

Abstract

Cells communicate with their environment via surface proteins and secreted factors. However, it is not known, how environmental cues modify the extracellular proteome. Unconventional protein secretion (UPS) is an evolutionarily conserved process, via which upon stress proteins are transported to the cell surface or into the extracellular space. The Golgi-associated protein GRASP55 facilitates unconventional secretion of distinct cargo proteins. Notably, despite the emerging importance of UPS for human disease, its regulation and biological role remains poorly understood. Here, the mTORC1 pathway was identified as the first signaling pathway controlling UPS. Mechanistically, mTORC1 phosphorylates GRASP55 directly to retain its Golgi localization under basal conditions, thus revealing a physiological role for mTORC1 at the Golgi. Cellular stress or drugs that inhibit mTORC1 cause rapid GRASP55 dephosphorylation and relocalization to secretory compartments required for UPS. Through multiple unbiased proteomic analyses, such as of the proximome, the secretome and the surfactome, numerous cargoes that follow this unconventional secretory route to shape the cellular secretome and surfactome were comprehensively characterized.

mTORC1 does not only affect GRASP55 localization and phosphorylation, but also alters the interactome. Using MMP2 secretion as a proxy for UPS, important insights into its regulation and physiological role were obtained. Further, the unbiased secretome analysis revealed a so far unknown involvement of GRASP55 in sorting of lysosomal proteins, implying a role for GRASP55 in the proper function of lysosomes which might link GRASP55 to lysosomal storage diseases.

Collectively, the findings reveal that the mTORC1-GRASP55 signaling hub functions as the integration point in stress signaling upstream of UPS, and as a key coordinator of the cellular adaptation to stress. Further GRASP55 acts as a sorting hub for lysosomal protein trafficking in the early secretory pathway.

Zusammenfassung

Zellen kommunizieren mit ihrer Umgebung über Oberflächenproteine und sekretierte Faktoren. Es ist jedoch bisher nicht bekannt, wie Umwelteinflüsse das extrazelluläre Proteom modifizieren können. Die unkonventionelle Proteinsekretion (UPS) ist ein evolutionär konservierter Prozess, über den Proteine bei Stress zur Zelloberfläche oder in den extrazellulären Raum transportiert werden. Das Golgi-assoziierte Protein GRASP55 ermöglicht die unkonventionelle Sekretion verschiedener Frachtproteine. Trotz der zunehmenden Bedeutung von UPS für Krankheiten beim Menschen sind seine Regulierung und seine biologische Rolle nach wie vor wenig bekannt.

Hier wurde der mTORC1 Weg als erster Signalweg identifiziert, der die UPS steuert. Mechanistisch betrachtet phosphoryliert mTORC1 GRASP55 direkt, um dessen Golgi-Lokalisation unter basalen Bedingungen beizubehalten, wodurch eine physiologische Rolle für mTORC1 am Golgi deutlich wird.

Zellulärer Stress oder spezifische Inhibitoren, die mTORC1 hemmen, verursachen eine schnelle GRASP55-Dephosphorylierung und Verlagerung an die für die USP erforderlichen sekretorischen Kompartimente. Durch mehrere umfassende proteomische Analysen wie durch das Proximom, das Sekretom und das Oberflächenproteom (Surfactome) wurden erstmals zahlreiche Frachtproteine, die diesem unkonventionellen Sekretionsweg zur Bildung des zellulären Sekretoms und Surfactoms folgen, umfassend charakterisiert. Neben dem Einfluss von mTORC1 auf die Lokalisation und die Phosphorylierung von GRASP55, konnte ein Einfluss auf das zelluläre Interaktom von GRASP55 gezeigt werden.

Mit der MMP2-Sekretion als Vertreter für UPS wurden wichtige Einblicke in deren Regulation und physiologische Rolle geliefert. Ferner ergab die umfassende ergebnisoffene Sekretomanalyse eine bis heute nicht beschriebene Beteiligung von GRASP55 an der korrekten Sortierung lysosomaler Proteine, was auf eine Rolle von GRASP55 für die ordnungsgemäße Funktion von Lysosomen deutet.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass der mTORC1-GRASP55-Signaltransduktionskomplex als Integrationspunkt für die Weiterleitung von Stresssignalen für die UPS und als Schlüsselkoordinator für die zelluläre Anpassung auf Stress fungiert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass GRASP55 als Verteilungsstelle für den lysosomalen Proteintransport im frühen Sekretionsweg fungiert.