



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



Progetto FFC#7/2020

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

Ruolo di modifiche post traduzionali nel recupero funzionale di F508del CFTR



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile:

Mauro Salvi

Università degli Studi di Padova,
Dip. di Scienze Biomediche



Ricercatori coinvolti: 3



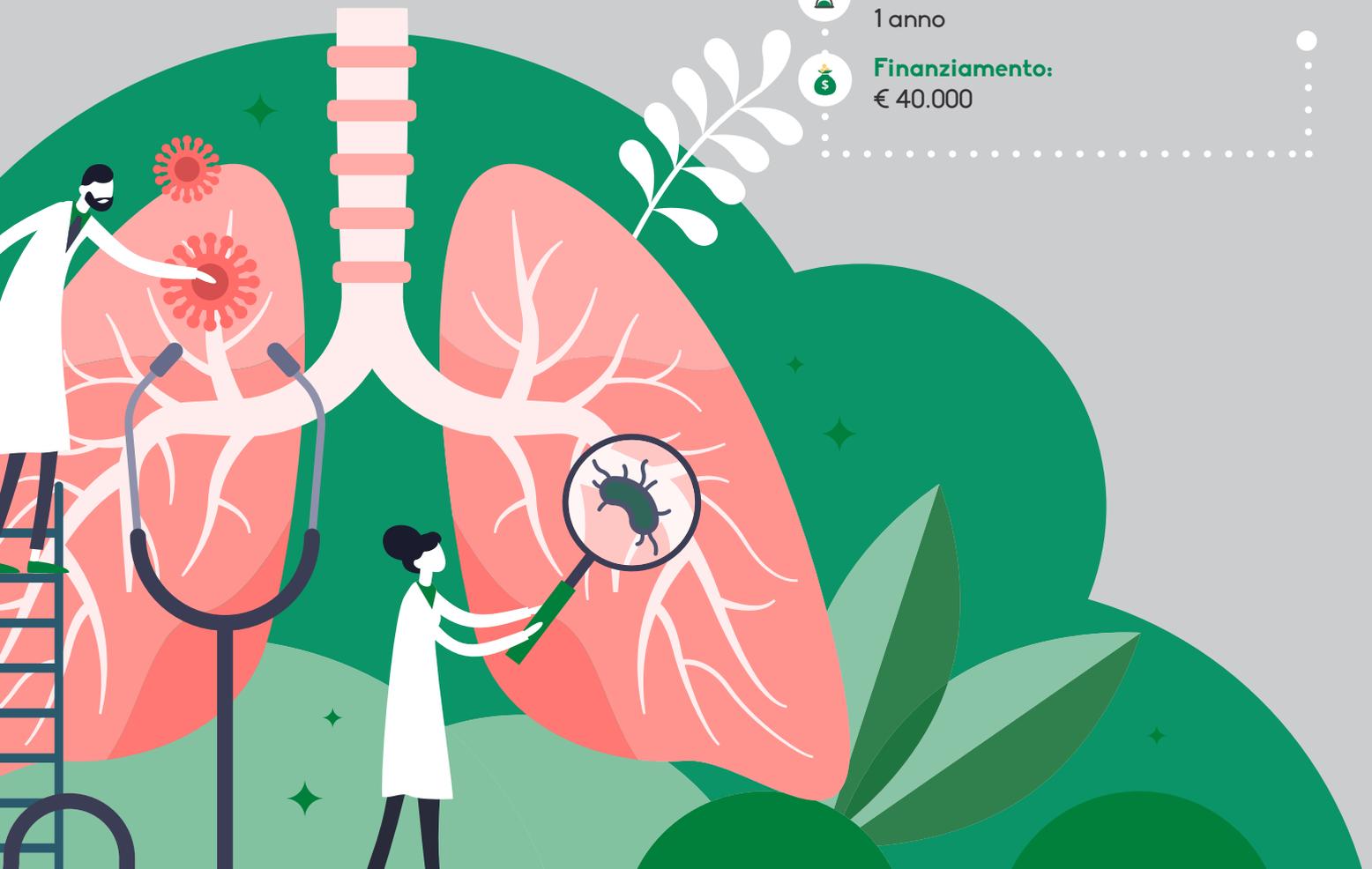
Qual è la durata dello studio:

1 anno



Finanziamento:

€ 40.000





Perché è importante

La proteina CFTR viene prodotta nel nucleo delle cellule, ma deve raggiungere la sua "sede di lavoro" che è la membrana cellulare. Durante il suo trasferimento dal nucleo alla membrana, CFTR per essere attiva e funzionante deve subire delle modificazioni chimiche, dette post traduzionali. Tra queste modificazioni c'è per esempio la metilazione, ovvero l'aggancio di gruppi metilici, e l'ubiquitinazione, ovvero l'aggiunta della proteina ubiquitina. Per entrambe le modificazioni sono noti gli enzimi responsabili, ma il loro ruolo in presenza di CFTR mutata non è chiaro e va approfondito.



Che cosa hanno usato i ricercatori

Sono stati identificati cinque enzimi, chiamati demetilasi, coinvolti nella metilazione della proteina CFTR con la mutazione F508del. È stato individuato un inibitore dell'enzima UBA1, responsabile del processo di ubiquitinazione. L'idea è che regolando la metilazione e l'ubiquitinazione di CFTR mutata si possa favorire il recupero del canale CFTR mutato a opera dei farmaci correttori.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

Sono state usate linee cellulari e cellule isolate da bronchi di persone con fibrosi cistica per verificare gli effetti della regolazione delle modificazioni post traduzionali sulla CFTR mutata in presenza di farmaci correttori.



Che cosa hanno ottenuto

Sono stati identificati due enzimi demetilasi che, se bloccati, aumentano il recupero di CFTR mutata in presenza di correttori. L'inibizione dell'enzima UBA1 a opera della molecola TAK-243 impedisce la distruzione della proteina CFTR con F508del, rendendola disponibile per l'azione del Kaftrio. Un approccio combinato di TAK-243 e Kaftrio porta a un miglioramento della funzionalità di CFTR mutata, anche su cellule che esprimono altre rare mutazioni, quale N1303K.



Che cosa succederà ora

La molecola TAK-243 sarà sottoposta a ulteriori approfondimenti, anche in considerazione del fatto che, usata assieme al Kaftrio, sembra riuscire a recuperare la funzionalità di CFTR con mutazioni per le quali il farmaco non è stato approvato.

Per saperne di più



Obiettivi

Una via alternativa per recuperare il canale CFTR mutato: controllare le modifiche della proteina nel suo percorso di maturazione mediante enzimi demetilasi.

Questo è un progetto di estensione di un precedente progetto pilota (FFC#11/2019), volto a scoprire quali siano le modifiche che la proteina CFTR subisce nel suo percorso di maturazione dopo il completamento della sua sintesi. La funzionalità della proteina CFTR con la mutazione F508del può essere recuperata grazie all'uso di correttori e questo recupero è associato a una serie di modifiche, dette post traduzionali, caratteristiche della forma sana. Il principale obiettivo di questo progetto è dimostrare il reale contributo delle modifiche post traduzionali sul recupero funzionale di CFTR con F508del. A tale scopo sono stati identificati cinque enzimi, chiamati demetilasi, coinvolti nella maturazione della proteina mutata indotta dai correttori. Questi enzimi intervengono sul meccanismo di metilazione, un'importante modificazione post traduzionale della proteina che subisce l'aggiunta o la rimozione del gruppo chimico -CH₃, chiamato metile. Lo studio intende capire se sia possibile favorire il recupero del canale CFTR mutato controllando queste modifiche, con particolare riferimento alla metilazione proteica.



Risultati

L'inibizione degli enzimi responsabili delle modificazioni post traduzionali di CFTR stabilizza la proteina mutata e migliora l'efficacia di Kaftrio, anche in presenza di mutazioni orfane di trattamento.

La proteina CFTR è sottoposta a diverse modifiche chimiche reversibili la cui regolazione è stata spesso proposta come possibile intervento terapeutico per il ripristino funzionale delle forme mutate. Tuttavia non è ancora stato compreso quali tra queste modifiche siano effettivamente importanti per il recupero funzionale della CFTR mutata. Recentemente è stato dimostrato che il canale CFTR è sottoposto anche a metilazione, una modifica post traduzionale caratterizzata dall'aggiunta di gruppi metilici a specifici amminoacidi. La metilazione spesso è alternativa a un'altra modificazione chimica, chiamata ubiquitinazione, che prevede l'aggiunta di una ubiquitina, una sorta di "etichetta" che se agganciata alla proteina porta alla sua degradazione.

I ricercatori hanno focalizzato i loro studi sulla regolazione della metilazione e dell'ubiquitinazione e hanno ipotizzato che la regolazione della metilazione potesse essere terapeuticamente importante. In questo progetto il gruppo di ricerca ha dimostrato come bloccando l'azione di due specifiche demetilasi, enzimi responsabili della rimozione del gruppo metilico, si riesca ad aumentare il recupero funzionale di CFTR con mutazione F508del in presenza di correttori. I ricercatori hanno inoltre provato a bloccare direttamente l'ubiquitinazione attraverso l'inibizione dell'enzima UBA1, responsabile dell'aggancio dell'ubiquitina alle proteine.

Usando la molecola TAK-243, un nuovo inibitore dell'enzima UBA1, i ricercatori sono riusciti a bloccare l'ubiquitinazione e a impedire la degradazione della proteina CFTR con F508del sia in una linea cellulare epiteliale bronchiale (cellule CFBE) sia in cellule prelevate da paziente. Da esperimenti *in vitro* su cellule epiteliali bronchiali e nasali ottenute da persone con fibrosi cistica, i ricercatori hanno dimostrato che TAK-243 riesce a stabilizzare la CFTR mutata e la rende maggiormente disponibile all'azione del Kaftrio. È stato infine dimostrato che un approccio combinato di TAK-243 e Kaftrio porta a un miglioramento della funzionalità di CFTR mutata anche su cellule che esprimono altre rare mutazioni, quale N1303K per cui il Kaftrio non è ancora stato approvato.

Publicazioni



Targeting the E1 Ubiquitin-Activating Enzyme (UBA1) Improves Elexacaftor/
Tezacaftor/Ivacaftor Efficacy towards F508del and Rare Misfolded CFTR Mutants,
Cellular and molecular life sciences, Volume 79, Marzo 2022

Cellular and Molecular Life Sciences (2022) 79:192
<https://doi.org/10.1007/s00018-022-04215-3>

Cellular and Molecular Life Sciences

ORIGINAL ARTICLE



Targeting the E1 ubiquitin-activating enzyme (UBA1) improves elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor efficacy towards F508del and rare misfolded CFTR mutants

Christian Borgo¹ · Claudio D'Amore¹ · Valeria Capurro² · Valeria Tomati² · Elvira Sondo² · Federico Cresta³ ·
Carlo Castellani³ · Nicoletta Pedemonte² · Mauro Salvi¹ 

Received: 26 January 2022 / Revised: 16 February 2022 / Accepted: 21 February 2022 / Published online: 16 March 2022
© The Author(s) 2022, corrected publication 2022

Funding Open access funding provided by Università degli Studi di Padova within the CRUI-CARE Agreement. Fondazione per la ricerca sulla Fibrosi Cistica, grant #11/2019 (sponsored by Delegazione FFC di Fabriano Ancona con il Gruppo di Sostegno FFC di Umbertide Città di Castello Perugia) and #7/2020 (sponsored by Delegazione FFC di Boschi Sant'Anna Minerbe "Alla fine esce sempre il sole") (MS). Fondazione per la ricerca sulla Fibrosi Cistica, grant FFC#9/2019 from Fondazione per la ricerca sulla Fibrosi Cistica (with the contribution of "Delegazione FFC di Genova con Gruppo di sostegno FFC di Savona Spotorno", "Delegazione FFC di Valle Scrivia Alessandria", "Delegazione FFC di Montescaglioso", and "Delegazione FFC di Ascoli Piceno") (NP). Cystic Fibrosis Foundation, Grant PEDEMO20G0 (NP). Italian Ministry of Health through Cinque per mille and Ricerca Corrente (Linea1) (NP). Italian Ministry of Health, Grant GR-2018-12367126 (ES). Dept. Biomedical Sciences of University of Padova, Grant BORG_BIRD2121_01-BIRD 2021 (CB).

Rendiconto economico



Progetto FFC#7/2020

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

Ruolo di modifiche post traduzionali nel recupero funzionale di F508del CFTR

 Periodo: 01/09/2020 – 30/09/2021 (un mese di proroga)	
 Responsabile: Mauro Salvi Università degli Studi di Padova, Dip. di Scienze Biomediche	
 Grant assegnato:	€40.000
 Usato per:	
• Materiale di consumo	€18.082
• Borse di studio	€21.000
• Servizi scientifici	€700
	€39.782
 Saldo (usato per altri progetti)	€218