

The interactome of AXL receptor provides insights into its biological roles and intracellular trafficking

AXL is a receptor tyrosine kinase (RTK) which together with TYRO3 and MER constitutes the TAM receptor subfamily. TAMs participate in the regulation of the immune system, phagocytic clearance of apoptotic cells and tumorigenesis. AXL and its ligand GAS6 were shown to be overexpressed in many types of human cancers, which correlated with increased tumor progression, metastasis and acquired resistance to anti-cancer therapies. In addition, AXL acts as an important receptor for the cellular entry of viruses, including ZIKA and SARS-CoV-2. Therefore, AXL is a promising therapeutic target, both for cancer treatment and anti-viral therapy, and one of its inhibitors is currently being tested in clinical trials for the treatment of cancer and COVID-19.

Endocytosis facilitates uptake of fragments of the plasma membrane (PM) together with the extracellular content via endosomes. This process plays a crucial role in the regulation of RTK functions, since it may lead to degradation of RTKs in lysosomes or their recycling to the PM, which terminates or sustains RTK-mediated signaling, respectively.

Despite numerous studies reporting the involvement of AXL in carcinogenesis as well as virus infections, the molecular mechanisms underlying these processes have been poorly characterized and AXL-binding proteins remained practically unknown. Additionally, none of TAM receptors have been studied so far with respect to their endocytosis. Thus, the aim of this thesis was the identification of AXL-interacting partners and the characterization of AXL endocytosis.

To discover the interactome of AXL, the proximity-dependent biotin identification (BioID) was used. Its results showed that AXL interacted with proteins implicated in actin-related processes, axonogenesis, cell junction organization, signaling and endocytosis. The latter category indicated that intracellular trafficking is an important regulator of AXL function. Therefore, the mechanisms of AXL internalization have been examined in detail. It was demonstrated that, upon GAS6 stimulation, GAS6-AXL complexes were rapidly internalized into cells, and this uptake operated via multiple endocytic routes, both clathrin-mediated (CME) and clathrin-independent endocytosis (CIE). Interestingly, blocking a single endocytic route, except for clathrin-independent carriers/GPI-AP-enriched compartments (CLIC/GEEC) and ARF6-dependent endocytosis, was not sufficient to reduce endocytosis of GAS6-AXL complexes. In contrast, the inhibition of AXL kinase activity completely blocked internalization

of the ligated receptor. These findings offer a mechanistic explanation for previous studies showing that AXL inhibitor treatment decreases AXL-mediated viral infections. They further provide a rationale for using pharmacological inhibition of AXL in anti-viral therapies.

Subsequent analyses concerning the kinetics of AXL internalization revealed that this process operated faster than the uptake of other RTKs, such as EGFR and PDGFR β . Moreover, in contrast to ligated EGFR, endocytosis of AXL did not lead to receptor degradation but most probably to its recycling back to the PM. The latter was associated with the prolonged phosphorylation of AXL and the sustained activation of its downstream effector AKT, which may contribute to AXL-driven cancer cell migration and invasion. Finally, the presented results revealed that depletion of AXL was sufficient to block GAS6 internalization, which supports a notion previously reported by our laboratory that AXL is a primary receptor for GAS6.

Altogether, this study provides the first comprehensive analysis of the AXL interactome as well as a detailed characterization of endocytosis of AXL, the first TAM receptor studied in this respect. The results presented here shed light on the molecular mechanisms regulating AXL and AXL-mediated processes on the cellular level that significantly extends our current understanding of the role of AXL in cancer progression and viral entry.

Key words:

AXL, TAM receptors, GAS6, interactome, endocytosis

Interaktom receptora AXL w badaniu funkcji biologicznych oraz transportu wewnątrzkomórkowego tego receptora

AXL jest receptorową kinazą tyrozynową (RTK), która wraz z białkami TYRO3 i MER należy do rodziny TAM. Kinazy TAM uczestniczą w regulacji odpowiedzi układu odpornościowego, usuwaniu komórek apoptotycznych oraz biorą udział w nowotworzeniu. Badania wykazały, że kinaza AXL i jej ligand, białko GAS6, ulegają nadmiernej ekspresji w komórkach nowotworowych, co koreluje ze zwiększoną inwazyjnością, powstawaniem przerzutów oraz opornością nowotworów na terapię. Ponadto, AXL pośredniczy również w procesie wnikania wirusów do komórek, np. wirusa ZIKA oraz SARS-CoV-2. Dlatego też AXL stanowi potencjalny cel terapeutyczny, a jeden z inhibitorów jej aktywności kinazowej jest testowany w badaniach klinicznych pod kątem zastosowania w leczeniu nowotworów oraz COVID-19.

Endocytoza jest procesem, w którym fragmenty błony komórkowej wraz ze składnikami zewnątrzkomórkowymi są pobierane do komórek za pomocą endosomów. W przypadku RTK, proces ten pełni kluczową rolę w przekazywaniu sygnału, regulując degradację tych białek w lizosomach lub ich recykling do błony komórkowej.

Pomimo wielu doniesień naukowych wskazujących na ważną rolę AXL w powstawaniu nowotworów oraz wnikaniu wirusów do komórek, molekularne mechanizmy leżące u podstaw tych procesów ani białka oddziałujące z AXL nie były dobrze poznane. Co więcej, żadna kinaza z rodziny TAM nie była dotychczas badana pod kątem endocytozy. Dlatego też, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zidentyfikowanie białek oddziałujących z AXL oraz scharakteryzowanie mechanizmów endocytozy tej kinazy.

Wykorzystując metodę BioID (ang. proximity-dependent biotin identification) zidentyfikowano białka wchodzące w interakcje z AXL. Uzyskane wyniki wykazały, że AXL oddziałuje m. in. z białkami regulującymi cytoszkielet aktynowy, aksonogenezę, organizację połączeń międzykomórkowych i przekazywanie sygnału. Ponadto, zidentyfikowano wiele białek zaangażowanych w endocytozę, co wskazywało na kluczową rolę tego procesu w regulacji funkcji AXL. Dlatego też w kolejnych etapach projektu szczegółowo scharakteryzowano endocytozę AXL. Wykazano, że stymulacja komórek ligandem GAS6 powoduje szybkie pobieranie kompleksów GAS6-AXL do komórek, które zachodzi na drodze endocytozy zależnej oraz niezależnej od klatryny. Co więcej, pokazano, że spośród badanych ścieżek internalizacji, jedynie zablokowanie ścieżki CLIC/GEEC (ang. clathrin-independent

carriers/GPI-AP-enriched compartments) oraz ścieżki zależnej od białka ARF6 powodowało zmniejszenie pobierania kompleksów GAS6-AXL, a całkowite zahamowanie endocytozy GAS6-AXL zaobserwowano wyłącznie po zablokowaniu aktywności domeny kinazowej AXL. Wyniki te stanowią mechanistyczne wyjaśnienie wcześniejszych badań pokazujących, że stosowanie inhibitorów AXL hamuje wnikanie wirusów do komórek, co tym samym uzasadnia wykorzystanie tych inhibitorów w terapiach przeciwwirusowych.

W kolejnym etapie, analiza kinetyki endocytozy AXL wykazała, że w porównaniu do EGFR i PDGFR β internalizacja AXL zachodzi szybciej. Stwierdzono także, że w przeciwieństwie do EGFR, pobieranie AXL nie prowadzi do degradacji tej kinazy, a najprawdopodobniej do jej recyklingu do błony komórkowej, co koreluje z długotrwałą fosforylacją i aktywacją AXL oraz białka AKT. Ta przedłużona aktywacja sygnalizacji może odgrywać rolę w zależnej od AXL migracji oraz inwazji komórek nowotworowych. Dodatkowo, przedstawione wyniki potwierdziły wcześniejsze obserwacje wskazujące, że GAS6 aktywuje przede wszystkim receptor AXL, a nie inne kinazy TAM.

Podsumowując, w niniejszej pracy przeprowadzono pierwszą kompleksową analizę białek oddziałujących z AXL oraz przedstawiono charakterystykę endocytozy AXL jako pierwszej kinazy z rodziny TAM badanej pod tym kątem. Zaprezentowane wyniki poszerzają wiedzę na temat molekularnych mechanizmów regulujących AXL i procesów regulowanych przez tę kinazę na poziomie komórkowym oraz przyczyniają się do lepszego zrozumienia roli AXL w progresji chorób nowotworowych i we wnikaniu wirusów do komórek.

Słowa kluczowe:

AXL, receptory TAM, GAS6, interaktom, endocytoza