



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#5/2021

Valutazione *in vitro* di nuovi strumenti per la modifica
(*editing*) sito-specifica di RNA messaggeri per proteina
CFTR con mutazioni stop



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: **Aldo Di Leonardo**
(Dipartimento di Scienze e Tecnologie
Biologiche Chimiche e Farmaceutiche
- STEBICEF, Università degli Studi di
Palermo)



Ricercatori coinvolti: 4



Qual è la durata dello studio: 2 anni

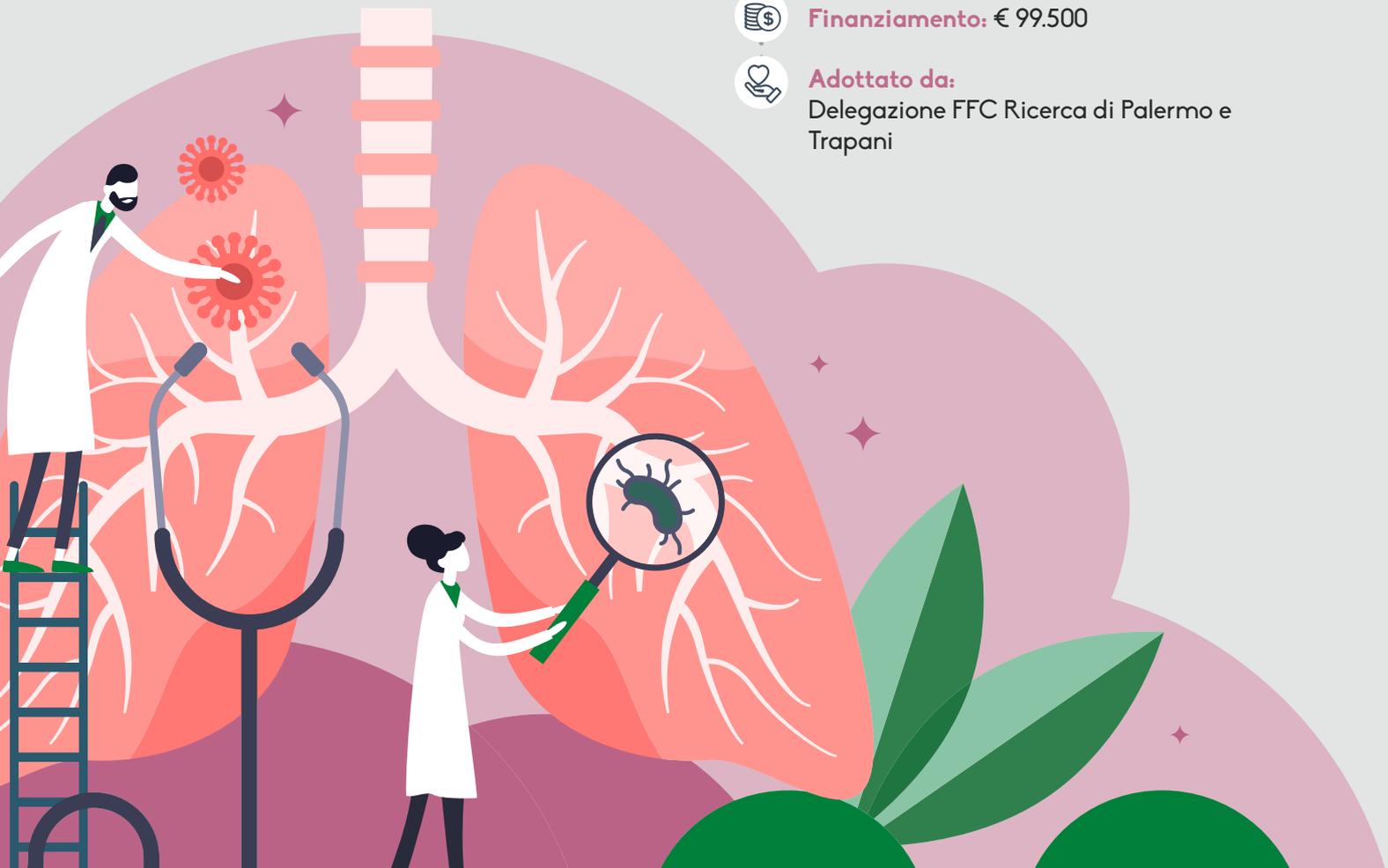


Finanziamento: € 99.500



Adottato da:

Delegazione FFC Ricerca di Palermo e
Trapani





Perché è importante

Le mutazioni stop (o nonsense) introducono un segnale di arresto prematuro nell'RNA messaggero di CFTR, che ha come effetto la produzione di una proteina tronca e non funzionale. Per le persone con fibrosi cistica (FC) che hanno mutazioni stop attualmente non ci sono opzioni terapeutiche approvate. A questo scopo è utile investigare nuove tecniche di terapia genica, specificamente tecniche di *editing* (correzione) sito-specifico di RNA, per correggere il segmento UGA nell'RNA messaggero di CFTR, che funziona da segnale di stop.



Che cosa hanno usato i ricercatori

Sono stati usati due metodi di *editing* di RNA (chiamati minixABE e RESTORE) con l'obiettivo di convertire la A (adenosina) del segmento UGA e ripristinare la lettura completa dell'RNA messaggero. I due metodi sono stati veicolati in cellule umane, in particolare in due tipi di linee cellulari bronchiali: una con la mutazione W1282X e l'altra con G542X. Come trasportatori, sono state usate particelle lipidiche o vettori virali (ossia virus opportunamente modificati in cui viene inserita l'informazione genetica).



Che cosa hanno fatto i ricercatori

Nelle cellule sottoposte a RNA *editing*, sono state usate tecniche microscopiche per verificare la presenza della proteina CFTR e la sua localizzazione sulla membrana plasmatica. Inoltre, si è testato il successo dei vettori virali nel trasportare le tecnologie di *editing* nelle cellule bronchiali umane. Infine è stato svolto il sequenziamento genico per verificare l'avvenuta correzione dell'RNA con il sistema RESTORE.



Che cosa hanno ottenuto

È stato confermato l'aumento dell'RNA messaggero di CFTR con entrambi i metodi di RNA *editing* (minixABE e RESTORE) e la presenza della proteina CFTR sulla membrana. Si è visto che i vettori virali migliorano il meccanismo di trasporto di tali tecnologie nelle cellule bronchiali umane. Nell'RNA messaggero delle cellule è stata confermata la sostituzione della A del segnale stop UGA con il segnale "senso" UGG.



Che cosa succederà ora

I risultati raggiunti aprono prospettive promettenti nella correzione dei segnali stop prematuri presenti nell'RNA di CFTR costituendo un approccio innovativo, anche se ancora da valutare *in vivo*. Rimangono aspetti da ottimizzare, in particolare il meccanismo di trasporto mirato verso specifici organi.

Per saperne di più



Obiettivi

Sviluppo di una nuova tecnica di *editing* genetico per correggere mutazioni stop sull'RNA messaggero del gene CFTR

Il progetto, prendendo in considerazione le mutazioni di stop, più rare della più diffusa F508del, ha l'obiettivo di sviluppare una nuova tecnica di *editing* genetico sito specifica. I ricercatori propongono lo sviluppo e utilizzo dell'*editing* sito-specifico dell'mRNA tramite la deaminazione dell'adenosina in inosina, ribonucleotide riconosciuto come guanosina dal ribosoma, che consentirebbe di correggere codoni stop nell'mRNA. Questa nuova tecnica di *editing* prevede l'utilizzo del sistema REPAIRv2 e di oligonucleotidi antisenso (ASOs) specifici per la regione dell'mRNA dove è presente il codone di stop. I ricercatori propongono di valutare l'efficacia della procedura su modelli cellulari con tecniche di biologia molecolare quali *real time-PCR*, *western blotting*, immunofluorescenza e sequenziamento.



Risultati

Con tecniche di *editing* dell'RNA è stato possibile correggere *in vitro* il segnale stop UGA di alcune mutazioni del gene CFTR

Le mutazioni stop (o nonsense) introducono un segnale di stop prematuro nell'RNA messaggero di CFTR, che ha come effetto la produzione di una proteina CFTR tronca e non funzionale. Per le persone con fibrosi cistica (FC) che hanno mutazioni stop attualmente non ci sono opzioni terapeutiche approvate. A questo scopo è utile investigare nuove tecniche di terapia genica, specificamente tecniche di *editing* (correzione) sito-specifico di RNA, per correggere la mutazione nonsense UGA nell'RNA messaggero del gene CFTR.

Sono stati usati due metodi di RNA *editing* (minixABE e RESTORE) veicolati in cellule umane, in particolare in due tipi di linee cellulari bronchiali, una con la mutazione W1282X e l'altra con G542X. Come trasportatori, sono state usate particelle lipidiche o vettori virali (ossia virus opportunamente modificati in cui viene inserita l'informazione genetica).

Lo scopo era convertire la molecola adenosina del codone UGA nella molecola inosina, che viene letta come guanosina e in questo modo converte il codone nonsense UGA nel codone senso UGG.

Per prima cosa è stato confermato l'aumento dell'RNA messaggero del gene CFTR con i due sistemi di RNA *editing*, minixABE e RESTORE. Al microscopio si è osservata la presenza della proteina CFTR nelle cellule sottoposte a RNA *editing* e la sua localizzazione sulla membrana plasmatica. Inoltre, sono stati testati con successo i vettori virali per migliorare il meccanismo di trasporto nelle cellule bronchiali umane. Infine è stato svolto il sequenziamento genico a seguito della correzione dell'RNA con il sistema RESTORE, ed è stata confermata la presenza del codone senso UGG nell'RNA messaggero delle cellule.

Complessivamente, i risultati suggeriscono che le mutazioni stop UGA nell'mRNA di CFTR possono essere corrette tramite RNA *editing*. Questi risultati aprono prospettive promettenti nella correzione dei codoni stop prematuri presenti nell'RNA costituendo un approccio innovativo, anche se ancora da valutare *in vivo*.

L'uso di inibitori della degradazione dell'RNA mutato incrementando l'RNA da modificare può rivelarsi utile. Rimangono aspetti da ottimizzare, in particolare il meccanismo di trasporto mirato verso specifici organi.

Publicazioni



Site-Specific RNA Editing of Stop Mutations in the CFTR mRNA of Human Bronchial Cultured Cells

International journal of molecular sciences, 2023



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Site-Specific RNA Editing of Stop Mutations in the CFTR mRNA of Human Bronchial Cultured Cells

Roberta E. Chiavetta ^{1,*}, Simona Titoli ¹, Viviana Barra ¹, Patrizia Cancemi ^{1,2}, Raffaella Melfi ¹ and Aldo Di Leonardo ^{1,2,*}

¹ Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Palermo, 90128 Palermo, Italy; chiavetta.robetta@gmail.com (R.E.C.); simona.titoli@unipa.it (S.T.); viviana.barra@unipa.it (V.B.); patrizia.cancemi@unipa.it (P.C.); raffaella.melfi@unipa.it (R.M.)

² Centro di Oncobiologia Sperimentale (C.O.B.S.), Viale Delle Scienze, 90128 Palermo, Italy

* Correspondence: aldo.dileonardo@unipa.it; Tel: +39-132897340

[†] Current address: Department of Molecular Biotechnology and Health Science, University of Torino, Via Nizza 52, 10126 Torino, Italy.

Author Contributions: Conceptualization, R.M. and A.D.L.; investigation, R.E.C., S.T. and R.M.; validation, R.M., V.B. and A.D.L.; formal analysis, V.B., R.M. and A.D.L.; writing—original draft preparation, R.E.C., S.T., R.M., V.B., P.C. and A.D.L.; writing—review and editing, R.M., V.B. and A.D.L.; supervision A.D.L.; funding acquisition, A.D.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona, Italy (grant FFC#5/2021 to A.D.L.).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available here and in Supplementary Material.

Acknowledgments: We wish to thank [Delegazione FFC di Palermo, Italy](#). Cell sorting data were provided by ATeN Center, University of Palermo, Italy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Abstract presentati a congressi scientifici



***Antisense Oligonucleotides direct endogenous ADARs to recode a
Premature Termination Codon in CFTR mRNA***

18th ECFS Basic Science Conference, Dubrovnik, Croatia, 29 March - 01 April 2023

***Novel approaches based on sequence-specific RNA editing by ADARs to correct
CFTR nonsense mutations causing Cystic Fibrosis***

46th European ECFS Congress, Vienna, Austria, 7-10 June 2023

***Applying RNA editing technology to correct the W1282X stop mutation in the
CFTR mRNA in human bronchial cells***

46th European ECFS Congress, Vienna, Austria, 7-10 June 2023

***Applying RNA editing technology to correct the W1282X stop mutation in the
CFTR mRNA in human bronchial cells***

FISV Congress 2022 Abstract book

***Exploring specific antisense oligonucleotides (ASOs) fused to ADARs recruiting
domain to restore CFTR nonsense mutation***

FISV Congress 2022 Abstract book

Rendiconto economico



AREA 1

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

Progetto FFC#5/2021

Valutazione *in vitro* di nuovi strumenti per la modifica (*editing*) sito-specifica di RNA messaggeri per proteina CFTR con mutazioni stop



Responsabile:

Aldo Di Leonardo

(Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche - STEBICEF, Università degli Studi di Palermo)



Periodo:

01/09/2021-31/08/2023



Grant assegnato:

€ 99.500



Usato per:

- Materiale di consumo € 59.940
- Spese viaggio/convegni € 2.046
- Borse di studio € 32.925
- Servizi scientifici € 4.289
- Spedizioni € 169

€ 99.369



Saldo (usato per altri progetti):

€ 131