

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA**  
**FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**

**CLONAREA ȘI EXPRIMAREA UNOR GENE IMPLICATE ÎN  
DIVIZIUNEA CELULARĂ LA PROCARIOTE**

**Rezumat**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:**

**ACAD. PROF. DR. OCTAVIAN POPESCU**

**DOCTORAND:**

**MANU DOINA RAMONA**

**CLUJ-NAPOCA**

**2011**

## Cuprins

<b>1. Introducere</b> .....	3
<b>2. Premisele cercetării</b> .....	4
<b>3. Obiectivele cercetării</b> .....	4
<b>4. Materiale și metode</b> .....	5
4.1. Amplificarea genei <i>ftsZ</i> de la <i>Escherichia coli</i> K-12 și <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 .....	5
4.2. Clonarea genei <i>ftsZ</i> de la <i>Escherichia coli</i> în vectorul pGEM-T .....	6
4.3. Clonarea genei <i>ftsZ</i> de la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> în vectorul pTZ57R .....	7
4.4. Clonarea genelor <i>ftsZ</i> <i>Escherichia coli</i> și <i>ftsZ</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> în vectorii de exprimare .....	8
4.5. Exprimarea și purificarea proteinelor FtsZ recombinat de la <i>Escherichia coli</i> și <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
4.6. Obținerea anticorpilor anti-FtsZ <i>Escherichia coli</i> și anti-FtsZ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
4.7. Analiza prin Western-blot a reactivității încrucișate a serurilor imune cu proteina FtsZ a celeilalte specii bacteriene și față de actină și beta-tubulină .....	10
<b>5. Rezultate</b> .....	
5.1. Amplificarea genei <i>ftsZ</i> de la <i>Escherichia coli</i> K-12 .....	11
5.2. Clonarea genei <i>ftsZ</i> de la <i>Escherichia coli</i> în vectorul pGEM-T .....	12
5.3. Clonarea genei <i>ftsZ</i> de la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> în vectorul pTZ57R .....	13
5.4. Clonarea genei <i>ftsZ</i> <i>Escherichia coli</i> în vectorii de exprimare.....	14
5.5. Clonarea genei <i>ftsZ</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> în vectorul de exprimare pET28a .....	16
5.6. Exprimarea și purificarea proteinelor FtsZ recombinat .....	17
5.7. Obținerea anticorpilor policlonali anti-FtsZ .....	19
5.8. Caracterizarea anticorpilor policlonali anti-FtsZ .....	21
Analiza prin Western-blot a reactivității încrucișate a FtsZ din cele două specii bacteriene, și față de actină și beta-tubulină .....	
<b>6. Analizarea și discutarea rezultatelor</b> .....	31
<b>7. Concluzii</b> .....	34
<b>Bibliografie</b> .....	36

## 1. Introducere

**Cuvinte cheie:** FtsZ, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, rezistență la antibiotice, anticorpi murini policlonali anti-FtsZ, reactivitate încrucișată, actină, tubuline.

Diviziunea celulelor bacteriene, denumită fisiune binară, debutează cu replicarea cromozomului bacterian, urmată de segregarea cromozomilor după replicare și citokineza, cu formarea septului de diviziune și separarea celulelor fiice. După selecția situsului de diviziune, în mod obișnuit la centrul celulei, între nucleozii recent replicați și segregăți, urmează asamblarea inelului citokinetic, care la procariote implică invariabil FtsZ.

FtsZ este o GTPază, care leagă și hidrolizează GTP, furnizând energia necesară remodelării formei celulei și septarea, posibil prin contracararea forțelor datorate turgorului și arhitecturii celulare existente. FtsZ este o proteină a cărei masă moleculară se situează în intervalul 37 până la 43 kDa, ubiquitară la bacterii. FtsZ este un omolog al tubulinelor eucariote, compararea structurii primare a FtsZ și tubulinelor pune în evidență omologia de secvență în domeniul N-terminal. Este remarcabil faptul că aceste proteine au o secvență bogată în glicină „glycine-rich cluster” [GGGTG(S/T)G], care în tubulină este cunoscută ca fiind parte din structura situsului de legare al GTP din domeniul N-terminal. Nici o altă proteină cunoscută nu are această secvență, în afară de tubuline și FtsZ. Mai mult, [GGGTG(S/T)G] este una dintre cele trei secvențe înalt conservate în familia tubulinelor care numără peste 150 de proteine. [Mukherjee și colab., 1993]

FtsZ și tubulinele polimerizează unidirecțional în filamente liniare, în manieră GTP-dependentă, iar în condiții apropiate, filamentele de FtsZ, formează mănunchiuri și teancuri, structuri elastice care ajută la menținerea inelului Z sub presiunea generată de constricția septală. Nu există însă dovezi că FtsZ ar forma *in vitro* sau *in vivo* structuri microtubulare. [Sun și Margolin, 1998; Gonzalez și colab., 2005]

*In vivo*, ftsZ se assemblează în partea mediană a celulei într-o structură supramoleculară denumită inel Z, care în microscopie convențională fluorescentă apare ca o formațiune omogenă, circular-închisă. PALM a evidențiat un inel Z cu o lățime de 110nm, cu protofilamente care nu sunt aliniate strâns, ci aranjate relaxat, suprapuse pe direcție longitudinală și radială, formând o structură neomogenă cu remodelarea dinamică a structurii prin schimburi între conformația helicală și cea de inel. [Fu și colab., 2010]

Celulele eucariote au un citoschelet complex și dinamic cu funcții esențiale de menținerea a formei celulelor, în semnalizarea celulară, în transportul moleculelor de ADN, organitelor și veziculelor de secreție și în diviziunea celulară. Inelul citokinetic al eucariotelor este de tip actomiozinic. Există o remarcabilă interdependență între structurile microtubulare care apar post-anafază și constricția determinată de componentele șanțului de clivare, până la finalizarea citokinezei. Zona mediană a fusului și corpul central conțin elemente structurale și de semnalizare care sunt asamblate după segregarea cromozomilor și intervin în localizarea septului de diviziune și desfășurarea citokinezei. Interacțiunile între fusul mitotic, inelul contractil și membrana celulară asigură poziționarea corectă a șanțului de clivare între cromozomii segregăți și adăugarea de noi membrane prin transport vezicular de-a lungul

microtubulilor zonelor specializate asigură finalizarea citokinezei și separarea celulelor-fiice. [Hales și colab., 1999; Straight și Field, 2000; Guertin și colab., 2002; Pollard, 2010]

## 2. Premisele cercetării

Componentele esențiale și conservate ale citoscheletului, implicate în diviziunea celulelor bacteriene, pot fi privite ca noi structuri-țintă pentru agenți antibacterieni activi față de bacteriile patogene care au dezvoltat rezistență față de antibioticele de uz frecvent. FtsZ este o proteină cu un rol esențial în diviziunea celulelor procariote, care deși prezentă în toate celulele bacteriene, a căror genă *ftsZ* a fost studiată, este totuși absentă în mitocondriile celulelor eucariote. Datorită evoluției divergente a FtsZ și omologului său eucariot, tubulina, FtsZ poate fi considerată o țintă atractivă pentru agenți terapeutici cu spectru larg, dar toxicitate selectivă față de patogenii bacterieni.

## 3. Obiectivele cercetării

Principalul scop al cercetării a fost evaluarea FtsZ ca proteină cu rol central în diviziunea celulară a celulelor bacteriene, fiind vizate două bacterii Gram-negative patogene la om, inelul citokinetic fiind considerat o posibilă nouă structură țintă susceptibilă la terapia antibacteriană, iar FtsZ molecula prezumtiv ideală ca țintă pentru interacțiunile cu agenți care ar bloca citokineza celulelor bacteriene.

Obiectivul inițial a constat în amplificarea genei *ftsZ* din genomul *Escherichia coli* tulpina K12 și a genei *ftsZ* din genomul *Pseudomonas aeruginosa* tulpina PAO1, în vederea clonării și supraexprimării acestor gene.

După supraexprimarea proteinelor FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*, proteinele recombinante au fost izolate, purificate și utilizate pentru obținerea anticorpilor policonali antiFtsZ *Escherichia coli* și antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa*.

Acești anticorpi au fost analizați sub aspectul caracteristicilor de specificitate, titru, afinitate, reactivitate specifică și reactivitate încrucișată antigen FtsZ *Escherichia coli*-anticorpi antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa* și antigen FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*-anticorpi antiFtsZ *Escherichia coli*.

S-a urmărit gradul de omologie între antigenii FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* prin aliniere de secvențe, dar și la nivelul determinantilor antigenici ai proteinelor din lizatele bacteriene, prin reacții imune încrucișate, având în vedere datele din literatură conform cărora, gena *ftsZ* este o genă esențială, conservată în celulele procariote,

ceea ce ar conferi unor agenți bacterieni care interacționează specific FtsZ și inhibă diviziunea celulară, un spectru larg de acțiune.

Următorul obiectiv a fost analiza reactivității încrucișate a FtsZ din cele două specii bacteriene cu proteinele cele mai importante ale citoscheletului eucariot, actina și tubulinele. Este cunoscută omologia de secvență la nivelul situsului GTPazic a tubulinelor și FtsZ și rolul central al actinei în citokineza eucariotelor, proteina centrală în citokineza la procariote fiind FtsZ. În acest scop, anticorpii antiFtsZ *Escherichia coli* și antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa* au fost utilizați într-un alt studiu de reactivitate încrucișată, de data aceasta față de antigenii actină și tubulină bovină. S-a urmărit apariția reacțiilor imune încrucișate între substratele actină și tubulină și anticorpii antiFtsZ *Escherichia coli* și antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa*.

Reactivitatea încrucișată între antigenii de origine eucariotă și anticorpii antiFtsZ a fost analizată în scopul obținerii de date privind selectivitatea de acțiune a unor anticorpi exclusiv față de antigeni bacterieni, fără afectarea structurilor celulelor eucariote ale organismului care a suferit o infecție cu *Escherichia coli* sau *Pseudomonas aeruginosa*.

## 4. Materiale și metode

### 4.1. Amplificarea genei *ftsZ* de la *Escherichia coli* K-12 și *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Pentru amplificarea genei *ftsZ* *Escherichia coli* au fost utilizate următoarele amorse sens și antisens:

FftsZ<sub>Ec</sub> 5'GGCATATGTTTGAACCAATGGAACCTTAC3'

RftsZ<sub>Ec</sub> 5'GTACTCGAGTTAATCAGCTTGCTTACGCAG3'

Subliniat sunt prezentate situsurile pentru enzimele de restricție, *NdeI* în amorsa sens și *XhoI* în amorsa antisens. Aceste situsuri de restricție au fost incluse în secvența amorselor și, în consecință, în secvența țintă amplificată în vederea obținerii capetelor coezive care facilitează clonarea genei în vectorii de exprimare.

Pentru amplificarea genei *ftsZ* *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 s-au utilizat următoarele amorse sens și antisens:

FftsZ<sub>Ps</sub> 5'GGCATATGTTTGAACCTGGTCGATAAC 3'

RftsZ<sub>Ps</sub> 5'GTGAATTCTCAATCGGCCTGACGACG 3'

Subliniat sunt prezentate situsurile pentru enzimele de restricție: *NdeI* în amorsa sens și *EcoRI* în cea antisens.

Gena *ftsZ* de la *E.coli* a fost amplificată prin PCR cu *Vent* polimeraza de la New England BioLabs (NEB). Aceasta enzimă oferă o fidelitate mai mare a produșilor, eventualele erori nefiind dorite în secvența ce codifică o proteină.

Gena *ftsZ* de la *Pseudomonas aeruginosa* a fost amplificată prin PCR cu *Taq* polimerază și *Pfu* polimerază. Pentru clonarea genei *ftsZ* de la *Pseudomonas aeruginosa* în vectorul de clonare selectat, pTZ57R, *Taq* polimeraza își dovedește utilitatea prin adăugarea de adenină la capetele 3' ale fragmentelor amplificate. Fiind necesară obținerea unor cantități mari de produs de amplificare și cu o mare fidelitate, pentru reacția de amplificare a genei *ftsZ* de la *Pseudomonas aeruginosa* s-a utilizat o polimerază termostabilă care copiază cu mare fidelitate ADN matriță – *Pfu* polimeraza. [McPherson și colab, 1991; Sambrook și Russell, 2001]

După migrare, ampliconii a fost purificați din geluri cu kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel), conform instrucțiunilor producătorului. [<http://www.mn-net.com/>: PCR clean-up Gel extraction User Manual NucleoSpin® Extract II]

#### 4.2. Clonarea genei *ftsZ* de la *Escherichia coli* în vectorul pGEM-T

Gena *ftsZ* a fost mai întâi clonată într-un vector de clonare p-GEM-T de la PROMEGA. Vectorul de clonare pGEM-T conține promotorii T7 și SP6 ARN polimerazelor, care flanchează situsul multiplu de clonare din regiunea care codifică peptidul  $\alpha$  al  $\beta$ -galactozidazei. Inserția genei de interes (*ftsZ Escherichia coli*) împiedică sinteza subunității  $\alpha$  și formarea unei  $\beta$ -galactozidaze funcționale, clonele recombinante fiind astfel direct identificate prin screeningul alb/albastru al coloniilor pe placă.

Vectorul este furnizat liniarizat și are capete coezive 3' care constau din câte o deoxitimină, care nu permit recircularizarea vectorului și oferă o optimizare a ligării produșilor de amplificare generați cu ajutorul unor polimeraze termostabile: vectorul permite clonarea directă a produșilor PCR dacă reacția de amplificare s-a făcut cu *Taq* polimeraza, deoarece aceasta are proprietatea de a introduce la capetele 3' câte o adenină. [<http://www.promega.com> pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual]

*Vent* polimeraza este o enzimă care are o fidelitate de amplificare mai mare decât *Taq* polimeraza, dar aceasta nu are proprietatea de a adăuga la capătul 3' câteva adenine. Pentru a fi posibilă clonarea genei *ftsZ* direct în vectorul pGEM-T, produșii PCR au fost supuși adenilării. În acest scop s-a folosit un kit de adenilare de la QIAGEN.

Insertul adenilat și vectorul pGEM-T au fost supuși ligării peste noapte la +4°C cu ADN ligază T4. [Sambrook și Russell, 2001, Promega Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, <http://www.fermentas.com/en/products/all/modifying-enzymes/ligases/el001-t4-dna-ligase>]

Moleculele recombinante pGEM*ftsZ E.coli* obținute după ligare au fost introduse prin electroporare în celule de *E. coli* tulpina DH5 $\alpha$ . Cultura a fost însămânțată pe mediu solid cu ampicilina (100  $\mu$ g/ml), X-Gal, IPTG și incubată peste noapte la 37°C. [Glover și Hames, 1995] Din 4 colonii albe bine individualizate de pe mediu cu ampicilină, X-Gal și IPTG au

fost obținute peste noapte preculturi de 5 ml, din care a doua zi a fost izolat ADN plasmidic utilizându-se GeneJetPlasmidMiniprep Kit de la Fermentas.

S-a făcut verificarea pe gel de agaroză a ADN-ului plasmidic purificat, care în prealabil a fost supus digestiei cu enzimele de restricție *NdeI* și *XhoI*. [Promega Technical Manual pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems; Sambrook și Russell, 2001; Ausubel și colab., 2003; Clark, 2005]

O verificare definitivă a prezenței genei corecte în vector s-a realizat prin secvențierea plasmidelor recombinante. Determinarea secvențelor de nucleotide a fragmentelor clonate s-a realizat cu ajutorul Analizorului Genetic ABI Prism 310, folosind BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), utilizând primerii de secvențiere pUC/M13 complementari unor secvențe din vectorul pGEM-T, din structura operonului *lac*, adiacente insertului. [MacBeath și colab., 2001; Ausubel și colab., 2003]

După verificare, vectorul pGEM-T cu gena *ftsZ* a fost supus digestiei cu enzimele de restricție *NdeI* și *XhoI* în vederea purificării genei, pentru clonarea în vectorii de exprimare.

### **4.3. Clonarea genei *ftsZ* de la *Pseudomonas aeruginosa* în vectorul pTZ57R**

Gena *ftsZ* *Pseudomonas aeruginosa* amplificată prin PCR și purificată din gel cu un kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel), a fost introdusă în vectorul de clonare pTZ57R de la Fermentas. Această clonare a fost necesară pentru facilitarea secvențializării genei, cât și pentru reclonarea ei în vectorii de exprimare.

Kitul de clonare InstAclone<sup>™</sup> PCR Cloning Kit conține vectorul liniarizat care are la capetele 5' o dideoxitimină liberă. Vectorul pTZ57R este un vector mic (2886pb), are mai multe copii/celulă, ceea ce permite obținerea unei cantități mari de ADN plasmidic. Situsul de clonare al vectorului se află în cadrul genei *lacZ'*, ceea ce permite selecția moleculelor corect recombinante pe mediu selectiv cu IPTG și X-Gal. Vectorul are gena pentru β-lactamază, în consecință conferă celulelor transformate rezistență la ampicilină. [Sambrook și Russell, 2001] La ligarea vectorului cu produsul PCR au fost respectate indicațiile oferite de producător (kit Instacclone PCR Cloning de la Fermentas). Ligarea s-a efectuat la 4°C peste noapte. Amestecul de ligare a fost utilizat pentru transformarea celulelor competente de *Escherichia coli* XL1-Blue.

Amestecul de transformare a fost însămânțat pe mediu LB solid cu ampicilină (100mg/l). Pentru selecția coloniilor cu molecule corect recombinante, pe mediu s-a adăugat IPTG și X-Gal. Din coloniile albe apărute în urma transformării au fost efectuate mai multe preculturi mici de 5ml suplimentate cu ampicilină (100mg/ml), care au fost incubate la 37°C cu agitare peste noapte. [Sambrook și Russell, 2001; Ausubel și colab., 2003; Nair, 2007]

Din acestea a fost purificat ADN plasmidic utilizând kitul de purificare GeneJET<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit de la Fermentas.

Moleculele recombinante au fost verificate inițial în gel de agaroză 1%, după digestia enzimatică a moleculelor recombinante. Verificarea definitivă a vectorilor recombițați s-a efectuat prin secvențializare cu un aparat Beckman Coulter CEQ8800, utilizând kitul de secvențializare recomandat de producător, GenomeLab DTCS Quick Start Kit. Pentru reacția de secvențializare s-au utilizat amorse M13, specifice vectorului pTZ57R. [Graham și Hill,

2001; Ausubel și colab., 2003] Plasmidele corect recombinat au fost supuse digestiei cu enzimele de restricție *NdeI* și *EcoRI*. [Sambrook și Russell, 2001; <http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>]

Prođușii de digestie au fost separați în gel de agaroză 1% și apoi excizați și purificați cu kitul gel NucleoSpin® Extract II Macherey-Nagel.

#### **4.4. Clonarea genelor *ftsZ Escherichia coli* și *ftsZ Pseudomonas aeruginosa* în vectorii de exprimare**

În scopul exprimării *ftsZ E.coli* am selectat doi vectori de exprimare: pET21b și pET28b, iar pentru exprimarea *ftsZ Pseudomonas aeruginosa* a fost utilizat pET28a.

Vectorul pET21b are o etichetă opțională de 6 histidine imediat după situsul multiplu de clonare, astfel proteinele recombinat exprimate vor avea această etichetă la capatul lor C-terminal. Vectorul are o mărime de 5442 pb, conține promotorul bacteriofagului T7 și gena pentru β-lactamază, care conferă celulelor gazdă de *E.coli* transformate rezistență la ampicilină.

Vectorul pET28b are în structura sa două etichete de 6 histidine, înainte și după situsul multiplu de clonare, astfel încât proteinele recombinat pot avea această etichetă atât la capătul N-terminal cât și la capătul C-terminal. Vectorul are o mărime de 5368 pb, conține promotorul de la bacteriofagul T7 și gena pentru rezistență la kanamicină.

Vectorul de exprimare pET28a are caracteristici comune vectorului pET 28b utilizat pentru exprimarea *ftsZ Escherichia coli*: are în structura sa două etichete de 6 histidine, înainte și după situsul multiplu de clonare, astfel încât proteinele recombinat pot avea această etichetă atât la capătul N-terminal cât și la capătul C-terminal, are o mărime de 5369 pb, conține promotorul de la bacteriofagul T7, care permite controlul exprimării proteinei țintă și gena pentru rezistență la kanamicină, care permite selecția bacteriilor transformate. Codonul stop nu a fost eliminat din genele *ftsZ*. Ca rezultat, o genă ce are codonul stop clonată în vectorul pET21b nu va avea eticheta de 6 histidine, iar aceeași genă clonată în pET28a sau pET28b va avea această etichetă doar la capătul N-terminal. [Novagen pET System Manual ediția a 10-a, 2002]

Vectorul pGEM-T cu gena *ftsZE.coli* a fost supus digestiei cu enzimele de restricție *NdeI* și *XhoI*. Vectorii pET21b și pET28b au fost supuși digestiei cu aceleași enzime de restricție.

Vectorul pTZ57R cu gena *ftsZ P.aeruginosa* a fost supus digestiei cu enzimele de restricție *NdeI* și *EcoRI*, la fel și vectorul pET28a.

Prođușii de digestie au fost separați în gel de agaroză 1% și apoi excizați și purificați cu kitul gel NucleoSpin® Extract II Macherey-Nagel.

Vectorii pET au fost apoi defosforilați cu fosfatază alcalină (*shrimp*), pentru a evita recircularizarea eventualelor molecule digerate cu o singură enzimă.[Sambrook și Russell, 2001].

Moleculele de vector și insert au fost puse la ligare peste noapte la 16°C. Pentru ligarea fragmentelor de ADN s-a folosit ADN ligaza de la bacteriofagul T4 (NEB).



Moleculele recombinante obținute după ligare au fost introduse prin electroporare în celule de *Escherichia coli* tulpina DH5 $\alpha$ . [Glover și Hames, 1995]

Din coloniile de pe mediu cu antibiotice (100mg/l ampicilină pentru pET21b și 30mg/l kanamicină pentru pET28a și pET28b) au fost făcute peste noapte preculturi de 5 ml, din care a doua zi a fost izolat ADN plasmidic.[Sambrook și Russell, 2001; Ausubel și colab., 2003; Novagen pET System Manual ediția a 10-a, 2002; [http://www.fermentas.com/templates/files/tiny\\_mce/media\\_pdf/broch\\_genejet\\_P19.pdf](http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/media_pdf/broch_genejet_P19.pdf)]

ADN plasmidic a fost analizat prin electroforeză în gel de agaroză (1%).

#### **4.5.Exprimarea și purificarea proteinelor FtsZ recombinante de la *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa***

Vectorii recombinanți pET28b- *ftsZ Escherichia coli* și pET28a-*ftsZ Pseudomonas aeruginosa* au fost introduși în celule de *Escherichia coli* tulpina de exprimare BL21(DE3). Bacteriile transformate au fost însămânțate pe mediu solid cu kanamicină. Din coloniile crescute pe placă au fost realizate preculturi în 5ml de mediu LB cu kanamicină, peste noapte, la 37°C. 50 ml de mediu LB cu adaos de kanamicină (100 mg/l) au fost inoculați cu toate bacteriile de pe mediu solid, rezultate în urma transformării. Cultura de bacterii a fost lasată să crească până la DO<sub>600nm</sub> de 0,8-0,1 și indusă cu IPTG, la 37 °C. Celulele bacteriene au fost lizate prin sonicare. Lizatele bacteriene au fost clarificate și centrifugate. Lizatele și supernatantele au fost migrate pe geluri de poliacrilamidă pentru verificarea exprimării proteinelor FtsZ recombinante împreună cu un markeri de greutate moleculară.

Supernatantele au fost purificate prin tehnica de cromatografie de afinitate cu ioni imobilizați pe coloană (proteinele FtsZ au fost purificate pe coloană cu Ni<sup>2+</sup>, datorită etichetei de histidină de la capătul N-terminal). Atomul de azot din imidazol va lega prin legătură coordinativă ionul metalic cu afinitate mai mare decât histidina. Imidazolul este în competiție cu proteina pentru ionii metalici, eluarea se poate face din acest motiv cu gradient de imidazol. [Ausubel și colab., 2003]

S-a determinat concentrația proteinelor prin metoda Bradford, după purificarea pe coloană. [Mikkelsen și Cortón E, 2004] Pe baza acestor determinări s-au preparat probele pentru electroforeza în gel de poliacrilamidă pentru verificarea purificării FtsZ *Escherichia coli*, respectiv FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*. [Popescu, 1990; Rosenberg, 2005]

#### **4.6.Obținerea anticorpilor policlonali anti-FtsZ *E. coli* și anti-FtsZ *P. aeruginosa***

Anticorpii policlonali antiFtsZ *Escherichia coli* și antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa* au fost obținuți prin imunizarea unor șoareci BALB/c cu vârsta de 6-8 săptămâni și greutate de 20g. Tulpina de șoareci provine de la Institutul Cantacuzino din București, iar întreținerea

animalelor de laborator, imunizările și recoltările au fost efectuate în baza de la Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe al Universității Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca.

Anterior imunizării primare, s-a făcut recoltarea din ziua 0, pentru obținerea serului preimun, de la fiecare șoarece.

Doi șoareci au fost imunizați cu 50μg proteină recombinată FtsZ de la *Escherichia coli* în amestec de 1:1 cu adjuvant Freund's complet (grupul 1) și alți doi șoareci au fost imunizați cu 50μg proteină recombinată FtsZ de la *Pseudomonas aeruginosa* în amestec de 1:1 cu adjuvant Freund's complet (grupul 2) în ziua 0. Șoarecii au fost reimunizați de două ori la un interval de câte trei săptămâni cu aceleași cantități de antigeni în amestec de 1:1 cu adjuvant Freund's incomplet. Recoltările au fost efectuate în ziua 0 (înainte de prima imunizare, pentru obținerea serului preimun), și la interval de câte două săptămâni, în primele două luni, după două luni de la prima imunizare, intervalul între recoltări a fost de 8 săptămâni. Titrul de anticorpi din serurile imune a fost determinat prin tehnica ELISA.

#### **4.7. Analiza prin Western-blot a reactivității încrucișate a serurilor imune cu proteina FtsZ a celeilalte specii bacteriene și față de actină și beta-tubulină**

Proteinele FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*, la fel actina (SigmaAldrich) și β-tubulina (tebu-bio) au fost migrate pe gel de poliacrilamidă, împreună cu un marker proteic standard de masă moleculară *Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas SM 0671 și SM 1181), care va fi transferat pe membrană odată cu celelalte benzi de fracțiuni proteice. După migrarea proteinelor, s-a efectuat transferul pe membrane de nitroceluloză 0,2 μM (Bio-Rad), timpul de transfer fiind de 1h și 30 de minute, la 50V. După realizarea transferului, gelul rămas se colorează cu Coomassie blue, pentru a verifica dacă transferul a fost complet. Membrana se colorează în 50ml fast green (1-3 minute), se decolorează cu fast green destaining (1-3 minute) și se spală cu apă distilată (1-3 minute).

După ce s-a realizat transferul, membrana trebuie spălată de doua-trei ori în TBS/T și apoi situsurile rămase libere pe membrană sunt blocate cu tampon de blocare TBST în care s-a dizolvat lapte praf degresat în concentrație de 3% și albumină serică bovină (BSA) în concentrație de 1%. Blocarea se realizează prin incubarea membranei timp de 1 oră la temperatura camerei sau peste noapte, la 4°C, pe un agitator orbital. Urmează două etape de spălare de câte 10 minute în TBST.

Membrana va fi imersată în soluția cu anticorpul primar preparat prin diluție 1/100-1/1000 a serurilor imune, în tampon TBST cu BSA 1%; această etapă de incubare cu anticorpii primari durează 1h-1h și 30 de minute la temperatura camerei sau peste noapte, la 4°C, cu o agitare ușoară, continuă. După tăierea membranei în benzi, acestea au fost incubate cu diluții diferite ale serurilor imune:

- Diluții de 100, 250, 500, 1000 x ale serurilor imune cu anticorpi policlonali anti-FtsZ *Escherichia coli*
- Diluții de 100, 250, 500, 1000 x ale serurilor imune cu anticorpi policlonali anti-FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*

După tratarea cu anticorpul primar, membrana se spală în tampon TBST, de două ori, câte 10 minute.

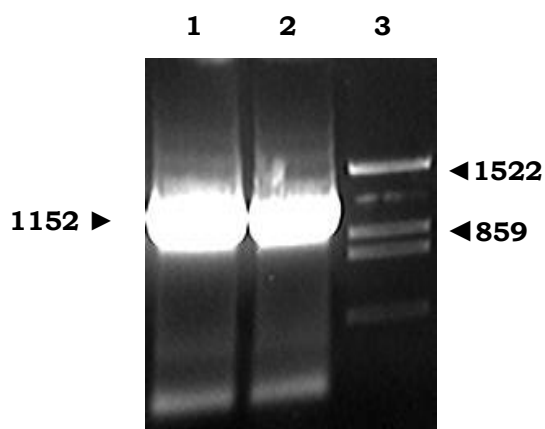
Complexele antigen-anticorp sunt detectate cu anticorpi secundari de tip antiIgG cuplați cu peroxidază, în diluție care se tatonază (1/1000-1/10000). Diluțiile anticorpilor secundari anti-șoarece cu care s-a lucrat au fost 1:1500 și 1:3000. Diluția anticorpilor secundari se realizează în TBST cu BSA 1%. Incubarea durează 1h la temperatura camerei, cu agitare ușoară pe un agitator orbital. Membrana se spală apoi în TBS/T, de două ori, câte 10 minute. Diluțiile de anticorpi trebuie tatonate astfel încât detecția să fie optimă.

Detecția s-a realizat colorimetric, prin adăția de substrat cromogen. Anticorpii secundari fiind conjugați cu peroxidază, substratul ales este 3,3'diaminobenzidina (DAB ). Se dizolvă o tabletă de DAB (250 mg) în 10 ml de apă distilată, se adaugă 10μl peroxid de hidrogen 30% și se urmărește reacția de culoare. [Chiriac și colab., în curs de publicare] Se oprește reacția prin transferul membranei în apă distilată și uscare rapidă. În cazul în care se obțin benzi determinate de legări nespecifice, substratul se poate dilua.

## 5. Rezultate

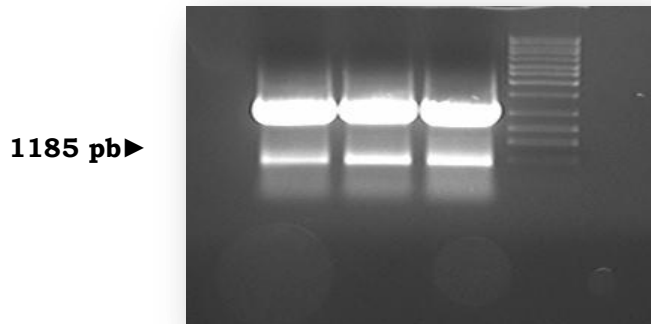
### 5.1. Amplificarea genei *ftsZ* de la *Escherichia coli* K-12

Prođușii de amplificare prin PCR ai genei *ftsZ* de la *Escherichia coli* au fost vizualizați în gel de agaroză 1% (Fig.1). După cum se poate observa din imaginea gelului, fragmentul amplificat este de lungimea dorită, cantitatea de produs amplificat este mare, iar reacția este specifică, fără alte amplificări nespecifice.



**Figura 1.** Prođușii de amplificare cu *Vent* polimerază ai genei *ftsZ* de la *Escherichia coli* .  
**1 și 2** - 50 μl din prođușii PCR  
**3**- marker molecular (vector pQE60 digerat cu *Dra*I)

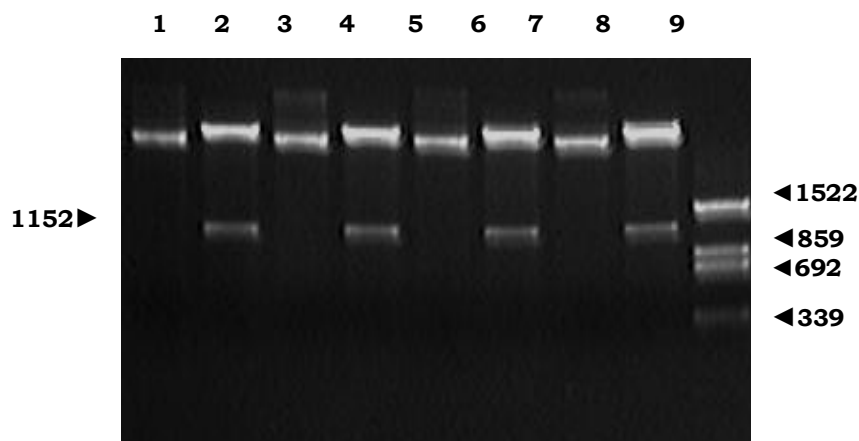
Prođușii de amplificare prin PCR ai genei *ftsZ* *P.aeruginosa* au fost de asemenea vizualizați în gel de agaroză 1% (Fig.2). După cum se poate observa din imaginea gelului, cantitatea de produs specific este mare și nu au avut loc amplificări nespecifice.



**Figura 2.** Produșii de amplificare ai genei *ftsZ* de la *Pseudomonas aeruginosa*.  
**1-3-** gena amplificată  
**4** marker molecular O'GeneRuler™ 1kb Ladder Fermentas.

## 5.2. Clonarea genei *ftsZ* de la *Escherichia coli* în vectorul pGEM-T

Pentru verificarea prezenței genei în vector, un volum de 5 μl din fiecare probă a fost supusă digestiei cu enzimele de restricție *NdeI* și *XhoI*. ADN plasmidic digerat a fost analizat cu ajutorul electroforezei în gel de agaroză (1%) (Fig.3)



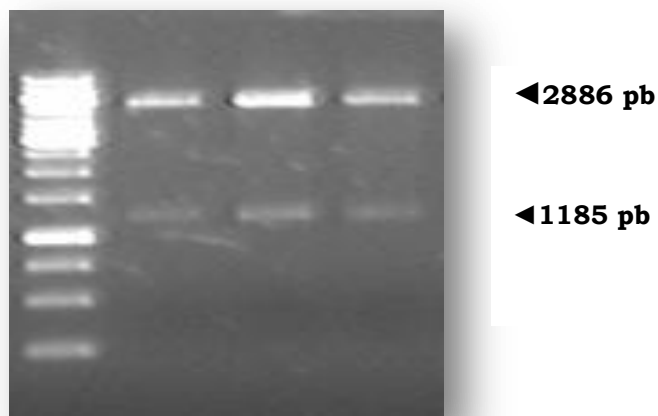
**Figura 3.** Produșii de digestie cu *NdeI* și *XhoI* ai ADN plasmidic recombinat  
**1, 3, 5, 7** – ADN plasmidic; **2, 4, 6, 8** – aceleași probe de ADN plasmidic digerate cu *NdeI* și *XhoI*; **9** - marker (pQE60 supus digestiei cu *DraI*)

O verificare definitivă a prezenței genei corecte în vector s-a realizat prin secvențierea plasmidelor recombinante, urmată de alinierea secvenței *ftsZ Escherichia coli* clonată în pGEM-T cu secvențe *ftsZ Escherichia coli* din bazele de date. Gena *ftsZ Escherichia coli* izolată și amplificată prin PCR și supusă secvențierii are o secvență de nucleotide identică cu secvența genei *ftsZ Escherichia coli* tulpina K-12, identificată în baze de date. Nu a fost identificat nici un nucleotid modificat față de secvența din bazele de date.

### 5.3. Clonarea genei *ftsZ* de la *Pseudomonas aeruginosa* în vectorul de clonare pTZ57R

Gena amplificată prin PCR și purificată din gel a fost introdusă în vectorul de clonare pTZ57R de la Fermentas. Amestecul de ligare a fost utilizat la transformarea celulelor competente de *Escherichia coli* XL1blue. Amestecul de transformare a fost însămânțat pe mediu LB solid cu ampicilină. Pentru selecția coloniilor cu molecule corect recombinante, s-a adăugat pe mediu IPTG și X-Gal.

Din coloniile albe apărute în urma transformării a fost purificat ADN plasmidic. Moleculele recombinante au fost verificate inițial prin digestie enzimatică a moleculelor recombinante și apoi prin secvențiere. Produșii de digestie au fost analizați în gel de agaroză 1%. Rezultatele acestei digestii sunt prezentate în Figura 4. După cum se poate observa din imaginea gelului toate moleculele au fost recombinante, rezultând două fragmente, unul de mărime mare (2886pb) ce corespunde vectorului liniarizat și fragmentul mai mic de aproximativ 1185pb ce corespunde genei *ftsZ*.



**Figura 4.** Digestia moleculelor recombinante pTZ57R-*ftsZPs*

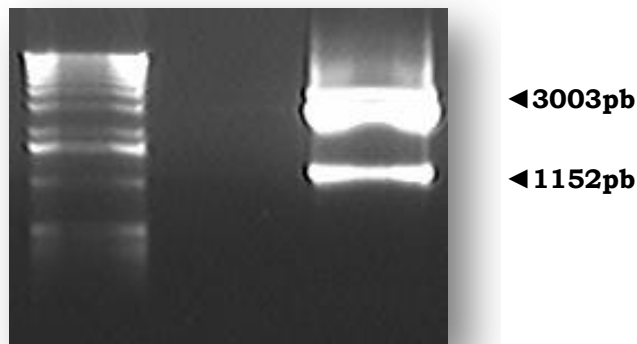
1 – marker molecular O'GeneRuler™ 1kb Ladder Fermentas

2, 3 și 4 - produși de digestie ADN plasmidic provenit din colonii diferite.

Verificarea definitivă a vectorilor recombinanți s-a efectuat prin secvențiere. S-a constatat identitatea secvenței de nucleotide a genei *ftsZ Pseudomonas aeruginosa* izolată și amplificată prin PCR, clonată în pTZ57R cu cea a genei *ftsZ Pseudomonas aeruginosa* tulpina PAO1 din baza de date NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### 5.4. Clonarea genei *ftsZ Escherichia coli* în vectorii de exprimare

După verificare, vectorul pGEM-T*ftsZE.coli* a fost supus digestiei cu enzimele de restricție *NdeI* și *XhoI* în vederea purificării genei. Produșii de digestie au fost migrați pe gel de agaroză 1% și gena a fost excizată și purificată din gel pentru a fi clonată în vectorii de exprimare.

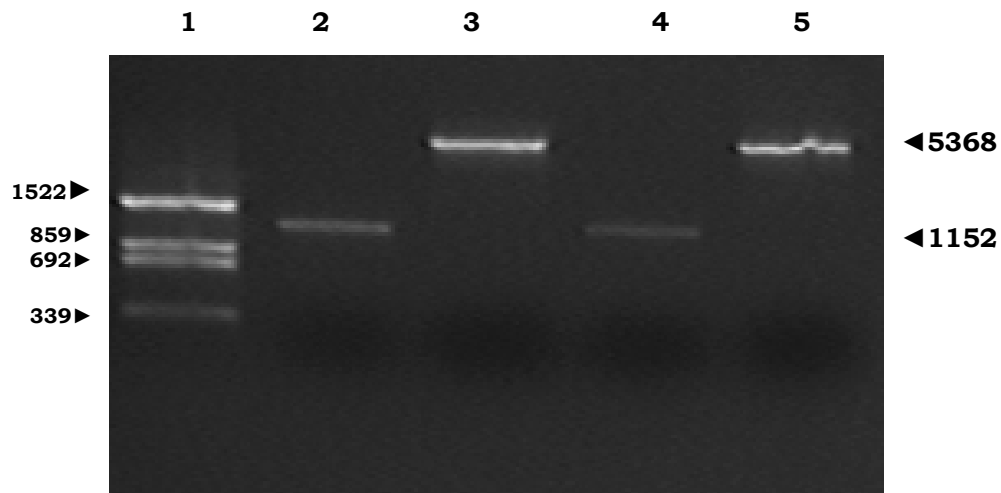


**Figura 5.** Digestia moleculei recombinante pGEM-T*ftsZE.coli*.

1- marker molecular de 1kpb (Invitrogen)

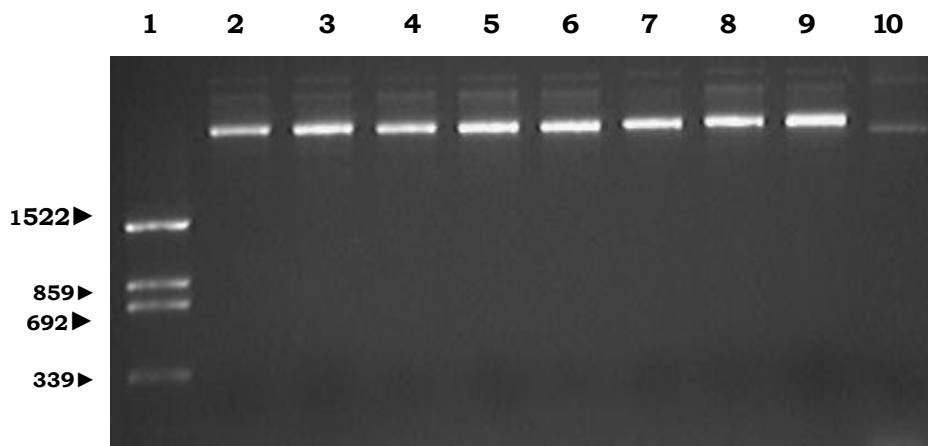
2 - vector recombinat pGEM-T digerat cu enzimele de restricție *NdeI* și *XhoI*.

În scopul exprimării *ftsZ E.coli* au fost selectați 2 vectori de exprimare: pET21b și pET28b. Vectorul pGEM-T cu gena *ftsZ* a fost digerat cu enzimele de restricție *NdeI* și *XhoI*. Vectorii pET21b și pET28b au fost supuși digestiei cu aceleași enzime de restricție. După digestia pGEM-*ftsZEc* și pET28b, pET21b, s-a efectuat o verificare a produșilor de digestie cu ajutorul electroforezei în gel de agaroză 1%, identificându-se în gel benzile corespunzătoare *ftsZE.coli* și vectorilor de exprimare.

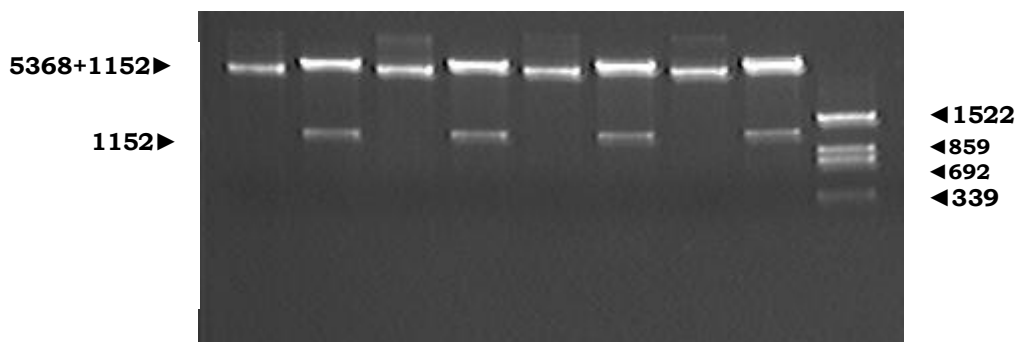


**Figura 6.** Verificarea genei *ftsZ* și a vectorilor pET21b și pET28b supuși digestiei cu enzimele *NdeI* și *XhoI*: **1** - marker de masă moleculară (vector pQE60 - digestie cu *DraI*); **2 și 4**- gena *ftsZ*; **3** – vector pET21b; **5** - vector pET28b.

Moleculele recombinante obținute după ligare au fost utilizate pentru transformarea celulelor de *Escherichia coli* tulpina DH5 $\alpha$ . Din coloniile de pe mediu cu antibiotice (ampicilină pentru pET21b și kanamicină pentru pET28b) a fost izolat ADN plasmidic (au fost examinate 4 colonii pentru fiecare vector). Din fiecare precultură a fost izolat ADN plasmidic care a fost analizat cu ajutorul electroforezei în gel de agaroză 1%. Toate coloniile analizate au avut gena *ftsZ* (Fig.7).



**Figura 7.** Verificarea prezenței genei *ftsZ* în vectorul pET21b și pET28b.  
**1** - marker de masă moleculară (vector pQE60 supus digestiei cu *DraI*)  
**2-5** - 5 $\mu$ l vector recombinat pET21b  
**6-9** – 5 $\mu$ l vector recombinat pET28b  
**10** – 3 $\mu$ l vector pET21b nerecombinat.

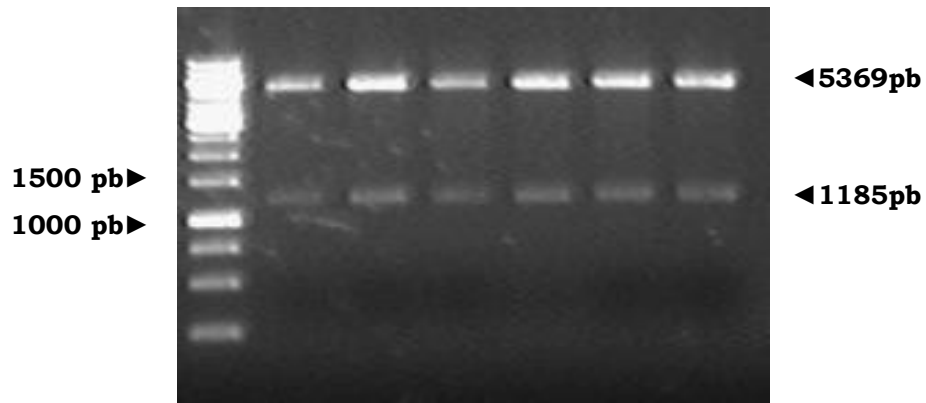


**Figura 8.** Verificarea prezenței genei *ftsZ* de la *Escherichia coli* (1152pb) în vectorul de exprimare pET21b după digestie cu *XhoI* și *NdeI*.  
**1,3,5,7-** pET21b*ftsZE.coli* nedigerat  
**2,4,6,8-** pET21b digerat (10μl amestec de digestie)  
**9-** marker de masă moleculară (vector pQE60 supus digestiei cu *DraI*)

### 5.5. Clonarea genei *ftsZ* *Pseudomonas aeruginosa* în vectorul de exprimare pET28a

Plasmidele corect recombine au fost supuse digestiei cu enzimele de restricție *NdeI* și *EcoRI*. Produșii de digestie au fost separați în gel de agaroză 1% și apoi excizați și purificați. Produșii de purificare au fost utilizați în continuare la reclonarea genei în vectorul de exprimare pET28a care a fost digerat cu aceleași enzime de restricție și purificat, apoi s-a efectuat ligarea *ftsZPs* în vectorul de exprimare pET28a. Amestecul de ligare a fost utilizat la transformarea celulelor competente de *Escherichia coli* DH5α. Amestecul de transformare a fost însămânțat pe mediu LB solid cu kanamicină. Din coloniile apărute în urma transformării s-au efectuat mai multe precultiuri suplimentate cu kanamicină, din care a fost purificat ADN plasmidic. Moleculele recombine au fost verificate inițial prin digestie enzimatică. Produșii de digestie au fost analizați în gel de agaroză 1%. Rezultatele acestei digestii sunt prezentate în Figura 9. După cum se poate observa din imaginea gelului toate moleculele au fost recombine, rezultând două fragmente, unul de mărime mare (5369pb) ce corespunde vectorului liniarizat și un fragment mai mic de 1185pb ce corespunde genei *ftsZ* de la *Pseudomonas aeruginosa*.



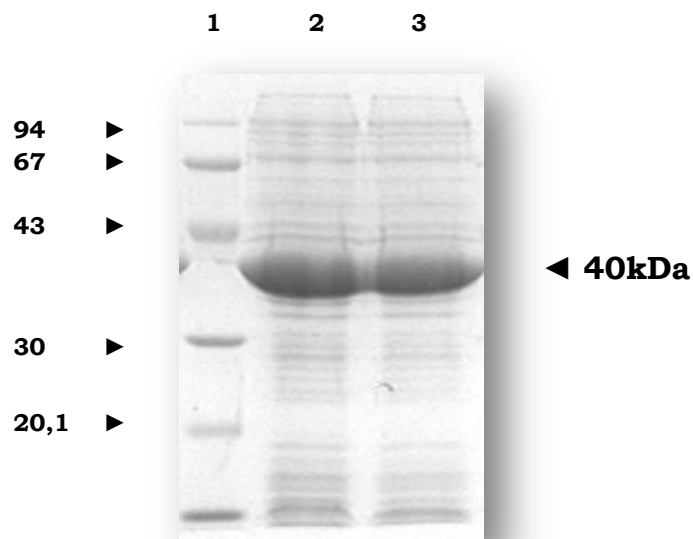


**Figura 9.** Digestia moleculelor recombinante.

- 1 - marker molecular O'GeneRuler™ 1kb Ladder (Fermentas);
- 2-7- produții de digestie ai vectorilor recombinanți pET28a-*fstZPs* cu enzimele de restricție *NdeI* și *EcoRI*.

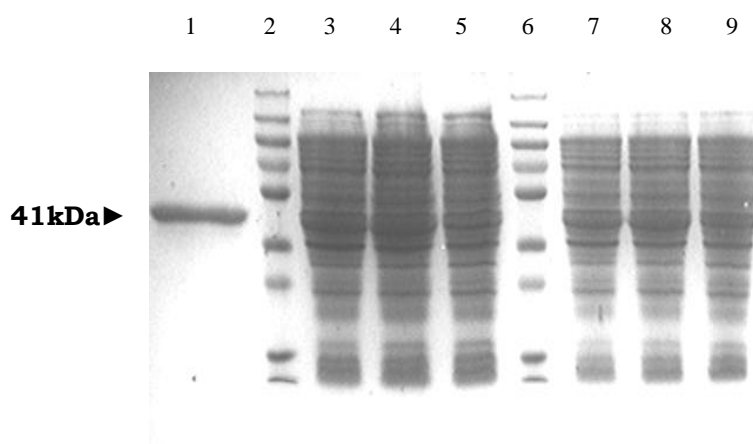
### 5.6. Exprimarea și purificarea proteinelor FtsZ recombinante

Vectorii recombinanți pET28b-*ftsZE.coli* au fost introduși prin electroporare în celule de *Escherichia coli* tulpina BL21(DE3), care este o tulpină de exprimare. Culturile de bacterii au fost lasate să crească până la  $DO_{600nm}$  de 0,8-1,0 și induse cu IPTG la 37°C. Celulele bacteriene au fost lizate prin sonicare. Lizatul bacterian a fost clarificat. S-a determinat concentrația proteinelor prin metoda Bradford. Pe baza acestei determinări s-au preparat probele pentru electroforeza în gel de poliacrilamidă.



**Figura 10.** Exprimarea proteinei FtsZ *Escherichia coli* în tulpina *E. coli* BL21(DE3)  
 1- marker molecular; 2- lizat bacterian; 3- supernatant cu proteina recombinată.

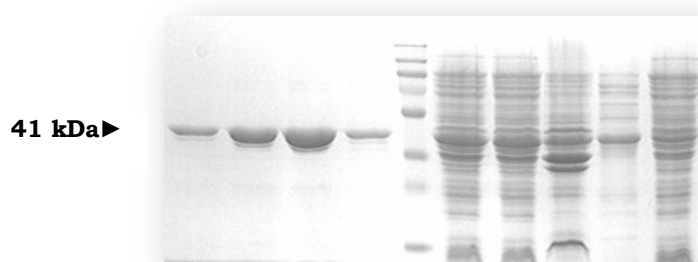
După cum se poate vedea din imaginea gelului (fig. 10) proteina recombinată FtsZ de la *Escherichia coli* se exprimă solubil în *Escherichia coli* tulpina BL21(DE3).



**Figura 11.** Verificarea pe gel de agaroză a exprimării proteinei FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* recombine în celulele gazdă de *Escherichia coli* BL21(DE3). 1- 20  $\mu$ l proteina purificată (eluat) după trecerea supernatantului pe coloană; 2- 4 $\mu$ l marker Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas SM1181); 3- 5 $\mu$ l lizat bacterian; 4- 5 $\mu$ l supernatant; 5- 5 $\mu$ l rest după trecerea prin coloană; 6- 4  $\mu$ l marker Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas SM1181); 7- 3  $\mu$ l lizat bacterian; 8- 3  $\mu$ l supernatant; 9- 3  $\mu$ l rest după trecerea prin coloană.

După cum se poate vedea din imaginea gelului proteina recombinată FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* se exprimă solubil în *Escherichia coli* tulpina BL21(DE3).

Concentrația finală a proteinei determinată prin metoda Bradford, după eluarea de pe coloană și reunirea fracțiunilor a fost de 0,8mg/ml. La repetarea exprimării și purificării FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*, concentrația finală a proteinei după eluarea pe coloană a fost de 0,56mg/ml, la un volum final de 3ml (Fig.12).

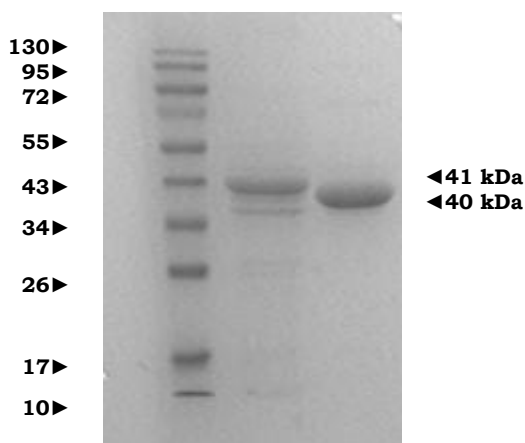


**Figura 12.** Verificarea reexprimării și purificării FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*

- 1-4 - fracțiunile după eluarea proteinei de pe coloană
- 5- PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas SM 1181)
- 6- lizat bacterian
- 7- supernatant
- 8- sediment
- 9- spălare coloană
- 10- rest după trecerea supernatantului pe coloană

### 5.7. Obținerea anticorpilor policlonali antiFtsZ

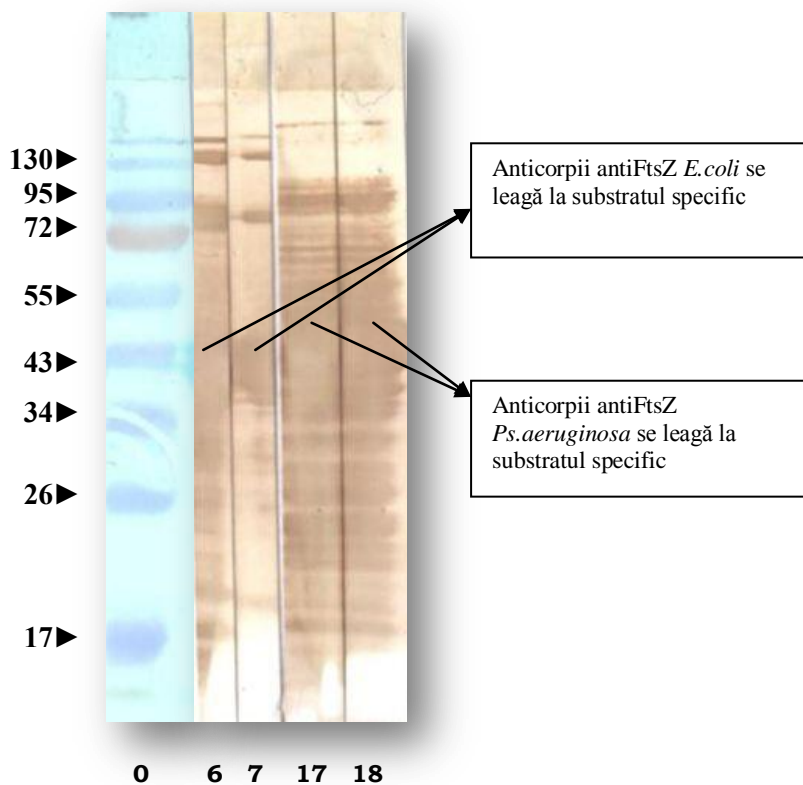
Șoarecii imunizați cu proteine recombinate FtsZ au produs anticorpi policlonali la numai 8 săptămâni după prima imunizare. Testarea reactivității specifice a anticorpilor obținuți s-a efectuat prin Western-blot. Anterior, substratoarele proteice (FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*) au fost migrate pe gel de poliacrilamidă împreună cu markerul de masă moleculară și transferate pe membrana de nitroceluloză. Verificarea transferului a fost făcută prin colorarea gelului cu Coomassie Blue (Fig.13).



**Figura 13.** Verificarea transferului FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* pe membrana de nitroceluloză

- 1: Marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder de la Fermentas (SM 0671)
- 2: 10 $\mu$ g fracțiune proteică FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* (GM= 41kDa)
- 3: 10 $\mu$ g fracțiune proteică FtsZ *Escherichia coli* (GM= 40kDa)

**Determinarea prin Western-blot a prezenței anticorpilor policlonali antiFtsZ în serurile imune după 8 săptămâni de la debutul imunizării și testarea afinității și reactivității specifice a anticorpilor obținuți**

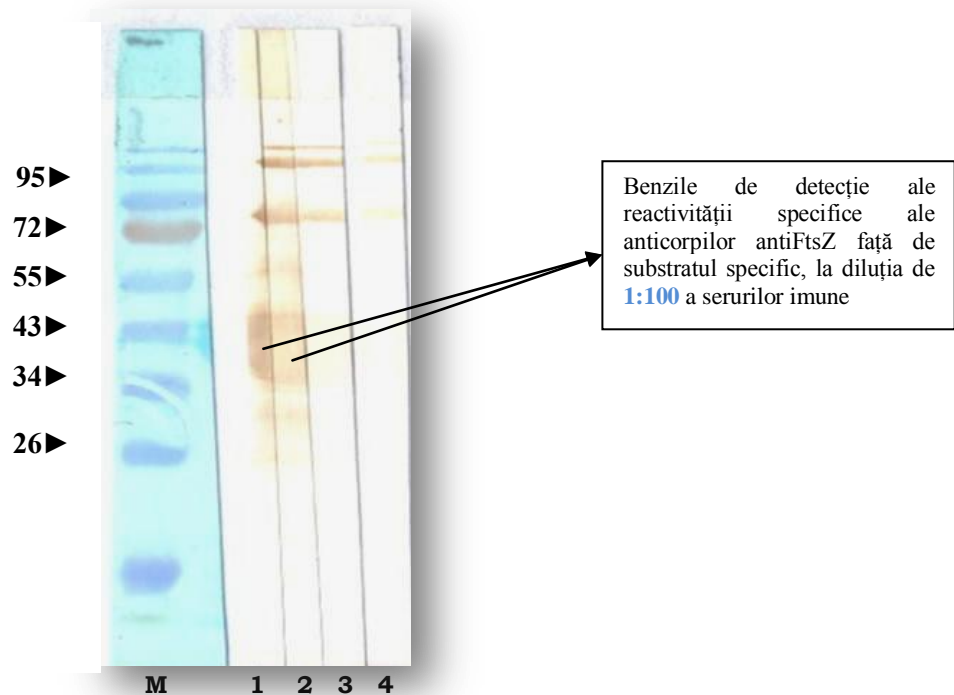


**Figura 14. Serurile imune cu anticorpilor policlonali antiFtsZ obținute după 8 săptămâni de la debutul imunizării și diluate de 100 x, au prezentat reacție pozitivă cu substratele specifice**

0	Marker PageRuler	Plus Prestained Protein Ladder	(Fermentas SM 0671)
6	FtsZ <i>E.coli</i>	Anti FtsZ <i>E.coli</i> (8 săptămâni) 1/100	Anti-șoarece 1/1500
7	FTSZ <i>E.coli</i>	Anti FtsZ <i>E.coli</i> (8 săptămâni) 1/100	Anti-șoarece 1/3000
17	FTSZ <i>P.aeruginosa</i>	Anti FtsZ <i>P.aeruginosa</i> (8 săptămâni) 1/100	Anti-șoarece 1/1500
18	FTSZ <i>P.aeruginosa</i>	Anti FtsZ <i>P.aeruginosa</i> (8 săptămâni) 1/100	Anti-șoarece 1/3000

## 5.8. Caracterizarea anticorpilor policlonali anti-FtsZ

Testarea concentrațiilor optime de anticorpi primari (prin diluțiile serurilor imune obținute prin imunizarea cu FtsZ *Escherichia coli*, după 16 săptămâni de la debutul imunizării) și a concentrațiilor optime de anticorpi secundari.



**Figura 15.** Analiza prin Western-blot a concentrațiilor optime de anticorpi primari din serurile imune ale grupului *E.coli*, obținute după 16 săptămâni de la începerea imunizării

0 Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas SM 0671)

1 : FtsZ *E.c.* Anti FtsZ *E.c.* (16 săptămâni) 1/100 Anti-șoarece 1/1500 +++++

2 : FtsZ *E.c.* Anti FtsZ *E.c.* (16 săptămâni) 1/100 Anti-șoarece 1/3000 +++

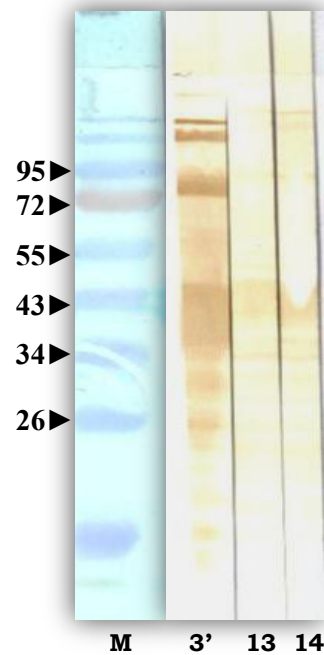
3 : FtsZ *E.c.* Anti FtsZ *E.c.* (16 săptămâni) 1/250 Anti-șoarece 1/1500 +

4 : FtsZ *E.c.* Anti FtsZ *E.c.* (16 săptămâni) 1/250 Anti-șoarece 1/3000

La diluții de 1:100 ale serurilor imune obținute după 16 săptămâni de la debutul imunizării se observă benzi distincte determinate de legarea anticorpilor antiFtsZ la substratul specific. Combinațiile optime ale diluțiilor anticorpilor primari din serurile imune cu diluțiile anticorpilor secundari constatate:

- anticorpilor primari antiFtsZ 1:100 și anticorpilor secundari 1:1500 sau anticorpilor primari antiFtsZ 1:100 și anticorpilor secundari 1:3000, aspect care urmează să fie clarificat în experimentele următoare.

**Testarea reactivității specifice a diferitelor concentrații de anticorpi primari antiFtsZ *E.coli* cu substratul specific FtsZ *E.coli***

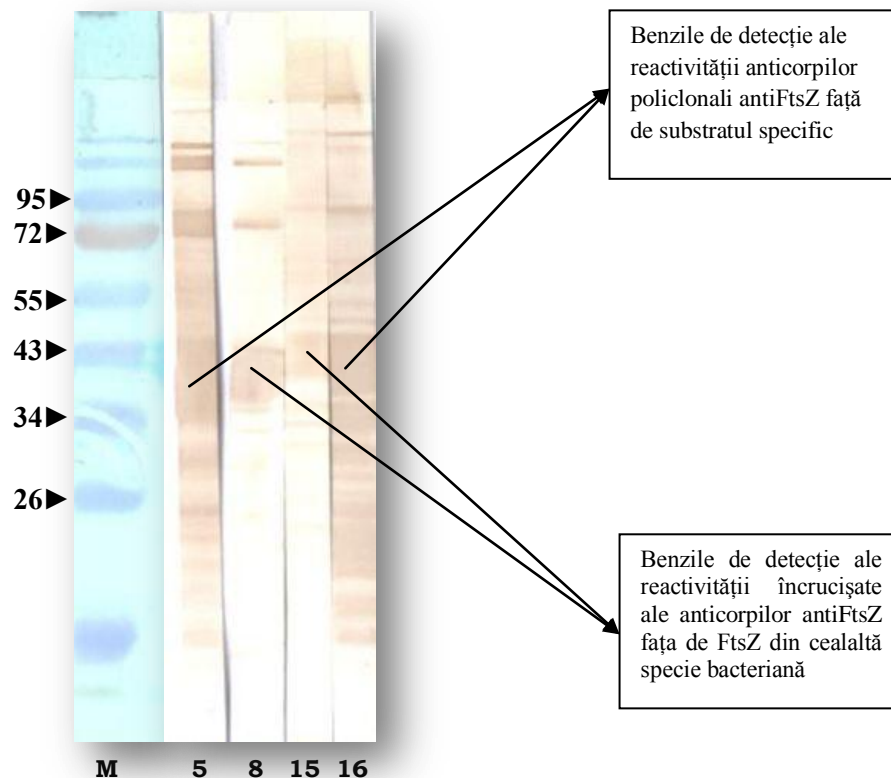


**Figura 16.** Testarea prin Western-blot a reactivității specifice a diferitelor concentrații de anticorpi primari antiFtsZ *E.coli* cu substratul specific FtsZ *E.coli*

<b>0</b>	Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas SM 0671)			
<b>3'</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti FtsZE.c. (16 săptămâni) <b>1/250</b>	Anti-șoarece <b>1/3000</b>	++++
<b>13</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti FtsZE.c. (16 săptămâni) <b>1/500</b>	Anti-șoarece <b>1/3000</b>	+++
<b>14</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	AntiFtsZE.c. (16 săptămâni) <b>1/1000</b>	Anti-șoarece <b>1/3000</b>	++

**Concentrația optimă** de anticorpi primari din seruri imune provenite de la recoltare efectuată la 16 săptămâni după debutul imunizării repetate a șoarecilor, este de **1:500**, cu o diluție de **1:3000** a anticorpilor secundari. La aceste concentrații, banda de detecție a reacției substratului FtsZ *Escherichia coli* cu anticorpilor policlonali specifici este clară, specifică, fără un detecția unor legări nespecifice semnificative. La incubarea serurilor imune în diluție de 1:250 cu substratul specific, urmată de incubarea cu anticorpilor secundari cuplați cu peroxidază, în diluție de 1:3000, apar la detecție astfel de legări nespecifice.

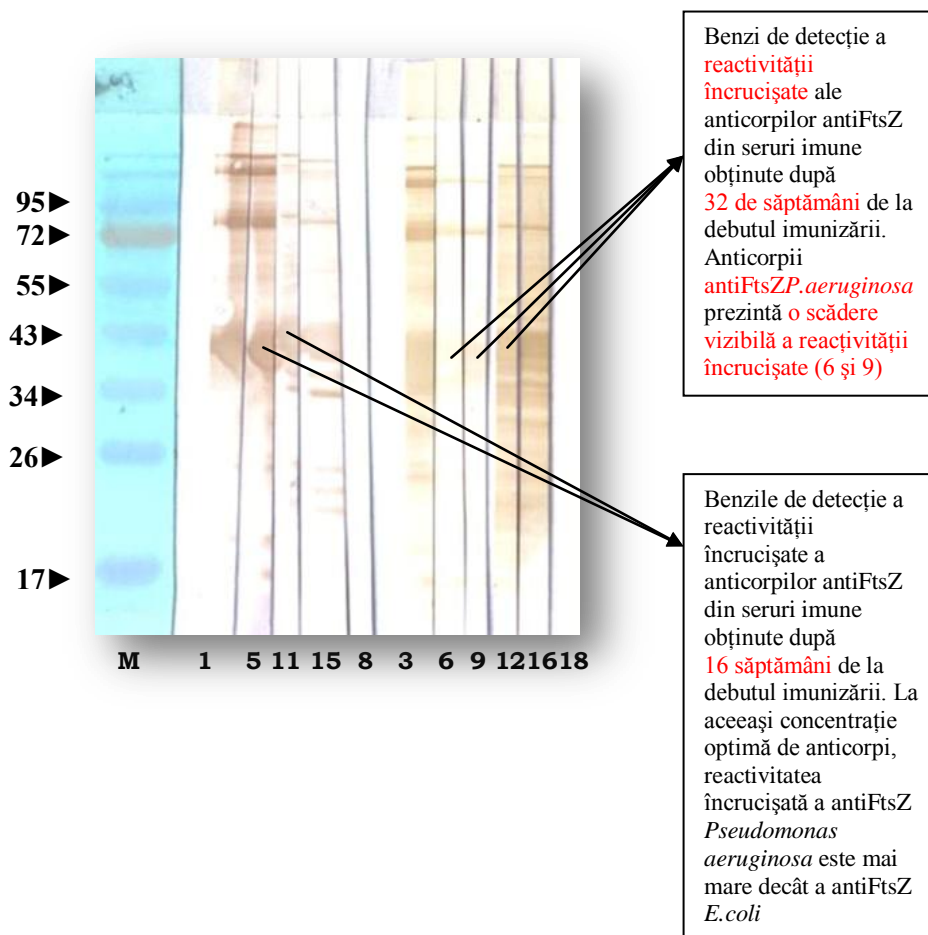
**Analiza reactivității încrucișate între FtsZ ale celor două specii de bacterii prin Western-blot, cu seruri imune obținute după 8 săptămâni de la prima imunizare și ulterior cu seruri imune obținute după 16 și 32 de săptămâni de la debutul imunizării.**



**Figura 17.** Analiza prin Western-blot a reactivității încrucișate a FtsZ de la *E. coli* și *Pseudomonas aeruginosa*, prin incubarea substratului cu seruri imune obținute la **8 săptămâni** de la debutul imunizării.

<b>5</b>	FTSZ <i>E.c.</i>	Anti <i>E.c.</i>	8 săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	++++
<b>8</b>	FTSZ <i>E.c.</i>	Anti <i>P.a.</i>	<b>8 săptămâni</b>	1/250	Anti-șoarece 1/3000	<b>+++ reactivitate încrucișată</b>
<b>15</b>	FTSZ <i>P.a.</i>	Anti <i>E.c.</i>	<b>8 săptămâni</b>	1/250	Anti-șoarece 1/3000	<b>+++ reactivitate încrucișată</b>
<b>16</b>	FTSZ <i>P.a.</i>	Anti <i>P.a.</i>	8 săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	++++

Se constată reactivitatea încrucișată a serului imun al fiecărui grup cu proteina celuilalt grup: anticorpii policlonali antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa* prezintă reactivitate încrucișată cu substratul FtsZ *Escherichia coli* (banda 8) și reacție imună pozitivă cu substratul specific FtsZ *Escherichia coli* (banda 5); anticorpii policlonali antiFtsZ *Escherichia coli* prezintă reactivitate încrucișată cu substratul FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* și reacție imună pozitivă cu substratul specific antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figura 18.** Detecția prin Western-blot a reactivității încrucișate a FtsZ de la *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa* cu seruri imune în diferite diluții provenite de la recoltări efectuate după **16 și 32 săptămâni** de la debutul imunizării.

Markerul de masă moleculară este SM 0671 de la Fermentas

<b>1</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti FtsZ <i>E.c.</i>	16 săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	++++
<b>5</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti FtsZ <i>P.a.</i>	16 săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	++++ reactivitate încrucișată
<b>11</b>	FtsZ <i>P.a.</i>	Anti FtsZ <i>E.c.</i>	16 săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	+++ reactivitate încrucișată
<b>15</b>	FtsZ <i>P.a.</i>	Anti FtsZ <i>P.a.</i>	16 săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	+++
<b>8</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	Ser de control preimun (NMS)	0 săptămâni;	1/250	Anti-șoarece 1/3000	- ser de control preimun

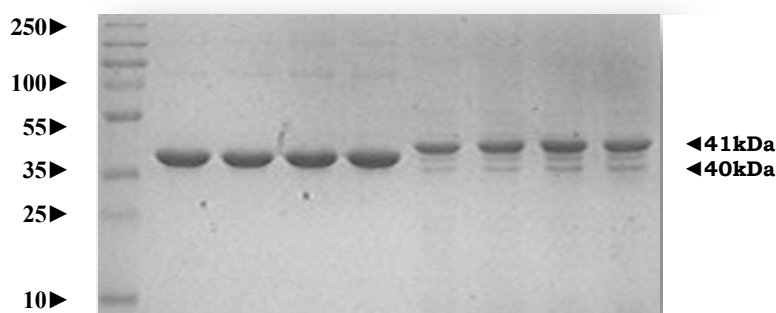


3	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti FtsZ <i>E.c.</i>	32săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	++++
6	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti FtsZ <i>P.a.</i>	32săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	+ reactivitate încrucișată slabă
9	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti FtsZ <i>P.a.</i>	32săptămâni	1/1000	Anti-șoarece 1/3000	+ reactivitate încrucișată slabă
12	FtsZ <i>P.a.</i>	Anti FtsZ <i>E.c.</i>	32săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	+++ reactivitate încrucișată
16	FtsZ <i>P.a.</i>	Anti FtsZ <i>P.a.</i>	32săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	++++
18	FtsZ <i>P.a.</i>	Ser de control preimun (NMS)	0săptămâni	1:1550	Anti-șoarece 1/3000	- ser de control preimun

Serurile imune ale fiecărui grup (din cele două grupe de șoareci imunizați cu FtsZ *Escherichia coli* și respectiv, FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*) prezintă reactivitate încrucișată cu proteinele celuilalt grup. După 32 de săptămâni de la debutul imunizării repetate, reactivitatea încrucișată a anticorpilor din serurile imune cu antigenele celeilalte specii bacteriene pare să scadă.

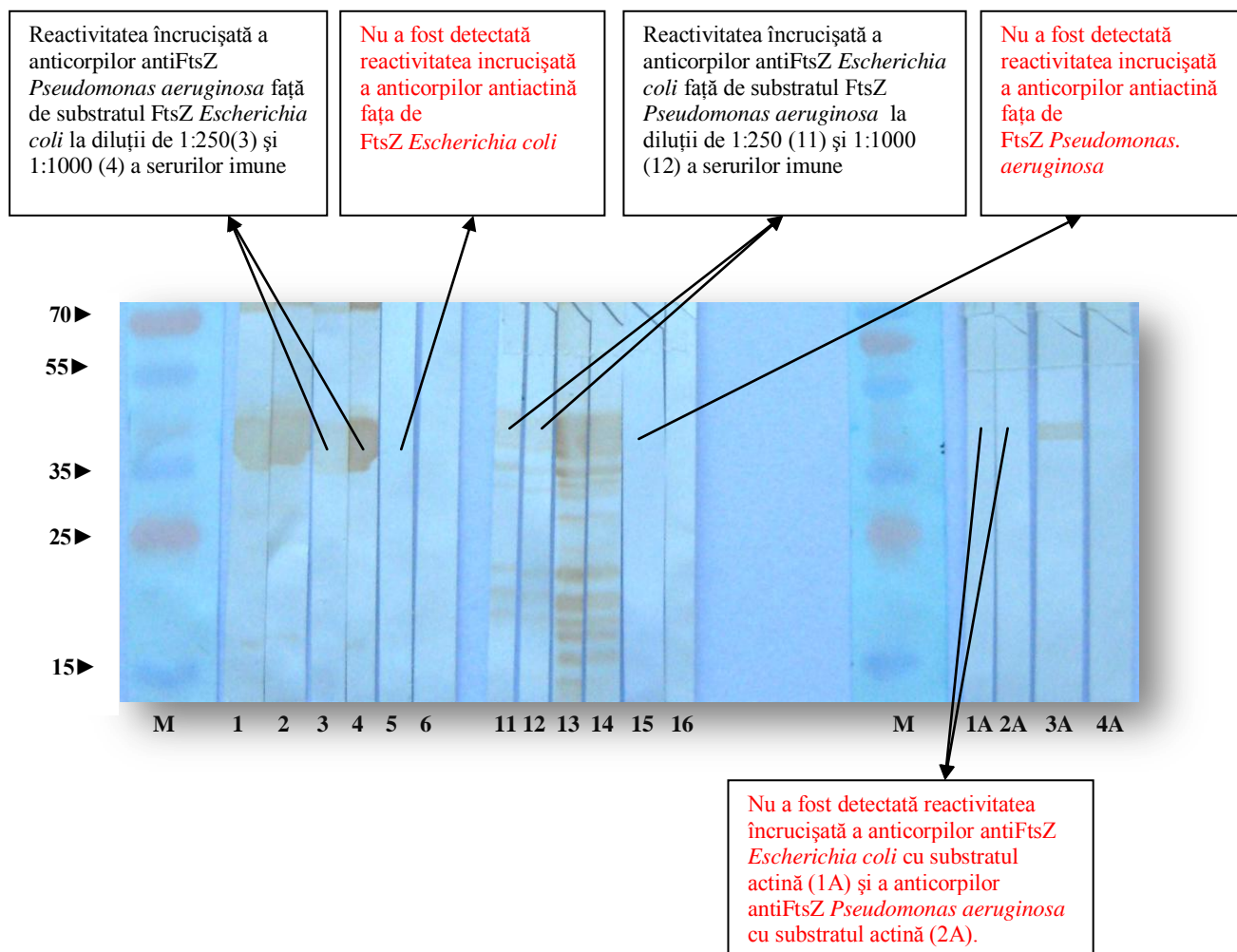
#### Analiza reactivității încrucișate între FtsZ și proteine ale citoscheletului eucariot.

După reexprimarea FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* și purificarea proteinei pe coloană cu Ni<sup>2+</sup>, FtsZ de la ambele specii bacteriene au fost supuse migrării pe gel de poliacrilamidă și transferului pe membrana de nitroceluloză. Gelul este colorat cu Coomassie Blue, pentru a verifica randamentul transferului pe membrană și distribuția benzilor.



**Figura 19.** Verificarea transferului FtsZ *E. coli* și *P.aeruginosa* pe membrana de nitroceluloză. 1: marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas SM 1181); 2, 3, 4, 5: 2,5μg, 5μg, FtsZ *Escherichia coli* ; 6, 7, 8, 9: 2,5μg, 5μg, FtsZ *P. aeruginosa*

**Analiza prin Western-blot a reactivității încrucișate a anticorpilor policlonali obținuți față de FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* cu actina**



**Figura 20.** Analiza prin Western-blot a reactivității anticorpilor policlonali antiFtsZ cu antigenii FtsZ și cu actina.

**0** Marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas SM 1181)

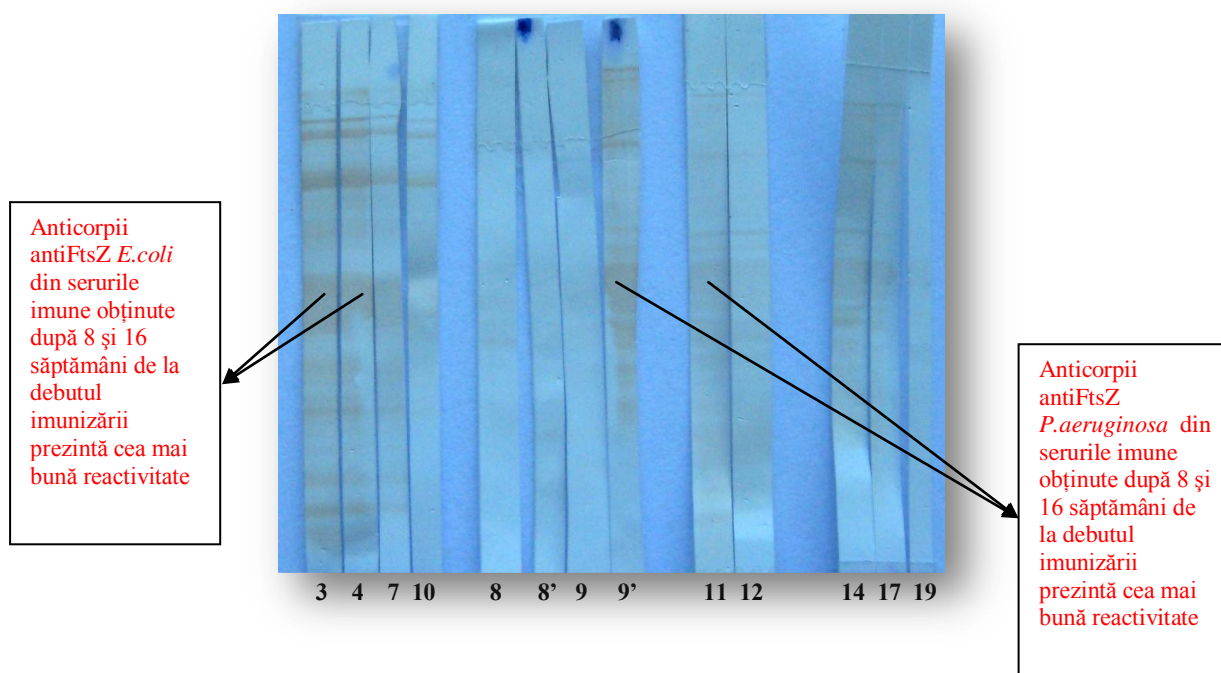
1	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti <i>E.c.</i> 16săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	+
2	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti <i>E.c.</i> 16săptămâni	1/1000	Anti-șoarece 1/3000	+
3	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti <i>P.a.</i> 16săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	+reactivitate încrucișată
4	FtsZ <i>E.c.</i>	Anti <i>P.a.</i> 16săptămâni	1/1000	Anti-șoarece 1/3000	+reactivitate încrucișată

5	FTSZ <i>E.c.</i>	Anticorpi monoclonali antiactină 1/500		Anti- iepure 1/2000	- nu a fost detectată reactivitate încrucișată	
6	FTSZ <i>E.c.</i>	NMS	0 săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	- ser preimun
11	FTSZ <i>P.a.</i>	Anti <i>E.c.</i>	16săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	+reactivitate încrucișată
12	FTSZ <i>P.a.</i>	Anti <i>E.c.</i>	16săptămâni	1/1000	Anti-șoarece 1/3000	+reactivitate încrucișată
13	FTSZ <i>P.a.</i>	Anti FtsZ <i>P.a.</i>	16săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	+
14	FTSZ <i>P.a.</i>	Anti <i>P.a.</i>	16săptămâni	1/1000	Anti-șoarece 1/3000	+
15	FTSZ <i>P.a.</i>	Anti actin monoclonal Ab 1/500		Anti- iepure 1/2000	- nu a fost detectată reactivitate încrucișată	
16	FTSZ <i>P.a.</i>	NMS	0 săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	- ser preimun
1A	Actină	Anti <i>E.c.</i>	16săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	- nu a fost detectată reactivitatea încrucișată
2A	Actină	Anti <i>P.a.</i>	16săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	- nu a fost detectată reactivitatea încrucișată
3A	Actină	Anticorpi monoclonali antiactină 1/500		Anti- iepure 1/2000	+	
4A	Actină	NMS	0săptămâni	1/250	Anti-șoarece 1/3000	- ser preimun

Anticorpii antiFtsZ din serurile imune obținute după 16 săptămâni de la debutul imunizării determină apariția benzilor de reactivitate specifică și încrucișată și la diluții mari ale serurilor, de 1:1000. Actina nu este recunoscută de anticorpii policlonali antiFtsZ nici la concentrații mari ale acestora (diluții de 1:250 ale serurilor imune), iar anticorpii monoclonali antiactină nu recunosc proteinele recombinat FtsZ.

#### **Testarea reactivității anticorpilor policlonali antiFtsZ în timp**

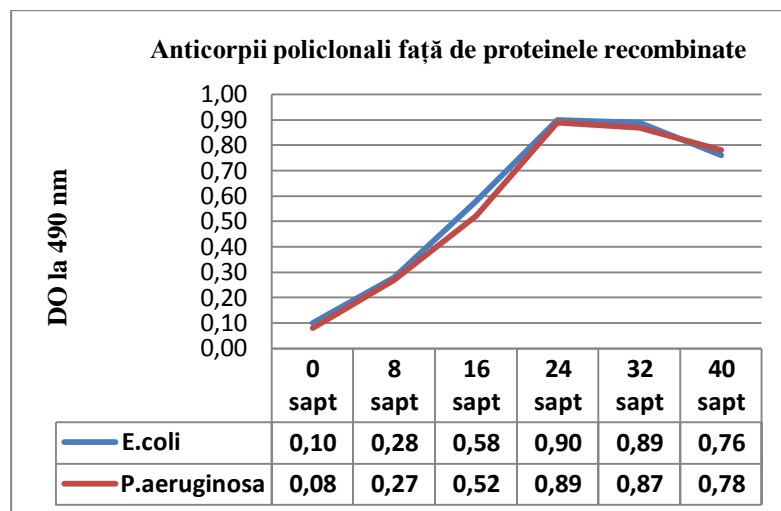
Ulterior recoltărilor efectuate la 40 de săptămâni de la prima imunizare, au fost preparate diluții de 1:500 ale serurilor imune obținute începând cu recoltarea din 19.12.2010. Anticorpii secundari au fost diluați în proporția de 1:3000.



**Figura 21.** Analiza prin Western-blot a reactivității în timp a anticorpilor policlonali anti-FtsZ *Escherichia coli* și anti-FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*

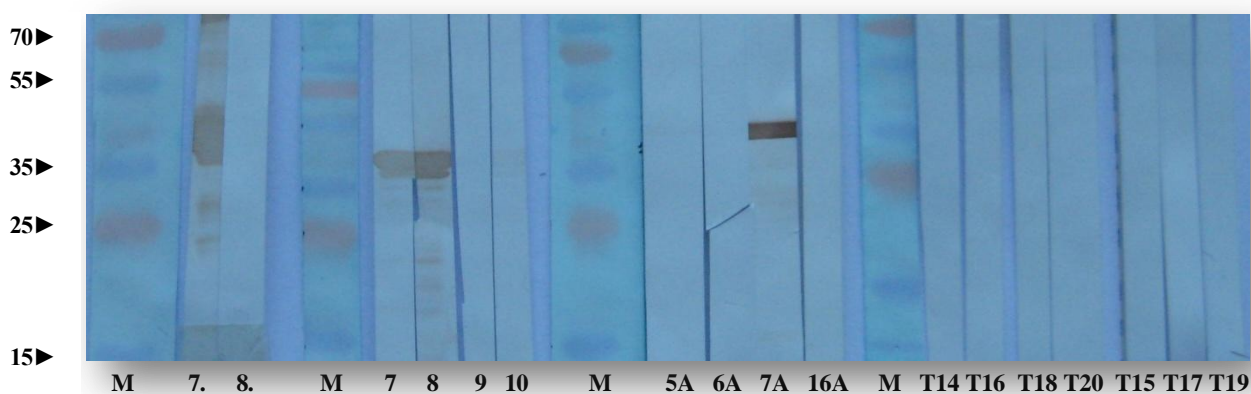
<b>3/7.2.11</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	AntiFtsZ <i>E.c.</i>	<b>8săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	++++
<b>4</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	AntiFtsZ <i>E.c.</i>	<b>16săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	++++
<b>7</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	AntiFtsZ <i>E.c.</i>	<b>24săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	++
<b>10</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	AntiFtsZ <i>E.c.</i>	<b>32săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	++
<b>8/10.12.10</b>	FtsZ <i>E.c.</i>	AntiFtsZ <i>E.c.</i>	<b>40săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	+
<b>8'</b>	FtsSZ <i>E.c.</i>	NMS	0săptămâni	Anti-șoarece 1/3000	- ser preimun
<b>9</b>	FtsZ <i>P.a</i>	NMS	0săptămâni	Anti-șoarece 1/3000	- ser preimun
<b>9'</b>	FtsZ <i>P.a</i>	AntiFtsZ <i>P.a.</i>	<b>8săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	++++
<b>11/26.1.11</b>	FtsZ <i>P.a</i>	AntiFtsZ <i>P.a.</i>	<b>16săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	++++
<b>12</b>	FtsZ <i>P.a</i>	AntiFtsZ <i>P.a.</i>	<b>24săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	++++
<b>14/7.2.11</b>	FtsZ <i>P.a</i>	AntiFtsZ <i>P.a.</i>	<b>32săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	+++
<b>17</b>	FtsZ <i>P.a</i>	AntiFtsZ <i>P.a.</i>	<b>40săptămâni</b>	Anti-șoarece 1/3000	++
<b>19</b>	FtsZ <i>P.a</i>	NMS	0săptămâni	Anti-șoarece 1/3000	- ser preimun

Cea mai bună reactivitate o au anticorpii antiFtZ din serurile imune obținute prin recoltări la 8-16 săptămâni după debutul imunizării, rezultate care corespund cu datele obținute la determinarea titrului de anticorpi din serurile imune prin tehnica ELISA.



**Figura 22.** Titrul de anticorpi în serurile obținute de la cele două grupuri de șoareci prin recoltări la 8, 16, 24, 32, 40 de săptămâni de la prima imunizare.

### Analiza prin Western-blot a reactivității încrucișate a FtsZ cu actina și beta-tubulina



**Figura 23.** Analiza prin Western-blot a posibilei reactivități încrucișate a anticorpilor antiFtsZ cu actina și  $\beta$ -tubulina.

- 0** Marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas SM 1181)
- 7.** FtsZ E.c. AntiFtsZ E.c. 16 săptămâni 1/500 Anti-șoarece + 1/3000
- 8.** FtsZ E.c. Anticorpi antiactină monoclonali 1/500 Anti-iepure 1/2000 **nu există reactivitate încrucișată**

7	FtsZ <i>P.a</i>	AntiFtsZ <i>E.c.</i>	16 săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	+
8	FtsZ <i>P.a</i>	AntiFtsZ <i>P.a.</i>	16 săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	+
9	FtsZ <i>P.a</i>	Anti actin monoclonal Ab 1/500			Anti-iepure 1/2000	nu există reactivitate încrucișată
10	FtsZ <i>P.a</i>	NMS	0 săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	Ser preimun
5A	Actină	AntiFtsZ <i>E.c.</i>	16 săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	nu există reactivitate încrucișată
6A	Actină	AntiFtsZ <i>P.a.</i>	16 săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	nu există reactivitate încrucișată
7A	Actină	Anti actin monoclonal Ab 1/500			Anti-iepure 1/2000	+
16A	Actină	NMS	0 săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	ser preimun
T14	Tubulină	AntiFtsZ <i>E.c.</i>	16 săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	nu există reactivitate încrucișată
T16	Tubulină	AntiFtsZ <i>P.a.</i>	16 săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	nu există reactivitate încrucișată
T18	Tubulină	Anti actin monoclonal Ab 1/500			Anti-iepure 1/2000	nu există reactivitate încrucișată
T20	Tubulină	NMS	0 săptămâni	1/500	Anti-șoarece 1/3000	ser preimun
T15	Tubulină	AntiFtsZ <i>E.c.</i>	16 săptămâni	1/100	Anti-șoarece 1/3000	nu există reactivitate încrucișată
T17	Tubulină	AntiFtsZ <i>P.a.</i>	16 săptămâni	1/100	Anti-șoarece 1/3000	nu există reactivitate încrucișată
T19	Tubulină	NMS	0 săptămâni	1/100	Anti-șoarece 1/3000	ser preimun

Actina și beta-tubulina nu sunt recunoscute de anticorpii policlonali antiFtsZ. Anticorpii monoclonali antiactină nu recunosc FtsZ *Escherichia coli*, FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* și tubulina, dar dau benzi clare când sunt incubati cu actina. După incubarea substratelor (proteinele recombinante FtsZ, actina sau tubulina) cu serurile preimune nu rezultă benzi de detecție a legării unor anticorpi existenți în organismul animalelor de laborator anterior imunizării repetate cu FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*.

## 6. Analizarea și discutarea rezultatelor

Anumite studii evidențiază prezența genei *ftsZ* și a proteinei codificate de această genă în „aproape dacă nu chiar în toate speciile de bacterii, în formă de coci sau bacili, Gram-negative și Gram-pozitive” [Corton și colab., 1987]. Proteina FtsZ poate fi considerată ca o țintă ideală pentru terapia antibacteriană, deoarece este asigurat spectrul larg de acțiune al agenților terapeutici orientați față de această proteină, FtsZ fiind conservată și universal prezentă la bacterii. FtsZ este o proteină esențială, cu rol central în diviziunea celulară, eveniment critic pentru supraviețuirea bacteriilor. [Amer și colab., 2008; Jeffrey și colab., 2003; Löwe și colab., 2004; McDevitt și colab., 2002; Mingorance și colab., 2010; Weiss, 2004]

Proteinele FtsZ din celulele de *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa* a evidențiat un grad ridicat de omologie al acestor secvențe, de 83,76%, cu o identitate de secvență de 58,63%, fiind posibil ca cele două proteine să dețină epitopi asemănători din punct de vedere spațial, cu mici diferențe ale secvenței de aminoacizi. Această ipoteză a fost analizată prin incubarea serurilor imune provenite de la ambele grupuri, obținute la 8 săptămâni de la debutul imunizării, cu substratele FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*, într-o nouă determinare Western-blot. S-a constatat reactivitatea încrucișată a serului imun al fiecărui grup cu proteina celuilalt grup: anticorpii policlonali antiFtsZ *Escherichia coli* prezintă reactivitate încrucișată cu substratul FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* și din nou reacție imună pozitivă cu substratul specific, FtsZ *Escherichia coli*; anticorpii policlonali antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa* prezintă reactivitate încrucișată cu substratul FtsZ *Escherichia coli* și reacție imună pozitivă cu substratul specific FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*.

Detecția prin Western-blot a reactivității încrucișate a FtsZ de la *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa* cu seruri imune în diferite diluții, provenite de la recoltări efectuate după 16 și 32 săptămâni de la debutul imunizării, au condus la același rezultat: serurile imune ale fiecărui grup (din cele două grupe de șoareci imunizați cu FtsZ *Escherichia coli* și respectiv, FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*) prezintă reactivitate încrucișată cu proteinele celuilalt grup. După 32 de săptămâni de la debutul imunizării repetate, reactivitatea încrucișată a anticorpilor din serurile imune cu antigenele celeilalte specii bacteriene pare să scadă. (fig.43) Dinamica titrului de anticorpi stabilită prin ELISA se corelează cu acest rezultat: concentrația anticorpilor antiFtsZ în serurile imune este în scădere după ce atinge un

vârf pe la 24 de săptămâni și intră într-un platou până la 32 săptămâni. Creșterea rapidă a titrului de anticorpi este rezultatul răspunsului imun secundar mai puternic.

Reactivitatea încrucișată a fost prezentă din punctual inițial al detecției, la 8 săptămâni de la prima imunizare și a persistat apoi întreaga perioadă de analiză. Chiar și în benzile incubate cu anticorpi din seruri imune diluate de 500 x și chiar 1000 x, reactivitatea încrucișată a putut fi detectată. Aceste rezultate nu sunt surprinzătoare având în vedere gradul înalt de omologie între secvențele de aminoacizi ale celor două proteine, FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*.

Testarea reactivității anticorpilor policlonali antiFtsZ în timp a arătat că cea mai bună reactivitate o au anticorpilor antiFtZ din serurile imune obținute prin recoltări la 8-16 săptămâni după debutul imunizării. Odată cu creșterea intervalului de timp de la inițierea imunizării, au fost obținute reacții pozitive și la diluții de 1000 x ale anticorpilor: anticorpilor antiFtsZ din serurile imune obținute după 16 săptămâni de la debutul imunizării determină apariția benzilor de reactivitate specifică și încrucișată la astfel de diluții mari ale serurilor, de 1:1000

După caracterizarea anticorpilor policlonali anti-FtsZ *Escherichia coli* și anti-FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* și analiza reactivității încrucișate cu antigenii celeilalte specii procariote, a fost analizată posibilitatea ca acești anticorpi obținuți față de FtsZ, o proteină esențială a citoscheletului procariot, să recunoască proteine ale citoscheletului eucariot: actina și tubulinele. Este susținută ideea că o proteină ancestrală care conținea un domeniu de legare a GTP cu pliere de tip Rossman a evoluat divergent, în două direcții: în familia de GTPaze tipice și în GTPazele atipice care include proteinele FtsZ tubulinele. [Erickson, 1998; Löwe și Amos, 1998].

În ceea ce privește GTPazele atipice, compararea structurii primare a FtsZ și tubulinelor a pus în evidență faptul că aceste proteine au în comun o secvență bogată în glicină [GGGTG(S\T)G], care în tubulină este cunoscută ca fiind parte din structura situsului de legare al GTP din domeniul N-terminal și nici o altă proteină cunoscută nu are această secvență, în afară de tubuline și FtsZ. Această secvență este una dintre cele trei secvențe înalt conservată în familia tubulinelor care numără peste 150 de proteine. Și este de asemenea conservată în proteinele FtsZ ale căror gene au fost secvențiate. [Mukherjee și colab., 1993] Alinierea secvențelor tubulinelor și FtsZ arată o lipsă totală de identitate de secvență la capătul C-terminal. În total, omologia de secvență evidențiată prin aliniere nu depășește 20%, indiferent de speciile selectate pentru a alinia secvențe ale tubulinelor și FtsZ. [Burns, 1998].

Alinierea secvențelor izotipurilor tubulinice umane, bovine și murine evidențiază o identitate totală a secvenței de aminoacizi, de 100%. Alinierea secvenței primare a  $\beta$ -tubulinelor de la om, bovine și murine cu proteina FtsZ de la *Escherichia coli* arată o identitate de secvență de 13,96%, iar dacă alinierea s-a făcut cu secvența de aminoacizi a proteinei FtsZ de la *Pseudomonas aeruginosa*, identitatea constatată este de 13,51%.

Se constată o lipsă totală de omologie între actină și omologul procariot al tubulinelor, proteina FtsZ, deși actina, component al citoscheletului, este componentul fundamental al inelului citokinetic al eucariotelor, iar FtsZ îndeplinește în celulele procariote aceeași funcție.

Erickson subliniază că practic s-a produs o inversare în cursul evoluției a rolului în citokineză și nu numai a acestor proteine ale citoscheletului celulelor eucariot, față de rolul îndeplinit la procariote: FtsZ prezintă un anumit grad de omologie structurală cu tubulinele, dar funcțional este similară actinei eucariote. Invers, tubulinele eucariote îndeplinesc un rol



similar cu cel al proteinelor procariote care au omologie de secvență și structurală cu actina. [Erickson, 2007]

Aceste observații explică rezultatele obținute în cursul analizei prin Western-blot a reactivității anticorpilor policlonali antiFtsZ față de actină. Substratul actină nu leagă anticorpul din serurile imune provenite de la șoareci imunizați cu FtsZ de la *Escherichia coli*. Identic, anticorpul generat față de FtsZ de la *Pseudomonas aeruginosa*, nu recunoște actina. În contrast, anticorpul de referință, un anticorp monoclonal anti-actină determină apariția unei benzi clare după incubarea cu membrana încărcată cu actină. Incubarea substratului de actină cu serurile preimune arată lipsa reactivității, deoarece nu apare o bandă detectabilă pe membrană. Actina nu este recunoscută de anticorpul policlonal antiFtsZ nici la concentrații mari ale acestora (diluții de 1:250 ale serurilor imune), iar anticorpul monoclonal antiactină nu recunoște proteinele recombinante FtsZ.

Următoarea analiză prin Western-blot a inclus și tubulina fiind urmărită reactivitatea anticorpilor policlonali antiFtsZ față de tubuline. Omologia de secvență cuprinsă între 13-14% între tubuline și FtsZ, este datorată în special aminoacizilor din domeniul N-terminal și în mod particular situsului GTPazic. Deși anticorpul este sintetizat față de proteine FtsZ și a fost stabilită prezența unor epitopi ai FtsZ *Escherichia coli* în domeniul N-terminal al proteinei [Voskuil și colab., 1994], s-ar părea că omologia de secvență cu tubulinele nu include existența unor epitopi din molecula tubulinelor, care ar putea determina o reactivitate încrucișată cu anticorpi antiFtsZ. Actina și beta-tubulina nu sunt recunoscute de anticorpul policlonal antiFtsZ. Anticorpul monoclonal antiactină nu recunoște FtsZ *Escherichia coli*, FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* și tubulina. Serurile imune reacționează cu antigenul microbial omolog, dar uneori și cu antigene ale gazdei. Anticorpul policlonal antiFtsZ recunoște și leagă epitopi comuni moleculelor omoloage FtsZ ale celor două specii bacteriene patogene la om, *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*. Antigenele proteice din surse taxonomice înrudite, dau frecvent reacții încrucișate. Cu cât două specii de organisme sunt mai apropiate filogenetic, cu atât proteinele lor omologe sunt mai asemănătoare și dau reacții încrucișate mai intense. Anticorpul este selectiv și specific, reactivitatea încrucișată fiind determinată de existența unor epitopi asemănători din punct de vedere spațial, cu mici diferențe ale secvenței de aminoacizi, care induc ușoare modificări ale epitopilor. Moleculele implicate în citokineza procariotelor și eucariotelor au suferit o evoluție divergentă, astfel încât gradul redus de omologie între secvențele FtsZ și tubulinelor spre exemplu, nu oferă anticorpilor antiFtsZ determinanți antigenici cu o structură primară și/sau o conformație care să determine reactivitate încrucișată. Legarea acestor anticorpi este selectivă, la epitopi ai antigenelor țintă bacteriene și nu afectează citoscheletul actinic și microtubulii celulelor gazdă eucariote.

## 7. Concluzii

1. Amorsele construite și condițiile de amplificare prin PCR selectate au asigurat eficiența și specificitatea reacției:
  - ▶ produsul de amplificare a fost de lungimea dorită, fără nucleotide modificate față de secvențele genelor *ftsZ E.coli* și *ftsZ P.aeruginosa* din în baza de date NCBI, eventualele erori nefiind dorite în secvențele genelor, condiție esențială pentru obținerea proteinelor recombinat
  - ▶ nu au existat amplificări nespecifice
  - ▶ cantitatea de amplicon a fost suficient de mare, ceea ce a facilitat manipularea ulterioară a secvenței amplificate și obținerea proteinelor recombinat FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*
2. Proteinele recombinat FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* se exprimă solubil în celulele de *Escherichia coli* tulpina BL21(DE3).
3. Alinierea secvențelor de aminoacizi ale proteinelor FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* a evidențiat un grad ridicat de omologie al acestor secvențe de 83,76%, ceea ce corespunde datelor din literatură conform cărora *ftsZ* este o genă esențială, conservată în speciile de bacterii.
4. Șoarecii imunizați cu proteine recombinat FtsZ au produs anticorpi policlonali la numai 8 săptămâni după prima imunizare. Titrul și afinitatea anticorpilor policlonali antiFtsZ obținuți de noi sunt suficient de mari, astfel încât anticorpul au prezentat o reacție pozitivă cu antigenii specifici, după 8 săptămâni de la prima imunizare.
5. Concentrația optimă a anticorpilor policlonali antiFtsZ obținuți de noi, utilizați în determinarea prin Western-blot a reactivității lor specifice, corespunde unei diluții a serurilor imune de 1:500. La diluții mai mici, apar numeroase benzi de detecție a unor legări nespecifice.
6. Se constată reactivitatea încrucișată a FtsZ din cele două specii de bacterii la 8 și la 16 săptămâni: anticorpul policlonali antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa* prezintă reactivitate încrucișată cu substratul FtsZ *Escherichia coli* și anticorpul policlonali

antiFtsZ *Escherichia coli* prezintă reactivitate încrucișată cu substratul FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*.

7. Cea mai bună reactivitate o au anticorpilor antiFtsZ din serurile imune obținute prin recoltări la 8-16 săptămâni după debutul imunizării. Anticorpilor antiFtsZ din serurile imune obținute după 16 săptămâni de la debutul imunizării determină apariția benzilor de reactivitate specifică și încrucișată și la diluții mari ale serurilor, de 1:1000.
8. După 32 de săptămâni de la debutul imunizării repetate, reactivitatea încrucișată a anticorpilor din serurile imune cu antigenele celeilalte specii bacteriene pare să scadă.
9. Alinierea între secvențele de aminoacizi ale FtsZ *Escherichia coli* sau FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* cu secvențele de aminoacizi ale unor izotipuri tubulinice umane, bovine sau murine din baza de date UniprotKB a arătat o omologie de secvență de 13,96% (TBB4 cu FtsZ *E.coli*) și de 13,51% (TBB4 cu FtsZ *Pseudomonas aeruginosa*).
10. Actina și beta-tubulina eucariote nu sunt recunoscute de anticorpilor policlonali antiFtsZ *Escherichia coli* și antiFtsZ *Pseudomonas aeruginosa*. Anticorpilor monoclonali antiactină nu recunosc FtsZ *Escherichia coli*, FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* și tubulina.
11. Anticorpilor policlonali obținuți prin inocularea FtsZ *Escherichia coli* și FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* la șoareci BALB/c au caracteristici de afinitate și de reactivitate care permit utilizarea lor în cercetare, în terapie antibacteriană și diagnostic.
12. Reactivitatea încrucișată a proteinelor FtsZ din cele două specii bacteriene deschide posibilitatea evaluării reactivității încrucișate a anticorpilor policlonali obținuți de noi cu proteinele FtsZ ale altor specii de bacterii. O reactivitate încrucișată extinsă, între FtsZ din celulele unui număr cât mai mare de specii bacteriene, ar oferi anticorpilor antiFtsZ calitățile necesare pentru obținerea agenților antibacterieni cu spectru larg.
13. Anticorpilor policlonali anti-FtsZ *Escherichia coli* și anti-FtsZ *Pseudomonas aeruginosa* prezintă reactivitate încrucișată față de proteine FtsZ ale altor specii, dar nu recunosc actina și tubulinele eucariote și în consecință pot fi utilizați selectiv față de proteina citoscheletului bacterian, FtsZ, pentru că nu se leagă și nu afectează proteinele citoscheletului celulei gazdă eucariote.

## ***Bibliografie selectivă***

**Amer F.A., El-Behedy E.M., Mohtady H.A.** *New Targets for Antibacterial Agents* Biotech. Mol Biol Rev. 3;2008: 46-57

**Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K.**

- ***Enzymatic Manipulation of DNA and RNA***- capitolul 3 în *Current Protocols in Molecular Biology* , secțiunea 1: *Restriction Endonucleases* pag.337-359, John Wiley & Sons Inc., 2003
- ***Escherichia coli, Plasmids, and Bacteriophages*** secțiunea II ***Vectors Derived from Plasmids*** capitolul 1 în *Current Protocols in Molecular Biology* pag.58-62, John Wiley & Sons Inc., 2003
- ***Escherichia coli, Plasmids, and Bacteriophages***, secțiunea I ***Escherichia coli***, capitolul 1 în *Current Protocols in Molecular Biology*, pag.1-31, John Wiley & Sons Inc., 2003
- ***DNA sequencing*** capitolul 7 în *Current Protocols in Molecular Biology*, pag. 736-877, John Wiley & Sons Inc., 2003
- ***Metal-Chelate Affinity Chromatography*** unitatea 10.11B din Secțiunea IV: *Purification of Proteins by Conventional Chromatography*, capitolul 10 *Analysis of Proteins* în *Current Protocols in Molecular Biology* pag. 1422-1436, John Wiley & Sons Inc., 2003

**Burns R.** Synchronized division proteins. *Nature* 391;1998: 121-123

**Chiriac M.T., Licarete E., Sas A.G., Rados A.M., Lupan I., Chiriac A.M., Speth H., Pop-Vancia V., Domsa I., Sesarman A., Popescu O., Sitaru C.** *Passive transfer of collagen XVII-specific antibodies induces sustained blistering disease in adult mice* (submitted)

**Clark D.** *Recombinant DNA Technology*, secțiunea *Multicopy Plasmid Vectors*, capitolul 22 în *Molecular*, pag.610-615, Elsevier Academic Press, 2005

**Coligan J.E., Bierer B.E., Margulies D.H., Svejach E.M., Strober W.** *Current Protocols in Immunology*, John Wiley&Sons, 2005

- **Unit 2.1** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* din capitolul 2: *Induction of Immune Responses*, p.85-96
- **Unit 2.4** *Production of Polyclonal Antisera* din capitolul 2: *Induction of Immune Responses* p.116-124
- **Unit 8.4** *One-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins* în Section III: *Electrophoretic Separation of Proteins* din capitolul 8: *Isolation and Analysis of Proteins*, p.1605-1613
- **Unit 8.9** *Staining Proteins in Gels* în Section IV: *Detection of Proteins* din capitolul 8: *Isolation and Analysis of Proteins*, p.1661-1663
- **Unit 8.10** *Immunoblotting and Immunodetection* în Section IV: *Detection of Proteins* din capitolul 8: *Isolation and Analysis of Proteins*, p.1686-1706

**Erickson H.P.** *Atomic structures of tubulin and FtsZ* Trends Cell Biol. 8; 1998: 133-137.

**Erickson H.P.** *Evolution of the cytoskeleton* Bioessays 29(7);2007: 668-677

**Fu G., Huang T., Buss J., Coltharp C., Hensel Z., Xiao J.** *In Vivo Structure of the E. coli FtsZ-ring Revealed by Photoactivated Localization Microscopy (PALM)* PLoS ONE 5(9); 2010: e12680

**Glover D.M., Hames B.D.** *Techniques for Transformation of Escherichia coli* capitolul 1 în *DNA cloning: a practical approach*, vol.1, *Core Techniques*, pag.1-35, Oxford University Press, 1995

**Gonzalez J.M., Velez M., Jimenez M., Alfonso C., Schuck P., Mingorance J., Vicente M., Minton A.P., Rivas G.** *Cooperative behavior of Escherichia coli cell-division protein FtsZ assembly involves the preferential cyclization of long single-stranded fibrils* Proc Natl Acad Sci USA 102;2005: 1895–1900

**Guertin D.A., Trautmann S., McCollum D.** *Cytokinesis in Eukaryotes* Microbiol Mol Biol Rev., 66(2);2002: 155–178

**Hales K.G., Bi E., Wu J.-Q., Adam J.C., Yu I.-C., Pringle J.R.** *Cytokinesis: an emerging unified theory for eukaryotes?* Curr Opin Cell Biol. 11;1999: 717–725

**Jeffrey E., Richard D.A., Dirk-Jan S.** *Cytokinesis in Bacteria* Microbiol Mol Biol Rev. 67(1);2003:52-65

**Löwe J., Amos A.L.** *Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ* Nature 391;1998: 203-206

**Löwe J., van den Ent F., Amos A.L.** *Molecules of the Bacterial Cytoskeleton* Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33;2004: 177-198

**MacBeath J.R.E., Harvey S.S., Oldroyd N.J.** *Automated Fluorescent DNA Sequencing on the ABI PRISM 377* capitolul 10 în *Graham C.A., Hill A.J.M. Methods in Molecular Biology* vol.167: *DNA sequencing protocols*, pag.119-153, Humana Press Incorporation, New Jersey, 2001

**McDevitt D., Payne D.J., Holmes D.J., Rosenberg M.** *Novel targets for the future development of antibacterial agents* Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 92; 2002: 28S–34S

**Mcperson M.J., Quirke P., Taylor G.R.** *Polymerase chain reaction: basic principles and automation* capitolul 1 în *PCR: a practical approach* pag. 1-13, Oxford University Press, 1991

**Mikkelsen S.R., Cortón E.** *Bioanalytical chemistry: capitolul1 Spectroscopic Methods for Matrix Characterization*, subcapitolul *Total protein-Bradford Method*, JohnWiley&Sons Inc., New Jersey, 2004

**Mingorance J., Rivas G., Vélez M., Gómez-Puertas P., Vicente M.** *Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria.* Trends Microbiol 18; 2010:348–356

**Mukherjee A., Dai K., Lutkenhaus J.** *Escherichia coli cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90; 1993: 1053–1057

**Nair A.J.** *Recombinant DNA Technology*, secțiunea 15.2. *Tools of Recombinant DNA Technology: Blue→White Screening*, capitolul 15 în *Principles of Biotechnology*, pag.631, Laxmi Publications Ltd., New Delhi, 2007

**Pollard T.** *Mechanics of cytokinesis in eukaryotes* Curr Opin Cell Biol. 22; 2010:50–56

**Popescu O.V.** *Electroforeza proteinelor în geluri de poliacrilamidă*, Ed. Tehnică, București, 1990.

**Rosenberg I. M.** *Protein Analysis and Purification* capitolul 4: *Electrophoretic Techniques*, p. 55-65, Birkhäuser, Boston, 2005

**Sambrook J., Russell D.V.**

- ***In Vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction*** capitolul 8 în *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ediția a III-a, vol.2, pag.8.1-8.29, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- ***Gel Electrophoresis of DNA and Pulse-field Agarose Gel Electrophoresis*** capitolul 5 în *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ed.a III-a, vol.1, pag.5.4-5.14, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- ***Expression of Cloned Genes in Escherichia coli*** secțiunea *Choosing a Promoter and Vector System*, protocolul: ***Expression Vectors Containing an IPTG-inducible Promoter***, capitolul 15 în *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed.a III-a, vol.3, pag.15.14-15.20, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- ***DNA ligases***– Information Panels din capitolul 1: *Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning* în *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed.a III-a, vol.1, pag.1.1.57-1.1.59, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- ***Electroporation***- Information Panel din capitolul 1: *Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning* în *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ed.a III-a, vol.1, pag.1.1.62-1.1.63, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- ***Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning*** secțiunea ***Screening for Recombinant Plasmids*** capitolul 1 în *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ed.a III-a, vol.1, pag.1.26-1.27, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- ***Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning*** secțiunea ***Dephosphorylation of Plasmid DNA***, capitolul 1 în *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed.a III-a, vol.1, pag. 1.93-1.97, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

**Straight A.F., Field C.M.** *Microtubules, membranes and cytokinesis* Curr Biol. 10; 2000: R760-R770.

**Sun Q., Margolin W.** *FtsZ Dynamics during the Division Cycle of Live Escherichia coli Cells* J. Bacteriol.180(8);1998:2050-2056

**Tengbjerg K., Haurum J.S.** *Polyclonals: A Third Generation of Antibody Therapeutics* IPT 20;2006: 46-49

**Voskuil J.L.A., Westerbeek C.A.M., Wu C., Kolk H.J., Nanninga N.** *Epitope Mapping of Escherichia coli Cell Division Protein FtsZ with Monoclonal Antibodies* J Bacteriol. vol.176(4);1994:1886-1893

**Weiss S. D.** *Bacterial cell division and the septal ring.* Mol Microbiol. 54(3);2004: 588-597

<http://ncbi.gov>

- NCBI. Enterobacteriaceae. Taxonomy browser
- NCBI. Pseudomonaceae. Taxonomy browser

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html>

<http://www.neb.com>

- T4 DNA ligase din [www.neb.com/nebecomm/products/productM0202.asp](http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0202.asp)

<http://www.promega.com/tbs/>: Promega Technical Manual pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems

Novagen pET System Manual ediția a 10-a, 2002

<http://www.fermentas.com>

- [www.fermentas.com/en/tools/doubledigest](http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest)
- [www.fermentas.com/en/support/technical-reference/phage-plasmid-dna/ptz57r](http://www.fermentas.com/en/support/technical-reference/phage-plasmid-dna/ptz57r)
- [www.fermentas.com/en/products/all/molecular-cloning/kits/k121-instaclone-pcr-cloning](http://www.fermentas.com/en/products/all/molecular-cloning/kits/k121-instaclone-pcr-cloning)
- [www.fermentas.com/en/products/all/modifying-enzymes/ligases/el001-t4-dna-ligase](http://www.fermentas.com/en/products/all/modifying-enzymes/ligases/el001-t4-dna-ligase)
- [www.fermentas.com/templates/files/tiny\\_mce/media\\_pdf/broch\\_genejet\\_P19.pdf](http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/media_pdf/broch_genejet_P19.pdf) (manual Gene Jet Plasmid Miniprep Kit- purificare plasmide din preculturi)

<http://www.stratagene.com>

- BL21(DE3) Competent Cells, BL21(DE3)pLysS Competent Cells and BL21 Competent Cells

<http://www.mn-net.com/>: PCR clean-up Gel extraction User Manual NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II

<http://expasy.org>

- UniprotKB

[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)

- ClustalW multiple alignments