



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Regulation of hypoxia-inducible factors by small ubiquitin-like modifiers

Hagen, M. van

### Citation

Hagen, M. van. (2010, May 26). *Regulation of hypoxia-inducible factors by small ubiquitin-like modifiers*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15552>

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/1887/15552>

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

# **Chapter 8**

## **Nederlandse samenvatting**



## Chapter 8

### Nederlandse samenvatting

Complexe organismen zoals de mens bestaan uit zeer grote aantallen cellen. Elk van die cellen heeft een eigen taak en is speciaal aangepast om die taak uit te kunnen voeren. Ondanks die specialisaties hebben alle cellen een vergelijkbare architectuur en gemeenschappelijke fundamentele eigenschappen. Zo gebruiken alle cellen DNA om genetische informatie op te slaan en door te geven, in de vorm van chromosomen. Het DNA waaruit de chromosomen zijn opgebouwd wordt weer onderscheiden in coderend en regulerend DNA.

Het coderende DNA bevat de informatie die de cel nodig heeft om haar eiwitten te maken, onderverdeeld in de genen. Een gen is een discreet stukje van het coderende DNA dat voor een specifiek eiwit codeert. Het regulerende DNA bepaalt wanneer en hoe vaak ieder eiwit geproduceerd moet worden. Alle eiwitten bestaan uit kettingen van aminozuren. Twintig verschillende aminozuren worden als kralen aan een ketting geregen in verschillende hoeveelheden en volgorden om alle voorkomende eiwitten te maken. De code voor de aminozuurvolgorden van alle eiwitten in de cel liggen opgeslagen in de genen.

Een andere overeenkomst tussen alle verschillende cellen is hun afhankelijkheid van zuurstof voor een normale stofwisseling. Voldoende zuurstof is noodzakelijk voor het genereren van genoeg energie om alle processen in de cel op gang te houden. Teveel zuurstof in een cel kan echter leiden tot de vorming van zuurstofradicalen, schadelijke moleculen die eiwitten en DNA kunnen beschadigen. Beschadigingen aan het DNA zouden kunnen leiden tot mutaties en ongeremde celgroei. Om dit risico te beperken wordt de hoeveelheid zuurstof in cellen daarom nauwkeurig gebalanceerd door complexe meet- en regelnetwerken, gevormd door vele verschillende eiwitten. In dit proefschrift hebben we specifiek gekeken naar de regulatie van een tweetal eiwitten die essentieel zijn voor de zuurstofhuishouding in cellen. Beide eiwitten worden vaak in hoge mate aangetroffen in tumoren en spelen dan een belangrijke rol in de ontwikkeling en overleving van de tumor.

Cellen en weefsels kunnen korte periodes van lage zuurstofomstandigheden (hypoxia) verdragen door onder andere over te schakelen naar minder efficiënte energie productie door glycolyse. Centraal in het aanpassingsvermogen van cellen aan hypoxische omstandigheden zijn de hypoxia-induceerbare factoren (HIFs). De HIFs zijn streng gereguleerde transcriptie

factoren. Dit zijn eiwitten die aan het regulerende DNA binden en zo de productie van andere eiwitten stimuleren. De HIFs stimuleren de productie van eiwitten die de cel en het omliggende weefsel helpen zich aan te passen aan de lage zuurstofomstandigheden, zoals glycolytische enzymen en factoren die de aanmaak van extra bloedvaten stimuleren.

De HIFs bestaan uit twee verschillende subeenheden, HIF- $\alpha$  en HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\beta$  is altijd aanwezig en actief in cellen terwijl HIF- $\alpha$  onder normale omstandigheden continu aangemaakt en direct weer afgebroken wordt. Pas als cellen in zuurstofnood dreigen te raken stopt de afbraak van HIF- $\alpha$  en wordt het actief. Van HIF- $\alpha$  zijn drie verschillende versies bekend: HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$  en -3 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  en -2 $\alpha$  lijken sterk op elkaar en hebben een vergelijkbare taak in de cel. Van HIF-3 $\alpha$  is weinig bekend maar gedacht wordt dat het een remmende functie heeft op HIF-1 $\alpha$  en -2 $\alpha$ .

In hoofdstuk 3 laten we zien dat de regulatie van HIF-1 $\alpha$  door sumoylering complexer is dan gedacht. SUMO's zijn kleine eiwitten die aan sommige andere eiwitten vast gezet kunnen worden en daarmee hun gedrag kunnen beïnvloeden. Het proces waarin SUMO wordt vastgemaakt aan een ander eiwit heet sumoylering. Sumoylering kan alleen plaatsvinden op het aminozuur lysine in de aminozuurketting van een eiwit en dan alleen op lysines waarnaast specifieke andere aminozuren liggen. Een dergelijke volgorde van aminozuren rondom een lysine wordt een SUMO consensus sequentie genoemd. Slechts een deel van alle verschillende eiwitten die een cel aanmaakt kan gesumoyleerd worden; samen worden zij de SUMO targets genoemd. Van de meeste SUMO targets is bekend dat te allen tijde maar een heel klein gedeelte ervan gesumoyleerd is.

Onze data bevestigen eerdere rapporten dat HIF-1 $\alpha$  gesumoyleerd wordt op twee verschillende aminozuren, de lysines op positie 391 en 477 in de aminozuurketting. Daarnaast laten wij zien dat ook lysine 377 gesumoyleerd kan worden. Het effect van sumoylering op HIF-1 $\alpha$  werd bestudeerd door mutaties in HIF-1 $\alpha$  aan te brengen die sumoylering op een of meerdere van deze lysines verhinderden. HIF-1 $\alpha$  mutanten waarin sumoylering van slechts een van deze drie lysines verhinderd was waren actiever dan wild-type (niet gemuteerd) HIF-1 $\alpha$ . Een mutant waarvan sumoylering op alle drie de lysines was verhinderd vertoonde een sterkere verhoging in activiteit dan die waarin sumoylering van slechts een enkele lysine was verhinderd. Hieruit concluderen we dat sumoylering een rol speelt in de regulering van de transcriptionele activiteit van HIF-1 $\alpha$ .

Onze resultaten in hoofdstuk 4 laten zien dat er samenwerking plaatsvindt tussen ubiquitinering en sumoylering op een subset van alle SUMO targets. Ubiquitine is, net als

SUMO, een klein eiwit dat op sommige andere eiwitten vastgezet kan worden. Waar sumoylering van een eiwit voornamelijk een regulerende rol speelt, leidt ubiquitineren meestal tot afbraak van het eiwit door het proteasoom. Sumoylering en ubiquitineren werden beschouwd als twee volledig onafhankelijke, of zelfs concurrerende eiwit modificaties. Er zijn eiwitten bekend waar zowel sumoylering als ubiquitineren kan plaatsvinden op een specifieke lysine. Sumoylering van deze lysine beschermt het eiwit dan tegen ubiquitineren en de daaropvolgende afbraak. Onze resultaten in dit hoofdstuk laten zien dat er ook samenwerking mogelijk is tussen deze twee modificaties. Een deel van de SUMO target eiwitten dient eerst gesumoyleerd te worden voordat ze geubiquitineerd kunnen worden om vervolgens afgebroken te worden. We hebben drieënzeventig eiwitten kunnen identificeren waar een dergelijk mechanisme betrokken is bij hun regulering.

In hoofdstuk 5 wordt beschreven dat, evenals HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  tijdens hypoxia ook door sumoylering wordt gereguleerd. Ondanks dat HIF-2 $\alpha$  twee SUMO consensus sequenties bezit bleek er maar een van gebruikt te worden. Sumoylering van HIF-2 $\alpha$  op Lys-394 leidt tot een afname in de transcriptionele activiteit. Daarnaast ontdekten we dat HIF-2 $\alpha$  behoort tot de subgroep van SUMO targets die in hoofdstuk 4 beschreven wordt. Na sumoylering kan HIF-2 $\alpha$  geubiquitineerd worden, gevolgd door proteasomale afbraak. SUMO speelt dus een rol bij de afbraak van een deel van de totale hoeveelheid HIF-2 $\alpha$  in de cel. De aanwezigheid van een mechanisme dat afbraak van HIF-2 $\alpha$  tijdens hypoxia mogelijk maakt, wanneer de activiteit van het eiwit juist nodig is, lijkt tegenstrijdig. Wellicht functioneert dit mechanisme om te zorgen dat zelfs tijdens hypoxia de hoeveelheid actief HIF-2 $\alpha$  in de cel binnen de perken blijft. Sumoylering van HIF-2 $\alpha$  zorgt er mogelijk voor dat het loskomt van het DNA en/of andere gebonden eiwitten en zodoende niet meer kan functioneren. Een dergelijk mechanisme zou ook belangrijk kunnen zijn als de cel weer voldoende zuurstof beschikbaar krijgt en de activiteit van HIF-2 $\alpha$  niet langer wenselijk is.

Het vermogen van ubiquitine om kettingen te vormen is bekend en al goed bestudeerd. Daarentegen is er weinig bekend over SUMO kettingen. In hoofdstuk 6 gaan we in op het vermogen van SUMO eiwitten om kettingen te vormen. Hiervoor ontwikkelden we eerst een nieuwe methode om door middel van massa-spectrometrie deze SUMO kettingen te kunnen bestuderen in complexe monsters (zoals die verkregen uit cellen, in tegenstelling tot minder complexe monsters die in een reageerbuis zijn samengesteld).

Van de drie verschillende SUMO eiwitten die een cel aanmaakt bezitten SUMO-2 en -3 zelf ook een consensus sequentie. Het derde SUMO eiwit, SUMO-1, heeft deze sequentie

niet. In proeven in reageerbuizen, waarin we alleen SUMO eiwitten en de enzymen die benodigd zijn voor sumoylering toevoegen, zijn SUMO-2 en -3 in staat om lange kettingen te vormen. Na het toevoegen van SUMO-1 in deze proeven kan dit eiwit ook worden gebruikt in de vorming van SUMO kettingen. Het ontbreken van een consensus sequentie in SUMO-1 houdt dan echter wel in dat verdere ketting groei niet meer mogelijk is. In proeven in reageerbuizen zijn SUMOs in staat om zowel ongeankerde kettingen te vormen als kettingen op SUMO target eiwitten. In onze proeven bleek HIF-1 $\alpha$  een geschikt target eiwit te zijn om SUMO kettingen op te vormen. Daarnaast laten we zien dat SUMO-2 en -3 in cellen ook kettingen kunnen vormen. We hebben niet kunnen bevestigen dat SUMO-1 in cellen ook gebruikt wordt voor ketting formatie maar kunnen deze mogelijkheid niet uitsluiten. Nader onderzoek is nodig om de functie van deze SUMO kettingen in de cel te achterhalen en om meer target eiwitten voor SUMO kettingen te identificeren.

De meeste solide tumoren produceren HIF-1 $\alpha$  en/of HIF-2 $\alpha$  in hoge mate en zijn afhankelijk van deze eiwitten voor hun ontwikkeling en overleving. Het verdiepen van onze kennis over de regulatie van HIF-1 $\alpha$  en HIF-2 $\alpha$  zal ons mogelijk in staat stellen om hun activiteit in tumoren te remmen. Het stimuleren van HIF- $\alpha$  sumoylering zou tot een remming van de activiteit en een verhoging van de afbraak van deze eiwitten kunnen leiden.