

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21945> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Elouarrat, Dalila

Title: "Linking lipids to acetylation" novel roles of PI(5)P and PIP4K in SIRT1 regulation and development

Issue Date: 2013-09-24

A d d e n d u m

NEDERLANDSE SAMENVATTING

CURRICULUM VITAE

LIST OF PUBLICATIONS

ACKNOWLEDGMENTS

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het menselijke lichaam bestaat uit ongeveer 10^{14} (100 biljoen) cellen die alle een specifieke taak hebben. Communicatie tussen deze cellen is van essentieel belang om een goed functionerend organisme te vormen. Onderlinge celcommunicatie of moleculen uit het externe milieu genereren specifieke signalen, die bijvoorbeeld kunnen bepalen welke taak of functie een cel moet uitoefenen. De deling van cellen is een proces waarbij celcommunicatie een grote rol speelt. Als deze communicatie verstoord raakt en cellen niet meer reageren op de juiste signalen kunnen cellen ongecontroleerd gaan groeien wat kan leiden tot kanker. Externe signaalmoleculen, zoals hormonen, groeifactoren en neurotransmitters oefenen hun werking uit via de plasmamembraan. Deze membraan is opgebouwd uit lipiden (vetachtige moleculen) en eiwitten, en vormt een barrière die het celinwendige scheidt van het externe milieu. In de plasmamembraan bevinden zich specifieke receptoren (ontvangers) voor extracellulaire signalen 'first messengers'. Via een opeenvolging van biochemische reacties en 'second messengers', geven deze receptoren signalen door die uitmonden in een respons, bijvoorbeeld het aflezen van bepaalde genen in de celkern of verandering van metabole processen.

Lipiden zijn niet alleen belangrijk voor de opbouw van celmembranen, maar kunnen zelf ook als signaalmoleculen fungeren in de cel. Een belangrijk groep van signaallipiden zijn de zogenaamde fosfoinositiden. Deze bestaan uit een inositol kopgroep die is gekoppeld (via een fosfaatdiester binding) aan diacylglycerol. Een gangbare manier van signaaloverdracht is fosforylering, d.w.z. het modificeren van signaalmoleculen met fosfaatgroepen door specifieke enzymen genaamd kinases. Fosfo-inositiden kunnen worden gefosforyleerd op de 3, 4 en 5 positie van de inositol kopgroep door "PIP kinases".

In dit proefschrift is onderzoek gedaan naar een PIP kinase, genaamd PIP4K, welke een fosfaatgroep koppelt aan fosfatidylinositol 5-fosfaat (PI(5)P) hetgeen leidt tot de vorming van fosfatidylinositol-bisfosfaat (PIP2). Echter, de vermoedelijke functie van PIP4K enzymen (α , β , γ isoformen) is niet de productie van PIP2, maar de verlaging van de hoeveelheid PI(5)P (die toeneemt na cellulaire stress), om zodoende de signaalfunctie van PI5P te remmen (zoals beschreven in hoofdstuk 1). Vroeger werd gedacht dat fosfo-inositiden alleen belangrijk waren voor signaalprocessen aan de plasmamembraan. Tegenwoordig weten we dat fosfo-inositiden ook een belangrijke signaleringsrol spelen in de celkern. PI(5)P is een signaalmolecuul dat diverse eiwitten in het cytosol kan activeren, (zoals de Akt eiwitkinase), maar ook functies in de celkern kan uitoefenen. Het is nu duidelijk dat PI(5)P herkend wordt door eiwitten die een zogenaamd "plant homeobox domain" (PHD) motief bevatten. Dergelijke PHD-bevattende eiwitten worden vooral gevonden in de celkern, zoals bijvoorbeeld het ING2 eiwit ("Inhibitor of Growth protein 2") Dit eiwit bindt aan PI(5)P en activeert op deze wijze de tumorsuppressor p53, en remt daardoor de celgroei en stimuleert celdood.

Naast fosforylering, is acetylering een andere veel voorkomende eiwitmodificatie. Acetylering is de koppeling van een acetyl groep aan lysine residuen in eiwitten, zoals histonen in de celkern. Dit is een omkeerbare reactie, waarbij lysine residuen worden geacetyleerd door "histone acetyltransferases" (HATs) en gedeacetyleerd door "histone deacetylases" (HDACs). Histon deacetylering is vaak geassocieerd met chromatine condensatie en repressie (remming) van transcriptie. De HDACs zijn onderverdeeld in vier verschillende klassen, waaronder

klasse III, genaamd sirtuïns. Het Sir2 eiwit, de afkorting van Silent Information Regulator 2, is het bekendste voorbeeld van een sirtuïen. In bakkersgist cellen is aangetoond dat (verhoogde werking van) Sir2 de levensduur verlengt. Sir2 komt ook voor in vele andere organismen in verschillende varianten. In zoogdieren bestaan zeven sirtuïns, SIRT1-SIRT7, die alle een geconserveerd NAD⁺ (cofactor) – bindings domein en een katalytisch domein bevatten. Ze verschillen vooral in hun N- en C-termini. SIRT1 is de evolutionair meest geconserveerde sirtuïen en speelt een cruciale rol in metabolisme, kanker en veroudering.

Door de-acetylering van verschillende substraten (zoals histonen, metabolisme enzymen en transcriptiefactoren), is SIRT1 nauw betrokken bij allerlei fysiologische functies. Het bekendste substraat van SIRT1 is de eerder genoemde tumorsuppressor p53. p53 reguleert genen die betrokken zijn bij remming van celgroei en geprogrammeerde celdood. p53 is vaak onderhevig aan gevaarlijke mutaties: in meer dan 50% van alle menselijke tumoren is een niet-werkend p53 gen aanwezig. Dit defecte p53 eiwit is niet meer in staat om de celdeling te remmen. De mate van acetylering is essentieel voor de activatie van p53. Hoewel veel onderzoek wordt verricht aan SIRT1 substraten en hun functies, blijft het onduidelijk hoe SIRT1 activiteit gereguleerd wordt. In dit proefschrift beschrijven we een nieuwe rol voor PI(5)P en PIP4K in de regulering van SIRT1 activiteit en in de embryonale ontwikkeling van de zebrafish.

Hoofdstuk 1 geeft een beknopt overzicht van de huidige status van het onderzoek naar de onderwerpen in dit proefschrift. Hierin staat een overzicht van de moleculen en enzymen die betrokken zijn bij het reguleren van PI(5)P, met nadruk op de rol van de drie PIP4K isoformen en hun biochemische functies. Ook wordt beschreven welke mechanismen betrokken zijn bij het reguleren van SIRT1 activiteit door stimuli zoals de cofactor NAD⁺, en door interactie met andere eiwitten.

Hoofdstuk 2 definieert PI(5)P als nieuwe regulator van SIRT1 enzymatische activiteit. Hier beschrijven we een directe interactie tussen SIRT1 en fosfo-inositiden, met name PI(5)P, via een fosfoinositiden bindend eiwit motief (KRRKKR) dat niet eerder geïdentificeerd is. Door te binden aan PI(5)P, wordt de deacetylerings activiteit van SIRT1 gereguleerd, zowel *in vitro* als *in vivo*. Bovendien hebben we gevonden dat p53 deacetylering door SIRT1 kan worden beïnvloed door de PI(5)P concentraties te manipuleren. Dit resulteert in meer of minder p53-afhankelijke transcriptie en stimulering van celdood. Onze resultaten tonen aan dat PI(5)P als signaalmolecuul kan fungeren, met name wanneer de cel “genotoxische stress” ondervindt. Hoe PI(5)P precies de activiteit van SIRT1 reguleert dient nader te worden uitgezocht. Maar de identificatie van een nieuw PI-bindende sequentie in SIRT1 dat de katalytische activiteit van SIRT1 kan beïnvloeden opent nieuwe wegen naar de ontwikkeling van farmacologische middelen gericht tegen SIRT1.

Er zijn literatuuraanwijzingen dat fosfolipiden behalve deacetylatis ook andere epigenetische processen kunnen beïnvloeden. Deze staan beschreven in hoofdstuk 3, met daarin de nieuwste inzichten in de rol van fosfolipiden in processen in de celkern (chromatine en gen transcriptie).

Hoofdstuk 4 is een vervolg op de ontdekkingen beschreven in hoofdstuk 2. Daarin observeerden we o.a. dat PIP4K expressie de activiteit van SIRT1 kon moduleren. Dit leidde tot de vraag of deze kinases zelf (en niet alleen het substraat PI(5)P) een rol in SIRT1 functie kunnen

vervullen. Hoofdstuk 4 verkent niet alleen de posttranslationale modificaties op PIP4K β maar beschrijft ook de interactie met SIRT1. Een interactie van SIRT1 met PIP4K β suggereert dat PIP4K β kan worden gemodificeerd door (de)acetylering. Door middel van massa spectroscopie identificeerden wij acht verschillende lysine residuen, waarvan lysine-239 gevoelig bleek voor de SIRT1 remmer nicotinamide. Ook zagen we dat lysine-239 wordt geacetyleerd door wild-type SIRT1 maar niet door de inactieve SIRT1(K239R) mutant. Gezien de resultaten beschreven in hoofdstuk 2, suggereren we een mechanisme waarin de PI(5)P afhankelijke stimulatie van SIRT1 activiteit kan worden geregeld door PIP4K β (de)acetylentie. In hoeverre PIP4K β (de)acetylentie de lokale concentraties van PI(5)P kan veranderen, en hoe acetylentie PIP4K β activiteit beïnvloedt dient nader onderzocht te worden.

De fysiologische betekenis van de drie PIP4K isovormen is nog onduidelijk. Om dit te onderzoeken in de embryonale ontwikkeling, hebben we gebruik gemaakt van de een modelorganisme, namelijk de zebravis (*Danio Rerio*). De zebravis wordt veel gebruikt om beter inzicht te krijgen in de complexiteit van de embryonale ontwikkeling. De zebravis biedt vele voordelen : ze leggen meer dan 300 eieren, en de embryonale ontwikkeling verloopt zeer snel. Bovendien vindt de embryonale ontwikkeling plaats buiten de moeder en zijn de embryo's doorzichtig, zodat het ontwikkelingsproces goed kan worden gevolgd.

In Hoofdstuk 5 identificeren we de zebravis ortholoog (zPIP4K α) van humaan PIP4K α en analyseren we de rol in de embryonale ontwikkeling. Zebravis embryo's waarin de expressie van zPIP4K α is onderdrukt door specifieke morfolino's (MO's) vertonen afwijkingen in de ontwikkeling van het oog, het hart en het middenstuk van romp tot staart. De katalytische activiteit van zPIP4K α is geconserveerd in zebravis en zoogdieren. De morfologische afwijkingen konden grotendeels worden hersteld door re-expressie van actief PIP4K α . Onze resultaten zijn de eerste beschrijving dat PIP4K α expressie en activiteit invloed heeft op ontwikkeling van vertebraten.

De resultaten beschreven in dit proefschrift vergroten ons inzicht in het werkingsmechanisme van PIP4Ks en het signaalmolecuul PI(5)P. Dergelijke studies kunnen helpen de (patho-) fysiologische functies te ontrafelen van PIP4K's in het algemeen, en van PI(5)P in het bijzonder. Hopelijk kan de nieuwe kennis in de toekomst vertaald worden in therapeutische toepassingen.

CURRICULUM VITAE

Dalila Elouarrat was born in Amsterdam, the Netherlands, on the 19th of January 1981. She attended Fons Vitae lyceum high school in Amsterdam from 1993 to 1998. In 1998 she studied Biochemistry at the Institute of Life Science & Chemistry, Hogeschool van Utrecht and performed a research internship on the department of Molecular biology in the group of Prof. Rene Medema at the Netherlands Cancer Institute. She worked under the supervision of dr Suzanne Lens on role of surviving in cytokinesis after which she obtained her bachelor's degree in 2002. In the same year, she started with the Master program in Oncology at the Free University in Amsterdam. From 2003 to 2004 she joined the group of prof. Ronald Plasterk at the Hubrecht institute in Utrecht to work on her MSc internship project studying mismatch repair genes in *C.elegans* under the supervision of dr Marcel Tijsterman. The second Master internship was performed in the Wellcome trust/Cancer research UK Gurdon Institute in Cambridge, United Kingdom, in the group of Prof Daniel St Johnston. During her project, where she developed a method to perform targeted RNAi in the germline of *Drosophila melanogaster*, she joined her second Master program Developmental Biology at the University of Cambridge which she obtained in 2005. In January 2006 she obtained her Master's degree in Science, Oncology from the Free University. From 2006 to 2007, she worked as a PhD student at the Netherlands Cancer Institute in the group of dr Nullin Divecha, investigating the role of PI(5)P and PIP4K in SIRT1 function. In august 2007 she joined the group of prof. Wouter Moolenaar at the Division of Cell Biology and the results of this research are described in this thesis.

In October 2013, Dalila will continue her scientific career as a postdoctoral fellow in the group of Prof Jerrold Olefsky in the Department of Diabetes, Metabolism & Endocrinology, at the University of California in San Diego, working on the role of lipids in the mechanisms of insulin resistance and type 2 diabetes.

LIST OF PUBLICATIONS

Elouarrat D and Moolenaar WH

Nuclear phospholipids as epigenetic regulators

Submitted 2013

Elouarrat D, van der Velden YU, Jones DR, Moolenaar WH, Divecha N and Haramis AP

Role of phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase alpha in zebrafish development

Int J Biochem Cell Biol. 2013; 26;45(7):1293-1301

Elouarrat D, Bultsma Y, D'Santos C, Moolenaar WH and Divecha N

Phosphatidylinositol-5-phosphate 4 kinase beta is a novel interacting partner for SIRT1

Manuscript in preparation

Elouarrat D*, Motta MC*, Singh SK, Bultsma Y, Jones DR, Moolenaar WH and Divecha N

The lipid second messenger phosphatidylinositol-5-phosphate activates SIRT1 deacetylase activity.

Submitted 2012

(DE and MCM contributed equally to this work)

Jones DR, Bultsma Y, Keune WJ, Halstead JR, **Elouarrat D**, Mohammed S, Heck AJ, D'Santos CS, Divecha N.

Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: an *in vivo* role for PIP4Kbeta.

Molecular Cell. 2006 Sep 1;23(5):685-95.

ACKNOWLEDGMENTS

I wish to express my gratitude to all who have contributed to this thesis

Mijn dank gaat uit naar allen die hebben bijgedragen aan de totstandkoming van dit proefschrift

