

综 述

雷帕霉素的新靶点: 溶酶体钙离子通道TRPML1

黎倩^{1, #}, 蔡伟杰^{1, #}, 吉永华^{2, 3}, 冯兴华^{1, *}

¹浙江工业大学长三角绿色制药协同创新中心, 杭州 310014; ²上海大学生物膜与生物医药研究所, 上海 200444; ³上海新华医院崇明分院癌痛转化医学研究所, 上海 202150

摘 要: 雷帕霉素(Rapamycin, Rap)是一种免疫抑制剂, 在临床上主要应用于器官移植过程中的抗排斥反应, 同时, Rap在抗癌、神经保护和抗衰老等领域也展现出巨大潜力。通过抑制哺乳动物Rap靶蛋白(mammalian target of Rapamycin, mTOR)活性, Rap能够活化调节溶酶体功能的转录因子EB (transcription factor EB, TFEB)从而上调溶酶体功能, 同时, Rap也能够去除mTOR对ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1)的抑制效果从而促进自噬。最新研究显示, Rap能够直接激活溶酶体钙离子通道TRPML1, 此效应并不依赖于mTOR; TRPML1通道的开放可释放溶酶体钙离子, 钙调神经磷酸酶(Calcineurin)作为此溶酶体来源的钙信号的感受器活化TFEB, 进而增强溶酶体功能并促进自噬。此发现拓宽了对Rap药理学机制的认知, 为衰老等领域的机制研究提供了理论基础。本文将以经典的Rap-mTOR-ULK1/TFEB信号通路为导引, 详细介绍溶酶体钙离子通道TRPML1被确认为Rap新靶标的论证过程, 并简要讨论此新信号通路(Rap-TRPML1-Calcineurin-TFEB)的药理学意义。

关键词: 雷帕霉素; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; ULK1; TRPML1; 转录因子EB; 自噬

中图分类号: R9

The new target of Rapamycin: lysosomal calcium channel TRPML1

LI Qian^{1, #}, CAI Wei-Jie^{1, #}, JI Yong-Hua^{2, 3}, FENG Xing-Hua^{1, *}

¹Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; ²Institute of Biofilm and Biomedicine, Shanghai University, Shanghai 200444, China; ³Institute of Translational Medicine for Cancer Pain, Chongming Branch, Shanghai Xinhua Hospital, Shanghai 202150, China

Abstract: Rapamycin (Rap) is an immunosuppressant, which is mainly used in the anti-rejection of organ transplantation. Meanwhile, it also shows great potential in the fields of anticancer, neuroprotection and anti-aging. Rap can inhibit the activity of mammalian target of Rap (mTOR). It activates the transcription factor EB (TFEB) to up-regulate lysosomal function and eliminates the inhibitory effect of mTOR on ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1) to promote autophagy. Recent research showed that Rap can directly activate the lysosomal cation channel TRPML1 in an mTOR-independent manner. TRPML1 activation releases lysosomal calcium. Calcineurin functions as the sensor of the lysosomal calcium signal and activates TFEB, thus promoting lysosome function and autophagy. This finding has greatly broadened and deepened our understanding of the pharmacological roles of Rap. In this review, we briefly introduce the canonical Rap-mTOR-ULK1/TFEB signaling pathway, and then discuss the discovery of TRPML1 as a new target of Rap and the pharmacological potential of this novel Rap-TRPML1-Calcineurin-TFEB pathway.

Key words: Rapamycin; mammalian target of Rapamycin; ULK1; TRPML1; transcription factor EB; autophagy

雷帕霉素 (Rapamycin, Rap) 的发现可追溯到上个世纪 70 年代早期, 它是加拿大麦基尔大学的斯

坦利·斯科利纳从复活节岛采集的土壤样品中分离、鉴定的土壤链霉菌代谢物, 早期被用作低毒性的抗

Received 2020-03-01 Accepted 2020-06-05

[#]These authors contributed equally to this review.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-571-66320080; E-mail: mnfxh@zjut.edu.cn; lysoworker@outlook.com

真菌药物^[1]。研究显示, Rap 可有效地抑制生长因子诱导的 T 细胞增殖, 已被美国食品药品监督管理局批准用于器官移植抗排斥反应以及一些自身免疫病治疗中。近年的研究表明, Rap 具有多种功能, 如抑制肿瘤细胞的增殖, 缓解神经退行性疾病以及延长果蝇、酵母、小鼠等模式生物的生命, 在抗癌、神经保护和抗衰老等领域表现出巨大潜力^[2, 3]。因此, 探究 Rap 及其类似物的作用机制对于基础研究和临床应用都具有重要意义。

Rap 是调控细胞活动状态的关键激酶——哺乳动物 Rap 靶蛋白 (mammalian target of Rapamycin, mTOR) 的抑制剂, 通过抑制 mTOR 活性达到治疗相关疾病的目的。mTOR 主要的活化位点是溶酶体膜^[4]。溶酶体是广泛存在于真核细胞的酸性细胞器, 含有多种酸性水解酶, 能降解蛋白质、脂肪和核酸等多种生物大分子, 被称为细胞的“消化器官”^[5]。此外,

溶酶体也是胞内重要的钙库, 特异地表达于溶酶体的钙通透性通道 TRPML1 是瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道家族中粘脂蛋白亚族 (TRPML1、TRPML2 和 TPRML3) 的一员, 是溶酶体中钙离子释放的主要途径^[6]。TRPML1 介导的钙信号参与了溶酶体胞吐、自噬及囊泡运输等重要的生理功能^[7]。

1 经典 Rap-mTOR-unc-51 样激酶 1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1)/转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 信号通路(图1)

mTOR 是在进化中高度保守的丝/苏氨酸激酶, 属于 PI3K 相关蛋白激酶家族, 在感受营养信号、调节细胞生长和增殖中起着重要作用。mTOR 活性异常与糖尿病、癌症、多种神经退行性疾病密切相

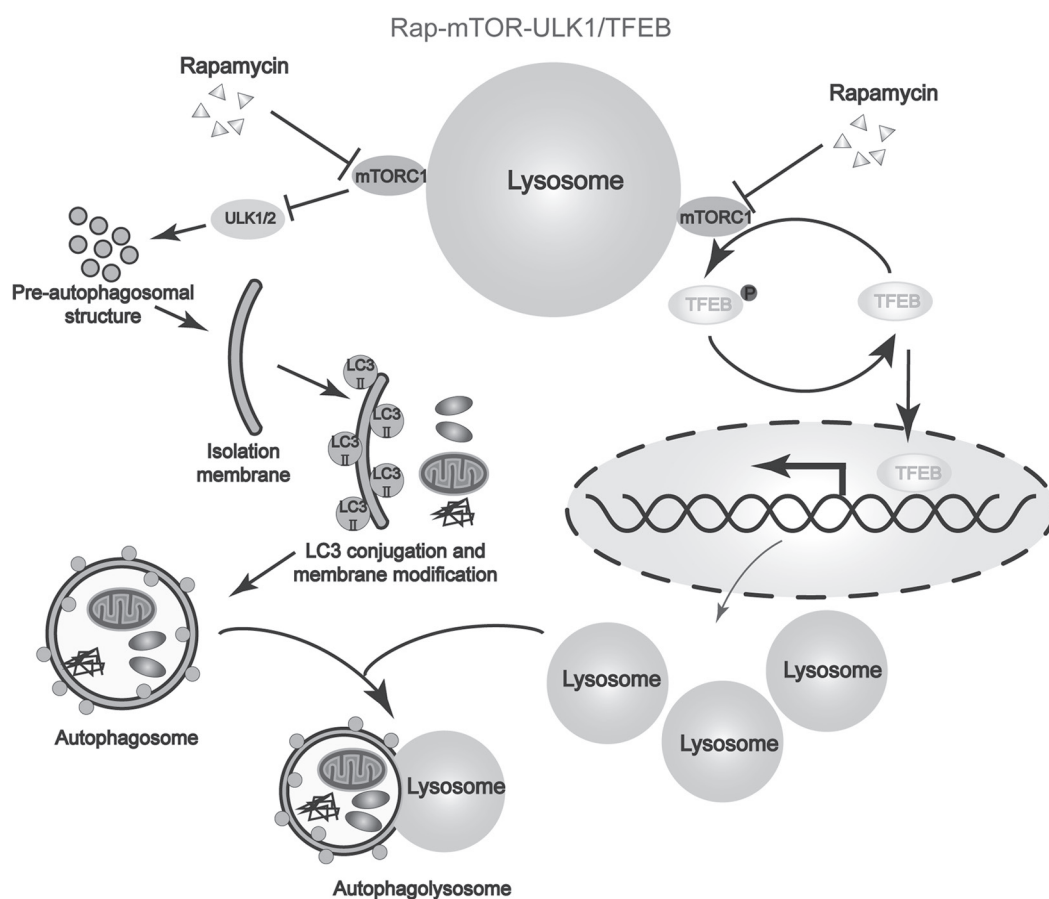


图 1. Rap-mTOR-ULK1/TFEB 通路

Fig. 1. Rap-mTOR-ULK1/TFEB pathway. Rap could inhibit the kinase activity of mTOR, which will result in the increase of ULK1 and TFEB in the dephosphorylated state. The dephosphorylated ULK1 will initiate the autophagy process. The dephosphorylated TFEB will be translocated into the nucleus and initiate the expression of lysosomal related genes. Rap, Rapamycin; mTOR, mammalian target of Rapamycin; ULK1, unc-51 like autophagy activating kinase 1; TFEB, transcription factor EB.

关。Rap 通过与细胞内受体 FKBP12 蛋白复合物结合后直接作用于 mTOR 的 FRB 结构域，形成 FKBP12/Rap/mTOR 三元复合物，阻断 mTOR 底物的募集，从而抑制 mTOR 活性^[2, 8]。mTOR 在细胞中以两种复合物的形式存在：mTOR 复合物 1 (mTORC1) 和复合物 2 (mTORC2)^[9]，mTORC1 对 Rap 极度敏感，Rap 主要是通过抑制 mTORC1 发挥作用。

mTORC1 的底物众多，主要有 S6K、4E-BP、ULK1 和 TFEB，它们各自调节不同的细胞功能。mTOR 通过 ULK1 调节细胞的自噬^[10]。自噬是细胞依赖于溶酶体降解自身和外来物质的过程，是真核细胞抵御外界不利因素、维持内环境稳态的一种内在平衡机制^[11]。自噬主要分为三类：巨自噬 (macroautophagy)、微自噬 (microautophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)。巨自噬是目前研究得最透彻的自噬。巨自噬 (本文后续部分简称为自噬) 主要分为自噬的起始、自噬体的形成、自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体等三个步骤^[12, 13]。ULK1 是自噬泡形成所必需的蛋白，是自噬启动的关键调控因子。当细胞营养充足时，活化的 mTORC1 通过磷酸化 ULK1 蛋白 757 位点的丝氨酸残基，使 ULK1 处于失活状态，从而抑制自噬的发生；而当营养物质匮乏或施加 mTOR 抑制剂时，mTORC1 失活，mTORC1 对 ULK1 的抑制效应消失，有利于自噬的发生^[10, 14]。因此，Rap 能够通过抑制 mTOR 活性调控自噬 (Rap-mTOR-ULK1 途径，图 1)。

mTOR 通过 TFEB 调节溶酶体生成。TFEB 是溶酶体生成的主要转录调节因子，其转录活性取决于其亚细胞定位：在正常情况下，mTOR 磷酸化 TFEB，磷酸化状态的 TFEB 与蛋白 14-3-3 结合形成 TFEB/蛋白 14-3-3 复合物后被滞留于细胞质中，从而抑制其转录活性；应急状态或施加 mTOR 抑制剂时，mTOR 活性被抑制，去磷酸化状态的 TFEB 与蛋白 14-3-3 解离后迅速移位至细胞核并结合于 CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation) 元件后上调溶酶体相关基因，增强溶酶体功能^[15]。因此，Rap 能够通过抑制 mTOR 活性促进溶酶体生成 (Rap-mTOR-TFEB 途径，图 1)^[16]。

2 Rap新信号通路：Rap-TRPML1-Calci-neurin-TFEB (图2)

mTOR 是 Rap 的靶点，Rap 的临床及实验结果

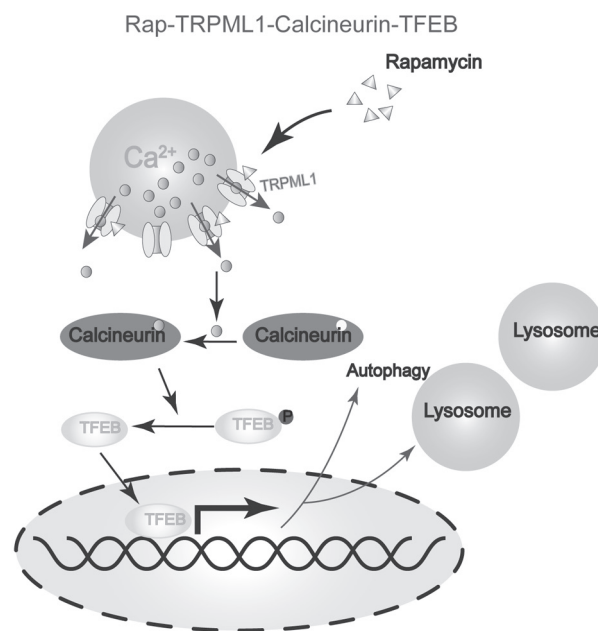


图 2. Rap-TRPML1-Calci-neurin-TFEB通路

Fig. 2. Rap-TRPML1-Calci-neurin-TFEB pathway. Rapamycin could activate directly the lysosomal cation channel TRPML1 to release the lysosome calcium store. The Calcineurin functions as the calcium sensor of the lysosomal calcium signaling and dephosphorylates the TFEB. Dephosphorylated TFEB will be translocated into the nucleus and then initiate the lysosomal biogenesis. Rap, Rapamycin; mTOR, mammalian target of Rapamycin; TFEB, transcription factor EB.

普遍认为是通过抑制 mTOR 活性而实现的。然而，令研究人员奇怪的是，Rap 对许多疾病的细胞及动物模型具有保护作用，而 mTOR 的强效抑制剂 Torin 1 并没有相同的作用^[17]，因此，推测 Rap 可能存在未知的新靶点。

2.1 Rap能够激活溶酶体钙离子通道TRPML1的电流

溶酶体电生理记录能够在接近生理状态下对溶酶体离子通道直接进行研究，是一项值得称道的里程碑技术革新。Zhang 等^[18]利用此技术检测 Rap 对 TRPML1 通道的影响，结果显示，在 TRPML1 过表达的细胞中，Rap 能够浓度依赖性地激活一内向整流电流 (类 TRPML1 电流) (半数激活浓度约为 12.8 $\mu\text{mol/L}$)，此电流能被 TRPML1 通道抑制剂 ML-SI3 所抑制。Rap 能在野生型胃壁细胞中激活此类 TRPML1 电流，而在 TRPML1 功能缺失细胞中却不能。Rap 仅能微弱地激活 TRPML2 通道，对 TPRML3 通道完全没有作用。此外，Rap 不能激活溶酶体钠离子通道 TPC2。以上研究结果提示，Rap 可特异地激活 TRPML1 通道。

2.2 Rap激活TRPML1不依赖于mTOR

Rap 能够抑制 mTOR 活性, 而 mTOR 能够调节溶酶体通道 TPC2 及 TRPML1 功能^[19, 20]。Rap 对 TRPML1 的激活是否通过调节 mTOR 活性而实现? Zhang 等^[18]通过不同方法证明 Rap 对 TRPML1 的激活并不通过 mTOR。首先, 无论是否含有 ATP (mTOR 的内源激动剂)^[21] 或者 Torin 1^[22], Rap 都能激活 TRPML1 电流。其次, 四个 Rap 类似物^[23] 虽都为 mTOR 抑制剂, 但对 TRPML1 通道的作用却不尽相同: 坦罗莫司和依维莫司能激活 TRPML1 电流, 而地磷莫司和唑他莫司则不能。再次, Zhang 等^[18]用基因的方法操控 mTOR 激酶的活性, 结果显示, 在表达失活态突变体 mTOR-D2357E、Rap 不敏感型突变体 mTOR-S2035T 和 Rap 超敏型突变体 mTOR-L1460P 的细胞中, Rap 都能激活 TRPML1 通道; 此外, 无论是 mTOR 活性的正向调控基因 (*RagA/B* 或 *p18*) 或负向调控基因 (*TSC2*) 缺失, Rap 都能够激活 TRPML1 电流^[10]。还有研究表明 TRPML1 通道能够直接被 mTOR 磷酸化^[20], 然而 Zhang 等^[18]研究显示, mTOR 磷酸化位点突变的 TRPML1 通道仍能被 Rap 激活, 提示 Rap 对 TRPML1 通道的激活并非通过 mTOR。

此外, 基于生物膜层光学干涉技术的生物分子相互作用系统的研究表明, Rap 和坦罗莫司能够与 TRPML1 结合, 而唑他莫司不能^[18]。综合以上结果, 推测 Rap 可通过直接结合于 TRPML1 而激活通道。

2.3 Rap诱导TFEB入核, 增强溶酶体功能

TRPML1 激动剂 (如 ML-SA1 和活性氧) 都能释放溶酶体中钙离子, 钙调神经磷酸酶 (Calcineurin) 作为钙信号的感受器, 催化 TFEB 的去磷酸化反应, 从而激活 TFEB 进而增强自噬 (TRPML1-Calcineurin-TFEB 通路)^[24, 25]。Rap 是否通过此通路活化 TFEB 呢? 研究显示, Rap 不能诱导稳定表达 TFEB-GFP 的 HeLa 细胞中 TFEB 的核移位, 但 Rap、坦罗莫司和依维莫司能活化过表达 TRPML1 的 TFEB-GFP HeLa 细胞中 TFEB, 这一效应能被 ML-SI3 抑制; 而 Rap 不能激活过表达功能缺陷突变体 TRPML1-DD/KK 中 TFEB^[18]。此外, 非 TRPML1 激动剂的 Rap 类似物不能活化 TFEB^[18]。

Zhang 等^[18]的研究进一步证实了溶酶体来源的钙信号在 Rap 激活 TFEB 过程中的作用: 首先, 钙离子螯合剂 BAPTA-AM 可以阻断 TFEB 的活化; 其次, 钙成像实验结果表明, Rap 能够通过释放溶

酶体中钙离子引起钙信号。钙调神经磷酸酶的抑制剂 FK506 和环孢素均能抑制坦罗莫司引起的 TFEB 入核, 表明钙调神经磷酸酶是溶酶体来源的钙信号感受器。免疫荧光实验结果表明, Rap 及坦罗莫司能够改变 TFEB 的磷酸化状态^[18]。TFEB 入核后, 与 CLEAR 元件结合, 增强溶酶体相关基因的表达^[25]。Zhang 等^[18]运用 CLEAR 荧光素报告系统发现, Rap 和坦罗莫司能显著增加异源表达 TRPML1 的 HEK293 细胞中的荧光; 定量 PCR 及细胞免疫荧光染色结果也分别显示, Rap 能上调溶酶体相关蛋白的 mRNA 水平, 增加溶酶体的数量及降解能力, 表明 Rap 和坦罗莫司能增强溶酶体功能。

综上所述, Rap 可通过 TRPML1-Calcineurin-TFEB 途径激活 TFEB, 并引起溶酶体生成 (图 2)^[18, 24, 26]。

2.4 Rap以TRPML1依赖性的方式促进自噬

自噬是一个与溶酶体功能紧密相关的生理过程, 因此 Zhang 等^[18]进一步探讨 Rap 对自噬的影响, 结果表明, 坦罗莫司能够增加人成纤维细胞、过表达 TRPML1 的 HEK293 细胞中自噬水平标记蛋白 LC3-II 和 p62 的含量, 同时也能增加 GFP-RFP-LC3 HeLa 细胞中红绿荧光信号重合斑点, 提示 Rap 类似物坦罗莫司能够增强自噬。

这一结果与 Scotto Rosato 等近期的研究结论相一致: TRPML1 激动剂能够通过激活 TRPML1 活化钙依赖性激酶 CaMKK β 及 AMPK, 进而活化 ULK1 和 VPS34 自噬蛋白复合体, 促进自噬^[27]。

3 Rap信号通路的药理学意义

自噬是一种保守的溶酶体降解途径, 是真核细胞维持内环境稳态的一种平衡机制^[11]。大量证据表明, 自噬通路在生理过程中起着重要作用, 自噬功能的异常与多种疾病的发生密切相关, 如: 癌症、代谢性疾病、神经系统疾病和心血管疾病等。因此, 自噬成为了治疗相关疾病潜在的靶点。自噬过程的通畅完成需要自噬的启动与溶酶体生成两个步骤的紧密配合、协同完成。溶酶体内所含的酸性水解酶能够降解各种生物大分子物质, 包括细胞代谢过程中产生的有害物质, 如活性氧、错误折叠蛋白、功能受损的线粒体等, 从而维持细胞的健康状态。溶酶体功能缺陷会导致有害物质的堆积, 损坏溶酶体功能, 阻断自噬。mTOR 是细胞能够精密调控这两个过程的关键激酶: 抑制 mTOR 能够激活 ULK1 启动自噬, 同时也能激活 TFEB 启动溶酶体生成, 为

消化自噬泡内的内含物做好充分准备。

一直以来, Rap 都被认为通过抑制 mTOR 达到激活自噬和溶酶体生成的目的。科研人员一直惊讶于 Rap 在抗衰老领域中的独特表现, 并疑惑于其独特表现的分子机制。Zhang 等^[18]研究表明, 溶酶体钙离子通道 TRPML1 是 Rap 的新靶点。TRPML1 的激活会引起溶酶体钙离子的释放, 此溶酶体来源的钙信号参与了许多生理过程, 包括通过活化钙调神经磷酸酶, 激活 TFEB, 增强溶酶体功能^[7]。近年来的研究表明, 增强 TRPML1 通道功能能够缓解多种溶酶体功能缺陷相关疾病的症状^[28-30]。因此, TRPML1 通道已成为治疗或缓解相关病症的靶点^[31]。Zhang 等^[18]的研究显示, 常用的 mTOR 抑制剂 Rap 能直接结合并激活 TRPML1 通道, 释放溶酶体钙离子, 活化 TFEB 从而增强溶酶体功能。这一信号途径并不依赖 mTOR 激酶活性; 同时, Rap 也能以 TRPML1 依赖性的方式增强自噬, 且极有可能通过活化激酶 CaMKK β 以及 AMPK 而实现^[27]。因此, Rap 能够通过激活 TRPML1 通道引起溶酶体钙离子释放, 并通过不同的钙信号感受器启动自噬以及增强溶酶体功能, 此过程能够充分保证自噬过程的顺利进行。

Zhang 等^[18]发现的 Rap-TRPML1-Calcineurin-TFEB 新通路对理解 Rap 独特药理功能提供了全新的视角, 是对经典通路 Rap-mTOR-ULK1/TFEB 的完善和补充。mTOR 的强效抑制剂在抗衰老等领域的“败走麦城”, 提示此 Rap-TRPML1-Calcineurin-TFEB 通路极有可能是 Rap 在相关领域“独领风骚”的原因。然而, Rap 相关的两条并行信号通路对其药理学作用的具体贡献尚待进一步研究。鉴于 mTOR 的诸多重要生理功能, mTOR 敲除或 mTOR 活性的完全抑制极有可能导致细胞的死亡。因而, Rap 在 TRPML1 通道中作用位点的研究、Rap 不敏感 TRPML1 通道突变体敲入的细胞或者动物模型都将有助于阐明此新信号通路在 Rap 抗衰老等领域中的作用。此外, 根据对 TRPML1 的作用效果, Rap 类似物可以分为 TRPML1 激动剂与非激动剂两类, 比较它们在不同领域的效果也将为新信号通路药理学作用的分子机制提供关键信息。

Zhang 等也发现 Rap-TRPML1-Calcineurin-TFEB 新通路具有细胞特异性: 在成纤维细胞中, Rap 能够通过 TRPML1 激活 TFEB, 而 HeLa 及 HEK 细胞中此通路不敏感, 过表达 TRPML1 通道能够敏化

此通路^[18]。这一结果提示, 溶酶体功能 / 钙信号与 Rap-TRPML1-Calcineurin-TFEB 信号通路敏感度直接相关。溶酶体能够清除细胞中有害物质, 对维持细胞, 特别是神经元等终端分化细胞的健康状态至关重要。溶酶体 / 自噬受损会导致与神经退行性疾病相关的有毒蛋白质的聚集和受损细胞器的累积, 最终导致神经元的死亡。维持终端分化细胞的健康是抗衰老的关键, 及时清除细胞内的致病物质是对抗神经退行性疾病的关键。因此, 神经元等终端分化细胞中此信号通路敏感与否, Rap 及其 TRPML1 激动剂类似物能否帮助清除神经元中致病物质, 能否延缓神经元的衰老等都值得深入探讨。

4 小结

mTOR 是 Rap 已知的靶点, Rap 可以通过抑制 mTORC1 活性, 激活自噬起始因子 ULK1 启动自噬, 以及活化 TFEB 增强溶酶体功能 (Rap-mTOR-ULK/TFEB 通路)^[3]。这两个过程的完美配合是保障自噬顺利进行的关键。而 Rap-TRPML1-Calcineurin-TFEB 信号通路的发现为理解 Rap 的药理功能开辟了全新的视角, 将有助于阐明 Rap 药理功能的分子机制, 有助于新一代 Rap 类似物以及抗衰老药物的研发, 必将推动神经退行性疾病和抗衰老等相关领域新疗法的开发。

参考文献

- 1 Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1975; 28(10): 727-732.
- 2 Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab* 2014; 19(3): 373-379.
- 3 Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, Baur JA. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest* 2013; 123(3): 980-989.
- 4 Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 2010; 141(2): 290-303.
- 5 Xu H, Ren D. Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol* 2015; 77: 57-80.
- 6 Di Paola S, Scotto-Rosato A, Medina DL. TRPML1: The Ca²⁺ retaker of the lysosome. *Cell Calcium* 2018; 69: 112-121.
- 7 Li P, Gu M, Xu H. Lysosomal ion channels as decoders of cellular signals. *Trends Biochem Sci* 2019; 44(2): 110-124.

- 8 Ruan B, Pong K, Jow F, Bowlby M, Crozier RA, Liu D, Liang S, Chen Y, Mercado ML, Feng X, Bennett F, von Schack D, McDonald L, Zaleska MM, Wood A, Reinhart PH, Magolda RL, Skotnicki J, Pangalos MN, Koehn FE, Carter GT, Abou-Gharbia M, Graziani EI. Binding of rapamycin analogs to calcium channels and FKBP52 contributes to their neuroprotective activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(1): 33–38.
- 9 Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149(2): 274–293.
- 10 Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 20): 3589–3594.
- 11 Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16(8): 461–472.
- 12 Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; 21(22): 2861–2873.
- 13 Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140(3): 313–326.
- 14 Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13(2): 132–141.
- 15 Raben N, Puertollano R. TFEB and TFEB3: Linking lysosomes to cellular adaptation to stress. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2016; 32: 255–278.
- 16 Martini-Stoica H, Xu Y, Ballabio A, Zheng H. The autophagy-lysosomal pathway in neurodegeneration: A TFEB perspective. *Trends Neurosci* 2016; 39(4): 221–234.
- 17 Malagelada C, Jin ZH, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Greene LA. Rapamycin protects against neuron death in *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2010; 30(3): 1166–1175.
- 18 Zhang X, Chen W, Gao Q, Yang J, Yan X, Zhao H, Su L, Yang M, Gao C, Yao Y, Inoki K, Li D, Shao R, Wang S, Sahoo N, Kudo F, Eguchi T, Ruan B, Xu H. Rapamycin directly activates lysosomal mucolipin TRP channels independent of mTOR. *PLoS Biol* 2019; 17(5): e3000252.
- 19 Cang C, Zhou Y, Navarro B, Seo YJ, Aranda K, Shi L, Battaglia-Hsu S, Nissim I, Clapham DE, Ren D. mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na⁺ channels to adapt to metabolic state. *Cell* 2013; 152(4): 778–790.
- 20 Onyenwoke RU, Sexton JZ, Yan F, Díaz MC, Forsberg LJ, Major MB, Brenman JE. The mucopolipidosis IV Ca²⁺ channel TRPML1 (MCOLN1) is regulated by the TOR kinase. *Biochem J* 2015; 470(3): 331–342.
- 21 Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 2001; 294(5544): 1102–1105.
- 22 Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 2009; 284(12): 8023–8032.
- 23 Zheng Y, Jiang Y. mTOR inhibitors at a glance. *Mol Cell Pharmacol* 2015; 7(2): 15–20.
- 24 Medina DL, Di Paola S, Peluso I, Armani A, De Stefani D, Venditti R, Montefusco S, Scotto-Rosato A, Prezioso C, Forrester A, Settembre C, Wang W, Gao Q, Xu H, Sandri M, Rizzuto R, De Matteis MA, Ballabio A. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol* 2015; 17(3): 288–299.
- 25 Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudo F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 2009; 325(5939): 473–477.
- 26 Medina DL, Ballabio A. Lysosomal calcium regulates autophagy. *Autophagy* 2015; 11(6): 970–971.
- 27 Scotto Rosato A, Montefusco S, Soldati C, Di Paola S, Capuozzo A, Monfregola J, Polishchuk E, Amabile A, Grimm C, Lombardo A, De Matteis MA, Ballabio A, Medina DL. TRPML1 links lysosomal calcium to autophagosome biogenesis through the activation of the CaMKK β /VPS34 pathway. *Nat Commun* 2019; 10(1): 5630.
- 28 Wang W, Gao Q, Yang M, Zhang X, Yu L, Lawas M, Li X, Bryant-Genevier M, Southall NT, Marugan J, Ferrer M, Xu H. Up-regulation of lysosomal TRPML1 channels is essential for lysosomal adaptation to nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(11): E1373–E1381.
- 29 Capurro MI, Greenfield LK, Prashar A, Xia S, Abdullah M, Wong H, Zhong XZ, Bertaux-Skeirik N, Chakrabarti J, Siddiqui I, O'Brien C, Dong X, Robinson L, Peek RM Jr, Philpott DJ, Zavros Y, Helmrath M, Jones NL. VacA generates a protective intracellular reservoir for *Helicobacter pylori* that is eliminated by activation of the lysosomal calcium channel TRPML1. *Nat Microbiol* 2019; 4(8): 1411–1423.
- 30 Park S, Ahuja M, Kim MS, Brailoiu GC, Jha A, Zeng M, Baydyuk M, Wu LG, Wassif CA, Porter FD, Zerfas PM, Eckhaus MA, Brailoiu E, Shin DM, Muallem S. Fusion of lysosomes with secretory organelles leads to uncontrolled exocytosis in the lysosomal storage disease mucopolipidosis type IV. *EMBO Rep* 2016; 17(2): 266–278.
- 31 Bonam SR, Wang F, Muller S. Lysosomes as a therapeutic target. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18(12): 923–948.