

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20733> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zhang, Xiaofei

Title: Molecular mechanisms of novel regulators in cytokine signal transduction

Issue Date: 2013-04-10

Nederlandse Samenvatting

In een multicellulair organisme wordt elke cel blootgesteld aan, en aangestuurd door, een combinatie van verschillende signalen, waarvan de BMP en Wnt eiwitten belangrijke voorbeelden zijn. De effecten van een signaal-molekuul op een cel zijn o.a. afhankelijk van de samenstelling van de signaal-ontvangende en signaal-verwerkende complexen en netwerken op en binnen het specifieke celtype. De respons van een cel hangt eveneens af van zijn directe omgeving, zoals aanwezigheid van, en (in)direkte contacten met, verschillende typen nabuurellen. De uiteindelijke respons wordt bepaald door de manier waarop de cel al deze informatie doorgeeft, verwerkt en vertaalt, wat gebeurt via meerdere zogenaamde signaaltransductie routes. Een groot aantal regulerende en modulerende eiwitten in de cel kan de werking van deze signaaltransductie routes en daarmee de integratie en interpretatie van de diverse signalen beïnvloeden. Door deze regulatoren en modulators te identificeren en karakteriseren krijgen we meer inzicht in de mechanismen waarmee de diverse signaal-ontvangende en signaal-verwerkende complexen in signaaltransductie routes functioneren en samenwerken. Hierdoor krijgen we ook meer inzicht in het ontstaan en mogelijk behandelen van een groot aantal ziektes.

De studies beschreven in dit proefschrift hadden tot doel nieuwe, nog onbekende regulatoren te identificeren van drie signaaltransductie routes: de TGF- β /BMP, IL-1 β en Wnt routes (beschreven in hoofdstuk 1). Hiervoor zijn verschillende methoden gebruikt. In hoofdstuk 2 hebben we via totaal proteoom eiwit-eiwit interactie screening het eiwit UBE2O als nieuwe regulator van de BMP route geïdentificeerd. We ontdekten vervolgens dat UBE2O het BMP remmende eiwit SMAD6 modificeert door er een ubiquitine groep op te zetten, en daarmee het remmende effect van SMAD6 op door BMP7 gemedieerde signalen weer kan afzwakken. Het (mono)ge-ubiquitineerde SMAD6 heeft minder bindingsaffiniteit voor de BMP type I receptor, wat ook resulteert in verlaagde remming van door BMP7 geïnduceerde differentiatie van adipocyten. We vonden bovendien dat cysteine 885 in het actieve centrum van het UBE2O E2 ubiquitine ligase domein essentieel is voor de mono-ubiquitinilering van SMAD6, en dat UBE2O daarmee de differentiatie van adipocyten door BMP7 potentieert.

De signaal-molekules IL-1 β en LPS activeren de transcriptiefactor NF- κ B via het adapter enzym TRAF6 en dit is een belangrijke stap in de regulatie van de immuunrespons. In Hoofdstuk 2 en 3 wordt de ontdekking en functionele karakterisering van twee nieuwe regulatoren van TRAF6 beschreven, het eerder genoemde ubiquitine ligase UBE2O en het deubiquitinerende enzym USP4. Beide regulatoren kunnen de activatie van de transcriptiefactoren NF- κ B en AP-1 door TRAF6 remmen. Verstoring van de hoeveelheid UBE2O en USP4 in de cel beïnvloedt ook de fosforylering en expressie van door IL-1 β en LPS aangestuurde NF- κ B en AP-1 signaleringsenzymen en targetgenen. Zowel UBE2O als USP4 bleken de hoeveelheid poly-geubiquitineerd TRAF6 in de cel te verlagen, maar via verschillende mechanismen. Het deubiquitinase USP4 bindt aan TRAF6 en knipt dan de

ubiquitines van de keten, wat afhankelijk bleek van de aanwezigheid van zijn eigen catalytisch centrum (hoofdstuk 4). Maar UBE2O verhindert juist de vorming van de polyubiquitine ketens aan TRAF6 en onafhankelijk van zijn eigen E2 ligase activiteit. Door aan TRAF6 te binden bleek UBE2O de interactie tussen TRAF6 en de TRAF6-regulator MyD88 te verstoren, en daarmee ook de ubiquitinilering van TRAF6 door het E2 ligase complex Ubc13/Uev1a (hoofdstuk 3).

Evenals de BMP route is de Wnt signaaltransductie cruciaal voor diverse cellulaire processen tijdens de embryonale ontwikkeling en het volwassen stadium. In hoofdstuk 5 hebben we onderzocht of er naast de Wnt co-receptoren LRP5 en LRP6 nog andere Wnt co-receptoren in bepaalde celtypen aanwezig zijn. Via siRNA screening voor celmembraan-eiwitten vonden we dat depletie van het LRP5/6-gerelateerde LRP8 eiwit een sterke verlaging gaf van signalering door Wnt3a. Vervolgens vonden we dat LRP8 aan het Axine eiwit bindt en daarmee deze negatieve regulator van Wnt inaktiveert. Dit leidt tot verhoging van de hoeveelheid β -catenine in de celkern, en daarmee tot activatie van Wnt target genen door deze door Wnt signalering geactiveerde transcriptionele co-factor. Bovendien vonden we dat LRP8 een sterk positief effect heeft op Wnt3a-medieerde osteoblast differentiation en botcel vorming.

We kunnen met deze resultaten dus beter begrijpen hoe celdifferentiatie en ontstekingsreacties door BMP, Wnt en IL-1 β gereguleerd worden, wat mogelijk kan leiden tot betere behandeling bij verstoring van deze processen.