



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#2/2021

Utilizzo di tecnologie CRISPR-Cas per revertire gli  
effetti delle mutazioni F508del e 2789+5G>A del gene  
CFTR



#### Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: **Anna Cereseto**  
(Dipartimento CIBIO - Centro per la  
Biologia Integrata, Università di Trento)



#### Partner: **Daniele Arosio**

(Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale  
delle Ricerche, Trento)



**Ricercatori coinvolti: 6**



**Qual è la durata dello studio: 2 anni**

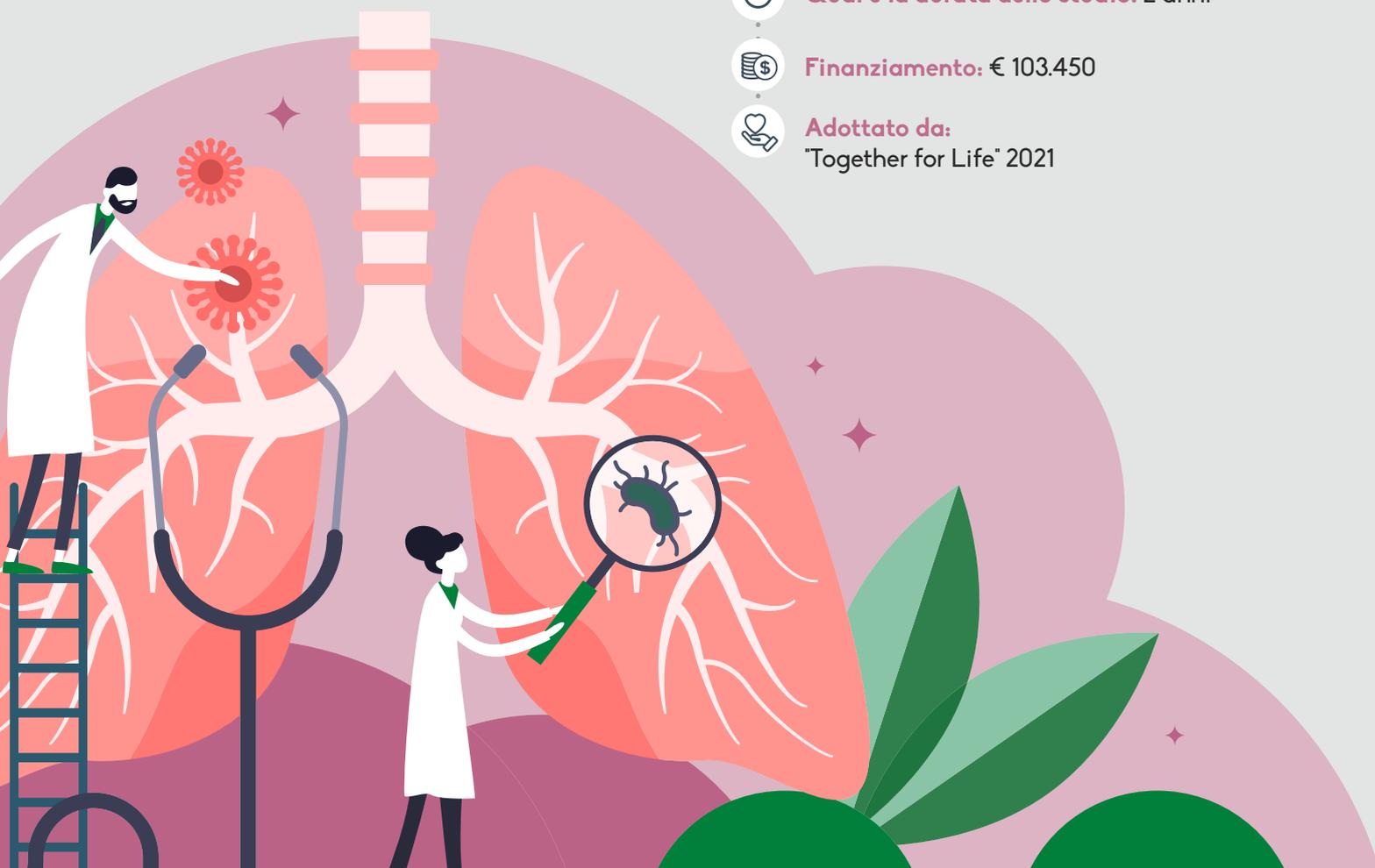


**Finanziamento: € 103.450**



#### Adottato da:

"Together for Life" 2021





## Perché è importante

Le tecniche di correzione del DNA che si sono sviluppate e raffinate negli anni recenti aprono a prospettive di cure definitive per malattie genetiche come la fibrosi cistica (FC). Tra queste, la tecnologia CRISPR-Cas9 permette di correggere le mutazioni nel DNA con elevata efficienza e precisione.



## Che cosa hanno usato i ricercatori

Sono state usate particolari tecnologie chiamate CRISPR-*base editor*, capaci di correggere le mutazioni senza tagliare il DNA ma convertendo l'informazione genetica errata in quella corretta. È stata usata anche una via alternativa di correzione, che sfrutta l'esistenza di mutazioni neutralizzanti, capaci di correzioni secondarie in grado di neutralizzare l'effetto della mutazione originale che causa la malattia. Le analisi sono state condotte sia su cellule epiteliali bronchiali umane sia su organoidi intestinali derivati da pazienti con CFTR mutata, con la mutazione 2789+5G>A e la F508del.



## Che cosa hanno fatto i ricercatori

È stata valutata l'efficienza del processo di correzione e la conseguente funzionalità del canale CFTR con F508del dopo l'introduzione delle mutazioni neutralizzanti in modelli di cellule bronchiali.

Per la mutazione 2789+5G>A, l'efficienza di correzione con CRISPR-*base editor* è stata verificata sia in organoidi che in cellule bronchiali derivate da pazienti, dove è stato valutato anche il ripristino della funzionalità del canale CFTR.



## Che cosa hanno ottenuto

Si è visto che l'introduzione di mutazioni neutralizzanti nel gene che contiene la F508del portano alla produzione di una proteina CFTR funzionante in modelli cellulari.

L'uso della tecnologia *base editor* per correggere la mutazione 2789+5G>A ha rivelato un ripristino della funzionalità della proteina CFTR sia in cellule bronchiali primarie che in organoidi.



## Che cosa succederà ora

I risultati ottenuti dimostrano che CRISPR-*base editor* è una tecnica promettente per una futura cura della FC, anche per le mutazioni più difficili da correggere.

Il successo di queste strategie ora dipende dallo sviluppo di un efficace sistema di trasporto a livello dei tessuti bersaglio, nello specifico dei polmoni delle persone con FC, al fine di raggiungere i test in clinica.

## Per saperne di più



### Obiettivi

#### Nuove strategie di *gene editing* e mutazioni neutralizzanti per ripristinare la funzione di CFTR con mutazioni F508del e 2789+5G>A

Questo progetto, estensione del precedente FFC#3/2019 e proposto dallo stesso gruppo di ricerca, ha l'obiettivo di utilizzare l'*editing* genetico per ripristinare la funzione del gene CFTR sfruttando l'esistenza di mutazioni neutralizzanti (in grado di neutralizzare l'effetto della mutazione originale che causa la malattia).

La mutazione di splicing 2789+5G>A, una delle 20 mutazioni più frequenti tra le 360 identificate come causa di fibrosi cistica, verrà riparata seguendo la strategia utilizzata nel progetto precedente (FFC#3/2019) e sfruttando le nuove tecnologie di *base editing*, in grado di modificare in modo mirato il singolo nucleotide.

Le modifiche terapeutiche verranno inserite tramite tecnologie CRISPR-Cas in modelli cellulari di fibrosi cistica (FC) ovvero in cellule epiteliali bronchiali e organoidi intestinali derivati da persone con FC con mutazioni F508del o 2789+5G>A.



### Risultati

#### La tecnologia CRISPR-*base editor* è in grado di correggere le mutazioni F508del e 2789+5G>A del gene CFTR in modelli cellulari

Le tecniche di correzione del DNA che si sono sviluppate e raffinate negli anni recenti aprono a prospettive di cure definitive per malattie genetiche come la fibrosi cistica (FC). Tra queste, la tecnologia CRISPR-Cas9 permette di correggere le mutazioni nel DNA con elevata efficienza e precisione.

Non tutte le mutazioni possono essere corrette con strategie standard di CRISPR-Cas9, ma esistono vie alternative come il CRISPR-*base editor* che è in grado di correggere le mutazioni senza tagliare il DNA, convertendo l'informazione genetica errata in quella corretta. È anche possibile sfruttare l'esistenza delle cosiddette mutazioni neutralizzanti, correzioni secondarie in grado di neutralizzare l'effetto della mutazione originale che causa la malattia.

Nel progetto, la tecnologia CRISPR-*base editor* è stata usata per correggere la mutazione 2789+5G>A e la mutazione F508del in cellule epiteliali bronchiali umane e organoidi intestinali derivati da persone con FC.

Le mutazioni neutralizzanti identificate precedentemente sono state inserite prima in modelli cellulari, in cui è stata valutata l'efficienza del processo di correzione e la conseguente funzionalità del canale CFTR con mutazione F508del. Successivamente è stata valutata l'efficienza della correzione in cellule bronchiali primarie.

È stata sviluppata una strategia di correzione anche per la mutazione 2789+5G>A: dopo test iniziali in linee cellulari, è stata verificata l'efficienza di correzione della mutazione sia in organoidi che in cellule bronchiali derivati da pazienti. Negli stessi modelli è stato valutato anche il ripristino della funzionalità del canale CFTR.

## Per saperne di più



Entrambe le strategie, sia usando le mutazioni neutralizzanti per correggere F508del che usando i *base editor* per correggere la mutazione 2789+5G>A, hanno portato a un ripristino della funzionalità di CFTR nei modelli cellulari, in cellule primarie e, nel secondo caso, anche in organoidi, rivelando che i CRISPR-*base editor* sono una tecnica promettente per una futura cura della FC.

Grazie a questo lavoro di ricerca si è osservato che anche le mutazioni più difficili da correggere possono essere riparate con la tecnologia CRISPR-Cas9: il successo di queste strategie ora dipende dallo sviluppo di un efficace trasporto di questi sistemi a livello dei tessuti, in particolare dei polmoni delle persone con FC, al fine di raggiungere i test in clinica.

## Publicazioni



### **Functional restoration of a *CFTR* splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor**

*Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2023

#### Molecular Therapy

Original Article



## Functional restoration of a *CFTR* splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor

Simone Amistadi,<sup>1,7</sup> Giulia Maule,<sup>1,7</sup> Matteo Ciciani,<sup>1</sup> Marjolein M. Ensink,<sup>2</sup> Liesbeth De Keersmaecker,<sup>2</sup> Anabela S. Ramalho,<sup>3</sup> Daniela Guidone,<sup>4</sup> Martina Buccirosi,<sup>4</sup> Luis J.V. Galiotta,<sup>4,5</sup> Marianne S. Carlon,<sup>2,6</sup> and Anna Cereseto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Trento, Department of Computational, Cellular and Integrative Biology, Laboratory of Molecular Virology, 38123 Trento, Italy; <sup>2</sup>KU Leuven, Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, Laboratory for Molecular Virology and Gene Therapy, 3000 Leuven, Belgium; <sup>3</sup>CF Research Lab, Woman and Child Unit, Department of Development and Regeneration, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium; <sup>4</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine, 80078 Pozzuoli, Italy; <sup>5</sup>Department of Translational Medical Sciences, University of Napoli "Federico II," 80138 Napoli, Italy; <sup>6</sup>KU Leuven, Department of Chronic Diseases and Metabolism, BREATHE Laboratory, 3000 Leuven, Belgium

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to lab members of Cereseto lab for helpful discussion throughout the project and to Alice Setti for technical support. We wish to thank the 1aBSSAH-CIBIO Next Generation Sequencing Facility of the University of Trento for sequencing samples and technical support. We are grateful to the Primary Cell Culture Service of the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation at the Laboratory of Medical Genetics, G. Gaslini Institute, Genova, Italy, for CF primary cells.

This work was supported by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation grants FFC#3/2019 (adopted by Delegazione FFC di Vercelli, Delegazione FFC di Verona Val d'Alpone, Associazione Trentina Fibrosi Cistica in ricordo di Marco Menegus, Delegazione FFC di Olbia), FFC#2/2021 (adopted by Together for Life 2021), and the European Union's Horizon 2020 innovation program through the Unlocking Precision Gene Therapy (UPGRADE) project (grant agreement no. 825825).

## Publicazioni



### Prime editing functionally corrects cystic fibrosis-causing CFTR mutations in human organoids and airway epithelial cells

Cell reports. Medicine, 2024

Cell Reports Medicine

CellPress  
OPEN ACCESS

Article

### Prime editing functionally corrects cystic fibrosis-causing CFTR mutations in human organoids and airway epithelial cells

Mattijs Bulcaen,<sup>1,2,\*</sup> Phéline Kortleven,<sup>2</sup> Ronald B. Liu,<sup>3,4</sup> Giulia Maule,<sup>5</sup> Elise Dreano,<sup>6,7</sup> Mairead Kelly,<sup>6,7</sup> Marjolien M. Ensinck,<sup>2</sup> Sam Thierie,<sup>2</sup> Maxime Smits,<sup>1,8</sup> Matteo Ciciani,<sup>6</sup> Aurelie Hatton,<sup>6,7</sup> Benoit Chevalier,<sup>6,7</sup> Anabela S. Ramalho,<sup>9</sup> Xavier Casadevall i Solvas,<sup>2</sup> Zeger Debyser,<sup>1,8</sup> François Vermeulen,<sup>9,10</sup> Rik Gijbbers,<sup>1,8</sup> Isabelle Semet-Gaudelus,<sup>6,7,11,12</sup> **Anna Cereseto,<sup>2</sup>** and Marianne S. Carlon<sup>2,8,13,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

<sup>2</sup>Department of Chronic Diseases and Metabolism, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

<sup>3</sup>Department of Biosystems, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

<sup>4</sup>School of Engineering, University of Edinburgh, EH9 3JL Edinburgh, UK

<sup>5</sup>Department of CIBIO, University of Trento, 38123 Povo-Trento, Italy

<sup>6</sup>INSERM, CNRS, Institut Necker Enfants Malades, 75015 Paris, France

<sup>7</sup>Université Paris-Cité, 75015 Paris, France

<sup>8</sup>Leuven Viral Vector Core, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

<sup>9</sup>Department of Development and Regeneration, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

<sup>10</sup>Department of Pediatrics, UZ Leuven, 3000 Leuven, Belgium

<sup>11</sup>Cystic Fibrosis National Pediatric Reference Center, Pneumo-Allergologie Pédiatrique, Hôpital Necker Enfants Malades, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), 75015 Paris, France

<sup>12</sup>European Reference Network, ERN-Lung CF, 60596 Frankfurt am Main, Germany

<sup>13</sup>Lead contact

\*Correspondence: mattijs.bulcaen@kuleuven.be (M.B.), marianne.carlon@kuleuven.be (M.S.C.)

<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101544>

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Liesbeth De Keensmaecker for excellent technical support. We acknowledge the Leuven Viral Vector Core for viral vector production. We thank Tine Bulcaen for the design of the DETECTOR logo. Images were recorded on a Zeiss LSM 880 - Airyscan (Cell and Tissue Imaging Cluster), supported by Hercules AKUL/15/37\_GOH1616N and FWO G.0929.15 to Pieter Vanden Bergh, University of Leuven. We acknowledge Gergely Lukacs for the 3HA-CFTR constructs and Luis Galletta for HS-EYFP (F46L-H148Q-I152L). We thank the Genomics Core, a KU Leuven Core facility, for performing sample prep and Illumina Novaseq NGS. The computing resources and services used in this work were provided by the VSC (Flemish Supercomputer Center), funded by the Research Foundation - Flanders (FWO) and the Flemish government. This research was funded by grants from the Mucovenering Belgium and Fund Alphonse Jean Fortin from the King Baudouin Foundation (2020-J1810150-E015), Emily's Entourage (US, 172749169, 6), Research Foundation - Flanders (FWO) (SBO OrganiD: S001221N), and KU Leuven Internal Funds C2 (C24M/21/041). M.B. and M.M.E. were supported by FWO-SB doctoral fellowships 15E8122N and 1S29917N, respectively. Work done by G.M. and A.C. was supported by the Italian Cystic Foundation FFC#2/2021 and M.C. by the Horizon Europe EC Pathfinder program AAVolution (grant agreement 01071041). Work done by E.D., M.K., A.H., and B.C. was supported by Vaincre La Mucoviscidose (RC20210902904 and RC20220500011), Mucoviscidose ABCF2. M.S.C. previously was a senior post-doctoral FWO scholar (12Z5920N) and is now supported by a KU Leuven BOFZAP professorship.

## Rendiconto economico



### AREA 1

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

### Progetto FFC#2/2021

## Utilizzo di tecnologie CRISPR-Cas per revertire gli effetti delle mutazioni F508del e 2789+5G>A del gene CFTR



**Responsabile:**

**Anna Cereseto**

(Dipartimento CIBIO - Centro per la Biologia Integrata, Università di Trento)



**Periodo:**

01/09/2021 – 31/10/2023



**Grant assegnato:**

€ 103.450



**Usato per:**

- Materiale di consumo € 31.069
- Spese viaggio/convegni € 4.764
- Borse di studio € 35.090
- Servizi scientifici € 525
- Spedizioni € 262
- Equipment € 492

€ 72.202



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

€ 31.248