



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Manipulating endosomal systems: the molecular mechanisms of transport decisions and Salmonella-induced cancer

Bakker, J.M.

Citation

Bakker, J. M. (2019, December 12). *Manipulating endosomal systems: the molecular mechanisms of transport decisions and Salmonella-induced cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/82070>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/82070>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/82070> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Bakker, J.M.

Title: Manipulating endosomal systems: the molecular mechanisms of transport decisions and Salmonella-induced cancer

Issue Date: 2019-12-12

Nederlandse Samenvatting

Regulatie van het endosomale systeem

Het endosomaal compartiment is een zeer dynamisch en strak gecontroleerd systeem van vesicles die zich door de eukaryotische cel bewegen tussen het plasmamembraan en verscheidene organellen (**hoofdstuk 1**). Traditioneel gezien wordt dit systeem beschreven als een mechanisme dat een verscheidenheid aan te transporteren moleculen opneemt van het celoppervlak in blaasjes genaamd endosomen en ze naar binnen dirigeert om ze vervolgens af te breken in het zure proteolytische milieu van het lysosomale compartiment. Onder deze ladingen bevindt zich een verscheidenheid aan moleculen variërend van geactiveerde oppervlakte-receptoren en biomoleculen tot nutriënten die cruciaal zijn voor het overleven van de cel. Na opname zorgt een complexe en gebalanceerde combinatie van moleculaire regelsystemen betrokken bij transport, fusie en segregatie en het leggen van contacten tussen verschillende organellen ervoor dat de levensduur van opgenomen ladingen sterk gereguleerd wordt.

Hoewel de meeste cellen in het lichaam afhankelijk zijn van het endosomale systeem voor een gezonde homeostase zijn er celtypes die hetzelfde systeem kunnen gebruiken voor meer specifieke doeleinden. Antigeen presenterende cellen bijvoorbeeld gebruiken endocytose om ziekteverwekkers op te nemen en af te breken, waarna het antigeen in contact worden gebracht met antigeen presenterende receptoren als MHC (*Major Histocompatibility Complex*) moleculen. Na binding aan deze receptoren zal het complex vervolgens naar het plasmamembraan gebracht worden alwaar het antigeen aan het immuunsysteem gepresenteerd kan worden om zo een immunreactie op gang te brengen. Door de aanwezigheid van een uitgekende voorraad aan antigeen receptoren zijn deze gespecialiseerde immuun cellen in staat om snel op infecties door verscheidene ziekteverwekkers te reageren.

Voor eukaryotische cellen is communicatie tussen cellen van essentieel belang om te functioneren als een organisme. Hoe deze communicatie ontvangen wordt hangt voor een groot deel af van de functie van het endosomaal systeem. Gedurende processen als groei en ontwikkeling, weefselschade, maar ook tijdens het opstarten van een immunreactie wordt de deling en differentiatie van cellen aangestuurd door signaal moleculen. Deze zijn afkomstig van de cel zelf (autocrien), naastgelegen cellen (paracrien) of, in het geval van hormonale regulering, over langere afstand binnen een organisme (endocrien). Door middel van deze moleculen is het lichaam in staat zich aan te passen aan veranderende omstandigheden. Om deze signalen op te vangen brengen cellen receptoren tot expressie op het oppervlak van de cel. Wanneer specifieke liganden hieraan binden ontstaat er een cascade van activatie van signaal eiwitten in de cel die uiteindelijk resulteert in biologische processen als celdeling en differentiatie, migratie en mogelijk zelfs gereguleerde celdood.

Receptoren bewegen zich vaak heen en weer tussen het oppervlak van de cel en de endosomen in de cel. Door de positionering streng te reguleren is de cel in staat om de hoeveelheden aanwezigheid van de receptoren op het oppervlak te controleren. Daarnaast kan een cel door de opname van receptoren en uiteindelijke afbraak in het

lysosomale compartiment de duur en intensiteit van de ontvangen signalering mede bepalen. Hierdoor kan een inkomend signaal adequaat geïnterpreteerd worden, alsmede voorkomen worden dat een over-activatie van het systeem zal leiden tot een afwijking van de cellulaire homeostase. Dat laatste kan verregaande consequenties hebben zoals duidelijk wordt gemaakt door de vele ziektes, waaronder kanker, die geassocieerd zijn met een verstoorde endocytose.

Een van de meest uitgebreid beschreven voorbeelden van een signaal receptor die zich laat reguleren door het endosomale systeem is de EGF (*Epidermal Growth Factor*) Receptor (EGFR) (**hoofdstuk 2**). Deze *Receptor Tyrosine Kinase* (RTK) wordt geactiveerd door zijn ligand EGF en de hieropvolgende opname en verhandeling in de cel is uitgebreid als voorbeeld gebruikt om het endosomale systeem te bestuderen. Na binding van ligand zorgt dimerisatie van receptoren voor kruislingse phosphorylatie op de intracellulaire domeinen. Deze geactiveerde domeinen van EGFR functioneren als adapter voor allerlei moleculen die onderdeel uitmaken van de signaal cascades in de cel. Uiteindelijk zullen deze signaal processen de biologische uitkomst van receptor activatie bepalen.

Naast het rekruteren van signaal moleculen worden ook de eerste componenten die betrokken zijn bij de opname van EGFR naar de gefosforyleerde domeinen gerekruteerd. Hiermee reguleert EGFR zijn eigen opname in de cel en zijn uiteindelijke afbraak in de lysosomen. Daarnaast kan de cel ook besluiten opgenomen EGFR weer terug naar het membraan te recyclen. Om de balans tussen al deze processen te waarborgen heeft de cel een groot aantal mechanismen ontwikkeld om zijn reactie op signalering, maar ook de opname van belangrijke stoffen van buiten de cel, tot in detail af te stemmen. Een aantal van deze systemen worden uitgebreid behandeld in dit proefschrift.

Zoals beschreven in **hoofdstuk 1 en 2** zijn er vele processen afhankelijk van het endosomaal systeem. Een grote rol is hierin weggelegd voor het laat endosomale (LE) compartiment. LE's ontvangen hun lading vanuit het vroege stadium van endocytose (EE's) en bepalen vervolgens welke moleculen in aanmerking komen voor degradatie. Dit proces is echter niet lineair, zoals duidelijk wordt uit de vele mogelijkheden voor de cel om materiaal uit het endosomale systeem weer terug te sturen richting het plasmamembraan. De meeste van deze recycling vindt plaats gedurende de vroegste stadia van endocytose, maar ook vanuit LE's is dit mogelijk. Om dit te laten plaatsvinden moeten specifieke membraan-geassocieerde moleculaire complexen van het LE verwijderd worden en vervangen voor nieuwe regulatiesystemen die deze recycling kunnen aansturen. In **hoofdstuk 3** wordt het moleculaire mechanisme achter zo'n verwisseling en wat de fysiologische consequenties hiervan zijn uitgebreid besproken.

Endosomale membranen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van GTPase eiwitten. Deze functioneren als moleculaire, schakelbare adapter-moleculen voor transport complexen. Het bestaan van LE's wordt voornamelijk gereguleerd door de GTPase Rab7. Door binding aan zijn effector molecuul RILP (*Rab-interacting*

lysosomal protein) rekruteert Rab7 het motor eiwit dynein naar het endosomale membraan. Deze motor transporteert LE's over het cytoskelet in de richting van de nucleus. In een tegenovergesteld mechanisme kan Rab7 via FYCO1 (*FYVE and coiled-coil domain-containing protein1*) ook het motor eiwit kinesin-1 rekruteren. Deze transporteert zijn LE's weg van de nucleus richting het celmembraan.

Zoals is te lezen in **hoofdstuk 3** wordt deze laatste route gebruikt door onder andere MHC-klasse II moleculen en is deze ook toegankelijk voor EGFR. Specifieke lading kan echter ook via een ander mechanisme uit de Rab7 gemarkeerde populatie LE's gehaald worden en via een nieuwe, Arl8b gemarkeerde, populatie endosomen gerecycled worden. Deze GTPase kan via zijn adapter molecuul SKIP (*SifA and Kinesin-interacting Protein*) ook het motor eiwit kinesin-1 binden om zo endosomen richting de periferie te transporteren. Om de scheiding tussen beide LE-compartimenten compleet te maken is het niet enkel nodig voor Arl8b om te binden, maar moet ook Rab7 verwijderd worden voor een volledige GTPase wisseling. Zoals beschreven in hoofdstuk 3 is Arl8b in samenwerking met SKIP en het HOPS complex in staat het GAP (*GTPase activating Protein*) eiwit TBC1D15 (ook bekend als Rab7GAP) te binden. Dit eiwit is vervolgens in staat Rab7 te inactiveren, waardoor het los laat van het membraan en Arl8b als enige GTPase overlaat. Wanneer het complex niet in staat is TBC1D15 te rekruteren zal geen succesvolle scheiding plaatsvinden en zal de cel niet in staat zijn lading in het LE compartiment correct te recyclen. Welke ladingen het precies betreft en hoe deze specifiek worden geselecteerd voor Arl8b transport is niet volledig duidelijk en zou onderwerp moeten zijn voor toekomstig onderzoek.

Salmonella en oncogenese

Na opname in het endosomale systeem is *Salmonella* in staat om mechanismen in de gastheercel zo te manipuleren dat het zijn eigen overleving kan bevorderen. Door de afgifte van het effector molecuul SifA kan *Salmonella* het eerder beschreven transport complex bestaande uit Arl8b-SKIP-kinesin-1 naar het membraan van het endosoom dat zijn niche vormt halen. Hierdoor ontstaat de vorming van tubulaire structuren waar *Salmonella* zich kan onttrekken van regulatie van het LE systeem en de daaraan gekoppelde afbraak in lysosomen. Daarnaast voorkomt *Salmonella* het rekruteren van AS160, een eiwit dat Rab14 kan verwijderen van het LE membraan. Deze stap is cruciaal in de verdere ontwikkeling richting lysosomen en daarmee voorkomt *salmonella* zijn eigen degradatie. Samengenomen verschaft *Salmonella* een van de vele voorbeelden van manipulatie van de gastheer door pathogenen met als doel de handhaving van zijn niche. Sommige van deze pathogenen, en de uitwerking die bijbehorende infecties kunnen hebben op de gastheer zijn beschreven in **hoofdstuk 4**. Hieronder bevinden zich naast opname in- en degradatie door het endosomale systeem ook voorbeelden van manipulatie van het ubiquitin systeem van de gastheer, effecten op de respons op ontstekingen en het presenteren van antigeen door het immuunsysteem. In al deze gevallen dient deze manipulatie tot één doel: het bevorderen van de eigen leefomgeving door het pathogeen. In **hoofdstukken 5 en 6** wordt dieper in gegaan op de mechanismes en consequenties van door *Salmonella*

geïnduceerde manipulatie waarbij cellen met een genetische predispositie tot kankercellen kunnen verworden.

Infecties met *Salmonella Typhi* (*S. Typhi*), welke regelmatig voorkomen in landen zoals India, resulteren in een 9 keer hoger risico op galblaaskanker. Patiënten data laat de galblaas zien als de plek waar chronische *S. Typhi* infectie plaats vindt in combinatie met verhoogde p53 en MYC-oncogen expressie. Tot heden werd de relatie tussen kanker en bacterie- of virusinfecties vooral beschouwd als indirect en waarschijnlijk een gevolg van langdurige ontstekingsreacties. **Hoofdstukken 5 en 6** laten met gebruik van *Salmonella Typhimurium* (vanaf hier *Salmonella* genoemd) zien dat door middel van afgifte van effector moleculen *Salmonella* signaaltransductie in cellen aanzet die, in combinatie met pre-mutaties, kan leiden tot transformatie in een *in vitro* experimentele setting. Hierbij spelen met name activatie van Akt en MAPK-signalering een belangrijke rol. Daarnaast laat het gebruik van *in vitro* gekweekte galblaas organoiden de door *Salmonella* geïnduceerde transformatie zien in zijn natuurlijke orgaan-niche. Hierbij valt op te merken dat in zo'n experimentele setting het immuunsysteem volledig afwezig is, waarmee aan kan worden getoond dat het directe effect op transformatie niet noodzakelijk door ontsteking veroorzaakt wordt. Vervolgens zijn muizen met een genetische predispositie gebruikt om *in vivo* het ontstaan van kanker onder invloed van *Salmonella* infectie verder te bewijzen.

In vitro experimenten waarbij *Salmonella* door middel van antibiotica verwijderd wordt na transformatie laten een blijvend effect zien op groei van getransformeerde cellen, wat duidt op genetische inprenting. Ondanks pogingen 'deep sequencing' data-analyses te doen naar genetische afwijkingen zoals puntmutaties in met *Salmonella* geïnfecteerde cellen zijn we niet in staat geweest het mechanisme achter deze inprenting te ontcijferen. Analyses uit epigenetische studies lijken erop te duiden dat na infectie de constante aanwezigheid van *Salmonella* niet vereist is voor het ontstaan van kanker. Het achterhalen van de werking van deze genetische inprenting is daarom erg belangrijk om meer te begrijpen van de directe rol van *Salmonella* in het veroorzaken van kanker.

Concluderend beschrijft dit proefschrift meerdere aspecten van manipulatie van het endosomaal systeem. Het eerste deel legt daarbij de focus op hoe de cel zichzelf in staat brengt om de opname en het transport van verschillende eiwitten in endosomen te reguleren. Hierbij dient EGFR als een voorbeeldmolecuul om de verschillende fases van het endosomaal transport te volgen. Daarnaast verschaft dit proefschrift een verder inzicht in het omschakelen van endosomale identiteit tijdens recycling, waarbij een nieuw gerekruteerd transport complex het vorige verwijderd om zo een efficiënte afscheiding van het voormalige compartiment te bewerkstelligen.

Het tweede deel van het proefschrift beschrijft hoe pathogenen misbruik kunnen maken van de systemen die door de gastheercel gebruikt worden, waaronder het endosomale systeem. Die hierbij gebruikte methoden kunnen in sommige gevallen zware consequenties hebben voor de gastheer, zoals blijkt uit de actieve rol die *Salmonella* kan spelen bij het induceren van transformatie.