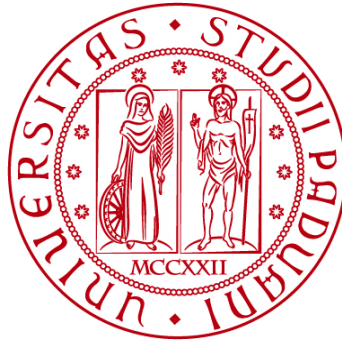


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Correlazione tra la struttura dei biofilm di
Pseudomonas aeruginosa e la tolleranza agli
antibiotici**

Tutor: Prof.ssa Roberta Provvedi
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Angela Marani

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
2. I BIOFILM DI <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	5
2.1 ESOPOLISACCARIDI	5
2.2 ACIDI NUCLEICI	7
2.3 PROTEINE	8
2.4 PROFAGI	10
3. LA MICROANATOMIA DEI BIOFILM INFLUENZA LA TOLLERANZA AGLI ANTIBIOTICI	11
3.1 ORGANIZZAZIONE CELLULARE NEI BIOFILM DI <i>P. AERUGINOSA</i>	11
3.2 FENOTIPI MUTANTI ED ELEMENTI NECESSARI PER IL PATTERNING	13
3.3 RELAZIONE TRA DISPOSIZIONE CELLULARE, STATUS METABOLICO E RISPOSTA AGLI ANTIBIOTICI	15
3.3.1 <i>Test sulla diffusione all'interno del biofilm</i>	15
3.3.2 <i>Test sull'attività metabolica</i>	16
3.3.3 <i>Test sulla vitalità cellulare</i>	16
3.3.4 <i>Test sulla tolleranza agli antibiotici</i>	17
4. CONCLUSIONI	19
5. BIBLIOGRAFIA	20

1. INTRODUZIONE

I biofilm sono comunità complesse di batteri circondate da una matrice polimerica extracellulare. Si tratta della più comune organizzazione multicellulare del mondo microbico, infatti i biofilm sono ubiquitari in natura e si possono sviluppare su molteplici superfici diverse, inclusi gli ospiti viventi e i dispositivi medici [1].

Nel processo di formazione del biofilm, oltre a subire numerosi cambiamenti fenotipici e fisiologici, le cellule batteriche secernono diversi polimeri che formano la matrice extracellulare, tra cui polisaccaridi, proteine, lipidi e acidi nucleici.

La matrice è l'elemento distintivo di tutti i biofilm batterici, e la sua complessa architettura conferisce proprietà emergenti che i batteri in forma planctonica non possiedono [2].

All'interno del biofilm, le cellule batteriche beneficiano di una maggiore capacità di colonizzazione e comunicazione cellulare; soprattutto, il biofilm agisce come uno scudo protettivo contro vari fattori di stress e agenti dannosi, come i raggi UV, gli antibiotici e la risposta immunitaria dell'ospite [3]. In questo modo, i biofilm costituiscono uno dei maggiori fattori eziologici di infezioni croniche e risultano particolarmente difficili da debellare [3]. Infatti, rispetto ai batteri in forma planctonica, i batteri organizzati in biofilm sono fino a 1000 volte più tolleranti agli antibiotici[2].

Tra i batteri che più comunemente formano biofilm vi sono quelli del genere *Pseudomonas*, in particolare *Pseudomonas aeruginosa*, un organismo modello per lo studio dei biofilm. Questo batterio è uno dei principali responsabili delle infezioni nosocomiali, che si manifestano soprattutto come polmoniti, suppurazioni di ferite e batteriemie [3].

La complessa struttura dei biofilm di *P. aeruginosa* contribuisce significativamente alla sua patogenicità, aumentando la tolleranza alla risposta immunitaria dell'ospite e facilitando lo sviluppo di infezioni croniche [3].

In un recente studio è stata analizzata l'anatomia a livello cellulare dei biofilm di *P. aeruginosa*, ed è stata individuata una particolare distribuzione in zone verticali delle cellule batteriche [4].

Si è dimostrato che il diverso orientamento delle cellule ha conseguenze sulla capacità di queste di assumere e distribuire risorse all'interno del biofilm, portando

dunque alla differenziazione di regioni con arrangiamento cellulare, status fisiologico e sensibilità agli antibiotici differenti [4].

I dati ottenuti suggeriscono quindi una correlazione tra la microanatomia di questi biofilm e la loro capacità di sopravvivenza e tolleranza agli antibiotici [4].

Una conoscenza più approfondita della struttura e della fisiologia dei biofilm è fondamentale per sviluppare strategie terapeutiche innovative volte ad eradicare le infezioni batteriche [4].

2. I BIOFILM DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Pseudomonas aeruginosa è un batterio ubiquitario capace di adattarsi ad un'ampia varietà di nicchie ecologiche, dove spesso si trova organizzato in biofilm; oltre ad infettare piante, insetti ed animali, è un noto patogeno opportunistico umano, responsabile di infezioni croniche e nosocomiali. La patogenicità di questo batterio è potenziata dalla composizione e dalla struttura del biofilm stesso, che conferiscono a *P. aeruginosa* maggiore tolleranza agli antibiotici e al sistema immunitario dell'ospite, rendendo quindi le infezioni più difficili da eradicare.

In questo contesto, è di particolare importanza l'apporto della matrice extracellulare (ECM), la quale costituisce un guscio protettivo entro cui le cellule batteriche sono protette e nutrite, e possono accrescersi e adattarsi all'ambiente. L'ECM rappresenta circa il 75-95% del biofilm maturo e comprende numerosi polimeri, tra cui polisaccaridi, proteine, lipidi e acidi nucleici [5, 3].

2.1 Esopolisaccaridi

I componenti più essenziali della matrice extracellulare sono gli esopolisaccaridi, i quali svolgono un ruolo cruciale nella struttura, nello sviluppo e nelle funzioni del biofilm stesso [3], e sono importanti per l'organizzazione spaziale della matrice extracellulare del biofilm [2].

P. aeruginosa produce principalmente tre diversi esopolisaccaridi, ciascuno dei quali contribuisce alla patogenicità del batterio: alginato, Psl e Pel [5].

L'alginato è un polimero anionico ad alto peso molecolare, composto da β -D-mannuronato e α -L-guluronato, che conferisce al biofilm un aspetto viscoso e una maggiore stabilità strutturale, oltre alla capacità di trattenere idratazione e nutrienti. I biofilm contenenti alginato dimostrano particolare persistenza, sia in presenza di condizioni ambientali avverse, sia nei confronti del sistema immunitario dell'ospite [3].

Gli studi condotti su *P. aeruginosa* dimostrano una significativa correlazione tra questo polisaccaride ed esiti clinici avversi, evidenziando come l'alginato, conferendo adattabilità e resistenza al batterio, ne aumenti anche la virulenza [3].

Quando il *P. aeruginosa* invade l'organismo, può iper-produrre alginato, causando una transizione del biofilm verso un fenotipo mucoso; questa conversione è

correlata ad un deterioramento della funzione polmonare ed un aumento significativo della mortalità dei pazienti [3].

In particolare, nei pazienti affetti da fibrosi cistica, l'alginato protegge le cellule batteriche dai radicali liberi e dalla fagocitosi che, ad opera di neutrofili e macrofagi, costituiscono la risposta immunitaria dell'organismo [3]. Vista l'ampia espressione di alginato nelle infezioni ai polmoni da *P. aeruginosa*, nuove strategie terapeutiche potrebbero avere proprio l'alginato come target [2].

La presenza di alginato favorisce anche la coinfezione con altri patogeni, come ad esempio *Staphylococcus aureus*, che altrimenti sarebbe ostacolata dal fatto che *P. aeruginosa* è aggressivo e competitivo nei confronti di altri batteri. Da un lato, l'eccessiva produzione di alginato può ridurre la sintesi di alcuni fattori di virulenza; dall'altro, nel fenotipo mucoide vi è una ridotta produzione di HQNO (2-eptil-4-idrossichinolina-N-ossido) e di ramnolipidi che previene l'eliminazione di *S. aureus*. Di conseguenza, il sistema immunitario risulta indebolito ed è promossa la coinfezione [3].

Si è osservato che anche la presenza di Psl, un ulteriore esopolisaccaride della matrice di *P. aeruginosa*, è fondamentale nei biofilm mucosi. Nelle colonie che iper-producono alginato, infatti, la delezione dei geni Psl inibisce la formazione di biofilm [5].

Psl è un polimero neutro costituito da unità ripetute di D-mannosio, D-glucosio e L-ramnosio coinvolto nell'adesione iniziale al substrato, nell'aggregazione cellulare e nella formazione delle colonie [2].

Si può trovare in due forme distinte: una forma cellula-associata a basso peso molecolare, che si dispone in modo elicoidale sulla superficie cellulare, ed una forma solubile ad alto peso molecolare. [5].

Psl, soprattutto nelle fasi iniziali di formazione del biofilm, favorisce la tolleranza a vari antibiotici, tra cui colistina, polimixina B, tobramicina e ciprofloxacina, ed è inoltre resistente ad alcuni inibitori di biofilm, in particolare al polisorbato 80. Ciò evidenzia l'importanza cruciale di Psl nella difesa delle cellule batteriche e nel contribuire alla stabilità e all'antibiotico-tolleranza del biofilm [5].

Inoltre, Psl concorre, nel contesto delle infezioni polmonari, alla colonizzazione batterica del tessuto (soprattutto in pazienti immunocompromessi), oltre che alla riduzione d'efficacia della risposta immunitaria [5].

Infine, fa parte dell'ECM di *P. aeruginosa* l'esopolisaccaride Pel, un polimero cationico costituito da N-acetil-D-glucosamina e N-acetil-D-galattosamina che partecipa ai contatti tra cellule, all'adesione al substrato e alla difesa dagli antibiotici [2].

Analogamente a Psl, Pel esiste sia in forma cellula-associata sia in forma libera, le quali sembrano avere funzioni differenti all'interno del biofilm: in particolare, la forma cellula-libera influenza la virulenza e le proprietà biomeccaniche del biofilm, come rigidità, umidità, galleggiamento e coesione [3, 5].

La presenza di carica netta positiva permette a Pel di legarsi al DNA extracellulare (eDNA), conferendo supporto alla struttura del biofilm, oltre che a polimeri come le mucine e l'acido ialuronico che vengono secreti dall'organismo ospite, suggerendo quindi che anche Pel contribuisce all'infezione [2]. Per esempio, i pazienti affetti da fibrosi cistica presentano nelle vie respiratorie un pH leggermente acido, il che rende questo ambiente ideale per l'interazione di Pel con il DNA e le mucine prodotte dall'ospite [5].

Pel ha un ruolo chiave nel potenziare la tolleranza agli antibiotici, soprattutto protegge le cellule batteriche dagli antibiotici aminoglicosidici. Questo è particolarmente vero nelle fasi di formazione del biofilm, e risulta accentuato dal legame di Pel con eDNA [3, 5].

Tradizionalmente, gli esopolisaccaridi sono noti per il loro contributo nell'adesione del biofilm e nel mantenimento della sua struttura; tuttavia, la ricerca si concentra sempre di più sul loro contributo alla resistenza agli antibiotici e al controllo dei processi di segnalazione tra le cellule [3].

2.2 Acidi nucleici

Un altro componente cospicuo della matrice extracellulare è rappresentato dagli acidi nucleici, in particolare il DNA, che è ubiquitario in tutti i biofilm batterici e fondamentale per la loro stabilità e formazione [3,2].

La formazione iniziale del biofilm può essere interrotta con la degradazione dell'eDNA da parte delle nucleasi. Questo effetto però non si ha sui biofilm maturi, perché durante la maturazione del biofilm vi è un passaggio da DNAB, conformazione destrorsa a bassa energia sensibile alle nucleasi, a DNAZ, conformazione sinistrorsa ad alta energia resistente alle nucleasi. L'equilibrio tra le due forme di DNA ha effetti sulla rigidità del biofilm [2].

L'eDNA ha un ruolo cruciale anche nell'innescare la formazione di fibre amiloidi-simili nell'ECM, agendo come nucleatore della polimerizzazione delle subunità proteiche. Si osserva una relazione mutualistica tra l'eDNA e queste fibre proteiche: l'eDNA facilita l'organizzazione delle proteine in fibre, che a loro volta proteggono l'eDNA dalla degradazione, stabilizzando ulteriormente la struttura del biofilm [2]. Inoltre, l'eDNA contribuisce alla tolleranza agli antibiotici in quanto, essendo altamente carico negativamente, si presume che possa sequestrare antibiotici carichi positivamente, come gli aminoglicosidi.

Le molteplici proprietà dell'eDNA evidenziano la sua importanza fondamentale all'interno dell'ECM del biofilm [2].

2.3 Proteine

All'interno della matrice extracellulare si trovano delle componenti proteiche che stabilizzano la struttura del biofilm, oltre che facilitarne l'adesione al substrato e le interazioni con altre molecole della matrice [3].

In molti biofilm batterici queste proteine si presentano sotto forma di fibre, tra cui spiccano gli amiloidi funzionali batterici, noti per la loro struttura a foglietto- β simile a quella degli amiloidi umani. Questa configurazione conferisce loro proprietà biofisiche notevoli, rendendoli capaci di instaurare forti interazioni tra le subunità proteiche, oltre a garantire elevata stabilità e resistenza a proteasi e agenti denaturanti [2].

Nei batteri del genere *Pseudomonas* sono presenti nell'ECM fibre proteiche chiamate Fap (Functional amyloids in *Pseudomonas*), che condividono la struttura a foglietto- β e svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'integrità del biofilm [2]. Si è osservato inoltre che la sovra-espressione del cluster genico

fapA-F, responsabile della produzione di questi amiloidi, comporta un notevole incremento dell'adesione del biofilm [3].

Le Fap sono codificate anche in specie patogene, tra cui *P. aeruginosa*; considerando che questo batterio rappresenta una significativa minaccia per la salute, nuove strategie terapeutiche potrebbero mirare specificamente alle fibre proteiche di matrice per trattare tali infezioni [2].

All'interno dell'ECM di *P. aeruginosa* è importante anche la presenza di CdrA, una proteina monomerica filamentosa composta da ripetizioni tandem che si estendono dalla superficie cellulare con un dominio tip capace di interagire con Psl [2]. CdrA è un'adesina extracellulare che promuove la coesione tra cellule nel biofilm [5].

Interagendo con Pel e Psl, CdrA contribuisce a mantenere l'integrità strutturale del biofilm; allo stesso tempo, l'interazione con Psl protegge CdrA dalla degradazione proteolitica, rafforzando il biofilm [3].

In assenza di esopolisaccaridi, molecole di CdrA possono interagire tra loro e promuovere comunque l'aggregazione cellulare, sebbene questi biofilm risultino più vulnerabili alla degradazione da parte delle proteasi [5].

I nanocorpi che hanno come bersaglio l'interazione CdrA-Psl demoliscono il biofilm e lo rendono più sensibile al trattamento antibiotico, sottolineando l'importanza dell'interazione tra CdrA e Psl per il mantenimento dei biofilm [2].

Le appendici cellulari sono un'ulteriore componente proteica del biofilm [3]. I flagelli e i pili IV giocano un ruolo essenziale nella formazione iniziale del biofilm [3], successivamente i cosiddetti pili CUP sono necessari per la stabilizzazione dei biofilm maturi [2]. In *P. aeruginosa*, si distinguono fino a cinque varianti di pili CUP, divise in due categorie: i "pili CUP classici", che favoriscono l'adesione iniziale e la formazione di microcolonie, e i "pili CUP arcaici", predominanti nei biofilm maturi, dove stabilizzano l'architettura tridimensionale [2].

Oltre alla loro funzione nella formazione del biofilm, le appendici cellulari sono implicate nelle infezioni. Ad esempio, i pili IV e i flagelli possono favorire l'adesione iniziale all'epitelio respiratorio dell'ospite, seguita poi dalla secrezione dell'ECM per formare il biofilm e il rilascio di tossine dannose per il tessuto polmonare [3].

2.4 Profagi

Generalmente, i batteriofagi rappresentano una minaccia per la sopravvivenza delle cellule batteriche. Tuttavia, alcuni di essi possono convivere con l'ospite e persino integrarsi nel suo genoma, instaurando una relazione simbiotica e conferendo vantaggi nella sopravvivenza: si parla, in questo caso, di profagi [2].

Nel genoma di *P. aeruginosa* sono codificati diversi profagi, tra cui *Pf4*, un batteriofago filamentoso appartenente alla famiglia *Inoviridae*. Soprattutto durante la formazione del biofilm, l'espressione del profago è strettamente regolata da *P. aeruginosa*, con la produzione di migliaia di copie di *Pf4* e il suo rilascio nell'ECM (contribuendo in parte anche alla stabilità del biofilm stesso) [2].

All'interno della matrice del biofilm, il profago *Pf4* interagisce con i polisaccaridi formando spontaneamente delle goccioline liquide cristalline, chiamate tactoidi, le quali sono in grado di avvolgere e proteggere le cellule batteriche, creando una vera e propria barriera contro gli antibiotici [2].

Quando *P. aeruginosa* infetta l'organismo ospite, l'abbondanza di profago induce nell'ospite una risposta immunitaria antivirale anziché antibatterica, ulteriormente aumentando la patogenicità del batterio e causando un considerevole aumento della morbilità nei pazienti [2].

La capacità dei tactoidi di interagire con le cellule batteriche in modo protettivo potrebbe spiegare perché ricorrono nella maggior parte dei batteri che formano biofilm [2].

3. LA MICROANATOMIA DEI BIOFILM INFLUENZA LA TOLLERANZA AGLI ANTIBIOTICI

Il presente capitolo è dedicato all'analisi dell'articolo intitolato "Cellular arrangement impacts metabolic activity and antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms" pubblicato nella rivista "PLOS Biology" nel febbraio 2024.

In questo studio viene analizzata la microanatomia dei biofilm di *P. aeruginosa*, ipotizzando che la disposizione delle cellule batteriche influisca sull'accesso alle risorse nel biofilm e, di conseguenza, anche sull'attività metabolica e la risposta agli antibiotici dei batteri.

Infatti, all'interno dei biofilm, si generano nel corso della maturazione dei gradienti chimici che portano alla delineazione di subzone caratterizzate da una diversa disponibilità di risorse. In questo modo, si può osservare nel biofilm una differenziazione fisiologica, morfologica e metabolica.

Sebbene nell'ECM le molecole vengano trasportate principalmente tramite processi diffusivi, un contributo significativo proviene dai microorganismi stessi; questi ultimi, alterando la struttura del biofilm, possono influenzare l'assorbimento e la distribuzione delle risorse.

3.1 Organizzazione cellulare nei biofilm di *P. aeruginosa*

Con l'obiettivo di approfondire la relazione tra la disponibilità di nutrienti e la dinamica fisiologica nei biofilm in *P. aeruginosa*, sono stati adottati come modello di studio i biofilm di macrocolonia. L'impiego di tali modelli è particolarmente vantaggioso per lo studio, sia perché permettono di analizzare una vasta gamma di fattori che possono influenzare la formazione dei biofilm (come la produzione di polisaccaridi, il ruolo dei pili e dei secondi messaggeri), sia perché, essendo facilmente riproducibili, consentono di osservare le variazioni geniche e biochimiche presenti in biofilm fisiologicamente differenziati.

È stata utilizzata la microscopia elettronica a scansione (SEM) per analizzare come si dispongono le cellule di *P. aeruginosa* all'interno dei biofilm; le immagini ottenute evidenziano la presenza di due regioni distinte all'interno del biofilm: una

regione “disordinata”, in cui le cellule appaiono orientate in direzioni diverse, ed una regione “ordinata”, in cui le cellule sono allineate longitudinalmente.

Successivamente, per osservare come si distribuiscono le cellule clonali, sono state cresciute delle colonie in cui il 2,5% della popolazione esprimeva costitutivamente un marcatore fluorescente, mentre la restante parte non era marcata. I risultati ottenuti sono stati analizzati prima con il microscopio a fluorescenza, per osservare la disposizione delle cellule marcate, e poi utilizzando uno script Python è stata studiata la posizione delle singole cellule rispetto all’asse verticale del biofilm.

Si è così riscontrato, come si può vedere nella figura 1, che nella zona disordinata (zona 1, la zona inferiore del biofilm), le cellule sono orientate in modo casuale, mentre nella zona ordinata (zona 2), le cellule si dispongono in striature orientate secondo l’asse verticale del biofilm ed equidistanti tra loro. Infine, è presente una zona 3, corrispondente alla porzione più superficiale del biofilm, in cui le cellule mostrano una certa deviazione dall’allineamento verticale, pur mantenendo la caratteristica aggregazione spaziale.

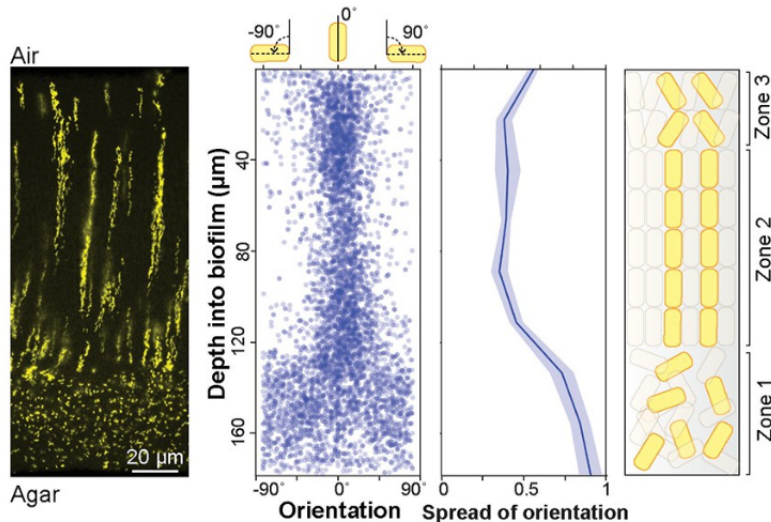


Figura 1. Orientamento delle cellule di *P. aeruginosa* nel biofilm. Immagini ottenute tramite microscopia a fluorescenza (a sinistra) e rappresentazione schematica della disposizione delle cellule lungo il biofilm (a destra) (da H. Dayton et al., 2024, modificato).

Studi analoghi condotti su biofilm pellicolari hanno dimostrato che le popolazioni di *P. aeruginosa* si organizzano in striature verticali sia nei biofilm coloniali, sia in quelli pellicolari.

Infine, per studiare lo sviluppo delle striature nel corso della maturazione dei biofilm, sono state effettuate diverse analisi al microscopio a intervalli temporali di 6, 12, 24 e 72 ore di incubazione. È emerso che, nella zona 1, le cellule batteriche durante la maturazione possiedono una certa capacità di movimento e tendono a disperdersi al contrario, nella zona 2, in seguito alla divisione cellulare le cellule rimangono allineate.

3.2 Fenotipi mutanti ed elementi necessari per il patterning

Nello studio si è dapprima ipotizzato che variazioni nella disponibilità di nutrienti potessero determinare la distribuzione delle cellule nelle diverse zone; per verificare tale ipotesi, diverse colonie di biofilm sono state coltivate a differenti concentrazioni di triptone. Dai risultati è emerso che la dispersione delle cellule nelle diverse zone non è correlata alla concentrazione assoluta di triptone, suggerendo dunque che la formazione delle caratteristiche striature non è reputabile solamente alla disponibilità di nutrienti. Inoltre, si è osservato che pur variando la concentrazione di triptone, i biofilm presentavano un picco di attività metabolica a profondità costanti tra i 40 e i 70 μm , coincidenti con la regione in cui le cellule sono allineate verticalmente. Emerge dunque che l'attività metabolica è massima laddove le concentrazioni relative di ossigeno e triptone sono ottimizzate, e poiché biofilm cresciuti in condizioni anaerobiche non sviluppano striature, si può concludere che l'ossigeno ha un ruolo cruciale nel determinare questo patterning.

Per identificare i determinanti genetici alla base della disposizione cellulare nel biofilm, sono stati coltivati 48 mutanti privi di proteine regolatorie, componenti della superficie cellulare e altri fattori che contribuiscono alla fisiologia del biofilm. Tramite analisi microscopica, i diversi fenotipi sono stati discriminati in 4 classi, visibili in figura 2: "striated", "bundled", "disordered" e "clustered".

Nel fenotipo "bundled" (*ΔpilA*) le cellule sono allineate verticalmente in modo analogo al WT, ma le striature appaiono più larghe e distanziate tra loro. Questa disposizione si riscontra nei mutanti con difetti nella funzionalità del pilus di tipo IV, che si traduce in una ridotta abilità delle cellule di separarsi prima della formazione delle striature.

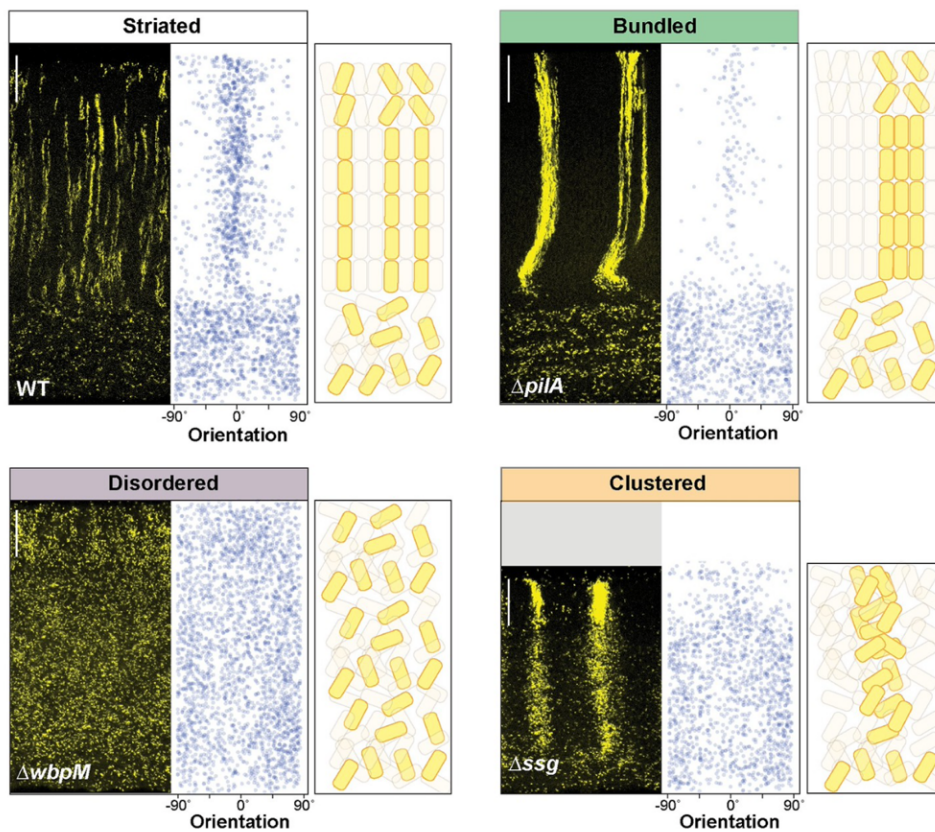


Figura 2. Patterning cellulare in diversi ceppi di *P. aeruginosa*. Immagini di microscopio a fluorescenza di biofilm WT e mutanti e rappresentazioni schematiche delle relative disposizioni cellulari. (da H. Dayton et al., 2024, modificato).

Nel fenotipo “disordered” ($\Delta wbpM$ e $\Delta gacA$), le cellule batteriche appaiono orientate casualmente ed equidistanti tra loro. Questo fenotipo può essere attribuito sia a disfunzioni di alcuni regolatori genici, sia alla delezione del gene *wbpM*, il quale è responsabile della sintesi dell’antigene O (componente significativo dei lipopolisaccaridi costituenti la membrana esterna dei batteri gram-negativi).

I mutanti che manifestano il fenotipo “clustered” (Δssg e $\Delta wapR$) dimostrano una disposizione casuale delle cellule, che però mantengono la capacità di aggregarsi verticalmente nelle zone 2 e 3 del biofilm. Questi ceppi sono caratterizzati dalla produzione di lipopolisaccaridi privi di antigene O attaccato; è interessante notare che, anche nei modelli di colture di fibrosi cistica, si riscontra una mancanza di antigene O, che provoca un fenotipo cellulare alterato definito “stacked”.

I mutanti con fenotipo “striated”, nonostante presentino un’organizzazione cellulare simile al WT, mostrano anomalie nello sviluppo del biofilm dovute a difetti di varia natura, tra cui livelli irregolari di secondi messaggeri, alterazioni del metabolismo, delezioni di proteine sensibili all’ossigeno e all’ossido nitrico, o difetti nella produzione di appendici cellulari, Pel o fattori di virulenza; alcuni esempi sono *ΔrmcA*, *Δpel* e *ΔflgK*.

Alla luce di questi risultati, si può concludere che innanzitutto la presenza di un pilus di tipo IV funzionale è essenziale per la separazione delle cellule clonali prima della formazione del patterning striato. Tuttavia, si può anche affermare che il pilus non influisce sulla dispersione cellulare nella zona 1, né sulla formazione delle striature o sull’orientamento delle cellule secondo l’asse verticale, dato che nei mutanti *ΔpilA* le cellule mostrano difetti solo nell’aggregazione delle cellule correlate, mentre le altre caratteristiche fenotipiche sono analoghe al WT.

Infine, osservando i mutanti “disordered” e “clustered”, si evince che le difetti nella struttura dei lipopolisaccaridi influenzano sia l’orientamento cellulare che l’aggregazione delle cellule clonali, compromettendo la formazione delle striature.

3.3 Relazione tra disposizione cellulare, status metabolico e risposta agli antibiotici

3.3.1 Test sulla diffusione all’interno del biofilm

Al fine di verificare qualora la diversa organizzazione cellulare influenzi la distribuzione delle risorse all’interno del biofilm, sono stati condotti degli esperimenti per osservare come varia la capacità di diffusione tra i ceppi selvatici e i ceppi mutanti di *P. aeruginosa*.

Sono stati presi in esame substrati di dimensioni diverse (ramnosio, colorante fluorescente e microsferi fluorescenti), e in tutti gli esperimenti si è riscontrato che la distribuzione delle molecole dipende in modo significativo dall’organizzazione cellulare, infatti i mutanti presentano alterate capacità di assorbimento e diffusione.

3.3.2 Test sull'attività metabolica

Successivamente, utilizzando la microscopia SRS (stimulated raman scattering), è stata analizzata la variazione dell'attività metabolica cellulare nei biofilm mutanti e nel WT, in base alla diversa disposizione delle cellule (sapendo che nei ceppi selvatici si riscontra attività metabolica massima tra i 40 e i 70 μm).

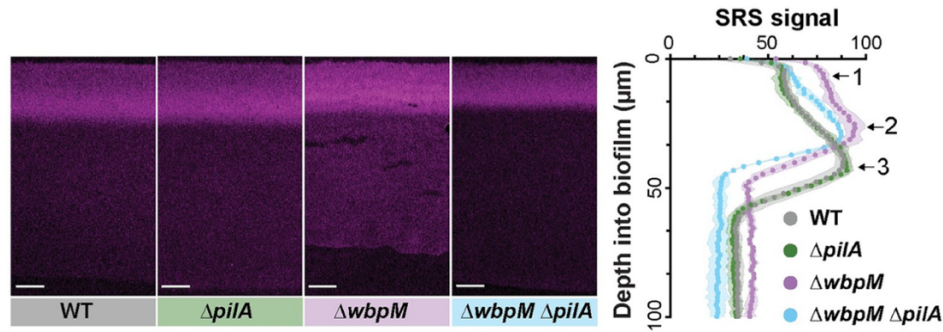


Figura 3. Mutazioni nella disposizione cellulare influenzano i modelli di attività metabolica nel biofilm. Immagini di microscopia SRS di colonie WT e mutanti e schema delle differenze riscontrate nell'attività metabolica. (da H. Dayton et al., 2024, modificato).

Nei mutanti $\Delta wbpM$, come si evince in figura 3, si riscontra uno spostamento dell'attività metabolica verso la superficie del biofilm, oltre alla comparsa di un picco di attività non presente nel ceppo selvatico. Nei mutanti $\Delta pilA$, invece, la situazione è analoga al WT.

3.3.3 Test sulla vitalità cellulare

Sono state poi fatte delle analisi per studiare la vitalità cellulare nei diversi biofilm, esponendo le cellule batteriche a ioduro di propidio (PI), un colorante che viene escluso dalle cellule vive con membrane intatte.

I risultati sono mostrati nella figura 4, dove si può vedere come le colonie $\Delta wbpM$ mostrano maggiore colorazione PI nella regione superiore del biofilm, che indica una quantità maggiore di cellule morte rispetto al WT e ai mutanti $\Delta pilA$, che presentano invece distribuzioni simili di PI.

Complessivamente, i dati ottenuti suggeriscono che nei mutanti $\Delta wbpM$ la disposizione casuale delle cellule è correlata ad una maggiore diffusione delle risorse, che riescono quindi a raggiungere la parte superiore del biofilm. Allo stesso tempo, questi mutanti presentano uno spostamento dell'attività metabolica verso la

superficie, che causa un più rapido esaurimento delle risorse; si spiega, così, l'incremento delle cellule non vitali visibile tramite la colorazione con PI.

Si evince, quindi, che l'organizzazione cellulare alterata presente nei ceppi mutanti è associata a pattern differenti di distribuzione dei substrati e di attività metabolica dei biofilm.

3.3.4 Test sulla tolleranza agli antibiotici

Poiché la tolleranza agli antibiotici è influenzata dallo status fisiologico delle cellule batteriche, si è ipotizzato che questi mutanti presentassero anche differenze nella risposta agli antibiotici. Per testare la suscettibilità agli antibiotici dei biofilm mutanti, diverse colonie di *P. aeruginosa* sono state incubate in un terreno contenente PI e tobramicina (antibiotico aminoglicosidico che ha un'azione battericida nei confronti delle cellule metabolicamente attive [3]), dove un aumento della colorazione di PI indica una diminuzione della tolleranza agli antibiotici.

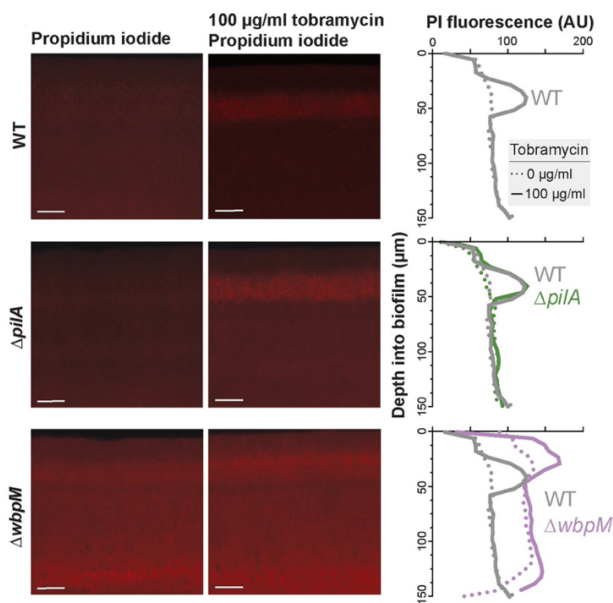


Figura 4. Analisi della vitalità cellulare nel biofilm. Immagini di microscopia a fluorescenza di biofilm esposti a PI (sinistra) e a PI + tobramicina (destra) e relativa rappresentazione schematica. (da H. Dayton et al., 2024, modificato).

Si è osservato che nelle colonie WT e nei mutanti *ΔpilA* si ha morte cellulare nella regione da 20 a 60 μm dall'interfaccia aria-biofilm, zona in cui si ha elevata attività metabolica.

Nei mutanti $\Delta wbpM$ e $\Delta gacA$, invece, si osserva che la zona dove si ha morte cellulare causata dalla tobramicina (cioè si ha ridotta tolleranza agli antibiotici) si trova tra 0 e 40 μm , zona in cui questi mutanti mostravano una spiccata risposta al ramnosio, e dove nei ceppi $\Delta wbpM$ si riscontra un picco di attività metabolica.

In realtà, si osserva nei mutanti $\Delta wbpM$ un aumento generale della mortalità cellulare rispetto ai biofilm non trattati.

Questi risultati sono coerenti con alcuni studi che in passato hanno dimostrato come lo status fisiologico del biofilm abbia un ruolo importante nel determinare l'antibiotico-tolleranza dei batteri. Per esempio, Walters et al. (2003) riportano che non è la scarsa penetrazione degli antibiotici a causare l'antibiotico-tolleranza dei biofilm di *P. aeruginosa*, bensì tale proprietà si verifica laddove sono presenti scarse quantità di ossigeno e bassa attività metabolica [6].

Infine, si osserva nei doppi mutanti $\Delta gacA\Delta pilA$ una diminuzione di tolleranza agli antibiotici spostata a profondità tra i 20 e i 60 μm , simile a WT e $\Delta pilA$. Infatti, queste colonie non presentano fenotipo "disordered", bensì la delezione di *pilA*, che è dominante su *gacA*, fa sì che le cellule si dispongano in striature verticali come accade nei mutanti $\Delta pilA$ e nel WT.

Una prima interpretazione della differenziale risposta alla tobramicina che si è riscontrata tra i WT e i mutanti "disordinati" potrebbe essere che nei mutanti $\Delta wbpM$ la tobramicina diffonde più facilmente. Questa ipotesi è in linea con i dati precedenti, i quali evidenziano una correlazione tra la disposizione delle cellule e alterazioni nella capacità di distribuzione di molecole nel biofilm e inoltre spiegherebbe lo spostamento in superficie della regione di morte cellulare vista tramite colorazione con PI.

In aggiunta, la minore tolleranza alla tobramicina che si verifica nei mutanti "disordinati", potrebbe essere dovuta all'aumento dell'attività metabolica vista in superficie, causata a sua volta dalla maggiore disponibilità di nutrienti in quella zona.

In entrambi i casi, i dati ottenuti nello studio dimostrano che esiste una relazione tra la diversa disposizione delle cellule, la diffusione delle risorse e lo status metabolico del biofilm, che in ultima analisi influenzano l'antibiotico-tolleranza dei batteri.

4. CONCLUSIONI

I biofilm batterici costituiscono per l'uomo una delle principali cause di malattie; in particolare, *P. aeruginosa* è uno dei principali responsabili dell'insorgenza di infezioni croniche e biofilm-associate [2].

Sono stati illustrati alcuni componenti dell'ECM di *P. aeruginosa*, evidenziando per ognuno di essi il significativo contributo fornito all'integrità del biofilm e alla patogenicità del batterio [5].

Lo studio condotto da Dayton et al. (2024) sull'organizzazione cellulare nei biofilm di *P. aeruginosa*, ha evidenziato la presenza di una correlazione tra la diversa disposizione cellulare, la distribuzione delle risorse e l'attività metabolica, che, in ultima analisi, influenzano la tolleranza agli antibiotici delle cellule batteriche nel biofilm [4].

In conclusione, in accordo con recenti studi che mostrano come le eccezionali proprietà emergenti dei biofilm siano date da complesse interazioni chimiche e fisiche tra le molecole e le cellule che li formano [2], i dati raccolti dimostrano come l'architettura e la microanatomia dei biofilm di *P. aeruginosa* abbiano un notevole impatto sulla fisiologia e la risposta agli antibiotici del patogeno [4].

Nonostante i significativi progressi compiuti nella comprensione della struttura dei biofilm di *P. aeruginosa*, oltre che nella caratterizzazione dei relativi componenti e interazioni, rimangono ancora delle domande aperte, per esempio sulla coinfezione con altri patogeni, sulla struttura e le interazioni di alcune proteine deputate alla sintesi degli esopolisaccaridi, come anche sui meccanismi di difesa e tolleranza agli antibiotici [5].

Per questo motivo è di fondamentale importanza approfondire la ricerca su *P. aeruginosa* e i componenti del suo biofilm, con l'obiettivo di sviluppare strategie terapeutiche innovative volte al trattamento di infezioni associate a biofilm [3,5].

5. BIBLIOGRAFIA

1. Willey J. M., Sandman K. M. e Wood D. H. (2020) Prescott's Microbiology. McGraw-Hill Education, New York, pp. 1101.
2. Böhning J., Tarafder A. K. e Bharat T. A. M. (2024) The role of filamentous matrix molecules in shaping the architecture and emergent properties of bacterial biofilms. *Biochemical Journal* 481 245-263
3. Wang X., Liu M., Yu C., Li J. e Zhou X. (2023) Biofilm formation: mechanistic insights and therapeutic targets. *Molecular Biomedicine* 4:49 1-25
4. Dayton H., Kiss J., Wei M., Chauhan S., LaMarre E., Cornell W. C., Morgan C. J., Janakiraman A., Min W., Tomer R., Price-Whelan A., Nirody J. A. e Dietrich L. E. P. (2024) Cellular arrangement impacts metabolic activity and antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLOS Biology* 22(2) 1-32
5. Gheorghita A. A., Wozniak D. J., Parsek M. R. e Howell P. L. (2023) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm exopolysaccharides: assembly, function and degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 47 1-31
6. Walters III M. C., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M. J. e Stewart P. S. (2003) Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(1) 317-323