

Poster P.10.78

TARGETING LIPIDS IN CLN8-ASSOCIATED NCL DISEASES: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INTERACTION OF CLN8 WITH VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN-ASSOCIATED PROTEIN A (VAPA), AND GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS

Papasergi S.^[1], Saladino P.^[1], Tinnirello R.^[2], Cernigliaro C.^[1], Prioni S.^[3], Grassi S.^[3], Mauri L.^[3], Giussani P.C.^[3], Prinetti A.^[3], Guarneri P.*^[1]

^[1]Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB), Department of Biomedical Sciences, CNR ~ Palermo ~ Italy,

^[2]Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB), Department of Biomedical Sciences, CNR ~ Italy, ^[3]Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, School of Medicine, University of Milan, Milan, Italy ~ Milano ~ Italy

The neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are autosomal recessive diseases with progressive dementia, motor disturbance, epilepsy, visual loss and early death, affecting mainly children but also adults. Mutations in 13 distinct genes cause NCLs with marked phenotypic heterogeneity and undefined pathomechanism. CLN8 gene shows wide complexity with 31 different mutations leading to late-infantile NCL variants (vLINCL) and progressive epilepsy with mental retardation (EPMR) (www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml). CLN8 encodes an ER-resident transmembrane protein with an ER-ERGIC retrieval signal, a TLC domain normally related to lipid sensing/trafficking, and possible multiple roles (1, 2). We proposed to study the functional meaning of CLN8-VAPA interaction previously characterized (Passantino et al., 2013), being VAPA an ER-docking-site for cytosolic lipid-binding-proteins responsible of ceramide transport, sphingolipid (SL), phospholipid and cholesterol synthesis/trafficking. We expect to define CLN8 implication in SL, and pinpoint the molecular bases of the phenotypic heterogeneity.

In the frame of the current project, using recombinant proteins and mammalian expression vectors (mono/bicistronic) encoding fICLN8, its subregions and fVAPA, and in vitro and in vivo assays, we identified a putative CLN8 region interacting with VAPA, that is highly conserved in vertebrates and bears some vLINCL mutations. In vitro SphingoStrips and TLC overlay assay revealed no direct binding of fICLN8 and subregions to ceramides; whereas, metabolic labeling studies showed kinetic changes in the ceramide pathway of HeLa cells overexpressing CLN8 and VAPA. Interestingly, CLN8 (presumably the N-terminus) was able to bind sulfatide, which regulates myelination; considering the myelin defects in NCLs (3), further studies are ongoing. Throughout site-directed-mutagenesis, we created a model of EPMR-type mutation. In cells expressing both EPMR and VAPA, we found a strong EPMR-VAPA interaction and higher sphingomyelin and cholesterol levels. We also generated CRISPR/Cas9 CLN8 KO clones that show to maintain survival and migration capacities similar to native HeLa cell line but grow as autophagy predisposed cells. In CLN8-KO clones, even though the high VAPA levels, the only difference observed in sphingolipid was a marked change in the ganglioside patterns, with a shift toward more complex species. The overall results indicate a multifaceted and at least in part novel role of CLN8 alone and with VAPA toward SL trafficking, also supported by the finding that fICLN8 and subregions were able to bind different phosphoinositides in vitro. We are underway using the newly created CRISPR-CERT KO clones to analyze this ceramide transporter as part of CLN8-VAPA complex and possible target of CLN8 dysfunction. Fibroblast cells of patients with CLN8-vLINCL and EPMR are being used to correlate phenotype/genotype divergences to the CLN8-VAPA complex.

Ruolo dei lipidi nelle patologie NCL associate a CLN8: interazioni strutturali e funzionali del CLN8 con la proteina vescicolare di membrana-associata alla proteina A (VAPA), e correlazioni genotipo-fenotipo.

Le ceroidolipofuscinosi neuronali (NCLs) sono un gruppo di malattie neurodegenerative principalmente dell'infanzia di tipo autosomico recessivo e associate a geni e variabili cliniche differenti. I sintomi comprendono un progressivo deterioramento cognitivo e motorio, epilessia, perdita della visione e morte precoce. 13 geni sono implicati nelle varie forme NCLs. Lo sviluppo della patogenesi NCL non è chiaro per la maggior parte delle forme i cui geni producono proteine dalla funzione sconosciuta. Ciò limita fortemente lo sviluppo di terapie risolutive a fronte delle attuali cure palliative e/o compassionevoli. Attualmente, il trattamento dei bambini con NCL tipo 2 (CLN2) è l'unica terapia con aspettative positive per il rallentamento dei sintomi devastanti. Ciò è reso possibile dalla conoscenza della CLN2, l'enzima lisosomiale tripeptidil peptidasi 1, il cui deficit è in parte compensato dalla somministrazione, seppure invasiva, dell'enzima sano.

Nelle forme di malattia associate a mutazioni del gene CLN8, è stata accertata una marcata eterogeneità associata alle diverse mutazioni, alle etnie, all'età di insorgenza e al tipo di sintomi; in generale mutazioni CLN8 vengono associate a varianti tardo-infantili di NCL e forme giovanili di epilessia con ritardo mentale (EPMR). Gli studi sulla proteina CLN8 localizzata nel reticolo endoplasmatico cellulare suggeriscono una diversità di funzione della proteina. Nell'ambito del progetto Telethon, i ricercatori stanno studiando una possibile funzione della proteina CLN8 sulla base della formazione di un complesso interattivo con la proteina VAPA che è nota regolare i lipidi ed in particolare gli sfingolipidi. Nel corso dello studio sono state messe in atto tecnologie ad hoc per simulare a livello cellulare condizioni di deficit parziale e totale della proteina CLN8, come la mutagenesi-sito diretta o la tecnologia CRSPR-Cas9; come pure sono state create sonde specifiche per produrre la forma sana di CLN8 e la proteina VAPA. E' in programmazione l'utilizzo di fibroblasti di pazienti affetti da CLN8-NCL o EPMR. Gli studi ad oggi suggeriscono un complesso ma incisivo ruolo della proteina CLN8 nella sintesi e traffico degli sfingolipidi, che in alcune condizioni viene supportato dalla presenza della proteina VAPA. Gli sfingolipidi sono implicati nello sviluppo e plasticità del sistema nervoso e la loro distribuzione spazio-temporale è essenziale al mantenimento delle funzioni neuronali. La validazione di questi risultati su cellule di fibroblasti di vari pazienti con diversa mutazione CLN8 e diverso quadro patologico, si prospetta come una valida chiave di definizione delle diversità fenotipiche dei pazienti e di approcci alla prognosi e terapia.

1. Passantino R, Cascio C, Deidda I, Galizzi G, Russo D, Spedale G, Guarneri P. Identifying protein partners of CLN8, an ER-resident protein involved in neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta*. 1833: 529-40 (2013).
2. di Ronza A, Bajaj L, Sharma J, Sanagasetti D, Lotfi P, Adamski CJ, Collette J, Palmieri M, Amawi A, Popp L, Chang KT, Meschini MC, Leung HE, Segatori L, Simonati A, Sifers RN, Santorelli FM, Sardiello M. CLN8 is an endoplasmic reticulum cargo receptor that regulates lysosome biogenesis. *Nat Cell Biol*. 20: 1370-1377 (2018).
3. Kuronen M, Hermansson M, Manninen O, Zech I, Talvitie M, Laitinen T, Gröhn O, Somerharju P, Eckhardt M, Cooper JD, Lehesjoki AE, Lahtinen U, Kopra O. Galactolipid deficiency in the early pathogenesis of neuronal ceroid lipofuscinosis model Cln8mnd: implications to delayed myelination and oligodendrocyte maturation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 38: 471-86 (2012).

Ceroidolipofuscinosi neuronali

Coordinator: Patrizia Guarneri
Partner: Alessandro Prinetti
Duration (N. Years): 3
Starting year: 2017

Telethon Project (nr):

GGP16277

Disease Name:

Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (NCLs)

Keywords:

CLN8, VAPA, Sphingolipids