

Rola białek ESCRT-I w regulacji funkcji lizosomów oraz sygnalizacji związanej z lizosomami

Słowa kluczowe (max 6): ESCRT, lizosomy, TFEB, TFE3, mTORC1

Endocytoza to proces pobierania cząsteczek ze środowiska zewnątrzkomórkowego lub powierzchni komórki i dostarczania ich do organelli zwanych endosomami, które pośredniczą w transporcie ładunku wewnątrz komórki. Białka obecne na błonach endosomalnych są rozpoznawane przez endosomalne kompleksy sortujące ESCRT (ang. endosomal sorting complexes required for transport), tworzone przez kompleksy ESCRT-0, -I, -II i -III. Umożliwiają one deformację zewnętrznej błony endosomalnej prowadząc do utworzenia pęcherzyków wewnętrznych w świetle endosomów, tzw. ILVs (ang. intraluminal vesicles). Zawartość ILVs może być wydzielana na zewnątrz komórki lub transportowana szlakiem endolizosomalnym do lizosomów. Dzięki aktywności hydrolaz, lizosomy dostarczają komórce składników odżywczych pochodzących z degradacji makrocząsteczek. Dodatkowo lizosomy regulują sygnalizację zależną od Ca^{2+} , a także stanowią platformę umożliwiającą wykrywanie dostępności składników odżywczych.

Mimo dobrze scharakteryzowanej roli ESCRT-I w funkcjonowaniu endosomów, udział tego kompleksu w utrzymaniu homeostazy lizosomów pozostaje słabo zbadany. Celem rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie roli ESCRT-I w utrzymaniu homeostazy lizosomów, a także zbadanie konsekwencji braku ESCRT-I dla prawidłowego funkcjonowania lizosomów i sygnalizacji związanej z lizosomami.

Realizując wyznaczony cel, w pierwszej kolejności scharakteryzowano morfologię lizosomów po usunięciu białek kompleksu ESCRT-I (Tsg101 i Vps28) za pośrednictwem siRNA (ang. small interfering RNA) w modelowych liniach komórkowych raka jelita grubego RKO i DLD-1. Analiza mikroskopowa znaczników lizosomalnych wykazała, że brak ESCRT-I prowadził do powstawania powiększonych lizosomów, ale nie zaburzał ich integralności, utrzymania niskiego pH i zawartości hydrolaz. Powiększenie lizosomów po usunięciu ESCRT-I mogło być spowodowane zaburzoną degradacją białek błonowych obecnych na lizosomach, m. in. kanału wapniowego MCOLN1, którego degradacja została zbadana przy użyciu linii reporterowej RKO-GFP-MCOLN1.

W celu weryfikacji czy brak podjednostek ESCRT-I prowadzi do aktywacji odpowiedzi transkrypcyjnej charakterystycznej dla zaburzonej funkcji lizosomów, przeprowadzono analizę sekwencjonowania RNA. Wykazano, że brak ESCRT-I indukował ekspresję genów związanych z autofagią i/lub biogenezą lizosomów. Analiza frakcji jądrowych komórek

pozbawionych ESCRT-I potwierdziła aktywację czynników transkrypcyjnych z rodziny MiT-TFE, takich jak TFEB i TFE3, potencjalnie zaangażowanych w indukcję ekspresji tych genów.

Następnie zbadano mechanizm związany z aktywacją czynników MiT-TFE po usunięciu ESCRT-I. Analiza mikroskopowa wykazała, że w komórkach pozbawionych ESCRT-I aktywacja czynników TFEB i TFE3 wymagała sygnalizacji zależnej od Ca^{2+} i hamowania aktywności kinazy mTORC1, ale nie była spowodowana ich defosforylacją zależną od kalcyneuryny. Dodatkowo, analiza biochemiczna pokazała, że brak ESCRT-I hamował aktywność mTORC1 specyficzną względem TFEB i TFE3, lecz nie wpływał na kanoniczne substraty mTORC1. Dlatego sprawdzono czy aktywacja MiT-TFE po usunięciu ESCRT-I nastąpiła z powodu zmniejszonej aktywności kompleksu GTPazy Rag, o którym wiadomo, że kontroluje aktywność mTORC1 specyficzną dla TFEB i TFE3. Nadekspresja stale aktywowanego mutantu RagC zapobiegła translokacji TFEB i TFE3 do jądra komórkowego w komórkach pozbawionych ESCRT-I, wskazując iż aktywacja czynników MiT-TFE zachodziła w wyniku hamowania szlaku mTORC1 zależnego od GTPazy Rag.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie opisują nowe funkcje kompleksu ESCRT-I w degradacji lizosomalnych białek błonowych i utrzymaniu niekanonicznej sygnalizacji mTORC1. Brak ESCRT-I prowadzi do odpowiedzi homeostatycznej, polegającej na hamowaniu niekanonicznej sygnalizacji mTORC1, a w konsekwencji aktywację czynników TFEB i TFE3, by przeciwdziałać niedoborom składników odżywczych pochodzących z degradacji lizosomalnej.

The role of ESCRT-I proteins in the regulation of lysosomal function and lysosome-related signaling

Key words (max 6): ESCRT, lysosome, TFEB, TFE3, mTORC1

Endocytosis is a process of internalizing molecules from the extracellular milieu or the cell surface and delivering them to membrane-bound organelles called endosomes, which facilitate further transport of internalized cargoes. Proteins present on endosomal membranes are recognized by the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT), which consist of ESCRT-0, -I, -II and -III. ESCRT mediate remodeling of the limiting membrane of endosomes and formation of intraluminal vesicles (ILVs) inside endosomes. The content of ILVs can be secreted outside the cell or transported via the endolysosomal pathway to lysosomes for degradation. In addition, lysosomes regulate Ca^{2+} -dependent signaling and constitute platforms to sense nutrient availability.

Despite a well-characterized function of ESCRT-I in regulating endosomal size and sorting, its involvement in maintaining lysosomal homeostasis remains poorly investigated. The general aim of this thesis was to characterize the role of ESCRT-I in maintaining lysosomal homeostasis and investigate the consequences of ESCRT-I depletion for lysosomal function and lysosome-related signaling.

First, lysosomal morphology was characterized in colorectal cancer cell lines, RKO and DLD-1, upon siRNA-mediated depletion of ESCRT-I components, namely Tsg101 or Vps28. Quantitative microscopic analysis of lysosomal markers revealed that lack of ESCRT-I led to enlargement of lysosomes but did not impair lysosomal integrity, maintenance of acidic pH or content of degradative enzymes. The increased lysosomal size was likely due to an impaired degradation of resident membrane proteins that was observed in cells lacking ESCRT-I. This included MCOLN1, a lysosomal Ca^{2+} channel, whose lysosomal degradation was studied using a GFP-MCOLN1-expressing reporter cell line.

To verify whether the lack of ESCRT-I induced transcriptional responses characteristic for altered lysosomal function, RNA sequencing analysis was performed. It revealed that depletion of ESCRT-I upregulated expression of genes related to autophagy and/or lysosomal biogenesis. Activation of transcription factors from the MiT-TFE family, namely TFEB and TFE3, predicted to be responsible for induced expression of these genes, was confirmed in nuclear fractions of ESCRT-I-depleted cells.

Next, a mechanism involved in the activation of MiT-TFE signaling upon ESCRT-I depletion was investigated. Quantitative analysis of microscopic images revealed that in cells

lacking ESCRT-I, activation of TFEB and TFE3 required Ca^{2+} -dependent signaling and mTORC1 inhibition, but was not due to calcineurin-dependent dephosphorylation of these transcription factors. Moreover, biochemical analyses indicated that the lack of ESCRT-I inhibited mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase activity specific towards TFEB and TFE3 but it did not affect canonical mTORC1 substrates. Therefore, it was verified whether the MiT-TFE activation upon ESCRT-I depletion occurred due to the reduced activity of the Rag GTPase complex, known to control the TFEB- and TFE3-specific lysosomal mTORC1 signaling. Overexpression of constitutive active RagC mutant prevented nuclear translocation of TFEB and TFE3 in Tsg101-depleted cells. Hence, the activation of MiT-TFE factors in cells lacking ESCRT-I occurred due to the inhibition of Rag GTPase-dependent mTORC1 pathway.

The results presented in this thesis characterize new roles of ESCRT-I in the turnover of lysosomal membrane proteins and maintaining lysosome-related Rag GTPase-dependent, non-canonical mTORC1 signaling. Lack of ESCRT-I leads to a homeostatic response, involving inhibition of the non-canonical mTORC1 signaling and, as a consequence, activation TFEB and TFE3 factors, in an attempt to counteract lysosomal nutrient starvation.