

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO

Proposta di assegnazione di una borsa di Dottorato

Titolo della ricerca: Studio dei meccanismi alla base dell'impatto dei corpi chetonici sull'obesità nel sistema modello *Caenorhabditis elegans*

Docente guida proposto: Prof Daniela Uccelletti

DESCRIZIONE DELLA RICERCA (max 2 pagine)

Obiettivi della ricerca

L'obesità può essere comunemente definita come un disturbo nell'omeostasi energetica che si sviluppa quando l'apporto energetico supera il dispendio energetico. È diventata una delle principali cause di una varietà di malattie croniche in tutto il mondo, tra cui diabete, malattie cardiovascolari e ipertensione. Pertanto, la ricerca sui meccanismi in grado di regolare l'omeostasi energetica potrebbe facilitare notevolmente la prevenzione e il trattamento dell'obesità. Questo progetto si propone di identificare i meccanismi molecolari e cellulari alla base del trattamento di molecole come il butirrato e suoi derivati nel sistema modello *Caenorhabditis elegans*, tramite approcci di genetica, lipidomica e metabolomica. *C. elegans* è un ottimo modello per esplorare la regolazione del metabolismo lipidico perché molti aspetti della sintesi dei grassi e dei percorsi di demolizione caratterizzati negli esseri umani sono conservati in questo semplice organismo. Nei mammiferi, ad esempio, diversi recettori ormonali nucleari (NHR) funzionano come sensori metabolici e regolatori principali del bilancio energetico. In *C. elegans*, la funzione di NHR-49 è simile a quella dei recettori attivati da proliferatori perossisomiali dei mammiferi (PPAR), regolando la β -ossidazione e l'espressione di geni che rispondono all'input della dieta. Ci si propone di effettuare l'analisi dell'espressione genica del metabolismo lipidico nei mutanti *nhr-9*, e in altri mutanti modello di obesità (ad es. *pept-1*, *tub-1*) trattati e non al fine di comprendere quali siano le ragioni delle differenze nell'accumulo di vescicole lipidiche, indotte dai corpi chetonici come il 2-idrossiisobutirrato, che si osservano tra questi e i nematodi *wild type* N2. Tale molecola infatti, come dimostrato in studi preliminari, nei ceppi N2 ha un effetto nel ridurre l'accumulo lipidico, mentre in alcuni mutanti questo effetto non è stato osservato. L'immagazzinamento dei grassi, che nei mammiferi avviene all'interno degli adipociti, in *C. elegans* si realizza all'interno di vescicole lipidiche, definite *lipid droplets*, che fungono da deposito. Tali goccioline presenti nelle cellule intestinali ed ipodermiche, grazie alla trasparenza del corpo del nematode, vengono visualizzate direttamente negli animali intatti tramite l'utilizzo di coloranti liposolubili (ad esempio il Sudan Black B che colora di nero i depositi lipidici) o integrando la dieta di laboratorio dell'animale con composti fluorescenti come Nile Red. Il contenuto lipidico di *C. elegans* è costituito da depositi grassi di trigliceridi, la cui percentuale è fortemente influenzata dalla dieta e dallo stadio di crescita e dai fosfolipidi che variano in base alla temperatura di crescita, e sono generalmente rappresentati da fosfatidiletanolamina (55%), fosfatidilcolina (32%), sfingomieline (8%) e cardiolipina e fosfatidil-inositolo (5%). Tramite approcci di lipidomica verrà valutata la variazione del contenuto di questi lipidi nei mutanti trattati con le molecole. I membri della famiglia delle desaturasi e delle elongasi in *C. elegans* sono codificati rispettivamente dai geni *fat* ed *elo*

e la loro inattivazione è associata alla comparsa di fenotipi metabolici, fisiologici e comportamentali che possono essere conseguenza diretta dall'alterazione della composizione lipidica totale nel nematode. Tali fenotipi possono essere caratterizzati da crescita ritardata, corpo più piccolo, movimenti rallentati, difetti riproduttivi, anomalie della segnalazione sensoriale e neurotrasmissione e ridotta vitalità. Essi verranno valutati nei mutanti trattati e non con le diverse molecole.

Verranno inoltre effettuati esperimenti di metabolomica per valutare le variazioni metaboliche presenti nelle popolazioni mutanti trattate con le molecole.

L'integrazione dei dati molecolari, lipidomici e metabolomici combinati con gli effetti fenotipici ci permetterà di delineare i meccanismi cellulari coinvolti nella risposta degli animali al trattamento con i corpi chetonici.

Stato delle conoscenze

L'elevata omologia tra i geni di *Caenorhabditis elegans* e quelli implicati nelle malattie umane fa del nematode un importante modello per lo studio delle patologie dell'uomo. *C. elegans*, grazie alle sue molteplici e versatili caratteristiche costituisce un potente organismo modello per la comprensione dei meccanismi molecolari complessi correlati alla patogenesi e all'individuazione dei target terapeutici di diverse malattie umane. L'utilizzo di questo organismo relativamente semplice costituisce un ottimo sistema manipolabile attraverso un'abbondanza di potenti strumenti di biologia cellulare, molecolare e genetici per la scoperta dei geni alla base di diverse malattie, tra cui l'obesità. L'aumento preponderante dell'obesità, che dal 1980 ha visto duplicare il numero di persone colpite da tale condizione, ha come fattori determinanti l'aumento di peso e i cambiamenti delle abitudini alimentari. Attualmente gli individui obesi nel mondo sono più di 600 milioni e in associazione a questa tendenza allarmante c'è il proporzionale aumento a livello mondiale del diabete mellito di tipo 2 (T2DM) i cui disordini metabolici ad esso correlati, come la dislipidemia e l'insulino-resistenza, sono importanti fattori di rischio per patologie associate, come malattie cardiovascolari e diversi tipi di cancro [1]. Un ruolo diagnostico di rilevante importanza nello sviluppo di tale disturbo metabolico sembra essere quello del microbioma intestinale che, con un numero di batteri superiore a 10^{14} , differisce nella composizione, soprattutto dei Bacteroidetes e dei Firmicutes tra individui magri ed obesi, anche in dipendenza a variazioni della dieta come dimostrato in studi su modelli murini e sull'uomo [2]. Il coinvolgimento del microbioma nel bilancio energetico è stato ulteriormente dimostrato dal fatto che, tramite studi di trapianto di microbiota fecale, il cui potenziale terapeutico è associato alla capacità di ripristino dell'equilibrio microbico intestinale sostituendo i patogeni con ceppi batterici più benefici, il microbioma obeso si è rivelato più efficiente nel produrre energia dalla dieta. Oltre a questo, è stato riscontrato nel microbiota intestinale dei pazienti affetti da diabete mellito di tipo II una diminuzione dei batteri che producono butirrato (*Roseburia* e *Faecalibacterium prausnitzii*), rispetto a quello degli individui sani [3]. Tale acido grasso a catena corta viene assorbito a livello intestinale e costituisce una fonte di energia per le cellule epiteliali del colon, infatti la sua assenza influisce sullo sviluppo di malattie e infiammazioni dell'intestino. Anche nei modelli murini è stato dimostrato che la somministrazione orale di questo composto determina un miglioramento della sensibilità all'insulina aumentando il dispendio energetico e la funzione mitocondriale [4], sebbene i meccanismi alla base dei potenziali effetti benefici del butirrato sul metabolismo non sono chiari. Si è visto che in *C.elegans* il β -idrossibutirrato (β HB) promuove l'estensione della durata della vita e la protezione contro stress metabolici, proteotossici e termici. Tale composto, che nei mammiferi viene prodotto principalmente dalla rottura catalitica degli acidi grassi all'interno del fegato, pare essere coinvolto nella riduzione del signaling del recettore dell'insulina DAF-2 con

conseguente attivazione del fattore di trascrizione DAF-16 [5]. La somministrazione del β -idrossibutirrato o una dieta chetogenica, a causa della ridotta assunzione di carboidrati, si sono dimostrate efficaci anche nell'abbassare la glicemia nei pazienti con diabete di tipo II [6]. Tali risultati sembrano indicare che il β HB sia un composto mimetico della restrizione dietetica potenzialmente utile nel trattamento di molti disturbi umani associati all'aging. Tuttavia sono ancora necessari ulteriori studi per chiarire il funzionamento e il ruolo di tali meccanismi sia a livello delle vie metaboliche che a livello cellulare e genetico.

Bibliografia:

- 1) Hartstra, A.V., Bouter, K.E., Bäckhed, F., & Nieuwdorp M. (2015). Insights Into the Role of the Microbiome in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:159–165
- 2) Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. *Nature* 2006;444:1027–1031.
- 3) Qin, J., Li, Y., Cai, Z., et al. (2012). *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*. *Nature*; 490:55–60.
- 4) Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., et al. (2009). *Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice*. *Diabetes*; 58:1509–1517.
- 5) Edwards, C., Canfield, J., Copes, N., Rehan, M., Lipps, D., & Bradshaw, P.C. (2014). D-beta-hydroxybutyrate extends lifespan in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)*; 6(8): 621–644.
- 6) Yancy, W. S. J., Foy, M., Chalecki, A. M., Vernon, M. C., Westman, E. C. (2005). *A low-carbohydrate, ketogenic diet to treat type 2 diabetes*. *Nutr Metab (Lond)*. pp. 2–34.

Lavori pubblicati negli ultimi 5 anni dal Docente Guida (2015-2019):

- Guantario, B., Zinno, P., Schifano, E., Roselli, M., Perozzi, G., Palleschi, C., **Uccelletti, D.***, Devirgiliis, C. In Vitro and in Vivo selection of potentially probiotic lactobacilli from nocellara del belice table olives (2018) *Frontiers in Microbiology* 9(MAR), pp. 595
- Schifano, E., Marazzato, M., Ammendolia, M.G., Zanni E., Ricci M., Comanducci A., **Uccelletti, D.***, Longhi, C. Virulence behavior of uropathogenic *Escherichia coli* strains in the host model *Caenorhabditis elegans* (2018) *MicrobiologyOpen* e756
- Ficociello, G., De Caris, M.G., Trillò, G., Cavallini, D., Sarto, M.S., **Uccelletti, D.***, Mancini, P. Anti-candidal activity and in vitro cytotoxicity assessment of graphene nanoplatelets decorated with zinc oxide nanorods (2018) *Nanomaterials* 8(10),752.
- Ficociello, G., Zonfrilli, A., Cialfi, S., Talora, C., **Uccelletti, D.** Yeast-based screen to identify natural compounds with a potential therapeutic effect in Hailey-Hailey disease (2018) *International Journal of Molecular Sciences* 19(6) 1814.
- Bregnocchi, A., Zanni, E., **Uccelletti, D.**, Marra, F., Cavallini, D., De Angelis, F., De Bellis, G., Bossù, M., Ierardo, G., Polimeni, A., Sarto, M.S. Graphene-based dental adhesive with anti-biofilm activity (2017) *Journal of Nanobiotechnology*, 15 (1), art. no. 89
- Zanni, E., Bruni, E., Chandraiahgari, C.R., De Bellis, G., Santangelo, M.G., Leone, M., Bregnocchi, A., Mancini, P., Sarto, M.S., **Uccelletti, D.***. Evaluation of the antibacterial power and biocompatibility of zinc oxide nanorods decorated graphene nanoplatelets: New perspectives for antibiodeteriorative approaches (2017) *Journal of Nanobiotechnology*, 15 (1), art. no. 57
- Di Filippo, P., Pomata, D., Riccardi, C., Buiarelli, F., **Uccelletti, D.**, Zanni, E. Muramic and dipicolinic acids in atmospheric particulate matter as biomarkers of bacteria and bacterial spores (2017) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409 (6), pp. 1657-1666.
- Zanni, E., Schifano, E., Motta, S., Sciubba, F., Palleschi, C., Mauri, P., Perozzi, G., **Uccelletti, D.***, Devirgiliis, C., Miccheli, A. Combination of metabolomic and proteomic analysis revealed different features among *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and *lactis* strains while in vivo testing in the model organism *Caenorhabditis elegans* highlighted probiotic properties (2017) *Frontiers in Microbiology*, 8 (JUN), art. no. 1206.
- Olivi, M., Alfè, M., Gargiulo, V., Valle, F., Mura, F., Di Giosia, M., Rapino, S., Palleschi, C., **Uccelletti, D.***, Fiorito, S. Antimicrobial properties of graphene-like nanoparticles: coating effect on *Staphylococcus aureus* (2016) *Journal of Nanoparticle Research*, 18 (12), art. no. 358,
- Cardarelli, S., D'Amici, S., Tassone, P., Tramonti, A., **Uccelletti, D.**, Mancini, P., Saliola, M. Characterization of the transcription factor encoding gene, *KIADR1*: Metabolic role in *Kluyveromyces lactis* and expression in *Saccharomyces cerevisiae* (2016) *Microbiology (United Kingdom)*, 162 (11), art. no. 000374, pp. 1933-1944.
- Ficociello, G., Zanni, E., Cialfi, S., Aurizi, C., Biolcati, G., Palleschi, C., Talora, C., **Uccelletti, D.*** Glutathione S-transferase Θ -subunit as a phenotypic suppressor of *pmr1Δ* strain, the *Kluyveromyces lactis*

model for Hailey-Hailey disease (2016) *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863 (11), pp. 2650-2657.

-Zanni, E., Chandraiahgari, C.R., De Bellis, G., Montereali, M.R., Armiento, G., Ballirano, P., Polimeni, A., Sarto, M.S., **Uccelletti, D.*** Zinc oxide nanorods-decorated graphene nanoplatelets: A promising antimicrobial agent against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* (2016) *Nanomaterials*, 6 (10), art. no. 179.

-Zanni, E., De Palma, S., Chandraiahgari, C.R., De Bellis, G., Cialfi, S., Talora, C., Palleschi, C., Sarto, M.S., **Uccelletti, D.***, Mancini, P. In vitro toxicity studies of zinc oxide nano- and microrods on mammalian cells: A comparative analysis (2016) *Materials Letters*, 179, pp. 90-94.

-Cialfi, S., Le Pera, L., De Blasio, C., Mariano, G., Palermo, R., Zonfrilli, A., **Uccelletti, D.**, Palleschi, C., Biolcati, G., Barbieri, L., Screpanti, I., Talora, C. The loss of ATP2C1 impairs the DNA damage response and induces altered skin homeostasis: Consequences for epidermal biology in Hailey-Hailey disease (2016) *Scientific Reports*, 6, art. no. 31567.

-Di Caprio, F., Altamari, P., Zanni, E., **Uccelletti, D.**, Toro, L., Pagnanelli, F. Lanthanum biosorption by different *Saccharomyces cerevisiae* strains (2016) *Chemical Engineering Transactions*, 49, pp. 37-42.

-Ficociello, G., Salemme, A., **Uccelletti, D.**, Fiorito, S., Togna, A.R., Vallan, L., González-Domínguez, J.M., Da Ros, T., Francisci, S., Montanari, A. Evaluation of the efficacy of carbon nanotubes for delivering peptides into mitochondria (2016) *RSC Advances*, 6 (71), pp. 67232-67241.

-Gorietti, D., Zanni, E., Palleschi, C., Delfini, M., **Uccelletti, D.**, Saliola, M., Puccetti, C., Sobolev, A.P., Mannina, L., Miccheli, A. NMR based profiling unveils different α -ketoglutarate pools involved into glutamate and lysine synthesis in the milk yeast *Kluyveromyces lactis* (2015) *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850 (11), pp. 2222-2227.

-Zanni, E., Laudenzi, C., Schifano, E., Palleschi, C., Perozzi, G., **Uccelletti, D.***, Devirgiliis, C. Impact of a complex food microbiota on energy metabolism in the model organism *Caenorhabditis elegans* (2015) *BioMed Research International*, 2015, art. no. 621709

-Zanni, E., Maulucci, G., Pomata, D., Buiarelli, F., Krasnowska, E.K., Parasassi, T., De Spirito, M., Heipieper, H.J., **Uccelletti, D.*** ER stress induced by the OCH1 mutation triggers changes in lipid homeostasis in *Kluyveromyces lactis* (2015) *Research in Microbiology*, 166 (2), pp. 84-92

*Corresponding author

Fondi attualmente disponibili per svolgere il programma di ricerca:

- Progetti Ateneo
- INAIL

Collaborazioni con laboratori nazionali ed internazionali

- Prof. Piero Del Boccio, Università degli studi di Chieti
- Dr. Chiara Devirgiliis, Food and Nutrition Research Center, CREA
- Prof. Alfredo Miccheli, Sapienza Università di Roma
- Dr. Hermann J. Heipieper, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ Department of Environmental Biotechnology, Leipzig
- Dr. John Cipollo, U.S. Department of Health and Human Services FDA, Gaithersburg, Maryland