



MALATTIE GENETICHE: USCITA PRESSO I LABORATORI DI MICROBIOLOGIA - UNIPV

Presentazione a cura del gruppo 2:

Martina Carbone; Sara Visco; Simona
Gullà; Rebecca Toader; Marta Ronchi;
Giulia Cattaneo; Lorenzo Pedroncelli;
Guido Scarpini

Introduzione

- ▶ Presso Università di Pavia nel laboratorio della Prof.ssa Scoffone è stato testato il composto **C11**, una molecola con attività antibatterica e antibiofilm che agisce inibendo la proteina batterica **FtsZ**, coinvolta nella divisione cellulare. In questo modo i batteri non riescono a dividersi correttamente, con conseguente riduzione della formazione del biofilm e aumento del danno cellulare batterico.
- ▶ Per valutare l'efficacia del composto vengono utilizzati modelli sperimentali di complessità crescente, che riproducono il biofilm in maniera più o meno simile alla condizione patologica reale della Fibrosi Cistica.
- ▶ Si parte inizialmente da modelli più semplici, rapidi e meno costosi, per evitare spreco di risorse e selezionare solo i trattamenti più promettenti, che vengono successivamente analizzati in modelli più complessi e più vicini al tessuto polmonare reale.

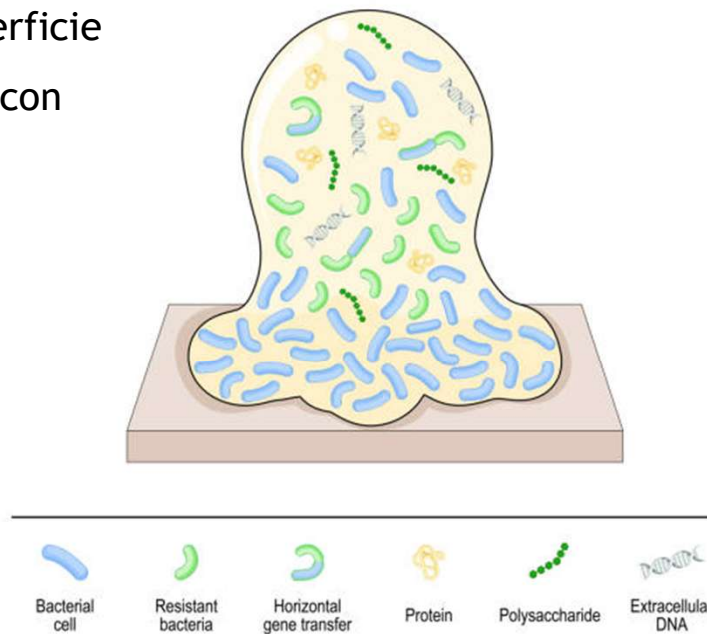


Cos'è il biofilm?

- ▶ Comunità di batteri aderenti ad una superficie
- ▶ Costituito da una matrice extracellulare con funzione protettiva

Importanza del biofilm

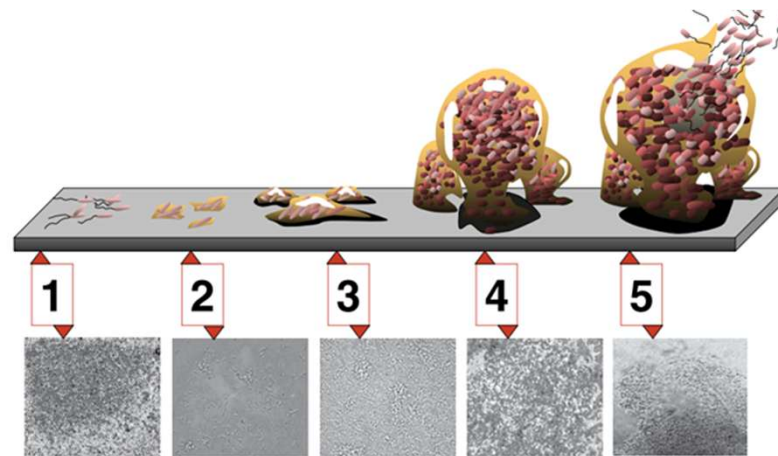
- ▶ Aumento della resistenza agli antibiotici
- ▶ Eterogeneità metabolica
- ▶ Persistenza dell'infezione



La valutazione del biofilm è fondamentale per studiarne la formazione, la resistenza agli antibiotici e l'efficacia dei trattamenti.

Come si forma il biofilm?

1. Adesione iniziale
2. Adesione irreversibile
3. Produzione della matrice (EPS)
4. Maturazione del biofilm
5. Dispersione



Un elemento chiave che regola molte di queste fasi è il **quorum sensing**.

Esperimento 1: Saggio con cristal violetto

Obiettivo: confrontare batteri non trattati VS batteri trattati con farmaco per valutare l'azione sul biofilm

FASI DEL SAGGIO

1. Inoculo batterico

Nei pozzetti della micropiastra vengono inseriti circa **400 µL di sospensione batterica** in un terreno di coltura formato da **TSB (Tryptic Soy Broth)** + glucosio allo 0,5%

2. Incubazione

La piastra viene incubata overnight a 37°C per permettere adesione batterica e formazione del biofilm

3. Lavaggi

Con PBS o soluzione fisiologica

4. Fissaggio

Si aggiunge etanolo al 100% per fissare il biofilm e far aderire meglio la biomassa alla parete del pozzetto

5. Colorazione con cristal violetto

Si aggiunge cristal violetto all'1%

6. Lavaggio

Si rimuove il colorante in eccesso mediante lavaggio



7. Solubilizzazione

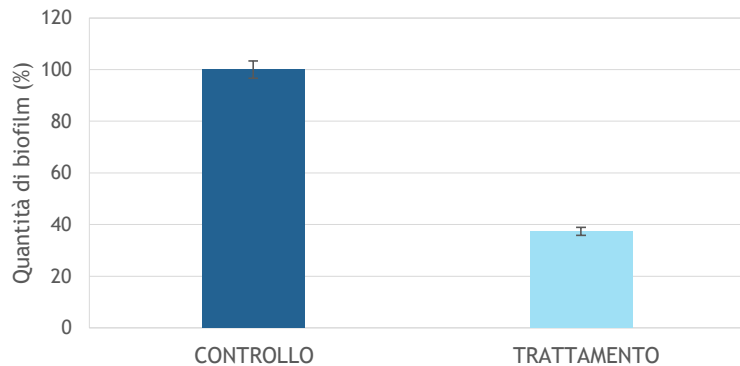
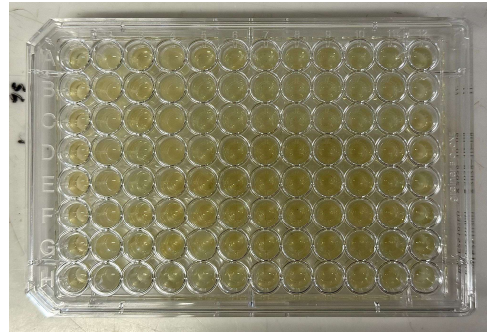
Si aggiunge acido acetico, per sciogliere il cristal violetto per poter essere quantificato

8. Lettura dell'assorbanza

La micropiastra viene letta con il Plate Reader il quale misura l'assorbanza (OD) usando filtri ottici permettendo di leggere solo determinate lunghezze d'onda.

La micropiastra è formata da 96 pozzetti distribuiti in 12 colonne delle quali abbiamo utilizzato:

- ▶ Colonna 2 → controllo
- ▶ Colonna 4
 - dalla A alla D → trattati
 - dalla E alla H → bianchi



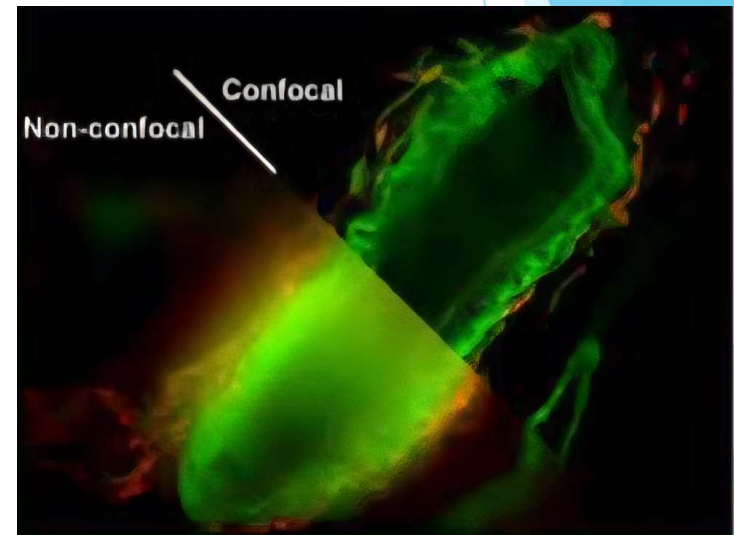
RISULTATI

Riduzione di più della metà del biofilm alla concentrazione di 4 $\mu\text{g/mL}$ di farmaco.

Media $\pm$ errore standard di 8 replicati tecnici del controllo e 4 del trattamento

Microscopia confocale

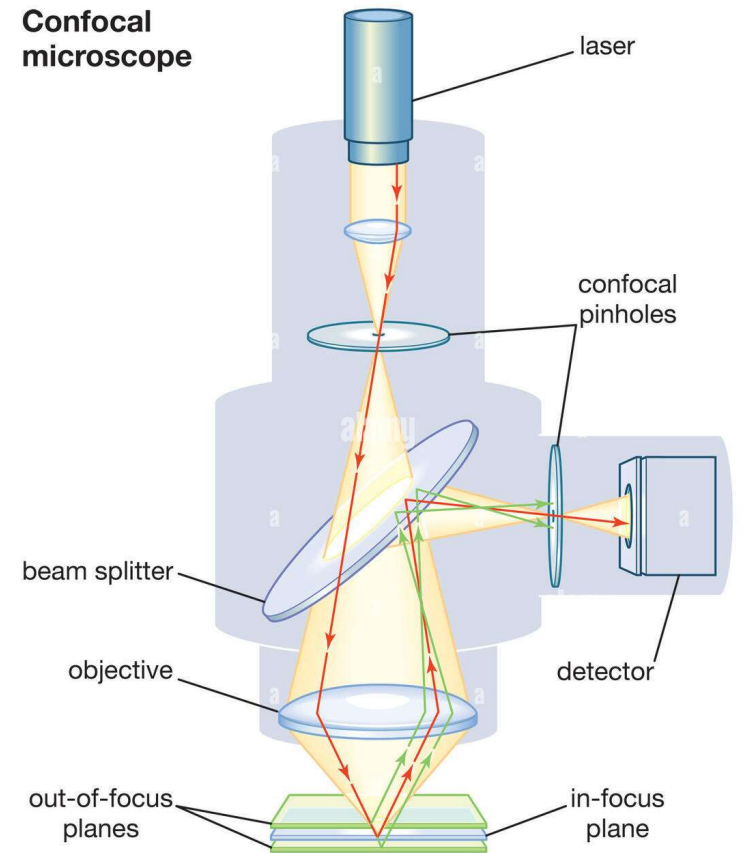
- ▶ Microscopio ottico
 - ▶ Luce inonda tutto il campione, illuminando la parte sopra e sotto rispetto alla 'fetta' a cui siamo interessati. Si forma un effetto sfuocato che copre i dettagli
- ▶ Microscopio confocale
 - ▶ Utilizzo di un laser che consente di scannerizzare punto per punto, la luce sopra e sotto viene bloccata da un pinhole. Il computer mette assieme i singoli punti.
 - ▶ Alzando e abbassando il fuoco del microscopio, si scannerizza una fetta alla volta e si ottiene una ricostruzione 3D.



Microscopia confocale

- ▶ **Laser:** lunghezza d'onda precisa
- ▶ **Specchio dicroico:** si comporta diversamente in base al fascio di luce
- ▶ **Specchi galvanometrici:** specchi che vibrano per consentire tutta la scansione
- ▶ **Obiettivo e campione:** l'obiettivo concentra la luce, il campione è trattato con fluorocromi
- ▶ **Pinhole:** posizionato sul piano focale coniugato, consente solo alla luce del piano a fuoco di passare
- ▶ **Rilevatore:** rileva i fotoni del punto a fuoco, convertendo in segnali elettrici
- ▶ **Computer:** associazione segnali elettrici e posizione degli specchi galvanometrici

Confocal microscope



Esperimento 2: Analisi biofilm con microscopia confocale

Nei pazienti con FC le infezioni batteriche croniche sono spesso associate alla formazione di biofilm.

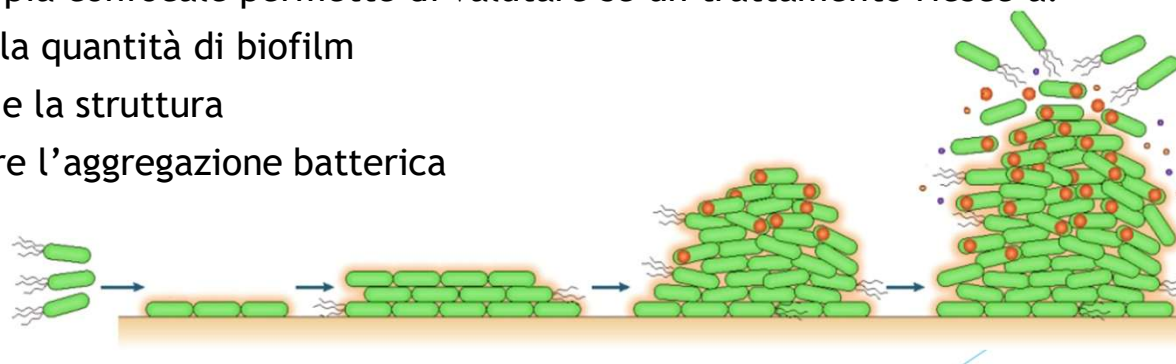
La microscopia confocale permette di osservare il biofilm in modo tridimensionale (3D).

Rispetto a una normale microscopia, consente di acquisire immagini a diversi piani focali e ricostruire il biofilm lungo l'asse z confrontando i campioni trattati e non trattati.

Questo è importante perché il biofilm non cresce in modo uniforme, ma forma strutture stratificate e complesse.

La microscopia confocale permette di valutare se un trattamento riesce a:

- ▶ Ridurre la quantità di biofilm
- ▶ Alterarne la struttura
- ▶ Diminuire l'aggregazione batterica



Come viene effettuata l'analisi

- ▶ I campioni vengono colorati con SYTO 9, che evidenzia i batteri in **verde**.
- ▶ Le immagini vengono acquisite in modalità LIF (fluorescenza).
- ▶ È stato utilizzato un microscopio confocale con obiettivo 63x ad olio.
- ▶ Per ogni pozzetto vengono acquisiti 3-4 campi.
- ▶ Si parte dal piano di contatto sul fondo del vetrino e si acquisiscono immagini verso l'alto.
- ▶ Il microscopio acquisisce immagini a diversi piani focali ("stack"), impostando un passo tra 0 e 3 μm .
- ▶ Alcuni piani possono essere eliminati se fuori fuoco o non rilevanti.
- ▶ Più il biofilm è spesso, meno luce raggiunge i piani superiori, quindi è possibile correggere l'intensità luminosa manualmente o automaticamente.

Cosa ci aspettiamo di vedere

Colorazione live/dead: I batteri marcati con SYTO 9 appaiono **verdi** e il Propidio Ioduro mostra in **rosso** i batteri con la membrana danneggiata o morti.

Nei campioni non trattati ci si aspetta:

- ▶ un biofilm più spesso
- ▶ maggiore intensità del segnale fluorescente
- ▶ strutture batteriche più compatte e organizzate

Nei campioni trattati ci si aspetta:

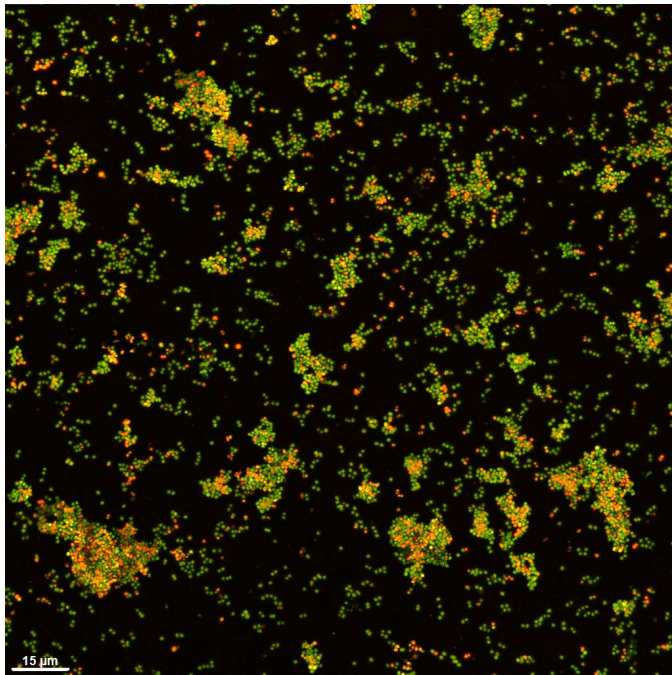
- ▶ riduzione del biofilm
- ▶ minore fluorescenza
- ▶ struttura meno compatta e meno organizzata

Le immagini ottenute permettono quindi di valutare visivamente l'efficacia del trattamento sulla formazione del biofilm.

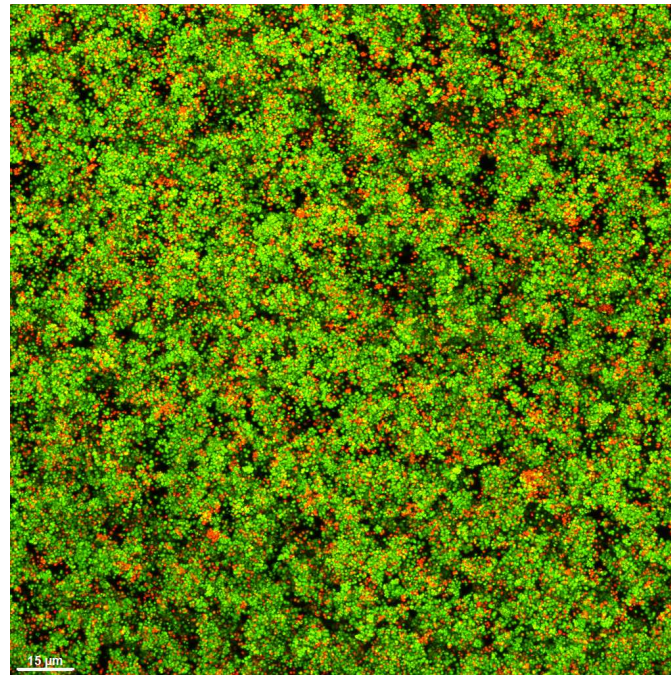


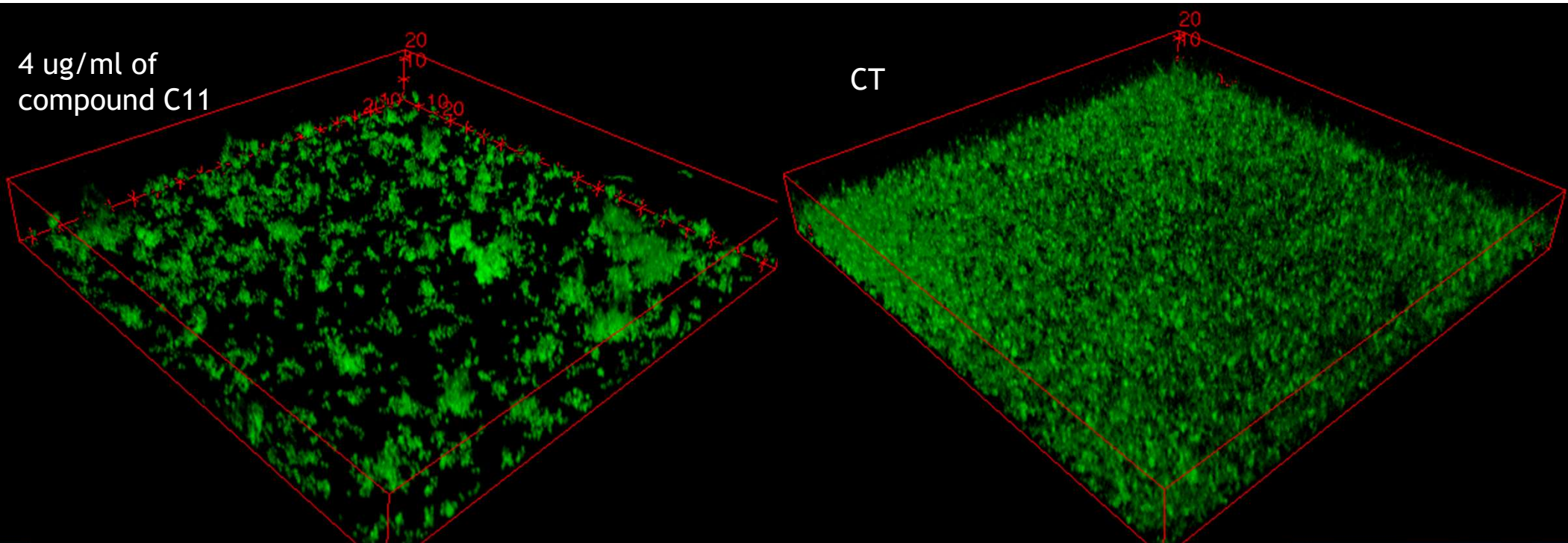
Confronto campione trattato e non trattato colorazione live/dead

4 ug/ml of compound C11



CT





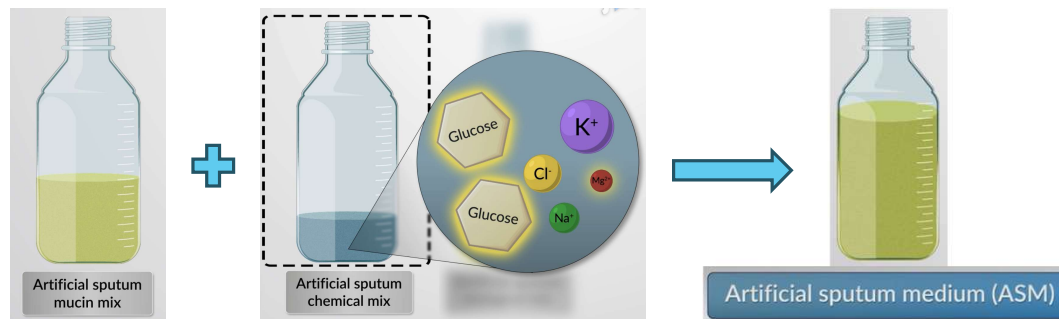
Ricostruzione 3D del biofilm

È stata ottenuta acquisendo immagini a diversi piani z del bronchiolo polmonare. Per ogni area sono state raccolte immagini a fluorescenza e immagini in luce riflessa/grayscale per il tessuto polmonare.

- Se la quantità di batteri è elevata, il colorante viene assorbito prevalentemente dai batteri.
- Se invece i batteri sono pochi, il colorante può legarsi anche alle cellule del tessuto, aumentando il fondo fluorescente.

Modelli avanzati: muco sintetico

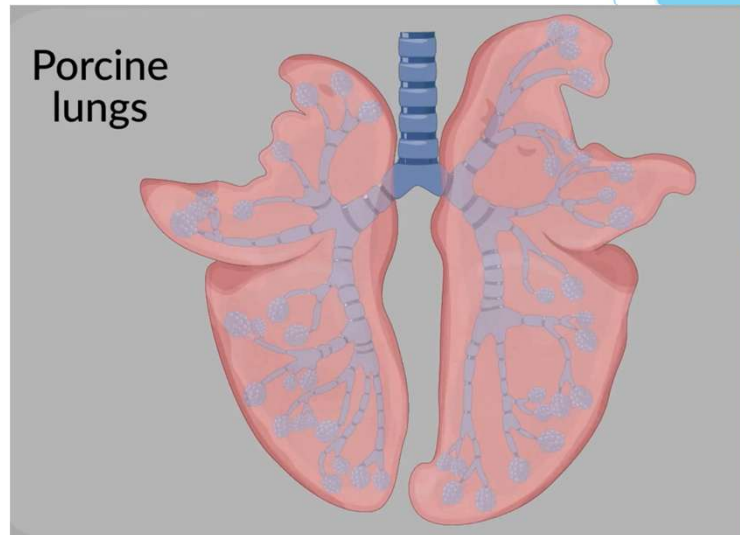
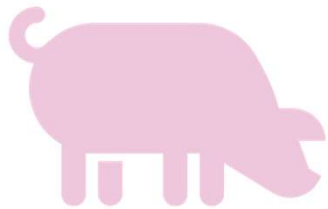
- ▶ Problema: ambiente fedele alla realtà clinica
- ▶ Soluzione usata fino ad ora → terreno TSB
- ▶ Soluzione attuale → modelli avanzati → muco sintetico



- ▶ Contro:
 - ▶ Terreno ricco e complesso
 - ▶ Soggetto a contaminazioni
- ▶ Pro:
 - ▶ Condizioni simili alla realtà

Modelli avanzati: bronchioli di maiale

- ▶ Perché è stato scelto il maiale?
- ▶ Workflow
 - ▶ Isolamento del bronchiolo
 - ▶ Divisioni in frammenti di uguale dimensione
 - ▶ Posizionamento in piastra multi-pozzetto
 - ▶ Inoculo batteri e aggiunta di muco
 - ▶ Incubazione a 37°C con CO₂
 - ▶ Analisi RNA-seq



Dissection of Pig Bronchiolar Tissue

Conclusioni

