

## Poster P.20.132

### SCREENING CVID PATIENTS WITH T CELL DEFECTS FOR PATHOGENIC VARIANTS OF CILIARY PROTEINS IDENTIFIES CCDC28 AS NEW PLAYER IN IMMUNE SYNAPSE ASSEMBLY

Onnis A.<sup>[1]</sup>, Capitani N.<sup>[1]</sup>, Cassioli C.<sup>[1]</sup>, Finetti F.<sup>[1]</sup>, Lougaris V.<sup>[2]</sup>, D'Elia M.M.<sup>[3]</sup>, Plebani A.<sup>[2]</sup>, Baldari C.T.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>University of Siena ~ Siena ~ Italy, <sup>[2]</sup>University of Brescia ~ Brescia ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Florence ~ Florence ~ Italy

Common variable immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency the hallmark of which is hypogammaglobulinemia. While intrinsic B cell defects account for the impaired antibody production in a significant proportion of patients, defects in other cellular components implicated in this process, namely T cells and antigen presenting cells (APC), have also been reported. Accordingly, multiple disease-associated genes have been identified, indicating that CVID groups multiple genetic disorders unified by antibody deficiency. For approximately 40% of these the aetiology is as yet unknown.

Our lab has previously reported that in CVID patients with defective T cell function (T-CVID) signaling by the T cell antigen receptor (TCR) is impaired, which in some patients was associated with deficiency of the actin regulator Vav. Here we extended our search for the genetic lesion(s) in T-CVID focusing on the immune synapse (IS), a specialized signaling platform that T cells assemble at the contact with cognate APCs. Based on our discovery that proteins implicated in ciliogenesis are co-opted by the non-ciliated T cell for IS assembly, we looked at ciliary proteins as candidate disease genes. Exome sequencing on 7 T-CVID patients revealed potentially deleterious SNPs among the ~100 genes analyzed. RT-PCR analysis of these genes in a cohort of over 100 CVID patients showed that the frequency of one of these SNPs, mapping to the CCDC28B coding sequence, was increased in CVID.

CCDC28B is a coiled-coil domain protein that acts as disease modifier in Bardet-Biedl syndrome and participates in ciliogenesis, however the underlying mechanism is largely unknown. We found that CCDC28B is expressed in T cells, where it co-localizes with early and recycling endosomes at the centrosome, with which it polarizes towards the APC during IS assembly. CCDC28B silencing in T cells resulted in impaired TCR accumulation at the IS, concomitant with defective phosphotyrosine signaling. The fact that the centrosome translocated normally in CCDC28B-deficient T cells suggested a defect in polarized TCR recycling, a process essential for replenishing the synaptic membrane with TCRs associated with an endosomal pool to sustain signaling. TCR recycling was indeed impaired in the absence of CCDC28B as a result of the inability of these cells to polymerize actin filaments on endosomes. This was caused by the failure of the actin regulator WASH to be recruited to endosomes carrying recycling TCRs. Biochemical analyses showed that CCDC28B interacts with WASH and the retromer complex to promote recycling. Collectively, our data identify CCDC28B as a new player in IS assembly that contributes to polarized TCR recycling by recruiting WASH to endosomal TCR for local actin polymerization. We have now cloned the CVID-associated CCDC28B variant and are testing the outcome of its expression on IS assembly in T cells. The results highlight a new strong candidate disease gene in T-CVID.

Lo screening di pazienti CVID per varianti patogeniche di proteine ciliari identifica CCDC28B quale coordinatore dell'assemblaggio della sinapsi immunologica

L'immunodeficienza comune variabile (CVID) è la più frequente malattia genetica del sistema immunitario. Questa patologia è caratterizzata da una grave riduzione dei livelli di anticorpi, che si manifesta in aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche e tendenza a sviluppare con alta frequenza danni polmonari irreversibili, patologie granulomatose e gastrointestinali, autoimmunità e cancro. L'attuale trattamento prevede la somministrazione a vita di anticorpi, il che comporta non solo un impatto negativo sulla qualità di vita dei pazienti ma spesso sfocia in gravi complicanze di tipo anafilattico. Mentre il difetto nella produzione di anticorpi è condiviso da tutti i pazienti CVID, non esiste una correlazione tra i livelli anticorpali e le specifiche complicanze. In accordo con questa eterogeneità, recenti progressi suggeriscono che la CVID è in realtà un insieme di differenti malattie genetiche. L'identificazione delle lesioni genetiche nella CVID potrà migliorare la precisione della diagnosi, contribuendo alla scelta del trattamento più adatto tra le terapie esistenti e fornendo nuovi spunti per lo sviluppo di terapie personalizzate. Con questo progetto vogliamo contribuire a questo obiettivo caratterizzando il macchinario molecolare che controlla l'attivazione dei linfociti T, un processo difettivo in circa il 40% dei pazienti CVID e associato alle presentazioni più gravi della malattia.

L'attivazione dei linfociti T dipende dalla formazione della sinapsi immunologica, una piattaforma molecolare attraverso la quale il linfocita riceve istruzioni da parte di altre cellule del sistema immunitario. Abbiamo recentemente dimostrato l'inatteso coinvolgimento in questo processo di proteine che controllano la formazione del ciglio primario, un organello di cui i linfociti T sono privi. Questa scoperta ha aperto un nuovo scenario, rivelando un'omologia tra la sinapsi immunologica e il ciglio primario che stiamo sfruttando per la ricerca delle lesioni genetiche nei pazienti CVID con difetti a carico dei linfociti T. Lo screening di oltre 100 pazienti ha rivelato mutazioni puntiformi potenzialmente patogeniche nei geni codificanti per alcune proteine ciliari. I nostri studi si sono focalizzati su una di queste, CCDC28B, di cui la variante patogenetica presenta una frequenza più elevata nei pazienti CVID. Abbiamo dimostrato che CCDC28B è essenziale per l'assemblaggio della sinapsi immunologica, verso la quale controlla il trasporto del recettore dell'antigene da cui parte il segnale per avviare la formazione della sinapsi immunologica e l'attivazione del linfocita T. Stiamo attualmente valutando il significato patogenetico della variante identificata nei pazienti CVID.

1. Cunningham–Rundles C. 2010. How I treat Common Variable Immunodeficiency. *Blood* 116:7–15.
2. Boncristiano M, Majolini MB, D'Elis MM, Pacini S, Valensin S, Olivieri C, Amedei A, Falini B, Del Prete G, Telford JL, Baldari CT. 2000. Defective recruitment and activation of ZAP–70 in common variable immunodeficiency patients with T cell defects. *Eur J Immunol* 30:2632–2638.
3. Paccani SR, Boncristiano M, Patrussi L, Olivieri C, Wack A, Valensin S, Hirst TR, Amedei A, Del Prete G, Telford JL, D'Elis MM, Baldari CT. 2005. Defective Vav expression and impaired F–actin reorganization in a subset of patients with common variable immunodeficiency characterized by T–cell defects. *Blood* 106:626–634.
4. Dustin ML, Choudhuri K. 2016. Signaling and Polarized Communication Across the T Cell Immunological Synapse. *Annu Rev Cell Dev Biol* 32:303–325.
5. Cassioli C, Baldari CT. 2019. A ciliary view of the immunological synapse. *Cells* 8, 789; doi:10.3390/cells8080789

Immunodeficienza Comune Variabile

Coordinator: Cosima T Baldari  
Duration (N. Years): 3  
Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16003

**Disease Name:**

CVID (Common Variable Immunodeficiency)

**Keywords:**

immune synapse, TCR signaling, vesicular trafficking