



**Fondazione per la Ricerca  
sulla Fibrosi Cistica - ETS**  
fibrosicisticaricerca.it

## AREA 1

**Terapie e approcci innovativi per correggere  
il difetto di base, genetica**



### Progetto FFC#2/2022

**Caratterizzazione del meccanismo di azione di  
modulatori di CFTR attraverso tecniche di analisi  
chimica, come la marcatura indotta da foto-attivazione**



**Chi ha condotto la ricerca:**

*Responsabile: Fabio Bertozzi*  
(D3-PharmaChemistry, Istituto Italiano di  
Tecnologia - IIT, Genova)



**Ricercatori coinvolti: 5**



**Qual è la durata dello studio: 1 anno**

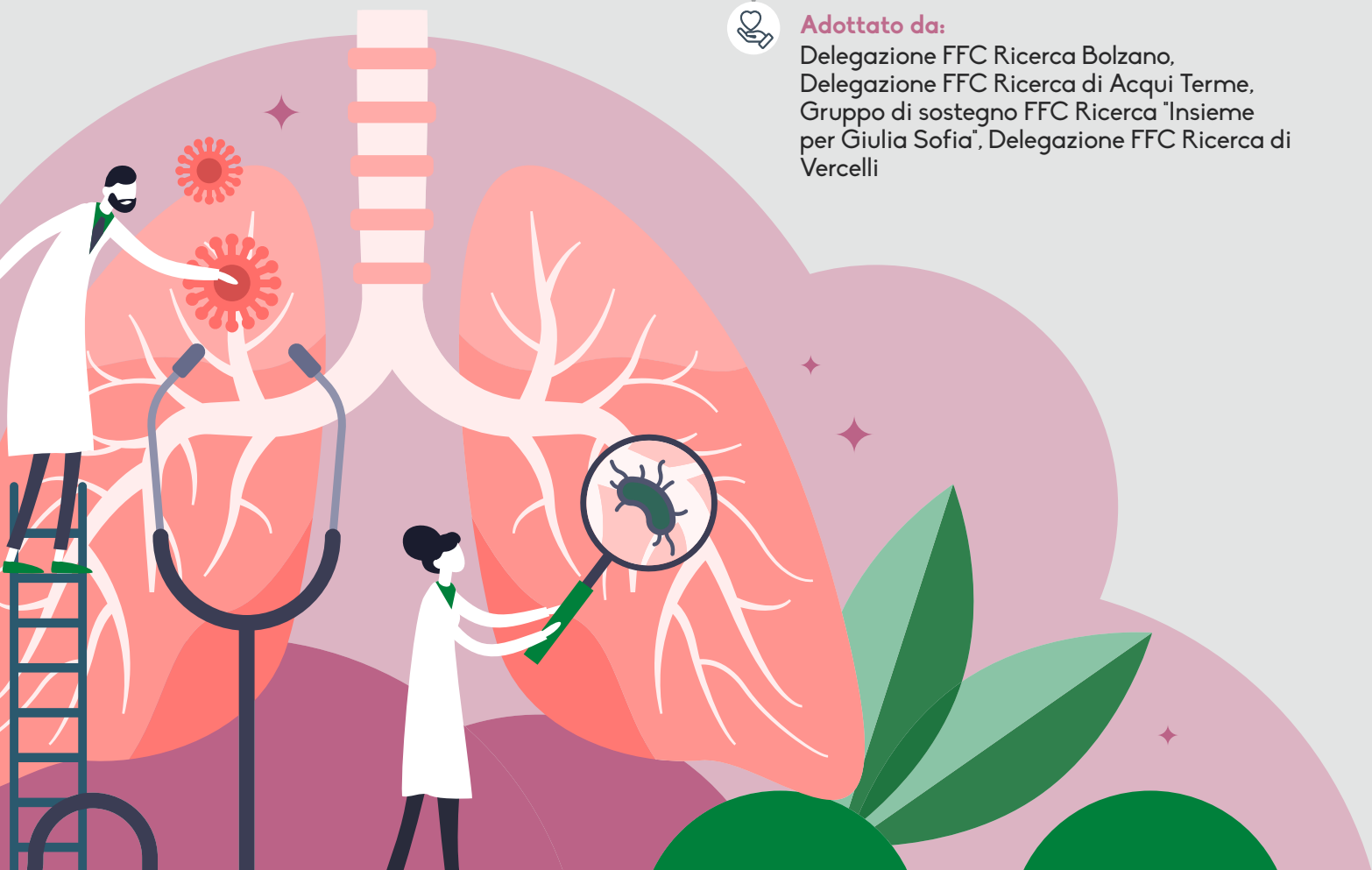


**Finanziamento: € 63.000**



**Adottato da:**

Delegazione FFC Ricerca Bolzano,  
Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme,  
Gruppo di sostegno FFC Ricerca "Insieme  
per Giulia Sofia", Delegazione FFC Ricerca di  
Vercelli





## Perché è importante

All'interno del progetto *Task Force for Cystic Fibrosis* è stato scoperto ARN23765, un correttore di CFTR con un'elevata potenza nel recuperare la funzione della proteina mutata in cellule epiteliali bronchiali da persone con fibrosi cistica (FC) omozigoti per la mutazione F508del (cioè portatori della mutazione su entrambe le copie del gene CFTR). Per meglio caratterizzare ARN23765 e rafforzarne il profilo come candidato allo sviluppo preclinico per il trattamento della FC, il gruppo di ricerca si è proposto di identificare a livello molecolare il suo meccanismo d'azione e il sito di interazione con il suo target biologico.



## Che cosa hanno usato i ricercatori

È stato usato l'approccio biochimico di Photo-Affinity Labeling (PAL), messo a punto nel precedente progetto FFC#4/2020, per mostrare, nelle cellule viventi, l'interazione tra ARN23765 e il canale CFTR. Per identificare le regioni specifiche della proteina CFTR coinvolte nell'azione di ARN23765 sono stati effettuati studi computazionali e funzionali. Inoltre, sono stati condotti esperimenti di mutagenesi, in cui inserendo mutazioni in siti specifici del DNA di CFTR si possono evidenziare le sequenze essenziali per la correzione indotta da ARN23765. Negli studi, sono state usate cellule FC con mutazione F508del-CFTR.



## Che cosa hanno fatto i ricercatori

Attraverso sonde chimiche strutturalmente correlate a ARN23765, foto-attivabili e con una porzione in grado di legarsi a CFTR, è stato indagato in cellule integre il meccanismo d'azione del correttore. Inoltre, sono stati condotti studi funzionali con specifici domini di CFTR per permettere di identificare le porzioni proteiche coinvolte nella correzione indotta da ARN23765. Infatti, la proteina CFTR è composta da 5 domini: 3 situati nel citoplasma della cellula (NBD1, NBD2 e R domain) e due che attraversano la membrana apicale (MSD1 e MSD2). Infine, sono state effettuate analisi computazionali insieme a esperimenti di mutagenesi per chiarire le basi molecolari dell'interazione di ARN23765 con il suo target biologico.



## Che cosa hanno ottenuto

I dati mostrano che in cellule integre il correttore si lega direttamente a CFTR, stabilizzandola attraverso interazioni specifiche con residui amminoacidici in una regione proteica definita. Gli studi funzionali con i diversi domini di CFTR hanno dimostrato che l'interazione con ARN23765 coinvolge la porzione proteica tra MSD1-NBD1. Il sito di legame di ARN23765 su CFTR è stato chiarito tramite analisi computazionali e studi di mutagenesi, con l'identificazione dei residui amminoacidici coinvolti nell'interazione.



## Che cosa succederà ora

I risultati di questo progetto contribuiscono a chiarire le basi molecolari del recupero dell'attività di CFTR indotta da ARN23765. Ulteriori studi potrebbero indagare potenziali bersagli aggiuntivi di ARN23765 per recuperare la funzione di CFTR.

## Per saperne di più



### Obiettivi

**Approfondire le conoscenze sul meccanismo d'azione della molecola ARN23765, ottenuta dal progetto *Task Force for Cystic Fibrosis*, usando la tecnica di analisi chimica chiamata Photo-Affinity Labeling (PAL)**

In questo progetto, continuazione di FFC#4/2020, il gruppo di ricerca vuole approfondire la conoscenza sui meccanismi di interazione tra il canale CFTR e il correttore ARN23765, ottenuto grazie al progetto strategico *Task Force for Cystic Fibrosis*. All'interno di FFC#4/2020 è stato messo a punto un sistema chiamato Photo-Affinity Labeling (PAL) in grado di mostrare, nelle cellule viventi, l'interazione tra ARN23765 e il canale CFTR, sia mutato (F508del) che normale. In questo nuovo progetto, sempre attraverso l'approccio PAL, il gruppo di ricerca si propone di identificare a livello molecolare il sito di legame tra CFTR e ARN23765 e scoprire il meccanismo attraverso cui avviene la correzione della proteina canale. Saranno inoltre effettuati studi computazionali e funzionali per identificare le regioni della proteina CFTR coinvolte nell'azione di ARN23765. L'identificazione del meccanismo d'azione di ARN23765 contribuirà a rafforzare la prospettiva della molecola di uno sviluppo preclinico per il trattamento della fibrosi cistica. E l'ottimizzazione della tecnica PAL potrà permettere alla strategia di diventare una procedura complementare per lo studio del meccanismo d'azione di altri modulatori di CFTR.



### Risultati

**In cellule integre, ARN23765 si lega a CFTR e stabilizza la regione proteica MSD1-NBD1**

All'interno del progetto *Task Force for Cystic Fibrosis* è stato scoperto ARN23765, un correttore di CFTR con un'elevata potenza nel recuperare la funzione della proteina mutata in cellule epiteliali bronchiali da persone con fibrosi cistica (FC) omozigoti per la mutazione F508del (cioè portatori della mutazione su entrambe le copie del gene). Per meglio caratterizzare ARN23765 e rafforzarne il profilo come candidato allo sviluppo preclinico per il trattamento della FC, il gruppo di ricerca si è proposto di identificare a livello molecolare il suo meccanismo d'azione e il sito di interazione con il suo target biologico.

Il meccanismo d'azione di ARN23765 è stato studiato in cellule integre attraverso l'approccio biochimico di Photo-Affinity Labeling (PAL), precedentemente usato nel progetto FFC#4/2020 e in grado di mostrare, nelle cellule viventi, l'interazione tra ARN23765 e il canale CFTR. Per identificare le regioni della proteina CFTR coinvolte nell'azione di ARN23765 sono stati effettuati studi computazionali e funzionali, insieme a esperimenti di mutagenesi, che consistono nell'inserire mutazioni in siti specifici del DNA di CFTR per evidenziare le sequenze essenziali alla correzione indotta da ARN23765.

Il meccanismo d'azione di ARN23765 in cellule integre è stato identificato attraverso studi di PAL usando sonde chimiche strutturalmente correlate al correttore. Inoltre, sono stati condotti studi funzionali con specifici domini di CFTR per permettere di identificare le porzioni proteiche coinvolte nella correzione indotta da ARN23765. Infatti, la proteina CFTR è composta da 5

## Per saperne di più



domini: 3 nel citoplasma (NBD1, NBD2 e R domain) e due che attraversano la membrana apicale (MSD1 e MSD2). Infine, sono stati effettuate analisi computazionali insieme a esperimenti di mutagenesi per chiarire le basi molecolari dell'interazione di ARN23765 con il suo target biologico.

L'interazione di ARN23765 con CFTR è stata studiata in cellule FC con mutazione F508del-CFTR. Gli studi funzionali con i diversi domini di CFTR hanno dimostrato che l'interazione con ARN23765 coinvolge la porzione proteica tra MSD1-NBD1. Sono stati identificati i residui amminoacidici coinvolti nell'interazione tra ARN23765 e CFTR.

I risultati di questo progetto contribuiscono a chiarire le basi molecolari del recupero dell'attività di CFTR indotta da ARN23765. I dati mostrano che in cellule integre il correttore si lega direttamente a CFTR, stabilizzandola attraverso interazioni specifiche con residui amminoacidici in una regione proteica definita.

## Rendiconto economico



### AREA 1

#### Terapie e approcci innovativi per correggere il difetto di base, genetica

##### Progetto FFC#2/2022

### Caratterizzazione del meccanismo di azione di modulatori di CFTR attraverso tecniche di analisi chimica, come la marcatura indotta da foto-attivazione



**Responsabile:**

**Fabio Bertozzi**

(D3-PharmaChemistry, Istituto Italiano di Tecnologia - IIT, Genova)



**Periodo:**

01/09/2022-30/11/2023



**Grant assegnato:**

€ 63.000



**Usato per:**

- Materiale di consumo

€ 32.568

- Spese viaggio/convegni

€ 3.767

- Borse di studio

€ 25.000

---

€ 61.335



**Saldo (usato per altri progetti):**

€ 1.665