



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Close the Gap : a study on the regulation of Connexin43 gap junctional communication

Zeijl, L. van

Citation

Zeijl, L. van. (2009, May 14). *Close the Gap : a study on the regulation of Connexin43 gap junctional communication*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13799>

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/1887/13799>

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



Samenvatting

Samenvatting

Om een meercellig organisme goed te kunnen laten functioneren is het essentieel dat cellen met elkaar communiceren. Intercellulaire communicatie kan plaatsvinden via de uitscheiding van hormonen en groeifactoren of rechtstreeks via cel-cel contacten, bijvoorbeeld via zogenaamde "gap junctions". Gap junctions zijn groepen kanaaltjes in de plasmamembraan die een directe verbinding vormen tussen het cytoplasma van aangrenzende cellen. Door deze kanalen kunnen kleine moleculen zich van de ene naar de andere cel verspreiden. Op deze manier blijven cellen op de hoogte van het doen en laten van hun directe burens en kunnen ze zelfs elkaars gedrag beïnvloeden. Ontregeling van gap junction communicatie (GJC) wordt geassocieerd met verschillende ziektes, met name kanker maar bijvoorbeeld ook hartritmestoornissen.

De bouwstenen van gap junction kanalen zijn de connexine eiwitten. Zes connexines vormen een ring die de helft van het uiteindelijke kanaal vormt. Zo'n half kanaal wordt ook wel connexon genoemd. Om een kanaal te kunnen vormen met een buurcel, wordt een connexon eerst naar de plasmamembraan getransporteerd. Wanneer een connexon in de ruimte tussen twee cellen een connexon van de buurcel tegenkomt, wordt er een chemische verbinding gevormd tussen de connexons, hetgeen resulteert in een functioneel kanaal. Er zijn 21 verschillende connexines in de mens. De meest voorkomende en best onderzochte is connexine43 (Cx43).

De mate van GJC kan op verschillende manieren gereguleerd worden. Bijvoorbeeld door het reguleren van de hoeveelheid connexine eiwit, maar ook door bestaande connexines te modificeren.

Het onderzoek dat beschreven wordt in dit proefschrift richt zich hoofdzakelijk op de regulatie van Cx43 GJC door externe signalen die aangrijpen op zogenaamde G eiwit-gekoppelde receptoren (GPCRs).

Cx43 is het belangrijkste connexine in het hart en communicatie via Cx43 gap junctions is essentieel voor het doorgeven van de actiepotentialen, waardoor het hele hart in hetzelfde ritme klopt. Een hartaanval kan veroorzaakt worden door vaatvernauwende stoffen zoals angiotensine of endothelines, die werken op GPCRs. Activatie van bepaalde GPCRs leidt tot een tijdelijke remming van GJC.

De tijdelijke sluiting van Cx43 gap junctions speelt een belangrijke rol in het beperken van de schade aan het hart tijdens een hartaanval. Het sluiten van de gap junctions beperkt de verspreiding van moleculen die aanzetten tot celdood door het hartweefsel. Het nadeel van het remmen van Cx43 GJC is dat er hartritmestoornis-

sen kunnen ontstaan. Het is dus van groot belang dat een cel de communicatie via Cx43 gap junctions zeer nauwkeurig kan reguleren. De belangrijkste vraag die aan de basis van dit proefschrift ligt is hoe receptorstimulatie leidt tot remming van Cx43-gebaseerde GJC en welke factoren de signaleringsroute vormen tussen GPCR en Cx43.

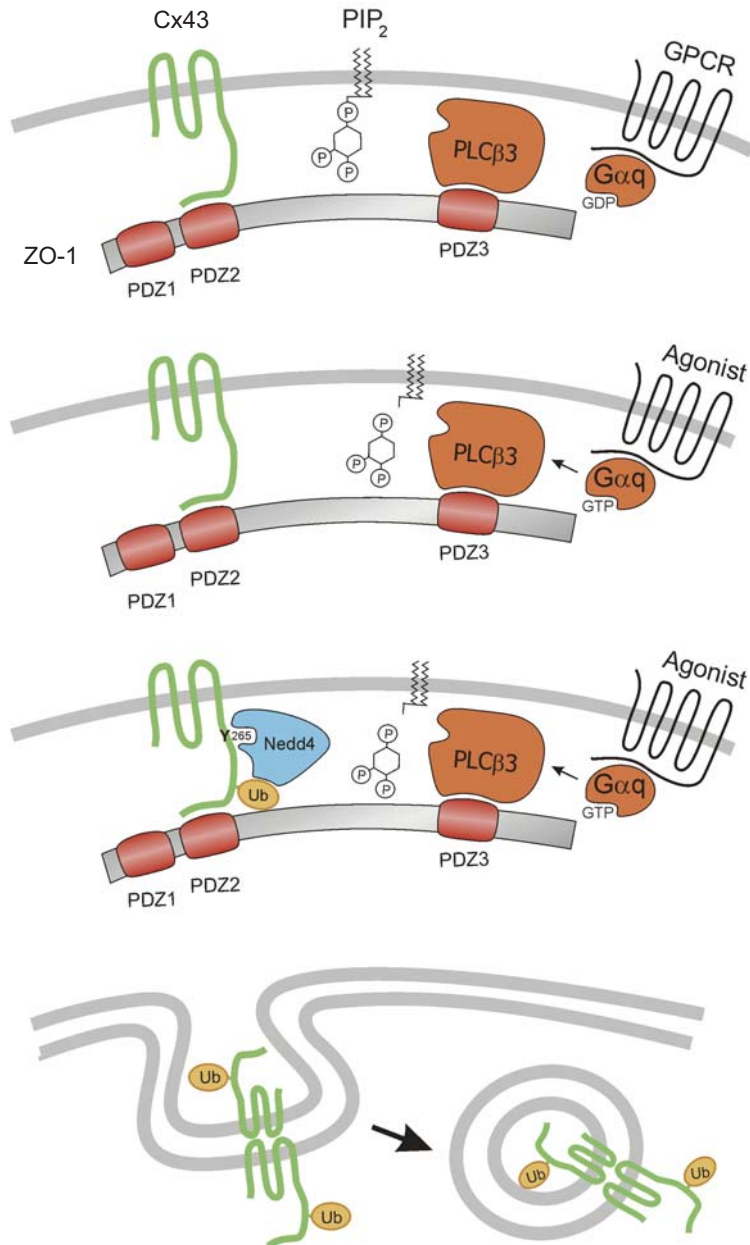
Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie over gap junctions en wat er bekend is van de regulatie van communicatie via Cx43 gap junctions.

In *hoofdstuk 2* tonen we aan dat de verwijdering van fosfolipide PIP₂ van de plasmamembraan noodzakelijk en voldoende is om Cx43 gebaseerde cel-cel communicatie te remmen. Verder hebben we vastgesteld dat de Cx43 bindingspartner ZO-1 essentieel is voor regulatie van GJC. ZO-1 is een eiwit dat voornamelijk bestaat uit eiwit-eiwit interactie domeinen. Naast Cx43 bindt ZO-1 ook aan PLCβ3, een eiwit dat PIP₂ kan afbreken. ZO-1 functioneert dus als een zogenaamde "scaffold" die Cx43 en PLCβ3 bij elkaar brengt, waardoor PIP₂ afbraak lokaal geregeld kan worden (Fig.1).

Nadat een eiwit gevormd is kan het, wanneer de cel daar behoefte aan heeft, gemodificeerd worden door een verandering aan een of meer aminozuren. Een manier om de functie van een eiwit te modifieren is fosforylering van een aminozuur. Een kinase bindt een fosfaat groep aan het aminozuur, waardoor het betreffende eiwit andere eigenschappen krijgt. Hierdoor verandert bijvoorbeeld de vorm van het eiwit, of het verandert de herkenning door andere eiwitten. Op deze manier kan een eiwit anders gaan functioneren.

In *hoofdstuk 3* hebben we het belang van de Cx43 C-terminale staart in de regulatie van GJC onderzocht. Eerdere studies hebben aangetoond dat modificatie van Cx43 op bepaalde aminozuren kan leiden tot het remmen van communicatie. Fosforylering van de Cx43 C-terminale staart op aminozuren S368, Y247 en Y265, en/of Cx43 internalisering via een internalisatiemotief rond residu Y286 worden gezien als belangrijkste regulerende gebeurtenissen. Door deze aminozuren afzonderlijk te muteren kunnen we vaststellen hoe belangrijk ze zijn.

Wij bestudeerden Cx43 mutanten door ze tot expressie te brengen in cellen waarin de expressie van endogeen Cx43 geblokkeerd is. We vinden dat na receptorstimulatie de kanalen die gevormd worden door Cx43 mutant Y265F open zijn, dit in tegenstelling tot endogeen Cx43 en de andere mutanten. Hoewel residu Y265 gefosforyleerd kan worden, vinden we geen toename in de fosforylering na receptor stimulatie. Bovendien wordt de remming van de communicatie niet beïnvloed



Figuur 1. Voorgesteld model: Communicatie via Cx43 kanalen wordt geremd door GPCR agonisten in twee stappen.

ZO-1 bindt PLCβ3 via PDZ domein interacties. Na activatie van Gαq door een receptor agonist wordt PLCβ3 geactiveerd en PIP₂ afgebroken. Dit leidt tot remming van GJC. In de tweede stap bindt Cx43 aan Nedd4 en wordt geubiquitineerd. Cx43 residu Y265 is onmisbaar voor de binding van Nedd4 aan Cx43 en voor Cx43 ubiquitineren. Cx43 ubiquitineren leidt tot de internalisatie van de gap junction en langdurige remming van GJC.

door kinase remmers. Dit samen maakt het onwaarschijnlijk dat fosforylering van Cx43 op Y265 belangrijk is voor het remmen van communicatie.

Behalve dat Y265 gefosforyleerd kan worden, maakt het ook deel uit van een motief dat internalisatie kan uit de membraan bewerkstelligen. Verdere mutaties in dit motief hadden echter geen invloed op de sluiting van de Cx43 kanalen. We concluderen dat aminozuur Y265 essentieel is voor remming van cel-cel communicatie en dat Y265 daarbij een structurele rol speelt.

Een andere belangrijke vorm van eiwitmodificatie is ubiquitineren. In dit geval wordt er een klein eiwit, ubiquitin, aan het eiwit geplakt (geligeerd). De enzymen die hiervoor verantwoordelijk zijn heten ubiquitin ligases. Door ubiquitineren kan de bestemming van een eiwit veranderd worden. Ubiquitineren kan bijvoorbeeld een signaal zijn om membraaneiwwitten te internaliseren en vervolgens af te breken.

In *hoofdstuk 4* hebben we de mogelijke rol van ubiquitineren bij de regulatie van communicatie via Cx43 gap junctions onderzocht.

Wij hebben gevonden dat Cx43 geubiquitineerd wordt door ubiquitin ligase Nedd4 na stimulatie van GPCRs. Het blijkt dat Cx43 residu Y265 van essentieel belang is voor de interactie van Cx43 met Nedd4 en voor ubiquitineren. We vinden dat remming van GJC in twee fasen gebeurt. Zoals beschreven in *hoofdstuk 2*, gaan tijdens de eerste fase de gap junctions dicht als gevolg van de afbraak van PIP_2 . De tweede fase wordt verzorgd door Nedd4 en ubiquitineren van Cx43 wat leidt tot internalisatie van Cx43 vanaf de plasmamembraan en interruptie van cel-cel communicatie.

Bovengenoemde hoofdstukken geven nieuwe inzichten in de remming van cel-cel communicatie door GPCR agonisten. Onze resultaten suggereren een model waarin GJC in twee fasen geremd wordt. Allereerst de sluiting van de Cx43 kanalen door afbraak van PIP_2 . Vervolgens, in de tweede fase, worden de Cx43 eiwwitten geïnternaliseerd als gevolg van Cx43 ubiquitineren. Deze tweede fase verlengt de remming van GJC tot ongeveer 30 minuten. Wij stellen een model voor waarin zowel afbraak van PIP_2 als Cx43 ubiquitineren noodzakelijk zijn voor internalisering en dus remming van GJC (Fig. 1).

Ten slotte, zoals beschreven in *hoofdstuk 5*, onderzochten we de invloed van Cx43 op het vermogen van cellen om in een bepaalde richting te bewegen, ofwel migreren. Cellen zonder Cx43 migreren langzamer dan cellen met Cx43. We vonden echter dat het effect van Cx43 op celmigratie onafhankelijk is van GJC. Cellen zonder Cx43 hebben tevens een lagere expressie van cel-cel contact eiwit N-cadherin. Het is bekend dat N-cadherin expressie belangrijk is voor celmigratie. We tonen

aan dat gebrek aan N-cadherin expressie alleen, zonder Cx43 expressie en GJC te beïnvloeden, voldoende is om de cellen net zo langzaam te laten migreren als de cellen zonder Cx43. Kortom, het effect van Cx43 op celmigratie is waarschijnlijk een indirect effect door regulatie van de N-cadherin expressie. Deze studie ondersteunt de hypothese dat Cx43 meer functies heeft dan alleen die van een kanaalvormend eiwit.

