



da inviare via mail a bandopondottorati@uniroma2.it entro il 25/09/2021

Richiesta per borsa di studio da attivare ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

Il sottoscritto **Dott. Michelangelo Campanella** (ricercatore) afferente al Dipartimento di Biologia Interno 4227, email michelangelo.campanella@uniroma2.it

CHIEDE

In collaborazione con il **Professor Robert Nistico** (professore ordinario, Dipartimento di Biologia)

l'attivazione di una borsa di studio di dottorato ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021. A tal fine comunica quanto segue:

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo: **Biologia Molecolare e Cellulare**

Area per la quale si presenta la richiesta:

X **Green**

Tipologia di cofinanziamento (pari ad euro 8000 una tantum):

X Fondi di ricerca Corso di Laurea in Farmacia (Responsabile Prof. Robert Nistico).

NisticoR.Pharmacy2020

Descrizione del Progetto:

Il ruolo dei mitocondri nell' ecologia: i Tetrapirroli come pesticidi biologici

L'obiettivo del nostro progetto è comprendere la biologia dei Tetrapirroli per esplorarne il potenziale come pesticidi. I Tetrapirroli sono una classe di composti naturali che si legano alla proteina mitocondriale TSPO. Quest'ultima, è una proteina "antica" altamente conservata in animali e piante. L'omologia della stessa si mantiene pressoché intatta tra vertebrati ed invertebrati, mentre varia in piante rendendo la stessa un potenziale bersaglio di cui avvelarsi per disegnare prodotti agricoli a protezione delle colture. La nostra ipotesi è che i Tetrapirroli, prodotti dalle piante e nelle quali hanno effetti detossificanti, regolino la funzione di TSPO ed i processi biologici da essa dipendenti nei parassiti rappresentando un agente con capacità pesticida (**Figura 1**).

Tale progetto permetterà la formazione di un dottorando nelle più avanzate tecniche sperimentali al quale consentirà anche una formazione tra mondo accademico ed industriale grazie al supporto di un'azienda all'avanguardia nello studio delle metodiche per la salvaguardia delle piante: **Enerzyme SRL**.

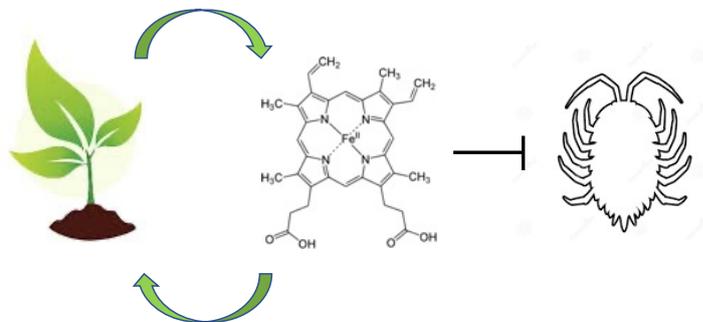


Figure 1. Schema dell'ipotesi alla base del progetto: i Tetrapirroli possono agire come agenti pesticidi rafforzando la capacità adattiva delle piante attraverso attivazione di TSPO endogeno e sempre attraverso lo stesso meccanismo mitocondriale modificare la biologia dei parassiti.

Background

Il controllo degli insetti nocivi si basa principalmente sull'impiego di pesticidi sintetici¹. Tuttavia, a causa della sempre maggiore resistenza all'azione degli agenti chimici a disposizione, e dell'impatto negativo che gli xenobiotici hanno su esseri umani ed ambiente, vi è urgente bisogno di cercare alternative più sicure ed ecologiche.

Molti composti botanici bioattivi hanno ricevuto particolare attenzione come potenziali pesticidi mostrando efficacia e profili di sicurezza favorevoli sull'uomo e sull'ambiente². Nonostante le premesse i pesticidi botanici e così la loro applicazione nei sistemi alimentari rimangono limitate a causa della loro elevata volatilità (i), scarsa solubilità in acqua (ii) e suscettibilità alla degradazione (iii). Inoltre, il loro effettivo meccanismo d'azione rimane tutt'ora sconosciuto. Tra questi si ipotizza che vi sia l'inibizione/o alterazione di importanti neurotrasmettitori come l'acetilcolina esterasi (AChE) (i), l'octopamina (ii) e l'acido γ -aminobutirrico (GABA) (iii) indicando il targeting di neurotrasmettitori degli insetti una possibile strategia per azioni tossiche altamente selettive.

In questo progetto proponiamo di studiare e modellare l'agente botanico Tetrapirrolo³ nella sua capacità regolatoria della proteina mitocondriale TSPO⁴. Dalla sua scoperta nel 1977 come bersaglio periferico delle benzodiazepine TSPO è ormai acclarato cardine in diverse funzioni essenziali alla fisiologia e patologia di vertebrati ed invertebrati⁵. TSPO è una proteina di risposta allo stress che viene sovra espressa a seguito dall'alterata omeostasi cellulare. Di notevole interesse è stato comprendere negli



ultimi anni la fisiologia di TSPO, attraverso la sintesi del pregnenolone, regoli il recettore GABA e quindi le attività di neurotrasmissione ad esso legate⁶.

Gli studi che hanno permesso di comprendere il ruolo di TSPO sono stati eseguiti utilizzando ligandi sintetici della proteina stessa, lasciando pertanto inesplorate sostanze chimiche naturali come i Tetrapirroli. Recentemente è emerso il ruolo di quest'ultimi come ligandi endogeni di TSPO con un'interessante differenza tra il regno animale e quello vegetale. Nel primo l'interazione TSPO-Tetrapirrolo coinvolge lo sviluppo embrionale, il metabolismo, la morte cellulare programmata, le lesioni e persino l'estensione della durata della vita.

In botanica il legame dei Tetrapirroli con TSPO facilita invece la disintossicazione e la resistenza alle condizioni avverse. Ciò è particolarmente rilevante poiché' finalizzato alla gestione di stress, tra cui la tolleranza al sale e/o alle specie reattive dell'ossigeno avendo quindi una funzione prettamente protettiva.

La nostra ipotesi sperimentale è che i Tetrapirroli possano agire come inibitori naturali e selettivi di TSPO in seguito ad esposizione a parassiti aggressivi, rappresentando quindi uno strumento per proteggere le piante, salvaguardandole da agenti nocivi e mantenendo l'ambiente circostante intatto.

Per dimostrare la nostra ipotesi abbiamo progettato tre principali obiettivi sperimentali:

- I. Caratterizzare il ruolo dei Tetrapirroli sulle funzioni mediate da TSPO apprendendo natura dell'interazione ed efficacia con i ligandi sintetici di TSPO.**
- II. Indagare se i Tetrapirroli influenzano la segnalazione GABA attraverso il precursore dei neurosteroidi pregnenolone la cui disponibilità dipende dall'omeostasi di TSPO.**
- III. Ottenere la relazione dose-risposta per testare i Tetrapirroli più efficienti in piante ingegnerizzate sovraesprimenti TSPO.**

Il lavoro, della durata di tre anni, genererà una prova di concetto necessaria per sviluppare un composto naturale che diventi utile ad un'agricoltura più ecologica.

Obiettivi formativi

Lo studente riceverà una preparazione tecnica e culturale nelle principali metodiche di biologia sperimentale oltre che apprendere un nuovo modo di fare ricerca che coinvolge accademia ed industria. La formazione vedrà uno sviluppo della coscienza ecologica e la ricerca di risultati fruibili a diversi livelli.

Ambiente accademico

I laboratori dei Proff Campanella e Nistico' offriranno allo studente un ambiente ideale per crescere tecnicamente e intellettualmente attraverso l'apprendimento di metodiche all'avanguardia della scienza sperimentale. Lo studente riceverà il supporto dei gruppi di scienziati esperti che forniranno il supporto quotidiano. Il Prof. Campanella sarà il principale responsabile del lavoro sperimentale e quindi della gestione dell'intero progetto garantendo il rispetto delle tempistiche e il raggiungimento degli obiettivi, soprattutto che la formazione sia completata in tempo. Inoltre, l'ambiente internazionale del laboratorio ospitante renderà il percorso dinamico e votato alla divulgazione del sapere.

Il Dipartimento di Biologia è l'ambiente ideale per lo sviluppo culturale e tecnico di uno studente di Dottorato ed il corso di Biologia Molecolare e Cellulare ne è diretta espressione. Diversi sono i talenti



che stanno svolgendo il training al suo interno sfruttando l'ambiente votato al rigore e confronto scientifico.

Ambiente non accademico

Enerzyme S.R.L. nasce dalla necessità di applicare la tecnologia sviluppata presso il Dipartimento di Biotecnologie dell'Università degli Studi di Verona. Leader nel campo dell'espressione di proteine ricombinanti nelle piante, l'azienda ha sviluppato e brevettato metodiche per apprendere la biologia degli organismi viventi ma soprattutto per favorire lo sviluppo di agenti utili per numerose applicazioni biotecnologiche. Lo studente verrà accompagnato nel suo percorso da personale qualificato in possesso del titolo di PhD e quindi consapevole delle necessità di uno studente in training.

Attività previste:

Obiettivo I. 12-15 mesi

Caratterizzare il ruolo dei Tetrapirroli sulle funzioni mediate da TSPO apprendendo la natura dell'interazione e confrontando la loro efficacia con quella dei ligandi sintetici di TSPO utilizzati di routine. Questa prima fase vedrà la raccolta del materiale e lo svolgimento dei saggi essenziali per quantificare e qualificare la natura dell'interazione tra Tetrapirroli e TSPO. L'impatto sulla funzione cellulare in base alla proteina sarà studiato e convalidato attraverso saggi di biochimica e biologia cellulare.

L'espressione di TSPO sarà modificata per corroborare l'esito sulla vitalità cellulare e contiamo di costruire modelli SAR utilizzando sorgenti digitali.

Obiettivo II. 6-8 mesi

Studiare se i Tetrapirroli influenzano la segnalazione GABA sfruttando il precursore dei neurosteroidi pregnenolone la cui disponibilità dipende dalla funzionalità di TSPO e la sua capacità di muovere colesterolo dal citosol al mitocondrio.

Verranno adottate tecniche di patch clamp per valutare la capacità di apertura dei recettori GABA esposti a Tetrapirroli. L'analisi sarà eseguita in presenza e assenza di TSPO per distinguere gli effetti diretti e indiretti. I metaboliti a valle del processo saranno anche misurati tramite kit ELISA.

Questa parte del lavoro sarà strumentale per comprendere gli effetti mediati dai Tetrapirroli e informare sulla loro funzione come pesticida.

Obiettivo III. 10-11 mesi includendo un periodo minimo di 6 per il placement presso Enerzyme.

I Tetrapirroli più efficienti, e nelle dosi più efficienti, verranno testati in piante ingegnerizzate sovraesprimenti TSPO. Nel dettaglio *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana glauca*. Alghe come la *Chlamydomonas reinhardtii* verranno utilizzate per confermare i dati. Sfruttando i dati ottenuti negli AIM I e II costruiremo curve dose-risposta in funzione dell'effetto specifico di TSPO. Dosi e tempi di trattamento saranno poi testati *in vivo* dopo il lavoro *in vitro* dei primi due obiettivi. Il lavoro *in vivo* avrà luogo presso il sito del partner non accademico dove lo studente imparerà come ingegnerizzare le piante e testarne i parametri fondamentali.

Infine i 3 mesi finali saranno dedicati alla scrittura e sottomissione della tesi.



Metodiche

Verranno impiegate linee derivate da esseri umani, insetti e piante in cui ci occuperemo della farmacologia e tossicologia dei Tetrapirroli e della loro interazione con TSPO. La microscopia confocale e il sistema di eccitazione multipla per l'imaging di cellule vive saranno adottati insieme alla microscopia elettronica a trasmissione (TEM). I protocolli standard di qRT-PCR, PCR, ChiP-seq, Western Blotting, ImmunoCytoChemistry (ICC), Co-Immunoprecipitation e Proximity Ligation Assays (PLA) completeranno il lavoro insieme ai protocolli in di crescita cellulare. Il lavoro sarà ulteriormente arricchito da studi sulla trascrittomica tramite tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS), tra cui metabolomica e proteo mica, trattasi della metodologia più avanzata per la modifica genetica dell'intero organismo che consente la convalida in vivo dei risultati.

Ogni esperimento prevederà almeno tre replicati biologici e tecnici. GraphPad Prism v7.0 sarà utilizzato per l'analisi statistica dei dati (Shapiro–Wilks, t-test o ANOVA).

Attinenza del progetto all'area indicata:

Il progetto proposto è naturalmente attinente all'area verde per la quale compete. Lo sviluppo di una metodica per ottenere la così detta *Green Death* di parassiti delle piante è un pilastro della transizione ecologica che lo Stato italiano si prefigge di raggiungere. Gli studi sviluppati offriranno al contempo informazione sulla fisiopatologia delle piante caratterizzando la biochimica molecolare di TSPO oltre che una serie di reagenti utili ad altre linee di ricerca del settore verde. Il progetto si colloca all'interno di un percorso necessario per una *Green Pharmacy* che appassioni gli studenti ed attragga finanziamenti.

Risultati attesi:

Questo studio chiarirà natura e tipo di interazione tra TSPO e i Tetrapirroli favorendo pertanto la comprensione di tale classe di ligandi naturali della proteina. Ciò permetterà di delineare l'importanza determinante per la funzione mitocondriale al fine di stimolare l'impiego di tale agente per colpire in maniera selettiva gli insetti nocivi al fine di proteggere le colture e salvaguardare l'approvvigionamento della catena alimentare.

Azienda pubblica o privata coinvolta nazionale o straniera in cui si prevede di far svolgere il periodo obbligatorio da 6 a 12 mesi previsto dal Decreto Ministeriale:

Lo studente svolgerà un periodo minimo di 6 mesi presso **Enerzyme S.R.L.** che è l'azienda privata indenticata come partner ideale per questo Progetto.

Referenze

- 1) doi: 10.1016/j.tree.2018.09.012
- 2) doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00303
- 3) doi: [10.3390/ijms17060880](https://doi.org/10.3390/ijms17060880)
- 4) doi: 10.1042/BJ20150899.
- 5) doi: [10.1038/cddis.2017.186](https://doi.org/10.1038/cddis.2017.186)
- 6) doi.org/10.1016/j.isci.2020.100889

Firma



TOR VERGATA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA

**Direzione II – Ricerca, Terza Missione, Procedure
Elettorali**

Divisione I – Ricerca Nazionale

Ripartizione III – Scuola di Dottorato