



# Esperienza Università di Pavia

Laboratorio di Microbiologia 5/04/24

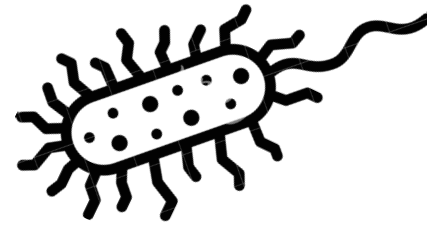
Erica Marcandalli  
Antonella De Martino  
Andrea D'Arienzo  
Michele Valsecchi

Elisa Albanese  
Claudia Sala  
Aurora Da Prada  
Sonia Manenti



Le condizioni della maggior parte dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica vengono compromesse a causa di **INFEZIONI BATTERICHE**

## Pseudomonas aeruginosa



Gram-negativo; patogeno opportunisto che colpisce pazienti immunocompromessi (*fibrosi cistica*)

(75%)

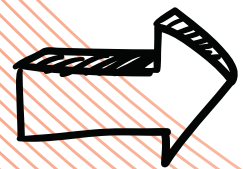


**Risposta infiammatoria esagerata:**

rilascio fattori pro-infiammatori

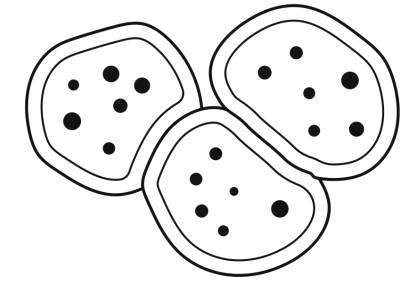
CFTR mutata

interazione con altri batteri = **biofilm**



**Lo scopo deve essere quello di eliminare non tanto il batterio (molto resistente), ma la sua virulenza**

## Staphylococcus aureus



Gram-positivo. Presente soprattutto nei pazienti in età pediatrica

## Burkholderia cenocepacia

30%

Gram-negativo; presenta un genoma costituito da:

- 3 cromosomi
- 1 plasmide
- isole di patogenicità

**QUORUM SENSING:** meccanismo di regolazione genica globale legato alla densità cellulare, che si realizza tramite il rilascio di molecole dette autoinduttori

# RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

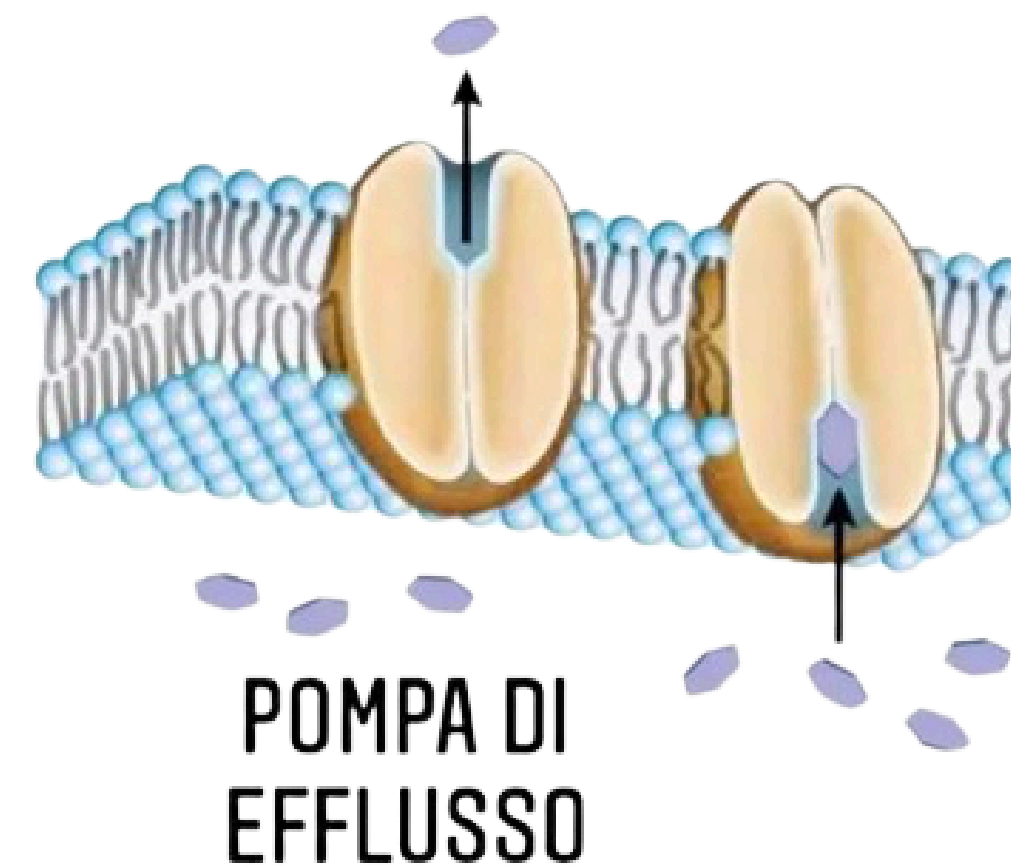
Pompe di efflusso

Modificazione del bersaglio dell'antibiotico

Mutazioni a livello della DNA girasi

Mutazioni a carico del ribosoma

Produzione di enzimi che inattivano gli antibiotici (beta lattamasi)



Sono stati identificati moltissimi geni codificanti per pompe di efflusso (16), molti dei quali giocano un ruolo cruciale nella resistenza agli antibiotici e nella tolleranza ai disinfettanti (clorexidina).



Inoltre sono coinvolte anche nella produzione di **Biofilm**

Cellule a stretto contatto tra loro tramite una matrice polimerica extracellulare

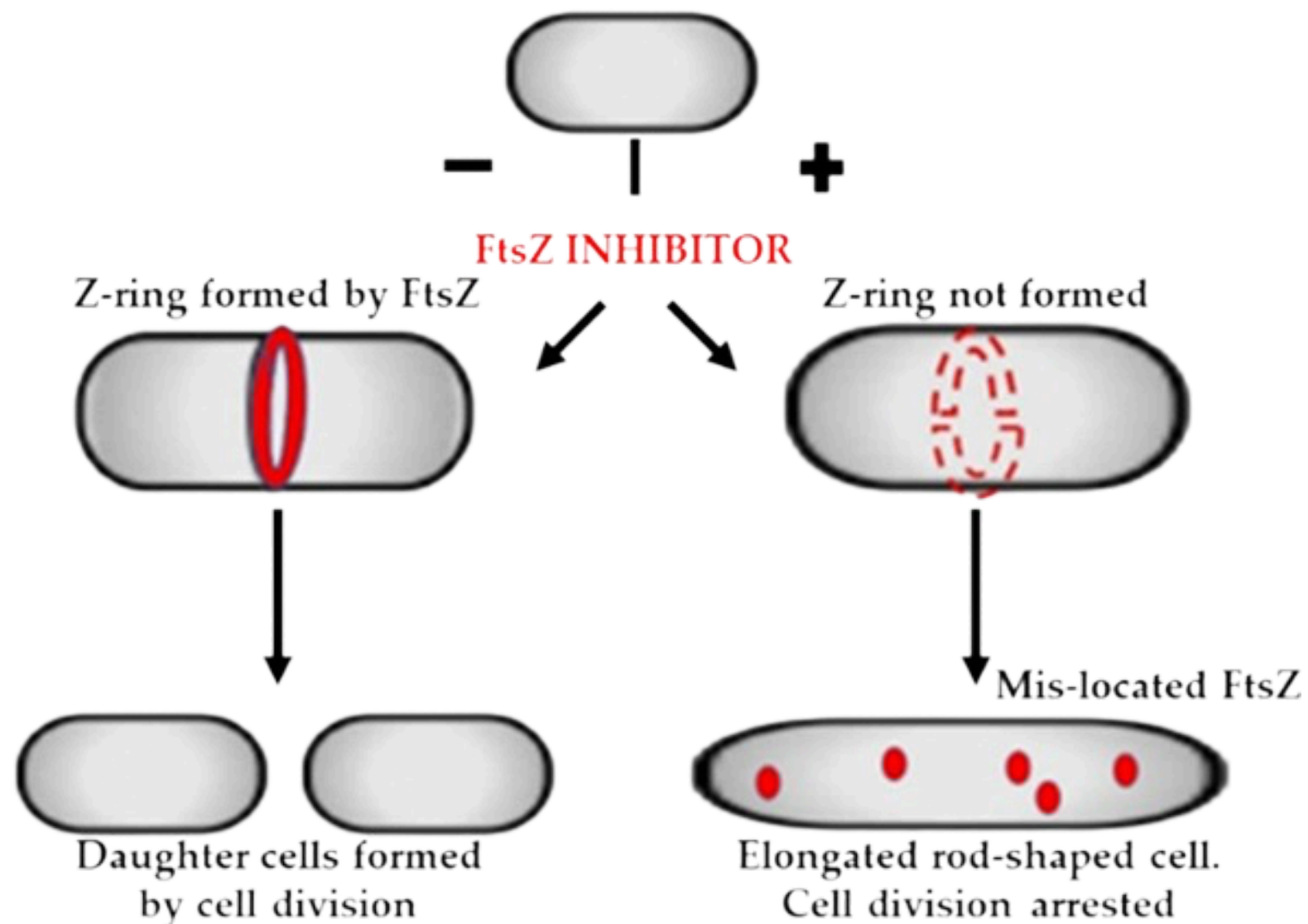


# STRATEGIE

**NON FUNZIONA CONTRO P. aeruginosa**

- 1 **C109** (MIC= 8UGg/l) proteina del setto di divisione senza la quale le altre proteine coinvolte nella divisione non vengono reclutate  
Bersaglio: **FtsZ**

INIBISCE LA FORMAZIONE DEL SETTO DI DIVISIONE



- 2 **DIKETOPIPERAZINES**

INIBISCE I FATTORI DI VIRULENZA

Conferiscono ai microorganismi patogeni la capacità di invadere i tessuti e produrre effetti tossici





# RICERCA DI STRATEGIE ALTERNATIVE

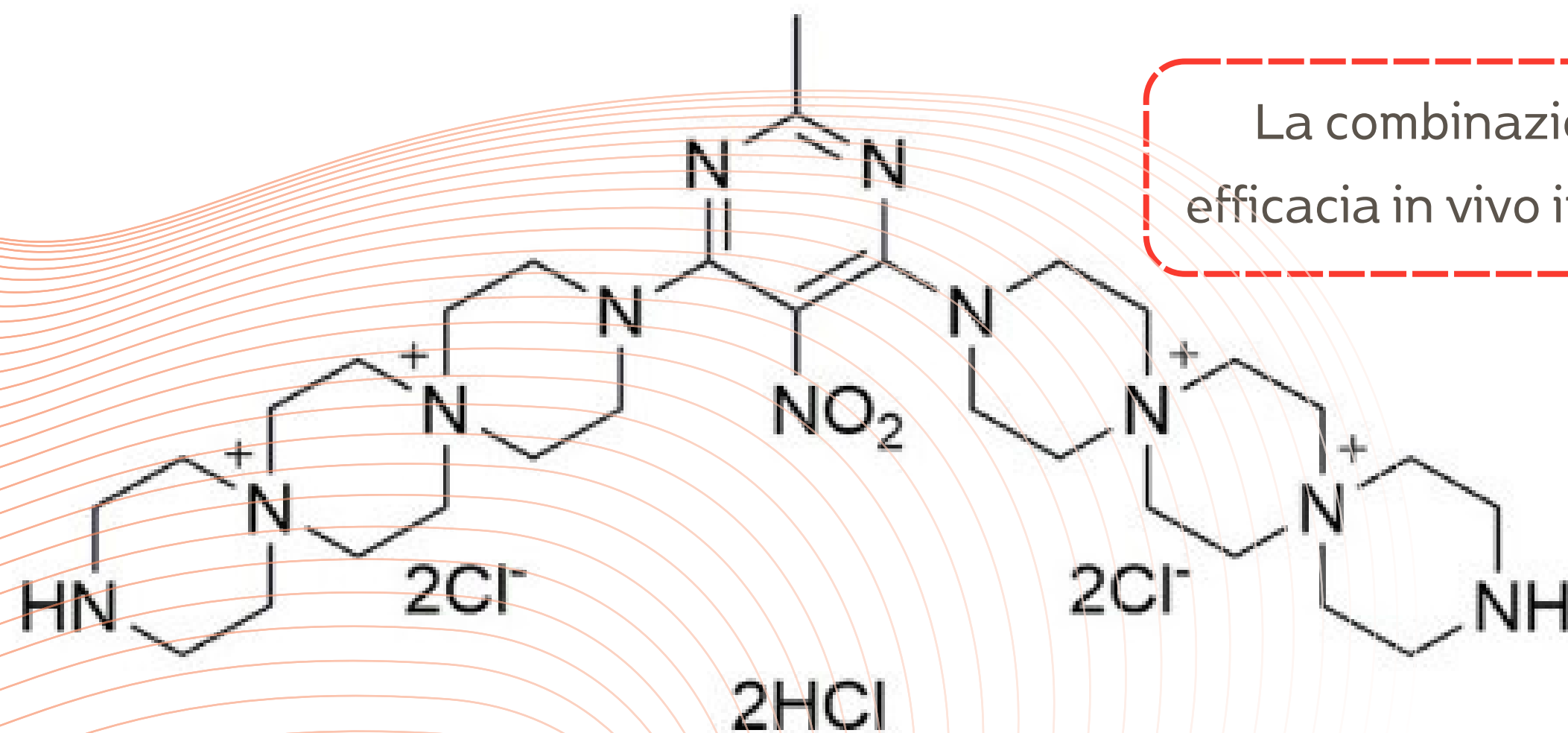
*Pseudomonas aeruginosa* è in grado di stabilire infezioni difficili da trattare nelle persone affette da fibrosi cistica. L'alto tasso di fallimento del trattamento antibiotico è dovuto alla sua nota resistenza ai farmaci, spesso mediata dalla formazione di biofilm persistenti.

Attualmente, il trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa* prevede la somministrazione di ceftazidime e colistina. Tuttavia, questi composti stanno diventando inefficaci a causa della resistenza agli antibiotici intrinseca, acquisita e adattativa.

Considerati i progressi limitati nello sviluppo di nuovi antibiotici e la minaccia di infezioni da ceppi emergenti resistenti agli antibiotici, è urgente sviluppare strategie terapeutiche alternative, compreso il riutilizzo di farmaci già esistenti.

# PDSTP - DISPIROTRIPIPERAZINA

Tra i vari approcci, è allo studio una molecola che potenzia l'attività degli antibiotici, che da sola ha effetto minimo ma in combinazione con antibiotici già in uso in clinica ne aumenta l'effetto almeno in vitro **PDSTP** un antivirale che inibisce adesione dei virus a cellule umane e in questo modo previene l'entrata del virus.



La combinazione PDSTP-rifampicina ha mantenuto la sua efficacia in vivo in un modello di infezione da *Galleria Mellonella*.

Composto non tossico caratterizzato da quattro atomi di azoto quaternario carichi positivamente.

# SCOPO DEL PRIMO ESPERIMENTO

Lo scopo di questo lavoro è stato studiare le presunte proprietà antiadesive di PDSTP su *Pseudomonas aeruginosa* mediante test di adesione.

Si è scelto *Pseudomonas* perché è il più comune nei polmoni dei pazienti con Fibrosi Cistica, ma PDSTP funziona anche contro altri batteri del gruppo Eskape

PDSTP si è rivelato efficace nel compromettere l'adesione di *Pseudomonas aeruginosa* a varie linee cellulari immortalizzate.

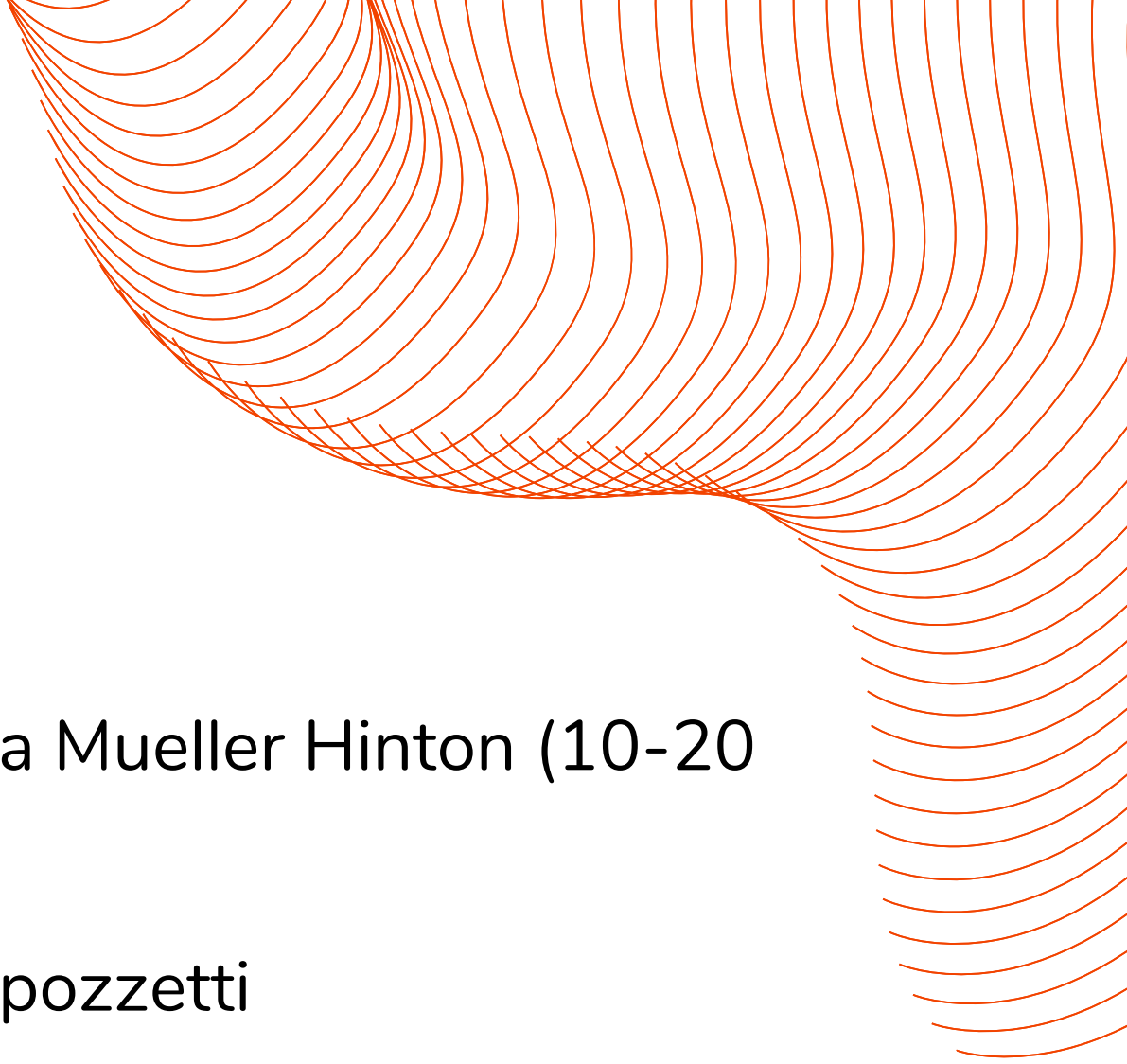
Inoltre, la combinazione di antibiotici clinicamente rilevanti con il composto ha portato a un notevole miglioramento dell'efficacia dell'antibiotico nei confronti dei ceppi clinici di fibrosi cistica multiresistenti.





# Materiali

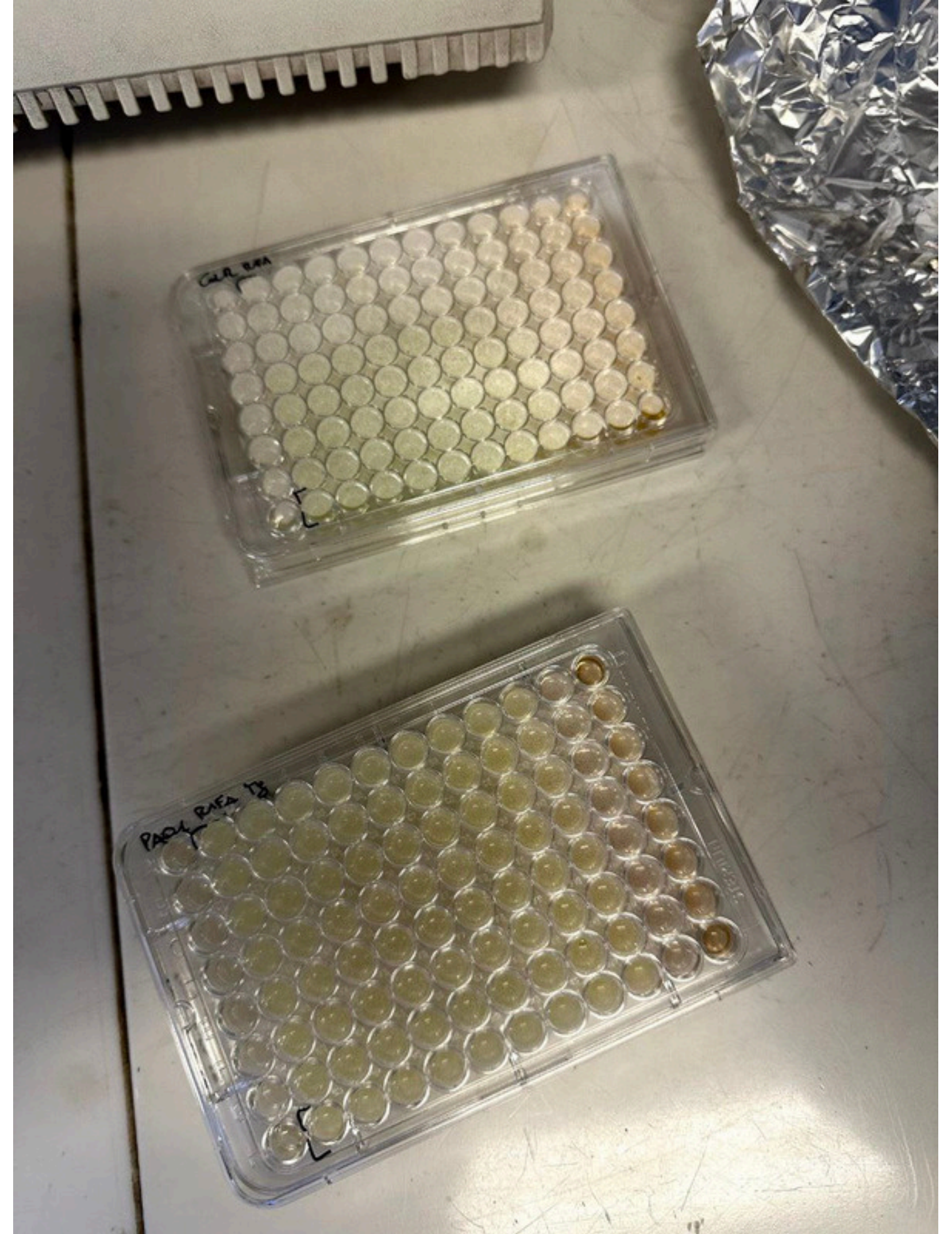
Primo test

- Ceppo PA01
  - Terreno di coltura Mueller Hinton (10-20 mg/L Mg)
  - Microtiter da 96 pozzetti
  - Rifampicina
  - Resazurina
  - Magnesio
  - PDSTP
- 



# 1-PREPARAZIONE COLTURA CELLULARE

I batteri sono stati inseriti nel microtiter contenente il terreno di coltura Mueller Hinton, in seguito al checker board assay con PDSTP e rifampicina. Poi incubati a 37°C per 20h





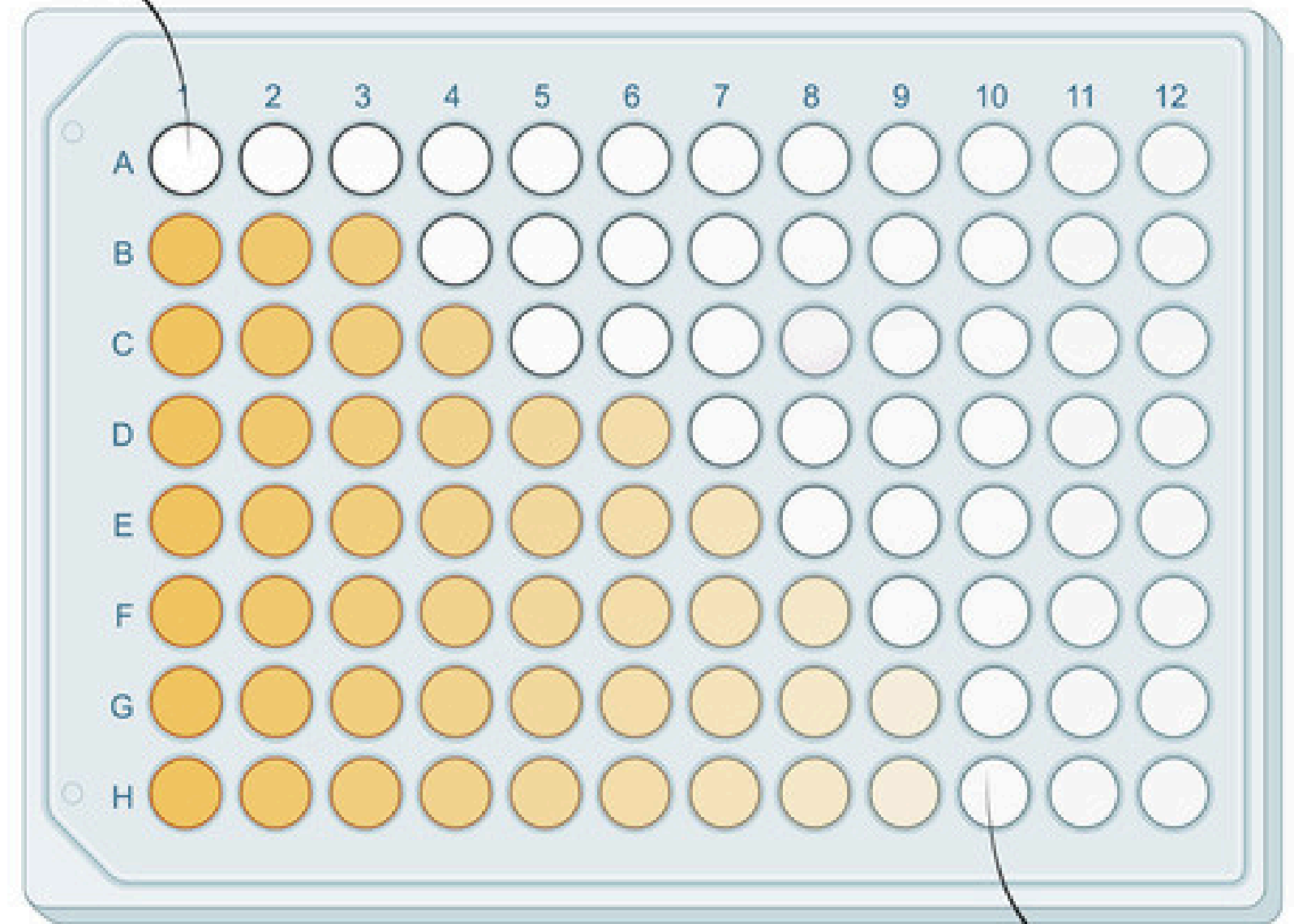
# 2-CHECKER BOARD ASSAY

Saggio utilizzato per identificare l'effetto della interazione tra PDSTP e rifampicina.

- Diluizioni seriali del potenziatore dall'alto verso il basso a partire da una concentrazione di 256  $\mu\text{g/ml}$
- Diluizioni seriali da destra verso sinistra della rifampicina a partire da una concentrazione di 64  $\mu\text{g/ml}$

MIC A alone

Drug A



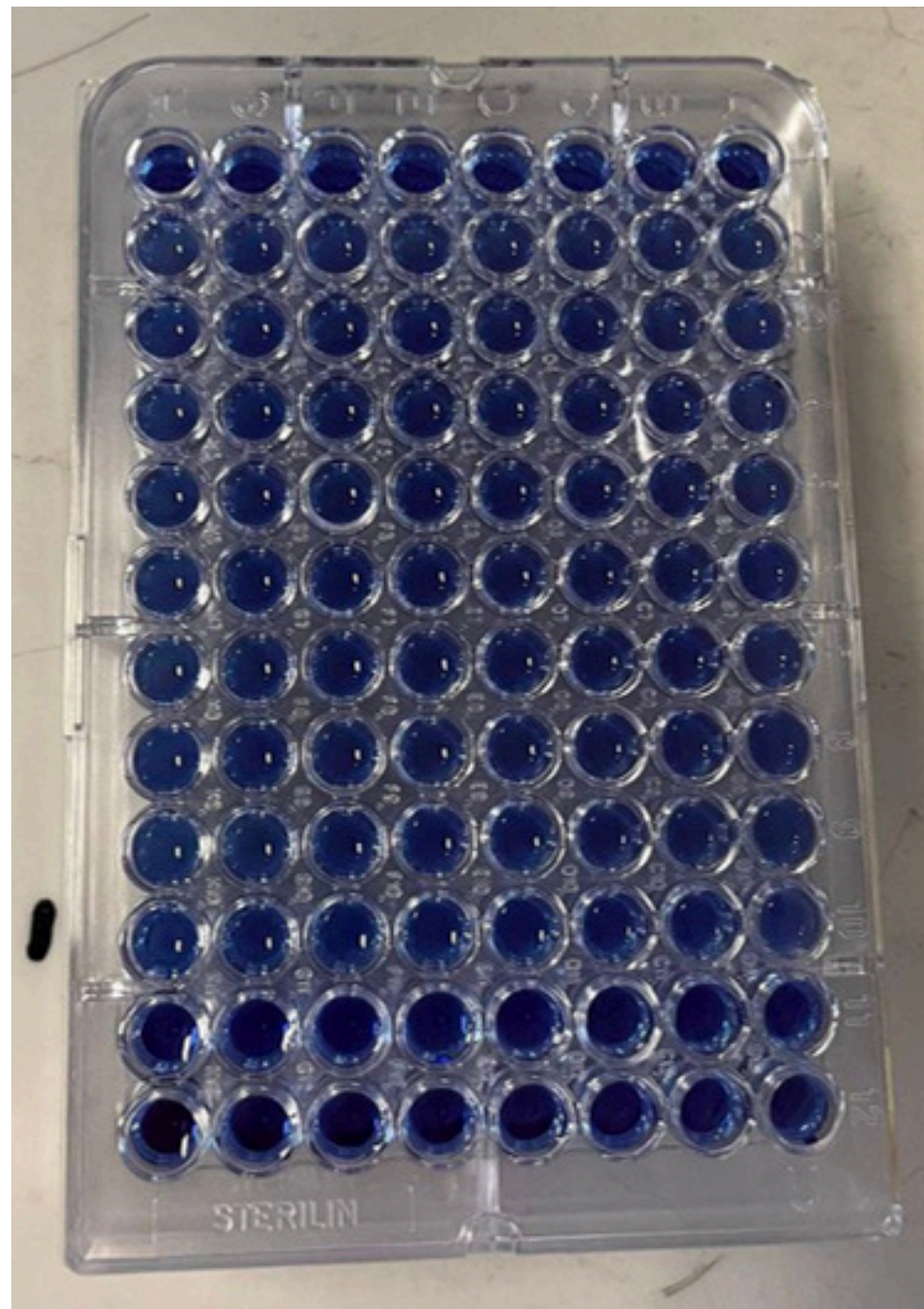
Drug B

MIC B alone



# 3-RESAZURINA

Per caratterizzare la crescita batterica da un punto di vista quantitativo si aggiungono 30 $\mu$ l di Resazurina per pozzetto.  
In seguito a riduzione, dovuta al metabolismo di *Pseudomonas*, diventa Resorufina



Riduzione





## 4-ECCESSO DI MAGNESIO

L'esperimento precedente è stato ripetuto aggiungendo un eccesso di magnesio  
(di circa 40 volte in più rispetto al terreno, ovvero 10-20mg/L)



Visto che il magnesio si lega nello stesso sito di legame del PDSTP, ci si aspetta una competizione ed una conseguente diminuzione dell'efficacia del potenziatore, quindi un minor blocco della proliferazione batterica

# RISULTATI

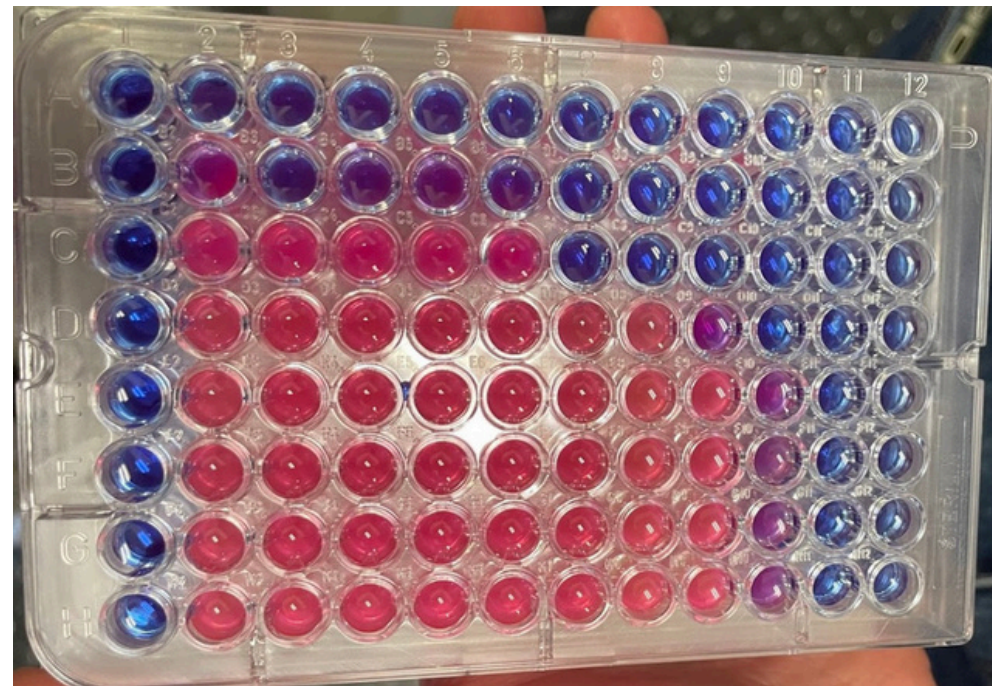
## Microplate reader

Strumento che ci permette di creare una mappa dove, grazie alla fluorescenza emessa, è possibile vedere e quantificare le zone in cui è avvenuta la crescita batterica e le zone in cui i due farmaci sono stati in grado di inibirla.





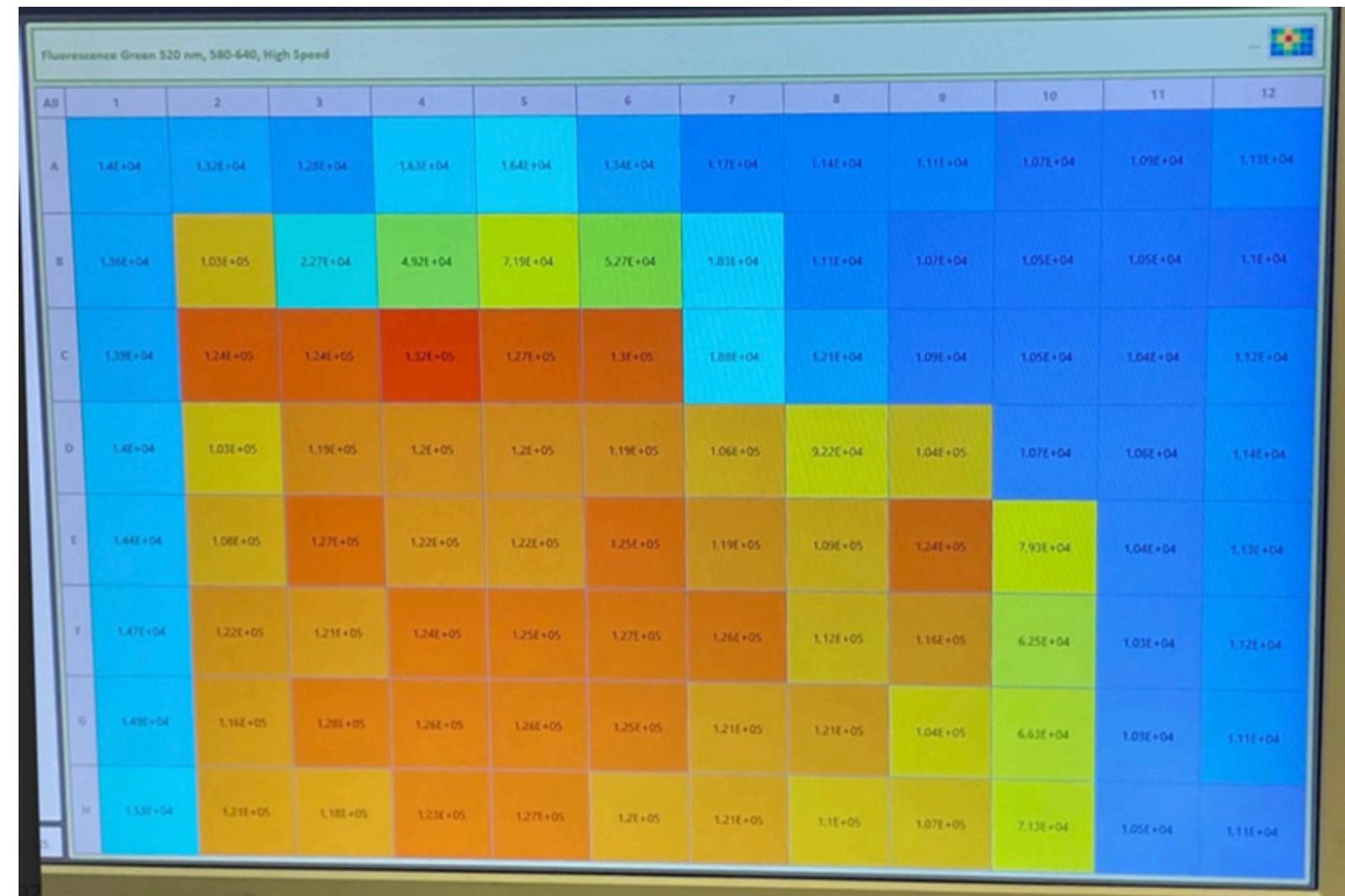
# INTERAZIONE TRA PDSTP E LA RIFAMPICINA



checkerboard con forma a  
gradini



**Sinergismo**





# ECCESSO DI MAGNESIO

- Zona dove la resazurina è stata metabolizzata



Effetto del PDSTP azzerato

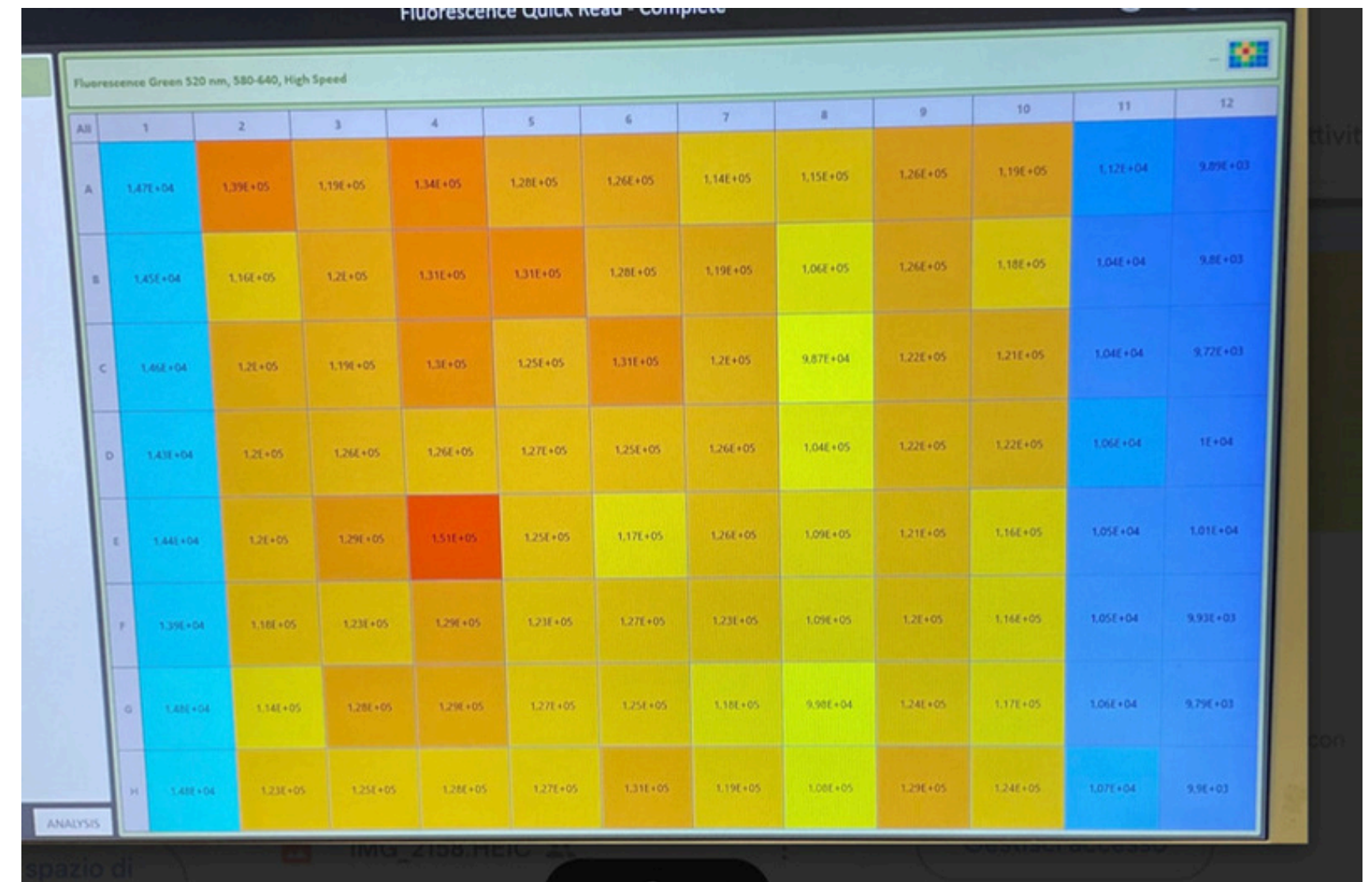
- Ultime 2 colonne (Rifampicina)



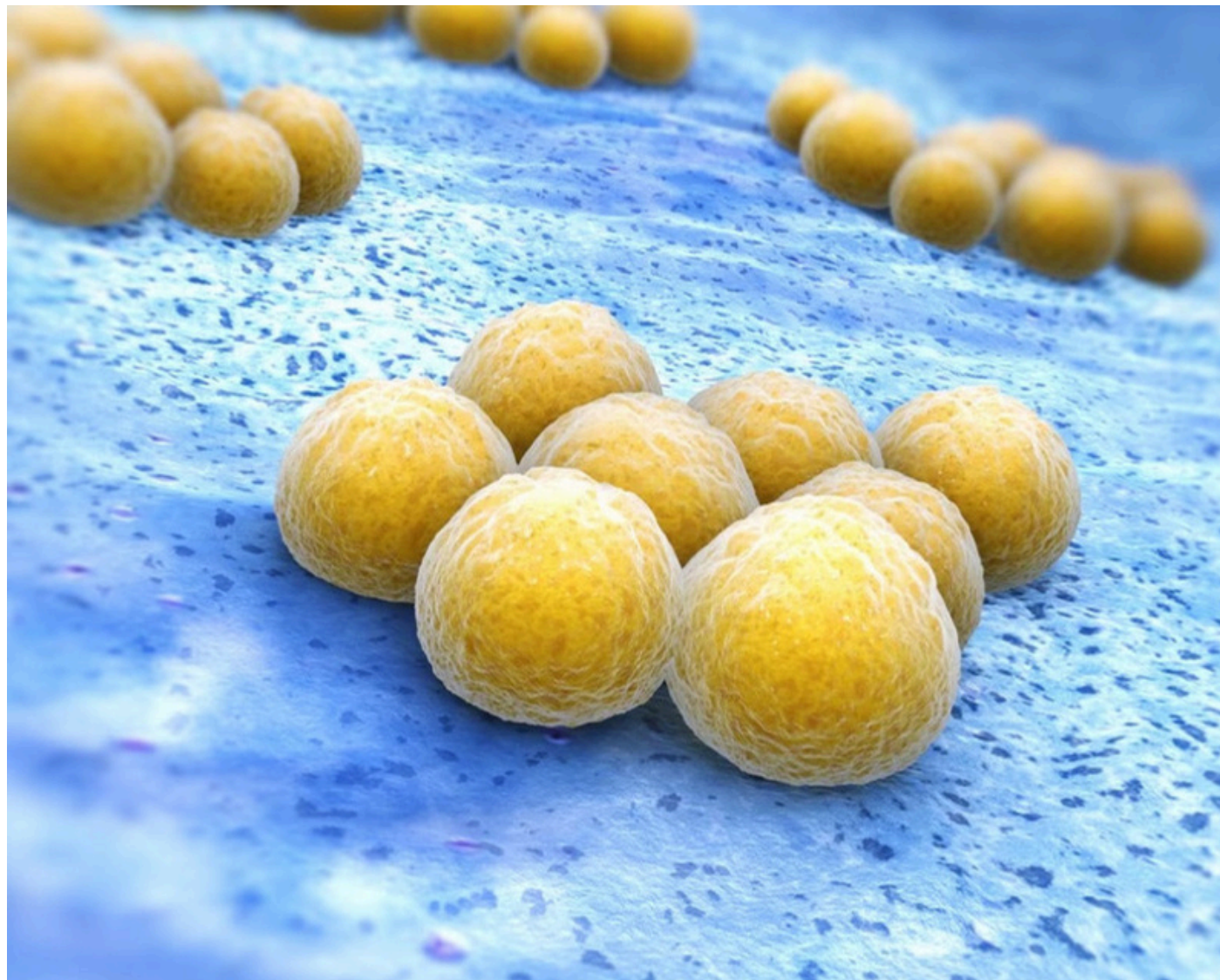
Inibizione crescita batterica



**L'azione di PDSTP dipende dalla concentrazione di magnesio nel terreno, mentre questa non influisce sull'azione dell'antibiotico**



# BIOFILM



Stafilococco aureo:  
capacità di crescere in biofilm

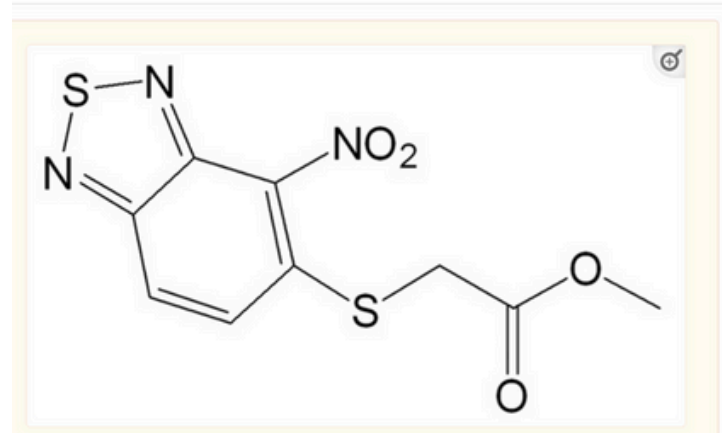
meccanismo con cui si proteggono  
dagli antibiotici, permettendogli di  
crescere sulle superfici biotiche e  
abiotiche

Vantaggio





**C109**



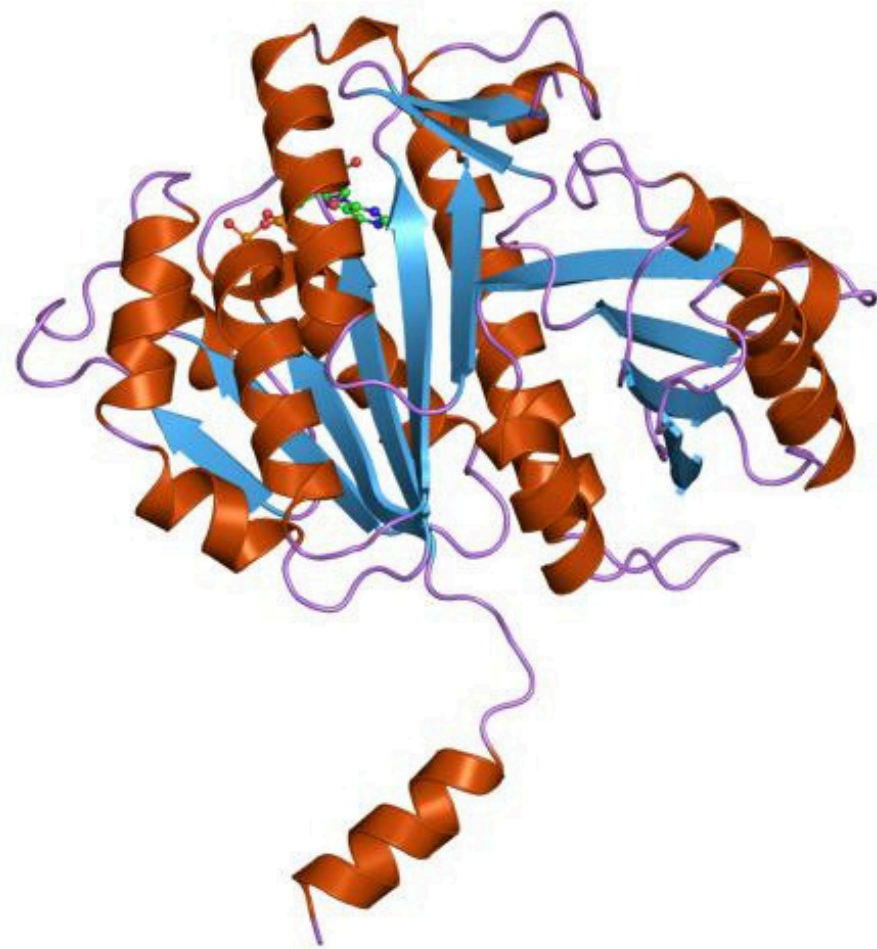
attività batteriostatica:  
inibisce la polimerizzazione di FTSZ

MIC = 2  $\mu$ g/ml  
buona ma negli esperimenti sono  
usate concentrazioni più alte  
perché i biofilm sono meno sensibili agli  
antibiotici

Meccanismo d'azione: FTSZ forma un anello al centro della cellula  
dove avverrà la divisione nelle due cellule figlie  
cellule batteriche trattate con C109: microscopio mostra FTSZ fluorescente che  
delocalizza, non è più un anello perfetto e stafilococco assume una morfologia atipica

Individuata in collaborazione con l'università di Roma e tramite virtual screening,  
sono arrivate 20 molecole, screenate per le loro attività contro la proteina purificata,  
valutando l'efficacia sull'attività in vitro della proteina

# FTSZ



- analoga della tubulina eucariotica: problema della tossicità di C109 in quanto colpisce qualcosa di simile alla tubulina umana
- già stata studiata come target
- coordina la divisione cellulare nei batteri: organizza il macchinario di proteine implicate

→ saggi su cellule eucariotiche e proteina purificata: bassa tossicità

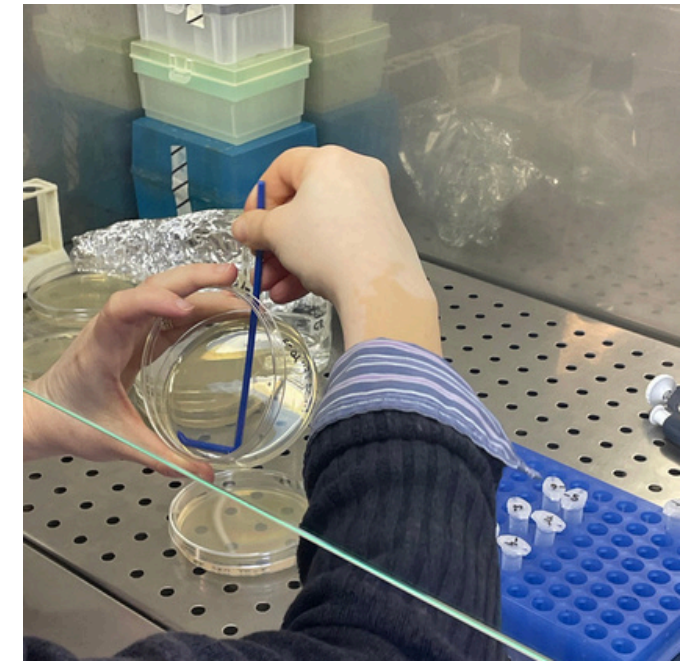
→ essenziale nei batteri, l'assenza impedisce la divisione



# VALUTARE L'AZIONE DEL COMPOSTO SULLA FORMAZIONE DEL BIOFILM

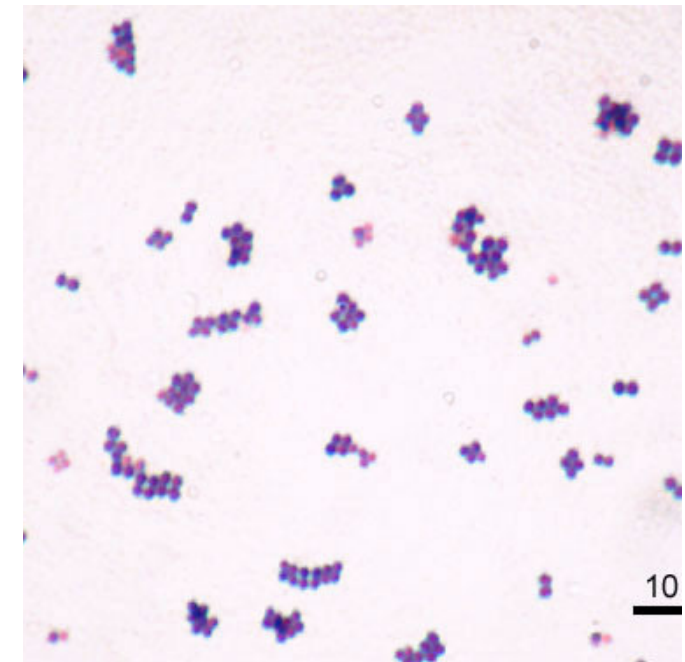
## 1. controllo di crescita

alterazione nella crescita del biofilm che C109 è in grado di inibire, in modo da quantificare efficacia del composto



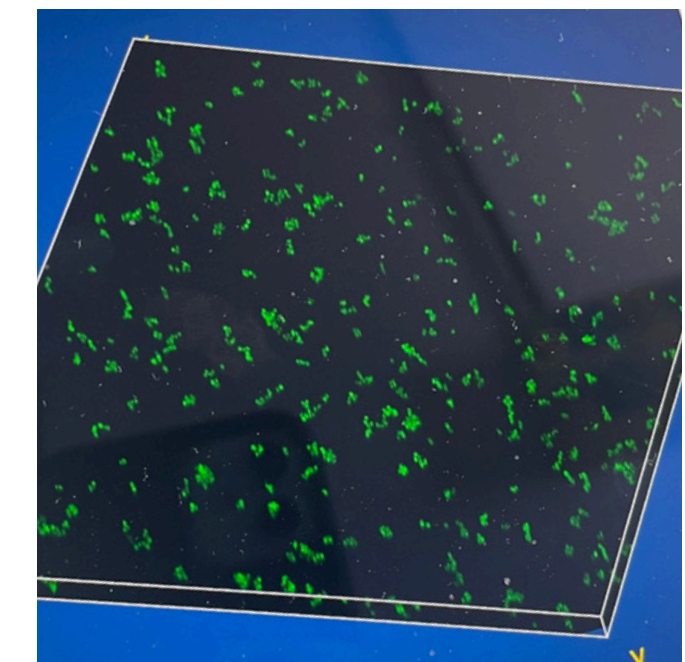
## 2. test di screening: colorazione del biofilm con **crystal violetto**

colora tutte le cellule vive e morte, evidenziando i batteri nel biofilm

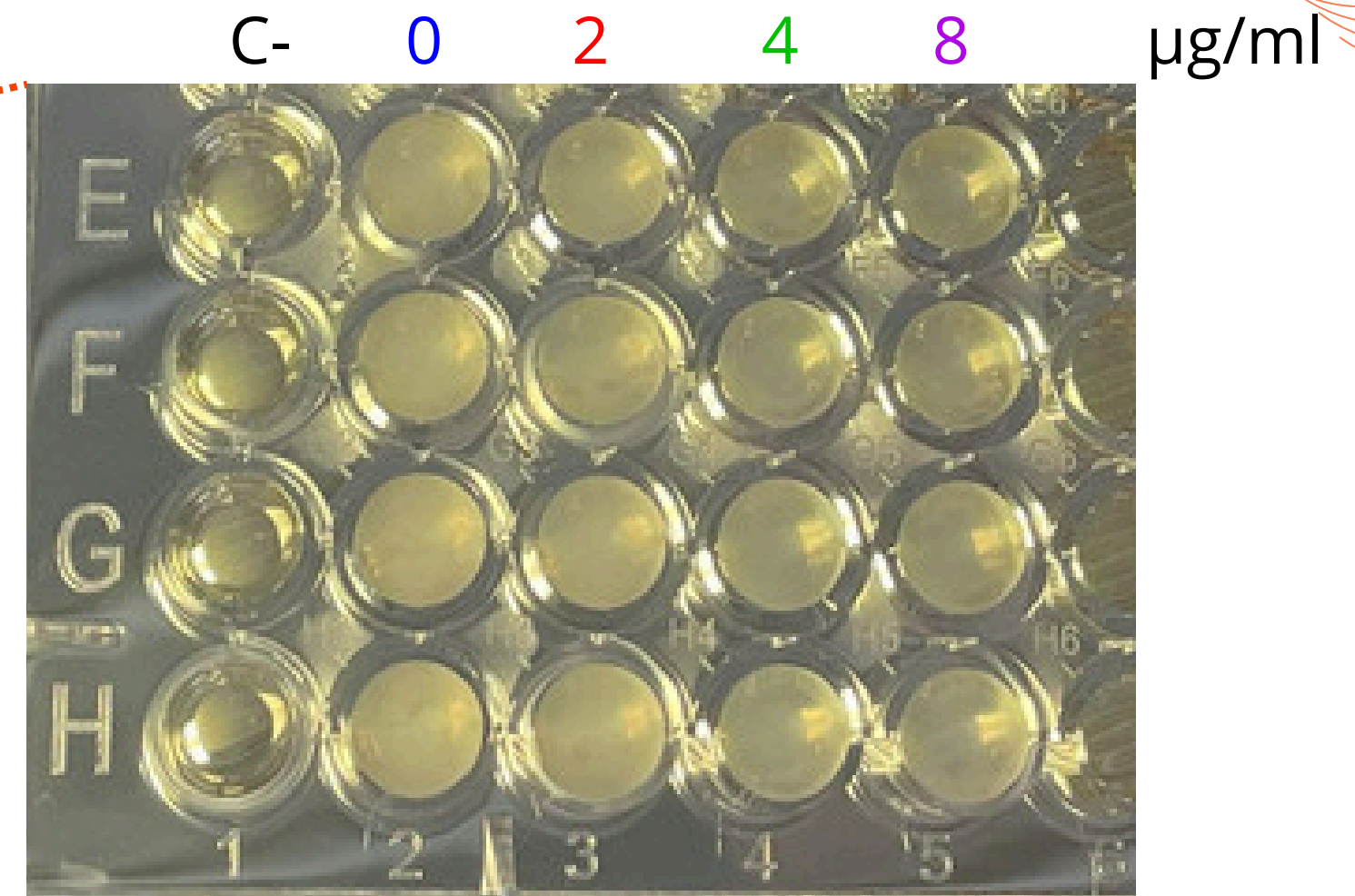
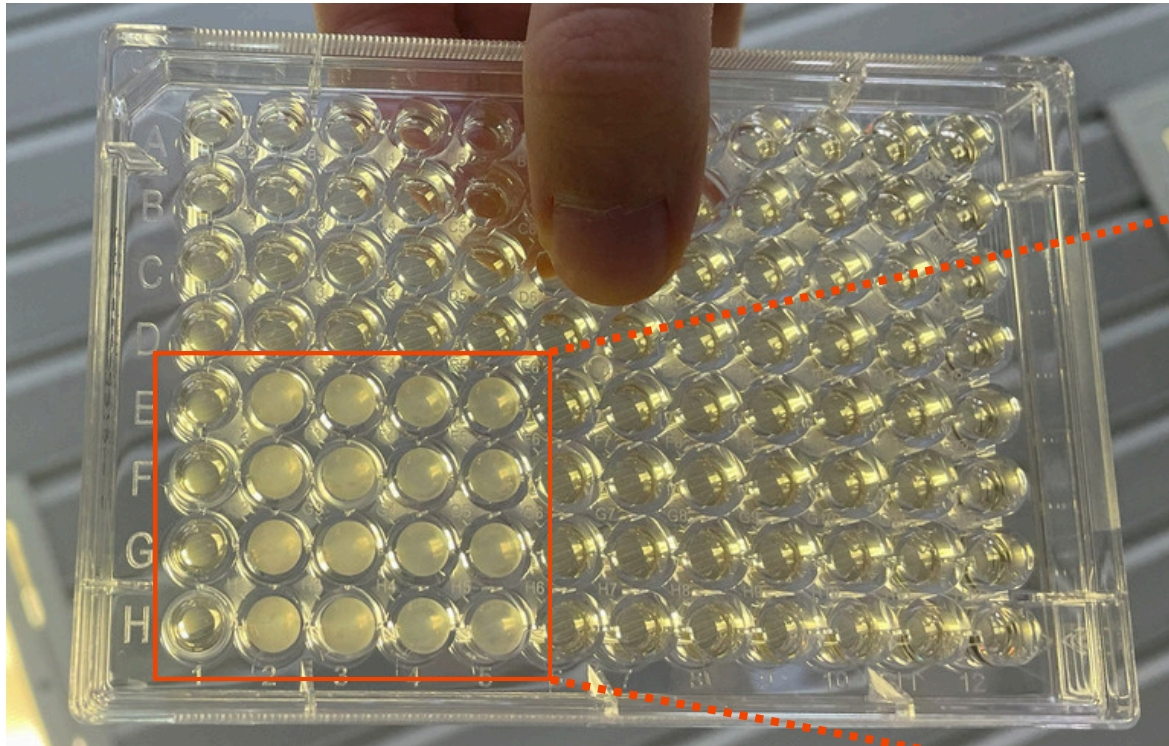


## 3. crescita del biofilm sul vetrino per visualizzazione al **microscopio confocale**

colorante fluorescente colora tutto il dna (esogeno, endogeno) delle cellule, tutta la struttura tridimensionale del biofilm



# PREPARAZIONE COLTURE

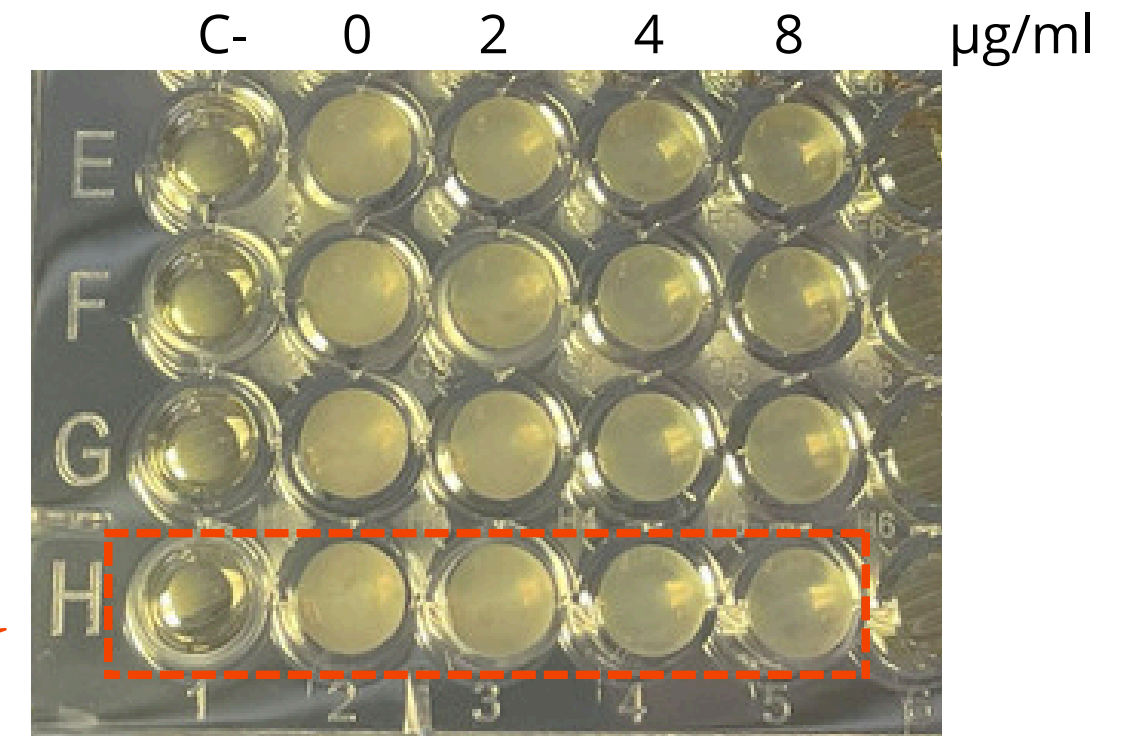
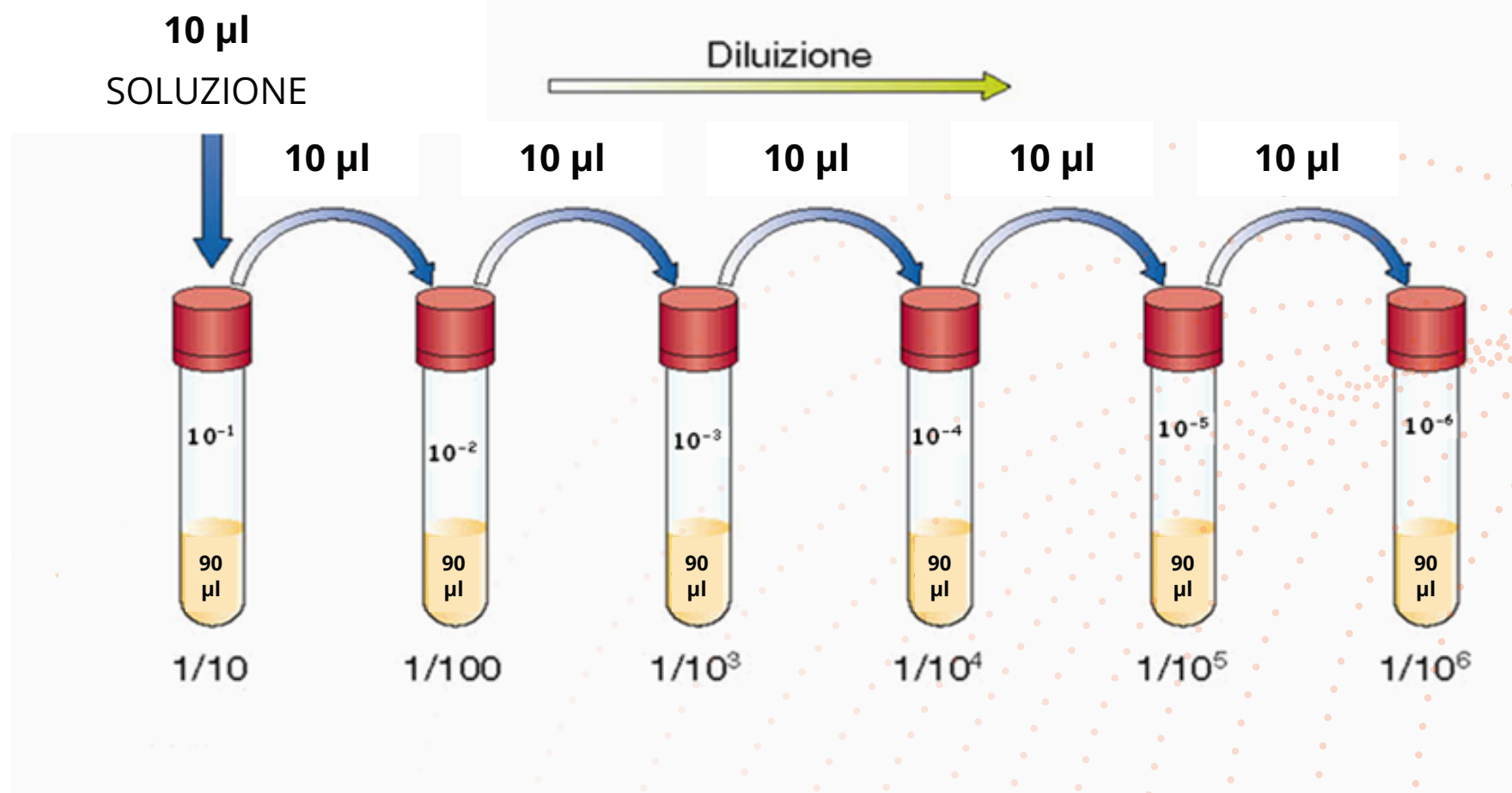


- **Coltura batterica** in terreno TSB + glucosio dal giorno precedente
- Eliminare surnatante e lasciare i **batteri adesi al fondo** del pozzetto
- Aggiungere terreno TSB e **molecola da testare** in diverse concentrazioni



# PIASTRAMENTO

- **Staccare biofilm** con soluzione fisiologica
- Prelevare 10  $\mu$ l ed eseguite le **diluizioni seriali**



- 0  $\mu$ g/ml --> diluizione **-6 e -7**
- 2  $\mu$ g/ml --> diluizione **-5 e -6**
- 4 e 8  $\mu$ g/ml --> diluizione **-3 e -4**

37°C per 24h

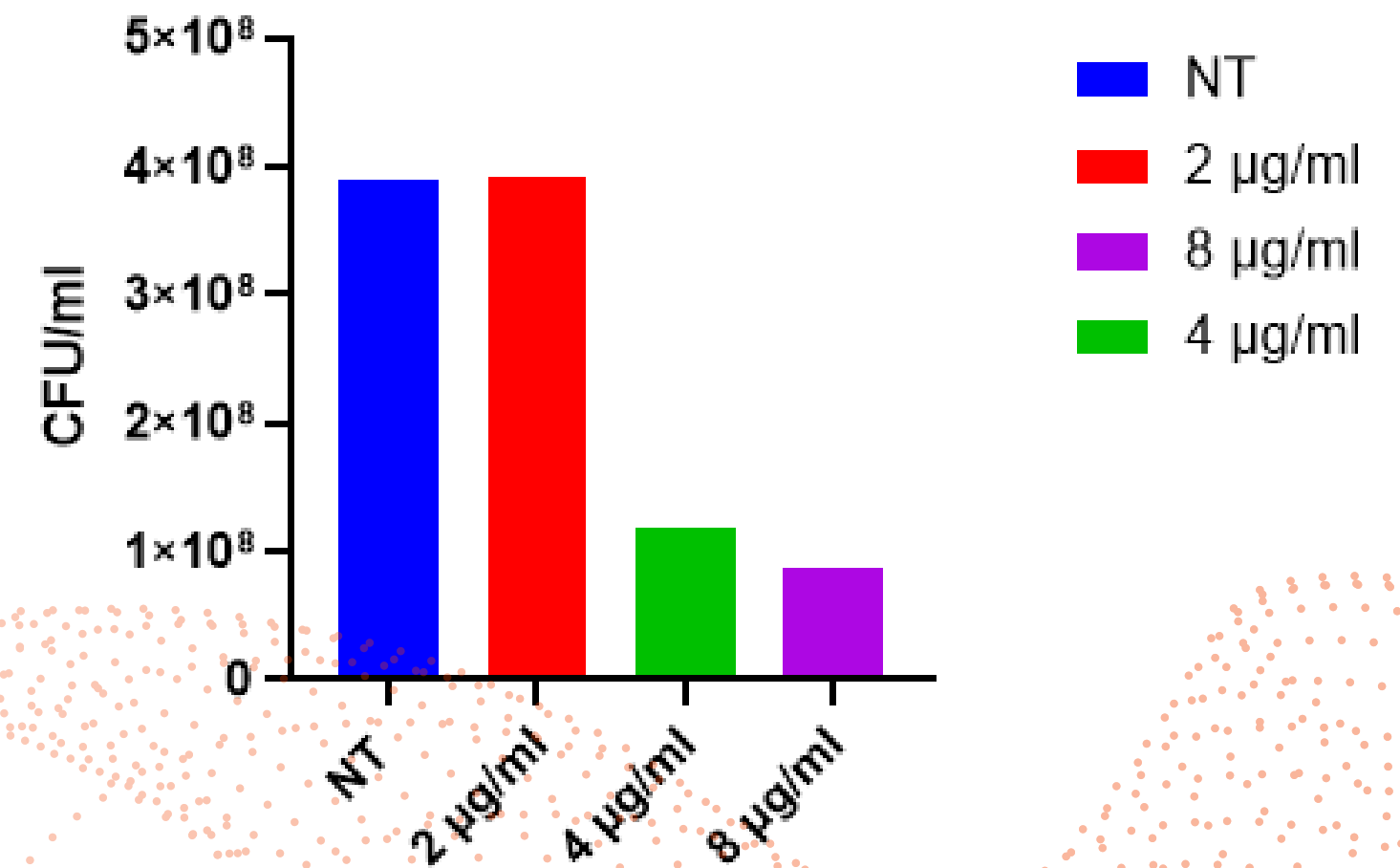
# RISULTATI: valutazione dell'effetto inibitorio

## CFU/ml delle singole diluizioni

NT	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml
$6,5 \times 10^8$	$2,92 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,32 \times 10^8$
$1,3 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$	$4,84 \times 10^7$	$4 \times 10^7$

CFU/ml  $3,9 \times 10^8$   $3,91 \times 10^8$   $1,19 \times 10^8$   $0,86 \times 10^8$

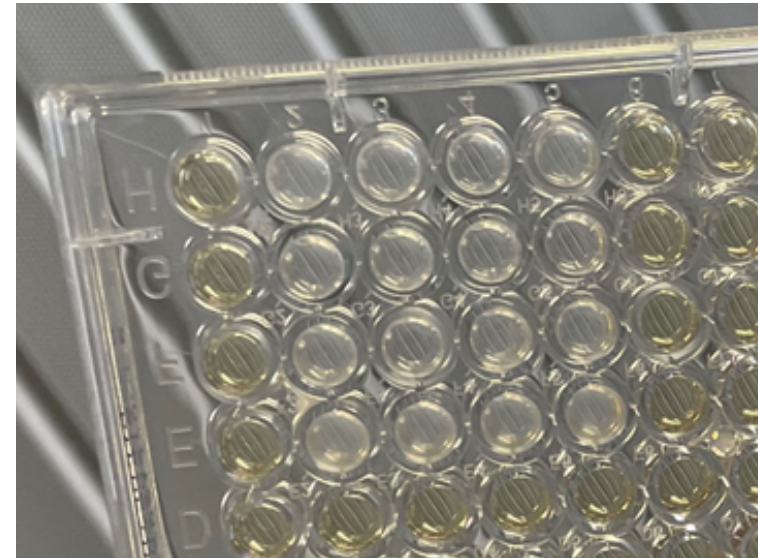
## Biofilm inhibition





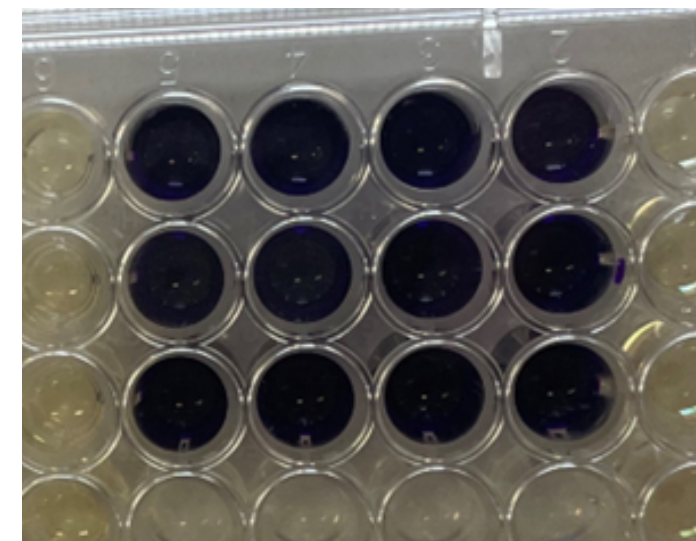
# COLORAZIONE CRISTALVIOLETTO

- 1) **Togliere il surnatante**
- 2) Lavare con 100  $\mu$ L soluzione fisiologica

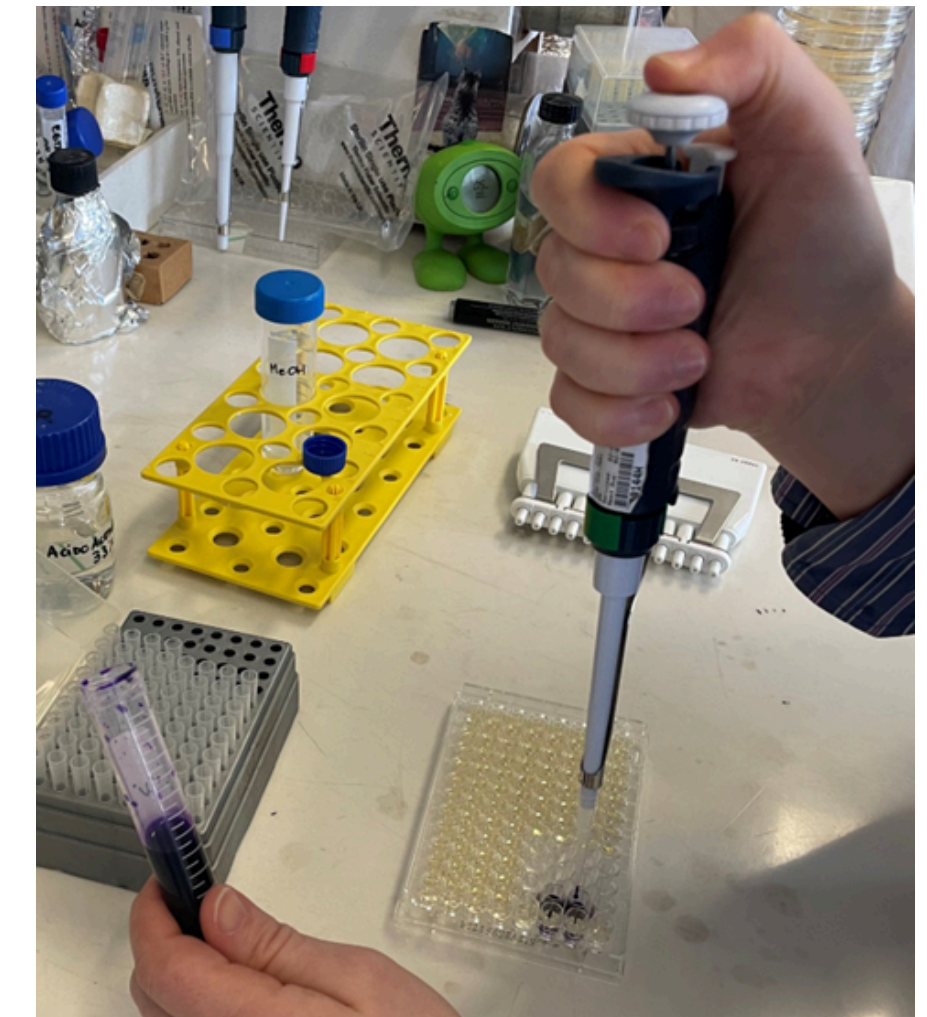


- 3) **Fissare i batteri** nei pozzetti (disidrato il biofilm e lo faccio aderire meglio alla parete del pozzetto) con 100 $\mu$ L di **metanolo** per 15 minuti

- 4) **Colorare con cristalvioletto** (conc-0,1) e lasciare agire
- 5) Togliere il colore ed effettuare un lavaggio

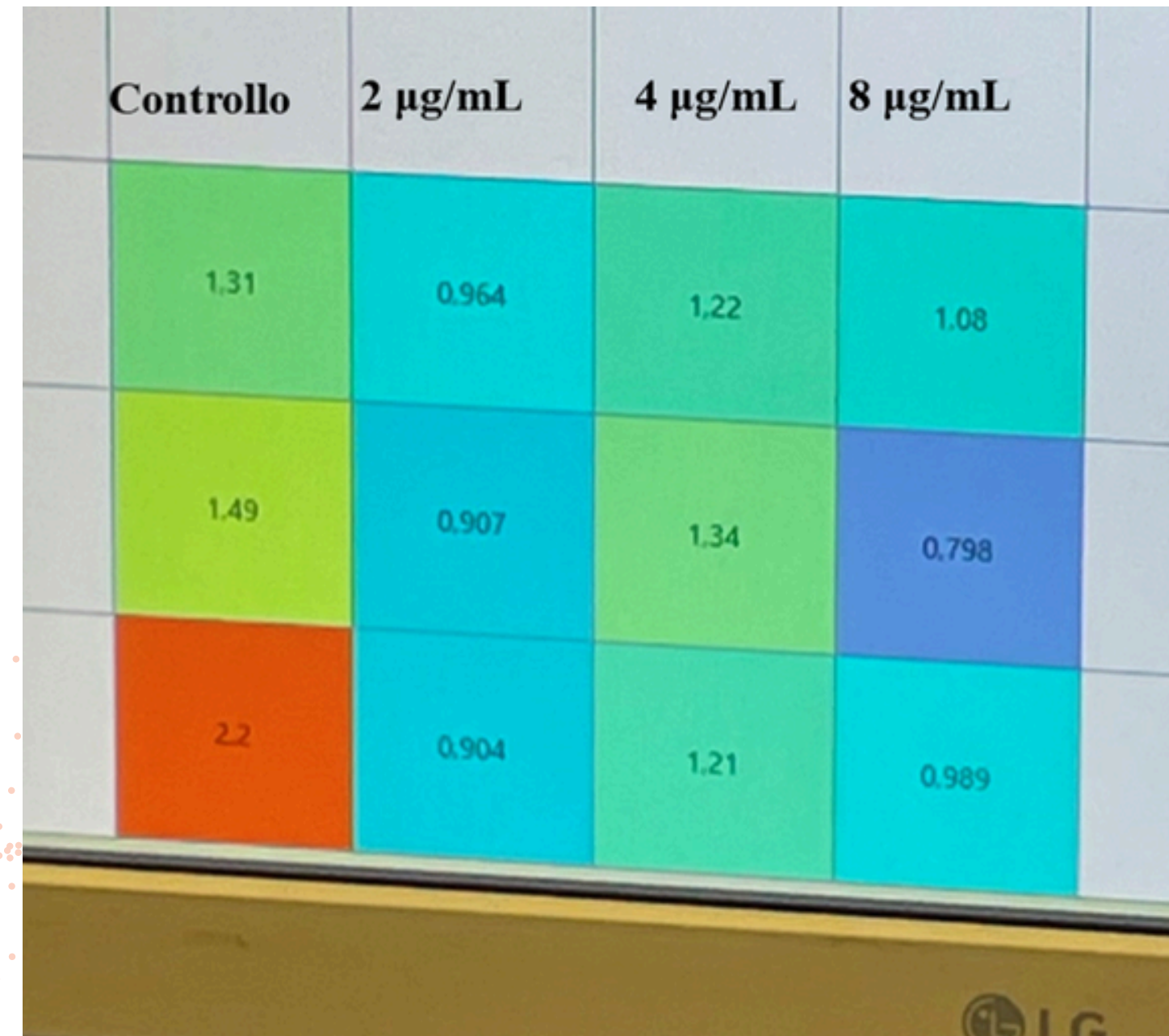
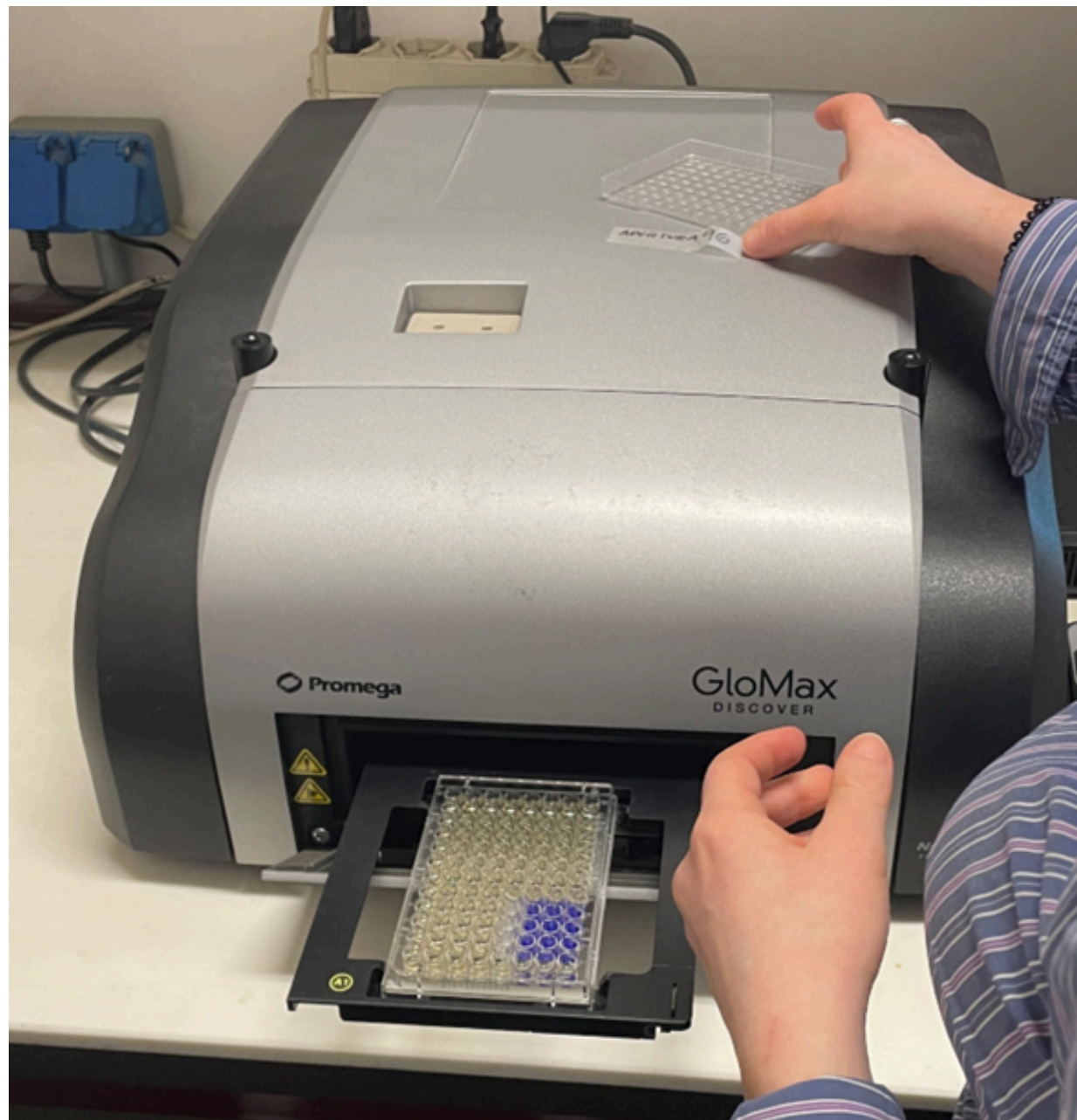


- 6) **Sciogliere i residui** di colorante con acido acetico (100 $\mu$ L al 33%) e lasciare agire





7) **Leggere l'assorbanza** ad una lunghezza d'onda di 600nm con un lettore di piastra

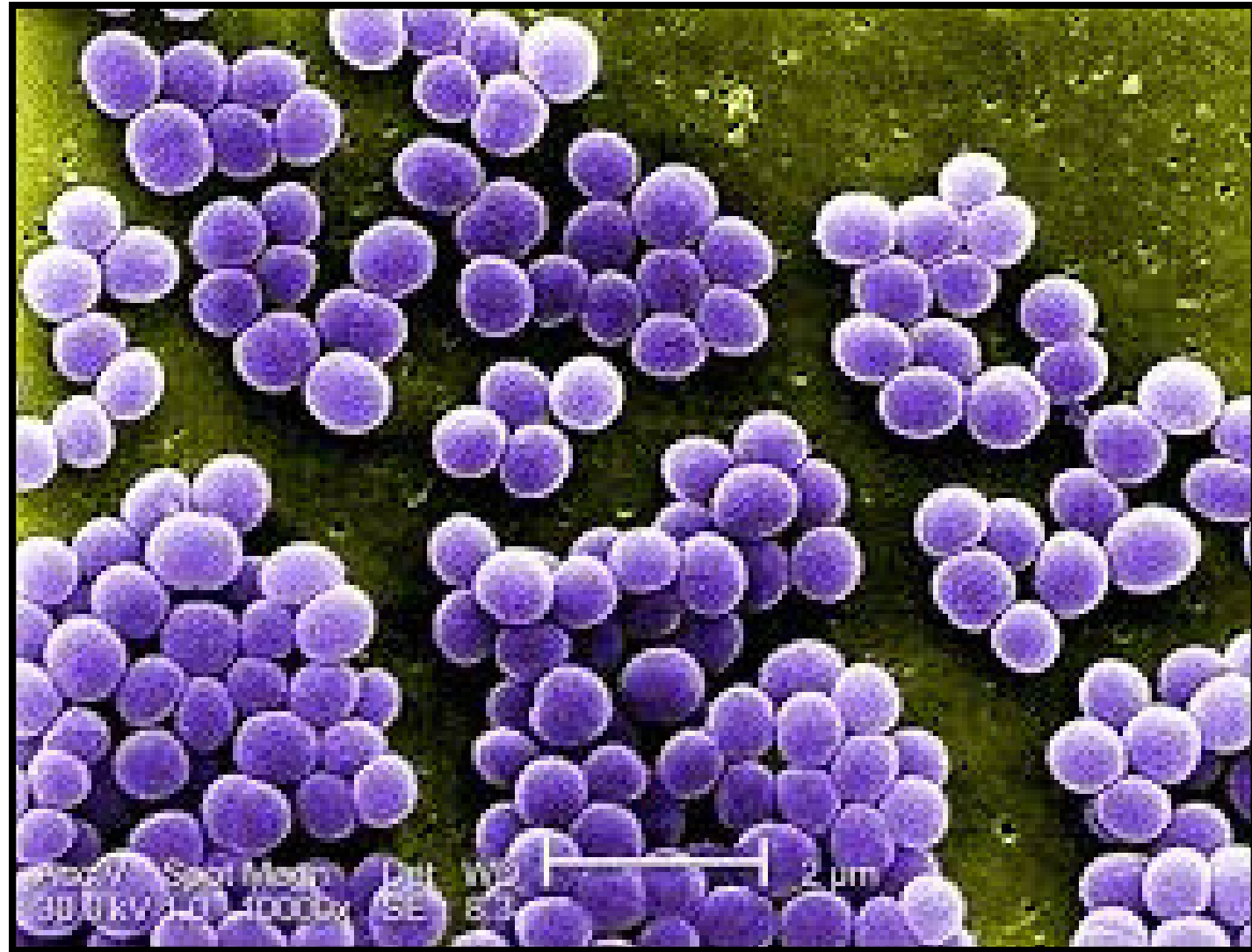




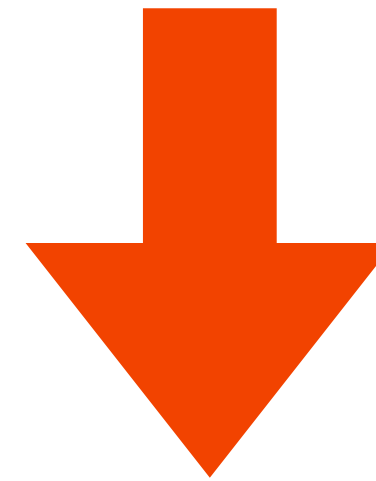


**Valutazione della capacità della molecola C109 di  
inibire la formazione di biofilm da parte di  
Staphylococcus aureus**

***TECNICA DEL MICROSCOPIO CONFOCALE***



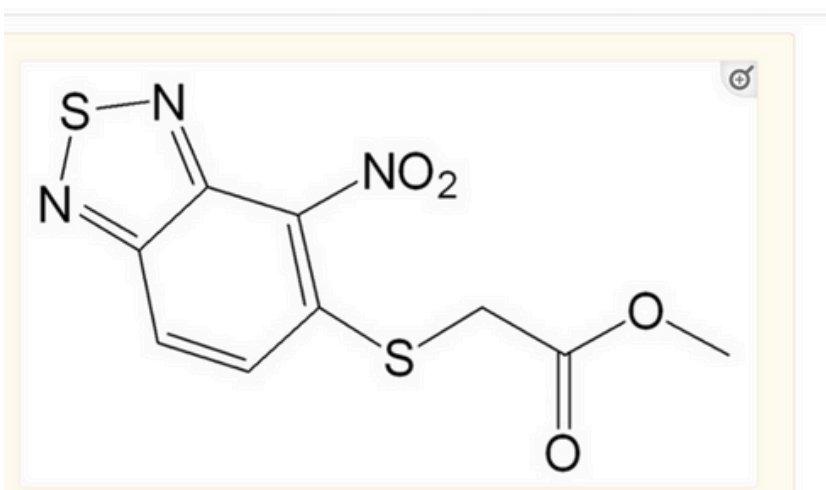
Lo *Staphylococcus aureus* rappresenta uno dei patogeni opportunisti maggiormente riscontrati nei polmoni di pazienti affetti da FC



Il ruolo di *S. aureus* nella progressione della malattia polmonare in FC rimane non chiaro, ma l'osservazione clinica di una rapida ri-colonizzazione dopo trattamento antibiotico, suggerisce che *S. aureus* possa persistere all'interno delle cellule del polmone e produrre infezioni ricorrenti che sembra aprano la strada ad infezioni croniche da *Pseudomonas aeruginosa*



Il composto C109, in studio presso l'Università di PV, è stato identificato come inibitore della proteina ftsZ, essenziale per la divisione cellulare e ha mostrato promettenti attività anti-biofilm



**Struttura chimica del composto C109**

caratterizzazione degli effetti di C109  
sulla morfologia del biofilm



**Microscopio confocale LEICA TCS SP8**

# MICROSCOPIO CONFOCALE

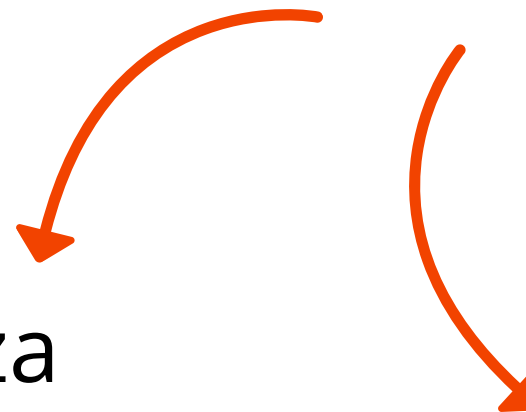
L'imaging del biofilm è stato rivoluzionato all'inizio del 1990 grazie all'avvento della  
MICROSCOPIA CONFOCALE

**Microscopia a fluorescenza**

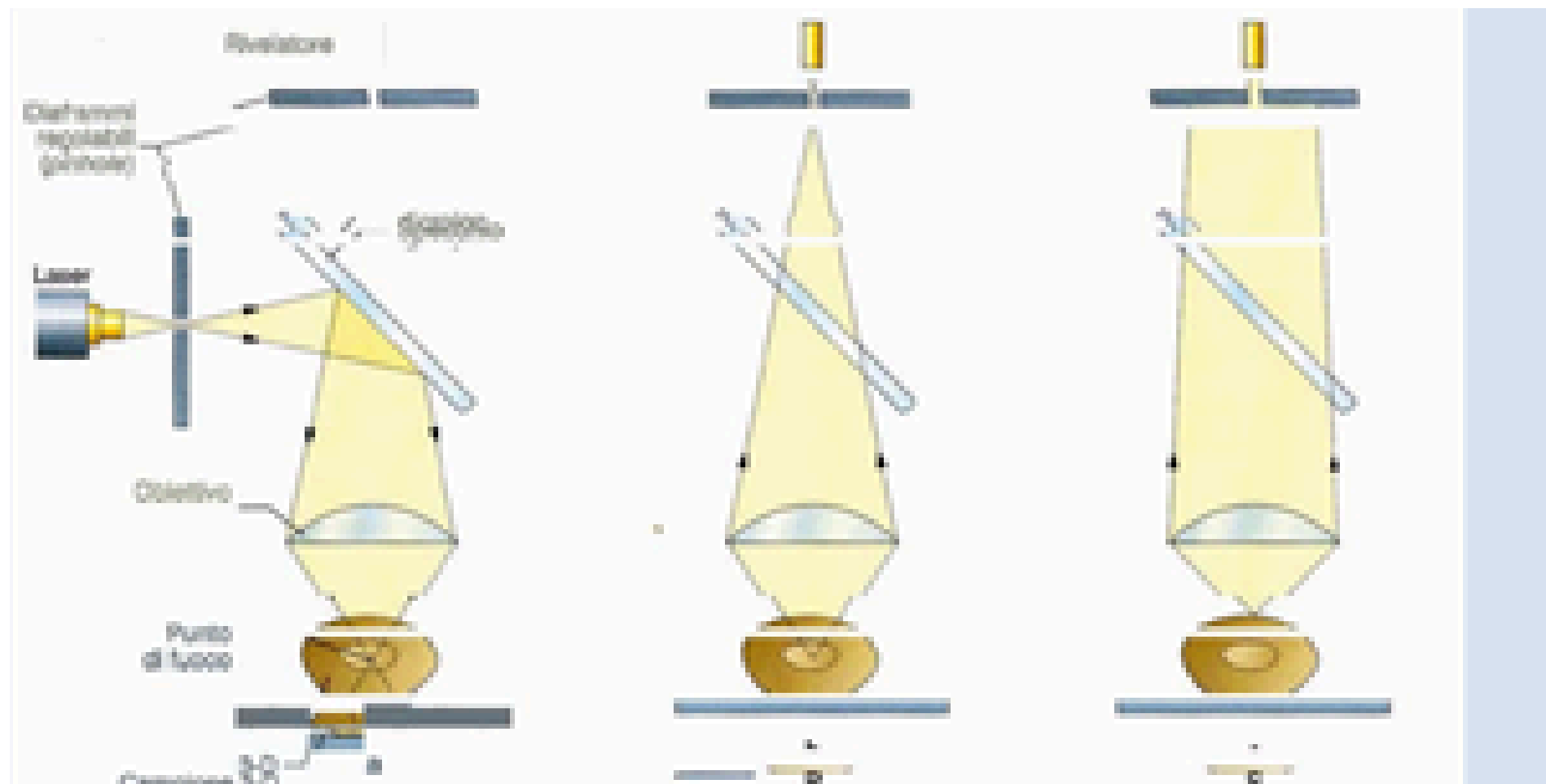
**Microscopia confocale a scansione laser**

ottenere immagini senza  
interferenze

ottenere immagini 3D



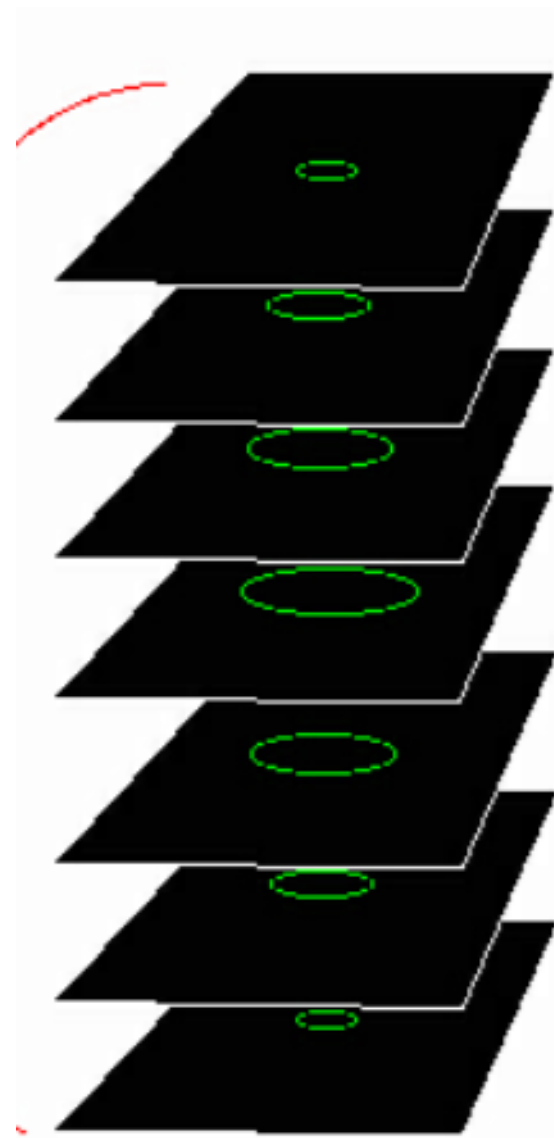




La microscopia confocale si avvale di una particolare configurazione ottica messa a punto da M. Minsky nel 1957, che consiste essenzialmente nell'illuminare non tutto il campione, ma solo il piano focale che si sta osservando e nel raccogliere la luce solo dal medesimo



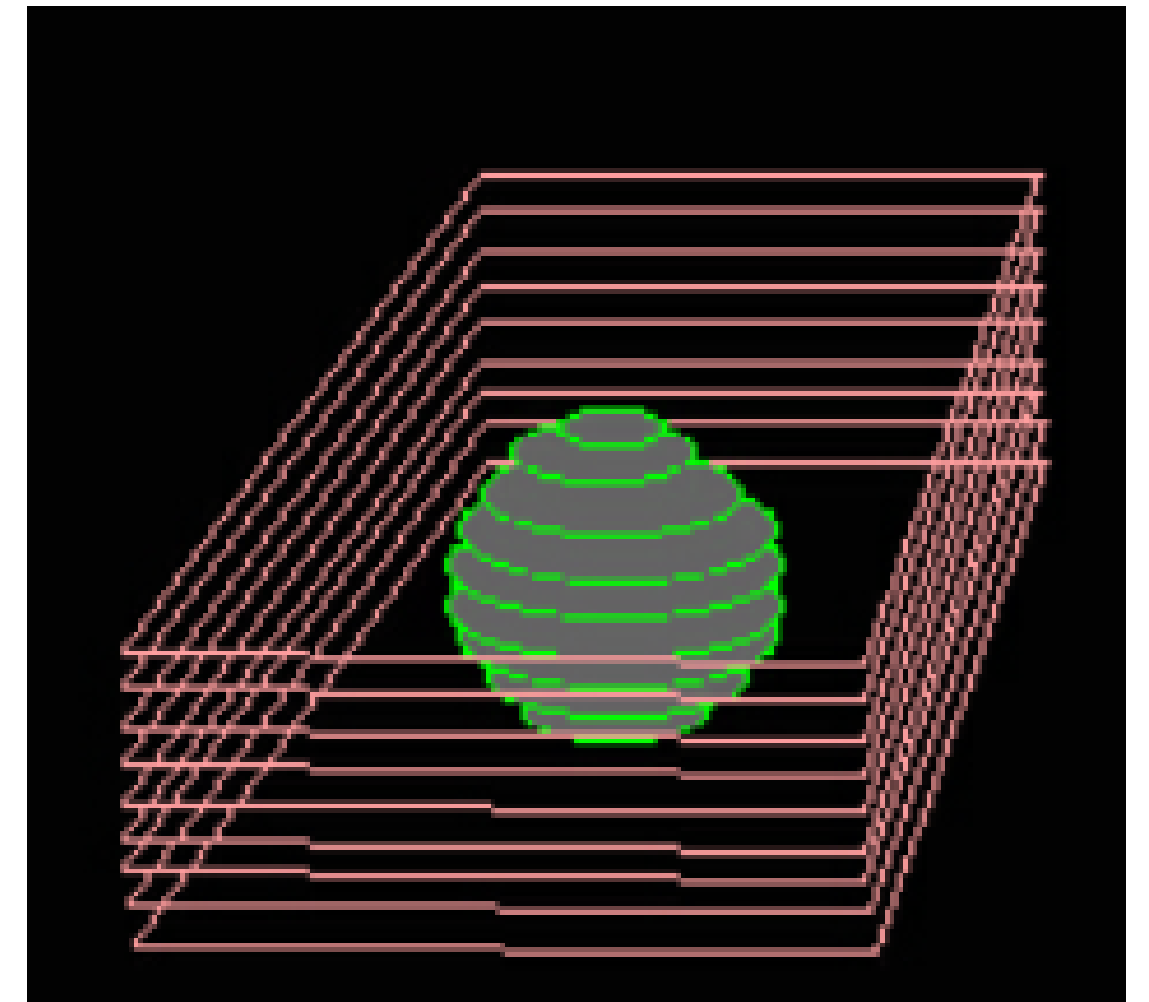
L'immagine risultante viene quindi depurata dalle componenti fuori fuoco e si ha un incremento della risoluzione massima.



Singole sezioni



**Software  
COMSTAT2**



Ricostruzione tridimensionale

Muovendosi lungo l'asse z e mantenendo fissi i piani x e y andiamo a variare il piano di messa a fuoco del campione. In questo modo andremo ad acquisire più sezioni ottiche successive che, se posizionate una di seguito all'altra ci permetteranno di ottenere un'immagine 3D



# Valutazione dell'attività anti-biofilm del composto C109

## Protocollo operativo

- ✓ Inoculare il ceppo di S.aureus in terreno ricco TSB+1% di glucosio
- ✓ Quando la densità ottica a 600 nm sarà pari a 0.05 trasferire la coltura in apposite chambered coverslip trattate per l'adesione delle cellule



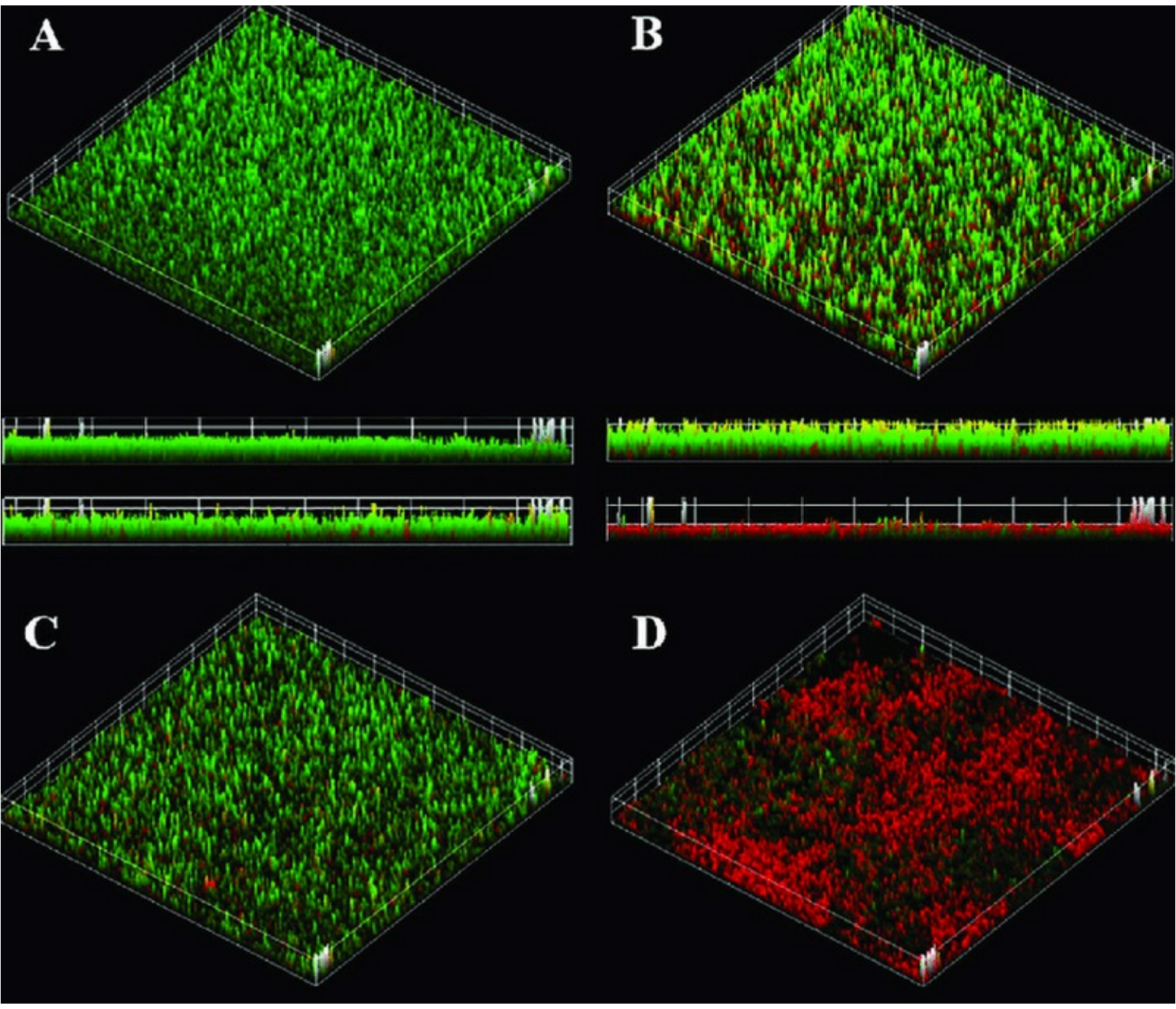
- ✓ Incubazione a 37°C per 4 h
- ✓ Vado a rimuovere il terreno e i batteri non adesi

- ✓ Aggiungo terreno fresco e il composto C109 a concentrazioni crescenti (2-4-8  $\mu\text{g/ml}$ )
- ✓ Incubazione a  $37^\circ\text{C}$  per 24h
- ✓ Rimozione del terreno e 2 lavaggi con 400  $\mu\text{l}$  di fisiologica
- ✓ Colorazione con una soluzione di fisiologica contenente Syto9  $5\mu\text{M}$  + Propidio Ioduro  $2.5\mu\text{M}$
- ✓ Incubazione a Tamb per 30'
- ✓ Rimuovo il colorante e lavo con 400  $\mu\text{l}$  di fisiologica
- ✓ Aggiungo 400  $\mu\text{l}$  di fisiologica per ogni pozzetto e passo all'osservazione: entrambi i coloranti colorano il DNA ma il Syto9 che è verde colora sia DNA endogeno che esogeno mentre il propidio ioduro, rosso, colora solo DNA esogeno



Cellule cresciute ON a 37°C senza aggiunta di C109

Cellule cresciute ON a 37°C con aggiunta di C109 -2ug/ml



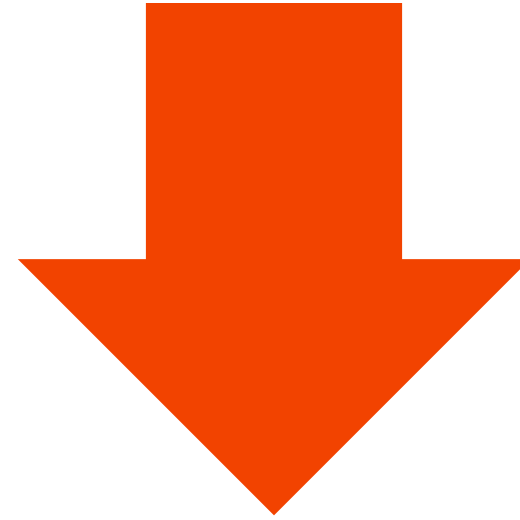
La percentuale di cellule morte in ogni campione è stata calcolata come rapporto tra fluorescenza rossa e fluorescenza totale (verde e rossa)

Cellule cresciute ON a 37°C con aggiunta di C109-4ug/ml

Cellule cresciute ON a 37°C con aggiunta di C109-8ug/ml

si osservano significative differenze morfologiche in presenza del composto C109: i biofilms risultano essere meno strutturati, contengono meno cellule e non sono in grado di colonizzare l'intera superficie del pozzetto

I risultati mostrano che FtsZ inhibitor C109 è in grado di inibire la formazione di biofilm in ceppi di *S. aureus* rappresentando una valida risorsa come composto antistafilococcico.



Open Access Article

## Antistaphylococcal Activity of the FtsZ Inhibitor C109

by Gabriele Trespidi <sup>1,†</sup> , Viola Camilla Scoffone <sup>1,†</sup> , Giulia Barbieri <sup>1</sup> , Federica Marchesini <sup>2</sup> ,  
Aseel Abualshaar <sup>2</sup> , Tom Coenye <sup>3</sup> , Francesca Ungaro <sup>4</sup> , Vadim Makarov <sup>5</sup> ,  
Roberta Migliavacca <sup>2</sup> , Edda De Rossi <sup>1</sup>  and Silvia Buroni <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, 27100 Pavia, Italy

<sup>2</sup> Unit of Microbiology and Clinical Microbiology, Department of Clinical-Surgical, Diagnostic and Pediatric Sciences, University of Pavia, 27100 Pavia, Italy

<sup>3</sup> Laboratory of Pharmaceutical Microbiology, Department of Pharmaceutical Analysis, Gent University, B-9000 Gent, Belgium

<sup>4</sup> Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, 80131 Naples, Italy

<sup>5</sup> Research Center of Biotechnology RAS, 119071 Moscow, Russia

\* Author to whom correspondence should be addressed.

† These authors contributed equally to this work.



**Negli animali non esiste FC**

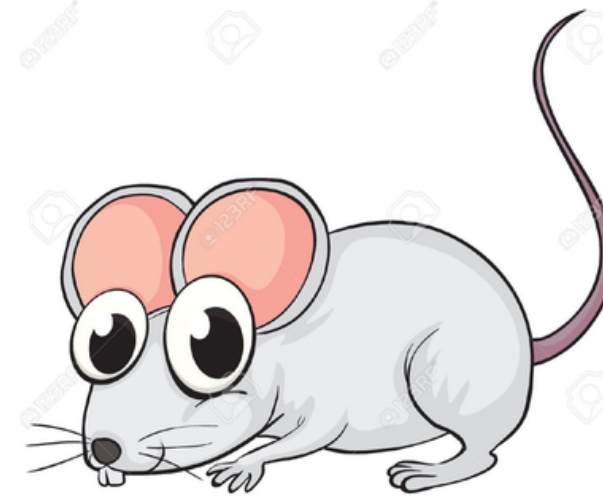
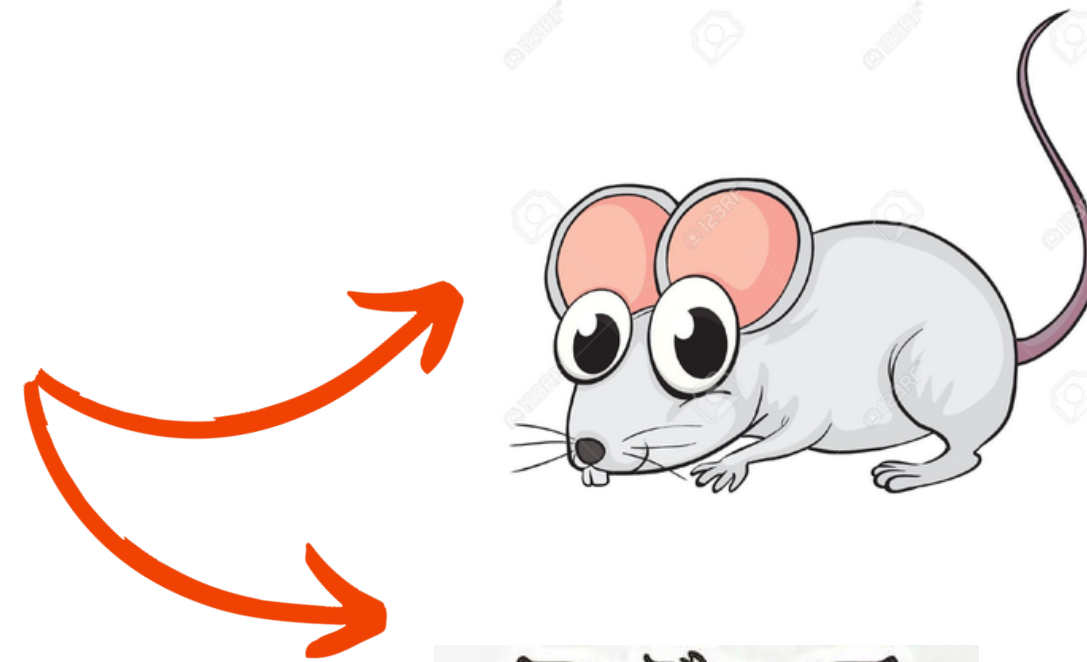


possiedono un gene CFTR non soggetto a mutazioni



non esiste un animale che SPONTANEAMENTE nasca con FC

**Ingegneria genetica** → Modelli animali riproducenti la malattia



- non sono longevi
- sviluppano preferenzialmente FC intestinale

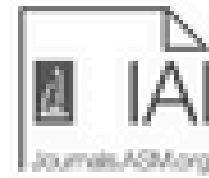
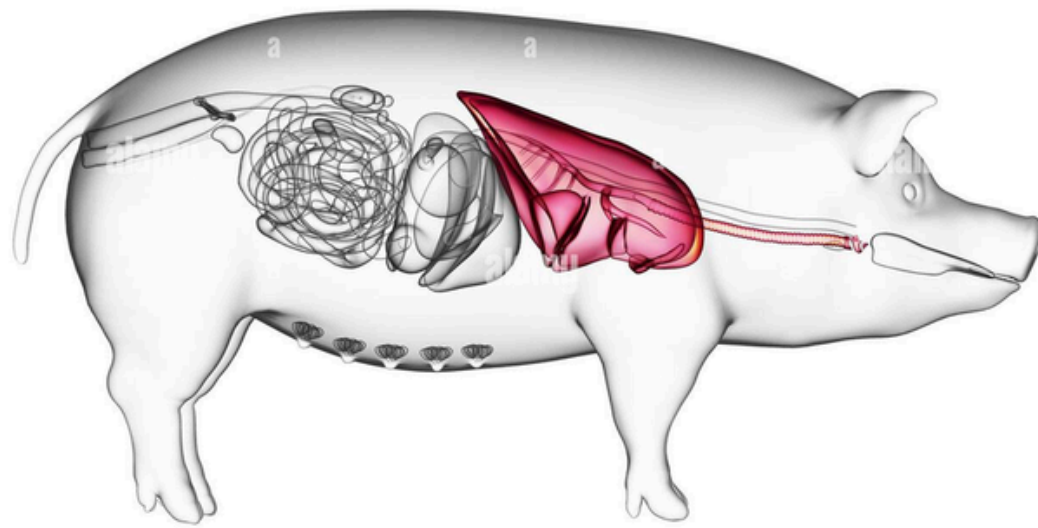


- necessità di strutture specializzate
- costi di gestione elevati
- problemi di natura etica



Modello animale in grado di riprodurre fedelmente la malattia FC





## Development of an *Ex Vivo* Porcine Lung Model for Studying Growth, Virulence, and Signaling of *Pseudomonas aeruginosa*

Freya Harrison, Aneesha Murull, Steven Higgins, Stephen P. Diggle

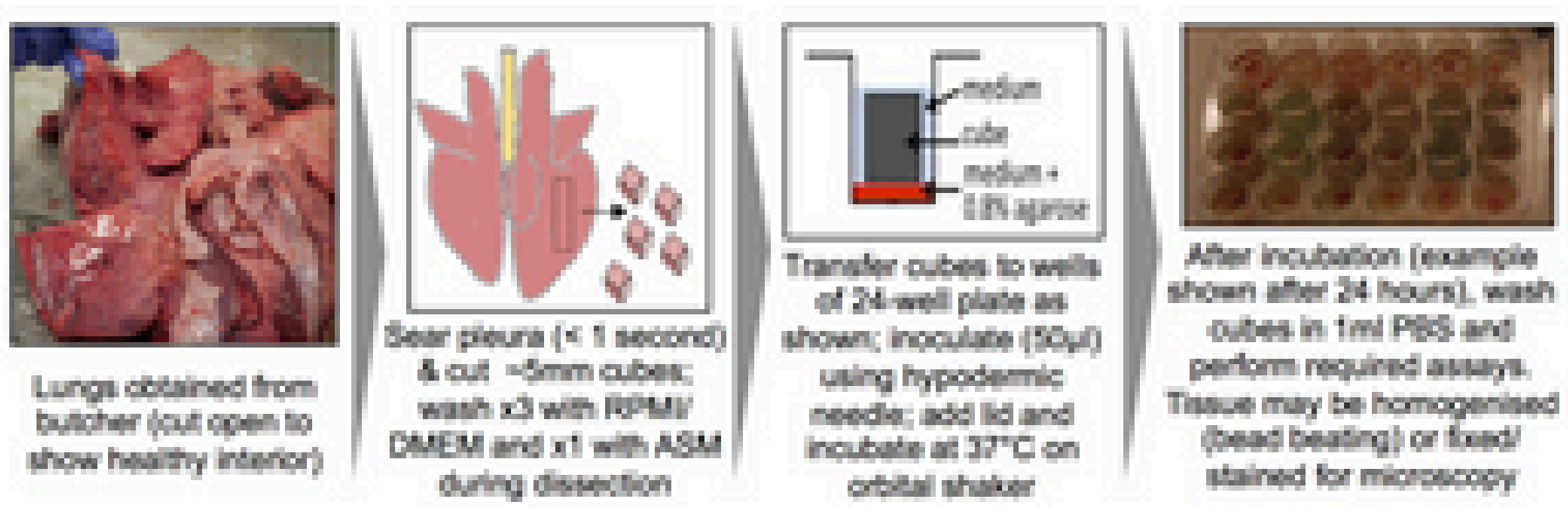
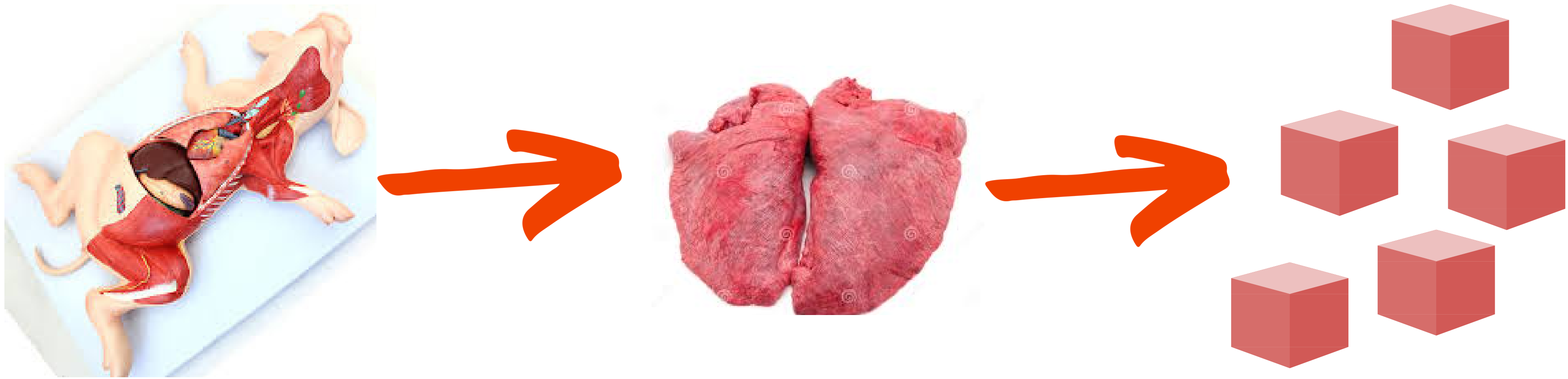
School of Life Sciences, Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, Nottingham, United Kingdom

Research into chronic infection by bacterial pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*, uses various *in vitro* and live host models. While these have increased our understanding of pathogen growth, virulence, and evolution, each model has certain limitations. *In vitro* models cannot recapitulate the complex spatial structure of host organs, while experiments on live hosts are limited in terms of sample size and infection duration for ethical reasons; live mammal models also require specialized facilities which are costly to run. To address this, we have developed an *ex vivo* pig lung (EVPL) model for quantifying *Pseudomonas aeruginosa* growth, quorum sensing (QS), virulence factor production, and tissue damage in an environment that mimics a chronically infected cystic fibrosis (CF) lung. In a first test of our model, we show that *lasR* mutants, which do not respond to 3-oxo-C<sub>12</sub>-homoserine lactone (HSL)-mediated QS, exhibit reduced virulence factor production in EVPL. We also show that *lasR* mutants grow as well as or better than a corresponding wild-type strain in EVPL. *lasR* mutants frequently and repeatedly arise during chronic CF lung infection, but the evolutionary forces governing their appearance and spread are not clear. Our data are not consistent with the hypothesis that *lasR* mutants act as social “cheats” in the lung; rather, our results support the hypothesis that *lasR* mutants are more adapted to the lung environment. More generally, this model will facilitate improved studies of microbial disease, especially studies of how cells of the same and different species interact in polymicrobial infections in a spatially

Il polmone di maiale è in grado di replicare l'ambiente polmonare FC



modello ex-vivo per lo studio della crescita batterica, del QS, della produzione di fattori di virulenza e dei danni tissutali in un ambiente in grado di mimare un polmone di un paziente con FC cronicamente infetto



**FIG 1** Schematic of the final protocol for preparation, infection, and culture of EVPL.



# Grazie per l'attenzione

Un ringraziamento all'università di Pavia che ci ha ospitati

Professoressa Maria Rosalia Pasca

Professoressa Silvia Buroni

Dott. Gabriele Trespidi

Dottorssa Viola Camilla Scoffone



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

