

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**  
*CURRICULUM IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI E*  
*GERONTOLOGICHE*

**XXIX Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

**TESI DI DOTTORATO**

**CARATTERIZZAZIONE DELLA FUNZIONE DI PI3K GAMMA**  
**COME NUOVO BERSAGLIO TERAPEUTICO NELLA**  
**FIBROSI CISTICA**

TUTOR/RELATORE

**Chiar.mo**  
**Prof. Domenico Bonaduce**

CANDIDATA

**Dott.ssa Flora Pirozzi**

## INDICE

### INTRODUZIONE

Fibrosi cistica	<i>pag 1</i>
Mutazioni del <i>CFTR</i>	<i>pag 2</i>
Ipotesi fisiopatologiche delle manifestazioni respiratorie	<i>pag 3</i>
Ruolo dell'AMP ciclico nell'attivazione del CFTR	<i>pag 4</i>
Modulatori del CFTR per la terapia della FC	<i>pag 5</i>
Il ruolo della fosfoinositide 3 chinasi $\gamma$ (PI3K $\gamma$ )	<i>pag 6</i>

### OBIETTIVO DELLA RICERCA

*pag 8*

### METODI

<i>In vitro</i>	
Anticorpi, plasmidi e reagenti	<i>pag 9</i>
Colture cellulari	<i>pag 9</i>
Trasfezione	<i>pag 10</i>
Estrazione di proteine e immunoprecipitazione	<i>pag 10</i>
Immunofluorescenza	<i>pag 11</i>
Saggio FRET	<i>pag 11</i>
Saggio delle PDE	<i>pag 12</i>
Estrazione e quantificazione dell'AMP ciclico	<i>pag 12</i>
<i>In vivo</i>	<i>pag 13</i>
<i>Analisi statistica.</i>	<i>pag 13</i>

### RISULTATI

PI3K $\gamma$ lega il CFTR e regola i livelli di AMP ciclico nelle vie aeree	<i>pag 14</i>
Il peptide derivato da PI3K $\gamma$ aumenta i livelli di AMP ciclico nelle vie aeree influenzando la funzione del CFTR in vivo ed in vitro	<i>pag 16</i>

### DISCUSSIONE

*pag 18*

### CONCLUSIONI

*pag 20*

### BIBLIOGRAFIA

*pag 21*

## INTRODUZIONE

**La fibrosi cistica.** La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva (AR) causata dalla mutazione del gene *CFTR* (regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica). Tra le malattie genetiche a trasmissione AR la FC è quella a più alta prevalenza nella popolazione caucasica dell'Europa, degli Stati Uniti e dell'Australia. Grazie al progresso terapeutico ottenuto negli ultimi anni la prognosi è nettamente migliorata, portando l'aspettativa di vita dei pazienti affetti da FC sopra i 40 anni<sup>1</sup>. Il gene *CFTR*, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7, codifica per una proteina canale che appartiene alla famiglia dei trasportatori ATP-binding cassette (ABC) ed è formata da 2 domini trans-membrana (MSD1 e MSD2) e 3 domini citosolici, di cui uno regolatorio e due domini che legano nucleotidi (NBD1 e NBD2)<sup>2</sup> [Fig.1].

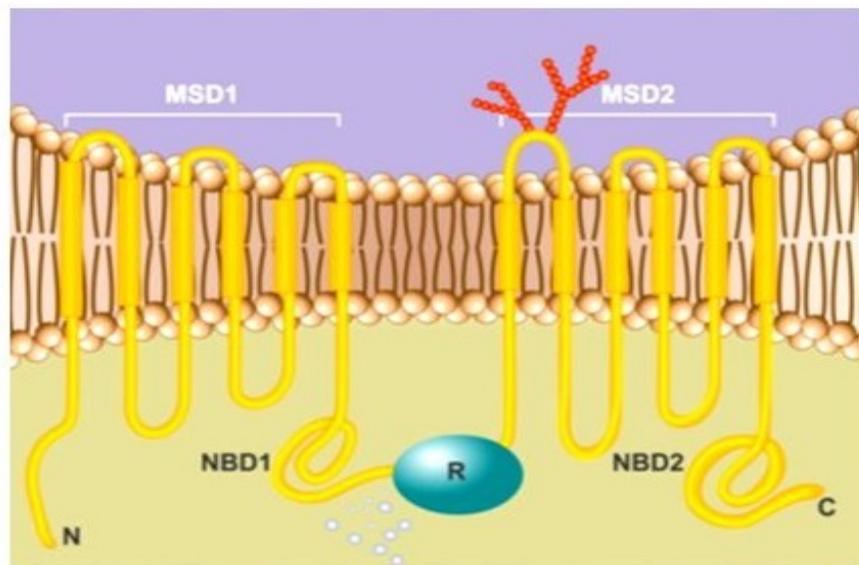


Figura 1: Rappresentazione schematica della proteina canale CFTR.

Questo canale è responsabile dell'efflusso di cloro e bicarbonati dalle cellule secretorie epiteliali dove, insieme ad altri canali ionici, tra cui il canale epiteliale del sodio (ENaC), controlla il trasporto di elettroliti e quindi la secrezione di acqua. Il gene *CFTR* è normalmente espresso in tutti gli organi

epiteliali, pertanto la FC si presenta come una malattia multiorgano: l'insufficienza respiratoria è la principale manifestazione della patologia, seguita dalla disfunzione pancreatica e il conseguente malassorbimento, insieme alla cirrosi biliare e all'infertilità<sup>1</sup>.

**Mutazioni del *CFTR*.** Dalla scoperta della mutazione del *CFTR* fino ad oggi sono state identificate più di 2000 varianti geniche<sup>1</sup>. La maggior parte delle mutazioni sono missenso, ma sono state descritte anche mutazioni nonsense, inserzioni o delezioni in frame, mutazioni di splicing o frame-shift. Se da una parte poche mutazioni ben caratterizzate sono responsabili da sole dell'85% dei casi di FC, dall'altra parte alcune varianti sembrano avere una scarsa rilevanza clinica<sup>3</sup>.

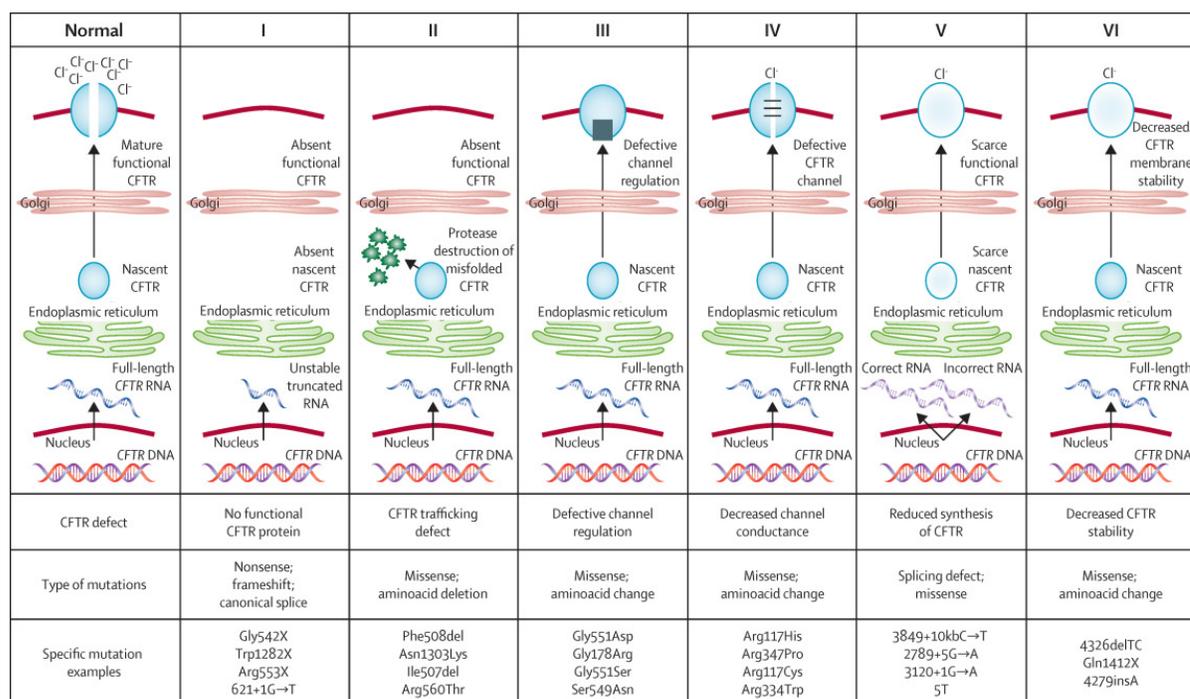


Figura 2: classificazione delle mutazioni del *CFTR*.<sup>1</sup>

Data la numerosità delle mutazioni del gene *CFTR*, sono state suddivise in 6 gruppi [Fig.2] a seconda del prodotto proteico che ne deriva, ed in particolare, della sua presenza o meno in membrana, e della sua funzionalità e stabilità quando presente. Alla classe I appartengono quelle mutazioni in cui è presente un RNA instabile o tronco, per cui la proteina non viene affatto sintetizzata, mentre nelle mutazioni di classe II la proteina viene prodotta, ma per un difetto di

folding viene subito avviata alla degradazione nel reticolo endoplasmatico, e il canale non arriva in membrana. Invece, nelle mutazioni di classe III la proteina è prodotta, riesce ad essere espressa in membrana, ma il canale presenta difetti nella regolazione. In queste prime 3 classi la proteina non ha funzione residua e i pazienti hanno un esordio precoce di malattia, con un fenotipo più severo. Per quanto riguarda le classi IV, V e VI, la proteina viene espressa in membrana e, nonostante abbia una ridotta funzione o minore stabilità, la patologia è in genere meno severa. La mutazione più frequente in Europa appartiene alla classe II ed è dovuta alla delezione della Fenilalanina in posizione 508: questo determina un misfolding della proteina che viene subito avviata alla degradazione nel reticolo endoplasmatico, senza mai raggiungere la membrana plasmatica. Questa classificazione, nonostante risulti molto utile per catalogare le numerose mutazioni esistenti, ha un ruolo più limitato nel predire il fenotipo corrispondente perché le manifestazioni cliniche possono essere molto diverse in pazienti con la stessa mutazione e viceversa. La grande variabilità nell'espressione clinica, soprattutto in ambito respiratorio, suggerisce la presenza di fattori non legati alle sole mutazioni del *CFTR*, ma ai complessi meccanismi di difesa delle vie respiratorie, tra cui il PH del liquido di superficie, i macrofagi residenti, le mucine e le proteine battericide, oltre alla complessa rete di citochine infiammatorie in risposta agli agenti infettivi <sup>4,5</sup>.

**Ipotesi fisiopatologiche delle manifestazioni respiratorie.** Le manifestazioni respiratorie, come detto, sono le più evidenti e costituiscono attualmente la principale causa di morte nei pazienti affetti da FC. La perdita di funzione del *CFTR* induce alterazioni a carico del liquido di superficie bronchiale e dei normali sistemi di difesa locali, predisponendo l'instaurarsi di infezioni polmonari ricorrenti, che presto sfociano in una broncopneumopatia cronica, fino all'insufficienza respiratoria che richiede nella maggior parte dei casi il trapianto polmonare<sup>6</sup>. Il liquido di superficie bronchiale costituisce normalmente la prima barriera contro i potenziali patogeni presenti nell'ambiente esterno, grazie ad un'attività antimicrobica data da meccanismi di difesa innati, così come al trasporto mucociliare che allontana meccanicamente i patogeni dai polmoni, ed infine alla presenza nel suo contesto

di cellule fagocitiche. Quando il CFTR non è funzionante si ha una disidratazione delle mucose bronchiali, una riduzione dell'altezza del liquido peri-ciliare e un sovvertimento della clearance muco-ciliare. L'ipotesi fisiopatologica alla base dei cambiamenti del liquido di superficie bronchiale più diffusa è legata all'alterazione dell'equilibrio tra la secrezione di anioni (cloro e bicarbonati) attraverso il CFTR, e il riassorbimento di sodio attraverso il canale epiteliale del sodio (ENaC)<sup>7</sup>. Il meccanismo alla base dell'aumentata attività di ENaC non è completamente chiaro, nonostante ci siano numerosi studi. Alcuni ricercatori sostengono che l'aumento del cloro intracellulare possa da solo aumentare l'attività di ENaC, altri invece hanno dimostrato un'interazione proteina-proteina diretta con il CFTR, suggerendo quindi che l'iper-attivazione di ENaC sia collegata direttamente alla disfunzione del CFTR. Secondo altri ricercatori, l'attivazione di ENaC sarebbe mediata da alcune proteasi, tra cui le elastasi dei neutrofili che sono abbondanti nei polmoni dei pazienti affetti da FC<sup>8</sup>. Sebbene nelle fasi iniziali della patologia non sia dimostrato un aumento diretto del riassorbimento di sodio, è stato però dimostrato che l'amiloride, che blocca direttamente il canale del sodio, provoca una riduzione del voltaggio trans-epiteliale più accentuata nelle cellule di pazienti con FC, indicando che l'alterata conduttanza al cloro è comunque responsabile delle alterazioni a carico delle correnti sodio-dipendenti<sup>6</sup>.

Un'altra modificazione che sembra fondamentale per l'instaurarsi della patologia è l'acidificazione del pH del liquido di superficie bronchiale, che indebolirebbe i meccanismi di difesa respiratori in due modi: 1) inibendo il potere antimicrobico del liquido di superficie bronchiale e 2) impedendo il trasporto muco-ciliare per l'aumentata della viscosità del muco stesso. La perdita di funzione del CFTR sarebbe infatti in grado di modificare direttamente il pH del liquido di superficie bronchiale bloccando la secrezione dei bicarbonati<sup>9</sup>.

**Ruolo dell'AMP ciclico nell'attivazione del CFTR.** Il canale CFTR appartiene, come detto precedentemente, alla famiglia dei trasportatori ABC, e la sua regolazione avviene mediante la formazione di complessi macromolecolari dinamici a livello della membrana apicale delle cellule

epiteliali. Il recettore  $\beta_2$  adrenergico, che è il principale recettore adrenergico nelle vie aeree, fa parte di uno di questi complessi e la sua stimolazione media l'attivazione del CFTR. Infatti il recettore  $\beta_2$  attiva l'adenilato ciclasi (AC) che produce AMP ciclico (AMPc), che in ultimo attiva la proteina chinasi A (PKA). La PKA è effettore di questa via di segnalazione e il dominio regolatorio del CFTR è tra i suoi substrati: la fosforilazione di questo dominio modifica la conformazione del canale consentendo il passaggio di anioni<sup>10</sup>. Il segnale viene invece terminato dall'idrolisi dell'AMPc da parte delle fosfodiesterasi (PDE). Esistono più di 100 isoforme di PDE. Esse sono codificate da un gruppo di 21 geni suddiviso in 11 famiglie che sono distribuite diversamente nei vari tessuti e nei vari compartimenti cellulari. Le isoforme 3 e 4 (PDE3 e PDE4) sono quelle maggiormente espresse nelle vie aeree e quindi implicate nell'idrolisi dell'AMPc a questo livello.

Sulla base della normale fisiologia del CFTR si è quindi preso in considerazione di usare come strategia terapeutica per la FC dei farmaci attivatori dell'AC, come la forskolina (FSK), o inibitori ad ampio spettro delle PDE, come la 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), per aumentare i livelli di AMPc. L'efficacia di questo trattamento è risultata però limitata per il numero insufficiente di copie di CFTR presenti in membrana. Inoltre la comparsa di importanti effetti collaterali dovuti alla scarsa specificità degli inibitori delle PDE ha scoraggiato lo sviluppo ulteriore di queste molecole<sup>11</sup>. Come detto precedentemente, la funzione delle diverse isoforme delle PDE non è ridondante, dal momento che ciascuna controlla i livelli di AMPc in uno specifico compartimento subcellulare. Questa caratteristica fornisce l'opportunità di agire selettivamente su un micro-dominio cellulare mediante la modulazione di una specifica fosfodiesterasi<sup>11</sup>. Purtroppo anche l'uso del Roflumilast un inibitore selettivo dell'isoforma più rappresentata nelle vie aeree, la PDE4, non ha dato buoni risultati clinici, principalmente per la presenza di effetti collaterali dovuti probabilmente alla sua inibizione sistemica<sup>12</sup>.

**Modulatori del CFTR per la terapia della FC.** Negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi farmaci definiti “correttori” (come ad esempio il VX-809, noto come lumacaftor) e “potenziatori”

(come ad esempio il VX-770 o ivacaftor) del CFTR, che ripristinano rispettivamente l'espressione e la conduttanza del canale mutato. Il loro utilizzo combinato è stato recentemente approvato per il trattamento di pazienti di età superiore ai 12 anni e portatori della mutazione più diffusa, F508del, in omozigosi<sup>13</sup>. Tuttavia, l'efficacia clinica è ancora insufficiente dal momento che i pazienti mostrano solo piccoli miglioramenti della funzione polmonare (miglioramento del FEV1 < 4%). Questo potrebbe essere dovuto ad un'interferenza tra i due composti durante il trattamento. Studi recenti hanno dimostrato che il trattamento cronico con il potenziatore VX-770 destabilizza il CFTR corretto dal VX-809 aumentandone il turnover<sup>14,15</sup>. L'insuccesso delle attuali terapie per la fibrosi cistica pone quindi la necessità di ricercare nuove strategie terapeutiche.

**Il ruolo della fosfoinositide 3 chinasi  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ).** Le PI3K sono una famiglia di enzimi implicati nella via di segnalazione dei lipidi di membrana, noti come fosfoinositoli. Questi enzimi sono raggruppati in 3 classi e tra questi la PI3K $\gamma$  appartiene alla classe I. Le PI3K di classe I sono normalmente attivate dai recettori transmembrana accoppiati alle proteine G (GPCRs) tra cui il recettore beta adrenergico, e mediano la formazione del fosfatidil-inositolo 3-fosfato (PIP3). La classe I è in realtà ulteriormente suddivisa in due sottogruppi e la PI3K $\gamma$  è l'unico membro della classe IB. E' formata dalla subunità catalitica (p110 $\gamma$ ) che può associarsi alle subunità regolatorie p101 o p84/87<sup>16</sup>. E' stato però dimostrato che PI3K $\gamma$  ha un'attività indipendente dalla produzione di PIP3, ma legata alla sua capacità di ancorare altre proteine (attività scaffold)<sup>17</sup>. Recentemente è stato dimostrato che questa funzione di PI3K $\gamma$  è implicata nei meccanismi che portano alla riduzione dell'AMPc a valle del  $\beta$ 2 recettore. In particolare, nelle cellule cardiache, PI3K $\gamma$  media la fosforilazione da parte di PKA e quindi l'attivazione, delle PDE 3A, 4B e 4D, legandole in uno stesso complesso macromolecolare grazie alla sua funzione scaffold. E' stato infatti dimostrato che la subunità p110 $\gamma$  lega da una parte la PDE3B<sup>17</sup> e dall'altro la subunità RII $\alpha$  di PKA<sup>18</sup>. Questa attivazione delle PDE mediata da PI3K $\gamma$  in specifici compartimenti subcellulare, avvia la

degradazione dell'AMPC e la terminazione del segnale a valle del recettore  $\beta_2$  adrenergico<sup>18,19</sup> [Fig. 3].

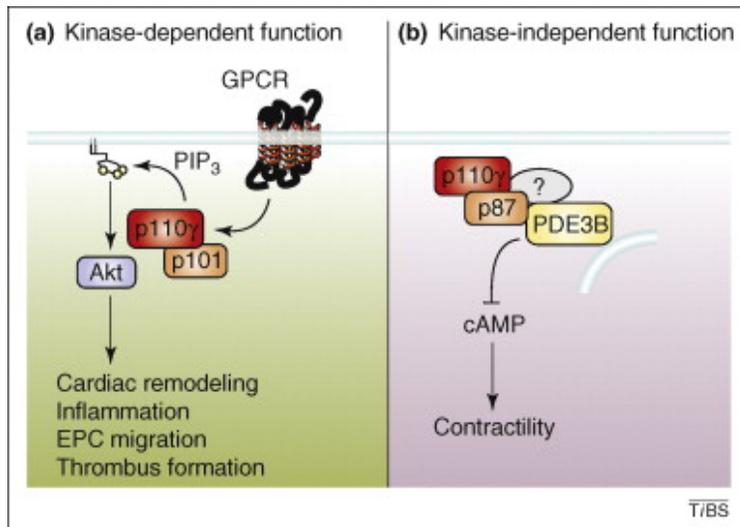


Figura 3: Funzione chinastica e scaffold di PI3K $\gamma$ <sup>20</sup>.

L'importanza fisiologica di questo meccanismo è ulteriormente dimostrata dalla constatazione che l'interruzione della funzione scaffold di PI3K $\gamma$  attiva pool di PKA localizzati in prossimità delle diverse proteine regolatrici del calcio (Ca<sup>+</sup>), amplificando quindi le correnti del Ca<sup>+</sup> e comportando l'insorgenza di aritmie ventricolari<sup>19</sup>. Sulla base di queste osservazioni risulta evidente che interferire con l'attività scaffold di PI3K $\gamma$  permetterebbe di manipolare alcuni specifici pool di AMPc.

## **OBIETTIVO DELLA RICERCA**

L'obiettivo della nostra ricerca è quello di sviluppare un nuovo trattamento efficace per la FC. In particolare, ci proponiamo di valutare in modelli in vitro e in vivo l'efficacia di un peptide proveniente dall'enzima fosfoinositolo-3 chinasi $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ), in grado di interrompere l'attività scaffold di PI3K $\gamma$ , che è stato recentemente identificato e sottoposto a copertura brevettuale (brevetto n° PCT/IB2015/059880 – WO/2016/103176) dal gruppo del Prof Hirsch. L'ipotesi fondante di questo lavoro è che l'enzima PI3K $\gamma$ , noto regolatore chiave della degradazione dell'AMPc, sia implicato nell'attivazione del canale CFTR e che interrompendo questa sua regolazione si possa ottenere una maggiore attività del CFTR.

## **METODI**

### **In vitro**

**Anticorpi, plasmidi e reagenti.** Gli anticorpi per CFTR (A2-570, A3-217 e A4-596) sono stati gentilmente donati dal Dr. J. R. Riordan (University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA) grazie al programma di distribuzione per gli anticorpi del CFTR della Fondazione per la Fibrosi Cistica. L'anticorpo per la PKA fosforilata è stato acquistato dalla Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) e l'anticorpo per il CFTR M3A7 dalla Millipore (Billerica, MA, USA). Gli anticorpi monoclonali per le subunità p110 $\gamma$ , p101 and p87 sono stati usati come precedentemente descritto<sup>18</sup>. Le PDE4B e PDE4D sono state immunoprecipitate e rilevate dopo corsa elettroforetica su gel (Western Blot, WB) usando anticorpi monoclonali di coniglio, come precedentemente descritto<sup>19</sup>, e anticorpi commerciali acquistati da Abcam (Cambridge, MA). Anticorpi per le subunità regolatoria e catalitica di PKA provengono da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

I cambiamenti nei livelli di AMPc sono stati monitorati mediante la Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) usando il sensore per l'AMPc ICUE3-pcDNA3<sup>21</sup>, come descritto precedentemente<sup>19</sup>.

L'isoproterenolo (Iso) e il CGP-20712<sup>o</sup> (CGP), provengono dalla Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), il Roflumilast dalla Chiesi Farmaceutici.

La Penetratina-1 (P1) e il peptide derivato da PI3K $\gamma$  sono stati sintetizzati dalla GenScript (GenScript, Piscataway, NJ, USA) e dalla Chinapeptides (Chinapeptides Co. Ltd, Shanghai, China).

**Colture cellulari.** Cellule epiteliali bronchiali umane normali (16HBE14o-) e con mutazione F508del (CFBE41o-) sono state gentilmente fornite dal Dr. Dieter Gruenert (University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA). Le cellule sono state coltivate in terreno Minimum Essenzial Medium (MEM) addizionato con 10% siero bovino fetale (FBS), 100U/ml di penicillina e 100 $\mu$ g/m di streptomina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) su piastre

precedentemente rivestite con fibronectina umana (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), collagene tipo I bovino (3 mg/ml; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) e albumina sierica bovina (BSA) (0.1%; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO).

Cellule HEK293 sono state coltivate in terreno di Dulbecco (DMEM) addizionato con 10% FBS, 100U/ml di penicillina e 100µg/ml di streptomicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

**Trasfezione.** Le cellule sono state trasfettate con calcio fosfato con circa 10 µg di cDNA plasmidico totale per il CFTR normale (Wild Type, WT) e con mutazione F508del. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate o trattate.

Tutte le cellule sono state coltivate ad una temperatura di 37°C e con una pressione parziale di CO<sub>2</sub> al di sotto del 5%.

**Estrazione di proteine e immunoprecipitazione (IP).** Le trachee congelate in azoto liquido sono state omogenate in 120 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), con inibitori delle proteasi (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) e delle fosfatasi (50 mmol/L fluoruro di sodio, 1 mmol/L sodio ortovanadato, and 10 mmol/L sodio pirofosfato). Dopo 30 minuti di incubazione su ghiaccio, il lisato è stato centrifugato a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C e il surnatante utilizzato per WB, per IP o per la misurazione dei livelli di attività delle PDE.

Le cellule 16HBE14o-, CFBE41o- e HEK 293 sono state lisate in 120 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) and 1% Triton X-100, con inibitori di proteasi e fosfatasi. Il materiale insolubile ai detergenti è stato precipitato mediante centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante è stato usato per WB o per le IP.

Per l'IP, l'estratto è stato incubato con 20 µl di proteina A o G Sepharose in rapporto 1:1 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) ed 1 µg di anticorpo per mg di proteina per 2 ore a 4°C. Gli immunocomplessi sono stati infine lavati per 4 volte con buffer di lisi, e usati o per WB o per la misurazione dell'attività delle PDE.

**Immunofluorescenza (IF).** Gli studi di IF sono stati effettuati con protocollo standard su cellule 16HBE14o- e CFBE41o- fissate con metanolo freddo. Per la marcatura di PI3K $\gamma$  è stato usato il seguente protocollo: le cellule sono state permeabilizzate con Saponina 0,1% per 10 secondi e quindi fissate in paraffina (PFA) 2% per 5 minuti. Dopo 2 lavaggi in PBS contenente Saponina 0,1%, le cellule sono state bloccate in PBS con Saponina 0,1% e BSA 2% per 20 minuti. Per la rilevazione di PI3K $\gamma$  è stato usato l'anticorpo generato in casa (come descritto in<sup>18</sup>) ad una concentrazione di 1:100 in soluzione di PBS con Saponina 0,1% e BSA 2% per 1 ora. L'anticorpo secondario Alexa (Alexa 488, Alexa 568 or Alexa633; Molecular Probes/Invitrogen) è stato usato ad una concentrazione di 1:500 per 45 minuti. I nuclei sono stati marcati con DAPI e l'acquisizione delle immagini è stata effettuata con microscopio Zeiss Observer-Z1, dotato di Apotome. Le immagini ottenute sono state processate per normalizzare il background e aumentare il contrasto. Le immagini Z-stack sono state acquisite e processate con lo strumento "Maximum Projection". Le misurazioni 3D e le ricostruzioni sono state eseguite con Imaris (BitPlane, Zurich, Switzerland).

**Saggio FRET.** La valutazione dei livelli di AMPc basata sul metodo FRET è stata effettuata su cellule bronchiali umane esprimenti la sonda ICUE3 come descritto in precedenza<sup>19</sup>. Le cellule sono state tenute in una soluzione K<sup>+</sup>-Ringer contenente (in mmol/L) 121.6 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 0.8 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 D-glucosio, 5 piruvato di sodio, 10 HEPES, ad un pH 7.4. Il segnale FRET è stato acquisito prima e dopo l'aggiunta di 100 nmol/L di Isoproterenolo (Iso) e 100 nmol/L di CGP-20712A (CGP), usando un sistema Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc, Buffalo Grove, IL, USA) munito di argon-LASER e con un obiettivo 63x con lente ad immersione in olio. Le lunghezze d'onda 458 e 514 nm sono state utilizzate per rilevare CFP e YFP, rispettivamente. Le immagini sono state catturate ogni 4 secondi alla velocità di scansione di 400 MHz e con risoluzione di 512 x 512. L'efficienza FRET è stata calcolata dall'applicazione Leica "FRET-sensitized emission imaging", secondo il metodo 3:  $EA(i) = B/A$ , dove  $EA(i)$  è l'efficienza apparente FRET; A e B sono

le intensità dei canali CFP e FRET, rispettivamente. Per l'analisi di imaging delle 16HBE14o- trattate con diversi peptide, le cellule esprimenti la sonda FRET ICUE3 sono state trattate con 50  $\mu$ M di P1 o di peptide derivato da PI3K $\gamma$  30 minuti prima della somministrazione di ISO e CGP.

**Saggio delle PDE.** L'attività delle PDE negli immunoprecipitati è stata misurata secondo il metodo a due passaggi di Thompson and Appleman<sup>22</sup>, con piccole modifiche. Gli immunoprecipitati sono stati esaminati in un volume totale di 200  $\mu$ l di soluzione di reazione contenente: 40 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.4 mmol/L 2-mercapto-etanolo and 0.1  $\mu$ Ci di [3H]cAMP (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) per 40 minuti a 33°C. Per bloccare la reazione, i campioni sono stati poi bolliti a 95°C per 3 minuti. Il prodotto di reazione delle PDE, il 5'-AMP, è stato quindi idrolizzato mediante incubazione in una soluzione con 50  $\mu$ g di veleno di serpente Crotalus Atrox per 15 minuti a 37°C (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). L'adenosina risultante è stata separata mediante cromatografia a scambio anionico usando 400  $\mu$ l di una sospensione al 30% (w/v) di resina Dowex AG1-X8 (Bio-Rad, Segrate, Milano, Italy). La quantità di adenosina così radio-marcata nel surnatante è stata quantificata mediante conteggio per scintillazione (Ultima Gold scintillation liquid from Perkin Elmer, Waltham, MA).

**Estrazione e quantificazione dell'AMP ciclico.** I polmoni e le trachee provenienti da animali sacrificati sono stati polverizzati in azoto liquido ed estratti con acido tricloroacetico al 6% freddo. I campioni sono stati sonicati per 10 secondi e centrifugati a 13000 rpm a 4°C per 15 minuti. Il surnatante è stato lavato per 4 volte con etere saturato d'acqua e liofilizzati. Il contenuto di AMPc è stato rilevato con saggio immunoenzimatico "Amersham cAMP Biotrak" (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, USA), secondo il protocollo indicato dal produttore.

**In vivo.**

Topi knock-out per PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) e knock-in esprimenti una PI3K $\gamma$  cataliticamente inattiva (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ) sono stati generati come descritto precedentemente<sup>17,23</sup>. I topi mutanti sono stati incrociati con topi C57Bl/6j per 15 generazioni per ibridare il background genetico e i topi C57Bl/6j sono stati usati come controllo (PI3K $\gamma^{+/+}$ ). Gli animali usati in tutti gli esperimenti avevano tra le 8 e le 12 settimane di età. I topi sono stati tenuti in gruppi di grandezza tale che tutti avessero libero accesso a cibo e acqua, in uno stabulario controllato e fornendo un ciclo luce/buio di 12 ore. Gli animali sono stati utilizzati in accordo con le linee guida e le normative istituzionali sul benessere animale approvate dal Comitato Etico Animale locale.

**Analisi statistica.**

Il software Prism (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA) è stato usato per l'analisi statistica. Il livello di significatività (P value) è stato calcolato usando il test di Student, o l'analisi della varianza "one-way" e "two-way" ANOVA seguita da test di Bonferroni, come appropriato.

## RISULTATI

**PI3K $\gamma$  lega il CFTR e regola i livelli di AMP ciclico nelle vie aeree.** Abbiamo valutato se l'enzima PI3K $\gamma$  fosse espresso nelle cellule epiteliali bronchiali e se fosse implicato nella regolazione dell'AMPc. Gli studi di immunofluorescenza mostrano la presenza di PI3K $\gamma$  a livello della membrana apicale delle cellule epiteliali bronchiali sia normali (16HBE41o-) che provenienti da pazienti con FC (CFBE41o-)[Fig. 4A]. Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione evidenziano che PI3K $\gamma$  e CFTR, sia mutato che WT, sono fisicamente associati tra loro[Fig. 4B]. Queste scoperte rafforzano l'idea che PI3K $\gamma$  sia parte integrante del complesso macromolecolare del CFTR.

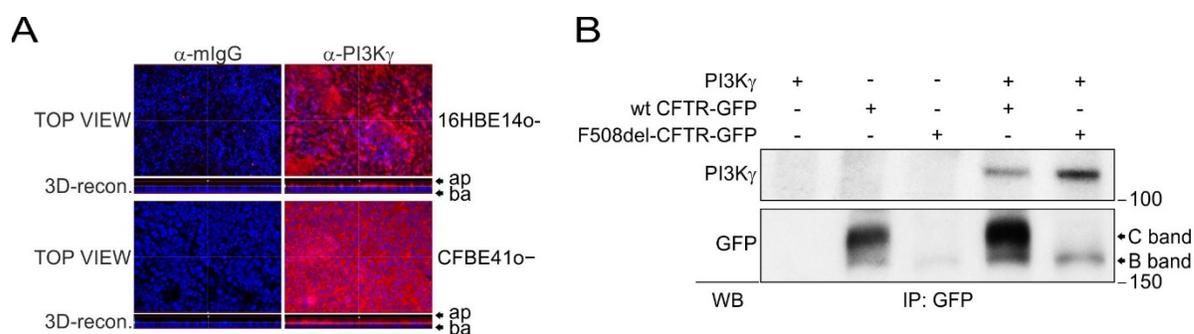


Figura 4: A) Immunofluorescenza di PI3K $\gamma$  su cellule epiteliali bronchiali WT e F508del;  
B) co-immunoprecipitazione di PI3K $\gamma$  e CFTR (normale e mutato).

Per valutare se questa interazione modificasse la compartimentazione dell'AMPc nelle vie aeree, abbiamo quantificato i livelli di AMPc nelle trachee di animali transgenici con diversa espressione di PI3K $\gamma$ . Topi knock-out per PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) mostrano livelli di AMPc 2 volte più alti dei topi controllo (PI3K $\gamma^{+/+}$  o WT), mentre animali che mantengono la sola funzione scaffold di PI3K $\gamma$  ma non quella chinasi (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ , kinase dead), mostrano gli stessi livelli di AMPc dei controlli [Fig. 5A]. Si può quindi dedurre che, in maniera simile a quanto dimostrato in precedenza nei cardiomiociti, anche nell'epitelio bronchiale la PI3K $\gamma$  controlla i livelli di AMPc con un meccanismo indipendente dall'attività chinasi. A questo punto sono stati dosati i livelli di attività delle PDE coinvolte nell'idrolisi dell'AMPc a livello dell'epitelio bronchiale (PDE4B e PDE4D), trovandoli significativamente ridotti nei topi KO (PI3K $\gamma^{-/-}$ ), ma non in quelli KD (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ) né nei WT

(PI3K $\gamma^{+/+}$ ) [Fig. 5B e C]. Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione confermano che le PDE 4B e 4D sono associate alla PI3K $\gamma$  formando un complesso macromolecolare costituito dai domini catalitico e regolatorio della PI3K $\gamma$  e anche dalla PKA che può quindi direttamente attivare le PDEs [Fig 5D, E, F].

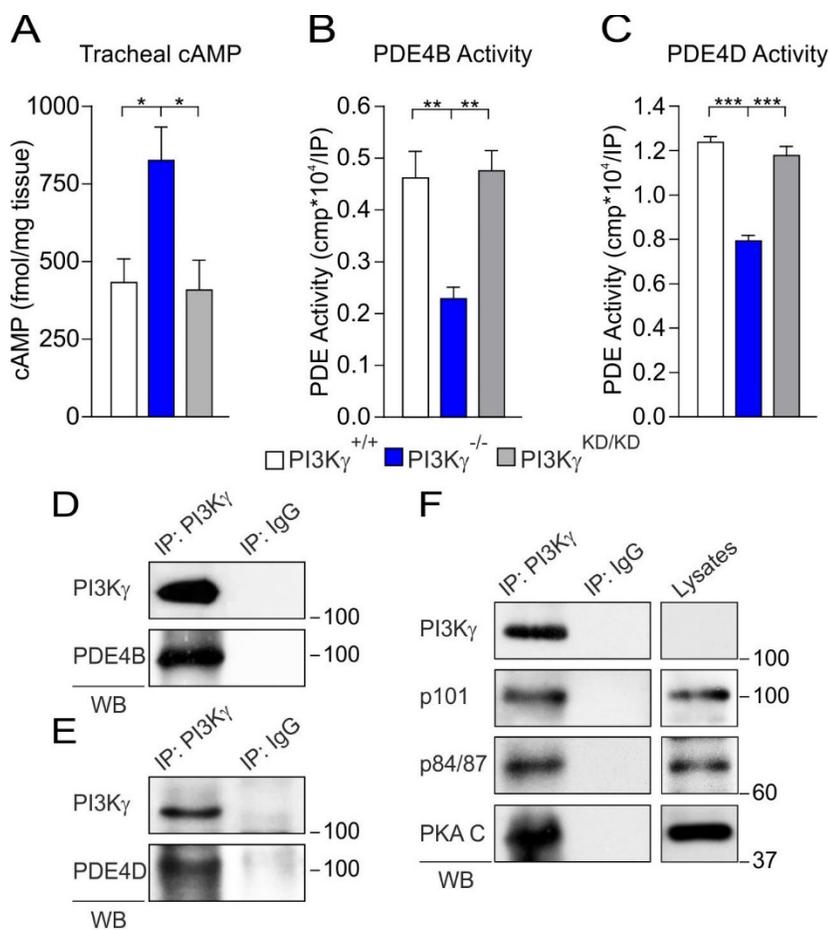


Figura 5: A) Livelli di AMPc nella trachea di animali WT (PI3K $\gamma^{+/+}$ ), KO (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) e kinase dead per PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ); B-C) livelli di attività delle PDE 4B e PDE4D in trachee di animali PI3K $\gamma^{+/+}$ , PI3K $\gamma^{-/-}$  e PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ; D-E) Rilevazione mediante Western blot (WB) di PDE4B e PDE4D dopo immunoprecipitazione di PI3K $\gamma$  in cellule 16HBE14o-; F) Rilevazione mediante WB delle subunità p110 $\gamma$ , p101 e p84/87 della PI3K $\gamma$ , e di PKA, dopo immunoprecipitazione di p110 $\gamma$ .

**Il peptide derivato da PI3K $\gamma$  influenza la funzione del CFTR aumentando i livelli di AMP ciclico nelle vie aeree.** Abbiamo utilizzato il peptide derivato da PI3K $\gamma$  (brevetto n° PCT/IB2015/059880 – WO/2016/103176) che, come detto in precedenza, è in grado di interrompere selettivamente la funzione scaffold di PI3K $\gamma$ . In particolare, abbiamo valutato la capacità del peptide di modificare i livelli di AMPc in sistemi cellulari e in vivo. Le cellule 16HBE14o- esprimenti la sonda FRET per l'AMPc, ICUE3, sono state trattate con il peptide o con un peptide di controllo privo di attività biologica (P1) e successivamente sono state stimulate con isoproterenolo (agonista  $\beta$ 2 AR) e CGP 20712A (antagonista  $\beta$ 1 selettivo). E' emerso che il peptide è in grado di aumentare i livelli di AMPc del 35% dopo stimolazione  $\beta$ 2 adrenergica, cosa che non accade con il peptide controllo [Fig.6A e B]. Lo stesso peptide è stato somministrato negli animali per via intratracheale e successivamente abbiamo valutato i livelli di AMPc nei polmoni e nella trachea, dimostrandone un aumento già dopo 2 ore con un picco massimo a 24 ore dalla somministrazione [Fig 6C e D].

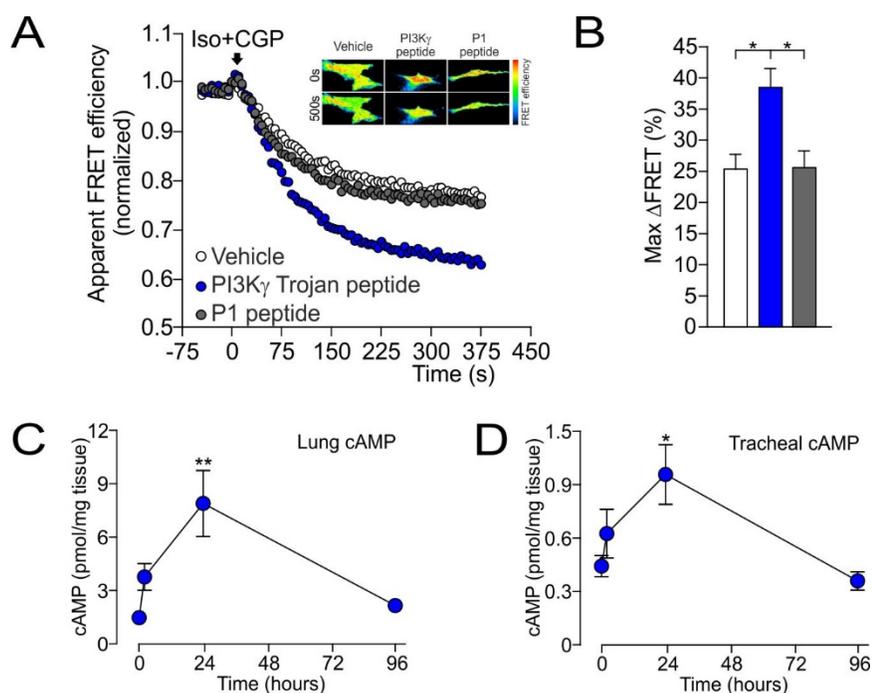


Figura 6: A) Curve rappresentative del segnale FRET dopo stimolazione con ISO+CGP, B) massima variazione in FRET espressa in percentuale; C) livelli di AMPc nei polmoni e D) nella trachea nei tempi indicati dopo la somministrazione del peptide.

Abbiamo poi valutato se l'interruzione della funzione scaffold di PI3K $\gamma$  con questo peptide potesse modificare l'attività del canale CFTR dipendente dall'AMPc. In effetti la fosforilazione indotta dall'AMPc del CFTR è risultata 5 volte maggiore nelle cellule epiteliali 16HBE14o- trattate con il peptide derivato da PI3K $\gamma$ , rispetto a quelle trattate con peptidi di controllo o non trattate (Fig. 7A e B). In particolare, l'interruzione dell'attività scaffold di PI3K $\gamma$  migliora la fosforilazione del canale nella stessa misura del Rolipram (inibitore della PDE4).

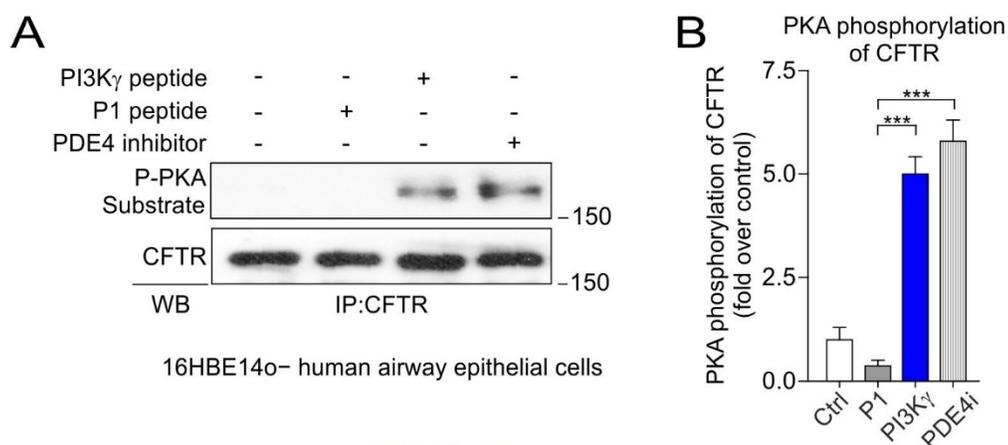


Figura 7: A) Rilevazione mediante western blot dei livelli di CFTR totale e fosforilato da PKA in cellule epiteliali bronchiali umane 16HBE14o- trattate con peptide derivato da PI3K $\gamma$ , peptide di controllo e inibitore delle PDE4; B) quantificazione dell'esperimento mostrato in A. Questi risultati dimostrano il ruolo chiave della PI3K $\gamma$  nella attivazione della PDE4 da parte di PKA e quindi nella regolazione del CFTR mediata dall'AMPc.

## DISCUSSIONE

Dai risultati di questo studio emerge che PI3K $\gamma$  svolge un ruolo cruciale nella compartimentalizzazione dell'AMPc nelle vie aeree, come precedentemente dimostrato nei cardiomiociti<sup>19</sup>. Grazie alla sua funzione scaffold, PI3K $\gamma$  è implicata nell'ancoraggio di più proteine in complessi macromolecolari a valle del recettore adrenergico  $\beta$ 2, e in tal senso può regolare l'attività del CFTR in risposta agli stimoli adrenergici.

L'aumento dei livelli di AMPc conseguente alla riduzione dell'attività di PDE 4B e 4D nelle vie respiratorie degli animali KO (PI3K $\gamma^{-/-}$ ), ma non degli animali KD (PI3K $\gamma^{KD/KD}$ ) dimostra che questa regolazione non dipende dalla funzione chinasi di PI3K $\gamma$ . In questo contesto, si inserisce il ruolo del peptide derivato dall'enzima PI3K $\gamma$ , recentemente identificato e sottoposto a copertura brevettuale (brevetto n° PCT/IB2015/059880) dal gruppo del Prof Hirsch, che è in grado di interrompere questa attività scaffold. La sua somministrazione intratracheale si è dimostrata in grado di aumentare i livelli di AMPc in vivo nelle vie aeree, ma non nel cuore né nel cervello, escludendo quindi la possibilità dell'insorgenza di effetti collaterali sistemici. In vitro, la sua efficacia nell'aumentare la fosforilazione del CFTR è simile a quella ottenuta dagli inibitori delle PDE. Come detto in precedenza, una strategia terapeutica mirata all'aumento dell'AMPc grazie agli inibitori delle PDE4, come il Roflumilast, è stata provata ma abbandonata per la comparsa di effetti indesiderati severi<sup>12</sup>. L'idea di utilizzare il peptide localmente, insieme alla sua specificità per le isoforme PDE4B e 4D in un compartimento cellulare confinato, potrebbe portare molti meno effetti indesiderati a vantaggio del beneficio terapeutico.

Lo sviluppo di nuovi potenziatori efficaci del CFTR è fortemente richiesta nella terapia della FC, considerato che, sebbene una terapia di combinazione con un correttore (VX-809) e un potenziatore (VX-770) sia stata approvata di recente, l'efficacia non è affatto soddisfacente. Da recenti lavori è emerso che questo è dovuto al fatto che la somministrazione cronica del VX-770 interferisce con la correzione del VX-809<sup>14,15</sup>. Da dati preliminari è emerso che a differenza del VX-770, il trattamento cronico con il peptide derivato da PI3K $\gamma$  non influenza la correzione del VX-809 e permette la

permanenza in membrana di una quantità significativamente più alta di CFTR rispetto all'associazione VX809 e VX-770.

Nel complesso questi dati mostrano quindi un ruolo importante per il peptide derivato da PI3K $\gamma$  come un nuovo potenziatore del CFTR che agisce aumentando l'AMPc in un compartimento cellulare ben confinato, senza interferire con la stabilità del CFTR.

## **CONCLUSIONI**

Complessivamente, questo lavoro volto a capire i meccanismi alla base dell'attivazione del CFTR che permettano di identificare una nuova ed efficace strategia terapeutica per i pazienti affetti da FC vede l'attività scaffold di PI3K $\gamma$  coinvolta in primo piano nella regolazione del canale.

L'idea di interrompere questa attività scaffold per aumentare la fosforilazione e l'attività del CFTR in pazienti con FC, fa del peptide derivato da PI3K $\gamma$  un nuovo potenziale candidato nella cura di questa patologia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Elborn, J.S. Cystic fibrosis. *Lancet* **388**, 2519-2531 (2016).
2. Gadsby, D.C., Vergani, P. & Csanady, L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477-483 (2006).
3. Egan, M.E. Genetics of Cystic Fibrosis: Clinical Implications. *Clin Chest Med* **37**, 9-16 (2016).
4. Castellani, C. & Assael, B.M. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell Mol Life Sci* **74**, 129-140 (2017).
5. Cutting, G.R. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* **1214**, 57-69 (2010).
6. Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K. & Welsh, M.J. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med* **372**, 1574-1575 (2015).
7. Haq, I.J., Gray, M.A., Garnett, J.P., Ward, C. & Brodlie, M. Airway surface liquid homeostasis in cystic fibrosis: pathophysiology and therapeutic targets. *Thorax* **71**, 284-287 (2016).
8. Berdiev, B.K., Qadri, Y.J. & Benos, D.J. Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst* **5**, 123-127 (2009).
9. Shah, V.S., *et al.* Airway acidification initiates host defense abnormalities in cystic fibrosis mice. *Science* **351**, 503-507 (2016).
10. Guggino, W.B. & Stanton, B.A. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 426-436 (2006).
11. Blanchard, E., *et al.* Anchored PDE4 regulates chloride conductance in wild-type and DeltaF508-CFTR human airway epithelia. *FASEB J* **28**, 791-801 (2014).
12. Oba, Y. & Lone, N.A. Efficacy and safety of roflumilast in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Respir Dis* **7**, 13-24 (2013).

13. Wainwright, C.E., Elborn, J.S. & Ramsey, B.W. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* **373**, 1783-1784 (2015).
14. Cholon, D.M., *et al.* Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of DeltaF508 CFTR in cystic fibrosis. *Sci Transl Med* **6**, 246ra296 (2014).
15. Veit, G., *et al.* Some gating potentiators, including VX-770, diminish DeltaF508-CFTR functional expression. *Sci Transl Med* **6**, 246ra297 (2014).
16. Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 329-341 (2010).
17. Patrucco, E., *et al.* PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* **118**, 375-387 (2004).
18. Perino, A., *et al.* Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Mol Cell* **42**, 84-95 (2011).
19. Ghigo, A., *et al.* Phosphoinositide 3-kinase gamma protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases. *Circulation* **126**, 2073-2083 (2012).
20. Hirsch, E., Braccini, L., Ciraolo, E., Morello, F. & Perino, A. Twice upon a time: PI3K's secret double life exposed. *Trends Biochem Sci* **34**, 244-248 (2009).
21. DiPilato, L.M. & Zhang, J. The role of membrane microdomains in shaping beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol Biosyst* **5**, 832-837 (2009).
22. Thompson, W.J. & Appleman, M.M. Cyclic nucleotide phosphodiesterase and cyclic AMP. *Ann N Y Acad Sci* **185**, 36-41 (1971).
23. Hirsch, E., *et al.* Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **287**, 1049-1053 (2000).