



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Intracellular routing of β -catenin

Hendriksen, J.V.R.B.

Citation

Hendriksen, J. V. R. B. (2008, June 19). *Intracellular routing of β -catenin*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12965>

Version: Corrected 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/1887/12965>

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

Nederlandse Samenvatting

*“Yesterday is history,
today is a gift,
tomorrow is an opportunity”*

Adapted from Mystery Land ID&T

Nederlandse Samenvatting

De Wnt signaal transductie route vervult een belangrijke rol in cellulaire processen die cruciaal zijn tijdens embryonale ontwikkeling en tijdens het handhaven van de normale homeostase in volgroeide weefsels. Deregulatie van de Wnt route resulteert in een verstoorde balans tussen proliferatie en differentiatie wat kan leiden tot het ontstaan van ziekten zoals kanker. Wnt eiwitten worden gesecreteerd en functioneren als groeifactoren die communicatie tussen cellen bewerkstelligen. Binding van Wnt aan de Fz en LRP5/6 receptoren resulteert in de ontvangende cel in een activatie van de Wnt signaal transductie, die zal leiden tot een verandering in transcriptie. Een centrale rol in de Wnt route wordt vervuld door het β -catenine eiwit. β -Catenine is een typisch voorbeeld van een eiwit dat verschillende functies heeft in de cel. Zo is het betrokken bij cel-cel adhesie aan de plasma membraan in een complex met E-cadherine, reguleert het het cytoskelet, en functioneert het als transcriptionele activator in de Wnt route. In een cel die niet gestimuleerd wordt door Wnt groeifactoren, is β -catenine louter aanwezig in het E-cadherine complex in de cel-cel contacten. Vrij β -catenine wordt namelijk efficiënt gebonden en afgebroken door een complex dat bestaat uit de 2 tumorsuppressor eiwitten APC en Axin, en uit de 2 kinases GSK3 en CK1. Dit complex fosforyleert het N-terminale deel van het β -catenine eiwit waardoor het gemarkeerd wordt voor afbraak door het proteasoom. Recente publicaties hebben laten zien dat na binding van Wnt aan de Fz en LRP6 receptor, er grote eiwit complexen worden gevormd aan de plasma membraan. Deze zogenaamde signalosomen bevatten verschillende eiwitten uit de Wnt route waaronder Fz, LRP6, Dvl, Axin en APC. Een mogelijk mechanisme is dat Wnt de Fz en LRP receptoren clusterd waarna Dvl gerecrueteerd wordt naar de Fz receptor. Dvl kan lange oligomeren vormen die ervoor zouden zorgen dat nog meer receptoren aggregeren. Axin wordt gebonden door Dvl waardoor ook de aan Axin bindende eiwitten APC, GSK3 en CK1 in de signalosomen gevangen worden. Hierdoor kunnen GSK3 en de membraan gebonden CK1 γ het intracellulaire domein van LRP6 fosforyleren waar Axin vervolgens aan zal binden. Binding van Axin aan LRP remt de activiteit van

het afbraakcomplex, waardoor β -catenine accumuleert in de cel en naar de kern kan gaan om transcriptie te activeren. De regulatie van de stabiliteit van het β -catenine eiwit wordt gezien als een cruciale stap in de Wnt route. Een aantal studies hebben echter laten zien dat niet alle β -catenine moleculen even actief zijn in het reguleren van transcriptie. De aanwezigheid van β -catenine dat niet gefosforyleerd is op de N-terminus, ook wel defosfo- β -catenine genoemd, correleert veel beter met transcriptionele activiteit dan totaal aanwezig β -catenine. Dit proefschrift beschrijft een aantal studies waarin in het bijzonder defosfo- β -catenine bestudeerd is.

De mechanismen die de activiteit van β -catenine in de cel kern reguleren zijn niet geheel duidelijk. Hoofdstuk 2 van dit proefschrift beschrijft een nieuwe rol voor het Ran-bindingseiwit 3 (RanBP3) als een negatieve regulator van de activiteit van β -catenine in de kern. RanBP3 is een nucleair eiwit waarvan bekend is dat het functioneert als een cofactor in de CRM1 nucleaire export route. Overexpressie van RanBP3 resulteert in een remming van Wnt signalering activiteit in zowel menselijke cellen als in *X. laevis* embryo's. Reductie van RanBP3 heeft het tegenovergestelde effect. De remmende werking van RanBP3 op β -catenine is afhankelijk van de capaciteit van RanBP3 om RanGTP te binden. RanGTP is net als RanBP3 een co-factor die betrokken is bij export uit de cel kern. Het mechanisme waarmee RanBP3 β -catenine reguleert zou dus mogelijk nucleaire export kunnen zijn. Wij vonden echter geen effecten op de lokalisatie van β -catenine in de cel na manipulatie van RanBP3 hoeveelheden. Echter, toen we specifiek naar actief, oftewel defosfo- β -catenine keken, vonden we dat RanBP3 de export van deze vorm van β -catenine uit de kern bevordert. RanBP3 beïnvloedt de lokalisatie van defosfo- β -catenine zelfstandig, onafhankelijk van de CRM1 export route. Onze resultaten passen in een model waarin RanBP3 export van defosfo- β -catenine uit de cel kern stimuleert om zo een eind te maken aan het Wnt signaal. Het feit dat RanBP3 specifiek de export van niet gefosforyleerd β -catenine uit de celkern bevordert, illustreert het belang van deze vorm van β -catenine voor de Wnt route.

Hoofdstuk 3 beschrijft de lokalisatie van niet gefosforyleerd β -catenine in een aantal colon tumor cellijnen en in normaal humaan darm weefsel. Het was eerder beschreven dat defosfo- β -catenine correleert met β -catenine dat transcriptioneel actief is, en dat deze vorm van β -catenine specifiek lokaliseert in de celkern. Onze data laat echter zien dat defosfo- β -catenine vooral op de cel-cel contacten lokaliseert. Alleen wanneer cellen geen of weinig E-cadherine tot expressie brengen, vinden we defosfo- β -catenine in de celkern. Het feit dat een vrij grote hoeveelheid defosfo- β -catenine op de cel-cel contacten zit, suggereert dat het daar functioneert in cel adhesie. Nadere inspectie van β -catenine aan de cel-cel contacten laat zien dat defosfo- β -catenine specifiek op de apico-laterale zijde van de celmembraan zit, terwijl totaal β -catenine op de gehele baso-laterale membraan voorkomt. Dit verschil in lokalisatie vinden we in tumor cellijnen en interessant genoeg ook in de regio van de humane darm waar de Wnt route actief is; de crypten. Deze bevinding suggereert dat een deel van het defosfo- β -catenine op de apico-laterale membraan wellicht betrokken kan zijn in Wnt signalering. Het is echter onmogelijk om deze potentiële subgroep van actief β -catenine aan de membraan te onderscheiden van het altijd aanwezige β -catenine betrokken bij cel adhesie. Bovendien vinden we in ons panel van colon tumor cellijnen geen correlatie tussen Wnt activiteit en de aanwezigheid van β -catenine in de kern of aan de cel-cel contacten. Wij benadrukken daarom het gebruik van een E-cadherine negatief systeem bij het bestuderen van de rol van niet gefosforyleerd β -catenine in Wnt signalering.

In hoofdstuk 4 beschrijven we hoe we, door gebruik te maken van cellen die geen E-cadherine hebben, een kleine maar distincte hoeveelheid defosfo- β -catenine aan de plasma membraan detecteren na stimulering met Wnt3a. Deze subgroep van defosfo- β -catenine kan alleen gevisualiseerd worden in E-cadherine negatieve cellen omdat het in normale cellen gemaskeerd wordt door het β -catenine aanwezig in cel-cel contacten. Defosfo- β -catenine dat verschijnt op de celmembraan na Wnt stimulering in E-cadherine negatieve cellen, colocaliseert zowel met de geactiveerde LRP6 receptor als met APC en Axin. In humane cellen en in *X. laevis* embryo's vinden we dat β -catenine meer actief is wanneer het gestabiliseerd wordt na een Wnt signaal dan wanneer het verhoogd tot expressie wordt gebracht. Onze data suggereert dat defosfo- β -catenine samen met de rest van het afbraak-

complex naar de LRP6 signalosomen migreert na Wnt inductie. Daarnaast stellen we een model voor waarin het uiteindelijke resultaat van deze recruterings niet de remming van β -catenine afbraak is, maar juist een activatie van β -catenine aan de plasma membraan. Een dergelijk model maakt een 1:1 stoichiometrie mogelijk voor Wnt en β -catenine, en plaatst de Wnt route in parallel met andere ontwikkelingsroutes waarbij het effector eiwit aan de membraan geactiveerd wordt.

β -Catenine reguleert transcriptie in de cel kern en dus zijn de import en export mechanismen van het eiwit mogelijk van belang voor de regulatie van transcriptionele output. β -Catenine is een vrij groot eiwit dat normaal gesproken een import en export signaal nodig zou hebben om via de transport routes te kunnen migreren tussen kern en cytoplasma. β -Catenine migreert tussen kern en cytoplasma, maar import en export signalen ontbreken. Er zijn op het moment twee theorieën over de export van β -catenine: de eerste oppert dat β -catenine zijn eigen export medieert door een interactie aan te gaan met de eiwitten van de kern porie. De tweede theorie stelt voor dat β -catenine indirect via de normale CRM1 route migreert door te binden aan APC of Axin, die wel de juiste transportsignalen bevatten voor deze route. In hoofdstuk 5 hebben wij specifiek de export van β -catenine uit de kern bestudeerd met een techniek die het mogelijk maakt om in levende cellen GFP (groen fluorescent eiwit) gelabelde β -catenine te volgen. Uit onze metingen blijkt dat export van β -catenine erg snel is, en nog steeds plaats vindt wanneer de CRM1 route volledig geblokkeerd is. Daarnaast laten we zien dat we de export van het vrije GFP molecuul uit de kern kunnen versnellen door het te koppelen aan β -catenine, en dat er een *in vitro* interactie is tussen β -catenine en de eiwitten van de kern porie. Deze resultaten suggereren dat β -catenine zelfstandig de kern verlaat door te binden aan de kern porie en dat het wellicht zelf als transport receptor kan fungeren. Onze data impliceren dat β -catenine vrij kan bewegen in de cel en dat lokalisatie gereguleerd wordt door retentie van eiwitten die β -catenine binden.