



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



Progetto FFC#03/2019

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

Sfruttare la tecnologia CRISPR/Cas9 per neutralizzare il difetto CFTR-F508del



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile:

Anna Cereseto

Università di Trento, CIBIO-Laboratorio di Virologia Molecolare

Partner: **Daniele Arosio**

Istituto di Biofisica CNR, Trento



Ricercatori coinvolti: 3



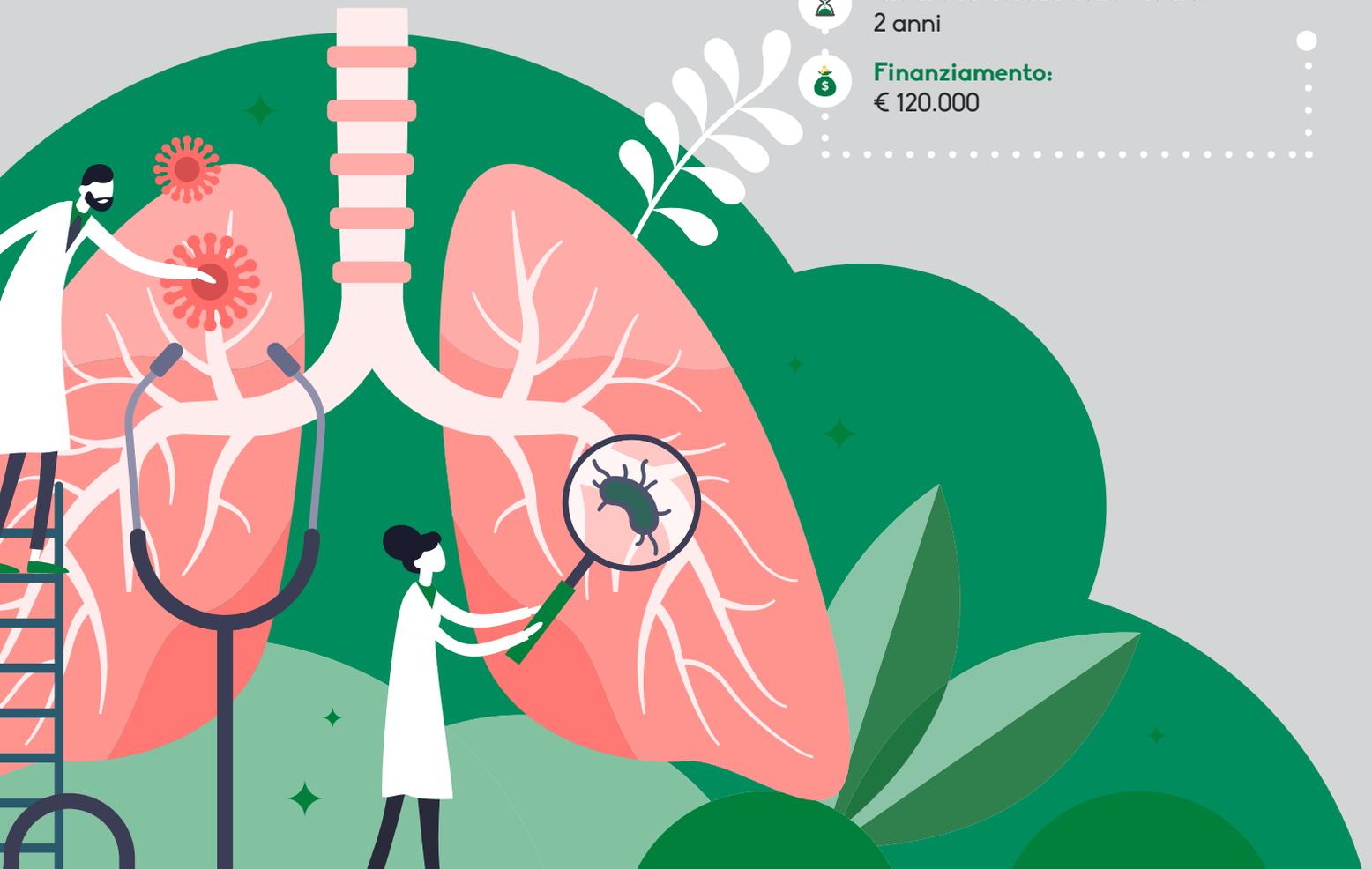
Qual è la durata dello studio:

2 anni



Finanziamento:

€ 120.000





Perché è importante

La tecnica di *editing* (correzione) genomico basata sul sistema CRISPR-Cas9 permette di correggere le mutazioni nel DNA con elevata efficienza e precisione. Ciò ha aperto nuove prospettive nella ricerca di una cura per le malattie genetiche come la fibrosi cistica (FC). Purtroppo ci sono mutazioni a carico di CFTR che non possono essere corrette: tra queste la F508del.



Che cosa hanno usato i ricercatori

Per ripristinare il corretto funzionamento del gene CFTR con mutazione F508del è stata esplorata una via alternativa di correzione basata sull'introduzione di piccole mutazioni definite "neutralizzanti", perché capaci di neutralizzare l'effetto della mutazione originaria e dare effetti meno severi della malattia. Per identificare queste nuove mutazioni è stata sfruttata una particolare versione della tecnica CRISPR-Cas9 chiamata *CRISPR-base editor*.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

Sono state identificate le mutazioni neutralizzanti migliori, in grado di ripristinare l'attività della proteina CFTR. Tali mutazioni sono state riprodotte e testate in modelli cellulari di fibrosi cistica con mutazione F508del (cellule epiteliali delle vie aeree e organoidi intestinali derivati da pazienti).



Che cosa hanno ottenuto

Si è visto che nei sistemi cellulari con la mutazione F508del usati, la proteina CFTR si localizzava sulla superficie della cellula. Ciò dimostra che pur essendo ancora presente la mutazione originaria F508del, l'introduzione delle nuove mutazioni produce una proteina CFTR capace di funzionare correttamente.



Che cosa succederà ora

Dopo i primi test della tecnica *CRISPR-base editor*, il gruppo di ricerca prosegue gli studi su nuove mutazioni neutralizzanti grazie al finanziamento FFC#2/2021.

Per saperne di più



Obiettivi

Ripristinare il corretto funzionamento di CFTR-F508del mediante *editing* genetico (tecnica CRISPR-Cas9 modificata), introducendo nel gene CFTR difettoso opportune mutazioni puntiformi, con funzioni neutralizzanti sulla mutazione causante malattia.

Lo sviluppo di nuove tecnologie per la terapia genica ha aperto nuove prospettive nella ricerca di una cura per le malattie genetiche come la fibrosi cistica (FC). In particolare, la tecnica basata sulla nucleasi CRISPR-Cas9 offre la possibilità di correggere il DNA genomico (*editing* genomico) con elevata efficienza e precisione. In questo progetto i ricercatori si propongono di ripristinare il corretto funzionamento del gene CFTR con mutazione F508del, la più frequente in fibrosi cistica, introducendo nella sua sequenza piccole mutazioni che dovrebbero neutralizzare l'effetto della mutazione originale causante malattia.

Per identificare queste nuove mutazioni verrà sfruttato un circuito molecolare, chiamato EvolvR, basato su una particolare versione della tecnica CRISPR-Cas9 chiamata CRISPR-*base editor*, che consentirà di inserire in modo mirato nuove mutazioni nella sequenza del gene CFTR. Tali mutazioni verranno selezionate in modo da promuovere il corretto trasporto in membrana della proteina CFTR e quindi agire da mutazioni neutralizzanti. Un avanzato screening funzionale rivelerà le mutazioni neutralizzanti migliori, cioè quelle in grado di ripristinare l'attività della proteina. Queste mutazioni saranno riprodotte in modelli cellulari di fibrosi cistica con mutazione F508del (cellule epiteliali delle vie aeree e organoidi intestinali derivati da pazienti). La prospettiva è che il gene così manipolato, pur conservando la mutazione originaria F508del, produca, per effetto delle nuove mutazioni, una proteina CFTR capace di funzionare correttamente.

Risultati

Difetti della proteina CFTR mutata possono essere corretti con l'inserimento di mutazioni neutralizzanti per mezzo dell'*editing* genomico. Nuove opzioni terapeutiche grazie al sistema "*CRISPR-base editor*".

L'*editing* genomico permette di correggere le mutazioni genetiche, incluse quelle che colpiscono il gene CFTR e causano la fibrosi cistica. Tuttavia non tutte le mutazioni possono essere corrette, tra esse la mutazione F508del caratterizzata dalla delezione di tre nucleotidi. Al fine di aggirare i limiti imposti dalla tecnologia CRISPR attualmente a disposizione, abbiamo esplorato una via alternativa di correzione basata sull'uso di mutazioni secondarie puntiformi (cioè di singolo nucleotide) definite "neutralizzanti". Queste mutazioni neutralizzano l'effetto della mutazione originaria dando effetti meno severi della malattia. All'interno del progetto, i ricercatori hanno studiato l'effetto delle mutazioni neutralizzanti e hanno verificato che, nei sistemi cellulari con la mutazione F508del usati, la proteina CFTR si localizzava sulla superficie della cellula. Una volta verificata la validità e l'efficacia delle mutazioni neutralizzanti il gruppo di ricerca ha messo a punto particolari strategie di *editing* genomico basate su CRISPR-Cas al fine di introdurre le mutazioni neutralizzanti in posizioni specifiche del gene CFTR con F508del. Questa tecnologia CRISPR-Cas di seconda generazione si chiama "*base editor*" e prevede la modifica di singoli nucleotidi (o basi) senza creare tagli. Il *base editing* è stato testato dal gruppo di ricerca che ora prosegue gli studi grazie al finanziamento FFC#2/2021 in cui verranno esplorate nuove mutazioni neutralizzanti, compatibili con il *base editing*.

Publicazioni



**Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing,
International Journal of Molecular Sciences, Volume 21, Maggio 202**



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing

Giulia Maule ^{1,2}, Daniele Arosio ² and Anna Cereseto ^{1,*}

¹ Department of Cellular Computational Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, 38123 Trento, Italy; giulia.maule@unitn.it

² National Council of Research, CNR, 38123 Trento, Italy; daniele.arosio@cnr.it

* Correspondence: anna.cereseto@unitn.it

Received: 7 May 2020; Accepted: 28 May 2020; Published: 30 May 2020



10. Conclusions and Future Directions

We have presented here emerging technologies and derived strategies as a path forward from conventional gene therapy based on delivery of therapeutic nucleic acids toward gene correction of *CFTR* mutations. Genome editing is at the forefront not just by offering novel therapeutic solutions but also for the development of experimental models, cellular and animal, essential in translational medicine. Although there is much to be done in particular in terms of tools for in-vivo delivery of nucleic acids and genome editing molecules, hurdles and limitations seem well-defined and manageable.

Funding: This work was supported by the Italian Cystic Fibrosis Foundation (grant FFC#3/2019) adopted by local foundations Associazione Trentina in Ricordo di Marco Menegus, Delegazioni Vercelli, Verona di Val d'Alpone, Olbia and by the Horizon 2020 UPGRADE (grant # 825825) project. Daniele Arosio's research is sustained by Fondazione Cassa Rurale Trento Rovereto (ref. 2018.256).

Acknowledgments: The authors are grateful to Davide Aiello, Irene Carrozzo and Antonio Casini for critically reading the manuscript.

Conflicts of Interest: A.C. and G.M are listed as inventors on a patent application related to this work. A.C. is cofounder and scientific advisor to Alia Therapeutics. D.A. declares no competing interests.

Rendiconto economico



Progetto FFC#03/2019

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

Sfruttare la tecnologia CRISPR/Cas9 per neutralizzare il difetto CFTR-F508del

| | |
|---|-----------------|
|  Periodo: 01/09/2019 – 31/10/2021 (proroga di 2 mesi) | |
|  Responsabile: Anna Cereseto <i>Università di Trento, CIBIO, Laboratorio di Virologia Molecolare</i> | |
|  Partner: Daniele Arosio <i>Istituto di Biofisica CNR, Trento</i> | |
|  Grant assegnato: | €120.000 |
|  Usato per: | |
| • Materiale di consumo | €75.993 |
| • Spese viaggio/convegni | €1.099 |
| • Borse di studio | €32.160 |
| • Servizi scientifici | €8.971 |
| • Pubblicazioni scientifiche | €1.767 |
| • Equipment | |
| | €119.990 |
|  Saldo (usato per altri progetti) | €10 |