

SINTEZA LUCRARILOR FAZA I

In prima etapa a proiectului a fost demarata **caracterizarea fenotipică și genotipică a tulpinilor de *Ps. aeruginosa* in scopul selectarii tulpinilor care vor fi utilizate pe parcursul proiectului**

Pana in prezent, s-au utilizat 60 tulpini de *Ps. aeruginosa* izolate din infecții cu diferite localizari aparute la pacienti cu afectiuni cardio-vasculare spitalizati în perioada 2009-2011, furnizate de Laboratorul de Microbiologie al Institutului de Boli Cardiovasculare “C.C. Iliescu” din București si o tulpina de referință ATCC (*American Type Tissue Cultures*), codificata *Ps. aeruginosa* ATCC 27853. Identificarea tulpinilor s-a realizat cu ajutorul galeriilor microtest API 20 NE și respectiv prin sistemul automatizat VITEK 2 (Chifiriuc si colab., 2010).

Pentru **caracterizarea fenotipică a factorilor de virulență solubili (toxine formatoare de pori, exoenzime)**, tulpinile de *Ps. aeruginosa* au fost cultivate pe medii de cultura specifice pentru detectarea fiecarui factor de virulență solubili (toxine formatoare de pori: hemolizine, lecitinaze, lipaze, DN-aza si proteaze: cazeinază, gelatinaza) (Limban si colab., 2011).

Pentru **caracterizarea genelor de virulență si reglatorilor expresiei factorilor de virulenta**, ADN genomic a fost extras cu ajutorul kit-ului Wizard DNA Genomic Purification (Promega, USA). Caracterizarea la nivel molecular pentru evidentierea prezenței genelor ce codifică 12 factori de virulență si a genelor de quorum sensing-QS s-a realizat prin **simplex PCR** pentru 3 proteaze: elastaza (*lasB*), proteaza alcalina (*aprA*) si proteaza IV, sideroforul pioverdina (*pvdA*), 4 exotoxine (ExoA, ExoS, ExoT și ExoU) si ramnolipid (*rhlAB*) sau **multiplex PCR**, pentru gena *algD*, ce codifica sinteza alginatului, gena *plcH*, ce codifica sinteza fosfolipazei C hemolitice si a genei *plcN*, ce codifica fosfolipaza C nehemolitica. Caracterizarea moleculara a locilor genici responsabili de QS la tulpinile de *P. aeruginosa* analizate s-a realizat prin detectarea prin PCR a genelor *lasI*, *lasR*, ce codifica sistemul QS *las* și a genelor *rhlI*, *rhlR*, ce codifica sistemul QS *rhl* (Cotar si colab., 2010) (Tabelele 1, 2).

Tabelul 1. Secvențele de nucleotide ale primerilor și condițiile de amplificare utilizate pentru amplificarea genelor ce codifică pentru factori de virulenta si reglatori acestora la tulpinile de *Ps. aeruginosa* studiate

Primer	Secvența de nucleotide	Denaturare inițială	Număr cicluri	Denaturare în fiecare ciclu	Atasare primeri	Extensie primeri	Extensie finală	Amplicon (bp)
<i>lasB</i>	5'-TTCTACCCGAAGGACTGATAC-3' 5'-AACACCCATGATCGCAAC-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 1,5 min	72°C, 5 min	153
<i>aprA</i>	5'-ACCTGTCCTATTTCGTTC-3' 5'-GATTGCAGCGACAACCTGG-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 1,5 min	72°C, 5 min	140
<i>rhlA B</i>	5'-TCATGGAATTGTCACAACCGC-3' 5'-ATACGGCAAAATCATGGCAAC-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 1,5 min	72°C, 5 min	151
proteaza IV	5'-TATTTCGCCGACTCCCTGTA-3' 5'-GAATAGACGCCGCTGAAATC-3'	94°C, 5 min	34	94°C, 30 sec	60°C, 30 sec	72°C, 2 min	72°C, 5 min	752
<i>algD</i>	5'-ATGCGAATCAGCATCTTTGGT-3' 5'-CTACCAGCAGATGCCTCGGC-3'	94°C, 3 min	30	94°C, 30 sec	55°C, 1 min	72°C, 1,5 min	72°C, 5 min	1310
<i>plcH</i>	5'-GAAGCCATGGGCTACTTCAA-3' 5'-AGAGTGACGAGGAGCGGTAG-3'	94°C, 3 min	30	94°C, 30 sec	55°C, 1 min	72°C, 1,5 min	72°C, 5 min	307
<i>plcN</i>	5'-GTTATCGCAACCAGCCCTAC-3' 5'-AGGTGCAACACCTGGAACAC-3'	94°C, 3 min	30	94°C, 30 sec	55°C, 1 min	72°C, 1,5 min	72°C, 5 min	466
<i>exoU</i>	5'-CCGTTGTGGTGCCGTTGAAAG-3' 5'-CCAGATGTTACCCGACTC G-3'	94°C, 2 min	36	94°C, 30 sec	59°C, 30 sec	68°C, 1 min	68°C, 7 min	134
<i>exoT</i>	5'-AATGCCGTCCTCACTGCATGCG-3' 5'-TGTTCCGCGAGGTACTGCTC-3'				58°C, 30 sec			152
<i>exoA</i>	5'-AACCAGCTCAGCCACATGTC-3' 5'-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3'	94°C, 5 min	35	94°C, 30 sec	65°C, 30 sec	72°C, 2 min	72°C, 5 min	207
<i>exoS</i>	5'-ATC GCTTCAGCAGAGTCCGTC-3' 5'-CAGGCCAGATCAAGGCCGCGC-3'	94°C, 5 min	35	94°C, 30 sec	65°C, 30 sec	72°C, 2 min	72°C, 7 min	1352
<i>pvdA</i>	5'-GACTCAGGCAACTGCAAC-3' 5'-TTCAGGTGCTGGTACAGG-3'	94°C, 5 min	30	94°C, 30 sec	59°C, 30 sec	72°C, 2 min	72°C, 7 min	1281

<i>lasI</i>	5'-ATGATCGTACAAATGGTCGGC-3' 5'-GTCATGAAACCGCCAGTCG-3'	94 °C, 5 min.	35	94 °C, 30 sec	50 °C, 30 sec.	72 °C, 2 min.	72 °C, 5 min.	605
<i>lasR</i>	5'-ATGGCCTTGTTGACGGT-3' 5' GCAAGATCAGAGAGTAATAAGACCCA-3'	94 °C, 5 min.	35	94 °C, 30 sec	50 °C, 30 sec.	72 °C, 2 min.	72 °C, 5 min.	725
<i>rhlI</i>	5'-CTTGGTCATGATCGAATTGTC-3' 5'-ACGGCTGACGACCTCACAC-3'	94 °C, 5 min.	35	94 °C, 30 sec	50 °C, 30 sec.	72 °C, 2 min.	72 °C, 5 min.	625
<i>rhlR</i>	5'-CAATGAGGAATGACGGAGGC-3' 5'-GTTTCAGATGAGGCCAGC-3'	94 °C, 5 min.	35	94 °C, 30 sec	50 °C, 30 sec.	72 °C, 2 min.	72 °C, 5 min.	730

Tabelul 2. Componentele utilizate pentru amplificarea genelor ce codifică pentru factori de virulenta și reglatori acestora la tulpinile de *Ps. aeruginosa* studiate

Genă	Concentrație primeri	Concentrație MgCl ₂	Concentrație dNTP mix	Concentrație ADN TaqPol	Concentrație tampon pentru Taq-polimerază	Concentrație ADN	Volum/reație
<i>lasB</i>	0,2 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,03 U/μl	1X	50 μg	50 μl
<i>aprA</i>	0,2 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,03 U/μl	1X	50 μg	50 μl
<i>rhlAB</i>	0,2 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,03 U/μl	1X	50 μg	50 μl
proteaza IV	0,4 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,03 U/μl	1X	50 μg	50 μl
<i>algD</i>	0,2 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,025 U/μl	1X	50 μg	50 μl
<i>plcH</i>	0,2 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,025 U/μl	1X	50 μg	50 μl
<i>plcN</i>	0,2 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,025 U/μl	1X	50 μg	50 μl
<i>exoU</i>	0,2 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,025 U/μl	1X	50 μg	25 μl
<i>exoT</i>	0,2 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,025 U/μl	1X	50 μg	25 μl
<i>exoA</i>	0,2 μM	1.75 mM	0.2 mM	0,025 U/μl	1X	50 μg	25 μl
<i>exoS</i>	0,2 μM	1.75 mM	0.2 mM	0,025 U/μl	1X	50 μg	25 μl
<i>pvdA</i>	0,2 μM	2.5 mM	0.2 mM	0,025 U/μl	1X	50 μg	25 μl
<i>lasI</i>	0,2 μM	2,5 mM	0,2 mM	0,025 U/μl	1X	50 ng	50 μl
<i>lasR</i>	0,2 μM	2,5 mM	0,2 mM	0,025 U/μl	1X	50 ng	50 μl
<i>rhlI</i>	0,2 μM	2,5 mM	0,2 mM	0,025 U/μl	1X	50 ng	50 μl
<i>rhlR</i>	0,2 μM	2,5 mM	0,2 mM	0,025 U/μl	1X	50 ng	50 μl

Tulpinile de *Ps. aeruginosa* au demonstrat abilitatea de a produce un adevarat cocktail de coenzime și toxine formatoare de pori, generând atât colonii nepigmentate, cât și producătoare de piocianina (pigment albastru-verde), pioverdina (pigment galben fluorescent) sau, în număr mai redus pigmentul brun (piorubina). Analiza rezultatelor PCR pentru detectarea prezentei genelor ce codifică 12 dintre cei mai importanți factori de virulență implicați în patogenizarea infecțiilor cu *Ps. aeruginosa*, a arătat că toate tulpinile de *Ps. aeruginosa* analizate posedă gene ce codifică prezența genelor *lasB*, *aprA* și *TCR*, ce codifică treiproteaze (elastaza, proteaza alcalină și proteaza IV) și trei proteine solubile implicate în invazia tisulară: două fosfolipaze C – fosfolipaza hemolitică (*haemolytic phospholipase C [PLC-H]*), fosfolipaza nehemolitică (*non-haemolytic phospholipase C [PLC-N]*), ramnolipidul (*rhlAB*). Majoritatea tulpinilor studiate posedă toxina ExoT, gena pentru pioverdina și pentru alginat. Toate tulpinile de *Ps. aeruginosa* studiate prezintă genele pentru cele două sisteme de semnalizare intercelulară implicate în reglarea expresiei factorilor de virulență: *lasI*, *lasR*, *rhlI* și *rhlR*, asadar nu s-a reușit pînă în prezent identificarea unei tulpini defective pentru genele de quorum sensing, necesară experimentelor ulterioare, motiv pentru care procedura de selecție va fi extinsă asupra unui număr mai mare de tulpini.

Din tulpinile de *P. Aeruginosa* analizate s-au obținut supernatantele sterile, prin nanofiltrarea culturilor de diferite varste pentru concentrarea micromoleculor de semnalizare pentru stabilirea influenței pe care aceste molecule o exercită asupra creșterii și expresiei factorilor de virulență solubili la tulpinile de *Ps. aeruginosa* omoloage dupa cultivarea acestora in mediu lichid suplimentat cu diferite concentratii ale supernatantelor nanofiltrate. S-a observat ca nanofiltratele provenite din culturi in faza de crestere stationara (24 de ore) inhiba rata de multiplicare a tulpinilor omoloage si modifica expresia unor factori de virulenta, ceea ce demonstreaza interferenta acestora cu sistemele de reglare bazate pe mecanismul de quorum sensing. Aceste nanofiltrate vor fi utilizate ca surse de molecule de semnalizare prin quorum sensing in experimentele urmatoare de inoculare pe diferite linii de *Drosophila*.

Ne-am propus de asemenea stabilirea de conditii de lucru standardizate si optimizarea protocoalelor de inoculare a unor linii normale si mutante de *Drosophila melanogaster* (musculita de fructe) cu cantitati controlate de *P. aeruginosa* ATCC 27853, caracterizata in prealabil prin metode fenotipice si moleculare pentru producerea de factori de virulenta. Conform rezultatelor obtinute, aceasta tulpina produce toate toxinele formatoare de pori testate (hemolizine, lecitinaze, lipaze, esta slab pigmentata, posedea genele de virulenta lasB, rhlAB, aprA, plcH, plcN, exoS si exoT si toate cele 4 gene QS.

S-a optat pentru tulpina de referinta, si nu pentru o tulpina foarte virulenta, cunoscuta fiind sensibilitatea deosebita pe care o are *D. melanogaster* la infectiile cu *P. aeruginosa* (D'Argenio si colab., 2001).

Pentru cresterea liniilor de *D. melanogaster* utilizate in experimentele descrise in continuare a fost utilizat un mediu de cultura nou, pe baza de malai, melasa, agar si acid propionic, turnat in conditii sterile in sticlute care au fost autoclavate in prealabil. Liniile respective au fost crescute in incubator la o temperatura relativ constanta de 25°C ($\pm 5^\circ\text{C}$).

Au fost utilizate trei linii de *D. melanogaster*, dupa cum urmeaza: linia control (de tip salbatic) Oregon si doua linii mutante, *l(3)S057302* si *Def14*. Cele doua linii mutante contin alelele mutante $\gamma\text{Cop}^{l(3)S057302}$ si respectiv γCop^{14a} , care afecteaza functionarea normala a genei *gammaCop*. Gena *gammaCop* are efect pleiotrop, iar una dintre functiile in care aceasta este implicata este modularea raspunsului imun (Cherry, 2008; Cronin si colab., 2009).

Primele experimente au vizat stabilirea unui protocol optim de infectare a indivizilor de *D. melanogaster* cu tulpina bacteriana etalon, folosind **metoda prin ingesta (hranire)**, care simuleaza o infectie cronica (Mulcahy si colab., 2011), spre deosebire de metoda prin ranire, care este foarte invaziva si simuleaza infectii acute.

Experimentele pilot initiale au fost efectuate folosind liniile Oregon si *Def14* au indicat faptul ca numarul de indivizi/varianta experimentală trebuie sa fie relativ mare (≥ 20) si ca doua densitati bacteriene relativ apropiate, de $4,5 \times 10^9$ UFC (unitati fondatoare de colonii) si respectiv de 9×10^9 UFC, au generat raspunsuri fiziologice aproape identice. Mai mult, incarcaturile bacteriene relative/individ nu au fost foarte diferite atunci cand am comparat indivizii hraniti pe hartii de filtru cu incarcaturi bacteriene distincte.

Tinand cont de rezultatele testelor initiale, s-a realizat un nou experiment, in care s-a urmarit inocularea de *D. melanogaster* apartinand la trei linii distincte din punct de vedere genetic: Oregon, *l(3)S057302* si *Def14*. Pentru fiecare linie in parte am selectat cate doua grupuri distincte de cate 30 de indivizi pentru fiecare sex (doua replici biologice pentru fiecare sex) atat pentru variantele de control, cat si pentru variantele experimentale (supuse inocularii). Astfel, am selectat cate 240 de indivizi pentru fiecare linie luata in studiu: (2X30 masculi control) + (2X30 masculi experiment) + (2X30 femele control) + (2X30 femele experiment) = 240. Fiecare grup

de indivizi a fost tratat individual, ca o replica biologica. Dupa ce au fost selectate corespunzator, prin recoltarea de indivizi adulti cu varsta cuprinsa intre 2-7 zile, recipientele fara mediu de cultura in care a fost transferat fiecare grup au fost incubate 25°C pentru 5 ore, in vederea infometarii musculitelor.

In paralel, intr-o alta serie de recipiente cu 5 ml dintr-un amestec de sucroza 5% si agar 2,4%, au fost plasate discuri de hartie de filtru cu diametrul recipientului, imbinate pentru grupurile control cu cate 200 µl de solutie sucroza 5%, iar pentru grupurile experiment cu cate 230 µl de solutie de sucroza 5% continind ~ 9 x 10⁹ UFC/ml (cu o densitate corespunzatoare standardului 10MacFarland).

Dupa perioada de infometare (5ore), musculitele au fost transferate in sticlutele cu hartie de filtru, au fost plasate in incubator la 25°C si lasate sa se hraneasca timp de 48 de ore. Dupa acest interval, care a fost numit interval de ingesta, din fiecare grup s-au selectat cate trei indivizi (echivalentul a trei replici tehnice) pentru a fi folositi la insamantarea placutelor cu mediu selectiv pe baza de Cetrimid. Au fost stabilite ratele de mortalitate pentru fiecare grup, iar indivizii viabili au fost transferati pe mediu proaspat, pe baza de malai si melasa. Acestia au fost urmariti timp de 96 de ore post-ingesta, fiind cuantificat numarul indivizilor care au murit la intervale de 24 de ore (Tabelul 3).

Indivizii selectati pentru insamantarea placutelor cu mediu pe baza de Cetrimid au fost mojarati individual in 200 µl de apa fiziologica sterile, iar pentru fiecare mojarat s-au realizat o serie de dilutii binare (0,5; 0,25; 0,125). Dupa 18 h de incubare la 37°C, au fost numarate coloniile de *P. aeruginosa* dezvoltate. Incarcatura bacteriana relativa a fost mai mare pentru indivizii Oregon comparativ cu cei mutanti, indiferent ca au fost derivate din masculi sau din femele. Acest rezultat este similar cu cel obtinut in experimentele pilot desfasurate anterior. Analiza cantitativa a microbiotei totale utilizand medii neselective indica faptul ca indiferent de linia testata, incarcatura microbiana totala a indivizilor de control netratati este mai redusa comparativ cu cea a indivizilor care au ingerat *P. aeruginosa* (Fig. 1).

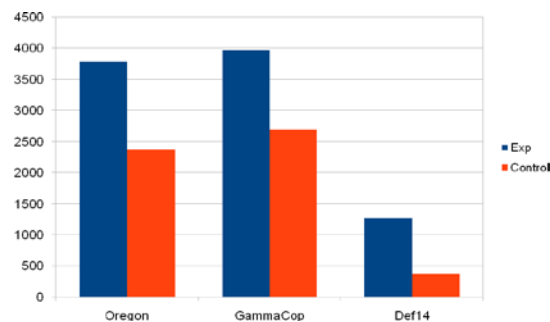


Fig 1. reprezentarea comparativa a nivelului cantitativ al microbiotei totale a indivizilor apartinand la diferite linii in conditii de control si dupa infectia cu *P. aeruginosa*

In plus, rezultatele preliminare sugereaza faptul ca incarcatura bacteriana relativa derivata de la masculii mutanti este mai mica decat cea derivata de la femelele mutante. Acest lucru s-ar putea corela cu talia mai mare a femelelor de *D. melanogaster* comparativ cu cea a masculilor.

Analiza viabilitatii musculitelor infectate cu *P. aeruginosa* a evidentiat diferente fiziologice semnificative statistic ($p < 0,05$) intre grupurile control si cele care au ingerat bacteria (Tabelul 3). Datele analizate statistic (testul *unpaired t test cu corectie Welch*, cu ajutorul softului specific *InStat (GraphPad.com)*), dupa perioada de ingesta de 48 de ore si dupa 96 de ore post-ingesta (144 de ore dupa expunerea initiala la infectie). In ceea ce priveste existenta unor

diferente semnificative statistic la nivelul mortalitatii globale a fiecarei linii mutante versus linia de tip slabatic *Oregon*, testul *Fischer* nu a furnizat rezultate semnificative statistic ($p > 0,05$). Intrucat, paradoxal, indivizii *Oregon* au o mortalitate relativa mai mare decat a mutantilor, atat in cazul controlului negativ cat si in cazul sticlutelor cu indivizi inoculati cu *P.aeruginosa*, impune atat repetarea experimentelor cat si utilizarea in paralel a altor linii de tip slabatic drept etalon.

Tabelul 3. Numarul **indivizilor morti** intr-o anumita etapa de expunere la solutie sucroza 5% fara (control) sau cu incarcatura bacteriana de 9×10^9 UFC de *P. aeruginosa* (experiment) intr-o anumita varianta experimentală considerata.

Varianta	Periada ingesta	Perioada post-ingesta	Total expunere	Varianta	Periada ingesta	Perioada post-ingesta	Total
Or.c1m	3	6	9	Or.e1m	18	7	25
Or.c2m	2	5	7	Or.e2m	12	9	21
Or.c1f	0	2	2	Or.e1f	9	9	18
Or.c2f	5	5	10	Or.e2f	19	3	22
γ C.c1m	1	0	1	γ C.e1m	10	4	14
γ C.c2m	1	0	1	γ C.e2m	8	2	10
γ C.c1f	1	0	1	γ C.e1f	9	1	10
γ C.c2f	2	1	3	γ C.e2f	6	3	9
D14.c1m	0	1	1	D14.e1m	5	3	8
D14.c2m	2	3	5	D14.e2m	8	3	11
D14.c1f	2	1	3	D14.e1f	8	2	10
D14.c2f	3	0	3	D14.e2f	5	4	9

Or.c1m = *Oregon* control 1, masculi; f = femela; γ C = *l(3)S057302*; D14 = *Def14*; e = experiment (adica indivizi care au ingerat bacterii).

In concluzie, protocolul de inoculare cu *P.aeruginosa* ATCC 27853 al indivizilor de *D.melanogaster* este fezabil, ceea ce permite utilizarea acestuia, cu eventuale imbunatatiri, in experimente cu linii de tip slabatic si mutant, in vederea identificarii prin tehnica *microarray* a genelor din genomul de *D.melanogaster* care sufera modificari semnificative ale nivelului de expresiei genice in urma infectiei cu aceasta bacterie.

Bibliografie selectiva

1. Chifiriuc MC, Banu O, Bleotu C, Lazar V. (2011). Interaction of bacteria isolated from clinical biofilms with cardiovascular prosthetic devices and eukaryotic cells. *Anaerobe* (1xxx3)
2. Limban C., Marutescu M., Chifiriuc MC. (2011) Synthesis, Spectroscopic Properties and Antipathogenic Activity of New Thiourea Derivatives *Molecules* 16(9): 7593-7607
3. Cotar A., Chifiriuc M.C., Dinu S., Bucur M., Iordache C., Banu O., Dracea O., Larion C., Lazar V. (2010). Screening of Molecular Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Infections *Int. J. Mol. Sci.* 11(12): 5273-5291
4. Cherry, S. (2008). Genomic RNAi screening in *Drosophila* S2 cells: What have we learned about host-pathogen interactions?, *Curr Opin Microbiol.* 11(3): 262–270.
5. Cronin, S. J. F., Nehme, N. T., Limmer, S., Liegeois, S., Pospisilik, J. A., Schramek, D., Leibbrandt, A., Simoes, R., Gruber, S., Puc, U., Ebersberger, I., Zoranovic, T., Neely, G. G., Haeseler, A., Ferrandon, D., Penninger, J. M. (2009). Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science*, Vol. 325. no. 5938, 340 – 343.
6. D'Argenio, D. A., Gallagher, L. A., Berg, C.A., Manoil, C. (2001). *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol*, 183: 1466–1471.
7. Mulcahy, H., Sibley, C. D., Surette, M. G., Lewenza, S. (2011). *Drosophila melanogaster* as an animal model for the study of *pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in vivo. *PLoS Pathog.*, 7(10):1-14 e1002299 (Epub 2011 Oct 6).