

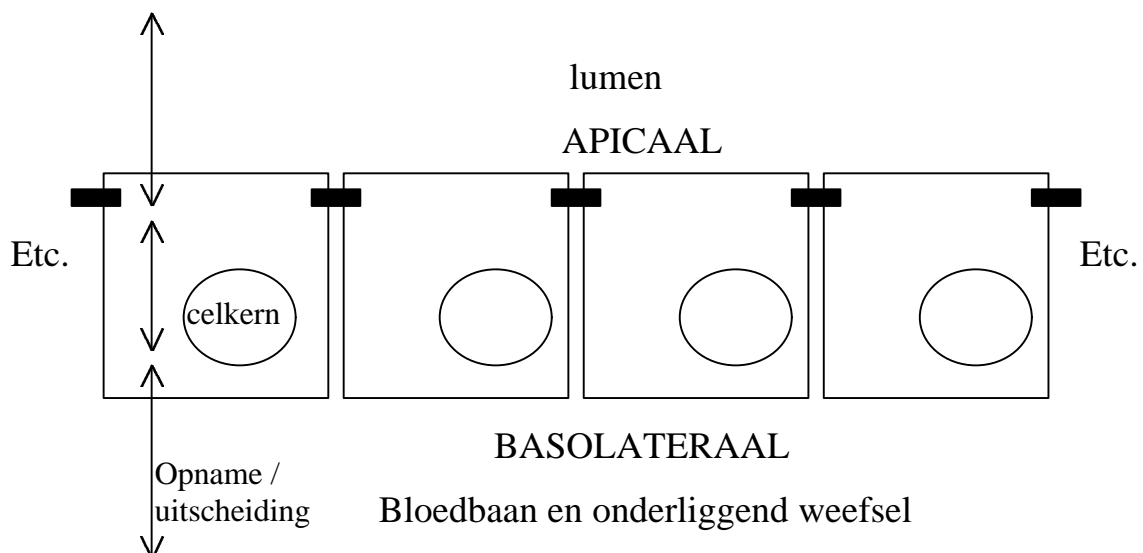
NEDERLANDSE SAMENVATTING

Transport en sortering van sfgolipiden in gepolariseerde cellen en de rol van sub-apicale compartimenten

Gepolariseerde cellen

Van de ongeveer 160 belangrijkste celtypen tot dusver geïdentificeerd in het menselijk lichaam is meer dan 60% van epitheliale aard. Deze epitheelcellen vervullen een essentiële functie als selectieve barrière tussen verschillende extracellulaire milieus (figuur 1). Zo scheiden lever, darm- en nierepitheelcellen respectievelijk de gal, darminhoud en urine van de bloedbaan en onderliggend weefsel. Deze cellen dragen er dus zorg voor dat de juiste stoffen op een gereguleerde wijze in de galkanalen, darm of urinebuis uitgescheiden worden. Tegelijkertijd bepalen deze cellen de opname van moleculen uit bijvoorbeeld de darm (denk aan voedingsstoffen uit de darm) of urinebuis (denk aan water voor urineconcentratie). Om een dergelijke functie te kunnen vervullen is het celoppervlak (ook wel de plasmamembraan genoemd) dat in contact staat met dergelijke (af- en aanvoer) kanalen, wezenlijk anders van vet- en eiwitsamenstelling dan het celoppervlak dat in contact staat met het bloed of onderliggend weefsel. Wanneer de plasmamembraan (PM) van cellen is onderverdeeld in zulke verschillende domeinen spreken we van gepolariseerde cellen. De PM die in contact staat met het lumen en het bloed/ onderliggend weefsel staan benoemen we respectievelijk apicaal en basolateraal membraan (zie figuur 1). Eiwitcomplexen tussen de cellen (figuur 1, zwarte blokjes) scheiden de apicale en basolaterale domeinen en zorgen er tevens voor dat de cellen een ondoordringbare laag vormen.

Figuur 1. Gepolariseerde epitheelcellen vervullen een barrièrefunctie.



Transport en sortering van vetten en eiwitten in gepolariseerde cellen

Het tot stand brengen en behouden van de apicale en basolaterale PM samenstelling is van groot belang. Om dit te bewerkstelligen worden de vetten en eiwitten, nadat zij diep in de cel nieuw zijn aangemaakt, gesorteerd en naar de apicale ofwel de basolaterale PM domein getransporteerd. Sortering wordt bewerkstelligd door specifieke vetten en eiwitten te concentreren op een plekje op de membraan van een intracellulair sorteringscompartiment. Vervolgens kan dit specifieke plekje afsnoeren als een blaasje (zie figuur 2) en getransporteerd worden naar het celoppervlak. Welk deel van het celoppervlak dit dan zal zijn wordt bepaald door een complexe verzameling van intracellulaire machinerieën die signalen in eiwitten en/ of lipiden (geassocieerd met de betreffende plekjes) herkennen. Vetten en eiwitten die al in de PM aanwezig zijn kunnen vervolgens weer door de cel worden opgenomen via eenzelfde soort blaasjes, waarna zij zich van het ene naar het andere PM domein kunnen bewegen. De opname van moleculen vanaf de PM noemen we 'endocytose' en het (transcellulair) transport tussen de twee PM domeinen noemen we 'transcytose'. Om ondanks het vóórkomen van transcytose toch de apicale en basolaterale samenstelling te kunnen behouden moet ook tijdens dit transport actief gesorteerd worden. Een foutieve sortering ondermijnt de celpolariteit en kan resulteren in een gestoorde barrièrefunctie met alle gevolgen van dien. Zo zijn veel voorkomende ziektebeelden als kanker, cystische fibrose, 'polycystic kidney disease' en bepaalde stapelingsziekten het gevolg van verstoorde celpolariteit. Om inzicht in het ontstaan van dergelijke problemen te krijgen is gedetailleerde kennis van intracellulaire transportroutes en sorteringsmechanismen noodzakelijk.

De sfingolipiden vormen een speciale subklasse van de cellulaire vetten. Twee belangrijke sfingolipiden zijn glucosylceramide (GlcCer) en sfingomyeline (SM). GlcCer en SM zijn verrijkt aanwezig in verschillende PM domeinen van de gepolariseerde cel waar zij functies verrichten met betrekking tot bescherming van de cel en de doorgifte van signalen van de buitenkant naar de binnenkant van de cel. Niet alleen op het celoppervlak maar ook binnen de cel zijn sfingolipiden van belang, omdat zij daar een belangrijke rol lijken te spelen bij de sortering van apicale eiwitten. Wanneer bijvoorbeeld de aanmaak van sfingolipiden wordt geremd, bijvoorbeeld middels farmacologische interventie, dan kunnen een aantal eiwitten met een bekende apicale bestemming niet meer naar de apicale PM getransporteerd worden. De gangbare theorie is dat sfingolipiden de neiging hebben om heel dicht bij elkaar te gaan zitten in een membraan (zie figuur 2, rechts). Deze sfingolipiden-rijke plekjes in de membraan vormen zo een soort van eilandjes die aantrekkelijk zijn voor eiwitten met een apicale bestemming, maar niet voor eiwitten met een basolaterale bestemming. Welke soort sfingolipiden bij apicaal gericht transport het meest van belang zijn, en of er ook sfingolipiden betrokken kunnen zijn bij basolateraal gericht transport, is echter nog niet geheel duidelijk. Ook onduidelijk is hoe gepolariseerd transport van sfingolipiden gereguleerd wordt.

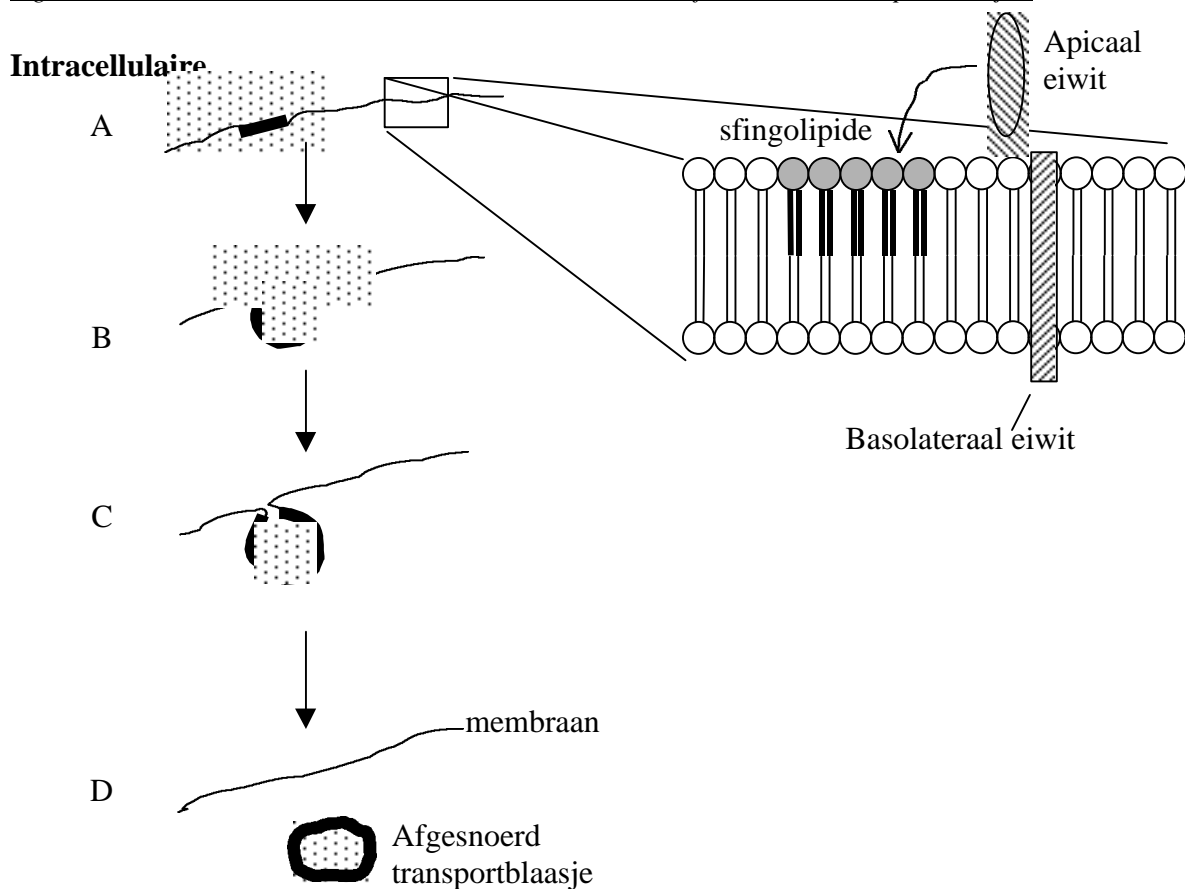
Het volgen van transport in cellen

Een goede manier om gepolariseerd transport in cellen te bestuderen is door de verschillende sfingolipiden in levende cellen te volgen. Hiertoe maken we gebruik van fluorescente lipide

analogen. Dat wil zeggen dat aan elk te bestuderen sfingolipide een fluorescente groep (NBD) vastgemaakt wordt. Er wordt als het ware een 'lampje' op gezet. Dit hebben we gedaan voor ceramide (Cer), SM, GlcCer en galactosylceramide (GalCer). Deze lipideanalogen kunnen we tussen de andere lipiden in de PM van de cellen inbouwen bij 4°C. Vervolgens starten we intracellulair transport van deze lipiden door de temperatuur te verhogen tot 37°C. Na afloop van de incubatie bekijken we de cellen onder een fluorescentiemicroscop. Door de cellen aan te stralen met licht met een specifieke golflengte, fluoresceren de lipiden en kan zo hun plaats in de cel zichtbaar worden gemaakt. Naast microscopische analyse kunnen we de fluorescente lipiden die zich in de PM bevinden extraheren, chromatografisch scheiden en de fluorescentie van elk (als maat voor de hoeveelheid) meten in een spectrofluorometer. Ook kunnen de fluorescente lipiden die zich in de PM bevinden 'onzichtbaar' gemaakt worden door de fluorescente groep 'kapot te maken' met behulp van natriumdithioniet.

Het transport van eiwitten in levende cellen kan ook bestudeerd worden. Dit hebben we gedaan voor immunoglobuline A (IgA), waaraan een fluorescerend molecuul gekoppeld werd. Dit fluorescente IgA wordt door de immunoglobuline receptor (pIgR) op het celoppervlak opgenomen en verder de cel in/ door getransporteerd. Door lipiden en eiwitten met verschillende fluorescente (rood of groen) moleculen te koppelen, kunnen we het transport van beide tegelijkertijd volgen en vergelijken.

Figuur 2. Concentratie van moleculen in de membraan en het afsnoeren van transportblaasjes.

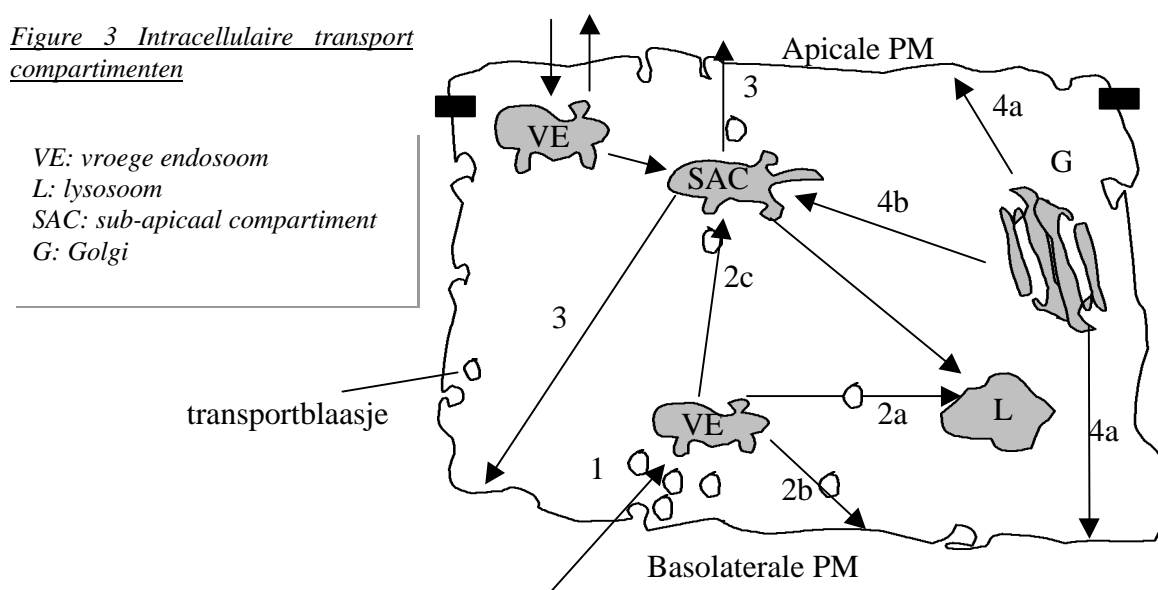


Wanneer een transportblaasje van één van de PM domeinen afsnoert (zie figuur 2), bereikt het eerst de zogenaamde vroege endosomen (figuur 3, stap 1). In deze compartimenten, die dicht langs de PM liggen, worden membraancomponenten gescheiden van de vloeibare inhoud en opgenomen stoffen (figuur 2, spikkels). De vloeibare fractie, alsmede membraancomponenten die niet langer in de cel nodig zijn, kunnen vervolgens vanaf de vroege endosomen in een afbraakroute gestuurd worden (figuur 3, stap 2a). Deze afbraakroute leidt naar lysosomen, een soort afvalverwerkingsfabriekjes in de cel. Eiwitten en lipiden die snel weer nodig zijn op het celoppervlak (bijvoorbeeld voor de opname van nieuwe stoffen) kunnen vanaf de vroege endosomen direct weer terug naar de PM (figuur 3, stap 2b). Om een dergelijke scheiding van moleculen te bewerkstelligen, vindt in de vroege endosomen sortering plaats, mogelijk via een mechanisme als hiervoor beschreven en uitgebeeld in figuur 2. Op die wijze worden andere membraancomponenten van de vroege endosomen naar de sub-apicale compartimenten (SAC) vervoerd (figuur 3, stap 2c). De SAC is een centraal station waar transportroutes uit alle richtingen samenkomen. Tevens kunnen eiwitten en lipiden van hier naar zowel de basolaterale als apicale PM getransporteerd worden (figuur 3, stap 3). Er zijn ook aanwijzingen dat de SAC in contact staat met andere intracellulaire compartimenten zoals de lysosomen en de Golgi (zie figuur 3).

De Golgi is een belangrijk sorteringsstation voor nieuw gemaakte eiwitten en lipiden. Ook hier kunnen blaasjes, verrijkt in basolateraal of apicaal bestemde moleculen, afsnoeren. De gevormde transportblaasjes kunnen vervolgens direct (figuur 4, stap 4a) of indirect via endosomen (figuur 3, stap 4b) naar het celoppervlak getransporteerd worden. Over de compartimenten die deel uit maken van de Golgi-naar-celoppervlak route, en over hun rol in sortering van apicale en basolaterale componenten is nog weinig bekend.

Samengevat kunnen we dus zeggen dat transport door een cel via een aantal stations verloopt. Op elk station worden specifieke eiwitten en lipiden in verschillende transportroutes gedirigeerd. Een dergelijke sequentiële (her)sortering biedt waarschijnlijk de nodige efficiëntie voor het in stand houden van celpolariteit.

Figure 3 Intracellulaire transport compartimenten



Wat wordt beschreven in dit proefschrift?

Het doel van onze experimenten was om inzicht te krijgen in de intracellulaire transportroutes en sortering van sfgolipiden in gepolariseerde levercellen (hepatocyten). HepG2 cellen fungeren als model systeem voor deze cellen. Er is met name gekeken naar de transcytotische route. In hoofdstuk 2 hebben we met behulp van bovengenoemde fluorescente sfgolipiden aangetoond dat er naast een basolateraal-naar-apicaal route, ook een route bestaat vanaf het apicale domein (BC) naar het basolaterale domein in HepG2 cellen. Hoewel zowel SM als GlcCer deze route kunnen volgen, blijkt dat GlcCer verrijkt aanwezig blijft in de apicale regio van de cel. Dit in tegenstelling tot SM, dat snel de apicale regio verlaat en basolateraal getransporteerd wordt. Blijkbaar worden SM and GlcCer in deze apicaal-naar-basolateraal transcytotische route gescheiden (gesorteerd). De proeven in hoofdstuk 2 suggereren dat de basolaterale plasma membraan een rol speelt bij de apicale verrijking van GlcCer. Echter, scheiding van de lipiden gebeurde ook voordat de lipiden de basolaterale membraan bereikten. We hebben kunnen uitsluiten dat dit gebeurt in de Golgi, een intracellulair compartiment dat betrokken is bij de sortering van nieuw aangemaakte eiwitten en lipiden.

In hoofdstuk 3 hebben we de apicaal-naar-basolateraal transcytotische route in meer detail onderzocht en hebben een sub-apicaal compartiment (de SAC) gekarakteriseerd wat betrokken is bij de sortering van SM en GlcCer. SM and GlcCer worden dus vanaf de apicale membraan naar de SAC getransporteerd, waar ze ophopen bij 18°C. Wanneer we daarna alle fluorescente lipiden uit de apicale en basolaterale PM extraheren, houden we dus cellen over met het overgrote deel van de lipide analoog in de SAC (zie hoofdstuk 3, figuur 4). Vervolgens wordt het transport weer gestart door de temperatuur te verhogen naar 37°C. Duidelijk is dan te zien dat SM naar de basolaterale PM gaat en GlcCer, daarentegen, naar de apicale PM. De SAC is ook bereikbaar voor fluorescent IgA dat vanaf de basolaterale membraan komt. Blijkbaar is de SAC een compartiment dat verschillende transportroutes (apicaal en basolateraal) verbindt. Dit wordt nog eens benadrukt doordat ook in de cel nieuw gemaakte sfgolipiden eerst de SAC bereiken alvorens afgeleverd te worden aan het celoppervlak (hoofdstuk 7, zie ook figuur 3 in dit hoofdstuk). Inherent aan deze centrale positie van de SAC is dat sorteringsmechanismen in de SAC aanwezig moeten zijn. Dit is aangetoond voor eiwitten en nu dus ook voor lipiden.

Extra evidentie voor de sortering van SM en GlcCer wordt gegeven in hoofdstuk 4, waarin we laten zien dat SM en GlcCer in aparte domeinen aanwezig zijn. Transport van deze SM- en GlcCer-verrijkte domeinen naar het celoppervlak wordt op verschillende wijze gereguleerd. Een interessante observatie was dat wanneer we op een artificiële wijze de intracellulaire concentratie van cAMP verhoogden, SAC-gelokaliseerd SM niet langer basolateraal maar, zoals GlcCer, apicaal getransporteerd werd. Echter, beide lipiden blijven gescheiden en bereiken de apicale PM via verschillende routes. De SAC-naar-apicale route die SM volgt vertoont gelijkenis met die van fluorescent IgA, wat suggereert dat deze transportstap deel uitmaakt van de basolateraal-naar-apicaal transcytotische route. Uit eerdere studies in ons lab bleek dat verhoging van intracellulair cAMP naast een stimulatie van apicaal gericht transport ook de aanmaak van apicale

membranen stimuleerde. Signaaltransductie via cAMP is daardoor gerelateerd aan de celpolariteit. Omdat uit experimenten bleek dat het blokkeren van de door SM gevolgde SAC-naar-apicale PM route ook de cAMP-geïnduceerde aanmaak van apicale membranen blokkeerde, is het aannemelijk dat de cAMP-gestimuleerde celpolariteit gerelateerd is aan (een) specifieke transport route(s). In hoofdstuk 5 laten we zien dat de mate van celpolariteit in een celweek sortering en tevens apicaal versus basolateraal transport vanaf de SAC via endogeen gestimuleerde cAMP-gemedieerde signaaltransductie kan beïnvloeden. Deze experimenten suggereren een fysiologische betekenis.

In hoofdstuk 6 hebben we vervolgens de transportroute die SM volgt van de SAC naar de apicale PM nader bestudeerd. Uit de resultaten blijkt dat SM, in tegenstelling tot GlcCer, niet direct van de SAC de apicale PM bereikt, maar via een tussenstation, de SIC. De SIC en de SAC zijn aparte compartimenten wat gedemonstreerd wordt door hun verschillende afhankelijkheid van celskeletaire componenten en de aanwezigheid van specifieke eiwitten. De rol van de SIC is nog niet geheel duidelijk maar op basis van onze resultaten alsmede die van andere laboratoria is het niet onwaarschijnlijk dat de SIC een subcompartiment is van de SAC en een belangrijke rol speelt bij signaalgeruleerd apicaal transport. Een dergelijke subcompartimentalisatie (SIC versus SAC) wordt ook gesuggereerd in hoofdstuk 7. Tenslotte wordt in hoofdstuk 8 uitvoerig ingegaan op de rol van sub-apicale compartimenten in intracellulair transport, gebaseerd op de bestaande literatuur.

Het werk beschreven in dit proefschrift heeft nieuwe en belangrijke inzichten gegeven in het intracellulair transport en de sortering van lipiden, met een duidelijke link naar celpolariteit. De aldus verkregen kennis vormt een belangrijke stap naar het ophelderen van moleculaire mechanismen die aan sortering en gepolariseerd transport van zowel lipiden als eiwitten ten grondslag liggen.

NAWOORD

Na vier jaar hard werken ligt het proefschrift dan eindelijk voor me. Veel mensen hebben hieraan bijgedragen, zonet door hun onmisbare hulp tijdens het onderzoek dan wel door hun bijdrage tot de zeer goede sferen waarin ik de afgelopen jaren heb mogen werken. Een aantal van deze mensen wil ik graag op deze plaats, ten overstaan van een groter publiek, bedanken. Allereerst mijn promotor Dick Hoekstra die ik zeer erkentelijk ben voor het grote vertrouwen dat hij in mij heeft gesteld en de vrijheid die ik heb gehad om naar eigen inzicht een interessante onderzoekslijn te ontwikkelen. Dick, bedankt voor je vrijwel onuitputtelijke geduld gedurende de vele malen dat ik een paar minuten langskwam om urenlang te babbelen. Ik zal met plezier aan onze conversaties terugdenken. Ook Mirjam Zegers wil ik graag bedanken voor het mij wegwijs maken in de wereld van lipidetransport en HepG2 cellen, nadat ik die geheel blanco binnenstapte, alsmede de zeer plezierige samenwerking. Jan Willem Kok bedank ik voor zijn immer grote interesse en hulpvaardigheid. Ook Joke van der Wouden, Olaf Maier en Margriet Jonker, met wie ik de afgelopen tijd intensief heb samengewerkt, en die de huidige “lipid transport in polarized cells”-groep vormen, zal ik niet snel vergeten. Met veel genoegen zal ik de op moleculair niveau gereguleerde vlucht van lipidetransport volgen. Olaf, thank you for your everlasting patience and interest when I ‘attacked’ you more than once with sudden brainstorms and ‘thought experiments’. Ook Margriet bedankt voor je enthousiasme, de plezierige samenwerking en het vele goede werk dat je voor me hebt gedaan in de laatste fase van mijn onderzoek.

Keith Mostov, thank you for giving me the opportunity to visit and perform experiments in your lab in San Francisco, which I enjoyed very much. I am looking forward to the next years to come. I also thank all members of the Mostov lab for the nice time I had and the many stimulating discussions. Thomas and Seng Hui (weekend trips and many dinners), and Chris (Laibach/ Dead Moon) I want to thank for the very nice times outside of the lab. Michel Vidal (Palm Beach Disco Hot Club...?), thanks for the great hospitality in Montpellier.

Dan wil ik nog bedanken: alle medewerkers van de fotodiensten voor hun hulp met de vele foto’s, dia’s en print-outs die een zo belangrijk (spoed)onderdeel van het onderzoek vormden, Jan Wijbenga als onmisbaar vraag- en hulpbaken voor van alles en nog wat, alle mensen die mij gedurende de afgelopen jaren van chemicaliën voorzien hebben, en iedereen die ik hier niet bij name genoemd heb, maar zeker niet vergeten zal.

Lieve Karin, zonder jou was ik nu hoogstwaarschijnlijk vergroeid geweest met het lab. Jij bent onmisbaar geweest en gaf me de mogelijkheid om geregeld wat afstand te nemen van het werk, en alles te relativeren. Ons wacht vast en zeker een mooie tijd in San Francisco!

Tot ziens,

