

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 Alessio Bocedi, qualifica Professore Associato afferente al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Interno: Settore G Livello 1 Stanza 1, Tel. 0672594378, email: bcdlss01@uniroma2.it

CHIEDE

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: Scienze Chimiche Area per la quale si presenta la richiesta (selezionare solo una delle due):

Innovazione

Green

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

Nome dell'Ente finanziatore pubblico o privato: IRCCS Fondazione G.B. Bietti

Persona di Riferimento: Dott. Diego Sbardella, Telefono: 3206428881

Email: diego.sbardella@fondazionebietti.it

Fondi di ricerca dipartimentali

Progetto di Ricerca (massimo 10.000 battute complessive spazi inclusi) che comprenda

Titolo: Green repurposing strategy for neurodegenerative disease

Descrizione del Progetto:

La citicolina, anche nota come CDP-colina, è un farmaco nootropo che trova largo impiego clinico nella terapia del glaucoma, un termine che definisce una famiglia di neuropatie ottiche croniche progressive caratterizzate da alterazioni morfologiche della testa del nervo ottico e dello strato delle fibre nervose retiniche, e morte delle cellule ganglionari retiniche (CGRs), in assenza di altre malattie oculari acquisite o congenite.

Nonostante il meccanismo farmacologico di azione sia attualmente sconosciuto, l'utilizzo della citicolina è sostenuto dall'efficacia nel ritardare la progressione della riduzione dell'acuità visiva, e da un eccezionale profilo di sicurezza, utile a massimizzare l'aderenza alla terapia del paziente.

Le proprietà chimico-fisiche della molecola suggeriscono che possa interagire con il metabolismo lipidico, agendo da precursore per la sintesi della fosfatidilcolina, e con pathways preposti al mantenimento dell'omeostasi redox.

Più recentemente, la citicolina è stata riportata essere un modulatore allosterico del proteasoma 20S ($K_d \cong 100$ nM), il complesso catalitico multisubunità del sistema ubiquitina proteasoma (UPS). Tramite la degradazione delle proteine, i pathways proteolitici intracellulari, UPS e autofagia, rappresentano dei sofisticati meccanismi molecolari di controllo dell'omeostasi proteica.

Non a caso, alterazioni dell'attività dell'UPS sono riportate in patologie neurodegenerative caratterizzate dall'accumulo di proteine danneggiate e/o amiloidogeniche.

Pertanto, in ambito farmacologico, l'identificazione di molecole che siano in grado di stimolare l'attivazione funzionale dell'UPS rappresenta un promettente obiettivo per contrastare l'evoluzione di percorsi neurodegenerativi.

In virtù di analogie cliniche e molecolari circa l'eziopatogenesi di glaucoma e morbo di Alzheimer, secondo un principio di "green repurposing strategy", obiettivi della seguente linea di ricerca sono:

- 1) completare la caratterizzazione funzionale dell'attività neuroprotettiva della citicolina in modelli sperimentali in vitro ed ex vivo, al fine di prevedere un'estensione della sua sperimentazione clinica ad ulteriori patologie neurodegenerative;
- 2) sintetizzare derivati della citicolina, attraverso l'aggiunta di gruppi funzionali, che possano essere avviati in una pipeline di sviluppo di nuovi farmaci ad attività neuroprotettiva.

Obiettivi formativi:

Il dottorando lavorerà a stretto contatto con Ricercatori sia dell'Università che dell'impresa coinvolta (IRCCS Fondazione Bietti), svolgendo periodi continuativi nei rispettivi laboratori, acquisendo quindi una "expertise", che spazierà fra la Biochimica, la Biologia Cellulare, la Chimica Farmaceutica e la proteomica.

Attività previste:

Studi biochimici:

- Modulazione funzionale di particelle di proteasoma (26S, immunoproteasoma e complessi 20S:Insulin-Degrading Enzyme (IDE), una peptidasi ad attività chaperon-like) nei confronti di peptidi sintetici e substrati macromolecolari da parte della citicolina. Particolare attenzione verrà riposta nei confronti di proteine amiloidogeniche (es., peptide β -amiloide, huntingtina (poly-Q length > 45 residui) e il dominio Microtubule Binding Domain (MBD) della proteina Tau). Complessi 20S:IDE, la cui formazione è stata documentata ex vivo ed in vivo, sembrano presentare spiccata affinità per oligomeri solubili di proteine amiloidogeniche. Tali studi verranno allestiti utilizzando IDE wild-type, IDE_E111Q (cataliticamente inattivo) e IDE_R767A (privo della capacità di costituire dimeri, una forma oligomerica dell'enzima ritenuta importante per la modulazione funzionale del proteasoma e per l'attività chaperon-like). L'analisi del processamento dei vari substrati, sintetici e non, qui proposta, si avvarrà di approcci di spettrofluorimetria, elettroforesi su gel, filter-trap assay, e, in particolare, di spettrometria di massa.

Modelli sperimentali cellulari

- SH-SY5Y (linea cellulare umana di derivazione neuronale) sottoposte a differenziamento tramite acido retinoico e, in seguito, stimulate con terreno condizionato di cellule (cho-7PA2 o cellule



H4-APP^{swe}) che over-esprimono stabilmente una forma mutata della proteina APP e che rilasciano costitutivamente oligomeri nativi del peptide amiloidogenico A β nel terreno. Tali cellule verranno trattate con differenti concentrazioni di citicolina, prima dell'esposizione agli oligomeri solubili tossici e durante il trattamento stesso, secondo uno schema ed un dosaggio che verrà stabilito tramite studi di screening preliminari. In tale modello cellulare verrà ulteriormente indagato il ruolo di IDE, mediante silenziamento genico dell'enzima e mediante trasfezione delle cellule con plasmidi codificanti per i mutanti E111Q e R767A.

- Retinal Ganglion Cells (RGCs) di derivazione murina saranno transfettate con plasmidi che esprimono l'optineurina (OPTN) wild-type e optineurina con mutazione E50K, una mutazione ad elevata prevalenza in forme giovanili di glaucoma, che rende la proteina amiloidogenica.

In entrambe le condizioni sperimentali proposte verrà saggiata l'attività neuroprotettiva della citicolina attraverso analisi: i) della proliferazione delle cellule (MTT, CyQuant assay); ii) l'induzione di apoptosi (Western blotting e TUNEL assay); iii) del turnover e la deposizione di A β e OPTN nei differenti stati conformazionali (monomeri, oligomeri, aggregati) attraverso tecniche elettroforetiche, filter-trap assay, saggi di co-immunoprecipitazione, saggi di microscopia ad immunofluorescenza. Tali indagini saranno accompagnate da analisi funzionali di particelle di proteasoma tramite saggi specifici, quali il proteasome assay su estratti citosolici, native-gel electrophoresis accoppiato a Western blotting.

Sintesi chimica – Medicinal Chemistry

Derivati sintetici della citicolina verranno sintetizzati introducendo sostituenti del residuo citidinico. Si studierà ad esempio la possibilità di introdurre sostituenti cationici o anionici, per modulare le interazioni elettrostatiche della citicolina con i residui carichi del proteasoma. Potrà inoltre essere valutata l'introduzione di residui aventi l'informazione molecolare adatta a guidare l'orientamento della citicolina verso i siti del proteasoma di interesse.

Nella prima fase della pipeline di sviluppo del composto, verrà saggiata l'attività modulatoria nei confronti delle particelle di proteasoma secondo quanto descritto precedentemente. La sperimentazione su modelli cellulari verrà riservata alla/e molecole per le quali sarà possibile documentare: a) un miglioramento dell'affinità di interazione con il proteasoma 20S di almeno 1 ordine di grandezza rispetto a quanto osservato per la molecola originale, secondo studi funzionali in vitro; b) un incremento statisticamente significativo (in termini di confronto di "relative activities"), rispetto alla citicolina, delle prestazioni catalitiche del proteasoma 20S nei confronti di almeno uno dei substrati macromolecolari amiloidogenici.

Attinenza del progetto all'area indicata:

La modulazione dell'UPS trova applicazioni nel settore della "green repurposing strategy", ovvero l'applicazione di farmaci già approvati dagli organismi regolatori internazionali, quali EMA e FDA, per scopi differenti da quelli per i quali sono stati originariamente sviluppati, con il vantaggio di accorciare significativamente il tempo necessario per autorizzarne l'impiego clinico. Il progetto offre la possibilità di investigare a livello molecolare, sulla base di traguardi scientifici già raggiunti dai proponenti, il ruolo di un farmaco, la citicolina, in un ambito più generale, connesso al turnover proteico. La scelta di tale farmaco è stata dettata da considerazioni pratiche, dato che la citicolina presenta requisiti, quali la sicurezza e tollerabilità, particolarmente adatti alla gestione clinica di pazienti con un profilo di aderenza alle terapie potenzialmente complesso, come quelli affetti da neurodegenerazione.

Per quanto riguarda gli aspetti di medicinal chemistry, l'eccellente affinità di legame per il proteasoma rende la citicolina un potenziale lead compound, sul cui scaffold realizzare derivati con proprietà chimico-fisico-biologiche ottimizzate per il target biologico che vengano avviati ad una pipeline di sviluppo industriale.

Risultati attesi:

L'esecuzione degli studi qui proposti è finalizzata a porre le basi per una successiva sperimentazione del farmaco in modelli preclinici di neurodegenerazione. Inoltre, la delucidazione ulteriore del meccanismo di azione biologica del farmaco è attesa avere significativi risvolti nella pianificazione di approcci farmacologici integrati di terapie in regime combinato.

I dati biochimici, già oggetto di approfonditi studi nel caso del proteasoma 20S isolato, consentono di prevedere una significativa attività modulatoria della citicolina nei confronti di specifiche particelle di proteasoma. Al fine della sperimentazione, qui proposta, è di cruciale rilievo definire se la potenziale attività modulatoria sia in grado di promuovere la clearance di proteine amiloidogeniche, il cui smaltimento, soprattutto nelle fasi precoci di fibrillazione, ovvero la deposizione di oligomeri solubili tossici, è un indirizzo farmacologico di interesse per rallentare il decorso clinico delle malattie neurodegenerative.

L'allestimento di modelli sperimentali cellulari, rappresentativi di insulti proteotossici a carattere neurodegenerativo, è finalizzato a definire il ruolo neuroprotettivo della citicolina mediante l'attivazione di pathways, quali l'UPS e l'autofagia, ritenuti responsabili del turnover delle proteine amiloidogeniche.

Infine, un obiettivo di rilievo è quello di sviluppare, mediante un approccio di medicinal chemistry, un derivato sintetico della citicolina con proprietà biologiche ottimizzate per la stimolazione del sistema UPS e per il miglioramento dell'omeostasi proteica in previsione sempre di una sua applicazione nel campo delle malattie neurodegenerative.

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: IRCCS Fondazione G.B. Bietti per lo Studio e la Ricerca in Oftalmologia – ONLUS (Sede Legale: Via Livenza 3, 00198 Roma).

Firma

Alessio Bocedi

