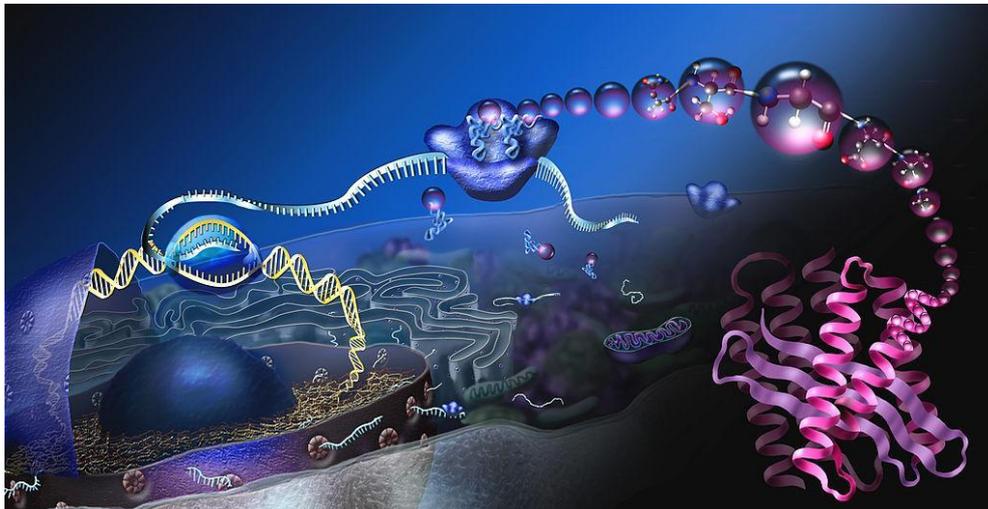


Scheda della proposta di progetto 1: mRNA nelle cellule dei mammiferi

Sei il ricercatore numero 1. Il tuo compito è ottenere finanziamenti per indagare l'utilizzo degli acidi ribonucleici messaggeri (mRNA) modificati per lo studio della funzione proteica nelle cellule di mammiferi viventi. Usa le informazioni di seguito per argomentare la tua richiesta di finanziamento.

Proponiamo di sviluppare mRNA modificato (progettato e prodotto in laboratorio) per l'espressione proteica nei sistemi cellulari dei mammiferi viventi. Ciò migliorerebbe significativamente lo studio della funzione proteica.

Il DNA è un materiale di archiviazione. È come un database di tutto ciò che una cellula può essere o fare. L'mRNA è la forma attiva del codice che controlla tutte le proteine e i metaboliti prodotti in un determinato momento nella cellula. Creando il codice mRNA per una proteina di interesse e portando quel codice alla cellula, potremmo studiare la sua funzione all'interno delle cellule per ottenere nuove informazioni utili sul funzionamento delle proteine. Ciò ci consentirebbe di studiare le proteine nel loro contesto naturale in sistemi viventi e non solo isolate all'interno di una provetta.

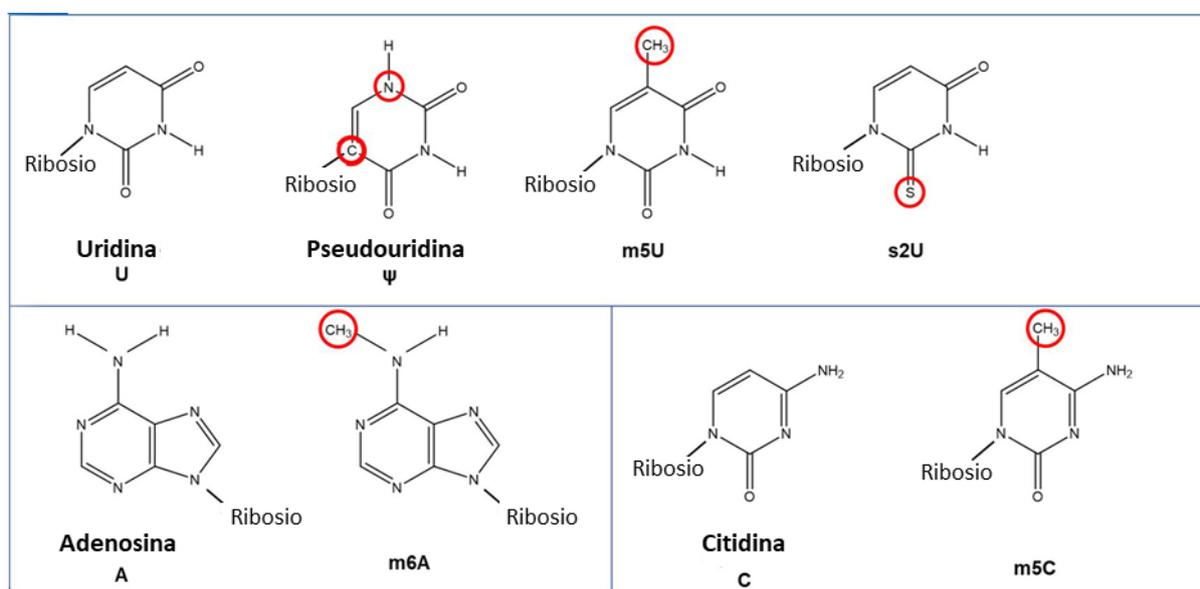


Dal DNA all'RNA alla proteina

Con i nostri studi precedenti su altre proteine abbiamo ottenuto una verifica teorica per la produzione di proteine ingegnerizzate dall'mRNA inserite nelle cellule, ma abbiamo anche sperimentato importanti rallentamenti correlati alla stabilità del codice mRNA, una volta inserito nelle cellule di un organismo vivente. In precedenza, una serie di sequenze codificanti mRNA veniva creata e inserita in cellule umane isolate, portando ad un aumento significativo

della produzione proteica nell'89% delle cellule. Tuttavia, una volta introdotto in un organismo, il codice si deteriorava e non sopravviveva abbastanza a lungo per funzionare.

Stiamo chiedendo un finanziamento per studiare la modifica chimica dei nucleosidi che compongono il codice mRNA per renderlo più stabile all'interno delle cellule di un organismo vivente. Ciò permetterebbe una produzione stabile di proteine bersaglio, utilizzando il sistema nervoso centrale come caso modello. Riteniamo che una lieve modifica chimica potrebbe proteggere il codice mRNA dal sistema di difesa dell'ospite, che lo riconosce come estraneo e ne causa il deterioramento. È importante sottolineare che i nostri dati preliminari suggeriscono che le cellule ospite riconosceranno ugualmente l'mRNA modificato e tradurranno il codice in una proteina funzionale



Esempi di modifiche chimiche ai nucleosidi dell'mRNA. Si noti che quando viene aggiunto uno zucchero di ribosio ad una base azotata per formare un nucleoside, il nome cambia: adenina→adenosina, guanina→guanosina, citosina→citidina, uracile→uridina

Immagine gentilmente concessa dagli autori

Verranno sintetizzate una serie di molecole di mRNA per studiare se la stabilità dell'mRNA può essere migliorata per consentire la produzione a lungo termine di proteine, comprese le proteine ingegnerizzate, nei sistemi dei mammiferi. Verranno utilizzate proteine ingegnerizzate che codificano per mRNA unite a una proteina fluorescente per consentirci di tracciare la produzione proteica da ciascun mRNA modificato e misurare la stabilità dell'mRNA in base al tempo in cui la proteina continua a essere prodotta. Il segnale di fluorescenza ci consentirà inoltre di studiare dove nell'organismo viene prodotta la proteina, per verificare se possiamo indirizzare l'mRNA in posizioni specifiche.

Questo studio avrà un impatto significativo sulla più ampia comunità scientifica, fornendo un'opportunità unica per studiare la funzione proteica nelle cellule viventi e consentire l'espressione stabile di proteine clinicamente importanti.



Argomentazioni chiave

- Questa è una nuova ricerca e potrebbe avere infinite possibilità.
- Questo lavoro fornirebbe informazioni utili sulle proprietà degli acidi nucleici e sul processo fondamentale di traduzione delle proteine.
- Se riuscissimo a sviluppare un sistema efficiente per aggiungere mRNA esterni alle cellule per indurle a produrre nuove proteine, questo aprirebbe nuove strade per lo studio della funzione proteica attraverso le discipline biologiche. Ad esempio, potrebbe essere utilizzato per comprendere meglio i ruoli che le diverse proteine svolgono in patologie come il cancro.
- Se riuscissimo a portare efficacemente l'mRNA ingegnerizzato in un sistema di cellule viventi, potremmo copiare il processo per altre sostanze biochimiche? Se standardizzassimo l'approccio, potrebbe essere utilizzato nei laboratori di tutto il mondo.
- Questa ricerca potrebbe anche consentire lo sviluppo di sistemi cellulari artificiali, lavorando insieme ad altri elementi ingegnerizzati per creare una cellula vivente e funzionante. Sarà necessaria una collaborazione interdisciplinare con i colleghi delle reti internazionali per trasformare tutto ciò in realtà.

Scheda della proposta di progetto 2: sincrotroni e simulazioni

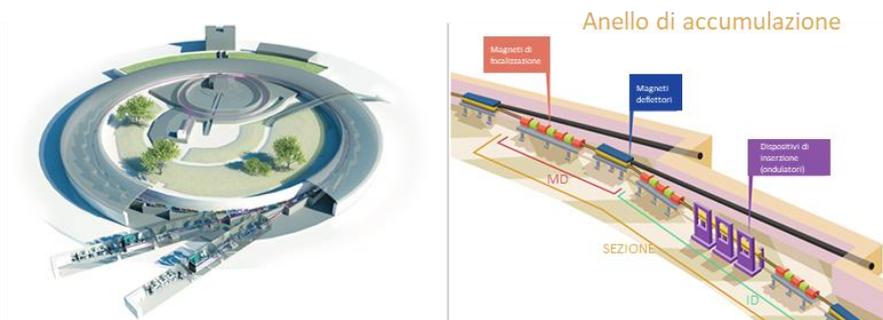
Sei il ricercatore numero 2. Stai cercando di ottenere finanziamenti per sviluppare metodi per individuare le strutture chimiche. Usa le informazioni di seguito per argomentare la tua richiesta di finanziamento.

Per capire il mondo, dobbiamo capire di cosa è fatto, come sono assemblate le sue parti e come interagiscono. La determinazione delle strutture chimiche, insieme alle formule atomiche e al modo in cui gli atomi sono collegati in tre dimensioni, ha una moltitudine di applicazioni dalla paleontologia alla scienza dei materiali e all'elettronica molecolare.

Questo obiettivo può essere raggiunto utilizzando i raggi X. Quando i raggi X vengono irradiati in un cristallo della sostanza che si desidera studiare, il fascio viene diffratto dalle molecole nel cristallo e i modelli di diffrazione risultanti rivelano la forma della molecola. I piccoli diffrattometri a raggi X sono apparecchiature standard in un laboratorio chimico e vengono utilizzati quotidianamente per verificare la struttura di molecole semplici.

Questa tecnica può essere utilizzata anche per proteine e acidi nucleici, che sono grandi biomolecole composte da migliaia di atomi. Tuttavia, risolvere le strutture di molecole così grandi e complesse è molto più difficile che per composti semplici. L'aumento del numero di atomi rende più difficile la penetrazione dei raggi X nel campione; inoltre, i composti biologici sono "fragili" e possono essere distrutti se esposti alle radiazioni per troppo tempo. Non è quindi possibile ottenere strutture di diffrazione di raggi X ad alta risoluzione di biomolecole utilizzando normali diffrattometri da laboratorio.

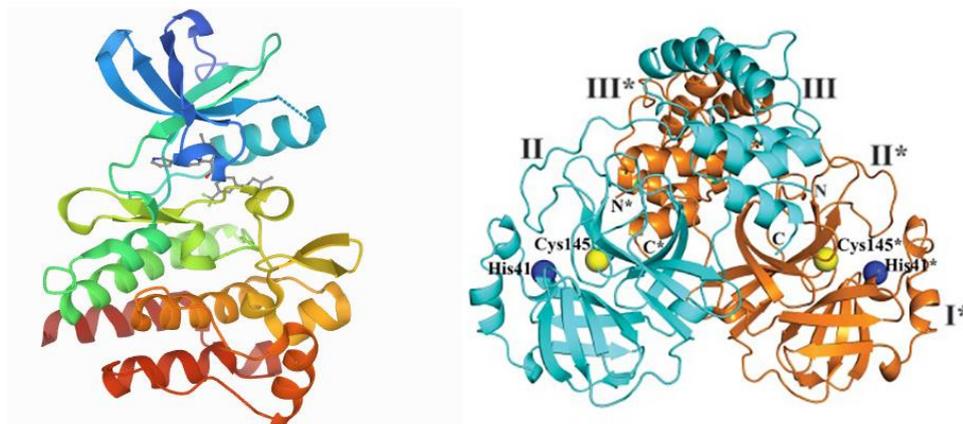
Questo problema potrebbe essere potenzialmente risolto utilizzando i sincrotroni, che sono acceleratori di particelle che accelerano gli elettroni ad alte velocità e quindi cambiano la loro direzione. Questo porta al rilascio di energia sotto forma di raggi X che sono mille volte più potenti dei raggi X di un diffrattometro standard. Questi raggi X più potenti penetrano in profondità nei materiali e possono essere applicati in fasci molto focalizzati, a una lunghezza d'onda specificata e in brevi lampi luminosi.



Schema dell'anello di accumulazione della European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), che evidenzia gli elementi che dirigono e focalizzano gli elettroni

ESRF

Miriammo a utilizzare il finanziamento della ricerca per sviluppare questa tecnica per rivelare la struttura delle proteine complesse. Strutture proteiche precise possono darci informazioni utili su come funzionano o mal funzionano le proteine correlate alle malattie. Ad esempio, potrebbe aiutarci a capire perché una proteina malfunzionante porta al cancro, come agenti patogeni come i virus entrano nelle nostre cellule o come gli anticorpi si legano ai loro antigeni bersaglio. Le informazioni sulla struttura proteica potrebbero anche aiutare lo sviluppo di composti farmacologici che si legano alle proteine per modificarne la funzione.



Esempi di strutture proteiche ottenute mediante diffrazione di raggi X. A sinistra: l'enzima ABL chinasi umano (ID PDB: [3CS9](#)), che è spesso mutato nella leucemia, legato al farmaco per la leucemia Nilotinib. A destra: una struttura recentemente risolta dell'enzima proteasi SARS-CoV-2 (ID PDB: [6Y2E](#)).

La proteasi SARS-CoV-2 adattata da Zhang L, Sun X, Hilgenfeld R (2020) Science 368:409–412..

Se siamo in grado di ottenere informazioni strutturali ad alta risoluzione, vorremmo anche utilizzarle per costruire modelli computazionali per simulazioni per aiutare a sviluppare e testare teorie relative alla funzione proteica nella salute e nella malattia.

Argomentazioni chiave

- L'uso dei sincrotroni ci consentirebbe di ottenere strutture molecolari più dettagliate di molte sostanze importanti.
- Avere informazioni strutturali dettagliate è fondamentale per la progettazione di molecole per diverse applicazioni.
- Questa tecnica potrebbe aiutarci a comprendere meglio le funzioni di importanti biomolecole, come le proteine.
- Le informazioni strutturali sulle proteine correlate alle malattie potrebbero fornire informazioni utili sullo sviluppo di farmaci per queste malattie.
- Non si sa dove potrebbe portarci l'analisi delle proteine correlate alla malattia in termini di assistenza sanitaria e medicina preventiva.

Scheda della proposta di progetto 3: produzione dei vaccini

Sei il ricercatore numero 3. Il tuo obiettivo è ottenere un finanziamento per un nuovo approccio di produzione dei vaccini attraverso l'utilizzo di polinucleotidi. Usa le informazioni di seguito per argomentare la tua richiesta di finanziamento.

L'obiettivo di questa proposta di ricerca è lo sviluppo di un processo per la purificazione su larga scala dei polinucleotidi per migliorarne la produzione per vaccini e altre applicazioni biomediche. È di fondamentale importanza che siano disponibili quantità sufficienti di polinucleotidi altamente purificati per il processo di produzione dei vaccini. I polinucleotidi sono i componenti attivi dei vaccini a DNA e RNA, codificano per la proteina che innesca lo sviluppo di anticorpi specifici per la malattia di interesse. Generalmente, in laboratorio, i polinucleotidi vengono purificati utilizzando tecniche di precipitazione o colonne filtranti con centrifugazione. Queste tecniche non sono adatte per la produzione su larga scala per una serie di motivi, tra cui:

- Uso di sostanze chimiche pericolose che rappresentano un rischio per la sicurezza di chi produce polinucleotidi
- Difficoltà a produrne in grandi quantità
- Poca purezza dei polinucleotidi finali, che li rende pericolosi per la somministrazione nell'uomo
- Bassa resa dei polinucleotidi finali, che li rende costosi da produrre



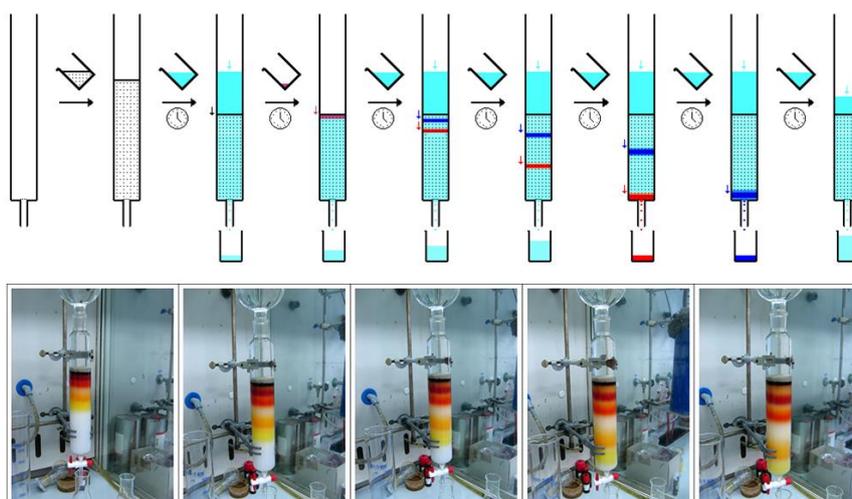
Illustrazione in 3D di RNA a filamento singolo

nobeastsofierce/Shutterstock.com

Tra i polinucleotidi, le molecole di RNA sono particolarmente difficili da purificare a sufficienza. Sono molecole grandi e instabili, sensibili alla rottura e al deterioramento. Sono anche suscettibili alla contaminazione da impurità, come il DNA. Più il contaminante è simile, più è difficile separarlo dal prodotto.

La cromatografia è una tecnica che separa i componenti di una miscela composta in base a come interagiscono con una fase stazionaria, ad esempio una resina. È un metodo altamente efficiente e modulare per la purificazione dei polinucleotidi, ma richiede un ulteriore sviluppo. Esistono molti tipi di cromatografia, ad esempio cromatografia di affinità, di interazione idrofobica, in fase inversa, a scambio anionico e a scambio cationico. Per purificare sufficientemente i polinucleotidi, può essere necessario combinare uno o più tipi.

Ciascun tipo di cromatografia può utilizzare diversi tipi di resina. Le resine sono in genere uno degli elementi più costosi del processo di produzione dei vaccini. Pertanto, è importante selezionare la resina più efficiente per l'applicazione. Anche parametri come temperatura, pH e portata influiscono sulle prestazioni della procedura cromatografica. È importante identificare una combinazione sicura di questi parametri che consenta al processo di purificazione di fornire polinucleotidi altamente purificati senza danneggiare o perdere grandi quantità di delicate molecole polinucleotidiche.



Schema (in alto) e fotografie (in basso) della cromatografia su colonna, che mostrano la separazione di diversi componenti da una miscela

Fotografie di [Alexiots A. Zlatich/Wikimedia, CC BY-SA 3.0](#)

Per migliorare la purificazione dei polinucleotidi, si cerca di finanziare lo sviluppo di una piattaforma di purificazione cromatografica che massimizzerà la purezza e la resa dei polinucleotidi e minimizzerà il costo del processo di purificazione. La piattaforma sarà applicabile a tutte le molecole di RNA prodotte utilizzando la trascrizione in vitro, che è il modo più comune per produrre RNA per i vaccini.



La cromatografia moderna viene in genere eseguita con macchine automatizzate (a destra) ed è spesso combinata con la spettrometria di massa (a sinistra) per analizzare i componenti separati.

Immagine gentilmente concessa da Rosaria Cercola

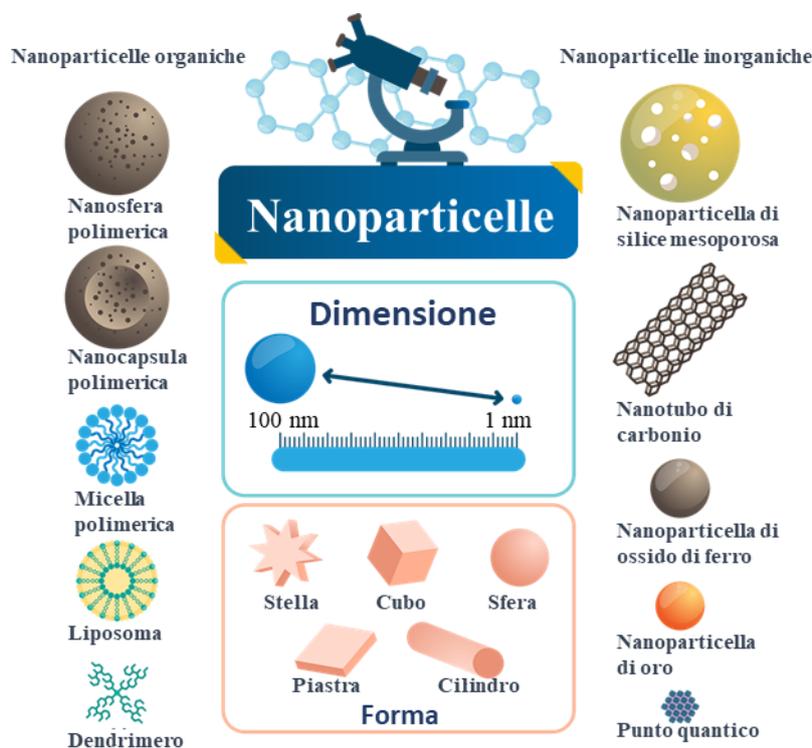
Argomentazioni chiave

1. La produzione di polinucleotidi altamente purificati è un passaggio fondamentale nella produzione di vaccini polinucleotidici come molti vaccini COVID-19 che sono sicuri per la somministrazione negli esseri umani.
2. Sono necessarie grandi quantità di mRNA altamente puro per produrre dosi di vaccino a RNA sufficienti per inoculare e proteggere un'ampia percentuale della popolazione mondiale, il che è particolarmente importante durante una pandemia.
3. Lo sviluppo di un processo standard di purificazione dei polinucleotidi aiuterà in futuro il rapido sviluppo di nuovi vaccini polinucleotidici o altri farmaci polinucleotidici.

Scheda della proposta di progetto 4: incapsulamento di nanoparticelle

Sei il ricercatore numero 4. Il tuo obiettivo è ottenere un finanziamento per studiare l'utilizzo di lipidi per aiutare la somministrazione di farmaci. Usa le informazioni di seguito per argomentare la tua richiesta di finanziamento.

Molti farmaci mostrano alti livelli di tossicità per le cellule (citotossicità), che possono causare gravi effetti collaterali. Inoltre, le molecole dei farmaci sono soggette a deterioramento metabolico quando somministrate, il che significa che devono essere utilizzate dosi maggiori e più frequenti (che, a sua volta, aumenta il rischio di effetti collaterali). Ciò porta a rischi inaccettabili per i pazienti, che potrebbero essere ridotti al minimo attraverso nuove strategie di somministrazione dei farmaci. Proponiamo la sintesi chimica di nuovi lipidi ionizzabili che potrebbero essere potenzialmente utilizzati per incapsulare molecole di farmaci impacchettandole in sfere protette note come nanoparticelle.



Panoramica dei diversi tipi di nanoparticelle

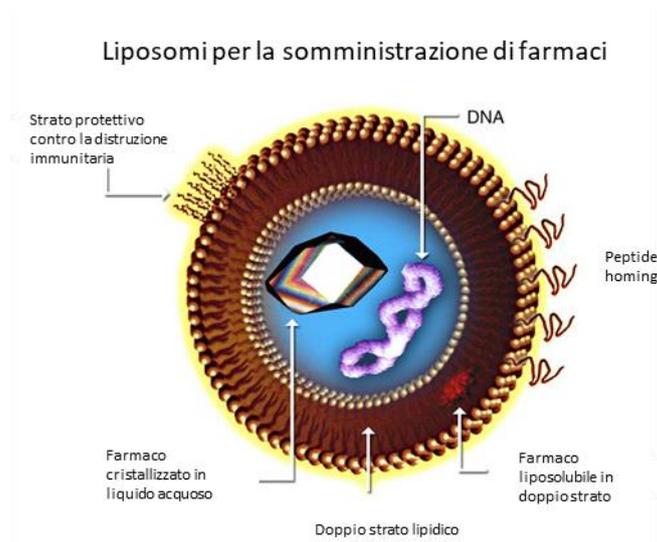
VectorMine/Shutterstock.com

Attraverso la chimica sintetica moderna, verrà preparata e testata una selezione di liquidi ionici per verificarne l'idoneità ad agire come veicolanti di farmaci attraverso la formazione di

nanoparticelle. Questo lavoro accoppierà varie molecole di varie catene di carbonio con ammine di base per creare una libreria di lipidi applicabili.

Nello specifico, si propone di generare nuovi lipidi ionizzabili che non possiedono una carica positiva permanente, ma possono diventare cationici in condizioni fisiologiche (ad esempio nel flusso sanguigno). Sfrutteremo la chimica per preparare una libreria di lipidi ionici fondamentalmente nuovi contenenti gruppi amminici ionizzabili, per generare una varietà di nanoparticelle differenti. L'obiettivo dello studio sarà mettere a punto la basicità dei gruppi amminici per fornire lipidi caricati positivamente in grado di trasportare molecole di farmaci anioniche ai tessuti bersaglio. Oltre alla sintesi di candidati per questi liquidi ionici, un passaggio chiave è la purificazione e la determinazione della struttura di queste molecole. Questa informazione è fondamentale per altri chimici per poter riprodurre la sintesi chimica.

Successivamente, studieremo la loro idoneità per la formazione di nanoparticelle e studieremo le dimensioni e la stabilità delle nanoparticelle in condizioni fisiologiche. Studieremo inoltre l'incorporazione di molecole di farmaci con carica negativa. Questo è importante perché molti farmaci moderni contengono cariche negative che sono caratteristiche degli acidi carbossilici o degli acidi fosforici. Questi ultimi sono importanti nelle strutture basate sul DNA e sull'RNA che potrebbero diventare farmaci in futuro. Si prevede che questo approccio aprirà nuove strade verso la somministrazione selettiva di farmaci, in particolare per il rilascio di molecole cariche all'interno o attraverso le membrane cellulari o il tessuto adiposo.



Nanoparticella lipidica (liposoma) per la somministrazione di farmaci o acidi nucleici

Kosi Gramatikoff/Wikimedia, Public Domain



www.scienceinschool.org

Argomentazioni chiave

- Questa è una nuova ricerca e potrebbe avere infinite possibilità.
- Se lo studio avrà successo, potremmo essere in grado di ridurre gli effetti collaterali tossici dei trattamenti medici o somministrare dosi più basse di medicinale.
- Potremmo essere in grado di creare una libreria di sostanze chimiche che sono fisiologicamente stabili nel corpo. Questa libreria sarà aperta agli scienziati di tutto il mondo, in modo che possano utilizzarla per un'ampia gamma di applicazioni.