



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE BIOMEDICHE
E NEUROMOTORIE

Modulo richiesta borsa di studio per attività di ricerca post-laurea

TUTOR

Elisabetta Ciani

TITOLO DEL PROGETTO

LACTOCOCCUS LACTIS COME SISTEMA DI DELIVERY PER TERAPIA PROTEICA NEL DISORDINE DA DEFICIT DI CDKL5

DESCRIZIONE DEL PROGETTO DI RICERCA

Il Disordine da deficit di CDKL5 (CDKL5 Deficiency Disorder, CDD) è una rara patologia del neurosviluppo legata al cromosoma X, causata da mutazioni nel gene CDKL5 e dalla conseguente perdita di funzione della proteina omonima. La malattia esordisce precocemente con epilessia farmacoresistente, grave disabilità intellettiva, alterazioni motorie e disturbi gastrointestinali, con un impatto rilevante sulla qualità di vita dei pazienti e delle loro famiglie. Attualmente non sono disponibili trattamenti in grado di correggere i deficit neurologici e comportamentali associati alla carenza di CDKL5.

La terapia proteica sostitutiva rappresenta un approccio razionale per le malattie monogeniche, ma nel caso di CDKL5 incontra importanti limitazioni: difficoltà di produzione della proteina in vitro, scarsa stabilità, costi elevati di produzione e purificazione e necessità di somministrazioni ripetute, spesso invasive. Per superare questi ostacoli, il progetto propone l'impiego di batteri lattici ingegnerizzati come sistemi di produzione e rilascio in vivo della proteina terapeutica.

In particolare, *Lactococcus lactis* sarà utilizzato come 'fabbrica biologica' per produrre e secernere nel tratto gastrointestinale la proteina di fusione TATk-CDKL5. Il dominio TAT favorisce l'attraversamento delle membrane cellulari e la distribuzione della proteina ai tessuti periferici e centrali. Dati preliminari indicano che proteine di fusione TAT prodotte da *L. lactis* possono essere assorbite a livello intestinale e raggiungere diversi organi, incluso il cervello, sostenendo la fattibilità dell'approccio (Medici et al., 2025; DOI: 10.1186/s13036-025-00538-4).

L'obiettivo generale è sviluppare e validare una piattaforma terapeutica non invasiva per la CDD basata sulla produzione in vivo di CDKL5. Il progetto prevede: (i) l'ottimizzazione dell'espressione e della secrezione di TATk-CDKL5 in *L. lactis*; (ii) la valutazione della biodistribuzione della proteina dopo somministrazione orale dei batteri ingegnerizzati nel modello murino *Cdkl5* knockout; (iii) l'analisi preliminare dell'efficacia del trattamento, con particolare attenzione alla funzione gastrointestinale, allo sviluppo cerebrale e al comportamento.

Saranno impiegate tecniche di biologia molecolare, coltura batterica, biochimica e biologia cellulare per ottimizzare la produzione della proteina e verificarne secrezione, stabilità, internalizzazione e attività biologica. I risultati costituiranno la base per i successivi studi in vivo di biodistribuzione ed efficacia terapeutica. Se validata, la piattaforma potrà essere adattata anche ad altre malattie genetiche rare caratterizzate da deficit proteico.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE BIOMEDICHE
E NEUROMOTORIE

DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DEL BORSISTA DI RICERCA

L'attività del borsista sarà svolta sotto la supervisione del tutor e sarà focalizzata sull'ottimizzazione della proteina terapeutica CDKL5 e sulla validazione preliminare del sistema di espressione e delivery basato su *Lactococcus lactis*.

Obiettivo dell'attività

Sviluppare una versione ottimizzata della proteina TATk-CDKL5 compatibile con l'espressione e la secrezione in *L. lactis* e valutarne la produzione e la funzionalità in vitro.

1. Ottimizzazione della proteina CDKL5

- supporto alla progettazione di varianti della proteina CDKL5, incluse forme troncate e stabilizzate;
- analisi delle regioni disordinate e identificazione dei domini funzionali essenziali;
- supporto alla generazione dei costrutti di espressione per le varianti di TATk-CDKL5.

2. Ottimizzazione dell'espressione in *Lactococcus lactis*

- clonaggio dei costrutti in vettori di espressione costitutiva;
- trasformazione e coltura di ceppi di *L. lactis*, inclusi ceppi proteasi-deficienti;
- confronto di differenti segnali di secrezione;
- valutazione dell'espressione e della secrezione mediante Western blot e analisi biochimiche.

3. Valutazione funzionale in vitro

- analisi dell'internalizzazione della proteina TATk-CDKL5 in cellule eucariotiche;
- valutazione dell'attività chinasi mediante analisi di target specifici, tra cui EB2;
- studio della stabilità della proteina secreta nel mezzo di coltura.

4. Analisi preliminare per l'espansione della piattaforma

- analisi bioinformatica per identificare ulteriori proteine terapeutiche compatibili con il sistema;
- valutazione preliminare di target alternativi;
- definizione di criteri di selezione basati su dimensione, stabilità, secrezione e complessità strutturale.

Risultati attesi

- identificazione di una o più varianti ottimizzate di TATk-CDKL5;
- dimostrazione dell'espressione e della secrezione della proteina in *L. lactis*;
- evidenza preliminare della stabilità e dell'attività biologica della proteina in vitro;
- definizione di una strategia per la selezione di ulteriori target proteici.

SEDE PREVALENTE ATTIVITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie
Piazza di Porta San Donato 2, 40126 Bologna

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE BIOMEDICHE
E NEUROMOTORIE

Commissione proposta <i>3 Commissari + 1 Supplente</i>	Elisabetta Ciani
	Stefania Trazzi
	Giorgio Medici
	Sandra Guidi (supplente)

Scheda attività assistenziale (se prevista)

ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DEL BORSISTA DI RICERCA/N. ORE SETTIMANA (max 18 ore settimanali)
AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI SI SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it