



DOTTORATO INTERNAZIONALE
IN NEUROFARMACOLOGIA

Anno VI. Numero 1.
Gennaio-Marzo 2013

Rivista trimestrale on-line

IL PROMETEO



Bollettino di Dottorato

Direttore: Prof. Filippo Drago



DOTTORATO
INTERNAZIONALE
DI
NEUROFARMACOLOGIA

Università degli Studi di Catania

**Dipartimento di Biomedicina
Clinica e Molecolare**

Sezione di Farmacologia e Biochimica

Viale Andrea Doria, 6 - Catania

Tel.: +39 095 7384237
Tel.: +39 095.7384238

il_prometeo@email.it
<http://www.unict.it/dfsc>

RIORGANIZZAZIONE MOLECOLARE DEI COMPLESSI mRNA-PROTEINA (RNPS) CONTENENTI PROTEINE DELLA FAMIGLIA "X FRAGILE RELATED (FXR)" E SUO RUOLO NELLA SINTESI PROTEICA REGOLATA DA FMRP



In questi due anni del Dottorato di Ricerca Internazionale in Neurofarmacologia ho svolto la mia attività di ricerca presso l'Istituto di Neuroscienze del CNR di Catania (ISN-CNR), nel laboratorio e sotto la supervisione della Dott.ssa Maria Vincenza Catania. Il progetto di ricerca affidatomi è incentrato sullo studio della formazione dei "granuli di stress" e del loro possibile ruolo nella sopravvivenza cellulare utilizzando come modello astrociti in coltura ottenuti da topi normali (wild type, WT) e Fmr1 Knock out (KO), il modello animale più accreditato della Sindrome del cromosoma X Fragile (FXS). Con questo progetto intendiamo approfondi-

dire alcuni aspetti della fisiopatologia della FXS e nello stesso tempo comprendere meglio l'importanza e la funzione dei granuli di stress. La FXS è la forma più comune di disabilità mentale ereditaria ed è causata dalla mancanza dell'espressione della proteina FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) a seguito del silenziamento trascrizionale del gene FMR1. FMRP è una proteina che lega gli RNA implicata in diversi aspetti del metabolismo dell'RNA, quali trasporto, regolazione della traduzione e stabilità. FMRP e i suoi paraloghi FXR1P e FXR2P fanno parte di una piccola famiglia di proteine, altamente conservata, che legano gli RNA. Le tre proteine

interagiscono tra di loro, ma il significato di questa interazione è poco chiaro. A livello citoplasmatico FMRP è stata riscontrata in particolari strutture citoplasmatiche dette "granuli di stress" (SGs), che rappresentano complessi ribonucleoproteici di reclutamento degli mRNA che si formano quando la cellula è in condizioni di stress. Durante uno stress la sintesi proteica viene bloccata, gli mRNA vengono reclutati all'interno dei granuli di stress e così preservati. Fattori di inizio della traduzione, come eIF2 e varie proteine che legano gli RNA, tra le quali FMRP, partecipano alla formazione dei SGs. Per via della funzione svolta, si ritiene che i SGs possano avere un ruolo protettivo impedendo l'apoptosi, ma la reale connessione tra SGs e sopravvivenza cellulare è ancora da comprendere. L'importanza di queste strutture di tipo ribonucleoproteico è emersa negli ultimi anni anche in relazione alla possibilità che la loro persistenza a seguito di uno stress cronico possa essere correlata allo sviluppo di inclusioni citoplasmatiche insolubili contenenti proteine che legano gli RNA riscontrate in numerose malattie neurodegenerative. Numerosi studi indicano che i recettori metabotropici per il glutammato (mGlu) sono coinvolti nella fisiopatologia della Sindrome del cromosoma X fragile. È noto che l'attivazione del recettore metabotropico per il glutammato stimola il trasporto degli mRNA mediato da FMRP e incrementa la sintesi proteica, ma non è mai stato studiato il suo ruolo nella formazione dei SGs e in particolare se la sua attivazione influenza l'equilibrio "SGs - sintesi proteica" che si crea nel corso di uno stress. L'attività di ricerca è stata focalizzata sulla realizzazione di diversi obiettivi: i) verificare se la formazione dei granuli di stress risulta alterata in assenza di FMRP; ii) verificare se, in assenza di FMRP gli astrociti, sono maggiormente sensibili a diversi tipi di stress (stress termico e ossidativo); iii) verificare se la stimolazione con agonisti dei recettori metabotropici per il glutammato mGlu5 altera la formazione dei granuli di stress e la sensibilità cellulare allo stress. Abbiamo utilizzato varie tecniche di laboratorio, quali immunocitochimica, analisi di Western blot, microscopia confocale, saggi MTT; tutti gli esperimenti sono stati condotti su colture astrogliali WT e Fmr1 KO che rappresentano il modello in vitro da noi utilizzato per studiare e visualizzare chiaramente la formazione dei granuli di stress. Per indurre la formazione dei granuli, abbiamo sottoposto le colture cellulari a vari tipi di stress (Sodio Arsenite, NaAsO₂, Perossido d'idrogeno H₂O₂, calore, 43°C). Una serie di esperimenti ha previsto il trattamento di alcuni campioni con DHPG ((S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine) un agonista del recettore mGlu5 prima dell'esposizione agli agenti stressanti. Abbiamo osservato una differenza nel numero di cellule che presentano granuli in seguito all'esposizione allo stress ossidativo e al calore tra colture WT e KO, in particolare abbiamo evidenziato una scarsa presenza di cellule con granuli di stress nei topi Fmr1KO rispetto ai WT. Inoltre, la vitalità cellulare dopo stress era ridotta maggiormente nei KO rispetto ai controlli. L'attivazione del recettore mGlu5 prima dell'esposizione allo stress riduce il

numero di cellule con SGs nei WT ma non negli astrociti Fmr1 KO; inoltre il pre-trattamento con DHPG amplifica il danno indotto dallo stress solo nelle colture WT, ma non ha alcun effetto nei KO. Per chiarire ulteriormente il coinvolgimento del recettore in questo processo, abbiamo studiato i livelli di fosforilazione del fattore d'inizio della traduzione eIF2. Quando si verifica una condizione di stress il fattore eIF2 viene fosforilato da una serie di chinasi e in questa sua forma fosforilata dà il via alla formazione dei SGs reclutando tutti gli mRNA disponibili. Abbiamo verificato se l'attivazione del recettore mGlu influenza P-eIF2 e quindi la formazione dei SGs. Abbiamo notato che incubando le colture con il DHPG seguito dalla NaAsO₂ si ha una riduzione dei livelli di fosforilazione di eIF2 negli astrociti WT, mentre negli astrociti FMR1 KO lo stress non induce la fosforilazione del fattore. Inoltre in queste condizioni sperimentali abbiamo notato una riduzione dei livelli di fosforilazione della proteina FMRP che ci suggerisce un mancato reclutamento della proteina nei SGs. Infatti attivando il recettore e sottoponendo subito dopo le cellule ad uno stress, si ha una riduzione della co-localizzazione delle proteine TIA-1 e FXR nei WT, invece negli Fmr1 KO sembra non esserci nessuna co-localizzazione. Questi primi due anni di dottorato sono stati a mio giudizio molto formativi sia da un punto di vista laboratoristico e di ricerca di base, sia da un punto di vista teorico, aspetti entrambi necessari per fornire a noi giovani ricercatori un profilo altamente professionale. Infatti oltre a dedicarmi alla realizzazione del progetto di ricerca, ho anche partecipato insieme ai miei colleghi ad una serie di lezioni frontali tenute da ricercatori e professori universitari su varie tematiche, che mi hanno permesso di incrementare le mie conoscenze. Inoltre nel programma della scuola di dottorato sono frequenti seminari e congressi tenuti da ricercatori affermati in tutto il mondo. Questi eventi sono fondamentali poichè danno la possibilità di interpretare la ricerca su orizzonti più ampi oltre a rappresentare un importante momento di confronto di idee tra i partecipanti. Sono particolarmente entusiasta delle possibilità che questo dottorato mi sta offrendo per la mia formazione nel campo delle Neurofarmacologia e delle Neuroscienze. La formazione che ho ricevuto sia di tipo sperimentale che didattico mi ha fatto crescere come ricercatore e mi ha permesso di apprezzare sempre più il valore della ricerca. Oltre alla esperienza quotidiana del laboratorio e dei meeting di tipo didattico, ho infatti avuto modo di partecipare già a ben tre congressi internazionali tra i più prestigiosi nelle nostre discipline e di ascoltare personalmente le lectures dei più importanti esperti nel settore. Inoltre, ho avuto il piacere di vedere selezionato il nostro abstract alla 8th Brain Research Conference, evento satellite della Società Americana di Neuroscienze dedicata al tema "RNA Metabolism in neurological Disease".

Barbara Di Marco

Abstract

Pharmacokinetics of a new subcutaneous diclofenac formulation administered to three body sites: quadriceps, gluteus, and abdomen

Salomone S, Piazza C, Vitale DC, Cardì F, Gugliotta B, Drago F.

Objective: To assess the relative bioavailability of a new subcutaneous (SC) diclofenac hydroxypropyl β -cyclodextrin (HPbCD) formulation administered to three body sites: quadriceps, gluteus, and abdomen. **Materials and methods:** This was a pilot, single-dose, randomized, three-way crossover relative bioavailability study. A total of 12 healthy subjects received a single SC injection of diclofenac HPbCD 50 mg/1 mL in the quadriceps, gluteus, or abdomen. **Results:** The AUC was comparable after SC diclofenac HPbCD in the quadriceps, gluteus, and abdomen. The C_{max} was comparable after SC administration in the quadriceps or abdomen, and ~ 17% higher in the gluteus. The absorption was rapid (30 minutes) after administration of the treatment at any site. The treatment was well tolerated. **Conclusions:** The relative bioavailability of SC diclofenac HPbCD was comparable when administered to the quadriceps, gluteus, and abdomen. The new diclofenac formulation can therefore be administered subcutaneously to any of these sites without clinically significant differences. A further adequately powered study would be necessary to reveal any differences among injection sites in terms of peak plasma concentration.



PACAP and VIP increase the expression of myelin-related proteins in rat schwannoma cells: Involvement of PAC1/VPAC2 receptor-mediated activation of PI3K/Akt signaling pathways

Castorina A, Scuderi S, D'Amico AG, Drago F, D'Agata V.

PACAP and its cognate peptide VIP participate in various biological functions, including myelin maturation and synthesis. However, defining whether these peptides affect peripheral expression of myelin proteins still remains unanswered. To address this issue, we assessed whether PACAP or VIP contribute to regulate the expression of three myelin proteins (MAG, MBP and MPZ, respectively) using the rat schwannoma cell line (RT4-P6D2T), a well-established model to study myelin gene expression. In addition, we endeavored to partly unravel the underlying molecular mechanisms involved. Expression of myelin-specific proteins was assessed in cells grown either in normal serum (10% FBS) or serum starved and treated with or without 100nM PACAP or VIP. Furthermore, through pharmacological approach using the PACAP/VIP receptor antagonist (PACAP6-38) or specific pathway (MAPK or PI3K) inhibitors we defined the relative contribution of receptors and/or signaling pathways on the expression of myelin proteins. Our data show that serum starvation (24h) significantly increased both MAG, MBP and MPZ expression. Concurrently, we observed increased expression of endogenous PACAP and related receptors. Treatment with PACAP or VIP further exacerbated starvation-induced expression of myelin markers, suggesting that serum withdrawal might sensitize cells to peptide activity. Stimulation with either peptides increased phosphorylation of Akt at Ser473 residue but had no effect on phosphorylated Erk-1/2. PACAP6-38 (10 μ M) impeded starvation- or peptide-induced expression of myelin markers. Similar effects were obtained after pre-treatment with the PI3K inhibitor (wortmannin, 10 μ M) but not the MAPKK inhibitor (PD98059, 50 μ M). Together, the present finding corroborate the hypothesis that PACAP and VIP might contribute to the myelinating process preferentially via the canonical PI3K/Akt signaling pathway, providing the basis for future studies on the role of these peptides in demyelinating diseases.

Pharmacokinetic characterization of tizanidine nasal spray, a novel intranasal delivery method for the treatment of skeletal muscle spasm.

Vitale DC, Piazza C, Sinagra T, Urso V, Cardì F, Drago F, Salomone S.

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The skeletal muscle relaxant tizanidine is approved by the US FDA and the European Medicines Agency for treating spasticity and is supplied as tablets for oral administration. However, tizanidine has a poor bioavailability, due to extensive first-pass metabolism. Therefore, the nasal route of administration, which bypasses portal circulation, may increase the bioavailability of tizanidine and, possibly, reduce the time to peak plasma concentration, thereby shorting the latency of therapeutic effect. The objective of this study was to evaluate the pharmacokinetic profile of tizanidine nasal spray and compare it to the profile of tizanidine oral tablets.

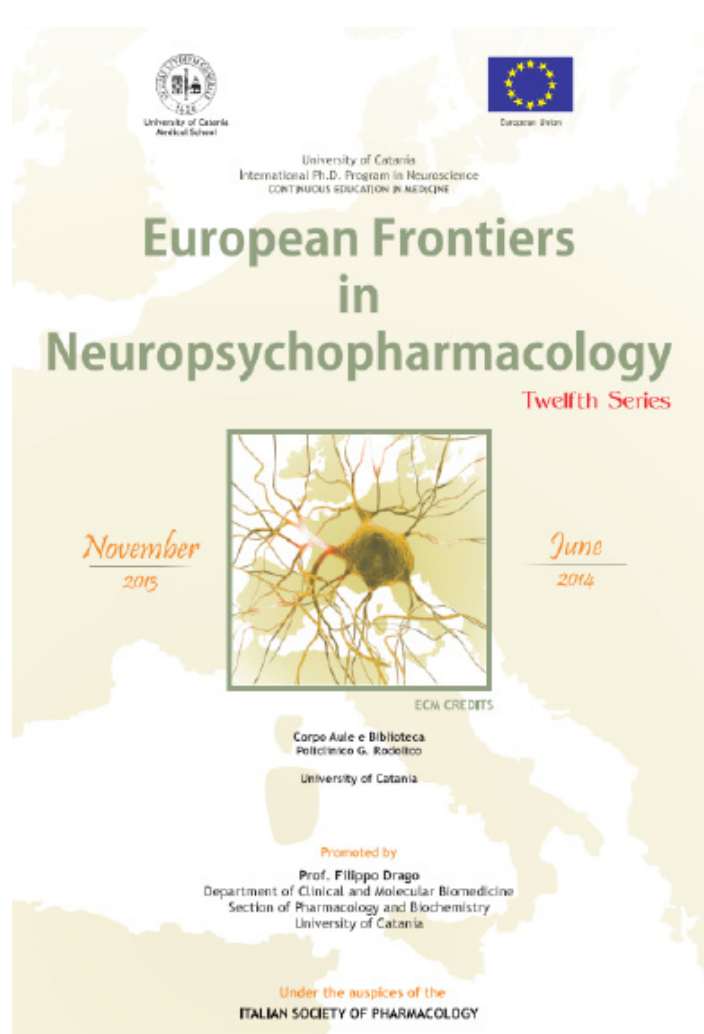
METHODS: This open-label, phase I study comprised two protocols: protocol 1, tizanidine HCl solution (32.73 mg/mL) intranasally at single doses of 2 and 4 mg versus 4 mg tizanidine oral tablets (randomized, three periods crossover, 12 healthy subjects); and protocol 2, tizanidine HCl solution (16.36 mg/mL) intranasally at a single dose of 1 mg vs. 4 mg tizanidine oral tablets (randomized, two periods crossover, 12 healthy subjects, one dropout). Tizanidine plasma concentrations were determined by liquid chromatography/mass spectrometry.

RESULTS: There was a linear relationship between different dosages of intranasal formulation and the area under the concentration-time curve and maximum plasma concentration (C_{max}). The relative bioavailability of the different dosages of intranasal formulation were 1.29, 1.93, and 4.23 for 1, 2, and 4 mg intranasal administration, respectively. Comparison of C_{max} values gave the following ratios: 0.91, 1.39, and 2.73, for 1, 2, and 4 mg intranasal administration, respectively. The mean time to C_{max} (t_{max}) was 0.99, 0.43, and 0.63 h for 1, 2, and 4 mg intranasal administration, respectively, whereas it was 1.13 and 1.30 h for the two series of 4 mg tizanidine oral tablets.

CONCLUSIONS: The bioavailability of the tizanidine intranasal formulation was higher than that of tizanidine oral tablets. The t_{max} was also shorter with the intranasal formulation. No serious adverse events occurred throughout the study, such that the two formulations resulted equally well-tolerated. The intranasal formulation of tizanidine results are therefore worthy of subsequent clinical testing in phase II.



International PhD Program in Neuropharmacology



Novembre Giugno

CATANIA

AULA MAGNA

CORPO AULE E BIBLIOTECA

A.O.U. "V. EMANUELE - POLICLINICO"