

Poster P.20.141

SAP AND DIACYLGLYCEROL KINASE A RECIPROCALLY REGULATE TCR SIGNALLING

Velnati S.^[3], Malacarne V.^[1], Ruffo E.^[2], Mauro C.^[2], Massarotti A.^[3], Tron G.^[3], Baldanzi G.^[3], Graziani A.^{*[1]}

^[1]Università di Torino ~ Torino ~ Italy, ^[2]Università Vita-Salute San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[3]Università del Piemonte Orientale ~ Novara ~ Italy

X-linked lymphoproliferative disease (XLP-1) is a primary immunodeficiency associated with excessive CD8+ T cell expansion following EBV infection. It is caused by LOF mutations in SH2D1A gene encoding SLAM-associated protein (SAP), an SH2-containing adaptor protein interacting with ITSM sequence of SLAM receptors. In absence of SAP, SLAM receptors act as negative regulator of TCR signalling, thus causing multiple immune defects including reduced TCR signaling and Restimulation-Induced Cell Death (RICD). The latter physiologically constrains antigen-activated T cell expansion during immune response and depends on TCR signalling strength.

We previously showed that upon TCR activation, SAP mediates the inhibition of diacylglycerol kinase alpha (DGK α), a negative regulator of TCR signalling, which metabolizes diacylglycerol (DAG) to phosphatidic acid (PA) (Baldanzi, 2011). Thus, in SAP absence, deregulated DGK α activity impairs TCR signalling by consuming DAG, a key signalling lipid for immune synapse formation and activation of PKC- ζ and Ras-GRP. Accordingly, potentiation of TCR-induced signaling by DGK α knockdown or inhibition rescues RICD in vitro and in vivo by stimulating PKC θ , ERK1/2 and RSK activities (Ruffo, 2016). These findings underscore the relevance of DGK α as a key negative regulator of TCR signaling strength and a therapeutic target to restore RICD sensitivity in XLP-1 patients.

Furthermore, our findings showing the role of DGK α as negative regulator of TCR signaling downstream of SAP, have been further supported by recent data indicating DGKA as negative regulator of T cell response to the antigen, and reporting DGKA deregulation as one of mechanisms sustaining tumor-induced immune escape.

Nevertheless, the molecular mechanisms underlying the regulation of DGK α activity and the mechanisms by which it negatively regulates T cells, still remain to be elucidated.

Thus, the goals of this project have included:

- i) To develop novel DGK α specific inhibitors suitable for human use, through a virtual screening strategy. Indeed through this strategy we have develop a novel inhibitor and identified a common pharmacophoric structure for DGK α inhibitors (Velnati et al. 2019; Velnati et al. in press).
 - ii) to identify the molecular mechanisms regulating DGK α , to explore whether knock down of SAP interactors affects RICD and whether DGK α inhibition rescues the defective RICD. Indeed we will present data showing that knock down of a SAP interactor impairs RICD, which is rescue by DGK α knock down.
 - iii) to explore the mechanisms by which inhibition of based on our previous work showing that DGK α regulates integrin internalization and recycling (Rainero, 2012; Malacarne et al. ms. in preparation).
- Altogether these data suggest the hypothesis that DGK α acts in a pathway along with a SAP-containing protein complex, which reciprocally regulate a pathway controlling the strength of TCR signaling.

La sindrome di Duncan (XLP1) è una immunodeficienza primaria associata a espansione di linfociti T attivati in seguito a infezione con virus di Epstein-Barr e legata a un difetto di morte cellulare indotta da stimolazione persistente del TCR (RICD). XLP1 è causata da mutazioni perdita di funzione del gene SH2D1A, codificante SAP, una proteina adattatrice, che regola la segnalazione del recettore dei

linfociti T (TCR). Diacilglicerolo cinasi alfa (DGKa) è un regolatore negativo dell'attivazione linfocitaria, che rimuove il diacilglicerolo, un mediatore lipidico dell'attivazione linfocitaria. Precedentemente avevamo dimostrato che DGKa è inibita in seguito a attivazione dei linfociti T mediante un meccanismo che coinvolge SAP (Baldanzi, 2011). Pertanto, in linfociti T privi di SAP, l'attività DGKa è sempre accesa, mantenendo inattivi i linfociti pur in presenza dell'antigene. In queste cellule, l'inibizione della funzione di DGKa ristabilisce RICD. Infine, in un modello murino della patologia, l'inibizione di DGKA riduce la condizione iper-infiammatoria che caratterizza la sindrome (Ruffo, 2016). Queste osservazioni sottolineano la rilevanza di DGKa come bersaglio terapeutico per ripristinare la sensibilità dei linfociti T privi di SAP alla attivazione da parte degli antigeni. Per sfruttare questa opportunità terapeutica, stiamo sviluppando nuovi specifici inibitori adatti per uso umano (Velnati et al., 2019)

Per comprendere i meccanismi molecolari mediante cui SAP regola DGKa e quindi l'attivazione linfocitaria, abbiamo sviluppato una strategia secondo due direzioni: i) verificare se anche alcune proteine associate in complesso con SAP contribuiscono a regolare la RICD, chiarendo quindi meglio il ruolo diretto di SAP; ii) sulla base del nostro lavoro precedente in cellule tumorali (Rainero et al. 2012), abbiamo inteso esplorare se SAP e DGKa regolano la presenza alla superficie della cellula di alcune proteine chiave nel regolare l'attivazione linfocitaria.

Complessivamente questi dati suggeriscono l'ipotesi che SAP, insieme a alcune proteine con cui interagisce, e DGKa regolano in modo reciproco il citoscheletro dei linfociti, contribuendo quindi a determinare la presenza alla superficie cellulare di proteine chiave per la sensibilità all'attivazione linfocitaria

BALDANZI, G. et al. SAP-mediated inhibition of diacylglycerol kinase α regulates TCR-induced diacylglycerol signaling. *J Immunol*, v. 187, n. 11, p. 5941-51, Dec 2011. ISSN 1550-6606.

RAINERO, E et al. Diacylglycerol kinase α controls RCP-dependent integrin trafficking to promote invasive migration. *J Cell Biol.* v. 196:277-95 Dec. 2012, doi: 10.1083/jcb.201109112

RUFFO, E. et al. Inhibition of diacylglycerol kinase α restores restimulation-induced cell death and reduces immunopathology in XLP-1. *Sci Transl Med*, v. 8, n. 321, p. 321ra7, Jan 2016. ISSN 1946-6242.

SNOW, A. L. et al. Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin Invest*, v. 119, n. 10, p. 2976-89, Oct 2009.

VELNATI, S. et al. Identification of a novel DGK α inhibitor for XLP-1 therapy by virtual screening. *Eur J Med Chem*, v. 164, p. 378-390, Feb 2019.

XLP-1 (Sindrome di Duncan)

Coordinator: Andrea Graziani

Partner: Gianluca Baldanzi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

Telethon Project (nr):

GGP16252

Disease Name:

XLP-1 (Duncan Syndrome)

Keywords:

T cell receptor, Lipid Signaling, Diacylglycerol