



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



Progetto FFC#04/2019

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

Ripristino della proteostasi difettiva in fibrosi cistica: nuove strategie per il recupero di CFTR-F508del



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: **Giorgio Cozza**

Università di Padova, Dip. di Medicina
Molecolare, Sez. Chimica Biologica

Partner: **Speranza Esposito**

Istituto Europeo per la Ricerca in Fibrosi
Cistica - IERFC c/o Istituto Scientifico
San Raffaele, Milano

Valeria Raia

Università di Napoli Federico II,
Centro Regionale Fibrosi Cistica



Ricercatori coinvolti: 16



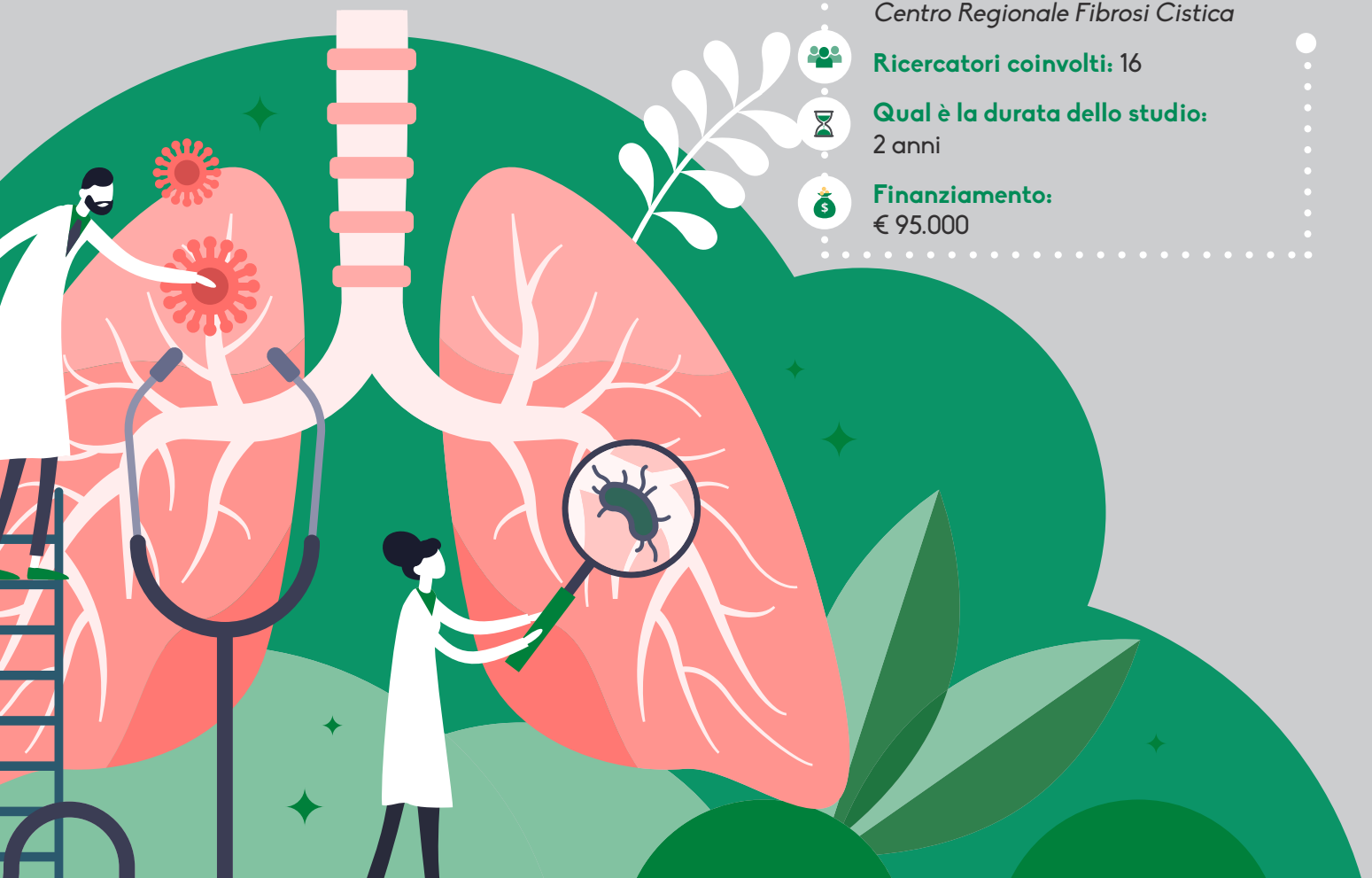
Qual è la durata dello studio:

2 anni



Finanziamento:

€ 95.000





Perché è importante

I farmaci attualmente disponibili per la terapia della fibrosi cistica (FC), come i potenziatori e i correttori, mirano a colpire direttamente la proteina CFTR. Tuttavia, non sempre hanno un'efficacia ottimale. I ricercatori intendono sviluppare una strategia alternativa basata sul miglioramento dell'ambiente in cui la proteina CFTR si sviluppa e matura.



Che cosa hanno usato i ricercatori

L'idea è agire su particolari fattori responsabili della bassa espressione di CFTR sulla membrana cellulare e coinvolti nella cosiddetta omeostasi della cellula, cioè nel sistema di regolazione della sintesi e degradazione delle proteine, specialmente quelle mal funzionanti. Nei precedenti progetti, FFC#2/2016 e FFC#10/2017, sono stati identificati alcuni di questi fattori, chiamati TG2, PDI, protein-chinasi, NRF2, e alcune molecole in grado di raggiungere tali bersagli.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

L'azione di TG2, NRF2 e altre proteine è stata approfondita. Inoltre, tramite approcci informatici e test *in vitro* su cellule, sono stati scoperti altri fattori capaci di ripristinare i livelli e la funzionalità del canale CFTR. Per testare l'efficacia di queste nuove molecole si sono usate cellule FC con la mutazione F508del, topi transgenici FC e cellule provenienti da epiteliali nasali di donatori omozigoti per F508del.



Che cosa hanno ottenuto

I risultati confermano che i fattori TG2, NRF2 e altre proteine sono bersagli promettenti nella terapia per la FC. I nuovi composti chimici individuati sono risultati efficaci nel ripristinare la omeostasi alterata in modelli FC e nel recuperare la funzione del canale CFTR sulla membrana plasmatica.



Che cosa succederà ora

Un simile approccio, non essendo diretto contro il canale CFTR, presenta la potenzialità di non essere mutazione dipendente e di poter essere efficace nei casi di mutazioni di CFTR ancora orfane di una efficace terapia. Alcune delle molecole selezionate, per esempio, oltre a risultare attive in modelli caratterizzati dalla presenza della più comune mutazione F508del, sono risultate promettenti anche contro la mutazione N1303K.

Per saperne di più



Obiettivi

Messa a punto di una strategia alternativa per aumentare il recupero *in vitro* e *in vivo* di CFTR con F508del intervenendo sulla proteostasi difettosa.

La mutazione più comune in fibrosi cistica, la F508del, è responsabile del difetto di ripiegamento e maturazione della proteina CFTR che le impedisce di raggiungere la membrana cellulare. Questo determina nei pazienti un muco bronchiale denso e uno stato di infiammazione cronica del polmone. L'approccio terapeutico più avanzato di cui si dispone, costituito da farmaci correttori e potenziatori, mira a colpire direttamente la proteina CFTR con la mutazione F508del. Tuttavia per ora i farmaci disponibili, in particolare i correttori, non hanno efficacia ottimale. I ricercatori intendono sviluppare una strategia alternativa, basata non sull'attacco diretto alla proteina mutata ma sul miglioramento del compartimento intracellulare, ossia l'ambiente in cui la proteina CFTR si sviluppa e matura. Per questo, si andrà ad agire su alcuni fattori della proteostasi responsabili della bassa espressione del CFTR sulla membrana cellulare. La proteostasi è il sistema di regolazione della sintesi e degradazione delle proteine, in particolare di quelle mal funzionanti. Nei precedenti progetti, FFC#2/2016 e FFC#10/2017, sono stati identificati fattori intracellulari importanti (TG2, PDI, protein-chinasi, NRF2) e alcune molecole in grado di raggiungere tali bersagli. Ora si vogliono ottimizzare queste molecole e scoprirne altre. Per farlo, si sfrutteranno approcci informatici, con tecniche quali il *Virtual screening* e la Ricerca Farmacoforica, e si effettueranno test *in vitro* su cellule, per analizzare i migliori candidati contro bersagli specifici. Infine l'efficacia delle nuove molecole verrà validata in modelli FC come cellule F508del, topi transgenici FC e cellule primarie da epiteliali nasali di donatori omozigoti per questa mutazione.



Risultati

Identificazione di target alternativi a CFTR e selezione di composti efficaci nel ripristinare la funzionalità cellulare in modelli sperimentali di FC con mutazione F508del.

Nell'ambito della ricerca di nuove molecole in grado di correggere il difetto di CFTR, i ricercatori si sono concentrati su specifici bersagli cellulari diversi dal canale CFTR mutato, sfruttando approcci computazionali e sperimentali e modelli animali preclinici. In particolare, usando diversi modelli cellulari, tra cui le cellule CFBE41o- (provenienti dall'epitelio polmonare umano e isolate da paziente affetto da FC con mutazione F508del) e cellule primarie da paziente con mutazione F508del, i ricercatori hanno identificato le molecole TG2 e NRF2 e specifiche proteine chinasi (enzimi) come bersagli promettenti nella terapia per la FC. Successivamente, sono stati selezionati diversi composti chimici, risultati efficaci nel ripristinare i livelli e la funzionalità del canale del CFTR. Inoltre, i ricercatori hanno dimostrato che, sebbene apparentemente non correlati, i nuovi bersagli identificati co-partecipano agli stessi eventi cellulari. È stata in seguito dimostrata l'efficacia della combinazione delle molecole selezionate nel ripristinare la proteostasi alterata in modelli FC e il recupero di una CFTR funzionante sulla membrana plasmatica. Tale approccio, non essendo diretto contro il canale CFTR, presenta la potenzialità di non essere mutazione dipendente e di poter essere efficace nei casi di mutazioni di CFTR orfane di una efficace terapia. Infatti, alcune molecole selezionate, oltre a risultare attive in modelli caratterizzati dalla presenza della più comune mutazione F508del, sono risultate promettenti anche contro la mutazione N1303K.

Pubblicazioni



Intracellular protein kinase CK2 inhibition by ferulic acid-based trimodal nanodevice, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 165, Dicembre 2020

International Journal of Biological Macromolecules 165 (2020) 701–712



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



Intracellular protein kinase CK2 inhibition by ferulic acid-based trimodal nanodevice



Sofia Zanin ^{a,1}, Simone Molinari ^{b,1}, Giorgio Cozza ^c, Massimiliano Magro ^d, Giorgio Fedele ^d, Fabio Vianello ^{d,*}, Andrea Venerando ^{d,*}

^a Department of Molecular Medicine, University of Pavia, via Forlanini 6, 27100 Pavia, Italy

^b Department of Geosciences, University of Padova, via Gradenigo 6, 35131 Padova, Italy

^c Department of Molecular Medicine, University of Padova, via Gabelli 63, 35121 Padova, Italy

^d Department of Comparative Biomedicine and Food Science, Agripolis Campus, University of Padova, viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italy

Acknowledgment

AV was supported by the Department of Comparative Biomedicine and Food Science of the University of Padova (DOR-2018). GC was supported by Supporting Talent in ReSearch (STARS), University of Padova (COZZ_STARS20_01) and Italian Cystic Fibrosis Research Foundation, Verona (FFC#4/2019).

Publicazioni



An Iron Shield to Protect Epigallocatechin-3-Gallate from Degradation: Multifunctional Self-Assembled Iron Oxide Nanocarrier Enhances Protein Kinase CK2 Intracellular Targeting and Inhibition. *Pharmaceutics*, Volume 13, Agosto 2021



Article

An Iron Shield to Protect Epigallocatechin-3-Gallate from Degradation: Multifunctional Self-Assembled Iron Oxide Nanocarrier Enhances Protein Kinase CK2 Intracellular Targeting and Inhibition

Luca Fasolato ^{1,†}, Massimiliano Magro ^{1,†}, Giorgio Cozza ^{2,✉}, Ferruccio Sbarra ¹, Simone Molinari ³, Enrico Novelli ¹, Fabio Vianello ^{1,✉} and Andrea Venerando ^{1,✉}

- ¹ Department of Comparative Biomedicine and Food Science, Agripolis Campus, University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italy; luca.fasolato@unipd.it (L.F.); massimiliano.magro@unipd.it (M.M.); ferrucciosbarra@gmail.com (F.S.); enrico.novelli@unipd.it (E.N.)
² Department of Molecular Medicine, University of Padova, Via Gabelli 63, 35121 Padova, Italy; giorgio.cozza@unipd.it
³ Department of Geosciences, University of Padova, Via Gradenigo 6, 35131 Padova, Italy; simone.molinari@unipd.it
✉ Correspondence: fabio.vianello@unipd.it (F.V.); andrea.venerando@unipd.it (A.V.); Tel.: +39-04-9827-2638 (F.V.); +39-04-9827-2593 (A.V.)
† These authors contributed equally to this paper.



Citation: Fasolato, L.; Magro, M.; Cozza, G.; Sbarra, F.; Molinari, S.; Novelli, E.; Vianello, F.; Venerando, A. An Iron Shield to Protect Epigallocatechin-3-Gallate from Degradation: Multifunctional Self-Assembled Iron Oxide Nanocarrier Enhances Protein Kinase CK2 Intracellular Targeting and Inhibition. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1266. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081266>

Academic Editors:
Rafael Vazquez-Duhalt,
Karla Juarez-Moreno and Josué D. Mota-Morales

Received: 20 July 2021
Accepted: 12 August 2021
Published: 16 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: Protein kinase CK2 is largely involved in cell proliferation and apoptosis and is generally recognized as an Achilles' heel of cancer, being overexpressed in several malignancies. The beneficial effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in the prevention and treatment of several diseases, including cancer, have been widely reported. However, poor stability and limited bioavailability hinder the development of EGCG as an effective therapeutic agent. The combination of innovative nanomaterials and bioactive compounds into nanoparticle-based systems demonstrates the synergistic advantages of nanocomplexes as compared to the individual components. In the present study, we developed a self-assembled core-shell nanohybrid (SAMN@EGCG) combining EGCG and intrinsic dual-signal iron oxide nanoparticles (Surface Active Maghemite Nanoparticles). Interestingly, nano-immobilization on SAMNs protects EGCG from degradation, preventing its auto-oxidation. Most importantly, the nanohybrid was able to successfully deliver EGCG into cancer cells, displaying impressive protein kinase CK2 inhibition comparable to that obtained with the most specific CK2 inhibitor, CX-4945 (5.5 vs. 3 μM), thus promoting the phytochemical exploitation as a valuable alternative for cancer therapy. Finally, to assess the advantages offered by nano-immobilization, we tested SAMN@EGCG against *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative bacterium involved in severe lung infections. An improved antimicrobial effect with a drastic drop of MIC from 500 to 32.7 μM was shown.

Keywords: epigallocatechin-3-gallate; nanocarrier; protein kinase CK2

Funding: This work was supported by the University of Padova (grant number: DOR1839928/18 to AV); Supporting Talent in ReSearch (STARS, University of Padova, grant number: COZZ_STARS20_01 to GC); and the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (grant number: FFC#4/2019 to GC). L.F. and E.N. were supported by Regione Veneto POR FESR 2014–2020, “3S_4H-Safe, Smart, Sustainable Food for Health” (grant number: 1006520).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.







Rendiconto economico



Progetto FFC#4/2019

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

Ripristino della proteostasi difettiva in fibrosi cistica: nuove strategie per il recupero di CFTR-F508del

 Periodo: 01/09/2019 – 31/08/2021	
 Responsabile: Giorgio Cozza <i>Università di Padova, Dip. di Medicina Molecolare, Sez. Chimica Biologica</i>	
 Partner: Speranza Esposito <i>Istituto Europeo per la Ricerca in Fibrosi Cistica - IERFC c/o Istituto Scientifico San Raffaele, Milano</i> Valeria Raia <i>Università di Napoli Federico II, Centro Regionale Fibrosi Cistica</i>	
 Grant assegnato:	€95.000
 Usato per:	
• Materiale di consumo	€72.767
• Borse di studio	€9.300
• Servizi scientifici	€12.558
	€94.625
 Saldo (usato per altri progetti)	€375