

**Titolo:**

Studio del ruolo del sistema nervoso nella modulazione dell'immunità innata mediante l'uso del sistema modello *Drosophila*

**Responsabile:**

Prof.ssa Valeria Cavaliere

**Progetto di ricerca:**

Le attività previste nel presente progetto di ricerca sono parte del progetto PRIN 2022 PNRR dal titolo: "Impact of neurotoxic pesticides on insect immunity (NEUROIMMUNITY)" che mira a comprendere i meccanismi che sottendono la neuromodulazione della risposta immunitaria negli insetti e l'impatto di fattori di stress quali i pesticidi sull'immunità degli insetti, utilizzando come sistemi modello la *Drosophila* e l'ape.

Il declino della salute delle api è il risultato di una sindrome multifattoriale indotta da una serie di fattori di stress biotico e abiotico. L'utilizzo nelle colture di insetticidi neurotossici, in particolare degli insetticidi neonicotinoidi, provoca la contaminazione di piante e alveari esponendo le api a dosi sub-letali che esercitano un impatto negativo sulla fisiologia dell'insetto alterandone sviluppo, riproduzione e comportamento [1]. Abbiamo dimostrato che i neonicotinoidi, modulatori competitivi dei recettori acetilcolinici, sono in grado di ridurre l'immunocompetenza in *Drosophila* e in ape indicando chiaramente l'esistenza di un meccanismo di cross-modulazione fra il sistema nervoso e quello immunitario [2]. Abbiamo recentemente dimostrato il ruolo della segnalazione mediata da acetilcolina [3], e della segnalazione aminergica [4] nella modulazione della risposta immunitaria innata di *Drosophila*. Lo studio della cross-modulazione neuro-immunitaria è un campo di ricerca in crescita nei vertebrati [5, 6], e si basa su vie regolative conservate [7], finora non caratterizzate negli insetti. "Neuroimmunity" è un progetto che mira all'acquisizione di conoscenze di base sulla modulazione neuro-immunitaria negli insetti e sull'impatto operato dai pesticidi neurotossici su di essa.

Il presente progetto si prefigge lo studio approfondito dei meccanismi attraverso i quali il sistema nervoso modula l'immunità innata mediante l'uso di *Drosophila*, un importante sistema modello per lo studio dei geni coinvolti nei meccanismi dell'immunità e della difesa dai patogeni negli insetti [8]. A tale scopo saranno eseguite analisi trascrittomiche mediante RNA seq del cervello e del tessuto immunitario (corpi grassi) in condizioni normali e in seguito a infezione sistemica batterica. La comparazione dei risultati ottenuti porterà all'identificazione dei geni differenzialmente espressi in individui sani e infettati. I livelli di espressione di tali geni nei tessuti immunitari saranno poi valutati in condizioni di alterata neurotrasmissione realizzata mediante approcci di genetica molecolare [9]. In questo modo si giungerà all'identificazione dei geni immuno-responsivi che sono regolati dal sistema nervoso.

**Piano di attività**

Le attività previste nel presente progetto sono mirate all'identificazione dei geni coinvolti nella regolazione neuro-immunitaria mediante l'uso del sistema modello *Drosophila*. Le attività

prevedono l'esecuzione di esperimenti di infezione sistemica batterica di individui adulti di *Drosophila* mirati alla dissezione di cervello e tessuti immunitari (corpi grassi) dai quali sarà estratto RNA da sottoporre a RNA seq. RNA di controllo sarà estratto dagli stessi tessuti ottenuti da individui sani e sottoposto a sequenziamento. L'analisi comparativa dei risultati delle RNA seq consentirà l'identificazione dei geni differenzialmente espressi nei due tessuti in conseguenza dell'infezione septica. L'espressione dei geni immunoresponsivi così identificati sarà poi analizzata in condizioni di alterata neurotrasmissione allo scopo di identificare i geni sottoposti a neuromodulazione. Il blocco della neurotrasmissione sarà realizzato mediante l'uso di tecniche di genetica molecolare disponibili in *Drosophila*. L'applicazione di tali tecniche implica la progettazione e l'esecuzione degli opportuni incroci necessari all'ottenimento dei differenti contesti genetici che consentono il controllo dell'espressione di specifici transgeni. Le attività prevedono inoltre lo studio della bibliografia corrente riguardante le tematiche inerenti al progetto e la partecipazione a riunioni per la presentazione e discussione dei risultati ottenuti. Tali riunioni saranno tenute periodicamente sia con i membri interni del laboratorio che con i membri dell'altra unità operativa del progetto PRIN 2022 PNRR "Neuroimmunity". A tali attività si aggiunge anche la stesura di eventuali comunicazioni a congresso e la preparazione dei relativi poster.

**Title**

Study of the nervous system role in modulating innate immunity using *Drosophila* model system

**Tutor**

Prof.ssa Valeria Cavaliere

**Research Project**

The activities envisaged in the present research project are part of the “Impact of neurotoxic pesticides on insect immunity (NEUROIMMUNITY)”, PRIN 2022 PNRR project, which aims to define the mechanisms underlying neuromodulation of the insect immune response and the impact of stress factor such as pesticides on immunity, using *Drosophila* and bees.

The honey-bee health decline is the final result of a multifactorial syndrome induced by biotic and abiotic stress agents. Neurotoxic pesticides used in the control of plant pests have become ubiquitous pollutants that expose bees to sub-lethal doses, which have a negative impact on the physiology of the insect, altering its development, reproduction and behavior [1]. We showed that neonicotinoid insecticides, which are agonists of nicotinic acetylcholine receptors, interfere with *Drosophila* and bees immune defence [2] indicating a mechanism of cross-modulation between nervous and immune systems. Recently, we showed the role of acetylcholine [3] and aminergic signalings [4] in modulating the *Drosophila* innate immune response. Neuroimmunity is a growing field of research in vertebrates [5, 6], and is based on conserved cross-regulatory pathways [7], largely overlooked so far in insects. The “Neuroimmunity” project aims to narrow this research gap to gain basic knowledge on neuro-immune modulation and on the immunomodulatory activity of neurotoxic pesticides.

The present project aims to define the mechanisms through which nervous system modulates innate immunity using *Drosophila*, a well-established model for the study of genes involved in the mechanisms of immunity and defense against pathogens in insects [8]. Transcriptome profiling through RNA seq of brain and immune tissue (fat body) from immune-challenged and unchallenged individuals will be performed to identify differentially expressed genes. Using molecular genetics tools available in *Drosophila* [9], the impact of blocked neurotransmission on genes differentially expressed in the immune tissue will be assessed. This will lead to the identification of the immunoresponsive genes that are modulated in the fat body by nervous system activity.

**Activity Plan**

The candidate will be engaged in research activities using *Drosophila* as a model system to identify key-genes involved in the neuroimmune regulation. Bacterial systemic infection experiments will be performed to analyze the transcriptional response in brain and immune tissue (fat body) through RNA sequencing. The comparative analysis of the RNAseq results obtained in immune-challenged and unchallenged individuals will lead to the identification of differentially expressed genes. The expression of the immunoresponsive genes will be studied in normal conditions and in conditions of altered neurotransmission to identify the neuromodulated genes. To block neurotransmission, molecular genetics tools will be applied,

which require planning and execution of genetic crosses to obtain the genetic backgrounds necessary to control the expression of specific transgenes. The activities also include the study of the current bibliography related to the subject and participation in meetings for the presentation and discussion of the results obtained. These meetings will be held periodically both with the internal members of the laboratory and with the members of the other operational unit of the PRIN 2022 PNRR "Neuroimmunity" project. Added to these activities are also writing abstracts and preparing scientific posters for conference.

### **Bibliography**

- [1] Blacquière, T., Smagghe, G., van Gestel C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4): 973-92.
- [2] Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., Pennacchio, F., 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(46): 18466-71.
- [3] Giordani, G., Cattabriga, G., Becchimanzi, A., Di Lelio, I., De Leva, G., Gigliotti, S., Pennacchio, F., Gargiulo, G., Cavaliere, V. 2023. Role of neuronal and non-neuronal acetylcholine signaling in *Drosophila* humoral immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 153, 103899.
- [4] Cattabriga, G., Giordani, G., Gargiulo, G., Cavaliere, V. 2023. Effect of aminergic signaling on the humoral innate immunity response of *Drosophila*. *Front. Physiol.* 14:1249205.
- [5] Tracey, K.J., Reflex control of immunity. 2009. *Nat Rev Immunol*, 9(6): 418-28.
- [6] Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2015. Neural circuitry and immunity. *Immunol Res.*, 63(1-3): 38-57.
- [7] Andersson, U., Tracey, K.J., 2012. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J Exp Med*, 209(6): 1057-68.
- [8] Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*, 25: 697-743.
- [9] del Valle Rodriguez, A., Didiano, D., Desplan, C., 2011. Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nature methods* 9, 47-55.