



PAOLA FOSSA  
DIPARTIMENTO DI FARMACIA  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA  
FOSSA@DIFAR.UNIGE.IT

# STUDI STRUTTURISTICI SULLA PROTEINA CFTR: OPPORTUNITÀ E PROSPETTIVE

*La fibrosi cistica, causata da mutazioni della proteina CFTR, è la più comune fra le malattie genetiche gravi. Oltre a terapie di tipo sintomatico, si sono recentemente resi disponibili farmaci in grado di ripristinare la funzionalità della proteina. Il meccanismo di azione di questi composti tuttavia non è ancora perfettamente chiaro. Con queste premesse, viene presentata una rassegna degli studi strutturistici più recenti, valutando la capacità dei modelli disponibili di spiegare il meccanismo di azione e supportare la progettazione razionale di nuovi farmaci.*

La fibrosi cistica è una malattia genetica autosomica recessiva letale considerata rara, ma tra queste è una delle più comuni, colpisce infatti circa 70.000 individui in tutto il mondo, di cui 30.000 in Europa. È molto comune nella razza caucasica, è tuttavia presente in minori percentuali in tutte le altre razze ed etnie con un'incidenza stimata di un caso ogni 2.500-4.000 nascite. Sebbene sia una patologia multi organo, che colpisce cute, fegato, pancreas, intestino, apparato riproduttivo maschile, la fibrosi cistica è normalmente diagnosticata tramite i sintomi che colpiscono l'apparato respiratorio, quali problemi di respirazione, frequenti infezioni polmonari ed un' aumentata produzione di muco che si deposita nelle vie respiratorie predisponendo il soggetto a infezioni batteriche progressivamente sempre più difficili da trattare.

Le aspettative di vita dei pazienti affetti da fibrosi cistica sono cambiate nel corso degli anni, ad oggi l'età media è calcolata intorno ai 40 anni [1].

La patologia è dovuta a un malfunzionamento della proteina canale transmembranale CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), espressa maggiormente dalla parte apicale delle cellule epiteliali secretorie che in condizioni normali regola principalmente l'ingresso e l'uscita degli ioni cloruro dalle cellule epiteliali e quindi il movimento di NaCl e acqua dentro e fuori le cellule del corpo, da cui il ristagno di muco nei soggetti malati. La disfun-

zione deriva da una mutazione del gene che codifica per CFTR. Ad oggi si conoscono almeno 2.000 mutazioni diverse, ciascuna associata ad uno specifico fenotipo. In particolare, la mutazione più comune nel mondo è quella che presenta la delezione del residuo di fenilalanina 508, F508del-CFTR. La CFTR appartiene alla superfamiglia delle proteine trasportatrici ABC, caratterizzate da un dominio di legame per l'ATP (ABC = ATP-Binding Cassette), una classe di proteine di membrana ampiamente diffuse che accoppia l'idrolisi dell'ATP con il trasporto di molecole attraverso le membrane secondo gradiente di concentrazione. I trasportatori ABC sono numerosi, tra queste CFTR è l'unica proteina ABC che funziona come canale ionico per il cloruro [2].

## La struttura di CFTR

La struttura di CFTR è composta principalmente da (Fig. 1):

- due domini che interagiscono con l'ATP, chiamati Nucleotide Binding Domain 1 e 2 (NBD1 e NBD2);
- due regioni che ancorano la proteina alla membrana, membrane-spanning domain MSD1 e MSD2;
- 4 domini intracellulari (ICD 1-4);
- un'area contenente numerosi siti per la fosforilazione;
- il dominio regolatore R, per far sì che il canale sia attivo, questo dominio deve essere fosforilato [3].

La prof. Fossa è stata insignita nel 2018 del titolo "Chem Pub Soc Lecture".

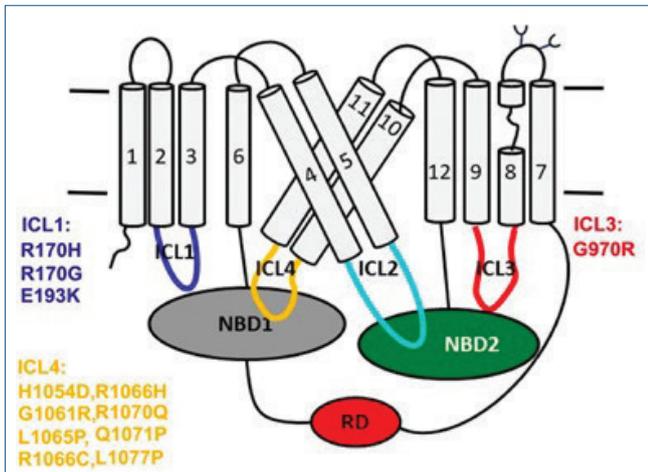
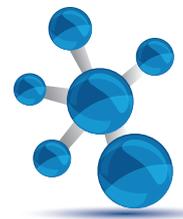


Fig. 1 - Schema della struttura della proteina di fibrosi cistica (tratto da T. C. Hwang et al., *J. Gen. Physiol.*, 2018, 150, 539)

Il ruolo degli NBD è quello di controllare l'apertura e la chiusura del canale tramite il legame con due molecole di ATP e l'idrolisi di una di esse. Per fare questo, NBD1 e NBD2 dimerizzano tra loro e, a seconda della funzione che deve svolgere il canale, cambiano conformazione. Si trovano lontani nella forma inattiva mentre sono ravvicinati nella forma attiva. La sintesi della CFTR avviene a livello del reticolo endoplasmatico, la proteina assemblata subisce modificazioni post-traduzionali nell'apparato di Golgi (glicosilazione) e da qui raggiunge la membrana epiteliale racchiusa in vescicole. La

proteina che non presenta la corretta sequenza può essere già riconosciuta a livello del reticolo endoplasmatico ed essere degradata dal proteosoma. Altri mutanti di CFTR possono invece non essere riconosciuti come aberranti ed essere trasportati alla superficie, dove presenteranno una funzionalità ridotta o assente.

Le diverse mutazioni di CFTR sono raggruppate in sei classi che ne riflettono le conseguenze funzionali e si traducono in un ampio range di gravità di malattia [4] (Fig. 2):

- Classe I: comprende mutazioni di inserzione-delezione, splicing, e nonsense che introducono un codone di stop (PTC) prematuro che porta a una espressione assente o ridotta di CFTR;

- Classe II: comprende mutazioni che portano a misfolding, quindi degradazione prematura da parte del reticolo endoplasmatico. Per questo motivo si riduce fortemente il numero di proteine CFTR che raggiungono la membrana cellulare;
- Classe III: comprende mutazioni che determinano alterata regolazione di CFTR, con conseguente apertura ridotta del canale;
- Classe IV: comprende mutazioni che alterano la conduttanza del canale e come effetto si ha un ridotto passaggio di ioni;
- Classe V: comprende mutazioni che non variano la conformazione della proteina ma ne alterano il numero, introducendo promotori o splicing anormali;
- Classe VI: comprende mutazioni che destabilizzano il canale in compartimenti post reticolo endoplasmatico e/o sulla membrana plasmatica, riducendone la stabilità conformazionale o generando segnali di internalizzazione del canale. Questo si traduce in un accelerato turnover della proteina da e verso la membrana plasmatica, con una conseguente diminuita espressione.

Le terapie attuali per il trattamento di CFTR sono principalmente di tipo sintomatico e sono basate sull'utilizzo di antibiotici, antiinfiammatori, mucolitici, soluzioni saline nebulizzate, vitamine liposolubili, enzimi pancreatici e insulina, nel caso di diabete dovuto a fibrosi cistica.

WT-CFTR	CFTR defect type:					
	I	II	III	IV	V	VI
	No protein	No traffic Maturation defect	No function Gating defect	Less function Conductance defect	Less protein	Less stable
<b>Mutation examples</b>	G542X (a) W1282X (a) 1717-1G (b)	<b>F508del</b> N1303K A561E	<b>rF508del</b> G551D S549R G1349D	R117H R334W A455E	A455E 3272-26A>G 3849+10 kb C>T	c.120del23 <b>rF508del</b>
<b>Corrective therapy</b>	Rescue synthesis	Rescue traffic	Restore channel activity	Restore channel activity	Correct splicing	Promote stability
<b>Drug</b>	Read-through compounds	Correctors	Potentiators	Potentiators	AONs Correctors Potentiators	Stabilizers
<b>Drug approved (Yes/No)</b>	PTC suppressors: Ataluren, aminoglycosides	Lumacaftor, Tezacaftor (+ivacaftor)	ivacaftor	ivacaftor	Antisense nucleotides (AONs), correctors, potentiators	No

Fig. 2 - Mutazioni principali di CFTR, adattamento da M. Amaral [4]

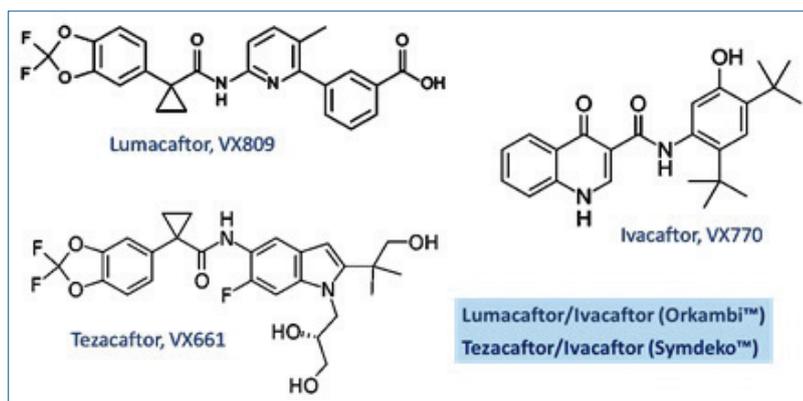


Fig. 3 - Le strutture chimiche di Lumacaftor, Tezacaftor e Ivacaftor.

Tuttavia parallelamente si sta affermando l'utilizzo di farmaci specifici, chiamati modulatori di CFTR, in grado di correggere il difetto di base. Essi si distinguono in correttori, in grado di ripristinare la capacità di CFTR di raggiungere la membrana cellulare, il Lumacaftor® e il Tezacaftor®, e potenziatori, in grado di ripristinare il corretto efflusso di ioni cloruro attraverso il canale attivato, l'Ivacaftor®. Questi farmaci sono disponibili anche in combinazione, Lumacaftor® e Ivacaftor® con il nome di Orkambi, Tezacaftor® e Ivacaftor®, con il nome di Kalydeco (quest'ultimo approvato nel gennaio 2018 dalla FDA). Sono riservati al trattamento delle forme più gravi della patologia e sono tutti prodotti dalla Vertex Pharmaceuticals (Fig. 3).

Ad oggi, la ricerca è rivolta soprattutto allo sviluppo di nuovi farmaci per correggere le disfunzioni della mutazione F508del-CFTR, principale causa della fibrosi cistica (FC), e in letteratura si assiste ad un crescente aumento degli studi scientifici volti non solo a studiare la fisiopatologia di CFTR ma anche a identificare nuovi composti in grado di correggere il difetto di base. Fra questi troviamo numerosi derivati eterociclici, in particolare amminoariltiazolici e ditiazolici, ed alcuni derivati ammino zuccherini. Per tutti, purtroppo, ancora non si conosce il preciso meccanismo di azione.

Di qui l'importanza di studi strutturali che possano essere di aiuto a delucidare il meccanismo di azione di questi composti e dei farmaci sopra descritti, nonché a sviluppare studi di progettazione razionale, virtual screening e sintesi di nuovi modulatori di CFTR.

Gli aspetti principali che vanno tenuti in considerazione nel valutare la validità dell'apporto degli studi

strutturali allo sviluppo di nuovi composti sono i seguenti:

- elevata instabilità della proteina mutata, dotata fra l'altro, di scarsa solubilità per quanto concerne la specie umana;
- disponibilità della struttura tridimensionale murina della porzione NBD1, disponibilità della struttura umana di entrambi gli NBD, anche in forma dimerizzata;
- disponibilità di modelli per omologia di vari templati di CFTR umana, basati sulla struttura di altre proteine ABC

trasportatrici o della proteina batterica Sav1866, che con CFTR condivide una buona omologia di sequenza e di struttura.

Indubbiamente la flessibilità della proteina mutata condiziona notevolmente il suo studio, come si può vedere da uno studio di dinamica molecolare (Fig. 4).

Per quanto riguarda le porzioni NBD1, quelle murine non contengono mutazioni solubilizzanti, presenti invece nei vari raggi X umani. Ciò chiaramente condiziona l'aderenza dei dati sperimentali con quelli computazionali, aggiungendo un altro fattore di variabilità, visto che il modello murino non ha sequenza identica a quello umano, il quale, a sua volta, presenta nei raggi X una sua sequenza primaria modificata.

Un secondo limite dato dai raggi X umani è la mancanza del dominio regolatore R, che solo se presente e fosforilato, consente l'apertura del canale. Il dominio è invece presente nella struttura NBD1 murina (Fig. 5).

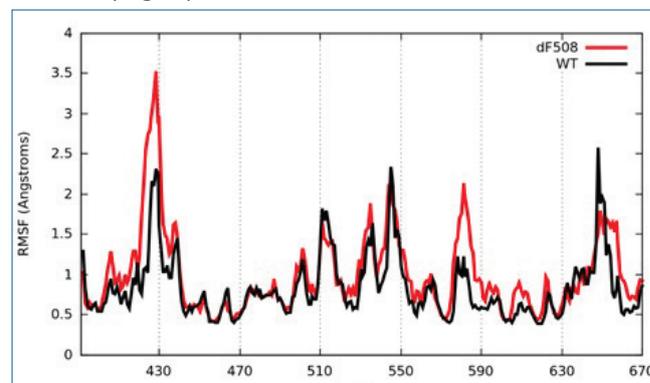


Fig. 4 - La flessibilità della proteina nativa (in nero) e della proteina mutata (rosso). Le zone variabili si estendono ben oltre l'intorno della mutazione (F508del)

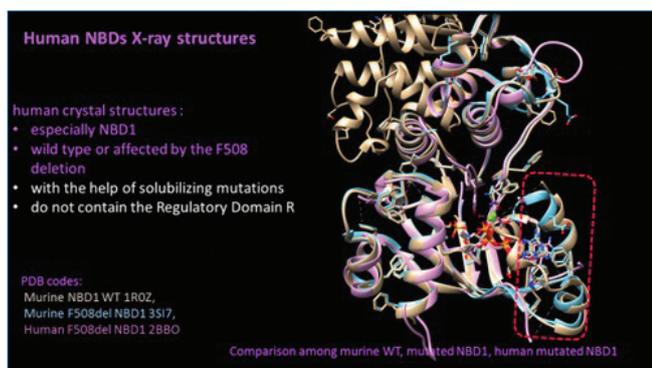
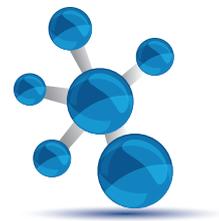


Fig. 5 - Un confronto fra la struttura dell'NBD1 umano e murino

Per quanto riguarda gli approcci teorici basati su *homology modeling*, essi sono numerosi. Come già detto, la maggior parte di essi considerano la struttura attiva del canale, essendo basati su un template di proteina ABC transporter o Sav1866. I modelli più noti sono quelli di Mornon [5, 9], Dalton [6], Rahman [7], Corradi [8] e Moran [10].

Ad oggi purtroppo quasi tutti i modelli disponibili si riferiscono alla proteina nativa, e non a quella mutata, inoltre mancano della porzione R. Di contro, alcuni di essi descrivono uno stato del canale attivo e non inattivo. Infine, per quanto riguarda la struttura 3D della proteina CFTR umana, essa è stata recentemente definita [11] tramite la nuova tecnica di criomicroscopia elettronica, tecnica specifica per delucidare la struttura tridimensionale di proteine in soluzione. Questa tecnica ha consentito di ottenere una struttura tridimensionale di CFTR intera, sebbene nello stato inattivo e con il dominio R modellato anziché sperimentalmente determinato nella sua struttura tridimensionale.

Per concludere, indubbiamente questi dati presentano ancora varie limitazioni, tuttavia, se considerati complessivamente e opportunamente integrati con i modelli per omologia e con l'applicazione di studi estensivi di dinamica molecolare, consentiranno di avere un quadro più preciso della struttura e della flessibilità della proteina mutata. Ciò renderà più facile l'identificazione di tasche adatte al binding, che potranno essere utilizzate non solo per ipotizzare il meccanismo di azione dei farmaci già noti, ma soprattutto per sviluppare nuovi farmaci, attingendo alle librerie di composti gratuitamente disponibili sul web. Con questa strategia sarà sicuramente possibile aumentare considerevolmente il numero di farmaci mirati a favore di una patolo-

gia così diffusa ma ancora così poco dotata di cure specifiche come la fibrosi cistica.

### Ringraziamenti

Si ringrazia la Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica-Onlus per il finanziamento del progetto FCC#6 2014, in particolare si ringraziano gli Sponsor del progetto: Delegazione FFC di Foggia, Nonno Nanni-Latteria Montello, Delegazione FFC di Manciano Grosseto, che hanno permesso l'avvio di queste ricerche.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] H. Mittmannsgruber, U. Smrekarm *et al.*, *J. Cyst. Fibros.*, 2016, **15**, 689.
- [2] C. Thomas, R. Tampé, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2018, **51**, 116.
- [3] J.R. Riordan, *Annu. Rev. Biochem.*, 2008, **77**, 701.
- [4] M.D. Amaral, *J. Intern. Med.*, 2015, **277**, 155.
- [5] J.P. Mornon, P. Lehn, I. Callebaut, *Cell Mol. Life Sci.*, 2009, **66**, 3469.
- [6] J. Dalton, O. Kalid *et al.*, *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, **52**, 1842.
- [7] K.S. Rahman, G. Cui *et al.*, *PLoS One*, 2013, **8**, e74574.
- [8] V. Corradi, P. Vergani, D.P. Tieleman, *J. Biol. Chem.*, 2015, **290**, 22891.
- [9] J.P. Mornon, B. Hoffmann *et al.*, *Cell Mol. Life Sci.*, 2015, **72**, 1377.
- [10] L. Belmonte, O. Moran, *Biochimie*, 2015, **111**, 19.
- [11] F. Liu, Z. Zhang *et al.*, *J. Chem. Cell*, 2017, **169**, 85.

### Updates in CFTR Structural Studies: Opportunities and Challenges

Cystic fibrosis is the most common severe genetic diseases and is due to mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator protein. Near symptomatic therapies, few drugs are emerging to address CFTR functionality, however their molecular mechanism of action still needs to be fully clarified. On these premises, an overview on recent progress in CFTR structural studies is presented, focusing on the ability of the available models to support the rational design of new compounds.