

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Attivazione di colonie batteriche:

diffusione e interferenza di molecole segnale

Relatore

Prof. Antonio Trovato

Laureanda

Rachele Favaretto

Anno Accademico 2018/2019

Sommario

Comportamenti collettivi di comunità batteriche sono coordinati in diversi casi dallo scambio di molecole segnale, un fenomeno noto come Quorum Sensing. Per colonie di batteri distribuiti su distanze sufficientemente grandi, la diffusione delle molecole segnale determina quanto rapidamente il segnale prodotto al centro della colonia da un ceppo mittente riesca ad attivare i batteri ricevitori. Altri ceppi batterici possono invece interferire con la trasmissione del segnale, producendo un enzima che degrada le molecole segnalatrici.

In questo lavoro di tesi, per mezzo di modelli di reazione-diffusione, è stata simulata la competizione fra la diffusione delle molecole segnale e la loro degradazione indotta da un ceppo disturbatore. Dati sperimentali con cui testare i risultati ottenuti sono presenti in letteratura.

Indice

1	Introduzione: cooperazione e comunicazione tra batteri	1
1.1	Crescita delle popolazioni batteriche	1
1.2	Quorum Sensing	2
1.3	Comportamenti sociali controllati dal QS	4
2	Rilevazioni sperimentali di meccanismi di interferenza nel QS	7
2.1	Quorum Quenching	7
2.2	Apparato sperimentale	7
2.3	Dati sperimentali	9
3	Modello teorico di reazione-diffusione	11
3.1	Equazioni e parametri utilizzati	11
3.1.1	Equazione di Hill	13
3.2	Risultati	13
3.3	Modifica del coefficiente di diffusione e dei parametri θ ed m	16
	Conclusioni	17
	Bibliografia	19

Capitolo 1

Introduzione: cooperazione e comunicazione tra batteri

Proprio come gli esseri umani e gli altri animali, i batteri sono organismi sociali. Il Quorum Sensing (QS) è un meccanismo di comunicazione batterica che regola molti processi di cooperazione, ovvero processi che apportano benefici a entrambe le cellule mittenti e riceventi il segnale di comunicazione. Spesso tali meccanismi sono alla base della sopravvivenza della specie o comunque comportano vantaggi di adattamento; alcuni esempi sono la formazione di un biofilm, la motilità collettiva, la bioluminescenza e la virulenza.

In quanto processo di cooperazione il QS si differenzia da altri meccanismi detti di *coercion* (coercizione), a vantaggio delle sole cellule mittenti o di *cue* (informazione), a esclusivo beneficio delle riceventi [1].

1.1 Crescita delle popolazioni batteriche

In un habitat chiuso tutte le risorse sono finite e non rinnovabili. Nella *Figura 1.1* a destra è rappresentata la curva di crescita di una popolazione microbiologica, ovvero un grafico del numero di cellule viventi in funzione del tempo, in un ambiente chiuso.

Tipicamente vi sono quattro fasi ben identificabili: la fase di latenza (lag phase), in cui il numero di cellule resta circa costante, a cui segue la fase di crescita esponenziale (exponential growth phase) in cui rapidamente si raggiunge il numero massimo di individui sostenibile dal sistema; la fase stazionaria (stationary phase), durante la quale il numero di cellule si stabilizza e infine la fase di mortalità (mortality phase).

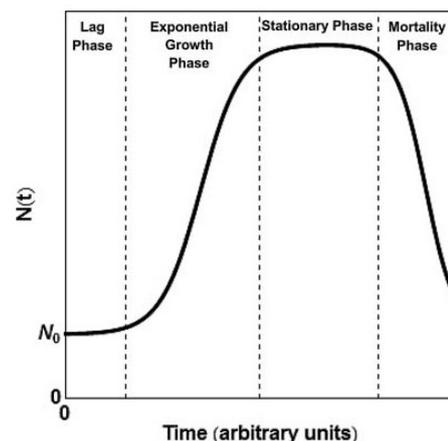


Figura 1.1: Curva di crescita di una popolazione microbiologica in un ambiente chiuso [2].

Quando si discute della curva di crescita, è inoltre utile definire le seguenti quantità:

- lag time, ovvero il tempo di ritardo dopo il quale inizia la crescita esponenziale della popolazione; dato che la curva è continua, il lag time non ha una durata ben definita, ma di solito viene stimato con l'intersezione della tangente della curva di crescita nella fase di latenza con quella nel punto medio del tratto di curva esponenziale (*Figura 1.2*);

- massimo tasso di crescita specifico, usato come misura dell'intensità di crescita di un organismo, ovvero della sua forza fisica. Matematicamente è definito come la pendenza della tangente della curva di crescita nel punto di inversione (*Figura 1.3*) [2].

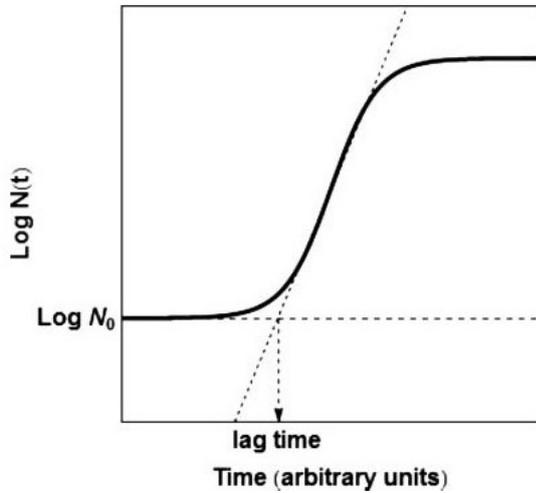


Figura 1.2: Metodo grafico di determinazione del lag time [2].

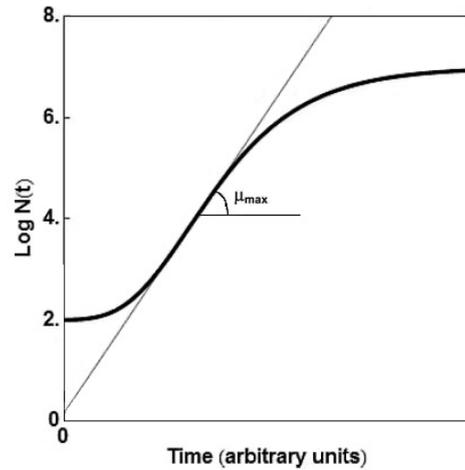


Figura 1.3: Definizione di massimo tasso di crescita specifico [2].

In microbiologia, uno dei due modelli di crescita di popolazione più utilizzato è l'equazione logistica continua del modello di Verhulst:

$$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t)\left[1 - \frac{N(t)}{N_{asympt}}\right]$$

dove $N(t)$ è il numero delle cellule al tempo t , N_{asympt} è il numero raggiunto asintoticamente (allo stato stazionario) e r una costante che dipende da caratteristiche ambientali (pH, temperatura...).

L'equazione dice che a un determinato istante il tasso di crescita di una popolazione è proporzionale alla dimensione istantanea della stessa, in altre parole più cellule ci sono, più possono duplicarsi, e alla frazione istantanea delle risorse ancora disponibili nell'habitat, rappresentate dal termine $1 - N(t)/N_{asympt}$. Fisicamente, dunque, N_{asympt} rappresenta la capacità dell'habitat, espressa con il numero di cellule che può sostenere [2].

Un esempio di controllo di comportamenti cooperativi da parte del QS nell'ambito dell'ecologia di popolazione è la manifestazione dell'effetto Allee solo in situazioni ottimali [3].

L'effetto Allee descrive l'idea che il tasso di riproduzione e di crescita siano positivamente correlati con la densità di individui nella popolazione. Tale effetto scompare a densità molto alte, perché di solito la competizione per le risorse interferisce con l'effetto positivo.

La regolazione QS assicura che le proprietà comportamentali che rendono possibile l'effetto Allee siano espresse solo quando la densità di popolazione è tale da apportare benefici alla comunità [3].

1.2 Quorum Sensing

Il Quorum Sensing QS è il meccanismo di comunicazione batterica attraverso piccole molecole segnale che vengono diffuse da alcune cellule induttrici ad altre ricettrici. Esso è presente sia nei batteri Gram-positivi, sia nei batteri Gram-negativi e poiché sono le stesse cellule a produrre e rispondere al segnale, tale processo viene detto anche Autoinduzione (AI).

Negli anni Ottanta, per lo studio di questo fenomeno, fu essenziale la scoperta nel batterio marino *Vibrio fischeri* del gene responsabile della bioluminescenza *lux* e dei due geni *luxI* e *luxR* necessari alla trascrizione del primo e quindi al controllo QS della luminescenza [4].

In seguito si scoprì che anche altri batteri (sempre Gram-negativi) facevano uso di geni analoghi a *luxI* e *luxR* per il controllo della bioluminescenza e così emerse un tema comune: gli omologhi a *luxI* catalizzano la sintesi di un omoserina lattone acilato (AHL, *Figura 1.4*), mentre gli omologhi a *luxR* fungono da attivatori trascrizionali, legandosi all'AHL [4].

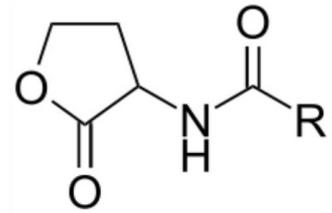


Figura 1.4: Molecola di Omoserina lattone acilato AHL.

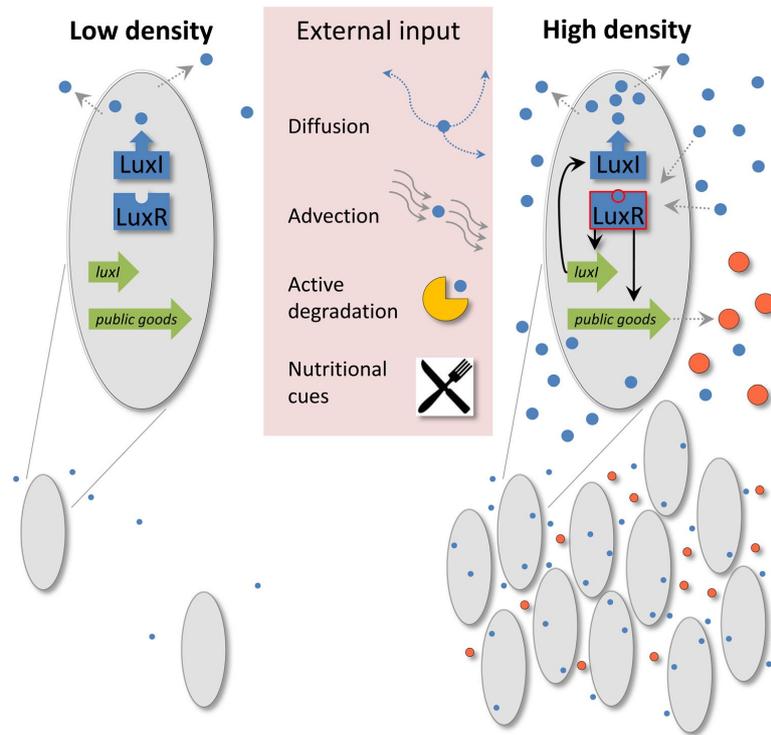


Figura 1.5: Contesto ambientale e sociale del QS: *LuxI* produce il segnale AHL (cerchi blu), segnale che diffonde fuori dalla cellula e viene recepito da *LuxR*. Molti input esterni influenzano il meccanismo. Quando la densità cellulare è sufficientemente alta, aumenta anche il livello di AHL e dunque la possibilità di legarsi a *LuxR*. Si ha un feedback positivo e si attiva il processo controllato dal QS: in questo caso inizia la produzione di beni pubblici (cerchi arancioni) [1].

Il QS batterico, dunque, implica segnali chimici extracellulari prodotti da cellule induttrici i quali diffondono e si accumulano localmente nel citoplasma delle cellule adiacenti. Quando la concentrazione supera il livello (quorum) richiesto, si attiva un feedback positivo e aumenta notevolmente la produzione del segnale, che non è più solo quello basale, ma è incrementato dal QS (un esempio è la produzione di AHL da parte di *LuxI* in *Figura 1.5*).

Le molecole segnale si legano poi agli attivatori trascrizionali che regolano la trascrizione o la repressione di specifici geni [4]. Tali geni sono a loro volta responsabili dell'attivazione o repressione di vie metaboliche o processi cellulari che possono condurre anche alla produzione di beni pubblici molto costosi in termini di risorse, ma che apportano benefici a tutta la colonia batterica. Da qui nasce l'idea che il QS sia un meccanismo di collaborazione sociale (*Figura 1.5*).

Il Quorum Sensing è inoltre influenzato da numerosi fattori, quali le caratteristiche ambientali, ovvero la temperatura e il pH: in particolare i segnali di AHL sono degradati più velocemente in un pH alcalino [3]. Altri fattori, inoltre, possono essere l'azione di enzimi prodotti da altri batteri che, in generale, non uccidono direttamente le cellule mittenti, ma ne neutralizzano l'azione, degradando le molecole segnale [4].

Esempi di QS in batteri Gram-positivi, invece, qui non saranno trattati, ma il meccanismo è analogo; essi includono il sistema di competenze *ComD/ComE* dello *Streptococcus pneumoniae* oppure il sistema virulento *AgrC/AgrA* dello *Staphylococcus aureus*.

1.3 Comportamenti sociali controllati dal QS

Come si è detto, uno degli scopi principali del meccanismo del Quorum Sensing è il controllo di costosi comportamenti cooperativi come la secrezione di beni pubblici.

Essendo dispendiosa, infatti, essa talvolta è sfruttata da batteri parassiti che traggono vantaggi dai beni comuni senza produrli (*Figura 1.6*).

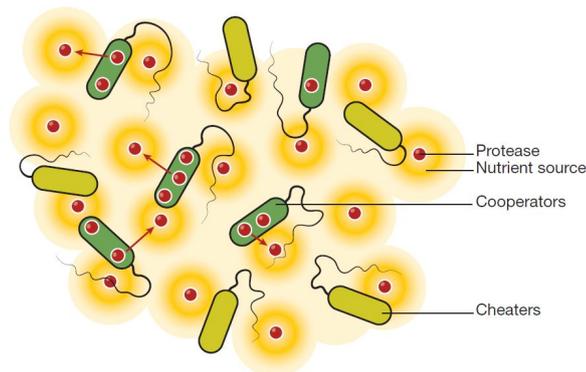


Figura 1.6: Le cellule batteriche che si comportano da collaboratori (in verde scuro) secernono beni pubblici (rossi) nell'ambiente circostante, mentre i batteri parassiti (in verde chiaro) sfruttano tali risorse senza produrle. Gli aloni arancioni rappresentano il nutrimento liberato dai beni pubblici, ad esempio proteine, di cui tutte le cellule, collaboratrici e non, possono beneficiare [4].

Per ovviare a questo problema, il QS ottimizza la spesa, inducendo l'azione congiunta e sincronizzata di molte cellule, azione che non sarebbe efficace se fatta da una o da un piccolo numero di unità: il QS induce la secrezione di beni solo quando è efficiente, ovvero quando i benefici superano i costi. Infatti, come rappresentato in *Figura 1.7* essi vengono prodotti solo se il numero di batteri parassiti non è elevato rispetto a quello dei batteri collaboratori.

Infine, come meccanismo di autodifesa, si nota che le colonie di batteri collaboratori tendono a formare gruppi compatti e isolati dai batteri parassiti, per mantenere i beni pubblici separati da questi ultimi (*Figura 1.8*).

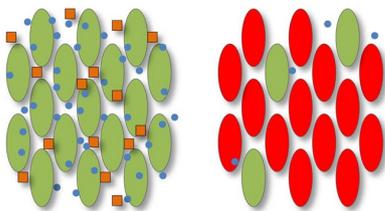


Figura 1.7: Le molecole segnale (punti blu) restringono la produzione di beni pubblici (quadrantini arancioni) in sole popolazioni dove è presente un elevato numero di cellule collaboratrici (verdi). Infatti, se ci sono molte cellule parassite (rosse) la secrezione di beni pubblici non avviene [1].

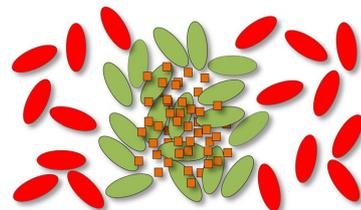


Figura 1.8: Gruppo compatto di batteri collaboratori (verdi) per mantenere i beni pubblici (arancioni) separati dai batteri parassiti (rossi) [1].

Per concludere, se si considerano i batteri patogeni, si osserva che sono meno virulente le infezioni causate da un insieme eterogeneo di batteri collaboratori e batteri parassiti. Questi risultati suggeriscono un nuovo approccio nel trattamento delle infezioni batteriche: si potrebbero utilizzare ceppi che producano enzimi inibitori della sintesi delle molecole segnale, in modo da ridurre la virulenza e la diffusione dell'infezione (*Figura 1.9*).

Il vantaggio sarebbe proprio questo: più che antibatterici, gli inibitori del QS sono agenti anti virulenza, dunque con l'uso di tale tecnica è meno probabile che emerga la resistenza agli antibiotici. [4]

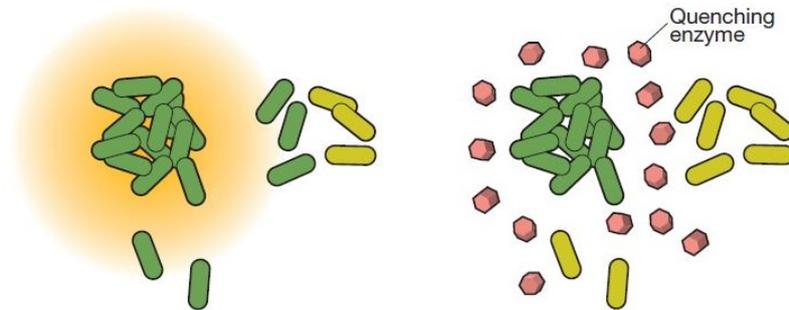


Figura 1.9: Nell'immagine a sinistra, l'aggregato ad alta intensità di batteri (in verde scuro) invia molecole segnale nell'ambiente circostante (alone arancione). Esso attiva il meccanismo del QS anche nelle cellule circostanti vicine (che iniziano anch'esse a produrre il segnale), non in quelle più lontane (verde chiaro). A destra, sono presenti degli enzimi degradatori del segnale (in rosa) e dunque il raggio di diffusione del QS diminuisce [4].

Capitolo 2

Rilevazioni sperimentali di meccanismi di interferenza nel QS

2.1 Quorum Quenching

Come introdotto in precedenza, non è sorprendente che, dato il vantaggio di adattamento fornito dal QS, altre specie batteriche si siano evolute per interferire nel processo di comunicazione.

I meccanismi di interferenza del QS sono chiamati Quorum Quenching e sono di due tipi: diafonia e degradazione del segnale [5]. Il primo meccanismo comprende lo sviluppo di legami competitivi con il recettore da parte di molecole secrete dai batteri interferitori. Il secondo riguarda la produzione di enzimi che modificano chimicamente o rompono le molecole segnale e le rendono perciò inerti come rappresentato in *Figura 2.1*.

In questo lavoro di tesi si studia la propagazione del segnale nello spazio se è presente degradazione, attraverso modelli teorici utili a descrivere i dati sperimentali presenti in letteratura in proposito.

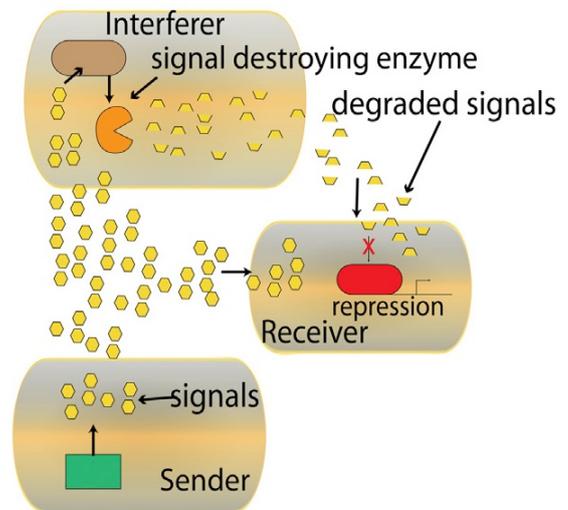


Figura 2.1: Distruzione delle molecole segnale da parte di enzimi prodotti da batteri interferitori [5].

In particolare si esamina l'abilità degli enzimi degradatori a modulare la propagazione del segnale in un sistema di batteri esteso spazialmente. Si studia, cioè, quantitativamente, qual è il livello di interferenza che può sopportare una rete di batteri che si scambiano molecole di AHL.

2.2 Apparato sperimentale

Come dati sperimentali di riferimento si considerano quelli ottenuti in [5].

Dal batterio *Aliivibrio fischeri* si isola il gene *luxI* che produce il segnale AHL e lo si ingegnerizza nel plasmide del ceppo mittente *Escherichia coli* (*NEB5 – alpha*). Il ceppo mittente produce inoltre

il gene recettore *LuxR* che, in risposta al QS, attiva l'espressione della proteina reporter verde *GFP* (Green Fluorescent Protein).

Il ceppo ricevente è sempre un *E. coli* con un plasmide analogo al precedente, ma differisce per due ragioni: anzitutto non è presente il gene *luxI* che produce AHL, inoltre si sostituisce *mCherry* (rosso) al posto di *GFP* (verde), in modo che il ceppo ricevente esprima la proteina fluorescente *mCherry* in risposta dell'attivazione del segnale QS (Figura 2.2) [5].

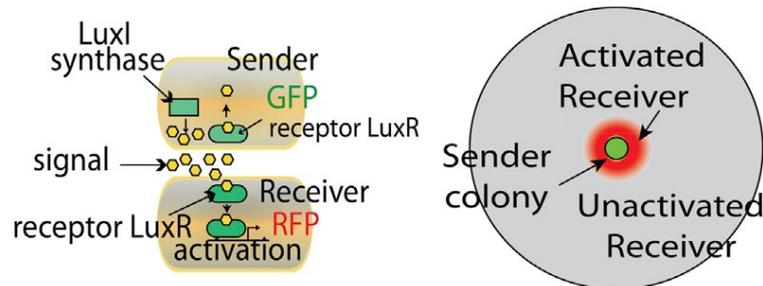


Figura 2.2: La rete di segnalazione è composta da un ceppo mittente che produce segnale AHL (l'attivazione è segnalata dalla *GFP* verde) e un ceppo ricevente contenente il reporter fluorescente rosso (*mCherry*) regolato da AHL. Nella preparazione del vetrino, i ricevitori sono distribuiti uniformemente e una colonia di batteri mittenti viene aggiunta al centro del piatto [5].

Il ceppo interferitore è un *E. coli* che ospita un terzo plasmide simile ai precedenti, ma contenente l'enzima lattonasi AiiA. Tale enzima è stato originariamente isolato dal *Bacillus thuringiensis* ed è il responsabile della degradazione dell'AHL: questo ceppo, dunque, non produce AHL, ma lo riceve e come risposta al QS aumenta la produzione di AiiA e attiva la degradazione [5]. A differenza dei due casi precedenti, inoltre, a questa risposta non è stata associata l'espressione di un gene fluorescente.

Dopo che si sono coltivati i ceppi batterici fino a una tarda fase di latenza, $10 \mu\text{L}$ del ceppo ricevente sono stati mescolati uniformemente con diverse quantità di ceppo interferitore e disposti su un vetrino di diametro 24 cm . Trascorsi 10 minuti, si è iniettato $1 \mu\text{L}$ del ceppo mittente al centro del piatto (Figura 2.3) [5].

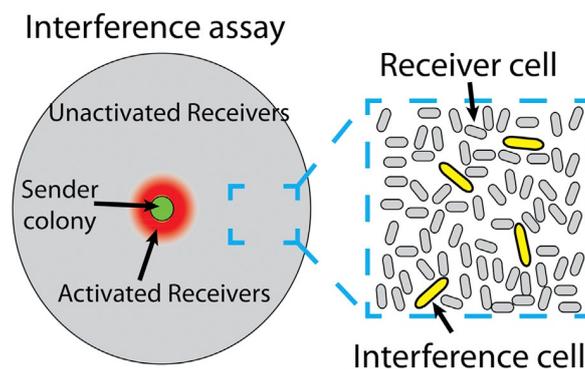


Figura 2.3: Introduzione dei batteri interferitori nel set up del piatto [5].

Il vetrino è stato fotografato con un microscopio a fluorescenza per studiare l'evoluzione del sistema.

Dopo che si aggiunge il ceppo mittente al centro del piatto, esso emette il segnale AHL che si diffonde sul terreno di coltura del ceppo ricevente per attivare l'espressione del gene ricevente e con esso la *mCherry*. Come si vede nell'immagine (Figura 2.4) le cellule riceventi più vicine a quelle mittenti si attivano per prime e con il tempo la regione di attivazione cresce.

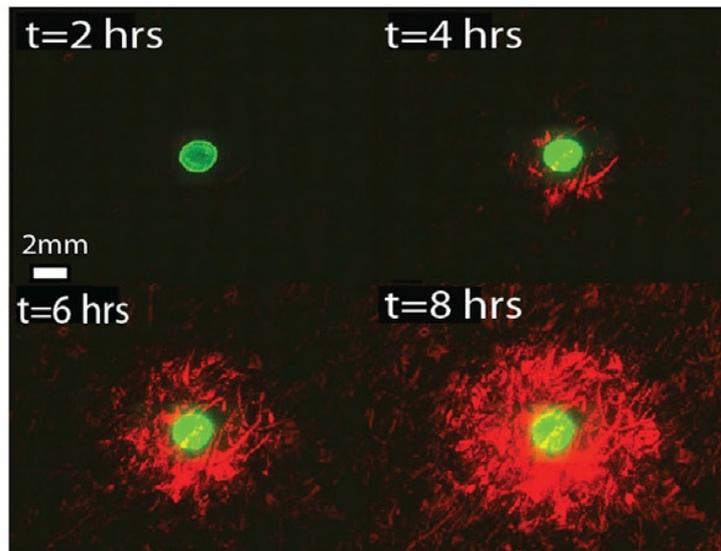


Figura 2.4: Time-lapse: immagini del microscopio a fluorescenza in cui si nota l'attivazione delle cellule riceventi (in rosso) quando AHL si diffonde verso l'esterno dalla colonia di mittenti. La fluorescenza verde indica la posizione del ceppo mittente [5].

2.3 Dati sperimentali

Per prima cosa si sono fatte delle misure senza il ceppo interferitore per avere un'idea del tempo di attivazione dei batteri riceventi in funzione della distanza dalla colonia di mittenti. I punti si possono interpolare con un andamento esponenziale, come si osserva nella (Figura 2.5).

In seguito si è aggiunto un ceppo analogo a quello interferitore, ma inerte, ovvero che non produce AiiA. In questo modo si è verificato che l'introduzione del ceppo interferitore non disturbasse la propagazione del segnale di per sé, ma che la correlazione con la ridotta diffusione dell'AHL fosse dovuta al solo enzima AiiA (Figura 2.5). Questo mostra che la sola presenza dei batteri interferitori non modifica la ricezione del segnale da parte del ceppo ricevente.

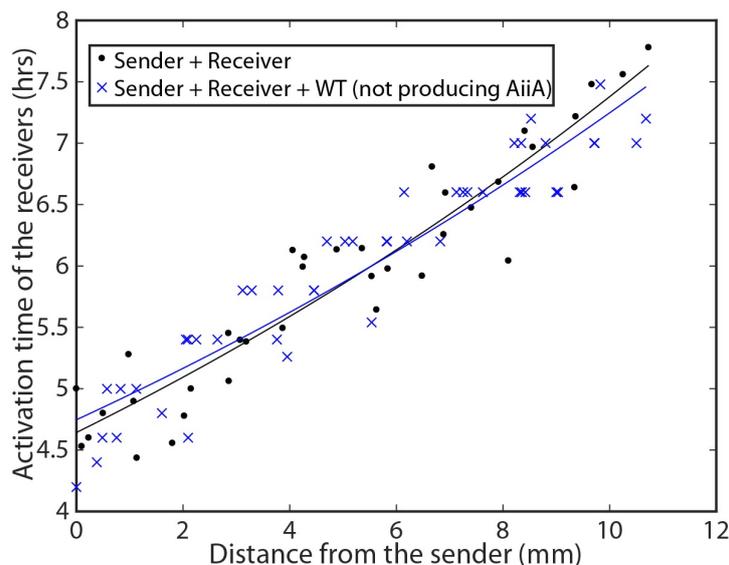


Figura 2.5: L'esperimento di controllo confronta le dinamiche di attivazione del ceppo mittente e del solo ricevitore (punti neri) o se abbinato con l'interferitore inerte (WT) che non produce gli enzimi AiiA (crocette blu) [5].

Infine sono state fatte misure dirette della robustezza del segnale all'introduzione di diverse quantità di ceppi interferitori che lo degradano.

Nel grafico in *Figura 2.6* è riportato il tempo di attivazione dei batteri riceventi rispetto alla distanza dal mittente a vari livelli di interferenza. Il numero di cellule di batteri interferenti nel dosaggio è normalizzato al numero di cellule in $100 \mu L$ di cellule in coltura. Le curve mostrano le tendenze qualitative dei dati.

Gli esperimenti sono stati condotti per 16 ore, molto più a lungo del tempo necessario per osservare il raggio massimo di attivazione, ovvero la massima distanza che raggiunge il segnale in quantità sufficiente ad attivare il QS (e dunque l'espressione di *GFP* e *mCherry*) [5]. Il raggio di attivazione, infatti, è una funzione del tempo, ma non aumenta illimitatamente, perché si stabilizza a un valore finito dopo un certo intervallo temporale (variabile a seconda del tasso di interferenza) e non cresce ulteriormente (*Figura 2.6*).

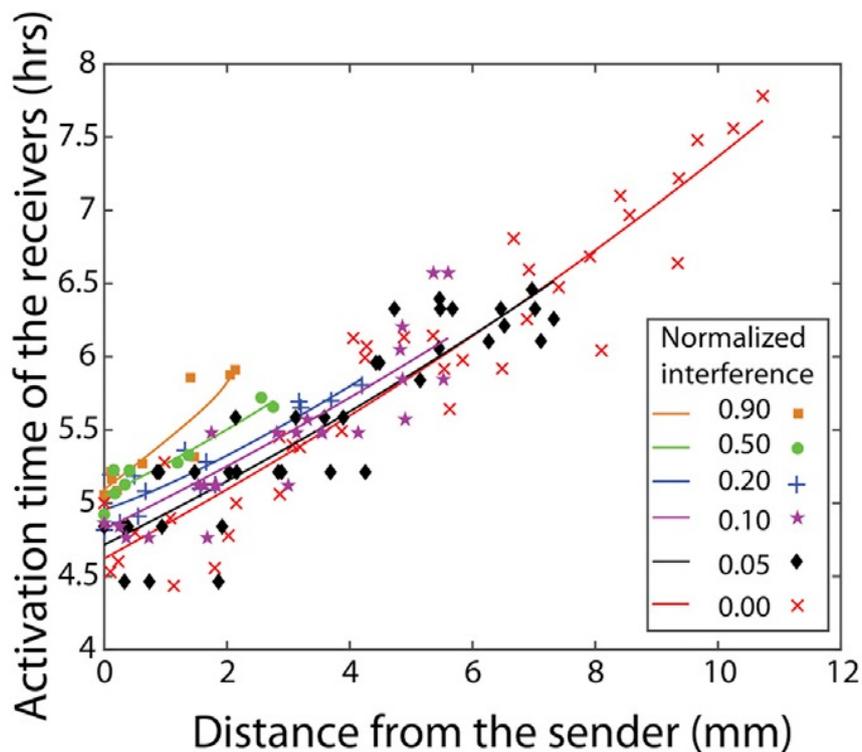


Figura 2.6: Tempo di attivazione dei batteri riceventi in funzione della distanza dai batteri mittenti, a diversi livelli di interferenza. Il valore in ascissa del punto in cui si interrompono le curve interpolanti i dati rappresenta il raggio massimo di attivazione [5].

Capitolo 3

Modello teorico di reazione-diffusione

Per riprodurre i dati sperimentali, l'andamento della crescita delle popolazioni batteriche e la dinamica della concentrazione di AHL e di AiiA sono stati modellizzati con equazioni differenziali secondo il modello di reazione-diffusione proposto in [5].

3.1 Equazioni e parametri utilizzati

La crescita delle tre popolazioni batteriche si può esprimere con l'equazione logistica di Verhulst 3.1, introdotta nei paragrafi precedenti:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \mu n \left(1 - \frac{n_{Total}}{s}\right) \quad (3.1)$$

dove μ , tasso costante di crescita, è un parametro ottenuto sperimentalmente, n è la densità cellulare, n_{Total} è la densità cellulare totale, quindi la somma delle densità dei ceppi mittenti, riceventi e interferitori e s è la massima densità cellulare sostenibile dal sistema [5].

La soluzione di tale equazione è (Figura 3.1):

$$n_{Total}(t) = \frac{s}{1 + qe^{-\mu t}} \quad (3.2)$$

con $q = \frac{s-n_0}{n_0}$ $n_0 = n(t=0)$ Come da analisi sperimentale (Figura 2.5), la crescita di ciascuno dei tre ceppi, inoltre, non è influenzata dalla presenza degli altri due (ad eccezione del termine n_{Total}/s dell'equazione 3.1).

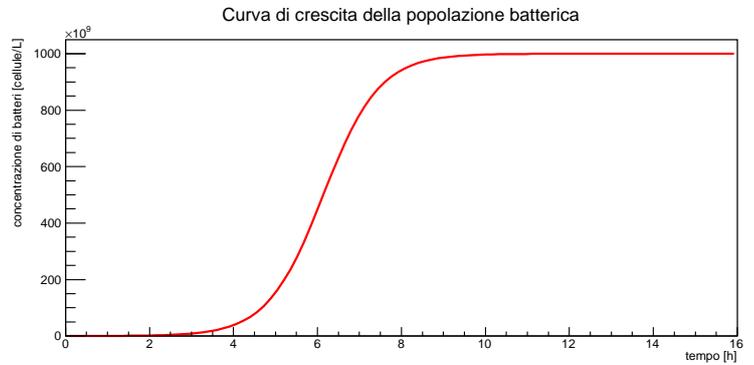


Figura 3.1: Curva di crescita della popolazione batterica utilizzata nell'esperimento. $\mu = 1.50 \text{ h}^{-1}$, $s = 10^{12} \text{ cell/L}$, $n_0 = 10^8 \text{ cell/L}$.

La dinamica della concentrazione di molecole segnale [AHL] è descritta dalla seguente equazione di diffusione 3.3:

$$\frac{\partial [AHL]}{\partial t} = D_{AHL} \nabla^2 [AHL] + n_{AHL} (\rho_{AHL} \frac{[AHL]^{m_1}}{[AHL]^{m_1} + \theta_1^{m_1}} + \rho_{b1}) - \gamma_1 [AHL] - \gamma_2 [AiiA] \frac{[AHL]^{m_2}}{[AHL]^{m_2} + \theta_2^{m_2}} \quad (3.3)$$

dove D_{AHL} è il coefficiente di diffusione del segnale, n_{AHL} la densità cellulare dei batteri mittenti, ρ_{AHL} il tasso di produzione massimo di AHL per cellula, ρ_{b1} il tasso di produzione basale di AHL, θ_i la concentrazione del segnale a metà dell'attività massima, γ il tasso basale di degradazione di AHL da parte del mezzo (γ_1) e dovuto alla presenza di AiiA (γ_2), [AiiA] la concentrazione di AiiA [5].

Infine l'andamento della concentrazione di AiiA in funzione del tempo è descritto dall'equazione 3.4:

$$\frac{\partial [AiiA]}{\partial t} = n_{AiiA} (\rho_{AiiA} \frac{[AHL]^{m_3}}{[AHL]^{m_3} + \theta_3^{m_3}} + \rho_{b2}) - \gamma_3 [AiiA] \quad (3.4)$$

dove n_{AiiA} la densità cellulare dei batteri interferitori, ρ_{AiiA} il tasso di produzione massimo di AiiA per cellula, ρ_{b2} il tasso di produzione basale di AiiA, γ_3 il tasso basale di degradazione di AiiA da parte del mezzo [5].

I valori dei parametri utilizzati nelle simulazioni sono riportati nella *Tabella 3.1* [5].

Parametro	Valore
μ	1.50 h^{-1}
s	10^{12} cell/L
D_{AHL}	$1.764 \text{ mm}^2 \text{ h}^{-1}$
ρ_{AHL}	$2.3 \cdot 10^{-9} \text{ nmol h}^{-1} \text{ per cell}$
ρ_{b1}	$2.3 \cdot 10^{-10} \text{ nmol h}^{-1} \text{ per cell}$
θ_1	70 nM
θ_2	70 nM
m_1	2.5
m_2	2.5
γ_1	0.005545 h^{-1}
γ_2	0.01 h^{-1}
ρ_{AiiA}	$2.3 \cdot 10^{-9} \text{ nmol h}^{-1} \text{ per cell}$
ρ_{b2}	$2.3 \cdot 10^{-10} \text{ nmol h}^{-1} \text{ per cell}$
γ_3	0.005545 h^{-1}
θ_3	70 nM
m_3	2.5

Tabella 3.1: Tabella con i valori dei parametri utilizzati nelle equazioni precedenti [5].

Un'altra variabile del problema in esame é il numero iniziale di batteri. Si è scelto di utilizzare $n_0 = 10^8 \text{ cell/L}$, in quanto valore più rappresentativo della quantità iniziale presente sul piatto, ma, come si nota nella *Figura 3.2*, la variazione del numero iniziale di cellule comporta una semplice traslazione nell'asse dei tempi e non un cambiamento nell'andamento generale della curva presa in analisi.

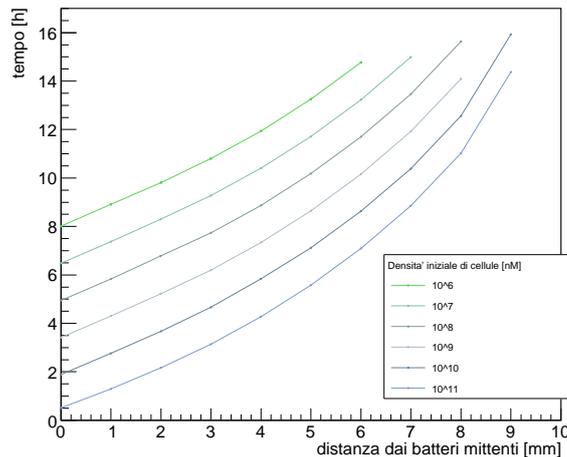


Figura 3.2: Traslazione nei tempi di attivazione del meccanismo QS al variare di n_0 .

Infine, per il computo dei valori di $[AHL]$ dall'equazione discretizzata con il metodo FTCS è necessario porre delle condizioni al contorno. Si sono valutate due possibilità: condizioni al contorno assorbenti, ovvero con il valore di $[AHL]$ posto identicamente nullo al bordo della griglia e condizioni al contorno riflettenti (derivata della funzione nulla al bordo). Nella *Figura 3.3*, analogo teorico dei dati in *Figura 2.6* in assenza di batteri interferitori, si nota come la differenza tra le due si veda solo per tempi $> 12h$: con condizioni riflettenti la curva piega verso il basso, fatto non verificato nei dati sperimentali. Per questa ragione si è deciso di adottare condizioni al contorno assorbenti.

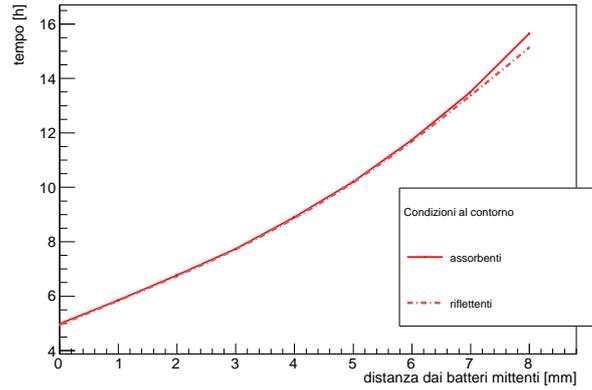


Figura 3.3: Differenza dei tempi di attivazione QS a seconda delle condizioni al contorno.

3.1.1 Equazione di Hill

Entrambe le equazioni 3.3 e 3.4 contengono una funzione di Hill (3.5), utile a descrivere le condizioni di equilibrio termodinamico del processo di associazione fra molecola segnale e recettore:

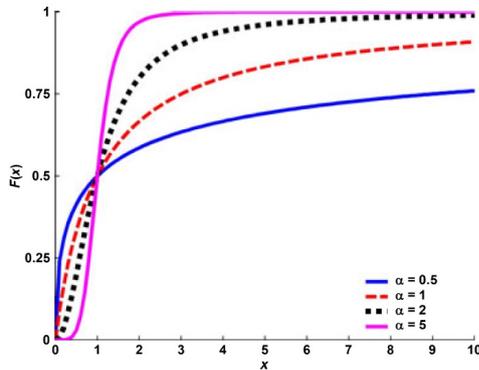


Figura 3.4: Andamento della funzione di Hill con diversi valori del parametro α [6]

$$y = y_{max} \frac{x^\alpha}{c^\alpha + x^\alpha} \quad (3.5)$$

i tre parametri sono y_{max} , ovvero il valore massimo che la funzione assume asintoticamente (nelle equazioni 3.3 e 3.4 ρ), c , il valore che assume x quando $y = y_{max}/2$ (θ_i) e l'esponente α (m_i), legato alla cooperatività del processo di associazione. A seconda dei valori che α assume y_{max} è raggiunto più o meno rapidamente (Figura 3.4). Nel caso in esame $\alpha = 2.5$, dunque il valore massimo è raggiunto per concentrazioni subito sopra la soglia c .

Nelle equazioni 3.3 e 3.4 le funzioni di Hill servono a rappresentare la quantità soglia di segnale necessaria ad attivare il meccanismo di Quorum Sensing fino al tasso di produzione massima ρ_{AHL} . Se $[AHL] \ll \theta_1$ la produzione di segnale è solo quella basale, invece se $[AHL] \gg \theta_1$ si instaura il meccanismo di feedback positivo del QS e si raggiunge il massimo della produzione ovvero ρ_{AHL} , di un ordine di grandezza maggiore del tasso di produzione basale. Lo stesso accade anche per la produzione di AiiA (soglia θ_3) e per la degradazione di AHL da parte di AiiA (soglia θ_2).

3.2 Risultati

Le simulazioni con il metodo a differenze finite FTCS per l'equazione di diffusione 3.3 e con il metodo di Eulero per le equazioni 3.1 e 3.4 hanno permesso di riprodurre qualitativamente i dati sperimentali. La Figura 3.5 è una rappresentazione della diffusione di AHL dopo 6 e 8 ore in assenza del ceppo interferitore.

Nella Figura 3.6 è rappresentata la concentrazione $[AHL]$ nel piatto a diversi istanti, sempre in assenza del ceppo interferente. La simulazione riproduce abbastanza bene l'immagine ottenuta con il microscopio ottico (Figura 2.4); ad esempio, dopo 8 ore, al microscopio ottico si vede un diametro di attivazione di circa 10 mm, nella simulazione di 9 mm. Nella Figura 3.7, invece, è presente anche il ceppo interferente (80% dei batteri totali). Si osserva che il ceppo interferente riesce a limitare il diametro di diffusione di AHL: sempre dopo 8 ore, ad esempio, lo fa diminuire da 9 mm a 5 mm, ovvero è ridotto del 44% rispetto alla situazione con solo batteri mittenti e riceventi.

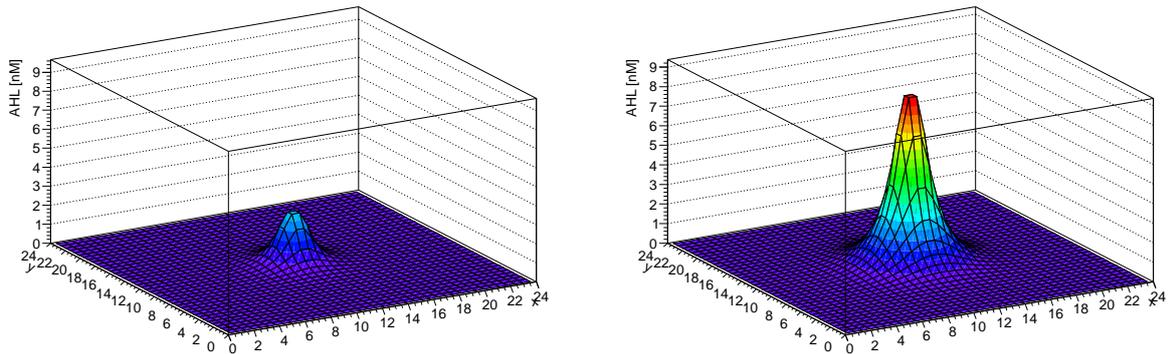


Figura 3.5: A sinistra concentrazione di AHL dopo 6h, a destra dopo 8h, in assenza del ceppo interferitore.

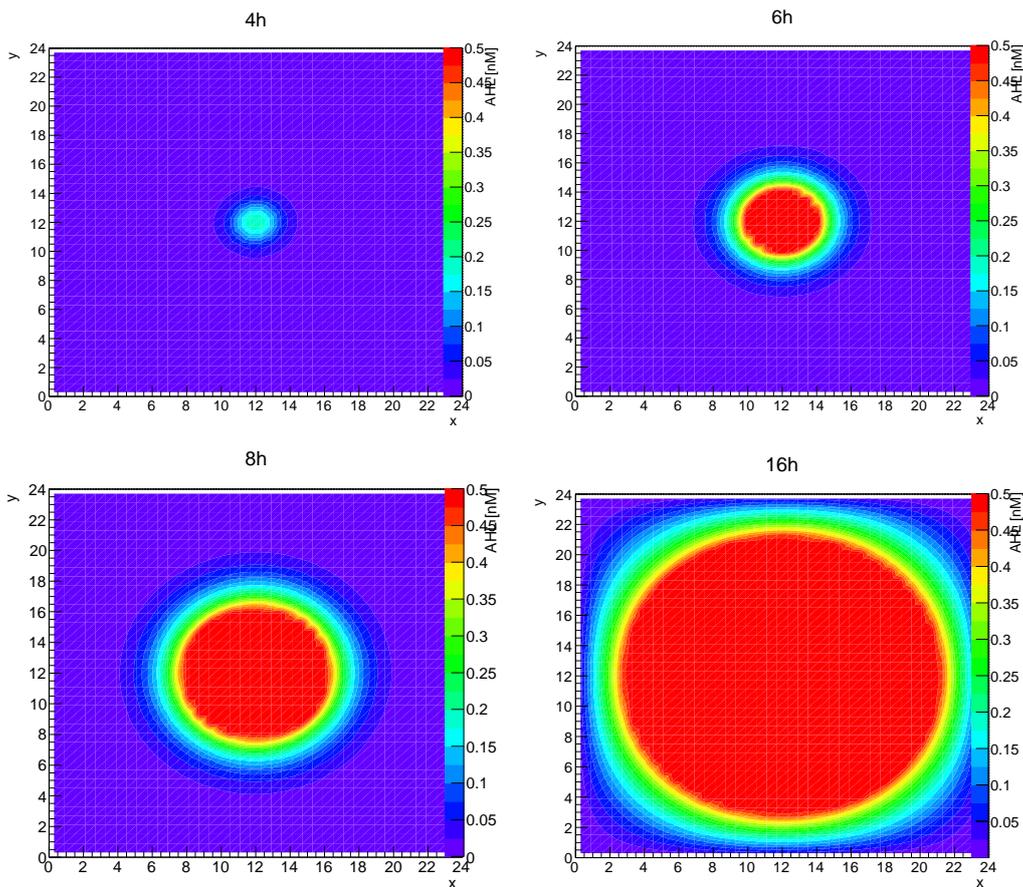


Figura 3.6: Time-lapse: concentrazione di AHL a diversi istanti in assenza di interferenza. La soglia per l'attivazione QS è stata posta $s_{[AHL]} = 0.5 \text{ nM}$. La zona colorata di rosso corrisponde a valori di $[AHL]$ che superano la soglia. Tale scelta è stata dettata dal confronto con la rilevazione del segnale in fluorescenza, tuttavia non è coerente con il valore di $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = 70 \text{ nM}$ utilizzato nel modello proposto da [5].

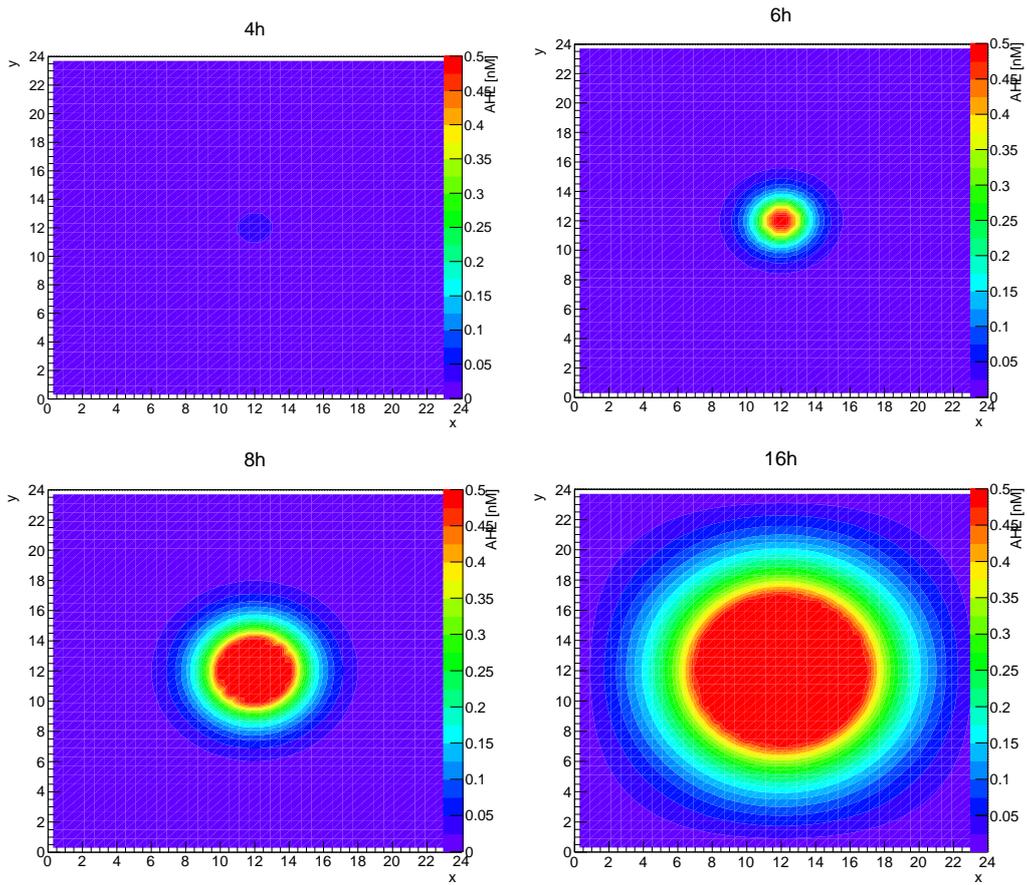


Figura 3.7: Time-lapse: concentrazione di AHL a diversi istanti con interferenza all'80% del totale. La soglia del quorum è $s_{[AHL]} = 0.5 \text{ nM}$. La zona colorata di rosso corrisponde a valori di $[AHL]$ che superano la soglia.

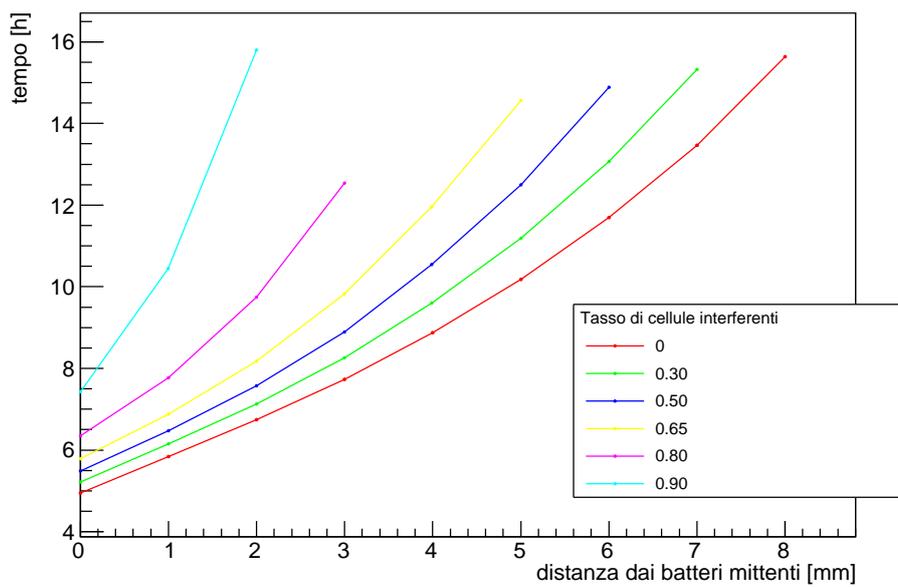


Figura 3.8: Attivazione dei batteri riceventi in funzione della distanza dai batteri mittenti, a diversi tassi di interferenza. Soglia del quorum $s_{[AHL]} = 0.5 \text{ nM}$.

Infine si sono replicati i dati della *Figura 2.6* nella *Figura 3.8*.

La corrispondenza di interferenza normalizzata x , utilizzata nell'esperimento, con il tasso di interferenza β , usato nella simulazione, è riportata nella tabella a lato. La formula che traduce il protocollo sperimentale [5] è $\beta = \frac{x \cdot 100}{x \cdot 100 + 11}$.

<i>Interferenza normalizzata x</i>	<i>Tasso di interferenza β</i>
0.9	0.9
0.5	0.8
0.2	0.65
0.1	0.5
0.05	0.3
0	0

Si nota che l'andamento qualitativo delle curve è lo stesso; inoltre sia i tempi iniziali di attivazione sia le distanze corrispondenti raggiunte coincidono. La simulazione però risulta molto più lenta a raggiungere il raggio massimo di attivazione rispetto ai dati sperimentali.

3.3 Modifica del coefficiente di diffusione e dei parametri θ ed m

Per riprodurre con maggiore accuratezza i dati sperimentali si è pensato di modificare i valori dei parametri delle equazioni 3.3 e 3.4 come riportato nella *Tabella 3.2*.

D_{AHL}	$\theta_{1,2,3}$	$m_{1,2,3}$
1.08 mm ² /h	5 nM	2

Tabella 3.2: Valori dei nuovi parametri proposti.

La modifica di D_{AHL} sostituisce il valore usato da [5], che utilizza il coefficiente di diffusione di AHL in acqua stimato da Stewart (2003), con quello dello stesso ordine di grandezza, ma inferiore, proposto da [7]. Esso risulta più adatto al caso in esame perché i batteri sul vetrino dell'apparato strumentale non sono in acqua, ma in un terreno di coltura semisolido più denso.

La scelta di abbassare $\theta_{1,2,3}$ di oltre il 90%, da 70 nM a 5 nM, invece, è dettata dalla necessità di avvicinare il valore di $\theta_{1,2,3}$ a quello della soglia usata per il quorum $s_{[AHL]} = 0.5$ nM. Il parametro m , infine, è stato anch'esso abbassato, ma del 25%. Queste ultime due modifiche consentono di velocizzare il raggiungimento del raggio massimo di attivazione.

I risultati sono mostrati nella *Figura 3.9*. I dati sperimentali della *Figura 2.6* sono descritti con più precisione: in particolare, in presenza del ceppo interferitore, il raggio massimo di attivazione è più vicino a quello sperimentale ed è raggiunto entro 8-9 ore.

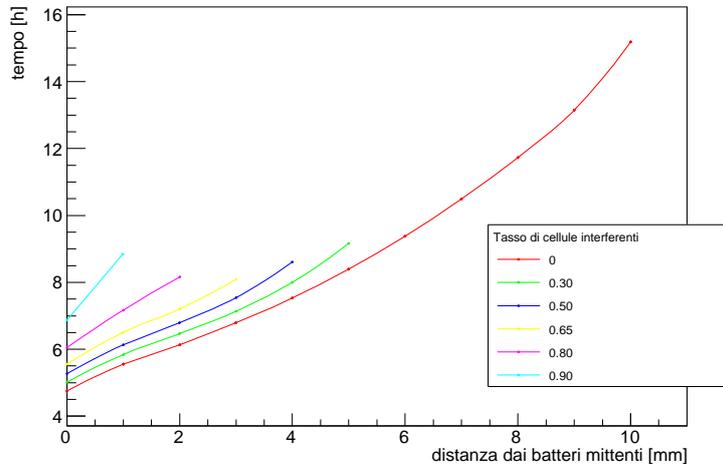


Figura 3.9: Attivazione dei batteri riceventi in funzione della distanza dai batteri mittenti a diversi tassi di interferenza ($s_{[AHL]} = 0.5$ nM, $D_{AHL} = 1.08$ mm²/h, $\theta = 5$ nM, $m = 2$). Il valore in ascissa del punto in cui si interrompono le curve rappresenta il raggio massimo di attivazione.

Conclusioni

Dall'analisi dei dati sperimentali risulta che la comunicazione batterica che sfrutta il meccanismo del Quorum Sensing tramite AHL ha una limitata zona di attivazione, se è presente anche un ceppo batterico interferitore. La grandezza di tale zona è modulabile cambiando il tasso di cellule interferenti.

In questo lavoro di tesi, con un modello reazione-diffusione, si è simulata la competizione fra la diffusione delle molecole segnale AHL e la loro degradazione ad opera dell'enzima AiiA, indotta dal ceppo disturbatore.

Il modello teorico testato risulta qualitativamente valido, ma, nonostante il notevole miglioramento ottenuto modificando i parametri utilizzati in [5], non riproduce quantitativamente i dati sperimentali.

Sarebbe dunque necessaria un'ulteriore analisi per ottenere predizioni più accurate, in modo da poter sfruttare il meccanismo del QS e la sua regolazione per applicazioni biomediche e industriali. In particolare la degradazione del segnale è uno strumento interessante al fine di limitare la comunicazione batterica, che è direttamente collegata alla patogenicità di numerose malattie, in quanto permetterebbe di evitare l'effetto della resistenza agli antibiotici.

Bibliografia

- [1] Kyle L. Asfahl, Martin Schuster. 2016. Social interactions in bacterial cell–cell signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 41, 92–107. doi: 10.1093/femsre/fuw038
- [2] Micha Peleg, Maria G. Corradini. 2011. Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us and What They Cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:10, 917-945. doi: 10.1080/10408398.2011.570463
- [3] Hense, B. A., Schuster, M. 2015. Core Principles of Bacterial Autoinducer Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 153-169. doi:10.1128/MMBR.00024-14
- [4] Marvin Whiteley, Stephen P. Diggle, E. Peter Greenberg. 2017. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551, 313–320. doi:10.1038/nature24624
- [5] Kalinga Pavan Silva, Prithiviraj Chellamuthu, James Q. Boedicker. 2017. Signal Destruction Tunes the Zone of Activation in Spatially Distributed Signaling Networks. *Biophysical Journal* 112, 1037–1044. doi: 10.1016/j.bpj.2017.01.010
- [6] Sylvain Goutelle, Michel Maurin, Florent Rougier, Xavier Barbaut, Laurent Bourguignon, Michel Ducher, Pascal Maire. 2008. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 22 633–648. doi: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x
- [7] Antonio Trovato, Flavio Seno, Marina Zanardo, Sara Alberghini, Alessandra Tondello, Andrea Squartini. 2014. Quorum vs. diffusion sensing: a quantitative analysis of the relevance of absorbing or reflecting boundaries. *FEMS Microbiol Lett* 352 (2014) 198–203. doi: 10.1111/1574-6968.12394