

Curriculum Vitae



Informazioni personali

Nome e cognome	GABRIELE TRESPIDI
Luogo e data di nascita	Castel San Giovanni (PC) - 03/03/1991
Indirizzo Laboratorio	Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani” – Università degli Studi di Pavia Via Ferrata, 9 27100 Pavia
Telefono	+39 0382 985575
E-mail	gabriele.trespidi@unipv.it
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6704-4409

Istruzione e formazione

Periodo	Da ottobre 2017 a novembre 2020
Titolo della qualifica	Dottorato di Ricerca in Genetica, Biologia Molecolare e Cellulare
Presso	Università degli studi di Pavia – Supervisore: Prof.ssa Edda De Rossi
Titolo della tesi	“Molecular study of the <i>Burkholderia cenocepacia</i> division cell wall operon and FtsZ interactome as targets for new drugs”

Periodo	Novembre 2016
Titolo della qualifica	Abilitazione all’esercizio della professione di Biologo
Presso	Università degli studi di Pavia

Periodo	Da ottobre 2014 a ottobre 2016
Titolo della qualifica	Laurea Magistrale in Biotecnologie Avanzate
Presso	Università degli studi di Pavia – Relatore: Prof.ssa Giovanna Riccardi
Voto	110/110 e lode
Titolo della tesi	“Caratterizzazione del bersaglio cellulare di una nuova molecola attiva contro <i>Burkholderia cenocepacia</i> ”

Periodo	Da ottobre 2010 a settembre 2013
Titolo della qualifica	Laurea Triennale in Biotecnologie
Presso	Università degli studi di Pavia – Relatore: Dott.ssa Valeria Merico
Voto	110/110 e lode
Titolo della tesi	“Very small embryonic-like stem cells, mito o realtà: revisione critica della letteratura”

Posizione accademica

Periodo	Da marzo 2023 ad oggi
Posizione ricoperta	Ricercatore a tempo determinato (RTD-Tipo A, SSD BIO/19)
Titolo del progetto	One Health Basic and Translational Research Actions addressing Unmet Needs on Emerging Infectious Diseases” (INF-ACT) – Research node 3: Antimicrobial resistance - WP3.4: <u>Non-conventional and alternative approaches to find new anti MDRO strategies and/or as adjuvant of already existing antibiotics</u>
Luogo di lavoro	Laboratorio di Microbiologia Molecolare - Università degli studi di Pavia, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani” – Responsabili: Prof.ssa Maria Rosalia Pasca e Prof.ssa Silvia Buroni

Esperienze professionali

Periodo	Da giugno 2022 a febbraio 2023
Posizione ricoperta	Assegnista di ricerca
Titolo del progetto	<u>Analisi di una libreria di composti di origine naturale e ottenuti mediante virtual screening per la determinazione dell’attività di inibizione della divisione cellulare batterica.</u>
Principali attività	Utilizzo di saggi spettrofotometrici accoppiati per la determinazione dell’attività inibitoria di nuovi composti verso l’attività GTPasica della proteina FtsZ (analogo della tubulina coinvolto nella divisione batterica) di <i>Staphylococcus aureus</i> . Caratterizzazione della polimerizzazione <i>in vitro</i> della proteina FtsZ in presenza dei suddetti composti utilizzando saggi di sedimentazione. Determinazione della minima concentrazione inibente dei composti contro <i>S. aureus</i> attraverso il metodo delle microdiluizioni.
Luogo di lavoro	Laboratorio di Microbiologia Molecolare - Università degli studi di Pavia, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani” – Responsabile: Prof.ssa Silvia Buroni

Periodo	Da dicembre 2021 a maggio 2022
Posizione ricoperta	Borsista di ricerca
Titolo del progetto	<u>Caratterizzazione di nuovi farmaci antimicrobici.</u>
Principali attività	Studio dell’attività antimicrobica e di inibizione dell’adesione batterica del composto PDSTP contro patogeni della fibrosi cistica. Saggi di adesione batterica (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i>) su cellule dell’epitelio polmonare umano (A549, CFBE41o-, 16HBE14o-). Utilizzo del saggio time-kill curve per determinare la possibile sinergia di nuovi composti antimicrobici con gli antibiotici utilizzati in clinica. Saggi per testare la permeabilità della membrana di Gram-positivi e -negativi a molecole antibiotiche e l’accumulo all’interno delle cellule.
Luogo di lavoro	Laboratorio di Microbiologia Molecolare - Università degli studi di Pavia, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani” – Responsabile: Prof.ssa Silvia Buroni

Periodo	Da dicembre 2020 a novembre 2021
Posizione ricoperta	Assegnista di ricerca
Titolo del progetto	<u>Caratterizzazione dello spettro d’attività e del meccanismo d’azione di un composto attivo contro i patogeni ESKAPE.</u>
Principali attività	Test dell’attività di inibizione ed eradicazione del biofilm <i>in vitro</i> da parte del composto C109 contro i patogeni del gruppo ESKAPE (<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterobacter species</i>). Espressione in <i>Escherichia coli</i> e purificazione della proteina essenziale del divisoma batterico FtsZ (bersaglio molecolare di C109) e successivo utilizzo di saggi biochimici per testare l’efficacia del composto nell’inibizione dell’attività GTPasica di FtsZ <i>in vitro</i> . Caratterizzazione delle proteine interagenti con FtsZ nei patogeni ESKAPE utilizzando un sistema two hybrid batterico. Utilizzo di saggi di polimerizzazione <i>in vitro</i> di FtsZ in presenza del composto C109 e di interattori per caratterizzare l’effetto del composto sulla formazione del divisoma.

Luogo di lavoro	<p>Saggi di adesione di patogeni della fibrosi cistica (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Burkholderia cenocepacia</i>) su cellule dell'epitelio polmonare umano (A549, CFBE41o-, 16HBE14o-) per lo studio di nuove molecole in grado di inibire l'adesione batterica alla superficie cellulare.</p> <p>Laboratorio di Microbiologia Molecolare - Università degli studi di Pavia, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani" – Responsabile: Prof.ssa Giovanna Riccardi</p>
Periodo	Da settembre 2019 a novembre 2019
Posizione ricoperta	Visiting PhD student
Principali attività	<p>Attività di ricerca nel laboratorio del Prof. Tom Coenye. Test dell'attività antimicrobica contro <i>Burkholderia cenocepacia</i> della nanosospensione idrosolubile del composto C109 e studio della citotossicità in un modello di infezione <i>in vivo</i>-like, utilizzando colture di cellule epiteliali polmonari umane (A549 e CFBE41o-) cresciute in 3D.</p> <p>Utilizzo di un modello di infezione di lesione cutanea cronica <i>in vitro</i> per testare l'efficacia del composto C109 nell'inibizione della formazione di biofilm di <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>
Luogo di lavoro	Laboratory of Pharmaceutical Microbiology (LPM) - Ghent University, Department of Pharmaceutical Analysis - Ghent (Belgium) – Responsabile: Prof. Tom Coenye
Periodo	Da ottobre 2017 a novembre 2020
Posizione ricoperta	Studiante di Dottorato di Ricerca in Genetica, Biologia Molecolare e Cellulare
Principali attività	<p>Ricerca di nuovi antimicrobici attivi contro <i>Burkholderia cenocepacia</i> e i patogeni multiresistenti agli antibiotici del gruppo ESKAPE e caratterizzazione dei bersagli molecolari. La ricerca di nuovi bersagli è incentrata prevalentemente sul divisoma batterico. Studio della molecola antimicrobica C109 e del suo bersaglio molecolare, la proteina del divisoma FtsZ nei patogeni sopracitati. Espressione in <i>E. coli</i> e purificazione di proteine del divisoma e caratterizzazione delle interazioni con la proteina FtsZ con saggi <i>in vitro</i> e utilizzando il sistema two hybrid batterico. Studi molecolari per caratterizzare la regolazione e l'organizzazione trascrizionale (identificazione del regolatore trascrizionale, promotore, sito d'inizio della trascrizione e unità di trascrizione) dell'operone division and cell wall (<i>dcw</i>) in <i>B. cenocepacia</i>. Colture di cellule epiteliali polmonari (A549 e CFBE41o-) in monostrato e in 3D e successivi saggi di infezione per testare l'attività antimicrobica di nuovi farmaci contro i batteri multiresistenti agli antibiotici del gruppo ESKAPE.</p>
Luogo di lavoro	Laboratorio di Microbiologia Molecolare - Università degli studi di Pavia, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani" – Supervisore: Prof.ssa Edda De Rossi
Periodo	Da marzo 2017 a settembre 2017
Posizione ricoperta	Frequentante volontario
Principali attività	<p>Attività diagnostica: estrazione di acidi nucleici, amplificazione con PCR, real-time PCR, sequenziamento diretto con metodica Sanger e pirosequenziamento, allo scopo di individuare mutazioni indice di malattia oncoematologica (JAK-2, Bcl-1, Bcl-2, BCR/ABL) o di predizione di risposta alla terapia nei tumori solidi e di insorgenza di resistenze (geni EGFR, RAS, BRAF); analisi di clonalità linfocitiche in prima diagnosi o in <i>follow-up</i> dei pazienti in terapia. Metodica FISH per la determinazione di aberrazioni genetiche (amplificazioni, aneusomie, traslocazioni) nell'adenocarcinoma della mammella e dello stomaco (gene Her-2), nell'adenocarcinoma del polmone (ALK).</p>
Luogo di lavoro	Laboratorio di Biologia Molecolare, U.O. Anatomia Patologica - Ospedale "Guglielmo da Saliceto" – Piacenza – Responsabile: Dott. Alessandro Ubiali
Periodo	Da novembre 2016 a febbraio 2017
Posizione ricoperta	Operatore del reparto farmaceutico stagista
Principali attività	<p>Preparazione dei campioni, prevalentemente estratti secchi e droghe vegetali, ed estrazione con solventi organici di pesticidi e idrocarburi policiclici aromatici (IPA), purificazione dalla matrice con cromatografia per gel filtrazione per successiva quantificazione dei microinquinanti tramite spettrometria di massa LC-MS/MS o GC-</p>

1. Identificazione e caratterizzazione di nuove molecole attive contro le infezioni polmonari causate da patogeni della fibrosi cistica

Responsabili: Prof.ssa Maria Rosalia Pasca e Prof.ssa Silvia Buroni.

Nonostante il sorprendente avanzamento nella comprensione della malattia e nello sviluppo di terapie che migliorano la qualità della vita degli individui affetti da fibrosi cistica, le infezioni polmonari rimangono una delle principali cause di morte per questi pazienti. In particolare, patogeni Gram-negativi multiresistenti agli antibiotici come *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* sono in grado di provocare gravi infezioni polmonari croniche in questi pazienti che risultano estremamente difficili da eradicare con le terapie attuali. Per questo motivo stiamo utilizzando diversi approcci per trovare nuove possibili cure, studiando nuovi farmaci con attività antimicrobica ma anche inibitori del quorum sensing e dell'interazione ospite-patogeno.

a) Caratterizzazione di nuove molecole antimicrobiche

La caratterizzazione di nuovi bersagli molecolari è fondamentale per lo sviluppo di nuove molecole con attività antimicrobica che risultino meno soggette ai meccanismi di resistenza sviluppati dai patogeni. Per questo, è stato studiato un promettente composto sintetizzato dal nostro collaboratore il Dott. Vadim Makarov (Russian Academy of Sciences, Moscow), il benzotriadiazolo C109, che mostra una notevole attività antimicrobica *in vitro* contro *B. cenocepacia* e un ampio spettro di Gram-positivi e negativi. Il composto colpisce un componente fondamentale per la divisione batterica, la proteina FtsZ, impedendo il normale svolgimento di questo processo e conseguentemente portando alla lisi del batterio. Per migliorare le proprietà di questa molecola è stata svolta una caratterizzazione approfondita di diversi derivati, comparando la loro stabilità, citotossicità e attività antibatterica con la molecola originale (Chiarelli *et al.*, 2020). Viste le potenzialità come nuovi bersagli molecolari delle proteine essenziali del divisoma batterico, è stata svolta una caratterizzazione a livello molecolare e biochimico di questo processo in *B. cenocepacia*, che favorirà l'approccio di drug design di nuove molecole antimicrobiche (Trespidi *et al.*, 2020).

b) Studio di inibitori del quorum sensing di *B. cenocepacia*

Il quorum sensing è un sistema di comunicazione che le popolazioni batteriche sfruttano per regolare e coordinare la loro espressione genica, inclusa l'espressione di alcuni fattori di virulenza. La proteina CepI è responsabile della sintesi di uno di questi segnali ed è risultata essere il bersaglio di nuove molecole appartenenti alla classe delle dichetopiperazine. Queste hanno attività inibitoria sull'attività enzimatica di CepI sia *in vitro* che *in vivo*, conseguentemente riducendo certi tratti della virulenza del patogeno. Inoltre, per comprendere il meccanismo d'azione di una di queste molecole è stato utilizzato un approccio di docking *in silico* e i dati ottenuti sono stati confermati tramite la creazione di mutanti e analisi proteomica, infine identificando il sito di legame del composto a CepI (Buroni *et al.*, 2018).

c) Inibizione dell'interazione ospite-patogeno e potenziamento dell'effetto degli antibiotici

È noto che l'utilizzo degli antibiotici per la cura di infezioni batteriche porta inevitabilmente alla selezione di ceppi resistenti. Per questo, lo studio di molecole alternative in grado di prevenire o combattere l'infezione senza applicare una forte pressione selettiva è un approccio tuttora considerato molto promettente. Grazie alla collaborazione con il Dr. Vadim Makarov, stiamo caratterizzando il composto PDSTP come inibitore dell'adesione alle cellule epiteliali dei patogeni *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* e *S. aureus*. Il composto è una dispirotriperazina già nota come antivirale che colpisce un meccanismo di riconoscimento ospite-patogeno conservato in virus e batteri. Attraverso saggi di adesione *in vitro* stiamo studiando le potenzialità del composto nel prevenire l'adesione di questi patogeni, riducendo così la virulenza degli stessi. Inoltre, ci stiamo focalizzando sulle interazioni del composto con cellule umane e batteri per comprenderne il meccanismo d'azione. Infine, il composto presenta una sorprendente efficacia nel potenziamento dell'effetto di antibiotici in uso clinico, un effetto che stiamo studiando per comprenderne le basi molecolari e definire le potenzialità di combinazioni PDSTP-antibiotico.

2. Caratterizzazione di nuovi composti antimicrobici efficaci contro i patogeni del gruppo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter species*)

Responsabile: Prof.ssa Silvia Buroni.

I patogeni del gruppo ESKAPE sono la principale causa di infezioni nosocomiali, causando la morte di centinaia di migliaia di pazienti ogni anno in tutto il mondo. Infatti, l'insorgenza di ceppi multiresistenti agli antibiotici rende queste infezioni estremamente difficili da trattare con le terapie attuali. In questo progetto è stata testata l'attività del composto antimicrobico C109 (Chiarelli *et al.*, 2020) contro questi patogeni, determinandone l'efficacia come antibatterico e anti-biofilm *in vitro*, utilizzando anche un innovativo modello di infezione di ferita cronica, e soprattutto focalizzando la

ricerca sullo studio del suo bersaglio cellulare, la proteina FtsZ. In questo caso, utilizzando saggi enzimatici e di sedimentazione per studiare l'attività e la capacità di formare polimeri della proteina, è stato elucidato il meccanismo d'azione del composto contro *S. aureus* e *A. baumannii* (Trespidi *et al.*, 2021; Scoffone *et al.*, 2022).

Essendo FtsZ, insieme ad altre proteine essenziali del divisoma batterico, un bersaglio innovativo e promettente per lo sviluppo di una nuova generazione di antibiotici attivi contro gli ESKAPE, stiamo analizzando tramite high throughput screening una libreria di 14 000 estratti microbici forniti dall'azienda NAICONS (<http://naicons.com>). Utilizzando un saggio di sedimentazione di FtsZ in particolari piastre da 96 pozzetti, è possibile selezionare i composti che mostrano un'attività inibitoria nei confronti della polimerizzazione di FtsZ. La loro efficacia viene poi analizzata approfonditamente attraverso saggi enzimatici sulla proteina purificata, insieme alla loro attività antimicrobica contro le cellule di *S. aureus* e *P. aeruginosa*. L'analisi dell'effetto dei composti su proteina purificata e cellule batteriche è svolta anche utilizzando ipotetici inibitori dell'attività enzimatica di FtsZ individuati tramite *virtual screening*.

3. Identificazione di nuovi candidati antigeni per lo sviluppo di un vaccino contro *Burkholderia cenocepacia*

Responsabile: Prof.ssa Silvia Buroni.

La sorprendente resistenza agli antibiotici del patogeno *B. cenocepacia* porta all'inefficacia dei trattamenti somministrati per curare queste infezioni. Un approccio innovativo che stiamo utilizzando per ovviare al problema è l'utilizzo della *reverse vaccinology* per l'identificazione di antigeni utili per sviluppare un vaccino efficace nella prevenzione di queste infezioni, grazie alla collaborazione con la Dott.ssa Mariagrazia Pizza e la Dott.ssa Maria Scarselli (GlaxoSmithKline, Siena).

4. Studio del ruolo del regolatore CodY nella virulenza di *Streptococcus agalactiae*

Responsabile: Dott.ssa Giulia Barbieri.

S. agalactiae è un batterio patogeno opportunisto Gram-positivo in grado di causare gravi infezioni neonatali. Per la prevenzione di queste, è fondamentale comprendere i meccanismi che regolano la virulenza di questo microorganismo, in particolare il ruolo del regolatore trascrizionale globale CodY. Questo regolatore, conservato nei Gram-positivi, è stato dimostrato in altre specie batteriche essere coinvolto nel controllo e nell'attivazione di diversi meccanismi legati alla virulenza. Grazie alla creazione di un mutante di *S. agalactiae* difettivo per il gene *codY*, utilizzando un ceppo ipervirulento, è stato possibile dimostrare che CodY è fondamentale per la transizione di questo batterio da commensale a patogeno. L'assenza del gene porta infatti a una diminuzione della virulenza del batterio, come dimostrato con esperimenti *in vivo*, usando un modello di infezione murino, e *in vitro* andando a testare la sua capacità di formare biofilm e aderire e invadere le cellule epiteliali (Pellegrini *et al.*, 2022).

Attività didattica

1. **Tutore** del Laboratorio Integrato di Biotecnologie Molecolari - Modulo di Microbiologia (Responsabile: Dott.ssa Viola Camilla Scoffone) nell'anno accademico 2022/2023, dal 16/11/2022 al 25/11/2022.
2. **Tutore** del Laboratorio Integrato di Biotecnologie Molecolari - Modulo di Microbiologia (Responsabile: Prof.ssa Silvia Buroni) nell'anno accademico 2021/2022, dal 02/12/2021 al 20/12/2021.
3. **Tutore** del Laboratorio Integrato di Biotecnologie Molecolari - Modulo di Microbiologia (Responsabile: Prof.ssa Silvia Buroni) nell'anno accademico 2020/2021, dal 26/11/2020 al 16/12/2020.
4. **Tutore** del Laboratorio Integrato di Biotecnologie Molecolari - Modulo di Microbiologia (Responsabile: Prof.ssa Silvia Buroni) nell'anno accademico 2019/2020, dal 18/11/2019 al 28/11/2019.
5. **Tutore** del Laboratorio Integrato di Biologia Sperimentale - Modulo di Microbiologia (Responsabile: Prof.ssa Maria Rosalia Pasca) nell'anno accademico 2018/2019, dal 07/01/2019 al 21/01/2019.

Supervisore dell'attività sperimentale di due studenti di laurea magistrale in Molecular Biology and Genetics e di tre studenti della laurea triennale in Biotecnologie presso l'Università degli studi di Pavia.

Premi e riconoscimenti

1. Articolo citato come Editor's choice sulla rivista Antibiotics-Basel MDPI nel 2021. Scoffone V.C., Trespidi G., Barbieri G., Irudal S., Perrin E., Buroni S. Role of RND efflux pumps in drug resistance of Cystic Fibrosis pathogens. Antibiotics. 2021; 10:863.

2. Selezione del progetto “Characterization of the mechanism of action and anti-adhesive activity against Gram-negative pathogens of a novel compound boosting the current antimicrobial therapies”, presentato alla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica all’interno del bando “Gianni Mastella Starting Grant 2022”, tra i quattro progetti, su 15 presentati, inviati ai revisori per la valutazione.

Partecipazione a progetti di ricerca

Partecipante al progetto: “One Health Basic and Translational Research Actions addressing Unmet Needs on Emerging Infectious Diseases” (INF-ACT) – Research node 3: Antimicrobial resistance, finanziato con fondi PNRR. PI Unità di Pavia: Prof.ssa Maria Rosalia Pasca (novembre 2022 – febbraio 2026).

Partecipante al progetto: PRIN 2020 20208LLXEJ dal titolo “Escaping the ESKAPEs: integrated pipelines for new antibacterial drugs” finanziato dal Ministero Italiano dell’Università e della Ricerca. PI Unità di Pavia: Prof.ssa Silvia Buroni. (aprile 2022 – marzo 2025).

Partecipante al progetto: PRIN 2017 20177J5Y3P dal titolo “Next generation antibacterials: new targets for old drugs and new drugs for old targets” finanziato dal Ministero Italiano dell’Università e della Ricerca. PI Unità di Pavia: Prof.ssa Giovanna Riccardi e Edda De Rossi. (settembre 2019 – settembre 2023).

Produzione scientifica

Autore di **11** pubblicazioni su riviste internazionali peer reviewed, di cui **2** pubblicazioni come primo autore. Autore di **13** comunicazioni a congressi nazionali e internazionali.

Indicatori bibliometrici (calcolati il 08/03/2023)

Scopus: H-index = 5; Citazioni totali = 171