



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



### Progetto FFC#6/2019

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

## Identificazione di deubiquitinasi e ubiquitina- ligasi che influenzano la correzione della proteina CFTR mutata



**Chi ha condotto la ricerca:**

*Responsabile:*

**Luis Galletta**

*Istituto Telethon di Genetica e*

*Medicina - TIGEM, Pozzuoli, Napoli*



**Ricercatori coinvolti: 7**



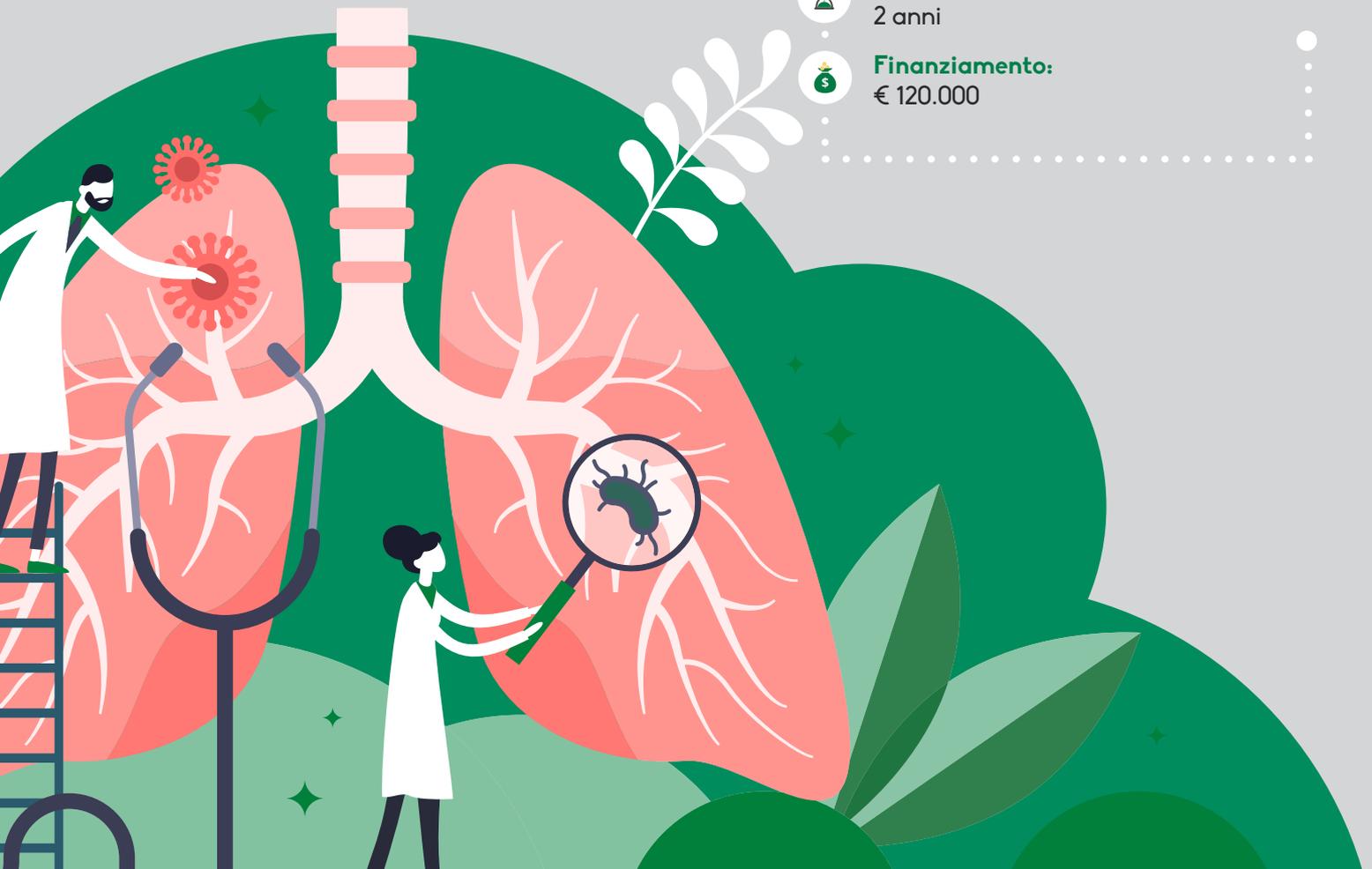
**Qual è la durata dello studio:**

2 anni



**Finanziamento:**

€ 120.000





## Perché è importante

I farmaci modulatori hanno bisogno di una proteina CFTR su cui agire. All'interno delle cellule esistono enzimi che controllano la produzione delle proteine e attaccano un'etichetta a quelle anomale per eliminarle. Ciò vale anche per la proteina CFTR mutata. L'enzima che attacca l'etichetta si chiama ubiquitina-ligasi (UBL) e l'etichetta si chiama ubiquitina. Esistono anche proteine con azione contraria: si chiamano deubiquitinasi (DUB) e rimuovono le etichette dalle proteine mutate o anomale.



## Che cosa hanno usato i ricercatori

Sono state studiate cellule in coltura che esprimono la proteina CFTR con mutazione F508del, linee cellulari ingegnerizzate (cioè opportunamente modificate) e cellule bronchiali ottenute da pazienti con fibrosi cistica per comprendere l'interazione tra le ubiquitina-ligasi, le deubiquitinasi e CFTR.



## Che cosa hanno fatto i ricercatori

Con tecniche biochimiche, di biologia molecolare e microscopia i ricercatori hanno studiato il tipo di interazione (fisica e/o funzionale) tra le proteine UBL, DUB e CFTR. Per valutare l'azione di questi enzimi nell'ubiquitinazione di CFTR è stato usato anche il silenziamento genico, una tecnica che consiste nello spegnimento di un gene per capirne la funzione.



## Che cosa hanno ottenuto

È stato identificato un piccolo gruppo di proteine DUB e UBL che influenzano il recupero della funzione di CFTR mediato dai correttori. Si è visto che modulando l'azione di questi enzimi e usando una combinazione di farmaci correttori di CFTR è possibile recuperare la funzione della proteina canale.



## Che cosa succederà ora

I dati raccolti sembrano promettenti per lo sviluppo di strategie che migliorino l'efficacia di trattamenti farmacologici per la proteina con F508del e altre mutazioni simili. L'ipotesi è quella di sviluppare farmaci che proteggono la CFTR mutata dalla degradazione, promuovendo l'attività di DUB e/o inibendo l'attività delle UBL e favorendo così l'azione dei correttori.

## Per saperne di più



### Obiettivi

**Identificazione delle proteine UBL e DUB, che rispettivamente degradano o salvano dalla degradazione la CFTR mutata.**

L'ipotesi da cui partono i ricercatori in questo progetto è che la proteina CFTR con la mutazione F508del, nonostante il trattamento con correttori, sia in gran parte eliminata a causa di proteine intracellulari chiamate ubiquitina-ligasi (UBL). Le UBL agiscono da controllori: riconoscono la proteina CFTR con la mutazione F508del e attaccano a essa l'ubiquitina, una specie di etichetta molecolare che una volta assegnata determina l'eliminazione della proteina mutata. Esistono tuttavia anche proteine con azione contraria: si chiamano deubiquitinasi (DUB), ne esistono circa 100 e rimuovono l'ubiquitina salvando le proteine dalla degradazione. L'obiettivo del progetto è identificare le UBL e le DUB che determinano il destino della proteina CFTR mutata. I ricercatori useranno sia cellule in coltura che esprimono la proteina CFTR con mutazione F508del sia linee cellulari ingegnerizzate (cioè opportunamente modificate) e sia cellule primarie bronchiali ottenute in precedenza da pazienti con fibrosi cistica. Applicheranno diverse tecniche complementari che permettono di comprendere il tipo di interazione (fisica e/o funzionale) tra UBL, DUB e CFTR. Attraverso questi studi, intendono identificare le proteine che sono maggiormente coinvolte nella degradazione della proteina CFTR mutata ed evidenziare come, intervenendo su queste, si potrebbe ottenere un potenziamento dell'effetto dei correttori.



### Risultati

**Identificate proteine ubiquitinasi e deubiquitinasi la cui modulazione cambia la funzione di CFTR mutata. Nuova ipotesi terapeutica per favorire l'azione dei correttori.**

F508del, la mutazione più frequente tra i pazienti con fibrosi cistica, provoca un grave difetto di stabilità e maturazione della proteina CFTR. Tale difetto può essere corretto da farmaci, chiamati correttori, la cui efficacia può essere limitata da processi cellulari che provocano la degradazione precoce della proteina mutata. I ricercatori hanno ipotizzato che la proteina CFTR con F508del, nonostante il trattamento con correttori, sia in parte eliminata a causa di proteine intracellulari chiamate ubiquitina-ligasi (UBL). Le UBL agiscono da controllori: riconoscono la proteina CFTR con la mutazione F508del e attaccano a essa l'ubiquitina, una specie di etichetta molecolare che ne determina l'eliminazione. Esistono anche proteine con azione contraria: si chiamano deubiquitinasi (DUB) che rimuovono l'ubiquitina salvando le proteine dalla degradazione.

Il progetto ha permesso di identificare un piccolo gruppo di DUB e di UBL (USP13, USP15, UCHL1, BAP1, USP39, OTUD7B, HUWE1) che, se opportunamente modulate mediante silenziamento genico (che ne riduce o azzerava la produzione), sono in grado di cambiare la funzione della proteina CFTR mutata. Sono stati anche condotti esperimenti in cui le cellule sono state trattate con combinazioni di correttori con meccanismo d'azione complementare. I risultati indicano un recupero della funzione di CFTR. I dati raccolti sembrano promettenti per lo sviluppo di strategie che migliorino l'efficacia di trattamenti farmacologici per la proteina con F508del e altre mutazioni simili. L'ipotesi è quella di sviluppare farmaci mirati che, promuovendo l'attività di DUB e/o inibendo l'attività di UBL, abbiano l'effetto desiderato di proteggere la CFTR mutata dalla degradazione, favorendo l'azione dei correttori.

## Pubblicazioni



### Evaluation of Fused Pyrrolothiazole Systems as Correctors of Mutant CFTR Protein, *Molecules* (Basel, Switzerland), Volume 26, Febbraio 2021



Article

#### Evaluation of Fused Pyrrolothiazole Systems as Correctors of Mutant CFTR Protein

Virginia Spanò <sup>1</sup>, Marilia Barreca <sup>1</sup>, Vincenzo Cilibrasi <sup>1</sup>, Michele Genovese <sup>2</sup>, Mario Renda <sup>2</sup>,  
Alessandra Montalbano <sup>1,\*</sup>, Luis Juan Vicente Galiotta <sup>2,3</sup> and Paola Barraja <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Biological, Chemical, and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF), University of Palermo, Via Archirafi 32, 90123 Palermo, Italy; virginia.spano@unipa.it (V.S.); marilia.barreca@unipa.it (M.B.); vincenzocilibrasi@gmail.com (V.C.); paola.barraja@unipa.it (P.B.)
  - <sup>2</sup> Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Campi Flegrei 34, 80078 Naples, Italy; m.genovese@tigem.it (M.G.); m.renda@tigem.it (M.R.); l.galiotta@tigem.it (L.J.V.G.)
  - <sup>3</sup> Department of Translational Medical Sciences (DISMET), University of Naples, "Federico II", Via Sergio Pansini 5, 80131 Naples, Italy
- \* Correspondence: alessandra.montalbano@unipa.it; Tel.: +39-091-238-968-22

**Abstract:** Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease caused by mutations that impair the function of the CFTR chloride channel. The most frequent mutation, F508del, causes misfolding and premature degradation of CFTR protein. This defect can be overcome with pharmacological agents named "correctors". So far, at least three different classes of correctors have been identified based on the additive/synergistic effects that are obtained when compounds of different classes are combined together. The development of class 2 correctors has lagged behind that of compounds belonging to the other classes. It was shown that the efficacy of the prototypical class 2 corrector, the bithiazole corr-4a, could be improved by generating conformationally-locked bithiazoles. In the present study, we investigated the effect of tricyclic pyrrolothiazoles as analogues of constrained bithiazoles. Thirty-five compounds were tested using the functional assay based on the halide-sensitive yellow fluorescent protein (HS-YFP) that measured CFTR activity. One compound, having a six atom carbocycle central ring in the tricyclic pyrrolothiazole system and bearing a pivalamide group at the thiazole moiety and a 5-chloro-2-methoxyphenyl carboxamide at the pyrrole ring, significantly increased F508del-CFTR activity. This compound could lead to the synthesis of a novel class of CFTR correctors.

**Keywords:** cystic fibrosis; CFTR; F508del-CFTR; CFTR corrector; CFTR potentiator



**Citation:** Spanò, V.; Barreca, M.; Cilibrasi, V.; Genovese, M.; Renda, M.; Montalbano, A.; Galiotta, L.J.V.; Barraja, P. Evaluation of Fused Pyrrolothiazole Systems as Correctors of Mutant CFTR Protein. *Molecules* **2021**, *26*, 1275. <https://doi.org/10.3390/molecules26051275>

**Author Contributions:** V.C., M.B. and V.S. carried out synthesis and characterizations; M.G. and M.R. performed functional studies; L.J.V.G. supervision and draft preparation; A.M. and P.B. supervision and writing—original draft preparation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Italian Cystic Fibrosis Research Foundation, grant number FFC#4/2018 (adopted by FFC Delegation from Vercelli), and FFC#6/2019 (adopted by FFC Delegation from Alba Cuneo).

**Acknowledgments:** This work was financially supported by Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca (MIUR).

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

**Sample Availability:** Samples of the compounds are available from the authors upon reasonable request.

## Publicazioni



**Comprehensive analysis of combinatorial pharmacological treatments to correct nonsense mutations in the CFTR Gene, *International journal of molecular sciences*, Volume 22, Novembre 2021**



Article

### Comprehensive Analysis of Combinatorial Pharmacological Treatments to Correct Nonsense Mutations in the CFTR Gene

Arianna Venturini <sup>1</sup>, Anna Borrelli <sup>1</sup>, Iliaria Musante <sup>2,3</sup>, Paolo Scudieri <sup>2,3</sup>, Valeria Capurro <sup>2</sup>, Mario Renda <sup>1</sup>, Nicoletta Pedemonte <sup>2</sup> and Luis J. V. Galletta <sup>1,4,\*</sup>

- <sup>1</sup> Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), 80078 Pozzuoli, Italy; a.venturini@tigem.it (A.V.); a.borrelli@tigem.it (A.B.); m.renda@tigem.it (M.R.)
  - <sup>2</sup> U.O.C. Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genova, Italy; ilia.musante@unige.it (I.M.); paolo.scudieri@unige.it (P.S.); valeriacapurro@yahoo.it (V.C.); nicoletta.pedemonte@unige.it (N.P.)
  - <sup>3</sup> Department of Neurosciences, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINOGMI), Università degli Studi di Genova, 16132 Genova, Italy
  - <sup>4</sup> Department of Translational Medical Sciences (DISMET), Università degli Studi di Napoli "Federico II", 80131 Napoli, Italy
- \* Correspondence: l.galletta@tigem.it; Tel: +39-081-1923-0693

**Abstract:** Cystic fibrosis (CF) is caused by loss of function of the CFTR chloride channel. A substantial number of CF patients carry nonsense mutations in the *CFTR* gene. These patients cannot directly benefit from pharmacological correctors and potentiators that have been developed for other types of CFTR mutations. We evaluated the efficacy of combinations of drugs targeting at various levels the effects of nonsense mutations: SMG11 to protect CFTR mRNA from nonsense-mediated decay (NMD), G418 and ELX-02 for readthrough, VX-809 and VX-445 to promote protein maturation and function, PTI-428 to enhance CFTR protein synthesis. We found that the extent of rescue and sensitivity to the various agents is largely dependent on the type of mutation, with W1282X and R553X being the mutations most and least sensitive to pharmacological treatments, respectively. In particular, W1282X-CFTR was highly responsive to NMD suppression by SMG11 but also required treatment with VX-445 corrector to show function. In contrast, G542X-CFTR required treatment with readthrough agents and VX-809. Importantly, we never found cooperativity between the NMD inhibitor and readthrough compounds. Our results indicate that treatment of CF patients with nonsense mutations requires a precision medicine approach with the design of specific drug combinations for each mutation.

**Keywords:** cystic fibrosis; nonsense mutation; chloride channel; readthrough therapy; CFTR rescue



**Citation:** Venturini, A.; Borrelli, A.; Musante, I.; Scudieri, P.; Capurro, V.; Renda, M.; Pedemonte, N.; Galletta, L.J.V. Comprehensive Analysis of Combinatorial Pharmacological Treatments to Correct Nonsense Mutations in the CFTR Gene. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11972. <https://doi.org/10.3390/ijms222111972>

Academic Editor: Hugo R. De Jonge

**Funding:** This work was supported by a research grant from the University of Pennsylvania Orphan Disease Center in partnership with the Movin' for Mallory Organization, by Telethon Foundation (TMLGCBX16TT), and by **Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC#6/2019)**.

**Institutional Review Board Statement:** The collection and study of airway epithelial cells were specifically approved by the Ethics Committee of the Istituto Giannina Gaslini following the guidelines of the Italian Ministry of Health (registration numbers: ANTECER, 042-09/07/2018 and 28/2020). Each patient provided informed consent to the study using a form that was also approved by the Ethics Committee.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in the article and Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** We thank Martin Mense, Hillary Valley, Deborah Benjamin, and Priyanka Bhatt (Cystic Fibrosis Foundation Laboratory) for the gene-edited 16HBE14o- cells and the native W1282X/W1282X bronchial epithelial cells. We thank David M. Bedwell (University of Alabama at Birmingham) for the G542C-CFTR plasmid. We also thank the Cystic Fibrosis Foundation for providing the SMG11 compound.

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

## Publicazioni



**Ionocytes and CFTR chloride channel expression in normal and cystic fibrosis nasal and bronchial epithelial cells, *Cells*, Volume 9, Settembre 2020**



Article

### **Ionocytes and CFTR Chloride Channel Expression in Normal and Cystic Fibrosis Nasal and Bronchial Epithelial Cells**

Paolo Scudieri <sup>1,2</sup>, Ilaria Musante <sup>1,2</sup>, Arianna Venturini <sup>3</sup> , Daniela Guidone <sup>3</sup>, Michele Genovese <sup>3</sup>, Federico Cresta <sup>4</sup>, Emanuela Caci <sup>2</sup> , Alessandro Palleschi <sup>5</sup> , Marco Poeta <sup>6</sup> , Francesca Santamaria <sup>6</sup>, Fabiana Ciciriello <sup>7</sup> , Vincenzina Lucidi <sup>7</sup> and Luis J. V. Galiotta <sup>3,6,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurosciences, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DiNOGMI), University of Genova, 16147 Genova, Italy; paolo.scudieri@unige.it (P.S.); ilaria.musante@unige.it (I.M.)

<sup>2</sup> Medical Genetics Unit, Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genova, Italy; emanuela.caci@unige.it

<sup>3</sup> Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), 80078 Pozzuoli (NA), Italy; a.venturini@tigem.it (A.V.); d.guidone@tigem.it (D.G.); m.genovese@tigem.it (M.G.)

<sup>4</sup> Centro Fibrosi Cistica, Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genova, Italy; federicocresta@gaslini.org

<sup>5</sup> Thoracic Surgery and Lung Transplantation Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda-Ospedale Maggiore Policlinico, 20122 Milano, Italy; alepalleschi@gmail.com

<sup>6</sup> Department of Translational Medical Sciences, Università di Napoli "Federico II", 80131 Napoli, Italy; po3ta.89@gmail.com (M.P.); santamar@unina.it (F.S.)

<sup>7</sup> Cystic Fibrosis Unit, Bambino Gesù Children's Hospital, 00165 Roma, Italy; fabiana.ciciriello@opbg.net (F.C.); vincenzina.lucidi@opbg.net (V.L.)

\* Correspondence: l.galiotta@tigem.it

Received: 28 July 2020; Accepted: 4 September 2020; Published: 13 September 2020



**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/9/2090/s1>, Figure S1: Analysis of nasal epithelium composition, Figure S2: Characterization of cells in the expansion phase, Figure S3: Rescue of F508del-CFTR expression by combination of correctors.

**Author Contributions:** P.S., I.M., A.V., D.G., M.G., F.C. (Federico Cresta), E.C., A.P., F.C. (Fabiana Ciciriello), and V.L. collected data; P.S., M.P., F.C. (Fabiana Ciciriello), V.L., and L.J.V.G. analyzed data; P.S., A.P., F.S., F.C. (Fabiana Ciciriello), V.L., and L.J.V.G. designed the study; P.S. and L.J.V.G. prepared the manuscript and figures. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from Telethon Foundation (TMLGCBX16TT), Cystic Fibrosis Foundation (GALIET19G0), and **Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC#6/2019)**.

**Acknowledgments:** We thank Nicoletta Pedemonte (Istituto Giannina Gaslini, Genova) for helping in the collection of samples. We thank Sven Enerbäck (University of Gothenburg) for kindly providing us with the FOXI1 plasmid.

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

## Pubblicazioni



Partial rescue of F508del-CFTR stability and trafficking defects by double corrector treatment, *International journal of molecular sciences*, Volume 22, Maggio 2021



International Journal of  
*Molecular Sciences*



Article

### Partial Rescue of F508del-CFTR Stability and Trafficking Defects by Double Corrector Treatment

Valeria Capurro <sup>1,†</sup>, Valeria Tomati <sup>1,†</sup>, Elvira Sondo <sup>1</sup>, Mario Renda <sup>2</sup>, Anna Borrelli <sup>2</sup>, Cristina Pastorino <sup>1</sup>, Daniela Guidone <sup>2</sup>, Arianna Venturini <sup>2</sup>, Alessandro Girardo <sup>3</sup>, Sine Mandrup Bertozzi <sup>4</sup>, Iliaria Musante <sup>1,5</sup>, Fabio Bertozzi <sup>3</sup>, Tiziano Bandiera <sup>3</sup>, Federico Zara <sup>1,5</sup>, Luis J. V. Galiotta <sup>2,6,\*</sup> and Nicoletta Pedemonte <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> U.O.C. Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genova, Italy; valeriacapurro@yahoo.it (V.C.); valeriatomati@gaslini.org (V.T.); elvirasondo@gaslini.org (E.S.); cristinapastorino22@gmail.com (C.P.); ilaria.musante@unige.it (I.M.); federico.zara@unige.it (F.Z.)
  - <sup>2</sup> Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), 80078 Pozzuoli, Italy; m.renda@tigem.it (M.R.); a.borrelli@tigem.it (A.B.); d.guidone@tigem.it (D.G.); a.venturini@tigem.it (A.V.)
  - <sup>3</sup> D3-PharmaChemistry, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, 16163 Genova, Italy; alessandro.girardo@iit.it (A.G.); fabio.bertozzi@iit.it (F.B.); tiziano.bandiera@iit.it (T.B.)
  - <sup>4</sup> Analytical Chemistry Lab, Istituto Italiano di Tecnologia, Via Morego 30, 16163 Genova, Italy; sine.bertozzi@iit.it
  - <sup>5</sup> Department of Neurosciences, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINO GMI), University of Genoa, 16132 Genova, Italy
  - <sup>6</sup> Department of Translational Medical Sciences (DISMET), University of Naples Federico II, 80131 Naples, Italy
- \* Correspondence: l.galiotta@tigem.it (L.J.V.G.); nicolettapedemonte@gaslini.org (N.P.)  
† These authors equally contributed to this paper and are listed in alphabetical order.

**Funding:** This work was supported by Italian Cystic Fibrosis Foundation grants FFC #9/2019 to N.P. (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”), FFC#6/2019 to L.J.V.G., and “Task Force for Cystic Fibrosis—Extension” to T.B. Work in N.P.’s lab is also supported by the Italian Ministry of Health through Cinque per mille and Ricerca Corrente (Linea1). L.J.V.G. also acknowledges grant TMLGCBX16TT from the Telethon Foundation.

## Rendiconto economico



### Progetto FFC#6/2019

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

## Identificazione di deubiquitinasi e ubiquitina- ligasi che influenzano la correzione della proteina CFTR mutata

 <b>Periodo:</b> 01/09/2019 – 30/11/2021 (tre mesi di proroga)	
 <b>Responsabile:</b> <b>Luis Juan Vicente Galletta</b> Istituto Telethon di Genetica e Medicina - TIGEM, Pozzuoli, Napoli	
 <b>Grant assegnato:</b>	<b>€120.000</b>
 <b>Usato per:</b>	
• Materiale di consumo	€71.138
• Borse di studio	€27.800
• Servizi scientifici	€1.350
	<b>€100.288</b>
 <b>Saldo (usato per altri progetti)</b>	<b>€19.712</b>