

Abstract

Proteins are essential for cellular function, and their correct folding within the ER is crucial for maintaining cell homeostasis. When protein quality control fails, misfolded proteins accumulate, trigger ER stress, and activate the Unfolded Protein Response (UPR), which can ultimately lead to cell death. This condition underlies several conformational disorders, including cystic fibrosis (CF), caused by mutations in the CFTR gene. CF therapy has been revolutionized by modulators, particularly correctors, which improve the amount and stability of misfolded CFTR at the plasma membrane. However, their precise mechanism of action in the cellular environment remains unclear, and a direct binding to CFTR has not been demonstrated. On this basis, we hypothesized that CFTR correctors may exert broader cytoprotective effects and could be repurposed for diseases characterized by impaired protein processing in the ER. We first investigated Lumacaftor (VX-809), the first clinically approved corrector, in lung adenocarcinoma and melanoma cell models in which ER stress was induced by thapsigargin, a SERCA inhibitor that disrupts ER Ca^{2+} homeostasis. VX-809 significantly modulated key ER stress-related pathways, including UPR signaling, apoptosis, oxidative stress, and inflammation. Considering the high burden and limited therapeutic options of neurodegenerative diseases, we then tested VX-809 in a neuroblastoma model commonly used to study these disorders and confirmed a broad protective effect against ER stress. Since the corrector currently used in clinical practice is Elexacaftor (VX-445), we next performed a direct comparison by repeating the full *in vitro* panel in lung adenocarcinoma and neuroblastoma cells. Functional proteomic analyses in neuroblastoma cells revealed that VX-445 largely recapitulates and extends VX-809 effects, with a prominent role in the regulation of Ca^{2+} homeostasis and oxidative stress.

Finally, by assessing mitochondrial apoptosis, membrane potential, oxidative stress, and calcium handling, we showed that VX-445 also modulates all these mitochondrial processes, indicating a specific mitochondrial-directed action. On the basis of the results obtained, it is well-founded to hypothesize that the correctors investigated in this thesis could also be employed for the treatment of other diseases associated with altered proteostasis in the ER.

Abstract

Le proteine sono essenziali per la funzione cellulare e il loro corretto ripiegamento all'interno dell'ER è cruciale per mantenere l'omeostasi cellulare. Quando il controllo di qualità proteico fallisce, le proteine mal ripiegate si accumulano, innescano stress dell'ER e attivano la Unfolded Protein Response (UPR), che può infine condurre alla morte cellulare. Questa condizione è alla base di diverse malattie conformazionali, tra cui la fibrosi cistica (CF), causata da mutazioni del gene CFTR. La terapia della CF è stata rivoluzionata dai modulatori, in particolare dai correttori, che aumentano la quantità e la stabilità di CFTR mal ripiegata a livello della membrana plasmatica. Tuttavia, il loro preciso meccanismo d'azione nell'ambiente cellulare rimane poco chiaro e non è stata dimostrata una loro interazione diretta con CFTR. Su queste basi, abbiamo ipotizzato che i correttori di CFTR possano esercitare effetti citoprotettivi più ampi e possano essere riposizionati per il trattamento di patologie caratterizzate da un alterato processamento delle proteine nell'ER. In primo luogo, abbiamo studiato Lumacaftor (VX-809), il primo correttore approvato clinicamente, in modelli cellulari di adenocarcinoma polmonare e melanoma in cui lo stress dell'ER era indotto dalla taspigargina, un inibitore di SERCA che altera l'omeostasi del Ca^{2+} dell'ER. VX-809 ha modulato significativamente vie chiave correlate allo stress dell'ER, incluse la segnalazione della UPR, l'apoptosi, lo stress ossidativo e l'infiammazione. Considerato l'elevato impatto e le limitate opzioni terapeutiche delle malattie neurodegenerative, abbiamo quindi testato VX-809 in un modello di neuroblastoma comunemente utilizzato per studiare questi disturbi, confermando un ampio effetto protettivo contro lo stress dell'ER.

Poiché il correttore attualmente impiegato nella pratica clinica è Elexacaftor (VX-445), abbiamo successivamente effettuato un confronto diretto ripetendo l'intero pannello in vitro in cellule di adenocarcinoma polmonare e di neuroblastoma. Analisi proteomiche funzionali nelle cellule di neuroblastoma hanno rivelato che VX-445 riproduce in larga misura ed estende gli effetti di VX-809, con un ruolo rilevante nella regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} e dello stress ossidativo. Infine, valutando l'apoptosi mitocondriale, il potenziale di membrana, lo stress ossidativo e la gestione del calcio, abbiamo mostrato che VX-445 modula anche questi processi mitocondriali, indicando un'azione specifica diretta al mitocondrio. Sulla base dei risultati ottenuti, è ragionevole ipotizzare che i correttori analizzati in questa tesi possano essere impiegati anche per il trattamento di altre patologie associate ad alterazioni della proteostasi nell'ER.