

SINTEZA LUCRARILOR

FAZA II

Studiul comparativ al microbiotei comensale a indivizilor masculi de *Drosophila melanogaster* apartinand la diferite genotipuri in scopul stabilirii conditiilor optime de cultivare, in vederea obtinerii unei populatii cat mai omogene pentru realizarea experimentelor de *microarray*.

Variatia microbiotei comensale cultivabile intre indivizii masculi de *D. melanogaster* care au diferite genotipuri a fost estimata conform protocolului descris anterior si este ilustrata in figura 1.

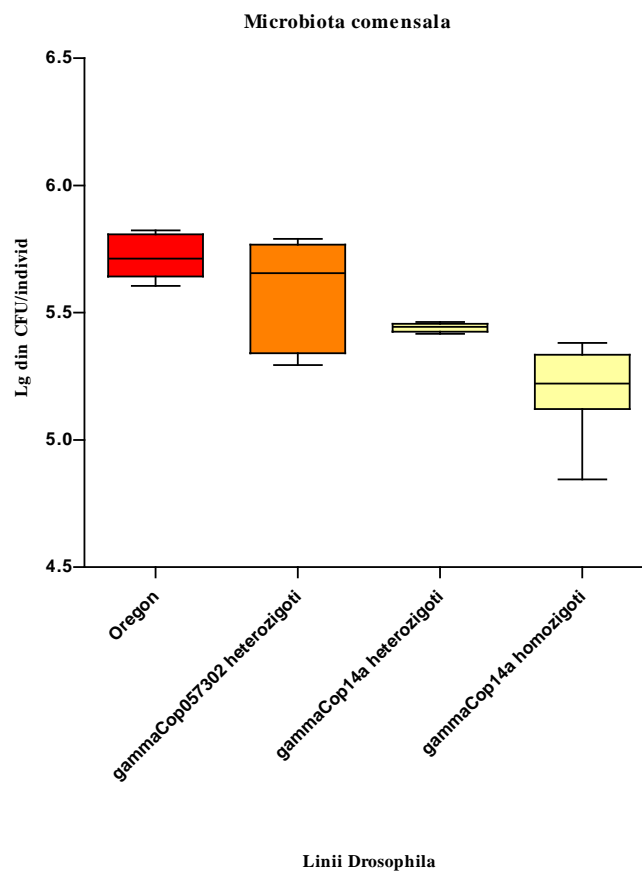


Fig.. 1. Nivelul microbiotei cultivabile la indivizii de *D. melanogaster* apartinand la diferite linii genetice

Analiza statistica (GraphPad) aratat ca masculii homozigoti $\gamma Cop14a$, contin microbiota cultivabila cel mai slab reprezentata (in medie 1.66×10^5 UFC/individ), diferentele fiind semnificative statistic fata de masculii heterozigoti $\gamma Cop14a$ (in medie 2.76×10^5 UFC/individ), masculii heterozigoti *gammaCop057302* (in medie 4.19×10^5 UFC/individ) si masculii *Oregon* (in medie 5.27×10^5 UFC/individ).

De asemenea, au fost observate diferente semnificative intre masculii heterozigoti *Oregon* si cei γ Cop14a, dar nu si intre masculii *Oregon* si masculii heterozigoti γ Cop057302 sau intre masculii heterozigoti γ Cop057302 si masculii heterozigoti γ Cop14a.

Evaluarea prin *microarray* a profilurilor de expresie genica a diferitelor linii de *D. melanogaster* infectate cu *P. aeruginosa*

In vederea realizarii experimentelor de *microarray*, au fost sincronizate mai multe culturi de *D. melanogaster* pentru a putea colecta indivizi cu varsta relativ uniforma. Experimentul de inoculare prin ingestie s-a desfasurat conform protocolului dezvoltat in cadrul fazei I a proiectului. In acest scop, grupuri de cate 25-27 de masculi cu acelasi genotip au fost mentinute timp de aproximativ 63 de ore in tuburi sterile de plastic cu diametrul de 2,6 cm in care au fost plasate discuri sterile de hartie deasupra unui strat subtire de mediu format din agar (2,4%) si sucroza (5%). Pentru grupurile control discurile de hartie au fost imbibate cu 231 μ l de solutie sucroza 5%, iar pentru grupurile de ingesta cu 231 μ l suspensie bacteriana in solutie de sucroza 5%, cu o densitate de aproximativ 9×10^9 UFC, corespunzatoare standardului 1 MacFrland, obtinuta prin prelucrarea unor suspensii bacteriene primare de *P. aeruginosa* (tulpina de referinta ATCC 27853).

Consecutiv intervalului de ingesta, cate 25 de indivizi (echivalentul unei replici biologice) din acelasi grup experimental au fost distribuiti in tuburi Eppendorf de 1,5 ml cu 300 μ l TRIzol; tuburile fiind fost depozitate la temperatura de -70°C . Au fost selectate 20 de replici biologice pentru masculii *Oregon* si cate patru replici biologice pentru celelalte categorii de masculi (tabelul 1).

Tabelul 1. Caracterizarea probelor analizate prin *microarray*.

Nr. proba	Grup experimental	Genotip	Stadiul de dezvoltare	Tesut	Cantitate tesut	Cant. ARN estimata	Masa tesut	Volum TRIzol
1-20	♂ Oregon Ctr. 1-20	Wild-type Oregon	Adult	Corp intreg	25 masculi	50 μ g	6.25 mg	300 μ l
21-24	♂ 14/14 Tratat 1-4	w; γ Cop14a alela mutanta in conditie homozigota	Adult	Corp intreg	25 masculi	50 μ g	6.25 mg	300 μ l
25-28	♂ 057302/Tb Tratat 1-4	w; γ CopS057302/TM6B, Tb	Adult	Corp intreg	25 masculi	50 μ g	6.25 mg	300 μ l
29-32	♂ Oregon Tratat 1-4	Wild-type Oregon	Adult	Corp intreg	25 masculi	50 μ g	6.25 mg	300 μ l
33-36	♂ 14/14 Netratat 1-4	w; γ Cop14a alela mutanta in conditie homozigota	Adult	Corp intreg	25 masculi	50 μ g	6.25 mg	300 μ l
37-40	♂ 057302/Tb Netratat 1-4	w; γ CopS057302/TM6B,	Adult	Corp intreg	25 masculi	50 μ g	6.25 mg	300 μ l

		Tb						
--	--	----	--	--	--	--	--	--

Probele suspendate in TRIzol au fost analizate prin *microarray* de catre FlyChip (Cambridge Systems Biology Centre, Cambridge, UK), fiind evaluat nivelul de expresie al tuturor genelor din genomul de *D. melanogaster* (aproximativ 14437 de gene) in fiecare replica biologica.

In urma acestor experimente de analiza a transcriptomului a fost evidentiat modul in care variaza nivelul de expresie al tuturor genelor in indivizii mutanti, tratati sau netratati, comparativ cu indivizii control din linia etalon (*wild-type*) Oregon.

In functie de stringenta criteriilor statistice folosite pentru selectarea anumitor gene sau grupuri de gene pentru care au fost observate variatii ale nivelului de expresie intre indivizii tratati cu *P. aeruginosa* si cei netratati, poate fi selectat un numar variabil de gene candidat pentru investigatii suplimentare.

De exemplu, urmarind modul in care variaza nivelul de expresie la masculi Oregon tratati comparative cu masculi Oregon netratati, considerand pentru selectie doar genele care au prezentat la masculii tratati un nivel de expresie de ± 2 comparativ cu masculii netratati, iar $P \leq 0,01$ (prag de relevanta statistica foarte ridicat), au fost identificate 13 gene candidat (tabelul 2).

Tabelul 2. Gene de *D. melanogaster* pentru care s-a obtinut un nivel de expresie modificat semnificativ dupa infectia cu *P. aeruginosa* la indivizi Oregon.

Gene de la <i>Drosophila melanogaster</i>	Nivelul modificarilor (Oregon tratat vs. Oregon Ctr)	Valoare P	Gene ortoloage umane
Gbeta76C (CG8770)	Supraexprimat 2.4256	0.00019	-
CR41602,CR40596,CR41540,CR41619,CR40560	Subexprimat 2.0484	0.00086	-
CG9468	Subexprimat 2.1011	0.0072	MAN2B1 (mannosidase)
retinin (CG13057)	Subexprimat 2.3471	1e-05	-
mag (CG5932)	Subexprimat 2.1966	1e-05	LIPA, LIPK, LIPM, LIPF, LIPJ, LIPN (lipase)
Arr2 (CG5962)	Subexprimat 4.8385	1e-05	ARRB1, ARRB2, ARRB3, SAG (arrestin)
inaF-B, inaF-D (CG42447, CG42563)	Subexprimat 2.6175	1.716e-05	-
ninaE (CG4550)	Subexprimat 7.4361	2.366e-06	-
CG3699	Supraexprimat 2.0826	5.563e-05	-
Rtp (CG10233)	Subexprimat 2.0984	7.707e-05	MORN4
CG31343	Subexprimat 2.0578	9.251e-05	-
CG12374	Subexprimat 2.3385	0.01	CPA6, CPB2, CPO, CPA3, CPA5, CPA2, CPA4, CPB1 (carboxypeptidase)
trpl* (CG18345)	Subexprimat 1.8941	1.192e-05	TRPC4, TRPC5, TRPC1 (transient receptor potential cation channel)

Unele dintre genele evidentiate in tabelul 2 au ortologi umani, acestea din urma urmand a fi studiate in fazele ulterioare ale proiectului, in ceea ce priveste nivelul de expresie al acestora in celule umane, in vederea elucidarii rolului acestora in cursul unor infectii cu bacterii patogene in general si cu *P. aeruginosa* in particular.

Validarea prin qRT-PCR a rezultatelor obtinute prin *microarray* pentru diferite gene de interes

Pentru aceasta a fost realizat *design*-ul a 26 de perechi de primeri care se leaga specific de 25 de tipuri de ADNc (complementar), fiecare tip de ADNc reflectand nivelul de expresie al unei anumite gene.

Acesti primeri au fost simbolizati dupa cum urmeaza: qRT-AttD_F (1); qRT-AttD_R (2); qRT-Bace_F (3); qRT-Bace_R (4); qRT-CG6188_F (5); qRT-CG6188_R (6); qRT-CG9466_F (7); qRT-CG9466_R (8); qRT-CG9468_F (9); qRT-CG9468_R (10); qRT-CG13624_F (11); qRT-CG13624_R (12); qRT-CG18585_F (13); qRT-CG18585_R (14); qRT-Hsromega_F (15); qRT-Hsromega_R (16); qRT-inaF-B_F (17); qRT-inaF-B_R (18); qRT-inaF-D_F (19); qRT-inaF-D_R (20); qRT-ninaE_F (21); qRT-ninaE_R (22); qRT-rtp_F (23); qRT-rtp_R (24); qRT-Syt4_F (25); qRT-Syt4_R (26); qRT-TotA_F (27); qRT-TotA_R (28); qRT-TotC_F (29); qRT-TotC_R (30); qRT-trp_Fa (31); qRT-trp_Ra (32); qRT-trp_Fb (33); qRT-trp_Rb (34); qRT-trpl_F (35); qRT-trpl_R (36); qRT-zetaTry_F (37); qRT-zetaTry_R (38); qRT-AttB_F (39); qRT-AttB_R (40); qRT-AttC_F (41); qRT-AttC_R (42); qRT-CecA2_F (43); qRT-CecA2_R (44); qRT-Dpt_F (45); qRT-Dpt_R (46); qRT-DptB_F (47); qRT-DptB_R (48); qRT-Dro_F (49); qRT-Dro_R (50); qRT-Relish_F (51); qRT-Relish_R (52).

Specificitatea de legare a acestor primeri a fost testata folosind o matrita ADNc obtinuta de la indivizi din linia *Oregon*. Pentru reactia qRT-PCR au fost folosite conditii de amplificare similar cu cele care vor fi utilizate in experimentele de qRT-PCR propriu-zise, respective o cantitate de 50 ng matrita ADNc/reactie si o temperatura de aliniere de 58°C.

Rezultatele obtinute valideaza 25 din cele 26 de perechi de primeri, aceasta din urma fiind testata suplimentar (figura 2).

In paralel cu cei 52 de primeri au fost testati si primeri specifici pentru gena *gammaCop* si cei specifici pentru controlul endogen (gena *RpL32*), pentru a putea determina daca eficientele relative ale acestor reactii de amplificare sunt asemanatoare.

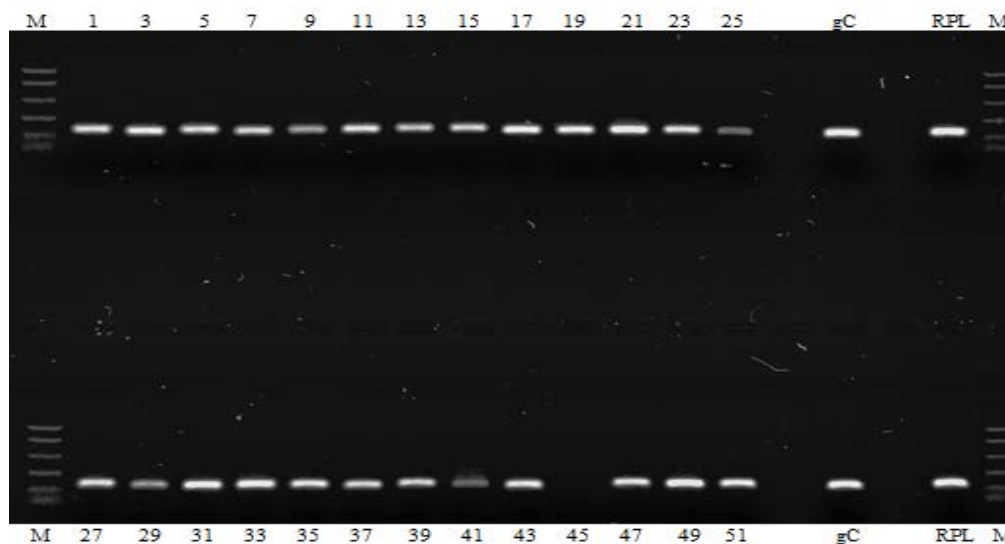


Fig. 2. Randul de sus - migrarea ampliconilor generati de primele 13 perechi de primeri (numarul probei este acelasi cu numarul primerului F din perechea de primeri corespunzatoare) si primerii specifici genei *gammaCop* (gC) si *RpL32* (RPL). Randul de jos - ampliconii corespunzatori celorlalte 13 perechi de

primeri. Perechea 45 (gena *Dpt*) nu a generat niciun amplicon si va fi testata suplimentar, iar perechea 41 (gena *AttC*) determina si ampliconi nespecifici, ceea ce impune optimizarea reactiei. Toti ampliconii au dimensiunea cuprinsa intre 190-210 pb.

Diseminarea rezultatelor

1. Conferinte internationale

Qualitative and quantitative assessment of *Drosophila melanogaster* native microbiota. The 35th International Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease (SOMED). Valencia, Spania, May 15th - 17th, 2012. Al. Ecovoiu, Attila Cristian Ratiu, Ilda Czobor, Mariana Carmen Chifiriuc

Conferinte nationale cu participare internationala

2. *Drosophila melanogaster*, model eucariot pentru studiul interactiilor gazda-parazit in infectii experimentale cu *Pseudomonas aeruginosa*. Conferinta Diaspora 2012. 21-24 Sept. 2012. Alexandru Al. Ecovoiu, Attila Cristian Ratiu, Ilda Czobor, Mariana Carmen Chifiriuc

Articole publicate in reviste ISI care contin rezultate partiale obtinute in cursul activitatilor de cercetare desfasurate in cadrul proiectului Idei 154/2011, si care mentioneaza la Acknowledgements codul proiectului.

- 1.1. Ion Anghel, Carmen Limban, Alexandru M Grumezescu, Alina G Anghel, Coralia Bleotu and Mariana C Chifiriuc, *In vitro* evaluation of anti-pathogenic surface coating nanofluid, obtained by combining Fe₃O₄/C12 nanostructures and 2-((4-ethylphenoxy) methyl)-N-(substituted-phenylcarbamothioyl)-benzamides, *Nanoscale Research Letters* 2012, 7:513, **SRI 1,64**
- 1.2. Carmen Limban, Alexandru Grumezescu, Crina Saviuc, Georgeta Voicu, Carmen Chifiriuc, Optimized anti-pathogenic agents based on core/shell nanostructures and 2-((4-ethylphenoxy) methyl)-N-(substituted-phenylcarbamothioyl)-benzamides, *International Journal of Molecular Science*, 13, 12584-12597, 2012, **SRI- 1,6**
- 1.3. Chifiriuc Carmen Mariana, Alexandru Mihai Grumezescu, Crina Saviuc, Cristina Croitoru, Dan Eduard Mihaiescu, Veronica Lazar, Improved antibacterial activity of cephalosporins loaded in magnetic chitosan microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 436, Issues 1–2, 15 October 2012, Pages 201-205; doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.031, 2012, **SRI- 1,31**
- 1.4. Grumezescu Alexandru Mihai, Ecaterina Andronescu, Anton Ficai, Coralia Bleotu, Dan Eduard Mihaiescu, Mariana Carmen Chifiriuc, Synthesis, characterization and *in vitro* assessment of the magnetic chitosan-carboxymethylcellulose biocomposite interactions with the prokaryotic and eukaryotic cells, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 436 (2012) 771– 777, **SRI 1,31**
- 1.5. Balaure Paul Catalin, Ecaterina Andronescu, Alexandru Mihai Grumezescu*, Anton Ficai, Keng-Shiang Huang, Chih-Hui Yang, Yung-Sheng Lin, Carmen Mariana Chifiriuc, Fabrication, characterization and *in vitro* profile based interaction with eukaryotic and prokaryotic cells of alginate-chitosan-silica biocomposite. *International Journal of Pharmaceutics*, 10.1016/j.ijpharm.2012.10.045, 2012, **SRI- 1,31**
- 1.6. Grumezescu A. M., A. Ficai, D. Ficai, G. Prdean, M. C. Chifiriuc, Polymeric magnetic silica microspheres as a drug loader for antimicrobial delivery substances, *Digest Journal of Nanomaterials and Biosstructures*, Vol. 7, No. 4, October-December 2012, p. 1891-1896.
- 1.7. Mariana C Chifiriuc, Valentina Grumezescu, Alexandru M Grumezescu*, Crina M Saviuc, Veronica Lazar, Ecaterina Andronescu, Hybrid magnetite nanoparticles/Rosmarinus officinalis essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity, *Nanoscale Research Letters*, 2012, 7:209 doi:10.1186/1556-276X-7-209, **SR- 1,64**