

Cover Page



Universiteit Leiden



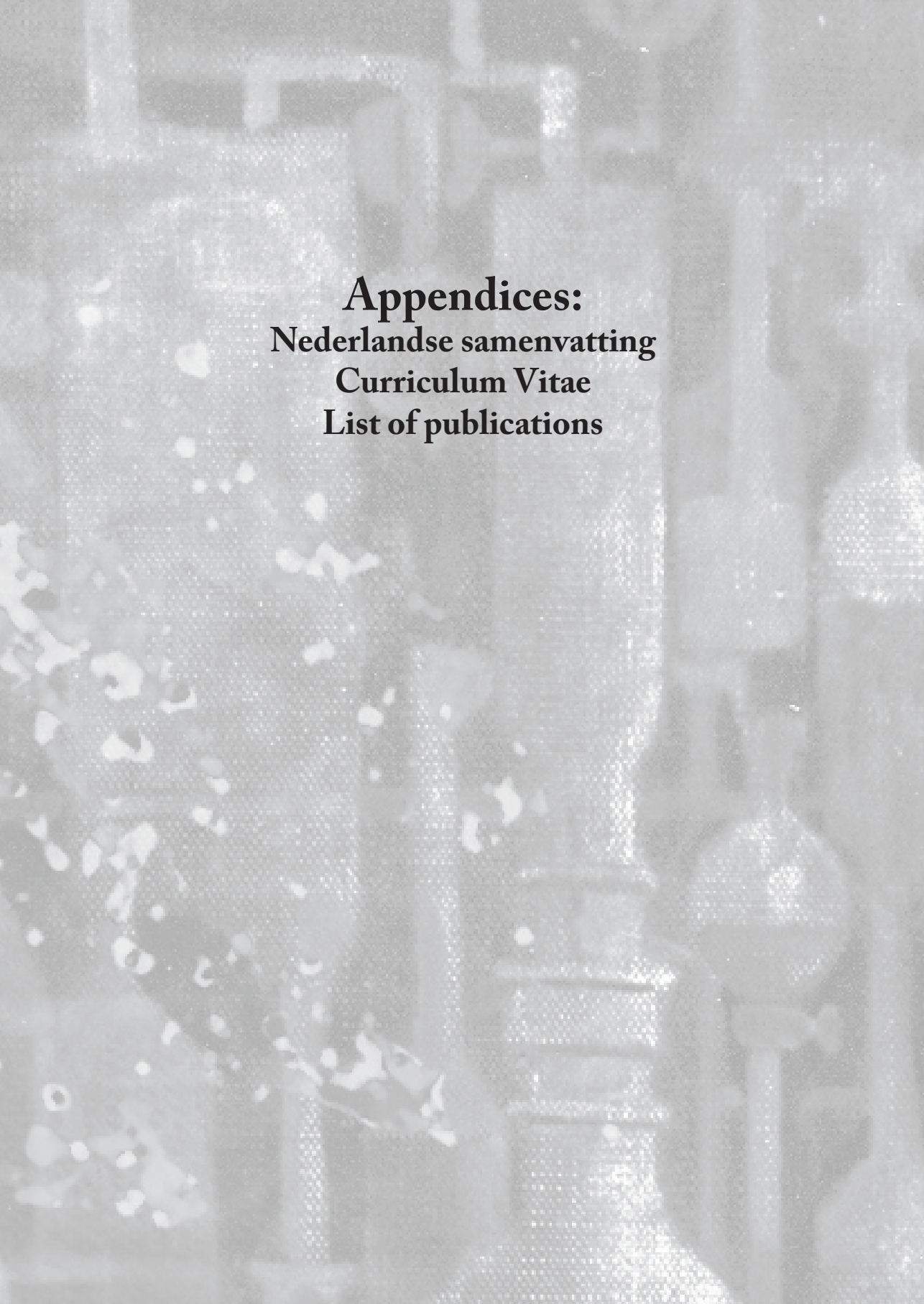
The handle <http://hdl.handle.net/1887/32636> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Jongsma, Marlieke Lyrissa Maria

Title: A genome-wide cell biological analysis of genes involved in MHC class II antigen presentation

Issue Date: 2015-04-01





Appendices:
Nederlandse samenvatting
Curriculum Vitae
List of publications

Nederlandse samenvatting

MHC klasse II eiwitten zijn het best te beschouwen als centrale regelmoleculen van het afweersysteem. Ze zorgen voor een selectieve en specifieke afweer maar –omdat het wel eens fout gaat– zijn ook vaak betrokken bij auto-immuunziekten zoals type 1 diabetes en multiple sclerose. Om die redenen is het van belang te begrijpen hoe deze moleculen werken en hoe ze te manipuleren zijn. Door het volledige menselijke genoom te screenen op veranderingen in MHC klasse II antigeen presentatie hebben we nieuwe eiwitten kunnen identificeren die betrokken zijn bij dit proces. Vervolgens hebben we sommige kandidaat eiwitten verder bestudeerd om hun functie te achterhalen. Zo hebben we kunnen aantonen dat een onbekend eiwit RMND5B betrokken is bij MHC klasse II transcriptie, de nieuwe GTPase Arl14/Arf7 een rol speelt bij de intracellulaire lokalisatie van MHC klasse II bevattende membraanblaasjes en dat een onbekend ER gelokaliseerde E3 ligase RNF26 verschillende types blaasjes op zijn plaats houdt in cellen. Daarnaast speelt RNF26 gecontroleerde blaasjes lokalisatie ook een belangrijke rol tijdens de celdeling, met name cytokinese. We hebben dus nieuwe eiwitten gevonden die MHC klasse II op nieuwe wijze beïnvloeden en daarbij ook nieuwe biologie gedefinieerd.

MHC klasse II moleculen zijn heterodimers bestaande uit een α - en β -keten welke samen een peptide bindende groeve vormen. Een peptide van exogene oorsprong kan aan deze groeve binden waarna het peptide beladen MHC klasse II molecuul naar het cel oppervlak wordt getransporteerd. Hier worden de exogene peptiden herkend door T-lymfocyten resulterend in een adaptieve immuunrespons. De laatste jaren is er een link gevonden tussen bepaalde MHC klasse II allelen en sommige auto-immuunziekten, maar het mechanisme hierachter is nog niet bekend. Om dit mechanisme te ontrafelen is het belangrijk om meer kennis te verkrijgen over MHC klasse II antigeen presentatie en het transport van deze moleculen naar het celoppervlak.

Om nieuwe eiwitten te identificeren die betrokken zijn bij MHC klasse II antigeen presentatie hebben wij een screen uitgevoerd waarbij we de genen van het menselijk genoom een voor een uitschakelden zodat we de effecten daarvan op MHC klasse II aan het celoppervlak konden bestuderen. Voor onze screen hebben we gebruik gemaakt van de melanoma cellijn MeIJuSo. Dit omdat

deze cellen –in tegenstelling tot immuuncellen zoals dendritische cellen– makkelijk te transfecteren zijn met siRNAs om de verschillende genen uit te schakelen. De effecten van de verschillende siRNAs hebben we uitgelezen met behulp van flow cytometrie. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van twee monoklonale antilichamen. Dit is antilichaam L243-Cy3 om de totale hoeveelheid MHC klasse II moleculen aan de oppervlakte te meten en antilichaam CerCLIP-Cy5 om te bepalen hoeveel MHC klasse II moleculen beladen waren met een peptide. Deze screen gaf ons een paar honderd kandidaat eiwitten wat al aangeeft hoe complex MHC klasse II antigeen presentatie in elkaar zit en hoeveel we eigenlijk nog niet begrijpen over deze route.

Om beter onderscheid te kunnen maken tussen deze kandidaten hebben we ze onderworpen aan een tweetal extra screens. In de eerste screen bestudeerden we welke kandidaten betrokken zijn bij de transcriptie van MHC klasse II moleculen. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van kwantitatieve PCR gecombineerd met gen uitschakeling via siRNAs. Met deze data waren we in staat om



een CIITA (de zover bekend belangrijkste MHC klasse II transcriptie regulator) regulerend netwerk te identificeren met vele feedback-loops. RMND5B is een van de eiwitten betrokken bij MHC klasse II transcriptie. RMND5B wordt net als SMAD-eiwitten getransporteerd naar de kern na TGF β stimulatie. SMADs zijn negatieve regulators van MHC klasse II transcriptie. Omdat in afwezigheid van RMND5B MHC klasse II transcriptie omlaag gaat, verwachten we dat RMND5B mogelijk een negatieve regulator is van SMADs.

Uiteraard waren niet alle kandidaten uit de screen betrokken bij MHC klasse II transcriptie. Om ook een beter beeld te krijgen van de functie van de overige kandidaten hebben we de verschillende genen uitgeschakeld met behulp van siRNAs waarna we GFP-gelabeld intracellulair MHC klasse II zichtbaar hebben gemaakt met behulp van confocal microscopie. Deze data hebben we gebruikt om de kandidaten onder te verdelen in subgroepen bestaande uit kandidaten met gelijke effecten op de intracellulaire MHC klasse II distributie. Een van de subclusters bevat genen die na uitschakeling MHC klasse II aan het oppervlak laat zien, maar geen -normaliter aanwezige- intracellulaire pool. Dit deed ons sterk denken aan de MHC klasse II distributie van een rijpe dendritische cel. Verdere bestudering van dit subcluster leidde tot de identificatie van een nieuw mechanisme dat de lokalisatie van MHC klasse II bevattende membraanblaasjes reguleert. Arl14/Arf7 bindt aan MHC klasse II bevattende blaasjes, waar het zijn effector ARF7EP rekruteert. ARF7EP bindt vervolgens aan een tot nu toe niet bestudeerde myosine, Myosine 1E die de membraanblaasjes verbindt met actine. Wij verwachten dat dit mechanisme een MHC klasse II moleculen intracellulair houdt in onrijpe dendritische cellen. Tijdens het rijpsings proces van dendritische cellen wordt

dit mechanisme negatief gereguleerd waardoor de MHC klasse II membraanblaasjes naar de oppervlakte worden getransporteerd voor antigeen presentatie in rijpe dendritische cellen.

Door de data van onze screen te combineren met andere datasets en twee extra screens uit te voeren hebben we een beter beeld gekregen van kandidaat eiwitten betrokken bij MHC klasse II antigeen presentatie. Verdere bestudering van deze eiwitten leidt mogelijk tot een beter begrip van het mechanisme achter auto-immuunziekten, waardoor betere behandelmethoden ontwikkeld kunnen worden.

Een opmerkelijk MHC klasse II fenotype kwam naar voren uit onze confocale laser microscopie gebaseerde screen. Cellulaire componenten hebben een keurig georganiseerde verdeling in cellen. Naast de kern bevindt zich het micotubuli-organiserende centrum (MTOC) en het Golgi. Daar omheen bevindt zich een 'wolk' van membraanblaasjes die op een gereguleerde manier via microtubuli naar het celoppervlak kunnen worden getransporteerd. Depletie van het gen coderend voor de ER membraan gelokaliseerde E3 ligase RNF26 leidde tot een willekeurige verdeling van deze blaasjes door de hele cel. Dit leidde tot een tweetal hoofdvragen: (1) hoe controleert de ER gelokaliseerde E3 ligase RNF26 de intracellulaire lokalisatie van membraanblaasjes en (2) waarom is gereguleerde blaasjes lokalisatie noodzakelijk in cellen?

Om te bepalen welke eiwitten nog meer betrokken zijn bij de door RNF26 gecontroleerde lokalisatie van membraanblaasjes hebben we het RING domein van RNF26 gebruikt als aas om bindende eiwitten te identificeren (GST-pulldown). Op deze wijze hebben we zeven eiwitten kunnen identificeren die aan RNF26 binden en daar-

naast ook resulteren in de verspreiding van membraanblaasjes na hun depletie. Twee van deze eiwitten zijn de actine bindende motor Myosine VI en de actine regulerende GEF DOCK7. Verder onderzoek heeft uitgewezen dat DOCK7 betrokken is bij de vorming van een actine netwerk in de blaasjes 'wolk' dat een platform vormt voor Myosine VI om membraanblaasjes aan actine te koppelen en ze op deze wijze op hun plek te houden. RNF26 rekruteert DOCK7 naar het gebied rond het MTOC en ubiquitineert DOCK7. DOCK7 ubiquitinatie speelt mogelijk een rol bij de binding aan Myosine VI of andere eiwitten betrokken bij dit proces.

Hoe worden membraanblaasjes verbonden aan Myosine VI? Hierbij spelen de overige vijf geïdentificeerde RNF26 binders een rol. EPS15 lokaliseert op vroege endosomes, TAX1BP1 op blaasjes afgesplitst van het Golgi en Tollip en Tom1L2 op late endosomes. Bestudering van de aanwezige domeinen in deze eiwitten liet zien dat ze alle vier een ubiquitin-bindend domein bevatten. Het vijfde eiwit, SQSTM1 (ook wel p62 genaamd) is voornamelijk bekend als eiwit betrokken bij de formatie van autophagosomes. Wij beschrijven hier een andere functie voor SQSTM1. SQSTM1 bindt op een ubiquitin onafhankelijke manier aan RNF26 waarna de E3 activiteit van RNF26 SQSTM1 ubiquitineert. Dit zorgt ervoor dat de ubiquitin-bindende domeinen van de membraanblaasjes geassocieerde eiwitten kunnen binden aan SQSTM1. RNF26 is vervolgens ook betrokken bij de ubiquitinatie van deze eiwitten wat leidt tot een stabiel complex. Ook Myosine VI bevat een ubiquitin-bindend domein waardoor het dit complex kan binden. Daarnaast bevat Myosine VI ook twee eiwit-bindende hot-spots. Via deze domeinen kan Myosine VI aan de verschillende eiwitten in het complex binden wat de stabiliteit van de interacties verder bevordert en membraanblaasjes worden ver-

bonden met de lokaal gevormde actine kabels.

Vanuit het ER zorgt een E3 ligase voor de vorming van een complex tussen membraanblaasjes en een actine bindend motor eiwit. Eiwit ubiquitinatie en ubiquitin-bindende domeinen spelen een belangrijke rol in de formatie van dit complex. Ubiquitinatie is reversibel en de-ubiquitinerende enzymen kunnen ubiquitin verwijderen waardoor het complex uiteenvalt en blaasjes -wanneer nodig- naar de oppervlakte getransporteerd kunnen worden. Waarom is de lokalisatie van membraanblaasjes gereguleerd? Een van de processen waarbij membraanblaasjes juist gepositioneerd moeten worden is mitosis, de celdeling.

Tijdens de celdeling worden niet alleen in S-phase verdubbelde chromosomen tussen de dochter cellen verdeeld, maar ook organellen en membraanblaasjes moeten tussen de cellen verdeeld worden. Daarnaast zijn deze blaasjes platformen voor eiwitten en eiwit complexen betrokken bij bijvoorbeeld cytokinese, het afsplitsen van de dochter cellen. Bestudering van membraanblaasjes in mitose liet zien dat blaasjes clusteren en verspreiden via een bepaalde timing. Dat RNF26 betrokken is bij mitose, en met name cytokinese, weten we doordat depletie van RNF26 met siRNA leidt tot cellen met meerdere kernen. Meerdere kernen ontstaan wanneer dochtercellen niet goed hebben kunnen splitsen. Daarnaast zorgt RNF26 depletie er ook voor dat cellen die wel afsplitsen veel meer tijd nodig hebben dan normaal. Tenslotte hebben we met microscopie kunnen zien dat membraanblaasjes in anafase niet meer clusteren in afwezigheid van RNF26. Ook Myosine VI staat bekend om zijn rol in cytokinese. Hoe RNF26 en Myosine VI samenwerken in mitose en hoe RNF26 gereguleerde processen getimed zijn is vooralsnog niet bekend en heeft verder onderzoek nodig.



In dit proefschrift laat ik zien hoe een screen naar het volledige menselijke genoom kan leiden tot identificatie van mechanismen die nog niet eerder beschreven zijn. Zoals de rol van RMND5B in MHC klasse II transcriptie, Arl14/Arf7 in de regulatie van MHC klasse II in onrijpe dendritische cellen en RNF26 in de regulatie van membraanblaasjes in interfase en mitotische cellen. Naast deze eiwitten hebben we nog vele andere eiwitten geïdentificeerd als mogelijk betrokken bij MHC klasse II antigeen presentatie. Hier-tussen zitten kandidaten die ons verder zullen helpen dit proces beter te begrijpen en hopen we uiteindelijk een volledig overzicht te krijgen over hoe MHC klasse II moleculen werken en hoe we dit verder kunnen manipuleren.