



ACADEMIA ROMÂNĂ

Școala de Studii Avansate a Academiei Române

Institutul de Biochimie

TEZĂ DE DOCTORAT

**-ROLUL PROTEINEI NPC1 ÎN BIOGENEZA ORGANITELOR
ENDOZOMALE-**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

DR. ȘTEFANA MARIA PETRESCU

DOCTORAND:

ALINA-ADRIANA RUS

2023

Cuprins

1. Scopul studiilor	3
2. Introducere	4
3. Rezultate	8
4. Concluzii	21

1. Scopul studiilor

Biogeneza organitelor endozomale și a organitelor înrudite cu endozomii este un proces activ cu diferite etape și multiple căi de maturare. Atât melanozomii, cât și endozomii provin dintr-un organit comun, endozomii timpurii, care prezintă diferite căi de maturare în funcție de organitele țintă. În acest proces de maturare al sistemului endo-lizozomal intervine și proteina Niemann-Pick C1 (NPC1). Această glicoproteină este un transportor de colesterol și lipide de la nivelul sistemului endo-lizozomal, care influențează biogeneza, dar și activitatea sistemului endo-lizozomal.

Principalul scop al acestei teze de doctorat a fost reprezentat de investigarea amănunțită a rolului proteinei NPC1 în biogeneza sistemului endo-lizozomal, în special în dezvoltarea organitelor înrudite cu lizozomii. Modelul de studiu ales au fost melanozomii în cadrul cărora am cercetat procesul de melanogeneză și de biogeneză.

Procesul de sinteză al melaninei prezintă un interes crescut deoarece melanina este implicată atât în anumite boli de hipo- sau hiperpigmentare, dar și în cancerul de piele. Așadar, este esențial să se identifice proteinele care prezintă un rol major și care influențează acest proces.

Implicațiile proteinei NPC1 în melanogeneză au fost studiate pe o linie pigmentată de melanom uman, MNT-1. Această linie a fost modificată genetic prin deletarea genei care codifică proteina NPC1, urmărindu-se modificările care apar la nivel celular și care influențează biogeneza melanozomilor. S-a investigat rolul proteinei NPC1, o proteină lizozomală, în biogeneza melanozomilor, organite subcelulare înrudite cu lizozomii la nivel structural și proteomic, dar cu funcții complet diferite de ale lizozomilor.

Această teză oferă o perspectivă nouă în înțelegerea biogenezei organitelor endo-lizozomale și transportului proteinelor țintă către aceste organite.

2. Introducere

Proteina NPC1, fiind descrisă în studiile timpurii ca un transportor de colesterol la nivelul lizozomului, a continuat să fie ținta cercetărilor care au dus la descoperirea mai multor funcții ale acesteia și la caracterizarea bolii Niemann-Pick tipul C1 (Pfeffer 2019). Proteina NPC1 nu este un simplu transportor la nivelul lizozomului, ci joacă un rol esențial în metabolismul lipidelor în sistemului endo-lizozomal. Împreună cu proteina NPC2 contribuie la efluxul colesterolului din lizozom, fiind implicată și în formarea de situsuri de contact multiple între ER și lizozomi (Schultz et al. 2018). Mutațiile de la nivelul genei care codifică proteina NPC1 conduc la boala Niemann-Pick tipul C1, o boală de stocare lizozomală care se caracterizează prin hepatosplenomegalie și neurodegenerescență (Wheeler and Sillence 2020). La nivel celular se acumulează colesterol și glicosfingolipide în sistemul endo-lizozomal, homeostazia metalelor, în special a calciului este perturbată, iar autofagia și traficul intracelular sunt afectate. Mai mult, unele studii au demonstrat influența și rolul proteinei NPC1 în biogeneza organitelor înrudite cu lizozomii (LRO) din celulele specializate. Astfel, a fost demonstrat că în absența proteinei NPC1 biogeneza granulelor alfa și a granulelor dense din plachetele sangvine este afectată (Platt et al. 2016).

Având în vedere aceste descoperiri, ipoteza noastră a fost îndreptată spre altă categorie de LRO, care este necesară procesului de pigmentație care are loc în melanocite. Așadar, influența proteinei NPC1 asupra biogenezei melanozomilor a reprezentat ținta cercetărilor de față. Biogeneza melanozomilor presupune un proces complex la care participă proteine cu rol specific în melanogeneză precum proteina structurală premelanozomală (PMEL17) sau enzime care intervin în calea de biosinteză a melaninei: tirozinaza (TYR), proteina înrudită cu TYR-1 (TYRP-1) și dopa-chrom tautomneraza (DCT) (Seiji, Fitzpatrick, and Birbeck 1961).

Au fost descrise și caracterizate patru stadii de maturare a melanozomilor în funcție de morfologia acestora și de gradul de pigmentație (Raposo and Marks 2007). Melanozomii de stadiul I, denumiți și premelanozomi, provin din endozomii timpurii și corespund unor corpi multiveziculari (MVB)/ vezicule multi-endozomale (MVE), care conțin și câteva vezicule intraluminale (ILV). Acești premelanozomi sunt organite rotunde, acoperite cu clatrină. Evoluția melanozomilor din stadiul I în stadiul II presupune formarea fibrilelor, care sunt aranjate paralel

și conferă melanozomilor formă elipsoidală. Melanozomii din primele două stadii sunt imaturi și sunt privați de pigmentație. Livrarea enzimelor melanogenice, TYR, TYRP-1 și TYRP-2, la melanozomi facilitează inițierea procesului de biosinteză a melaninei (D'Alba and Shawkey 2019). Așadar, melanozomii în care este depusă melanina pe fibrile și în care se mai observă aceste fibrile sunt clasificați în stadiul III, iar melanozomii în care fibrele au fost acoperite în totalitate de melanină fac parte din stadiul IV. Melanozomii din stadiul IV sunt apoi transferați cheratinocitelor pentru a-și îndeplini funcțiile specifice protective.

În procesul de biogeneza a melanozomilor participă proteine cu rol enzimatic, structural sau de transport. Dintre acestea, PMEL17 este cea mai importantă proteină structurală, care intervine în formarea fibrilelor din melanozomi, fibrile necesare pentru depunerea melaninei, iar TYR, TYRP-1 și TYRP2 se numără printre cele mai importante proteine enzimatice. De asemenea, un rol important în procesul de melanogeneză le este atribuit și proteinelor implicate în traficul proteinelor melanogenice, de exemplu proteina AP-3 și proteina AP-1 (Theos et al. 2005).

Proteina PMEL17 este implicată direct în formarea melanozomilor, deoarece participă activ în formarea matrixului fibrilar amiloid, necesar pentru procesul de melanogeneză, pentru organizarea arhitecturii veziculelor de melanină și pentru protejarea melaninei împotriva degradării (Watt et al. 2013). Pentru generarea fibrilelor necesare formării melanozomilor, proteina PMEL17 este supusă unor procesări post-tranlaționare și unor clivări la nivelul premelanozomilor/MVB (Hee et al. 2017). Astfel, după inserția proteinei în RE (forma P1), acesta este transportată în aparatul Golgi în veziculele COPII, care recunosc rezidul de valină din capătul C-terminal. În acest compartiment N-glicanii sunt maturați, iar O-glicanii sunt adăugați, formându-se forma P2 a proteinei, care prezintă o masă moleculară cu 20 kDa mai mare decât forma P1 (Bissig, Rochin, and Van Niel 2016). Forma P2 este procesată de o convertază și se formează un fragment $M\alpha$ fibrilogen luminal mare (compus din NTR, PKD și RPT), care rămâne printr-o punte di-sulfidică legat de fragmentul $M\beta$ (compus din KLD, domeniul transmembranar și citoplasmatic). În forma $M\alpha$ S-S $M\beta$, PMEL17 ajunge în melanozomii timpurii (stadiul I) și este transferată printr-un proces dependent de proteina CD63 în ILV. În continuare, PMEL17 este procesată de diferite proteaze, printre care BACE-2 și ADAM17, rezultând o formă solubilă luminală - $M\alpha$. Această formă este clivată în două fragmente $M\alpha$ N și $M\alpha$ C, din care se formează

domeniile NTR și PKD, respectiv RPT. Principalele domenii care contribuie la formarea fibrilelor sunt PKD și RPT, dar domeniul NTR are rol major în reglarea asamblării fibrilelor melanozomale. Fiind o proteină care prezintă multiple forme, au fost dezvoltati diverși anticorpi care recunosc forme specifice ale proteinei PMEL17. Principalii anticorpi utilizați în studiul de față sunt:

- α PEP-13, care recunoaște formele imature, neclivate P1 și P2.
- α HMB-45, care recunoaște domeniul insolubil RPT, care intervine în formarea fibrilelor (Watt et al. 2013).

Așadar, putem concluziona că proteina PMEL17 joacă un rol esențial în biogeneza melanozomilor, fiind implicată direct în formarea fibrilelor pe care se depune melanina, iar procesarea acesteia este indispensabilă funcționalității melanozomilor.

În procesul de biosinteză a melaninei este necesară acțiunea enzimatică a unor proteine, dintre care TYR este indispensabilă (Hearing and Jiménez 1987). Această proteină, monofenol monooxigenaza, a fost studiată pentru prima dată în anul 1895 în extractele de scoici, demonstrându-se capacitatea de a oxida tirozina (Fitzpatrick 1949). TYR este o glicoproteină membranară de tip I, care prezintă 6/7 situsuri de N-glicozilare expuse pe partea lumenală a melanozomilor și 17 reziduri de cisteină grupate în două domenii bogate în cisteină. Pentru a-și îndeplini funcția enzimatică, doi ioni de cupru sunt încorporați în structura enzimei. Procesul de sinteză al TYR se desfășoară la nivelul RE, de unde este mai apoi transportată în aparatul Golgi și prin calea secretorie ajunge în final în melanozomii de stadiul II. N-glicanii atașati covalent în RE sunt necesari pentru plierea și maturarea proteinei, iar ciclul chaperoanelor calnexina-calreticulină intervine în aceste procese (Petrescu et al. 2000). În cazul în care TYR este greșit pliată, aceasta este recunoscută de proteina EDEM1 și este direcționată degradării pe calea proteazomală (Marin et al. 2012). N-glicozilarea TYR este esențială pentru maturarea și activitatea ei. Dacă TYR este corect pliată și maturată, va fi transportată la nivelul aparatului Golgi, unde va fi supusă altor modificări de glicozilare și apoi va fi direcționată către organitele țintă. TYR este transportată direct sau via PM către endozomii timpurii, iar apoi va fi direcționată către melanozomii de stadiu II, unde participă în procesul de melanogeneză.

În concluzie, melanogeneza este un proces extrem de important pentru organismul uman, fiind implicate multe proteine activ sau pasiv. Este important să cunoaștem indeaproape și cât mai exact proteinele care participă la aceste procese pentru a putea interveni pe cale medicamentoasă și a ajuta oamenii care suferă de diverse probleme de pigmentație, dar și pentru a preveni și a identifica din timp cancerul de piele.

3. Rezultate

3.1 Generarea și caracterizarea liniei celulare de NPC1-KO

În studiul de față am ales să investigăm rolul proteinei NPC1 în biogeneza organitelor înrudite cu lizozomii (LRO), care sunt specializate în producerea de melanină. Am utilizat o linie pigmentată de melanom uman, MNT-1, care a fost depletată de proteina NPC1 prin metoda de knock-out (KO) CRISPR/CAS9. Celulele au fost co-transfectate cu două plasmide comerciale specifice pentru KO de NPC1 și au fost cultivate în mediu cu puromicină pentru o primă selecție a celulelor transfectate. În urmă, a fost efectuată o selecție pe baza fluorescenței în roșu prin citometrie în flux, iar celulele care au prezentat fluorescență au fost placate individual în placă de 96 godeuri. În clonele obținute a fost testată expresia proteinei NPC1 prin Western blot și au fost păstrate cele care nu au exprimat proteina NPC1 (Figura 1).

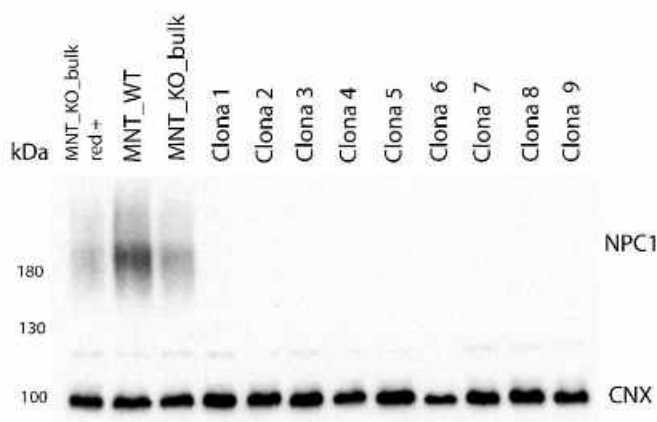


Figura 1. Verificarea clonelor de NPC1-KO prin Western blot.

Expresia proteinei NPC1 a fost determinată prin Western blot din lizatele celulelor co-transfectate cu plasmidele pentru CRISPR/Cas9 și MNT-WT. Calnexina (CNX) a fost utilizată ca și control de încărcare.

Conform literaturii de specialitate în absența proteinei NPC1, se acumulează colesterol și glicosfingolipide la nivel endo-lizozomal (Bräuer et al., 2019). Pentru a caracteriza clonele

obținute, a fost efectuat un prim experiment în care am cuantificat volumul lizozomal cu LysoTracker Green prin citometrie în flux. În figura 2, se poate observa o creștere semnificativă a volumului lizozomal în anumite clone, dar câteva clone nu prezintă o variație semnificativă a compartimentului lizozomal. Interesant este faptul că doar clonele cu o pigmentație redusă (cele reprezentate cu gri) au și un volum lizozomal mărit, adică prezintă și fenotipul BNPC.

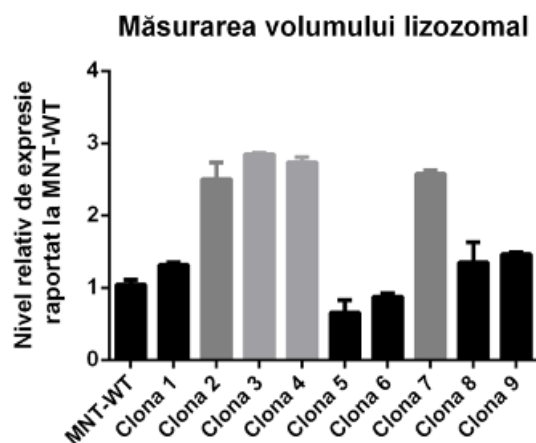


Figura 2. Determinarea volumului lizozomal prin LysoTracker Green.

Volumul lizozomal a fost măsurat în celulele WT și în câteva clone de NPC1-KO. Celulele au fost incubate cu LysoTracker Green, iar apoi a fost determinată fluorescența acestora la citometru în flux.

În continuare, am ales o clonă care reprezintă fenotipul BNPC și am determinat nivelul colesterolului prin colorare cu filipină și printr-o metodă biochimică cu Amplex red, iar nivelul glicosfingolipidelor a fost determinat prin HPLC. În absența proteinei NPC1 nivelul colesterolului a crescut, dar în cazul glicosfingolipidelor s-a remarcat un nivel aproximativ egal de GlcCer în ambele linii celulare (Figura 3A, B și C). Totuși, nivelul total de glicosfingolipide a fost ușor mai ridicat în linia de NPC1-KO (Figura 3D și E). Așadar, în noua linie generată de NPC1-KO s-a observat fenotipul BNPC care cuprinde creșterea volumului lizozomal, nivelului de colesterol și de glicosfingolipide.

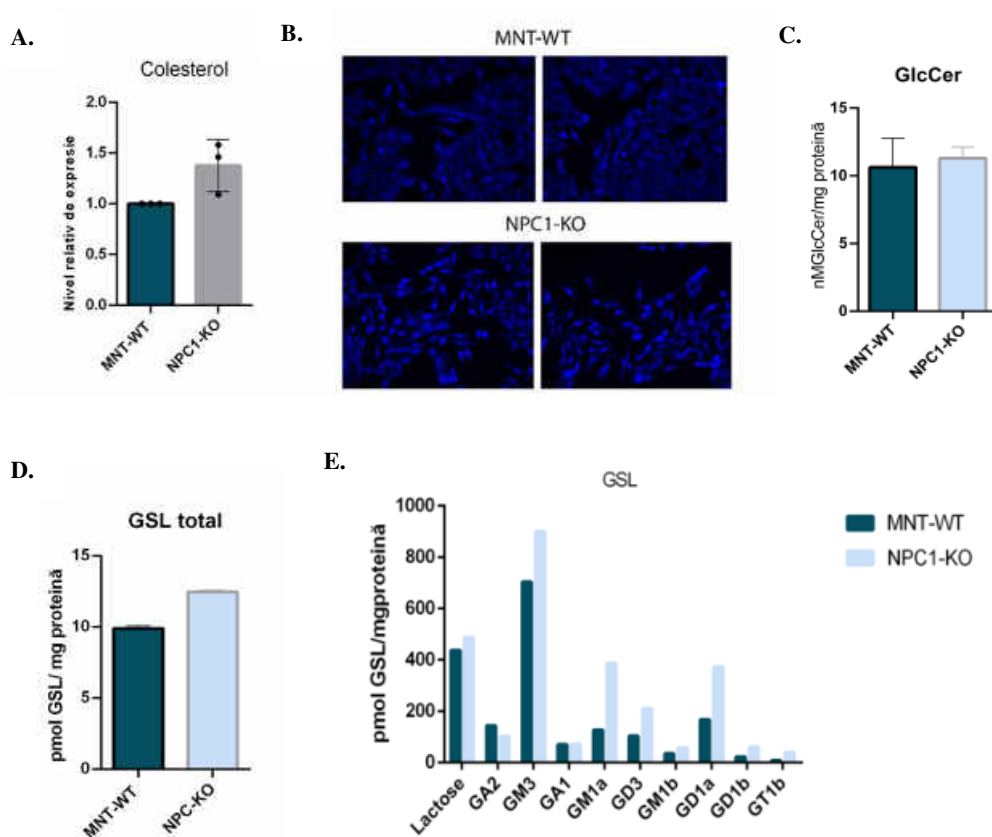


Figura 3. Nivelul colesterolului și a glicosfingolipidelor în MNT-WT vs NPC1-KO.

(A) Măsurarea cantității de colesterol prin metoda Amplex-red (B) Colorarea colesterolului cu filipină și vizualizarea la microscopie de fluorescență. (C) Determinarea nivelului de GlcCer prin HPLC. (D) Determinarea cantității totale de glicosfingolipide. (E) Determinarea nivelului diferitelor specii de glicosfingolipide.

3.2 Rolul proteinei NPC1 în biogeneza melanozomilor

În partea a doua a studiului ne-am focusat pe investigarea rolului proteinei NPC1 în biogeneza melanozomilor și în procesul de pigmentație. Încă de la recoltarea celulelor putem remarca diferențe semnificative în ceea ce privește pigmentația liniilor MNT-WT versus NPC1-KO (Figura 4A). În absența proteinei NPC1, pigmentația celulelor este afectată, celulele fiind de

culoare maro deschis. Știind că TYR este o enzimă esențială în melanogeneză, am determinat activitatea în gel și expresia ei prin Western blot (Figura 4B, C și D). Am observat că în celulele deficiente în proteina NPC1 expresia semnificativ scăzută a TYR este corelată cu activitatea scăzută. Nu doar expresia TYR este scăzută în linia NPC1-KO ci și expresia proteinelor înrudite cu TYR, TYRP-1 și DCT (Figura 4E și F). Așadar, în absența proteinei NPC1 procesul de biosinteză al melaninei este afectat.

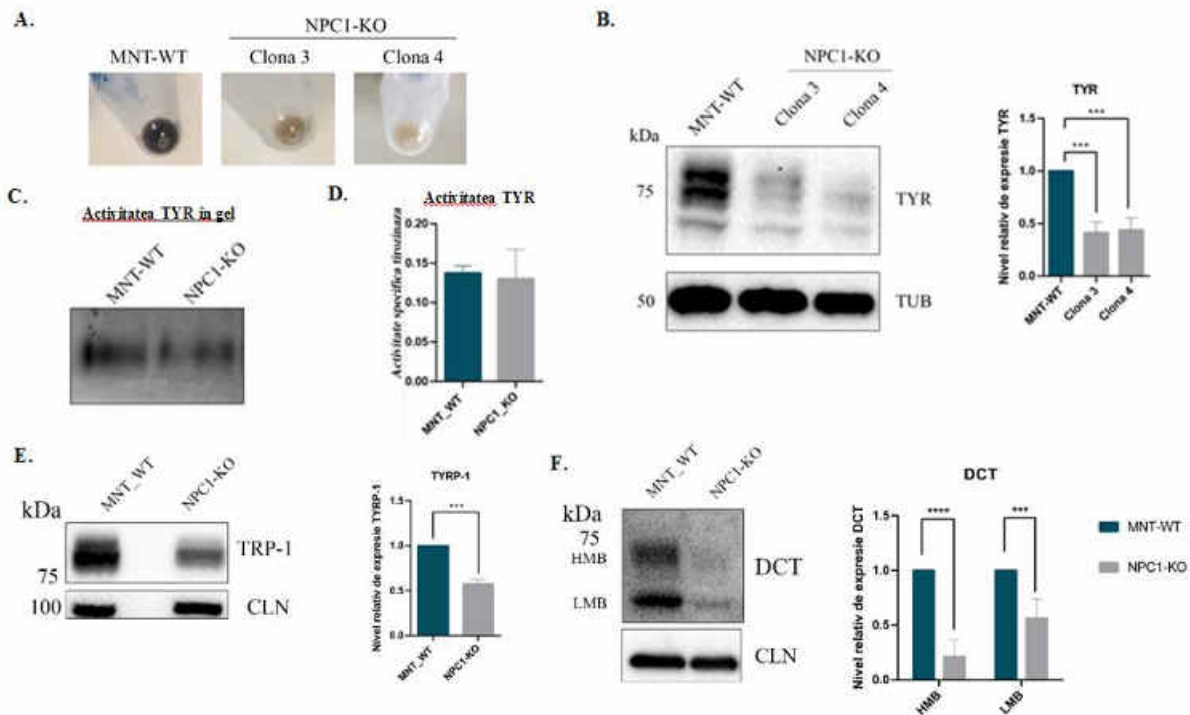


Figura 4. Enzimele melanogenice în celulele NPC1-KO.

(A) Comparație vizuală a peților celulelor MNT-WT și a clonelor cu KO de NPC1. (B) Nivelul de expresie al TYR a fost determinat prin Western blot. TUB a fost utilizată ca și control de încărcare. (C) Poză a gelului incubat cu L-Dopa pentru a determina activitatea TYR în gel (D) Activitatea specifică a TYR calculată în urma determinării activității TYR în placă. (E, F) Nivelul proteinelor TYRP-1 și DCT a fost determinat prin Western blot, iar expresia proteică a fost normalizată la nivelul de CNX. Alături se află reprezentarea grafică a expresiei celor două proteine.

În următoarele experimente am dorit să aflăm modul în care proteina NPC1 influențează expresia TYR. Pentru a elucida cauza scăderii nivelului de TYR în celulele NPC1-KO, am analizat prin RT-PCR dacă există modificări la nivel de transcripție a TYR în cele două linii celulare comparate. ARN-ul TYR a fost determinat în cele două linii celulare, iar conform figurii 5A se poate observa că în cazul TYR nu există diferențe semnificativ statistice la nivel transcripțional. În plus, am analizat prin Western blot nivelul factorului de transcripție asociat microftalmiei (MITF), care este principalul factor de transcripție al TYR (Wang et al. 2014). Conform datelor prezentate în figura 5B se poate afirma că nu există diferențe semnificative la nivel de expresiei proteică. Deci, în absența proteinei NPC1 expresia TYR este afectată, dar la nivel transcripțional nu sunt identificate modificări.

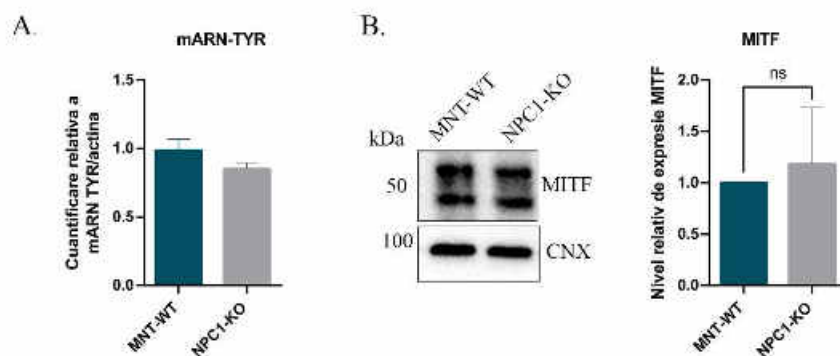


Figura 5. Studiul TYR la nivel de transcripție.

(A) Cuantificarea mARN al TYR prin RT-PCR în cele două linii comparate. (B) Determinarea proteinei MITF prin Western blot și cuantificarea acesteia. CNX a fost utilizată ca și control de încărcare.

În continuare, am studiat procesarea și glicozilarea TYR în absența proteinei NPC1 prin intermediul enzimelor EndoH, PNGaseF și NeuA. Enzima PNGaseF îndepărtează majoritatea N-glicanilor atașați proteinei, rezultând o formă deglicozilată (Chu 1986). În schimb, glicozidaza EndoH scindează doar oligozaharidele îmbogățite în manoză sau cele de tip hibrid, care nu au fost clivate de manozidaza II din aparatul Golgi. Prin supunerea proteinelor la digestia cu EndoH se poate urmări calea de procesare a acestora și dacă au tranzitat aparatul Golgi. O altă enzimă care ne ajută să descifrăm eventuale diferențe de procesare a glicanilor cu structură complexă

aparținând TYR este NeuA, o sialidază, care scindează resturile de acid sialic din structura complexă a glicoproteinelor.

Lizatul celular provenit din liniile de MNT-WT și NPC1-KO a fost incubat separat cu cele trei enzime și a fost analizată expresia și procesarea TYR prin Western blot. Acțiunea enzimei NeuA poate fi remarcată prin prezența unei mici modificări a masei moleculare în cadrul TYR. Între cele două linii celulare expresia TYR este diferită, dar nu apar modificări în ceea ce privește maturarea TYR prin adăugarea acidului sialic. Diferența de masă moleculară care este observată între proteina neincubată și cea incubată cu enzima NeuA este aproximativ la fel în ambele linii celulare (Figura 6A). Expresia polipeptidului de TYR deglicozilat a fost determinată prin digestie cu enzima PNGase și a fost evidențiată scăderea expresiei de TYR în absența proteinei NPC1 (Figura 6B). În urma acțiunii enzimei EndoH asupra TYR prin WB au fost vizualizate două benzi care aparțin TYR, una EndoH sensibilă (EndoH sens) și una EndoH rezistentă (EndoH rez). Observăm că raportul între cele două benzi (EndoH rez/EndoH sens) este diferit în cele două linii celulare (Figura 6B). Astfel, în celulele depletate de proteina NPC1 raportul este scăzut, indicând o creștere a formei proteice EndoH sens, a formei imature de TYR. În celulele NPC1-KO apare o alterare a maturării TYR, fiind afectat procesul de glicozilare complexă de la nivelul aparatului Golgi. Aceste observații ne indică că în celulele depletate de proteina NPC1, este posibil ca procesarea de la nivelul aparatului Golgi să fie întârziată sau afectată, sau ca TYR matură să fie mai rapid degradată.

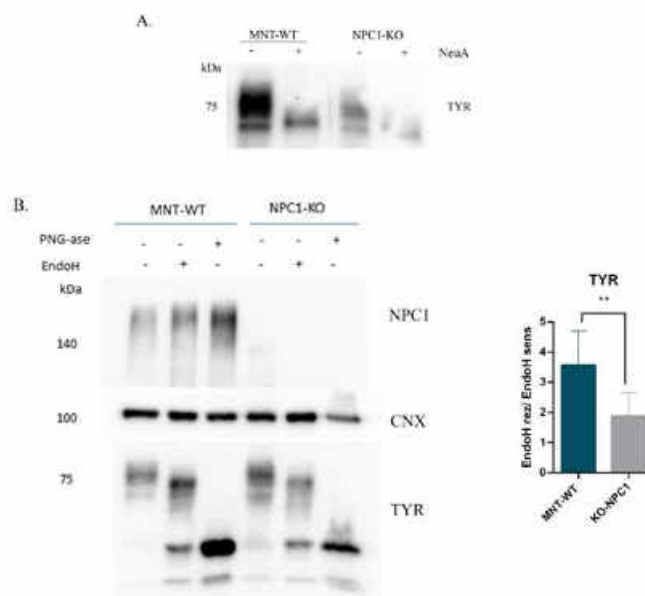


Figura 6. Evaluarea procesării TYR.

(A) Expresia TYR în urma digestiei cu NeuA a fost determinată prin Western blot. (B) Lizatele celulare au fost incubate cu PNGase respectiv cu EndoH, iar proteinele de interes au fost determinate prin Western blot. Alături este reprezentarea grafică a raportului dintre benzile EndoH rez/ EndoH sens în celulele NPC1-KO vs MNT-WT.

Pentru a desluși calea TYR în absența proteinei NPC1, am evaluat procesul de secreție extracelular al TYR în celulele de melanom. Celulele NPC1-KO și MNT-WT au fost cultivate timp de 72 h, iar din mediul de cultură colectat au fost determinate prin WB expresiile mai multor proteine secretate. Precum se vede în figura 7, deși nivelul proteinei LAMP-2 este crescut în mediul celulelor NPC1-KO, expresia TYR este scăzută în veziculele secretate extracelular. Așadar, secreția TYR nu este accelerată sau accentuată, iar scăderea nivelului de TYR este cauzată de alte procese intracelulare de sechestrare și de degradare accelerată. Flotilina-1, care este o proteină rezidentă a exozomilor (Phuyal et al. 2014), a fost identificată în ambele linii celulare, sugerând faptul că procesul de secreție extracelulară nu este afectat în absența proteinei NPC1.

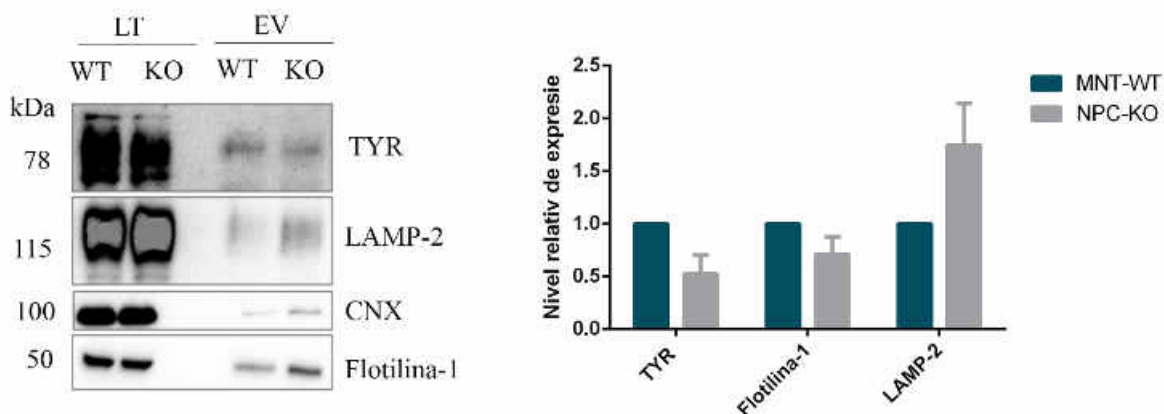


Figura 7. Influența proteinei NPC1 asupra secreției extracelulare.

Proteinele TYR, LAMP-2, CNX și flotilina-1 au fost analizate prin WB, iar benzile au fost cuantificate în programul Chemidoc.

Rata de degradarea a TYR în absența proteinei NPC1 a fost studiată cu ajutorul unui inhibitor al sintezei de proteine, cicloheximida (CHX). Celulele MNT-WT și NPC1-KO au fost incubate cu CHX și au fost recoltate la diferite intervale de timp (0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h și 4 h). În linia celulară parentală timpul de înjumătățire al TYR este de aproximativ 3.5 h, în comparație cu linia NPC1-KO unde timpul de înjumătățire al TYR este 1.5 h (Figura 8). Astfel, în absența proteinei NPC1, degradarea TYR este accelerată. Prin urmare, în celulele NPC1-KO se poate presupune că nivelurile reduse de TYR sunt procesate la proteine mature, dar prezintă un control de calitate slab în calea secretorie, ceea ce conduce la o degradare accelerată a TYR.

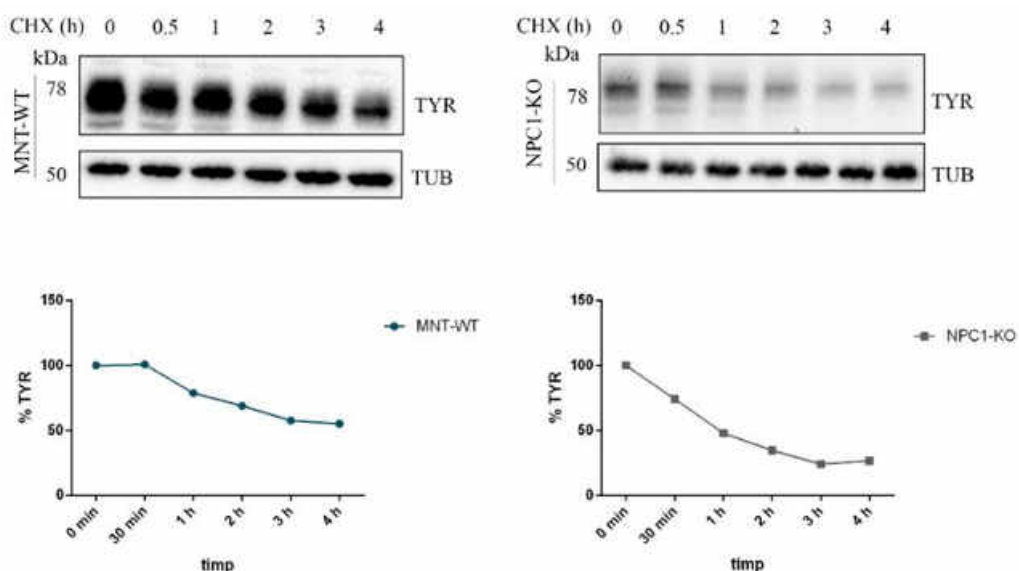


Figura 8. Degradarea TYR

Cele două linii celulare au fost tratate cu CHX și au fost recoltate la diferite intervale de timp. Expresia TYR a fost detminată prin Western blot. TUB a fost utilizată ca și control de încărcare.

În procesul de maturare a melanozomilor intervin diverse proteine, dintre care PMEL17 și TYR sunt esențiale. Am investigat calea de biogeneză a melanozomilor în celulele depletate de proteina NPC1, efectuând studii de localizare subcelulară a diferitelor proteine asociate cu calea endozomală sau melanozomală. Microscopia de fluorescență și separarea subcelulară a organelor pe gradient de sucroză au fost utilizate pentru a caracteriza influența proteinei NPC1 în LRO, în melanozomi, și implicit în melanogeneză.

Am analizat distribuția TYR prin microscopie de imunofluorescență confocală în cele două linii celulare. În celulele MNT-WT, TYR a apărut sub formă de structuri punctate împrăștiate în citoplasmă, o parte fiind concentrată în regiunea perinucleară (Figura 9). Imaginile în BF au arătat că TYR coincide cu granulele de pigment acumulate în regiunea juxtaniculară, dar și cu cele distribuite la periferia celulei și vârfurile celulelor, confirmând astfel localizarea TYR în melanozomii pigmentați, maturi. În schimb, în celulele NPC1-KO, nu numai că intensitatea colorării TYR a fost mai mică, dar și distribuția sa intracelulară a fost izbitor de diferită. Semnalul juxtanicular TYR a fost redus semnificativ, în timp ce localizarea sa a fost concentrată de-a lungul regiunilor extinse la periferia celulei, aproape de membrana plasmatică. În același timp, acestor celule le lipseau melanozomii maturi, foarte pigmentați.

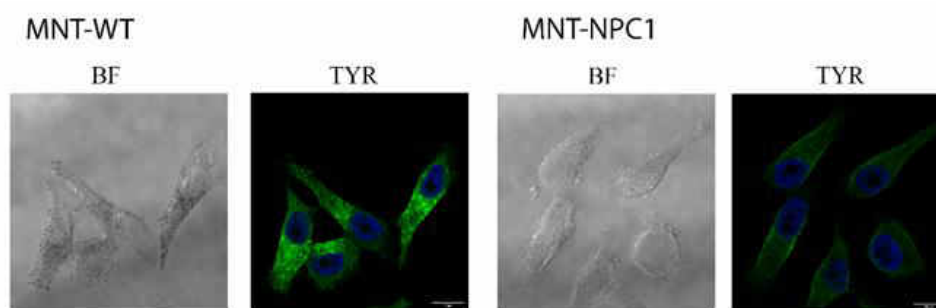


Figura 9. Vizualizarea TYR la microscopie confocală.

TYR a fost marcată cu anticorpul anti-PEP7 (1:300, ON), nucleii cu Hoechst, iar veziculele cu melanină au fost vizualizate în BF.

TYR detectată în celulele MNT-WT a co-localizat extensiv cu RAB38, o RabGTPază implicată în reglarea transportului membranal către și de la melanozomii maturi (Figura 10). În schimb, în celulele NPC1-KO, co-localizarea lor părea să fie limitată la compartimentele periferice. Un efect similar asupra distribuției intracelulare a fost observat pentru TYRP-1, o altă proteină implicată în melanogeneză. Mai mult, a existat o reducere a intensității fluorescenței pentru proteinele TYR și TYRP-1 (Figura 10). Scăderea pigmentației și modificările în expresia și localizarea subcelulară a proteinelor asociate în mod normal cu melanozomii maturi sugerează că deficiența proteinei NPC1 cauzează defecte în biogeneza și/sau maturarea melanozomilor.

Deoarece sortarea enzimelor melanogene către melanozomii în curs de maturizare provine din subcompartimente endozomale specifice, am investigat morfologia diferitelor organite din calea endocitară folosind markeri specifici. Localizarea proteinei EEA1, o proteină asociată cu domeniile membranei endozomale timpurii, nu a fost modificată în mod substanțial în celulele NPC-1 KO în comparație cu celulele WT MNT-1 (Figura 10). Pe de altă parte, TYR și EEA1 au prezentat o localizare diferită în ambele linii celulare. În schimb, a existat o co-localizare parțială, dar evidentă, a TYR cu CD63, o tetraspanină prezentă în endolizozomi, precum și în melanozomii maturi și cu fibrilele de PMEL17 (HMB-45 reactive) (Figura 10). În celulele MNT-WT, HMB-45 a prezentat o co-localizare parțială cu TYR în structuri punctate, discrete, situate în principal la periferia celulei, dar și intracelular. În schimb, în celulele NPC1-KO, ambele proteine au fost deplasate periferic acolo unde co-localizează parțial.

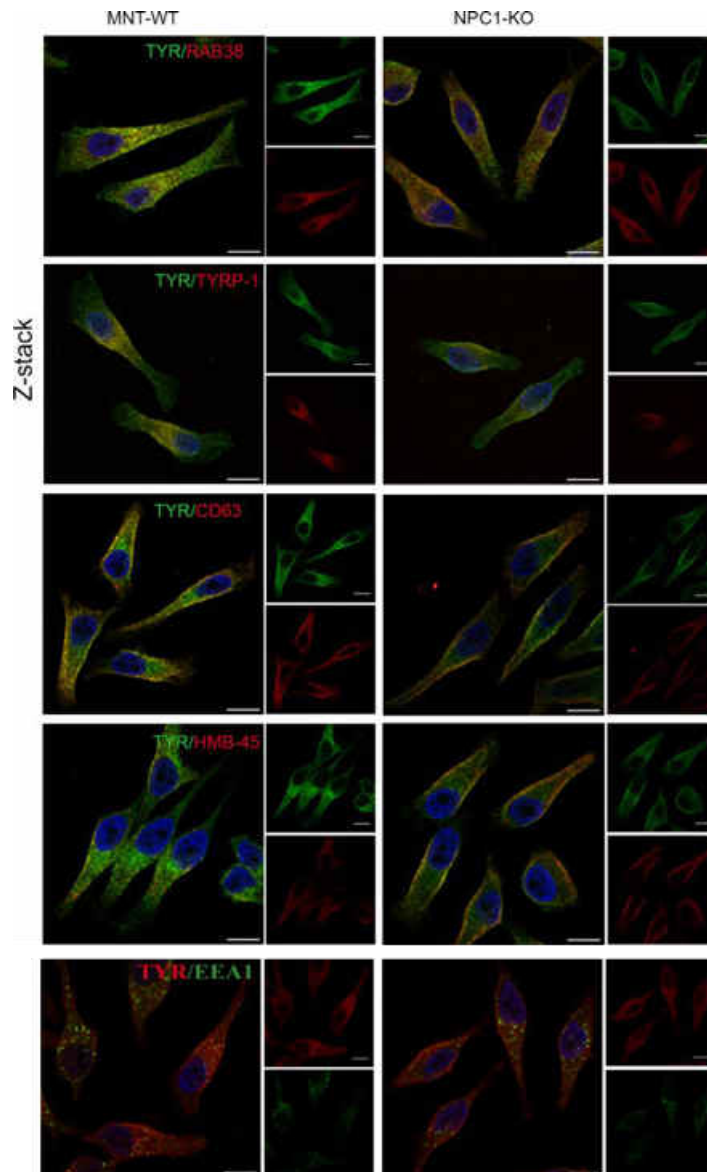


Figura 10. Co-localizarea TYR cu proteina TYRP-1, Rab38, CD63 și HMB-45

Celulele MNT-WT și NPC1-KO au fost incubate cu anticorpul de TYR (anti-Pep7) și cu un anticorp față de una din proteinele asociate melanozomilor: Rab38, CD63 sau PMEL matur HMB-45 reactiv, sau față de EEA1. Nucleii au fost marcați cu Hoechst, iar pozele au fost achiziționate cu obiectivul 63x.

Localizarea anormală a fibrilelor de PMEL17 ne-a determinat să investigăm dacă există diferențe în procesul de maturare și formarea fibrilelor. Am descoperit că expresia formelor imature (P1/P2) și M-beta ale PMEL17, recunoscute de anticorpul PEP-13 și de PMEL17, nu au

fost modificate în absența proteinei NPC1 (Figura 11A și B). Cu toate acestea, un fragment asociat fibrilelor care conține domeniul repetat (RPT) a fost supraexprimat în absența NPC1 (Figura 11C). Analiza Western blotului a arătat că a existat o creștere semnificativă statistic atât a formelor PMEL17 solubile, cât și a celor insolubile, în linia NPC1-KO în comparație cu celulele MNT-WT. Formarea accelerată a fibrilelor ar putea avea loc la nivelul membranei plasmatică sau în endozomii/corpii multivesiculari în timpul procesului de maturare PMEL17, necesitând un trafic tranzitoriu către membrana plasmatică înainte de transferul la endozom/premelanozomi timpurii.

Posibila îmbogățire a fibrilelor de PMEL17 la membrana celulară a fost măsurată prin citometrie în flux. După cum se arată în Figura 11D, expresia de suprafață a proteinei PMEL17 a fost similară în ambele linii celulare. Prin urmare, celulele NPC1-KO prezintă o creștere a proteinei mature PMEL17, care este acumulată în premelanozomi/melanozomi imaturi.

Așadar, în celulele deficiente în proteina NPC1, traficul TYR și a proteinelor înrudite cu TYR este deviat de la melanozomi către lizozomi și TYR este degradată mai repede. În consecință, biosinteza melaninei este redusă, este afectată formarea matricei PMEL17-melanină în melanozomii timpurii, iar aceste organite rămân imature afectând dramatic procesul de pigmentare a celulelor.

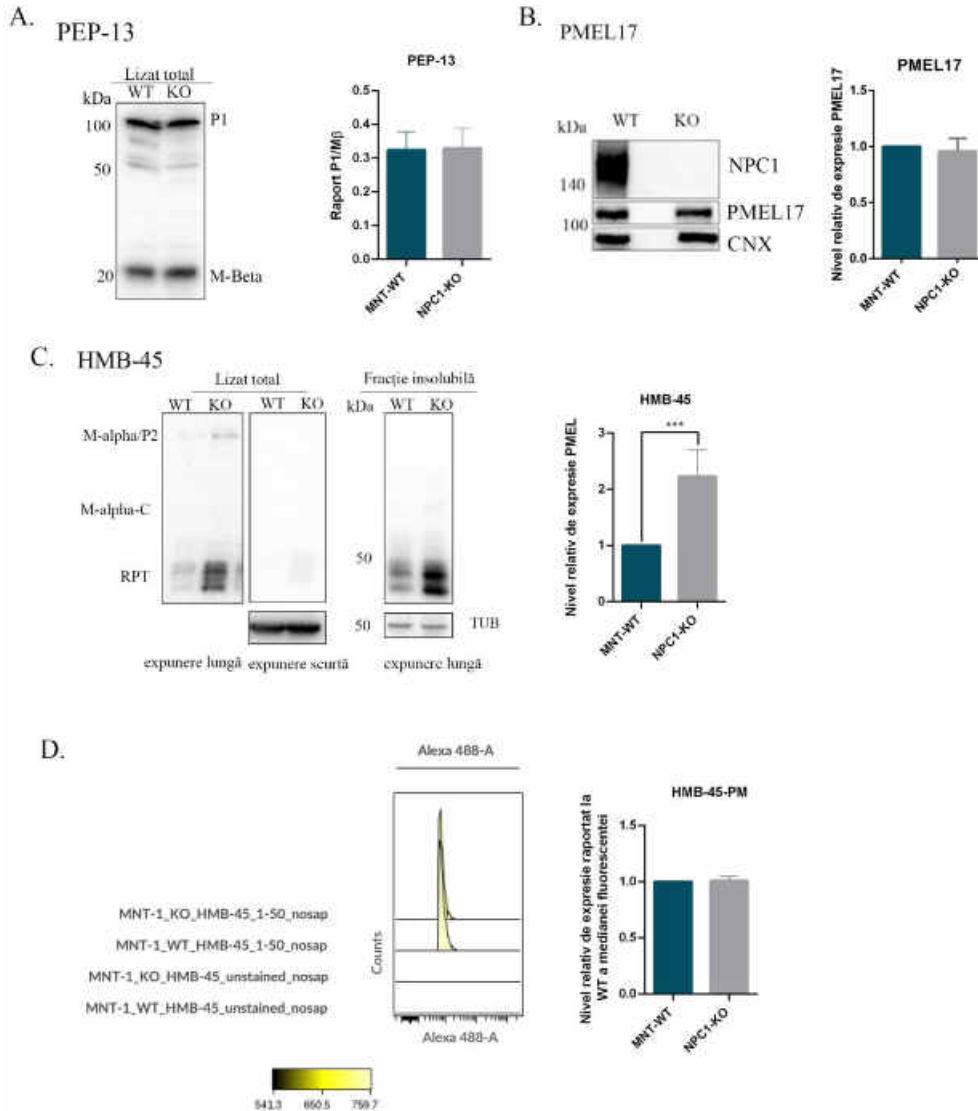


Figura 11. Procesarea proteinei PMEL17 în MNT-WT vs NPC1-KO.

(A, B, C) Prin Western blot a fost detectat nivelul expresiei diferitelor forme de procesare a proteinei PMEL17 și a fost reprezentată grafic cuantificarea proteinei PMEL în cele două linii celulare comparate. Detecția proteinei PMEL17 a fost efectuată cu anticorpii anti-PEP13 (A), anti-PMEL17 (B) și HMB-45 (C). (D) Determinarea cantitativă a expresiei proteinei PMEL17 matur de la nivelul PM prin citometrie în flux. Celulele nepermeabilizate au fost marcate cu anticorpii HMB-45, au fost incubate cu anticorpii secundari anti-șoarece-AlexaFluor488, iar intensitatea a fost detectată la FACS.

4. Concluzii

Bolile lizozomale rare precum Niemann-Pick au prezentat un interes crescut pentru cercetători în ultimii ani. Deși sunt numeroase studii cu privire la funcția proteinei NPC1, mecanismul întreg încă nu a fost pe deplin elucidat. Proteina NPC1 prezintă un rol esențial în metabolismul lipidic, fiind implicată în transportul glicosfingolipidelor și a colesterolului la nivel endo-lizozomal, dar are implicații majore și în funcționarea optimă a sistemului endo-lizozomal.

În studiul de față am ales să investighez dacă proteina NPC1 are un rol și în maturarea căii endo-lizozomale. Astfel, am ales ca model de studiu calea de maturare a melanozomilor, care sunt organite înrudite cu lizozomii și provin din endozomii timpurii.

Am generat o linie celulară nouă depletată de proteina NPC1 prin metoda CRISPR/CAS9 și am observat că fenotipul celular al bolii NPC1 este asociat cu defecte majore de pigmentație. Linia NPC1-KO a prezentat caracteristicile celulare specifice bolii, precum volum lizozomal mărit, creșterea expresiei proteinei LAMP-2, acumularea de colesterol și acumularea unor specii de glicosfingolipide.

Pentru a identifica cauza defectelor de pigmentație am investigat soarta TYR și a proteinei PMEL17, acestea fiind două proteine esențiale procesului de biogenează a melanozomilor și de biosinteză a melaninei.

În urma studiului efectuat, putem reda principalele observații și concluzii cu privire la influența proteinei NPC1 asupra melanogenezei:

-Datele de proteomică, cât și rezultatele de la WB au indicat o reducere drastică a expresiei TYR în absența proteinei NPC1. În plus, prin imunoblot a fost remarcată și scăderea nivelului de expresie a proteinelor înrudite cu TYR și anumune a TYRP-1 și DCT.

-Prin experimente de qRT-PCR am demonstrat că TYR nu este afectată la nivel transcripțional, ci la nivel post-tranlațional. Nivelul de expresie comparabil al factorului de transcripție MITF în cele două linii celulare (MNT-WT și NPC1-KO) susține aceste observații.

-În linia NPC1-KO rata de degradare a TYR este crescută comparativ cu linia MNT-WT, fapt ce explică nivelul scăzut de TYR și reducerea sintezei de melanină în celulele KO.

-Investigarea procesului de N-glicozilare, a arătat că raportul dintre fracția matură versus cea imatură este mai mic în absența proteinei NPC1, indicând că proteina NPC1 care co-immunoprecipită cu TYR este implicată în maturarea ei. Ambele proteine prezintă motive de dileucină, ceea ce ne indică sortarea lor din TGN spre un comportament endocitic comun, care apoi poate să se matureze în melanozomi.

-În prezența BafA am observat că în celulele NPC1-KO pigmentația este parțial recuperată, iar nivelul de TYR crește semnificativ. BafA inhibă degradarea lizozomală, dar poate să inhibe și unele căi implicate în transportul retrograd din Golgi în RE sau LRO în TGN. Astfel, diferitele forme de N-glicozilare (EndoH rezistente) identificate în prezența BafA pot reprezenta glicoforme redirecționate din LRO spre Golgi, iar apoi din TGN în melanozomii, evitând degradarea lizozomală.

-În absența proteinei NPC1 este modificată distribuția TYR rămase. În timp ce în celulele MNT-WT, TYR prezintă o localizare specifică melanozomilor maturi, la nivel perinuclear și în capetele dentritice, în celulele NPC-KO TYR este redistribuită spre periferia celulei, în vezicule Rab38, HMB-45 și CD63 pozitive. TYR rămâne în niște vezicule care aparțin LRO, în MVB sau melanozomii imaturi care conțin fibrile amiloide, dar nu sunt capabili să se matureze.

-Spre deosebire de TYR, în celulele NPC1-KO proteina PMEL17 nu este afectată la nivel de sinteză sau de degradare. Chiar dacă expresia polipeptidului de PMEL17 este la fel în ambele linii celulare (MNT-WT și NPC1-KO), nivelul de expresie al domeniului RPT specific fibrilelor, recunoscut de anticorpusul HMB-45 este semnificativ crescut în linia depletată de proteina NPC1. Acest fapt poate fi datorat unui proces mai eficient de generare a fibrilelor. Astfel, în celulele NPC1-KO, traficul PMEL17 nu este afectat, aceasta ajungând în MVB, unde este procesată și are loc formarea fibrilelor.

-În concluzie, în absența proteinei NPC1, traficul TYR către melanozomi este alterat și, deși sunt generate fibrilele de PMEL17, biogeneza melanozomilor este afectată.

-În această teză se descrie pentru prima dată un nou rol al proteinei NPC1 în biogeneza melanozomilor.

Bibliografie selectată

- Bissig, Christin, Leila Rochin, and Guillaume Van Niel. 2016. "PMEL Amyloid Fibril Formation: The Bright Steps of Pigmentation." *International Journal of Molecular Sciences* 17(9): 1438.
- Chu, F K. 1986. "Requirements of Cleavage of High Mannose Oligosaccharides in Glycoproteins by Peptide N-Glycosidase F." *Journal of Biological Chemistry* 261(1): 172–77.
- D'Alba, Liliana, and Matthew D. Shawkey. 2019. "Melanosomes: Biogenesis, Properties, and Evolution of an Ancient Organelle." *Physiological Reviews* 99(1): 1–19.
- Fitzpatrick, Thomas B. 1949. "MAMMALIAN TYROSINASE: MELANIN FORMATION BY ULTRAVIOLET IRRADIATION." *Archives of Dermatology* 59(6): 620.
- Hearing, Vincent J., and Mercedes Jiménez. 1987. "Mammalian Tyrosinase—The Critical Regulatory Control Point in Melanocyte Pigmentation." *International Journal of Biochemistry* 19(12): 1141–47.
- Hee, Jia Shee, Susan M. Mitchell, Xinran Liu, and Ralf M. Leonhardt. 2017. "Melanosomal Formation of PMEL Core Amyloid Is Driven by Aromatic Residues." *Scientific Reports* 7(1): 44064.
- Marin, Marioara B. et al. 2012. "Tyrosinase Degradation Is Prevented When EDEM1 Lacks the Intrinsically Disordered Region" ed. Anand S. Mehta. *PLoS ONE* 7(8): e42998.
- Petrescu, Stefana M. et al. 2000. "Tyrosinase and Glycoprotein Folding: Roles of Chaperones That Recognize Glycans." *Biochemistry* 39(18): 5229–37.
- Pfeffer, Suzanne R. 2019. "NPC Intracellular Cholesterol Transporter 1 (NPC1)-Mediated Cholesterol Export from Lysosomes." *Journal of Biological Chemistry* 294(5): 1706–9.
- Phuyal, Santosh et al. 2014. "Regulation of Exosome Release by Glycosphingolipids and Flotillins." *FEBS Journal* 281(9): 2214–27.
- Platt, Nick et al. 2016. "Immune Dysfunction in Niemann-Pick Disease Type C." *Journal of Neurochemistry* 136: 74–80.
- Raposo, Graça, and Michael S. Marks. 2007. "Melanosomes — Dark Organelles Enlighten Endosomal Membrane Transport." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(10): 786–97.
- Schultz, Mark L. et al. 2018. "Coordinate Regulation of Mutant NPC1 Degradation by Selective ER Autophagy and MARCH6-Dependent ERAD." *Nature Communications* 9(1): 3671.

- Seiji, M., T.B. Fitzpatrick, and M.S.C. Birbeck. 1961. "The Melanosome: A Distinctive Subcellular Particle of Mammalian Melanocytes and the Site of Melanogenesis1." *Journal of Investigative Dermatology* 36(4): 243–52.
- Theos, Alexander C. et al. 2005. "Functions of Adaptor Protein (AP)-3 and AP-1 in Tyrosinase Sorting from Endosomes to Melanosomes." *Molecular Biology of the Cell* 16(11): 5356–72.
- Wang, Ye et al. 2014. "Mutations of <I>TYR</I> and <I>MITF</I> Genes Are Associated with Plumage Colour Phenotypes in Geese." *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27(6): 778–83.
- Watt, Brenda, Guillaume Van Niel, Graça Raposo, and Michael S. Marks. 2013. "PMEL: A Pigment Cell-Specific Model for Functional Amyloid Formation." *Pigment Cell & Melanoma Research* 26(3): 300–315.
- Wheeler, Simon, and Dan J. Sillence. 2020. "Niemann–Pick Type C Disease: Cellular Pathology and Pharmacotherapy." *Journal of Neurochemistry* 153(6): 674–92.