



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea  
SCIENZE BIOLOGICHE

---

ADATTAMENTO ED EVOLUZIONE DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN PAZIENTI  
CON FIBROSI CISTICA

PSEUDOMONAS AERUGINOSA ADAPTATION AND EVOLUTION IN PATIENTS WITH  
CYSTIC FIBROSIS

Tesi di Laurea di:  
di:



---

Docente Referente  
Chiar.mo Prof.



Sessione AUTUNNALE  
Anno Accademico 2020/2021



UNIVERSITÀ  
POLITECNICA  
DELLE MARCHE

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE BIOLOGICHE

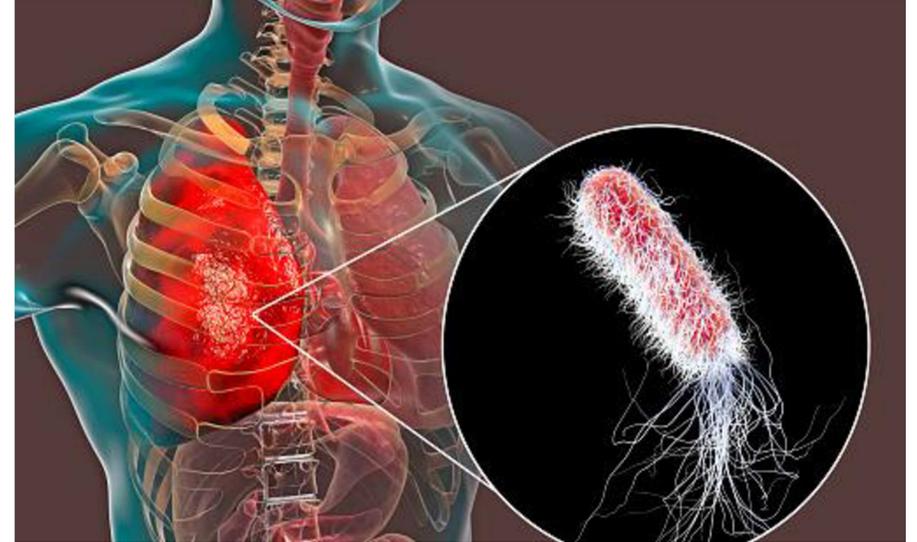
ADATTAMENTO ED EVOLUZIONE DI PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

PSEUDOMONAS AERUGINOSA ADAPTATION AND EVOLUTION  
IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

*Autori: Elio Rossi, Ruggero La Rosa, Jennifer A. Bartell, Rasmus L. Marvig, Janus A. J. Haagensen, Lea M. Sommer, Søren Molin e Helle Krogh Johansen.*

*Tesi di laurea di:* VICOLI PIERA  
*Docente referente:* PROF. SSA VIGNAROLI CARLA

Sessione Autunnale di Laurea Anno Accademico 2020/2021



- 
- 
- *Pseudomonas aeruginosa* è un batterio gram negativo e anaerobio facoltativo, capace di resistere ad alte dosi di antibiotici. È un patogeno opportunisto che causa infezioni in pazienti vulnerabili, come quelli affetti da fibrosi cistica.
  - La fibrosi cistica è una malattia genetica autosomica recessiva frequente tra le persone di etnia caucasica.
  - La risposta infiammatoria che è indotta dalla presenza del batterio nel paziente porta al rilascio di citochine da parte del sistema immunitario e al danneggiamento dei tessuti.

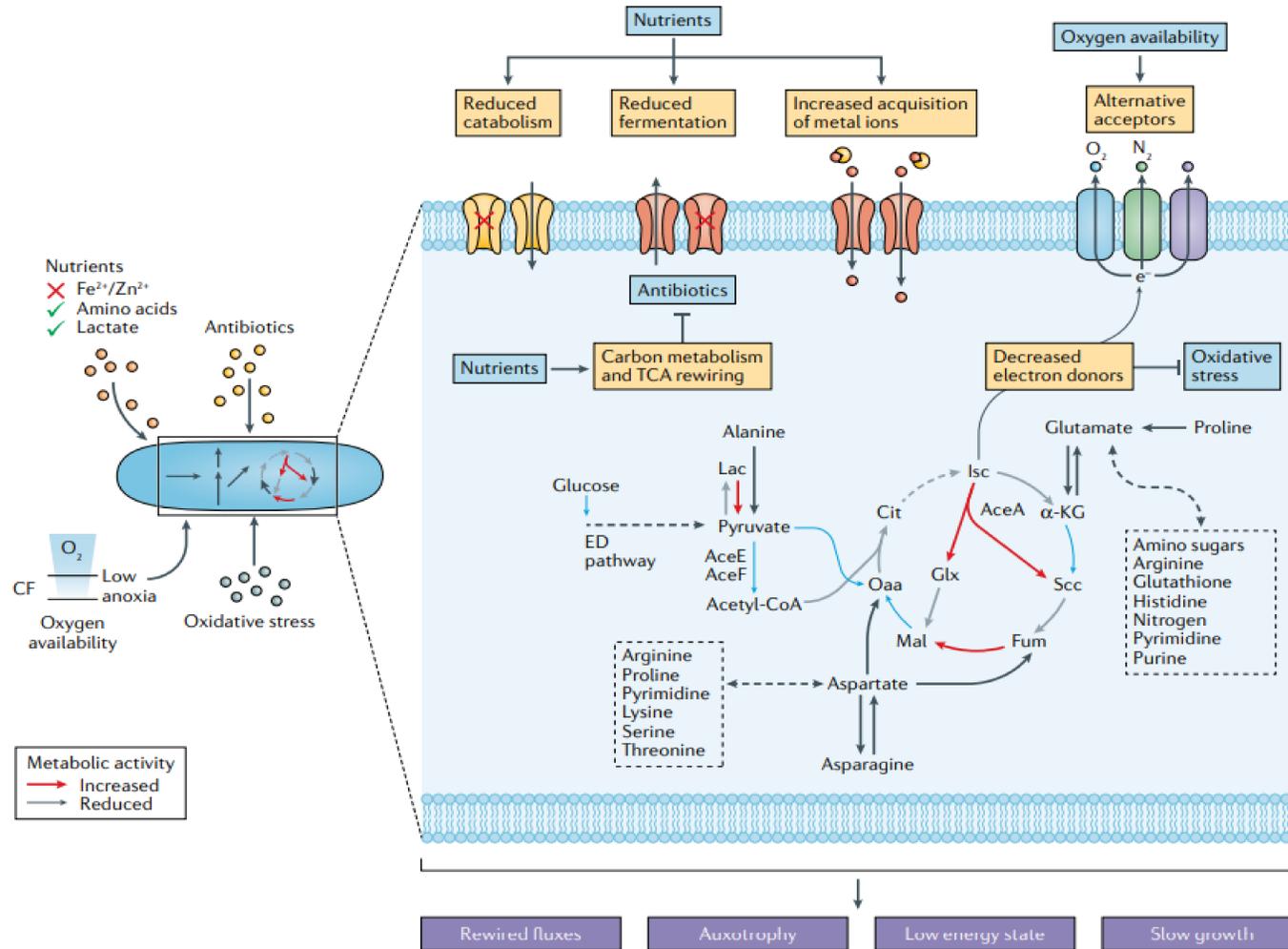
# GENOMICA

Durante le infezioni a lungo termine *P. aeruginosa* accumula:

- ❖ Mutazioni a livello dei geni che interferiscono con la sensibilità ad antibiotici;
- ❖ Mutazioni a livello dei geni *mutS* e *mutL*, coinvolti nella riparazione del DNA e appartenenti alla lista dei geni coinvolti nella patogenicità;
- ❖ Mutazioni puntiformi e piccole inserzioni o delezioni nei geni coinvolti nella resistenza agli antibiotici beta lattamici sono risultati molto importanti per l'adattamento e l'evoluzione del batterio durante l'infezione.

L'acquisizione o la perdita dei geni in relazione al trasferimento orizzontale di geni mobili e trasposoni può introdurre grandi cambiamenti a livello fenotipico.

# CONDIZIONI AMBIENTALI E METABOLISMO



Da articolo: PSUDOMONAS AERUGINOSA ADAPTION AND EVOLUTION IN PATIENT WITH CYSTIC FIBROSIS. Autori: Elio Rossi, Ruggero La Rosa, Jennifer A. Bartell, Rasmus L. Marvig, Janus A. J. Haagensen, Lea M. Sommer, Søren Molin e Helle Krogh Johansen.

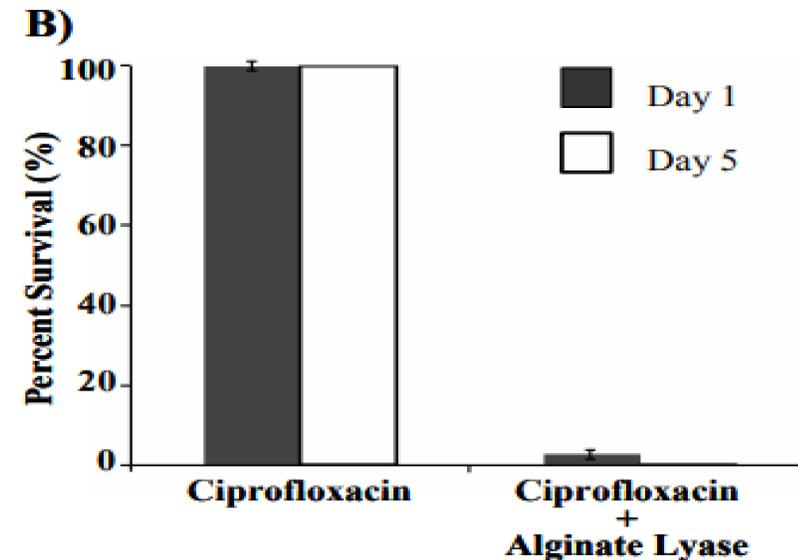
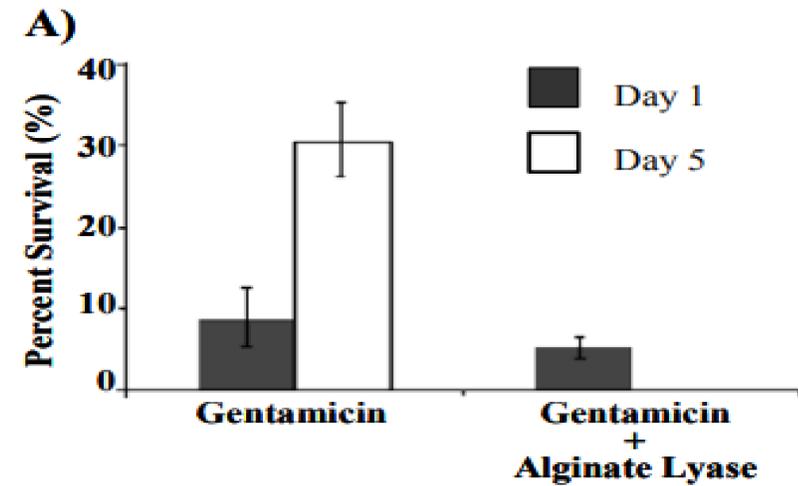
# BIOFILM

TRATTAMENTO CON GENTAMICINA DOPO 1 GIORNO: 9% sopravvissuti;

- GENTAMICINA+ALGINATO LIASI: 5% sopravvissuti.

TRATTAMENTO CON CIPROFLOXACINA DOPO 1 GIORNO: 100% sopravvissuti;

- CIPROFLOXACINA+ALGINATO LIASI: 3% sopravvissuti.



Da articolo: The Role of Alginate in *P. aeruginosa* PAO1 Biofilm Structural Resistance to Gentamicin and Ciprofloxacin. AUTORI: Laura A. Cotton, Rebecca J. Graham and Rose J. Lee

# ANTIBIOTICO RESISTENZA

I batteri colonizzatori delle vie aeree dei pazienti affetti da CF rispondono alla continua presenza di uno o più antibiotici e questo causa delle serie complicazioni nei trattamenti.

Fattori che contribuiscono all'antibiotico resistenza:

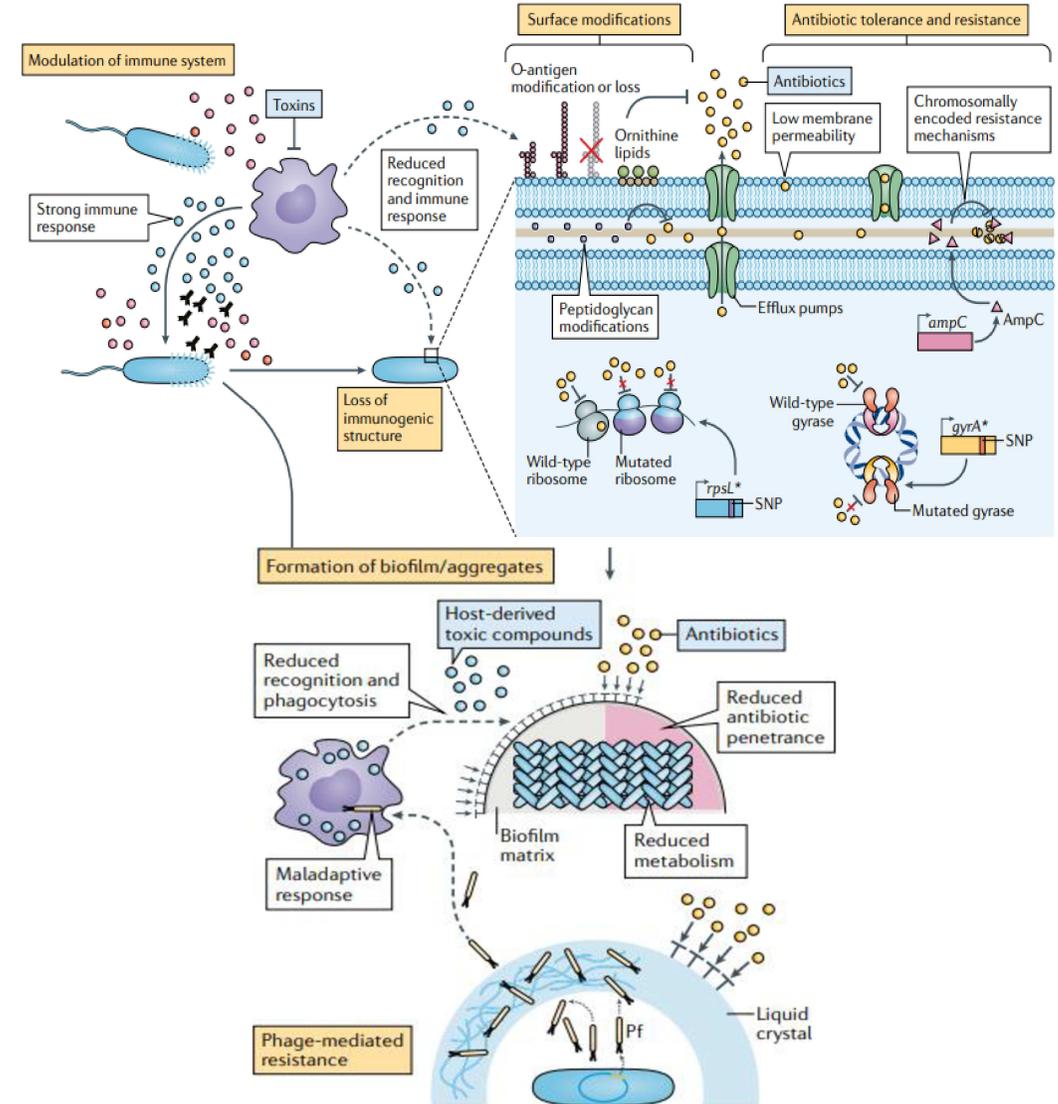
- Acquisizione elementi mobili;
- Mutazioni spontanee.

Il «resistoma mutazionale» di *P. aeruginosa* rappresenta l'insieme dei geni che, dopo mutazione, possono causare antibiotico-resistenza.

# MECCANISMO DI TOLLERANZA AGLI ANTIBIOTICI

Meccanismi per sopravvivere alla presenza di antibiotici e ai continui attacchi del sistema immunitario dell'ospite:

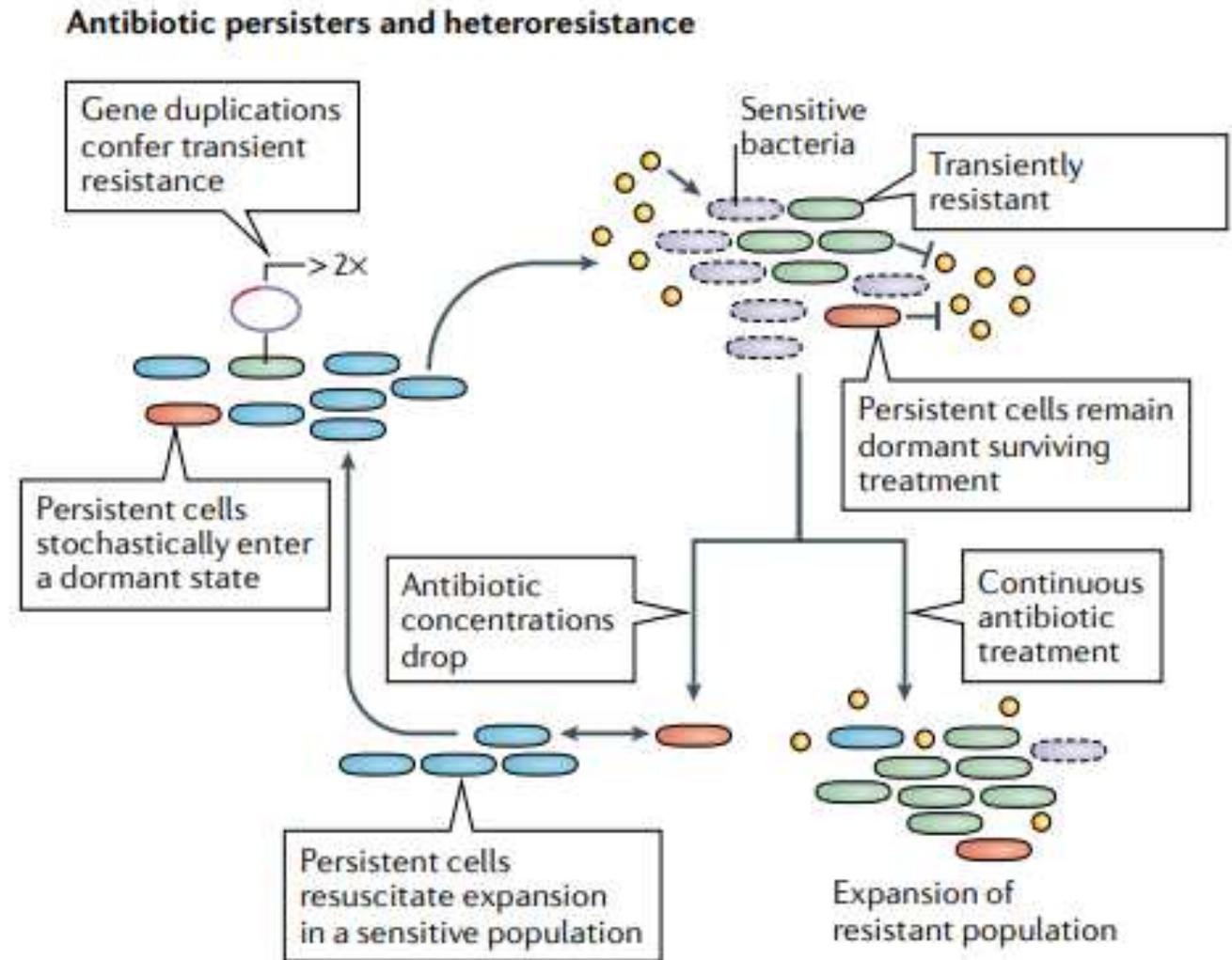
1. Rilascio tossine;
2. Perdita di strutture immunogeniche;
3. Produzione di lipidi diversi (contenenti ornitina) al posto dei fosfolipidi;
4. Formazione di biofilm;
5. Iperespressione della pompa di efflusso MexXY.



Da articolo: PSUDOMONAS AERUGINOSA ADAPTION AND EVOLUTION IN PATIENT WITH CYSTIC FIBROSIS. Autori: Elio Rossi, Ruggero La Rosa, Jennifer A. Bartell, Rasmus L. Marvig, Janus A. J. Haagensen, Lea M. Sommer, Søren Molin e Helle Krogh Johansen.

# POPOLAZIONI PERSISTENTI E ETERORESISTENZA

- I batteri persistenti sopravvivono al trattamento con antibiotici e sono in grado di riprendere la crescita quando le concentrazioni di antibiotico diminuiscono;
- Il fenotipo persistente non è associato a nessun cambiamento genetico specifico.
- Nella eteroresistenza, una sottopopolazione di cellule mostra un sostanziale incremento della resistenza che consente loro di replicarsi attivamente anche in presenza di antimicrobici.



Da articolo: PSUDOMONAS AERUGINOSA ADAPTION AND EVOLUTION IN PATIENT WITH CYSTIC FIBROSIS. Autori: Elio Rossi, Ruggero La Rosa, Jennifer A. Bartell, Rasmus L. Marvig, Janus A. J. Haagenen, Lea M. Sommer, Søren Molin e Helle Krogh Johansen.

## TOLLERANZA DEL SISTEMA IMMUNITARIO DELL'OSPITE

Diversi fattori di stress (stress ossidativo, fagocitosi, scarsità di nutrienti) correlati all'ospite, influenzano l'adattamento di *P. aeruginosa* nelle vie aeree dei pazienti affetti da CF.

Il sistema immunitario innato rilascia alti livelli di specie reattive di ossigeno e azoto al fine di danneggiare il DNA e le proteine batteriche.

Il batterio risponde a questo attacco con:

- enzimi che vanno ad eliminare i ROS e RNS;
- proteine che sono coinvolte nel mantenere il bilancio redox;
- modifiche della composizione lipidica attraverso l'espressione di geni *olsAB*;
- la perdita dell'antigene O;
- l'espressione di polisaccaridi PEL e PLS;
- rilascio di profagi filamentosi .



# CONCLUSIONE

- Le informazioni riguardanti l'adattamento di *P. aeruginosa* nelle vie aeree dei pazienti con CF sono importanti per la diagnostica e la terapia.
- L'identificazione dei geni patoadattativi, potrebbe permettere di trovare dei marcatori genetici che vanno a predire lo stabilirsi della potenziale infezione.
- L'aggregazione batterica e i cambiamenti nel metabolismo, così come la produzione di molecole segnale, che si riscontrano nei ceppi batterici isolati da pazienti con infezione a lungo termine, sono informazioni rilevanti in ambito clinico e utilizzate come metodi diagnostici per determinare le prime fasi dell'infezione.



**GRAZIE PER L' ATTENZIONE**

## RIASSUNTO

Le infezioni causate dal batterio *P. aeruginosa* nelle vie aeree di pazienti affetti da fibrosi cistica sono determinate da ceppi batterici sensibili agli antibiotici; tuttavia, in molti casi queste infezioni possono diventare croniche e portare alla morte dei pazienti. *P. aeruginosa* è un batterio gram negativo e anaerobio facoltativo, che ha una grande versatilità ecologica e resilienza ai cambiamenti ambientali. È un patogeno opportunisto e negli umani causa infezioni in soggetti vulnerabili, ad esempio pazienti affetti da fibrosi cistica, che è una malattia genetica autosomica recessiva. Questa malattia è causata da mutazioni nel gene CFTR, che codifica per una proteina che regola il movimento del cloro, al quale segue il movimento dell'acqua, dall'interno verso l'esterno delle cellule epiteliali delle ghiandole mucose. All'interno delle vie respiratorie dei pazienti affetti da CF *P. aeruginosa* crea una nicchia e la risposta infiammatoria che è indotta dalla presenza del batterio porta al rilascio di citochine da parte del sistema immunitario dell'ospite e al danneggiamento dei tessuti.

Durante le infezioni a lungo termine in *P. aeruginosa* si accumulano mutazioni a livello dei geni coinvolti nella formazione del biofilm, nella diminuzione della sensibilità agli antibiotici, si osserva riduzione nella produzione di fattori di virulenza e differenti sistemi di regolazione. Il batterio isolato da pazienti affetti da CF con infezione cronica mostra frequentemente un fenotipo ipermutato, che in molti casi può essere spiegato da mutazioni che si riscontrano a livello dei geni *mutS* e *mutL*, che sono coinvolti nella riparazione del DNA.

Il batterio nelle vie aeree dei pazienti affetti da CF è sottoposto a pressioni selettive, come attacchi da parte del sistema immunitario dell'ospite, azione degli antibiotici, bassa concentrazione di ossigeno, diminuzione di importanti nutrienti (zinco e ferro) e attacco da parte dei radicali dell'ossigeno. Nonostante ciò, il batterio riesce a sostenere la colonizzazione nello spesso strato di muco grazie al suo metabolismo versatile. Per la produzione di energia, il batterio è capace di utilizzare ossigeno, azoto e altri composti come il tiosolfato come accettori terminali di elettroni. Inoltre, può anche ottenere energia dalla fermentazione di piruvato e arginina. Il complesso della piruvato deidrogenasi, che collega il metabolismo del glucosio con il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA), è soggetto ad un'alta pressione selettiva negativa e i geni *aceE* e *aceF* che codificando per il complesso PDH, risultano essere mutati. Mutazioni in questi geni vengono considerate patoadattative, correlate alla patogenicità di *P.aeruginosa*.

Nell'ambiente polmonare *P. aeruginosa* si accresce formando piccoli aggregati simili a biofilm. È stato documentato che questo stile di vita induce tolleranza a vari fattori di stress, tra cui antibiotici. Particolarmente importante nel biofilm è il ruolo dell'alginato, che contribuisce alla resistenza antibiotica.

I batteri colonizzatori delle vie aeree dei pazienti affetti da CF rispondono alla continua presenza di uno o più antibiotici e questo causa delle serie complicazioni nelle terapie. Fattori differenti contribuiscono all'antibiotico resistenza. L'acquisizione di elementi mobili è rilevante, ma le mutazioni spontanee sono la causa principale dello sviluppo della resistenza agli antibiotici nelle infezioni croniche da *P. aeruginosa*.

*P. Aeruginosa* ha diversi meccanismi intrinseci e acquisiti per sopravvivere alla continua presenza di antibiotici e ai continui attacchi del sistema immunitario dell'ospite. La bassa permeabilità della membrana e la presenza conservata della beta-lattamasi AmpC, così come le pompe di efflusso, contribuiscono all'intrinseca bassa sensibilità dei ceppi batterici verso diverse classi di antibiotici. Il batterio può inibire ed evadere il sistema immunitario attraverso il rilascio di tossine, la perdita di strutture immunogeniche, tra cui flagelli e pili, modifiche della struttura dell'antigene, produzione di lipidi contenenti ornitina al posto dei fosfolipidi, produzione di polisaccaridi extracellulari e passaggio ad un sistema di vita aggregato simile ai biofilm. La struttura del biofilm limita la diffusione di grandi molecole e ostacola l'efficacia dei biocidi. Rilascio attivo di fagi filamentosi codificati nel genoma di *P. aeruginosa* influenzano direttamente la risposta immunitaria dell'ospite innescando la produzione dell'interferone di tipo I, che inibisce la secrezione di TNF e la fagocitosi batterica.

Le popolazioni batteriche persistenti sopravvivono al trattamento con antibiotici e sono in grado di riprendere la crescita quando le concentrazioni di antibiotico diminuiscono. La comparsa delle varianti persistenti nelle popolazioni di *P. aeruginosa* che infettano i pazienti con CF è una delle cause che rende l'eradicazione di questi batteri molto difficile.

Il sistema immunitario innato dell'ospite durante l'infezione rilascia alti livelli di specie reattive di ossigeno e azoto al fine di danneggiare il DNA e le proteine batteriche. Il batterio risponde esprimendo enzimi che vanno ad eliminare i ROS e RNS, proteine che sono coinvolte nel mantenere il bilancio redox, enzimi coinvolti nella riparazione della proteina periplasmatica-ossidata e attivando la proteina LEX A che induce una risposta SOS.

Le informazioni riguardanti l'adattamento di *P. aeruginosa* nelle vie aeree dei pazienti con CF sono importanti per la diagnostica e la terapia. L'identificazione dei geni patoadattativi, potrebbe permettere di trovare dei marcatori genetici che vanno a predire lo stabilirsi della potenziale infezione.

# BIBLIOGRAFIA

---

- Pseudomonas aeruginosa adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. AUTORI: Elio Rossi, Ruggero La Rosa, Jennifer A. Bartell, Rasmus L. Marvig, Janus A. J. Haagenen, Lea M. Sommer, Søren Molin and Helle Krogh Johansen.
- <https://www.humanitas.it/malattie/fibrosi-cistica>
- The Role of Alginate in P. aeruginosa PAO1 Biofilm Structural Resistance to Gentamicin and Ciprofloxacin. AUTORI: Laura A. Cotton, Rebecca J. Graham and Rose J. Lee. Department of Microbiology & Immunology, UBC.

## IMMAGINI SLIDE INIZIALE:

<https://www.alamy.it/polmonite-causata-da-batteri-pseudomonas-aeruginosa-illustrazione-del-computer-p-aeruginosa-e-un-batterio-gram-negativo-che-provoca-piu-resistenti-agli-antibiotici-nosocomiali-ospedaliere-infezioni-di-diversa-ubicazione-inclusi-polmonite-osteomielite-peritonite-ed-infezioni-di-ferite-image223398663.html> ;

<https://smhs.gwu.edu/news/smhs-faculty-members-awarded-medical-research-grants>