

## Poster P.16.110

### **CONE DYSTROPHIES AND RETINAL DEGENERATION FROM PROTEIN STRUCTURES TO BIOLOGICAL NETWORKS: TOWARD THE DESIGN OF THERAPEUTIC MOLECULES.**

Asteriti S.<sup>[1]</sup>, Boni F.<sup>[2]</sup>, Dal Cortivo G.<sup>[1]</sup>, Marino V.<sup>[3]</sup>, Cangiano L.<sup>[3]</sup>, Milani M.<sup>[4]</sup>, Dell'Orco D.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Verona ~ Verona ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Milan ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Pisa ~ Pisa ~ Italy, <sup>[4]</sup>CNR Biophysics ~ Milan ~ Italy

Cone dystrophy (COD) is a severe form of retinal disorder affecting photoreceptors. Common symptoms include decreased central and color vision, photophobia and, in several patients, cone degeneration is followed by that of rods (CORD), resulting in the progressive loss in peripheral vision. Currently, no cure exists for CORD, which affects 1 in 40,000 people<sup>1</sup>. To date, up to 20 missense mutations in GUCA1A, the gene encoding the calcium sensor guanylate-cyclase-activating protein (GCAP1) have been associated with autosomal dominant COD/CORD. The consequences of alterations in GCAP1 have been only partly explored and mechanisms leading to the onset of the disease remain largely unclear. In this project we have thoroughly characterized GCAP1 variants associated with COD/CORD and their interaction with the target GC1 by applying biochemical, biophysical and electrophysiological approaches, which have all been integrated by computer simulations. The main findings can be summarized as follows:

- Human GCAP1 under physiological conditions presents a dynamic monomer-dimer equilibrium affected by salt and Mg/Ca relative concentrations, that renders its crystallization particularly challenging. However, SAXS studies corroborated by protein docking simulations allowed us to build a 3D model of the GCAP1 dimeric assembly;
- A thorough structural and functional characterization was performed of the previously known COD-associated variants affecting the Ca<sup>2+</sup> binding sites, namely p. E155A/G and p.D100G. All variants show reduced affinity for Ca<sup>2+</sup> and a constitutive activation of the GC1 target at physiological concentrations of Ca<sup>2+</sup>..
- A novel variant (p.E111V) associated with a severe form of CORD has been identified in an Italian family during the project; we fully characterized the protein<sup>2</sup>;
- In silico screening for possible small molecules affecting the interaction between GCAP1 and GC1 led to the identification of a compound that seems to be more selective for the pathogenetic p.D100G variant compared to the wild type GCAP1; the role of this ligand in regulating GC1 enzymatic activity is under investigation;
- Nano-sized liposomes with lipid composition mimicking that of photoreceptor outer segment were produced and their biodistribution was investigated in mouse retina both ex-vivo and following intra-vitreous injections. The liposomes fuse with retinal membranes and reach all layers including photoreceptor outer segments;
- Liposomes encapsulated with E111V-GCAP1 and delivered in vivo and ex vivo perturb the phototransduction cascade in mouse rods in a way consistent with numerical simulations of the same cascade, thus opening the way to powerful tools for protein therapeutics.

We plan to complete the structural and biochemical characterization of CORD-GCAP1-GC1 interaction and test the physiological effects of both small ligands and recombinant wild-type protein encapsulation into liposome for in vivo delivery.

La distrofia dei coni (COD) è una grave forma di malattia della retina che colpisce i fotorecettori. I sintomi più comuni sono la diminuzione della visione centrale e del colore, la fotofobia e, in molti

pazienti, la degenerazione dei coni è seguita da quella dei bastoncelli (CORD), con conseguente progressiva perdita della visione periferica. Attualmente non esiste una cura per la CORD, che colpisce 1 persona su 40.000. Ad oggi sono state identificate 20 mutazioni in GUCA1A, il gene che produce la proteina calcio-sensore che attiva la guanilato-ciclastasi (GCAP1) che l'associano a COD/CORD di tipo autosomico dominante. Le conseguenze delle alterazioni di GCAP1 sono state esplorate solo parzialmente e i meccanismi che portano all'insorgenza della malattia rimangono per lo più poco chiari. In questo progetto abbiamo caratterizzato le varianti di GCAP1 associate a COD/CORD e la loro interazione con il target GC1 applicando approcci biochimici, biofisici ed elettrofisiologici, che sono stati tutti integrati da simulazioni al computer. I principali risultati possono essere riassunti come segue:

- La GCAP1 umana in condizioni fisiologiche presenta un equilibrio dinamico monomero-dimero influenzato dalle concentrazioni relative di sale e  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ , che rende la sua cristallizzazione difficoltosa
- È stata eseguita una completa caratterizzazione strutturale e funzionale delle varianti già identificate in precedenza come associate a COD che interessano i siti di legame  $Ca^{2+}$ , ossia p.E155A/G e p.D100G. Tutte le varianti mostrano una ridotta affinità per il  $Ca^{2+}$  ed attivano costitutivamente il target GC1
- Una nuova variante (p.E111V) associata a una grave forma di CORD è stata identificata in una famiglia italiana durante il progetto e caratterizzata<sup>2</sup>;
- Lo screening al computer di piccole molecole ha portato all'identificazione di un composto che sembra essere più selettivo per la variante patologica p.D100G rispetto alla proteina wild-type GCAP1 per l'interazione con l'enzima GC1;
- Sono stati prodotti liposomi di dimensioni nanometriche con composizione lipidica simile al segmento esterno dei bastoncelli e studiata la biodistribuzione nella retina del topo. I liposomi si fondono con le membrane retiniche e raggiungono tutti gli strati neuronali compresi i segmenti esterni dei fotorecettori;
- I liposomi incapsulati con E111V-GCAP1 e somministrati in vivo ed ex vivo perturbano la cascata di fototrasduzione nei bastoncelli di topo in modo consistente con quanto predetto dalle simulazioni numeriche della stessa cascata, fornendo quindi un potente strumento di indagine per la terapia proteica.

Prevediamo di completare la caratterizzazione strutturale e biochimica iniziata e di testare gli effetti fisiologici dell'incapsulamento in liposoma di piccoli ligandi e di proteine ricombinanti per una futura somministrazione in vivo.

1. Hamel CP. Orphanet J Rare Dis. 2007 Feb 1;2:7

2. Marino V, Dal Cortivo G, Oppici E, Maltese PE, D'Esposito F, Manara E, Ziccardi L, Falsini B, Magli A, Bertelli M, Dell'Orco D. Hum Mol Genet. 2018;27(24):4204-4217

Distrofia dei coni

Coordinator: Daniele Dell'Orco

Partners: Mario Milani, Lorenzo Cangiano

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16010

**Disease Name:**

Cone Dystrophy

**Keywords:**

Phototransduction, Retinal dystrophy, Protein therapy