Universiteit Leiden
The Netherlands

Studies on Intracellular Logistics

Spits, M.

Citation
Spits, M. (2021, September 8). *Studies on Intracellular Logistics*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3209250

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/1887/3209250

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

Cover Page

Universiteit Leiden

Leiden University Repository

The handle https://hdl.handle.net/1887/3209250 holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Spits, M.
Title: Studies on Intracellular Logistics
Issue Date: 2021-09-08

Nederlandse Samenvatting en Discussie

De definitie van logistiek leest als volgt: De gedetailleerde organisatie en implementatie van een complexe operatie. Dit is niet alleen maar waar voor het vliegveld Schiphol of de haven van Rotterdam, maar ook voor complexere systemen zoals het functioneren van een cel. In zulke systemen kunnen twee activiteiten die niet lijken samen te hangen in feite van levensbelang zijn voor elkaar. Het onderzoek dat is gepresenteerd in Studies in Cellulaire Logistiek bevat ook voorbeelden van systemen die voorheen niet met elkaar te maken leken te hebben wel degelijk op elkaar van invloed zijn. Hoofdstuk Twee laat zien hoe de laatste stap in mitose, de reconstructie van de nucleaire envelop (NE), ook van belang is voor het herstellen van de balans tussen oplosbare eiwitten tussen de nucleus en het cytoplasma. Dit was bereikt door het herkenbaar maken van het nucleaire membraan middels het gebruik van fluorescente eiwitten en het DNA. Dit stelde ons in staat om deze structuren in de cellen gedurende mitose te volgen. Veranderingen in de locatie van eiwitten konden hierdoor gekwantificeerd worden. De gepresenteerde data in hoofdstuk vier heeft betrekking op de relatie tussen de structuur en mobiliteit van het endoplasmatisch reticulum (ER) en de mobiliteit van late endosomale/lysosomale populaties. Deze twee processen werden voorheen als twee separate processen beschouwd. Hier laten wij zien dat deze twee processen wel degelijk met elkaar te maken hebben. Tijdens observaties van de beweging van een late endosoom/lysosoom door een cel, is opgemerkt dat deze vergezeld kan worden door een ER tubule. Als gevolg hiervan observeerden wij dat dit kan leiden tot de generatie van nieuwe kruispunten in het ER-netwerk. Ten slotte bespreekt Hoofdstuk vijf de ontdekking van een nieuw eiwit dat betrokken is bij interacties tussen het ER en late endosoom en tussen het ER en de Golgi Apparatus. Wij zagen dat deze interacties een groot effect hebben op de formatie van eiwit ophopingen die van belang zijn voor de pathologie van de ziekte van Parkinson. Hoofdstuk een zal de therapeutische mogelijkheden van de proteasoom als doelwit voor het behandelen van niet-kleincellige longkanker bespreken. In Hoofdstuk drie zal de reis die epidermaal groei factor (EGF) en epidermaal groeifactor receptor (EGFR) ondernemen worden samengevat. Hierin zijn de epische processen die dit duo in tijd en ruimte onderneemt worden besproken en het effect hiervan op verschillende cellulaire activiteiten.

Het herstellen van de distributie van oplosbare eiwitten gedurende mitose

Wanneer een cel mitose ondergaat, zal het genetisch materiaal worden gekopieerd en worden verdeeld over twee dochtercellen. Om dit te bewerkstelligen, zal de cel grote veranderingen moeten ondergaan. Een belangrijke stap in mitose is dat de NE, die om het DNA zit, gefragmenteerd wordt en weer wordt opgebouwd wanneer mitose voltooid is. Dit is van groot belang omdat het NE normaal gesproken een belangrijke rol vervult in het onderhouden van de dichotomie van de nucleus en het cytoplasma. Dit wordt bereikt door dat de nucleaire porie complex (NPC) in de NE ervoor zorgt dat er alleen eiwitten van een specifiek formaat doorheen kunnen. Daarnaast kunnen er alleen eiwitten doorheen die een bepaalde korte peptide sequentie bevatten genaamd nucleair lokalisatie signaal (NLS). Dit signaal wordt herkend door de NPC en verschaft toegang tot de nucleus. Dit systeem zorgt voor de compartimentering van de nucleus en het cytoplasma. Wanneer deze barrière verdwijnt ten behoeve van mitose, zal de inhoud van beide compartimenten homogeniseren. Wanneer mitose is voltooid zal de NE weer worden hersteld in de nieuwe dochtercellen en zal het genetische materiaal zich gaan uitzetten. Dit riep de volgende vraag op: hoe faciliteert de nieuwe dochtercel het herstel van de distributie van de oplosbare eiwitten van ieder compartiment? De reformatie van het NE zou gemakkelijk kunnen leiden tot de incorrecte distributie van eiwitten die de NE normaliter waarborgt. Hierdoor is het aannemelijk dat er een mechanisme bestaat dat de correcte distributie van eiwitten tussen de nucleus en het cytoplasma begeleidt. Wij lieten zien dat wanneer de NE is afgebroken, het genetisch materiaal zo dicht is ingepakt, dat er bijna geen eiwitten tussen kunnen komen. Dit geldt voor zowel de nucleaire eiwitten als cytoplasmatische eiwitten. Wanneer de NE zich weer vormde om het genetische materiaal, zal de nieuwgevormde nucleus zich weer expanderen. Dit had als consequentie dat bijna alle eiwitten buiten de nieuwe nucleus werden gesloten. Wanneer de expansie begon werd binnen een tijdsbestek van vijf minuten de distributie weer hersteld middels de specifieke import eigenschappen van de NPCs of middels vrije diffusie. Door cellen te behandeld met de stof Analinoquinazoline 15 (Q15), werd de condensatie van het genetische materiaal worden geremd. Dit kwam doordat het stofje met de eiwit hGAP-G2 (een onderdeel van het Condensin II complex) interacteerde. Dit eiwitcomplex is medeverantwoordelijk voor het condenseren van het genetisch materiaal. Ondanks de remmende eigenschappen van de Q15 behandeling, ondergaan veel cellen alsnog mitose. Dit zorgt er echter voor dat het genetisch

materiaal minder gecondenseerd is. Hier observeerden wij eiwitten in de nucleus die normaliter in het cytoplasma horen. Dit suggereerde dat de staat van genetische condensatie de exclusie van eiwitten dicteerde in delende cellen. Dit riep de volgende vraag op: Hoe zou een cel dit probleem oplossen als het een groot eiwit in beide compartimenten bevindt. Hiervoor keken wij naar het 20S proteasoom. Dit is een groot eiwitcomplex van ±750 kDa dat is betrokken bij de afbraak van overbodige of niet functioneerden eiwitten. Door het formaat kan het proteasoom niet vrij diffunderen naar de nucleus. Dit zou kunnen betekenen dat er wellicht twee varianten zijn de van het proteasoom of dat cellen geen proteasoom bevatten vlak na de celdeling. Echter, wanneer wij de locatie van het proteasoom volgden gedurende mitose observeerden wij dat het proteasoom rap de kern in werd geïmporteerd wanneer de nucleus weer gevormd werd. Deze import leek in een kortere tijd te gebeuren dan vrije diffusie. Deze import van het proteasoom eindigde kort na de formatie van de nieuwe nucleus. Onder stabiele condities vond er vrijwel geen import plaats van de proteasoom van het cytoplasma de nucleus in. Dit indiceerde dat er een actief import mechanisme is dat kort actief is na de formatie van een nieuwe nucleus. Het nucleaire importsysteem wordt aangedreven door een eiwit familie genaamd karyopherins. Na het uitvoeren van een screen waarbij we de expressie van elk individueel lid van de karyopherin familie reduceerden, zagen we dat de reductie van importin-5 (IPO5) ervoor zorgde dat er minder proteasoom signaal in de kern te zien was. Dit werd verder bevestigd nadat we de locatie van IPO5 volgden gedurende mitose. Hierbij observeerden wij dat IPO5, zich normaliter in het cytoplasma bevindt, maar vlak na de celdeling tijdelijk rap de kern in gaat. Dit kwam overeen met onze observaties van de nucleaire import van het 20S proteasoom. Een reductie van IPO5 expressie leidde tot een reductie van het 20S proteasoom signaal in de nucleus en een verhoging IPO5 expressie leidde tot een verhoging van het 20S proteasoom signaal in de nucleus. Ipo5 lijkt van essentieel belang te zijn bij de herverdeling van het 20S proteasoom direct na de celdeling. Deze data ondersteunt het bestaan van een nieuw import mechanisme. Een mechanisme dat voor een korte tijd actief is vlak na mitose. Het zou interessant zijn om dit mechanisme te onderzoeken voor zijn therapeutische waarde. Aangezien een verhoogde celdeling een kenmerk is van kanker en specifieke inhibitie van een dergelijk mechanisme kan leiden tot interessante therapeutische inzichten. Verstoring van de distributie van het 20S proteasoom zou letaal kunnen zijn gezien het belang hiervan bij het onderhouden van eiwit niveaus. Als een cel niet meer in staat is om transcriptie factoren in de nucleus op te ruimen,

kan dit leiden tot de dood van de cel. Dit gepaard gaande met de gelimiteerde vracht dat IPO5 importeert, maakt dit systeem tot een interessant doelwit voor verder onderzoek.

Late endosomen spelen een rol in het onderhouden van de structuur van het ER

Het ER is een organel dat door het hele cytoplasma van de cel te vinden is. Dit organel interacteert met bijna elk ander organel in de cel en heeft daarom de potentie om menig mechanisme binnen de cel te beïnvloeden. Deze mechanismes variëren van lipide synthese en distributie tot eiwittransport naar het Golgi Apparatus en zelfs de organisatie van de endosomale populaties in ruimte en tijd. De beweging van endosomen gebeurt door het rekruteren van motor eiwitten. Deze motor eiwitten zijn verantwoordelijk voor beweging in specifieke richtingen. Dit wordt bewerkstelligd door Kinesin en Dynein-Dynactin eiwitcomplexen. Wij observeerden dat wanneer een endosoom door het cytoplasma beweegt, het in staat is om een ER tubule mee te trekken. Dit fenomeen heet ER liften. Dit is een eerder geobserveerd fenomeen, echter is het nauwelijks beschreven. Om dit fenomeen te kwantificeren hebben wij een algoritme ontwikkeld dat in staat is de beweging van membranen in cijfers uit te drukken. Met dit algoritme zijn wij in staat om de invloed die de bewegende endosomen hebben op de beweging van het ER te kwantificeren. Onze data liett zien dat de ER liften een nieuwe type beweging is die los staat van eerder omschreven mechanismes, namelijk TAC gemedieerde ER beweging en ER schuiven. Wij observeerden dat het ER liften gefaciliteerd kan worden door verschillende types endosomen zoals vroege endosomen, recyclende endosomen en zelfs ER naar Golgi bewegende endosomen. Echter zagen we dat late endosomen/lysosomen in staat zijn het ER het meest te bewegen. Dit werd verder bevestigd wanneer we de late endosomen/lysosomen lieten sekwestreren. Dit werd bereikt door de cellen te verhongeren of door RILP of TMEM55B tot overexpressie te brengen in cellen. Deze manieren zorgden ervoor dat late endosomen/lysosomen rondom het microtubule organisatorisch centrum (MTOC) blijven. Niet alleen liet onze data zien dat late endosomen/lysosomen de meeste beweging genereerden, we observeerden ook dat wanneer ER liften plaatsvindt, er nieuwe ER-kruispunten door gegenereerd kunnen worden. Om dit te kwantificeren hadden wij wederom een algoritme ontwikkeld dat de hoeveelheid kruispunten uitdrukt in kruispunten per µm2 voor een bepaalde regio. Onze data liet een duidelijk reductie in ER kruispunten zien als gevolg van de hierboven genoemde experimentele condities. Deze data liet een duidelijke connectie zien tussen endosomale bewe-

ging en de complexere ER netwerkstructuur. Er zijn zeer veel interacties tussen het ER en late endosomen/lysosomen en veel van deze worden gefaciliteerd door MSP-domein bevattende eiwitten. Van deze familie van eiwitten werd voorheen gedacht dat er slechts twee leden bestonden, VAPA en VAPB. Echter heeft automatische annotatie voorspeld dat er ten minste drie andere eiwitten zijn die een MSP-domein hebben. Voor een van deze drie, MOSPD2, is aangetoond dat het vergelijkbare interactie partners heeft als VAPA. Dit zijn de eiwitten ORP1L, STARD3 en STAD3NL. Wij onderzochten of deze eiwitten de soort connecties faciliteert die ER liften mogelijk maakt. Dit werd bewerkstelligd door de expressie van VAPA, VAPB en MOSPD2 te reduceren. Onze observaties suggereerden dat het reduceren van de expressie van een of twee van deze eiwitten niet leidde tot een reductie in beweging van het ER. Echter wanneer de expressie van alle drie de eiwitten werd gereduceerd, leidde het tot een significante reductie in de beweging van het ER rondom bewegende late endosomen/lysosomen. Een vergelijkbaar effect werd waargenomen in de hoeveelheid ER kruispunten per µm2. Deze data liet zien dat de eiwitten die de connecties tussen het ER en de late endosomen/lysosomen faciliteerde ook betrokken waren bij het onderhouden van de ER netwerkstructuur via ER beweging. Verder ondersteunde deze data ook ER liften als nieuwe vorm van ER beweging. Samengevat, liet deze data zien dat late endosomen/lysosomen invloed kunnen uitoefenen op het ER. Dit liet een dynamische uitwisseling en evenwicht zien tussen de twee compartimenten. Een voorbeeld van het nut van symbiose kan zijn om toegang te krijgen tot de grote voorraden van Calcium die in het ER is opgeslagen. Deze voorraden kunnen nodig zijn voor de formatie van cellulaire protrusies en het produceren van neurieten. In dit voorbeeld zien we vaak dat late endosomen/lysosomen naar locaties worden gestuurd voorafgaand aan neuriet formatie. Er wordt gedacht dat de endosomen membraan leveren dat nodig is voor de neuriet, echter om dit te faciliteren is er ook calcium nodig. ER liften zou hier een oplossing voor kunnen zijn. Naar aanleiding van de data wordt in hoofdstuk vier omschreven dat ER liften een belangrijke rol speelt in ER beweging en ER structuur onderhoudt.

MOSPD2 is een MSP-domein bevattend eiwit dat betrokken is in het transport van Ceramiden van het ER naar de cis-Golgi op een non-vesiculaire manier.

Zoals Hoofdstuk vier eerder omschreef zijn membraan contact sites (MCS) door de hele cel heen te vinden. Ze bevinden zich tussen de verschillende organellen en ze verzorgen veel verschillende functies.

Veel van deze MCSs bevinden zich tussen het endosomale compartiment en het ER. Het ER eiwit Protrudin en het ER eiwit VAPA interacteren bijvoorbeeld samen met het late endosomale eiwit FYCO om beweging te faciliteren naar het plus einde van microtubuli en faciliteren protrusie groei. Op een vergelijkbare manier interacteert VAPA met ORP1L en RILP om beweging naar de minus kant van de microtubuli te bewegen en ook de cholesterolniveaus in endosomen te handhaven. ORP1l heeft meerdere conformaties afhankelijk van de aanwezigheid van cholesterol in late endosomen. Een van deze conformaties verzorgt contact tussen het ER en late endosomen via VAPA en gebeurt onder lage cholesterol condities. Deze conformatie kan artificieel worden gerepliceerd door de overexpressie te faciliteren van een verkorte variant van ORP1L, ORP1LΔORD. Dit resulteerde in een verhoging van MCSs tussen late endosomen en het ER. Door dit fenotype te combineren met een vorm van afstand afhankelijke ligatie co-precipitatie methode genaamd BioID, konden wij een lijst genereren van eiwittien die in MCSs gevonden kunnen worden. Een van deze eiwitten deelt veel eigenschappen met het eerdergenoemde VAPA. Dit eiwit was MOSPD2 en heeft naast een transmembraan domein en een MSP-domein ook een CRAL/TRIO-domein. Onze data liet zien dat MOSPD2 in het ER is gehuisvest en kan interacteren met ORP1L op een FFAT-MSP afhankelijke manier. Het CRAL/TRIO-domein is eerder beschreven en interacteert met kleine lipofiele moleculen. Dit suggereerde dat MOSPD2 additionele functies zou kunnen hebben, analoog aan OPR1L dat cholesterol transporteert. Vervolgens, reduceerden we de expressie van MOSPD2 door het gebruik van siRNAs en hebben de cellen geanalyseerd voor lipides. Vanwege de overeenkomsten tussen de leden van de MSP-domein familie (VAPA, VAPB, MOSDP1 en MOSPD3) en hun capaciteit om te dimeriseren, hebben de overige leden hun expressie eveneens gereduceerd. Lipide analyse liet zien dat er een reductie was in Glucosylceramides en een verhoging in zijn voorganger, Ceramide, in cellen waarbij MOSDP2 was gereduceerd. Die suggereerde dat MOSPD2 betrokken was bij of de synthese of transport van Ceramide van de ER naar de cis-Golgi. Dit werd bevestigd door de conversie van ceramide naar glucosylceramide te onderzoeken met behulp van dunnelaagchromatografie (TLC). Door de cellen te scheuren konden we condities creëren waarbij vesiculair transport van ceramides niet meer mogelijk was. Deze cellen waren alvorens behandeld met siRNAs om de expressie van MOSPD2 te reduceren. Onder deze omstandigheden zagen wij nog steeds een significante reductie in Ceramide naar Glucosylceramide conversie. Vervolgens hadden wij de hoeveelheid MOSPD2 in cellen gereduceerd en daarna behandeld met BFA. Deze stof zorgde voor de

fusie van de Golgi Apparatus en het ER, wat op zijn beurt de noodzaak wegnam om ceramides van het ER naar de cis-Golgi te transporteren. Dit omdat het eiwit dat de conversie faciliteert, UDP-glucose ceramide glucosyltransferase (UGCG), op het cis-Golgi zit. Analyse van de TLC-data liet ons zien dat er geen invloed meer was op de conversie van ceramide naar glucosylceramide. Deze data ondersteunde de hypothese dat MOSPD2 betrokken was bij het transport van ceramides tussen het ER en het cis-Golgi. Vervolgens hebben we onderzocht of MOSPD2 met UGCG kan interacteren om het transport te faciliteren. Dit liet zien dat MOSPD2 en UGCG inderdaad met elkaar een interactie aan gaan op een non-FFAT-MSP afhankelijke manier. Dit werd verder bevestigd toen we keken naar de interactie met mutanten van UGCG. Hierbij zagen we verhoogde interactie tussen MOSPD2 en UGCGD92A. Dit effect werd verder vergroot door de combinatie met MOSPD2ΔCRALTRIO en UGCGD92A. Dit werd verder onderbouwd door de duidelijke re-lokalisatie van MOSPD2 naar het Golgi Apparatus, waar UGCG te vinden is. Vervolgens onderzochten we de interactie in vitro en zagen we dat de interactie afhankelijk was van de grondstoffen die nodig zijn om van ceramide glucosylceramide te maken. Dit suggereerde een functionele interactie tussen de twee eiwitten. Om MOSPD2 verder te karakteriseren hebben we gekeken naar de eventuele fysiologische rol in ziektes. Aangezien Glucosylceramides betrokken zijn bij verschillende lysosomale opslag aandoeningen, besloten we de rol van MOSPD2 in alpha-synuclein aggregaten te onderzoeken. In onlangs gepubliceerd werk lieten onderzoekers zien dat een verstoring in de balans van ceramides en Glucosylceramides een rol kan spelen in het veroorzaken van alpha-synuclein aggregaten. Deze aggregaten zijn kenmerkend voor de pathologie van de ziekte van Parkinson. Wij hebben geobserveerd dat wanneer MOSPD2 tot overexpressie werd gebracht dit leidde tot een verhoging van cellen die alpha-synuclein aggregaten bevatten. Eveneens zagen we dat wanneer MOSPD2 expressie werd gereduceerd, dit leidde tot een reductie in aantal cellen die de alpha-synuclein aggregaten bevatten. Het fenotype werd tegengehouden door de cellen te behandelen met de UGCG-remmer D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropanol (PDMP). Deze data liet zien dat MOSPD2 nauw betrokken is bij de glucosylceramide synthese. Echter zijn er additionele experimenten nodig om de rol van MOSPD2 in de ziekte van Parkinson aan te tonen. Echter is MOSPD2 slechts een van de manieren die cellen gebruiken om ceramide te transporteren. Dit maakt MOSPD2 een interessant doelwit omdat dit mogelijk maar een deel van de synthese kan platleggen in plaats van de complete synthese. Daarnaast lijkt het CRAL/TRIO-domein een geschikte kandidaat

om te beïnvloeden.