



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel regulators of endosome dynamics, MHCII antigen presentation and chemosensitivity

Wijdeven, R.H.M.

Citation

Wijdeven, R. H. M. (2017, November 29). *Novel regulators of endosome dynamics, MHCII antigen presentation and chemosensitivity*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/59471>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/59471>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:
<http://hdl.handle.net/1887/59471>

Author: Wijdeven, R.H.M.

Title: Novel regulators of endosome dynamics, MHCII antigen presentation and chemosensitivity

Issue Date: 2017-11-29

Nederlandse Samenvatting

Het lichaam is opgebouwd uit ongeveer 22.000 verschillende eiwitten, elk met een andere functie, zoals hemoglobine voor het transport van zuurstof, tubuline eiwitten die het skelet van de cel vormen en lichtreceptoren waarmee we kunnen zien. Van ongeveer een kwart hebben we nog geen idee wat ze doen, en van de rest vaak maar een van de vele functies, welke we vaak niet begrijpen in de context van de andere eiwitten in de cel. Het uitzoeken van nieuwe functies voor (onbekende) eiwitten kan belangrijke inzichten geven in hoe processen gereguleerd worden, omdat een nieuw eiwit vaak een functie blijkt te hebben die vooraf moeilijk te voorspellen is. Deze manier van onderzoek heeft bijvoorbeeld geleid tot de ontdekking van het systeem waarmee eiwitten in de cel afgebroken worden (ubiquitin-proteasoom systeem), alsmede hoe cellen communiceren met hun omgeving (het endosomale systeem). De vele nieuwe technieken die de laatste jaren ontwikkeld zijn dragen enorm bij aan deze vorm van onderzoek, waarbij het genereren van empirische data voorafgaat aan het rationeel overdenken van het systeem.

Dit proefschrift bevat bevindingen van onderzoek uit drie verschillende gebieden in de biologie van cellen, te weten het endosomale systeem, antigeen presentatie en chemoresistentie tegen een kanker medicijn. Voor de meeste onderzoeken hebben we getracht nieuwe eiwitten te vinden die deze processen reguleren, met als doel het proces beter te begrijpen en aanknopingspunten te vinden voor nieuwe medicijnen of het optimaliseren van bestaande therapieën.

Nieuwe regulatoren van het endosomale systeem

In **hoofdstuk 2** beschrijven we nieuwe regulatoren van een proces genaamd autofagie, ofwel 'zichzelf opeten'. Wanneer cellen een tekort aan nutriënten hebben, kunnen ze via autofagie een deel van hun eigen eiwitten afbreken om hier nieuwe voedingsstoffen uit te halen. Verder wordt dit proces gebruikt om grote eiwitcomplexen en aggregaten af te breken, maar ook bacteriën en virussen. Gebrekkige autofagie kan leiden tot neurodegeneratieve ziektes, terwijl in veel tumoren autofagie juist overgeactiveerd wordt. Moleculair gezien wordt het gewenste substraat, zoals een aggregaat, eerst omgeven door een membraan, waarna deze gesloten wordt en als autofagosoom fuseert met late endosomen en lysosomen, hun zuurdere variant. Late endosomen en lysosomen zijn de afbraakplekken in een cel en na deze fusie wordt het autofagiesubstraat afgebroken. Deze afbraak wordt gefaciliteerd door de lage pH en de aanwezige proteases, en zorgt ervoor dat de individuele bouwstoffen vrijkomen en opnieuw gebruikt kunnen worden. Autofagie is dus een soort recycling van oud materiaal en voorkomt dat dit ophoopt in de cel, met alle schadelijke gevolgen van dien. Hoe het transport van de autofagosomen naar lysosomen werkt, en vervolgens hoe de fusie van beide organellen tot stand komt, is nog onduidelijk. Ons werk laat zien dat een eiwit genaamd ORP1L zich op late endosomen en lysosomen bevindt en de fusie met autofagosomen kan blokkeren. Wij denken dat lysosomen op deze manier inkomend materiaal kunnen blokkeren, bijvoorbeeld omdat ze al materiaal hebben om af te breken, of omdat ze een speciale functie hebben, zoals melanosomen die pigment bij zich dragen. Verder laten we zien hoe late autofa-

gosomen (nadat ze gefuseerd zijn met late endosomen) getransporteerd worden in de cel, en hoe dit transport ook gereguleerd wordt door ORP1L. Interessant genoeg blijkt dat een ander organel betrokken is bij het blokkeren van dit transport, namelijk het endoplasmatisch reticulum (ER), een cellulaire structuur dat voornamelijk betrokken is bij de synthese van nieuwe eiwitten. Op het moment dat het ER contact maakt met de autofagosomen stopt het transport en blijven ze hangen op dezelfde plek in de cel. Wij denken dat dit het uitwisselen van voedingsstoffen mogelijk maakt maar de exacte functie is nog onbekend.

Buiten het afbreken van autofagosomen (inwendig materiaal), zorgen late endosomen en lysosomen ook voor de afbraak van voedingsstoffen die opgenomen worden van buitenaf, alsook voor de afbraak van signaalreceptoren. Dit gaat via de zogenaamde endocytische route, waarbij kleine blaasjes gevormd worden vanaf de buitenkant van de cel, die hiermee de voedingsstoffen opnemen. Deze blaasjes, of endosomen, fuseren vervolgens via verschillende tussenstappen met de late endosomen en lysosomen om hun inhoud af te breken. Problemen in de endocytische route kunnen leiden tot kanker, doordat groeireceptoren niet afgebroken worden en cellen blijven groeien, maar ook tot neurodegeneratieve ziektes doordat eiwitagregaten niet goed verwijderd worden. Wanneer men kijkt naar endosomen in de cel, bevindt het overgrote deel van de verschillende endosoomtypes zich op een specifieke plek in de cel, naast de nucleus op de plek waar de microtubuli (het skelet van de cel) bij elkaar komen. Waarom en hoe de cel zo georganiseerd is, is lang onduidelijk geweest. In **hoofdstuk 3** hebben wij een nieuw eiwit gevonden, RNF26, wat de organisatie van de endosomen in deze perinucleaire regio verzorgt. RNF26 bevindt zich niet zelf op de endosomen, maar op een specifiek deel van het ER, en bindt adaptoreiwitten op verschillende endosoomtypes om ze op deze manier bij elkaar te houden. Het bij elkaar houden van deze endosoomtypes faciliteert fusie en uitwisseling, en stroomlijnt hiermee de snelle afbraak van extracellulair materiaal. Het rekruteren van de adaptoreiwitten, en hiermee de endosomen, gebeurt door middel van een klein eiwit genaamd ubiquitine, dat een soort brug vormt tussen RNF26 en de endosomen. RNF26 is een enzym dat dit eiwit op andere eiwitten kan plakken, waardoor deze -via de ubiquitine brug- adaptors van de verschillende endosomen kunnen binden. Dit maakt dat het proces dynamisch is. Wanneer het endosoom naar een andere plek in de cel gebracht moet worden dan gebeurt dit simpelweg door middel van het verwijderen van de ubiquitine brug.

In **hoofdstuk 4 en 5** hebben we getracht nieuwe functies te vinden voor de eiwitten die de ubiquitine verwijderen, de zogenaamde de-ubiquitinerende enzymen (DUBs). Van verschillende eiwitten uit deze klasse enzymen is nog niets bekend over wat ze doen, en om te kijken of deze eiwitten een rol spelen in de endocytische route hebben we ze een voor een weggehaald uit de cel en gekeken naar het effect op endosomen. Hiermee hebben we een nieuwe functie gevonden voor het eiwit OTUD1 in de afbraak van groeireceptoren en de positionering van endosomen. Verder hebben we gevonden dat USP54 -in tegenstelling tot voorspellingen- wel katalytische activiteit vertoont en dat dit eiwit specifiek lokaliseert naar endosomen en plekken waar cellen contact met elkaar maken, in zogenaamde tight junctions. Deze junctions zijn onder andere belangrijk in de darmen, waar ze onderdeel zijn van de barrière tussen de inhoud van de darm en het lichaam, en in de nieren, waar ze helpen bij het

filteren van het bloed. In cellen zien we dat USP54 belangrijk is voor het vormen van deze junctions en het is interessant om te kijken of dit ook in organismen zo is. Hoe USP54 dit exact doet zijn we nog aan het bestuderen.

Factoren die de expressie van MHCII beïnvloeden

Tijdens een infectie moet het immuunsysteem geactiveerd worden om de indringers (virussen, bacteriën etc.) te bestrijden. Activatie van het adaptieve deel van het immuunsysteem zorgt voor een reactie specifiek tegen een virus of bacterie en verloopt via zogenaamde major-histocompatibility complex (MHC) moleculen, die ook voor transplantatie afstoting verantwoordelijk zijn. Deze eiwitten presenteren kleine stukjes eiwit (peptiden) op de oppervlakte van de cel en de T-cellen scannen deze MHC-peptide complexen om te kijken of er verdachte (lichaamsvreemde) peptiden op zitten, wat duidt op een infectie of kanker. MHCI moleculen presenteren voornamelijk peptiden vanuit de binnenkant van de cel, terwijl MHCII eiwitten die opgenomen zijn uit de omgeving aan zich bindt, al kunnen MHCII moleculen ook eiwitten binden die via het eerder genoemde autofagie-proces in het lysosoom terecht zijn gekomen. De expressie van MHCII komt voornamelijk voor in gespecialiseerde afweercellen, maar stimulatie met cytokines (signaalstoffen) zoals Interferon-gamma (IFN γ) kan ook zorgen voor MHCII expressie op andere celtypes. Dit laatste is interessant omdat deze MHCII expressie bijdraagt aan transplantatie afstoting en autoimmunitet. Verder kunnen tumoren (die gemuteerde eiwitten hebben en dus andere peptiden bezitten) herkend kunnen worden als lichaamsvreemd door de T-cellen, waarna de T-cellen de tumor aanvallen. Dit is de basis voor immunotherapie. Hoewel veel onderzoek gedaan wordt naar MHCI, is voor een goede afweerreactie zowel MHCI als MHCII herkenning noodzakelijk. Het vinden van nieuwe eiwitten of stoffen die IFN γ -gemedieerde MHCII expressie reguleren zou dus nieuwe aanknopingspunten op kunnen leveren voor het voorspellen of beïnvloeden van de afweerrespons. In **hoofdstuk 7** beschrijven we twee eiwitten die betrokken zijn bij IFN γ -gemedieerde MHCII expressie in niet-immuun cellen, te weten Keap1 en p62. Om MHCII te produceren moet het DNA opgemaakt worden en dit gebeurt door verschillende modificaties, waaronder acetylactie van de histonen. Zowel Keap1 als p62 reguleren de transcriptie (productie) van MHCII via de acetylactie van histonen en het blokkeren van deacetylases zorgt ervoor dat Keap1 en p62 niet meer nodig zijn. Verder hebben we gevonden dat arsenicum, wat in veel landen in het drinkwater voorkomt, ook zorgt voor verminderde histon acetylactie en hiermee IFN γ -gemedieerde MHCII expressie. Interessant genoeg is al bekend dat arsenicum kan helpen om transplantatie afstoting tegen te gaan, wat dus potentieel verloopt via deze route. Ook is er een medicijn dat onder andere aangrijpt op Keap1, dimethyl fumarate, dat IFN γ -gemedieerde MHCII expressie blokkeert. Dit gaat echter onafhankelijk van Keap1, via een mechanisme dat we nog niet helemaal begrijpen. Dit medicijn wordt gebruikt voor het behandelen van de auto-immuunziekten multiple sclerose en psoriasis, en dit hoofdstuk laat een deel van het mechanisme zien dat dit zou kunnen verklaren.

Resistentie tegen chemotherapeuticum doxorubicine

Een van de belangrijkste redenen waarom niet alle patiënten reageren op chemo-

therapie is omdat de tumor ongevoelig wordt voor de chemo. In **hoofdstuk 8 en 9** beschrijven we enkele factoren die verantwoordelijk kunnen zijn voor verminderde gevoeligheid voor de chemotherapeutische medicijnen etoposide en doxorubicine. Deze medicijnen grijpen aan op het eiwit topoisomerase II, welke breuken maakt in het DNA om te voorkomen dat het DNA in de knoop komt te zitten, en zorgen hiermee voor DNA schade in de cel, wat leidt tot celdood. Vooral doxorubicine is een veelgebruikt medicijn en is heel effectief, maar heeft ook sterke bijwerkingen. Door middel van een mutagenese-screen waarbij een virus zich in een gen inbouwt en deze hiermee uitschakelt hebben we nieuwe eiwitten gevonden die betrokken zijn bij resistentie tegen topoisomerase II inhibitors. Een van deze factoren is het SWI/SNF chromatine remodeling complex. Van dit complex is bekend dat het betrokken is bij het binden van topoisomerase II aan het DNA. Het missen van een van de onderdelen van SWI/SNF leidt tot verminderde gevoeligheid van de tumor voor doxorubicine. Dit complex is gemuteerd in verschillende tumoren en van sommige van deze tumoren was al bekend dat ze heel ongevoelig waren voor doxorubicine. Verder zien we dat borsttumoren met een lage expressie van een van de subunits van SWI/SNF slechter reageren op doxorubicine. Het is dus interessant om verder te onderzoeken of patiënten met mutaties in dit complex met een andere chemotherapy behandeld moeten worden, en dat SWI/SNF dus als een selectiemarker kan werken voor het kiezen van de juiste behandeling.