

**RAPORT ȘTIINȚIFIC
ETAPA III**

Titlul proiectului: Aspecte transcriptomice ale interacțiunilor gazdă-patogen-antibiotic la *Drosophila melanogaster* infectat cu patogeni ESKAPE

Acronim: TRANSCEND

Număr contract: 96/2022 (PN-III-P4-PCE-2021-1797)

Perioada raportată: 2023-2024

Pagina web a proiectului: <https://unibuc.ro/cercetare/promovarea-rezultatelor-cercetarii/proiecte-de-cercetare/proiecte-cu-finantare-nationala/transcend/?lang=en>

Etapa 3 – Stabilirea semnificației clinice a rezultatelor obținute, pe baza analizei bioinformatică a profilurilor de expresie genică la modelele eucariote și procariote utilizate, în diferite condiții experimentale

1. Obiective prevăzute / realizate

Ob. 3 Stabilirea semnificației clinice a rezultatelor obținute, pe baza analizei bioinformatică a profilurilor de expresie genică la modelele eucariote și procariote utilizate, în diferite condiții experimentale - realizat în totalitate

Act. 3.1 Identificarea genelor eucariote modulate de infecția bacteriană;

Act. 3.2 Identificarea genelor eucariote modulate de administrarea antibioticului;

Act. 3.3 Evidențierea genelor de rezistență la antibiotice cu profiluri modificate de expresie *in vivo* (în prezența/absența antibioticului) *versus in vitro*;

Act. 3.4 Construirea unei hărți genetice pentru ilustrarea relațiilor dintre genele cu profiluri de expresie modificată, potențial implicate în dialogul gazdă-bacterie antibioretistentă-antibiotic;

Act. 3.5 Indicarea genelor ipotetice care pot fi utilizate pentru predicția severității clinice a unei infecții;

Act. 3.6 Descrierea genelor ipotetice care pot prezice eficacitatea și toxicitatea antibioticelor *in vivo*.

Act 3.1 – Identificarea genelor eucariote modulate de infecția bacteriană

Datele rezultate în experimentele de secvențiere a ARN total realizate în cadrul etapei anterioare au fost utilizate pentru a cuantifica efectele infecției cu tulpina bacteriană patogenă multirezistentă de *Klebsiella pneumoniae* BL13 asupra expresiei genice la indivizii masculi de *Drosophila melanogaster* cu genotip *wild-type*, Oregon, și în indivizii cu genotip mutant homozigot $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$. Pentru fiecare dintre cele trei condiții experimentale, respectiv: i) control neinfectat și netratat, ii) infecție timp de 69 ore și iii) infecție timp de 51 ore urmată de tratament cu antibioticele de ultimă intenție COL sau MEM timp de 18 ore, au fost utilizate câte trei replici biologice, fiecare cu câte 50 de masculi. Anterior experimentului de infecție, masculii de *D. melanogaster* au fost înfometaji în sticle sterile timp de 2 ore, după care au fost transferați în tuburi cu mediu minimal (agar bacteriologic 2,4% și sucroză 5% în apă distilată) și un disc de hârtie de filtru sterilă plasat la suprafața mediului. Pe acest disc a fost pipetat un volum de 230 μ L soluție sucroză 5% (control), suspensie bacteriană cu o densitate de $4,5 \times 10^9$ unități formatoare de colonii (UFC) în soluție sucroză 5% (infecție) și soluție de antibiotic de concentrație 32 μ g/mL pentru COL și 256 μ g/mL pentru MEM (infecție și tratament). Pentru fiecare condiție experimentală au fost selectați indivizi pentru evaluarea încărcăturii microbiene, extracție ADN și extracție ARN total. Indivizii selectați au fost imersați în tuburi Eppendorf cu RNAlater (Invitrogen, AM7024).

Extracția ARN total a fost realizată cu kit-ul *Monarch Total RNA Miniprep* (New England Biolabs, T2010S). Volumul eluției finale a fost ajustat la 70 μ L, iar secvențierea ARN total a fost realizată cu tehnologia *long-reads* dezvoltată de Oxford Nanopore Technologies (ONT) pe un secvențiator MinION MK1C. Biblioteca de secvențiere a fost obținută cu kit-ul SQK-RNA002,

pornind de la un mix comun de 3 μL per replică biologică pentru fiecare condiție experimentală secvențiată. Reacția de secvențiere a fost rulată pe un *flow-cell* FLO-MIN106D de generație R9 timp de 24 ore (Tabelul 1).

Tabelul 1. Sumarizarea concentrațiilor obținute în urma extracției ARN total și a pregătirii bibliotecilor de secvențiere, și a rezultatelor generate de reacția de secvențiere. Abrevierile pentru numărul de *read-uri* și numărul de nucleotide secvențiate sunt corespunzătoare unităților de măsură (k = kilo, 10^3 și M = mega, 10^6).

Condiție experimentală	Replica biologică	Concentrație ARN extras	Concentrație <i>input</i> bibliotecă ARN	Concentrație <i>output</i> bibliotecă ARN	Număr de <i>read-uri</i>	Număr de nucleotide secvențiate
Oregon + <i>K. pneumoniae</i>	RB1	124,9 ng/ μL	1010,7 ng	380 ng	24,07 k	34,78 M
	RB2	87,4 ng/ μL				
	RB3	124,6 ng/ μL				
$\gamma\text{COP}^{14a}/\gamma\text{COP}^{14}$ <i>a</i> + <i>K. pneumoniae</i>	RB1	111,2 ng/ μL	873,9 ng	190 ng	33,15 k	43,86 M
	RB2	101,1 ng/ μL				
	RB3	79 ng/ μL				

Datele de secvențiere au fost interpretate cu Dorado (versiunea 0.5.2), o aplicație dedicată secvențierii ONT și rulată în sistemul de operare Linux Mint. Interpretarea semnalelor electrice generate în cadrul secvențierii a fost realizată cu modelul de *basecalling* rna002_70bps_hac@v3. Implementarea unor proceduri bazate pe aplicațiile *minimap2* și *NanoCount* au permis identificarea numărului de transcripti și de gene pentru fiecare condiție experimentală (Tabelul 2).

Tabelul 2. Numărul de transcripti genici și de gene identificate pentru fiecare condiție experimentală secvențiată.

Condiție experimentală	Număr transcripti identificați	Număr gene identificate
Oregon + <i>K. pneumoniae</i>	70	41
$\gamma\text{COP}^{14a}/\gamma\text{COP}^{14a}$ + <i>K. pneumoniae</i>	96	56

Identificarea genelor modulate de infecția bacteriană a fost realizată prin compararea genelor exprimate între toate condiții experimentale. Astfel, utilizând un *script* original de *bash* și o aplicație *online* (Heberle et al., 2015), s-au evidențiat variantele de splicing ale transcriptiilor și respectiv genele aferente exprimate în toate condițiile experimentale (transcripti comuni sau gene comune) și respectiv într-o singură condiție experimentală (transcripti unici sau gene unice) (Figurile 1 și 2).

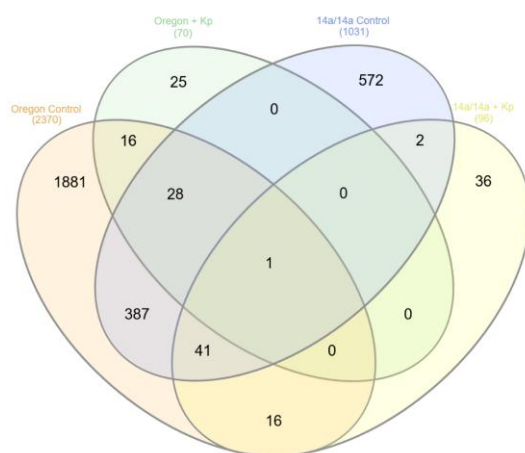


Figura 1. Evaluarea transcripților comuni și specifici identificați în cadrul experimentului de infecție cu *K. pneumoniae*. Grafic obținut cu aplicația InteractiVenn (<https://www.interactivenn.net/>).

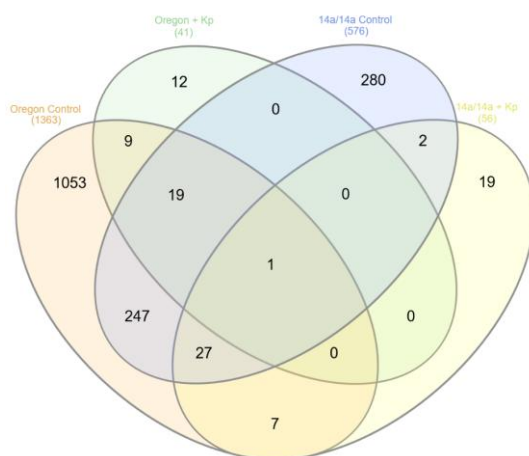


Figura 2. Evaluarea genelor comune și specifice identificate în cadrul experimentului de infecție cu *K. pneumoniae*. Grafic obținut cu aplicația InteractiVenn (<https://www.interactivenn.net/>).

Analiza celor două seturi de date (transcripții alternativi și gene) evidențiază 25 de transcripți unici asociați cu 12 gene unice pentru condiția experimentală Oregon infectat cu *K. pneumoniae*, și 36 de transcripți unici asociați cu 19 gene unice pentru condiția experimentală $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ infectat cu *K. pneumoniae*. Genele unice identificate în urma secvențierii ARN a condițiilor experimentale infectate cu *K. pneumoniae* ar putea fi potențiali modulatori ai răspunsului imun. În cadrul acestui experiment nu a fost identificată nicio genă comună între cele două genotipuri *D. melanogaster* ca urmare a infecției. Această observație sugerează diferențe fundamentale de expresie genică între masculii Oregon și cei $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ induse de infecție.

Pentru condiția experimentală Oregon infectat cu *K. pneumoniae*, genele identificate sunt: *Cytochrome P450 4p3* (*Cyp4p3*), *Cytochrome P450 6d2* (*Cyp6d2*), *gliolectin* (*glec*), *osa*, *Sterol*

regulatory element binding protein (SREBP), Transition protein-like 94D (Tpl94D), Xrp1, CG3198, CG5281, CG12783, CG43057 și CG43638.

Pentru condiția experimentală $\gamma\text{COP}^{14a}/\gamma\text{COP}^{14a}$ infectat cu *K. pneumoniae*, genele identificate sunt: *Acyl-CoA binding protein 3 (Acbp3), Amun, Arginyl-tRNA synthetase (ArgRS), Calnexin 99A (Cnx99A), Chd64, Dehydrogenase/reductase 4 (Dhrs4), Dynein heavy chain at 36C (Dhc36C), ER membrane protein complex subunit 4 (EMC4), HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (HUWE1), myoblast city (mbc), myo-inositol-1-phosphate synthase (Inos), Regulator of cullins 1b (Roc1b), Serpin 77Bc (Spn77Bc), Tetraspanin 29Fb (Tsp29Fb), trivet (trv), CG1902, CG9967, CG31077 și CG45045.*

În cadrul activității 3.1 au fost analizate și datele obținute anterior pentru variantele experimentale: $\gamma\text{COP}^{14a}/\gamma\text{COP}^{14a}$ control și $\gamma\text{COP}^{14a}/\gamma\text{COP}^{14a} + \textit{Enterobacter kobei}$. Pentru identificarea genelor eucariote modulate de infecția bacteriană au fost concepute două scripturi *bash*, disponibile la adresa <https://github.com/DenisaConstantin/directRNAseqAnalysis>. Primul script necesită drept input *read*-urile stocate în fișiere de tip FASTQ și secvențele transcripturilor de referință. În cadrul acestuia, *read*-urile sunt aliniate *versus* transcriptii de referință, cu ajutorul *software*-ului minimap2 (Li, 2018). Ulterior, fișierul SAM rezultat este convertit în fișier BAM, care este sortat și indexat. Rezultatele alinierii sunt interpretate cu ajutorul *tool*-ului NanoCount (Gleeson și colab., 2022), urmând o serie de comenzi *bash* pentru a număra transcriptii și genele identificate. Pentru fiecare fișier cu *read*-uri este realizat automat și controlul calității acestora cu ajutorul *software*-ului NanoPlot (De Coster și Rademakers, 2023). Totuși, în cadrul analizei sunt folosite toate *read*-urile fără a fi stabilit un prag de calitate.

Cel de-al doilea script *bash* realizează comparații între două fișiere furnizate de utilizator. Spre exemplu, într-o primă etapă pentru a putea evidenția genele modulate de infecția cu *E. kobei*, au fost utilizate fișierele ce conțin date despre $\gamma\text{COP}^{14a}/\gamma\text{COP}^{14a}$ control și $\gamma\text{COP}^{14a}/\gamma\text{COP}^{14a} + \textit{E. kobei}$. Acest script generează trei fișiere care conțin: i) transcriptii identificați în mod particular pentru primul grup; ii) transcriptii identificați doar în al doilea grup și iii) transcriptii identificați în comun între cele două grupuri. Analizând transcriptii specifici grupului $\gamma\text{COP}^{14a}/\gamma\text{COP}^{14a} + \textit{E. kobei}$ au fost selectate patru gene (*ben, spin, sip3 și sesB*), pentru care au fost construiți primerii utilizați în experimente de modulare a expresiei genice prin tehnica qRT-PCR în cadrul experimentului de infecție cu *Acinetobacter baumannii*. Grupurile experimentale folosite au fost următoarele: i) grupul control (ingestă cu soluție de sucroză 5%); ii) grupul infectat cu *A. baumannii* (ingestă cu inocul bacterian suspendat în soluție de sucroză); iii) grupul infectat cu *A. baumannii* și tratat cu MEM (MEM).

Concentrațiile de ARN obținute cu ajutorul kit-ului *Monarch® Total RNA Miniprep Kit* (New England Biolabs) măsurate utilizând spectrofotometrul ASP-2680 au avut valori cuprinse între 23,2

și 158 ng/μL.

Reacția de reverstranscriere a fost realizată utilizând kit-ul *GoScript Reverse Transcription System*, Promega. Pentru reacțiile de qRT-PCR a fost utilizat kit-ul *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega), iar pentru fiecare reacție a fost utilizat Master Mix 2X, 20 ng ADNc și 0,16 μM primer *forward* și *reverse*, într-un volum final de 20 μL. Aparatul folosit în această etapă a fost *7500 Applied Biosystems*, iar rezultatele au fost analizate cu software-ul qDATA (Ionașcu și colab., 2023). Programul utilizat pentru amplificare a fost descris anterior.

Pentru acest experiment au fost utilizate toate cele trei replici biologice, iar fiecare replică biologică a fost analizată cu câte trei replici tehnice. Pentru normalizarea reacțiilor a fost folosită endogena *RpL32 (Ribosomal protein L32)*. Genele de interes au fost *Relish* și *dorsal* pentru rolul lor bine cunoscut în răspunsul imun, *ben*, *spin*, *sip3* și *sesB*, identificate în urma experimentului de secvențiere ARN. Gena *ben* face parte din calea de semnalizare Imd, alături de *Relish* (Zhou și colab., 2005). De asemenea, gena *septin interacting protein 3 (sip3)* are rol în reglarea răspunsului imun înăscut, de data aceasta prin calea de semnalizare Toll (Zhu și colab., 2023), dar și în metabolismul proteinelor. Aceasta codifică o proteină transmembranară asociată reticulului endoplasmatic, care promovează degradarea proteozomală a peptidelor pliate greșit (Kang și Ryoo, 2009). Gena *spinster (spin)* este implicată în dezvoltare, transport, răspunsul la stimuli, iar proteina codificată este o proteină transmembranară, cu rol important în calea mTOR (Rong și colab., 2011). Gena *sesB (stress-sensitive B)* este implicată în procese precum transport, dezvoltare și răspuns la diferiți stimuli (Terhzaz și colab., 2010). Aceasta codifică o proteină care mediază transportul moleculelor de ADP în matricea mitocondrială pentru sinteza ATP, dar și exportul moleculelor de ATP (Rikhy și colab., 2003).

În continuare, vom prezenta doar variantele experimentale pentru care s-au obținut rezultate semnificative statistic.

Gena *Relish (Rel)* este subexprimată atât în urma infectării cu *A. baumannii*, cât și în urma tratamentului cu MEM pentru indivizii Oregon (Figura 3A). De asemenea, pentru indivizii cu genotipul $\gamma\text{COPS057302}/+$ (care au fost descriși în raportările anterioare), a fost observată diminuarea expresiei odată cu administrarea MEM (Figura 3B). În schimb, pentru indivizii cu genotipul $\gamma\text{COP}^{14a}/\gamma\text{COP}^{14a}$ gena *Rel* este supra-exprimată comparativ cu grupul control (Figura 3C), atât urma infecției, cât și consecutiv tratamentului.

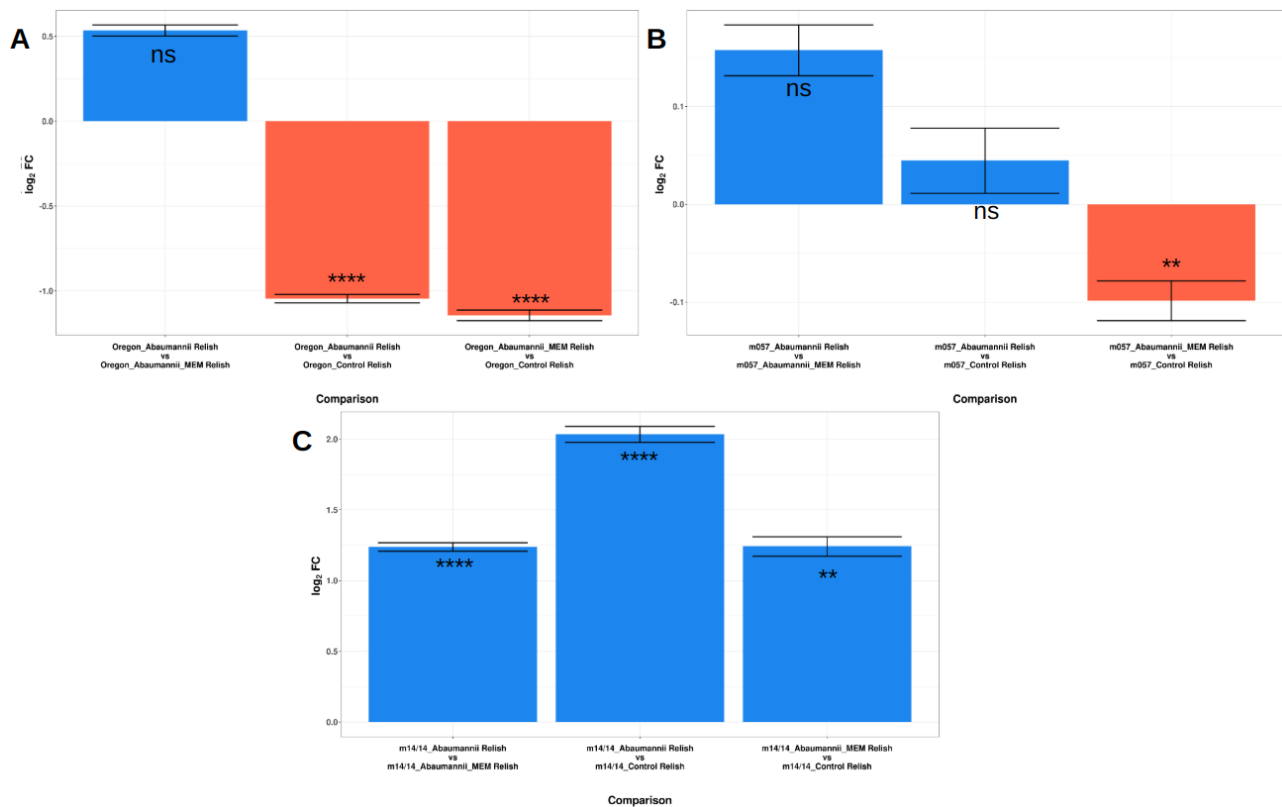


Figura 3. Nivelul de expresie pentru gena de interes *Rel*, la indivizii Oregon (A), γ *COPS057302/+* (B) și γ *COP^{14a}/γCOP^{14a}* (C) (captură de ecran din interfața qDATA).

În cazul genei *Dorsal*, atât pentru indivizii Oregon (Figura 4A), cât și pentru indivizii cu genotipul γ *COPS057302/+* (Figura 4B) a fost evidențiată diminuarea nivelului de expresie atât în urma infectării experimentale, cât și în urma tratamentului administrat. Similar cazului genei *Rel*, gena *Dorsal* este supra-exprimată pentru indivizii cu genotipul γ *COP^{14a}/γCOP^{14a}* infectați cu *A. baumannii*, comparativ cu grupul control, cât și în cadrul grupului tratat cu MEM, comparativ cu grupul control (Figura 4C). Este, de asemenea, a fost observată diminuarea expresiei genei *Dorsal* după administrarea tratamentului.

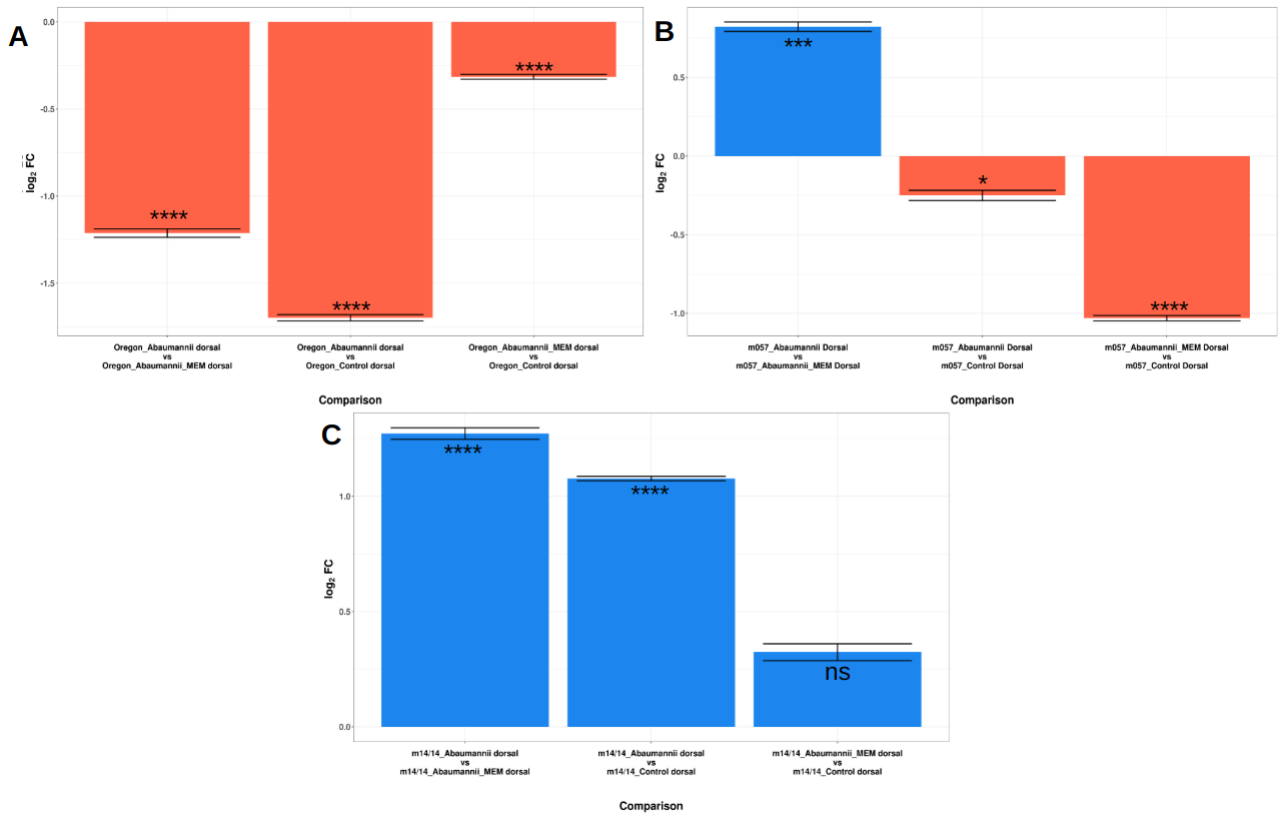
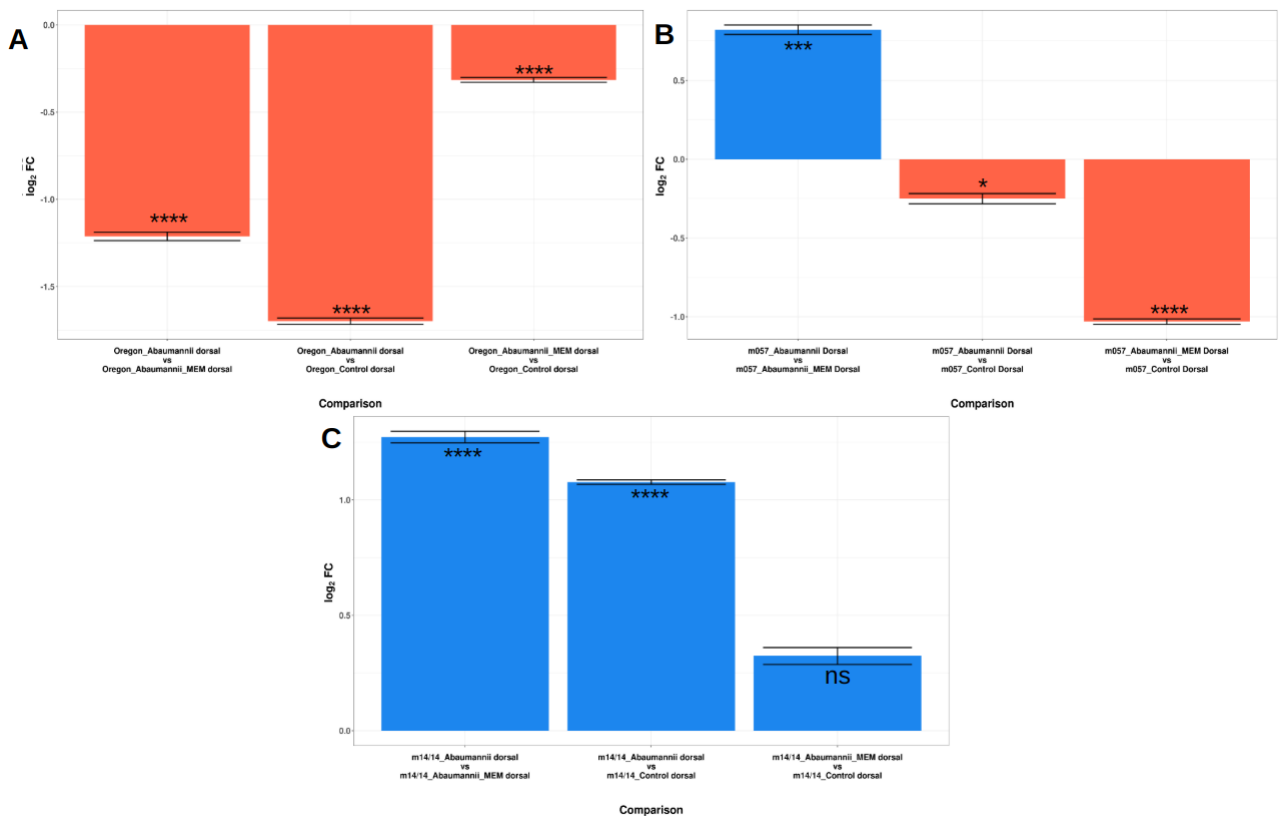


Figura 4. Nivelul de expresie pentru gena de interes *Dorsal*, la indivizii Oregon (A), γ COPS057302/+ (B) și γ COP^{L4a}/ γ COP^{L4a} (C) (aptură de ecran din interfața qDATA).

Gena *ben* este sub-exprimată în cadrul grupurilor infectat și infectat și tratat, comparativ cu



grupul control pentru indivizii Oregon (Figura 5A). Pentru indivizii γ COPS057302/+ infectați și tratați cu MEM a fost observată diminuare expresiei genei *ben*, comparativ cu grupul control (Figura 5B). Gena *ben* este supra-exprimată în urma infecției, dar și în urma tratamentului în cadrul grupurilor formate din indivizi γ COP^{14a}/ γ COP^{14a} (Figura 5C).

Pentru gena *spin*, asemenea genei *ben*, pentru indivizii Oregon (Figura 6A) sau γ COPS057302/+ (Figura 6B) a fost observată diminuare expresiei genice. În schimb, la indivizii γ COP^{14a}/ γ COP^{14a} gena *spin* este supraexprimată atât în urma infecției cu *A. baumannii*, cât și în urma tratamentului cu MEM (Figura 6C).

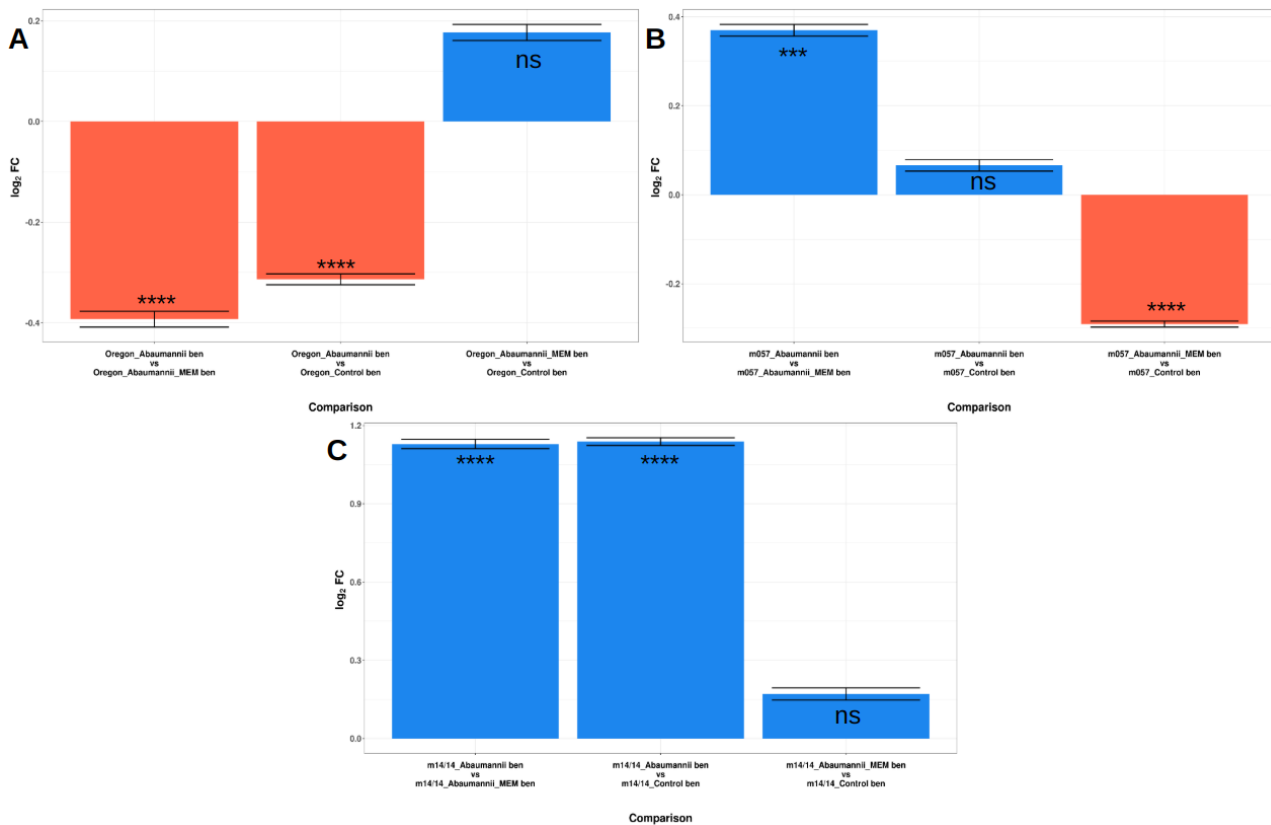


Figura 5. Nivelul de expresie pentru gena de interes *ben*, la indivizii Oregon (A), γ COPS057302/+ (B) și γ COP^{14a}/ γ COP^{14a} (C) (Captură de ecran din interfața qDATA).

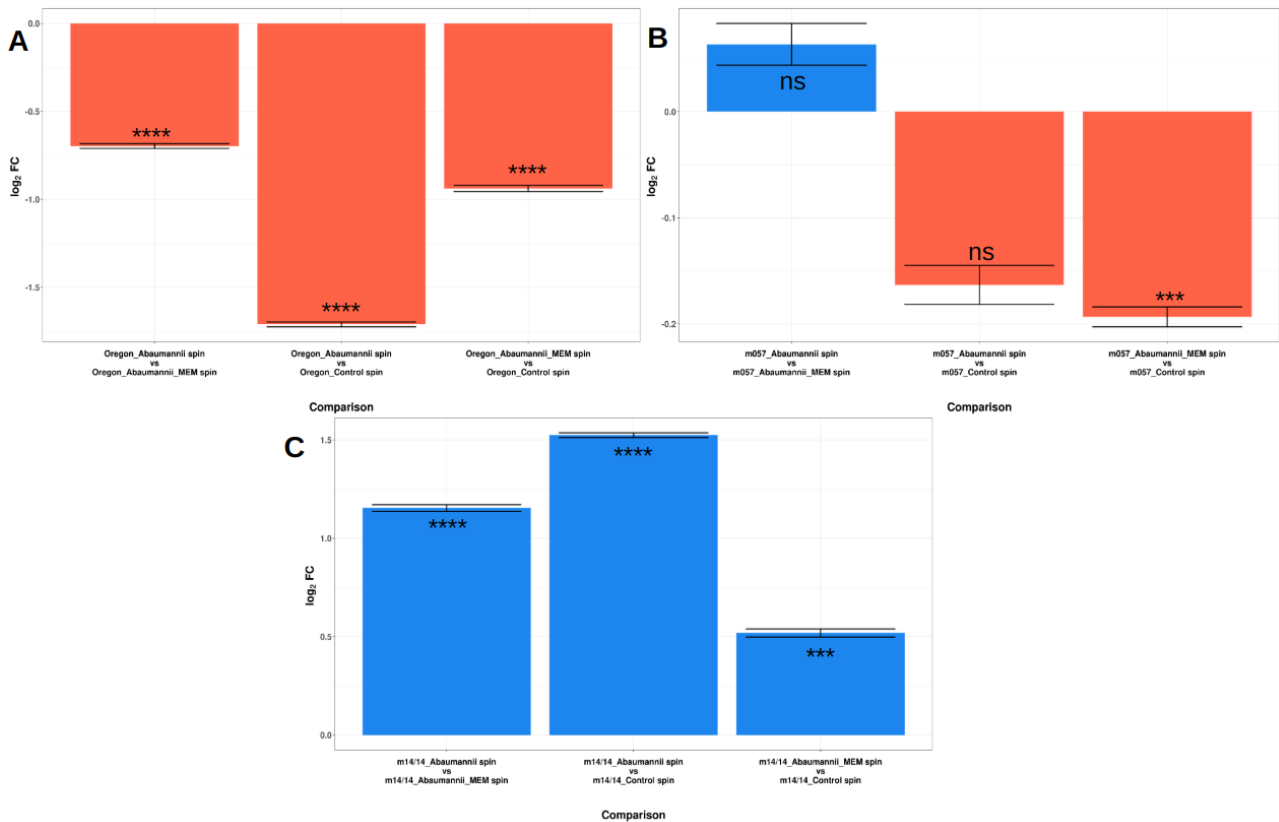


Figura 6. Nivelul pentru gena de interes *spin*, la indivizii Oregon (A), $\gamma COPS057302/+$ (B) și $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ (C) (Captură de ecran din interfața qDATA).

Pentru toate genele analizate în acest raport se poate observa diminuarea nivelului relativ de expresie în cadrul grupurilor formate din indivizi Oregon sau $\gamma COPS057302/+$, spre deosebire de grupurile formate din indivizi $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$, pentru care au fost identificate creșteri ale nivelului de expresie genică.

Pentru indivizii Oregon și $\gamma COPS057302/+$ au fost realizate experimentele de qRT-PCR pentru genele de interes *sesB* și *sip3* (Figurile 7, 8).

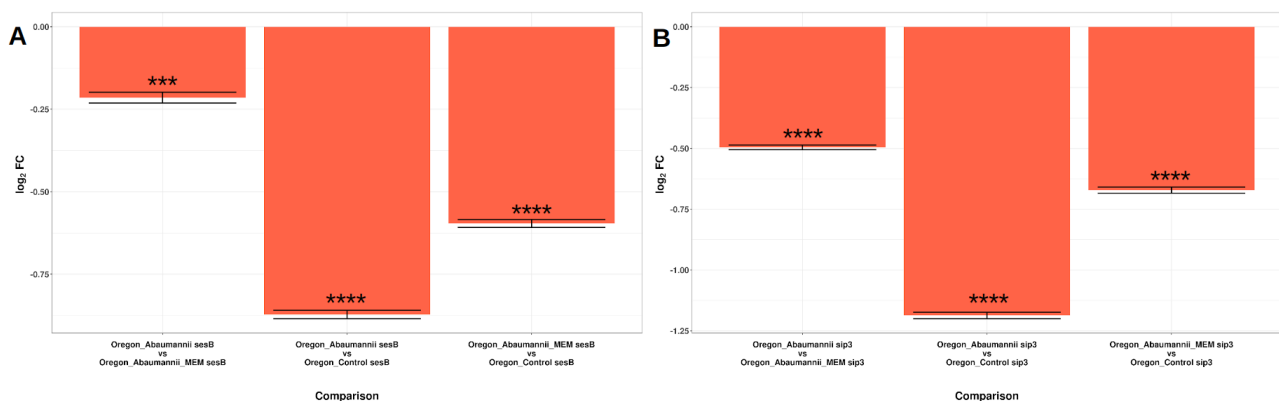


Figura 7. Nivelul de expresie la indivizii Oregon pentru genele de interes *sesB* (A) și *sip3* (B) (captură de ecran din qDATA).

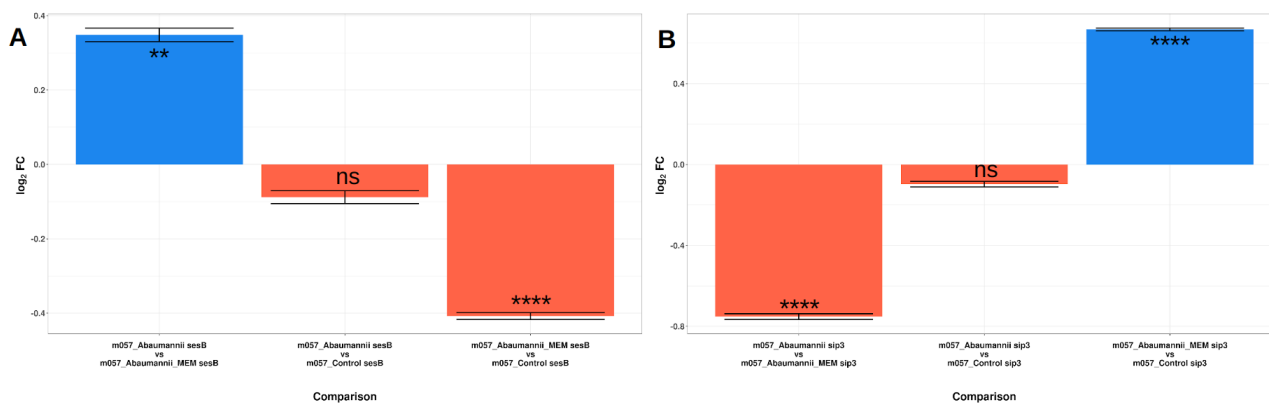


Figura 8. Nivelul de expresie la indivizii $\gamma COP^{S057302/+}$ și genele de interes *sesB* (A) și *sip3* (B) (captură de ecran din qDATA).

În cazul genei *sesB* a fost observată diminuarea expresiei în urma infecției cu *A. baumannii*, atât în cadrul indivizilor Oregon, cât și $\gamma COP^{S057302/+}$. În cazul indivizilor Oregon, în urma administrării MEMului a fost observată o creștere a expresiei, în timp ce pentru indivizii $\gamma COP^{S057302/+}$ se poate observa diminuarea acesteia.

Gena *sip3* a fost subexprimată în cadrul grupurilor formate din indivizi Oregon infectați, dar și în grupul infectați și tratați. Pentru indivizii $\gamma COP^{S057302/+}$ infectați și tratați cu MEM este evidențiată o creștere a expresiei genei *sip3*.

Conform *Student's two-way two sample t test* grupurile formate din indivizi cu genotipul $\gamma COP^{S057302/+}$ infectați cu *A. baumannii* vs $\gamma COP^{S057302/+}$ control nu prezintă semnificație statistică pentru niciuna din cele două gene prezentate, spre deosebire de indivizii $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$, pentru care au fost identificate variații mai ample ale nivelului expresie la genele de interes.

Rezultatele obținute sunt similare cu cele obținute pentru indivizii Oregon infectați cu patogenul *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, la care nu au fost identificate modificări semnificative ale profilurilor de expresie a genelor, spre deosebire de indivizii cu genotipul $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ la care au fost identificate modulare semnificative a expresiei unor gene.

Act 3.2 – Identificarea genelor eucariote modulate de administrarea antibioticului

Identificarea genelor eucariote la indivizii masculi Oregon și $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ modulate de administrarea antibioticului COL (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) timp de 18 ore au fost identificate prin secvențierea ARN total după modelul descris în secțiunea 3.1 (Tabelul 3).

Tabelul 3. Sumarizarea datelor aferente extracției și secvențierii de ARN total. Abrevierile pentru numărul de *read*-uri și numărul de nucleotide secvențiate sunt corespunzătoare unităților de măsură (k = kilo, 10^3 și M = mega, 10^6).

Condiție	Replica	Concentrație	Concentrație	Concentrație	Număr	Număr
----------	---------	--------------	--------------	--------------	-------	-------

experimentală	biologică	ARN extras	input bibliotecă ARN	ouput bibliotecă ARN	read-uri	nucleotide secvențiate
Oregon + COL	RB1	31,8 ng/μL	702,6 ng	320 ng	29,91 k	46,61 M
	RB2	100,3 ng/μL				
	RB3	102,1 ng/μL				
$\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ + COL	RB1	126,4 ng/μL	1022,4 ng	400 ng	71,57 k	91,82 M
	RB2	121,7 ng/μL				
	RB3	92,7 ng/μL				

Rezultatele analizei cantitative a numărului de transcripti și respectiv a genelor corespunzătoare celor două condiții experimentale de interes sunt prezentate în Tabelul 4, iar numărul transcriptiilor și al genelor modulate comune sau unice pentru condițiile experimentale sunt prezentate în Figurile 9 și 10.

Tabelul 4. Numărul de transcriți genici și numărul de gene identificate pentru fiecare condiție experimentală secvențiată.

Condiție experimentală	Număr transcriți identificați	Număr gene identificate
Oregon + COL	330	203
$\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ + COL	1421	817

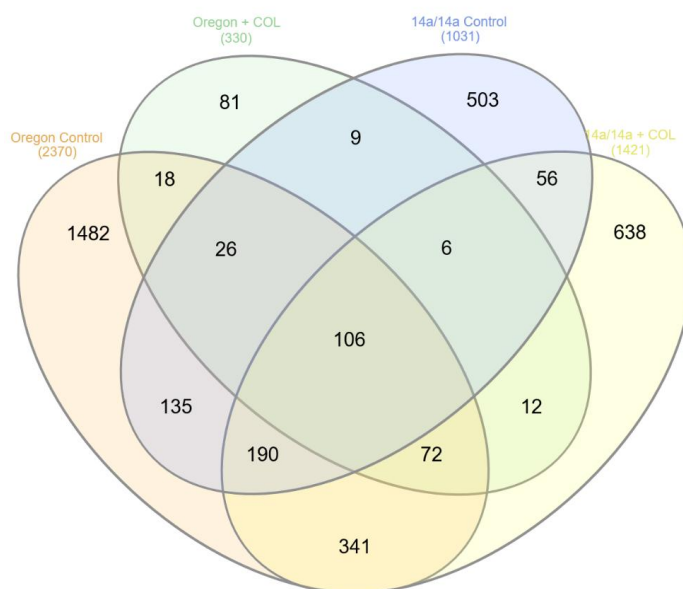


Figura 9. Evaluarea transcriptiilor comuni și specifici identificați în cadrul experimentului de tratament cu COL. Grafic obținut cu aplicația InteractiVenn (<https://www.interactivenn.net/>).

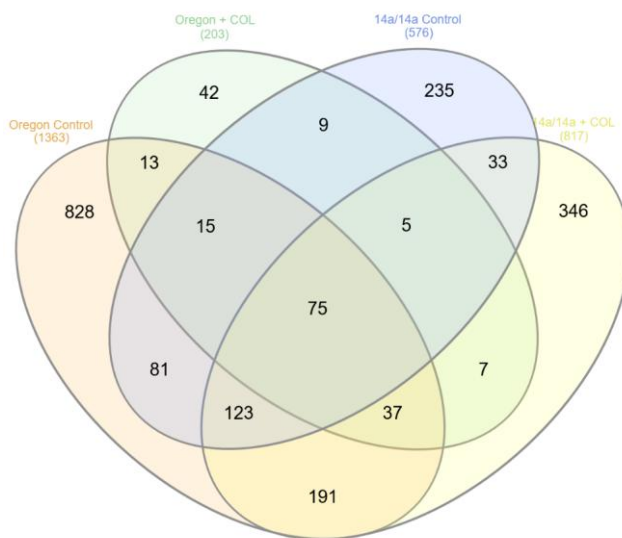


Figura 10. Evaluarea genelor comune și specifice identificate în cadrul experimentului de tratament cu COL. Grafic obținut cu aplicația InteractiVenn (<https://www.interactivenn.net/>).

Analiza datelor a permis identificarea a 42 de gene unice pentru condiția experimentală Oregon tratat cu antibioticul COL și 346 pentru condiția experimentală $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ tratat cu COL. Aceste rezultate indică un răspuns transcripțional mai complex al mutațiilor aflați sub tratament, comparativ cu indivizii etalon aflați în condiții similare de tratament.

Act 3.3 – Evidențierea genelor de rezistență la antibiotice cu profiluri modificate de expresie *in vivo* (în prezența/absența antibioticului) versus *in vitro*

În etapele anterioare ale proiectului a fost monitorizată dinamica populațiilor bacteriene din microbiota cultivabilă a unor categorii specifice de indivizi, Oregon, mutații heterozigoți $\gamma COP^{14a}/+$ și $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$, în diferite condiții experimentale: infecție prin ingestă cu bacterii din grupul ESKAPE; ingesta antibioticelor COL și MEM, administrate împreună sau separat; infecție urmată de tratament cu antibiotice.

Indivizii viabili, colectați distinct pentru fiecare varianta experimentală, au fost triturati și suspensia celulară rezultată a fost inoculată pe medii cromogene suplimentate cu antibiotic, de tip COL-APSE sau mSuperCARBA. În urma acestor evaluări, au fost evidențiate și numărate în primul rând coloniile galbene și verzi rezistente la COL, precum și cele crem, rezistente la MEM. La identificarea cu tehnologia MALDI-TOF coloniile galbene s-au dovedit a fi *Providencia rettgeri*, cele verzi *Serratia marcescens*, iar cele crem *A. baumannii*. Atât *P. rettgeri* cât și *S. marcescens* prezintă rezistență la MEM și sunt izolate din mediul spitalicesc (Liu și colab., 2023, Xu și colab., 2024). Remarcabil, anumiți siderofori secretați de către *S. marcescens* pot stimula creșterea tulpinilor de *A. baumannii* (Eze și colab., 2021; Eze și colab., 2023).

În această etapă a proiectului, s-a realizat de asemenea analiza datelor de infecție experimentală cu *A. baumannii* și tratament cu MEM (Tabelul 5). Atât la masculii Oregon, cât și la cei γ COP14a/ γ COP14a, valorile \log_{10} UFC scad mai mult de jumătate în urma tratamentului cu MEM.

Tabelul 5. Sinteza datelor \log_{10} UFC care corespund evaluării încărcăturii bacteriene a indivizilor Oregon și γ COP14a/ γ COP14a infectați cu *A. baumannii* și, respectiv, infectați și tratați cu MEM.

Indivizi Mediu Experiment	Oregon				γ COP14a/ γ COP14a			
	COL-APSE colonii gal- bene	COL-APSE colonii verzi	mSuperCARBA colonii crem	Total	COL-APSE colonii gal- bene	COL-APSE colonii verzi	mSuperCARBA colonii crem	Total
<i>A. bau- mannii</i>	3,57	4,434	2,541	10,545	3,805	4,889	2,944	11,638
<i>A.baumannii</i> + MEM	0	2,146	2,396	4,542 (43,07%)	2,433	2,831	0	5,264 (45,23%)

În aceeași indivizi de tip control, evaluarea diversității genurilor bacteriene efectuată prin secvențiere ARNr 16S utilizând ONT și, consecutiv, analiza *read*-urilor cu *epi2me*, a evidențiat următoarele aspecte:

- pentru indivizii Oregon, raportul dintre filumurile Proteobacteria (Gram -) și Firmicutes (Gram +) este de 2,193;
- pentru indivizii γ COP14a/ γ COP14a, raportul dintre filumurile Proteobacteria (Gram -) și Firmicutes (Gram +) este mult mai mare, de 8,098.

Aceste rezultate sugerează faptul că în indivizii mutanți este favorizat statusul pro-inflamator, asociat cu predominanța bacteriilor Gram-negative, ceea ce conduce la o creștere a permeabilității intestinale. Totodată, faptul că numărul bacteriilor Gram negative este mai mare la mutații γ COP14a/ γ COP14a favorizează transferul genelor de rezistență pe orizontală și poate cauza diminuarea eficienței tratamentelor cu antibiotice.

În această etapă am utilizat ADN complementar derivat din ARN total provenit de la câte trei replici biologice pentru indivizii Oregon și γ COP14a/ γ COP14a în diferite variante experimentale, inclusiv control, pentru evaluarea nivelului de expresie al genei *OXA-40/24*, specifică tulpini de *A. baumannii* utilizată în experimente. Probele biologice control, infectate și respectiv infectate și tratate cu antibiotic au fost simbolizate după cum urmează:

- pentru indivizii Oregon: Oregon_ctr OXA-40/24, Oregon_Abaumannii OXA-40/24, Oregon_Abaumannii_MEM OXA-40/24;
- pentru indivizii γ COP14a/ γ COP14a: m1414_ctr OXA-40/24, m1414_Abaumannii OXA-40/24, m1414_Abaumannii_MEM OXA-40/24.

Pentru reacțiile qRT-PCR s-a utilizat un protocol dezvoltat în cadrul proiectului. Astfel, *per* reacție, am utilizat *GoTaq qPCR Master mix 2X* (Promega) care conține SYBR Green, 20 ng ADNc *input*/reacție și câte 0,16 μ M primer *forward* și *reverse*, într-un volum final de 21 μ L, la care s-a ajuns

prin completare cu *Nuclease-free water* (Promega). Programul a fost rulat cu un aparat Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Citirea nivelurilor de fluorescență a fost realizată în etapa de elongare, la 72°C.

La indivizii Oregon, indiferent de varianta experimentală, pentru endogenă au fost calculate valori Ct minime de aproximativ 15,2, iar pentru gena țintă valori de aproximativ 30,2. O aceeași tendință a fost observată și pentru γ COP14a/ γ COP14a, unde pentru endogenă valorile Ct au pornit de la 16,5, iar pentru gena țintă de la aproximativ 26,7. Aceasta diferență consistentă dintre valorile Ct corespunzătoare endogenei și respectiv genei țintă, indică faptul că, indiferent de varianta experimentală, la indivizii testați microbiota bazală exprimă endogenă *ARNr 16S*.

Utilizând aplicația qDATA (Ionascu si colab., 2023), am reușit calcularea valorilor *Fold-change* (FC) pentru o serie de comparații realizate între diferite categorii de indivizi și diferite variante experimentale. Deoarece în niciuna dintre probele biologice testate nu am detectat expresia genei OXA-40/24 la indivizii control, aceștia nu au fost considerați pentru analiză cu software-ul qDATA. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figurile 11 și 12.

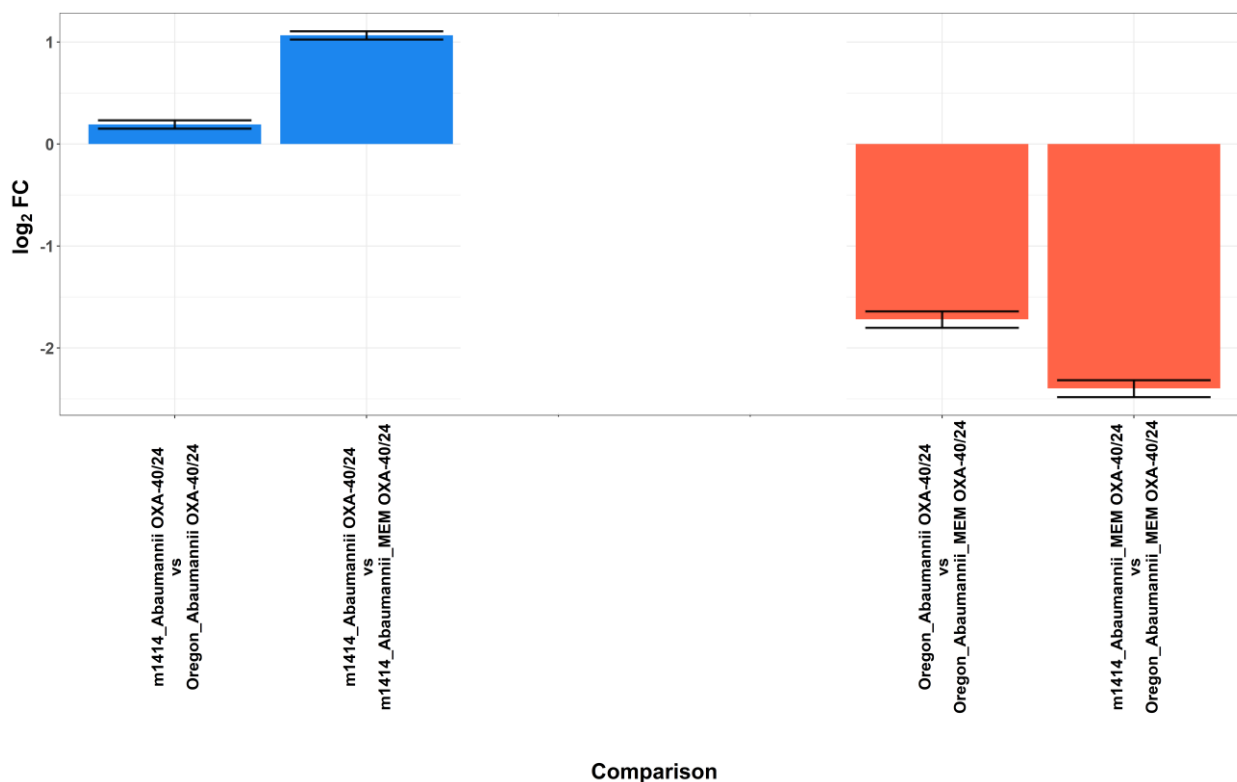


Figura 11. Reprezentarea grafică a valorilor log₂FC calculate pentru variantele experimentale considerate. Graficul este generat și descărcat direct din aplicația qDATA.

Valorile FC efective (Figura 12) indică faptul că gena OXA-40/24 este supraexprimată la indivizii γ COP14a/ γ COP14a infectați, atât comparativ cu indivizii Oregon infectați (FC = 1,143), cât și comparativ cu indivizii γ COP14a/ γ COP14a infectați și ulterior tratați cu MEM (FC = 2,093). La indivizii Oregon infectați a fost observată subexprimarea genei țintă comparativ cu indivizii Oregon infectați și ulterior tratați cu MEM (FC = 0,304), pe când aceeași genă a fost mai puternic subexprimată la indivizii γ COP14a/ γ COP14a infectați și ulterior tratați cu MEM comparativ cu cei Oregon infectați și ulterior tratați cu MEM (FC = 0,19).

Comparison	Type	FC	Median	SD	Variance	SE	CI-lower	CI-upper	IQR	Minimum	Maximum
m1414_Abaumannii OXA-40/24 vs Oregon_Abaumannii OXA-40/24	Up-regulated	1.143	1.015	0.65	0.423	0.033	1.11	1.175	1.033	0.214	3.357
m1414_Abaumannii OXA-40/24 vs m1414_Abaumannii_MEM OXA-40/24	Up-regulated	2.093	1.81	1.179	1.39	0.059	2.034	2.153	1.874	0.378	5.521
Oregon_Abaumannii OXA-40/24 vs Oregon_Abaumannii_MEM OXA-40/24	Down-regulated	0.304	0.167	0.337	0.114	0.017	0.287	0.321	0.144	0.064	1.763
m1414_Abaumannii_MEM OXA-40/24 vs Oregon_Abaumannii_MEM OXA-40/24	Down-regulated	0.19	0.104	0.218	0.048	0.011	0.179	0.201	0.108	0.031	1.04

Figura 12. Valorile FC și statistici descriptive asociate acestora obținute în urma analizei datelor corespunzătoare indivizilor Oregon și γ COP14a/ γ COP14a în diferite contexte experimentale.

Semnificația statistică a valorilor FC a fost calculată cu *Student's two-sample t-test Welch corrected* implementat în qDATA. Rezultatele acestui test, prezentate în Figura 13, ne indică faptul că, în afară de diferențele de expresie genică observate între indivizii γ COP14a/ γ COP14a infectați și cei Oregon infectați, toate celelalte modulări ale expresiei genice a OXA-40/24 sunt semnificative din punct de vedere statistic.

Comparison	Significant	t	p	df
m1414_Abaumannii OXA-40/24 vs Oregon_Abaumannii OXA-40/24	No	-0.452	0.65408	32
m1414_Abaumannii OXA-40/24 vs m1414_Abaumannii_MEM OXA-40/24	Yes	3.687	0.001305	21
Oregon_Abaumannii OXA-40/24 vs Oregon_Abaumannii_MEM OXA-40/24	Yes	-7.757	1.09E-07	21
m1414_Abaumannii_MEM OXA-40/24 vs Oregon_Abaumannii_MEM OXA-40/24	Yes	-8.617	2.28E-08	21

Figura 13. Rezultatele *Student's two-sample t-test Welch corrected* care testează semnificația statistică a diferențelor de FC estimate pentru grupurile și variantele experimentale considerate.

Rezultatele observate în cazul comparației indivizilor Oregon infectați cu cei infectați și ulterior tratați cu MEM ar putea indica faptul că dinamica procesului de colonizare a indivizilor gazdă cu *A. baumannii* este similară. Consecutiv tratamentului cu MEM a fost indusă expresia genei OXA-40/24. Rezultatele anterioare, referitoare la prezența *A. baumannii* la indivizii Oregon infectați și respectiv infectați și tratați cu MEM, au evidențiat încărcături bacteriene similare. În acest context, și anume existența unor populații bacteriene de *A. baumannii* de dimensiuni comparabile între cele două variante experimentale pentru Oregon, fluctuațiile nivelului de expresie a genei specifice OXA-40/24 pot fi cuantificate relativ corect.

În cazul indivizilor γ COP14a/ γ COP14a, într-un scenariu plauzibil, vulnerabilitatea imunologică a acestor mutanți probabil contribuie la o prezență masivă a tulpinilor Gram-negative comensale, ceea ce a determinat un mediu competițional particular pentru *A. baumannii*. În plus, comparativ cu datele anterioare observate pentru Oregon, consecutiv administrării MEM au mai putut fi identificate

bacterii aparținând *P. rettgeri*, posibil ca o consecință a unei eficiențe scăzute a antibioticului în contextul bacterian specific. Astfel, după ce indivizii infectați experimental nu au mai fost menținuți pe un mediu selectiv, competiția cu speciile bacteriene natural rezidente a condus la scăderea cantitativă a *A. baumannii*. Prin urmare, chiar dacă există doar un nivel de expresie bazal pentru *OXA-40/24*, care nu este diferit între indivizii Oregon infectați și cei γ COP14a/ γ COP14a infectați, aparenta supra-expresie a acestei gene este posibil să fie cauzată de o debalansare consistentă a încărcăturii *A. baumannii* în indivizii mutanți.

Analiza profilurilor de expresie în condiții *in vivo versus in vitro* reprezintă o strategie importantă pentru a înțelege mai bine modul în care microorganismele își adaptează mecanismele de rezistență în medii diferite și modul în care acest lucru influențează eficacitatea tratamentului.

Investigarea *in vitro* a expresiei genelor de rezistență la antibiotice s-a realizat prin expunerea tulpinilor bacteriene la MEM la o concentrație de 1 mg/ml, timp de 18 ore, similar cu durata expunerii *in vivo*. Extracția ARN a fost precedată de liza celulelor bacteriene cu ajutorul unui tampon de liză optimizat (10 mM Tris-HCl, pH=8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl și lizozim 10 mg/ml), urmată de precipitare cu acetat de amoniu 2,5 M și isopropanol, spălare cu etanol 70%, uscare, resuspendare în apă ultrapură (RNase free) și tratament cu DN-ază. Calitatea și puritatea ARN extras au fost verificate folosind un spectrofotometru (Nanodrop) și electroforeză în gel de agaroză 1%. După confirmarea calității și integrității ARN-ului, s-a realizat sinteza ADNc cu ajutorul kitului de reverstranscriere *GoScript™ Reverse Transcription System*. Ulterior, s-a realizat analiza expresiei genelor de rezistență utilizând Real-Time PCR (instrument ViiA 7, Applied Biosystems). S-au utilizat 300 ng cDNA per reacție iar amplificarea s-a realizat cu SYBR Green. În fiecare reacție de Real-Time PCR au fost incluși primeri specifici pentru genele țintă de rezistență, bla OXA-40/24, bla OXA-48, KPC și VIM, precum și un control intern (endogen pentru 16S rRNA). Reacțiile au fost realizate într-un volum final de 10 μ L, care a inclus primeri (10 nM), SYBR Green, și cDNA. Reacția de amplificare s-a desfășurat cu următorii parametri de amplificare: denaturarea inițială: 95°C, 2 minute; 40 de cicluri de amplificare: denaturare la 95°C, 15 secunde; hibridizare și elongare la 60°C, 30 secunde. Pentru analiza datelor obținute, s-a utilizat metoda $\Delta\Delta$ Ct (delta-delta Ct), care permite cuantificarea relativă a expresiei genelor țintă față de controlul intern și față de o probă de referință. Astfel, au fost evaluate diferențele de expresie ale genelor de rezistență între bacteriile tratate și cele netratate, pentru a identifica modificările în expresie datorate expunerii la MEM. Fiecare probă a fost analizată în cel puțin 3 replici tehnice, iar experimentul a fost repetat pentru a obține o validare biologică.

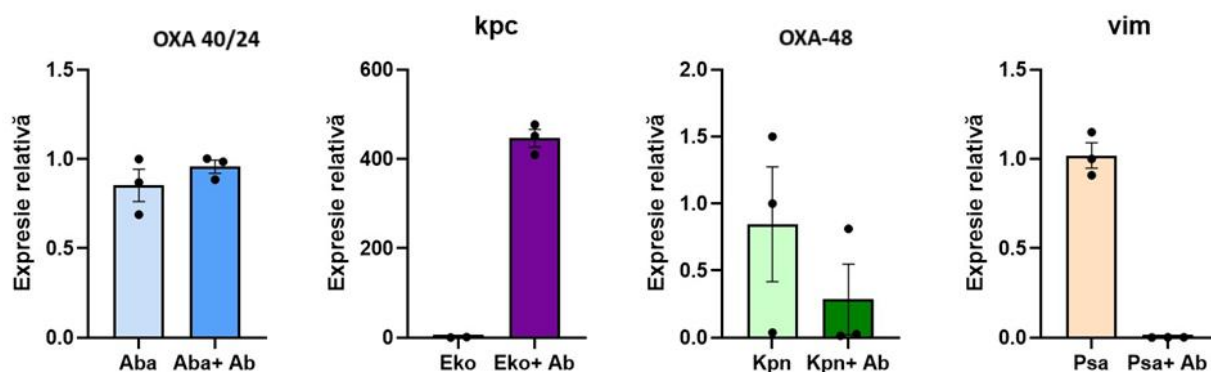


Figura 14. Expresia genelor investigate la tulpinile *Acinetobacter baumannii* (Aba), *Enterobacter kobei* (Eko), *Klebsiella pneumoniae* (Kpn) și *Pseudomonas aeruginosa* (Psa), în absența și în prezența MEMului, evaluată prin Real-Time PCR.

Expresia genelor blaOXA 40/24 și bla-KPC a fost supraexprimată în prezența meropenemului, în timp ce în cazul genelor blaOXA-48 și bla-VIM, se observă o scădere a expresiei genei sub presiunea antibioticului (Figura 14).

Analiza comparativă a expresiei genei blaOXA 40/24 *in vitro* versus *in vivo* evidențiază o tendință similară de creștere a expresiei în prezența antibioticului, însă nivelurile de expresie variază în funcție de *background*-ul genetic, ceea ce indică necesitatea studiilor *in vivo* pentru elucidarea profilurilor de activare a mecanismelor de rezistență, în scopul personalizării terapiei anti-infecțioase.

Act 3.4 – Construirea unor hărți genetice pentru ilustrarea relațiilor dintre genele cu profiluri de expresie modificată, potențial implicate în trialogul gazdă-bacterie antibioretistentă-antibiotic

Tabelul 6. Gene și transcripți cu profiluri de expresie modificată în cadrul experimentelor de infecție cu *K. pneumoniae*

Condiția experimentală Oregon + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Condiția experimentală γ COP ^{14a} / γ COP ^{14a} + <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<p>70 transcripți identificați</p> <p>41 gene identificate</p> <p>Gene unice (12): <i>Cyp4p3</i>, <i>Cyp6d2</i>, <i>glec</i>, <i>osa</i>, <i>SREBP</i>, <i>Tpl94D</i>, <i>Xrp1</i>, <i>CG3198</i>, <i>CG5281</i>, <i>CG12783</i>, <i>CG43057</i>, <i>CG43638</i>.</p>	<p>96 transcripți identificați</p> <p>56 gene identificate</p> <p>Gene unice (19): <i>Acbp3</i>, <i>ArgRS</i>, <i>Cnx99A</i>, <i>Chd64</i>, <i>Dhrs4</i>, <i>Dhc36C</i>, <i>EMC4</i>, <i>HUWE1</i>, <i>mbc</i>, <i>Inos</i>, <i>Roc1b</i>, <i>Spn77Bc</i>, <i>Tsp29Fb</i>, <i>trv</i>, <i>CG1902</i>, <i>CG9967</i>, <i>CG31077</i>, <i>CG45045</i>.</p>
<p>Procese biologice la nivelul (GeneOntology):</p> <p>reticulului endoplasmatic (GO:0005783 – <i>Cyp4p3</i> și <i>Cyp6d2</i> și <i>SREBP</i>) și membranei nucleare (GO:0005654 – <i>glec</i> și <i>osa</i>)</p>	<p>Procese biologice la nivelul (GeneOntology):</p> <p>membranei plasmaticice (GO:0005886 – <i>Cnx99A</i>, <i>mbc</i> și <i>Tsp29Fb</i>), reticulului endoplasmatic (GO:0005783 –</p>

	<i>Cnx99A</i> și <i>EMC4</i>) și citoscheletului (GO:0005856 – <i>Chd64</i> și <i>Dhc36C</i>)
Procese biologice asociate (GeneOntology): transport transmembranar (GO:0022857 – <i>CG5281</i> , <i>CG12783</i>), reglarea transcripției pentru ARN polimeraza II (GO:0006357 – <i>SREBP</i> și <i>osa</i>), activitatea oxidoreductazelor (GO:0016705 – <i>Cyp4p3</i> și <i>Cyp6d2</i>), legarea ionilor de metal (GO:0046872 – <i>Cyp4p3</i> și <i>Cyp6d2</i>) sau legarea structurii hem (GO:0020037 – <i>Cyp4p3</i> și <i>Cyp6d2</i>).	Procese biologice asociate (GeneOntology): activitatea <i>ubiquitin protein ligase</i> (GO:0061630 – <i>HUWE1</i> și <i>Roc1b</i>), activitatea isomerazelor (GO:0016853 – <i>Dhc36C</i> și <i>Inos</i>) sau legare ATP (GO:0005524 – <i>Dhc36C</i> și <i>ArgRS</i>)

Tabelul 7. Gene și transcripti cu profiluri de expresie modificată în cadrul experimentelor de tratament cu antibioticul de ultimă intenție COL

Condiția experimentală Oregon + COL	Condiția experimentală γ COP ^{14a} / γ COP ^{14a} + COL
330 transcripti identificați 203 gene identificate Gene unice (42): <i>apt, cact, Capr, crol, Droj2, edin, eIF4E7, EMC4, Ephrin, gcl, Got1, Grx1t, Hf, Hou, Hpr1, IBIN, loopin-1, mei-38, Mtkl, net, Prosalph2, Rab27, Reg-2, Rpt3R, rush, TBC1D5, Twd1D, CG10477, CG13220, CG14591, CG32137, CG33017, CG33307, CG34188, CG3566, CG4069, CG43169, CG5958, CG6931, CG7668, CG9536, CG9550</i>	1421 transcripti identificați 817 gene identificate 346 gene unice (Anexa 1)
Procese biologice la nivelul (GeneOntology): citoplasmei (GO:0005737 – 15 gene), membranei reticulului endoplasmatic (GO:0005789 – 2 gene), nucleului celular (GO:0005634 – 8 gene), aparatului Golgi (GO:0005794 – 3 gene), mitocondriei (GO:0005739 – 2 gene) și spațiului extracelular (GO:0005615 – 2 gene)	Procese biologice la nivelul (GeneOntology): citoplasmei (GO:0005737 – 80 gene), nucleului (GO:0005634 – 59 gene), mitocondriei (GO:0005739 – 41 gene), spațiul extracelular (GO:0005615 – 35 gene), membranei reticulului endoplasmatic (GO:0005789 – 5 gene) și respectiv reticulului endoplasmatic (GO:0005783 – 13 gene) și aparatului Golgi (GO:0005794 – 11 gene)
Procese biologice asociate (GeneOntology): legarea ionilor de metal (GO:0046872 – 4 gene), catabolismul proteinelor median de <i>ubiquitin-dependent protein</i> (GO:0043161 – 3 gene), transportul vesicular (GO:0016192 – 2 gene), reglarea transcripției pentru ARN polimeraza II (GO:0006357 – 2 gene), activitatea hidrolazelor (GO:0016787 – 2 gene), activitatea factorilor de transcripție GO:0003700 – 2 gene) și legarea ATP (GO:0005524 – 2 gene)	Procese biologice asociate (GeneOntology): activitatea hidrolazelor (GO:0016787 – 28 gene), activitatea oxidoreductazelor (GO:0016491 – 22 gene), legare ARN (GO:0003723 – 20 gene), legare ATP (GO:0005524 – 20 gene), reproducere (GO:0019953 – 17 gene), translație (GO:0006412 – 16 gene) sau proteoliză (GO:0006508 – 13 gene)

În baza analizelor bioinformatic prezentate în cadrul activităților 3.5 și 3.6 am investigat cu ajutorul aplicației STRING (<https://string-db.org/>) interacțiunile potențiale între genele identificate unic în secvențiat, cu *focus* pe procesele biologice de la nivelul reticulului endoplasmatic. Rezultatele acestei analize pentru indivizii $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ tratați cu COL sunt prezentate în Figura 15. În condițiile experimentale de Oregon infectat cu *K. pneumoniae*, $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ infectat *K. pneumoniae* sau Oregon tratat cu COL, nu au fost identificate interacțiuni între genele asociate cu activitate la nivelul reticulului endoplasmatic.

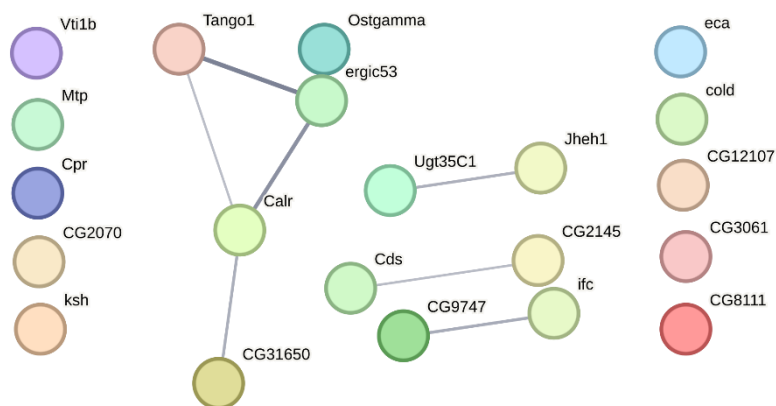


Figura 15. Hartă de interacțiuni potențiale între produșii genelor pentru care a fost identificat un *enrichment* funcțional pentru reticulul endoplasmatic la indivizii $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ tratați cu COL. Imagine generată cu STRING v12.0.

Act 3.5 – Indicarea genelor ipotetice care pot fi utilizate pentru predicția severității clinice a unei infecții

Datele obținute în cadrul activității 3.1 și 3.2 au fost analizate utilizând *script*-uri originale în limbajul de programare R pentru a evidenția funcțiile genelor exprimate unic în condițiile experimentale de interes prin implementarea GeneOntology (GO) cu biomaRt (Durinck și colab., 2005; Durinck și colab., 2009).

În cadrul experimentelor de infecție cu *K. pneumoniae*, majoritatea genelor identificate unic pentru linia etalon Oregon sunt implicate în procese biologice la nivelul reticulului endoplasmatic (GO:0005783 – *Cyp4p3* și *Cyp6d2* și *SREBP*) și la nivelul membranei nucleare (GO:0005654 – *glec* și *osa*). Printre cele mai comune procese biologice se remarcă activitatea de transport transmembranar (GO:0022857 – *CG5281*, *CG12783*). De asemenea, analiza datelor a evidențiat cel puțin două gene unice pentru condiția experimentală Oregon + *K. pneumoniae* implicate în reglarea transcripției pentru ARN polimeraza II (GO:0006357 – *SREBP* și *osa*), activitatea oxidoreductazelor (GO:0016705 – *Cyp4p3* și *Cyp6d2*), legarea ionilor de metal (GO:0046872 – *Cyp4p3* și *Cyp6d2*) sau legarea structurii hem (GO:0020037 – *Cyp4p3* și *Cyp6d2*).

Genele unice pentru condiția experimentală $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ infectat cu *K. pneumoniae* sunt majoritar implicate în procese biologice de la nivelul membranei plasmatic (GO:0005886 – *Cnx99A*,

mbc și *Tsp29Fb*), reticulului endoplasmatic (GO:0005783 – *Cnx99A* și *EMC4*) și citoscheletului (GO:0005856 – *Chd64* și *Dhc36C*). Pentru această condiție experimentală au fost identificate cel puțin două gene unice, implicate în activitatea *ubiquitin protein ligase* (GO:0061630 – *HUWE1* și *Roc1b*), activitatea isomerazelor (GO:0016853 – *Dhc36C* și *Inos*) sau legare ATP (GO:0005524 – *Dhc36C* și *ArgRS*).

Act 3.6 – Descrierea genelor ipotetice care pot prezice eficacitatea și toxicitatea antibioticelor *in vivo*

Analiza genelor identificate specific în urma tratamentului liniei Oregon cu antibioticul de ultimă intenție COL a evidențiat genele implicate majoritar în procese biologice la nivelul citoplasmei (GO:0005737 – *cactus*, *germ cell-less*, *apontic*, *rush hour*, *Rab27*, *Houki*, *Glutaredoxin 1 testis-specific*, *Regulatory particle triple-A ATPase 3-related*, *DnaJ-like-2*, *eukaryotic translation initiation factor 4E7*, *Caprin*, *Proteasome alpha2 subunit*, *loopin-1*, *meiotic 38* și *CG5958*), membranei reticulului endoplasmatic (GO:0005789 – *EMC4* și *CG3566*), nucleului celular (GO:0005634 – *net*, *germ cell-less*, *apontic*, *Rhythmically expressed gene 2*, *crooked legs*, *Houki*, *Hpr1*, *Proteasome alpha2 subunit*), aparatului Golgi (GO:0005794 – *Rab27*, *TBC1 domain family member 5* și *CG9536*), mitocondriei (GO:0005739 – *Ephrin* și *CG3566*) și spațiului extracelular (GO:0005615 – *edin* și *CG7668*). Cele mai comune procese biologice identificate pentru genele din această condiție experimentală sunt legarea ionilor metalici (GO:0046872 – *DnaJ-like-2*, *crooked legs*, *loopin-1*, *rush hour*), catabolismul proteinelor mediat de *ubiquitin-dependent protein* (GO:0043161 – *germ cell-less*, *Regulatory particle triple-A ATPase 3-related*, *Proteasome alpha2 subunit*), transportul vesicular (GO:0016192 – *Rab27* și *CG32137*), reglarea transcripției pentru ARN polimeraza II (GO:0006357 – *crooked legs*, *net*), activitatea hidrolazelor (GO:0016787 – *loopin-1*, *Regulatory particle triple-A ATPase 3-related*), activitatea factorilor de transcripție GO:0003700 – *apontic*, *net*) și legarea ATP (GO:0005524 – *DnaJ-like-2*, *Regulatory particle triple-A ATPase 3-related*).

Majoritatea genelor identificate specific pentru condiția experimentală γ *COP*^{14a}/ γ *COP*^{14a} tratat cu COL sunt implicate în diferite procese la nivelul citoplasmei (GO:0005737 – 80 gene), nucleului (GO:0005634 – 59 gene), mitocondriei (GO:0005739 – 41 gene), spațiului extracelular (GO:0005615 – 35 gene), membranei reticulului endoplasmatic (GO:0005789 – 5 gene) și respectiv reticulului endoplasmatic (GO:0005783 – 13 gene) sau aparatului Golgi (GO:0005794 – 11 gene). Cele mai comune procese identificate sunt activitatea hidrolazelor (GO:0016787 – 28 gene), activitatea oxidoreductazelor (GO:0016491 – 22 gene), legarea ARN (GO:0003723 – 20 gene), legarea ATP (GO:0005524 – 20 gene), reproducere (GO:0019953 – 17 gene), translație (GO:0006412 – 16 gene) sau proteoliză (GO:0006508 – 13 gene).

COL induce *gene enrichment* pentru gene implicate în procese biologice la nivelul reticulului endoplasmic (13 + 8 = 21 la masculii $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ versus 3 la masculii Oregon) și respectiv la nivelul aparatului Golgi (11 la masculii $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ versus 3 la masculii Oregon). Cele 13 gene aferente GO:0005783 sunt: *cold*, *CG31650*, *CG12107*, *CG8111*, *ksh*, *eca*, *Mtp*, *ifc*, *Calr*, *Jheh1*, *Cds*, *Cpr* și *CG2145*; cele 8 gene aferente GO:0005789 (membrana reticulului endoplasmic) sunt: *Ostgamma*, *CG2070*, *ergic54*, *CG3061*, *CG9747*, *Ugt35C1*, *Vti1b*, *Tango1*, iar cele 11 gene asociate cu GO:0005794 sunt: *Pis*, *Qsox1*, *asrij*, *Ccm3*, *ksh*, *eca*, *IntS3*, *Vti1B*, *Mtp*, *Tango1* și *Uba5*. Se observă că 4 dintre aceste gene (*ksh*, *eca*, *Mtp* și *Tango1*) sunt comune celor două grupuri și că niciuna dintre cele 28 de gene unice nu a fost identificată în analiza masculilor control Oregon.

Acest aspect este remarcabil, întrucât masculii $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ sunt mutați pentru gena *gammaCop*, esențială pentru transportul antero-retrograd între reticulul endoplasmic și aparatul Golgi (<http://flybase.org/reports/FBgn0028968.htm>). O ipoteză plauzibilă este aceea că, în contextul genetic indus de funcționarea parțială a alelei γCOP^{14a} (care este o alelă hipomorfă), un total de 28 de gene specifice reacționează, aparent într-un efect de compensare, la impactul COL. Acest aspect necesită studii ulterioare, pentru a identifica dacă acest răspuns al genomului gazdă la tratamentul cu COL ar putea reprezenta un avantaj sau un dezavantaj în cazul unei infecții urmate de tratament cu acest antibiotic la un pacient cu mutații în gena *gammaCop*, cunoscut fiind faptul că *background*-ul genetic poate influența pozitiv sau negativ interacțiunea individului cu diferiți factori de mediu.

Un alt aspect interesant care reiese din datele de mai sus este identificarea de *gene enrichment* pentru 17 gene implicate în procesul de reproducere la *D. melanogaster*, care este în acord cu date originale obținute anterior (Ecovoiu et al., 2019). Astfel, încrucișările dintre masculi și femele cu genotipul $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$ nu permit obținerea de descendenți adulți, ceea ce sugerează că mai multe gene implicate în reproducere sunt funcționale în aval de gena *gammaCop*. Din nou, aceste rezultate subliniază necesitatea investigării aprofundate a efectelor COL asupra funcției reproductive.

În concluzie, toate obiectivele stabilite pentru această etapă au fost în mod riguros atinse, cu obținerea unor rezultate semnificative, privind: i) identificarea modificărilor la nivelul microbiotei (raport crescut Proteobacteria/Firmicutes la mutați, favorizând statusul pro-inflamator și transferul orizontal al genelor de rezistență) și al genelor eucariote modulate de infecția bacteriană, în funcție de genotipurile studiate, sugerând potențialul genelor implicate în procesele de transport transmembranar, activitatea oxidoreductazelor și ubiquitinilare de a fi utilizate ca markeri ai susceptibilității la infecție pentru genotipurile studiate și ai severității infecțiilor bacteriene produse; ii) identificarea genelor eucariote modulate de administrarea antibioticului COL, care stimulează procese asociate reticulului endoplasmic și aparatului Golgi la mutați, evidențiind potențiale mecanisme de compensare genetică în contextul mutației γCOP^{14a} și potențialul utilizării acestor gene ca markeri ai toxicității antibioticului; iii) diferențe de expresie a genelor de rezistență la

carbapeneme, în funcție de tulpina bacteriană și de *background*-ul genetic al indivizilor infectați, sugerând un context competițional unic cauzat de vulnerabilitatea imunologică a mutațiilor.

Diferențele semnificative între genotipurile studiate în răspunsul la infecții bacteriene și tratamente cu antibiotice au implicații clinice importante, datele obținute oferind o bază solidă pentru cercetări ulterioare privind trioul gazdă-agent infecțios-antibiotic, pentru optimizarea și personalizarea strategiilor terapeutice, în funcție de *background*-ul genetic al pacientului.

Bibliografie:

1. BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. Steffen Durinck, Yves Moreau, Arek Kasprzyk, Sean Davis, Bart De Moor, Alvis Brazma and Wolfgang Huber, *Bioinformatics* 21, 3439-3440 (2005).
2. De Coster, W., Rademakers, R., 2023. NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 39(5), btad311.
3. Ecovoiu, A. A., Graur, M. A. R. I. A. N., & Ratiu, A. C. (2019). Hypomorphic alleles of *gammaCop* gene from *Drosophila melanogaster* display an unexpected expression pattern in mutant eggs, testes and embryos. *Rom. Biotechnol. Lett*, 24, 324-331.
4. Gleeson, J., Leger, A., Prawer, Y. D., Lane, T. A., Harrison, P. J., Haerty, W., Clark, M. B., 2022. Accurate expression quantification from nanopore direct RNA sequencing with NanoCount. *Nucleic acids research*, 50(4), e19-e19.
5. Heberle, H.; Meirelles, G. V.; da Silva, F. R.; Telles, G. P.; Minghim, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16:169 (2015).
6. Kang, M.-J., Ryoo, H. D., 2009. Suppression of retinal degeneration in *Drosophila* by stimulation of ER-associated degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), 17043–17048.
7. Li, H., 2018. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), 3094-3100.
8. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. Steffen Durinck, Paul T. Spellman, Ewan Birney and Wolfgang Huber, *Nature Protocols* 4, 1184-1191 (2009).
9. Rikhy, R., Ramaswami, M., Krishnan, K. S., 2003. A Temperature-Sensitive Allele of *Drosophila* *sesB* Reveals Acute Functions for the Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase in Synaptic Transmission and Dynamin Regulation. *Genetics*, 165(3), 1243–1253.
10. Rong, Y., McPhee, C. K., Deng, S., Huang, L., Chen, L., Liu, M., Tracy, K., Baehrecke, E. H., Yu, L., Lenardo, M. J., 2011. Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), 7826–7831.
11. Terhzaz, S., Cabrero, P., Chintapalli, V. R., Davies, S.-A., Dow, J. A. T., 2010. Mislocalization of mitochondria and compromised renal function and oxidative stress resistance in *Drosophila* *SesB* mutants. *Physiological Genomics*, 41(1), 33–41.
12. Zhou, R., Silverman, N., Hong, M., Liao, D. S., Chung, Y., Chen, Z. J., Maniatis, T., 2005. The role of ubiquitination in *drosophila* innate immunity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34048–34055.
13. Zhu, Y., Liu, L., Zhang, C., Zhang, C., Han, T., Duan, R., Jin, Y., Guo, H., She, K., Xiao, Y., Goto,

A., Cai, Q., Ji, S., 2023. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation contributes to Toll innate immune defense in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Immunology*, 13.

Director Project,
Mariana Carmen Chifiriuc

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Chifiriuc', with a long horizontal stroke extending to the right.