitatea acestor secvențe, care nu au fost adresate în totalitate nici în urma experimentelor de proteomică^{11–13}. Mai precis, pentru jumătate din genele megaplasmidului pAO1 presupuse a fi implicate în catabolismul

nicotinei ori nu li se cunoaște funcția, ori nu există dovezi experimentale ale implicării în metabolismul nicotinei. Chiar mai mult, există și posibilitatea ca minim unele dintre aceste gene să fie reziduuri ale proceselor evolutive care au contribuit la asamblarea clusterului *nic*¹³.

Scopul studiului

Dezvoltarea recentă a tehnologiilor omice bazate pe „genă la metaboliți” și „metaboliți la genă” a avut un impact major în dezvăluirea prevalenței clusterelor de gene silențioase din genomul microorganismelor. Mai mult, descoperirea instrumentelor de editare precisă a genomului și utilizarea operonilor artificiali pentru ingineria căilor metabolice au devenit jucători cheie în activarea grupurilor de gene silențioase în vederea obținerii de noi metaboliți la scară largă, care anterior s-ar fi dovedit a fi slab exprimați și dificil de caracterizat în condiții de laborator. În comparație cu modul tradițional de extracție a metaboliților, accesul la diversitatea grupurilor de gene biosintetice distincte și anterior necaracterizate, împreună cu utilizarea instrumentelor moderne de editare a genelor pentru modularea exprimării operonilor, ar contribui la descoperirea de noi compuși și la diversificarea acestora. Considerând că din 23.000 metaboliți bioactivi sintetizați de microorganisme, aproximativ 10.000 au fost identificați la actinobacterii, este absolut covârșitor potențialul explorării acestui grup de microorganisme pentru îmbunătățirea calității vieții umane și nu numai.

Prin urmare, pentru a avansa în elucidarea aspectelor necunoscute ale degradării nicotinei prin calea piridinei de la *P. nicotinovorans* ATCC 49919, s-a ales implementarea unei abordări multiomice¹⁴, bazată pe dezvoltările recente ale tehnologiilor din domeniu. În acest studiu au fost urmărite asamblarea completă și analiza genomului tulpinii de interes, secvențierea și analiza transcriptomului în urma tratamentului cu nicotină, reanaliza datelor proteomice deja existente folosind noul genom disponibil și, în final, integrarea și analiza datelor omice referitoare la degradarea nicotinei la *P. nicotinovorans* ATCC 49919.

Astfel, a fost asamblat și analizat primul genom complet al unei tulpini de *P. nicotinovorans* și primul transcriptom al unui microorganism care realizează catabolismul nicotinei folosind calea piridinică. Aceste realizări au permis efectuarea primului studiu multiomic asupra catabolismului bacterian (și chiar microbial) al nicotinei, care integrează date genomice, transcriptomice și proteomice. Analiza multiomică asupra degradării nicotinei la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 ar permite aprofundarea cunoștințelor asupra biologiei moleculare și biochimiei degradării nicotinei prin calea piridinică, reprezentând

fundamentele pentru dezvoltarea unui viitor model catabolic la specia de referință. Pornind de la acest model și cu ajutorul ingineriei genetice, *P. nicotinovorans* ATCC 49919 are potențialul de a deveni un agent biologic important în decontaminarea resurselor poluate cu nicotină și o adevărată unitate de producție a substanțelor chimice prin procedee care aderă la principiile chimiei verzi și durabile.

Obiectivele principale ale studiului

Considerând că scopul acestui studiu este integrarea datelor genomice cu cele transcriptomice și proteomice asupra catabolismului nicotinei la *P. nicotinovorans* ATCC 49919, obiectivele principale stabilite corespund numărului de analize omice efectuate. În continuare, sunt prezentate obiectivele principale ale studiului și activitățile asociate fiecăruia.

O.1. Obținerea și analiza genomului *P. nicotinovorans* ATCC 49919 complet asamblat și adnotat structural și funcțional.

- O.1.1.** Validarea și implementarea metodologiei pentru extracția și purificarea ADN-ului genomic (ADNg) de greutate moleculară mare pentru secvențierea cu citire lungă.
- O.1.2.** Pregătirea bibliotecilor și secvențierea cu citire lungă a ADN-ului genomic.
- O.1.3.** Procesarea primară a datelor de secvențiere cu citire scurtă a ADN-ului genomic.
- O.1.4.** Procesarea primară a datelor de secvențiere cu citire lungă a ADN-ului genomic.
- O.1.5.** Asamblarea hibridă a genomului *P. nicotinovorans* ATCC 49919.
- O.1.6.** Validarea și adnotarea asamblării genomului *P. nicotinovorans* ATCC 49919.
- O.1.7.** Analiza funcțională a genomului *P. nicotinovorans* ATCC 49919.
- O.1.8.** Diseminarea rezultatelor obținute în urma îndeplinirii acestui obiectiv.

O.2. Obținerea transcriptomului *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în prezența nicotinei și analiza expresiei genice diferențiale în momentele cheie ale catabolismului alcaloidului.

- O.2.1.** Stabilirea momentelor cheie în catabolismul nicotinei la tulpina de interes.
- O.2.2.** Stabilirea metodologiei și extracția ARN-ului total pentru secvențierea cu citire lungă.
- O.2.3.** Pregătirea bibliotecilor și secvențierea directă a ARN-ului.
- O.2.4.** Procesarea primară a datelor de secvențiere directă a ARN-ului.
- O.2.5.** Procesarea citirilor ARN în vederea analizei statistice a expresiei diferențiale a genelor în urma tratamentului cu nicotină la *P. nicotinovorans* ATCC 49919.
- O.2.6.** Interpretarea rezultatelor analizei expresiei diferențiale a genelor (DGE) de la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în urma tratamentului cu nicotină.

O.2.7. Diseminarea rezultatelor obținute în urma îndeplinirii acestui obiectiv.

O.3. Analiza multiomică integrată a *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în urma tratamentului cu nicotină.

O.3.1. Reinterpretarea proteomului *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în prezența nicotinei folosind rezultatul îndeplinirii **O.1.**, anume genomul complet asamblat al tulpinii.

O.3.2. Analiza statistică a expresiei diferențiale a proteinelor (DPE) de la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în urma tratamentului cu nicotină în cele trei momente cheie ale catabolismului alcaloidului.

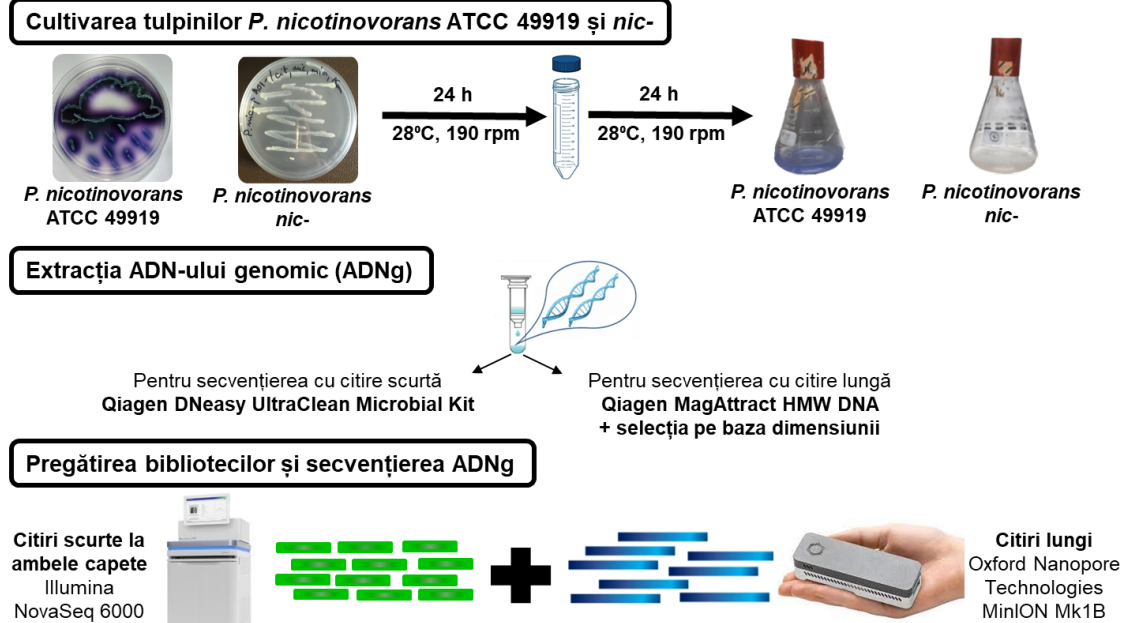
O.3.3. Integrarea datelor transcriptomice (rezultatul îndeplinirii **O.2.**) cu cele proteomice reinterpretate (rezultatul îndeplinirii **O.3.1.**) și analiza genelor și produselor lor implicate în răspunsul *P. nicotinovorans* ATCC 49919 la tratamentul cu nicotină.

O.3.4. Diseminarea rezultatelor obținute în urma îndeplinirii acestui obiectiv.

CAPITOLUL 3 - METODE DE CERCETARE

În Figura 3.1. sunt prezentate succint activitățile O.1.1. – O.1.7., urmărite pentru îndeplinirea primului obiectiv al studiului, anume asamblarea, adnotarea și analiza genomului complet al tulpinii *P. nicotinovorans* ATCC 49919.

A. Metode *in vitro*



B. Metode *in silico*

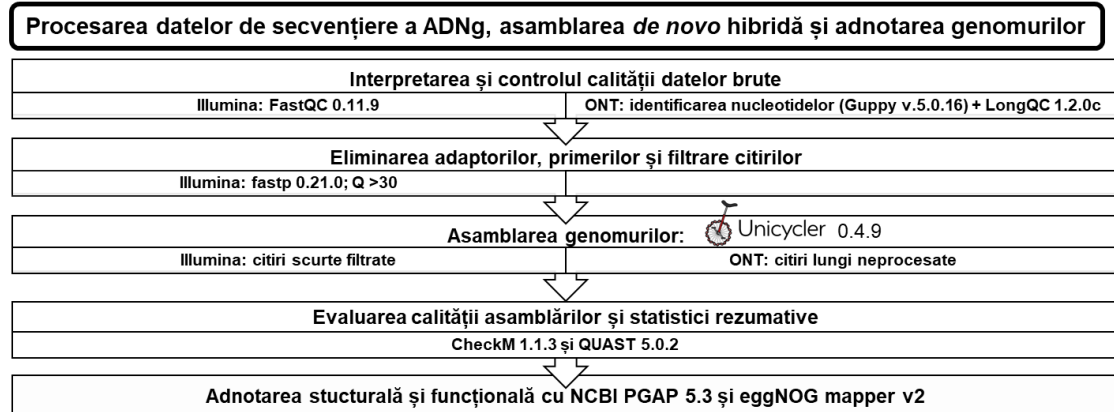
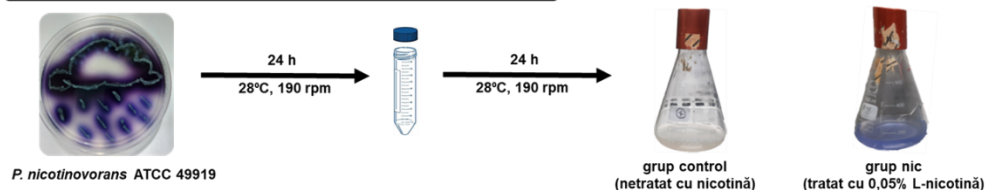


Figura 3.1. Reprezentare schematică a activităților O.1.1. – O.1.7. asociate primului obiectiv al studiului, anume asamblarea, adnotarea, validarea și analiza funcțională a genomului complet al *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919.

În Figura 3.2. – A. sunt prezentate etapele principale realizate în vederea secvențierii propriu-zise a transcriptomului bacterian, asociate activităților O.2.1. – O.2.3. ale studiului. În Figura 3.2. – B. este prezentată succint procesarea datelor transcriptomice în vederea analizei expresiei diferențiale a genelor în momentele cheie ale catabolismului nicotinei, corespunzătoare activităților O.2.4. – O.2.6.

A. Metode *in vitro*

Cultivarea *P. nicotinovorans* ATCC 49919 și tratamentul cu nicotină

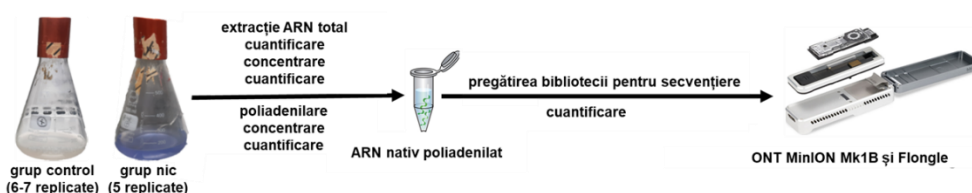


Determinarea momentelor cheie ale catabolismului nicotinei

1. Determinarea densității optice a culturilor bacteriene la 600 nm
2. Dozarea spectrofotometrică a concentrației de albastru de nicotină la 585 nm
3. Cuantificarea dinamicii concentrației de nicotină și albastru de nicotină în mediul de cultură prin cromatografie lichidă de ultra performanță

Prelevarea, păstrarea și prevenția contaminării probelor

Extracția ARN-ului total, pregătirea bibliotecilor și secvențiere



B. Metode *in silico*

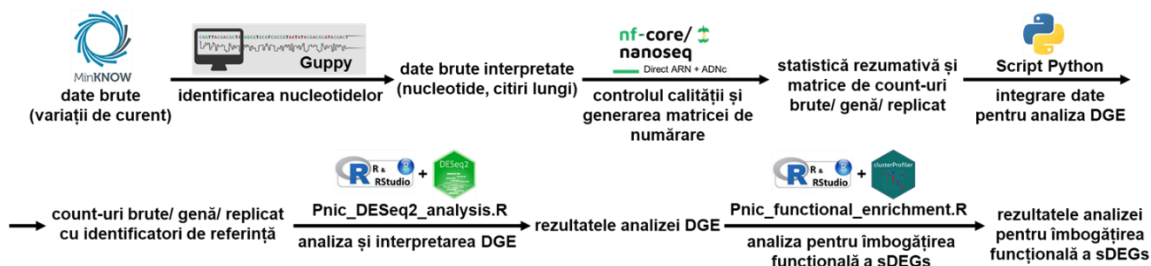


Figura 3.2. Reprezentare schematică a principalelor etape parcurse în vederea analizei expresiei diferențiale a genelor (DGE) în timpul degradării nicotinei de către *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919, asociate A. activităților O.2.1. – O.2.3.

și metodelor *in vitro*, respectiv B. activităților O.2.4. – O.2.6. și metodelor *in silico*;

OD_{600nm}: densitatea optică a unei probe măsurată la o lungime de undă de 600 nm; sDEGs: gene exprimate diferențial cu semnificație statistică.

În vederea realizării activității **O.3.1.**, setul de date proteomice disponibil în ProteomeXchange cu ID-ul PXD012577 a fost reanalizat folosind ca referință adnotarea genomului *P. nicotinovorans* ATCC 49919. Programul Scaffold cu opțiunea de analiză MudPIT a fost utilizat pentru validarea identificărilor bazate pe nanoLC-MS/MS a peptidelor și proteinelor. Activitatea **O.3.2.**, anume testarea expresiei diferențiale a proteinelor în cele trei momente cheie ale degradării nicotinei de către *P. nicotinovorans* ATCC 49919 a fost realizată cu testul Fisher.

Tabelele cu rezultatele fiecărei comparații efectuate au fost prelucrate în continuare cu scriptul `Pnic_proteome_FC_rescale.R`¹⁵, pentru transformarea valorilor schimbării nivelului de expresie (*eng.* fold change, FC) în log₂ (LFC) și re-scalarea acestora față de valorile minime și maxime ale LFC obținute din datele de transcriptomică. Aceste modificări au fost necesare pentru a permite vizualizarea integrată a datelor provenite din analiza transcriptomică și proteomică.

Pentru realizarea activității **O.3.3.**, au fost identificate căile metabolice îmbogățite în timpul catabolismului nicotinei prin implementarea funcției `enrichKEGG` din pachetul `clusterProfiler`, cu pragul statistic $p = 0,1$ și metoda Benjamini-Hochberg (BH) pentru corectarea testării ipotezelor multiple. Pentru a vizualiza cele mai îmbogățite căi biochimice disponibile în KEGG PATHWAY s-a utilizat pachetul `pathview` 1.42.0, disponibil prin Bioconductor.

CAPITOLUL 4 - REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.1 Asamblarea, adnotarea și analiza genomului *Paenarthrobacter nicotinovorans*

Figura 4.1. prezintă hărțile circulare ale repliconilor identificați în cele două genomuri secvențiate și asamblate în acest studiu, anume *P. nicotinovorans* ATCC 49919 și tulpina derivată *nic*-, lipsită de megaplasmidul pAO1. În genomul *P. nicotinovorans* ATCC 49919 au fost identificați doi repliconi (Figura 4.1. – A). Cel mai lung replicon al tulpinii ATCC 49919, de 4.316.184 pb și cu un conținut mediu de guanină și citozină (GC) de 63,2%, a fost atribuit cromozomului bacterian. Pe cromozom au fost identificate în total 4173 gene și 4098 de secvențe codificatoare (CDS) pentru 4068 proteine și 30 pseudogene. Genomul prezintă 54 CDS pentru ARN de transfer, trei CDS pentru ARN necodificator și șase operoni ribozomali identici și compleți, fiecare conținând cele trei gene 5S, 16S și 23S ale subunităților ARNr la procariote. În două instanțe, doi operoni ribozomali sunt situați în strânsă proximitate, fiind separați de trei secvențe ce nu codifică ARNr (evidențiat cu mov în Figura 4.1. – A.). Al doilea replicon, de 165.141 pb și cu un conținut mediu de GC de 59,7%, reprezintă un plasmid cu 145 CDS. Analiza BLAST a ADN-ului extracromozomial prezent la tulpina ATCC 49919 a indicat 99,9% identitate cu secvența megaplasmidului pAO1 descrisă anterior de Igloi și Brandsch (înregistrarea GenBank AJ507836.1), despre care se cunoștea⁹ că ar fi prezentă la tulpina ATCC 49919.

Au fost realizate multiple validări ale calității genomurilor asamblate pentru a contribui cu date de încredere în comunitate, în vederea facilitării explorării potențialului tulpinii de interes ATCC 49919, a speciei *P. nicotinovorans* și a genului *Paenarthrobacter*. Pentru a asigura accesul la datele genomice rezultate, conform principiilor FAIR în științele omice (detaliate în subcapitolele 2.3.1 și 2.3.3.2 ale tezei), genomurile complete au fost depuse și sunt accesibile în baza de date de referință internațională NCBI GenBank. În februarie 2022, NCBI GenBank a selectat genomul *P. nicotinovorans* ATCC 49919 asamblat aici drept secvență de referință pentru specia *P. nicotinovorans*, ca o recunoaștere suplimentară a calității sale. Mai multe informații despre relevanța genomurilor incluse în NCBI RefSeq au fost descrise în subcapitolul 2.3.3.2 al tezei, referitor la principalele baze de date utilizate în stocarea datelor omice.

În prezent, în NCBI Genome sunt înregistrate 21 genomuri *P. nicotinovorans*, 13 fiind depuse între februarie 2022 și martie 2025. Chiar și la ora actuală, din totalul de 21 de genomuri încadrate drept *P. nicotinovorans*, numai trei asamblări sunt în stadiul complet, două din cele trei fiind, în continuare, chiar cele asamblate în cadrul acestui studiu pentru

ATCC 49919 și *nic*-. Cu atât mai mult, rezultatul primului obiectiv al studiului curent, anume genomul complet, circular și adnotat structural și funcțional al *P. nicotinovorans* ATCC 49919, și-a păstrat statutul de secvență de referință pentru specia *Paenarthrobacter nicotinovorans* încă din februarie 2022, fapt care evidențiază calitatea și impactul acestuia.

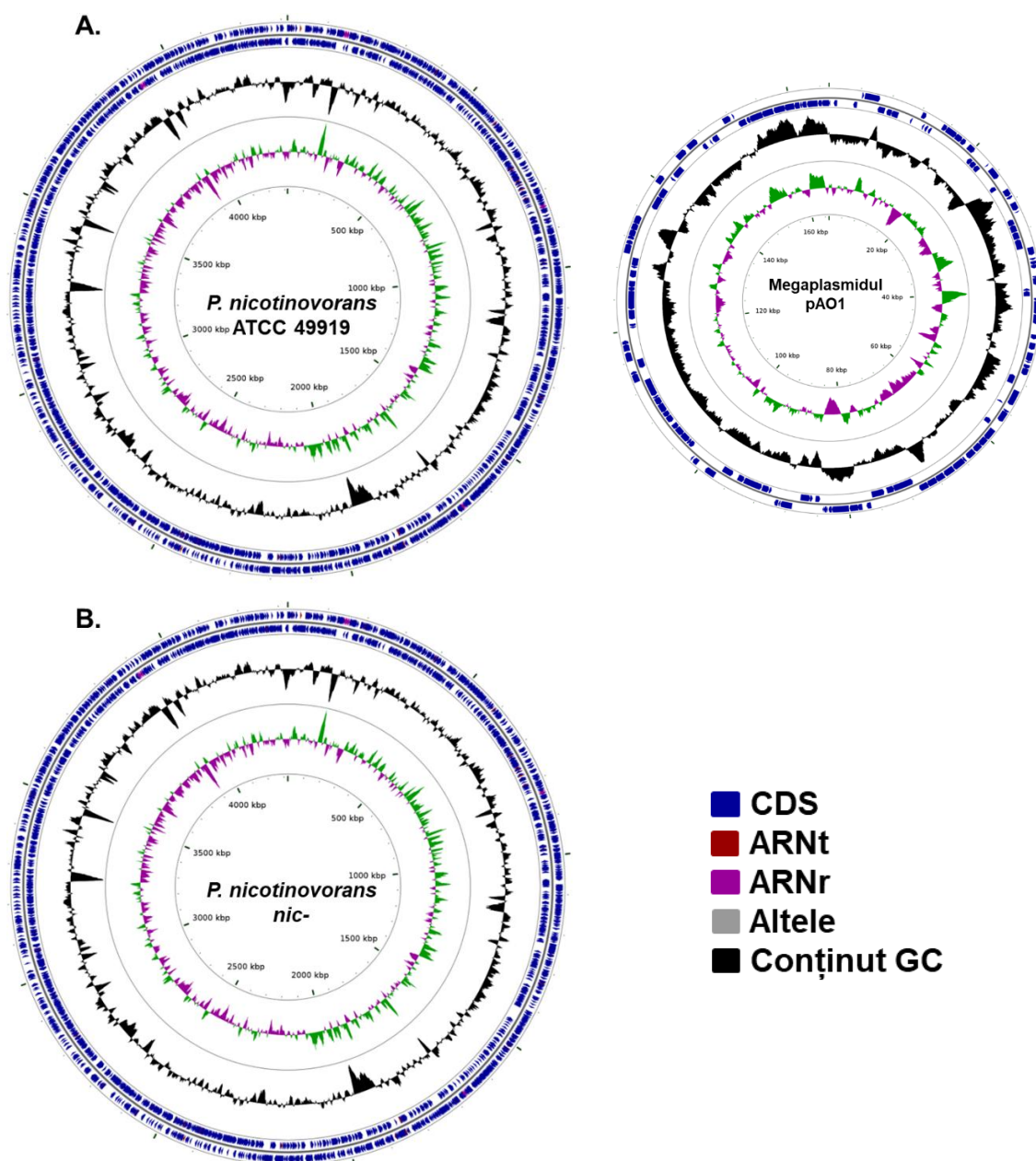


Figura 4.1. Hărți circulare ale genomurilor *P. nicotinovorans* asamblate.

A. Repliconii identificați la tulpina *P. nicotinovorans* ATCC 49919; stânga: cromozomul bacterian, dreapta: megaplasmidul pAO1. **B.** Repliconul identificat la *P. nicotinovorans nic*-, reprezentând cromozomul bacterian. Figurile au fost generate cu CGView, conform subcapitolului 3.2.2.6 al tezei; kbp: kilo perechi de nucleotide; CDS: secvențe codificatoare; GC: guanină și citozină.

4.2 Analiza transcriptomică a degradării nicotinei la *Paenarthrobacter nicotinovorans*

4.2.1 Momentele cheie ale catabolismul nicotinei

În Figura 4.2. se observă corelarea fazelor principale ale dezvoltării celulelor de *P. nicotinovorans* ATCC 49919 cu momentele cheie ale catabolismului nicotinei pentru probele utilizate în analiza transcriptomică. Momentele cheie pentru prelevarea celulelor bacteriene au fost stabilite la aproximativ 5, 10 și 24 ore de la inoculare (HAI).

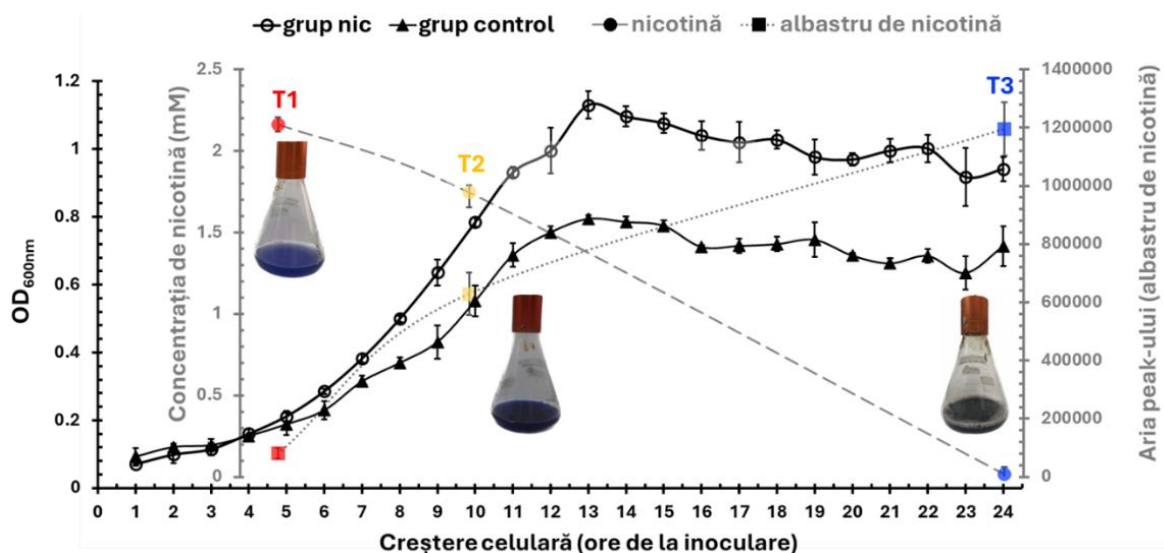


Figura 4.2. Dinamica concentrației de nicotină și a albastrului de nicotină din mediul de cultură în cele trei momente cheie ale catabolismului alcaloidului la *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919¹⁵.

Roșu: probe prelevate la ~5 ore de la inoculare (HAI), corespunzând debutului fazei de creștere exponențială; galben: probe prelevate la ~10 HAI, corespunzând tranziției de la faza de creștere exponențială la faza staționară; albastru: probe prelevate la ~24 HAI, corespunzând fazei staționare. Barele de eroare reprezintă deviația standard calculată pentru minim trei determinări per replicat biologic¹⁵.

La *P. nicotinovorans* ATCC 49919, faza de lag durează aproximativ 5 HAI și corespunde unei densități optice la lungimea de undă de 600 nm (OD_{600nm}) egală cu 0,25. În acest moment, denumit în continuare T1, are loc debutul fazei de creștere logaritmică sau exponențială (log), observabilă odată cu începerea acumulării în mediul de cultură a albastrului de nicotină, produsul final al degradării nicotinei la bacteria studiată (Figura 4.2.).

La ~10 HAI ($OD_{600nm} = 0,6$), moment denumit în continuare T2, este surprinsă tranziția dintre faza logaritmică și cea staționară, în care cantitatea de nicotină din mediul de cultură începe să scadă (Figura 4.2.). În T2, culturile de *P. nicotinovorans* ATCC 49919

ating densitatea celulară maximă, catabolismul nicotinei este intens și continuă acumularea de metaboliți intermediari în mediul de cultură.

La 24 HAI, moment denumit în continuare T3, celulele se află în faza staționară. Aceasta debutează la ~18 HAI, fiind caracterizată de un număr constant de celule bacteriene, de consumul complet al nicotinei din mediul de cultură și de finalizarea catabolismului nicotinei, după cum se observă în Figura 4.2. La 24 HAI, depinzând de suplimentarea mediului citrat cu nicotină, OD_{600nm} variază de la 0,7 la 1, creșterea celulară fiind mai intensă când este disponibilă și nicotina ca sursă de carbon pe lângă citrat (Figura 4.2.).

4.2.2 Analiza expresiei diferențiale a genelor în timpul degradării nicotinei

După cum se poate observa în Figura 4.3. – A., în urma tratamentului cu nicotină în T1, T2 și T3 au fost identificate 29, 35, respectiv 17 gene exprimate diferențial în mod statistic semnificativ (sDEGs; $p\text{-adj} < 0,1$ și $|LFC| > 1$). În Figura 4.3. – B. este prezentată suprapunerea dintre sDEGs identificate în fiecare din cele trei comparații efectuate. 25 dintre sDEGs identificate în T1 au fost identificate și în T2, toate aceste gene aparținând clusterului *nic* codificat de megaplasmidul pAO1¹⁵.

Singurele patru sDEGs unice în T1 sunt codificate de cromozomul *P. nicotinovorans* ATCC 49919, pe când cele zece gene exprimate diferențial doar în T2 sunt șase gene *nic* și patru gene cromozomiale. Toate sDEGs au fost supra-exprimate atât în T1, cât și în T2 în urma tratamentului cu nicotină, cu singura excepție reprezentată de *JMY29_20035*. Aceasta este o genă cromozomială care codifică o permează din familia transportorilor ABC (detaliați în subcapitolul 4.1.5.1 al tezei) și este singura sub-exprimată în faza logaritmică ca urmare a suplimentării mediului citrat cu nicotină (nic_T1 vs control_T1: $LFC < -4,4$, $p\text{-adj} < 0,1$)¹⁵.

În ceea ce privește T3, toate sDEGs în celulele tratate cu nicotină au fost specifice acestui moment (Figura 4.3. – B.) și sunt codificate de cromozomul bacterian. Trei sDEGs au fost supra-exprimate, în timp ce restul de 14 gene au fost sub-exprimate. Aceste rezultate se aliniază cu așteptările sugerate de analiza grupării probelor (prezentată în subcapitolul 4.2.2.3 al tezei). Deoarece probele T1 și T2 reprezintă celule prelevate la debutul și, respectiv, spre finalul fazei logaritmice, acestea au în comun majoritatea sDEGs induse de nicotină. Pe de altă parte, probele T3 sunt distincte, reprezentând faza staționară târzie, când nicotina este epuizată, prin urmare nu au sDEGs comune cu cele identificate la celulele în T1 sau T2¹⁵.

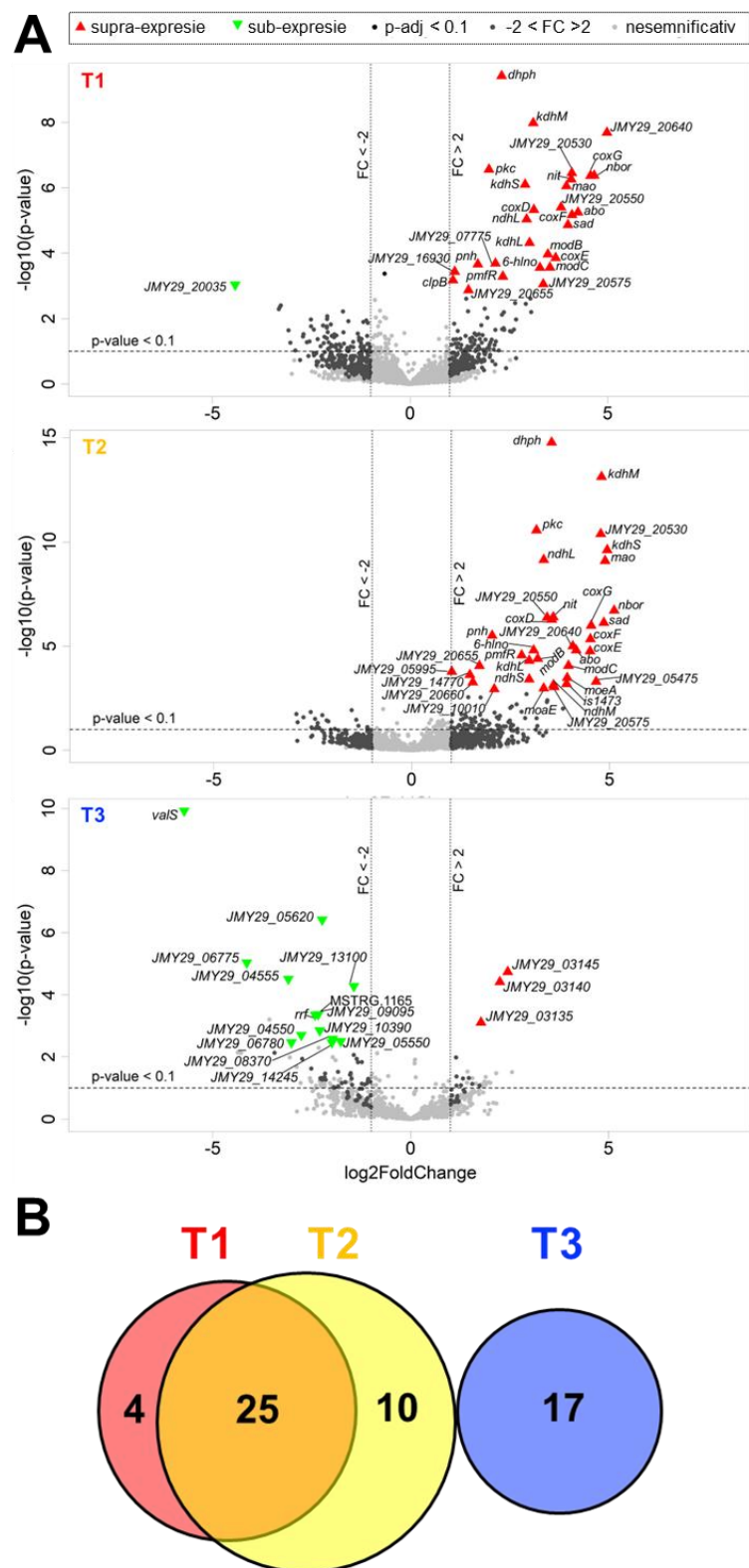


Figura 4.3. Expresia diferențială a genelor indusă de tratamentul cu nicotină¹⁵.

A. Grafic vulcan al rezultatelor analizei expresiei diferențiale a genelor între probele tratate cu nicotină versus control în momentele T1, T2, respectiv T3; FC = schimbarea nivelului de expresie; **B.** Diagrama Venn a intersecției genelor exprimate diferențial în mod statistic semnificativ în fiecare dintre cele trei momente cheie ale degradării nicotinei¹⁵.

Analiza dependentă de momentul cheie al catabolismului nicotinei nu a indicat diferențe semnificative ($p\text{-adj} < 0,1$) între genele exprimate spre finalul față de debutul fazei logaritmice (nic_T2 vs nic_T1). Cu toate acestea, comparând celulele din faza staționară cu cele din faza logaritmică târzie (T3 vs T2), a fost detectat un număr mai mare de sDEGs decât față de debutul fazei logaritmice (T3 vs T1). Cu $p\text{-adj} < 0,1$ și $|LFC| > 1$, s-au identificat 1171 sDEGs pentru nic_T3 vs nic_T1, respectiv 1249 sDEGs pentru nic_T3 vs nic_T2. În comparația față de faza staționară (T3), un total de 1035 sDEGs au fost identificate în ambele etape analizate ale fazei logaritmice (T1 și T2). Însă, 136 sDEGs au fost specifice în T1, iar 214 sDEGs în T2. Toate sDEGs în T3 codificate de pAO1 au fost sub-exprimate, confirmând că degradarea nicotinei a încetat în faza staționară din cauza epuizării complete a compusului din mediul de cultură, după cum era așteptat din analiza cromatografică (Figura 4.2.)¹⁵.

4.3 Analiza multiomică a degradării nicotinei la *Paenarthrobacter nicotinovorans*

4.3.1 Gene plasmidiale exprimate diferențial în timpul degradării nicotinei

Analiza DGE a indicat că 25 din cele 40 de gene *nic* adnotate (Figura 4.4., Figura 4.5.) au fost supra-exprimate în faza logaritmică în prezența nicotinei (Figura 4.3. – A.). Dintre aceste 25 de gene *nic*, produsele a 14 (*nbor*, *mao*, *sad*, *coxD*, *nit*, *coxG*, *dhph*, *pkc*, *pnh*, *kdhL*, *kdhM*, *6-hlno*, *ndhL*, *modC*) au fost detectate anterior prin nanoLC-MS/MS în mediul de cultură suplimentat cu nicotină^{13,15}. Chiar mai mult, enzimele codificate de *nbor*, *mao*, *sad*, *nit*, *dhph*, *pnh*, *kdhL*, *kdhM*, *6-hlno* și *ndhL* au funcțiile în catabolismul nicotinei la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 cunoscute și dovedite experimental^{15–17}.

Pe de altă parte, până în prezent, *coxD*, *coxG*, *pkc* și *modC* au fost implicate doar putativ în degradarea nicotinei, singurele dovezi experimentale pre-existente acestui studiu multiomic fiind produsele acestora detectate prin nanoLC-MS/MS în mediul de cultură suplimentat cu nicotină¹³. Noile date de secvențiere directă a ARN-ului confirmă că expresia *coxD*, *coxG*, *pkc* și *modC* este direct indusă de nicotină, deoarece aceste gene sunt puternic sub-exprimate în faza staționară ($LFC < -4$, $p\text{-adj} < 0,05$), când nicotina nu mai este detectată în mediul de cultură (Figura 4.2.)¹⁵.

Celelalte 11 gene *nic* sugerate din analiza transcriptomică ca fiind supra-exprimate în faza logaritmică în prezența nicotinei (Figura 4.3. – A.) sunt *JMY29_20530* (proteină ipotetică care conține un domeniu în formă de cupă, *eng.* cupin), *JMY29_20550* (proteină ipotetică din familia fumaril-acetoacetat-hidrolazelor), *abo*, *JMY29_20575/pern* (permează putativă din familia APC, abreviere pentru aminoacid-poliamină-cation organic), *pmfR*, *coxF*, *coxE*, *JMY29_20640* (proteină ipotetică din familia Dabb, care conține proteine ce

prezintă un domeniu α/β în formă de butoi), *JMY29_20655* (proteină ipotetică care conține un domeniu în formă de cupă), *kdhS* și *modB*. Proteinele corespunzătoare codificate de aceste 11 gene *nic* nu au putut fi identificate în datele proteomice, cel mai probabil din cauza abundenței lor scăzute, a modului de prelucrare a probelor sau a altor factori necunoscuți¹⁵.

Pentru restul genelor *nic* adnotate inițial⁹ nu a fost detectată expresie diferențială care să sugereze implicarea în catabolismul nicotinei în mod statistic semnificativ ($p\text{-adj} < 0,1$ și $|LFC| > 1$). Majoritatea genelor care au fost corelate experimental cu metabolismul nicotinei înaintea studiului curent au fost adnotate corect în secvența publicată⁹ în 2003. Însă, analiza secvențelor pAO1 a evidențiat și diferențe în lungimea genelor adnotate, acestea fiind cauzate de modificări ale poziției codonilor start sau stop. Suplimentar, există diferențe și între adnotarea structurală computațională cu NCBI PGAP și coordonatele start și stop indicate de analiza citirilor directe ale transcriptelor exprimate de *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în condițiile experimentale testate. Astfel, în Anexa 6 a tezei se regăsesc marcate toate genele *nic* pentru care a existat minim o citire în minim o bibliotecă ARN secvențiată aici. În plus, sunt incluse și neconcordanțele în adnotarea clusterului *nic* observate între datele obținute de Igloi și Brandsch⁹ și cele generate atât prin secvențierea hibridă a ADN-ului, cât și prin secvențierea directă a ARN-ului.

Pentru opt dintre genele *nic* ipotetice sau putative detectate în secvența inițială⁹ a pAO1, analiza citirilor noi de ADNg sau ARN nu au adus dovezi suplimentare că oricare dintre respectivele gene ar fi exprimate sau cel puțin codificate de secvența plasmidului asamblată aici prin abordarea hibridă. Această observație este fondată de lipsa adnotării structurale și funcționale a acestor gene, realizată computațional cu NCBI PGAP 5.3. Prin urmare, au fost observate diferențe distincte între adnotări (Anexa 6 a tezei) și în cazul proteinelor ipotetice și putative, situație care se datorează îmbunătățirii din ultimele decenii a algoritmilor de detectare a genelor¹⁸.

Mai mult decât atât, nici datele experimentale de secvențiere directă a ARN-ului și analiza bioinformatică a acestora (aliniera față de genomul complet cu Minimap2, reconstrucția și cuantificarea transcriptelor cu StringTie2 și featureCounts), nu au indicat existența sau expresia celor opt gene putative sau ipotetice, marcate în Anexa 6 a tezei cu „nedetectat de PGAP sau prin secvențiere”. Neconcordanțele dintre aceste coordonate ar fi putut complica și afecta în mod negativ succesul unor aplicații ce necesită ingineria genetică a megaplasmidului pAO1 și a tulpinii ATCC 49919.

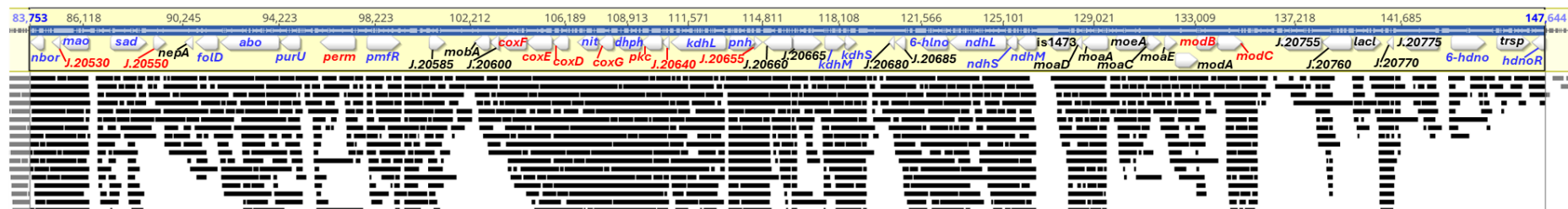


Figura 4.4. Organizarea genetică a clusterului de gene *nic* (sus) și citirile ARN reprezentative (jos) aliniate folosind Geneious Prime 2024.0.7 RNA cu setarea medium sensitivity.

Text albastru: gene cu funcții cunoscute în degradarea nicotinei și pentru care s-a demonstrat anterior că au expresia corelată cu nicotina; text roșu: gene pentru care s-a demonstrat pentru prima dată în acest studiu că au expresia corelată cu nicotina; text negru: gene putative ale clusterului *nic*.

4.3.2 Integrarea căii de degradare a nicotinei în metabolismul general al celulei

Pe baza analizei inițiale a proteomului a fost sugerat că α -ceto-glutaratul, unul dintre principalii produși finali ai degradării nicotinei la tulpina studiată, este integrat în căile metabolice generale ale celulei prin intermediul unui ciclu modificat al acizilor tricarboxilici (TCA)¹³. Astfel, s-a postulat că atunci când actinobacteria dispune de nicotină ca sursă de carbon, importul suplimentar de citrat nu este de necesitate majoră pentru creșterea și metabolismul celular¹³. Această ipoteză este sugerată și susținută și de rezultatele analizei transcriptomului *P. nicotinovorans* ATCC 49919, fiind indicată atât de expresia genelor cromozomiale, cât și de cea a genelor codificate de pAO1¹⁵ (Figura 4.6.).

În primul rând, dintre genele *nic* s-a remarcat *JMY29_20550*, care codifică o proteină ipotetică din familia fumaril-acetoacetat-hidrolazelor (InterPro Pfam ID: PF01557). În *E. coli* W, o enzimă din aceeași familie catalizează o decarboxilare urmată de o reacție de izomerizare implicată în metabolismul compusului aromatic acid 4-hidroxifenilacetic. Nivelurile ARNm pentru *JMY29_20550* au fost de peste nouă ori mai ridicate ($LFC > 3,4$, $p\text{-adj} < 0,001$) atunci când nicotina a fost prezentă în mediul de cultură (Figura 4.3. – A.) și au fost semnificativ mai scăzute ($LFC < -6,4$, $p\text{-adj} < 0,001$) după consumul nicotinei, după cum s-a observat comparând celulele tratate aflate în faza staționară față de cele în faza logaritmică. O scădere de peste patru ori a expresiei *JMY29_20550* ($LFC < -2$, $p\text{-adj} < 0,05$) a fost observată în comparația probelelor netratate în T3 față de T2. Având în vedere aceste observații și creșterea mai intensă a celulelor *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în prezența nicotinei ca sursă suplimentară de carbon pe lângă citrat (Figura 4.2.), este foarte probabil ca enzima codificată de *JMY29_20550* să îndeplinească roluri similare omologului său de la *E. coli*, transformând direct α -ceto-glutaratul în acid succinic și formic, conectând astfel metabolismul nicotinei la ciclul TCA modificat raportat anterior^{13,15}.

Suplimentar, gena cromozomială *JMY29_06775* este puternic sub-exprimată în faza staționară atât de grupul control, cât și de cel tratat cu nicotină ($LFC < -1,9$, $p\text{-adj} < 0,05$). Însă, s-a detectat că nivelurile de expresie ale *JMY29_06775* sunt remarcabil de scăzute ($LFC = -4,14$, $p\text{-adj} < 0,005$) față de celulele netratate în faza staționară în urma degradării nicotinei. *JMY29_06775* codifică un transportor din cadrul CitMHS, o familie de proteine care, la bacterii, sunt responsabile de transportul secundar al complexelor formate între ioni metalici și citrat. Prin urmare, tiparul de expresie observat pentru *JMY29_06775* se datorează, cel mai probabil, derivaților nicotinei precum acidul succinic și α -ceto-glutaric, care persistă în mediul de cultură în faza staționară și continuă să alimenteze ciclul TCA (Figura 4.6.) chiar și după epuizarea nicotinei din mediu¹⁵.

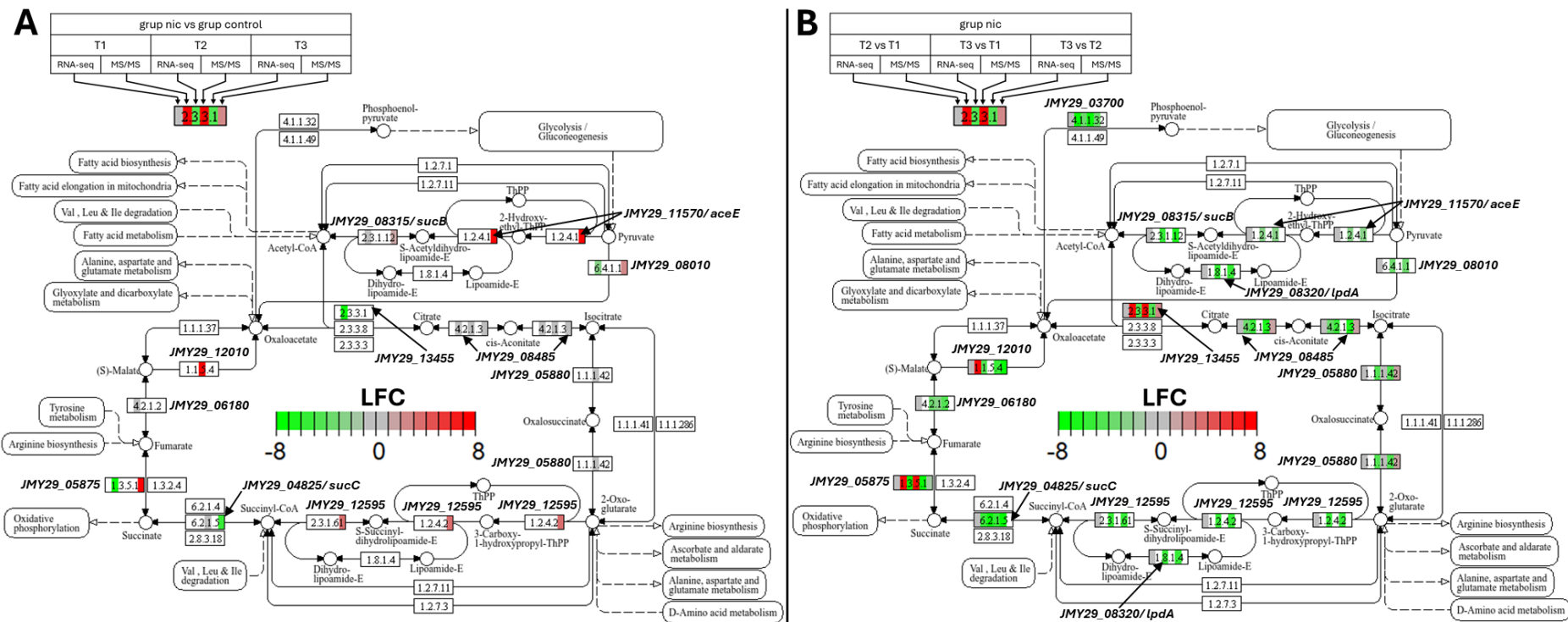


Figura 4.6. Prezentare generală a genelor și proteinelor exprimate diferențial în mod statistic semnificativ în timpul cultivării *P. nicotinovorans* ATCC 49919 cu nicotină, implicate în ciclul acizilor tricarboxilici conform datelor transcriptomice și proteomice.

A. gene și proteine exprimate diferențial în mod statistic semnificativ în grupul tratat cu nicotină față de control; **B.** analiza genelor și proteinelor exprimate diferențial în mod statistic semnificativ între cele trei momente cheie ale catabolismului nicotinei; RNA-seq: rezultate din comparația datelor transcriptomice; MS/MS: rezultate din comparația datelor proteomice; LFC: log2FoldChange; grafice generate conform subcapitolului 3.2.4.2 al tezei.

CONCLUZII

Considerând importanța dezvoltării metodelor eficiente pentru decontaminarea deșeurilor de tutun și bioremedierea resurselor naturale poluate de nicotina toxică, acest studiu a avut ca scop extinderea cunoștințelor privind catabolismul nicotinei la *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919, microorganismul de referință pentru degradarea alcaloidului prin calea piridinică. Pentru a completa datele biochimice, de biologie moleculară și proteomice pre-existente asupra subiectului de interes, a fost propusă o abordare bazată pe dezvoltările recente ale tehnologiilor de secvențiere de ultimă generație. În acest sens, obiectivele principale au fost derivate din și ierarhizate urmând dogma centrală a biologiei moleculare, fiind reprezentate de generarea și analiza primului genom complet și adnotat al speciei *P. nicotinovorans* ATCC 49919, secvențierea și analiza transcriptomului actinomicetului tratat cu nicotină, reanaliza unui set pre-existent de date proteomice folosind genomul asamblat și, nu în ultimul rând, integrarea datelor omice complementare.

În urma analizei critice a tehnologiilor de secvențiere de actualitate și considerând caracteristicile speciei studiate, s-a ales o abordare hibridă pentru asamblarea genomului, fundamentată de consensul comunității de specialitate asupra faptului că aceasta ar fi asigurat, cel mai probabil, calitatea dorită a secvenței genomice rezultate. În plus, a fost secvențiat, asamblat și analizat și genomul unei tulpini derivate, *P. nicotinovorans nic*-, care a pierdut capacitatea de degradare a nicotinei.

Conform principiilor FAIR, datele brute obținute din secvențierea ADN-ului genomic, cât și genomurile *P. nicotinovorans* ATCC 49919 și *nic*- asamblate și adnotate au fost diseminate în bazele de date publice de referință în domeniu și pot fi accesate și utilizate de orice persoană interesată. Genomul tulpinii *P. nicotinovorans* ATCC 49919 asamblat prin abordarea *de novo* hibridă reprezintă prima secvență completă și adnotată structural și funcțional a unui microorganism capabil de degradarea nicotinei prin intermediul căii piridinei¹⁸.

Suplimentar, rezultatul primului obiectiv îndeplinit a permis o serie de analize care au contribuit la impactul acestui studiu. În primul rând, s-au dezvoltat contribuțiile limitate existente referitoare la originea și evoluția genelor catabolice *nic*. A fost descrisă utilizarea secvenței genomului complet al *P. nicotinovorans* ATCC 49919 drept referință pentru analiza filogenetică și filogenomică comparativă față de genomurile a 63 de specii înrudite sau care prezentau un set comun de cinci gene *nic*¹⁹. S-a demonstrat că două dintre secvențele *P. nicotinovorans* (DSM 420 și JCM 3874) din NCBI Genome sunt redundante, iar altele nu

reprezintă specii de *P. nicotinovorans*, nefiind echipate cu genele implicate în catabolismul nicotinei, caracteristica esențială pentru a fi numite „nicotinovorans”¹⁹. Mai mult, a fost identificată o serie de repliconi aparținând unor tulpini înrudite cu *P. nicotinovorans* ATCC 49919 și care prezintă o ordine conservată a genelor clusterului *nic*¹⁹.

În al doilea rând, genomul complet obținut a facilitat executarea cu succes a celui de-al doilea obiectiv principal al studiului, anume secvențierea și analiza transcriptomului de la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în prezența nicotinei în momentele cheie ale degradării alcaloidului. Setul de date transcriptomice generat în acest studiu este de calitate superioară, caracteristică importantă mai ales considerând că este chiar primul care descrie catabolismul microbial al nicotinei prin calea piridinică. În plus, datele produse sunt printre primele generate cu ajutorul tehnologiei nanopore utilizată pentru secvențierea directă a ARN-ului bacterian, mai ales utilizând celulele de secvențiere Flongle.

Datele brute, interpretate în nucleotide și citiri, plus fișierele cheie utilizate în analiza expresiei diferențiale a genelor între momentele cheie ale catabolismului nicotinei au fost diseminate în baza de date relevantă, NCBI GEO, fiind disponibile cu acces liber. Acestea reprezintă o sursă importantă de informații referitoare la catabolismul bacterian al nicotinei, dar și o resursă pentru studiile viitoare în domeniul transcriptomicii sau chiar a epitranscriptomicii microbiene, atunci când metodele bioinformaticе vor fi suficient de dezvoltate pentru a permite acest tip de analiză asupra procariotelor.

Rezultatele obținute prin analiza DGE la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în prezența nicotinei în trei momente cheie ale catabolismului alcaloidului sunt conforme cu și le confirmă pe cele descrise anterior pe baza analizei proteomului speciei de interes cultivată pe mediu citrat suplimentat cu nicotină¹³. Mai mult, datele transcriptomice au suplimentat în mod semnificativ informațiile biochimice, genomice și proteomice generate anterior sau raportate aici pentru tulpina ATCC 49919. Realizarea cu succes a primelor două obiective a permis îndeplinirea celui final, anume integrarea datelor genomice și transcriptomice originale cu un set pre-existent de date proteomice.

Datele transcriptomice noi și reinterpretarea proteomului *P. nicotinovorans* ATCC 49919 pe baza genomului nou asamblat au confirmat expresia corelată cu nicotina a 25 de gene *nic* și a produselor lor. Dintre acestea, opt au fost raportate pentru prima dată ca având expresia corelată cu nicotina: *JMY29_20530*, *JMY29_20550*, *perm*, *coxF*, *coxE*, *JMY29_20640*, *JMY29_20655* și *modB*. Analiza genelor active și a nivelelor proteinelor corespunzătoare acestora au oferit informații privind integrarea catabolismului nicotinei cu metabolismul general al celulei bacteriene și a dezvăluit un repertoriu alcătuit din multiple

mecanisme de apărare împotriva stresului oxidativ generat în timpul degradării alcaloidului toxic. Tiparele de expresie ale genelor și proteinelor indicate prin analiza transcriptomului și proteomului în urma tratamentului cu nicotină au fost coroborate cu informații funcționale de la omologii de secvență apropiați, ceea ce a permis identificarea mai multor noi gene putative implicate în procesele cheie ale degradării nicotinei. S-a postulat că *JMY29_05475* codifică putativ un exportator al pigmentului albastru din familia transportatorilor EamA, *JMY29_04550* și *JMY29_04555* au fost propuse ca fiind implicate în controlul transportului nicotinei, iar *JMY29_20550* în conectarea metabolismului nicotinei la ciclul modificat al acizilor tricarboxilici¹⁵.

Prin combinarea datelor de proteomică bazate pe nanoLC-MS/MS cu datele generate prin secvențierea cu citire scurtă a ADN-ului, cu citire lungă a ADN-ului și directă a ARN-ului, acest studiu oferă prima investigație multiomică asupra *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919. Chiar mai mult, această lucrare reprezintă chiar prima analiză multiomică a unei căi bacteriene de degradare a nicotinei¹⁵.

PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR

În scriptul inclus în Anexa 4 a tezei și disponibil în domeniul public¹⁵, redactat pentru analiza funcțională a datelor de transcriptomică și proteomică, identificatorul taxonului (tax_id) poate fi înlocuit cu identificatorul NCBI al oricărui taxon de interes. Prin urmare, cu modificări minimale, scriptul modular poate fi utilizat atât pentru generarea unei baze de date locală pentru orice specie cu informații disponibile în NCBI, cât și pentru analiza pentru îmbogățirea funcțională a genelor sau proteinelor exprimate diferențial generate de un alt studiu. Se consideră dezvoltarea acestui script într-un pipeline automatizat pentru procesarea rezultatelor analizei DGE în vederea îmbogățirii funcționale a acestora, cu relevanță mai ales pentru speciile non-model, pentru care cel mai probabil nu există pachete de adnotare în domeniul public.

Catabolismul nicotinei de către *P. nicotinovorans* ATCC 49919, suplimentar faptului că se regăsește între cele mai bine caracterizate căi de degradare a nicotinei, prezintă totodată și potențial biotehnologic, după cum s-a elaborat în **Motivația economică și ecologică a studiului** și **Motivația medicală a studiului**. În prezent, eforturile sunt concentrate în mod proactiv pe dezvoltarea de plasmide și instrumente bazate pe CRISPR pentru ingineria *P. nicotinovorans* ATCC 49919 cu scopul îmbunătățirii randamentului de degradare a nicotinei și eficienței conversiei sale¹⁵.

Descoperirile raportate de studiul multiomic deschid noi oportunități de utilizare a ingineriei genetice și metabolice pentru continuarea modificării tulpinii în vederea intensificării randamentului și ratelor de conversie a nicotinei. Țintele principale în această direcție sunt *JMY29_04550* și *JMY29_04555*, implicate putativ în controlul transportului transmembranar al nicotinei, *JMY29_05475*, postulat ca fiind implicat în exportul pigmentului albastru, plus gena *JMY29_14770* care codifică o catalază. Ipotetic, supra-expresia acestor gene ar crește rata de absorbție a nicotinei și de export a derivaților metabolici și, simultan, ar reduce stresul oxidativ intracelular. Prin urmare, ar fi îmbunătățită concomitent toleranța la nicotină și rata de degradare a alcaloidului¹⁵.

Chiar mai mult, toate cele opt gene *nic* raportate pentru prima dată în acest studiu ca având expresie corelată cu nicotina sunt posibile ținte pentru experimente de knock-out pentru întreruperea procesului catabolic și obținerea intermediarilor metabolici de interes economic. Această abordare s-a dovedit a fi fezabilă în alte microorganisme care degradează nicotina. În plus, în ciuda faptului că ingineria întregului metabolism celular este o sarcină mai complexă, aceasta deja s-a dovedit a fi posibilă în *Pseudomonas* sp. JY-Q, care

degradează nicotina prin calea pirolidinei. Principalele ținte potențiale în această abordare sunt reprezentate de gena *nic JMY29_20550*, identificată ca enzimă cheie implicată în conectarea căii de degradare a nicotinei cu ciclul modificat al acizilor tricarboxilici, precum și cei patru factori de transcriere cu expresie corelată cu nicotina și codificați de cromozom (*JMY29_08370*, *JMY29_09095*, *JMY29_04550*, *JMY29_04555*)¹⁵.

Constatările bazate pe rezultatele analizei transcriptomului necesită validare suplimentară prin metode alternative și complementare secvențierii directe a ARN-ului, mai ales în cazul genelor putative indicate ca fiind exprimate diferențial, dar ale căror produse nu au fost identificate în setul de date proteomice. Impactul acestor potențiale gene țintă pentru ingineria genetică și metabolică a *P. nicotinovorans* ATCC 49919 în dezvoltarea potențialelor aplicații biotehnologice ale tulpinii necesită studii exploratorii în mod particular. În cazul în care eforturile de inginerie genetică a căii de degradare a nicotinei prin intermediul piridinei la *P. nicotinovorans* ATCC 49919 nu vor genera rezultatele dorite, o strategie alternativă care prezintă potențial este reprezentată de transferul megaplasmidului pAO1 în tulpini precum *Pseudomonas putida* S16 sau J5 și *Agrobacterium tumefaciens* S33. S-a dovedit sau s-a sugerat că aceste tulpini utilizează același compus molibdenic esențial pentru degradarea nicotinei ca și *P. nicotinovorans* ATCC 49919, factor care limitează transferul pAO1 în alte specii utilizate în ingineria genetică și metabolică, precum *E. coli*.

DISEMINAREA REZULTATELOR OBTINUTE ÎN CADRUL TEZEI

Lista lucrărilor publicate

1. **El-Sabeh A**, Mlesnita AM, Mihasan M. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of nicotine metabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919. International Biodeterioration & Biodegradation. Volume 199. 2025.
DOI: 10.1016/j.ibiod.2025.106017 – **IF 4.1, Q2**
2. **El-Sabeh A**, Mlesnita AM, Munteanu IT, Honceriu I, Kallabi F, Boiangiu RS, Mihasan M. Characterisation of the *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 genome and identification of several strains harbouring a highly syntenic *nic*-genes cluster. BMC Genomics. 24, 536. 2023.
DOI: 10.1186/s12864-023-09644-3 – **IF 3.5, Q1**
3. **El-Sabeh A**, Honceriu I, Kallabi F, Boiangiu RS, Mihasan M. Complete genome sequences of two closely related *Paenarthrobacter nicotinovorans* strains. Microbiology Resource Announcements. 16;11(6). 2022.
DOI: 10.1128/mra.00133-22 – **IF 0.7, Q3**

Contribuții în baze de date și platforme de dezvoltare software de referință internațională

Conform principiilor FAIR adoptate de științele omice, datele și scripturile originale generate și utilizate în acest studiu au fost depuse în platformele internaționale de referință, putând fi utilizate integral, parțial sau chiar modificate de către oricine.

1. Datele brute generate din secvențierea genomurilor tulpinilor *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 și *nic*- au fost depuse în NCBI Sequence Read Archive (SRA) sub numerele de înregistrare din Tabel 4.3. - coloana „Nr. Access SRA” al tezei.
2. Asamblările complete ale genomurilor au fost depuse în NCBI Genome cu următoarele numere de înregistrare:
 - *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919: ASM2191934v1, corelat cu GenBank assembly GCA_021919345.1 și RefSeq assembly GCF_021919345.1; îi corespund:
 - secvența cromozomului: GenBank CP089293.1, RefSeq: NZ_CP089293.1
 - secvența megaplasmidului pAO1: GenBank CP089294.1, RefSeq: NZ_CP089294.1
 - *Paenarthrobacter nicotinovorans nic*:- ASM2191800v1, corelat cu GenBank assembly GCA_021918005.1 și RefSeq assembly GCF_021918005.1; îi corespunde:
 - secvența cromozomului: GenBank CP089515.1, RefSeq NZ_CP089515.1

3. Datele de secvențiere directă a ARN-ului de la *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 și fișierele cheie generate pentru și din analiza expresiei diferențiale a genelor au fost depuse în NCBI GEO cu numerele de înregistrare: GSE240220 și GSE279035.
4. Setul de date nanoLC-MS/MS reanalizat pe baza genomului nou asamblat a fost depus în ProteomeXchange Consortium prin repozitoriul partener PRIDE, cu numărul de identificare PXD057439.
5. Scripturile Python și R, plus fișierul log R, pot fi accesate în Zenodo cu DOI: 10.5281/zenodo.14035581 și în GitHub la github.com/amadaes/Pnic_multiomics.

Membru în echipa unor proiecte de cercetare

2021 - Decembrie 2023 – Proiect „Secvențierea genomului unei bacterii utile: *Paenarthrobacter nicotinovorans* – următorul pas în extinderea aplicațiilor biotehnologice”, acronim PaeNicGenom, contract de finanțare nr. PCE 152/ 2021, cod PN-III-P4-ID-PCE-2020-0656 (cercetare.bio.uaic.ro/grupuri/bioactive/content/grants/PCE2021/PCE2021_objectives.html)

Burse internaționale câștigate

1. Bursă FEBS–YSF pentru participarea la 23rd FEBS Young Scientists’ Forum (YSF) 2024 și 48th FEBS Congress
2. Bursă pentru participarea la 2nd International Molecular Biosciences PhD & Postdoc FEBS-IUBMB-ENABLE Conference
3. Bursă pentru tineri cercetători la 47th FEBS Congress
4. Bursă pentru tineri cercetători la 25th IUBMB - 46th FEBS - 15th PABMB Congress

Lista rezumatelor publicate

1. **El-Sabeh A**, Mihasan M, A multi-omic study of nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans*, FEBS Open Bio Volume 14, Issue S2 Supplement: Mining biochemistry for human health and well-being, 48th FEBS Congress, 29 June – 3 July 2024, Milano, Italy, June 2024, pg. 83 (SpT-07-1).
DOI: 10.1002/2211-5463.13836
2. **El-Sabeh A**, Mihasan M, Transcriptome analysis of genes and metabolic pathways associated with nicotine degradation in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919, Accelerating human and environmental knowledge discovery through bioinformatics advances. 2nd RoBioinfo Conference 2024, 2024, Poster Session, Editura Universitara.
DOI: 10.5682/9786062817954

3. **El-Sabeh A**, Mihasan M, Transcriptomic study of nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 using direct RNA sequencing, Abstract Book - Annual Scientific Session of Naturalist Students (SSASN), 7th edition, October 26, 2023 and Scientific Session of the Faculty of Biology (SSFB), New Trends in Biology: from Molecules to Complex Systems, 3rd edition, October 27-28, 2023, Journal of Experimental and Molecular Biology (2023) 24(4):215-261, pg. 242.
DOI: 10.47743/jemb-2023-161
4. **El-Sabeh A**, Mihasan M, Transcriptomic study of nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 using long-read direct RNA sequencing, FEBS Open Bio, Volume 14: Supplement: FEBS-IUBMB-ENABLE 2nd International Molecular Biosciences PhD and Postdoc Conference, The emerging challenge, Environmental impacts on human health, 23–25 November 2023, University of Cologne, Germany, May 2024, pg. 14 (ST007).
DOI: 10.1002/2211-5463.13792
5. **El-Sabeh A**, Mihasan M, Investigation of bacterial nicotine-metabolism using direct RNA sequencing on a MinION Flongle, 2023, FEBS Open Bio, Volume 13: Supplement: Together in bioscience for a better future, 47th FEBS Congress, July 8–12, 2023, Tours, France, July 2023, pg. 146 (P-04.1-16).
DOI: 10.1002/2211-5463.13646
6. Mihasan M, **El-Sabeh A**, A highly syntenic *nic*-genes cluster is present in several related bacterial strains, 2023, Posters, FEBS Open Bio, Volume 13: Supplement: Together in bioscience for a better future, 47th FEBS Congress, July 8–12, 2023, Tours, France, July 2023, pg. 123 (P-03.1-12).
DOI: 10.1002/2211-5463.13646
7. **El-Sabeh A**, Mihasan M, Investigation of nicotine-catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 using long-read direct RNA sequencing, Human Genomics and Microbiome in the Context of Data Federation: RoBioinfo Conference 2023, Editura Universitară, Editia I, 2023.
DOI: 10.5682/9786062816179
8. **El-Sabeh A**, Honceriu I, Kallabi F, Boiangiu RS, Mihășan M, The Complete Genome Assembly of the Nicotine-Degrading *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919. New trends in Biology: from molecules to complex systems, Journal of Experimental and Molecular Biology, 23(2):1-69, pg. 46.
DOI:10.47743/jemb-2022-23-2

9. **El-Sabeh A**, Honceriu I, Kallabi F, Boianigiu RS, Mihășan M, Secvența completă a genomurilor a două tulpini strâns înrudite de *Paenarthrobacter nicotinovorans*. Volum de rezumate: Sesiunea științifică anuală a studenților naturaliști – ediția VI-a., 2022 (Iași – Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”), pg. 13.
www.bio.uaic.ro/?page_id=12649
10. **El-Sabeh A**, Honceriu I, Kallabi F, Boianigiu RS, Mihasan M, Genome sequence of *Paenarthrobacter nicotinovorans* strain ATCC 49919, a nicotine-degrading soil microorganism, FEBS Open Bio, Volume 12: Supplement: The Biochemistry Global Summit, 25th IUBMB Congress, 46th FEBS Congress, 15th PABMB Congress, July 9–14, 2022, Lisbon, Portugal, July 2022, pg. 17 (ShT-06.1–1).
DOI: 10.1002/2211-5463.13442
11. **El-Sabeh A**, Honceriu I, Kallabi F, Boianigiu RS, Mihasan M, Complete genome sequence of the well-studied nicotine-degrading microorganism *Paenarthrobacter nicotinovorans* strain ATCC 49919, FEMS Conference on Microbiology: 30 June - 2 July 2022, Belgrade, Serbia, Serbian Society of Microbiology, 2022: Electronic Abstract Book, ISBN 8691489782.
www.femsbelgrade2022.org/abstract-book

Participări și premii la conferințe internaționale

Comunicări orale

1. 29.06 - 03.07.2024 – The 48th FEBS Congress, Milano, Italia
El-Sabeh A, Mihasan M - A multi-omic study of nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans*
2. 23 - 25.11.2023 – The 2nd International Molecular Biosciences PhD & Postdoc FEBS-IUBMB-ENABLE Conference, Cologne, Germania
El-Sabeh A, Mihasan M - Transcriptomic study of nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 using long-read direct RNA sequencing – **acordată unul din cele două premii pentru prezentări de tip Short Talk (15 minute) în cadrul sesiunii „Novel Experimental Model Systems”**
3. 13 - 15.09.2023 – The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Cluj-Napoca, România
El-Sabeh A, Mihasan M - Long-read direct RNA nanopore sequencing of the nicotine-related transcriptome of *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919
– **acordată Premiul II în cadrul sesiunii Young Researchers**

4. 11 - 13.05.2023 – The RoBioinfo Conference 2023, București, România
El-Sabeh A, Mihasan M - Investigation of nicotine-catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 using long-read direct RNA sequencing
5. 21 - 24.10.2022 – International Conference and XXXIX Scientific Sessions of the Romanian Society for Cell Biology (RSCB 2022), Cluj Napoca, România
El-Sabeh A, Honceriu I, Kallabi F, Boiangiu RS, Mihasan M - Complete genome sequence of the nicotine-degrading soil microorganism *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919
6. 09 - 14.07.2022 – The Biochemistry Global Summit 2022: 25th IUBMB-46th FEBS-15th PABMB, Lisabona, Portugalia
El-Sabeh A, Honceriu I, Kallabi F, Boiangiu RS, Mihasan M - Genome sequence of *Paenarthrobacter nicotinovorans* strain ATCC 49919, a nicotine-degrading soil microorganism

Comunicări tip poster

7. 25 - 27.09.2024 – The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, București, România
El-Sabeh A, Mihasan M - A multiomic analysis of nicotine degradation via the pyridine pathway in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919
– **acordat unul din cele trei premii pentru sesiunea de postere**
8. 29.06 - 03.07.2024 – The 48th FEBS Congress, Milano, Italia
El-Sabeh A, Mihasan M - A multi-omic study of nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans*
9. 26.06 – 29.09.2024 – The 23rd FEBS Young Scientists' Forum (YSF 2024), Pavia, Italia
El-Sabeh A, Mihasan M - A multi-omic study of nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans*
10. 11 - 13.04.2024 – The 2nd RoBioinfo Conference, Cluj-Napoca, România
El-Sabeh A, Mihasan M - Transcriptome analysis of genes and metabolic pathways associated with nicotine degradation in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919
– **acordat unul din cele trei premii pentru sesiunea de postere**
11. 08 - 12.07.2023 – The 47th FEBS Congress, Tours, Franța
El-Sabeh A, Mihasan M - Investigation of bacterial nicotine-metabolism using direct RNA sequencing on a MinION Flongle

12. 30.06 - 02.07.2022 – FEMS Conference on Microbiology, Belgrad, Serbia

El-Sabeh A, Honceriu I, Kallabi F, Boianiu RS, Mihasan M - Complete genome sequence of the well-studied nicotine-degrading microorganism *Paenarthrobacter nicotinovorans* strain ATCC 49919

Participări la conferințe naționale

Comunicări orale

13. 27 - 28.10.2023 – Sesiunea Științifică a Facultății de Biologie - Tendințe în Biologie: de la molecule la sisteme complexe, organizată de Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, România

El-Sabeh A, Mihasan M - Transcriptomic study of nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 using direct RNA sequencing

14. 27 - 28.10.2022 – Sesiunea Științifică a Facultății de Biologie - New Trends in Biology: from molecules to complex systems, organizată de Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, România

El-Sabeh A, Honceriu I, Kallabi F, Boianiu RS, Mihasan M - The complete genome assembly of the nicotine degrading *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919

15. 21.05.2022 – Sesiunea științifică anuală a studenților naturaliști – ediția a VI-a, organizată de Facultatea de Biologie a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, România

El-Sabeh A, Honceriu I, Kallabi F, Boianiu RS, Mihasan M - Secvența completă a genomurilor a două tulpini strâns înrudite de *Paenarthrobacter nicotinovorans*

Comunicări tip poster

16. 27 - 28.10.2024 – Sesiunea Științifică a Facultății de Biologie - New Trends in Biology: from molecules to complex systems, organizată de Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, România

El-Sabeh A, Mihasan M – A multiomic study of nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919

– acordat unul din cele trei premii pentru sesiunea de postere

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Lam J, Schneider J, Shadbegian R, Pega F, St Claire S, Novotny T. Modelling the global economic costs of tobacco product waste. *Bull World Health Organ.* 2022 Oct 1;100(10):620–7. DOI: 10.2471/BLT.22.288344
2. Zhang LY, Mai J, Shi JF, Ai KB, He L, Zhu MJ, et al. Study on tobacco quality improvement and bacterial community succession during microbial co-fermentation. *Ind Crops Prod.* 2024 Feb 1;208:117889. DOI: 10.1016/J.INDCROP.2023.117889
3. Deng M, Basak P, Zhang Y, Song J, Suo H. An update in recent research on nicotine contamination and nicotine-degrading microorganisms. *Toxicon.* 2025 Jan;254:108209. DOI: 10.1016/j.toxicon.2024.108209
4. Mihășan M. Megaplasmidul pAO1-Structură și funcție. Iași, Romania: Editura Universității “Alexandru Ioan Cuza” din Iași; 2011.
5. Mihașan M. Bioinformatics-Based Molecular Classification of *Arthrobacter* Plasmids. *Cell Mol Biol Lett.* 2015 Dec 1;20(4):612–25. DOI: 10.1515/cmble-2015-0036
6. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot (Tokyo).* 2009 Jan;62(1):5–16. DOI: 10.1038/ja.2008.16
7. Boiangiu RS, Mihasan M, Gorgan DL, Stache BA, Hritcu L. Anxiolytic, promnesic, anti-acetylcholinesterase and antioxidant effects of cotinine and 6-hydroxy-l-nicotine in scopolamine-induced zebrafish (*Danio rerio*) model of alzheimer’s disease. *Antioxidants.* 2021 Feb 1;10(2):1–28. DOI: 10.3390/antiox10020212
8. Beer B, Pick A, Sieber V. In vitro metabolic engineering for the production of α -ketoglutarate. *Metab Eng.* 2017;40:5–13. DOI: 10.1016/j.ymben.2017.02.011
9. Igloi GL, Brandsch R. Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *J Bacteriol.* 2003 Mar;185(6):1976–86. DOI: 10.1128/JB.185.6.1976-1986.2003
10. Jerke K, Nakatsu CH, Beasley F, Konopka A. Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids. *Plasmid.* 2008 Mar 1;59(2):73–85. DOI: 10.1016/J.PLASMID.2007.12.003
11. Mihășan M, Babii C, Aslebagh R, Channaveerappa D, Dupree E, Darie CC. Proteomics based analysis of the nicotine catabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1. *Sci Rep.* 2018 Nov 2;8(1):1–9. DOI: 10.1038/s41598-018-34687-y
12. Mihășan M, Babii C, Aslebagh R, Channaveerappa D, Dupree EJ, Darie CC. Exploration of Nicotine Metabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 by Microbial Proteomics. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1140:515–29. DOI: 10.1007/978-3-030-15950-4_30
13. Mihășan M, Boiangiu RȘ, Guzun D, Babii C, Aslebagh R, Channaveerappa D, et al. Time-Dependent Analysis of *Paenarthrobacter nicotinovorans* pAO1 Nicotine-Related Proteome. *ACS omega.* 2021 Jun 8;6(22):14242–51. DOI: 10.1021/ACSOMEGA.1C01020
14. Zhang Z, Mei X, He Z, Xie X, Yang Y, Mei C, et al. Nicotine metabolism pathway in bacteria: mechanism, modification, and application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2022 Feb 1;106(3):889–904.
15. El-Sabeh A, Mlesnita AM, Mihasan M. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of nicotine metabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2025 Mar;199:106017. DOI: 10.1016/j.ibiod.2025.106017
16. Brandsch R. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006 Jan 7;69(5):493–8. DOI: 10.1007/S00253-005-0226-0/FIGURES/2
17. Fitzpatrick PF. The enzymes of microbial nicotine metabolism. *Beilstein J Org Chem.* 2018 Aug 31;14:2295. DOI: 10.3762/BJOC.14.204
18. El-Sabeh A, Honceriu I, Kallabi F, Boiangiu RS, Mihasan M. Complete Genome Sequences of Two Closely Related *Paenarthrobacter nicotinovorans* Strains. *Microbiol Resour Announc.* 2022 Jun 16;11(6). DOI: 10.1128/MRA.00133-22
19. El-Sabeh A, Mlesnita AM, Munteanu IT, Honceriu I, Kallabi F, Boiangiu RS, et al. Characterisation of the *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919 genome and identification of several strains harbouring a highly syntenic nic-genes cluster. *BMC Genomics.* 2023 May 4;24(1). DOI: 10.1186/s12864-023-09644-3