

DISS. ETH NO. 27851

Cytosolic pH regulates cell proliferation and reversible protein aggregation

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

presented by

Lisa Maria Koch

MSc. Molecular Biology, University of Vienna

born on 15.10.1993

citizen of Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Matthias Peter (examiner)

PD. Dr. Reinhard Dechant (co-examiner)

Prof. Markus Stoffel (co-examiner)

2021

Summary

A large number of intracellular processes and protein assemblies are sensitive to changes in cytosolic pH (pH_c). An inherent pH buffering capacity protects mammalian cells from minor pH-fluctuations, but fails to counteract sustained oscillations. Indeed, the negative membrane potential and catabolic metabolism promote acidification of the cytosol and thus, mammalian cells have evolved means to provide stringent maintenance of pH-homeostasis that involve active extrusion of protons or proton equivalents from the cytoplasm.

The plasma membrane-localized sodium-hydrogen-exchanger isoform 1 (Na⁺/H⁺-exchanger 1, NHE1) represents a crucial regulator of pH-homeostasis in a wide range of cell types. Overexpression or hyper-activation of NHE1 promote an increase of pH_c which has been identified a key hallmark of cancer cells. Although, emerging evidence implicates cytosolic pH as a conserved signal promoting cell growth and proliferation, the underlying molecular mechanism have remained largely unknown.

In this study we demonstrate that elevated pH_c mediated by NHE1 impinges on a transcriptional program that regulates cell cycle progression in early G₁. pH_c-increase in response to growth factor and nutrient availability promotes the expression of the cell cycle regulator cyclin D1. We identified that pH_c-dependent cyclin D1 transcription requires the presence of the transcription factors CREB1/ATF1 and ETS1 as well as the transcriptional co-activators p300/CBP possessing histone acetyltransferase activity. Cellular and biochemical characterization revealed that CREB1 and p300/CBP bind in a pH-dependent manner. The CREB1-p300/CBP interaction acts as a pH-sensor and coincidence detector by integrating mitogenic cues and signals from nutrient metabolism to coordinate cyclin D1 transcription. Thus, our data provides a mechanistic link between elevated pH and cell proliferation.

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive type of lung cancer characterized by high expression of cyclin D1. Immunohistochemical analysis of MPM biopsies and mRNA-expression analysis of MPM cell lines revealed a high correlation between cyclin D1 and NHE1 expression. Consequently, pharmacological reduction of pH_c decreased cyclin D1 expression and proliferation in human MPM cell lines by preventing CREB1-p300/CBP interaction. In support of this we hypothesized that altered pH_c could provide an attractive target for anti-cancer therapies. Utilizing an isogenic MPM mouse model we tested whether administration of the FDA-approved NHE-inhibitor amiloride could exert anti-tumor effects. While amiloride treatment at a high dose conferred only a minor reduction in tumor growth, it jeopardized the animals' health, suggesting that further therapeutic developments impinging on pH regulation are required.

In summary, our results provide decisive evidence that elevated pH_c is a critical regulator of cell cycle progression in early G₁ by promoting expression of cyclin D1. These mechanistic insights could have important implications in the development of novel anti-cancer therapies. While changes in pH-homeostasis can induce proliferation signals, it has another critical role to maintain the function and structure of proteins. Thus, dysregulation of pH leads to protein misfolding and may eventually result in the formation of protein aggregates or amyloid fibrils, which are often associated with neurodegenerative pathologies. While these protein aggregates remain in an irreversible state, emerging evidence implicates reversible aggregation as functional feature of some proteins. Yet, the underlying molecular principles of amyloid reversibility remain poorly understood.

Recent work from our group demonstrated that reversible aggregation of the yeast pyruvate kinase Cdc19 depends on its pH-sensitive core that resides within a low complexity region (LCR) and harbors glutamate residues that confer pH-sensing capacity. In this study we demonstrate that pH-dependent amyloid reversibility presents a critical mechanism that is conserved from yeast to human cells. We elucidated that the mammalian homolog of Cdc19, pyruvate kinase M2 (PKM2), is pH-dependent reversible amyloid. While glutamate residues function as pH-sensors in the amyloid core of Cdc19, PKM2 confers amyloid reversibility by a histidine residue which senses pH changes in a narrow physiological range.

Given the importance of PKM2 in the regulation of cellular metabolism in proliferating cells by catalyzing the final step of glycolysis, we investigated the functional relevance of amyloid PKM2 reversibility in different cellular contexts ranging from cancer cells to pancreatic β -cells. We hypothesise that highly glycolytic melanoma cells induce PKM2 aggregation as a protective mechanism from therapy-induced stress, while reversible aggregation in β -cells could be associated with insulin secretion. In both cases further investigations will be required to provide additional proof of our hypotheses. Thus, a number of recombinant cell lines were generated to provide a profound basis for future experimental approaches.

Zusammenfassung

Zahlreiche intrazelluläre Prozesse reagieren empfindlich auf Veränderungen des zytosolischen pH-Werts (pH_z). Eine inhärente pH-Pufferkapazität schützt Säugetierzellen vor geringfügigen pH-Schwankungen, jedoch kann diese anhaltenden Schwankungen nicht entgegenwirken. Da das negative Membranpotenzial und der katabole Stoffwechsel eine die Ansäuerung des Zytosols mitsichbringen, haben Säugertierzellen Mechanismen entwickelt, die das Aufrechterhalten der pH-Homöostase gewährleistet. Dies wird durch eine aktive Extrusion von Protonen oder Protonenäquivalenten aus dem Zytoplasma bewerkstelligt.

Der Natrium-Wasserstoff-Austauscher 1 (Na⁺/H⁺-Austauscher 1, NHE1), welcher in der Plasmamembran lokalisiert ist, stellt einen wichtigen Regulator der pH-Homöostase in einer Vielzahl von Zelltypen dar. Eine Überexpression oder Hyperaktivierung von NHE1 führt zu einem Anstieg des pH-Wertes, der als ein wesentliches Merkmal von Krebszellen anerkannt worden ist. Obwohl immer mehr Studien belegen, dass der zytosolische pH-Wert ein konserviertes Signal darstellt, welches das Zellwachstum und die Zellproliferation fördert, sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch weitgehend unbekannt.

In dieser Studie zeigen wir, dass NHE1 zur Erhöhung des zytologischen pH-Werts führt, was als Folge die Transkription von Genen bewirkt, welche für die Regulation der Zellzyklusprogression in der frühen G₁-Phase verantwortlich sind. Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen führt zum Anstieg des zytosolischen pH-Werts, was die Expression des Zellzyklusregulators Cyclin D1 forciert. Wir haben festgestellt, dass die pH-abhängige Cyclin D1-Transkription die Transkriptionsfaktoren CREB1/ATF1 und ETS1 sowie der transkriptionellen Co-Aktivatoren p300/CBP erfordert. Eine genaue Charakterisierung mittels zellulärer und biochemischer Methoden ergab, dass CREB1 und p300/CBP in einer pH-abhängig Weise interagieren. Die Interaktion zwischen CREB1 und p300/CBP fungiert als pH-Sensor, der eingehende Signale aus dem Nährstoffmetabolismus integriert, um die Transkription von Cyclin D1 zu koordinieren. Unsere Daten zeigen eine mechanistische Verbindung zwischen erhöhtem pH-Wert und Zellproliferation.

Das maligne pleurale Mesotheliom (MPM) ist eine aggressive Form von Lungenkrebs, welche oft eine hohe Expression von Cyclin D1 aufweist. Immunhistologische Analysen von MPM-Biopsien und mRNA-Expressionsanalysen von MPM-Zelllinien zeigten eine hohe Korrelation zwischen der Expression von Cyclin D1 und NHE1. Reduktion des zytosolischen pH-Wert mittels eines NHE-Inhibitors, verringerte die Expression von Cyclin D1 und das Wachstum von humanen MPM-Zelllinien, da eine Interaktion von CREB1-p300/CBP verhindert wird. Da die De-regulation des zytosolischen pH-Werts als Merkmal vieler Krebsarten gilt, könnte dies ein guter Angriffspunkt für die Entwicklung von neuen Krebsmedikamenten sein.

Anhand eines isogenen MPM-Mausmodells testeten wir, ob die Verabreichung des von der FDA zugelassenen NHE-Inhibitors Amilorid eine Anti-Tumor-Wirkung haben könnte. Die Behandlung mit Amilorid in einer hohen Dosis führte zwar nur zu einer kleinen Verringerung des Tumorwachstums, gefährdete aber wesentlich die Gesundheit der Tiere. Aus diesem Grund glauben wir, dass weitere therapeutische Entwicklungen, die die pH-Regulierung beeinflussen, erforderlich sind.

Unsere Ergebnisse liefern einen entscheidenden Beweis dafür, dass ein erhöhter pH-Wert ein wichtiger Regulator der Zellzyklusprogression in der frühen G₁-Phase ist, indem er die Expression von Cyclin D1 steuert. Diese mechanistischen Erkenntnisse könnten eine wichtige Rolle für die Entwicklung neuer Krebstherapien haben.

Interessanterweise können Fluktuationen des pH-Werts nicht nur Proliferationssignale auslösen, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Funktion und Struktur von Proteinen spielen. So führt eine Dysregulation des pH-Werts zu einer Fehlfaltung von Proteinen und kann schließlich zur Bildung von Proteinaggregaten oder Amyloidfibrillen führen, die häufig mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Während diese Proteinaggregate in einem irreversiblen Zustand verbleiben, gibt es Hinweise darauf, dass die reversible Aggregation ein funktionelles Merkmal einiger Proteine ist. Die zugrundeliegenden molekularen Prinzipien der Reversibilität von Amyloiden sind jedoch nach wie vor nur unzureichend bekannt.

Jüngste Ergebnisse unserer Forschungsgruppe haben gezeigt, dass die reversible Aggregation der Hefe-Pyruvatkinase Cdc19 von ihrem pH-sensitiven Kern abhängt, der sich in einer Region mit geringer Komplexität (low complexity region, LCR) befindet. In dieser Aminosäuresequenz sind zwei Glutamate enthalten, die die Fähigkeit zur pH-Sensitivität verleihen. In dieser Studie zeigen wir, dass die pH-abhängige Reversibilität von Amyloid einen kritischen Mechanismus darstellt, der hoch konserviert ist. Wir haben herausgefunden, dass das Säugetier-Homolog von Cdc19, die Pyruvatkinase M2 (PKM2), ein pH-abhängig reversibles Amyloid ist. Während Glutamatreste als pH-Sensoren im amyloiden Kern von Cdc19 fungieren, ist ein Histidin in der LCR von PKM2 für seine amyloide Reversibilität verantwortlich.

Angesichts der Tatsache, dass PKM2 eine bedeutende Rolle bei der Regulation des zellulären Stoffwechsels in proliferierende Zellen einnimmt, haben wir die funktionelle Bedeutung der amyloiden Reversibilität in verschiedenen zellulären Kontexten untersucht, die von Krebszellen bis zu β -Zellen der Bauchspeicheldrüse reichen. Wir stellen die Hypothese auf, dass hochglykolytische Melanomzellen die PKM2-Aggregation als Schutzmechanismus vor therapieinduziertem Stress induzieren, während die reversible Aggregation in β -Zellen mit der Insulinsekretion zusammenhängen könnte. In beiden Fällen sind weitere experimentelle

Untersuchungen erforderlich, um unsere Hypothesen zu untermauern. Eine Reihe von rekombinanten Zelllinien wurden generiert, um eine fundierte Basis für zukünftige experimentelle Ansätze zu schaffen.