

# FoxO signaling in growth regulation of Tsc1-deficient cells

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Gupta, Avantika

**Publication date:**

2019

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000389362>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 26407

# **FoxO signaling in growth regulation of Tsc1- deficient cells**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**AVANTIKA GUPTA**

M.Sc. (Hons.), Birla Institute of Technology & Science Pilani

born on 08.03.1991

citizen of India

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ernst Hafen

Dr. Hugo Stocker

Prof. Dr. Gerald Schwank

Prof. Dr. Iswar Hariharan

Prof. Dr. Aurelio Teleman

2019

# 1. ABSTRACT

Cancer cells have an extraordinary ability to adapt to intracellular insults, environmental stresses or the selective pressure applied by therapy. Such adaptations can be manifested via metabolic changes, epigenetic reprogramming or remodeling of the tumor microenvironment, and can aid in tumor growth and progression on the one hand, while also conferring vulnerabilities to cancer cells distinct from normal cells. These dependencies are appealing targets and have been exploited in various treatment strategies against cancer. However, such therapies have not always been successful due to the inherent resistance or relapse of tumors, highlighting the importance of understanding the signaling landscape of individual tumor types.

Dietary restriction is endorsed as an effective means to suppress tumor growth and improve the efficacy of cancer therapies. However, not all tumors are sensitive to dietary restriction, as has been shown for tumors with high PI3K activation. The mechanism of this resistance has been further explored in a model of early tumorigenesis in *Drosophila*, where cells mutant for the tumor suppressor *Pten* are resistant to nutrient restriction (NR) and exhibit a growth advantage as compared to the surrounding wild-type cells. Here, we report that cells lacking *Tsc1*, a component of the tuberous sclerosis complex, are also resistant to NR, but the tissue overgrowth is a consequence of enlarged cell size as opposed to the increased cell division rate of *Pten* mutant cells. Differential activation of the transcription factor FoxO is essential in limiting the proliferation of *Tsc1* mutant cells under NR, in the presence of either wild-type or overproliferating *Pten* mutant cells. Additionally, FoxO also inhibits precocious differentiation in cells with high mTORC1 activity under NR.

The main goal of the present thesis was to identify the FoxO target genes responsible for the proliferation brake in *Tsc1* mutant cells upon NR. Transcriptomic and genetic analyses identified a role of the endoplasmic reticulum (ER) stress response pathways in regulating the growth of *Tsc1* mutant cells downstream of FoxO. Similar to the loss of FoxO function, induction of ER stress enhanced the overgrowth of *Tsc1* mutant tissues. Significant efforts have been made to target the dependence of diverse cancers on ER stress upregulation. Our results suggest such strategies as promising

treatment options for tumors with elevated mTORC1 activity and a suppression of FoxO.

In addition to the intrinsic and extrinsic factors, intracellular pH (pHi) is a critical feature that is deregulated in cancer cells. Studies on pH dynamics have been limited in *Drosophila* because of unavailability of efficient tools for pH measurement. Here, we describe the generation of a ubiquitously expressed, genetically encoded pH indicator, tpHusion, which can be used to robustly monitor changes in pHi in different tissues during development or in disease states. We also report the combination of tpHusion with genetic manipulations to analyze the effect of clonal loss of tumor suppressors on pHi. These results demonstrate that tpHusion is a powerful tool to study pHi in *Drosophila*.

## 2. ZUSAMMENFASSUNG

Krebszellen sind in der Lage, sich an intrazelluläre und extrazelluläre Stressfaktoren oder an den durch eine Therapie ausgeübten selektiven Druck anzupassen. Solche Anpassungen können sich durch Stoffwechseleränderungen, epigenetische Umprogrammierung oder Umgestaltung der Tumor-Mikroumgebung manifestieren. Sie können einerseits Tumorstadium und -progression unterstützen; andererseits bewirken sie in Krebszellen auch Schwachstellen, welche als attraktive Angriffspunkte dienen und in verschiedenen Behandlungsstrategien gegen Krebs ausgenutzt werden. Solche Therapien waren jedoch häufig aufgrund von inhärenter Resistenz oder des Rückfalls von Tumoren nicht erfolgreich, was die Wichtigkeit unterstreicht, die Signallandschaft einzelner Tumortypen besser zu verstehen.

Ernährungseinschränkungen werden als wirksames Mittel zur Unterdrückung des Tumorstadiums und zur Verbesserung der Wirksamkeit von Krebstherapien empfohlen. Allerdings reagieren nicht alle Tumoren auf diätetische Einschränkungen, wie für Tumoren mit hoher PI3K-Aktivierung gezeigt wurde. Der Mechanismus dieser Resistenz wurde in einem Modell der frühen Tumorentstehung in *Drosophila* weiter untersucht, in welchem Zellen, die für den Tumorsuppressor *Pten* mutiert sind, gegen Nährstoffrestriktion (NR) resistent sind und einen Wachstumsvorteil im Vergleich zu den umgebenden Wildtypzellen aufweisen. Hier berichten wir, dass Zellen, denen der Tumorsuppressor *Tsc1* (eine Komponente des *Tuberous Sclerosis Complex*) fehlt, auch gegen NR resistent sind. Das Überwachsen des Gewebes ist aber eine Folge vergrößerter Zellen, im Gegensatz zur erhöhten Zellteilungsrate von *Pten*-mutanten Zellen. Eine differentielle Aktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO ist wesentlich für die Begrenzung der Proliferation von *Tsc1*-mutanten Zellen unter NR in Gegenwart von entweder Wildtyp- oder überproliferierenden *Pten*-mutanten Zellen. Zusätzlich inhibiert FoxO auch die frühzeitige Differenzierung in Zellen mit hoher mTORC1-Aktivität unter NR.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Zielgene von FoxO zu identifizieren, welche für die Proliferationsbremse verantwortlich sind. Transkriptomische und genetische Analysen deckten eine Rolle der Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums (ER) bei der Regulierung des Wachstums von *Tsc1*-mutanten Zellen

unterhalb von FoxO auf. Ähnlich wie der Verlust der FoxO-Funktion verstärkte die Induktion von ER-Stress das Überwachsen von *Tsc1*-mutierten Geweben. Es wurden bereits erhebliche Anstrengungen unternommen, um die Abhängigkeit verschiedener Krebsarten von der Hochregulierung des ER-Stresses als Angriffspunkt zu nutzen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass solche Behandlungsoptionen für Tumoren mit erhöhter mTORC1-Aktivität und einer Unterdrückung von FoxO vielversprechend sind.

Zusätzlich zu den intrinsischen und extrinsischen Faktoren ist der deregulierte intrazelluläre pH-Wert (pHi) ein kritisches Merkmal von Krebszellen. Studien zur pH-Dynamik waren bisher in *Drosophila* nur begrenzt möglich, da keine effizienten Instrumente zur pH-Messung *in vivo* zur Verfügung standen. Hier beschreiben wir die Herstellung eines ubiquitär exprimierten, genetisch kodierten pH-Indikators, tpHusion, der eingesetzt werden kann, um Änderungen des pHi in verschiedenen Geweben während der Entwicklung oder in Krankheitsmodellen zuverlässig zu messen. Die Kombination von tpHusion mit genetischen Manipulationen erlaubt es, die Wirkung des klonalen Verlusts von Tumorsuppressoren auf den pHi zu analysieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass tpHusion ein geeignetes Instrument zur Untersuchung des pHi in *Drosophila* darstellt.