

Poster P.10.63

ALTERATION OF LYSOSOMES AND OF LYSOSOMAL ACTIVITY IN CHARCOT-MARIE-TOOTH 2B PERIPHERAL NEUROPATHY

Romano R.^[1], Rivellini C.^[2], De Luca M.^[1], Tonlorenzi R.^[2], Beli R.^[1], Manganelli F.^[3], Nolano M.^[4], Santoro L.^[3], Eskelinen E.^[5], Previtali S.C.^[2], **Bucci C.*^[1]**

^[1]University of Salento ~ Lecce ~ Italy, ^[2]San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[3]University of Naples "Federico II" ~ Naples ~ Italy, ^[4]Salvatore Maugeri Foundation ~ Benevento ~ Italy, ^[5]University of Turku ~ Turku ~ Finland

Charcot-Marie-Tooth type 2B (CMT2B) is a rare autosomal-dominant axonal disorder affecting the peripheral nervous system and characterized by distal weakness, muscle atrophy, prominent sensory loss, foot ulcerations and recurrent infections leading to toe amputations, and for this reason also classified as ulcero-mutilating neuropathy [1, 2]. CMT2B is caused by 5 mutations (L129F, K157N, N161T/I, V162M) of the RAB7A gene, encoding a small GTPase of the RAB family that controls late endocytic trafficking regulating maturation of endosomes, transport from early endosomes to lysosomes, biogenesis of lysosomes and clustering and fusion of late endosomes and lysosomes in the perinuclear region. Controlling these steps of endocytosis RAB7 impacts on several other cellular processes and, in particular, it plays important roles in neurons, regulating neurotrophin trafficking and signaling, neurite outgrowth and neuronal migration [3-5]. The CMT2B-causing RAB7 mutant proteins were previously characterized and it was established that they show altered nucleotide Koff and inhibited GTPase activity per binding event [6-8]. Also they exhibit altered interaction with several RAB7 effector proteins and they inhibit neurite outgrowth and autophagy [9-12]. As several neurodegenerative diseases are caused by lysosomal dysfunctions, we decided to investigate whether CMT2B-causing RAB7A mutations alter the activity of these organelles. Thus, we used healthy and CMT2B skin fibroblasts carrying the Rab7V162M mutation and we investigated expression of endocytic proteins, signaling receptor degradation and lysosomal activity. We found that CMT2B fibroblasts exhibited higher expression of late endocytic proteins, such as LAMP proteins, and of lysosomal enzymes, such as cathepsins. Moreover, in CMT2B cells we found higher activity of cathepsin B, D and L and, using DQ-BSA, we confirmed higher lysosomal activity. Also in CMT2B cells there was higher epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation compared to control fibroblasts and, as expected, EGFR signalling pathways were downregulated. This is of importance considering the neurotrophic functions of EGFR and its important role in neuronal survival, in particular after injury. In addition, we found in CMT2B cells an increased number of lysosomes. Therefore, our data demonstrate higher lysosomal activity in CMT2B cells. We also differentiated sensory neurons from induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from skin fibroblasts of healthy controls and of patients and we confirmed these data demonstrating that patient neurons show higher lysosomal activity compared to neurons of healthy individuals. Thus, considering that hyperactivation of degradation can induce a premature termination of signaling possibly contributing to axonal degeneration, our data suggest that higher lysosomal activity leads to neurodegeneration in CMT2B.

ALTERAZIONI DEI LISOSOMI E DELLA FUNZIONALITÀ LISOSOMALE NELLA NEUROPATIA PERIFERICA CHARCOT-MARIE-TOOTH DI TIPO 2B.

La malattia Charcot-Marie-Tooth di tipo 2B (CMT2B) è una rara patologia che colpisce il sistema nervoso periferico causando debolezza, atrofia muscolare e accentuata perdita sensoriale principalmente a carico degli arti inferiori. Questa neuropatia periferica è anche caratterizzata da frequenti ulcere e infezioni ai piedi che portano spesso all'amputazione delle dita dei piedi e per

questo motivo questa patologia è anche identificata come patologia ulcero-mutilante. La neuropatia periferica CMT2B è causata da 5 mutazioni nel gene codificante la proteina RAB7, una proteina che lega ed idrolizza il nucleotide GTP e che gioca un ruolo importante per la genesi e la funzionalità dei lisosomi, i compartimenti digestivi della cellula. In precedenza abbiamo caratterizzato le proprietà biochimiche e funzionali delle proteine RAB7 mutate che causano la CMT2B scoprendo che presentano dei difetti nel legame al nucleotide e nell'attività di idrolisi del GTP per evento di legame. Inoltre, queste proteine mutate presentano un'alterata interazione con alcuni effettori di RAB7 oltre al fatto che la loro espressione inibisce la crescita dei neuriti. Considerando che il funzionamento non ottimale dei lisosomi è causa di altre malattie neurodegenerative abbiamo deciso di investigare se questi compartimenti cellulari funzionassero in modo adeguato nelle cellule dei pazienti. Per questi studi abbiamo usato cellule (fibroblasti) della pelle di individui sani e di pazienti affetti da questa patologia derivandone anche cellule staminali pluripotenti che sono state poi differenziate a neuroni sensoriali, e cioè le cellule nervose interessate dalla patologia. L'analisi dei lisosomi e della loro funzionalità in queste cellule ha permesso di stabilire che le cellule dei pazienti contengono un maggior numero di lisosomi e che c'è una maggiore attività digestiva di questi compartimenti cellulari, attività che porta ad una maggiore degradazione proteica ed in particolare alla degradazione di recettori importanti per la segnalazione cellulare. Infatti, risulta maggiormente degradato in queste cellule il recettore per il fattore di crescita epidermale (EGFR) che svolge normalmente un importante ruolo trofico per la sopravvivenza di vari tipi di cellule nervose ed in particolare delle cellule nervose danneggiate per qualche motivo. I nostri dati dimostrano quindi che le mutazioni a carico della proteina RAB7 che causano la CMT2B alterano i lisosomi e la funzionalità lisosomiale e, considerando che un'aumentata degradazione di recettori per la segnalazione può indurre una prematura terminazione della segnalazione cellulare che potrebbe contribuire alla degenerazione assonale, questo suggerisce che l'aumentata attività degradativa dei lisosomi possa portare alla neurodegenerazione nella CMT2B.

1. Laura, M. et al., Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders: an evolving landscape. *Curr Opin Neurol*, 2019. 32(5): p. 641-650.
2. Bucci, C. et al., Charcot-Marie-Tooth disease and intracellular traffic. *Prog Neurobiol*, 2012. 99: p. 191-225.
3. Saxena, S. et al., The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci*, 2005. 25(47): p. 10930-10940.
4. Deinhardt, K. et al., Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron*, 2006. 52(2): p. 293-305.
5. Kawauchi, T. et al., Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron*, 2010. 67(4): p. 588-602.
6. Spinosa, M.R. et al., Functional characterization of Rab7 mutant proteins associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B disease. *J Neurosci*, 2008. 28(7): p. 1640-1648.
7. De Luca, A. et al., Characterization of the Rab7K157N mutant protein associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 372(2): p. 283-287.
8. McCray, B.A. et al., Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Hum Mol Genet*, 2010. 19(6): p. 1033-1047.
9. Colecchia, D. et al., Alterations of autophagy in the peripheral neuropathy Charcot-Marie-Tooth type 2B. *Autophagy*, 2018. 14(6): p. 930-941.
10. Cogli, L. et al., Charcot-Marie-Tooth type 2B disease-causing RAB7A mutant proteins show altered interaction with the neuronal intermediate filament peripherin. *Acta Neuropathol*, 2013. 25(2): p. 257-272.
11. Cogli, L. et al., CMT2B-associated Rab7 mutants inhibit neurite outgrowth. *Acta Neuropathol*, 2010. 120(4): p. 491-501.

12. Cogli, L. et al., Vimentin phosphorylation and assembly are regulated by the small GTPase Rab7a. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1833: p. 1283-1293.

Charcot Marie Tooth di tipo 2B

Coordinator: Cecilia Bucci

Partners: Stefano Previtali, Lucio Santoro

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

Telethon Project (nr):

GGP16037

Disease Name:

Charcot Marie Tooth Type 2B

Keywords:

Charcot-Marie-Tooth type 2B, Lysosome, Epidermal Growth Factor Receptor