Investigating Targetable Interfaces and Non-canonical Functions of the Septin Cytoskeleton

Khushboo Sharma

ABSTRACT

Septins are a family of conserved, filament forming cytoskeletal GTPases that are crucial for a variety of cellular processes such as cytokinesis, signaling, morphogenesis etc. These proteins are found in all extant higher eukaryotes except plants. Septins have an evolutionarily conserved role in animal cell cytokinesis. Interestingly, septins are dispensable for cytokinesis in hematopoietic cells. Targeting the septin cytoskeleton in solid tumors may retard tumor growth due to cytokinetic failure, while avoiding myelosuppression as an unintended side effect. This PhD work was aimed at facilitating such a septin targeting opportunity. Targeting the septin cytoskeleton is difficult due to the redundancy in septin families as well as no specific inhibitors being available. Therefore, our first objective was to identify the targetable interfaces of the septin filament that are essential for both filament formation and function. Abbey et al, 2016 have previously established that SEPT7-SEPT7 G-G interface is dispensable for cytokinetic function, so we generated a mutant W268A to target the SEPT7-SEPT9 interface. We have successfully demonstrated that SEPT7- W268A mutant abrogates both SEPT7-SEPT7 and SEPT7-SEPT9 interaction. Since this tryptophan residue is conserved in all mammalian septin families and across species, we propose it as a viable target for designing specific inhibitors of the septin cytoskeleton to disrupt cellular function. However, septin function inside the cell is not limited to cytokinesis and further investigation of the non-canonical roles of septins is essential for safe pharmacological targeting. Here, we describe a novel role of septins as regulatory barriers for kinase inhibitor induced micron scale vacuolation. We show that perturbations in septin filament dynamics can affect vesicular trafficking independent of canonical autophagy. Deciphering the role of septins in the process is a step towards understanding tumor resistance mechanisms especially in autophagy-addicted tumors, as well as modulation of intracellular defense mechanisms.

सार

सेप्टिन, फिलामेंट बनाने वाले साइटोस्केलेटल GTPases का एक संरक्षित परिवार है जो कई तरह की सेलुलर प्रक्रियाओं जैसे साइटोकाइनेसिस, सिग्नलिंग, मॉर्फोजेनेसिस आदि के लिए ज़रूरी है। ये प्रोटीन पौधों को छोड़कर सभी जीवित यूकेरियोट्स में पाए जाते हैं। दिलचस्प बात यह है कि हेमेटोपोएटिक कोशिकाओं में साइटोकाइनेसिस के लिए सेप्टिन ज़रूरी नहीं हैं। इस स्टडी में, हमारा मकसद सॉलिड ट्यूमर में सेप्टिन साइटोस्केलेटन को टारगेट करना था, जहाँ साइटोकाइनेसिस फेल होने से ट्यूमर की ग्रोथ धीमी हो सकती है, साथ ही अनचाहे साइड इफ़ेक्ट के तौर पर माइलोसप्रेशन से भी बचा जा सकता है। सेप्टिन साइटोस्केलेटन को टारगेट करना मुश्किल है क्योंकि सेप्टिन परिवारों में रिडंडेंसी होती है और कोई खास इनहिबिटर भी उपलब्ध नहीं हैं। इसलिए, हमारा पहला मकसद सेप्टिन फिलामेंट के उन टारगेट करने लायक इंटरफेस की पहचान करना है जो फिलामेंट बनने और उसके काम करने, दोनों के लिए ज़रूरी हैं। एबे एट अल, 2016 ने पहले ही यह साबित कर दिया है कि SEPT7-SEPT7 G-G इंटरफेस साइटोकाइनेटिक फ़ंक्शन के लिए ज़रूरी नहीं है, इसलिए हमने SEPT7-SEPT9 इंटरफेस को टारगेट करने के लिए एक म्यूटेंट W268A बनाया। हमने सफलतापूर्वक दिखाया है कि SEPT7-W268A म्यूटेंट SEPT7-SEPT7 और SEPT7-SEPT9 इंटरैक्शन, दोनों को खत्म कर देता है। चूँकि यह ट्रिप्टोफैन रेजिड्यू सभी मैमेलियन सेप्टिन परिवारों और अलग-अलग प्रजातियों में संरक्षित है, इसलिए हम इसे सेलुलर फ़ंक्शन को बाधित करने के लिए सेप्टिन साइटोस्केलेटन के खास इनहिबिटर डिज़ाइन करने के लिए एक सही टारगेट के तौर पर प्रस्तावित करते हैं। हालाँकि, सेल के अंदर सेप्टिन का काम सिर्फ़ साइटोकाइनेसिस तक ही सीमित नहीं है और फार्माकोलॉजिकल टारगेटिंग के लिए सेप्टिन की गैर-पारंपरिक भूमिकाओं की और जाँच ज़रूरी है। यहाँ, हम काइनेज इनहिबिटर से होने वाले माइक्रोन-स्केल वैक्यूलेशन के लिए रेगुलेटरी बैरियर के तौर पर सेप्टिन की एक नई भूमिका का वर्णन करते हैं। हम दिखाते हैं कि सेप्टिन फिलामेंट डायनामिक्स में गड़बड़ी पारंपरिक ऑटोफैगी से अलग वेसिकुलर ट्रैफ़िकिंग को प्रभावित कर सकती है। इस प्रक्रिया में सेप्टिन की भूमिका को समझना ट्यूमर रेजिस्टेंस मैकेनिज्म, खासकर ऑटोफैगी-एडिक्टेड ट्यूमर में, और साथ ही इंट्रासेलुलर डिफेंस मैकेनिज्म के मॉड्यूलेशन को समझने की दिशा में एक कदम है।