

RST - RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC IN EXTENSO

Titlul proiectului: **Dezvoltarea unei biotehnologii bazate pe microorganismul *Arthrobacter nicotinovorans* pentru producerea de compuși neuro-protectivi**

Contract: **105 din 02/05/2018**

Cod Depunere: **PN-III-P1-1.1-TE-2016-0367**

Director de proiect: **Conf. Dr. Marius MIHĂȘAN**

Perioada: **01 IANUARIE - 31 DECEMBRIE 2019**

1. Rezumatul etapei

A fost evaluată influența nivelului de agitare, de aerare, pH-ul și concentrației de nicotină asupra dezvoltării bacteriene și acumularea de 6HNic. S-a stabilit astfel că frecvența de 5 Hz este optimă, și că nivelul de pO₂ și pH-ul sunt indicatori esențiali ce pot fi utilizați pentru a monitoriza conținutul de 6HLN din mediu. Suplimentar, s-au inițiat activități ce au în vedere obținerea unui sistem de editare genetică bazat pe CRISPR și s-au testat inhibitori pentru 6HLNO și pentru pompe de eflux.

2. Descrierea științifică și tehnică

A. Sinteza rezultatelor obținute în această etapă

Metabolismul L-nicotinei în tulpina *Paenarthrobacter nicotinovorans* convertește acest alcaloid în acid metil- γ -amino-butiric și (E)-2,2',5,5'-tetrahidroxi-6H,6'H-(3,3'-bipiridiniliden)-6,6'-dionă (sau pe scurt albastru de nicotină, NB). Unul dintre intermediarii metabolici ce apare în una din primele etape ale căii metabolice, 6-hidroxi-L-nicotină (6HLN), este un compus cu proprietăți neuro-protective (Hritcu et al., 2017; Hritcu and Mihasan, 2019; Ioniță et al., 2017) și implicit cu valoare biotehnologică. 6HLN este produsul reacției catalizate enzima nicotin-dehidrogenază (NDH) și este apoi convertit în 6-hidroxi-metil-miosmină prin acțiunea enzimei 6-hidroxi-L-nicotin oxidaza (6HLNO). Datorită unui diferențe de afinitate pentru substrat între cele 2 enzime (K_M 0,037 mM pentru 6HLNO (Decker et al., 1972) vs 0,02 mM pentru NDH (Hochstein and Dalton, 1967)), compusul se acumulează temporar în mediul de cultură.

În încercarea de a crește randamentul de conversie a nicotinei în 6HLN am aplicat 2 strategii distincte. Prima este aceea de a supra-exprima NDH în paralel cu utilizarea de inhibitori chimici ai 6HLNO (Decker et al., 1972). Au fost astfel efectuate o serie de experimente în biofermentator ce

au utilizat $ZnSO_4$ ca inhibitor și a fost monitorizat consumul de nicotină și producerea de 6HLN prin cromatografie de fază inversă.

Astfel, s-a evaluat influenței nivelului de agitare și aerare asupra dezvoltării bacteriene și acumularea de 6HNic iar rezultatele obținute sunt prezentate în figura 1. După cum se poate observa cel mai bun nivel de agitare este de 5 Hz, la care concentrația de 6HNL se menține la nivele crescute pentru o perioadă lungă de timp. De asemenea, de notat că 6HLN se acumulează în faza staționară de dezvoltare a culturii bacteriene. Fazele de creștere și schimbarea culorii asociată cu acestea pot fi urmărite pe filmul disponibil la adresa: <https://mail.uaic.ro/~marius.mihasan/research/culturecut1min10sec.mp4>

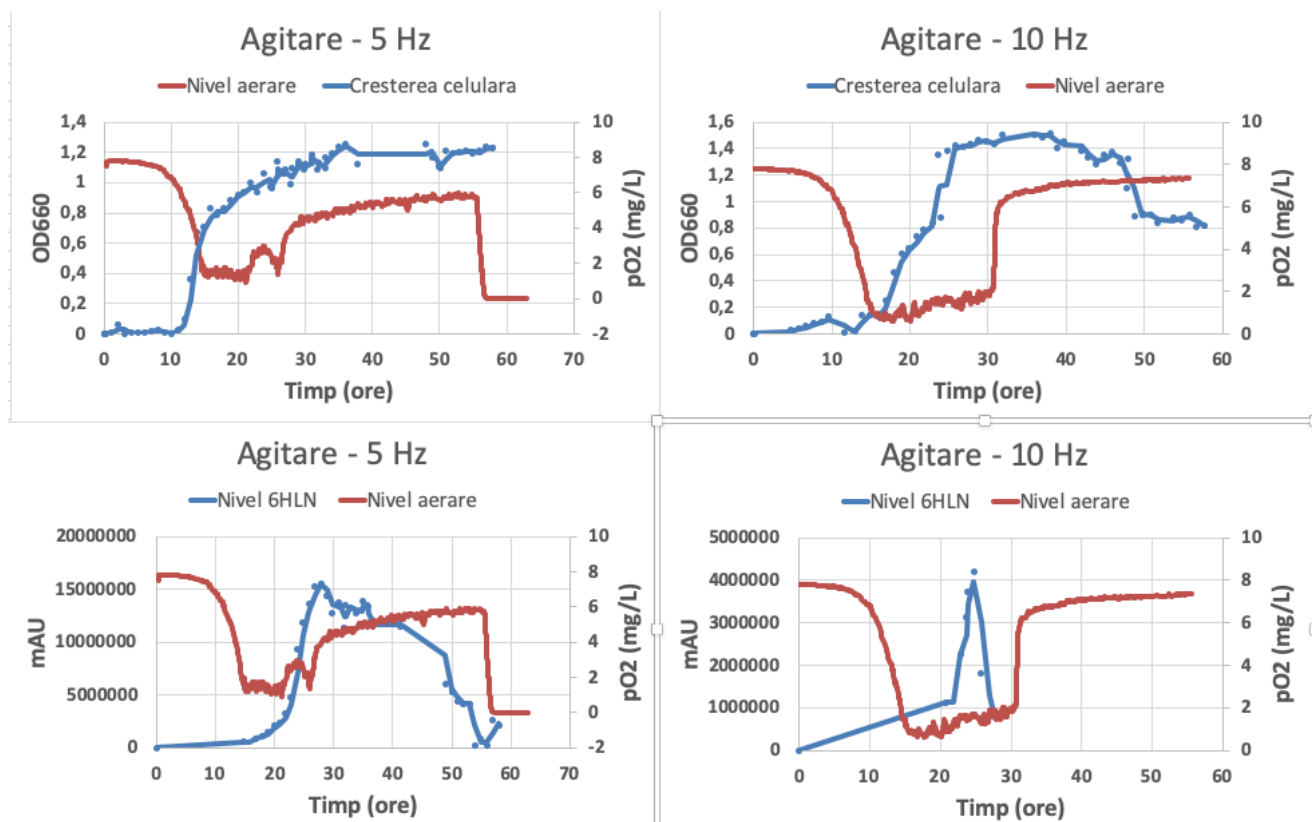


Figura 1. Influența nivelului de agitare și de aerare asupra dezvoltării culturii *Paenarthrobacter nicotinovorans* pART2ndh și a acumulării compusului cu proprietăți neuroprotectoare 6HLN.

Un alt parametru urmărit a fost modul în care evoluează pH-ul din mediul de cultură cu corelarea nivelului de acumulare a 6HLN. După cum se poate vedea în figura 2, acumularea 6HLN în mediul de cultură este însoțită de o creștere a pH-ului, însă nu putem în acest moment concluziona dacă cele 2 procese sunt dependente. Este mai degrabă probabil ca modificarea pH-ului să fie pusă în legătură cu trecerea de la o fază de creștere la alta.

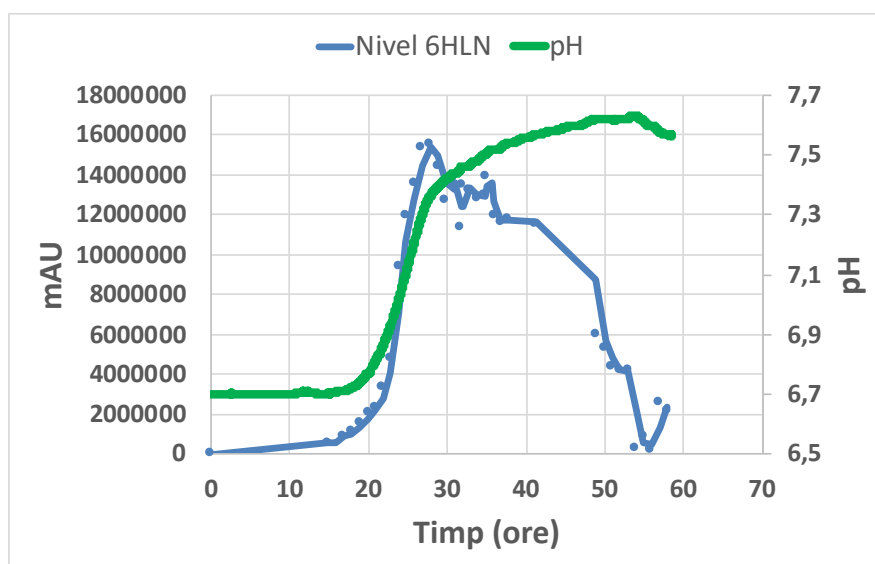


Figura 2. Dinamica acumulării 6HLN în corelație cu modificarea de pH a mediului de cultură.

Ultimul aspect evaluat pe parcursul experimentelor din această etapă a fost stabilirea corelației dintre concentrația de nicotină din mediu, creșterea bacteriei și bineînțeles acumularea produsului de interes 6HLN. Datele obținute pot fi observate în figura 3.

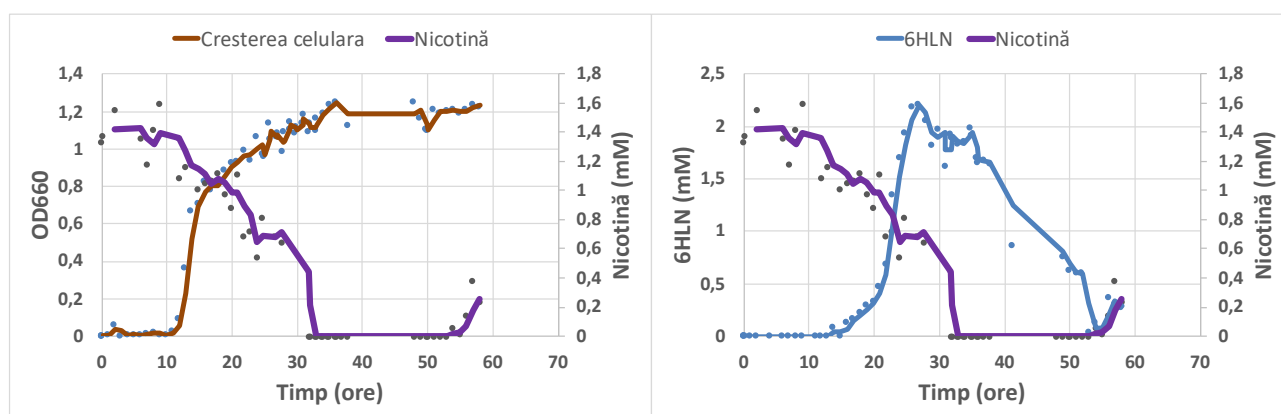


Figura 3. Evoluția concentrației de nicotină din mediul de cultură în corelație cu fazele de dezvoltare ale celulei și nivelul de 6HLN.

După cum se poate observa, majoritatea nicotinei este consumată în etapa de creștere exponențială, instalarea fazei staționare fiind probabil datorate epuizării nicotinei din mediu. Simultan, consumarea nicotinei duce la creșterea nivelului de 6HLN pînă la aproximativ 2 mM, însă pe măsură ce nivelul de nicotină scade, bacteria începe să importe din mediu 6HLN. Ca urmare, nivelul acestui compus scade semnificativ, el fiind complet metabolizat pînă la finalul celor 60 ore de cultivare.

Pe parcursul experimentelor s-au testat suplimentar și 2 concentrații diferite ale inhibitorului ZnSO₄. Am observat astfel că concentrația de 0,1 mM ZnSO₄ este optimă. Deși nu duce la creșterea nivelului de 6HLN ce se acumulează în mediu, face însă ca viteza cu care acest compus este importat în celulă și metabolizat să scadă semnificativ. Dacă în cazul cultivării fără inhibitor,

intervalul de acumulare era de 1-2 ore, în cazul utilizării 0,1 mM ZnSO₄ acest interval crește la aproximativ 24 ore (Figura 3) ceea ce este extrem de util din punct de vedere practic.

A doua strategie utilizată în paralel cu prima este inactivarea completă a expresiei enzimei 6HLNO prin distrugerea genei codificatoare. Deoarece din proiectele anterioare a reieșit dificultatea de a utiliza tehnicile de knockout pe bază de recombinare omoloagă, de această dată s-a dorit utilizarea sistemului CRISPR de editare genetică datorită acurateții sale. Până în prezent nu a fost descris nici un sistem CRISPR care să funcționeze în genul *Arthrobacter*, de aceea am ales un sistem utilizat în genul înrudit: *Corynebacterium* (Jiang et al., 2017; Tauch et al., 2003). Pentru aceasta, plasmidul pJYS3_ΔcrtYf (Figura 4, A) purtător al genelor pentru sistemul CRISPR-Cpf1 de editare genetică a fost achiziționat de la Addgene. După izolarea ADN-ului plasmidial din tulpina de *E. coli* DH5α gazdă (Figura 4, B), identitatea plasmidului a fost verificată prin digestii controlate cu enzimele de restricție *Bgl*I, *Nde*I și combinația lor. Identificarea fragmentelor așteptate în urma digestiei (Figura 4, C) ne-a asigurat că plasmidul este cel dorit. Am realizat transformarea celulelor competente de *P. nicotinovorans* după un protocol utilizat în mod curent în cadrul laboratorului, dar nu am putut obține celule recombinante.

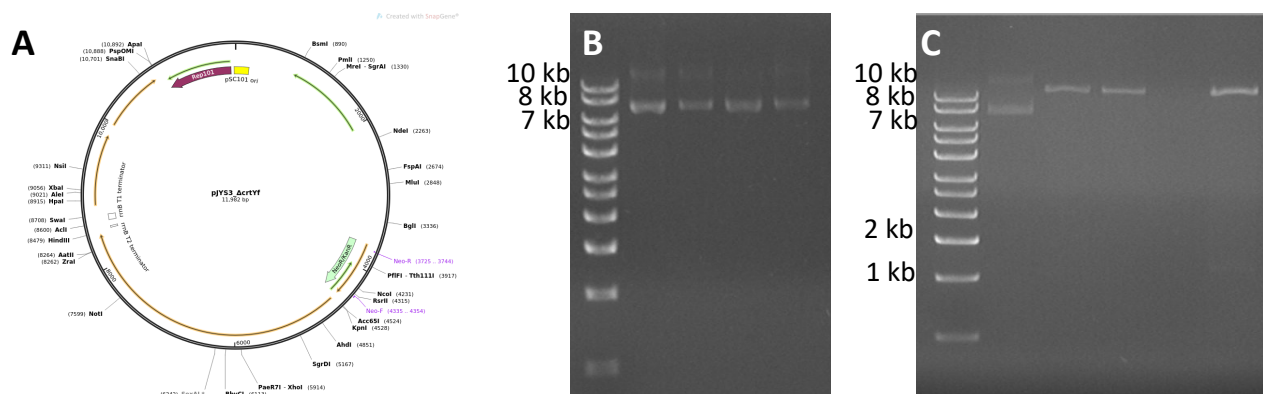


Figura 4. Plasmidul pJYS3_ΔcrtYf (A – harta genetică, B. migrare pe geluri 0,75% agaroză, C. digestie de verificare cu *Bgl*I, *Nde*I și combinația lor în urma căreia se obțin, conform hărții genice, plasmidii liniari (11 kb) în randul 2 și 3, iar în randul 4, 2 fragmente unul de 1 kb și unul de 10 kb.

Lipsa de transformanți la electroporarea plasmidului pJYS3_ΔcrtYf poate fi pusă pe seama fie a originii de replicare disfuncționale, fie pe seama toxicității sistemului CRISPR în *Paenarthrobacter*. Pentru a stabili cauza, s-a început realizarea unui plasmid nou prin mutarea genelor responsabile de sistemul CRISPR-Cpf1 de pe pJYS3_ΔcrtYf pe plasmidul pART2 folosit în mod curent în laboratorul nostru pentru supraexpresia proteinelor în *P. nicotinovorans*. Figura 5 Harta genetică a noului plasmid numit pART2-Fncpf1.

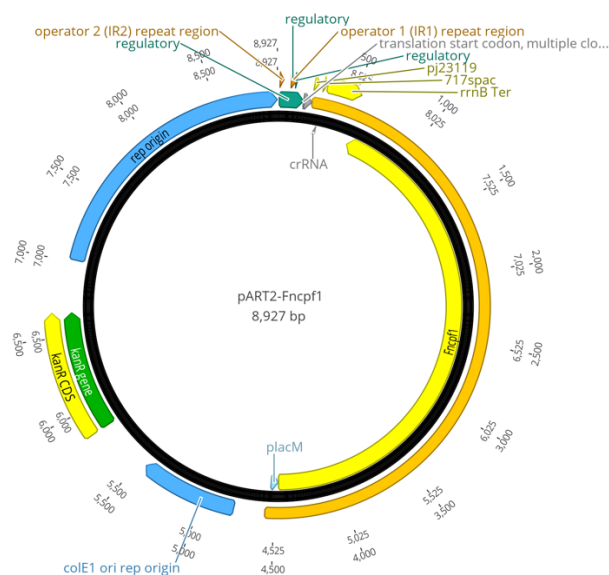


Figura 5. Harta genetică a plasmidului pART2-Fncpf1.

La momentul realizării acestui raport, enzimele de restricție și primerii necesari realizării acestui plasmid au fost achiziționați. Suplimentar, s-au identificat potențiali inhibitori pentru pompele de influx posibil a fi responsabile de introducerea 6HLN în mediu și s-au realizat teste preliminare cu unul dintre inhibitori: nigericină.

B. Obiectivele generale urmărite și gradul lor de realizare:

Activități prevazute	Gradul de realizare	Descriere/observatii:
2018, Etapa 1, Denumire etapă: Determinarea condițiilor optime în vederea obținerii cantității maxime de 6HNic în condiții de cultivare la nivel de bioreactor;		
Evaluarea influenței nivelului de agitare și aerării asupra dezvoltării bacteriene și acumularea de 6HNic.	total	Datele generate sunt prezentate în figura 1. S-a stabilit că nivelul de agitare de 5 Hz este cel optim și s-a corelat apariția 6HLN în mediu cu nivelul de O ₂ dizolvat.
Monitorizarea excreției și acumulării 6HNic funcție de pH-ul mediului de cultura.	total	Datele generate sunt prezentate în figura 2. S-a observat că pH-ul crește simultan cu acumularea în mediu a 6HLN, însă este puțin probabil ca cele 2 procese să fie dependente.
Evaluarea creșterii bacteriene și dinamicii acumulării 6HNic funcție de concentrația de substrat (nicotina) în mediul de cultura.	total	Datele generate sunt prezentate în figura 3. 6HLN se acumulează maxim la trecerea dintre faza de creștere logaritmică spre cea staționară.

E. Modul de diseminare a rezultatelor

În acest punct al derulării proiectului (12 luni de implementare), rezultatele directe generate au fost prezentate la 5 conferințe (1 internațională și 4 naționale) sub forma a 4 prezentări orale susținute de membrii echipe și 4 postere. De asemenea, unii membrii echipei au fost implicați în redactarea a 2 manuscrise ce sunt în prezent trimise spre publicare la Proteomics (IF 3.106, Q2 in Biomedical Research Methods, Q2 in Biochemistry & Molecular Biology) și Journal of Biosciences (IF 1,823, Q2 in Biology).

Experimentele cu inhibitorul pentru 6HLNO ZnSO₄ au generat rezultate ce au fost utilizate pentru a completa cererea de brevet OSIM Reg. no. A/01088/11.12.2018.

Din capitolul de cheltuieli indirecte, s-a organizat în perioada 4-5 Aprilie 2019 la Iași, Facultatea de Biologie, workshop-ul *5th @RoBioinfo Seminar: Bioinformatics tools for exploring protein biology*. Evenimentul a fost organizat în parteneriat cu Societatea Română de Bioinformatică, în comitetul de organizare fiind implicați 2 dintre membrii echipei proiectului. La eveniment au participat 5 trainers (Anna Marabotti, University of Salerno, Italy, Hema Bye-A-Jee, EMBL-EBI, Cambridge, Matt Conroy, EMBL-EBI, Cambridge și Claudiu Mihăilă, connex.ai), iar publicul țintă a fost reprezentat din 24 de tineri cercetători (6 studenți Master sau licență, restul doctoranzi și postdocs). Site-ul evenimentului este disponibil la adresa:

<http://www.rsbi.ro/2019/01/06/bioinformatics-tools-for-exploring-protein-biology/>

D. Dificultăți întâmpinate și rezolvarea lor

Nu au fost întâmpinate greutăți majore pe plan științific, însă faptul că plasmidul pJYS3_ΔcrtYf nu supraviețuiește în *Arthrobacter* implică o serie de etape suplimentare pentru mutarea genelor CRISPR în pART2.

Debutul târziu al plății avansului a dus la întârzieri în realizarea achiziției de consumabile și reactivi, însă activitățile au fost reprogramate în consecință.

Data:

04.11.2019

Director proiect,

Marius MIHĂȘAN, Conf. Dr. Habil.

