



IL PROMETEO



Bollettino di Dottorato

Direttore: Prof. Filippo Drago

Attività della Dottoranda SCUDERI SORAYA iscritta al terzo anno del corso di Dottorato Internazionale in Neurofarmacologia (XXVII CICLO)



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>

Nel corso dei due anni, come previsto dal progetto formativo del Dottorato Internazionale in Neurofarmacologia, la Dott.ssa Scuderi Soraya è stata indirizzata ad un arricchimento formativo e professionale, al fine di poter disporre degli strumenti conoscitivi necessari ad affrontare l'attività di ricerca.

Una serie di attività si sono delineate lungo il percorso: didattica frontale, seminari tematici, autoformazione (ap-

profondimenti bibliografici), colloqui e progettazione con il Tutor, incontri Journal club, conferenze, corsi teorico-pratici, retreat e non ultime la 10a ed 11a edizione della Summer School di Neuroscienze organizzata dal Prof.re Filippo Drago.

La dottoranda Soraya Scuderi iscritta al terzo anno si è dedicata con grande entusiasmo ed efficacia, allo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi della retinopatia diabetica, ed in particolare all'evento infiammato-

rio e alla possibilità che alcuni peptidi siano in grado di prevenire e/o limitare il danno a carico della retina, compiendo studi in vitro ed in vivo. Nonostante gli enormi passi avanti nella gestione dell'iperglicemia e dell'ipertensione, la retinopatia diabetica rimane infatti una delle più importanti complicanze oculari del diabete mellito e rappresenta la principale causa di cecità nei soggetti in età lavorativa dei paesi industrializzati.

L'attività di ricerca in vitro è stata sviluppata presso il Dipartimento di Scienze Bio-Mediche, sez Anatomia ed Istologia dell'Università di Catania, sotto la supervisione del Tutor Prof.ssa Velia D'Agata. Oggetto di studio è stato il danno a carico della membrana emato-retinica esterna indotto dall'iperglicemia e dall'evento infiammatorio. Sono stati impiegati la linea cellulare di epitelio pigmentato retinico immortalizzata di uomo (ARPE19), supporti semipermeabili detti transwells, condizioni di coltura mimanti l'evento infiammatorio (e.g. IL-1) e l'iperglicemia, due peptidi a nota funzione retinoprotettiva PACAP e VIP e sono state così valutate vitalità, apoptosi, integrità della barriera ematoretinica esterna mediante metodiche biochimiche, biomolecolari, saggi di permeabilità e misurazione della resistenza elettrica trans epiteliale.

I dati ottenuti dal gruppo di ricerca hanno dimostrato che la sommatoria degli eventi, iperglicemia ed infiammazione, è determinante per la compromissione dell'integrità della barriera emato retinica esterna e induce un alterato pattern di espressione proteica delle principali molecole costituenti le tight junctions (Zo-1, claudin-1). I peptidi saggiati si sono rivelati capaci di promuovere la vitalità cellulare delle ARPE19 e di impedire l'alterazione dell'integrità dell'epitelio.

L'attività di ricerca in vivo è stata portata avanti in collaborazione con il Dipartimento di Biomedicina Clinica e Molecolare, Sezione di Farmacologia e Biochimica dell'Università di Catania, nella figura del Prof.re Claudio Bucolo. È stato sviluppato un modello di diabete precoce per valutare l'evento infiammatorio e lo stato di neurodegenerazione della retina di ratti dopo 3 settimane dalla somministrazione di streptozotocina (STZ 60 mg/Kg). Nonostante lo stato precoce di diabete, i ratti mostrano un significativo danno a carico della retina. Infatti monitorando i geni coinvolti nella morte apoptotica, è stato registrato un

aumento nell'espressione dei geni proapoptotici a discapito di quelli antiapoptotici. Dall'analisi western blot affiancata ad uno studio di distribuzione tissutale, con microscopia confocale, è stato possibile dimostrare la modificazione del pattern di espressione dei principali membri della famiglia della citochina IL-1, protagonisti dell'evento infiammatorio. In particolar modo si assiste ad un aumento dei recettori IL-1RI e IL-1RII e della citochina IL-1 ed un'alterazione della loro distribuzione nei diversi strati retinici dei ratti trattati con la STZ. Queste evidenze identificano nei membri della famiglia IL-1 elementi chiave nella cascata pro infiammatoria che consegue all'iperglicemia responsabile del danno retinico, e questo suggerisce nuovi target terapeutici per il trattamento della retinopatia diabetica. Nello studio in vivo è stato investigato il ruolo retino-protettivo del peptide NAP dal danno indotto dall'iperglicemia. Il peptide esercitata la sua azione retino protettiva riducendo l'evento apoptotico, attraverso l'inattivazione della caspasi 3 esecutrice ed attivando una tra le più importanti vie di segnalazione di sopravvivenza cellulare, MAPK/ERK pathway.

La dottoranda è stata, inoltre, coinvolta in un progetto complementare alla sua tematica di ricerca quale il delivery di farmaci in oftalmologia, nel quale si è occupata di eseguire saggi di permeabilità di diverse formulazioni per uso oftalmico sia su cellule di epitelio corneale che di epitelio pigmentato retinico ed in uno studio riguardante la proteina PARK2. L'impegno nell'attività di ricerca ha portato a diverse pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

Soraya Scuderi

Abstract

Ameliorative effect of PACAP and VIP against increased permeability in a model of outer blood retinal barrier dysfunction

Soraya Scuderia,^{a,b}, Agata Grazia D'Amico,^{a,b}, Alessandro Castorina,^a

Rosa Imbesia, Maria Luisa Carnazza, Velia D'Agata

^a Department of Bio-Medical Sciences, University of Catania, Catania, Italy

^b International Neuropharmacology Ph.D. program, University of Catania

Breakdown of the outer blood retinal barrier (BRB) due to the disruption of tight junctions is one of the main factors accounting for diabetic macular edema (DME), a common clinical manifestation of diabetic retinopathy (DR). Previous studies have shown that PACAP and VIP are protective against several types of retinal injuries. However, whether these peptides are involved in maintenance of outer BRB function during DME remains to be elucidated. Here, using an *in vitro* model of DME, we explored the effects of both PACAP and VIP. Human retinal pigment epithelial cells (ARPE19) were cultured for 26 days either in normal glucose (NG, 5.5 mM) or in high glucose (HG, 25mM). In addition, to mimic the inflammatory aspect of the diabetic milieu, HG cells were also treated with IL-1 (HG + IL-1). Effects of PACAP or VIP on cells permeability were evaluated by measuring both apical-to-basolateral movements of fluorescein isothiocyanate (FITC) dextran and transepithelial electrical resistance (TEER). Expression of tight junction-related proteins (zonula occludens-1, occludin and claudin-1, respectively) were evaluated by Western blot analyses. Results demonstrated that cells grown in HG + IL-1 show significantly increased FITC-dextran diffusion, which is paralleled by a decrease in TEER when compared to NG cultures. Treatment with either PACAP or VIP reversed both of these effects. Furthermore, the reduction of claudin-1 and ZO-1 expression observed in cell cultures grown in HG + IL-1 was totally reversed by PACAP and, to a minor extent, by VIP. Finally, occludin expression was not affected in any of the experimental conditions tested. In conclusion, these findings show that PACAP and VIP counteract HG + IL-1-induced damage in ARPE19 cells, suggesting that both peptides might be relevant to the maintenance of outer BRB function in DME, possibly through the modulation of proteins related to tight junctions integrity.

Homology Modeling of Dopamine D2 and D3 Receptors: Molecular Dynamics Refinement and Docking Evaluation

Chiara Platania

Dopamine (DA) receptors, a class of G-protein coupled receptors (GPCRs), have been targeted for drug development for the treatment of neurological, psychiatric and ocular disorders. The lack of structural information about GPCRs and their ligand complexes has prompted the development of homology models of these proteins aimed at structure-based drug design. Crystal structure of human dopamine D3 (hD3) receptor has been recently solved. Based on the hD3 receptor crystal structure we generated dopamine D2 and D3 receptor models and refined them with molecular dynamics (MD) protocol. Refined structures, obtained from the MD simulations in membrane environment, were subsequently used in molecular docking studies in order to investigate potential sites of interaction. The structure of hD3 and hD2L receptors was differentiated by means of MD simulations and D3 selective ligands were discriminated, in terms of binding energy, by docking calculation. Robust correlation of computed and experimental K_i was obtained for hD3 and hD2L receptor ligands. In conclusion, the present computational approach seems suitable to build and refine structure models of homologous dopamine receptors that may be of value for structure-based drug discovery of selective dopaminergic ligands (disease, cardiovascular disease) and healthy subjects.

Regulation of intraocular pressure in mice: Structural analysis of dopaminergic and serotonergic systems in response to cabergoline

Chiara Platania

Elevated intraocular pressure (IOP) is the main recognized risk factor of glaucoma. To investigate the contri-

bution of dopaminergic and serotonergic systems in IOP regulation, we used cabergoline, a mixed dopamine and serotonin agonist, in C57BL/6J WT and dopamine D3 receptor knock-out D3R(-/-) mice with normal eye pressure or steroid-induced ocular hypertension. Furthermore, we studied the structural basis of the cabergoline-mediated activation of the dopaminergic and serotonergic systems by molecular modeling. Topical application of cabergoline, significantly decreased, in a dose-dependent manner, the intraocular pressure in WT mice, both in an ocular normotensive group (-9, -5 and -2mmHg with 5%, 1%, and 0.1%, respectively) and an ocular hypertensive group, with a prolonged effect in this latter group. No change of intraocular pressure was observed after topical application of cabergoline in D3R(-/-) mice. We modeled and optimized, with molecular dynamics, structures of hD3, h5HT1A and h5HT2A-C receptors; thereafter we carried out molecular docking of cabergoline. Docking revealed that binding of cabergoline into D3 and 5HT1A receptors is associated with a better desolvation energy in comparison to 5HT2A-C binding. In conclusion, the present study support the hypothesis that dopaminergic system is pivotal to regulate IOP and that D3R represents an intriguing target in the treatment of glaucoma. Furthermore, the structure-based computational approach adopted in this study is able to build and refine structure models of homologous dopaminergic and serotonergic receptors that may be of interest for structure-based drug discovery of ligands, with dopaminergic selectivity or with multi-pharmacological profile, potentially useful to treat optic neuropathies.



International PhD Program in Neuropharmacology

University of Catania
International Ph.D. Program in Neuroscience
CONTINUOUS EDUCATION IN MEDICINE

European Frontiers
in
Neuropsychopharmacology
Twelfth Series

November
2015

June
2014

ECAA CREDITS

Corpo Aule e Biblioteca
Policlinico G. Rodolico
University of Catania

Promoted by
Prof. Filippo Drago
Department of Clinical and Molecular Biomedicine
Section of Pharmacology and Biochemistry
University of Catania

Under the auspices of the
ITALIAN SOCIETY OF PHARMACOLOGY

Novembre Giugno

CATANIA

AULA MAGNA

CORPO AULE E BIBLIOTECA

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