

LUNG DISEASE

A PI3K γ mimetic peptide triggers CFTR gating, bronchodilation, and reduced inflammation in obstructive airway diseases

Alessandra Ghigo^{1,2*†}, Alessandra Murabito^{1†}, Valentina Sala^{1,2}, Anna Rita Pisano³, Serena Bertolini³, Ambra Gianotti⁴, Emanuela Caci⁴, Alessio Montresor^{5,6}, Aiswarya Premchandrar⁷, Flora Pirozzi^{1,8}, Kai Ren¹, Angela Della Sala¹, Marco Mergioti¹, Wito Richter⁹, Eyleen de Poel¹⁰, Michaela Matthey¹¹, Sara Calder^{5,6‡}, Rosa A. Cardone¹², Federica Civiletti¹³, Andrea Costamagna¹³, Nancy L. Quinney¹⁴, Cosmin Butnarusu¹, Sonja Visentin¹, Maria Rosaria Ruggiero¹, Simona Baroni¹, Simonetta Geninatti Crich¹, Damien Ramel¹⁵, Muriel Laffargue¹⁵, Carlo G. Tocchetti^{8,16,17}, Renzo Levi¹⁸, Marco Conti¹⁹, Xiao-Yun Lu²⁰, Paola Melotti²¹, Claudio Sorio^{5,6}, Virginia De Rose¹, Fabrizio Facchinetti³, Vito Fanelli¹³, Daniela Wenzel^{11,22}, Bernd K. Fleischmann²², Marcus A. Mall^{23,24}, Jeffrey Beekman¹⁰, Carlo Laudanna^{5,6}, Martina Gentzsch^{14,25}, Gergely L. Lukacs⁷, Nicoletta Pedemonte⁴, Emilio Hirsch^{1,2*}

Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-elevating agents, such as β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) agonists and phosphodiesterase (PDE) inhibitors, remain a mainstay in the treatment of obstructive respiratory diseases, conditions characterized by airway constriction, inflammation, and mucus hypersecretion. However, their clinical use is limited by unwanted side effects because of unrestricted cAMP elevation in the airways and in distant organs. Here, we identified the A-kinase anchoring protein phosphoinositide 3-kinase γ (PI3K γ) as a critical regulator of a discrete cAMP signaling microdomain activated by β_2 -ARs in airway structural and inflammatory cells. Displacement of the PI3K γ -anchored pool of protein kinase A (PKA) by an inhaled, cell-permeable, PI3K γ mimetic peptide (PI3K γ MP) inhibited a pool of subcortical PDE4B and PDE4D and safely increased cAMP in the lungs, leading to airway smooth muscle relaxation and reduced neutrophil infiltration in a murine model of asthma. In human bronchial epithelial cells, PI3K γ MP induced unexpected cAMP and PKA elevations restricted to the vicinity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), the ion channel controlling mucus hydration that is mutated in cystic fibrosis (CF). PI3K γ MP promoted the phosphorylation of wild-type CFTR on serine-737, triggering channel gating, and rescued the function of F508del-CFTR, the most prevalent CF mutant, by enhancing the effects of existing CFTR modulators. These results unveil PI3K γ as the regulator of a β_2 -AR/cAMP microdomain central to smooth muscle contraction, immune cell activation, and epithelial fluid secretion in the airways, suggesting the use of a PI3K γ MP for compartment-restricted, therapeutic cAMP elevation in chronic obstructive respiratory diseases.

INTRODUCTION

Obstructive airway diseases, including asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and the genetic disorder cystic fibrosis (CF), represent a major health burden worldwide. Over the next decade, prevalence of asthma and COPD is predicted to rise in developing countries (1) and so is the number of patients with CF requiring

long-term care, because survival is progressively improving due to better treatments and intensive follow-up (2). Despite the diversity in etiology, pathogenetic mechanisms, and clinical manifestations, these conditions share common features such as chronic airway inflammation, mucus hypersecretion, and airflow obstruction due to airway hyperreactivity and/or mucus plugging (1, 2). Conventional

¹Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, 10126 Torino, Italy. ²Kiher Biotech Srl, 10126, Torino, Italy. ³Chiesi Farmaceutici S.p.A., Corporate Pre-Clinical R&D, 43122 Parma, Italy. ⁴UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genova, Italy. ⁵Division of General Pathology, Department of Medicine, University of Verona School of Medicine, 37134 Verona, Italy. ⁶Cystic Fibrosis Translational Research Laboratory "Daniele Lissandrini," Department of Medicine, University of Verona School of Medicine, 37134 Verona, Italy. ⁷Department of Physiology, McGill University, Montréal, Québec H3G 1Y6, Canada. ⁸Department of Translational Medical Sciences, Federico II University, 80131 Naples, Italy. ⁹Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of South Alabama College of Medicine Mobile, AL 36688, USA. ¹⁰Department of Pediatric Pulmonology, Wilhelmina Children's Hospital, University Medical Center Utrecht, 3584 EA Utrecht, Netherlands. ¹¹Department of Systems Physiology, Medical Faculty, Ruhr University Bochum, 44801 Bochum, Germany. ¹²Department of Biosciences, Biotechnologies, and Biopharmaceutics, University of Bari, 70126 Bari, Italy. ¹³Department of Anesthesia and Critical Care Medicine, University of Torino, Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino, 10126 Torino, Italy. ¹⁴Marsico Lung Institute/Cystic Fibrosis Research Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA. ¹⁵Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Paul Sabatier University, 31432 Toulouse, France. ¹⁶Interdepartmental Center of Clinical and Translational Research (CIRCET), Federico II University, 80131 Naples, Italy. ¹⁷Interdepartmental Hypertension Research Center (CIRIAPA), Federico II University, 80131 Naples, Italy. ¹⁸Department of Life Sciences and Systems Biology, University of Torino, 10123 Torino, Italy. ¹⁹Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, University of California San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA. ²⁰School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, 710049 Xi'an Shaanxi, P.R. China. ²¹Cystic Fibrosis Center, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, 37126 Verona, Italy. ²²Institute of Physiology I, Life and Brain Center, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany. ²³Department of Pediatric Respiratory Medicine, Immunology, and Critical Care Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany. ²⁴German Center for Lung Research (DZL), associated partner, 10117 Berlin, Germany. ²⁵Department of Pediatric Pulmonology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA. *Corresponding author. Email: alessandra.ghigo@unito.it (A.G.); emilio.hirsch@unito.it (E.H.)

†These authors contributed equally to this work.

‡Present address: Department of Infectious, Tropical Diseases and Microbiology, IRCCS Sacro Cuore Don Calabria Hospital, 37024 Negrar, Italy.

Copyright © 2022
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim
to original U.S.
Government Works

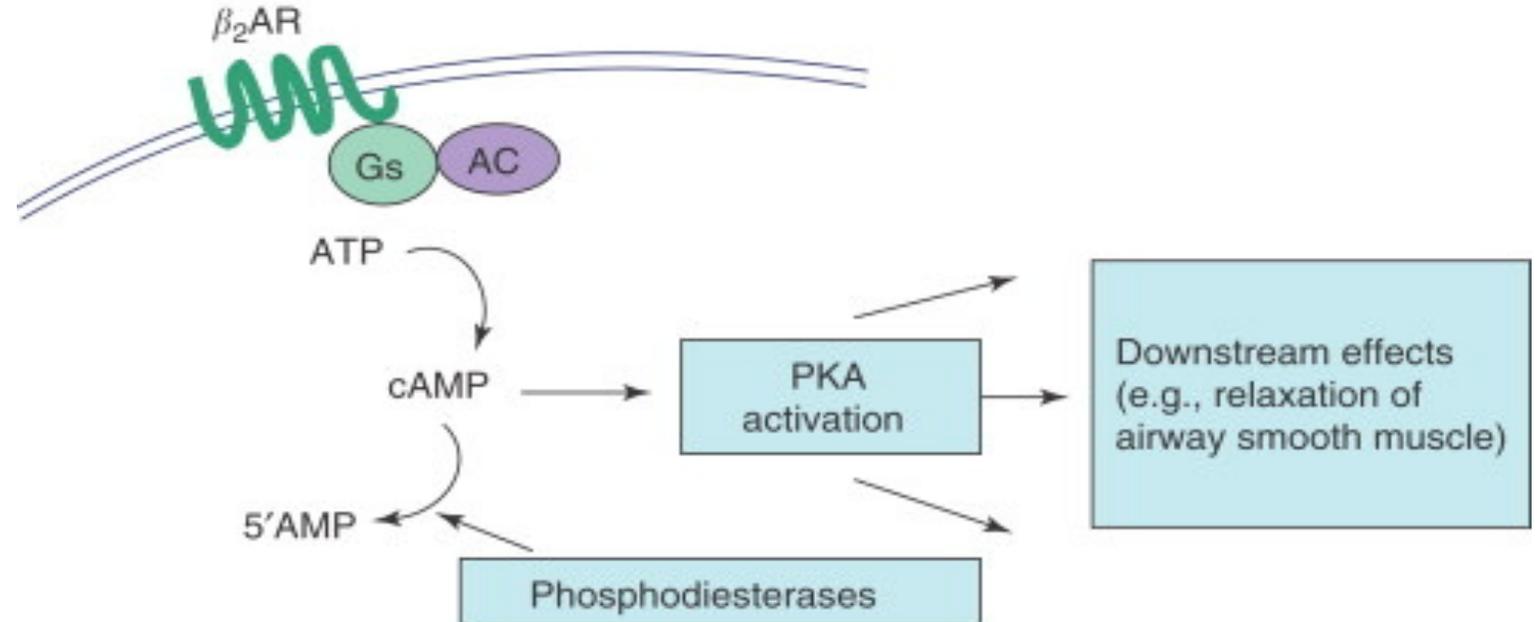
Downloaded from <https://www.science.org> at Universita Degli Studi Di Torino on March 31, 2022

SUMMARY:

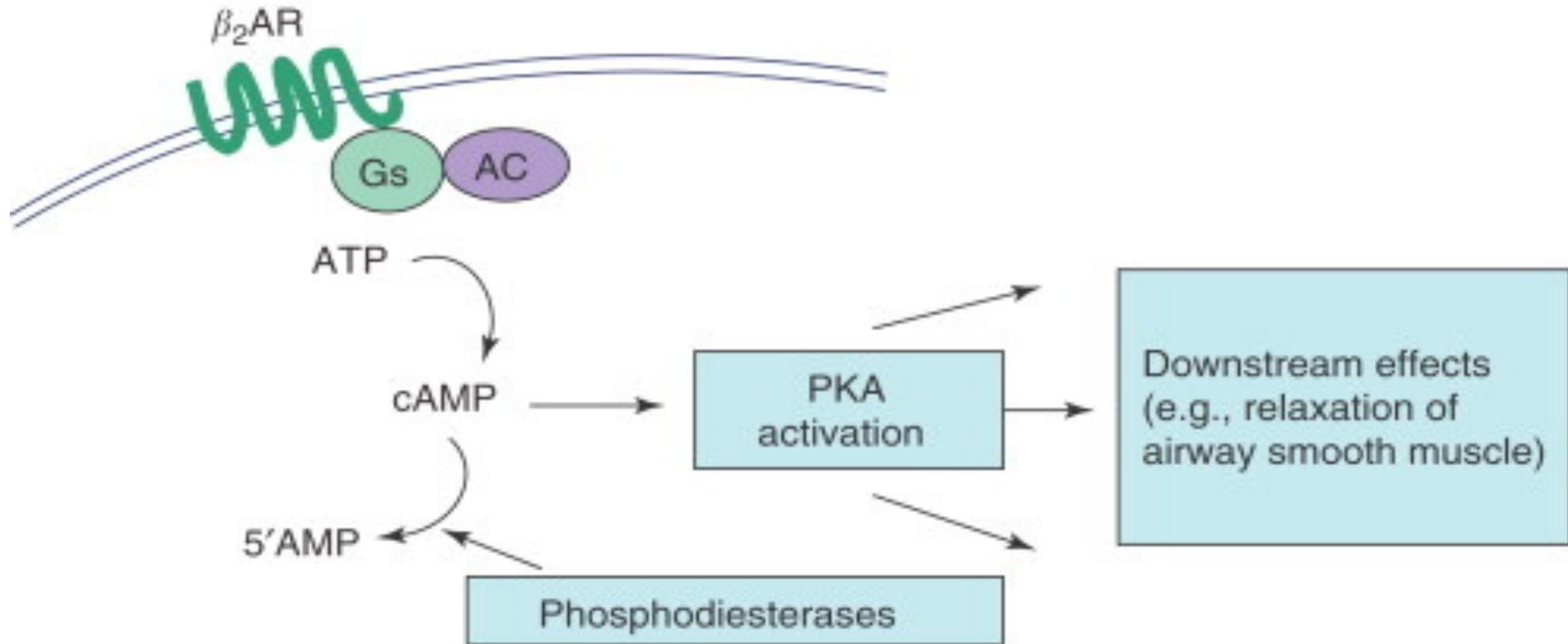
Agenti che aumentano il livello di cAMP come l'**agonista del recettore adrenergico Beta2 (Beta2-AR)** sono usati per trattare le malattie respiratorie, nonostante abbiano numerosi side-effects. I trattamenti per le malattie respiratorie (Asma) utilizzano agonisti di Beta2-AR per ridurre infiammazioni delle vie aeree, invertono la costrizione delle vie aeree, rilassano la muscolatura liscia delle vie aeree, risolvono l'infiammazione. Inoltre, gli agonisti β_2 -AR sono potenti induttori del CFTR.

Sebbene gli agonisti β_2 -AR possano essere utili in queste malattie croniche ostruttive, la loro efficacia è ancora limitata; l'inibizione della degradazione del cAMP da parte di farmaci che prendono di mira la fosfodiesterasi 4 (PDE4) il principale enzima idrolizzante del cAMP nelle vie aeree, è clinicamente efficace ma mostra effetti collaterali:

- vomito
- diarrea
- perdita di peso



Viene sviluppato un peptide mimetico PI3Ky che regola un microdominio di segnalazione cAMP (attivato da Beta2-AR). In questo lavoro si vede come in cellule epiteliali bronchiali umane il peptide mimetico PI3Ky **ha indotto aumenti di cAMP** e PKA e ha promosso la fosforilazione di CFTR wild-type su serina-737, **attivando il gating del canale e ha salvato la funzione di F508del-CFTR**,



SVILUPPO:

Il gruppo ha lavorato sul cuore identificando il peptide mimetico **PI3K γ come regolatore negativo di Beta2-AR/cAMP nel cuore.**

Interrompendo la funzione scaffold di PI3K γ (=legare la proteina chinasi A, PKA, a PDE3 e PDE4) mediante il peptide mimetico PI3K γ provoca l'amplificazione del segnale β 2-AR/cAMP nei cardiomiociti → **aumento cAMP**

Hanno **ipotizzato che il peptide mimetico PI3Ky potesse dare** risultati terapeutici per trattare le malattie respiratorie.

Interrompendo la funzione scaffold si ha:

1) Inibizione di PDE4B e dunque **aumento cAMP** nella muscolatura liscia bronchiale umana, nelle cellule epiteliali e immunitarie.

2) **limitazione** di broncocostrizione **e l'infiltrazione di neutrofili** polmonari.

3) **Promozione del gating di CFTR wild-type (wt)** e ha **ripristinato la funzione del mutante CFTR** più diffuso nella FC (F508del) potenziando gli effetti dei modulatori CFTR approvati.

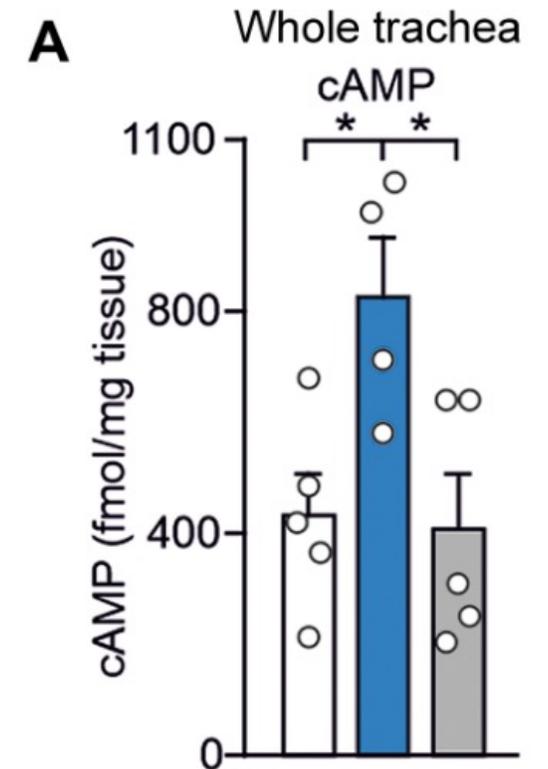
RISULTATI

□ PI3K $\gamma^{+/+}$ ■ PI3K $\gamma^{-/-}$ ■ PI3K $\gamma^{KD/KD}$

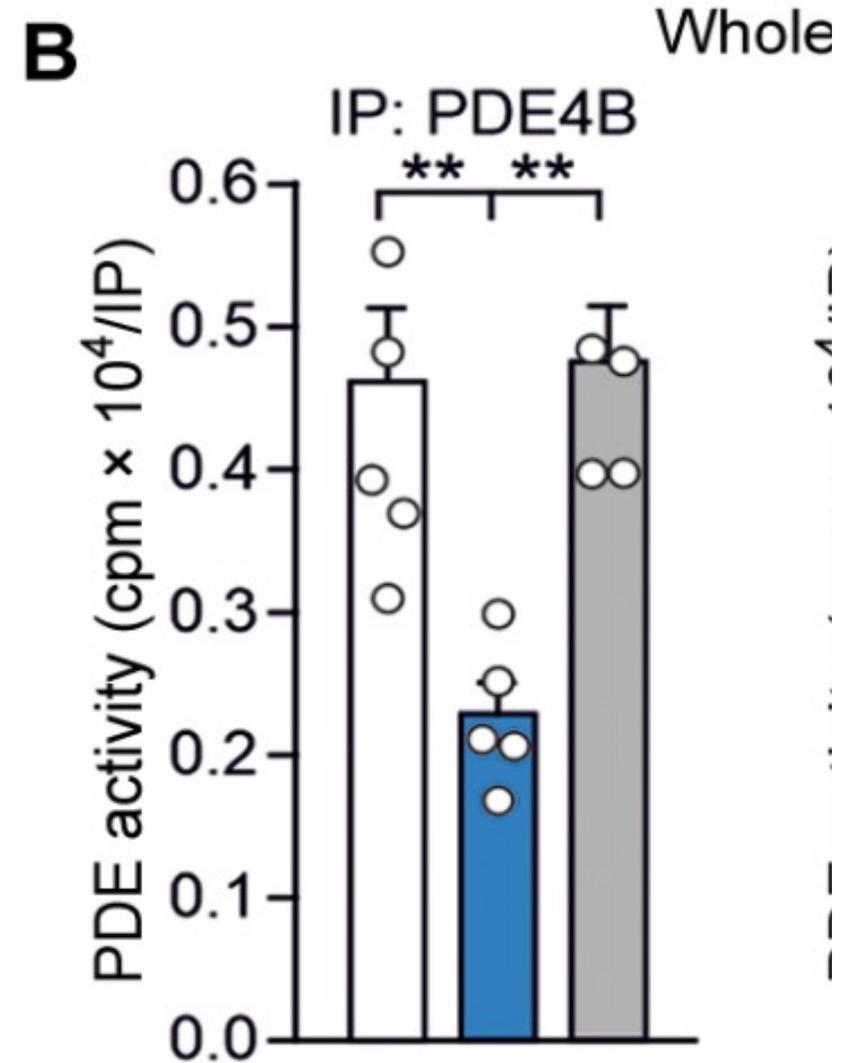
1) valutare il ruolo dell'attività dello scaffold nella regolazione del cAMP delle vie aeree

-topi knock-out PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$) senza funzione scaffold
-topi che conservano l'attività scaffold

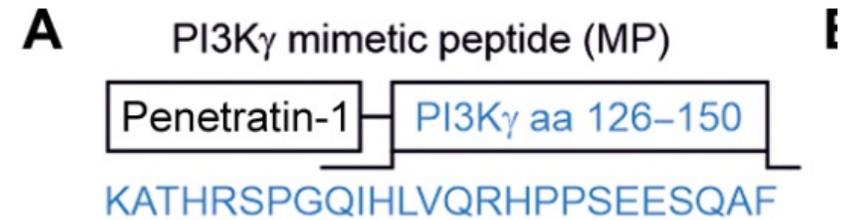
→ cAMP era due volte più alta nelle trachee PI3K $\gamma^{-/-}$ rispetto alle altre suggerendo un controllo indipendente dalla chinasi



l'aumento della concentrazione di cAMP rilevato nelle trachee PI3K γ -/- era correlato con una ridotta attività di PDE4B e PDE4D

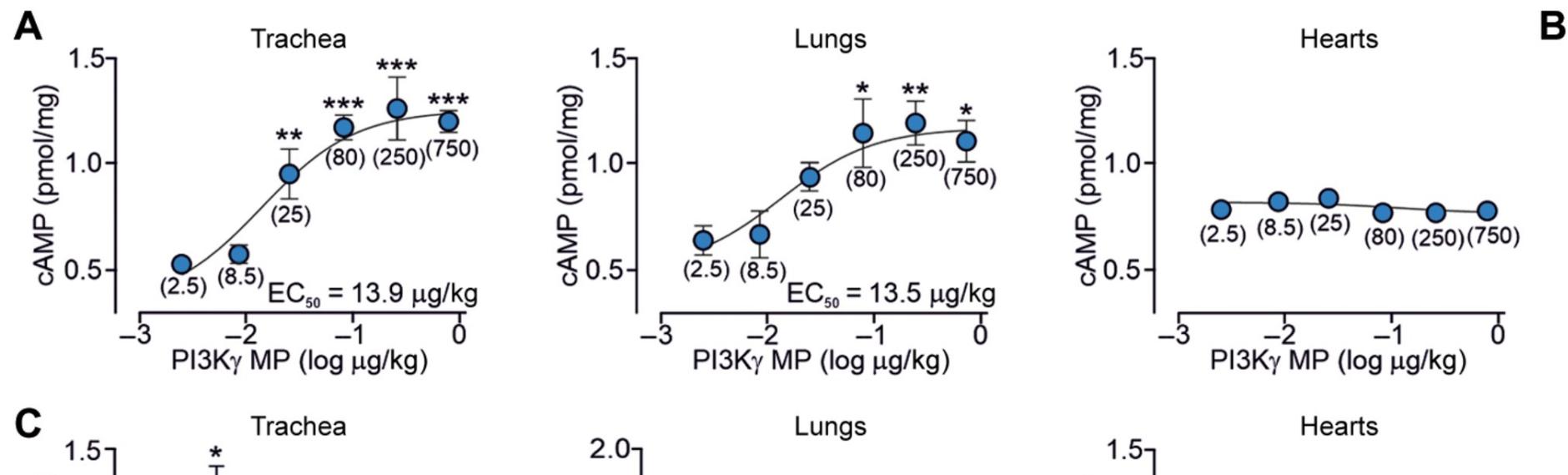


Per interrompere la funzione di ancoraggio PKA di PI3K γ in vivo, un peptide che racchiude il **motivo di legame PKA** è stato fuso con la sequenza di penetrazione cellulare **penetratin-1 (P1)** e poi è stata testata l'efficacia di penetrazione



Per valutare se il mimetico PI3K γ potesse aumentare la concentrazione di cAMP in vivo

Dosato intra-trachealmente nei topi \rightarrow induceva un aumento dose-dipendente di cAMP in entrambe le trachee e nei polmoni



L'applicazione intrapolmonare diretta ha impedito al peptide mimetico di diffondersi al di fuori del tratto respiratorio

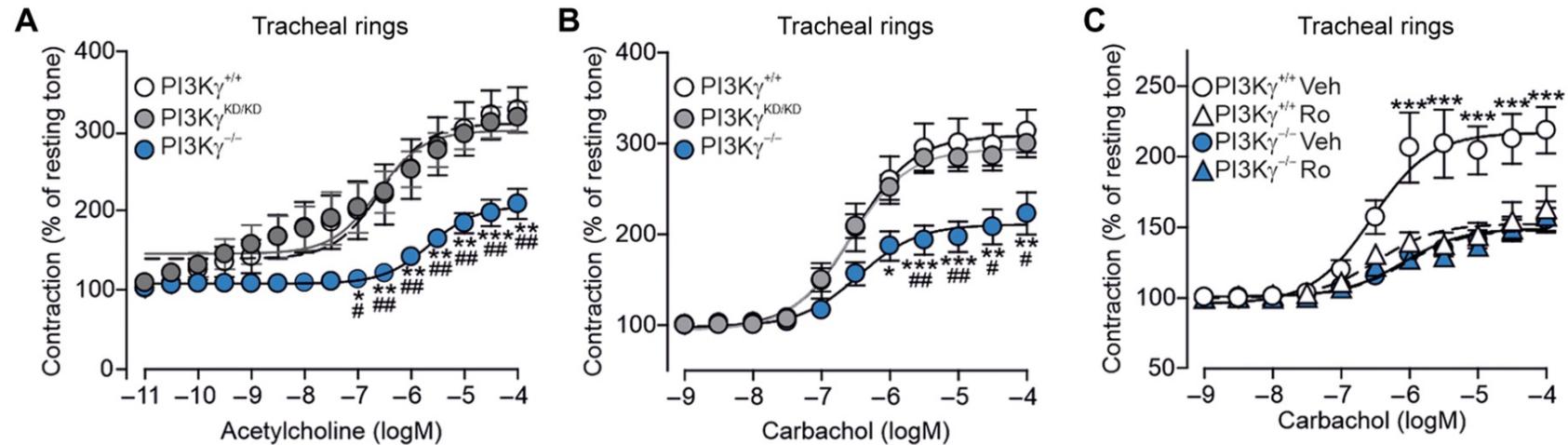
Non sono stati osservati effetti collaterali sistemici dopo l'esposizione cronica

Immunogenicità trascurabile, non ha suscitato alcuna risposta anticorpale

2) Valutazione in anelli tracheali di topo dell'influenza sul **rilassamento della muscolatura liscia delle vie aeree** cAMP-dipendente

→ ridotta contrazione delle vie aeree in modello PI3K γ $-/-$ è collegato a una riduzione dell'attività PDE4.

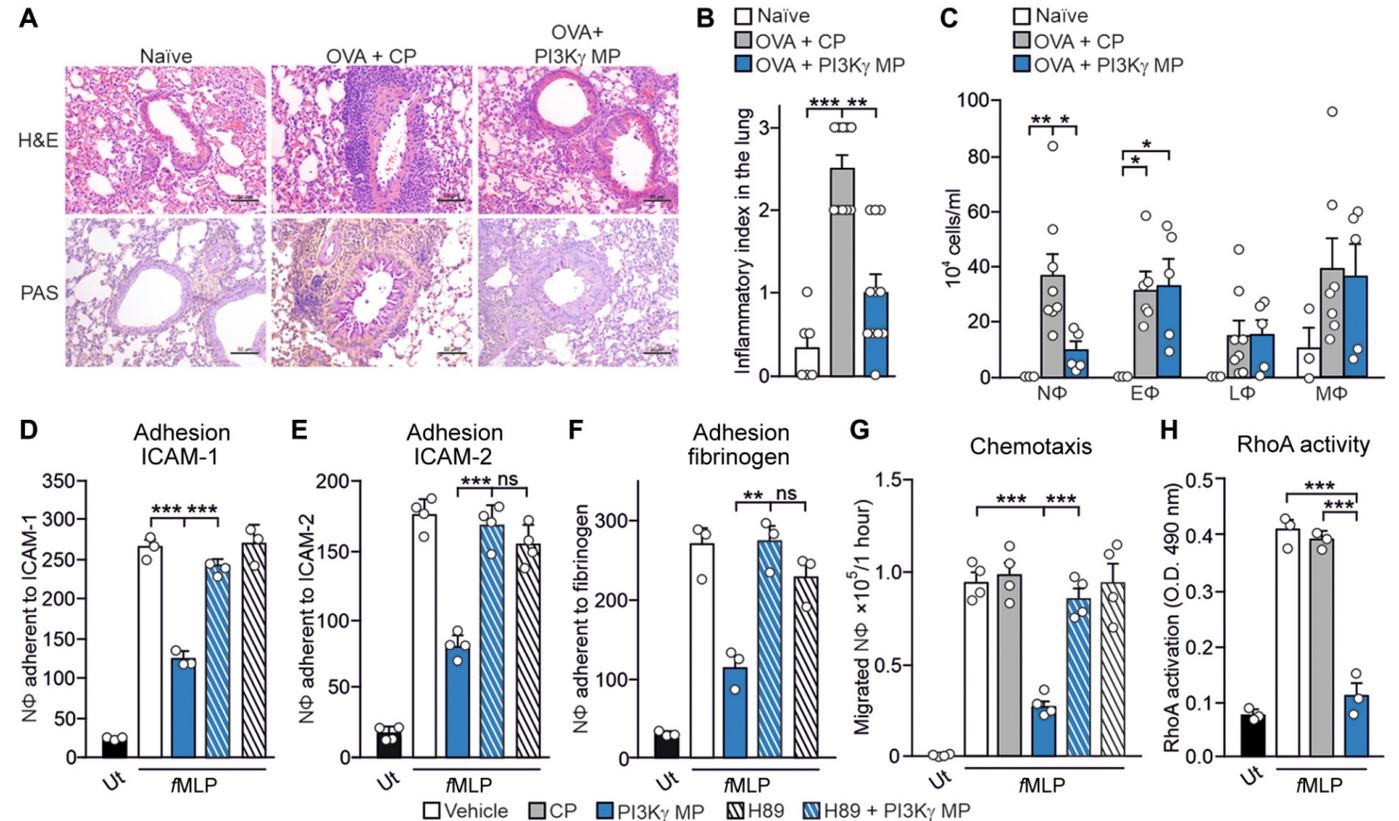
Promozione del rilassamento delle vie aeree nei topi sensibilizzati all'ovoalbumina (OVA), un modello consolidato di asma. Il mimetico PI3K γ potrebbe alleviare la broncocostrizione associata all'asma attraverso l'aumento del cAMP.



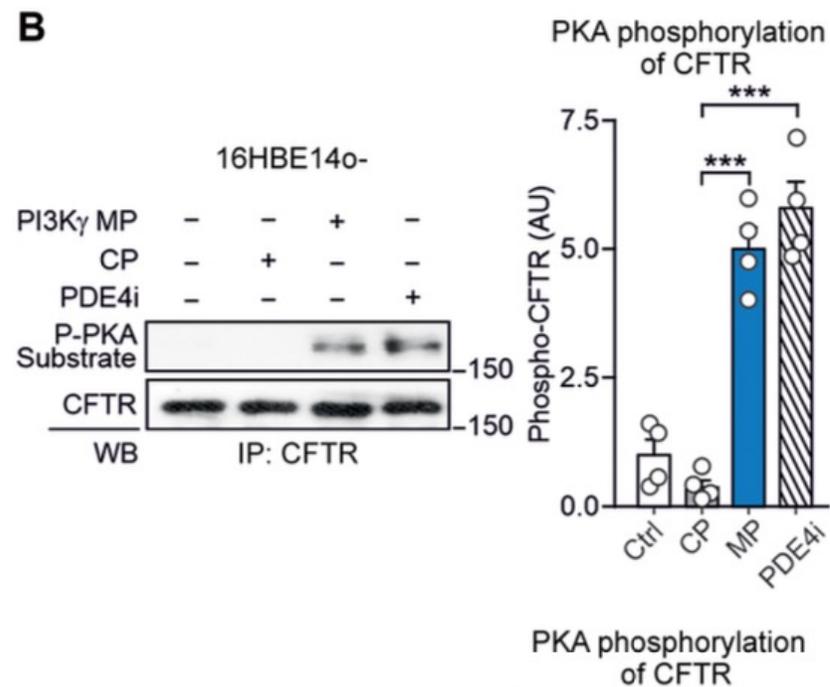
L'infiammazione peribronchiale è smorzata negli animali ripetutamente esposti al mimetico PI3K γ (Fig. A e B).

L'inibizione del legame alla PKA ha ridotto l'adesione dei neutrofili a ICAM-1, ICAM-2 e fibrinogeno (Fig. da D a F) in presenza del mimetico PI3K γ

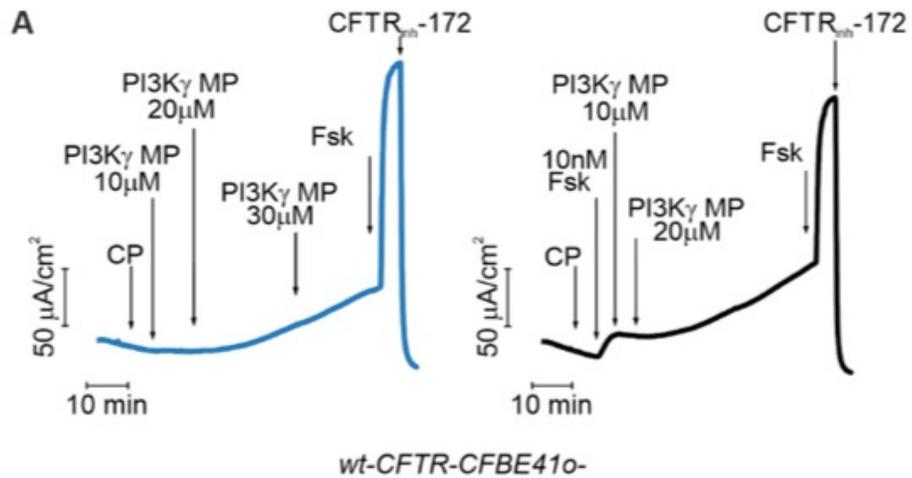
Il mimetico PI3K γ ha ridotto significativamente la chemiotassi dei neutrofili (**attenua l'adesione e la tras migrazione dei neutrofili**) (Fig. G e H)



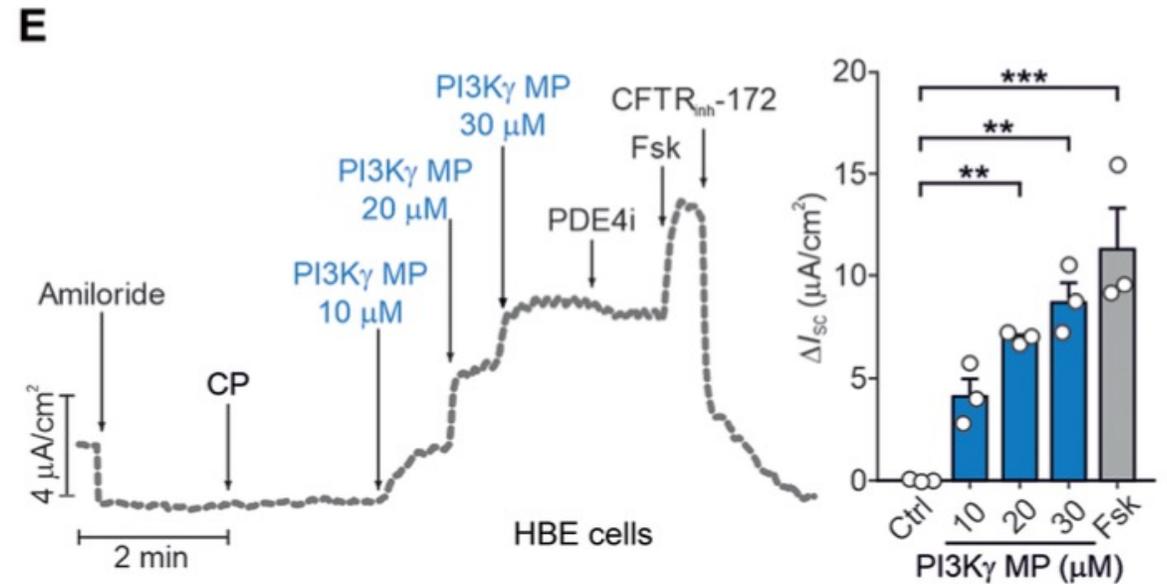
3) Per testare se il mimetico PI3K γ potesse innescare il gating CFTR, la fosforilazione del canale è stata valutata mediante Western blot e trovata essere cinque volte più alta nelle cellule 16HBE14o- trattate con il mimetico PI3K γ rispetto alle cellule CP (Fig.B). **Il mimetico PI3K γ ha aumentato la fosforilazione di CFTR.**



La misurazione delle correnti di corto circuito (ISC) ha mostrato che l'applicazione acuta del mimetico PI3K γ a monostrati polarizzati wt-CFTR-CFBE41o- ha indotto un **aumento dose-dipendente della conduttanza CFTR** (Fig.A e E)



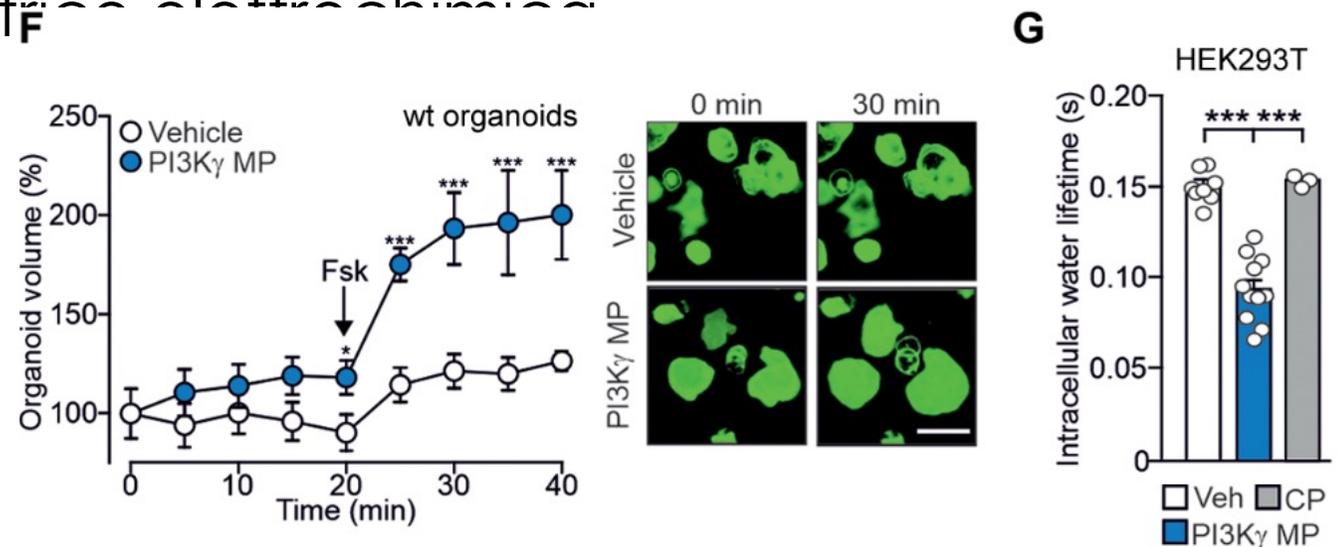
C



Per valutare ulteriormente l'azione diretta del mimetico PI3K γ sulle correnti CFTR sono usati organoidi rettali:

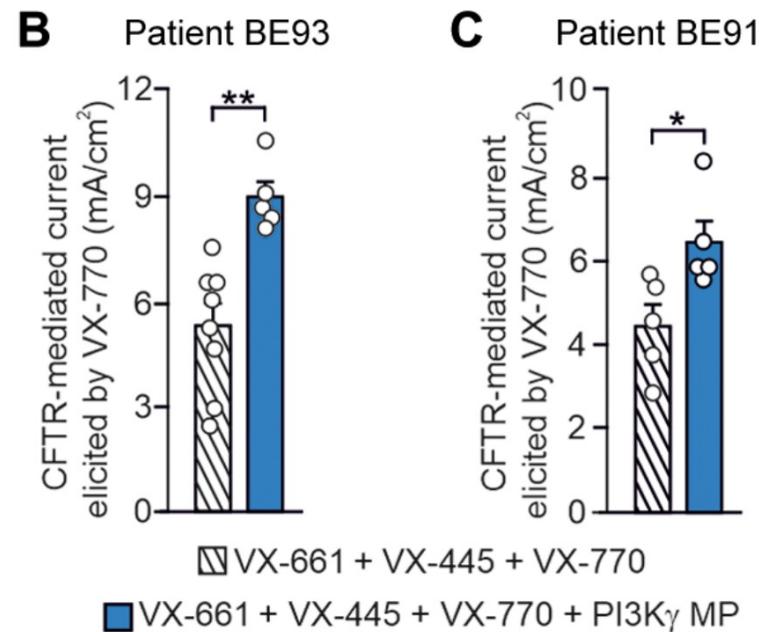
il rigonfiamento degli organoidi in risposta a Fsk è dipendente da CFTR → questo perché l'attivazione di CFTR innesca la secrezione di acqua, in altri termini vi è un rapido efflusso di acqua nelle cellule che esprimono wt-CFTR (Fig. G).

Il mimetico PI3K γ potrebbe indurre Cl⁻ e la conseguente secrezione di acqua nelle cellule epiteliali bronchiali attraverso un meccanismo dipendente dal cAMP, coordinando il gating diretto del CFTR con l'elevazione della forza motrice elettrochimica.



Il peptide mimetico PI3K γ migliora gli effetti terapeutici dei modulatori CFTR nei modelli CF in vitro (F508del-CFTR). In particolare viene valutata la capacità di PI3K γ di migliorare gli effetti terapeutici della recente tripla combinazione elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in cellule HBE F508del da due diversi donatori con CF.

In entrambi i casi, CPT-cAMP ha ulteriormente aumentato le correnti di Cl⁻, che sono state inibite da CFTRinh-172, dimostrando ulteriormente che la secrezione di Cl⁻ dipendeva da CFTR. Questi dati suggeriscono quindi l'uso di PI3K γ per aumentare l'efficacia della terapia Trikafta.



DISCUSSIONE

Le azioni farmacologiche del mimetico **PI3K γ** derivano dalla sua abbassamento della quantità di cAMP. Il peptide inibisce unicamente le PDE senza disturbare altri complessi (blocca i sottotipi selettivi di PDE4 con un ruolo preponderante nei polmoni, come PDE4B)

A differenza degli agonisti β 2-AR, agisce attraverso un meccanismo distinto con almeno due vantaggi:

- interviene sulla degradazione del cAMP piuttosto che sull'attivazione di β 2-AR, evitando così la desensibilizzazione del recettore

- essendo un peptide inalato non raggiunge altri tessuti dove l'aumento del cAMP non sarebbe desiderabile.

Il mimetico PI3K γ potrebbe essere utile per il trattamento delle malattie delle vie aeree ed essere utilizzato nel trattamento della FC dove, nonostante il successo dei modulatori attualmente approvati, mancano ancora trattamenti che consentano ai pazienti una durata di vita normale. Potrebbe rappresentare una strada per ripristinare l'attività di F508del-CFTR vicino al 100% della funzione wt.