



University of Groningen

The roles of MYO5B in epithelial cells and the intestine

Leng, Changsen

DOI:
[10.33612/diss.127906021](https://doi.org/10.33612/diss.127906021)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Leng, C. (2020). *The roles of MYO5B in epithelial cells and the intestine: A focus on microvillus inclusion disease*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.127906021>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

MYO5B speelt een belangrijke rol bij endosomale homeostase in intestinale epitheelcellen (1, 2). Gereguleerd endosomaal transport is cruciaal voor de polariteit van epitheelcellen en de ontwikkeling van darmarchitectuur (3). Mutaties in *MYO5B* kunnen microvillusinclusieziekte (MVID) (4–6) en/of progressieve familiale intrahepatische cholestase (7) veroorzaken. Bovendien is het *MYO5B*-geassocieerde recycling-endosomaal systeem betrokken bij het proces van celdeling, waaronder cytokinese (8, 9) en oriëntatie van de mitotische spoel (10-12). Onlangs is er bewijs geleverd dat *MYO5B* gecorreleerd is aan tumorigenese en de prognose van colorectale kanker (CRC) (13). Het doel van dit proefschrift was om meer inzicht te verkrijgen in de rol van *MYO5B* in MVID, celdeling en CRC.

MVID wordt gekenmerkt door ernstige vlokatrofie en de verkeerde lokalisatie van borstelzomeiwitten (14, 15, 20). We identificeerden een nieuw element van het mechanisme waardoor het verlies van myosine Vb functie tot deze defecten leidt en identificeerden nieuwe leads voor therapeutische interventie. Zo laten we in hoofdstuk 3 zien dat verlies van myosine Vb het laat endolysosomale systeem beïnvloedt, zoals blijkt uit lysosomale ijzeraccumulatie, een door ijzer veroorzaakte overgevoeligheid voor oxidatieve lysosoomschade en resulterende celdood. Belangrijk is dat behandeling met antioxidanten en ijzerchelatoren de overgevoeligheid van myosine-Vb gedepleteerde cellen voor de door oxidatieve stress veroorzaakte celdood in cellijnsystemen tegenging. Onze resultaten tonen aan dat myosine Vb belangrijk is voor laat endolysosomale homeostase. Overgevoeligheid van myosine-Vb-gedepleteerde cellen voor oxidatieve lysosomale membraanpermeabilisatie en celdood moet als onderdeel van MVID-pathogenese worden beschouwd. We poneren de stelling dat een dergelijke celdood ten grondslag ligt aan de ernstige vlokatrofie in MVID.

Vlokatrofie wordt ook waargenomen in diermodellen van MVID (21). Daarom werden in hoofdstuk 4 *myo5b*-knockout muizen gebruikt om onze hypothese te testen dat oxidatieve celdood ten grondslag lag aan de ernstige vlokatrofie in MVID. Vergelijkbaar met onze cellijnstudies vonden we dat functieverlies van myosine Vb veranderingen veroorzaakte in het laat endolysosomale systeem in muizeenterocyten, zoals blijkt uit

lysosomale ijzerstapeling en overgevoeligheid voor oxidatieve lysosoomschade. We toonden aan dat behandeling met de antioxidant N-acetylcysteïne (NAC) de vlokatrofie - die werd waargenomen na *MYO5B*-inactivatie - aanzienlijk verminderde en de bloedsuikerspiegel herstelde. De NAC-behandeling herstelde tevens gedeeltelijk de lokalisatie van borstelzomeiwitten, waaronder ezrin, DPPIV en NHE3. Alles bij elkaar genomen hebben we een nieuw moleculair mechanisme geïdentificeerd dat de uitgebreide vlokdegeneratie bij MVID verklaart en preklinisch bewijs levert dat behandeling met antioxidanten een veelbelovende farmacologische therapeutische optie is voor MVID-patiënten.

Myosin Vb is een recycling endosoom-geassocieerd eiwit en betrokken bij celpolariteit. Recycling door middel van endosomen en daarmee geassocieerde eiwitten, met name het myosine Vb-bindende eiwit kleine GTPase rab11a, is ook geïmpliceerd in celdelingsprocessen, waaronder de oriëntatie van de mitotische spoel (10-12) en cytokinese (8, 9). Hoofdstuk 5 beschrijft dat verlies van *MYO5B*-expressie de cytokinese vertraagde en de oriëntatie van de mitotische spoel veranderde, wat leidde tot de verkeerde oriëntatie van het celdelingsvlak en de delaminatie van intestinale epitheelcellen veroorzaakte. We vonden dat de effecten op de oriëntatie van de mitotische spoel, maar niet op de cytokinese, een direct gevolg was van fysieke hinder door vergrote late endosomen (hier ook vacuolen genoemd), die werden gevormd als gevolg van een herverdeling van chloridekanalen van het celoppervlak naar late endosomen na verlies van *MYO5B*. Beschikbaarheid van Rab7 werd geïdentificeerd als een beperkende factor voor de ontwikkeling van vergrote late endosomen. In overeenstemming daarmee werden de misoriëntatie van de mitotische spoel en celdelaminatie gecorrigeerd na verhoging van de beschikbaarheid van rab7 in de *MYO5B*-knock-outcellen. Resultaten met de laat endosomale vacuole-remmer bafilomycine A1 en vacuole-inductor wortmannin ondersteunden de relatie tussen de mitotische spoeloriëntatiedefecten en de aanwezigheid van laat endosomale vacuolen. Over het algemeen identificeerde dit hoofdstuk een nieuwe rol voor *MYO5B* bij de regulering van de grootte van late endosomen, en het onvermogen om de omvang van late endosomen te beheersen als een onverwacht nieuw mechanisme dat ten grondslag ligt aan defecten in celdelingsoriëntatie en epitheliale architectuur.

In hoofdstuk 6 hebben we de rol van *MYO5B* onderzocht bij het reguleren van de chemosensibilisatie van colorectale kanker (CRC). We hebben aangetoond dat verlies

van myosine Vb de gevoeligheid van CRC Caco-2-cellen voor cisplatine verhoogde. Verlies van myosine Vb in Caco-2-cellen beïnvloedde de herverdeling van Golgi-geassocieerd ATP7B naar het plasmamembraan onder omstandigheden van verhoogde koperconcentraties maar niet van cisplatine. Met behulp van fluorescent gelabeld cisplatine vonden we dat cisplatine zich ophoopt in lysosomale compartimenten. Ten slotte hebben we aangetoond dat de overgevoeligheid voor cisplatine in myosine-Vb-depleteerde Caco-2-cellen wordt veroorzaakt door door cisplatine geïnduceerde reactieve zuurstofsoorten (ROS) die de lysosomale membraan gevoelig maakten voor permeabilisatie en een daaropvolgende celdood. Deze studie concludeerde dat het verlies van myosine Vb de gevoeligheid van colorectale kankercellen voor cisplatine verhoogt door verandering van de lysosomale membraanintegriteit.

Perspectieven

Uit de studies van MVID in hoofdstuk 3 en hoofdstuk 4 hebben we geleerd dat veranderingen in het laat endolysosomale systeem en de nadelige gevolgen daarvan voor aan oxidatieve stress blootgestelde enterocyten deel uitmaken van de pathogenese van MVID. De behandeling met antioxidanten van *MYO5B*-knockout-muizen met NAC verminderde vlokatrofie zonder veranderingen in celproliferatie, en herstelde de darmfunctie gedeeltelijk. Ondersteund door de gerapporteerde associaties tussen oxidatieve stress, vlokatrofie en intestinale mucosale pathologieën in dierstudies (22-25), poneren we de stelling dat de overgevoeligheid van myosine-Vb-gedepleteerde epitheelcellen voor oxidatieve lysosoombeschadiging en daaruit volgende celdood een plausibele en potentieel klinisch mogelijke oorzaak is van de ernstige vlokatrofie bij MVID. Deze studie gaf dus aan dat het voorkomen van oxidatieve dood van vlok-enterocyten onderdeel moet zijn van de behandeling van MVID-patiënten. Dit biedt een nieuwe therapeutische mogelijkheid voor MVID-patiënten. Klinische studies moeten worden uitgevoerd om te bepalen of voor de kliniek goedgekeurde antioxidanten of ijzerchelatoren geschikt zijn om de atrofie van de darmvlokken en de schadelijke gevolgen daarvan (bijv. malabsorptie, secretoire diarree) bij MVID-patiënten te verminderen.

NAC is een door EMA en FDA goedgekeurd, patentvrij medicijn voor de behandeling van paracetamolintoxicatie bij volwassenen en kinderen. NAC is ook geregistreerd als een niet-voorgeschreven ('over the counter') medicijn voor gebruik bij kinderen (> 2 jaar) als een orale of inhalatie-mucolyticum voor de behandeling van astmatische longziekte. De humane equivalente dosis NAC die in de dierstudies werd gebruikt, ligt ruim binnen het dosisbereik dat in de kliniek is voorgeschreven. Alles bij elkaar genomen lijkt NAC zeer geschikt voor herbestemming voor de behandeling van MVID. Op basis van de literatuur en onze preklinische gegevens met muizen verwachten we dat de behandeling van MVID-patiënten met antioxidanten zoals NAC de symptomen zal verminderen.

Hoofdstuk 5 leverde het eerste bewijs dat een afwijkende grootte van het late endosoom, vermoedelijk door de fysieke uitlijning van de mitotische spoel fysiek te belemmeren, de celdelingsoriëntatie en de epitheliale monolaagorganisatie kan verstoren. Deze bevindingen voegen een onverwachte nieuwe dimensie toe aan de rol van membraantransport in processen die een goede mitotische progressie en celdeling garanderen. Toekomstige studies zouden de mogelijke bijdrage van vergrote endosoom-gerelateerde defecten aan de pathogenese van ziekten bij de mens, waarbij afwijkende endosomen zijn gerapporteerd, moeten onderzoeken (26), waaronder neurodegeneratieve ziekten (27, 28), infectieziekten (29), zeldzame erfelijke aandoeningen ziekten (30–33) en kanker (34, 35), en het potentieel onderzoeken om de beschikbaarheid van rab7 te moduleren als een therapeutische benadering. Aangezien de afwijkende expressie van MYO5B ook nauw verband houdt met de carcinogenese en progressie van verschillende vormen van kanker (13, 36-40), is het van belang om de correlaties van endosomen met een afwijkende grootte te bepalen fenotype (indien aanwezig) met maligniteit en prognose van kanker. Het valt nog te bezien of en zo ja, hoe deze bevinding kan bijdragen aan MVID-pathogenese. Eerder werden defecten in de darmvlokken van MVID patiënten toegeschreven aan defecten in celdeling-oriëntatie. Het Par/Cdc42-eiwitcomplex controleert de oriëntatie van de mitotische spoel en is verkeerd gelokaliseerd in MVID darmweefsel, wat leidt tot onjuist geplaatste apicale membranen en afwijkende lumenpositionering (43-45). De vergrote late endolysosomen werden alleen waargenomen in de post-mitotische enterocyten van de villi en niet in de mitotische enterocyten van de crypten. Dienovereenkomstig hebben we geen spoeloriëntatiedefecten in de MVID dunne darm

waargenomen. We achten het daarom onwaarschijnlijk dat spoelloriëntatiedefecten significant bijdragen aan de architecturale defecten die worden gezien in de vlokken van de MVID-darm.

Zoals beschreven in hoofdstuk 6, kan cisplatine lysosomen sensibiliseren voor oxidatieve destabilisatie en celdood veroorzaken in myosine-Vb-gedepleteerde cellen. Dienovereenkomstig poneren we dat de detectie van myosine Vb-expressie in CRC-weefsels een voorspeller kan zijn van cisplatinegevoeligheid. Aangezien CRC-patiënten met een lage *MYO5B*-expressie een kortere algehele en metastasevrije overleving vertoonden (13), kan cisplatine tijdens een uitgebreide behandeling ook voor deze patiënten voordelig zijn. Natuurlijk is validatie van het lysosoomfenotype in weefsels van CRC-patiënten nodig, en dierproeven moeten worden uitgevoerd om het effect van cisplatinebehandeling in vivo te bepalen. Bovendien wordt het intracellulaire cisplatine opgeslagen in het lysosoomcompartiment bij kanker, waardoor cellen de cisplatineconcentratie in het cytosol verlagen en de export buiten de cel door exocytose kunnen verhogen (46, 47). Als we manieren kunnen vinden om het lysosomale membraan te beschadigen, waardoor de lysosomale inhoud naar het cytosol lekt, kunnen lysosomen dienen als 'zelfmoordzakken' door het laten weglekken van de grote opeenhoping van cisplatine die potentieel schadelijk zijn voor de cellen (48). Deze studie biedt een aantal nieuwe mogelijke opties voor de behandeling van kanker door verhogen van de permeabiliteit van lysosomen, bijvoorbeeld gericht op myosine Vb (*MYO5B*) of/en recycling van endosomaal transport om ijzerophoping in lysosomen te induceren.

Referentie

1. Roland JT et al. Rab GTPase-Myo5B complexes control membrane recycling and epithelial polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(7):2789–2794.
2. Engevik AC et al. Loss of myosin Vb promotes apical bulk endocytosis in neonatal enterocytes. *J. Cell Biol.* 2019;218(11):3647–3662.
3. van Ijzendoorn SCD. Recycling endosomes. *J. Cell. Sci.* 2006;119(Pt 9):1679–1681.
4. Müller T et al. MYO5B mutations cause microvillus inclusion disease and disrupt epithelial cell polarity. *Nat. Genet.* 2008;40(10):1163–1165.
5. Erickson RP, Larson-Thomé K, Valenzuela RK, Whitaker SE, Shub MD. Navajo microvillous inclusion disease is due to a mutation in MYO5B. *Am. J. Med. Genet. A* 2008;146A(24):3117–3119.
6. Dhekne HS et al. MYO5B, STX3, and STXBP2 mutations reveal a common disease mechanism that unifies a subset of congenital diarrheal disorders: A mutation update. *Hum. Mutat.* 2018;39(3):333–344.
7. Gonzales E et al. MYO5B mutations cause cholestasis with normal serum gamma-glutamyl transferase activity in children without microvillous inclusion disease. *Hepatology* 2017;65(1):164–173.
8. Schiel JA, Prekeris R. Membrane dynamics during cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2013;25(1):92–98.
9. Montagnac G, Chavrier P. Endosome positioning during cytokinesis. *Biochem. Soc. Trans.* 2008;36(Pt 3):442–443.
10. Hehnly H, Doxsey S. Rab11 endosomes contribute to mitotic spindle organization and orientation. *Dev. Cell* 2014;28(5):497–507.
11. Das S, Hehnly H, Doxsey S. A new role for Rab GTPases during early mitotic stages. *Small GTPases* 2014;5. doi:10.4161/sgtp.29565
12. Zhang H, Squirrell JM, White JG. RAB-11 Permissively Regulates Spindle Alignment by Modulating Metaphase Microtubule Dynamics in *Caenorhabditis elegans* Early Embryos. *Mol Biol Cell* 2008;19(6):2553–2565.
13. Letellier E et al. Loss of Myosin Vb in colorectal cancer is a strong prognostic factor for disease recurrence. *Br. J. Cancer* 2017;117(11):1689–1701.
14. Davidson GP, Cutz E, Hamilton JR, Gall DG. Familial enteropathy: a syndrome of protracted diarrhea from birth, failure to thrive, and hypoplastic villus atrophy. *Gastroenterology* 1978;75(5):783–790.
15. Cutz E et al. Microvillus inclusion disease: an inherited defect of brush-border assembly and differentiation. *N. Engl. J. Med.* 1989;320(10):646–651.

16. Jayawardena D, Alrefai WA, Dudeja PK, Gill RK. Recent advances in understanding and managing malabsorption: focus on microvillus inclusion disease. *F1000Res* 2019;8. doi:10.12688/f1000research.20762.1
17. Raafat F, Green NJ, Nathavitharana KA, Booth IW. Intestinal microvillous dystrophy: a variant of microvillous inclusion disease or a new entity?. *Hum. Pathol.* 1994;25(11):1243–1248.
18. Amin A, Farmer DG. Current outcomes after pediatric and adult intestinal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2019;24(2):193–198.
19. Schofield DE, Agostini RM, Yunis EJ. Gastrointestinal microvillus inclusion disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 1992;98(1):119–124.
20. Engevik AC et al. Loss of MYO5B Leads to Reductions in Na⁺ Absorption With Maintenance of CFTR-Dependent Cl⁻ Secretion in Enterocytes. *Gastroenterology* 2018;155(6):1883-1897.e10.
21. Cartón-García F et al. Myo5b knockout mice as a model of microvillus inclusion disease. *Sci Rep* 2015;5:12312.
22. Loguercio C, Di Pierro M. The role of glutathione in the gastrointestinal tract: a review. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(5):401–407.
23. Zheng P et al. Arginine metabolism and its protective effects on intestinal health and functions in weaned piglets under oxidative stress induced by diquat. *Br. J. Nutr.* 2017;117(11):1495–1502.
24. Arslan A et al. Protective effect of resveratrol against methotrexate-induced oxidative stress in the small intestinal tissues of rats. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(7):10491–10500.
25. Yi G et al. Heat stress induces intestinal injury through lysosome- and mitochondria-dependent pathway in vivo and in vitro. *Oncotarget* 2017;8(25):40741–40755.
26. Kaur G, Lakkaraju A. Early Endosome Morphology in Health and Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018;1074:335–343.
27. Nixon RA. Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 2005;26(3):373–382.
28. Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, Paskevich PA, Nixon RA. Abnormalities of the endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease: relationship to disease pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996;389:271–280.
29. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:92.
30. Remis NN et al. Mucolipin co-deficiency causes accelerated endolysosomal vacuolation of enterocytes and failure-to-thrive from birth to weaning. *PLoS Genet.* 2014;10(12):e1004833.

31. Stutterd C et al. Neuropathology of childhood-onset basal ganglia degeneration caused by mutation of VAC14. *Ann Clin Transl Neurol* 2017;4(12):859–864.
32. Shubin AV, Demidyuk IV, Komissarov AA, Rafieva LM, Kostrov SV. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget* 2016;7(34):55863–55889.
33. Narumi S et al. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nat. Genet.* 2016;48(7):792–797.
34. Maltese WA, Overmeyer JH. Methuosis: nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *Am. J. Pathol.* 2014;184(6):1630–1642.
35. Aki T, Nara A, Uemura K. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biol. Toxicol.* 2012;28(3):125–131.
36. Dong W et al. Inactivation of MYO5B promotes invasion and motility in gastric cancer cells. *Dig. Dis. Sci.* 2012;57(5):1247–1252.
37. Dong W, Wang L, Shen R. MYO5B is epigenetically silenced and associated with MET signaling in human gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* 2013;58(7):2038–2045.
38. Dong W, Qin G, Shen R. Rab11-FIP2 promotes the metastasis of gastric cancer cells. *Int. J. Cancer* 2016;138(7):1680–1688.
39. Ho JR et al. Deregulation of Rab and Rab Effector Genes in Bladder Cancer [Internet]. *PLoS One* 2012;7(6). doi:10.1371/journal.pone.0039469
40. Kuang S-Q et al. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2008;22(8):1529–1538.
41. Ullmann SL, Butcher L. Mammalian oocyte organelles with special reference to pleomorphic mitochondria and vacuole formation in marsupials. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996;8(4):491–508.
42. Setti AS et al. Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2011;159(2):364–370.
43. Michaux G et al. The localisation of the apical Par/Cdc42 polarity module is specifically affected in microvillus inclusion disease. *Biology of the Cell* 2016;108(1):19–28.
44. Sakamori R et al. Cdc42 and Rab8a are critical for intestinal stem cell division, survival, and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* 2012;122(3):1052–1065.
45. Jaffe AB, Kaji N, Durgan J, Hall A. Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol* 2008;183(4):625–633.

46. Circu M et al. Modulating lysosomal function through lysosome membrane permeabilization or autophagy suppression restores sensitivity to cisplatin in refractory non-small-cell lung cancer cells [Internet]. *PLoS One* 2017;12(9). doi:10.1371/journal.pone.0184922
47. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol. Ther.* 2000;85(3):217–229.
48. Turk B, Turk V. Lysosomes as “Suicide Bags” in Cell Death: Myth or Reality?. *J Biol Chem* 2009;284(33):21783–21787.

